

タイ産マンゴスチーン果実抽出物の 多機能性化粧品への応用研究

東北大学大学院薬学研究科分子生物薬学

大泉 康

The fruit hull of mangosteen, *Garcinia mangostana*, has been used for many years as traditional medicine for treatment of skin infection, wounds, and diarrhea in Thai. However, its mechanism of action as a medicine has not been elucidated. In the present study, we examined the effects of mangosteen extracts (100% ethanol, 70% ethanol, 40% ethanol and water) on prostaglandin (PG) E₂ synthesis and histamine release. All extracts of mangosteen potently inhibited A23187-induced PGE₂ synthesis in C6 glioma cells. Also it was found that the 40% ethanol extract of mangosteen appreciably reduced IgE-mediated histamine release from RBL-2H3 cells. Furthermore γ -mangostin, one of main constituents in the fruit hull of this plant, inhibited COX-2 gene transcription by preventing the IKK/I κ B/NF- κ B system in C6 rat glioma cells. These results suggest that the 40% ethanol extract of mangosteen has potent inhibitory activities of both PGE₂ synthesis and histamine release. It is also suggested that γ -mangostin serves as an anti-inflammatory agent.

1. 緒言

タイやインドネシア等の東南アジアで広く栽培されているマンゴスチーンは、古くから抗炎症作用や抗アレルギー作用を示す民間薬として使用されてきた (Harborne and Baxter, 1993; Chairungsrilerd *et al.*, 1996)。このように長年使用され、強い治療効果を示すにもかかわらず、これまでその科学的根拠について、殆ど検討されていなかった。本研究では、炎症やアレルギー反応の重要なケミカルメディエーターであるプロスタグランジンおよびヒスタミンに着目し、マンゴスチーン果実 (果皮) 抽出物のプロスタグランジン生合成・遊離阻害活性およびヒスタミン遊離阻害活性の検討、さらにシクロオキシゲナーゼ (COX) の発現に対するマンゴスチーン果皮の主成分の一つである γ -mangostin の抗炎症作用の機構について解明研究を行った。

2. 実験方法

2.1 マンゴスチーン果皮抽出物の調製および γ -mangostin の単離精製

乾燥させたマンゴスチーン果皮 1 kg に対し、water, 40% ethanol, 70% ethanol 若しくは 100% ethanol、各々 10 l で抽出を行った。抽出 1 時間後、各溶出溶媒を濃縮させて、各溶媒の抽出物とした。 γ -mangostin の単離精製



Approach for application of extracts of the fruit hull of mangosteen, *Garcinia mangostana*, to development of multifunctional cosmetics

Yasushi Ohizumi

Department of Pharmaceutical Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

は既報の方法に従った (Nakatani *et al.*, 2004)。

2.2 動物

Wistar 系雄性ラット (7 ~ 8 週令, 180 ~ 200g, specific pathogen-free, Charles River Japan, Kanagawa, Japan) を使用した。なお、動物実験は、東北大学大学院薬学研究科動物実験委員会の「実験動物取り扱いに関する指針」に基づいて行った。

2.3 カラゲニンによるラット足蹠浮腫法

エーテル麻酔後、懸濁液 500 ml を腹腔内に投与した。懸濁液の種類が分かるよう尾の付け根周辺に印をつけた。両後肢の踝まで Milli Q 水を入れた測定用試験管に浸け、体積を測定した。測定から 30 分後、再び麻酔し、前日調製した 1% カラゲニン生理食塩水懸濁液を両後肢の足蹠に投与した。カラゲニン投与 5 時間後麻酔し、浮腫をおこさせた両後肢を再び測定用試験管に浸け、体積を測定した。カラゲニン投与前後の後肢体積 V_0 、 V_t を用い、次式により浮腫率を算出した (Tasaka *et al.*, 1980)。

$$\text{浮腫率} : E = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100 (\%)$$

V_0 = 起炎物質投与前の足容積

V_t = 起炎物質投与後の足容積

2.4 細胞の培養

ラット肥満細胞 RBL2H3 細胞および C6 ラットグリオーマ細胞の培養は既報の方法に従った (Nakatani *et al.*, 2002)。

2.5 抗原抗体反応による RBL-2H3 細胞からのヒスタミン遊離

RBL-2H3 を 12 穴プレートに培養し、PIPES バッファー (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.6 mM MgCl₂, 1.0 mM CaCl₂,

5.5 mM glucose, 10 mM PIPES, pH 7.4) にて洗浄後、細胞をマウス抗 DNP 抗体 (IgE) と 37°C でインキュベートし、細胞を感作した。細胞を洗浄後、各被験サンプルとインキュベートした後、ホスファチジルセリン 10 mg/ml を処理し、さらに抗原である DNP-BSA によって細胞を刺激した。メディアウム中に遊離したヒスタミン量と細胞内に残存したヒスタミン量をそれぞれ測定し、全量に対する遊離量を百分率で表した。

2.6 PGE₂ の測定

C6 細胞を Eagle's minimum essential medium-20 mM HEPES, pH 7.35 (EMEM-HEPES) 中で各被験サンプルを加えて 10 分間インキュベートした。その後、A23187 を 10 分間刺激することにより、細胞からの PGE₂ 遊離を誘導した。インキュベート後の上清に氷冷した EDTA-インドメタシンを速やかに加え、-20°C で保存した。PGE₂ の定量は既報の方法 (Nakatani *et al.*, 2004) に従った。

2.7 RT-PCR 法による COX-1 および COX-2 mRNA の発現解析

C6 細胞を 6 ウェルプレートに 2.0×10^5 cells/ウェルの濃度で播き、2 日間培養した。γ-mangostin または vehicle を加えて 1 時間インキュベートした後、10 μg/ml LPS を加えて、更に 1 時間インキュベートした。RT-PCR 法による COX-1 及び COX-2 mRNA の発現解析は既報の方法 (Nakatani *et al.*, 2004) に従った。

2.8 IKK 活性の測定

C6 細胞を 150 mm dish に 5.0×10^5 cells/dish の濃度で播き、2 日間培養した。10 μg/ml LPS と 10 分間インキュベートし、PBS を用いて直ちに洗浄した。細胞抽出物から免疫沈降法により、anti-IKKα/β antibody で IKKα/β を回収した。Kinase 反応溶液 (25 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MgCl₂ · 6H₂O, 0.1 mM Na₃VO₄, 2 mM DTT, 5 mM β-glycerolphosphate, 1 μg of IκBα (1-317), [³²γ-P]-ATP) に回収した IKKα/β を加え、γ-mangostin または vehicle と 30°C の恒温槽中で 30 分間インキュベートした。その後、サンプルは SDS-PAGE で分離し、molecular imager (GS363, Bio-Rad) を用いて解析を行った (Nakatani *et al.*, 2004)。

2.9 トランスフェクションおよびレポーター遺伝子アッセイ

C6 細胞を 24 ウェルプレートに 3.0×10^4 cells/ウェルの濃度で播き、2 日間培養した。Lipofectamine 2000 を用いてレポーター遺伝子を C6 細胞にトランスフェクションした (Nakatani *et al.*, 2004)。また同時に pRG-TK ベ

クターもトランスフェクションした。13 時間培養後、γ-mangostin または vehicle を加えて 3 時間インキュベートした。その後、1 μg/ml LPS を加えて更に 8 時間インキュベートした後、細胞を回収し、luciferase 活性を測定した (Nakatani *et al.*, 2004)。

2.10 データの統計処理

実験値は、平均値 ± 標準誤差として示し、有意差検定は analysis of variance (ANOVA) を用いて行った。

3. 実験結果

3.1 カラゲニンによるラット足趾浮腫に対するマンゴスチーン果皮抽出物の作用

Wistar 系雄性ラットの後肢にカラゲニンを投与すると、誘発性血管透過性亢進に基づく浮腫を発症することが知られている。この炎症モデルを用いて、後肢の浮腫の変化を測定することにより、マンゴスチーン果皮抽出物の抗炎症作用を検討した。カラゲニンを 1% の濃度にした溶液を 75 μl 投与した際に 5 時間後に誘発される浮腫を 100% とし、マンゴスチーン果皮各抽出物による浮腫の抑制作用を検討した (Fig. 1)。抽出物の中で、70% ethanol 抽出物及び 100% ethanol 抽出物は、100 mg/kg の投与量で約 50% の抑制活性を示した。マンゴスチーン果皮 water 抽出物は、100 mg/kg の投与量で約 60% の抑制活性を示し、40% ethanol 抽出物は約 75% の顕著な抑制活性を示した。対照薬として用いた甜茶 (*Rubus Suavissimus*) 抽出物は、10 mg/kg の投与量で約 70% と比較的強い抑制活性を示したが、100 mg/kg の投与量で比較すると、マンゴスチーン果皮 water 抽出物及び 40% ethanol 抽出物と同等な活性であった。

3.2 抗原抗体反応誘発性ヒスタミン遊離に対するマンゴスチーン果皮抽出物の作用

これまでの *in vivo* レベルの実験結果から、マンゴスチーン果皮抽出物が抗炎症作用を示すことが明らかになった。その作用メカニズムを検討するため、*in vitro* レベルの検討を行った。まず炎症の初期段階において、細胞内のケミカルメディエーターとして増加することが知られているヒスタミン遊離について検討した。

RBL2H3 細胞は、抗炎症のメカニズムの解明を行うときに汎用される細胞で、抗原抗体反応によりヒスタミン遊離を引き起こすことが知られている。RBL2H3 細胞を monoclonal mouse anti-DNP-BSA IgE 抗体感作させた後、DNP-BSA 刺激により遊離されるヒスタミン量を指標とし、抗ヒスタミン遊離作用の検討を行った

マンゴスチーン果皮各抽出物はヒスタミン遊離抑制作

用を示した。その中で、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で water 抽出物が約 40% の抑制活性および 40% ethanol 抽出物が約 80% の抑制活性をそれぞれ示した (Fig. 2)。対照薬である甜茶

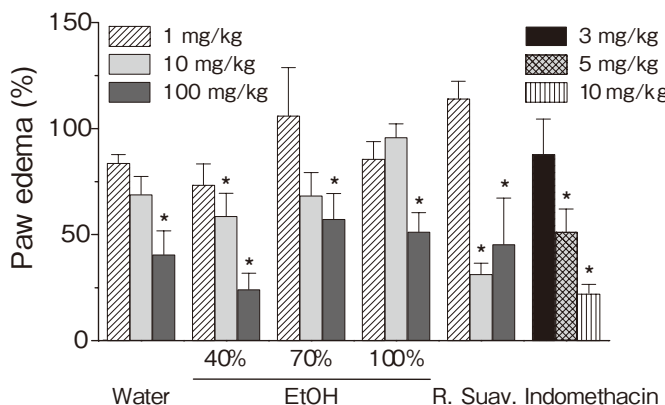


Fig. 1 Concentration-dependent inhibitory effects of several mangosteen extracts, water extract of *rubus suavissimus* and indomethacin on carrageenan-induced rat paw edema.

Foot volume was measured in 5 h after carrageenan (1%, 75 μl) injection into the hind paw. Each extract, indomethacin or vehicle was administered subcutaneously 30 min before the carrageenan injection. Each column represents the mean ($n = 6$) with S.E. of three independent determinations. *, $p < 0.05$ compared with the value for non-treated rat without carrageenan.

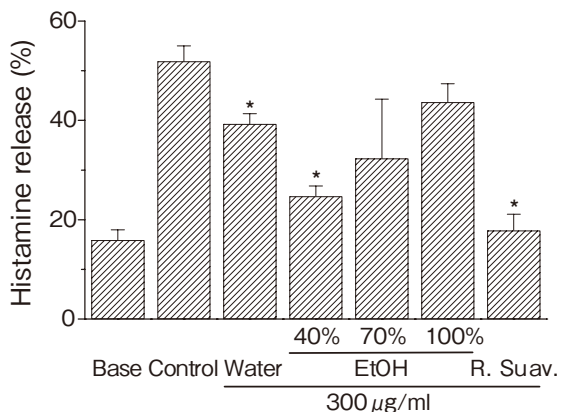


Fig. 2 Inhibitory effects of several mangosteen extracts and water extract of *rubus suavissimus* on histamine release from RBL2H3 cells.

The cells were sensitized by anti-DNP-BSA IgE antibody (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1 h. After sensitization, the cells were incubated with each extract or vehicle for 5 min. The cells were stimulated by antigen (DNP-BSA, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min. Results were expressed as percentage of histamine release (released histamine plus histamine remaining in the cells as 100%). Each column represents the mean of percentage of histamine release with S.E. of three independent experiments. *, $p < 0.05$ compared with the value for non-treated cells without antigen and antibody.

抽出物も同じ濃度で 90% 以上の抑制活性を示した。有意な抑制活性が認められた 3 種の抽出物において、濃度依存的な解析を行った。40% ethanol 抽出物は、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度において約 80% の顕著な抑制作用が認められ、同濃度で殆ど抑制活性の見られなかった甜茶抽出物と比較してかなり強いものであった。

3.3 PGE₂ 生成に対するマンゴスチーン果皮抽出物の作用

炎症の中期から後期にかけて、PGE₂ が重要な働きを示すことが知られている。PGE₂ は炎症反応を仲介するケミカルメディエーターであり、血管拡張及び血管透過性亢進等の作用を示す。Ca²⁺ イオノフォアとして知られている A23187 は、中枢神経系のグリア細胞において PLA₂ を活性化し、アラキドン酸遊離を引き起こして、プロスタグランジン類の生成を誘発することが知られている。グリア細胞のモデル細胞として広く使用されている C6 細胞を用いて、A23187 刺激による PGE₂ 生成に対するマンゴスチーン果皮各抽出物の作用を検討した (Fig. 3)。マンゴスチーン果皮各抽出物は 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度において、A23187 誘発性 PGE₂ 生成を顕著に抑制したが、対照薬の甜茶抽出物はほとんど作用を示さなかった。また、各抽出物の濃度依存性を検討した結果、マンゴスチーン果皮 70% ethanol 抽出物は、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でほぼ完全に PGE₂ 生成を抑制し、40% 及び 100% ethanol 抽出物においても、

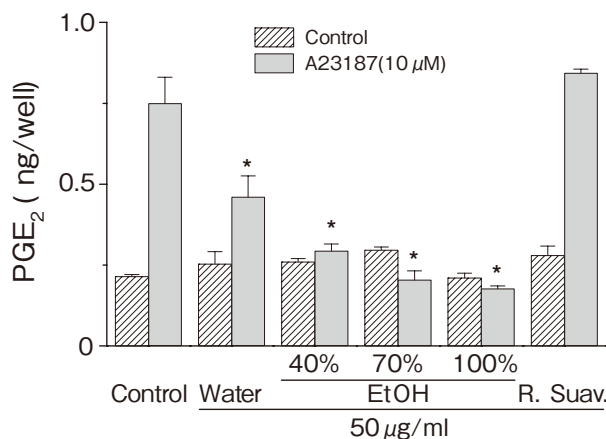


Fig. 3 Inhibitory effects of several mangosteen extracts and water extract of *rubus suavissimus* on A23187-induced PGE₂ release from C6 cells.

The cells were pre-incubated with each extract or vehicle for 10 min, and stimulated by 10 μM A23187 for 10 min. The PGE₂ released in the medium was determined by radioimmunoassay. Each column represents the mean of PGE₂ with S.E. of three independent determinations. *, $p < 0.05$ compared with the value for non-treated cells without A23187.

30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でほぼ100%の抑制活性を示した。甜茶抽出物は、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで濃度を上げて、ほとんど抑制活性を示さなかった。

3.4 PGE₂ 生成に対する γ -mangostin の作用

つぎに、この A23187 誘発性 PGE₂ 生成に対する γ -mangostin の作用を検討した (Fig. 4)。A23187 により増加した PGE₂ 生成を、 γ -mangostin は前処置することにより濃度依存的に抑制し、その IC₅₀ 値は、約 5.0 μM であった。

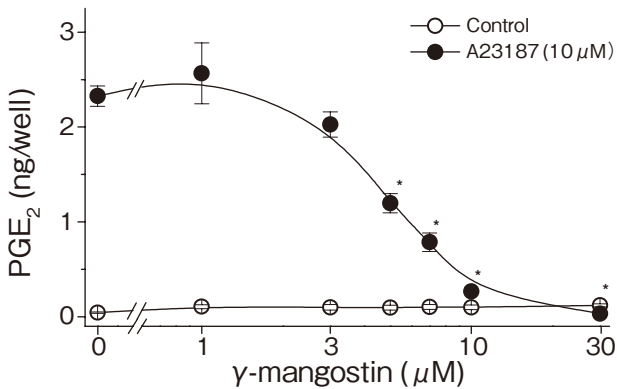


Fig. 4 Concentration-dependent inhibitory effects of γ -mangostin on A23187-induced PGE₂ release from C6 cells.

The cells were pre-incubated with the indicated concentrations of γ -mangostin for 10 min and stimulated by 10 μM A23187 for 10min. The PGE₂ released in the medium was determined by radioimmunoassay. Each point represents the mean of PGE₂ with S.E. of three independent determinations. *, $p < 0.05$ compared with the value for non-treated cells without A23187.

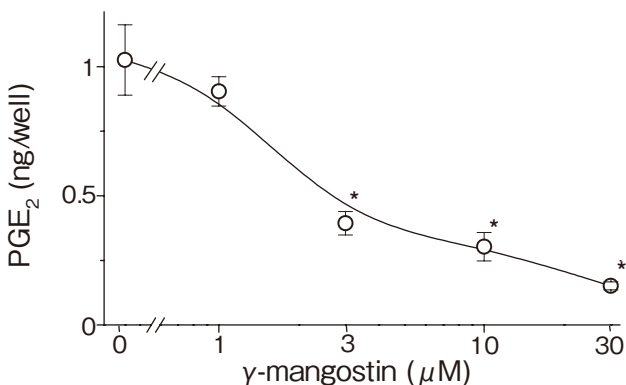


Fig. 5 Concentration-dependent inhibitory effects of γ -mangostin on endogenous PGE₂ release from C6 cells.

The cells were incubated with the indicated concentrations of γ -mangostin for 18 h. The PGE₂ released in the medium was determined by radioimmunoassay. Each point represents the mean of PGE₂ with S.E. of three independent determinations. *, $p < 0.05$ compared with the value for non-treated cells.

3.5 内因性 PGE₂ 生成に対する γ -mangostin の作用

また、 γ -mangostin を C6 細胞に加え、18 時間後培養メディアウム中に遊離された PGE₂ 量を測定した結果、 γ -mangostin は濃度依存的に PGE₂ 生成を抑制し、IC₅₀ 値は約 2 μM であった (Fig. 5)。

3.6 γ -mangostin は IKK 活性を阻害して NF- κ B の標的遺伝子である COX-2 遺伝子の発現を抑制する

LPS および TNF α などの炎症性サイトカインによる COX-2 mRNA の発現誘導に、NF- κ B の活性化が関与することが知られている。COX は、アラキドン酸から PGE₂ への変換を行う酵素であり、炎症時に大量に生成される COX-2 は、炎症刺激後数時間内に発現する酵素である。この NF- κ B の制御系において、IKK は I κ B をリン酸化して NF- κ B の転写活性を促進する。すなわち、 γ -mangostin による LPS 誘発性 COX-2 mRNA 発現誘導の抑制作用は、NF- κ B/I κ B 系を介した COX-2 遺伝子の転写抑制の可能性が考えられた。そこで、IKK 活性に対する γ -mangostin の作用を検討した。 γ -mangostin は IKK 活性を濃度依存的に抑制した (Fig. 6)。

また、 γ -mangostin は LPS 誘発性の NF- κ B 依存的な転写促進を抑制した (Fig. 7)。さらに COX-2 遺伝子の NF- κ B 応答配列を含むプロモーター領域に依存的な転写促進を

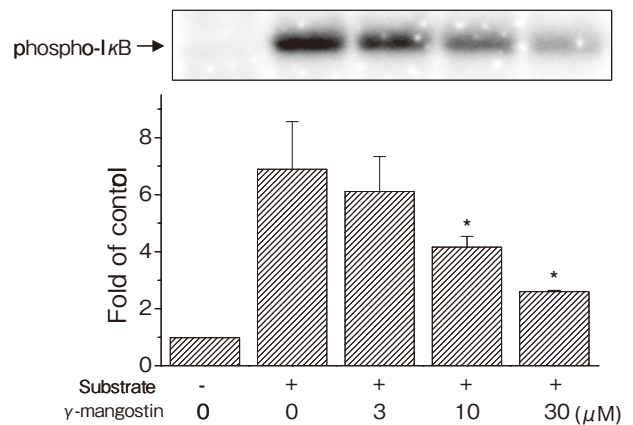


Fig. 6 Concentration-dependent inhibitory effects of γ -mangostin on IKK activity of C6 cells.

The cells were harvested, lysed and immunoprecipitated with anti-IKK $\alpha\beta$ antibody. The kinase assay was carried out in 25 μl of kinase buffer containing 5 μM cold ATP, 10 μCi [γ -³²P]-ATP (5000 Ci/mmol) and 1 μg of I κ B α as a substrate and incubated with the indicated concentrations of γ -mangostin at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. The proteins were resolved by 11% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The densitometric data is calculated as the fold increases of non-treated cells. Each column represents the mean of phosphorylation of I κ B with S.E. of three independent determinations. *, $p < 0.05$ compared with the value for cells incubated with ATP and substrate.

抑制した。このような転写抑制活性を持つ γ -mangostin は、予想通り LPS 誘発性の COX-2 mRNA の発現を抑制し (Fig 8)、その結果 γ -mangostin によって COX-2 タンパク質の発現も抑制された。

4. 考察

今回、マンゴスチーンの果皮を water、40% ethanol、70% ethanol 及び 100% ethanol の各溶媒を用いて抽出し、各々の抽出物の抗炎症および抗アレルギー作用について検討し、その作用機序の解析を行った。これらのマンゴスチーン果皮抽出物は、ヒスタミン遊離及び PGE₂ 生成の抑制作用を示すことが明らかになった。その中でも 40% ethanol 抽出物が、ヒスタミン遊離及び PGE₂ 生成に対して抑制作用を示した。一方、花粉症やアトピー性皮膚炎等の炎症及びアレルギー作用に対し、有効性を示す生薬として近年、日本国内で甜茶抽出物が注目されている。甜茶抽出物は、ヒスタミン遊離を有意に抑制したが、PGE₂ 生成に対しては、全く影響を与えなかった。マンゴスチーン果皮抽出物、特に 40% ethanol 抽出物は、炎症及びアレルギーに対してきわめて有用である可能性が考えられ、また、興味深い化合物がそれに含まれている可能性も考えられる。

COX には構成的な発現を示す COX-1 と、炎症性サイトカインや LPS 等様々な刺激により誘導される COX-2

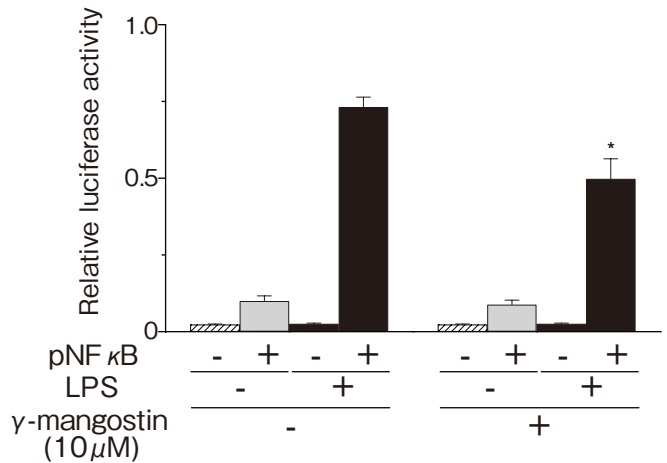


Fig. 7 Inhibitory effects of γ mangostin on LPS-induced enhancement of luciferase activity of pNF- κ B-Luc in C6 cells.

The cells were transfected with 0.475 μ g of pNF- κ B-Luc, dN-Luc (the NF- κ B-responsive element-deficient pNF- κ B-Luc) and 0.025 μ g of pRG-TK plasmid. After transfection, the cells were pre-incubated with the indicated concentration of γ mangostin for 3 h and incubated with 1 μ g/ml of LPS for 8 h. Relative luciferase activity was calculated as the ratio of firefly luciferase activity to *Renilla* luciferase activity. Each column represents the mean of luciferase activity with S.E. of three independent determinations. *, $p < 0.05$ compared with the value for co-transfected cells with pNF- κ B-Luc and pRG-TK plasmid which were treated with LPS alone.

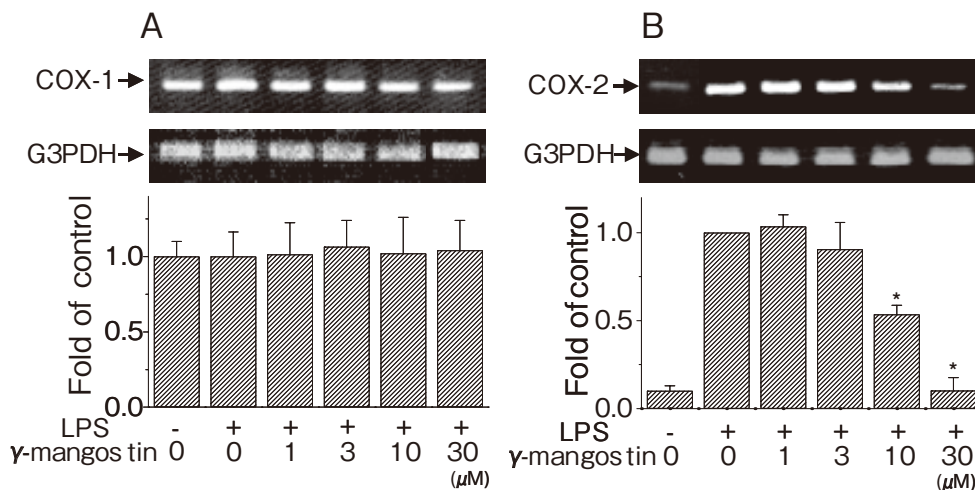


Fig. 8 Concentration-dependent effects of γ mangostin on the LPS-induced expressions of COX-1 (A) and COX-2 (B) mRNAs in C6 cells as measured by RT-PCR.

The cells were pre-incubated with the indicated concentrations of γ mangostin for 1 h and incubated with 10 μ g/ml of LPS for 1 h. Total RNA from C6 cells was reverse transcribed for cDNA synthesis and subjected to PCR. G3PDH mRNAs, which were included to serve as internal control, were shown. The densitometric data is calculated as the fold increases of non-treated cells. Each point represents the mean of expression of COX-1 or COX-2 with S.E. of three independent determinations. *, $p < 0.05$ compared with the value for non-treated cells without LPS.

の2種類のアイソザイムが存在し、種々のプロスタノイドの産生に関与している。本研究では、COX-2 遺伝子に対する転写レベルでの γ -mangostin の作用機序について詳細に検討したところ、 γ -mangostin の COX-2 転写抑制作用は、IKK 阻害に基づく NF- κ B の活性化の抑制によるものであることが明らかになった。RT-PCR 法を用いて、COX-2 mRNA レベルの発現について検討したところ、 γ -mangostin は濃度依存的に COX-2 mRNA の発現上昇を阻害した。

本研究では、マンゴスチーン果皮各抽出物の抗アレルギーおよび抗炎症作用メカニズム、さらに γ -mangostin の IKK/I κ B/NF- κ B 系を介した COX-2 遺伝子の転写抑制による抗炎症作用メカニズムを明らかにした。以上の結果より、タイ産マンゴスチーン果実抽出物の多機能性化粧品への応用が期待される。

(参考文献)

- 1) Chairungsilerd N., Takeuchi K., Ohizumi Y., Nozoe S., Ohta T. Mangostanol, a prenyl xanthone from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* **43**, 1099-1102 (1996).
- 2) Harborne J.B., Baxter H. "Phytochemical Dictionary," A Hand book of Bioactive Compounds from Plants, Taylor and Francis, London, 1993.
- 3) Nakatani K., Atsumi M., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Nakahata N., Ohizumi Y. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1137-1141 (2002).
- 4) Nakatani K., Yamakuni T., Kondo N., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Inoue H., Ohizumi Y. γ -Mangostin inhibits Inhibitor- κ B kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells. *Mol. Pharmacol.*, **66**, 667-674(2004).
- 5) Tasaka K., Meshi T., Akagi M., Kakimoto M., Saito R., Okada I., Maki K. Anti-inflammatory activity of a proteolytic enzyme, Prozime-10. *Pharmacology* **21**. 43-52 (1980).