

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00816

研究課題名(和文) ビタミンEの新規創傷治癒促進機能とその分子機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on molecular mechanisms underlying the promotion of wound repair by vitamin E

研究代表者

松浦 達也 (Matsura, Tatsuya)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00199746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビタミンEの抗酸化作用によらない創傷治癒促進効果の可能性を探るために、上皮細胞の創傷治癒モデルを用いてその分子機構を検討した。ビタミンE同族体はいずれも創傷治癒を促進した。治癒過程における細胞の極性化を検討した結果、ビタミンEは極性制御分子aPKC, Par3の傷に面した細胞膜への局在化の亢進とaPKC-Par3複合体量の増加を誘導した。さらに、ビタミンEは細胞の極性化に伴ってaPKCの上流でPI3Kシグナルの活性化を誘導することが明らかとなった。

以上の結果から、ビタミンEはPI3K/aPKCシグナル伝達経路を介して細胞の極性化を促進し、創傷治癒を早めることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined whether vitamin E affects wound-mediated HaCaT keratinocyte polarization process including the recruitment of Par3 and aPKC, leading to wound repair independently of its antioxidant activity. Functional assays showed that vitamin E but not other antioxidants enhanced wound closure as well as cell polarization, and regulated the localization and complex formation of Par3 and aPKC in HaCaT cells after wounding. Knockdown of aPKC or Par3 abrogated vitamin E-mediated promotion of the wound closure and cell polarization in HaCaT cells. We also found that aPKC kinase activity was significantly increased in vitamin E-treated cells through activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway. Our study has demonstrated that vitamin E promotes the cell polarization and migration in human keratinocytes HaCaT cells after wounding via PI3K/aPKC signaling cascade, resulting in acceleration of wound repair.

研究分野：生化学、医科栄養学、酸化ストレス学

キーワード：ビタミンE 創傷治癒 細胞極性 非抗酸化作用 PI3キナーゼ aPKC Par3

1. 研究開始当初の背景

わが国は高齢化社会をむかえ、寝たきりの高齢者数が急増している。現在これらの患者に対する在宅医療において、いかに褥瘡(床ずれ)を管理するかが重要な課題となっている。近年、外傷患者にビタミンE、ビタミンC、β-カロテンなどの抗酸化栄養成分を含むサプリメントを処方した場合、創傷治癒時間が短縮されることが報告された(Clin Nutr 31:469-475, 2012)。ビタミンE単独摂取が創傷治癒に及ぼす影響を調べた疫学研究は今のところ行われていないが、高濃度のα-トコフェロール(α-Toc)が主に抗酸化作用によって培養骨格筋細胞形質膜の傷修復をもたらすことが明らかにされた(Nat Commun DOI: 10.1038/ncomms1594, 2011)。しかしながら、ビタミンEと創傷治癒に関する文献のレビューの結果、ビタミンEの創傷治癒に及ぼす影響を確立するためには信頼できる研究が不足していることが明らかになった(Int Wound J 13:331-335, 2016)。

近年、ビタミンEの抗酸化作用によらない生理作用が注目されている。以前の研究で、ビタミンE同族体のトコリエノール(T3)が低濃度で抗酸化能とは独立した神経保護効果を示すことを報告している(Biochim Biophys Acta 1842:1303-1312, 2014)、本研究では、低濃度ビタミンEの創傷治癒に対する効果について、創傷治癒に重要な役割を果たす細胞の極性化への影響を中心に検討した。

2. 研究の目的

本研究は、培養ヒトケラチノサイト(HaCaT細胞)を用いて、ビタミンE同族体(Toc及びT3)の抗酸化作用によらない新規創傷治癒促進効果とその分子機構を解明することを目的とする。上述したように高濃度ビタミンEの抗酸化能に基づいた創傷治癒促進効果は報告されているが、低濃度ビタミンEによる非抗酸化作用による創傷治癒促進効果に関しては、これまで検討されていなかった。本研究では、まずビタミンE同族体(Toc及びT3)間で創傷治癒促進効果に差が見られるかを検討する。また、これらの作用が抗酸化作用と関係なく起こるかどうかも確認する。創傷治癒においては、細胞の極性化(傷面を埋めるための細胞移動の制御及び、傷面の細胞同士の接着後に起こるタイトジャンクションの形成)が重要である。傷修復過程で細胞極性の制御分子であるaPKC(atypical protein kinase C)、Par3(partitioning defective-3)、Par6からなる複合体(aPKC-Par複合体)が傷面の細胞膜に局在することが知られているので、ビタミンE処理後のaPKC、Par3の傷面細胞膜への局在化を検討する。さらに、これら細胞極性制御分子の活性化のシグナル伝達経路とビタミンEの作用点についても検討する。

本研究により、ビタミンEの新規創傷治癒促進作用の分子機構が解明されれば、褥瘡管

理の改善はもちろん、食品成分に限らず、より効果的な化学物質を合成することができ、新規の創薬につながる可能性も含めて、本研究の成果は社会的に貢献できるものと考えられる。

3. 研究の方法

HaCaT細胞を用いてWound healing assayを行いビタミンE同族体の傷修復に対する作用を検討した。また、MTT assayとBrdUの細胞への取り込みを用いて細胞増殖に対する影響も調べた。傷修復の初期には細胞移動における極性化が起こり、傷面に向かって核、ゴルジ体が配置されることが知られている。傷面に向かって120度角に配置されるゴルジ体数を評価することにより極性化の程度を調べ、ビタミンEの作用を検討した。aPKC及びPar3の細胞内局在について免疫組織学的及び生化学的手法(膜分画及びウエスタンブロッティング)を用いて検討した。aPKCとPar3がビタミンEの創傷治癒促進作用に関与することを確認するために、aPKC阻害剤処理とaPKC、Par3のノックダウンを施行した。さらに上流シグナルの探索のためPI3キナーゼ(PI3K)の活性化及びPI3K阻害剤の効果も調べた。

4. 研究成果

α-TocとT3は共にHaCaT細胞の傷修復を促進したが、その効果はT3の方がより大きかった(図1)。また、傷修復時に起こる細胞

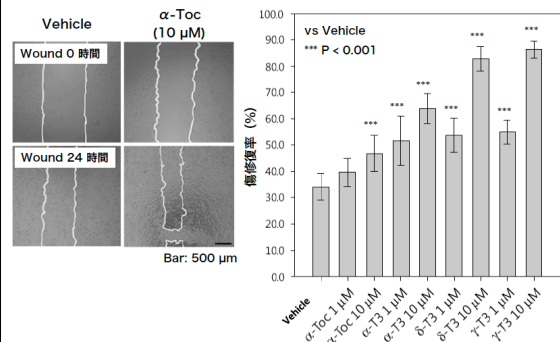


図1. ビタミンEによる創傷治癒促進効果

の極性化においても同様の促進効果が確認された(図2)。一方、ビタミンEは細胞増殖

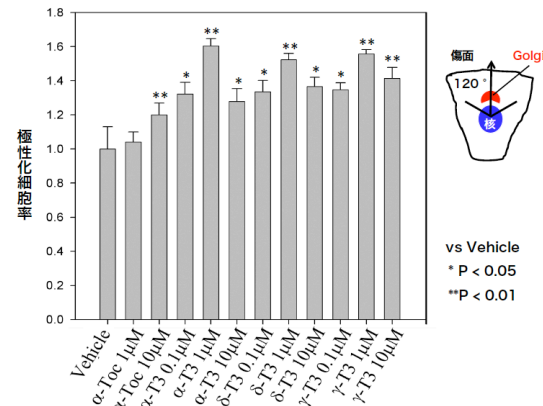


図2. ビタミンEによる創傷治癒過程における細胞の極性化促進効果には影響を及ぼさなかった。他の抗酸化物質であるTrolox、ビタミンC、N-acetylcysteineは、傷修復率と極性化を共に促進し

なかったことから、抗酸化作用がこの過程に影響を与えていないと考えられた。ビタミンEは極性制御分子 aPKC、Par3 の傷に面した細胞膜への局在化を促進することも明らかとなった (図3、4)。

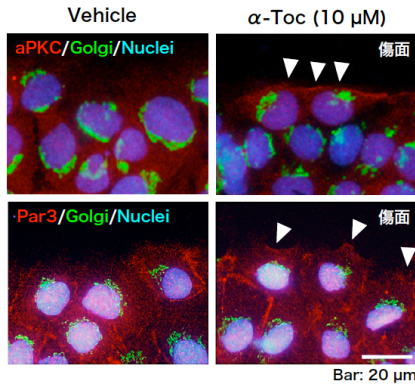


図3. ビタミンEは傷修復過程におけるaPKC、Par3の傷面細胞膜への局在化を促進した

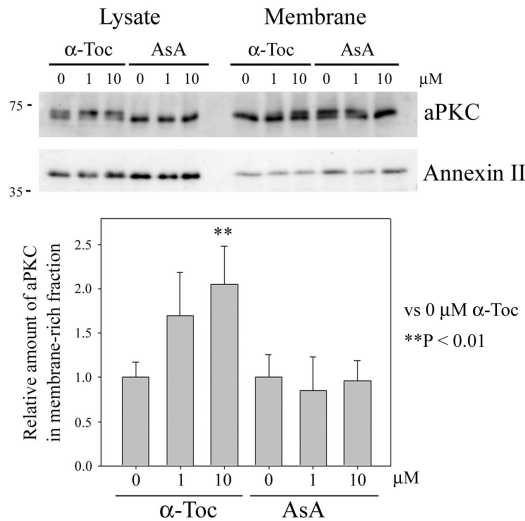


図4. ビタミンEは傷修復過程におけるaPKCの細胞膜への局在化を促進した

免疫沈降の実験でビタミンEはaPKC-Par3複合体量の増加を誘導することが明らかになった。aPKC阻害剤(ζ-PS)処理(図5)とaPKC、Par3のノックダウン(図6)は、いずれもビタミンEによる傷修復率と細胞の極性化促進作用を有意に阻害した。この結果より、aPKC、Par3がビタミンEの創傷治癒促進作用に重要な役割を果たしていることが確認された。

次に、aPKC、Par3の細胞形質膜へのリクルートの上流シグナルを探索する目的で、aPKCのリン酸化に関わることが知られているPI3Kシグナルに対するビタミンEの作用について検討した。Aktのリン酸化を指標としてPI3Kの活性化を調べた結果、ビタミンEは細胞の極性化に伴ってPI3Kシグナルの活性化を誘導することが明らかになった。またその作用はT3の方がα-Tocよりも強かった。PI3K阻害剤(Ly)処理によりビタミンEによる細胞の極性化及び創傷治癒促進作用は抑制された(図5)。

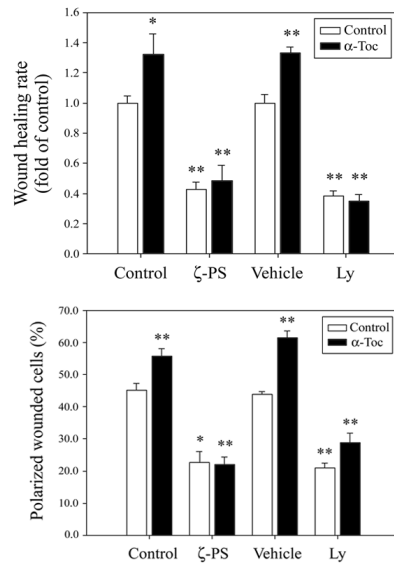


図5. ビタミンEはPI3Kシグナル経路を介してaPKCを活性化し、傷修復と細胞の極性化を促進する (BioFactors DOI:10.1002/biof.1414)

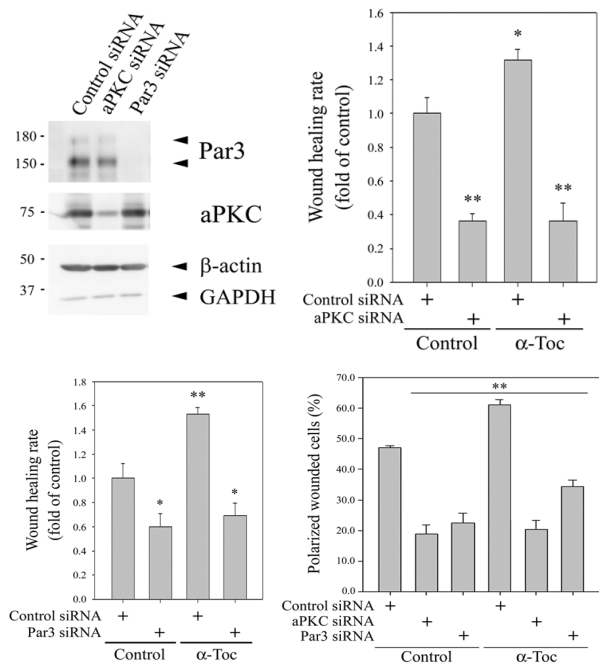


図6. aPKCとPar3のノックダウンビタミンEの創傷治癒促進効果を阻害する (BioFactors DOI:10.1002/biof.1414)

T3がα-Tocよりも強い創傷治癒促進効果を発揮することに関しては、PI3K/aPKCシグナルの上流で、T3がエストロゲン受容体と相互作用する可能性も含めて現在検討中である。

以上の結果より、ビタミンEはPI3K/aPKCシグナルの活性化を伴った細胞の極性化を誘導し、創傷治癒を促進する可能性が示唆された。

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10件)

- 堀越洋輔, 倉敷達之, 松浦達也, コエンザイムQ10による脂肪組織の代謝制御を

- 介した抗肥満・抗糖尿病効果. ビタミン. 査読有, vol. 92, 2018, 印刷中.
- ② Horikoshi Y, Kamizaki K, Hanaki T, Morimoto M, Kitagawa Y, Nakaso K, Kusumoto C and Matsura T. α -Tocopherol promotes HaCaT keratinocyte wound repair through the regulation of polarity proteins leading to the polarized cell migration. *BioFactors*. 査読有, vol. 44, 2018, 180-191. DOI:10.1002/biof.1414.
- ③ Ohta Y, Yashiro K, Ohashi K, Horikoshi Y, Kusumoto C and Matsura T. Compound 48/80, a mast cell degranulator, causes oxidative damage by enhancing vitamin C synthesis via reduced glutathione depletion and lipid peroxidation through neutrophil infiltration in rat livers. *J Clin Biochem Nutr*. 査読有, vol. 60, 2017, 187-198. DOI:10.3164/jcfn.16-89.
- ④ 松浦達也. 代謝変化に伴う CoQH₂/CoQ 比の増加はミトコンドリア電子伝達系におけるスーパーコンプレックスの再構築を促進する. *ビタミン*. 査読有, vol. 91, 2017, 441-444.
- ⑤ Nakasone M, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Kitagawa Y, Takahashi T, Inagaki Y and Matsura T. Preconditioning by low dose LPS prevents subsequent LPS-induced severe liver injury via Nrf2 activation in mice. *Yonago Acta Med*. 査読有, vol. 59, 2016, 223-231.
- ⑥ Takahashi T, Nakaso K, Horikoshi Y, Hanaki T, Yamakawa M, Nakasone M, Kitagawa Y, Koike T and Matsura T. Rice bran dietary supplementation improves neurological symptoms and loss of Purkinje cells in vitamin E-deficient mice. *Yonago Acta Med*. 査読有, vol. 59, 2016, 188-195.
- ⑦ Hanaki T, Horikoshi Y, Nakaso K, Nakasone M, Kitagawa Y, Amisaki M, Arai Y, Tokuyasu N, Sakamoto T, Honjo S, Saito H, Ikeguchi M, Yamashita K, Ohno S and Matsura T. Nicotine enhances the malignant potential of human pancreatic cancer cells via activation of atypical protein kinase C. *Biochim Biophys Acta*. 査読有, vol. 1860, 2016, 2404-2415. DOI:10.1016/j.bbagen.2016.07.008.
- ⑧ Nakaso K, Horikoshi Y, Takahashi T, Hanaki T, Nakasone M, Kitagawa Y, Koike T and Matsura T. Estrogen receptor-mediated effect of δ -tocotrienol prevents neurotoxicity and motor deficit in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 査読有, vol. 610, 2016, 117-122. DOI:10.1016/j.neulet.2015.10.062.
- ⑨ Ohta Y, Yashiro K, Ohashi K, Horikoshi Y, Kusumoto C, Matsura T and Fukuzawa K. Effect of dietary vitamin E supplementation on liver oxidative damage in rats with water-immersion restraint stress. *J Nutr Sci Vitaminol*. 査読有, vol. 61, 2015, 113-122. DOI:10.3177/jnsv.61.113.
- ⑩ Horikoshi Y, Kitatani K, Tiriumi K, Fukunishi N, Itoh Y, Nakamura N, Ohno S, Matsura T and Takekoshi S. Aberrant activation of atypical protein kinase C in carbon tetrachloride-induced oxidative stress provokes a disturbance of cell polarity and sealing of bile canaliculus lumen. *Am J Pathol*. 査読有, vol. 185, 2015, 958-968. DOI:10.1016/j.ajpath.2014.
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 中曽一裕, 松浦達也. ワークショップ: 古くて新しい脂溶性ビタミンの科学 抗酸化能だけではないビタミン E の効果～トコトリエノールのシグナル伝達を介した細胞保護機序～. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年 12 月, 神戸市, 神戸ポートアイランド.
- ② 松浦達也. トコトリエノールの非抗酸化作用によるパーキンソン病モデル細胞保護効果. 第 39 回日本臨床栄養学会総会, 第 38 回日本臨床栄養協会総会 第 15 回大連合大会, 2017 年 10 月, 千葉市, 幕張メッセ国際会議場.
- ③ 堀越洋輔, 中曽一裕, 北川良憲, 持田晋輔, 松浦達也. 創傷治癒促進効果に関与するトコトリエノールの分子構造とシグナル経路の検討. 第 28 回ビタミン E 研究会, 2017 年 1 月, 東京, 東洋大学白山キャンパス.
- ④ 中曽一裕, 堀越洋輔, 松浦達也. パーキンソン病モデル細胞・動物に対するビタミン E 同族体 δ -トコトリエノールの効果. 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月, 仙台市, 仙台国際センター.
- ⑤ 中曽一裕, 高橋 徹, 堀越洋輔, 花木武彦, 北川良憲, 仲宗根正人, 松浦達也. xCT 遺伝子欠失はビタミン E 欠乏性運動障害を増悪させる. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2016 年 8 月, 仙台市, 仙台国際センター.
- ⑥ 松浦達也. ビタミン E の非抗酸化作用による新規生理活性. 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会第 24 回年会 (招待講演), 2016 年 8 月, 仙台市, 東北大学片平キャンパスさくらホール.
- ⑦ 堀越洋輔, 中曽一裕, 花木武彦, 仲宗根正人, 北川良憲, 持田晋輔, 松浦達也.

創傷治癒促進効果に関わるトコトリエノールの分子構造の検討. 日本ビタミン学会第 68 回大会, 2016 年 6 月, 富山市, 富山国際会議場.

- ⑧ 堀越洋輔, 中曾一裕, 花木武彦, 仲宗根正人, 北川良憲, 持田晋輔, 松浦達也. ビタミン E による極性制御因子の機能制御を介した創傷治癒促進効果. 第 57 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2016 年 5 月, 南国市, 高知大学岡豊キャンパス.
- ⑨ 松浦達也. エネルギー産生におけるコエンザイム Q10 の役割. 日本コエンザイム Q 協会第 13 回研究会 (招待講演), 2016 年 2 月, 八王子市, 東京工科大学片柳研究所棟.
- ⑩ 松浦達也. ビタミン E の非抗酸化作用による細胞障害保護および創傷治癒促進効果. 第 27 回ビタミン E 研究会 (招待講演), 2016 年 1 月, 高松市, あなぶきホール.
- ⑪ 高橋 徹, 中曾一裕, 堀越洋輔, 花木武彦, 小池泰介, 松浦達也. 米糠成分による神経系保護効果およびマウス運動機能・短期記憶への効果. 第 27 回ビタミン E 研究会, 2016 年 1 月, 高松市, あなぶきホール.
- ⑫ 松浦達也. ビタミン E とコエンザイム Q10 の新規生理活性と臨床応用. 平成 27 年度日本ビタミン学会市民公開講座 (招待講演), 2015 年 10 月, 福岡市, 福大メディカルホール.
- ⑬ 堀越洋輔, 花木武彦, 中曾一裕, 竹腰 進, 松浦達也. 酸化ストレス誘導性肝障害における極性変化とビタミン E による保護効果. 第 18 回 Vitamin E Update Forum, 2015 年 8 月, 東京, 如水会館.
- ⑭ 堀越洋輔, 中曾一裕, 花木武彦, 池口正英, 仲宗根正人, 持田晋輔, 松浦達也. 酸化ストレスによる極性異常とビタミン E による極性保護効果の検討. 日本ビタミン学会第 67 回大会, 2015 年 6 月, 奈良市, 奈良県新公会堂.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 松浦達也 他, 丸善プラネット, コエンザイム Q10 の基礎と応用, 2015, 11-24.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 達也 (MATSURA TATSUYA)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号 : 00199746

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

堀越 洋輔 (HORIKOSHI YOSUKE)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号 : 60448678

(4) 研究協力者

()