

# 酸化ストレスやパターン脱毛に対して治療的な有用性が示唆される *Malus pumila* Miller cv Annurca の新規抽出物：ヒト毛乳頭細胞を用いた実験結果から



画像[1]はイメージです

イタリア共和国南部バジリカータ州ポテンツァ県 [2] にあるバジリカータ大学 (University of Basilicata [3])、EVRA 社 (EVRA S.r.l. Società Benefit [4])、Spinoff Bioactiplant 社 (Spinoff Bioactiplant S.r.l.) などの研究者からなるグループが 2024 年 6 月の FEBS Open Bio 誌に発表した研究論文によると [5]、プロシアニジン B2 のすべての供給源のうち、この活性代謝物を最も高濃度に含んでいるのがリンゴ果実で、なかでも *Malus pumila* Miller cv Annurca (以降、アンヌルカ) は、グラニースミス、フジ、レッドデリシャス、ピンクレディー、ゴールデンデリシャスなどの他の市販のリンゴと比べてプロシアニジン B2 の含有量が最も多いことが報告されていることから [6]、このアンヌルカの抗酸化活性と育毛効果について検討することにしました。具体的には、パターン脱毛 (pattern hair loss\* : PHL) 予防のための栄養補助食品 (nutraceutical) や化粧品への応用を検証するために、ヒト毛乳頭細胞 (human follicle dermal papilla cells : HFDPCs) を用いて、アンヌルカリンゴ抽出物「AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup>」の潜在的な抗酸化活性と育毛効果を初めて調査することを目的としました。

\*原文では patterned hair loss と表記されています。

アンヌルカリンゴ果実全体 (皮と果肉) の抽出物 (AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup>) は De Biasio らが以前に報告した方法 [7] で得たもので、EVRA 社によって製造されました。プロシアニジン B2 とクロロゲン酸の定量もまた、同じ報告にあるように [7]、高速液体クロマトグラフィー-ダイオードアレイ検出器 (HPLC-DAD) によって実施されました。

## 細胞培養とサンプル調製

ヒト毛乳頭細胞 (HFDPCs) は、PromoCell 社 (ドイツ、ハイデルベルク) から購入しました。同社によると本品は、ウシ胎仔血清 (4%)、ウシ下垂体抽出物 (0.4%)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF) (1 ng/mL)、および組換えヒトインスリン (5 µg/mL) を添加した毛包毛乳頭細胞基底培地中で、

5% CO<sub>2</sub>の加湿雰囲気下、37℃で維持したもので、実験に際しては、製品 AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup>を完全な細胞培養液に溶解しました。

### HPLC-DAD による分析結果

PHL の予防に關与する 2 つの主要なフェノール化合物とされているプロシアニジン B2 とクロロゲン酸について、AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup> 乾燥エキス中のそれらの含有量を HPLC-DAD によって定量したところ、プロシアニジン B2 が  $0.080 \pm 0.0086$  mg/g、クロロゲン酸が  $0.523 \pm 0.019$  mg/g であることが明らかとなりました (図 1)。また、これらのデータは、フェノール抽出を促進するために酸性処理を施した凍結乾燥アンヌルカ種リングを用いてフェデリコ 2 世ナポリ大学の Maisto らが実施した以前の研究の結果 (プロシアニジン B2 が  $0.088 \pm 0.003$  mg/g、クロロゲン酸が  $0.521 \pm 0.051$  mg/g) [8] と類似していることもわかりました。

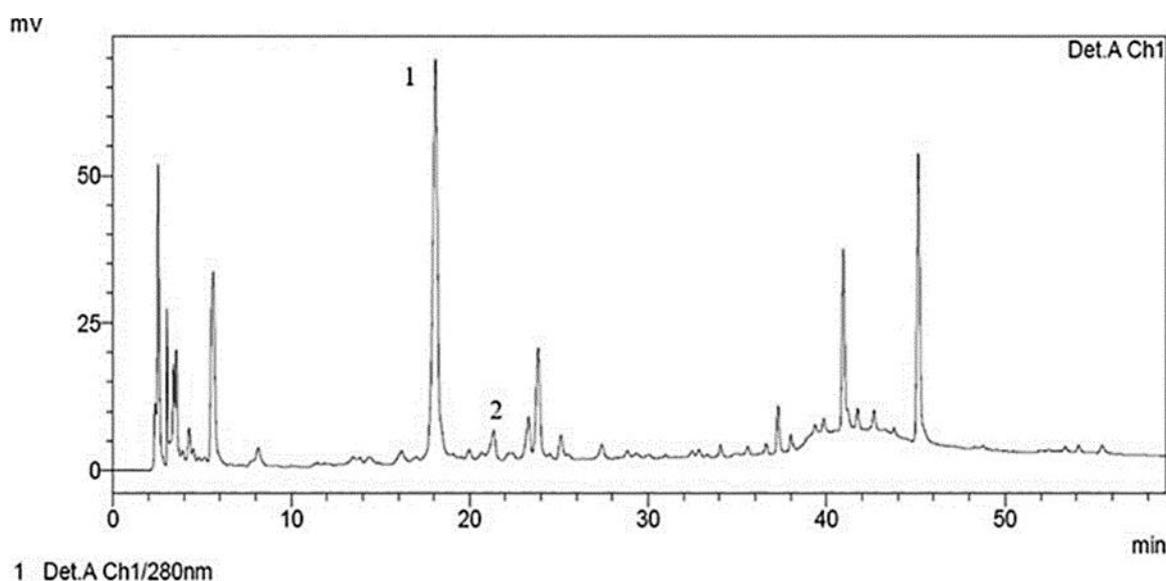


図 1. AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup>の代表的なクロマトグラム。(1) クロロゲン酸、(2) プロシアニジン B2。波長 280nm で分析  
参考 URL-5 より引用・改変

### AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup>の抗酸化活性

抗酸化物質は様々な物質から構成されており、各化合物はその化学構造によって特定のタイプのラジカルや酸化剤に対抗する特異的な能力を持つ可能性があるため、抽出物の抗酸化特性を包括的かつ正確に理解するために複数の手法を採用することが不可欠であることから、研究グループは FRAP、DPPH、ABTS の三種類のアッセイを実施しました。

調査の結果、まず、AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup>乾燥抽出物の還元力は  $19.35 \pm 0.48$  mmol TE\*/kg DW を示し、以前の研究で Maisto らが報告した数値 ( $15.59 \pm 0.11$  mmol TE/kg DW [8]) より高いものでした。次に、ABTS ラジカルを消去する同抽出物の能力については、 $15.92 \pm 0.94$  mmol TE/kg DW の ABTS 値を得ました。最後に、生物学的試料、食品、天然抽出物などの総合的な抗酸化力を評価するために一般的に用いられている FRAP アッセイでは、AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup>による抗酸化活性は  $26.60 \pm 0.65$  mmol TE/kg DW で、以前の研究で報告された数値 ( $26.63 \pm 0.70$  mmol TE/kg DW [8]) と同様であることが明らかとなりました。

\* TE : trolox equivalent

## 抗酸化酵素のタンパク質発現を調節する AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup>

マンガンスーパーオキシドジスムターゼとしても知られている SOD2 は、細胞のミトコンドリア内に特異的に存在するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) のアイソフォームで、スーパーオキシドラジカルを中和し、細胞を酸化損傷から守ることに関与しています。SOD2 の変異はいくつかの加齢性疾患と関連していることが証明されていることから、ミトコンドリアの健康と細胞の酸化還元バランスを維持する SOD2 の役割は全体的な細胞機能と健康にとってきわめて重要とされています。酸化ストレスから細胞を保護することに関与するもう 1 つの重要な抗酸化酵素がカタラーゼ (CAT) です。CAT 活性は、SOD などの他の抗酸化酵素と連携して ROS (活性酸素種) を中和し、細胞の恒常性を維持することにより、細胞の酸化還元バランスを維持するためにきわめて重要とされています。そこで研究グループは、AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup> がヒト毛乳頭細胞 (HFDPCs) の酸化還元状態を維持するかどうかを評価するために、基礎状態または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘発酸化ストレス下で、HFDPCs における SOD2 および CAT のような抗酸化酵素の発現に及ぼす AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup> の影響について調べました。

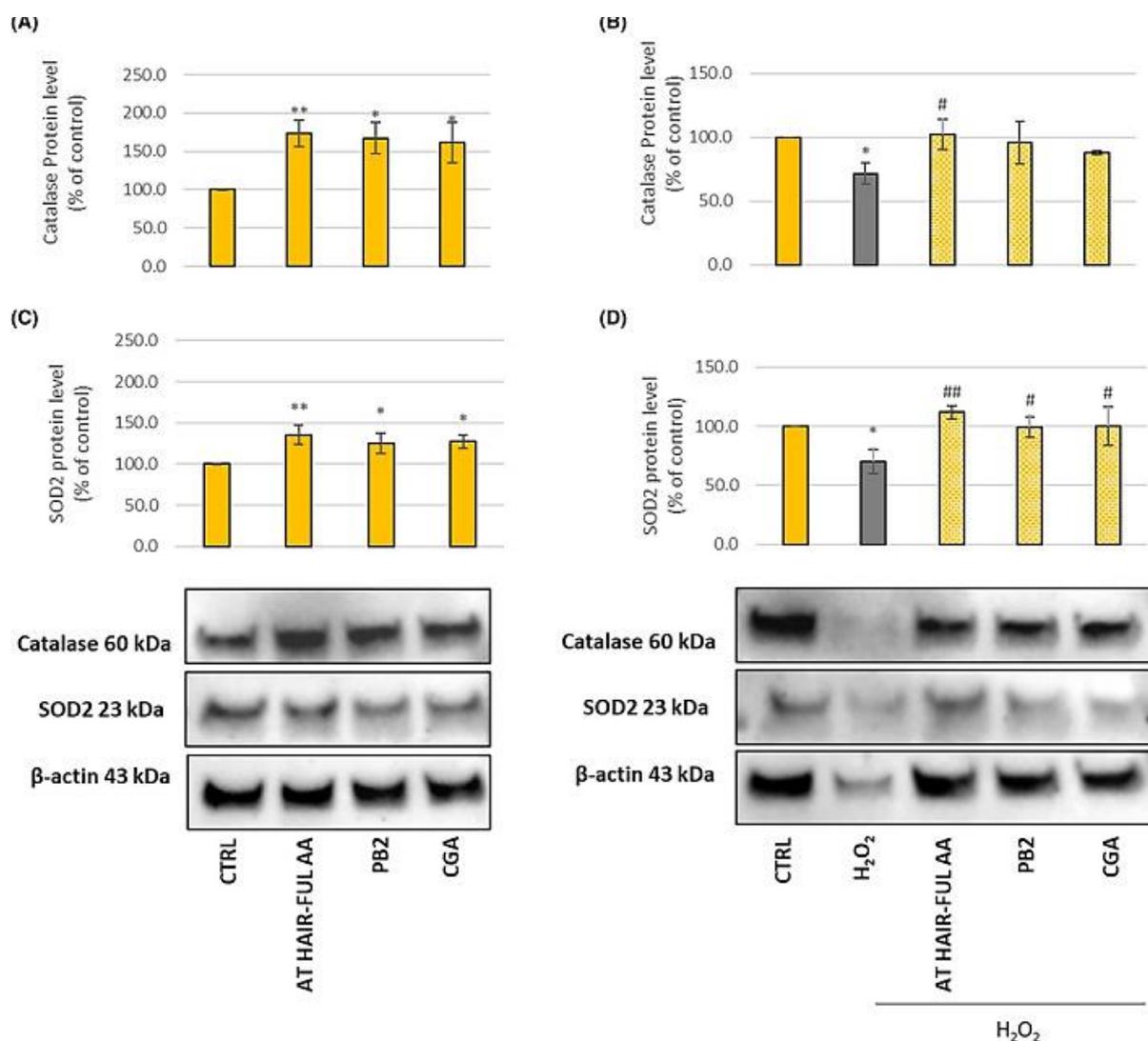


図 2. 抗酸化酵素に対する AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup> の効果。AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup> (2 mg/mL)、プロシアニジン B2 (PB2、0.16 μg/mL) およびクロロゲン酸 (CGA、1.05 μg/mL) で処理したヒト毛乳頭細胞 (HFDPCs) (A, C)。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 μm で 2 時間ストレス処理した後に AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup> (2 mg/mL)、プロシアニジン B2 (PB2、0.16 μg/mL) およびクロロゲン酸 (CGA、1.05 μg/mL) で処理した HFDPCs (B, D)。タンパク質レベルはβ-アクチン含量で正規化した。データはコントロール細胞を 100%として正規化し、3 回の独立した実験 (n = 3) の平均値±SD で表した。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs CTRL グループ、# P < 0.05, ## P < 0.01 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理グループ。参考 URL-5 より引用・改変

AT HAIR-FUL AA® (2 mg/mL)、プロシアニジン B2 (PB2, 0.16 µg/mL)、またはクロロゲン酸 (CGA, 1.05 µg/mL) で 24 時間処理したときのタンパク質発現をウェスタンブロットで測定したところ、AT HAIR-FUL AA®、プロシアニジン B2、クロロゲン酸のいずれによる処理も両酵素の発現を増加させることが明らかとなりました (図 2 A,C)。さらに、ストレス細胞を AT HAIR-FUL AA® で処理した場合、コントロール (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 400 µm) と比較して、SOD2 と CAT の発現の増加 (図 2 B,D) が観察されました (それぞれ  $P < 0.05$  と  $P < 0.01$ )。

活性代謝物であるプロシアニジン B2 (PB2) とクロロゲン酸 (CGA) は、アンヌルカ抽出物と同様に、SOD2 酵素をアップレギュレートし (図 2 D)、CAT の発現を基底レベルまで回復させました (図 2 C)。興味深いことに、ストレス条件下の AT HAIR-FUL AA® は単独の化合物よりも CAT 発現を増加させたことから、アンヌルカの特異的な代謝物の可能な相乗作用が示されました (図 2 C)。この観察は、果実の抗酸化微量栄養素と多量栄養素の可能な相乗効果により、新鮮な果実の摂取量を増やすと、単一のサプリメントの場合よりも健康効果が高まるという知見と一致しています。

### AT HAIR-FUL AA® で処理した HFDPCs における成長因子の発現

休止期 (telogen phase) から成長期 (anagen phase) への毛周期の移行を促進する因子であるβ-カテニンについて、AT HAIR-FUL AA® とその主な代謝物が 4 時間後と 24 時間後に HFDPCs における同因子の発現増強における役割を調べました。図 3 に示すように、β-カテニン (β-catenin) は抽出物と PB2 で 24 時間処理した後に対照群と比べて有意に増加したことが明らかとなりました ( $P < 0.05$ )。

AT HAIR-FUL AA® 処理後の HFDPCs における FGF-2 発現の増加が観察されたことにより、アンヌルカリンゴ抽出物を投与したマウスにおける線維芽細胞増殖因子 (FGF) と血管内皮増殖因子 A (VEGFA) の発現増加、および毛髪の長さ、重さ、太さ、密度が改善を見出し、アンヌルカ抽出物がβ-カテニン発現の増加を介して (FGF と VEGFA を誘導する) Wnt シグナル伝達の活性化を促進することに関与している可能性があることを示唆した以前の研究が裏づけられました [9]。同様に、PB2 による処理も、未処理細胞と比べて FGF-2 発現の増加を誘導することが明らかとなりました ( $P < 0.001$ )。FGF は毛包の発達と表皮細胞の分化および増殖に重要な役割を果たしている一方 [10]、FGF-2 はマウスの毛周期にポジティブな影響を及ぼすとされています [11]。

### まとめ

PHL の治療のために、長年にわたっていくつかの薬理的治療薬が開発されてきましたが、その有効性に関する情報はごくわずかしが発表されていません。こうしたことから、製薬業界や医療業界は新規かつ安全な治療法の開発に力を注ぐようになりました。これらの治療法の中でアンヌルカ抽出物は、*in vivo* および健康なヒト被験者において発毛を誘導できることが明らかとなりました。

今回の研究で、新しいアンヌルカ抽出物である AT HAIR-FUL AA® がヒト毛乳頭細胞で初めて調査され、抗酸化酵素である SOD と CAT の活性を増加させることにより、細胞内の ROS の蓄積に対抗する能力が実証されました。さらに AT HAIR-FUL AA® は、毛包の形態形成と再生に関与することが知られている因子であるβ-カテニンを増加させ、休止期から成長期への移行を促進することに関与していることが示されました。また、毛包の発育に重要な役割を果たす FGF-2 の増加とも関連していることが明らかとなりました。

これらの結果から、AT HAIR-FUL AA® は、酸化ストレスを軽減し、毛髪成長関連因子の発現を誘導することにより、脱毛の予防や治療に有用な天然物質である可能性が示唆されましたと論文の著者は結論づけています。

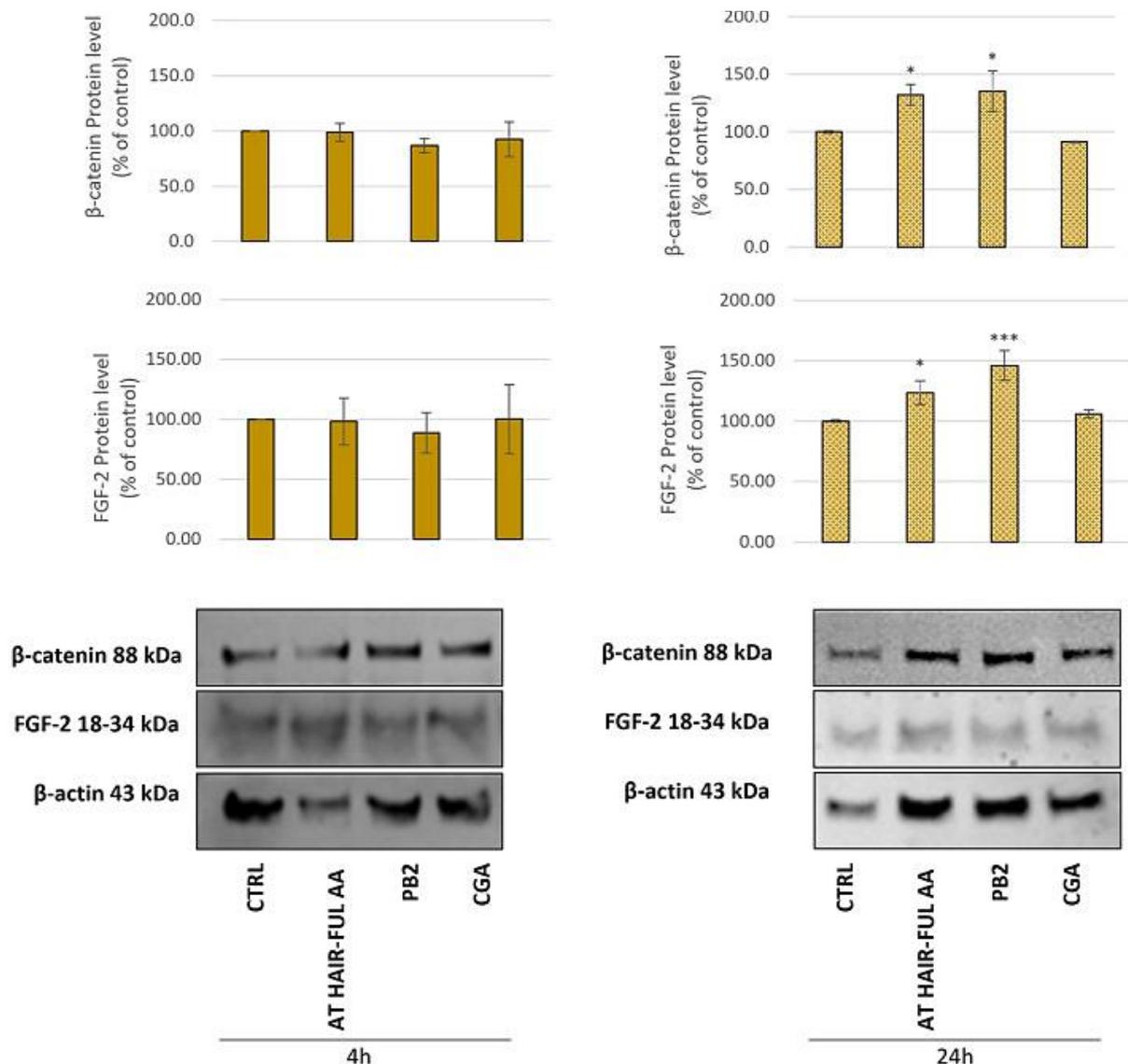


図 3. 毛髪成長因子に対する AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup>の効果。ヒト毛乳頭細胞 (HFDPCs) を AT HAIR-FUL AA<sup>®</sup> (2 mg/mL) またはプロシアニジン B2 (PB2, 0.16 μg/mL) またはクロロゲン酸 (CGA, 1.05 μg/mL) で 4 時間および 24 時間処理した。データは CTRL 群を 100%として正規化し、3 回の独立した実験 (n = 3) の平均値±SD で表した。  
\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$

参考 URL-5 より引用・改変

## 抄録

パターン脱毛 (PHL) または男性型脱毛症は、世界中で約 50%の人が罹患している疾患である。長年にわたりいくつかの薬理的治療薬が開発されてきたものの、その有効性を検討した研究はほとんどない。したがって、より安全で効果的な新しい戦略が求められている。最近の調査で、アンヌルカリンゴ抽出物を塗布すると、プロシアニジン B2 の含有量の高さのおかげで、ケラチンの生成が誘発され、髪の成長が促進されるかもしれないということが示されている。そこで本研究では、ヒト毛乳頭細胞 (HFDPCs) を用いて、アンヌルカリンゴ抽出物の PHL 予防における役割を初めて調べることを目的とした。HFDPCs をアンヌルカリンゴ抽出物で処理すると、スーパーオキシジスムターゼ 2 やカタラーゼなどの抗酸化酵素の活性が上昇し、細胞内の活性酸素の蓄積が抑制された。さらにアンヌルカリンゴ抽出物による処理は、毛髪成長刺激に関与するβ-カテニンと線維芽細胞増殖因子 2 を増加させた。これらのデータから、アンヌルカリンゴ抽出物は酸化ストレスを軽減し、毛髪成長関連因子の発現を誘導することにより、脱毛を予防または治療するための治療上有用な栄養補助食品となる可能性が示唆される。

**Keywords** : androgenetic alopecia, Annurca apple extract, antioxidant effect, nutraceutical products, patterned hair loss

#### 出典

Benedetto N, Mangieri C, De Biasio F, Carvalho RF, Milella L, Russo D. Malus pumila Mill. cv Annurca apple extract might be therapeutically useful against oxidative stress and patterned hair loss. FEBS Open Bio. 2024 Jun;14(6):955-967. doi: 10.1002/2211-5463.13805. Epub 2024 May 6. PMID: 38711215; PMCID: PMC11148120.

#### 参考 URLs

1. [https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Melaio\\_Valle\\_di\\_Maddaloni.jpg](https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Melaio_Valle_di_Maddaloni.jpg)  
[2024年6月17日最終閲覧]
2. <https://www.italia.it/en/basilicata> [2024年7月19日最終閲覧]
3. <https://portale.unibas.it/site/en/home.html> [2024年7月19日最終閲覧]
4. <https://www.evra-ingredients.com/> [2024年7月19日最終閲覧]
5. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2211-5463.13805> [2024年7月23日最終閲覧]
6. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030881461201686X>  
[2024年7月19日最終閲覧]
7. <https://scientificeditorial.com/index.php/JAC/article/view/A-randomized-double-blind-placebo-controlled-clinical-trial-to-e> [2024年7月19日最終閲覧]
8. <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/10/1453> [2024年7月22日最終閲覧]
9. <https://www.mdpi.com/1467-3045/44/12/428> [2024年7月23日最終閲覧]
10. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X16301873>  
[2024年7月23日最終閲覧]
11. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961201003726>  
[2024年7月23日最終閲覧]

#### 免責事項

ここに記載した情報はできるだけ正確であるよう務めておりますが、内容について一切の責任を負うものではありません。確認および解釈のために、原文を参照されることをおすすめいたします。

2024年7月23日 作成

株式会社 光洋商会 [www.koyojapan.jp/](http://www.koyojapan.jp/)

〈東京本社〉 〒104-0061 東京都中央区銀座1-19-7 JRE銀座一丁目イーストビル3F Tel: 03-3563-7531 Fax: 03-3563-7538

〈大阪支店〉 〒530-0002 大阪府大阪市北区曽根崎新地2-6-23 MF桜橋ビル10F Tel: 06-6341-3119 Fax: 06-6348-1732

