

ウイントシグナルを制御する天然由来化粧品素材, 有効成分の探索

千葉大学大学院 薬学研究院

當 銘 一 文

Wnt signaling is conserved in various species, and implicated in numerous aspects of development, cell biology, and physiology. Particularly, it is involved in melanogenesis and hair inducing process including regeneration of hair follicle. Thus, compounds that regulate Wnt signaling could be effective cosmetic agents for whitening or hair restoration. We screened the plants and actinomycetes extracts from our natural resource library for Wnt signaling regulating natural compounds. Activity-guided fractionation led to the isolation of new limonoid from *Xylocarpus granatum* and six cardenolides from *Calotropis gigantea* as active compounds. Also, several active compounds such as macrolactams were obtained from the fermented actinomycetes sampled from Chiba prefecture. These active compounds would be helpful and evidence-based cosmetic agents.

1. 緒 言

ウイントシグナルは、動物の発生過程、その後の種々の組織・器官形成に至るまで多彩な役割を演じている。また、がん、神経疾患などの疾患に加え、体内時計、再生医療においても重要な役割を担っている¹⁾。このようにさまざまな生命現象に関わるウイントシグナル経路であるが、そのシグナル経路を制御する化合物の化粧品分野への応用を考えると、以下の理由から美白、育毛分野があげられる。

美白：肌の色は、表皮基底層に存在するメラノサイト（色素細胞）などにより産生されるメラニン量や性状により決められる。メラニンは、メラノサイト内に存在するメラノソームにおいてチロシナーゼによる酸化反応により生成することが知られており、チロシナーゼの阻害はメラニン生成を抑制することができる。最近の研究により、ウイントシグナルを阻害することで、チロシナーゼが抑制されることが知られている²⁾。従ってウイント阻害作用を示す化合物には、美白作用が期待される。

育毛：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つつある。毛髪の退縮に向かう機構については、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と、この幹細胞へシグナルを伝達する毛乳頭細胞

の重要性、さらにこれら二種の細胞間に作用する分泌性のシグナル因子が大きく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マウスを用いた研究で明らかになりつつある^{3, 4)}。毛包においてウイントシグナル伝達分子が発現していることが知られており、皮膚が毛包へと分化する際、ウイントシグナルの発現が重要な役割を果たすとの報告があり、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。従ってウイント亢進作用をもつ化合物には、育毛作用が期待される。

当研究室では、独自に構築した天然資源抽出物ライブラリー（熱帯産植物や放線菌などの抽出物）を対象として、ウイントシグナル制御に関するスクリーニングを行ってきた。その結果、ウイントシグナルを阻害、または亢進する抽出物を複数見出し、それらから美白、または育毛作用を有する有効成分を見出し、その作用メカニズムを解析することで、エビデンスに基づく化粧品素材を創製することを目的としている。

2. 実 験

2.1 TCF/ β -catenin 転写活性試験

TCF/ β -catenin 転写活性をウイントシグナルの指標とし、TCF/LEF 結合領域を有するルシフェラーゼレポーター遺伝子 (SuperTOPFlash) が安定発現した STF/293 細胞株を用いた。対数増殖期にある STF/293 細胞⁵⁾ 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) を 20 μ L 加え 30 分間振



Exploration of natural cosmetic agents that regulate Wnt signaling pathway

Kazufumi Toume

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

とうした。その後プレートと発光基質液（プロメガ）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転写活性すなわちウイントシグナル制御作用を評価した（図1）。STF/293細胞は、John Hopkins大学のJeremy Nathans教授よりご恵与頂いた。

2.2 スクリーニング試験

スクリーニングは、上記のTCF/ β -catenin転写活性を指標に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および当研究室で独自に分離培養を行い構築した放線菌エキスからなるライブラリーを対象とした。なお本スクリーニング研究で用いた放線菌は千葉県を中心に全国各地の土壌、海水、海泥などから分離したものである。

2.3 成分の分画、構造解析

上記スクリーニング試験において、顕著なウイントシグナル制御作用を示した抽出物を選別し、活性を指標に溶媒分配、各種カラムクロマトグラフィー（Diaion HP-20, シリカゲル, ODS, Sephadex LH-20, ODS HPLC等）によ

り活性成分の分画・精製を行った。構造は、核磁気共鳴（NMR）や質量分析（MS）等のスペクトル解析にて解析を行った。

3. 結果及び考察

3.1 *Xylocarpus granatum* から得られたウイント阻害成分

スクリーニング試験においてウイント阻害作用を示したバングラデシュ産センダン科植物 *X. granatum* の葉部メタノール抽出物について活性を指標に分離精製を進めたところ、4種のリモノイド類（1-3等）を単離した。スペクトルデータに基づく構造解析の結果、化合物1, 2は新規化合物であることが判明し、それぞれxylogranin A (1) およびB (2) と命名した。このうち化合物2, 3は強いウイントシグナル阻害作用を示し、そのIC₅₀値はそれぞれ48.9, 54.2nMであった。一方化合物1は活性を示さなかった。化合物2, 3はオルトエステル基が存在するが、1にはない。DFT計算の解析の結果、活性を示す化合物2, 3と、1は異なる安定構造を示し、この構造の違いが活性へ影響しているものと示唆された。

強力な作用を示した2について本シグナルの亢進が知られているヒト大腸がん細胞（SW480細胞）における以下の解析を行った。本シグナルにおける転写活性化因子である

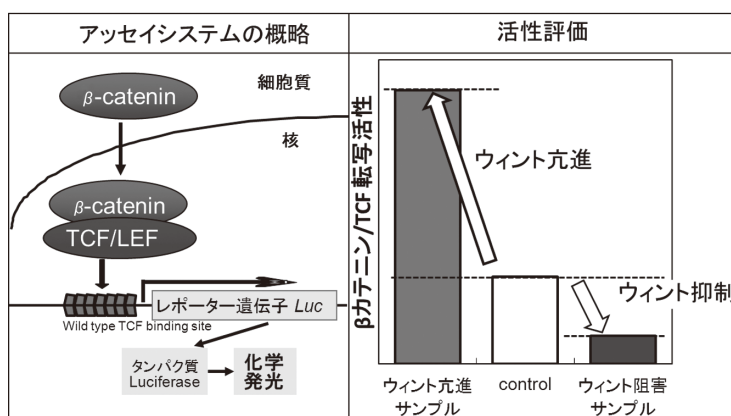


図1 スクリーニングアッセイシステムおよび活性評価の概略

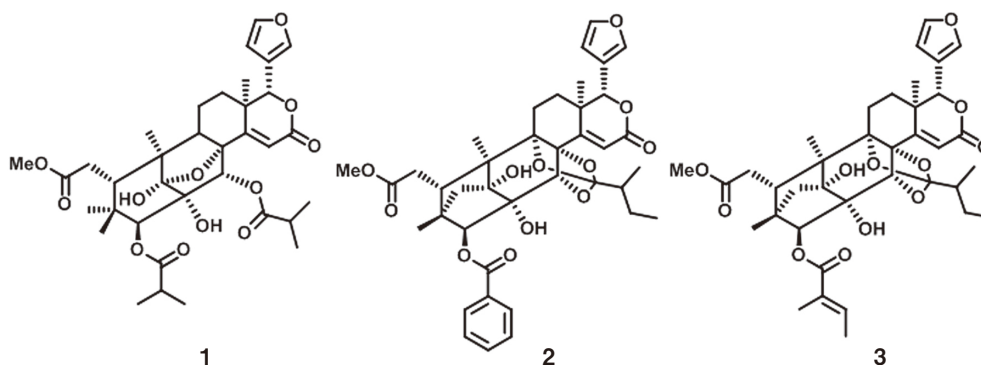


図2 *X. granatum* から単離したリモノイド化合物

β -cateninのタンパク質発現量を検討したところ、細胞全体、細胞質では顕著な変化は認められなかったが、核内においては濃度依存的な減少が認められた(図3A)。また、免疫染色法による β -cateninの局在について解析を行ったところ、対照群では核内に存在していた β -cateninが、**2**の添加により核内から消失する傾向が認められた(図3B)。以上のことから**2**は、核内の β -cateninを減少させることによりウイントシグナルを阻害するものと示唆された。

さらにウイントシグナルの標的遺伝子である*c-myc*、*PPAR δ* の発現量への**2**の影響を検討した。まず、ウエスタンブロット法により、標的遺伝子産物の発現量を検討したところ、200nMの濃度で*c-myc*は細胞全体、核内において、*PPAR δ* は核内において減少がみられた。また、mRNAの発現量をリアルタイムPCR法により検討したところ、*c-myc*は化合物添加により低濃度では上昇したが、200nMの濃度では減少し、また、*PPAR δ* も200nMの濃度で減少した。したがって、**2**はウイントシグナルの標的遺伝子の発現をmRNAレベルで抑制することが示された。

3.2 *Calotropis gigantea* から得られたウイントシグナル阻害成分

バングラデシュ産ガガイモ科植物*C. gigantea*の滲出液抽出物にも強力なウイントシグナル阻害作用が認められ、その活性成分について探索を行った。本植物抽出物を溶媒

分配し、活性が認められた酢酸エチル可溶部について活性試験を指標として、シリカゲル、ODSカラムによる分画を行った。その結果、6種のカルデノライド類(**4**–**9**)を単離し、NMR及びMSスペクトルデータの解析および文献値との比較によりそれぞれの構造を決定した。これら6種の化合物は強力なウイントシグナル阻害作用を示し、そのIC₅₀値は0.7–3.8nMであった。これら化合物のウイントシグナルへの作用は知られておらず、本研究により初めて明らかとなった。

またこれらの化合物のうち、calotropin (**7**)について3種のヒト大腸がん細胞(DLD1, HCT116, SW480)および非がん細胞(293, 293T)に対する毒性試験を行った。その結果、**7**はとくに大腸がん細胞に対して顕著な細胞毒性を示すことがわかった。次に、SW480細胞において、活性化化合物**7**がウイントシグナルの転写活性化因子である β -cateninと標的遺伝子である*c-myc*のタンパク質の発現量へ及ぼす影響を検討した。その結果、**7**により β -cateninのタンパク質量は細胞全体、核、細胞質で濃度依存的に減少することが認められた(図5A)。また、標的遺伝子である*c-myc*の減少も確認された。しかし、**7**とプロテアソーム阻害剤であるMG-132とを併用すると、 β -cateninの減少は認められなかった。さらに**7**の添加により β -cateninの分解シグナルであるCK1 α およびGSK3 β による β -cateninのリン酸化の促進が認められ、**7**は、 β -cateninの

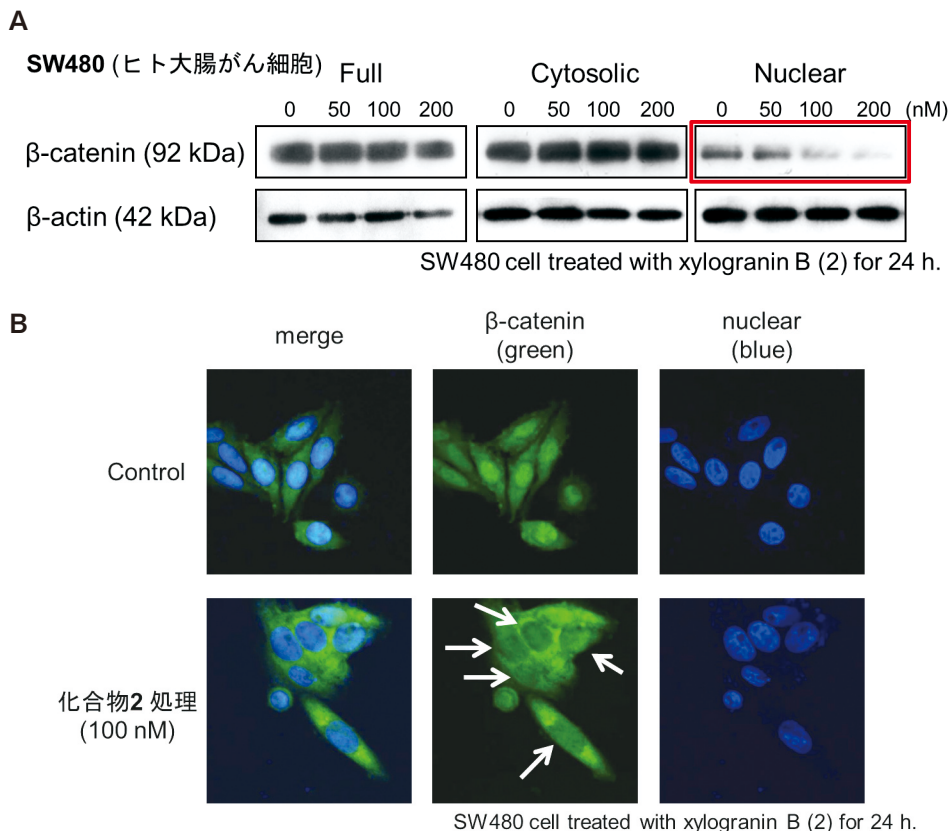


図3 xylogranin B (**2**) による β -cateninの核内局在の阻害

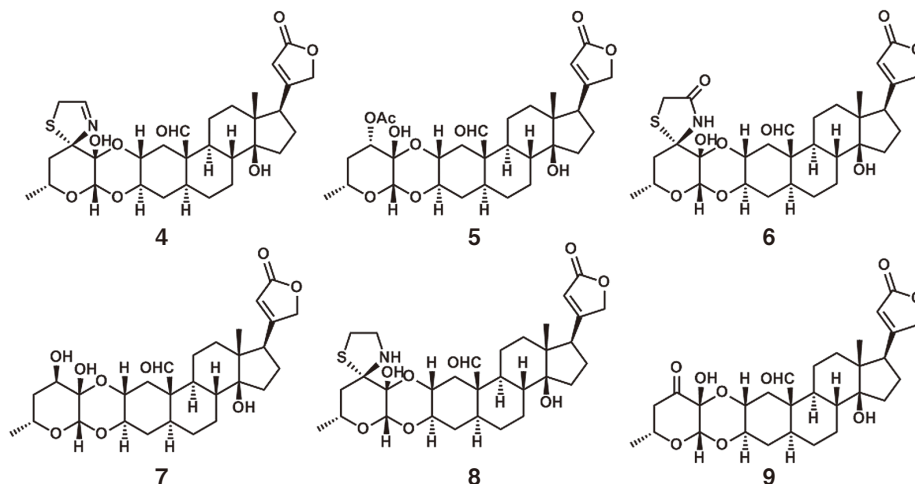


図4 *C. gigantea* から単離したカルデノライド類

リン酸化を促進することにより、その分解を促進することが示唆された。7により促進されたGSK3βによるβ-cateninのリン酸化はGSK3β阻害剤であるLiClの処理により抑制されたが、CK1αによるリン酸化は抑制されなかった。また、促進されたCK1αとGSK3βによるβ-cateninのリン酸化は、CK1α阻害剤であるCKI-7の添加により抑制された。またCKIαRNAiによりβ-cateninの分解も抑制された。このことから7のウイントシグナル阻害のメカニズムとして、7がCK1αのタンパク量の増加を誘導することにより、β-cateninのリン酸化を誘導し、続くプロテアソーム系での分解を促進することによるものと示唆された(図5B)。

3.3 放線菌から得られたウイントシグナル阻害成分

2種の放線菌株について各々ウイントシグナル阻害作用をもつ活性成分の探索を行った。まず、九十九里町産海水サンプルより分離した放線菌株CKK748からは

griseoviridin (10)、千葉県産土壌由来の放線菌株CKK784からはbiscaberin (11)を始めとする数種のマクロラクタム類および*N*-formylantimycic acid methyl ester (15)を単離、同定した。これらのうち、10および11は濃度依存的にTCF転写阻害活性を示した。

3.4 ウイントシグナル促進成分

前述のスクリーニングの結果、数種の植物抽出物にはウイントシグナルを更新する作用が認められた。そのうちバン格拉デシュ産ミカン科植物*Zanthoxylum rhetsa*について活性を指標に分画を進めた結果、活性成分としてケルシトリン(16)を得た。本植物の分画物にはほかにも活性画分があり、現在それらの活性成分について成分探索を進めている。

4. 総括

ウイントシグナル伝達機構を対象とした研究はきわめて熾烈な競争の最中にある^{7, 8)}。特にメラニン生成とウイントシグナルに関しては、ウイントシグナルを制御する因子であるGSK-3βを抑制することで、メラニン生成が抑制されることなどが報告されている⁹⁾。また、ウイントシグナルと薄毛に関しては、毛乳頭細胞死抑制にウイントシグナル経路が関与することや¹⁰⁾、成体における毛包形成とウイントシグナル経路の関与が報告されている¹¹⁾。

一方、ウイントシグナルを制御する低分子を美白、育毛につなげる研究例は比較的少ない。最近の美白への応用例としては、ショウガ科植物より得られたカルダモンが報告されている²⁾。また、ウイントシグナルに作用して育毛作用を示す化合物に関しては、放線菌由来のラディシコールなどがあげられる¹²⁾。天然からウイントシグナル伝達経路を介して美白・育毛作用を示す成分が見出されれば、その利用価値はきわめて高いことが期待される。

本研究では、上記の知見をもとに、有用な美白・育毛作用を示す化合物の発見をめざし、当研究室保有の天然資源

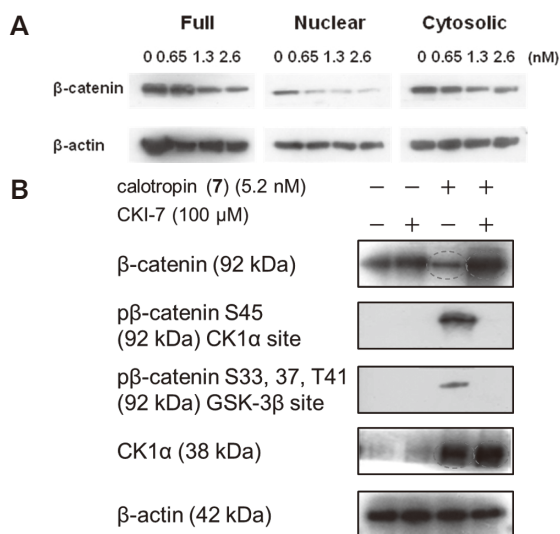


図5 ウェスタンブロットによるSW480細胞におけるcalotropin (7)の影響の解析

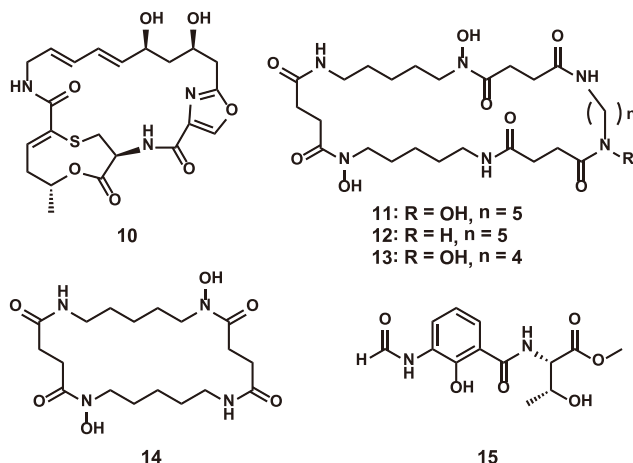


図6 ウィントシグナルに関するスクリーニングにより放線菌から単離した化合物

抽出物ライブラリーについて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、バングラデシュ産植物より、ウィントシグナルを阻害、または促進する化合物を、千葉県海水および土壌より分離培養した放線菌からは、ウィントシグナルを阻害する天然化合物の発見に成功した。そのうち、化合物**2**、**7**については、そのウィントシグナル阻害作用について解析を行い、それぞれ β カテニンを減少させることが判明したが、**2**については核内においてのみ β カテニンを減少させること、**7**については、CK1 α のタンパク質発現を増加させることで細胞全体の β カテニンを減少させることを明らかにした。

今後、さらなるウィントシグナル制御作用をもつ天然化合物の探索とそれらの作用機構の詳細な解析を進め、分子レベルでのエビデンスに基づく新たな化粧品素材の開発へ貢献したい。

謝 辞

本研究はコスメトロジー研究振興財団の研究助成により行われました。心より感謝申し上げます。また研究の遂行にあたりまして、ご指導・ご協力いただきました千葉大学大学院 薬学研究院の石橋正己教授、荒井緑准教授、大槻崇博士をはじめ共同研究者の皆様にご感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Luo, J.; Chen, J.; Deng, Z. L.; Luo, X.; Song, W. X.; Sharff, K. A.; Tang, N.; Haydon, R. C.; Luu, H. H.; He, T. C. Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab. Invest.* **2007**, *87*, 97-103.
- 2) Cho, M.; Ryu, M.; Jeong, Y.; Chung, Y. H.; Kim, D. E.; Cho, H. S.; Kang, S.; Han, J. S.; Chang, M. Y.; Lee, C. K.; Jin, M.; Kim, H. J.; Oh, S. Cardamonin suppresses melanogenesis by inhibition of Wnt/ β -catenin signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 500-505

- 3) 岸本治郎, *日本農芸化学会誌* **2003**, *77*, 566-569.
- 4) 岸本治郎, *実験医学* **2000**, *18*, 1817-1820.
- 5) Xu, Q.; Wang, Y.; Dabdoub, A.; Smallwood, P. M.; Williams, J.; Woods, C.; Kelley, M. W.; Jiang, L.; Tasman, W.; Zhang, K.; Nathans, J. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* **2004**, *116*, 883-895.
- 6) Tamai, Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Ishibashi, M. Griseoviridin and cyclic hydroxamates found in a screening program for Wnt signal inhibitor. *Heterocycles* **2012**, *86*, 1517-1524.
- 7) Espada, J.; Calvo, M. B.; Díaz-Prado, S.; Medina, V. Wnt signalling and cancer stem cells. *Clin. Transl. Oncol.* **2009**, *11*, 411-427.
- 8) Reya, R.; Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **2005**, *434*, 843-850
- 9) Bellei, B.; Flori, E.; Izzo, E.; Maresca, V.; Picardo, M. GSK3 β inhibition promotes melanogenesis in mouse B16 melanoma cells and normal human melanocytes. *Cell Signal.* **2008**, *20*, 1750-1761
- 10) 鳥居, 西沢ら, Wnt5aの毛乳頭細胞死抑制作用とそのメカニズム. *フレグランスジャーナル* **2009**, *37*, 54-60
- 11) Ito, M.; Yang, Z.; Andl, T.; Cui, C.; Kim, N.; Millar, S. E.; Cotsarelis, G. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* **2007**, *447*, 316-320
- 12) Shinonaga, H.; Noguchi, T.; Ikeda, A.; Aoki, M.; Fujimoto, N.; Kawashima, A. Synthesis and structure-activity relationships of radicicol derivatives and WNT-5A expression inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4622-4635