

皮膚の老化予防を目的としたコラーゲンのAGE化阻害物質の探索

熊本大学医学薬学研究部

藤原 章雄

N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine (CML) is an advanced glycation end-product (AGE) that was known as one of major AGEs in hydrolysate of glycated collagen. Subsequently, CML was also detected in human serum, and its level in patients with diabetes was found to be higher than in normal subjects. Furthermore, it is known that AGE-collagen induces apoptosis in fibroblasts through activation of reactive oxygen species and MAP kinases. Therefore, treatment with AGEs inhibitors may be a potential strategy for the prevention of clinical diabetic complications and skin aging. In the present study, we investigated the inhibitory effect of natural compounds on CML formation to discover the candidate agents for the new AGE inhibitors. In this screening, rutin, astragaloside, quercetin and gallic acid showed significant inhibitory effect on CML formation during incubation of collagen with ribose, thus those compounds may be candidates for the new AGE inhibitors.

1. 緒言

我々は、当研究室が保有する天然化合物ライブラリーを用いて、健康維持や疾病予防に有効な「機能性天然薬物」の探索研究を行っており、これまでに、抗動脈硬化作用を有するトマト新規配糖体や、メタボリックシンドロームを改善するリンゴ由来トリテルペン、高血圧を予防する杜仲葉由来イリド配糖体などを発見してきた¹⁾。

さらに近年、この研究の一環として、糖尿病合併症や動脈硬化症、皮膚老化などの老化性疾患の発症や進展に関与する Advanced glycation end products (AGEs) の生成を阻害する天然化合物の探索を行っている。AGEs とは、還元糖とタンパク質の非酵素的な反応であるメイラード反応によって生じる最終生成物の総称であり、このメイラード反応は、グルコースなどの還元糖とタンパク質のアミノ基が反応してアマドリ転位物を形成する前期反応と、アマドリ転位物が酸化、脱水、縮合、転位などの反応を経て、AGEs 構造体へと変化する後期反応からなる。現在、AGEs 構造体としては、約20種が知られており、その中でも主要な AGEs 構造体である N^{ϵ} -(carboxymethyl) lysine (CML) は、糖尿病合併症の病変部位や動脈硬化巣のみならず、肺線維症の肺胞マクロファージなどでも蓄積することが報告されている²⁾。さらに、コラーゲンに生成する CML と病態との関連についても、様々な報告がなされており、例えば、CML 化コラーゲンは骨を形成する骨芽細胞のアポトーシスを誘導することで骨形成を阻害し、こ

の現象は骨粗鬆症の原因の一つであると考えられている³⁾。また、コラーゲンの CML 化は、表皮に存在するケラチノサイト(角化細胞)の遊走やコラーゲンへの接着能を低下させることから、糖尿病患者における創傷治癒の遅延には、コラーゲンの CML 化が関与していることが示唆されている⁴⁾。

コラーゲンは、皮膚の真皮において線維芽細胞から産生され、真皮の70%以上を構成するタンパク質であり、このコラーゲンが線維芽細胞に引っ張られることで肌の張りが保たれている。しかし、CML がコラーゲンに蓄積すると、CML 化コラーゲンが RAGE (receptor for AGE) を介して Caspase 経路や MAP kinase 経路を活性化し、線維芽細胞をアポトーシスさせることが報告されている^{3,5)}。すなわち、AGEs は線維芽細胞のアポトーシスを誘導することによって肌の張りの低下といった皮膚老化を促進すると考えられる。

そこで、本研究では、皮膚老化予防に対する新たなターゲット分子として CML に注目し、当研究室が保有する天然化合物ライブラリーを用いて、CML 生成阻害化合物の探索を行った。

2. 実験方法

2-1. 試験化合物

本研究で用いた天然物化合物は、当研究室が保有するライブラリー化合物に含まれる代表的な植物由来二次代謝産物(アルカロイド、テルペノイド、フラボノイドなど)であり、計96種を選出して用いた。

2-2. CML 生成阻害試験

リブース (30mM) とゼラチン (2mg/mL) もしくは、I 型コラーゲン (1.5mg/ml) の混合溶液を 37°C で7日間インキュベートすることで CML が生成する条件下に、DMSO に溶解した天然化合物 (100 μ M) を添加し、CML 生成に



Search for natural compounds inhibiting AGE formation for preventing skin aging

Yukio Fujiwara

Department of Cell Pathology, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

対する阻害作用を、抗CML抗体を用いたELISA法にて評価した。

2- 3. ELISA

ELISAによるCML含量の評価は、Nagaiらの方法に準じて行った⁶⁾。リボース-ゼラチン(10 μ g/ml)を96穴プレートにコーティングし、0.05%Tween 20を含むPBS(washing buffer)で3回洗浄後、0.5%ゼラチンにてブロッキングを行った。各wellをwashing bufferで洗浄し、抗CML抗体(6D12)を添加後、1時間インキュベートした。各wellを洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体と1時間インキュベートし、最後にOPDにて発色反応後、1Mの硫酸にて反応を停止した。各wellの492nmにおける吸光度をmicro-ELISA plate readerにより測定した。

2- 4. 繊維芽細胞の3次元培養

ヒト真皮線維芽細胞は、JCRB細胞バンクより購入した。ヒト真皮線維芽細胞(4.0 \times 10⁵ cells/well)を培地で懸濁させた溶液に、I型コラーゲン溶液を加え、培養チャンバー内で培養することで、I型コラーゲンマトリックスに線維芽細胞を包埋した。2日後、凝固したマトリックスを培養チャンバーより剥離し、8日間培養後することで、正常に収縮するマトリックスを形成させた。

2- 5. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットによるMAPキナーゼの活性化の評価は、これまでの報告に準じて行った⁵⁾。37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートした各種コラーゲン溶液(I型コラーゲン溶液、リボース-I型コラーゲン溶液、天然化合物を添加したリボース-I型コラーゲン溶液)にて、3時間刺激したヒト真皮線維芽細胞を回収し、lysis bufferを用いて細胞を溶解させた。電気泳動には、10%ポリアクリルアミドゲルを用いた。また、一次抗体は、Rabbit monoclonal anti-Phospho-p38 antibody, Rabbit polyclonal anti phospho-(JNK1+JNK2) antibody, Mouse monoclonal anti- β -actin antibodyを用いて行った。

2- 6. 免疫組織化学染色

37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートした各種コラーゲン溶液(I型コラーゲン溶液、リボース-I型コラーゲン溶液、天然化合物を添加したリボース-I型コラーゲン溶液)にて刺激したヒト真皮線維芽細胞を4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィンにて包埋した。続いて、パラフィン切片を作製後、定法により抗CML抗体(6D12)およびRabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 antibodyを用いた免疫染色を行った。

3. 結果

3- 1. CMA生成阻害作用を有する天然化合物のスクリーニング

1次スクリーニングとして、リボースとゼラチン(可溶性コラーゲン)を用いたCML生成阻害試験系にて、96種の天然化合物のCML生成阻害作用を評価した。方法としては、リボース(30mM)とゼラチン(2mg/mL)の混合溶液を37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートすることでCMLが生成する条件下に、天然化合物(100 μ M)を添加し、CML生成に対する阻害作用を、抗CML抗体を用いたELISA法にて評価した。その結果、rutin, astragalín, chlorogenic acidを含む10種の化合物が有意なCML生成阻害試験作用を示した(Fig. 1A)。次に、2次スクリーニングとして、リボースとI型コラーゲンを用いたCML生成阻害試験系にて、1次スクリーニングで阻害作用の認められた10種の化合物の効果を同様に評価した。その結果、rutin, astragalín, quercetin, gallic acidの4種類の化合物に顕著なCML生成阻害作用が認められた(Fig. 1B and C)。

3- 2. 線維芽細胞の三次元培養を用いた皮膚老化予防作用の検討

肌の張りは、真皮中に存在する線維芽細胞がコラーゲンを引っ張ることで保たれている。通常、正常なコラーゲンマトリックス中で線維芽細胞を培養すると、線維芽細胞がI型コラーゲンを引っ張り引き締めることで弾力のある真皮類似構造を形成し、マトリックスの収縮が観察されるが、CML化コラーゲンマトリックス中では、その収縮率が低下する。そこで、上記のスクリーニングで得られた4種(rutin, astragalín, quercetin, gallic acid)のCML生成阻害化合物を添加したコラーゲンを用いて、マトリックスの収縮に対する効果を検討した。方法としては、ヒト真皮線維芽細胞(4.0 \times 10⁵ cells/well)を培地で懸濁させた溶液に、Native-collagen溶液、CML-collagen溶液(riboseとnative-collagenの混合溶液を7日間インキュベートしたもの)もしくは、CML生成阻害化合物で処理したcollagen溶液(CML-collagenを調製する条件下にCML生成阻害化合物を添加したもの)を加え、培養チャンバー内で培養することで、コラーゲンマトリックスに線維芽細胞を包埋した。2日後、凝固したマトリックスを培養チャンバーより剥離し、8日間培養後に収縮したマトリックスの直径を測定することで評価した。その結果、CML-collagenを用いたマトリックスではnative-collagenを用いた場合に比べて、その収縮率が低下し、その収縮率の低下は、CML生成阻害化合物により改善された(Fig. 2)。

前述したように、rutin, astragalín, quercetin, gallic acidは、コラーゲンのCML化により低下したマトリックスの

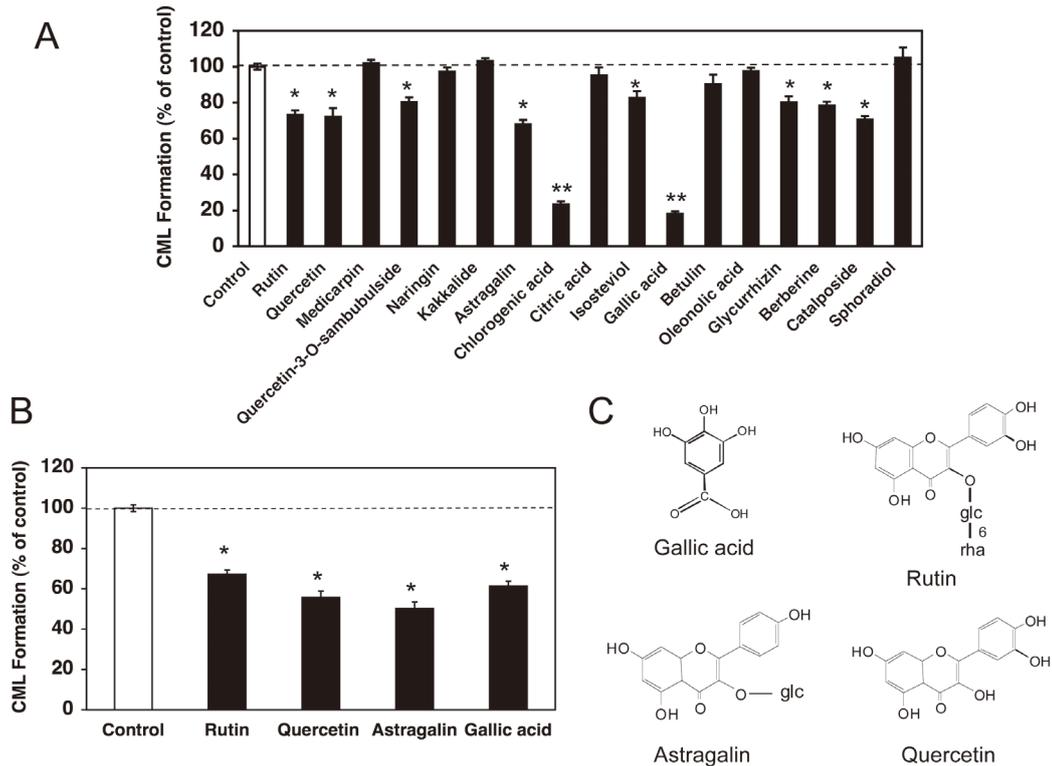


Fig. 1 Effect of Natural compounds on CML formation. (A) Gelatin (2mg/mL) and ribose (30mM) were incubated with natural compounds (100 μ M) in 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. (B) Type I collagen (1.5mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with natural compounds (30 μ M) in 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CMA content was determined by noncompetitive ELISA. (C) Structures of natural compounds inhibiting CML formation. Data are presented as the mean \pm SD. *, $P < 0.01$, **, $P < 0.001$ vs. control.

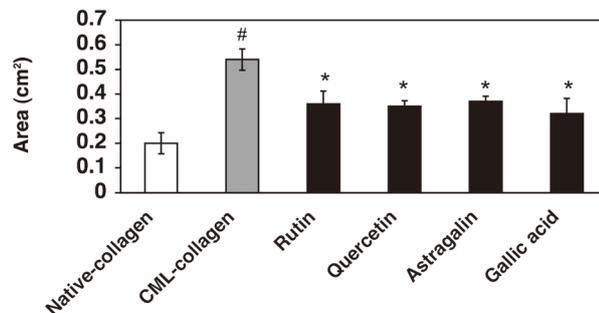


Fig. 2 Effect of Natural Compounds on Contraction of Collagen Matrix. Fibroblasts (4.0×10^4 cells/well) were cultured in type I collagen matrix for 12 days. Data are presented as the mean \pm SD. #, $P < 0.005$ vs. Native-collagen, *, $P < 0.005$ vs. CML-collagen.

収縮率を改善したため、その改善作用がCML生成阻害作用によるものであるかを確認するために、マトリックス中のCML含量を、抗CML抗体を用いた免疫染色により評価した。その結果、マトリックスの収縮率が低下したコントロールではCMLの蓄積が確認され、その蓄積は、rutin, astragalol, quercetin, gallic acidの添加により抑制されていた (Fig. 3)。ゆえに、rutin, astragalol, quercetin, gallic acidによるマトリックス収縮改善作用は、これら化合物のCML生成阻害作用によることが示唆された。また、マトリックス中の線維芽細胞の形態を、HE染色によって確認

したところ、CML化コラーゲン中では、線維芽細胞の形態が丸くなり、Native collagenと比較して、明らかに細胞死が誘導されていた (Fig. 4)。一方、CML生成阻害化合物 (rutin, astragalol, quercetin, gallic acid) を添加したマトリックス中の線維芽細胞は、Native collagenと比較して変化の無い正常な形態であった (Fig. 4)。さらに、カスパーゼ3の活性化を免疫染色により評価したところ、CML-collagenでは、カスパーゼ3は活性化しており、その活性化はCML生成阻害化合物により抑制された (Fig. 5) ゆえに、CML生成阻害化合物によるマトリックスの収縮率の

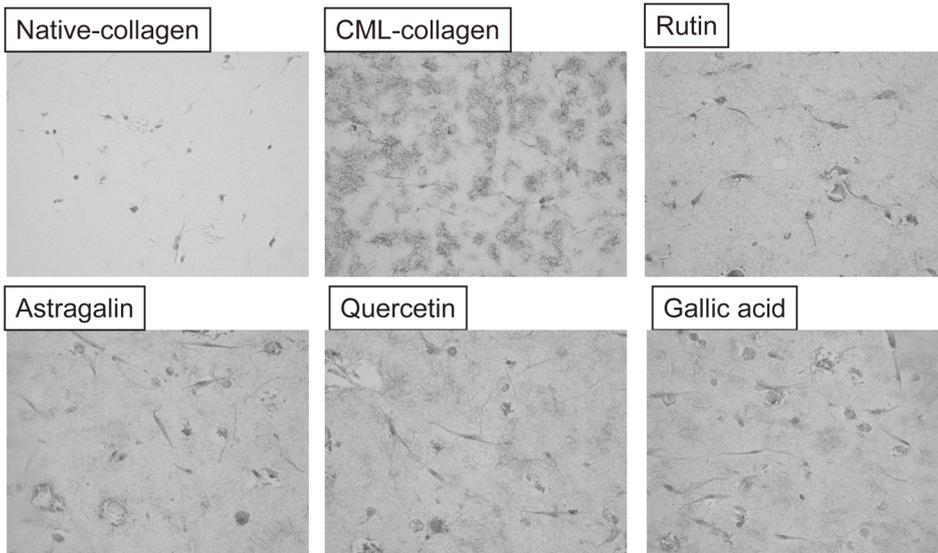


Fig. 3 CMA Accumulation in Collagen Matrix.

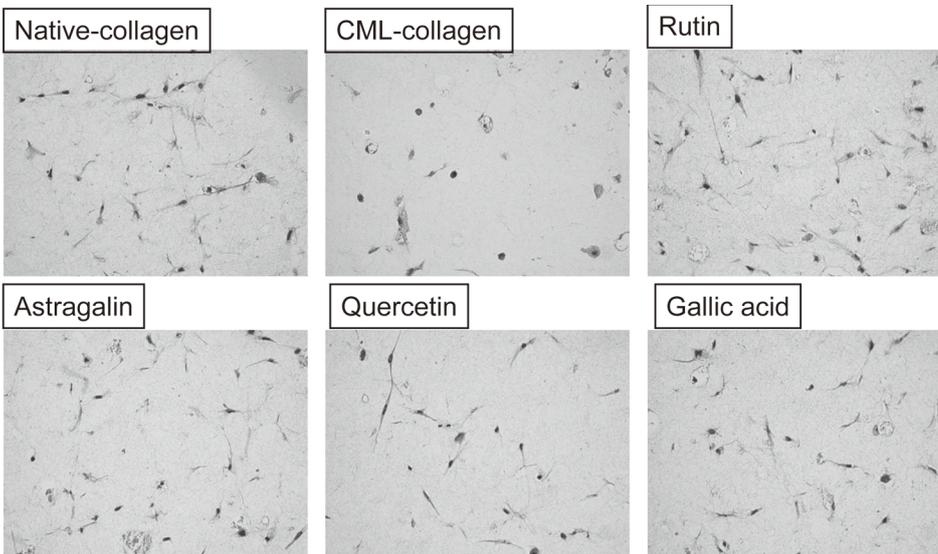


Fig. 4 HE Staining of Fibroblasts in Collagen Matrix.

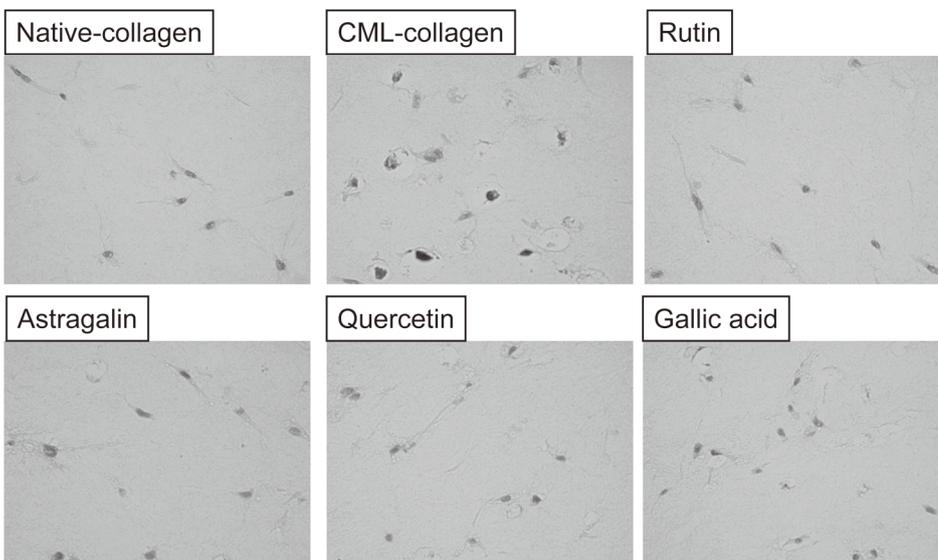


Fig. 5 Caspase-3 Activation in Collagen Matrix.

改善は、それら化合物がコラーゲンの CML 化を阻害したことで線維芽細胞のアポトーシスが抑制されたためであることが示唆された。

3-3. CML 生成阻害化合物による線維芽細胞のアポトーシス抑制メカニズム

次に、CML 生成阻害化合物が線維芽細胞のアポトーシスを抑制するメカニズムを解明することにした。CML 化タンパクは、RAGE を介して JNK や p38 などの MAP kinase を活性化することで、細胞をアポトーシスに導くことが報告されている^{3,5)}。そこで、本研究では、CML 化コラーゲンによる p38 および JNK の活性化に対する CML 生成阻害化合物の効果を検討した。方法としては、ヒト真皮線維芽細胞に CML-collagen または CML 生成阻害化合物で処理したコラーゲンを 3 時間添加後の phosphorylated-JNK および phosphorylated-p38 の発現量をウェスタンブロット法にて評価した。その結果、CML 生成阻害化合物は、コラーゲンの CML 化による p38 および JNK の活性化を顕著に抑制した (Fig. 6)。ゆえに、CML 生成阻害化合物は、コラーゲンの CML 化を抑制することで、CML-collagen により誘導される JNK, p38 の活性化を抑制し、結果的に線維芽細胞のアポトーシスを抑制することで、三次元培養におけるマトリックスの収縮率の低下を改善したものと考えられた。

4. 考 察

一次スクリーニングにより得られた 10 種の CML 生成阻害化合物について、I 型コラーゲンを用いた二次スクリーニングを行ったところ、rutin, astragal, quercetin, gallic acid の 4 種の化合物が、顕著な CML 生成阻害作用を示した (Fig. 1)。また、これら 4 種の CML 生成阻害化合物は、

線維芽細胞の三次元培養において、コラーゲンの CML 化に伴うコラーゲンマトリックスの収縮率の低下を改善した。その理由として、CML コラーゲンのマトリックスでは、線維芽細胞のアポトーシスが起るためマトリックスの収縮率の低下が引き起こされたが、CML 生成阻害化合物で処理したマトリックスでは、線維芽細胞のアポトーシスが抑制されたため、マトリックスの収縮率の改善が認められた。また、そのアポトーシス抑制メカニズムは、CML コラーゲンにより活性化される MAP kinase (JNK, p38) 経路の抑制によるものであった。つまり、CML 生成阻害化合物は、コラーゲンの CML 化を抑制することで、CML-collagen により誘導される JNK および p38 の活性化を抑制し、結果的に線維芽細胞のアポトーシスを抑制したため、三次元培養におけるマトリックスの収縮率の低下を改善したものと考えられた。本研究において、4 種の天然由来化合物 (rutin, astragal, quercetin, gallic acid) が有する皮膚老化改善作用および、その作用メカニズムを解明したことで、CML が皮膚老化改善作用における新たなターゲット分子として重要であることが示された。さらに、本研究では CML-collagen が引き起こすと考えられる病態や老化症状のうち、特に皮膚老化に注目して研究を行ったが、CML-collagen は皮膚老化のみならず骨粗鬆症や糖尿病合併症の原因物質であるとも考えられているため、今後さらに CML の生体に及ぼす影響が明らかになることで、CML 阻害剤の重要性が高まり、本研究で得られた知見や CML 阻害化合物の社会的利用価値が高まることが期待される。

謝 辞

当該研究テーマおよび関連テーマの実施に際して、グラントサポートを賜りました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝致します。

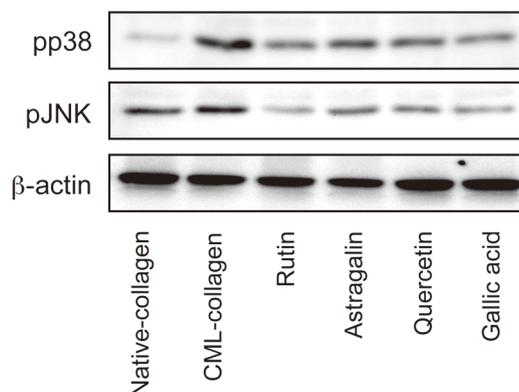


Fig. 6 Effect of Natural Compounds on MAP kinase (p38, JNK) Activation. Human dermal fibroblasts were incubated for 3 hours with 400 μ g/mL CML-collagen, unmodified collagen or natural compounds (30 μ M)-treated collagen. The phosphorylation of p38 and JNK were analyzed by western blotting analysis.

(参考文献)

- 1) Fujiwara Y, Kiyota N, Hori M et al, Esculeogenin A, a new tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 ; 27 : 2400-2406.
- 2) Matsuse T, Ohga E, Teramoto S et al, Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol.* 1998 ; 51 : 515-519.
- 3) Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM et al, Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem.* 2005 ; 280 : 12087-12095.
- 4) Morita K, Urabe K, Moroi Y et al, Migration of keratinocytes is impaired on glycated collagen I. *Wound Repair Regen.* 2005;13:93-101.
- 5) Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M et al, Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292 : C850-856.
- 6) Nagai R, Ikeda K, Higashi T et al, Hydroxyl radical mediates N epsilon-(carboxymethyl) lysine formation from Amadori product. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 234 : 167-172.