

合成ノビレチンの経口投与によるラット真皮への影響

倉本 純子¹⁾, 井上 隆之¹⁾, 元矢 知志¹⁾, 小川 典子¹⁾,
古屋 智英¹⁾, 野村 正人²⁾, 大谷 浩¹⁾

Effects of orally administered synthetic nobiletin on rat dermis

Junko KURAMOTO¹⁾, Takayuki INOUE¹⁾, Tomoyuki MOTOYA¹⁾, Noriko OGAWA¹⁾,
Motohide FURUYA¹⁾, Masato NOMURA²⁾ and Hiroki OTANI¹⁾

Abstract

Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata), a typical Japanese citrus fruit, recently has been expected to make the healthy skin. Nobiletin (5, 6, 7, 8, 3', 4'-hexamethoxy flavone), a citrus polymethoxy flavonoid, is one of the compounds of Shiikuwasha. Nobiletin has been reported in *in vitro* studies that it possesses various bioactive effects, such as anti-inflammatory activities, however, few *in vivo* studies have been done.

In this study, we examined the effects of nobiletin involved in the impact on the collagenolysis. We revealed that nobiletin increases mRNA expressions of anti-oxidant enzymes. Furthermore, nobiletin suppresses mRNA expressions of matrix metalloproteinases (MMPs) and increases mRNA expressions of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). These results suggest that anti-oxidative action and suppression of the collagenolysis in the dermis may be enhanced through the oral administration of nobiletin.

Keyword: *Citrus depressa* Hayata, Nobiletin, Anti-oxidant, Collagen

¹⁾ 島根大学医学部解剖学講座発生生物学

Department of Developmental Biology, Faculty of Medicine ,
Shimane University.

²⁾ 近畿大学工学部化学生命工学科

Department of Biotechnology and Chemistry, Faculty of
Engineering, Kinki University.

1. 緒言

シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) は沖縄県特産の柑橘系果実であり、美肌効果を持つとされ化粧品や健康食品としても流通している。近年、シークワシャー中の美肌効果を示す成分としてノビレチン (nobiletin ; Fig.1) が注目され、抗酸化効果¹⁾、抗炎症効果^{2,3)}などの様々な薬理学的効果が明らかとなってきた。ノビレチンは主に果皮の外側にある外果皮 (フラベド) に多く含まれている⁴⁾。

皮膚は大きく表皮・基底膜・真皮に分類される。中でも真皮に含まれるコラーゲンは、皮膚の弾力やハリを維持する重要な役割を担っている。その為、真皮におけるコラーゲンの減少は、皮膚の弾力やハリを減少させ、しわの増加に直結する。

コラーゲンは線維芽細胞から産生される。紫外線や大気汚染、活性酸素に曝露すると線維芽細胞の活動を低下させ、コラーゲンの生産が減少することが報告されている⁵⁾。人体は日常のストレスや紫外線などから活性酸素を発生するが、過剰な活性酸素は線維芽細胞への攻撃をもたらす。ノビレチンが有する抗酸化作用は、活性酸素を減少させるため、コラーゲンの維持に対して有効に働くことが期待される。さらにノビレチンはコラーゲン分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) の発現を抑制し^{6,7)}、また核内転写因子である peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) は MMP の発現を抑制することが *in vitro* で示唆されている⁸⁾。

そこで本研究ではラットを用いて *in vivo* でノビレチンの抗酸化効果、MMP の発現抑制効果および PPAR の発現亢進効果について検討したので報告する。

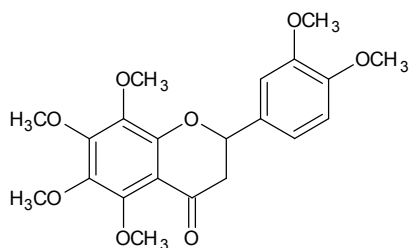


Fig.1 ノビレチンの化学構造式

2. 材料と方法

2.1 実験動物

JCL-Wistar 系雄性 8~12 週齢ラット (300~350 g) 6 匹 (日本クレア株式会社) を実験動物として用いた。動物は島根大学総合科学研究支援センター実験動物分野にて飼育した。飼育条件は室温 23±2℃、湿度 55±10%、換気回数は平均 10~13 回/時間、照明は 12 時間毎の明暗切り替え条件 (明期 : 7:00~19:00, 暗期 : 19:00~7:00) に設定した。ポリカーボネイトケージに木材チップを床敷として用いて飼育した。試料は市販の固形試料 (MF, オリエンタル酵母製) を使用し、飲料水は水道水を自由に摂取させた。1 週間の予備飼育後、無作為に 3 匹ずつコントロール群、ノビレチン投与群の 2 群に分けた。本研究は島根大学総合科学研究支援センター動物実験指針に従い、動物実験専門部会の承認のもと (承認番号 IZ26-9) で実施した。

2.2 経口投与サンプルの調製と投与

株式会社ウシオケミックスより供与された合成ノビレチン 33 g を 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) 水溶液 0.5 mL に溶解し約 50 mg/kg 体重になるよう調整した。

ノビレチン投与群には、経口投与サンプル 0.5 mL を 14 日間連続経口投与し、最終経口投与終了後一晩の絶食をさせた。対照群には同量の 10%DMSO 水溶液のみを経口投与させた。

2.3 試料採取

投与終了後、深麻酔下で頭皮を採取し、mRNA 発現解析のためのサンプルは分析まで -80℃ で凍結保存した。また一部のサンプルは免疫組織学的観察のため、4%パラホルムアルデヒド (pH 7.4) 固定液にて一晩固定し、洗浄、スクロース置換後、凍結標本包埋剤 (OCT コンパウンド) で包埋した。

2.4 抗酸化酵素およびマトリクス分解酵素への影響解析

頭皮より真皮のみを採取し、全 RNA を抽出し、逆転写後、SYBR Green を用いたリアルタイム PCR 解析により、抗酸化酵素 superoxide dismutase (SOD), catalase (Cat), glutathione peroxidase (Gpx) およびマトリクス分解酵素 MMPs (2, 9, 13), 核内転写因子 PPARs (α , γ , δ) の mRNA 発現を定量した。内部標準として glyceraldehyde-3-phos

Table1 プライマー配列リスト

	forward primers (5'-3')	reverse primer (5'-3')
SOD	ATCTTCTTGTGCAGTGCCAGC	TAGGGCTCAGGTTTGTCCAG
Cat	ATGAAGCAGTGGAAGGAGCA	TCAAAGTGTGCCATCTCGTC
Gpx	GGAGAATGGCAAGAATGAAGA	CCGCAGGAAGGTAAAGAG
MMP2	CCAACTACGATGATGAC	ACCAGTGTCTCAGTATCAG
MMP9	ACCACATCGAACTTCGA	CGACCATACAGATACTG
MMP13	TGATGGACCTTCTGGTCTTCTGG	CATCCACATGGTTGGAAGTTCT
PPAR α	ACGATGCTGTCCTCCTTGATG	GCGTCTGACTCGGTCTTCTTG
PPAR γ	CCCTTTACCACGGTTGATTTCTC	GCAGGCTCTACTTTGATCGCACT
PPAR δ	AGGACATGAGCCATCCAAAG	TACACCCCTTCCCTTCAGTG
GAPDH	GTGACCAGAGCGAAAGCA	CCTTGACTGTGCCGTTGAACT

phate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。プライマーの配列を Table1 に示す。

2.5 免疫組織化学

免疫組織化学用に、凍結包埋された組織から 10 μ m の薄切切片を作製した。ノビレチン経口投与による表皮基底膜への影響を解析するために、基底膜における Type4 コラーゲンの発現・分布を観察した。一次抗体には anti-Collagen IV antibody rabbit IgG (1:1000; Abcam Cambridge, MA, USA) を用い、4°C で一晩反応させた。二次抗体には Alexa Fluor 546-conjugated secondary antibody (1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて 60 分室温で反応させた。細胞核は Fluoroshield Mounting Medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Immuno Bio Science, Mukilteo, WA) を用いて発色させた。組織の観察は共焦点レーザー顕微鏡 LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss, Jena, Germany) およびイメージングソフトウェア LSM Software ZEN (Carl Zeiss) を用いた。

2.6 統計学的解析

データは Excel を用いて平均 \pm 標準偏差で表した。2 群間の比較は t 検定を用いた。有意水準は 1%未満とした。

3. 結果

投与終了後の体重に、2 群間で有意な差は認められなかった。

3.1 抗酸化酵素の発現

ラット真皮における抗酸化酵素 mRNA の発現について、リアルタイム PCR を施行した結果、ノビレチン投与群はコントロール群と比較し、SOD, Cat, Gpx の mRNA の発現が有意に増加していた (Fig.2)。

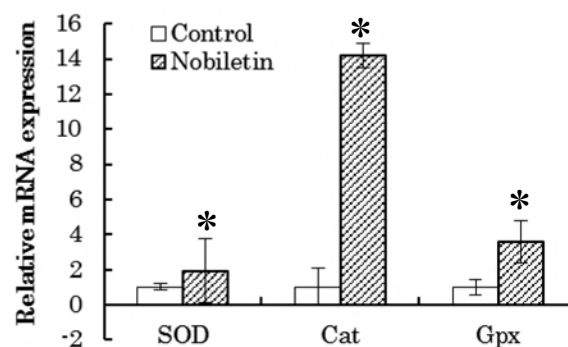


Fig.2 抗酸化酵素の発現

3.2 マトリクス分解酵素の発現

抗酸化酵素と同様にリアルタイム PCR で mRNA の発現を解析した結果、MMP2 および MMP9 の発現は、コントロール群と比較してノビレチン投与群が有意に低下して

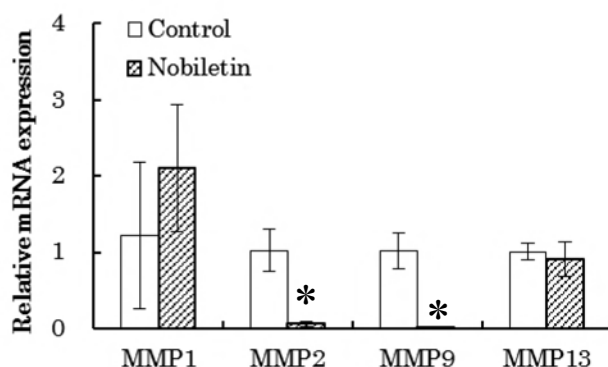


Fig.3 マトリクス分解酵素の発現

いたが, MMP1, MMP13 に有意な差は見られなかった (Fig.3)。

3.3 核内転写因子の発現

PPARs の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析した結果, PPAR α , γ , δ 全てコントロール群と比較しノビレチン投与群が有意に増加していた (Fig.4)。

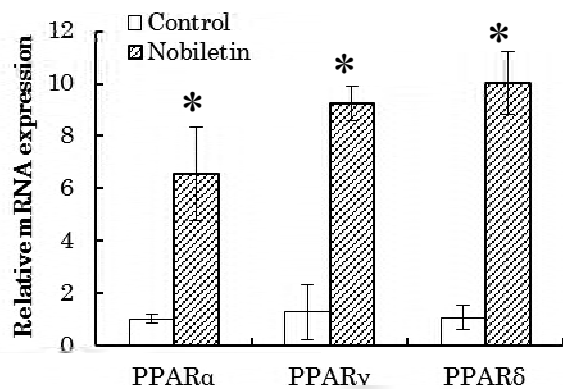


Fig.4 核内転写因子の発現

3.4 基底膜の構造変化

ラット皮膚における Type4 コラーゲンの免疫組織化学染色を行った結果, 基底膜に存在する Type4 コラーゲンは, ノビレチン投与群においてコントロール群と比較し顕著な発現が認められた (Fig.5)。

4. 考察

シークワシャーの成分の一つであるノビレチンの美肌

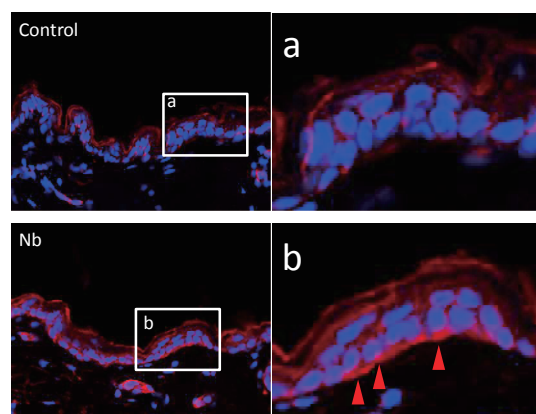


Fig.5 基底膜の蛍光免疫染色による組織図

効果に対する薬理学的効果は *in vitro* での検討がなされているが, 本研究では経口投与においても真皮に薬理学的効果が生じるかどうかを, ラット経口投与を用いて *in vivo* で検討した。その結果, ノビレチンは経口投与でも, 真皮において抗酸化効果を示し, コラーゲン分解を抑制する可能性が示唆された。

抗酸化効果に関して, 本研究では SOD, Cat および Gpx の mRNA 発現を検討した。SOD は $O_2^{\cdot -}$ (スーパーオキシド) を Cat や Gpx は H_2O_2 を消去する活性酸素からの防御機構である。 H_2O_2 は不対電子を持たないが, 遷移金属の存在下で容易に還元され, OH^{\cdot} (ヒドロキシルラジカル) を生じる活性酸素である。ノビレチンを経口投与したラット真皮ではこれら抗酸化酵素の mRNA の発現が亢進しており, ノビレチンが *in vivo* においても抗酸化効果を持つことが示唆された。過剰な活性酸素はコラーゲンを産生する線維芽細胞を減少させるため⁵⁾, ノビレチンは抗酸化効果によりコラーゲンを維持し, 皮膚の弾力やハリを保っていると考えられる。

また, ノビレチンは MMP2 及び 9 の mRNA の発現を減少させ, ノビレチン群のラット皮膚の免疫染色においては, コントロール群と比べ表皮基底膜の Type4 コラーゲン染色が強く染色された。MMP2, MMP9 は基底膜に存在する Type4 コラーゲンを分解するため, ノビレチン投与による分解抑制によりコラーゲンを維持している可能性が

示唆された。また、ノビレチン群の方が強く染色されていたことは、ノビレチンの MMP2, MMP9 抑制によるコラーゲン分解抑制効果だけでなく、何らかの因子を介したコラーゲン生産を増加させる機構も働いている可能性がある。この MMP9 の抑制に関し、PPAR γ は MMP9 を抑制することが報告されている⁹⁾。ノビレチンは MMP9 を抑制する PPAR γ の発現も亢進していたため、MMP9 の抑制は PPAR γ 亢進を介した影響の可能性もある。PPAR に関して、ノビレチン投与により PPAR γ だけでなく、PPAR α および PPAR δ の mRNA の発現も増加していた。PPAR α は主に脂肪酸の代謝、特に脂肪酸酸化を調節することが知られているが¹⁰⁾、PPAR δ の生理機能については不明な点が多いが、全身の組織に発現が認められ、脂質代謝や表皮細胞の増殖に密接な関係があるとされる¹⁰⁾。ノビレチンには美肌効果だけでなく、全身への効果も考えられ、PPAR α および PPAR δ の増加を介した効果については、今後、解明することが必要と考えている。

以上の結果より、ノビレチンは経口投与においても、真皮での抗酸化効果及びコラーゲンの維持作用を示し、皮膚の弾力やハリを保つ可能性が示唆された。

5. 参考文献

- 1) A. Murakami, Y. Nakamura, Y. Ohto, M. Yano, T. Koshiba, K. Koshimizu, H. Tokuda, H. Nishino, H. Ohigashi, *Biofactors* **2000**, *12*, 187-192.
- 2) N. Lin, T. Sato, Y. Takayama, Y. Mimaki, Y. Sashida, M. Yano, A. Ito, *Biochemical Pharmacology* **2003**, *65*, 2065-2071 10.1016/s0006-2952(03)00203-x.
- 3) C. S. Lai, S. M. Li, C. Y. Chai, C. Y. Lo, S. Dushenkov, C. T. Ho, M. H. Pan, Y. J. Wang, *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 2415-2424 10.1093/carcin/bgn222.
- 4) 市ノ木山浩道, 前川哲男, 後藤正和, *園芸学研究* **2012**, *11*, 387-391.
- 5) 伊藤まゆ, 三樹美夏, 林浩孝, 新井隆成, 鈴木信孝, 上馬場和夫, *日本補完代替医療学会誌* **2009**, *6*, 111-118.
- 6) K. Kawabata, A. Murakami, H. Ohigashi, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2005**, *69*, 307-314 10.1271/bbb.69.307.
- 7) T. Sato, L. Koike, Y. Miyata, M. Hirata, Y. Mimaki, Y. Sashida, M. Yano, A. Ito, *Cancer Research* **2002**, *62*, 1025-1029.
- 8) P. Delerive, J. C. Fruchart, B. Staels, *Journal of Endocrinology* **2001**, *169*, 453-459 10.1677/joe.0.1690453.
- 9) N. Marx, G. Sukhova, C. Murphy, P. Libby, J. Plutzky, *Am J Pathol* **1998**, *153*, 17-23.
- 10) 川人豊, *炎症・再生* **2006 Jan**, *23*, 74-83.