

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700530

研究課題名(和文) 癬痕治療を促進させる超音波フォノフォレーシス法の確立

研究課題名(英文) Development of ultrasound-induced phonophoresis to promote scar healing

研究代表者

前重 伯壮 (Maeshige, Noriaki)

神戸大学・保健学研究科・助教

研究者番号：90617838

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)：短鎖脂肪酸による抗線維化・抗炎症作用を促進させる超音波照射条件を解明した。酪酸は最も生理作用の強い短鎖脂肪酸であり、我々は、ヒト皮膚由来線維芽細胞、ケロイド線維芽細胞、翼状片由来線維芽細胞において、線維化促進因子の発現抑制やapoptosisの促進、増殖抑制作用を示すことを明らかにした。また低強度(0.1～0.5 W/cm<sup>2</sup>)の超音波を酪酸添加に付加して照射することにより、抗線維化作用、抗炎症作用が促進されることがわかった。さらに、超音波照射によって、酪酸によるヒストンアセチル化作用が増強することが判明した。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the ultrasound parameters to promote the antifibrogenic and anti-inflammatory effects by short chain fatty acids. Butyrate is a fatty acid having the most potent physiological action among short chain fatty acids. We found the antifibrogenic effects of butyrate in human dermal fibroblasts, keloid fibroblasts and pterygium fibroblasts, and facilitatory effects of low-intensity ultrasound (0.1-0.5 W/cm<sup>2</sup>) for the antifibrogenic and anti-inflammatory effects by butyrate. In addition, we found the promotional effects of low-intensity ultrasound on histone acetylation by a low-concentration of butyrate.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：超音波 短鎖脂肪酸 線維化 線維芽細胞

### 1. 研究開始当初の背景

肥厚性癬痕、ケロイドなどの皮膚線維増殖性病変は、患者に外観的な問題や搔痒感を与えるだけでなく、癬痕拘縮を伴うことにより患者の QOL および ADL を阻害する。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC inhibitor) の一種である短鎖脂肪酸の酪酸は、線維化抑制作用を有することが報告されているため、皮膚の線維増殖性病変に対して有効性を示す可能性がある。トリグリセリドであるトリブチリンの経口摂取により血中の酪酸濃度を上昇させることが確認されている。そのため、経口摂取によって癬痕組織に供給することが可能である。また、外用薬として経皮的な吸収によって作用させることも可能である。しかし、いずれの投与方法においても、標的組織・細胞に到達するまでに酪酸の濃度が低下する。したがって、低濃度の酪酸の作用を高める手段を構築する必要がある。その方法として、超音波による膜透過性促進の応用が考えられたが、酪酸に対する促進効果は明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

酪酸の線維増殖性病変における線維化抑制作用と、その作用に対する超音波照射の促進効果を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

正常ヒト皮膚由来線維芽細胞は Clonetics 社より購入した。線維増殖性病変であるケロイドおよび翼状片由来の線維芽細胞は手術時の切除組織を採取し、組織小片を 10cm 組織培養用シャーレに少量の FBS 含有 DMEM とともに留置し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養して初代培養した。実施にあたっては、神戸大学大学院保健学研究科倫理委員会に本研究内容を申請し、患者の不利益になることがないことを十分に口頭で説明し、文書にて患者より同意を得た。

#### (2) 脂肪酸添加

短鎖脂肪酸である酪酸を 1-16mM に希釈して培地に添加した。

#### (3) 超音波照射

超音波治療器 (イトーUS750、伊藤超短波) を使用し、添加後に周波数 3 MHz、パルスモード 20% または 100%、照射時間 10-20 分の条件で、強度 0.1-0.5W/cm<sup>2</sup> の超音波を照射した。

#### (4) 線維化反応の定量

癬痕内に存在する線維の type collagen (collagen I), type III collagen (collagen III)、および線維化促進因子の transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1)、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、線維組織における炎症性サイトカインの interleukin-6 (IL-6) の mRNA 発現を real time PCR 法にて定量した。

#### (5) ヒストンアセチル化の定量

酪酸が核内に存在する HDAC の酵素活性ポケットに結合することにより増加するヒストンのアセチル化を western blotting 法を用いて定量した。

### 4. 研究成果

酪酸 (Butyrate) がヒト皮膚由来線維芽細胞 (図 1) ケロイド由来線維芽細胞 (図 2) 翼状片由来線維芽細胞で線維化反応を抑制することが確認され、酪酸が病態組織での線維化反応に対しても抑制効果を示すことが示唆された。

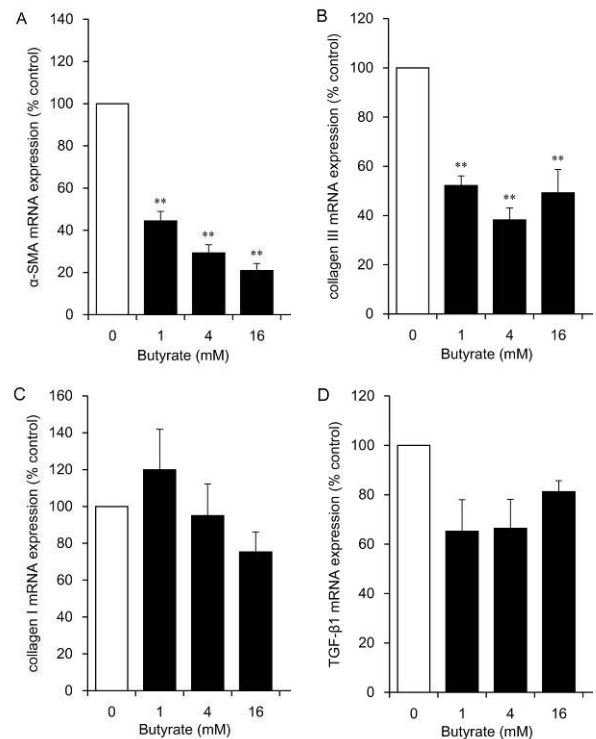


図 1 酪酸添加 24 時間後の線維化抑制反応

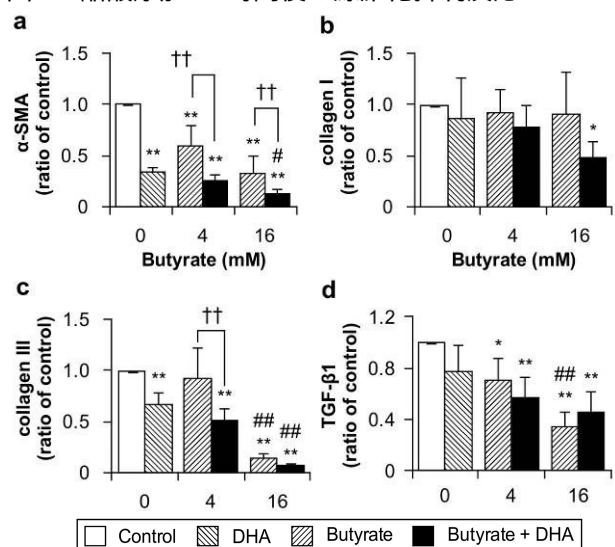


図 2 酪酸添加 48h 後の線維化抑制反応

そして、0.5 W/cm<sup>2</sup> の超音波を 4 mM 酪酸添加と同時に 10 分間照射することにより、酪酸添加単独と比較して、線維化促進因子の TGF- $\beta$  1 発現が有意に抑制されることが明ら

かになった(図3)。

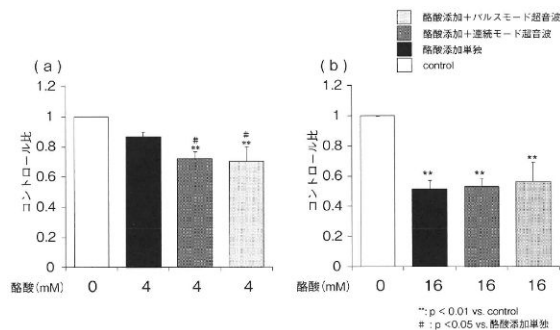


図3 酪酸添加および超音波照射24時間後の線維化抑制反応

さらに、1 mM の低濃度酪酸 (SB) と 0.1 W/cm<sup>2</sup> の低強度超音波を併用することにより、酪酸添加 3 時間後にヒストンのアセチル化 (acetylated histone) が有意に高まることを確認され、この効果は低濃度酪酸または低強度超音波単独では認められなかった(図4)。ヒストンアセチル化の促進に伴い、lipopolysaccharide 添加 (L) による IL-6 mRNA 発現上昇も有意に抑制された(図5)。20%パルスモード超音波 (PU)、連続モード超音波 (CU) 共にこれらの効果を示すことが確認された(図4, 5)。

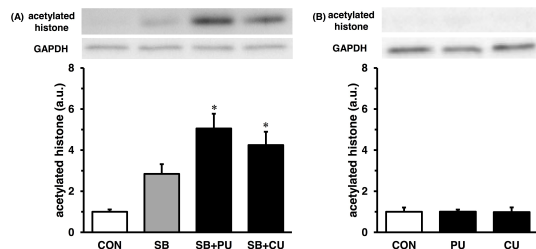


図4 低濃度酪酸と低強度超音波の併用によるヒストンアセチル化促進作用

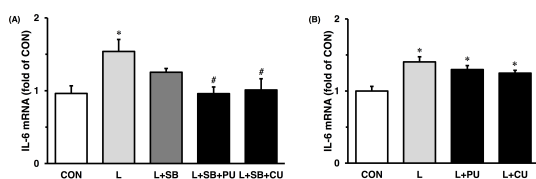


図5 低濃度酪酸と低強度超音波の併用によるLPS誘導性IL-6発現亢進の抑制

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

前重 伯壮、田淵 寛人、古賀 由華、越智 茜、植村 弥希子、石川 (青山) 倫子、三好 真琴、杉元 雅晴、寺師 浩人、宇佐美 眞、短鎖脂肪酸の線維化促進因子発現抑制に対する超音波照射の促進作用、査読有、物理療法科学、21 巻、2014、53-58

Kazuhiro Torii、Noriaki Maeshige、Michiko Aoyama、Midori Imai、Hiroto Tabuchi、Makoto Miyoshi、Yasuhiro Hamada、Hiroto Terashi、Makoto Usami、Antifibrogenic effects of short chain fatty acids on human dermal fibroblasts、査読無、Wound Repair and Regeneration、Vol. 21、2013、pp. A7

寺師 浩人、前重 伯壮、野村 正、宇佐美 眞、脂質研究の最近の話題-創傷治癒と脂肪酸代謝、査読無、静脈経腸栄養、28 巻、2013、939-943

前重 伯壮、1 ページ講座「理学療法関連用語」8. 癬痕、理学療法ジャーナル、査読無、46 巻、2012、725

前重 伯壮、鳥井 一宏、田淵 寛人、青山 倫子、寺師 浩人、杉元 雅晴、宇佐美 眞、超音波の照射時間率がヒト皮膚由来線維芽細胞の  $\alpha$ -SMA 発現に対して与える影響、日本物理療学会誌、査読有、19 巻、2012、44-48

[学会発表](計8件)

Yuka Koga、Noriaki Maeshige、Mikiko Uemura、Michiko Aoyama-Ishikawa、Motoki Kai、Yuya Nishiyama、Makoto Miyoshi、Chikako Katakami、Makoto Usami、Butyrate and phenylbutyrate suppress fibrosis in human pterygium fibroblasts、The 16th Congress of Parenteral and Enteral Nutrition Society of Asia、2015.9.5、名古屋国際会議場(愛知県)

Yuka Koga、Noriaki Maeshige、Michiko Aoyama-Ishikawa、Akane Ochi、Mikiko Uemura、Motoki Kai、Yuya Nishiyama、Makoto Miyoshi、Michiko Takahashi、Hiroto Terashi、Makoto Usami、Anti-inflammatory and antifibrogenic effects of butyrate/DHA on lipopolysaccharide stimulated dermal fibroblasts、12th Asian Congress of Nutrition、2015.5.14、パシフィコ横浜(神奈川県)

Noriaki Maeshige、Aakane Ochi、Yuka Koga、Mikiko Uemura、Michiko Aoyama-Ishikawa、Hayato Yamashita、Makoto Miyoshi、Taketo Inoue、Mayu Fujiwara、Motoki Kai、Yuya Nishiyama、Hiroto Terashi、Makoto Usami、The effects of butyrate/DHA on apoptosis and apoptosis related factors in keloid fibroblasts、12th Asian Congress of Nutrition、2015.5.14、パシフィコ横浜(神奈川県)

Noriaki Maeshige、Yuka Koga、Junya Takegaki、Masayuki Tanaka、Michiko Aoyama-Ishikawa、Makoto Miyoshi、Makoto Usami、Hidemi Fujino、Low-intensity

ultrasound enhances histone acetylation and improves anti-inflammatory effects by short chain fatty acid treatments in human dermal fibroblasts, Experimental Biology 2015, 2015.4.1, Boston (USA)

植村 弥希子、前重 伯壮、越智 茜、古賀 由華、青山 倫子、山下 勇人、三好 真琴、井上 岳人、寺師 浩人、宇佐美 眞、ケロイド線維芽細胞に対する酪酸・DHA の apoptosis 誘導効果、第 44 回日本創傷治癒学会、2014.12.2、ホテルメトロポリタン仙台（宮城県）

前重 伯壮、田淵 寛人、古賀 由華、越智 茜、植村 弥希子、石川（青山）倫子、三好 真琴、杉元 雅晴、寺師 浩人、宇佐美 眞、短鎖脂肪酸の抗線維化作用に対する超音波照射の促進効果-in vitro 実験による検証、第 21 回日本物理療法学会学術大会、2013.10.20、神奈川県立保健福祉大学（神奈川県）

Noriaki Maeshige, Kazuhiro Torii, Hiroto Tabuchi, Ayumi Saka, Kyoko Araki, Michiko Aoyama Ishikawa, Midori Imai, Yuka Koga, Akane Ochi, Mikiko Uemura, Makoto Miyoshi, Yasuhiro Hamada, Hiroto Terashi, Makoto Usami, Antifibrogenic and proapoptotic effects of butyrate/DHA via PGE2 secretion on keloid fibroblasts in inflammatory model, The 35th congress of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition, 2013.9.1, Leipzig (Germany)

田淵 寛人、前重 伯壮、鳥井 一宏、青山 倫子、今井 緑、三好 真琴、小谷 穰治、濱田 康弘、寺師 浩人、宇佐美 眞、酪酸・DHA 併用がケロイド由来線維芽細胞における -SMA, collagen の発現に与える抑制効果、第 19 回外科侵襲とサイトカイン研究会、2012.12.8、ホテルオークラ神戸（兵庫県）

〔図書〕(計 1 件)

前重 伯壮 他、文光堂、実学としての理学療法概観、2015、442 (118-133)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-usami/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前重 伯壮 (MAESHIGE, Noriaki)  
神戸大学・大学院保健学研究科・助教  
研究者番号：90617838

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

鳥井 一宏 (TORII, Kazuhiro)  
田淵 寛人 (TABUCHI, Hiroto)  
坂 安優未 (SAKA, Ayumi)  
荒木 杏子 (ARAKI, Kyoko)  
古賀 由華 (KOGA, Yuka)  
越智 茜 (OCHI, Akane)  
植村 弥希子 (UEMURA, Mikiko)