

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：21102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10996

研究課題名（和文）生薬「蒲黄」による創傷治癒制御機構の解明及び組織再生の可能性の有無の検証

研究課題名（英文）Regulation of wound healing by the herbal medicine "Cattail Pollen" and its possibility for skin regeneration.

研究代表者

今 淳（Kon, Atsushi）

青森県立保健大学・健康科学部・教授

研究者番号：60271798

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）：蒲黄は皮膚の創傷治癒の民間薬として使用され続けているが、その科学的検証は全く行われていない。本研究では、蒲黄の創傷治癒促進作用の存否の検証と、その分子機構に関して解析した。その結果、蒲黄を真皮線維芽細胞に添加したところ、細胞の遊走能と接着能は促進し、培養レベルで創傷治癒を促進していた。次に創傷治癒を制御する遺伝子/タンパク質の発現を解析した結果、蒲黄は転写レベルで、癒痕の原因となる型コラーゲンの発現は著明に抑制され、逆に癒痕を抑制するデコリンの発現が促進していた。従って、蒲黄は癒痕形成を抑制しながら創傷治癒（再生）を促進している可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の臓器は損傷を受ける癒痕を残して創傷治癒する。癒痕はコラーゲンの過剰沈着による線維化であり、その部の機能は永久に失われる。しかし、癒痕を消失させ、再生させる医薬は存在しない。日本では、蒲黄が皮膚の傷薬として使用され続けているが、その科学的検証は行われていない。本研究によって、蒲黄は癒痕形成を抑制し、皮膚を再生する可能性を見出した。従って、皮膚の再生医薬の初めての開発に貢献できる期待される。

研究成果の概要（英文）：The herbal medicine "Cattail Pollen" continues to be used as a folk medicine for wound healing of the skin, but its scientific verification has not been investigated at all. In this study, we verified the existence or absence of the wound healing promoting effect of Cattail Pollen and analyzed its molecular mechanism. As a result, when extract of Cattail Pollen was added to dermal fibroblasts, the migration and adhesion of the cells were promoted, indicating that Cattail Pollen promote wound healing of the skin at the culture level. Next, we analyzed how the expression of genes/proteins that control wound healing changes mediated by Cattail Pollen. As a result, the expression of type I collagen, which causes scar formation, was markedly suppressed at the transcriptional level, and the expression of decorin, which suppresses scarring formation, was promoted. Therefore, these results suggest that Cattail Pollen may promote skin regeneration without scar formation.

研究分野：皮膚科学

キーワード：蒲黄 創傷治癒 古事記 皮膚 蒲

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓以外の哺乳類の殆どの臓器は、損傷を受けると再生できず、傷跡の瘢痕を残して創傷治癒(修復)する。瘢痕はコラーゲンの異常沈着による線維化であり、機能は不可逆的に失われる。皮膚も同様であり、しかも現時点では、皮膚を再生させる医薬は全く存在しない。

蒲の花粉の乾燥物が生薬の「蒲黄」である。蒲黄の効能に関する記述は日本最古の歴史書である「古事記」にまで遡る。記述によると、皮膚の傷ついた白兔が蒲の花粉を塗ったところ皮膚が元通りに治った(再生)とある。それ以来、蒲黄は直接塗布したり、煎じ薬を内服したりして、今日まで皮膚の創傷治癒の民間薬として使用され続けている。しかし蒲黄の創傷治癒の促進作用や再生能の科学的解析は全く行われていないのが現状であった。

### 2. 研究の目的

創傷治癒は、完全に元通りに治癒する再生と、瘢痕を残して、その部位の機能が低下若しくは喪失して治癒する修復の2種類からなる。上述した背景を踏まえて、本研究では、蒲黄による(1)皮膚の創傷治癒を促進するのか、(2)促進作用に関わる遺伝子の制御機構を明らかにし、(3)蒲黄は修復のみならず再生をも促進できるか否か、以上の点を中心にして解析する。蒲黄が単に皮膚の修復を促進するのみならず、完全に元通りに再生できるのか否か、その可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1)蒲黄による細胞の挙動の変動の解析

水で煎じた蒲黄の遠心上清を抽出物としてマウス真皮線維芽細胞に添加する。そして細胞の遊走能、接着能、増殖能の変動を解析し、創傷治癒促進がいずれに作用によるものなのかを解析する。

#### (2)蒲黄により誘導される遺伝子の網羅的解析

蒲黄の抽出物でマウス真皮線維芽細胞を刺激し、細胞内で発現する全遺伝子の変動をマイクロアレイで網羅的に解析する。蒲黄で新たに発現が誘導される遺伝子の中から皮膚の創傷治癒を促進する遺伝子を同定する。

#### (3)蒲黄による創傷治癒制御機構の解析

蒲黄の抽出物の濃度や反応時間でマウス真皮線維芽細胞を刺激する。(2)で発現の変動が大きい遺伝子及びその翻訳産物のタンパク質の発現変動をリアルタイム PCR 及びウェスタンブロット法で解析する。

の制御機構が転写レベルで行われているかを転写阻害剤による阻害実験で解析する。転写阻害剤アクチノマイシン D でマウス真皮線維芽細胞を予め刺激して転写をストップさせ、次いで蒲黄の抽出物で刺激して、で検出された遺伝子がどの様に発現を変動させるか、リアルタイム PCR で解析する。

の解析で、蒲黄の抽出物が遺伝子の転写を制御している場合には、各遺伝子のプロモーター領域を解析する。各遺伝子のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼベクターを構築し、これをマウス真皮線維芽細胞に導入してルシフェラーゼアッセイ法を行い、蒲黄の応答配列を決定する。そして、応答配列に結合する転写因子をゲルシフトアッセイ法で同定する。

### 4. 研究成果

以下の実験を行う上で、蒲黄の抽出液の細胞毒性について検討した。マウス真皮線維芽細胞最終濃度が0~2%の濃度で蒲黄の抽出液を添加して培養し、各濃度における細胞数を計測した。その結果、0.5%までの濃度では細胞数に有意な差は認めることなく増殖した。しかし0.75%以上の濃度になると細胞数は著明に減少した。以上から、蒲黄の濃度が0.5%以下では細胞増殖に影響が無く、細胞毒性を認めない安全性の高い濃度であることが示された。従って0.5%までの細胞毒性の無い濃度で以下の実験を行った。

最初に蒲黄が皮膚の創傷治癒を促進するか否かを *in vitro* の系で、細胞の増殖能、遊走能、接着能について解析した。細胞の増殖能に関しては、蒲黄の抽出液を最終濃度0.5%になる様にマウス線維芽細胞に添加して培養し、各培養時間での細胞数を測定した。その結果、48時間まで培養しても、蒲黄で刺激した細胞と刺激していないコントロールの細胞の間には細胞数の違いを認めなかった。従って蒲黄には細胞の増殖能を促進する作用を認めなかった。次に蒲黄が細

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

細胞の遊走能を促進するか否かを解析した。マウス線維芽細胞の一部を剥離して人工的に創傷モデルを作製し、次いで蒲黄で細胞を刺激した(Wound healing assay)。その結果、培養後 12 時間では、剥離部に遊走する細胞の細胞数は、蒲黄で刺激した細胞と無刺激のコントロール細胞との間に違いを認めなかった。しかし培養 24 時間では、蒲黄の刺激によって遊走する細胞が有意増加した。以上から、蒲黄には細胞の遊走能を促進させる機能を有していることが明らかになった。最後に、蒲黄が細胞の接着能を促進するか否かを解析した。マウス線維芽細胞を継代培養し、その 30 分後に培養皿に接着している細胞数を計測した。その結果、蒲黄で刺激した場合に接着している細胞数は、コントロール細胞よりも有意に増加していた。従って、蒲黄には細胞の接着能を促進させる機能を有していることが明らかになった。以上から、蒲黄はマウス線維芽細胞の遊走能と接着能を促進することで、創傷治癒を促進することが明らかになった。

皮膚の創傷治癒機構は、他の組織と同様に、炎症期、増殖期、組織の再構築期の順の過程を経て進行する。その際には、サイトカインや止血因子などの液性因子の制御によって、損傷部の止血と炎症反応を生じる。次いで、成長因子などの細胞の増殖や遊走・接着に関わる因子が誘導され、線維芽細胞が損傷部に移動する。線維芽細胞はコラーゲン、ヒアルロン酸、プロテオグリカン等の細胞外マトリックス成分を生合成し、これらが互いに協同し合いながら損傷部組織の再構築が行われ、創傷治癒は完了することになる。そこで、マウス線維芽細胞を蒲黄の抽出液で 48 時間刺激し、発現しているすべての遺伝子の変動をマイクロアレイで網羅的に解析した。

マウス線維芽細胞では 41345 種類の遺伝子が発現していたが、そのうち創傷治癒機構の炎症期に関連するサイトカインや止血因子などの遺伝子の発現変動では、4 種類の遺伝子の発現のみが蒲黄によって変動していた。促進する遺伝子は 3 種類であり、いずれも CXC ケモカイン、CC ケモカインであった。逆に抑制された遺伝子は 1 種類のみであった。促進していた遺伝子は好中球、単球、Tリンパ球及び樹状細胞に作用して、創傷部への遊走を促進して炎症反応を起こし、血管新生も促進する。従って蒲黄は、創傷治癒機構の初期段階である炎症期と、次に続く肉芽形成を行う増殖期に強く作用して可能性が考えられた。

次に、血管新生や細胞の遊走・接着能に関連する遺伝子の発現が蒲黄によりどの様に変動するのかを解析した。その結果、血管新生に関わる遺伝子のうち14種類の発現が促進していた。逆に、15種類の遺伝子は抑制されていた。そのうち発現が促進する遺伝子では、何れも血管新生を促進させる重要な遺伝子であり、細胞の分化、炎症を誘導、血管新生をも促進する遺伝子であった。その他、炎症の症状である血管透過性の亢進、血管拡張及び疼痛の誘発に関与する遺伝子も検出された。

細胞の遊走・接着に関連する遺伝子の発現が蒲黄によって促進するものを検索した。その結果、24 種類の遺伝子の発現が促進していた。特に、FGF やインテグリンファミリーの遺伝子の発現が著明に促進していた。真皮の細胞外マトリックス成分及びその代謝に関わる遺伝子に関しては、促進するものは 3 種類の遺伝子であった。そのうちのデコリンは著明に促進していた。デコリンは創傷治癒の際に形成される組織の線維化を抑制し、瘢痕形成を阻害させる重要な物質である、従って、蒲黄は皮膚の再生を促進できる可能性が見出された。一方、蒲黄により発現の抑制された遺伝子は 33 種類であり、非常に多くの遺伝子が検出された。真皮を構築する主要な細胞外マトリックス成分はコラーゲンであり、その中でも Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型コラーゲンが代表的なものである。今回の解析結果では、Ⅰ型コラーゲンをコードする 2 種類の遺伝子 col1a1 及び col1a2 遺伝子の発現が著明に抑制されていた。Ⅰ型コラーゲンは皮膚の創傷治癒に重要なタンパク質であるが、修復の際に過剰発現し、瘢痕形成を生じさせる。以上から、蒲黄によって Ⅰ型コラーゲン遺伝子の発現は低下し、しかも抗線維化作用を有するデコリン遺伝子の発現が促進したことは、蒲黄には瘢痕形成を阻害し、完全な皮膚再生を生じさせる能力の存在を示していた。

マイクロアレイでの Ⅰ型他コラーゲン遺伝子(col1a1 及び col1a2 遺伝子)及びデコリン遺伝子の発現変動の結果から、蒲黄は皮膚の創傷治癒を促進し、しかも再生をも促進できる可能性が見出された。そこで、各遺伝子がどの様に蒲黄により制御されるのか、その詳細を解析した。最初に、マウス真皮線維芽細胞を蒲黄の抽出液で反応させ、各遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR 法で解析した。col1a1 遺伝子と col1a2 遺伝子の発現は、蒲黄の濃度依存性及び反応時間依存性に発現が抑制されていた。一方、デコリン遺伝子の発現は逆に増加していた。

そこで、発現抑制機構の詳細を明らかにするため、最初に、予め *de novo* のタンパク質阻害剤シクロヘキシミドと反応させた阻害実験を行った。その結果、阻害剤で刺激すると、蒲黄による col1a1 遺伝子及び col1a2 遺伝子の発現抑制は完全に消失していた。デコリン遺伝子に関しても、阻害剤の刺激によって、蒲黄による発現促進は消失した。従って、蒲黄による col1a1 遺伝子、col1a2 遺伝子及びデコリン遺伝子の発現変動には、*de novo* のタンパク質の誘導が必要であることが明らかになった。次に、発現制御が転写レベルで行われているか否かを解析した。そこで最初に、転写阻害剤であるアクチノマイシン D でマウス真皮線維芽細胞細胞を予め刺激し、次いで蒲黄で刺激する阻害実験を行い、各遺伝子の発現がどのように変動するかをリアルタイム

## 【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

PCR法により解析した。その結果、蒲黄による Col1a1 遺伝子及び Col1a2 遺伝子の発現抑制は転写阻害剤の刺激によって消失していた。デコリン遺伝子についても同様に解析したところ、転写阻害剤の刺激によって、発現促進は消失した。従って、蒲黄は型コラーゲン遺伝子とデコリン遺伝子の発現を転写レベルで制御し、その際には *de novo* のタンパク質の誘導が必要であると考えられた。

蒲黄による型コラーゲン遺伝子(Col1a1 及び Col1a2 遺伝子)及びデコリン遺伝子の転写レベルでの制御機構の詳細を更に明らかにするため、プロモーター領域における蒲黄の応答配列の局在を解析した。最初に、Col1a1 の-1020~+116 及び Col1a2 の-1012~+50 のプロモーター領域の組み込まれたルシフェラーゼベクターをマウス線維芽細胞にそれぞれ導入し、更に蒲黄で刺激し、ルシフェラーゼの活性を測定した。その結果、Col1a1 遺伝子及び Col1a2 遺伝子の各ルシフェラーゼ活性は蒲黄により抑制されていなかった。以上から、解析した-1020~+116 及び-1012~+50 の各領域には、蒲黄の応答配列は存在していなかった。更に上流の領域に存在すると予想され、今後の更なる解析が必要と考えられた。

次にデコリン遺伝子についても同様に解析した。デコリン遺伝子の-871~+94 のプロモーター領域を挿入したルシフェラーゼベクターを細胞に導入し、同様に蒲黄で刺激し、ルシフェラーゼの活性の変動を解析した。その結果、ルシフェラーゼの活性は増加し、蒲黄はデコリン遺伝子の転写を促進しており、蒲黄が作用する応答配列は、-871~+94 の領域に存在すると考えられた。応答配列を更に詳細に解析するため、次にプロモーター領域の上流側から順次欠失させた-602~+94、-381~+94、-148~+94 の領域の組み込まれたルシフェラーゼベクターを細胞に導入し、活性の変動を解析した。その結果、-602 まで欠失させると、それ以降は蒲黄によるルシフェラーゼの活性の促進は消失した。従って、デコリン遺伝子における蒲黄の応答配列は-871~-602 の領域に存在することが明らかになった。-871~-602 のプロモーター領域に、どのような転写因子が結合し得るかを、モチーフ解析によって検索した。その結果、プロモーター領域の-826~-815 及び-756~-745 の領域には転写因子の FOXA2 が、-784~-772 には C/EBP が、-720~-713 には MZF1 が、-678~-666 及び-610~-598 には OCT1 が、それぞれ結合できる領域が存在していた。いずれの転写因子も、細胞の発生、増殖や分化、接着や遊走を調節する重要な転写因子である。従って、これらの転写因子が応答配列に結合して、デコリン遺伝子の転写を促進している可能性が考えられた。既に述べたシクロヘキシミドによる阻害実験の結果から、蒲黄は上で述べた何れかの転写因子を新たに生合成し、これが応答配列に誘導されて結合して、デコリン遺伝子の転写を促進する可能性が考えられた。

以上要約すると、本研究では、蒲黄による創傷治癒、特に線維化関連遺伝子の転写制御機構を解明するために、型コラーゲン遺伝子及びデコリン遺伝子の転写制御の存否及び転写制御領域であるプロモーター領域を解析した。その結果、蒲黄は Col1a1 及び Col1a2 の両方の型コラーゲン遺伝子の転写を抑制していることを明らかにした。一方、デコリン遺伝子に関しては、蒲黄は-871~-602 の領域に作用して、転写を促進することが明らかになった。また、この領域には、蒲黄によって新たに転写因子が生合成され、応答配列に誘導される機構の可能性を見出し、FOXA2、C/EBP、MZF1、OCT1 が結合し得る転写因子として見出した。従って、これらの解析結果を考え合わせると、蒲黄による型コラーゲン遺伝子の転写の抑制及びデコリン遺伝子の転写の促進が、損傷部に瘢痕を残さない、組織の完全な再生を遺伝子の転写レベルで制御している可能性が考えられ、古事記での真実性を更に支持する可能性が期待された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Haruka Tatehana, Tomohiro Tochigi, Toshio Norikura, Atsushi Kon, Hiromi Izawa	4. 巻 65
2. 論文標題 Physicochemical characteristics of unripe apple starches	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	6. 最初と最後の頁 478-482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/nskkk.65.478	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Norikura Toshio, Tatehana Haruka, Izawa Harumi, Saito Chotoku, Kon Atsushi	4. 巻 65
2. 論文標題 The Validity of Estimated Dietary Amino Acid and Protein Values via the Amino Acid Composition Table 2015	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 219-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.65.219	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Haruka Tatehana, Emi Saigyo-Tanishita, Mikoto Miura-Okawa, Toshio Norikura, Atsushi Kon, Hiromi Izawa	4. 巻 27
2. 論文標題 Apple juice enhances ascorbic acid absorption and accumulation in ODS rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY RESEARCH	6. 最初と最後の頁 639-646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.27.639	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Yutaro Sasaki, Akiko Kojima-Yuasa, Hinako Tadano, Ayaka Mizuno, Atsushi Kon, Toshio Norikura	4. 巻 16
2. 論文標題 Ursolic acid improves the indoxyl sulfate-induced impairment of mitochondrial biogenesis in C2C12 cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrition research and practice	6. 最初と最後の頁 147-160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4162/nrp.2022.16.2.147	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大越 咲弥, 奥山ほのか, 舘花春佳, 乗鞍敏夫, 井澤弘美, 今 淳
2. 発表標題 蒲黄により発現が誘導される創傷治癒関連遺伝子の転写制御機構について：蒲黄の応答配列の解析
3. 学会等名 2022年度保健医療福祉研究発表会・日本ヒューマンケア科学学会第15回学術集会・合同集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須長佳太郎, 村中みさき, 角掛那奈, 舘花春佳, 乗鞍敏夫, 井澤弘美, 今 淳
2. 発表標題 生薬「蒲黄」によるSerum amyloid A3遺伝子の発現促進機構
3. 学会等名 2020年度青森県保健医療福祉研究発表会・日本ヒューマンケア科学学会第13回学術集会 合同集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村中 みさき, 須長 佳太郎, 角掛 那奈, 舘花春佳, 乗鞍敏夫, 井澤弘美, 今 淳
2. 発表標題 生薬「蒲黄」によるLipocalin 2遺伝子の発現制御機構
3. 学会等名 2020年度青森県保健医療福祉研究発表会・日本ヒューマンケア科学学会第13回学術集会 合同集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原 江里, 高橋 春花, 星 英里, 舘花春佳, 乗鞍敏夫, 井澤弘美, 今 淳
2. 発表標題 生薬「蒲黄」によるデコリン遺伝子の発現制御機構
3. 学会等名 2019年度 青森県保健医療福祉研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大越咲弥, 奥山ほのか, 舘花春佳, 乗鞍敏夫, 井澤弘美, 今 淳
2. 発表標題 蒲黄により発現が誘導される創傷治癒関連遺伝子の 転写制御機構について: 蒲黄の応答配列の解析
3. 学会等名 2022年度保健医療福祉研究発表会・日本ヒューマンケア科学学会第15回学術集会 合同集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原 江里, 高橋 春花, 星 英里, 舘花春佳, 乗鞍敏夫, 井澤弘美, 今 淳
2. 発表標題 生薬「蒲黄」によるデコリン遺伝子の発現制御機構
3. 学会等名 2019年度 青森県保健医療福祉研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤優和, 阿部 峻, 舘花春佳, 乗鞍敏夫, 井澤弘美, 今 淳
2. 発表標題 生薬「蒲黄」による創傷治癒関連遺伝子の網羅的発現解析
3. 学会等名 2018年度 青森県保健医療福祉研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 生薬「蒲黄」によるコラーゲン遺伝子の発現制御機構
2. 発表標題 阿部 峻, 後藤優和, 舘花春佳, 乗鞍敏夫, 井澤弘美, 今 淳
3. 学会等名 2018年度 青森県保健医療福祉研究発表会
4. 発表年 2018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	井澤 弘美  (Izawa Hiromi)  (20315534)	青森県立保健大学・健康科学部・准教授   (21102)	
研究 分担者	乗鞍 敏夫  (Norikura Toshio)  (40468111)	青森県立保健大学・健康科学部・准教授   (21102)	

	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
連携 研究者	館花 春佳  (Tatehana haruka)  (30805809)	青森県立保健大学・健康科学部・助手   (21102)	

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