

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) 田所 晋(三重県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第445号
学位授与年月日 平成27年3月31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 skin
(レプチンによる皮膚の創傷治癒促進)
PLOS ONE 第10巻 3号 e0121242.1頁~e0121242.16頁掲載 平成27年3月23日発行
論文審査委員 主査 教授 五味 一博
副査 教授 濱田 良樹 副査 教授 里村 一人

内容の要旨

レプチンは主として脂肪細胞で産生される抗肥満ホルモンとして知られ、その他にも骨形成、血管新生、血圧上昇、血糖値低下など多彩な生理作用が報告されている。近年、創傷における治癒促進因子としても報告されており、全身投与や局所投与による創傷治癒期間の短縮が確認されている。しかし、レプチンを創傷治癒促進剤として臨床応用を目指すにあたり、全身投与や複数回の局所投与では全身への副作用が懸念される。そこでこの論文ではレプチンの低用量かつ単回投与による創傷治癒促進が可能か否かについて検討し、さらに皮膚創傷治癒におけるレプチンのメカニズムを明らかにすることで、創傷治癒促進薬としてレプチンが臨床応用できる可能性につき検討した。

まず、*in vivo*においてマウスおよびヒト皮膚組織におけるレプチン受容体(Ob-R)の発現を免疫組織化学的に検討したところ、有棘細胞、顆粒細胞にOb-Rの発現が認められた。次に化学熱傷モデルマウスを作製し、100 ng/mlのレプチン10 μ lを薬剤徐放能を有する生体吸収性ハイドロゲル(MedGEL[®])に含浸させ潰瘍部に局所に単回貼付したところ、4日目では両群間に有意差を認めないものの、8日目ではレプチン投与群において創の大きさが有意に縮小していた。そこで、レプチンの血管新生促進作用に注目し創傷部直下組織における血管新生について検討したところ、血管内皮細胞マーカーであるCD31陽性細胞がレプチン投与群で有意に増加していることを見出した。また、本実験によるレプチン投与では投与8日後までに体重、血糖値、AST、ALTに変化を認めず、明らかな副作用はみられなかった。

また、*in vitro*において皮膚創傷治癒におけるレプチンのメカニズムを明らかにすることを目的にまずヒト皮膚角化細胞におけるレプチン受容体の存在をRT-PCR法とWestern blot法を用いて確認した。さらに、レプチンのヒト皮膚角化細胞に対する増殖、分化、細胞遊走促進への影響について、クリスタルバイオレット法、Real-time RT-PCR法、スクラッチ法にて検討した。その結果、レプチン添加により増殖能は4日目、14日目に有意に上昇し、分化能に関しては3日目、7日目にCytokeratin13、Cytokeratin14、Transglutaminase IのRNA発現量の増加を認め、スクラッチ法ではレプチン添加後18時間以降で細胞遊走が有意に促進された。

これらのことから、本論文では薬剤徐放能を有する生体吸収性ハイドロゲルを利用する事により低用量かつ単回でのレプチン投与により創傷治癒が促進されることを見出し、その創傷治癒促進効果は皮膚角化細胞の遊走促進と創傷部の血管新生促進による複合的なものと考えられた。

本研究により、レプチンを創傷治癒促進薬として利用できる可能性が強く示唆された。

審査の結果の要旨

レプチンは主に白色脂肪細胞で産生される抗肥満ホルモンであるが、創傷治癒促進等、様々な生理作用が報告されている。現在、全身投与や局所投与により創傷治癒期間の短縮が確認されているが全身投与や複数回の局所投与では全身への副作用が懸念される。本研究では *in vivo* におけるレプチンの低用量、単回投与による皮膚創傷治癒促進作用の評価と、*in vitro* におけるレプチンのヒト皮膚角化細胞に対する増殖、分化、細胞遊走能への影響を、クリスタルバイオレット法、RT-PCR 法、スクラッチ法にて検討している。

その結果、*in vivo* では化学熱傷モデルマウスに 100 ng/ml のレプチン 10 μ l を薬剤徐放能を有する生体吸収性ハイドロゲル (MedGEL[®]) に含浸させ潰瘍部局所に単回貼付したところ、8 日目以降にレプチン群において PBS を含浸させたコントロール群よりも創の面積が有意に縮小した。また、創傷部直下の組織において血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性細胞がレプチン群で有意に増加していることが示され、レプチンが血管新生を促進することで創傷治癒促進に作用することが考えられた。*in vitro* ではヒト皮膚角化細胞にレプチン受容体の存在が RT-PCR 法と Western blot 法により確認された。また、培養ヒト皮膚角化細胞へのレプチン添加により増殖能の亢進と、角化細胞の分化度を示す Cytokeratin13, Cytokeratin14, Transglutaminase I の RNA 発現が有意に増加した。さらに、レプチン添加により細胞遊走が有意に促進され、上皮化の促進が生じることが示された。

以上、本研究における結果は、レプチンの皮膚創傷治癒に与える影響を *in vitro*, *in vivo* から検討したものである。レプチンを生体吸収性ハイドロゲルと併用することで、低用量でかつ単回応用において創傷治癒が促進されることを示しており、今後の臨床応用への道を拓く上で有用な研究であると考えられる。

よって、本論文は博士 (歯学) の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。