

令和元年6月19日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20623

研究課題名(和文) ディフェンシンを介したレプチンによる口腔粘膜治療薬としての可能性

研究課題名(英文) Possibility of leptin as an oral mucosal treatment via beta-defensin

研究代表者

梅木 泰親 (Umeki, Hirochika)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10552408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：レプチンの口腔粘膜創傷治癒促進効果について、上皮細胞に対するhBD-2が関与している可能性につき明らかにすることを目的に、日本家兔の下顎歯肉に化学熱傷を作成した。翌日より同部にレプチンもしくはPBSを混和しゲル化させたものを創部に毎日貼付し、組織採取後hBD-2のタンパク質発現を免疫組織化学的手法にて検討した。

また、上皮細胞に炎症を惹起させた際に、レプチンを作用させることで、上皮細胞にどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的に、in vitroにおいて口腔粘膜上皮細胞を培養し、ニコチンを作用させ、レプチン添加群、非添加群にわけて、口腔粘膜上皮細胞の増殖について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内の環境に起因する口腔粘膜疾患(白板症や扁平苔癬など)や難治性の歯周病などは今後ますます増加するであろう疾患であるが、その積極的な治療法は未だ確立されておらず、早期の治療法の開発が望まれる。また、わが国の喫煙者は約1,500万人と推定され、これらの喫煙者の口腔内における難治性疾患の治療法の確立も急務であると言える。本研究は口腔粘膜創傷治癒促進作用のあるレプチンと、炎症状態にある口腔環境中に発現しているhBD-2や炎症性サイトカインとの関連に着目し、新たな治療法、あるいは補助療法としてレプチンの有用性が確認できれば、今後の新たな治療法をもたらす、国民に大いに貢献しうる研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chemical wounds were created in the mandibular gingiva of Japanese white rabbits in order to clarify the possible role of hBD-2 on epithelial cells for leptin's oral wound healing promotion effect. Wound formation was verified after 1 day, and leptin or phosphate-buffered saline (PBS) was mixed with type I collagen and topically applied to the wound daily. After tissue collection, hBD-2 protein expression was examined by immunohistochemistry. In addition, when inflammation is caused in epithelial cells, to clarify what effect leptin has on epithelial cells, the oral mucosal epithelial cells were cultured in vitro treated with nicotine, and divided into leptin-added and non-added leptin groups, and the proliferation of the epithelial cells was examined.

研究分野：歯学

キーワード：レプチン ディフェンシン 口腔粘膜 治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜は、人が生きていく上で最初に様々な外来異物に曝される器官であり、宿主の恒常性を維持する上で非常に重大な役割を担っている。しかし、この口腔粘膜が一旦破綻すると、宿主は大きな危険に曝露されることになる。研究代表者はそういう観点から、口腔粘膜創傷を早期に治療し、物理的バリアを確保しようという目的の下、抗肥満ホルモンとして知られるレプチンを口腔粘膜の創傷に貼付することで副作用の発現無く早期に治癒させようことを見出してきた。一方、レプチンを炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ とともに上皮細胞に作用させると、天然の抗菌ペプチドである $\beta$ ディフェンシン 2 (hBD-2) の発現が上昇するという報告がある。また、喫煙者では口腔粘膜上皮細胞からの hBD-2 の産生・分泌が常に上昇しているとの報告があり、恒常的に外来毒素に曝され、炎症性サイトカインが放出され、本来果たすべき免疫応答がなされていないことが、喫煙者の口腔内環境の悪化につながっているとも考えられる。

### 2. 研究の目的

口腔粘膜は常に外来異物に曝される厳しい環境下で、生体を防護する重要な器官である。感染や機械的刺激、化学物質など様々な外来異物に対抗するが、その防御機構に異常や破綻が生じると生体は恒常性が維持できなくなる。そこで全身疾患や喫煙などのバリア機構が減弱した状況を軽減し、口腔粘膜を正常に働かせることは予防医学につながる。本研究は、生体の持つ抗菌ペプチドであるディフェンシンに着目し、口腔粘膜創傷治癒促進作用のあるレプチンを直接作用させるとともに、これら生体内の抗菌活性をも上昇させ、喫煙などの口腔環境の悪化した状況下での感染治療、創傷治癒促進にレプチンを応用できる可能性につき検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) レプチンの口腔粘膜創傷治癒促進効果におけるメカニズムの検討

レプチンの口腔粘膜創傷治癒促進効果について、上皮細胞に対する hBD-2 が関与している可能性につき明らかにすることを目的に以下の検討を行った。日本家兎の下顎歯肉に 50%酢酸を含浸させた濾紙を 2 分間貼付し、化学熱傷を作成した。翌日より同部にタイプ I コラーゲンである Cellmatrix にレプチン (レプチン群) もしくは PBS (コントロール群) を混和しゲル化させたものを創部に毎日貼付した。6 日目にレプチン群と、コントロール群の歯肉を採取し、固定後に組織切片とした。hBD-2 のタンパク質発現を免疫組織化学的手法にて検討した。

#### (2) 口腔粘膜上皮細胞における炎症惹起下でのレプチンの影響の検討

上皮細胞に炎症を惹起させた際に、レプチンを作用させることで、上皮細胞にどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的に以下の検討を行った。in vitro において口腔粘膜上皮細胞を培養し、ニコチンを作用させ、炎症状態を惹起する。そこでレプチンを添加した群 (レプチン添加群) と添加しない群 (レプチン非添加群) にわけて、口腔粘膜上皮細胞の増殖についてクリスタルバイオレット法を用いて検討した。

### 4. 研究成果

(1) レプチンの口腔粘膜創傷治癒促進効果について、上皮細胞に対する hBD-2 が関与している可能性につき明らかにすることを目的に、日本家兎の下顎歯肉に化学熱傷を作成した (図 1)。翌日より同部にタイプ I コラーゲンにレプチンもしくは PBS を混和し、ゲル化させたものを創部に毎日貼付した。6 日目にレプチン群と、コントロール群の歯肉を採取し、固定後に組織切片とし、hBD-2 のタンパク質発現を免疫組織化学的手法にて検討したところ、コントロール群に比べ、レプチン群の粘膜上皮の有棘細胞層と顆粒細胞層に hBD-2 の発現が増加している傾向がみられたものの、明らかな有意差は認められなかった (図 2)。そのため、NF- $\kappa$ B および STAT1、STAT3 のリン酸化について検討することで、hBD-2 の発現の変化が IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカイン経路であるのか、レプチン経路であるのかについても明らかにする予定であったが、明らか

図 1

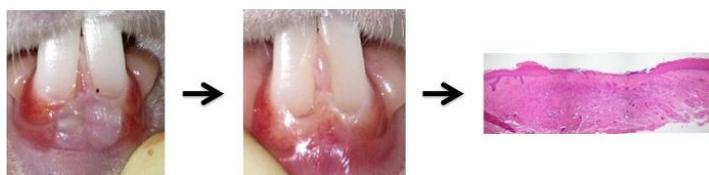
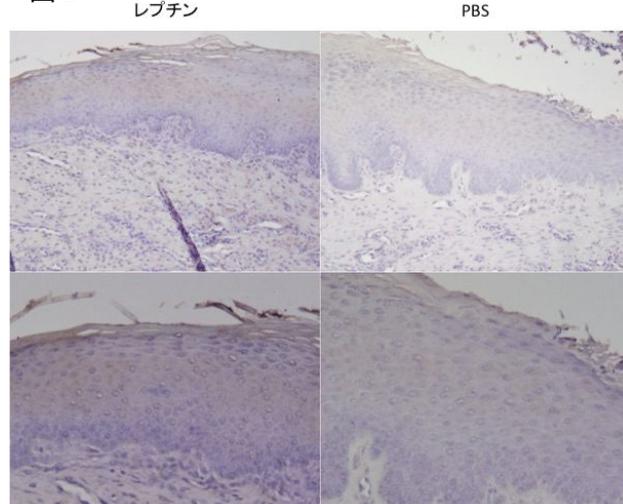


図 2



な有意差がなかったため、検討することができなかった。

(2) 上皮細胞に炎症を惹起させた際に、レプチンを作用させることで上皮細胞にどのような影響を及ぼすか明らかにすることを目的に、まず適正なニコチン濃度を決定するために *in vitro* において口腔粘膜上皮細胞を培養し、そこに各種濃度のニコチンを添加させ、細胞増殖についてクリスタルバイオレット法にて検討した。その結果、ニコチン濃度は細胞がニコチンの影響を受けているものの、増殖が認められる  $5 \times 10^{-4}$  とすることとした(図3)。このニコチン濃度を上皮細胞に作用させた上で炎症状態を惹起し、そこでレプチンを添加する群(レプチン添加群)と添加しない群(レプチン非添加群)にわけて、口腔粘膜上皮細胞増殖についてクリスタルバイオレット法にて検討したところ、レプチン添加群と非添加群で明らかな有意差は認められなかった(図4)。そのため、レプチン添加による上皮細胞からのhBD-2の発現や、STAT1、STAT3のリン酸化の変化についても検討する予定であったが、レプチン添加群と非添加群で明らかな有意差がなかったため、検討することができなかった。

図3

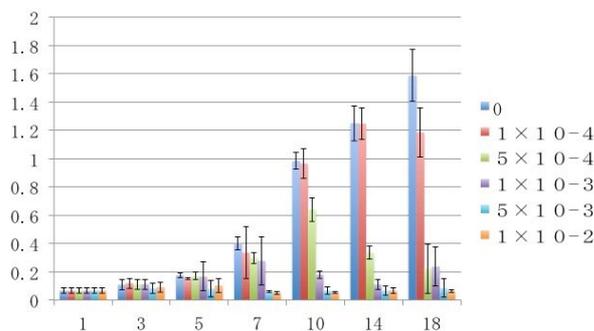
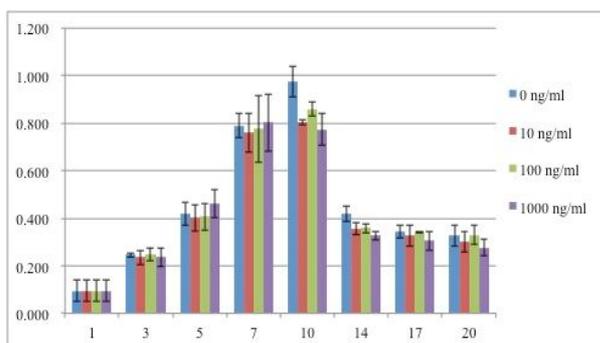


図4



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。