

芍薬に含まれるコラーゲンのAGEs化を阻害する化合物の探索とその皮膚老化改善作用の検討

熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学分野

藤原 章雄

Advanced glycation end-products (AGEs), were known as major hydrolysate of glycated collagen. Subsequently, AGEs was also detected in human serum, and its level in patients with diabetes was found to be higher than in normal subjects. Furthermore, it is known that AGEs-collagen induces apoptosis in fibroblasts through activation of reactive oxygen species and MAP kinases. Therefore, treatment with AGEs inhibitors may be a potential strategy for the prevention of clinical diabetic complications and skin aging. In the present study, we investigated the inhibitory effect of *Syakuyaku* extract and compounds contained in *Syakuyaku* on N^ω-(carboxymethyl) arginine (CMA) formation to discover the candidate agents for the new AGEs inhibitor. As a result, *Syakuyaku* extract and pentagalloylglucose isolated from *Syakuyaku* extract showed significant inhibitory effect on CML and CMA formation during incubation of collagen with ribose, thus *Syakuyaku* and pentagalloylglucose may be candidate agents for the new AGEs inhibitors.

1. 緒言

我々は、健康維持や疾病予防に有効な「機能性天然薬物」の探索研究を行っており、これまでに抗動脈硬化作用を有する天然化合物やマクロファージの活性化制御作用を有することでガン免疫療法に有効な天然化合物を発見してきた¹⁻⁶⁾。

さらに近年、この研究の一環として、糖尿病合併症や動脈硬化症、皮膚老化などの老化性疾患の発症や進展に関与する advanced glycation end-products (AGEs) の生成を阻害する天然化合物の探索を行なっている。AGEsとは還元糖とタンパク質の非酵素的な反応であるメイラード反応によって生じる最終生成物の総称であり、このメイラード反応はグルコースなどの還元糖とタンパク質のアミノ基が反応してアマドリ転位物を形成する前期反応と、アマドリ転位物が酸化、脱水、縮合、転位などの反応を経てAGEs構造体へと変化する後期反応からなる。現在、様々なAGEs構造体が知られており、その中でも、様々なタンパクで生成する主要なAGEs構造体であるN^ε-(carboxymethyl) lysine (CML)は、糖尿病合併症の病変部位や動脈硬化症のみならず、肺線維症の肺胞マクロファージなどでも蓄積することが知られている⁷⁾。また、コラーゲンに特異的に生成するAGEsとしてはN^ω-(carboxymethyl) arginine (CMA)が知られている⁸⁾。さらに、コラーゲンに生成するAGEsと病態との関連についても、様々な報告がなされ

ており、例えば、AGEs化コラーゲンは骨を形成する骨芽細胞のアポトーシスを誘導することで骨形成を阻害し、この現象は骨粗鬆症の原因の一つであると考えられている⁹⁾。また、コラーゲンのAGEs化は、表皮に存在するケラチノサイト(角化細胞)の遊走やコラーゲンへの接着能を低下させることから、糖尿病患者の創傷治癒の遅延にはコラーゲンのAGEs化が関与していることが示唆されている¹⁰⁾。

コラーゲンは、皮膚の真皮において線維芽細胞から産生され、真皮の70%以上を構成するタンパク質であり、このコラーゲンが線維芽細胞に引っ張られることで肌の張りが保たれている。しかし、コラーゲンがAGEs化すると、AGEsコラーゲンによるRAGE (receptor for AGE)を介したsignalingにより線維芽細胞のアポトーシスが引き起こされ^{9, 11)}、その結果、肌の張りの低下といった皮膚老化が促進すると考えられている。

そこで、本研究では、皮膚老化予防に対する新たなターゲット分子としてAGEsに注目し、生薬「芍薬」のAGEs生成阻害作用の検討および芍薬に含まれるAGEs生成阻害化合物の探索を行なった。

2. 実験

2.1 試験サンプル

本研究で用いた生薬抽出エキスは、各種生薬をMeOHで24時間温浸することで調製した。また、試験化合物は生薬「芍薬」から各種クロマトグラフィーにて単離・精製したものをを用いた。

2.2 AGEs生成阻害試験

リボース (30mM) とゼラチン (2mg/ml) もしくは、I型コラーゲン (1.5mg/ml) の混合溶液を37℃で7日間インキュベートすることで、AGEsであるCMLとCMAが生成する条件下に、DMSOで溶解した試験サンプルを添加



Identification of compounds inhibiting AGEs formation in *Syakuyaku*

Yukio Fujiwara

Department of Cell Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

し、CML生成およびCMA生成に対する阻害作用を、抗CML抗体ならびに抗CMA抗体を用いたELISA法にて評価した。

2.3 ELISA

ELISAによるCMLおよびCMA含量の評価は、Nagaiらの方法に準じて行った¹²⁾。リボース-ゼラチン混合液(10 μ g/ml)を96穴プレートにコーティングし、0.05% Tween 20を含むPBS(washing buffer)で3回洗浄後、0.5%ゼラチンにてブロッキングを行った。各wellをwashing bufferにて洗浄し、抗CML抗体もしくは抗CMA抗体を添加後、1時間インキュベートした。各wellをwashing bufferにて洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体にて1時間インキュベートし、最後にOPDにて発色反応後、1M硫酸にて反応を停止した。各wellの450nmにおける吸光度をmicro-ELISA plate readerにより測定した。

2.4 線維芽細胞の3次元培養

ヒト真皮線維芽細胞は、JCRB細胞バンクより購入した。ヒト真皮線維芽細胞(4.0 \times 10⁵ cell/well)を培地で懸濁させた溶液に、I型コラーゲン溶液を加え、培養チャンバー内で培養することで、I型コラーゲンマトリックスに線維芽細胞を包埋した。2日後に凝固したマトリックスを培養チャンバーより剥離し、8日間培養することで、正常に収縮するマトリックスを形成させた。

2.5 ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットによるMAPキナーゼの活性化の評価は、これまでの報告に準じて行った¹¹⁾。37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートした各種コラーゲン溶液(I型コラーゲン溶液、リボース-I型コラーゲン溶液、天然化合物を添加したりボース-I型コラーゲン溶液)にて、3時間刺激したヒト真皮線維芽細胞を回収し、lysis bufferを用いて細胞を溶解させた。電気泳動には、10%ポリアクリルアミドゲルを用いた。また、1次抗体は、Rabbit monoclonal anti-Phospho-p38 antibody, Rabbit polyclonal anti-Phospho-(JNK1+JNK2) antibody, Mouse monoclonal anti- β -actin antibodyを用いて行った。

2.6 免疫組織化学染色

37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートした各種コラーゲン溶液(I型コラーゲン溶液、リボース-I型コラーゲン溶液、天然化合物を添加したりボース-I型コラーゲン溶液)にて刺激したヒト真皮線維芽細胞を4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィンにて包埋した。続いて、パラフィン切片を作成後、定法により抗CML抗体、抗CMA抗体およびRabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 antibody

を用いた免疫染色を行った。

3. 結果

3.1 芍薬エキスおよび芍薬抽出画分のAGEs生成阻害作用

芍薬のAGEs生成阻害作用を評価するために、芍薬のMeOH抽出エキスを調製し、まずは、コラーゲンに特異的に生成するAGEsであるCMAに対する阻害作用を評価した。その結果、Fig.1Aに示すようにMeOH抽出エキスはCMAの生成を有意に抑制した。また、MeOH抽出エキスをDiaion HP-20カラムにて分画した画分を用いて評価を行なったところ、50% MeOH溶出画分にのみ顕著な

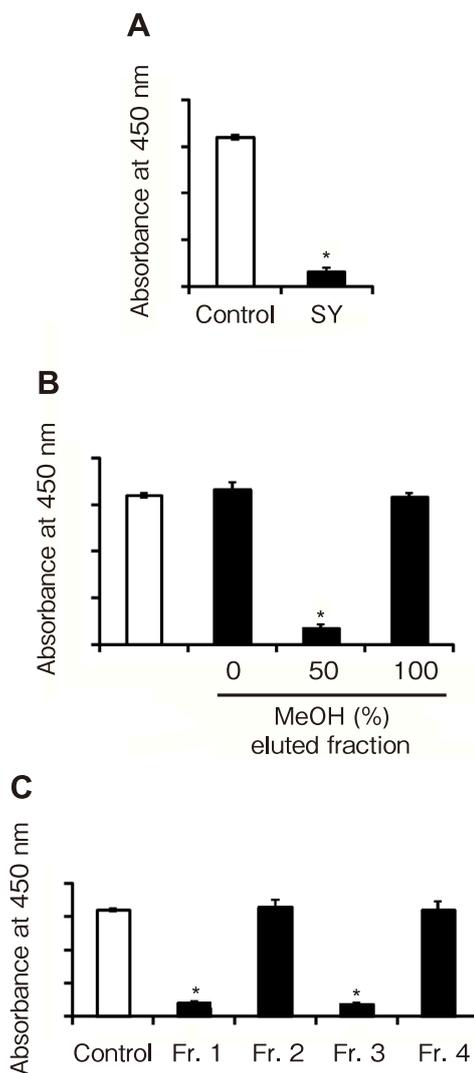


Fig.1 Inhibitory effect of Syakuyaku (SY) on CMA formation. Gelatin and ribose were incubated with 50 μ g/ml Syakuyaku (SY) extract (A), 50 μ g/ml fractions isolated by Diaion HP-20 column (B) and 10 μ g/ml fractions isolated from 50%MeOH eluted fraction by Wako gel column (C) in phosphate buffer for 7 days followed by determination of CMA by noncompetitive ELISA as described under Material and Methods. Data are presented as the mean \pm SD. *, P <0.01 versus control.

CMA 阻害作用が認められた (Fig.1B)。続いて、阻害効果の認められた 50% MeOH 溶出画分を Wako gel カラムを用いて分画し、得られた 4 つの画分の阻害作用を評価したところ、Fraction 1 ならびに Fraction 3 に顕著な CMA 阻害作用が認められた (Fig.1C)。ゆえに、これらフラクションに活性本体が含まれていることが示唆された。

3.2 芍薬抽出画分からの化合物の単離

Fig.1C で顕著な CMA 生成阻害作用が認められた fraction 1 および fraction 3 を各種クロマトグラフィー (シリカゲルカラム、逆相シリカゲルカラム、HPLC) により分離精製を行なった。単離した化合物を核磁気共鳴 (NMR) および質量分析により構造解析を行なったところ、Fig.2 に構造を示す化合物 (Methylgallate, Galloylpaeoniflorin, Trigalloylglucose, Tetragalloylglucose, Pentagalloylglucose) を同定した。

3.3 芍薬由来化合物の AGEs 生成阻害作用

AGEs 生成を阻害する芍薬の活性本体を同定する目的で、まず、リボースとゼラチン (可溶性コラーゲン) を用いた

AGEs 生成阻害試験系にて、単離した化合物の阻害作用を評価した。その結果、すべての化合物に有意な CMA の生成阻害作用が認められ、GP を除く、すべての化合物に CML の生成阻害作用が認められた (Fig.3A)。次に、リボースと I 型コラーゲンをを用いた AGEs 生成阻害試験系にて同様に評価を行った。その結果、すべての化合物に有意な CMA の生成阻害作用が認められ、TRGG, TEGG, PGG に有意な CML の生成阻害作用が認められた (Fig.3B)。また、これら化合物は CML よりも CMA の生成をより強く抑制することが明らかとなった (Fig.3)。

3.4 線維芽細胞の三次元培養を用いた AGEs 阻害作用を有する芍薬由来化合物の評価の検討

肌の張りは、真皮中に存在する線維芽細胞がコラーゲンを引っ張ることで保たれている。通常、正常なコラーゲンマトリックス中で線維芽細胞を培養すると、線維芽細胞が I 型コラーゲンを引っ張り引き締めることで弾力のある真皮類似構造を形成し、マトリックスの収縮が観察されるが、AGEs 化コラーゲンマトリックス中では、その収縮率が低下する。そこで、CMA 生成阻害作用の認められた

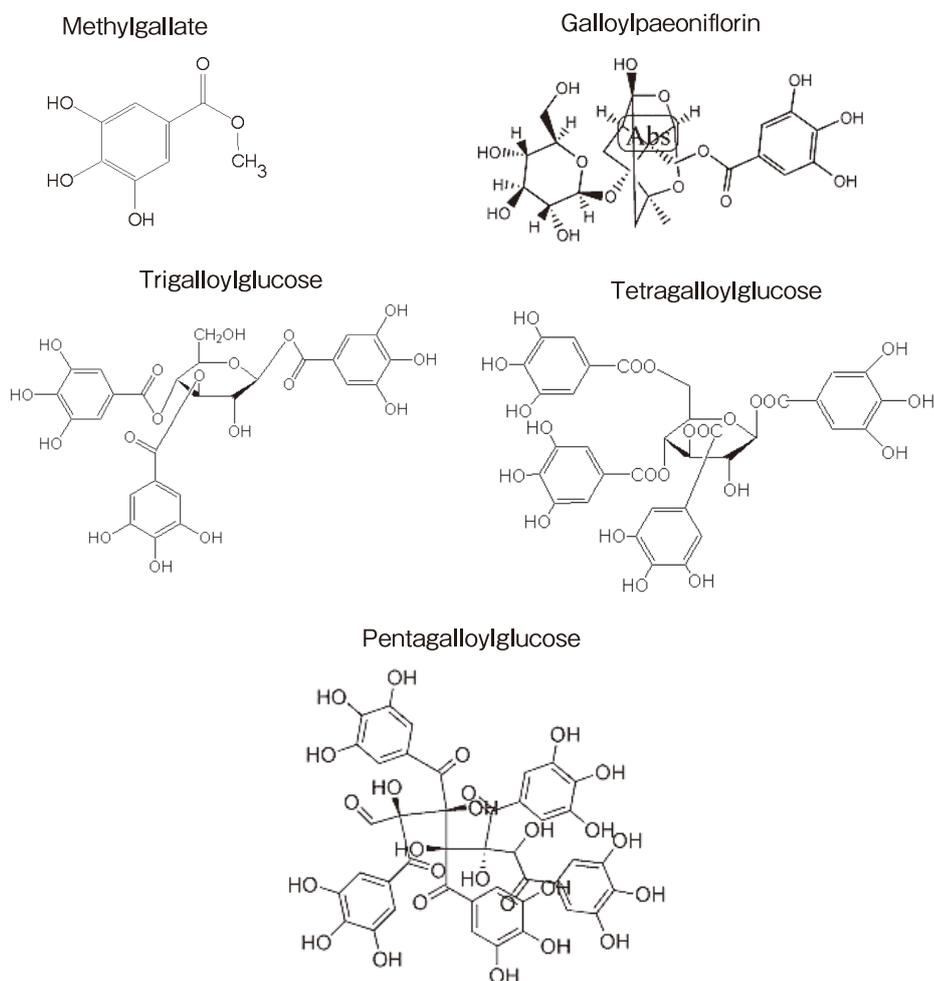


Fig.2 Chemical structure of compounds isolated from fractions possessing inhibitory effect on CMA formation.

Pentagalloylglucose (PGG) を添加したコラーゲンをを用いて、マトリックスの収縮に対する効果を検討した。方法としては、ヒト線維芽細胞を培地で懸濁させた溶液に、native-collagen 溶液、AGEs-collagen 溶液 (ribose と native-collagen の混合液を7日間インキュベートしたもの) もしくは、PGG を添加した collagen 溶液 (AGEs-collagen 溶液を調製する際に PGG を添加したもの) を加え、培養チャンバー内で培養することで、コラーゲンマトリックスに線維芽細胞を包埋した。2日後、凝固したマトリックスを培養チャンバーより剥離し、8日間培養後にマトリックスの収縮を観察した。その結果、AGEs-collagen を用いたマトリックスでは native-collagen を用いた場合に比べて、その収縮率が低下

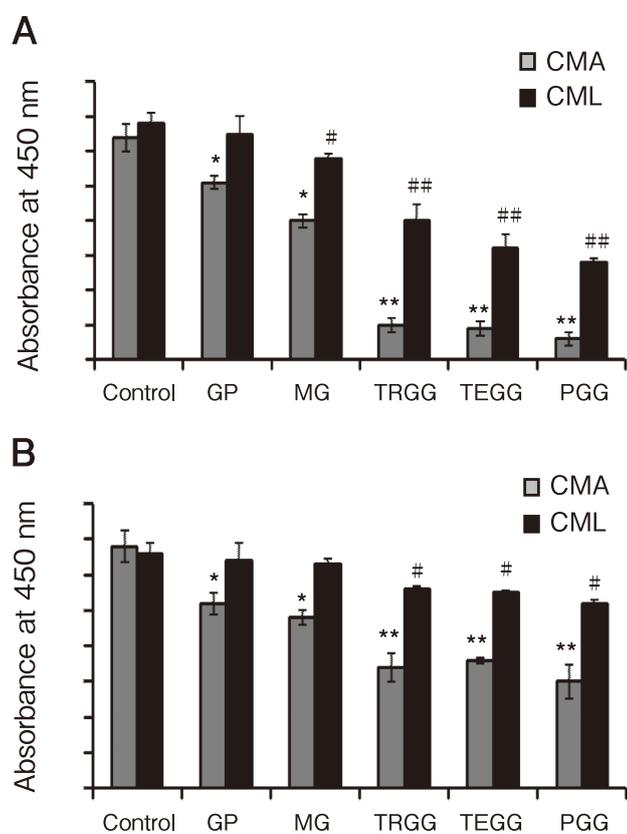


Fig.3 Inhibitory effect of compounds isolated from *Syakuyaku* on AGEs formation.

Gelatin and ribose were incubated with indicated concentration of compounds (GP; Galloylpaeniflorin, MG; Methylgallate, TRGG; Trigalloylglucose, TEGG; Tetragalloylglucose, PGG; Pentagalloylglucose) in phosphate buffer for 7 days followed by determination of CMA and CML by noncompetitive ELISA as described under Material and Methods (A). Type-I collagen and ribose were incubated with indicated concentration of compounds (GP; Galloylpaeniflorin, MG; Methylgallate, TRGG; Trigalloylglucose, TEGG; Tetragalloylglucose, PGG; Pentagalloylglucose) in phosphate buffer for 7 days followed by determination of CMA by noncompetitive ELISA as described under Material and Methods (B). Data are presented as the mean \pm SD. *, $P < 0.01$; **, $P < 0.005$; #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ versus control.

し、その収縮率の低下は PGG により改善した (Fig. 4)。

前述したように、PGG は、コラーゲンの CMA 化により低下したマトリックスの収縮率を改善したため、その改善作用が CMA 生成阻害作用によるものであるかを確認するために、マトリックス中の CMA 含量を、抗 CMA 抗体を用いた免疫染色により評価した。その結果、マトリックスの収縮率が低下したコントロールでは CMA の蓄積が確認でき、その蓄積は PGG の添加により抑制された (Fig.5A)。ゆえに、PGG によるマトリックス収縮改善作用は、これら化合物の CMA 生成阻害作用によることが示唆された。また、マトリックス中の線維芽細胞の形態を、HE 染色により確認したところ、CMA 化コラーゲン中では、線維芽細胞の形態が丸くなり Native collagen と比較して、明らかに細胞死が誘導されていた (Fig.5B)。一方、CMA 生成阻害化合物である PGG を添加したマトリックス中の線維芽細胞は、Native collagen と比較して、変化のない正常な形態であった (Fig.5B)。さらに、カスパーゼ3の活性化を免疫染色により評価したところ、CMA-collagen では、カスパーゼ3の活性化が認められ、その活性化は PGG により抑制された (Fig.5C)。ゆえに、CMA 生成阻害化合物である PGG によるマトリックスの収縮率の改善は、PGG がコラーゲンの CMA 化を阻害したことによる線維芽細胞のアポトーシスの抑制であることが示唆された。

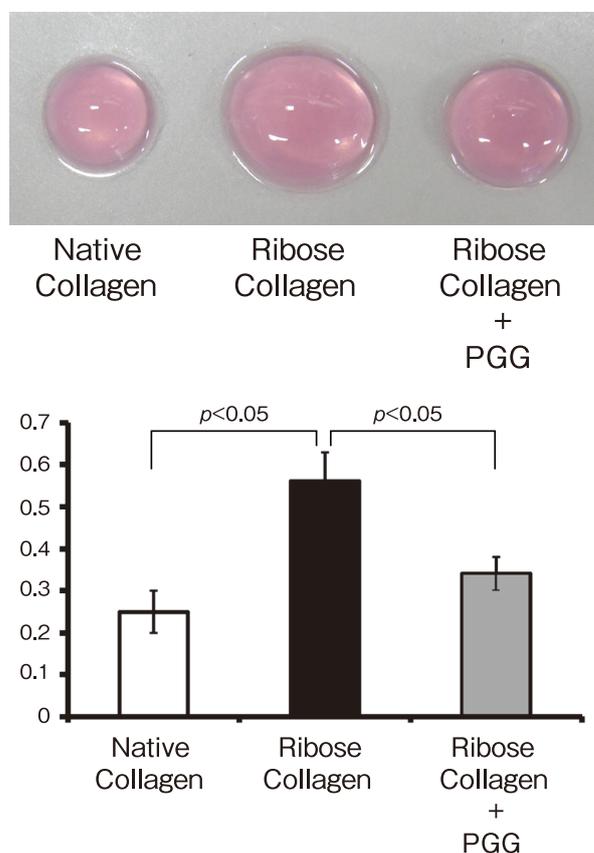


Fig.4 Effect of PGG on contraction of collagen matrix.

3.5 CMA 生成阻害化合物による線維芽細胞のアポトーシス抑制メカニズム

次に、CMA 阻害化合物である PGG が線維芽細胞のアポトーシスを抑制するメカニズムを解明することにした。これまでに、CMA の類似構造を有する AGEs 構造体である CML 化したタンパクは、RAGE を介して JNK や p38 などの MAP kinase を活性化させることで、細胞をアポトーシスに導くことが報告されている^{9, 11)}。そこで、本研究では CMA 化コラーゲンによる JNK や p38 の活性化ならびに PGG の JNK や p38 の活性化に対する作用を検討した。方法としては、ヒト線維芽細胞に CMA 化コラーゲンまたは PGG で処理したコラーゲンを 3 時間添加後の phosphorylated-p38 および phosphorylated-JNK の発現量をウエスタンブロット法にて評価した。その結果、PGG

は CMA 化コラーゲンによる p38 および JNK の活性化を顕著に抑制した (Fig. 6)。ゆえに、CMA 生成阻害化合物は、コラーゲンの CMA 化を抑制することで、CMA 化コラーゲンによる p38 および JNK の活性化を抑制し、結果的に線維芽細胞のアポトーシスを抑制することで、三次元培養におけるマトリックスの収縮率の低下を改善したものと考えられた。

4. 考 察

本研究により芍薬の AGEs 生成阻害作用が明らかとなり、その活性本体は化学構造中にガロイル基を有する Methylgallate, Galloylpaeoniflorin, Trigalloylglucose, Tetragalloylglucose, Pentagalloylglucose であることが明らかとなった。また、構造活性相関として、ガロイル基を

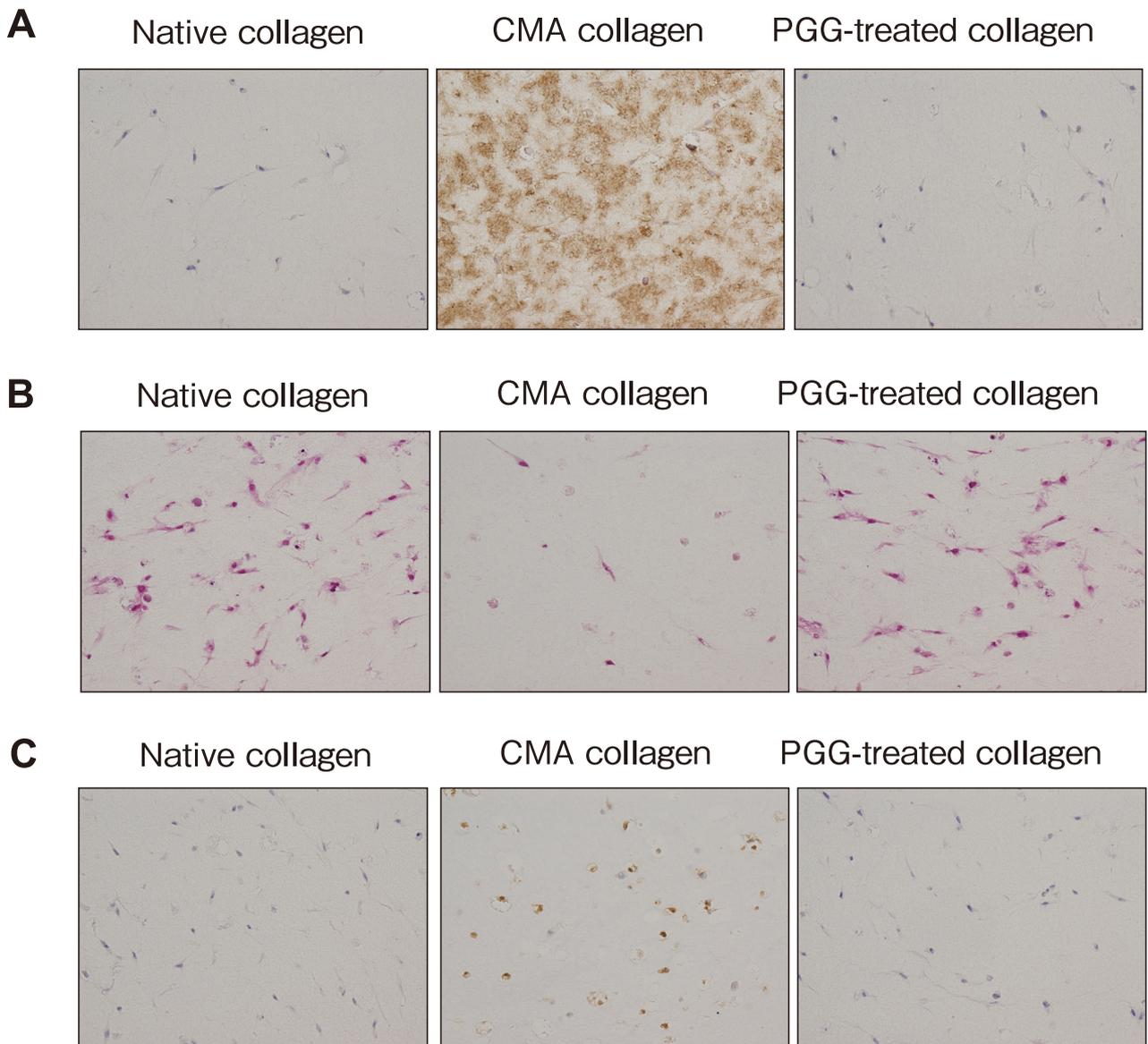


Fig.5 Effect of PGG on CMA Accumulation and Cell Viability in Collagen Matrix. CMA accumulation (A). HE staining of Fibroblast (B). Caspase-3 activation (C).

多くもつPentagalloylglucose (PGG) が最も阻害活性が強く、ガロイル基の数が減少していくにつれ活性が低下する傾向が認められたことから、ガロイル基の数がCMAの阻害活性に参与する可能性が示唆された。また、PGGは線維芽細胞の三次元培養において、コラーゲンのCMA化に伴うコラーゲンマトリックスの収縮率の低下を改善した。この収縮率改善メカニズムは、CMA生成阻害化合物がコラーゲンのCMA化を抑制することで、結果的にCMAコラーゲンにより誘導されるアポトーシスシグナルの一つであるMAP kinase (JNK, p38) シグナルの抑制を介した線維芽細胞のアポトーシス抑制によるものであることが明らかとなった。本研究にて、生薬「芍薬」および、芍薬に含まれる成分の皮膚老化改善作用および、その作用メカニズムを解明したことで、CMAが皮膚老化改善作用における新たなターゲット分子として重要であることが示された。本研究ではCMAコラーゲンが引き起こすと考えられる病態や老化症状のうち、特に皮膚老化に注目して研究を行ったがCMAコラーゲンは皮膚老化のみならず骨粗鬆症や糖尿病合併症の原因物質であることも考えられているため、今後さらにCMAの生体に及ぼす影響が明らかになることで、CMA阻害剤の重要性が高まり、本研究で得られた知見やCMA阻害化合物の社会的利用価値が高まることが期待される。

謝 辞

当該研究テーマおよび関連テーマの実施に際して、グラントサポートを賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝します。

(引用文献)

- 1) Fujiwara Y, Kiyota N, Hori M, Matsushita S, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Takeya M, Ikeda T, Nohara T, Nagai R, : Esculeogenin A, a new tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting ACAT., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 2400-2406, 2007.
- 2) Fujiwara Y, Hayashida A, Tsurushima K, Nagai R, Yoshitomi M, Daiguji N, Sakashita N, Takeya M, Tsukamoto S, Ikeda T, : Triterpenoids Isolated from Zizyphus jujuba Inhibit Foam Cell Formation in Macrophages. *J Agric Food Chem*, **59**, 4544-4552, 2011.
- 3) Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Yoshitomi M, Horlad H, Ikeda T, Nohara T, Takeya M, Nagai R, : Tomatidine, a tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *J Agric Food Chem*. **60**, 2472-2479, 2012.

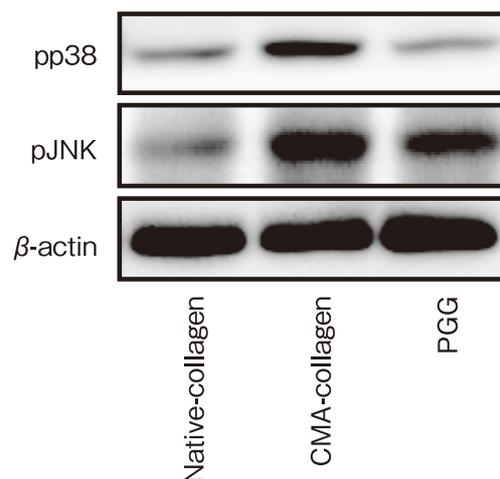


Fig.6 Effect of PGG on MAP Kinase (p38 and JNK) Activation.

Human dermal fibroblasts were incubated for 3 hours with 400µg/ml CMA-collagen, native collagen or PGG (30µM) -treated collagen. The phosphorylation of p38 and JNK were analyzed by western blotting analysis.

- 4) Fujiwara Y, Komohara Y, Ikeda T, Takeya M, : Corosolic acid Inhibits Glioblastoma Cell Proliferation by Suppressing the Activation of STAT3 and NF-κ B in Tumor Cells and Tumor-associated Macrophages., *Cancer Sci*. **102**, 206-211, 2011.
- 5) Fujiwara Y, Komohara Y, Kudo R, Tsurushima K, Ohnishi K, Ikeda T, Takeya M, : Oleonic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3. *Oncol Rep*, **26**, 1533-1537, 2011.
- 6) Horlad H, Fujiwara Y, Takemura K, Ohnishi K, Ikeda T, Tsukamoto H, Mizuta H, Nishimura Y, Takeya M, Komohara Y : Corosolic acid impairs tumor development and lung metastasis by inhibiting the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *Mol Nutr Food Res*. in press.
- 7) Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, Ouchi Y, : Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol*. **51**, 515-519, 1998.
- 8) Shimasaki S, Kubota M, Yoshitomi M, Takagi K, Suda K, Mera K, Fujiwara Y, Nagai R, : N^ω-(carboxymethyl) arginine Accumulates in Glycated Collagen and Klotho-deficient Mouse Skin. *Anti-Aging Medicine*, **8**, 82-87, 2011.
- 9) Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT, : Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes

- and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem*, **280**, 12087-12095, 2004.
- 10) Morita K, Urabe K, Moroi Y, Koga T, Nagai R, Horiuchi S, Furue M, : Migration of keratinocytes is impaired on glycated collagen I. *Wound Repair Regen*. **13**, 93-101. 2005.
- 11) Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT, : Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. *Am J Physiol Cell Physiol*. **292**, C850-856. 2007.
- 12) Nagai R, Ikeda K, Higashi T et al, Hydroxy radical mediates N epsilon-(carboxymethyl) lysine formation from amadori product. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 234 : 167-172.