

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11000

研究課題名(和文) クロロゲン酸の皮膚再生における生理作用の解明

研究課題名(英文) Physiological activity of chlorogenic acid on skin regeneration

研究代表者

金澤 成行 (Kanazawa, Shigeyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50506243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はクロロゲン酸による皮膚再生の効果を明らかにすることを目的とする。まずは、クロロゲン酸を添加した群と非添加群(コントロール)に分け、24時間後の細胞数を比較した。クロロゲン酸はコントロール群と比べて、有意に線維芽細胞の増殖を認めた。そして、線維芽細胞をクロロゲン酸10 $\mu$ M刺激後、細胞増殖シグナルであるERK1/2やAktの活性化の状態を解析したところ、クロロゲン酸の刺激でAktの活性化を確認することができた。さらには、線維芽細胞に過酸化水素でのストレスを与えたうえで、クロロゲン酸10 $\mu$ Mで30分刺激した。クロロゲン酸は細胞死シグナルの代表であるJNKのリン酸化を抑制することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、糖尿病や高齢者が大幅に増加し、糖尿病性皮膚潰瘍、高齢者の褥瘡や皮膚剥離などの皮膚障害の発生率が急増し、慢性炎症の酸化ストレスによる皮膚の細胞死のため治癒が困難となっている。また、ヒト皮膚は日常的な紫外線による活性酸素の発生により皮膚がんの誘因にもなる。しかしながら、このような酸化ストレスに対する皮膚の防御機構は明らかになっていない。

本研究により、クロロゲン酸が、ヒト線維芽細胞の酸化ストレスを抑制し、細胞死を抑制することがわかった。これらの結果は、糖尿病や熱傷、放射線などの強いストレス下における創傷治癒を促進させる治療薬、紫外線の皮膚がん予防薬などの創薬につながる。

研究成果の概要(英文)：This study is intended to clarify effects on skin regeneration by Chlorogenic acid. At first, the group was divided into a group to which chlorogenic acid was added and a group to which no chlorogenic acid was added (control), and the number of cells after 24 hours was compared. Chlorogenic acid showed a significant proliferation of fibroblasts as compared with the control group. Then, after stimulating fibroblasts with 10  $\mu$ M chlorogenic acid, the state of activation of ERK1 / 2 and Akt, which are cell proliferation signals, was analyzed. As a result, activation of Akt was confirmed by stimulation with chlorogenic acid. Furthermore, the fibroblasts were stressed with hydrogen peroxide and then stimulated with 10  $\mu$ M chlorogenic acid for 30 minutes. Chlorogenic acid was able to suppress the phosphorylation of JNK, which is a representative of cell death signals.

研究分野：創傷治癒

キーワード：線維芽細胞 クロロゲン酸 皮膚再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病、がん、虚血性心疾患、脳血管疾患、高血圧、高脂血症などの生活習慣病の増加が大きな社会問題となっている。さらには、高齢者の増加に伴い、糖尿病性皮膚潰瘍、放射線治療による皮膚障害、高齢者の褥瘡や皮膚剥離などの皮膚障害の発生率が急増している。また、ヒトの皮膚は日常的に紫外線にさらされており、紫外線による活性酸素の発生 (= 酸化ストレス) は皮膚がんの誘因(死亡率は 20 年前の 2 倍、罹患率は 4 倍; 国立がん研究センター)にもなる。このような時代背景から、疾病の予防や治療を効果的に進めるためにも、生体調節機能に關与する機能性成分を有する食品についての関心が高まっている。なかでも、ポリフェノールなどの植物二次代謝成分は、様々な生体調節機能を示す代表的な機能性成分である。これらの成分を含む食品の摂取は、生活習慣病の予防や治療に繋がるのが期待され、多くの研究がなされている。ポリフェノールとは分子内に複数のフェノール性ヒドロキシ基を持つ植物成分の総称で、紫外線の酸化ストレスから自身を守るために、植物はポリフェノールを作り出している。なかでも、コーヒーに多く含まれているクロロゲン酸は他のポリフェノールと比べ強い抗酸化作用をもつ。そして、抗酸化作用だけでなく、多様な生理活性があることが報告されており、血糖降下作用、抗酸化作用、抗炎症作用、抗癌作用、細胞解毒作用など多岐にわたる。しかしながら、クロロゲン酸の皮膚における直接的な生理作用はいまだ不明である。そこで、このクロロゲン酸がヒト皮膚線維芽細胞の生存にどのような影響を与え、どのようにして酸化ストレスや慢性炎症の皮膚障害から皮膚を守り、そして皮膚の再生に貢献するのかを、本研究で究明する。

### 2. 研究の目的

クロロゲン酸の皮膚における酸化ストレスに対する応答、皮膚再生能力への貢献というのは全くの未知であり、それを明らかにすることが本研究の目的である。細胞の生死は細胞内の増殖シグナル・生存シグナルによって、運命づけられている。これらシグナルのうち、JNK ならびに p38-MAPK 経路は、紫外線、放射線、酸化ストレスや熱ショックといった様々なストレス刺激によって活性化され、細胞死の誘導といったストレス応答に關与している。細胞増殖においては、MAP キナーゼ経路のひとつである ERK1/2 や PI3-kinase/Akt 経路などが代表的な Pathway である。本研究は、これらのシグナルに焦点をあてて解析する。

本研究は、皮膚におけるクロロゲン酸の活性酸素(酸化ストレス)に対する応答と皮膚再生に対する役割を、細胞増殖・細胞死シグナルに焦点をあてながら、分子生物学的実験手法により明らかにするとともに、学術的な独自性がある。そして、本研究の成果を応用することで、糖尿病や熱傷、放射線などの強いストレス下においても皮膚の再生を促進させる治療薬、紫外線の皮膚がん予防薬などの創薬へと展開させていくことを考えている。

### 3. 研究の方法

#### 皮膚線維芽細胞の増殖におけるクロロゲン酸の影響について

ヒト皮膚線維芽細胞を 96 ウェルプレートに濃度  $1 \times 10^5$ /ml で培養し、クロロゲン酸を添加した群(0、1、10、100  $\mu$ M)と非添加群に分け、24 時間後の細胞数を比較する (cell proliferation assay)。さらに、セルカウンターを用いて、実際に細胞数を計測する。

#### 皮膚線維芽細胞の酸化ストレスによる細胞死におけるクロロゲン酸の影響について

本実験で細胞死を検出するのに、DNA 鎖分解物の標識法 (TUNEL) に基づく単一細胞レベルでの、アポトーシスを免疫組織化学的に検出する In Situ 細胞死検出キット TMR red (Roche) を用いる。皮膚線維芽細胞を培養し、過酸化水素を加え (0.5mM)、酸化ストレスを与えることで、細胞死を促す。そこに、クロロゲン酸 (10  $\mu$ M) を加え、24 時間後のタネル染色陽性細胞の数を測定する。評価はタネル染色陽性細胞数 / 全ての細胞数で行う。

#### クロロゲン酸が細胞増殖シグナルに与える影響について

線維芽細胞をクロロゲン酸 10  $\mu$ M で 30 分刺激後、細胞増殖シグナルである ERK1/2 や Akt の活性化の状態をウエスタンブロッティング法 (あるいは ELISA 法) で解析する。また、これらのタンパクのシグナル下流には、様々な分子 (CREB、GSK など) が存在するが、U0126 (ERK 阻害剤)、LY294002 (PI3-kinase 阻害剤) を用いることで、クロロゲン酸のシグナルに關与している分子を同定する。同様の実験を、過酸化水素を加え (0.5mM) 酸化ストレスを与えた条件でも行う。

#### クロロゲン酸が細胞死シグナルに与える影響について

線維芽細胞をクロロゲン酸 10  $\mu$ M で 30 分刺激した後、細胞死シグナルの代表である JNK や p38-MAPK の蛋白活性化の状態をウエスタンブロッティング法 (あるいは ELISA 法) で解析する。同様の実験を、過酸化水素を加え (0.5mM) 酸化ストレスを与えた条件でも行う。

### 4. 研究成果

皮膚線維芽細胞の増殖におけるクロロゲン酸の影響について；  
ヒト皮膚線維芽細胞を 96 ウェルプレートで培養し、クロロゲン酸を添加した群 (0、1、10、100  $\mu\text{M}$ ) と非添加群 (コントロール) に分け、24 時間後の細胞数を比較した。クロロゲン酸 1、10、100  $\mu\text{M}$  においてコントロール群と比べて、有意に線維芽細胞の増殖を認めた。しかしながら、これ以上の濃度においては、有意な増殖は認めなかった。したがって、細胞増殖における適したクロロゲン酸濃度は 1 ~ 100  $\mu\text{M}$  の幅におさまることがわかった。

皮膚線維芽細胞の酸化ストレスによる細胞死におけるクロロゲン酸の影響について；  
まず、皮膚線維芽細胞を培養し、過酸化水素を加え (0.5mM) 酸化ストレスを与えることで、細胞死を促した。そこに、クロロゲン酸 (10  $\mu\text{M}$ ) を加え、24 時間後のタネル染色 (細胞死の検出) 陽性細胞の数を測定したところ、クロロゲン酸 (10  $\mu\text{M}$ ) を加えた群では、有意に細胞死の減少を認めた。以上の結果から、クロロゲン酸は皮膚線維芽細胞の増殖を促す、さらには、酸化ストレス下において、皮膚線維芽細胞の細胞死を抑制することが示唆された。

クロロゲン酸が細胞増殖シグナルに与える影響について；  
細胞の生死は細胞内の増殖シグナル・生存シグナルによって、運命づけられている。細胞増殖においては、MAP キナーゼ経路のひとつである ERK1/2 や PI3-kinase/Akt 経路などが代表的な Pathway である。線維芽細胞をクロロゲン酸 10  $\mu\text{M}$  刺激後、細胞増殖シグナルである ERK1/2 や Akt の活性化の状態をウエスタンブロッティング法で解析したところ、クロロゲン酸の刺激で Akt の活性化を確認することができた。また、LY294002 (PI3-kinase 阻害剤) を用いると Akt の活性化の減弱を認めた。以上から、クロロゲン酸のシグナルに関与している分子の一つが Akt であること同定できた。

クロロゲン酸が細胞死シグナルに与える影響について；  
細胞の生死は細胞内の増殖シグナル・生存シグナルによって、運命づけられている。線維芽細胞をクロロゲン酸 10  $\mu\text{M}$  で 30 分刺激した後、細胞死シグナルの代表である JNK や p38-MAPK の蛋白活性化の状態をウエスタンブロッティング法で解析した。まずは、細胞を酸化ストレス下におかない条件下で JNK や p38-MAPK の蛋白活性化を調べたところ、クロロゲン酸 10  $\mu\text{M}$  の有無では有意差は認められなかった。次に、線維芽細胞に過酸化水素でのストレスを与えたうえで、クロロゲン酸 10  $\mu\text{M}$  で 30 分刺激した後、同様に細胞死シグナルの代表である JNK や p38-MAPK の蛋白活性化を解析した。クロロゲン酸は JNK のリン酸化を抑制することができた。つまり、クロロゲン酸は細胞シグナルの一つである JNK の活性化を防ぐことで、皮膚線維芽細胞を酸化ストレスから防御する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	峯岸 芳樹  (Minegishi Yoshiki)  (10467566)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教   (13401)	
研究分担者	富田 興一  (Tomita Koichi)  (90423178)	大阪大学・医学系研究科・准教授   (14401)	
研究分担者	馬込 卓弥  (Magome Takuya)  (20769731)	大阪大学・医学系研究科・招へい准教授   (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関