

平成 23 年 2 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700370
 研究課題名(和文) 白髪予防薬剤の作製に有効なモデル動物の開発および薬物選別の実践

研究課題名(英文) Screening of anti-hair graying drugs

研究代表者

飯田 真智子 (IIDA MACHIKO)
 中部大学・生命健康科学研究所・研究員
 研究者番号：60465515

研究成果の概要(和文)：白髪は老化の象徴であり、ストレスや健康状態を反映するバロメータでもある。白髪を予防できれば、若々しく活動的な生活を送る事ができる。しかし、これまでに画期的な白髪予防剤は開発されていない。そこで、培養細胞(*in vitro*)およびマウス(*in vivo*)試験系を用いて、約 3000 種類の植物エキス及び植物由来化合物から、白髪予防・治療剤スクリーニングを行った。その結果、ある構造的特徴をもつ化合物およびそれを含む植物抽出液を塗布したマウスで白髪予防効果がみられることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Hair graying is an obvious sign of human aging and also recognized as a barometer of health (i. e. nutrition, stress or immunity). Therefore, preventing hair graying may give us the appearance of having a healthy and active lifestyle. Although the mechanisms of hair graying have been reported for decades, anti-hair graying drugs are not yet developed. In this study we selected anti-hair graying drugs (in vitro and in vivo methods) from around 3000 kinds of plant extracts or chemicals.

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	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：毛髪科学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

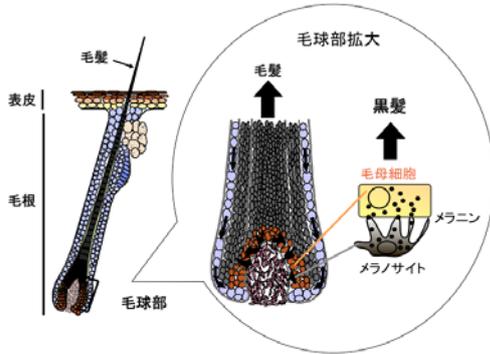
①白髪予防剤

日本人女性のアンケートでは、「最も気になる毛髪の悩み」は白髪である。白髪関連製品の日本市場は年間 1000 億円にのぼり、世界

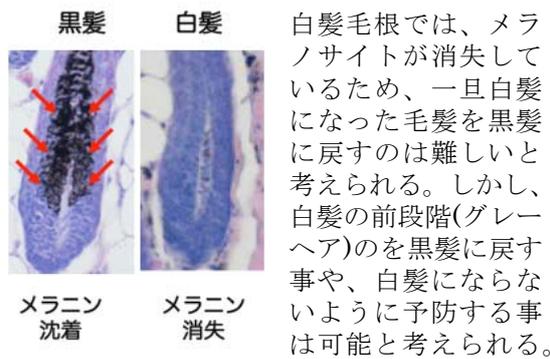
市場は年間 1 兆円を超えると推測される。既に白髪予防・治療効果をうたった化粧品は、少なからず存在する。しかし、科学的に証明されているものはほとんどないのが現状である。

②毛髪の色は、毛根に存在するメラノサイトが産生するメラニン色素によって作られる(図1)。しかし、加齢とともに、メラノサイトの供給源であるメラノサイト幹細胞の減少、メラノサイトのメラニン産生能が低下することにより、徐々に白髪が発症する(図2)。

(図1)



(図2)



2. 研究の目的

白髪予防剤を開発するために、培養メラノサイトを用いた1次スクリーニング、および、白髪発症マウスを用いた1次スクリーニングを行う事により、約 3000 種類の植物エキス及び植物由来化合物から、白髪予防効果のある薬剤選別することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)培養メラノサイトを用いた1次スクリーニング(白髪遺伝子のプロモーター活性による選別)

①ベクターの構築

ヒトゲノムDNAを鋳型としてヒトMITF-M遺伝子のプロモーター領域(-395bp ~ +128)を下記プライマーを用いたPCRにより増幅した(図3)。

(図3) 使用したプライマーの配列

Forward : AGTCATCCTGCAGTCGGGAAGTGGC
Reverse : GGATACCTTGTATTATAGTACCTTC

②遺伝子導入

ヒトのメラノサイト細胞株であるSK-Mel-28細胞にInvitrogen社のLipofectamine™ LTXを用いて白髪関連遺伝子を対象に遺伝子導入を行った(図4)。遺伝子導入から24時間後、96穴培養ディッシュに1ウェルあたり 1×10^4 細胞ずつ播種した。翌日、試験薬剤を加えた培地に置き換え、さらに24時間培養した。細胞を $1 \times$ Passive Lysis Buffer (Promega)中で懸濁し溶解した。細胞溶解後、Luciferase Assay Bufferを加え、プレートリーダーにて、Fireflyルシフェラーゼ活性を測定した。さらに1ウェルあたり30 μ LのStop&Glo® Bufferを加えFireflyルシフェラーゼを不活性化したのち、Renillaルシフェラーゼ活性を測定した。試験薬剤を添加したときの、ルシフェラーゼ活性を溶媒のみを加えたルシフェラーゼ活性と比較することで、試験薬剤が白髪関連遺伝子のプロモーター活性に与える影響を調べた。

図4 Lipofectamine LTXを用いた遺伝子導入
(6 cmディッシュ1枚あたり)

Opti-MEM 1.0 mL
pMITF-M-Firefly Luciferaseベクター 2.7 μ g
pEF1 α -Renilla Luciferaseベクター 1.0 μ g
PLUS試薬 5.0 μ L
Lipofectamine LTX 12.5 μ L

(2)モデルマウスを用いた選別

①(1)の培養細胞レベルで選別された試験物質を白髪発症マウスに塗布し、個体レベルでの白髪予防効果を検証した。薬剤塗布には、3週齢のモデルマウスを用いた。マウスの背側部分の毛をシェーバーで剃った後、薬剤を塗布した。ネガティブコントロールとして、溶媒である70%エタノールを用いた。マウスは種類の薬剤につき、5匹以上を用いて解析した。塗布は、1週間に連続5日間行った。

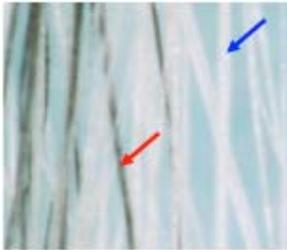
②色彩色差計を用いた判定法

薬物を塗布した後の体毛を回収し、世界的な色彩基準であるL*値を色彩色差計(コニカミノルタCR400)により白髪予防効果を客観的に評価した。

③白髪率の計算

剃毛した毛をプレパラート標本とし、顕微鏡下で白毛と黒毛の本数を数えた。また、毛髪中のメラニン分布を観察した(図5)。

(図 5)



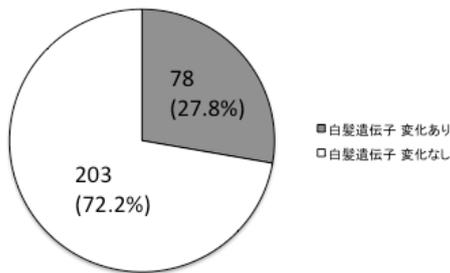
赤矢印：黒髪
青矢印：白髪

4. 研究成果

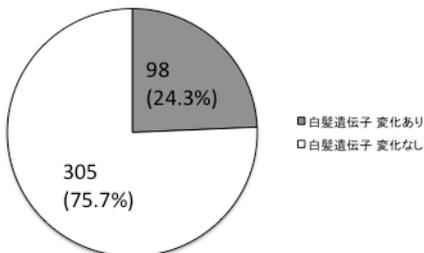
(1)培養細胞を用いたスクリーニングの結果植物エキス約 400 種および化合物約 2500 種を用いて、上記方法により白髪遺伝子プロモーター活性に与える影響を検討した。

- ① 植物エキスでは、約 28%が白髪予防遺伝子の発現に変化を及ぼした(図 6)
- ② 化合物では、約 24%が白髪予防遺伝子の発現に変化を及ぼした(図 7)。
- ③ 化合物の中でも、抗老化作用が期待されているフラボノイドに着目すると、約 28%で白髪予防遺伝子の発現に変化を及ぼした(図 8)。
- ④ 一方、フラボノイド以外の物質では、約 16%が白髪予防遺伝子の発現に変化を及ぼした(図 9)。

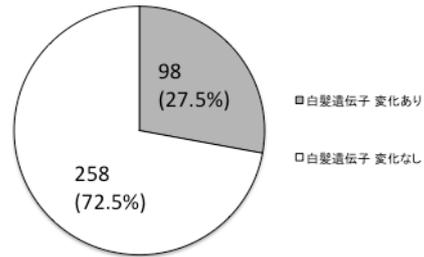
(図 6)



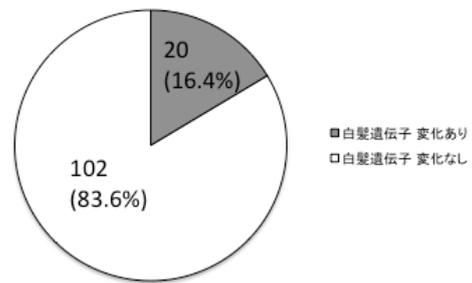
(図 7)



(図 8)



(図 9)



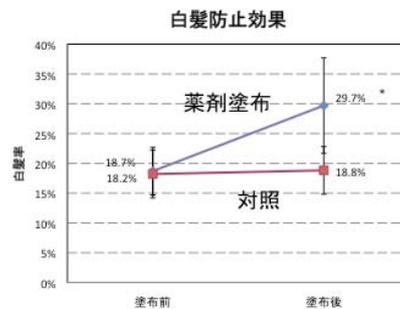
尚、具体的な抽出物名および化合物名は、特許出願準備中である。

(2)モデルマウスによる選別

①(1)の培養細胞において選別された試験物質について、特許性や新規性および安全性を評価し、約 5 種類の候補物質を絞り込んだ。

②現時点で、マウス皮膚に塗布して 1 ヶ月が経過した。この時点でも、試験薬剤の塗布により、有意に白髪を予防できる事がわかった(図 10)。

(図 10)



(総括)

(1) 本研究により、細胞レベルおよびマウス個体レベルにおける白髪予防剤のスクリーニング方法を確立することが出来た。

- (2) 細胞レベルでは、植物エキスあるいは化合物それぞれ約 90 種類の候補物質を選別できた。
- (3) 個体レベルでの白髪予防効果を一部得る事ができた。この事は、このスクリーニング方法の妥当性を示しているとも言える。
- (4) 今後、残りの候補物質について、マウスレベルでの試験を行うとともに、その効果の組織学的・分子学的を行う予定である。
- (5) 世界的にみても白髪予防剤はほとんど存在しないため、本研究成果が社会的に与えるインパクトは非常に大きいと考えられる。今後、企業との共同研究により、ヒトへの応用に向けた安全性試験および製品化のステップに進む予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 真智子 (IIDA MACHIKO)
中部大学・生命健康科学研究所・研究員
研究者番号：60465515

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし