

Wnt シグナルを標的とした育毛促進作用をもつ天然成分の探索

千葉大学大学院薬学研究院

大 槻 崇

Wnt signaling maintains hair inducing activity including regeneration of hair follicle. On the basis of our screening program targeting activation of TCF/ β -catenin transcriptional activity, a plant extract of *Excoecaria indica* was selected as a positive sample. Activity-guided fractionations led to the isolation of α -sapinine (**1**) as active compound. Also, two flavonoid glycosides, myricetin 3-*O*- β -D-galactopyranoside (**2**) and myricetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**3**) were isolated from *Erythrophleum succirubrum* as active compounds. Compound **1** led to more than 20-fold increase in TCF/ β -catenin transcriptional activity at 1.4 or 2.9 μ M.

1. 緒 言

古来より加齢に伴う男性型脱毛が多く男性を悩ませてきたが、最近では脱毛の発症メカニズムについても分子レベルで解明されてきている。退縮に向かう分子機構についてはアポトーシスによるものであることが明確になってきたが、休止していた毛包の発毛段階へのスイッチングに関しては、以前から指摘されていた男性ホルモン（アンドロゲン）の関与に加え、最近では、毛包上皮幹細胞の存在、この幹細胞にシグナルを送る毛乳頭細胞の重要性、及びこれら2種の細胞間に作用する分泌性のシグナル因子の関与することがトランスジェニックマウスやコンディショナルノックアウトの研究で明らかになりつつある^{1,2)}。また、動物の発生過程で、体軸形成や陥入運動など形づくりの基盤となる初期の重要なプロセスから、その後の種々の組織・器官の形成に関与する Wnt シグナル伝達経路の活性化（ β -catenin/LEF/Tcf タンパクの複合体形成→複合体の TCF 結合領域への結合それに伴う転写活性化）が、毛包形成、毛髪生成に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。当研究室では、最近、Wnt シグナル伝達経路における最下流の TCF/LEF 転写因子の転写活性を評価するレポーターアッセイを確立した。本研究では、Wnt シグナルを活性化する天然物（小分子化合物）を探索し、見出した活性成分の中から、有効な育毛促進作用を有する化合物を発見し、育毛剤原材料としての利用に貢献することを目的とする。

2. 実 験

2・1 TCF/ β -catenin 転写誘導活性試験

対数増殖期にある 293T/STF 細胞³⁾を 96 穴白色平底マイクロプレートに各ウェル中 200 μ L あたり 3×10^4 cells の密度で細胞を播種し、10%FBS 含有 D-MEM 培地中で 24 時間培養した。培地の除去後、種々の濃度の試料（植物エキス、分画後の画分、単離した化合物）を含有する 200 μ L の培地を添加し 24 時間培養した。その後培地を取り除き、PBS で細胞を 1 回洗浄後、細胞溶解剤 Cell Culture Lysis Reagent（プロメガ社製）を 20 μ L 加え 30 分間振とうした。その後プレートと発光基質液（発光基質 Luciferase Assay Substrate + 緩衝液 Luciferase Assay Buffer, ともにプロメガ社製）をマイクロプレートルミノメーター（サーモ社製ルミノスキャンアセント）へセットしルシフェラーゼ活性を測定した。なお、試料添加時のルシフェラーゼ遺伝子の発現量（化学発光量）を指標として、TCF/ β -catenin 転写誘導活性を評価した。293T/STF 細胞は、John hopkins 大学の Jeremy Nathans 教授よりご恵与頂いた。

2・2 スクリーニング検体

スクリーニングは、当研究室で独自に採集、構築したタイ、インドネシア、バングラデシュ産の植物エキス群を対象とし、良好な活性を示す検体を選別する。

2・3 *Excoecaria indica* からの活性成分の探索

Excoecaria indica の葉部（42 g）をメタノールで室温にて 24 時間抽出した。その後、ホモジナイズし、遠心分離及び濾過により抽出液を濾別した。残渣にメタノールを加えて再抽出し、これらの抽出液を併せて減圧濃縮し、抽出物（16 g）を得た。次に、この抽出物についてヘキサン、酢酸エチル、ブタノールを用い溶媒分配を行い、ヘキサン可溶部（0.7 g）、酢酸エチル可溶部（3.9 g）、ブタノール可溶部（3.3 g）、水可溶部（3.9 g）をそれぞれ得た。ヘキサ



Search for natural product for promoting hair growth based on Wnt signaling

Takashi Ohtsuki

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

ン可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（分離用担体：Silica gel PSQ100（28 mm×260 mm）；移動相：クロロホルム / メタノール）に付し Fr. 1A～1R を得た。次に、Fr. 1E（53.6 mg）についてゲルろ過カラムクロマトグラフィー（分離用担体：Sephadex LH-20（20 mm×550 mm）；移動相：メタノール）に付し Fr. 2A～2O を得た。次に Fr. 2D について、逆相HPLC（カラム：CAPCELL PAK ACR C18（4.6 mm×250 mm）；移動相：75% メタノール；流速、1.0 mL/min；検出UV（254 nm））による精製を行い化合物 **1**（1.4 mg）を単離した。

2・4 *Erythrophleum succirubrum* からの活性成分の探索

Erythrophleum succirubrum の葉部 330 g をメタノールで室温にて 24 時間静置した。その後、ホモジナイズし、遠

心分離及び濾過により抽出液を濾別した。残渣にメタノールを加えて再抽出し、これらの抽出液を併せて減圧濃縮し、抽出物 56 g を得た。この抽出物のうち 37 g をヘキサン、酢酸エチル及びブタノールで溶媒分配を行い、ヘキサン可溶部（10.9 g）、酢酸エチル可溶部（4.3 g）、ブタノール可溶部（9.3 g）、水可溶部（13.4 g）をそれぞれ得た。ブタノール可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（分離用担体：Silica gel PSQ100B（44 mm×600 mm）；移動相：クロロホルム / メタノール）に付し Fr.1A～1I を得た。このうち Fr. 1E について逆相HPLC（カラム：Mightysil RP-18（10 mm×250 mm）；移動相：35% メタノール；流速：2.0 mL/min；検出：UV（254 nm） and RI）による分画を行い、Fr.2A-2F を得た。得られた画分のうち Fr.2C 及び 2E について、C30 カラムを用いた逆相HPLC（カラム：Develosil C30 UG5（8 mm×250 mm）；移動相：45% メタノ

Excoecaria indica (leaves, dry weight: 42 g , extract weight 16 g)

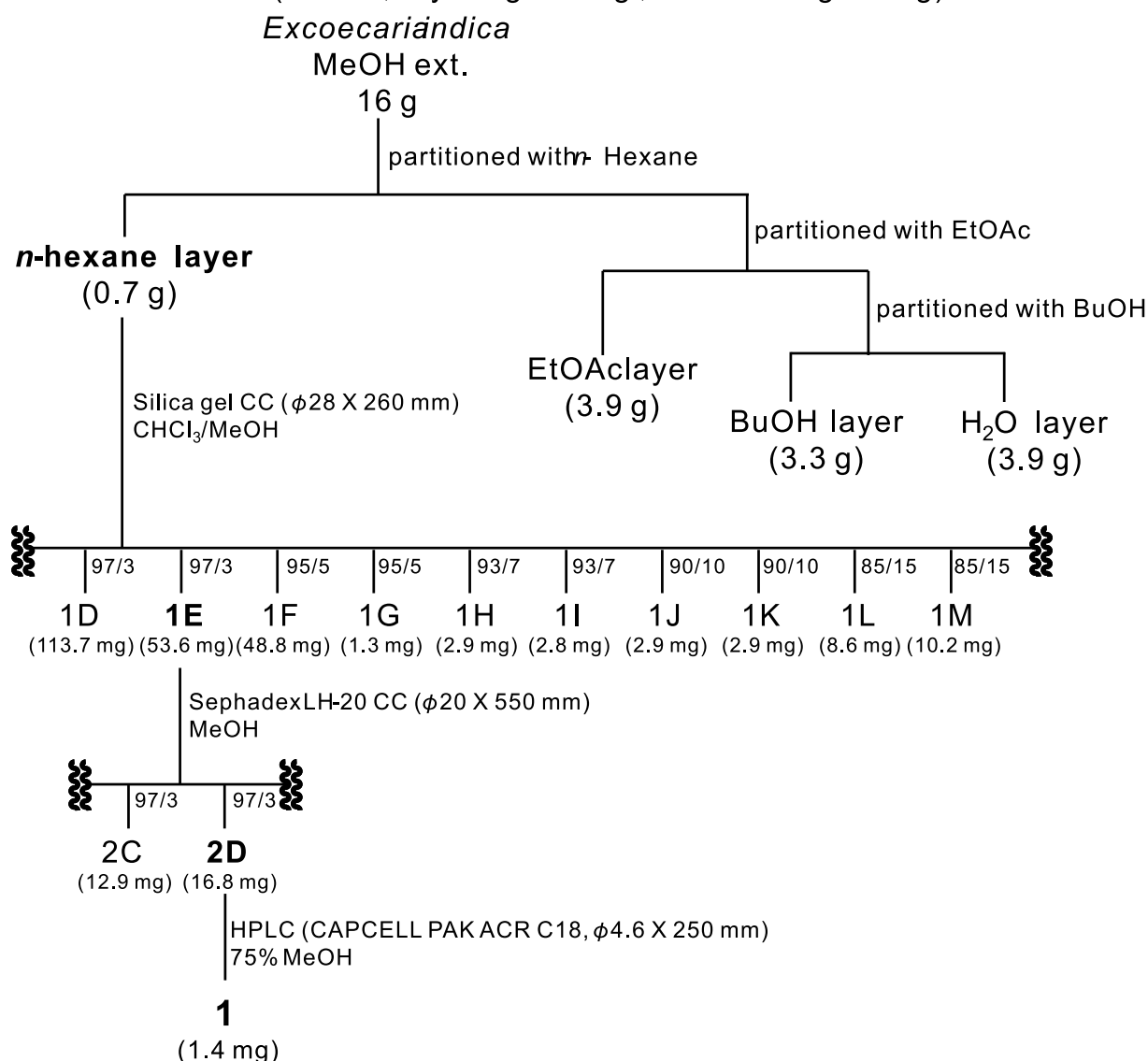


Fig.1 Isolation chart of *Excoecaria indica*

Erythrophleum succirubrum (leaves, dry weight: 331 g, extract weight 56 g)

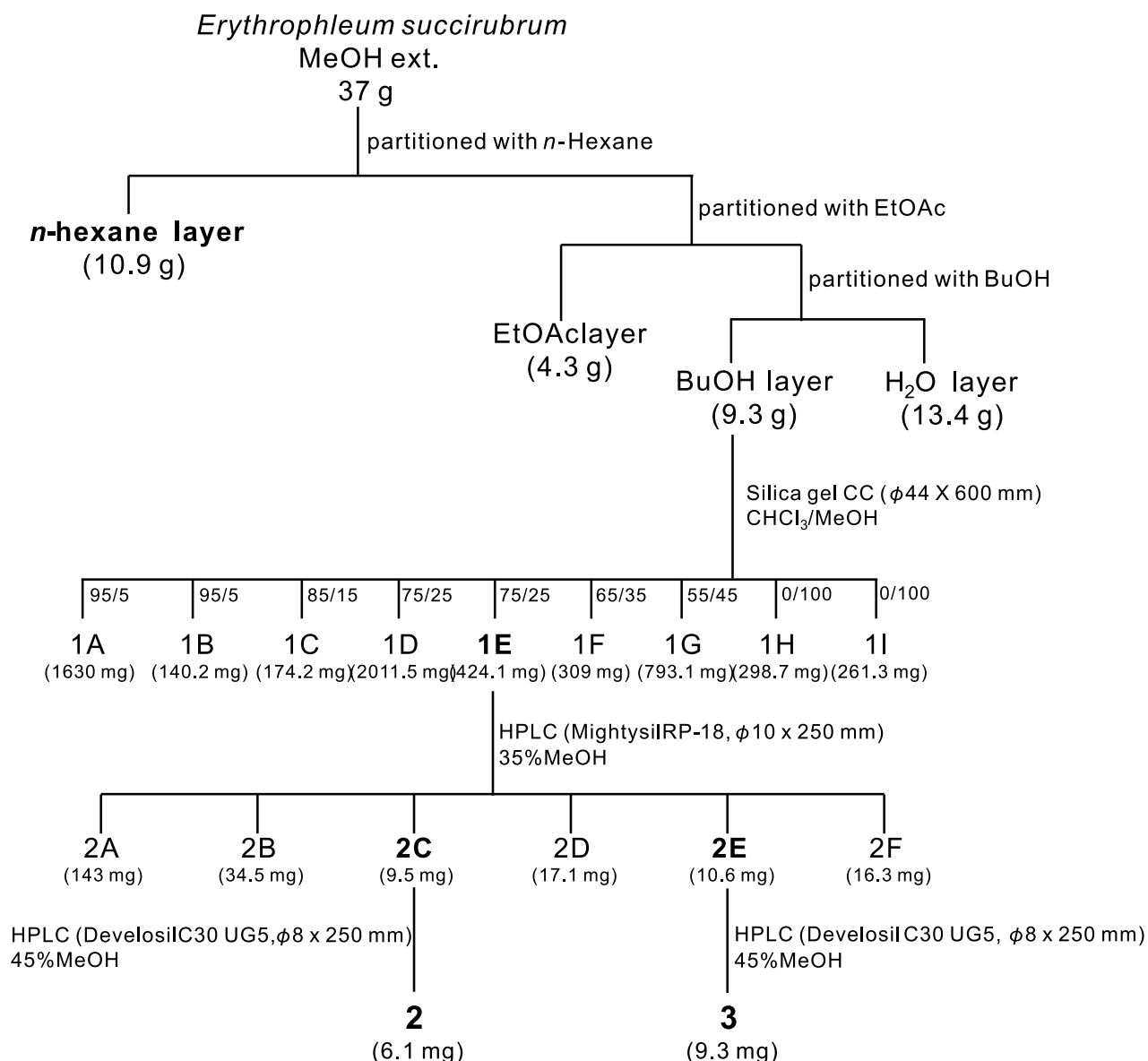


Fig.2 Isolation chart of *Erythrophleum succirubrum*

ール；流速：1.5 mL/min；検出：UV (254 nm) and RI
を行い，Fr.2C からは化合物 **2** (6.1 mg) を，Fr.2E からは
化合物 **3** (9.3 mg) をそれぞれ単離した。

3. 結果及び考察

3・1 スクリーニング

当研究室の天然物資源ライブラリー（天然抽出物）の
うち，植物エキス 250 種についてスクリーニングを行
ったところ，2 種に TCF/β-catenin 転写活性を上昇させ
ることが判明した。このうち，強い活性が認められた
Excoecaria indica（トウダイグサ科）を試料として選択し
活性成分の探索を行った。また，本スクリーニングにて
TCF/β-catenin 転写阻害作用を示した植物 *Erythrophleum*

succirubrum（マメ科）より転写活性を上昇させる化合物
を単離したので併せて報告する。

3・2 *Excoecaria indica* からの活性成分の探索

Excoecaria indica の葉部より得られたメタノール抽出物
の TCF/β-catenin 転写活性について検討を行ったところ，
25 μg/mL で未処理群と比較して 9.5 倍 TCF/β-catenin 転
写活性を上昇させることが判明した。次に，本抽出物につ
いてヘキサン，酢酸エチル，ブタノールを用い溶媒分配
を行い，各可溶部をそれぞれ得た。得られた各可溶部の
TCF/β-catenin 転写活性について検討を行ったところ，ヘ
キサン可溶部，酢酸エチル可溶部，ブタノール可溶部に活
性が認められた。そこで，ヘキサン可溶部について分画を

行った。ヘキサン可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付しFr.1A～1Rを得た。得られた画分のうちFr. 1E, 1F, 1H, 1K, 1L, 及び1MにTCF/ β -catenin転写活性の上昇が認められた。単離量並びにTLC分析の結果を考えあわせ、Fr.1Eを次の分画の対象とした。そこでまず、Fr.1E (53.6 mg)について、Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィーを行いFr. 2A～2Oを得た。主成分がFr. 2C及び2Dに移行したことがTLC分析より明らかになったため、この2つの画分について、逆相HPLCによる精製を行い化合物**1** (1.4 mg)を単離した。

化合物**1**は、各種スペクトル分析及び文献値⁴⁾との比較より、 α -sapinineと同定した。

化合物**1**: α -sapinine. White solid; $C_{30}H_{37}NO_7$, MW: 523. $[\alpha]_D^{26} = -63.6$ (c 0.4, $CHCl_3$); EIMS m/z 523 $[M]^+$, 1H NMR [measured at 600 MHz, $CDCl_3$]: δ 7.08 (s, H-1), 2.80 (m, H-4), 3.45 (brd, $J=15.6$, H-5), 5.14 (brs, H-7), 2.02 (m, H-8), 3.52 (m, H-10), 1.87 (m, H-11), 5.72 (d, $J=10.2$, H-12), 0.83 (d, $J=4.8$, H-14), 1.17 (s, H-16), 1.33 (s, H-17), 1.12 (d, $J=6.0$, H-18), 1.80 (s, H-19), 3.91 (d, $J=12.0$, H-20), 4.01 (d, $J=12.0$, H-20), 6.70 (d, $J=9.0$, H-3'), 7.42 (t, $J=7.2$, H-4'), 6.61 (t, $J=7.2$, H-5'), 7.88 (d, $J=7.8$, H-6'), 2.92 (d, $J=4.8$, NH-CH₃), 2.08 (s, CO-CH₃), ^{13}C NMR [measured at 150 MHz, $CDCl_3$]: δ 156.1 (C-1), 137.1 (C-2), 214.3 (C-3), 49.6 (C-4), 25.1 (C-5), 143.4 (C-6), 126.4 (C-7), 40.7 (C-8), 78.1 (C-9), 47.4 (C-10), 43.5 (C-11), 74.9 (C-12), 65.3 (C-13), 37.1 (C-14), 25.2 (C-15), 24.1 (C-16), 16.5 (C-17), 11.8 (C-18), 10.4 (C-19), 69.3 (C-20), 173.5 (C-21), 169.1 (C-22), 152.3 (C-1'), 110.8 (C-2'), 110.8 (C-3'), 134.9 (C-4'), 114.3 (C-5'), 134.9 (C-6'), 29.5 (NH-CH₃), 21.2 (CO-CH₃).

3・3 *Erythrophleum succirubrum* からの活性成分の探索

Erythrophleum 属の植物は西アフリカ、アーストラライアやフィリピンなどに広く分布しており、葉部、種子に強い毒性を示し、子供や家畜を致死させた報告が多数ある。マメ科植物*Erythrophleum succirubrum*はタイでは「**Saat**」との慣用名で知られ、その葉部、種子の急性毒性作用、心臓停止及び神経筋遮断作用が報告されている⁵⁾。これまでに*Erythrophleum* 属の成分研究に関しては、アルカロイド類化合物の cassaine, cassaidine, acetyl cassaidine の単離報告例がある⁶⁾。なお、*Erythrophleum succirubrum* のメタノールエキ스는、上記のスクリーニングにおいてTCF/ β -catenin転写阻害活性を示したものの、本植物について詳細な成分解析を行ったところ、驚くことにTCF/ β -cateninの転写を活性化する成分の単離に至ったので報告する。

Erythrophleum succirubrum の葉部 330g をメタノールで抽出し抽出物 56g を得た。このうち 37g をヘキサン、酢酸エチル及びブタノールで溶媒分配を行い、各可溶部をそれぞれ得た。得られた各可溶部のうちブタノール可溶部を選択し以下の分画を行った。まず、本可溶部についてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行いFr.1A～1Iを得た。このうち、Fr.1Eについて逆相HPLCによる分画を行い、Fr.2A-2Fを得た。得られた画分のうちFr.2C及び2Eについて、C30カラムを用いた逆相HPLCを行い、Fr.2Cからは化合物**2**を (6.1 mg)、Fr.2Eからは化合物**3** (9.3 mg) をそれぞれ単離した。単離した化合物**2**及び**3**は、 1H NMR スペクトルにおいて特徴的なシグナルとして、6-8 ppm 付近でフラボノイド骨格由来するシグナル並

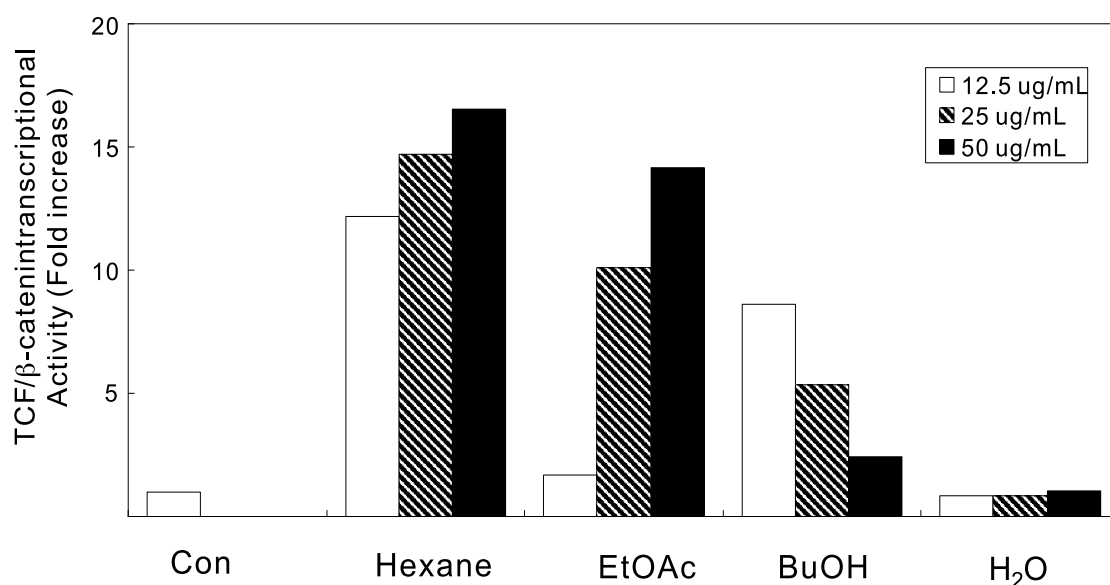


Fig.3 TCF/ β -catenin transcriptional activity of each soluble fractions of *Excoecaria indica*

びに 3-5 ppm 付近に一分子の糖に由来するシグナルが観測されたことより、**2** 及び **3** はフラボノイド配糖体と推定された。各種スペクトル分析及び文献値との比較より、**2** は myricetin 3-*O*- β -D-galactopyranoside⁷⁾, **3** は myricetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside⁸⁾ と同定した。

化合物 **2**: Myricetin 3-*O*- β -D-galactopyranoside. Yellow powder; C₂₁H₂₀O₃, MW: 480.; FABMS *m/z* 481 [M+H]⁺, ¹H NMR [measured at 500 MHz, CD₃OD]: δ 6.19 (*d*, *J*=2.0, H-6), 6.39 (*d*, *J*=2.0, H-8), 7.37 (*s*, H-2' and H-6'), 5.18 (*d*, *J*=8.0, H-1''), 3.82 (*dd*, *J*=8.0 and 9.0, H-2''), 3.56-3.59 (overlapped, H-3''), 3.86 (*brd*, *J*=3.0, H-4''), 3.49 (*brt*, *J*=6.5, H-5''), 3.65 (*dd*, *J*=6.5 and 11.5, H-6''), and 3.56-3.59 (overlapped, H-6''), ¹³C NMR [measured at 125 MHz, CD₃OD]: δ 158.7 (C-2), 136.0 (C-3), 179.4 (C-4), 163.0 (C-5), 99.9 (C-6), 166.1 (C-7), 94.7 (C-8), 158.4 (C-9), 105.6 (C-10), 121.7 (C-1'), 110.0 (C-2'), 146.3 (C-3'), 138.1 (C-4'), 146.3 (C-5'), 110.0 (C-6'), 105.6 (C-1''), 73.3 (C-2''), 75.1 (C-3''), 70.1 (C-4''), 77.2 (C-5''), 62.0 (C-6'').

化合物 **3**: Myricetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside. Yellow powder; C₂₁H₂₀O₃, MW: 464.; FABMS *m/z* 465 [M+H]⁺, ¹H NMR [measured at 500 MHz, CD₃OD]: δ 6.19 (*d*, *J*=2.1, H-6), 6.35 (*d*, *J*=2.1, H-8), 6.94 (*s*, H-2' and H-6'), 5.31 (*d*, *J*=1.5, H-1''), 4.21 (*dd*, *J*=1.5 and 3.2, H-2''), 3.78 (*dd*, *J*=3.2 and 9.5, H-3''), 3.33 (*t*, *J*=9.5, H-4''), 3.51 (*dq*, *J*=6.1 and 9.5, H-5''), 0.95 (*d*, *J*=6.1, H-6''), ¹³C NMR [measured at 125 MHz, CD₃OD]: δ 159.4 (C-2), 136.3 (C-3), 179.7 (C-4), 163.2 (C-5), 99.8 (C-6), 165.9 (C-7), 94.7 (C-8), 158.5 (C-9), 105.9 (C-10), 122.0 (C-1'), 109.6 (C-2'), 146.9 (C-3'), 137.9 (C-4'), 146.9 (C-5'), 109.6 (C-6'), 103.6 (C-1''), 71.9 (C-

2''), 72.1 (C-3''), 73.4 (C-4''), 72.0 (C-5''), 17.7 (C-6'').

3・4 単離した化合物の TCF/ β -catenin 転写活性

単離した3種の化合物について TCF/ β -catenin 転写活性について検討を行った。その結果, α -sapinine (**1**) は, 293T/STF 細胞の生存率を維持しながら 1.4 μ M で 22.5 倍 (Viability: 86%), 2.9 μ M で 46.6 倍 (Viability: 88%) と比較的低濃度で顕著に TCF/ β -catenin の転写を活性化することが判明した。また, フラボノイド配糖体である myricetin 3-*O*- β -D-galactopyranoside (**2**) 及び myricetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**3**) は, 293T/STF 細胞の生存率を維持しながら 50 μ M 及び 100 μ M で TCF/ β -catenin の転写を活性化することが判明した。

4. 結 語

Wnt シグナルと毛髪生成に関しては 2007 年 5 月に成体における毛包形成と Wnt シグナル経路の関与について Nature 誌⁹⁾ で報告されるなど, その新知見が多く報告されている¹⁰⁾。一方, 小分子を用いたアプローチでは, Wnt シグナルを活性化させる化合物として, QSH¹¹⁾ や SB-216763¹²⁾, SB-415286¹²⁾ などが報告されているが, Wnt シグナルに作用する小分子を育毛作用に結びつけた研究はあまり知られていない¹³⁾。本研究では, 上記の知見を基に, 有効な育毛促進作用を有する化合物を発見を目指し, 当研究室保有の植物エキス 250 種について TCF/ β -catenin 転写活性を指標としたスクリーニングを行った。その結果, 活性が認められた *Excoecaria indica* より α -sapinine を, *Erythrophleum succirubrum* より myricetin 3-*O*- β -D-galactopyranoside 及び myricetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside の単離に成功した。今後, 特に *Excoecaria indica* の活性画分について, 更に成分探索を行い, 得られた活性成分の化

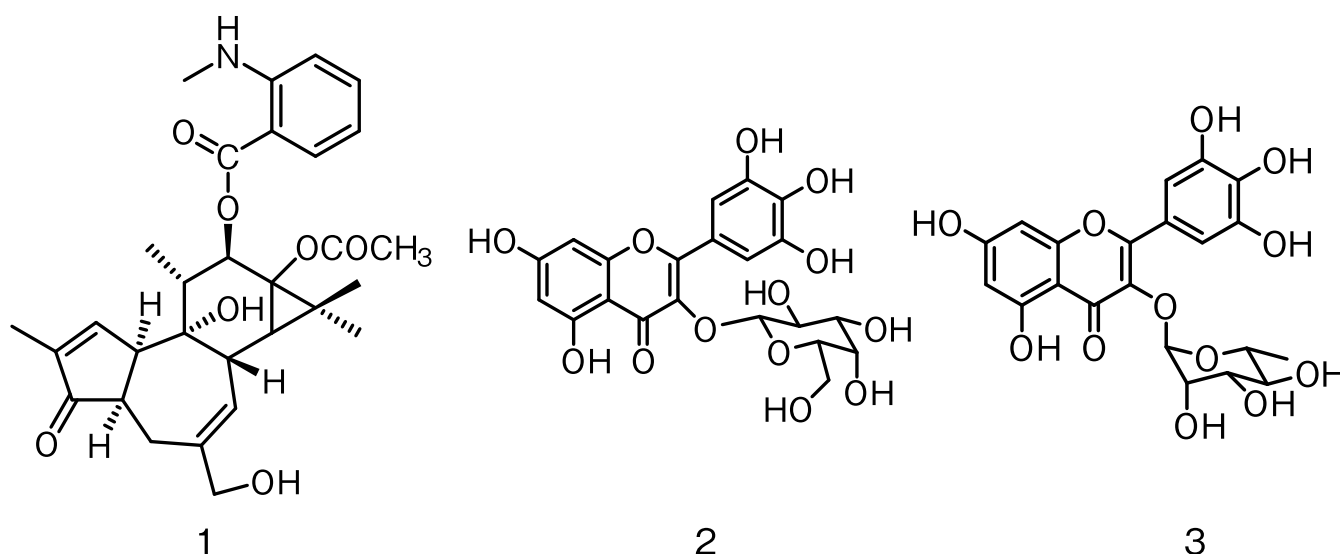


Fig.4 Chemical structure of compounds **1-3**

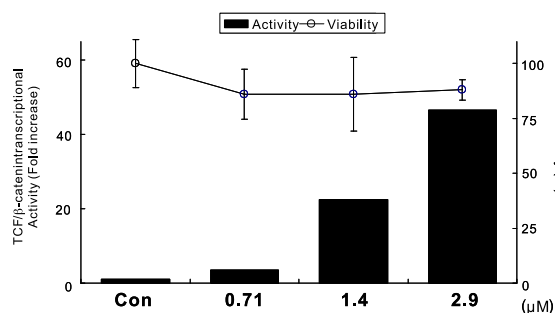


Fig.5 TCF/β-catenin transcriptional activity of compound **1**
Values are mean ± S.D. (n=3)

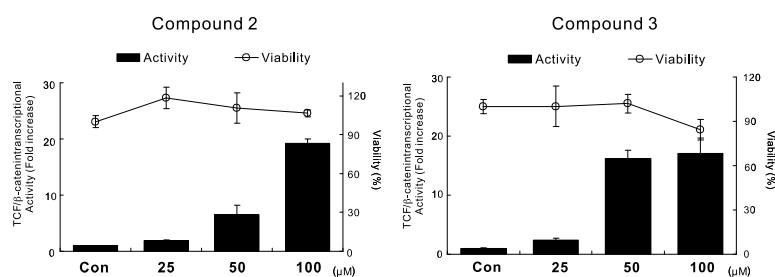


Fig.6 TCF/β-catenin transcriptional activity of compound **2** and **3**
Values are mean ± S.D. (n=3)

学構造を明らかにする予定である。また、得られた活性成分について、種々の生化学的手法（Western blotting 法など）を用いてその作用機構の詳細な解析を行い、有望な作用を示した成分について、*in vivo* 実験等により育毛作用に関する有用性を評価し、育毛剤原材料としての利用を検討していきたい。

(引用文献)

- 1) 岸本治郎, 日本農芸化学会誌 **2003**, 77, 566-569.
- 2) 岸本治郎, 実験医学 **2000**, 18, 1817-1820.
- 3) Xu, Q.; Wang, Y.; Dabdoub, A. et al., **2004**, 116, 883-895.
- 4) Chumkaew, P.; Karalai, C.; Ponglimanont, C. et al., *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 540-543.
- 5) Sattayasai, J.; Sattayasai, N.; Laupattarakasem, P. et al., *J. Sci. Coc. Thailand* **1983**, 9, 47-52.
- 6) Griffin, W.J.; Phippard, J.H.; Culvenor, C. C. J. et al., *Phytochemistry* **1971**, 10, 2793-2797.
- 7) Foo, L.Y.; Lu, Y.; Molan, A.L. et al., *Phytochemistry* **2000**, 54, 539-548.
- 8) Chung, S.; Kim, Y.; Takaya, Y. et al., *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 4664-4668.
- 9) Ito, M.; Yang, Z.; Andl, T. et al., *Nature* **2007**, 447, 316-320.
- 10) Gerard M. J. Beaudoin III, G. M. J.; Sisk, J. M.; Coulombe, P. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 14653-14658.
- 11) Zhang, Q.; Major, M.B.; Takanashi, S. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2007**, 102, 7444-7448.
- 12) Coghlan, M.P.; Culbert, A.A.; Cross, D.AE. et al., *Chem. boil.*, **2000**, 7, 794-803.
- 13) 河崎綾, 鳥居宏右, 西沢幸二 他, 日本薬学会第 127 年会講演要旨集 **2007**, 2, 117.