

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790660

研究課題名(和文) 角層をターゲットとした皮膚アンチエイジング剤としての漢方薬の作用解明

研究課題名(英文) Investigation of anti-aging effect of Kampo medicine on the skin, targeting stratum corneum

研究代表者

田宮 久詩 (TAMIYA, Hisashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80464634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円、(間接経費) 300,000円

研究成果の概要(和文)：当帰飲子(To)という漢方薬の皮膚抗老化作用について、皮膚角層にターゲットを絞り、形態学的および生化学的に調べた。結果、Toは皮膚老化による皮膚角層水分量の減少や角層細胞面積および角層多重剥離度の増加を抑制した。またToは、表皮成長因子の一つであるepiregulinや、皮膚バリア機能に関連するfilaggrinのmRNA発現を増加させた。以上より、Toは老齢マウス皮膚において、表皮成長因子産生を亢進させることにより、皮膚老化による表皮ターンオーバーの低下を回復させることで、皮膚抗老化作用を発揮する可能性があることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the efficacy of Toki-inshi (TO), one of traditional Japanese kampo prescriptions, for aged skin of mice, targeted on the stratum corneum (SC). Water containing of SC (WCSC) increased significantly in dose-dependent manner by oral TO. In addition, cell areas of corneocytes (CAC) and degrees of multiple detachments (DMD) showed significant reduction dose-dependently. Epidermal thickness of the groups given feeds containing more than 2% of TO increased significantly, which was consistent with increase of the number of PCNA-positive basal cells and mRNA level of epiregulin. The expression of filaggrin also increased in the group of 10% of TO in both immunohistochemistry and mRNA level. Oral TO has skin moisturizing effect in the elderly mice, which are associated with the improvement of impaired turnover of SC from aging by activating the proliferation of basal cell, and enhancement of retention ability of skin moisture by increased level of filaggrin.

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：漢方 皮膚アンチエイジング 当帰飲子 角層ターンオーバー

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を背景に、老化に伴って生じる種々の疾患への対応について重要性が増している。皮膚科領域において問題になるのは老化による皮膚の乾燥状態、いわゆる老人性乾皮症である。皮膚は乾燥状態が続くと、そう痒や湿疹化を引き起こすため、このような状態になれば、生活の質は著しく損なわれる。老人性乾皮症の発症メカニズムについては、老化により皮膚の新陳代謝が低下する結果、水分保持や皮膚バリア機能に重要な役割を持つ角層のターンオーバーが低下し、機能の低下した古い角質層が残存してしまうことが主因とされる。

治療法については、西洋医学的には保湿外用剤やステロイド外用剤が主体となるが難治例も多い。しかし、漢方薬の中に、西洋医学では類をみない機序で、老化による皮膚保湿能低下を改善させる効果を見出した。つまり、これまでの皮膚乾燥に対する対処法は保湿外用剤を皮膚に塗布することで皮膚上に被膜を作り水分の蒸発を抑えることから皮膚乾燥を抑制するというものがほとんどであったが、当帰飲子という漢方薬が、低下した角層のターンオーバーを回復させ、皮膚本来の生理機能を高めることで皮膚保湿効果を持つ可能性があることを新しく見出した。(田宮久詩他、当帰飲子は老齢マウス皮膚の乾皮症状を改善する～皮膚機能計測およびコルネオサイトメトリーによる検討～ 2011 和漢医薬学会 優秀発表賞受賞) この発見をきっかけに、老化皮膚に対する漢方薬の効果を詳細に検討することに至った。

2. 研究の目的

これまでの研究により、当帰飲子は、皮膚の新陳代謝を高め、老化により低下する角層ターンオーバーを回復させることで、老化による皮膚の乾燥状態を改善させる可能性があることを発見したため、さらに同漢方薬の詳細な作用機序を探るため、角層にターゲットを絞り、角層のターンオーバーに関わる次のような因子、表皮における成長因子および分化マーカー関連の遺伝子発現、角層の酸化ストレス度が、同漢方薬により、どのような影響を受けるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

老齢マウスモデルを用いた in vivo 実験を行った。方法としては、36 週齢、雄の HR-1 ヘアレス老齢マウス (各群 n=5) をさらに計 4 週間、当帰飲子 0%、2%、10% 含有飼料に

て飼育し、40 週齢となった時点で以下の項目を測定する。皮膚機能変化については角層水分量、経表皮水分蒸散量 (皮膚バリア機能を反映) を指標にした。角層状態の変化についてはコルネオサイトリー法による角層形態学的変化の観察、つまり角層細胞面積 (角層ターンオーバーを反映)、多重剥離度 (皮膚老化程度を反映) にて検討した。さらに角層状態を変化させる様々な因子について、角層酸化ストレス度は角層カタラーゼ活性を、成長因子発現および分化マーカーについては表皮の epidermal growth factor やフィラグリニンなどの mRNA 発現を RT-PCR 法にて調べた。

方法

(1) 群分け;

通常飼育した 36 週齢オス HR-1 ヘアレスマウスを、3 群 (各群 n=5) に分け、それぞれ当帰飲子エキス製剤 (ツムラ株式会社提供) 0、2、10% 濃度含有餌にて、さらに 40 週齢まで飼育した。各実験においてコントロールとして、8 週齢オスを用いた。

(2) 皮膚機能計測;

各濃度当帰飲子含有餌にて 4 週間飼育後、各群において角質水分量 (water containing of stratum corneum: WCSC) および皮膚バリア機能について皮膚機能計測の追試を行った。WCSC は、SKICON-200EX (IBS) を用い、マウスを愛護的に保持した状態で、背部皮膚において一匹あたり計 5 回ずつ計測した。また皮膚バリア機能については、経表皮水分蒸散量 (transepidermal water loss: TEWL) を指標に用いた。TEWL は Evaporimeter AS-TW1 (ASAHI BIOMED) を用い、マウスを愛護的に保持した状態で、背部皮膚において一匹あたり計 3 回ずつ計測した。なお皮膚機能計測に当たっては、温度 22℃、湿度 39% の密閉部屋で、午前 10 時～12 時の間に行った。

(3) 皮膚角層形態観察 (コルネオサイトメトリー);

各濃度当帰飲子含有餌にて 4 週間飼育後、各群においてニチバン製セロファンテープを用いてマウス背部皮膚を計 2 回テープストリッピングし、角層を採取した。このうち第 2 層目の採取角層を 0.5% プリリアントグリーン、1.0% ゲンチアナバイオレット混合溶液にて染色し、光学顕微鏡で角層の形態学的変化についての追試観察を行った。角質細胞面積は、400 倍の拡大にて各プレパラートごと、ランダムに 10 個角質細胞を選定し、画像処理ソフト PhotoShop のヒストグラムツールを使い、各角質細胞の面積をピクセル数で算出した。多重剥離度は 100 倍の拡大にて各プレパラートごと、ランダムに 5 視野を選定し、多重剥離度 (%) = 角質細胞

胞全体面積/多重剥離部分面積×100にて算出した。

(4) 組織学的評価；

各濃度当帰飲子含有餌にて4週間飼育後、各群において背部皮膚を採取し、4%パラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋したサンプルを用いて、HE染色およびPCNA免疫染色を行い、表皮の厚さや表皮基底細胞の増殖能について調べた。

(5) 角層酸化ストレス度評価；

表皮の酸化ストレススカベンジャーの代表であるカタラーゼ活性を調べることで、角層の酸化ストレス度を調べた。つまり、皮膚の酸化ストレス度が大きい場合は、角層に残存しているカタラーゼは消費され減少するため、角層のカタラーゼ活性は低下する。方法としては、各濃度当帰飲子含有餌にて4週間飼育後、各群において背部皮膚よりセロファンテープで採取した第2層目の角層を250nmol/L H₂O₂を入れた1.5mL エッペンチューブに120min浸す。Horseradish peroxidase存在下に4-aminoantipyrineとphenolを反応させ、550nm吸光度を測定しH₂O₂消費量を決定した。同時に測定した角層蛋白量でH₂O₂消費量を除したものを角層カタラーゼ活性とした。

(6) 表皮成長因子および分化マーカー遺伝子発現

各濃度当帰飲子含有餌にて4週間飼育後、各群において背部より皮膚を採取し、ディスプレイ処理にて表皮のみを採取した。トリゾール溶液でホモゲナイズし、epidermal growth factor および表皮分化マーカー(フィラグリン、ロリクリン、ケラチン、インボルクリン)についてmRNA発現をRT-PCR法にて調べた。

4. 研究成果

(1) 皮膚機能

WCSC: 40週齢マウスのWCSCは8週齢マウスと比較して有意に低下したが、当帰飲子含有餌摂取により、用量依存的にWCSCは回復した。これは老齢による皮膚の乾燥状態が、当帰飲子が改善させることを示したものと考えられた。

TEWL: 40週齢マウスのTEWLは8週齢マウスと比較して有意に低下した。しかし当帰飲子含有餌摂取による有意差は認めなかった。

(2) 皮膚角層形態

(コルネオサイトメトリー)

角質細胞面積: 40週齢マウスの角質細胞面積は8週齢マウスと比較して有意に増大した。しかし当帰飲子含有餌摂取により、角質細胞

面積の縮小が見られた。これは老齢による角層ターンオーバーの低下が当帰飲子により改善されることを示したものと考えられた。

多重剥離度: 40週齢マウスの角層多重剥離度は8週齢マウスと比較して有意に増加した。しかし当帰飲子含有餌摂取により、角層多重剥離度の増加は抑制された。これは老齢による角層剥離異常が当帰飲子により改善されることを示したものと考えられた。

(3) 組織学的評価

表皮厚: 40週齢マウスの表皮厚は8週齢マウスと比較して有意に減少した。しかし当帰飲子含有餌摂取により、表皮厚の減少は抑制された。

表皮基底細胞増殖能: 40週齢マウスの角化細胞PCNA陽性細胞数は8週齢マウスと比較して有意に減少した。しかし当帰飲子含有餌摂取により、PCNA陽性細胞数の減少は抑制された。

これらの結果は、老齢による皮膚ターンオーバーの低下が当帰飲子により改善されることを示したものと考えられた。

(4) 角層酸化ストレス度評価

皮膚角層のカタラーゼ活性、カルボニル蛋白については、各群で有意差を認めず、当帰飲子は角層酸化ストレス度には影響しないことが考えられた。

(5) 表皮成長因子および分化マーカー遺伝子発現

10%当帰飲子投与マウスでは、表皮成長因子の一つであるepiregulinおよび皮膚バリア機能維持に関連するfilaggrinのmRNA発現が増加した。

以上の研究成果より、当帰飲子は老齢マウス皮膚において、表皮成長因子産生亢進により、表皮基底細胞増殖を促し、表皮ターンオーバー低下を回復させることで、皮膚アンチエイジング効果を発揮する可能性があることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Yanagihara S, Kobayashi H, Tamiya H, Tsuruta D, Okano Y, Masaki H, Yamada T, Hasegawa S, Akamatsu H, Ishii M. Protective effect of hochuekkito, a Kampo prescription, against ultraviolet B irradiation-induced skin damage in hairless mice, J Dermatol. 40, 201-206, 2013 査読あり

DOI: 10.1111/1346-8138.12050.

田宮 久詩、生活習慣の改善が神経線維腫発生予防に寄与していると考えた神経線維腫症 1 型の一例、日本レックリングハウゼン病学会誌、3 巻、38-41、2012 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

田宮 久詩、皮膚バリア機能からみた補中益気湯のエビデンス、平成 24 年度日本東洋医学会関西支部例会 2013 年 10 月 27 日(大阪)

田宮 久詩、小林 裕美、柳原 茂人、石井 正光、高橋 邦明、当帰飲子は老齡マウス皮膚の乾皮症状態を改善する～皮膚機能計測およびコルネオサイトメトリーによる検討～和漢医薬学会 2011 年 8 月 27、28 日(富山県)

〔図書〕(計 1 件)

田宮 久詩、全日本病院出版会、Derma, 2013 年 11 月号 No. 211, 2013 (71-73)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田宮 久詩 (TAMIYA, Hisashi)
大阪市立大学大学院医学研究科講師
研究者番号: 8 0 4 6 4 6 3 4

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし