三重大学

令和５年４月18日
国立大学法人 三重大学

NEWS RELEASE

光皮膚老化抑制効果を示す新規化合物2種を スイカ幼果実から発見

SDGsを踏まえた化粧品原料「スイカ幼果実エキス」を開発

- スイカ幼果実より新規フェノール配糖体※1 2-caffeoyl-3-hydroxy-3-methylbutyric 4-β-D-glucopyranosyloxy-3-hydroxybenzyl ester および 2-caffeoyl-3-hydroxy-3-methylbutyric 4-β-D- glucopyranosyloxybenzyl ester をそれぞれ単離した。スイカの学名 Citrullus lanatus と配糖体の構造様式から前者を Citrulluside H、後者を Citrulluside T とそれぞれ命名した。
- Citrulluside H または Citrulluside T にて処理した正常ヒト皮膚線維芽細胞では、紫外線照射により誘導されるコラーゲン分解酵素の発現を遺伝子レベルで抑制した。
- Citrulluside H または Citrulluside T を含むスイカ幼果実エキスの8週間の連続塗布は、紫外線照射に起因するシワやたるみ（光皮膚老化※2）を軽減した。
- Citrulluside H または Citrulluside T にて処理したマクロファージは、*C. acnes*（アクネ菌）に誘導される炎症を軽減した。

【概要】

三重大学大学院生物資源学研究科 伊藤智広准教授、岐阜大学（工学部 纐纈守 教授）、株式会社萩原農場（奈良県磯城郡田原本町 代表取締役社長 萩原俊嗣）の研究グループは、スイカ栽培過程で発生する農産副産物であるスイカ幼果実から新規フェノール配糖体2種（Citrulluside H および Citrulluside T）を単離・精製し、これら新規化合物が光皮膚老化および *C. acnes* 誘導による炎症を抑制することを明らかにしました。 これら新規化合物を含む幼果実エキスの8週間の連続塗布では、シワを軽減する効果も確認できました。これら研究成果から、株式会社萩原農場では持続可能な農業生産に向けた栽培副産物の香粧品素材「スイカ幼果実エキス」を開発しました。本製品は、2023 年 5 月 17 日～19 日にパシフィコ横浜にて開催予定の CITE Japan 2023※3 に出展する予定です。

【背景】

太陽光に含まれる光線の一つである紫外線（以下 UV）は、ヒトの皮膚の構造および機能に深刻な悪影響を及ぼす環境因子の一つであり、その照射量と種類および曝露される個体の肌に応じて、日焼けや免疫力の低下、皮膚がん、シワ、シミなどを引き起こします。光皮膚老化とは、UV 照射によってコラーゲン産生を担う線維芽細胞のコラーゲンの発現の低下や *C. acnes* が産生した光増感物質（プロトポルフィリンⅣ）※4を介したコラーゲン非架橋結合などが原因で、肌にシワやたるみが生じる現象であります。生体内でポルフィリンなどの光増感物質は一重項酸素だけでなく、他の活性酸素種（reactive oxygen species、以下ROS）であるスーパーオキシド（・O2-）、ヒドロキシルラジカル（・OH）も発生させ、これらの ROS は、炎症やコラーゲン分解酵素の発現を誘導します。したがって、光皮膚老化の原因である ROS の消去や発生の抑制が、光皮膚老化の軽減に重要であると考えられます。近年、様々な天然物成分が光皮膚老化の抑制効果を示すことが報告されています。例えば、ヘアレスマウスに緑茶ポリフェノールの epigallocatechin-3-

gallate(EGCG)の経口投与は、UV-B 照射による真皮中のタンパク質の酸化やコラーゲン分解酵素の発現を抑制します(Praveen *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 122, 1480-1487 (2004))。また、ミカンなどの柑橘類に含まれるポリフェノールの 1 つであるヘスペリジンをヒト表皮角化細胞に添加し、UV-A を照射すると、 ROS の産生やサイトカイン(TNF-α、IL-1β、IL-6)の発現が抑えられ、皮膚の酸化や炎症が軽減されます(Li *et al.*, *J. Photochem. Photobiol.*, *B:Biol.* 165, 240-245 (2016))。これらの報告のように、光皮膚老化に有効な天然物成分が自然界にまだ数多く存在すると考えられています。

また、私たちヒトの体には、真核生物、古細菌、細菌、ウイルスを含む多くの微生物が叢を成して互いにバランスを保って生息しています(Blum, H. E., *Adv. Med. Sci.* 62, 414-420 (2017))。腸内における細菌叢の乱れは、宿主の消化管、自己免疫、代謝、神経関連に至る疾患発症に深く関与します。これら疾患発症を防ぐため、整腸作用、免疫機能調節、血圧降下作用を持つ乳酸菌やビフィズス菌といったプロバイオティクスが適用され、ヒトにおける微生物の重要性が広く認知されています。ヒトの皮膚にも腸内と同様に常在菌が 10^7 個以上も存在し、皮膚環境の状態に大きく関与しています。日和見菌である *Cutibacterium acnes*(以下 *C. acnes*)は、普段は代謝産物によって皮膚を弱酸性に保ち、皮膚環境にとって有用な存在であります。しかし、嫌気下かつ皮脂に富んだ環境では過剰に増殖し、ヒアルロニダーゼ (hyaluronidase)、リパーゼ(lipase)、プロテアーゼ(protease)といった酵素群によってニキビの悪化を惹起します。ニキビは若者に特に多く見られ、日本では 90 %以上の人が経験する代表的な炎症性皮膚疾患であります。

【研究内容】

スイカは起源・発展地の気候を反映して、生育、特に開花・結実期には高温を要求します。生育適温は昼温 25～30℃、夜温 18～22℃であります。したがって、日本では気温が最も高くなる 7～8 月に結実し、収穫を向かえます。この生産過程でツルが弱いなど成長が鈍い幼果は摘果され、ほとんどが廃棄されている現況にあります(図1)。スイカは1個体当たりの土地専有面積が大きい点や種子一粒が高い点から、他の作物に比べて栽培コストが比較的高い農産物であります。そのため、多くの栽培副産物が生じることは、生産者や種苗メーカーにとってその生産性が収入を大きく左右します。そこで、未利用副産物であるスイカ幼果実に含まれる有効成分を探索するために、エタノール抽出物を作成し、抗酸化およびコラーゲン酵素分解酵素の発現抑制効果を確認しました。これら機能を発揮する化合物を同定するためにカラムクロマトグラフィー[※5] に供し、主要なピークから 4 つの化合物を単離しました。このうち 2-caffeoyl-3-hydroxy-3-methylbutyric 4-β-D-glucopyranosyloxy-3-hydroxybenzyl ester 、2-caffeoyl-3-hydroxy-3-methylbutyric 4-β-D- glucopyranosyloxybenzyl ester は、これまでに報告例のない新規物質であることが化合物データ分析の結果から判明し、スイカの学名 *Citrullus lanatus* と配糖体の構造様式から前者を Citrulluside H、後者を Citrulluside T とそれぞれ命名しました(図2)。これら両化合物は紫外線吸収能を有する物質であり、未登熟の状態の幼果に多く含まれていました。最近 Zhang らの報告において登熟したスイカの種子から Citrulluside からカフェ酸が 1 分子外れた Lanatusoside C および Lanatusoside D が単離されています(Zhang, *et al.*, *Nat. Prod. Res.* 34, 398-404 (2020))。スイカ幼果実では、種子のもとになる受精胚珠が肥大している状態で、柔らかく種子発生の初期状態であります。成熟するにつれ、種皮が形成されていく過程で構成成分のリグニンが集積していくので、カフェ酸が代謝消費され、リグニンのもとになるコニフェリルアルコールなどが合成されていくと考えられています。この過程で、Citrulluside も同様に代謝されカフェ酸が外れていくため、登熟過程で減少していると考えられます。

図1. 廃棄処分されるスイカ摘果幼果物

左: 廃棄処分される摘果幼果、右下:摘果幼果の断面図

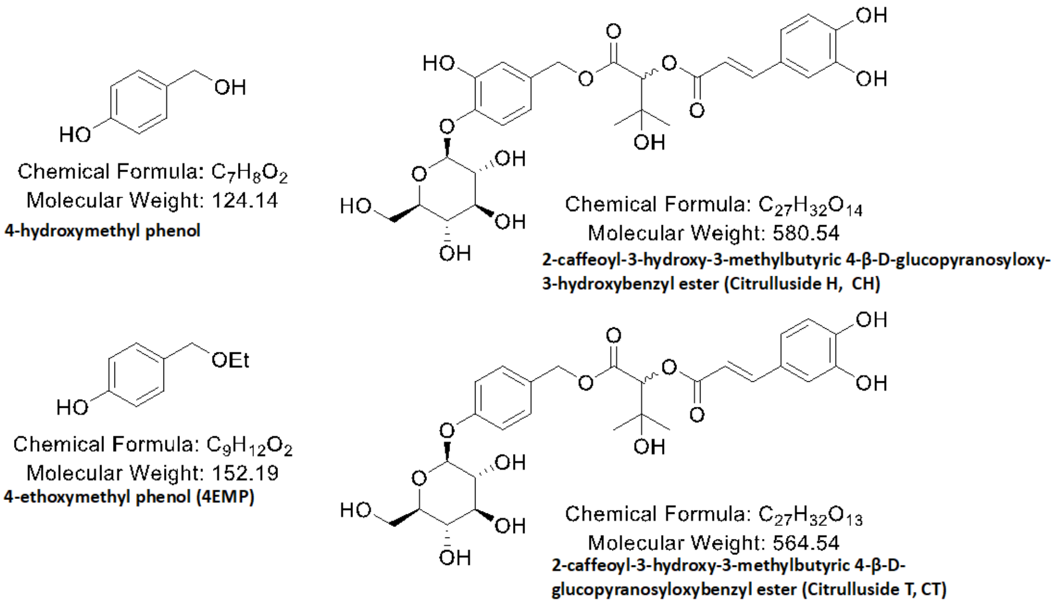

図2. スイカ摘果幼果物から単離した化合物

UV-B 照射したヒト新生児正常皮膚線維芽細胞内にて産生する ROS を Citrulluside H および Citrulluside T が消去することで(抗酸化能)がコラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-1、MMP-3)の発現が遺伝子レベルで抑制され、本物質の光皮膚老化抑制機構であると考えられました(図3および4)。

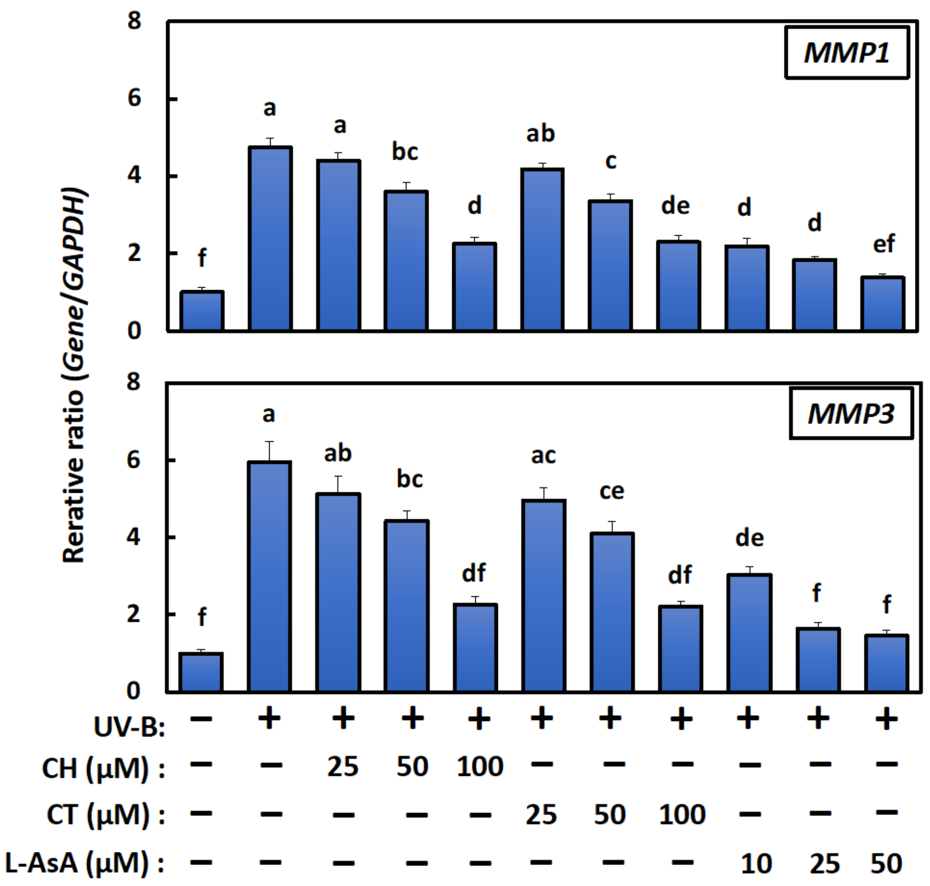

図3. Citrulluside H および Citrulluside H による UV-B 照射後 NHDFs における MMP-1 および MMP-3 の遺伝子発現への影響

データは、平均値±標準誤差で示した。多群間の比較は。Tukey-Kramer 法による検定を行なった($p<0.05$)。

CH: Citrulluside H , CT: Citrulluside T, L-AsA: L-ascorbic acid.

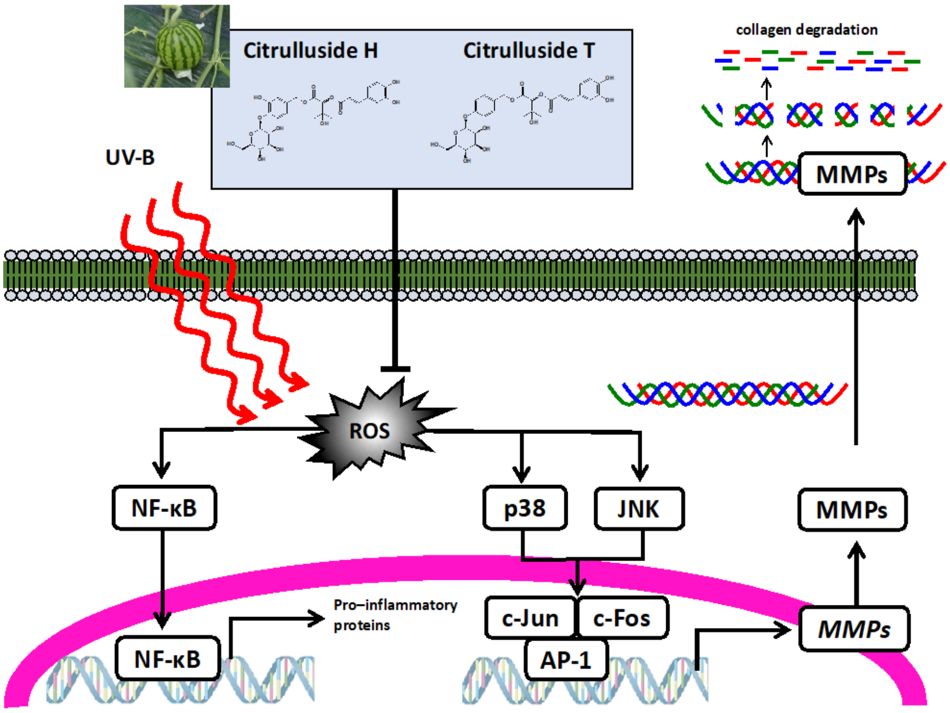

図4. Citrulluside H および Citrulluside H による光皮膚老化抑制機構

また、光老化によるコラーゲン分解を抑制する効果が *in vitro* 系の実験で示唆され、シワ改善の効果が期待されたことから、実際のヒト肌における効果をヒトボランティア試験により検討しました。試験デザインは二重盲検群間比較試験でシワグレードが 1 または2の女性 7 名を被験者とし、CH および CT を含んだ配合製剤と無配合のプラセボ製剤を左右の目尻に 1 日 2 回、8 週間塗布しました。シワ改善評価については、日本香粧品学会抗老化機能評価専門委員会により策定された「新規効能取得のための抗シワ製品評価ガイドライン」に基づき行いました。その結果、シワグレード標準に基づいた目視判定では、Citrulluside H および Citrulluside T を含んだ配合製剤塗布部位ではシワグレード 2 からグレード 3 への進行を抑制しました。また、目尻のシワのレプリカをとり非接触 3D 測定装置 PRIMOS Lite を用いた最大シワ最大深さを計測したところ、Citrulluside H および Citrulluside T を含んだ配合製剤の塗布部位では塗布前の状態よりも深度が浅くなっており、シワの改善効果を確認しました（図5）。

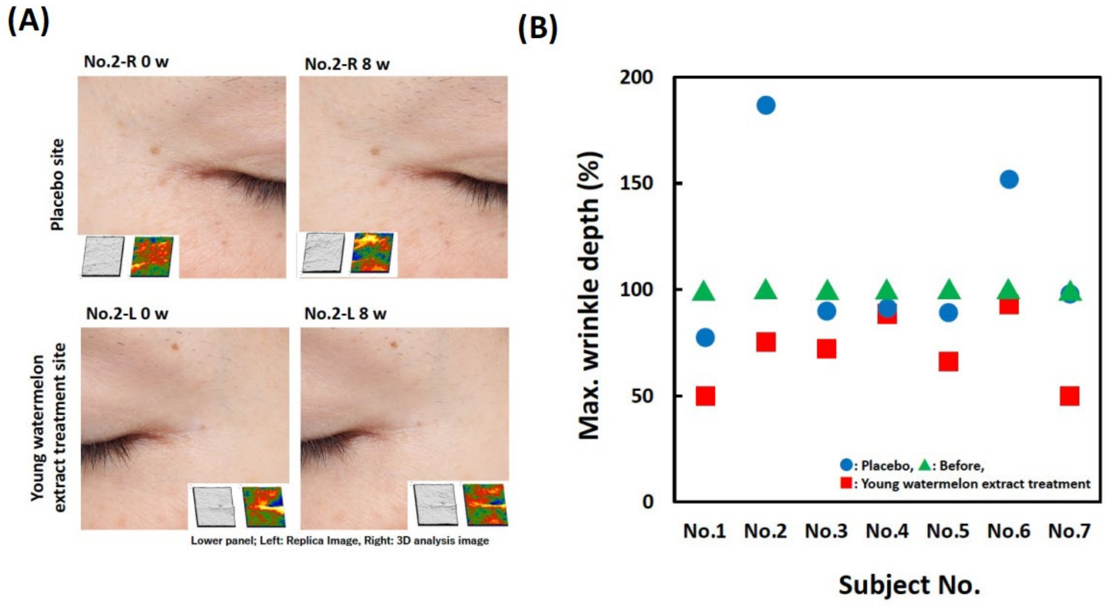

図5. シワグレード基準比較評価とシワ部位レプリカによる三次元評価

(A)シワグレード基準比較評価(上段左：プラセボ(左目尻開始時)、上段右：プラセボ(左目尻 8 週間経過時、下段左：スイカ幼果エキス配合(右目尻開始時)、下段右：プラセボ(右目尻 8 週間経過時)。同一被験者の左右の目尻を利用して評価した・写真下部には目尻のレプリカを取り、非接触3D 測定装置 PRIMOS Lite により解析したレプリカ画像(左)と三次元解析画像(右)を示した。(B)シワ部位レプリカによる三次元評価、●：プラセボ、▲：塗布開始前、■：スイカ幼果エキス配合製剤塗布 8 週間経過後

続いて、*C. acnes* は、皮脂による毛穴のつまりや、ターンオーバーの乱れによる皮膚のバリア機能の低下などが原因となり過剰に繁殖し、炎症を引き起こします。マクロファージやケラチノサイトの細胞膜表面に存在する Toll 様受容体(toll-like receptor、以下、TLR)1/2 のヘテロ受容体や TLR 2/6 のヘテロ受容体は、*C. acnes* の細胞壁の主要成分であるリポタイコ酸やペプチドグリカンを認識することで活性化します。これにより、誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase、以下、iNOS)やシクロオキシゲナーゼ- 2(cyclooxygenase-2、以下 COX-2)の発現が誘導され、一酸化窒素(nitric oxide、以下 NO)とプロスタグランジン E2(prostaglandin E2、以下、PGE2)を産生し、生体内で炎症反応が惹起されます。Citrulluside H および Citrulluside T の *C. acnes* による炎症を抑制する効果をマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞に *C. acnes* 加熱死菌体刺激により産生される NO 量を指標に検討しました。その結果、Citrulluside H および Citrulluside T は、TLR 受容体を介した炎症情報伝達シグナルを減弱させ、炎症性マクロファージ(M1)の極性化を抑制することで *C. acnes* による炎症を抑制することが確認できました。

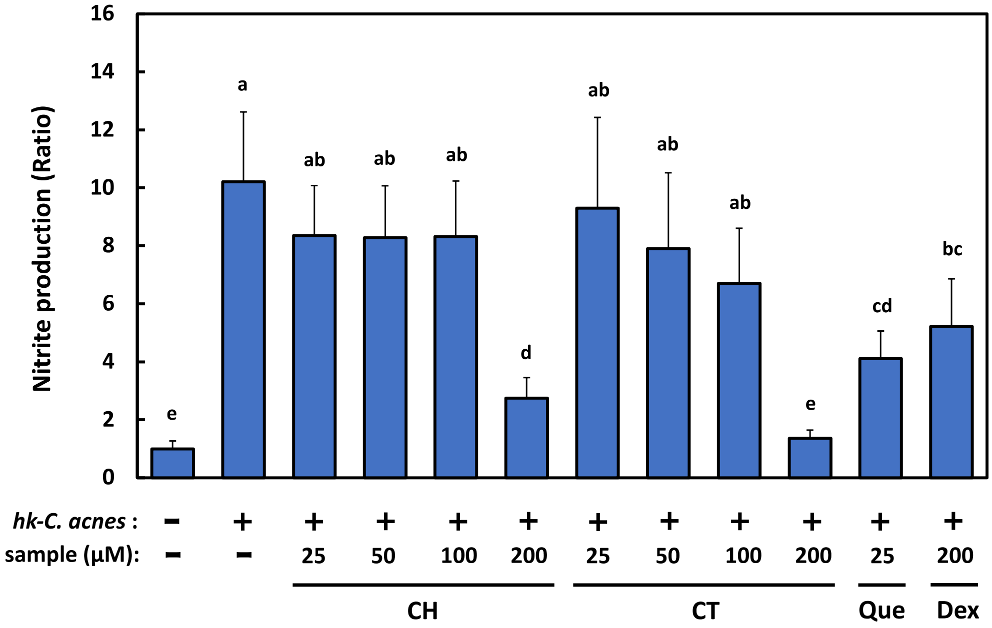

図 9. Citrullusside H および Citrullusside H による RAW264.7 細胞における C. acnes 加熱死菌体刺激による一酸化窒素産生への影響

平均値±標準誤差で示した(n=8)。多群間の比較は、Tukey-Kramer 法による検定を行なった($p<0.05$)。
CH:Citrullusside H , CT:Citrullusside T, Que: quercetin, Dex: dexamethasone, *hk-C. acnes*: アクネ菌加熱死菌体.

【今後の展望】
スイカの栽培副産物である摘果幼果から Citrullusside H および Citrullusside T を発見し、光皮膚老化やアクネ菌による炎症を抑制する機能性を確認することで香粧品素材としての可能性を見出すことができました。この Citrullusside H および Citrullusside T は未登熟幼果に多く含まれることから、栽培廃材の摘果幼果の資源化が期待されます。本研究のように、副産物に含まれる成分を知ることで、循環型の持続可能な農業生産の道を切り開くことが期待できます。

【用語解説】
※1配糖体:糖のアノマー水酸基が糖以外の有機化合物とグリコシド結合した物質のこと

※2 光皮膚老化:日光を長期間浴び続けることによって引き起こされる肌の老化(シワやたるみ、色素沈着など)をいう

※3 CITE Japan 2023:第 11 回化粧品産業技術展 2023 年 5 月 17 日~19 日パシフィコ横浜にて開催予定(主催:日本化粧品原料協会連合、共催:日本化粧品技術者会、後援:の本化粧品工業連合会

※4 光増感物質: 光を吸収することによって励起状態となり、触媒へと電子を注入する役割を果たす物質のこと。ヒトの皮膚にはポルフィリンの他にトリプトファンやリボフラビン、プテリン類等の光増感物質がある

※5 カラムクロマトグラフィー:化合物の精製法の一つ。シリカゲルなどの固定相(充填材)と移動相(固定相の間を流れる気体や液体)との相互作用による流出速度の差によって物質を分離することができる

【論文情報】

掲載誌: Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine 37, 386-394.
掲載日: 2021 年 2 月 18 日
論文タイトル: Citrulluside H and citrulluside T from young watermelon（*Citrullus lanatus*）fruit attenuate ultraviolet B radiation-induced matrix metalloproteinase expression through the scavenging of generated reactive oxygen species in human dermal fibroblast.
著者: Tomohiro Itoh, Singo Fujita, Masayuki Ninomiya, Mamoru Koketsu, Toshiharu Hashizume.

掲載誌: Natural Product Communications 18, 1934578X2211432.
doi: https://doi.org/10.1177/1934578x221143202
掲載日: 2022 年 12 月 30 日
論文タイトル: Phenolic glycosides citrulluside H and citrulluside T isolated from young watermelon（*Citrullus lanatus*）fruit have beneficial effects against *Cutibacterium acnes*-induced skin inflammation.
著者: Tomohiro Itoh, Mai Muramatsu, Daiki Miyazono, Mamoru Koketsu, Shingo Fujita, Toshiharu Hashizume.

＜本件に関するお問合せ＞

三重大学大学院生物資源学研究科
生物圏生命科学専攻海洋生命分子化学講座　水圏材料分子化学教育研究分野
准教授 伊藤 智広（いとう ともひろ）
TEL: 059-231-9675
E-mail: titoh@bio.mie-u.ac.jp