

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11620

研究課題名(和文)疾患マウスモデルを用いた天然創傷治癒素材による腸内環境改善機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of intestinal environment improvement mechanism by natural wound healing material using disease mouse model

研究代表者

清水 美穂 (Shimizu, Miho)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・客員准教授

研究者番号：00500399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：400年以上前の薬学書に創傷治癒効果があることが書かれている鶏卵殻膜は、近年、摂取により膝関節の痛みの改善、動物においては線維化や炎症予防効果が報告されている。我々は人が卵殻膜をサプリメントとして摂取すると呼吸機能・皮膚弾力性・運動機能改善と同時に腸内細菌叢のバランスが改善することを見出し、また、マウスに卵殻膜をサプリメントとして摂取させると、創傷治癒の早期に分泌される柔らかいIII型コラーゲンの発現が上昇するという結果を得ていた。本研究では予防につながる卵殻膜の腸内環境改善効果を、DSS大腸炎マウスモデルにより検証した結果、卵殻膜を事前に摂取することで疾患病理改善を実証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患(IBD)は様々な腸の病気を含み、中でも最も一般的なものは潰瘍性大腸炎(UC)とクローン病(CD)であり、持続性あるいは反復性の下痢、腹痛、血便などを伴う。近年、IBD患者は増えてきており、比較的若い年齢層(10～30歳代)で発症するため、栄養の吸収障害から成長障害をきたす可能性がある。本研究ではIBDのモデルとして最もよく用いられているDSS大腸炎モデルへの卵殻膜1日1回サプリメント的摂取が、病態悪化を防ぐ予防効果があることを示せた意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Chicken eggshell membrane has been described as having wound-healing effects in pharmacological books dating back more than 400 years. Recently, it has been reported that eggshell membrane improves knee joint pain and prevents fibrosis and inflammation in animals. We have found that when humans ingest eggshell membrane as a supplement, the balance of intestinal microflora improves as well as respiratory function, skin elasticity, and locomotor function, and when mice are fed eggshell membrane as a supplement, the expression of soft type III collagen, which is secreted early in the wound healing process, increases. The results were obtained. In this study, the intestinal environment improving effect of eggshell membrane leading to prevention was verified by the DSS colitis mouse model by prior ingestion of eggshell membrane.

研究分野：健康科学

キーワード：卵殻膜 炎症性腸疾患 細胞外マトリクス III型コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口から肛門までは身体の中の外であり、最大の組織かつ外界とのインターフェースである皮膚と類似した構造と機能を担っている。皮膚および腸管細胞は常に化学的・物理的ストレスを受けており、ゲノムの損傷とタンパク質変性の危機にさらされている。ホメオスタシス維持にはストレス対応が必要であり、タンパク質変性を修復するためにストレスタンパク質(=ヒートショックタンパク質, HSP; 分子シャペロン)が備わっている。ストレスタンパク質を増やす細胞活性化の基本は、細胞の足であるインテグリンの細胞外マトリクス (ECM)への接着に外乱を与えそれに抗する仕事をさせること、つまり細胞骨格タンパク質を介して核にメカニカルな刺激を与えることである。マクロな刺激としては運動であるが、個々の細胞を活性化してミトコンドリア代謝を上げる素材であることが最近明らかになった(Ohto-Fujita et al, 2011, 2019)のが、古くから創傷治癒材として中国の薬学書にも掲載されている鶏卵殻膜である。卵殻膜は、約 90%がタンパク質から成り、脂質と糖質を数%ずつ含むとされているが、タンパク質は卵殻膜の構成成分でもあるリシルオキシダーゼ様タンパク質でクロスリンクされているため、水に不溶のメッシュ状構造をとっている。近年のプロテオミクス解析により、500種類以上のタンパク質が含まれることが報告され、コラーゲンではX型、V型、I型を含む。糖質はグリコサミノグリカン (GAGs)であり、ヒアルロン酸を多く含むが、それ以外(コンドロイチン硫酸)はプロテオグリカンのコアタンパク質に付加して存在する。卵殻膜は構成成分からみて、ニワトリ胚の発生を育む、哺乳類の胎盤に類似し、バクテリアや紫外線・乾燥からのストレスに対するバリア機能を有する細胞外マトリクス素材であり、皮膚や腸のECMとも類似している。

卵殻膜はまた、摂取により膝関節の痛みの改善、動物実験においては肝線維化や潰瘍性大腸炎予防効果が報告されている安全な食品である。我々のこれまでの研究から、健常成人が卵殻膜サプリメントを摂取すると8週間で呼吸機能改善、腕の皮膚弾力性改善、運動機能改善と同時に腸内細菌叢のバランスがよくなること、マウスに卵殻膜をサプリメントとして摂取させると、大腸のクリステ(間質)で、創傷治癒の早期に分泌される柔らかいIII型コラーゲンの発現が上昇するという予備的結果を得ていた。

2. 研究の目的

本研究では、創傷治癒天然素材卵殻膜を健常成人が摂取すると、腸内細菌叢バランス改善効果があったことを単にバクテリアの問題とみるのではなく、これまでの皮膚での卵殻膜の細胞-細胞外マトリクス効果の知見をベースに、腸を皮膚と類似した細胞環境であると捉え、予防につながる卵殻膜の腸内環境改善効果を、疾患動物モデル等を用いて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

炎症性腸疾患 (IBD)は様々な腸の病気を含み、その中でも最も一般的なものは潰瘍性大腸炎(UC)とクローン病(CD)であり、持続性あるいは反復性の下痢、腹痛、血便などを伴う。近年、IBD患者は増えてきており、比較的若い年齢層(10~30歳代)で発症するため、栄養の吸収障害から成長障害をきたす可能性がある。現在DSSによる大腸炎モデルは、IBDのモデルとして最もよく用いられ、DSSを投与された動物は、体重減少、緩い便や下痢の兆候を示し、時には直腸出血を伴う。本研究では、DSSを誘発させたマウスに対し、卵殻膜を丸ごと微粉砕したパウダーを、人がサプリメント摂取した場合と同じく1日1回動物用ゼリーに混ぜて摂取させた場合の腸病理への改善効果および腸内細菌叢への効果を検証した。本研究では、人でのサプリメント摂取研究の結果を踏まえ、それを説明するためのin vivoのデータを得ることが目的であるため、同じ方法(サプリメント的に)投与すること、人での実験における卵殻膜摂取量の体重換算を与えた。

動物実験計画は東京農工大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験等の実施に関する基本指針に基づき実施した。実験動物としてB6マウスを使用した。動物は購入後、ケージで個別に飼育し、水と飼料を自由に摂取できる環境にした。大腸炎を誘発させるために飲料水にデキストラン硫酸ナトリウム(Sigma-aldrich社製)を最終濃度2.0%(wt/vol)になるように加えた。投与する卵殻膜を医療用ゼリーに懸濁して与えた。1週間のサプリメント投与を終えてから、飲料水を2% DSS溶液にした。なお、DSS溶液投与期間も1日1回、12時~13時の間で適量のサプリメント投与は続けた。3日目と5日目に解剖し、大腸を摘出して病理評価を行った。

4. 研究成果

(1) DSS大腸炎モデルマウスの疾患活動指数DAIへの卵殻膜摂取効果

疾患活動指数(DAI)を用いてDSS5日間投与の疾患の臨床的進行を評価したところ、3日目でDSS群と比較して卵殻膜摂取群でDAIスコアが有意に抑制され($p < 0.01$)、4、5日目でも抑制されることが明らかになった。

(2) DSS大腸炎モデルマウスの大腸病理組織学評価にみる卵殻膜摂取効果

DSS を 5 日間投与した大腸では、DSS 群において、陰窩の著しい消失と炎症細胞の浸潤が観察された。一方、卵殻膜群では、陰窩の消失や炎症細胞の浸潤があまり確認されず、大腸炎が軽減されていることが判明した。

< 総括 >

卵殻膜及を 1 週間事前に経口投与しておきその後も食べさせ続けると、DSS 誘発大腸炎モデルマウスの DAI スコアを抑えることが明らかになった。また DSS 5 日目の大腸組織中の Ⅲ 型コラーゲン遺伝子発現が DSS で減少に転じたのが、卵殻膜摂取群で増加傾向が見られ、大腸炎と細胞外マトリックスが密接に関わっている可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Ohto-Fujita E, Konno T, Simizu M, Isihara K, Sugita T, Miyake J, Yoshimura K, Atomi Y, Hydrolyzed eggshell membrane immobilized on phosphorylcholine polymer supplies extracellular matrix environment for human dermal fibroblasts. Cell Tissue Res 345:177-190(2011).

Ohto-Fujita E, Shimizu M, Sano S, Kurimoto M, Yamazawa K, Atomi T, Sakurai T, Murakami Y, Takami T, Murakami T, Yoshimura K, Hasebe Y, Atomi Y. Solubilized eggshell membrane supplies a type III collagen-rich elastic dermal papilla. Cell Tissue Res. 376:123-135 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Ohto-Fujita Eri, Hatakeyama Nozomi, Atomi Aya, Yasuda Shunsuke, Kodama Shoki, Atomi Tomoaki, Tanaka Kazuya, Noboru Hirose, Harada Kenji, Asano Yoshihide, Watanabe Toshiyuki, Hasebe Yukio, Shimizu Miho, Atomi Yoriko	4. 巻 77
2. 論文標題 Effect of Eggshell Membrane Powder Intake on the Body Function of Healthy Individuals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fiber Science and Technology	6. 最初と最後の頁 258 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2115/fiberst.2021-0029	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 -

1. 著者名 大戸-藤田恵理, 清水美穂, 長谷部由紀夫, 跡見 順子	4. 巻 36
2. 論文標題 呼吸機能改善への天然素材卵殻膜を利用したアプローチ	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 52-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Ohto-Fujita Eri, Nogawa Norio, Shimizu Miho, Ijiri Ken-ichi, Hasebe Yukio, Atomi Yoriko	4. 巻 77
2. 論文標題 Application of Neutron-Irradiated 6Li (n,) 3H Reaction to a Protein-Based Fibrous Non-Woven Fabric Biopolymer: Radiolabeling of Cross-Linked Natural Fibrous Chicken Eggshell Membranes and Their Whole-Body Tissue Distribution after Oral Ingestion in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fiber Science and Technology	6. 最初と最後の頁 182 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2115/fiberst.2021-0018	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9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 清水美穂, 藤田恵理, 長谷部由紀夫, 跡見順子
2. 発表標題 天然創傷治癒素材卵殻膜は機械的ストレスに対して本質的に適応的な細胞-マトリックス相互作用を介してアンチエイジングをもたらす
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会公募ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 E. Ohto-Fujita, M. Shimizu, A. Atomi, S. Horinouchi, N. Shibayama, R. Hosoda, H. Hiruta, T. Murakami, S. Miyazaki, M. Kurimoto, Y. Asano, T. Watanabe, Y. Hasebe, Y. Atomi
2. 発表標題 Eggshell membrane promotes homeostasis of skin and lung tissue associated with type III collagen and decorin expression and ameliorates pulmonary fibrosis in a bleomycin mouse model
3. 学会等名 Cell Bio 2022-An ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoriko Atomi
2. 発表標題 Eggshell membrane save the aging society
3. 学会等名 第22回国際栄養学会議 - 22nd IUNS-ICN Luncheon Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 跡見順子, 大戸(藤田)恵理, 清水美穂, 跡見綾, 堀ノ内慎哉, 柴山夏実, 細田涼太, 蛭田容基, 村上智亮, 宮崎新也, 栗本大嗣, 浅野善英, 渡邊敏行, 長谷部由紀夫
2. 発表標題 卵殻膜はType III collagenとデコリン発現を伴う皮膚・肺組織の恒常性を促進しプレオマイシンマウスモデルの肺線維症を減弱する
3. 学会等名 第54回日本結合組織学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 跡見順子
2. 発表標題 未病予防のための「良い姿勢」心身を一体化する身体調律と細胞に活力を与える天然素材卵殻膜
3. 学会等名 第29回日本未病学会学術総会 シンポジウム4 運動部会シンポジウム 「令和の日本人の健康と日常を快適に過ごすための細胞 - 身体活性化法」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 跡見順子, 大戸-藤田恵理, 野川憲夫, 清水美穂, 井尻憲一, 長谷部由紀夫
2. 発表標題 3H labeling of chick embryo ECM eggshell membranes by the recoil tag method and systemic tissue distribution after oral ingestion in mice
3. 学会等名 2021日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoriko Atomi, Eri Ohto-Fujita, Norio Nogawa, Miho Shimizu, Ken-ichi Ijiri, Yukio Hasebe
2. 発表標題 Radiolabeling of cross-linked natural fibrous chicken eggshell membranes and their whole-body tissue distribution after oral ingestion in mice
3. 学会等名 2021 ASCB (CELL BIO virtual 2021, An online ASCB) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 跡見順子, 大戸-藤田恵理, 柴山夏実, 細田涼太, 清水美穂, 跡見綾, 堀ノ内慎哉, 宮崎新也, 村上智亮, 浅野善英, 長谷部由紀夫
2. 発表標題 ブレオマイシン肺線維症マウスモデルを用いた鶏卵殻膜摂取による抗線維化効果検証
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会(オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y Atomi, E Ohto-Fujita, M Shimizu, A Atomi, N Hatakeyama, N Shibayama, R Hosoda, S Horinouchi, T Murakami, S Miyazaki, M Kurimoto, S Yasuda, S Kodama, N Nogawa, T Atomi, K Tanaka, N Hirose, K Harada, Y Asano, T Watanabe, Y Hasebe
2. 発表標題 Oral eggshell membrane administration attenuated lung fibrosis via type III collagen- and decorin-mediated wound healing
3. 学会等名 Cell Bio 2020 Virtual-an Online ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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	藤田 恵理 (Ohto-Fujita Eri) (50466877)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・産学官連携研究員 (12605)	
研究分担者	跡見 順子 (Atomi Yoriko) (90125972)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・客員教授 (12605)	

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
---------	---------