

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 梅木泰親(和歌山県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第434号
学位授与年月日 平成27年3月13日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程)歯学専攻
学位論文題目 Leptin Promotes Wound Healing in the Oral Mucosa
(レプチンは口腔粘膜において創傷治癒を促進する)
Plos One, 第9巻, 第7号 e101984.1頁~e101984.9頁掲載 平成26年7月17日 発行
論文審査委員 主査教授 中村芳樹
副査教授 斎藤一郎 副査教授 里村一人

内容の要旨

【緒言】

口腔は消化管、気道の開口部であり、その表層は唾液に湿潤された口腔粘膜で覆われ、外部環境に直接的に曝される器官である。口腔粘膜は、口腔上皮と呼ばれる重層扁平上皮と、その下の固有層と呼ばれる結合組織層の二つより構成され、口腔の表面を覆い、保護や感覚、分泌などの機能をもつ。その中でも、深部の組織や器官を口腔内環境から分離し、保護することは最も代表的な口腔粘膜の機能である。口腔内には多くの常在微生物が存在しており、それらが組織内に侵入すれば感染源となり得る。また、機械的、物理的、化学的刺激などの様々なストレスにも曝され、口腔粘膜、特に口腔上皮はこれらの脅威に対する大きな防壁として機能している。このことから、口腔粘膜を正常に維持することは、口腔だけでなく全身の健康状態を維持するために重要である。

レプチンは146個のアミノ酸からなる16kDaの抗肥満ホルモンである。レプチンは主に白色脂肪細胞によって産生されるが、最近の研究でレプチンが胎盤や胃、骨格筋、脳、下垂体などでも産生されることが確認されている。一方、レプチンは脂質代謝、造血、卵巣機能、骨形成、血管新生、創傷治癒などにおいて様々な生理作用を示すことが知られている。また、レプチン受容体(Ob-R)は視床下部、脂肪組織、骨格筋細胞、肝細胞など様々な組織で発現していることも知られている。レプチンとOb-Rの広い分布とその多機能性は、レプチンが単に全身性のホルモンとして機能するにとどまらず、局所因子としても多様な生理的役割を果たす可能性を示唆しているものであると考えられる。

これまでの研究でヒト唾液中にもレプチンが存在することが報告された。しかし、口腔内でのレプチンの生理的役割は未だ不明である。本研究では、レプチンの口腔内における生理的役割、特に創傷治癒に対する影響に着目し、検討を行った。

【材料および方法】

ヒトおよびウサギの正常口腔粘膜におけるレプチン受容体(Ob-R)の発現について免疫組織化学的に検討した。また、日本家兎(雄性、体重2.5~3.0kg)の下顎歯肉に、50%酢酸を含浸させた直径5mmの濾紙を2分間貼付し、口腔粘膜化学熱傷モデルを作製した。翌日から、I型コラーゲンであるCellmatrix[®]に100ng/mlレプチンまたはPBS 10 μ lを混和しゲル化させ、創部へ毎日貼付した。貼付開始後6日目および13日目に潰瘍の大きさを計測、組織学的検討を行った。貼付期間中のウサギの体重、AST、ALT、血糖値の変動についても併せて検討を行った。

また、レプチンの口腔粘膜上皮細胞に対する影響について検討することを目的に、不死化したヒト口腔粘膜上皮細胞株(RT7)におけるOb-Rの発現をRT-PCR法により検討するとともに、この細胞の増殖に対するレプチンの影響をクリスタ

ルバイオレット法にて、分化に対する影響を上皮細胞関連遺伝子である Keratin 4, Keratin 10, Transglutaminase I の発現を指標として RT-PCR 法にて検討した。さらに、RT7 細胞の細胞遊走に対するレプチンの影響について wound healing assay (スクラッチ法) を用いて併せて検討した。また RT7 細胞の EGF および KGF 産生に対するレプチンの影響について ELISA 法を用いて検討した。

【結 果】

ヒトおよびウサギの口腔粘膜における Ob-R の局在を確認するために免疫組織化学的検討を行ったところ、上皮の有棘細胞層、顆粒細胞層および上皮下結合組織中に存在する血管内皮細胞においてその発現が認められた。ウサギ口腔粘膜化学熱傷モデルにおける潰瘍の大きさの変化を測定した結果、潰瘍は対照群と比べてレプチン投与群で有意に縮小し、治癒に要した期間もレプチン投与群において有意に短縮した。また、潰瘍直下の結合組織の血管数を計測した結果、対照群と比べレプチン投与群で有意に血管が多く認められた。この期間中の体重、AST、ALT および血糖値に異常は認められず、レプチン投与による副作用は認められなかった。In vitro においては、RT-PCR 法にて、RT7 細胞における Ob-R の mRNA の発現が認められた。また、RT7 細胞の増殖に対するレプチンの影響は認められなかった。一方、RT7 細胞の分化に対しては、レプチンは抑制的に作用している可能性が示唆された。さらに、RT7 細胞の遊走に対するレプチンの影響を検討した結果、レプチン投与群で有意に細胞遊走が促進された。一方、RT7 細胞の EGF および KGF 産生に対するレプチンの影響について検討したところ、その産生への影響は明らかでなかった。

【結 論】

上記の結果より、口腔粘膜におけるレプチンの標的細胞は上皮細胞および血管内皮細胞であること、局所投与されたレプチンが副作用の出現なく口腔粘膜の創傷治癒を促進すること、レプチンが潰瘍直下の結合組織における血管新生を促進すること、さらに、レプチンがヒト口腔粘膜上皮細胞の遊走を促進することが明らかとなった。

これらの結果は、唾液中のレプチンの生理的役割を解明する一助となるばかりでなく、レプチンが口腔粘膜における難治性疾患、例えば扁平苔癬や頭頸部癌に対する放射線療法および化学療法に伴う口腔粘膜傷害などの治療や予防に有用であり、これまででない新しい創傷治癒促進薬として使用できる可能性を強く示唆するものであると考えられた。

審査の結果の要旨

口腔粘膜は、口腔上皮と呼ばれる重層扁平上皮と、その下の固有層と呼ばれる結合組織層の二つより構成され、口腔の表面を覆い、保護や感覚、分泌などの機能をもつ。また機械的、物理的、化学的刺激などの様々なストレスにも曝され、口腔粘膜、特に口腔上皮はこれらの脅威に対する大きな防御壁として機能している。本研究はこのような観点から、生体内で多様な機能を有するレプチン、特に唾液中に含まれるレプチンの口腔内における機能について、創傷治癒の観点から検討した。研究は *in vivo* から *in vitro* にわたり、形態学的また分子生物学的手法を用いて行われた。

【結 果】

1. ヒトおよびウサギの口腔粘膜における Ob-R の局在についての免疫組織化学的所見では、上皮の顆粒細胞層、有棘細胞層および上皮下結合組織中に存在する血管内皮細胞においてその発現が認められた。
2. ウサギ口腔粘膜化学熱傷モデルにおける潰瘍の大きさの測定結果では、潰瘍は対照群と比べてレプチン投与群で有意に縮小し、治癒に要した期間も有意に短縮した。また、潰瘍直下の結合組織の血管数も対照群と比べレプチン投与群で有意に血管が多く認められた。
3. RT7 細胞では Ob-R の mRNA の発現が認められたが、RT7 細胞の増殖に対するレプチンの影響は認められなかった。
4. RT7 細胞の分化に対しては、レプチンは抑制的に作用していた。さらに、RT7 細胞の遊走に対するレプチンの影響では有意に細胞遊走が促進された。
5. RT7 細胞の EGF および KGF 産生に対するレプチンの影響は明らかでなかった。

以上より、口腔粘膜におけるレプチンの標的細胞は上皮細胞および血管内皮細胞であり、また局所投与されたレプチンが副作用の出現なく口腔粘膜の創傷治癒を促進することが明らかとなった。

これらの結果はレプチンが口腔粘膜における難治性疾患、例えば扁平苔癬や頭頸部癌に対する放射線療法および化学療法に伴う口腔粘膜傷害などの治療や予防に有用であり、これまででない新しい創傷治癒促進薬として使用できる可能性を強く示唆するものであると考えられた。

よって、本研究は博士(歯学)の学位を請求するにあたり、十分な価値を有するものと判定した。