

薬用人参の皮膚老化防止作用と育毛作用の分子メカニズム

東京医科歯科大学難治疾患研究所

古川 哲史

The earliest evidence of humans' use of herb for healing dates back to the Neanderthal period. In the late 20th century, with concerns over the iatrogenic effects of conventional medicine and desire for more self-reliance, interest in natural health increased and use of herbal medicines again became popular. Among >20,000 herbal products that are currently on the market, ginseng root is one of the most popular herbs. The name "ginseng" originates in the "panacea (cure-all)", and it exhibits varieties of actions, including modulation of immune responses, antineoplastic effects, and cardio-protection. In addition, recent data show that ginseng has beneficial effects on skin-care and hair growth, and ginseng is widely used as a cosmetology medicine in Eastern Asia.

Steroid saponin "ginsenoside" is the major constituent of ginseng; more than 30 ginsenosides are included in ginseng. In this study, we examined effects of ginsenoside Re which exerts the strongest bioactivities. Ginsenoside Re exhibits estrogenic actions in a dose-dependent manner. Estrogen exhibits its actions by transactivation of various genes, referred as a classical genomic pathway and by membrane-delimited signaling referred as a non-genomic pathway. Ginsenoside Re produces nitric oxide via the non-genomic pathway of estrogen receptor without activation of genomic pathway. This is because ginsenoside Re has a bulky side-chain which interferes with the co-activator recruitment. Thus, ginsenoside Re is considered as non-genomic pathway specific ligand of estrogen receptor. Since estrogen is known to increase collagen content in the skin and proliferate hair follicle cells, the role of estrogenic actions of ginsenoside Re in skin-care and hair growth should be examined in the future study.

1. 緒言

ハーブの医療に対する使用の歴史はネアンデルタール人までさかのぼる^{1,2)}。20世紀に入ってから近代医薬品の副作用に対する危惧や個人の健康に対する意識の高まりから、ハーブ薬品の使用頻度が再び増加傾向を示している。市販されているハーブ医薬品・ハーブサプリメントは2万種類以上あるが、その中で薬用人参 *Panax ginseng* は最も人気のあるハーブ医薬品の一つである³⁾。*Panax* はラテン語の *panacea* (=cure-all) に由来し万能薬として使用されており、免疫活性化作用・抗腫瘍作用・強心作用など様々な作用を有する。最近スキンケア・育毛に効果があることが注目されており、東アジアを中心として広く使用されているが、そのメカニズムは充分解明されていない。

薬用人参の主成分は steroid saponin の ginsenoside であり、現在では30種類以上の ginsenoside が含まれると考えられている^{4,5)}。薬用人参は閉経期に伴う様々な症状に有効であることが知られており、中国では更年期障害の治療薬として処方されている⁶⁾。乳がん由来細胞株 MCF-7 を用いた転写アッセイ実験では、人参にエストロゲン様作用

があることも報告されている^{7,8)}。そこで、本申請では薬用人参成分の性ホルモン作用の分子メカニズムを検討した⁹⁾。

2. 実験と考察

2・1 薬用人参の主成分 ginsenoside のエストロゲン様作用

申請者は性ホルモンであるテストステロン・エストロゲンが性ホルモン受容体を介する作用で、心筋のカリウムチャンネルを活性化することを報告している¹⁰⁻¹²⁾。そこで薬用人参の主成分 steroid saponin (=ginsenoside) の性ホルモン様作用の強さを、本アッセイ系を用いて検討した。薬用人参には30種類以上の ginsenoside の存在が知られている。現在市販されている ginsenoside は Rb1, Rc, Rd, Re, Rg1 の5種類であり、これらに関して検討した。Ginsenoside は3位と21位に糖鎖のついた panaxadiol と6位と21位に糖鎖のついた panaxatriol に分類されるが、ginsenoside Rb1, Rc, Rd は panaxadiol に、ginsenoside Re, Rg1 は panaxatriol に分類される(図1A)^{4,5)}。

これらの ginsenoside の心筋カリウムチャンネル活性化の濃度—反応曲線を取ってみると図1Bのようになり、ginsenoside Re が最も作用が強く、ginsenoside Rd はほとんど活性化作用を示さず、ginsenoside Rb1, Rc, Rg1 はこれらの中間の作用を示した。そこで以下の検討は ginsenoside Re のみを用いて行った。



Molecular mechanism for protection against skin aging and hair growth by *Panax ginseng*

Tetsushi Furukawa

Tokyo Medical and Dental University, Medical research Institute

2・2 Ginsenoside Re の性ホルモン受容体への結合アッセイ

Ginsenoside Re の性ホルモン受容体であるアンドロゲン受容体 (AR)・エストロゲン受容体 (ER)・プロゲステロン受容体 (PR) への結合アッセイを competitive binding assay を用いて行った。ジヒドロテストステロン (DHT) の AR への結合の IC_{50} 、エストラジオール (E2) の ER への結合の IC_{50} 、プロゲステロン (P4) の PR への結合の IC_{50} は、それぞれ 2.8nM、33.8nM、50.0nM であった (図2)。Ginsenoside Re も AR, ER, PR に対して濃度依存的に結合し、その IC_{50} はそれぞれ 59.0 μ M、80.6 μ M、80.6 μ M と比較的高濃度であった (図2)。

2・3 Ginsenoside Re のゲノム作用

性ホルモンの古典的作用は、脂溶性の性ステロイドホルモンが脂質2重層からなる細胞膜を透過し、細胞質内にあ

る性ホルモン受容体に結合し、ホルモン-受容体複合体が核内へ移行し、性ホルモン応答領域を有する遺伝子に結合し転写調節を行うゲノム作用であり、これは転写-翻訳の過程を経ることから数時間~数日の時間経過で起こる反応である (図3)¹³⁾。ところが近年、数秒~数分のゲノム作用では説明できない早い経過で起こる反応が性ホルモンにはあることが判明し、非ゲノム作用と呼ばれ特に末梢組織における重要性が注目を集めている^{14,15)}。非ゲノム作用は細胞膜に局在した反応であり、チロシキナーゼ c-Src、脂質キナーゼである PI3-kinase、Ser/Thr キナーゼである Akt、内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS を介して一酸化窒素 NO を産生する経路が良く知られている (図3)^{14,16)}。

まず最初に、ginsenoside Re の性ホルモンゲノム作用の有無を検討した。アンドロゲンのゲノム作用は前立腺ガン由来の細胞株 LNCaP の増殖で¹⁷⁾、エストロゲンのゲノム作用は MCF7 細胞の増殖で検討されている¹⁸⁾。

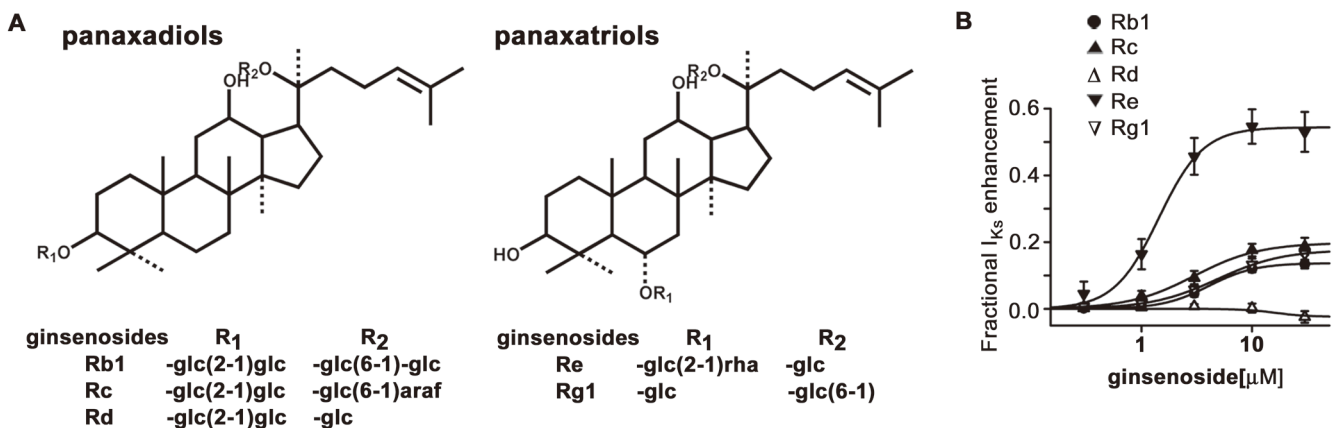


図1 種々の ginsenoside とエストロゲン様作用の強さ。

- A. Panaxadiol と panaxatriol の化学構造。Panaxadiol は 3 位と 21 位にインセットにある糖鎖が付き、panaxatriol は 6 位と 21 位に糖鎖が付く。
 B. 心筋カリウムチャネル活性化を用いてアッセイした ginsenoside のエストロゲン様作用。Re が最も作用が強く、Rd は作用が無く、Rb1, Rc, Rg1 はこれらの中間の強さを示す。

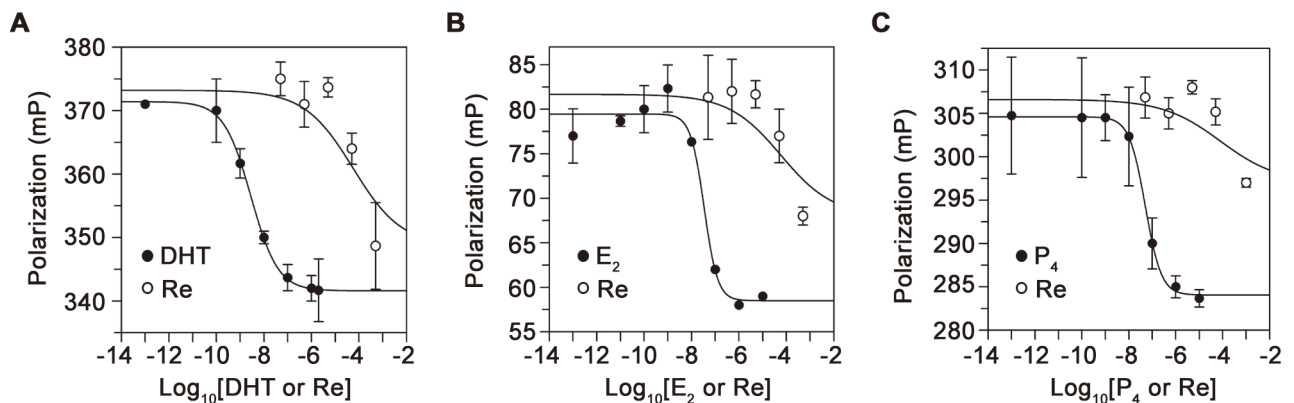


図2 Ginsenoside Re の性ホルモン受容体への結合。

AR (パネルA)・ER (パネルB)・PR (パネルC) に対するそれぞれのリガンドと ginsenoside Re の結合。

そこでこれらの細胞の増殖に対する作用を検討すると、ginsenoside Re はいずれも増殖作用を示さず、逆に DHT および E2 による増殖作用に対して抑制的に働いた (図 4)。

2・4 Ginsenoside Re の非ゲノム作用

次に ginsenoside Re の性ホルモン非ゲノム作用の有無を検討した。非ゲノム作用は Akt のリン酸化抗体を用いた Western blot 解析により Akt のリン酸化により検討した¹⁹⁾。図 5A に示すように、ginsenoside Re は濃度依存性に Akt をリン酸化した。Ginsenoside のリン酸化は AR の阻害薬 nilutamide、ER の阻害薬 ICI182,780、PR の阻害薬 mifepristone により部分的に阻害され、nilutamide、ICI182,780、mifepristone の同時投与によりほぼ完全に阻害され (図 5B)、ginsenoside Re は AR、ER、PR それぞれの非ゲノム経路を活性化することが示唆される。また c-Src の阻害薬 PP2、PI3-kinase の阻害薬 wortmanin、Akt の阻害薬 SH-6 により阻害されたことから (図 5B)、心筋カリウムチャネル活性化で明らかにした、性ホルモン受容体 - c-Src - PI3-kinase - Akt - eNOS の経路で NO を産生することが ginsenoside Re の主な作用経路であることが示唆された¹²⁾。

2・5 コアクチベーターのリクルートに対する作用

以上から、ginsenoside Re は性ホルモンのゲノム経路は活性化せず、非ゲノム経路のみを特異的に活性化することが判明した。性ホルモン受容体はアミノ末端から

activation factor-1 (AF-1), DNA-binding domain (DBD), ligand-binding domain (LBD), activation factor-2 (AF-2) の 4 つのドメイン構造を有している²⁰⁾。ゲノム経路では性ホルモンが LBD に結合するとヘリックス 12 が構造変化を起こすことによりコアクチベーターの結合ポケットが生じ、コアクチベーターをリクルートする^{21, 22)}。一方非ゲノム経路では LBD に性ホルモンが結合すると、AR・PR ではプロリンリッチ領域の構造変化が起こり c-Src の SH-3 ドメインに結合し、ER ではリン酸化チロシン周辺の構造変化が起こり c-Src の SH-2 ドメインに結合し、c-Src の活性化をもたらす¹⁶⁾。そこで、ginsenoside Re によるコアクチベーターのリクルートの検討を、fluorescent resonance energy transfer (FRET) を用いた検討により行った。コアクチベーターは L-X-X-L-L (L はロイシン、X はあらゆるアミノ酸) からなるモチーフが性ホルモン受容体コアクチベーター結合ポケットに結合する。そこで、東京大学大学院理学系研究科化学専攻梅澤研究室で開発された CFP-LBD- (L-X-X-L-L) モチーフ-YFP からなる蛍光プローブ、AR-SCCoR、ER-SCCoR、PR-SCCoR、を活用した²³⁻²⁵⁾。CFP は 440nm の光で励起され、480nm の蛍光を発生し、YFP は 480nm の光で励起され 535nm の光を発生する。そこで、この蛍光プローブに 440nm の光を当てると、通常は CFP だけが励起され 480nm の光を発生するが、リガンドが結合しコアクチベーターが LBD に結合すると、CFP から発生した 480nm の光で YFP が励起され 535nm の光を発生する。これによりコアクチベーターのリクルー

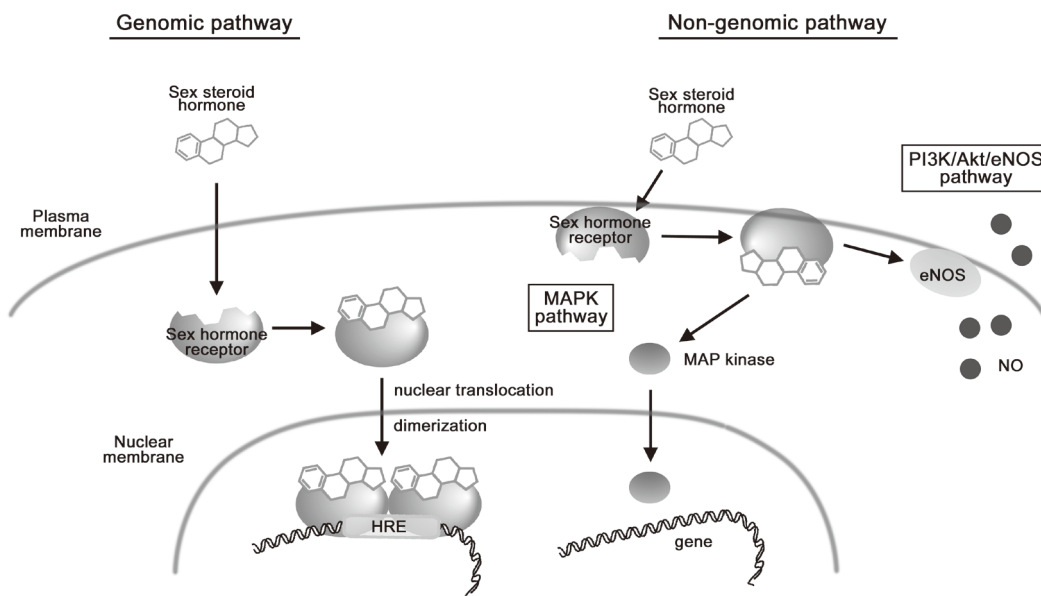


図 3 性ホルモンのゲノム作用と非ゲノム作用。

ゲノム作用では、性ホルモンが受容体に結合し、ホルモン受容体複合体が、コアクチベーターをリクルートし、ホルモン応答領域を有する遺伝子に結合し転写を制御する。一方、非ゲノム作用は膜局在の受容体に結合し、c-Src を介して MAP-kinase 経路あるいは NO 合成酵素 (eNOS) を活性化する。

トの有無を検討できる。図6にあるように、ginsenoside ReはAR-SCCoR, ER-SCCoR, PR-SCCoRともFRETシグナルを発せず、性ホルモン受容体には結合するがコアクチベーターのリクルートが出来ないためにゲノム作用は示さなかったものと考えられる。DHT, E2, P4でもたらされるFRETシグナルに対してはginsenoside Reは逆に抑制することから、これらの阻害薬として作用することが判明した。

3. 考察

薬用人参あるいはその主成分ginsenosideは、多くのスキンケア製品・育毛製品として市販されているが、その作用メカニズムは充分解明されていない。文献的には、薬用人参が1型コラーゲンの合成を誘導すること²⁶⁾、

ginsenosideがケラチノサイトにおいて紫外線によるアポトーシスから保護すること²⁷⁾、皮膚損傷の修復を促進すること²⁸⁾などが知られている。また、薬用人参がマウスの毛根細胞の増殖を誘導すること²⁹⁾、放射線による毛根細胞のアポトーシスを抑制すること⁸⁾などが報告されている。エストロゲンも皮膚や毛髪に対して重要な働きをすることは古くから知られている。エストロゲンは皮膚のコラーゲン含量を増加させること、紫外線傷害に対して保護的に働く³⁰⁾。また、産後脱毛症が知られており、妊娠中は成長期にある毛根細胞の割合が増え、出産後は休止期にある毛根細胞の割合が増えることが知られている³¹⁾。以上のような薬用人参とエストロゲン作用の類似性は、ginsenoside Reに見られるエストロゲン様作用で説明される可能性がある。今回の検討では、ginsenoside Reは性ホルモン受容体の

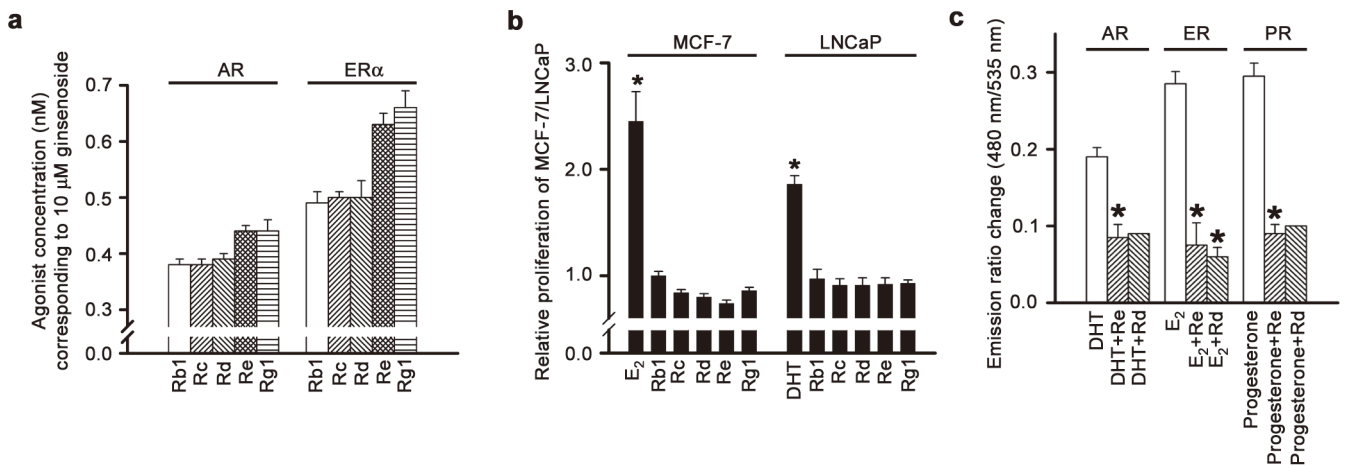


図4 Ginsenoside Reのゲノム作用。

性ホルモン受容体 (AR・ER) のゲノム作用を、アンドロゲン感受性細胞 LNCaP とエストロゲン感受性細胞 MCF-7 の増殖に対する作用で検討。Ginsenoside Reはこれらの細胞の増殖促進せず、DHT・E2による増殖に対して阻害した。

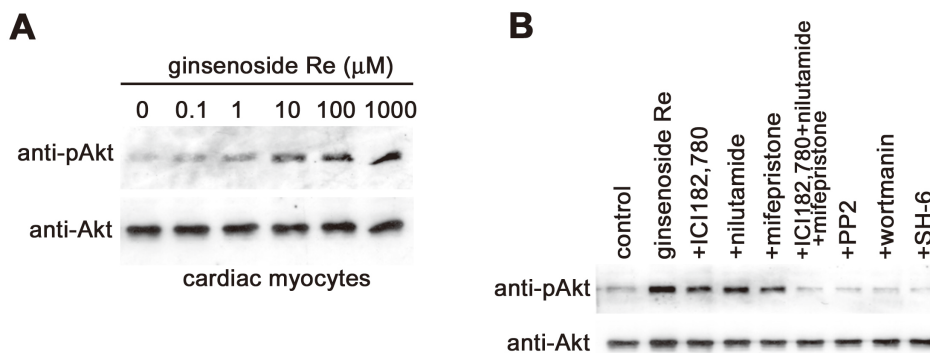


図5 Ginsenoside Reの非ゲノム作用。

性ホルモンの非ゲノム作用を、Aktのリン酸化で検討した。

A. GinsenosideはAktのリン酸化を濃度依存性に増強した。

B. IC1182,780・nilutamide・mifepristoneはAktのリン酸化を部分的に抑制し、これら3阻害薬の同時投与はほぼ完全に抑制した。また、PP2・wortmanin・SH-6もAktのリン酸化をほぼ完全に抑制した。

ゲノム経路は活性化せず、非ゲノム経路を選択的に活性化した⁹⁾。これは ginsenoside Re は性ホルモン受容体に結合することはできるが、コアクチベーターをリクルートできないためと考えられた。エストロゲン受容体のアンタゴニストは長い側鎖を有しており、LBD に結合しても側鎖がヘリックス 12 の移動を妨げるため、コアクチベーター結合ポケットを形成できないためリガンドの作用を阻害すると考えられる。Ginsenoside Re も長い側鎖を有しており、ドッキング実験でも ER の LBD に対する ginsenoside Re の結合はヘリックス 12 の移動を妨げることが示唆されており、ginsenoside Re が E2 による MCF-7 細胞の増殖を抑制し、ER-SCCoR において E2 による FRET シグナルを抑制し、アンタゴニストとして作用することと良く一致する。今回の検討では ginsenoside Re の性ホルモン非ゲノム作用が、スキンケア・育毛の作用することを示す直接の証拠は得られておらず今後の課題と考えられる。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援を頂きました(財)コスメトロジー研究振興財団及び共同研究者に深く感謝いたします。

(文献)

- 1) Winslow LC, Kroll DJ. Herbs as medicines. *Arch Internal Med.* 1998;158:2192-2199.
- 2) Goldman P. Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. *Ann Internal Med.* 2001;135:594-600.
- 3) Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol.* 1999;58:1685-1693.
- 4) Kaku T, Miyata T, Uruno T, Sako I, Kinoshita A. Chemico-pharmacological studies on saponins of

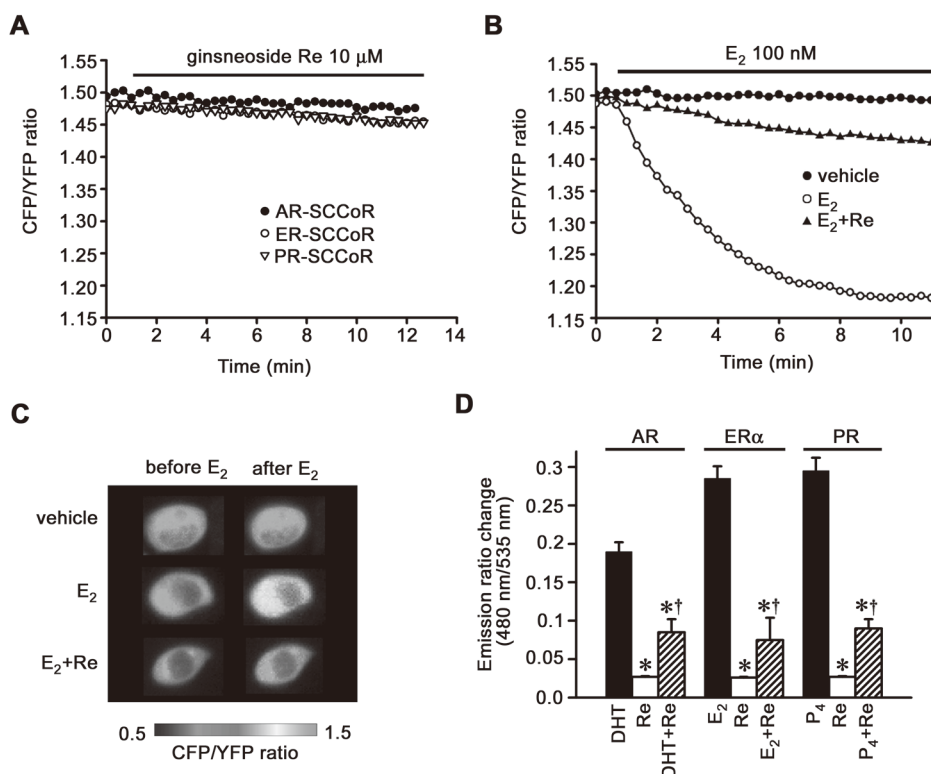


図6 コアクチベーターリクルートアッセイ。

性ホルモン受容体のコアクチベーターリクルートを、FRET プローブ (AR-SCCoR・ER-SCCoR・PR-SCCoR) を用いて行った。

- A. Ginsenoside Re は AR・ER・PR いずれにおいてもコアクチベーターのリクルートを誘導しなかった。
- B. E2 は ER のコアクチベーターリクルートを誘導し、ginsenoside Re はこの作用を抑制した。
- C. 実際の実験例。E2 により FRET シグナルが誘導されており、E2 と ginsenoside Re の同時投与では E2 による FRET シグナル誘導が抑制されている。
- D. 複数例での統計的解析。Ginsenoside Re は AR・ER・PR のコアクチベーターリクルートを誘導せず、DHT・E2・P4 によるコアクチベーター誘導を抑制した。

- Panax ginseng C. A. Meyer. II. Pharmacological part. *Arzneim-Forsch.* 1975;25:539-547.
- 5) Kaku T, Miyata T, Uruno T, Sako I, Kinoshita A. Chemico-pharmacological studies on saponins of Panax ginseng C. A. Meyer. I. Chemical part. *Arzneim-Forsch.* 1975;25:343-347.
- 6) Low Dog T. Menopause: a review of botanical dietary supplements. *Am J Med.* 2005;118 (Suppl 12B):98-108.
- 7) Lee Y, Jin Y, Lim W, Ji S, Choi S, Jang S, Lee S. A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;84:463-468.
- 8) Kim SH, Jeong KS, Ryu SY, Kim TH. Panax ginseng prevents apoptosis in hair follicles and accelerates recovery of hair medullary cells in irradiated mice. *In vivo (Athens, Greece)* . 1998;12:219-222.
9. Furukawa T, Bai CX, Kaihara A, Ozaki E, Kawano T, Nakaya Y, Awais M, Sato M, Umezawa Y, Kurokawa J. Ginsenoside Re, a main phytosterol of Panax ginseng, activates cardiac potassium channels via a nongenomic pathway of sex hormones. *Mol Pharmacol.* 2006;70:1916-1924.
- 10) Bai CX, Sunami A, Namiki T, Sawanobori T, Furukawa T. Electrophysiological effects of ginseng and ginsenoside Re in guinea pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol.* 2003;476:35-44.
- 11) Bai CX, Takahashi K, Masumiya H, Sawanobori T, Furukawa T. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea-pig cardiomyocytes. *Br J Pharmacol.* 2004;142:567-575.
- 12) Bai CX, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation.* 2005;112:1701-1710.
- 13) Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Human Reprod Update.* 2000;6:225-236.
- 14) Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Reviews.* 2000;52:513-556.
- 15) Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Reviews.* 2001;81:1269-1304.
- 16) Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* 2000;19:5406-5417.
- 17) Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of androgens and antiandrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.* 1976;36:4610-4618.
- 18) Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.* 1976;36:4595-4601.
- 19) Baron S, Manin M, Beaudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veysiere G, Morel L. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279:14579-14586.
- 20) Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annu Rev Physiol.* 2006;69:9.1-9.20.
- 21) McKenna NJ, O'Malley BW. Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann NY Acad Sci.* 2001;949:3-5.
- 22) McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 2002;108:465-474.
- 23) Awais M, Sato M, Sasaki K, Umezawa Y. A genetically encoded fluorescent indicator capable of discriminating estrogen agonists from antagonists in living cells. *Anal Chem.* 2004;76:2181-2186.
- 24) Awais M, Sato M, Umezawa Y. A fluorescent indicator to visualize ligand-induced receptor/coactivator interactions for screening of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in living cells. *Biosens Bioelectron.* 2006.
- 25) Awais M, Sato M, Lee X, Umezawa Y. A fluorescent indicator to visualize activities of the androgen receptor ligands in single living cells. *Angewandte Chemie* 2006;45:2707-2712.
- 26) Lee J, Jung E, Lee J, Huh S, Kim J, Park M, So J, Ham Y, Jung K, Hyun CG, Kim YS, Park D. Panax ginseng induces human Type I collagen synthesis through activation of Smad signaling. *J Athnopharmacol.* 2007;109:29-34.
- 27) Lee EH, Cho SY, Kim SJ, Shin ES, Chang HK, Kim DH, Yeom MH, Woe KS, Lee J, Sim YC, Lee TR. Ginsenoside

- F1 protects human HaCaT keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis by maintaining constant levels of Bcl-2. *J Invest Dermatol.* 2003;121:607-613.
- 28) Chang LK, Whitaker DC. The impact of herbal medicines on dermatologic surgery. *Dermatol Surg.* 2001;27:759-763.
- 29) Matsuda H, Yamazaki M, Asanuma Y, Kubo M. Promotion of hair growth by ginseng radix on cultured mouse vibrissal hair follicles. *Phytother Res.* 2003;17:797-800.
- 30) Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exper Dermatol.* 2002;11:487-502.
- 31) Conrad F, Paus R. Estrogens and the hair follicle. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2004;2:412-423.