

# 森林生物資源からの育毛活性成分の探索

九州大学大学院 農学研究院森林資源科学部門

近藤 隆一郎

The investigation of bioactive natural products has, in recent years, assumed a greater sense of urgency in response to the expanding human population and its subsequent demands for food, cosmetics, good health, and increasing areas of land on which to live. It has so far been known a lot of hair regrowth promoters of that the efficacies are mainly the stimulation of blood circulation and the vasodilatation. Recently the basic researches for hair growth and hair follicle cycle have been rapidly improved by the progress of cell culture technique and genetic engineering. In general the following factors have been mentioned as probable causes on hair loss: the hormonal effect of androgen, the inactivation of hair matrix cells, the reduction of blood circulation around hair follicle and so on. The purpose of this investigation is to identify extracts or components from plants having proliferating effects on mouse hair epithelial cells.

The proliferation activity of 49 samples prepared from extract of heartwood was examined. The extracts from *Cercidiphyllum japonicum* showed proliferation activity on hair epithelial cells by [<sup>3</sup>H] thymidine uptake assay. Structure-activity investigation suggested that catechol structure is important for expressing ability of proliferation activity on hair epithelial cells.

## 1. 緒言

樹木は化学的にはセルロース、ヘミセルロース、リグニン及び抽出成分に分類できる。特に、抽出成分は樹種により質的、量的に多種多様であり、これまでに様々な生理活性物質が報告されており<sup>1), 2)</sup>、これらから有用な機能を備えた物質が見つかる可能性は高いと考えられる。

また育毛剤の需要は年々高まってきている。従来、育毛剤のターゲットは中高年の男性であったが、近年の社会的環境の変化に伴い若年層や女性にまでその需要が拡大している。以前の育毛剤は頭皮の環境整備や栄養補給、経験的な民間薬が主であった。しかし近年、毛の成長や脱毛症に関する基礎的研究の進展により見いだされた知見に基づく新しい観点からの育毛活性成分の開発が試みられるようになってきている<sup>3)</sup>。本研究で着目した毛根由来上皮系細胞は最終的に毛に分化する細胞であり、同細胞の増殖促進活性を有する物質は育毛剤原料の候補となり得る。

そこで本研究では豊富な生理活性成分を有している樹木抽出物からの育毛活性成分の探索として、毛根由来上皮系細胞増殖促進物質を見出すことを目的とした。

## 2. 実験

### 2.1 毛根由来上皮系細胞の培養

毛根由来上皮系細胞の単離および培養は Tanigaki<sup>4)</sup> の方法を一部改良して行った。

4日齢マウスより背部皮膚片を採取した。皮膚片を幅2~3mm程度の短冊状にし、その皮膚片を500unit/mL ディスパーゼ入り5% FBS-DMEMに移し、4℃で17.5時間静置した。この際に抗生物質 (GIBCO, Antibiotic-antimycotic) を1% v/vとなるように添加した。

ディスパーゼ処理した皮膚片を、ピンセットを用いて表皮を剥離除去し、真皮を0.25% コラゲナーゼ入り5% FBS-DMEMに移した。これを37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後、真皮の固まりが見えなくなるまでピペッティングを行い、1000rpmで5分遠心し、真皮繊維芽細胞および毛根組織を得た。

遠心後、ペレットにPBS (-)を加え、十分に懸濁させた後、真皮繊維芽細胞を取り除くために400rpmで1分遠心処理し、上清を吸引除去した。この操作を4回繰り返した。さらに真皮繊維芽細胞を取り除くために70μmのフィルターを通し、フィルター上に残ったものをバックウォッシュし、これを毛根組織とした。

得られた毛根組織を遠心処理で集め、0.25%トリプシン/0.1% EDTA溶液を加え、5分間ピペッティングした。FBSをトリプシンと同量加え、さらにPBS (-)を10倍量加えた。この細胞懸濁液をシリコンメッシュで濾過し、シリコンメッシュを通過してきたものを毛根由来上皮系細胞とした。

得られた毛根由来上皮系細胞を遠心後、上清を吸引除去し、5% FBS-DMEMに懸濁した。血球計算盤にて細胞数を計測し、所定濃度となるように5% FBS-DMEM (0.5



Investigation on active compounds of hair growth from forest bioresources

Ryuichiro Kondo

Laboratory of Systematic Forest and Forest Products Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University

%抗生物質を含む)にて細胞を希釈した。type 1 collagen でコートした 24well plate (FALCON) に  $5 \times 10^5$  cells/well の細胞密度で播種した。播種した細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 17 時間培養した。

17 時間培養後、5%FBS-DMEM を吸引除去し、PBS (-) で洗浄後、培地を MCDB153 (SIGMA) (insulin: 5 µg/mL, hydrocortisone: 1.4 µM, EGF: 5ng/mL, BPE: 50µg を含む) に交換し、培養を続けた。培養は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で行った。なお MCDB 153 に培地交換した日を培養初日と定義した。

## 2.2 毛根由来上皮系細胞増殖促進活性評価法

所定期間培養した毛根由来上皮系細胞に [<sup>3</sup>H] thymidine 溶液 (8KBq/well) (statistic ability, 1.81TBq/mmol) (Amersham) を添加し一定時間取り込ませた。その後、各 well を冷 PBS (4°C) で 2 回洗浄、冷 10%トリクロロ酢酸で 1 回洗浄した。さらに冷 10%トリクロロ酢酸を加え、4°C で 30 ~ 60 分静置した。トリクロロ酢酸を除去後、1N の NaOH を添加し 1 時間以上 37°C で静置した。その後、数回ピペティングし液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

## 2.3 サンプル調製およびスクリーニング

国産樹木 (主に落葉広葉樹) は九州大学演習林よりサンプリングした。直径が 20cm 以上の幹もしくは枝を伐採し、心材部と樹皮に分けた。心材部、樹皮それぞれを木粉 (#80pass) にし、室温でメタノールに浸して 1 日静置を 3 回繰り返すことによりメタノール抽出物を得た。

タイ産樹木は葉部、茎部、花部に分けそれぞれをアセトン抽出した。

調製した抽出物を毛根由来上皮系細胞培養初日に添加 (1/1000v/v、エタノール溶液) した。4 日間培養後、[<sup>3</sup>H]thymidine を添加し細胞増殖促進活性を評価した。なお溶媒のみを加えたものを control とし、control を 100% として各サンプルの細胞増殖促進活性を評価した。

## 2.4 カツラ (Cercidiphyllum japonicum) に含まれる成分の探索

カツラ材部メタノール抽出物 2474mg を n-ヘキサン、エーテル、酢酸エチルで逐次分配し、n-ヘキサン可溶部、エーテル可溶部、酢酸エチル可溶部、水層残渣を得た。各可溶部の重量を測定し、分配比を算出した後、各可溶部の細胞増殖促進活性について試験した。さらにエーテル可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン→酢酸エチル→メタノール) により 8 つに分画した。各画分に含まれる成分を逆相分取 HPLC により単離し、NMR、MS、旋光度により同定した。

## 3. 結果

### 3.1 毛根由来上皮系細胞増殖促進活性評価系の確立

細胞増殖促進活性評価系の確立の際にポジティブコントロールとして毛根由来上皮系細胞増殖促進効果ならびに発毛効果が報告されている minoxidil (70ppm) を用いた。よって minoxidil と control の間に顕著な [<sup>3</sup>H]thymidine 取り込み量の差が観察される系の構築を目的とした。

培養 2 日目以降の [<sup>3</sup>H]thymidine 取り込み量を経時的に測定した結果培養 4 日目に control と minoxidil 添加系に差が観察された (Fig. 1)。この結果から control と minoxidil 添加系に差が観察されるのは培養 4 日目前後であることが判明した。また control の取り込み量は経時的に減少していくのに対し、minoxidil 添加系では培養 4 日目以降から取り込み量が減少している。Control は分化し、その結果、増殖能が失われ取り込み量が減少していると考えられる。一方 minoxidil は毛根由来上皮系細胞の分化を遅延、増殖期間を延長するために培養 4 日目から [<sup>3</sup>H]thymidine 取り込み量に差がでていると考えられる。

よって minoxidil と同様の効果を持つ物質の探索を行うことを目的に、スクリーニングでは培養初日にサンプルを添加し、培養 4 日目に [<sup>3</sup>H]thymidine を添加しその取り込み量を測定することで各サンプルの毛根由来上皮系細胞増殖促進効果を評価することとした。

### 3.2 樹木抽出物のスクリーニング

49 種の樹木抽出物をスクリーニングした結果、アカマツ心材メタノール抽出物、カツラ心材メタノール抽出物、ニセアカシア樹皮メタノール抽出物、Albizia myriophylla 葉部アセトン抽出物に minoxidil と同等の細胞増殖促進活性が観察された (Fig. 2)。

最も再現性よく、また入手が容易であるカツラ材部メタノール抽出物について培養 2 日目以降の [<sup>3</sup>H]thymidine 取

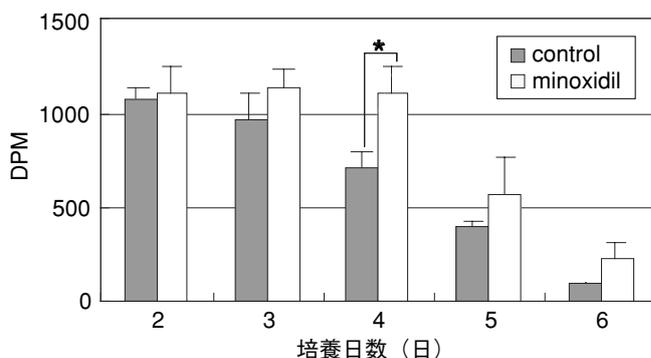


Fig.1 [<sup>3</sup>H] thymidine取り込み量の経時変化 mean±SD, n=3, \*p<0.05 to control

り込み量を経時的に測定した結果、カツラ材部メタノール抽出物にも minoxidil と同様に毛根由来上皮系細胞の増殖期間の延長効果が観察された (Fig. 3)。このことからカツラ材部メタノール抽出物に minoxidil と同様の効果をする物質が含まれると考えられる。

### 3.3 カツラ材部メタノール抽出物に含まれる成分の探索

カツラ材部メタノール抽出物に着目し、これに含まれる成分の探索を行った。有機溶媒分配後の各可溶部の細胞試験結果 (Fig. 4) を示す。細胞試験の結果より、エーテル可溶部に 1 ppm、0.1 ppm 両濃度において高い毛根由来上皮系細胞増殖促進活性が観察された。そこでエーテル可溶部に含まれる成分の探索を行った。その結果 (2R,3R) - (+) - aromadendrin、kaempferol、sexangularetin、(2R,3R) - (+) - taxifolin、quercetin、(2R,3R) - (+) - ampeloptin、myricetin、gallic acid を同定した (Fig. 5)。kaempferol、sexangularetin 以外の単離・同定した化合物を細胞試験に供したところ (2R,3R) - (+) - taxifolin、

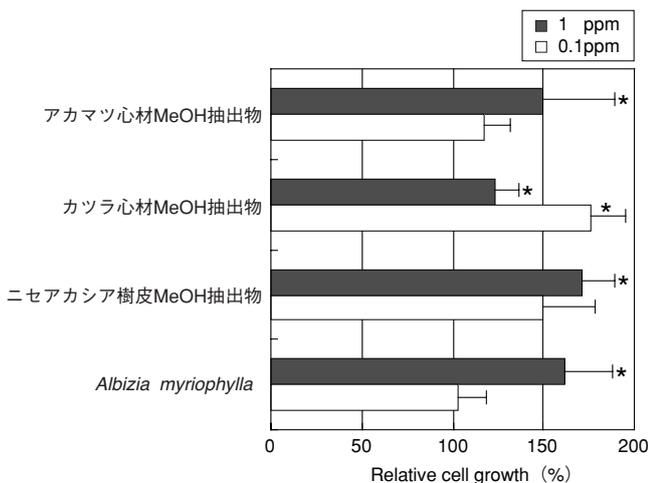


Fig.2 樹木抽出物の毛根由来上皮系細胞増殖促進活性評価系を用いたスクリーニング結果  
mean±SD, n=3, \*p<0.05

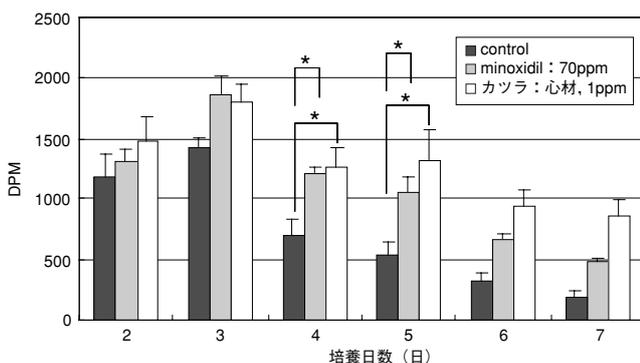


Fig.3 カツラ材部メタノール抽出物添加系の [3H] thymidine 取り込み量の経時変化。  
mean±SD, n=3, \*p<0.05 to control

quercetin、(2R,3R) - (+) - ampeloptin、myricetin、gallic acid に有意な活性が観察された (Fig. 6)。これら活性を示した化合物のどのような構造が活性発現に寄与しているの検討するために、共通構造に着目した構造-活性相関を行った。

### 3.4 フラボノイドおよび関連化合物の細胞増殖促進活性

細胞増殖試験に供した化合物の一部を Fig. 7 に、試験結果を Fig. 8 に示す。フラボノイド化合物では flavone、(±) - 4'-hydroxyflavanon、(±) - naringenin、apigenin に活性が観察されなかった。B 環の水酸基パターンに注目するとカテコール構造を有するもの (luteolin、(±) - eriodictyol、(+) - catechin、(-) - epicatechin、(-) - epigallocatechin (EGC)) に活性が観察された。またフラボノイド以外の化合物でもカテコール構造を有している

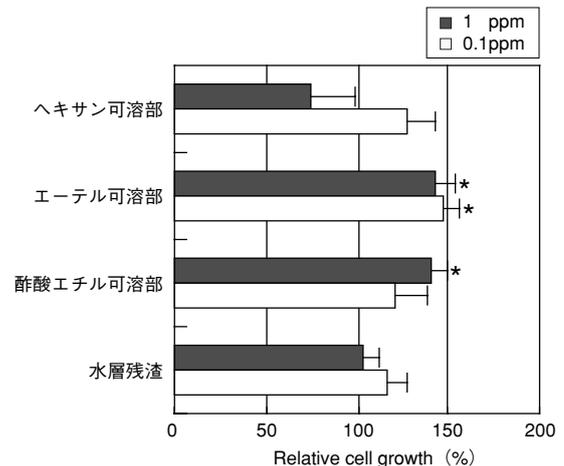


Fig.4 カツラ材部メタノール抽出物各可溶部の細胞増殖促進活性  
mean±SD, n=3, \*p<0.05

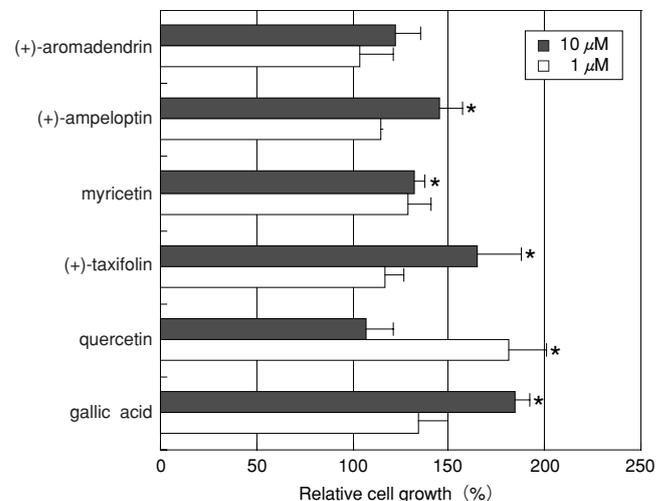


Fig.6 カツラ材部メタノール抽出物エーテル可溶部より単離した化合物の細胞増殖促進活性  
mean±SD, n=3, \*p<0.05

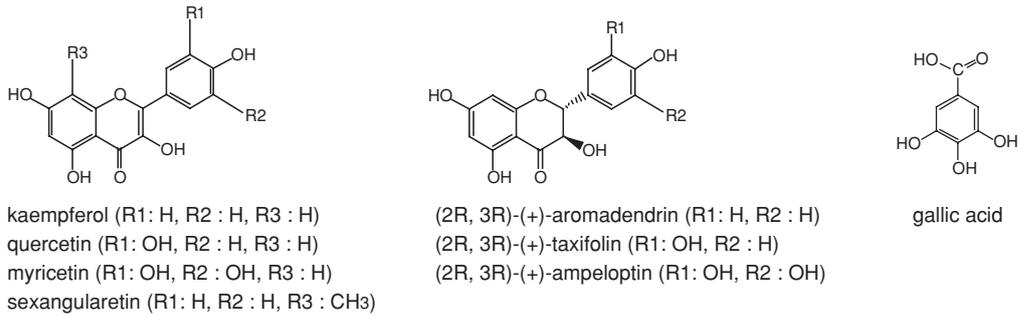


Fig.5 カツラMeOH抽出物エーテル可溶部より単離・同定された化合物

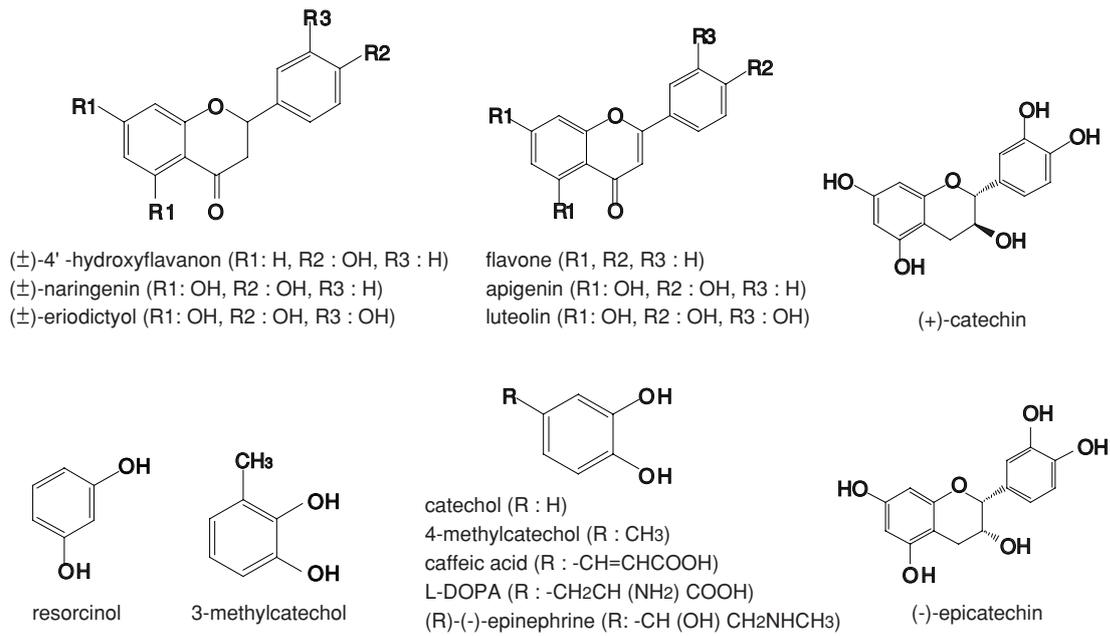


Fig.7 フラボノイドおよび関連化合物

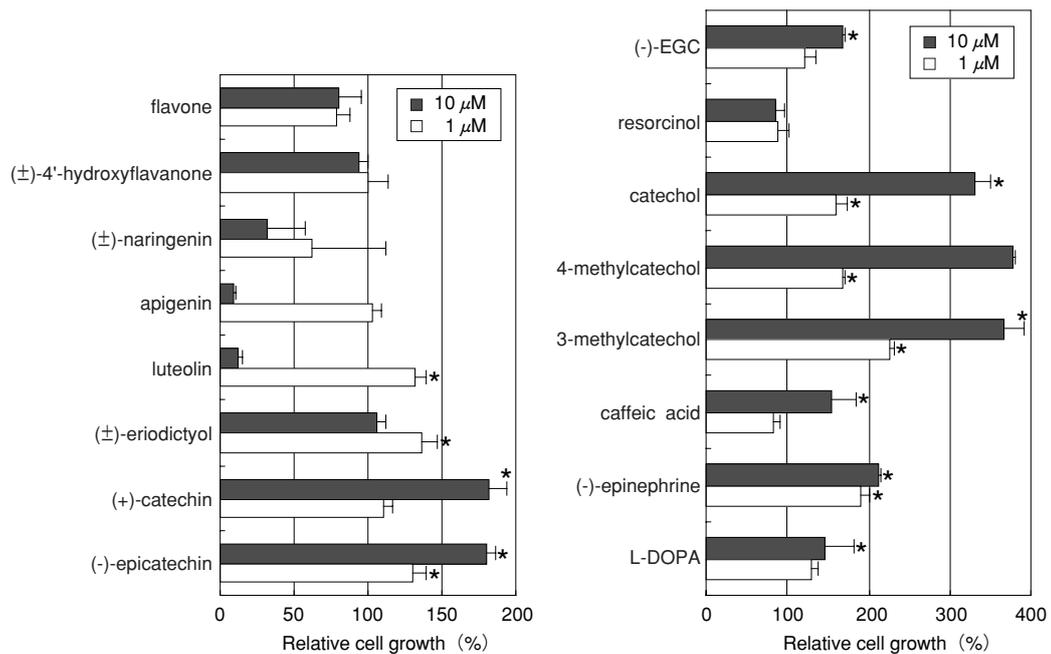


Fig.8 フラボノイドおよび関連化合物の細胞増殖促進活性  
 mean±SD, n=3, \*p<0.05 to control

もの (catechol, 4-methylcatechol, 3-methylcatechol, caffeic acid, L-DOPA, (-) -epinephrine) に活性が観察された。カツラより単離された活性化合物も分子内にカテコール構造を有している。これらの結果から活性発現にはカテコール骨格の存在が重要であることが示唆された。

#### 4. 考 察

今回、毛根由来上皮系細胞の培養系および [<sup>3</sup>H] thymidine 取り込み法を用いた細胞増殖促進活性評価系を構築した。また minoxidil が毛根由来上皮系細胞の増殖期間を延長していることが示され、樹木抽出物より minoxidil と同様の効果を有する物質を探索した結果、カツラ材部メタノール抽出物を選抜した。カツラ材部メタノール抽出物は毛根由来上皮系細胞に対し、minoxidil と同様に同細胞の増殖期間の延長が観察された。

カツラ材部メタノール抽出物の活性成分として gallic acid, taxifolin, quercetin, myricetin, ampeloptin などのポリフェノール類を同定した。これらの化合物をもとに構造 - 活性相関を検索したところ、分子内にカテコール構造を有するポリフェノール類に活性が観察された。このことから毛根由来上皮系細胞増殖促進活性の発現には分子内にカテコール構造を有していることが重要であることが示

唆された。

今後は今回見出された活性化合物の活性発現機構の解明を行うとともに活性化合物をリードとした新規育毛剤の開発が期待される。

#### (引用文献)

- 1) C. Polotti, R. Kondo, K. Shinmizu et al: An examination of the anti fungal components in the heartwood extracts of *Pterocarpus indicus*. Mokuzaigakkaishi, 41, 593-597 (1995)
- 2) K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai: The inhibitory components from *Artocarpus incisus* on melanin Biosynthesis. Planta Medica, 64, 408-412 (1998)
- 3) Takahashi T, Kamiya T, Yokoo Y: Proanthocyanidins from grape seeds promote proliferation of mouse hair follicle cells in vitro and convert hair cycle in vivo. Acta Derm-venereol, 78, 428-432 (1998)
- 4) Tanigaki N, Ando H, Ito M, Hashimoto A, Kitano Y. Electron microscopic study of cultured cells from the murine hair tissues: cell growth and differentiation. Arch Dermatol Res 282, 402-407 (1990)