

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592648

研究課題名(和文)短鎖及び多価不飽和脂肪酸を用いた新規肥厚性瘢痕・ケロイド治療法の開発に関する検討

研究課題名(英文)Development of the novel therapeutic modality for hyperplastic scar and keloid using short chain fatty acids and polyunsaturated fatty acids

研究代表者

宇佐美 眞 (Usami, Makoto)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：00193855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：短鎖脂肪酸と多価不飽和脂肪酸の抗線維化作用を明らかにし、最も効果的な組み合わせが酪酸とドコサヘキサエン酸であることを見出した。ヒト皮膚由来およびケロイド由来線維芽細胞を用いて、線維化促進因子の  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、型および型コラーゲン発現への抑制効果、細胞増殖の抑制、アポトーシスを促進する作用を明らかにした。また、病態モデルである炎症性サイトカインあるいは緑膿菌由来LPSによる炎症刺激下、TGF- $\beta$ 1刺激下においても強い抗線維化および抗炎症作用が確認された。酪酸の作用機序としてヒストンアセチル化の促進、抗線維化作用を有する脂質メディエーターであるPGE2の産生促進を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We revealed the antifibrogenic effects of short chain fatty acids and polyunsaturated fatty acids, and the best combination is butyrate and docosahexaenoic acid among those fatty acids. As the mechanisms, we found the inhibitory effects on the expressions of profibrotic factors including  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1, type I collagen and type III collagen, and the inhibition of cell proliferation, and promotion of apoptosis in normal human dermal and keloid fibroblasts. These antifibrogenic effects were also found in the pathological models with addition of proinflammatory cytokines or pseudomonas aeruginosa derived LPS or TGF- $\beta$ 1 stimulation. As the key mechanisms of these effects, the production of PGE2, as an antifibrogenic lipid mediator, and the histone acetylation by butyrate were revealed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学

キーワード：創傷治癒学

## 1. 研究開始当初の背景

肥厚性瘢痕やケロイドなどの線維増殖性病変の治療法として、外科的切除とステロイド剤等が併用されてきたが、再発例が多く、新たな治療手段の開発が求められる状況にあった。

脂肪酸は、炭素鎖が 2-6 の短鎖脂肪酸、8-12 の中鎖脂肪酸、14 以上の長鎖脂肪酸に分けられ、我々は短鎖脂肪酸の細胞生物学的効果に注目し、in vitro の系で、腸粘膜 integrity に及ぼす効果 (Ohata, Usami. Nutrition 2005)、末梢血単核球の NF- $\kappa$ B 活性化抑制を介する TNF- $\alpha$  産生抑制 (Usami. Nutr Res 2008)、好中球 apoptosis 促進による過剰炎症反応の回避 (Aoyama, Usami. Nutrition 2010)、血管内皮細胞の tight junction 透過性抑制 (Miyoshi, Usami. Nutrition 2008) を報告してきた (宇佐美眞、外科代謝栄養 2010)。しかし、短鎖脂肪酸の皮膚での線維化抑制作用については未だ詳細な検討が報告されていなかった。

他方、必須脂肪酸である多価不飽和脂肪酸は、細胞膜を構成するリン脂質の構成成分であり、n-3 系多価不飽和脂肪酸には炎症反応調節作用が知られている。我々は in vitro および in vivo の系で、膜脂肪酸組成変化と腸粘膜 integrity に及ぼす多価不飽和脂肪酸の効果を報告して来た (Usami. J Parent Enteral Nutr 2006, Usami. Clin Nutr 2001, Usami. Nutrition 2003)。さらに、脂質が皮膚を構成する重要な成分であり、細胞膜の正常機能維持や免疫に寄与することから、皮膚瘢痕組織での細胞膜構成脂質変化を明らかにしてきた (寺師浩人、PEPARS 2009, Nomura, Terashi. Wound Rep Reg 2007)。

現在まで、短鎖脂肪酸と多価不飽和脂肪酸を組み合わせた形での皮膚の線維化抑制、炎症抑制効果を検討したものは無く、これらを検討することは新しい瘢痕・ケロイド治療に結びつくと考えられた。

## 2. 研究の目的

短鎖脂肪酸および多価不飽和脂肪酸添加の線維増殖性病変抑制効果を明らかにすることを目的とした。具体的には、患者の機能障害や外見的な変化が QOL の低下に繋がる、肥厚性瘢痕・ケロイド形成抑制効果を検討した。

短鎖脂肪酸による線維化マーカーの抑制効果と、多価不飽和脂肪酸による抗炎症作用が培養細胞系で確認されていることから、それぞれの効果及び相乗効果等について正常ヒト皮膚由来線維芽細胞と、手術時に採取した患者由来のケロイド線維芽細胞を用いて検証した。

さらに、これらの脂質は、脂質代謝酵素である cyclooxygenase (COX) の発現を促進し、ケロイド線維芽細胞で発現が低下している prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) などの生理活性の高い脂質メディエーターの生成に関わることから、本研究では各々の作用機序の解明も目的

とした。

## 3. 研究の方法

<ケロイド由来線維芽細胞の初代培養>

ケロイドを採取するにあたっては、神戸大学大学院保健学研究科倫理委員会に本研究内容を申請し、患者の不利益になることがないことを十分に口頭で説明し、文書にて患者より同意を得た。初代培養にて得られた線維芽細胞は継代数が 6 以下のものを実験に使用した。また、正常ヒト皮膚由来線維芽細胞は Clonetics 社より購入し、継代数が 8 以下のものを使用した。

<短鎖脂肪酸、多価不飽和脂肪酸の添加>

短鎖脂肪酸である、酪酸、プロピオン酸、および多価不飽和脂肪酸である DHA、EPA を培地に希釈し、線維化抑制に最適な濃度を検討した。

<線維化マーカー発現定量>

Collagen I、Collagen III、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 を定量した。mRNA 発現：real time PCR、細胞内蛋白発現：Western blot、サイトカイン産生：ELISA

<細胞増殖、障害、Apoptosis の解析>

細胞増殖：細胞数測定、BrdU アッセイ  
細胞障害：トリパンブルー染色  
Apoptosis: Flow cytometry

<ヒストン脱アセチル化阻害作用の検出>

アセチル化ヒストン H3: ヒストン H3 の蛋白発現を Western blot にて定量し、短鎖脂肪酸のヒストン脱アセチル化阻害作用を確認した。

<脂質メディエーター生成の測定>

PGE<sub>2</sub> の生成、および COX-1、COX-2 の発現を定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 各脂肪酸の線維化抑制効果の解明

ヒト皮膚由来線維芽細胞において、Collagen I、Collagen III、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 の mRNA 発現を定量し、短鎖脂肪酸である酪酸およびプロピオン酸、多価不飽和脂肪酸である DHA および EPA の線維化抑制効果が確認された。短鎖脂肪酸では酪酸 (1-16 mM)、多価不飽和脂肪酸では DHA (100  $\mu$ M) が強い線維化抑制効果を有することが明らかとなった。時間依存性も明らかとなり、添加後 48 時間で強い抑制効果が得られることが確認された。64 mM 以下の酪酸、100  $\mu$ M 以下の DHA では細胞障害性を認めないことが確認された。0.01-16 mM の酪酸が細胞増殖を抑制し、特に 1-16 mM で抑制効果が強いことが確認された。さらに、100  $\mu$ M の DHA と 16 mM の酪酸が apoptosis を促進し、酪酸でより効果が強いことが明らかとなった。1-16 mM の酪酸が、線維化抑制作用を有す PGE<sub>2</sub> の産生を促進し、その作用は、COX-1 による影響が強いことが確認された。

### (2) 酪酸、DHA の混合添加の有効性確認

正常線維芽細胞において、酪酸 (1-16 mM)

と DHA (100  $\mu$ M) の混合添加が、酪酸および DHA の単独添加より線維化促進因子である  $\alpha$ -SMA、Collagen I、Collagen III、TGF- $\beta$ 1 の mRNA およびタンパク発現を強く抑制することが明らかになった。

同様の結果が前胸部・耳垂ケロイド由来線維芽細胞でも確認された。さらに、線維化モデルとしての IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ 1 刺激下ケロイド線維芽細胞においても、混合添加による強い抑制効果が認められた。

細胞増殖性に対する効果については線維化促進因子と同様の抑制効果が認められた。apoptosis については、IL-1 $\beta$  による炎症刺激下、および非炎症刺激下において、酪酸・DHA の混合添加により強く促進された。

また、非炎症刺激下とは異なり、IL-1 $\beta$  による炎症刺激下では、PGE<sub>2</sub> 産生が著増し、DHA が COX 発現非依存的にその産生を強く抑制した。脂肪酸解析より、DHA 添加によって細胞膜組成脂質の DHA 含有率の上昇、アラキドン酸含有率の減少が確認され、DHA と酪酸の混合添加では EPA の含有率が上昇することが見出され、酪酸が多価不飽和脂肪酸の代謝変動を生じる作用が示唆された。さらに、western blotting により、酪酸によるヒストンアセチル化の用量依存性が明らかになり、酪酸による HDAC inhibitor 作用がケロイド線維芽細胞においても確認された。

### (3) 病態モデルに対する効果と機序解明

感染による肥厚性癬痕病態モデルとして緑膿菌由来 lipopolysaccharide 添加下皮膚線維芽細胞の実験系を新たに確立し、酪酸および DHA、またこれらの併用による抗炎症作用(炎症性サイトカイン IL-6 発現抑制)を明らかにした。抗線維化作用についてはこれまでと同様に添加後 48 時間に認められた。一方、抗炎症作用については、酪酸は添加直後(3 時間後)から効果を示し、酪酸と DHA の併用は添加直後および 48 時間後において強い効果を示した。

酪酸、DHA による apoptosis 促進の機序を解明するために、デスレセプター経路のアポトーシス促進因子である Fas、ミトコンドリア経路の促進因子の Bax および抑制因子の Bcl-2、また過剰発現によりケロイド線維芽細胞にアポトーシス耐性をもたらす IGF-1R に対する影響を解析した。酪酸は Bcl-2 と IGF-1R 発現を抑制し、それに伴いアポトーシスを強く促進した。一方、角化細胞において酪酸による発現上昇が報告されている Fas については、本研究では酪酸により有意に抑制された。このことから、角化細胞と線維化細胞では、酪酸によるアポトーシスへの作用機序が異なることが明らかになった。DHA は Bcl-2 発現を有意に抑制したが、有意なアポトーシス促進は得られなかった。酪酸と DHA の混合添加では、アポトーシスおよびその関連因子において、酪酸の効果が増強された。これらのことから、DHA は酪酸のアポトーシス促進作用を高めることが示唆された。

## 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 2 件)

寺師浩人、前重伯壮、野村正、宇佐美真：脂質研究の最近の話題「創傷治癒と脂肪酸代謝」静脈経腸栄養 28 33-37(2013)、査読有

Kazuhiro Torii, Noriaki Maeshige, Michiko Aoyama, Midori Imai, Hiroto Tabuchi, Makoto Miyoshi, Yasuhiro Hamada, Hiroto Terashi, Makoto Usami. Anti-fibrogenic effects of short chain fatty acids and  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid on keloid fibroblasts. Wound Repair and Regeneration 22. A13 (2014), 査読有

[学会発表](計 10 件)

鳥井一宏、前重伯壮、青山倫子、今井緑、田淵寛人、三好真琴、濱田康弘、寺師浩人、宇佐美真 短鎖脂肪酸のヒト皮膚由来線維芽細胞に与える抗線維化作用の検討 2011 年 12 月 5 日 第 41 回日本創傷治癒学会 名古屋

Kazuhiro Torii, Noriaki Maeshige, Michiko Aoyama, Midori Imai, Hiroto Tabuchi, Makoto Miyoshi, Yasuhiro Hamada, Hiroto Terashi, Makoto Usami. Antifibrogenic effects of short chain fatty acids and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human dermal fibroblasts. 2012 年 9 月 2 日 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies, Yokohama

Kazuhiro Torii, Noriaki Maeshige, Michiko Aoyama, Midori Imai, Hiroto Tabuchi, Makoto Miyoshi, Yasuhiro Hamada, Hiroto Terashi, Makoto Usami. Novel antifibrogenic therapy for keloid formation by butyrate and DHA combination; in vitro study. 2012 年 9 月 10 日 34th Congress of the European Society of Clinical Nutrition and Metabolism, Barcelona

鳥井一宏、前重伯壮、青山倫子、今井緑、田淵寛人、三好真琴、濱田康弘、寺師浩人、宇佐美真 短鎖脂肪酸・多価不飽和脂肪酸がヒト皮膚由来線維芽細胞に与える抗線維化作用 2012 年 5 月 19 日 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 仙台  
鳥井一宏、前重伯壮、青山倫子、今井緑、田淵寛人、三好真琴、濱田康弘、寺師浩人、宇佐美真 短鎖脂肪酸・多価不飽和脂肪酸がケロイド由来線維芽細胞に与える抗線維化作用 2012 年 12 月 3 日 第 42 回日本創傷治癒学会 札幌

鳥井一宏、前重伯壮、青山倫子、今井緑、田淵寛人、三好真琴、濱田康弘、寺師浩人、宇佐美真 ケロイド由来線維芽細胞に対する酪酸・DHA の抗線維化作用と apoptosis 促進 2012 年 12 月 16 日 第

10 回日本機能性食品医学学会総会 東京  
田淵寛人、前重伯壮、鳥井一宏、青山倫子、今井緑、三好真琴、小谷穰治、濱田康弘、寺師浩人、宇佐美眞 酪酸・DHA 併用がケロイド由来線維芽細胞における  $\alpha$ -SMA、collagen の発現に与える抑制効果 2012年12月8日 第19回外科侵襲とサイトカイン研究会 神戸  
前重伯壮、荒木杏子、坂安優未、鳥井一宏、田淵寛人、青山倫子、三好真琴、植村弥希子、今井緑、濱田康弘、寺師浩人、宇佐美眞 TGF- $\beta$ 1/IL-1 $\beta$  刺激下ケロイド線維芽細胞の apoptosis 耐性および線維形成亢進に対する酪酸・DHA の制御作用 2013年5月26日 第67回日本栄養・食糧学会大会 名古屋  
Noriaki Maeshige, Kazuhiro Torii, Hiroto Tabuchi, Ayumi Saka, Kyoko Araki, Michiko Aoyama Ishikawa, Midori Imai, Yuka Koga, Akane Ochi, Mikiko Uemura, Makoto Miyoshi, Yasuhiro Hamada, Hiroto Terashi, Makoto Usami. Antifibrogenic and proapoptotic effects of butyrate/DHA via PGE<sub>2</sub> secretion on keloid fibroblasts in inflammatory model. 2013年9月1日 35th Congress of the European Society of Clinical Nutrition and Metabolism, Leipzig  
植村弥希子、前重伯壮、古賀由華、越智茜、鳥井一宏、田淵寛人、坂安優未、荒木杏子、青山倫子、三好真琴、寺師浩人、宇佐美眞 炎症刺激下ケロイド線維芽細胞における酪酸・DHA の PGE<sub>2</sub> 産生制御と抗線維化作用 2013年11月14日 第43回日本創傷治癒学会 大分

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：皮膚線維化抑制剤  
発明者：宇佐美眞、前重伯壮、鳥井一宏、寺師浩人、濱田康弘  
権利者：宇佐美眞、前重伯壮、鳥井一宏、寺師浩人、濱田康弘  
種類：特許  
番号：2012-034793  
出願年月日：2012年2月21日  
国内外の別：国内

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

神戸大学医学部保健学科病態代謝学外科代謝栄養学研究室

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fhs-usami/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇佐美 眞 (USAMI MAKOTO)

神戸大学保健学研究科

教授

研究者番号：00193855

(2)研究分担者

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)

神戸大学医学部附属病院形成外科

教授

研究者番号：80217421

(3)連携研究者

石川(青山) 倫子 (ISHIKAWA-AOYAMA

MICHIKO)

神戸大学保健学研究科

保健学研究員

研究者番号：40566121

前重 伯壮 (NORIAKI MAESHIGE)

神戸大学保健学研究科

助教

研究者番号：90617838