

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590694

研究課題名（和文） 天然物由来の創傷治療用化合物の探索

研究課題名（英文） Studies on wound-healing substances from natural products

研究代表者

住吉 真帆 (SUMIYOSHI MAHO)

愛媛大学・大学院医学系研究科・研究員

研究者番号：60444767

研究成果の概要：低濃度 (10pg から 100ng/mL) のツボクサ (*Centella asiatica*) 成分 Asiaticoside および赤升麻 (*Astilbe thunbergii*) 成分 Eucryphin が、熱傷治癒促進作用をもつことを、マウス熱傷モデルを用いて明らかにした。創傷部滲出液の分析、細胞を用いた分析を行い、これら天然物由来化合物が生体の再生能を向上させて創傷治癒を促進していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：創傷治癒・天然由来化合物・紫外線

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化社会において、高齢者の創傷治癒、特に褥創の治療は、しばしば長期化することがあり、そのことが患者および介護者に肉体的・精神的・経済的負担を強いるものとなる。現在、創傷治療に用いられる薬剤は少なく、近年、ようやく褥創および皮膚潰瘍治療剤としてヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)が発売された。

(2) しかし、創傷部を食品用ラップで被覆することにより湿潤化させると、内因性の創傷治癒促進因子の作用が増強し、治療成績が向

上することから、単に増殖因子を外的に与えるのではなく、生体が本来有する組織再生能を向上させることで、治癒効果を上げる化合物の開発が望まれるようになってきた。

(3) 我々は紅蓼に含まれるサポニンのひとつ(Ginsenoside Rb₁)が血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を介する血管再生を増強することによって、創傷治癒効果をもつことを明らかにしており (*Br J Pharmacol* 148; 860-870, 2006)、このように有用な天然物由来化合物は、創薬のリード化合物としての利用が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 創傷治療用化合物の研究をさらに発展させ、将来の臨床応用を目指すため、本研究では組織再生能を向上させることにより創傷治癒を促進させる天然物由来化合物の同定、作用機序の解明を目的とする。

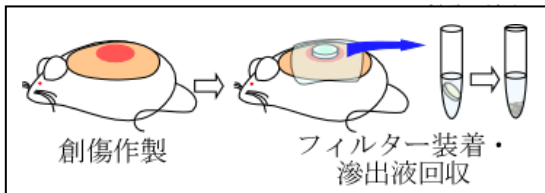
(2) また、近年環境の悪化とともに紫外線量が増加しており、紫外線による健康被害が懸念されている。強度の紫外線により所謂火傷様の皮膚炎症が引き起こされることから、このような紫外線による皮膚炎症に対して保護効果をもつ天然物由来化合物の検索も行う。

3. 研究の方法

(1) マウス熱傷モデルを用いた創傷治癒を促進する天然物由来化合物の検索とその作用機序の解明

①マウス熱傷モデルを作製し、創傷部へ検体を含むワセリン軟膏を塗布した。創傷部の大きさを経時的に測定し、その効果を判定することにより、創傷治癒促進効果をもつ天然物成分、その効果をもつ濃度を同定した。

②天然物由来化合物の作用メカニズムを明らかにするために、マウス熱傷モデルの創傷部滲出液を採取した。創傷部へポリエチレンフィルターを装着させ、フィルムで被覆した。隔日でフィルターを回収し、リン酸緩衝生理食塩水中で粉碎、攪拌し、滲出液を抽出した。



③滲出液中のサイトカイン[インターフェロン (IL)-1 β , 単球走化活性因子 (MCP-1), VEGF 等]濃度は ELISA キットを用いて測定した。

④滲出液中の白血球数をカウントし、ギムザ染色した塗抹標本の多核白血球・マクロファージ比からそれぞれの数を算出した。

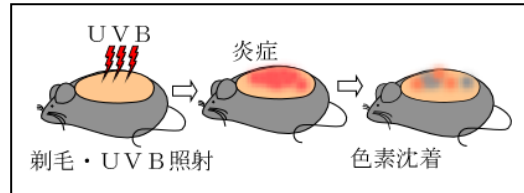
⑤創傷部周辺皮膚の病理切片を作製し、免疫組織染色を行った (Ki-67, VEGF 等)。

⑥皮膚角化細胞または THP-1 マクロファージ細胞の培養液中へ検体を加え、サイトカイン産生量を ELISA キットで測定した [VEGF, MCP-1, トランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β 1 等]。

(2) 紫外線照射による皮膚損傷に対して保護効果をもつ天然物由来化合物の検索

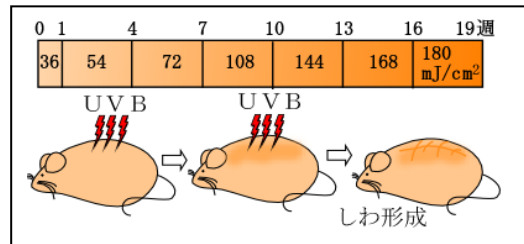
①紫外線 B 波 (UVB) 照射による急性炎症モデル

マウスへ 120mJ/cm² の UVB を 3 日間毎日、その後 11 日間隔日で照射し、皮膚の厚さおよび伸びを隔日で測定した。検体は 1 日 2 回朝夕に経口投与した。皮膚切片を作製し、HE 染色、アザン染色、フォンタマナッソン染色して、HE 染色像およびアザン染色像から上皮および真皮層の厚さを測定した。皮膚組織中の TGF- β 1 濃度は ELISA キットを用いて測定した。



②低用量長期 UVB 照射マウス

ヘアレスマウスへ低用量 (36mJ/cm²) UVB を週に 3 回照射した。UVB 強度は 36mJ/cm² から徐々に増加させ、最終的に 120mJ/cm² (12 週間) または 180mJ/cm² (19 週間) まで熱量を上げた。



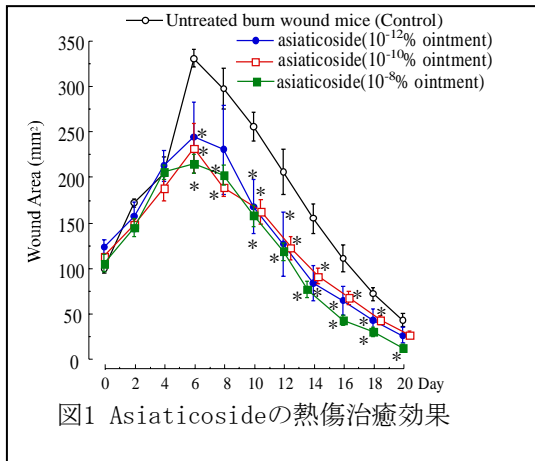
皮膚の厚さ、皮膚の伸びを週に 1 度測定した。また、しわ形成の観察された 6 週から 11 週目の間に背部写真を撮影し、Bissett らの方法に準じてしわ形成をスコア化した。UVB 照射終了後、皮膚組織を採取し、組織中のタンパク質を抽出後、VEGF 濃度を ELISA キットにて測定、ザイモグラフィにてマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 発現量の検討を行った。また皮膚切片を作製し、HE 染色、アザン染色および免疫組織染色 (Ki-67、コラーゲン、TUNEL 染色等) を行った。

4. 研究成果

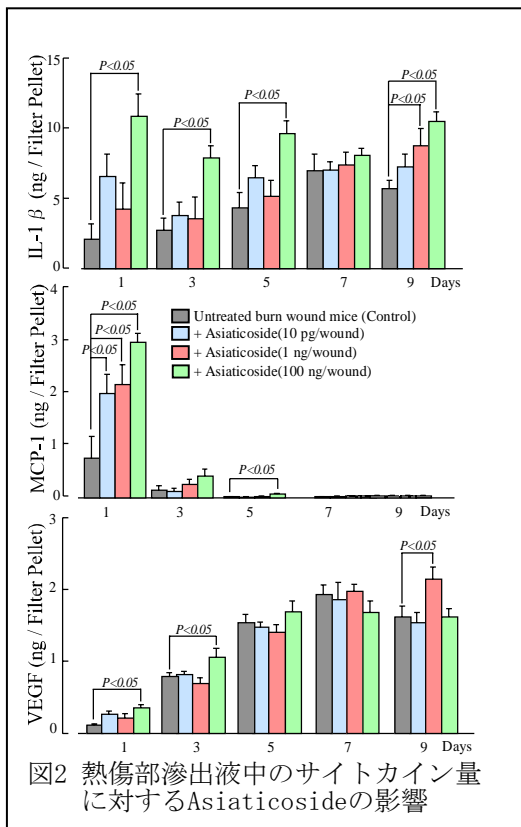
(1) マウス熱傷モデルを用いた創傷治癒を促進する天然物由来化合物の検索とその作用機序の解明

①ツボクサ (*Centella asiatica*) 成分 Asiaticoside

ツボクサ成分の Asiaticoside が低濃度 (10⁻¹²% から 10⁻⁸%) で創傷治癒促進効果をもつことを明らかにした。熱傷による創傷部面積は、低濃度の Asiaticoside を含むワセリン軟膏を塗布することで、ワセリンのみを塗布した対照群と比較して有意に縮小した (図 1)。



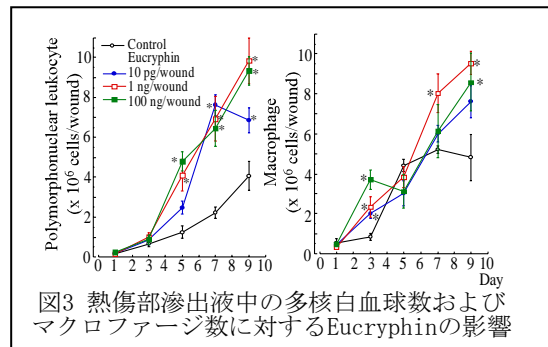
創傷部浸出液中のサイトカインを測定したところ、Asiaticoside 処置群の MCP-1、IL-1 β および VEGF 量が上昇していた (図 2)。



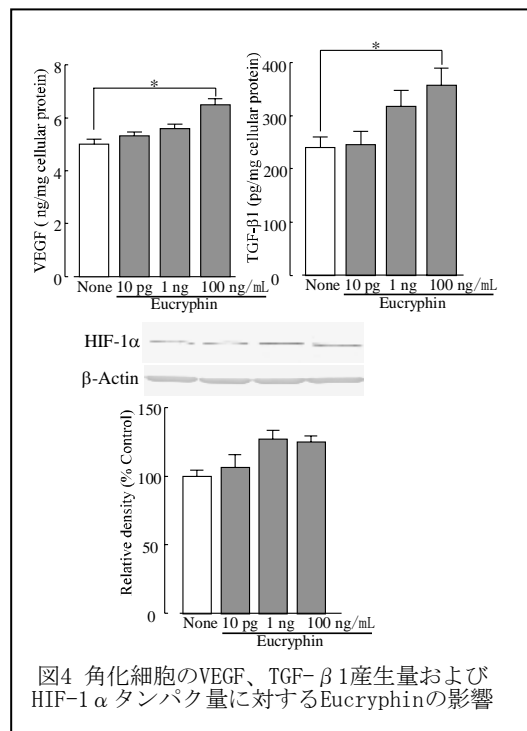
HaCaT 細胞および THP-1 マクロファージ細胞を用いた培養実験から、Asiaticoside は角化細胞の MCP-1 産生を促進し、またマクロファージからの IL-1 β 産生を MCP-1 存在下で促進することで創傷部での VEGF 産生を促すことを明らかにした。これらの結果から、Asiaticoside の創傷治癒促進効果は、創傷部の血管新生促進によることが示唆された。

② 赤升麻 (*Astilbe thunbergii*) 成分 Eucryphin

我々は、すでに赤升麻成分のうち、創傷治癒効果を持つ化合物として 3 種の化合物を同定しており、そのうち最も創傷治癒効果をもつ成分は Eucryphin であった [J Ethnopharmacol (2007)109(1):72-77]。この Eucryphin の創傷治癒作用のメカニズムを検討するために、マウス熱傷モデルを用いて、その熱傷部浸出液を採取した。熱傷部浸出液中のマクロファージおよび多核白血球数は、Eucryphin(1ng および 100ng/wound) 処置群において増加しており (図 3)、また浸出液中の MCP-1、IL-1 β 、TGF- β 1 および VEGF 濃度も上昇していた。



ヒト角化細胞を用いた培養実験において、Eucryphin は TGF- β 1 および VEGF の産生量を増加させており、また HIF-1 α タンパク量も上昇させた (図 4)。



これらの結果から、低濃度の Eucryphin による創傷治癒効果のメカニズムとして創傷部の血管新生促進作用が示唆された (論文投稿中)。

③熱傷治癒実験 考察

本研究では天然物由来化合物の創傷治癒効果を検討するために、熱傷モデルマウスを用いた。熱傷による創傷は、開放創と異なり、創傷部の滲出液が多く、また治癒過程において創が広がってから回復するなど、褥創や皮膚潰瘍に観察される過程を解析することが可能である。Asiaticoside および Eucryphin の研究においても、このモデルによって滲出液中の多核白血球、マクロファージの集積や、サイトカイン分泌量への影響を検討することで、その作用メカニズムを明らかにすることができた。

Asiaticoside の創傷治癒効果については以前に報告があるが、今回の我々の研究では非常に低濃度での創傷治癒効果を明らかにした。また、Eucryphin も同様に低濃度(1ng および 100ng/wound)での創傷治癒効果を見出した。

(2)紫外線照射による皮膚損傷に対して保護効果をもつ天然物由来化合物の検索～UVB照射による急性炎症モデル～

紅蔘 (*Panax ginseng*) エキス

紅蔘エキスを経口投与することで、UVB照射による急性炎症による皮膚肥厚、皮膚の伸びの低下、色素沈着が抑制された(図5)。

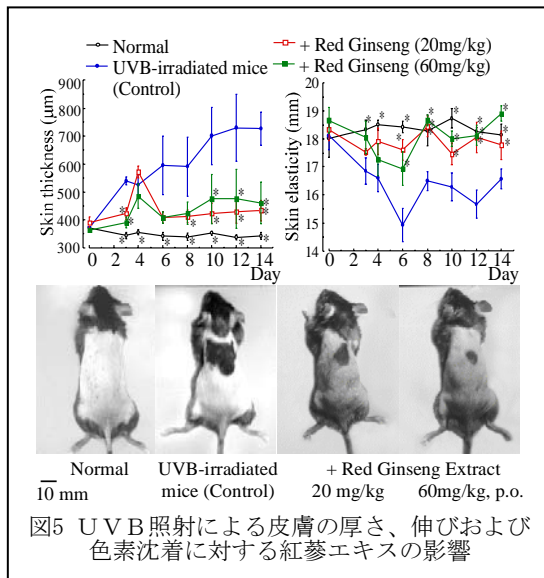


図5 UVB照射による皮膚の厚さ、伸びおよび色素沈着に対する紅蔘エキスの影響

UVB照射によって、皮膚組織中のTGF-β1が上昇しており、紅蔘エキス経口投与群では、この上昇が抑えられていた。UVB照射による急性炎症への紅蔘エキスの作用機序にはTGF-β1の増加抑制が関わると考えられるが、さらなる解析が必要である。

(3)紫外線照射による皮膚損傷に対して保護効果をもつ天然物由来化合物の検索～低用量長期UVB照射マウス～

①紅蔘 (*Panax ginseng*) 成分 Ginsenoside Rb₁

低用量UVB長期照射によって、皮膚肥厚、伸びの低下、しわ形成が引き起こされる。紅蔘総サポニンおよびGinsenoside Rb₁を塗布することで、皮膚肥厚、伸びの低下が抑制された。また、しわ形成も抑制された(図6)。

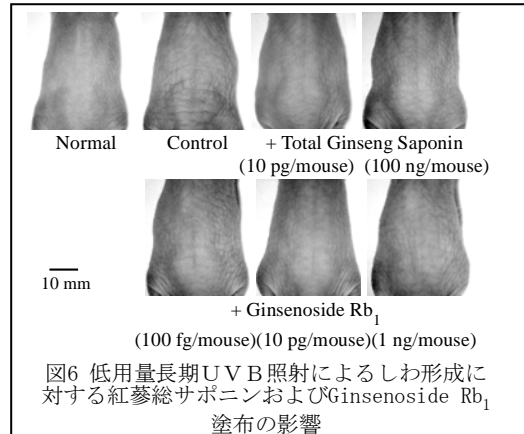


図6 低用量長期UVB照射によるしわ形成に対する紅蔘総サポニンおよびGinsenoside Rb₁塗布の影響

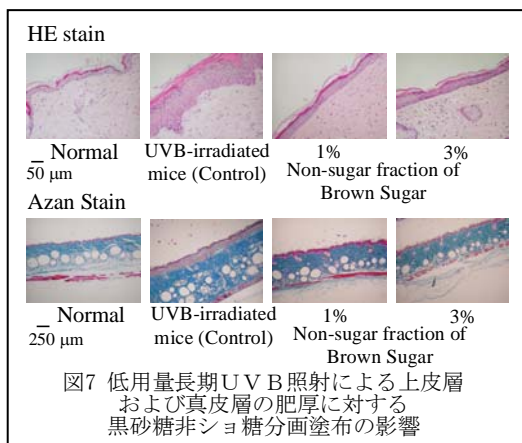
皮膚組織切片を作製し、免疫組織染色を行ったところKi-67、アポトーシス、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 陽性細胞数はUVB長期照射によって増加し、紅蔘総サポニンおよびGinsenoside Rb₁を塗布することでその増加は抑制された。また、真皮層のコラーゲン線維は、正常マウスでは上皮層と平行に規則的に観察されるが、UVB照射によって断片化し、またその方向性も乱れていた。紅蔘総サポニンおよびGinsenoside Rb₁塗布群ではこのコラーゲン線維の変化も抑制していた。

ヒト角化細胞を用いた培養実験ではGinsenoside Rb₁は、UVB照射細胞のBcl-2の発現量を上昇させた。UVB照射マウスで観察されたアポトーシスに対する紅蔘総サポニンおよびGinsenoside Rb₁の保護作用はこのBcl-2発現量増加によるものと考えられる。

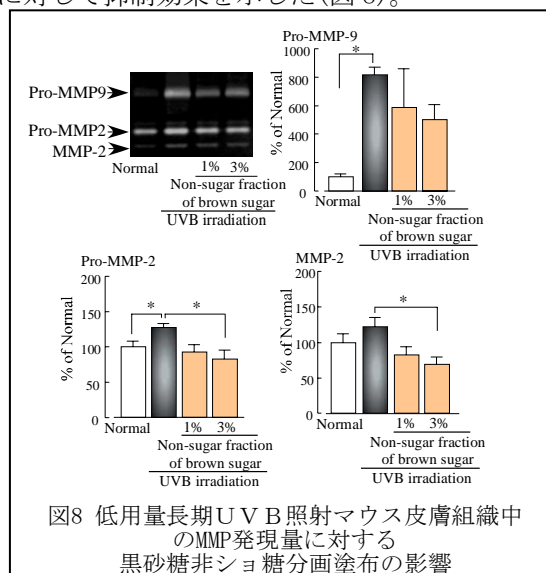
②黒砂糖非シヨ糖分画

低用量UVB長期照射による皮膚肥厚、伸びの低下、しわ形成に対して、黒砂糖非シヨ糖分画塗布(1%および3%)はそれを抑制した。また、皮膚組織切片を作製し、上皮層および真皮層の厚さを測定したところ、黒砂糖非シヨ糖分画塗布は上皮層および真皮層の肥厚を抑制していた(図7)。

低用量UVB長期照射によって、皮膚血管は拡張しており、黒砂糖非シヨ糖分画処置により血管拡張は抑制されていた。また、低用量UVB長期照射による、皮膚組織中のVEGF濃度の上昇も黒砂糖非シヨ糖分画塗布群では抑制されていた。



皮膚組織中の MMP-2 および MMP-9 発現量について、ザイモグラフィを用いて検討したところ、低用量 UVB 長期照射によって MMP-2、MMP-9 共に増加していた。黒砂糖非シヨ糖分画処置は、MMP-9 発現量に対しては影響を及ぼさなかったが、MMP-2 発現量の増加に対して抑制効果を示した(図 8)。



以上の結果から、黒砂糖非シヨ糖分画の UVB 照射による皮膚老化の防止作用には、UVB 照射によって増加する皮膚組織中の VEGF および MMP-2 タンパク量を抑制することが関与すると考えられる。

③ウコン(*Curcuma longa*)エキス

ウコンエキス(300mg および 1000mg/kg)を 1 日 2 回朝晩経口投与することで、低用量 UVB 長期照射によって引き起こされる皮膚老化が抑制された。ウコンエキス投与によって皮膚肥厚、伸びの低下、しわ形成が抑制された。

また UVB 照射による皮膚血管の拡張もウコンエキス経口投与によって抑制され、皮膚組織中の VEGF および MMP-2 タンパク量の増加も抑えられた(論文投稿中)。

④ UVB 照射実験 考察

黒砂糖非シヨ糖分画や、ウコンエキスは皮膚トラブルに効果があるとして伝統的に用いられてきた天然物である。また、我々は紅蔘成分について、その創傷治癒効果を報告している。本研究では、皮膚の損傷や炎症に効果があると指摘されていた天然物が紫外線による皮膚損傷(光老化)に対しても効果をもつことを示唆した。紫外線による皮膚損傷は、老化のみならず、発癌の危険因子でもある。さらに長期の紫外線照射実験を行うことで、これら天然物の発癌への効果を検証可能であり、今後の研究課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Sumiyoshi M, Hayashi T, Kimura Y. Effects of the nonsugar fraction of brown sugar on chronic ultraviolet B irradiation-induced photoaging in melanin-possessing hairless mice. *Nat Med (Tokyo)* 63: 130-136 (2009) 査読有

② Kim YG, Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *Eur J Pharmacol.* 602: 148-156 (2009) 査読有

③ Kim YG, Sumiyoshi M, Kawahira K, Sakanaka M, Kimura Y. Effects of Red Ginseng extract on ultraviolet B-irradiated skin change in C57BL mice. *Phytother Res.* 22: 1423-1427 (2008) 査読有

④ Kawahira K, Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Effects of ginsenoside Rb₁ at low doses on histamine, substance P, and monocyte chemoattractant protein 1 in the burn wound areas during the process of acute burn wound repair. *J Ethnopharmacol.* 117: 278-284 (2008) 査読有

⑤ Kimura Y, Sumiyoshi M, Samukawa K, Satake N, Sakanaka M. Facilitation of action of asiaticoside at low doses on burn wound repair and its mechanism. *Eur J Pharmacol* 584: 415-423 (2008) 査読有

[学会発表] (計 3件)

①木村善行, 住吉真帆, 林輝明
低用量長期UVB照射による皮膚老化に対する黒砂糖非シヨ糖分画の影響 日本生薬学会第55回年会 2008年9月20日 長崎大学

②住吉真帆, 木村善行
低用量長期UVB照射による皮膚老化に対するウコン *Curcuma longa* L. 抽出物の影響 日本生薬学会第55回年会 2008年9月19日 長崎大学

③木村善行, 住吉真帆, 金永坤, 河平一宏, 阪中雅広
紅蓼の紫外線B波照射による皮膚老化に及ぼす影響 日本生薬学会第54回年会2007年9月14日 愛知学院大学薬学部

6. 研究組織

(1)研究代表者

住吉 真帆(SUMIYOSHI MAHO)
愛媛大学・大学院医学系研究科・研究員
研究者番号: 60444767

(2)研究分担者

(3)連携研究者

木村 善行(KIMURA YOSHIYUKI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 20294796