

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650441

研究課題名(和文) 運動刺激負荷下でのハーブ創傷治癒活性検出法の新規開発

研究課題名(英文) Development of novel detection method of bioactivity of injured tissue from biological specimen

研究代表者

野村 純(NOMURA, JUN)

千葉大学・教育学部・教授

研究者番号：30252886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が新規に開発した創傷治癒モデルを活用することで効率的に創傷治癒活性をもつ生理活性物質を検出する系の構築を目指した。ハーブ類及び生物由来の資料より成分を抽出し、創傷治癒モデルにおいてその効果を検討した。まず、すでに先行していたセントジョーンズワート抽出物を用いて繊維芽細胞、貪食能を持つ細胞株を用いて運動制御に関わる機能検出系を開発した。この結果、免疫系細胞の増殖および活性化誘導能をもつハーブ抽出物成分を見出すことに成功した。さらに海綿から単離したバクテリアを用い、新規貪食および増殖制御活性の検出に成功した。今後、この検出系をさらに先鋭化する。

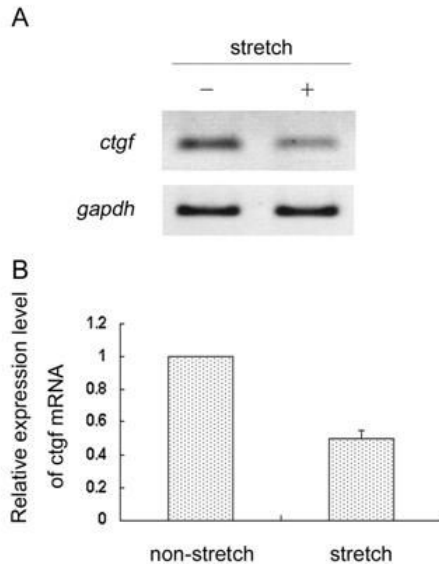
研究成果の概要(英文)：We aimed to develop novel detection method for bioactive materials from various biological specimens which has healing activity of tissue injury. We combined cell movement assay, growth assay and phagocyte assay. Then we applied biomaterials from herbs and other bio products on the detection procedure. Finally, we detect stimulation activity of cell growth and anti-phagocytic activity from those materials by our newly developed method.

研究分野：総合領域

キーワード：メカニカルストレス 創傷治癒 ハーブ抽出成分 スカールヒーリング メディカルハーブ 生理活性検出 運動療法 炎症制御

1. 研究開始当初の背景

我々は宇宙飛行時に起こる飛行士の体の変化が老化時の変化と酷似している点に着目し、ヒトの老化メカニズムの解明を目指し研究を続けてきた。宇宙空間において起こる環境の変化の中でも特に力学的刺激が細胞機能の分子レベル、遺伝子レベルでの変化に着目した。この結果、新規運動負荷皮膚細胞培養系を開発し、メカニカルストレスが結合組織構成分子の発現を制御し、皮膚形態的、機能的リモデリングにも関与することを示した (Connective tissue Res. 2009)。



サイクリック伸展培養により抑制されたCTGF mRNA 発現 (Connect. Tissue. Res. 2009)

H22 年より上記創傷治癒モデルを用いて、ハーブ成分の創傷治癒促進作用に関し、細胞レベルおよび分子レベルでの解析を試みてきた。この結果、薬用ハーブの一種であるセントジョーンズワートに新しい創傷治癒活性を見出すことに成功した。

創傷治癒過程は炎症時のさまざまな細胞因子、液性因子の複合的な組み合わせにより生じるものであり、さらに、遺伝因子や環境因子が絡む非常に複雑な反応である。運動負荷という環境因子存在下での治癒機構に関してはいまだ研究が進んでいない。また代替医療において用いられている様々な薬草やハーブの成分には治癒促進作用をもつ物質が含まれており、それらのほとんどはいまだ治癒にどのようにかかわっているのかが科学的に解明されていない。

2. 研究の目的

したがって、本研究の目的は、我々が新規に開発した細胞運動を主眼とした創傷治癒モデルを活用し、ハーブ・薬草類を含む生物試料から効率的に創傷治癒活性をもつ生理活性物質を検出する系を構築することである。

3. 研究の方法

伝統的な代替医療の中には様々な創傷治癒の方法がある。これらの療法のうちで実証性のありそうなものの中から科学的根拠を示し、薬草類、ハーブなどから有効成分を発見し実用化していくことである。すでに我々は、この系を用いた薬効の検索で西洋オトギリソウ抽出物から新たな創傷治癒活性を見出し、報告している (和洋女子大学紀要 2012)。

さまざまなハーブ抽出物存在下で、繊維芽細胞、マクロファージ系細胞、好中球系細胞株細胞などを用い培養を行った。このときさらに運動刺激負荷下でのスクラッチリペアによる創傷治癒モデルを活用した。運動刺激を行いつつ細胞の修復を観察可能な伸展培養下でのスクラッチリペアは新規に確立したモデルであり、これにより様々な知見が得られている。

Description	B / A ratio (Keloid+ / Normal+)	A ratio (Normal)	B ratio (keloid)
amyloid beta (a4) precursor protein (protease nexin-ii, alzheimer disease)	0.5345	1.802	0.9636
fibulin 1 isoform c precursor; fbln1	0.5446	1.331	0.7251
wingless-type mmtv integration site family, member 7a precursor; wnt7a	0.6407	1.359	0.8713
calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta); calm3	0.6526	0.9911	0.6468

例) 本システムを利用してcDNAarrayにより検出したケロイド細胞特異的遺伝子群

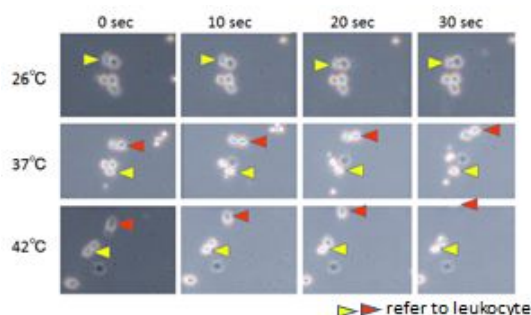
スクラッチリペアモデルによりハーブ成分ありとなしでの治癒活性の違いをタイムラプス撮影などの手段により観察し、経時的に評価した。評価は細胞の形態変化、移動度、並び、増殖能、生存能について行った。さらに生存能、増殖能は創傷治癒結果特に「綺麗に傷を治す」という観点から重要なため、MTS法を用いて別途解析を行った。

創傷治癒過程で増加することが期待されるコラーゲンや、炎症性サイトカインの発現量に着目して解析した。検出にはデスクトップ型フローサイトメーターに生理活性物質検出ビーズを活用したハイスループット測定系を構築した。また、エリオスポットELISAを組み合わせタンパク質量の差を検出した。この情報に基づき遺伝子発現に差があると考えられる分子に関して半網羅的に発現量の変動を解析した。線維芽細胞、マクロファージ系細胞、好中球系細胞株細胞を培養しつつ、ハーブ抽出物と反応させ、形態、運動能などに変化が出たものに関してRNAを抽出し、その量の変化を解析した。その際にリアルタイムPCRを使用した。

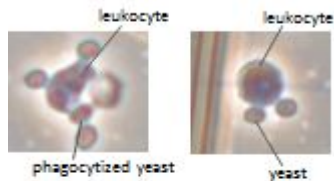
4. 研究成果

3 つの観点から検出システム開発を進めた。細胞運動の観測による生理活性物質の検出。この系では細胞運動持続観測システム

を用いた不死化細胞株でのメディカルハーブ抽出成分による細胞運動抑制活性検出についての系を確立した。RAW263 細胞にセントジョーンズワートからの抽出物を添加するとその細胞運動が抑制されることを見出した。さらにこの系に加え、温度制御を導入することでさらに詳細な運動能観測を可能としている。

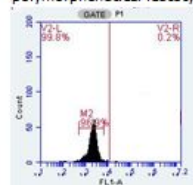


貪食能検出系の開発。我々は、蛍光標識ターゲットセルを作成することでフローサイトメトリーを用いた貪食能検出系を確立した。

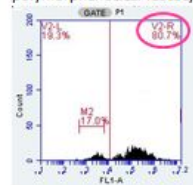


Left: phagocytizing leukocyte.
Right: non-phagocytizing leukocyte.

polymorphonuclear leucocytes+, FITC labeled E-coli-



polymorphonuclear leucocytes+, FITC labeled E-coli+



○ refer to the rate of phagocytizing polymorphonuclear leucocytes (%).

この際クエンチング剤の選別および処理法についての検討を行い、最適化を行った。さらにケミルミネッセンスコーティングビーズを導入することで化学発光による貪食能検出系も新たに導入することに成功した。この二つを組み合わせることで鋭敏で詳細な貪食能解析を可能とした。

プロテインアレイ系をベースとする分泌物、産生物質の定量的解析方法の確立。プロテインアレイと ELISPOT の組み合わせによる分泌物測定系と交代ビーズを用いたマルチフローサイトメトリー解析系を組み合わせることでより低両性と再現性の高い検出システムを開発した。

リアルタイム PCR を用いた RNA 発現検出

系についてもプライマーパネルを作製し、網羅的高率的解析を可能とする体制を整えた。

これらの系を複合して活用することで、多種のハーブなどから新たな好中球貪食活性化誘導物質を検出し、現在単離精製を進めている。

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 3 件)

(1) 野村 純・加藤徹也・木下 龍・高木啓・山下修一・他、ASEAN 連携による海外派遣での科学教育および教員養成の新たな試み、日本科学教育学会年会論文集、査読無、第 38 巻、2014、pp.403-404

(2) 高橋美知代・鈴木敏和・高木亜由美・金子健彦・松本光・額田均・橋詰直孝、入院高齢者における栄養アセスメント追跡調査、和洋女子大学紀要、査読有、第 54 巻、2014、pp.25-34

(3) 山口 悠・野村 純・加藤徹也・木下 龍・高木 啓・東崎健一・山下修一・他、白血球による貪食作用に基づくパーソナルデスクラボ開発とその教材活用、千葉大学教育学部研究紀要、査読無、第 61 巻、2013、pp.457-462

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 野村 純・加藤徹也・木下 龍・高木啓・山下修一・他、ASEAN 連携による海外派遣での科学教育および教員養成の新たな試み、日本科学教育学会第 38 回年会、2014 年 9 月 13 日、埼玉大学

(2) 高橋美知代・鈴木敏和・金子健彦・松本光・額田均・橋詰直孝、長期入院高齢者における血中 L-カルニチンおよびコエンザイム Q10 レベル、第 35 回日本臨床栄養学会総会・第 34 回日本臨床栄養協会総会第 11 回大連合大会、2013 年 10 月 4 日、京都テルサ(京都)

(3) Takahashi Michiyo ・ Suzuki Toshikazu ・ Takagi Ayumi ・ Hashizume Naotaka ・ Matsumoto Hikaru、Blood levels of the micronutrients vitamin B1 and zinc decrease with advancing age in normally-nourished elderly aged 75 and over、The 20th Congress of the International Association of Gerontology、2013 年 6 月 24-26 日、Seoul(South Korea)

(4) Udagawa-Rusu Koko ・ Suzuki Toshikazu ・ Yanagisawa Yukie、Assesing the situation of problems concerning meals and nutrition for the elderly under home care、

The 20th Congress of the International Association of Gerontology., 2013年6月24-26日、Seoul(South Korea)

〔図書〕(計 2 件)

(1) 野村 純・他、千葉大学教育学部、サイエンススタジオ CHIBA 世界を目指せ次世代科学者の卵たち !、2014、109

(2) 野村 純・他、千葉大学教育学部、サイエンススタジオ CHIBA 世界を目指せ次世代科学者の卵たち !、2014、119

〔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：
出願年月日：
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

野村 純(NOMURA JUN)
千葉大学・教育学部・教授
研究者番号：30252886

(2) 研究分担者

鈴木 敏和(SUZUKI TOSHIKAZU)
和洋女子大学・家政学群・准教授
研究者番号：70270527

(3) 連携研究者

()

研究者番号：