

皮膚老化改善作用を持つ天然植物成分の探索と機能解析

島根大学医学部医学科免疫学講座

小谷 仁司

Skin aging is one of the important problems in the cosmetics field that is difficult to control or improve. In recent years, it has become clear that the functional deterioration due to skin aging is due to the SASP factor secreted by aging cells. Therefore, we decided to search for a plant extract that specifically removes senescent cells in the skin by means of senolysis. In this study, we screened the senolytic effect of many plant extracts. Among them, we focused on the ginger extract and performed a detailed analysis, but unfortunately, we could not clarify the selective activity of senescent cells. However, it was suggested that the combination of some flavonoids and the anticancer drug dasatinib has a senolytic effect. In the future, we would like to further search for the remaining plant extracts and contribute to the development of cosmetics that are useful for improving skin aging.

1. 緒言

皮膚の老化は美容にとって最も目立つとともに、抑制・改善が難しい問題点の1つとなっている。加齢による皮膚細胞の老化だけでなく、日々の生活において、肌は日光によりUV照射され、皮膚の細胞は酸化ストレスを生じ、DNAの損傷をはじめ皮膚細胞の老化が非加齢的にも生じている。また、酸化ストレスによる皮膚の老化だけでなく、皮膚のシミが生成することなどを気にするため、日焼け止めを塗り、日傘をさし、日光を避けるというのが現状における防御策となっている。本研究では、近年注目されてきている老化細胞除去薬 (senolytic drug) という概念を、皮膚の老化改善に適用することにより、新たな皮膚老化改善に有用な天然植物成分を見出すことができるのではないかと考え研究に取り組むことにした。これまでの皮膚老化抑制などの方法論は、老化を起こす原因となる紫外線照射を防ぐ日焼け止めや、DNA損傷を起こす酸化ストレスの抑制を目的に、抗酸化物質などが注目されていた。しかし、皮膚の機能低下は老化細胞が産生する老化細胞分泌因子 (インターロイキン6: IL-6をはじめとする炎症性サイトカインなど) に大きく制御されていることから、老化細胞の増加を抑制するのではなく、老化細胞を特異的に取り除くという新たな方法論で皮膚機能を健康的に維持することを目指し、老化細胞除去活性を有する天然植物成分の探索を進めることとした。

Senolytic drugによる皮膚老化改善

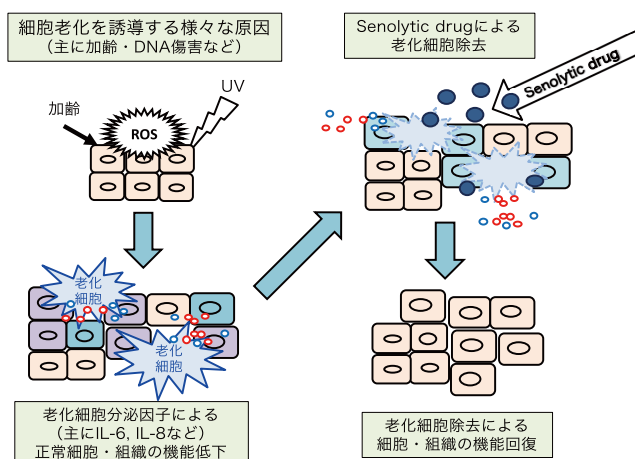


Fig. 1 細胞老化メカニズムと老化細胞除去薬 (senolytic drug) による皮膚老化改善作用

2. 方法

本研究では、株化培養細胞のケラチノサイトを用いて、細胞老化を誘導し、in vitroにおいて老化ケラチノサイトと非老化ケラチノサイトに対する細胞生存率や細胞死誘導活性を比較することにより老化細胞特異的に細胞死を誘導 (老化細胞除去) する天然植物成分を探索・機能解析することとした。また、これまでの研究で抗癌剤誘導性の細胞老化を起こすヒト癌細胞株に関しても同様の評価をおこなうことにより、老化細胞除去活性を持つ天然植物成分の絞り込みをおこなうこととした。

2. 1. 使用細胞株

株化されたヒトケラチノサイトであるHaCaT細胞はドイツ連邦共和国ガン研究センターより入手した。比較対象として使用するヒト癌細胞株は肺癌細胞株であるA549細胞または乳癌細胞株であるMDA-MB-231細胞を使用し



Search and functional analysis of natural plant components that improve skin aging

Hitoshi Kotani

Department of Immunology Shimane University Faculty of Medicine

た。HaCaT細胞およびMDA-MB-231細胞はDMEM培地(高グルコース)に10%FBSと抗生物質のゲンタマイシンを添加した培地を用いて37℃ 5%CO₂存在下での培養をおこなった。A549細胞はRPMI1670培地に10%FBSと抗生物質のゲンタマイシンを添加した培地を用いて37℃ 5%CO₂存在下での培養をおこなった。

2.2. 使用植物エキス

本研究で使用する植物エキスは、生薬約150種類のメタノール抽出エキスおよび、共同研究者により採取された沖縄・奄美産植物エキスの80%メタノール抽出エキスを利用し、100μg/mLとなるように調製して、細胞生存率を指標として非老化細胞と老化細胞の比較をおこなうことにより老化細胞除去活性をスクリーニングした。

2.3. ウェスタンブロット法

細胞を回収し、PBSで洗浄した後にRIPA bufferを添加し、氷上で30分かけてタンパク抽出をおこなった。タンパク定量をおこない、同タンパク量となるようにポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動をおこなった。その後、PVDF膜に転写し、5%スキムミルク溶液でブロッキングした後、1次抗体および2次抗体と反応させ、画像解析装置Amersham imageQuant 800 (Cytiva)によりタンパク発現を測定した。

2.4. Senescence associated beta galactosidase (SA-β-gal) 染色とFACS解析

SA-β-gal染色とその測定は、4%パラホルムアルデヒドで固定した細胞に基質であるSPiDER-βGal(同仁化学)を添加した後、フローサイトメーター(FACS)CytoFLEX(BECKMAN COULTER)を用いて測定した。

2.5. RNA抽出とrealtime RT-PCR

細胞を回収し、Nucleo ZOL (Takara)を用いてRNA抽出をおこない、さらにReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用いて逆転写をおこない、作成したcDNAを用いて、realtime RT-PCRをおこなった。Realtime RT-PCRはTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いてThermal Cycler Dice TP900 (Takara)により測定し、ΔΔCt法により各mRNA発現量の解析をおこなった。

2.6. 細胞の生存率の測定 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay

細胞の生存率の測定は、96 well plateを用いてサンプル添加し培養したのち、細胞の入ったwellにCCK-8試薬(同仁化学)を添加し、1~2時間後に各wellの吸光度をマイ

クロプレートリーダーにより測定した。

2.7. 細胞死の評価 Annexin V & PI染色とFACS解析

細胞死の測定は、APC蛍光ラベルされたAnnexin VとPropidium Iodide (PI)を回収した細胞に添加し、FACSを用いて測定をおこなった。

2.8. 細胞老化の誘導方法

他の研究者により既にHaCaT細胞での細胞老化誘導が報告されているBromodeoxyuridine (BrdU)の添加での方法¹⁾でおこなうこととした。具体的には、BrdU 45μMを含む培地で7日間培養をおこなうことで細胞老化を誘導した。比較対象とする癌細胞株の細胞老化誘導に関しては、我々の研究室で既に確立しているDNAポリメラーゼ阻害剤の1つであるaphidicolin 500nMを含む培地で5日間培養をおこなうことで細胞老化を誘導した。これらの細胞老化が誘導されたことの確認は、老化細胞の指標となるp21タンパクの発現やSA-β-gal染色、細胞の肥大化などにより確認をおこなった。

3. 結果

皮膚の老化改善作用を調べるために、in vitroでの細胞老化誘導をヒトケラチノサイトであるHaCaT細胞株に対してBrdUを添加し、7日間培養をおこない細胞老化を誘導した。その結果、老化細胞の指標の1つであるp21のタンパク発現がBrdUの濃度依存的に増化していることが確認された(Fig. 2)。さらに、老化細胞が産生するSA-βgalの発現を基質となるSPiDER-βGalを用いて確認をおこなったところ、BrdU 45μM添加後7日の細胞においてSA-β-gal活性の増化が確認されるとともに、老化細胞の特徴である細胞の肥大化が確認された(Fig. 2)。この細胞の肥大化に関しては、顕微鏡での形状観察とFACSによる細胞サイズをあらわすforward scatter (FSC)の増大で確認した。

次に老化細胞除去活性を持つ天然植物エキスのスクリーニングをおこなうにあたり、HaCaT細胞だけでなく他の老化細胞を同時にスクリーニングして、活性を持つ植物の絞り込みをおこないやすくするため、ヒト肺癌細胞株であるA549細胞を用いて、既に我々の研究室で確立されているaphidicolin誘導性細胞老化を利用することとした。このaphidicolinはセファロスラム・アフィジコラという菌類から単離された抗生物質の1つであり、DNAポリメラーゼ阻害作用を持つ化合物である。A549細胞にaphidicolin 500nMを添加し、5日間培養することにより細胞老化誘導をおこなった。A549に関しても細胞老化の確認のため、SA-β-galの発現確認とp21タンパクの発現確認をお

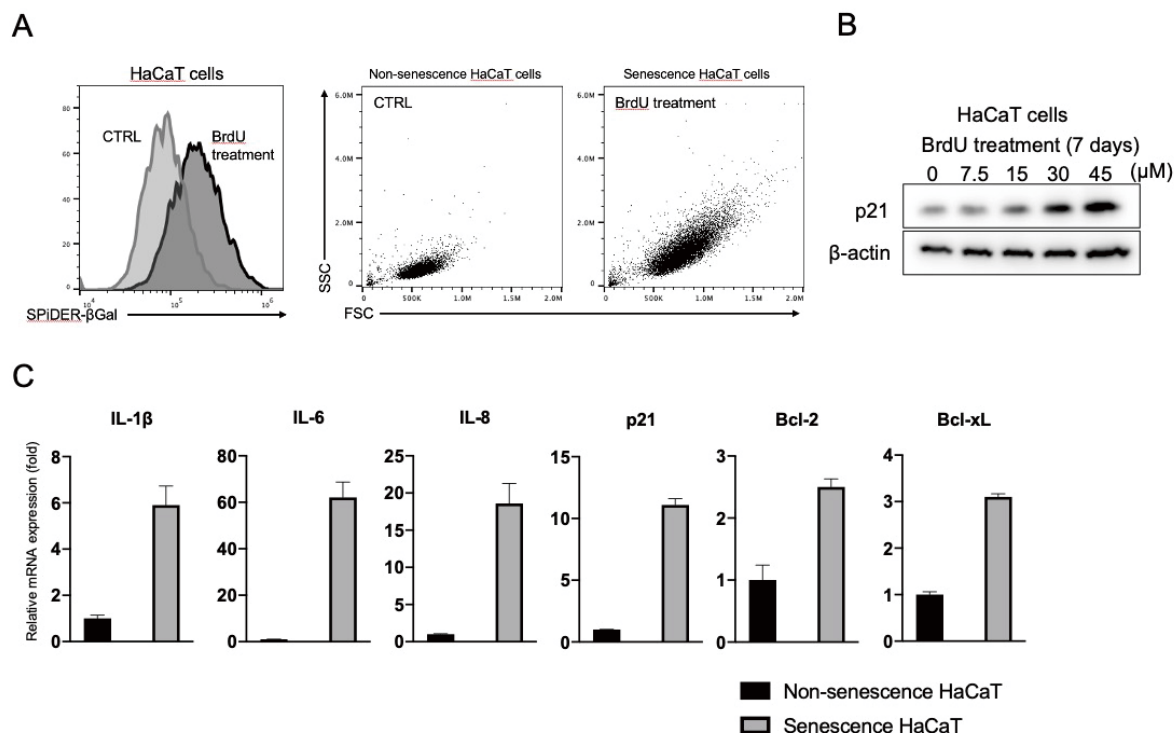


Fig. 2 BrdU 添加により細胞老化誘導した HaCaT 細胞の解析
A. SA-β-gal 活性・細胞サイズの FACS 解析 B. p21 タンパク発現解析
C. SASP および抗アポトーシスタンパクの mRNA 発現解析

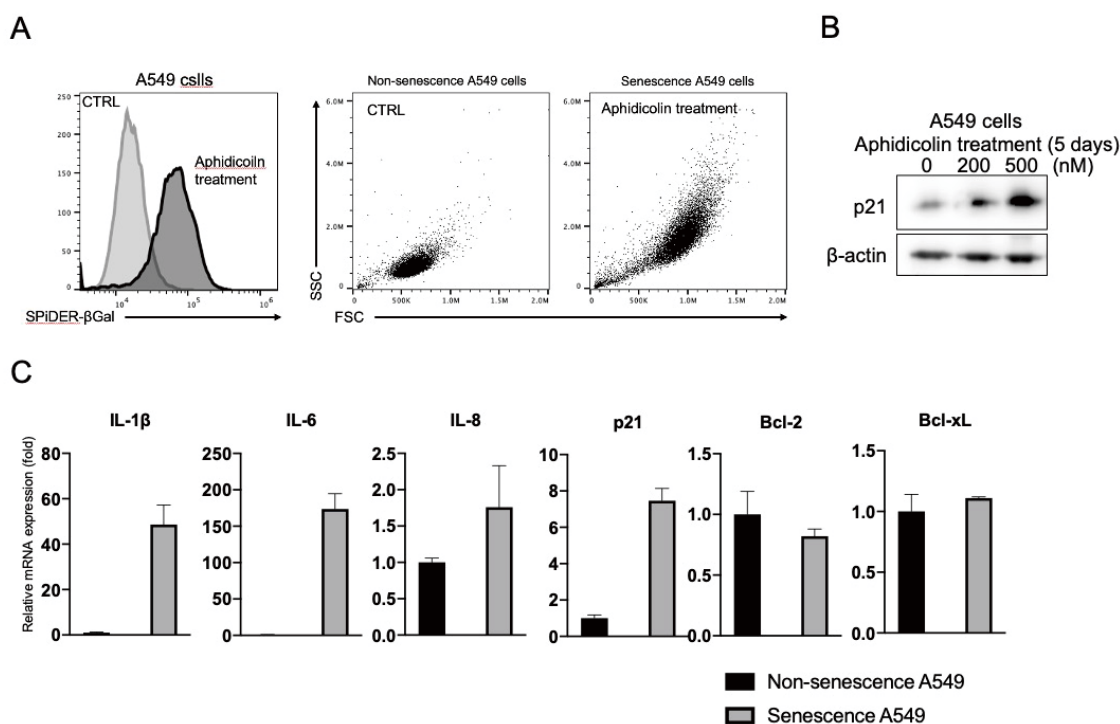


Fig. 3 Aphidicolin 添加により細胞老化誘導した A549 細胞の解析
A. SA-β-gal 活性・細胞サイズの FACS 解析 B. p21 タンパク発現解析
C. SASP および抗アポトーシスタンパクの mRNA 発現解析

こなった (Fig. 3)。さらに、細胞老化を誘導した HaCaT 細胞および A549 細胞に関して、組織の機能低下を起こす原因となることが示唆されている老化細胞分泌因子 (SASP

factor)²⁾ の mRNA 発現を調べるために RNA 抽出をおこない、realtime RT-PCR 法を用いて mRNA 発現量を非老化細胞と比較した (Fig. 2, 3)。その結果、HaCaT 細胞におい

て老化誘導された細胞でインターロイキン(IL)-1 β 、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカインのmRNA発現が増化しているとともに、細胞周期に関わるp21や抗アポトーシスタンパクであるBcl-2およびBcl-xLなどのmRNA発現も増化していることが明らかになった。同様にA549に関しても老化細胞でIL-1 β 、IL-6、p21などのmRNA発現増化が確認されたが、Bcl-2やBcl-xLのmRNA発現はほとんど変化していなかった。

これらの細胞老化誘導したHaCaT細胞とA549細胞を用いて、非老化細胞と比較をおこないながら植物エキス100 μ g/mLを48時間添加した時の細胞の生存率をCCK-8 assayによりスクリーニングをおこなうことで、老化細胞特異的に細胞傷害を示すという老化細胞除去活性を持つ植物エキスを探索することとした。当初の研究計画では、HaCaT細胞に蛍光タンパクを定常発現させ、赤色蛍光タンパクと緑色蛍光タンパクを発現させた細胞で、非老化細胞と老化細胞を色分けし、同じwell内で植物エキス添加をおこない、蛍光タンパクの色の比率で老化細胞を特異的に細胞傷害する活性を持つものを探索する予定としていたが、HaCaT細胞を入手するのに時間がかかったため、CCK-8 assayという簡便な細胞生存率を測定する方法で、

比較検討をおこなう方法として進めた。ここでは、既に老化細胞除去薬として報告のあるBcl-2およびBcl-xL阻害剤であるABT-263³⁾という化合物をポジティブコントロールとして使用した。使用した植物エキスは生薬メタノール抽出エキス150種類と奄美産植物80%メタノール抽出エキス560種類であり、現在もスクリーニングを完了していない沖縄産植物80%メタノール抽出エキスについて継続的に探索をおこなっている。スクリーニングの結果、生薬抽出エキスではオウバク、カシュウ、カンキョウ、シンイ、ウワウルシなどで、HaCaT細胞の老化細胞での生存率が低い結果が得られた。(Fig. 4) さらに、A549細胞においても老化細胞での生存率が低い結果が得られた生薬エキスに、カンキョウが見出された。

このカンキョウという生薬は食品で知られる生姜をもととした生薬であり、同じ生姜をもととしたショウキョウと呼ばれる生薬と区別して使われている。ショウキョウのほうはあまり老化細胞と非老化細胞での生存率に変化はなく、同じ生姜由来でこのように結果が異なることに興味を持ち、少し調べることにした。カンキョウは生姜を蒸してから乾燥させるという漢方医学的な修治という処理がおこなわれている生薬であり、蒸さずに乾燥させたものをショウ

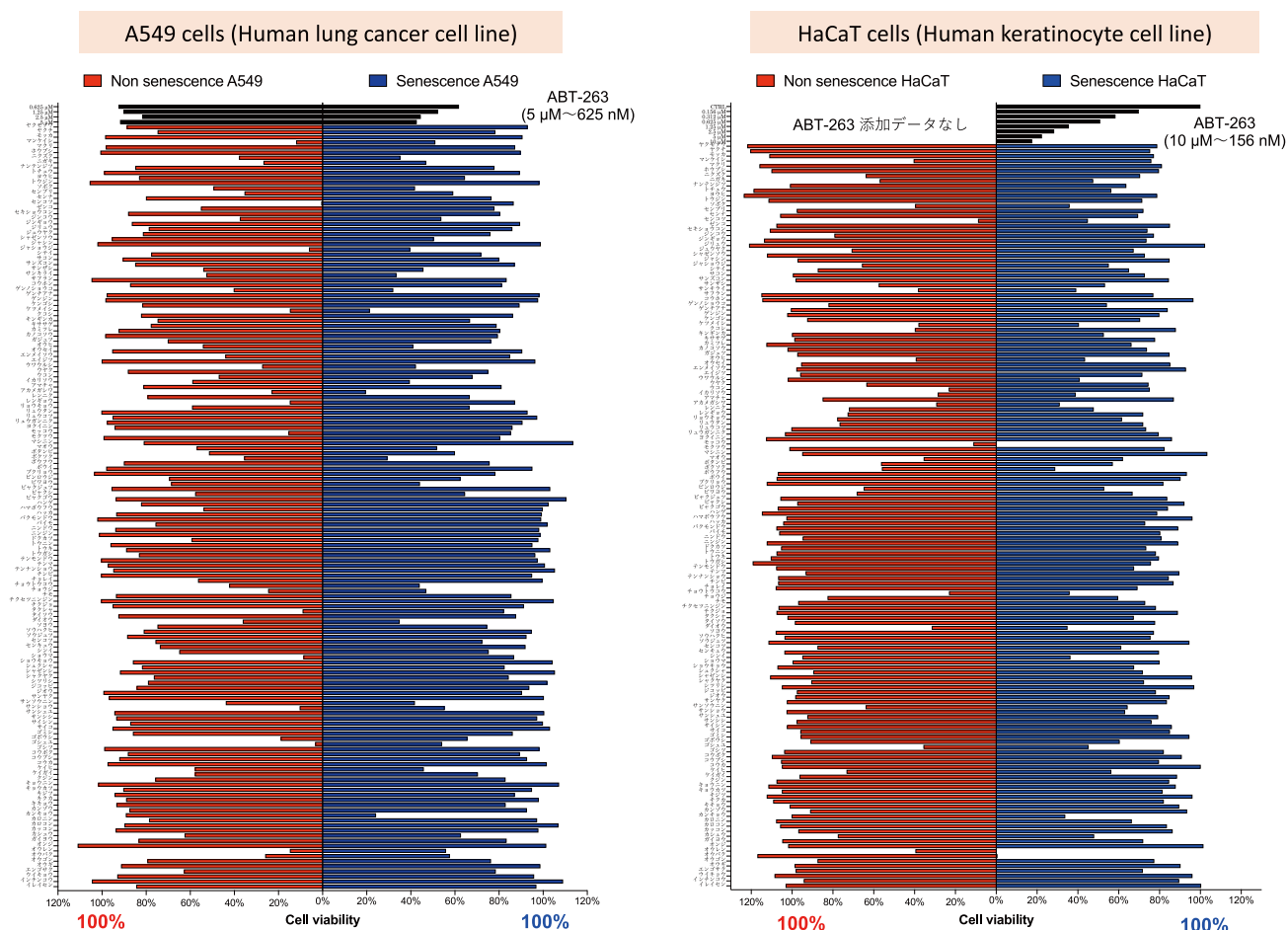


Fig. 4 老化誘導細胞と非老化誘導細胞を用いた生薬抽出エキスの老化細胞除去活性スクリーニング結果

キョウと呼んでいる。では、この蒸すという処理で何が起きているかについてだが、生姜に多く含まれる gingerol という化合物が、この処理により shogaol という化合物に化学変化し、shogaol の含有量が増加するということが知られている。そこで、カンキョウおよびショウキョウの比較と、市販で購入することができる 6-gingerol と 6-shogaol を用いて、HaCaT 細胞の非老化細胞と老化細胞に対する apoptosis 誘導に関して比較をおこなうこととした (Fig. 5)。その結果、アポトーシス誘導により活性化する PARP と annexin V の発現をウエスタンブロット法と FACS で解析したところ、スクリーニングの時の結果に反し、非老化細胞でのアポトーシス誘導がカンキョウエキスを強く見

られ、さらに、カンキョウに多く含まれる 6-shogaol での apoptosis が annexin V の発現割合を見ると、老化細胞のほうがほんの少し apoptosis の割合が多いが、非老化細胞でも濃度依存的に apoptosis が誘導され、グラフには記載されていないが、6-shogaol の 40 μ M ではそのほとんどの細胞が apoptosis するほどであることが明らかとなった。

次に、奄美産植物エキスにおけるスクリーニング結果の一部を紹介する。奄美産植物エキスは 560 種類ほどあり、その中から老化細胞のほうで細胞生存率が低く見られたトベラ、ヒメガマ、アイダクグ、ナチシダ、キツネノマゴをグラフで示す (Fig. 6)。これらの植物エキスに関する詳細な解析をおこなう必要があるが、これらの奄美産植物エキ

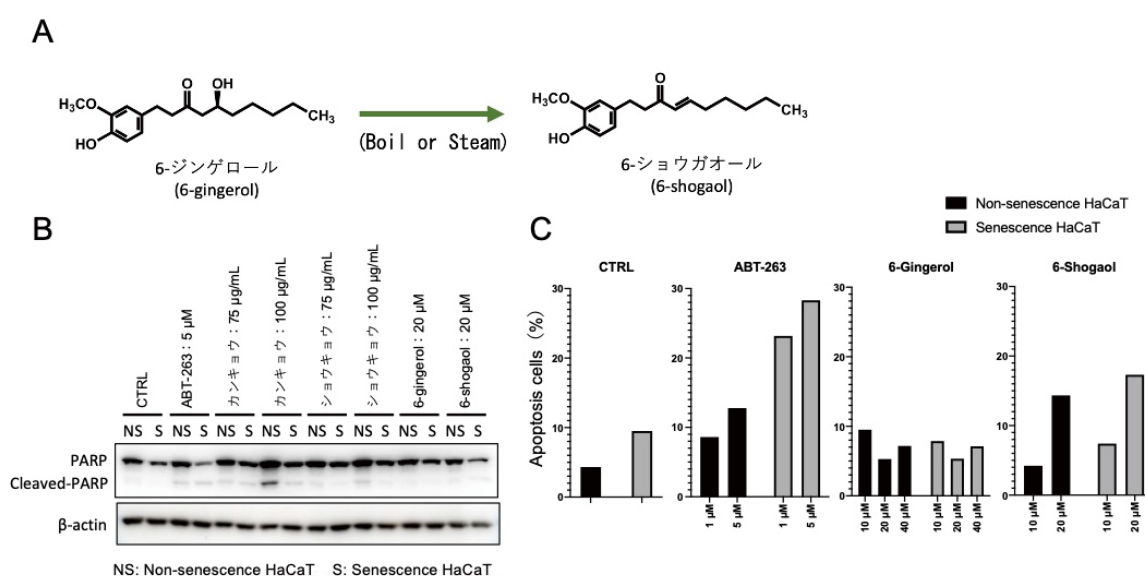


Fig. 5 生姜含有成分 (6-gingerol および 6-shogaol) の HaCaT 細胞への apoptosis 誘導活性評価
A. 生姜含有成分の化学構造と修治 (boil or steam) による化学変化
B. 生姜エキス (カンキョウ・ショウキョウ) とその成分による PARP の活性化のウエスタンブロット解析
C. 生姜含有成分による apoptosis 細胞 (Annexin V 陽性細胞) の FACS 解析

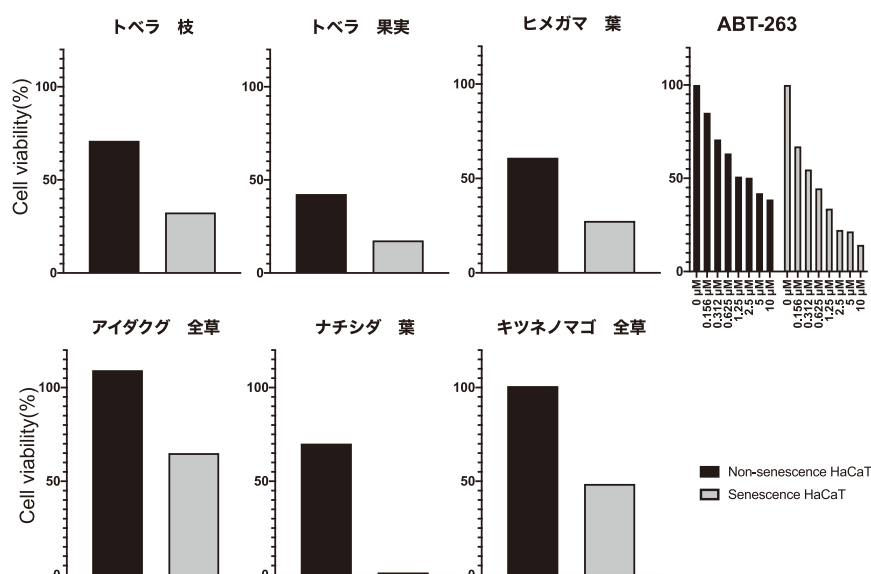


Fig. 6 HaCaT 細胞での奄美産植物抽出エキス (100 μ g/mL) の老化細胞除去活性スクリーニング結果の一部

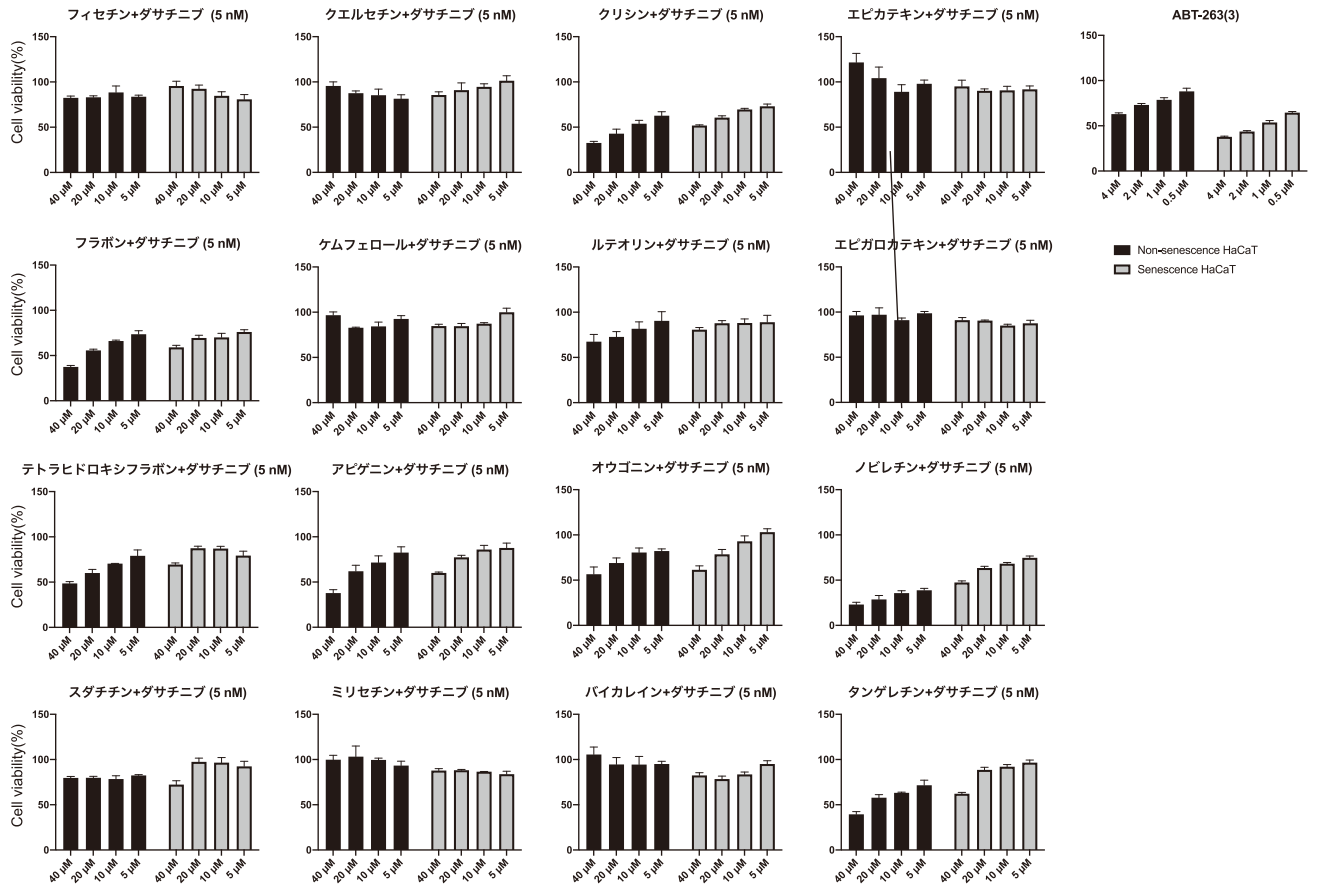


Fig. 7 HaCaT 細胞でのフラボノイド+ダサチニブによる老化細胞除去活性評価

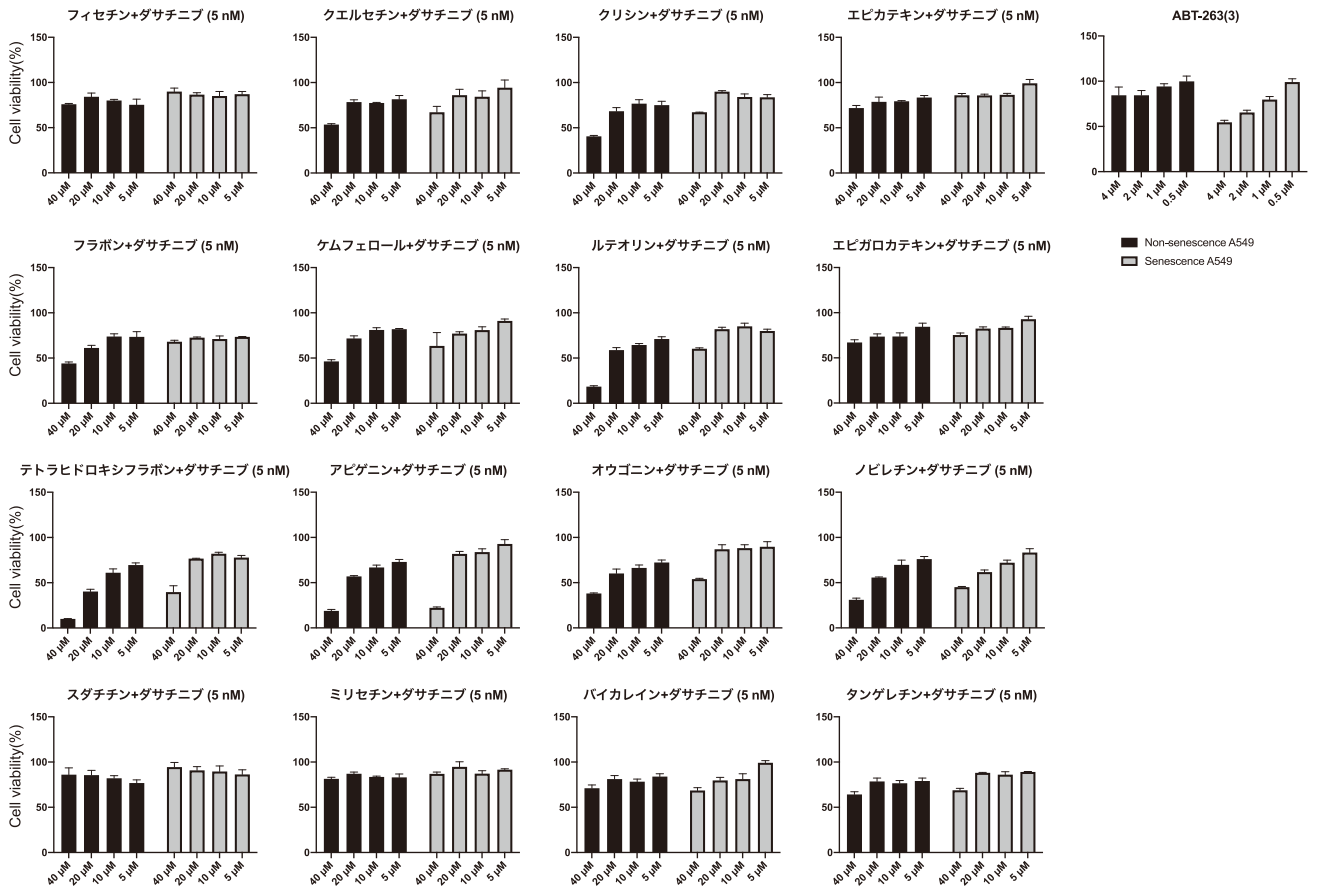


Fig. 8 A549 細胞でのフラボノイド+ダサチニブによる老化細胞除去活性評価

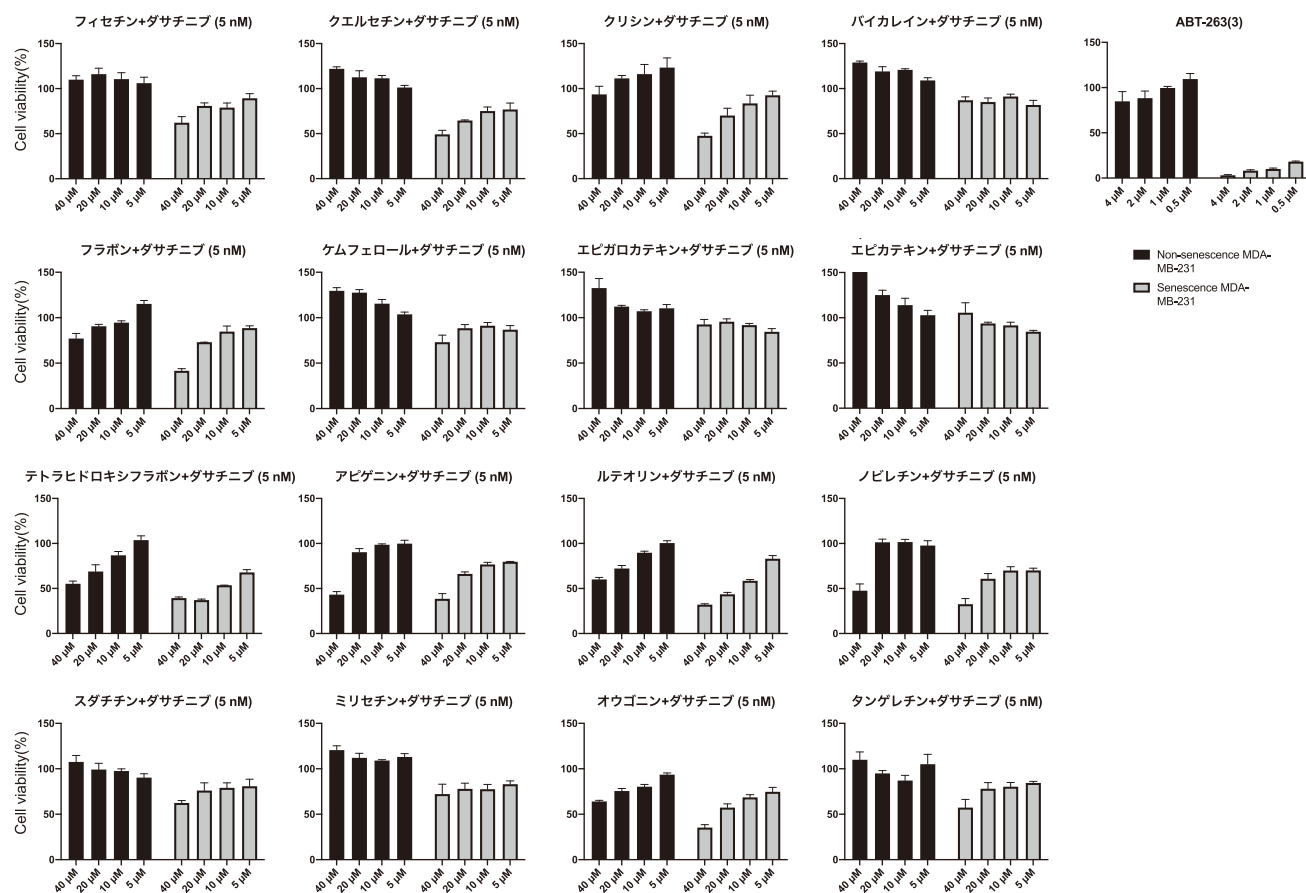


Fig. 9 ヒト乳癌細胞株(MDA-MB-231 細胞)でのフラボノイド + ダサチニブによる老化細胞除去活性評価

ス共同研究者により、採取された植物であり、さらにエキスを増やして様々な解析をおこなうためには、奄美での植物採取をおこなう必要が出てくることから、現在の新型コロナウイルス感染に関わる社会情勢から、植物採取のために移動することが難しいことから、詳細な解析は一旦保留とし、残っている沖縄産植物エキスのスクリーニングを進めていくこととした。

さらに、老化細胞除去活性を持つ天然由来化合物を探索するために、他の研究者により既に報告⁴⁾がある、フラボノイドのクエルセチンと抗癌剤のダサチニブの組み合わせを参考に、様々なフラボノイドとダサチニブの組み合わせで老化細胞除去活性を持つものがないか調べることにした。ここでは、HaCaT細胞とA549細胞、さらにヒト乳癌細胞株のMDA-MB-231についてCCK-8assayによる細胞生存率を指標として比較をおこなった (Fig. 7-9)。その結果、ポジティブコントロールとして利用したABT-263の老化細胞に対する特異性がMDA-MB-231細胞で特に高いことが明らかとなった。さらに、HaCaT細胞は非老化細胞でもABT-263に濃度依存的な生存率抑制効果があり、老化細胞特異的な活性を調べるのが難しいことが明らかとなった。フラボノイドの結果では、MDA-MB-231細胞で既に報告があるフィセチンとクエルセチンで老化細胞の生

存率が特異的に低下する結果が得られ、その他にもクリシンやアピゲニン、ルテオリンやノビレチンなどをダサチニブと組み合わせることで、老化細胞での細胞生存率が低下している傾向が見られた。しかし、HaCaT細胞やA549細胞では老化細胞より非老化細胞での細胞生存率が低下する傾向が多く見られ、その結果の解析が難しいこととなった。

4. 考 察

本研究では、スクリーニング結果からのヒットエキスとしてカンキョウエキスを注目して、その特徴的な成分の解析などもおこなったが、残念ながら非老化細胞でも細胞傷害を示す結果となってしまった。このカンキョウエキスを詳細に解析する際には、新たにカンキョウの購入から抽出までおこなっており、スクリーニング時のカンキョウとロットが異なるという原因も影響している可能性が考えられる。生姜という素材であることから、幅広いロットの抽出エキスでの検討と成分分析をおこなったものの評価も今後おこなっていくべきであると考え。さらに、今回の老化細胞と非老化細胞の比較という方法では多くの問題点も明らかとなった。老化細胞は細胞周期が止まり増殖しなくなり、細胞も肥大化するが、非老化細胞は細胞増殖が起き

るということから、薬剤添加から解析までの時間が経つほど細胞増殖の影響が大きく影響するという同じ細胞数で実験を行うとしても、CCK-8 assay など細胞サイズの異なるものを同じように評価するのは問題ないのかなど、考慮すべき内容はたくさん存在する。これらの点に注意をしながらさらに研究を進めていく予定である。

5. 総 括

本研究により、皮膚の老化改善に有効となる天然植物エキスを明らかにすることはできなかったが、老化細胞除去活性を持つ植物エキスの探索がスタートするとともに、問題点などを明らかにさせながら進めていくことができるようになった。まだ、奄美産植物のナチシダのように非常に老化細胞に特異的な植物エキスも残っており、まだスクリーニング中の沖縄産植物エキスもあるため、より老化細胞に特異性の高い植物エキスおよびその活性成分の探索を継

続的に実施し、皮膚の老化改善に役立つ製品として研究成果を社会に還元していきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) E. Michishita, N. Matsumura, T. Kurahashi, T. Suzuki, H. Ogino, M. Fujii, D. Ayusawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (4), 877-879 (2002)
- 2) Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., et al. *Nat. Med.*, 24, 1246-1256. 2018
- 3) Kota Sato, Soichiro Iwasaki, Hironori Yoshino *Int J Mol Sci.* 22 (24):13233. 2021
- 4) Hidetaka Ota, Ayuto Kodama *Sci Rep.* 12 (1):2425. 2022