

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11789

研究課題名(和文) バイオイメージングを利用した伝統的健康法による呼吸機能改善効果の分析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of traditional health methods on improving respiratory function using bioimaging

研究代表者

藤田 恵理 (Fujita, Eri)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50466877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを対象とした試験で、卵殻膜を摂取した群では、呼吸機能が対照群に比べて有意に増加した。また放射性標識した卵殻膜をマウスに経口投与し、卵殻膜の薬物動態を明らかにした。マウス肺組織や肺線維芽細胞の画像解析や遺伝子発現解析により、卵殻膜は、線維化を防止コラーゲンの線維形成を健全に維持することが知られているデコリンの発現レベルや分泌を顕著に増加させることを明らかにした。肺線維症モデルマウスに卵殻膜を経口投与すると、肺胞のデコリンレベルが有意に増加し、肺線維化マーカーであるTAZ核移行を低減した。卵殻膜は肺組織の細胞外環境を改善することにより、肺線維化を軽減し呼吸機能を改善すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化に伴い呼吸器疾患は増加しており、特に肺線維症については根本的な治療法がない。肺線維症の緩和を目指し、入手が容易で伝統的に創傷治癒効果があるとされてきたニトリ卵殻膜に注目した。我々は天然素材・卵殻膜が、弾力性に富む細胞外マトリクス成分であるデコリンやIII型コラーゲンの発現を誘導するという作用機序を利用し、呼吸機能改善や肺線維症にも有効なアプローチを開発した。卵殻膜の経口摂取は、肺組織の細胞外環境を改善することにより肺の健康に寄与する栄養/機能性食品として期待できる。

研究成果の概要(英文)：In a human study, respiratory function was significantly increased in the group that ingested eggshell membrane compared to the control group. Radiolabeled eggshell membrane was also orally administered to mice to clarify the pharmacokinetics of eggshell membrane. Image analysis and gene expression analysis of mouse lung tissue and lung fibroblasts revealed that eggshell membrane significantly increased the expression level and secretion of decorin, which is known to prevent fibrosis and maintain healthy collagen fiber formation. Oral administration of eggshell membrane to mice models of pulmonary fibrosis significantly increased the level of decorin in the alveoli and reduced TAZ nuclear migration, a marker of pulmonary fibrosis. These results suggest that eggshell membrane improves the extracellular environment of lung tissue, thereby reducing pulmonary fibrosis and improving respiratory function.

研究分野：生命科学

キーワード：卵殻膜 細胞外マトリクス 肺線維症

1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い、慢性閉塞性疾患 (COPD)、呼吸器感染症、肺がんなどの呼吸器疾患が増加している。高齢化が急速に進行している日本においては平成 28 年厚生労働省の調査で「肺炎による死亡」が 80 歳以上の死因の第 3 位になるなど、肺の炎症や疾患は年々増え続けている。このような背景から、呼吸器疾患の予防や治療法の開発が急務である。呼吸器疾患の病因は多様であるが、ほとんどの場合、肺の構成要素の炎症により組織の過剰な修復反応が起こるため、線維性の I 型コラーゲン等が蓄積し肺胞間質が厚く硬くなる。間質が肥厚した肺は弾力を失い膨らみにくくなるため、低酸素血症による呼吸困難を生じる。肺線維症は悪化した呼吸器疾患の一般的病理である。現在、肺線維症の治療は主に抗線維化薬や炎症を抑える免疫抑制剤が使用されているが、これらの治療法は疾患の進行を抑えることは可能であっても、線維化した肺を元に戻すことのできる根本的な治療法はない。

天然由来の複合素材であるニワトリ卵殻膜 (Eggshell membrane; ESM) は、ニワトリ胚を物理的ダメージや微生物感染から保護するバリアーである。近年、ESM の摂取は肝臓の線維化を抑制する効果があること (Jia, et al., Sci Rep. 2014) や、関節痛の緩和や膝関節炎の症状の改善 (Ruff, et al., 2009a, Ruff, et al., 2009b) 等の臨床研究も報告されている。しかし、肺線維化に対する研究はまだない。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの研究を含めいくつかの研究から、ニワトリ ESM の摂取が皮膚等の組織中の細胞外マトリクス成分を改善し、組織の弾力性を高めることが明らかになっている (Ohto-Fujita, et al., Cell Tissue Res. 2011, Ohto-Fujita, et al., Cell Tissue Res. 2019)。細胞外マトリクスとは、すべての組織、臓器に存在する非細胞の構成成分で、組織の強度を支える構造的な機能を持つだけでなく、細胞そのものが細胞外マトリクスを産生し、細胞-マトリクス間の相互作用を介して組織の形態形成・分化・ホメオスタシス等に重要な働きをすることがわかってきた。細胞外マトリクスには、主に線維状タンパク質のコラーゲンやエラスチン等と、組織中で水和ゲル状態で存在するプロテオグリカン類がある。線維化のメカニズムには、この細胞外マトリクスの合成と分解のアンバランスが関与しているが、ESM の細胞外マトリクス改善機能を利用することにより従来にないアプローチで、肺線維症等の呼吸器疾患において新規の治療法を開発できると考えた。そこで本研究では、肺線維化を緩和する治療薬としての ESM の効果とメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 二重盲検法によるプラセボ対照試験で、ESM 摂取後の呼吸、皮膚、ジグザグ歩行などの身体機能を対照群と比較して検討した。本研究では、21~68 歳 (平均 39.5 ± 15.1 歳) の生活習慣病を含む病歴のない健康なボランティア 20 名を対象とした。ESM 群では、被験者に ESM サプリメントを 1 日 8 錠 (朝と夜に各 4 錠) 8 週間摂取してもらった。対照群では、ESM を含まないサプリメントを摂取した。ESM の摂取前と 8 週間後に、被験者の肺機能をスパイロメーターを用いて調べた。皮膚弾力性は、Cutometer® MPA 580 で測定した生物物理学的手法を用いて決定した。身体機能解析としてジグザグ歩行速度を計測した。

(2) ESM が消化されて体内に吸収されているかを実証するために単一の分子に標識化合物を作成することはできるが、ESM は不溶性で線維状の天然の複合材料であること、さらに、消化吸収された ESM がどのような分子形態になっているかは不明であるので、合成標識化合物を作成することができない。そこで本研究では線維性の天然素材である ESM を直接トリチウム標識する方法を開発し、その標識 ESM の吸収を調べた。タンパク質などの有機化合物を炭酸リチウムと混合し中性子照射するとトリチウムを用いたリコイルタギング法により、 ${}^6\text{Li} (n,) {}^3\text{H}$ 反応で生成したトリチウムにより標識される。マウスに標識 ESM を経口投与し、その後経時的に採取した血液および組織の放射能を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

(3) マウスを対象に ESM の経口摂取が肺の恒常性を改善するかどうかを、ブレオマイシン肺線維症モデル (BLM モデル) を含めて検討した。ESM をマウスに経口摂取させ、2 週間後に肺の遺伝子発現変化を調べた。BLM 肺線維症マウスに ESM を 1 日 1 回長期摂取させた後、肺を摘出し、組織切片の免疫染色や組織染色等の病理学的解析を実施し、一般に使用されている肺線維化評価法であるアシュクロフト法を用いて線維化の評価を行った。肺線維化マーカーとして知られ、ECM 剛性を感知するメカノトランスデューサー TAZ 転写因子の活性化を肺組織切片の TAZ の免疫染色による核移行を指標として定量した。さらに遺伝子発現解析および免疫染色法により、デコリンや III 型コラーゲンなどの肺での細胞外マトリクス成分の変化を解析した。

(4) 肺線維芽細胞の ESM による応答を検討するため、ヒト肺線維芽細胞株の ESM に対する応答

を、可溶化 ESM(SESME)表面を有する培養環境で検討した。ESM 摂取によるデコリンの誘導と、肺線維症軽減の関連を調べるために、ECM 剛性を感知するメカノトランスドューサー-TAZ 転写因子の活性化を肺線維芽細胞の TAZ の免疫染色による核移行を指標として定量した。さらに、SESME を培地に添加したヒト肺線維芽細胞のデコリン分泌を ELISA 法により定量した。

4. 研究成果

(1) ヒトを対象としたプラセボ対照試験で ESM を 8 週間摂取した群では、呼吸機能(強制呼気量 1 秒/強制バイタル容量比 (FEV1/FVC))、腕の皮膚の弾力性、ジグザグ歩行速度の変化率が対照群に比べて有意に増加した。

(2) トリチウムを用いたリコイルタギング法により ESM を放射性標識し、マウスに投与することで、経口投与した³H ESM の薬物動態を明らかにした。トリチウム標識 ESM はマウスに経口投与後に血中および肺を含む全身の組織に分布していた。本研究の方法により線維性の ESM のトリチウム標識が可能であり、実際に経口投与した標識 ESM がマウスの臓器に消化吸収されたため、代謝評価に有用な方法であることが明らかになった。

(3) マウスに ESM を経口投与したところ、2 週間後に肺組織のデコリン、III 型コラーゲン遺伝子発現レベルが上昇した。BLM 誘発肺線維化モデルマウスで ESM の抗線維化効果を調べた実験では、我々が以前に行ったヒトでの実験(Ohto-Fujita *et al.*, 2021a)と同等の 11 mg/kg ESM を毎日経口投与した。ピクロシリウスレッド染色した肺切片の画像解析により、BLM + ESM マウスは BLM マウスに比べ、コラーゲン沈着、線維化、気管支付近のリンパ球などの炎症細胞の浸潤が抑制されていることが確認された。BLM 群では線維化領域に TAZ の核局在が生じたが、BLM + ESM 群では TAZ の核局在が抑制された。BLM + ESM マウスでは、BLM マウスに比べ、2 週間後に肺胞のデコリンおよび細気管支の III 型コラーゲンレベルが顕著に増加していることを免疫染色によるイメージング及び遺伝子発現解析により明らかにした。デコリンは TGF-β を阻害し、肺線維症を効果的にブロックすることが知られている。ESM による肺組織でのデコリン誘導が肺線維化の軽減に関与していると考えられる。

(4) ESM 上で培養した肺線維芽細胞は、III 型コラーゲン、デコリン、MMP2 レベルが顕著に高かった。SESME を培地に添加したヒト肺線維芽細胞では、TGF-β 誘導性の TAZ の核移行が増加していなかった。また、SESME を培地に添加したヒト肺線維芽細胞で、ESM は線維化を防ぎコラーゲンの線維形成を健全に維持することが知られているデコリンの細胞外分泌を促進した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ohto-Fujita Eri, Nogawa Norio, Shimizu Miho, Ijiri Ken-ichi, Hasebe Yukio, Atomi Yoriko	4. 巻 77
2. 論文標題 Application of Neutron-Irradiated ${}^6\text{Li}$ (n, γ) ${}^3\text{H}$ Reaction to a Protein-Based Fibrous Non-Woven Fabric Biopolymer: Radiolabeling of Cross-Linked Natural Fibrous Chicken Eggshell Membranes and Their Whole-Body Tissue Distribution after Oral Ingestion in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fiber Science and Technology	6. 最初と最後の頁 182 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2115/fiberst.2021-0018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohto-Fujita Eri, Hatakeyama Nozomi, Atomi Aya, Yasuda Shunsuke, Kodama Shoki, Atomi Tomoaki, Tanaka Kazuya, Noboru Hirose, Harada Kenji, Asano Yoshihide, Watanabe Toshiyuki, Hasebe Yukio, Shimizu Miho, Atomi Yoriko	4. 巻 77
2. 論文標題 Effect of Eggshell Membrane Powder Intake on the Body Function of Healthy Individuals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fiber Science and Technology	6. 最初と最後の頁 258 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2115/fiberst.2021-0029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eri Ohto-Fujita, Norio Nogawa, Miho Shimizu, Ken-ichi Ijiri, Yukio Hasebe, Yoriko Atomi	4. 巻 -
2. 論文標題 Application of neutron-irradiated ${}^6\text{Li}$ (n, γ) ${}^3\text{H}$ reaction to a protein-based fibrous non woven fabric biopolymer: Radiolabeling of cross-linked natural fibrous chicken eggshell membranes and their whole-body tissue distribution after oral ingestion in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fiber Science and Technology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 E. Ohto-Fujita, M. Shimizu, A. Atomi, S. Horinouchi, N. Shibayama, R. Hosoda, H. Hiruta, T. Murakami, S. Miyazaki, M. Kurimoto, Y. Asano, T. Watanabe, Y. Hasebe, Y. Atomi
2. 発表標題 EggsheII membrane promotes homeostasis of skin and lung tissue associated with type III collagen and decorin expression and ameliorates pulmonary fibrosis in a bleomycin mouse model
3. 学会等名 Cell Bio 2022-An ASCB EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水美穂, 藤田恵理, 長谷部由紀夫, 跡見順子
2. 発表標題 天然創傷治癒素材卵殻膜は機械的ストレスに対して本質的に適応的な細胞-マトリックス相互作用を介してアンチエイジングをもたらす
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会公募ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 跡見順子, 大戸(藤田)恵理, 清水美穂, 跡見綾, 堀ノ内慎哉, 柴山夏実, 細田涼太, 蛭田容基, 村上智亮, 宮崎新也, 栗本大嗣, 浅野善英, 渡邊敏行, 長谷部由紀夫
2. 発表標題 卵殻膜はType III collagenとデコリン発現を伴う皮膚・肺組織の恒常性を促進しブレオマイシンマウスモデルの肺線維症を減弱する
3. 学会等名 第54回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 跡見順子, 大戸-藤田恵理, 野川憲夫, 清水美穂, 井尻憲一, 長谷部由紀夫
2. 発表標題 リコイルタグ法によるニワトリ胚細胞外マトリックス卵殻膜のトリチウム標識とマウス経口摂取後の全身組織分布
3. 学会等名 2021日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoriko Atomi, Eri Ohto-Fujita, Norio Nogawa, Miho Shimizu, Ken-ichi Ijiri, Yukio Hasebe
2. 発表標題 Radiolabeling of cross-linked natural fibrous chicken eggshell membranes and their whole-body tissue distribution after oral ingestion in mice
3. 学会等名 CELL BIO virtual 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoriko Atomi, Eri Ohto-Fujita, Natsumi Shibayama, Ryota Hosoda, Miho Shimizu, Aya Atomi, Shinya Horinouchi, Shinya Miyazaki, Tomoaki Murakami, Yoshihide Asano, Yukio Hasebe
2. 発表標題 Verification of the antifibrotic effect of chicken eggshell membrane ingestion using a bleomycin pulmonary fibrosis mouse model
3. 学会等名 2020日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y Atomi, E Ohto-Fujita, M Shimizu, A Atomi, N Hatakeyama, N Shibayama, R Hosoda, S Horinouchi, T Murakami, S Miyazaki, M Kurimoto, S Yasuda, S Kodama, N Nogawa, T Atomi, K Tanaka, N Hirose, K Harada, Y Asano, T Watanabe, Y Hasebe
2. 発表標題 Oral eggshell membrane administration attenuated lung fibrosis via type III collagen- and decorin-mediated wound healing
3. 学会等名 2020ASCB (CELL BIO virtual 2020, An online ASCB) (国際学会)
4. 発表年 2020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	清水 美穂 (Shimizu Miho) (00500399)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・客員准教授 (12605)	

6. 研究組織（つづき）

	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	平工 志穂 (Hiraku Shiho) (30302821)	東京女子大学・現代教養学部・教授 (32652)	
研究 分 担 者	田中 幸夫 (Tanaka Yukio) (60179794)	東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・名誉教授 (12605)	
研究 分 担 者	跡見 順子 (Atomi Yoriko) (90125972)	東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・客員教授 (12605)	

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