

令和元年6月21日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08006

研究課題名(和文)皮膚における抗炎症作用に着目したダチョウ脂質中の新規機能性分子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel functional of ostrich oil focusing on anti-inflammatory activity through skin

研究代表者

河原 岳志 (Kawahara, Takeshi)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：30345764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚保護作用に知られるダチョウ油を作用させたヒト皮膚角化細胞に対して網羅的遺伝子解析を行い、Toll様受容体(TLR)10の発現誘導作用を明らかにした。発現誘導に関わる分子がトリグリセリドであることや、その構成脂肪酸の遊離型であることを明らかにした。今年度は、遊離脂肪酸の皮膚角化細胞におけるTLR2リガンド誘導型の炎症性応答に対する抑制作用について検討を行った。
また脂肪酸受容体として知られるPPARならびにGPRのTLR10誘導機構への関与を明らかにするため、市販アゴニスト、アンタゴニストを用いた検討を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚に油脂を塗ることで治癒効果を得る行為に対して、皮膚角化細胞をモデルとした網羅的遺伝子解析により科学的な観点から解明を試みた。明らかになったトリグリセリドおよび遊離脂肪酸によるToll様受容体10(TLR10)誘導作用は、脂肪酸組成のヒトへの類似性をもとにしたこれまでの仮説とは全く異なる観点からのアプローチであり、オーファン受容体でありながら抗炎症作用に関与しているとされるTLR10の働きという面から興味深い現象であり、学術的意義が高いと考えている。またこの知見をもとに、より効果的な塗布行為への応用が考えられるため、社会的な意義も大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive gene analysis was performed in human skin keratinocytes treated with ostrich oil, which is known to have a skin protective effect. Through this study, the inducing action of Toll-like receptor (TLR) 10 by triglyceride and free fatty acids was clarified. This year, the suppressive effect of free fatty acids on TLR2 ligand-induced inflammatory response in skin keratinocytes was investigated. Moreover, the involvement of PPARs and GPRs on the TLR10 induction was evaluated using commercially available agonists and antagonists of these receptors.

研究分野：畜産物利用

キーワード：皮膚角化細胞 Toll様受容体10 Toll様受容体2 遊離脂肪酸 抗炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ダチョウ (*Struthio camelus*) は、一般的な空を飛ぶ能力をもった鳥類とは独立した進化を遂げた地上性の大型鳥類である。代表的な家禽でもあり、その肉や卵は世界各地で食料として利用されている。地上で生活するというリスクに対抗するためか、ダチョウは傷を負った際の回復が非常に早いことが知られ、経験的にその油はヒトの皮膚における傷や炎症に対しても優れた治癒効果を示すことで知られている。

ダチョウ油の機能性の根拠としては、脂肪酸分析結果を基にしたパルミトレイン酸の存在が挙げられている。しかしながらパルミトレイン酸はヒトにとって必須脂肪酸ではない上に、動植物の多くの食材にも普遍的に存在する脂肪酸である。またこの脂肪酸に他の遊離脂肪酸と明確に差別化できる皮膚での抗炎症作用が知られているわけではないため、素材のもつ特別な治癒効果を客観的に説明するための根拠としては疑問が残る。

以上の背景から、ダチョウ脂質の機能性について、皮膚角化細胞の応答性を指標にした多角的検証を試みる研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ダチョウ油の皮膚治癒効果の鍵を握る活性成分が現在提唱されている脂肪酸の他に存在するという仮説のもと、それをこれまで目を向けられていなかった皮膚角化細胞への作用から証明を試みる点にあり、皮膚角化細胞を「ケモカイン産生細胞である皮膚炎症の起点」とする視点で研究の対象とし、「皮膚の傷からの感染による角化細胞からのケモカイン産生の抑制 炎症の場の形成抑制 皮膚修復の早期正常化」という流れからなる新たな治癒効果の提案をすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ダチョウ肉からの脂質 (親油性成分) の調製

市販ダチョウ肉の油身部分をホモジナイズし、クロロホルム-メタノールを用いる Bligh-Dyer 法により脂溶性成分を抽出した。得られた抽出物から溶媒を除去したものをサンプルとして用いる。得られた脂溶性成分の細胞培養系への添加は、従来法であるウシ血清アルブミンによる可溶化法のほかシクロデキストリン (CD) を用いた可溶化法により行った。

(2) ヒト角化細胞モデル系による炎症性応答に対する効果の検討

ヒト角化細胞株 HaCaT ならびに成人正常皮膚角化細胞 (HEKa) を角化細胞のモデルとして用い、TNF- α による炎症応答の誘導の際に細胞に起こる変化をマイクロアレイ解析により評価した。統計上有意な変化がみられた遺伝子については定量 PCR 法により確認を行った。

(3) 活性成分の解明

活性が強くみられた CD による可溶化物から徐放される成分を対象に、液相分配や固相抽出法などの分画による活性成分の特性付けを行った。標品が入手可能な成分については、それら標品を用いた各 CD や BSA による可溶化を行った後、細胞培養系への添加により活性に及ぼす影響を評価し、活性成分の解明を行った。

(4) 活性発現に関わる分子機構の解明

ダチョウ脂質による活性発現の発現機構を解明するため、多くの脂質の受容体として機能することで知られるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR γ) G タンパク質共役受容体 (GPR) を対象に、それらのアゴニスト、アンタゴニストを用いて対象分子の発現に及ぼす影響を評価することで活性化機構の解明を試みた。

4. 研究成果

市販ダチョウ肉より得られた脂質画分を用いて、TNF- α による炎症誘導時の遺伝子発現を対象としたマイクロアレイ解析を行い、ダチョウ脂質無添加条件と比較して発現量が 1.5 倍以上抑制あるいは促進された遺伝子を選出したところ、皮膚の物理的バリア関連因子の上昇作用はみられなかったものの、TLR10 や Unc93 homolog B1 (Unc93B1) の有意な発現上昇がみられた。以上の結果と定量 PCR 解析での再現性をもとに、抗炎症性受容体としての作用報告のある TLR10 の発現に焦点を置き、その発現に及ぼすダチョウ脂質の影響について以後の解析を行った。

BSA および各シクロデキストリンにより可溶化した脂質をサンプルとし、活性成分の特性付けを行ったところ、TLR10 の遺伝子発現は TNF- α 単独刺激に対して、BSA により可溶化した脂質、 β -シクロデキストリンおよび γ -シクロデキストリンにより可溶化した脂質を添加した細胞で有意的に促進された。さらには正常ヒト角化細胞である HEKa 細胞での培養系においても再現され、この現象が HaCaT 細胞のがん細胞としての特性に依存した現象ではなく、皮膚角化細胞を介した応答であることが明らかとなった。

以上の結果から、ダチョウ脂質中の脂肪酸割合で上位を占めるオレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、パルミトレイン酸、リノール酸を有力候補として選出し、それらのトリグリセリドならびに遊離脂肪酸の市販品を用いて、TLR10 発現に及ぼす効果について検討を行った結果、HEKa 細胞における TLR10 発現量は、今回検討を行った全ての遊離脂肪酸とトリグリセリド

の添加により、BSAのみを添加したコントロールと比較して有意に増加することが確認された。また遊離型とトリグリセリド型の活性比較では、全体的に遊離脂肪酸の方がTLR10を強く誘導する傾向がみられた。脂肪酸の種類による比較においては、脂肪酸の飽和度とTLR10発現量に相関がみられ、飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸で顕著なTLR10発現の誘導がみられた。しかしながら、TLR2とホモダイマーを形成するTLR1、TLR6の発現量についても確認を行ったところ、遊離型の飽和脂肪酸に顕著なTLR1の発現誘導作用があることが明らかとなった。以上の結果から、ダチョウ脂質での含量が多いことで知られる一価不飽和脂肪酸のパルミトレイン酸は、TLR2との二量体形成のうえで競合するTLR1を誘導せず、TLR10のみを強く誘導し抗炎症作用を發揮する可能性が示された。

TLR10誘導に基づく抗炎症作用について確認を行うため、HEKaの培養系にTLR10発現増強作用のみられたトリグリセリドならびに脂肪酸を添加培養し、その後市販TLR2リガンドであるPam2CSK4、Pam3CSK4、FSL-1により炎症応答の誘導を行った結果、トリグリセリドでは脂肪酸の種類にかかわらずTLR2リガンド誘導性のIL-8産生を抑制する作用はみられなかったが、遊離脂肪酸では3種のリガンド全てに対して有意な抑制作用が観察された。3種のリガンドの中では特にTLR1/TLR2リガンドであるPam3CSK4誘導性の炎症に対して効果が認められ、作用の強さでは一価不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸でもっとも顕著であった。以上のことから遊離型となった脂肪酸の一部がダチョウ油の抗炎症に大きく寄与している可能性が示唆された。

さらに遊離脂肪酸によるTLR10誘導に関わる受容体を解明するため、脂質受容体として知られるPPAR α 、PPAR β 、PPAR γ ならびにGPR40およびGPR120を候補に検討を試みた結果、アゴニストによる試験では、検討を行った全てにおいて有意で濃度依存的なTLR10の誘導が確認された。一方で、遊離脂肪酸によるTLR10の誘導は、いずれのアнтаゴニスト存在下でも阻害作用を受けなかった。以上の結果から、脂質受容体として知られるこれらの受容体が単独でTLR10誘導に関与しているのではなく、総合的な作用として誘導が起こっている可能性が高いと考えられる。

TLR10が抑制する対象分子であるTLR2は、TLR1やTLR6と共に細菌や酵母の菌体成分をリガンドとするパターン認識受容体であるが、皮膚はその抗原の由来する原因微生物（アクネ菌、黄色ブドウ球菌など）に常に晒されており、皮膚の恒常性維持の面からその炎症性応答を制御することは重要な意味がある。実際、皮膚角化細胞TLR2を介した炎症性応答の亢進は皮膚本来の修復作用を妨げ、皮膚炎の悪性化・慢性化に関与している。このことから、本研究で明らかとなったダチョウ脂質成分によるTLR10誘導作用は皮膚における多くの炎症病態に対する治療効果の一端として機能している可能性がある。今後、さらなるアプローチによる作用機序の解明が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) DOI: 10.1264/j sme2.ME19003.

著者: Sandagdorj B., Hamajima C., Kawahara T., Watanabe J., Tanaka S.

論文表題: Changes in microbiota that influence the immunomodulatory effects of fermented *Brassica rapa* L.

雑誌名: Microbes and Environments, 2019

査読: 有

(2) DOI: 10.3920/BM2017.0162

著者: Kawahara T., Hanzawa, N., Sugiyama, M.

論文表題: Effect of *Lactobacillus* strains on thymus and activation-regulated chemokine expression in keratinocytes and the development of atopic dermatitis-like symptoms

雑誌名: Beneficial Microbes, 9(4), 2018, 643-652

査読: 有

(3) DOI: 10.1186/s12906-017-1606-6

著者: Kawahara T., Tsutsui, K., Nakanishi, E., Inoue, T., Hamazu, Y.

論文表題: Effect of the topical application of an ethanol extract of quince seeds on the development of atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice

雑誌名: BMC Complementary and Alternative Medicine, 2017, 80(17)

査読: 有

〔学会発表〕(計9件)

(1) 発表者名: 河原 岳志、谷岡 美季

発表表題: ダチョウ脂質構成脂肪酸のヒト皮膚角化細胞における抗炎症作用の解析

学会等名: 日本畜産学会 2019年度大会

(2) 発表者名: 田中 佑季、志水 一誓、友清 帝、渡邊 樹、飛田 啓輔、河原 岳志

発表表題: *Lactobacillus crispatus* KT-11株 S-layer タンパク質の口タウウイルス感染抑制機

構の解析

学会等名：日本酪農科学会 2018 年度シンポジウム

(3) 発表者名： Kawahara, T.

発表表題： Expression of livestock product functionality mediated by skin keratinocytes

学会等名： International Symposium on Animal Science & Technology 2018 (招待講演)

(4) 発表者名： 河原 岳志、加藤 保貴

発表表題： Toll 様受容体 10 誘導作用をもつダチヨウ脂質成分の解析

学会等名：日本畜産学会 2017 年度大会

(5) 発表者名：志水 一誓、友清 帝、渡邊 樹、飛田 啓輔、河原 岳志

発表表題： *Lactobacillus crispatus* KT-11 株 S-layer タンパク質によるロタウイルス感染抑制機構の解析

学会等名：日本畜産学会 2017 年度大会

(6) 発表者名：志水 一誓、河原 岳志、友清 帝、渡邊 樹、飛田 啓輔

発表表題： *Lactobacillus crispatus* KT-11 株抽出物のロタウイルス下痢症抑制効果

学会等名：日本畜産学会 2017 年度大会

(7) 発表者名： 河原 岳志、田口 丈

発表表題： ダチヨウ脂質のヒト皮膚角化細胞遺伝子発現に及ぼす効果

学会等名：日本畜産学会 2016 年度大会

(8) 発表者名： 河原 岳志、杉山 京、伊藤 綾花、田口 丈

発表表題： *Lactobacillus* 属乳酸菌の塗布によるアトピー性皮膚炎改善効果

学会等名：日本酪農科学会 2016 年度シンポジウム

(9) 発表者名：井ノ上 利文、河原 岳志、瀧渦 康範

発表表題： マルメロ種子エタノール抽出物のアトピー性皮膚炎予防効果

学会等名：日本化粧品学会 2016 年度大会

〔 図書 〕 (計 3 件)

著者： 河原 岳志

表題：皮膚角化細胞由来のケモカイン (TARC) 発現抑制によるアトピー性皮膚炎の軽減

書名等：アレルギーの臨床 2018 年 1 月号、46-50

出版社：北隆館

著者： Kawahara, T. , Hamauzu, Y. , Inoue, T.

表題： Effect of topical application of an extract of quince seeds on the development of atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice

書名等： Fragrance Journal Korea, 6:99-103 2017

出版社：Fragrance Journal Korea

著者： 河原 岳志、瀧渦 康範、井ノ上利文

マルメロ熱水抽出物の塗布による NC/Nga 系マウスにおける皮膚炎抑制効果

書名等：フレグランスジャーナル , 5:58-61 2017

出版社：フレグランスジャーナル社

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 1 件)

名称：新規な抗メタボリックシンドローム作用を有する乳酸菌ならびにそれらを用いて得られる漬物およびその製造方法

発明者：渡辺 純、河合 崇行、富田 理、田中 沙智、河原 岳志

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 第 2019-058984 号

出願年：2019

国内外の別：国内

取得状況 (計 1 件)

名称：抗ウイルス剤
発明者：瀧渦 康範、河原 岳志
権利者：同上
種類：特許
番号：特許 第 6493899 号
取得年：2019
国内外の別：国内

〔その他〕
該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：田口 丈、加藤 保貴、谷岡 美季
ローマ字氏名：Takeru Taguchi, Hotaka Kato, Miki Tanioka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。