

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05446

研究課題名(和文) 緑茶カテキンEGCGを用いた臓器線維症治療のための基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for organ fibrosis treatment using green tea catechin EGCG

研究代表者

吉田 浩二 (Yoshida, Koji)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：60230736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- β 誘導性上皮間葉転換 (EMT) に対するカテキン類の影響を検討したところ、TGF- β 誘導性EMTはエピガロカテキンガレート(EGCG)により抑制される傾向にあった。また、角膜潰瘍の病態において、EGCGはコラーゲン分解を阻害した。このコラーゲン分解の阻害は、角膜線維芽細胞におけるIL-1 誘導性uPA (ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター) の産生を抑制することにより生じるものであると推察された。高濃度のEGCGは細胞に障害を及ぼすおそれがあるものの、臓器線維化の予防や角膜潰瘍の治療に応用できる可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

さまざまな刺激により線維芽細胞が活性化されて筋線維芽細胞となり、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックス成分を活発に合成・分泌するようになり、組織の線維化が進展し臓器レベルでの線維症が発症する。肝硬変や肺線維症等に代表される臓器線維症に苦しむ患者の数は多い。しかし、線維症に対する有効な治療法は未だ存在しない。ポリフェノールの一種であるエピガロカテキンガレート(EGCG)は緑茶に最も多く含まれるカテキンである。EGCGには抗線維化作用があり、臓器線維症治療や角膜潰瘍治療に応用できる可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：When the effects of catechins on TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) were examined, TGF- β -induced EMT was suppressed by epigallocatechin gallate (EGCG). In addition, in the pathological states of corneal ulcer, EGCG inhibited collagen degradation in cornea. It was speculated that this inhibition of collagen degradation was caused by suppressing the production of IL-1 β -induced uPA (urokinase-type plasminogen activator) in corneal fibroblasts. Although high concentrations of EGCG may damage cells, they have been shown to have potential applications in the prevention of organ fibrosis and the treatment of corneal ulcers.

研究分野：生化学

キーワード：線維化 上皮間葉転換 エピガロカテキンガレート

1. 研究開始当初の背景

臓器線維症は創傷治癒後の組織に過剰な細胞外マトリックスが蓄積し、臓器が機能不全に陥った状態である。肺線維症・肝硬変・心筋症など各臓器に起こる線維症および動脈硬化、糖尿病の腎臓に見られる基底膜肥厚など線維化に関連した疾患に苦しむ患者は我が国では数百万人に上ると推定されるが、有効な治療法は確立されていない。各臓器には若干の特異性はあるものの、線維化進展のメカニズムには共通点も多い。角膜創傷後にも線維性病変が生じる。角膜実質が傷害されると角膜線維芽細胞が活性化され創傷治癒機転が発動する。その結果、角膜に線維化が生じ、角膜の透明性が損なわれ視力障害をもたらす。角膜実質に生じた線維化は難治性であり、有効な治療薬の開発が急務である。

申請者らは臓器線維症研究の過程で、緑茶に含まれるポリフェノール的一种であるエピガロカテキンガレート(EGCG)が角膜線維芽細胞の線維化を抑制することを明らかにした。EGCGは日常的に飲む緑茶中に含まれ、安全性は確立されていると考えられる。EGCGの臓器線維化抑制機序と線維症治療薬としてのEGCGの有効性について調べ、臨床応用に発展させることを着想した。

2. 研究の目的

臓器線維症の治療にEGCGの応用を図ることが本研究の目的である。線維化を誘導する主要なサイトカインはTGF- β であることが報告されている。申請者らはEGCGが細胞レベルで線維化を抑制することをすでに見出している。そこで、EGCGがTGF- β の作用を阻害する機序を明らかに、最終的には、EGCGによる種々の臓器線維症治療への応用をめざす。同時に、日常的に飲む緑茶中に含まれ安全性が確立されているEGCGを手軽な点眼薬として角膜創傷治療に応用し、角膜の線維化を制御し角膜透明性の回復をめざす。

3. 研究の方法

当該研究では、培養細胞を用いた生物学的実験および生化学的実験手法により線維化の強力な誘導因子であるTGF- β に対して緑茶カテキンに含まれるポリフェノールであるEGCGがどのような効果をもつかを明らかにした。また、EGCGの角膜潰瘍の治療薬としての可能性を探るためにコラーゲンゲル内で培養した角膜線維芽細胞によるIL-1誘導コラーゲン分解に対するEGCGの効果についてプロテアーゼ活性の調節に焦点を当てて検討を行った。

4. 研究成果

(1) 角膜線維芽細胞に対するEGCGの効果

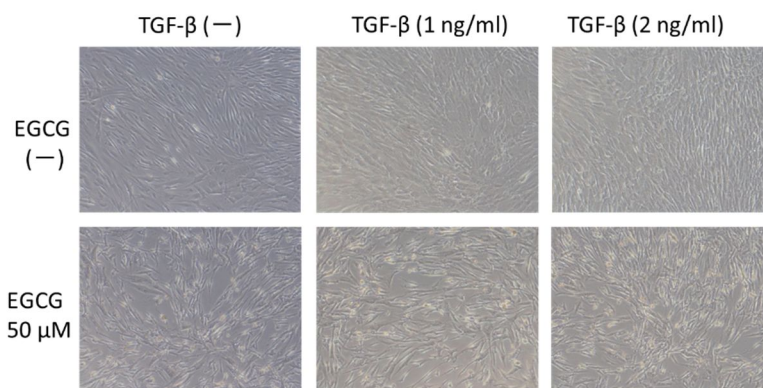


図1. 角膜線維芽細胞の位相差顕微鏡写真

角膜線維芽細胞はTGF- β 処理により筋線維芽細胞に形態変化したが、EGCGはこの形態変化を抑制した(図1)。

また、TGF- β 処理により、角膜線維芽細胞は間葉系マーカー(線維化マーカー)タンパク質のFibronectin、 α -smooth muscle actin(α -SMA)の発現が増加したが、EGCGはこの発現を顕著に抑制した(図2)。

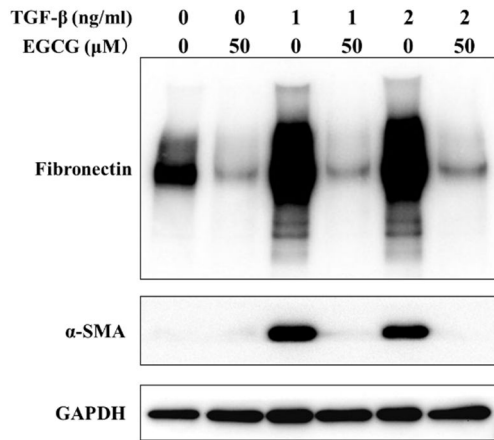


図 2. 角膜線維芽細胞 lysate に対するウエスタンブロット

(2) 角膜線維芽細胞を 3D 培養上清中の分解コラーゲンの測定

非分解コラーゲンを限外ろ過によって除去した後、培養上清を、6 M 塩酸中で 110 °C、24 時間加水分解した。加水分解物中のヒドロキシプロリンの量を分光光度法で測定したところ、EGCG は角膜線維芽細胞による IL-1 プラスミン誘導コラーゲン分解作用を抑制することがわかった (図 3)。

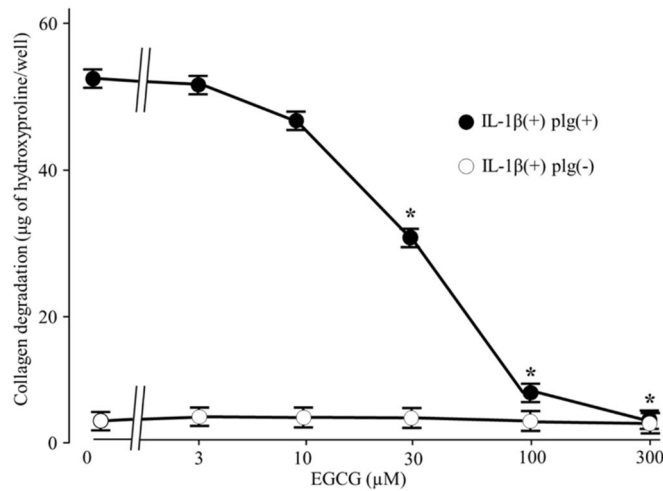


図 3. 角膜線維芽細胞による IL-1 誘導コラーゲン分解の EGCG による濃度依存的阻害

(3) 角膜線維芽細胞における IL-1 誘導 uPA 発現の EGCG による濃度依存性阻害

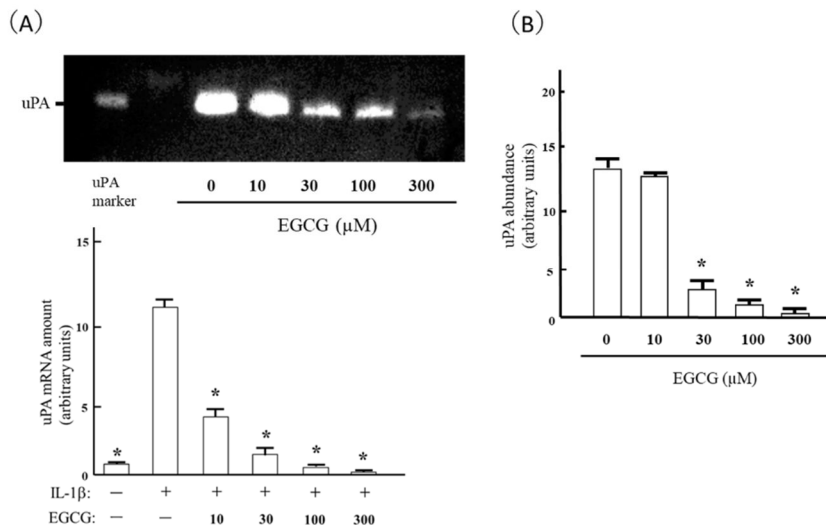


図 4. 細胞中の uPA についてのフィブリンザイモグラフィーと RT-PCR による検討

EGCG によるコラーゲン分解の阻害作用は、角膜線維芽細胞における IL-1 誘導のウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) の産生を抑制することにより生じるものであり、その結果としてプラスミノゲンの uPA によるプラスミン活性、プラスミン依存性の MMP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) の活性、MMP1 を介したコラーゲンの分解の抑制につながるものであると推察された。

(4) 角膜線維芽細胞の 3D 培養における MMP1 の産生と活性化に対する EGCG の効果

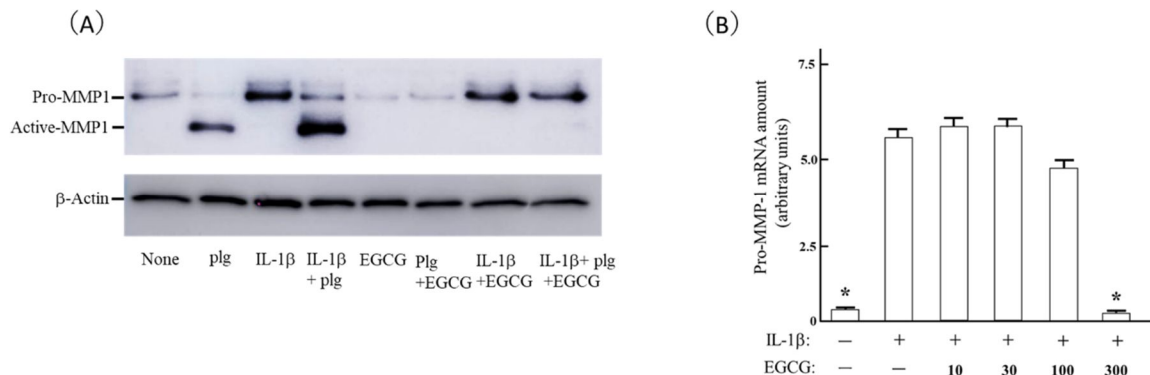


図 5 角膜線維芽細胞の 3D 培養における MMP1 の産生と活性化

EGCG は角膜線維芽細胞による MMP1 の産生には影響を与えなかった (図 5)。

(5) 培養上清のプラスミン活性の検討

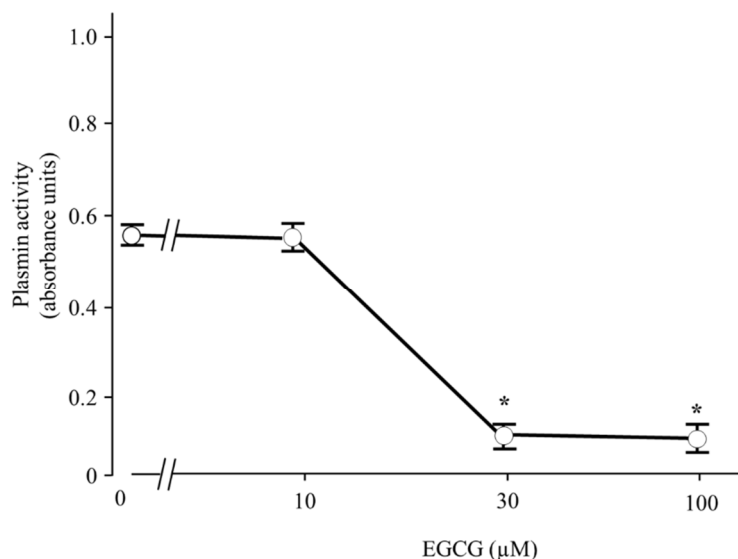


図 6. 角膜線維芽細胞の 3D 培養におけるプラスミノゲンのプラスミンへの変換の EGCG による濃度依存的阻害

EGCG は uPA の産生を抑制することによりコラーゲン分解を抑制した (図 6)。

当該研究において、EGCG が線維化抑制作用をもつことが明らかになり、抗線維化の作用機序のひとつとして IL-1 プラスミン誘導コラーゲン分解作用に対する抑制が考えられた。プラスミノゲンは uPA によりプラスミンに変換され、プラスミンは MMP1 を活性化しコラーゲンを分解させることから、この EGCG によるコラーゲンの分解の阻害作用は、角膜線維芽細胞における IL-1 が誘導する uPA の産生を抑制することにより生じるものである。さらに、EGCG は、IL-1 が誘導する NF- κ B シグナル伝達経路の活性化を阻害することにより、uPA 合成の抑制に関与すると推察される。以上のことから、EGCG は将来的に線維症、角膜潰瘍の治療薬になりうると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imoto Mayumi, Watanabe Katsunori, Yoshida Koji, Nakae Ken-ichi, Kamisako Toshinori, Yamada Toshiyuki	4. 巻 66
2. 論文標題 Glycosylated Bence Jones Protein with Poor Thermal Reactivity in Heat Coagulation Tests	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Laboratory	6. 最初と最後の頁 2365 ~ 2369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7754/clin.lab.2020.200304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugioka Koji, Yoshida Koji, Murakami Junko, Itahashi Motoki, Mishima Hiroshi, Nishida Teruo, Kusaka Shunji	4. 巻 60
2. 論文標題 Inhibition by Epigallocatechin Gallate of IL-1-Induced Urokinase-Type Plasminogen Activator Expression and Collagen Degradation by Corneal Fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 2895 ~ 2903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-27306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田浩二、杉岡孝二、高橋彩、村上純子、三島弘、西田輝夫、日下俊次
2. 発表標題 角膜線維芽細胞におけるIL-1誘導性u-PA発現およびコラーゲン分解に対するエピガロカテキンガレートの効果
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井萌、十合晋作、川路英哉、伊藤昌可、Miniwan Tulafu、渡邊純子、門屋講太郎、難波由喜子、鈴木健司、折茂 彰、吉田浩二、林崎良英、高橋和久
2. 発表標題 ITGA11-fibronectinカスケードを介する癌関連肺線維芽細胞の遊走能の解析
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村優太 , 吉田浩二 , 坂田喜美 , 濱野将大
2. 発表標題 HCEC+uPARにおけるTGF- 誘導性上皮間葉転換の検討
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱野将大、坂田喜美、吉田浩二
2. 発表標題 培養ヒト角膜上皮細胞におけるエピガロカテキンガラートによる上皮間葉転換抑制効果の検討
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田喜美、濱野将大、吉田浩二
2. 発表標題 培養尿管上皮細胞におけるエピガロカテキンガラートによる上皮間葉転換抑制効果の検討
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱野将大, 坂田喜美, 吉田浩二
2. 発表標題 培養ヒト角膜上皮細胞におけるエピガロカテキンガラートの上皮間葉転換抑制効果および細胞毒性に関する検討
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田喜美、濱野将大、吉田浩二
2. 発表標題 エビガロカテキンガレートが尿管上皮細胞の上皮間葉転換に及ぼす効果
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村優太、吉田浩二
2. 発表標題 HCEC+uPARにおける上皮間葉転換に対するEGCGの効果についての検討
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉岡 孝二 (Sugioka Koji) (50399119)	近畿大学・大学病院・准教授 (34419)	
研究分担者	萩原 智 (Hagihara Satoru) (40460852)	近畿大学・医学部・講師 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------