Inonotus obliquus (Chaga) 由来の
発毛・育毛活性成分に関する研究

2019

嵯峨山　和美

目次

緒言 1

第 1 章　研究背景
第 1 節　ヘアサイクルと育毛剤について 2
第 2 節　モンゴルについて 9
第 3 節　*Inonous obliquus* (Chaga) について 10

第 2 章　実験動物を用いた Chaga とセイヨウオオバコの発毛・育毛活性の評価
第 1 節　実験動物を用いた Chaga とセイヨウオオバコの発毛・育毛活性の評価 12
第 2 節　Chaga 抽出液の各種代謝酵素活性に与える影響 14
第 3 節　小括 15

第 3 章　毛乳頭細胞増殖促進活性を指標とした Chaga の発毛・育毛活性成分の探索
第 1 節　Chaga の抽出条件の検討ならびに粗画分の調製 16
第 2 節　毛乳頭細胞増殖促進活性を指標とした活性成分の探索 21
第 3 節　Chaga 含有成分の毛乳頭細胞増殖促進活性の評価 26
第 4 節　小括 27

第 4 章　Chaga 粗画分ならびに活性成分の作用メカニズムの検討
第 1 節　テストステロン 5α リダクターゼ阻害活性およびアンドロゲン受容体拮抗作用の評価 28
第 2 節　ヘアサイクルに関与する細胞増殖因子の遺伝子発現の評価 30
第 3 節　小括 33

結語 34

謝辞 35

実験の部 36

参考文献 42

緒言

高齢化の進展や女性の社会進出、あるいは社会的ストレスの増大を背景として、現在日本では老若男女を問わず脱毛や薄毛人口が増加していると言われている[1, 2]。2017 年の International society of hair restration surgery の発表では、2016 年に世界中で 1,838,946 人が脱毛改善のための治療を受けたと推定された[3]。脱毛や薄毛の原因は、これまで遺伝的素因やホルモンバランスの乱れなどによるものとされてきたが、特に近年は、環境からのストレスに加えて精神的なストレスとの関係について研究が行われている[4, 5]。

上述のように、脱毛や薄毛は今や一般的な問題であることから、発毛・育毛剤が広く社会に求められており、多くの企業が商品開発にしのぎを削っている。2016 年度の国内ヘアケア市場規模は 4,408 億円に達し (事業者売上高ベース、矢野研究経済研究所「ヘアケアマーケティング総監 2017」)、そのうち発毛・育毛剤の市場規模は 675 億円であり、今後も拡大するものと考えられる。加えて近年は、頭皮や頭髪への“やさしさ”を重視したカラーリングや、“自然志向”の高いヘアケア製品など、原料へのこだわりが市場から求められている。このような背景から発毛・育毛剤の素材として天然資源が注目され、多くの商品が開発されているが、その有効性や安全性について、科学的に十分に実証されていないのが現状である。

本研究では、モンゴルで伝統的に洗髪に用いられている *Inonotus obliquus* (Chaga) に注目し、新しい医薬品や医薬部外品、および化粧品への応用を目指し、その抽出液の発毛・育毛活性の評価、ならびにその活性成分の探索を行った。

第 1 章　研究背景

第 1 節　ヘアサイクルと育毛剤について

1.1.1　ヘアサイクル

毛は、小器官である「毛包」で形成される。この毛包の発生が、ヒトでは胎生 9 週頃に頭部から始まる。胎生表皮側の上皮系細胞の集積と、真皮側の間葉系細胞の集積により毛包原基が形成される (Figure 1.1)。毛包原基では、上皮系細胞と間葉系細胞の相互作用により、分化が進み、毛包が形成される[6, 7]。

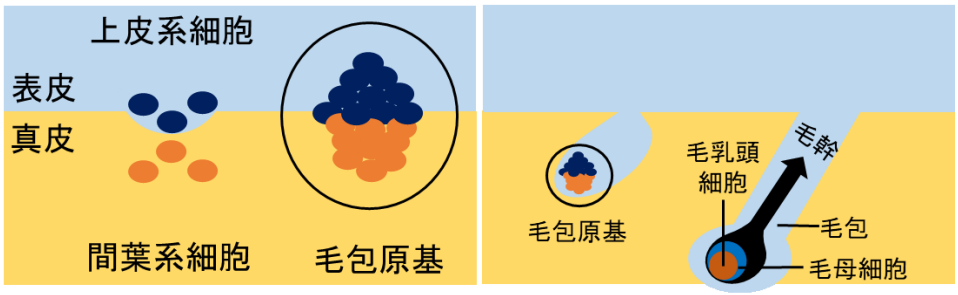


Figure 1.1.　毛包の発生

毛周期はヘアサイクルと呼ばれ、3 ステージ（①成長期：anagen、②退行期：catagen、③休止期：telogen）を 1 サイクルとしている。すなわち、①上皮系由来の毛母細胞が活発に増殖して毛幹が伸びることで、頭髪の太さと長さが増加し、頭髪全体の成長が進行する成長期 (ヒトの頭髪では通常 2-5 年の期間) から、②毛母細胞の細胞分裂が停止し、アポトーシスを起こすことで頭髪の成長が停止する退行期 (2-3 週間の期間) へ移行し、③毛包が萎縮することで古い頭髪が脱落して再び毛包が再構築されるまで、頭髪の伸長が行われない休止期 (3-6 ヶ月の期間) を経て、次の成長期となるまでの 3 ステージである (Figure 1.2) [8]。

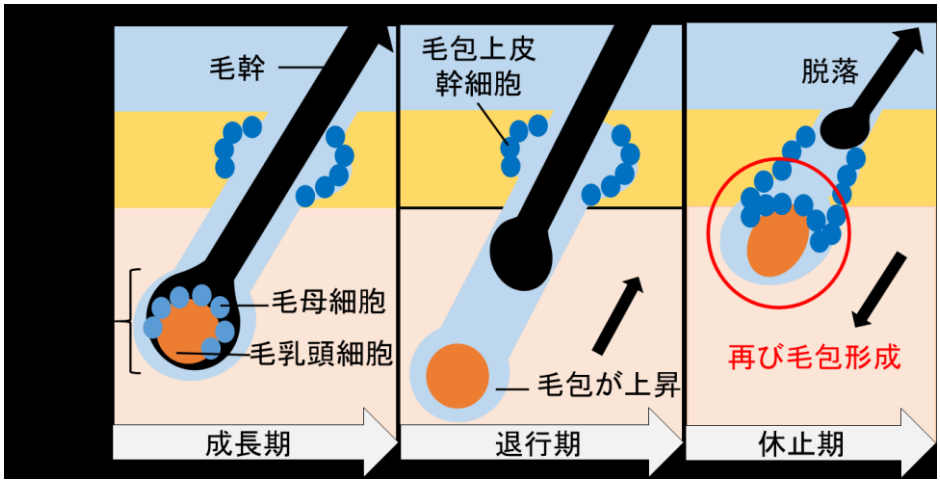


Figure 1.2.　ヘアサイクル

脱毛症は、何らかの原因で正常なヘアサイクルが維持されなくなり、成長する頭髪より脱落する頭髪が多くなった状態であり、一般的には男性型脱毛症 (androgenetic alopecia ; AGA) と円形脱毛症 (alopecia areata ; AA) に分類される。AGA は、国内の患者数が 1,800 万人を超え、女性にも発生することが報告されている[9]。AGA 発症の原因は、男性ホルモンの影響が大きく、ジヒドロテストステロン (DHT) の過剰生成による。テストステロンが前頭部から頭頂部にある毛乳頭細胞の細胞質に取り込まれると、Ⅱ型 5α リダクターゼにより DHT が生成する。DHT は細胞質でアンドロゲン受容体と結合し、核内に移行する。この結合体が標的遺伝子のプロモーターと結合し、結果的に毛母細胞の増殖を抑制する[10]。

AGA では、毛包が成長しない状態で、成長期が短縮し、毛が細く短いうぶ毛のまま休止期に移行するため十分な硬毛形成が得られない。AGA の改善には、うぶ毛を硬毛化することが重要である。一方、女性の AGA では、休止期に留まっている毛を活性化することが重要とされる。

それに対して、AA は、現在では自己免疫疾患の一種と考えられている。AA における脱毛は T 細胞による毛包の障害に起因し、毛包の消失や毛包周辺組織での炎症性病変が認められる。これは、AA 病変部の毛包でインターフェロン-γ (IFN-γ) が大量に産生され、これによりケモカイン C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) が発現し、これが T 細胞を誘導することにより起こることが明らかになっている[11]。CXCL10 は、T 細胞の内皮細胞への接着において重要な役割を果たしていることから、新たな円形脱毛症の治療薬の標的として期待される。

1.1.2　ヘアサイクルに関与する細胞増殖因子

毛根の最下部にある毛乳頭細胞は、FGF-7 (fibroblast growth factor、線維芽細胞増殖因子)、VEGF (vascular endothelial growth factor、血管内皮細胞増殖因子)、IGF-1 (insulin-like growth factor、インシュリン様増殖因子)、HGF (hepatocyte growth factor、肝細胞増殖因子) などの多くの細胞増殖因子を産生し、毛母細胞の分裂や分化に強い影響を与えている。VEGF は、毛包周囲の毛細血管網の発達を促し、毛母細胞へ栄養を供給することで細胞分裂を誘導するが、AGA の毛乳頭細胞では、FGF-7 遺伝子の発現量が約半分低下していることが報告されている[12]。また、男性ホルモンが毛乳頭細胞に作用すると IGF-1 遺伝子が発現され、毛包上皮系細胞を増殖することから、IGF-1 は、ヘアサイクルの成長期延長に有効と考えられている[13]。HGF は、アポトーシス抑制作用などによりヘアサイクルの退行期や休止期への移行を抑制するため、FGF-7、IGF-1 と同様に、成長期毛をより長く成長させるとともに、毛球部形態を維持する機能を有する[14]。

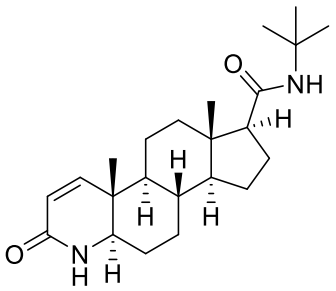
1.1.3　発毛・育毛に関する薬剤の現状

既存の脱毛症治療薬は、脱毛症以外の疾患に対する臨床試験で、副次的に発見され、脱毛剤治療薬として適用拡大されたものである。日本国内で販売されている発毛・育毛に関する製品は、薬事法上、医薬品 (一般用医薬品ならびに医療用医薬品)、医薬部外品、化粧品に分類されている。医薬品では、AGA や AA の治療が目的とされているが、医薬部外品は、積極的に治療に用いられるものではなく、脱毛予防や育毛の促進を期待して使用される。化粧品は頭皮、若しくは頭髪を健やかに保つために使用される。

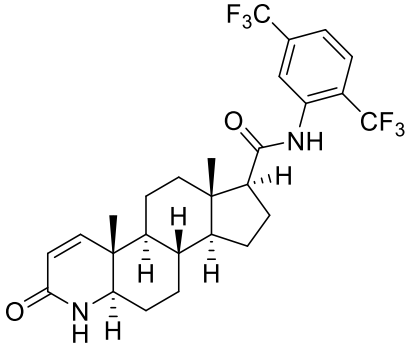
日本で承認がある医療用医薬品として、フィナステリド、デュタステリド、カルプロニウム塩化物 (外用) があり、一般用医薬品ではミノキシジル (外用) がある。これらに加え、海外ではスピロノラクトン、シメチジン、クロベタゾールプロピオン酸エステル、ジトラノール (アントラリン)、コルチコステロイド、トレチノイン、およびミノキシジル (内服) が医薬品として脱毛症の治療に用いられる (Figure 1.3)。

上述の医薬品のうち、フィナステリド、デュタステリド、スピロノラクトン、シメチジンは AGA の治療に用いられ[15, 16]、クロベタゾールプロピオン酸エステル、ジトラノール、コルチコステロイド、トレチノインは、AA の治療に用いられている[17-19]。ミノキシジルは、AGA と AA の両者に、カルプロニウム塩化物は、AA と壮年性脱毛症 (AGA の一種) にそれぞれれ適用されている。

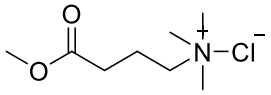
フィナステリドは、1992 年に前立腺肥大の治療薬 (5 mg/日) として、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration，FDA) で承認された。その後、1997 年には、低用量経口薬 (1 mg/日) で、AGA 治療薬として承認を得て注目された。日本へは 2005 年に AGA 治療薬として承認されている。本剤は、テストステロンの DHT の変換を触媒するⅡ型 5α リダクターゼ阻害剤で、抗アンドロゲン作用を示し[20]、毛包で男性ホルモンの作用を減弱する。フィナステリドは、日本では成人男性にのみ適用が認められており、女性や未成年は適用外である。2015 年に日本で承認を得たデュタステリドは、Ⅰ型、Ⅱ型 5α リダクターゼをともに阻害する。



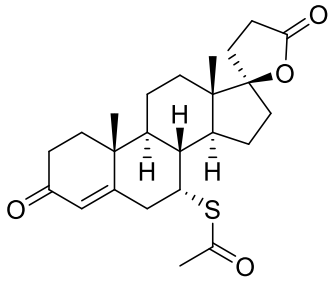
finasteride



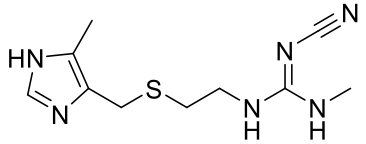
dutasteride



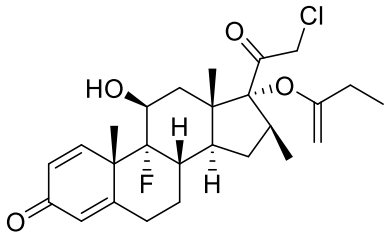
carpronium chlorid



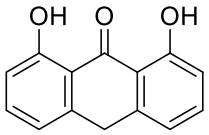
spironolactone



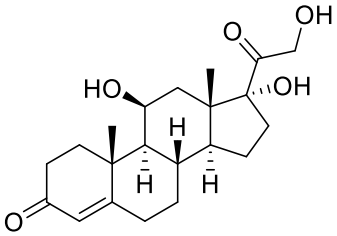
cimetidine



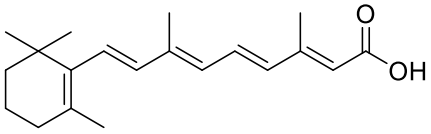
clobetasol propionate



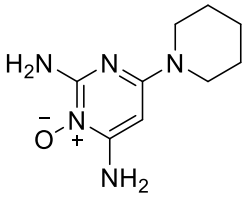
dithranol (anthralin)



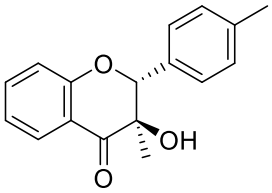
cortisol



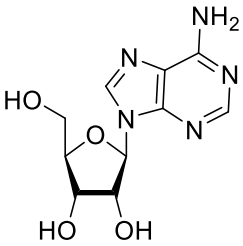
tretinoin



minoxidil



t-flavanone



adenosine

Figure 1.3.　国内外で発毛・育毛剤として販売されている薬剤

ミノキシジルは、1979 年に血管拡張作用を有する経口降圧薬として FDA で承認され、その後、FDA が唯一有効性を認めた発毛・育毛剤として話題となった。ミノキシジルは、毛包で、3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホスルフェート依存性スルホトランスフェラーゼによって、ミノキシジルサルフェートとなり、毛乳頭細胞のスルフォニアウレア受容体 (SUR) を活性化する[21] (Figure 1.4)。アデノシン-3-リン酸 (ATP)トランスポーターである SUR は ATP を細胞外に放出し、ATP は、アデノシンへと分解される。生成したアデノシンは、毛乳頭細胞膜のアデノシン受容体に作用し、VEGF など細胞成長因子を放出させ、脱毛頭皮における頭髪の成長を促進する。

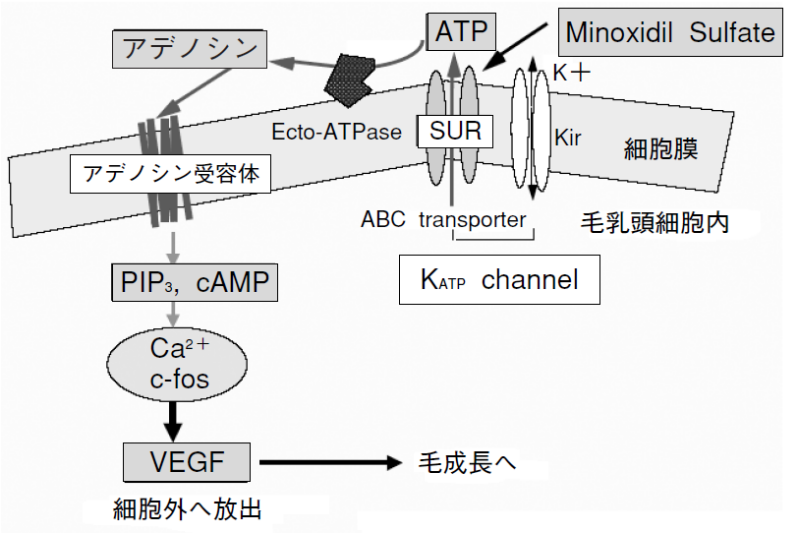


Figure 1.4. ミノキシジルの作用機序[22]

また、カルプロニウム塩化物は、コリンエステラーゼ抵抗性のアセチルコリン受容体作動薬として働く。局所血管拡張作用は、アセチルコリンの 10 倍程度であり (ウサギ)、頭皮の血行を促進し、頭髪の成長を促す。

日本では、薬用植物を含む天然素材やその成分から開発された化合物が、脱毛の予防または育毛の促進のために、医薬部外品や化粧品成分として数多く用いられている。医薬部外品の育毛成分として知られる *trans*-3,4'-dimethyl-3-hydroxyflavanone (t-フラバノン) は、毛包上皮細胞の増殖促進活性を有するセイヨウオトギリソウ由来の天然物 astilbin をリード化合物として開発された。t-フラバノンは、毛乳頭で成長期毛を退行期へと移行させる腫瘍増殖因子-β (TGF-β) の活性化を抑制することで、毛包上皮細胞の増殖を促進する[23, 24]。また、FGF-7 産生促進剤であるアデノシンや BMP 産生調節剤である 6-ベンジルアミノプリンなども、医薬部外品として使用されている。

医薬部外品や化粧品は、医薬品に比べて患者の秘密情報が保護されやすく、入手が容易であり、低コストであることから関心が高まっている。ショウキョウチンキ、センブリ抽出液、

ニンジン抽出液を有効成分とする医薬部外品もある。このような医薬部外品の多くは複数の生薬を含むことが多く、それらの生薬の併用効果で、血行を促進し、毛包細胞に栄養を与えるとともに、直接毛包細胞に働きかけ、細胞の増殖を促進することが期待されている。これらの原料は、植物由来であることから副作用が少ないイメージを有することから好んで使用されている。また、新たな天然素材の探索研究も活発に行われており、*Platycladus orientalis* [25]や *Erica multiflora* [26]、ブドウ種子[27]などの抽出物のように、多くの植物抽出物が育毛を促進すると報告されている。

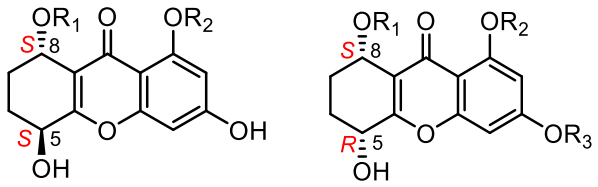
しかしながら、このような天然抽出物に関する研究は進んでいるものの、その活性成分については未解明なものが多く、ヒトの有効性も科学的に十分に実証されているとは言えないのが現状である。

第 2 節 モンゴルについて

モンゴルは、中国とロシアとの間に位置する北東アジアの内陸にある。北部からアルタイ山脈の西部にかけてタイガと呼ばれる針葉樹林が広がる。南部にはゴビ砂漠、東北地域にはステップが広がり、これら多様な地形が、生物の多様性を生んでいる。また、長くて寒い冬と短い夏が繰り返される極端で過酷な気候により、他の地域にはないユニークな植物が形成されている。

モンゴル人は、古代から独自の医学を使って人間や動物の病気を予防・治療してきた。その後、モンゴル固有の医学は、チベット仏教の伝播とともにチベット医学を根源とする医療体系に取り込まれ、モンゴル伝統医学として確立された[28]。モンゴル医学で用いられる伝統薬物のうち、約 72%は植物であり、約 28%は動物または鉱物を基原とする。モンゴルには約 3,000 種の植物が生息しているが、現在、薬用植物として使われているのは 100 種程度である。

徳島大学はモンゴル健康科学大学 (現、モンゴル国立医科大学) との学術交流に関する協定書 (2007 年 10 月 5 日締結) に基づき、「生薬学・天然物化学分野での指導・教育」を行うとともに、「薬用植物を含む天然薬用資源に関する共同研究の推進」を行っている。その一環として、当研究室では、モンゴル民族が伝承する薬物の情報の収集と新規医薬品創製を目指した薬用植物の含有成分の調査を行っており、これまでにモンゴル産リンドウ科植物 *Gentianella amarelle* ssp. *acuta* から、新規 tetrahydroxanthone を単離し (Figure 1.5)、化学構造を明らかにしている[29]。また、リンドウ科植物 *Gentiana algida* の地上部から、新規セコイリドイド配糖体を単離し、化学構造を明らかにしている[30]。



	R_1	R_2		R_1	R_2	R_3
1	H	H	**2**	H	H	H
3	Glc	H	**6**	Xyl	H	H
4	Xyl	H	**7**	H	Glc	H
5	H	Glc	**8**	H	H	Glc

Figure 1.5. モンゴル産リンドウ科植物 *Gentianella amrelal* ssp. *acuta* から単離された新規 tetrahydroxanthone.

第 3 節　*Inonotus obliquus* (Chaga) について

Inonotus obliquus（和名：カバノアナタケ、樺孔茸）は、タバコウロコタケ科(*Hymenochaetaceae*）に属する耐寒性のキノコである。北半球の温帯から亜寒帯地域に広く分布し、日本では北海道、東北地方、長野県等で見られる。*I. obliquus* は、シラカバなどのカバノキ類の幹に寄生し、樹皮を破って黒い固い菌核を形成する。その菌核は、ロシア語で Chaga (tchaga) と呼ばれ、ロシアや西シベリアでは、4 世紀以上にわたり癌に対する民間薬として使用されている。このため、培養腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導[31, 32]、腫瘍細胞の浸潤抑制[33]、発がんプロモーション抑制[34]、およびマウスメラノーマ細胞に対する抗がん作用等[35]の Chaga の抗腫瘍作用[36]に焦点が当てた研究が盛んに行われている。一方、Chaga は、抗酸化作用[37, 38]、抗炎症作用[39]、抗 HIV[40]、抗 HSV[41]、および抗インフルエンザウイルス[42]作用、ならびに糖尿病[43, 44]や動脈硬化などの予防効果を示すことも明らかになっている。日本では、機能性食品として活用もされており、Chaga の粉砕や粉末あるいは液体培養液が市販されている。Chaga の成分としては、β グルカンなどの多糖類、フェノール性化合物、フラボノイド、トリテルペノイド、アルカロイド、ステロール等が報告されている[45-51] (Figure 1.6)。

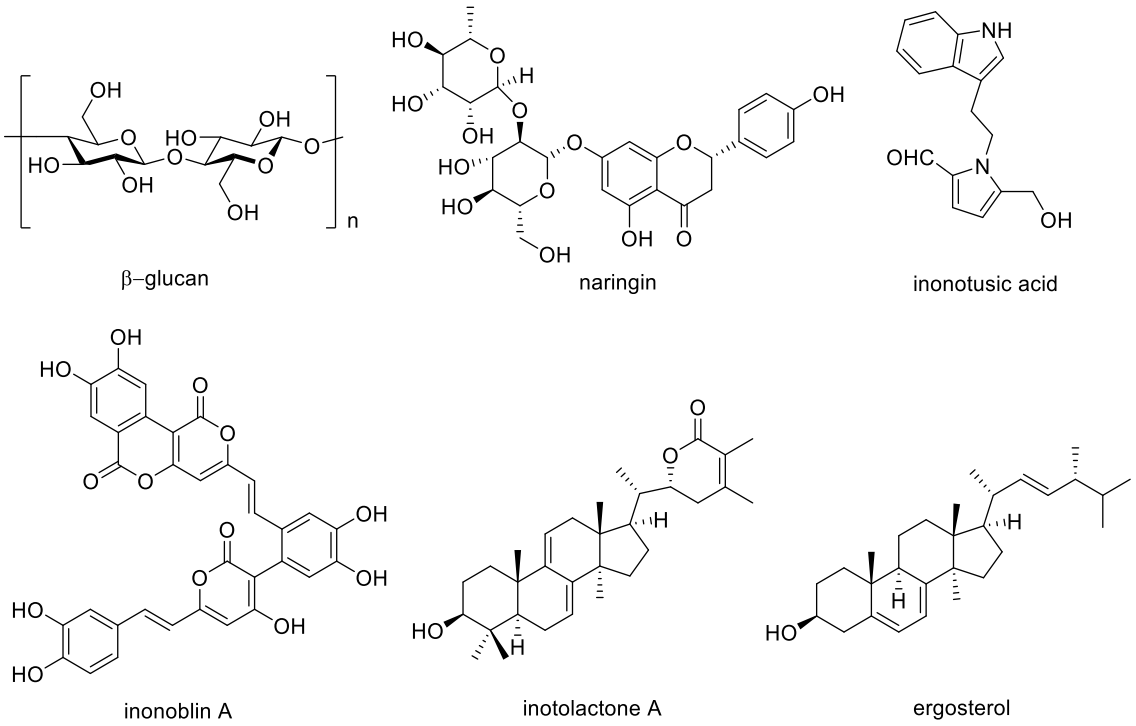


Figure 1.6.　*Inonotus obliquus* から単離された化合物

当研究室では、モンゴル伝統薬物の有効利用法の開発に関する研究を行っており、その一環で「モンゴルでは、Chagaやセイヨウオオバコを洗髪剤として利用し、健康な頭髪の維持に役立てている」という情報を得ている。そこで、著者はChagaに発毛・育毛活性を有する化合物が含有されると考え、Chagaを素材として新しい発毛・育毛剤を開発することも視野に入れ、その活性成分の探索を行った。

第 2 章　実験動物を用いた Chaga とセイヨウオオバコの発毛・育毛活性の評価

第 1 節　実験動物を用いた Chaga とセイヨウオオバコの発毛・育毛活性の評価

2.1.1　Chaga ならびにセイヨウオオバコの抽出液の調製

モンゴルで購入した Chaga の粉砕物 (250 g, dry) を熱水、ならびに常温下 35 % EtOH で抽出し、熱水抽出液 (IoW) と 35 % EtOH 抽出液 (IoE) を調製した。同様に、セイヨウオオバコの地上部 (250 g, dry) を抽出し、熱水抽出液 (PmW) と 50 % EtOH 抽出液 (PmE) を得た。Chaga 熱水抽出液 (IoW) とセイヨウオオバコ熱水抽出液 (PmW) を等量混合し、混合液 mix (IoW+PmW) を調製した。

2.1.2　実験動物を用いた発毛・育毛活性の評価

ICR マウスの背部を除毛した後、除毛部に抽出液 IoW、IoE、PmW、PmE、mix (IoW+PmW)、および対照薬剤 (ミノキシジル) を 2 時間おきに 1 日 5 回、14 日間、1 回あたり 400 μL 程度塗布した後に、毛の密度を測定した[52, 53]。

その結果、IoW に、強い発毛・育毛活性があることが確認された (Figure 2.1)。一方、IoE、PmW、および PmE の発毛・育毛活性は、いずれもミノキシジルと同程度であった。
Mix (IoW+PmW) にも、IoW の単独の発毛・育毛活性には劣るものの、PmW より強い活性が認められたことから、本発毛・育毛活性は、IoW によるものと推定された。

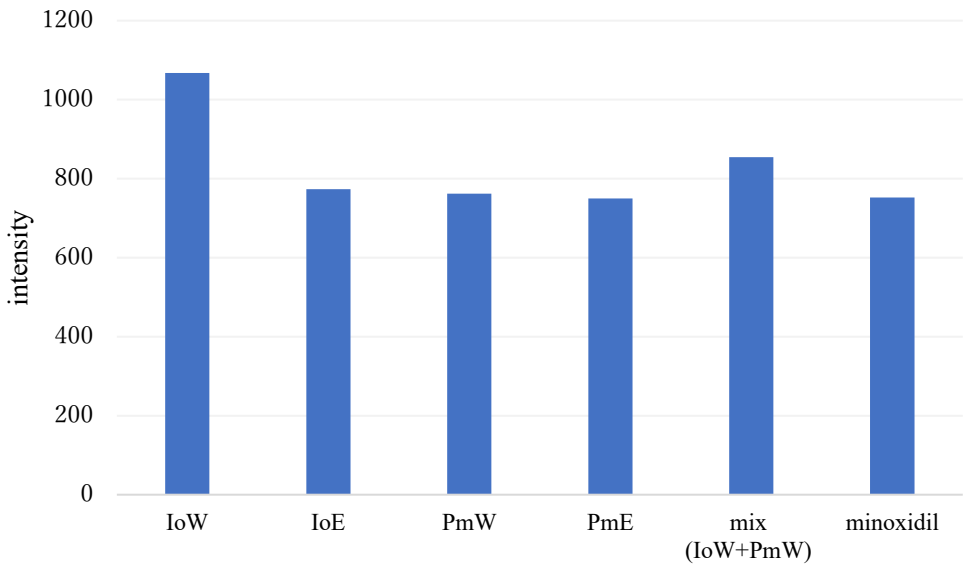


Figure 2.1. Chaga ならびセイヨウオオバコ抽出液の発毛・育毛活性
(IoW : Chaga 熱水抽出液、IoE: Chaga 35 %EtOH 抽出物液、PmW：セイヨウオオバコ熱水抽出液、PmE：セイヨウオオバコ 50 %EtOH 抽出液、mix (IoW＋PmW)：Chaga とセイヨウオオバコ熱水抽出液の等量混合液)

第 2 節　Chaga 抽出液の各種代謝酵素活性に与える影響

Chaga 熱水抽出液 (IoW)と 35 % EtOH 抽出液 (IoE) について、エネルギー代謝酵素 (アルカリフォスファターゼ、酸性フォスファターゼ、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼ)、タンパク質代謝酵素 (ロイシンアリルアミラーゼ、バリンアリルアミラーゼ、シスチンアリルアミラーゼ、トリプシン、α-キモトリプシン)、脂質代謝酵素 (エステラーゼ、エステラーゼリパーゼ、リパーゼ) および糖質代謝酵素 (α-ガラクトシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼ、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ、α-マンノシダーゼ、α-フコシダーゼ) に与える影響を評価した。

その結果、IoW は、アルカリフォスファターゼ、エステラーゼ、リパーゼ、ロイシンアリルアミダーゼ、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼ、β-ガラクトシダーゼおよび α-グルコシダーゼの活性を亢進する作用を示し、特に、アルカリフォスファターゼ、エステラーゼ、リパーゼ、およびナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼの活性を顕著に亢進した (Figure 2.2)。一方、IoE は、アルカリフォスファターゼ、エステラーゼ、リパーゼ、ロイシンアリルアミダーゼの活性を亢進したが、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、およびに α-グルコシダーゼの活性には、影響を与えなかった。

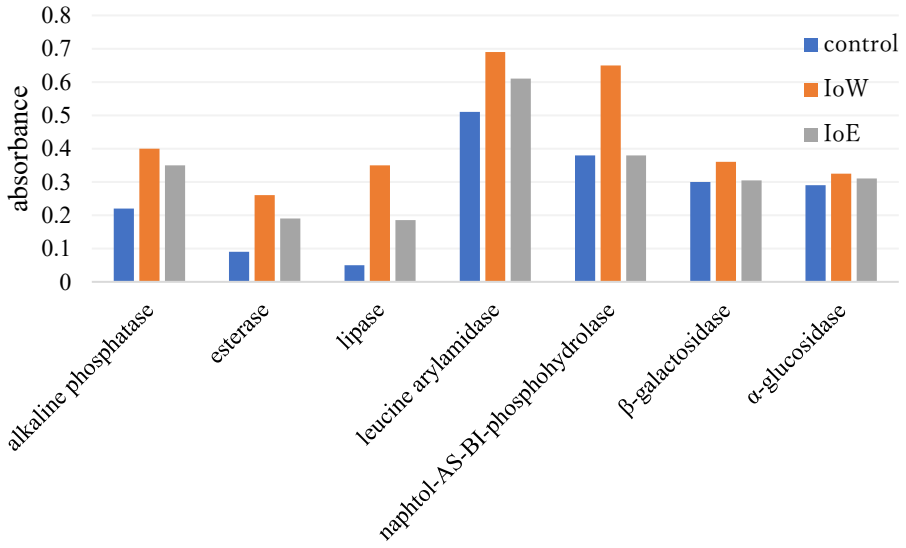


Figure 2.2.　Chaga の熱水抽出液 (IoW) と 35 % EtOH 抽出液 (IoE) が各種代謝酵素の活性に与える影響

第 3 節　小活

Chaga ならびにセイヨウオオバコの熱水抽出液と 35 % EtOH あるいは 50 % EtOH 抽出液について、実験動物を用いて発毛・育毛活性を評価した。いずれの抽出液も対照薬剤のミノキシジルと同等以上の活性を有することを明らかにした。特に、Chaga の熱水抽出液に顕著な活性を見い出した。

Chaga 熱水抽出液と 35 % EtOH 抽出液の各種代謝酵素に与える影響を評価した結果、Chaga 熱水抽出液はアルカリフォスファターゼ、エステラーゼ、リパーゼ、ロイシンアリルアミダーゼ、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼ、β-ガラクトシダーゼおよび α-グルコシダーゼの活性を亢進することが明らかになった。

第 3 章　毛乳頭細胞増殖促進活性を指標とした Chaga の発毛・育毛活性成分の探索

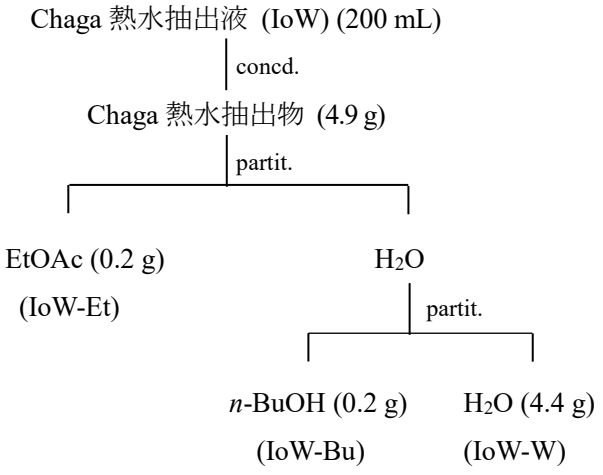
第 1 節　Chaga の抽出条件の検討ならびに粗画分の調製

3.1.1　Chaga の抽出条件の検討

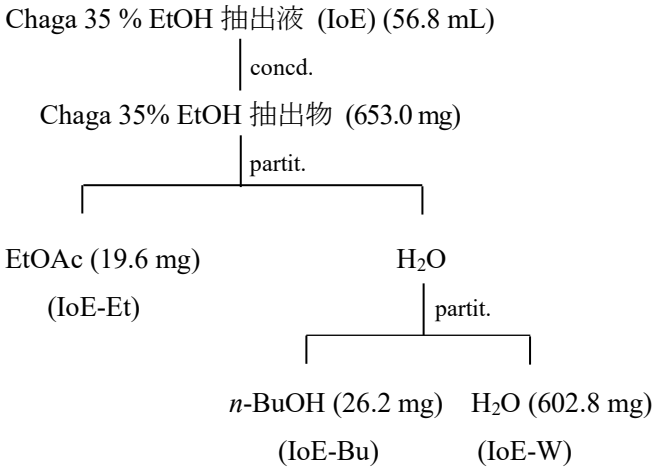
Chaga に含有される発毛･育毛活性成分を探索するため､第 2 章で活性を見い出した Chaga 熱水抽出液 (IoW) と 35 % EtOH 抽出液 (IoE) に含有される成分の薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析を行った。すなわち、IoW と IoE をそれぞれ減圧下濃縮し抽出物を作製した。これらをそれぞれ EtOAc と H_2O で分配し、得られた H_2O 可溶部をさらに *n*-BuOH と H_2O で分配した(Scheme 3.1 および 3.2)。

得られた各層の濃縮物について TLC で含有成分の極性を確認した (Figure 3.1)。熱水抽出物と 35 % EtOH 抽出物はいずれも低極性～高極性にかけて多数のスポットを示し、幅広い極性に多数の化合物を含有することが示唆された。

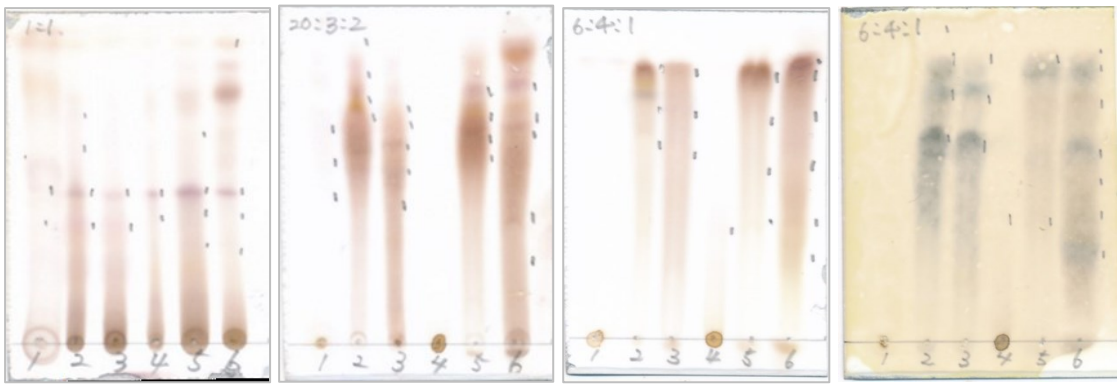
そこで、多数の化合物を効率よく抽出するため、さらには Chaga 抽出物の医薬品、医薬部外品あるいは化粧品としての製品開発についても視野に入れ、溶解スペクトルが広く、安全性が高い 80 % EtOH を抽出溶媒に用いることにした。



Scheme 3.1. Chaga 熱水抽出液 (IoW) の分配



Scheme 3.2. Chaga 35 % EtOH 抽出液 (IoE) の分配



$CHCl_3$:EtOAc=1:1	EtOAc:MeOH:H_2O=20:3:2	$CHCl_3$:MeOH:H_2O=6:4:1	$CHCl_3$:MeOH:H_2O=6:4:1
(10 % H_2SO_4)	(10 % H_2SO_4)	(10 % H_2SO_4)	($FeCl_3$)

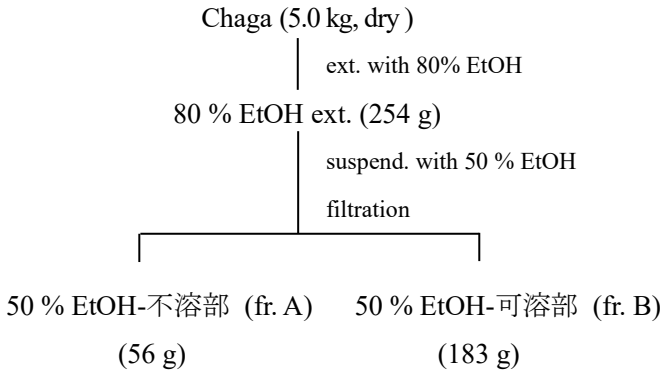
Figure 3.1.　Chaga 抽出液ならびに各画分の TLC

$CHCl_3$/EtOAc=1:1 {1: Chaga 熱水抽出液 (IoW), 2: EtOAc 層 (IoW-Et), 3: BuOH 層 (IoW-Bu),
4: Chaga 35 %EtOH 抽出物液 (IoE), 5: EtOAc 層 (IoE-Et), 6: BuOH 層 (IoE-Bu)}

EtOAc/MeOH/H_2O=20:3:2, $CHCl_3$/MeOH/H_2O=6:4:1
{1: Chaga 熱水抽出液 H_2O 層 (IoW-W), 2: IoW-Et, 3: IoW-Bu,
4: Chaga 35 %EtOH 抽出物液 H_2O 層 (IoE-W), 5: IoE-Et, 6: IoE-Bu}

3.1.2　Chaga の抽出ならびに粗画分の調製

Chaga (5.0 kg, dry) を 80 ％ EtOH で抽出した。得られた抽出物を 50 % EtOH で懸濁した後、吸引濾過し 50 % EtOH 不溶部 (fr. A, 56 g) と可溶部 (fr. B, 183 g) を得た (Scheme 3.3)。



Scheme 3.3．Chaga の抽出と粗画分

3.1.3　Chaga 粗画分の各種代謝酵素に与える影響

Chaga より調製した 50 % EtOH 不溶部 (fr. A) と可溶部 (fr. B) が、第 2 章第 2 節と同様 19 種の代謝酵素に与える影響を評価した。

その結果、fr. A (250 µg/mL) は、リパーゼ、ロイシンアリルアミダーゼ、α-グルコシダーゼに活性亢進作用を示した (Figure 3.2)。

Fr. B (250 µg/mL) はアルカリフォスファターゼ活性とロイシンアリルアミダーゼに対して活性亢進作用を示した。

しかしながら、これらの結果は、第 2 章で行った Chaga 熱水抽出液と 35 % EtOH 抽出液の酵素活性に与える影響の評価結果と対応していなかったため、酵素活性を指標とした活性成分の探索は困難と判断した。そこで、fr. A と fr. B のヒト頭髪毛乳頭細胞を用いた評価を行うこととした。

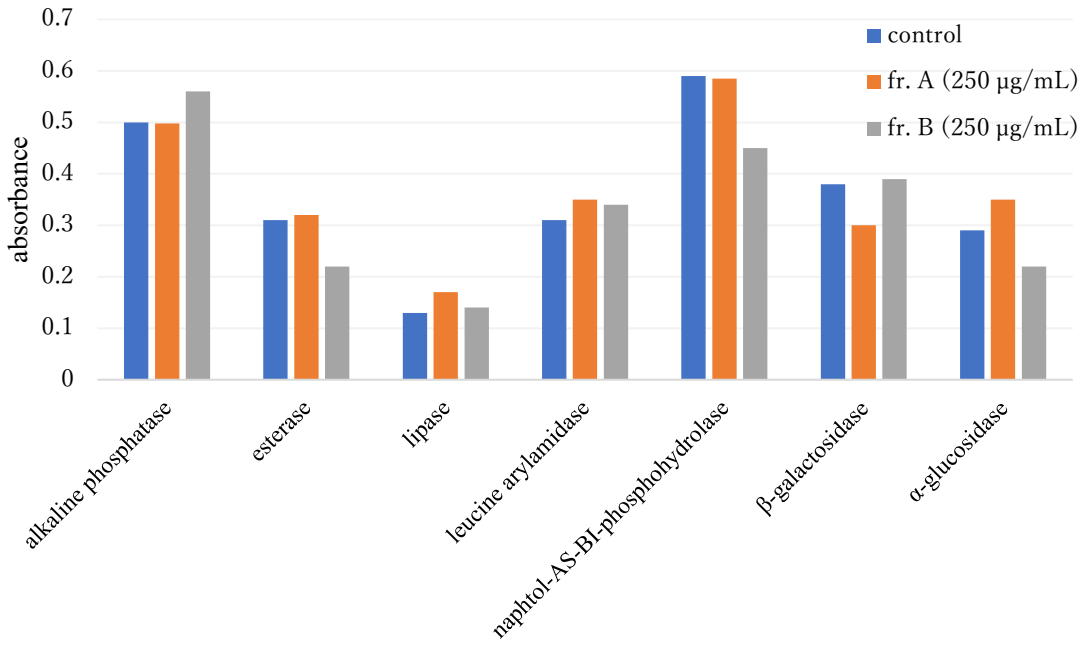


Figure 3.2.　Fr. A と fr. B が各種酵素活性に与える影響

第 2 節　毛乳頭細胞増殖促進活性を指標とした活性成分の探索

Fr. A と fr. B について、ヒト頭髪毛乳頭細胞 (Human Follicle Dermal Papilla Cells, HFDPC) の増殖に与える影響[54-56]を MTT アッセイを用いて毛乳頭細胞増殖率 (%) で評価した。

その結果、fr. A は 3.1 μg/mL で、140 %の細胞増殖促進活性を示したが、12.5 μg/mL 以上の濃度では細胞毒性を示すことが分かった (Table 3.1)。

一方、fr. B の 3.1 μg/mL における細胞増殖促進活性は 115 %であったが、12.5 μg/mL では 139 %の増殖促進活性が見られた。対照薬剤のミノキシジルの細胞増殖促進活性は 4.2 μg/mL において 104.6 %であった。

Table 3.1　Fr. A と fr. B の毛乳頭細胞増殖促進活性 (%)

sample	concentration (μg/mL)		
	3.1	12.5	50
fr. A	139.8 ± 1.3***	< 80 % [a]	< 80 % [a]
fr. B	114.5 ± 2.4**	139.2 ± 2.2***	< 80 % [a]
minoxidil	104.6 ± 1.4* at 4.2 μg/mL		

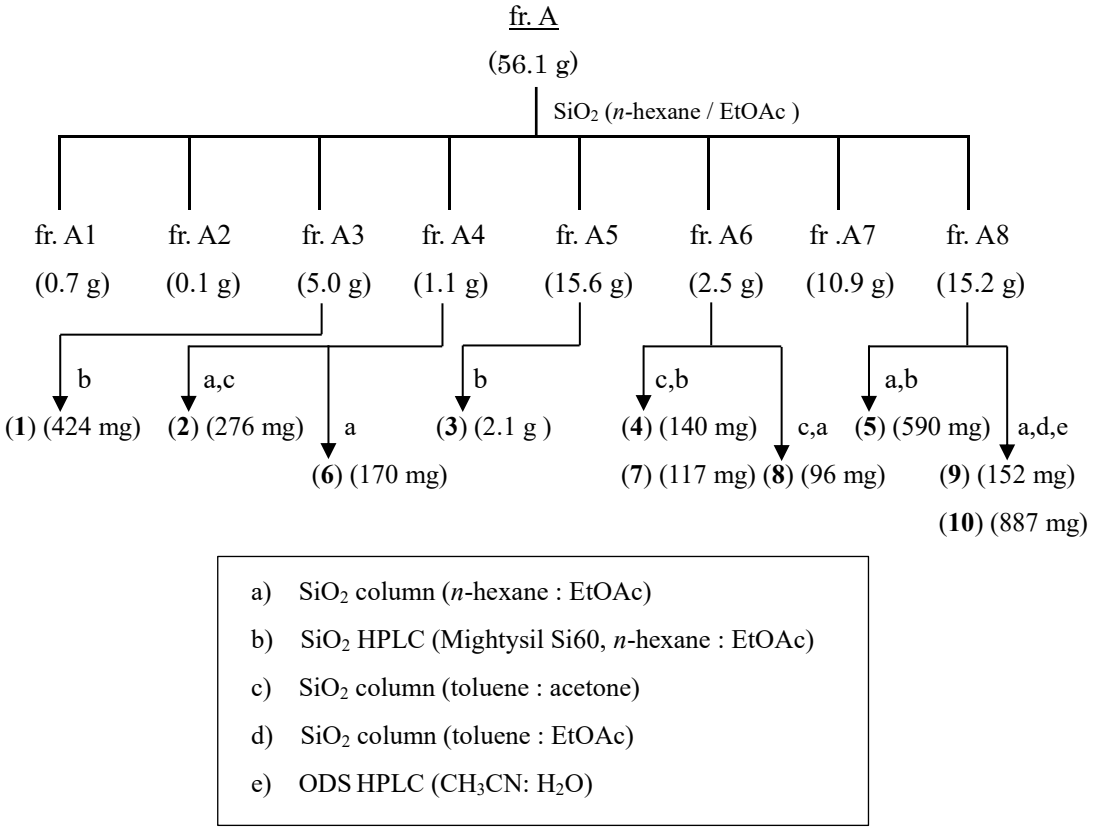
Data represent means ± SE (n = 6)

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

[a] Cell viability < 80 %

Fr. A に顕著な毛乳頭細胞増殖促進活性が認められたため、SiO_2 カラムを用いて分画し、fr. A1–A8 を得た。これらのフラクションの HFDPC に対する増殖促進活性を評価した。その結果、fr. A3–A6 と A8 は 1 μg/mL の濃度で、それぞれ 158.4、151.9、206.8、136.5、134.6 % の増殖促進活性を示した (Figure 3.3)。

そこで、fr. A3–A6 と fr. A8 を SiO_2 カラム、ODS カラム等を用いて繰り返し分離し、10 種の化合物 (**1**–**10**) を Scheme 3.4 に示した収量で単離した。



Scheme 3.4. Fr. A からの化合物 **1**–**10** の単離

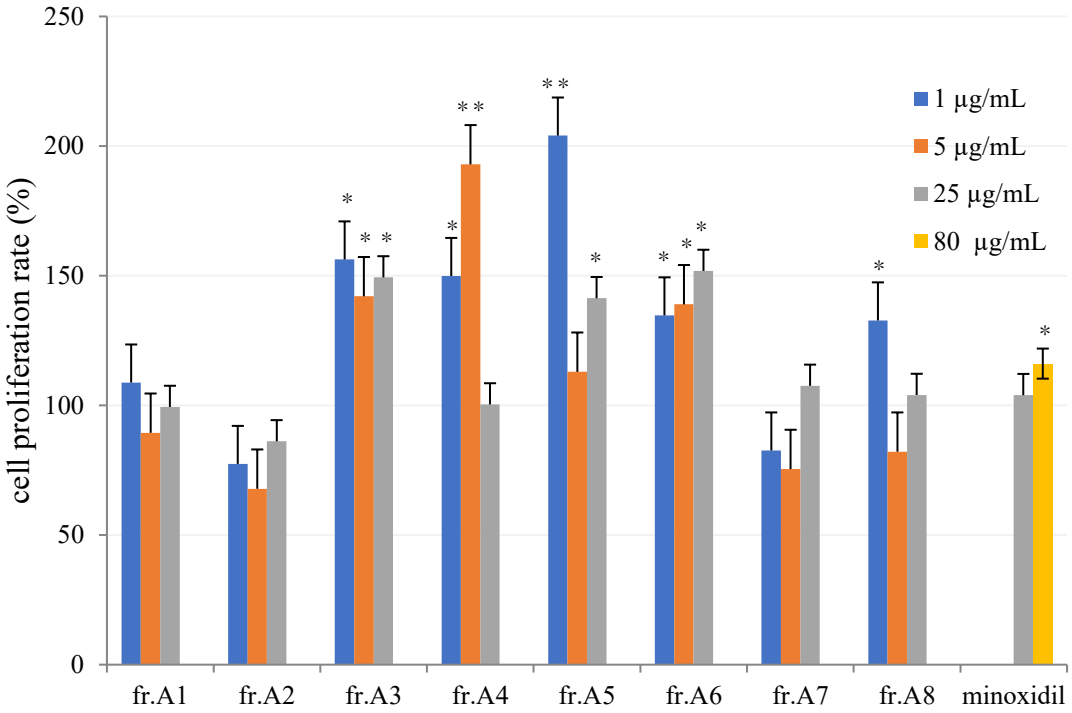


Figure 3.3.　Frs. A1–A8 の毛乳頭細胞増殖促進活性

Data represent means ± SE (n = 3), *P < 0.05, **P < 0.01

3.2.1　化合物 **1–10** の同定

化合物 **1–10** の各種スペクトルデータを文献値と比較し、ラノスタン型トリテルペンの lanosterol (**1**) [57]、 lanost-8,24-diene-3β-ol-22-al (**2**) [58]、inotodiol (**3**) [57-59]、lanost-8,24-diene-3β,21-diol (**4**) [59]、trametenolic acid (**5**) [57, 58]、lanost-8,23*E*-diene-3β,22*R*,25-triol (**9**) [60]、シクロラノスタン型トリテルペンの 3β,21*R*,24*S*-21,24-cyclolanost-8-ene-3,21,25-triol (**10**) [61, 62]、ルパン型トリテルペンの betulin (**7**) [57]、ステロールの β-sitosterol (**6**) [63] および ergosterol peroxide (**8**) [64] であると同定した（Figure 3.4)。

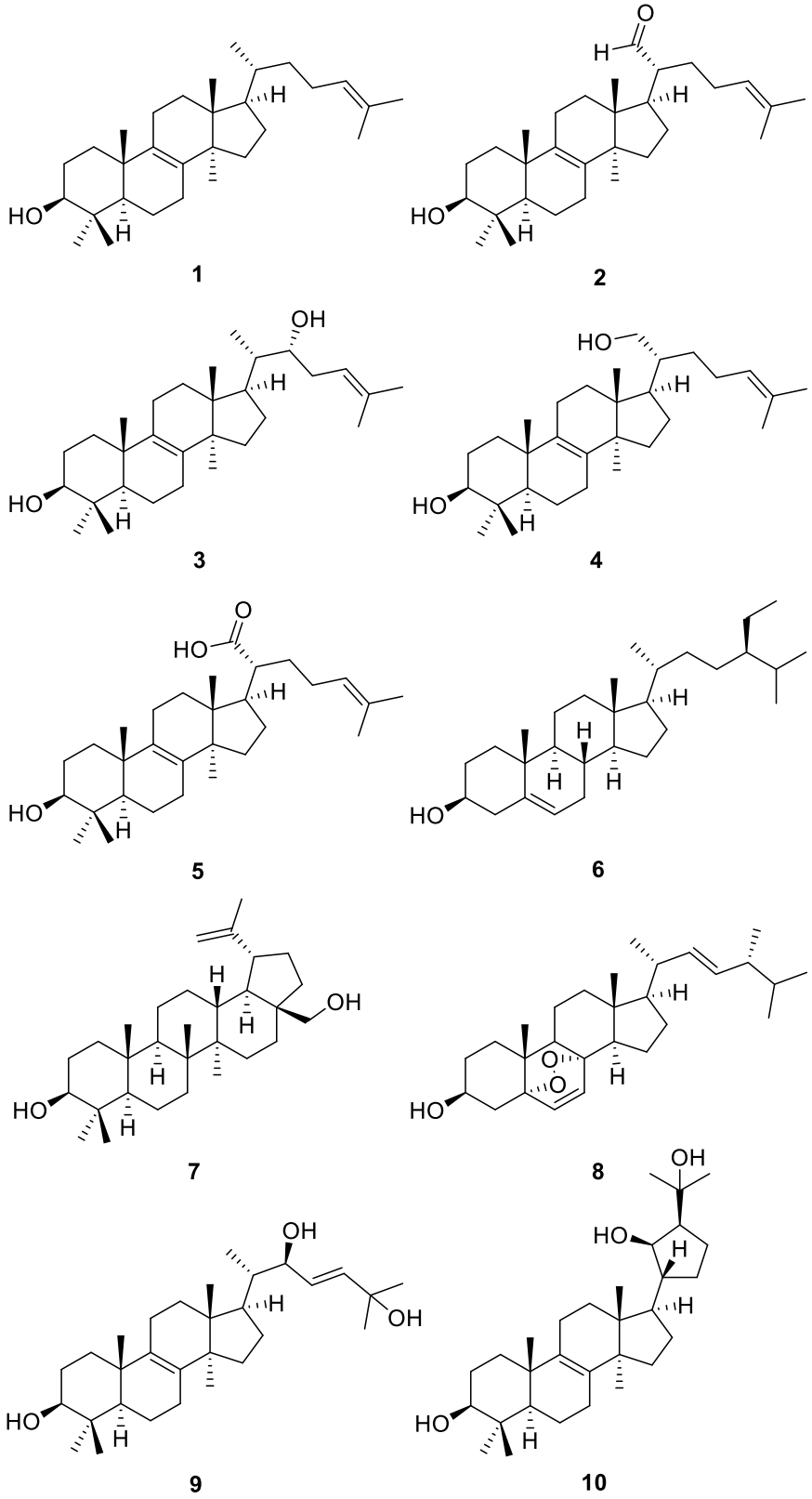


Figure 3.4.　化合物 **1–10** の構造

第 3 節　Chaga 含有成分の毛乳頭細胞増殖促進活性の評価

単離した化合物のうち、ラノスタン型トリテルペン **1**–**5** について HFDPC の増殖促進活性を評価した。

化合物 **2** は 5 μM で、**3** は 1.3 μM で細胞毒性を示したが、**2** は 0.02 μM、**3** は 0.08 μM でそれぞれ 131.4 %と 121.1 %の増殖促進活性を示した。

4 は、0.31 μM、1.3 μM、5.0 μM の濃度で、それぞれ 115.1 %、147.7 %、136.6 %の増殖促進活性を示した (Table 3.2)。また、化合物 **5** も、0.31 μM、1.3 μM における増殖率がそれぞれ 114.4 %、118.8 %と顕著な増殖促進活性を示した。

毛乳頭細胞増殖促進活性を示した化合物 **1**–**5** について相乗効果の有無を確認した。混合比は、各化合物の濃度 (**1** は 20 μM、**2** と **3** は 0.31 μM、**4** は 1.3 μM、**5** は 1.3 μM) とした。ミノキシジルは、80 μM で増殖率 116 %を示したが、**1**–**5** の混合物の増殖率は 166.7 %であった。いずれの化合物単独における増殖率よりも高かった。

Table 3.2　ラノスタン型トリテルペン **1**–**5** の毛乳頭細胞増殖促進活性 (%)

compound	concentration (μM)						IC_{50}[a]
	0.02	0.08	0.31	1.3	5	20	(μM)
1	105.0±6.0	118.8±1.1*	114.6±2.4*	90.6±1.0	87.1±1.3	110.6±2.5*	64.5
2	131.4±4.2*	120.0±4.5*	100.3±2.0	97.4±2.7	< 80 % [b]	*nt*	> 5
3	103.7±2.2	121.1±4.4*	111.1±2.9*	< 80 %	< 80 % [b]	*nt*	> 5
4	120.5±8.9*	113.0±9.4*	115.1±2.0***	147.7±4.0***	136.6±5.7***	*nt*	21.1
5	110.9±4.1	108.1±4.2	114.4±2.0***	118.8±1.6***	96.0±2.7	*nt*	59.7
minoxidil		116.1 ± 3.5 * at 80 μM					

Data represent means ± SE (n = 6)

nt not tested

*P < 0.05, ***P < 0.001

[a] Cytotoxicity against HFDPC

[b] Cell viability < 80 %

[c] Data at 0.02 and 0.08 μM, and at 0.31, 1.3, 5, and 20 μM were obtained in differently performed assays.

第 4 節　小括

HFDPC の増殖促進活性を指標として Chaga の発毛・育毛活性成分の探索を行い、10 種の化合物 (**1**–**10**) を単離した。化合物(**1**–**10**) の構造を各種スペクトルの解析により同定した。このうちラノスタン型トリテルペン lanosterol (**1**)、lanost-8,24-diene-3β-ol-22-al (**2**)、inotodiol (**3**)、lanost-8,24-diene-3β,21-diol (**4**)、および trametenolic acid (**5**) は、いずれも対照薬剤のミノキシジルを上回る HFDPC 増殖促進活性を示すことを明らかにした。

第 4 章　Chaga 粗画分ならびに活性成分の作用メカニズムの検討

第 1 節　テストステロン 5α リダクターゼ阻害活性およびアンドロゲン受容体拮抗作用の評価

4.1.1　テストステロン 5α リダクターゼ阻害活性

Chaga 80 % EtOH 抽出物から調製した 50 % EtOH 不溶画分 (fr. A) と可溶画分 (fr. B)、ならびに fr. A から単離した HFDPC 増殖活性を示す化合物 **1**–**5** について、テストステロン 5α リダクターゼ阻害活性 [65, 66]を評価した。

その結果、fr. A と fr. B、および化合物 **1**–**5** は、いずれもテストステロン 5 α リダクターゼ阻害活性を示さなかった (Table 4.1 および 4.2)。

Table 4.1　Fr. A と fr. B のテストステロン 5α リダクターゼ阻害活性 (%)

sample	concentration (μg/mL)			
	100	400	1000	IC_{50} (μg/mL)
fr. A	4.0	70.7	88.2	307.0
fr. B	−2.6	72.8	98.4	309.4
β-estradiol	*nt*	*nt*	*nt*	13.0

Data represent the average (n = 4)

nt not tested

Table 4.2　**1**–**5** のテストステロン 5α リダクターゼ阻害活性 (%)

sample	concentration (μM)			
	225	450	900	IC_{50} (μM)
1	−2.9	−2.3	−8.5	−
2	−6.6	−5.3	−3.3	−
3	7.0	16.9	38.6	> 900
4	15.4	17.1	29.4	> 900
5	4.9	1.1	2.7	−
β-estradiol	18.0	*nt*	51.4	8.9

Data represent the average (n = 4)

nt not tested

4.1.2　Fr. A と fr. B のアンドロゲン受容体拮抗作用

Fr. A と fr. B について、アンドロゲン受容体拮抗作用[67]を評価した結果、fr. A と fr. B はいずれも拮抗作用を示さなかった (Table 4.3)。

Table 4.3　Fr. A と fr. B のアンドロゲン受容体拮抗作用 (%)

sample	concentration (μg/mL)			
	3.1	12.5	50	IC_{50} (μg/mL)
fr. A	−11.5	0.6	99.9	30.2
fr. B	15.0	0.1	43.1	> 50
cyproterone acetate	*nt*	*nt*	*nt*	0.0024 (5.7 nM)

Data represent the average (n = 4)

nt not tested

第 2 節　ヘアサイクルに関与する細胞増殖因子の遺伝子発現の評価

4.2.1　Fr. A と fr. B が細胞増殖因子の遺伝子発現に与える影響

Fr. A と fr. B について、ヘアサイクルに関与する細胞増殖因子 FGF-7、VEGF、IGF-1、および HGF の遺伝子発現に与える影響[68, 69]を評価した。すなわち、fr. A と fr. B を HFDPC に作用させた後、各細胞増殖因子の mRNA 発現量を測定した。

その結果、fr. A は FGF-7 に対して、3.1 μg/mL で 113.5 %、12.5 μg/mL で 133.9 %の発現促進作用を示し、VEGF に対して 12.5 μg/mL で 141.2 %の発現促進作用を示した (Figure 4.1)。

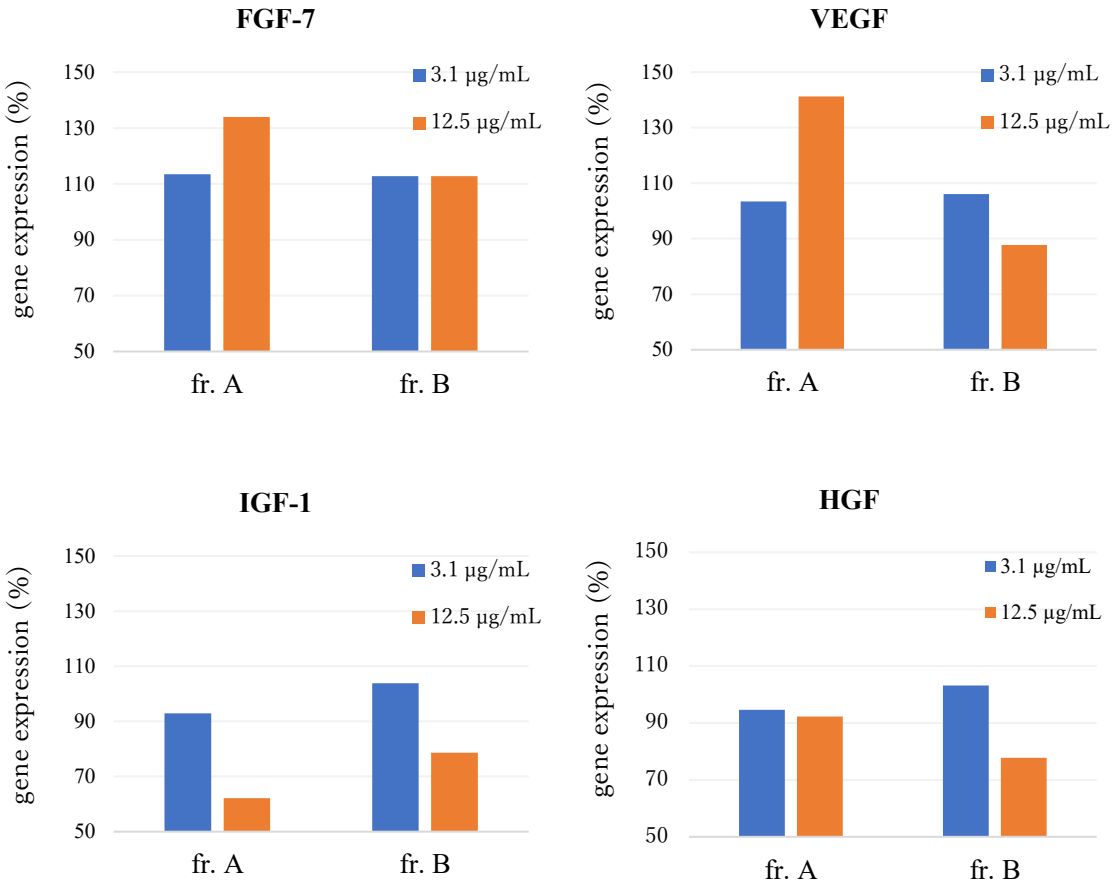


Figure 4.1.　Fr. A と fr. B の細胞増殖因子の遺伝子発現に与える影響
(adenosine 25 μg /mL (6.7 μg/mL) のとき FGF-7 は 129.0 %、VEGF は 119.8 %、$n = 2$)

4.2.2　化合物 **1**–**10** が細胞増殖因子の遺伝子発現に与える影響

Fr. A から単離した化合物 **1**–**10** についても同様に、各種細胞増殖因子の mRNA 発現量を測定した。FGF-7 に対して、それぞれ **1** は 5.0 μM で 134.2 %、**2** は 1.25 μM で 167.8 %、**3** は 1.25 μM で 122.2 %、4 は 1.25 μM で 133.0 %、**6** は 20 μM で 150.9 %、**7** は 20 μM で 126.1 %、**8** は 5 μM で 122.9 %、**9** は 5 μML で 115.8 %、**10** は 5 μM で 142.9 %の発現促進作用を示した (Figure 4.2)。

VEGF に対して、**5** は 20 μM で 157.8 %、**7** は 20 μM で 207.5 %の発現促進作用を示した。

IGF-1 に対して、**6** は 1.25 μM で 126.5 %の発現促進作用を示した。

HGF に対して、**2** は 1.25 μM で 124.9 %、**3** は 1.25 μM で 124.9 %、**7** は 1.25 μM で 116.1 %の発現促進作用を示した。

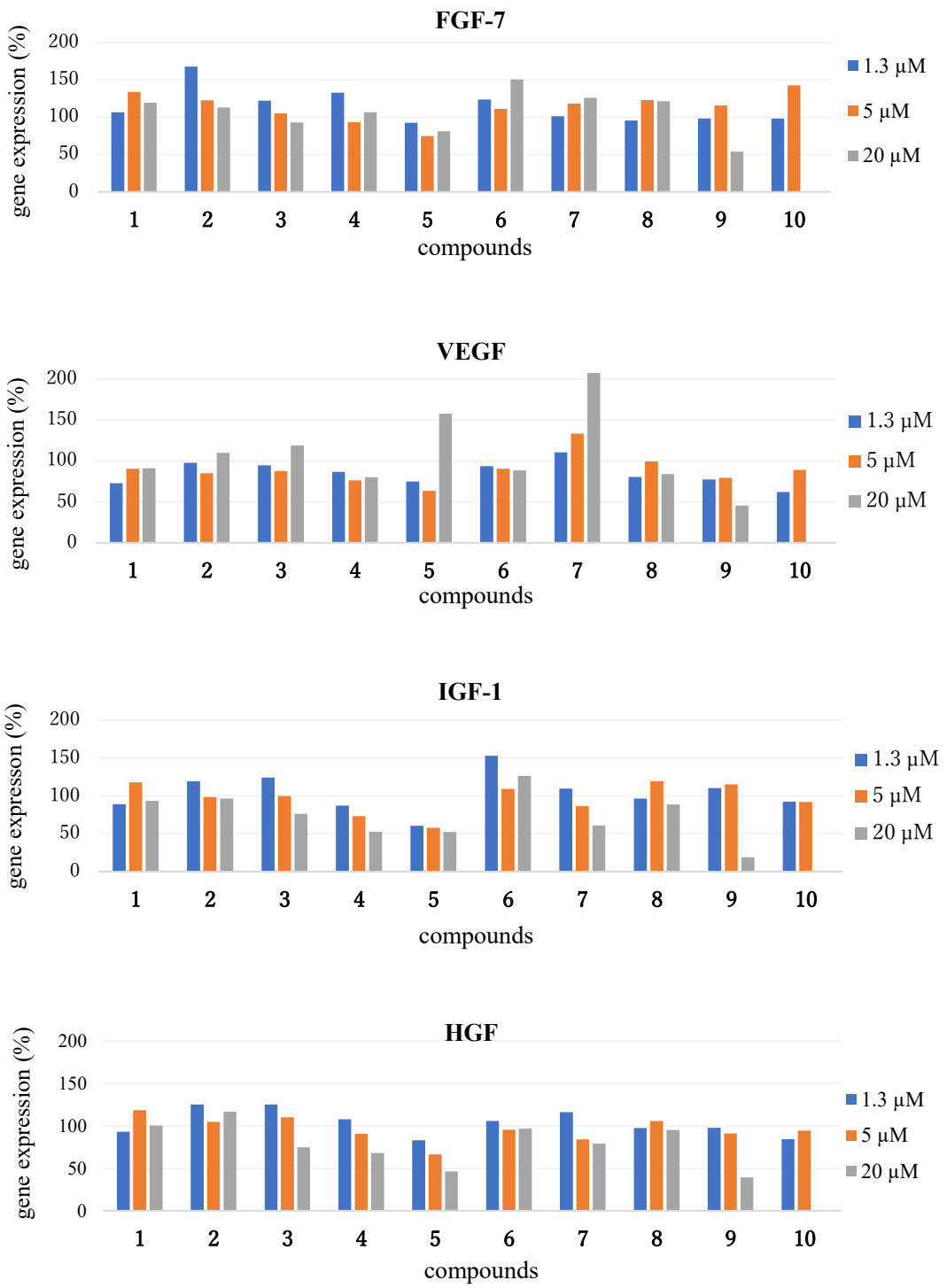


Figure 4.2.　化合物 **1**–**10** の細胞増殖因子の遺伝子発現に与える影響
(アデノシン 25 μg /mL (6.7 μg/mL) のとき FGF-7 は 139.1 %、VEGF は 118.2 %、*n*=2)

第 3 節　小括

Chaga 80 % EtOH 抽出物から調製した 50 % EtOH 不溶画分 (fr. A) と可溶画分 (fr. B)、 ならびに fr. A から単離した HFDPC 増殖活性を示す化合物 **1**–**5** について、テストステロン 5α リダクターゼ阻害活性ととアンドロゲン受容体拮抗作用を評価した。その結果、fr. A と fr. B、および化合物 **1**–**5** は、テストステロン 5α リダクターゼ阻害活性とアンドロゲン受容体拮抗作用を示さないことが明らかとなった。

Fr. A と fr. B、および化合物 **1**–**10** について、各種増殖因子の mRNA 発現量を測定したところ、FGF-7 に対して、fr. A と fr. B、および **1**–**10** のうち化合物 **5** 以外は、発現促進作用を示すことが明らかとなった。また、化合物 **5** と **7** は、VEGF に対して発現促進作用を示した。

ステロイドは、テストステロン 5α リダクターゼ阻害活性ならびにアンドロゲン受容体拮抗作用を有することから、発毛・育毛剤として利用されている[70]。一方、Chaga から単離した化合物 **1**–**5** はいずれもこれらの活性を示さなかったため、ステロイドとは異なる作用機序で発毛・育毛活性を示すことが示唆された。

結語

筆者は、当研究室が行っているモンゴル伝統薬物の有効利用法の開発に関する研究の一環で得た「モンゴルではChaga (*Inonotus obliquus*の菌核) やセイヨウオオバコが健康な頭髪の維持のために利用されている」という情報に基づき、Chagaを素材とした、新しい発毛・育毛剤の開発を視野に入れ、その発毛・育毛活性成分の探索を行った。

ヒト頭髪毛乳頭細胞 (HFDPC) に対する増殖促進活性を指標として選択し、Chaga の活性成分の探索を行った。その結果、**10** 種の化合物 (**1–10**) を単離し、スペクトル解析によりそれらの構造を明らかにした。このうち、化合物 **1–5** はラノスタン型トリテルペンで、いずれも対照薬剤ミノキシジルを上回る HFDPC 増殖促進活性を示した。さらに、**1–5** は相乗的に増殖促進活性を示すことを明らかにした。

化合物 **1–5** は、テストステロン 5α リダクターゼ阻害活性とアンドロゲン受容体拮抗作用は示さなかったが、ヘアサイクルに関与する線維芽細胞成長因子-7（FGF-7）と血管内皮細胞成長因子（VEGF）の遺伝子の発現を高めることが明らかになった。

本研究では、発毛・育毛に関わるテストステロン 5α リダクターゼやアンドロゲン受容体等に標的を設定した target based drug discovery (TDD) ではなく、HFDPC に対する増殖促進活性を指標とした phenotypic drug discovery (PDD) による活性成分の探索を実施したことから、それらとは異なる作用メカニズムにより発毛・育毛作用を示す新しいリード化合物を発見することができたと考えている。

本研究により、天然素材 Chaga ならびにその含有成分が発毛・育毛活性を示すことの科学的なエビデンスを示すことができたと考えている。Chaga あるいはその含有成分が化粧品や医薬部外品としてのヘアケア製品あるいは発毛・育毛剤とした医薬品として展開されることを期待する。

謝辞

本研究に際し終始御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研部 柏田 良樹 教授に衷心より感謝の意を表します。

本研究において種々の有益な御指導・御助力を賜りました徳島大学大学院社会産業理工学研究部 田中 直伸 准教授に心より深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり生物活性評価の御手配・御協力を賜りました株式会社スヴェンソン Cosmetics Marketing 事業部 副事業部長 福元 隆俊 氏に感謝致します。

本研究において有益なデータの御提供・御教授を賜りました新潟薬科大学薬学部薬学科 山下 菊治 教授に深く感謝致します。

本研究において、2014 年当時、モンゴル健康科学大学より徳島大学歯学部へ留学しておられ、生物活性評価の方法をご教示くださいました Dr. Aldartsogt Dolgorsuren に深く感謝致します。

本研究の機器の測定に御教示を賜りました徳島大学技術支援部蔵本技術部門 北池 秀次 副技術部門長に深謝致します。

本研究の機器の測定等に御教示を頂き、また、毛乳頭細胞増殖試験の実施にあたり御協力を頂きました徳島大学薬科学教育部の丹羽 莞慈 修士はじめ、励ましてくださいました徳島大学薬学部生薬学研究室の皆様に深く感謝致します。

最後に、夜間および休日の研究生活を応援し、理解してくれました私の家族に心から感謝致します。

2019 年 3 月

嵯峨山　和美

実験の部

第 2 章

供試材料

2014 年、モンゴルで購入した (Ionsei Samhwa、ウランバートル) Chaga (*Inonotus obliquus*) の乾燥粉砕物とセイヨウオオバコ (*Plantago major*) の地上部乾燥物を用いた。

Chaga ならびにセイヨウオオバコの抽出液の調製

①Chaga 熱水抽出液 (IoW) の調製

Chaga (250 g, dry) を 1 L の熱水 (90 ℃) で 24 時間抽出した後、残渣をろ去して Chaga 熱水抽出液 (IoW) を得た。

②Chaga 35 % EtOH 抽出液 (IoE) の調製

Chaga (250 g, dry) を 1 L の 35 % EtOH で、日中は 4 ℃、夜間は室温にて 2 週間抽出した後、残渣をろ去して Chaga 35 % EtOH 抽出液 (IoE) を得た。

③セイヨウオオバコ熱水抽出液 (PmW) の調製

セイヨウオオバコ(250 g, dry) を 1 L の熱水 (90 ℃) で 24 時間抽出した後、残渣をろ去してセイヨウオオバコ熱水抽出液 (PmW) を得た。

④セイヨウオオバコ 50 % EtOH 抽出液 (PmE) の調製

セイヨウオオバコ (250 g, dry) を 1 L の 50 % EtOH で、日中は 4 ℃、夜間は室温にて 2 週間抽出した後、残渣をろ去してセイヨウオオバコ 50 % EtOH 抽出液 (PmE) を得た。

⑤IoW と PmW 混液{mix (IoW+PmW)}の調製

IoW と PmW を等量混合し、Chaga とセイヨウオオバコの熱水抽出液の混液{mix (IoW+PmW)}とした。

実験動物を用いた発毛・育毛活性の評価

ICR マウス (クローズドコロニー、日本チャールズリバー) を除毛した後、除毛した ICR マウス背部に、各抽出液 IoW、IoE、PmW、PmE、mix (IoW+PmW)、および対照薬剤 (ミノキシジル) を 2 時間おきに 1 日 5 回、14 日間、1 回あたり 400 μL 程度塗布し、14 日経過した後に、毛の密度を RS イメージ プレスソフトウェアー (Roper Scientific, Martinstried, Germany) を用いて測定した。6 群、n=3 とした。

Chaga 抽出液の各種代謝酵素活性に与える影響

Chaga 熱水抽出液 (IoW) と 35 % EtOH 抽出液 (IoE) について、エネルギー代謝酵素 (アルカリフォスファターゼ、酸性フォスファターゼ、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼ)、タンパク質代謝酵素 (ロイシンアリルアミラーゼ、バリンアリルアミラーゼ、シスチ

ンアリルアミラーゼ、トリプシン、α-キモトリプシン)、脂質代謝酵素 (エステラーゼ、エステラーゼリパーゼ、リパーゼ) および糖質代謝酵素 (α-ガラクトシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-グルクロニダーゼ、α-グルコシダーゼ、β-グルコシダーゼ、N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ、α-マンノシダーゼ、α-フコシダーゼ) に与える影響を酵素活性研究試薬キット (アピザイム、シスメックス・ビオメリュー株式会社、日本) で測定した。酵素液として、SD ラット (クローズドコロニー、日本チャールズリバー、東京) の肝臓、膵臓、小腸、血漿、および腎臓のホモジネート (インターナルオルガン溶液) を用いた。酵素液 (インターナルオルガン溶液) 32.5 μL と IoW または IoE のそれぞれ 32.5 μL を、またコントロール群 (CTR) には酵素液 (インターナルオルガン溶液) 32.5 μL と超純水 32.5 μL をそれぞれ混合して、アピザイムキットのマイクロウエルに加えて、37 ℃で 4 時間インキュベーションした後、ZYM A 試薬溶液 32.5 μl と ZYM B 試薬溶液 32.5 μl を加えて、ナノドロップ 1000 分光光度計 (エル・エム・エス、東京) にて吸光度 {アルカリ性フォスファターゼ、エステラーゼ、エステラーゼリパーゼ、リパーゼ (以上、551 nm) ; ロイシンアリルアミダーゼ、バリンアリルアミダーゼ (以上、497 nm) ; シスチンアリルアミダーゼ、トリプシン、α-キモトリプシン (以上、402 nm) ; 酸性フォスファターゼ (540 nm)、ナフトール-AS-BI-フォスフォヒドロラーゼ (547 nm)、α-ガラクトシダーゼ (403 nm)、β-ガラクトシダーゼ (551 nm)、β-グルクロニダーゼ (586 nm)、α-グルコシダーゼ (556 nm)、*N*-アセチル-β-グルコサミニダーゼ (416 nm)、α-マンノシダーゼ (403 nm)、α-フコシダーゼ (552 nm)}を測定した。

第 3 章

NMR スペクトルは、Bruker AVANCE-500 NMR spectrometer で測定した。
薄層クロマトグラフィー (TLC ; thin-layer chromatography) には、silica gel 60 F_{254} (Merrk, Germany) を、カラムクロマトグラフィーには、silica gel 60N (63–210 μm, 関東化学、東京) をそれぞれ用いた。HPLC カラムには、Mightysil Si60 (関東化学) と Mightysil RP-18 GPII を用いた。

<u>Chaga の抽出条件の検討</u>

第 2 章で得られた Chaga 熱水抽出物と Chaga 35 % EtOH 抽出物について、それぞれ EtOAc と H_2O で溶媒間分配し、得られた H_2O 可溶部をさらに *n*-BuOH と H_2O で溶媒間分配した。得られた可溶画分について、TLC で確認した。展開溶媒は $CHCl_3$/EtOAc=1:1、$CHCl_3$/MeOH/H_2O=6:4:1、EtOAc/MeOH/H_2O=20:3:2 を用い、発色試薬は、10 % H_2SO_4 と $FeCl_3$ を用いた。

<u>供試材料</u>

Chaga 刻み (ロシア産、Lot No.131008) は、チハヤ株式会社 (香川県高松市) より購入し

た。標本は、徳島大学薬学部生薬学研究室で保管した。

毛乳頭細胞増殖促進活性を指標とした活性成分の探索

Chaga (5.0 kg, dry) に、80 % EtOH を 14 L 加え、5 日間室温で抽出した。振動真空濃縮機 (VD-15-T、冷却水量 10 L/min.、合計 7.0 Kw、220 V/60 Hz、株式会社阿部鐵工所) で濃縮した。得られた抽出物を 50 % EtOH で懸濁した後、吸引濾過して、不溶部 (fr. A、56.1g) と可溶部 (fr. B、183.0g) を得た。

Fr. A を SiO_2 カラム (*n*-hexane / EtOAc , 12:1−2:1) で分画し、fr. A1–A8 を得た。

Fr. A3 (300 mg) を SiO_2-HPLC (*n*-hexane / EtOAc, 12:1) で精製し、lanosterol (**1**, 12 mg) [58] を単離した。

Fr. A4 (1.1 g) を、SiO_2 カラム (*n*-hexane/EtOAc, 15:1−4:1) で分画し、frs. A4.1–10 を得た。さらに、fr. A4.8 (57.3 mg) を、SiO_2 カラム (toluene/acetone, 20:1−18:1) で分離し、lanost-8,24-diene-3β-ol-22-al (**2**, 7 mg) [59-60]を単離した。Fr. A4.6 (465 mg) を、SiO_2 カラム (*n*-hexane / EtOAc , 12:1−7:1) で分離し、fr. A4.6.8 として β-sitosterol (**6**, 114 mg) [64] を単離した。

Fr. A5 (400 mg) を、SiO_2-HPLC (*n*-hexane / EtOAc, 6:1) で精製し、inotodiol (**3**, 53 mg) [59-60] を単離した。

Fr. A6 (2.5 g) を、SiO_2 カラム (toluene/acetone, 30:1−15:1) で分画し、frs. A6.1–9 を得た。さらに、fr. A6.5 (743 mg) を、SiO_2-HPLC (*n*-hexane / EtOAc, 8:2)で精製し、lanost-8,24-diene-3β-,21-diol (**4**, 12 mg) [60]と betulin (**7**, 10 mg) [58] を単離した。Fr. A6.6 (200 mg) を、SiO_2 カラム(*n*-hexane / EtOAc, 6:1−3:1) で分離し、ergosterol peroxide (**8**, 9 mg) [65]を単離した。

Fr. A8 (800 mg) を、SiO_2 カラム(*n*-hexane/EtOAc, 6:1−1:1) で分画し、frs. A8.1–A8.13 を得た。さらに、A8.6 (204 mg) を、SiO_2-HPLC (*n*-hexane / EtOAc, 8:2) で精製し、trametenolic acid (**5**, 59 mg) [58, 59]を単離した。Fr. 8.10 (800 mg) を、SiO_2 カラム (toluene /EtOAc, 9:1−2:1) で分画し、frs. A8.10.1–A8.10.8 を得た。Fr. 8.10.6 (168 mg) を、ODS-HPLC (CH_3CN:H_2O=7:3) で精製し、lanost-8,23*E*-diene-3β,22*R*,25-triol (**9**, 8 mg) [61]と 3β,21*R*,24*S*-21,24-cyclolanost-8-ene-3,21,25 -triol (**10**, 47 mg) [62, 63]を単離した。

化合物 **1**–**10** のスペクトルデータを文献値と比較し、それぞれの構造を同定した。

Chaga 粗画分の各種代謝酵素に与える影響

Fr. A と fr. B について、第 2 章の酵素活性試験と同様の方法を用い、250 μg/mL で及ぼす影響を評価した。

毛乳頭細胞増殖促進活性試験

ヒト頭髪毛乳頭細胞 (東洋紡績株式会社製、商品名「ヒト頭髪毛乳頭細胞 Human Follicle Dermal Papilla Cells (HFDPC) (Code No.CA60205a)」) を、毛乳頭細胞増殖培地 (Code. TMTPGM-250、東洋紡績株式会社) の基礎培地 250 mL に、ウシ胎児血清(FCS) 2.5 mL、イ

ンスリン・トランスフェリン・トリヨードサイロニン混液 (ITT) 1.25 mL、牛下垂体抽出液 (BPE) 2.5 mL およびサイプロテロンアセテート (Cyp) 1.25 mL を添加した。培地を用いて (5 % CO_2, 37 ℃) 培養した。トリプシン/ EDTA (0.05 %濃度) 処理後、細胞を、10 %ウシ胎児血清(FBS)含有ダルベッコ変法イーグル培地 DMEM (ナカライテスク株式会社) を用いて、1.0×10^4 細胞 / mL に調製し、96 ウエルマイクロプレートの各ウェルに、200μL ずつ播種した。3 日間培養後、培地を吸引除去し、化合物の DMSO 溶液を、無血清 DMEM 培地で希釈した各種濃度 (0.02、0.08、0.31、1.3、5、20 μM) の試料 (320 μM を希釈) またはミノキシジルを、各ウェルに 200 μL ずつ添加し、さらに 4 日間培養した。培地を吸引除去し MTT アッセイを用いて毛乳頭細胞増殖を測定した。即ち、MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド) を、終濃度 0. 4 mg/mL で無血清の DMEM に溶解し、各ウェルに 100 μL ずつ添加した。2 時間培養後、2-プロパノールを 50 μL ずつ各ウェルに加え、波長 570 nm における吸光度を測定して、第 1 の吸光度を得た。同時に、濁度として波長 650 nm における吸光度を測定して、第 2 の吸光度を得た。第 1 の吸光度と第 2 の吸光度の差をもってブルーホルマザン生成量とした。毛乳頭細胞増殖促進率 (%) は、下記式 (1) により算出した。

毛乳頭細胞増殖促進率 (%) ＝A1/B1 × 100　・・・式 (1)

A1：被験試料添加時のブルーホルマザン生成量

B1：被験試料無添加時のブルーホルマザン生成量

第 4 章

テストステロン 5α リダクターゼ阻害活性試験

テストステロンをプロピレングリコールに溶解して、濃度 4.2 mg/mL の溶液を調製した。この溶液 20 μL と、1 mg/mL NADPH 含有 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.13) 825 μL とを、蓋付きＶ底試験管で混合した。化合物は、EtOH、50 % EtOH または精製水に溶解して各種濃度の溶液を調製した。

前述の蓋付きＶ底試験管中の混合液に、被験試料の溶液 80 μL および S-9 ラット肝ホモジネート 75 μL を加えて再び混合した。試験管中の内容物を 37 ℃で 60 分間反応させた後、塩化メチレン 1 mL を加えて反応を停止した。反応混合物を遠心分離 (1600×g、10 分) し、塩化メチレン層を、下記の条件でガスクロマトグラフィー分析を行った。

テストステロンから3α-アンドロスタンジオールおよびジヒドロテストステロンへの変換率は、予め、3α-アンドロスタンジオール、ジヒドロテストステロンおよびテストステロンの標準品のエタノール溶液をガスクロマトグラフィー分析し、これら 3 化合物のピーク面積から求めた。

ラット肝ホモジネート(S-9) による反応後の 3α-アンドロスタンジオール、ジヒドロテストステロンおよびテストステロンそれぞれのピーク面積は、標準品のピーク面積に対する

相対比を下記 (2) にしたがって求めた。その後、式 (3) にしたがって被験試料の変換率を算出した。

相対比＝被験試料のピーク面積／標準品のピーク面積　・・・式 (2)

変換率(%)=(A2+B2)/(A2+B2+C2)×100　・・・式 (3)

A2：3 α-アンドロスタンジオールの相対比

B2：ジヒドロテストステロンの相対比

C2：テストステロンの相対比

算出された変換率に基づき、下記式 (4) にしたがってテストステロン 5α-リダクターゼ活性阻害率を求めた。

テストステロン 5 α リダクターゼ活性阻害率 (%)＝(1-E/D) × 100　･･･式 (4)

D：空試験での変換率

E：被験試料添加での変換率

なお、ガスクロマトグラフィーの条件は、以下のとおりである。

使用機器　：Shimadzu GC-2010

カラム　　：DB-1701 (φ0.53mm×30m、膜厚：1.0 μm)

カラム／注入温度　：240 ℃ / 300

検出器　　：FID

キャリアガス　：窒素ガス

アンドロゲン受容体拮抗作用試験

マウス自然発生乳がん (シオノギ癌、SC-115) よりクローニングされた SC-3 細胞を、2 % DCC-FBS および 0.01 μm テストステロンを含有する MEM 培地 (MEM/2 培地) を用いて培養した後、トリプシン処理により細胞を回収した。回収した細胞を、MEM/2 培地で 1.0×10^5 細胞/mL の濃度に調製した。細胞を 96 ウェルプレートに 100 μL ずつ各ウェルに播種した。

一晩培養後、培地を除去し、0.5 % BSA 含有 Ham F12+MEM (HMB) に溶解した。1 mM ジヒドロテストステロンと被験試料を 100 μL 添加し、48 時間培養した。終濃度 0.4 mg/mL で MEM/2 に溶解した MTT を各ウェルに 100μL ずつ添加し、2 時間培養後、2-プロパノールを各ウェルに 200 μL ずつ加えた。波長 570 nm における吸光度を測定して、第 1 の吸光度を得た。同時に、濁度として波長 650 nm における吸光度を測定して、第 2 の吸光度を得た。第 1 の吸光度と第 2 の吸光度の差をもってブルーホルマザン生成量とした。

ヘアサイクルに関与する細胞増殖因子の遺伝子発現

ヒト正常毛乳頭細胞 (HFDPC：頭頂部由来) を 60 mm ディッシュに播種し、ヒト正常毛乳頭細胞用培地 (PCGM) を用いて培養した。細胞がコンフルエントになった後、培地を 10 % FBS 含有の DMEM 培地へ交換し、さらに 2 時間培養した。各種濃度の化合物を、各ディッシュに 3 mL ずつ添加し、さらに 6 時間培養後、常法により totalRNA を調製した。被験

試料無添加で培養した細胞についても、同様に totalRNA を調製した。それぞれの RNA 量を分光光度計で測定し、200 ng/μL になるように total RNA を調製した。

この totalRNA を鋳型とし、ヘアサイクルに関与する各種増殖因子および内部標準である GAPDH の mRNA の発現量を測定した。検出は、リアルタイム PCR 装置（Smart Cycler Cepheid ）を用いて、TaKaRa SYBR Prime Script TM RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (code No.RR063A) によるリアルタイム 2Step RT-PCR 反応により行った。

各種増殖因子の mRNA 発現量は、GAPDH mRNA の発現量で補正し算出した。各種増殖因子 mRNA の発現率は、下記式 (5) により算出した。

各種増殖因子 mRNA 発現率 (%)＝A3/B3 × 100　・・・式 (5)

A3：被験試料添加時の補正値

B3：被験試料無添加時 (コントロール) の補正値

上記増殖因子としては、線維芽細胞増殖因子-7 (FGF-7)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、インシュリン様増殖因子-1 (IGF-1) および肝細胞増殖因子 (HGF) について調べた。

さらに、線維芽細胞増殖因子-7 (FGF-7) および血管内皮増殖因子 (VEGF) 産生促進作用を有することが従来から知られているアデノシンについて、mRNA 発現率をまとめた。

参考文献

[1] Yoshino T (2005) Estrogen controls the expression of BMP-2 gene through β-type estrogen receptor. Fragrance Journal 33:31-35

[2] Banno N, Tsuda Y (2005) Promotion of hair growth by JIOU with the combination of anti-androgenic effect and improved blood circulation. Fragrance Journal 33:73-78

[3] Relevant Research Inc. (2017) International Society of Hair Restoration Surgery, Practis Census Results

[4] Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, Peters EMJ, Paus R (2006) Neuroimmunology of Stress: Skin Takes Center Stage. J Invest Dermatol 126:1697-1704

[5] Ito N, Sugawara K, Bodó E, Takigawa M, van Beek N, Ito T, Paus R (2010) Corticotropin-releasing hormone stimulates the in situ generation of mast cells from precursors in the human hair follicle mesenchyme. J Invest Dermatol 130:995-1004

[6] Mou C, Jackson B, Schneider P, Overbeek PA, Headon DJ (2006) Generation of the primary hair follicle pattern. Proc Natl Acad Sci USA 103:9075-9080

[7] Itami S (2007) Molecular mechanism of hair follicle cycling and androgenetic alopecia. Fragrance Journal 35:12-16

[8] Stenn KS, Paus R (2001) Controls of hair follicle cycling. Physiological Reviews 81:449-494

[9] Olsen EA, Hordinsky M, Roberts JL, Whiting DA (2002) Female pattern hair loss. J Am Acad Dermatol 47:795

[10] Walsh PC, Madden JD, Harrod MJ, Goldstein JL, MacDonald PC, Wilson JD (1974) Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2 Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. N Engl. J.Med. 291:944-949

[11] Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa M, Tokura Y (2013) CXCL10 produced from hair follicles induces Th1 and Tc1 cell infiltration in the acute phase of alopecia areata followed by sustained Tc1 accumulation in the chronic phase. J Dermatol Sci 69:140-147

[12] Midorikawa T, Chikazawa T, Yoshino T, Takada K, Arase S (2004) Different gene expression profile observed in dermal papilla cells related to androgenic alopecia by DNA macroarray analysis. J Dermatol Sci 36:25-32

[13] Okajima K (2009) Hair-growing effect of a saliva component sialic acid: the molecular mechanism and possible therapeutic application for alopecia. Fragrance Journal 37: 43-47

[14] McElwee KJ, Huth A, Kissling S, Hoffmann R (2004), Macrophage-stimulating protein promotes hair growth ex vivo and induces anagen from telogen stage hair follicles in vivo. J Invest Dermatol 123:34-40

[15] Paus R (2000) Stress, hair growth control and the neuro-endocrine immune connection. Allergo

J 9:611-620

[16] Botchkarev VA (2003) Stress and the hair follicle: Exploring the connections. Am J Pathol 162:709-712

[17] Meidan VM, Touitou E (2001) Treatments for androgenetic alopecia and alopecia areata. Drugs 61:53-69

[18] Semwal BG, Agrawal KK, Singh K, Tandon S, Sharma S (2011) Alopecia switch to herbal medicine. J Pharm Res Opinion 1 4:101-104

[19] Blumeyer A, Tosti A, Messenger A, Reygagne P, del Marmol V, Spuls PI, Trakatelli M, Finner A, Kiesewetter F, Trüeb R, Rzany B, Blume-Peytavi U (2011) Evidence based (S3) guideline for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. J Dtsch Dermatol Ges 9:S1-S57

[20] Sawaya ME, Keane RW, Blume-Peytavi U, Mullins DL, Nusbaum BP, Whiting D, Nicholson DW (2001) Androgen responsive genes as they affect hair growth. Euro J Dermatol 11:304-308

[21] Li M, Marubayashi A, Nakaya Y, Fukui K, Arase S (2001) Minoxidil-induced hair growth is mediated by adenosine in cultured dermal papilla cells: possible involvement of sulfonylurea receptor 2B as a target of minoxidil. J Invest Dermatol 117:1594-1600

[22] Tajima M (2005) Recent trends of the research and the developments regarding hair promoter. Fragrance Journal 33:17-24

[23] Sasajima M, Moriwaki S, Hotta M, Kitahara T, Takema Y (2008) trans-3,4'-Dimethyl-3-hydroxyflavanone, a hair growth enhancing active component, decreases active transforming growth factor beta2 (TGF-beta2) through control of urokinase-type plasminogen activator (uPA) on the surface of keratinocytes. Biol Pharm Bull 31:449-53

[24] Soma T, Tsuji Y, Hibino T (2002) Involvement of Transforming Growth Factor-β2 in Catagen Induction During the Human Hair Cycle. J Invest Dermatol 118:993-997

[25] Zhang Y, Han L, Chen SS, Guan J, Qu FZ, Zhao YQ (2016) Hair growth promoting activity of cedrol isolated from the leaves of *Platycladus orientalis*. Biomed Pharmacother 83:641-647

[26] Kawano M, Han J, Kchouk ME, Isoda H (2009) Hair growth regulation by the extract of aromatic plant *Erica multiflora*. J Nat Med 63:335-339

[27] Takahashi T, Kamiya T, Yokoo Y (1998) Proanthocyanidins from grape seeds promote proliferation of mouse hair follicle cells *in vitro* and convert hair cycle *in vivo*. Acta Derm Venereol (Stockh) 78:428-432

[28] Nagaoka K (2014) Traditional Medicine in the Contemporary Life of Mongolia. Asian and African Area Studies 13:305-309

[29] Lu S, Tanaka N, Kawazoe K, Murakami K, Damdinjav D, Dorjbal E, Kashiwada Y (2016) Tetrahydroxanthones from Mongolian medicinal plant *Gentianella amarella* ssp. *acuta*. J Nat Med 70:780-788

[30] Tanaka N, Takekata M, Kurimoto S, Kawazoe K, Murakami K, Damdinjav D, Dorjbal E,

Kashiwada Y (2015) Algiolide A, secoiridoid glucoside from Mongolian medicinal plant *Gentiana algida*. Tetrahedron Lett 56:817-819

[31] Baek J, Roh HS, Baek KH, Lee S, Lee S, Song SS, Kim KH (2018) Bioactivity-based analysis and chemical characterization of cytotoxic constituents from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) that induce apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. J Ethnopharmacol 224:63-75

[32] Tsai CC, Li YS, Lin PP (2017) *Inonotus obliquus* extract induces apoptosis in the human colorectal carcinoma's HCT-116 cell line. Biomed & Pharmacothera 96:1119-1126

[33] Lee JS, Lee KR, Lee S, Lee HJ, Yang HS, Yeo J, Park JM, Choi BH, Hong EK (2017) Polysaccharides isolated from liquid culture broth of *Inonotus obliquus* inhibit the invasion of human non-small cell lung carcinoma cells. Biotechnol Bioprocess Engineering 22:45-51

[34] Akita A, Y, Yasukawa K (2015) Inhibitory effects of Chaga (*Inonotus obliquus*) on tumor promotion in two-stage mouse skin carcinogenesis. J Pharm Nut Science 5:71-76

[35] Kim YO, Park HW, Kim JH, Lee JY, Moon SH, Shin CS (2006) Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. Life Sci 9:72-80

[36] Lee KR, Lee JS, Kim YR, Song IG, Hong EK (2014) Polysaccharide from Inonotus obliquus inhibits migration and invasion in B16-F10 cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 via downregulation of NF-κB signaling pathway. Oncol Rep 31:2447-2453

[37] Ma L, Chen H, Zhu W, Wang Z (2013) Effect of different drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides extracted from mushroom *Inonotus obliquus*. Food Res Int 50:633-640

[38] Zheng W, Zhang M, Zhao Y, Wang Y, Miao K, Wei Z (2009) Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus.* Bioresource Technol 100:1327-1335

[39] Ma L, Chen H, Dong P, Lu X (2013) Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus.* Food Chem 139:503-508

[40] Ichimura T, Watanabe O, Maruyama S (1998) Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, Fuscoporia obliqua. Biosci Biotech Bioch 62:575-577

[41] Shapolova EG, Lomovskii OI, Kazachinskaya EI, Loktev VB, Teplyakova TV (2016) Antiviral activity of SIO_2–polyphenol composites prepared mechanochemically from plant raw materials. Pharm Chem J 50:595-599

[42] Ichinohe T, Ainai A, Nakamura T, Akiyama Y, Maeyama J, Odagiri T, Tashiro M, Takahashi H, Sawa H, Tamura S, Chiba J, Kurata T, Sata T, Hasegawa H (2010) Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom

mycelia. J Med Virol 82:128-137

[43] Geng Y, Lu ZM, Huang W, Xu HY, Shi JS, Xu ZH (2013) Bioassay-guided isolation of DPP-4 inhibitory fractions from extracts of submerged cultured of *Inonotus obliquus.* Molecules 18:1150-1161

[44] Wang J, Wang C, Li S, Li W, Yuan G, Pan Y, Chen H (2017) Anti-diabetic effects of *Inonotus obliquus* polysaccharides in streptozotocin-induced type 2 diabetic mice and potential mechanism via PI3K-Akt signal pathway. Biomed Pharmacother 95:1669-1677

[45] Zhong XH, Ren K, Lu SJ, Yang SY, Sun DZ (2009) Progress of research on *Inonotus obliquus*. J Integr Med, 15:156-160

[46] Ríos JL, Andújar I, Recio MC, Giner RM (2012) Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds. J Nat Prod 75:2016-2044

[47] Lee IK, Kim YS, Jang YW, Jung JY, Yun BS (2007), New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. Bioorganic &Medicinal Chemidtry Letters 17:6678-6681

[48] Zhao F, Mai Q, Ma J, Xu M, Wang X, Cui T, Qiu F, Han G (2015). Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities. Fitoterapia 101:34-40

[49] Nakajim Y, Sato Y, Konishi T (2007) Antioxidant small phenolic ingredients in *Inonotus obliquus* (persoon) Pilat (Chaga). Chem Pharma Bull 55:1222-1226

[50] Ying YM, Zhang LY, Zhang X, Bai HB, Liang DE, Ma LF, Shan WG, Zhan ZJ (2014) Terpenoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus*. Phytochemstry, 108:171-176

[51] Zhang LY, Bai HB, Shan WG, Zhan ZJ (2014) A new alkaloid from the mycelium of *Inonotus obliquus.* J Chem Res 38:245-246

[52] Hattori M, Ogawa H (1983) Biochemical analysis of hair growth from the aspects of aging and enzyme activities. J Dermatol 10:45-54

[53] Jiang J, Tsuboi R, Kojima Y, Ogawa H (2005) Topical application of ketoconazole stimulates hair growth in C3H/HeN mice. J Dermatol 32:43-47

[54] Mossmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65:55-63

[55] Rho SS, Park SJ, Hwang SL, Lee MH, Kim CD, Lee IH, Chang SY, Rang MJ (2005) The hair growth promoting effect of Asiasari radix extract and its molecular regulation. J Dermatol Sci 38:89-97

[56] Woo H, Lee S, Kim S, Park D, Jung E (2017) Effect of sinapic acid on hair growth promoting in human hair follicle dermal papilla cells via Akt activation. Arch Dermatol Res 30:381-388

[57] Yan ZF, Yang Y, Tian FH, Mao XX, Li Y, Li CT (2014) Inhibitory and acceleratory effects of *Inonotus obliquus* on tyrosinase activity and melanin formation in B16 melanoma cells. Evid-

Based Compl Alt Med, 2014:259836

[58] Kahlos K, Hiltunen R, v Schantz M (1984) 3β-Hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al, a new triterpene from *Inonotus obliquus.* Planta Med 50:197-198

[59] Kahlos K, Hiltunen R (1986) Two new oxygenated lanostane type triterpenes from *Inonotus obliquus*. Acta Pharm Fenn 95:71-76

[60] Taji S, Yamada T, Wada S, Tokuda H, Sakuma K, Tanaka R (2008) Lanostane-type triterpenoids from the sclerotia of *Inonotus obliquus* possessing anti-tumor promoting activity. Euro J Med Chem 43:2373-2379

[61] Zhao F, Mai Q, Ma J, Xu M, Wang X, Cui T, Qiu F, Han G (2015) Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities. Fitoterapia 101:34-40

[62] Taji S, Yamada T, Tanaka R (2008) Three New Lanostane Triterpenoids, Inonotsutriols A, B, and C, from *Inonotus obliquus.* Helvetica Chimica Acta 91:1513-1524

[63] Garg VK, Nes WR (1984) Codisterol and other Δ^5-sterols in the seeds of Cucurbita maxima. Phytochemistry 23:2925-2929

[64] Yusoo S, Tamai Y, Terazawa M (2001) Chemical constituents of *Inonotus obliquus* IV.: Triterpene and Steroids from cultured mycelia. Eurasian J For Res 2:27-30

[65] Yamamura T, Masaki H, Sakon K, Tezuka T (1991) Inhibition of 5α-reductase by plant extracts. J Soc Cosmet Chem Jpn 25:117-121

[66] Kumar N, Rungseevijitprapa W, Narkkhong NA, Suttajit M, Chaiyasut C (2012) 5α-reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment. J Ethnopharmacol 139:765-771

[67] N. Nakamura, K. Matsumoto, F. Sato (1989) Androgen in duced autocrine growth factor secreted from Shionogi carcinoma 115 in serum-free culture. Hormones and clinical 37:101-110

[68] Iino M, Ehama R, Nakazawa Y, Iwabuchi T, Ogo M, Tajima M, Arase S (2007) Adenosine stimulates fibroblast growth factor-7 gene expression via adenosine A2b receptor signaling in dermal papilla cells. J Invest Dermatol 127:1318-1323

[69] Vesely D, Astl J, Lastuvka P, Matucha P, Sterzl I, Betka J (2004) Serum Levels of IGF-I, HGF, TGFβ1, bFGF and VEGF in Thyroid Gland Tumors. Physiol Res 53:83-89

[70] Azzouni F, Godoy A, Li Y, Mohler J (2012) The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases. Adv Urol 2012:530121