

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33906

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580193

研究課題名(和文)ポリメトキシフラボノイドの角化誘導作用と表皮機能再生効果の検証

研究課題名(英文)Nobiletin, a polymethoxylated flavone from citrus peels, induces differentiation of normal human epidermal keratinocytes

研究代表者

大口 健司(Ohguchi, Kenji)

椋山女学園大学・生活科学部・准教授

研究者番号：80359257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：柑橘類にはフラボノイドの水酸基がメトキシ基に置換された“ポリメトキシフラボノイド”と呼ばれる一群の化合物類が含まれている。その代表的な化合物であるNobiletin(ノビレチン)の新規機能性として皮膚構成細胞の表皮細胞に対する角化誘導作用を見出した。Nobiletinによる角化誘導作用の分子メカニズムについて、Nobiletin類縁化合物を用いて分子構造と生物活性の関係を調べるとともに、Nobiletinが表皮細胞の細胞内シグナリングに与える作用を解析した。また、ヘアレスマウスを用いた表皮バリア機能障害モデルにおいて、Nobiletinの表皮機能再生効果(表皮バリア回復促進作用)を実証した。

研究成果の概要(英文)：Nobiletin, a polymethoxylated flavone from citrus peels, is known to have a wide range of pharmacological activities. In this study, we examined the effects of nobiletin on differentiation of human epidermal keratinocytes. We examined the effects of several polymethoxyl flavones of Citrus on induction of differentiation. Our present findings suggest that the presence of two methoxyl groups on the B ring appears to be critical for the differentiation-inducing effect. In addition, the results obtained here provide possible evidence that the activation of ERK/CREB signaling in part mediates improvement of differentiation of human epidermal keratinocytes induced by nobiletin.

Furthermore, the effects of topical application of nobiletin on the epidermal barrier recovery rate after barrier disruption by tape stripping were evaluated. Immediately after tape stripping, nobiletin accelerated the barrier recovery on hairless mouse skin.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物有機化学

キーワード：生物活性物質 細胞機能調節物質 ノビレチン 表皮細胞 角化

1. 研究開始当初の背景

我々は日常の食生活の中で、野菜や果物等からポリフェノール類をはじめとする種々の機能性成分を摂取している。ミカン属 (Citrus) にはフラボノイドの水酸基 (-OH) がメトキシ基 (-OCH₃) に置換されたポリメトキシフラボノイド (ポリメトキシフラボン) と呼ばれる一群の化合物が特異的に含まれている。その代表的な化合物である Nobiletin (ノビレチン) には、抗ガン作用、メタボリックシンドローム改善作用、抗炎症作用、認知症予防作用など多彩な生物活性があることがわかってきており、高機能性食品因子として注目されている。

申請者はこれまでに、種々の培養細胞系を用いた Nobiletin の機能性探索を精力的に進めており、神経細胞系における酸化ストレス傷害軽減作用や好塩基球細胞系における脱顆粒抑制作用などを報告した。そして最近、新たな機能性として皮膚の主要細胞である表皮角化細胞に対する強力な角化誘導作用を見出した。体表を覆う表皮角化細胞は、皮膚最外層のターンオーバーに関わっており、活発に増殖と角化を繰り返すユニークな特色をもっている。ヒト正常表皮角化細胞に Nobiletin を添加すると、形態学的な変化を伴いながら角化固有のマーカーである keratin 10 (角化型ケラチン) や involucrin (エンペロップ蛋白質) の発現が著明に上昇することを確認している。

2. 研究の目的

本研究課題は、培養細胞系で Nobiletin をはじめとする数種類のポリメトキシフラボノイドの角化誘導作用について、構造活性相関解析を行うとともに、これらの化合物が作用する細胞内シグナル伝達経路を解明する。

さらに、表皮の最も重要な役割であるバリア機能に障害をもたらした実験動物モデルを用いて、in vivo におけるポリメトキシフラボノイドの表皮機能再生効果を検証し、機能性食品成分の新たな可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) ポリメトキシフラボノイドの機能性研究は Nobiletin を中心に行われているが、天然にはメトキシ基の数や位置の違いのみならず、特定箇所のメトキシ基が水酸基になった化合物など多様なポリメトキシフラボノイドが存在する。メトキシ基の数や位置が異なる化合物ならびに水酸基をもったヒドロキシタイプの化合物など、数種類のポリメトキシフラボノイド (天然品および合成品) について、角化誘導活性をヒト表皮角化細胞を用いて評価する。構造活性相関解析は、細胞固有の角化マーカー (ケラチンやエンペロップ蛋白質など) を指標に、メトキシ基の数、メトキシ基の結合位置、官能基の違い (メトキシ基と水酸基) による活性の差違について検討する。

(2) 表皮角化細胞の角化過程は、様々な細胞内シグナル伝達分子によって厳密にコントロールされている。各々のシグナル分子の活性化 (リン酸化) や発現量に対するポリメトキシフラボノイドの影響を、ウエスタンブロット法などを用いて詳細に調べていくことにより、ポリメトキシフラボノイドのターゲットとなっているシグナル伝達経路を特定していく。さらに、siRNA や特異的阻害剤を用いて、ポリメトキシフラボノイドのエフェクターとして角化のスイッチング機構に深く関与する分子を同定する。

(3) 皮膚の諸機能の中でも、表皮がもつバリア機能は、生体の水分保持と調節において重要な役割を担っている。テープストリッピング法により、表皮バリア機能を一過性に破壊することができる。HR-1 ヘアレスマウス (雌性、10 週齢) の背部に粘着テープ (幅 10mm のセロハンテープ) を密着させたのち、それをはがすことにより角質層を剥離した。この操作を同一部位で数回繰り返し、角質層を除去した後、ポリメトキシフラボノイドを被験部位に塗布して、バリア修復能に与える影響を調べた。表皮バリア機能の解析は、経皮水分蒸散量 (Transepidermal water loss、以下 TEWL と略) を測定することにより行った。TEWL の測定には、テヴァメーター (Covrage and Khazaka, Germany) を用いる。

4. 研究成果

(1) 分化誘導活性を指標としたポリメトキシフラボノイドの構造活性相関解析

ポリメトキシフラボノイドの機能性研究は Nobiletin を中心に行われているが、天然にはメトキシ基の数や位置の違いのみならず、特定箇所のメトキシ基が水酸基になった化合物など多様なポリメトキシフラボノイドが存在する。そこで、メトキシ基の数や位置が異なる化合物ならびに水酸基をもったヒドロキシタイプの化合物など、種々のポリメトキシフラボノイド化合物の角化誘導活性についてヒト正常表皮角化細胞を用いて評価した。その結果、ポリメトキシフラボノイドは構造上二つのベンゼン環 (A 環および B 環) を有するが、表皮角化細胞に対する角化誘導作用は A 環ではなく B 環のメトキシ基の数が大きく影響することを見出し、評価した化合物の中で Nobiletin が最も強い作用を示した。その作用について、表皮角化細胞の角化誘導刺激として知られる高カルシウム (CaCl₂) 添加と比較した。角化マーカーとして keratin 10 および Involucrin のタンパク質発現誘導パターンを調べたところ、カルシウム刺激は keratin 10 よりも Involucrin 発現を強く誘導するのに対し、Nobiletin は Involucrin よりも keratin 10 発現を強く誘導した。これらの結果は Nobiletin の角化誘導メカニズムはカルシウムとは異なり、ケラ

チンの発現調節が優位である可能性を示唆した。

(2) ポリメトキシフラボノイドの細胞内シグナリング解析

ヒト表皮角化細胞に Nobiletin を添加すると、角化マーカー keratin 10 の発現が著明に上昇するが、その分子メカニズムは不明であった。そこで、Nobiletin による keratin 10 発現誘導作用について、転写因子 cAMP-responsive element binding protein (CREB) を中心に、その活性制御に関わる細胞内シグナリングを解析した。表皮角化細胞における CREB 発現について siRNA を用いてノックダウンしたところ、Nobiletin による K10 発現誘導作用が抑制された。CREB は、リン酸化されると活性化されるが、Nobiletin 添加 2 時間後から CREB のリン酸化が亢進される様子が示された。CREB のリン酸化は、種々のタンパクリン酸化酵素によって厳密にコントロールされることが知られている。そこで、Nobiletin による CREB のリン酸化が、どのシグナル経路を使っているかを調べるため、特異的な阻害剤を用いた手法により検討した。Protein kinase A (PKA)、Extracellular Signal-regulated kinase (ERK)、P38 MAP kinase (p38)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、PI3 kinase (PI3K)、Calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) に対するそれぞれの阻害剤の影響を調べた結果、ERK 阻害剤を予め添加した細胞において、Nobiletin による CREB のリン酸化が抑制された。また、Nobiletin は ERK のリン酸化を誘導し、その経時変化は CREB のリン酸化と一致した。すなわち、Nobiletin による keratin 10 発現誘導作用に ERK-CREB シグナリングが関与する可能性が示唆された。

(3) 表皮バリア機能障害モデル系におけるポリメトキシフラボノイドの作用解析

皮膚の諸機能の中でも、表皮がもつバリア機能は、生体の水分保持と調節において重要な役割を担っている。そこで、ヘアレスマウス (HR1) を用いた表皮バリア機能障害モデルにおける Nobiletin の表皮機能再生効果 (表皮バリア回復促進作用) を in vivo で検証した。表皮バリア回復へ与える影響を検証するためには、何からの方法により一過性に表皮バリアを破壊する必要がある。本研究では、テープストリッピング法 (粘着テープを皮膚に貼り付け、それを剥がすことで角質細胞をテープに写しとる方法) によって、一過性に表皮バリア機能を低下させたモデル動物系を用いた。角質層は、角質細胞から成る薄い層がパイ生地のように重層している (マウスは約 10 層)。ヘアレスマウス背部皮膚の同一箇所においてテープストリッピングを繰り返し行いながら、テヴェメーターによって TEWL (経皮水分蒸散量) 値を測定した結果、ストリッピング回数が 5 回以上になると急激

に TEWL が上昇した。その後、8 回のストリッピングによって TEWL 値はほぼプラトーに達した。すなわち、最上層から 5~8 層目の角質層が強固なシート構造を形成し、バリアとして重要な役割を担っていることが示唆された。また、8 回のストリッピングによってバリアを破壊した後、経時的に TEWL を測定したところ、測定値は徐々に低下し、角質層が修復されバリアが回復していく過程がみられた。次に、表皮バリア回復に与える Nobiletin 塗布の影響を調べた。8 回のテープストリッピングを行いバリアを破壊した直後から、1 日 3 回 Nobiletin を塗布した。テープストリッピング直後の TEWL 値を 0%、テープストリッピング前の値を 100% として、各測定時間における TEWL の値からバリア回復率を算定した。その結果、塗布 24 時間後において、コントロール群はバリア回復が遅れたのに対し、Nobiletin 塗布群では回復を促進させた。

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 1 件)

K. Ohguchi, M. Iinuma, Y. Nozawa, M. Ito
Nobiletin, a polymethoxylated flavone from citrus peels, induces differentiation of normal human epidermal keratinocytes. (submitted)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大口 健司 (OHGUCHI Kenji)
椋山女学園大学・生活科学部・准教授
研究者番号：80359257

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：