

サボテンセルエキストラクトの育毛作用と成分分析

星薬科大学

柴 藤 淳 子

In recent years, the population of people with thinning hair has been increasing due to a variety of reasons, including stress from work, relationships, diet, etc. Since hair greatly influences one's appearance and age, interest in hair growth in the hair care market is growing among both men and women. Since the psychological impact of thinning hair is particularly serious, the development of an effective hair-growth product will contribute to the maintenance and improvement of consumers' mental and physical health, and thus an epoch-making hair-growth product is expected to be developed. However, in reality there are few products that provide sufficient hair-growth effects and for which the scientific basis for the hair-growth effects has been clarified. Moreover, the problematic side effects caused by chemical substances in 'hair growth products' remains a serious issue that cannot be ignored.

We have been paying attention and researching since long on the hair-growing effects of cactus cell extracts obtained through low-temperature vacuum extraction. Compared to the conventional steam distillation method, the cell extract obtained by low-temperature vacuum extraction is 100% plant-derived, and we believe that it can contribute to the provision of materials for hair-growth agents with high safety. Since ancient times, Japanese women have valued the beauty of their hair. Since beautiful hair has always been a longing of women, we hope to develop hair growth products that also care for beautiful hair by clarifying the mechanism of action of cactus cell extract on hair growth and the ingredients involved in nurturing beautiful hair.

1. 緒 言

近年、仕事や人間関係などのストレスによる薄毛人口が増加している。毛髪は見た目年齢を大きく左右するためヘアケア市場における育毛関連の関心は男女問わず高まっている。特に薄毛が及ぼす精神面への影響は深刻で、効果のある育毛剤が開発されれば消費者の心身の健康維持・増進にも貢献することから画期的な育毛剤が期待されている。しかしながら十分な育毛効果が得られ、さらに育毛作用の科学的根拠が明らかにされている製品は少なく、化学物質による副作用などの問題も無視できない課題である。

我々は以前より低温真空抽出法で得られたサボテンセルエキストラクトの育毛効果に注目してきた。従来の水蒸気蒸留法と比べ溶剤を使用しないので低温真空抽出法で得られるセルエキストラクトは100%植物由来であり、安全性の高い育毛剤の素材提供に貢献できると考えている。古来より日本の女性たちは髪的美しさを大切にしてきた。美しい髪はいつの時代も憧れであることから、サボテンセルエキストラクトの育毛作用メカニズムや美髪に関与する成分を明確にすることで、美髪ケアも兼ねた育毛商品の開発を目指せればと考えている。

2. 方 法

2. 1. マウス育毛評価実験

実験には青王丸 (*Notocactus ottonis*) から低温真空抽出法 (Yoshimi Medical Farm Co., Ltd.) により得られたセルエキストラクト (N-CE) を用いた。C57BL/6J雄マウスは、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、6:00-18:00、12時間/12時間の明/暗サイクルで自由摂取により飼育された。ミノキシジル (MXD) は脱毛症の治療に使用され、多くの毛髪研究でポジティブコントロールとして使用されていることから比較として用いた。プロピレングリコール：エタノール：水 (5:3:2) を Vehicle 対照群 (VC) とし、予備実験を行ったところ N-CE 10% 濃度で良好な育毛促進が確認された。よって C57BL/6J マウスを N-CE 10%、MXD 3%、VC の 3 つのグループ (6 匹/グループ) に分け、雄マウスの背部の毛を剃って 1 週間後に再度毛を剃ることで毛周期を合わせ、調整試料 200 μL を毎日背部に塗布し観察および写真撮影を行った。写真画像は ImageJ ソフトウェアを使用し画像解析した。マウスの剃毛領域に対する育毛領域の割合を算出し育毛率 (%) を測定した。

2. 2. マウス毛包観察

C57BL/6J 雄マウスの背部全層皮膚組織を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、PBS に置換した。パラフィンに包埋するために脱水しキシレン浸透させた。5 μm のパラフィン切片をヘマトキシリン/エオシン染色処理後、脱水のち透徹しカバーガラスで封入した。切片画像は、BZ-X 710 明視野システム (Keyence) によって $\times 20$ 倍率で



Hair Growth Activity and Ingredient Analysis of Cactus Cell Extract

Junko Shibato

School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Hoshi University

写真撮影し、画像はImageJソフトウェアを使用し解析した。切片写真の真皮と皮下組織における毛包総数と皮下組織のみにおける毛包数を測定し、平均毛包数を算出した。

2. 3. 育毛成分のスクリーニング分析

N-CEの育毛成分のスクリーニング法としてメタボローム解析法を採用した。N-CEをエバポレーターで400倍に濃縮し、80 μ Lの試料に対し内部標準物質の濃度が1,000 μ Mとなるように調製した20 μ Lの水溶液を加えて攪拌し、限外ろ過処理を行った。サンプルはCE-TOFMS (Agilent Technologies)、による測定に供した。検出されたピークはHMT代謝物質ライブラリおよびKnown-Unknownライブラリに登録された全物質との照合検索を行った。

2. 4. マイクロアレイ解析

マウス育毛評価実験において調整試料塗布後1週間ごとに3週間目までのマウス背部全層皮膚組織をサンプリングし-80℃で保存した。組織からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析はWhole Mouse GenomeオリゴDNAマイクロアレイキット4x44K (Agilent)を用いDye-swap法によりVCと比較して発現変動した遺伝子(アップレギュレーション: Up (≥ 1.5 -fold)、ダウンレギュレーション: Down (≤ 0.75 -fold))をリスト化した。

2. 5. プロテオーム解析

-80℃で保存したマウス皮膚組織からタンパク質を抽出し、トリプシン消化処理をした。消化サンプルをTMT標識し、HLB OASISカラムで脱塩後、POROS 20 R2逆相レジンを使用して5-100% ACN Buffer (pH10)で12分画を溶出した。Q-Exactive MS分析はUHPLC Dionex UltiMate® 3000 (Thermo Fisher Scientific)を使用した逆相クロマトグラフィーで分離し、データベース(MaxQuant

ソフトウェア、PerseusおよびRプログラム)でタンパク質同定ならびに相対定量数値化を行った。その後VCと比較して発現変動したタンパク質(アップレギュレーション: Up (≥ 2.0 -fold)、ダウンレギュレーション: Down (≤ 0.5 -fold))をリスト化した。

2. 6. カテゴリー解析

リスト化した遺伝子およびタンパク質の生物学的機能カテゴリー(エンリッチメント)解析はDatabase for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8を用いて行った。

3. 結果

3. 1. マウス実験におけるN-CEの育毛効果

マウスを用いた育毛実験の調整試料塗布後14および27日後の育毛領域の割合をFig. 1に示した。14日後では3% MXDと比較して10% N-CEの育毛率はやや低かったが、27日後では3% MXDと同程度の高い育毛促進効果が確認できた(Fig. 1)。さらにマウス背部全層皮膚組織の毛包総数は3% MXDより増加傾向にあることが確認できた(Fig. 2)。

3. 2. N-CEの育毛成分分析

N-CEに含まれる育毛成分のメタボローム解析によるスクリーニング分析の結果から、育毛剤やシャンプーなどのヘアケア製品に使用されている物質が検出された(Table 1)。育毛剤関連ではアデノシン、アゼライン酸、ジベレリン酸、プロスタグランジンE2の他にリボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、ピリドキサル、ピリドキサミン、ピリドキシンなどビタミンB群がスクリーニングされた(Table 1)。

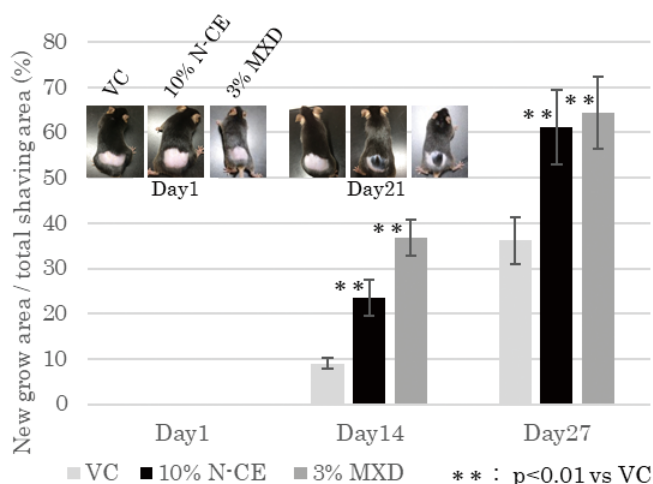


Fig. 1 マウスによる育毛実験

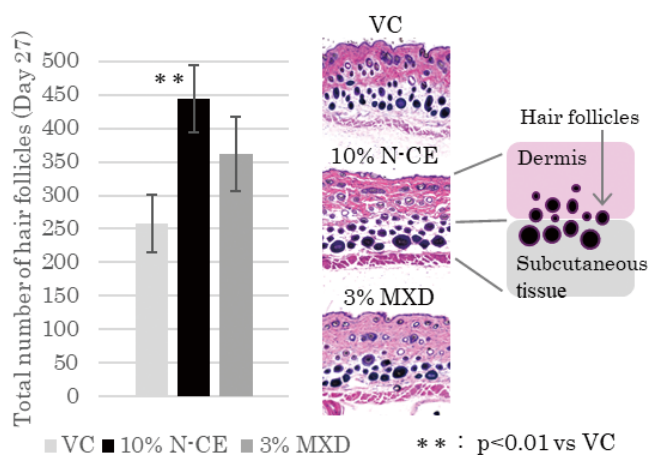


Fig. 2 マウス背部皮膚組織の毛包数測定実験

Table 1 N-CEに含まれる育毛関連代謝化合物

育毛剤関連	ヘアケア関連
Adenosine	Carnitine
Azelaic acid	Diethanolamine
Gibberellic acid	Triethanolamine
Prostaglandin E2	Glycerol
Riboflavin	Threonine
Nicotinic acid	cis-4-Hydroxyproline
Pantothenic acid	Glutamic acid
Pyridoxal	Thymidine
Pyridoxamine	Urocanic acid
Pyridoxine	Decanoic acid
Glucosamine	Gluconic acid
Citric acid	

3. 3. 育毛関連因子の同定

マイクロアレイ・プロテオーム解析から得られた発現変動遺伝子およびタンパク質データの上位20を調査した結果、幾つかの育毛関連因子が同定された。

3. 3. 1. 3% MXD マイクロアレイ解析

発現増加遺伝子群の多くがサイトカイン、ケラチン、細胞接着、細胞増殖のカテゴリーに分類されるものだった。育毛関連ではLef1(毛乳頭細胞マーカー¹⁾)、Dsg4(毛包ケラチノサイト細胞接着の重要なメディエーター²⁾)の発現増加が確認された。発現減少遺伝子群では筋収縮、鉄恒常性・細胞増殖に分類されるものが多く、その他にオートファゴソーム、凝固に関連する遺伝子もあった。

3. 3. 2. 3% MXD プロテオーム解析

塗布から1週間目においてはサイトカイン、好中球、ケラチン、血液凝固・フィブリン血餅形成のタンパク質発現増加が多く見られたが、2および3週間目ではケラチン関連が大多数になっていた。育毛関連ではTchhl1(ケラチノサイト増殖、毛髪形成^{3,4)})、Tchh(毛幹形成⁵⁾)、Padi3、Padi1(PADI1/3を介したTCHHのシトルリン化による毛幹分化⁶⁾)、Padi4(毛髪幹細胞再生と増殖の調整⁶⁾)の発現増加が確認された。発現減少タンパク質においてはいずれも筋収縮関連が殆どであった。

3. 3. 3. 10% N-CE マイクロアレイ解析

発現増加遺伝子のカテゴリーは、血管新生、オートファジー、成長・分化、筋収縮、細胞接着が多く、育毛関連はFGF2(毛包の成長・発達⁷⁾)、PAX6(メラニン形成⁸⁾)が確認された。発現減少遺伝子はサイトカイン、メラノサイト、凝固、鉄恒常性などが多かった。

3. 3. 4. 10% N-CE プロテオーム解析

発現増加タンパク質のカテゴリーはエンドサイトーシス、オートファジー、筋収縮があり、育毛関連ではLdb1(毛包幹細胞の維持⁹⁾)、Kctd1(皮膚や髪の発達¹⁰⁾)、Myo5a(毛

色に関与^{11,12)})が同定された。発現減少タンパク質のカテゴリーはケラチン、鉄結合、アクチン結合があった。

3. 4. 生物学的機能エンリッチメント解析

DAVIDツールにより得られた生物機能解析(Functional Category Term)の結果は有意(p値 ≤ 0.05)であり、さらに例えば“Signal”や“Activator”というような分類される遺伝子数が膨大になるようなTermは省いてTable 2, 3に示した。MXDによる発現増加遺伝子(3% MXD UP: Microarray)カテゴリーのトップはケラチンで、角質化、メラニン生合成など毛髪に関与するものが含まれていた。発現減少遺伝子(3% MXD Down: Microarray)では筋タンパク、ミオシン、筋小胞体など筋収縮に関与するものが多かった。この結果はタンパク質の場合でもほぼ同じことが確認できた(Table 2)。

一方N-CEによる発現増加遺伝子(10% N-CE UP: Microarray)カテゴリーは免疫、サイトカイン、炎症、ゴルジ体、シトルリン化、ホメオボックスなどがあり、発現減少遺伝子(10% N-CE Down: Microarray)カテゴリーにはケラチン、メラニン生合成、筋タンパクなどが含まれていた。またタンパク質の場合は発現増加および発現減少のいずれにおいてもケラチン、筋タンパクが多く含まれていることが確認できた(Table 3)。

4. 考 察

MXDでは遺伝子およびタンパク質共にケラチン、メラニンなど毛髪関連が発現増加を示し、筋収縮関連の発現減少が確認された。これはMXDの育毛作用メカニズムとされている血管平滑筋弛緩(血管拡張)→血流改善→育毛促進が実際に生じた結果によるものと考えられた。しかしながらN-CEではMXDとは異なるカテゴリーが多く確認できた。成分分析の結果、N-CEには育毛に関与する物質が多数含まれていたことから、MXDとは異なる育毛作用機序の存在が示唆された。

育毛効果のある成分から検討すると、アデノシンの関与が考えられた。アデノシンはアデノシンA2A受容体を介した血小板内Cyclic AMP濃度の上昇による血小板凝集抑制、血管平滑筋弛緩、血管新生、成長因子促進などが育毛作用とされており資生堂から育毛剤“アデノゲン”が販売されている。今回の結果ではN-CEによる凝固関連の減少、血管新生や成長因子の増加は確認されたが、MXDのような明確な筋収縮関連の減少は確認できなかった。この結果はアデノシンには血管拡張作用があるが、同時に血管収縮作用もあることに起因している可能性が示唆された¹³⁾。

次に考えられるのはオートファジーの関与であった。最近ではオートファジー活性化による発毛促進の報告は多数されている。オートファジーを誘発することによって毛包

Table 2 3% NXDによる発現変動遺伝子およびタンパク質のカテゴリー解析

3% MXD UP : Microarray			3% MXD UP : Proteome		
1W	2W	3W	1W	2W	3W
Keratin	Keratin	Keratin	Keratin	Keratin	Keratin
Disulfide bond	Cell division	Melanin biosynthesis	Intermediate filament	Intermediate filament	Intermediate filament
Keratinization	Cell cycle	Albinism	Lysosome	Lipid biosynthesis	Fatty acid metabolism
Collagen	Intermediate filament	Kinetochores	Lipid metabolism	Lipid metabolism	Protein phosphatase
Inflammatory response	Citrullination		Acyltransferase	Fatty acid metabolism	Lysosome
Chemotaxis	Microtubule		Cell adhesion	Cell cycle	Fatty acid biosynthesis
Cell adhesion	Centromere		Hemostasis	Acyltransferase	Lipid metabolism
Myosin	Melanin biosynthesis		Blood coagulation	Lysosome	Pyridoxal phosphate
Intermediate filament	Disease mutation		Cysteine biosynthesis	Fatty acid biosynthesis	Lipid biosynthesis
Cytokine	Wnt signaling pathway		Cytoskeleton	Pyridoxal phosphate	Cysteine biosynthesis
Melanin biosynthesis	Keratinization		Fatty acid metabolism	Protein phosphatase	Cell junction
Acute phase	DNA repair		Disulfide bond	Cell junction	
Albinism	Actin-binding		Amino-acid biosynthesis	Cysteine biosynthesis	
Amidation	Homeobox			Cytoskeleton	
Proteoglycan	Albinism			Heparin-binding	
Antimicrobial	Lipid-binding			Cell division	
	Zinc transport			Endoplasmic reticulum	
	Tyrosine-protein kinase			Proteoglycan	

3% MXD Down : Microarray			3% MXD Down : Proteome		
1W	2W	3W	1W	2W	3W
Muscle protein	Disulfide bond	Disulfide bond	Muscle protein	Muscle protein	Muscle protein
Lipid metabolism	Muscle protein	Muscle protein	Keratin	Endocytosis	Calmodulin-binding
Lipid biosynthesis	Sarcoplasmic reticulum	Actin-binding	Intermediate filament	Sarcoplasmic reticulum	Myosin
Thick filament	Lectin	Sarcoplasmic reticulum	Myosin	Thick filament	Respiratory chain
Fatty acid metabolism	Actin-binding	Cell adhesion	Thick filament	Calmodulin-binding	Sarcoplasmic reticulum
Calmodulin-binding	Cytokine	Collagen	Calmodulin-binding	Myosin	Thick filament
Oxidoreductase	Inflammatory response	Thick filament	Actin-binding	Lysosome	Actin-binding
Sarcoplasmic reticulum	Myogenesis	Growth factor	Metal-binding	Actin-binding	Cytoskeleton
Actin-binding	Calmodulin-binding	Sugar	Endoplasmic reticulum	Mitochondrion	Metal-binding
Myosin	Lipoprotein	Heme	Endocytosis	Cytoskeleton	Lysosome
Fatty acid biosynthesis	Thick filament	Calmodulin-binding	Cell division		Prenylation
Heme	Growth factor		Iron		Disulfide bond
Growth factor	Heme				
Lipid	Lipid metabolism				
Disulfide bond	Myosin				
Acylferase	Chemotaxis				
Lipoprotein	Osteogenesis				
Glucose metabolism	Heparin-binding				

Table 3 10% N-CEによる発現変動遺伝子およびタンパク質のカテゴリー解析

10% N-CE UP : Microarray			10% N-CE UP : Proteome		
1W	2W	3W	1W	2W	3W
Immunity	Homeobox	Citrullination	Keratin	Keratin	Keratin
Lectin	Disease mutation	Cell adhesion	Intermediate filament	Lysosome	Intermediate filament
Disulfide bond	Developmental protein	Disease mutation	Metal-binding	Lipid biosynthesis	Lysosome
Innate immunity	Spermatogenesis	Acetylation	Calmodulin-binding	Cytoskeleton	Cytoskeleton
Cytokine	Zymogen	Homeobox	Hemostasis	Cell adhesion	Keratinization
Inflammatory response			Blood coagulation	Lipid metabolism	Calmodulin-binding
Chemotaxis			Muscle protein	Fatty acid metabolism	Cysteine biosynthesis
Antiviral defense			Actin-binding	Cell cycle	Proteoglycan
Acute phase			Cytoskeleton	Sarcoplasmic reticulum	Myosin
Golgi apparatus			Disease mutation	Cysteine biosynthesis	Actin-binding
			Myosin	Intermediate filament	Acyltransferase
			Endocytosis	Proteoglycan	Aminopeptidase
			Lipid-binding	Myosin	Protein phosphatase
				Prenylation	
				Cell division	

10% N-CE Down : Microarray			10% N-CE Down : Proteome		
1W	2W	3W	1W	2W	3W
Keratin	Lectin	G-protein coupled	Keratin	Keratin	Muscle protein
Cell cycle	Disulfide bond	Disulfide bond	Fatty acid metabolism	Intermediate filament	Metal-binding
Mitosis	Muscle protein	Olfaction	Lysosome	Muscle protein	Sarcoplasmic reticulum
Cell division	Pheromone-binding	Sensory transduction	Intermediate filament	Lipid-binding	Fatty acid metabolism
Kinetochores	Calmodulin-binding	Cell adhesion	Lipid biosynthesis	Metal-binding	Fatty acid biosynthesis
Intermediate filament	Oxygen	Sulfation	Muscle protein	Myosin	Lipid biosynthesis
Microtubule	Lipoprotein	Lectin	Fatty acid biosynthesis	Endocytosis	Lipid metabolism
DNA repair		Adaptive immunity	Lipid metabolism	Keratinization	Endocytosis
DNA replication		Heme	Cysteine biosynthesis	Actin-binding	Keratin
Melanin biosynthesis		Hormone	Cell cycle	Calmodulin-binding	
Calmodulin-binding		Immunity	Cell adhesion		
Citrullination		Iron transport	Proteoglycan		
Albinism		Homeobox			
Wnt ing pathway		Myogenesis			
Helicase		Cytokine			
Osteogenesis		Zymogen			
Muscle protein		Actin-binding			

サイクルの成長期への誘導や成長期の延長をもたらすとされている。さらにオートファジー阻害剤である抗マラリア剤クロロキンが髪色の変化や脱毛などを誘発する可能性があることも示されている¹⁴⁾。N-CEによるオートファジーやオートファゴソーム関与因子の発現変動が多く確認されたことから、N-CEはオートファジー誘発による育毛作用を有している可能性も高いと思われる。

5. 総 括

今回のマイクロアレイ解析とプロテオーム解析からN-CEによる育毛作用はMXDの作用機序とは異なる可能性が確認できた。今後は膨大なデータを基にさらなる生物学的な機能の解釈やパスウェイ解析を行うことでN-CEによる育毛作用や美髪効果などについて明らかにしていくとともに、N-CEとMXDの併用によるより効果的な育毛条件の検討を進めることで臨床試験移行に貢献できればと考えている。

(引用文献)

- 1) Yi Zhang et al., Lef1 contributes to the differentiation of bulge stem cells by nuclear translocation and cross-talk with the Notch signaling pathway, *Int J Med Sci.* Apr 17; 10 (6) : 738-46 (2013)
- 2) Kljuic A, et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell.* Apr 18; 113 (2) : 249-60 (2003)
- 3) Teruhiko Makino et al., Trichohyalin-like 1 protein plays a crucial role in proliferation and anti-apoptosis of normal human keratinocytes and squamous cell carcinoma cells. *Cell Death Discov*; 6: 109. (2020)
- 4) Wu Z et al., Identification of trichohyalin-like 1, an s100 fused-type protein selectively expressed in hair follicles. *J Invest Dermatol.* Aug; 131(8): 1761-3. (2011)
- 5) F Buket Ü Basmanav et al., Mutations in Three Genes Encoding Proteins Involved in Hair Shaft Formation Cause Uncombable Hair Syndrome. *Am J Hum Genet.* Dec 1; 99 (6) : 1292-1304. (2016)
- 6) Kim Vikhe Patil et al., A Hairy Cytiation – PADIs in Regeneration and Alopecia. *Front Cell Dev Biol.* Dec 13; 9: 789676. (2021)
- 7) Kyung-A Hwang et al., Adenosine stimulates growth of dermal papilla and lengthens the anagen phase by increasing the cysteine level via fibroblast growth factors 2 and 7 in an organ culture of mouse vibrissae hair follicles. *Int J Mol Med.* Feb; 29 (2) : 195-201. (2012)
- 8) Raviv S, et al., PAX6 regulates melanogenesis in the retinal pigmented epithelium through feed-forward regulatory interactions with MITF. *PLoS Genet.* May 29; 10 (5) (2014)
- 9) Xiaoman Xu et al., Co-factors of LIM domains (Clims/Ldb/Nli) regulate corneal homeostasis and maintenance of hair follicle stem cells. *Dev Biol.* Dec 15; 312 (2): 484-500. (2007)
- 10) Xiaoling Chen et al., The phenotypic characteristics of patients with athelia and tooth agenesis. *Ann Transl Med.* Oct; 9 (20) : 1583. (2021)
- 11) Christen M et al., MYO5A Frameshift Variant in a Miniature Dachshund with Coat Color Dilution and Neurological Defects Resembling Human Griscelli Syndrome Type 1. *Genes (Basel)*. Sep 23; 12 (10) : 1479. (2021)
- 12) Hui Zhang et al., Novel mutations in the Myo5a gene cause a dilute coat color phenotype in mice. *FASEB J.* Apr; 35 (4) : e21261. (2021)
- 13) Joana Beatriz Sousa and Carmen Diniz, The Adenosinergic System as a Therapeutic Target in the Vasculature: New Ligands and Challenges. *Molecules.* May 6; 22 (5) : 752. (2017)
- 14) Min Chai et al., Stimulation of Hair Growth by Small Molecules that Activate Autophagy. *Cell Rep.* Jun 18; 27 (12) : 3413-3421. e3. (2019)