

機関番号：16301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590700

研究課題名 (和文) 天然薬物のUVB照射による発癌抑制作用とその作用機構

研究課題名 (英文) Inhibitory effects of natural products on UVB irradiation-induced carcinogenesis and its mechanism

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：紅参(Ginsenoside Rb₁)、ウコン、オリーブ葉エキス(主成分 Oleuropein)、黄芩(主成分 Baicalein, Wogonin)が UVB 照射によって引き起こされる皮膚の肥厚、弾力性の低下やしわの形成を抑制し、その作用は MMP 類発現、VEGF 産生、DNA 損傷や COX-2 発現抑制によることを明らかにした。特に、Oleuropein に強い UVB 照射による発癌抑制作用を見出した。

研究成果の概要 (英文)：Red Ginseng (ginsenoside Rb₁), turmeric, olive leaf extract (main component, oleuropein), Scutellariae radix (main component, baicalein and wogonin) inhibited the increase in skin thickness and wrinkle, and the reduction in skin elasticity induced by UVB irradiation. It is clarified that the inhibitory action of these substances may be due to the inhibition of the levels of MMPs and COX-2 expression, VEGF production, and DNA damage. Among these substances, we found that oleuropein inhibited the chronic UVB irradiation-induced skin carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：癌・植物成分・薬理学・老化・UVB

1. 研究開始当初の背景

(1) 長期間の紫外線暴露は、皮膚の老化と共に皮膚がんの発生につながることはよく指摘されている。近年の環境破壊の進展、特にオゾン層の破壊により地表に到達する紫外線量の量が増加し、皮膚がんの発生が増大することは予想されている。

(2) 長期の紫外線暴露は、皮膚炎症反応の亢進、フリーラジカルによる皮膚組織細胞の DNA 損傷や皮膚免疫機能の低下を引き起こし、皮膚の老化と共に、皮膚がんの発生をも

たらず。

(3) 紫外線による皮膚障害および発癌の防止剤としては、紫外線カット剤が使用されている。

(4) 今後、地球上の環境破壊の進展が予想され、紫外線による皮膚炎症、皮膚老化、皮膚がんの発生を阻止する薬剤の開発が急務である。

(5) 和漢薬には、外用剤や内服剤として伝統的に皮膚疾患の治療薬として使用され、紫外線照射による皮膚老化や皮膚がん発生に

有効な化合物が存在している可能性が高い。本研究において、伝統的に皮膚障害に使用されている天然薬物にその素材を求めた。

2. 研究の目的

長期間の紫外線暴露は、皮膚の老化(しわの増加、メラニン色素の沈着など)と共に皮膚がんの発生や癌増殖に密接に関係している。本研究の目的は、皮膚疾患治療の伝承薬物から、紫外線照射による皮膚老化や皮膚がん発生を阻止する化合物を探索し、その化合物の構造およびその作用機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 短期 UVB 照射による皮膚炎症に対する影響：ヘアレスマウス或いは C57BL/6J マウスを用い、高用量の UVB(120 或いは 180 mJ/cm²)を背部に 5 日間或いは 2 日間連続照射し、皮膚炎症を誘発し、天然薬物エキスおよび天然薬物から単離した化合物(Saponin、Flavonoid 等)を経口投与し、皮膚浮腫を測定する。

(2) 長期低用量 UVB 照射(36~180mJ/cm²)による皮膚老化および皮膚腫瘍の発生に対する影響：ヘアレスマウスを用い、低用量の UVB を長期間(12、19、30 週間、週 3 回)照射し、天然薬物エキスおよび天然薬物から単離した化合物を経口投与或いは外用塗布し、皮膚の肥厚、弾力性、しわ形成、色素沈着などの皮膚老化と共に皮膚腫瘍の発生・増殖を測定する。

(3) 作用機構の解明：短期および長期 UVB 照射後の皮膚組織の免疫染色[Ki-67、CD31(血管新生)、COX-2、8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG、DNA 損傷)抗体]の測定および皮膚組織中の Cyclooxygenase-2 (COX-2)、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)および Matrix Metalloproteinase (MMP)類の発現を測定し、その天然薬物成分の作用機構を明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、皮膚疾患の治療薬として使用されている伝統薬物として、黒砂糖(砂糖除去分画)、ウコン、高麗紅参エキスおよび人参中成分の Ginsenoside Rb₁、オリーブ葉エキスおよびその主成分 Oleuropein、松樹皮成分 Flavangenol、黄芩中の主成分 Baicalein および Wogonin を取り上げ、UVB 照射による皮膚老化、発がんに対する影響を検討した。以下にその研究成果を順次報告する。

(1) ウコンエキスおよび黒砂糖の非ショ糖分画の低用量長期 UVB 照射に及ぼす影響：

①ウコンエキス(300mg および 1000mg/kg、1 日 2 回)19 週間の経口投与は、週 3 回の UVB

照射による皮膚の肥厚の増加、弾力性の低下、しわの増加およびメラニン顆粒の増加を抑制した(図 1、2)。さらに、ウコンエキスは UVB 照射による MMP-2 発現を抑制した。

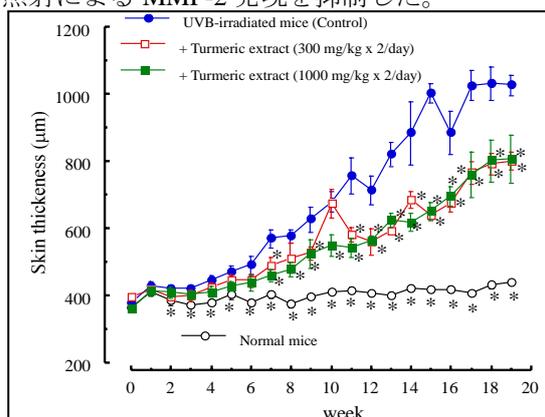


図 1 長期 UVB 照射におけるウコンエキスの皮膚肥厚の増加に及ぼす影響

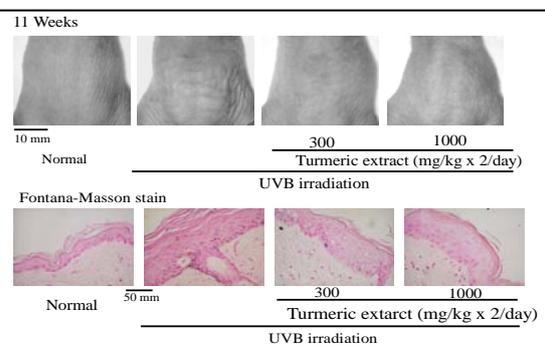


図 2 長期 UVB 照射によるウコンエキスのしわおよびメラニン顆粒増加に及ぼす影響

②黒砂糖の非ショ糖分画の 1%および 3% 溶液を 19 週間毎日マウスの背部に UVB 照射後に 50μl 塗布した。UVB 照射(週 3 回)による皮膚肥厚の増加、弾力性の低下、しわの増加、メラニン顆粒の増加および皮膚 MMP-2 の発現の増加が黒砂糖の非ショ糖分画の塗布によって阻止された(図 3)。

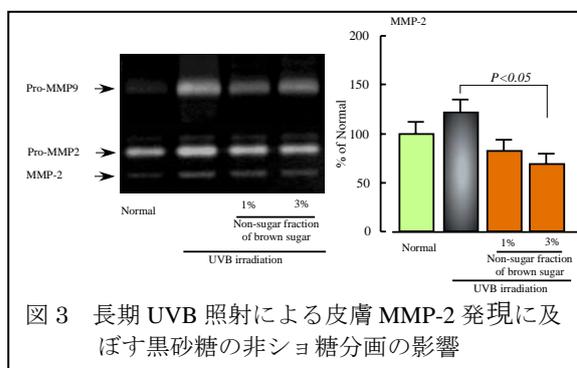


図 3 長期 UVB 照射による皮膚 MMP-2 発現に及ぼす黒砂糖の非ショ糖分画の影響

以上の実験結果から、ウコンエキスおよび黒砂糖中の非ショ糖分画の UVB 照射による皮膚老化防止作用は、一部 UVB による皮膚

MMP-2 発現の増加の阻止によることが推測された。

(2) 人参サポニン Ginsenoside Rb₁ の低用量 長期 UVB 照射に及ぼす影響：

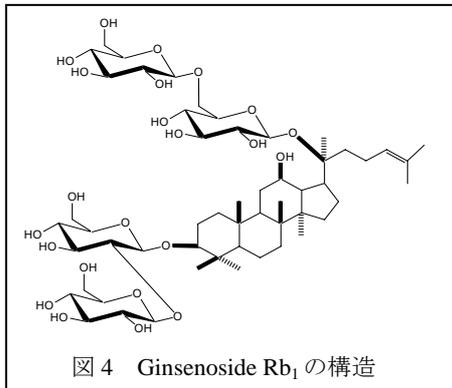


図4 Ginsenoside Rb₁ の構造

Ginsenoside Rb₁(1ng、10pg、100fg/マウス)の外用塗布によって、UVB 照射による皮膚肥厚の増加、弾力性の低下およびしわの形成が抑制された(図5)。

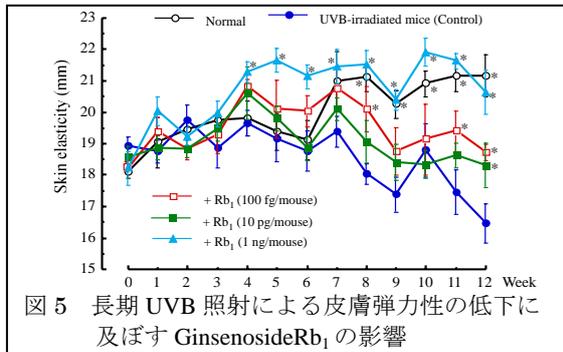


図5 長期 UVB 照射による皮膚弾力性の低下に及ぼす Ginsenoside Rb₁ の影響

さらに、皮膚病理組織(免疫染色)測定から、UVB 照射で引き起こされた表皮層、真皮層の肥厚の増加、Ki-67、アポトーシス、8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG、酸化 DNA) 陽性細胞数の増加が Ginsenoside Rb₁ によって抑制された(図6)。また、UVB 照射による真皮層のコラーゲン層の断裂も Rb₁ の塗布によって、改善された。

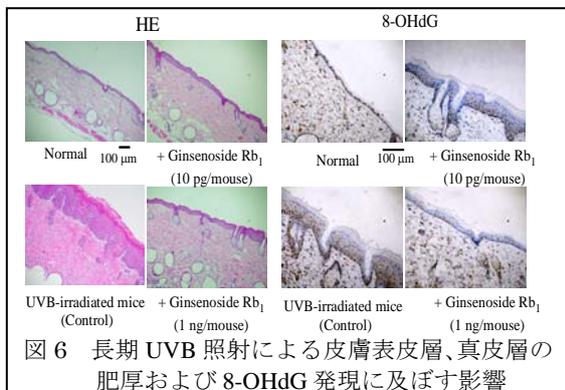


図6 長期 UVB 照射による皮膚表皮層、真皮層の肥厚および8-OHdG 発現に及ぼす影響

従って、Ginsenoside Rb₁ による光老化防止効果は、UVB 照射によって引き起こされる DNA 損傷やコラーゲン断裂の防止によるも

のであると推測された。

(3) オリーブ葉エキスおよび主成分

Oleuropein の高用量短期および低用量長期 UVB 照射による皮膚障害、発癌および癌増殖に及ぼす影響：

① 高用量短期 UVB 照射による皮膚障害：オリーブ葉エキス(300 および 1000mg/kg) および Oleuropein(25 および 85mg/kg) を朝夕2回2週間経口投与し、高用量 UVB(120mJ/cm²) を最初の5日間、毎日照射し、その後は隔日に照射を行った。その結果、オリーブ葉エキスおよび Oleuropein(図7)は、UVB 照射による皮膚の肥厚の増加、弾力性の低下、表皮層および真皮層の肥厚の増加、メラニン顆粒の増加、表皮の増殖能(Ki-67 陽性細胞)および DNA 損傷(8-OHdG、酸化 DNA)を抑制した。さらに、オリーブ葉エキスおよび Oleuropein は UVB 照射によって引き起こされた MMP-13 発現を抑制する傾向が認められた(図8)。

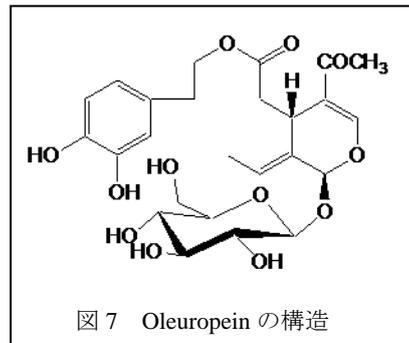


図7 Oleuropein の構造

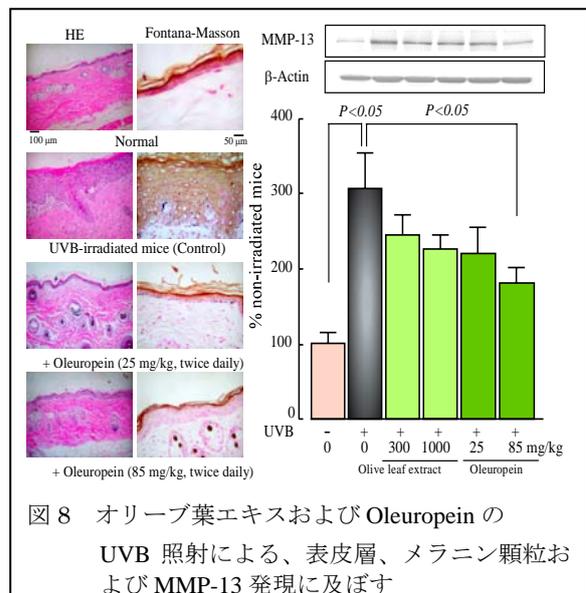


図8 オリーブ葉エキスおよび Oleuropein の

UVB 照射による、表皮層、メラニン顆粒および MMP-13 発現に及ぼす

以上の事から、短期 UVB 照射による皮膚障害に対するオリーブ葉エキスおよび Oleuropein の抑制効果は、UVB 照射によって引き起こされた表皮層の増殖能、DNA 損傷および MMP-13 発現の増加の抑制によることが

推測された。

②低用量 UVB 長期照射による発癌および癌増殖：UVB 照射を低用量(36~180mJ/cm²、漸次増加)で 30 週間行った結果、17 週目から皮膚腫瘍の発生が認められた。オリーブ葉エキス(300 および 1000mg/kg)および Oleuropein (25mg/kg)投与によって、10 週目から UVB 照射による皮膚の肥厚および弾力性の低下およびしわの形成を抑制した。オリーブ葉エキスおよび Oleuropein は皮膚腫瘍の発生および腫瘍の増殖を抑制した(図 9)。

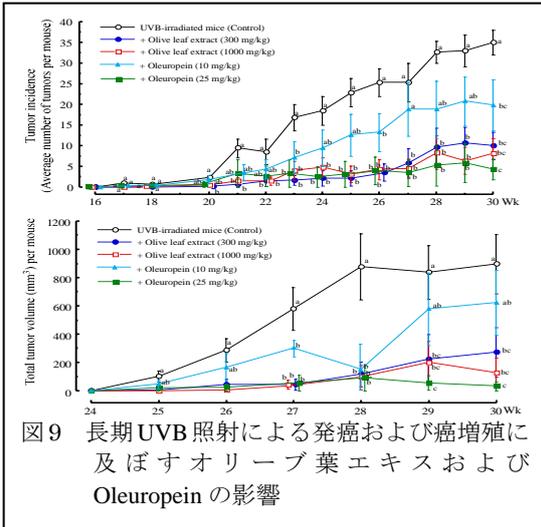


図 9 長期 UVB 照射による発癌および癌増殖に及ぼすオリーブ葉エキスおよび Oleuropein の影響

皮膚組織中の VEGF、MMP-2、MMP-9、MMP-13 および COX-2 の発現は UVB 照射によって増加し、それらの発現は、オリーブ葉エキスおよび Oleuropein によって抑制された(図 10)。

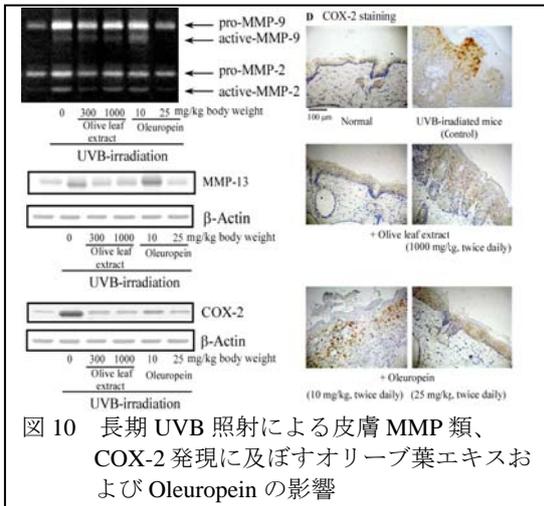


図 10 長期 UVB 照射による皮膚 MMP 類、COX-2 発現に及ぼすオリーブ葉エキスおよび Oleuropein の影響

以上の実験結果から、オリーブ葉エキスおよび Oleuropein の長期 UVB 照射によって引き起こされる皮膚障害、発癌および癌増殖に対する抑制作用は、COX-2 発現の減少を介した VEGF、MMP-2、MMP-9、MMP-13 の発現抑制によると推測された。

(4) 松樹皮(*Pinus maritima*)中のポリフェノール成分 Flavangenol(図 11)の長期 UVB 照射における皮膚障害および発癌に及ぼす影響：

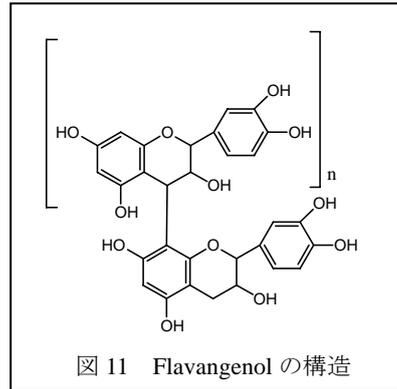


図 11 Flavangenol の構造

メラニン含有ヘアレスマウスに UVB 照射(週 3 回)を低用量(36~168mJ/cm²、漸次増加)で 20 週間行った結果、皮膚の肥厚、弾力性の低下、しわの形成と共に 15 週目から皮膚腫瘍の発生が認められた。Flavangenol(60、200 および 600mg/kg)の朝夕 2 回の 20 週間の経口投与は、UVB 照射による皮膚の肥厚、弾力性の低下およびしわの形成を抑制し、皮膚腫瘍の発生を抑制した(図 12-14)。

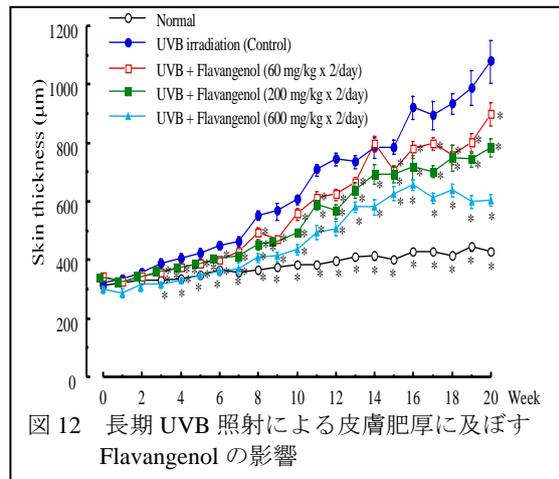


図 12 長期 UVB 照射による皮膚肥厚に及ぼす Flavangenol の影響

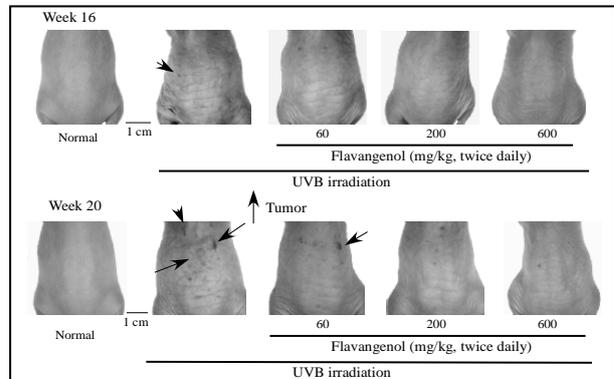


図 13 長期 UVB 照射によるしわ形成および皮膚腫瘍発生に及ぼす Flavangenol の影響

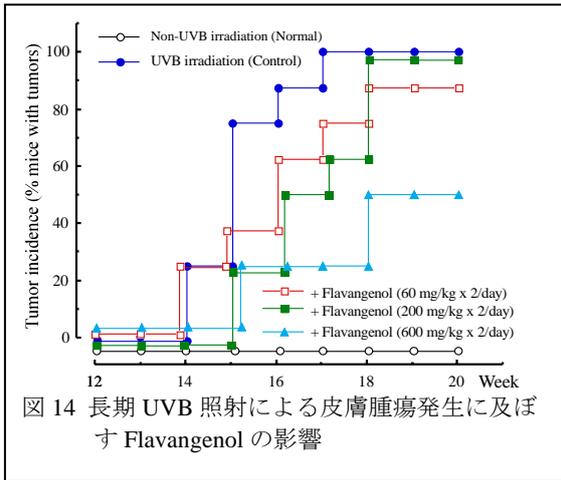


図 14 長期 UVB 照射による皮膚腫瘍発生に及ぼす Flavangenol の影響

さらに、長期 UVB 照射によって引き起こされた皮膚表皮層(Ki-67)および真皮層の肥厚、VEGF 発現量および 8-OHdG 発現の増加、血管長さおよび血管径の増大は Flavangenol の投与によって抑制された(図 15)。

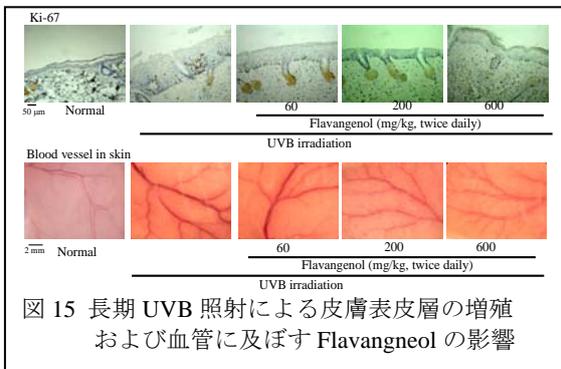


図 15 長期 UVB 照射による皮膚表皮層の増殖および血管に及ぼす Flavangenol の影響

以上の実験結果から、Flavangenol の抗光老化および抗発癌作用は、活性酸素のスキャベンジャー作用を介した DNA 障害、表皮層の増殖および VEGF 産生の抑制によることが推測された。

(5) 黄芩(*Scutellaria baicalensis* 根)中の主成分 Baicalein および Wogonin の高用量短期 UVB 照射による皮膚障害に及ぼす影響：

高用量(200m J/cm²)の UVB 照射は、黄芩中の Baicalein (10 および 50mg/kg) および Wogonin (10 および 50mg/kg)を投与 7 日目および 8 日目に行い、Baicalein(図 16)および Wogonin(図 16)の投与は 2 日間の UVB 照射後も 7 日間投与した。高用量の UVB 照射は、皮膚炎症を引き起こし、皮膚の肥厚、耳介の浮腫を引き起こした。

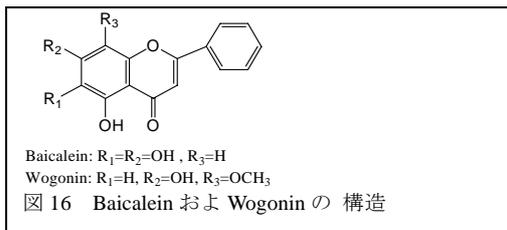


図 16 Baicalein およ Wogonin の 構造

Baicalein(10 および 50mg/kg)および Wogonin

(50mg/kg)は、高用量 UVB 照射による皮膚肥厚および耳介の浮腫を抑制した(図 17、18)。

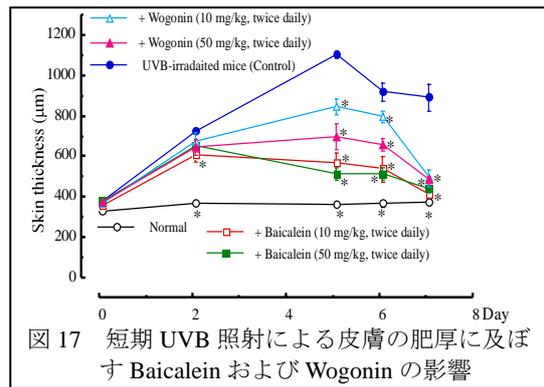


図 17 短期 UVB 照射による皮膚の肥厚に及ぼす Baicalein およ Wogonin の影響

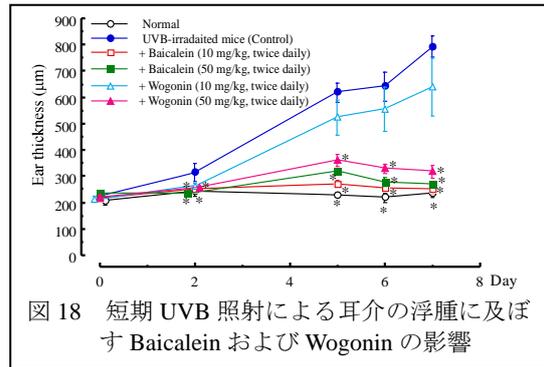


図 18 短期 UVB 照射による耳介の浮腫に及ぼす Baicalein およ Wogonin の影響

皮膚中の MMP 類は高用量短期の UVB 照射によって MMP-2 および MMP-9 の発現が増加し、Baicalein および Wogonin は MMP-9 の発現を抑制したが、MMP-2 の発現を抑制しなかった(図 19)。

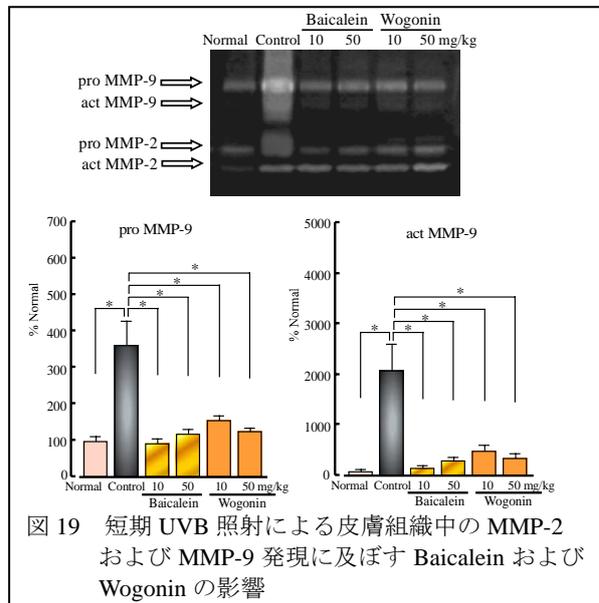


図 19 短期 UVB 照射による皮膚組織中の MMP-2 および MMP-9 発現に及ぼす Baicalein およ Wogonin の影響

次に、Baicalein および Wogonin の高用量短期 UVB 照射に対する皮膚障害の防御作用の機構を明確にするために、ヒト角化細胞 Cell line HaCaT 細胞を用い、UVB 照射下での COX-2、Hypoxia inducible factor (HIF)-1α および

Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)の発現を培養系で検討した。Baicalein および Wogonin は UVB 照射下での COX-2 の発現を抑制した(図 20)。

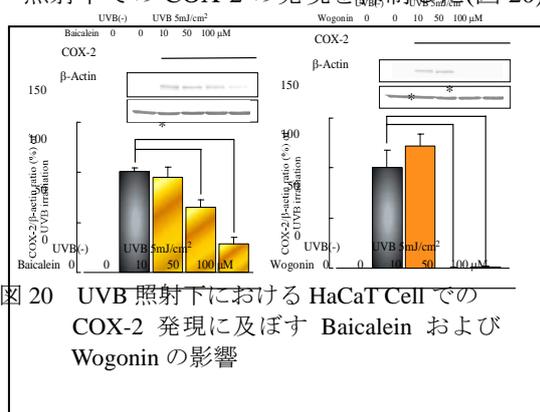


図 20 UVB 照射下における HaCaT Cell での COX-2 発現に及ぼす Baicalein および Wogonin の影響

Wogonin は HIF-1 α の発現を抑制したが、Baicalein は逆に増強した。NF- κ B の発現も UVB 照射によって増強し、Baicalein は NF- κ B の発現を抑制したが、Wogonin は何ら影響を与えなかった。以上の結果から、Baicalein および Wogonin の UVB による皮膚障害に対する防御作用は、COX-2 発現もしくは NF- κ B の発現を介していることを示唆した。

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 8 件)

- (1) Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of baicalein and wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis* roots on skin damage in acute UVB-irradiated hairless mice. *Eur J Pharmacol* in print (2011). 査読有
- (2) Kimura Y, Sumiyoshi M. French maritime pine bark (*Pinus maritime* Lam.) extract (flavangenol) prevents chronic UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis in melanin-possessing hairless mice. 86: 955-963 (2010). 査読有
- (3) Sumiyoshi M, Kimura Y. Effects of olive leaf extract and its main component oleuropein on acute ultraviolet B irradiation-induced skin changes in C57BL/6J mice. *Phytother Res* 24: 995-1003 (2010). 査読有
- (4) Sumiyoshi M, Kimura Y. Effects of a turmeric extract (*Curcuma longa*) on chronic ultraviolet B irradiation-induced skin damage in melanin-possessing hairless mice. *Phytomed* 16: 1137-1143 (2009). 査読有
- (5) Kimura Y, Sumiyoshi M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B

radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice. *J Nutr* 139: 2079-2086 (2009). 査読有

- (6) 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
- (7) 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. *J Nat Med* 63: 130-136 (2009). 査読有
- (8) 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

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 木村善行、住吉真帆
漢薬・黄芩中の Flavonoid 成分の急性 UVB 照射による皮膚障害に対する影響
第 27 回和漢医薬学会学術大会 2010 年 8 月 28 日 京都薬科大学(京都)
- (2) 木村善行、住吉真帆
紫外線 B 波照射による皮膚発癌および皮膚障害に及ぼす各種食用生薬の影響
第 3 回食品薬学シンポジウム 2009 年 11 月 12 日 近畿大学(大阪)
- (3) 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中の非ショ糖成分の影響
日本生薬学会第 55 回年回 2008 年 9 月 20 日 長崎大学(長崎)
- (4) 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 回年回 2008 年 9 月 20 日 長崎大学(長崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(3) 連携研究者

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