

ークとして分離することが可能となった。濃縮効率はゲル中のレクチン含量に依存し、本条件では目的とする糖鎖のみを高感度で分析することが可能となっている。本法は、糖鎖のプロファイリングやスクリーニングに幅広く応用することが可能と考えられる。

これらの方法は専用の装置を必要とせず、高い濃縮効率を得ることができる。また、今回の研究はもっとも単純な十字型流路をもつメタクリレート製チップを共通して使用し、検出用のアルゴンレーザーを照射してゲルを作製しているため、用途に応じて実際の分析現場で利用することができる。すなわち、臨床分析や環境分析など、それぞれの分析目的に応じた応用が可能である。よって、本論文は、博士（薬学）の学位論文に十分値するものと認める。

氏名	増田めぐみ
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	薬第103号
学位授与の日付	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規程第5条第1項該当
学位論文題目	ノニ (<i>Morinda citrifolia</i>) の光老化抑制作用に関する研究

論文審査委員	(主査)	教授	松田秀秋
	(副主査)	教授	松尾圭造
	(副主査)	教授	岩城正宏

論文内容の要旨

老化に伴う皮膚の形態変化は顔面や手などの日光暴露部位に顕著に現れるが、慢性的な紫外線暴露の結果として「シミ」や「シワ」などが生じる形態変化は光老化と呼ばれる。近年のオゾン層の破壊により光老化のリスクが増大し、いつまでも若く美しくありたいという女性の願いから光老化抑制化粧品市場は拡大している。

光老化を抑制する手段としては、紫外線から皮膚を保護するサンスクリーン剤の使用が第一選択とされているが副作用も問題になっている。一方、光老化につながる紫外線シグナル経路に拮抗する、より安全な光老化抑制化粧品の開発が望まれている。

光老化による「シミ」は紫外線によるメラニンの生成と色素沈着に起因するとされている。メラニンの生成はメラニン合成酵素 tyrosinase によって制御されているので、tyrosinase 阻害作用をもつ物質が「シミ」の発生を予防する美白剤として化粧品に使用されている。光老化による「シワ」の発生は真皮結合組織の主成分であるコラーゲンの分解に起因する場合が多いとされている。コラーゲンの分解は紫外線により線維芽細胞から放出される matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) や、好中球から放出される human leukocyte elastase (HLE) によって促進される。そのため、線維芽細胞からの MMP-1 放出抑制作用および HLE 阻害作用を有する薬剤は「シワ」の予防に利用できると考えられる。

著者は天然資源から光老化による「シミ」および「シワ」の発生を紫外線シグナル経路に拮抗することで予防する新規な化粧品素材の探索を目的とした。天然資源としては紫外線に対する自己防衛システムを有すると考えられる南太平洋の島々の沿岸などに生育する植物に着目し、ハワイヤタヒチで民間薬とされてきたノニ (*Morinda citrifolia* L., アカネ科) を選出した。

近年、ノニは果肉のジュースや葉のお茶が機能性食品市場に流通している。ノニ果実には多くの種子が含まれるが、ジュースの製造過程で除かれ廃棄されている。そこで、種子の有効利用も視野に入れ、果肉、葉、および種子の抽出エキスを一次スクリーニングに用いた。

第1章第1節では、ノニが光老化抑制作用を有するかどうかを検討する目的で、50% エタノールで抽出したノニの果肉エキス (MCF-ext)、葉エキス (MCL-ext)、および種子エキス (MCS-ext) について、「シワ」の発生抑制作用は HLE 阻害作用を指標に、

および MCL-ext の経口投与は ELT を短縮し、線溶系活性化作用を示した。

第2章第1節では、第1章第1節で MCS-ext に tyrosinase 阻害作用および DPPH ラジカル捕捉作用を見出したことからメラニン産生抑制作用が期待できたので、 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) 刺激 B16 メラノーマ細胞を用いて MCS-ext のメラニン産生抑制作用を検討した。MCS-ext は細胞増殖に影響を及ぼすことなく、メラニン産生を抑制した。そこで活性を指標に分画した結果、lignan の 1 と 2 が主有効成分であることが明らかになった。特に 1 は B16 メラノーマ細胞の増殖に影響を及ぼすことなく強いメラニン産生抑制作用を示した。

第2節では、lignan (1 および 2) のメラニン産生抑制のメカニズムについて α -MSH 刺激 B16 メラノーマ細胞を用いて検討した。その結果、これらの lignan は細胞増殖に影響を及ぼすことなく α -MSH 刺激による細胞内メラニンの増加を抑制した。また、Lignan 1 および 2 の添加 24 から 72 時間後に α -MSH による細胞内 tyrosinase 活性の上昇が抑制され、72 時間後に α -MSH による細胞内 tyrosinase 発現の亢進が抑制された。メラニンの産生過程においては、小眼球症関連転写因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF : tyrosinase 遺伝子の発現を制御する特異的な転写因子) の活性化によりメラニンの産生が促進されることが知られている。また、細胞内シグナル p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) カスケードは MITF を活性化し、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) と p70 ribosomal S6 kinase (p70 S6K) カスケードは MITF を抑制するといわれている。Western blot 法を用いて検討した結果、1 および 2 はいずれも p38 MAPK のリン酸化の抑制と同時に ERK1/2 のリン酸化の亢進を介して MITF の活性化を抑制し、tyrosinase の発現を減少させることが示唆された。

第3章第1節では、第1章第1節で MCS-ext に HLE 阻害作用を見出したことから、光老化による「シワ」の発生抑制作用が期待できたので、UVA 照射正常ヒト真皮線維芽細胞 (normal human dermal fibroblasts, NHDFs) を用いて MCS-ext の MMP-1 放出抑制作用を検討した。MCS-ext は細胞増殖に影響を及ぼすことなく UVA 照射 48 時間後、NHDFs からの MMP-1 放出を抑制した。活性を指標に分画した結果、1 が主有効成分であることが明らかになった。

メラニン産生抑制作用は tyrosinase 阻害作用を指標に *in vitro* 試験で一次スクリーニングした。また、メラニンの合成には酸化反応が関与することから、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル捕捉作用を指標に抗酸化作用もスクリーニングした。その結果、いずれの試験においても MCF-ext や MCL-ext に比べて、MCS-ext に最も強い作用が認められた。

第2節では、第1節で最も強い作用を示した MCS-ext についてそれぞれの活性を指標に有効成分の探索を行った。その結果、tyrosinase 阻害作用および抗酸化作用成分として二種の lignan [3,3'-bisdemethylpinoresinol (1) および americanin A (2)] と quercetin (3) を単離した。さらに HLE 阻害作用成分として ursolic acid (4) を単離した。これらの化合物はノニ種子から今回初めて単離された。

第3節では、光老化抑制化粧品素材としては、血液流動性低下抑制作用を併有すればより望ましいと考えられるので、ノニが血液流動性低下抑制作用を有するか否かを検討する目的で、MCF-ext, MCL-ext, および MCS-ext を lipopolysaccharide (LPS) で誘発した播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) モデルラットに経口投与し、micro channel array flow analyzer (MC-FAN) を用いて血液の全血通過時間を測定した。その結果、LPS で誘発した対照群ラットの血液の全血通過時間と比べて、MCS-ext および MCL-ext を経口投与した群の全血通過時間が短縮されたことから、これらのエキスは血液流動性低下抑制作用を有することが明らかになった。

第4節では、MCS-ext および MCL-ext の血液流動性低下抑制作用を *in vitro* 試験で検討した。その結果、MCS-ext に赤血球凝集抑制作用が認められ、MCL-ext にもやや弱い作用が認められた。そこで、有効成分を探索するため、第2節で MCS-ext から単離した成分の赤血球凝集抑制作用を検討した。その結果、1, 2, および 4 に作用が認められ、MCS-ext および MCL-ext の赤血球凝集抑制作用は主に 4 に由来することが示唆された。また、MCL-ext に血小板凝集抑制作用が認められたので有効成分を探索した結果、有効成分として 4, rutin (5), および kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (6) を単離した。

第5節では、第3節で MCS-ext および MCL-ext に血液流動性低下抑制作用が認められたので、これらエキスの線溶系活性化作用について、正常ラットにおけるユーグロブリン溶解時間 (euglobulin lysis time, ELT) を指標に検討した。その結果、MCS-ext

第2節では、1 の MMP-1 放出抑制のメカニズムについて UVA 照射 NHDFs を用いて検討した。その結果、1 は UVA による細胞内 MMP-1 の発現を抑制した。UVA 照射により細胞内シグナル c-Jun-N-terminal kinase (JNK) および p38 MAPK カスケードが活性化し、JNK および p38 MAPK のリン酸化の亢進、c-Jun や c-Fos の発現亢進などを経て activator protein-1 (AP-1) が活性化されることにより MMP-1 の生産が亢進されることが知られている。Western blot 法を用いて検討した結果、1 は UVA による JNK および p38 MAPK のリン酸化の抑制を介して AP-1 活性を抑制し、細胞内 MMP-1 の発現および放出を抑制することが示唆された。

以上の研究から、ノニの種子に光老化による「シミ」および「シワ」の予防に必須の4つの作用、すなわちメラニン産生抑制作用、HLE 阻害作用と MMP-1 放出抑制作用、および血液流動性低下抑制作用を有することを初めて見出した。これまでその果肉や葉は機能性食品素材として利用されているが種子は廃棄されていた。今回、種子が光老化につながる紫外線シグナル経路に拮抗する新規でかつ望ましい光老化抑制剤として有用であることを見出した。従って、臨床試験を含むさらなる研究が必要であるが、ノニ種子は「シミ」および「シワ」の予防ないしは治療に利用できる化粧品の新規素材に成り得る可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

老化に伴う皮膚の形態変化は顔面や手などの日光暴露部位に顕著に現れるが、慢性的な紫外線暴露の結果として「シミ」や「シワ」などが生じる形態変化は光老化と呼ばれ、美容上の問題となっている。

学位申請者は天然資源から光老化による「シミ」および「シワ」の発生を紫外線シグナル経路に拮抗することで予防する新規化粧品素材の探索を目的としている。その研究題材として南太平洋の島々の沿岸などに生育する植物に着目し、ハワイやタヒチで民間薬とされてきたノニ (*Morinda citrifolia*) を選択している。

まず、ノニの果肉、葉、および種子の抽出エキスを被検体として用い、メラニン産生抑制作用については tyrosinase 阻害作用を指標に、「シワ」の発生抑制作用については HLE 阻害作用を指標に一次スクリーニングを行った結果、いずれの試験においてもこれまで未利用であった種子が果肉あるいは葉よりも強い作用を示すことを明らかにしている。さらに、種子の tyrosinase 阻害および抗酸化作用成分として 3,3'-bisdemethylpinoresinol、americanin A、および quercetin を単離し、HLE 阻害作用成分として ursolic acid を単離している。

「シミ」予防の観点から、スクリーニング試験で選出した種子のメラニン産生抑制作用を B16 マウスメラノーマ細胞培養系で評価し、有効成分は 3,3'-bisdemethylpinoresinol および americanin A であることを確認している。これらのリグナンは細胞内チロシナーゼの発現を抑制することにより強いメラニン産生抑制作用を示すことを明らかにするとともに、その作用メカニズムについて細胞内のシグナル伝達における詳細な研究を行っている。

「シワ」予防の観点から、I 型コラーゲンの分解に関与する matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) に着目し、スクリーニングで選出した種子に、UVA 照射による正常ヒト真皮線維芽細胞からの MMP-1 放出抑制作用を見出し、その有効成分は 3,3'-bisdemethylpinoresinol であることを明らかにしている。さらに本化合物の MMP-1 放出抑制のメカニズムについて細胞内のシグナル伝達における詳細な研究を行っている。

以上の研究から、ノニ種子は光老化につながる紫外線シグナル経路に拮抗する新規でかつ望ましい光老化抑制剤として有望であると思われる。

本論文は皮膚におけるメラニンの産生抑制作用に加えて、「シワ」の予防にも薬用利用できる新規化粧品素材として見出されたノニ (*Morinda citrifolia*) の薬理学的研究、および有効成分の探索、さらにはその作用機序を解明するという「薬用資源学」が目指す基本的な研究の姿勢を示したもので、極めて価値ある論文である。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文に十分値するものと認める。

氏名	森田賢大		
学位の種類	博士(薬学)		
学位記番号	薬第104号		
学位授与の日付	平成24年3月22日		
学位授与の要件	学位規程第5条第1項該当		
学位論文題目	ドキシソルピシンの新たな耐性機構と抗がん剤のジェネリック医薬品への切り換えによる経済効果に関する研究		
論文審査委員(主査)	教授	杉浦麗子	
(副主査)	教授	西田升三	
(副主査)	教授	松山賢治	