

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500533

研究課題名(和文) 生体組織の伸展性に対する魚類由来エラスチンペプチドの影響

研究課題名(英文) Effects of elastin peptide from fish ductus arteriosus on tissue extensibility

研究代表者

伊藤 浩行 (ITO, Hiroyuki)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：60113148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：カツオ動脈球由来のエラスチンペプチドを高血圧自然発症ラットに投与することにより、大動脈内皮細胞の傷害が軽減され、壁の収縮能が低下が認められた。エラスチンペプチドの消化吸収により血中で増加するProlylglutamine (PG) を静脈内に投与したラットにおいても内皮細胞の保護作用が認められたことから、有効成分はPGであることが明らかとなった。一方、ヘアレスラットに紫外線照射により光老化を惹起し、エラスチンペプチド含有クリームの効果を検証したところ、塗布群では皮膚伸展性の向上が認められた。これらの結果より、カツオ動脈球由来のエラスチンペプチドは、動脈や皮膚に対して障害抑制作用があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effects of elastin peptide from fish ductus arteriosus on vascular and cutaneous function was investigated using spontaneously hypertensive rats (SHR) or hairless rats. Chronic administration of elastin peptide to SHR resulted in amelioration of endothelial injury and preservation of arterial elasticity. Prolyl glutamine, a degradation product of elastin peptide, may be key sequence of elastin peptide, since continuous infusion of PG to SHR was effective to prevent endothelial injury. In cultured endothelial cells, expression of ICAM-1 and Caveolin was depressed by elastin peptide and PG. In rat model with ultraviolet irradiation, on the other hand, skin elasticity was higher in rats which administered elastin peptide to skin of rats rather than control rats. These results suggest that elastin peptide from fish arteriosus was effective for preservation of elasticity not only in artery but also in skin.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：カツオ動脈球 エラスチンペプチド 伸展性 動脈 皮膚

1. 研究開始当初の背景

エラスチンはコラーゲンとともに動脈や皮膚および肺などに豊富に存在する線維性蛋白質で、エラスチンはゴム状弾性により、またコラーゲンは剛性により、これらの組織の機能に重要な役割を果たしている。しかし、加齢や様々な病的状態によりエラスチンの崩壊・減少が生じ、替わってコラーゲンの増加が生じるため、両者の量的・質的均衡が崩れ、組織は硬化し機能の低下が生じる。コラーゲンは可溶性蛋白質で、生体より抽出することが容易であり、すでにコラーゲンあるいはコラーゲンペプチドは健康食品や化粧品として広く用いられている。一方、エラスチンは不溶性タンパク質であるため、化学的あるいは酵素的に分解したペプチドが用いられているが、その応用は極一部に限られている。これまでエラスチンの再生あるいは組織伸展性の回復の手段として、動物由来のエラスチンあるいはその分解産物を投与することが試みられているが、いまだ有効性は確かめられていない。牛や豚など大動物からは大量のエラスチンを得ることが出来るが、感染やアレルギーなど様々な問題をかかえているため、替って魚類由来の EP の応用が試みられている。魚類動脈球にはエラスチンが豊富に含まれていることが知られており、得られた不溶性エラスチンを酵素分解した可溶性エラスチンペプチド(以下 EP)が製品化され、コラーゲンと同様にエラスチンを含む健康食品や化粧品の開発に用いられているが、その効果は十分に明らかにされているとは言い難い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、魚類動脈球より得られた可溶性 EP が動脈や皮膚などの形態や機能にどのような影響をもたらすかを、疾患モデル動物あるいは培養細胞を用いて、病理学的・生体力学および分子生物学的に検証することである。さらに、その機序を明らかにす

るために、EP の消化吸収により血中に増加する Prolyl glysin (以下 PG) の影響を検索する。

(1) 動脈壁の物性に及ぼす影響

EP が動脈の構成成分や機能にどのような影響を及ぼすかを、高血圧自然発症ラット (SHR) を用いて検証する。SHR では高血圧の進展に伴い内皮細胞傷害や動脈壁伸展性の障害が認められる。そこで SHR に EP を投与した場合、血管の物性や形態学的異常がどのように修復されるかを明らかにする。さらにその機序を明らかにするために有効成分と考えられる PG を静脈内に投与し、大動脈内皮細胞に及ぼす影響を検索する。この研究により、動脈病変に対する創薬および健康食品としての応用に対する基礎資料を得る。

(2) 皮膚の物性に及ぼす影響

光老化モデルを用いて、組織の修復や伸展性の低下の防止に対して EP が有効であるか否かを検証する。すなわち、エラスチンレセプターを有する細胞(ケラチノサイト、線維芽細胞・血管内皮細胞・平滑筋細胞など)が反応し、これらの細胞の機能や増殖活性におよぼす影響を検索し、やがてはエラスチン新生に至るであろうとの仮説を検証する。この研究により、創傷治癒あるいは老化に対する新たな方略が見出されることが期待される。

(3) 培養細胞に対する EP の影響

上記の実験の検証として培養細胞を用いて EP の影響を検索する。すなわち、血管内皮細胞・平滑筋細胞・皮膚ケラチノサイト・線維芽細胞を EP を含む溶液中で培養し、増殖能や種々の分子の発現に及ぼす影響を検索する。

3. 研究の方法

(1) 動脈の機能に及ぼす影響の検索：

15 週齢の雄性 SHR に EP を粉末飼料に混じて経口投与した。さらに別のラットに PG を背部皮下に埋め込んだ minipomp により、

持続的に静脈内投与を行った。対照群には vehicle のみを投与した。いずれも4週後に屠殺し、胸部大動脈を分離し、材料とした。

動脈拡張能の測定

胸部大動脈を摘出し、血管の分岐をすべて結紮した後、リン酸緩衝溶液シリンジポンプを用いて注入し、内圧負荷時の血管外径を、Video dimension analyzer (C3160, 浜松ホトニクス)を用いて光学的に測定した。この時に得られる内圧 - 外径関係をコンピュータに連続的に記録した。

血管反応性の測定

血管反応性の測定には、マグヌス装置としてマイクロティシュオーガンバス (MTOB-1Z; ラボサポート有限会社) およびイージー・マグヌス (いわしや岸本医科産業 (株)) を用いた。幅 2 mm のリング標本を作成し、Krebs-Henseleit 溶液で満たしたマイクロティシュオーガンバスおよびイージー・マグヌスのステンレスピンに取り付けた。恒温槽は 37 °C, 95% O₂ + 5% CO₂ 混合ガスで通気した。取り付け後、各リング標本に 1.5 g の静止張力を 1 時間加えた。

フェニレフリン (PHE) による血管収縮反応: 1 時間の平衡化後、リング標本に再度 1.5 g の静止張力を加えた後、オーガンバスに 3 M KCl (終濃度: 60 mM) を添加し 15 分間反応させて得られた張力を最大収縮 (収縮率 100%) とした。その後 KCl を洗浄 (5 分間, 3 回) して得られた Base line を収縮率 0% とした。次に PHE を累積的に添加 (終濃度: 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁶ M) し反応曲線を得た。

アセチルコリン (ACh) による血管弛緩反応: PHE を洗浄 (5 分間, 3 回) した後、リング標本を 45 分平衡化した。その後得られた Base line を弛緩率 100% とした。そして KCl 最大収縮の 80% になるよう PHE で前収縮させた時点を弛緩率 0% とした。リング標本に ACh を累積的に添加 (終濃度: 10⁻¹⁰ ~ 10⁻⁶ M) し反応曲線を得た。

関連分子の発現の検索

弓部・胸部大動脈より RNA を抽出し、connective tissue growth factor, type III collagen, tropoelastin の発現をそれぞれの特異的プライマーとキットを用いて定法に従って realtime PCR 法により検索した。

病理組織学的検索

大動脈を定法に従って固定し、内皮細胞の状態を走査電顕による観察を行った。

(2) 皮膚の伸展性に及ぼす影響:

ヘアレスラットに紫外線照射による光老化を作成し、エラスチン含有クリームを連日塗布し、皮膚伸展性への影響を検索した。

張力の測定

各部位からダンベル状試料を作製し、生体軟組織用断面積測定装置を使用して、試験片の断面積を測定した。引張試験には、万能材料試験機 (EZ Test/CE, 島津製作所) を使用し、ひずみの計測には、試料実質部以外で生じる変形の影響を除去するために Video dimension analyzer (C3160, 浜松ホトニクス) を使用した非接触計測を行った。ゼロ点を設定した後、引張速度 20mm/min で試料が破断するまで負荷試験を行った。

関連分子の発現

損傷部組織より RNA を抽出し、結合組織関連分子 (connective tissue growth factor, type I および type III collagen, tropoelastin, fibroblast growth factor) の発現を realtime PCR により検索した。

病理組織学的検索

創傷部組織を採取し、定法に従って固定し、組織学的観察を行った。

(3) 培養細胞を用いた解析

上記の研究結果に基づき、その詳細を明らかにするために、培養細胞を用いてエラスチンペプチドの影響を検索した。10⁴ cell /well

の内皮細胞を 96 well plate に播種後、血清・増殖因子含有培地に EP、PG を 10ng/ml、100ng/ml、1000ng/ml 添加し、細胞生存率 (24hr、48hr、72hr) を MTT assay (Cayman Chemical) を用いて測定した。さらに過酸化水素処置による細胞障害発生に対する EP 添加の影響を検索するために、内皮細胞を semi confluent に培養後、過酸化水素 100 μ M を添加し、Aging モデル作成を作成した。EP あるいは PG を同時に添加し、添加 4 時間後、細胞を回収した。ICAM-1、eNOS、claudin-5、VE カドヘリン、PECAM、 α -glactosidase、CTSA、TNF- α 、MMP9、Caveolin-1、Bcl-2、18S rRNA の発現解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 動脈の機能におよぼす影響

血圧および体重の変動

EP あるいは PG 投与による血圧・体重の変動におよぼす影響は認められなかった。

動脈に及ぼす影響

SHR 大動脈内皮細胞の形態を走査電顕により検索したところ、対照群では凹凸不正や bleb あるいはクレーターなど、高度の内皮細胞傷害が認められたが、EP 投与群ではその程度は明らかに軽度であった。また有効成分と考えられる PG を静脈内に投与した群でも、EP 群と同様に病変の軽減が認められた。正常血圧の Wistar-Kyoto rat (WKY) に比べ SHR では大動脈における伸展性は明らかに不良で血管強度も大であったが、これらにおよぼす EP の影響は認められなかった。しかし PG 投与群では対照群に比べ大動脈拡張能が有意に高く、伸展性低下の抑制が認められた。血管の反応性を比較したところ、EP 投与群では phenylephrine による収縮反応の低下が認められたが、acetylcholine による弛緩反応には差が認められなかった。そこで、総頸動脈の伸展性を比較したところ、EP 投与群では対照群に比べ有意に高値であり、動

脈の部位による反応の差が認められた。しかし、大動脈における結合組織関連分子の発現には差が認められなかった。

以上の結果は、EP には動脈内皮細胞に対する保護作用が見られること、その有効成分は PG であることを示唆している。しかし、動脈の部位によりその効果には相違がみられることや、蛋白レベルへの影響が認められなかったことなど、今後さらに検討すべき問題が残されている。

(2) 皮膚に及ぼす影響

ヘアレスラットに紫外線照射を行い、EP 塗布の影響を検索した。組織学的に表皮表層の粗さを組織計測的に比較したところ、EP クリーム塗布群では表皮表層はプラセボ群に比べ凹凸が少なく、表面が滑らかであることが明らかとなった。引張り試験により伸展に要する応力を Stress-Strain 曲線により比較検討したところ、Control 群に比べ UV 群では、引張の増加とともに応力は著しく増大し、皮膚伸展性の低下が認められた。一方、紫外線照射した皮膚に EP を塗布した群では SS 曲線は control と UV 群の中間で、弾力性は照射群およびプラセボ群に比べ明らかに良好であった。また、破断時の Strain 値も高く、伸展性低下の抑制が認められた。皮膚における結合組織関連因子の発現を比較したところ、UV 群に比べ EP 群では、CTGF および TGF- β の発現低下傾向、EGF の発現上昇が認められた。一方、UV 群に比べ EP 群では、CTGF および TGF- β の発現低下傾向、EGF の発現上昇傾向が認められた。また、Placebo 群に比べ EP 群では、Type I collagen および Type III collagen の発現低下が認められた。しかし、これらの発現量は個体差が大きく、さらに詳細な検討が必要である。

(3) 培養細胞におよぼす影響

血管内皮細胞を培養し、過酸化水素刺激を加えた場合の EP および PG の影響を検索した。非刺激状態の内皮細胞の増殖能には影響が

認められなかった。そこで、内皮細胞の機能に関するいくつかの分子の発現を刺激・非刺激状態で検索した。Caveolin-1 の発現は、刺激により亢進したが、EP および PG の添加により抑制された。非刺激状態でも同様に抑制が認められたが、とくに PG では濃度依存性が認められた。eNOS の発現は刺激による影響が認められなかったが、非刺激状態では EP でも PG でも抑制が認められた。ICAM-1 の発現は刺激により亢進したが、EP でも PG でも抑制が見られ、特に PG では濃度依存性が認められた。非刺激状態では EP で抑制されたが、低濃度の PG では亢進が認められた。しかし、高濃度の PG では EP と同様の抑制が見られ、矛盾する結果であった。これらの結果は、EP あるいは PG の内皮細胞保護作用を支持するものではあるが、結果は必ずしも一致しておらず、今後さらに条件を検討して再検する必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 14 件)

山本衛、宮崎祐次、竹森久美子、伊藤浩行、内圧負荷下でのラット胸部大動脈の変形挙動、日本非破壊検査協会第 45 回応力・ひずみ測定と強度評価シンポジウム、平成 26 年 1 月 24 日、大阪市(大阪科学技術センター)。

山本衛、宮崎祐次、竹森久美子、伊藤浩行、ヘアレスラットの損傷皮膚に対する伸展性評価、日本機械学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会、平成 26 年 1 月 11 日、仙台市(東北大学)。

宮崎祐次、竹田一平、竹森久美子、伊藤浩行、山本衛、低強度の紫外線照射がヘアレスラット皮膚の生体力学的特性に及ぼす影響、日本機械学会第 24 回バイオフロンティア講演会、平成 25 年 11 月 2 日、京都市(同志社大学)。

宮崎祐次、竹森久美子、伊藤浩行、山本

衛、ヘアレスラット皮膚の生体力学的特性に及ぼす紫外線照射の影響、日本実験力学会 2013 年度年次講演会、平成 25 年 8 月 22 日、由利本荘市(由利本荘市文化交流館)。

宮崎祐次、藪定彦、竹森久美子、伊藤浩行、山本衛、創傷治癒過程におけるヘアレスラット皮膚の生体力学的評価、日本機械学会第 23 回バイオフロンティア講演会、平成 24 年 10 月 6 日、弘前市(弘前文化センター)

竹森久美子、山本衛、伊藤浩行、Effects of Elastin Peptide from Bonito Bulbus Arteriosus on Vascular Structure and Function in Spontaneously Hypertensive Rat、15th International SHR Symposium、平成 24 年 9 月 27 - 28 日、オーストラリア(メルボルン)

竹森久美子、山本衛、伊藤浩行、エラスチンペプチドによる血管保護作用の検討、第 49 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会、平成 24 年 9 月 6 - 7 日、東京都(日大会館)

山本衛、宮崎祐次、藪定彦、竹森久美子、伊藤浩行、高血圧自然発症ラットより摘出した胸部大動脈の内圧負荷試験、日本実験力学会 2012 年度年次講演会、平成 24 年 7 月 15 日、豊橋市(豊橋技術大学)

山本衛、宮崎祐次、藪定彦、竹森久美子、伊藤浩行、ヘアレスラット皮膚に対する組織学的および生体力学的検討、日本実験力学会第 11 回バイオメカニクスカンファレンス、平成 24 年 4 月 28 日、新潟市(新潟大学)

藪定彦、宮崎祐次、竹森久美子、伊藤浩行、山本衛、ヘアレスラットより摘出した皮膚組織の生体力学的特性、日本機械学会第 22 回バイオフロンティア講演会、平成 23 年 10 月 7 日、津市(三重県アストプラザ)

竹森久美子、高血圧自然発症ラット(SHR)の血管構造および機能に及ぼすエラスチンペプチドの影響、美容・アンチエイ

ジング食品研究会 & 機能性食品用ペプチド
研究会第 1 回合同研究会、

平成 23 年 9 月 13 日、大阪市

竹森 久美子、伊藤 浩行、 高血圧
自然発症ラット (SHR/1zm) の血管機能にお
よぼすカツオ動脈球由来エラスチンペプチ
ドの影響、第 47 回高血圧関連疾患モデル学
会学術総会、平成 23 年 9 月 6 - 7 日、札幌
市 (北海道大学)

竹森 久美子、伊藤 浩行、 Effects of
elastin peptide on vascular structure and
function in SHR Smooth Muscle Symposium
2011、平成 23 年 5 月 27 日、カナダ (ナイ
アガラフォールズ)

竹森 久美子、伊藤 浩行、 カツオエ
ラスチン分解産物 Plorylglycine 慢性投与に
よる血管保護作用、 第 100 回日本病理学会
総会、平成 23 年 4 月 28 - 30 日、 横浜
市 (パシフィコ横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 浩行 (ITO Hiroyuki)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号： 60113148

(2) 研究分担者

山本 衛 (YAMAMOTO Ei)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号： 00309270

竹森 久美子 (TAKEMORI Kumiko)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号： 00288888

(3) 連携研究者 なし