

# 温州みかんに含まれるヘスペリジンの 毛包細胞増殖効果

笹沼いづみ<sup>\*1</sup>, 大塚 努<sup>\*2</sup>

## A hesperidin in satsuma mandarin stimulates the cell proliferation of hair follicle cells

Izumi SASANUMA and Tsutomu OHTSUKA

The satsuma mandarin belongs to citrus genus in plant taxonomy. Citrus fruits contain compounds for health promoting properties. In this study we examined the effect of citrus components on the proliferation of ES and hair follicle cells, and identified the components involved in the cell proliferation. In the cell culture based in vitro assay, we found the extracts from satsuma, yuzu, and orange stimulate the cell proliferations. Especially, the proliferation of hair follicle cell was stimulated by the hesperidin in the peel of satsuma mandarin.

KEYWORDS: Citrus, Hair Follicle Cell, Flavonoids.

### 1. 緒言

温州みかんが分類される柑橘類には 500 種類以上の有効成分が検出されている。柑橘類に含まれる代表的な成分は、カロテノイド類、フラボノイド類、リモノイド類、クマリン、多糖類などがあり、これらの成分は、動物細胞の増殖に影響を与えるという報告がある<sup>1)</sup>。即ち、カロテノイド類とリモノイド類では発がん抑制効果、フラボノイド類では、骨芽細胞の活性化が報告されており、柑橘類の成分は、動物細胞の増殖を調節する因子として作用することが知られている<sup>1)</sup>。そのため、これらの成分は、漢方薬、スキンケア、育毛剤などに利用されてきた<sup>1)</sup>が、その作用機構については未だ不明な点が多い。

細胞の増殖を促進する因子は、外因性の物質と内因性の物質がある。これらは受容体に結合し、シグナル伝達を開始させることで細胞を増殖させる。柑橘類に含まれる成分は、外因性の物質と同様の作用で動物細胞に働きかけると考えられ、外

因性の物質による増殖調節は、細胞膜に受容体がない場合は、細胞膜の透過性に依存する。よって、動物実験を用いた場合では、明確な結果を得ることはできないと考えられる。しかし、細胞培養の技術の発展により、細胞に働きかける因子とその影響について検討することが可能になってきた。

本研究では、柑橘類に含まれる細胞増殖調節因子を同定するために、柑橘類から成分を抽出・分画し、これらの動物細胞増殖に与える影響を細胞レベルで検討した。

### 2. 材料及び方法

供試細胞：マウス ES 細胞 (RCB1517)、毛包細胞 (RCB0736)。供試植物：オレンジ (*Citrus sinensis*)、レモン (*Citrus limon*)、ユズ (*Citrus junos*)、ウンシュウミカン (*Satsuma orange*)、グレープフルーツ (*Citrus X paradisi*)。

柑橘類抽出物：蒸留水 (水抽出)、100%エタノール (エタノール抽出物)、または 60%飽和の硫酸

\*1 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail: sasaki@oyama-ct.ac.jp

\*2 森永乳業株式会社(Morinaga Milk Industry co., Ltd.)

アンモニウム（タンパク質画分）で抽出した。  
抽出物の分析：分光光度計による吸収スペクトル測定と TLC を行った。タンパク質の分析：タンパク質量はローリー法、分子量は SDS-PAGE で測定した。細胞数の測定：MTT 法で行い、増殖率を算出した。増殖率 = [細胞数/前回の細胞数]

### 3. 結果

#### 3.1 ES 細胞と毛包細胞の増殖における柑橘類果皮抽出物の影響

ES 細胞は  $5.2 \mu\text{g/ml}$  濃度のオレンジ-タンパク質で増殖が促進された（図 1）。また、 $20.8 \mu\text{g/ml}$  濃度のユズ-エタノール抽出物で増殖が促進された（図 2）。これら以外の抽出物では ES 細胞の増殖はコントロールの培養より低いことが明らかになった。

一方、毛包細胞はミカンとユズ水抽出物で増殖が促進された（図 3）。また、エタノール抽出物とタンパク質では、全ての柑橘果皮抽出画分が毛包細胞の増殖を促進することが認められた。この中で最も増殖効果を示したものは、 $0.2 \mu\text{g/ml}$  濃度のミカン-エタノール抽出物と  $0.13 \mu\text{g/ml}$  濃度のユズ-タンパク質であった（図 4）。

ユズのエタノール抽出物は ES 細胞と毛包細胞の両方で増殖を起こすことが明らかになったが、ユズのエタノール抽出物は  $0.2 \mu\text{g/ml}$  で細胞の増殖率が低下するため、これ以降はミカンのエタノール抽出物に着目し、検討を行った。

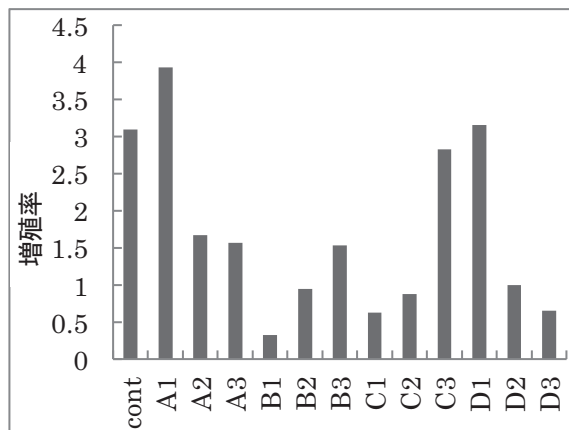


図 1 柑橘類果皮から得たタンパク質画分が ES 細胞の増殖に及ぼす影響。添加物は A オレンジ、B グレープフルーツ、C レモン、D ユズで、それらの濃度は 1 が  $5.2 \mu\text{g/ml}$ 、2 が  $10.4 \mu\text{g/ml}$ 、3 が  $20.8 \mu\text{g/ml}$ 。の条培養日数は 18 日間である。

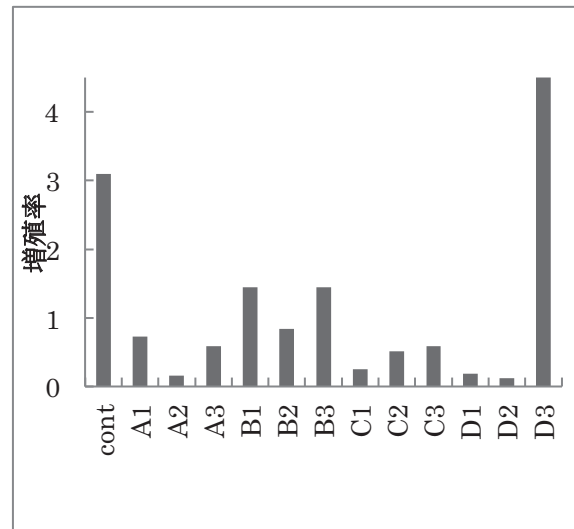


図 2 柑橘類果皮から得たエタノール抽出物が、ES 細胞の増殖に及ぼす影響。添加物は A オレンジ、B グレープフルーツ、C レモン、D ユズで、それらの濃度は 1 が  $5.2 \mu\text{g/ml}$ 、2 が  $10.4 \mu\text{g/ml}$ 、3 が  $20.8 \mu\text{g/ml}$ 。の条培養日数は 18 日間である。

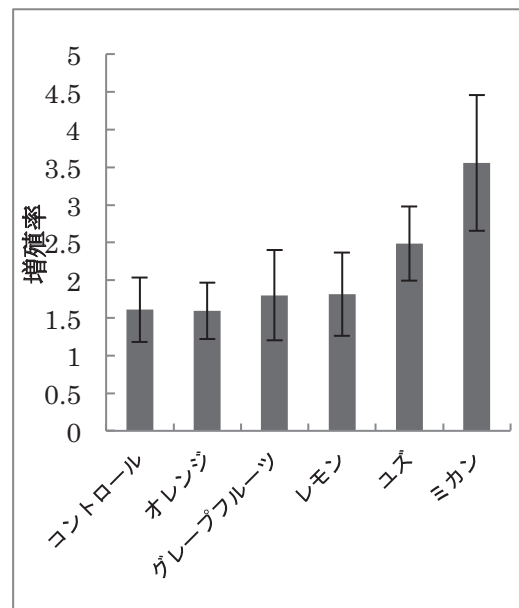


図 3 柑橘類果皮から得た水抽出物が毛包細胞の増殖に及ぼす影響。添加物濃度は  $0.2 \mu\text{g/ml}$  で培養日数は、4 日間である。

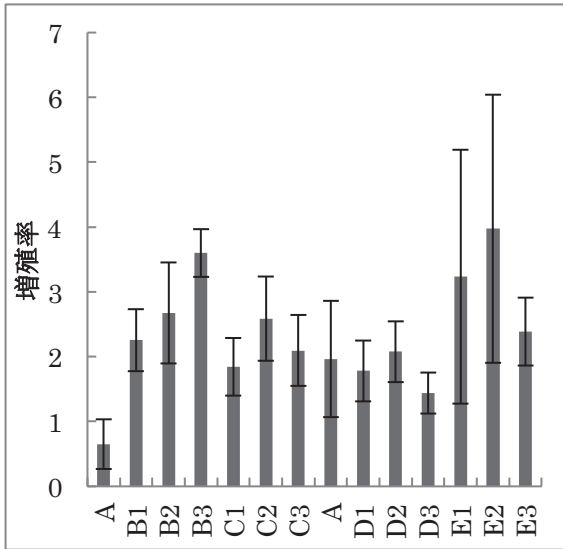


図4 柑橘類果皮から得たエタノール抽出物とタンパク質画分が毛包細胞の増殖に及ぼす影響。A: コントロール、B: ミカンエタノール抽出物、C: ユズエタノール抽出物、D: ミカンタンパク質画分、E: ユズタンパク質画分。1は添加濃度  $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、2は添加濃度  $0.13 \mu\text{g/ml}$ 、3は添加濃度  $0.2 \mu\text{g/ml}$  の条件で培養した。培養は4日間行った。

### 3.2 ミカンのエタノール抽出物とヘスペリジンの吸収スペクトル

吸収スペクトルを測定したところ、ミカンで  $294\text{nm}$  と  $331\text{nm}$  の吸収が認められた。ヘスペリジンのピーク  $290\text{nm}$  と  $329\text{nm}$  とミカン抽出物のピークはヘスペリジンを内部標準として用いた (ミカン抽出物に標準物質としてのヘスペリジンを混合し測定した) 場合に一致した。(表1)。

表1 ミカンのエタノール抽出物とヘスペリジンの吸収スペクトル

	吸収波長 [nm]	OD
ミカンのエタノール抽出物	294	1.85
	331	1.47
ヘスペリジン	290	1.03
	329	0.52

### 3.3 女性ホルモンが毛包細胞の増殖に及ぼす影響

ヘスペリジンをはじめとするフラボノイドは、細胞内の受容体であるステロイド受容体、特に女性ホルモンの受容体に結合し作用することが知られているので、今回用いた細胞の女性ホルモンに対する増殖率を測定し、ミカン抽出物のそれと比較した。女性ホルモンを毛包細胞に添加したところ、コントロールに対して約5倍の増殖が認められた(図5)。

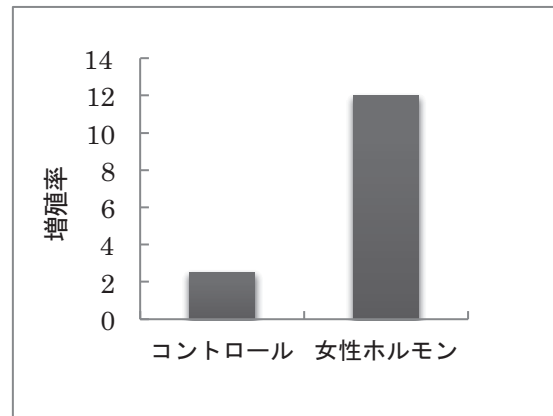


図5 女性ホルモンが毛包細胞の増殖に与える影響。

### 3.4 ヘスペリジンが毛包細胞の増殖に及ぼす影響

ヘスペリジンを毛包細胞に添加したところ、コントロールと比較して約1.3倍の増殖が認められた(図6)。

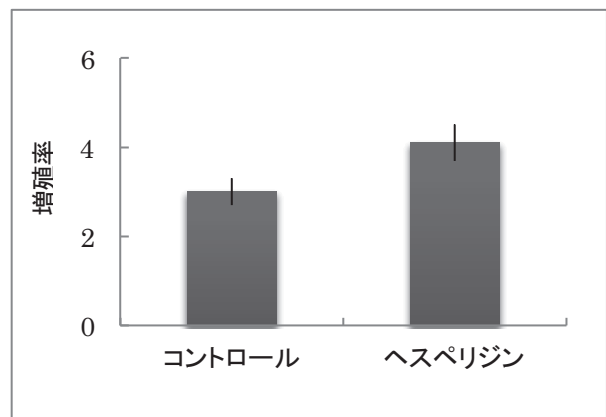


図6 ヘスペリジンの毛包細胞に与える影響。

### 3. 5 ミカン-エタノール抽出物の同定

ヘスペリジンとミカンのエタノール抽出物を TLC で分析したところ、ミカンでは Rf 0.97, 0.89, 0.82 の3つの蛍光スポットが検出された。Rf 0.82 のスポットは内部標準にヘスペリジンを用いた（ミカン抽出物に標準物質としてのヘスペリジンを混合し測定した）ときにスポットの位置が一致した。3つのスポットは同一色の蛍光を示したが、ミカンのエタノール抽出物には、分離に用いた溶媒に対する溶解度が異なる3種類の物質が含まれることが明らかになった(表2)。

表2 ミカンのエタノール抽出物とヘスペリジンの Rf 値

	ミカン	ヘスペリジン
Rf 値	0.97	0.82
	0.89	
	0.82	

## 4. 考察

ユズとミカンの抽出物は毛包細胞を増殖させることが明らかになった。これらの抽出物には 295nm 付近で吸収を示す物質が共通に含まれていた。ミカンに含まれる色素成分はβ-クリプトキサンチン、β-カロチンなどのカロチノイド、クマリン、リモノイド、タンゲレチン、さらにノビレチン、ヘスペリジンなどフラボノイドがある<sup>1, 2)</sup>。ミカンに含まれるフラボノイドは、ヘスペリジン、ノビレチン、タンゲレチンがあげられる<sup>1, 2)</sup>。

毛包細胞の増殖に関係していると推察されたものは290nm付近の吸収を持つ化合物であり、構造と吸収波長の関係から考察するとミカン、ユズに含まれるフラボノイドが毛包細胞の増殖を促進したと考えられる。ヘスペリジンは吸収波長285nmの物質で、ミカンに豊富に含まれ、レモン、ユズにも含まれるが、グレープフルーツに含まれない<sup>1, 2)</sup>。よって、ミカンとユズの果実皮に含まれる共通成分とその組成比からヘスペリジンが毛包細胞の増殖を促進した可能性があると推察した。

フラボノイドは皮膚繊維芽細胞の増殖を促進するほか、様々な細胞に対して増殖効果が検討され

ている。また、毛包の増殖はフラボノイドにより促進されるという報告がある<sup>3)</sup>。よって、ミカン、ユズに含まれるフラボノイドであるヘスペリジンが毛包細胞を増殖させたと考えられた。

ヘスペリジンとミカンのエタノール抽出物を比較したところ、ミカンの抽出物はヘスペリジンと同一の吸収スペクトルを持つことから、アグリコンの部分は同一であると考えられた。このフラボノイドは糖部分の構造により、ジグリコシドのヘスペリジン、モノグルコシドのヘスペレチン7-グルコシド、アグリコンのヘスペレチンとして存在する<sup>1)</sup>。TLC では、ヘスペリジンの他に Rf 値の高いスポットが2つ検出された。これらは、ヘスペレチン7-グルコシドとヘスペレチンと考えられた。

ミカンの抽出物はコントロールと比較した増殖率がヘスペリジンより高いことから、毛包細胞を増殖させることに、ヘスペレチン7-グルコシドとヘスペレチンもまた関与する可能性がある。女性ホルモンはコントロールに対して約5倍、ミカン抽出物は約7倍の増殖率を示したことから、ミカン抽出物は女性ホルモンより強い細胞増殖効果が期待できる。ヘスペリジンの毛包増殖効果は炎症抑制効果や血管増殖因子の誘導によるという報告はあるが<sup>1, 3)</sup>、ヘスペレチン7-グルコシドまたはヘスペレチンが毛包細胞を直接増殖させるという報告はこれまでにない。

ヘスペレチンの骨格から、細胞内の女性ホルモン受容体もしくは、細胞膜上の TGF-β 受容体に作用し、増殖作用を示すと考えられたが、女性ホルモンより高い増殖効果を示すことから、これとは異なる受容体または複数の受容体を同時に刺激したために強い増殖効果を示したものと考えられた。

以上のことから、ミカンの抽出物に含まれる毛包細胞増殖因子は、ヘスペレチンとその配糖体であり、これらは複数の受容体を刺激することにより、毛包細胞の増殖を促進することが推察された。

### 参考文献

- 1) E.Grotewold: The Science of Flavonoids, Springer Science+Business Media, LLC, USA, pp.213-257 (2008)
- 2) 野方洋一：近畿中国四国農業研究センター研究報告 第5号, pp. 19-84 (2005)
- 3) Bassino E, Antoniotti S, Gasparri F, Munaron L: Effects of flavonoid derivatives on human microvascular endothelial cells. Nat. Prod. Res., 2, 1-4 (2016)

【受理年月日 2016年 9月23日】