

食薬用植物からの育毛活性物質の探索

筑波大学生命環境系

繁 森 英 幸

Hepatocyte growth factor (HGF) has mitogenic, motogenic, and morphogenic activities in epithelial cells. Induction of HGF production may be involved in organ regeneration, wound healing and embryogenesis. HGF is also known to act on human and animal hair follicles to promote hair growth. In this study, the effects of naturally occurring compounds, which were isolated from edible and medicinal plants, on HGF production in Neonatal Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) were investigated. Clovamide, one of the caffeic acid derivatives significantly induced HGF production dose-dependent manner. To know the important substructure for HGF production activity, we next investigated the effect of the partial structure of these caffeic acid derivatives. From the results, clovamide showed strong activity on the promotion of HGF production. It was suggested that the caffeoyl moiety of caffeic acid derivatives such as clovamide and its related compounds is essential for accelerated production of HGF. The compound which has the caffeoyl moiety may be useful for the treatment of some intractable organ diseases in addition to hair growth activity.

1. 緒 言

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) は、当初肝細胞に対する最も強力な増殖促進因子として同定されていたが、腎尿細管や気管支上皮、ケラチノサイトなど様々な上皮系細胞に対しても増殖促進因子として機能することが知られている¹⁾。また最近では、血管内皮細胞、軟骨細胞、造血幹細胞などの間葉系細胞の増殖を促進させることも明らかにされている。さらに、HGFはヒトおよび動物の毛包に働き、発毛・育毛を促進することも知られている²⁾。成長期毛包の毛乳頭細胞からは、HGF、インスリン様増殖因子-1、血管内皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、退行期にはトランスフォーミング増殖因子-βなどの因子が産生され、これらが毛母細胞などに作用することで、ヘアサイクルが制御されていると考えられている³⁾。また、毛髪の成長期移行シグナルであるシグナル伝達兼転写活性化因子3 (STAT3) は、HGFにより活性化されることが知られている。当研究グループでは、これまでに寄生植物のアメリカナシカズラやヤセウツボから単離したカフェオイルキナ酸 (CQA) 類ならびにフェニルエタノイド配糖体 (PHEG) 類などのカフェ酸誘導体に、正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する顕著なHGF産生促進活性があることを見出した⁴⁾。また一方で、ジンチョウゲから単離したDaphnane型ジテルペン化合物にも顕著なHGF産生促進活性を見出している⁵⁾。そこで本研究では、食薬用植物を含む天然素

材から新たなHGF産生促進活性物質を探索するとともに、CQA類、PHEG類やDaphnane型ジテルペン化合物と併せて、それらの化合物の機能を解明することを目的とする。

2. 方 法

2. 1. 天然由来化合物のHGF産生促進活性

2. 1. 1. 活性試験用化合物

当研究室で食薬用植物や微生物から単離した化合物⁶⁻¹⁰⁾ : Acteoside, Arctigenin, Antimycin A3a, Palmaenone A, Palmaerin A, Daphnodorin C, Clovamide, Piceatannol および Scirpusin B

2. 1. 2. 細胞培養

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Normal human dermal fibroblasts : NHDF) (Kurabo Co.) を、10% FBSを加えたダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Sigma-Aldrich Co.) を用いて、37℃、5% CO₂ 加湿雰囲気中で培養し、各実験に使用した。

2. 1. 3. NHDF細胞への化合物投与

フラスコで培養したNHDF細胞をトリプシン処理し、96well plateに5.0×10⁴ cells/mLになるように100μLずつ播種して、コンフルエントになるまで培養し、化合物を0.5% FBS DMEMで希釈し、培地交換の要領で96well plateに100μL/wellで添加し96h培養した。

2. 1. 4. サンドイッチ酵素結合免疫吸着検査法 (Enzyme-linked immuno-sorbent assay : ELISA)

ELISA用の96well plate (Nunc) に抗ヒトHGF抗体 (R&D Systems) を播種し、4℃で一晩インキュベートした。各wellを0.05% Tween 20 in PBS (TBS/T) で洗浄し、ブロッキング剤 (5% Tween 20, 5% Sucrose 含有PBSで溶解した1% BSA) を添加し1h静置した。これ以降の実験操作は室温で行った。溶液の除去ならびにTBS/T洗浄を行い、上記の細胞上清を添加した。同時に、標準曲線用に human HGF standard (R&D Systems) を0~50ng human



Search for hair growth-promoting compounds from edible and medicinal plants

Hideyuki Shigemori

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

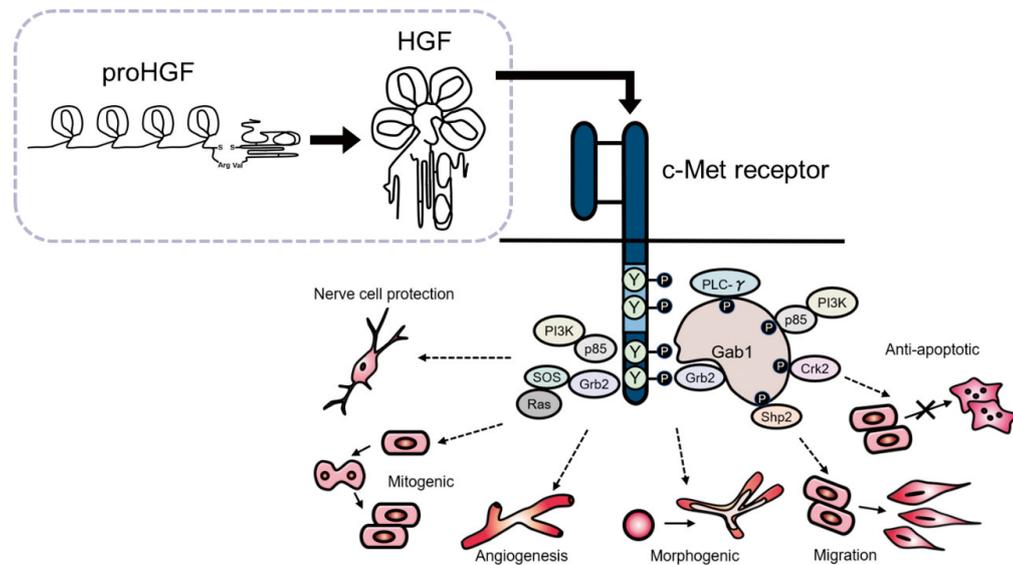


図1 HGFが関与する生理作用

HGF/mLの範囲で添加した。2h静置した後、溶液の除去ならびにTBS/T洗浄を行い、ビオチン化抗HGF二次抗体(R&D Systems)を添加し2h静置した。溶液の除去およびTBS/T洗浄を行い、ストレプトアビジン標識ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase: HRP)(R&D Systems)を添加した。インキュベート(30min)後、溶液の除去ならびにTBS/T洗浄を行い、酵素基質 2,2'-Azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazole-6-sulfonic acid)(ABTS)溶液を添加してアルミホイルで遮光し30min静置した。最後に反応停止剤として2M硫酸を添加した後、410nmで吸光度を測定した。得られた値より検量線を作成し、1wellあたりのHGF産生量を求めた。

2.1.5. BCAタンパク質量法

ELISAアッセイに用いる上清を取り除いた後の96well plateをTBS/Tで軽く洗浄し、0.5% Triton X-100含有PBSを添加して20minほどシェイカーで振盪し細胞層を回収した。新たな96well plateに回収した細胞サンプルまたはBSA standardとWorking solutionを添加し、562nmで吸光度を測定した。得られた値より検量線を作成し、サンプル内のタンパク質量すなわちプレートに生着していた細胞数を求めた。

上記の2つのアッセイ結果より、単位タンパク質量あたりのHGF産生量(pg/ μ g protein)を算出し、各化合物によるHGF産生促進活性を調べた。

2.1.6. HGF産生に関与するmRNAの発現量測定

NHDFを6cm dishに播種しコンフルエントになってから化合物を添加した。化合物処理後、培地を除去してPBSで洗浄後、RNA抽出用試薬ISOGEN 1mL/wellを添加し、かき取ってチューブに回収して5min室温静置した。これ

に、0.2mLクロロホルムを添加し室温で3min静置した後、遠心(12000rpm、15min、4 $^{\circ}$ C)し、水層(上層)を新しいチューブに移した。0.5mLイソプロパノールを添加して室温で5-10min静置した。遠心(12000rpm、10min、4 $^{\circ}$ C)した後、上清を除去して70%エタノール(1mL)を添加し、さらに遠心(7500rpm、5min、4 $^{\circ}$ C)した後、上清を除去して風乾し、水で希釈してtotal RNA溶液を調製した。

一方で、氷上で試薬とRNA溶液を混ぜ、65 $^{\circ}$ Cで5min(RNA変性)、37 $^{\circ}$ Cで5min(ゲノムDNA除去)、37 $^{\circ}$ Cで15min、50 $^{\circ}$ Cで5min、98 $^{\circ}$ Cで5min(逆転写活性および酵素失活反応)の条件で反応終了後にサンプルを回収した(cDNA)。このcDNAサンプルと試薬およびプライマーを混ぜPCR用の96well plateに播き、フィルムをして定量的逆転写PCR(RT-qPCR)を行った。

2.1.7. HGF産生経路に関わる酵素に対する阻害剤を用いたHGF産生促進活性

阻害剤：KT5720(プロテインキナーゼA：PKA)、PD98059(分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ/細胞外シグナル調節キナーゼ：MAPK/ERK)、SB203580(p38分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ：p38MAP)、SP600125(c-Jun N-terminal kinase：JNK)、Wortmannin(ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ：PI3K)およびBisindolylmaleimide 1(プロテインキナーゼC：PKC)

2.1.1.における活性試験用化合物中で最も顕著なHGF産生促進活性が認められたClovamideを用いて上記の阻害剤を添加してNHDF細胞からのHGF産生量を2.1.4. サンドイッチELISA法と2.1.5. BCAタンパク質量法と同様の方法を用いて測定した。

3. 結果

3.1.1. 天然由来化合物によるHGF産生促進活性

HGF産生促進活性が知られている血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) をポジティブコントロールとして、9種類の天然由来化合物 (Acteoside、Arctigenin、Antimycin A3a、Palmaenone A、Palmaerin A、Daphnodorin C、Clovamide、PiceatannolおよびScirpusin B) について、各5μMを用いてサンドイッチELISA法により

HGF産生促進活性を調べた。その結果、ActeosideおよびClovamideに顕著なHGF産生促進活性が認められた(図2)。ActeosideのHGF産生促進活性についてはすでに当研究室で報告していることから、これ以降の実験では、Clovamide(図3)を用いて検証することとした。

そこで、Clovamideの濃度(0.5、1、5および10μM)を変えて経時変化(48hおよび96h)を調べたところ、濃度依存的ならびに時間依存的にHGF産生促進活性が増強した(図4)。

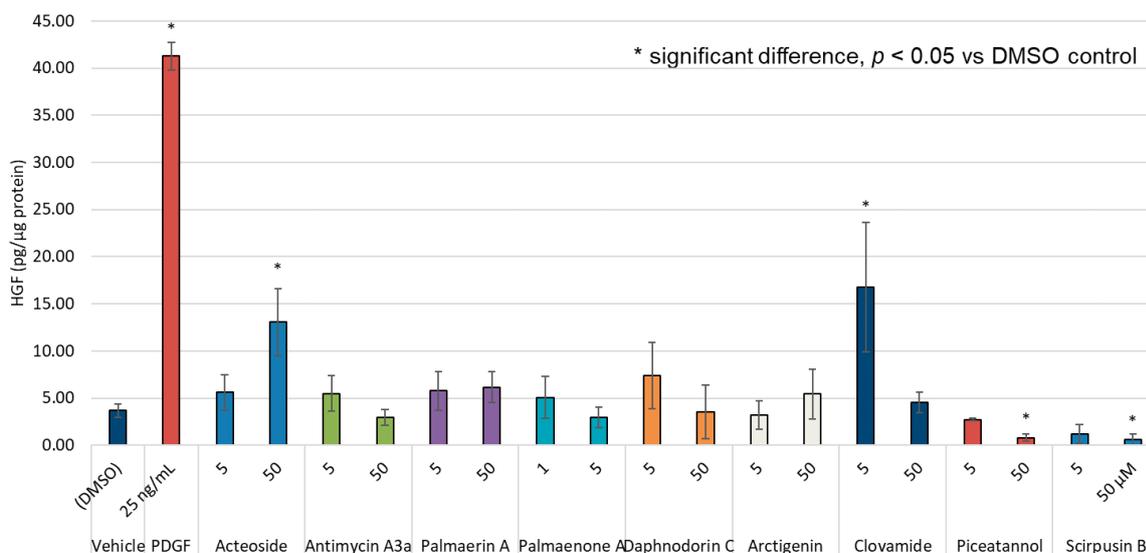


図2 天然由来化合物のHGF産生促進活性

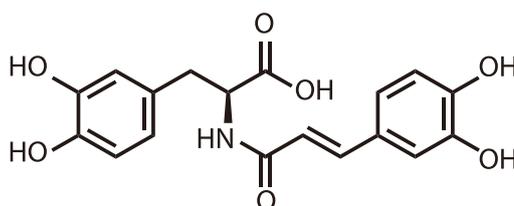


図3 Clovamideの構造式

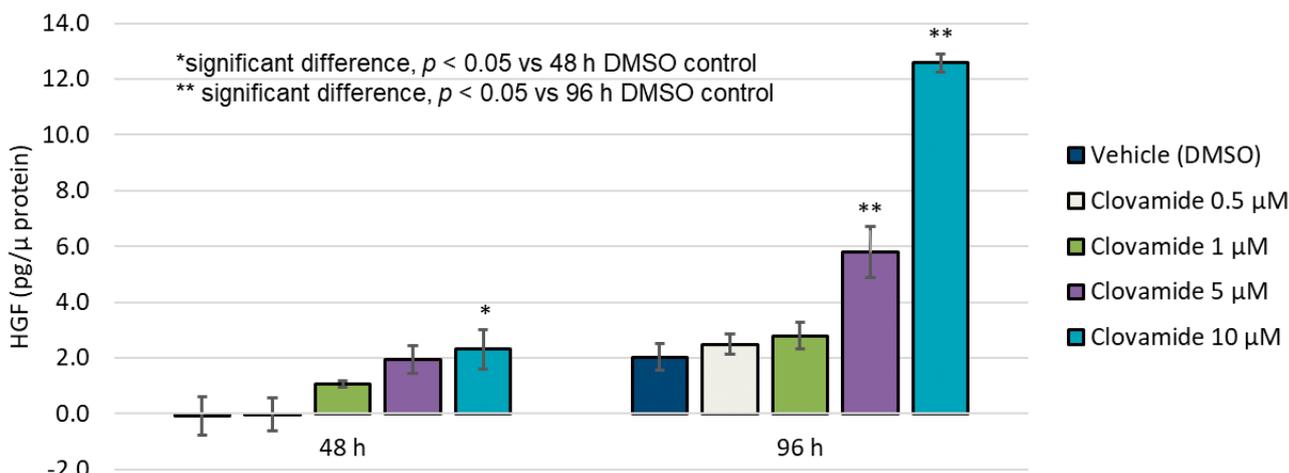


図4 Clovamideの濃度および時間依存的なHGF産生促進活性

3. 1. 2. HGF 産生に関するmRNAの発現量測定

RT-qPCR を用いて Clovamide の添加 (5 および 20 μM) による HGF mRNA 発現量を調べた結果、6 h 処理では有意差は見られなかったが、48 h 処理において Clovamide (20 μM) では有意差が見られた (図 5)。

3. 1. 3. Clovamide による HGF 産生促進経路の解明

HGF 産生経路に関わると想定した酵素の阻害剤 (KT5720, PD98059, SB203580, SP600125, Wortmannin および Bisindolylmaleimide 1) を用いて、Clovamide との共処理による HGF 産生量を調べた結果、PKA 阻害剤である

KT5720 を添加した際に HGF 産生量が減少することが観測された (図 6)。したがって、HGF 産生には PKA 経路の関与が重要であることが示唆された。

4. 考 察

9 種類の天然由来化合物を用いて サンドイッチ ELISA 法により HGF 産生促進活性を調べた結果、Acteoside および Clovamide に顕著な HGF 産生促進活性が認められたことから、先行研究で活性が認められた CQA 類や PHEG 類などのカフェ酸誘導体と同様にカフェ酸構造に含まれるカ

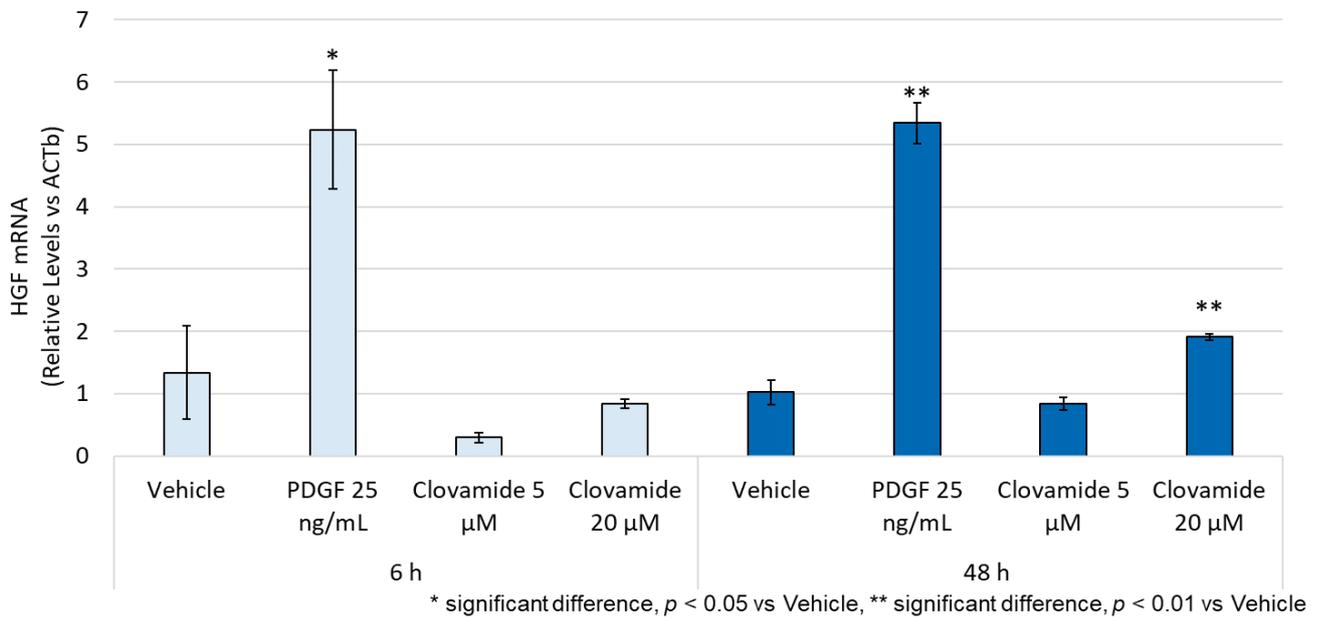


図5 Clovamide処理によるHGF mRNA発現量

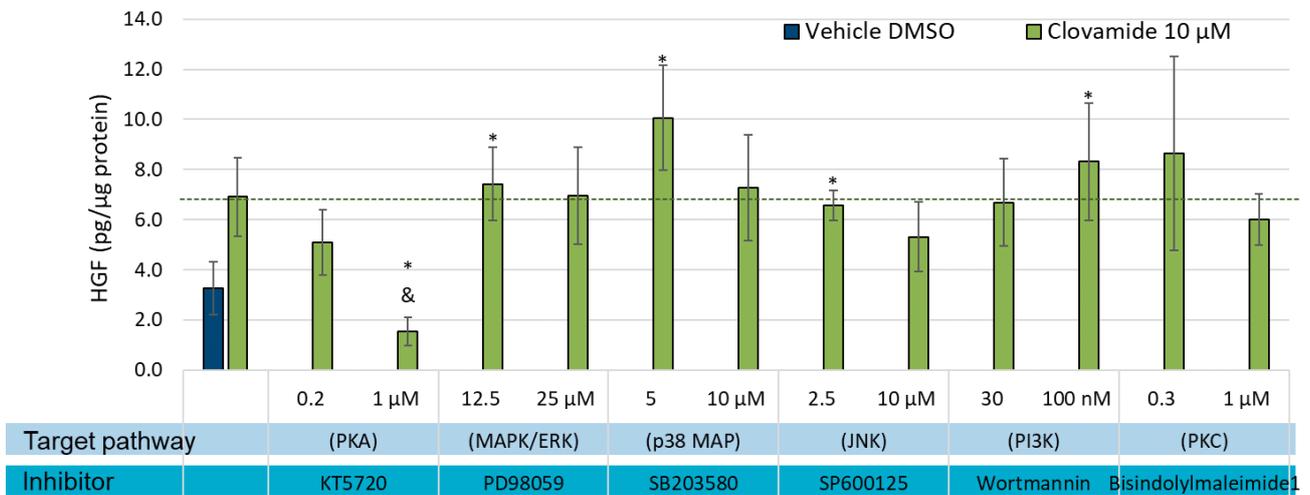


図 6 酵素阻害剤を用いた Clovamide による HGF 産生量の変化

テコール構造が活性発現に重要であることを明らかにした。そこで本研究では、Clovamideを用いてHGF産生促進活性についてさらなる機構解明を行った。Clovamideの濃度を変えて経時変化を調べたところ、濃度依存的ならびに時間依存的にHGF産生促進活性が増強したことから、Clovamideに顕著なHGF産生促進活性を有していることを確認した。また、RT-qPCRを用いてClovamideの添加によるHGF mRNA発現量を調べた結果、時間依存的に発現量が増加していることから、遺伝子発現レベルでもHGF産生が促進されていることを明らかにした。さらに、酵素阻害剤を用いた実験において、ClovamideによるHGF産生促進活性発現機構にはPKA経路が重要であることを明らかにした。

5. まとめ

HGFは健康状態の時はあまり産生されておらず、病気になった時に血中のHGF量が増加する。実際に、肝炎の患者では数倍から10数倍にも上昇することから、HGFは組織や臓器に傷害が加わることで産生されることが知られている。一方で、加齢とともにHGF産生能力は低下し、このことが高齢化に伴う生活習慣病が発症しやすくなる原因とも言われている。さらに、HGFは育毛・発毛作用があり、頭髪の再生も行うため、加齢に伴うHGF産生量の低下が脱毛や薄毛の原因ともなっている。すでに筋萎縮性側索硬化症(ALS)や脊椎損傷などに対するHGF投与による臨床試験が行われているが、脱毛や薄毛の治療の場合はそこまでの療効は適していないと思われる。そこで、HGF産生を促進する化合物を食品やサプリメントまたは化粧品として摂取することで体内のHGF産生を向上させることが有効な方法と考えられる。すでに、先行研究において顕著なHGF産生促進活性が認められたCQA類ならびにPHEG類は、サツマイモ、ゴボウ、プロポリス、コーヒーならびにオリーブなどの食用植物に含まれている。また、今回活性が認められたClovamideもカカオ豆やコーヒー豆に含まれている成分でもあることから、ココア、チョコレートおよびコーヒーにも含まれている。したがって、これらを日常的に摂取することによって加齢に伴って減少したHGFの産生を促進することで、脱毛や薄毛を予防する育毛剤の開発につながるものと思われる。このような化合物は皮膚への安全性はもちろんのこと、生体内に投与しても健康に対する害はほとんどないことが示唆される。したがって、これらの化合物を配合したサプリメントや化粧品の安全性は高く、このような天然由来化合物を配合した育毛剤の開発に貢献するものと考えられる。

(引用文献)

- 1) Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int.* 59: 2023-2038, 2001.
- 2) Lee Y-R, Yamazaki M, Mitsui S, Tsuboi R, Ogawa H. Hepatocyte growth factor (HGF) activator expressed in hair follicles is involved in *in vitro* HGF-dependent hair follicle elongation. *J Dermatol Sci* 25: 156-163, 2001.
- 3) Philpott MP, Sanders DA, Kealey T. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth *in vitro*. *J Invest Dermatol.* 102: 857-861, 1994.
- 4) Kurisu M, Nakasone R, Miyamae Y, Matsuura D, Kanatani H, Yano S, Shigemori H. Induction of hepatocyte growth factor production in human dermal fibroblasts by caffeic acid derivatives. *Biol Pharm Bull* 36: 2018-2021, 2013.
- 5) Nakasone R, Kurisu M, Onodera M, Miyamae Y, Matsuura D, Kanatani H, Yano S, Shigemori H. Promoting effects on hepatocyte growth factor production of daphnane diterpenoids from *Daphne odora*. *Heterocycles* 87: 1087-1092, 2013.
- 6) Kurisu M, Miyamae Y, Murakami K, Han J, Isoda H, Irie H, Shigemori H. Inhibition of amyloid β aggregation by acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biosci Biotech Biochem.* 77: 1329-1332, 2013.
- 7) Higashinakasu K, Yamada K, Shigemori H, Hasegawa K. Isolation and identification of potent stimulatory allelopathic substances exuded from germinating burdock (*Arctium lappa*) seeds. *Heterocycles* 65: 1431-1437, 2005.
- 8) Matsumoto T, Hosoya T, Tomoda H, Shiro M, Shigemori H. Palmaenones A and B, two new antimicrobial chlorinated cyclopentenones from discomycete *Lachnum palmae*. *Chem Pharm Bull* 59: 1559-1561, 2011.
- 9) Tanabe Y, Matsumoto T, Hosoya T, Sato H, Shigemori H. Palmaerins A-D, new chlorinated and brominated dihydroisocoumarins with antimicrobial and plant growth regulating activities from discomycete *Lachnum palmae*. *Heterocycles* 87: 1481-1491, 2013.
- 10) Tsunoda T, Takase M, Shigemori H. Structure-activity relationship of clovamide and its related compounds for the inhibition of amyloid β aggregation. *Bioorg Med Chem* 26: 3202-3209, 2018.