

氏名・(本籍)	きょう 喬 志 偉 (中国)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第861号
学位授与の日付	平成26年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Anti-melanogenesis effect of Glechoma hederacea L. extract on B16 murine melanoma cells (マウス B16 メラノーマ細胞におけるカキドオシエキスによるメラニン生成の抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 眞 鍋 求 (副査) 教授 今 井 由美子 教授 三 浦 昌 朋

## 学位論文内容要旨

### **Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells**

(マウス B16 メラノーマ細胞におけるカキドオシエキスによるメラニン生成の抑制)

申請者氏名 喬 志偉

### 研究目的

メラニン、チロシンに代表されるフェノール類物質の酵素的酸化により形成された高分子の色素の総称である。メラニンの生合成は、メラノサイトという細胞で行われ、特異的に発現する酵素のチロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質 (TRP-1/2) と転写因子 MITF により調節されている。メラニンは生体を紫外線から保護し、大切な役割を果たしている。しかし、長期間紫外線を浴び続けることで、過剰にメラニンが生成されるようになり、シミ、そばかすなどが皮膚に出現する。シミやそばかすなどの色素沈着症の予防や治療のために、メラニンの生成を抑制することが重要となる。より強いメラニン生成抑制作用をもつ美白剤の開発が望まれている。

カキドオシ (*Glechoma hederacea* L.) は、シソ科のカキドオシ属の植物であって、生薬名「連銭草」とも呼ばれている。利尿作用や消炎作用などを有する植物として古くから民間療法において広く用いられている。

本研究では、天然由来のカキドオシから得られたカキドオシエキスが有する新しい生理作用の探索過程においてメラニン生成の抑制効果を見出し、さらに、メラニン生成抑制効果の作用機構を明らかにすることを目的とした。

### 研究方法

(1) メラニン生成はマウス B16F10 メラノーマ細胞株を用いて、培養 3 日後に細胞から抽出したメラニンの吸光度を測定することにより評価した。未処置対照のメラニン生成量に対するカキドオシエキス添加時のメラニン生成量から、相対値としてメラニン生成率を求めた。(2) MTT アッセイ

を行い、カキドオシエキスによる細胞生存率への影響を検討した。(3) チロシナーゼの酵素活性は、マッシュルーム由来のチロシナーゼを用い、L-ドーパから生じるドーパクロム生成量の吸光度を測定して評価した。(4) 細胞内チロシナーゼ活性は B16F16 細胞から抽出した細胞抽出液と L-ドーパを反応させ、生成したドーパクロムの吸光度を測定して評価した。(5) メラニン生成に関連するタンパク質の発現量は、細胞からタンパクを抽出し、BCA アッセイで濃度を測定した後、Western Blotting で検討した。(6) メラニン生成に関連する遺伝子の発現量は RT-PCR で評価した。

### 研究成績

(1) カキドオシエキスは B16F10 メラノーマ細胞のメラニン生成を濃度依存的に抑制した。MTT アッセイの結果、メラニン生成を抑制する濃度のカキドオシエキスは細胞生存率への影響を示さなかった。メラニン生成過程の律速酵素であるチロシナーゼに対し、コウジ酸がポジティブコントロールとしてチロシナーゼの酵素活性を阻害したことが確認された。(2) カキドオシエキスは直接的に酵素活性への阻害作用を示さなかった。しかし、カキドオシエキスによって B16F10 細胞内チロシナーゼ活性は有意に低下することが明らかになった。また、この効果が濃度依存的であることも明らかにした。(3) メラニン生成に関連するタンパク質チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2 と転写因子 MITF の発現量を調べるため、Western Blotting を行った。その結果、カキドオシエキスによるチロシナーゼおよび転写因子 MITF の発現量が抑制された。しかし、TRP-1 と TRP-2 への影響は認められなかった。さらに、RT-PCR の結果から、チロシナーゼ遺伝子の発現量の抑制が観察された。

### 結論

本研究において、カキドオシエキスにより細胞内のメラニン生成を効果的に抑制していることが示された。カキドオシエキスはコウジ酸と異なり、チロシナーゼの酵素活性を直接阻害するのではなく、酵素そのものの発現量を減少させる作用からメラニン生成を抑制すると考えられた。さらに、その上流にある転写因子 MITF の発現の抑制も認められた。カキドオシエキスは美白化粧品の有効成分や色素沈着症の予防や治療薬などへの応用が考えられる。

## 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：真鍋 求

申請者：喬 志偉

### **Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells**

(マウス B16 メラノーマ細胞におけるカキドオシエキスによるメラニン生成の抑制)

本研究は、カキドオシエキスによるマウス B16 メラノーマ細胞のメラニン生成抑制効果を検討したものである。

その結果、カキドオシエキスは（１）メラニン生成を濃度依存的に抑制し、（２）細胞毒性を示さず、（３）細胞内チロシナーゼ活性を低下させ、（４）MITF を介してチロシナーゼ遺伝子の発現を抑制する、などの特徴的所見を示した。

以上より、カキドオシエキスは美白化粧品の有効成分として、色素沈着症の予防や治療へ応用できる可能性が示された。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

#### 1) 斬新さ

天然植物カキドオシはシソ科蔓性多年草であり、昔から民間療法として、利尿、消炎薬として広く用いられているが、メラニン生成に対する効果は未だ検討されていなかった。

本研究は、このカキドオシに着目し、この水溶性抽出物がメラニン生成を抑制するのではないかという作業仮説を立て、その当否を検証した点が斬新である。

その結果、カキドオシエキスは、細胞毒性を示さずメラニン生成を抑制し、

かつ MITF を介してチロシナーゼの発現を翻訳ないし分解のレベルで制御する、などの特徴的所見が見いだされた。

## 2) 重要性

当該領域においては、メラニン生成を抑える美白剤の研究が活発に進められており、より効果的で安全な美白剤の開発が必要とされている。

本研究において、1) で述べた実験仮説について細胞生物学的手法を駆使して証明したことは、新規治療戦略の創生に大きく寄与するものと思われる。すなわち、カキドオシエキスが新たな美白剤の有効成分として、色素沈着症の予防・治療において重要な知見を見いだしたと考えられる。メラニン抑制のメカニズムを解明したことにより、本植物エキスの応用がさらに広がることが期待できる。

## 3) 実験方法の正確性

本研究はカキドオシエキスによる、細胞内メラニン生成量、細胞生存率、メラニン生成に関連する各種タンパク・遺伝子の発現などについて、確立された方法を用いて着実に検証を行った。

いずれの方法も再現性が高い客観的な評価方法で、正確性が高いと思われる。

## 4) 表現の明瞭さ

カキドオシエキスによるメラニン生成の抑制およびその作用機構を解明することを研究目的とし、これを検証するための実験方法、得られた結果とその考察などについて必要十分に表現されていた。全体として熟慮された内容であり、簡潔かつ明瞭に記載された論文であった。

以上に述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。