

## 【審査論文】

## ヒト線維芽細胞培養系を用いたセイヨウトギリソウ抽出物の創傷治癒に及ぼす効果

鈴木敏和、森瀬結実香、高橋沙由里、友木屋理美、野村純

### Determination of the wound healing effect of St. John's wort extracts using the scratch assay in human fibroblasts *in vitro*

Toshikazu SUZUKI, Yumika MORISE, Sayuri TAKAHASHI, Satomi TOMOKIYA and Jun NOMURA

#### 要旨

セイヨウトギリソウは、発熱性疾患の解熱、利尿促進、創傷治癒など様々な疾患に効く薬草として、古くから使用されている。最近、セイヨウトギリソウは軽度のうつ症状を改善する薬草として着目され、うつ症状改善の分子機構の解析も精力的に行われている。一方、創傷治癒促進効果の機構については不明な点が多く、また分子機序を調べた研究が非常に少ない。本研究では、セイヨウトギリソウ成分をエタノールで抽出し、ヒト線維芽細胞を用いた*in vitro*創傷治癒モデル系における影響を調査した。セイヨウトギリソウ抽出物は、2%ウシ胎児血清を含む培養条件では、4 µg/mL以下の低濃度においてヒト線維芽細胞の創傷部位とみなされる隙間空間への移動を促進した。6-8 µg/mLでは濃度依存的に細胞の移動促進効果が失われ、10 µg/mLでは、細胞の移動を阻害した。1%ウシ胎児血清を含む培養条件では、セイヨウトギリソウの阻害効果の方が強く、移動促進のピークは観察されなかった。また、線維芽細胞の創傷部位への移動に関与するフィブリン溶解活性、およびウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子およびプラスミノゲン活性化因子阻害因子-1の発現は、4-6 µg/mLのセイヨウトギリソウ抽出物添加により促進されたが、10 µg/mLでは促進効果が消失した。以上の結果より、セイヨウトギリソウ抽出物には、*in vitro*モデル系における創傷治癒を促進する成分と阻害する成分の両者を含むことが示唆された。

**キーワード:** セイヨウトギリソウ(St. John's wort)、創傷治癒(wound healing)、ヒト線維芽細胞(human fibroblasts)、スクラッチアッセイ (scratch assay)、フィブリン溶解活性 (fibrinolytic activity)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (urokinase-type plasminogen activator, uPA)、プラスミノゲン活性化因子阻害因子-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)

#### 1. 緒言

セイヨウトギリソウ (学名: *Hypericum perforatum L.*, 英名: St. John's wort、以下SJW) は、イギリス、ヨーロッパ原産の黄色の五弁花を咲かせる多根茎性および多年草の植物であり、現在では世界中のいたる場所で野生している。学名の*Hypericum*は、ギリシャ語の*hyper* (上) と*eikon* (像) に由来する<sup>1)</sup>。古代ギリシャおよびローマでは、この植物が悪霊から守ってくれる神秘的な力を持つとされ、家の中にある魔よけの像の上にSJWの花が置かれていた。*perforatum*は、SJWの葉が穿孔 (perforations) のように見え

る半透明分泌腺を持つことに由来する。英名は、聖ヨハネ (St. John) の誕生日を祝うSt. John's day (6月24日) 付近に、この植物が開花することに由来する。

Gerard (1597) やWithering (1796) による古草本誌によると、SJWは薬草として紀元前5世紀より用いられ、傷治療師を魅了してきた<sup>2)</sup>。Gerardは、彼の著である「The Herball or General History of Planters」の中で、創傷治癒に最も効果のある貴重な薬として、彼が処方したSJW軟膏を紹介している<sup>2)</sup>。また17世紀から19世紀に書かれた薬草書や薬局方などによると、創傷治癒の他にも抗炎症治療、抗がん治療や利尿薬として利用されてきた<sup>2)</sup>。さらに、SJWは神経性疲労や軽度うつ症の軽減作用を持つ<sup>3)</sup>。精神疾患治療を目的としたSJWの使用は、1525年にスイスの内科医、Paracelsusの使用から始まり、ヨーロッパの伝統医学において、神経痛、不安症、神経症およびうつ症の治療薬として使用されてきた<sup>4)</sup>。近年発表された2つの相対的メタ分析によると、「SJWは軽から中程度うつ症の治療に対して、プラセボ (偽薬) よりも効果が高く、一般的に処方されている抗うつ薬よりも副作用が少ない」と結論付けられている<sup>3,5)</sup>。

治療薬としてのSJW作用機序解明を目指した研究は、抗うつ作用に関しては盛んに行われている。SJWは、ノルアドレナリン、セロトニンおよび $\gamma$ -アミノ酪酸のシナプトソームへの取り込みを阻害する、*in vivo*において $\beta$ -アドレナリン受容体の発現量を低下させる、前頭前皮質においてドーパミン作用を増強する<sup>6,7)</sup>。生理活性成分のひとつ、ハイパフォリンがSJWの主な抗うつ活性成分であると仮説を立てている研究者もいるが<sup>8)</sup>、現在でも完全には分かっていない<sup>6,9)</sup>。

SJWの創傷治癒効果に関しては、臨床や動物モデルを使用した報告は複数ある<sup>2,10,11)</sup>。一方、細胞レベルおよび分子レベルで研究し、作用機序を示した報告は非常に少ない。Ozturkらは、ニワトリ胎児線維芽細胞を用いた研究より、SJWは、創傷部位付近に多く存在する移動可能な多角形細胞の割合を増加させ、コラーゲン産生能を高めることを示した<sup>12)</sup>。Dikmenらは、マウスNIH3T3線維芽細胞を用い、Ozturkらと同様の結果を得ている<sup>13)</sup>。しかし、一般的に創傷治癒モデルとしてよく使用されている、ヒト由来の線維芽細胞を用いた研究はまだ無い。そこで本研究では、ヒト皮膚由来の線維芽細胞を用い、スクラッチアッセイ法<sup>14)</sup>による*in vitro*のモデル創傷治癒系に及ぼすSJWの効果を調べた。

## II. 実験方法

### II-1. SJW抽出物の調製

SJWは、ハーブティとして販売されている、開花期の地上部を乾燥させたものを (株) 生活の木より購入した。12 gのSJWを鋏で断片化した後、乳鉢で磨り潰し、1 mm角以下の細片にした。これを100 mLのエタノールに浸漬させ、4℃で一週間静置し、成分を抽出した。Whatmann No.1濾紙で不溶物を除去後、抽出液を減圧エバポレーター装置にセットし、40℃を越えない条件下でエタノールを完全に蒸発させた。550 mgの乾固されたSJW抽出物が得られた。SJW抽出物は、50 mg/mLの濃度となるようジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、1 mLずつ分注した後、使用時まで-20℃で保存した。

### II-2. 細胞培養

ヒト皮膚由来線維芽細胞は、Kanazawaらにより樹立された細胞株を使用した<sup>15)</sup>。細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS, Gemini Bio-Products)、60  $\mu$ g/mLカナマイシンを含むダルベッコ改変最小必須培地 (DMEM, Sigma-Aldrich) を用いて、37℃、95% 空気/5%二酸化炭素に条件を設定した湿式炭酸ガスインキュベーター (MC5-AAC, SANYO) の中で、培養・継代された。細胞は、液体窒素中に保管されていた継代数5 (passage 5) のものを液体窒素中から溶解し、コンフルエント (細胞密集状態) の1/5の密度で培養ディッシュ中に播

種した。3-4日後、対数増殖後期（80%コンフルエント以下）に到達したところで、各実験に用いた。

### II-3. SJWの細胞毒性の測定

細胞培養用の96穴プレートに、1穴あたり10,000個の細胞を播種し、一晚培養した後、FBSの濃度を1%または2%を含むDMEM培地に交換し、もう一晚培養を行った。3日目に各穴の細胞が単層でコンフルエント状態になっていることを確認した後、濃度が1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25または50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようSJW抽出物を各穴に加えた。対照群となる穴には、最終濃度が同じになるようDMSOを添加し、さらに一晚培養を行った。SJW添加22時間後、各穴に10  $\mu\text{L}$ のCell Counting Kit-8（同仁化学研究所）を添加し、37°Cで2時間インキュベーションを行った。生細胞が産生する可溶性ホルマザン色素量を波長450 nm（参考波長600 nm）の吸光度をマイクロプレートリーダー（MTP-450, コロナ電気）を用いて測定し、各穴に生存する細胞数の相対値を求めた。

### II-4. スクラッチアッセイ法による*in vitro*創傷治癒活性の測定

Liangらの方法<sup>14)</sup>を改変し、以下のように行った。細胞培養用の6穴プレートに、1穴あたり200,000個の細胞を播種し、一晚培養した後、FBSの濃度を1%または2%を含むDMEM培地に交換し、もう一晚培養を行った。各穴の細胞が単層でコンフルエント状態になっていることを確認した後、滅菌された200  $\mu\text{L}$ 用のピペットチップを用いて、単層に引っかき傷を入れた。傷を入れたときに剥れた細胞を除去するために、培地を吸引除去し、さらに各穴をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄した。次いで、2, 4, 6, 8または10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のSJW抽出物、および1%または2% FBSを含むDMEM培地を加え24時間培養した。培地を除去し、PBSで2回洗浄した後、3%ホルムアルデヒドを含むPBSを加え、室温で20分間インキュベートし、細胞を固定化した。固定化後、0.1%クリスタルバイオレット水溶液を加え、室温で15分間インキュベートし細胞を染色した。各穴をPBSで洗浄後、倒立型顕微鏡（CKX-41、オリンパス）およびデジタルCCDカメラ（DP72、オリンパス）を用いてデジタル写真撮影を行い、引っかき傷を入れた部分に移動した細胞数を計数した。コンフルエント状態の単層とは細胞密集度の異なった、細胞-細胞間に隙間のあるものを移動細胞とみなした。

### II-5. 培養液中のフィブリン溶解活性の測定

Radhaらの方法<sup>16)</sup>に若干の改変を行い、以下のように行った。フィブリノーゲン（伊藤ライフサイエンス）を5 mg/mLとなるよう、0.2 Mホウ酸-ナトリウム緩衝液（pH7.8）に溶解し、溶解液10 mLを直径90 mmの培養ディッシュに入れた。次いで、0.2 Mホウ酸-ナトリウム緩衝液に溶解した20 units/mLスロンビン（伊藤ライフサイエンス）溶液0.5 mLを培養ディッシュに加え素早く攪拌した後、30分間静置し、フィブリン平板を作製した。SJW処理された細胞由来の培養上清50  $\mu\text{L}$ をフィブリン平板にスポットし、37°Cの炭酸ガスインキュベーター中で40時間インキュベートした。インキュベート後、楕円状に溶解した領域の長径（a）と短径（b）を測定し、 $a \times b$ 値をフィブリン溶解活性とみなし、対照細胞に対する活性の相対値を求めた。

### II-6. ウェスタンブロッティング解析によるタンパク質発現量の測定

Suzukiらの方法<sup>17)</sup>に従って、以下のように行った。細胞をPBSで3回除去した後、5%  $\beta$ -メルカプトエタノールを含むLaemimliサンプル緩衝液（Bio-Rad Laboratories）に溶解し、90°Cで5分間加熱して、全

タンパク質溶解液を得た。1サンプルあたり10  $\mu\text{g}$ タンパク質をゲル濃度5-20%のc-PAGEポリアクリルアミドゲル(アトー)を用いて展開した。次いで、展開されたタンパク質を、25 mM Tris、192 mMグリシン、10%メタノールを含む緩衝液中でImmobilon P 転写膜(Millipore)へ電気的に転写した。転写は、ミニトランスブロットセル(Bio-Rad Laboratories)を用い、100Vの定電圧条件下で3時間の通電により行った。次いで、転写膜を抗ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子(uPA)(sc-14109, Santa Cruz Biotech)、抗プラスミノーゲン活性化因子阻害因子-1(PAI-1)(sc-8979, Santa Cruz Biotech)ウサギポリクローナル抗体、または抗 $\beta$ -アクチン(691001, MP Biomedical)マウスモノクローナル抗体を含む溶液中で4 $^{\circ}\text{C}$ 下、一晩インキュベートした。引き続き、転写膜を西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギまたはマウス二次抗体(GE Healthcare)溶液中で室温下、1時間インキュベートした。最終的に、転写膜上で形成された抗原-抗体複合体をSuperSignal West Pico化学発光試薬(Pierce)を用いて発光させ、これをX線フィルムに感光させて検出した。Multi Gauge Ver. 2.2イメージ解析ソフト(富士写真フィルム)を用いて、相対的なタンパク質の発現量を半定量した。

## II-7. 統計解析

ウエスタンブロット解析を除くすべての実験は、3回以上で行い、データは平均値  $\pm$  標準偏差(SD)で示した。2項目間の有意差検定は、Studentのt-検定によりおこなった。 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

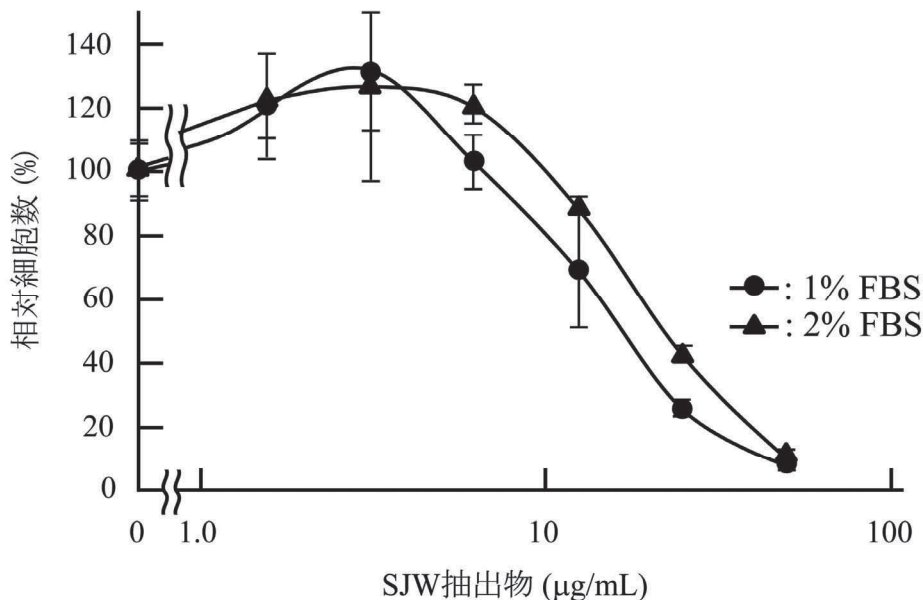


図1. ヒト線維芽細胞におけるSJW抽出物の毒性

コンフルエント(密集状態)の細胞を1.6-50  $\mu\text{g/mL}$ のSJW抽出物存在下で24時間培養した。細胞生存率をCell counting kitを用いて調べた。未処理群の細胞数を100%とし、3回の実験の平均値  $\pm$  SD値で相対細胞数をプロットした。

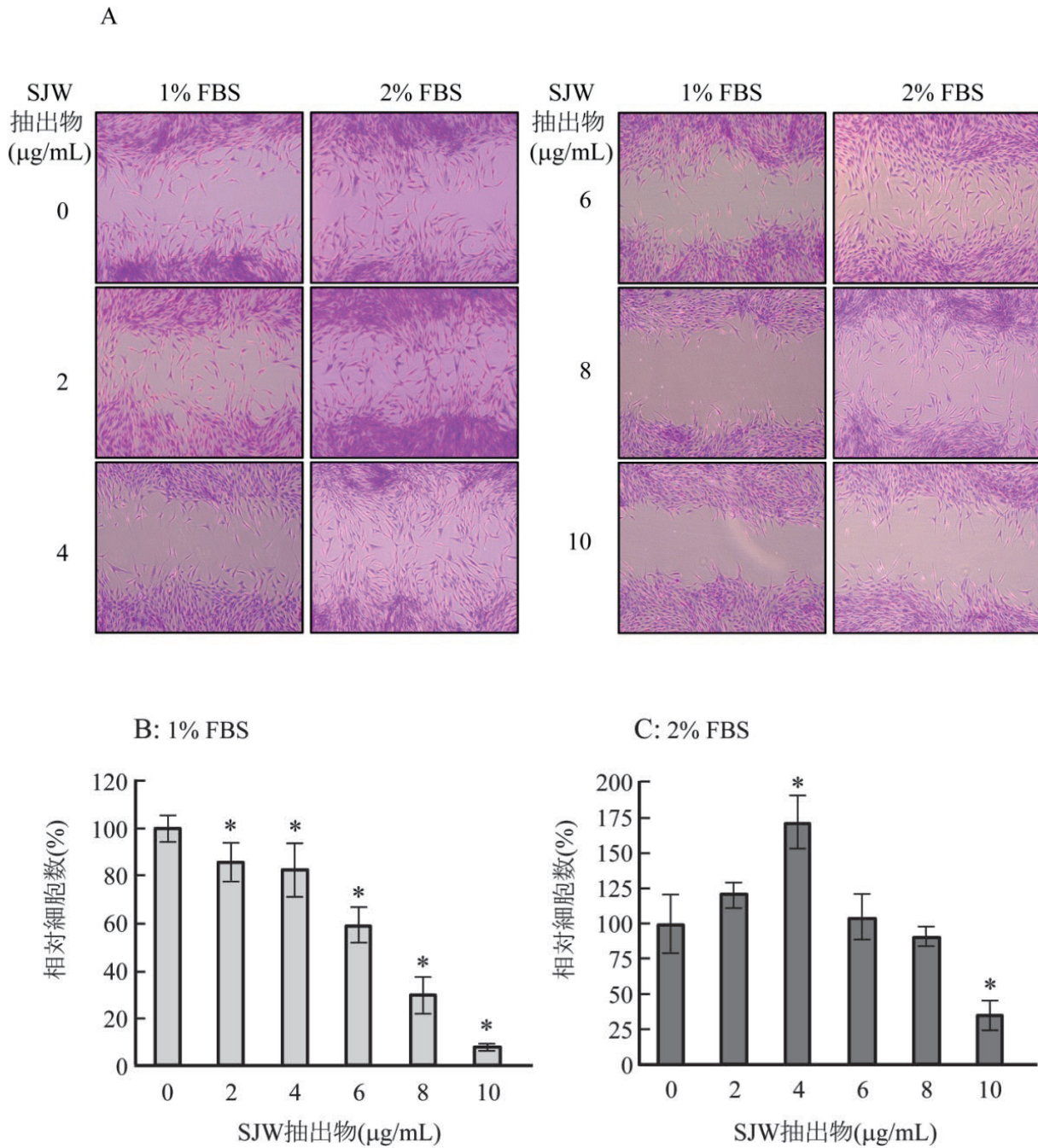


図2. *in vitro* 創傷治癒活性に及ぼすSJW抽出物の効果

コンフルエント状態にある細胞層にひっかき傷を入れた後、様々な濃度のSJW抽出物存在下で24時間培養を行った。A、実験方法の記載に従って、細胞を固定・染色後、ひっかき傷を入れた部位の顕微鏡写真撮影を行った。BおよびC、ひっかき傷の部位に移動した細胞数の計測を行い、未処群における移動細胞数を100%とし、4回の実験の平均値 ± SD値でプロットした。1% FBS (B) または2% FBS (C) を含む培地で実験した。\* $p < 0.05$  対コントロール。

### III. 結果

#### III-1. SJW抽出物の細胞毒性

細胞毒性の無い、または非常に低いSJW抽出物濃度を知るために、コンフルエント状態のヒト線維芽細胞に対するSJW抽出物の細胞毒性を調査した (図1)。10% FBS存在下では、後述するスクラッチアッセイ時に線維芽細胞の増殖が起こるため、細胞の移動と区別することが難しい。そこで、細胞増殖がほとんど起こらない、1%または2% FBSを含む培地の下で実験を行った。6 µg/mL程度までのSJW抽出物で24時

間処理しても、細胞毒性は全く見られなかった。12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SJW抽出物処理時における相対細胞数は、1%および2% FBS存在下でそれぞれ、70%および90%であった(図1)。この結果より、以降の実験は、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度のSJW抽出物存在下で実験を行うことにした。

### III-2. *in vitro*創傷治癒活性に及ぼすSJW抽出物の効果

培養細胞系を用いた創傷治癒活性測定系として、スクラッチアッセイが用いられている<sup>14,16,18</sup>)。これは、コンフルエント状態の線維芽細胞や角化細胞にひっかき傷を入れ、傷を入れた部位に移動した細胞数を測定し、創傷治癒活性とみなす方法である。ひっかき傷を入れたコンフルエント状態の細胞を様々な濃度のSJW抽出物で24時間処理した後、細胞を固定・染色し、傷部分へ移動した細胞を観察、計数した(図2)。1% FBSを含む培地の下では、SJW抽出物は、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度において、*in vitro*創傷治癒活性を濃度依存的に阻害した(図2B)。10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のSJW抽出物では、コントロールと比べて10%以下に減少した。2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のSJW抽出物も*in vitro*創傷治癒活性を有意に減少させたが、その程度は、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SJW抽出物と同程度であった。2% FBSを含む培地の下では、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のSJW抽出物存在下で*in vitro*創傷治癒活性を約70%増大させた(図2C)。6および8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のSJW抽出物では増大は見られず、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SJW抽出物存在下では、コントロールの35%に減少した。

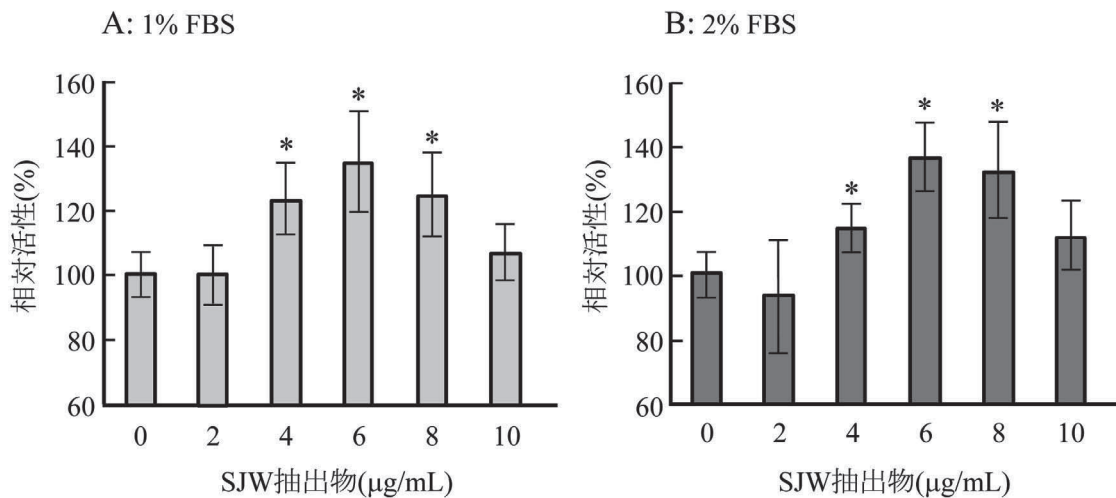


図3. 培養上清のフィブリン溶解活性

様々な濃度のSJW抽出物存在下で24時間培養した細胞より培養上清を採取し、実験方法の記載に従って、上清に含まれるフィブリン溶解活性を測定した。未処理細胞の活性を100%とし、4回の実験の平均値  $\pm$  SD値で相対活性をプロットした。1% FBS (A) または2% FBS (B)を含む培地で実験した。\* $p < 0.05$  対コントロール。

### III-3. ヒト線維芽細胞培養液中のフィブリン溶解活性、およびウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA) および1型プラスミノゲン活性化因子阻害分子(PAI-1) 発現に及ぼすSJW抽出物の効果

uPAは、血液凝固で生じたフィブリン塊を溶解するプラスミンを活性化する、またその他の細胞マトリックス分解酵素を活性化して線維芽細胞が創傷部位へ移動するのを助けるなど、創傷治癒の初期段階に作用すると示唆されている<sup>16,19</sup>)。PAI-1は、生体内に存在する主要なuPA阻害分子のひとつであるが、細胞の接着や移動の調節に関与しており、この分子も創傷治癒に関わっていることが示唆されている<sup>20</sup>)。そこで、SJW抽出物がヒト線維芽細胞のフィブリン溶解活性や、uPAおよび

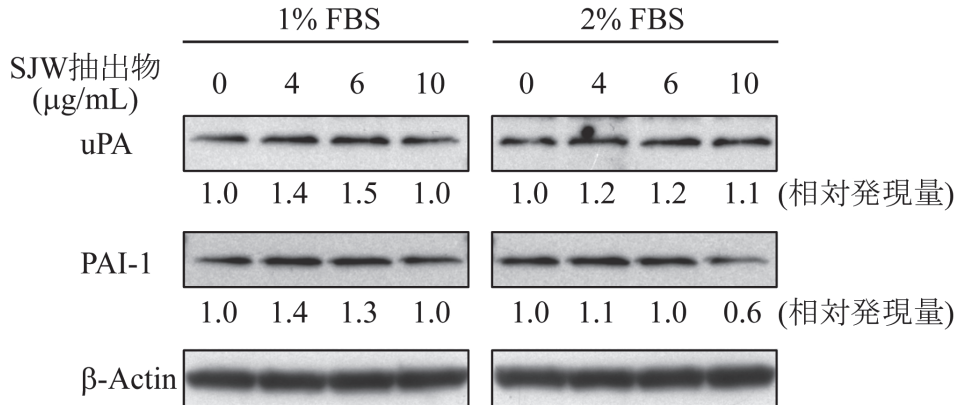


図4. ウェスタンブロッティング解析によるuPAおよびPAI-1タンパク質の発現量解析

様々な濃度のSJW抽出物存在下で24時間培養した細胞より、全細胞抽出液を調製し、実験方法の記載に従って、uPA、PAI-1タンパク質を検出した。各レーンにアプライしたタンパク質量のばらつきを補正を目的として、β-アクチンタンパク質の検出も行った。イメージアナライザーで検出シグナルの黒化度を定量化し、未処理細胞の発現量を1.0として相対発現量を示した。

PAI-1発現にどのような影響を及ぼすか検討した。ひっかき傷を入れたコンフルエント状態の細胞を様々な濃度のSJW抽出物で24時間処理した後、培養上清を分離し、ヒト線維芽細胞が分泌したフィブリン溶解活性を調べた (図3)。また、残った細胞より全タンパク質抽出液を調製し、uPAおよびPAI-1タンパク質の発現量をウェスタンブロッティング法により調べた (図4)。培養上清中に分泌されたフィブリン溶解活性は、1%および2% FBSを含む培地条件下の両方で、4-8 μg/mLのSJW抽出物処理により増大した (図3)。6 μg/mLのSJW抽出物処理時に活性がピークを示し、コントロール細胞と比べて、35% (1% FBS) および37% (2% FBS) の活性増加が観察された。10 μg/mLのSJW抽出物処理条件下では、コントロール細胞との間に有意な差は見られなかった。これより、SJW抽出物にはヒト線維芽細胞が分泌するフィブリン溶解活性成分を調節する作用のあることが示唆された。uPAおよびPAI-1の発現量は、1% FBSを含む培地条件下では、4-6 μg/mLのSJW抽出物処理により増加したが、10 μg/mLのSJW抽出物処理ではコントロール細胞と同等であった (図4)。2% FBSを含む培地条件下では、4-6 μg/mLのSJW抽出物処理によりuPAの発現量が増加したが、その程度は20%と小さかった。PAI-1は、発現量変化が見られなかった。10 μg/mLのSJW抽出物処理では、PAI-1の発現量がコントロール細胞より40%減少した。以上の結果より、SJW抽出物は、uPA-PAI-1系に関わるタンパク質発現を6 μg/mL以下の低濃度で正に、それ以上の高濃度で負に調節することが示唆された。また、ヒト線維芽細胞において、SJW抽出成分によるフィブリン溶解活性成分の培地中への分泌調節の少なくとも一部に、uPA-PAI-1系の発現調節が関与していることが示唆された。しかし、フィブリン溶解活性と*in vitro*系の創傷治癒活性との間には、はっきりとした相関関係は見られなかった。

#### IV. 考察

本研究では、*in vitro*創傷治癒モデル系におけるSJWの効果調べた。2% FBSを含む培地の下では、4 μg/mLのSJW抽出物は創傷治癒活性を約70%増大させた (図2C)。6 μg/mL以上では、濃度依存的に創傷治癒活性が低下し、10 μg/mLではコントロールと比べて活性が65%減少した。1% FBSを含む培地の下では、SJW抽出物は創傷治癒活性に対して阻害的に作用したが、2および4 μg/mL SJW抽出物における創傷治癒活性は同等であった。これより、SJW抽出物は、*in vitro*創傷治癒活性を低濃度下では促進的に、

高濃度下では阻害的に作用すること、およびSJW抽出物の*in vitro*創傷治癒活性を促進させる効果を発揮するためには、FBS中の因子が必要であることが示唆された。線維芽細胞の創傷部位への移動時に必要と考えられるフィブリン溶解活性は、培地中のFBSの濃度に依らず、6 µg/mL SJW抽出物存在下で活性ピークが観察され、創傷治癒活性のピークとはずれが観察された(図3)。また、フィブリン溶解活性およびuPAタンパク質の発現は、10 µg/mL SJW存在下でもコントロールと同レベルであったが(図3、4)、創傷治癒活性は、1% FBSを含む培地の下ではコントロールと比べて10%以下に、2% FBSを含む培地の下ではコントロールの35%に減少していた(図2)。これらの結果より、SJW抽出物中には、線溶系活性化を介して*in vitro*創傷治癒活性を促進させる成分とは異なった、阻害的に作用する成分も含まれている可能性が示唆された。すなわち、複数の生理活性成分が*in vitro*創傷治癒活性を調節していると考えられた。

SJWは、ハイパフォリン、ヒペリシン、フラボノイドおよびフラボノイド重合体(二量体、プロアントシアニジン)など、複数の生理活性物質を含む<sup>2)</sup>。ハイパフォリンは抗うつ効果の他に、がん細胞の増殖抑制、アポトーシス誘導、細胞遊走阻害、浸潤抑制活性を持つことが報告されている<sup>21)</sup>。これら抑制作用には、エラスターゼ(IC<sub>50</sub>=3 µM)、スロンビン(IC<sub>50</sub>=40 µM)、uPA(IC<sub>50</sub>=40 µM)の活性阻害作用や、細胞外シグナル調節キナーゼ1/2(ERK1/2)阻害を介したマトリックスメタプロテアーゼ発現阻害作用など、細胞の接着・移動を調節するプロテアーゼ活性の負の調節が関与している。またハイパフォリンは、血管内皮細胞において、uPAやマトリックスプロテアーゼの発現を抑制し、血管新生に必要な細胞の移動・浸潤能を阻害する<sup>22)</sup>。フラボノイド重合体のプロアントシアニジンを90%以上含むブドウ種子抽出物は、uPAおよびPAI-1発現抑制を介して、線維芽細胞が分泌するフィブリン溶解活性を減少させ、*in vitro*系における創傷治癒活性を阻害する<sup>23)</sup>。したがって、SJW抽出物中のハイパフォリンやプロアントシアニジンは、*in vitro*系における創傷治癒活性を阻害する、すなわち、線維芽細胞のひっかき傷部位への移動を抑制する可能性が考えられた。実際に10 µg/mLのSJW抽出物処理は、それより低い濃度のSJW抽出物処理によって増大した線維芽細胞のフィブリン溶解活性成分の分泌(図3)、uPAおよびPAI-1タンパク質発現量(図4)の両方を抑えた。しかし、2% FBS培地地下における*in vitro*創傷治癒活性のピーク(図2C、4 µg/mL SJW抽出物)は、フィブリン溶解活性のピーク(図3、6 µg/mL SJW抽出物)よりも低濃度であったことより、SJWはuPA-PAI-1系活性調節以外の機構により創傷治癒活性を阻害している可能性が考えられた。

アロエに含まれるアントラキノン、エモジンは、ヒト線維芽細胞においてuPA および PAI-1の発現を増大させ、*in vitro*創傷治癒活性を促進させる<sup>16)</sup>。この作用は、エモジンによる活性酸素産生が関与していると推測されている。SJWにはエモジンと構造の似通ったキサントン類が含まれる<sup>2)</sup>。キサントン類は、一般的には抗酸化作用を持つが、細胞内に入ると活性酸素産生作用のあることが、最近報告された<sup>24)</sup>。また、SJWの主要な生理活性物質のひとつであるヒペリシンは、アセチル補酵素Aを出発物質とし、中間物質エモジンを経て生合成される<sup>25)</sup>。ヒペリシンは、光線力学療法による抗がん剤の増感剤として研究されている。光エネルギーによって励起されたヒペリシンが大量の活性酸素を産生し、がん細胞を殺傷する<sup>25)</sup>。したがって、外部からエネルギーを付与しなくても、一部のヒペリシンが細胞内で励起され、少量の活性酸素を発生させる可能性がある。血清中に含まれる細胞増殖因子のひとつ、血小板由来増殖因子(PDGF)は、線維芽細胞の*in vitro*創傷治癒活性測定系で陽性コントロール分子として使用されるが<sup>18)</sup>、PDGFが線維芽細胞の受容体に結合すると、細胞内活性酸素量が増大する<sup>26)</sup>。これらのことから総合すると、キサントン類およびヒペリシンがSJWの*in vitro*創傷治癒活性促進物質の候補として考えられた。SJWの*in vitro*創傷治癒活性促進作用は、1% FBS条件下では観察されなかったが、2および4 µg/mL SJW抽出物における創傷



治癒活性は同等であった（図2C）。これは、1% FBS条件の下では、SJWの創傷治癒促進効果が小さいために、活性増大のピークが現れなかった可能性がある。SJWの創傷治癒促進効果を顕在化させるFBS中の因子であるが、PDGFなどの細胞増殖因子の他に、血清中の鉄イオンの可能性もある。*in vitro*創傷治癒活性を促進させるSJW成分とその作用を増強させる血清成分の同定、および分子機構の解明が、今後の課題の一つである。

本実験より、SJWには*in vitro*創傷治癒活性を促進する成分および阻害する成分の両方が含まれている可能性が示唆された。これが*in vivo*でどのように創傷治癒促進に働いているか明らかにすることも、今後残された課題である。前述したアントシアニンもまた、*in vivo*系では創傷治癒を促進するが、*in vitro*系においては逆に阻害的に作用する<sup>23)</sup>。*in vivo*系におけるSJWの創傷治癒効果の機構としては、炎症期間の縮小と細菌感染防御が報告されている<sup>11)</sup>。SJWに含まれるハイパフォリン、ヒペリシン、フラボノイド類およびアントシアニンは、抗菌作用を持つ<sup>2)</sup>。しかし、直線切開モデルにおけるSJWの創傷治癒促進作用は、抗炎症および抗細菌感染作用だけでは説明ができなかった<sup>11)</sup>。本研究で示唆された線維芽細胞の創傷部位への移動促進、および創傷部位のコラーゲンの沈着を促進する作用<sup>12)</sup>と合わせ、SJWは複数の生理活性成分を通じて多角的に創傷治癒の促進に作用する可能性が考えられる。

## V. 謝辞

フィブリン溶解活性の測定法に関しまして、有用なご助言を頂きました宮崎大学医学部応用生理学教室の丸山眞杉教授に感謝いたします。

## VI. 参考文献

1. Di Carlo, G.; Borrelli, F.; Ernst, E.; Izzo, A. A., St. John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol . Sci* . **2001**, *22*(6), 292-297.
2. Saddiqe, Z.; Naeem, I.; Maimoona, A., A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *131*(3), 511-521.
3. Linde, K.; Ramirez, G.; Mulrow, C. D.; Pauls, A.; Weidenhammer, W.; Melchart, D., St. John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ* **1996**, *313*(7052), 253-258.
4. Bilia, A. R.; Gallori, S.; Vincieri, F. F., St. John's wort and depression: efficacy, safety and tolerability--an update. *Life Sci.* **2002**, *70*(26), 3077-3096.
5. Kasper, S., *Hypericum perforatum*—a review of clinical studies. *Pharmacopsychiatry* **2001**, *34* Suppl 1, S51-S55.
6. Butterweck, V., Mechanism of action of St. John's wort in depression : what is known? *CNS Drugs* **2003**, *17*(8), 539-562.
7. Yoshitake, T.; Iizuka, R.; Yoshitake, S.; Weikop, P.; Muller, W. E.; Ogren, S. O.; Kehr, J., *Hypericum perforatum* L (St. John's wort) preferentially increases extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*(3), 414-418.
8. Mennini, T.; Gobbi, M., The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. *Life Sci.* **2004**, *75*(9), 1021-1027.
9. Kasper, S.; Caraci, F.; Forti, B.; Drago, F.; Aguglia, E., Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2010**, *20*(11), 747-765.
10. Lavagna, S. M.; Secci, D.; Chimenti, P.; Bonsignore, L.; Ottaviani, A.; Bizzarri, B., Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. *Farmaco* **2001**, *56*(5-7), 451-453.
11. Sutar, I. P.; Akkol, E. K.; Yilmazer, D.; Baykal, T.; Kirmizibekmez, H.; Alper, M.; Yesilada, E., Investigations on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*(2), 468-477.
12. Ozturk, N.; Korkmaz, S.; Ozturk, Y., Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*(1), 33-39.
13. Dikmen, M.; Ozturk, Y.; Sagratini, G.; Ricciutelli, M.; Vittori, S.; Maggi, F., Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of *Hypericum perforatum* on cultured NIH3T3 fibroblasts. *Phytother. Res.* **25**(2), 208-214.
14. Liang, C. C.; Park, A. Y.; Guan, J. L., *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*(2), 329-333.
15. Kanazawa, Y.; Nomura, J.; Yoshimoto, S.; Suzuki, T.; Kita, K.; Suzuki, N.; Ichinose, M., Cyclical cell stretching of skin-derived fibroblasts downregulates connective tissue growth factor(CTGF) production. *Connect. Tissue Res.* **2009**, *50*(5), 323-329.

16. Radha, K. S.; Madhyastha, H. K.; Nakajima, Y.; Omura, S.; Maruyama, M., Emodin upregulates urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1 and promotes wound healing in human fibroblasts. *Vascul. Pharmacol.* **2008**, *48*(4-6), 184-190.
17. Suzuki, T.; Lu, J.; Zahed, M.; Kita, K.; Suzuki, N., Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *468*(1), 1-14.
18. Fronza, M.; Heinzmann, B.; Hamburger, M.; Laufer, S.; Merfort, I., Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *126*(3), 463-467.
19. Watanabe, M.; Kondo, S.; Mizuno, K.; Yano, W.; Nakao, H.; Hattori, Y.; Kimura, K.; Nishida, T., Promotion of corneal epithelial wound healing *in vitro* and *in vivo* by annexin A5. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*(5), 1862-1868.
20. Lijnen, H. R., Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*(1), 35-45.
21. Dona, M.; Dell'Aica, I.; Pezzato, E.; Sartor, L.; Calabrese, F.; Della Barbera, M.; Donella-Deana, A.; Appendino, G.; Borsarini, A.; Caniato, R.; Garbisa, S., Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* **2004**, *64*(17), 6225-6232.
22. Martinez-Poveda, B.; Quesada, A. R.; Medina, M. A., Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *Int. J. Cancer* **2005**, *117*(5), 775-780.
23. Dhungana, S.; Madhyastha, R.; Madhyastha, H.; Nakajima, Y.; Omura, S.; Maruyama, M., Downregulation of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 by grape seed proanthocyanidin extract. *Phytomedicine* **2010**, *17*(1), 42-46.
24. Cheng, J. H.; Huang, A. M.; Hour, T. C.; Yang, S. C.; Pu, Y. S.; Lin, C. N., Antioxidant xanthone derivatives induce cell cycle arrest and apoptosis and enhance cell death induced by cisplatin in NTUB1 cells associated with ROS. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*(4), 1222-1231.
25. Karioti, A.; Bilia, A. R., Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*(2), 562-594.
26. Sundaresan, M.; Yu, Z. X.; Ferrans, V. J.; Sulciner, D. J.; Gutkind, J. S.; Irani, K.; Goldschmidt-Clermont, P. J.; Finkel, T., Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem. J.* **1996**, *318*(Pt 2), 379-382.

鈴木 敏和 (和洋女子大学生活科学系准教授)

森瀬結実香 (和洋女子大学家政学群健康栄養学類 4年)

高橋沙由里 (和洋女子大学家政学群健康栄養学類 4年)

友木屋理美 (千葉大学教育学部養護教諭養成課程修士 1年)

野村 純 (千葉大学教育学部養護教諭養成課程准教授)

(2011年 9月 5日 受付)