

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590710

研究課題名（和文）損傷消化管粘膜上皮における塩基性アミノ酸ヒスチジンの機能性研究

研究課題名（英文）The role of histidine on wound healing using cultured rat intestinal epithelial cells

研究代表者

市川 寛（ICHIKAWA HIROSHI）

同志社大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：60336732

研究成果の概要（和文）：生体内におけるヒスチジン欠乏状態は、透析を必要とするような糖尿病腎症などの病態を悪化させるのみならず、褥瘡などの創傷治癒の遅延や、非ステロイド抗炎症薬（NSAID）起因性消化管粘膜傷害の原因ともなりうる。本研究は、粘膜上皮修復機序におけるヒスチジンの機能性を明らかにすることを目的としている。ラット小腸上皮細胞による円形上皮欠損モデルを用いて、各種アミノ酸を個別で欠落させた培養液を用い、修復速度の違いを検討したところ、ヒスチジンが欠乏した状態において、小腸粘膜上皮の修復過程に著しい障害をきたすことを見いだした。以上のことは、粘膜上皮修復機序において、必須アミノ酸であるヒスチジンが重要な役割をしていることを示しており、病的状態におけるヒスチジン欠乏が、消化管粘膜障害を増悪させる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：The amino acid balance in the living body will lose a balance for various stresses under pathological condition. The aim of this study was to investigate the functional role of histidine which is the important amino acid in pathological conditions on wound healing using cultured rat intestinal epithelial cells (RIE). In the histidine lack culture medium and the Zero culture medium, the restitution speed of RIE showed delay remarkably. In MTT assay, compared with the Full culture medium, the cell proliferation after 24 hour incubation in the histidine lack culture medium was significantly decreased. In the histidine lack culture medium and the Zero culture medium, the expression of HSP70 and Cleaved Caspase-3 were increased, compared with the Full culture medium. It was suggested that the induction of heat shock protein, the induction of apoptosis and the reduction of growth factor were involved in the mechanisms of delayed wound healing by lack of histidine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：病態医科学

キーワード：ヒスチジン・小腸粘膜・創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

(1) アミノ酸は、タンパク質合成や、エネルギー源の素材、生理活性物質の前駆体として機能するほか、ホルモン分泌をうながしたり、自らシグナル分子として働き、代謝や細胞機能を調節するなど、多様な機能を有している栄養素である。また、その特性をもとに、飼料、医療、サプリメント、化粧品などに应用されている。また、近年この現代社会では、美容・健康に対する人々の意識が向上し、アミノ酸を含有する食品は頻りに市場に出まわるようになるなど、美容・健康ブームが起こっている。

(2) アミノ酸は栄養素として重要であるが、一般的な食生活をおくる日本人はタンパク質由来のアミノ酸を十分に摂取している場合が多く、特別な場合を除きさらなる摂取が有効なのかは議論がある。ところが一旦病的な状態になると、生体内のアミノ酸バランスは様々なストレスでそのバランスを崩すことになる。たとえば、糖尿病とも関連性が深く、新たな国民病とまでいわれ、今後増加すると思われる慢性腎臓病 (CKD) に関連した報告では、血中ヒスチジン濃度の低下が蛋白崩壊、炎症惹起、酸化ストレスの増大に引き続き、その予後までも悪化させることが示唆されている。また、外傷性ショックや、周術期、熱傷などの身体的ストレスが、特に血中ヒスチジン濃度を低下させ、さらに病態を悪化させていると報告されている。

2. 研究の目的

(1) 臨床的には、血中ヒスチジン濃度の低下をきたした透析を必要とするような糖尿病腎症などの CKD 患者では、褥瘡治療や術後の回復期において、創傷の治癒が際立って遅延し、近年では難治性消化性潰瘍や、重篤な小腸粘膜傷害による消化管出血も合併することが多く、患者の生活の質 (QOL) を著しく阻害する要因にもなっている。また、近年増加している非ステロイド性抗炎症薬による消化管粘膜傷害での出血などで、死亡に直結する病態に直面することも珍しくない。また、これら創傷治癒の遅延機序は潜在的な動脈硬化性病変や糖尿病にともなう酸化ストレスが関与しているともいわれている。

(2) したがって、創傷治癒促進や、粘膜上皮傷害の阻止は、患者の QOL を高めるために必須であり、臨床医学の現場でも決して軽視されてはいけない視点である。そこで今回、塩基性アミノ酸一種であるヒスチジンに注目し、病的状態を反映すると考えられるヒスチジン低下が粘膜上皮 (RIE) の創傷修復に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 円形上皮欠損の作製：培養した RIE が 80~90%コンフルエントになった状態を確認してから作業を始めた。上皮欠損作成の 24 時間前に、FBS を含んでいない、全アミノ酸添加培地 (Full 培地)、アミノ酸無添加培地 (Zero 培地)、各種アミノ酸欠落培地に交換し、インキュベーター内で培養した。培養後、アスピレーターチューブの先に 10 μ l 用のチップ (NEPTUNE) をつけ、これを手製の穴あけ器にセットし、微小吸引によって細胞膜に円形欠損を作成した。その後、培養液を除去し、PBS(-) で 1 回洗浄して、培地交換を行った。円形欠損作製時を 0 時間とし、3, 6, 9, 12 時間後の欠損部位の面積を解析した。

(2) 細胞増殖測定 (MTT Assay)：培養 RIE のコンフルエント確認後、培養液を除去し、PBS(-) を加えて細胞を洗浄し、そこにトリプシンを加え、インキュベーター内に 5 分間放置して細胞を遊離させた。その後、適量の DMEM 培地で細胞を 50ml チューブに回収し、1500rpm \times 5 分間 20 $^{\circ}$ C で遠心し、上清を除去した後、適量の DMEM 培地を加えてよく攪拌した。ヘモサイトメーターで細胞数を数え、 9×10^4 個/ml の濃度の細胞液になるように DMEM 培地で調製した。上記の細胞液を 96 well プレート (Greiner bio-one) の 1 well につき 100 μ l ずつ加え、インキュベーター内で 24 時間培養させた。その後、培養液を除去し、PBS(-) で洗浄後、Full 培地、Zero 培地、ヒスチジン欠落培地 (Δ His 培地) を加えた。この時点から 0 時間として、24 時間培養後、細胞増殖測定をした。測定には、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) 反応液 (CCK-8 溶液) を使用した。反応液を 1well につき 10 μ l 加え、その直後を 0 分として、15 分毎にマイクロプレートリーダー (Wallac 1420 Multilabel/Luminescence Counter) で 450 nm、560 nm の吸光度を測定し、560 nm をバックグラウンドとした [3]。さらに、上記と同様の操作で、 Δ His 培地にヒスチジンを添加して、細胞増殖測定を行った。

(3) ウェスタンブロット法：上記の RIE が 80~90%コンフルエントになった状態を確認してから作業を始めた。まず、細胞を PBS(-) で 1 回洗浄し、Full 培地、Zero 培地、 Δ His 培地へ交換し、5%CO₂、37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で 90 分間前培養した。培養後、複数の線状上皮欠損を作製した。線状上皮欠損の作製は、ディッシュの縦・横 50 回ずつ、合計 100 回の傷を、200 μ l チップを用いてつけた。上記の上皮欠損 RIE と、III-1 で正常培養した上皮欠損のない RIE の培養液を除

去し、PBS(-)加えて細胞を洗浄し、そこにトリプシンを加え、インキュベーター内に5分間放置して細胞を遊離させた。その後、適量のDMEM培地で細胞を15mlチューブにそれぞれ回収し、1500rpm×5分間、20°Cで遠心し、上清を除去した後、1mlのPBS(-)を加えよく攪拌し、1.5mlのエッペンチューブに移した。そして、再度、1500rpm×5分間4°Cで遠心し、上清を除去した。上記の回収したRIEのチューブに、氷冷 Whole cell Lysing Buffer (10mlにつきカクテルタブレット (Roche) 1粒入り) を100 μ lずつ入れ、よく攪拌し、超音波破碎機 (アストラソン) にて、Amplitude:40、Pulse-on Time:1秒、Pulse-off Time:3秒の条件で3回破碎した。作業は全て氷上で行った。タンパク測定のために、サンプルを蒸留水で20倍~40倍に希釈した。まず、BCA Protein Assay kit (PIERCE社) を使用し、Albumin Standard (2mg/ml) を用いて、スタンダードを作製した。(表3) その後96wellプレートに、スタンダード液と希釈したサンプルを10 μ lずつ入れた。次に、Protein Assay kitのReagent AとReagent B液を50:1の割合でよく混ぜ合わせ反応液を作製し、プレートに200 μ lずつ入れて37°Cで30分間反応させた。その後、マイクロプレートリーダーで560nmの吸光度を測定した [4, 5]。測定データより、タンパク濃度が1mg/mlになるように、Whole cell Lysing Bufferで調製した。はじめに、5×SDSバッファー 875 μ lと2-メルカプトエタノール (和光純薬) 125 μ lをよく混合した。このバッファーと上記で調製したタンパク液を4:1の割合になるように添加し、よく攪拌後95°C5分間煮沸した。その後、泳動用ゲル (ミニプロティアンTGXゲル 4-20% BIO RAD) の各ウェルに10 μ gのタンパク液を注入し、泳動バッファー中で200V、35分間室温で泳動した。分子量マーカーとして、エクセルラダーマーカー (APRO) を用いた。次に、必要な枚数のメンブレン (PVDF, MILLIPORE社) を、1枚ずつ容器に入れ、適量のメタノールに浸し、蒸留水で洗浄後、ブロッキングバッファーに浸し、振とう器で揺らしておいた。また、ブロッキングに使用するろ紙も、必要枚数 (1枚のメンブレンにつき6枚) を容器にいれ、ブロッキングバッファーに浸し、振とう器で揺らしておいた。泳動終了後ゲルを取り出し、室温で、ブロッキングバッファーに30分間浸した。このゲルとメンブレンをブロッキング装置 (ATTO) の電極版の上にセットし、定電流 (*メンブレン1枚につき144mA)・25分間室温でブロッキングした (電源装置 (ATTO CROSSPOWER 150) 使用)。終了後、メンブレンを取り出し、ブロッキング用溶液に浸して、室温で、20分間振とう器で揺らす操作を3回繰り返した。その後、メンブレンを

ハイブリダイゼーションバッグに入れ、そこに、Canget Signal Solution1 (TOYOBO) で希釈した一次抗体を加えて、気泡が入らないように密封し、4°Cで一晩反応させた。一次抗体は、Caspase-3 (1:1000, Cell Signaling)、TGF- β (1:500, Cell Signaling)、PCNA (1:5000, Transduction Laboratories)、PDGFR- β (1:1000, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) を用いた。一晩反応後、ブロッキング用溶液に浸して、室温で、20分間振とうさせ、その後溶液を交換した。この操作を3回繰り返した。次に、メンブレンをハイブリダイゼーションバッグに入れ、Canget Signal Solution2 (TOYOBO) で20000:1に希釈した二次抗体を加えて、気泡が入らないように密封し、室温で90分間反応させた。二次抗体は、それぞれの一次抗体に適したものをを用いた (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (DAKO) または Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (DAKO))。反応後、メンブレンをTBSTに浸し、20分間振とうさせた。これを3回繰り返した。洗浄後、メンブレンを発色液 (ECL Plus Western Blotting, GE Healthcare) に浸した。(PDGFR- β , Caspase-3, PCNAは2分間、TGF- β は5分間) 反応後、ハイブリダイゼーションバックに入れ、現像した。

4. 研究成果

(1) 上皮欠損における修復速度の検討: 図1は、上皮損傷12時間後の欠損面積率を示している。12時間が経過すると、Full培地に対し、Zero培地、チロシン、ヒスチジン、ロイシンの欠落した培地において、修復が遅延した。

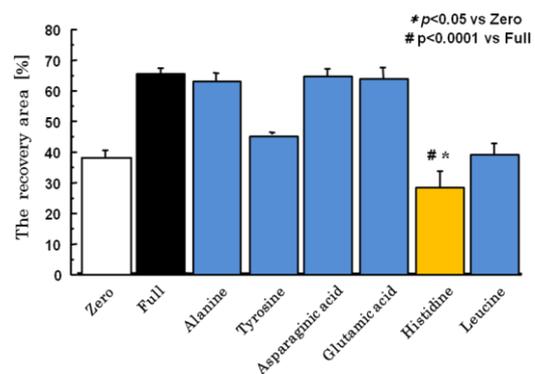


図1 12時間後の欠損修復率

(2) MTT Assay: ヒスチジン欠落培地における培養24時間後の細胞増殖は、Full培地に対し、抑制されていた。ヒスチジン欠落培地

へのヒスチジン添加による細胞増殖は、ヒスチジン 10 μ M の添加で、Full 培地と同程度の増殖率を示した (図 2)。

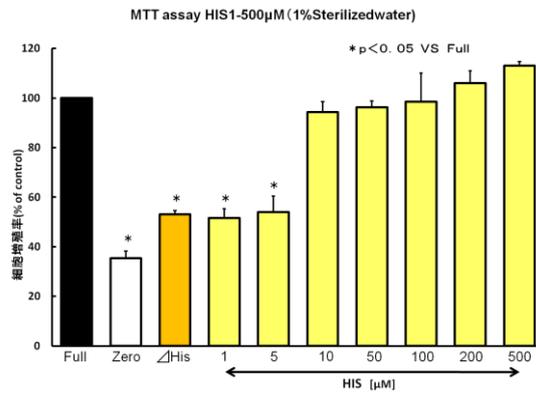


図 2 ヒスチジン添加による MTT Assay

(3) ウェスタンブロット法による種々のタンパク発現の解析：細胞遊走の促す働きをもつ TGF- β は、Full 培地、Zero 培地、 Δ His 培地の三群間において、65 kDa の位置にバンドが検出された。TGF- β の発現量は、三群間ともに、傷つけ 6 時間後までは増加し、それ以降は発現低下にむかう傾向がみられた。特に、ヒスチジン欠落時における TGF- β の発現量は、前培養の時点で、Full 培地に対しおよそ 50%以下を示した (図 3)。

アポトーシスの指標である Caspase-3 は、Full 培地、Zero 培地、 Δ His 培地の三群間において、35 kDa、17 kDa の位置にバンドが検出された。三群間の不活性型 Caspase-3 の発現量に差はなかった (図 11)。Cleaved Caspase-3 の発現量は、Zero 培地、ヒスチジン欠落培地の二群間では、時間の進行とともに、発現が増加していくことが確認できた。

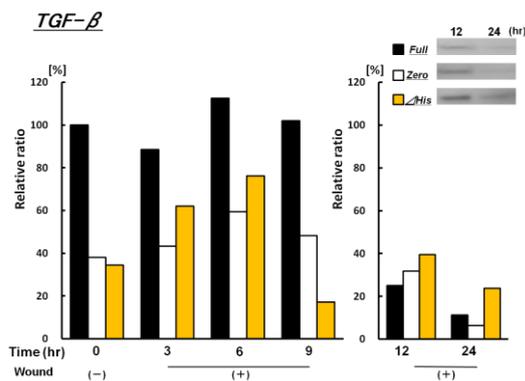


図 3 TGF- β の発現量

これに対し Full 培地では、6 時間から 9 時間の間に、活性型 Caspase-3 の発現が徐々に低下していく傾向がみられた。Zero 培地、 Δ His 培地では、培養 12 時間、24 時間後も、

Cleaved Caspase-3 の発現がみられた。これに対し、Full 培地では、極めて低い発現量を示した (図 4)。

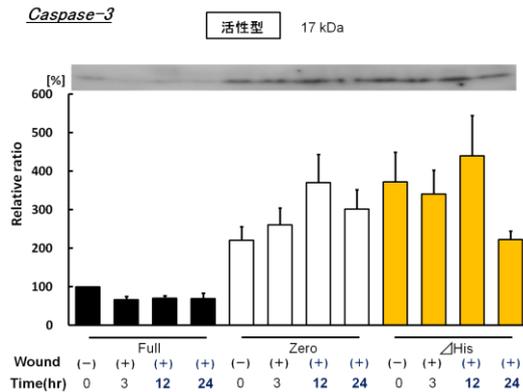


図 4 活性型 Caspase-3 の発現量

細胞の増殖期に発現される PCNA は、36 kDa の位置にすべてのサンプルにバンドが検出された。三群間とも、経時的に、発現は低下していた。培養 24 時間後では、Full 培地に対し、Zero 培地と Δ His 培地での発現はそれぞれ 60%、40%抑制されていた。細胞増殖活性をもたらす PDGFR- β は、180kDa の位置にすべてのサンプルにバンドが検出された。三群間とも、経時的に、PDGFR- β の発現は低下していた。すでに、前培養の時点で、Full 培地に対し、Zero 培地と Δ His 培地での発現はそれぞれ 60%、40%抑制されており、培養 24 時間後は、Zero 培地と Δ His 培地の PDGFR- β 発現量は、低値を示した (図 5)。

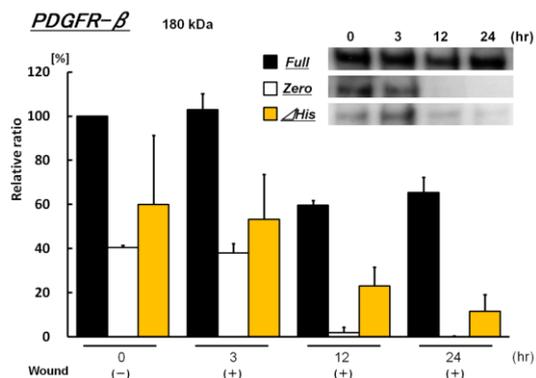


図 5 PDGFR- β の発現量

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 2 件)

- ① 市川寛, 南山幸子, 若原綾子 他. (査読有). フット小腸粘膜上皮の創傷修復機序におけるヒスチジンの機能性について. アミノ酸研究 4 (2010), 175-177.

- ② 高木智久, 内藤裕二, 市川寛 他. (査読無). 小腸上皮損傷治癒における各種アミノ酸の役割. THE GI FOREFRONT 6.(2011). 186.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Ichikawa H. The histidine affects delayed wound healing induced by indomethacin using cultured rat epithelial cells. International Free Radical Winter School in Muikamachi 2013. 2013年03月10日, Niigata.
- ② 太田彩香. 小腸粘膜上皮修復におけるヒスチジンの重要性. 日本栄養食糧学会近畿支部大会. 2012年10月20日, 兵庫県.
- ③ 市川 寛. インドメタシンによるラット小腸粘膜上皮創傷治癒遅延に及ぼすヒスチジンの影響. 第65回日本栄養・食糧学会大会. 2011年5月14日. お茶の水女子大学 (東京).
- ④ 市川 寛. 粘膜上皮修復機序におけるヒスチジンの機能性. 第32回日本炎症・再生医学会. 2011年6月2日. 京都国際会館 (京都).
- ⑤ Ichikawa H. The role of histidine on wound healing using cultured rat intestinal epithelial cells. IVth International Symposium Nutrition, Oxygen Biology, and Medicine. (第4回栄養と酸素医生物学シンポジウム). 2011年6月15日. CAMPUS DES CORDELIERS (フランス).
- ⑥ 市川 寛. 小腸粘膜上皮修復機序におけるヒスチジンの機能性. 日本外科代謝栄養学会第48回学術集会. 2011年7月8日. 名古屋国際会議場 (名古屋).
- ⑦ Matsuo S. The histidine affects delayed wound healing induced by indomethacin using cultured rat epithelial cells. 5th SFRR-Asia/8th ASMRM/11th J-mit 2011. (第5回国際フリーラジカル学会および第8回アジアミトコンドリア研究医学会). 2011年8月31日. 鹿児島市民文化ホール (鹿児島).
- ⑧ Ichikawa H. The role of histidine on wound healing using cultured rat intestinal epithelial cells. 2011 International Conference on Food Factors. (国際フードファクター学会). 2011年11月20日. Taipei international Convention Center 台北国際会議場 (台湾).
- ⑨ 市川 寛. ラット小腸粘膜上皮の創傷修復機序におけるヒスチジンの機能性について. 第64回日本栄養・食糧学会大会. 2010年5月21日. アスティとくしま (徳島).

- ⑩ 市川 寛. ラット小腸粘膜上皮の創傷修復機序におけるヒスチジンの機能性について. 第10回日本抗加齢医学会総会. 2010年6月11日. 京都国際会館 (京都).
- ⑪ 市川 寛. ラット小腸粘膜上皮の創傷修復機序におけるヒスチジンの機能性について. 日本アミノ酸学会第4回学術大会. 2010年9月16日. ホテルサンシャイン鬼怒川 (栃木).
- ⑫ Ichikawa H. The role of histidine on wound healing. The 5th International Niigata Symposium on Diet and Health (食と健康に関する新潟国際シンポジウム). 2010年10月30日. 朱鷺メッセ (新潟).
- ⑬ Ichikawa H. Influence of histidine on the wound restoration mechanism of the rat intestinal epithelial cells. International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine (フリーラジカル研究に関する国際シンポジウム). 2011年1月20日. 京都センチュリーホテル (京都).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 寛 (ICHIKAWA HIROSHI)
同志社大学・生命医学研究科・教授
研究者番号: 60336732

(2) 研究分担者

南山 幸子 (MINAMIYAMA YUKIKO)
京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 00362989