

令和元年6月27日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18905

研究課題名(和文)天然由来白斑治療薬開発を目指したメラニン合成促進物質の探索と作用機序解析

研究課題名(英文)Discovery of natural compounds for the treatment of vitiligo and elucidation of their mechanism of action

研究代表者

宇都 拓洋(UTO, Takuhiro)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：90469396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：新しい白斑治療薬創出を目標として、生薬エキスおよび天然化合物ライブラリーからメラニン合成促進物質を探索し、生薬エキスから活性成分を単離・同定した。さらに活性成分を用いて、ヒト皮膚モデルもしくはモデル動物を用いた確実な効果の立証、さらに活性成分の作用機序解析を行った。本研究により、甘草フラボノイドであるリクイリチンおよびリクイリチゲニン、辛夷エキスから単離したマグノリン、丁子エキスに含まれる精油成分やトリテルペン類、マリアザミの種子成分であるシリビニンにメラニン合成促進活性を見出し、それらの作用機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、メラニン合成促進作用を示す天然物は報告されてはいるが、網羅的なスクリーニングを行った研究はなく、またメラニン合成促進活性を有する化合物の詳細な分子作用機序や標的分子の解明、ヒト皮膚3次元モデルや動物レベルでの効果の立証まで至っているものは限られていた。本研究は、これらを解決する先駆的研究であり、本研究で得られた成果は、将来新しい白斑治療薬創出に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to screen 130 crude drugs and 250 natural compounds to identify novel compounds to induce melanin synthesis in melanoma cell lines. We found that liquiritin and liquiritigenin, major flavonoids in licorice root, induced melanin synthesis via activation of the p38 and PKA signaling pathways. Among the 130 crude extracts, Magnolia flower extract strongly activated melanogenesis, and we identified (+)-magnolol from its ethyl acetate fraction as the active compound leading to melanin synthesis. Moreover, analysis using a three-dimensional epidermal model revealed that the ethyl acetate fraction and (+)-magnolol induced melanin synthesis through the epidermal barrier. Among the 250 natural compounds, silibinin, the main compound extracted from the milk thistle (*Silybum marianum*), evoked melanin synthesis. Our findings will be valuable in providing leads for the discovery of new drugs for the treatment of vitiligo.

研究分野：天然物化学

キーワード：白斑 メラニン 生薬 スクリーニング 甘草フラボノイド 辛夷 マグノリン シリビニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 尋常性白斑は、皮膚の基底層に分布するメラノサイトが何らかの原因で機能障害に陥りメラニンを供給できなくなること起因する後天性疾患である。白斑の治療は、ステロイド剤等の塗布と紫外線照射療法の併用により白斑部分のメラニン合成を誘導する方法がもっとも多いが、紫外線照射には特別な機器が必要であることや、週に 2~3 回の長期通院が必要であり患者の負担は大きい。多くの患者で紫外線照射療法の有効性は確認されているが、色が出てくる過程でまだら模様になること、ぶちのまま色素再生が頭打ちになること、広範囲に存在する白斑の場合は難しいなどの問題がある。特に露出部分に白斑がある患者の精神的苦痛は大きく、QOL を著しく低下させ社会活動も障害するため、より臨床にマッチした白斑治療法の確立が望まれている。

(2) 生薬・天然物の研究領域において、しみ、そばかす、黒ずみ等の抑制を目的にメラニン合成を阻害する天然物の探索研究が活発に行われてきた。一方、白髪の予防・改善、白斑の治療、皮膚癌予防等の効果を目指して、メラニン合成を促す天然物の探索が近年活発になっている。我々は、マウスおよびヒトメラノーマ細胞株を用いたパイロットスクリーニングにより、甘草フラボノイドがメラニン合成促進活性を有することを見出し特許出願した(特願 2015-112380)。しかしながら、我々の報告を含めメラニン合成促進作用を示す天然物は報告されてはいるが、網羅的なスクリーニングを行った研究はなく、またメラニン合成促進活性を有する化合物の詳細な分子作用機序や標的分子の解明、ヒト皮膚 3 次元モデルや動物レベルでの効果の立証まで至っているものは限られている。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、我々がパイロットスクリーニングで見出したメラニン合成促進エキスおよび化合物を先発サンプルとして研究を進め、生薬エキスおよび天然化合物ライブラリーのスクリーニングにより白斑改善効果が期待できる活性成分を同定する。

(2) メラニン合成促進活性を示す化合物を用いて、皮膚モデルもしくはモデル動物を用いた確実な効果の立証、さらに活性成分の作用機序解析を行い、本研究成果が白斑治療薬創出および治療標的分子発見に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 生薬エキスおよび天然化合物ライブラリーのスクリーニング

我々が保有している生薬メタノールエキスおよび天然化合物ライブラリー(エキス約 130 種、天然化合物約 250 種)からメラニン合成促進作用があるエキスおよび化合物を探索した。活性確認はマウスメラノーマ B16-F1 およびヒトメラノーマ HMV-II を 24 well plate で培養し、24 時間後に各サンプルで処理した。3 日後に 1M NaOH により細胞溶解後、マイクロプレートリーダー(415nm)を用いて吸光度を測定することでメラニン合成促進を評価した。ポジティブコントロールとしてメラニン細胞刺激ホルモン(α -MSH)を用いた。また、同時に MTT 法にて細胞増殖をモニターすることで毒性確認も行った。(研究協力者:長崎国際大学 正山 征洋特任教授)

(2) 活性成分の単離・同定

スクリーニングの結果よりメラニン合成促進作用があったエキスにおいて活性成分の単離・同定を行った。メタノールエキスをヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水で順次分配した。このうちメラニン合成促進作用のある画分について各種カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を繰り返し行うことによって化合物の単離を行った。得られた化合物について各種機器分析(NMR、MS など)を用いて構造解析を行った。(研究協力者:長崎国際大学 太田 智絵助教、Phenikaa University グエン ヒュー トウン准教授)

(3) 活性成分の作用機序解析

細胞内チロシナーゼ活性評価は、まず B16-F1 を 6 well plate に播種し、24 時間後、培地に各サンプルを添加した。3 日後に細胞を回収し、1% tween-PBS で細胞溶解液を調整した。得られた細胞溶解液に L-DOPA を加え、37 °C でインキュベート後、吸光度(415nm)を測定した。メラニン誘導に関与する酵素群および関連転写因子の解析は、B16-F1 を 6cm dish に播種し、24 時間後、各サンプルを添加した。培養後、RIPA buffer で細胞溶解液を調整した。各タンパク質発現は、各特異的抗体を用いて Western Blot 法で検出した。(研究協力者:長崎国際大学 藤井 俊輔講師)

(4) 活性画分および成分のヒト皮膚 3 次元モデルでのメラニン合成活性の確認

ヒト正常表皮細胞にメラノサイトを加えてメンブランフィルター上で培養した皮膚 3 次元モデルは、薬剤・UV 等の各種刺激によりメラノサイト増殖やメラニン合成誘導を確認でき、ヒト正常皮膚に近く信頼性の高い評価法である。本評価法を用いて、活性画分および成分のメラニン合成促進活性を確認した。

(5) 活性画分および成分のメラニン保有ヘアレスマウスでのメラニン合成促進活性の確認

活性画分および成分をマウス皮膚へ塗布しメラニン合成促進活性を確認した。紫外線照射によりメラニンが誘導されることが確認されている Hos:HRM-2 (オス・4 週令) を用いた。活性画分および成分をエタノール・プロピレングリコール (3 : 7) に溶解させ、マウス皮膚に 24 時間おきに塗布した。

4. 研究成果

(1) 甘草フラボノイドのメラニン合成促進活性とその作用機序

近年、甘草含有フラボノイドの多彩な機能が注目され、食品や化粧品などに多く利用されている。報告されている甘草含有フラボノイドの機能は、抗酸化作用、superoxide scavenging 作用、発癌抑制作用、抗菌作用、アポトーシス誘導作用などがあるが、メラニン合成に関する報告はない。我々は、甘草エキスがマウスメラノーマ細胞 B16-F1 においてメラニン合成促進活性を有すること、さらに甘草フラボノイドであるリクイリチン (LQ) およびリクイリチゲニン (LQG) (図 1) がメラニン合成促進活性を示すことを見出した。その活性は LQ より LQG が強く、同様な結果がヒトメラノーマ細胞 HMV-II でも確認された (図 2)。

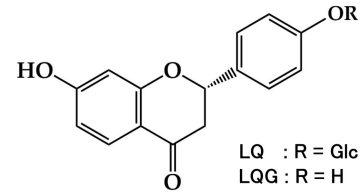


図1 LQ および LQG の化学構造

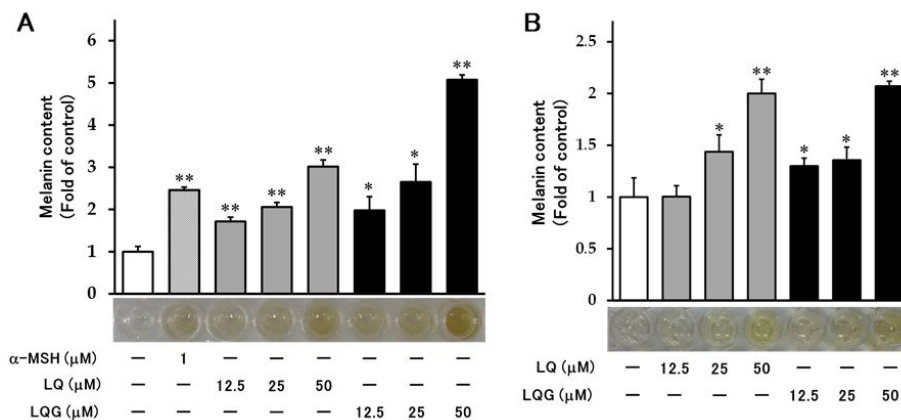


図2 B16-F1 (A) および HMV-II (B) における LQ および LQG のメラニン合成促進活性

メラニンは、L-チロシンを出発物質として生合成されており、一連の合成反応は、チロシナーゼ (Tyr)、tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) および 2 (TRP-2) により調節されている。またこれらメラニン合成に関与する酵素群の発現は、microphthalmia-associated transcription factor (MITF) がプロモーター領域の M-box に結合することで誘導され、MITF の活性化は複雑なシグナル伝達系により制御されている。まず我々は *in vitro* Tyr 活性に与える LQ および LQG の影響を調べたところ、LQ および LQG は直接的に Tyr 活性を誘導しなかった。次に細胞内 Tyr 活性を調べた結果、B16-F1 において LQ および LQG は細胞内 Tyr 活性を誘導していることが分かった。Tyr、TRP-1/-2 および MITF の発現解析の結果、LQ および LQG は、MITF を活性化することで Tyr、TRP-1、TRP-2 のタンパク発現を誘導しメラニン合成を促進していることが示唆された。さらにシグナル伝達系の解析の結果、LQ および LQG は ERK、p38 および CREB のリン酸化を誘導しており、各種シグナル伝達経路の阻害剤を用いた検討の結果、LQ および LQG により活性化された p38 および PKA が CREB をリン酸化することで MITF の発現を誘導し、Tyr、TRP-1、TRP-2 の発現を高めていることが示唆された (研究成果 [雑誌論文] など参照)。さらに我々は LQ および LQG に対する MAb を作製し、抗 LQ/LQG-MAb を用いた各種分析方法の確立に成功しているため、LQ や LQG の細胞内挙動、標的分子の同定を目的として更なる研究へ展開している (研究成果 [雑誌論文] など参照)。

(2) 生薬エキスをライブラリーのスクリーニング

より強力なメラニン合成促進化合物の探索を目的として、約 130 種の生薬メタノールエキスを最終濃度 20 μg/mL に調整しメラニン合成促進能を調べた。その結果、5 種の生薬エキスが B16-F1 においてコントロール細胞に比べて約 3 倍量のメラニンを誘導した。また同様な結果が HMV-II においても確認された。さらに、同濃度において細胞毒性は認められなかったことから、これら 5 種の生薬エキスはメラニン合成促進活性を有することが示唆された。

(3) 辛夷から単離したマグノリンのメラニン合成促進能とその作用機序解析

生薬エキスをライブラリーのスクリーニングの結果で得られた 5 種の生薬エキスの 1 つは、辛夷 (シンイ) である。辛夷は、モクレン科タムシバやコブシなどのつぼみを用いる生薬で、発散・排膿作用があり、頭痛・頭重をともなう鼻炎・蓄膿症などを治療する目的で用いられている。まず我々は、辛夷に含まれるメラニン合成促進能を有する活性成分を単離・同定すること

にした。辛夷エキスから調整したヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水画分のうち、酢酸エチル画分が最も高いメラニン合成促進活性を有することから、同画分から 7 種のリグナン類 1~7 を単離・同定した(図3)。これらリグナン類のメラニン合成促進活性を比較した結果、マグノリン(5, (+)-magnolin)が活性および含量が高かったことから更なる解析を進めた。

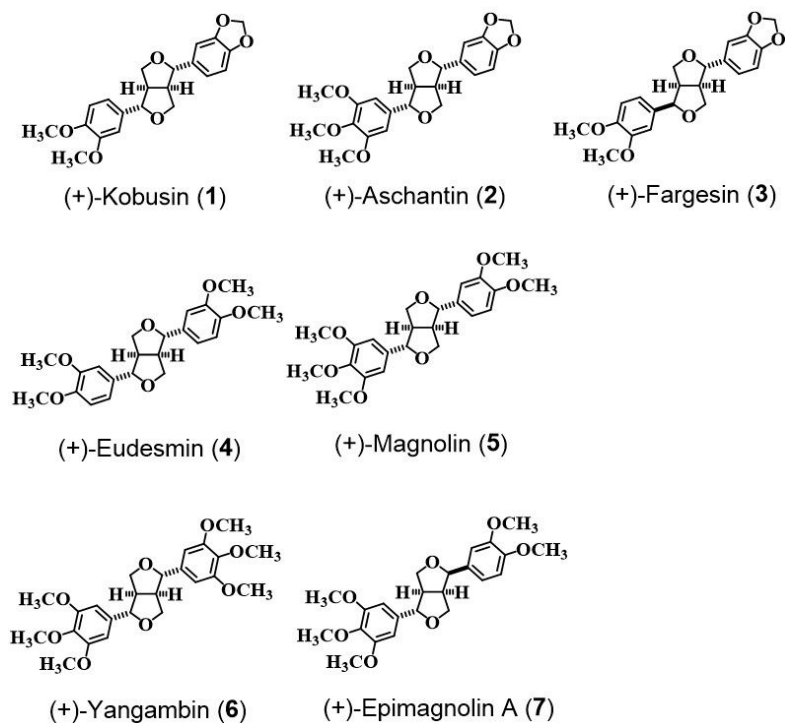


図3 辛夷の酢酸エチル画分から得られたリグナン類

マグノリンは、細胞内 Tyr 活性を高め、Tyr、TRP-1、TRP-2 のタンパク発現を活性化した。シグナル伝達系の解析の結果、マグノリンは ERK、Akt、GSK3-β のリン酸化には影響を与えず、p38、PKA、CREB のリン酸化を誘導した。さらに p38 および PKA 阻害剤によりマグノリンのメラニン合成活性が抑制されたことから、マグノリンによりリン酸化された p38 および PKA は CREB のリン酸化誘導を介する経路もしくは直接的に MITF の発現を誘導することで、Tyr、TRP-1、TRP-2 の発現を高めていることが示唆された。(研究成果〔産業財産権〕参照)

ヒト皮膚 3 次元モデルにおいて、酢酸エチル画分およびマグノリンがメラニン合成促進活性を示すか検証した。まず、ヒト皮膚 3 次元モデルでメラノサイトに直接作用しメラニン合成を誘導できるかを確認するために、培地中に酢酸エチル画分(10 μg/mL)もしくはマグノリン(20 μM)を添加し 12 日間培養した。その結果、酢酸エチル画分およびマグノリンともに黒化を誘導した。次に、酢酸エチル画分およびマグノリンが角層バリア機能をパスしてメラニン合成を誘導できるかを確認するために、皮膚モデルの角質層の上部から酢酸エチル画分(0.1 もしくは 0.3 w/v%) およびマグノリン(0.1 もしくは 0.3 w/v%)を添加し、12 日間培養した。その結果、どちらも 0.1 w/v% から顕著に黒化を誘導した(図4)。これらの結果から、辛夷エキスの酢酸エチル画分およびマグノリンは角層バリア機能をパスしてメラニン合成を誘導することが可能であることが明らかとなった(研究成果〔学会発表〕参照)

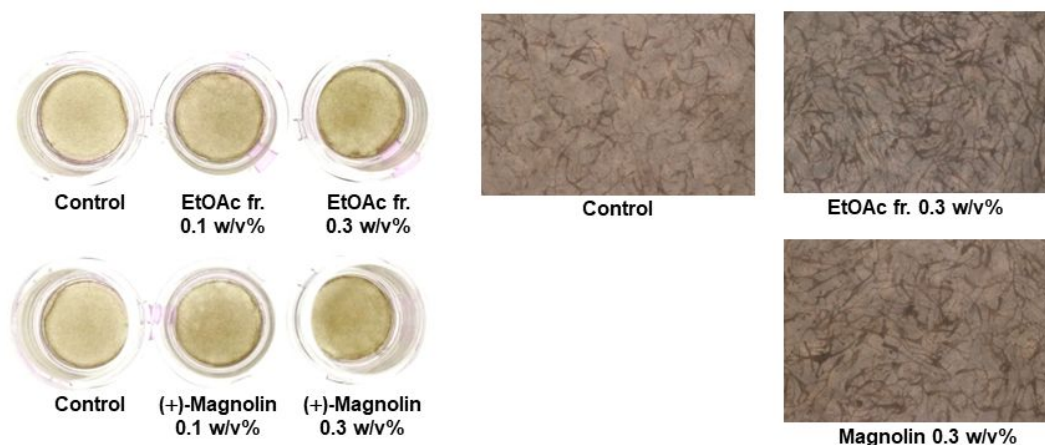


図4 ヒト皮膚3次元モデルを用いた酢酸エチル画分およびマグノリンのメラニン合成促進活性の確認

さらに、メラニン保有ヘアレスマウス Hos:HRM-2 を用いて酢酸エチル画分および マグノリンのメラニン合成促進活性を確認した。2 週間処理を続けたが、コントロールと比べて、皮膚の色に顕著な差は見られなかった。マウスにおいて黒化が確認できなかった理由は、酢酸エチル画分および マグノリンの処理方法が原因と考えられ、酢酸エチル画分およびマグノリンが効果的に皮膚に接触・浸透し続ける処理方法を検討する必要がある。

(4) 丁子エキスのメラニン合成促進能と活性成分の解析

辛夷エキスと同様に丁子エキスも高いメラニン合成促進活性を示すことを見出した。成分解析および活性評価の結果、酢酸エチル画分に含まれる精油成分やトリテルペン類に活性を見出し、それらが協調してメラニン合成を誘導している可能性を明らかにした。

(5) 天然化合物ライブラリーのスクリーニングから得られたメラニン合成促進成分

約 250 種の天然化合物を最終濃度 10 μM に調整しメラニン合成促進能を解析した。その結果、8 種の化合物がコントロール細胞に比べて約 3 倍量のメラニンを誘導した。このうち、シリビニン (silibinin)、ホノキオール (honokiol)、ペペリシン (hypericin) はメラニン産生調整に関する報告はなく、さらにシリビニンには顕著な細胞毒性が認められなかったことから更なる解析を行った。

(6) シリビニンのメラニン合成促進能とその作用機序解析

シリビニン(図5)は、マリアアザミの種子の主要成分であり、フラボノリグナンに属する。B16-F1 および HMV-II において、シリビニン処理により細胞内メラニン量が濃度依存的に増加した。シリビニンは細胞内 Tyr 活性を活性化し、Western Blot 法でのメラニン誘導に關する酵素群の解析の結果から、シリビニンは Tyr、TRP-1、TRP-2 のタンパク質発現を誘導することが明らかとなった(図6)。更なる解析の結果、シリビニンは PKA および p38 のリン酸化を誘導し、シリビニンにより活性化されたメラニン合成は、PKA 阻害剤 H89 および p38 阻害剤 SB203580 により抑制された。これらの結果より、PKA と p38 のリン酸化がシリビニンのメラニン合成に關与していることが示唆された(研究成果〔学会発表〕 参照)。

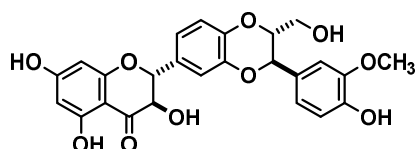


図5 シリビニンの化学構造

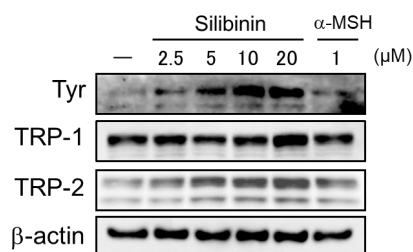


図6 B16-F1 におけるシリビニンの Tyr, TRP-1, TRP-2 発現への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Takuhiro Uto, Tomoe Ohta, Akihisa Yamashita, Shunsuke Fujii, Yukihiro Shoyama, Liquiritin and liquiritigenin induce melanogenesis via enhancement of p38 and PKA signaling pathways, *Medicines*, 査読有り、2019、6(2)、68.

DOI: 10.3390/medicines6020068

Shunsuke Fujii, Osamu Morinaga, Takuhiro Uto, Shunichi Nomura, Yukihiro Shoyama, Simultaneous determination of glycyrrhizin and liquiritin in licorice roots and Kampo medicines by combination enzyme-linked immunosorbent assay using anti-glycyrrhizin and anti-liquiritin monoclonal antibodies, *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 査読有り、2017、38(3)、285-298.

DOI: 10.1080/15321819.2016.1260586

藤井 俊輔、宇都 拓洋、正山 征洋、天然化合物特異的モノクローナル抗体を用いた薬用植物の品質評価法、*アグリバイオ*、2017、1(7)、62-65.

<https://www.molcom.jp/products/detail/115629/>

〔学会発表〕(計4件)

片山 幸樹、Bua Siritantiwat、宮嶋 祥吾、太田 智絵、宇都 拓洋、正山 征洋、シリビニンのメラニン合成誘導能とその作用機序解析、日本薬学会第138年会、2018年3月

Takuhiro Uto, Tomoe Ohta, Yukihiro Shoyama, (+)-Magnolin isolated from Magnolia flower activates melanogenesis; Involvement of p38 and PKA signaling pathways, *Food for Health International Conference 2017 (FOHIC2017)*、2017年10月、招待講演

宇都 拓洋、太田 智絵、Nguyen Huu Tung、Kasina Soitanasirikul、久住呂 美和、正山 征洋、辛夷から単離した(+)-Magnolin のメラニン合成誘導能とその作用機序解析、日本生薬学会第 64 回年会、2017 年 9 月

宇都 拓洋、白斑治療薬開発を目指した天然由来メラニン合成促進物質の探索および作用機序に関する研究、日本生薬学会第 64 回年会、2017 年 9 月、日本生薬学会学術奨励賞受賞講演

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：メラニン合成促進組成物

発明者：正山 征洋，宇都 拓洋，太田 智絵

権利者：長崎国際大学

種類：特許

番号：特願 2017-149066

出願年：平成 28 年

国内外の別：国内

〔その他〕

受賞

日本生薬学会 学術奨励賞、白斑治療薬開発を目指した天然由来メラニン合成促進物質の探索および作用機序に関する研究、2017 年 9 月

ホームページ等

研究室ホームページ研究成果 <http://niu.pharmacog.jp/achievement03.html>

researchmap <http://researchmap.jp/read0109923>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：正山 征洋

ローマ字氏名：(SHOYAMA, yukihiro)

研究協力者氏名：太田 智絵

ローマ字氏名：(OHTA, tomoe)

研究協力者氏名：藤井 俊輔

ローマ字氏名：(FUJII, shunsuke)

研究協力者氏名：グエン ヒュー トウン

ローマ字氏名：(NGUYEN, huu tung)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。