

ISSN 2188-563X

COSMETOLOGY

2024_032

Annual Report of Cosmetology

——
コスメトロジー研究報告

素材・物性に関する分野
生体作用・安全性に関する分野
精神・文化に関する分野

ごあいさつ

本財団は、1990年に株式会社コーセーの創業者小林孝三郎により設立され、コスメトロジー（化粧品科学）の確立と発展をめざして研究助成活動を展開してまいりました。今日まで本財団がこの活動を滞りなく継続できましたことは、多くの関係者の皆さまのご理解とご協力によるものと心より感謝申し上げます。

コスメトロジーは、医学、生命科学、物理学、化学、心理学、社会学など幅広い学問領域が基盤となって、これら様々な専門分野の研究者が一堂に集って化粧品分野の研究テーマに取り組むことで体系づけられてきたといえます。

本財団の使命はそのセンターとしての役割を果たすことであり、これまで助成した研究テーマも、化粧品の新素材や物性評価など工学的なテーマから、皮膚の健康や美容のための皮膚科学、化粧品の安全性、さらには化粧心理や化粧文化など多岐にわたります。

32冊目となる今年の研究報告書は、2021年度から2022年度に助成を受けられた研究者38名の研究報告を収載しています。また、昨年年第34回表彰・贈呈式でコーセーコスメトロジー奨励賞を受賞された山田勇磨北海道大学大学院薬学研究院教授の受賞講演録を掲載しています。

皆さまには、この研究報告書 COSMETOLOGY 誌をご高覧いただきまして、コスメトロジーの更なる発展に向けてご活用いただければ幸いです。

引き続き、本財団はコスメトロジー分野の独創的で発展性ある研究テーマを積極的に支援してまいります。

今後とも皆さまの温かいご理解とご協力をお願い申し上げます。

2024年9月

公益財団法人 コーセーコスメトロジー研究財団

理事長 小林 一俊

目 次

■ごあいさつ

■コーセーコスメトロジー奨励賞受賞記念講演

- ・ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の開発…………… 3
北海道大学大学院薬学研究院 山田 勇磨

■コスメトロジー研究助成報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・NMR 及び Cryo-TEM 併用によるエマルション中の化粧品原料の分散・溶解状態の定量的評価基盤の確立…………… 10
千葉大学大学院薬学研究院 植田 圭祐
- ・フォトニックウォーターコスメティクス：ほとんど水からなる色材化粧品…………… 17
東京農工大学 内田 紀之
- ・進化分子工学によるデザイナー炭化水素生合成経路の開発…………… 20
早稲田大学先進理工学部応用化学科 梅野 太輔
- ・ガス透過性金型による高溶解型無痛ナノマイクロニードルの開発…………… 26
富山県立大学大学院工学研究科 竹井 敏、山岸 里緒、三浦 早耶香
- ・ペプチドマトリックスを用いた化粧品香料の超高感度センシング…………… 33
東京工業大学 田中 祐圭
- ・ヒアルロン酸・コラーゲンのナノ粒子化による新規皮膚浸透促進技術の開発とそのメカニズムの解明 …… 37
佐賀大学 徳留 嘉寛
- ・肌温度感受性を有する細胞増殖因子送達ナノ粒子の開発…………… 41
広島大学大学院医系科学研究科 長瀬 健一
- ・微少血管系の多機能イメージングによる皮膚特性・機能の評価…………… 45
山陽小野田市立山口東京理科大学工学部機械工学科 中道 友
- ・多量体タンパク質のサブユニット間相互作用を利用した新規機能性ハイドロゲルの構築と薬剤徐放システムへの活用…………… 52
奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科物質創成科学領域 真島 剛史
- ・化粧品基材に利用可能なペプチド界面活性剤のバクテリア合成系構築…………… 58
名古屋工業大学大学院工学研究科 水野 稔久
- ・新規枝作り酵素による高保湿剤としての多分岐グルカンの合成と構造・物性解析…………… 66
東京工業大学生命理工学院 八波 利恵
- ・ペプチドの革新的合成…………… 72
中部大学 山本 尚

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・表皮電位を指標とした皮膚バリア光治療法の時空間的評価…………… 76
東京都立大学システムデザイン学部機械システム工学科 阿部 結奈
- ・皮膚細胞ゲノムのメチル化測定による加齢マーカーの開発…………… 82
東海大学医学部 今西 規

・ タイトジャンクションが角層形成に及ぼす影響の解明	86
岐阜大学大学院医学系研究科皮膚科学 岩田 浩明	
・ ペプチドビーズを用いた反応速度論による迅速・詳細なアレルギー感作試験法の開発	90
甲南大学フロンティアサイエンス学部 臼井 健二	
・ かゆみを引き起こす pathogenic code の同定と治療基盤の開発	93
かずさ DNA 研究所オミックス医科学研究室 遠藤 裕介	
・ ヒト特有の表皮セラミド合成経路および生理機能の解明	97
北海道大学大学院薬学研究院 大野 祐介	
・ 上皮での炎症性サイトカイン産生を担う新規分子群の役割とそれを制御する化合物の探索	101
熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座 押海 裕之	
・ 紫外線による細胞老化と光老化を繋ぐ分子基盤の解明	105
公益財団法人東京都医学総合研究所基礎医科学研究分野 笹沼 博之	
・ 加齢による皮下脂肪萎縮の分子基盤の解明	109
国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学環境医学研究所 菅波 孝祥	
・ 新規アレルギー反応制御分子 Ly6G による皮膚ホメオスタシス維持機構の解明	114
金沢大学医薬保健研究域薬学系 鈴木 亮	
・ T 細胞のステムネスを標的とした、乾癬治療法の研究	119
慶應義塾大学医学部 竹馬 俊介	
・ 触覚を痒覚に変換するアロネーシス・パスウェイの分子神経基盤の解明と治療法の開発	125
順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所・順天堂かゆみ研究センター 冨永 光俊	
・ 経皮曝露されたナノ粒子の存在様式変化の理解と毒性発現を適切に解析・予測するための試験法の提案	127
和歌山県立医科大学薬学部 長野 一也	
・ 全光学的手法を用いた老化皮膚における力学特性変化の解析	131
徳島大学ポスト LED フォトニクス研究所 長谷 栄治	
・ 優れた安全性・安定性を有する経皮吸収型イオン液体の創製とコスメトロジー素材への応用	136
和歌山県立医科大学薬学部薬剤学研究室 福田 達也	
・ 角質層バリア形成および金属アレルギー発症におけるスプラバシンの機能解明	141
浜松医科大学皮膚科学講座 本田 哲也	
・ 皮膚角化細胞の老化を防ぐ脂質分子種の網羅的探索とその分子機構	145
慶應義塾大学薬学部 前川 大志	
・ 転写因子 Nrf3 を標的としたシミ予防研究への HIV-1 プロテアーゼ阻害剤リポジショニング	149
同志社大学生命医科学部医生命システム学科遺伝情報研究室 和久 剛	

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

・ 生活行動および心の健康が皮膚の性状・バリアに与える影響の解析研究	156
理化学研究所生命医科学研究センター免疫器官形成研究チーム 川崎 洋	
・ 化学療法中の乳がん患者へのメイクアップ指導による QOL 向上の検討	160
九州大学大学院 消化器・総合外科 茂地 智子	
・ 顔面の皮膚血流に及ぼす加齢と運動習慣の影響	162
早稲田大学スポーツ科学学術院 林 直亨	

・ コスメティック産業集積地発展における社会構造、多様なアクターの協働、支援制度に関する分析	168
同志社大学 藤本 昌代	
・ 三次元顔認証スマホアプリによる表情筋トレーニング/ストレッチの客観的指標の導入と 末梢性顔面神経麻痺後遺症予防リハビリへの応用	174
産業医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 堀 龍介	
・ 毛根細胞を用いた統合失調症発症予測因子の探索	181
東北大学大学院医学系研究科 前川 素子	
・ サブプレートニューロンから紐解く美意識の起源	184
公益財団法人東京都医学総合研究所 丸山 千秋	
・ 顔形態の社会的シグナルとしての役割	188
奈良女子大学大学院生活環境科学系 横山 ちひろ	
IV. コスメトロジー研究助成を受けて	196
■学術集会支援助成、国際交流助成	219
■付 録	
事業報告書	229
2023年度 研究助成を受けられた方々	231
役員一覧	234

**コーセーコスメトロジー奨励賞
受賞記念講演**

ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の開発

北海道大学大学院薬学研究院 教授

山田 勇磨

やまだ・ゆうま

- 北海道大学薬学部総合薬学科卒業(2003年)、同大学院薬学研究科修士・博士課程を経て博士(薬学)取得(2008年)。2016年より北海道大学大学院薬学研究院准教授、2023年より現職。
- ドラッグデリバリーシステム(DDS)を中心とする研究・教育に従事。ルカ・サイエンス株式会社(ベンチャー企業)科学顧問(兼業)、創発的研究支援事業(JST)創発研究者(兼任)。
- 北海道科学技術奨励賞(2017年)、日本酸化ストレス学会学術奨励賞(2018年)、日本核酸医薬学会奨励賞(2018年)、米国薬剤師会エバート賞(2022年)ほか受賞。



本日は栄えあるコーセーコスメトロジー奨励賞を授与していただき、選考委員の先生方、財団の関係者の皆様にご心より御礼申し上げます。本日は受賞対象に選出いただいたミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の開発についてお話をさせていただきたいと思っております。

ミトコンドリアは細胞の中で様々な機能を有するオルガネラとして注目されており、革新的疾患治療の実現やライフサイエンスの発展に加えて美容・健康の維持についても注目を集めているオルガネラです。

ここに示すような様々な事業を実現するためにはミトコンドリアを標的としたドラッグデリバリーシステムDDSが必要不可欠となります。ミトコンドリアは2層の膜構造を有しており、送達する分子の物性やサイズを制限するため、高次構造を有する分子、疎水性を有するような分子の送達は難しい状況にありました。

私たちはミトコンドリア標的型のナノカプセルとしてリポソームの研究を進め、こちらに示す「MITO-Porter」というコンセプトを立案しました。MITO-Porterは送達したい薬物をナノサイズのカプセルに内封し細胞に導入、ミトコンドリアにアクセスした後に膜融合を介して薬物をミトコンドリア内に送達するため、送達する薬物の物性やサイズを制限しないDDSが可能になるというふうに考えました。

細胞内で動いているミトコンドリアは活発に融合と分裂を繰り返しておりますので、膜融合を介する戦略がうまくワークすると思われました。

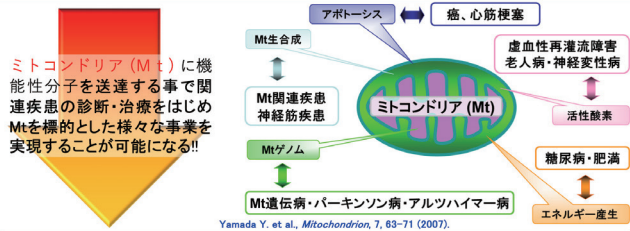
100種以上の組成の中からミトコンドリアと融合しやすい組成、MITO-

Porterを見出すことに成功し、細胞を用いた検証実験などを進めてまいりました。こちらがその一例ですが、緑色の蛍光標識をほどこしたMITO-Porterを細胞に振りかけますと、細胞内で多くの緑の輝点が観察され、さらに赤色に染色したミトコンドリアと重なり合った黄色の輝点も観察されたことから、MITO-Porterが細胞のミトコンドリアに集積できることを確認しております。

これまでにタンパク質、核酸、難水溶性分子など、多種

ミトコンドリアを標的とする意義

- ミトコンドリア(Mt)は様々な分野で魅力的なオルガネラ!!
1. 革新的な疾患治療の実現: 様々な疾患と関連!! ⇒ 虚血性疾患・神経筋疾患・癌治療
 2. 美容・健康の維持: 老化・肥満に影響!! ⇒ アンチエイジング・メタボリックシンドローム
 3. ライフサイエンスの発展: 生命維持に必要不可欠!! ⇒ 独自のDNA・エネルギー産生・アポトーシス・発生



ミトコンドリアを標的としたDrug Delivery System (DDS) は、医療・ライフサイエンス分野の発展に大きく貢献する!!

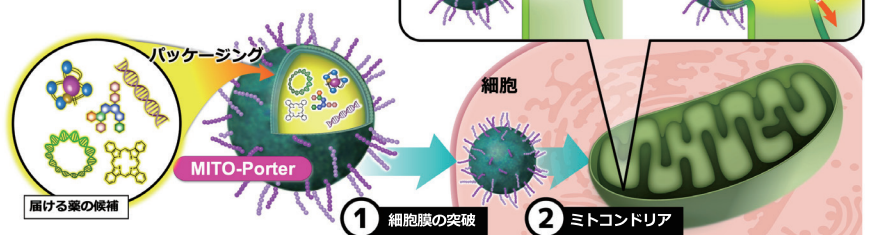
Laboratory for Molecular Design of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Japan



膜融合でミトコンドリアに薬を届けるMITO-Porter

従来技術: 送達分子の物性やサイズを制限するため、高次構造分子の送達は不可能だった。

MITO-Porterは膜融合を介してミトコンドリア内へ送達分子を導入するため、送達分子の物性やサイズを制限しないDDSになり得る!!



Yamada Y. et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1778: 423-432 (2008). Yamada Y. et al., *Adv Drug Deliv Rev* 154-155:187-209 (2020). 特許取得 第5067733号

Laboratory for Molecular Design of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Japan

多様な分子のミトコンドリア送達を報告し、がん治療、遺伝子治療などのナノ医薬品の研究開発というものを中心に研究を進めてまいりました。このような中で2018年度のコスメトロジー研究助成に応募させていただき、幸運なことに採択していただき、私たちにとっては初めてとなるMITO-Porterを活用した美容研究に挑戦する機会を与えていただきました。この応募申請の中では、皮膚細胞のミトコンドリアに作用してATP産生能や代謝能を亢進させること、またミトコンドリアで産生される余剰の活性酸素を除去する抗酸化能を獲得するナノカプセル、カプセル型の機能性化粧品の開発を最終の目標に据えました。

送達するためのナノカプセルとしては先ほど申し上げたMITO-Porterを用いて、送達する分子としましてはATP産生の補酵素であり、抗酸化能を有するコエンザイムQ₁₀を用い、コエンザイムQ₁₀ MITO-Porterの構築、培養細胞を用いた細胞内動態の観察、ミトコンドリア細胞機能の機能評価の順に研究を進めました。この申請に先立ちまして、2015年にコエンザイムQ₁₀を内封したMITO-Porterの開発を進めておりました。こちらは肝臓虚血障害モデルのマウスにコエンザイムQ₁₀を肝臓のミトコンドリアに送達し、虚血再灌流障害時の活性酸素を抗酸化能で除去するという戦略です。こちらに肝臓障害マーカーALT値を示しています。通常、障害をかけただけのものと、非常に高いALT値が観察されますが、コエンザイムQ₁₀ MITO-Porterを用いますと減少することを見いだしています。このようなことがありましたので、リポソーム、ナノカプセルを使ってコエンザイムQ₁₀を用いることで、化粧品にも応用できないかと考えて検討を進めてまいりました。

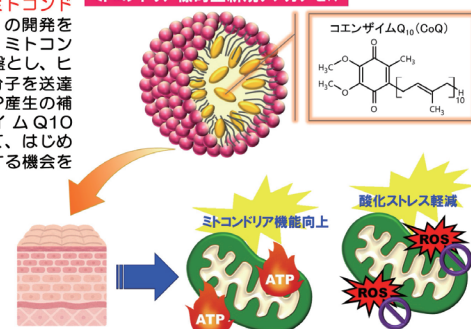
リポソームはもともと医薬品として市販されているものも多く、ドキソルビシン封入リポソームなどが有名です。その中でも化粧品分野ではコーセー様が日本で初めてのリポソーム型化粧品コスメデコルテを開発されていたので、リポソームとコエンザイムQ₁₀、ミトコンドリアというのは非常に化粧品にとっても親和性が高いんじゃないかというふうに考え

ました。大谷翔平さんがCMで「リポソーム」といっているのを聞いて感動しました。それでもうできているから、もう応募した申請研究でやることはないんじゃないかと思われるかもしれませんが、研究室でリポソームを作るときは1mLとか10mLのスケールで、頑張っても100mLなんですけれども、実用化したいと思ったら、L、tLの単位でつくらなければならない。なので、これまでは医薬品開発のシーズができたとしても、つくり方から大量にスケール

コスメトロジー研究助成への応募 (2018年度)

本研究では、皮膚細胞のミトコンドリアに作用してATP産生能・代謝能を亢進、ミトコンドリアで産生される余剰活性酸素を除去し抗酸化能の獲得を可能とする『ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品』の開発を目指す。ミトコンドリアの分子送達に関しては、ミトコンドリア標的型ナノカプセル・MITO-Porterを基盤とし、ヒト由来皮膚細胞のミトコンドリア内部に機能性分子を送達する戦略を試みる。送達分子候補としては、ATP産生の補酵素であり抗酸化能を有するコエンザイムQ₁₀ (CoQ₁₀)などを用いる。この度の助成によって、はじめて『MITO-Porterを活用した美容研究』に挑戦する機会を与えて頂いた。

ミトコンドリア標的型新規ナノカプセル



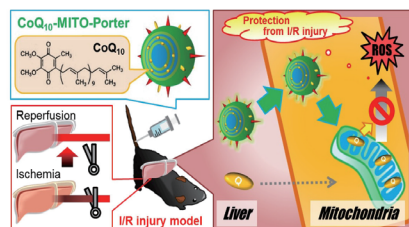
研究内容

1. CoQ₁₀-MITO-Porterの構築
2. 培養細胞を用いた細胞内動態観察
3. ミトコンドリア・細胞の機能評価

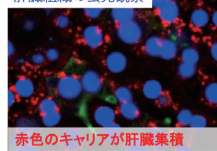
Laboratory for Molecular Design of Pharmaceuticals, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Japan

研究の出発点 (2015) ミトコンドリアを標的とした病態モデル動物における治療効果の検証

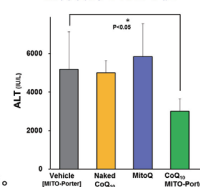
抗酸化分子CoQ₁₀を搭載したMITO-Porterを構築し、キャリア投与後に肝臓虚血再灌流障害 (Mt由来の活性酸素が過剰発生)を誘発し、血中の肝臓障害マーカーALT値を測定した。



肝臓組織の蛍光観察



肝障害時のALT値



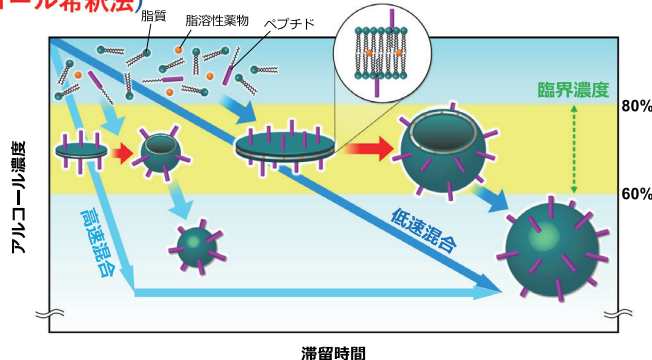
CoQ₁₀-MITO-Porterの前投与によって、肝臓虚血再灌流障害時の血清ALT値を有意に減少させる事に成功した。

→動物実験 (in vivo) においてもMITO-Porterを用いたMt治療戦略の有用性を示せた。

Laboratory for Molecular Design of Pharmaceuticals, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Japan

マクロ流体デバイスによる粒子調製の基本原理

(アルコール希釈法)

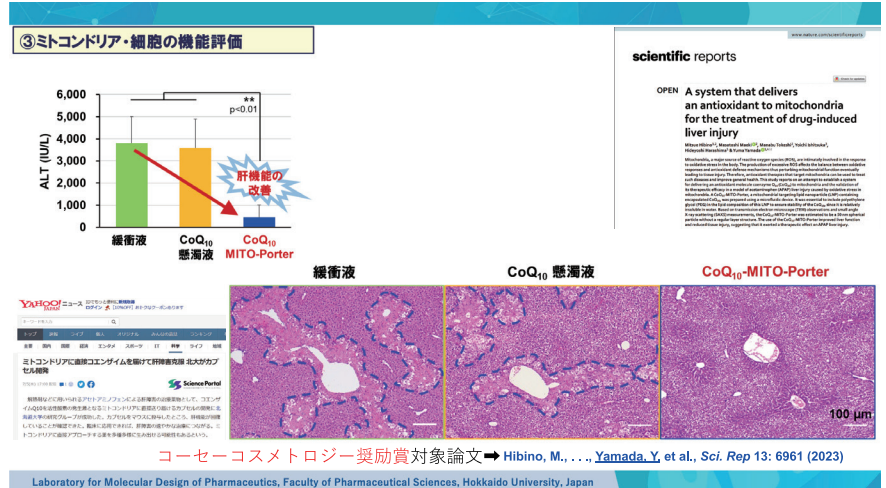


Laboratory for Molecular Design of Pharmaceuticals, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Japan

アップしなければならないという実用化への壁がありました。このような壁を超える方法としてマイクロ流体デバイスを使って大量調製しようと考えて申請をさせていただきました。それが2018年なんですけど、そのころはマイクロ流体デバイスといわれても何を言っているんだろと思われる方が多かったと思うんですけど、2020年に開発されたmRNAワクチン、mRNA含有LNPはこのマイクロ流体デバイスの原理を活用しています。なので、今、結構認知度は上がってはきているんですけど、この手法を使って難水溶性分子を封入しようということにトライしました。

その基本的な原理としてはアルコール希釈法という古典的な方法を使っています。脂質はアルコールのような有機溶媒中では単分子で存在できますけれど、これを希釈していくと単分子ではいられなくなって、疎水部分の足を向けて頭を外に向けてこのようなディスクの構造をつくります。どんどん希釈していくと、この状態でもエネルギー的に不安定な粒子になります。ゆっくり希釈すると大きな粒子、速く希釈すると小さな粒子ができるのですが、人間がやると希釈のスピードがガタガタになってしまうので小さい粒子と大きい粒子が混ざって不均一になってしまうという問題があります。また、人間が希釈するには限界があるので、小さくするにも限界があります。ここでマイクロ流体デバイスという手法を使って、迅速に攪拌して希釈しようと考えた人たちがいて、私たちは北海道大学工学部の渡慶次(とけし)教授、真栄城(まえき)准教授がオリジナルで設計されたマイクロ流体デバイス・iLNPを使って粒子調製を試みました。こちらの流路は、脂質溶液と緩衝液を流し、この邪魔板構造を通過する際に高速に攪拌させるという原理になっています。従来法のエタノール希釈法と比べるとマイクロ流体デバイスを用いて調製した方が、粒子径が非常にシャープになります。あと流路を1個ではなく集積化することができて連続に運転することができますので、チップ1個でラボでつくっているものを実用化したいと思えば、集積化して連続で流せばいいということになるので、ラボレベルと実用化レベルと一直線につながることになります。核酸では先行して10年ほど前からトライされていたのですが、実は、難水溶性分子、コエンザイムQ₁₀のようなものでは報告はありませんでした。

まずここから着手しているんですけど、割愛して結果だけを申し上げますと、(今までは)頑張っつつくっても100nm程度の粒子だったんですけど、マイクロ流体デバイスを使うことで50nmクラスまでダウンサイジングすることを成功し



ております。さらに恩恵としましては粒子が小さくなりましたので、従来法と比べてマイクロ流体デバイスで調製した粒子が細胞の中で動きやすくなったので、ミトコンドリアにも多く集積できるようになりました。さらに肝虚血再灌流障害のモデルでやった実験をもう一度、今度は薬剤障害性の実験でやりましたが、粒子を小さくすることで肝臓の血管のすき間から粒子を漏れやすくする工夫ができましたので効果も抜群に上がり、ALT値が先ほどは30%ほど抑えていたんですけども、新型のMITO-Porterを使うとALT値を90%値に下げることが成功し、肝臓の組織障害がなくなることを確認しました。これを今年のScientific Reportsに紹介させていただいて、コーセーコスメトロジー奨励賞の対象論文に選んでいただきました。プレスリリースなどもさせていただいて、yahooニュースなどでも紹介させていただいています。

ちょうど時間になりましたが、最後にコスメトロジー研究助成の採択者の皆様方にメッセージを、ということでしたので、僭越ながら一言述べさせていただきたいと思えます。2018年には、(いま)私がこのすばらしい賞を受賞しているとは夢にも思っておりませんでした。制度すら知らなかったというところでもあります。ただ、そのときに採択していただいた研究を、機能性ナノカプセルという形で化粧品開発につなげたいなというふうに強く思いました。それまではなかなか美容研究をする機会を与えていただけなかったんで、しっかりその研究を全うしたいなと思ったからです。5年たちまして私はここにあります。コロナ禍で大変なときもありましたが、学生の皆さんの努力もあって、非常にいい研究ができました。この機会を素敵な出会いと思って「きれい」に貢献できる研究を継続したいと思えますし、可能性は無限大だと思っています。受賞された皆さんの「きれい」への健闘を祈念させていただいて、私の話とさせていただきたいと思えます。本日はありがとうございました。

コスメトロジー研究助成報告

- I. 素材、物性に関する分野
- II. 生体作用、安全性に関する分野
- III. 精神、文化に関する分野
- IV. コスメトロジー研究助成を受けて

I . 素材、物性に関する分野

NMR 及び Cryo-TEM 併用によるエマルション中の化粧品原料の分散・溶解状態の定量的評価基盤の確立

千葉大学大学院薬学研究院

植田 圭祐

This study aimed to investigate the effect of different types of oil used in emulsions on the supersaturated dissolution behavior and liquid-liquid phase separation (LLPS) of active ingredients. Labrafil® M 1944 CS (M1944, hydrophilic-lipophilic balance (HLB): 9.0) and Labrafac™ PG (PG, HLB: 1.0) were used as oils with different hydrophobicity. Fenofibrate (FFB) was used as a model active ingredient that is poorly water-soluble. Cryo-TEM observations showed emulsion droplets less than 20 nm in diameter and FFB-rich droplets ranging from several tens nm to over 100 nm in diameter in each emulsion. ¹H NMR analysis indicated that M1944 had minimal impact on the molecular environment of the FFB-rich phase. In contrast, the distribution of PG into the FFB-rich phase in the PG emulsion changed the molecular environment of the FFB-rich phase. This change reduced the chemical potential of the FFB-rich phase and, consequently, the FFB concentration dissolved in the bulk water. The present study clarified that LLPS of FFB occurs even in emulsions, forming the FFB-rich phase. The LLPS behavior of FFB varied depending on the type of oil used in the emulsion. Highly hydrophobic PG was liable to partition into the hydrophobic active ingredient-rich phase and reduce the concentration of the active ingredient dissolved in the bulk water. To improve the absorption of active ingredients in supersaturation-forming emulsion formulations, it is important to consider the effect of emulsion components on the LLPS of the active ingredient.

1. 緒言

エマルションは化粧品や医薬品有効成分の吸収性や使用感の向上等を目的として、様々な用途に用いられている。近年では脂質製剤の一種である自己乳化型マイクロエマルション製剤 (SMEDDS 製剤: Self-microemulsifying drug delivery system) が広く研究されている。SMEDDS 製剤は oil、surfactant、co-surfactant で構成される脂質製剤であり、水との接触により自己乳化し、マイクロエマルション (Microemulsion, ME) を形成する¹⁻²⁾。ME は一般的なエマルションのように水や oil 等の 2 種類の液体を含む一方、oil が直径 100 nm 以下の膨潤ミセルとして水溶液に分散した熱力学的に安定な分散系である。ナノサイズ化による液滴の表面積の増大により、有効成分が効率的に水中に放出される。このような利点から難溶性成分の吸収性改善において SMEDDS 製剤の有用性が示されている。また、近年では過飽和形成型の SMEDDS 製剤が有効成分の更なる吸収改善を目的として研究されている³⁾。過飽和形成型の SMEDDS 製剤ではバルクの水中に溶解した有効成分濃度が結晶溶解度以上に到達しており、受動拡散による吸収を効果的に改善する。

エマルションからの有効成分の吸収は、一般的にエマル

ション構成成分と適応部位の相性や、エマルション構成成分と有効成分の相溶性等によって変化する。しかし、有効成分の吸収性を最大化するためのエマルション設計指針は未だ確立されておらず、製品開発は依然トライ&エラーの状況である。これはエマルション中における、有効成分の分子状態について十分な評価基盤が確立されていないためである。例えば、水中油 (O/W) 型のエマルションを例に挙げると、有効成分は水相及び油相中に分配することに加えて、界面活性剤により形成されたミセル中にも分配する。過飽和形成型の製剤において有効成分濃度が非晶質溶解度に達すると、有効成分は単分子状態でバルクの水中に溶解することができずに水相と有効成分濃縮相に相分離を起こすことが報告されている。この現象は液-液相分離 (LLPS) と呼ばれる⁴⁾。有効成分濃縮相は有効成分のリザーバーとして機能する一方、バルクの水中に溶解した有効成分濃度は非晶質溶解度で維持されるため、過飽和形成による吸収性向上は LLPS により制限される⁵⁾。エマルション中でも同様に有効成分濃度がある一定の濃度以上になるとバルクの水相から有効成分が LLPS を起こすと考えられるが、oil を含むエマルションにおける有効成分の LLPS 現象については十分な研究が行われていない。

そこで本研究では、SMEDDS 製剤構成成分が有効成分の過飽和溶解挙動に及ぼす影響の評価を目的として、核磁気共鳴法 (NMR) 及び極低温透過型電子顕微鏡 (cryo-TEM) を組み合わせた、エマルション中の有効成分の分散・溶解状態の定量的評価技術確立を目的とした検討を行った。



Development of quantitative evaluation methodology of cosmetic ingredients in emulsions by combined use of NMR and Cryo-TEM

Keisuke Ueda

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

2. 方法

2.1. 試料調製

Oilとして疎水性の異なる Labrafil[®] M 1944 CS (M1944, Hydrophilic-Lipophilic Balance(HLB)=9.0) 及び LabrafacTM PG (PG, HLB=1.0)を用いた。Surfactantとして NIKKOL HCO-40(HCO40, HLB=12.5) 及び co-surfactantとして Transcutol[®] Pをそれぞれ用いた。Oil, surfactant, co-surfactantを秤量し、40℃にて混合するこ

とにより SMEDDS 製剤を得た。調製した SMEDDS 製剤に対して難水溶性モデル有効成分として Fenofibrate (FFB) を加え、完全に溶解させることで FFB 封入 SMEDDS 製剤を調製した。FFB 未封入 SMEDDS 製剤及び FFB 封入 SMEDDS 製剤を PBS に分散させることにより ME を調製した。同様の調製法により、oil を含まない HCO40 ミセル溶液及び oil、surfactant を含まない blank 溶液も調製した。調製した各試料の組成を Table 1 に示す。

Table 1 Composition of samples (unit: g). FFB dose in FFB-loaded samples represents in parentheses.

Sample	SMEDDS components					PBS
	M1944	PG	HCO40	Transcutol [®] P	FFB	
Blank solution	-	-	-	1	(0.1)	100
Micellar solution	-	-	0.2	1	(0.1)	100
M1944 ME (oil 0.01)	0.01	-	0.2	1	(0.1)	100
M1944 ME (oil 0.02)	0.02	-	0.2	1	(0.1)	100
M1944 ME (oil 0.03)	0.03	-	0.2	1	(0.1)	100
M1944 ME (oil 0.05)	0.05	-	0.2	1	(0.1)	100
M1944 ME (oil 0.1)	0.1	-	0.2	1	(0.1)	100
PG ME (oil 0.01)	-	0.01	0.2	1	(0.1)	100
PG ME (oil 0.02)	-	0.02	0.2	1	(0.1)	100
PG ME (oil 0.03)	-	0.03	0.2	1	(0.1)	100
PG ME (oil 0.05)	-	0.05	0.2	1	(0.1)	100
PG ME (oil 0.1)	-	0.1	0.2	1	(0.1)	100

2. 2. Cryo-TEM測定

JEM-2100Fを用いて、加速電圧 120kV で cryo-TEM 測定を行った。

2. 3. 溶液 ¹H NMR測定

JNM-ECZ600 (14.1 T) を用いて ¹H NMR 測定を行った。DANTE presaturationによる水消しを用い、37℃において ¹H NMR スペクトルを取得した。

3. 結果

3. 1. Cryo-TEMによるFFB封入MEの形態評価

M1944 ME (oil 0.01) 及び M1944 ME (oil 0.02) では、直径約 20 nm の膨潤ミセル由来の液滴に加えて直径 150 nm 程度の大きな粒子が観察され (Fig. 1)、FFB 濃縮相の形成が示された。また、FFB 封入 M1944 ME (oil 0.03) では 20 nm 程度の膨潤ミセルに加えて 100 nm 程度の FFB 濃縮相液滴と考えられる粒子が観察された。一方、M1944 ME (oil 0.05) 及び M1944 ME (oil 0.1) では、直径 20 nm 程度の膨潤ミセルのみが観察された。これらの結果から、M1944 ME (oil 0.05) 及び M1944 ME (oil 0.1) 中では仕込み FFB すべてが膨潤ミセル中に可溶化され、FFB 濃縮相が形成されなかったと考察した。すなわち、これらの溶液中における見かけの FFB 非晶質溶解度は FFB 仕込み濃度 (1000 µg/mL) 以上であることが示唆された。

FFB 封入 PG ME について cryo-TEM 測定を行った結果、直径 10~20 nm 程度の膨潤ミセルに加えて直径約 50~100 nm 程度の粒子が観察され (Fig. 2)、FFB 濃縮相

液滴の形成が示唆された。加えて、PG 濃度が最も高い PG ME (oil 0.1) の cryo-TEM 画像中においても FFB 濃縮相に由来する液滴が認められたことから、今回調製したすべての PG ME において、見かけの FFB 非晶質溶解度は FFB 仕込み濃度 (1000 µg/mL) 以下であることが示唆された。更に、PG 含量の増加に伴い FFB 濃縮相液滴のサイズが小さくなったことから、PG の共存が FFB 濃縮相液滴サイズに影響を及ぼすことが認められた。

3. 2. ¹H NMR測定による分子状態評価

Fig. 3 には FFB 封入 M1944 ME の ¹H NMR スペクトルにおける FFB の芳香環プロトン部分の拡大図を示す。M1944 濃度が 0.03% 以下の FFB 含有 M1944 ME の NMR スペクトルにおいては、水相に溶解した FFB 及び FFB 濃縮相に由来するピークがそれぞれ認められ、FFB が M1944 ME 中において FFB 濃縮相を形成したことが示された。波形分離により得られた各相の FFB のピークの面積値から水相及び FFB 濃縮相中に存在する FFB 量を算出した (Fig. 4a)。M1944 含量の増加に伴い水相中の FFB 濃度が増加し、FFB 濃縮相量が減少した。この結果から、FFB 濃縮相存在下における ME 中の FFB 濃度、すなわち見かけの非晶質溶解度は M1944 の増加に応じて増加することが示された。また、M1944 濃度が 0.05% 以上の M1944 ME では溶解 FFB 濃度が仕込み FFB 濃度と同様の値となり、すべての FFB が ME 中に溶解した状態であることが確認された。

FFB 濃縮相中に由来する FFB ピークのケミカルシフトは M1944 濃度に依存せず一定であった (Fig. 3)。更に、

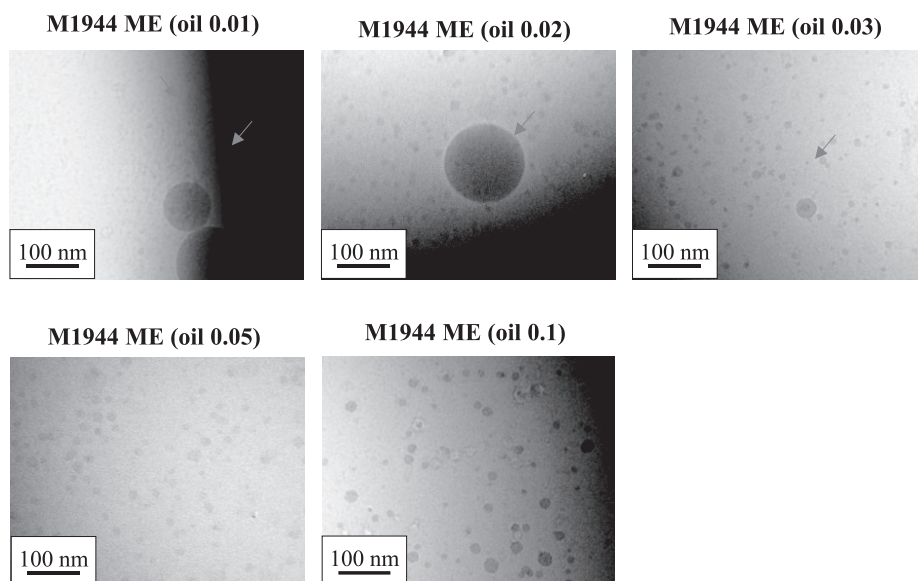


Fig. 1 Cryo-TEM images of FFB-loaded M1944 ME. The arrows indicate FFB-rich phases.

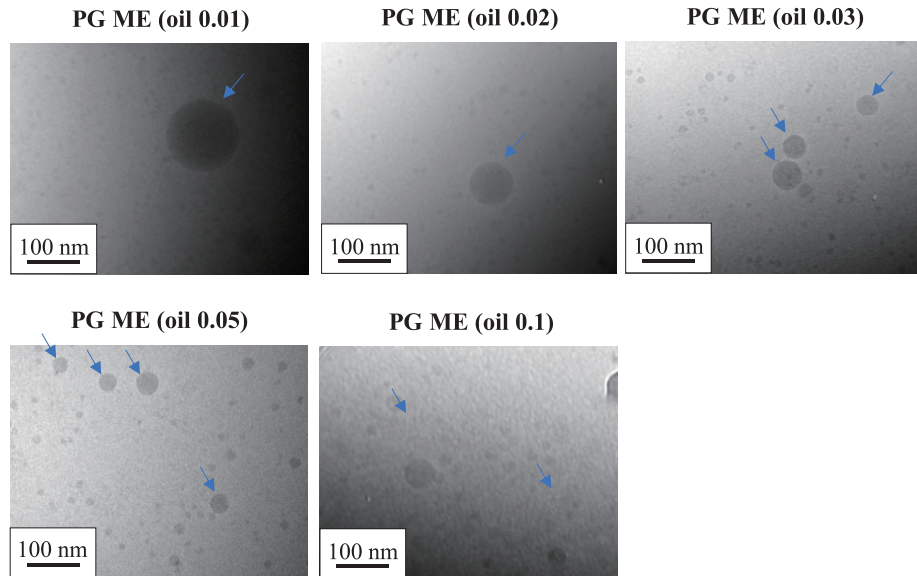


Fig. 2 Cryo-TEM images of FFB-loaded PG ME. The arrows indicate FFB-rich phases.

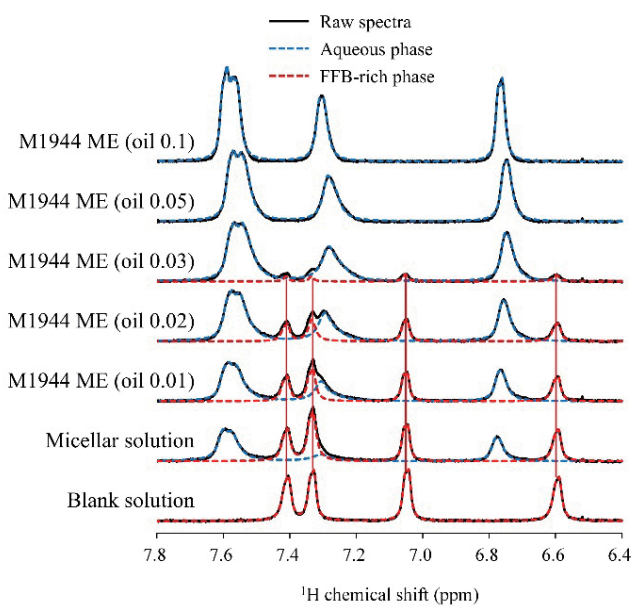


Fig. 3 ^1H NMR spectra of aromatic region of FFB in FFB-loaded M1944 ME.

NMR スペクトルにおいて認められた M1944 ピークの面積値から算出した FFB 封入 M1944 ME の水相に存在する M1944 量は仕込み M1944 量と一致しており、ほぼすべての M1944 が水相に存在することが確認された (Fig. 4b)。以上の結果から、M1944 の添加は FFB 濃縮相中の FFB の分子環境に影響を及ぼさないことが示された。

Fig. 5 に FFB 含有 PG ME の ^1H NMR スペクトルにおける FFB の芳香環プロトン部分の拡大図を示す。PG 濃度が 0.05% 以下の PG ME においては、溶解 FFB に由来するピーク及び FFB 濃縮相に由来するピークがそれぞれ認

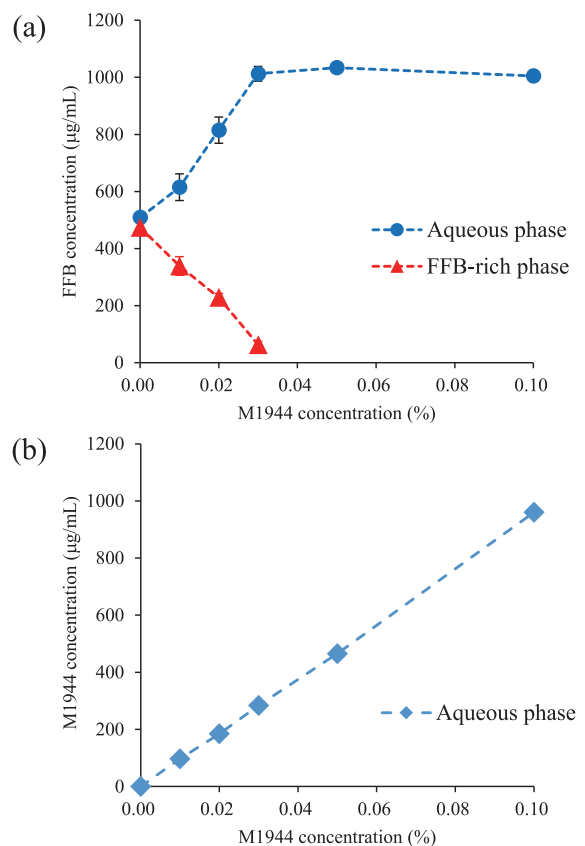


Fig. 4 (a) Dissolved FFB in aqueous phase and phase-separated FFB concentrations calculated by the FFB peak area. (b) M1944 concentration in aqueous phase.

められた。一方、PG 含量の増加に伴い、FFB 濃縮相に由来するピークが低磁場シフトし、PG ME (oil 0.1) のスペクトルにおいては各相の FFB ピークの波形分離が行えな

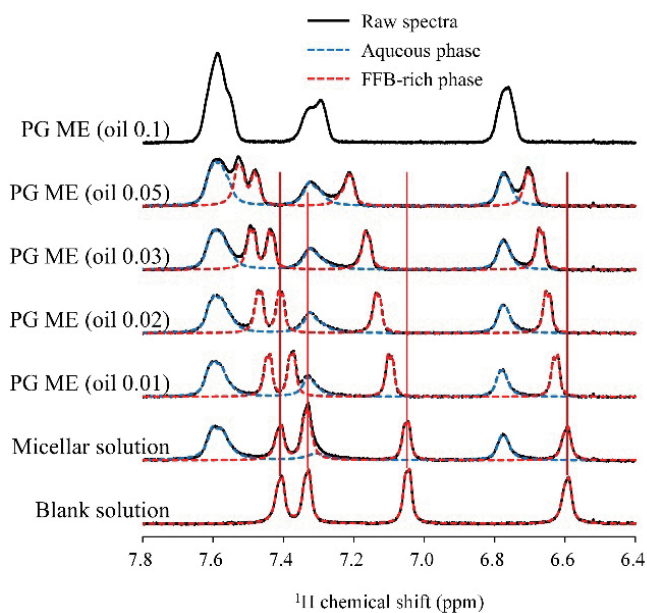


Fig. 5 ¹H NMR spectra of aromatic region of FFB in FFB-loaded PG ME.

かった。しかし、cryo-TEMを用いた解析より、FFB含有PG ME (oil 0.1) 中においてもFFB濃縮相の形成が示されていることから、PG ME (oil 0.1) のNMRスペクトル中ではFFB濃縮相に由来するピークが水相に溶解したFFBピークと重なっていると考察した。Fig. 6a には波形分離により得られたピークの面積値より算出した水相及びFFB濃縮相中のFFB量を示す。水相及びFFB濃縮相中のFFB量はPG仕込み量を変化させてもほとんど一定であった。この結果から、FFB濃縮相存在下における水相中のFFB濃度、すなわち見かけの非晶質溶解度はPG濃度にかかわらずほぼ一定であることが示唆された。

先にも述べたようにFFB濃縮相に由来するFFBピークはPG量の増加に伴い大きく低磁場シフトした (Fig. 5)。また、NMR測定結果の解析から、一部のPGがFFB濃縮相に分配していることが示されており、PGの混合によりFFB濃縮相の分子環境が変化したことが示された。NMRスペクトル上のPGピーク的面積値から水相及びFFB濃縮相中のPG量を算出した結果 (Fig. 6b)、水相及びFFB濃縮相に存在するPG量は共にPG含量の増加に伴って増加した。FFB濃縮相量及びFFB濃縮相中に分配したPG量からFFB濃縮相中のFFBに対するPGの質量比を算出した結果 (Fig. 6c)、PG仕込み量の増加に伴い、FFB濃縮相中のPG比率が増加することが示された。従って、PG仕込み量の増加に伴うFFB濃縮相へのPG分配量の増加によりFFB濃縮相の分子環境がより大きく変化し、FFB濃縮相中のFFBピークがより低磁場側へシフトしたと考察した。

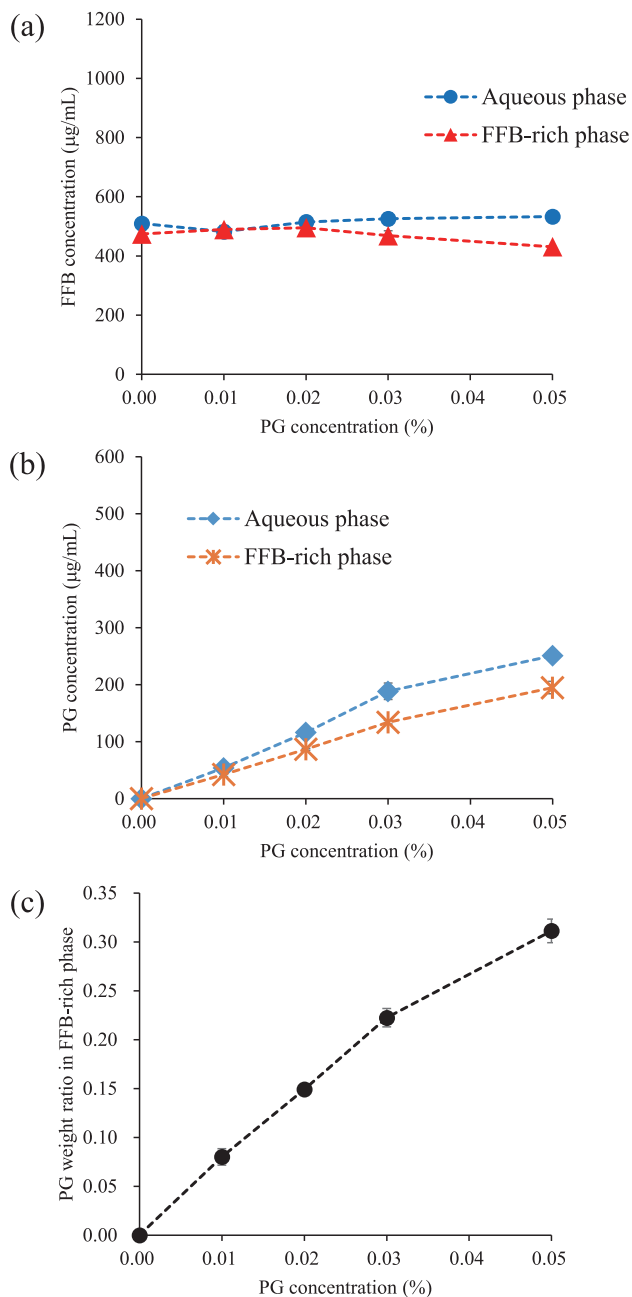


Fig. 6 (a) Dissolved FFB in aqueous phase and phase-separated FFB concentrations calculated by the FFB peak area. (b) PG concentration in aqueous phase. (c) Weight ratio of PG to FFB in FFB-rich phase (n=3, mean ± S.D.).

4. 考察

Fig. 7 には各ME中におけるFFB分散状態の模式図を示す。M1944 ME中ではM1944濃度の増加に伴い可溶化されるFFB量が増加し、見かけのFFB非晶質溶解度が上昇した。一方、NMR測定結果より、FFB濃縮相の分子環境はM1944の共存により変化しないことが示された。以上の結果から、M1944 ME中のバルクの水中の最大FFB濃度はFFB本来の非晶質溶解度 (~4.5 µg/mL) で一定となり、

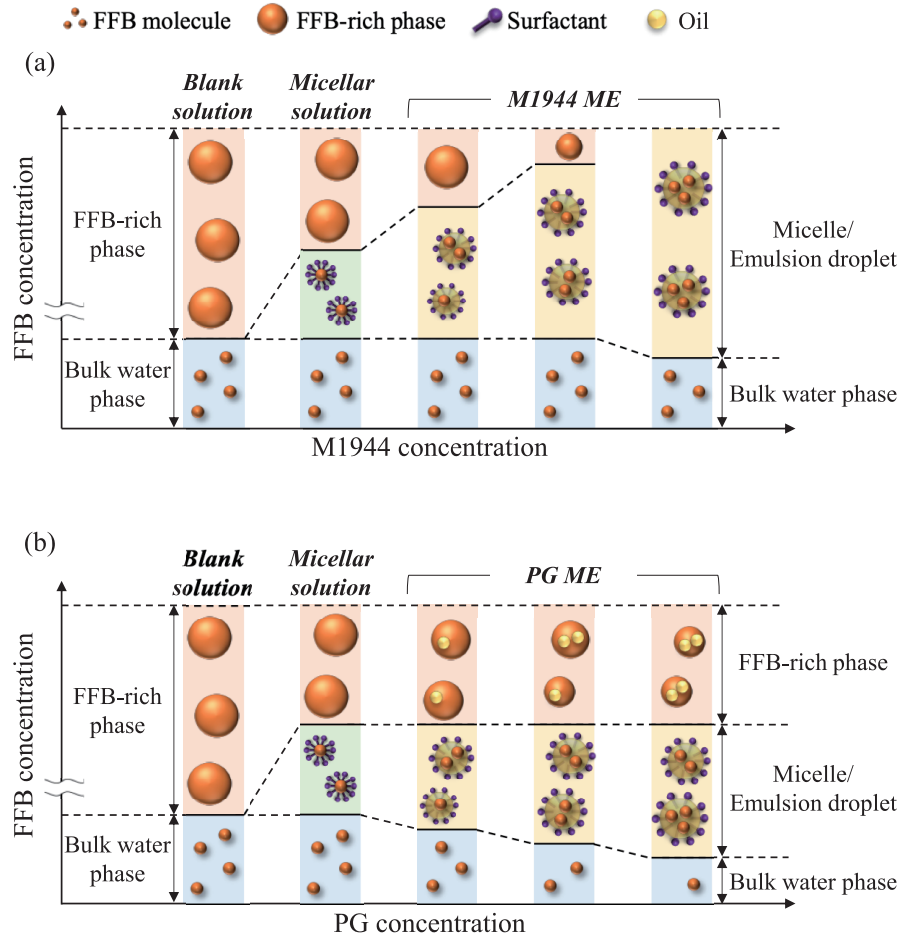


Fig. 7 Schematic illustration of FFB dissolved state in (a) M1944 ME and (b) PG ME.

FFB濃縮相の形成が認められたM1944濃度範囲では膨潤ミセルに可溶化された分だけ溶解有効成分濃度(=見かけの非晶質溶解度)が上昇したと考察した。一方、M1944濃度0.05%以上のME試料ではFFB濃縮相が形成されおらず、本試験で用いたFFB仕込み濃度(1000 µg/mL)がME中における見かけの非晶質溶解度に到達していないことが示された。

一方、PG MEではPG含量にかかわらず、水相に溶解したFFB量がほとんど変化せず、すべての系においてFFB濃縮相形成が認められた。M1944 MEと比較してPG MEはFFBの可溶化作用が弱いことが示されている一方、ミセル溶液と比較してPG ME(oil 0.1)中においてFFB溶解度が改善していることが示されており、少なくともPG添加によりFFB可溶化作用は強くなっていると推察される。一方、FFB封入PG MEのNMR解析より、PGはFFB濃縮相に分配することが示されている。有効成分濃縮相への添加剤成分の分配は有効成分濃縮相中の有効成分の化学ポテンシャルを低下させ、有効成分濃縮相と平衡状態にあるバルクの水中にフリーで溶解する有効成分濃度を減少させることが報告されている⁶⁻⁷⁾。PG MEではPG含量の増加

に伴いFFB濃縮相中に分配したPG量が増加し、バルクの水中に溶解可能な最大FFB濃度が減少したと考えられた。PG濃度依存的にバルクの水中に溶解したFFB濃度が低下した結果、膨潤ミセルによる可溶化作用がPG濃度依存的に増加したにもかかわらず、見かけのFFB非晶質溶解度がPG ME中において一定になったと考察した。

5. 総括

NMRを用いた解析によりME中に用いるoilが有効成分の過飽和溶解挙動に大きな影響を及ぼすことが示された。M1944の添加はFFBのバルクの水中における過飽和度を低下させるリスクは小さかった一方、M1944濃度が高い場合、M1944の強いFFB可溶化能力によって、バルクの水中におけるFFB過飽和度は低下することが示された。一方、PGの添加はPGのFFB濃縮相中への分配によりFFBの到達可能な最大過飽和度を直接的に低下させた。このようにエマルション中のオイルは有効成分の過飽和溶解挙動やLLPS挙動に大きな影響を及ぼし、分子状態評価に基づく最適なエマルション組成選択が、MEを活用した吸収改善において重要であると考えられた。本研究より、

エマルション中の有効成分の分散状態の定量的評価におけるNMRの有用性が示された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) C. W. Pouton Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **25** (1), 47-58, 1997.
- 2) R. Neslihan Gursoy, S. Benita Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed. Pharmacother.* **58** (3), 173-182, 2004.
- 3) H. D. Williams, N. L. Trevaskis, Y. Y. Yeap, M. U. Anby, C. W. Pouton, C. J. H. Porter Lipid-based formulations and drug supersaturation: harnessing the unique benefits of the lipid digestion/absorption pathway. *Pharm. Res.* **30** (12), 2976-2992, 2013.
- 4) G. A. Ilevbare, L. S. Taylor Liquid-liquid phase separation in highly supersaturated aqueous solutions of poorly water-soluble drugs: Implications for solubility enhancing formulations. *Cryst. Growth Des.* **13** (4), 1497-1509, 2013.
- 5) A. S. Indulkar, Y. Gao, S. A. Raina, G. G. Z. Zhang, L. S. Taylor Exploiting the phenomenon of liquid-liquid phase separation for enhanced and sustained membrane transport of a poorly water-soluble drug. *Mol. Pharm.* **13** (6), 2059-2069, 2016.
- 6) K. Ueda, D. E. Moseson, V. Pathak, L. S. Taylor Effect of polymer species on maximum aqueous phase supersaturation revealed by quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mol. Pharm.* **18** (3), 1344-1355, 2021.
- 7) N. S. Trasi, L. S. Taylor Thermodynamics of highly supersaturated aqueous solutions of poorly water-soluble drugs—Impact of a second drug on the solution phase behavior and implications for combination products. *J. Pharm. Sci.* **104** (8), 2583-2593, 2015.

フォトニックウォーターコスメティクス：ほとんど水からなる色材化粧品

東京農工大学

内田 紀之

The periodic microstructures selectively reflect light and show vivid colors (structural colors) despite the absence of dye molecules. Currently, we have intensively investigated the possibility of creating highly ordered dynamic photonic crystals composed almost entirely of water by utilizing charged nanosheets. In this context, we accidentally discovered photonic structures (photonic water) that can be prepared simply by dispersing plant-derived phospholipid in water. Conventional photonic structures have low biocompatibility because the majority of the dispersion consists of colloidal particles, which are reflective bodies for achieving structural colors. Our photonic water is a colloidal dispersion consisting almost entirely of water (>98%), which quickly loss the structural color when sprayed on the skin. This means that the photonic water is expected to have high biocompatibility. When the subcutaneous permeability and biocompatibility of this photonic water was systematically evaluated, it was revealed that, unlike conventional photonic structures, it has a high potential for use in color cosmetics.

1. 緒言

周期的な微細構造は光を選択的に反射させ、色素を含まないにも関わらず鮮やかな色を呈する(構造色)。このようなフォトニック結晶は光の性質を操る究極のツールであり、次世代光学材料の最有力候補である。しかし、「結晶」の名前が示す通り、数百nm周期の高秩序構造でなければならぬため、通常は固体材料で構成される。フォトニック結晶の研究は、格子のサイズや方向が変わらない(変えられない)ことを前提として発展してきた。また、一つの課題として、構成される材料はほとんどの場合、人工の有機物か金属であり、環境調和性が低く、大量生産が困難であった。一方で自然界には、細胞質などの流体よりなる動的なフォトニック結晶を巧みに使う生物(熱帯魚やカメレオンなど)が存在する。彼らは、環境に応答して自らの体色を高速かつ自在に変化するなど、静的な固体に基づく人工のフォトニック結晶では到底不可能な、動的フォトニック機能を発揮する。もし、このような生体現象を模倣し、水のような流体を主体に、高秩序の動的フォトニック結晶を構築できれば、従来のフォトニック結晶では想定すらされていなかった特性が実現され、フォトニクス分野の基礎・応用両面に破壊的イノベーションをもたらすことは間違いない。最近、筆者は植物由来のリン脂質を水に分散させるだけでナノシート状の集合構造を形成し、構造色を示すフ

ォトニック構造体(フォトニックウォーター)を構築することを偶然発見し、その応用研究を行っている。このフォトニックウォーターはほとんど水(>98%)からなるコロイド分散液であり、皮膚に散布すると速やかに脱色する。保湿剤や日焼け止めなどの化粧品は着色していると皮膚に塗布した際に皮膚が着色汚れを起こすため、従来透明または白色である。リン脂質ナノシートは皮膚に塗布する前は鮮やかな色材として働くが、皮膚に塗布後にはナノシートの特殊な形状を利用した化粧品成分として振る舞うため、上記の問題を解決する色材化粧品として有望な材料モチーフである。本研究課題ではこのほとんど水からなるフォトニック構造体の設計、および色材化粧品への応用を目的とした(図1)。

2. 方法

2.1. リン脂質ナノシートの皮下浸透性評価

皮下浸透性を評価するため、ラットの皮膚を採取し、それをフランツディフージョンセルに設置した後、皮膚上にナノシートのサンプルを添加して拡散によって皮膚に浸透させることでその浸透挙動を評価した。

2.2. リン脂質ナノシートの生体親和性評価

生体親和性を評価するため、リン脂質ナノシートをがん細胞に投与し、その際の細胞毒性を評価した。その後、リン脂質ナノシートをマウスに尾静脈投与し、その際の血中動態を調べた。

3. 結果

リン脂質ナノシートの経皮浸透性を評価するため、まず始めに蛍光性のNBDで修飾されたリン脂質ナノシートの調整を行った。ホスファチジルエタノールアミンに対して



Photonic water cosmetics: colored cosmetics consisting almost entirely of water

Noriyuki Uchida

Affiliation Tokyo University of Agriculture and Technology

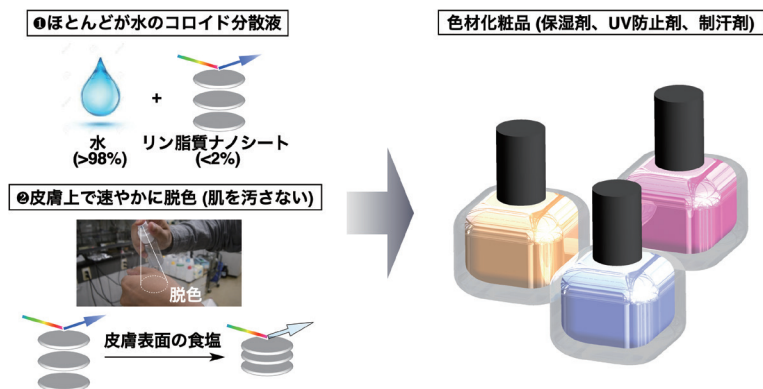


図1 リン脂質ナノシートフォトリックウォーターの特徴：①水々しさを保証する高含水性、②皮膚の着色汚れを防ぐ脱色性、および色材化粧品への応用

NBD-Fを作用させることでNBDラベル化されたリン脂質を合成し、これをリン脂質ナノシートの調整段階において混合することで、蛍光ラベル化リン脂質ナノシートの調整後行うことができた。次に、蛍光ラベルされたリン脂質ナノシートの分散液をフランツセル上のマウスの皮膚に投与し、24時間後にサンプル皮膚の切片サンプルを作成し、蛍光顕微鏡観察を行った結果を図2に示す。位相差顕微鏡画像において、角質層に由来するひだ状の組織と共に、繊維質な表皮組織を確認することができる。さらに、同じ場所の蛍光顕微鏡観察を行ったところ、驚くべきことに、角質層だけでなく、角質層を突破して表皮層にまで浸透したリン脂質ナノシートの蛍光が観察され^{1,2)}、リン脂質ナノシートが皮膚バリアとして機能する角質層を突破して浸透していることが確認された。このような高い皮下浸透性は従来のリン脂質集合体であるリポソームやミセルなどでは実現できない機能であり、本研究課題のリン脂質ナノシートが経皮投与剤として有望であることが示唆された。また、リン脂質ナノシートはその疎水性の膜中に薬剤成分を封入させることができる。そこで筆者らは化粧品成分として知られるフラレンをリン脂質ナノシートに封入し、同様に経皮投与を行ったところ、フラレン内包リン脂質ナノシートの場合も高い経皮浸透性が確認された。これはリン脂質ナノシートが化粧品成分や薬剤を皮下組織へと送達するためのキャリア材料として有望であることを示していた。

次に、リン脂質ナノシートの生体親和性を評価するため、まず始めに、リン脂質ナノシートの分散液(2.0wt%)に対して希釈操作を行い、どのような構造変化が起こるのか調べた。リン脂質ナノシートは一般的に熱力学的に不安定な集合構造であり、粒子状のミセルや中空状のリポソームに容易に構造転移することが知られており、生体機能性材料の応用が妨げられてきた。しかしながら、筆者らのリン脂質ナノシートの場合、0.2wt%という非常に低い濃度によってもナノシート状の集合構造が維持されていること

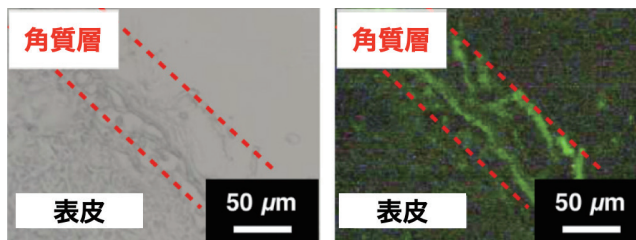


図2 蛍光性のリン脂質ナノシートを皮下に投与した際の明視野顕微鏡画像(左)、および蛍光顕微鏡画像(右)

が確認された。これは、従来のリン脂質ナノシートと異なり、本研究のリン脂質ナノシートにおいては速度論的に安定なゲル相のリン脂質膜を構成要素としているためであると考えられる。このリン脂質ナノシートの構造安定性は生体内の希釈条件下においても、ミセルなどの細胞毒性を示す傾向がある集合構造へと構造転移しないことを示しており、体内に取り込まれたリン脂質ナノシートの安全性を示す結果であった。実際、リン脂質ナノシートの分散液をがん化した線維芽細胞である3T3細胞に投与し、CCKアッセイによりその細胞毒性を評価したところ、ほとんど細胞毒性を示さないことが確認された³⁾。さらに、実際の生体内におけるリン脂質ナノシートの生体適合性を評価するため、リン脂質ナノシートを蛍光性のCy5dでラベル化し、その分散液をマウスの尾静脈に投与した後、血中動態をin vivo共焦点レーザー顕微鏡によって経時追跡を行った。その結果、リン脂質ナノシートは球状のリポソームと比較して、凝集することなく均一な分散液として血中を流れる様子が観察され、リン脂質ナノシートが体内に取り込まれた場合も有害な効果が低いことが示唆された。

4. 考察

筆者はリン脂質ナノシートが高い皮下浸透性を示したのは以下のことが理由であると考えている。皮膚組織は細胞

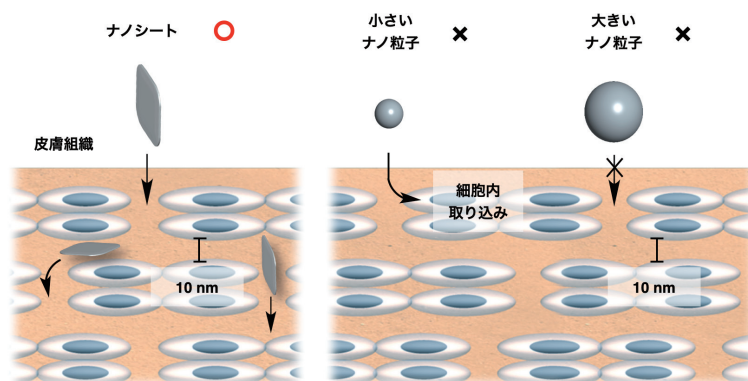


図3 リン脂質ナノシートの形状効果を利用した皮下浸透性：ナノシートは皮膚組織の狭い間隔よりも薄いため、高い浸透性を示す。小さいナノ粒子は皮膚表層の細胞に取り込まれ、大きなナノ粒子は皮膚組織の間隙を通過するのが困難

が密に敷き詰められた(10nm以下の間隙)バリア性の高い角質層に覆われた組織であり、ミセルのような微粒子は組織の表層で細胞に取り込まれてしまう一方、ベシクルは通常50nm以上の粒子であるため、効果的な皮下浸透性は期待できない。それに対し、リン脂質ナノシートはその極薄の形状(4nm以下の厚さ)から、皮膚の狭い間隙を通過して、皮膚組織へと浸透することができるため、リン脂質ナノシートが高い皮下浸透性を実現できる。過去に筆者らの他の研究グループにおいてもリン脂質ナノシートの経皮浸透性を評価した研究が報告されている。しかしながら、これらの研究においては、リン脂質ナノシートがその形状効果から経皮浸透性を示すものの、皮膚組織内で系が希釈されることにより、リポソームへと構造転移してしまい、角質層の途中までしか浸透しない材料であった。それに対し、本研究課題のリン脂質ナノシートは形状効果に加え、高い希釈安定性を有している。このため、皮下組織に浸透した後もナノシートの形状が維持され、高い経皮浸透性を示したと考えられる。より詳細な比較実験が必要となるものの、実際、本研究課題の研究結果はリン脂質ナノシートの形状効果を利用した高い皮下浸透性を示唆する結果である。今後、リン脂質ナノシートの表面修飾などを行うことで、より長い時間皮下組織に滞在する材料を設計することができれば、化粧品を始めとする様々な生体機能性材料へと応用することができると考えている。

5. 総括

本研究課題においてはリン脂質ナノシートの経皮浸透挙動と生体親和性に関する評価を行った。実際、リン脂質ナノシートは従来の球状のリポソームや粒子状のミセルと比較して高い皮下浸透性を示すと共に、細胞毒性の低さやマウスに投与した際の安全性などが確認された。リン脂質ナノシートのフォトニック構造から生じる構造色とリン脂質ナノシートが有する保湿作用などの機能を組み合わせることで、将来的に新しいタイプの化粧品が生み出されると期待される。

(引用文献)

- 1) Noriyuki Uchida*, Masayoshi Yanagi, Hiroki Hamada* "Transdermal delivery of anionic phospholipid nanoparticles containing fullerene" *Nat. Prod. Commun.* **2022**, 17, DOI: 10.1177/1934578X221078444.
- 2) Noriyuki Uchida*, Masayoshi Yanagi, Hiroki Hamada* "Bicelle composed of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine and sodium cholate" *Nat. Prod. Commun.* **2022**, 17, DOI: 10.1177/1934578X221092702.
- 3) Yuichiro Takagi, Noriyuki Uchida* Yasutaka Anraku, Takahiro Muraoka "Stabilization of bicelles using metal-binding peptide for extended blood circulation" *Chem. Commun.* **2022**, 58, 5164-5167.

進化分子工学によるデザイナー炭化水素生合成経路の開発

早稲田大学先進理工学部応用化学科

梅野 太輔

Squalene and squalane are compounds in demand in many industries, from ointments, health foods, special lubricants, nutrients and pharmaceuticals to biofuels, as well as in many cosmetics as a skincare ingredient due to its excellent emulsifier performance and outstanding stability. Highly efficient and stable microbial production is required as a highly efficient and sustainable supply method for these compounds. However, squalenes maintain a large C₃₀ skeleton, and the cells had to be disrupted to extract the squalene from the cells, resulting in the contamination of countless impurities in the extract. In this study, we developed a system to synthesise mini-squalenes was created, for enabling the hyperproduction of squalene-like compounds via continuous extraction and the creation of novel squalene alternatives possibly with the better quality as cosmetic ingredients.

1. 緒言

スクアレンは、我々の表皮脂質の5~15%を占める炭化水素成分であり、単にコレステロールなどの生理活性テルペンの生合成原料となるのみならず、それ自身に積極的な役割があることがわかっている。我々の皮脂腺からは、一日およそ100~500mgものスクアレンが分泌され、汗腺からのその他の分泌物と乳化して皮膚表面を保湿し、肌のなめらかさの保持に役立っている。これらは化粧品素材として保湿クリームなどに使われるだけでなく、各種健康食品素材としての需要がある¹⁾。さらには、インフルエンザウイルスのアジュバンド(免疫賦活剤)として、1shotあたり1mgのスクアレンが使用されている²⁾。また、スクワレンを水素還元して得られるスクワランはさらに需要が高い。そもそもスクアランは、第二次世界大戦中に日本軍が寒冷地での戦車・戦闘機の潤滑油として用いたのが工業規模での利用のさきがけであるという¹⁾。戦後は、時計やカメラのシャッター用潤滑油として民需使用されるようになったが、その皮膚への親和性・良好な展伸性と低温特性、さらには保湿性に優れることから、化粧品への応用展開が一気に進むことになった。今では、バスオイル、ヘアケア製品、メイクアップ剤、リップスティック、日焼け剤、ボディパウダー、ネイルケア製品など、コスメ・スキンケアに関連する無数の製品に0.1~50%程度の含有量で含まれるに至っている。さらにスクアレン・スクアランは、完全なる炭化水素であるため、その燃料特性にも優れており、SAF

(Sustainable Aviation Fuel)として大量生産する挑戦も始まっている。化粧品産業はもちろん、医療・健康食品・潤滑油など、産業需要の高いスクアレン・スクアランの年間需要はすでに数千トン(マーケットサイズは200億円)を超える³⁾。燃料用途のスクアレンの実用生産に目処がつけば、その需要規模は青天井に成長するに違いない。

このように需要の高いスクアレン・スクアランであるが、その持続可能な供給は脅かされている。主な供給源の一つは深海ザメの肝油であるが、毎年、おびただしい数(~1億匹といわれる)のサメがスクアレンのために乱獲されており、動物愛護の立場から、多くの企業が肝油由来スクアレンの使用中止を宣言し始めている。さらに海洋汚染のため、最近では、肝油に種々の有害物質が検出されるケースが増えはじめている。また、植物スクアレンの多くはオリーブなどの可食植物に由来するうえ、その含有量が気候によって大きく変動するため、安定な供給源にはなり得ない。また植物スクアレンはパラフィンなど他成分とともに抽出されるため、高純度のスクアレン・スクアラン源とも言い難い。このような背景のもと、スクアレンの持続可能で夾雑物の少ない新たなリソースとして微生物生産への期待が高まっている。Amyris社をはじめとする合生成物学ベンチャーは、スクアレン合成経路を導入した大腸菌や酵母などを徹底的に育種し、産業要請の一部(2013年実績でおよそ需要の20%)に応えつつあるが、その高い分子量(炭素骨格30、分子量411/423)とロウのような油性(沸点285/417℃)によって、高い膜蓄積性を示し、細胞を破碎せずに取り出すことが困難である。その結果、膜蓄積容量を超える生産はできないという重大な問題によって、その直接の微生物生産は困難である⁴⁾。ファルネセン(C₁₅骨格)程度の炭化水素の場合は、微生物の培養液に、有機溶媒(ドデカンなど)を上層するだけで、連続的に抽出しながら生物生産が可能となるため、~100g/Lを超える生産が可能となる⁵⁾。前出のAmyris社は、半分の分子量を持つ直鎖状テルペン(フ



Directed evolution of pathways for non-natural squalenes

Daisuke Umeno

Dept. Applied Chemistry, Waseda University

アルネセン)を微生物生産し、これらを化学触媒プロセスで縮合してスクアレンを供給している。

私たちは長年大腸菌でのスクアレンの高効率生産に挑んできたが⁶⁾、株の生産力の向上とともに、その蓄積毒性は顕著となり、ある程度以上の生産は宿主致死に至ることが明らかになった。その原因はひとえに、大きすぎる分子骨格(C₃₀)にある。そもそも、その優れた油質・保水効果と低刺激性によって長年愛用されてきたスクアレン・スクアランであるが、油というよりは「ろう」に近い物性を持つ。これが本当に化粧品素材としての理想型なのであろうか？その分子量をもう少しだけ小さくすることができれば、流動性がより高く、かつスクアレンと同等の油質・保水効果を示す、全く新しい化粧品素材が開発できるのではないか？

最近我々は、スクアレン合成酵素の近縁酵素であるフィトエン合成酵素(カロテノイド色素の原料骨格合成酵素)を特異性変換し、イソプレナムユニット1つぶんだけ小さい骨格を持つC₂₅カロテノイドを大腸菌に生合成させることに成功した。すると驚くことに、その化合物は、C₃₀やC₄₀骨格を持つ天然カロテノイドと異なり、大腸菌を破碎することなく、培養液に上層したドデカン層に連続的に抽出されてくることになった⁷⁾(Fig. 1)。フィトエンと構造が酷似しているスクアレンも、その骨格サイズを小さく変更することによって、肌上での展性や保湿効果をそのままに、その流動性や加工性、さらには微生物生産を可能とする新規化粧品ベース素材となるのではないか。この着想にもとづき本助成研究では、進化分子工学を駆使して「ミニスクアレン」合成酵素を実際に創出し、実際に大腸菌で生産させることに成功した。

2. 方法

2.1. ミニスクアレン合成酵素の創出

バイオ燃料の分野でもスクアレンは注目されているが、実際に燃料として使うためには、クラッキングによって

低分子化されることになる。エネルギー負荷の高いこのクラッキングプロセスを避けるため、多くの研究者が「小さいな(<C₂₅スクアレン)」の生合成に挑戦したが、これまで誰も成功していない。理論的には、スクアレン合成酵素(Squalene synthase, SQS)の反応ポケットの形状を再デザインし、より小さな基質に最適化すれば、C₂₅スクアレンを合成できるSQS変異体の創出は可能であろう。しかし色素前駆体であるフィトエンの場合^{8,9)}と異なり、スクアレンは分子量にかかわらず無色透明であり、それを前駆体とするホパノイドやステロイド類も無色であるため、スクリーニングの手立てがなかった。立体構造情報が豊富なヒト由来のSQS(hSQS)と中度好熱性シアノバクテリア(Thermocynechococcus)由来のSQS(tSQS)の2つを出発点とし、Fig. 2に示す3工程によって実験室内で「進化」させてC₂₅構造を持つスクアレン合成酵素を創出することを試みた。

具体的な工程を概説すると、以前の我々の発見¹⁰⁾に基づき、tSQS/hSQSのNADHからの電子供与能を奪うアミノ酸置換を導入し、カロテノイド前駆体デヒドロスクアレン(DSQ)型の生産物を与える酵素変異体に変換する(工程①)。こうして得たC₃₀-DSQSの反応ポケットにランダムなアミノ酸置換を遺伝子レベルで導入し、そのサイズ特異性の多様化を図る。我々は最近、C₂₅骨格を持つフィトエンを前駆体としたときのみ、蛍光性の色素を与える不飽和化経路を開発した⁷⁾。この系を使い、C₃₀ではなくC₂₅カロテノイドを合成する変異体を探索する(工程②)。最後に、こうして得られたC₂₅-DSQS変異体から工程①で導入した変異部位を野生型に戻し、還元能を復活させてC₂₅-SQSを得る(工程③)という作戦である。

2.2. ミニスクアレンの大腸菌生産と抽出特性の調査

得られた変異体は大腸菌にプラスミド発現させ、培地の体積の20~50%のドデカンを上層したかたちで30~37℃で24~48時間振盪培養した。その後、細胞外に抽出し得

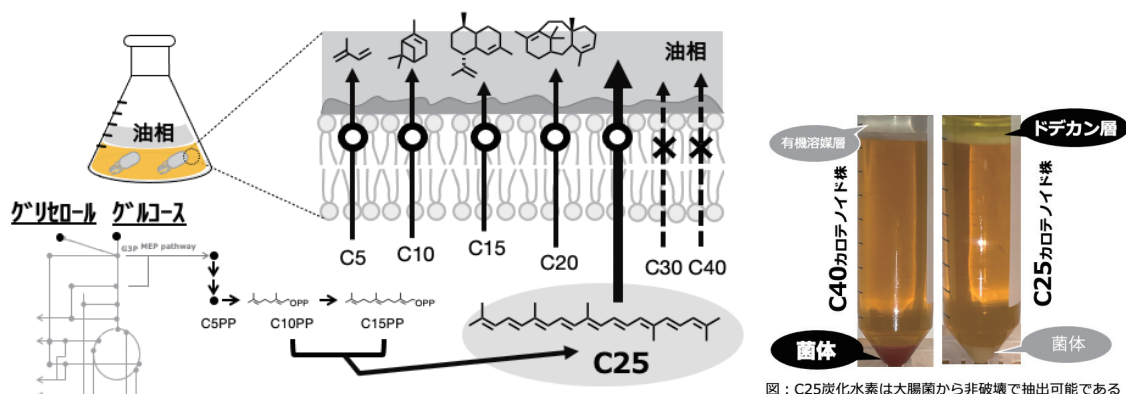


Fig. 1 大腸菌は C₂₅ カロテノイドを放出する～ C₂₅ スクアレンも同様と期待される

たスクアレン類は、培地を遠心し上澄として現れるドデカン画分から、細胞残留したスクアレン類は、遠心時に得られる細胞ペレットを回収し、アセトン抽出→ヘキサン/水二相分配させたヘキサン画分から回収した。

3. 結果

3.1. ミニスクアレン合成酵素の創出

我々は、中度好熱シアノバクテリア *Thermocynechococcus* 由来の tSQS の活性を落とさずその還元能だけを奪う変異⁷⁾を見出している。そのような変異のひとつ V314A (314 番目の残基をバリンからアラニンに変換する変異) を導入した tSQS 変異体を作成したところ、首尾よく C₃₀-DSQ 合成酵素として振る舞うことが確認された。この変異体を発現する大腸菌にカロテノイド不飽和化酵素 CrtI を追加発現すると黄色いコロニーを与えた。この酵素は、C₃₀-DSQ を 3~4 ステップ不飽和化し、大腸菌に蓄積する¹¹⁾。Fig. 2 の工程①が首尾よく成功したことになる。

この tSQS 変異体を親として、遺伝子全域にランダムな変異を様々な方法で導入して遺伝型を多様化した。得られた tSQS ライブラリを、CrtI を共発現する大腸菌に導入したところ、ほとんどの変異体は親と代わり映えない黄色コロニーを与えたが、数割のコロニーは白いコロニーを与えた。これらはランダム変異によって tSQS の機能あるいはフォールディング能が損なわれた「dead mutants」である。そしてこれら有象無象の中に、わずかに蛍光性を示すコロニーが見られた。我々はこの蛍光性変異体を単離し、次の世代の親と定め、さらなるランダム変異導入(遺伝型の多様化)に供した。このサイクルを 3 世代にわたって右

繰り返す、CrtI 共発現によって高い蛍光性を示す tSQS 変異体を得ることができた(工程②: C₂₅-DSQ: Fig. 3a左)。この変異体は全く C₂₅-SQ を合成しなかったが、工程①で導入した 314A 変異を元のアミノ酸(V)に戻したところ(工程③)，得られた変異体は、細胞内で C₂₅-SQ を主生成物として与えることがわかった(Fig. 3a右)。自然界の SQS は種を問わず厳密に C₃₀ 骨格のスクアレンを合成し、ホパノイドやステロールなど、50,000 超ものトリテルペンはすべて、この C₃₀-SQ から生合成される。本研究は、3 段階の進化工程を経て、世界で初めて「ミニスクアレン」の生合成に成功した。

我々は、ヒト由来の hSQS においても、ミニスクアレン合成酵素化を試みた。hSQS は高血圧創薬標的であったこともあり、多くの X 線結晶構造が取得されている。しかし tSQS と異なり、hSQS には、NADPH の結合がなければ縮合が完結しない独特な「仕掛け」が埋め込まれているため、単に C₃₀-DSQS 化する変異を導入するだけでは、全体活性が大きく下がってしまう¹⁰⁾。そこでこの酵素については、構造情報を参考にした部位だけを特異的なランダム化を集中的に導入し、工程②(C₂₅ 骨格合成能の蛍光選抜)によって、C₂₅-DSQ 型の変異体を得た(Fig. 3a左)。得られた変異体から、工程①で導入した NADPH 結合性を奪う変異のキャンセル(工程③)を行ったところ、hSQSwt の 40 倍もの C₂₅-SQ 合成ができる変異体の獲得に成功した(Fig. 3b右)。

3.2. ミニスクアレン合成酵素の連続抽出培養

こうして獲得した C₂₅ SQS を大腸菌に導入し、ドデカン

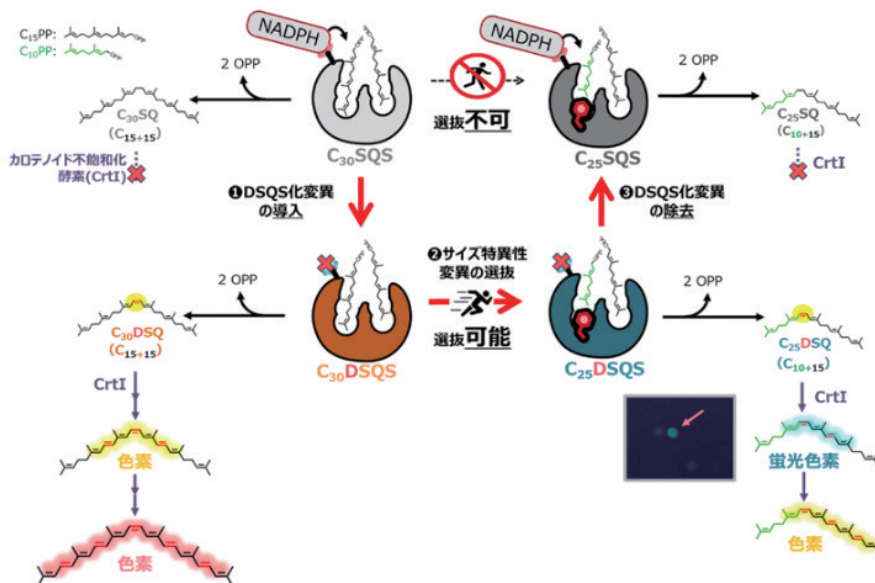


Fig. 2 急がばまわれ? ミニスクアレン合成酵素を創出する「進化工程」

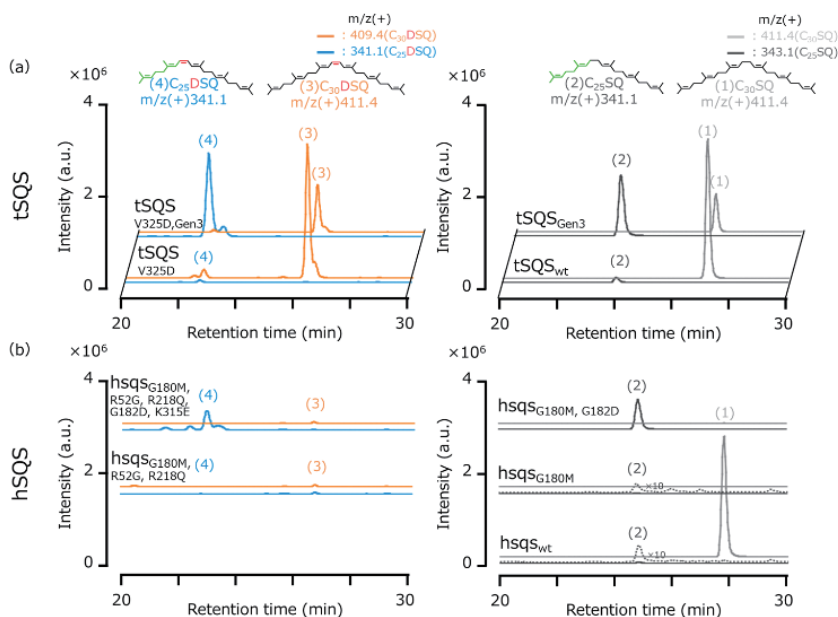


Fig. 3. tSQS および hSQS のサイズ変異体

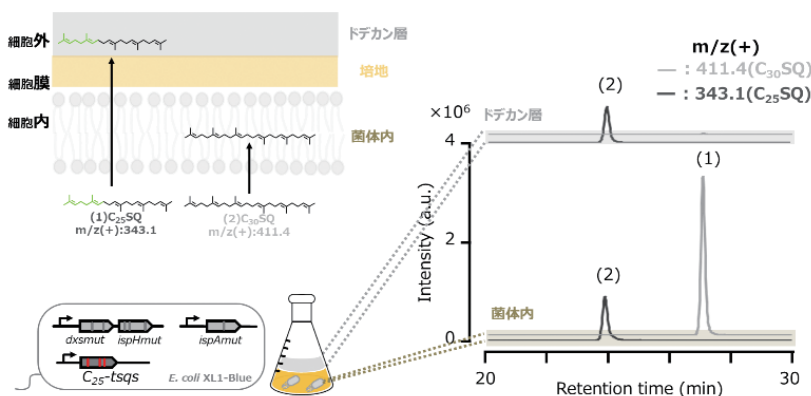


Fig. 4 C₂₅SQ の膜透過性検証

を上層したまま培養を行った。C₃₀SQは膜蓄積するため細胞ペレット画分のみ見られたが、C₂₅SQは上層したドデカン層にみられた (Fig. 4)。期待どおり、直鎖状C₂₅-SQは細胞外に抽出することが可能であることが本系でも追認された。

3. 3. もうひとつの反応特異性・分岐型スクアレンの合成

炭化水素の油質を決める主要素として、分子サイズと不飽和度が知られるが、これに加えて、分岐の有無という構造要素も重要である。SQSは2分子のC₁₅PPを還元的に縮合して直鎖状のC₃₀SQを合成する酵素であるが、我々はhSQSのさらなるサイズ変異体の変更を画策しているうちに、試作したhSQS変異体のひとつが、SQ型でもDSQ型

でもない、新規生成物を合成していることを偶然発見した。この化合物は、C₄₀骨格を持ち、不飽和度はC₄₀-DSQ (カロテノイド原料であるフィトエンと同じ)でありながら、フィトエンの持つ287nm (3つの二重結合の共役)を持たない。SQSの触媒する反応メカニズムを考慮すると、この新規化合物はC₄₀デヒドロボトリオコッセン (DBo)だと予測した (Fig. 5)。興味深いことに、この変異体は、C₂₀原料 (C₂₀PP)の二分子縮合産物はこの分岐型分子を与えるが、C₁₅原料 (C₁₅PP)の二分子縮合時には、天然型 (直鎖型)のC₃₀SQを与えることが明らかになった。すなわちこの酵素は、同じ酵素の同じ反応ポケットの中で、基質サイズによって2つの異なる縮合形式での炭化水素構造の形成を触媒する極めて珍しい特色を持つ。我々の知る限り、このような「自動仕分け機能」を持つ酵素の報告はない。

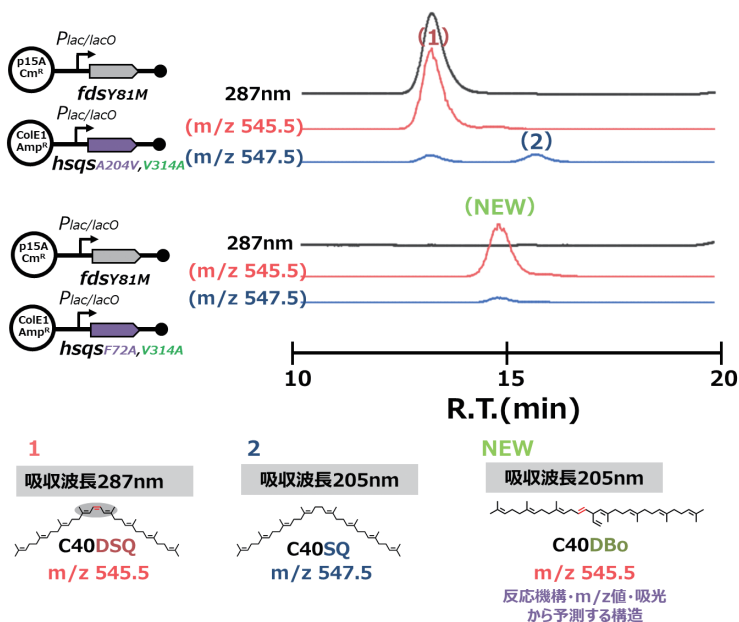


Fig. 5 新規 C₄₀ 炭化水素を合成する SQS 変異体

4. 総括

スクアレンの微生物生産における最大の問題は、細胞からそれを取り出せないことにある。米国ベンチャー Amyris 社は、C₁₅ 骨格を持つファルネセンを連続微生物生産し、これを化学触媒で縮合してスクアレンに変換する、半生物・半有機合成のスクアレン製造方法を実用化し、世界スクアレン需要の 2 割を担うことに成功している。しかしこのスクアレンは完全なる微生物合成ではないため、真の「バイオスクアレン」とは言い難い。本研究では、炭素骨格をあと 5 つぶんだけ間引いた C₂₅ スクアレンは、勝手に大腸菌の外に出てくることを発見した。化学触媒過程を一切排したかたちで、廃糖や廃油などから一段でスクアレン・スクアランを大量合成することができるとしたら、この化合物こそが、唯一にして絶対のフォーマットであると我々は確信している。大量微生物生産に適した改質型・連続抽出可能な「ミニスクアレン」の生合成経路は、イソプレノイド原料供給路を強化した微生物などの併用によって、拡大し続けるエマルジョン型保湿剤需要に応えられる、真に全生物生産な新規化粧品素材となる可能性が高い。また、一過的かつ不規則なパンデミック対応に不可欠なアジュバンドの大量供給体制の整備にも、一役買う可能性がある。さらに、本研究を進展させれば、C₅+C₂₀ や C₅+C₁₅ 型の非天然スクアレンシリーズやその分岐型炭化水素などの生合成が可能となる。軟膏成分やスキンケア素材として、実験室でも自然界でもアクセス不能だった、数多くの新規な物性を持つバイオ化粧品素材のシリーズ開発ができるものと期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたって多大なる御支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) 海谷 篤, 天然スクアレン, スクアランの用途と最近の原料事情. 油化学, **1990**, 39 (8), 525-529.
- 2) K.J. Fisher; R. Kinsey; R. Mohamath, *et al.* Semi-synthetic terpenoids with differential adjuvant properties as sustainable replacements for shark squalene in vaccine emulsions. **2023**, *npj Vaccines*, 8, 14.
- 3) <https://www.greenpeace.org/static/planet4-eastasia-stateless/2019/11/eca7ede5-eca7ede5-etc-squalene-synbio-casestudy2014.pdf>
- 4) Y. Meng; X. Shao; Y. Wang; Y. Li; X. Zheng; G. Wei; S-W. Kim; C. Wang, Extension of cell membrane boosting squalene production in the engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, **2020**, 117 (11), 3499-3507.
- 5) A. Meadows; K. Hawkins; Y. Tsegaye, *et al.* Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production. *Nature*, **2016**, 537, 694-697.
- 6) A. Katabami; L. Li; M. Iwasaki, M. Furubayashi; K. Saito; D. Umeno, **2015**, 119 (2), 165-171.
- 7) 梅野太輔, 尾島 匠, 非対称骨格を有するカロテノイド及び蛍光性非対称骨格を有するカロテノイド, 特願

2023-112676.

- 8) M. Furubayashi; M. Ikezumi; S. Takaichi, et al. A highly selective biosynthetic pathway to non-natural C₅₀ carotenoids assembled from moderately selective enzymes. *Nat Commun.* **2015**, 6, 7534.
- 9) M. Furubayashi; D. Umeno, Use of directed enzyme evolution to create novel biosynthetic pathways for production of rare or non-natural carotenoids. *Methods Enzymol.*, **2022**, 671, 351-382.
- 10) M. Furubayashi; L. Li; A. Katabami; K. Saito; D. Umeno: Directed evolution of squalene synthase for dehydrosqualene biosynthesis, *FEBS Lett.*, **2014**, 588, 3375-3381.
- 11) D. Umeno; A.V. Tobias; F.H. Arnold; Evolution of the C₃₀ Carotenoid Synthase CrtM for Function in a C₄₀ Pathway. *J. Bacteriol.*, **2002**, 184 (23), 6690-6699.

ガス透過性金型による高溶解型無痛ナノマイクロニードルの開発

富山県立大学大学院工学研究科

竹井 敏、山岸 里緒、三浦 早耶香

This study aimed to expand the surface nano and micro-patterning techniques of highly dissolvable painless microneedle materials such as hyaluronic acid, collagen, and other substances in imprint lithography techniques using the developed inorganic gas-permeable porous molds for cosmetic applications. The microneedle materials have superior properties of skin appearance and transdermal drug delivery systems. However, because hyaluronic acid and collagen are either solid or semisolid at room temperature, and because the use of water and volatile solvents in microneedle can be a cause of pattern failure in surface nano and micro-patterning techniques, these materials have been of limited utility as microneedle for high resolution cosmetic applications. Excellent resolution nano-microneedle patterning can be achieved by diluting water or volatile solvents in imprint lithography techniques using the gas-permeable molds. Based on this study, acceptable chemistries for the imprinted materials have been expanded, which will be beneficial for future applications with various cosmetic and pharmaceutical materials containing dilution water using the gas-permeable porous molds.

1. 緒言

ヒアルロン酸を成分とするマイクロニードルは、痛みや恐怖を伴う注射に代わる新規薬剤投与手段として化粧品や医薬品のライフサイエンス分野で注目されている^{1,2)}。ヒアルロン酸はグリコサミノグルカンの一種でD-グルクロン酸とN-アセチル-D-グルコサミンの繰り返し構成単位二糖からなる直鎖状の高分子多糖である。生体内において、皮膚、関節、眼球の硝子体に多く含まれ、保水性が非常に高く、1g当たり2～6Lの水を保持して高粘度のゲルを形成できることから、皮膚の水分保持や関節の保護の重要な機能を果たしている。ヒアルロン酸は、紫外線や加齢によって減少することが報告されており、その減少が皮膚のシワやたるみに大きく影響している。シワやたるみなどの肌老化を改善するためには、ヒアルロン酸を皮膚内に浸透させることが求められる。

しかし、皮膚の最外層に位置する角質層は外部からの刺激や異物の侵入を防ぐバリア機能を有している。角質層はケラチンや繊維状タンパク質、セラミドや中性脂質から成り立っており、水溶性物質や分子量が500以上の物質の透過を制限している。そのため、適度に脂溶性であり、分子量が500以下である物質でなければ、角質層を通過することができない。分子量500を超える水溶性化合物の皮膚透過性は極めて低く、ヒアルロン酸のような水溶性高分子の

皮膚への浸透は困難であるとされている。

化粧品や医薬品において、高分子量の有効成分を生きた細胞層に届ける方法としては、有効成分を封入したエマルションやリポソームの微粒子キャリアを用いる方法³⁾や、高電圧の負荷により薬剤を細胞内へ導入するエレクトロポレーション法⁴⁾、電気エネルギーを利用して薬物の皮膚透過性を促進するイオントフォレシス法⁵⁾、超音波を利用したソノフォレシス法⁶⁾の物理的経皮吸収促進法が報告されている。

しかしながら、これらの方法では、投与時に特別な装置を必要とするという欠点があることや、電圧・超音波による処理後の皮膚バリアの障害、角質層下の生きた細胞・組織への影響が懸念されている。そこで、マイクロニードルを用いた経皮吸収促進法が期待されている。マイクロニードルとは、マイクロメートルサイズの超微細針を皮膚に適用することにより角質層に微小孔を開け、有効成分を皮膚内で放出させる投与方法である。マイクロニードルの素材としてヒアルロン酸を使用したもの、または金属製の微細針にヒアルロン酸をコーティングしたものを皮膚に適用することにより、針の先端が角質層に穿刺され、ヒアルロン酸を直接角質層に浸透させることができる。

マイクロニードルを用いた経皮投与の特徴として、安全かつ簡便な投与形態により自己投与が可能であること、ニードルの微小化により痛みを伴わず、出血がないこと、薬物分子量・油水分配係数の物理化学的性質に依存せず、水溶性の高分子や粒子状の物質を皮膚内に送達できること、固形製剤により保管・輸送に便利であること、生分解性・自己溶解性の成分を使用したマイクロニードルにおいては注射針の産業廃棄物のコスト削減が可能であることが挙げられる。国内外で現在市販されているマイクロニードルの針先の形状は、三角錐、富士山型、四角錐、円錐と多種多



Development of Highly Dissolvable Painless Nano-microneedles Using Gas Permeable Porous Molds

*Satoshi Takei, Rio Yamagishi, Sayaka Miura

Graduate School of Engineering, Toyama Prefectural University

様である。皮膚への穿刺の際に先端半径が小さいほどよく刺さり、皮膚刺激性や痛みは少ないとされている。

しかし、既存品は針が神経に到達するサイズであり適用時の痛みや違和感を伴う課題になる場合がある。既存のマイクロニードルの針の大きさは、底面直径が約150 μm ～900 μm 、高さが約200 μm ～350 μm である。これは、注射針と比較してはるかに微細であるが、神経の通る真皮層に到達するサイズであるため、適用時の痛みや違和感を生じるという欠点がある(図1)。

マイクロニードルの製造法としては、主にDroplet-born Air Blowing (DAB)方式とMolding方式の2つの微細加工技術に大別される。Droplet-born Air Blowing (DAB)方式では、インクジェット技術を用いてヒアルロン酸などの生分解性ポリマー溶液の液滴を基板上に等間隔に付着させ、その上に別の基板を重ねゆっくり引き離す⁷⁾。粘度の高いポリマー液滴は引き延ばされ、送風機により空気を吹きかけ乾燥させることでマイクロニードルを作製する。DAB方式では、液滴の引き上げにより作製するため、ニードルの長さや形状に制限があり、解像度が低く微細加工が困難であることや、ニードルの高さにばらつきがあること、機械的な強度が弱いことの欠点がある。

一方、Molding方式は、ヒアルロン酸の生分解性ポリマー溶液を、微細加工が施された金型に流し込む、または金型を押し当て、加熱し硬化することによりマイクロニードルを作製する⁸⁾。Molding方式は微細加工ができるためマイクロニードルの更なる微細化が可能となる。しかし、石英や金属製の金型を使用する従来のMolding方式の過程では、加熱時の水や溶剤によるガスの発生、成形不良、金型の破損の課題があった。特に、ヒアルロン酸やコラーゲンの高分子量的美容成分は高粘度であることや溶剤や水を用いて調製をすることから、自己溶解型マイクロニードルの微細化が困難であるという課題があった。

そこで、我々は、成形時に金型と美容成分溶液の間に巻き込まれるガスを除去することが可能な「ガス透過性多孔質金型」を用い^{9,10)}、Molding法の一つであるインプリントリソグラフィを用いた自己溶解型マイクロニードルパッチの製造技術を見出した。

本研究では、無機系TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質金型によりヒアルロン酸素材の自己溶解型マイクロニードルを既存の約20分の1以下のサイズに超微細化する技術を報告する。具体的には、微細加工技術の一つであるインプリントリソグラフィを用いて超微細マイクロニードルの作製を試みた。インプリント加工において、従来の非ガス透過性金型では、金型と被転写材間のガスの巻き込みにより成形不良を生じるが、新たに試作したTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系ポリマーと3次元光造形法で積層したガス透過性金属を組み合わせたTiO₂-SiO₂系ガス透過性

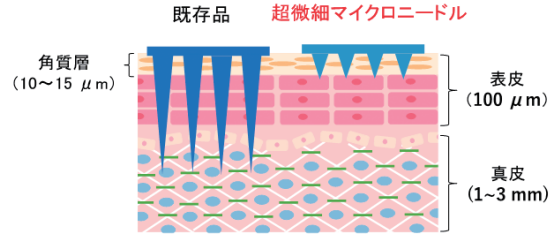
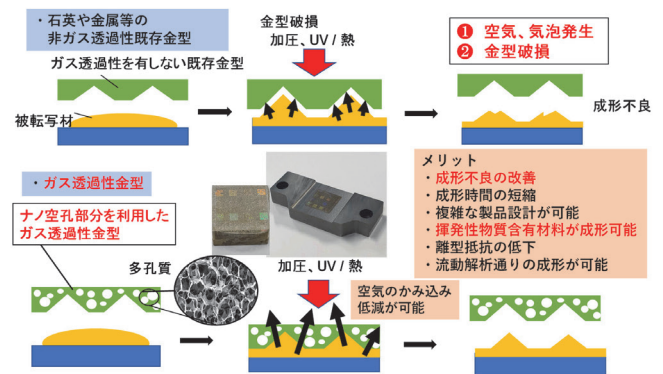


図1 皮膚の断面図と既存の自己溶解型マイクロニードルのサイズ

ガス透過性多孔質金型の有用性



ガス透過性多孔質金型によるマイクロニードルの微細化・成形不良改善

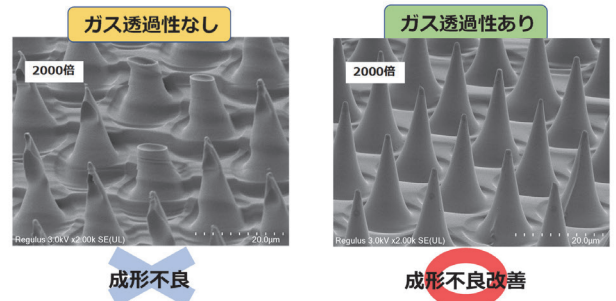


図2 目的：ガス透過性多孔質金型によるマイクロニードルの微細化・成形不良改善

多孔質無機系金型を用いると、発生したガスは金型の多孔質構造を通過し金型外へと除去されるため、成形不良を改善できた(図2)。

2. 方法

2.1. TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型

酸化チタンカップリング剤と酸化ケイ素カップリング剤を混合後ゾル-ゲル重合を行い、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系ポリマーを合成した^{11,12)}。ガス透過性多孔質金型の多孔質度と機械的強度とマイクロニードル成分のヒアルロン酸との離型性はそれぞれトレードオフの関係となるため、超微細マイクロニードルの製造用に新たな分子

設計を施したTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を開発した。TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型の多孔質度を増加させるために、螺旋構造を有する新たな分子系を、微細マイクロニードルのナノ突起構造を形成するTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜に使用した。TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜の設計要素（分子構造・分子量・分散値・架橋反応基濃度・水酸基濃度・反応抑制基の濃度・機械的強度・ガス透過率・陽電子寿命法による自由体積分布・ガス透過性下地基板との密着性・表面エネルギー）について最適化条件を確立した。合成したTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型と架橋剤と触媒からなるTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型形成組成物を調製した（図3）。TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質金型を用い、従来の約20分の1のサイズのマイクロニードルの設計及び製造により、皮膚に適応する際の痛みや違和感の低減、表面積増大による美容成分の

浸透性向上を目指した。

2.2. ガス透過性多孔質金型による高溶解型無痛ナノマイクロニードルの製造法

TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質金型、並びにヒアルロン酸系高溶解型無痛ナノマイクロニードルへの製造法を示す（図4）。本研究で行うナノインプリントリソグラフィプロセスは、①凸型石英マスター金型を、3次元光造形法で積層したガス透過性金属下層基板の上にTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜材料に転写し、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜を作製する工程と、②TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を高純度加水分解ヒアルロン酸の溶液に転写する工程の2段階で構成される。①の工程では、凸型石英マスター金型をTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜材料に乗せて加圧し、加熱またはUV照射により硬化することでTiO₂-SiO₂系ガ

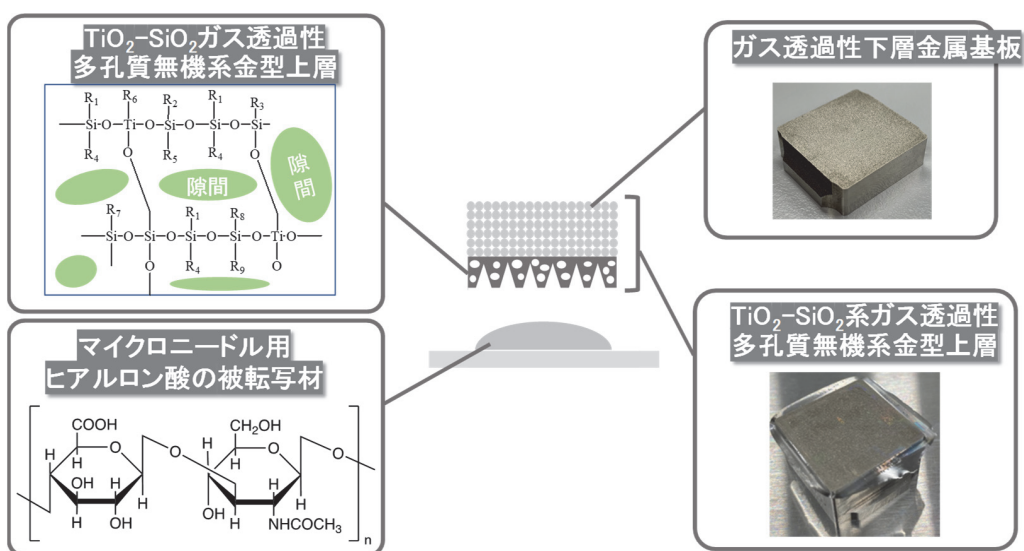


図3 TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型と被転写材ヒアルロン酸

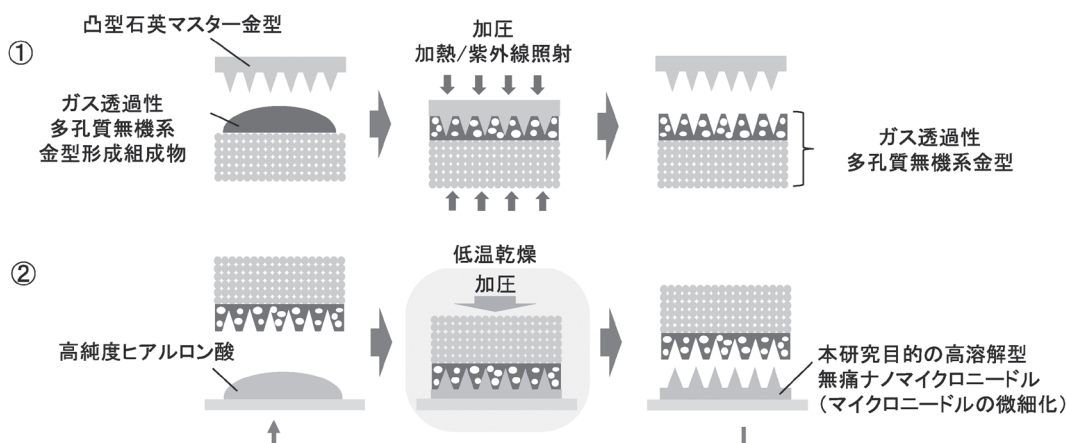


図4 ガス透過性多孔質金型とヒアルロン酸系ナノマイクロニードルの製造法

ス透過性多孔質無機系金型上層膜を得た。②の工程では、ヒアルロン酸溶液の被転写材を塗布した基板の上に、①で作製したTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を乗せて加圧し、低温乾燥によりニードルパターンを得た。同じ一つのガス透過性金型により②の工程を繰り返すことによって、超微細マイクロニードルパッチの大量生産が可能となる製造法を適用した。

3. 結果

3.1. 加水分解ヒアルロン酸マイクロニードル形状のインプリント回数依存性

TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を用いて製造した、底面直径13μm、高さ24μm(従来の約20分の1のサイズ)の高純度加水分解ヒアルロン酸の超微細マイクロニードルに対する評価を行った。TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を用いた微細加工結果及び回数依存性測定結果を示す(図5)。従来の凹型石英マスター金型を使用して成形した場合の超微細マイクロニードルは、水や揮発性溶剤の影響により針の先端が尖っておらず、成形不良を

生じている。一方で、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を使用した場合、先端まで加水分解ヒアルロン酸が充填されており、成形不良が改善されていることが分かる。また、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を使用した加水分解ヒアルロン酸への転写を14回繰り返したところ、1回目と14回目の転写結果に大きな差は見られなかった。同じ一つの金型で繰り返し転写が可能であることから、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型は有機系材料である加水分解ヒアルロン酸との離型性に優れ、金型の汚れ・剥離を防止できることが実証された。本実験では、手動のナノインプリント加工であったが、自動のナノインプリント装置を使用した場合、さらなる転写回数の向上が実現できる可能性があり、生産技術の確立を今後進める。

3.2. 加水分解ヒアルロン酸へのインプリント加工後の熱分解・化学変性

加水分解ヒアルロン酸系超微細マイクロニードル成形時の熱分解・化学変性を確認するため、80℃、90分間の加熱前後における加水分解ヒアルロン酸のフーリエ変換赤外

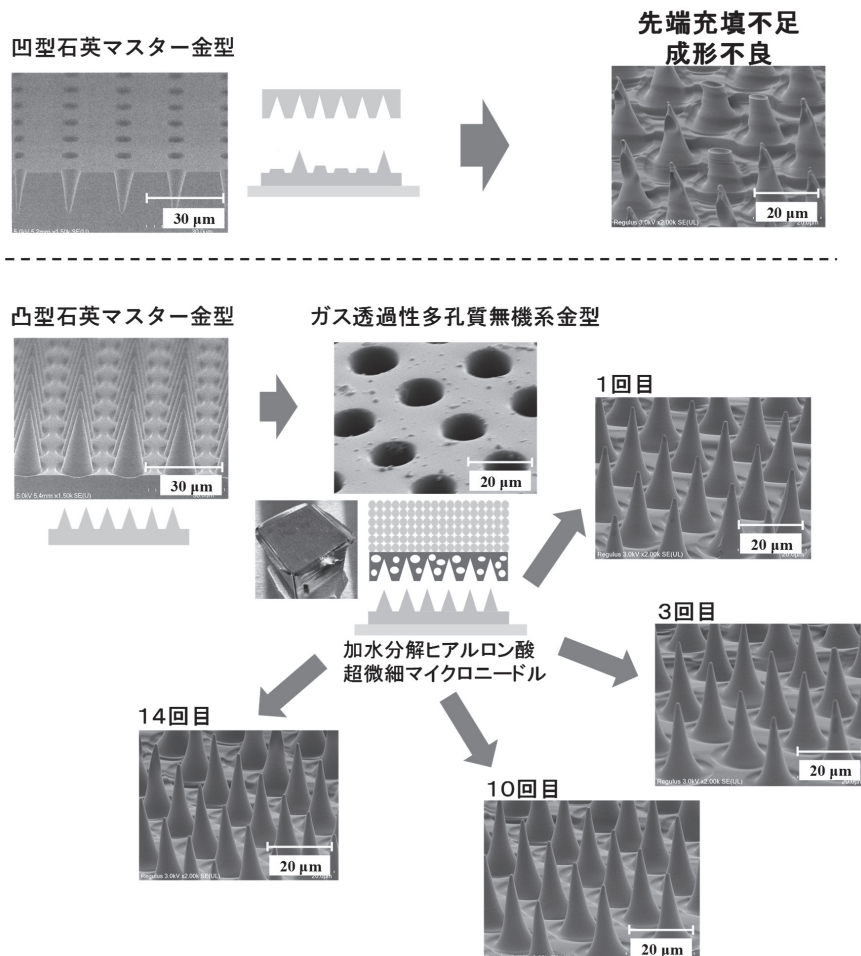


図5 TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を用いた加水分解ヒアルロン酸マイクロニードル形状のインプリント回数依存性

分光器 (FT-IR) スペクトルを測定した結果を図6に示す。加熱前のスペクトルでは 3400cm^{-1} (O-H結合)、 2880cm^{-1} (C-H結合)、 1740cm^{-1} (エステル)、 1649cm^{-1} (アミドI型)、 1554cm^{-1} (アミドII型)、 1045cm^{-1} (C-O結合) にピークが検出された。加熱後のスペクトルにおいても同様に 3375cm^{-1} (O-H結合)、 2885cm^{-1} (C-H結合)、 1735cm^{-1} (エステル)、 1640cm^{-1} (アミドI型)、 1551cm^{-1} (アミドII型)、 1033cm^{-1} (C-O結合) にピークが検出され、加熱による加水分解ヒアルロン酸の成分変化、化学変性はほとんど見られないことが分かった。

3. 3. 加水分解ヒアルロン酸の超微細マイクロニードルの溶解挙動

加水分解ヒアルロン酸の超微細マイクロニードル溶解挙動を環境試験装置により測定した結果を図7に示す。(a)

及び (b) は、底面の一辺の長さが $364\mu\text{m}$ 、高さが $346\mu\text{m}$ の市販マイクロニードル、(d) は、直径が約 $13\mu\text{m}$ 、高さが $24\mu\text{m}$ の超微細マイクロニードルの走査電子顕微鏡の画像である。市販のマイクロニードルの先端は尖っておらず、加水分解ヒアルロン酸超微細マイクロニードルの先端と比較して平坦である。

また、 31°C 、湿度 $90\sim 95\%$ の環境下で静置した際の各マイクロニードルの溶解挙動について、(e) 加水分解ヒアルロン酸素材の超微細マイクロニードル (無添加) は、(c) ヒアルロン酸ナトリウムのほかに、高湿度下で溶解しやすい吸湿性を持つグリセリンやブチレングリコールなどの各種添加物を配合した市販のマイクロニードルと同様に、35分間で体積の 60% 以上が溶解していた。したがって、加水分解ヒアルロン酸素材の超微細マイクロニードルは、溶解を促進する添加剤不使用であるにも関わらず、よ

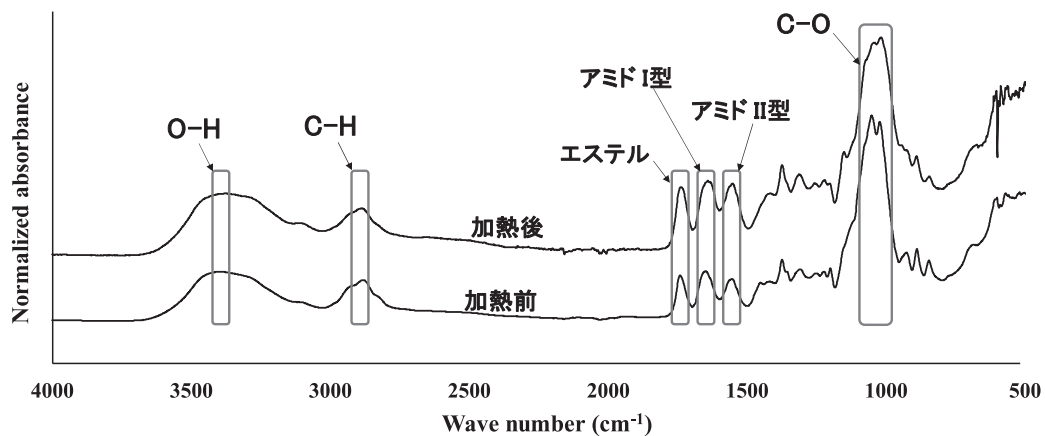


図6 インプリントによる成形加熱前後での高純度加水分解ヒアルロン酸の化学変性分析

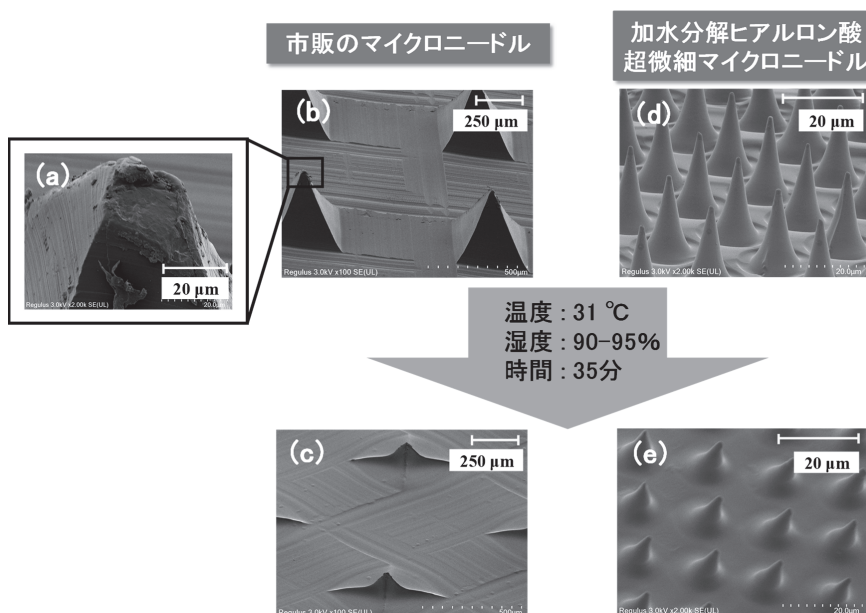


図7 恒温高湿度環境下でのマイクロニードルの溶解挙動の比較

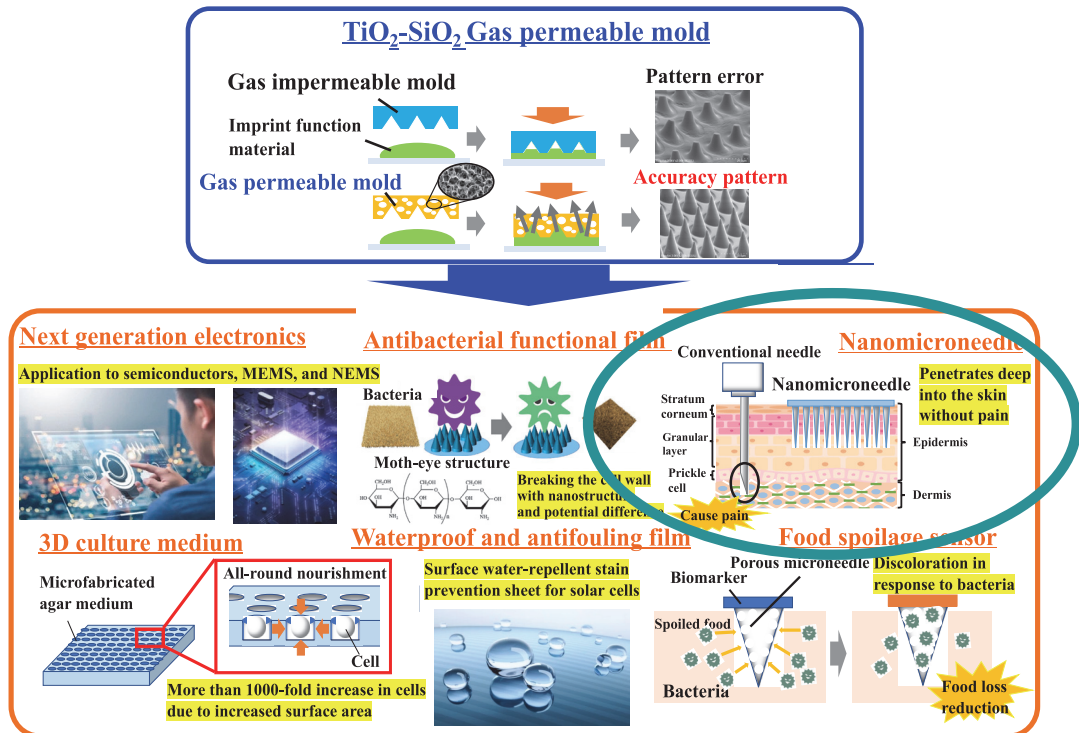


図 8 TiO₂-SiO₂ 系ガス透過性多孔質無機系金型で切り開くナノ加工による素材表面の機能発現

り短時間で皮膚に作用する点で有利であることが分かった。試作した加水分解ヒアルロン酸系超微細マイクロニードルは、真皮に届かず痛みを伴わず、②1時間以内で溶解し、③皮膚にまんべんなく浸透させる高溶解型無痛ナノマイクロニードルとなる初期的な学術成果が得られた。

4. 考察・まとめ

次世代の化粧品・美容製品の差別化・高付加価値化を鍵となる「浸透性」を画期的に改善できる1 cm²当たり100万本以上の高溶解型無痛ナノマイクロニードルを目指して、新たに分子設計を施したTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型による、化粧品用の超微細マイクロニードルパッチの初期的な生産技術を提案できた¹³⁾。具体的には、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型の活用により、従来の約20分の1のサイズの超微細マイクロニードルの成形が実現できることを確認し、評価にて優れた溶解性及び熱安定性を評価した。マウスやブタ等を用いた皮膚への浸透性・有効性の評価など、より高精度な生体適合性評価を今後行う。本研究成果は、化粧品分野にとどまらず、高純度加水分解ヒアルロン酸を基材・マトリクスとして、インスリン等の高分子量バイオ医薬品・薬剤を塗布またはヒアルロン酸溶液に含有させ微細加工をすることにより、自己投与可能かつ痛みを伴わない経皮投与製剤への展開が期待できると思われる。

また、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型は、酸

化チタンと酸化ケイ素のハイブリッド化によるフレキシブル性の制御に優れる利点があり、金型表層の多孔質化による優れた水・ガスを除去できるガス透過性を有することから、複雑な微細構造の離型を可能とし、成形できる構造の多様化が期待できると考えられる¹⁴⁾。具体的には、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を用いたエレクトロニクスからライフサイエンス用途への微細加工技術の具体的な期待される用途を図8に示す。超微細マイクロニードルの製造の他にも、モスアイ構造を付与した抗菌性ナノ突起フィルムや細胞の成長を促進する3次元培養培地、食品腐敗を検知し食品ロスの低減に貢献できる食品腐敗センサーへの応用が期待され、幅広い分野への用途展開を加速していくことにより新たな社会基盤の構築が進むことが予想される。

(引用文献)

- 1) I. Saha, V. K. Rai, Carbohydrate Polymers 267, 118168 (2021).
- 2) S. Miura, R. Yamagishi, R. Miyazaki, K. Yasuda, Y. Kawano, Y. Yokoyama, N. Sugino, T. Kameda, S. Takei, Gels, 8, 785 (2022).
- 3) H. Zhou, D. Luo, D. Chen, X. Tan, X. Bai, Z. Liu, X. Yang, W. Liu, Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 14, 867 (2021).
- 4) X. Chen, L. Zhu, R. Li, L. Pang, S. Zhu, J. Ma, L. Du,

- Y. Jin, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 151, 105410 (2020).
- 5) A. Liatsopoulou, A. Varvaresou, F. Mellou, E. Protopapa, *International Journal of Cosmetic Science*, 45(2), 117 (2023).
- 6) D. Park, H. Park, J. Seo, S. Lee, *Ultrasonics*, 54 (1), 56 (2014).
- 7) J. D. Kim, M. Kim, H. Yang, K. Lee, H. Jung, *Journal of controlled release*, 170 (3), 430 (2013).
- 8) H. R. Nejad, A. Sadeqi, G. Kiaee, S. Sonkusale, *Microsystems & nanoengineering*, 4 (1), 1 (2018).
- 9) S. Takei, Kaori Yasuda, *Appl. Phys. Express*, 13106506 (2020).
- 10) S. Takei, *Applied Physics Express*, 12 (4), 046501 (2019).
- 11) S. Miura, R. Yamagishi, N. Sugino, Y. Yokoyama, R. Miyazaki, K. Yasuda, M. Ando, Y. Hachikubo, T. Murashita, T. Kameda, Y. Kawano, S. Takei, *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 36, 3 183 (2023).
- 12) R. Yamagishi, S. Miura, K. Yasuda, N. Sugino, T. Kameda, Y. Kawano, Y. Yokoyama, S. Takei, *Appl. Phys. Express*, 15, 046502 (2022).
- 13) R. Yamagishi, S. Miura, S. Takei, *COSMETIC STAGE Vol.18, No.1* (2023).
- 14) R. Yamagishi, S. Miura, M. Ando, Y. Hachikubo, T. Murashita, N. Sugino, T. Kameda, Y. Yokoyama, Y. Kawano, K. Yasuda, S. Takei, *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 36 (2), 83 (2023).

ペプチドマトリックスを用いた化粧品香料の超高感度センシング

東京工業大学

田中 祐圭

In recent years, the development of ultra-sensitive sensing technology for volatile organic compounds (VOCs) has extended beyond environmental monitoring to encompass a wide range of applications including cosmetics and food quality inspection, body odor analysis, fatigue and stress marker detection, and hazardous substance detection. In response, there has been significant progress in the development of compact devices targeting various VOCs using semiconductor manufacturing technologies such as MEMS. However, existing VOC sensors like gas chromatography have been unable to meet the demands for real-time detection, miniaturization, and ultra-sensitivity. Therefore, this study aims to create an ultra-sensitive bioelectronics VOC sensor that meets inspection needs by integrating target recognition molecule design techniques with biosensing technology on two-dimensional atomic thin films. Initially, peptides binding to nonanal, a major component of cosmetic fragrances and a key contributor to aging odor, were explored. Functional materials capable of efficiently capturing nonanal were developed by modifying the surface of ZnO nanowire arrays with these peptides. Furthermore, graphene field-effect transistor (GFET) sensing using peptides binding to other aldehyde molecules identified previously, such as benzaldehyde, demonstrated ultra-sensitive VOC detection.

1. 緒言

近年、揮発性有機化合物 (VOC) の超高感度センシングが注目されている。これは、環境モニタリングだけでなく、化粧品や食品の品質検査、体臭の分析、疲労やストレスのマーカーの検出、そして危険物の探知など、幅広い用途に期待されている (Chem Soc Rev. 2020;49:6364-401)。しかし、ガスクロマトグラフィーやイオンモビリティ質量分析などの既存の VOC センサは、リアルタイムの検出や小型化、超高感度などの検査ニーズに十分に答えられていない。

電解効果トランジスタ (FET) センサに用いられる電極表面では、溶液内のイオンが引き寄せられ、デバイ長と呼ばれる 10nm 程度の領域で電位の傾きが生じる。FET センサでは、この領域内に捉えた標的分子による微小な電位変化を検出することで高感度センシングが可能となる。したがって、センサ感度の向上には、グラフェンなどの電極表面に修飾される標的認識分子のサイズが重要である。しかし、一般的に利用される標的認識分子である抗体は、分子サイズが 10-15nm 程度と大きいため、既存の界面分子設計ではグラフェンがもつ優れた導電性を最大限活かしたセンシングを実現することが難しい状況である (図 1)。そのため、抗体と同等の標的認識能を有し、かつ抗

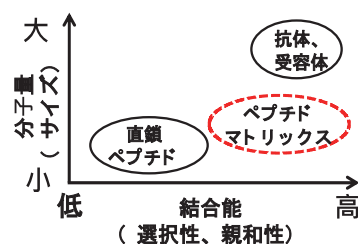


図1 ペプチドマトリックスがもつ分子特性と標的結合能の模式図

体よりもサイズの小さい分子設計が可能となれば、超高感度 VOC センサの開発が期待される。

これまで、申請者はアミノ酸が 5~20 程度繋がった様々な標的認識ペプチドについて研究を進めてきた¹⁻³⁾。しかしながら、これらの直鎖ペプチドは一般に優れた保存安定性をもつものの、標的への特異性や親和性に課題がある。このため、申請者はシステインを両端に付与した機能性ペプチドを開発した。システインはチオール (SH) 基をもつため、このペプチドを材料表面に滴下すると、各ペプチド分子が S-S 結合により繋がった複雑な構造を形成する。このマトリックス構造を標的分子との結合界面に利用すると、サイズの大きい類似分子には結合せず、標的小分子を複数のペプチドで同時に捉えることが可能となる。実際に、このペプチドマトリックスを表面プラズモン共鳴 (SPR) センサ基板上で合成したところ、標的小分子トリニトロトルエン (TNT) に対して、抗体に匹敵する結合親和性 ($KD=10.1$ nM) を示した⁴⁾。このような特性をもつペプチドマトリックスは、グラフェン FET による超高感度 VOC 検出に求められる理想的な界面分子となる。

そこで本研究では、これまでに開発を進めている標的認



Ultra-sensitive sensing of cosmetic fragrances using peptide matrices

Masayoshi Tanaka

Tokyo Institute of Technology

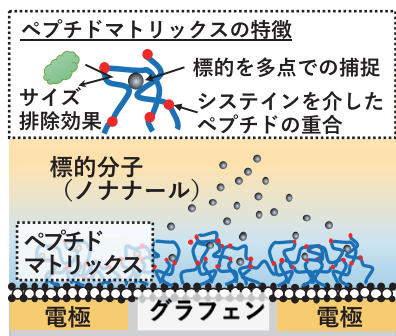


図2 開発するペプチドマトリックス修飾グラフェンFETによる超高感度VOCセンサの概要

識分子の設計技術を用い、検査ニーズを満たすこれまでにない超高感度VOCセンサを創出することを目的とした(図2)。

2. 方法

2.1. VOC結合ペプチドの探索

ノナフルエン結合性ペプチドの探索には、ファージディスプレイライブラリー (NEW ENGLAND BIOLABS, Phage display library kit) を使用した。最初に、カバーガラスをMilliQ水とエタノールで2回ずつ洗浄して70℃で1時間乾燥させた。次に70%エタノール中に0.1 Mの濃度となるようにノナフルエンを溶解し、洗浄したカバーガラスの上に400 μLスポットし、ガラス表面全体に引き伸ばした。その状態で30分間静置し、エタノールの蒸発とともにノナフルエンを吸着させた。その後、7残基のランダムペプチドを提示しているファージ溶液を滴下し、60分静置後、Tris buffered saline (TBS, pH7.4) で6回洗浄した。次に、Gly-HCl buffer (pH2.6) を500 μLをスポットし、20分間静置することで強固にノナフルエン修飾基板に吸着したファージを回収した。ファージDNAを回収しDNA配列を取得することで、ノナフルエン修飾基板に高い結合能をもつペプチド配列を同定した。

2.2. ZnOナノワイヤアレイの合成とペプチド修飾

シリコン基板の上にスパッタリングによってTi薄膜、Au薄膜、ZnO薄膜を順に形成し、完全に風乾させた後、窒素ガスで不純物を除いた。その後、0.9%のポリエチレンイミン、6mMヘキサメチレンテトラミン (HMTA)、24 mM硝酸亜鉛六水和物をMilliQに溶解した反応液に基板を浸漬し、ナノワイヤアレイを伸長させた。伸長したナノワイヤアレイは、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察され、その表面積を算出した。

合成されたZnOナノワイヤアレイを同定されたノナフルエン結合性ペプチドで修飾した。具体的には、3-aminopropyl-tri-ethoxy-silane (APTES, 1%) を調製し、15分間超音波攪拌を行い、その後ZnOナノワイヤアレイ基板を浸漬し、30分間反応させた。反応後、MilliQに1回ディップし、100℃で1時間加熱することで焼結した。その後、基板をMilliQとエタノールでそれぞれ2回洗浄し、70℃で一晩乾燥させた(図3)。

ペプチド溶液 (5 mM in DMF)、HBTU 10 mM、DIEA 20 mM、となるよう各試薬を溶解し、アミノ基修飾したZnOナノワイヤアレイ基板を浸漬させ2時間反応させた。反応後、DMF、メタノールでそれぞれ4回洗浄し、風乾した。

主鎖を保護するFmoc基は、20%のpiperidineに50分間浸漬させることで脱保護した。脱保護した溶液は回収し、301 nmでの吸光度を測定することで、修飾されたペプチド量を定量した。

2.3. GC/MSによるペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイのノナフルエン捕捉量定量測定

作製したペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイのノナフルエン捕捉能を評価するために、飽和ノナフルエン蒸気 (p=49.3 Pa) に5分間暴露した。その後、GC/MSによって捕捉されたノナフルエン量を定量し、ペプチド修飾前後でのノナフルエン捕捉量を比較した。バイアル瓶の中に針金で籠を作り、ペプチド修飾基板を籠の内部に入れ、バイアル瓶に液体のノナフルエンを加えることにより、飽和ノナフルエン蒸

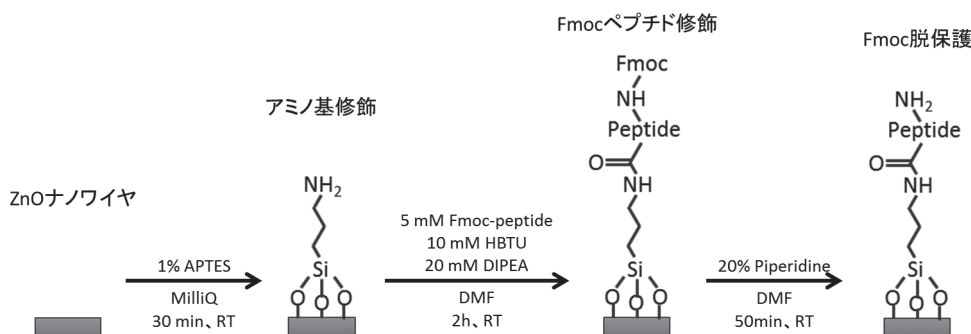


図3 ZnOナノワイヤアレイへのペプチド修飾方法

気にペプチド修飾ナノワイヤアレイ基板を暴露した。その後、400℃で20分加熱することで吸着したノナナールを脱離させ、GC/MSで気相内のノナナールを計測した。

2.4. ペプチドを利用したベンズアルデヒドのGFETセンシング

GFETを使用して、ペプチドの結合特性を評価した。単層グラフェンは熱化学気相合成法で合成され、リソグラフィ技術を用いてマイクロ電極を接触させることで、電気伝導を測定した。このGFETを電気化学セル中に設置することで、グラフェンに適宜電圧を印加することが可能となる。GFET表面に自己組織的にペプチドを修飾し、ベンズアルデヒドの結合応答をグラフェンの電気伝導率変化をもとにリアルタイム測定した。標的分子に対する標的分子の濃度依存性 (1 pM~10 nM) から結合特性を定量的に評価するとともに、電気伝導率の測度論的な解析を実施した。

3. 結果と考察

3.1. ノナナール結合ペプチドの探索

ノナナール修飾基板に対して、ファージディスプレイライブラリーを用いたところ、今回解析した24クローンのうち、全ての配列がペプチドXであった。そのため、この配列Xは分子内に酸性アミノ酸も塩基性アミノ酸ももたず、分子内での構造を取りにくい、比較的自由度の高い疎水性な物性をもっていることが考えられた。今回標的とするノナナールは疎水性の強い炭化水素鎖の部分と、極性及びマイナスチャージが強いアルデヒド基を有している。そのため結合部位としては、ノナナールの分子サイズ (約アミノ酸3残基) 程度の疎水性の高い領域に対して結合していると考えられる。今回の配列Xのうち、N末端側にこのような特性に該当する領域があることから、この部位がノナナール結合領域であると考えられた。

3.2. ZnOナノワイヤアレイ合成とペプチド修飾

合成されたナノワイヤアレイのSEM画像からナノワイヤの直径と長さを算出したところ、それぞれ平均すると直径約500 nm、長さ約7μmと見積もられた。そこから算出される表面積は、基板1 mm²あたり約20 mm²である。このことから、ナノワイヤアレイ基板を用いることにより、ノナナール捕捉量が平板と比べて最大で20倍に向上する可能性が見込まれるが、現実にはナノワイヤアレイ間のスペースは物質移動が制限され、反応効率が低下すると考えられる。

ここで得られたナノワイヤアレイにペプチドXを修飾し、その密度を算出したところ、69.1 pmol/mm²であった。これは平面ガラス基板を用いた際の修飾密度11.2 pmol/

mm²と比較して約5倍の密度であった。これによりナノワイヤ構造により表面積を増加させることで単位面積あたりのペプチド修飾密度を向上できることが示された。一方で表面積としては20倍あるのに対して、修飾密度の向上は6倍程度であった。これは、ナノワイヤアレイ上部には比較的大きな間隙が存在するのに対し、根元付近では非常に密になっており、ペプチドなどの分子の物質移動が制限され、修飾効率が低下している可能性がある。ペプチドの分子サイズは、7残基ペプチドで1.5 nm程度であり、今回使用したナノワイヤアレイの間隙と比較すると十分小さな分子であるが、ナノワイヤ表面には活性点 (アミノ基) が無数に存在している点、静置して反応させていることから、物質移動が拡散による点を考慮すると、ナノワイヤ下部には未反応点がかかり存在する可能性がある。よりペプチド修飾密度の向上が求められた場合は、この辺りの検討が必要と考えられた。

3.3. ペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイを用いたノナナールの捕捉

ノナナール結合候補ペプチドX及びコントロールペプチドAAAAを修飾したZnOナノワイヤアレイ基板を加えて、ノナナール吸着量の評価をGC-MSを用いて行った。

その結果、ペプチド配列Xを修飾したZnOナノワイヤアレイ基板では、ノナナール捕捉量がネガティブコントロールであるAAAA修飾基板に対して8.27倍向上することが示された (図4)。従来行われてきた芳香族化合物検出や、アルコール類や酢酸、アンモニアといった極性の強い小分子の検出のみならず、疎水性が強く特徴的な官能基の少ない揮発性有機物に対しても特定のアミノ酸配列を有するペプチドを分子認識プローブとして利用することで、デバイスの捕捉・濃縮効率を高めることが可能であることを示すものである。

3.4. ペプチドを利用したベンズアルデヒドのGFETセンシング

これまでに同定してきたベンズアルデヒド結合性ペプチ

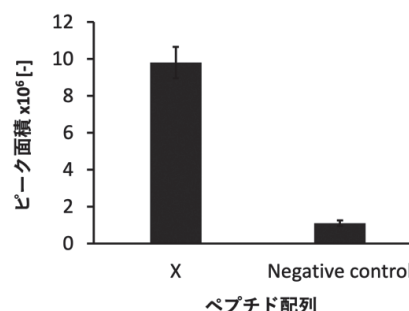


図4 ペプチド修飾ZnOナノワイヤアレイを用いたノナナールの捕捉

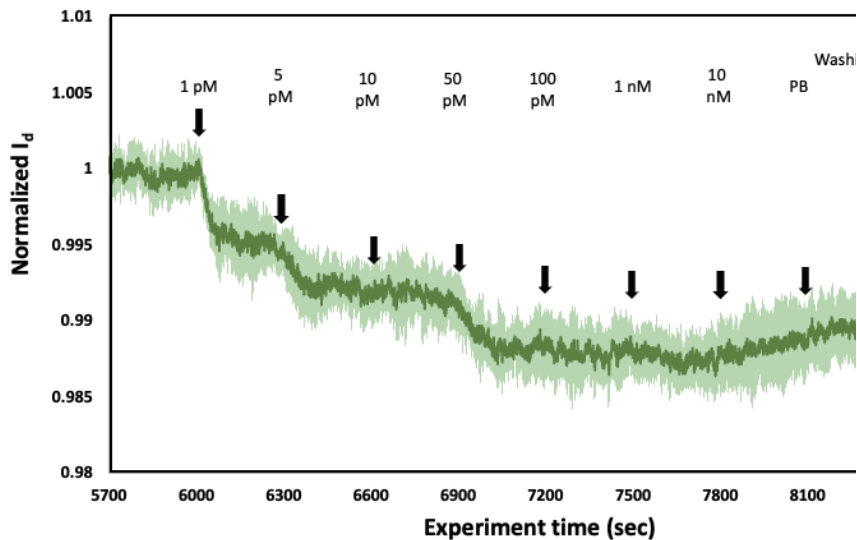


図5 ベンズアルデヒド修飾 GFET を用いたベンズアルデヒド検出

ドを利用したGFETセンシングについても検討を進めた。今回用いたペプチド配列Yとグラフェン結合配列を連結した二機能性ペプチドを調製し、これをグラフェン表面に滴下することで表面を機能化し、異なる濃度のベンズアルデヒドに対する応答性評価をもとに乖離定数を評価した。その結果、ベンズアルデヒドとの乖離定数が数pMであることが示され、非常に優れた結合親和性を保つことが示された。また1 pMのベンズアルデヒドに対しても応答が得られており、ベンズアルデヒドを超高感度に検出できるセンシング技術を開発することができた(図5)。

4. まとめ

本研究により、これまでに報告例の非常に乏しいVOCに対するペプチドプローブを探索する方法を確立し、同定されたペプチドを用いることで気相のVOCを濃縮回収できること、そしてGFETセンサ表面を修飾することでVOCを超高感度に検出できることが確認された。今後は、標的選択性の評価、そしてこれまでに研究を進めているペプチドマトリックス構造を利用することによる結合親和性、選択性の向上に向けた研究開発が進められることが期待される。また本研究により微細加工によるVOCの濃縮、そして小型化が容易なセンシング技術であるGFETへの適用可能性が示されたことは、今後VOCを携帯可能なレベルでの小型センサを利用したリアルタイム検出の足がかりとなる研究成果である。そのため今後ますます健康、安全などに関わるセンシング技術の開発が求められる中で、本

研究によって得られた成果は非常に波及効果が大きく、更なる研究の発展が強く期待される。

(引用文献)

- 1) Tanaka, M.; Hayashi, M.; Roach, L.; Kiriki, Y.; Kadonosono, T.; Nomoto, T.; Nishiyama, N.; Choi, J.; Critchley, K.; Evans, S. D.; Okochi, M. Synthesis of Near-Infrared Absorbing Triangular Au Nanoplates Using Biomineralisation Peptides. *Acta Biomater.* **2021**, *131*, 519-531. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2021.06.010>.
- 2) Suwatthanarak, T.; Tanaka, M.; Miyamoto, Y.; Miyado, K.; Okochi, M. Inhibition of Cancer-Cell Migration by Tetraspanin CD9-Binding Peptide. *Chem. Commun.* **2021**, *57* (40), 4906-4909. <https://doi.org/10.1039/D1CC01295A>.
- 3) Yoshikawa, K.; Saito, S.; Kadonosono, T.; Tanaka, M.; Okochi, M. Osmotic Stress Induces the Formation of Migrasome-like Vesicles. *FEBS Lett.* **2024**, *598* (4), 437-445. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14816>.
- 4) Komikawa, T.; Tanaka, M.; Yanai, K.; Johnson, B. R. G.; Critchley, K.; Onodera, T.; Evans, S. D.; Toko, K.; Okochi, M. A Bioinspired Peptide Matrix for the Detection of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *153*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112030>.

ヒアルロン酸・コラーゲンのナノ粒子化による 新規皮膚浸透促進技術の開発とそのメカニズムの解明

佐賀大学

徳留 嘉寛

It is known that hyaluronic acid (HA) and collagen (COL) in the skin decrease with aging and environmental changes, causing wrinkles. It is important to add reduced HA and COL, but it is difficult to deliver water-soluble polymers from the skin into the body. Therefore, in this study, hyaluronic acid collagen nanoparticles were prepared by the poly-ion complex method. Particle size was increase, zeta potential did not change, and PDI was increase, depending on buffer concentration. Transmission electron microscopy images showed that the particles had a particle-like structure. Skin permeability was confirmed with nanoparticles made of fluorescently labeled collagen. As a result, fluorescence was observed in the skin with nanoparticulated collagen compared to non-particulated collagen. Hyaluronic acid collagen nanoparticles were shown to be a potential material for improving skin penetration of water-soluble polymers.

1. 緒言

ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid, HA) は皮膚や関節、脳、血液などに広く分布し、全身のHAのうち約50%が皮膚に存在している¹⁾。D-グルクロン酸とN-アセチル-D-グルコサミンの二糖単位が連結したアニオン性グリコサミノグリカンであり、生体で最大の水溶性高分子ポリマーである²⁾。コラーゲン (Collagen, COL) は皮膚、血管、骨組織など、体を構成するタンパク質の30%を占めており、真皮では約70%を占めている。COLを構成するアミノ酸はGly-Pro-Hypを中心としたGly-X-Yの繰り返し構造からなり、三本のポリペプチド鎖が三重らせん構造を形成している³⁾。COL線維に熱を加えることでタンパク変性を起こし、三重らせん構造が解離して一本鎖となる。変性後COLは酵素分解することで断片化され、コラーゲンペプチドへ変化することが知られている。COL線維の分子量は約300 kDaとされており、変性後COLの分子量は約100 kDa、COLペプチドは約0.1~10 kDaとされる。COLの種類は、皮膚の真皮や骨などに存在するI型COL、軟骨の主成分であるII型COLを代表として、現在約28種類のCOLが存在している⁴⁾。近年では人工臓器や人工皮膚などのバイオマテリアルとしての利用が増えている⁵⁾。

真皮中のHAやCOLは、加齢や紫外線暴露などの要因によって減少し、皮膚弾力性の低下を引き起こす^{6,7)}。これらの改善には、減少したHAやCOLを補充することが重要であるとされているが、HAやCOLは水溶性高分子

であるため受動拡散では角層を通過できない。現在、HAやCOLを皮膚に直接補充できる方法は、注入療法またはマイクロニードル⁸⁾を用いた場合のみとされている。また、現在多くの化粧品に配合されているHAやCOLは、皮膚の表面に留まることで水分蒸散を防ぎ、保湿機能を担っている。

著者らは、ポリイオンコンプレックス(polyion complex : PIC) 技術を用いたヒアルロン酸ナノ粒子 (HANP) によってHAの皮膚浸透性の向上を報告している^{9,10)}。

本課題ではHAとCOLの相乗効果を期待し、PIC技術によるヒアルロン酸・コラーゲンナノ粒子 (HACOLNP) による新規皮膚浸透促進技術の開発とそのメカニズムの解明を目的としている。特にこの研究課題ではHAとCOLから成るナノ粒子の調製と物性評価結果、また、本課題では特にCOLの皮膚浸透性を評価した。

2. 方法

2.1. 実験材料

ヒアルロン酸ナトリウム (平均分子量1,200 kDa) は化粧品グレードのものを入手し使用した。水溶性コラーゲンマリンジェンS-06 (PF) は新田ゼラチン株式会社 (大阪、日本) から供与された。蛍光標識コラーゲンはコスモ・バイオ (東京、日本) から購入した。試薬は特級グレードのものを精製せずにそのまま用いた。

2.2. ヒアルロン酸・コラーゲンナノ粒子の調製

ヒアルロン酸とコラーゲンの水溶液を調製し、それを攪拌混合することで粒子を得た。蛍光標識コラーゲンナノ粒子は同様に蛍光標識コラーゲン水溶液とヒアルロン酸水溶液を攪拌混合することで得た。

2.3. 粒子物性の測定

粒子径、多分散指数 (PDI) は動的光散乱法で、ゼータ



Development of novel skin penetration enhancement technology by nanoparticulation of hyaluronic acid and collagen and its mechanism

Yoshihiro Tokudome

Laboratory of Cosmetic Sciences, Saga University

電位はレーザードップラー電気泳動法により、ゼータサイザーウルトラ (Malvern、UK) により測定した。

2.4. 透過型電子顕微鏡観察

粒子の形態観察は透過型電子顕微鏡を用い、ネガティブ染色法で行った。ナノ粒子水溶液をカーボンコーティングされた銅グリッド (400 メッシュ) に吸収させ、2% タングステン酸溶液 (pH7.0) により 15 秒染色した。観察は JEM-1400 Plus (日本電子株式会社、東京、日本) により加速電圧 100 kV で測定した。画像は CCD カメラ (EM-14830RUBY2、日本電子株式会社) により撮影した。

2.5. 皮膚浸透性の確認

縦型拡散セル (有効透過面積 0.785 cm²) にヒト摘出皮膚を装着し、24 時間の皮膚透過試験を行った。拡散セルは 32℃ で保持し、開放系で、ドナー溶液はクエン酸 Buffer 群、非粒子コラーゲン、粒子化した HACOL 群または粒子化した FITC 標識コラーゲン・ヒアルロン酸とし、それぞれを 0.2 mL ずつ適用した。

試験開始 24 時間後に皮膚を採取し、表面をよく洗ったあとに凍結切片を作成した。FITC 標識 COLHA 粒子や FITC コラーゲンを適用した群は、蛍光顕微鏡で観察した。

3. 結果と考察

3.1. ナノ粒子の物性評価

1, 3, 15, 20, 30 そして 50mM のクエン酸緩衝液 (pH4) 中でヒアルロン酸・コラーゲンナノ粒子を調製した。調製する際のクエン酸緩衝液濃度が高くなるにつれてナノ粒子の粒子径は大きくなった (Fig. 1a)。ゼータ電位は調製する際の緩衝液濃度には大きな影響は受けなかった (Fig. 1b)。粒子径の分散を示す PDI は調製した緩衝液濃度が高くなるに従って大きくなり、特に 30 mM を超える濃度のときに PDI は大きくなった (Fig. 1c)。今回の試験で用いている粒子はイオンコンプレックスという技術により調製している。ポリイオンコンプレックスは陽または陰イオンを有する高分子を水溶液として混合した際に、互いのイオンを打ち消すように反応することで粒子化すると考えられている。イオン濃度が低いときはヒアルロン酸とコラーゲンのイオンが反応して粒子化していることが想定されるが、高い濃度の緩衝液中ではその緩衝液に含まれるイオンが粒子化を妨げている可能性が考えられる。我々の以前の検討で、ヒアルロン酸とポリリシンからなる粒子をリン酸緩衝液中に混合した際に、粒子が破壊されることを報告している¹⁰⁾ので、今回もそのようなメカニズムで粒子が不安定

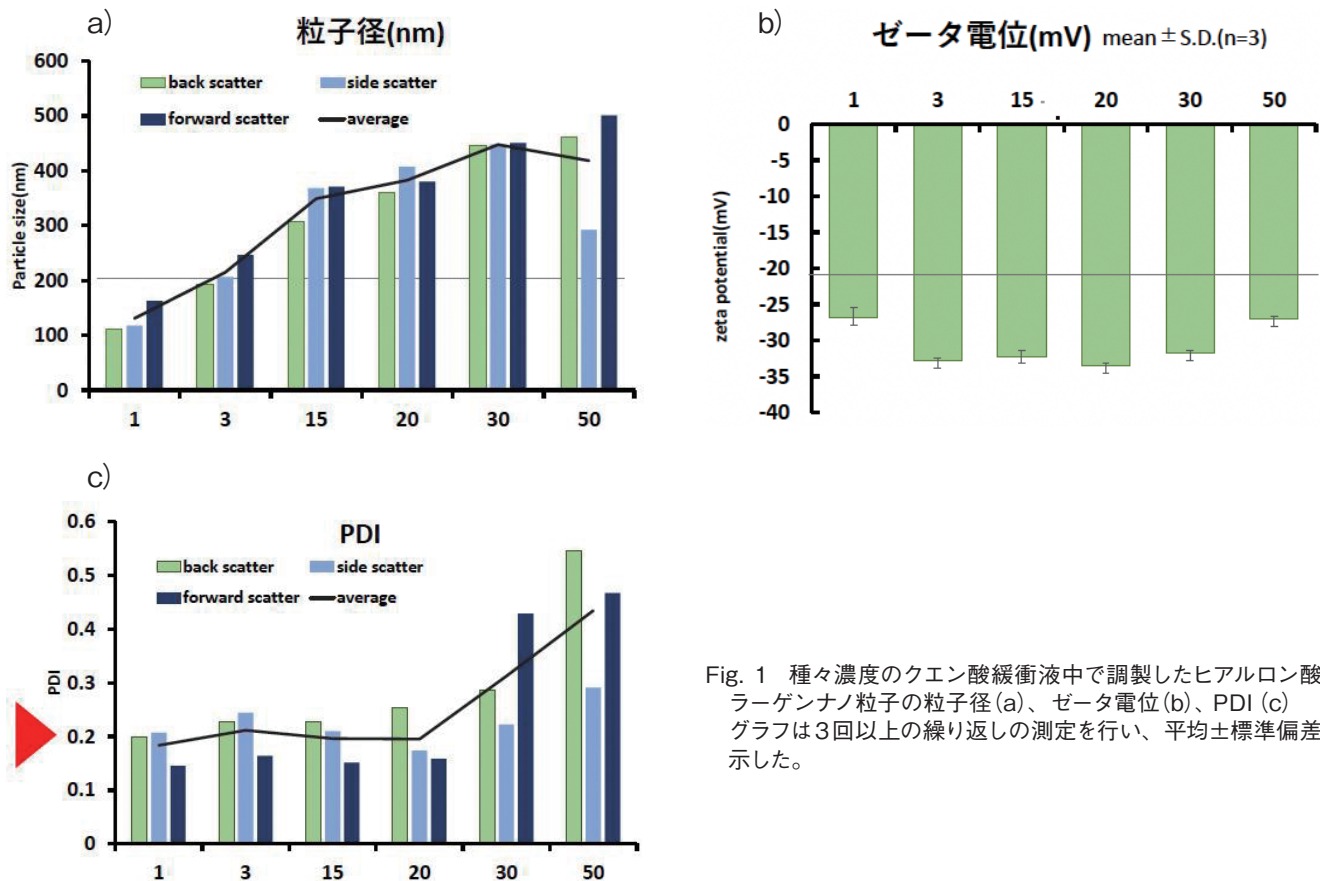


Fig. 1 種々濃度のクエン酸緩衝液中で調製したヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子の粒子径 (a)、ゼータ電位 (b)、PDI (c) グラフは3回以上の繰り返しの測定を行い、平均±標準偏差で示した。

Table 1 ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子と FITC コラーゲンヒアルロン酸の粒子径、ゼータ電位、PDI

サンプル	粒子径(nm)	PDI	ゼータ(mV)
HACOLNP	189.8±2.26	0.224±0.016	-32.86±0.44
FITC-COLHANP	178.6±8.13	0.264±0.01	-28.793±0.73

グラフは3回以上の繰り返しの測定を行い、平均±標準偏差で示した。

化している可能性がある。また、別に蛍光標識したコラーゲンを使用してヒアルロン酸コラーゲン粒子を調製した。その結果、非標識コラーゲンを使用したときと大きく変わらない物性をもつ粒子が調製された (Table 1)。

3.2. ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子の透過型電子顕微鏡観察

調製したナノ粒子を透過型電子顕微鏡で観察した。画像を Fig. 2 に示す。粒子は比較的球状であり、粒子の表面には斑点のような模様があることがわかった。今回行ったネガティブ染色の場合、水に親和性の高いところは黒く、水に親和性の低いところは白く観察される。今回はイオンコンプレックスで粒子を作成しているため、白く観察されているところは完全に陽イオンと陰イオンが電荷を打ち消し合っているところであり、黒い部分はイオンが遊離していることが推察される。このようにヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子の表面は均一な電荷状態ではないことが想定された。

3.3. ヒアルロン酸コラーゲン粒子の皮膚浸透性

蛍光標識されたコラーゲンをを用いてヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子を調製し、ヒト皮膚を介した皮膚浸透試験を行った。24時間後に皮膚表面を洗浄、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で皮膚中の蛍光を測定した (Fig. 3)。

調製した Buffer 液、非粒子化コラーゲンと比較して、ナ

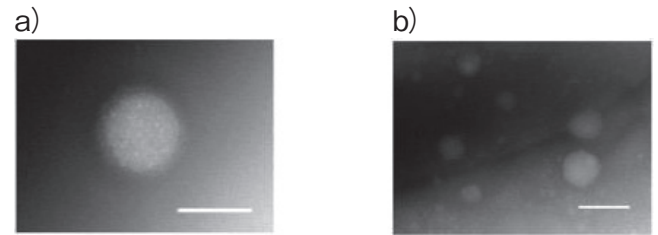


Fig. 2 ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子の透過型電子顕微鏡画像。粒子はネガティブ染色法で観察した。スケールバーは 200 nm を示した。

ノ粒子化したコラーゲンでは皮膚中に強い蛍光が観察された。興味深いことに非粒子化コラーゲンでは角層部分に強い蛍光が観察されたが、粒子化するとその蛍光は比較的弱くなった。これらのことからコラーゲンは粒子化することで効率的に皮膚内に浸透することが示唆される結果が得られた。我々は以前に粒子化したヒアルロン酸が皮膚内に浸透している可能性を報告しており、ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子はヒアルロン酸とコラーゲンを同時に皮膚内に送達可能な非常に興味深い材料であることが推察された。しかし、この蛍光画像の数値化ができておらず、定量的な評価ができていないことが今後の課題である。また、もう一つの課題として、この蛍光が蛍光標識コラーゲン由来であることを証明することが必要であり、サイズ排除クロマトグラフィーなどでの検討が必要である。こちらも現在検討を進めている。なぜ、粒子化することで高分子のコラーゲンが皮膚浸透するのかは議論の対象である。一般にイオン性化合物は皮膚浸透性が低いとされる。イオンコンプレックスを作ることで一部のイオンが打ち消されることで皮膚への浸透経路が変わり、皮膚浸透性が高まった可能性もあるが詳細は不明であり、今後の検討を要する。

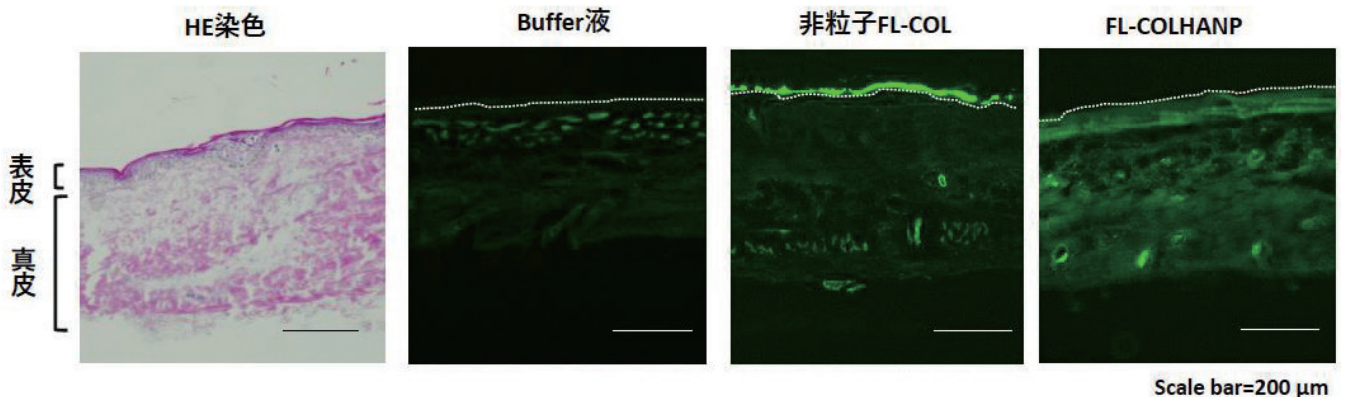


Fig. 3 FITC コラーゲンヒアルロン酸(ヒアルロン酸コラーゲン)ナノ粒子の皮膚浸透性。緑色は FITC コラーゲン由来である。スケールバーは 200μm を示した。

4. 総括

ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子を調製し、ヒト皮膚に適用したところ非粒子化コラーゲンと比較して粒子化したコラーゲンは皮膚浸透性が高い可能性が示された。また、以前の我々の検討とも合わせて考えると、ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子はヒアルロン酸とコラーゲンを同時に皮膚内に浸透させる画期的なマテリアルであることが推察された。

謝辞

本研究の遂行にあたりご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Susan S., Antonei B. C., Robert S., Hyaluronidase expression in human skin fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 268-273 (1999).
- 2) Weissmann B., Meyer K., Sampson P., Linker A., Isolation of oligosaccharides enzymatically produced from hyaluronic acid., *J. Biol. Chem.*, 208, 417-429 (1954).
- 3) Rich A., Crick F. H. C., The molecular structure of collagen, *J. Mol. Biol.*, 3, 483-506 (1961).
- 4) Kadler K. E., Baldock C., Bella J., Boot-Handford R. P., Collagens at a glance, *J. Cell Sci.*, 120, 1955-1958 (2007).
- 5) Lee C. H., Singla A., Lee Y., Biomedical applications of collagen, *Int. J. Pharm.*, 221, 1-22 (2001).
- 6) Morifuji M., The beneficial role of functional food components in mitigating ultraviolet-induced skin damage, *Experimental Dermatol.*, 28, 28-31 (2019).
- 7) Kon A., Hyaluronan in the skin and its correlation with dermatopathology, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 22, 68-79 (2010).
- 8) Henry S., McAllister D. V., Allen M. G., Prausnitz M. R., Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, 87, 922-925 (2008).
- 9) Tokudome Y., Komi T., Omata A., Sekita M., A new strategy for the passive skin delivery of nanoparticulate, high molecular weight hyaluronic acid prepared by a polyion complex method, *Sci. Rep.*, 8, 2336 (2018).
- 10) Shigefuji M., Tokudome Y., Nanoparticulation of hyaluronic acid: A new skin penetration enhancing polyion complex formulation: Mechanism and future potential, *Materialia*, 14, 100879 (2020).

肌温度感受性を有する細胞増殖因子送達ナノ粒子の開発

広島大学大学院医系科学研究科

長瀬 健一

In this study, we aimed to develop basic fibroblast growth factor (bFGF)-releasing nanoparticles for regeneration of dermal tissue. The nanoparticles were prepared by electrospray a bFGF-dispersed poly(D,L-lactide-co-glycolide) emulsion. bFGF-loaded PLGA nanoparticles can be developed by optimizing the applied electrospray voltage and the oil: water ratio of the emulsion. The prepared nanoparticles exhibited prompt release at the initial duration and continuous gradual release at the subsequent duration. These results indicated that the prepared bFGF-releasing nanoparticles would effectively deliver bFGF to dermal tissue.

1. 緒言

現在、皮膚の再生医療において細胞増殖因子 (Growth Factor) を疾患部位に効果的に働かせて、疾病部位を治療する治療法が注目を集めている。これらの細胞増殖因子は日常的に皮膚に作用させることで、皮膚機能を効果的に改善することが可能となるため、化粧品への応用が期待されている。しかし、これらの細胞増殖因子を肌内部に効果的に作用させる手法が確立されておらず、化粧品としての有効利用はできていない。また、これらの細胞増殖因子は安定性が著しく低いため、化粧品の状態で、活性を安定に維持する方法が必要である。

そこで本研究では、これらの細胞増殖因子の活性を維持したまま、効果的に表皮、真皮へと送達する機能性ナノ粒子を開発する。細胞増殖因子を内包したポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体 (PLGA) の生分解性高分子から構成されるナノ粒子を、電圧をかけて微粒子を作製するエレクトロスプレー法¹⁻⁴⁾により作製する。これにより、細胞増殖因子を生分解性高分子内に内包することで活性を安定に維持することができる。これにより、細胞増殖因子を効果的に肌に作用させるナノ粒子の開発を行う。

2. 方法

2.1. エレクトロスプレーによるナノ粒子作製

PLGAをアセトン:エタノール=9:1の混合溶媒に、40℃で加熱攪拌しながら溶解し、0.2 w/vのポリマー溶液を作製した(図1)。また、bFGFはあらかじめ0.5 μg/

μLに分注し、凍結保存しているものを融解し、水を加えて0.25 μg/mLのbFGF水溶液を得た。PLGA溶液にbFGF水溶液とSpan 80を加えボルテックスで攪拌し、分散させた。作製したエマルジョンを5 mLプラスチックシリンドルに入れ、電界紡糸装置により電圧を印可しながらポリマー溶液をアルミホイルに噴霧するエレクトロスプレーによりナノ粒子を作製した(図1)。この時、エマルジョンの水相:油相の比率、印可電圧を変化させて作製した(表1)。

2.2. ナノ粒子の物性評価

2.2.1. ナノ粒子の形状観察

作製したナノ粒子の形状を電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM)により観察した。ナノ粒子をオスミニウムでコーティングし、FE-SEMによりナノ粒子の形状を観察した。ナノ粒子の粒子径は、FE-SEM画像をImageJによる画像処理により解析した。

2.2.2. ナノ粒子中のbFGF含有量の測定

クロロホルム1 mLおよび、超純水1 mLからなる混合溶媒を調整した。PLGA-bFGFを混合溶媒に入れ、短時間ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、1時間静置した後に水相を採取した。採取した水相中のタンパク質量をNanoOrange[®] Protein Quantitation Kitを用い、マイクロプレートリーダーにて蛍光を測定し、ナノ粒子が担持するbFGFの総量を測定した。

2.2.3. ナノ粒子のbFGF放出挙動

1 mLのPBS中に作製したbFGF含有ナノ粒子を浸漬し、37℃で振盪しながらインキュベートした。所定の時間に上澄み液を少量とり、NanoOrange[®] Protein Quantitation Kitを用いてサンプルの蛍光を測定し、PBS中に放出されたbFGFを定量した。

3. 結果および考察

3.1. 作製したナノ粒子の形状

エレクトロスプレーにより作製されたナノ粒子をFE-



Development of thermoresponsive nano-particle for effective delivery of growth factor

Kenichi Nagase

Graduate School of Biomedical and Health sciences, Hiroshima University

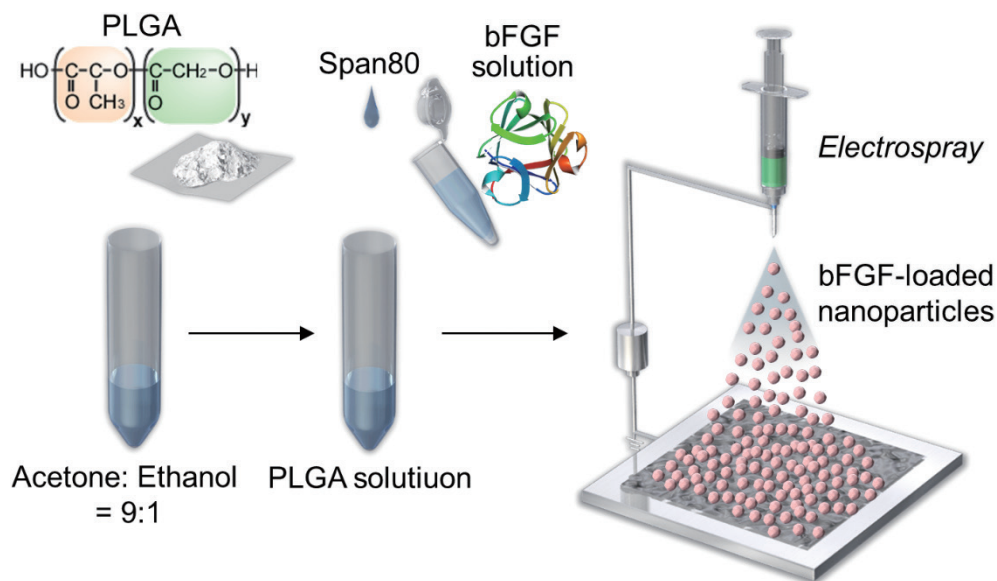


図1 エレクトロスプレーによるナノ粒子作製方法

表1 エレクトロスプレー条件

Code ^{a)}	PLGA concentration (w/v)	Volume ratio of oil phase and water phase (Oil phase: Water phase)	Applied voltage (kV)	Flow rate of emulsion (mL/h)	Spray time (min)
12kV-500	0.2	500:1	12.0	2.0	45
15kV-500	0.2	500:1	15.0	2.0	45
20kV-500	0.2	500:1	20.0	2.0	45
15kV-200	0.2	200:1	15.0	2.0	45

a) Named using the applied voltage and oil-to-water ratio.

SEMにより観察した (図2)。印加電圧が12.0 kVではエレクトロスプレーの電圧が不十分ではないため、粒子状にならなかった。印加電圧が15.0 kVの場合では粒子径が均一な凝集体を形成していることがわかった。また、印加電圧が20 kVの場合は、粒子径がより小さくなり単一の粒子としてアルミホイル状に分散して付着していることがわかった。この状態ではアルミホイルから回収するのが困難であるため、印可電圧は15 kVが最適であるとわかった。また、印可電圧15 kVでエマルジョンの油相：水相の比率を変化させたところ、O:W=500:1の方がO:W=200:1よりも粒子径が小さいことがわかった。これは、これは水溶液の比率が小さい方がより揮発性が高くなるためであると考えられる。

これらの結果より、印可電圧15.0 kV、油相：水相の比率O:W=500:1が均一なナノ粒子を作製するのに適したエレクトロスプレーの条件であることがわかった。

3.2. 作製したナノ粒子のbFGF含有量

作製したナノ粒子に含まれているbFGFの総量を測定した (表2)。印加電圧が高い15 kVで作製したナノ粒子の方が12 kVで作製したナノ粒子よりもbFGFの含有量が小さいことがわかった。これは、12 kVで作製したナノ粒子はシート状の構造を取っているため、体積が大きくなりbFGFの含有量も大きくなったと考えられる。また、油相の割合が小さい15kV-200の方がbFGFの量が小さくなった。これは、油相の割合が小さい15kV-200は粒子径が大きくなるが、粒子に含有されているbFGFの量は増えないことを示している。

3.3. 作製したナノ粒子のbFGF放出挙動

作製したナノ粒子の生理条件下でのbFGF放出挙動をリン酸緩衝液に浸漬することで観察した (図3)。24時間以内での放出挙動を比較すると、6時間で40%程度のbFGF

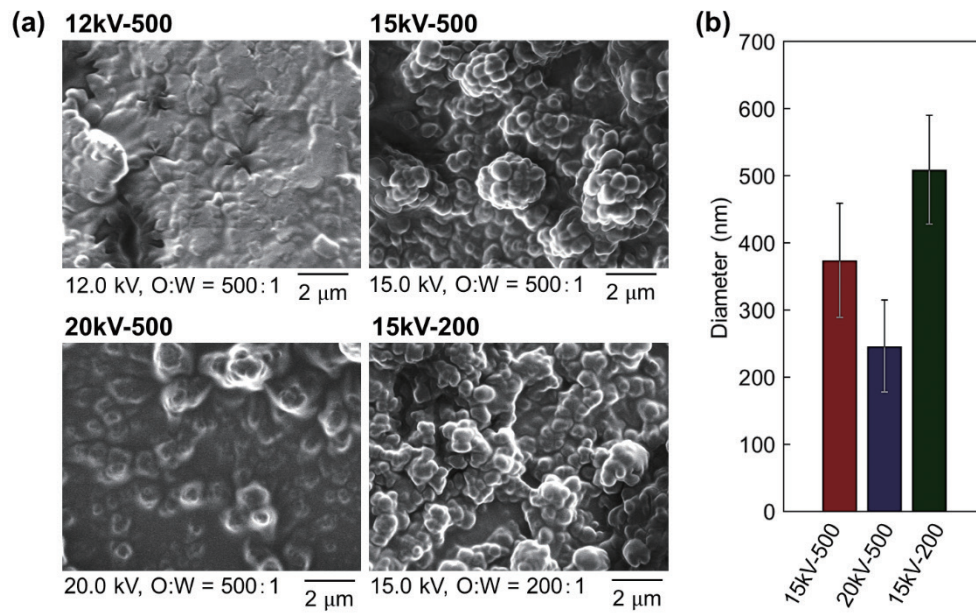


図2 FE-SEMによる作製ナノ粒子の形状評価

表2 ナノ粒子のbFGF含有量

Code ^{a)}	Amount of bFGF (ng)
12kV-500	819.73
15kV-500	740.33
15kV-200	651.73

a) Named using the applied voltage and oil-to-water ratio.

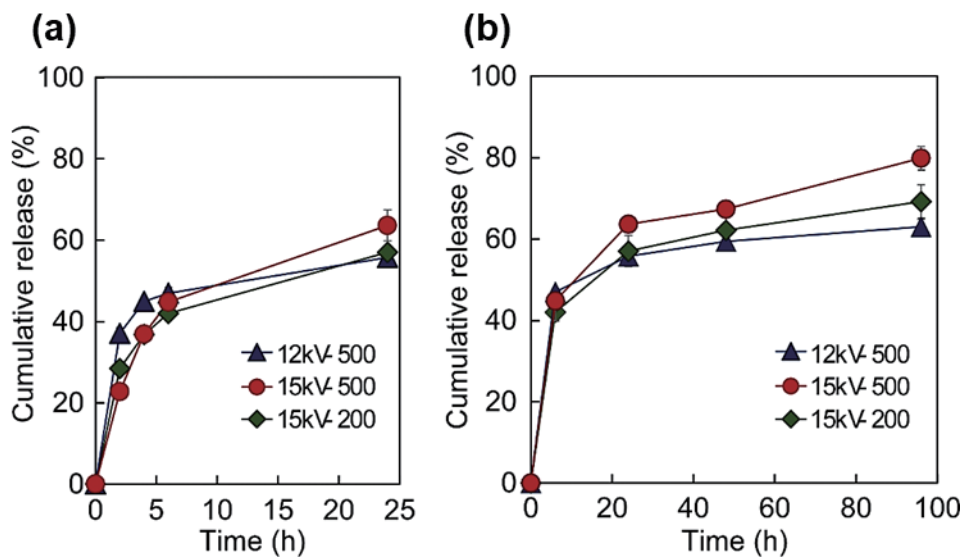


図3 ナノ粒子のbFGFの放出挙動の観察

を放出することがわかった。これはナノ粒子の表層付近に含有しているbFGFが放出されたためであると考えられる。96時間後までの放出挙動を観察したところ、12kV-500、15kV-200のbFGFの放出は24時間からそれほど変わらないのに対して、15kV-500のbFGF放出は約80%程度にまで上昇した。これは、15kV-500の粒子の形状が生理条件でのPLGAの分解とbFGFの放出に適しているためと考えられる。これらの結果より、15kV-500のナノ粒子が生体内でのbFGFの放出に適していることが示された。

4. 総括

本研究では、生分解性高分子であるPLGAで皮膚の再生を促すbFGFを内包したナノ粒子を作製した。様々な条件でエレクトロスプレーを行ったところ、印可電圧15kV、油相：水相の比率O：W = 500：1が均一なナノ粒子を作製するのに適した条件であることがわかった。また、bFGFの放出挙動を観察したところ、96時間で80%のbFGFの放出が可能であった。これらの結果より、作製したナノ粒

子は生体内で効果的なbFGF放出を促すことが示唆された。今後はナノ粒子の表面修飾による機能化により、さらなる機能性向上が期待できる。

(引用文献)

- 1) I. K. Shim, H. J. Chung, M. R. Jung, S. Y. Nam, S. Y. Lee, H. Lee, S. J. Heo, and S. J. Lee, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **102**, 3639-3648, (2014).
- 2) H.-J. Chung, J.-T. Kim, H.-J. Kim, H.-W. Kyung, P. Katila, J.-H. Lee, T.-H. Yang, Y.-I. Yang, and S.-J. Lee, *J. Control. Release*, **205**, 218-230, (2015).
- 3) K. Nagase, Y. Nagumo, M. Kim, H.-J. Kim, H.-W. Kyung, H.-J. Chung, H. Sekine, T. Shimizu, H. Kanazawa, T. Okano, S.-J. Lee, and M. Yamato, *Macromol. Biosci.*, **17**, 1700073, (2017).
- 4) K. Nagase, M. Nagaoka, Y. Nakano, and R. Utoh, *J. Control. Release*, **366**, 160-169, (2024).

微小血管系の多機能イメージングによる皮膚特性・機能の評価

山陽小野田市立山口東京理科大学工学部機械工学科

中道 友

It is known that there is a close relationship between skin function and microvascular structures and blood flow dynamics. To measure the microvascular structures and the blood flow dynamics, functional imaging with optical coherence tomography (OCT) has been attracting attention. OCT is a noninvasive micro-tomographic imaging technique based on low coherent interferometry of near-infrared light and can visualize the tissue structure of the skin, evaluate aging by visualizing capillaries, and measure functional information such as blood flow velocity. However, previous studies with OCT measured static functional information independently and thus were insufficient to evaluate skin functional properties. In other words, it is necessary to comprehensively analyze these dynamics to evaluate skin functional properties. Therefore, this study aimed to develop a novel method to evaluate skin functional properties by detecting multiple functional information of skin micro-vasculatures and by analyzing their dynamics. To realize this, I developed a novel functional OCT technique that can simultaneously detect micro-vasculatures, blood flow velocities, and blood flow angles. Furthermore, the technique was applied to human subjects, and the dynamics of micro-vasculatures and blood flows during stimulation were investigated. In this report, I report validation results of the developed technique and its application to human subjects during alcohol stimulation for evaluating alcohol tolerance.

1. 緒言

表皮、真皮、皮下組織から成る皮膚において、皮膚機能と組織内のミクロな血管構造・血流動態には密接な関係があることが知られている。例えば血管構造については、毛細血管およびリンパ管の構造が不安定化することによって、皮膚を構成する細胞への酸素や免疫細胞の運搬・回収が正しく行われず老廃物が溜まりやすくなることにより、加齢による皮膚老化を引き起こすことが報告されている¹⁾。また血流動態については、皮膚の血流量が年齢や血圧、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット、総コレステロールといった血液生理値と相関を持つことや²⁾、肌荒れやほてり、敏感肌などの皮膚の肌状態に関係することが報告されている³⁾。この皮膚内部のミクロな血管構造・血流動態を計測するため、光干渉断層法 (Optical Coherence Tomography : OCT) を利用した機能計測が注目されている。OCTとは近赤外広帯域光を使った非侵襲なマイクロ断層画像法であり、皮膚の組織構造の可視化に加え⁴⁾、毛細血管の可視化による加齢の評価や⁵⁾、血流速度の検出などの機能計測が可能である⁶⁾。しかしながら、過去の研究ではこれらがそれぞれ独立に計測されており、また静的な情報を検出しているため、皮膚の特性や機能の評価するのに充分でなかった。言い換

えると、皮膚の特性・機能を正確に評価するためには、血管分布や血流速度、その他の情報を同時に検出し、これらのダイナミクスを包括的に解析することが必要であると考えられる。そこで本研究では、皮膚組織内の毛細血管分布や血流速度など複数の情報を同時検出し、さらにそれらの刺激に対する応答 (ダイナミクス) を解析することで、皮膚の特性や機能の評価する新規手法の開発を目的とした。本報告では、研究期間内で開発した毛細血管分布を高SNで検出する方法と、毛細血管の血流速度・角度を検出する手法について報告する。また、皮膚特性・機能評価の検証として、開発した手法をアルコール刺激下におけるヒト皮膚に適用し、応答のダイナミクスからアルコール耐性を評価した結果も報告する。

2. 方法

2.1. OCT

OCTには計測原理の違いから時間領域OCT、スペクトラルドメインOCT、波長掃引OCTなどの種類があるが⁷⁾、本研究では波長掃引OCTを用いて実験を行ったため、以下にその原理について簡単に説明する。

波長掃引OCTに用いる光干渉計の概略を図1に示す。波長掃引レーザ光源からの光は、光カプラによって参照鏡方向とサンプル方向に分けられる。参照鏡とサンプルから反射したそれぞれの光は再び光カプラにて合波し、その干渉光の強度を光差分ディテクタで検出する。このとき、光源に波長掃引レーザを用いるため、干渉光強度を連続的に検出することで干渉光のパワースペクトルを取得することができる。この干渉光のパワースペクトルには、サンプル内の複数の反射位置に対応した振動成分が含まれているた



Evaluation of skin functional properties by multi-functional imaging of micro-vasculatures

Yu Nakamichi

Department of Mechanical Engineering,
Faculty of Engineering, Sanyo-Onoda
City University

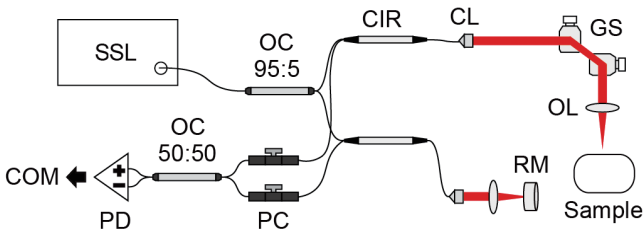


図1 波長掃引OCTの概略。SSL:波長掃引レーザ。OC:光カプラ。CIR:サーキュレータ。CL:コリメータ。GS:ガルバノスキャナ。OL:対物レンズ。RM:参照鏡。PC:偏光コントローラ。PD:光差分ディテクタ。COM:コンピュータ。

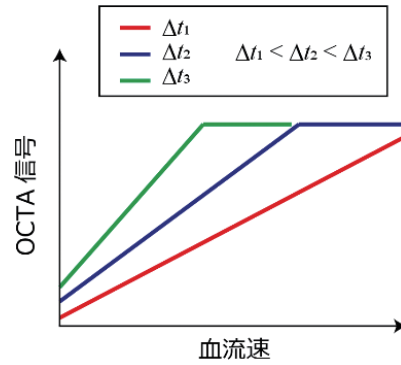


図2 OCTAの信号特性。Δt: OCT信号の計測時間間隔。

め、干渉光のパワースペクトル $S(k)$ (k :波数)を逆フーリエ変換することによって、サンプルの深さ z 方向の反射光強度分布 $I(z)$ を得ることができる。

$$I(z) = A(z)^2 = |F^{-1}\{S(k)\}|^2 \quad (1)$$

OCTでは、照射光をスキャンすることにより反射光強度分布 $I(z)$ をサンプルの複数位置で取得し、それらを並べることで2次元あるいは3次元の反射光強度分布を取得する。反射光強度はサンプルの構造や物性で変化するため、反射光強度分布よりサンプルの3次元構造を把握することができる。なお、式(1)の $A(z)$ は反射光の振幅分布を示しており、後述する解析に用いる。

本研究の実験では、中心波長1334 nm、掃引幅114 nm、掃引速度20kHzの波長掃引レーザ(HSL-2000、Santec)を備えた波長掃引OCT(IV-2000、Santec)を用いた。OCTの空間分解能は、深さ方向(z 方向)が $6.7\mu\text{m}$ 、光軸に垂直な方向(x 方向)が $14.6\mu\text{m}$ である。計測方法については、後述の解析を行うため同一照射位置でOCT信号を複数記録し、その後照射光のスキャンを行うMB-スキャンプロトコルを採用した⁸⁾。

2.2. 毛細血管構造検出手法

OCTで得る信号を解析し組織内の毛細血管分布を検出手法の総称をOCT Angiography (OCTA) という⁹⁾。OCTAには様々なアルゴリズムが提案されているが、基本的には血管内の赤血球の動きに伴うOCT信号の時間的なばらつきを定量することによって、毛細血管と非血管組織を判別する。このOCTAで得られる信号には、図2に示すように(i)血流速度が大きくなるほどOCTA信号は大きくなる、(ii)OCTの計測時間間隔が大きいかほど流速に対するOCTA信号の傾きが大きい、(iii)OCTの計測時間間隔に関わらずOCTA信号はある一定の値でサチュレーションする、といった特性があることが明らかとなっている^{10,11)}。また、これらの特性から、サチュレーションを起こさない複数の小さな計測時間間隔のOCTA信号を解析することにより、血流速度を定量できると考えられている。しかしな

がら、小さな計測時間間隔のOCTA信号はその値が小さく、血管検出のSNが低下するという課題があった。そこで本研究ではまず、小さな計測時間間隔のOCTA信号から高いSNで血管を検出する手法の開発を行った。

本手法では最初に、下式に示すMulti-timescale split-spectrum amplitude-decorrelation angiographyという手法を用い、複数の小さな計測時間間隔におけるOCTA信号 D を算出する¹⁰⁻¹²⁾。

$$D(x, z, \Delta t) = 1 - \frac{2}{L \left(M - \frac{\Delta t}{\tau}\right)} \sum_{m=1}^{M - \frac{\Delta t}{\tau}} \sum_{l=1}^L \frac{A_m^l(x, z) \cdot A_{m + \frac{\Delta t}{\tau}}^l(x, z)}{A_m^l(x, z)^2 + A_{m + \frac{\Delta t}{\tau}}^l(x, z)^2} \quad (2)$$

τ はOCT信号 A の取得時間間隔、 M は信号の取得回数、 Δt は任意の時間間隔(Δt は τ の整数倍)、 L はスペクトル S の分割数、 (x, z) は空間を表す。通常のOCTAでは、このOCTA信号 D の空間パターンから血管と非血管組織を判別する。一方、本手法では複数のOCTA信号の計測時間間隔に対する傾き G を算出し、血管と非血管組織の判別に用いる¹²⁾。なお、本研究では $M=40$ のOCT信号を $\tau=50\mu\text{s}$ 毎に計測し、 $\Delta t=0.05\sim 0.55\text{ms}$ のOCTA信号から G を算出した。

$$G(x, z) = \frac{\partial D(x, z, \Delta t)}{\partial \Delta t} \quad (3)$$

提案手法の有用性を検証するため、ヒト皮膚を用いた実験を行った。実験では、手の母指球を計測対象とし、従来法と提案手法で得られる血管パターンのSNについて評価を行った。なお、本研究の実験は全て山陽小野田市立山口東京理科大学の人を対象とする生命科学・医学系研究に係る倫理審査の承認(承認番号22003号)を受け行った。

2.3. 血流速度・角度検出手法

最近、式(2)に示したような複数の時間間隔におけるOCTA信号を解析することによって、血流速度を定量的に検出できることがHwangらにより報告された¹³⁾。しかし、OCTA信号は図2に示した特性の他にも複雑な非線形特性を持つことが明らかになっており¹¹⁾、Hwangらの手法

が適用できる条件は限られると考えられる。そこで本研究では、OCT、OCTA、ドップラーOCT¹⁴⁾と機械学習を組み合わせた新規の血流速・角度検出手法を開発した。ドップラーOCTとは、赤血球の動きに伴う光波のドップラー変調を検出することにより、光軸方向(対象深さ方向)の血流速 v_z を検出する手法である。

$$v_z(x, z) = v(x, z) \cos \theta(x, z) = \frac{4\pi n \tau}{\lambda} \Delta \rho(x, z) \quad (4)$$

v は血流速、 θ はドップラー角度(流れ角度)、 λ はOCTに用いる光源の中心波長、 $\Delta \rho$ は異なる時刻(時間間隔： τ)で得たOCT信号の位相差である。提案手法では、OCT信号強度 I 、OCTA信号 D 、ドップラー位相差 $\Delta \rho$ から、機械学習により血流速および角度を予測するモデル f_v 、 f_θ をそれぞれ求める。

$$v(x, z) = f_v\{I(x, z), D(x, z, \Delta t), \Delta \rho(x, z)\} \quad (5)$$

$$\theta(x, z) = f_\theta\{I(x, z), D(x, z, \Delta t), \Delta \rho(x, z)\} \quad (6)$$

本研究ではモデル f_v 、 f_θ を求めるため、OCT信号強度、血流速、角度の異なる192条件にて教師データの取得実験を行った。教師データからMatlab R2022bの回帰学習器(Statistics and Machine Learning Toolbox; MathWorks)を用いて異なる31のモデルを学習し、 v 、 θ の最小二乗誤差が最も小さなモデルをそれぞれ採用した(図3)。

上述した手法を評価するため、表面を平らにしたシリコンチューブにヒト血液(Blood A Type, Each EDTA-2K, Human、コスモ・バイオ)を送液し、提案手法を適用して血流速および角度の断層分布を検出した。血液の平均流速は8.3、16.6 mm/s、角度は $\pm 25^\circ$ の4条件にて計測を行った。

2.4. アルコール耐性の評価検証実験

本研究の目的は皮膚組織内の毛細血管分布や血流速などを同時検出し、それらの刺激に対する応答から皮膚特性・

機能を評価する手法の開発である。この実現可能性を検証するため、前述した手法を用いてアルコールを皮膚に塗布したときの毛細血管構造、血流速、角度を検出し、応答解析を行うことで被験者のアルコール耐性を評価した。

アルコール耐性を評価する従来手法にアルコールパッチテストがある。アルコールパッチテストはアルコールを皮膚に塗布した際の毛細血管の膨張に伴う赤みを見ることで被験者のアルコール耐性を評価する。通常、アルコールパッチテストにおけるアルコール耐性評価は定性的なものであるが、本研究ではアルコール塗布後0、7、17分後のデジタル画像データを主成分解析することによって、被験者のアルコール耐性を数値化した。このアルコールパッチテストで得たアルコール耐性と、提案手法で得たアルコール耐性を比較することにより、手法の妥当性を検証した。

3. 結果および考察

3.1. 毛細血管構造検出手法

図4(a)にヒト母指球の3次元OCT断層像を示す。また、図4(a)の任意位置における2次元OCT断層像を図4(b)に示す。図4(b)より、OCTにより皮膚の真皮、表皮といった層構造が可視化できている様子が分かる。ここで、皮膚では表皮と真皮の境界付近および真皮深層に血管が密に走行していることが知られているため¹⁵⁾、図4(b)の赤枠で囲んだ深さ範囲において従来法・提案手法のOCTA信号を投射し、図4(c)に示す血管パターンマップを算出した。結果より、従来法および提案手法ともに浅層と深層の異なる血管パターンを検出できているが、従来法に比べ提案手法のSNが高いことが定性的に確認できる。なお、試料を用いた定量的なSNの評価も別途行っており、開発した手法が図4(c)の従来法に比べ2~3倍高いSNで血管を検出できることを示している¹²⁾。

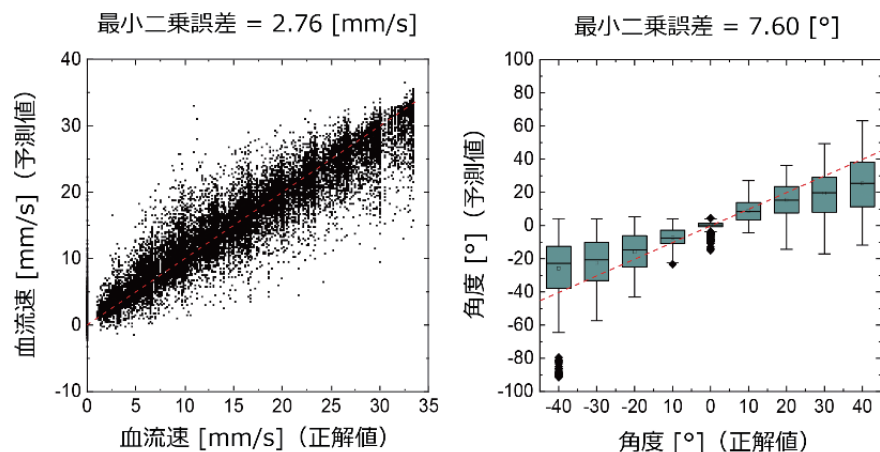


図3 血流速(左)と角度(右)の学習結果。

3.2. 血流速・角度検出手法

図5に開発した血流速・角度検出手法により得られた試料のOCT断層像、血流速分布、角度分布を示す。OCT断層像を見ると、画像中央に楕円型の流路部分が確認できるが、血流速および角度の変化による影響は確認できないことが分かる。一方、血流速分布と角度分布を見ると、それぞれの分布において血流速および角度の変化による顕著な違いが確認できる。血流速分布においては、8.3 mm/sの条件に比べ、16.6 mm/sの条件における流速が大きいことが分かる。また、流路中央における流速は平均流速を考慮すると妥当な値であり、分布も非ニュートン流体である血液の特徴¹⁶⁾を表している。角度分布においても、血流速に寄らず設定した角度である $\pm 25^\circ$ 程度の値を示しており、妥当な結果と言える。

3.3. アルコール耐性の評価検証実験

開発した毛細血管構造検出手法と血流速・角度検出手法をアルコール刺激中のヒト母指球に適用した。結果の一例として、アルコール耐性の高い被験者および低い被験者の結果を図6、7にそれぞれ示す。なお、図6、7では、真皮深層における3次元のOCTA信号を投射することにより、毛細血管(OCTA信号)、血流速・角度の2次元マップを求めている。図6のアルコール耐性が高い被験者の毛細血管の時間変化を見ると、アルコール刺激開始後時間が経過しても大きな構造変化はないことが分かる。血流速と角度についても、血流速は1~2 mm/s、角度は約 40° で時間的に大きな変化がないことが分かる。一方、図7のアルコール耐性が低い被験者の毛細血管の時間変化を見ると、アルコール刺激開始後60s程度から血管が拡張の様子が確認できる。また、血流速も血管が太くなるのに伴い

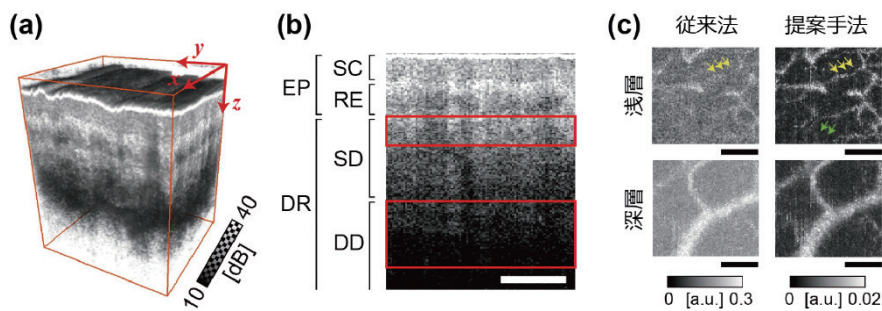


図4 開発した毛細血管構造検出手法の適用例¹²⁾。(a) ヒト母指球の3次元OCT断層像。(b) 皮膚の層構造。EP:表皮。DR:真皮。SC:角質層。RE:残表皮。SD:真皮浅層。DD:真皮深層。(c) 従来法(左)と提案手法(右)で得られた浅層および深層の血管パターン。スケールバーは0.5 mm。

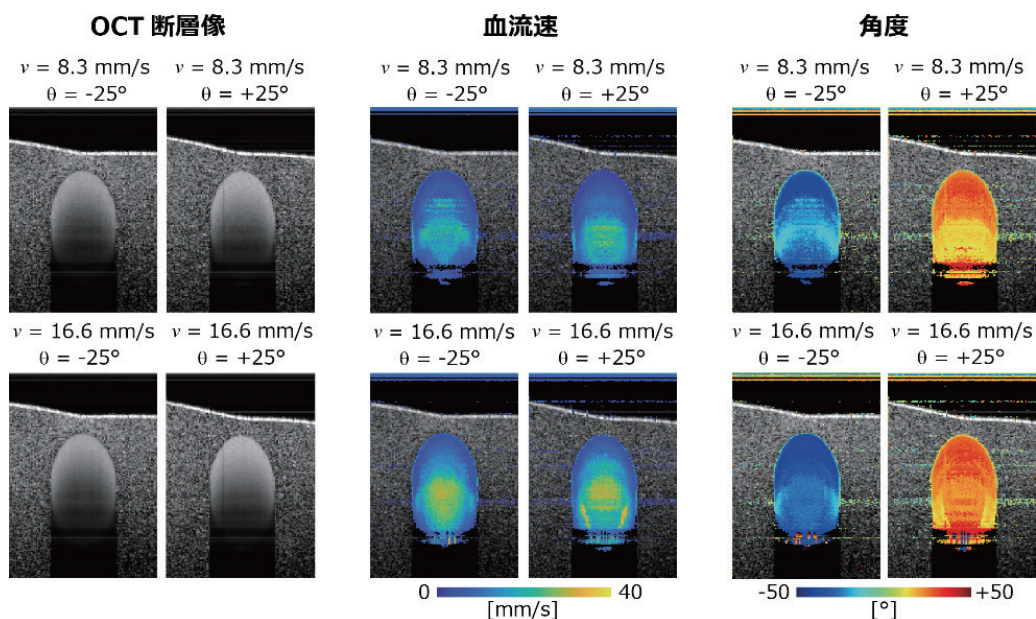


図5 開発した血流速・角度検出手法の適用例。(左) 試料のOCT断層像。(中) 血流速分布。(右) 角度分布。画像サイズは1.45 mm × 2 mm。

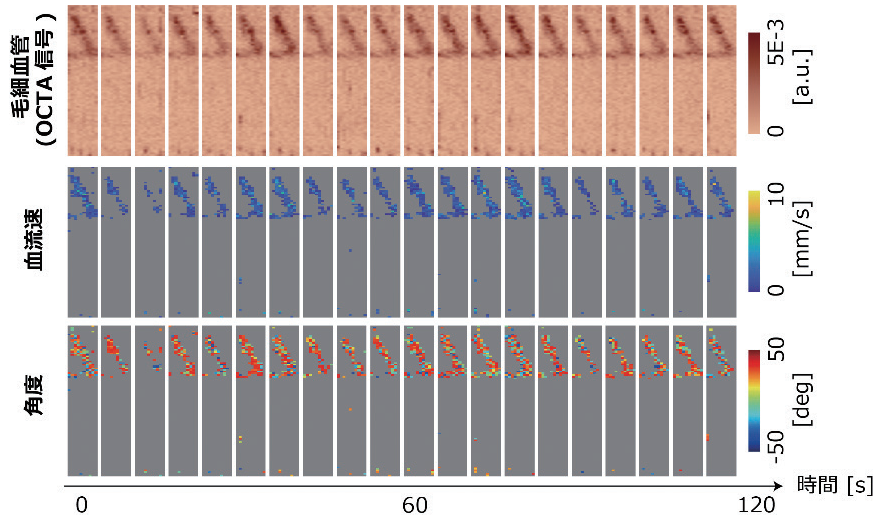


図6 アルコール耐性が高い被験者の毛細血管(上)、血流速(中)、角度(下)の時間変化。各画像サイズは約0.3mm×3mm。

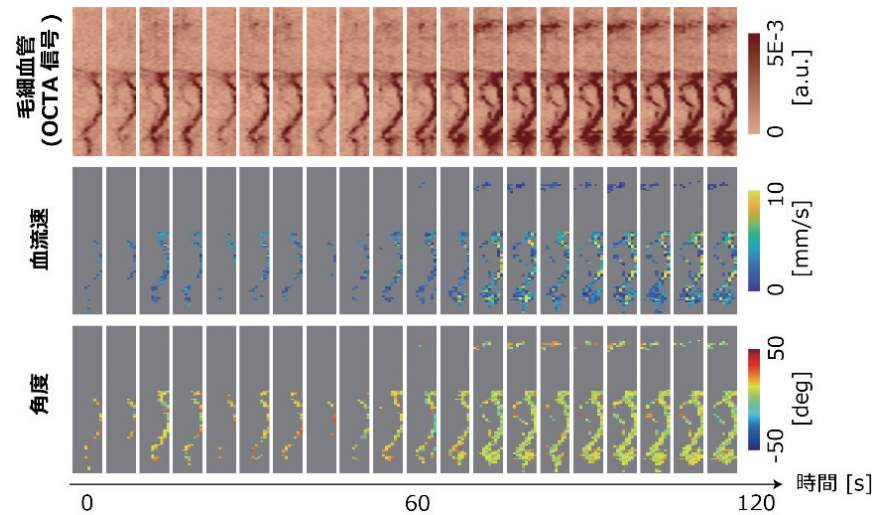


図7 アルコール耐性が低い被験者の毛細血管(上)、血流速(中)、角度(下)の時間変化。各画像サイズは約0.3mm×3mm。

若干の増加傾向が見られる。血液の流れる角度については、約10°で時間的に大きな変化はなかったが、毛細血管の角度が実験の短い時間で変化することは考えにくいので、妥当な結果であると考えられる。

アルコールパッチテストで得たアルコール耐性と提案手法を比較するため、図8(a)に示す畳み込みニューラルネットワークを用い、提案手法で得た信号からアルコール耐性を予測するモデルを求めた。なお、アルコールパッチテストで得るアルコール耐性は血管の角度には依存しないと考えられるため、ここでは毛細血管の面積(ピクセル数)と平均血流速の時間変化データのみを教師データ(N=9)とし学習を行った。図8(b)にアルコールパッチテストで得たアルコール耐性と提案手法によるアルコール耐性の比較を示す。図中の白抜きのプロットはモデルの学習に使用したデータを示しているが、アルコールパッチテストと提案

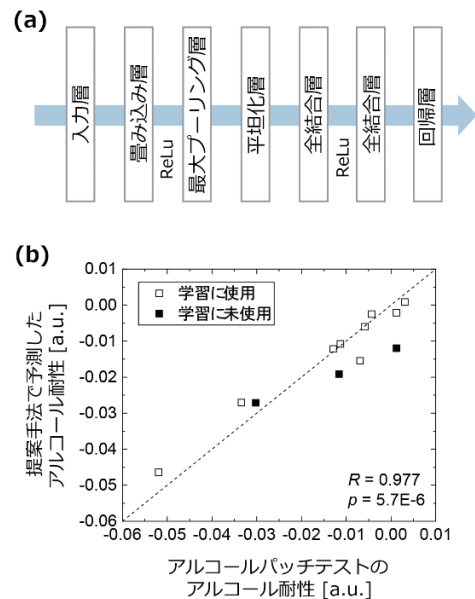


図8 (a)畳み込みニューラルネットワーク。(b)アルコールパッチテストによるアルコール耐性と提案手法によるアルコール耐性の比較。

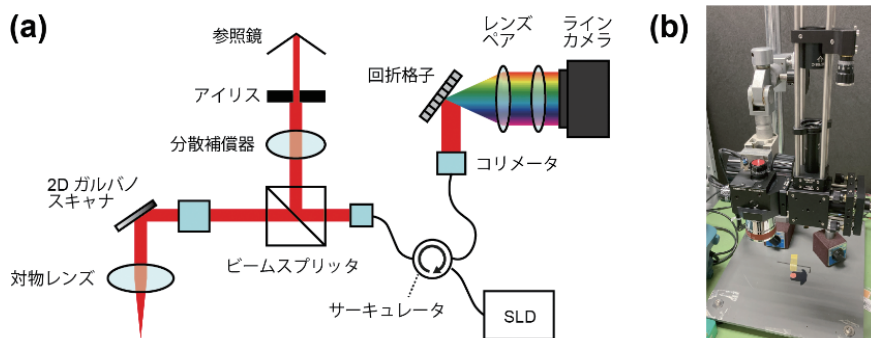


図9 構築した高速スペクトラルドメイン OCT システムの概略 (a) と写真 (b)。

手法のアルコール耐性の相関は高く ($R=0.977$, $p=5.7 \times 10^{-6}$)、精度の良いモデルが得られたことが分かる。また、黒塗りのプロットは学習に使用していないデータをモデルに適用しアルコール耐性を求めたものであるが、これらについてもアルコールパッチテストと提案手法のアルコール耐性に相関があることが分かる。以上のように、アルコール刺激を開始してから 120 秒間の毛細血管構造と血流速のダイナミクスを解析することにより、アルコール耐性を評価可能であることが示された。

4. 総括

本研究では、皮膚組織内の複数の微小血管系情報を検出し、それらの刺激に対するダイナミクスを解析することで皮膚特性・機能を評価する手法の開発を目的とした。本稿では、提案手法の実現のため開発した、毛細血管分布を高 SN で検出する方法と毛細血管の血流速・角度を検出する手法について報告した。また、これらの手法をアルコール刺激下の皮膚に適用し、アルコール刺激に対する血管構造と血流速の応答を解析することでアルコール耐性を評価可能であることを示した。提案手法によるアルコール耐性の評価自体には大きな学術的意義は無いが、この結果により提案手法の妥当性が示されたとともに、適切な刺激を選択することによって提案手法により様々な皮膚機能・特性を評価できることを示唆した。また、提案手法は皮膚の機能・特性を計測するものであるが、化粧品や医薬品などの塗布を刺激とすれば、それらの効能評価にも応用が可能と考えられる。

本研究の今後の展望として、血液粘度計測など OCT の更なる多機能化を行うことで、計測可能な皮膚機能・特性を拡大することが挙げられる。しかし、本研究で使用した OCT では、計測速度が不十分であることから上記の実現が困難であった。そこで本研究では、報告した内容と並行して、これまでの研究で使用した OCT よりも 5 倍以上高速計測が可能なスペクトラルドメイン OCT システムの構築を行った (図 9)。今後は、構築したシステムを用いた

OCT の更なる多機能化および様々な皮膚機能・特性を評価する方法を構築し、コスメトロジー分野や医療分野への実用研究を進めていきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) 澤根美加, 大田正弘, 山西治代, 本山晃, 高倉伸幸, 加治屋健太郎. 皮膚老化において重要な役割を担う血管・リンパ管. 日本化粧品技術者会誌. 46 (3), 188-196, 2012.
- 2) Tsuchida Y, Fukuda O, Kamata S. The correlation of skin blood flow with age, total cholesterol, hematocrit, blood pressure, and hemoglobin. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 88 (5), 844-50, 1991.
- 3) 塚田弘行, 武田あきら, 宇山侑男. 皮膚と微小循環の血流. 日本化粧品技術者会誌. 30 (2), 184-189, 1996.
- 4) Adabi S, Hosseinzadeh M, Noei S, Conforto S, Daveluy S, Clayton A, Mehregan D, Nasiriavanaki M. Universal in vivo Textural Model for Human Skin based on Optical Coherence Tomograms. *Scientific Reports*. 7, 17912, 2017.
- 5) Hara Y, Yamashita T, Kikuchi K, Kubo Y, Katagiri C, Kajiya K, Saeki S. Visualization of age-related vascular alterations in facial skin using optical coherence tomography-based angiography. *Journal of Dermatological Science*. 90 (1), 96-98, 2018.
- 6) Furukawa D, Saeki S, Ito T, Hishino Y. In vivo micro-tomographic visualization of capillary angiodynamics around upper dermis under mechanical stimulus using low coherence interferometer "optical coherence doppler velocigraphy". *American Journal of*

- Physics and Applications. 6 (4), 89-96, 2018.
- 7) 山成正宏. OCT技術の基本を紐解こう. 視覚の科学. 39 (3), 37-44, 2018.
 - 8) Zhu J, Merkle CW, Bernucci MT, Chong SP, Srinivasan VJ. Can OCT angiography be made a quantitative blood measurement tool? Applied Science. 7 (7), 687, 2017.
 - 9) Chen CL, Wang RK. Optical coherence tomography based angiography. Biomedical Optics Express. 8 (2), 1056-1082, 2017.
 - 10) Tokayer J, Jia Y, Dhalla H, Huang D. Blood flow velocity quantification using split-spectrum amplitude decorrelation angiography with optical coherence tomography. Biomedical Optics Express. 4 (10), 1909-1924, 2013.
 - 11) Nakamichi Y, Chiu KS, Sun CW. Signal properties of split-spectrum amplitude decorrelation angiography for quantitative optical coherence tomography-based velocimetry. Biomedical Optics Express. 12 (10), 5955-5968, 2021.
 - 12) Nakamichi Y. Gradient mapping of multi-timescale optical coherence angiography signals for enhancing signal-to-noise ratio of flow detection. Journal of Biomechanical Science and Engineering. 18 (2), 23-00035, 2023.
 - 13) Hwang Y, Won J, Yaghy A, Takahashi H, Girgis JM, Lam K, Chen S, Moulton EM, Ploner SB, Maier A, Waheed NK, Fujimoto JG. Retinal blood flow speed quantification at the capillary level using temporal autocorrelation fitting OCTA [invited]. Biomedical Optics Express. 14 (6), 2658-2677, 2023.
 - 14) Liu G, Chen Z. Advances in Doppler OCT. Chinese Optics Letters. 11 (1), 011702, 2013.
 - 15) Xu J, Song S, Men S, Wang RK. Long ranging swept-source optical coherence tomography-based angiography outperforms its spectral-domain counterpart in imaging human skin microcirculations. Journal of Biomedical Optics. 22 (11), 1-11, 2017.
 - 16) 辻岡克彦, 小笠原康夫, 梶谷文彦. 血流と血流速度分布計測のME. BME. 4 (11), 21-29, 1990.

多量体タンパク質のサブユニット間相互作用を利用した新規機能性ハイドロゲルの構築と薬剤徐放システムへの活用

奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科物質創成科学領域

真島 剛史

Association-controllable hemoprotein assemblies and hydrogels were constructed from a fusion protein (FP) with two c-type cytochrome units utilizing 3D domain swapping (3D-DS), where the same structural region is exchanged three-dimensionally between molecules of the same protein. FP was expressed with *E. coli* and purified by ion exchange and size exclusion chromatography. The dimer and trimer of FP, oligomerized by 3D-DS, were prepared by the procedure of ethanol addition, lyophilization, and redissolution of the residual. The obtained 3D-DS FP dimer constructed hemoprotein assembly exhibiting a dynamic structural change between ring and linear forms, regulated by CO and imidazole binding. The oligomerization of the FP 3D-DS dimer depended on the temperature and protein concentration. The structural change between ring and linear structure of the dimer of FP 3D-DS dimer was directly observed by the high-speed atomic force microscopy in solution. Highly concentrated 3D-DS FP trimer formed protein hydrogels, which decomposed by CO and imidazole binding. In this study, protein nanostructures and protein hydrogels were constructed through the interaction between proteins. These results contribute as the basis of future functional supramolecular protein assemblies and drug delivery systems using protein-based structures.

1. 緒言

ハイドロゲルは、水により膨潤するゲルであり、ドラッグデリバリーや生体代替・模倣材料への利用が可能なバイオマテリアルとして注目されている。中でもタンパク質を原料としたハイドロゲルは、生体親和性や生分解性の高さを持つ。これまでに、アルブミン等の球状タンパク質^{1,2)}やコラーゲン³⁾を用いたゲルの細胞培養足場や薬剤徐放への応用が報告されているが、多くのタンパク質ゲルは、タンパク質の立体構造が崩れ、内部の疎水性残基が表出することでゲル化が起きているため、タンパク質自体に由来する機能は消失している。タンパク質ハイドロゲルへ生体適合性を失わずに高度な機能を付与するためには、材料となるタンパク質の構造と機能を維持した状態でのゲル化が必要であるが、未だ一般的な方法論が確立されていない。本研究では、多量化するタンパク質のサブユニット間相互作用を利用することで、ゲルの形成と分解を制御可能なタンパク質ハイドロゲルの構築に取り組んだ。

2. 方法

2.1. ビルディングブロックタンパク質の設計

タンパク質ナノ構造体及びハイドロゲルのビルディングブロックを作成するにあたり、2種類のc型ヘムタンパ

ク質を融合したタンパク質を3Dドメインスワッピング(3D-DS)機構⁴⁾に基づいて設計した。3D-DSは同じタンパク質が3次的に同じ構造部位を交換することで多量化する、タンパク質の会合機構の一つであり、天然にも多く見られるものである。また、ヘムタンパク質とは、コファクターとして鉄プロトポルフィリンIX(ヘム)を持つタンパク質群であり、ヘムが機能発現に重要な役割を果たしている。まず超好熱菌 *Allochromatium vinosum* 由来のシトクロム *c'*(AVCP) に着目した^{5,6)}。AVCPは通常2量体で存在し、ヘムが還元条件下で一酸化炭素(CO)と結合、もしくは酸化条件下でイミダゾールと結合することで単量体へと解離する(Fig. 1a)。このAVCPの機能を利用することで、小分子による外部刺激により構造を制御可能なタンパク質ナノ構造体やタンパク質ハイドロゲルが構築できると考えた。次に、複数のAVCPを結合するため、超好熱菌 *Aquifexaerolius* 由来のシトクロム *c*₅₅₅ を円循環置換して構築したタンパク質(CPC)をAVCPの結合基盤部位として選択した⁷⁾。CPCはN末端部位とC末端部位の間に α ヘリックスをリンカーとして挿入することで、3D-DS機構により2量体、3量体を形成する(Fig. 1b)。CPCは大腸菌での発現時には単量体として得られ、エタノールの添加、凍結乾燥、再溶解の処理を行うことで多量化する。本研究では、AVCPをN末端側とC末端側の2つのユニットに分割し、それぞれをCPCのN末端側とC末端側に結合する形で融合タンパク質(FP)を設計した(Fig. 1c)。FPはCPCと同様に大腸菌での発現時には、単量体で得られ、エタノール添加、凍結乾燥、再溶解の処理を行うことで多量化すると考えられる。これにより、大腸菌の中でのタンパク質多量化による発現や精製時の問題を回避でき、精製を極めて簡便に行うことが可能となる。



Construction of functional protein hydrogels utilizing the interaction between subunits of oligomeric proteins

Tsuyoshi Mashima

Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology

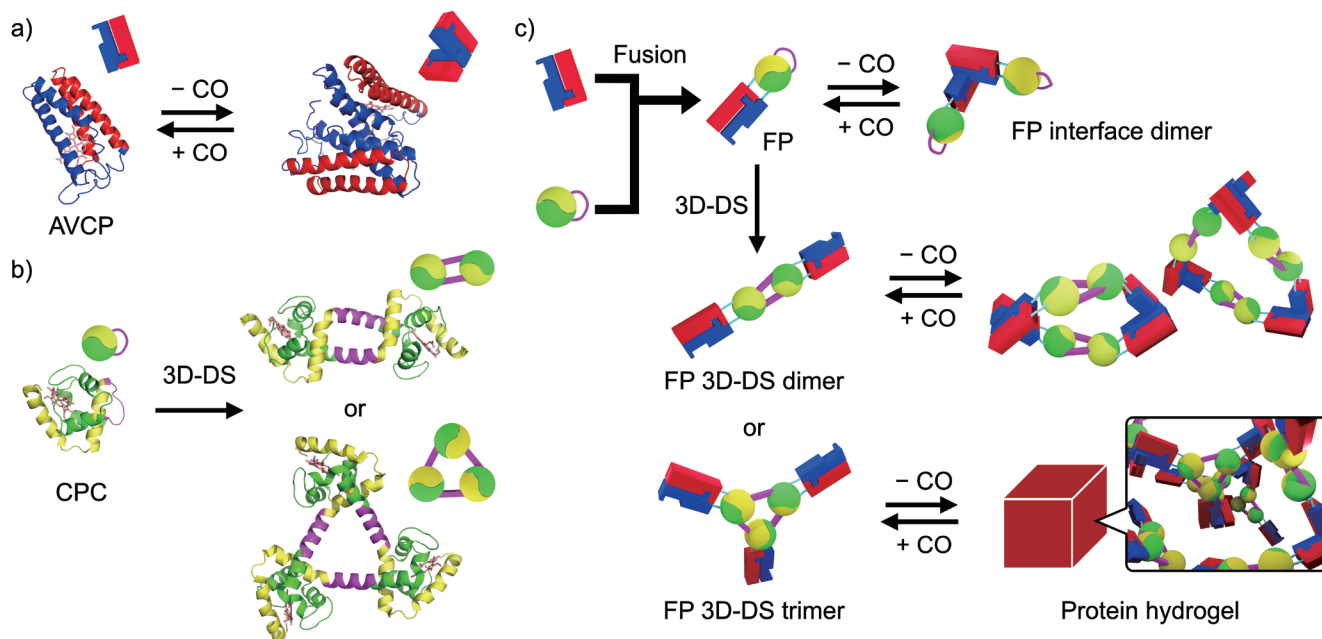


Fig. 1 タンパク質ナノ構造体とハイドロゲル構築の概略図。a) AVCP の構造とモノマー・ダイマー間平衡の模式図。N 末端側を青、C 末端側を赤で示す。b) CPC の予測構造と 3D-DS 2 量体の予測構造と 3 量体の結晶構造 (PDB ID: 5Z25)。c) AVCP と CPC の融合による FP の構築と FP 3D-DS 多量体によるナノ構造体とハイドロゲル構築の模式図。

2. 2. ビルディングブロックタンパク質の発現と精製

FPはc型ヘムタンパク質を生産可能なCCM(cytochrome *c* maturation) システムを有する大腸菌を用いて発現させた。FPは大腸菌の細胞膜と外膜間のペリプラズムに発現されるため、コールド・オスモティック・ショック法により、FPを大腸菌から抽出した。得られたFPをフェリシアン化カリウムで酸化した後、イオン交換クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により精製した。FPの純度をSDS-PAGEで確認し、得られたFPの状態をSEC及びUV-visスペクトル、CDスペクトル測定から確認した。

2. 3. ビルディングブロックタンパク質の多量化

精製したFPに対して、エタノール添加、凍結乾燥、再溶解の処理を行い、多量化させた後、SECにより精製を行った。エタノール添加の終濃度を比較したところ、2量体 (3D-DS FP dimer)、3量体 (3D-DS FP trimer) とともに40% (v/v) で最も多く得られた。SECはCOをバブリングした還元剤を含む緩衝液を移動相に用いて行った。得られた3D-DS FP dimer及びtrimerについては、SEC-多角度光散乱 (MALS) 測定により、設計通りの会合数の会合体が得られていることを確認した。3D-DS多量化によるタンパク質構造の変化については、酸化、還元、CO付加状態のUV-visスペクトルを比較した。またイミダゾール結合能の変化についても、イミダゾール滴定によるヘムの吸収ピーク変化から評価した。

2. 4. 3D-DS FP dimerによるタンパク質ナノ構造体の構築と構造評価

単離した3D-DS FP dimerをCOまたはイミダゾール存在下と非存在下で静置した後、SECにより会合状態の変化を評価した。また、一度会合した3D-DS FP dimerにCOまたはイミダゾールが再度付加することで、離散することを確認した。さらに、高速分子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、会合状態の3D-DS FP dimerの動的な構造を観察した。

2. 5. 3D-DS FP trimerによるタンパク質ハイドロゲルの構築

単離した3D-DS FP trimerを酸化条件下で限外ろ過により濃縮し、ゲルを作成した。得られたゲルに対し、COまたはイミダゾールを付加することで、ゲルが分解されるか観察した。さらに分解後に酸化条件下で濃縮することで再度ゲル化が可能か確認した。

3. 結果・考察

3. 1. ビルディングブロックタンパク質の培養と精製

大腸菌を用いて培養、精製されたFPは全てAVCPサブユニット部分で結合した2量体 (FP interface dimer) として得られた。FP interface dimerのUV-visスペクトルはAVCPとCPCのスペクトルの和と完全に合致し、FPのAVCPとCPCサブユニットのヘム周辺環境は融合後も維持されていることが明らかになった (Fig. 2a)。CDスペクトルについても同様に、AVCPとCPCのスペクトル

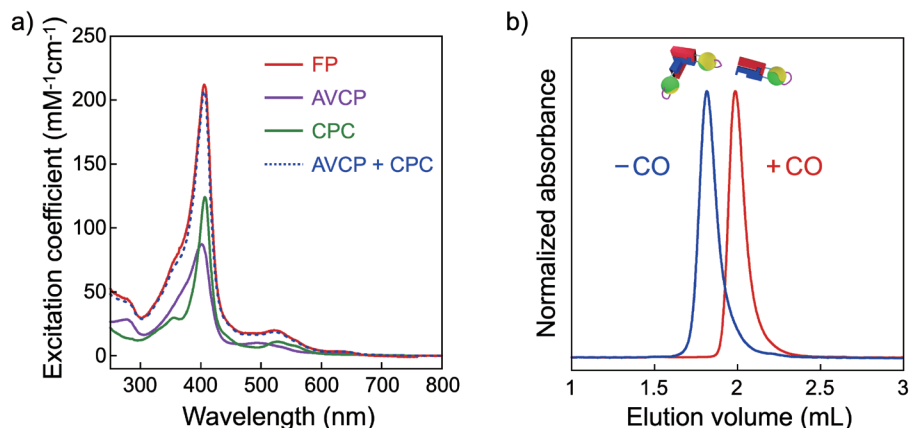


Fig. 2 a) FP (赤), AVCP (紫), CPC (緑) のUV-vis スペクトル。青点線は AVCP と CPC のスペクトルの和を示す。b) FP の SEC 測定の溶出曲線。移動相は 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7 (青)、及び同様の緩衝液に 5mM ジチオナイトを添加し CO をバブリングしたもの(赤)。

の和が FP interface dimer のスペクトルと合致し、FP の AVCP と CPC サブユニットにおいて融合後もタンパク質構造に大きな変化が無いことが示された。さらに、還元条件下で CO をバブリングし UV-vis スペクトルを測定したところ、CO がヘムに結合した典型的なスペクトルが得られ、FP interface dimer は CO 結合能を維持していることが明らかになった。そして、還元条件 CO 雰囲気下において、FP interface dimer は単量体に解離した (Fig. 2b)。また、酸化条件下でイミダゾールを添加すると、FP interface dimer は単量体へと解離した。これらの結果から、FP は AVCP サブユニット間の相互作用により 2 量化しており、AVCP と同様に CO とイミダゾールへの応答性を維持していることが明らかになった。

3. 2. ビルディングブロックタンパク質 2 量体または 3 量体の構築と物性評価

3D-DS 処理後に SEC により単離・精製された FP 3D-DS dimer 及び trimer は、還元条件 CO 雰囲気下においても安定的に 2 量体及び 3 量体として存在しており、設計通りに AVCP サブユニット間の相互作用ではなく、3D-DS によって多量化していることが示唆された。次にイミダゾールを含む移動相を用いて、AVCP サブユニット間の相互作用が働かない状況で SEC-MALS 測定を行ったところ、FP 3D-DS dimer 及び trimer の推定分子量は 47.1kDa と 76.6kDa で、それぞれの計算値 50.6kDa と 75.9kDa に合致し、単量体 (25.3kDa) がそれぞれ 2 量化及び 3 量化していることが確認された (Fig. 3a)。

また、還元後の FP 3D-DS dimer 及び trimer の大気下及び CO 雰囲気下の UV スペクトルは、FP から大きな変化は無く、3D-DS による多量化後もヘム周囲の構造や

CO 結合能が失われていないことが示された。また、FP と FP 3D-DS dimer のイミダゾール結合能を比較したところ、FP 3D-DS dimer の結合定数 ($K_a=16.6 \text{ mM}^{-1}$) は FP の結合定数 ($K_a=10.0 \text{ mM}^{-1}$) から大きな変化がなく、3D-DS 多量化後もイミダゾール結合能が維持されていることが確認された。さらに FP 3D-DS 多量体は酸化条件下でさらに会合し、より大きな多量体を形成した (Fig. 3b)。この多量体は再度 CO またはイミダゾールを付加することで、FP 3D-DS dimer または trimer へと解離し、AVCP サブユニット間の相互作用により、より高次の会合体を可逆的に形成することが示された。

3. 3. タンパク質ナノ構造体の構築

FP 3D-DS dimer の多量化は温度とタンパク質濃度に強く依存しており、室温では FP 3D-DS dimer の 2 量体のみが得られるのに対し、4℃ 下では 3 量体及びより高次の多量体が形成された (Fig. 4a)。さらに、4℃ 下においてはタンパク質濃度によって 3D-DS FP dimer の 2 量体、3 量体、及び高次多量体の比率に大きな変化が見られた (Fig. 4b)。3D-DS FP dimer の濃度が 0.5 μM では主に 2 量体が形成されたのに対し、25 μM や 50 μM 等の高濃度では 3 量体やより高次の多量体が主成分となった。これらの結果から、FP 3D-DS dimer が形成する多量体構造が平衡状態にあることが示された。

次に、FP 3D-DS dimer の 2 量体が設計通りの構造をとっているか確認するために、AFM を用いて非常に低濃度 (25nM) の FP 3D-DS dimer 2 量体の溶液中の構造をマイカ基板上で観察したところ、直径約 20nm の環状の構造体が観察された (Fig. 5a-d)。これらの構造は、FP 3D-DS dimer 2 量体の AlphaFold2 予測構造から計算された

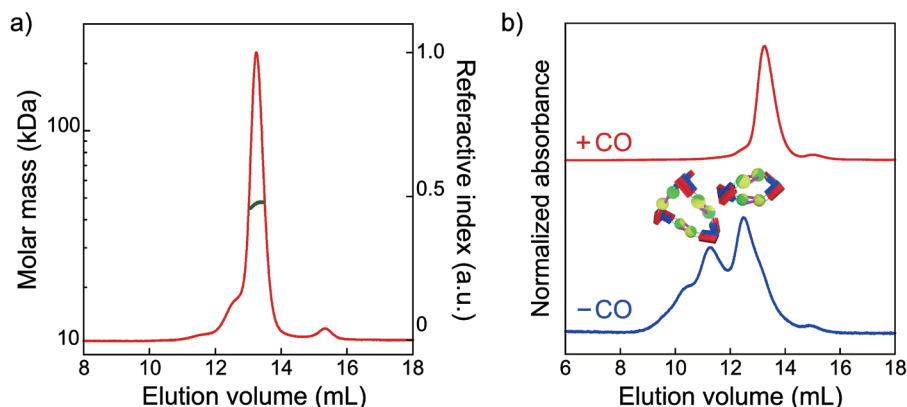


Fig. 3 a) FP 3D-DS dimer の SEC-MALS 解析。移動相は 10mM イミダゾールを含む 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7。b) FP 3D-DS dimer の SEC 測定の溶出曲線。移動相は 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7 (青)、及び同様の緩衝液に 5mM ジチオナイトを添加し CO をバブリングしたもの(赤)。

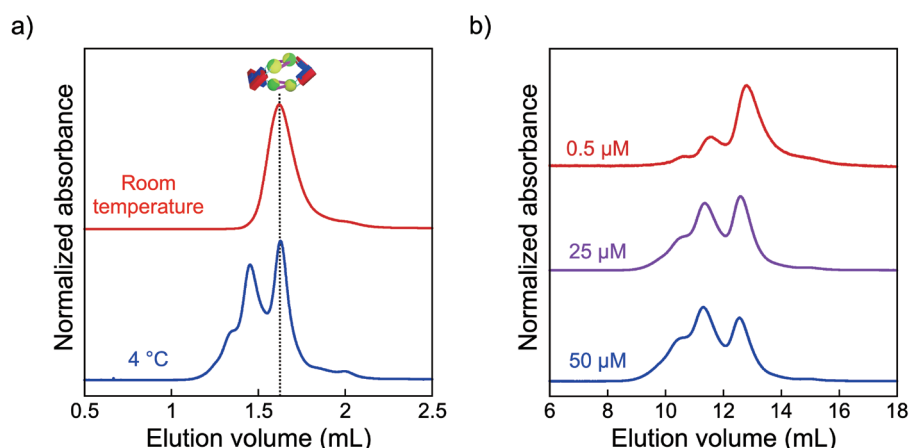


Fig. 4 a) 異なる温度での FP 3D-DS dimer の SEC 測定の溶出曲線。移動相は 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7, 室温 (赤), 4 °C (青)。b) 様々な濃度での FP 3D-DS dimer の SEC 測定の溶出曲線。移動相は 50mM リン酸カリウム緩衝液, pH7。濃度は 0.5 μM (赤), 25 μM (紫), 50 μM (青)。

シミュレーション構造とよく一致した。また、直線状の構造体も同様に観察され (Fig. 5e-f)、こちらは FP 3D-DS dimer が片方の AVCP サブユニットのみで結合した構造のシミュレーション構造とよく一致した。これらの FP 3D-DS dimer 2 量体の環状と線形の 2 構造は AFM 観察中に相互に変化を繰り返しており、FP 3D-DS dimer が形成する多量体が動的な構造体であることが示唆された。

3.4. タンパク質ハイドロゲルの構築

FP 3D-DS trimer を大気下において限外ろ過により 1mM (FP 濃度) まで濃縮したところ、ゲルが得られた (Fig. 6)。得られたゲルは、還元条件 CO 雰囲気下におくことで、分解され、再度大気下で濃縮することで、ゲルを形成した。よって本ゲルは FP 3D-DS trimer が AVCP サブユニット

間の相互作用により架橋構造を構築しゲル化していると考えられる。本ゲルはタンパク質の機能を活用した可逆的に分解構築が可能なハイドロゲルである。

4. 総括

本研究では、小分子である CO やイミダゾールに反応して会合するタンパク質に着目し、3D-DS 機構を基盤として融合タンパク質を設計することで、タンパク質間相互作用により、タンパク質のみからなるナノ構造体及びタンパク質ハイドロゲルの構築を達成した。本成果は、タンパク質をビルディングブロックとする、ナノサイズの機能性タンパク質構造体や、ドラッグデリバリーシステムの構築に貢献するものである。

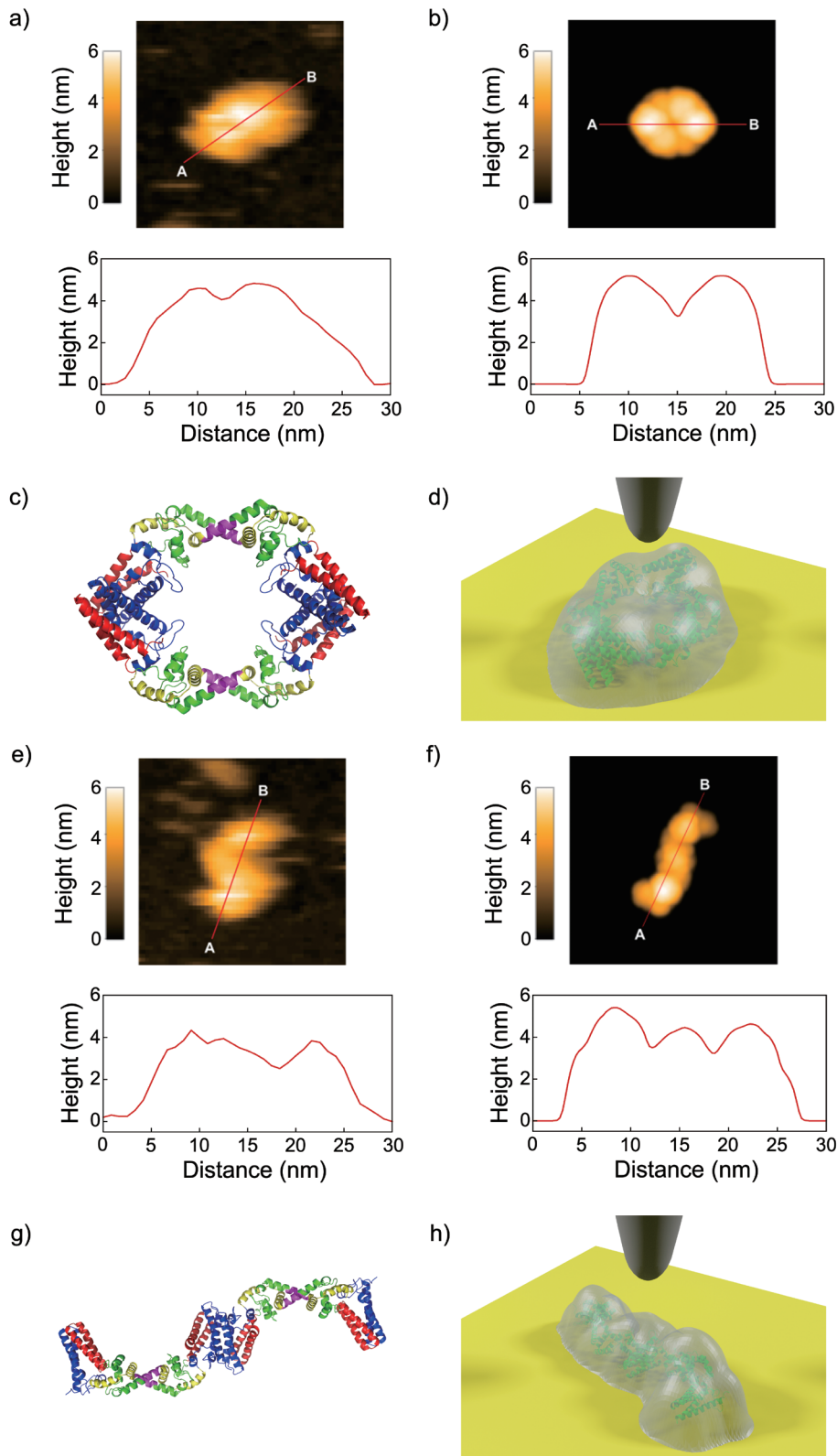


Fig. 5 高速原子間力顕微鏡 (AFM) 測定 a) 測定された AFM 画像 (上) と環状の FP 3D-DS dimer 2 量体の断面高さ (下) と b) そのシミュレーション画像。c) AlphaFold を用いて予測された環状の FP 3D-DS dimer2 量体の立体構造。d) マイカ基板 (黄色) 上の環状 FP 3D-DS dimer2 量体の AFM 測定の概略図。FP 3D-DSdimer 2 量体を緑色で示す。e) 測定された AFM 画像 (上) と直線状の FP 3D-DS dimer 2 量体の断面高さ (下) と f) そのシミュレーション画像。g) AlphaFold を用いて予測された直線状の FP 3D-DS dimer 2 量体の立体構造。h) マイカ基板 (黄色) 上の直線状 FP 3D-DS dimer2 量体の AFM 測定の概略図。FP 3D-DS dimer 2 量体を緑色で示す。

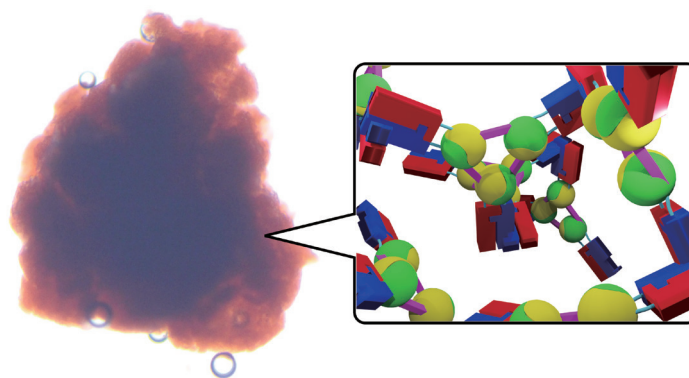


Fig. 6 FP 3D-DS trimer ゲルの写真と、内部構造の模式図。

(引用文献)

- 1) Kong, F.; Mehwish, N.; Lee, H. B., Emerging albumin hydrogels as personalized biomaterials. *Acta Biomaterialia* **2023**, 157, 67-90.
- 2) Meng, R.; Zhu, H.; Deng, P.; Li, M.; Ji, Q.; He, H.; Jin, L.; Wang, B., Research progress on albumin-based hydrogels: Properties, preparation methods, types and its application for antitumor-drug delivery and tissue engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, 11. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1137145.
- 3) Dinescu, S.; Kaya, M. A.; Chitoiu, L.; Ignat, A.; Kaya, D. A.; Costache, M., Collagen-Based Hydrogels and Their Applications for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels* **2018**, 1-21.
- 4) Hirota, S.; Mashima, T.; Kobayashi, N., Use of 3D domain swapping in constructing supramolecular metalloproteins. *Chem. Commun.* **2021**, 57, 12074-12086.
- 5) Doyle, M. L.; Gill, S. J.; Cusanovich, M. A., Ligand-controlled dissociation of Chromatium vinosum cytochrome *c'* *Biochemistry* **1986**, 25, 2509-2516.
- 6) Evers, T. H.; Merkx, M., Successful recombinant production of Allochromatium vinosum cytochrome *c'* requires coexpression of *cmm* genes in heme-rich Escherichia coli JCB712 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 327, 668-674.
- 7) Oda, A.; Nagao, S.; Yamanaka, M.; Ueda, I.; Watanabe, M.; Uchihashi, T.; Shibata, N.; Higuchi Y.; Hirota, S., Construction of a Triangle-Shaped Trimer and a Tetrahedron Using an alpha-Helix-Inserted Circular Permutant of Cytochrome *c*₅₅₅ *Chem. Asian. J.* **2018**, 13, 964-967.

化粧品基材に利用可能なペプチド界面活性剤のバクテリア合成系構築

名古屋工業大学大学院工学研究科

水野 稔久

Our aim is to create a bacterial synthesis system for the peptide gemini (PG)-surfactants, previously known for their antibacterial properties. We focused on the Polymyxin B synthesis enzyme, structurally similar to our target PG-surfactants. This enzyme, part of the non-ribosomal peptide synthesis (NRPS) family, comprises ten modules, each with an A domain for substrate amino acid adenylation, a T domain for conversion to thioester form, and a C domain for peptide chain elongation. To adapt this enzyme for PG-surfactant synthesis, we needed to modify the A domain's substrate amino acids to cysteine derivatives with alkyl chains. Prior studies suggested A domain mutation allows this conversion, yet details on the Polymyxin B A domain structure and crucial amino acids were scarce. In our study, we cloned and sequenced the ten Polymyxin B enzyme modules from *P. polymyxa* NBRC3020, expressed them in *E. coli*, purified the proteins, and tested each A domain's adenylation activity. We confirmed their ability to adenylate the respective substrate amino acids. Next, to activate modified cysteine derivatives with C1, C2, or C3 alkyl chains to SH groups, we introduced mutations in the 10th module's A domain. Our results showed these mutations successfully enabled the adenylation of these modified cysteine derivatives.

1. 緒言

「マイクロプラスチック問題」や「オーガニック志向」な風潮から、化粧品基材が天然由来成分であることや生分解性を持つことは、環境面への配慮のみならず利用者の健康面からも需要は高い。界面活性剤は化粧品に必須の基材であるが、アミノ酸やペプチドを極性基として含む界面活性剤はこの要件を満たす。しかし現状価格が高いため、その利用は限定されている。一方「薬用化粧品」の「有効成分」として、「細胞増殖因子様ペプチド」のような高度な生理活性ペプチドの利用も進んでいる。最近我々のグループでは、ペプチドを極性基として持つジェミニ型の界面活性剤 (PG-surfactant) の研究開発を進めており、低濃度の添加でも (臨界ミセル濃度 ~ 0.00001wt%) 様々な疎水分子を水中に分散できる基礎的性質に加え、高い抗菌活性を示す試薬開発に成功した (MIC ~ 4 μ g/mL、以下「抗菌性 PG-surfactant」と呼ぶ)¹⁾。更に一部の誘導体については、細胞毒性なく哺乳類細胞 (線維芽細胞や間葉系幹細胞など) に効率よく取り込まれるものも見つかっており、種々の生理活性ペプチドを細胞内まで送達可能な「細胞膜透過キャリア」としての利用も可能である²⁾。しかしこれらの化粧品基材としての実用化を考えた場合には、生産コストの問題を解決する必要がある。



Construction of Bacterial Synthesis System for peptide gemini surfactants Usable in Cosmetics Substrates

Toshihisa Mizuno

Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology

そこで本研究では、比較的安価に単鎖ペプチドの生産が可能な「バクテリアの非リボソームペプチド合成 (NRPS) 系」³⁾に着目し、新たな生産技術の開発に取り組む。具体的には、「抗菌性 PG-surfactant」に構造類似した抗生物質 Polymyxin B を生産可能な NRPS 合成酵素への変異導入により、「抗菌性 PG-surfactant」の生産を可能とする組換えバクテリア構築を最終的には目指したい。しかしこのためには、側鎖にアルキル鎖が修飾された Cys 由来の非天然アミノ酸を取り込んだペプチドの合成可能な NRPS 合成酵素の開発が必要であった。そこで本研究では、まず Polymyxin B 合成に関する NRPS 酵素の中に含まれる、基質アミノ酸の活性化に寄与するアデニル化 (A) ドメインに関して調査した。次に、この A ドメインへの変異導入により、側鎖にアルキル鎖が修飾された Cys 由来の非天然アミノ酸を活性化可能な A ドメインの開発に取り組んだ。最終的に、Polymyxin B に対する NRPS 合成酵素を持つ *P. polymyxa* へこれを組み入れるところまではできなかったが、側鎖にアルキル鎖が修飾された Cys 由来の非天然アミノ酸を含む非リボソームペプチド合成を可能とする NRPS 酵素は天然に存在しないため、多くの示唆を与える結果が得られたものと考えている。

2. 方法

2.1. 各モジュール遺伝子のクローニングと各モジュールのアミノ酸配列の決定

P. polymyxa NBRC3020 株は独立行政法人 製品評価技術基盤機構から入手し、TSBYE⁴⁾を培地に 30℃にて一晚培養することで増殖させた。この細菌に表 1 のプライマーを直接添加して行うダイレクト PCR によって、各モジュール部分の遺伝子クローニングは行った。なお

はリファレンスとなるアミノ酸 (終濃度 1 mM)、ピロホスファターゼ (0.2 unit/mL)、MgCl₂ (10 mM)、DTT (1 mM)、10% グリセロールを含む 50 μL の Tris HCl 緩衝液 (50 mM, pH 7.5) を 25 °C に保ち、ここへ ATP を終濃度 1 mM で添加することにより、酵素反応は開始した⁶⁾。そのまま 25 °C で 1 時間反応後、Phosphate Assay Kit (BioAssay Systems 社製) を添加し 25 °C で 20 分インキュベーションすることにより、溶液中に遊離したリン酸イオン濃度の非色定量を行った。この濃度を元に、間接的に基質アミノ酸のアデニル化割合の定量化を行った。一方でターンオーバー数 k_{cat} 、ミカエリス定数 K_m 、 k_{cat}/K_m などは、同様の反応を異なる基質アミノ酸濃度、反応時間でそれぞれ測定を行い、このプロットデータから得られる反応初速度と、各基質アミノ酸初濃度のデータを用いた Lineweaver-Burk plot から算出は行った。

2. 4. 基質アミノ酸認識サイトへの遺伝子変異と S アルキル化システインを基質アミノ酸として用いたアデニル化活性の評価

DNA シークエンス結果により明らかとなった各モジュールのアミノ酸配列を元に、AlphaFold 2 によって立体構造の推定を行った。

2. 5. 基質アミノ酸を、アルキル鎖を側鎖修飾された Cys に変換されたモジュール 10 の構築

立体構造予測を元に活性サイトで基質アミノ酸の識別にキーとなっているアミノ酸を特定し、ここへアミノ酸変異を行った変異体を構築することで、改変されたモジュール 10 の構築を行った。モジュール 10 の遺伝子に対して変異を導入し、2. 2. ~ 2. 3. と同様の方法にて、蛋白質発現、単離精製、酵素活性評価を行った。

3. 結果

3. 1. モジュール 1 ~ 10 までの遺伝子クローニングとアミノ酸配列の決定

Polymyxin B は 10 個のアミノ酸と、主鎖アミノ基に縮合される 1 個の脂肪酸から構成されており、L-Dab⁴ の側鎖アミノ基と L-Thr¹⁰ の主鎖カルボキシ基が最後に縮合されることで、環化された目的生成物は合成される。NRPS 酵素全体は、構成する 10 個のアミノ酸に対応する 10 個の酵素モジュールが連結された構造を持ち、さらにそれぞれのモジュールには基質アミノ酸のアデニル化を担う A ドメイン、これをチオエステル体として保持する T ドメイン、さらにこれと一つ前の T ドメインにチオエステル体として保持されている伸長ペプチド鎖どうしを縮合する C ドメインを含む。Polymyxin B の NRPS 合成酵素の各モジュールは、*pmx A*、*pmx B*、*pmx E* の 3 つの遺伝子領域に保持されている (図 2)⁵⁾。今回まず、各モジュール遺伝子をクローニングし、それぞれを可溶性蛋白質として得て、さらに A ドメインのアデニル化活性を評価可能にする必要がある。これを勘案し、表 1 に示した DNA プライマーを用いて各遺伝子のクローニングは行った。しかし、モジュール 3、4 に関しては配列相同性が高いためか、うまくそれぞれの遺伝子部分のクローニングができなかった。しかしこちらは遺伝子領域を切り出すための DNA プライマーをさらに最適化することで、最終的には達成できるものと思われる。得られた各モジュール遺伝子は、Gibson Assembly によって pET-21d (+) のマルチクローニングサイトに導入し、これを DNA シークエンスすることで各モジュール内のアミノ酸配列は決定した。図 3 (a) には、一例として決定されたモジュール 7 のアミノ酸配列を示し、図 3 (b) には、決定されたアミノ酸配列を元に推定されたモジュール

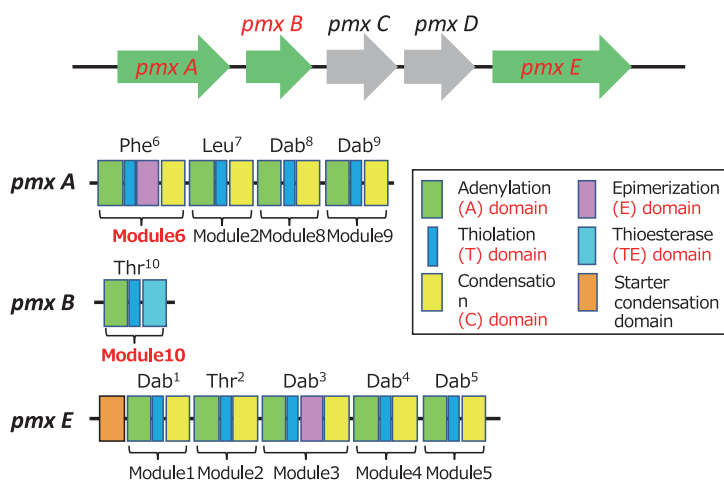


図 2 Polymyxin B の NRPS 合成に関わる遺伝子の配置 (合成酵素を構成する 10 個のモジュールは、Pmx A、Pmx B、Pmx E の 3 種類の蛋白質に振り分けられている)

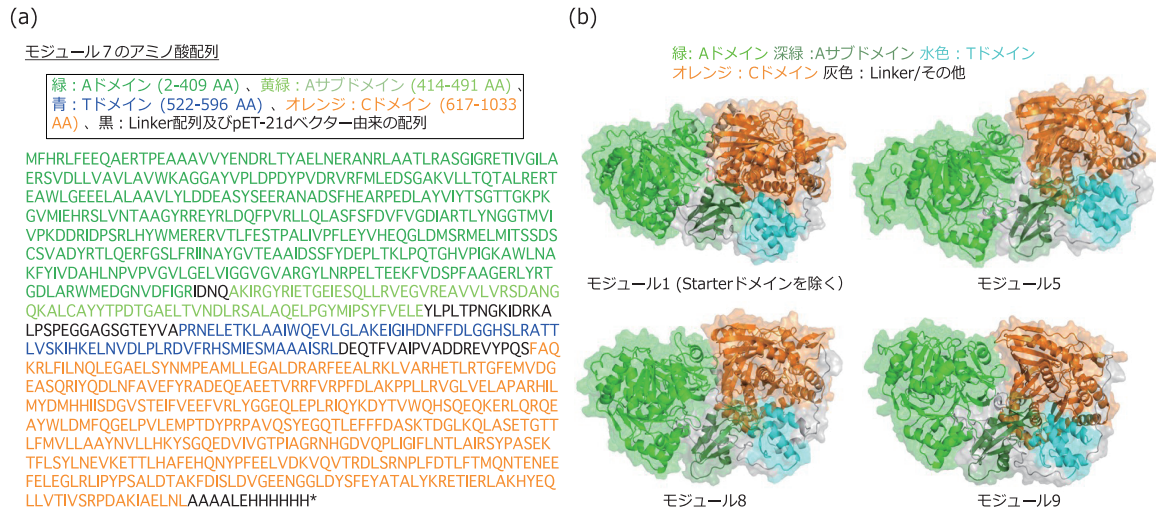


図3 決定されたアミノ酸配列の例と AlphaFold 2 により推定された酵素モジュールの立体構造:(a) モジュール7(118.3 kDa、基質アミノ酸は L-Dab)のアミノ酸配列、(b) モジュール1(172.0kDa、基質アミノ酸は L-Dab)、モジュール5 (124.6 kDa、基質アミノ酸は L-Dab)、モジュール8 (118.3 kDa、基質アミノ酸は L-Dab)、モジュール9 (119.3 kDa、基質アミノ酸は L-Dab)の推定立体構造

ル1、5、8、9の立体構造を示した。いずれのモジュールについても、含まれると想定されていたA、T、Cドメインなどを含むことがわかり、目的とする各モジュール遺伝子のクローニングができていたことが示された。また、各モジュールのアミノ酸情報の報告がある *P. polymyxa* E681株と配列相同性を評価したところ、Aドメインについては90%以上の高い相同性を持っていることがわかった。

3.2. 酵素モジュールの大腸菌を用いた蛋白質発現と単離精製

各モジュールの発現ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し、蛋白質発現と単離精製に取り組んだ。まず IPTG 添加による発現誘導を行ったところ、いずれのモジュールについても大腸菌による十分な生産量での異種発現が可能であることが分かった (図4 (a))。しかしその後、各酵素モジュールの単離精製のため、超音波処理による破碎バ

ッファーへの抽出を試みたが、上清画分として得られたのはモジュール1、5、6、8、9、10のみであった。モジュール2については、Pmx Eの一部をモジュール単位で切り出す形となるが、クローニングされたシーケンス結果からは、モジュールの全遺伝子領域は確実に取り出せていた。この結果は、Polymyxin Bの各酵素モジュールを水溶性蛋白質として得るためには、単純にモジュール単位で切り出して蛋白質発現するのではダメな場合もあるということがわかった。上清画分に得られた酵素モジュールに関しては、His-tagを用いたアフィニティーカラム精製を行い、その後のアデニル化活性の評価に十分な純度で得られたことを SDS-PAGE 分析により確認した (図4 (b) には一例として、モジュール1、6の結果を示す)。

3.3. 大腸菌を用いた各モジュールの蛋白質発現、そこに含まれるAドメインの活性評価

モジュール1、5、6、8、9、10に含まれるAドメインのアデニル化活性に関して、評価を行った。各モジュールに特異的な基質アミノ酸、これに構造類似性の高いもの、あるいは Polymyxin Bに含まれる他のアミノ酸などを 1mM の終濃度で加え、さらに ATP を終濃度 100 μ M で添加後、25 $^{\circ}$ C、1時間の反応条件で酵素反応を行った。なお酵素活性については、アデニル化反応の副生成物となるピロリン酸をリン酸に分解し、このリン酸濃度をモリブデン酸マラカイトグリーンアッセイにより定量化することで、間接的に評価した。

その結果、まず各モジュールは想定通りの基質アミノ酸に対して特異性を持つことがわかり、遺伝子クローニングの段階で目的とする各モジュール遺伝子が取得できている

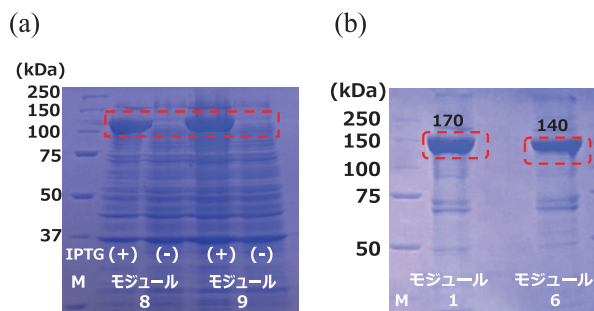


図4 (a) 15% SDS-PAGE を用いた大腸菌 BL21 (DE3) 株による、モジュール8、9の IPTG 誘導による発現確認、(b) 15% SDS-PAGE を用いた単離精製された酵素モジュール1、6の純度確認

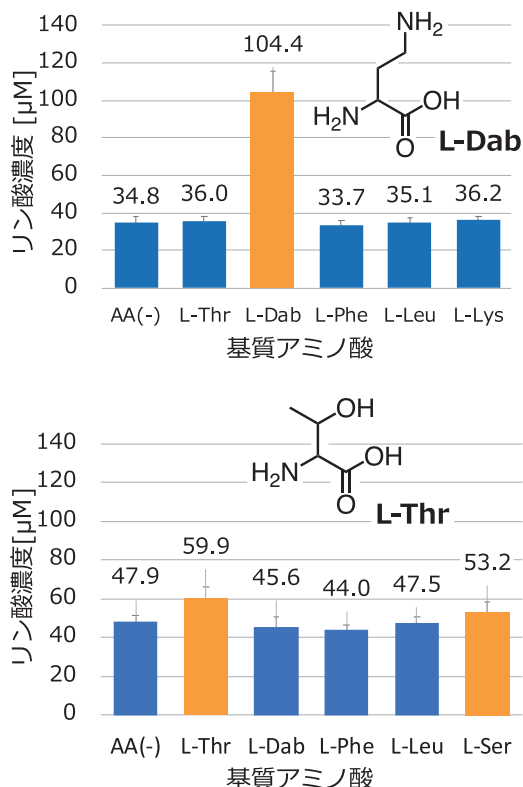


図5 モジュール5(上)、モジュール10(下)のAドメインにおける各基質アミノ酸に対するアデニル化活性の基質選択性に関する評価

ことが改めて示唆された(図5はモジュール5と10の結果を示す)。またモジュール10に関しては、元々の基質アミノ酸であるL-Thrだけではなく、構造的に類似したL-Serに対しても弱いながら活性をもつことが分かった。一方で、L-Dabを基質アミノ酸とするモジュール1、5、6、8、9については、L-Dabと比較的構造的に類似したL-Lysには全く活性をもたないこともわかり、モジュールごとの基質アミノ酸に対する特異性、厳密さに関しては、モジュールごとにその性質が異なることが分かった。

次に酵素活性の比較的高かった、モジュール1、5、8、9、10について、基質アミノ酸濃度を変化させた時の初速

度データを元にしたLineweaver-Burk plotにより、アデニル化活性のターンオーバー数 k_{cat} 、ミカエリス定数 K_m 、 k_{cat}/K_m を算出した(表2)。今回の評価では、Tドメインに対して4'-ホスホパンテテイン(4'-PPT)が導入されたホロ状態で評価を行っていないため、酵素はシングルターンオーバーの条件での評価となり、全体的な活性は低く見積もられた。しかし、得られたパラメーターを比較したところ、L-Dabを同じ基質アミノ酸として用いるモジュール5、8、9については、類似の酵素活性をもつことがわかった。一方でL-Thrを基質アミノ酸として用いるモジュール10については、L-Dabを基質アミノ酸として用いるモジュールと比較し、約1/50程度の活性であることが分かった。

3.4. Aドメインが基質アミノ酸をL-Dabにする場合、L-Thrにする場合にキーとなるアミノ酸残基の構造予測データを元にした考察

L-Dabを基質アミノ酸とするモジュール1、5、8、9、L-Thrを基質アミノ酸とするモジュール10について、各基質アミノ酸の認識にキーとなるアミノ酸の特定を、AlphaFold 2による立体予測構造を元に行った。まずL-Dabを基質アミノ酸とするモジュール1、5、8、9のAドメインにおける、基質結合サイト周辺の構造類似性に関して、各立体構造を重ね合わせた場合の平均二乗偏差(RMSD)も含めて評価した。まず全体的な傾向として、L-Dabを基質アミノ酸とするこれらモジュールに含まれるAドメインでは、高い配列相同性と共に、認識に関与するアミノ酸残基コンホメーションの類似性も推測された。具体的には、L-Dabの α -アミノ基はAsp204の側鎖カルボキシ基、 γ -位の側鎖アミノ基はAsp310により認識される一方で、アデニル化における補因子となる Mg^{2+} イオンはThr305、ATP由来のリン酸イオンはAsp394により認識される(図6)。これらは、モジュール1、5、8、9間で高い保存性が見られた。本研究ではL-Thrを認識するモジュール10に対して、側鎖にアルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるように改変を行ったが、もしこれらの

表2 Lineweaver-Burk plotによる各モジュールに含まれるAドメインのアデニル化活性の評価

Module	基質アミノ酸	MW (kDa)	k_{cat} [min^{-1}]	K_m [mmol L^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{L mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$]
モジュール1	L-Dab	172.0	0.061	0.261	0.235
モジュール5	L-Dab	124.6	0.550 ± 0.340	0.445 ± 0.210	0.826 ± 0.619
モジュール8	L-Dab	118.3	0.663 ± 0.058	1.09 ± 0.228	0.623 ± 0.095
モジュール9	L-Dab	119.3	0.478 ± 0.095	0.411 ± 0.029	1.15 ± 0.142
モジュール10	L-Thr	124.6	0.014 ± 0.004	0.725 ± 0.640	0.019 ± 0.007

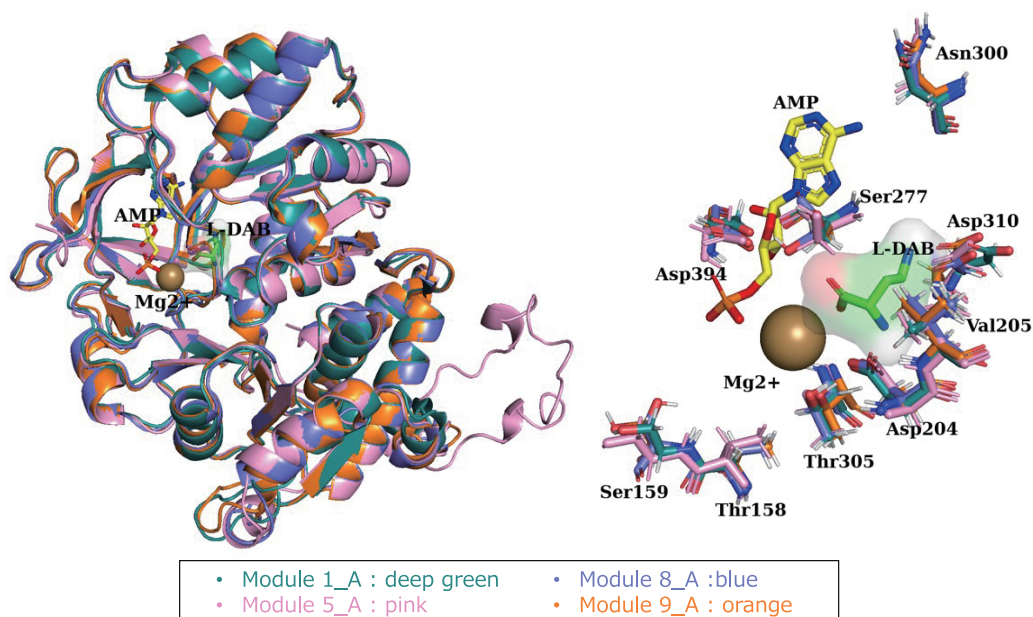


図6 モジュール1、5、8、9のL-Dabの結合サイト周辺の立体構造の比較(左)と結合サイト周辺のアミノ酸残基の比較(右)

モジュールをアルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるように変更するのであれば、Asp310を含めた周辺アミノ酸残基に対する変異が有効であると示唆された。

一方で、L-Thrをアデニル化するモジュール10のAドメインについては、L-Thrの α -アミノ基は同様にAsp204の側鎖カルボキシ基により認識される一方で、L-Thrの側鎖はPhe466が蓋をする形で認識をしていると推測された。アデニル化における補因子となる Mg^{2+} イオンはThr305、ATP由来のリン酸イオンはAsp394により認識されるのは変わらなかった。したがって、側鎖にアルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるようにモジュール10を改変するには、Phe466周辺へのアミノ酸変異が有効であることが示唆された。

3.5. アルキル鎖修飾システインのアデニル化を可能とするモジュール10への改変

モジュール10のAドメインを、アルキル鎖修飾システイン誘導体をアデニル化可能なものに変換するための変異候補残基について、AlphaFold2により予測されたモジュール10のAドメインの活性サイトへS-メチル化CysのAutoDock7によるドッキングシミュレーションを元に考察した。Asp204がL-ThrやL-Cysの α -アミノ基の認識に働いていることが予想され、こちらは*S. Albus*のNRPSに含まれるCysを基質アミノ酸として利用するAドメインでも保存されていた。一方で元々の基質アミノ酸であるL-Thrと比較し、アルキル鎖修飾システインでは側鎖方向の立体的嵩高さが大きく、先の項目で指摘していたように

Phe⁴⁶⁶が明らかに立体障害となることが予想された。

そこで、ここへのAla変異体(Phe466Ala)であれば、アルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるAドメインとして機能することが期待された。PCRとGibson Assembly技術を用いてこの変異体の発現ベクターを調製し、*E. coli* BL21 (DE3)株を用いて蛋白質生産を行った。大腸菌からの抽出を行ったところ元のモジュール10と同じように上清画分に得られたため、これをHis-tagカラムを用いて精製し、アデニル化活性の評価を行った。基質アミノ酸には、L-Thr、L-Serと共に、L-Cys、S-メチルL-Cys(L-Cys(Me))、S-エチルL-Cys(L-Cys(Et))、S-アリルL-Cys(L-Cys(All))を用いて活性評価を行ったところ、元々のモジュール10の基質アミノ酸であるL-ThrやL-Serに対する酵素活性が大きく減少した。一方でAドメインでは全く活性の見られなかった、L-Cys(Me)、L-Cys(Et)、L-Cys(All)に対してアデニル化活性が得られることが明らかとなった(図7)。本来は、この変異体をリードとして、擬似基質を用いた酵母ディスプレイ法などを用いたセレクション系に進んでいきたかったのであるが、図8に示した擬似基質合成法の確立には至ったものの、残念ながら本研究助成期間が終了してしまっただけで、本期間内に達成しきれなかったのは非常に残念であったが、今後は合成法の確立された擬似基質を用いたセレクション系を用い、当初目的となる側鎖にアルキル鎖修飾されたCysをアデニル化できるモジュール取得、さらにこれを*P. polymyxa*に戻すことで、抗菌性PG-surfactantの合成が可能なる組換えバクテリアの構築を目指していきたい。

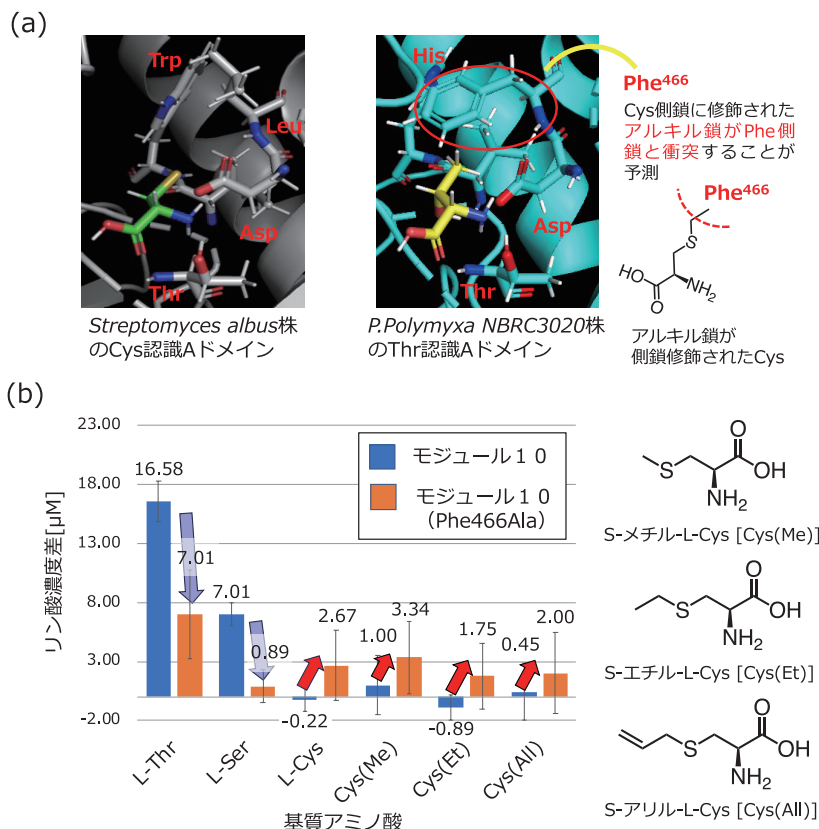


図7 アルキル鎖をSH基に修飾されたシステイン誘導体のアデニル化活性の評価；(a) *S. albus* のCys認識Aドメインと *P. Polymyxa* NBRC3020株のThr認識Aドメインの構造比較、(b) モジュール10のAドメインと、このAドメインに対してPhe466Ala変異を加えた変異体でのL-Thr、L-Ser、L-Cys (Me)、L-Cys (Et)、L-Cys (All)に対するアデニル化活性の比較

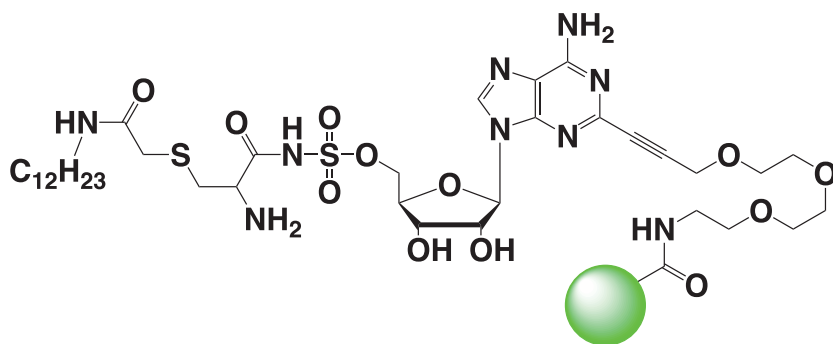


図8 合成法の確立ができた擬似基質の化学構造 (Aドメインでの反応生成物となる、アデニル化されたアルキル鎖修飾Cysに類似した化学構造をもつ。ホスホジエステル部分をスルホンアミドに変更することで、加水分解を受けずにAドメインに留まれる。またこの基質を固定相に固定化しセクション実験に用いるため、ビオチンをアデニン部分にアセチレン化PEGリンカーを介して導入した。黄緑色の丸部分に、ビオチンは修飾される)

4. 総括

本研究では、我々が以前に抗菌活性を示すと明らかにしたジェミニ型ペプチド界面活性剤 (抗菌性PG-surfactant) のバクテリアによる合成系構築を目指し、構造の比較的類似したPolymyxin Bの合成酵素に着目した。この酵素は非

リボソームペプチド合成酵素の1つであり、Polymyxin Bに含まれる10個のアミノ酸に対応した10個の酵素モジュールが連結された構造をもつ。抗菌性PG-surfactantの合成を可能とする酵素へと変換する上で、Aドメインの基質アミノ酸を側鎖にアルキル鎖を含むシステイン誘導体に変換が必要であるが、以前の報告において、Aドメインに対

して変異を加えることで、基質アミノ酸の変換が可能であり、結果産生される非リボソームペプチドへの変異も可能となると報告があった。しかし Polymyxin B 合成酵素の A ドメインに関しては、先行研究による構造情報がほとんどなく、各基質アミノ酸の認識でキーとなる A ドメイン内のアミノ酸残基が不明であった。そこでまず、Polymyxin B の合成酵素に含まれる 10 個のモジュール遺伝子を *P. polymyxa* NBRC3020 株からクローニングし、こちらのアミノ酸配列を明らかとした。またこれらが大腸菌にて発現し、各モジュール蛋白質を精製後、それぞれに含まれる A ドメインのアデニル化活性を評価し、確かにそれぞれが対応する基質アミノ酸のアデニル化が可能であること、またそれらの酵素活性パラメーターの算出を行った。最後に、C1、C2、C3 のアルキル鎖を側鎖修飾されたシステイン誘導体 (Cys (Me)、L-Cys (Et)、L-Cys (All)) を活性化できるように、10 番目のモジュールに含まれる A ドメインに対して変異を加え、結果これらのアデニル化が可能となるモジュール 10 の変異体の構築に成功した。本来は、この変異体をリードとして、図 8 に示した擬似基質を用いたセレクション系に進んでいきかけたのであるが、本期間内に達成しきれなかったのは非常に残念である。しかし引き続き検討を進めることで、本研究目的の達成を目指していきたい。

(引用文献)

- 1) Kimura, R.; Shibata, M.; Koeda, S.; Miyagawa, A.; Yamamura, H.; Mizuno, T. Development of New Antimicrobial Agents from Cationic PG-Surfactants Containing Oligo-Lys Peptides. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 4072-4082.
- 2) Sumito, N.; Koeda, S.; Umezawa, N.; Inoue, Y.; Tsukiji, S.; Higuchi, T.; Mizuno, T. Development of Cell-Penetration PG-Surfactants and Its Application in External Peptide Delivery to Cytosol. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 821-833.
- 3) Sussmuth, R. D.; Mainz, A. Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 3770-3821.
- 4) He, Z.; Kislá, D.; Zhang, L.; Yuan, C.; Green-Church, K. B.; Yousef, A. E. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 168-178.
- 5) Kim, J. F.; Jeong, H.; Park, S. Y.; Kim, S. B.; Park, Y. K.; Choi, S. K.; Ryu, C. M.; Hur, C. G.; Ghim, S. Y.; Oh, T. K.; et al. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 6103-6104.
- 6) McQuade, T. J.; Shallop, A. D.; Sheoran, A.; Delproposto, J. E.; Tsodikov, O. V.; Garneau-Tsodikova, S. A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis. *Anal. Biochem.* **2009**, *386*, 244-250.
- 7) Sousa, S. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins* **2006**, *65*, 15-26.

新規枝作り酵素による高保湿剤としての多分岐グルカンの合成と構造・物性解析

東京工業大学生命理工学院

八波 利恵

In recent years, the development of environmentally friendly materials with reduced environmental impact has been promoted in various fields in order to realize a sustainable society. Among them, materials synthesized by microbial enzymes are attracting attention as environmentally friendly materials because they do not require organic solvents during synthesis and are decomposed by microorganisms without causing environmental pollution.

Haloarcula japonica, a halophilic archaeon that requires high concentrations of salt, harbors the *malA* gene encoding an enzyme of the α -amylase family in its genome, and recombinant MalA expressed in *H. japonica* efficiently catalyzes the transfer of short glucose chains and produces highly water-soluble hyperbranched glucan. This property has been shown to produce a highly water-soluble hyperbranched glucan. This property makes the synthesized glucan potentially applicable as a high-performance moisturizer.

In this study, recombinant MalA was prepared to gain insight into the substrate specificity of MalA, and high molecular weight glucans were synthesized utilizing various maltodextrins and polysaccharides to analyze their chain length distribution. Furthermore, the solubility of glucans synthesized with MalA was evaluated under different NaCl concentrations. The results revealed that MalA mainly synthesizes highly branched glucans from maltodextrins of degree of polymerization (DP) 3 or higher and shows a unique ability to produce branched glucans from very short oligosaccharides such as G3. Furthermore, the glucan synthesized with MalA showed higher solubility than those synthesized without enzymatic treatment, suggesting its potential as a high-performance moisturizer.

The synthesized glucans have potential applications in the cosmetics industry as an environmentally friendly alternative to palm oil and squalene, addressing concerns regarding deforestation, human rights issues, and species extinction. Further studies on the structure and properties of the synthesized branched glucan will facilitate its use as a high-performance moisturizer in cosmetic formulations.

1. 緒言

近年、持続可能な社会の実現のために、環境負荷低減型の素材開発が様々な分野で行われている。中でも、微生物酵素によって合成される素材は、「合成の際に有機溶媒を使用しない」、「河川等に排出されても微生物が分解でき、環境汚染とならない」という2つの利点から環境に非常に優しい素材として注目されている。

*Haloarcula japonica*は、生育に高濃度の塩を要求する高度好塩性古細菌である¹⁾。また、*H. japonica*のゲノム上に α -アミラーゼファミリー酵素をコードする *malA* 遺伝子が見出され、発現型プラスミド pJMalA を用いた親株 *H. japonica* における組換え MalA の発現と性質検討が行われた。その結果、MalA は非常に短いグルコース鎖を極めて効率よく α -1,6 転移する新規な好塩性枝作り酵素であることがわかった^{2,3)}。薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた予備的解析の結果、オリゴ糖に組換え MalA を作用させ

て合成した高重合度グルカンは多くの分岐をもち、その分岐鎖は非常に短いことが推測された (図1)。またこの構造から、本グルカンは極めて水溶性が高く高保湿剤として利用できると考えられた。

そこで本研究では、まず MalA に関する知見を得るため、組換え MalA を調製し、基質特異性の解析を行うこととした。またこのグルカンは、非常に短い分岐鎖を数多く有する多分岐グルカンであることが推測されたが、その構造の詳細は調べられていない。そこで、各種マルトオリゴ糖および多糖に組換え MalA を作用させて高重合度グルカンを合成し、その分岐鎖解析および水に対する溶解性を評価した。なお、MalA との比較として、*Rhodothermus obamensis* 由来枝作り酵素 Branchzyme を用い、基質特異性の解析および Branchzyme を作用させて合成した高重合度グルカンの解析も行った。

2. 方法

2.1. 組換え MalA の発現および精製

MalA 発現型プラスミド pOMJ2 を *H. japonica* に導入し、形質転換体を取得した。取得した形質転換体を 37℃ で7日間培養し、可溶性画分を取得した。可溶性画分をニッケル固定化担体を用いた FPLC に供した。溶出した試料を透析し、SDS-PAGE を行った。



Synthesis, structure and property analysis of hyperbranched glucan as a high moisturizing agent by a novel branching enzyme

Rie Yatsunami

Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology

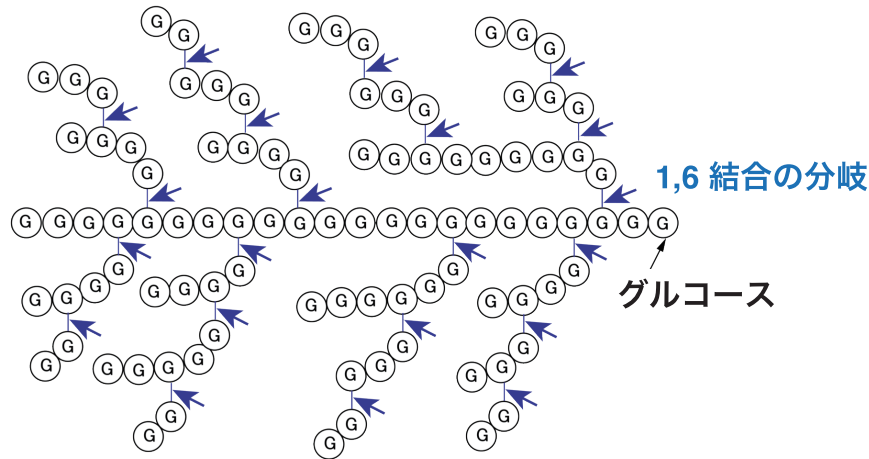


図1 MalA が合成する新規多分岐グルカンの構造模式図
新規多分岐グルカンは、多くの分岐をもち、その分子鎖は非常に短い。

2.2. 組換え MalA および Branchzyme の基質特異性の評価

基質には、マルトオリゴ糖としてグルコース (G1)、マルトース (G2)、マルトトリオース (G3)、マルトテトラオース (G4) を、多糖として可溶性デンプン、アミロース、アミロペクチンおよびグリコーゲンを用いた。可溶性基質 (マルトオリゴ糖、可溶性デンプン、アミロペクチンおよびグリコーゲン) の調製は以下のように行った。マイクロチューブに 20 mg の基質および 1.0 ml の滅菌イオン交換水を加え、設定温度 100℃ で加熱溶解した。溶解後、遠心分離により回収した上清を、2.0% (w/v) 基質溶液として用いた。不溶性基質であるアミロースの調製は、アミロースに 2.0 M NaOH を加え、適宜攪拌しながら溶解後、等量の 2.0 M HCl で中和し、2.0% 溶液を調製した。MalA の活性は、ヨウ素デンプン反応を用いた加水分解活性により算出した。2.0 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 40 μ l に、5.0 μ l の 2.0% 可溶性デンプンおよび 5.0 μ l の酵素精製標品を加え、37℃ において 15 分間反応を行った。反応液に 150 μ l のヨウ素試薬および 1.1 ml のイオン交換水を加え、波長 660 nm の吸光度を用いて測定した。上述の測定条件において、1 分間に A_{660} を 0.1 減少させるのに必要な酵素量を 1 ヨウ素デンプンユニット (ISU) と定義し、酵素活性を算出した。比活性 (ISU/mg) は酵素精製標品中に含まれるタンパク質濃度より見積った。Branchzym は 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 40 μ l に、5.0 μ l の 2.0% 可溶性デンプンおよび 5.0 μ l の酵素精製標品を加え、70℃ において 15 分間反応を行った。組換え MalA と同様に 1 分間に A_{660} を 0.1 減少させるのに必要な酵素量を 1 ヨウ素デンプンユニット (ISU) と定義し、酵素活性を算出した。

MalA による基質特異性の解析は、以下のようにして行った。すなわち、4.5 M NaCl を含む 200 mM クエン酸緩

衝液 (pH 6.5) 8.0 μ l に、2.0% 各種基質溶液 10 μ l および MalA 精製標品 (60 ISU/ml) あるいは 2.0 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 2.0 μ l を加え、37℃ において 24 時間反応を行った。反応産物は、TLC により解析した。すなわち試料を、TLC プレートにスポットし、展開溶媒として 1-ブタノール/酢酸/水 (混合比 2:2:1、v/v/v) を使用して室温で展開した。展開後の TLC プレートを風乾し、発色液に浸潤した後、加熱して発色させた。発色液には 6.5 mM MN-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩および 3% 硫酸を含むメタノール溶液を使用した⁴⁾。

2.3. 組換え MalA および Branchzyme による高重合度グルカンの合成

2.2.1. MalA による高重合度グルカンの合成

4.5 M NaCl を含む 200 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.5) 1.6 ml に、5.0% 各種基質溶液 (G3、G7、アミロペクチンおよびグリコーゲン溶液) 2.0 ml および MalA 精製標品 (60 ISU/ml) あるいは 2.0 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 400 μ l をポリエチレンチューブに加え、37℃ において 96 時間反応を行った。ただし、G3 に関しては合成効率の低さを考慮して、4 倍スケールで反応を行った。反応終了後、TLC 解析用に少量採取し、残りの反応液から高重合度糖転移産物の抽出を行った。

2.2.2. Branchzyme による高重合度グルカンの合成

100 mM Tris-HCl (pH 7.2) 1.6 ml に、5.0% 各種基質溶液 (G3、G7、アミロペクチンおよびグリコーゲン溶液) 2.0 ml および Branchzyme 精製標品 (60 ISU/ml) あるいは 100 mM Tris-HCl (pH 7.2) 400 μ l をポリエチレンチューブに加え、70℃ において 96 時間反応を行った。反応終了後、TLC 解析用に少量採取し、残りの反応液から高重合度糖転移産物の抽出を行った。

2. 4. 組換え MalA および Branchzyme が合成した高重合度グルカンの抽出

上述した糖転移反応溶液を遠心分離し、不溶性物質を除いた上清をマイクロチューブに分注し、15分間 (5分間×3、適宜激しく攪拌) 加熱して、反応溶液中に存在する MalA (あるいは Branchzyme) を失活させた。遠心分離により変性した MalA (あるいは Branchzyme) などの不溶性物質を除き、上清を得た。2倍量の冷100%エタノールを加え、ドライアイス上で20分静置し、遠心により沈殿を回収した。沈殿物を冷70%エタノールおよび冷アセトンで洗浄し、再度遠心した後、遠心濃縮機により減圧乾燥した。この沈殿物に対して0.4 M NaCl含有滅菌イオン交換水500μlを加えて加熱溶解後、遠心分離し、不溶物を除去した。この操作を繰り返し、上清を凍結乾燥したものを高重合度グルカン抽出物とした。また、高重合度グルカン抽出物を滅菌イオン交換水に溶解した溶液を高重合度グルカン溶液とした。

2. 5. 枝切り酵素による高重合度グルカンの分解と分解産物の解析

2.0% 各高重合度グルカン溶液4.0μlに、滅菌イオン交換水4.0μlおよびそれぞれ10mU/μlとなるよう調製したイソアミラーゼ、プルランナーゼ、オリゴ-1,6-グリコシダーゼ混合酵素液 (以降、枝切り酵素ミックスと呼ぶ) 2.0μlを加え、37°Cにおいて14時間程反応を行った。反応終了後、TLC解析を行った。

2. 6. 高重合度グルカンの各塩濃度下における溶解性評価

G7、グリコーゲンおよびアミロペクチンに組換え MalA を作用させて合成した高重合度グルカン [以後、それぞれ G7 (MalA+)、グリコーゲン (MalA+) およびアミロペクチン (MalA+) と呼ぶ] に 0-4.0 M NaCl 溶液 100μl を加えた。37°C あるいは 100°C のもと、15分間静置した (適宜激しく攪拌)。その後、遠心分離により上清を回収した。上清を滅菌イオン交換水で500倍に希釈したのち、フェノール硫酸法^{5,6)}を用いて試料に含まれるグルカン量を測定した。溶解率 (%) は、100°C で溶解したグルカン量 ($G_{100^\circ\text{C}}$) と 37°C で溶解したグルカン量 ($G_{37^\circ\text{C}}$) の割合を以下の式により算出した。

$$\text{溶解率 (\%)} = G_{37^\circ\text{C}} / G_{100^\circ\text{C}} \times 100$$

3. 結果および考察

3. 1. MalA 精製標品の取得

MalA 発現型プラスミド pOMJ2 を導入した *H. japonica* 形質転換体を培養後、菌体破碎後に得られた可溶性画分および不溶性画分を SDS-PAGE に供したところ、可溶性画分に MalA が過剰に生産されていることを示唆するバンド

が認められた。そこで、可溶性画分をニッケル固定化担体を用いた FPLC に供し、精製を行った。溶出後の試料を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行ったところ、単一バンドのタンパク質が検出され、MalA が精製されたことが確認された。

3. 2. 組換え MalA および Branchzyme の基質特異性の解析

マルトオリゴ糖を基質として組換え MalA の基質特異性を解析した。その結果、組換え MalA は G1、G2 には作用せず、G3 以上のマルトオリゴ糖から、もとの大きさ以上のオリゴ糖および多分岐グルカンを合成することが明らかとなった (図2)。G3 という非常に短いオリゴ糖から多分岐グルカンを合成する酵素はこれまで例がなく、全く新しい多分岐グルカンを合成している可能性が示唆された。また、各種多糖 (可溶性デンプン、アミロース、アミロペクチンおよびグリコーゲン) を基質として用いたところ、いずれの場合も多分岐グルカンが合成することがわかった。一方、G3 および G7 を基質に用いて、Branchzyme を作用させたのちの産物を TLC によって解析した。その結果、いずれの基質を用いた場合も加水分解産物および高重合度グルカンは検出されなかった。これより、Branchzyme は G3 および G7 に作用しないと考えられた。これに対し、アミロペクチンあるいはグリコーゲンを基質に用いた場合、いずれも加水分解産物と高重合度グルカンが検出され、糖転移反応の進行が確認された。

3. 3. 各種マルトオリゴ糖および多糖に酵素を作用させて合成した高重合度グルカンの解析

G3 あるいは G7 に MalA を作用させて合成した高重合度グルカンに枝切りミックスを加え、その分岐鎖を調べた [図3(a)]。その結果、G3 あるいは G7 に MalA を作用させて合成した高重合度グルカンは、G1 を含む非常に短い分岐鎖を数多く有する多分岐グルカンであることが示唆された。また、主な分岐鎖は G2-G4 と推測された。次に、基質であるアミロペクチンに対し、枝切り酵素ミックスで処理してその分岐鎖を調べたところ、G3 以上の分岐鎖を確認できた。しかしながら、G3-G4 のスポットは G6 以上に比べ薄いことから、アミロペクチンには非常に短い分岐鎖は少なく、G6 より長い分岐鎖を多く有することが推察された。そこで、アミロペクチンに MalA を作用させて合成した高重合度グルカンに枝切り酵素ミックスを加え、その分岐鎖を調べたところ、G2 以上の分岐鎖を確認できた。これより、アミロペクチンに MalA を作用させることで、より短い分岐鎖をもつグルカンを合成できることがわかった。一方で、グリコーゲンに MalA を作用させたものと、させていないものとは、その分岐鎖のパターンに変化はなか

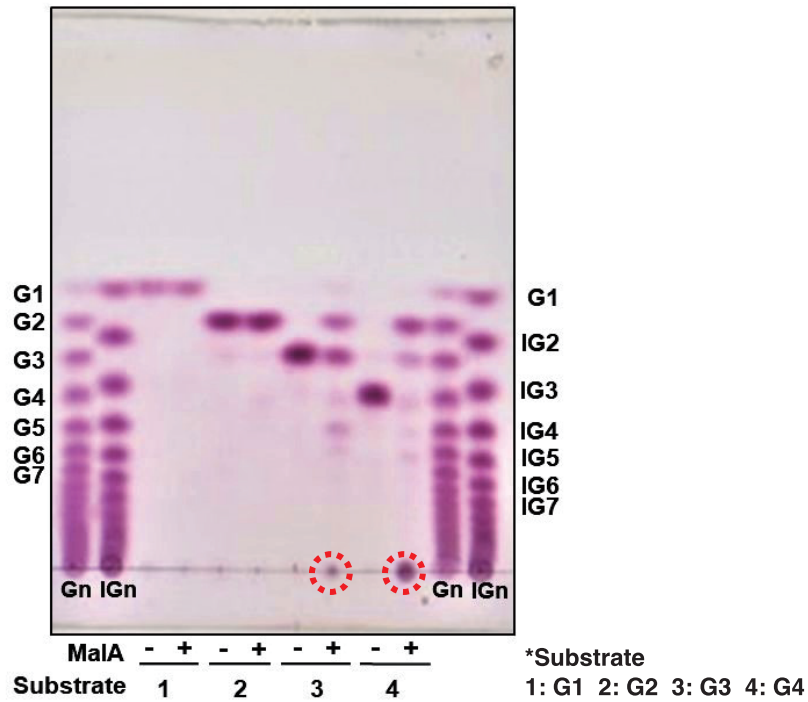


図2 マルトオリゴ糖を基質とした組換え MalA による加水分解および糖転移反応産物の TLC 解析

MalA に基質を加え、2.0M NaCl 存在下、37°C で 24 時間反応後の産物を TLC に供した。多分岐グルカンを破線の丸で囲った。

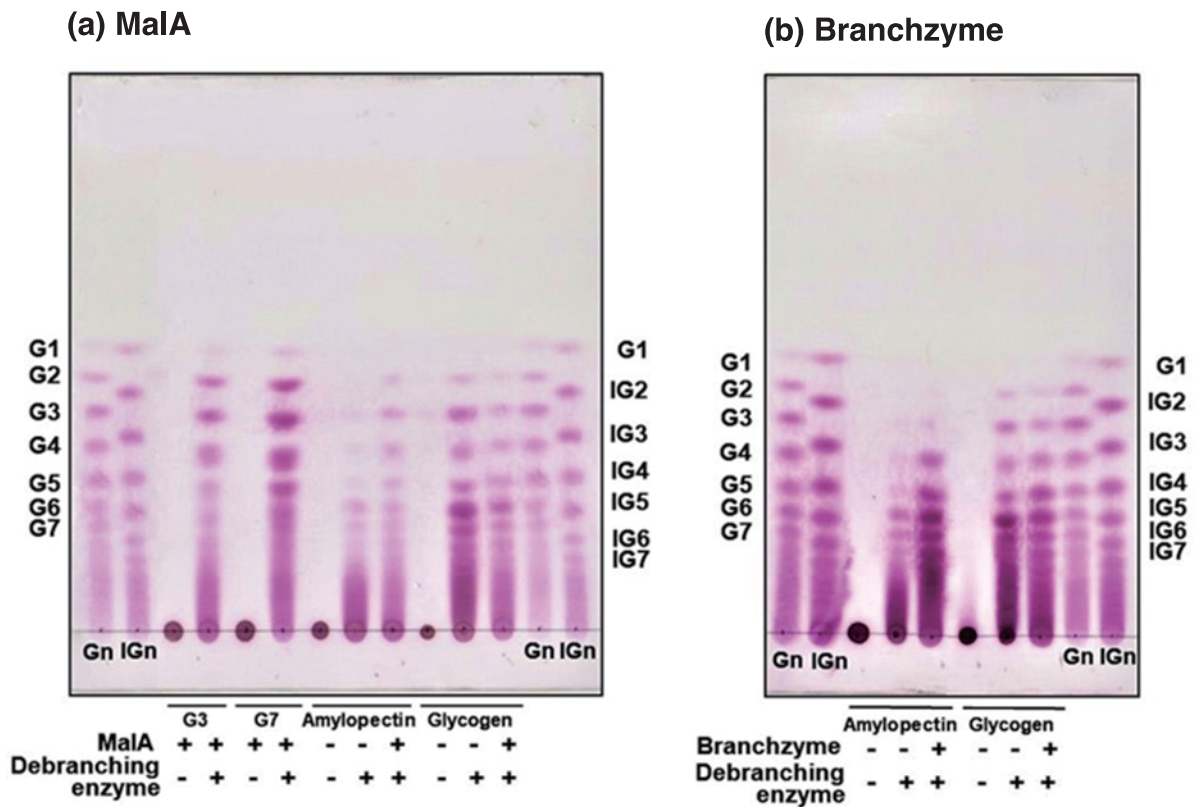


図3 マルトオリゴ糖あるいは多糖に酵素を作用させて合成した高重合度グルカンの TLC による分岐鎖解析
各基質に組換え MalA (a) あるいは Branchzyme (b) を用いて高重合度グルカンを合成したのち、枝切り後の試料を TLC に供した。

った。これより MalA はグリコーゲンには作用しにくいことが推測された。

同様に、アミロペクチンあるいはグリコーゲンに Branchzyme を作用させて合成した高重合度グルカンに枝切り酵素ミックスを加え、その分岐鎖を調べた [図 3 (b)]。アミロペクチンに Branchzyme を作用させて合成したグルカンからは、G2 以上の分岐鎖を確認できた。一方で、グリコーゲンに Branchzyme を作用させたものと、させていないものとは、その分岐鎖のパターンに変化はなかった。これより MalA と同様、Branchzyme はグリコーゲンには作用しにくいことが推測された。

以上の結果より、G3 あるいは G7 に MalA を作用させて合成した高重合度グルカンが、極めて短い分岐鎖を最も多くもつことがわかった。これより、本グルカンがより高い水溶性を有すると考えられた。

3. 4. G7 および多糖に MalA を作用させて合成した多分岐グルカンの溶解性解析

G7 (MalA+)、グリコーゲン (MalA+) およびアミロペクチン (MalA+) の 37℃ における各 NaCl 濃度下の溶解性を、溶解率を算出して評価した (図 4)。その結果、すべての多分岐グルカンにおいて NaCl 濃度における溶解性の差は見られなかったものの、MalA を作用させることで溶解率が高くなることがわかった。このことから、MalA を作用させて合成した短い分岐鎖を有する多分岐グルカンは、NaCl 濃度に関わらず高い溶解性を示すことが示唆された。また、MalA を作用させて合成したグルカンのうち、G7 (MalA+) は、グリコーゲン (MalA+) およびアミロペクチン (MalA+) に比べ、全ての NaCl 濃度下で最も高い溶解率を示すことがわかった。

4. 総括

本研究により、組換え MalA は G1、G2 には作用せず、

G3 以上のマルトオリゴ糖から、もとの大きさ以上のオリゴ糖および高重合度グルカンを合成することが明らかとなった。また、各種多糖 (可溶性デンプン、アミロース、アミロペクチンおよびグリコーゲン) を基質に用いた結果、可溶性デンプン、アミロース、アミロペクチンおよびグリコーゲンを基質として用いた場合、いずれも高重合度グルカン合成することがわかった。G3 という非常に短いオリゴ糖から多分岐グルカン合成する酵素はこれまで例がなく、全く新しい多分岐グルカン合成している可能性が示唆された。各種基質に組換え MalA を作用させて合成した高重合度グルカンの分岐鎖を解析したところ、G3 および G7 に MalA を作用させて合成した高重合度グルカンは、G1 を含む非常に短い分岐鎖を数多く有する多分岐グルカンであることが示唆され、主な分岐鎖は G2-G5 と推測された。このような短い分岐鎖をもつグルカンは既報の Branchzyme を用いても得ることができず、MalA は極めて短い分岐鎖をもつ新規多分岐グルカン合成を触媒する新規酵素であることが示唆された。さらに、MalA が合成したグルカンの溶解性を調べたところ、多糖に MalA を作用させることで溶解率が高くなることが明らかとなった。

現在、様々な分野で地球環境に優しいものづくりが求められ、コスメトロジーにおいても新しい技術開発が強く望まれている。これまで化粧品原料として使用されてきたパーム油 (植物油) は、東南アジアなどで生産されるアブラヤシから採取されている。そのため、プランテーション開発に関わる熱帯雨林の破壊・人権面などの問題が挙げられてきた。他にも化粧品用保湿剤として使用されているスクアレンは、深海ザメの肝油から生産されている。しかしながら深海ザメが絶滅危惧種であるため、今後漁獲に規制が入り生産が大幅に減少すると推定されている。これらに対し、本研究で合成する新規多分岐グルカンは、微生物酵素による合成であるため、環境破壊・人権問題・種の絶滅といった問題が全くない。また、本研究で合成したグルカン

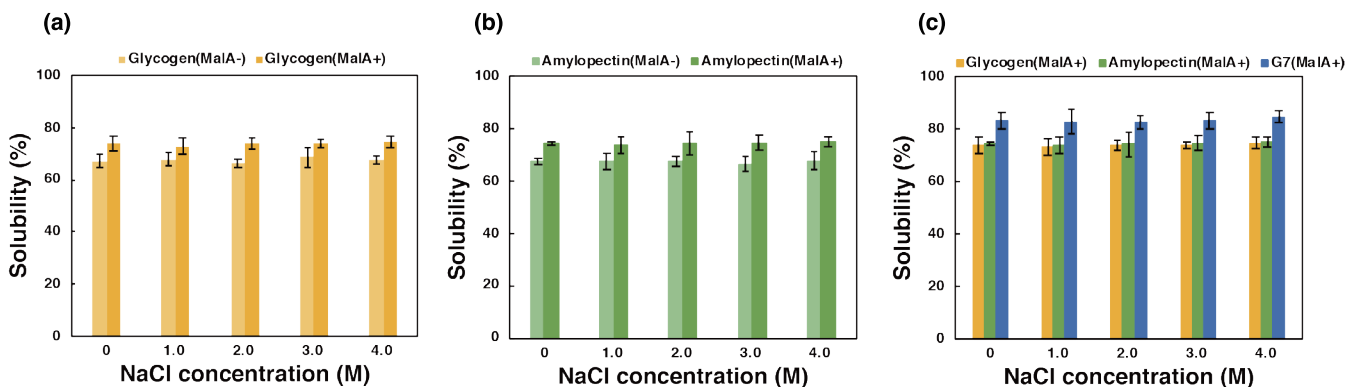


図 4 グリコーゲン、アミロペクチンおよび G7 に組換え MalA を作用させて合成した多分岐グルカンの各 NaCl 濃度下における溶解性解析 (a) および (b) はグリコーゲンおよびアミロペクチンを基質として MalA を作用させて合成した多分岐グルカンの溶解率を、(c) はグリコーゲン、アミロペクチンおよび G7 に MalA を作用させて合成した多分岐グルカンの溶解率を比較した。

は高い溶解性を有することからコスメトロジー分野における高保湿剤として応用が期待される。今後は、本研究において合成した多分岐グルカンの構造および物性をさらに詳細に調べ、高保湿剤としての応用を検討していく予定である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Horikoshi K, Aono R, Nakamura S. The triangular halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica*. *Experientia*, 49, 497-502 (1993)
- 2) Onodera M, Yatsunami R, Tsukimura W, Fukui T, Nakasone K, Takashina T, Nakamura S. Gene analysis, expression and characterization of an intracellular α -amylase from extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 281-288 (2013)
- 3) Sueda R, Yoshida K, Onodera M, Fukui T, Yatsunami R, Nakamura S. Characterization of a GlgC homolog from extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 85, 1441-1447 (2021)
- 4) Bounias M. N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride as a new reagent for nanomole quantification of sugars on thin-layer plates by a mathematical calibration process. *Anal. Biochem.*, 106, 291-295 (1980)
- 5) Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356 (1956)
- 6) 福井 作蔵. 還元糖の定量法 II, *化学と生物*, 3, 484-490 (1965)

ペプチドの革新的合成

中部大学

山本 尚

Peptide Synthesis was changed over 60 years from 1960 using innovation of solid state synthesis. Unfortunately, this method could not scale up and only useful for the synthesis of mg quantity.

We try to change the content of peptide synthesis completely and introduce three completely new innovations..

1. 緒言

地上の全ての生物はペプチドとペプチドが繋がったタンパク質で生きてきた。そのためペプチドは人類にとって欠かすことのできない重要物質である。1960年まで、ペプチドは人間が合成できないと言われてきた。しかし、若いロバート・メリフィールドは固相合成という天才的な手法でこの問題を解決した¹⁾。しかし、その後の60年間、この手法の何らの破壊的イノベーションも発明されないうまま、持続的イノベーションのみの発展で時間が流れた。そのため、現行のペプチド合成では微量合成は可能であるが、キロヤトンの工業的合成への問題点は解決されないまま現代にバトンをつないでしまっている。我々の研究室ではこの問題を解決すべく試行錯誤し、3つの主要な発明によりこれまでの固相合成を根底から覆す新手法を開発した。これは従来法を新たな手法に刷新できる破壊的イノベーションとして期待できる。

2. 方法

2.1.

ペプチド合成はこれまでアミノ酸もしくはペプチドC末端のカルボン酸を活性化する手法で合成を進めてきた。そのため、1つのアミノ酸を連結させるためには少なくともペプチド結合形成反応に加えて保護・脱保護反応の3工程が必要となるが、アミノ酸の種類に応じて更なる工程が必要となるケースも少なくない。我々はこの状況を根底から革新して、アミノ酸にジケトピペラジンを結合させる連続収束型ペプチド伸長反応を開発した。ジケトピペラジンはジペプチド環化体であり、対面に位置するアミド結合の片

側にBoc基などの保護基を修飾することで活性化することが可能であり、求核性アミノ酸エステルとともに攪拌することで位置選択的に開環に伴うアミド交換反応が進行し、対応する線状トリペプチドが得られる。この特徴的な反応はあらゆる添加剤を必要とせず進行するが^{2,3)}、有機酸触媒を添加すると劇的に加速し、わずか15分で反応が完結することも見出している。この手法はアミノ酸エステルだけでなくペプチドエステルを求核種として適用可能であるため、繰り返しBoc-保護ジケトピペラジンを系内に添加していくことで、ジペプチドを最小単位とした連続伸長によるオリゴペプチド合成が可能となる(two by two法; 図1)。この戦略により従来多工程により構成されるペプチド合成を飛躍的に簡略化した。

2.2.

分子内に複数アミド基が含まれるペプチドは、長鎖ペプチドになるにつれて分子内、もしくは分子間水素結合が複雑に構築され、脂溶性が極度に低下することによる固体化が観測される。この凝集体は一切の有機溶媒に不溶となるため、その後の伸長反応をはじめとする有機反応を全く受け付けない。この問題点は長きにわたるペプチド液相合成の課題となっており、多くの化学者を苦しめてきた。我々はこの一般的な問題について、含ケイ素TAGを開発することで解決した。ペプチドC末端にケイ素原子を含む長鎖アルキルエステルやベンジルエステルを調製し、長鎖ペプチド合成を試みたところ、短鎖ペプチドと同様の効率でペプチド結合を形成することが可能となり、標的化合物の合成に成功した⁴⁾。特にSi-Si結合をもつスーパーシリル基は特に有機溶媒に対する可溶性効率が高く、ケイ素原子に対して3つのトリアルキルシリル基が結合したTAGをブロパルギルアルコールと接続することで更なる脂溶性向上に成功した(図2)。これにより、10ペプチドほどの長鎖ペプチドも固体化せず、油状で取り扱いできることを明らかにした⁵⁾。



Destructive Innovation of Peptide Synthesis

Hisashi Yamamoto

Chubu University

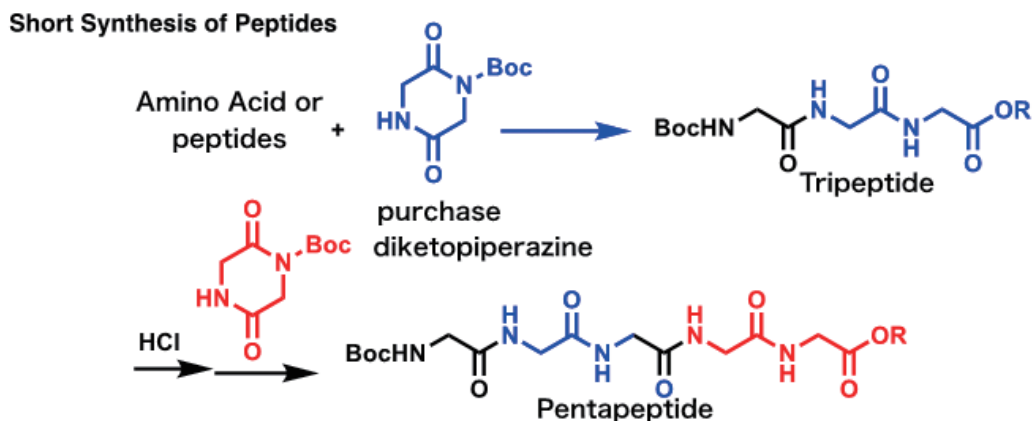


図1 Two by Two 法

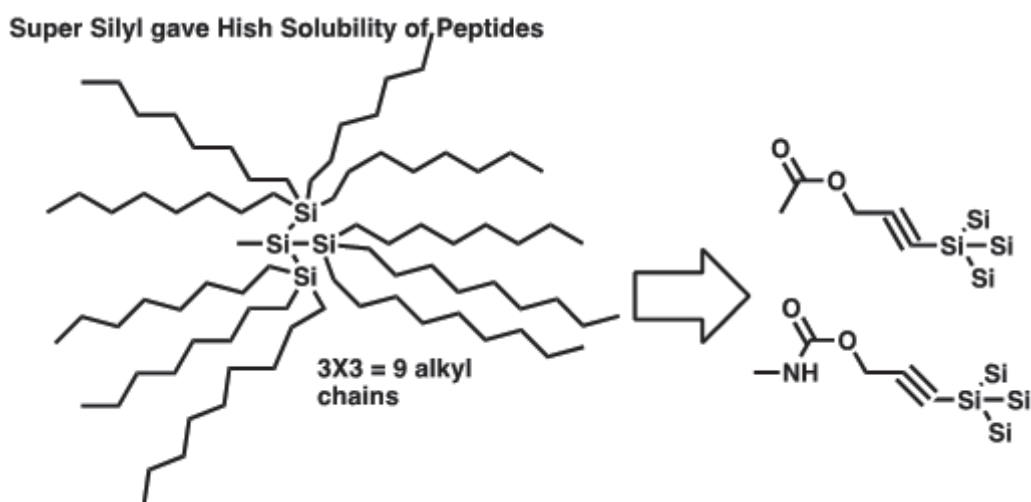


図2 スーパーシリル法

2. 3.

活性を有するペプチドは5ペプチド以上のオリゴペプチドや20ペプチドを超える長鎖ペプチドが大部分を占めている。しかし、長鎖ペプチド合成の反応開発ははまだアミノ酸を一つずつ連結し、脱保護を繰り返す手法に依存していた。一方、我々は2.1.の合成で短鎖ペプチド合成法の簡略化に成功し、2.2.の成果により長鎖ペプチド合成を液相合成で可能となるTAGを開発した。そこで最後に短鎖ペプチドから長鎖ペプチドを効率的に合成する手法の開発に着目した。我々はケイ素を含むジペプチド環化体であるシラサイクリックジペプチドの合成・単離に世界で初めて成功し、報告している(図3)⁶⁾。この化合物は空气中安定である一方、フッ素系試薬によって簡単に脱離が可能となるSi-NおよびSi-O結合によって構成されているためジペプチドへの両末端伸長が可能となる。そのため、このシラサイクリック化合物の両末端にアミノ酸を連結したテトラペプチド合成、またここで調製したテトラペプチドをシラサイクリック化合物の両末端に結合する10ペプチド合成、

などの収束型ペプチド伸長反応が可能となり、所望の長鎖ペプチドに短工程でたどり着ける効率的な手法を開発した。

3. 結果

2.1. 前述したBoc-ジケトピペラジンを現在10数種合成しており、そのうち伸長反応に応用した例全てにおいて80%収率を超える高収率で対応するトリペプチドが得られている。またそこで合成したトリペプチド体に対して新たなBoc-ジケトピペラジンを結合させるペンタペプチド合成も70%以上の収率で進行することを確認している。2.2.で記述したTAGを使用した長鎖ペプチド合成では抗菌作用を示すDRGN-I(14ペプチド)やアラニンにより構成される7ペプチド、HER2阻害作用を示すNalipepimut-S(9ペプチド)の合成を順次成功させ、その脂溶化効果を立証した。2.3.で示したシラサイクリック化合物は天然、非天然アミノ酸を含む50例の基質を合成し、そのうち24例では収率90%を超えている。またこのシラサイクリック化合物を利用した収束型合成にも挑戦し、現在6ペプチド

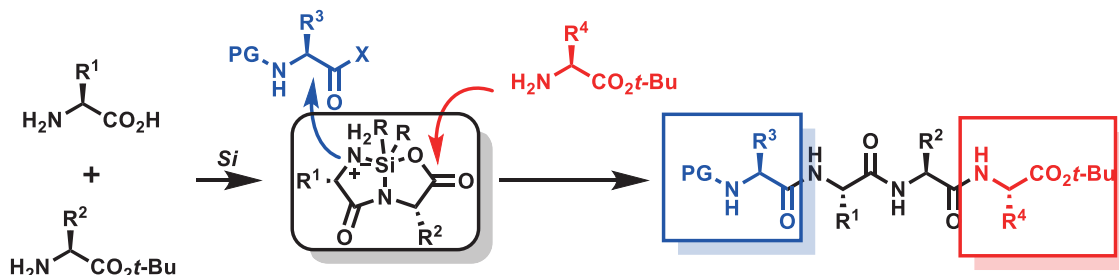


図3 収束型合成法

をワンポット反応で効率的に合成できることを明らかにした。

4. 考察

ペプチドは地上の生き物に欠かすことのできない最重要物質である。特に化粧品を含む医薬分野ではペプチド医薬品が未来を担う中分子創薬のエースと言って良い。現在毎分毎秒ペプチド合成に携わる研究室において新たなペプチドが合成されているが、その多くが医薬品としての重要性を見出せないまま廃棄されている。明日の医薬品はペプチドが負うといっても過言でないにもかかわらず、効果的なペプチドの合成が困難であることが問題を複雑化している。我々のペプチド合成がこの問題の解決の糸口となってくれることを切に願う。

(引用文献)

- 1) R. B. Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154 (1963).
- 2) W. Muramatsu, H. Yamamoto, An economical approach for peptide synthesis via regioselective C-N

bond cleavage of lactams. *Chem. Sci.*, **13**, 6309-6315 (2022).

- 3) I. Ramakrishna, T. Hattori, H. Yamamoto, Triisobutylaluminium-Mediated Regioselective Protection of Sterically Hindered Amide NH of Cyclo-(AA-Gly): Key Building Block for Next-Generation Peptide Synthesis. *Synlett*, **34**, A-H (2023).
- 4) A. Wu, I. Ramakrishna, T. Hattori, H. Yamamoto, Silicon-based hydrophobic tags applied in liquidphase peptide synthesis: protected DRGN-1 and poly alanine chain synthesis. *Org. Biomol. Chem.*, **20**, 8685-8692 (2022).
- 5) A. Wu, H. Yamamoto, Super silyl-based stable protecting groups for both the C- and N-terminals of peptides: applied as effective hydrophobic tags in liquid-phase peptide synthesis. *Chem. Sci.*, **14**, 5051-5061 (2023).
- 6) T. Hattori, H. Yamamoto, Synthesis of Silacyclic Dipeptides: Peptide Elongation at Both N- and C-Termini of Dipeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **144**, 1758-1765 (2022).

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

表皮電位を指標とした皮膚バリア光治療法の時空間的評価

東京都立大学システムデザイン学部機械システム工学科

阿部 結奈

As the involvement of epidermal keratinocytes in signal transduction triggered by various external stimuli attracts attention, red light irradiation has been suggested to promote the recovery process of skin barrier disorder. For its practical application as a therapy, further elucidation of the underlying mechanism and the optimum parameter of the stimuli is needed. In this study, transepidermal potential difference (TEP), the electrical voltage generated across the epidermal tissue, was utilized as a measurement indicator to evaluate the integrity of the skin barrier. TEP can be measured by a simple system with a pair of reference electrodes connected to the top and bottom of the tissue via salt bridges. The potential difference is derived from the localization of ions in the epithelial tissue, and the disturbance of normal distribution caused by damage to the skin structure decreases the potential difference. Skin specimens extracted from hairless mice were used for *ex vivo* measurement. The specimens showed ca. -6 mV of TEP and promoted recovery of TEP by red light irradiation after the barrier destruction by acetone. The acceleration of recovery varied depending on the radiance and the duration of the stimulation. Higher radiance showed better recovery even in short duration, but it seemed to have a “window” for maximizing the therapeutic effect and avoiding the toxic effect of high-intensity light. Then, continuous TEP measurement was carried out to observe the acute response to the irradiation. Hydrogel salt bridges composed of polyvinyl alcohol were shown as a promising material to avoid excessive hydration of the tissue during the measurement. This method will enable the *in situ* evaluation for elucidating the therapeutic effect of the light stimuli and its safe application.

1. 緒言

表皮ケラチノサイトは、角層を主体とする構造的な皮膚バリアを形成する一方、近年では侵害受容や温度感覚等、様々な外的刺激の伝達に関与していることが明らかになりつつある^{1,2)}。光刺激もまた表皮によって受容されることが示唆されている。表皮細胞には光受容分子オプシンが発現しており³⁾、可視光周辺の波長域の光が、メラニン産生、創傷治癒、コラーゲン産生等のプロセスを調節する働きを持つことが知られている⁴⁾。本研究では、先行研究⁵⁾で報告された赤色光の皮膚バリア回復促進効果に着目した。この効果には網膜度と類似した光受容経路の関与が示唆され⁶⁾、細胞レベルでは細胞形態の改善やタンパク質発現量の増大が観察されている⁷⁾。

ここで、表皮組織内にはイオンの局在が生じ、 Ca^{2+} などの濃度差が細胞増殖や分化のシグナルとして働くことが知られている⁸⁾。このような濃度差により、組織の厚み方向には表皮電位 (transepidermal potential difference, TEP) と呼ばれる電位差が生まれ、その大きさはヒト皮膚では部位により数十mV程度に達する⁹⁾。TEPの値は皮膚バリアの機能不全 (イオン分布の変化を伴う) により減弱

することから、バリアの定量評価指標として活用できる可能性がある¹⁰⁾。一般的なバリア評価指標である経皮水分蒸散量と比較すると、TEPは皮膚組織の内部状態を反映するため計測雰囲気の影響を受けにくく、オンデマンドでの評価が可能となると期待できる。既報¹¹⁾では、ブタ皮膚切片の*ex vivo*モデルを用いて、実験的なバリア破壊によりTEPが減弱し再び回復すること、適切な条件での赤色光照射がTEPの回復を促進すること等を観察した。本研究では、赤色光によるバリア治療法の確立に向けた基礎的検討として、赤色光刺激の条件による回復効果の評価を試みた。

2. 方法

計測対象としてヘアレスマウス皮膚切片 (株式会社星野試験動物飼育所, ラボスキン) を用いた。これは体毛を持たないヘアレスマウス成体 (Hos: HR-1) の背部全層皮膚であり、摘出後は凍結せずに氷冷状態で輸送し、実験まで4℃で保管したのち、実験直前に培養液 (gibco, DMEM, フェノールレッド不含) を含む濾紙に載せて室温に戻した。TEP計測系は既報^{9,12)}を参考に、図1に示す形に組み立てた。リング液 (大塚製薬) に4wt%のアガロース (フナコシ, Agarose I) を溶解し、シリコンチューブ (AS ONE, ラボランチューブ, 内径3 mm) に充填してゲル化させ、塩橋とした。電気化学アナライザ (BAS, AL7082E, 開回路電圧測定モード) の2つの測定端子にそれぞれAg/AgCl参照電極 (イーシーフロンティア, RE-1B) を接続した。2つの電極はそれぞれ飽和KCl溶液に浸し、さらに塩橋で皮膚切片と接続した。ここで、一方の塩



Spatiotemporal Evaluation of Light Treatment for Skin Barrier Based on Transepidermal Potential Difference

Yuina Abe

Tokyo Metropolitan University

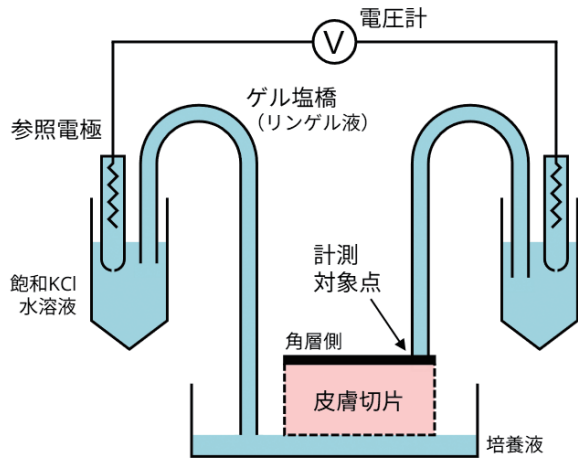


図1 皮膚切片 TEP 計測系模式図. 電圧計の両端子に参照電極を接続し, さらに表皮組織までを電解液 (飽和 KCl, リンゲル液, 培養液, 皮膚切片内組織液) で接続した.

橋は表皮 (角層) 側の計測対象点に直接接触させ, もう一方は培養液を含んだ濾紙を通じて真皮側と電氣的に接続した. この系は表皮 (角層) と真皮との間に生じる電位差を計測するが, 真皮内に電位差が発生しないことは先行研究⁹⁾および以前の報告¹³⁾, 本研究の予備実験により確認済みであり, 計測された値は表皮組織の厚み (深さ) 方向に沿う電位差に等しいとみなすことができる.

光照射系は既報¹¹⁾と同様とした. 白色 LED 光源 (林時計工業, LA-HDF5010) に赤色フィルター (林時計工業, R-60 φ22.5mm) とライトガイド (林時計工業, LGC1-3L1000) を取り付け, 赤色光源として用いた. ライトガイド先端を対象に近づけ, 直径 8 mm 程度の円形の領域に赤色光が照射されるよう調整した. 光パワーセンサ (日置電機, Optical Power Meter 3664, Optical Sensor 9743) で放射照度を確認し, LED 光源の出力を目的の照度に合わせた.

2.1. ヘアレスマウス皮膚切片の TEP 計測

皮膚切片の表皮側で計測対象点を決め, この点における TEP を 60 秒間計測した. サンプルング周期は 0.1 秒とした. 60 秒間の計測値から平均を算出し, TEP の初期値とした. 計測後, 計測対象点を中心とした 10 mm 角の範囲を, アセトン (富士フィルム和光純薬) を含ませた綿棒で拭くことで脱脂し, 実験的にバリア機能不全状態を模擬した. このとき, 表皮組織の機械的損傷を最小限に抑えるため, 綿棒は皮膚切片表面を軽く転がすように操作した. 1 分間静置し, アセトンを揮発させた.

計測対象点の TEP を再度 60 秒間計測した. ここで, TEP が初期値の 40-80% となったことを確認した. これより値が大きかった場合は, 40-80% になるまでアセトン処理を繰り返した. 値が 40% 未満となった場合は計測を中止し, この切片のデータを除外した.

2.2. 赤色光照射による TEP 変化の観察

まず 2.1. と同様に, 皮膚切片の表皮側で計測対象点を決め, TEP を 60 秒間計測した. その後アセトン処理を行い, 再び TEP を 60 秒間計測し, 電位差の大きさが初期値の 40-80% となったことを確認した.

つづいて計測対象点に赤色光を照射し, 各条件を比較した. 照度条件の比較のため, 放射照度を 10, 20, 40 mW/cm² の 3 段階に設定し, 各サンプルに 60 分間の照射を行った. このとき, 照射開始から 20 分ごとに TEP を計測した. また, 放射照度を 20 mW/cm² に固定したうえで照射の持続時間を 5 分, 1 分および 1 秒に変更し, 照射直後および照射終了後の TEP を計測した. すべての条件で照射開始から 10 分後, 20 分後に計測を行った.

また, 光の効果の空間的な広がりについても検討した. 放射照度を 20 mW/cm² に, 持続時間を 20 分に設定し, 光照射点からの距離が異なる 3 点の計測対象点をとって, 照射開始から 20 分ごとに TEP を計測した. 距離は 0 mm (光照射点直下), 10 mm, 20 mm とした. このとき, アセトン処理の領域は 3 つの計測対象点すべてが収まるよう, 10 × 30 mm に広げた.

2.3. PVA ゲルを用いた TEP 連続計測の検討

比較的短時間に起きる TEP 変化のモニタリングをめざし, 連続計測の検討を行った. ここで, アセトン処理を施したヘアレスマウス皮膚の表面を覆い, 水分の蒸発を妨げると, 角層脂質の回復が阻害されることが報告されている¹⁴⁾. 本計測系は塩橋内の電解液を介して電圧計と皮膚切片を接続するため, 測定中は計測対象点が湿潤状態に保たれ, 回復を阻害する可能性がある. この影響について確認するため, 測定対象点を 20 × 20 × 1 mm のゲル塩橋シートで覆い, この上から光を照射して 10 分ごとに TEP を計測した. 光の放射照度は 20 mW/cm² に, 持続時間は 10 分に設定し, 照射終了と同時にゲル塩橋シートを除去した. シートの材料として, 従来用いていたアガロースゲルと, PVA クライオゲルの 2 種類を比較した. PVA クライオゲルは, 25% ジメチルスルホキシド水溶液に PVA (Moiwol® 28-99, Sigma-Aldrich) 15 wt% を加熱溶解し, 凍結・融解のサイクルを 3 回繰り返すことで作成し¹⁵⁾, 純水中で洗浄したのち溶媒をリンゲル液に置換したものをを用いた.

また, 皮膚切片に直接接触するチューブ充填のゲル塩橋を PVA クライオゲルに変え, 1 時間の連続計測を行った. 計測開始から 60 秒後に光照射を開始し, 計測終了まで照射を続けた.

3. 結果

図 2 にヘアレスマウス皮膚片の TEP 計測結果を示す. 計測開始当初の状態では, 各サンプルは皮膚表面 (角層)

側が負になる-6 mV前後の電位差を示した。電位差の極性の向きは各先行研究^{9, 13, 16)}の報告と一致し、また電位差の大きさはヘアレスマウス皮膚の *ex vivo*¹⁶⁾ および既報¹³⁾ における *in vivo* 計測結果の中間程度であった。アセトン

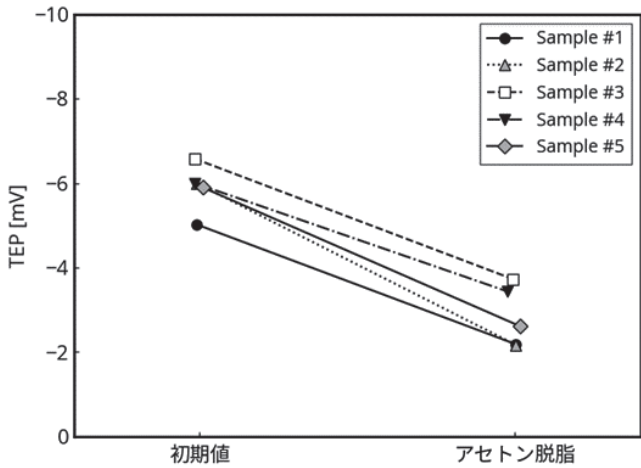


図2 マウス皮膚切片のTEP初期値, およびアセトン脱脂後のTEP.

塗布による脱脂処理を施すと、TEPは-2.2 mVから-3.4 mV程度の値にまで減少した。先行研究¹⁶⁾では、本研究結果よりTEP初期値の小さい(-4mV程度)皮膚切片に対してテープストリッピングによる皮膚バリア破壊処理を施したところ、2 mV程度の電位差減少が観察された。ここで、TEPの値は部位により異なることが報告されている⁹⁾ため、以降の検討では各計測点における当初のTEPの値を100%として算出した変化率に基づき、電位差変動の傾向を比較した。アセトン処理による変動幅については先行研究¹⁶⁾を参考に、本研究では当初TEP値の40-80%に減少したサンプルを以降の実験に使用可能であると判断した。

図3(a)-(c)に光照射時のTEP計測結果を示す。なお、データの一部は図2の結果と同一のものである。脱脂処理により、TEPの値は平均して当初値の60%程度にまで減少した。その後、TEPの値は多くのサンプルで増大し元の水準に近づいたが、光照射の条件により回復の程度は異なった。

放射照度の条件について比較すると(図3(a)), 10 mW/cm²および20mW/cm²では、光を照射しない場合

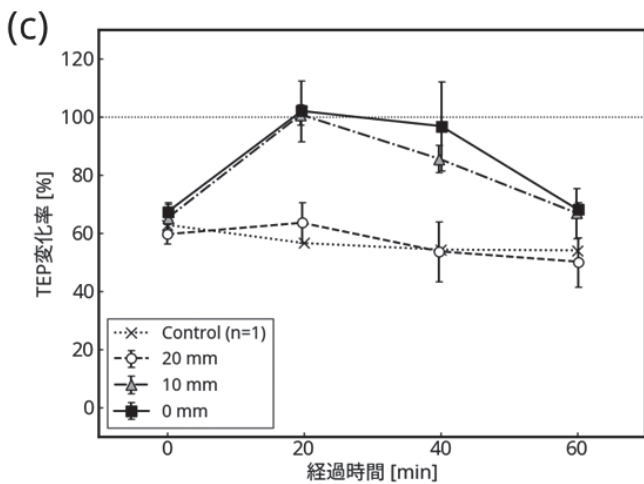
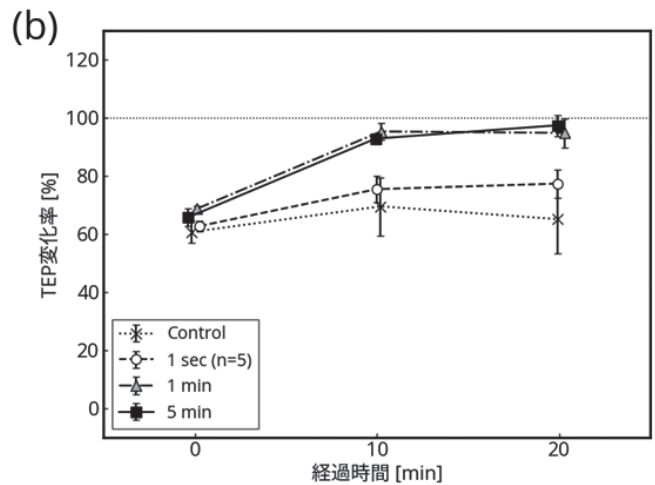
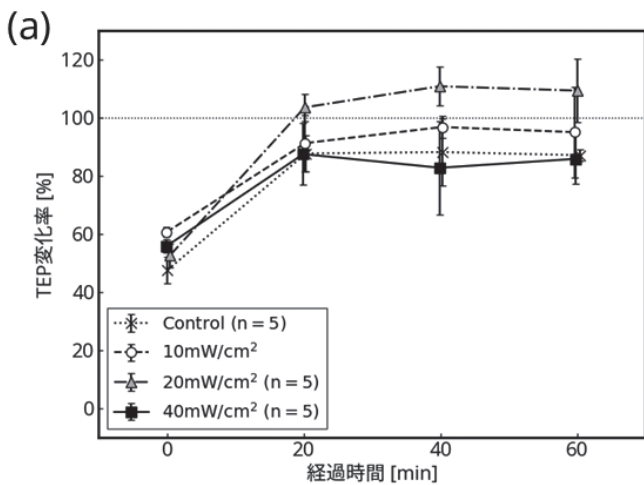


図3 赤色光照射によるTEP変化。(a)赤色光を持続時間60 min, 10-40mW/cm²の異なる放射照度で照射した場合。(b)赤色光を放射照度20mW/cm², 1 sec-5minの異なる持続時間で照射した場合。(c)赤色光を放射照度20mW/cm², および持続時間20minで照射した場合の、照射点からの距離0-20mmにおけるTEP変化。エラーバーはすべて標準誤差。特記なき場合n=3。

に比べてTEP値の回復が早まり、また、その効果は20 mW/cm²の条件のほうがより大きかった。一方、さらに放射照度が大きい40 mW/cm²では、回復の程度は光を照射しない場合とほぼ同等であった。

照射の持続時間について比較すると(図3(b)), 1 min および5 minの条件では、照射開始後20分までに、いずれの場合も最大で100%程度にまでTEPが回復した。1 secでは、回復促進的な効果はほとんどみられなかった。照射点から空間的に離れた点での回復については(図3(c)), 照射点直下の距離0 mmの点と距離10 mmの点が、特に照射終了直後の20 minの時点において同様の回復傾向を示した。距離20 mmの点、および光を照射しなかった点では回復がほとんどみられなかった。なお、この実験では他の実験に比して全体的にTEP回復が小さい傾向がみられ、すべての条件で光照射終了後、時間経過に伴いTEPが減少していった。推測される原因については後述する。

図4(a)(b)にPVAハイドロゲル塩橋を用いたTEP連続計測の検討結果を示す。

ハイドロゲル被覆の影響を比較すると(図4(a)), いずれの条件でも10分間の被覆・光照射の直後に、TEPの値は初期値の20%程度にまで減少した。ゲルを除去した後、アガロースゲルで被覆したサンプルの回復は平均で45%程度にとどまったが、PVAゲルで被覆したサンプルは平均で90%程度にまで回復した。

PVAゲル塩橋を用いて光照射中のTEP連続計測を行ったところ(図4(b)), 計測開始時に40%程度であったTEP変化率は、3600秒時点で約83%にまで回復した。

4. 考 察

光照射によるTEP値回復促進効果は、皮膚が受け取っ

た光エネルギーの密度(放射照度と持続時間の積、フルエンス)に対して単調な相関関係を示さなかった。放射照度については20 mW/cm²における回復効果が最も大きく、また、持続時間については1分間程度でも、60分間の連続照射に近い回復効果がみられた。

本研究以前に実施した、家畜ブタの皮膚片を用いた実験¹¹⁾では、放射照度が大きいほどより大きな回復促進効果がみられたものの、光源装置の最大照度(40 mW/cm²)を超える条件については検討できなかった。ブタ皮膚においても、さらに放射照度が大きい条件では回復効果が小さくなる傾向がみられた可能性がある。またフルエンスを考慮すると、40 mW/cm²の照度で10分間の照射を行った場合にはTEPが初期値に近いレベルまで回復した一方、フルエンスで勝る26 mW/cm²・60分間の照射では十分に回復しないサンプルが多かった。本研究の結果と照らし合わせると、光によるTEP値回復促進効果はエネルギー量依存的に現れるものではなく、短時間であっても適切な照度の光を当て、治療的效果を誘起するプロセスがより重要であると推測される。

関連する研究例として、赤色LED照射によるマウス皮膚の創傷治療促進法に関し、フルエンスが同一となる複数の条件で比較が行われた¹⁷⁾。この研究では、照度8 mW/cm²程度の光を約600秒/日で露光する条件でもっとも治療効果が高く、他の照度・時間の条件では効果が小さかった。治療プロセスに関与する細胞の代謝や増殖を促進するには一定以上の照度の光が必要である一方、過剰な刺激は有害な効果をもたらす治癒促進を妨げたと推測された。本研究でみられたTEP回復効果の傾向についても、同様の機序によって説明がつく可能性がある。

また、既報¹¹⁾のブタ皮膚切片を用いた実験と、本研究

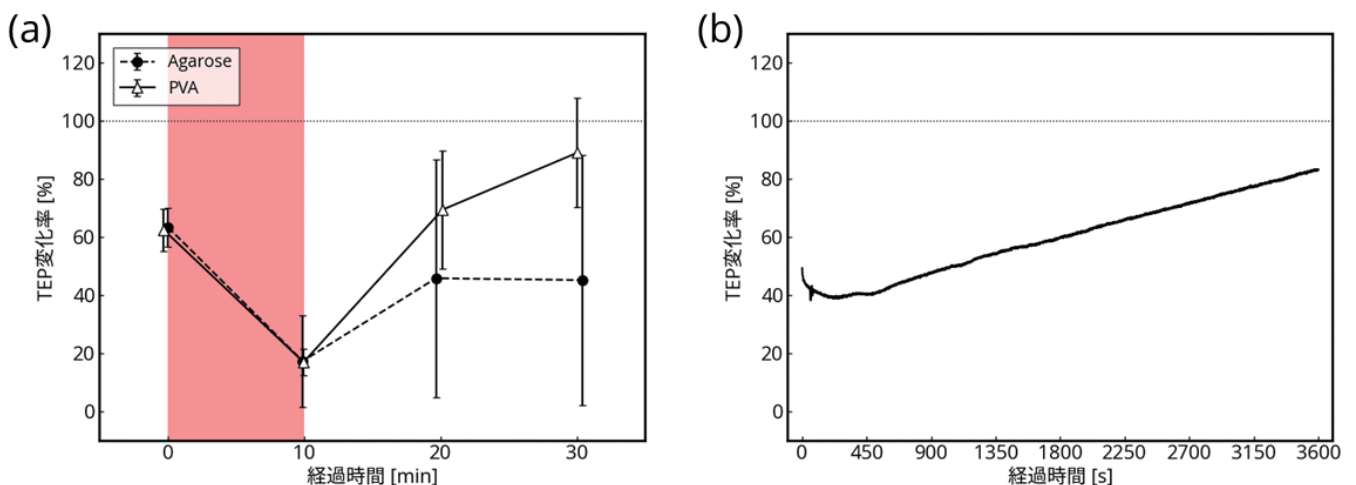


図4 PVAハイドロゲル塩橋を用いたTEP連続計測の検討。(a) ハイドロゲルで被覆しながら光を照射した場合のTEP値変化、n=3。エラーバーは標準偏差。薄赤色で塗りつぶした領域は被覆・光照射の期間を表す。(b) PVAハイドロゲル塩橋を用いたTEP変化の連続計測。

のマウス皮膚切片を用いた実験では、最も効果が高いとみられる光刺激の強度が異なった。ブタ皮膚切片は少なくとも 40 mW/cm^2 以上の光による刺激を必要とした一方、マウス皮膚切片ではこれより小さい 20 mW/cm^2 の照度でより大きな回復促進効果がみられた。本研究ではこの差異の原因特定に至らなかったものの、両者の皮膚構造の違いが重要な要因であると考えられる。例えば、ブタ皮膚の各組織の厚さはヒト皮膚に近いとされ¹⁸⁾、表皮の厚さは平均して $100 \mu\text{m}$ 程度¹¹⁾ である一方、本研究で用いたヘアレスマウス HR-1 の表皮の厚さは $10 \mu\text{m}$ 以下であった¹⁹⁾。このような差異は生理的特性・光学的特性の差異につながり、結果としてそれぞれ異なる光感受性を示したものと推測できる。

さらに、光照射点から離れた点での計測結果から、光刺激による TEP 回復促進効果は照射点の中心から 10 mm 程度離れた点にまで伝播することが示唆された。ブタ皮膚切片を用いた既報¹¹⁾ においては、回復効果は距離 20 mm の点にまで広がったとみられる結果が得られており、この差異も皮膚構造の違いによるものと推測される。なお、この実験ではすべての条件で TEP 値の減少がみられたが、これは同一の皮膚切片上に計測対象点を 3 点とり、アセトン処理によるバリア破壊の面積が他の実験の 3 倍となったことが組織への負荷を増大させたためであると考えられ、既報¹¹⁾ でも同様の傾向が観察された。効果の伝播に関しては、先行研究²⁰⁾ において表皮組織内の生細胞に局所的なレーザー刺激を印加し、周囲の細胞で一過的な Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された例があり、バリア破壊への応答や外的刺激のシグナル伝達との関連が推測されている。光による刺激の効果も、表皮内イオン分布の変化などを介して空間的に伝播した可能性が考えられる。

光刺激による回復促進メカニズムの解明や、最適な刺激条件の探索のために、TEP を指標としたリアルタイム評価が有用であると期待できる。先述の通り、本研究で用いた TEP 計測系では、皮膚切片サンプルがゲル塩橋内の溶媒（電解液）を介して接続されるため、計測中に皮膚が水和しバリア回復が妨げられる可能性があった。本研究では、生体親和性が高いゲル材料としてアガロースと PVA の 2 種類を比較し、PVA ゲルでより TEP 回復阻害効果が小さくなることを確認した。PVA ゲルは柔軟性に優れ、アガロースゲルより高分子の割合が大きい（含水率が低い）配合で十分なハンドリング性を示したため、皮膚に影響を与えにくい塩橋材料の有力な候補となる。本研究ではこの PVA 塩橋を用い、光刺激によって TEP 値が回復する様子を観測することに成功したが、その回復は非連続計測の結果と比較すると遅い傾向にあった。塩橋による皮膚表面の閉塞および水分供給の阻害効果は小さく、光照射の回復促進効果のほうが支配的であったとみられるものの、非連

続計測では 10 分程度で回復が頭打ちになる比較的早い変化がみられたことを考慮すると、塩橋の影響は依然として無視できない水準にある。TEP は十分に大きな内部抵抗を持つ計測器により開回路電圧として計測するため、回路の電気抵抗値の増大はある程度許容でき、したがって電解液の接触をさらに減らす余地がある。今後、生体親和性と良好な水和特性を兼ね備えた塩橋担体を検討し、組織のイオン動態を攪乱しない連続計測を実現したい。

5. 総括

本研究では、表皮バリアの健全性に伴って変わる TEP の値を指標として、ヘアレスマウス皮膚切片における赤色光の皮膚バリア回復促進効果の評価を試みた。既報¹¹⁾ のブタ皮膚切片を用いた検討の結果からは、放射照度が大きいほど回復促進効果も大きいことが示唆されたが、本研究では最大照度の条件で効果の減弱がみられ、刺激に一定の有効域があることが示唆された。表皮組織の構造は生物種だけでなく、解剖学的部位や環境、年齢等によって異なるため、光刺激に対する感受性も変動することが予測される。したがって治療法としての確立に向けては、治療効果を個別に確認してパラメータを至適範囲に調整することが重要であり、TEP のようなオンデマンドに利用できるリアルタイム評価指標が有用である。In vivo での TEP 計測に向けては既にウェアラブルデバイスのプロトタイプを開発済みであり²¹⁾、外的刺激機能と組み合わせた新たな皮膚ヘルスケアへのアプローチ開拓が期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より御礼申し上げます。

また多大なご助言とご協力をいただきました東北大学西澤松彦教授、辰井裕希氏をはじめとする研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Sadler K E, Moehring F, Stucky C L. Keratinocytes contribute to normal cold and heat sensation. *Elife* 9, 1-14 (2020)
- 2) Talagas M, Lebonvallet N, Berthod F, Misery L. Lifting the veil on the keratinocyte contribution to cutaneous nociception. *Protein Cell* 11, 239-250 (2020)
- 3) Suh S, Choi E H, Atanaskova Mesinkovska N. The expression of opsins in the human skin and its implications for photobiomodulation: A Systematic Review. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 36, 329-338 (2020)

- 4) Shin D W. Various biological effects of solar radiation on skin and their mechanisms: implications for phototherapy. *Animal Cells Syst. (Seoul)*. 24, 181-188 (2020)
- 5) Denda M, Fuziwara S. Visible Radiation Affects Epidermal Permeability Barrier Recovery: Selective Effects of Red and Blue Light. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1335-1336 (2008)
- 6) Goto M, Ikeyama K, Tsutsumi M, Denda S, Denda M. Phosphodiesterase inhibitors block the acceleration of skin permeability barrier repair by red light. *Exp. Dermatol.* 20, 568-571 (2011)
- 7) Chabert R *et al.* Evaluation of light-emitting diodes (LED) effect on skin biology (in vitro study). *Ski. Res. Technol.* 21, 426-436 (2015)
- 8) Pillai S, Bikle D D, Mancianti M - L, Cline P, Hincenbergs M. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: Modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J. Cell. Physiol.* 143, 294-302 (1990)
- 9) Barker A T, Jaffe L F, Vanable J W. The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 242, R358-R366 (1982)
- 10) Kawai E, Nakanishi J, Kumazawa N, Ozawa K, Denda M. Skin surface electric potential as an indicator of skin condition: a new, non-invasive method to evaluate epidermal condition. *Exp. Dermatol.* 17, 688-692 (2008)
- 11) Abe Y *et al.* Red light-promoted skin barrier recovery: Spatiotemporal evaluation by transepidermal potential. *PLoS One* 14, e0219198 (2019)
- 12) Dubé J *et al.* Restoration of the Transepithelial Potential Within Tissue-Engineered Human Skin In Vitro and During the Wound Healing Process In Vivo. *Tissue Eng. Part A* 16, 3055-3063 (2010)
- 13) Abe Y *et al.* Minimally-invasive transepidermal potentiometry with microneedle salt bridge. *Biomed. Microdevices* 18, 55 (2016)
- 14) Grubauer G, Elias P M, Feingold K R. Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J. Lipid Res.* 30, 323-333 (1989)
- 15) Terutsuki D *et al.* Totally Organic Hydrogel - Based Self - Closing Cuff Electrode for Vagus Nerve Stimulation. *Adv. Healthc. Mater.* 11, 1-9 (2022)
- 16) Denda M, Ashida Y, Inoue K, Kumazawa N. Skin Surface Electric Potential Induced by Ion-Flux through Epidermal Cell Layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 112-117 (2001)
- 17) Lanzafame R J *et al.* Reciprocity of exposure time and irradiance on energy density during photoradiation on wound healing in a murine pressure ulcer model. *Lasers Surg. Med.* 39, 534-542 (2007)
- 18) Vardaxis N J, Brans T A, Boon M E, Kreis R W, Marres L M. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: Implications for human wound healing studies. *J. Anat.* 190, 601-611 (1997)
- 19) Denda M *et al.* Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function. *J. Invest. Dermatol.* 111, 858-863 (1998)
- 20) Kumamoto J, Goto M, Nagayama M, Denda M. Real-time imaging of human epidermal calcium dynamics in response to point laser stimulation. *J. Dermatol. Sci.* 86, 13-20 (2017)
- 21) Abe Y *et al.* Porous microneedle-based wearable device for monitoring of transepidermal potential. *Biomed. Eng. Adv.* 1, 100004 (2021)

皮膚細胞ゲノムのメチル化測定による加齢マーカーの開発

東海大学医学部

今西 規

With the aim of developing molecular markers that can be applied to quantitatively assess skin cell ageing, we planned to carry out genomic analysis of skin epidermal cells sampled from a large number of subjects. Here we focused on the 'epigenetic clock', a method to estimate human ages based on methylation status of the genomes. Although various epigenetic clocks have been developed for various organs for people in Western countries, these are expected to have large errors if applied to the Japanese skin data. So, it is necessary to collect original epigenetic data and develop a formula for estimating ages suitable for Japanese skin tissue. The resulting age estimator is expected to be of use not only in the cosmetology field, but also in various fields such as forensic medicine and physical anthropology. As this study has been significantly delayed from its original plan and is still ongoing, the main results of the study will be published elsewhere in the future. In this paper, we present the results of verification experiments on each technical element that was required to complete this research. Specifically, we report the evaluation of sampling methods that allow samples to be taken without contact between the subject and the experimenter, a comparison of the collection efficiency of five different sample types, and the results of trial measurements of bacterial flora that is possibly associated with aging. After several trial experiments, we have achieved a situation where we can use these technologies consistently. The collection and analysis of samples for this study is currently underway. In the near future, the main objective of this study -the development of ageing markers for skin- should be achieved.

1. 緒言

1.1. 研究の背景と目的

ヒトゲノムのメチル化とは、CpG配列のC(シトシン)にメチル基(-CH₃)が付加される反応である。遺伝子領域のメチル化は遺伝子発現制御のための重要な機構のひとつである。メチル化の状態はヒトの発生初期にリセットされ、その後は加齢とともに徐々に変化するが、一部のサイトは年齢に正確に比例してメチル化度(メチル化を受けたDNAの割合)が増加または減少する。このことを利用して、ヒトゲノム上のCpGサイト353ヶ所のメチル化度からヒトの年齢を推定する手法が開発された¹⁾。2018年には皮膚や血液などの組織を対象とした改良版のメチル化年齢推定法が提唱され、予測精度が向上した²⁾。このメチル化年齢(DNA methylation age)は加齢の分子マーカーとして脚光を浴びており、各種疾患との関連や再生医療・加齢研究などへの応用について現在も精力的に研究が行われている。

一方で、この手法には欠点もある。第一に、多数のCpGサイトのメチル化度を測るためにはメチル化測定用アレイを用いた実験が必要であり、実験のコストが非常に高い。



Development of molecular marker for aging based on epigenetic changes of skin cells

Tadashi Imanishi

Tokai University School of Medicine

第二に、メチル化年齢の推定式は主に欧米人のデータを使って作成されたため、日本人にもそのまま適用できるのかどうかは十分に検証されていない。そこで本研究では、できるだけ低コストの実験手法で、かつ正確な年齢推定ができる新しい方法の開発をめざしている。さらに、この手法を日本人の皮膚試料に適用し、予測精度の検証と新たな年齢推定式の開発を行うことをめざしている。

皮膚の加齢に関する新たな分子マーカーを開発することは、コスメトロジー分野の発展のために必要である。コスメトロジー分野にはアンチエイジング効果を謳う化粧品やサプリメント食品が数多くあるが、その科学的なエビデンスは明確でないことが多い。本研究により皮膚の加齢分子マーカーを確立することができれば、アンチエイジング効果を客観的に評価できるようになり、分野の発展に大きく貢献できると期待される。

1.2. 検証実験の目的

本研究では皮膚の加齢マーカーを作ることを目的として、多くの被験者から試料を採取する計画である。しかし、開発する年齢推定法は将来的に法医学分野で広く活用できることが望ましいので、皮膚だけでなく他の非侵襲的に採取できる試料についても、可能な範囲で同時に試料を収集することにした。そこで本研究では、皮膚表皮細胞に加えて爪、毛髪、唾液、口腔内粘膜について実際のサンプリングを行い、DNA抽出効率の検証を行う。また、本研究では、新型コロナウイルス感染症の流行が完全に終息していない状況下で、感染事故を決して起こさないような安全な方式で試料採取を行うことが必要とされた。そのため、実験

者が接触せず、被験者自身で採取を行うことを前提として、試料の採取方法を作成することにした。

本研究の後半部分では、皮膚の表皮細胞のメチル化年齢を推定するとともに、同じ被験者の皮膚細菌叢を調べる計画である。メチル化年齢はさまざまな疾患群で実年齢と大きくずれることや、状況によってはメチル化年齢が加速する現象も知られている³⁾。そこで、メチル化年齢と細菌叢の関連を明らかにすることを目的としている。ここでは方法論が機能することを検証するための試験的な細菌叢解析を行った。

2. 方法

2.1. 皮膚表皮細胞のサンプリングとDNA抽出

既報⁴⁾を参考に、表皮細胞のサンプリングには2種類の方法を用いた。ひとつは市販の洗顔シート、もうひとつはエタノール消毒綿である。それぞれを使って、被験者自身で皮膚の一定面積を拭っていただいた。この洗顔シートまたはエタノール消毒綿を被験者自身で15mL遠沈管に入れた。その後、実験者側で蒸留水4mLを添加しボルテックスで20秒混和したのち、30分静置した。次にボルテックスで20秒混和し、遠沈管内でシートを絞った。その後遠心条件2000G×1分間で遠心分離した後、上清を廃棄し沈降物のみを使用した。ここからのDNA抽出にはQIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN社)を使用し、製造者の提供するプロトコルにしたがって操作を行った。

2.2. 爪および毛髪のサンプリングとDNA抽出

毛髪については毛根あり、毛根なしの2種類の材料を用意した。いずれも1cmの長さにそろえた。これをQIAamp DNA Investigator Kitを使用して、製造者の提供するプロトコルにしたがってDNA抽出までの処理を行った。proteinase Kによる酵素処理のステップは、56℃で3時間に変更した。

爪は「爪切り」で切り取り、組織破碎・細胞破碎などの特別な処理を行わずにそのまま、またはヤスリを用いて粉末化して使用した。QIAamp DNA Investigator Kitを使用して、製造者の提供するプロトコルにしたがってDNA抽出までの処理を行った。proteinase Kによる酵素処理のステップは、目視により完全に溶けるまで行った。

2.3. 唾液および口腔内粘膜細胞のサンプリングとDNA抽出

唾液は被験者自身で10mLチューブに入れ、実験者に渡す方法をとった。DNA抽出にはQIAamp DNA Investigator Kitを使用した。

口腔内粘膜細胞は、専用の綿棒 (Isohelix Swab SK-2S, Isohelix社) を用いて採取を行った。被験者自身で口腔内

の右頬内側および左頬内側を各50回ずつこすり、キットに添付のチューブに格納して実験者に渡す方法をとった。その後はIsohelix Buccalfix Plus DNA Isolation Kit (BFP-50, Isohelix社)を用いて、製造者の提供するプロトコルにしたがってDNA抽出までの操作を行った。

2.4. 細菌叢解析

各試料から抽出したDNAに対して、細菌の16S rRNA遺伝子のほぼ全長を増幅できるユニバーサルプライマーS-D-Bact-0008-c-S-20およびS-D-Bact-1391-a-A-17を用いてPCRを行った。このプライマーセットには実績があり、20種のバクテリアゲノムの混合物をほぼ均一の割合で検出することに成功している⁵⁾。塩基配列の決定にはMinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies社、以下ONT社)を使い、フローセルにはFlow Cell R9.4.1 (FLO-MIN106D, ONT社)を使用した。複数のサンプルを一度のランで解析するため、Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004, ONT社)によってサンプルにバーコードを付加しつつ塩基配列を決定した。得られたデータをMinION専用のベースコーラーであるGuppy version 3.2.8 (ONT社)で塩基配列に変換した。個々の配列の種同定と集計には、クラウド上でメタゲノム解析ができるEPI2ME (ONT社)とGenomeSync-GSTKシステム⁶⁾を使用した。

3. 結果

3.1. 皮膚表皮細胞のサンプリングに関する条件検討

同一人物の顔の右頬と左頬から、2種類の方法 (A:市販の洗顔シート、B:エタノール消毒綿) で皮膚表皮細胞を採取した。いずれのサンプリング方法を用いても遠心後の溶液は白濁し、沈殿物が認められた。つまり表皮細胞が採取できていることが確認できた。また、それぞれの最終的なDNA抽出量は、A:0.144ng/μL、B:0.374ng/μLであった (表1)。この結果から、いずれの方法でもゲノム解析に用いるには十分なDNA量が得られるが、エタノール消毒綿を使用する方が効率的にDNAを回収できることが判明した。

表1 条件検討に用いたサンプルとDNA収量 (液量50μL)

サンプル	DNA濃度 (ng/μL)
皮膚A (洗顔シート)	0.144
皮膚B (エタノール消毒綿)	0.374
毛髪C (毛根を含む)	0.195
毛髪D (毛根を含まない)	0.0079
爪E (そのまま)	1.12
爪F (粉末)	0.0911

3. 2. 毛髪および爪のサンプリングに関する条件検討

同一人物の毛髪 10mm からの DNA 抽出を試みた。proteinase K による酵素処理のステップでは、毛根を含む毛髪 (サンプル C) と毛根を含まない毛髪 (サンプル D) のいずれのサンプルも 3 時間のインキュベーションで全て溶け切っていた。それぞれからの DNA 回収量は、C : 0.1950ng/μL、D : 0.0079ng/μL であった (表 1)。両者には 25 倍の差がある。毛根があれば数本で十分な DNA を回収できるのに対し、毛根がない場合はかなりの長さあるいは多くの本数が必要と考えられた。

左手の第一指 (親指) から爪を切りそのまま使用したもの (サンプル E、8mg) と、爪を粉末化したもの (サンプル F、2mg) について、DNA 抽出を行った。そのまま使用したサンプル E は 24 時間の酵素処理で半分ほど溶け残っていたのに対し、粉末化したサンプル F は 3 時間で完全に溶けていた。抽出された DNA 量はサンプル E では 1.12ng/μL であったのに対し、サンプル F では 0.0911ng/μL であり、収量には 10 倍以上の差があった (表 1)。いずれの方法でも解析に十分な量の DNA が得られるが、酵素処理時間は overnight とすることが望ましいと考えられた。

3. 3. 唾液および口腔内粘膜細胞のサンプリングと細菌叢解析に関する条件検討

試験的に唾液と口腔内粘膜細胞の採取を行い、さらに DNA 抽出を行ったところ、いずれも高濃度で DNA が抽出できることを確認した。

3. 4. 細菌叢解析の試験的实施

皮膚と唾液から抽出した DNA について、細菌叢解析を試験的に実施した。塩基配列決定は問題なく実行できたが、ライブラリとして使用した DNA 量を少量に制限したため得られた read 数は皮膚が 12 本、唾液が 339 本であった。それぞれの塩基配列データを EPI2ME ソフトウェアによって種同定し、生物種の系統樹とともに表示した (図 1 および図 2)。塩基配列決定に使用した DNA シークエンサーがロングリードを決定できるタイプであるため、種レベ

ルでの分類が可能であった。なお、GenomeSync-GSTK システムを用いた細菌叢の解析でも、EPI2ME と一致する結果が得られた。皮膚の細菌叢解析では、皮膚の常在菌として知られている表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) やアクネ菌 (*Cutibacterium acnes*) などが検出された。唾液の細菌叢解析では、口腔内の常在菌である *Streptococcus salivarius* をはじめとする Streptococcus 属

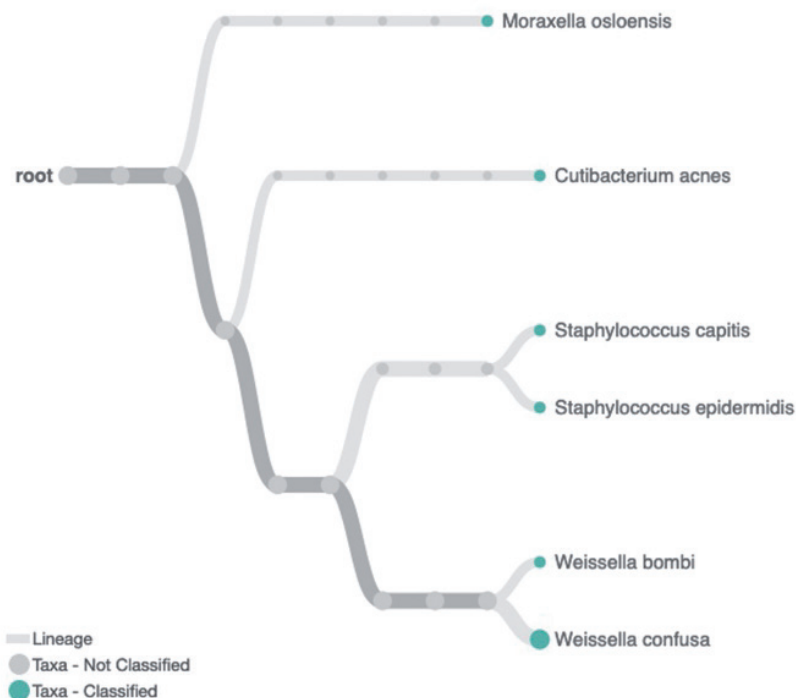


図 1 皮膚細菌叢の解析例。検出された主要な細菌を種レベルで表示した。

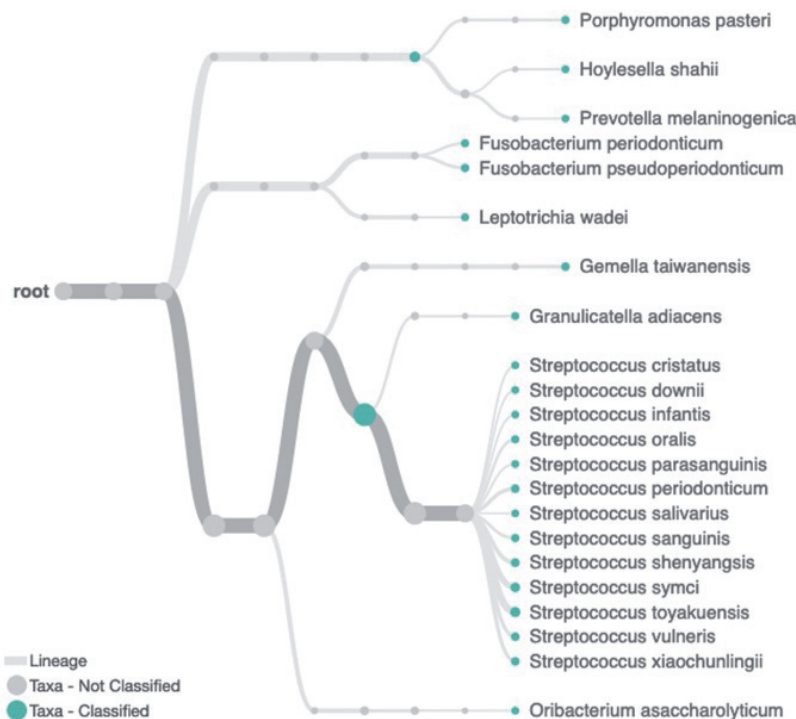


図 2 唾液細菌叢の解析例。検出された主要な細菌を種レベルで表示した。

の細菌が優勢であった。また、皮膚細菌叢と比較すると大きな多様性を持つことも示唆された。以上の結果から、皮膚および唾液（口腔内）の細菌叢に関するデータを問題なく取得できることを確認できた。

4. 考察

4.1. 方法論の検証結果について

冒頭でも述べたように、本研究は皮膚表皮細胞をターゲットとしたメチル化年齢推定法の開発を目的としている。しかし、他の部位についても同時に試料を得ることが望ましい。そこで、どの試料が効率的に採取可能であるかを検討するために検証実験を行った次第である。まず、皮膚表皮細胞のサンプリングについては問題なく実施できることを確認できた。メチル化状態の測定と細菌叢の解析のいずれの目的に対しても、必要なDNA量を取得することができると考えられた。一方、毛髪についてはDNAの収量に問題があった。また、十分なDNA量を確保するためには毛根を含めることが望ましいが、毛根を含む毛髪を採取するには軽微な侵襲が伴う。特に高齢者や女性などでは心理的な抵抗が強いと予想され、被験者の同意を得ることがやや難しいと考えられた。そして爪については、採取も容易で十分な量のDNAを回収可能であるが、試料採取後の処理に時間と手間がかかることが問題である。しかも、爪は組織学的には皮膚の一部であるとみなすことができるので、皮膚とほぼ同じ結果になる可能性もある。そのため優先順位的には低く設定すべきであろうと判断した。以上の考察から、結論としては、本研究では皮膚表皮細胞に加えて唾液と口腔内粘膜細胞を採取することが望ましいと考えた。

これまでに、皮膚の加齢変化と細菌叢の間には「相関」があるという報告がなされている。しかし、両者の因果関係を証明した研究はない。細菌叢は皮膚の水分量や皮脂量などの物理化学的要因によって影響を受けると考えられるので、皮膚の加齢変化と細菌叢の両方に影響する交絡因子が存在することも、十分に考えられる。一方で私は、両者の関係については、細菌叢が原因で皮膚が老化したのではなく、皮膚細胞の老化が原因で細菌叢が変化したのだと予想している。この仮説を証明するためには、メチル化年齢推定法を用いた皮膚細胞の老化状態の評価が決定的な役割を果たすであろう。さらには皮膚だけではなく、口腔内でも同様の現象が観察される可能性がある。本領域の今後の研究成果に期待したい。

4.2. 本研究のこれから

最後に本研究の今後について述べる。本研究はすでに東

海大学医学部臨床研究審査会の承認を受けて、解析が進行中である。試料としては、さまざまな年代の日本人280名の血液由来DNAを取得している。また、20代から70代のボランティア48名から皮膚表皮細胞、唾液、口腔内粘膜細胞を収集する予定である。以上の試料について、ゲノムのメチル化状態を測定する計画である。本稿で述べたように、サンプリングとDNA抽出までの段階については検証実験は完了した。ゲノム解析の方法は基本的には解析キットを利用しつつ bisulfite sequencing によって行うが、target capture 技術を活用して目的とする CpG サイトを濃縮することで、効率的にゲノム解析を実施する方針である。そして得られた配列データは計算機で解析し、メチル化された DNA 分子の割合を求める。以上のデータをそろえたら、次は機械学習により皮膚の年齢推定式を得る。このためのプログラムはすでに準備ができており、問題なく実行できる見通しである。以上の研究が順調に進めば、近い将来に皮膚の加齢マーカーについて発表できる状況になるであろう。

(引用文献)

- 1) Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14 (10):R115. 2013.
- 2) Horvath S, Oshima J, Martin GM, et al. Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies. *Aging* 10 (7):1758-1775. 2018.
- 3) Onizuka M, Imanishi T, Harada K, Aoyama Y, Amaki J, et al. Donor cord blood aging accelerates in recipients after transplantation. *Scientific Reports* 13 (1): 2603. 2023.
- 4) Bjerre RD, Hugerth LW, Boulund F, et al. Effects of sampling strategy and DNA extraction on human skin microbiome investigations. *Scientific Reports* 9 (1): 17287. 2019.
- 5) Mitsuhashi S, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi JS, Shiraishi Y, Asano K, and Imanishi T. A portable system for rapid bacterial composition analysis using a nanopore-based sequencer and laptop computer. *Scientific Reports* 7: 5657. 2017.
- 6) Kryukov K, Imanishi T, and Nakagawa S. Nanopore sequencing data analysis of 16S rRNA genes using the GenomeSync-GSTK system. *Methods in Molecular Biology* 2632:215-226. 2023.

タイトジャンクションが角層形成に及ぼす影響の解明

岐阜大学大学院医学系研究科皮膚科学

岩田 浩明

The tight junction (TJ) is an intercellular junction complex that seals adjacent epithelial cells and plays a crucial role in epithelial barrier function. TJs consist of several proteins, including those of the transmembrane claudin family, occludin and the scaffold zonula occludens (ZO) family. The distribution of TJs is distinct among stratified squamous epithelia, such as between skin and oral buccal mucosa. However, how TJs are associated with stratum corneum have not been elucidated. We show that epithelial turnover and proliferation dictate TJ distribution in the squamous epithelia. Human samples and mouse pharmacological models revealed that slower epithelial turnover/proliferation led to the confinement of TJs in the uppermost part of squamous epithelia. In contrast, TJs were dispersedly distributed in faster cell turnover/proliferation conditions. Cell culture experiments and mathematical modeling corroborated the TJ arrangements. These findings demonstrate that TJ formation is dependent on epithelial cell dynamics. the confinement of ZO-1 within a single layer of squamous epithelia is indicative of slow epithelial proliferation and turnover rates. Our findings do not fully elucidate the functional significance of ZO-1 distribution, but our study does suggest that ZO-1 reflects the proliferation and turnover of epithelia. Our study implicates that TJ expression can be a therapeutic output of diseased epithelia.

1. 緒言

皮膚（重層扁平上皮）は、基底層から角層へと角化する過程でバリア構造を形成する。物理的な皮膚バリアには、角層バリアとタイトジャンクション（TJ）バリアの二つが存在する¹⁾。明確に機序を分けることは困難だが、主に角層はOut-inバリア（外的刺激を防御）、顆粒層TJは主にIn-outバリア（水分保持）として重要である²⁾。正常な角層は規則正しい網かご構造（Basket weave）を形成するが、表皮の炎症はコンパクト角層となる^{3,4)}。コンパクト角層は一見強固に思えるが、柔軟性に乏しく亀裂が多数生じて結果的にバリア機能は低下する。

皮膚は重層扁平上皮であり、TJは顆粒層に限局して形成される^{1,2)}。常に上方への角化が生じる重層扁平上皮において、特定の部位にTJを維持することは常にTJも代謝されていることが明らかになっている。皮膚と異なり、粘膜では上皮のターンオーバー速度が数倍早いことが知られている⁵⁾。粘膜では角層形成がされないが、TJの形成に関する知見はほとんどない。われわれは、粘膜では皮膚と異なり複数層にわたりTJ構成タンパクの一つであるZO-1の発現が認められることを報告してきたが⁶⁾、なぜ皮膚と異なる発現となりバリア機能は保持されているかなど不明な点が残されたままである。

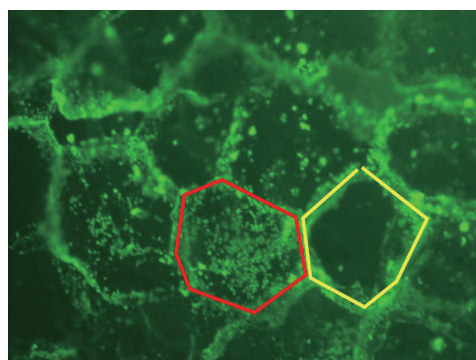


図1 テープストリッピングで採取した角層の
コルネオデスマソーム(CDS)の染色

Basket weave角層は細胞接着構造であるコルネオデスマソーム（CDS）が規則的な六角形構造を形成する⁷⁾。そしてCDSはカリクレインにより分解され角層が脱落する。一方、コンパクト角層ではCDSは六角形を維持するが全体に分布する（図1）。Basket weave角層で辺縁にCDSが残存する理由は長らく不明であった。しかし、TJ様構造が角層の細胞辺縁に存在し、カリクレインによるCDSの分解を防ぐためと考えられている^{4,7)}。

本研究では、上皮のターンオーバー速度がTJ形成に及ぼす影響を解明するとともに、TJがBasket weave角層の形成・維持に必要な不可欠な存在であるという仮説を検証することを目的とする。

2. 方法

2.1.

正常口腔粘膜と正常皮膚におけるTJの形成の違いを顕微鏡的観察を行う。



The association with tight junction and stratum corneum formation

Hiroaki Iwata

Gifu University Graduate School of Medicine, Department of Dermatology

2. 2.

TJの形成にターンオーバー速度の影響を評価する。

正常口腔粘膜、口腔扁平苔癬、正常皮膚、乾癬病変部と4つの組織におけるTJ形成を上皮のターンオーバー速度の違いに着目して評価する。

2. 3. 正常ヒトおよびマウス皮膚、炎症皮膚の詳細なTJおよび角層観察

TJ関連タンパクの発現量、分布を免疫染色にて超解像度技術を用いて縦断面・水平面を詳細観察する。マウスは耳介皮膚が比較的Basket weave構造を明瞭に観察できるため、同部位で正常とイミキモド乾癬モデルマウスのTJと角層の構造およびタンパク発現を詳細に観察する。

2. 4. 培養細胞条件によるTJ形成条件の確立と変異細胞の樹立

三次元培養ではコンパクト角層になるため、培養条件を検討してBasket weave角層が形成される条件を確立する。正常と異常の違いをRNASeqで網羅解析を行いBasket weave角層形成に重要な遺伝子の候補を探索する。

3. 結果

電子顕微鏡観察では、Basketweave角層(図2左)とコンパクト角層(図2右)は弱拡大では角層の重なりが異なる

ように観察されていることが分かる。しかし、それぞれ拡大を上げて観察すると上下の接点となる部位は多くはコルネオデスモソームと思われる構造が観察される。

4種類の条件の上皮では、ターンオーバー速度が異なることが知られており、基底細胞の分裂細胞数の違いに起因する(図3)。基底細胞の分裂細胞数をKi-67染色と比較すると、正常粘膜と乾癬皮膚で分裂細胞数が多く、正常皮膚と口腔扁平苔癬の組織で少ないことが観察される。この分裂細胞数の違いが上皮のターンオーバー速度の違い、さらに上皮の厚みの違いに関与していることが示唆される。

粘膜におけるTJをZO-1に着目して評価すると、皮膚とは異なりZO-1の重層化が観察される。同様の所見は、乾癬病変部皮膚でも同様の変化が観察することができる(図4、5)。ZO-1の分布について、蛍光強度を基準に定量化すると正常粘膜と乾癬病変部では上皮の外側1/2-1/3に発現するが、正常皮膚と口腔扁平苔癬では1/5程度に留まる違いが明らかになった。

4. 考察

角層バリアはコンパクトであればより強固なイメージがある。実際に、電子顕微鏡での観察結果ではコルネオデスモソームの結合がより多く残存している可能性がある。しかし、Basket weave角層と比べて角層間脂質が減少するため保湿機能の低下につながり、さらに物理的刺激に対す

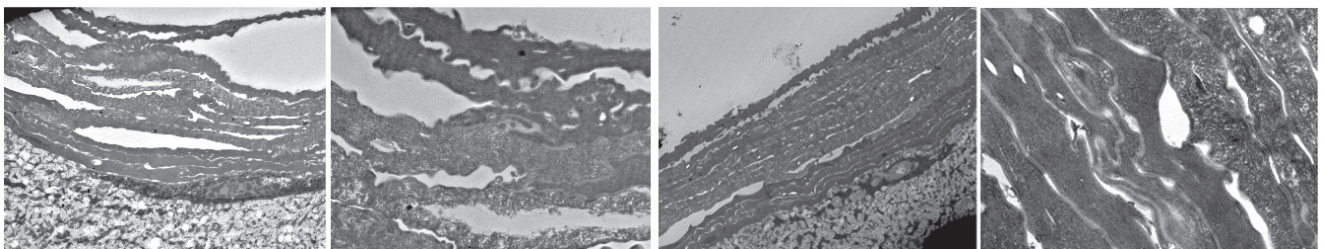


図2 Basketweave角層(左)とコンパクト角層(右)の電子顕微鏡像

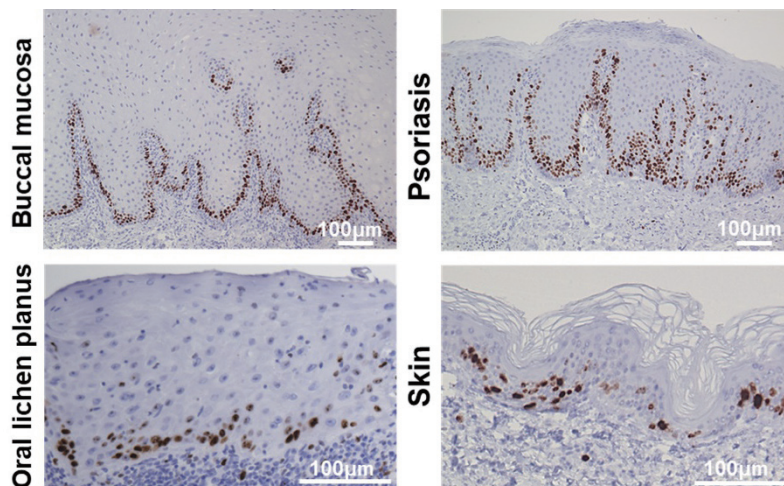


図3 正常粘膜、口腔扁平苔癬、正常皮膚、乾癬組織におけるKi-67染色

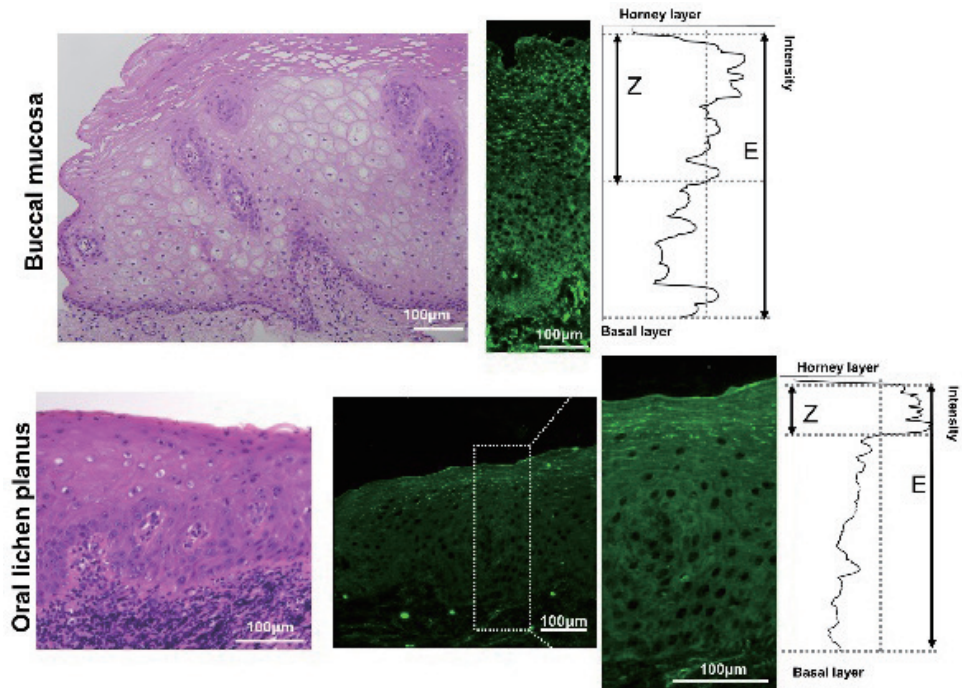


図4 粘膜におけるZO-1の分布

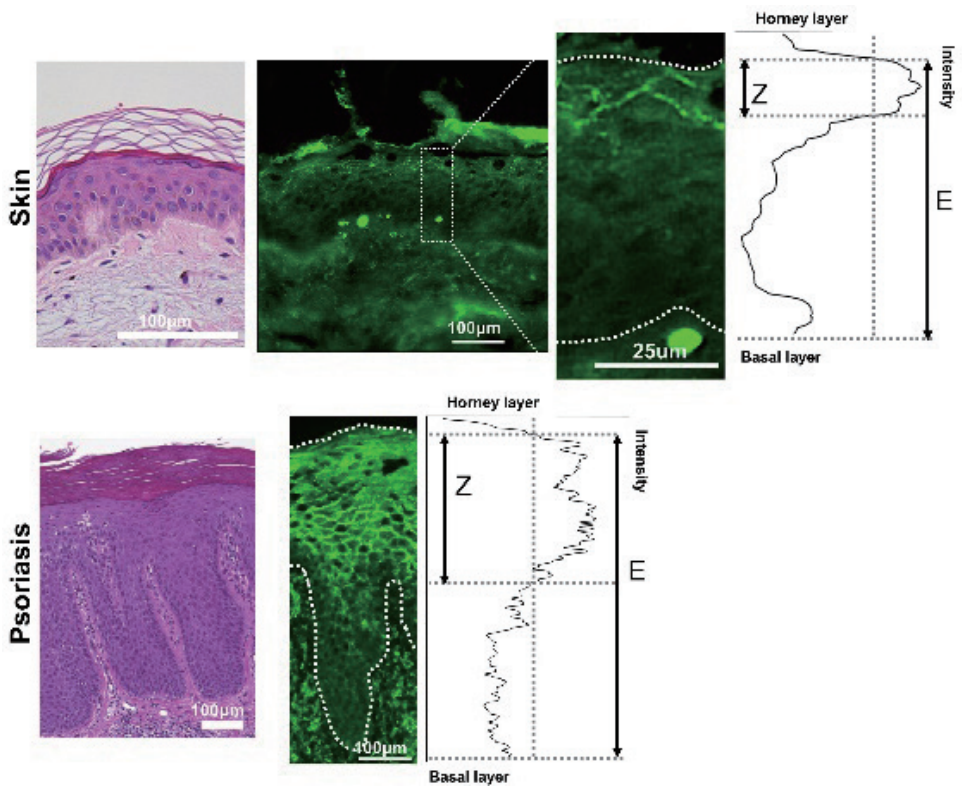


図5 皮膚におけるZO-1の分布

る柔軟性が乏しくなることが考えられる。

皮膚と粘膜で上皮最外層の構造は大きく異なる。皮膚には角層が形成されるが、粘膜では通常角層は認めない。今回の研究では、その理由の一つとして表皮のターンオーバー速度の違いにあると考えた。TJの構成成分の一つ

ZO-1の分布で評価したところ、ターンオーバー速度が相対的に速い条件(正常粘膜と乾癬病変部)ではZO-1が重層化して観察されるが、ターンオーバー速度が相対的に遅い条件(口腔扁平苔癬と正常皮膚)では、ZO-1は限局性に発現していることが分かる。この結果は、直接的ではな

いが細胞増殖速度の促進がTJの分布に影響を及ぼしていることが示唆された。TJはバリア機能として重要であり、皮膚では顆粒層2層目に限局して形成される^{2,8)}。粘膜や乾癬病変部ではTJが顆粒層に限局して形成されることはないため、バリア機能が正常に機能しているか疑問が生じる。この点に関しては、われわれは先行研究で物質の透過性を角層側から表皮内、真皮側から角層側に向かう両方向のバリア機能を評価した⁶⁾。正常な皮膚とは異なり、粘膜では基底層側の数層をトレーサーは貫通するが、角層へ向かうにつれて、トレーサーは徐々に減衰していくことが観察された(図6)。このことより、皮膚における顆粒層における限局的なバリア機能とは異なり、粘膜においてTJのバリア機能は複数層で維持されていると考えられた。粘膜同様に細胞増殖が亢進している皮膚疾患の代表である乾癬でも同様の所見が得られたことは、乾癬皮膚においても正常皮膚と同等とは言えないが一定程度バリア機能は保持されていることが推察された。本研究は今後、三次元培養皮膚を用いることで、増殖因子やインヒビターを添加することで表皮ターンオーバー速度をコントロールするモデルが作成できる可能性があると考えている。

本研究では、TJが角層形成に及ぼす影響までは解明が進んでいない。粘膜では角層は形成されず、乾癬病変部皮膚ではコンパクト角層となるが、このように正常皮膚と明らかに角層形成が異なる理由としてTJの形成が影響している可能性は十分考えられる。今後は、角層形成に及ぼす影響についてもさらに解明を進めていく予定である。

謝 辞

本研究成果の一部は、Cell Prolif. 56: e13441, 2023.⁹⁾にて報告した。本研究の遂行に当たり多大なご支援を頂きました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Otani, T. & Furuse, M. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends Cell Biol* 30, 805-817(2020).
- 2) Yokouchi, M. *et al.* Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. *J Dermatol Sci* 77, 28-36 (2015).
- 3) Goto, H., Tada, A., Ibe, A. & Kitajima, Y. Basket-

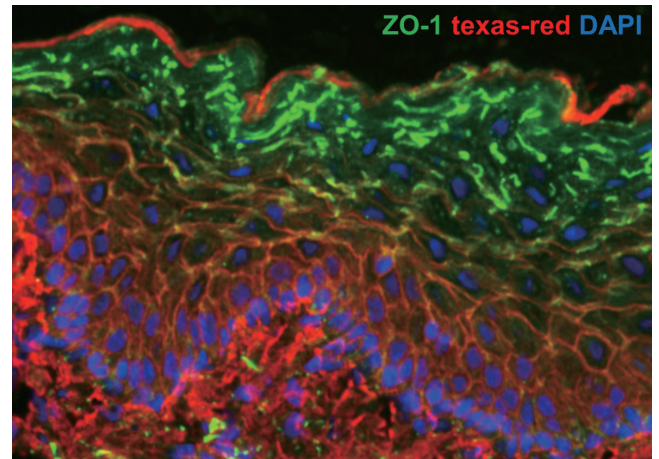


図6 マウス頬粘膜にバイオチントレーサー(赤)を投与して、粘膜内の通過を観察。ZO-1(緑)で標識。

weave structure in the stratum corneum is an important factor for maintaining the physiological properties of human skin as studied using reconstructed human epidermis and tape stripping of human cheek skin. *Br J Dermatol* 182, 364-372 (2020).

- 4) Kishibe, M. Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. *J Dermatol Sci* 95, 50-55 (2019).
- 5) Lehman, J. S., Tollefson, M. M. & Gibson, L. E. Lichen planus. *International Journal of Dermatology* 48, 682-694 (2009).
- 6) Imafuku, K. *et al.* Zonula occludens-1 demonstrates a unique appearance in buccal mucosa over several layers. *Cell Tissue Res* 384, 691-702 (2021).
- 7) Igawa, S. *et al.* Incomplete KLK7 Secretion and Upregulated LEKTI Expression Underlie Hyperkeratotic Stratum Corneum in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 137, 449-456 (2017).
- 8) Yoshida, K. *et al.* Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci* 71, 89-99 (2013).
- 9) Imafuku, K. *et al.* Zonula occludens-1 distribution and barrier functions are affected by epithelial proliferation and turnover rates. *Cell Prolif* 56, e13441 (2023).

ペプチドビーズを用いた反応速度論による 迅速・詳細なアレルギー感作試験法の開発

甲南大学フロンティアサイエンス学部

白井 健二

The direct peptide reactivity assay (DPRA) detects binding of test chemical samples to lysine or cysteine of the test peptides as a prominent alternative to animal testing for sensitization. However, DPRA cannot measure binding of poorly water-soluble samples to the test peptides, and the HPLC step in DPRA is time-consuming and technical in comparison with other general measurements. Recently, we had constructed the chromophore solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) as an alternative skin sensitization assay system to solve these problems. In this study, we further improved C-SPRA system for detecting various and numerous samples in a short period of time (a few hours).

At first, we selected a microbead for immobilization of the test peptides, PEGA (Poly[acryloyl-bis(aminopropyl) polyethylene glycol]) resin was selected as much more suitable for the quick reaction. Then we optimized the protocol. Especially, the preparation of the peptide-microbeads before the assay was simplified. Using PEGA resin we found that in the preparation we could skip the swelling step every time. These studies effectively modified the conventional C-SPRA. Our method allows a next-generation high-throughput alternative measurement to animal testing for in vitro skin sensitization rapid assessment with easy handling in a few hours.

1. 緒言

化粧品およびその関連物質によるアレルギー発症や、悪化リスクの防止は、コスメトロジー、化粧品開発において重大な課題となる。開発段階における感作試験においては、実際にヒトへのテストは現実的ではなく、動物実験に頼らざるを得ないのが現状である。しかしながら、近年、倫理的観点、コストの問題などから動物実験や臨床試験に頼らない、代替法が求められている。皮膚感作性試験代替法の一つである、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)¹⁾は有効な手法であると考えられている。DPRAは生体内の感作反応を模倣し、ペプチドと被験物質とを反応させた後にHPLCを用いて未反応ペプチドを測定し、その減少率から感作性を予測する試験法である。DPRAは現状の代替法の中でも有効な手法ではあるが、油性物質などの難水溶性物質を評価できない、操作が煩雑、効率性が悪いなどの問題点も多い。我々はこれまで、分析化学とペプチド工学を融合させた新手法(C-SPRA)^{2,3)}の構築を行ってきた(図1)。C-SPRAはDPRAを基礎としているものの、従来からの最大の懸念であった、非水溶性・疎水性の物質、界面活性剤などの両親媒性物質ともに試験が可能となる、試験物質の守備範囲が広い方法であり、また操作も簡便な手法である。具体的には、DPRAで使用するペプチドを、ビ

ーズ上に固定する。本ビーズは、有機溶媒中・水中どちらにもなじみ、膨潤するものを使用する。特に難水溶性試験物質を有機溶媒中に溶かしこみ、そこに本ビーズを投与すれば、ビーズに固定したペプチドが試験物質と容易に接触できるようになる。これにより感作性試験が可能となり、試験終了後は、ビーズをとどめることができるフィルター付きカラムを用いることで、試験溶液を洗い流すことができる。さらにNH₂基・SH基指示薬を組み合わせることで、分光法で検出可能な極めて簡便な試験法である。しかしながら、依然として測定に時間がかかること、また感作性の有無の定性的結果のみを採用しているため詳細解析が行えないことなどが欠点として挙げられる。そこで、本研究では24時間反応ではなく、1時間程度の短い反応時間で指示薬の結合度合いを算出し、反応速度論的解析を試みることにより、従来法よりも迅速かつ詳細な解析が可能な手法へと改良することを目的とした。

2. 方法

①ビーズ・指示薬の選択

これまでC-SPRAで用いていたNH₂基指示薬であるピクリン酸⁴⁾とSH基指示薬であるエルマン試薬⁵⁾を用いて、研究を進めていくことにした。さらに、ビーズについては、これまで使用していたポリスチレン系のビーズでは、反応場がビーズ奥深くまであるため、試験物質や指示薬が、到達しなかったり、吸着したりといった懸念もあるので、そのような心配のないビーズ(アクリルアミド系のビーズ: PEGAビーズ)を検討した。

②操作法の確立

実際に1時間以内といった短時間でのテスト物質との反

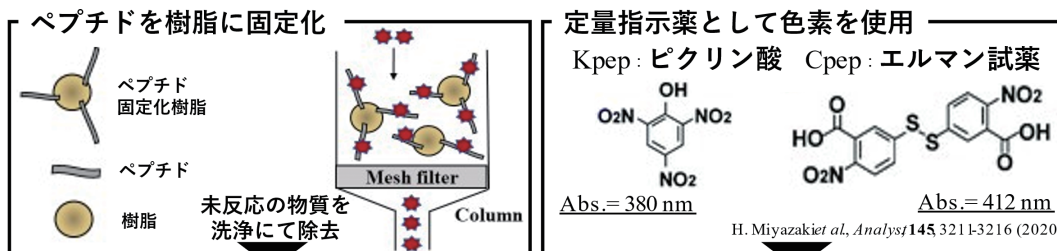


Development of the rapid chromophore solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) for sensitization assessment as alternatives to animal testing

Kenji Usui

Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University

C-SPRA (Chromophore– Solid Phase Peptide Reaction Assay)法 DPRA 法を改良



溶媒の置換、疎水性物質の測定が可能

UV-Vis測定での感作性評価が可能

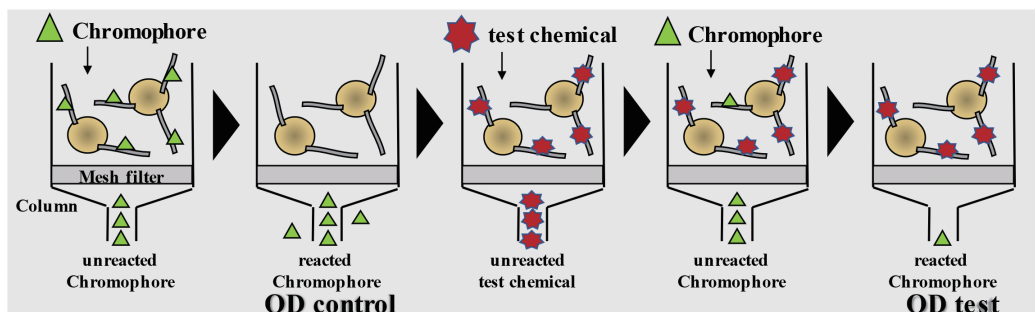


図1 C-SPRA法の概要

応を行った後に、指示薬の結合に有意な差が出るのかについて検討を行い、反応時間の短縮化・最適化を行った。

③本システムの有用性の検証実験

簡便さを求めるために操作に慣れていない専門性の低い学部1、2年生の学生に試験を行ってもらった。また、代表的な化粧品材料となる天然物や、よく知られる感作性物質数十種類を用い、実際の感作性試験を行い、その有用性の検証を行った。

3. 結果と考察

①について

まず、ビーズの検討においてはPEGAビーズを用いた検討を行った。ペプチド合成においては、従来から用いているLysine (Lys, K) 含有ペプチドとCysteine (Cys, C) 含有ペプチドを、βアラニンを介してビーズと結合させた配列を、これまでに確立した最適化されたFmoc固相合成法により高純度のペプチド固定化ビーズを得ることに成功した。またこのビーズは、常に膨潤状態で取り扱うため、試験前に膨潤させる必要がないため、準備操作が簡便となることがわかった。

②と③について

反応時間においては24時間反応が従来のポリスチレンとほぼ同じ結果となることを確認したのちに、反応時間を徐々に減らしていき、最終的に、30分反応、10分反応での感作性有無の判定までもが、数種類の試験物質において

可能となる結果が得られた(図2)。すなわち、感作性があるといわれているBQ、FITC、MPH、ACAにおいては、OECDプロトコルと同じ判定方法を用いれば、K含有ペプチド(Kpep)、C含有ペプチド(Cpep)のいずれか一方が感作性あり(P)と検出されれば、判定はPとなり、IPAや試験物質なしのネガコンでは、どちらのペプチドを用いた場合でも感作性なし(N)と検出され、判定はNとなり、従来法と同様の判定結果となった。

残念ながら当初の予定であった反応速度を求めて詳細解析を行う計画は、PEGAにおいても樹脂内部への試験物質などの拡散速度や、固定化ペプチドの溶液中のような拡散がみられないことを考慮に入れて解析しなければならず、簡便・迅速計測には向かないことが分かった。そこで、より簡便さや迅速さを追求した改良や検証、弱い感作性物質の簡便検出についての確立を行った。その結果、まず操作方法などの最適化を行った結果、本試験は学部1、2年生が行っても、良好な結果が得られることがわかり、汎用性が高いことが分かった。さらに、弱い感作性物質の検出においては、通常のプロトコルよりも、濃度を濃くした条件で、ネガコンと比べて有意な減少率が得られたことから、弱い感作性を検出・判定する手法が確立できた。

4. 総括

以上のように、従来使用していたビーズの材質を変更することにより、本研究では当初の計画の1時間程度よりもさらに短い、10分という反応時間で指示薬の結合度合いを算出してアレルギー感作性の判定が可能なる手法へと改

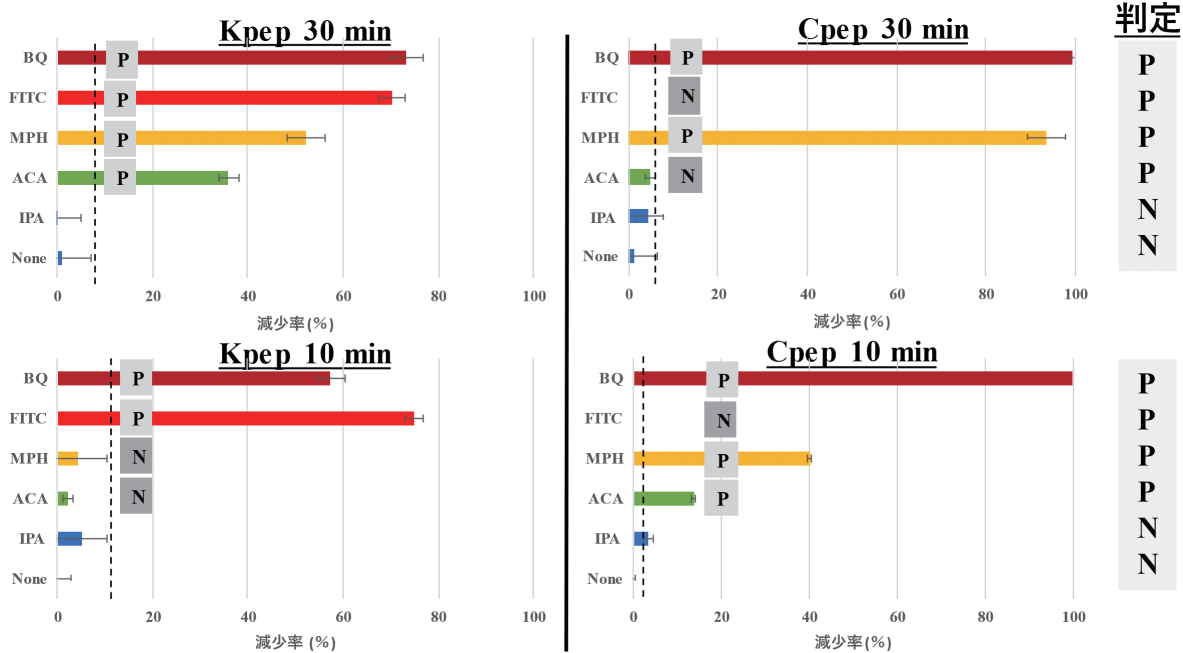


図2 PEGA ビーズに固定化した Kpep、Cpep を用いた 30 分反応、10 分反応のアレルギー感作試験

良することに成功した。現在、これまでの結果をまとめたものを論文投稿中であり、近日中の発行を目指す⁶⁾。また C-SPRA に関する解説記事も発行された⁷⁾。本法が開発できれば、誰でも簡単に動物実験も使わずに感作性試験を行うことができ、化粧品をはじめとする有用物質の探索・開発に大いに貢献できると考えられる。これにより、日本のコスメトロジー、化粧品業界のみならず、世界においても本法は、スタンダードとなる有力な手法となることが期待できる。

謝 辞

本研究の遂行にご協力いただきました共同研究者の皆様、特に浜田芳男博士、栢森史浩博士(甲南大学)、有海秀人博士(山口東京理科大学)、そして甲南大学・山口東京理科大学にて携われた学生の皆様に感謝申し上げます。

最後に本研究の遂行にあたり、多大なるご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

1) OECD Test Guideline 442C, In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (2015).
 2) H. Miyazaki, Y. Hamada, H. Takaishi, Y. Minamino,

H. Ikeda, H. Mekata, M. Takaishi, K. Yamashita, K. Usui, Development of a Chromophore-Solid Phase Peptide Reaction Assay (C-SPRA) for Assessing Skin Sensitization In Vitro, *Analyst*, **145**, 3211-3216 (2020)
 3) H. Miyazaki, H. Takaishi, H. Ikeda, H. Ariumi, Y. Hamada, K. Yamashita, K. Usui, Synthesis of Peptide-Immobilized Magnetic Beads, and Peptide Reactivity Assay for Assessing Skin Sensitization Utilizing Chromophore, *Processes*, **8**, 1257 (2020)
 4) B.F. Gisin, The Monitoring of Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis with Picric Acid, *Anal. Chim. Acta.*, **58**, 248-249 (1972)
 5) G. L. Ellman, Tissue Sulfhydryl Groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77 (1959)
 6) K. Usui, H. Miyazaki, M. Fukuda, A. Nishimura, M. Maeda, S. Yamaguchi, H. Ikeda, Y. Hamada, K. Yamashita, F. Kayamori, H. Ariumi, Fast and User-Friendly Chromophore-Solid Phase Peptide Reaction Assay (FC-SPRA) for Assessing Skin Sensitization, *Submitted*.
 7) 白井健二, 宮崎 洋, 山下 邦彦, 栢森 史浩, 有海秀人, 様々な分野に適用可能な皮膚感作性試験法の開発, *アレルギーの臨床*, 2023年11月号, 75-79 (2023)

かゆみを引き起こす pathogenic code の同定と治療基盤の開発

かずさDNA研究所オミックス医学研究室

遠藤 裕介

Atopic dermatitis is thought to affect more than one million people in Japan. In particular, 80% of patients are under the age of 44 in the active stage of the disease, and it is a serious problem that chronically impairs quality of life. In clinical practice, in addition to existing immunosuppressive agents including steroids and other drugs, anti-IL-4/IL-13 receptor antibodies are used as biological agents for treatment. However, a major problem with these current treatments is the long-term administration of expensive antibody preparations increases the burden on the medical economy itself. In addition, existing treatments only suppress symptoms and do not prevent or cure the disease.

On the other hand, recent advances in science and technology have made it possible to perform trans-omics analysis, in which RNA, proteins, and metabolites are comprehensively analyzed and their parameters are linked to each other. These tools can be very powerful to capture events occurring at the molecular level in disease lesions and identify new therapeutic targets. However, due to the complexity of the system and experimental limitations, trans-omics analysis using immune cells is still lagging behind, and there is a strong requirement for such efforts in terms of therapeutic applications. Against this background, the applicant was the first to construct a system that combines RNA-seq and proteome analysis using the same samples and combines each parameter. Furthermore, we have identified pathogenic Th2 cells (Tpath2) that cause allergic disease. In addition to these achievements, we have recently identified cutaneous T cells that specifically produce IL-3 and IL-31. Therefore, we have conceived this research proposal to identify pathogenic codes that cause atopic dermatitis and itch and to develop new therapeutic targets and platforms by utilizing the applicant's trans-omics analysis system and CRISPR tools that can be applied *in vivo* to cutaneous T cells.

1. 緒言

アトピー性皮膚炎患者は本邦では百万人以上にも及ぶと考えられている。特に44歳以下の活動期での患者割合が80%を占め、QOLを慢性的に損ねる深刻な問題となっている。臨床の現場ではステロイドを含む既存の免疫抑制剤などに加え、生物学的製剤として、抗IL-4/IL-13受容体抗体が治療として使用されている。しかし、このような現状の治療は、副作用リスクに加え、高額な抗体製剤の長期間の投与という医療経済そのものへの負担増を招くことが大きな問題である。また、既存の治療はあくまで症状を抑制するに留まり、疾患の予防や治癒を達成するものではない。

一方、近年の科学技術の進歩により、RNA・タンパク・代謝物を網羅的に分析し、相互にパラメーターをリンクさせるトランスオミクス解析が可能となってきた。これらのツールは、疾患の病変部で起きている事象を分子レベルで捉え新たな治療標的を同定するための非常に強力な武器となり得る。しかし、解析システムの複雑さや実験的制約から免疫細胞を用いたトランスオミクス解析は依然として遅

れており、治療応用の観点からもその取り組みが強く求められている。このような背景の下、申請者は同一サンプルを用いてRNA-seq・プロテオーム解析を行い、各パラメーターをコンバインするシステムをいち早く構築した¹⁾。また、これまでにアレルギー疾患を引き起こす病原性Th2細胞(Tpath2)を同定し、免疫-アレルギー研究を世界的にリードしている²⁻⁴⁾。これらの実績に加え、最近我々はIL-3やIL-31を特異的に産生する皮膚T細胞を同定している。そこで、皮膚T細胞について、申請者が有するトランスオミクス解析システムや*in vivo*でも適用可能なCRISPRツールを活用し、アトピー性皮膚炎やかゆみを引き起こすpathogenic codeを同定し、新たな治療標的・治療基盤を開発する本研究案を着想した。本研究ではアトピー性皮膚炎の経時的な病態シークエンスについて、皮膚に浸潤している免疫細胞のRNA・タンパクのトランスオミクス解析を行い、病態を制御するpathogenic codeの候補因子を抽出することを第一目標とする。特に、皮膚炎症を引き起こすIL-3やIL-33、およびかゆみを引き起こすIL-31をクラスタリング解析の指標とする。また、最近我々は脂質代謝がアレルギー炎症病態を増悪化させる病原性T細胞の誘導⁵⁾に深く関与していることを発見しているため、脂質の関与についてはリポドミクス解析を用いて検証する。抽出された因子については、生体内CRISPRツールを用いてさらに絞り込む。最終的に、同定されたpathogenic codeに対する分子標的薬や関連ノックアウトマウスを用いることで、アトピー性皮膚炎の治療への有効性を評価する。



Identification of pathogenic code causing itch and development of therapeutic basis

Yusuke Endo

Laboratory of Medical Omics Research,
Kazusa DNA Research Institute

2. 方法

アトピー性皮膚炎の炎症早期から病態収束に到る経時的な免疫応答シークエンスについて、疾患を引き起こす Tpath2 細胞および病態を抑制する免疫制御細胞の RNA・タンパク・代謝物のトランスオミックス解析を行い、病態を制御する pathogenic code の同定を目指し研究を推進した。また、*in vitro*、*in vivo* の解析から pathogenic code をコントロールし、新規アレルギー分子標的としての有効性について検証を進めた。

アトピー性皮膚炎については、ビタミン D3 誘導体 MC903 を用いて再現性よく病態が誘導される。このマウスモデルを用いて、病態進行に伴う Tpath2 サブセットのキネティクスについてはじめに検討を行った。また、その際の一連の病態スコア、組織病理像についても解析を行った。さらに、Tpath2 サブセットがもっとも機能的であるタイミングを中心に組織や Tpath2 サブセットを回収し、RNA・タンパク・代謝物を高精度に測定できるオミックス解析を行った。病態スコアや組織病理像との相関解析を行い、各病態における pathogenic code の同定を目指して研究を推進した。

3. 結果

3.1. イムノオミックス解析によるアトピー性皮膚炎病態を誘導する pathogenic code の同定

これまでの研究から、アトピー性皮膚炎の重症化には、アレルゲンを記憶し、かゆみや炎症を誘導する病原性記憶 T 細胞が関与することがわかっている。中でも 2 型の病原性記憶 T 細胞が、炎症を起こした組織で増えており、これが IL-3 や IL-31 といったサイトカインを放出して、炎症性白血球である好塩基球が組織に浸潤するのを誘導する。2 型病原性記憶 T 細胞 Tpath2 による顆粒球の誘導は、喘息など他の慢性アレルギー疾患でもみられることがわかっている^{6,7)}。そこで本研究ではアトピー病態進行に伴う Tpath2 サブセットのキネティクスについてはじめに検討を行った。

炎症皮膚病変に浸潤する細胞を単離して、フローサイトメトリー解析を行い、各種免疫細胞について調べたところ、炎症誘導の早期 (Early) と比較して、慢性期 (Late) の方がより多くの炎症細胞が浸潤していることが示された。特に、 $CD4^+CD44^+$ の活性化 T 細胞が顕著に Late phase で増加していることを見出している。また、その際のサイトカイン産生についても同様にフローサイトメトリーを用いて解析したところ、 $IL-3^+IL-31^+IL-13^+$ Tpath2 細胞は炎症が悪化するに従い増加することが認められた (図 1 上段)。その他にも、IL-5 などの Th2 サイトカインも病態がより悪化した Late phase において多く産生されていることを確認

している。

次に、これらの病態タイムコースサンプルを用いて、トランスオミックス解析を行った。各フェーズにおいて、T 細胞サブセットを回収し、RNA-seq/プロテオーム解析を実施した。解析データについては、これまでの研究で得られている統合解析手法を用いてそれぞれのデータをコンバインして解析を行った。得られたデータセットについては未処置のコントロール群をサブトラクトする形式で各因子やパスウェイを抽出した。Gene Ontology 解析で特定のパスウェイの濃縮が認められるか検討したところ、Tpath2 サブセットがより多く認められた Late phase において、サイトカインシグナルやサイトカイン受容体に加え、脂質代謝や糖タンパクといった経路が上昇していることが認められた (図 1 下段 左)。これらについてより詳細に検証するべく Gene Set Enrichment 解析 (GSEA) を行ったところ、脂質代謝経路の中でも特に脂肪酸代謝に関わる因子が Late phase でより多く集積していることがわかった (図 1 下段 右)。実際に、定量的 PCR を用いて、脂肪酸代謝に関わる遺伝・酵素の発現を解析したところ、今回解析した脂肪酸代謝やステロール代謝に重要な全ての因子がコントロール-Early-Late と進行するに従い、発現の亢進が認められた (図 1 下段 右)。

3.2. 皮膚病原性 T 細胞における脂肪酸代謝の重要性検証

次に、上記の結果を受けて脂質代謝や脂肪酸代謝が皮膚のかゆみや炎症を誘導する T 細胞の機能分化に重要な役割を果たしているのではないかと考え、その影響について検証を行った。はじめに *in vitro* で炎症皮膚病変の Late phase で浸潤してくるような $IL-3^+IL-31^+IL-13^+$ Tpath2 細胞の誘導条件について検討を行った。いくつかのサイトカイン条件 (Th0/Th1/Th2/Th9/Th17)、およびタイムコースを追って検討をしたところ Th2 細胞分化条件 (IL-2/IL-4/anti-IFN γ) で通常の培養期間よりも長く培養した条件でより多くの $IL-3^+IL-31^+IL-13^+$ Tpath2 細胞を得ることができた。

次にこの分化条件において、脂質代謝酵素 X および脂質トランスポーター Y を用いた $CD4^+$ T 細胞や脂質フリーの培養下で $IL-3^+IL-31^+IL-13^+$ Tpath2 細胞の分化誘導能を検証した。脂質代謝酵素 X 欠損細胞では IL-3 は 1/5 程度に、IL-31 は 1/2 程度に、IL-13 は 2/3 程度にそれぞれ低下することが示された。また、脂質トランスポーター Y 欠損細胞では、IL-3 は 1/3 程度に、IL-31 は 1/3 程度に、IL-13 は 1/2 程度にそれぞれ低下することが示された。さらに、脂質フリーの培養条件下では、IL-3 は 1/10 程度に、IL-31 は 1/5 程度に、IL-13 は 1/2 程度にそれぞれ低下することが示された。これらの結果は、 $IL-3_IL-31/IL-13$

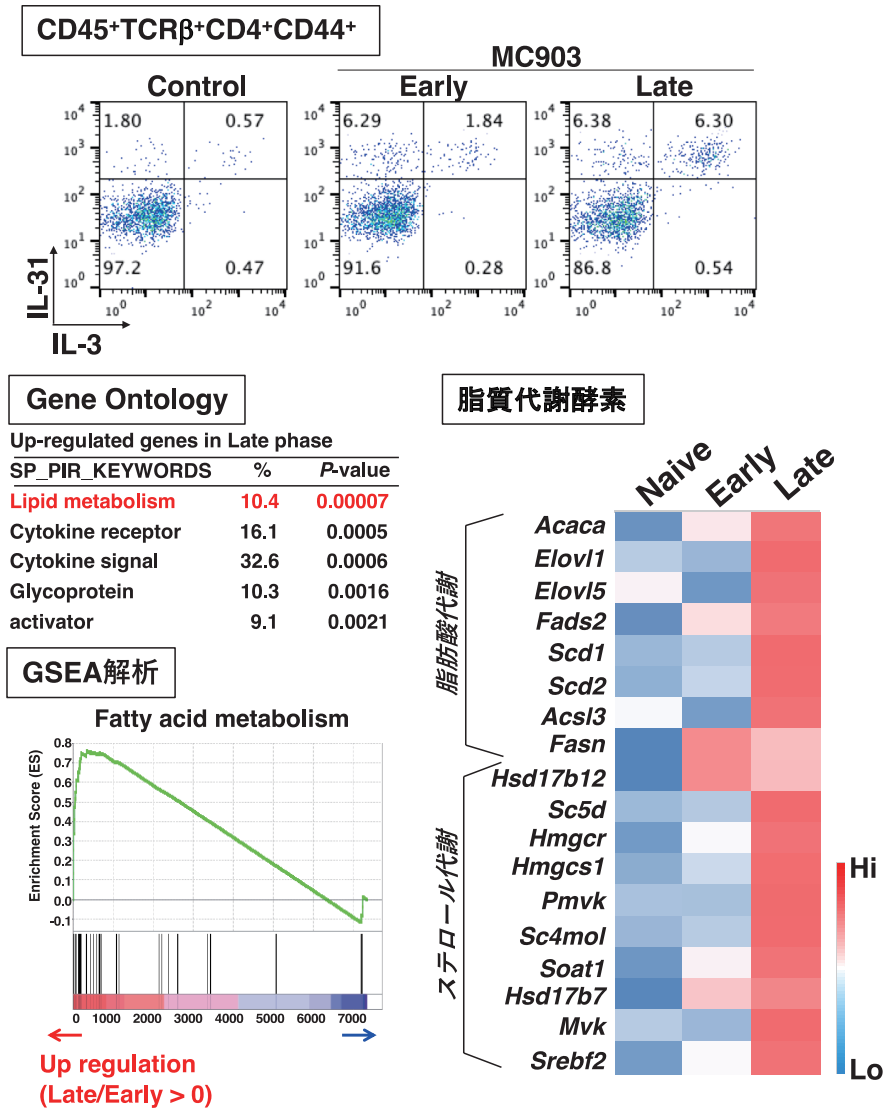


図1 炎症皮膚病変に浸潤する病原性 Th2 細胞のマルチオミクス解析

を共産生する皮膚病原性 T 細胞は細胞内と細胞外の脂質代謝に非常に強く依存していることを示唆している (図2)。

4. 考察および総括

本研究は、アトピーの炎症早期から病態重症化に到る経時的な免疫応答シーケンスについて、疾患を引き起こす病原性 Th2 細胞 T_{path2} の RNA・タンパクのトランスオミクス解析を行い、病態を制御する pathogenic code の同定を目指し研究を推進した。その成果として、免疫細胞の脂質代謝がこれらの細胞集団やアレルギー病態に極めて重要な役割を果たすことが明らかとなった。現状ではいったいどの特性を持った脂質が皮膚 T_{path2} 細胞の誘導に必須であるかは不明なため、今後高精度リポミクス解析を駆使することで明らかにしたい。また、これらの脂質代謝経路を標的とすることで、これまで有効な治療法が見つかっていないアレルギー疾患に対して、従来とは異なる革新

的な治療法開発につながると考えている。事実、これまでのアレルギー疾患に対する治療法は、主に免疫応答を広範に制御するステロイド・免疫抑制剤に関するものが中心で、疾患を誘導する細胞だけにアプローチすることは難しいと考えられてきた。しかし、最新の知見によって、脂質合成の亢進と T 細胞の病原性がリンクすることが示唆されており、病原性 T 細胞集団の脂質代謝を標的として病態を制御できる可能性が見えてきている。こうした研究により疾患の原因となる細胞を標的とすることは、副反応を極力抑えつつより効果の高い治療へとつながる非常に意義深い課題であると考えている。今後、免疫細胞自身の *De novo* 脂質代謝の作用と、生体環境から免疫細胞へと働きかける脂質代謝物の生理作用を双方向から精査していくことが疾患治療を評価する上で重要であると考えている。どの代謝物、どの代謝経路を制御すれば、より効率的に疾患治療へと応用できるのか、疾患ごとの代謝物・免疫細胞のリンクについて

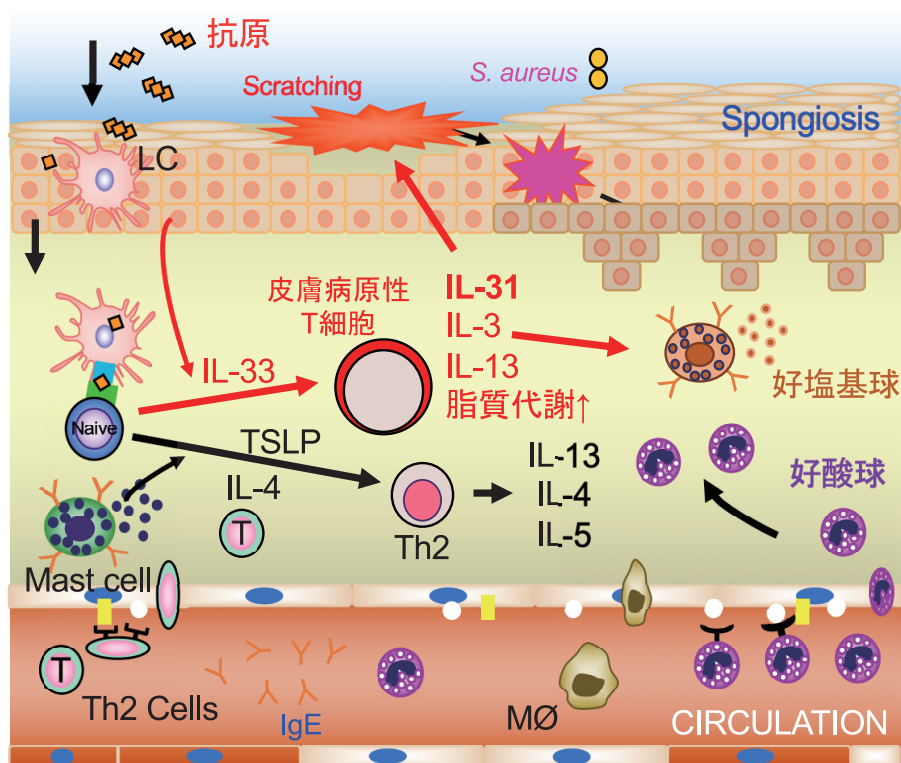


図2 アトピー性皮膚炎における病原性 Th2 細胞と脂質代謝

研究を進め、「代謝で免疫を制御する」ことを目指していきたい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りましたコーセーコスメトロジー研究財団に心より深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Kanno T., Nakajima T., Kawashima Y., Yokoyama S., Asou HK., Sasamoto S., Hayashizaki K., Kinjo Y., Ohara O., Nakayama T., and Endo Y.* Acsbg1 dependent mitochondrial fitness is a metabolic checkpoint for tissue T_{reg} cell homeostasis. *Cell Rep.* 37 (6):109921 (2021).
- 2) Endo Y, Iwamura C, Kuwahara M, Suzuki A, Sugaya K, Tumes DJ, Tokoyoda K, Hosokawa H, Yamashita M, and Nakayama T. Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3. *Immunity.* 35:733-745 (2011).
- 3) Endo Y, Hirahara K, Inuma T, Shinoda K, Tumes DJ, Asou HK, Matsugae N, Obata-Ninomiya K, Yamamoto H, Motohashi S, Oboki K, Nakae S, Saito H, Okamoto Y, and Nakayama T. The Interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in the airway. *Immunity* 42:294-308 (2015).
- 4) Yamamoto T, Endo Y, Onodera A, Hirahara K, Asou HK, Nakajima T, Kanno T, Ouchi Y, Uematsu S, Nishimasu H, Nureki O, Damon DJ, Shimojo N, and Nakayama T. DUSP10 constrains innate IL-33-mediated cytokine production in ST2hi memory-type pathogenic Th2 cells. *Nat. Commun.* 9:4231 (2018).
- 5) Nakajima T., Kanno T., Yokoyama S., Sasamoto S., Asou HK., Damon J. T., Ohara O., Nakayama T., and Endo Y.* ACC1-expressing pathogenic T helper 2 cell populations facilitate lung and skin inflammation. *J. Exp. Med.* 218 (12): e20210639 (2021).
- 6) Endo Y, Hirahara K, Yagi R, Tumes DJ, and Nakayama T. Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol.* 35: 69-78 (2014).
- 7) Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, Endo Y, Hosokawa H, Shinoda K, Tumes DJ, Okamoto Y. Th2 cells in health and disease. *Annu Rev Immunol.* 35: 53-84 (2017).

ヒト特有の表皮セラミド合成経路および生理機能の解明

北海道大学大学院薬学研究院

大野 祐介

The stratum corneum, which constitutes the outermost layer of the epidermis, consists of corneocytes and lipid lamellae. The lipid lamellae, comprising a multi-layered lipid structure, are important for the skin permeability barrier that protects against the invasion of pathogens and foreign substances and prevents water loss through the skin. Ceramides account for approximately 50% of the lipid lamellae (by weight) and play a pivotal role in the skin permeability barrier function. In contrast to most tissue, a variety of ceramides exist in the stratum corneum. Ceramides containing a 6-hydroxy long-chain base (H-ceramides) are unique to the human stratum corneum and are the predominant ceramides. However, the biosynthetic pathway and physiological function of H-ceramides remain unclear.

In this study, we demonstrated that H-ceramide production increases in a keratinocyte-differentiation-dependent manner, and treatment with ascorbic acid enhances its production. Meanwhile, treatments with cosmetic ingredients that have antioxidant properties, such as kojic acid, coenzyme Q₁₀, and astaxanthin, did not enhance the production of H-ceramides, indicating that antioxidative effects are not involved in the H-ceramide production. By comprehensive expression analysis using RNA sequencing, we identified i) 1073 genes increased (≥ 2 -folds) during keratinocyte differentiation, ii) 159 genes increased (≥ 2 -folds) by a treatment with ascorbic acid, and iii) 87 genes increased in both conditions. Among them, we cloned 16 genes and investigated their activity to produce H-ceramides by an overexpression assay using HEK 293T cell. However, H-ceramides were not produced at least in our assay condition. Therefore, further analyses, including to establishment *in vitro* and *in vivo* assay systems, are required to identify the gene responsible for H-ceramide synthesis. Our finding contributes to future studies identifying an H-ceramide synthase, elucidating the mechanisms of its production, and developing novel cosmetic materials/products.

1. 緒言

セラミドは単一の分子の名称ではなく、長鎖アミノアルコール（長鎖塩基）と脂肪酸がアミド結合した構造をもつ脂質の総称である¹⁾。ヒトのセラミドは長鎖塩基および脂肪酸の構造（二重結合・水酸基の有無、位置）の違いにより30のセラミドクラス（遊離セラミド25クラス、結合型セラミド5クラス）に分類され、各クラスには炭素鎖長の異なるセラミド分子種が存在する。皮膚の最外層である表皮の角質層は、角質細胞および脂質ラメラと呼ばれる脂質の多層構造体によって構成されており、脂質ラメラは皮膚を介した生体内外の物質の透過（体外からの病原体・異物の侵入、体内からの水分蒸散）を制限するバリアとして特に重要である。セラミドは脂質ラメラの約50%（重量比）を占め、多くの組織とは異なり角質層には多様なセラミド分子種が存在することが知られていたが、各分子種の詳細な存在量・組成比については不明な点が多く残されていた。長鎖塩基の6位に水酸基をもつセラミド（Hセラミド）は1994年にヒトの皮膚に存在することが明らかにされ²⁾、

我々のグループをはじめとする解析により、Hセラミドはヒトの角質層に特有であり、かつヒトの角質層では主要なセラミドクラスであることが明らかとなった（図1）^{3,4)}。

セラミドは皮膚の透過性バリア機能の向上を目的として、化粧品、美容液、ドリンク等様々なセラミド配合製品が市販され、広く認知されるようになってきた。しかし、配合されているセラミドの殆どはヒトの角質層セラミドとは分子種や組成が異なっており、セラミドによるバリア機能を十分に発揮できていない可能性が高い。ヒト角質層セラミド組成を反映した製品開発の障壁となっていた主たる要因として、ヒト角質層に存在する多様なセラミド分子種の存在量・組成の詳細とその多様性を生み出す分子機構が不明であったことがあげられる。特にHセラミドはヒト角質層で最も多いセラミドクラスであるにもかかわらず、その発見から30年を経た現在においてもその合成経路および生理機能は依然不明である。そこで本研究では、Hセラミドの合成酵素を同定し、産生経路を解明することを目的とした。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒト不死化ケラチノサイト（Evercyte, NHEK-SVTERT3-5）はCnT-prime epithelial proliferation medium (CELLnTEC) を用いて培養することで増殖させた。細胞の分化はCnT-prime epithelial 3D barrier medium (CELLnTEC) を用いて培養することで誘導し、14日間培養した。HEK 293T



Synthetic pathway and physiological function of human-specific epidermal ceramides

Yusuke Ohno

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

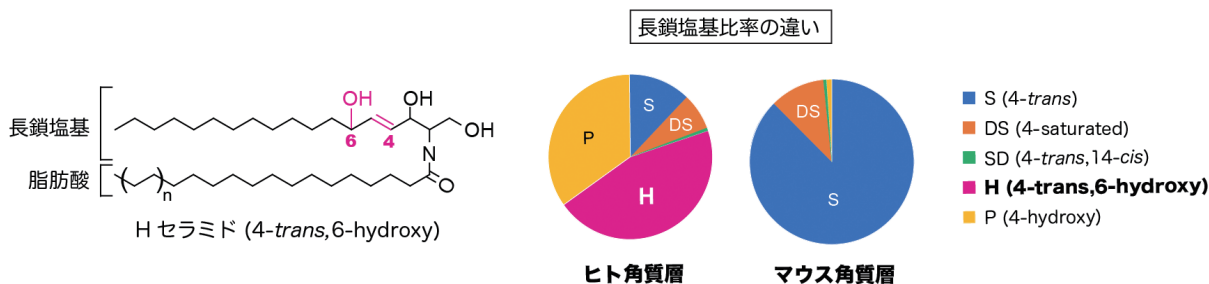


図1 Hセラミドの構造と角質層での存在比率

細胞は、10% 仔ウシ血清, 100units/mL penicillin および 100µg/mL streptomycin (Merck) を含む Dulbecco's Modified Eagle's medium (D6429; Merck) を用いて培養した。遺伝子導入には Lipofectamine plus (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2.2. RNA シークエンス

分化させたヒト不死化ケラチノサイトより NucleoSpin RNA (Takara) を用いて RNA の抽出を行った。NEBNext® Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs), NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit (New England Biolabs) を用いてシーケンスライブラリーの調製を行った。Illumina NovaSeq 6000 (Illumina) を用いて測定を行い、両端 150bp のペアエンドリードでリード数 6Gb のデータを取得した。データのクオリティチェック, トリミング, マッピング, リードカウント, TPM の算出はそれぞれ FastQC (バージョン 0.11.7), Trimmomatic (バージョン 0.38), HISAT2 (バージョン 2.1.9), featureCounts (バージョン 1.6.3) を用いて行った。

2.3. セラミドの測定

14日間分化させたヒト不死化ケラチノサイトを 100µL H₂O に懸濁させ、375µL CHCl₃/CH₃OH=1:2 (v/v) を加えて激しく攪拌した。125µL H₂O および 125µL CHCl₃ を加えて激しく攪拌後、遠心により二層に分離させた。下層を回収し、溶媒を留去後、200µL CHCl₃/CH₃OH=1:2 (v/v) に再懸濁させ、液体クロマトグラフィー-連結型タンデム質量分析 (LC-MS/MS; Xevo TQ-S, Waters) によるセラミドの検出, 定量を行った。

2.4. 候補遺伝子のクローニング

ヒト不死化ケラチノサイト (分化7日) の cDNA および各遺伝子特異的なプライマーを用いて各候補遺伝子を PCR により増幅し (KOD FX, TOYOBO), dA 付加後, pGEM-T Easy vector (Promega) にクローニングした。配列の確認後, 目的遺伝子を制限酵素により切り出し, 動

物細胞発現用ベクター pCE puro 3 × FLAG-1 にサブクローニングした。

3. 結果

3.1. アスコルビン酸によるHセラミドの増加

ケラチノサイトの分化時にアスコルビン酸を添加すると Hセラミドと予想されるセラミド量が増加することが TLC を用いた解析により示唆されていた^{5,6)}。そこでまず、アスコルビン酸が Hセラミド産生増加に関与することを証明するため、アスコルビン酸存在下/非存在下において各日数分化させたケラチノサイトより脂質を抽出し、LC-MS/MS により Hセラミド量を定量した。その結果、分化日数依存的に Hセラミド量が増加し、アスコルビン酸非添加群に比べ、添加群では顕著に増加した (図2 7日, 3.7倍; 10日, 7.1倍; 14日, 11.3倍; 21日, 6.7倍)。

アスコルビン酸は抗酸化物質, 分化促進または水酸化酵素の補酵素として働くことが知られている^{7,8)}。そこで、アスコルビン酸による Hセラミドの産生増加が抗酸化作用によるものかどうかを明らかにするため、抗酸化作用を目的とした化粧品材料として用いられるコウジ酸, コエンザイム Q₁₀ およびアスタキサンチンの Hセラミド産生への影響を調べた。各抗酸化剤を不死化ケラチノサイト分化時に添加し、脂質を抽出後、Hセラミド量を調べたところ (図3),

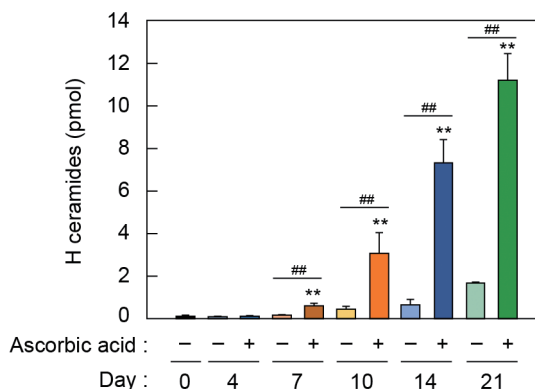


図2 分化, アスコルビン酸依存的なHセラミドの産生増加

いずれの化合物もHセラミド産生を増加させないことが明らかとなった。

3.2. アスコルビン酸依存的な遺伝子発現変動の網羅的解析

Hセラミド量がケラチノサイトの分化依存的に増加したことから、未同定のHセラミド合成酵素は分化依存的に発現が増加すると考えられる。また、アスコルビン酸存在下でHセラミド産生が増加したことから、アスコルビン酸がHセラミド合成酵素の発現を増加させた可能性が考えられる。そこで、Hセラミド合成酵素の候補を探索するため、RNAシーケンスによりケラチノサイトの分化による発現変動を網羅的に調べた。各分化日数におけるケラチノサイトからRNAを抽出し、RNA濃度、純度を調べたところ、分化日数10日、14日、21日のRNAは分解が進んでいた。これは皮膚では角質層を形成する段階までケラチノサイトは分化が進行すると、DNAやRNAの分解が進行するためであると考えられる。分化日数7日ではRNAの分解が進んでおらず、アスコルビン酸依存的なHセラミドの増加が見られたため、分化7日におけるRNAを用いてRNAシーケンス解析を行った。その結果、i) 分化依存的に発現増加(2倍以上)する1073遺伝子、ii) アスコルビン酸依存的に発現増加(2倍以上)する159遺伝子、i) かつii) の条件を満たす87遺伝子を同定した(図4)。

3.3. 水酸化酵素候補遺伝子の活性解析

RNAシーケンス解析により発現増加していた遺伝子のうち、脂質代謝関連遺伝子(*SPTLC3*, *SPTSSB*, *PSAPL1*, *CLN8*, *PTGS1*, *FADS6*, *ABHD12B*, *ABHD17B*)、脂質トランスポーター(*GLTP*, *STARD5*)、水酸化および不飽和化関連遺伝子(*CYP1A1*, *CYP2C18*, *CYP2E1*, *CYP2W1*, *CYP561D1*, *SDR16C5*)をHセラミド合成酵素の候補遺伝子としてクローニングし、哺乳類発現細胞発現用ベクターに組み込んだ。HEK 293T細胞に各プラスミドをそれぞれ導入し、脂質を抽出後、LC-MS/MSによりHセラミドの検出を行った。しかし、いずれの遺伝子の発現によってもHセラミドは検出限界以下であった。ジヒドロセラミド水酸化/不飽和化酵素であるDEGS2は水酸基および二重結合共にもたないセラミドの長鎖塩基部分の6位に水酸基を導入する酵素である。DEGS2が別の因子の存在によってセラミドの4位に水酸基を導入する活性を発揮する可能性を考え、DEGS2と上記の各候補因子をHEK 293T細胞に共過剰発現させた。細胞から脂質を抽出し、LC-MS/MSによりHセラミド産生を調べたところ、Hセラミドは検出限界以下であった。これらの結果から、クローニングした各遺伝子は少なくとも今回用いた実験系ではHセラミド合成活性を示さな

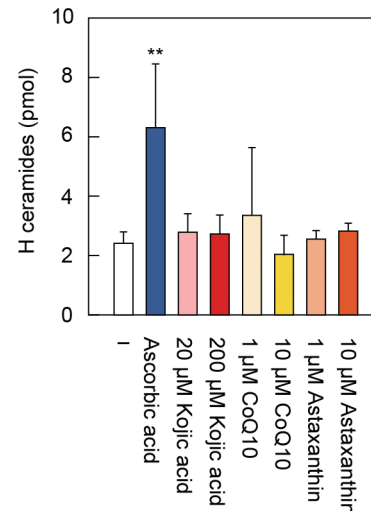


図3 Hセラミド産生への抗酸化剤の影響

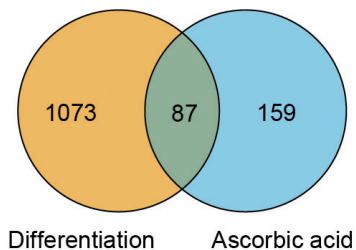


図4 ケラチノサイトの分化依存的、アスコルビン酸依存的な遺伝子発現の増加

いことが明らかとなった。

4. 考察, 総括

Hセラミドはヒト特有かつ角質層で最も多いセラミドクラスであるにもかかわらず、産生経路や生理機能は不明であり、Hセラミドを配合した製品もこれまで販売されていない。本研究では、Hセラミドの産生量がケラチノサイトの分化依存的に増加すること、さらにその産生量はアスコルビン酸添加によって大幅に増加することを見出した。アスコルビン酸は抗酸化作用を目的として食品等に用いられるが、抗酸化作用をもつ化粧品材料であるコウジ酸、コエンザイムQ₁₀、アスタキサンチンはHセラミド産生を亢進しなかったことから、アスコルビン酸の作用は抗酸化作用以外によることを明らかにした。アスコルビン酸の抗酸化作用以外の機能として、ケラチノサイトの分化に関与することが知られていることから^{7,9)}、網羅的な発現解析を行ったところ、ケラチノサイトの分化依存的かつアスコルビン酸依存的に発現増加する87の遺伝子を同定することに成功した。これまでにアスコルビン酸により発現が増加する遺伝子の網羅的解析を行った報告はなされておらず、ケ

ラチノサイトの分化メカニズムには不明な点が多く残されていることから、詳細な本研究で得られた結果はHセラミド産生酵素の同定のみならず、ケラチノサイトの分化メカニズムを理解するための重要な知見となることが予想される。

網羅的遺伝子発現解析の結果をもとに、Hセラミド合成酵素の候補として16遺伝子を選択し、HEK 293T細胞へ過剰発現させることで活性を調べたが、いずれの遺伝子も発現させてもHセラミドは産生されなかった。その要因として以下の3つの可能性を考えている：i) 選択した候補遺伝子はいずれもHセラミド合成酵素でない、ii) 候補遺伝子にHセラミド合成酵素が含まれているが、単独では活性を発揮できない(HEK 293T細胞には活性に必要な別の因子が発現していない)、iii) Hセラミド産生におけるアスコルビン酸の役割は遺伝子発現ではなく、水酸化活性の補助因子である。そのため今後はこれら3つの可能性を検証するため、i) HセラミドをもたないマウスケラチノサイトのRNA発現とヒトRNA発現の比較解析による別の候補遺伝子のスクリーニングと活性解析、ii) HEK 293T細胞ではなく、ケラチノサイトを用いた過剰発現実験もしくはノックアウト細胞の作成とHセラミド産生量の解析、iii) 分化ケラチノサイトの総細胞抽出液もしくは膜画分を用いた*in vitro*の活性解析系の構築とアスコルビン酸添加時のHセラミド産生活性解析、をそれぞれ行う必要があると考えている。

本研究期間中においてHセラミド合成酵素の同定には至らなかったが、Hセラミド産生におけるアスコルビン酸の関与を証明し、アスコルビン酸依存的に発現変動する遺伝子を同定することに成功した。今後は上述の可能性を検証することでHセラミド合成酵素、合成経路および産生の分子メカニズムが明らかになることで、Hセラミドの生理機能の解明およびヒトセラミドとしての新たなコスメトロジー製品への応用へ発展することが期待される。

(引用文献)

- 1) Kihara A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog. Lipid Res.*, **63**, 50-69 (2016)
- 2) Robson KJ, Stewart ME, Michelsen S, Lazo ND, Downing DT. 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.*, **35**, 2060-2068 (1994)
- 3) Kawana M, Miyamoto M, Ohno Y, Kihara A. Comparative profiling and comprehensive quantification of stratum corneum ceramides in humans and mice by LC/MS/MS. *J. Lipid Res.*, **61**, 884-895 (2020).
- 4) Suzuki M, Ohno Y, Kihara A. Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases. *J. Lipid Res.*, **63**, 100235 (2022)
- 5) Ponc M, Weerheim A, Kempenaar J, Mulder A, Gooris GS, Bouwstra J, Mommaas AM. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *J. Invest. Dermatol.*, **109**, 348-355 (1997)
- 6) Uchida Y, Behne M, Quiec D, Elias PM, Holleran WM. Vitamin C stimulates sphingolipid production and markers of barrier formation in submerged human keratinocyte cultures. *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1307-1313 (2001)
- 7) Catani MV, Savini I, Rossi A, Melino G, Avigliano L. Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutr. Rev.*, **63**, 81-90 (2005)
- 8) Wang K, Jiang H, Li W, Qiang M, Dong T, Li H. Role of Vitamin C in Skin Diseases. *Front. Physiol.*, **9**, 819 (2018)
- 9) Pasonen-Seppanen S, Suhonen TM, Kirjavainen M, Suihko E, Urtti A, Miettinen M, Hyttinen M, Tammi M, Tammi R. Vitamin C enhances differentiation of a continuous keratinocyte cell line (REK) into epidermis with normal stratum corneum ultrastructure and functional permeability barrier. *Histochem. Cell Biol.*, **116**, 287-297 (2001).

1) Kihara A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal

上皮での炎症性サイトカイン産生を担う新規分子群の役割とそれを制御する化合物の探索

熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座

押海 裕之

RIG-I-like receptors (RLRs) recognize viral RNAs as well as endogenous retroelement RNA, leading to the expression of pro-inflammatory cytokines. Since abnormal regulation of RLRs causes auto-immune-like disorders, their activation should be strictly regulated. We investigated the proteins and small chemicals that affect this regulation and found that the Riplet ubiquitin ligase fine-tunes RLRs-mediated pro-inflammatory cytokines via K63-linked polyubiquitination of the LGP2 protein. Moreover, we conducted a chemical screening and identified several chemicals that augment RLR-mediated pro-inflammatory cytokine expression. Interestingly, the identified molecules target a metabolite that attenuates inflammatory responses. We found that the addition of the metabolite reduces pro-inflammatory cytokine expression in epithelial cells. These findings are expected to be utilized to develop a new method and chemicals to attenuate inflammatory reactions in the skin.

1. 緒言

皮膚での炎症は腫れや赤みや痛みなどの原因となり、化粧品においても接触性皮膚炎や、いわゆる化粧品かぶれなどが問題となっている。本研究では、上皮における炎症を制御する分子メカニズムを解明すること、さらに、炎症を抑制する化合物を新たに同定することを目的とする。これらの目的を達成することで、化粧品によるかぶれや皮膚炎の問題を解決する基礎基盤を作ることが可能になると期待される。

我々はこれまで炎症について、上皮細胞での炎症性サイトカイン産生を誘導する Riplet E3 ユビキチンリガーゼを同定しその機能を解明したほか、上皮成長因子である EGF が細胞内のヘリケース分子を介して炎症を抑制するメカニズム、さらに、ZNF598 分子による炎症性サイトカインを抑制するメカニズムなどを解明した¹⁾。本研究では我々のこれまでの研究をさらに発展させ、炎症を誘導する Riplet E3 ユビキチンリガーゼの活性を抑制する新たな化合物をケミカルスクリーニングによって単離し、さらに、ZNF598 分子や Riplet 分子依存的な炎症のメカニズムを解明する。これらにより、化粧品かぶれのメカニズムを解明するとともに、かぶれを抑える新たな成分を同定できると期待される。

2. 方法

2.1. LGP2 のユビキチン化を介した炎症性サイトカイン産生の制御

Riplet 分子依存的な炎症性サイトカイン産生の新たな制御機構を解明するために、HeLa 細胞や HEK293 細胞、A549 細胞などの細胞を用い解析を行った。解析では、それぞれの分子を発現するベクターや、それぞれの分子に対する siRNA を用いることで、個々の分子が炎症性サイトカインの産生にどのような役割を果たすのかを調べた。遺伝子発現の網羅的な解析としてマイクロアレイ解析は東レの 3D-Gene を用いた。

ユビキチン化において、HA や Myc などのタグ付きのユビキチン発現ベクターを用いるとともに、ユビキチンに対する抗体などによりタンパク質のユビキチン修飾を調べた。また、LGP2 タンパク質のユビキチン修飾については、質量分析として LC-MS/MS を用いた解析を実施した。

2.2. 炎症を制御する新たな化合物の探索

ケミカルスクリーニングでは大阪大学のオリジナル化合物ライブラリーおよび東京大学創薬機構の既存薬ライブラリーから分与をえて使用した。ケミカルスクリーニングの実験系においては、Riplet 依存的なシグナルを検出するためにサイトカイン遺伝子のプロモーターの下流に mCherry 遺伝子を繋いだレポータープラスミドと同時に、恒常的に発現する遺伝子のプロモーターに GFP 遺伝子を繋いだレポータープラスミドを細胞に導入し、mCherry による赤色の蛍光と、内在性コントロールとなる GFP の緑色の蛍光のバランスが大きく変化する化合物を選択した。ケミカルスクリーニングでは合計でおよそ 3200 化合物についてスクリーニングを実施した。



Role of new molecules and chemicals regulating inflammatory responses in the skin

Hiroyuki Oshiumi

Department of Immunology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

3. 結果

3.1. 炎症性サイトカイン産生を制御する新たな分子メカニズムの解明

Ripletは炎症性サイトカインの産生を誘導するRIG-Iを活性化する分子である。RipletはRIG-Iをユビキチン化することで、RIG-I依存性の炎症性サイトカインの産生を誘導する²⁾。炎症性サイトカインは外来の微生物に対する免疫応答に重要である反面、その過剰な産生は自己炎症性疾患や自己免疫疾患、アレルギーなどの原因ともなることから、その抑制機構が重要である。我々は、RipletによるRIG-I依存性の炎症性サイトカイン産生を抑制するメカニズムとして、RIG-Iファミリー分子であるLGP2タンパク質に着目し研究を進めた。

まず、LGP2遺伝子をCRISPR-Cas9のシステムを用いてノックアウト (KO) した細胞を用い、Riplet経路を刺激するpoly I:Cで刺激後の炎症性サイトカインを野生型細胞と比較したところ、IFN- β 、IL-6、IP-10などの炎症性サイトカインのmRNAの発現がLGP2 KOにより亢進することが定量PCR法により示された。Ripletはユビキチンリガーゼ活性を有するため、LGP2のユビキチン化を調べるために、LGP2とRiplet分子をそれぞれ細胞に発現させると、Ripletを共発現した際にLGP2のポリユビキチン化が顕著に増加することがウェスタンブロット法により示された。このLGP2のポリユビキチン化を定量的に測定するために蛍光色素を用いた顕微鏡観察を実施したところ、予想通り、Ripletを共発現させることで、LGP2のユビキチン化を示すシグナルが統計的に有意に増加することが示された。さらに、RipletとLGP2分子が結合するかどうかを調べるために免疫沈降法により調べたところ、これらの二つの分子が結合することが示された。

RipletによるLGP2のユビキチン化が63番目のリジン

を介しているかを調べるため、63番目以外のリジンを全てアルギニンに置換した組換えユビキチン (K63 only Ub) を発現させ調べたところ、この組換えユビキチンがRipletの発現により効率的にLGP2分子に取り込まれることが明らかとなった。また、この組換えユビキチンのLGP2分子への結合はRiplet KO細胞では大きく減少することも示された。また逆にRipletをKOした細胞ではLGP2のユビキチン化を示すシグナルが大きく減弱した。これらのデータからRipletがLGP2をリジン63鎖を介したポリユビキチン修飾することが示唆された。

実際に、LGP2分子がポリユビキチン修飾を受ける残基を決定するために、質量分析を行ったところ、39番目、532番目、599番目、629番目のリジン残基がユビキチン化を受けることが示された。これらの4つのリジン残基のポリユビキチン修飾は、Ripletを共発現することで増加することが、LFQ法による解析により示唆された。これらのリジン残基のユビキチン化がLGP2分子の機能に関与するかどうかを調べるために、これらの4つのリジン残基をアルギニンに置換したLGP2分子として、LGP2-4KR分子を作成し細胞へ発現させると、Riplet依存性の炎症性サイトカインの産生や、IP10やCcl5などの炎症に関与するケモカインの発現が上昇することが示された (図1)。

これらの結果は、Ripletは、LGP2が存在すると、逆に、炎症性サイトカインの産生を抑制することを示唆する³⁾。

3.2. 炎症を抑制する新たな化合物の探索 (ケミカルスクリーニング)

Riplet分子はI型インターフェロンの他にIL-6などの炎症性サイトカイン産生の誘導で非常に重要な働きをする分子である。我々はRipletの活性化を評価する実験系を作製したことから、この実験系を用いてRipletの活性を制御する化合物についてケミカルスクリーニングを実施した。お

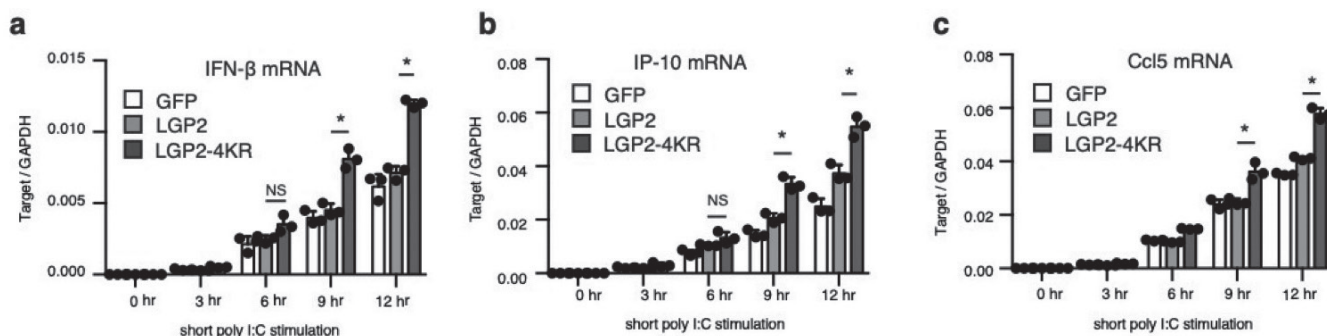


図1 LGP2のユビキチン修飾と炎症性サイトカイン

ユビキチン化を受けるリジンをアミノ酸置換し、ユビキチン化されないLGP2分子を発現させ、炎症に関与するサイトカインとしてIFN- β 、IP-10、Ccl5のmRNAの発現を調べたところ、ユビキチン化されない変異型LGP2タンパク質(LGP2-4KR)を発現する細胞では、それらのサイトカインの産生が亢進していた。これらの結果は、ユビキチン化されることで炎症性サイトカインの産生を抑制することを示唆する。

よそ 3200 個の化合物についてケミカルスクリーニングを実施したところ、興味深いことに複数の化合物を同定することができた。

これらの薬剤（化合物 X）を、HeLa 細胞などの、ヒト上皮細胞の培養上清に加え、細胞を刺激後に炎症性サイトカインの産生を調べたところ、この化合物 X が IFN- β や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を非常に強く増強することを発見した。

化合物 X が標的とする分子 Z に対する siRNA を用いたノックダウン実験を実施すると、化合物 X の添加と同様に上皮細胞から産生される炎症性サイトカインの産生が亢進した。さらに、化合物 X が代謝産物 Y の合成を阻害することから、逆に、この代謝産物 Y を培養上清に加えて細胞を刺激したところ、炎症性サイトカインの産生を有意に抑制することを発見した（図 2）。これらの結果は、細胞中の代謝物 Y の量が、細胞が産生する炎症性サイトカイン量と逆相関することを示唆する。

そのメカニズムについて調べたところ、この代謝産物を合成する合成酵素の転写を制御する転写因子が、実は炎症性サイトカインの産生誘導に関与する分子の発現も制御することを明らかとした。これらの結果は、化合物 X が標的とする代謝産物 Y が、炎症を抑制する働きを示唆する。

次に、マウス個体実験を実施するため、化合物 X をマウスへ投与し、Riplet 経路を刺激する薬剤を投与後の炎症性サイトカインの産生を調べたところ、化合物 X の投与によりマウス組織での炎症性サイトカインの産生量が増加する結果を得た。逆に、代謝物 Y の量が増えるマウス動物モデルを用いると炎症性サイトカイン量が低下することが示された。これらのことから、代謝物 Y は炎症を抑制する効果を持つことが示された。

4. 考 察

Riplet はユビキチンリガーゼ活性を有し、RIG-I 分子依存的な炎症性サイトカインの産生を亢進する働きを持つ。一方で、今回の研究から、LGP2 依存的な炎症性サイトカインの抑制にも関与することが示された。この一見相反する Riplet の作用は、Riplet が、RIG-I と LGP2 のタンパク質のバランスによって、その役割を変えることを示唆する。つまり、炎症性サイトカインの産生量は、ユビキチン化された RIG-I と、ユビキチン化された LGP2 分子のバランスによって制御されていることを示唆している。

RIG-I や LGP2 はウイルス感染時に主に機能すると考えられているが、ウイルス非存在下においても炎症性サイトカインの産生に関与することが明らかとなっている。特に、RIG-I 遺伝子の変異により自己炎症性疾患を誘導することが明らかとなっており、細胞内に元々存在するレトロトラ

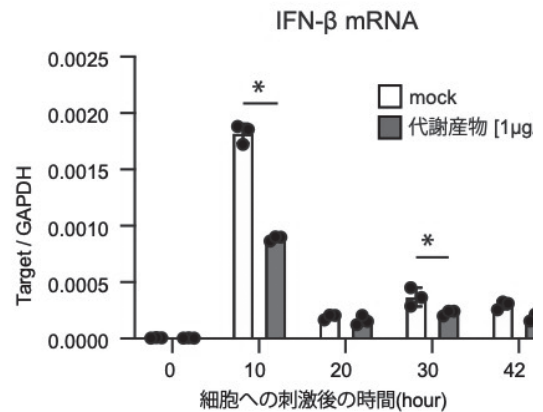


図 2 代謝産物による炎症性サイトカインの抑制
培養細胞を刺激し炎症性サイトカイン産生を誘導する実験において、培養液にあらかじめ代謝産物を添加することで、炎症性サイトカインの産生が有意に低下した。

ンスポゾンなどにより、内因性に炎症を誘導すると考えられる。このようなウイルス非存在下で RIG-I や LGP2 が関与する炎症性サイトカインの産生の誘導や抑制が、化粧品によるかぶれなどにどのように関与するのかはまだ明らかとなっていないが、紫外線などの照射により活性化した内在性のレトロ因子が RIG-I による炎症を誘導することが報告されており、本研究で明らかとした Riplet の新たな役割が、紫外線などによる炎症にどのように関与するのかは、今後のさらなる研究により解明されると期待される。

ケミカルスクリーニングにより同定された化合物 X と代謝物 Y について、これらが炎症性サイトカインの産生を制御することを示唆する結果は他のグループからも報告があるが、その詳細な分子機構は不明であった。本研究で、代謝物 Y が炎症性サイトカインの産生を抑制する詳細なメカニズムを解明したことで、代謝物 Y の抗炎症作用を用いた化粧品の開発などにつながると期待される。

5. 総 括

本研究の結果、炎症の制御に関与する新たなメカニズムとして、Riplet 分子による LGP2 分子のポリユビキチン修飾と、代謝産物 Y による炎症抑制効果を新たに明らかとした。炎症性サイトカインは血管内皮細胞に作用し血管透過性を亢進することなどにより、局所での腫脹、発赤、疼痛の原因となる。一方で炎症反応の誘導としては、自然免疫応答と獲得免疫応答の二つの経路が存在する。獲得免疫においては抗原が炎症反応を誘導するが、自己免疫疾患以外では外来微生物やアレルゲンの存在により炎症が誘導される。一方で、自然免疫はパターン認識受容体のリガンドとなるものが炎症を誘導する。Riplet 分子は、ウイルス感染時の炎症性サイトカイン産生に必要な分子として同定され

たが、最近の研究から、このRipletが関与する経路が内在性のレトロ因子により誘導される炎症にも関与することが示唆されており、アレルゲンや抗原に非依存的な炎症誘導に関与すると考えられる。特に、内在性レトロ因子は紫外線などの刺激により活性化することが報告されていることから⁴⁾、本研究で明らかとなった炎症の制御機構は、紫外線などによる抗原非依存的な炎症を抑制する新たな方法の開発などにつながると期待される。特に、本研究で同定した代謝産物Yは従来の化粧品にも配合されることがあるため、今後、この代謝産物Yの割合を高めることで炎症を抑える機能的な化粧品として利用できると期待される(図3)。

(引用文献)

- 1) Wang G, Kouwaki T, Okamoto M, Oshiumi H. Attenuation of the innate immune response against viral infection due to ZNF598-promoted binding of FAT10 to RIG-I. *Cell Reports* 28: 1961-1970 (2019)
- 2) Naesens L, Haerynck F, Gack MU. The RNA polymerase III-RIG-I axis in antiviral innate immunity and inflammation *Trends Immunol.* 44: 435-449 (2023)
- 3) Kouwaki T, Nishimura T, Wang G, Nakagawa R, Oshiumi H. K63-linked polyubiquitination of LGP2 by Riplet regulates RIG-I-dependent innate immune

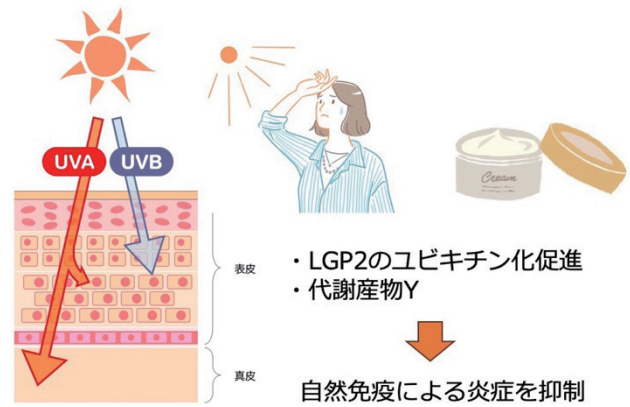


図3 炎症を制御する新たな成分
 本研究で解明した新たな分子メカニズムを標的とした物質(成分)を用いることで、今後、抗炎症性作用を示す化粧品などの開発につながると期待される。

- response. *EMBO Reports* 24: e54844 (2022)
- 4) Mix X, Zheng M, Yu Y, Wu J, Kuang Q, Hu Z, Ouyang L, Lu S, Zhao M. Ultraviolet light induces HERV expression to activate RIG-I signaling pathway in keratinocytes. *Exp Dermatol* 31: 1165-1176 (2022)

紫外線による細胞老化と光老化を繋ぐ分子基盤の解明

公益財団法人東京都医学総合研究所基礎医学研究分野

笹沼 博之

As we are now facing an era of hyper aging society, maintaining mental and physical youthfulness throughout a lifetime is directly linked to healthy longevity and the quality of life (QOL). Youthful is often assessed by appearance, including signs of aging such as skin blemishes and wrinkles. Therefore, inhibiting these skin aging signs holds immense importance for maintaining QOL. Sunspots and wrinkles are attributed to photoaging, caused by exposure to ultraviolet (UV) irradiation from sunlight. Since the continuous exposure of UV and subsequent photoaging leads to solar keratosis and skin cancer, investigation of molecular mechanism of photoaging and its prevention are necessary for the maintenance of QOL. In this study, we aim to investigate photoaging in terms of genomic alternation by exposure of UV, especially the molecular mechanism underlying cause of photoaging. Our research would help provide fundamental insights for seeking “photoaging scavenger compounds” in future.

1. 緒言

細胞に存在するDNAは、絶えず内的外的要因によって損傷を受ける。内的要因としては活性酸素種が最も多い、一方で、外的要因で最も多いのが紫外線である。紫外線はDNA鎖にぶつかるとそのエネルギーにより塩基間を共有結合により架橋してしまう。架橋された二つの塩基は、転写やDNA複製を行うポリメラーゼによって認識できないため正しい塩基を合成鎖に挿入することができない。こうした架橋塩基は、複数の修復経路によって修復される。Translesion DNA synthesis (TLS) 経路とヌクレオチド除去修復 (NER) 経路は、主要な紫外線損傷経路である。TLS経路では、TLSポリメラーゼが架橋塩基を乗り越えることによってDNA合成を継続する。またNER経路では、架橋塩基を含む周辺の塩基をヌクレアーゼにより除去し、除去された領域をDNAポリメラーゼが合成することで修復する。TLSとNER経路は本研究では、それらに加えてDNA二重鎖切断修復経路である相同組換え (HR) 修復経路の紫外線損傷修復における役割を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒトBリンパ芽球細胞由来であるTK6細胞を使用した。TK6細胞の培養には、RPMI1640培地に非働化ウマ血清

を10%加えた。さらにL-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン、ストレプトマイシンをそれぞれ、最終濃度2mM、1mM、100U/mL、100mg/mL加えた。細胞培養液は、CO₂濃度5%、湿度100%、37°Cで培養した。

2.2. 遺伝子改変細胞の樹立

2.2.1. RAD18 遺伝子破壊細胞の樹立

TK6細胞のRAD18遺伝子をCRISPR/Cas9技術を使用し、相同組換え法により破壊した。RAD18遺伝子破壊の方法は、2023年9月に出版された『Cosmetology』最新号(第31号)の津田雅貴先生による研究課題「新規変異評価システムを用いた長波長の紫外線(UVA)による突然変異誘発機構の解明」に記述されている。

2.2.2. AuxinによるBRCA2 遺伝子発現抑制細胞の樹立

AuxinによるBRCA2遺伝子発現抑制細胞とは、植物ホルモンであるAuxinを培地中に加えることで、AID配列を融合させた標的分子(BRCA2-AID)がプロテアソーム依存的に分解を起こす細胞である^{1,2)}。最初に、F1, 5'-ACTGTGGCATAGAGAGAGGTTAAGCAATTGとR1, 5'-ATGGTAAAACCCAGTCTCTACTAAAAATGCプライマーを用いてヒトゲノムより約2kbの断片を増幅、精製した(AMP1)。AMP1を鋳型として、LeftアームをLeft_F2, 5'-AGGGCGAATTGGAGCTCCCCACTGTGGCATAGAGAGAGGTTAAGCAATTGとLeft_R2, 5'-TTGGCGCCTGCACCGGATCCGATATATTTTTT AGTTGTAATTGTGTCCTGプライマーを使って、またRightアームをRight_F2, 5'-CGAAGTTATTAGGTCCCTCGTGTGGCACAATGAGAAAAGAAATTAGTTTC Right_R2, 5'-GGGAACAAAAGCTGGGGAACCTCTTATGGTAAAACCCAGTCTCTACTAAAAATGCを使って増幅した。増幅したLeftとRightアームを精製し、制



Elucidation of the molecular basis linking UV-induced cellular aging and dermatoheliosis

Hiroyuki Sasanuma

Department of Basic Medical Sciences,
Tokyo Metropolitan Institute of Medical
Science

制限酵素 SmaI と EcoNI で消化した pBS-AID ベクターを混ぜた。それぞれの DNA 断片を Seamless kit (Invitrogen, US) によって連結し、ターゲティングベクターを作製した。BRCA2 遺伝子座は、染色体 13 番にある。TK6 細胞の染色体 13 番はトリソミーであるため、全ての BRCA2 遺伝子座に AID タグを挿入するために、3 種類のマーカー遺伝子を持つターゲティングベクターを作製した (図 1)。BRCA 2 遺伝子の終結コドン直前に AID 配列を挿入するために終結コドン直後の 3'UTR を標的とする gRNA (5'-ACCTTTCCAGTTTATAAGAC) を Cas9-gRNA 発現ベクターである pX330 にクローニングした。6 × 10⁶ 細胞に対して、3 種類のターゲティングベクター (Neomycin, Hygromycin, Histidinol) と pX330-gRNA を同時にエレクトロポレーション法 (NEON, Invitrogen, US) により細胞に導入した。エレクトロポレーション後、24 時間抗生物質なしの培地で培養し、96 ウェルプレートに細胞を Neomycin, Hygromycin, Histidinol 入りの培地ともに塗布し、10 日間培養した。コロニーを 2mL 培地で増やし、1 mL から細胞ストック、1 mL からゲノムを抽出した。AID タグが BRCA2 遺伝子の C 末端に導入されたかどうかを次のプライマーを用いて確認した³⁾ (図 2)。

BRCA2_AID_chkR, 5'-CTATTAACCTAAGAAAGTACAAATATTG,

HIS_AID_F, 5'-ATTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTT,

HYGRO_AID_F, 5'-CGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCACGCGCGT,

NEO_AID_F, 5'-AGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGC

3. 結果

3.1. BRCA2 と合成致死性を示す遺伝子変異のスクリーニングと結果の検証実験

BRCA 2 遺伝子は、相同組換えに重要な役割を果たす。BRCA2 遺伝子変異は、家族性乳がん卵巣がん症候群やファンコーニ貧血を引き起こす。BRCA2-AID 細胞を用いて、BRCA2 遺伝子発現を抑制したときに合成致死性を示す遺伝子変異のスクリーニングを行った。方法は、図 3 に示す通り、ヒトゲノムにコードされているほぼ全ての遺伝子 (約 2 万遺伝子) に対して gRNA を発現するレンチウイルスを Cas9 発現 BRCA2-AID 細胞に感染させた。感染細胞のみを選択するため Puromycin を含む培地で培養した。増殖細胞を 2 つのグループに分け、一つを Auxin 含有培地でもう一つを Auxin 不含有培地で培養した。その結果、約 100 遺伝子変異が BRCA 2 遺伝子発現抑制細胞の増殖能をより悪くすること、約 70 遺伝子変異が逆に BRCA 2 遺伝子発現抑制細胞の増殖能を回復させることがわかった

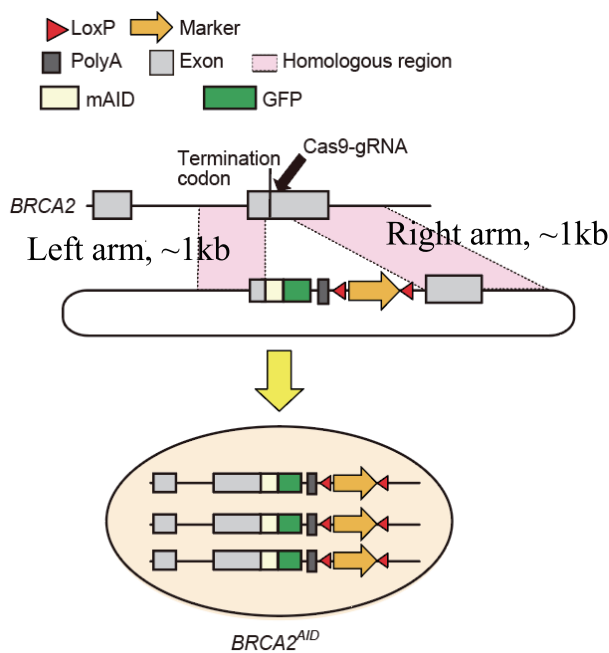


図 1 BRCA2 AID 細胞の作製方法
約 1 kb の Left arm と Right arm を AID タグを挟んでクローニングした。gRNA-Cas9 が終結コドン直後を切断すると、ピンク領域の相同配列間で相同組換えが起こる。相同組換えにより AID タグとマーカー遺伝子がゲノムに挿入される。

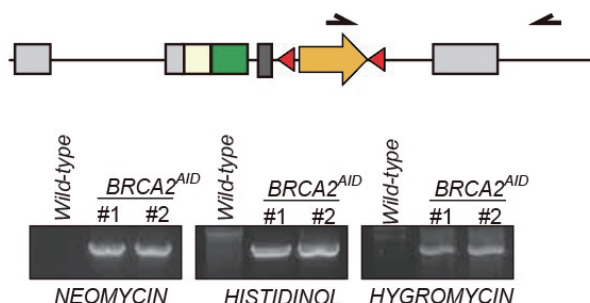


図 2 PCR 増幅による標的組換えの確認
⇐で示すプライマーを使用した。野生型細胞では、→プライマーがアニールする抗生物質耐性遺伝子がないので、予想される位置に増幅断片が検出されない。

(FDR < 0.05)。その中で紫外線損傷修復に非常に重要な役割を果たす XPA 遺伝子変異が見つかった。このスクリーニング結果の再現性を調べる目的で、XPA 遺伝子を標的とする gRNA をクローニングし Cas9-gRNA^{XPA} を発現するウイルスを作製したのち、BRCA2^{AID} 細胞に感染させた (図 4)。BRCA2 と XPA 遺伝子が両方発現している細胞に比べ、XPA 遺伝子単独欠損では、その増殖に違いがなかった。BRCA2 と XPA 遺伝子発現を両方無くした細胞では、増殖能が単独に比べて有意に悪くなることわかった。

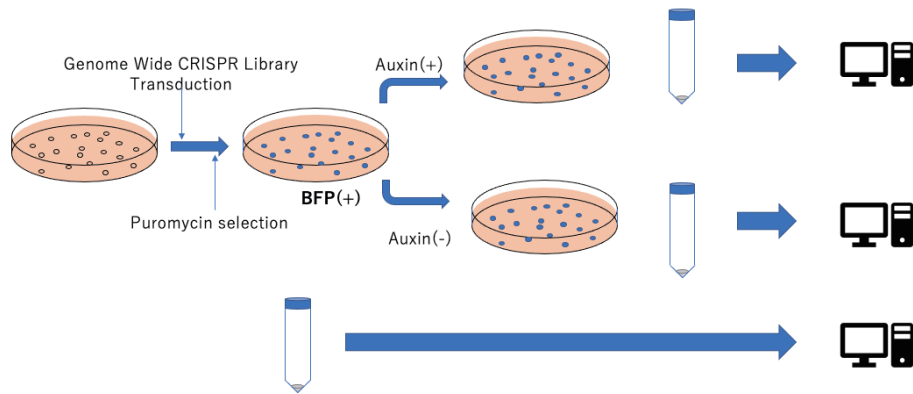


図3 BRCA2 発現抑制細胞を用いた遺伝的スクリーニング概略図
BRCA2 AID細胞にCas9を安定的に発現する細胞株を樹立した。その細胞に約2万遺伝子に対するgRNAを発現するレンチウイルスを感染させた。感染細胞をPuromycinによって選択したのち、生存した細胞を二つに分け、一つをAuxinあり培地でもう一つをAuxinなし培地で5日間培養した。5日間培養したのち細胞からゲノムDNAを抽出し、レンチウイルスに含まれるバーコード配列を含む約200baseを増幅した。増幅した領域をNGSにより配列解読をおこなった。

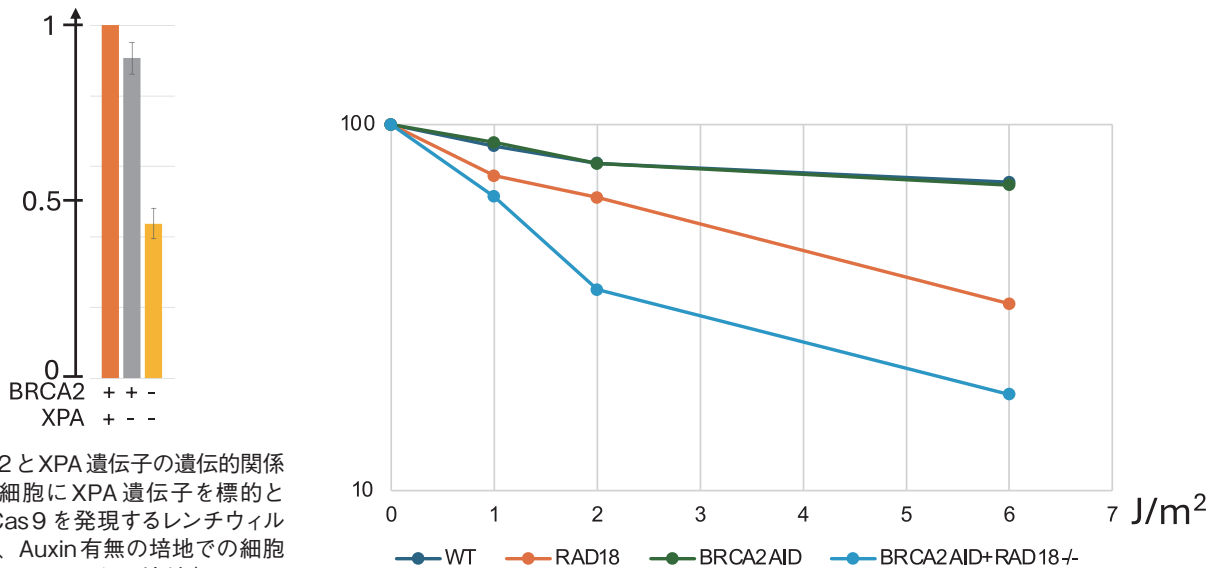


図4 BRCA2とXPA遺伝子の遺伝的關係
BRCA2 AID細胞にXPA遺伝子を標的とするgRNA-Cas9を発現するレンチウイルスを感染させ、Auxin有無の培地での細胞増殖を調べた。Auxinなし培地(BRCA2が発現)かつXPA遺伝子が発現している時の細胞密度を1として、それぞれの細胞密度を相対値として示す。

図5 BRCA2とRAD18遺伝子の遺伝的關係
BRCA2 AID細胞にRAD18遺伝子を破壊した。BRCA2 AID細胞培養液にAuxinを0.1mM加え、BRCA2発現を抑制した。

3.2. TLS経路とHR経路の關係

RAD18遺伝子は TLSポリメラーゼPolηと相互作用し、紫外線によって発生する損傷部位で停止した複製フォークを認識して集積する。RAD18欠損では、TLSポリメラーゼPolηによる損傷部位の乗り越えが起きず、RAD18欠損細胞は紫外線に対して感受性を示す。RAD18とBRCA2との關係を調べるために、BRCA2 AID細胞からRAD18遺伝子を欠損させた。その細胞において、紫外線感受性を調べた(図5)。その結果、BRCA2^{AID}細胞の紫外線感受性は、Auxin存在下で野生型と同程度であった。予想された通り、RAD18遺伝子欠損は、紫外線に対して感

受性を示した。面白いことにBRCA2とRAD18遺伝子を両方なくした細胞では、紫外線に対して単独変異細胞に比べ、より強い感受性を示した。

4. 考 察

このことは、紫外線損傷修復経路であるヌクレオチド除去修復(NER)と相同組換え(HR)が細胞増殖能を維持するために重要な役割を果たしていることを示唆した。おそらく細胞では内因性のDNA損傷が絶えず起こっており、それをXPAが関わるNER経路とBRCA2が関わるHR経路が常に修復しているのかもしれない。NER修復や

TLS修復経路は、紫外線の造る損傷（ピリミジンダイマーや64光産物）に重要な役割を果たすことが知られている。近年では、その詳細な分子メカニズムも明らかになっている。今回の結果は、紫外線による損傷修復に重要な役割を果たすNERやTLS経路がなくなった場合に、細胞はその傷をHRによって修復している可能性を示唆する結果を得た。BRCA2発現抑制細胞単独では、紫外線に対して感受性を示さないことから、紫外線によるDNA損傷修復は、まずNERやTLS経路が重要な役割を果たし、その損傷の多くが修復されるが、これらの経路のいずれかが機能不全に陥ると、その傷は相同組換えが必要な損傷、すなわちDNA二重鎖切断に変換されると考えられる。紫外線損傷がどのような過程を経てDNA二重鎖切断に変換されるのかは不明である。

5. 総括

本研究を通して、複数あるDNA損傷修復経路の相補性が明らかとなった。現在の概念では、DNA損傷の種類に対応してNERやTLS、HRといった経路分けがされている。しかし本研究を含め、近年では例えばHR経路の因子がTLSに関与するといった、予期しない報告が相次いでいる⁴⁾。このことは、紫外線によるDNA損傷によってNER経路に関わる因子が活性化されても、結果としてHRや非相同末端結合経路によって修復される可能性を示唆している。紫外線によって発生する光老化をDNA損傷という観点から考えてみると、NER、TLS経路とHR経路のDNA修復能を数値化することができるようになれば、将来の光

老化のリスク評価が可能となり、光老化や皮膚がん予防につながるかと推察される。

(引用文献)

- 1) N. N. Hoa, R. Akagawa, T. Yamasaki, K. Hirota, K. Sasa, T. Natsume, J. Kobayashi, T. Sakuma, T. Yamamoto, K. Komatsu, M. Kanemaki, Y. Pommier, S. Takeda, H. Sasanuma, Relative contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11, to the initial step of DNA double-strand break repair by homologous recombination in both the chicken DT40 and human TK6 cell lines. *Genes Cells* 20, 1059-1076 (2015).
- 2) Nishimura, K., T. Fukagawa, H. Takisawa, T. Kakimoto, M. Kanemaki, An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* 6, 917-922 (2009).
- 3) A. Tomita, H. Sasanuma, T. Owa, Y. Nakazawa, M. Shimada, T. Fukuoka, T. Ogi, S. Nakada. Inducing multiple nicks promotes interhomolog homologous recombination to correct heterozygous mutations in somatic cells. *Nat Commun* 14, (2023).
- 4) S. Pathania, J. Nguyen, S. Hill, R. Scully, G. O. Adelmant, J. A. Marto, J. Feunteun, D. M. Livingston. BRCA1 is required for postreplication repair after UV-induced DNA damage. *Mol Cell* 44, 235-251 (2011).

加齢による皮下脂肪萎縮の分子基盤の解明

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学環境医学研究所

菅波 孝祥

Although its role as an endocrine organ that produces adipokines (adipose tissue-derived hormones) has been the focus of recent attention, the primary function of adipose tissue is to store excessive energy as triglyceride. Thus, its functional failure leads to ectopic lipid accumulation in non-adipose tissue, thereby causing abnormal systemic glucose metabolism. In this regard, Japanese people are characterized by a body fat distribution that is low in subcutaneous adipose tissue and relatively high in ectopic fat, and they have the same risk of diabetes as Western people despite having a lower body mass index (BMI) than Western people. In the elderly, subcutaneous adipose tissue becomes atrophic and fibrotic, which is not only a cosmetic feature of aging, but is also closely related to the excessive accumulation of ectopic fat and the pathogenesis of various aging-related diseases. In this study, we focused on atrophy of subcutaneous adipose tissue and identified gene expression changes common to atrophy of subcutaneous adipose tissue through RNA-seq analysis of aged mice and a Cachexia model. For the next step, we would like to further investigate the molecular mechanism and develop a new method to improve metabolism by preventing and improving atrophy of subcutaneous adipose tissue.

1. 緒言

アディポカイン研究の進捗により、内分泌器官としての脂肪組織の意義が明らかになり、メタボリックシンドロームの病態メカニズムの理解は急速に進んだ。一方、余剰エネルギーを中性脂肪として蓄積することは脂肪組織の一義的な機能であり、その許容量をオーバーすると肝臓や骨格筋などに異所性に蓄積され、全身の糖代謝異常につながる。例えば日本人は、皮下脂肪が少なく、異所性脂肪が相対的に多いという体脂肪分布の特徴があるため、欧米人よりもBMI (body mass index) が低いにもかかわらず、欧米人と同等の糖尿病リスクを有している。また、高齢者に多く認められる“隠れ肥満”では、皮下脂肪組織の萎縮や骨格筋量の減少により体重は正常範囲にとどまるが、内臓脂肪や異所性脂肪が過剰に蓄積する。このように皮下脂肪組織は、余剰のエネルギーを安全に蓄積するメタボリックシンクとしての役割を果たす。さらに、加齢に伴う皮下脂肪組織の萎縮は、皮膚の創傷治癒力や局所免疫力の低下にもつながる。しかしながら、加齢による皮下脂肪組織の機能破綻に関しては、ほとんど注意が払われてこなかった。

研究代表者は、過栄養が脂肪組織に慢性炎症を惹起し、アディポカイン産生調節や脂肪蓄積能の破綻によりメタボリックシンドロームを発症する分子メカニズムの解明に取り組んできた。特に、マクロファージが脂肪細胞と相互作用

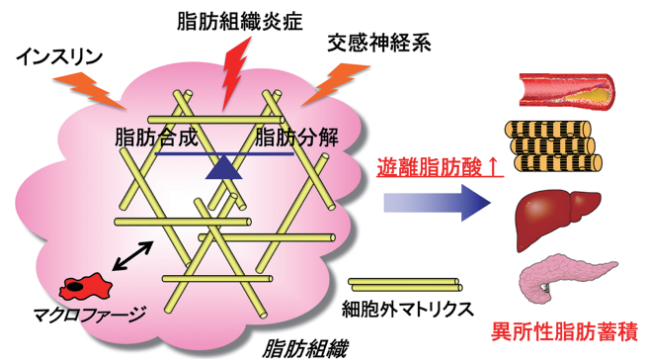


図1 脂肪組織炎症と異所性脂肪蓄積

用して炎症慢性化に働き、脂肪組織の線維化を誘導することを見出した^{1,2)}。その結果、内臓脂肪組織の脂肪蓄積能が障害され、肝臓に異所性に蓄積することで、インスリン抵抗性が増悪する(図1)。これにより、脂肪組織に余剰エネルギーを蓄えることが全身の代謝を良好にコントロールするという概念“adipose tissue healthy expansion”の分子機構の一端を明らかにした。一方、海外の臨床研究によると、内臓脂肪組織と同様に皮下脂肪組織においても線維化が生じ、その線維化の程度は脂肪肝や糖代謝異常と正の相関を示すという³⁾。即ち、皮下脂肪組織の萎縮や線維化は、単に老化の外観の特徴のみならず、老化関連疾患の病態形成にも密接に関わると想定される(図2)。そこで本研究では、マウスモデルを用いて加齢に伴う皮下脂肪萎縮の分子メカニズムの解明を目指す。

2. 方法

2.1. マウス

マウスは雄性C57BL/6J系統を日本クレアから購入した。名古屋大学東山動物実験施設、および名古屋大学環境



Molecular mechanism underlying age-associated adipose tissue atrophy

Takayoshi Suganami

Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University

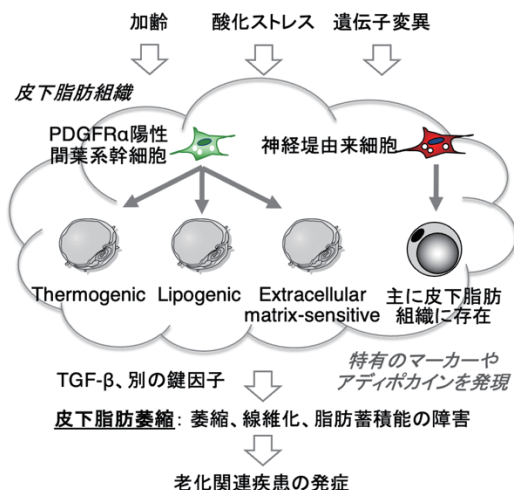


図2 皮下脂肪細胞の多様性と加齢による変化

医学研究所特別実験棟において適切な温湿度管理の下で飼育し、若齢マウスとして10週齢、加齢マウスとして1年齢の個体を使用した。皮下脂肪組織として鼠径部皮下脂肪組織、内臓脂肪組織として副睾丸周囲脂肪組織をサンプリングし、RNA-seq解析に加えて組織学的解析などに供した。

2.2. RNA-seq解析

定法に従って脂肪組織からtotal RNAを抽出し、RNA-seq解析に供した⁴⁾。シークエンスは、名古屋大学環境医学研究所発生・遺伝分野の荻朋男博士のサポートを得て実施した。シークエンス結果をiDEP.96、およびIPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いて解析した。

2.3. 脂肪組織間質細胞の調整

定法に従って、トリミングした脂肪組織をコラゲナーゼで処理し、遠心処理にて浮遊する成熟脂肪細胞と沈降する間質細胞に分離した。浮遊細胞を廃棄し、沈降した細胞を回収することで間質細胞分画を調整した^{1,2)}。

2.4. カヘキシアモデルの作製

腎不全カヘキシアのモデルとして、5/6腎摘モデルを作製した。片側腎を2/3摘出し、回復後に対側腎を全摘することで、5/6腎重全摘とした。モデル作製後、16週間経過を観察し、サンプリングを行った。片側腎のみを摘出した1/2腎摘マウスを対照群とした。

3. 結果

3.1. 加齢マウスの脂肪組織に関する解析

マウスは雄性のC57BL/6J系統を用いて、若齢マウスとして10週齢、加齢マウスとして1年齢を使用した。皮下脂肪組織として鼠径部皮下脂肪組織、内臓脂肪組織として副睾丸周囲脂肪組織をサンプリングした。組織学的な解析により、いずれの脂肪組織においても加齢マウスで細胞密度が低下することを確認し、RNA-seq解析に供した。

RNA-seq解析では、加齢に伴って脂肪組織部位特異的に発現が2倍以上増減する遺伝子群に着目した。例えば、加齢に伴って発現が増加する遺伝子は、皮下脂肪組織では1,073個、内臓脂肪組織では631個、共通して増加する遺伝子は170個であった(図3)。このうち、内臓脂肪組織において特異的に発現が増加する遺伝子群として、既に知

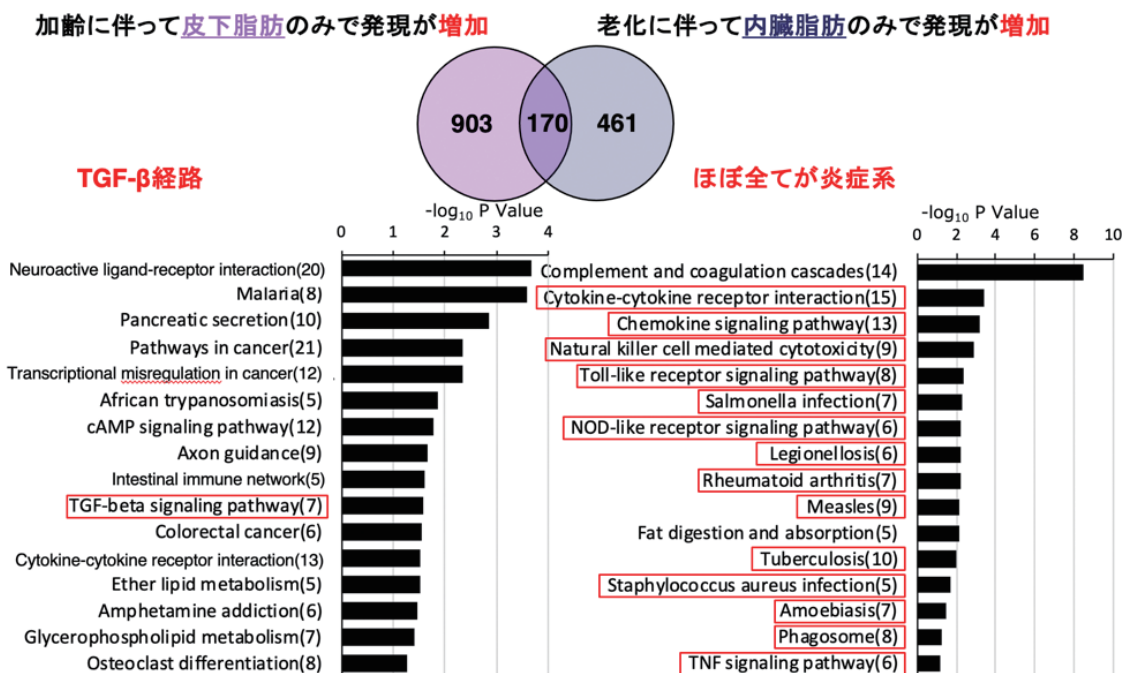


図3 加齢に伴って脂肪組織部位別に発現が増加する遺伝子群

られているように、炎症性サイトカインやケモカインなど炎症関連遺伝子群が上位を占めた。これに対して、皮下脂肪組織において特異的に発現が増加する遺伝子群としては、TGF- β (Transforming Growth Factor- β) シグナルが抽出された。より詳細に解析すると、TGF- β スーパーファミリーのうち、脂肪細胞分化を抑制するTGF- β 経路は発現低下し、これに対して脂肪細胞分化を促進するBMP (Bone Morphogenetic Protein) 経路が発現上昇していた。

一方、加齢に伴って発現が減少する遺伝子は、皮下脂肪組織では758個、内臓脂肪組織では1,323個、共通して減少する遺伝子は62個であった(図4)。皮下脂肪組織において特異的に発現が減少する遺伝子群としては、脂肪細胞分化のマスター制御因子であるPPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ)-C/EBP (CCAAT-Enhancer-Binding Proteins) 経路が抽出され、加齢に伴う皮下脂肪萎縮と合致する所見であった。この分子機序として、炎症の関与を想定している。即ち、内臓脂肪組織と比べて軽度ではあるが、加齢に伴って皮下脂肪組織においてもTNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) など炎症性サイトカインの発現が上昇し、これがPPAR γ -C/EBP経路を抑制すると考えられる。

3.2. 脂肪組織由来間質細胞の加齢変化

すべての臓器は、その臓器を特徴付ける実質細胞とそれ以外の多彩な間質細胞から構成され、脂肪組織も例外ではない。実質細胞である成熟脂肪細胞は、余剰エネルギーを

中性脂肪として蓄える巨大な脂肪滴を有し、生体のエネルギー状態に応じて中性脂肪を蓄積、あるいは分解することで自身のサイズをダイナミックに変化させる⁵⁾。間質細胞には、免疫細胞、血管構成細胞、成熟脂肪細胞に分化する前駆脂肪細胞などが含まれ、脂肪組織に含まれる細胞数の約1/3を占めるという⁶⁾。例えば、持続的な過栄養は成熟脂肪細胞のサイズを増大(肥大化)させるのみならず、種々の免疫細胞の浸潤、血管新生、細胞外マトリクスの蓄積などダイナミックな組織学的変化をもたらす、脂肪組織全体の機能が変容する。一方、加齢が脂肪組織の間質細胞に及ぼす影響は、未だ不明の点が多い。

そこで、若齢、および加齢マウスの皮下脂肪組織から間質細胞を調整し、RNA-seq解析を行った。その結果、臓器全体の解析結果(3.1.)と同様に、PPAR γ -C/EBP経路の強力な発現低下が観察された一方、TGF- β 、およびBMP経路は発現が低下していた。以上より、前駆脂肪細胞を含む間質細胞において、TGF- β やBMPではなく、炎症に伴うPPAR γ -C/EBP経路の抑制が成熟脂肪細胞密度の低下、ひいては皮下脂肪組織の萎縮をもたらす可能性が高い。

3.3. カヘキシアモデルにおける脂肪萎縮

加齢に加えて、がん、心不全、腎不全など消耗性疾患に伴う悪液質(カヘキシア)においても脂肪組織の萎縮が認められ、栄養状態の不良が疾患予後にも悪影響を及ぼす。そこで5/6腎摘による腎不全モデルをマウスに作製し、

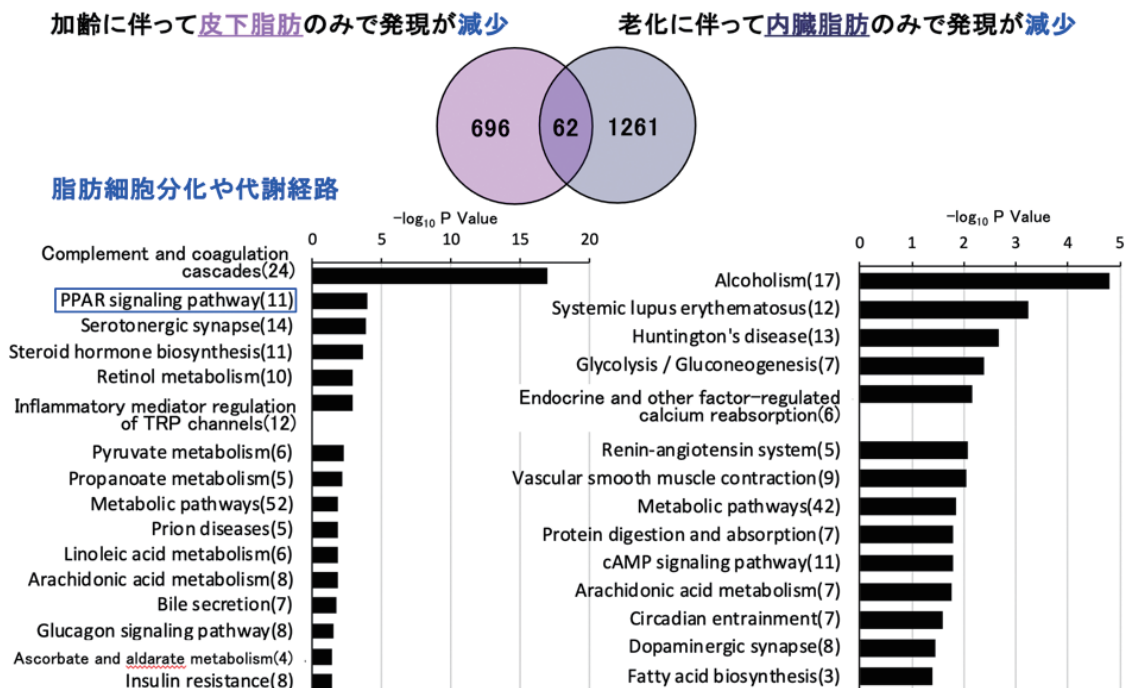


図4 加齢に伴って脂肪組織部位別に発現が減少する遺伝子群

脂肪組織の変化を検討した。16週間の腎不全状態により、皮下脂肪組織と内臓脂肪組織の重量は、それぞれ対照群の1/2以下まで顕著に減少した。RNA-seq解析を行ったところ、両者は同様に萎縮したにもかかわらず、遺伝子発現プロファイルが大きく異なっていた。皮下脂肪組織では、TNF- α など炎症性サイトカイン発現の上昇とPPAR γ 発現の低下が認められ、加齢による脂肪組織萎縮と同様の傾向を確認した。

4. 考察および総括

これまで肥満やメタボリックシンドロームの増加が注目され、過栄養がどのようにして慢性炎症を惹起し、全身の代謝異常や臓器合併症につながるかが精力的に研究されてきた。皮下脂肪組織に関しては、近年、エネルギー消費を司るベージュ脂肪細胞の分化機構が注目されており、新しい抗肥満治療への応用が期待されている。一方、高齢者では、骨格筋の質や量の低下(サルコペニア)が指摘され、body mass indexの高い方がむしろ生命予後が良いことも知られている。また、加齢とともに進行する皮下脂肪組織の萎縮は、代謝柔軟性(Metabolic flexibility)の低下や“隠れ肥満”の要因と想定されるが、その分子機序はほとんど分かっていない。本研究では、加齢マウスの皮下脂肪組織と内臓脂肪組織を比較することにより、皮下脂肪組織の萎縮に特徴的な遺伝子群の同定を試みた。その結果、脂肪細胞分化のマスター制御因子であるPPAR γ 経路が抑制されること、その機序として、TNF α など炎症性サイトカインの発現上昇が認められることを見出した。

皮下脂肪組織と内臓脂肪組織の違いは広く認識されているが、この違いが何によって規定されているかは、未だ不明の部分が多い。例えば、皮下脂肪組織は体循環の血液が灌流するのに対して、内臓脂肪組織は門脈血が灌流する。門脈血には、消化管から吸収された高濃度の栄養素やエンドトキシン、種々のホルモン・サイトカインが含まれるため、内臓脂肪組織選択的に慢性炎症が生じると想定される。実際、ヌードマウスの皮下や腹腔内に脂肪細胞株を移植した検討では、腹腔内に移植した脂肪細胞株がより強い炎症反応を呈したという。これに対して、腹腔内に皮下脂肪組織を移植したマウスでは全身の糖代謝が改善するという報告もあり、皮下脂肪組織と内臓脂肪組織は細胞起源が全く異なる可能性も提唱されている。実際、寒冷刺激や交感神経系の活性化でベージュ脂肪細胞が誘導されるのは主に皮下脂肪組織であり、皮下脂肪組織と内臓脂肪組織に含まれる脂肪幹細胞の違いが示唆される。過栄養による慢性炎症は主に内臓脂肪組織に生じることが知られているが、今回、加齢に伴う慢性炎症はむしろ皮下脂肪組織に顕著に認められた点が興味深い。TNF α は、皮下脂肪組織の間質細胞においても上昇していたため、今後、多様な間質細胞のうち、

どの細胞が加齢に伴ってTNF α を産生するのかを明らかにする必要がある。

全身の栄養状態が低下する病態としては、加齢に加えて、カヘキシアが注目されている。これは単なる栄養不足の状態ではなく、通常の栄養サポートでは完全に回復せず、進行性に予後を増悪させる点で臨床的な課題となっている。この機序として、がんや心不全、腎不全などに伴う全身の慢性炎症状態が指摘されており、脂肪組織が萎縮する。最近、がんカヘキシアに対しては、食欲亢進作用を有するグレリン受容体アナログが臨床応用され、栄養状態の改善や骨格筋量の増加が期待されているが、対象症例に限られるなど十分な知見は得られていない。本研究では、腎不全カヘキシアモデルを用いて解析した結果、皮下脂肪組織の萎縮に関して、加齢と同様にTNF- α の発現亢進とPPAR γ の発現抑制を認めた。種々の皮下脂肪組織の萎縮に共通する病態基盤として、この分子機序をさらに解明することで、複数の疾患において新たな栄養・代謝改善法の開発につながることを期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり貴重なご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T, Kimura K, Inoue H, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat Commun.* 2014; 9(5): 4982. doi: 10.1038/ncomms5982. PMID: 25236782.
- 2) Ichioka M, Suganami T, Tsuda N, Shirakawa I, Hirata Y, Satoh-Asahara N, Shimoda Y, Tanaka M, Kim-Saijo M, Miyamoto Y, Kamei Y, Sata M, Ogawa Y. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. *Diabetes.* 2011; 60(3): 819-826. doi: 10.2337/db10-0864. PMID: 21282371.
- 3) Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, Bedossa P, Clément K. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes.* 2010; 59(11): 2817-25. doi: 10.2337/db10-0585.
- 4) Itoh M, Tamura A, Kanai S, Tanaka M, Kanamori Y, Shirakawa I, Ito A, Oka Y, Hidaka I, Takami T, Honda Y, Maeda M, Saito Y, Murata Y, Matozaki T,

- Nakajima A, Kataoka Y, Ogi T, Ogawa Y, Suganami T. Lysosomal cholesterol overload in macrophages promotes liver fibrosis in a mouse model of NASH. *J Exp Med*. 2023; 220(11): e20220681. doi: 10.1084/jem.20220681.
- 5) Suganami T, Tanaka M, Ogawa Y. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. *Endocr J*. 2012; 59: 849-57. doi: 10.1507/endocrj.ej12-0271.
- 6) Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 2010; 88: 33-9. doi: 10.1189/jlb.0210072.

新規アレルギー反応制御分子 Ly6G による 皮膚ホメオスタシス維持機構の解明

金沢大学医薬保健研究域薬学系

鈴木 亮

The role of mast cells (MCs) in the development of allergic diseases is pivotal, with their activation triggered by allergens leading to degranulation and the release of inflammatory mediators, such as histamine. These mediators not only induce allergic diseases but also elevate vascular permeability, attracting various immune cells to the inflammatory tissues and intricately regulating allergic responses. In a previous study, utilizing a mouse model, we demonstrated that neutrophils suppress allergic reactions. Notably, we observed proximity and interaction between activated MCs and neutrophils. While neutrophils are recognized for their defense responses against foreign substances, the molecular mechanism governing MC-neutrophil interactions in allergic diseases remains elusive. In this study, our focus turned to Ly6G, a protein specific to neutrophils, to unravel the regulatory mechanism of allergic responses orchestrated by Ly6G through interactions between MCs and neutrophils. Ly6G was found to migrate to MCs through neutrophil-MC interactions, with its migration significantly heightened upon allergen stimulation. To probe the function of Ly6G, we produced recombinant Ly6G (rLy6G) and confirmed its binding to MCs using flow cytometry. Further analysis revealed that rLy6G mitigated allergen stimulation-dependent enhancement of MC degranulation. Intriguingly, rLy6G tended to increase mRNA expression and protein secretion of TNF α and CCL2 in MCs. To identify functional sequences, we synthesized nine peptides, derived from Ly6G sequence. Several peptides were identified to suppress MC degranulation, but TNF α and CCL2 secretion were upregulated. To assess the impact of rLy6G on allergic responses in a disease model, we employed a Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) model. Administration of rLy6G demonstrated a reduction in the increase in vascular permeability, a marker of anaphylactic symptoms, compared to control mice. These results collectively indicate that Ly6G plays a pivotal role in regulating allergic responses through MC-neutrophil interactions.

1. 緒言

アレルギー疾患（アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、アナフィラキシーショックなど）は、世界的患者数の増加など、これまで以上に重大かつ身近な社会問題として注目されている。アレルギー疾患は、多様な疾患症状（発症部位、病態、重症度、加齢変化など）を示すため、予防や根治が難しく、疾患の複雑化・慢性化、更には患者QOL (quality of life) の低下を招くなど、解決すべき課題である¹⁾。

このようなアレルギー疾患に対する予防や治療については、疾患原因となるアレルゲン（ラテックス、金属、花粉など）への曝露の回避をはじめ、抗アレルギー薬や抗炎症薬など、医薬品による対症療法が中心である。また、根治療法として期待されているアレルゲン特異的免疫療法についても、長期にわたる治療期間の問題や治療にアレルゲンを摂取するため、危険を伴うのが現状である。そのため、アレルギー（マスト細胞）応答を調節する新たなアレルギー制御因子の解明が期待されている。アレルギー疾患の発

症には、マスト細胞が重要な役割を担っており、アレルゲンがIgE受容体を活性化すると、ヒスタミンをはじめとする炎症性メディエーターが分泌され、疾患が惹起される。アレルギー炎症組織では、マスト細胞と様々な免疫細胞が相互作用し、アレルギー疾患の複雑化や難治化を招いていると考えられている。

我々のアレルギー疾患モデルを用いた *in vivo* 研究から、アレルゲン親和性が浸潤細胞の種類に大きな違いを生じさせ、皮膚炎症反応を調節・制御していることを明らかにした。特に、マスト細胞の活性化によって、アレルギー炎症を誘導した皮膚組織では、炎症組織に浸潤する好中球の数が有意に増加しており、更に、マスト細胞と好中球が相互作用している様子も観察された²⁾。これまで、自然免疫において重要な役割を有する好中球が、アレルギー応答において、どのような役割を担っているのかなど、好中球によるアレルギー応答制御機構を追究してきた。その過程で、独自に確立した *in vitro* 共存培養系などを用いた研究から、脱顆粒したマスト細胞と好中球が接着している様子が観察されており、これら接着を介した相互作用によって、アレルギー炎症の病態を調節している可能性が示唆された。更に、マスト細胞と好中球の接着部位では、好中球に特異的に発現するLy6G蛋白質が、マスト細胞と好中球の接着部位で移動していることを見出した。本研究では、好中球に特異的に発現するLy6G蛋白質によるアレルギー応答調節機構の解明を目指した。



Ly6G protein expressed in neutrophils is a novel regulator for skin homeostasis

Ryo Suzuki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University

2. 方法

2.1. 骨髄由来マスト細胞と骨髄単離好中球の *in vitro* 共存培養系を用いた解析

マスト細胞と好中球の相互作用及び両者の相互作用を介した好中球蛋白質 Ly6G の機能解析を行うため、マスト細胞には骨髄由来マスト細胞を用い、好中球には骨髄単離好中球を用いた。骨髄由来マスト細胞は、マウス骨髄細胞を採取し、IL (Interleukin)-3 及び SCF (Stem cell factor) 存在下で1か月間培養し、マスト細胞に分化したものをを用いた。骨髄由来マスト細胞の分化率の確認には、マスト細胞マーカー蛋白質 (骨髄由来マスト細胞: FcεRI, CD117) を用いて行った。また、骨髄単離好中球は、骨髄細胞を採取し、精製キットを用いたネガティブセレクション法により単離した。精製率の確認には、マウス好中球マーカー蛋白質 (Ly6G) を用いて行った。マウス骨髄由来マスト細胞と骨髄単離好中球をマトリゲルコートしたガラスボトムディッシュ上で培養する共存系を用いて、抗 DNP-IgE 抗体を感作させた細胞に対して、アレルゲン (DNP-HSA) による特異的刺激応答に伴うマスト細胞と好中球の相互作用、好中球蛋白質 Ly6G の培養上清中への遊離、及び近傍のマスト細胞への移動について定量・定性的な解析を行った。

2.2. リコンビナント Ly6G 蛋白質の作製

リコンビナント蛋白質は、研究目的や用途に応じて、大腸菌発現系 (BL21 (DE3), ClearColi BL21 (DE3) など) やヒト細胞発現系 (HEK 293 細胞など) を用いてリコンビナント Ly6G 蛋白質を作製した。リコンビナント蛋白質の精製には、タグとして結合させたヒスチジンやヒト Fab を用いて Ni-NTA ビーズやプロテイン G を用いて行った。リコンビナント蛋白質の発現及び精製の確認には、電気泳動による CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色法や各種特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法により実施した。

2.3. リコンビナント Ly6G 蛋白質を用いたマスト細胞応答調節機構の解析

Ly6G 蛋白質によるマスト細胞の結合能の解析には、リコンビナント Ly6G 蛋白質で処理した骨髄由来マスト細胞を抗タグ抗体で標識し、フローサイトメータを用いて定量した。また、リコンビナント Ly6G 蛋白質によるマスト細胞活性化調節機構の解析には、マスト細胞のアレルゲン刺激応答に伴うシグナル分子の活性化や遺伝子転写調節、更にマスト細胞から分泌される炎症性メディエータを指標に解析した。マスト細胞のシグナル分子の活性化の解析には、ウエスタンブロッティング法を用いて、マスト細胞の活

性化に重要な各種シグナル分子 (Syk, LAT, PLC γ , Akt, Erk, p38 など) のリン酸化を指標に行った。また、炎症性メディエータの遺伝子転写調節機構の解析には、定量的 PCR を用いて行った。さらに、即時相の分泌反応の解析には、ヒスタミン分泌 (脱顆粒反応) の指標として用いられる分泌顆粒内酵素 (β -hexosaminidase) の定量を行った。遅発相 (サイトカイン・ケモカイン) の分泌反応の解析には、ELISA 法を用いた。

2.4. 疾患モデルを用いた Ly6G によるアレルギー制御機構の解析

アレルギー疾患モデルとして、マスト細胞の活性化依存的アレルギーモデルとして汎用される受動皮膚アナフィラキシーモデル (PCA: passive cutaneous anaphylaxis) を用いた。受動皮膚アナフィラキシーモデルの作成には、C57BL/6N マウスを用いた。マウスは抗 DNP-IgE 抗体を受動的に感作させた。その翌日、アレルゲン (DNP-HSA) をエバンスブルー色素と同時に投与した。その後、血管から組織中に浸潤したエバンスブルー色素を組織から抽出し定量を行うことで、マスト細胞の活性化の指標とした。

3. 結果及び考察

これまで我々は、アレルギー応答の多様性の制御機構について追究してきた。その中で、アレルゲンで活性化されたマスト細胞によって誘導されたアレルギー炎症組織では、マスト細胞と好中球が近傍に存在し、相互作用することによって、アレルギー炎症を調節している可能性を明らかにした (図1)。また、マスト細胞と好中球の *in vitro* 共存培養系を確立し、アレルゲン刺激応答に伴うマスト細胞の活性化とそれに伴う好中球との相互作用をライブイメージング法を用いて追究した。マスト細胞をアレルゲンで特異的

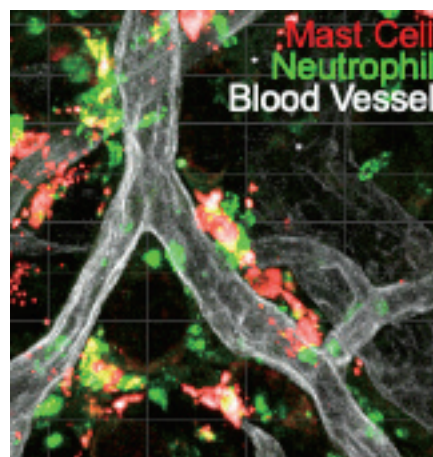


図1 アレルギー疾患モデルでのマスト細胞と好中球の相互作用脱顆粒反応しているマスト細胞 (赤) と血管 (白) から組織に浸潤した好中球 (緑) が接着し相互作用している。

に活性化すると、炎症性メディエータの分泌に伴いマスト細胞の細胞膜でラフリングが観察された。一方、好中球は、マスト細胞の分泌反応後に球状から紡錘形に形態が変化し、マスト細胞方向への遊走と接着し相互作用する様子が観察された(図2)。次に、相互作用している両細胞を判別するため、好中球に特異的に発現し、マーカー蛋白質として汎用されるLy6G蛋白質を用いて相互作用している両細胞を染色した³⁾。その結果、Ly6G蛋白質が好中球からマスト細胞の細胞膜へ移動していることを見出した。更に、好中球からマスト細胞へ移動したLy6G蛋白質について定量解析を行ったところ、アレルゲン刺激に伴って、接着している部分でLy6G蛋白質の移動が顕著に起こっていることが明らかになった(図3)。また、画像解析の結果から、細胞間接着を介した情報交換や機能調節に必要な細胞骨格蛋白質(F-actin)が、マスト細胞と好中球の接着部位に集積していることも明らかになった⁴⁾。

次に、Ly6G蛋白質の移動メカニズムを明らかにすることを試みた。はじめに、好中球からLy6G蛋白質の遊離機構について追究した。マスト細胞と好中球を共存培養し、

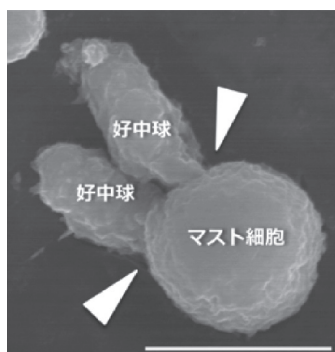


図2 *In vitro* 共存培養系におけるマスト細胞と好中球の接着を介した相互作用
矢頭部分でマスト細胞と好中球が接着している。
Bar=10µm

アレルゲン刺激に伴う、培養上清中のLy6G蛋白質量をウェスタンブロッティング法で定量した。その結果、未刺激状態においてもLy6G蛋白質の遊離が観察されたが、アレルゲン刺激1時間後の培養上清においてLy6G蛋白質量が増加し、アレルゲン刺激3~6時間後では培養上清中のLy6G蛋白質が減少している様子も観察された。マスト細胞の分泌顆粒内には、多くのプロテアーゼが含まれていることが明らかになっており、マスト細胞の活性化によりヒスタミンなど各種炎症性メディエータと共に分泌される⁵⁾。これらのプロテアーゼが、マスト細胞と好中球の相互作用(接着)部位の局所で高濃度に分泌され、好中球細胞膜上のLy6G蛋白質が切断されることによって、培養上清中に遊離し近傍のマスト細胞に移動した可能性が示唆された。また、Ly6G蛋白質がマスト細胞に移動していることは、マスト細胞がLy6G蛋白質を結合する分子を発現していることやLy6G蛋白質によるマスト細胞の機能調節の可能性が考えられた。

先の研究成果から、我々はLy6G蛋白質のマスト細胞の機能調節機構について明らかにすることを試みた。そのため本研究では、リコンビナントLy6G蛋白質を用いた。リコンビナントLy6G蛋白質の作製には、大腸菌発現系やヒト細胞発現系を用いた。はじめに作製したリコンビナントLy6G蛋白質のマスト細胞への結合能の解析を行った。リコンビナントLy6G蛋白質を処理したマスト細胞をフローサイトメータで解析したところ、未刺激状態ではLy6G蛋白質が約20%程度のマスト細胞で結合していた。一方、アレルゲン刺激を行ったマスト細胞では、Ly6G蛋白質の結合量が増加している様子が観察された。これらの結果からも、マスト細胞の細胞膜上にはLy6G蛋白質に対する結合因子が存在し、マスト細胞の機能を調節している可能性が示唆された。現在は、Ly6G結合分子の同定の前段階として、マスト細胞のLy6G結合分子の存在について明らか

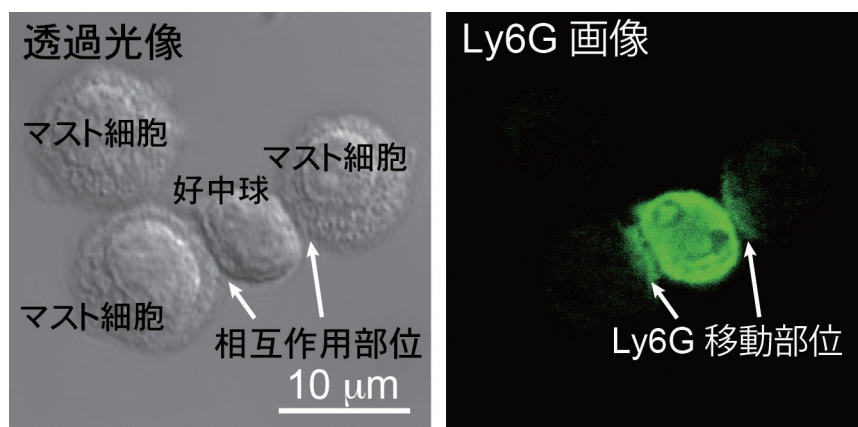


図3 *In vitro* 共存培養系における好中球からマスト細胞へのLy6G蛋白質の移動
マスト細胞と好中球の接着部位でLy6G蛋白質が移動している。

にするため、ブルダウン法やファーウエスタン法を用いた実験系の確立や最適化を行っている。

更に、Ly6G蛋白質によるマスト細胞応答調節機構を明らかにするため、Ly6G蛋白質による炎症性メディエータ分泌反応への影響について解析した。はじめに、即時相の炎症反応に重要である脱顆粒反応の解析を行った。脱顆粒反応の解析にはヒスタミン分泌の指標として汎用される分泌顆粒内酵素 (β -hexosaminidase) の定量を行った。その結果、Ly6G蛋白質処理によりアレルゲン刺激に伴う脱顆粒反応が有意に抑制されており、また、その抑制効果はLy6G蛋白質の濃度依存的であることが明らかになった(図4)。更に、遅発相の炎症反応に重要なサイトカイン(TNF α など)・ケモカイン(CCL2など)についてELISA法を用いて定量解析を行った。その結果、 β -hexosaminidaseと同様に抑制効果が観られるとの予想に反して、Ly6G蛋白質を処理した細胞では、有意に分泌反応が増強していた(図4)。

これまでの研究成果から、Ly6G蛋白質はマスト細胞の分泌反応を調節する機能を有する可能性が示唆された。しかし、 β -hexosaminidaseとサイトカイン・ケモカインが異なる調節作用を示す原因については未だ不明である。そこで、その解析の一環として、Ly6G蛋白質の分泌機能配列を明らかにすることを試みた。Ly6G蛋白質を断片化したLy6G断片化ペプチドを作製し、Ly6G断片化ペプチド処理によるマスト細胞の脱顆粒反応(β -hexosaminidase)の解析を行ったところ、Ly6G断片化ペプチド(#4及び#9)処理したマスト細胞では、アレルゲン刺激に伴う脱顆粒量が有意に減少していることが明らかになった。また、Ly6G断片化ペプチド処理によるマスト細胞のサイトカイン(TNF α など)及びケモカイン(CCL2など)分泌への影響を解析したところ、Ly6G断片化ペプチド(#4)の処理によりアレルゲン刺激に伴う分泌量が増加していることが

明らかになった。

更に、Ly6Gによる分泌反応調節機構を明らかにするため、Ly6G蛋白質によるシグナル調節機構の解析を行った。マスト細胞に発現しIgE受容体シグナルに関係する重要シグナル分子(キナーゼなど)について、蛋白質のリン酸化を指標にウエスタンブロット法を用いて解析した⁶⁾。ここでは、マスト細胞の脱顆粒反応に重要であるLyn、Syk、LAT、PLC γ をはじめ、サイトカイン・ケモカイン転写調節に重要な因子であるMAPK(Erk、p38、JNK)に着目し解析を行った。Ly6G処理したマスト細胞ではアレルゲン刺激に伴ってシグナル分子(Syk、LAT、PLC γ 、Akt、Erk、p38など)において活性化状態が持続している傾向が観察された。このことから、Ly6G蛋白質はマスト細胞のシグナル伝達分子の活性化状態にも影響を与え、分泌反応を調節している可能性が示唆された。

最後に、Ly6G蛋白質による生体レベルでのアレルギー応答制御機構について追究した。本研究では、マスト細胞依存的な動物モデルとして多くの研究で汎用されている受動皮膚アナフィラキシーモデル(PCA: passive cutaneous anaphylaxis)を用いた⁷⁾。その結果、Ly6G蛋白質を投与したマウスでは、マスト細胞の活性化に伴うマスト細胞の活性化の指標として用いた血管透過性(Evans Blue色素の組織内浸潤)が、未処理の場合と比較して有意に抑制されていることが分かった(図5)。このことから、Ly6G蛋白質は生体レベルでもアレルギー応答を調節している可能性が示唆された。

4. 総括

本研究は、アレルギー炎症組織においてアレルギー担当細胞であるマスト細胞と主に自然免疫で生体防御応答を担う好中球が近傍に存在し相互作用していることを見出したことから始まった。その後、骨髄由来マスト細胞と骨髄

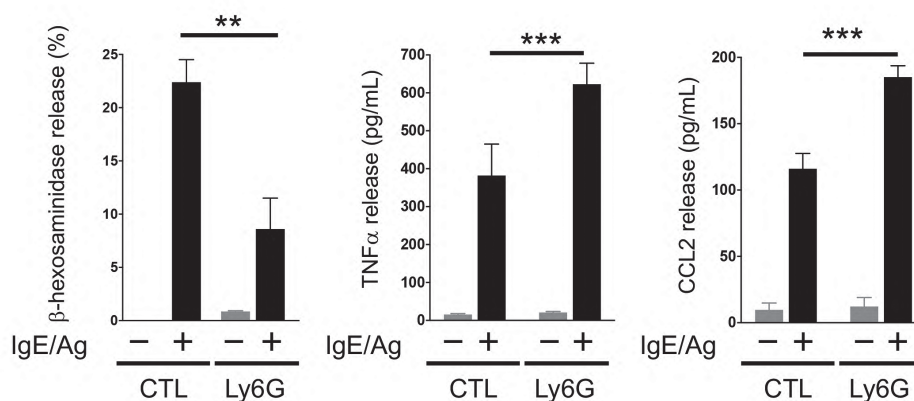


図4 Ly6G蛋白質によるマスト細胞の分泌反応への影響
リコンビナントLy6G蛋白質処理によるアレルゲン刺激応答に伴うマスト細胞の各種炎症性メディエータの分泌反応

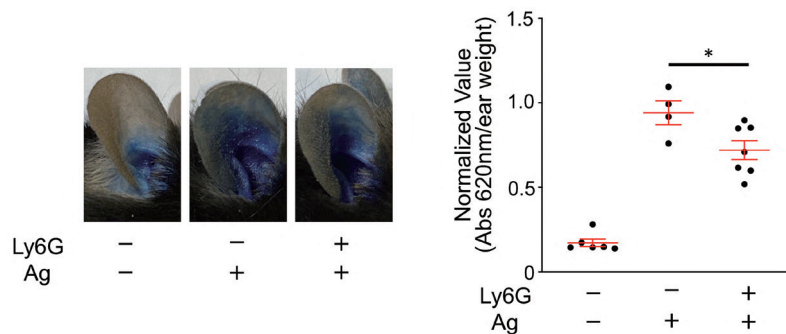


図5 *In vivo*疾患モデルにおけるLy6G蛋白質によるアレルギー応答の調節
リコンビナントLy6G蛋白質処理によってアナフィラキシー反応が抑制されている。

単離好中球の *in vitro* 共存培養系を用いた実験から、マスト細胞の活性化に伴って好中球に特異的に発現するLy6Gが、好中球の細胞膜上から切断され、切断されたLy6G蛋白質がマスト細胞に移動していることを見出した。更に、Ly6G蛋白質によるアレルギー調節機構を明らかにするため、リコンビナントLy6G蛋白質の作製に着手し、大腸菌及びヒト細胞発現系でのLy6G蛋白質の精製に成功した。作製Ly6G蛋白質を用いたマスト細胞の機能調節機構の解析では、Ly6Gが濃度依存的にマスト細胞の脱顆粒反応を抑制していることが示唆された。その一方で、サイトカイン・ケモカインの分泌に関しては、Ly6G蛋白質処理によって、マスト細胞からサイトカイン・ケモカイン分泌が亢進するなど、相反する調節作用を示すことも明らかになった。また、Ly6G断片化ペプチドを作製し、マスト細胞の機能調節を行っている機能配列の同定を行ったところ、脱顆粒反応を抑制し、サイトカイン・ケモカイン分泌を亢進する機能配列が存在している可能性が示唆された。炎症性メディエータ分泌におけるLy6G蛋白質の作用は未だ不明な部分が多いが、今後、これら分子メカニズムを明らかにすることによって、複雑な炎症性メディエータ分泌メカニズムの一端が明らかになるものと期待される。更に、受動皮膚アナフィラキシーモデル (PCA: passive cutaneous anaphylaxis) を用いた機能解析の結果、Ly6G蛋白質が生体レベルにおいてもアレルギー炎症応答を抑制する可能性も見出した。今後、各種疾患モデル (全身性アナフィラキシー、アトピー性皮膚炎モデル、食物アレルギーモデルなど) での研究を展開することによって、Ly6G蛋白質によるアレルギー調節機構が明らかになることが期待される。また、Ly6G蛋白質はLy6ファミリーの一つであり、他のLy6ファミリー蛋白質によるアレルギー応答調節機構の解析も現在進めている。引き続き *in vitro* 及び *in vivo* レベルの研究を通して、複雑で多様なアレルギー疾患の増悪・緩和機構及びLy6ファミリー蛋白質による制御に関する

新たな知見を獲得し、アレルギー疾患研究の観点から、健康な皮膚の維持・増進に貢献したいと考えている。

(引用文献)

- 1) Vitte J, Vibhushan S, Bratti M, Montero-Hernandez JE, Blank U: Allergy, Anaphylaxis, and Nonallergic Hypersensitivity: IgE, Mast Cells, and Beyond. *Med Princ Pract*, 31, 501-515 (2022).
- 2) Suzuki R, Leach S, Liu W, Ralston E, Scheffel J, Zhang W, Lowell CA, Rivera J: Molecular editing of cellular responses by the high-affinity receptor for IgE. *Science*, 343, 1021-1025 (2014).
- 3) Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA: Ly6 family proteins in neutrophil biology. *Journal of leukocyte biology*, 94, 585-594 (2013).
- 4) Yu Y, Smoligovets AA, Groves JT: Modulation of T cell signaling by the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*, 126, 1049-1058 (2013).
- 5) Dudeck A, Koberle M, Goldmann O, Meyer N, Dudeck J, Lemmens S, Rohde M, Roldan NG, Dietze-Schwonberg K, Orinska Z, Medina E, Hendrix S, Metz M, Zenclussen AC, von Stebut E, Biedermann T: Mast cells as protectors of health. *The Journal of allergy and clinical immunology*, (2018).
- 6) Fujisawa S, Nagata Y, Suzuki R: Leukotriene D4 accelerates antigen-mediated mast cell responses via the cysteinyl leukotriene 1 receptor. *Cell Immunol*, 382, 104632 (2022).
- 7) Ji N, Pan S, Shao C, Chen Y, Zhang Z, Wang R, Qiu Y, Jin M, Kong D: Spinacatin Suppresses the Mast Cell Activation and Passive Cutaneous Anaphylaxis in Mouse Model. *Frontiers in pharmacology*, 9, 824 (2018).

T細胞のステムネスを標的とした、乾癬治療法の研究

慶應義塾大学医学部

竹馬 俊介

IL-17-producing helper T (Th17) cells are long-lived and serve as central effector cells in chronic autoimmune diseases. The underlying mechanisms of Th17 persistence remain unclear. We demonstrated that abatacept, a CD28 antagonist, effectively prevented the development of skin disease in a Th17-dependent experimental autoimmune dermatitis model. Abatacept selectively inhibited the emergence of IL-7R-negative effector-phenotype T cells while allowing the survival and proliferation of IL-7R+ memory-phenotype cells. The surviving IL-7R+ Th17 cells expressed genes associated with alcohol/aldehyde detoxification and showed potential to transdifferentiate into IL-7R-negative effector cells. Inhibiting aldehyde dehydrogenase reduced IL-7R+ Th17 cells in vivo, independently of CD28, and exhibited additive effects when combined with abatacept. Our findings suggest that CD28 blockade prevents inflammation without eliminating persistent memory cells. These remaining memory cells can be targeted by other drugs, such as aldehyde dehydrogenase inhibitors, to limit their survival, thereby facilitating the treatment of chronic autoimmune diseases.

1. 緒言

T細胞による免疫反応は、(1) 抗原特異性、(2) 対応する抗原の多様性、(3) 記憶能を備え、ウイルスや細菌に対する生体防御に必須である。一方、T細胞の強すぎる活性化は時に生命を脅かす自己免疫疾患の原因となる。自己免疫疾患は人口の5%もが罹患すると言われ¹⁾、この病理を理解することは重要である。筆者は、T細胞の抑制レセプターであるCTLA-4やPD-1分子の解析から、免疫の第4の法則である、「寛容」と、その破綻の結果として起こる自己免疫疾患の発症機構をテーマとして研究を行っている。

慢性の皮膚角化疾患である乾癬は、自己反応性のIL-17産生型ヘルパーT細胞(Th17)によって起こり、患者に著しい「生活の質」の低下をもたらすばかりか再発を特徴とする難治性疾患である。近年の研究では、Th17は他のT細胞に比して生体内で長期間生存し、自己複製を行うという、幹細胞様の性質(ステムネス)を有するとされ²⁾、これが、治療抵抗性や再発の原因であると考えられている。しかしながらTh17細胞が本当にステムネスを持つのか、あるいは長期生存に関する他のメカニズムがあるのかは明らかになっていない。

本研究では、皮膚反応性Th17細胞の移入によって、マウスに乾癬に類似した慢性皮膚炎を起こす実験系を樹立し、移入したTh17細胞を追跡することで、Th17細胞の生存

機構を明らかにしようと試みた³⁾。

2. 方法

2.1. 実験的皮膚炎

高橋ら⁴⁾が樹立した、デスモグライン3反応性Dsg3H1 TCRトランスジェニックマウスをCD45.1コンジェニックマウスに交配した。このマウスのリンパ節よりマグネティックソーティングを用いて調整したT細胞を、抗CD3抗体、および抗CD28抗体によって刺激し、Th17誘導に用いるTGFβ(2ng/mL)、IL-6、(20ng/ml)、IL-23(20ng/mL)に加え、炎症性サイトカインであるIL-1β(10ng/mL)を添加することで誘導病原性Th17へと分化誘導させた。培養後6日後に回収した細胞を、同系野生型マウスであるC57BL/6Nに静脈注射した。その後、肉眼的な皮膚炎の発症を観察すると同時に、移入後2-3週間で病理組織解析、FACS解析に供した。一部の実験では、生体内での細胞分裂を評価するため、移入前のT細胞をCellTrace Violet溶液(Thermo Fisher)で標識した。

2.2. 病理組織解析

イソフルラン深麻酔により犠牲死させたマウスの耳介を、4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、パラフィン包埋を行った。4μm厚の病理切片を作成し常法によってヘマトキシリン・エオジン染色を施した。キーエンスBZ-X800顕微鏡およびEVOS M5000顕微鏡によって撮像した。

2.3. 細胞分離とFACS解析

皮膚所属リンパ節細胞は、腋下、鼠径、腕頭、頸部リンパ節を、滅菌プラスチック注射筒のピストン部により機械的に破碎することで得た。表皮および真皮からの細胞分離に関して、マウス耳介をまずピンセットにより2層



Development of a Therapy for Psoriasis Targeting Stemness of T-helper 17

Shunsuke Chikuma

Keio University School of Medicine

に剥離し、2.5g/l-Trypsin/1mmol/l-EDTA 溶液（ナカライテスク）内で30分酵素消化した後、表皮の分離を行った。軟骨を含む真皮層は、コラゲナーゼD (1.6mg/mL, Roche)、ヒアルロニダーゼ (1.2mg/mL, Wako) および Dnase I (0.1mg/mL, Roche) を添加したRPMI培地中で1時間酵素消化することによって得た。以上のようにして粗精製したリンパ節、表皮、真皮細胞を100µmセルストレーナでろ過し、Flexible Viability Dye eFlour 780 (Thermo Fisher) および蛍光標識抗体によって免疫染色した。この細胞をBD社 FACS CANTOIIまたはBeckman Coulter社 CytoFlex Sにて解析した。また、RNA シークエンス解析に供するT細胞はBD FACS ARIA3セルソーターにより分離した。

2.4. 治療モデル

病原性Th17を移植したマウスに、アバタセプト (Bristol-Myers Squibb; 100-200µg/body) または同量のヒト免疫グロブリン (Jackson ImmunoResearch Lab) を、移植時、2日目、4日目の3回腹腔内注射した。また、ALDH阻害剤の投与実験では、アバタセプトに加えて、シアナミド (東京化成工業) を水溶液として移植後毎日経口投与 (80mg/kg体重) した。シアナミドの対照マウスには滅菌水を投与した。

2.5. RNAシークエンス解析

T細胞からのRNA抽出は、Qiagen RNeasy Plus Micro Kitを用いて行った。イルミナNOVOSEQを用いてペアエンドリードにて6Gbp程度のデータを取得し、HISAT2, Samtools, およびFeatureCountを用いて、マウスゲノム参照配列GRCm38p4 (mm10) へマッピングしリードカウントを得た。データの正規化および発現変動遺伝

子の同定にはDEseq2を用いた。変動遺伝子に基づく生物学的解析には、Metascape (metascape.org) および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, www.gsea-msigdb.org) を用いた。

3. 結果

3.1. Th17依存性皮膚炎モデル

Th17が体内で長期間生存し、自己免疫疾患を起こすモデルを確立し、このモデルを解析することを試みた。皮膚抗原を認識するDsg3H1 TCRマウスのT細胞を、*in vitro* で活性化させ、多種の炎症性サイトカインを加えることで、Th17へと分化誘導させた。このT細胞は、Th17細胞の特徴であるIL-17Aだけでなく、病原性Th17細胞に特徴的なIL17Fサイトカインや、IL-23レセプター、GM-CSFの産生も起こすことがわかり、高い病原性を持つTh17が誘導されたと考えられた。この病原性Th17を野生型マウスに移植したところ、2~3週間を経て非常に強く慢性的な(3か月以上)皮膚炎を発症することがわかった。このような皮膚炎は、Dsg3H1 TCRマウスをTh1に分化させ移植したマウスには全く起こらなかった。移植したT細胞に特異的に発現するCD45.1をマーカーとして用い、移入後2週間後のマウスを解析したところ、Th1誘導したT細胞が体内で消失する一方で、病原性Th17の移入では2次リンパ組織(リンパ節、脾臓)での長期の生存と、皮膚への浸潤を起こし、皮膚炎を発症した。以上の結果より、Th17依存性の慢性皮膚炎モデルを樹立することができた(図1)。

3.2. 実験的皮膚炎モデルは、CD28阻害薬で完全に阻害される

アバタセプトは、T細胞の活性化を担うCD28シグナル



図1 Th17依存性慢性皮膚炎モデル
A 当モデルの概略。 B マウスに起こる皮膚炎。

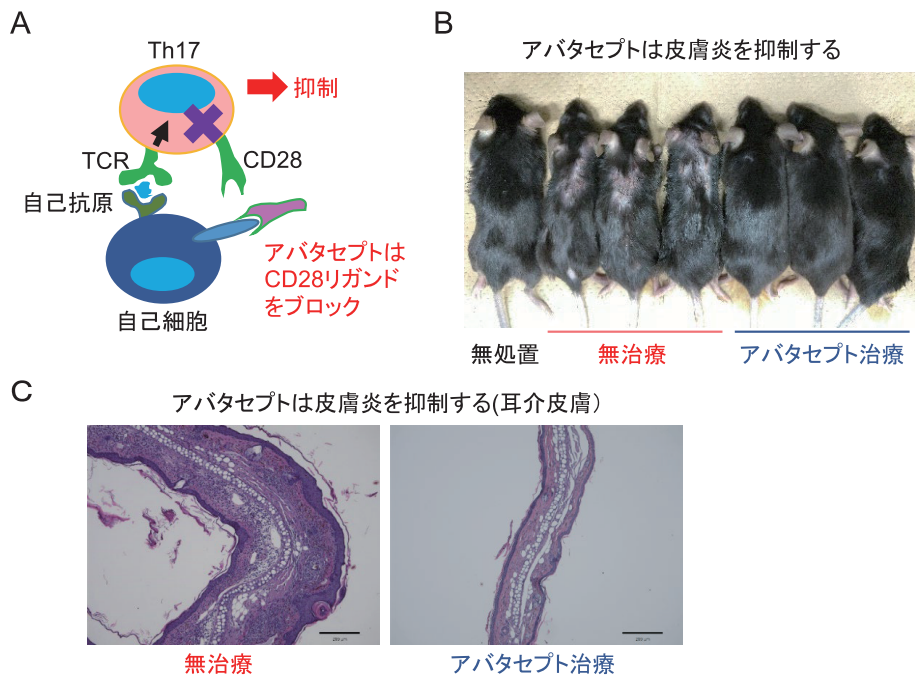


図2 Th17依存性皮膚炎におけるアバタセプトの効果

A アバタセプトの作動原理。自己免疫において、T細胞へ自己抗原を提示する自己細胞は同時に副刺激分子であるCD28のリガンド(CD80およびCD86)を発現する。アバタセプト(CTLA4-Ig)はこのリガンドに高親和性で結合し、CD28からのシグナルを阻害することで、T細胞を抑制する。BおよびC アバタセプトは、マウスに起こる肉眼的(B)組織学的な(C)皮膚炎を完全に抑制した。

を競合阻害する免疫抑制剤で、リウマチ性関節炎などの治療に用いられる。前項で樹立した皮膚炎モデルを免疫抑制剤であるアバタセプトにより治療できるかを検討した。病原性Th17を投与し、アバタセプト投与を行ったマウスでは、皮膚炎の発症が完全に抑制された(図2)。

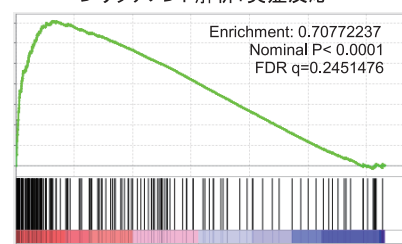
3.3. CD28阻害薬は、Th17による炎症性反応を抑制する

CD28刺激は、ナイーブT細胞の活性化時に必要であるとされる一方で、すでに分化したTh17における機能は不明であった。そこで、分化させたTh17をCD28で刺激し、遺伝子発現の変化を調べた。CD28で刺激した細胞には、組織炎症に関わる多種の遺伝子が、わずか2時間で誘導され、CD28が炎症反応に重要であることがわかった(図3)。そこで、アバタセプト治療群のマウスにおいて、炎症性サイトカインの発現を調べたところ、これらのマウスでは無治療群に比して、自己を攻撃する炎症性サイトカインが大幅に抑制されていることがわかった。

3.4. CD28阻害によって治療したマウスにはTh17の一部が残存する

治療により皮膚炎を発症しなかったマウスで、移植したTh17が完全に消失したのかをFACSにより解析した。意

A CD28刺激で、多くの炎症性遺伝子セットが上昇する
エンリッチメント解析: 炎症反応



B 炎症性サイトカインはアバタセプトにより抑制される

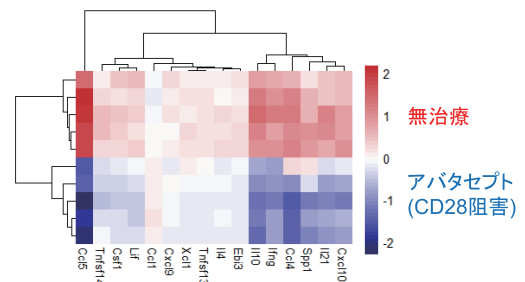


図3 アバタセプトによる炎症抑制効果

A CD28はin vitroで炎症性遺伝子の発現を強力に刺激する。B アバタセプトによって皮膚炎発症抑制されたマウスでは、多くの炎症性遺伝子が抑制される。

外なことに、一部のTh17が生存し、分裂していることがわかった。このような細胞は記憶性（メモリー）T細胞の特徴であるIL-7レセプターを発現し、リンパ節や脾臓といった、リンパ組織に残存していることがわかった（図4）。この、メモリー様Th17細胞を体内から回収し、あらたなマウスに移植すると、この細胞から、また炎症性サイトカインを出すTh17細胞が産生されることがわかった。つまりこの細胞は、免疫抑制治療を行っても体内に潜伏し、疾患の再発に貢献する細胞であることが考えられた。

3. 5. 治療後生存したTh17は、アルデヒド脱水素酵素を発現し、この阻害剤で除去できる

IL-7レセプター陽性細胞が、幹細胞のようにふるまうことから、この細胞を体内から除去できれば自己免疫疾患の完治を目指せると考えた。メモリー様Th17細胞と、炎症性Th17細胞を体内より分離し、発現遺伝子を詳細に比較した。前者の細胞は、アルコール代謝に関わる酵素群、特に、いくつかのアルデヒド脱水素酵素（ALDH）遺伝子を発現していた（図5）。ALDHは、がん細胞や造血幹細胞

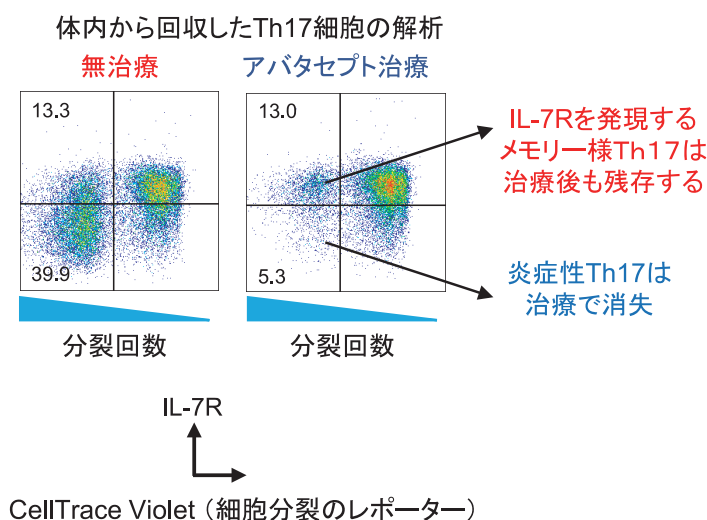


図4 アバタセプトは、メモリー様Th17は抑制しない
 A 無治療およびアバタセプト治療群のマウスより、リンパ節細胞を調整しFACS解析した。多く分裂し、CellTrace Violetを低発現した細胞にはIL-7R陽性および陰性細胞が観察され、治療群ではIL-7R陰性の細胞が顕著に減少している一方、IL-7R陽性細胞はほとんど影響を受けず体内に残存していることがわかった。

A しつこく残存するTh17はアルデヒド脱水素酵素など、アルコール解毒に関わる遺伝子を発現する

B 残存したメモリー様Th17は、ALDH阻害薬で減少

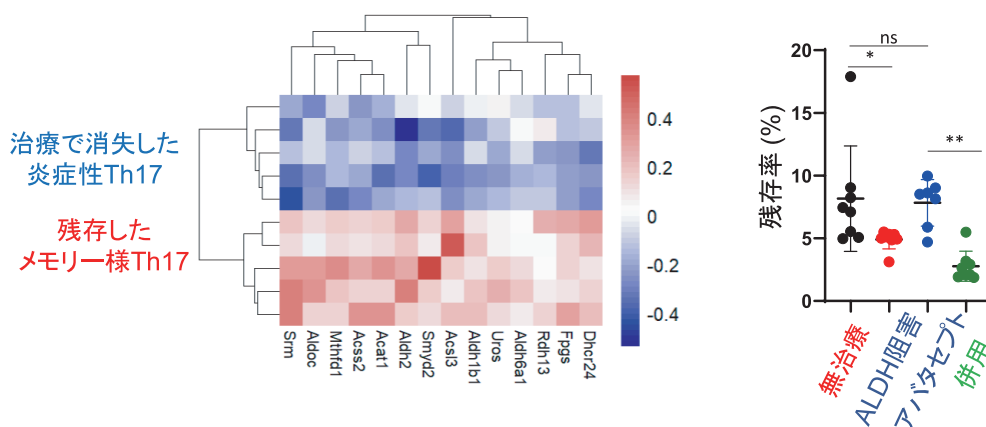


図5 残存するTh17は、アルデヒド脱水素酵素阻害剤で減少する
 A 無治療およびアバタセプト治療群のマウスより、CD4陽性T細胞を調整しRNAシーケンス解析に供した。治療群に多く発現する遺伝子より、代謝関連酵素を抽出すると、いくつかのアルデヒド脱水素酵素（ALDH）を含む、アルコール代謝に関わる遺伝子が多数見出された。B ALDH阻害薬であるシアナミドを、Th17依存性皮膚炎モデルに適用したところ、アバタセプトでは阻害できなかったIL-7R陽性のメモリー細胞の生存阻害することがわかった。

の生存と深く関わっていることが知られている。IL-7レセプター陽性細胞が、ALDHを発現することから、ALDH阻害薬によってこの細胞を阻害できるのではないかと考え、古典的なALDH阻害薬であるシアナミドを皮膚炎モデルに適用した。結果として、シアナミドを投与したマウスでは、体内に残存するIL-7レセプター陽性細胞の数が優位に減少すること、この治療は、アバタセプトと相加的に、Th17の活性化と生存を抑制することがわかった。以上の実験より、Th17のうち、体内で長期生存するものはALDH阻害剤で除去できることが示された。

4. 考察とまとめ

近年、自己免疫疾患には、抗サイトカイン療法やT細胞をターゲットとする治療が行われるが、治療不応答や再発が問題となる。本研究で樹立した皮膚炎モデルは、多くの自己免疫疾患の中心とされるTh17細胞が、体内で長期的（数か月）の単位で生存し慢性皮膚炎を起こすという新規のモデルであり、自己免疫疾患の治療法探索には最適であると考えられる。

まず、CD28阻害薬であるアバタセプト治療後にマウスのリンパ組織を解析することで、Th17細胞には異なる性質を有する少なくとも2種の細胞があることを見出した。一つは、IL-17、TNF、GM-CSFといった炎症性サイトカインを放出し、自己組織を攻撃し皮膚炎の発症に寄与するが、アバタセプト治療によってほぼ完全に抑制された。一方で、炎症性サイトカインは放出しないものの、アバタセプトに全く影響を受けず分裂し、再び炎症性細胞に分化する能力を持つメモリー様Th17細胞が存在することがわかった。Th17は、長期生存し炎症細胞を産生する「幹細胞様の性質（ステムネス）」を持つと言われるが、メモリー様Th17細胞が体内で残存し、炎症細胞を生み出すという、まさに幹細胞様の性質を示すことが明らかになった（図6）。

さらに、アバタセプト抵抗性のメモリー様Th17細胞がALDH遺伝子を発現し、この阻害薬で生存抑制できることを示した。シアナミドは、飲酒時に服用すると肝臓のALDHを阻害することで、二日酔いの症状を増強するため、アルコール依存症の患者が飲酒習慣から脱却するための「嫌酒薬」として数十年の古くから用いられる。本研究では、

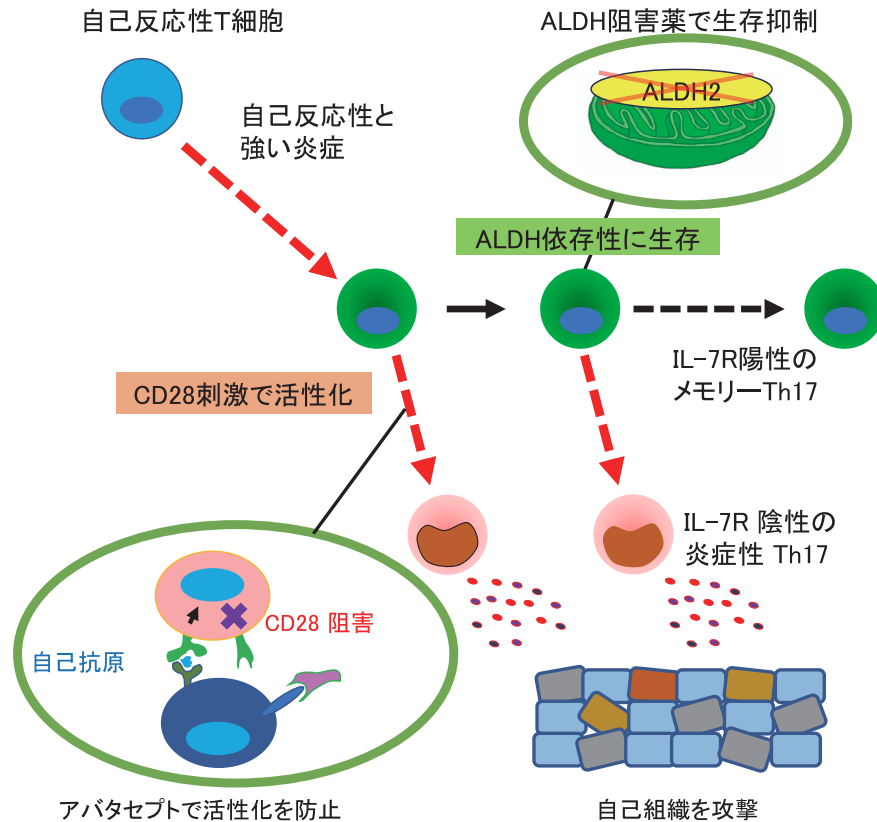


図6 本研究のまとめ
自己反応性Th17の中にはCD28依存性に活性化する炎症性Th17と、CD28に依存せず生存するメモリー様Th17があることがわかった。さらに後者の細胞は、ALDH依存性に生存すること、この阻害薬で生存抑制をできることが明らかになった。

シアナミドがTh17に作用してこの生存を阻害するという意外な効果を見出した。ALDH阻害薬は健常な組織にも毒性を持つため、直ちに免疫治療薬として臨床応用することは難しいと考えられる。しかしながら今後、免疫抑制剤治療に抵抗性のメモリー様Th17細胞をさらに深く調べる事で、ALDHに準ずる弱点を見つけ制御することができれば自己免疫疾患の根治につなげることができると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたって、多くの実験を補助していただいた慶應医学部微生物学免疫学教室技術員 時藤夕紀子さん、修士課程学生の早瀬帆高さん、RNAシーケンスのデータ解析をご指導いただいた慶應医学部百寿総合センター 佐々木貴史先生、マウスをご提供いただきました慶應医学部皮膚科学教室 天谷雅行先生および高橋勇人先生、実験の遂行および論文執筆にあたり多くの助言や討論をいただいた、慶應医学部薬理学教室 竹馬真理子先生および京都大学 廣田圭司先生に深く感謝いたします。最後に、研究の場を与えていただいた吉村昭彦教授には、いつも暖かく細やかなご指導をいただき深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Hayter, SM, Cook, MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 11, 754-765, 2012.
- 2) Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, Sukumar M, Reger RN, Yu Z, Kern SJ, Roychoudhuri R, Ferreyra GA, Shen W, Durum SK, Feigenbaum L, Palmer DC, Antony PA, Chan CC, Laurence A, Danner RL, Gattinoni L, Restifo NP. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*. 35: 972-85, 2011.
- 3) Tokifuji Y, Hayabuchi H, Sasaki T, Hara-Chikuma M, Hirota K, Takahashi H, Amagai M, Yoshimura A, Chikuma S. Targeting abatacept-resistant T-helper-17 cells by aldehyde dehydrogenase inhibition. *iScience* 27, 108646, 2024.
- 4) Takahashi H, Kouno M, Nagao K, Wada N, Hata T, Nishimoto S, Iwakura Y, Yoshimura A, Yamada T, Kuwana M, Fujii H, Koyasu S, Amagai M. Desmoglein 3-specific CD4+ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. *J Clin Invest*. 121: 3677-88, 2011.

触覚を痒覚に変換するアロネーシス・パスウェイの分子神経基盤の解明と治療法の開発

順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所・順天堂かゆみ研究センター

富永 光俊

Mechanical allodynia is an itch hypersensitivity phenomenon wherein a minor mechanical stimulus that would not normally cause itch, such as rubbing against clothing, triggers itch. This is a challenging problem in people with dry skin-based diseases such as xerosis and atopic dermatitis, which understandably diminishes their quality of life. However, the precise details of the pathogenic mechanism of mechanical allodynia remain unclear. Recently, we found that intrathecal administration of sulfated cholecystokinin 8 (CCK8S) induced mechanical allodynia in mice. Previous studies have identified CCK receptors, CCK1R and CCK2R, but the molecular mechanisms underlying the induction or activation of these receptors are not fully understood. This study was performed to reveal the roles of CCK receptors in induction of mechanical allodynia. Behavioral analyses using CCK1R- or CCK2R-deficient mice showed that CCK8S-induced mechanical allodynia was markedly reduced in CCK2R-deficient mice but not in CCK1R-deficient mice. Additionally, CCK2R-deficient mice exhibited a decreased frequency of mechanical allodynia induced by itch mediators or dry skin. However, their response to heat pain or capsaicin-induced mechanical allodynia was unaffected. Notably, oral administration of a CCK2R antagonist suppressed dry skin-induced mechanical allodynia. These results suggest that spinal CCK2R is involved in the induction of mechanical allodynia and could be a potential target for its treatment.

1. 緒言

アロネーシスは、衣服の擦れなど、通常ではかゆみを起こさない些細な刺激がかゆみを誘発する痒覚過敏現象を指す。これはアトピー性皮膚炎の患者にて問題となる「かゆみと搔破の悪循環」の病態形成に強く関与しており、治療法の開発が切望されている¹⁾。しかし、現行のモデル動物では、起痒物質によるかゆみとアロネーシスが同時に発生するため、アロネーシスの分子神経基盤のみ抽出して解析することが困難である。

コレシストキニン (CCK) は、中枢神経系において神経伝達物質または神経調節物質として作用し、不安、摂食、アロディニアなどの発生に関与している²⁾。また中枢神経系には硫酸化修飾されたCCK8 (CCK8S) が広く分布していることが知られている²⁾。

このような背景の中、最近、我々は未発症NC/Ngaマウスの後根神経節と比較して、アトピー性皮膚炎を発症したNC/Ngaマウスの後根神経節において発現増加している遺伝子の一つとしてCCK遺伝子を見出し、CCK8Sをマウスの脊髄内に投与すると、機械刺激によるアロネーシス (機械的アロネーシス) のみが誘発されたことから、機械的ア

ロネーシスの発生メカニズムの解明に繋がる分子とモデル動物を確立してきた。

そこで本研究では、これらの発見を基盤に、我々が独自に作製した動物モデルを用いて触覚を痒覚に変換する脊髄神経経路 (アロネーシス・パスウェイ) の分子神経基盤の解明とアロネーシス治療法の開発を目指した。

2. 方法

本研究では、B6.129S4-Cckbr<tm1Tom>マウス (CCK2R欠損マウス)³⁾を用いて、薬理的行動解析 (かゆみ、痛み行動、機械的アロネーシス)、組織学的解析 (*in situ* ハイブリダイゼーション)、ドライスキンモデル⁴⁾を駆使して、CCK8S誘発性機械的アロネーシスにおけるCCK2Rの役割の解明とCCK2Rを標的とする機械的アロネーシスに対する治療効果の検討を行った。

3. 結果

(現時点では未発表論文のデータのため開示できません。ご理解いただけますようお願い申し上げます。)

4. 総括

本研究では、遺伝子改変動物を用いた行動薬理的解析や分子生物学、組織学的解析技術を駆使して、1) 髄腔内CCK8S投与は機械的アロネーシスを誘発すること、2) その機械的アロネーシスの誘発に脊髄におけるCCK2R分子が関与していること、3) CCK2Rアンタゴニストの経口投与はドライスキン誘発性アロネーシスの発生頻度を低下させることを見出した。これらの知見から、おそらく部分的に、脊髄後角において、CCK8S-CCK2Rシステムが機械

Elucidation of the molecular neuronal basis of the allodynia pathway that converts tactile sensation into itch sensation and development of therapeutic method

Mitsutoshi Tominaga

Juntendo Itch Research Center (JIRC), Institute for Environmental and Gender-Specific Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan



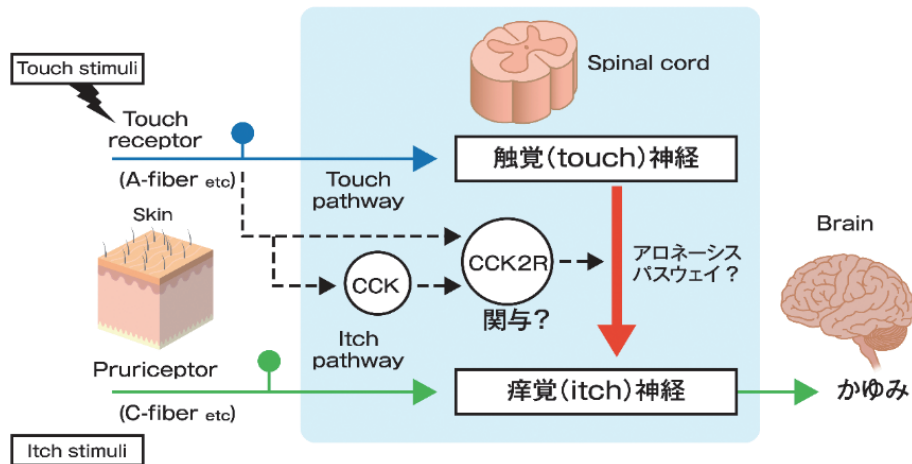


図1 機械的アロネーシスの神経回路モデル
 健常時、痒覚経路と触覚経路は独立にそれぞれの感覚情報が、皮膚→脊髄→脳に伝わる。一方、ドライスキンモデルマウスの脊髄では、触覚から痒覚へと情報を伝えるアロネーシス・パスウェイが駆動し、これによって機械的アロネーシスが発生すると考えられる。このアロネーシス・パスウェイの駆動に脊髄CCK/CCK2Rシステムが関与している可能性が高い。

刺激によるアロネーシスの発生に関与していることが示唆された(図1)。そして、遺伝子改変動物を用いた解析から、CCK8S-CCK2Rシステムはかゆみメディエーター誘発性機械的アロネーシス及びドライスキン誘発性アロネーシスの発生にも関与していることが示唆された。

以上のことから、脊髄CCK2Rは機械的アロネーシスの発生に関与するアロネーシス・パスウェイの駆動に関与する鍵分子であることから、痒覚過敏の治療標的分子になり得ることが示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団のご支援をいただきましたことに心より感謝を申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、ご指導いただいた順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所の高森建二特任教授、またご協力いただいた当研究グ

ループの先生方に深謝いたします。

(引用文献)

- 1) Tominaga, M. and Takamori, K. Peripheral itch sensitization in atopic dermatitis. *Allergol. Int.* **71**, 265-277 (2022).
- 2) Dufresne, M. *et al.* Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol. Rev.* **86**, 805-847 (2006).
- 3) Nagata, A. *et al.* G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 11825-11830 (1996).
- 4) Miyamoto, T. *et al.* Itch-associated response induced by experimental dry skin in mice. *Jpn J Pharmacol.* **88**, 285-292 (2002).

経皮曝露されたナノ粒子の存在様式変化の理解と 毒性発現を適切に解析・予測するための試験法の提案

和歌山県立医科大学薬学部

長野 一也

To ensure the safe usage of silver nanoparticles (nAgs) in cosmetics, it is necessary to reveal the physical forms of nAgs inside the skin, as these forms may change during the process of percutaneous absorption. In this respect, we have previously established an analytical system based on single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS) to determine the physical forms of nAgs in the skin. Here, we analyzed the physical forms of nAgs inside the mouse skin. Furthermore, we tried to propose an appropriate test system, to understand the kinetics of nAgs after dermal exposure in a simple and detailed manner.

We evaluated the quantity as well as the physical forms of Ag in the epidermis and dermis of mice after exposing nAgs with 100 nm diameters (nAg100) or Ag⁺ to the skin. Sp-ICP-MS analysis indicated that nAg100 could be absorbed and distributed into the deeper layers in the ionized form, whereas Ag⁺ was absorbed and distributed without a change in physical forms. This data suggested that it is essential to consider the distribution and particle size of not only nAgs but also Ag⁺ released from nAgs into the skin, to understand the skin response following exposure of nAgs. Next, we focused on a three-dimensional skin culture model as an animal-substitute *in vitro* test system from the viewpoint of animal welfare, and analyzed the distribution of nAg100 (epidermal and dermal layer) and the amount and physical form of nAg100 in each layer. Sp-ICP-MS analysis showed that nAg100 could be also absorbed and distributed into the deeper layers in the ionized form, as well as *in vivo* studies. The data suggested that a three-dimensional skin culture model could be a useful *in vitro* test system for understanding the kinetics of nAgs after dermal exposure in a simple and detailed manner.

1. 緒言

ナノ粒子は、組織浸透性が高いことから、化粧品をはじめ、身の回りの製品に応用されている¹⁾。一方で、ナノ粒子は、その微小さから、従来サイズの粒子とは異なる体内動態を示すため、皮膚内での炎症惹起をはじめ、様々な毒性発現が指摘されている²⁾。このような背景から、様々な素材・大きさのナノ粒子が、動物などに投与され、それぞれの毒性は、投与されたナノ粒子に起因しているとの考察が散見される。また、その機序解析を目的とした *in vitro* 試験においても、*in vivo* で投与したナノ粒子をそのまま利用している実験が多く認められる。しかし、最近では、1) 抗菌スプレーなどに汎用される銀ナノ粒子が、生体内でイオン化されて粒子が小さくなることや³⁾、逆に、イオンから粒子が再形成されることが報告されており⁴⁾、必ずしも曝露されたナノ粒子自体が、毒性を発現させているとは限らないことがわかりつつある。そのため、*in vitro* 試験において、*in vivo* で投与したナノ粒子をそのまま利用することは、真実と異なる現象を観察している可能性も考えられる。さらに重要なこととして、2) ナノ粒子が起因する生体

応答(毒性を含む)は、粒子の大きさや、粒子/イオンといった存在様式の違いによって異なることを見出しており⁵⁻⁷⁾、「投与・添加されたナノ粒子の物性」と「引き起こされる生体応答(毒性を含む)」の間がブラックボックスのままでは、ナノ粒子に起因する毒性を真に理解しえない。したがって、ナノ粒子含有製品の安全性担保には、ナノ粒子の存在様式を定量的に理解し、毒性を発現させている正体を理解したうえで、試験系を設定することが重要である(図1)。

しかし、ICP-MSや電子顕微鏡観察といった従来手法は、一長一短で、存在量と存在様式を同時評価できず、新たな技術基盤が求められていた(表1)。

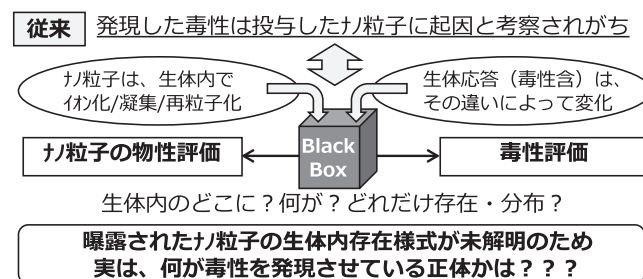


図1 ナノ粒子の毒性評価の概要図

Understanding the change in physical forms of nanoparticles exposed dermally and proposing test methods for appropriate analysis and prediction of their toxicity

Kazuya Nagano

School of Pharmaceutical Sciences, Wakayama Medical University

表1 ナノ粒子の定量・定性評価するための手法

	存在量の解析 (定量解析)	存在様式の解析 (定性解析)
ICP-MS	○	X
電子顕微鏡観察	X	○
生体試料応用型1粒子ICP-MS	○	○

本観点から、申請者はこれまでに、上記のブラックボックスを解き明かすことを目指し、生体試料の前処理を最適化することで、生体内でのナノ粒子の存在量と存在様式を解析可能な「生体試料応用型1粒子ICP-MS」を独自開発してきた⁸⁾。本技術を活用し、安全なナノ粒子含有化粧品などを開発するためには、①経皮曝露されたナノ粒子の存在様式が、皮膚内でどのように変化するかを立証し、②どういったナノ粒子が経皮曝露されると、どこに、何が、どれだけ分布するかを精査したうえで、③適切な試験系を設定することが求められる。

そこで本研究では、銀ナノ粒子をモデルに、皮膚内での存在様式変化を解析したうえで、3次元皮膚培養モデルなどを活用することにより、毒性発現を適切に理解・予測するための試験系の提示を目指す。

2. 方法

2.1. マウス皮膚に曝露された銀ナノ粒子の存在様式変化の解析

モデルナノ粒子として、100nmの銀ナノ粒子 (nAg100) を nanoComposix 社より購入し、実験に供した。硝酸銀を富士フィルム和光純薬より購入し、銀イオン (Ag^+) を nAg100 の対照群として設定した。マウスは、ICRの雌 (8週齢) を日本SLCより購入した。皮膚組織の分画は、まず、テープストリッピングで角質層を採取し、表皮と真皮を Microwave 法 (200 W, 30 秒) にて分離した。各皮膚組織における銀の存在量については、ICP-MS法によって評価した。また、存在様式については、高効率に回収でき、存在様式を変化させることのない水酸化ナトリウムによる前処理で組織を可溶化し、生体試料応用型1粒子ICP-MSによって評価した⁸⁾。

2.2. 3次元皮膚培養モデルに添加された銀ナノ粒子の存在様式変化の解析

3次元皮膚培養モデル (表皮モデル: EPI-212) を、KURABOより購入した。nAg100の添加濃度を検証するため、3次元皮膚培養モデルに各種濃度 (3, 10, 30, 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の nAg100 を添加し、24時間後、WST-8アッセイにより、3次元皮膚培養モデルに対する障害性を検証した。障害性が観察されなかった最大濃度 (90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の nAg100 を3次元皮膚培養モデルの上層に添加し、24時間後、サンプルを回収した。サンプルとしては、まず、3次元皮膚培養モデルの上層と下層の溶液をそれぞれ回収後、3次元皮膚培養細胞層に水酸化ナトリウムを添加・溶解させて回収した。回収したサンプル中の銀の存在量・存在様式は、2.1.と同様、それぞれICP-MS法と生体試料応用型1粒子ICP-MSによって評価した。

3. 結果と考察

3.1. マウス皮膚に曝露された銀ナノ粒子の存在様式変化の解析

マウス皮膚に曝露された銀ナノ粒子の各層 (表皮層と真皮層) での存在量と存在様式変化を理解するため、100nmの銀ナノ粒子 (nAg100) と、その対照群として、銀イオン (Ag^+) をマウス皮膚に塗布した。塗布5日後、皮膚組織の各層における存在量をICP-MS法で解析し、存在様式を生体試料応用型1粒子ICP-MS法で解析した。

その結果、いずれの曝露群においても、表皮と真皮で、銀が検出された (図2(a))。そこで、その存在様式を解析したところ、 Ag^+ 曝露群では、表皮・真皮ともに、そのほとんどが曝露させた Ag^+ として検出された。その一方で、nAg100 曝露群では、表皮・真皮ともに、曝露させた粒子のみならずイオンが約6:4の割合で検出された (図2(b))。また、その粒子径は、約80nmとイオン化に伴って小さくなっていることが示唆された (図2(c))。したがって、経

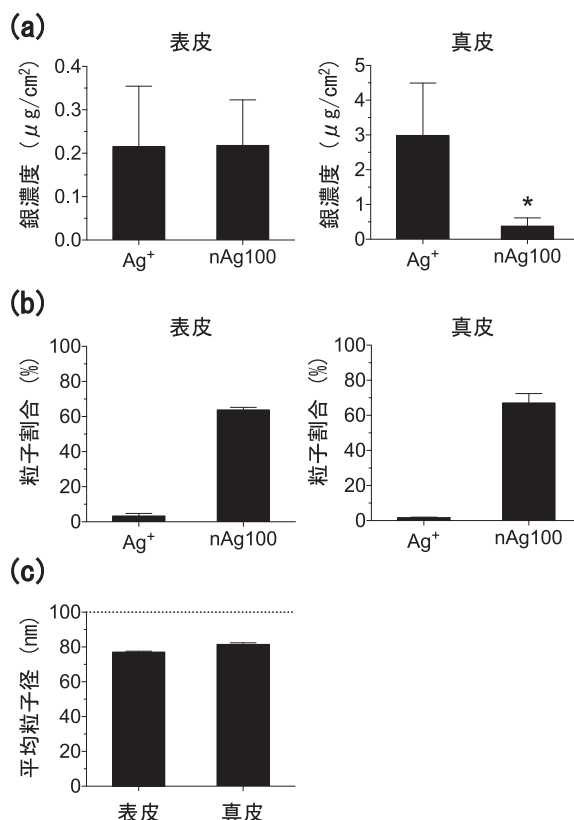


図2 マウス皮膚に塗布したnAg100と Ag^+ の存在量・存在様式変化の解析
マウス皮膚にnAg100と Ag^+ を20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で塗布し、5日後、表皮と真皮中のAgの存在量と存在様式を解析した。(a)は、表皮と真皮中に検出された銀濃度。(b)は、表皮と真皮中に検出された銀粒子の割合。(c)は、表皮と真皮で検出された粒子の平均粒子径。破線は、皮膚塗布時の粒子径。全データは平均値±S.E.で示した (n=3)。* p<0.05 (Student's t-test)

皮吸収の過程でイオン化していることが示唆された。

以上から、マウス皮膚に曝露されたnAg100は、その吸収過程でイオン化し、表皮や真皮では、粒子とイオンが共存していることが明らかとなった。

3. 2. 3次元皮膚培養モデルに添加された銀ナノ粒子の存在様式変化の解析

nAg100のみならず、経皮曝露された各種ナノ粒子の動態(どこに、何が、どれだけ分布するのか)を詳細に理解するためには、簡便でハイスループットな評価系が必要である。そこで、動物愛護の観点からも、動物代替の*in vitro*試験法として、3次元皮膚培養モデルに着目した。本試験では、様々な3次元皮膚培養モデルの中から、表皮モデルを選択した。すなわち、3次元皮膚培養の上層・3次元皮膚培養の細胞層・3次元皮膚培養層の下層がそれぞれ、*in vivo*における皮膚表面・表皮内・真皮以降を再現しうると考えられた。

まず、3次元皮膚培養モデルにおいても、銀ナノ粒子が経皮吸収の過程でイオン化し、表皮や真皮では、粒子とイオンが共存していることを明らかにするため、nAg100をモデルに、3次元皮膚培養の上層・3次元皮膚培養の細胞層・3次元皮膚培養の下層における存在量と存在様式を解析した。最初に、nAg100の添加濃度を決定するため、各種濃度のnAg100を3次元皮膚培養層に添加し、その障害性をWST-8アッセイによって評価した。障害性が観察されなかった最大濃度(90 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を決定したうえで、nAg100を3次元皮膚培養モデルの上層に添加し、24時間後、各層の銀の存在量と存在様式を解析した。

各層の銀の存在量をICP-MS法で評価したところ、いずれの層にも銀が検出され、真皮にまで浸透していることが示唆された。一方で、その量は、皮膚表面(3次元皮膚培養の上層)から、表皮(3次元皮膚培養の細胞層)、真皮以

降(3次元皮膚培養の下層)に進むにあたって、少なくなっており、皮膚バリアによって深部に向かって浸透する量は制限されていることが示唆された(図3(a))。次に、各層の銀の存在様式を生体試料応用型1粒子ICP-MS法で評価したところ、皮膚表面(3次元皮膚培養の上層)では、ほとんどが粒子であったのに対して、表皮(3次元皮膚培養の細胞層)、真皮(3次元皮膚培養の下層)と向かうにつれて、イオン割合が大きくなっており、nAg100は、イオン化しながら、浸透していることが示唆された(図3(b))。実際、各層で検出された粒子の大きさを検証すると、皮膚表面(3次元皮膚培養の上層)から、表皮(3次元皮膚培養の細胞層)、真皮(3次元皮膚培養の下層)へと向かうにつれて粒子径が小さくなっており、イオン化に伴って小さくなっていることが示唆された(図3(c))。

以上から、マウス皮膚のみならず、3次元皮膚培養モデルに添加されたnAg100も、その吸収過程でイオン化し、表皮や真皮では、粒子とイオンが共存していることが明らかとなった。そのため、3次元皮膚培養モデルは、経皮曝露された各種ナノ粒子の動態(どこに、何が、どれだけ分布するのか)を詳細かつ簡便に理解するための評価系になる可能性が示された。一方で、表皮や真皮に浸透する量や、イオン化の割合、粒子径の減少は、マウス皮膚と3次元皮膚培養モデルで乖離があった。これは、各種条件が異なるため、必然ではあるものの、ヒト皮膚での経皮吸収後の動態を理解・予測するために、まずは、ヒト皮膚を用いて検証したうえで、その結果に相応する3次元皮膚培養モデルの種類や条件を探っていくことで、動物代替の*in vitro*試験法になることが期待される。

4. 総括

本研究によって、nAg100が経皮曝露されても、皮膚組織内にはnAg100がそのまま存在しているとは限らず、経

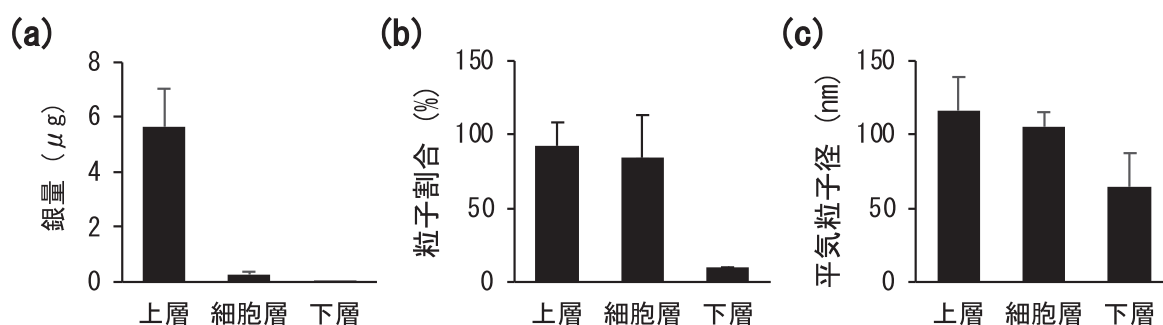


図3 3次元皮膚培養モデル(表皮モデル)に添加したnAg100の各層での存在量・存在様式の解析
3次元皮膚培養モデル(表皮モデル)にnAg100を90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加し、24時間後、3次元皮膚培養の上層(皮膚表面に相当)、3次元皮膚培養の細胞層(表皮に相当)、3次元皮膚培養の下層(真皮以降に相当)のAgの存在量と存在様式を解析した。
(a)は、各層に検出された銀量。(b)は、各層に検出された銀粒子の割合。(c)は、各層で検出された粒子の平均粒子径。
全データは平均値 \pm S.D.で示した(n=3)。

皮吸収後の毒性を適切に解析するためには、各皮膚組織中に存在する粒子とイオンの双方を考慮することの重要性が示された。また、存在量のみならず、存在様式を含めた動態を簡便に推測する手法として、3次元皮膚培養モデルの有用性を部分的に明らかにした。特に、3次元皮膚培養モデルは、本試験で利用した表皮モデルのほか、真皮モデルや、角層が未熟なタイプやバリア能が亢進したタイプなど、多種多様にラインナップされている。そのため、子どもの皮膚や皮膚疾患などによって角層が未熟な場合の評価も期待される。また、真皮に到達した粒子とイオンの影響を観察するには、*in vivo*での皮膚を利用するよりも、3次元皮膚培養された真皮モデルに直接、粒子・イオン単独もしくは双方を添加する方が、適切に真皮での応答を解析できる可能性も考えられる。

さらに本研究が進展することによって、将来的には、生体に曝露されたナノ粒子の運命から、毒性や機能を引き起こす正体を明らかにすることも夢ではなく、安全で有用なナノ粒子の設計やその利用方法も講じることが可能になるかもしれない。例えば、ナノ粒子から徐放されるイオンが毒性に関連する場合には、イオン化しにくい素材の利用や、イオン化させない設計・利用方法が理論的に構築可能である。また、逆に、イオンが機能に関連する場合には、粒子がイオン放出源のデリバリーキャリアとしてデザインすることも可能かもしれない。

以上は、新たな機能性化粧品を安全かつ合理的に開発することに直結するため、コスメトロジーの進展に大きな貢献が期待される。

(引用文献)

- 1) Dubey SK., Dey A., Singhvi G., Pandey MM., Singh V., Kesharwani P. : Emerging trends of nanotechnology in advanced cosmetics., *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 214:112440 (2022).
- 2) Larese FF., D'Agostin F., Crosera M., Adami G., Renzi N., Bovenzi M., Maina G. : Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin., *Toxicology.* 255:33-7 (2009).
- 3) Park EJ., Yi J., Kim Y., Choi K., Park K. : Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a trojan-horse type mechanism., *Toxicol. Vitro.* 24, 872-878 (2010).
- 4) Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam HR., Larsen EH. : Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part. Fibre. Toxicol.* 8, 18 (2011).
- 5) Morishita Y., Yoshioka Y., Takimura Y., Shimizu Y., Namba Y., Nojiri N., Ishizaka T., Takao K., Yamashita F., Takuma K., Ago Y., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Saito S., Matsuda T., Hashida M., Miyakawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Distribution of silver nanoparticles to breast milk and their biological effects on breast-fed offspring mice., *ACS Nano.* 10 (9) : 8180-91 (2016).
- 6) Hirai T., Yoshioka Y., Izumi N., Ichihashi K., Handa T., Nishijima N., Uemura E., Sagami K., Takahashi H., Yamaguchi M., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Ishii K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Metal nanoparticles in the presence of lipopolysaccharides trigger the onset of metal allergy in mice., *Nat. Nanotechnol.*, 11 (9) : 808-816 (2016).
- 7) Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y. : Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice., *Nat. Nanotechnol.*, 6 (5) : 321-328 (2011).
- 8) Ishizaka T., Nagano K., Tasaki I., Tao H., Gao JQ., Harada K., Hirata K., Saito S., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Optimization and evaluation of pretreatment method for sp-ICP-MS to reveal the distribution of silver nanoparticles in the body., *Nanoscale Res. Lett.*, 14 (1) : 180 (2019).

全光学的手法を用いた老化皮膚における力学特性変化の解析

徳島大学ポストLEDフォトンクス研究所

長谷 栄治

Extracellular matrices such as collagen and elastin are important factors that determine the mechanical properties of the skin. Therefore, to analyze the mechanical properties of the skin, it is desirable to visualize their distribution and measure the mechanical properties at those locations. In response to this need, we developed a new all-optical multimodal imaging technique that combines nonlinear optical microscopy with Brillouin scattering microscopy. This novel imaging technique allows for the simultaneous visualization of three key microscale information, such as collagen, elastin, and elastic modulus, within the same field of view. This approach not only facilitates a detailed understanding of the structural and mechanical aspects of skin but also enhances our ability to assess how these properties change in various conditions, including aging. Such insights are vital for advancing our knowledge of skin biology and could lead to improved strategies for diagnosing and treating skin disorders.

1. 緒言

皮膚の老化とは、皮膚を構成している個々の細胞の機能低下であり、表皮、真皮やその結合部、付属器の機能低下に加え、形態に異常が出ることで定義できる。代表的な症状として、シワ・タルミの形成やハリ不足、乾燥、疾患（色素異常、血管異常、脂腺異常）等が挙げられる。ここで、シワ・タルミ・ハリという老化による皮膚の外観変化に着目すると、これらは皮膚の力学特性の変化が強く影響するものである。したがって、これらの形成や不足のメカニズムを調査する、あるいはそれらを抑制・軽減する方法を検討する上では、皮膚の力学特性を詳細に計測する手法が望まれる。皮膚の真皮層は、皮膚全体の厚さの大部分を占めており、真皮層の約70wt%は細胞外マトリックスであるコラーゲンが占める。したがって、このコラーゲンの分布や配向、線維の太さは、皮膚の力学特性を決定する上で極めて重要な役割を担っている。老化皮膚においては、内因性の自然老化によりコラーゲンが変性・消失する上、外因性の老化である光老化では、弾性線維であるエラスチンの蓄積・変性が起こる。これらのことから、老化皮膚の力学特性を詳細に調査するためには、直径数 μm 程度のコラーゲン線維およびエラスチン線維の分布やその状態を高空間分解で把握した上で、その位置における力学特性を同様に高空間分解で計測することが望まれる。

そこで本研究では、非線形光学顕微鏡（多光子顕微鏡）

とブリルアン散乱顕微鏡を融合した新たなマルチモーダル光学顕微鏡を開発し、老化皮膚の詳細な力学の可視化を目指す。非線形光学顕微鏡では、SHG（第2高調波発生）光と2光子蛍光という2つの非線形光学現象を画像コントラストとしたイメージングがかねてより皮膚科学・皮膚計測の分野において着目されている¹⁾。SHGではコラーゲン分子の構造に由来する固有の2次非線形感受率を利用し、2光子蛍光ではエラスチン分子の自家蛍光特性をそれぞれ利用することで、真皮層を構成する主要な細胞外マトリックスを選択的に可視化することが可能となる。また、光の音波による非弾性散乱現象を用いたブリルアン散乱顕微鏡では、その散乱光スペクトルから測定対象の粘弾性情報を得られることから近年バイオイメージング分野で注目されている²⁾。本研究ではこれらのモダリティを融合し、コラーゲン・エラスチンの選択的観察を行って皮膚力学特性に大きく寄与する2つの物質の情報を得た後、ブリルアン散乱顕微鏡により同一位置の粘弾性率を測定する。これらの計測を若年皮膚および老化皮膚に対して行い、両者の比較から老化皮膚における力学特性変化の原因となる構造や物質の同定を行うことを研究の最終目標とする。本研究ではその前段階として非線形光学顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡それぞれを独立に開発し、正常な皮膚組織における同一箇所マルチモーダルイメージングを行った結果について報告する。

2. 方法

非線形光学顕微鏡とブリルアン散乱顕微鏡から成るマルチモーダル光学顕微鏡の開発の前段階として、それぞれの顕微鏡を独立に構築して同一試料のイメージングを行う。図1(a)に開発した顕微鏡装置の概略図を示す。はじめに、非線形光学顕微鏡の光源として波長可変のフェムト秒パラメトリック光発振器を用いた（中心波長可変幅



All-Optical Analysis of Mechanical Properties in Aged Skin

Eiji Hase

Institute of Post-LED Photonics,
Tokushima University

=680-1300nm, パルス幅=120fs, パルス繰り返し周波数=80MHz)。エラスチンからの2光子自家蛍光を取得することを考慮し、レーザー中心波長は800nmに設定した。レーザー光は1/2波長板(HWP)と偏光子(P)から成る出力調整器を経た後、SHG光の偏光依存性をキャンセルするため1/4波長板(HWP)により円偏光となるよう設定した。レーザー光の焦点は、ガルバノミラー(GM)、リレーレンズ、対物レンズ(OL)によりサンプル上で2次元スキャンされる。焦点において発生した前方透過SHG光成分は、コンデンサーレンズにより集められ、ダイクロイックミラーおよび光バンドパスフィルター(透過波長中心400nm, 透過幅10nm)でレーザー基本波成分を除去した後、パルスカウンターに接続されたフォトンカウンティング型光電子増倍管(PC-PMT)によってその光強度が計

測される。また、2光子自家蛍光の計測に関しては反射配置を用いて計測した。サンプルから発生した2光子自家蛍光は、入射側と同じ対物レンズによって集められ、同一光路を逆方向に伝播した後、SHG光検出側と同様にダイクロイックミラーと光バンドパスフィルター(透過波長中心450nm, 透過幅40nm)でレーザー基本波成分を除去した後、パルスカウンターに接続されたフォトンカウンティング型光電子増倍管によって光強度を計測する。上記セットアップを用いることで、サブ秒~数秒程度で数百 μm 四方の視野におけるSHGおよび2光子自家蛍光強度分布をサブ μm 程度の空間分解能で画像化できる。

次に、図1(b)に構築したブリルアン散乱顕微鏡のセットアップを示す。光源には波長532nmの狭線幅かつ単一モード発振の半導体レーザー励起固体レーザー

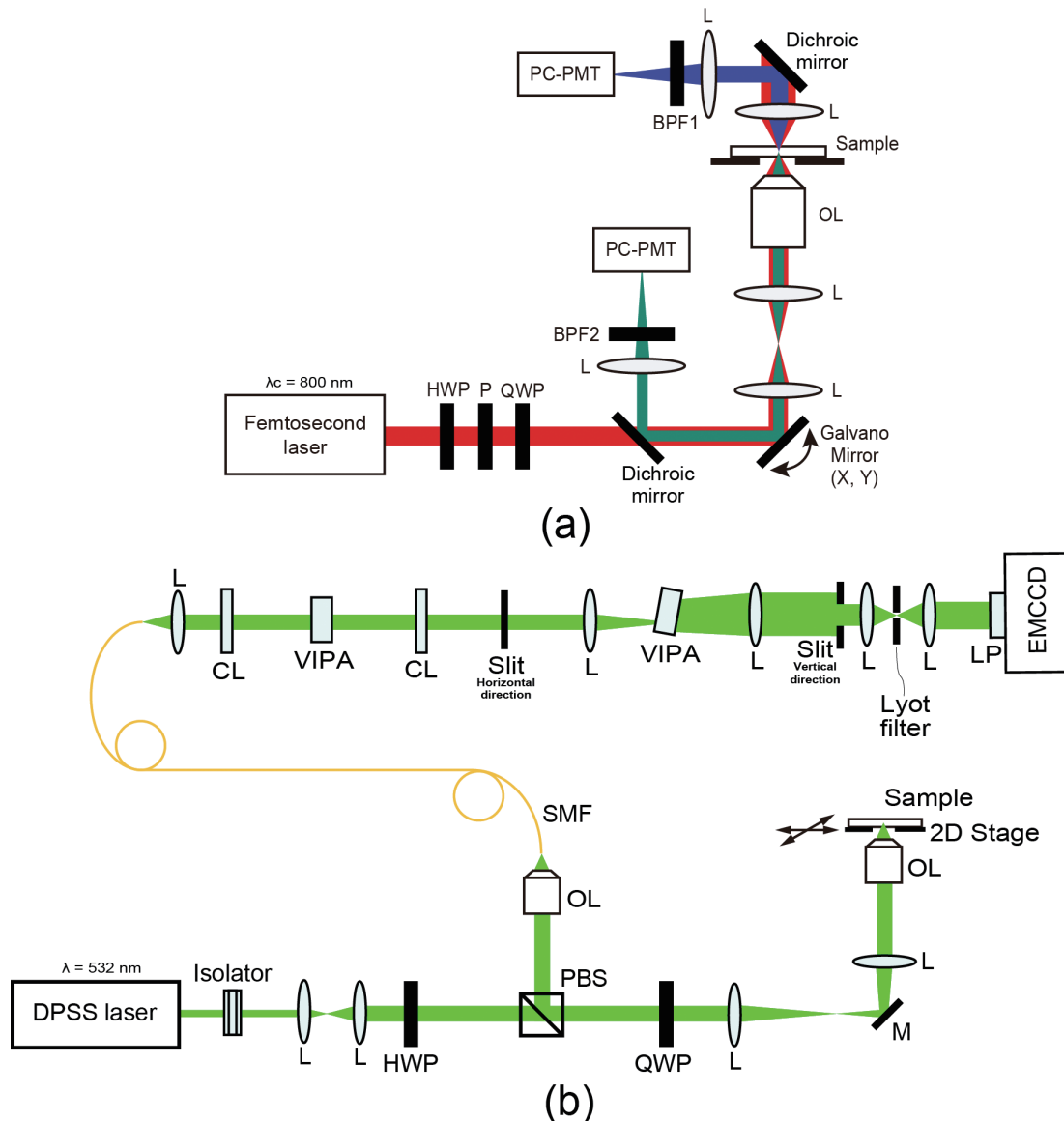


図1 構築した実験装置の概略図
(a) 非線形光学顕微鏡 (SHG および 2 光子自家蛍光), (b) ブリルアン散乱顕微鏡

(DPSSLaser)を用いた。レーザー光はレーザー共振器への戻り光を除去するためのアイソレーターを通過した後、そのビーム径が拡大され、出力調整される。レーザー光は対物レンズによってサンプルに集光され、発生したブリルアン散乱光は入射側と同じ対物レンズによって集められる。この際に集められた反射光には、その大部分を占める弾性散乱成分であるレイリー散乱光と、典型的にはそれより6~8桁程度光強度が低いブリルアン散乱光成分が含まれている。次に、入射側光路を逆方向に伝播し、1/4波長板と偏光ビームスプリッター(PBS)により反射光成分を分岐する。分岐された光は対物レンズによりシングルモードファイバー(SMF)に入射され、自作のタンデムVIPA(virtuallyimagedphasedarray)型の分光計に入射する³⁾。VIPAは傾けたファブリ・ペローエタロンと考えることができ、回折格子に比べて高いスペクトル分解能を持つ一方、その自由スペクトル範囲(FSR)は回折格子に比べて狭く、典型的な製品では数十GHz程度である。一方、生体試料からのブリルアン散乱による光周波数シフトは可視光を用いた場合、典型的に数GHzから十数GHz程度であることから、これを分光するために適切な素子となる。通常、VIPAには線状に集光したレーザー光を入射させ、対向する反射面により波長に応じて背面から異なる出力角を持つ複数のビームが生じる。また、前述のようにレイリー散乱に対して極めて弱いブリルアン散乱光の検出においてSN比(信号対雑音比)あるいはSB比(信号対背景比)をよく測定するため、VIPAのタンデム型直交配置やスリット、リヨフィルターなどの空間マスク・フィルターを設置している。このような分光計により空間分散された後方散乱光スペクトルは高感度な電子増倍CCDカメラ(EMCCD)によって計測される。この計測について顕微鏡XYステージを走査しながら行うことで、2次元イメージングを行った。カメラの露光時間は1点(ピクセル)あたり100msに設定した。ここで、ブリルアン散乱光によるスペクトル解析では、その光周波数シフト Ω を測定する。

$$\Omega = 2 \sin \frac{\theta}{2} n \omega_i v \quad (1)$$

ここで、 θ は入射光と散乱光のなす角であり、今回用いた反射配置の場合は $\theta = 180^\circ$ となる。 n は測定領域の屈折率であり、 ω_i は入射光の光周波数である。また、 v は音速であり、このようにブリルアン散乱による周波数シフトは幾何学的・光学的情報に加えて音響学的情報が含まれている。ここで、音速 v は、

$$v = \sqrt{\frac{M'}{\rho}} \quad (2)$$

と書ける。 ρ は密度であり、 M' は縦波弾性率と呼ばれる縦波音波の伝播に関係するばね定数である。ここで、生体試

料の大部分は水分であること、また、たんぱく質など特定の物質においては式(1)、(2)において屈折率と密度の増減が打ち消し合うことから、この周波数シフトの測定から対象のばね定数に関する情報を得ることが可能となる。

また、測定試料としては、関連するすべての法律、倫理規定、規制を遵守し、Obio, LLCより提供された健康な白人女性の正常な腹部皮膚をマイクロームで厚さ8 μm の凍結切片に切り分けた皮膚切片を用いた。測定の際にはPBS(リン酸緩衝生理食塩水)を試料切片に滴下し、ウェットな状態で測定した。

3. 結果と考察

3.1. 皮膚断面切片のブリルアンイメージング

これまでに、SHGおよび2光子蛍光を用いた皮膚試料の観察に関する様々な研究が行われており、コラーゲン・エラスチン分布の選択的観察ができる特徴の有用性がex vivo, in vivoの両面から確認されている。一方、ブリルアン散乱顕微鏡による生体試料の観察については、その大部分が胚やin vitro培養細胞における観察への応用であり、皮膚組織の観察に用いられた例はほとんどない。そこで、準備実験としてブリルアン散乱顕微鏡を用いた皮膚断面切片の観察を実施した。図2に実験結果を示す。図2(a)および(b)は皮膚断面切片の明視野像であり、画像上方向が表皮側である。図2(b)の拡大像において、表皮から真皮の範囲の皮膚組織が視野内に存在していることがわかる。次に、図2(c)は図2(b)中の赤破線枠の領域をブリルアン散乱顕微鏡で測定し、各点のブリルアンスペクトルからブリルアン散乱の周波数シフト量を非線形カーブフィットで得た後、その値をプロットしたブリルアンシフト画像である。現状の装置では1点(1ピクセル)あたりに露光時間とステージ移動時間を含めて数百ms程度要することから60 μm *150 μm の領域を20ピクセル*50ピクセルで粗く画像取得した。実際にはNA=0.7の対物レンズを波長532nmにて用いているため焦点スポット径はサブ μm となっていると考えられ、音響フォノンの平均自由行程も生体試料の場合はそれと同程度であることから、この条件は離散的な空間サンプリングとなっている。図から、表皮の角質層ではブリルアンシフトが高くなっており、顆粒層-有棘層-基底層にかけてはシフト量が次第に減少していく様子が可視化されている。一方、真皮層では視野内において最もブリルアンシフトが高くなっていることが確認できた。また、最上部の青色の部分は試料が存在しない箇所である。以上のような結果は、先行研究において原子間力顕微鏡や超音波顕微鏡を用いた皮膚断層の弾性率イメージングを行った結果とよく一致していた^{4,5)}。そのため、ブリルアンシフトイメージングで得られた結果についても、ブリルアンシフト量がその位置における弾性率に比例して

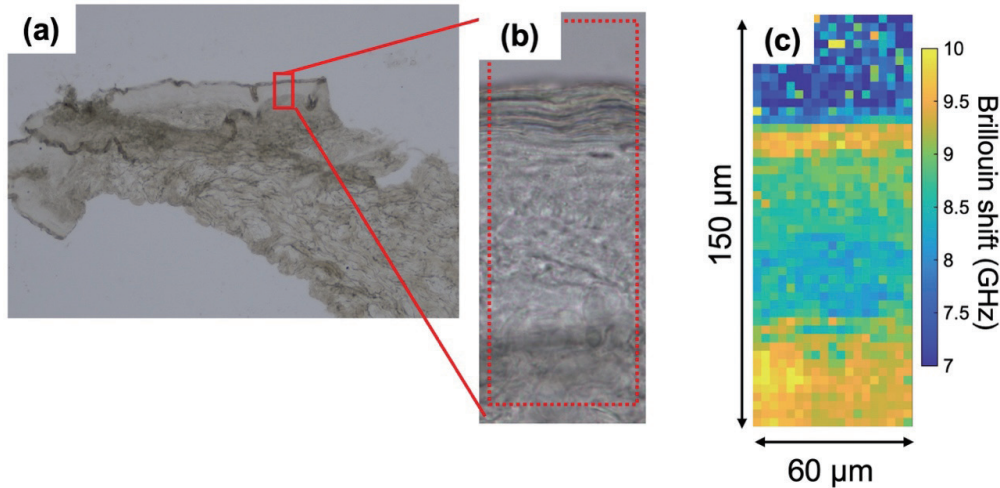


図2 皮膚断層切片のブリルアンイメージング結果
(a) 明視野像, (b) 明視野拡大像, (c) ブリルアンシフト画像

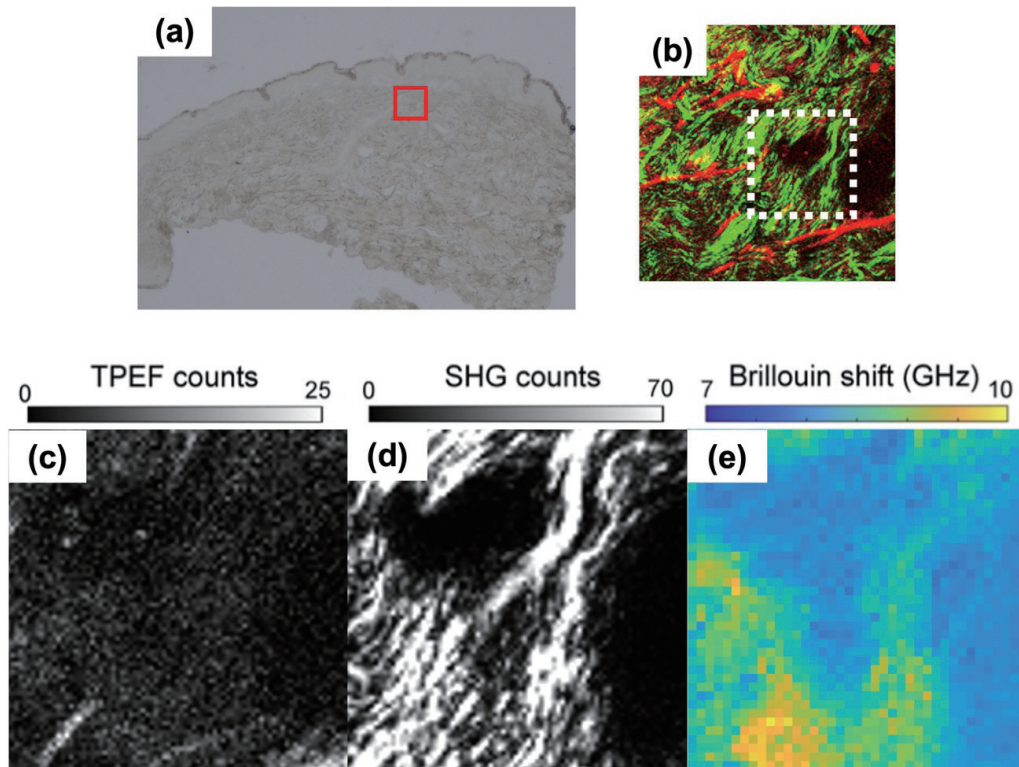


図3 皮膚断層切片のマルチモーダルイメージング結果
(a) 明視野像, (b) SHG(緑)および2光子蛍光(赤)画像, (c) 2光子蛍光画像, (d) SHG画像, (e) ブリルアンシフト画像.

おり、ブリルアンシフト量を指標とすることで皮膚の弾性率分布の可視化に応用できることがわかった。

3. 2. 真皮断面切片のマルチモーダル光学イメージング

ブリルアンシフトを用いた皮膚弾性率イメージングにおいてその有用性が確認できたので、同一の試料の同一箇所

におけるSHG、2光子蛍光およびブリルアンイメージングを行った。試料は先程と同様に皮膚断面切片を用いたが、コラーゲンおよびエラスチンの可視化のため真皮層に着目してイメージングを行った。図3に実験結果を示す。図3(a)は皮膚切片の明視野画像であり、赤枠をSHGおよび2光子蛍光により非線形光学イメージングしたものが図3(b)である。画像視野は137 μ m四方、画像サイズは128

ピクセル四方である。疑似カラーとしてSHG強度を緑色、2光子蛍光強度を赤色で重ねて表示している。どちらの現象でも線維状に存在するコラーゲン、エラスチンが高コントラストで可視化されていることがわかる。また、ブリルアン散乱顕微鏡では図3(b)中の白破線枠で囲った領域をイメージングし、ブリルアンシフトを解析して画像化したものが図3(e)である。ブリルアンイメージングは50 μm 四方領域を50ピクセル四方で取得した。また、比較のため図3(b)の同一領域における2光子蛍光、SHG強度の分布を別々に画像化したものを図3(c)および(d)に示す。SHG、2光子蛍光、ブリルアンシフトの比較から、ブリルアンシフトの大小はエラスチン(2光子蛍光)分布よりもコラーゲン(SHG)分布を反映した分布となっていることが確認できる。実際に生体由来の単離したコラーゲンおよびエラスチン線維それぞれを引張試験した先行研究では、コラーゲンの弾性率がエラスチンの弾性率より典型的に3桁程度高い値であることが確認されている⁶⁾。したがって、今回のイメージング領域におけるブリルアンシフトの変動はコラーゲンの持つ高い弾性率に起因する分布であると考えられる。また、図3(e)では1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の高空間分解な計測によりブリルアンシフト画像において線維状の構造も確認できる。図3(d)と(e)の比較により、これはコラーゲン線維の存在を反映した分布となっていると考えられ、組織中において直径数 μm オーダーで存在するコラーゲン線維の弾性率分布が高空間分解に可視化できたと考えられる。以上のような結果から、SHG・2光子蛍光・ブリルアン散乱を用いたマルチモーダルイメージングの皮膚計測における有用性が確認できた。

4. 総括

本研究課題は、皮膚の力学特性を調査するための新規な光学顕微鏡の開発に関する研究内容である。これまで、皮膚の力学特性を測定する手法のほとんどは皮膚表面のみ(非3次元)の情報かつ低空間分解能でのマクロな測定であったことから、老化皮膚の力学特性変化に関する知見は十分に蓄積されていない。特に、力学特性計測法の空間分解能あるいは画像視野の制限から、光学顕微鏡像で得られるような形態学的情報と力学特性とを適切に関連付けることは困難であった。一方、申請研究では、全光学的手法の利用によりサブ μm ～数 μm 程度の高空間分解能で同一視野におけるコラーゲン・エラスチン・弾性率という3つのマイクロ情報の可視化に成功した。加えて、本手法は非接触、ラベルフリーで分子選択的かつ外力の付与なく力学特性が計測でき、さらに原理的には3次元空間の計測可能であることから、本研究で得られる知見の新規性は極めて

高く、かつ化粧品・薬品や美容器具開発といった皮膚老化分野において有用であると考えられる。例えば、すでに知られているような老化によるコラーゲン・エラスチンの変性・消失あるいは蓄積、真皮乳頭層の喪失といった形態学的変化が、実際に局所的な力学特性にどのような影響を与えているのかを知ることができれば、適切な薬効を持った化粧品・薬品開発に応用できると考えられる。さらに、将来的には本手法を従来の力学特性計測手法と組み合わせれば、ハリ・シワ・たるみといった老化に伴う外観のマクロな変化が、コラーゲン・エラスチンといった個々の物質のミクロな観点からどのような影響を受けているのか調査できると期待される。また、社会的な側面からは、少子高齢化が進むわが国において健康寿命の延伸、あるいは国際的に評価の高いわが国のコスメトロジー産業の更なる振興に貢献するものと考えられる。

謝辞

本研究の実施にあたり、ご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団様に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Campagnola PJ, Dong CY. Second harmonic generation microscopy: principles and applications to disease diagnosis. *Laser Photonics Rev.* **5**, 13-26, 2011.
- 2) Prevedel R, Diz-Muñoz A, Ruocco G, Antonacci G. Brillouin microscopy: an emerging tool for mechanobiology. *Nat. Methods* **16**, 969-977, 2019.
- 3) Scarcelli G, Yun SH. Confocal Brillouin microscopy for three-dimensional mechanical imaging. *Nat. Photonics* **2**, 39-43, 2008.
- 4) Miura K, Yamashita K. Evaluation of aging, diabetes mellitus, and skin wounds by scanning acoustic microscopy with protease digestion. *Pathobiol. Aging Age Relat. Dis.* **6**, 1516072, 2018.
- 5) Achterberg VF, Buscemi L, Diekmann H, Smith-Clerc J, Schwengler H, Meister JJ, Wenck H, Gallinat S, Hinz B. The nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1862-1872, 2014.
- 6) Muiznieks LD, Keeley FW. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* **1832**, 866-875, 2013.

優れた安全性・安定性を有する経皮吸収型イオン液体の創製と コスメトロジー素材への応用

和歌山県立医科大学薬学部薬剤学研究室

福田 達也

Ionic liquids (ILs) have attracted attention in the drug delivery fields since ILs achieve solubilization, stabilization, and enhancement of transdermal absorption of a variety of compounds. However, some species of ILs have been reported to exhibit high toxicity when applied to the skin, which poses a major challenge for application to the cosmetology field. Hence, development of new ILs with good performance with safety has been required. In this study, we aimed to prepare new ILs that allows for promotion for transdermal absorption without toxicity. We could prepare ILs by using amine having polyethylene-glycol moieties and geranic acid as cation and anion, respectively. The ILs achieved solubilization of some poorly water-soluble compounds, and also enabled efficient delivery of a macromolecule into the skin without skin damage. These results suggest that these ILs would be applied for cosmetology materials with safety. Also, we could develop ILs composed of an antioxidative compound, edaravone, in which interaction had been formed between edaravone anion and cation molecules. Through *in vitro* and *in vivo* experiments, the edaravone-ILs were shown to exhibit high antioxidative activity similar to edaravone regardless of forming ILs, suggesting that the ILs have a potential to exhibit antioxidative effect for beauty and anti-aging. In conclusion, use of ILs should be a safe and useful approach for transdermal drug delivery and development of new cosmetology materials.

1. 緒言

皮膚内の水分蒸発を防ぎ、かつ外部からの異物侵入を防ぐ最大のバリア機能を有する皮膚角質層は、生体の恒常性維持に必要な不可欠な組織部位である一方、化粧品などを適用する場合、その有効成分の皮内への輸送はバリア機能には阻まれ、十分な効果を得ることができない。これまでに創薬の分野では、マイクロニードル、超音波、イオントフォレシスなどの物理的な刺激を利用する手法が提案されており、低分子化合物のみならず高分子化合物の経皮送達が可能となり、その有用性が報告されている¹⁻²⁾。しかし、化粧品に適用するにはデバイスを用いずに使用できるといった簡便性が必要であり、コストや実用性の観点からも、新たな経皮吸収システムの開発が課題と考えられる。

近年、創薬の研究領域では「イオン液体 (Ionic Liquids: ILs)」が新規経皮吸収促進溶媒として注目を集め、世界中で研究が盛んに行われている³⁾。ILsは、カチオン分子とアニオン分子から構成される100℃以下の融点を有する塩と一般的に定義されており、組み合わせによってはイオン結合を保持した状態で室温にて液体で存在できるものもあり、任意の機能性を付与することができる。一般の分子性液体 (水や有機溶媒) と異なり、難揮発性や高い熱安定性、

イオン電導性などの性質を有すること、また構成成分の組み合わせによりその性質を制御できることから、“第三の液体”として化学、工学、材料科学の分野でもともと広く使用されてきた。初めてのILsに関する報告は、1914年にWaldenらにより作製された、室温で液体の(融点13-14℃)の硝酸エチルアンモニウムであり、100年以上前の話である。医薬領域におけるILsの適用は、1990年代後半から2000年代初期から始まり、酵素やタンパク質の熱安定性の改善や、抗菌剤、抗がん剤の合成に用いる触媒としての利用が主であった。その後、難水溶性化合物の可溶化や、薬物放出システム構築への利用、低分子/高分子医薬の経皮吸収促進作用、などといった薬物送達システム(DDS)・製剤研究における多くの有益な機能が報告され、新たなDDSマテリアルとして盛んに研究され始めた。

当研究室ではこれまでに、ILを用いたDDS研究を展開しており、重炭酸コリン(カチオン)およびゲラン酸(アニオン)からなるイオン液体、Choline And Geranate (CAGE)が多くの難水溶性低分子化合物に対して優れた可溶化能を示し、加えて低分子から高分子化合物(タンパク質や核酸医薬)を経皮送達できることを報告してきた。具体的には、CAGEをフラボノイドであるノビレチンやBovine serum albumin (BSA)、インスリンと混合し皮膚へ塗布することで高い経皮吸収促進作用を示し、血糖降下作用を有するノビレチンやインスリンを経皮送達した場合には、一過的な作用を示す皮下注射と比較して持続的な作用を得られることを見出してきた⁴⁻⁵⁾。また、糖鎖からシアル酸を脱離させる酵素シアリダーゼを、CAGEを利用して老化促進モデルマウスの真皮に送達したところ、皮膚のエラスチン量が増加し、老化で失われた皮膚の弾力を回



Development of ionic liquids with safety and stability for transdermal absorption and their application to cosmetology materials

Tatsuya Fukuta

Department of Physical Pharmaceutics,
School of Pharmaceutical Sciences,
Wakayama Medical University

復できることが示唆される結果を得た⁶⁾。これらのことから、医薬領域だけでなく、コスメトロジー領域においても、ILsの応用展開が強く期待されている。

一方で、ILsの種類によっては、皮膚に適用した際に高い毒性を示すものも報告されており、コスメトロジー領域への応用を考える際には大きな課題となる⁷⁾。先述したCAGEは、それ自身がバイオフィilm除去能や中和活性により幅広い抗菌活性を示すことが明らかとなっており、そのメカニズムとしてCAGEの構成成分であるコリンが負に帯電した菌脂質膜LPS domainに作用し、静電的相互作用によるイオン複合体を形成すること、また膜に埋め込まれたコリンの安定化の際に、ゲラン酸が脂質膜中にスパイクされ、それにより膜構造が破壊されることが報告されている⁸⁾。一方、皮膚などの正常細胞の脂質二重膜には構造上ゲラン酸がスパイクされにくく、菌体に比べて正常細胞への毒性は低いとされているものの、コスメトロジー領域への応用に向けた新たなILsの開発が期待される。

そこで本研究では、コスメトロジー素材として応用可能な、優れた安全性・安定性を有する経皮吸収型ILsの創製を目的として、①皮膚への刺激性や毒性がほとんど認められないことから化粧品成分として広く使用されるポリエチレングリコール(PEG)を骨格として有するIL、②シミの形成に関与する活性酸素の除去作用をもつ抗酸化剤を成分とするIL⁹⁾、を開発したため、報告させていただく。

2. 方法

2.1. イオン液体の調製

アミノ基、およびPEGを骨格として有する3種の化合物をカチオンとして、ゲラン酸をアニオンとして任意のモル比で混合し、30分室温で攪拌混合させた。その後、60℃で30分間エバポレーションに供し、60℃で48時間、減圧下にて真空乾燥させた。ILの形成を60℃および室温に戻したのちに目視で観察するとともに、Nuclear Magnetic Resonance (NMR)にて確認した(論文投稿準備中により詳細は割愛させていただく)。

抗酸化剤を成分とするILの調製時には、ラジカルスカベンジャーとして脳梗塞急性期や筋委縮性側索硬化症の治療薬として認可されているエダラボンを用い、薬物自身をカチオンあるいはアニオンとして構成されたIL、すなわちActive Pharmaceutical Ingredient (API)-ILの作製を行った。エダラボンをアニオンとして、またカチオンとして過去にAPI-ILのカチオン成分として使用された実績のある重炭酸コリン、1-デシル-3-メチルイミダゾリウムクロライド、1-ブチル-1-メチルピロリジニウムクロライド、テトラブチルホスホニウムクロライドの4種を選択した。各カチオンとエダラボンを1:1(モル比)で室温にて1時間攪拌混合後、溶媒をエバポレーターにより留去した後、

60℃にて48時間真空乾燥させた。エダラボンILの形成を目視、NMRおよびフーリエ変換赤外分光法(FT-IR)にて評価した。

2.2. PEGモチーフを有するILによる高分子医薬の皮内送達

2.1.に從って作製したPEGモチーフを有するILを、FAM標識NF-κBデコイオリゴDNAと混合し、HOS:HR-1ヘアレスマウスの背部皮膚へ塗布した。一定時間後、ILを塗布した部分の皮膚を回収し、OCTコンパウンド中で凍結固化させたものをクライオスタットにより凍結切片とした。得られた切片中の核酸由来の蛍光を蛍光顕微鏡にて観察した。

2.3. 抗酸化物質を構成成分とするILの物性評価

化合物のIL化は水への溶解性を向上させることが報告されている。そこで、エダラボン、および2.1.で作製できたエダラボンILを過剰量秤量し、水と混合、室温で24時間反応させた。得られたサンプルを遠心分離(1,000g, 10min)し、上清中のエダラボン濃度をHPLCにて評価した。また、室温におけるエダラボンILの粘度を、粘度計MicroVISC(Rheosense, San Ramon, CA, USA)を用いて評価した。また、エダラボンILの融点を示差走査熱量計(DSC)にて測定した(Hitachi DSC7000X instrument; Hitachi High-Tech Science Corporation, Tokyo, Japan)。また、エダラボンILを水中に分散させた後、得られた懸濁液中におけるエダラボンILの粒子径、表面電荷をZetasizer Pro(Malvern Instruments, Worcestershire, UK)を用いて評価した。

2.4. 抗酸化物質を構成成分とするILの抗酸化活性評価

エダラボンおよびエダラボンILの抗酸化活性を、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカルアッセイを用いて*in vitro*にて評価した。具体的には、96-wellプレート中に最終濃度としてDPPHが50μM、エダラボンおよびエダラボンILが0、10、20、40μMとなるように混合した。そして、DPPHおよび各サンプルを20分間反応させた後の、DPPHラジカルの吸光度(λ=540nm)をマイクロプレートリーダーにて測定した。各サンプルの抗酸化活性は、コントロール群(エダラボン0μM)と比較した際のDPPHラジカルの消去率を、得られた吸光度を基に算出することで評価した。また、エダラボンをIL化することにより、*in vivo*における抗酸化活性が損なわれていないことを確認すべく、エダラボンの適応疾患の一つである脳梗塞のモデル動物として頻用される、transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO)ラットを用いて評価した¹⁰⁾。

3. 結果

3.1. PEGモチーフを有するILの作製と高分子医薬の皮内送達

これまでに当研究室にて用いていたCAGEのアニオン成分であるゲラン酸をアニオンとし、PEGモチーフを有するアミンをカチオンとしてILの作製を行った。PEGアミンについては、異なる末端基（メトキシ基、ヒドロキシ基等）およびPEG鎖長（分子量）の分子種をいくつか選定し、異なるアニオン：カチオン比率でILを調製した。その結果、室温で固体のものも一部得られたが、処方最適化により室温で液体のILsを見出した。これらPEGアミン骨格を有するILs（PEG-ILs）は、難水溶性薬物の可溶化を可能とするCAGEと同様に高い薬物溶解性を示した。さらに、ある種のPEG-ILは、蛍光標識オリゴ核酸と混合してマウス背部皮膚へ塗布した際に、高い皮膚吸収促進効果を示すとともに、皮膚刺激性を示さないことが明らかとなった。PEG-ILsの物性評価として、中間水に着目し検討を行った。その結果、CAGEでは水と混合することでゲル構造を示し、さらに水を添加すると相分離を起こすが、ある種のPEG-ILsにおいては、体積比として90%まで水を添加した場合でも均一な溶液を維持し、水の添加による顕著な溶解度低下も認められなかった。DSC測定から中間水の存在が示唆されており、これにより高い水分含量においても相分離せず、ILsの形態を維持していた要因であると考察される。以上より、PEGアミンを用いて作製した新規ILsは高分子医薬の皮膚吸収促進を可能とするとともに、高い安全性を有するILsであることが示唆された（論文投稿準備中）。

3.2. エダラボンILの物性・機能性評価

3.1.の検討と並行して、抗酸化活性を有し、美容や炎症性皮膚疾患への応用が可能なILsの作製に着手した。抗酸化剤として、高いラジカル捕捉能により脳梗塞や筋萎縮性側索硬化症の治療薬として使用されているエダラボンをアニオンとして使用した。エダラボンと混合するカチオンとして、過去にAPI-ILsのカチオン成分として使用された実績のある重炭酸コリン、1-デシル-3-メチルイミダゾリウムクロライド、1-ブチル-1-メチルピロリジニウムクロライド、テトラブチルホスホニウムクロライドの4種を選択した。各カチオンとエダラボンを1:1（モル比）で室温にて1時間攪拌混合後、溶媒をエバポレーターにより留去した後、60℃にて48時間真空乾燥させることで、エダラボンILの形成を評価した結果、重炭酸コリンを用いた場合では析出しILが形成されなかったが、他の3つのカチオンを用いた場合ではILの形成が目視において確認でき（図1）、NMRやFT-IRによりカチオン・アニオン間の相互作用を観察できた。一方で、1-デシル-3-メチル

イミダゾリウムクロライドで作製したILは60℃では液体であったものの、室温では固体となってしまうこと、また1-ブチル-1-メチルピロリジニウムクロライドで作製したILは水に懸濁した際に容易に析出した。テトラブチルホスホニウムをカチオンとして作製したILは室温において液体であり、かつ水中で析出しなかったことから、今後の経皮製剤としての取り扱いやすさの観点から、テトラブチルホスホニウムをカチオンとし作製したILを“エダラボンIL”とし、以降の検討で使用した。エダラボンILの水への飽和溶解度をHPLCにて評価したところ、エダラボンの飽和溶解度が 1.96 ± 0.05 mg/mLであったのに対し、エダラボンILは 3.47 ± 0.35 mg/mL（エダラボンとして）であり、約1.8倍に増加した。さらに、エダラボン粉末は水に溶けにくく長時間の攪拌混合を必要とする一方で、エダラボンILは水中にて約10秒間攪拌混合するのみで速やかに溶解した。また、エダラボンILの粘度および融点をそれぞれ測定したところ、粘度は 7753.7 ± 61.3 mPa·S（20.7℃において）、融点は -41.3 ℃であった。ILを水に懸濁した際に、IL自身でナノ粒子を形成し、それがILの皮膚や粘膜の透過促進に有効に働くことが示唆されている¹¹⁾。そこで、エダラボンILを水に懸濁させた際の粒子径およびζ電位を測定したところ、粒子径が 199.2 ± 68.0 nm、ζ電位が -26.6 ± 1.2 mVと、負電荷のナノ粒子を形成していることが明らかとなった。

次に、エダラボンをIL化したことによる抗酸化活性への影響を*in vitro*および*in vivo*において評価した。DPPHラジカルアッセイによってラジカル捕捉活性を評価した結果、エダラボンILは濃度依存的な抗酸化活性を示し、またその活性はエダラボン原薬と同程度であった（図2）。このことから、IL化によってエダラボンの抗酸化活性が変化しないことが示唆された。さらに、*in vivo*における抗酸化活性を評価するため、エダラボンの適応疾患である脳梗塞のモデルラットに対してエダラボンILを尾静脈内投与した結果、エダラボンILはエダラボン溶液と同程度の脳細胞死の抑制と運動機能不全の改善を示し、*in vivo*においてもエダラボン原薬と同様に高い抗酸化活性を発揮することが明らかとなった⁹⁾。

4. 考察

ILsは難水溶性化合物の可溶化や、低分子・高分子医薬の経皮吸収促進を可能とすることから、医薬領域において経皮薬物送達を実現する技術として近年盛んに研究が行われている。一方で、ILsの種類によっては皮膚に適用した際に高い毒性を示すものも知られており、コスメトロジー領域への応用を考えた際には、化合物の経皮吸収促進作用を有し、かつ高い安全性を有するILsの開発が望まれている。そこで本研究では、皮膚への刺激性や毒性がほとんど

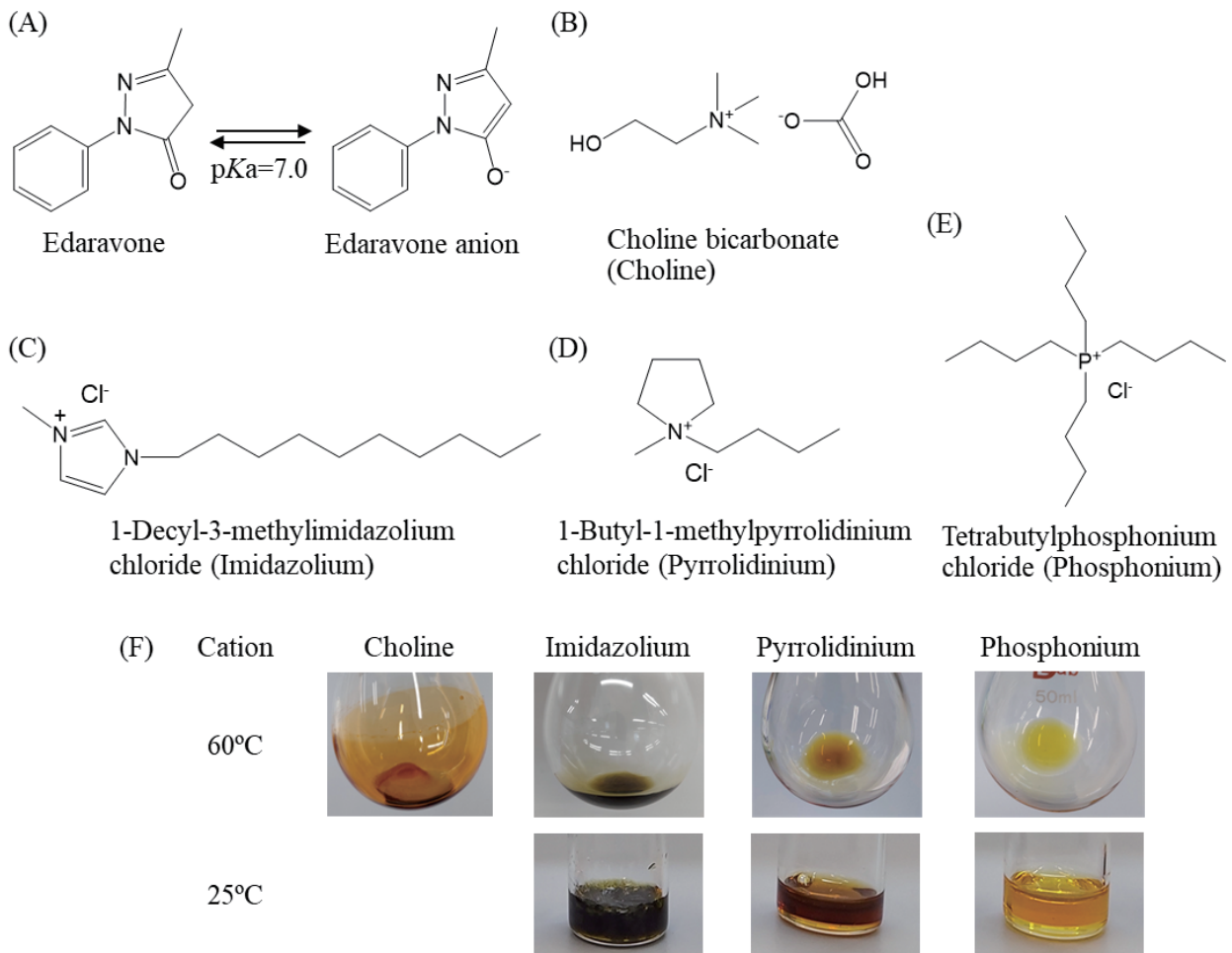


図1 エダラボンイオン液体の材料 (A-E) と 25°C および 60°C における各イオン液体の様子

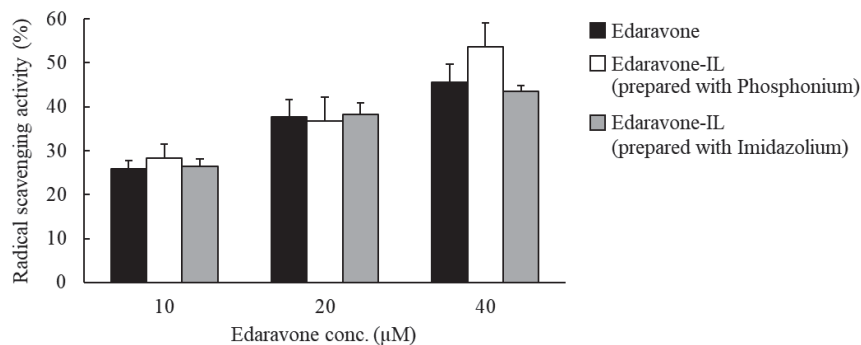


図2 DPPHラジカルアッセイによるエダラボンおよびエダラボンILの抗酸化活性評価

認められず、化粧品成分として広く使用されるPEG、およびシミ予防等により美容へ応用できる可能性を有する抗酸化剤としてエダラボンに着目し、研究を実施した。

PEGアミン骨格を有する化合物をカチオン分子としていくつか選定し、経皮DDSのILsとして多くの実績・報告のあるCAGEのアニオン成分であるゲラン酸と反応させることでILsの作製を行った。処方最適化の結果、室温で

液体のILsをいくつか見出すとともに、CAGEと同様に高い薬物溶解性を示すことが明らかとなった。さらに、モデル高分子として蛍光標識オリゴ核酸とPEG-ILをマウス皮膚へ塗布したところ、皮膚へ顕著な傷害を示すことなく核酸を皮内へ送達できている様子が観察された。高分子医薬である核酸の皮内送達が可能であったことから、多くの化粧品成分の経皮吸収促進剤として本PEG-ILが応用可能で

あることが期待される。一方で、本PEG-ILによる経皮吸収促進の詳細なメカニズムや、頻回投与時の安全性などが未だ明らかでないため、今後更なる検討が必要である。

抗酸化剤は、シミ予防やアンチエイジング効果を有することから、コスメトロジーの素材として注目されている。本研究では、高い抗酸化活性を有するエダラボンに着目し、いくつかのカチオンと反応させることで、薬物(API: Active Pharmaceutical Ingredient)自身をIL化させた「API-IL」の開発に成功した。さらに、エダラボンはIL化させた場合においても高い抗酸化活性を維持していることが*in vitro*、*in vivo*の検討から示された。このことから、皮膚に適用した場合においても高い抗酸化活性を発揮することが期待される。今後、メラニン保有ヘアレスマウスを用いたシミ予防に関する検討や、酸化ストレスが病態進行に関与するアトピー性皮膚炎や乾癬のモデル動物にエダラボンILを応用することで、皮膚の健康を維持するコスメトロジー素材としてエダラボンILが応用可能であるか明らかとしていきたい。

本検討により、皮膚への刺激性を示すことなく高い経皮吸収促進作用を示す新規ILの開発、および高い抗酸化作用を有するILを見出すことができた。今後、これらILsを皮膚へ適用した際の皮膚への影響や、安全性に関する知見を蓄積することで、コスメトロジー素材としての有用性を実証したいと考えている。

(引用文献)

- 1) Sun T., Dasgupta A., Zhao Z., Nurunnabi M., Mitragotri S. Physical triggering strategies for drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 158, 36-62 (2020).
- 2) Fukuta T., Oshima Y., Michiue K., Tanaka D., Kogure K. Non-invasive delivery of biological macromolecular drugs into the skin by iontophoresis and its application to psoriasis treatment. *J. Control. Release*, 323, 323-332 (2020).
- 3) Curreri AM., Mitragotri S., Tanner EEL. Recent advanced in ionic liquids in biomedicine. *Adv. Sci.*, 8, e2004819 (2021).
- 4) Banerjee A., Ibsen K., Iwao Y., Zakrewsky M., Mitragotri S. Transdermal protein delivery using choline and geranate (CAGE) deep eutectic solvent. *Adv. Healthc. Mater.*, 6, 1601411 (2017).
- 5) Hattori T., Tagawa H., Inai M., Kan T., Kimura S., Itai S., Mitragotri S., Iwao Y. Transdermal delivery of nobiletin using ionic liquids. *Sci. Rep.*, 9, 20191 (2019).
- 6) Minami A., Fujita Y., Goto J., Iuchi A., Fujita K., Mikami Y., Shiratori M., Ishii A., Mitragotri S., Iwao Y., Kanazawa H., Kurebayashi Y., Takahashi T., Otsubo T., Ikeda K., Suzuki T. Enhancement of elastin expression by transdermal administration of sialidase isozyme Neu2. *Sci. Rep.*, 11, 3302 (2021).
- 7) Uddin S., Islam MR., Moshikur RM., Wakabayashi R., Kamiya N., Moniruzzaman M., Goto M. Transdermal delivery of antigenic protein using ionic liquid-based nanocarriers for tumor immunotherapy. *ACS Appl. Bio. Mater.*, 5, 2586-2597 (2022).
- 8) Ibsen KN, Ma H., Banerjee A., Tanner EEL., Nangia S., Mitragotri S. Mechanism of antibacterial activity of choline-based ionic liquids (CAGE). *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4, 2370-2379 (2018).
- 9) Fukuta T., Ikeda-Imafuku M., Iwao Y. Development of edaravone ionic liquids and their application for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Mol. Pharm.*, 20, 3115-3126 (2023).
- 10) Yoneda S., Fukuta T., Ozono M., Kogure K. Enhancement of cerebroprotective effects of lipid nanoparticles encapsulating FK506 on cerebral ischemia/reperfusion injury by particle size regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 611, 53-59 (2022).
- 11) Shi Y., Zhao Z., Gao Y., Pan DC., Salinas AK., Tanner EEL., Guo J., Mitragotri S. Oral delivery of sorafenib through spontaneous formation of ionic liquid nanocomplexes. *J. Control. Release*, 322, 602-609 (2020).

角質層バリア形成および金属アレルギー発症における スプラバシンの機能解明

浜松医科大学皮膚科学講座

本田 哲也

Suprabasin (SBSN) is a secreted protein and a substrate for transglutaminase 2 and 3 activities. In the skin epidermis, SBSN is primarily expressed in the granular layer in both mice and humans. According to mouse studies, SBSN is suggested to play a role in the formation of the corneal barrier. Furthermore, *Sbsn*-deficient mice show increased allergic responses to nickel, indicating that SBSN plays protective roles in the establishment of metal allergy. However, the exact involvement and detailed mechanisms in humans remain largely unclear. To address these issues, we measured the amount of SBSN in the blood of nickel allergy patients. We also examined the involvement of SBSN in the skin corneal layer using a 3D-human skin equivalent model. The results indicate that SBSN concentration in the blood was significantly lower in nickel allergy patients than in non-nickel allergy patients. Knockdown of SBSN led to impaired corneal layer formation. Furthermore, SBSN knockdown keratinocytes showed increased IL-1beta production. These findings suggest that SBSN plays a physiological role in the formation of the skin corneal barrier and the development of nickel allergy.

1. 緒言

スプラバシンは、皮膚や上部消化管（口腔粘膜・食道）などの重層扁平上皮にて発現が認められる分泌タンパク質の一種である。皮膚では、顆粒層～角質層に主に発現が認められる（図1）。従来、その機能については、消化管領域の悪性腫瘍に関する解析が少数行われている程度で、皮膚での生理的機能はほとんど解明されていなかった。

我々の研究室では、アトピー性皮膚炎患者の皮膚角質層のプロテオーム解析から、スプラバシンがアトピー性皮膚炎病変部で有意に低下していることを世界に先駆けて発見した¹⁾（図2）。そして、アトピー性皮膚炎の中でも、金属アレルギーと関連の深い“内因性アトピー性皮膚炎”において、血中スプラバシン濃度が低く、血中ニッケル濃度が高いことを見出した^{2,3)}。これらの知見を元に、我々はスプラバシンノックアウトマウス（*Sbsn*^{-/-}マウス）を作成し、皮膚角質層バリア形成および金属（ニッケル）アレルギー発症におけるスプラバシンの機能解明を行った。*Sbsn*^{-/-}マウスでは、胎児期において角質層バリア機能低下が認められた。出生後は、顆粒層における顆粒の低形成、角質層の脆弱性が認められた。ニッケルに対する接触皮膚炎のマウスモデルを作成し、*Sbsn*^{-/-}マウスにて検討を行ったところ、*Sbsn*^{-/-}マウスは予想に反し野生型マウスに比して炎症反応が低下していた。ところが、経口ニッケル負荷状態では*Sbsn*^{-/-}マウスの血中ニッケル濃度は有意に高く、またニ

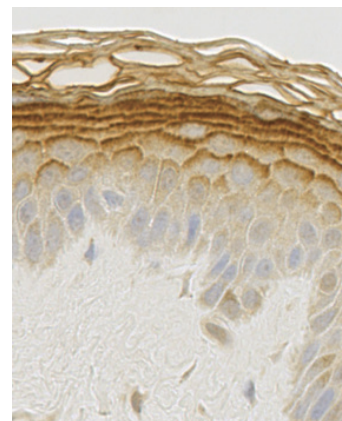


図1 皮膚スプラバシン

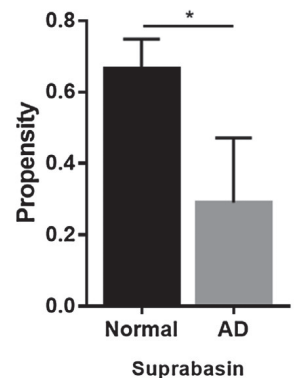


図2 皮膚でのスプラバシンの発現

ッケルへの免疫寛容が誘導されず、ニッケルに対する接触皮膚炎が増強されていた⁴⁾。以上の結果より、スプラバシンは皮膚角質層バリア形成および金属アレルギー病態制御に関わっている可能性が強く示唆された。しかしその詳細なメカニズム、人での妥当性は不明である。

以上の背景から、本研究では、「皮膚角質層バリア形成および金属アレルギー発症におけるスプラバシンの機能解明」を目的とした。化粧品を安全に使用する上で、皮膚角質層バリア形成機序、接触アレルギー反応発症機序理解は極めて重要な課題である。上述のようにスプラバシンは角質層バリア、接触アレルギーの両者の制御に深く関わっている可能性があり、スプラバシンの観点から解析を進めることで、角質層バリア形成とアレルギー病態を繋ぐ新たなメカニズム解明を目指す。

2. 方法

2. 1.

これまでの研究結果から、スプラバシンは金属アレルギーの中でも特にニッケルアレルギーとの関係が深い可能性



Functions of suprabasin in the formation of skin corneal barrier and development of metal allergy

Tetsuya Honda

Department of Dermatology, Hamamatsu University School of Medicine

が考えられた。その基礎データを取得するために、ニッケルアレルギー患者における血清スプラバシン濃度を定量し、ニッケルアレルギー、非アレルギー患者とで比較を行った。浜松医科大学皮膚科に通院中で金属アレルギー疑いのためパッチテストを施行した患者 31 名を対象とした。そのうち 10 名は特に明らかな皮膚症状を発症していなかったが、8 名は手湿疹、6 名は慢性湿疹、3 名が掌蹠膿疱症、2 名が扁平苔癬、1 名が環状紅斑、1 名が円形脱毛症を発症していた。内因性アトピー性皮膚炎患者は試験対象から除外した。パッチテストはパッチテストパネル（佐藤製薬株式会社）、5% nickel sulfate（鳥居薬品工業株式会社）を用いて施行した。パッチテストの判定は ICDRG 基準に基づき、貼付 3 日後、7 日後に行った。採血はパッチテスト前に施行し血清を採取し冷凍庫に保存した。血清スプラバシンの定量は、ELISA を用いて測定した（Cloud-Clone, SEH197Hu）以上の研究は浜松医科大学倫理委員会の承認のもと行われた（研究番号：20-138）。

2. 2.

後述のように、ニッケルアレルギー陽性の患者ではスプラバシンの血中濃度はニッケルアレルギー陰性（非金属アレルギー患者）患者より低値であることが判明した。この結果は、スプラバシンの発現が低いために皮膚や粘膜のバリア機能が低下し、ニッケル吸収が亢進している可能性を示唆する。それを検証するため、ニッケルアレルギー陽性、金属アレルギー陰性患者血清中のニッケル濃度を定量した（inductively coupled plasma mass spectrometry, Mitsubishi Chemical Analytech, Tokyo, Japan）。

2. 3.

皮膚角層バリア形成に関わるスプラバシンの機能を解析するため、ヒト 3 次元培養皮膚を用いてスプラバシンの shRNA によるノックダウンを行った。その後 3 次元培養皮膚の HE 染色、免疫組織学的解析と、皮膚バリア機能関連分子の RT-PCR 解析を行った。

2. 4.

金属アレルギーなど接触皮膚炎の反応にはインフラマソームの活性化が重要であることが報告されている。IL-1 beta はインフラマソーム活性化の代表的な指標である。

また、接触皮膚炎では種々の程度で IFN-gamma や IL-17A、IL-4/IL-13 などのサイトカインの関与が報告されている。そのため、ヒト培養表皮角化細胞を用いてスプラバシンのノックダウンを shRNA にて行い、ニッケル刺激、各種サイトカイン刺激による IL-1 beta 産生を ELISA で測定した。サイトカインは 50 μg/mL、ニッケルは 1.5 mM で 48 時間刺激した。

3. 結果

3. 1.

パッチテスト施行 31 名のうち、10 名がニッケルに陽性であった。1 名はコバルトに陽性、3 名がクロムに陽性、5 名が金に陽性であった。金属パッチテストに陰性の患者は 17 名であった。ニッケル陽性患者（10 名）と金属パッチテスト陰性患者（17 名）とで血清スプラバシン濃度を比較したところ、ニッケル陽性患者では金属パッチテスト陰性患者に比べ有意に低下していた⁵⁾ (P=0.032) (図 3)。両群において、性別、年齢、血清 IgE に有意差は認めなかった⁵⁾ (表 1)。

3. 2.

血中のニッケル濃度はニッケルアレルギー陽性患者のほうが、金属アレルギー陰性患者より低かった (図 4)。他の金属（クロム、コバルト、金）の血中濃度は両群で差を認めなかった。

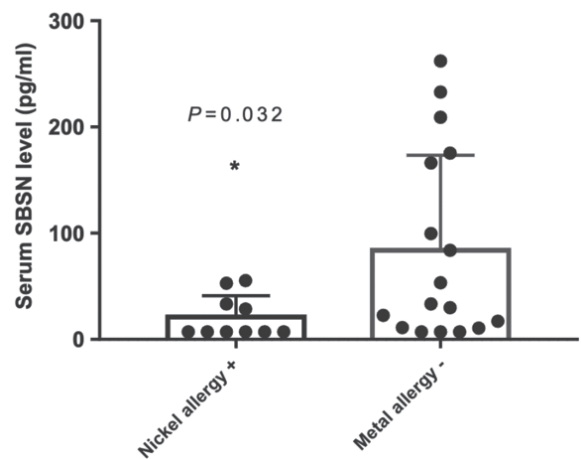


図 3 血中スプラバシン濃度

表 1 患者背景

	Patients	Sex(M/F)	Age (years, mean ± SD)	IgE (kU/L, mean ± SD)
Nickel allergy +	n=10	3/7	50.0 ± 14.4	159.5 ± 266.0 (n=6)
Metal allergy -	n=17	11/6	62.5 ± 21.3	369.2 ± 501.4 (n=11)
P value		0.12	0.07	0.42

3. 3.

スプラバシンのノックダウンにより、表皮全体の厚さ、角質層の厚さはコントロールに比べ低下した(図5A)。顆粒層も低下していた(図5B)。またフィラグリンやロリクリンなどの分化マーカーはスプラバシンノックダウンにより低下していた(図5C, D)。

3. 4.

IL-4/IL-13 刺激およびIL-17A 刺激下において、IL-1 beta 産生が誘導される傾向が認められた。さらに同条件

下において、スプラバシンのノックダウン群においてIL-1 beta 産生がより高くなる傾向が認められた。

4. 考 察

従来、内因性アトピー性皮膚炎患者は金属アレルギーを多く伴い、また血清スプラバシンが低下していることが報告されていたが、その低下がアトピー性皮膚炎に伴ったものなのか、金属アレルギーに伴ったものかどうかは明らかではなかった。今回の結果は、症例数は少ないものの、金属アレルギー自体が血清スプラバシン低下と関連している

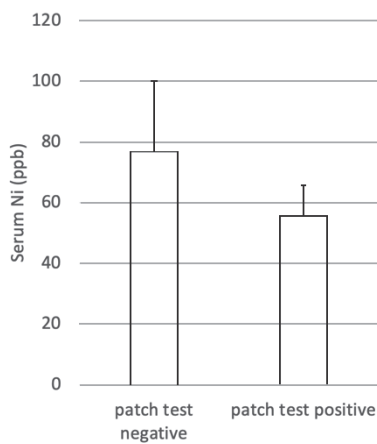


図4 血中ニッケル濃度

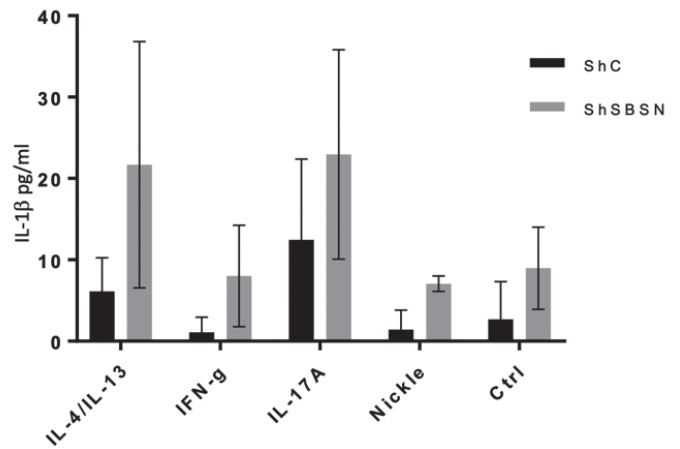


図6 培養表皮角化細胞からのIL-1 beta 産生

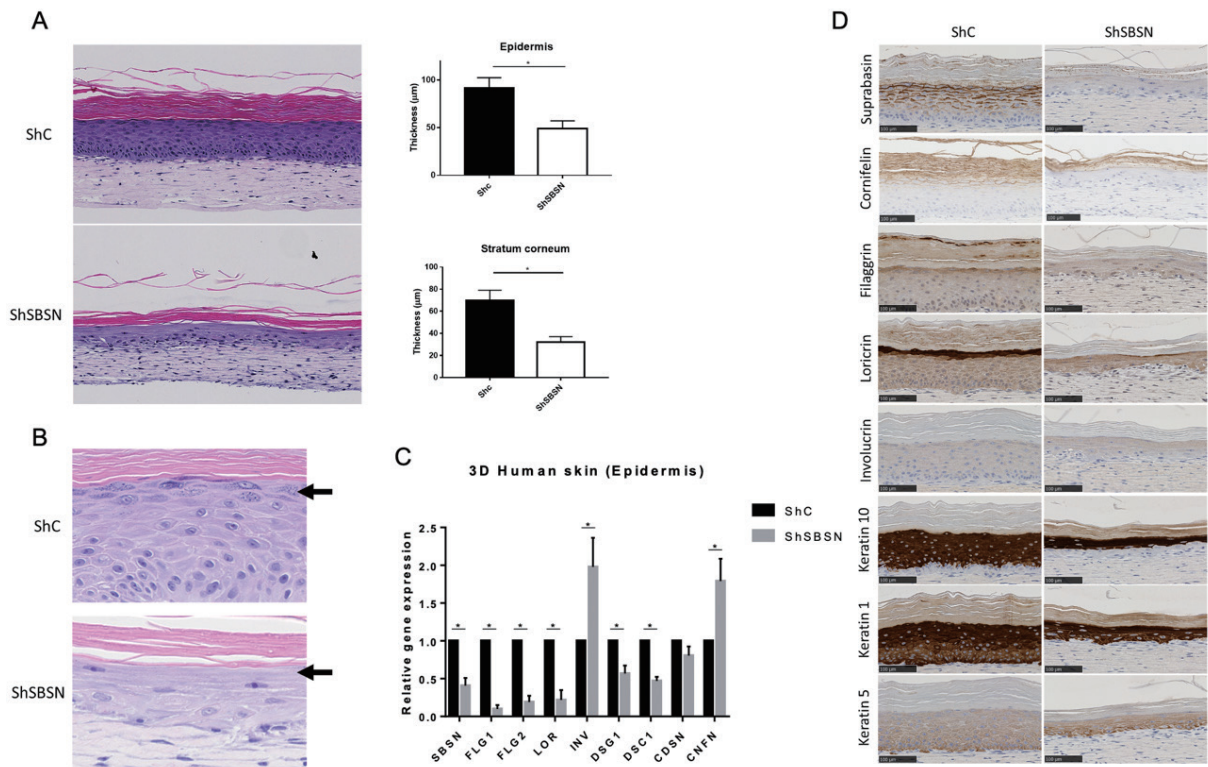


図5 (A) 三次元培養皮膚 HE 染色と表皮・角層厚定量 (B) HE 染色 (C) 各種分化マーカーのRT-PCRと(D) 免疫染色

ことを強く示唆するものと考えられた。この理由は現時点では明らかではないが、スプラバシンは皮膚や腸管で発現していることから、金属アレルギー患者では皮膚や腸管でのスプラバシン発現が低下しバリア機能が障害され、金属に感作されやすくなった可能性を考えた。

一方で、血中のニッケル濃度は予想に反し、ニッケルアレルギー陽性群で低下していた。この原因は不明であるが、今回測定したニッケル濃度は通常の10倍以上の値が検出されており、何らかの理由によりサンプルにニッケルがコンタミネーションしていた可能性を考えている。そのため現時点ではニッケル濃度について結論は出せず、今後の検討課題である。

角層バリア形成におけるスプラバシンの機能であるが、スプラバシンのノックダウンにより表皮の分化マーカーは著明に低下し、組織学的にも顆粒層の消失や角層の形成不全など、角層バリア形成不全が認められた。あくまで人工的な系であるが、スプラバシンが表皮の分化促進、角層バリア形成促進に関わっている可能性が示唆される。さらに、スプラバシンノックダウンにともない、IL-1betaの発現は高くなる傾向が認められた。スプラバシンが低下することでIL-1beta発現が亢進すれば、金属アレルギーによる感作、惹起反応が亢進することが予想される。ニッケルアレルギー患者では表皮のスプラバシンが低下し、結果としてニッケルへの感作や惹起反応が促進している可能性が示唆される。

5. 総括

血中スプラバシンの低下とニッケルアレルギー発症の関係が示唆された。また表皮におけるスプラバシンのノックダウンにより表皮角化細胞の分化、角層バリア形成が障害

され、またIL-1beta産生が亢進している結果からは、スプラバシンの生理的役割として、表皮角化細胞の分化促進、IL-1beta産生抑制を担っている可能性が示唆された。このメカニズムが破綻すると、ニッケルアレルギーが成立しやすくなる可能性がある。今後はさらにそれらの詳細な分子メカニズムを解析する必要があるが、表皮におけるスプラバシンの補充は角層バリア機能維持、金属アレルギー感作抑制につながる可能性が考えられた。

(Reference)

- 1) Sakabe, J. *et al.* Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 957-960. e958 (2014).
- 2) Aoshima, M. *et al.* Decreased expression of suprabasin induces aberrant differentiation and apoptosis of epidermal keratinocytes: Possible role for atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* **95**, 107-112 (2019).
- 3) Yamaguchi, H., Hirasawa, N., Asakawa, S., Okita, K. & Tokura, Y. Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration. *Allergol Int* **64**, 282-284 (2015).
- 4) Nakazawa, S. *et al.* Suprabasin-null mice retain skin barrier function and show high contact hypersensitivity to nickel upon oral nickel loading. *Sci Rep* **10**, 14559 (2020).
- 5) Nakazawa, S. *et al.* Decreased serum level of suprabasin in patients with nickel allergy. *J Dermatol* **49**, e189-e190 (2022).

皮膚角化細胞の老化を防ぐ脂質分子種の網羅的探索とその分子機構

慶應義塾大学薬学部

前川 大志

Skin is exposed to a variety of DNA damage-inducible stimulations such as chemicals and ultraviolet rays. The accumulation of DNA damages causes cell senescence of keratinocytes, which causes solar keratosis and melanoma. Those diseases not only threaten the life of patients itself but also decrease the quality of life of the patients. Thus, it is important to uncover molecular mechanisms and signatures of keratinocyte senescence. We have previously found that knockdown of SPOP, a substrate recognition receptor for cullin-3 (CUL3) ubiquitin ligase, in non-cancerous human keratinocyte-derived HaCaT cells exhibited cell senescence phenotypes (e.g. upregulation of p21 mRNA) as well as dysregulation of intracellular cholesterol distributions. These results suggest the relationships between cell senescence and lipid metabolisms controlled by the CUL3/SPOP ubiquitin ligase. In this study, we aim to characterize SPOP-knockdown HaCaT cells from the standpoint of cell cycle and to measure lipid molecular species in SPOP-knockdown HaCaT cells using untargeted lipidomics by the combination of LC-MS/MS9030 and MS-DIAL 4. We showed that SPOP knockdown drastically inhibited the translation of CDC6 and CDT1, which is essential for DNA replication licensing, leading to the upregulation of p21 mRNA and G1/S arrest (Sanada, [Maekawa](#) et al., BBRC. 2023). Our untargeted lipidomics revealed that neutral lipids were decreased in SPOP-knockdown HaCaT cells. Our results suggest a decrease of neutral lipids as a lipid signature of G1/S arrest HaCaT cells that mimic keratinocyte senescence.

1. 緒言

皮膚は我々の内部と外界を隔てる一番外側に存在する組織であり、人体最大の組織とも言える。日常生活において、衣類で覆われていない皮膚の領域は恒常的に外界からの多様な刺激に晒されており、化学物質や紫外線などは皮膚組織、特にケラチノサイトのDNA損傷を引き起こす。このDNA損傷の蓄積はケラチノサイトの加齢依存的な細胞老化に繋がり、日光角化症などの原因となる。日光角化症は皮膚癌の発症誘発だけでなく、シミやシワの主因となり、患者の容姿への影響（生活の質の低下）が大きく懸念される。従って、ケラチノサイトの細胞老化の分子機構やその分子マーカーを同定することができれば、当該分子基盤に対する介入方法の開発に繋がり、将来的には皮膚の老化進行抑制剤の開発に資する。即ち、皮膚癌などの疾患予防、容姿維持に伴う生活の質の向上のために、老化進行抑制剤の開発標的となるケラチノサイトの細胞老化の新しい分子機構の導出が必要である。

Cullin-3 (CUL3) ユビキチンリガーゼは、基質認識受容体を介して標的基質タンパク質をユビキチン化するE3複合体である。CUL3 ユビキチンリガーゼの基質認識受容体はBTB domainを有しており、ヒトには183種類のBTB

domain containing protein (BTBP) 遺伝子がアノテーションされている¹⁾。各BTBPが異なる基質タンパク質と結合し、その後には修飾されるユビキチン鎖のパターン（ユビキチンコード）やユビキチン化基質タンパク質の運命（分解や新規機能付加）も多様であることから、CUL3/BTBPの軸は極めて多岐にわたる生理機能を発揮できる。我々は今までに、幾つかのBTBPに関して、機能的な基質タンパク質を同定し、それぞれの軸の血管内皮細胞、各種癌細胞における機能を解明してきた（図1）。

SPOP (speckle-type POZ protein) は、BTBPの一つであり前立腺癌や子宮体癌などにおいて基質結合領域に非常に多くのアミノ酸変異が同定されている極めて重要な癌関連タンパク質であり、その腫瘍増殖における機能解析が進んでいる²⁾。一方で、ケラチノサイトに代表される癌化していない細胞における機能は殆ど不明なままである。我々は今までに、SPOPをヒト不死化ケラチノサイトHaCaT cellsにおいて発現抑制すると細胞増殖が著しく阻害され、p21のmRNAレベルが増加することを明らかにしている。この表現型は細胞老化の表現型に酷似しており、SPOP発現抑制HaCaT cellsが老化したケラチノサイトをミミックしていると示唆される。また興味深いことに、SPOP発現抑制HaCaT cellsにおける細胞内生体膜コレステロール局在をD4Hプローブ³⁾により観察した結果、その局在や蛍光強度の減少を見出した（前川、未発表）。D4Hの生体膜コレステロールへの結合性はコレステロールの量だけでなく、周辺の脂質環境により影響を受ける⁴⁾。即ち、SPOP発現抑制HaCaT cellsではコレステロールに加え、リン脂質や中性脂質などの脂質代謝全体が変動している可能性が強く示唆される。以上より、SPOPを介入点とすることで、



Comprehensive screen of lipid species that prevent keratinocyte cell senescence

Masashi Maekawa

Department of Pharmacy, Keio University

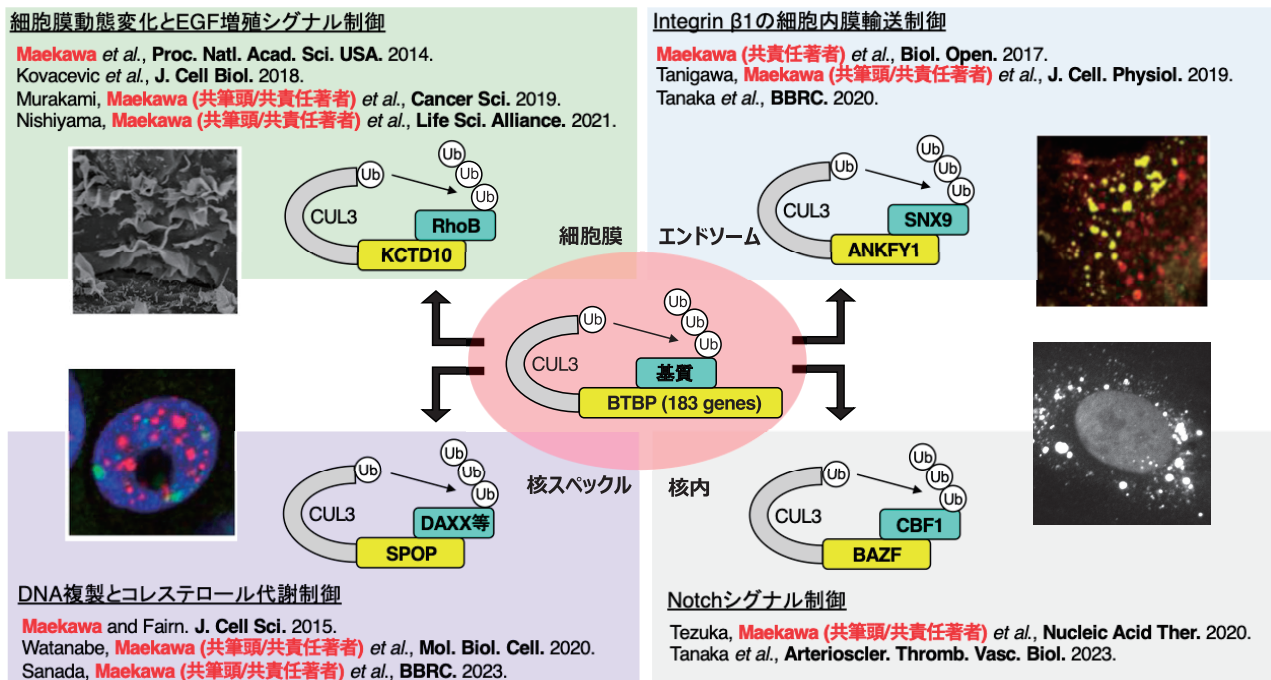


図1 我々が明らかにしてきたCUL3/BTBP/基質タンパク質軸の多様な生理機能

細胞老化と脂質代謝変動の因果関係を探ることができると着想した。そこで本研究では、1) SPOP発現抑制HaCaT cellsの性状をcell cycleの観点から解き明かし、2) SPOP発現抑制HaCaT cellsの脂質代謝変動をノンターゲットリピドミクスによりノンバイアスに捉えることを目的とした。

2. 方法

2.1. SPOP発現抑制HaCaT cellsの性状解析

SPOPに対し、配列の異なる2種類のsiRNAをRNAimaxにより、HaCaT cellsにそれぞれトランスフェクションし、72時間後に細胞を定量PCR、ウェスタンブロット法に供し、細胞周期やDNA複製に関与する遺伝子やタンパク質の量を検討した。DNA合成能については、チミジンアナログ (Edu) の取り込みにより評価した。Cdt1とCdc6の翻訳活性については、シクロヘキシミド (CHX) のpulse-chase実験とL-homopropargylglycine (HPG) のクリックケミストリーにより解析した。

2.2. ノンターゲットリピドミクス

SPOPおよび、CDC6、CDT1の下流で代謝制御を受ける脂質分子種を網羅的に捉えるためLC/Q-TOFMS (Shimadzu LC-MS030) を用いたノンターゲットリピドミクスを行った。具体的には、配列の異なる2種類のSPOP、CDC6、CDT1に対するsiRNAをRNAimaxにより、HaCaT cellsにそれぞれトランスフェクションし、72時間後に細胞を一層抽出後、ノンターゲットリピドミクスに供した⁵⁾。データ解析はMS-DIAL 4 softwareを用いた⁵⁾。

3. 結果

3.1. SPOPはHaCaT cellsにおいてDNA複製ライセンス因子CDC6とCDT1の翻訳を正に制御する

SPOPを発現抑制したHaCaT cellsの性状の解析を進めた結果、p21のmRNAレベルの増加に加えて (図2A)、Eduの新規合成されたDNAへの取り込みが著しく阻害されることが分かった (図2B)。これらの結果はSPOPの発現抑制により、p21が転写レベルで発現上昇し、G1/S arrestが生じている可能性を強く示唆するものである。次にこの分子機構を調べるため、DNA合成の初期段階に関与するDNA複製ライセンス因子CDC6、CDT1と、DNA2本鎖をほどこき、DNA polymeraseとDNAとの結合を可能にするMCM complex (MCM2-7) の発現をウェスタンブロット法により調べた。その結果、CDC6とCDT1のタンパク質がSPOPの発現抑制により顕著に減少し、MCM complexのタンパク質発現には影響は見られなかった (図2C)。これら分子群のmRNAレベルを調べた結果、SPOPの発現抑制により有意に減少する遺伝子は存在しなかった。また、CDC6やCDT1の発現抑制によっても、p21のmRNA発現の増加が認められた。以上の結果から、SPOP発現抑制HaCaT cellsでは、DNA複製ライセンス因子CDC6、CDT1の翻訳が阻害されることで、p21の発現が上昇し、G1/S arrestが生じ、細胞老化に似た表現型を示していることが示唆された。更に、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドを一定時間処理した後、wash

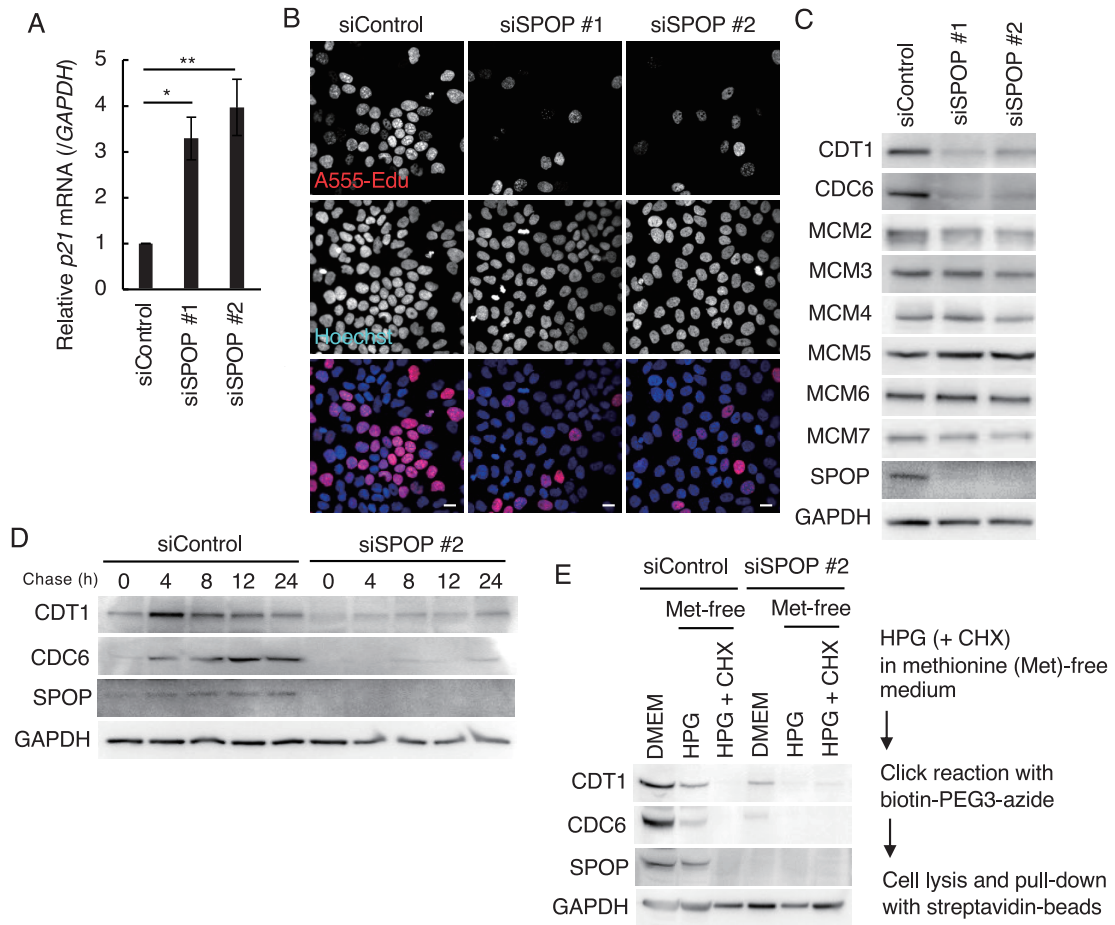


図2 SPOPの発現抑制により、p21 mRNAレベルの上昇(A)、DNA新輝合成の抑制(B)、CDT1とCDC6のタンパク質レベルの減少(C)、翻訳阻害(D、E)が認められる。細胞は全てHaCaT cells。Figures were reproduced from Sanada *et al.*, BBRC. 2023.

outして、その後のタンパク質の新規合成を調べた結果、SPOPの発現抑制によりCDC6とCDT1のタンパク質新規合成が著しく阻害された(図2D)。同様の結果は、クリックケミストリーが可能なアミノ酸アナログHPGでも得られた(図2E)。以上より、SPOPはHaCaT cellsにおいて、DNA複製ライセンス因子であるCDC6とCDT1の翻訳を正に制御していることが明らかになった⁶⁾。

3. 2. SPOP発現抑制HaCaT cellsでは中性脂質が減少する

G1/S arrestを起こし細胞老化に似た表現型を示すSPOP発現抑制HaCaT cellsをノンターゲットリポドミクスに供した結果、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルイノシトール(PI)に代表される主要リン脂質の量に大きな変化は見られなかった。一方で興味深いことに、SPOP発現抑制により、中性脂質の量が減少していた。SPOP発現抑制時と同様に、G1/S arrestを誘導するCDC6、CDT1の発現抑制の際にも同様の脂質変

動を確認した。以上より、G1/S arrestを伴う細胞老化において、細胞内では中性脂質の量が減少することが示唆された(大谷, 前川, 未発表)。中性脂質の生合成関連遺伝子のmRNAレベルには顕著な上昇が見られていなかったことから、中性脂質の分解が亢進していると考えられた。

4. 考察

SPOPは前立腺癌や子宮体癌の患者において、高い頻度でアミノ酸変異が見つかってきたことから、癌細胞における機能解析を中心に展開されてきた。本研究では野生型SPOPを発現する非癌細胞であるHaCaT cellsにおいて、SPOPのDNA複製ライセンス因子の翻訳制御因子としての機能を初めて明らかにした⁶⁾。興味深いことに、CDC6、CDT1のmRNAの5'-UTR領域は非常に短く、且つG/C richな領域を有する。これらの配列を認識する特異的な翻訳関連タンパク質がSPOPの標的ユビキチン化基質タンパク質である可能性が考えられる。今後、SPOP結合タンパク質の網羅的解析を進めることで、当該ユビキチン化基質タンパク質の同定が期待される。

SPOPを発現抑制し、細胞老化をミミックしたHaCaT cellsの脂質代謝解析より、G1/S arrestにより中性脂質の減少を見出した。また、遺伝子発現変動から中性脂質の分解が進んでいる可能性が示唆された。SPOPなどを発現抑制しない状態で、強制的に中性脂質の分解を誘導(リパーゼの強制発現など)することで、G1/S arrestや細胞老化の表現型が促進するか検証することで、当該脂質代謝と細胞老化の因果関係に迫ることが可能である。中性脂質が細胞老化を防ぐ分子である可能性を今後、更に詳細に検討することが必要である。細胞周期が進むプロセスにおいて、各チェックポイントが存在するが、その基準の一つに細胞内脂質の質と量があり、細胞内脂質変動が細胞周期の状態や細胞老化を評価できる新たなシグナチュアとなる可能性を秘めている。

5. 総括

本研究により、ケラチノサイトの細胞老化をミミックしたG1/S arrest HaCaT cellsの脂質シグナチュアとして中性脂質の減少を明らかにした。今後は、SPOPの下流でユビキチン化を受け、中性脂質の代謝を担う責任基質タンパク質を同定する必要がある。更に当該基質タンパク質に介入した際の細胞老化への影響を調べる必要もある。HaCaT cellsは不死化された細胞であるので、今後はより生理的な細胞老化と脂質代謝の関連を調べる。具体的には、初代培養系ケラチノサイトを継代老化させて、時間依存的な老化に伴う脂質代謝をノンターゲット解析によって調べ、本研究で得られた脂質代謝変動と比較し、細胞老化と密接に関連する脂質代謝を同定する。近年、高度不飽和脂肪酸が酸化されたオキシリピンの一種に細胞老化を促進させる機能が報告されている^{7,8)}。今後、細胞老化に伴い変動する脂質代謝変動の全貌をノンターゲットリピドミクスにより高深度で計測し、明らかにし、当該経路に介入すること

で細胞老化を自在に制御することが期待される。

本研究は愛媛大学プロテオサイエンスセンター・細胞増殖腫瘍制御部門・東山繁樹先生の研究室に在籍していた際に開始した研究です。暖かくも厳しくご指導いただきました同部門の東山繁樹先生、実験サポートをしてくださった長生真未先生、SPOP発現抑制HaCaT cellsの性状解析を共に進めてくれた愛媛大学医学部附属病院 形成外科 眞田紗代子先生、中岡啓喜先生、愛媛大学医学部附属病院皮膚科 佐山浩二先生、藤澤康弘先生に感謝申し上げます。また、ノンターゲットリピドミクス解析は現所属の慶應義塾大学薬学部 有田誠先生の研究室で進めたものです。ご指導とご支援をいただきました有田誠先生、実際に実験を進めてくれた大谷航平君、MS-DIAL4の解析をご指導頂きました東京農工大学 津川裕司先生、理化学研究所 内野春希先生に御礼申し上げます。最後に本研究の推進において多大な援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Petroski and Deshaies., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 9-20 (2005).
- 2) Zhang et al., *Cancer Res.* 83 (4), 489-499 (2023).
- 3) Maekawa and Fairn., *J. Cell Sci.* 128 (7), 1422-1433 (2015).
- 4) Ercan et al., *EMBO J.* 40 (6), e106524 (2021).
- 5) Tsugawa et al., *Nat. Biotechnol.* 38 (19), 1159-1163 (2020).
- 6) Sanada et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 651, 30-38 (2023).
- 7) Wiley et al., *Cell Metab.* 33 (6), 1124-1136 (2021).
- 8) Liu et al., *Cell Metab.* 35 (4), 667-684 (2023).

転写因子 Nrf3 を標的としたシミ予防研究への HIV-1 プロテアーゼ阻害剤リポジショニング

同志社大学生命医科学部医生命システム学科遺伝情報研究室

和久 剛

Melanin is a pigment produced from the amino acid L-Tyrosine in melanosomes. The CNC-family transcription factor Nrf3 is expressed in the basal layer of the epidermis, where melanocytes reside. Our previous *in vitro* study using mouse melanoma B16F10 and human normal melanocytes showed that Nrf3 promotes melanogenesis by upregulating the core melanogenic gene circuit, which includes Mitf, Tyr, Tyrp1, Pmel, and Oca2. Nrf3 also induces the gene expression of several autophagosome-related factors for melanin precursor uptake by macropinocytosis, an evolutionarily-conserved fluid-phase form of endocytosis. In parallel, Nrf3 prompts autophagic degradation of melanosome for melanocyte survival. Furthermore, Nrf3-mediated melanin production is suppressed by an HIV-1 protease inhibitor nelfinavir (NFV). Here, we investigated the anti-melanogenic effect of NFV by histological and gene expression analyses using a mouse model of UV-induced hyperpigmentation. In this model, C57BL/6 mice were exposed to 130 mJ/cm² UV once every two days for 2 weeks. For the next 2 weeks of UV treatment, 10 μM NFV was topically applied to the right ear (UV+NFV), while the left ear received either vehicle oil (UV). Then, mouse ear specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin. Bright-field microscopy images of none stained paraffin section were used for melanin quantification. We found that NFV treatment attenuates UV-induced melanin accumulation. Furthermore, we confirmed that NFV treatment suppressed the UV-induced gene expression of core melanogenic and autophagosome-related factors, including Mitf, Tyr, and Cln3. These results indicate the anti-melanogenic potential of NFV *in vivo*.

1. 緒言

皮膚は、紫外線 (UV) 照射、環境汚染、乾燥など、様々な有害刺激に対する物理的バリアとして機能している^{1, 2)}。特に、過度の紫外線照射はDNA損傷や遺伝子変異を引き起こし、皮膚がんの発生につながる。そこで、皮膚は表皮の基底細胞層にあるメラノサイトで作られる天然色素のメラニンを使って、過剰な紫外線から身を守っている³⁾。

メラニン生成は、遺伝子発現、酵素反応、膜輸送を含むメラニン生成カスケードとして知られている³⁾。メラニン生成カスケードは、メラノサイト内においてメラニン生成の内因性誘導物質として機能する α -メラノサイト刺激ホルモン (α MSH) に応答して、Gタンパク質共役型受容体であるメラノコルチン1受容体 (MC1R) が活性化することによって始まる⁴⁾。そして、活性化されたMC1Rはアデニル酸シクラーゼに細胞内の環状アデノシンリン酸 (cAMP) の増加を促し、cAMPシグナル伝達経路を介してメラノサイト誘導転写因子 (Mitf) の遺伝子発現を誘導する。Mitfタンパク質は、チロシナーゼ (Tyr) やチロシナーゼ関連タンパク質1 (Tyrp1) などのメラニン生合成酵素チロシナーゼファミリーや、メラノサイトタンパク質

Pmel 17 (Pmel) などのメラノサイト構造マトリックスタンパク質の遺伝子発現などメラニン生成のマスター転写因子として機能する⁵⁾。Mitfは、Mitf-A、Mitf-C、Mitf-H、Mitf-Mの少なくとも4つのアイソフォームから構成されている。Mitf-Mはメラノサイトにのみ発現し、このアイソフォームを欠くマウスは表皮と毛包にメラノサイトがないことが知られている⁶⁾。

メラノソームの形成は多段階にわたる。まず、Pmelタンパク質は、初期エンドソームと呼ばれる色素を含まないステージIおよびIIのメラノソームでフィブリル構造を形成する。その後、TyrとTyrp1タンパク質がトランスゴルジからエンドソーム膜に選別され、メラニン生成が開始される。このメラニン生成は、ステージIIIおよびIVのメラノソームのPmelフィブリルに豊富に存在している。これらの知見は、多くのメラニン生成成分がエンドソーム起源であることを示唆している⁷⁻⁹⁾。Tyrタンパク質はメラニン合成の律速酵素であり、アミノ酸L-チロシン (L-Tyr) からL-DOPA、さらにメラノソームへの仕分け後にL-ドーパキンを触媒する¹⁰⁾。さらに、陰イオン輸送体タンパク質と考えられている眼皮アルビニズム2型 (Oca2、別名P for pink-eyed dilute) は、メラノソームのpHを調節してメラニンを生成するのに必須である^{11, 12)}。

NRF3はCNC-bZipファミリーに属する転写因子の一つとして同定され、そのホモログにはNRF1およびNRF2が存在する¹³⁾。通常、NRF3は小胞体膜に繫留されており、ERADユビキチン結合酵素HRD1によるユビキチン・プロテアソーム系によって分解されている¹⁴⁾。しかしアミノ酸欠乏などのストレスに応答して、NRF3はアスパ



Drug Repositioning of a HIV-1 Protease Inhibitor as an anti-melanogenic reagent targeting Nrf3

Tsuyoshi Waku

Laboratory for Genetic Code, Department of Medical Life Systems, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University

ルチルプロテアーゼ DNA-damage-inducible 1 homolog 2 (DDI2) によって切断される¹⁵⁾。次に、切断された Nrf3 タンパク質は核内に移行し、小 MAF (sMAF) タンパク質とヘテロ二量体を形成する。その後、NRF3-sMAF 複合体はゲノム DNA 中の抗酸化応答配列に結合し、下流の遺伝子の発現を誘導する¹³⁾。また我々は、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤が DDI2 の酵素活性を阻害する、すなわち NRF3 の阻害剤として機能する可能性を見出している¹⁶⁾。

興味深いことに、マウスではケラチノサイトやメラノサイトが存在する表皮基底層で Nrf3 が高いレベルで発現し、さらにケラチノサイトにおける Nrf3 の紫外線誘発アポトーシス効果を報告があった¹⁷⁾。近年、我々はマウスメラノーマやヒトメラノサイトを用いた *in vitro* 解析から、Nrf3 が Mitf や Tyr, Tyrp1, Oca2 といった既知のメラニン産生遺伝子の発現を誘導することでメラニン産生を促進していることを見出した。また興味深いことに、Nrf3 は複数のオートファジー因子 (Cln3, Ulk2, Gabarapl2) も同時に発現誘導し、メラニン前駆体の細胞内取り込みやメラノーマ細胞の生存に寄与していることも明らかにしている¹⁸⁾。そこで本研究では、この Nrf3-メラニン産生経路を標的とした新たなシミ予防の可能性を検討するため、Nrf3 阻害効果を期待できる HIV プロテアーゼ阻害剤ネルフィナビル (NFV) のメラニン産生抑制効果を *in vivo* で検証した。

2. 方法

UV 照射マウスモデル作製と薬剤処理

先行研究を参考に実施した¹⁹⁻²¹⁾。4 週齢の C57BL/6N CrSlc マウス (清水実験材料) に、130mJ/cm² の強度で 2 日に 1 回 UV を照射した。UV 照射には、Handy UV Lamp (アズワン 254nm suv-4) を用いた。14 日以降は UV 照射直前に、10μM NFV を右耳介に塗布し、左耳介には溶媒のみを塗布した。溶媒には、1% プロピレングリコール:エタノール (5:3) 混合溶液を用いた。NFV 塗布して 14 日後に耳介を回収した。またコントロールとして、UV 照射しない同系同週齢マウスの耳介を用いた。

パラフィン切片作製とメラニン定量

耳介組織を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako) に浸漬し、4℃ で 24 時間固定した。固定後の耳

介組織はエタノール/キシレンで置換し、その後パラフィンブロック中に耳介組織を包埋した。マイクロームを用いて 6μm に薄切し、組織切片を作製した。組織中のメラニンとして、未染色の明視野像に観察される黒色領域を ImageJ で定量した。

定量的リアルタイム PCR

Isogen II (ナカライテスク) を用いて、未固定の耳介組織から Total RNA を精製した。次に M-MLV RTase (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した後に、TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa) を用いてリアルタイム PCR を行った。各遺伝子の mRNA 量は ΔΔCt 法で数値化した後、β-actin mRNA 量で標準化した。使用したプライマー配列は表 1 に示す。

3. 結果

NFV は UV 照射マウス耳介組織におけるメラニン蓄積を減弱できる

Nrf3 は通常、小胞体にアンカーされており、タンパク質切断を受けることで活性化する転写因子である。この Nrf3 のタンパク質切断を担う酵素がアスパルチルプロテアーゼ DDI2 である。X 線結晶構造解析から、DDI2 は HIV-1 プロテアーゼと類似した酵素活性ドメインを有していることが明らかになっている¹⁹⁾。HIV-1 プロテアーゼは、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の発症原因となるヒト免疫不全ウイルス (HIV) が持つプロテアーゼである。そのため、これまでに様々な HIV-1 プロテアーゼ阻害剤が開発され、AIDS 治療薬として臨床利用されてきた。我々は先行研究において、Nrf3 によるメラニン産生の促進が、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤の 1 つであるネルフィナビル (NFV) によって減弱することを、マウスメラノーマ細胞 B16F10 を用いた *in vitro* 解析から見出している。しかし NFV が *in vivo* においても同様のメラニン産生抑制効果を有するのことは未だ不明であったため、本研究では UV 照射マウスモデルを用いて検証した。まず C57BL/6N CrSlc マウス (4 週齢) に、130mJ/cm² の強度で 2 日に 1 回 14 日間 UV を照射した。その後は、UV 照射直前に 10μM NFV を右耳介に塗布し、左耳介には溶媒のみを塗布した。NFV 塗布して 14 日後に耳介を回収した。またコントロールと

表 1 リアルタイム PCR プライマー配列

Target gene	Forward primer	Reverse primer
mouse β-actin	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAG
mouse Mitf	AGCGTGTATTTTCCCCACAGAG	AGCTCCTTAATGCGGTCGTTTA
mouse Tyr	ATCGGCCAACGATCCCATT	TAGGTGCATTGGCTTCTGGG
mouse Cln3	AACCAGAGCCATGTGGAACC	GCGCCAGGAGTTTGATGACA

して、UV 照射しない同系同週齢マウスの耳介を用いた。これらの耳介組織をパラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィンブロックを作成し、マイクロトームを用いて 6µm の組織切片を作製した。次いで組織中のメラニンとして、未染色の明視野像に観察される黒色領域を定量比較した (図 1A)。その結果、耳介組織中のメラニンは UV 照射によって増加した (図 1B, Ctrl vs. Vehicle)。しかし、このメラニン増加は NFV 塗布によって減弱した (図 1B, Vehicle vs. NFV)。この結果は、NFV は UV 照射によるメラニン蓄積を抑制できることを示している。

NFV は耳介組織でも Nrf3-メラニン産生経路に関与する遺伝子発現を抑制する

上述したマウス耳介の組織学的解析から、NFV が UV 照射によって誘導されるメラニン産生を減弱できることを見出した。そこで次に、NFV が Nrf3-メラニン産生経路を阻害できているのかを検討した。マウスメラノーマ細胞やヒトメラノサイト細胞を用いた先行研究から、Nrf3 は Mitf や Tyr のメラニン産生遺伝子に加え、オートファジー関連因子である Cln3 も発現誘導していることを見出し

ていた¹⁸⁾。そこで UV 照射マウス耳介において、これら 3 つの遺伝子 (Mitf, Tyr, Cln3) の発現が NFV 塗布によって変動するのか検討した。まず上述と同様にマウス耳介組織を回収し、表 1 に示すプライマーを用いて定量的リアルタイム PCR を行った (図 2)。その結果、Mitf, Tyr, Cln3 の 3 遺伝子すべての mRNA 量が UV 照射で増加し (Ctrl vs. Vehicle)、さらに NFV によって減少することを明らかにした (Vehicle vs. NFV)。この結果は、NFV が Nrf3 を阻害してメラニン産生を抑制していることを示唆している。

4. 考 察

本研究は、Nrf3 抑制効果のある HIV-1 プロテアーゼ阻害剤のシミ予防研究へのリポジショニングを目的としている。UV 照射モデルを用いた組織学的解析の結果、NFV は皮膚にダメージを及ぼすことなく UV 照射によるメラニン蓄積を抑制できることを明らかにした。また遺伝子発現解析の結果、NFV は Nrf3 を阻害してメラニン産生を抑制している可能性を見出した。しかし今回行った遺伝子発現解析では、耳介組織を全て用いているため、メラノサイトとケラチノサイトは区別できない。さらにマウス個体への NFV

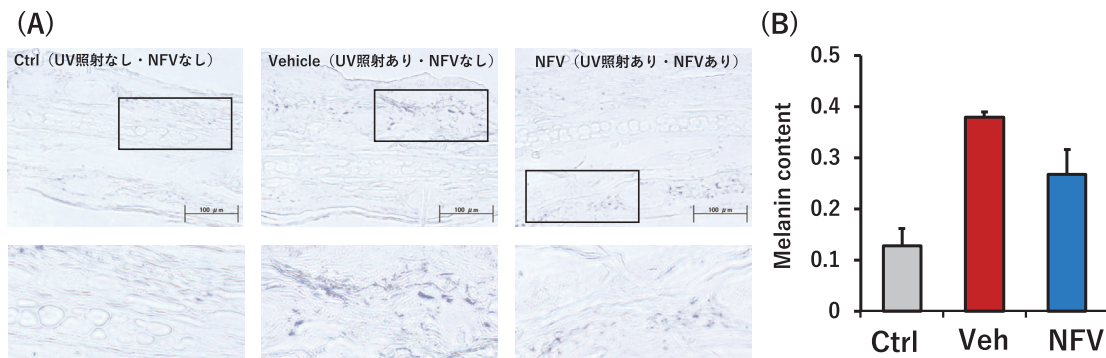


図 1 UV 照射マウス耳介組織のメラニン量に NFV 塗布が及ぼす影響

- (A) 各マウス耳介組織の代表的な明視野像。四角で囲った領域の拡大像を下段に表示した。
(Ctrl: コントロール、Vehicle: 溶媒のみ、NFV: 10µM NFV 塗布)
(B) 各マウス耳介組織のメラニン定量 (n=3, mean ± SD)

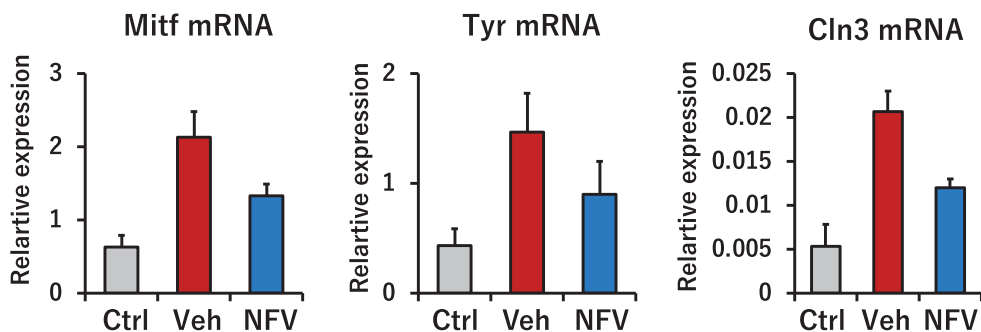


図 2 UV 照射マウス耳介組織における遺伝子発現解析 (n=3, mean ± SD)
(Ctrl: コントロール、Veh: Vehicle/溶媒のみ、NFV: 10µM NFV 塗布)

塗布が、実際にメラノサイト内のNrf3タンパク質切断を阻害できているのか確認できていない。そこで今後は、マウス耳介からメラノサイトを単離して解析する必要がある。またNFVが耳介の皮膚構造に及ぼす影響や、NFV以外のHIV-1プロテアーゼ阻害剤も検討する必要がある。

美意識の変化から女性のみならず男性も皮膚の健康、特に美白需要が高まってきている。現在、これらのメラニン産生経路を標的に、効率的にメラニン蓄積を予防・改善できる方法が求められている。シミ（色素斑）の原因は日光性と加齢性に大別される。日光性色素斑は日焼けに代表されるもので、強い紫外線を含む日光を長時間浴びることが引き金となる。また加齢性色素斑は、わずかな紫外線でもメラニンが過剰に作られやすくなることや（紫外線感受性の増加）、メラニンを含む皮膚細胞が垢となって剥がれ落ちることなく長期間皮膚に留まり続けること（皮膚細胞のターンオーバー低下）が原因であると考えられている。現在、日光性色素斑の予防を目的とした数多くの日焼け止め製品が市販されており、その主成分は、紫外線が皮膚に入り込むのを防止する紫外線吸収剤と紫外線散乱剤である。一方の加齢性色素斑の予防には、トラネキサム酸などで紫外線感受性を低下させることが有効である。またビタミンC誘導体やコウジ酸のように、Tyrの酵素活性やメラノソーム形成を低下させることで、メラニンの産生や蓄積を抑制することも美白効果が認められている。このような紫外線の入り込み防止や感受性低下、酪氨酸酵素やメラノソームの阻害を目的とした既存製品とは異なり、本研究で着目したHIV-1プロテアーゼ阻害剤はNrf3活性を阻害することでメラニン産生を包括的に抑制できる可能性がある。またHIV-1プロテアーゼ阻害剤と既存製品の併用は、紫外線を防止しつつ多層的にメラニン産生を抑制し日焼けや加齢に伴うシミの原因となるメラニン蓄積を強力に阻害できる、より有効なシミ予防・美白製品の開発につながると期待できる。

(引用文献)

- 1) Ovaere, P. *et al.* The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in Biochemical Sciences* **34**, 453-463 (2009)
- 2) Hsu, Y. C., Li, L. & Fuchs, E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature Medicine* **20**, 847-856 (2014)
- 3) D'Mello, S. A. N. *et al.* Signaling pathways in melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1144 (2016)
- 4) Thody, A. J. α -MSH and the regulation of melanocyte function. *Annals of the New York Academy of Science* **885**, 217-229 (1999)
- 5) Hida, T. *et al.* Elucidation of melanogenesis cascade for identifying pathophysiology and therapeutic approach of pigmentary disorders and melanoma. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 1-23 (2020)
- 6) Flesher, J. L. *et al.* Delineating the role of MITF isoforms in pigmentation and tissue homeostasis. *Pigment Cell and Melanoma Research* **33**, 279-292 (2020)
- 7) Hossain, M.R. *et al.* Diversified stimuli-induced inflammatory pathways cause skin pigmentation. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 3970 (2021)
- 8) Ohbayashi, N. *et al.* Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. *F1000Res.* **9**, F1000 Faculty Rev-608 (2020)
- 9) Raposo, G., and Marks, M.S. Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 786-797 (2007)
- 10) Eisenhofer, G. *et al.* Tyrosinase: a developmentally specific major determinant of peripheral dopamine. *The FASEB Journal* **17**, 1248-1255 (2003)
- 11) Brilliant, M.H. The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell and Melanoma Research* **14**, 86-93 (2001)
- 12) Grønskov, K., Ek, J., and Brøndum-Nielsen, K. Oculocutaneous albinism. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2**, 43-48 (2007)
- 13) Kobayashi, A. *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 6443-6452 (1999)
- 14) Chowdhury, AMMA. *et al.* Multiple regulatory mechanisms of the biological function of NRF3 (NFE2L3) control cancer cell proliferation. *Scientific Reports* **7**, (2017)
- 15) Hirose, S. *et al.* NRF3 activates mTORC1 arginine-dependently for cancer cell viability. *iScience* **26**, 106045-106045 (2023)
- 16) Gu, Y. *et al.* Nelfinavir inhibits human DDI2 and potentiates cytotoxicity of proteasome inhibitors. *Cellular Signalling* **75**, 109775 (2020)
- 17) Siegenthaler, B. *et al.* (2018) Nrf3 promotes UV-induced keratinocyte apoptosis through suppression

- of cell adhesion. *Cell Death & Differentiation* **25**, 1749–1765.
- 18) Waku T. *et al.* The CNC-family transcription factor Nrf3 coordinates the melanogenesis cascade through macropinocytosis and autophagy regulation. *Cell Reports* **42**, 111906 (2023)
- 19) Kumar, KJS. *et al.* In Vitro and In Vivo Studies Disclosed the Depigmenting Effects of Gallic Acid: A Novel Skin Lightening Agent for Hyperpigmentary Skin Diseases. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* **39**, 259–270 (2013)
- 20) Fang, Y. *et al.* Spherical Nucleic Acids for Topical Treatment of Hyperpigmentation. *Journal of the American Chemical Society* **143**, 1296–1300 (2021)
- 21) Patzelt, A. *et al.* In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. *Skin Research and Technology* **18**, 364–369 (2012)
- 22) Sivá, M. *et al.* Human DNA-Damage-Inducible 2 Protein Is Structurally and Functionally Distinct from Its Yeast Ortholog. *Scientific Reports* **6**, 30443 (2016)

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

生活行動および心の健康が皮膚の性状・バリアに与える影響の解析研究

理化学研究所生命医科学研究センター免疫器官形成研究チーム

川崎 洋

The effects of lifestyle behavior and mental health (stress, depression, etc.) on skin appearance and function have been discussed, but there is a lack of evidence, and much is unknown regarding how these affect skin properties and functions. In this study, we assessed what parameters of the skin were affected by various lifestyle and mental health indicators by analyzing the relationship between information on daily lifestyle behavior and mental state and skin barrier assessment indicators obtained at the same time. Patients with atopic dermatitis tended to have a lower Vitality index and more depressed mental states than healthy subjects. It was also found that the Vitality index was negatively correlated with the skin barrier index, Transepidermal water loss (TEWL). It was considered necessary to conduct a larger study to verify the association between mental status and skin barrier in healthy subjects. The present study suggests that mental health is related to the degree of skin barrier abnormalities in patients with atopic dermatitis and recalls the possibility of a psychogenic approach in the treatment of atopic dermatitis.

1. 緒言

健康な皮膚を保つことは、疾患発症抑制の観点からも美容的観点からも重要である。近年は“皮膚バリア”という概念が確立し、皮膚バリア異常による疾患発症増悪への影響や¹⁾、皮膚バリアパラメータと皮膚外観・整容との関わりが次々に報告され²⁾、適切にスキンケアをして健康な皮膚を保つことの重要性が広く認知されつつある。しかしながら、健康な皮膚を保つ上で考慮すべき因子に対する理解は十分ではないため、スキンケアというと保湿・保護剤の外用や紫外線予防等の限定的な処置にとどまっているのが医療・ヘルス分野の現状である。

特に、皮膚の外観・機能に対する生活行動や精神面（ストレスやうつ状態、等）の影響が過去に指摘されていたが、エビデンスに乏しく、それらが皮膚の性状や機能にどのように作用するかについては不明な点が多い³⁾。そこで本研究では、日々の生活行動と精神状態に関する情報と、それと同時に取得する皮膚画像と皮膚性状・バリア評価指標との関連解析を通じて、各種生活行動や心の健康に関する指標が、皮膚のどのようなパラメータに影響するのかを評価し、皮膚の健康をセルフケアする際の新たな指針の提唱を目指す。

研究を実施する上で、健常者のみを対象とすると、皮膚バリアの変化が少なく日々の生活行動や精神状態との関連を調べるためには膨大なサンプル数を要することが考えら

れた。そこで本研究では、皮膚バリア異常を特徴の一つとし、不安やうつ状態と疾患の関連性が示唆されているアトピー性皮膚炎を健常者に加え研究対象に加えることで効率的な研究遂行を目指した。

2. 方法

2.1. 試験概要

本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会（承認番号：20180218, 20190284）と理化学研究所倫理委員会（H28-24）の承認を受け、その倫理規定に準じて研究実施された。すべての研究は書面を用いて説明、同意取得された。

（研究1）

本研究では、MIMOSYS[®]（Mind Monitoring System）を搭載した慶應義塾大学病院通院中の16歳以上のアトピー性皮膚炎患者計76名をリクルートし、スマートフォンアプリ（肌日記クラウド）を、各個人のスマートフォンにインストールして連日1年間にわたり入力していただいた。経過中、8名が研究を辞退され68名が研究に協力された。研究協力者が入力されたデータ・使用を許諾していただいた情報は、専用のAWSクラウドサーバー（東京リージョン）に蓄積され解析に使用された。肌日記では、スキンケア外用剤記録（内容・塗布順番・塗布部位・塗布時刻）、睡眠、気分、入浴、体重、生理、飲酒、喫煙、運動、皮膚画像、気分やかゆみ等に関する自己評価情報、等の入力に加え、音声病態分析（MIMOSYS[®]）による心の健康指標が計測された。

（研究2）

本研究では、①試験部位に重篤な皮膚疾患を有さない、②重篤な心疾患・筋肉系疾患を有さない、③金属アレルギーを有さない、の基準を満たす、健常者、アトピー性皮膚炎患者、それぞれ11名ずつを被験者として研究対象にした。健常者としてリクルートされた11名のう



Analysis of the effects of lifestyle behavior and mental health on skin properties and barriers

Hiroshi Kawasaki

Laboratory for Developmental Genetics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (IMS)

ちの1名は、皮膚の乾燥症状が著しく健常皮膚として適当ではないと考えられたため、解析対象から外れた。被験者の概要を表に示す。本研究では研究1で用いた音声病態分析(MIMOSYS[®])による心の健康指標と同時に経皮水分蒸散量(TEWL)、角層水分量の計測と皮膚画像解析、等が計測された。また、本研究で計測する皮膚の状態を、2名の異なる皮膚科医がEASI(Eczema Area and Severity Index)の評価法に準じて局所EASIとして評価した。皮膚バリア評価は、温度をコントロールされた部屋(21.6~26.2℃)にて15分以上の馴化がされた状態で実施され、皮疹を有するアトピー性皮膚炎患者に対しては非炎症部を対象として評価された。TEWLと角層水分量は、Cutometer DUAL MPA580(Courage+Khazaka)を用いて計測された。

2.2. 肌日記アプリによる生活行動、皮膚画像情報の収集

スマートフォンアプリ(肌日記)は、慶應義塾大学皮膚科とORSOにより共同開発された。Android/iOS版共に公開ストアから、研究協力者個人のスマートフォンにアプリをインストールし、研究参加時に配布される暗号コードを入力することでユーザー登録をすることができる。研究期間中、下記の情報が収集された。

必須項目入力:(連日)外用状況(薬種・塗布順番・塗布部位・塗布時刻)、服薬状況(薬種・服用時刻)、症状の程度(10段階)、睡眠(睡眠の質4択・入眠時刻・起床時刻)、気分(4択)、入浴(シャワーのみ or 入浴時間(分))、体重、患部(写真登録)、生理(有無)、飲酒(酒量4択)、喫煙(本数5択)、運動(運動強度4択・自由テキスト)、喘息(症状の重さ4択)、鼻炎(症状の重さ4択)、蕁麻疹(症状の重さ4択)、ヘルペス(有無)、食事(写真登録)、気になったことメモ(自由テキスト)、音声病態分析によるストレスCheck(2.3.にて説明)

2.3. 音声認識システムMIMOSYSを活用した精神状態評価

MIMOSYS[®]は東京大学大学院医学系研究科音声病態分析学講座で開発された、声帯の不随意反応に着目し、声の周波数の変動パターン等から心の状態を分析することでメンタルヘルスを「元気圧」(短期間の指標)と「心の活量値」(過去2週間を反映する長期間の指標)として評価するシステムである⁴⁾。うつ病と診断された患者を「元気圧」を用いて識別可能であると示唆される⁵⁾など、精神状態を評価するツールとして認知されている。PST社により設計された本システムを肌日記に導入することで、自宅で毎日定められた音声をスマートフォンに向けて発することで、「元気圧」「心の活量値」の算出が可能となる。

2.4. データ解析

統計学的解析(Mann-Whitney test, Spearman Correlation Coefficient)に関しては、Prism 10(GraphPad Software)を用いて実施された。

3. 結果

(研究1)

68名のアトピー性皮膚炎患者からMIMOSYS[®]を搭載したスマートフォンアプリ「肌日記」によるライフログ情報、心の健康情報(元気圧、心の活量値)、皮膚画像情報、等の収集を行った。本研究における、主要な評価項目である元気圧、心の活量値に関する代表的な一個人内での経時的な推移パターンを図1に示す。

興味深いことに、これら68名のアトピー性皮膚炎患者の元気圧の平均値は30.0であり、計測同期間にPST社から提供されたMIMOSYS[®]を一般使用された、のべ53,394人の元気圧の平均値 46.2 ± 13.5 (平均 \pm SD)と比べても著明に低値であることがわかった。元気圧が低値を示す際は抑うつ傾向を認めることが多いと報告されており⁵⁾、今回計測されたアトピー性皮膚炎患者には抑うつ状態にある患者が一定数含まれる可能性が示唆された。また、本観察から、図1bのように日々の元気圧の変動が大きい症例が多数存在することがわかった。各患者の元気圧の変動と皮膚バリア状態の推移を同時に評価することで、精神状態と皮膚バリアとの関連を評価できる可能性が考えられた。今回取得した皮膚画像を元に皮膚バリア状態を予測評価し、生活行動因子や精神状態と関連解析をすることを検討したが、皮膚画像を定期的かつ同フォーマットにて撮影している患者数が極めて少なかったため、同解析は実施できなかった。また、一部患者では元気圧の推移と痒み症状との関連が示唆される症例があった。

(研究2)

本研究にて計測された、健常者とアトピー性皮膚炎患者の皮膚バリア指標、および元気圧の比較データを図2に示す。皮膚バリアで最も汎用される指標であるTEWLは、統計学的有意差はできなかったもののアトピー性皮膚炎患者にて健常者に比べ高値を示した(図2a)。角層水分量に関しては両者間で明らかな違いを認めなかった(図2b)。元気圧は、統計学的有意差を認めなかったが、アトピー性皮膚炎患者で低値の傾向を認め、研究1での観察結果に対して妥当な結果を得た(図2c)。TEWLと元気圧の関連を調べたところ、健常者とアトピー性皮膚炎患者でTEWLと元気圧の相関関係が異なり、アトピー性皮膚炎患者にて負の相関傾向を示した(図3)。角層水分量と元気圧の間には明らかな相関関係を認めなかった(データ未掲載)。

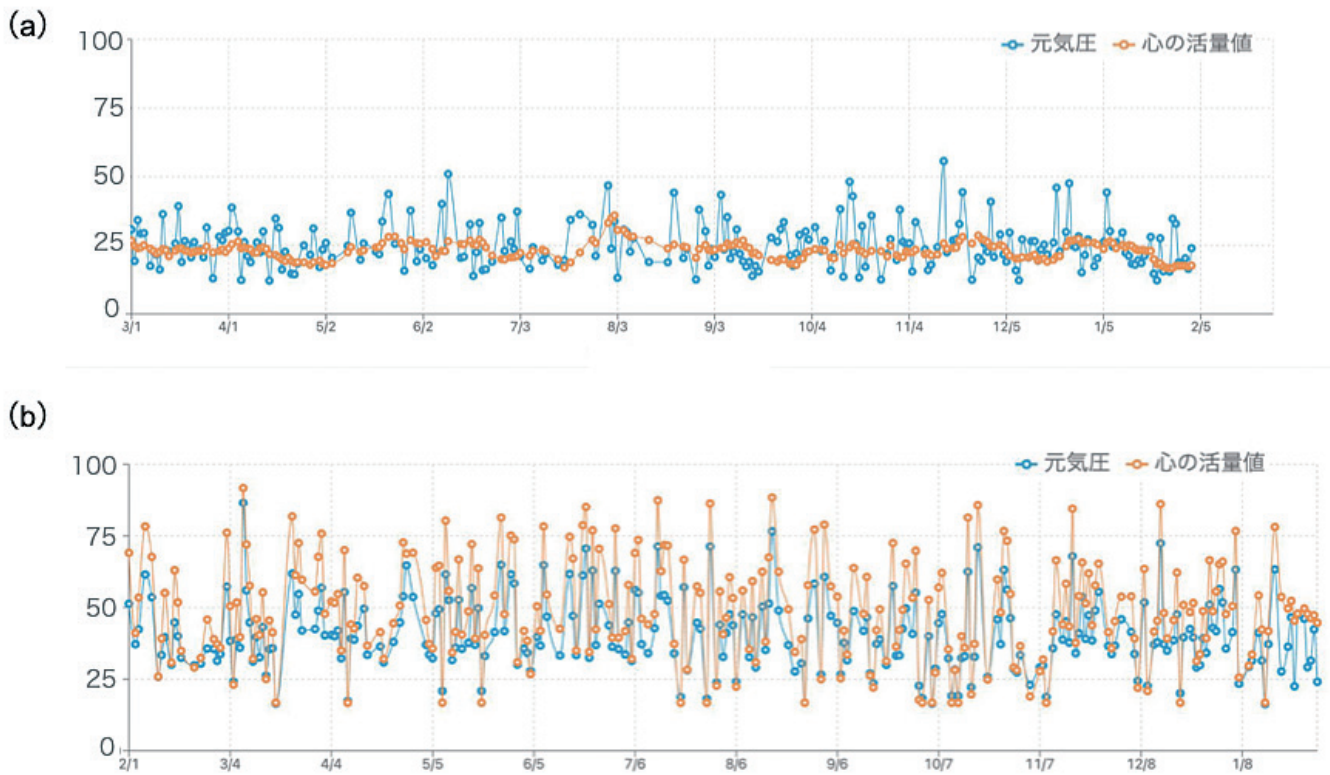


図1 元気圧と心の活量値の日々の推移 (2名のアトピー性皮膚炎患者データを代表的結果として示した)

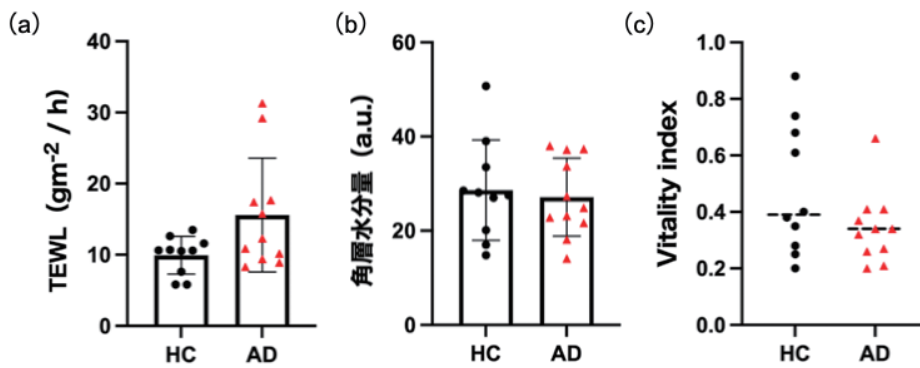


図2 健常人(HC)とアトピー性皮膚炎患者(AD)における、TEWL、角層水分量、元気圧 (Vitality Index) の比較

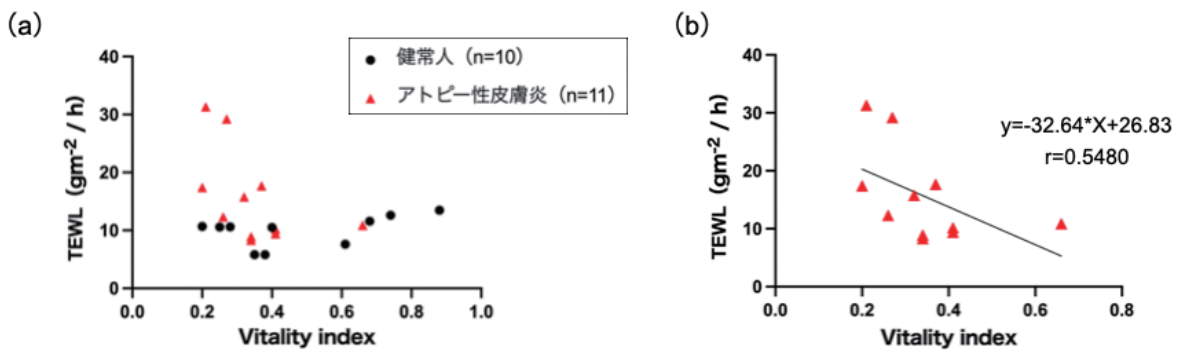


図3 TEWLと元気圧(Vitality Index)
 (a) は健常人とアトピー性皮膚炎患者データをとともに表示、(b) はアトピー性皮膚炎患者データのみを表示

4. 考察

まず本研究では、アトピー性皮膚炎患者における精神状態評価を、音声病態分析 (MIMOSYS[®]) を用いて実施した。その結果、調査したアトピー性皮膚炎患者集団の中には抑うつ状態にある患者が多いことが示唆され、アトピー性皮膚炎患者には抑うつ病態にある患者が多いという既報告⁶⁾を支持するものであった。

研究2では健常者、アトピー性皮膚炎患者間の皮膚バリア指標 (TEWL、角層水分量) と精神状態評価指標 (元気圧) の間の関連を調べた。認知されているように⁷⁾、アトピー性皮膚炎患者皮膚では、無疹部であっても皮膚バリアに関する代表的指標である TEWL は、健常者皮膚に比べ高値の傾向を示した。特筆すべきことに、本研究では、アトピー性皮膚炎患者皮膚においてのみ、TEWL と元気圧の間に負の相関関係が認められた。サンプルサイズが少なく、精神状態と皮膚バリア指標間の関連に関しては因果・病態に関するさらなる解析が必要であるものの、研究1でアトピー性皮膚炎患者の中に元気圧の推移と痒み症状との関連が示唆される症例があった事実と合わせ、少なくともアトピー性皮膚炎患者においては心の健康状態が皮膚バリア異常を含む病態形成に影響する可能性を示唆する。

5. 総括

本研究から、アトピー性皮膚炎患者において、心の健康状態が皮膚バリア異常の程度に関連することが示唆された。アトピー性皮膚炎患者では抑うつ状態にある方が多く、心因的アプローチが皮膚バリアや症状の改善に有用である可能性が考えられる。一方、健常者における心の健康や生活行動が皮膚の性状・バリアに影響するかどうかに関しては、より大規模にデータを収集し検証される必要がある。

謝辞

本研究にご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Baker P, Huang C, Radi R, Moll SB, Jules E, Arbiser JL. Skin Barrier Function: The Interplay of Physical, Chemical, and Immunologic Properties. *Cells*. 2023; 12 (23): 2745
- 2) Voegeli R, Gierschendorf J, Summers B, Rawlings AV. Facial skin mapping: from single point bio-instrumental evaluation to continuous visualization of skin hydration, barrier function, skin surface pH, and sebum in different ethnic skin types. *Int J Cosmet Sci*. 2019; 41 (5): 411-24.
- 3) Rieder EA, Andriessen A, Cutler V, Gonzalez ME, Greenberg JL, Lio P, et al. Dermatology in Contemporary Times: Building Awareness of Social Media's Association With Adolescent Skin Disease and Mental Health. *J Drugs Dermatol*. 2023; 22 (8): 817-25.
- 4) Hagiwara N, Omiya Y, Shinohara S, Nakamura M, Higuchi M, Mitsuyoshi S, Yasunaga H, Tokuno S. Validity of Mind Monitoring System as a Mental Health Indicator using Voice. *ASTESJ* vol. 2, no. 3, pp. 338-344 (2017)
- 5) Shinohara S, Nakamura M, Omiya Y, Higuchi M, Hagiwara N, Mitsuyoshi S, et al. Depressive Mood Assessment Method Based on Emotion Level Derived from Voice: Comparison of Voice Features of Individuals with Major Depressive Disorders and Healthy Controls. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18 (10): 34069609
- 6) Silverberg JI, Gelfand JM, Margolis DJ, Boguniewicz M, Fonacier L, Grayson MH, et al. Symptoms and diagnosis of anxiety and depression in atopic dermatitis in U.S. adults. *Br J Dermatol*. 2019; 181 (3): 554-65.
- 7) Proksch E, Folster-Holst R, Jensen JM. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci*. 2006; 43 (3): 159-69.

化学療法中の乳がん患者へのメイクアップ指導による QOL 向上の検討

九州大学大学院消化器・総合外科

茂地 智子

Breast cancer survivors have been increasing in Japan due to development of screening, diagnostic, and therapeutic technology. It is important to manage the appearance-related side effects on breast cancer patients because it can affect their self-esteem and quality of life (QOL). The aim of this study is to assess the impact of cosmetic care on QOL in breast cancer patients during chemotherapy.

1. 緒言

がん医療の進歩によるがん生存率の向上に伴い、本邦においても、がん治療を継続しながら社会生活を営むがん患者は増加している。厚生労働省の2020年の報告によると、就労を継続しながら通院するがん患者は44.8万人で増加傾向にあり、その1/3以上は女性が占めている。本邦の女性が罹患するがんの中で、最も罹患率が高い乳がんは、年々増加の傾向にある。また、学校生活、就職、結婚、妊娠、子育てなどの様々なライフイベントの移行期を経験する思春期・若年成人 (adolescent and young adult; AYA) 世代 (一般的には15～39歳) の後半 (30～39歳) のがん患者では、乳がんの割合が22%と最も高い。よって、乳がん患者の治療を選択・遂行するうえで、QOL (Quality of Life) の維持や向上は軽視されるべきではない問題といえる。

がん治療は、効果が期待される一方で、その副作用により皮膚への色素沈着や脱毛などの外見の変化を生じさせ、患者のQOL低下の大きな要因となり¹⁾、治療継続の意欲低下にも影響する可能性がある。Nozawaらの報告では、がん治療の副作用による身体的苦痛のうち、外見の変化に関連した苦痛の割合が高いことが示された。そして、その91%が、仕事中は外見を従来通りに装うことは重要だと回答し、98%が外見の情報を病院で提供してほしいと回答した²⁾。このように、がん治療の副作用による外見の変化に対するケアや支援への患者のニーズは高いのにも関わらず、その予防や対処について科学的に検証された報告は僅少で、エビデンスの蓄積が急がれる課題であると考えられる。

本研究では、抗がん剤治療を受ける乳がん患者へのアピアランスケアの一つとしてのメイクアップ指導が、患者

Impact of cosmetic care on quality of life in breast cancer patients during chemotherapy

Tomoko Shigechi

Department of Surgery and Science, Gradual School of Medical Sciences, Kyushu University

のQOLに与える効果について検証することを目的とする。そして、将来的には、エビデンスに基づいたアピアランスケアの情報や方法を医療従事者及び患者の間で共有し、がん治療の一環としてがん患者のニーズに対応したシステムの構築を目指した。

2. 方法

2.1. 対象

被験者をメイクアップ指導介入群12名、対照群12名に分ける並行群間比較試験をデザインした。被験者の適格基準は、当院乳腺外科で化学療法を受ける20歳以上60歳未満の女性乳がん患者で文書による同意が得られた者とし、化粧品に対するアレルギー症状の体質を有するなど試験担当医師が不適当と判断した患者は除外することにした。また、被験者の情報は、匿名化され新たに症例番号を付して情報の保存・管理を行うこととした。割付因子はメイクアップ指導の希望の有無とし、患者の意思を優先とすることにした。

2.2. メイクアップ指導

メイクアップ指導は、あらかじめ美容専門家からレクチャーを受けた医療スタッフ (医師、看護師、薬剤師) が連携して、コーサーにより作成されたメイク指導用のテキストや動画を用いて化学療法開始前に行うこととし、指導内容は皮膚の色素沈着のカバー方法や脱落した眉毛の書き方、つけまつげのつけ方などである。使用するメイク用品はコーサーで販売している化粧品を患者に無償提供することとし、皮膚の異常が生じた場合には使用を中止することとした。

2.3. QOLの測定

QOLの測定は、がん患者を対象とした尺度であるEuropean Organization for Research and Treatment of Cancer Core Quality of Life Questionnaire (EORTC QLQ-C30) 日本語版及び乳がん患者用サブモジュールであるEORTC QLQ-BR23日本語版と、自尊感情を測定す

	治療前	治療3週間後	治療9週間後	治療15週間後	治療27週間後
介入群					
メイクアップ指導	○				
EORTC QLQ-C30	○	○	○	○	○
EORTC QLQ-BR23	○	○	○	○	○
Rosenberg 自尊感情尺度	○	○	○	○	○
自由回答欄を設けた質問票	○	○	○	○	○
非介入群					
EORTC QLQ-C30	○	○	○	○	○
EORTC QLQ-BR23	○	○	○	○	○
Rosenberg 自尊感情尺度	○	○	○	○	○

る尺度である Rosenberg 自尊感情尺度 日本語版の自己記入式質問票を用いて行う。質問票の記入は上の表の通り、治療前と治療 3 週間後、9 週間後、15 週間後、27 週間後の計 5 回依頼する。メイクアップ指導介入群には、前記の質問票に加えて、指導を受けたメイクアップ法継続の有無の質問や、メイクアップを実践するうえで困っている点や追加で必要な情報についての自由回答欄を設けた質問票の記入も依頼する。

3. 結果

コーセー美容開発部の協力のもと、メイクアップ指導用のテキストや動画の作成は完了し、コスメ用品の選定と購入は完了した。研究説明書・同意書の作成、QOL 評価目的の質問票の作成も完了した。

4. 考察

長い間、がん薬物療法による副作用によって生じる外見の変化に対する予防や治療については注視されることがなく、これに関連した報告は国内及び海外においてもごく僅かであった。がん治療の進歩によるがん分子標的薬の登場により、近年になってようやく治療継続中の QOL の維持が期待されるようになってきた。抗 EGFR 抗体薬（パニツムマブ）による皮膚障害への予防法の有用性を検証する目的で実施された臨床試験（STEPP 試験）では、治療開始前日からのスキンケアの予防的効果が示された³⁾。しかし、がん患者のアピアランスケアの領域は、未だにエビデンスが構築できるほどの研究成果がないのが現状である。

乳がんは、他がんに比べて若年で発症し、患者のあらゆるライフイベントとが治療時期が重なるため薬物療法による外見の変化が患者の QOL や精神面へ与える影響はより一層大きいと考えられる。メイクアップは日常生活に密接した行為であり、がん患者における支援が強く求められているが、美容領域での専門性が高いため医療従事者間での知識の定着や手技の獲得が難しく患者への情報提供が十分ではない。したがって、本研究では、アピアランスケアの中でもメイクアップ指導という介入に焦点を当てた。疾患や治療などに伴う外見変化に対するメイクアップは、

「メディカルメイクアップ」という呼び名が示す通り、医学と美容学の融合によって成り立つ。すなわち、疾患や治療による患者の個々の症状や予測される変化への医学的知見のうえで、使用する化粧品や医薬部外品などの化粧品の選定やそれらの使用方法の知識、カバーアップの特殊技術など美容領域での専門性が求められる。患者への情報提供や手技取得の指導は医療機関でなされることが求められているため医療従事者がそれらに熟知しておく必要があるが、美容専門家との連携がなければ成し得ないことである。今回の研究も、コーセーの美容開発部の支援があったからこそ具体的に進めることができた。

また、アピアランスケアによる外見の改善が精神面に及ぼす影響、具体的には「がん治療中も従来通りの日常生活ができる」という自己肯定感が患者の治療や社会活動への大きな原動力となると考える。医療機関で医療として患者に提供する情報や技術はエビデンスに基づくことが前提となるが、前述の通り、がん患者へのメイクアップ指導に限らずアピアランスケアに関する研究報告はほとんど見られない。本研究を通じて、乳がん患者にメイクアップ指導という介入によって化学療法を受ける患者の QOL の向上を示すことができれば、がん患者のアピアランスケアの有効性を示唆する一つのエビデンスを提示できると考えられる。

(引用文献)

- 1) Lacouture, M. and V. Sibaud, Toxic Side Effects of Targeted Therapies and Immunotherapies Affecting the Skin, Oral Mucosa, Hair, and Nails. *Am J Clin Dermatol*, 19 (Suppl 1): p. 31-39, 2018.
- 2) Nozawa, K., et al., Quantitative assessment of appearance changes and related distress in cancer Patients. *Psycho-Oncology*, 22 (9): p. 2140-2147, 2013.
- 3) Lacouture ME, et al., Skin toxicity evaluation protocol with panitumumab (STEPP), a phase II, open-label, randomized trial evaluating the impact of a pre-emptive Skin treatment regimen on skin toxicities and quality of life in patients with metastatic colorectal cancer: *J Clin Oncol*. 28 (8): 1351-1357, 2010.

顔面の皮膚血流に及ぼす加齢と運動習慣の影響

早稲田大学スポーツ科学学術院

林 直亨

The purpose of this study was to investigate the effects of aging and exercise habits on facial skin blood flow (FBF). We hypothesized that FBF declines with aging, and that exercise habits would inhibit the decline. FBF was assessed in 180 healthy subjects (male 109, female 71, 38 ± 17 yrs, 168 ± 9 cm, 62.9 ± 13.7 kg) in sitting position using the laser speckle flowgraphy. Blood flow in forehead significantly but slightly increased with ageing, showing regional differences that relative blood flow in cheek to forehead decreased with ageing. The blood flow in the forehead and cheeks was greater in those who had an exercise habit. No clear effects of type of exercise or location of exercise were observed. These results suggest that blood flow in the facial skin may change with aging, showing regional differences and that exercise habits could inhibit the change with ageing. To clarify the effects of aging and exercise habits on blood flow in facial skin, it is necessary to increase the sample size and conduct a longitudinal study.

1. 緒言

弾力性のある太い動脈は加齢に伴い硬化する。この現象は1881年にCharles Royによって記録され、William Oslerの「人は動脈とともに老いる」という有名な言葉にも残されている¹⁾。加齢に伴う動脈硬化については多くのデータが蓄積されてきた。

同様に、微小血管の緊張も加齢に伴い亢進する²⁾。こうした微小血管の変化は、加齢に伴う末端臓器の障害と関連する³⁾。筆者らのグループも、20～80歳の対象者男女890名を対象として、眼底血管の柔軟性に及ぼす加齢の影響を横断的に検討したところ、加齢に伴い眼底血管の柔軟性が減少していることを観察した⁴⁾。微小血管は、酸素と栄養素の組織への供給、老廃物と二酸化炭素の除去など、組織の維持を担っている。したがって、組織の維持は微小血管の機能に依存する。なお、ここでいう微小血管とは直径300 μ m未満の血管であり、細動脈、毛細血管、一部の静脈が含まれる。

加齢に伴うこうした血管の硬化に抗う手段として、運動習慣が有効であることが多くの研究によって支持されている⁵⁾。

ところが、運動を行う場合、主導筋から離れた部位の血管の機能が改善しない例が報告されている。すなわち、運動習慣に伴う血管機能の改善の程度には部位差がある⁵⁾。実際、前述の眼底血管に関する報告では、運動習慣の有無

は眼底循環に影響を及ぼさなかった。

一方、若年者(10, 20歳代)と中高齢者(50歳以上)の顔面皮膚の血流(FBF)を比較した我々の予備的な報告では、女性では若年者よりも中高齢者で低下していた⁶⁾。これらの先行研究の概観から、加齢・性別・運動習慣・日焼けが顔面の皮膚血管に与える影響を一気に明らかにする必要があると考えられる。そこで、本研究では、①FBFに加齢の影響があるのか、②影響があるならば、運動習慣はFBFに影響を与えるのか、③運動実施場所(屋内外)がFBFに影響するのかを検討することを目的とした。併せて、頬部を加温した際のFBFの変化も記録し、血管の拡張能に与える加齢と運動習慣の影響についても検討した。

2. 方法

2.1. 対象者

本研究には、顔部に皮膚疾患のない18歳以上の健康成人180名(男性109名、女性71名)が参加した。全参加者に対して、本研究の目的、内容、実験の危険性について説明し、書面による参加の同意を得た。測定前12時間以内のカフェインおよびアルコール摂取、3時間前の食事摂取、および前日から強度の運動を控えるよう指示した。本研究はヘルシンキ宣言に則って行われ、早稲田大学人を対象とする研究に関する倫理審査委員会の承認を受けて実施した(承認番号2022-470)。

2.2. プロトコル

対象者の実験室入室後、運動習慣の調査用紙を記入させた後、5分間以上の座位安静を保たせた。その後1分間にFBFを2回記録した。

加えて、対象者のうち111名(男性79名、女性32名)には、皮膚を加温した後のFBFを観察する試行を実施した。加温は電子レンジにて40℃に温めたホットバックを右頬部



Effects of ageing and exercise habits on facial skin blood flow

Naoyuki Hayashi

Faculty of Sport Sciences, Waseda University

に60秒間当ててことで行い、FBFの測定は加温直後に実施した。当試行は3分間の安静をはさみ2回行った。FBFの記録は1回当たり10秒間であった。

2.3. FBFの記録

FBFはレーザースペックル血流計(LSFG-ANW, ソフトケア, 福岡)を用いて記録した。当機器のレンズ部分と対象者の距離は焦点距離の230mmに設定した。計測中、対象者はあごと額上部をあご台に固定した。その後、第三者が付属のソフトウェアにてオフラインでMBR (Mean Blur Rate) を算出した。これは、血球の移動速度に比例する指標であり、レーザースペックル法で計測した血流速度は、末梢血流量測定のスランダードであるマイクロソフトウェア法と高い相関を示すことが知られている⁷⁾。

2.4. 運動習慣の調査

各被験者から、以下について書面にて回答を得た。すなわち、習慣的な運動の有無、習慣的な運動の実施期間、運動頻度、1回の運動時間、運動を行う場所(屋内・屋外)、運動の種類、主観的な運動強度、であった。運動強度は、主観としての強度が「安静」を6、「非常にきつい」を19とした、6～20のBorgのスケールを用いた。

2.5. データ解析

すべての値は平均値±標準偏差を記した。FBFとしては、前額部、左頬、鼻、左頬、右頬のMBRを用いた(図1)。同一被験者内では同じ対象範囲のMBRを設定した。前額部の値を100として、他部位のMBRを相対値とした解析も行った。対象者の身体的特性および運動習慣は男性と女性で分け、その差は対応のないt検定にて評価した。

各部位のFBF(絶対値および前額部に対する相対値)お

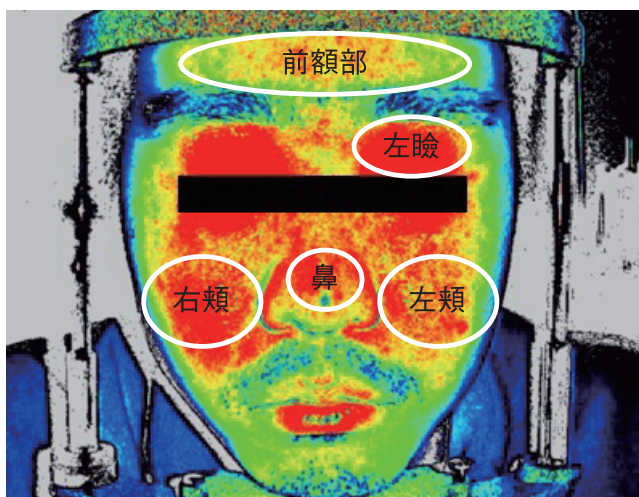


図1 FBFの解析例。前額、左頬、鼻、左頬、右頬を解析対象とした

よび温熱刺激に伴う右頬部の増加量をそれぞれ従属変数、年齢、性別、体格指数(BMI)、運動習慣の有無、運動期間、運動頻度、運動時間、運動の実施場所、運動強度を独立変数とした重回帰分析(強制投入法)を行った。重回帰分析によって有意な係数が認められた従属変数については、二要因の分散分析(性別×年齢)を用いて検定した。有意な交互作用が認められた際には、Bonferroniの事後検定を行った。また、運動場所の影響は一要因の分散分析にて評価した。これらの統計解析は、統計解析ソフト(IBM SPSS Statistics 27.0 for Mac, IBM, Tokyo, Japan)を用いて行った。統計的に有意な水準は $P < 0.05$ とした。

3. 結果

3.1. 全体的な結果

対象者の身体的特徴および運動習慣について表1に示した。身長、体重およびBMIには男性の方が有意に大きかった。運動習慣のある者の主観的な運動強度は女性よりも男性で有意に高い値であった。

MBRの絶対値で評価したFBFを従属変数とした重回帰分析によって得られた係数を表2に示した。頬および鼻のMBRに影響する変数はなかった。年齢は前額部のMBRに有意な正の影響を示した。運動習慣ありを高い値と設定し、運動習慣にかかる係数 β が正であったことから、前額および右頬のFBFは有意に高い値を示す結果であった。運動場所は頬のMBRに有意な影響を示した(図2)ものの事後検定では有意差は観察されなかった。

前額部のMBRに対する相対値で評価したFBFを従属変数とした重回帰分析によって得られた係数を表3に示した。

表1 対象者の身体的特性および運動習慣

	全対象者	男性	女性
n	180	109	71
年齢, 歳	38 ± 17	37 ± 18	41 ± 17
若年者(39歳以下), n	115	78	37
中高齢者(40歳以上), n	65	31	34
身長, cm	166.7 ± 9.2	171.9 ± 6.9	158.6 ± 5.8*
体重, kg	62.9 ± 13.7	69.8 ± 11.9	52.2 ± 8.3*
BMI, kg/m ²	22 ± 3	24 ± 3	21 ± 3*
温熱刺激の実施, n	111	79	32
運動習慣有り, n	107	77	30
運動期間, 月	79 ± 100	89 ± 107	52 ± 77
運動頻度, 回/週	3 ± 2	3 ± 1	3 ± 2
1回の運動時間, 分	79 ± 53	81 ± 55	74 ± 49
運動強度(6~20)	13 ± 2	14 ± 3	12 ± 1*
運動の実施場所			
屋外, n	52	35	17
屋内, n	34	27	7
両者, n	21	15	6

*: 男性群との間に有意差あり(対応のないt検定)

表 2 FBF (MBR の絶対値) に与える説明変数の影響

	前額部の MBR			左頬の MBR			右頬の MBR		
	β	P	r	β	P	r	β	P	r
年齢	0.17	< 0.05	0.20	0.00	0.97	0.01	0.00	0.97	-0.01
性別	0.05	0.57	0.03	0.00	0.98	-0.08	-0.02	0.85	-0.10
BMI	0.01	0.88	0.06	0.03	0.69	0.09	0.00	0.97	0.06
運動習慣	0.53	< 0.05	0.09	0.62	< 0.05	0.12	0.55	< 0.05	0.15
運動期間	-0.08	0.35	-0.04	-0.04	0.69	0.01	-0.07	0.41	-0.01
運動頻度	0.06	0.62	0.08	-0.08	0.50	0.06	-0.09	0.45	0.08
運動時間	-0.07	0.57	-0.04	-0.05	0.68	0.00	-0.03	0.80	0.03
運動場所	0.03	0.84	-0.06	0.37	< 0.05	-0.01	0.32	< 0.05	-0.06
運動強度	-0.36	0.20	-0.03	-0.03	0.91	0.09	0.04	0.89	0.13

MBR の絶対値に与える説明変数の影響. 性別は男性を 1, 女性を 2, 運動習慣はなしを 1, ありを 2 とした. 運動場所は屋外を 1, 屋内を 2, 両者との回答を 3 とした.
 β : 標準化偏回帰係数, P : 危険率 ($P < 0.05$ のみ網掛け), r : 相関係数

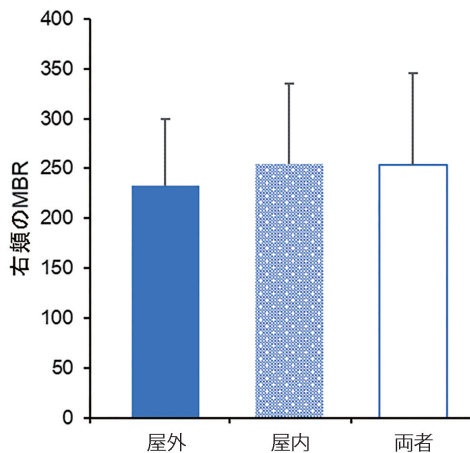


図 2 運動を行う場所が右頬の FBF (MBR の絶対値) に与える影響

表 3 FBF (MBR の相対値) に与える説明変数の影響

	左頬の MBR			鼻の MBR			左頬の MBR			右頬の MBR		
	β	P	r	β	P	r	β	P	r	β	P	r
年齢	-0.14	0.09	-0.15	-0.13	0.10	-0.15	-0.18	< 0.05	-0.19	-0.17	< 0.05	-0.19
性別	0.00	0.97	0.02	0.02	0.86	-0.02	0.07	0.44	0.02	0.06	0.50	0.00
BMI	-0.10	0.24	-0.12	0.04	0.67	-0.01	0.00	0.98	-0.03	-0.03	0.74	-0.05
運動習慣	-0.06	0.81	-0.02	0.00	-0.99	-0.04	0.08	0.76	0.02	0.00	0.99	0.03
運動期間	0.16	0.07	0.11	0.02	0.81	0.04	0.06	0.48	0.05	0.04	0.61	0.04
運動頻度	-0.10	0.36	-0.05	-0.18	0.13	-0.04	-0.16	0.16	-0.04	-0.17	0.14	-0.04
運動時間	0.24	< 0.05	0.12	0.24	< 0.05	0.15	0.18	0.12	0.10	0.17	0.14	0.10
運動場所	0.20	0.21	0.03	0.23	0.16	0.00	0.47	< 0.05	0.07	0.40	< 0.05	0.04
運動強度	0.10	0.72	0.01	0.20	0.48	0.06	0.36	0.19	0.05	0.43	0.12	0.06

前額部を基準にした MBR の相対値に与える説明変数の影響. 性別は男性を 1, 女性を 2, 運動習慣なしを 1, ありを 2, 運動場所は屋外を 1, 屋内を 2, 両者との回答を 3 とした.
 β : 標準化偏回帰係数, P : 危険率 ($P < 0.05$ のみ網掛け), r : 相関係数

年齢は両頬のMBRに有意な負の影響を示した。運動時間は脛および鼻のMBRに有意な正の影響を示した。運動場所は両頬のMBRに有意な影響を示した。

3.2. 年齢および性別の影響

MBRの絶対値で示した前額部および鼻のFBFには、有意な年齢と性別の交互作用（性別と年齢）が認められた。前額部の例を図3に示した。男性では加齢に伴ってMBRが増加したものの、女性では増加はみられなかった。

前額部のMBRに対する相対値で示した脛、両頬のFBFは、男女ともに若齢者に比較して中高齢者の方が低い値を示した。性別の主効果影響および性別と年齢の交互作用のみられる部位はなかった。

3.3. 運動習慣の影響

MBRの絶対値で前額部、右頬のFBFを評価すると、運動習慣のない者よりもある者の方が有意に高いFBFを示した（図4）。一方、前額部に対するMBRの相対値には、運動習慣の影響はみられなかった。

3.4. 温熱刺激に対するFBFの応答

温熱刺激に伴ってMBRは増加した。この増加応答に対して有意な説明変数は運動頻度のみであった。右頬への温熱刺激に対するFBF変化に対して、重回帰分析で有意な説明変数となったのは運動頻度（ $\beta=0.35, r=0.03$ ）であった。ただし、単相関では有意ではなかった。

4. 考 察

加齢に伴い部位によるFBFの増減の差異が起こる可能

性が示され、一方で運動習慣のある者では前額部と頬のFBFが増加する可能性が示唆された。前額部のMBRの絶対値は年齢との関係において β が正を示していたことから、加齢に伴い増加することが示された。一方、前額部に対する頬部のMBRの相対値は年齢との関係において β が負を示していた。このことから、加齢に伴い前額部に比して、頬の血流が減少する可能性が示された。

MBRの絶対値をFBFの絶対値として評価することの妥当性は、プレチスモグラフとの相関によって示されている⁸⁾。したがって、上記の加齢に伴う前額部での血流増加は妥当なものである。とはいえ、加齢に伴う血流増加という現象の生理的意義や背景については今後検討する必要がある。特に、加齢に伴って皮膚が菲薄化し、奥までレーザーが入った結果、見た目の血流が増加したように見える現象である可能性は否定できない。

一方、MBRの相対値の結果からは、加齢に伴う血流の変化に領域差があることが示された。頬部のMBRの相対値が加齢に伴って低下することが示されており、頬部では、前額に比べると加齢に伴い血流が低下するということが示唆された。

このような加齢に伴う血流の変化には男女差があった。絶対値のMBRでは、前額部と鼻のFBFに性別と年齢との交互作用が認められていた。相対値では交互作用は認められなかったものの、性別がFBFの部位差に影響する可能性も示唆された。

運動習慣のある者では、右頬の血流が高かった。運動を行う場合、顔面の皮膚から離れた部位、多くの場合は脚部に刺激が与えられる。このような場合は必ずしも循環系が改善しない例が報告されている。ところが、本研究では、

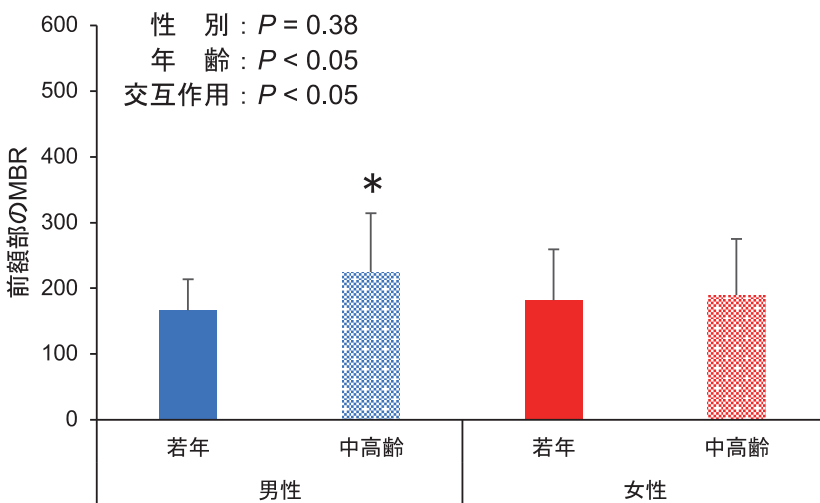


図3 前額部のMBRの絶対値に及ぼす性別と年齢の影響

男性では若年（39歳以下）と中高齢者（40歳以上）との間に有意差があり、年齢と性別の交互作用もみられた。

*: 同性の若年との間に有意差あり ($P < 0.05$)。

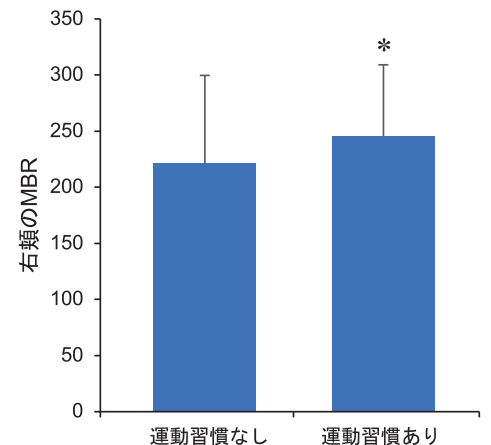


図4 運動習慣の有無が右頬のFBF (MBRの絶対値)に与える影響

*: 運動習慣ありが有意に高い値 ($P < 0.05$)。

顔面の一部において血流の増加が観察された。

運動習慣に伴う FBF の増加のメカニズムとしては、血管機能、神経、内分泌系の影響が考えられるものの、これらの関与については明らかではない。とはいえ、一過性の運動に伴う血流増加の重畳の結果であると推察される。自転車運動時には顔面皮膚の血管拡張により血流が 40～60% の増加することを我々は報告した⁹⁾。また、ハンドグリップでは、昇圧によって前額・頬部で 10% 程度血流が増加することを明らかにした¹⁰⁾。したがって、運動に伴う血流増加の効果が重畳して、FBF が増加したと考えることが妥当であろう。

温熱刺激に対する右頬の FBF の増加応答には運動習慣の影響はみられなかった。運動頻度の影響は観察されたものの、個人差が非常に大きかった。マッサージローラーを用いて頬部にマッサージを 5 週間行うことによって、温熱刺激に対する FBF の増加応答、すなわち血管の拡張応答が大きくなったことが報告されている¹¹⁾。このような明瞭な応答の差は観察されなかった。温熱刺激に伴う血管の拡張反応が運動習慣によって改善する可能性については、今後の検討が必要である。

運動を屋内で行っている者の方が頬の FBF は高い値を示した。ただし、サンプル数が屋外 52 名と屋内 34 名と少なく、事後検定では統計的な有意差は得られなかった。運動を屋内で行う者と屋外で行う者とは紫外線の影響によって運動習慣の効果がマスクされてしまう可能性もある。今後はサンプル数を増やして、運動を行う場所の影響についても検討する必要がある。

本研究の限界としては、変数に加えられていない要因や対象者数の影響が挙げられる。加齢に加えて、高血圧、糖尿病、喫煙、および LDL コレステロール値は動脈硬化の決定因子となるリスクである¹²⁾。これらの要因については本研究では考慮されていなかった。また、要因の数に比べて対象者数が十分ではない。今後も対象者数を増やして解析する必要がある。

運動が皮膚に与える影響については、理解がほとんど進んでいない。近年では、有酸素性運動と筋力トレーニングの介入は、ともに皮膚弾力性と真皮構造を改善することが報告されている¹³⁾。こうした研究と併せて、運動習慣が皮膚の構造および機能に与える影響の理解が進むことが期待される。

5. 総括

顔面皮膚の血流に対する加齢と運動習慣の影響の有無を検討することを目的として研究を行った。健康者 180 名を対象に、顔面皮膚の血流をレーザースペckル法によって計測した。加齢に伴って、顔面皮膚の血流は部位差を示しながら変化する可能性が示唆された。また、運動習慣のあ

る者では前額部と頬の血流が高いことが示された。運動の種類や実施場所の影響などについては明確な影響は認められなかった。加齢および運動習慣が顔面皮膚の血流に与える影響について明らかにするために、サンプル数を増やして検討し、縦断的な研究も併せて実施する必要がある。

謝辞

本研究に助成をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に感謝申し上げます。実験の実施やデータ解析に多大な協力をしてくれた中村宣博博士（早稲田大学スポーツ科学学術院）に感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Seals DR, DeSouza CA, Donato, AJ, Tanaka H. Habitual exercise and arterial aging. *J Appl Physiol.* 2008, 105: 1323-1332.
- 2) Feihl F, Liadet L, Levy BI, Waeber B. Hypertension and microvascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2008, 78: 274-285.
- 3) Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J Appl Physiol* 2008, 105: 1652-1660.
- 4) Liu C, Kobayashi T, Shiba T, Hayashi N. Effects of aging and exercise habits on blood flow profile of the ocular circulation. *Plos One* 2022 17: e0266684.
- 5) Green DJ, Hopman MTE, Padilla J, Laughlin MH, Thijssen DHJ. Vascular adaptation to exercise in humans; role of hemodynamics stimuli. *Physiol Rev.* 2017, 97: 495-528.
- 6) Miyaji A, Hayashi N. Vascular function in the facial skin circulation is significantly correlated with age. *FASEB J.* 2019, 33 Experimental Biology 2019 Meeting Abstracts 518.3.
- 7) Wang L, Cull GA, Piper C, Burgoyne CF, Fortune B. Anterior and posterior optic nerve head blood flow in nonhuman primate experimental glaucoma model measured by laser speckle imaging technique and microsphere method. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012, 53: 8303-09.
- 8) Nagashima Y, Ohsugi Y, Hiraishi M, Niki Y, Fuji A, Majima M, Okamoto T. Development of laser speckle blood flowmeter for evaluating the physiological function of skin. *Biomed Phys Eng Express.* 2019, 5: 055012
- 9) Hayashi N, Kashima H, Ikemura T. Facial blood flow responses to dynamic exercise. *Int J Sports Med.* 2021,

- 42: 241-245.
- 10) Kashima H, Ikemura T, Hayashi N. Regional differences in facial skin blood flow responses to the cold pressor and static handgrip tests. *Eur J Appl Physiol* 2013, 113: 1035-1041.
- 11) Miyaji A, Sugimori K, Hayashi N. Short- and long-term effects of using a facial massage roller on facial skin blood flow and vascular reactivity *Comp Therap Med* 2018, 41: 271-276.
- 12) Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006, 27: 2588-2605.
- 13) Nishikori, S., Yasuda, J., Murata, K. Takegaki J, Harada Y, Shirai Y, Fujita S. Resistance training rejuvenates aging skin by reducing circulating inflammatory factors and enhancing dermal extracellular matrices. *Sci Rep*. 2023, 13: 10214.

コスメティック産業集積地発展における社会構造、 多様なアクターの協働、支援制度に関する分析

同志社大学

藤本 昌代

In France, the state and city governments support small and medium-sized companies in the cosmetics industry, strengthen their brand value by grouping them together, and cooperate with universities and national research institutes to strengthen their technological capabilities. On the other hand, there are few cosmetic industry clusters in Japan, and the JCC, a Japanese cosmetic industry support organization related with Cosmetic Valley, has seen a decline in financial and human resource support for the cosmetic industry from prefectures and cities, and has failed to strengthen cooperation with universities and national research institutes. The current membership has been reduced by half since its establishment, and it is difficult to say that it has developed. There is a big difference between Japan and France, where it has been difficult to establish a cooperative structure with government and national institutions and large companies to strengthen the cosmetics industry. The survey also revealed cultural differences in the information behavior of both manufacturing companies and consumers: in France, both companies and consumers focus on the attitude of items related to the SDGs, while in Japan, many consumers pay attention to efficacy but do not focus strongly on the attitude of companies.

1. 緒言

本稿は日仏の化粧品産業集積地での聞き取り調査をもとに、集積地の社会構造、化粧品産業の多様なアクター、支援制度に関する分析を行うものである。産業集積地に対する「クラスター」という概念は、ハーバード大学のM. Porterによってもたらされた概念であり (Porter 1998 = 2005)、この概念に基づいて世界中で産業集積地の発展に注力する政策が取られた。Porterの概念が個々の企業による自生的な集積を指すのに対して、本研究では各地域の発展、継続に対して行政支援が重要な役割を果たすタイプの産業集積地に注目している。

欧州の化粧品産業の中心地であるフランスには多くの地域に産業集積が見られる。たとえば、ChartresにはCosmetic Valleyという化粧品産業を支援する組織があり、L'OréalやLVMH等々の世界中で有名な企業をはじめとする大小企業さまざまな規模の化粧品関連の製造業、原材料、香料、顔料などのサプライヤー、パッケージ、品質検査企業、大学などの研究機関が集積している。他にも温暖で花に恵まれた南仏地方には香水で発達したGrasseという産業集積地があり、Fragonardなど創業百年近い有名な老舗企業が存在している。ここにも香水だけでなく、香料や多くの素材提供企業が集まっている。これらのフランスの化粧品産業集積地にはトップランナーのL'Oréalという王者



Analysis of social structure, collaboration among various actors, and support systems in the development of cosmetics industry clusters

Masayo Fujimoto

Doshisha University

から、大学発ベンチャーなどの小さなスタートアップ企業まで多くの企業がある。

本研究では主に化粧品産業集積地の発展に寄与するために、中小企業の支援、大企業と中小企業との連携、国内市場、国際市場へのネットワーキングなどを促進する地方自治体が注力する組織について調査を行う。本稿では事例として、フランスではChartres、Orléans、Lyonにある化粧品産業が集積している地域、日本では化粧品産業の中小企業に対して地方自治体が支援する地域として佐賀県の唐津市を挙げる。分析では調査を通して得た情報から、支援組織の役割、化粧品に対する社会意識と制度について検討を行う。

2. 方法

本研究の方法論は、マクロデータでは見えないミクロレベルの要素について質的調査の手法を用いて情報を収集している。本項では、化粧品産業におけるフランスと日本の位置づけ、フランスと日本の化粧品産業集積地に関する地理的情報などを示す。

2.1. 化粧品産業における日仏の位置づけ

CHAILEEDOの2023年度調査(2024年3月12日更新)によれば、世界の化粧品売上高トップ10企業は、第1位 L'Oréal 450億3000万\$、第2位 Unilever 287億6000万\$、第3位 Estee Lauder 151億5,700万\$、第4位 P&G 151億8,600万\$、第5位 LVMH 90億4,000万\$、第6位 Beiersdorf 85億1,000万\$、第7位 資生堂 66億1,000万\$、第8位 Coty 60億1,000万\$、第9位 Kenvue 57億6,800万\$、第10位 Natura 53億7,000万\$である。フランスは、L'Oréalが群を抜いて高い売上げであり、LVMH、Cotyなどを含め3社もトップ10に入っており、文字通りコスメティック大国である。日本企業である資生堂の順位は2022

年度と変わらないが、中国の消費者が福島原発廃水放出のタイミングで日本の化粧品をボイコットした影響で売上高が減少していると評されている。日本の化粧品産業には資生堂、花王、コーセーなど、いくつかの大企業があり、日本の中では資生堂が化粧品部門において花王、コーセーに比べて群を抜いて売上高が高い。

2.2. フランスの化粧品産業集積地の地理的情報

フランスの化粧品関連企業には、大企業ばかりではなく、多くの中小企業があり、これらによって支えられている。大企業は自社に研究所をもち、品質管理まで自社内で行うことができるが、中小企業は研究部門、製造、品質管理、マーケティング、それぞれが充実しているとは限らない。そこで、中小企業は連合組織を作り、それぞれのビジネスに役立つ情報やネットワーク作り、団体としての交渉力を高めるようにしている。本稿で扱う事例は、1つめはChartresにある最大の化粧品産業集積地の支援組織のCosmetic Valleyである。ChartresはParisに近く、公共交通機関で約1時間半の距離にあり、アクセスがしやすい。2つはOrléansにある支援組織のCosmétoSciencesである。OrléansはParisにもChartresにも近い場所にある。同組織は、Cosmetic Valleyのメンバーでもあり、大学、研究機関などとの連携の役割を担っている。3つめに示すのはLyonにある化粧品関連企業が集積するエリアである。Lyonはフランス東部の中部地域にあり、ParisとGrasseの中間に位置する。

2.3. 日本の化粧品産業集積地の地理的情報

フランス同様、日本の場合も化粧品産業の多くは中小企業であり、互いに補完し合う必要がある。そのために日本でも支援組織を設け、産業集積の拡大を目指している地域がある。日本における化粧品産業集積地の1つに九州地方の佐賀県唐津市があり、Japan Cosmetic Centerという行政が関わる支援組織がある。本稿では日本の事例としてJCCでの活動を取り上げる。

2.4. 聞き取り調査の対象地域と組織概要

フランスと日本の聞き取り調査の対象組織、アクターは以下の通りである。

(1) フランス

・Cosmetic Valley

Chartresにあり、Centre州、Chartres市など自治体が化粧品産業集積地の発展を支援する政策を立て、中小企業だけでなく、大企業もフランス化粧品業界のために協力する化粧品産業支援組織である。インタビュー対象者は担当者であるa氏、b氏である。

・CosmétoSciences

Orléansにあり、運営事務局は市職員が出向しており、Orléans大学構内に事務所があり、研究、技術革新に注力する化粧品産業支援組織である。インタビュー対象者は担当者であるc氏、d氏である。

・材料系サプライヤー企業2社

Lyonにある化粧品産業の集積地で活動する企業であるA社、B社である。インタビュー対象者は関連分野で博士学位、修士学位取得の技術・営業の管理職であるe氏、f氏である。

(2) 日本

・Japan Cosmetic Center

佐賀県唐津市にあり、佐賀県、唐津市が関わり、運営には市が関わる化粧品産業支援組織である。インタビュー対象者は事務長であるg氏である¹⁾。

3. 結果

本項では、調査の結果について、まずフランスの代表的な化粧品産業集積地と日本の化粧品産業集積地の概要、連携関係を示し、その中で中小企業の支援制度などについて示す。その後、欧州の企業、消費者の動向について示し、日仏の傾向差について議論する。

3.1. フランスの化粧品産業集積地概要と連携関係

(1) Cosmetic Valleyの例

フランスの代表的な産業集積地支援団体としてCosmetic Valleyが挙げられる。Cosmetic Valleyはフランスの香水・化粧品分野の企業、研究センター、大学、学校を結集、調整し、支援する組織である(Cosmetic Valleyウェブサイト)。Cosmetic ValleyはChartresやOrléansなどの地方自治体と協力して化粧品産業の成長促進、フランスの化粧品産業の国際的な影響力拡大に貢献することをミッションとしている。同組織は大小さまざまな規模の事業所がメンバーとなり、現在、その数は6,300を超え(そのうち85%が中小企業)、売上高710億€(約767億\$うち、トップ10に入る大手3社が600億\$を超える売上高)、これらの組織は約226,000人の従業員を雇用している(この情報を組織の説明に挙げていることから、事業の成功が経済的利益だけでなく、雇用創出も目的としており、それが社会的役割であるという認識が強いことがわかる)。また、毎年ほぼ60社ほどの地域内スタートアップ企業の創設にも関わっている。

歴史的には1994年に中小企業同友会として設立され、地方自治体の支援を受け、Chartres市にCosmetic Valleyという組織が設立され、老舗香水メーカーGuerlain社社長Jean-Paul Guerlain氏が初代会長に就いている。1つの組織体となることで、化粧品産業の中小企業は「フランスブランド」として大きな勢力として活動しやすくなった。

2014年にCentre-Val de Loire州とChartres市は、同組織が世界の化粧品業界のリーダーとしての地位を強化するために国内外での連携を強化することを求めた。そのためCosmetic Valleyは2016年には5大大陸での化粧品メーカー協会設立を支援し、そのリーダーとして化粧品業界を牽引するため、グローバル化粧品クラスターとして国際展開を行っている。Cosmetic Valleyの活動は後述する日本のJapan Cosmetic Center設立にも大きく影響を及ぼしている。

Cosmetic Valleyの事務局の責任者の1人であるa氏によれば、フランスの化粧品産業には約1,000か所の研究所、26,000人の研究者がおり、1994年にCosmetic Valleyが協会として設立されてから10年後の2005年には、フランス政府主導の競争力クラスター(Pôle de compétitivité)の一員となった。同組織は市場調査、消費者の志向を常に観察する担当者を置いたり、Cosmeticに関連するイベントを開き、ネットワークを可視化する努力をしている。この組織で特徴的なことは、行政が産業支援に注力しており、企業間ネットワークだけでなく、大学や公的研究機関と企業との共同プロジェクトも成功するために多くの支援をしていることである。

彼らの活動には2つのプラットフォームがあり、1つめは化粧品の測定と試験に関するものであり、2つめは安全性と無害性の評価に関するプラットフォームである。後述するが、Centre-Val de Loire州の化粧品研究ネットワークの1つであるCosmeto-Science ProgrammeではOrléans大学やCNRS(フランス国立科学研究所)の多様な研究室と共同研究している。Cosmetic Valleyでの活動には産業界からは中小企業だけでなく、L'Oréal、LVMH、Chanel、Hermes、Guerlainなどの大企業も参加しており、化粧品産業の地位、技術向上に貢献している。Cosmetic Valleyは化粧品産業の技術向上のために国際的イノベーションに関するコンペティションを用意し、アカデミックな研究部門と産業部門にそれぞれ賞を与えており(賞金1万€)、国際的な知名度の向上にも努めている。

その他、関連する活動として国内外の化粧品メーカー、サプライヤー、開発機器メーカー等々が集うCosmetic 360というイベントや研究者が集うCosmetic Innovationという研究発表会などがある。Cosmetic 360の担当者であるb氏によれば、このイベントはフレグランスと化粧品産業のイノベーションに関する国際見本市であり、技術革新に焦点を当てたもので、他の商品紹介の見本市とは異なるものである。これは毎年10月に開催され、来場者数は約5,000人で出展社数は220社である(今回、b氏の許可を得て、2023年10月の見本市の参与観察を許された)。すべての出展社は、化粧品分野に関わる企業、組織であり、技術革新やソリューションを紹介するため集まるという(たとえば、化粧品の価値として、原材料、成分、試験、

包装、物流などがあり、バリューチェーン全体が、このセクターに革新やソリューションを提示する)。

より具体的には、ここでは製薬会社のポンプ技術を化粧品用に提案したり、3Dプリンターによるプロトタイプングの可能性を提案し、スタートアップ企業向けの小規模なシリーズを作ることもできるといった応用可能性を提案するものがある。また、ある製剤メーカーは24時間以内に製剤化することができ、別の製剤メーカーは希少な成分で製剤化することができ、別の製剤メーカーは特殊な製法で製剤化することができるというように、製剤、製法、マーケティング、あらゆる種類の革新が提案されている。この見本市には、スタートアップ企業、中小企業、大企業など、あらゆるタイプの企業が出展しており、大企業はスタートアップ企業の興味深い提案にアンテナを張り、共同研究や時にはM&Aまで展開できる相手を探している。そのため、展示会の後に、交流し、パートナーシップを結ぶ可能性を見据えたコミュニケーションが行われるのである。

2023年はクリーン・テクノロジーがテーマとなり、トレサビリティ、脱炭素化、廃棄物の削減、汚染物質の削減、さまざまな製品の製造、生分解など、あらゆる革新的な技術に目が向けられている。デジタル化という側面も重要で、新しいテクノロジー、3Dプリンター、エレクトロニクスなど使えるものを組み合わせることに関心が集まる。人工知能、持続可能性、テクノロジー、微生物学、これらすべてが化粧品業界の問題や期待に応えられるのではないかという関心と多様な提案がなされている。

b氏は「私たちの役割は、プロジェクトを組み立てることを手伝えることです」と述べる。たとえば、ある研究者が実業家と出会い、共同プロジェクトを立ち上げたいと考えた場合、b氏らはそのプロジェクトの立ち上げを手助けし、さらに資金調達の手助けをする。このように彼らは機会を創出し、その後のプロジェクトが成果を上げられるように多様な支援を行っているのである。

(2) CosmétoSciencesの例

2つめに挙げるのは、Chartresの近くのOrléansにあり、Cosmetic Valleyと深い関わりをもつCosmétoSciencesである。同組織はOrléans大学構内事務所を設置し、Orléans市の職員が出向し、運営に従事している。CosmétoSciencesでは事務局の担当者のc氏とd氏にインタビューを行った。同組織は2015年から2022年にかけて、11の学術研究機関(Orléans大学、Tours大学、CNRSフランス国立研究所他)の23個の研究チームと30組織の産業パートナーを結びつけ40の共同研究プロジェクトの創出に寄与している(現地資料およびCosmétoSciencesウェブサイト)。化粧品産業の研究、技術革新に大きく貢献しているのがOrléans大学とTours大学であり、Paris、Chartresへの近接有利性があり、教育の中に化粧品産業に求められる人材

育成を取り入れている。CosmétoSciencesの事務局は、化粧品の研究とイノベーションを促進するために、Region Centre-Val de Loire(サントル=ヴァル・ド・ロワール地域圏=フランスにある11の広域行政圏で州に相当する)が10年間にわたり長期資金を提供している。c氏によれば、これはRegion Centre-Val de Loire独自の化粧品に特化したエコシステムである。Region Centre-Val de Loire議会は、化粧品の研究とイノベーションを地域イノベーション戦略の中心に据えており、このエコシステムは、学术界と企業との結びつきを促進するものであり、企業の繁栄、雇用創出を支援するものとして位置づけられている。

CosmétoSciencesは、国内および国際的規模での研究と技術革新を促進しており、それには7カ国が参加し、化粧品業界のバリューチェーン全体を対象としている。同地域には化粧品産業の問題や課題に焦点を当て、大学、教育機関、CNRSなど、化粧品に携わる研究者や研究所が集まっている。CosmétoSciencesは、地域議会からの資金援助を受け、大学が主導し、CNRSなどの高度研究機関と提携している。また、国際関係の発展を担当する機関との連携や産業界との連携を担当してくれるCosmetic Valleyなどのパートナーもいる。このプログラムにおける主なミッションは、地域規模での研究と専門知識を構造化し、地域の専門知識、研究成果、技術移転を促進する研究と技術革新を強化することである。同組織はプロジェクトの開発を支援し、国内および欧州の協力関係を発展させ、産業の問題と連動して、エコロジー、エネルギー、DX化などの課題に対応するための技術革新を支援する。また、Cosmetic Valleyとは社会経済的な連携も行っており、たとえば、Cosmetic 360やその他の促進イベントへの参加、一般市民への知識の普及も行っている。CosmétoSciencesは、まず研究者同士のつながりを作ることを目的とし、そのために、さまざまな国との多様なエコシステム、多様な研究所を選定し、研究者間のリンクを作ることで共同研究の機会を開発している。産業界のエコシステムについては、Cosmetic Valleyと同様である。Cosmetic Valleyが非常に大きなネットワークとして産業界との強い連携をもっているのに対して、CosmétoSciencesは小規模ではあるが、研究主体の活動を重視している。たとえば、持続可能な化粧品に関する国際会議を開催し、持続可能な化粧品の問題に取り組んでいる7カ国の研究者を集めたワークショップも開催している。

CosmétoSciencesは資金源を確保し、コンソーシアム設立のためのプロジェクト立ち上げを支援し、パートナー探しを手伝い、論文執筆プロジェクトや知的財産に関する支援も行っている。そのほか、学会や企業とのミーティングも3カ月に一度定期的に行い、企業のニーズを把握し、どのように協力できるかを調査している。主な研究テーマに

は、自然と環境に優しい生物学的活性の評価、化粧品の安全性、製剤の問題などがあり、原料の選択から完成したプロジェクトまでのすべての評価からスキルをもつさまざまな研究室があるという。CosmétoSciencesが強調するのは、これらのプロジェクトがすべて産学共同プロジェクトだということであり、各プロジェクトには企業が参加している。そして、その目的は産学間の技術移転でもある。共同研究を希望する研究者や大学院博士課程の学生には、給与、宿泊施設、そこでの生活のサポートのサービスが提供されている。特に、Cifreと呼ばれる政府と企業が折半する博士課程学生に対する3年間の給付制度が利用され、博士課程修了後学生がそのまま共同研究企業に就職することも珍しくない。さらに高校生など若い世代の育成のために教育プログラムも用意している。

(3) Lyonの化粧品素材系サプライヤーによる社会課題に対する制度情報

3つめに示すのは、化粧品素材系サプライヤー、研究組織などが集積するLyonでの調査である。Lyonはフランス東部の中部地域にあり、パリと南仏の原料生産地の間に位置する。同地では大企業に材料を卸すA社のe氏とB社のf氏にグループインタビューを行った。両氏によれば、化粧品産業は非常に厳しい欧州規制下にあり、それに合わせて、安心して使える安定した材料を使う必要がある。その中で新しい製品を作る上で重要な業務の1つとして、その年度に大手企業から掲げられる「コンセプト」に適合した最終製品のための素材を用意することがある。化粧品産業では安心して用いられる材料を使いつつ、新商品に適合的な材料を作る配合、レシピは非常に重要な開発と考えられている。しかし、それは効能や、地域特性(高湿地域、乾燥地域など)に合わせた使い心地だけでなく、トレサビリティ、SDGsを意識した行動基準(男女、人種、LGBTQ、社会階層への差別的行動、環境によい材料の利用等々のチェック)を遵守している企業が製造した製品であるかが問われている。2021年にヨーロッパではエコビューティースコアコンソーシアム(Eco Beauty Score Consortiumウェブサイト)が立ち上がり、2022年のプレスリリース当時36組織であった参加者は、2年後の2024年3月時点で2倍の71組織に増えている。コンソーシアムの目的は、化粧品の共通の環境影響スコアリングシステムを開発し、消費者がより多くの情報に基づいて購入決定を行えるようにすることである。本基準は、世界最大の化粧品メーカーであるL'Oréalが環境に悪影響を与える企業行動を抑制し、消費者により的確な情報を提供しようとして2020年頃からLCA(Life Cycle Assessment)を開発した(たとえば、CO₂ミッションなど)。これは、環境影響スコアリングシステムなどのチェック項目があり、

これを数値化し、算定するためのルールを決め、自分たちの化粧品をこのLCAバリューを使って、スコアのラベリングをするものである。メンバー組織は、処方や包装に使用される標準的な成分や原材料、および製品使用時の環境影響についての共通データベースにアクセスすることができ、非専門家でも、個別の製品の環境影響を評価できる共通のツールが目指されている。日本からは資生堂と花王などが加わっている。今後、ますます企業は消費者からその環境基準に適合的な製造をしているかということを問われるようになっていくだろう。e氏は、「たとえ、よい効き目があっても行動基準が守られていない企業の製品はボイコットされ、また、行動基準順守によってコストが高くなっても消費者は受け入れる土壌がある」と述べる。そのため、このコンソーシアムに関わる大手化粧品メーカーに卸しているサプライヤーはこれらのスコアで高得点を取得すること、また、その基準に適合的な材料を提案していく必要があるという。

(4) 日本の化粧品産業集積地

日本に存在する化粧品の産業集積地として挙げられるのは、佐賀県唐津市であり、その支援団体はJapan Cosmetic Centerである。池田・藤本他(2021)によれば、同地域は2011年に世界最大の化粧品産業クラスターであるCosmetic ValleyのAlban Muller元会長がアジアへの戦略拠点となる日本のパートナーを求めて佐賀県唐津市を訪れたことによる。Muller氏は同地域の天然資源、アジアへの地理的近接性、また、コスメティック産業イベントで既知であった検査・輸入代行を行う株式会社ブルーム、化粧品製造を行う株式会社トレミー、保税物流を行う松浦通運株式会社の3社からなる小規模クラスターの存在、薬用植物栽培研究所や佐賀大学などの研究機関があることなどから、クラスター要件を満たしていると評価した。これにより、佐賀県唐津市は2013年4月にフランスのCosmetic Valleyと連携協力協定を締結し、国際的コスメティック・クラスター形成推進母体として「Japan Cosmetic Center」(以下、JCC)を設立し、初代会長にMuller氏が就任した。

設立から5年後の2019年3月のJCCの正会員数は195の個人・企業が所属し、24の大学、自治体、団体が支援会員として入会していた(池田・藤本他2021)。佐賀県、唐津市、玄海町など、3つのレイヤーの行政組織がその支援に関わる点においてCosmetic Valleyに似て、行政による産業活性化、雇用創出への期待が高いことがうかがえる。もとより、ブルームの高い検査能力、トレミーでの迅速なボトリング、松浦通運での入管作業のスムーズな流れは、自社に品質管理部の充実が厳しく、日本の薬事法に詳しくない海外の中小企業にとって非常に重要なカウンターパートナーであったため、設立後の行政の支援、会員組織の増

加による団体としてのブランド力向上、日本の化粧品産業の地位、売り上げ向上への貢献に強く期待が寄せられた。

JCCはCosmetic Valleyのように「新市場開拓事業」(海外に向けて会員企業とのマッチングや海外企業誘致事業、海外クラスターとの提携)、「産業創出事業」(地域資源を活用した事業)「地域ブランド事業」「専門人材配置」(職業教育として高校生向け短期講座や地元の高校において「化粧品学習及び課題研究」を実施、化粧品産業で働く地元の人材育成)の4つの事業を行い、また、外部資金の獲得や研究の支援においても重要な役割を果たしている。

JCCの場合、ブルームの山崎社長の推進力、Cosmetic Valleyの国際戦略、すでにブルーム、トレミー、松浦通運の業績が確立されていたこともあり、この3社主導で進められていることがあるものの、大企業がこの化粧品産業集積地にあまり強くコミットしていないこと、また、コロナ禍以降、佐賀県、唐津市が化粧品産業だけに多くの人的支援、経済的支援を行うのは容易ではないこともあり、設立当初よりも、行政からの支援は減少している(g氏)。現在、JCCの会員組織は2023年12月で正会員106の個人・企業が所属し、支援会員26であり、メンバー企業数はコロナ禍前の約半数に縮小している。

日本では化粧品業界全体の強化を狙ったフランスの行政、大企業、中小企業、研究機関の連携に倣ったものの、その後、行政が支援し続けているフランスに比べて、日本の場合、行政の経済的、人的負担を継続しきれなかったという状況があるようである。そして、日本の大手化粧品メーカーそれぞれの動きは国際市場を見据えて海外での活動も活発に行われているが、JCCの中小企業との連携は限定的であり、日本の上位3社の資生堂、花王、コーセーはメンバー企業に入っていない。

4. 考察およびまとめ

これまで化粧品業界には少数の大企業と多くの中小企業があるという産業構造と中小企業が支え合う集積地における支援機構の存在、連携関係の構造、支援制度などを示してきた。集積地における中小企業支援組織の役割として、中小企業への情報支援、助成金支援、ブランドたらしめる団体の維持などを示してきた。フランスの場合、州、市を挙げて化粧品産業の中小企業の支援、グループ化することで団体としての国際的ネームバリューの強化、技術力強化における大学、国立研究機関の協力体制などが組み立てられており、また、世界トップ10に入っている大手3社も参画していることから、今回、観察された集積地は短期間にメンバー組織を大きく増やし、発展していた。他方で日本の場合、化粧品産業集積地は少なく、Cosmetic Valleyとの提携をもつ化粧品産業支援組織であるJCCは初代会長にMuller氏が就任しても、その後、化粧品産業に対する県、

市からの経済的、人的支援の減少、大学、国立研究所との連携強化が順調とは言えず、メンバー組織が半減し、大手3社の参入もないため、化粧品業界全体の動きになっているとは言い難い。

中小企業は製品化への全ての過程を1社で網羅するには人材、資金が不足しているため、支援組織の情報は欠かせない。大企業も常にベンチャー企業の研究を探索しており、M&Aでその技術を吸収できる機会を求めている。フランスの一大産業である化粧品産業と、その地位の確立が途上である日本の化粧品産業とでは、行政や国立機関の協力体制、大企業の化粧品業界の強化への協力体制の実現の差は大きい。

また、本調査では企業行動に影響を及ぼす文化的な違いが日仏に存在することも明らかになった。フランスそして広く欧州の消費者はSDGsに配慮した企業が作っているものか、ケミカル由来のものを使っていないか、環境、人権、サステナビリティに配慮している企業が作ったものかをチェックし、それが満たされていない場合は、たとえ何かよい効用が期待されても購入しない傾向が強い。フランスの場合は、近年のLCAアセスメントによる、ある一定基準を超えている企業か、意識が低い企業かで消費者が製品購入を決めるという傾向が強まっている。日本では、SDGsに対して配慮しているという記述がある企業のウェブサイトでも、あまり、詳しく書かれておらず、製品とそれとは切り離された意識がうかがえる。日本の消費者は化粧品の効用に着目し、その製造企業の幹部の男女比、人種比、LGBTQへの配慮や自然環境を配慮した材料、地域への排水、発がん性の低い素材を用いているかなど、企業行動の社会性への関心、それへの配慮で発生するコスト、価格の上昇への受容は高いようには見えない。ただし、これらについては大手企業、準大手企業はフォローできるかもしれないが、中小企業については単独では解決が困難なことも少なくないと考えられ、彼らが経済的に成立する方策についてCosmetic ValleyやCosmétoSciencesの支援組織に期待される役割はさらに大きくなるだろう。

これらのことから、製品に求められる品質は社会（消費者の関心）が何を重視しているかによって決められるといえよう。自然由来というのは、フランスに限らず、日本でも好まれるが、その過程に化学的な処理がなされるかどうかについては関心が低い。その中で、いずれの国も「良さそう」という観念に導かれた行動が見られる。安全第一の材料で作られた化粧品では効用が一義的には求められておらず、社会的な要素を遵守していることも求められている。したがって化粧品の製造、原料購買はそれぞれ（大企業主導の）製造サイドの理由による情報行動²⁾であり、消費者の化粧品購入も当該地域における観念に導かれた情報行動といえよう。

化粧品は化学製品でありながら、社会的受容に大きく影響を受ける産業である。日本企業も海外での販売では当該国の原料及び製造基準に合わせているが、日本もこれまでに以上にSDGsに則った企業行動を取らなければ、販売が厳しくなるだろう。ただ、フランスの行動基準に則った製品が高価格になり、それがラグジュアリー層を想定したものだとする、社会階層に関する議論も必要である。化粧品産業のように社会的受容に影響を受ける分野において、社会に対する社会学的分析視点を持った研究はこれからますます重要になるだろう。

本研究は1年間の短期間であったため時間的な限界があった。今後、さらなる分析、調査などの機会が与えられたら、より深い研究成果が期待されるだろう。

- 1) 研究時間の都合上、g氏へのインタビューは2023年以前に行われたものであり、既刊の論文の中で公表しているものを引用する。ただし、メンバー数等のデータに関しては2024年3月時点で公表されているものを用いている。
- 2) 加藤秀俊は、情報行動について、私たちの情報行動について人は観念の生き物であると述べている（加藤 1970）。

謝 辞

研究を遂行するにあたり、多大なご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) CHAILEEDO ウェブサイト (<https://chaileedo.com/the-top-ten-global-beauty-companies-achieved-a-total-revenue-of-nearly-150-billion-in-2023/>, 2024年3月24日取得).
- 2) Cosmetic Valley ウェブサイト (<https://www.cosmetic-valley.com/>, 2024年3月24日取得).
- 3) CosmétoSciences ウェブサイト (<https://cosmetosciences.fr/>, 2024年3月27日取得).
- 4) Eco Beauty Score Consortium ウェブサイト (<https://www.ecobeautyscore.com/>, 2024年3月28日取得).
- 5) 池田梨恵子・藤本昌代・東秀忠・野原博淳, 産官学連携クラスターの日仏比較研究シリーズ: 事例J3: 佐賀県唐津市・玄海町コスメティック・クラスター 2018年度調査, 評論・社会科学, 139, 107-127 (2021).
- 6) Japan Cosmetic Center ウェブサイト (<https://jcc-k.com/>, 2024年3月24日取得).
- 7) 加藤秀俊, 1972, 『情報行動』中央公論新社.
- 8) Porter, M. E., 1998, On Competition, Boston: Harvard Business School Press. (= 2005, 竹内弘高訳, 『競争戦略論』(I・II)ダイヤモンド社).

三次元顔認証スマホアプリによる表情筋トレーニング/ストレッチの客観的指標の導入と末梢性顔面神経麻痺後遺症予防リハビリへの応用

産業医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科

堀 龍 介

We developed an iPhone app, FacialPalsyZero, which can objectively and quantitatively evaluate facial motion using Apple's three-dimensional facial recognition system, Face ID. We released it on the App Store for free. FacialPalsyZero smoothly displays real-time scores indicating the ratio of the amount of change in five facial regions, including the eyebrow, eye, nose, cheek, and mouth, between maximum movement and the resting state. FacialPalsyZero is a revolutionary application for evaluating facial motor function that is simple, easy to use, and objective. In this study, we assessed the performance of FacialPalsyZero, further upgraded it by increasing the number of BlendShapeLocation items from 7 to 15, introduced Debug Mode, and created FacialPalsyZero+ with high-definition facial motion objective evaluation functions. The results of this study have been reported.

The findings of this study have facilitated the easy and objective evaluation of facial movements. It is anticipated that further enhancements to the accuracy of FacialPalsyZero+ will lead to the replacement of evaluation methods that have traditionally relied on subjective experience with a more objective and quantitative approach. The challenge for the future is to optimize treatment and rehabilitation for the sequelae of peripheral facial nerve palsy. This study would make a significant contribution to the field of cosmetology.

1. 緒 言

表情筋は顔面頸部の皮膚に付着しており、微妙な動きをして人の表情を作り出す。眼の開閉、口で食べる・しゃべるなどの運動にも関わっており、顔面神経の支配を受けている。人は表情筋で表情を作って自由に感情を表現するわけで、表情が豊かだと明るくはつらつとした印象を与えるため、健康な表情筋の維持は生活には欠かせない。一方、加齢や無表情など衰えた表情筋は顔のハリの低下やたるみの原因となり、表情が暗い印象になったり老けて見えたりする。末梢性顔面神経麻痺ではその程度によって表情筋が全く動かなくなり閉眼や食事などで困るのに加え、左右非対称の顔貌に精神的苦痛も感じる。また、末梢性顔面神経麻痺患者での病的共同運動などの後遺症予防リハビリで代表的なものとしてミラーフィードバック法がある。鏡越しに自分の顔を見ながら口唇を動かさずに閉眼したり、食事の時や話をする時などには口を動かす必要のある時にはなるべく意識して目を開くような運動訓練などを行う。しかし、ミラーフィードバック法にしても実際の強度や程度に対する判断は鏡越しに自分を見るだけの主観的判断に過ぎないため、患者は判断に困惑して効果も不十分となり、結

果としてリハビリが長続きしないことがしばしばみられる。従って、顔の運動や表情筋の動きを客観的に評価できるシステムの開発は Cosmetology において非常に重要なものであるといえる。

われわれは、Appleの三次元顔認証システムを利用して顔の運動を手軽に客観的かつ定量的に評価できる独自のアプリ「FacialPalsyZero」を開発し、AppStoreに無料公開している(図1)。眉・目・頬・鼻翼・口角の顔面5部位の最大運動時と安静時の変化量の比をタイムラグなく滑らかにスコア表示することができる。このアプリは顔面神経麻痺患者の顔面運動機能評価のために開発した。これまでの顔面運動機能評価は、簡便であるが主観的、もしくは客観的であるが非常に手間と時間がかかる、というように一長一短の評価法しかなかったが、FacialPalsyZeroは簡便で手間がかからず客観的という画期的な顔面運動機能評価アプリである。

本研究ではFacialPalsyZeroの性能の評価を行い、さらにFacialPalsyZeroの改良とDebug Modeの開発、そして高精細顔面運動客観的評価アプリFacialPalsyZero+の開発を行った。

Introduction of an objective index for facial muscle training/stretching using a three-dimensional face recognition iPhone App and its application to rehabilitation for prevention of sequelae of peripheral facial nerve paralysis

Ryusuke Hori

Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, University of Occupational and Environmental Health, Japan



図1 FacialPalsyZero ?

2. 方法

2.1. FacialPalsyZeroと柳原法、ENoG、積分筋電図の相関関係の確認

すでに開発していたFacialPalsyZeroは、Appleが提供するBlendShapeLocationという顔面の動きを示す指標を利用して、検出された顔の表情を特定の顔の特徴の動きで表現し、BlendShapeLocationの各キーに対応する値は、その特徴のニュートラルな構成に対する現在の位置を示す浮動小数係数で、0.0(ニュートラル)から1.0(最大動作)の範囲で示される。この係数で動きを定量化したものがFacialPalsyZeroの概要である。FacialPalsyZeroでは顔面運動の主要部位の動きを代表する眉/目/頬/鼻翼/口角の5か所(左右10か所)に対する7つのBlendShapeLocation(眉: browOuterUp, browDown / 目: eyeblink, browDown / 頬: cheekSquint / 鼻翼: noseSneer / 口角; mouthDimple, mouthSmile)を評価対象とした(図2)。顔面神経麻痺の一般的な評価法である柳原法とFacialPalsyZeroの相関関係を調べるため、健常人5人を対象にスコアを評価した。次に顔面神経麻痺患者12人を対象として柳原法との比較を行った。さらにENoG、積分筋電図との相関関係を検討した。

2.2. 高精細評価のためのFacialPalsyZeroの改良とDebug Modeの開発

BlendShapeLocationには実際は全52の指標があり、より高精細に評価するため15か所(左右で30か所)を評価するシステムにバージョンアップした。顔面神経麻痺および後遺症の高精細部位診断と運動評価法の開発のためには、柳原法以外にも国際的にも認知されている顔面神経麻痺評価法や後遺症評価法であるHouse-Brackmann法、Sunnybrook法、May法との相関関係も十分に評価できるアプリのプログラム開発をする必要がある。そこでアプリプログラムでの30か所の浮動小数係数をリアルタイムに表示し、その数値が目まぐるしく変化する状態が一目でわかるDebug Modeの開発に取り組んだ。

2.3. 表情筋トレーニング/ストレッチ強度における客観的指標の導入

健常人3人を対象に、表情筋に対応したDebug Modeでの顔面部位を特定し、その部位に応じた自発的筋収縮、受動的筋伸張の客観的スコアを継続的に記録し、過不足のない最適な表情筋トレーニング/マッサージ強度を特定するとともに、最適な継続および間隔日数を特定することを検討した。表情筋は、おでこ-前額部(前頭筋、上眼瞼挙筋、眼輪筋、眉毛下制筋、皺眉筋)、眼周囲(眼輪筋)、ほうれい線-鼻唇溝(上唇挙筋、小頬骨筋、上唇鼻翼挙筋)、

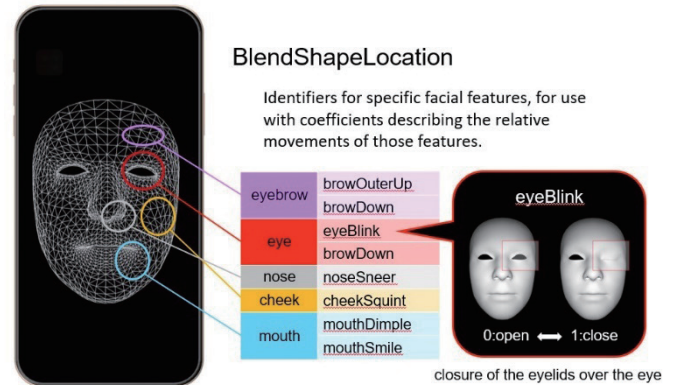


図2 FacialPalsyZero で用いる BlendShapeLocation 顔面運動の主要部位の動きを代表する5か所の部位に対する7つのBlendShapeLocationを評価対象とする

口周囲(口輪筋、口角挙筋、大頬骨筋、口角下制筋、笑筋)、首回り(オトガイ筋肉、広頸筋)を想定する。

2.4. FacialPalsyZero+の開発

Debug Modeの開発を基に柳原法、House-Brackmann法、Sunnybrook法、May法に準じた12の表情を設定し、この12の顔面運動シーンを撮影しその動きを解析するアプリ「FacialPalsyZero+」を開発した。顔面運動の設定された12のシーンごとに安静時からの顔面運動変化を2秒間、1秒当たり60フレーム(60fps)で記録する。それぞれ個別の評価項目を用いて、複数の医師で評価した柳原法の値と比較した。健常例5例、麻痺例30例での検討を行った。

3. 結果

3.1. FacialPalsyZeroと柳原法、ENoG、積分筋電図の相関関係の確認

健常人5人のスコア評価では、全員正常値が検出された(90%以上を正常とする)。顔面神経麻痺患者12人を対象とした柳原法との比較では、5か所の評価部位すべてにFacialPalsyZeroと柳原法のスコアに相関関係がみられた。ENoG、積分筋電図との相関関係の検討では、いずれもFacialPalsyZeroのスコアとの相関関係がみられた(図3)。

3.2. 高精細評価のためのFacialPalsyZeroの改良とDebug Modeの開発

15のBlendShapeLocation(左右で30)は、browOuterUp, browDown, eyeblink, CheekSquint, noseSneer, mouthSmile, mouthDimple, eyeWide, eyeSquint, mouthLowerDown, mouthUpperUp, mouthPress, mouthStretch, mouth, mouthFrownを使用した。これらと実際の顔の動きを図4に示す。Debug Modeを図5に示す。Debug Modeでは顔面の素早い動きを1秒当たり60フレーム(60fps)で浮動小数係数をリアルタイムに表示することができる。

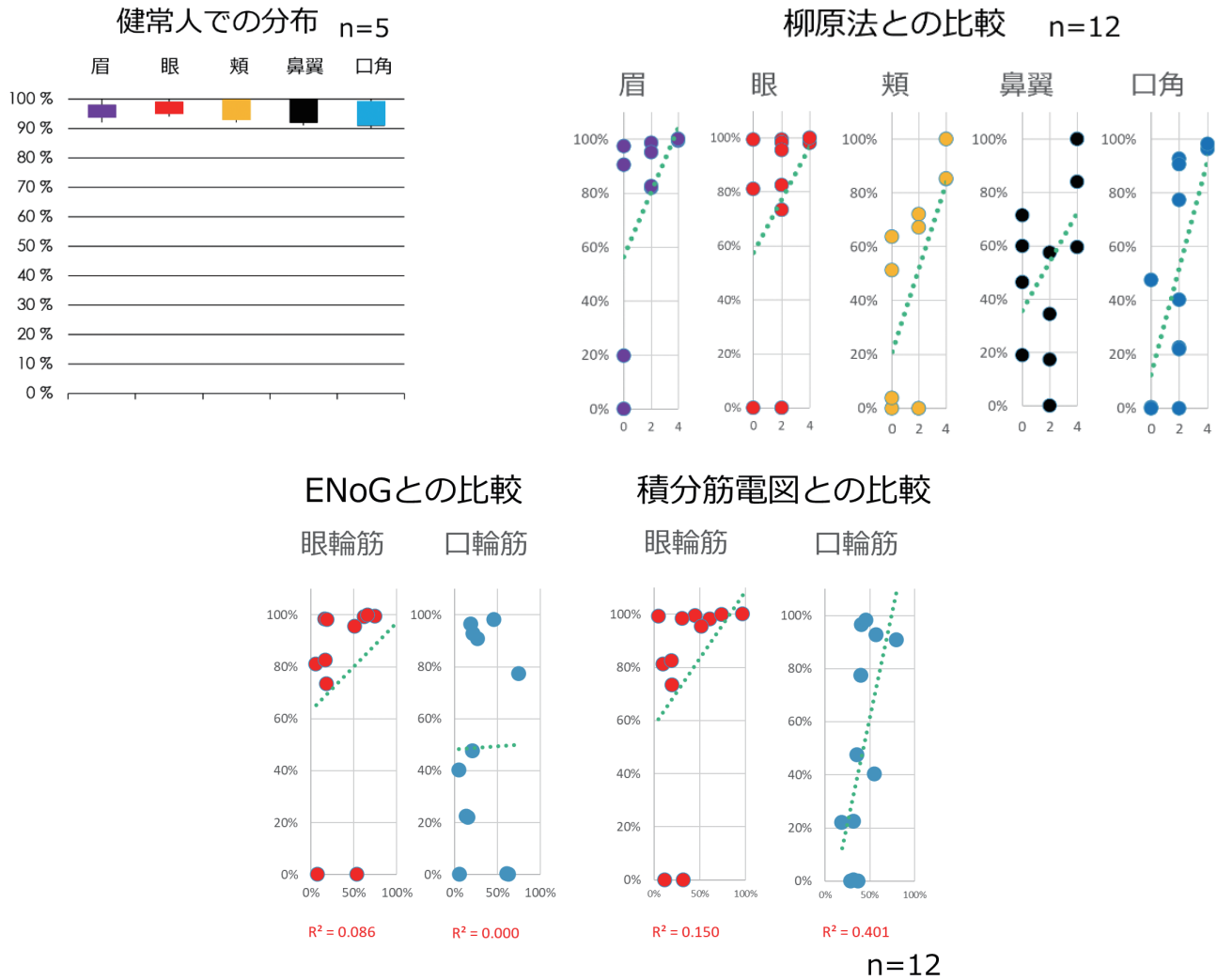


図3 健常人5人での分布、顔面神経麻痺患者12人を対象とした柳原法との比較、ENoG、積分筋電図との相関関係

15 BlendShapeLocation 実際の顔の動き

eyebrow	browOuterUp	眉毛の外側の上方への動き
	browDown	眉毛の外側の下向きの動き
eye	eyeBlink	上下眼瞼の閉鎖
	eyeWide	目を中心としたまぶたの広がり
	eyeSquint	目の周りの顔の収縮
nose	noseSneer	鼻の穴の周りの盛り上がり
cheek	cheekSquint	頬の周りと目の下の上向きの動き
mouth	mouthLowerDown	下唇の下方向の動き
	mouthUpperUp	上唇の上方向の動き
	mouthDimple	口角の後方への動き
	mouthPress	下唇の上方への圧縮
	mouthStretch	口角の外方向への動き
	mouth	上下唇を合わせた外方向への動き
	mouthSmile	口角の上方への動き
	mouthFrown	口角の下向きの動き

図4 15のBlendShapeLocation 実際の顔の動き

3.3. 表情筋トレーニング/ストレッチ強度における客観的指標の導入

Debug Modeで表示されるリアルタイムの浮動小数係数は1秒60フレームであり、すなわち浮動小数係数は1/60秒ごとにめぐるましく表示が動く。従って、表情筋の部位に応じた自発的的最大筋収縮、受動的的最大筋伸張の客観的スコアを継続的に記録することは困難であったため、表情筋トレーニング/マッサージ強度を特定することはできなかった。

3.4. FacialPalsyZero+の開発

柳原法、House-Brackmann法、May法に準じた12の表情の設定内容を図5に示す。12の表情は、Facial rest (安静時)、brow elevation (前額作皺)、blinking eyes (瞬

目)、mild eye closure (軽閉眼)、strong eye closure (強閉眼)、eye closure (right) (右眼閉眼)、eye closure (left) (左眼閉眼)、nose wrinkling (鼻作皺)、grin (歯の露出)、whistling (口笛)、blowout cheek (頬を膨らます)、lower lip depression (下口唇下動)とした。sceneはこの順に撮影した。顔面の主な動きとして、前額の動きがbrow elevation、目の動きがblinking eyes/mild eye closure/strong eye closure/eye closure (right)/eye closure (left)、鼻の動きが nose wrinkling、口の動きがgrin/whistling、頬部の動きがblowout cheekに対応する。柳原法、House-Brackmann法、May法における対象となる表情設定は図6のとおりである。

FacialPalsyZero+においてscene 4の軽閉眼ではeyeblink

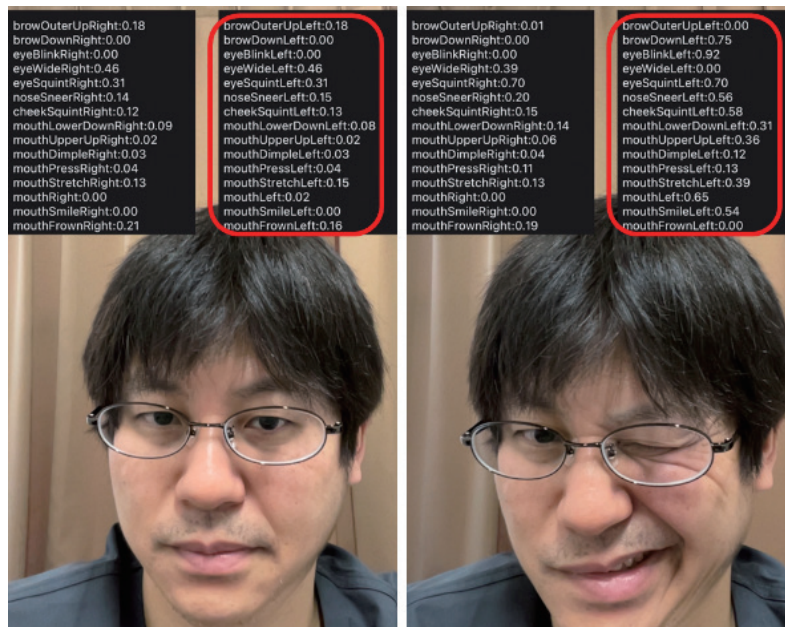


図5 Debug Mode

30か所の浮動小数係数をリアルタイムに表示し、その数値が目まぐるしく変化する状態が一目でわかる。

	Scene	FacialPalsyZero+	Yanagihara 40-point	House-Brackmann	May
1	Facial rest		0, 2, 4	I-VI	○
2	brow elevation	Forehead %	0, 2, 4	I, II, III, VI	○
3	blinking eyes				○
4	mild eye closure		0, 2, 4		X
5	strong eye closure	Eye %	0, 2, 4	I-VI	○
6	eye closure (right)				X
7	eye closure (left)		0, 2, 4		○
8	nose wrinkling	Nose %	0, 2, 4		○
9	grin		0, 2, 4	I-VI	○
10	whistling	Mouth %	0, 2, 4		○
11	blowout cheek	Cheek %	0, 2, 4		○
12	lower lip depression		0, 2, 4		○
		Total 100%	40/40	Grade I-VI	Total 100

図6 柳原法、House-Brackmann法、May法に準じた12の表情の設定内容

において2秒間の合計値を評価指標として左右の比率を検討したところ、カットオフ値を99.5%以上が柳原法における4点、99.5%から90%が2点、90%未満が0点と設定することで正診率は88%を示した。Scene 9の歯の露出ではmouthsmile・mouth・cheeksquintを組み合わせて評価し、カットオフ値を適切に設定することで正診率は78%を示した。動きがないscene 1の安静時や、適切な評価指標がないscene 2の額の前額作皺では評価が難しかった(図7)。一方で本アプリは動的な評価が可能であり、例えば軽閉眼では左右の動きの微妙な差の時間的な変化を客観的データとして示すことが可能であった。また瞬間的な動的変化として麻痺症例での瞬目の左右の違いを示すことも可能であり、顔面全ての座標変化を同時に測定可能であることから眼輪筋が動いた際の口輪筋の動き左右差も記録することが可能であった(図8)。

4. 考察

顔面神経麻痺の程度を正確に客観的に評価することは、治療方針の決定ひいては予後にかかわるために非常に重要である。従来の顔面神経麻痺評価法には主観的評価法と客観的評価法があり、それぞれ利点と欠点がある。主観的評価法として柳原法、House-Brackmann法、May法などがあるが、これは検者が自身で見て判断するため、非常に簡便で費用もかからず普及している。しかし、主観的であるがために検者間での差が大きく、柳原法では検者が変わるとスコアが一致しないことが多いとされている。例えば、柳原法40点満点中30点とつける検者もいれば6点とつける検者もある¹⁾。客観的検査法には顔面筋誘発筋電図や積分筋電図などがあるが、定量的評価が可能であるものの手間や費用がかかり、検査できない施設も多いのに加え検査

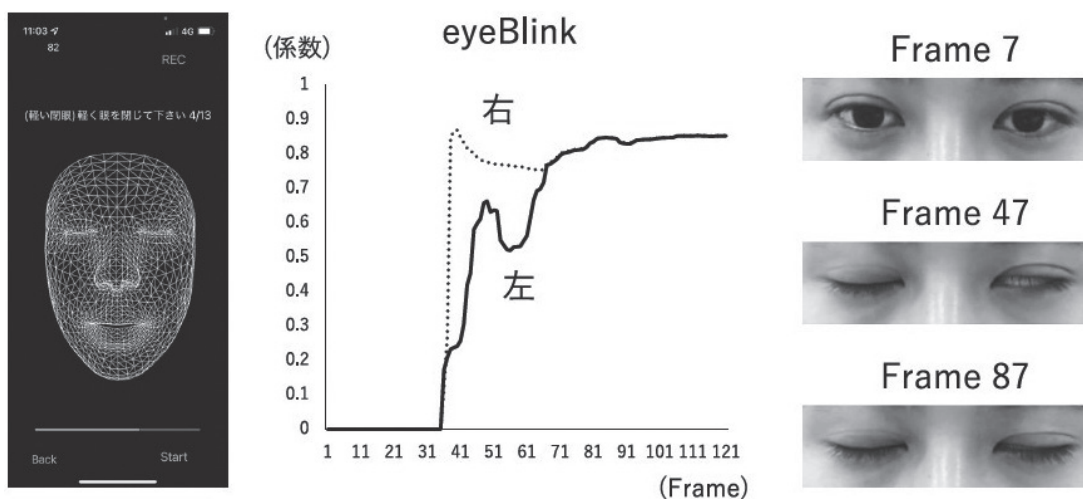


図7 「FacialPalsyZero+」軽い閉眼での測定例(左麻痺例)

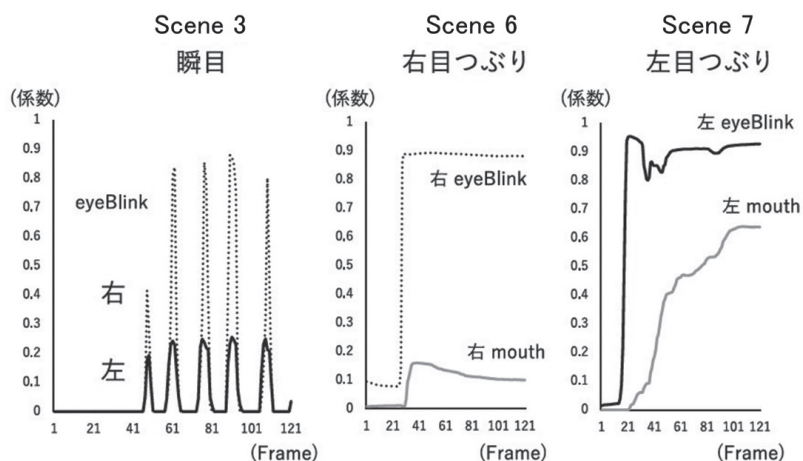


図8 「FacialPalsyZero+」指標の動的変化(左麻痺例)

できる施設でも頻回に検査をするのは患者負担的にも保険的にも現実的ではない。簡便で手間がかからず、定量的で検者間で差が出ない評価法が理想的であるが、これまでそのような検査法は存在しなかった。また、顔面神経麻痺評価としてこれらの方法が長らく使用されてきたのは、主観的評価法や客観的評価法の利点も評価されてきたからではあるが、別の要素として機械やコンピューターによる評価が困難な分野であったということも大きい。しかし近年、機器や人工知能 (AI) の発展により画像認識の分野においては人間の知覚を超える高い識別性能を示すこともできる時代となってきている。我々の研究グループでは、iPhoneの三次元顔認証システムを使用することで麻痺を手軽に客観的かつ定量的に評価できると考え、Appleの3次元顔認証システム (Face ID) を利用し独自のアプリ「FacialPalsyZero」を開発しAppStoreに公開している²⁾。FacialPalsyZeroはiPhoneから照射される赤外線により、顔表面の1220個のポイントの3次元空間での座標情報や顔の動きを定量化できる。その情報をリアルタイムで取得し、素早い動きにも対応可能である。主観的な要素は全くなく、客観的に定量化できる。しかも、簡便でかつ直感的であるので医療従事者だけではなく患者からも好評のアプリである。本研究助成により、このアプリのバージョンアップ、Debug modeの開発、そしてさらに高精細評価ができるFacialPalsyZero+の開発に取り組んだ。

FacialPalsyZeroのバージョンアップとして、対象とするBlendShapeLocationを7から15に増やした。BlendShapeLocationは全52あるが、これらはApple社が決めた指標である。バージョンアップアプリでは顔面の主な動きとして、前額、目、鼻、口、頬の動きを評価できる15のBlendShapeLocationを選択した。Debug Modeでは1秒当たり60フレーム (60fps) で浮動小数係数をリアルタイムに表示することができる。すなわち1/60秒という非常に短い間隔で顔面の素早い動きを数値化して表示することができる。これら技術基盤はFacialPalsyZero+の開発に応用されていくのであるが、逆にこのような素早い動きがめぐるましく表示されるため、表情筋の部位に応じた自発的的最大筋収縮、受動的 maximum 筋伸張の客観的スコアを継続的に記録することは困難であった。このことが表情筋トレーニング/ストレッチ強度における客観的指標の導入を困難にさせた原因である。この解決方法としてはDebug Modeで表示される浮動小数係数をすべてアプリに保存するように仕様を変更することが挙げられるが、アプリに保存した場合そのデータを見るために一度リアルタイムの画面を切ってから保存を呼び戻さなくては行けない。従って、これではリアルタイムで表情筋トレーニング/マッサージ強度を特定することは困難となる。さらなるプログラム開発が必要であると考えられる。

FacialPalsyZero+では安静時、前額作皺、瞬目、軽閉眼、強閉眼、右眼閉眼、左眼閉眼、鼻作皺、歯の露出、口笛、頬を膨らます、下口唇下動の12の表情を設定し、これにより国内外の広く普及している柳原法、House-Brackmann法、May法の各評価にも対応できるようにして、FacialPalsyZero+を世界でも普及させる戦略とした。また、記録は安静時からの12の表情 (顔面運動変化) を各2秒間、1秒当たり60フレーム (60fps) で記録した。つまり各表情を2秒間で120フレーム記録することとなる。この結果、120もの座標データをもとに高精細に評価できるようになるだけでなく、連続する座標データの時間的な変化を客観的データとして示すことにより顔面の動的な評価ができる。すなわち、これら連続する座標データの傾きが顔面の動きの速度、そして連続する速度データの傾きが加速度となるわけである。このような時間的な変化を手軽に評価できる機器は今までにないものであり、新たな知見につながる可能性を秘めている。またスマートデバイスを用いることで医療従事者だけでなく麻痺患者自身でさえも客観的な評価をいつでも行うことが可能になるので、早期診断・正確な診断に基づく予後予測・治療方針の決定に役立つかもしれない²⁾。顔面神経麻痺の早期予後診断として、我々はアブミ骨筋反射の内視鏡下観察と筋電図閾値についての検討も行っている³⁾。顔面神経麻痺患者に対するFacialPalsyZero+のデータ集積とアブミ骨筋反射の内視鏡下観察の結果をまとめ合わせることで、より正確な顔面神経麻痺の早期予後診断ができることも期待される。

FacialPalsyZero+の研究結果では、図6のように軽閉眼では左右の動きの微妙な差の時間的な変化を客観的データとして示したり、図7のように瞬間的な動的変化として麻痺症例での瞬目の左右の違いを示したりすることも可能であった。また、図7のごとく、顔面全ての座標変化を同時に測定可能であることから眼輪筋が動いた際の口輪筋の動きや左右差も記録することが可能であった²⁾。これまで顔面の複数部位の動きを同時に評価するのは検者の主観的判断しかなく、客観的評価法は存在しなかった。FacialPalsyZero+の顔面全ての座標変化を同時に測定できる機能を用いることにより、顔面神経麻痺の重要な後遺症である病的共同運動を、精細にかつその動きの動的指標まで客観的に評価することができる。病的共同運動は麻痺発症2週間後のENoG値が40%未満の場合に、発症4か月後以降に起こるとされている⁴⁾。病的共同運動の治療もミラーフィードバック法などの主観的なりハビリテーションが主体であった。今後FacialPalsyZero+のさらなる応用により、病的共同運動発症が予測される患者/病的共同運動発症患者を対象として、ミラーフィードバック療法を改良した客観的な三次元顔認証スマホアプリフィードバック療法の開発が期待される。例えば、病的共同運動が起

こっている各部位の筋収縮客観的スコアをアプリで計測し、このスコアを目安にスマホアプリフィードバック療法を行うなどが考えられる。また、三次元顔認証スマホアプリを見ながらこれに客観的スコア表示機能を搭載させることにより、アプリ使用者のリハビリに対する理解が深まり、飽きて脱落することなく継続することができるようになることも期待できる。

5. 総括

本研究の成果により、顔面の動きが簡便に客観的に評価することができるようになった。FacialPalsyZero+の精度を高めることで、今まで経験に左右されることが多かった評価が客観的かつ定量的な評価方法に置き換わることが期待される。今後は顔面神経麻痺後遺症における治療およびリハビリの最適化に取り組んでいくことが課題となりえる。何より本アプリで顔面表情を観察すると、人の豊かで

明るい表情を客観的に評価することができ、その結果、気持ちも前向きになって男女問わず美容と健康の増進につながると考えられる。本研究は、コスメトロジーに大きく貢献するものと思われる。

(引用文献)

- 1) 松代直樹：麻痺スコア（40点法）の検者による差異
顔面神経麻痺の専門家9人と全国の一般耳鼻咽喉科勤務
医47人での検討. Facial N Res Jpn 2010; 29: 63-65.
- 2) 児嶋剛：3次元顔認証システムによるリアルタイム顔
面神経麻痺評価. Facial N Res Jpn 2021; 41: 10-12.
- 3) 堀龍介：アプミ骨筋反射の内視鏡下観察と筋電図閾値
について. Facial N Res Jpn 2022; 42: 139-141.
- 4) 村上健：顔面神経麻痺のリハビリテーション. MB
ENT2016; 198: 1-67.

毛根細胞を用いた統合失調症発症予測因子の探索

東北大学大学院医学系研究科

前川 素子

Biomarkers at the substance level are needed as objective evidence to elucidate the pathophysiology of schizophrenia. We have been focusing on “hair follicles,” which are derived from the same ectoderm as the brain, as a biological sample useful for stratifying psychiatric disorders. In this study, we compared gene expression patterns in follicle cells from schizophrenia and healthy controls and found that 241 genes were up-regulated, and 28 genes were down-regulated in the schizophrenia group (FDR < 0.1, |fold change| > 1.2). The Gene Ontology (GO) Biological Process pathway was found to be enriched in a pathway related to “prepulse inhibition”, a known intermediate phenotype of schizophrenia, a “microglial pathway”, and an “MHC class II pathway” involved in antigen presentation by immune system cells. In addition, the GO Cellular Component pathway was enriched in pathways related to “ribbon synapses” in the active zone of synapses and pathways related to “astrocyte projection”, which have attracted attention for their association with brain function. It is very significant that we found these results by conducting hypothesis-free gene expression analysis of hair follicles. Based on the results of this study, we intend to pursue the possibility that the expression of these biomarker genes may be useful in the early detection of schizophrenia patients, therapeutic evaluation, and drug discovery.

1. 緒言

統合失調症をはじめとする精神疾患の診断は、特徴的な精神症状や経過を組み合わせた「面接」で行われている。しかし、従来の「面接」による診断の結果は、客観的評価指標に基づいたものではないため、脳病態を十分には反映していないのが現状である。このような現状を改善するため、エビデンスに基づく客観的な指標を用いた診断法の開発が精神医学全体の緊急かつ最重要な解決すべき課題であると考えられている。特に、客観的根拠としての物質レベルでのバイオマーカーが求められており、このようなバイオマーカーを開発して疾患を層別化することで、精神疾患の病態理解や治療薬開発などへの応用が期待されている。

我々は、精神疾患の層別化に役立つ生体試料として、脳と同じ外胚葉由来組織である「毛根細胞」に注目してきた。我々は、ヒトの「毛根細胞」を用いて遺伝子発現解析を行い、主に脳に発現すると考えられてきた“オリゴデンドロサイト関連遺伝子”や“GABA 関連遺伝子”などが、実は「毛根細胞」にも発現することを発見した (Maekawa et al., *Biol Psychiatry*, 2015)。また、統合失調症患者群の毛根細胞では、脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質 FABP4 遺伝子 (Maekawa et al., *Biol Psychiatry*, 2015)、核内受容体 PPARA 遺伝子 (Maekawa et al., *Transl Psychiatry*,

2017)、*SFII* 遺伝子 (Matsuura et al., *Sci Rep*, 2018)、硫化水素産生酵素 *MPST* 遺伝子 (Ide et al., *EMBO Mol Med*, 2019)、などの発現が変動することを見出している。さらに、動物モデルを用いた解析でこれらの遺伝子が統合失調症の病態生理と関わる可能性があることも明らかにしている (Maekawa et al., 2015, Maekawa et al., 2017, Ide et al., 2019, Wada et al., 2020)。我々は、上記の他にも多くの未同定のバイオマーカー候補遺伝子があると考えている。そこで本研究では、統合失調症及び健常対照者から毛根細胞及びその他の生体試料や生体情報を収集し、バイオマーカー探索を行い、毛根細胞の遺伝子発現を指標とした統合失調症の病態理解を目指す。

2. 方法

本研究は、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会にプロトコルの承認を得て行った (2022-1-832)。

2.1. 研究対象者の募集

本研究では、健常対照者 (男性 9 名、女性 8 名、平均年齢 28.4 ± 5.6)、統合失調症 (男性 6 名、女性 16 名、平均年齢 38.0 ± 8.1) のリクルートに成功した。統合失調症患者は、アメリカ精神医学会の DSM-5 (精神障害の診断と統計マニュアル第 5 版) の診断基準で、統合失調症と診断された 20 歳以上、65 歳未満の者を対象とした。健常者は精神疾患簡易構造化面接法 (Mini-International Neuropsychiatric Interview : M. I. N. I) を用いて精神疾患の基準を満たし



Exploration of biomarkers of schizophrenia using hair follicles

Motoko Maekawa

Department of Organ Anatomy, Graduate School of Medicine, Tohoku University

	健常対照	統合失調症
年齢	28.4 ± 5.6	38.0 ± 8.1
性別 (男性 / 女性)	6/16	9/8

ていない者を対象とした。

2.2. 精神症状の評価

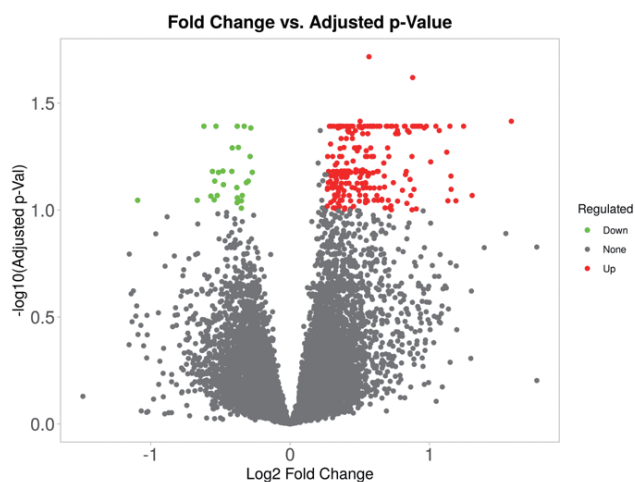
統合失調症の精神症状と抗精神病薬の治療反応性は陽性陰性症状評価尺度 (Positive and Negative Syndrome Scale : PANSS)、Clinical global impression - severity (CGI-S) を用いて評価した。また認知機能に関しては、統合失調症認知機能簡易評価尺度 (Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia, Japanese version : BACS-J) を用いて評価する。副作用やアドヒアランスに関しては、薬原性錐体外路症状評価尺度 (Drug Induced Extrapyramidal Symptoms Scale : DIEPSS) や薬に対する構えの調査票 (Drug Attitude Inventory-10 : DAI-10) を使用した。

2.3. 毛根細胞の収集

各被験者から、頭髮 (毛根細胞) を 10 本採取した。毛根細胞を含む領域を切り取り、NucleoSpin RNA XS (MACHEREY-NAGEL 社) を使用して total RNA の抽出を実施した。TapeStation または BioAnalyzer (Agilent Technologies) を用いた電気泳動による核酸定量を実施し、RNA の品質検定を行った。SMART (Switching Mechanism At 5'End of RNA Template) 法を用いてライブラリ作製を実施した。その後、NovaSeq システム (NovaSeq X Plus / NovaSeq 6000) を用いて 150base 長ペアエンドシーケンス解析を実施した。得られたデータは FASTQ ファイル形式に変換した。

3. 結果

まず、健常対照群の男性、女性の毛根細胞を用いて遺伝子発現パターンを比較し、毛根細胞の遺伝子発現について男女差の有無を調べた。その結果、54 遺伝子が発現上昇、72 遺伝子が発現低下を示した (FDR < 0.1, |fold change| > 1.2)。Gene Ontology (GO) 解析を行った結果、生殖に



関わる遺伝子などが発現変動していた。

次に、統合失調症群及び健常対照群の毛根細胞を用いて遺伝子発現パターンを比較した結果、健常対照群と比較して統合失調症群で 241 遺伝子が発現上昇、28 遺伝子が発現低下を示した (FDR < 0.1, |fold change| > 1.2)。Pathway 解析を行った結果、Gene Ontology (GO) Biological Process の経路では、統合失調症の中間表現型の一つとして知られるプレパルス抑制に関連する経路、ミクログリアの経路、免疫系細胞の抗原提示に関わる MHC クラス II の経路がエンリッチされていることが明らかになった。また、GO Cellular Component の経路では、シナプスのアクティブゾーンに存在するリボンシナプスに関わる経路、脳機能との関連が注目されているアストロサイトに関連する経路などがエンリッチされていた。

4. 考察

本研究では、統合失調症患者の毛根細胞において、脳のシナプス機能やシナプス形成に関わる経路や、統合失調症の行動表現型と関連が深いプレパルス抑制に関わる経路がエンリッチされていることが判明した。仮説フリーで毛根細胞の遺伝子発現解析を実施し、このような結果に辿り着いたことは、大変意義深い結果であると言える。今回の結果を踏まえ、今後、これらのバイオマーカー遺伝子の発現が、統合失調症患者の早期発見、治療評価、創薬などに役立つ可能性についても追求していきたいと考えている。

一方で課題も見つかった。健常対照者の毛根細胞の遺伝子発現パターンを男性と女性の間で比較すると、複数の遺伝子の発現変化が認められた。その多くが、生殖に関わる遺伝子であり、統合失調症で変化している遺伝子との重複はなかったが、男女の差を踏まえて結果を慎重に解釈する必要があると言える。

5. 総括

本研究は、健常対照者、統合失調症患者、合計 39 名の検体を使って実施した。検体を集めることから研究を開始し、2 年間でこのような成果を得られたことは大変意義深かったと言える。ただし、現時点でサンプルサイズとしてはまだ十分ではないため、今後もサンプル収集を続け、より大きな集団で研究を実施したいと考えている。また、本研究では、毛根細胞の遺伝子発現解析を行うとともに、被験者に対して詳しい精神症状の調査、脳の画像解析、網膜の断層画像撮影、血液検体収集なども同時に行った。今後、バイオマーカー遺伝子の発現量とこれらの指標との関連を調べ、毛根細胞の遺伝子発現と統合失調症の特性や生理学的特性との関連について調べたいと考えている。これらの研究を実施することで、実際に社会に役立つバイオマーカー開発に取り組んでいきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) Maekawa M, et al., Utility of scalp hair follicles as a novel source of biomarker genes for psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry*. 78 (2): 116-25, 2015.
- 2) Maekawa M et al., Polyunsaturated fatty acid deficiency during neurodevelopment in mice models the prodromal state of schizophrenia through epigenetic changes in nuclear receptor genes. *Transl Psychiatry*. 7, e1229, 2017.
- 3) Matsuura A et al., Dietary glucoraphanin prevents the onset of psychosis in the adult offspring after maternal immune activation. *Sci Rep*. 8 (1): 2158.
- 4) Ide M, et al., Excess hydrogen sulfide and polysulfides production underlies a schizophrenia pathophysiology. *EMBO Mol. Med*. e10695, 2019.
- 5) Wada Y, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor α as a novel therapeutic target for schizophrenia. *EBioMedicine*. 62: 103130, 2020.

サブプレートニューロンから紐解く美意識の起源

公益財団法人東京都医学総合研究所

丸山 千秋

It is essential to understand how the mechanisms that respond to various stimuli from the outside world develop from the fetal to the neonatal period to understand the origin of the sense of beauty. Predictably, the neural circuits for perceiving beauty are formed in an "experience-dependent developmental process," in which postnatal experiences stimulate neural circuits. However, neural circuits that develop *in utero*, even with limited sensory input from the outside world, are believed to be mediated by the spontaneous electrical activity of SpNs, the first neurons to be born and mature in the cerebral cortex. SpNs are the first born and mature neurons that play an essential role in neuronal migration and induction of thalamocortical axons during embryonic development. In this study, our first objective was to elucidate the mechanism of constructing basic neural circuits to create human aesthetics through functional analysis of SpNs. By identifying marker genes in SpN during the embryonic period and manipulating spontaneous neural activity, we investigated the essential characteristics of SpN. Furthermore, we explored the role of SpNs in the brain evolutionary process of sensory. We also discussed how the development of input circuits changes, with and without SpN, during brain evolution.

1. 緒言

美意識は人間のみならず動物にも存在する。子孫繁殖のパートナーを獲得するために動物たちは美しい体色や模様で相手を惹きつける本能を持っている。ヒトの場合、美を感じると内側眼窩前頭皮質と呼ばれる領域が活性化することが知られている¹⁾。また、自閉症や他の精神疾患の患者において美的感覚が健常者と異なる、あるいは感覚過敏があるという報告がある²⁾。すなわち刺激に対する脳の神経回路の反応が、美を感じるメカニズムであるとすれば、その健全な発達が美意識の形成には重要である。そこで主に視覚、聴覚に対する外界の様々な刺激に反応するメカニズムが、胎児期から新生児期にかけてどのように発達してくるのかを知ることは、美意識の起源を理解する上で不可欠である。

ヒトの脳は約860億もの神経細胞(ニューロン)が6層の構造内に精緻に配置されており、それらニューロン間に配線される神経回路によって我々は判断し、覚え、言葉を話す。また、美しい風景や絵画を見たとき、目の網膜に入った視覚刺激は視床と呼ばれる脳領域を経由して大脳皮質第4層の標的細胞に入った後、他の皮質内領域へ出力する。そして内側眼窩前頭皮質や帯状回といった領域の活動が盛んになり、美を認知する。この一連の神経回路がどのようにして形成されるのかについて、生後に経験したことによ

りそれが刺激となって神経回路ができるという“経験依存的な発達”は予想できる発達過程である。しかしながら子宮内で、外界からの感覚入力に限られている中でも発達してくる神経回路は、大脳皮質で最も早く誕生、成熟するニューロンであるSpNの自発的電気活動が担っているのではないかと考えられているが、未解明な部分が多い。胎児や早産児の脳波研究から、下肢が動くとき大脳皮質の体性感覚野のS1領域で紡錘型の速波(spindle burst)と呼ばれる脳波が観測される。この脳波はSpNに由来すると言われており、生後時間が経つにつれてだんだん減少することが観察されている。SpNは最も早く生まれて成熟するニューロンで、胎生期に神経細胞移動³⁾や視床皮質軸索の誘導などの過程で重要な役割を果たすことが知られている。またSpNは生後、細胞死によって激減することから、胎児期から新生児期にかけてその自発電気活動により感覚と運動の統合を制御し、大脳皮質神経回路の基本を作り上げることが示唆される⁴⁾。そこで本研究では、まずヒトの美意識を作り上げるための基本神経回路の構築メカニズムをSpNの機能解析を通して明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1. SpNのサブタイプの同定

まず、SpNの細胞としての特徴を明確にするために、遺伝子発現の違いによるサブタイプの同定を行った。マウス胎児脳においてSpNが特異的に蛍光タンパクを発現する2種のトランスジェニックマウス(Lpar 1-EGFPとNeuro D 1-CreERT 2/Ai14)を用いてGFP陽性、tdTomato陽性のSpNを単離し、シングルセルRNAseq解析を行った。RのパッケージSeuratを用いて個々のデータと2系統の統合データをそれぞれ解析し、さらに空間遺伝子発現解析Visiumの結果との統合解析を行った。



Origins of Aesthetic Sense Unraveled from Subplate Neurons

Chiaki Ohtaka-Maruyama

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

2. 2. SpNの自発神経活動と神経回路形成

SpNがどのような自発活動をするのかを調べるために、マウス脳スライスおよび脳全体のカルシウムイメージングを行う。SpN特異的にCREを発現するマウス系統D1B-CreをGCaMP6-flox マウスと交配し、SpNの神経活動が胎生期のどのぐらいの時期から始まっているのかを解析する。また、視床-皮質軸索で特異的にGCaMPを発現するマウス系統(TCA-GCaMP)を用いて、発達過程においてSpNの活動を変化させた際、どのようにTCAの活動パターンが変化するのかについて神経活動をイメージングする。SpNの活動抑制にはKir2.1-flox マウスとSP-特異的Creマウスを交配する方法を用いる。この条件下で、脳構築や神経回路形成、および生後の個体の行動にどのような影響があるかを解析することで、発達脳におけるSpNの細胞ダイナミクスと感覚統合過程を解明する。

2. 3. 脳進化におけるSP層の役割

サブプレート (SP) 層は調べられた限り全ての哺乳類に存在するが、非哺乳類脳には存在しない。分子マーカーの発現としては、鳥類や爬虫類にもSpN特異的なマーカー遺伝子は数箇所に分かれて発現している(図1)。一方哺乳類の中でも霊長類になるとSP層が厚く発達していることが知られている^{5,6)}。このことは、霊長類ではより多くのニューロンを胎児期に配置し、また視覚、聴覚などの感覚入力においても、より多くの軸索の正確な投射制御が必要である可能性を示唆している。そこで、脳進化過程の鍵とも考えられるSP層の発達に寄与したメカニズムは何かについて、シングル解析のデータおよびマウス、マーモセット、ヒトの胎児脳を用いたVisium解析データを用いて遺伝子発現の観点から検証を行った。

3. 結果

3. 1. マウスSpNのサブタイプの同定

Lpar1-EGFP、D1B-Cre、およびその2種の統合データおよびVisiumデータを用いて解析を行った結果、図2に示すような、胎生期の新規SP層のマーカー候補が同定できた(図2,3)。各クラスターに特異的に発現している遺伝子もあれば2種、あるいは3種のグループで共通の遺伝子も同定できた。また、注目すべき点の一つは、最終的に同定された33遺伝子のうち、黄色で示した8遺伝子は自閉症に関連があることが報告されている遺伝子であった。またRNA Scope法を用いてNr 4a2、Hs 3st4、Sox5について発現の重なり具合を調べたところ、1遺伝子のみ陽性の細胞から、3つとも陽性のものまで、発現の様式から5種のサブタイプに分かれることが明らかになった(図4)。このようにSpNはヘテロな細胞集団であることが結論づけられた。

サブプレートマーカー遺伝子の発現

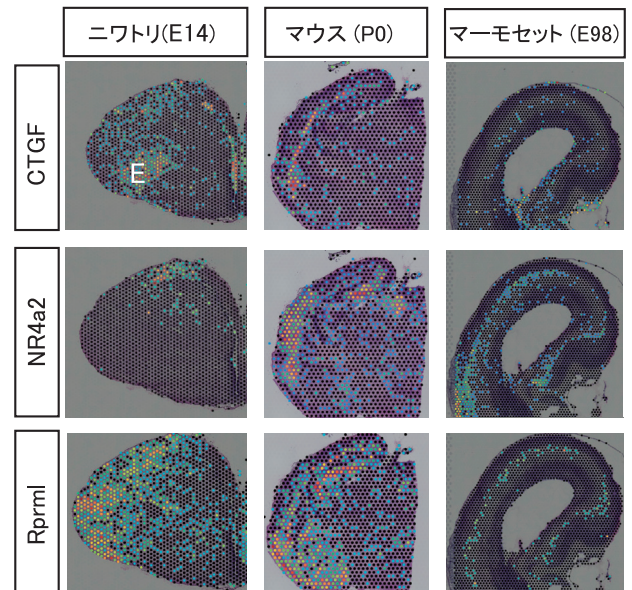


図1 SP マーカー発現の比較

同定したサブプレートニューロン (SpN) の胎生期マーカー

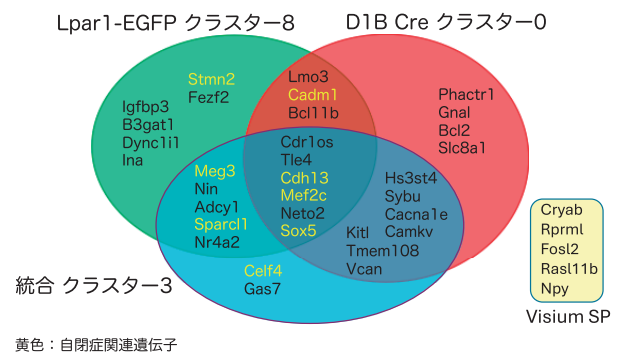


図2 胎生期サブプレートの新規分子マーカー

胎生期のSpNマーカーの同定

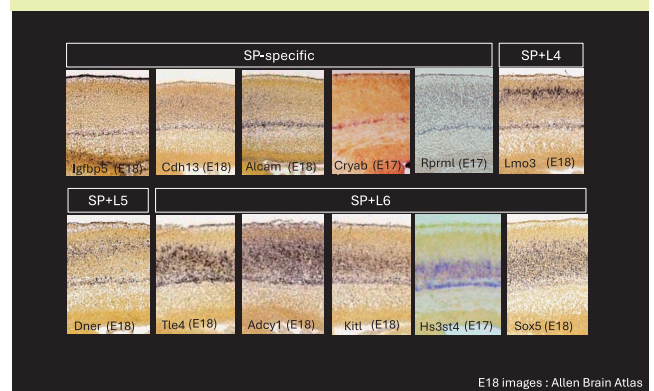


図3 胎生期サブプレート子マーカーの mRNA 発現パターン

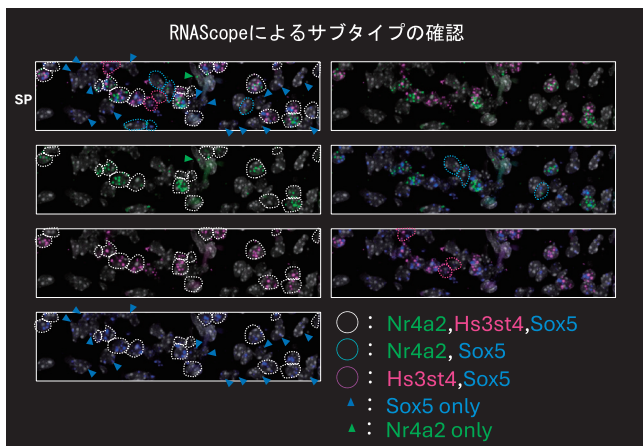


図4 サブプレートニューロンのサブタイプ

3. 2. SpNの自発神経活動と神経回路形成

SpNは神経産生期に最初に生まれ、成熟するニューロンであるため、大脳形成期の最初から神経活動を行って後から生まれるニューロンや神経回路の形成過程に関わっている。これまでにマウス胎生期E15.5の段階でスライスを作製してCa²⁺イメージングを行ったところ、この時期からSpNは盛んに神経活動をしていることがわかった。そこで、より早い段階でSpNの活動を計測する実験を進めている。TCA-GCaMPを用いた広域Ca²⁺イメージングの計測条件が決定できた。今後はSpNの自発神経活動を抑制した際のTCA-GCaMPの活動や、脳構築にどのような影響が出るのかについてKir2.1-floxマウスをD1B-Creとの交配マウスの全脳イメージングやスライスでのイメージングを行う。

3. 3. 脳進化におけるSP層の役割

哺乳類脳は大脳新皮質に6層の構造が見られるが、これは哺乳類独自の構造で、非哺乳類にはない。鳥類脳ではニューロンが集まって神経核を形成する核構造が見られる(図5)。哺乳類の中でも特にヒト胎児脳ではSP層は皮質板(CP)の5倍以上も厚く、表層SP(SPs)、中間層SP(SPi)と深層SP(SPd)に分けられる⁷⁾。しかしなぜ霊長類やヒトではSP層がこんなに厚くなるのか、その中にどのようなSpNのサブタイプが存在するのかについては未解明である。そこで我々は、ニワトリ、マウス、マーモセットのVisium空間的遺伝子発現解析を用いて、SP層の分子マーカー発現を指標に種間による比較解析を行った(図6)。その結果、鳥類脳のCTGF遺伝子は視床からの軸索投射先であるentopallium(E)に強く発現していた(図1)。ここは入力神経細胞のマーカーであるEAG2の発現領域でもあり、サブプレートと、哺乳類で言うところの入力細胞である第4層のマーカーが共局在していた。一方哺乳類脳ではCTGFは視床軸索が最初に到達するSpNでのみ発現す

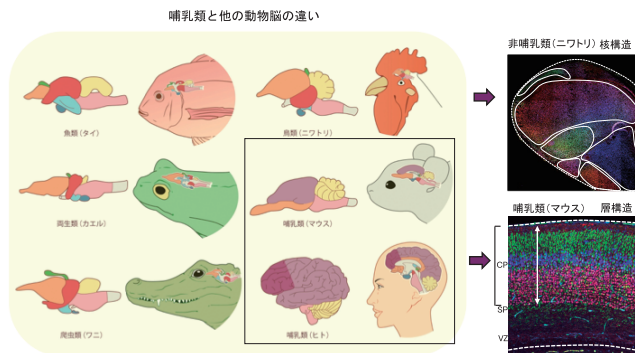


図5 脳構造の動物種による違い

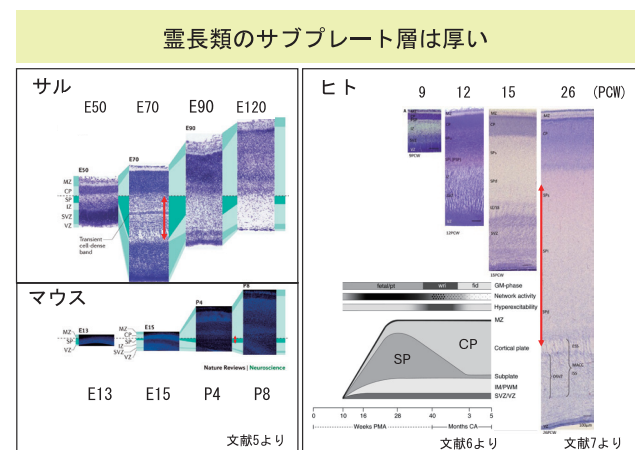


図6 SP層の種間比較

る、という種による違いが明らかになった。

4. 考察

SpNは脳構築の際に、細胞移動制御や視床軸索の投射制御などを担い、哺乳類大脳新皮質の形成過程に必須の役割を果たしている。その分子発現による特徴は胎児期ではほとんどわかっていなかったが、今回の解析で、胎生期のマウス脳のSpNは少なくとも5種以上のサブタイプが存在することがわかった。そのサブタイプの役割の違いは未解明であるが、移動ニューロンにシナプスを介してシグナルを送っているサブタイプと、視床軸索の入力を受けて第4層へと投射を促すSpNは別のサブタイプである可能性がある。また、非哺乳類にはSpNはないが、視床からの感覚入力を受ける軸索が投射する入力細胞SpNのマーカーのCTGFの発現が見られたという結果より、原始羊膜類の脳では、感覚入力を最初に伝える視床軸索が到達する早生まれニューロンがCTGFを発現する、という共通性がある可能性が示唆された。それが哺乳類ではSpNとなってさらに第4層へと軸索を伸張させて入力神経細胞層の特異化に寄与するが、非哺乳類ではそれが直接inputニューロンになるという違いがあるのではないかと考えられた。ま

た、霊長類のSP層の厚みに関しては、Visiumでどのような遺伝子が特異的に発現しているのかについて確認したところ、軸索誘導や細胞外基質の関連遺伝子が高発現している他、レチノイン酸の代謝関連遺伝子も霊長類で特に高発現していることもわかってきた。これらの結果は、美的感覚も含む、感覚入力に原始羊膜類から視床を介して入力細胞に送られるという共通性がある一方で、哺乳類ではSpNの一部のサブタイプがそれを受け取り、第4層へと回路を繋ぐ中継所の役割を担っているが、非哺乳類では中継点がなく、入力を受け取った細胞自身が入力細胞へと分化することが示唆された。また、哺乳類では視床皮質回路の制御に関わるSpNのサブタイプ以外にも、細胞移動を促すサブタイプや、未知の機能を持つサブタイプなど、複数のヘテロな細胞集団であることがわかってきた。同定された胎生期のSpNの分子マーカーに自閉症関連遺伝子が多いということは、これらのSpNの機能の不具合は生後の神経回路構築、特に感覚入力の回路形成にとって決定的な影響を及ぼすことが想定される。このことが自閉症患者の感覚過敏の表現型につながっている可能性は否定できない。

5. 総括

今後は同定されたSpNマーカー遺伝子が、早期の脳形成過程でSpNに発現することでどのような機能を果たしているのかを解析することで、感覚入力を大脳皮質に伝える最初期の神経回路である、視床-皮質神経回路形成のメカニズムの理解を深めてゆきたい。

これまでの先行研究も考え合わせると、哺乳類における脳構築の共通の原理として、SpNの発達早期の自発活動が「活動依存的な神経回路構築」に必須であり、さらに生後の「経験依存的な神経回路の発達」と合わせて両輪となって脳神経回路形成を促進していると考えられる。前者の早

期の自発活動が美意識を生み出す起源と言えるのではないかと考えている。今後は、SpNの発生起源についても明らかにし、鳥類や爬虫類との比較進化的解析により動物の美意識はどのように進化してきたのかについての考察を深めたい。

(引用文献)

- 1) Kawabata H, Zeki S, Neural correlates of beauty. *J Neurophysiol.*, **91**, 1699-1705 (2004)
- 2) Danesh AA, Howery S, Aazh H, Kaf W, Eshraghi AA., Hyperacusis in autism spectrum disorders. *Audiol Res.*, **11**, 547-556 (2021)
- 3) Ohtaka-Maruyama C, Okamoto M, Endo K, Oshima M, Kaneko N, Yura K, Okado H, Miyata T, Maeda N, Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons. *Science*, **360**, 313-317 (2018)
- 4) Molnar Z, Luhmann HJ, Kanold PO, Transient cortical circuit match spontaneous and sensory-driven activity during development. *Science*, **370**, 308 (2020)
- 5) Hoerder-Suabedissen, Molnar Z., Development, evolution and pathology of neocortical subplate neurons. *Nature Neurosci.*, **16**, 133-146 (2015)
- 6) Hadders-Alga M, Neural subplate and clinical significance of general movements:an update. *Dev. Med Child Neurol.* **60**, 39-46 (2018)
- 7) Kostovic I, The enigmatic fetal subplate component forms an early tangential cortical nexus and provides the framework for construction of cortical connectivity. *Prog Neurobiol.*, **194**, 101883 (2020)

顔形態の社会的シグナルとしての役割

奈良女子大学研究院生活環境科学系

横山 ちひろ

Individual differences in human facial morphology are a source of information for the rapid acceptance of social characteristics of individuals. However, due to confounding with facial expressions and inconsistencies in measurement criteria, the relationship between facial morphology and social trait acceptance is still controversial. In this study, we examined the relationship between metrics of facial morphology and social trait acceptance, such as “reliable”, “dominance”, and “masculinity”, using artificially generated face stimuli with no facial expression. We also investigated the effect on social trait acceptance of partial loss of facial morphological information due to the wearing of masks, which has become routine in the Corona Disaster. Furthermore, we investigated the effect of blushing, which is associated with the emotion of embarrassment and evolutionarily unique to humans. The results revealed that facial width to height ratio (fWHR) affects social trait acceptance, and that the two metrics of fWHR have different effects. Wearing a mask partially changed the acceptance of social traits. The blush effect was found to be effective only for the “masculinity” rating by women subjects. The results of this study clarify the sociobiological significance of human facial morphology and provide empirical evidence for psychosocial interventions in face-to-face communication.

1. 緒言

生物の形態には個体差がある。ヒトの顔形態の個体差は、他の身体部位に比べ顕著であることが知られている¹⁾。顔形態が表すのは、個人を同定する個体情報だけではない。対称性、肌の質感や色などは人の印象を左右し^{2,3)}、表情によって人の感情を伝えることができる⁴⁾。しかし表情から読み取る感情は、場面の状況（文脈）に大きく左右され、同じ表情であっても文脈が異なると受け取り方が全く異なることさえある⁵⁾。表情に依存しない、無表情の顔形態は安定した特性である。また、ヒトが顔画像から人物の印象を判断するのに必要な時間は0.5秒程度であるという⁶⁾。このように顔形態は、個体の特性を素早くかつ効率よく伝える情報源である。

顔形態は顔の縦横比 (Facial width to height ratio: fWHR) という指標によって、これまで多くの研究が行われてきた。ヒトのfWHRには男女差があり、テストステロンの血中濃度、社会的地位や攻撃性との関連が報告されてきたものの、否定的な結果も多い⁷⁾。最近非ヒト霊長類においても、fWHRの性的二型性や攻撃性などの行動特性との関連が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。さらに、顔形態の発信側の関連性だけでなく、受容側にとってどう受け取られるのかという検証も行われてきた。しかしfWHRの測定基準が複数あ

り、顔画像に表情が含まれているなど、実験条件のばらつきが指摘されており、基準の統一および表情の影響を調整した研究が求められている¹¹⁾。本研究では、人工顔モデルFaceGen（自動3D顔作成のためのソフトウェア）に標準で装備される高解像度3D顔スキャンデータセットから得られた各民族の平均顔（表情なし）およびそのModify機能を利用した。顔刺激から受け取る社会特性の評価軸については、「信頼性」「支配性」という独立した二因子が抽出されており¹²⁾、本研究ではこれに「男性性」すなわち顔形態の性的二型性の受容を加えて検証した。

コロナ禍において日常的となったマスク装着が与える社会認知能力への影響が懸念されている¹³⁾。本研究では、顔形態の各種計測指標と顔刺激から受容する上記の社会特性二因子と性的二型性の関連を明らかにした上で、マスク装着がこれに与える影響を調査した。さらに、他者視点取得能力に基づく高次の感情としての羞恥感情に伴う赤面現象に着目し、赤面が社会特性二因子と性的二型性の評価に与える影響を調査した。赤面現象は、自律神経系の調節下にあるが脳上位中枢に強く支配される。赤面顔を受容する側の印象は表情に左右されるとの報告があるが¹⁴⁾、人工顔刺激を用いた実験はまだない。

2. 方法

2.1. 対象

20～25歳（平均21.48、標準偏差1.27）の健康な男女30人（男性13人、女性17人）が実験に参加した。実験開始前に実験の内容について説明を行い、書面上で実験参加への同意を得た。本研究は、奈良女子大学における人を対象とする研究に関する倫理規程（令和2年2月19日規程第74号）に則り、倫理審査委員会において承認された（承



Facial morphology as a social signal

Chihiro Yokoyama

Nara Women's University, Faculty of Human life and Environmental Science

認番号 21-71)。

2.2. 課題の概要

使用した顔画像は、FaceGen Modeller 3.5 (顔作成モデリングソフトウェア) を用いて作成された。FaceGen Modeller 内のデータから得た中性平均顔 5 種類 (Racial Group を使用) を “face-brow-nose-chin-ratio” 機能を用いて facial wide high ratio (fWHR) を調整し元となる Racial Group 別に 5 パターンを作成、顔画像を合計 25 種類用意する。作成したすべての顔画像について、Fiji (画像計測ソフトウェア) を用いて、これまでの研究で用いられてきた顔形態計測指標である fWHR を 2 種類計測した (図 1)。fWHR_{stomion} は左右頬骨弓点間距離を鼻鞍点・口点間距離で割った値、fWHR_{lower} は左右頬骨弓点間距離を鼻鞍点・おとがい点間距離で割った値である。

上記の顔画像 (標準顔画像) に加えて、マスク装着による情報一部欠損 (マスク装着顔画像)、頬部のカラーリング (赤面顔画像) を加工し、合計 3 群のセットを作成する。マスク装着による情報欠損は GIMP (画像編集ソフトウェア) で加工し、頬部のカラーリングは FaceGen Modeller の “cheek blush” 機能を用いた。

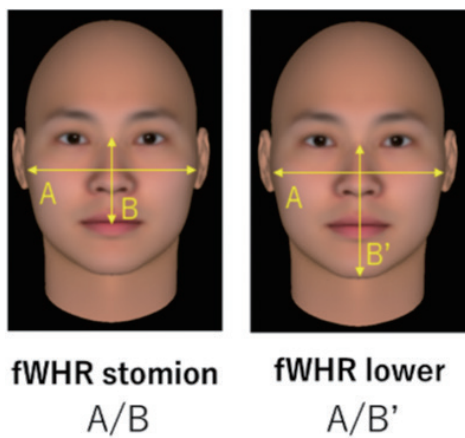


図 1 2 種類の fWHR の計測基準
fWHR_{stomion} (左) および fWHR_{lower} (右)。A は左右頬骨弓点間距離、B は鼻鞍点・口点間距離、B' は鼻鞍点・おとがい点間距離を示す。

課題はオープンソースの心理実験環境 Psychopy を用いて作成した。顔画像提示画面では、25 種類の顔画像から元となる Racial Group 別に左右 20 ペア (合計 100 ペア) を作成しこれを順序ランダムに提示した。評価画面では、顔画像ペアの下に「信頼できる」「支配的」「男性らしさ」について「どちらの顔がより該当するかと問いキーボードの左右の位置に対応するキー (左なら Z、右なら /) を押すように促した。回答時間は制限せず、反応した後に次の質問に移行する。被験者は、1 回目の検査で、標準顔画像を用いた課題 (全 100 ペア) を行った【実験 1】。2 週間以上の間隔をあけ 2 回目の検査で、マスク装着顔画像を用いた同じ課題 (全 100 ペア) を行った【実験 2】。同日に 20 種類の顔画像の赤面像 (同じ画像でカラーリングの有無、左右の位置違いを含めて 50 ペア) を行った【実験 3】。顔画像評価課題の画面の例を示す (図 2)。

2.3. 解析の方法

各人の標準顔画像およびマスク装着顔画像に対する社会特性 (信頼性、支配性、男性性) の評価スコアを算出した。評価スコアは、選択された = 1、選択されない = 0 とした全試行の平均とする。標準顔画像の結果とマスク装着画像の結果はそれぞれ、性別を交絡因子として加え各評価スコアについて顔形態計測指標 (fWHR_{stomion} あるいは fWHR_{lower}) との関連を一般化線形モデル General linear model (GLM) にて検定した (分布型は準二項分布、関数は二次関数)。マスク装着の有無が社会特性の評価スコアに与える影響の検定として、標準顔画像の結果とマスク装着画像の結果を統合し、上記のモデルにマスク装着の有無を交絡因子として加えた検定を行った。赤面の社会特性評価スコアにあたる影響は、選択された = 1、選択されない = 0 とした全試行の評価スコアについて、赤面が全く影響を及ぼさない場合に評価スコア 0.5 を比較値としたウィルコクソンの符号順位検定を行った。統計的有意差は $p < 0.05$ とした。

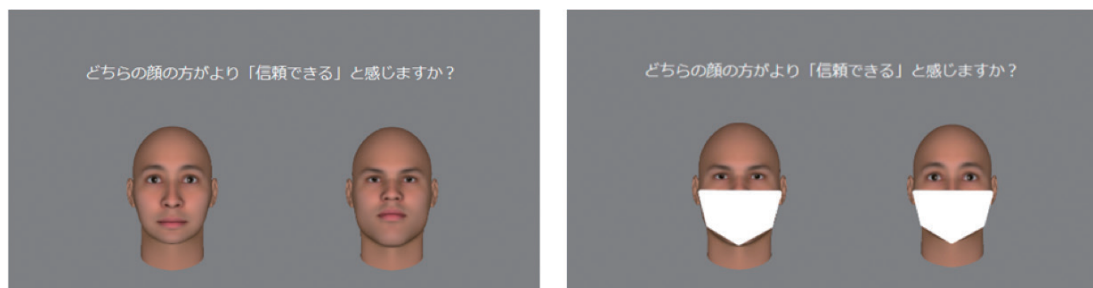


図 2 課題の画面の一例
実験 1 (標準顔画像実験) で用いた課題 (左)、実験 2 (標準顔画像実験) で用いた課題 (右)

3. 結果

3.1. 顔の縦横比と社会特性評価【実験1】

目的変数を社会特性評価スコア、説明変数をfWHR指標の値と性別とその交互作用とした分析で、fWHR stomionは3つの社会特性評価スコアすべてに影響した。信頼性評価は、支配性評価および男性性評価と異なり、fWHRの中央値よりやや大きい値で信頼性が最も高くなり、またその関係に性差がある傾向を示した。一方、fWHR lowerは信頼性評価に有意な影響は認められず、支配性評価と男性性評価に影響していたが、その関連性はfWHR stomionの場合と逆方向であった(図3)。

3.2. マスク効果【実験2】

マスク装着顔でも同様の分析を行った。fWHR stomionは3つの社会特性評価スコアすべてに影響した。信頼性評価は、支配性評価および男性性評価と異なり、fWHRの中央値よりやや大きい値で信頼性が最も高くなり、その変化の幅は女性の被験者のほうが大きかった。一方、fWHR lowerは信頼性評価に有意な影響は認められず、支配性評価と男性性評価に影響していたが、その関連性はfWHR stomionの場合と逆方向であった(図4)。

標準画像とマスク画像を用いた実験の結果を統合し、目

的変数を社会特性評価スコア、説明変数をfWHR指標の値と性別に加えてマスク装着の有無とその交互作用とした分析では、fWHR stomionで、マスク装着の有無は信頼性評価と男性性評価に効果のある傾向を、支配性評価に有意な効果を示した。また、fWHR lowerで行った分析では、マスク装着の有無は信頼性評価に有意な効果、fWHR値との間に有意な交互作用を示した(図5)。

3.3 赤面効果【実験3】

赤面が全く影響を及ぼさない場合に社会特性評価スコアの平均値として0.5を比較値としたウィルコクソンの符号順位検定では、男性性評価でのみ顔色の違いがスコアに有意な効果を与えていた。被験者の男女別で検定を行ったところ、この効果は女性の被験者でのみ有意であった(図6)。

4. 考察

4.1. 顔の縦横比と社会特性評価

顔形態の個体差の指標であるfWHR stomionとfWHR lowerは共に社会特性スコアに影響を与えているが、その影響の大きさや方向は異なっていた。これまでの研究に散見される矛盾の要因には、それぞれの研究で用いられた顔形態の指標に不一致が考えられる。fWHR lowerの値は下顎の大きさと負の関連があり¹¹⁾、本研究の結果は、下顎

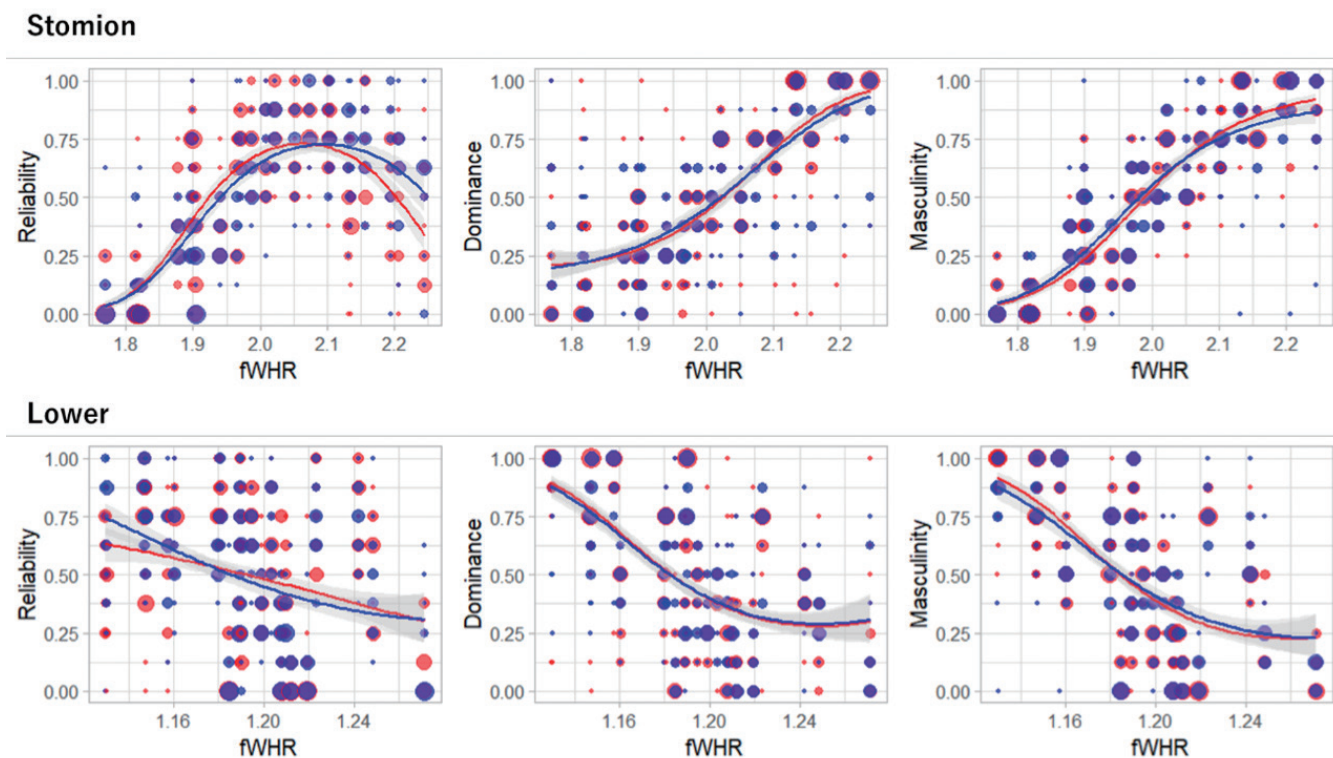
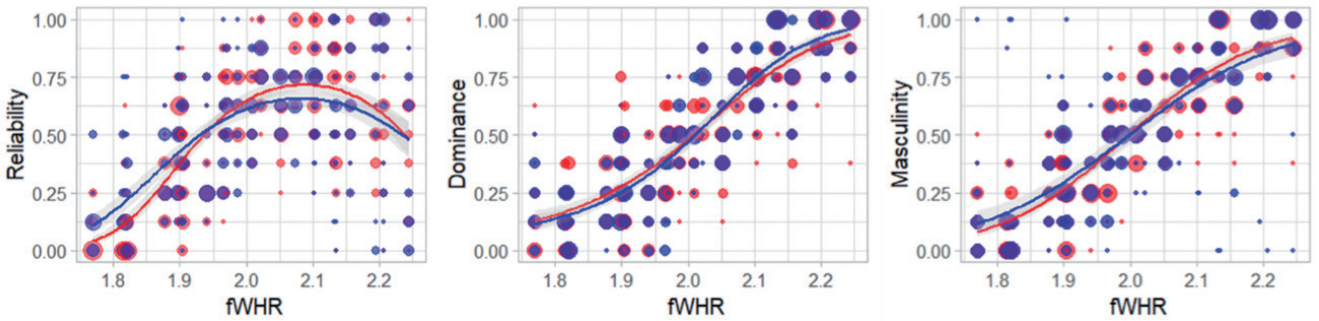


図3 fWHR値と社会特性評価(標準顔画像)

上段はfWHR stomion、下段はfWHR lowerの結果。横軸はfWHRの値、縦軸は社会特性評価スコア、信頼性評価(左)、支配性評価(中)、男性性評価(右)の散布図および回帰曲線を示す。参加者の性別は男性(青)、女性(赤)で表している。

Stomion (Mask)



Lower (Mask)

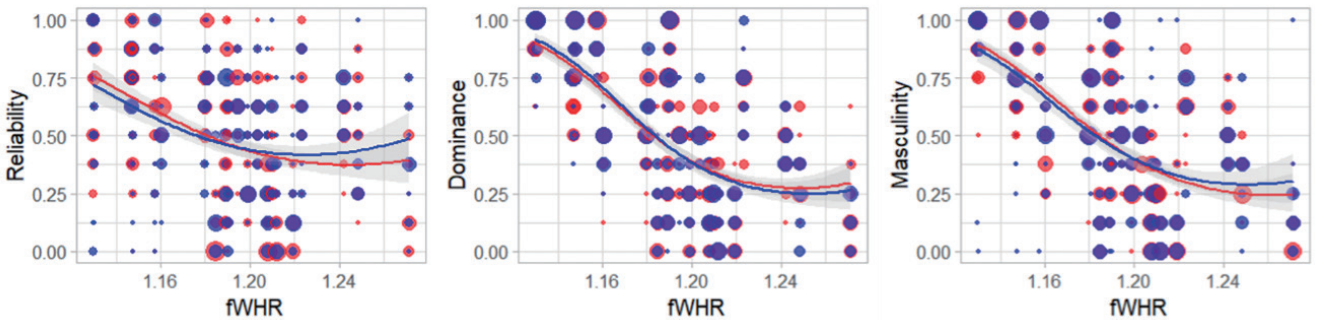
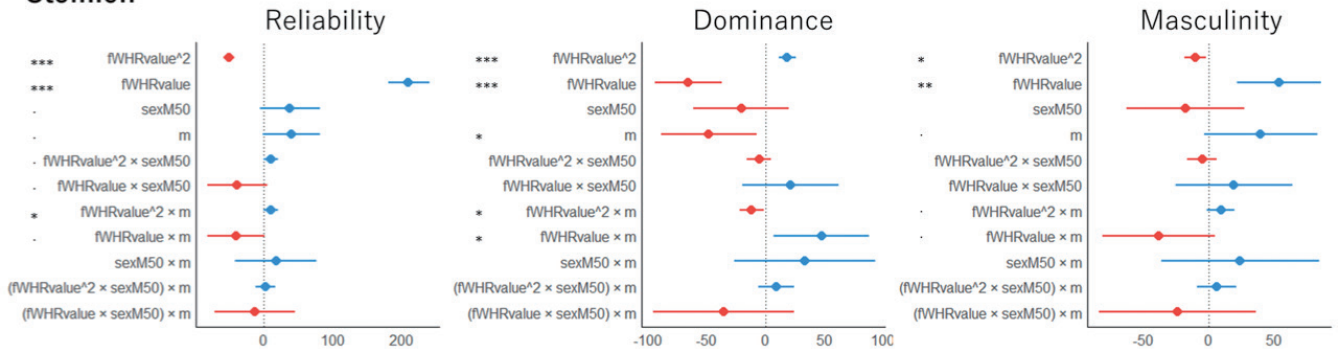


図4 fWHR値と社会特性評価(マスク装着顔画像)

上段は fWHR stomion、下段は fWHR lower の結果。横軸は fWHR の値、縦軸は社会特性評価スコア、信頼性評価(左)、支配性評価(中)、男性性評価(右)の散布図および回帰曲線を示す。参加者の性別は男性(青)、女性(赤)で表している。

Stomion



Lower

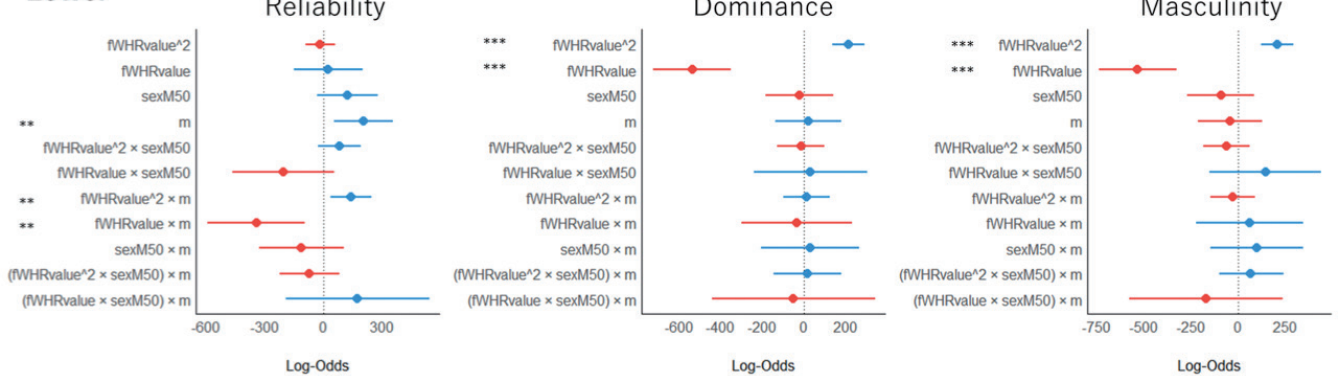


図5 マスク装着の有無を説明変数に加えた一般化線形モデルの回帰係数

上段は fWHR stomion、下段は fWHR lower の結果。各パラメータの推定値の95%信頼区間を示す。***p<0.01, **p<0.01, *p<0.05, p<0.1

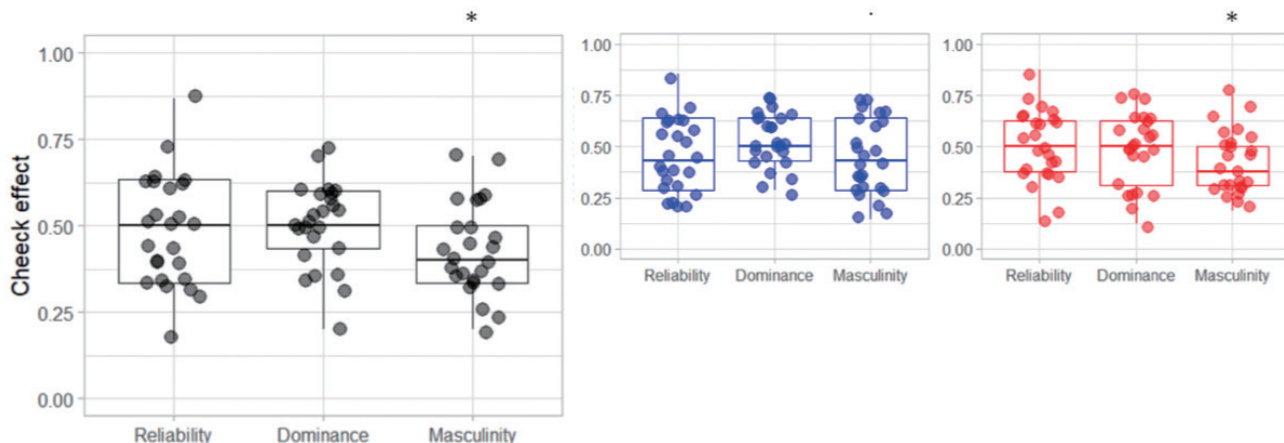


図6 赤面効果

被験者全体(左)、男性(右上)、女性(右下)の結果。グラフの横軸は、信頼性、支配性、男性性評価を表す。縦軸は赤面画像を選んだ割合を示す。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.1$

が大きくなるほど支配的で男性的であると評価されることを示唆する。実際、日本人の調査では男性の方が女性より顎が大きい¹⁵⁾。また、人工顔の縦横比を操作し同様の評価を調査した先行研究では、fWHRの高い顔は信頼性、支配性、男性性が高いと評価されていた¹⁶⁾。本研究ではfWHR stomionおよびfWHR lowerの実測値との関連を調査することで、各指標との関連性の違いを明らかにした。

本研究では、受け取り側の性別が顔の形態と社会評価の関係に影響することも明らかとなった。信頼性評価ではfWHR stomionと被験者の性別に交互作用の傾向が見られ、男性の方が女性に比べてfWHR stomionが高い顔をより信頼できると評価する傾向にあった。この結果は、赤面効果において受け取り側の性差が存在したことと同様に、社会的背景による影響があるかもしれない。

社会特性評価と顔形態指標との関連において、信頼性評価は支配性・男性性評価に比べて特異な性質を持っていることが明らかとなった。信頼性評価とfWHR stomionとの関連は男女とも、支配性・男性性評価では示されないベル型の近似曲線を示し、fWHR lowerでは関連を示さなかった。信頼できるか否かは、対象となる人物の「誠実性」を評価していると考えられる。「誠実性」は進化過程においてチンパンジーやヒトにはじめて見いだされる性格因子であり¹⁷⁾、その特異性が顔形態指標との関連に表れていた可能性がある。

4.2. マスク効果

標準顔画像と同様、マスク装着顔画像の場合でもfWHR stomionとfWHR lowerは共に社会特性スコアに影響を与えており、かつその影響の大きさや方向は異なっていた。社会特性スコアと顔形態指標との関連性はマスク装着によ

って大きく変化することはなかったものの、マスク装着の有無を説明変数に加えた分析では一部有意な影響を与えていた。fWHR stomionを用いた分析では、マスク装着の顔はより信頼できる(傾向)、支配的でない、男性的である(傾向)と評価される効果があり、fWHR lowerを用いた分析では、マスク装着の顔はより信頼できると評価される効果があることが示された。これらの結果は、マスクによって見た目の魅力が上昇するという先行研究の結果と矛盾しない^{18, 19)}。マスクによる顔形態の視覚情報の一部欠損は、表情受容や個体識別に影響することはすでに報告されている¹³⁾。

4.3. 赤面効果

顔色の有無は男性性評価において有意な負の効果があり、この効果は女性の被験者で顕著であった。顔色が赤い顔が女性らしいと判断されたことは、男性の方が女性の顔より赤いという先行研究の報告と矛盾する²⁰⁾。本研究では、高次の社会的感情である羞恥に伴う顔色の変化から着想を得て実験を行ったため、顔領域の一部である頬の部分のみ変化させたが、多くの先行研究では顔全体の肌の色を変化させている²¹⁻²³⁾。また、社会的背景によって顔色の赤みに対する評価や女性のメイクアップの方法の違いが影響している可能性がある。例えば、日本の女性はメイクアップの際のチークカラーの使用率が高く、15歳から29歳までの86%以上の方がチークカラーを使用することが報告されている²²⁾。一方で、中国の女性の間ではチークカラーは日常で必要な化粧品とされていない²³⁾。日本では多くの女性が頬の赤みを増やすようなメイクアップを行うことから、特に女性の被験者が顔色の赤い顔をより女性らしいと評価したのかもしれない。

5. 総括

本研究により、顔形態は受容側の評価である社会特性評価に確実に影響を与えていることが示された。また顔形態の指標の違いによってその影響の大きさや方向が異なっていた。またマスク装着や頬部の色変化は、社会特性評価に部分的に影響を与えていた。その影響は評価される社会特性や被験者の性別に特異的であった。これらの特異的な影響には生物学的および(あるいは)文化的背景の存在が考えられる。今後さらなる検証が必要である。

顔形態が社会特性評価に影響するという事は、印象操作が可能であることに他ならない。ポスト・コロナの時代となり、マスクをはずすことに対する不安²⁴⁾、男性における化粧意欲の高まりなどが報告されている²⁵⁾。本研究の結果は、今後化粧の心理・文化的な効果の実証など応用研究につながる可能性がある。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。助成いただいた研究の一部は、第10回日本人間行動進化学会(2023年11月20日)において報告しました。本研究をともに進めた奈良女子大学生活環境学部心身健康学科に在籍した上 瑞樹氏、岩松 千佳氏をはじめ研究室のメンバーに感謝します。

(文献)

- 1) Sheehan MJ, Nachman MW. Morphological and population genomic evidence that human faces have evolved to signal individual identity. *Nat Commun.* 2014 Sep 16; 5: 4800.
- 2) Scheib JE, Gangestad SW, Thornhill R. Facial attractiveness, symmetry and cues of good genes. *Proc Biol Sci.* 1999 Sep; 266 (1431): 1913-7.
- 3) Fink B, Grammer K, Thornhill R. Human (*Homo sapiens*) facial attractiveness in relation to skin texture and color. *J Comp Psychol.* 2001 Mar; 115 (1): 92-9.
- 4) Young AW, Rowland D, Calder AJ, Etcoff NL, Seth A, Perrett DI. Facial expression megamix: tests of dimensional and category accounts of emotion recognition. *Cognition.* 1997 Jun; 63 (3): 271-313.
- 5) Le Mau T, Hoemann K, Lyons SH, Fugate JMB, Brown EN, Gendron M, et al. Professional actors demonstrate variability, not stereotypical expressions, when portraying emotional states in photographs. *Nat Commun.* 2021 Aug 19; 12 (1): 5037.
- 6) Willis J, Todorov A. First Impressions: Making Up Your Mind After a 100-Ms Exposure to a Face. *Psychol Sci.* 2006 Jul 1; 17 (7): 592-8.
- 7) Hodges-Simeon CR, Hanson Sobraske KN, Samore T, Gurven M, Gaulin SJC. Facial Width-To-Height Ratio (fWHR) Is Not Associated with Adolescent Testosterone Levels. *PLoS One.* 2016; 11 (4): e0153083.
- 8) Wilson V, Weiss A, Lefevre CE, Ochiai T, Matsuzawa T, Inoue-Murayama M, et al. Facial width-to-height ratio in chimpanzees: Links to age, sex and personality. *Evolution and Human Behavior.* 2020 May; 41 (3): 226-34.
- 9) Lefevre CE, Wilson VAD, Morton FB, Brosnan SF, Paukner A, Bates TC. Facial Width-To-Height Ratio Relates to Alpha Status and Assertive Personality in Capuchin Monkeys. *PLOS ONE.* 2014 Apr 4; 9 (4): e93369.
- 10) Wilson V, Lefevre CE, Morton FB, Brosnan SF, Paukner A, Bates TC. Personality and facial morphology: Links to assertiveness and neuroticism in capuchins (*Sapajus [Cebus] apella*). *Personality and Individual Differences.* 2014 Feb; 58: 89-94.
- 11) Hodges-Simeon CR, Albert G, Richardson GB, McHale TS, Weinberg SM, Gurven M, et al. Was facial width-to-height ratio subject to sexual selection pressures? A life course approach. *PLoS One.* 2021; 16 (3): e0240284.
- 12) Oosterhof NN, Todorov A. The functional basis of face evaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Aug; 105 (32): 11087-92.
- 13) Fitousi D, Rotschild N, Pnini C, Azizi O. Understanding the Impact of Face Masks on the Processing of Facial Identity, Emotion, Age, and Gender. *Front Psychol.* 2021; 12: 743793.
- 14) Thorstenson CA, Pazda AD. Facial coloration influences social approach-avoidance through social perception. *Cogn Emot.* 2021 Aug; 35 (5): 970-85.
- 15) 瀧上啓志, 山口芳功, 吉武一貞. 成人正常咬合者の歯、歯列、顎骨の形態変化. *日本口腔科学会雑誌.* 2001; 50 (5): 293-8.
- 16) Costa M, Lio G, Gomez A, Sirigu A. How components of facial width to height ratio differently contribute to the perception of social traits. *PLoS One.* 2017; 12 (2): e0172739.
- 17) Weiss A, Adams MJ, Widdig A, Gerald MS. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) as living fossils of hominoid personality and subjective well-being. *J Comp Psychol.* 2011 Feb; 125 (1): 72-83.

- 18) Kamatani M, Ito M, Miyazaki Y, Kawahara JI. Effects of Masks Worn to Protect Against COVID-19 on the Perception of Facial Attractiveness. *i-Perception*. 2021 May; 12 (3): 20416695211027920.
- 19) Oldmeadow JA, Koch C. Effects of Face Masks on Person Perception. *Perception*. 2021 Oct; 50 (10): 876-89.
- 20) Edwards EA, Duntley SQ. AN ANALYSIS OF SKIN PIGMENT CHANGES AFTER EXPOSURE TO SUNLIGHT. *Science*. 1939 Sep;90 (2332): 235-7.
- 21) Stephen ID, Oldham FH, Perrett DI, Barton RA. Redness enhances perceived aggression, dominance and attractiveness in men's faces. *Evol Psychol*. 2012 Aug;10 (3): 562-72.
- 22) Thorstenson CA, Pazda AD, Elliot AJ, Perrett DI. Facial Redness Increases Men's Perceived Healthiness and Attractiveness. *Perception*. 2017 Jun; 46 (6): 650-64.
- 23) Young SG, Thorstenson CA, Pazda AD. Facial redness, expression, and masculinity influence perceptions of anger and health. *Cogn Emot*. 2018 Feb; 32 (1): 49-60.
- 24) ポーラ文化研究所「女性の化粧行動・意識に関する実態調査 2017」レポート3 extension://elhekieabhbkpmpce/coobjddigjcaadp/https://www.cosmetic-culture.poholdings.co.jp/report/pdf/20171120make2017.pdf
- 25) 香港貿易局.Cosmetics-Products-in-China-Characteristics-of-Female-Consumers. 2016 March 22 <https://hkmb.hktdc.com/en/1X0A5LZA/hktdc-research/Cosmetics-Products-in-China-Characteristics-of-Female-Consumers>
- 26) 東京新聞「新型コロナの流行が落ち着いても「学校でマスクを外すのが怖い」本紙への投稿に共感する高校生たち」2022年9月18日 <https://www.tokyo-np.co.jp/article/202803>
- 27) 日本インフォメーション株式会社「～コロナ禍で美容・健康意識が上昇～男性の生活様式×美意識に関する調査2」2021年8月18日 <https://www.n-info.co.jp/report/0021>

IV. コスメトロジー研究助成を受けて

コスメトロジー研究助成を受けて

植田 圭祐

この度はコーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただいたことに対して、心から感謝しております。この助成金を通じて、私たちの研究を前に進めることができ、化粧品分野におけるエマルジョン品質評価技術において、新たな知見を得ることができました。

エマルジョンは古くから化粧品や食品、医薬品分野で活用されてきており、油相及び水相両面を有する利点から様々な有効成分の担体として汎用されています。エマルジョン中の有効成分の分散状態の評価法にはこれまでも様々な手法が用いられてきておりますが、非破壊的かつ定量的にその分子状態を区別した上での評価法は十分に確立されておりませんでした。採択いただきました助成金を活用させていただきまして、エマルジョン中の化粧品原料の分散や溶解状態について、NMRとCryo-TEMの併用によって定

量的な評価基盤を構築することができました。これらの研究結果は、エマルジョン研究分野において重要な一歩であり、今後の研究にも大いに役立つものと期待しております。

コロナ禍を経て大学における研究環境も影響を受けている中で、本研究助成は研究を進める上で非常に助かり、大変有難かったです。今回の助成を通じて得た知識と成果を広く波及させ、化粧品学の発展に寄与していきたいと考えております。エマルジョン中の化粧品原料についての評価基盤をさらに深化させ、新たな技術や製品の開発に向けて研究を進めてまいります。

この度は助成をいただきありがとうございました。コーセーコスメトロジー研究財団のご発展をお祈り申し上げます。
(千葉大学大学院薬学研究院)

コスメトロジー研究助成を受けて

内田 紀之

この度は、コスメトロジー研究助成に採択して頂き、財団並びに関係者の皆様に心より御礼申し上げます。本研究課題はほとんど水からなるフォトニック構造体を化粧品へと応用する研究を進めさせて頂きました。コロイド粒子が規則的なフォトニック構造を形成することで生じる構造色は退色せず、鮮やかな色を呈することから、色材への応用が期待されているものの、化粧品への応用は限定的でした。この大きな原因はフォトニック構造体を構成する分散液はほとんどが光を反射させるための反射体からなり、生体適合性が著しく低いことでありました。

最近私は、ほとんど水からなるフォトニック結晶を偶然発見し、色材化粧品への応用が可能であると思ひ至り、本

研究助成に応募しました。採択頂いたおかげで、このフォトニック構造体の皮下浸透性や刺激応答性を系統的に評価することができ、自分らの材料が従来のフォトニック構造体と異なり高い生体親和性を示し、化粧品応用に適していることを明らかにすることができました。現在企業との共同研究により、材料の低価格化などを進め、実用化へ向けた試みが進められております。

最後になりましたが、本研究に対して2年間の研究助成を頂いたことに感謝申し上げます。自身の萌芽的な研究に助成を頂いたおかげで、大きく発展させることができたと考えております。コーセーコスメトロジー研究財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。
(東京農工大学)

2022年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

梅野 太輔

このたびは、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき、本当にありがとうございました。私の専門は合成生物学と進化分子工学であり、化粧品学とは「いまいち」接点の少ない研究をしてまいりましたが、もともとバイオ燃料の微生物生産のつもりで生合成研究をはじめたスクアレンが化粧品業界で確固たる市場を持っていること、品質の良いスクアレンがサメの乱獲と海水汚染によって安定供給困難になっているということを知り、「化粧品ベース素材の合成生物学」というものに挑戦してみようと考えました。本研究は、化粧品業界に強い興味を持って研究室に入ってきた数名の学生が担当してくれたため、ナイーブな研究であったにもかかわらず、助成期間の間に著しく発展し、他の方法ではつくれないいくつかの炭化水素化合物の生合成経路の開通に繋がりました。これからも、

香り成分、保湿成分、栄養素や色素など、コスメトロジー素材となりえるさまざまな素材の合成生物学を続けていきたいと思います。

当時私どもは千葉大学から本属を移したばかりで経済的に困窮しておりましたが、本助成によって新天地での本研究の立ち上げが非常にスムーズにできました。私どもに貴財団への応募を呼びかけてくださった同部門の桐村光太郎教授に深く御礼申し上げます。最後に、貴財団がこれからも多くの研究者を啓発し、コスメトロジーという新しい目標への出会いの機会を与えてゆくことを祈念するとともに、多くの研究室の立ち上げ・発展を支えてこられた成果に対しても、あらためて敬意と感謝を申し上げます。

(早稲田大学理工学術院・先進理工学部応用化学科、応用生物化学部門)

2022年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

竹井 敏

本研究実施にあたり、多大なるご支援をいただいた公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の皆様には感謝の意を表す。本助成を足掛かりに実用化に向けた産学官連携プロジェクトが開始できる初期成果、並びに合成・材料化・分析・加工・評価を担当する指導学生3人の受賞(2023年応用物理学会 第2回ナノインプリント技術研究会 Student Poster Award、2023年高分子学会ポリマー材料フォーラム 優秀発表賞、及び2023年マザック優秀論文表彰)につながった。

一つの組織の人的資源や予算だけでは研究競争に勝てない時代において、本採択をご縁に化粧品展示会や関連学会で交流する機会が増え、異なる組織でチームをつくり、化

粧品開発研究に取り組む今の自分の土台となった。ナノレベルの超微細な加工技術を生かし、企業と共同でライフサイエンスやヘルスケア分野の製品開発や実用化を進めるモチベーションが高まった。ナノインプリント加工や射出成形において用いられる金型を多孔質にできる技術を深化させ、高溶解型無痛ナノマイクロニードルの生産技術において培った経験や人脈を生かし、国内外の企業や人をつなぐ『橋渡し』を担いたい。ゼロから何かを生むよりも、今ある技術に付加価値をつけることにより、社会産業への技術貢献と、企業が求める人材の育成にまい進する。

(富山県立大学)

コスメトロジー研究助成を受けて

田中 祐圭

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただき、厚く御礼申し上げます。私は2022年4月に東京工業大学の准教授として独立した研究室をもつこととなりました。本助成に採択いただいたのがこのタイミングであったことから、この助成金を活用させていただき、なんとか研究室を立ち上げ新たな研究をスタートすることができました。

私は、さまざまな生物がもつ生命現象を分子レベルで理解しこれを活用した新しい技術の開発を進めています。これまで、ナノサイズレベルの酸化物粒子の形態制御を可能とするタンパク質の解析や、疾病にも深く関わる生体膜の構造を制御するタンパク質の探索技術の開発とその機能解析などを進めてきております。

一方で本助成金ではこれとは全く異なるコンセプトで研究を進めております。具体的には、揮発性低分子有機化合

物(VOC)などの小分子を超高感度に検出するセンサの開発です。我々はこれまでにさまざまな標的認識ペプチドを同定してきましたが、これらのペプチドプローブの末端にチオール基を有するシステイン残基を付加することで、分子内結合が誘起され、センサ基盤表面で非常に入り組んだペプチドマトリックス構造を形成させることができることを見出しております。これがさまざまな小分子を高感度に捉えるための有効な分子認識界面として利用できることを期待しています。本研究においても、この新たな分子認識界面の設計について研究を進めており、報告書に記載のとおり、これまでにない新たな展開が見えてきており、今後の研究の進展に期待しております。

最後に、本研究をご支援いただいたことに改めて深く御礼申し上げますとともに今後も貴財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。
(東京工業大学)

コスメトロジー研究助成を受けて

徳留 嘉寛

この度は、コーセーコスメトロジー研究助成に採択を頂き本当にありがとうございました。関係の皆様にも深く御礼申し上げます。

私は埼玉の大学から、数年前に佐賀大学に異動したのですが、移動した年に採択して頂きました。大学からの研究費も多くなかった中で研究活動をどのように進めていこうかがき苦しんでいる中で助成を頂き、本当に感謝しております。また、授賞式にも呼んで頂き、佐賀から東京に参ったことも良い思い出として残っています。

最近の多くの競争的資金は病気の治療などを目的とするものが多い中で、国民の大半が興味のある Well-being を目指す研究にもご支援を頂けることは本当に貴重だと思っています。また化粧品業界は本当に幅広い分野を網羅しており、これらも助成対象とされていることには驚きました。コスメトロジー研究助成に採択された課題を見ると、内容は本当に多岐にわたり、これらが本当にコスメ研究や化粧品業界の発展につながると思うとワクワクします。コスメ

関連研究に対する研究助成が少ない中で、これだけ多くの件数の助成をしてくださることは、コスメ関連に携わる教育・研究者の端くれとして非常にありがたく思っています。

今回、採択頂いたイオンコンプレックスを用いた水溶性高分子の皮膚浸透促進に関する研究は、私のライフワークになりつつあります。実際に、水溶性高分子化合物を皮膚に入れることは通常は不可能だとされていますが、それが実現できると信じて検討をしています。この課題が採択されたということは「諦めずに挑戦しなさい」と言われているようで本当に心強く思っています。これからも一生懸命研究活動を続けたく存じます。

私は今回の成果をしっかりと化粧品業界の発展のために活かし、貢献できるように微力ながらさらに精進していきたいと考えております。改めまして、コスメトロジー研究助成に採択して下さったこと感謝申し上げます。
(佐賀大学)

2022年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

長瀬 健一

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択頂き誠に有難うございました。自分の研究申請が採択された際は非常に嬉しかったです。

本申請研究は、生体内で分解するポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA)により、皮膚細胞組織を活性化する塩基性細胞増殖因子(bFGF)を肌に効果的に送達するナノ粒子の作製です。

私は博士研究員の時から機能性高分子の研究を行っています。温度に応答する高分子を用いたクロマトグラフィーなどの分離精製技術、幹細胞を分離精製することで再生医療へ応用する技術、さらには、新規医療モダリティであるウイルスベクター、細胞外小胞を分離精製する技術などへの展開を行っています。一方で、学生の中から化粧品に応用できる研究ができたら華やかで、実用的で良いなど

いう思いを抱いておりました。

大学の研究助成募集案内でコスメトロジー研究助成というものがあるということを知り、思い切って応募をしてみようと思ったのが、この研究を始めるきっかけとなりました。実際に研究で作製したナノ粒子は、生理条件での分解と効果的なbFGFの放出を実現することができました。実用化には、まだまだやらなくてはならないことが多いですが、憧れの化粧品研究の第一歩を踏み出したのは、コスメトロジー研究助成のおかげです。

末筆ではございますが、研究助成を賜ったコーセーコスメトロジー研究財団ならびに関係者の皆様に深く感謝すると共に貴財団の今後、ますますのご発展を祈念いたします。
(広島大学大学院医系科学研究科)

2022年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

中道 友

この度はコーセーコスメトロジー研究助成に採択していただき、誠にありがとうございました。今回採択いただいた研究課題は、私が2020年に現職である山陽小野田市立山口東京理科大学に着任したときから新たに始めた研究で、光干渉断層法(OCT)という光イメージング技術を使って皮膚内の毛細血管の構造や血流速度などを計測し、それらのダイナミクスから皮膚の機能を評価する新技術を開発するといったものです。正直なところ、本研究課題は過去に採択された課題とは似ても似つかぬものでしたので、採択のご連絡をいただいた際は、喜びとともに大きな驚きも感じたことを覚えています。

さて、本研究では主に3つの目標を掲げ研究を行いました。1つ目の目標は、OCT信号の解析技術の開発で、毛細血管を高いSNで検出する手法、毛細血管内の血液の速度・角度を検出する手法、血液の粘度を検出する手法について検討しました。血液の粘度を検出する手法については遅れてしまっていますが、毛細血管を検出する手法では論文を

1本書き上げることができ、血液の速度・角度を検出する手法でも近いうちに論文を投稿できるところまで成果を得ることができました。2つ目の目標は、上述した機能信号のダイナミクスから皮膚の機能を評価する方法の開発で、こちらも計画より遅れてしまっているものの、複数被験者のデータを蓄積・解析することができ、成果発表までもう一步のところまで来ています。3つ目の目標は、高速なOCT計測システムを開発して計測できる機能信号の幅を広げようというもので、これまで使用していたOCTの5倍高速なシステムを構築することができました。今後も、これらの研究をさらに進め、本研究課題で提案した技術がコスメトロジーの分野に貢献できるよう尽力していく所存です。

最後になりましたが、本研究の遂行にあたり御支援賜りましたことに厚く御礼申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展を心より祈念いたします。

(山陽小野田市立山口東京理科大学 工学部 機械工学科)

コスメトロジー研究助成を受けて

真島 剛史

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択して頂き、誠にありがとうございました。私は2021年の4月に奈良先端科学技術大学院大学に着任し、そのすぐ後に本助成を頂けたことで、研究をスムーズに立ち上げることができました。本研究では、タンパク質を用いたハイドロゲルの構築に取り組みました。ハイドロゲルは水により膨潤するゲルであり、ドラッグデリバリーや生体代替・模倣材料への利用が可能なバイオマテリアルとして注目されています。中でもタンパク質を原料としたハイドロゲルは生体親和性や生分解性の高さが特長です。研究を進める上で、当初ゲルの素材として利用しようとしていたタンパク質では、ゲル内部に小分子の包摂が行えないという問題もありました。しかし、ゲル素材となるタンパク質設計から再度スタートし、結果的により高度なタンパ

ク質の機能を取り込んだタンパク質ゲルの構築に至りました。具体的には、注目したタンパク質が持つ一酸化炭素やイミダゾールといった小分子の付加により会合状態と離散状態を制御できるという機能を活かし、これらの小分子によりゲル化を制御できるタンパク質ゲルの構築を達成できました。また、自身でタンパク質の設計から行ったことで、ゲル化における分子レベルの挙動予測や、希薄条件下での小さな会合体構造の観察も可能となりました。現在、本結果をまとめた論文を投稿しております。これらの成果を上げることができたのは、貴財団の助成により、一つの目標に粘り強く挑戦する機会を得られたからであり、コーセーコスメトロジー研究財団およびご関係者の皆様へ、心より感謝申し上げます。（奈良先端科学技術大学院大学）

コスメトロジー研究助成を受けて

水野 稔久

この度は、貴財団の研究助成を受けさせて頂き、誠にありがとうございました。研究課題として掲げていた「抗菌活性を持ったペプチド界面活性剤をバクテリアの非リボソームペプチド合成 (NRPS) 酵素で合成できる系の構築」というテーマは、実際に取り組んでみたところ、注目する NRPS 酵素に関する詳細なアミノ酸配列の決定や立体構造の推定、さらに活性部位で重要な役割を果たすアミノ酸残基の特定、個々のモジュールの酵素活性評価法の確立など、基礎的な知見の積み重ねが必要であることがわかりました。したがって、残念ながら頂いていた2年間の研究期間では最終目標まで完遂することができませんでした。助成金を頂くことで初めて成し遂げることができた、NRPS 酵素の遺伝子クローニングや大量な配列解析による各酵素モジュールの新規アミノ酸配列同定、コンピュータシミュレーションによる立体構造推定、大腸菌を用いた異種発現と各

酵素モジュールの単離、酵素活性評価、またセレクション系構築に不可欠な新規擬似基質についても、合成法確立まで達成することができました。助成期間終了後も本研究プロジェクトは継続し、最終的な研究目標の達成を目指していきたいと考えております。ペプチド界面活性剤は、近年化粧品業界で注目されている成分の一つであり、保湿力、抗菌・抗炎症作用、安全性、肌への優しさ、生理活性などに加えて、環境への配慮という観点からも注目を集めています。一方で価格の低減が必須の課題であり、私たちが取り組んでいる NRPS 酵素を用いた合成系の構築がなされた際には、ペプチド界面活性剤の産業利用において大きな貢献が期待されると考えています。この達成を目指し、引き続き検討を続けてまいりますので、どうぞよろしくお願い申し上げます。（名古屋工業大学大学院工学専攻）

2021年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

八波 利恵

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団コスメトロジー研究助成に採択いただき、誠にありがとうございました。

採択のご連絡をいただいた時は、新型コロナウイルス感染症の影響で、授業はオンライン、研究は登校自粛からなかなか進まず、不安な日々を過ごしておりました。また、共に研究室を運営していた先生がご退官された直後でもあり、指導を引き継いだ学生の研究や研究費の獲得などで精神的にも肉体的にもかなり疲弊しておりました。そのような中で採択のご連絡を受け、素直な喜びと、研究の成果を期待してくださった財団にも報いられるよう、身が引き締まる思いでした。

私は、博士学生の頃から日本で分離された高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* を研究対象としてきました。この菌は、塩湖や塩田のような高塩濃度環境下で生育します。味噌、醤油といった高塩環境でも生育する好塩性の微生物は私たちの生活とも馴染みが深く、発酵食品などで活躍し

ています。一方で、高度好塩性古細菌の工業応用例はまだ限られております。「このような微生物が一体なんの役に立つのだろうか。このような微生物を何か社会に役立てられないか」と常々思いながら研究を行ってまいりました。最近になって、*H. japonica* が新規多分岐グルカンを生産することを見出し、コスメトロジーの分野でこのグルカンを工学応用できるのではないかと考え、申請に至りました。多分岐グルカンについては、詳細な構造解析や物性解析がまだまだ必要ですが、コスメトロジーの分野だけでなく、健康食品としての機能も有することがわかってきました。今後もこの新規グルカンをはじめとして、*H. japonica* を利用した工学応用に努めていきたいと思っております。

最後に本研究を支えてくださいました貴財団をはじめ、ご関係者の皆様に厚くお礼を申し上げ、今後ますますのご発展を心よりお祈り申し上げます。

(東京工業大学生命理工学院)

2022年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

山本 尚

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき誠にありがとうございました。貴財団は我々にとって大変興味深い企業でした。少なくとも私にとっては全く新しい体験でした。化粧品の化学とは皮膚の上皮の化学であり、何が起きているのか、わくわくしながら勉強させていただきました。我々の研究課題はペプチドであり、ペプチドの役割は化粧品でも、非常に大きいのではないかと考えています。と言っても、化粧品に使われる可能性のあるペプチドは医療に用いられる比較的長いペプチドと比べると、トリペプチドを中心とする短いペプチドばかりです。トリペプチドは3つのアミノ酸が繋がったものであり、簡単だと思う人も多いと思います。しかし、必須アミノ酸だけで考えてもトリペプチドには $2 \times 20 \times 20$ で8千種類のペプチドが考えられます。そうのうちのたった1つを選ぶだけでも、大変な作業になります。

ペプチドの合成は、そう簡単ではありませんでした。1つのアミノ酸をつけるだけでも、数工程が必要となります。

20個のアミノ酸が繋がったものでは、合成に1年以上もかかることは珍しくありません。我々の合成はそれを簡略化するのに成功しました。もちろん世界初めての快挙だと思っています。相当長いペプチドでも数週間で合成できます。これによって医療の世界が変わると言われています。短いトリペプチドでも、8千種類のペプチドを機械合成することに現在取り組んでいます。これは化粧品の世界でもきっと役立つと思っています。

我々はHow to makeの世界を制覇したと思っていますが、どんなペプチドがいいのか、What to makeの世界は完全に未開の分野です。この未開の分野を開拓するため、現在始めているところです。成功すれば、医療の世界が変わると思っています。

最後に本研究をご支援いただきましたことを重ねて感謝申し上げますとともに、貴財団のますますのご発展を祈念申し上げます。

(中部大学)

コスメトロジー研究助成を受けて

阿部 結奈

このたびご採択・ご支援を賜りましたことを大変光栄に存じますとともに、心より感謝を申し上げます。

私の研究課題では、皮膚バリアの健全性を反映する電気化学的指標「表皮電位」を用いて、皮膚へのインコヒーレント赤色光照射刺激によるバリア回復促進効果の評価を試みてまいりました。赤色光にはさまざまな有用性が報告されていますが、バリア回復プロセスに及ぼす効果については、作用機序や最適な刺激条件など未解明の点が多く残されています。現在までにいくつかの刺激条件を比較し、放射照度に一定の有効域があることや、比較的短時間の照射にも長時間の照射と同等の効果があること、効果に空間的広がりがあることなどを観察してまいりました。いまだ基礎的な検討の段階ではありますが、将来的には物理的な作用のみでバリアを手軽に治療できる、新たなヘルスケアデバイスの開発につながることを期待しております。一方、光照射の効果は皮膚組織の生理的・光学的特性に応じて変

動することが示唆されたため、モニタリングとそれを実現する計測法の重要性も改めて思い知らされました。

表皮電位は表皮細胞が作り出すイオン濃度勾配によって生じると考えられています。イオンの分布は組織損傷に伴って変化し、皮膚バリアの回復だけでなく創傷の治癒にも関与することから、表皮電位は広く皮膚健全性を計測するための手がかりとなる可能性があります。次の技術的課題は、長時間のモニタリングでも組織内イオン動態に影響を与えずにアクセスする手法の開発です。近年発展するウェアラブルデバイスのような形で、治療中、あるいは日常生活の中でも皮膚健全性の変動を捉えるデバイスが実現できればと考えております。

今後、得られた成果をさらなる研究展開に活用し、一層精進してまいります。これまでのご支援に改めて御礼申し上げます。

(東京都立大学システムデザイン学部機械システム工学科)

コスメトロジー研究助成を受けて

今西 規

コーセーコスメトロジー研究財団 2021 年度コスメトロジー研究助成に採択していただき、深く感謝申し上げます。われわれの研究は皮膚の老化を測る分子マーカーを設定しようという試みであり、成功すれば将来にわたって利用できる定量性のあるマーカーが完成し、コスメトロジー分野の発展に貢献できる研究になると考えています。本研究は現在、データ取得のための解析が進行中という状況です。

今回の研究では、ヒトを対象とする研究を実施することの難しさを強く感じました。われわれの研究テーマ「皮膚細胞ゲノムのメチル化測定による加齢マーカーの開発」は、2021 年 10 月に採択いただいたものです。この時期は新型コロナウイルス感染症が繰り返し大流行を起し、終息の気配がありませんでした。附属病院にて新型コロナ感染者を受け入れていた東海大学医学部では、職員全員が感染予防に最大限の注意を払うように指導がなされ、そのためヒト由来試料の取得を必要とする本研究は、安全対策のた

めに方法論の検証を徹底して行う必要がありました。また、研究倫理審査が研究のボトルネックになりました。われわれの研究計画は東海大学医学部臨床研究審査委員会に申請しましたが、最終的に実施許可が出るまでに実に 13 ヶ月を要してしまい、研究開始が大幅に遅延しました。さらには 2022 年 12 月に当研究室の研究技術員が急逝する事件があり、研究活動に専念できない時期が長く続いてしまいました。本研究が現在も進行中であり、最終的な成果がまだ出ていないこと背景には、こうした事情があります。

現在は本研究は着実に進んでいます。当初に計画した目標には未だ到達していませんが、近い将来に成果を公表できるように、最後まで責任を持って研究に取り組んで参ります。

改めまして、貴財団のあたたかいご支援には深く感謝申し上げます。

(東海大学医学部)

2021年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

岩田 浩明

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団には私たちの研究課題に助成を頂き誠にありがとうございます。皮膚バリアは健康な皮膚の維持のみでなくアトピー性皮膚炎を含めて皮膚疾患にも大きく関与する因子です。タイトジャンクションバリアは、まだ疾患との関係性は十分に解明されていない分野であり、これからさらに疾患との関係性について理解が深まると思われます。われわれの研究課題は、全く異なる皮膚基底膜部の疾患の研究をきっかけに着眼した内容です。しかも、自己免疫疾患を主に研究してきたところから、皮膚バリアとこれまでほとんど関わることがなかった領域に踏み出すきっかけになりました。基底膜部と顆粒層付近と表皮に着目するとかなり離れた位置関係になります。しかし、表皮は基底層から角層に向かって分化(角化)するという点では連続性のある臓器であり、当然相互作用はあることが予想されます。基底膜付近の研究を主に培養細胞を用いて続けてきたものとして、顆粒や角層の研

究は単層培養では十分な解明できないため新しい研究手法の習得から始めました。大学院生や共同研究者の助けを借りながら、少しずつ結果を出すことができました。一部の成果ですが大学院生が論文発表まで仕上げることができたのは、コーセーコスメトロジー研究財団の支援を頂けたことによります、心より感謝申し上げます。

しかし、まだ当初の目的であるタイトジャンクションが角層形成に及ぼす影響の解明にはたどり着いていません。今回の研究を通じて、自分の研究分野・手法・考え方など多くの広がりを得ることができました。そして、一つの成果はまた次への課題のアイデアを生み出します。今後も、新たな仲間とともに一つずつ成果を積み上げていけるように努力していきたいと思えます。ご支援を頂きました財団には重ねまして御礼申し上げます。

(岐阜大学大学院医学系研究科皮膚科)

2021年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

臼井 健二

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団コスメトロジー研究助成に採択いただき、誠にありがとうございました。私は、学生時代よりペプチド工学を専門としており、生体関連化学、ナノバイオ分野の研究者でありまして、コスメトロジー(化粧品学)分野に関わることは残念ながら本研究を行う以前はありませんでした。最近、アレルギー感作試験の一つにペプチドが用いられていることを知り、研究を始めた新参者であるにも関わらず、このような助成をいただいたことは、我々の研究の方向性が間違っていないという自信につながりました。お陰様で、原著論文1報を国際誌へ投稿でき、和文解説文も1報発表でき、さらにはコロナ禍が落ち着いたタイミングで国際学会にも参加できました。このような成果につながったのも、貴財団の萌芽的研究へのご理解、すなわち助成金使途や研究計画の柔軟な変更が可能であること、単年の財団助成が多い中、2年間の研究期間をお認めいただいたことが大きな要因であったと考えております。特に、当初単年で計画であっ

たところを、助成途中で2年間の研究期間への変更をお認めいただいたことは、ご迷惑をおかけして申し訳なかったと感じると同時に、研究者へのご理解とご信頼をいただいていると感じ、大変嬉しく感謝いたしております。僥越ながら是非今後とも貴財団のこのような素晴らしい理念・活動を継続していただけたらと願っております。私も本研究を通して、コスメトロジー分野に貢献すべく、今後も精進を重ねていきたいと考えております。特に本研究は、アレルギー感作試験の有力な一つとして世界中で使用していただけるよう、OECDテストガイドライン化を目指せばと考えており、本助成はその足掛かりとなったと感じております。

最後になりましたが、本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました貴財団ならびに関係者の皆様へ深く感謝するとともに、貴財団のますますのご発展を心より祈念いたします。(甲南大学フロンティアサイエンス学部)

コスメトロジー研究助成を受けて

遠藤 裕介

この度はコスメトロジー研究助成を賜り、誠にありがとうございます。私のような若手PIにとってはこのようなご支援をいただくことは大変有り難いことで、光栄に思うと同時により一層 皮膚-アレルギー研究が進むよう精進を重ねる必要があると再認識しております。選考委員の先生、財団関係者の方々に深く御礼申し上げます。

私の免疫研究のスタートは今から15年ほど前にさかのぼります。大学院生時代の6年間では一貫して記憶T細胞について研究を行い、アレルギー性炎症を強く誘導する病原性記憶Th2細胞(Tpath2細胞)を同定することができました。学位取得後は今回のもう一つの研究テーマである脂質代謝とT細胞機能分化という、新たなテーマに挑戦しました。免疫と代謝のクロストークについては私が研究を開始した当初はほとんどその関係性についてはわかっておりませんでした。ここ数年の研究からT細胞の病原性と脂質代謝が非常に重要な接点であることがわかってきました。

また、今回の研究活動を通して、皮脂というワードが示すように皮膚における脂質が免疫機能やアトピーと密接な関係にあることがわかり、コスメトロジー分野と免疫との関連性について、改めて考える良い機会となりました。免疫と代謝のクロストークは未だ解明されていない課題が多く残されておりますので、“代謝”で免疫を制御することを目指し、これからも日々挑戦していきたく思います。

最後になりますが、本研究を大きく進展させていただく機会をいただきましたコーセーコスメトロジー研究財団に心から御礼を申し上げます。良い研究・発見を続けていくことが皆様への恩返しにつながると思いますので、たゆまぬ努力を続け、基礎と臨床の距離を少しでも縮められるよう、また免疫-コスメトロジー研究分野の進展に貢献できるよう一歩一歩邁進していく所存でございます。

(かずさDNA研究所オミックス医科学研究室)

コスメトロジー研究助成を受けて

大野 祐介

この度は第32回コスメトロジー研究助成を賜り、財団関係者の皆様方、ご審査いただきました審査員の先生方に心より御礼申し上げます。今回採択いただいた課題はセラミドを構成する長鎖塩基の6位に水酸基をもつHクラスと呼ばれるセラミドの合成酵素の同定を目的としたものです。セラミドは長鎖塩基と脂肪酸からなりますが、ヒトの角質層には長鎖塩基および脂肪酸の構造の異なる25クラスのセラミドが存在しています。Hセラミドはそのうち5クラスを占めており、ヒト角質層における存在量は約半分にもおおよびます。しかし、Hセラミドの合成酵素、すなわち長鎖塩基の6位に水酸基を導入する酵素は未だ同定されていません。Hセラミドはヒトにしか存在しておらず、皮膚疾患との関連性が不明であること、ヒト由来の実験サンプルは入手困難であること、培養ヒトケラチノサイトでは角質層ほどの量が産生されないことから実験を進めることが非常に困難です。今回、本研究助成の成果のうち、アスコル

ビン酸がケラチノサイトの分化に伴うHセラミドの産生を大きく増加させることが明らかになり、それに伴い多くの遺伝子発現が変動することが明らかとなりました。このことはHセラミド合成酵素の同定への大きな進展であると確信しております。また、本研究助成の私の中間報告を見て連絡をくださり、ディスカッションをさせていただいた先生もおり、本研究助成を介して研究のネットワークが広がり、今後の発展が期待できる非常に有意義な経験をさせていただいたと思っております。

私事になりますが、2024年4月より順天堂大学薬学部および同医学研究科環境医学研究所(兼任)に異動することとなりました。環境医学研究所では皮膚のかゆみの研究を目的としたグループがありますので、本研究の成果も含めこれまで培ったセラミド解析とともに、違った視点からのセラミドの重要性に関する研究も発展させていきたいと考えております。

(北海道大学大学院薬学研究院)

2021年度 研究助成

化粧品学と免疫学

押海 裕之

化粧品は肌に直接触れるため、肌の炎症の問題は切り離すことができない重要な課題である。炎症は免疫応答として生じるが、その機序としてはT細胞やB細胞が関与する獲得免疫と、マクロファージや上皮細胞などが関与する自然免疫とに大別される。本研究では、この自然免疫が関与する炎症の新たな分子機構に焦点を当て研究を進めた。その成果として、分子生物学的な手法から自然免疫による炎症制御の新たな分子機構を解明するとともに、ケミカルスクリーニングによりある代謝産物が抗炎症作用を示すメカニズムを新たに解明した。特に、この代謝産物は従来の化

粧品にも配合されている成分であるが、その抗炎症作用について着目されておらず、本研究成果により、今後、この代謝産物を抗炎症成分とした化粧品の開発につながることを期待される。歴史的に見ると化粧品は意図しない炎症を誘導することが社会問題となることが幾度か繰り返されている。本研究での基礎研究は、将来にわたり、そのような問題が生じないための基礎基盤としての重要性があることに加え、化粧品に機能を持たせた機能性化粧品の開発に繋がると期待される。

(熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座)

2021年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

笹沼 博之

この度はコーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただき、大変ありがとうございました。本財団の助成が決定した時期は、京都大学から現所属の東京都医学総合研究所に研究グループリーダーとして移籍した時でした。当時は、研究室の立ち上げに必要な備品、消耗品を購入する予算に乏しく、研究助成をいただけることになりまして大変喜んだことを覚えております。この助成をいただけたおかげで東京都医学研では、紫外線による細胞老化のメカニズム解明を課題の一つとして立ち上げることができたと思っております。深く感謝申し上げます。

我々の個体を形成している細胞のほとんどは、ゲノムDNAを持っております。ご存知の通り、ゲノムDNAとは細胞の設計図です。残念ながら我々のゲノムDNAは、年齢とともに変異が蓄積していきまします。変異とは、細胞内的、外的要因によって発生するDNA損傷が正しく修復できなかった結果として発生します。ゲノムDNAの損傷を発生させる主原因の一つは、紫外線です。紫外線は、細胞殺傷能力は低いものの、損傷と変異を多く発生させます。紫外線に曝露することにより発生する形質としては、シミや光老化が有名です。私が小学生の頃は、夏休みにはよく海やプールに遊びにいった真っ黒に日焼けして二学期を迎

えたものですが、最近シミが増えたのはそのせいかなとも思っています。本助成の目的は、まさに紫外線による光老化の分子機構を明らかにするというものでした。光老化というものは、人の場合は長い年月をかけて進行するものです。その光老化現象を、細胞を使った研究でどこまで理解することができるのか、本助成開始時は大変な不安を覚えておりましたが、今こうして報告書を書きながらその分子機構の一端を解明できたのではないかと思っております。

本助成をいただくことが決定した2021年は、日本はまだコロナ禍にありました。当時はほぼ全ての学術集会在オンラインになり、対面で研究者とお会いする機会がほぼなくなっていました。財団の方々は、授賞式の現地開催を行うべきかどうか大変な煩悶があったとお察しいたします。その中で開催された2021年11月25日の授賞式は、対面で強い期待と激励をいただくことができ、大変勇気づけられました。本助成をいただくことで得られた研究成果を端緒としまして、今後さらに分子メカニズムの解明研究に邁進していく所存です。最後となりましたが、本研究にご支援をいただき、財団の皆様を重ねて御礼申し上げます。貴財団のご発展を祈念いたします。

(東京都医学総合研究所)

肥満と痩せの狭間で

菅波 孝祥

この度は、貴重なご助成を賜り、誠に有難うございました。私は元々、肥満やメタボリックシンドロームを対象とする代謝研究者で、持続する過栄養が代謝臓器に慢性炎症を惹起する分子メカニズムの解明に取り組んできました。従来、脂肪組織では脂肪細胞、肝臓では肝細胞といった実質細胞が注目されてきましたが、実際には、免疫細胞や血管構成細胞、線維芽細胞など多種多様な間質細胞が数多く含まれ、実質細胞との相互作用で臓器を形作っています。例えば肥満では、中性脂肪が内臓脂肪に過剰蓄積して脂肪細胞が肥大化することに加えて、マクロファージなどの免疫細胞の浸潤、血管新生の亢進、細胞外マトリクスの蓄積など、ダイナミックな組織学的変化が生じます。このような研究を通して、肥満やメタボリックシンドロームは代謝性疾患であると同時に、慢性炎症性疾患であることが明らかになってきました。

一方、最近では加齢に伴う痩せ、無理なダイエット、がん

など消耗性疾患に伴うカヘキシアにより、脂肪組織が萎縮することで十分な機能を果たせなくなる病態も注目されてきました。ここでは、主に皮下脂肪の萎縮が問題になります。皮下脂肪は中性脂肪としてエネルギーを安全に蓄え、必要時にはこれを分解して全身臓器に供給する重要な役割を担います。皮下脂肪が萎縮することにより全身の代謝のフレキシビリティが低下し、加齢性疾患を起しやすいう状態が生じていると考えられています。本研究において、加齢やカヘキシアの皮下脂肪組織で共通に変動する遺伝子群を同定することができました。興味深いことに、ここでも炎症が関与しているようです。結局、栄養に関して中庸が最も良い、という結論は示唆に富んでいると思います。今後は、過栄養と低栄養、全く逆向きのベクトルにもかかわらず、炎症が脂肪組織の機能を障害する分子機序を解明し、この生物学的意義を明らかにしたいと考えています。

(国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学環境医学研究所)

コスメトロジー研究助成を受けて

鈴木 亮

この度は、貴財団からの研究助成を賜りまして誠に有り難うございました。本研究助成を得て、研究を大きく展開・発展できましたことを、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

私はアレルギー応答の多様性に着目して、これまで一貫してアレルギー研究活動を行ってきました。アレルギー疾患は、アトピー性皮膚炎や接触性皮膚炎だけでなく、食物アレルギーにおいても皮膚での発疹や炎症が現れるなど、主な疾患症状として皮膚症状が挙げられます。健康的な皮膚は、「心と身体」の健康維持・増進において重要な意味を持ち、また化粧品には、「美しくなる」という本来の目的に加えて、「健康的に美しくなる」ことが求められています。心身ともに健康的な日常生活を送るためには、皮膚の健康の

維持が必要不可欠です。そのような意味においても「コスメトロジー」と私が専門とする「アレルギー研究」は密接に関連していると言えます。今回の貴財団の助成を頂くことにより、皮膚の恒常性維持において、我々の「アレルギー研究」が貢献可能であること、更に「コスメトロジー」に展開できることを再確認を致しました。

現在のアレルギー疾患への治療法は対症療法に留まっており、予防・診断・治療方法については、新たなアレルギー反応制御分子の発見が社会から広く望まれています。今後も「アレルギー研究」という立場から、皮膚の健康維持を通して、心身の健康増進に貢献していきたいと考えております。

(金沢大学医薬保健研究域薬学系)

2021年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

竹馬 俊介

この度、御財団より助成をいただき、研究報告をするに当たって、これまでの研究経緯とこの助成でかなった事、について述べたいと思います。

私は幼少時からアトピー性皮膚炎と診断され、冬になるとあらわれる皮膚乾燥症状、掻痒に悩まされてきました。その後、北海道大学の獣医学部に進み、多くの愛玩動物もアトピー性皮膚炎に悩まされていることを知りました。皮膚のかゆみは一度始まると簡単には収まりません。免疫細胞を研究すれば、このような皮膚疾患を完治できるのではないかと思ったのが、私が免疫の研究を始めたきっかけです。

獣医学部から医学部の大学院へ進学、アメリカ留学を経て日本の研究室に赴任し、現在もTリンパ球の基礎研究を進めておりますが、決して皮膚に特化した研究を行っているわけではありませんでした。

2015年に、慶應皮膚科の天谷先生、高橋先生に、皮膚疾患のモデルマウスを解析する機会をいただき、慢性皮膚炎と、治療モデルを確立しました。しかし、このモデルをどのように解析して行くか迷っていました。一つの理由と

して、私の様に、大きなラボに所属する研究スタッフは、個人的に思い切って使える研究費が少ないという事があります。その様な時期に、御財団の助成があることを知り、「この機会に、私が行っている皮膚炎モデルに関する研究を一気に進めよう」と思い、申請し採択していただきました。

助成金は、皮膚炎を起こすT細胞の性状解析のため、数十検体のRNAシーケンス解析に用い、ここから、皮膚炎の遷延化に関わるT細胞が特有の遺伝子群を発現することを見出すことが出来ました。さらに、この分子を阻害することによって皮膚炎の原因細胞を除去することを示すことができ、研究結果をiScience誌に発表することができました。

御財団の助成をいただいたおかげで、研究を進め皮膚炎の起因を免疫学的に一つ明らかにするという事ができました。

30年以上抱いていた夢が一つかないました。大変有難うございました。
(慶應義塾大学医学部)

2021年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

富永 光俊

かゆみは痛みと同様に誰もが日常的に経験する感覚です。かゆみで死んでしまうということはなく、痛み研究よりも軽視されてきたことから、これまでかゆみの基礎研究は非常に遅れていました。しかし、近年では抗ヒスタミン薬が無効な難治性かゆみは、患者の生活の質(QOL)を著しく低下させ、疾病負荷を生じさせる一因になっていることが明らかとなり、またこれを契機に世界中でかゆみ研究が推し進められ、かゆみセンターや拠点が次々に設立されるようになりました。特に米国では、NIH(国立衛生研究所)によって多額の予算がかゆみの基礎研究に投入され、重要な研究課題として今も尚、精力的にかゆみの基礎と臨床研究が推し進められています。

このような背景の中、私は博士(工学、医学)の学位を取得後、20年間、一貫して「かゆみ」の基礎及び臨床研究に取り組んできました。そしてこの度は、私の中心的な研究テーマであるかゆみ過敏現象のアロネーシスの研究に対してコスメトロジー研究助成に採択して頂き、誠に有難うございました。

貴重なご支援により、当研究を大きく進展させる機会を頂戴しました。改めて、深く御礼申し上げますと共に、今後も精進し、かゆみを含む敏感肌に関する研究分野の発展に貢献できるように努めてまいります。

(順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所・順天堂かゆみ研究センター)

コスメトロジー研究助成を受けて 長野 一也

このたびは、コーセーコスメトロジー研究財団コスメトロジー研究助成に採択いただき、誠にありがとうございました。

申請研究の内容に対する助成は、貴財団が初めてであったため、嬉しかったことを鮮明に覚えています。また、2021年に現所属にうつり、研究室を主宰する立場になった際に採択いただきましたので、研究室立ち上げに背中を押していただいたように感じております。さらに、当時は、COVID-19によるパンデミックも落ち着きを見せ始めたところで、久しぶりのオンサイトも含めた受賞式と、制限を設けられながらも交流会を開催いただいたことは、多くの研究者の出会いや恩師との再会にもつながり、心から感謝申し上げます。

申請研究は、先端素材として各分野で実用化が進んでいるナノ粒子のうち、銀ナノ粒子をモデルに、経皮曝露後の動態に関する内容です。銀ナノ粒子を皮膚に塗布したとしても、塗布した銀ナノ粒子のままではなく、経皮吸収する過程でイオン化し、粒子径が小さくなることを見出しまし

た。

本知見は、ナノ粒子を皮膚に応用しようとする医薬品や化粧品の開発に際し、皮膚に塗布する前の物性のみならず、塗布後の変化も含めて考慮することが、機能性の充進や安全性の担保につながることを提示できたものと考えております。COVID-19によるパンデミックを乗り越えつつある現在において、脱マスクや外に出る機会などが増しており、改めて、スキンケアや化粧品の重要性が増してきているものと思います。こういった観点からも、今後も、Dermatology（皮膚科学）とCosmetology（化粧品学）の進展に貢献できるよう、邁進してまいります所存です。

本研究を進めるにあたって、ご協力いただきました共同研究者や学生の皆さまに御礼を申し上げます。最後になりましたが、本研究助成申請を選考いただきました選考委員の先生方、ならびにご支援をいただきました貴財団関係者の皆様に衷心より感謝申し上げます。

(和歌山県立医科大学薬学部)

全光学的手法を用いた老化皮膚における力学特性変化の解析 長谷 栄治

1. 研究課題のコスメトロジー（化粧品学）への成果波及や将来展望

本研究課題は、皮膚の力学特性を調査するための新規な光学顕微鏡の開発に関する研究内容である。これまで、皮膚の力学特性を測定する手法のほとんどは皮膚表面のみ（非3次元）の情報かつ低空間分解能（数十 μm 程度）でのマクロな測定であったことから、老化皮膚の力学特性変化に関する知見は十分に蓄積されていない。特に、力学特性計測法の空間分解能の制限から、光学顕微鏡像で得られるような形態学的情報と力学特性とを適切に関連付けることは困難であった。一方、申請研究では、全光学的手法の利用によりサブ μm ～数 μm 程度の高空間分解能で同一視野におけるコラーゲン・エラスチン・弾性率という3つのマイクロ情報の可視化に成功した。加えて、本手法は非接触、ラベルフリーで分子選択的かつ外力の付与なく力学特性が計

測でき、さらに表面からの深さ数百 μm 程度までを3次元的に計測可能であることから、本研究で得られる知見の新規性は極めて高く、かつ化粧品・薬品や美容器具開発といった皮膚老化分野において有用であると考えられる。例えば、すでに知られているような老化によるコラーゲン・エラスチンの変性・消失あるいは蓄積、真皮乳頭層の喪失といった形態学的変化が、実際に局所的な力学特性にどのような影響を与えているのかを知ることができれば、適切な薬効を持った化粧品・薬品開発に応用できると考えられる。さらに、将来的には本手法を従来の力学特性計測手法と組み合わせれば、ハリ・シワ・たるみといった老化に伴う外観のマクロな変化が、コラーゲン・エラスチンといった個々の物質のマイクロな観点からどのような影響を受けているのか調査できると期待される。また、社会的な側面からは、少子高齢化が進む我が国において健康寿命の延伸、あるい

は国際的に評価の高い本産業の更なる振興に貢献するものと考えられる。

2. 助成を受けられたご感想や当財団の研究助成事業へのご要望

この度は提案研究に関する研究費用の助成を頂き、誠にありがとうございました。私のような若手研究者にとって単年で200万円という助成は大金であり、研究進捗の大きなお力添えとなりました。例えば、科研費・若手研究（あるいは基盤研究C）では典型的に2-3年の期間で350万円程度が直接経費として研究に使用できる、という状況から比較してもそのことがご理解頂けることと思います。また、本助成によって得られた研究成果の国際会議での発表も今後実施していきたいと考えておりますが、これも目安や物価高が相まって、昨年度の自身の実績では渡航費・参加費合わせて50万円以上を要し、研究費を圧迫している状況です。貴財団ではこのような海外学会発表の支援も別個に実施されていることから、大変魅力的な研究助成事業と存

じます。

コスメトロジー分野に関する研究は、医薬理工をはじめとした自然科学分野に加えて社会科学や人文科学の知見も取り入れる必要があるという、非常に学際的な研究分野であると考えます。採択課題リストを拝見すると、実際に貴財団においてもそのことに注力された選定が行われていることと存じます。他財団等の助成でもこのように全分野からの研究提案を募集するものもあるかと思いますが、貴財団のように単一のキーワード（「コスメトロジー」）のもとに全分野から募集することは希少であると考えます。もし、貴財団のお力添えにより助成者同士の研究交流会などが開催されると、通常の学会では出会わないような異分野の研究者との交流や、難易度が高いと考えられる文理融合研究など、様々な研究分野の有機的な連携のきっかけとなり、コスメトロジー分野のさらなる発展に貢献すると考えます。

（徳島大学ポストLEDフォトンクス研究所）

2022年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて 福田 達也

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択して頂き、厚く御礼申し上げます。私はこれまでに、リポソームやエクソソームを用いたがんや脳梗塞といった難治性疾患治療に対するDDS研究を行ってきておりましたが、今回貴財団の助成に採択頂いたことで化粧品素材への応用を目指したイオン液体研究を行う契機となり、大変感謝申し上げます。また、弊学薬学部は2024年4月現在、開学4年目であり、研究室の立ち上げ段階でもありましたので、研究室としても発展のきっかけを賜ることができましたこと、改めて御礼申し上げます。

今回助成を賜りましたイオン液体は、経皮薬物送達システム(TDDS)として世界的に研究が進められており、経口投与や皮下投与後の薬物の体内動態改善、新しいナノ粒子開発の素材として等、幅広い応用が期待されております。その一方で、種類によっては強い皮膚刺激性毒性が発現してしまうことから、コスメトロジー領域への展開には改善

すべき課題が残されておりました。助成期間を通じて、皮膚刺激性の少ないイオン液体や、抗酸化活性を有するイオン液体を開発できたことは、コスメトロジー素材への応用に向けて非常に有用な知見が得られたと考えております。今後、これら新しいマテリアルを用いて、化粧品成分を含有させた経皮吸収剤の設計を行い、創薬領域のみならずコスメトロジー領域においても、イオン液体を用いたTDDSへ適用できるよう研究を進めてまいりたいと考えております。

本研究を進めるにあたりご協力頂きました共同研究者には大変感謝申し上げます。最後になりましたが、今回のご支援を賜りましたことに改めて御礼申し上げます。今後、得られた研究成果をもとに、イオン液体研究をさらに発展させられるよう、邁進していく所存です。コーセーコスメトロジー研究財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。（和歌山県立医科大学薬学部薬剤学研究室）

コスメトロジー研究助成を受けて

本田 哲也

まずは、コスメトロジー研究助成に採択いただきましたことに、関係者の皆様に心より感謝申し上げます。本支援は研究を進めるうえで、大変強力なサポートとなりました。

私はこれまで、皮膚科学研究の中でも主に樹状細胞やT細胞など、皮膚の免疫細胞に興味を持ち研究を行ってまいりました。しかし近年は皮膚を皮膚たらしめる細胞群とその機能、すなわち表皮角化細胞による皮膚バリア形成機構にも興味を持ち研究を進めています。そのきっかけの一つが、コスメトロジー研究助成への応募でした。角質層というサララップ1枚分ほどの厚さしかない構造が、外界と生体を明確に区別する物理的バリアとなっています。その角質層は、表皮角化細胞の精緻な分化機構に基づいて形成される最終産物です。角質層は外界からの異物侵入を強力に防御し、また体内への水分保持に極めて重要な役割を果たし、皮膚の健康、美しさに最も関与していると考えられます。

さらに角質層の機能不全は、アレルギー発症にも明確な関連性を持っています。T細胞や樹状細胞に焦点を当てていた私の皮膚アレルギー研究ですが、しだいに表皮角化細胞の重要性に気づくようになり、角質層バリアとアレルギーをつなぐ研究課題として、本研究課題であるスプラバシンによる角質層バリア形成機構とアレルギー発症への関与の申請に至りました。その結果、スプラバシンの新機能の発見に繋がる成果を上げることができました。さらに本申請をきっかけに、他の観点からも皮膚角質層バリア機能形成機構についての研究を進めています。私の研究を支援いただいただけではなく、視野を広げる大きなきっかけを与えていただきましたコーセーコスメトロジー財団に改めて深く感謝申し上げます。このご支援を無駄にすることなく、今後も皮膚科学研究、コスメトロジー研究を継続し、社会に還元できる成果を上げられるよう、日々精進してまいります。(浜松医科大学皮膚科学講座)

私がコスメトロジー研究に出会うまで

前川 大志

この度はコスメトロジー研究助成を賜りましたこと、コーセーコスメトロジー研究財団の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。元来、皮膚科学や化粧品科学を主戦場としない私が角化細胞の研究に取り組むことになった経緯(不思議な人のご縁)を簡単に紹介します。私は学生時代に東京大学薬学部(新井洋由先生, 当時)で、リン脂質代謝による細胞内膜輸送制御に関する研究を行いました。博士号取得後は、ご縁がありカナダのDr. Gregory Fairnの研究室に留学し、コレステロール可視化プローブD4Hを開発しました。その後、恩師の田口友彦先生のご紹介で、愛媛大学プロテオサイエンスセンター 東山繁樹先生の研究室に着任し、コムギ無細胞タンパク質合成系を利用してcullin-3型ユビキチンリガーゼの腫瘍増殖における機能解析を進めました。東山研究室では愛媛大学大学院医学系研究科の大学院生を受け入れており、多様な診療科からの大学院生たちと一緒に研究する機会に恵まれました。その中で、愛媛大学医学部形成外科の眞田紗代子先生が大学院生として参画することになり、角化細胞におけるcullin-3型

ユビキチンリガーゼの機能を調べる運びになりました。これ以前に、角化細胞におけるコレステロール局在を自身が開発したD4Hを用いて調べ、cullin-3型ユビキチンリガーゼの機能低下により生体膜コレステロールの量や状態に異常が生じることを見出していました。そして、眞田先生が角化細胞でcullin-3型ユビキチンリガーゼの機能を低下させると細胞老化に酷似した表現型を示すことを発見し、cullin-3型ユビキチンリガーゼを介入点として、角化細胞の細胞老化と脂質代謝異常の因果関係に迫ることができると着想しました。この着想を得た頃、リポドミクスの大家である現所属の慶應義塾大学薬学部の有田誠先生の研究室への異動が決まり、まさに脂質解析研究にふさわしい環境で本研究を推進できることになりました。理詰めで展開される研究も大変美しいですが、大いなる人の繋がりの中でひょんなきっかけで展開される研究もまた面白いと思っており、後者を面白く育てていくことが私の責務だと思っています。(慶應義塾大学薬学部)

2022 年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

和久 剛

この度はコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき、深く感謝申し上げます。私は転写制御の破綻に起因する疾患発症メカニズムの解明と、その分子基盤を標的とした新たな治療戦略や候補化合物の創出を目標に基礎研究を行っています。近年では、転写因子Nrf3のがん増悪における役割の解明を中心に研究しており、主要な成果の一つがエンドサイトーシスなどの膜輸送制御を介した新たな腫瘍形成メカニズムの発見です。この研究過程の中で、がん悪性度が高いマウスメラノーマでNrf3発現を増加させたところ、細胞が真っ黒になることを見つけました。この偶然の発見が本研究の着想したきっかけです。当初、この予期せぬ発見にかなり困惑しましたが、もしやと思いメラニン産生について勉強し始めました。そうすると、 α MSH-Creb-Mitf軸で形成される転写シグナルや、膜で囲まれたメラニン貯蔵庫のメラノソームなど、複雑でエレガントなメラニン産生ネットワークの存在を知り、自分がこ

れまでに研究してきた転写や膜輸送制御と非常に親和性の高い生命現象であると感じました。また当時、Nrf3活性を抑制できる化合物を見出しており、それが抗メラニン産生作用を有するのではないかと期待し、シミ予防の新たな分子基盤と候補化合物を提案できると本研究を計画・応募して採択いただきました。本研究の成果としては、紫外線照射で誘導されるメラニン産生を有意に抑制できる有用性を示唆する結果を得ることができました。まだまだプレリミナリーな知見であるため引き続きさらなる検証は必要ですが、将来の美容分野に還元できるように今後も本研究を進めていく所存です。

最後になりましたが、コーセーコスメトロジー研究財団の関係者皆様には心より御礼を申し上げますとともに、貴財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。

(同志社大学生命医科学部医生命システム学科)

2021 年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

川崎 洋

この度、コスメトロジー研究助成をいただき、コーセーコスメトロジー研究財団の方々に感謝いたします。今回の応募をきっかけに、心の健康と精神活動が皮膚の健康状態(性状やバリア状態)にどのように影響するか、という研究テーマに関心を持ち、研究助成期間終了後もこれに関わる研究を継続発展させることができしております。本助成による研究活動を、形ある研究成果、かつ社会的価値あるものへと昇華できるよう、今後も努力してまいりたいと思います。

また、私は皮膚科臨床医であり研究者として、これまで疾患研究に長らく従事してまいりましたが、常々医療とヘルス領域間、皮膚科学と化粧品学との壁を感じておりました。疾患や病的状態というのを突き詰めていくと、どこまでが異常でどこからが正常なのかという問題に行き着きま

すし、整容面の悪化や美容に悪い内容というのは肌を病的状態へと導くものであり、美容状態の悪化は肌の病的状況の把握と捉えることもできると感じます。現行の制度や立場的な隔たりはあるのですが、双方の領域間の交流が進み、医学的視点、医学的知識を美容・ヘルスに応用する、化粧品学の知識を医療に応用する、ことがより自由にできるようになると、社会的・学術的メリットが大きいと考えています。コスメトロジー研究助成は、多くの臨床医が化粧品学に関心をもつきっかけとなり、基礎医学研究者、化粧品研究者と交流をもつ場として大変貴重と思いますし、その観点で今後とも本助成の継続的なご活動ご支援をお願いできたら幸いです。

末尾ではございますが、貴財団のますますのご発展を祈念致します。(理化学研究所生命医科学研究センター)

運動と美容の研究：次の展開へ

林 直亨

私の専門は運動生理学で、末梢循環の調節についてヒトを対象に研究をしております。この10年間以上、顔面の皮膚血流の研究を進めており、味覚などの情動、マッサージ、温熱刺激、一過性の運動などに伴う血流の変化について研究してまいりました。

本研究では、加齢と運動習慣が顔面の皮膚血流に与える影響について検討しました。これまで、私の研究グループは、顔をマッサージローラーで刺激すると、その部位の皮膚血流が20%程度増加し、継続することで顔面の皮膚血流が変化することを報告しておりました。一方、1回の自転車運動実施でもその程度血流が増加することも観察していました。そこで、今回の研究では、運動習慣を有する者は顔面の皮膚血流が増加しているのではないかとの仮説を検証いたしました。ポストコロナの影響もあり、対象者を十分に確保できなかったのは残念ですが、横断研究とはい

え運動習慣のある方の顔面の皮膚血流が高い可能性を観察することができましたのは、貴財団の助成金を受けたお陰です。感謝申し上げます。

今後は引き続き対象者を増やして、本研究を論文として報告できるよう研究を継続いたします。また、運動実施場所の影響も多少見られましたので、日焼け止めの効果と併せて検討する予定です。運動実施が皮膚に与える効果など、運動と美容とに関連する領域については、研究がほとんど進んでおりません。皮膚血流の研究を礎に、この領域の研究が少しでも進むよう、今後とも尽力してまいります。

末筆ではございますが、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択頂きましたことに改めて深謝いたしますとともに、貴財団のますますのご発展を祈念致します。
(早稲田大学スポーツ科学学術院)

コスメトロジー研究助成を受けて

藤本 昌代

この度は、コスメトロジー研究助成に採択していただき、誠にありがとうございました。化粧品材料研究や化粧品の効果に関する研究が多い中、社会学的観点からの応募をお認めいただけたことに深く感謝しております。

化粧品産業の集積地を研究しようと考えたきっかけはフランスの労働社会学者から、「日本にも化粧品産業の集積地がありますよね」と言われたことでした。私はポストクの時スタンフォード大学の産業クラスター研究プロジェクトのメンバーとして調査に関わらせていただいたことから、その後も科学技術系の企業や公的機関などが集積する地域で多様な職種の役割や相互作用、地域特性について研究をしてきました。現在も日仏米比較の調査をしています。その中でフランスの共同研究者が行っていた化粧品産業の研究について情報共有をしてくれた際に、日本にも集積地があることを教えてくれました。そこで私は日本に戻って唐津市の化粧品産業集積地の調査を行っていましたが、コロナ禍や研究資金の関係でフランスの化粧品産業集積地まで調査に行くことができていませんでした。

今回、コスメトロジー研究助成を与えていただけたおかげで、フランスに1か月以上滞在することができ、現地の人々とラポールを形成し、多くの情報を与えていただくことができました。このように外国で長期に調査ができる機会は少ないので非常にありがたい経験でした。その中で化粧品というのは改めて社会に受容されて成立する製品だという認識を強く抱き、それは国によって大きく異なるということを知る事象に巡り合いました。そのため、産業と社会規範、社会意識について、ここからが本格的に問いを検証する研究が始まると感じており、1年間のプロジェクトであることを惜しんでいます。しかしながら、この重要な発見に至れたのは本研究助成のおかげであり、今後、化粧品産業で研究資金を獲得することができたなら、この続きを研究できればと考えております。

最後にご支援をいただきました財団関係者の皆様にご心より御礼申し上げます。貴財団のご発展を心よりお祈り申し上げます。
(同志社大学)

2021 年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

堀 龍介

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択して頂き、心より感謝申し上げます。私は顔面神経麻痺診療に深く携わっており、これまで多くの臨床研究を行ってきました。顔面神経麻痺診療はまずは診断、評価、そして治療となりますが、病気の性質上治癒までに時間がかかるに加え、場合によれば完全に治らない症例もあります。顔面神経麻痺を発症すると麻痺が治るものなのかどうかは気掛かりなことであり、従って患者さんは早期に病院を受診いたします。従って、顔面神経麻痺の適切な評価と早期予後診断は、患者さんの立場に立っても、また医療者の立場に立っても重要なことです。しかし、これまで顔面神経麻痺の評価というと、簡便であるが検者間での差が大きく信頼性が低い主観的評価、及び定量的であるが検査に手間と費用がかかる客観的評価しかありませんでした。そこで、iPhoneの三次元顔認証システムを使用することで麻痺を客観的かつ定量的に評価できると考え、Appleの3次元顔認証システム（Face ID）を利用し独自のアプリ

「FacialPalsyZero」を開発しAppStoreに無料公開いたしました。ただ、研究にはやはり予算が必要なものであり、そのタイミングで、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択して頂いたことには感謝しかありません。本研究によりさらにアプリの開発を進めることができ、そしてこれまでにない新たな顔面運動評価である顔面運動の動的評価、すなわち運動の速度評価も開発することができました。麻痺が治ったと判断されていても、例えば目を閉じる速度が遅いという違和感をこれまでの診療では無視してきたものが、新たな評価によってより患者さんの立場に立った診療ができるものと確信しております。顔面神経麻痺では顔面運動機能が悪くなり、その結果無表情や顔のハリの低下につながり、豊かな表情を失うと共に、左右非対称の顔貌に精神的苦痛も感じます。本研究成果は、これらの問題を解決する可能性が期待され、コスメトロジーに大きく貢献するものと思われま

（産業医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

2021 年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

前川 素子

この度は、コスメトロジー研究助成に採択いただき誠にありがとうございました。

本研究課題は、「毛根細胞の遺伝子発現を指標として統合失調症のバイオマーカーを探索する」という内容の研究になります。現所属先でこの研究をスタートアップできたのは、本研究助成があったからです。心より感謝申し上げます。

私は、以前所属していた研究室で、ヒトの毛根細胞が「脳に似た遺伝子発現パターンを示す」ことを見出しました。このことから、毛根細胞は精神神経疾患のバイオマーカー探索に役立つのではないかと考えました。そこでまず、パイロット実験として、統合失調症患者と健常対照者から採取した毛根細胞を用いて、統合失調症の病態との関連が疑われる遺伝子について遺伝子発現解析を行いました。その結果、それらの遺伝子の発現が変動することを見出しました。そこで、今度は仮説フリーで統合失調症のバイオマ

ーカー探索を行うことを考えました。しかし、その頃に異動が決まり、（異動先の現所属研究室では、このような研究は実施していなかったため）この研究を諦めざるを得ない状況になりました。そのような中、コスメトロジー研究助成に採択いただき、本研究を実施できることになりました。

本研究課題については、被験者をリクルートするところから開始したため、まだ目標とするサンプル数に達していません。しかし、現時点で、統合失調症患者と健常対照者の2群間比較を行ったところ、統合失調症患者の毛根細胞で脳機能に関連する複数の遺伝子の発現が変動していることが明らかになりました。この結果は、本研究の大変意義深い成果であったと考えます。また、本研究を行うことで、さまざまな臨床科の先生方に興味を持っていただき、共同研究（被験者に対して、脳画像解析、網膜断層画像解析、血液検体の生化学解析などを実施）の話が進むなど、研究が多方面へ展開しつつあるのも大きな成果です。今後は、

サンプル数を拡大してバイオマーカー遺伝子を同定する、バイオマーカー遺伝子と他の生理学的指標との関連を調べてバイオマーカー遺伝子の生理学的意義を明らかにする、以上の2点を目標にしていきたいと考えています。これらの研究を実施することで、質の高い論文の作成を目指す

とともに、実際に社会に役立つ技術の開発を進めてまいります。

最後になりますが、貴財団の関係者の皆様に感謝申し上げますとともに、貴財団のますますの発展を祈念いたします。
(東北大学大学院医学系研究科)

2021 年度 研究助成

コスメトロジーと脳科学

丸山 千秋

この度はコーセーコスメトロジー研究財団の助成金に採択いただきましてありがとうございました。公募要領を最初に見た際、化粧品関連研究に対する助成金なのかなと思って確認を進めて行くうちに、とても広い分野にわたって基礎研究に対しても助成をいただける研究費だということを知り、応募させていただくことにしました。私は脳がどのようにでき、神経回路が発達するのかという研究を行っております。完成したヒトの脳は、様々な感覚情報を瞬時に処理して次の行動へと反映させます。この情報処理能力はスーパーコンピューターに勝るとも劣らないスペックともいえます。なかでも視覚情報処理能力に関しては、ハイスペック故に周囲の状況を補完することで実際のものとは違うものが見え、それを利用したものが錯視やだまし絵、トリックアートなどです。実はそれをうまく利用して、目を大きく見せたり切れ長に見せたりするのがマスカラやアイラインなどのアイメイクです。つまりコスメトロジーは

脳科学と直接つながっていると言っても過言ではありません。このような高精度な感覚情報処理の神経回路も、もとを辿れば大脳皮質形成と初期の軸索誘導からはじまっており、そのメカニズムを紐解くことは脳の機能原理を理解する上で重要です。

その意味からも本研究助成でサポートしていただいたサブプレートニューロンの研究は最初に行える神経回路形成に必須のニューロンであり、その脳神経回路形成における役割を理解することはコスメトロジーの発展にも寄与できると考えております。今回サポートしていただいたことを機に、今後は研究をさらに発展させて、コスメトロジーと脳科学を融合させた新しい学問分野の開拓も目指していきたいと考えております。

(公益財団法人東京都医学総合研究所・脳神経回路形成プロジェクト)

2022 年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

横山 ちひろ

私はこれまで非ヒト動物(げっ歯類および霊長類)を対象にその認知あるいは社会行動の神経基盤について研究してきました。特にヒトに最も近縁の動物である非ヒト霊長類の行動と脳機能の関連を知るほどに、「ヒトとはなにか」を知るにはヒトを対象にした研究だけではなく、ヒト以外の動物との違いを知ることも重要であると考えようになりました。2021年に職場を現在の大学に移し、新たな実験系を立ち上げる機会を得ました。このときヒトの社会性を非ヒト霊長類と比較可能なものとして捉える試みに着手し、その一つが「顔形態の社会的シグナルとしての役割」です。

個体間の社会的な情報交換であるコミュニケーションの様式は動物種によって様々です。ヒトには他の動物にはない言語によるコミュニケーションがありますが、それ以外のいわゆる非言語的コミュニケーションは、ヒトと動物で、どこがどの程度異なるのでしょうか。顔情報はヒトの社会認知に特別な役割を果たしていることが知られています。最近動物における顔情報の情報処理や脳基盤も明らかとなりヒトと同一の部分、そして異なる部分がわかってきました。本研究は、顔の物理的形態に着目し受信側が受ける社会特性の印象を問う実験によって、顔形態のもつ社会的機

能を調査するものです。形態指標以外をなるべく統制するために評価対象の顔画像は人工的に作成されました。顔の形態は、それだけで社会特性評価(印象の形成)に影響し、社会的な情報源として機能していることが実証されました。今後は非ヒト霊長類を対象とした研究も参照しながら、その背景にある生物学のおよび文化的背景を明らかにしてい

きたいと考えています。その成果はコスメトロジー研究に繋がるものと信じています。

貴財団よりご援助いただき、研究室運営の初動時を乗り切ることができました。心より感謝申し上げますとともに、貴財団のますますのご発展を祈念いたします。

(奈良女子大学)

國際交流助成

•

學術集會支援助成

国際交流助成を受けて

森 貴裕

2023年日米国際植物化学シンポジウム（第59回植物化学シンポジウム）が2023年11月10日、東京大学山上会館本館（東京）にて開催された。本会議はこれまで58回の開催を数え、これまで、植物化学に関するあらゆるサイエンスの最新の研究成果について討論する国内最大級の会議であり、最も長い歴史を持つ。植物化学シンポジウムは、植物由来の新規天然薬用化合物の単離、構造決定、生理、生物活性評価、生合成経路解析、生合成エンジニアリング研究の討論によって、植物化学関連コスメトロジー分野の発展に大きく貢献してきた。

本助成金にて招聘させて頂いた、マサチューセッツ工科大学Jing-Ke Weng教授とケンブリッジ大学Ryan Nett教授、カリフォルニア大学ロサンゼルス校Yi Tang教授の3名の国外研究者、鳥取大学大学院工学研究科永野真吾教授、神戸大学大学院農学研究科水谷正治准教授、富山大学和漢医薬学総合研究所森田洋行教授、東京大学大学院薬学系研究科牛丸理一郎助教の4人の国内外研究者により、植物化学に関する生合成、酵素化学、酵素工学、合成生物学の最

先端の研究成果に関する講演が行われた。

Nature姉妹誌を含む、インパクトの大きい植物化学関連の原著論文を数多く発表している、Jing-Ke Weng教授の講演を中心に、本分野で活躍する多くの研究者の知的交流が行われ、アルカロイド、テルペノイド、ポリケタイド、リグニンといったコスメトロジーの材料となる化合物の生合成酵素、合成生物学に関する植物化学分野のさらなる発展につながる基盤が築かれた。本基盤を元に、国境を越えた研究グループ間の人的交流や共同研究がいくつか生まれ、コスメトロジーに関する学術分野が大いに発展することが考えられる。また、海外講演者に国内の植物化学関連の研究を行っている研究室を訪問していただき、教員、ポストク、学生とのディスカッションを行っていただき、大いにコスメトロジー、植物化学研究の裾野が広がった。

以上より、本助成金による海外研究者招聘は非常に有意義なものであり、コーセーコスメトロジー研究財団に厚く御礼申し上げます。（東京大学大学院薬学系研究科）

第41回 日本美容皮膚科学会総会・学術大会 市民公開講座を終えて 伊藤 正俊

8月19日(土)・20日(日)と、東京都新宿区にある京王プラザホテルにて第41回日本美容皮膚科学会総会・学術大会が開催されました。学会前日にあたる8月18日(金)には同会場にて市民公開講座を開催し、約200名の方にご参加いただき、コスメシューティカル(機能性化粧品)について現状や問題点、それを受けた今後の仕組みづくりについて座長・演者の先生より詳しくご解説いただきました。

機能性化粧品は、通常の化粧品よりも肌に対しての効能効果が大きいいため、用法用量をきちんと守らなければなりません。効能効果が大きいからたくさん使えば肌が綺麗になると勘違いされている一般の方は大勢いらっしゃるのが現状ですが、今回の講座を通して使用したことで生じる肌トラブルを避けるためには、使用方法や用量を守ることが最も重要であるということの注意喚起・啓発活動になったと思います。

今講座では、講演を2演題行った後に3名の先生によるパネルディスカッションの時間を設けました。パネルディスカッションを行ったことにより、演者の先生お一人からのお話を一方的に聴講するだけではなく、先生方のよりリ

アルな声を聞く機会になったと思います。講演やディスカッションの内容を元に、聴講にいらしていただいた一般の方からの質問にもお答えいただきました。ご自身で診察に行くタイミングでないと医師に話を聞く機会はなかなかないので、気になっていることを積極的に質問していらっしゃる様子が見受けられました。

今回の市民公開講座を終えて、貴財団の目的となっている「広く生活者の保健衛生の向上を図ること」、「美しく豊かな人間生活の実現に寄与する」以上2点に合致した講座を行うことができたと思います。一般の方が自分の身近な商品に対してのみならず、専門性も含んだ内容の講座を受講する機会を設けることができたことにより、正しい知識と、美に対する高いモチベーションを得られただけではなく、生活の中で疑問に思っていた事柄に対する理解やアドバイスを受ける有意義な機会を提供できたと思います。市民公開講座開催にあたり貴財団からのご支援はなくてはならないものでした。多大なご支援をいただきましたこと、この場をお借りして心より深謝申し上げます。

(日本美容皮膚研究会)

日本動物実験代替法学会第36回大会を終えて

伊藤 晃成

このたび、令和4年11月27日から29日の3日間、千葉大学西千葉キャンパスのけやき会館をメインに、大学生協食堂、総合校舎の教室等、複数の会場を使って日本動物実験代替法学会第36回大会を開催いたしました。

参加者の多くは国内企業、大学、研究所の研究者で、加えて韓国、中国、オーストラリア、インドからもシンポジウム演者を招き、グローバルな視点での情報交換が行われました。初日には、韓国の動物実験代替法学会 (KSAAE) と日本の動物実験代替法学会 (JSAAE) の会長との協力協定に関する調印式が執り行われ、国際的な連携の一環も実現しました。

シンポジウムは合計9つ企画され、本学会が開発に大きく貢献してきた歴史のある化粧品局所感作評価法に関する内容に加え、最近特に話題の全身毒性評価、Micro Physiological System、過去の大会ではほぼ取り扱われることのなかった中枢神経系の *in vitro* 評価系や医療機器の代替法評価法まで幅広く取り上げました。80件を超える一般ポスター発表があり、熱い討論が交わされました。加えて、チ

ャレンジコンテスト 2023 に入賞した高校生らのポスター発表も一般ポスターと同時に開催し、若手研究者の卵らとの直接交流も実現しました。

企業展示ブースには37社の応募があり、ポスターと同会場に参加者との密な情報交換が行われました。

会場は連日熱気に溢れ、参加者にとり非常に有益な大会となりました。天候に恵まれたせいか予想以上に当日参加者が多く、事前に準備した要旨集が不足するハプニングがあったものの、昨年より100名程度多い約690名の参加者を迎えて成功裏に終えることができました。

最後に、ご支援を賜ったコーセーコスメトロジー研究財団にあらためて感謝申し上げます。今後も本学会活動を通じてコスメトロジー分野の発展に尽力したいと考えておりますので、引き続きご理解とご支援をよろしくお願いいたします。

(日本動物実験代替法学会第36回大会大会長／千葉大学大学院薬学研究院)

学術集会開催を終えて 臺 美佐子

2023年9月17日、石川県立看護大学にて、第12回国際リンパ浮腫フレームワーク・ジャパン研究協議会学術集会を「浮腫ケア未来創成」のテーマにて、浮腫を有する方々の“皮膚の健やかさと美しさ”を向上・維持させる支援方法の普及を目的として開催した。オンデマンド配信参加者数も含め、全参加者数は314人であった。

シンポジウム「国際共同研究推進に向けた新戦略」では、長年リンパ浮腫、糖尿病性足潰瘍に関する国際共同研究に携わって来られた東京大学の仲上豪二郎先生、金沢大学の大江真琴先生、医療統計の専門家である大阪公立大学の新谷歩先生、実装科学の専門家である国立がん研究センターの島津太一先生にご登壇頂き、皮膚の健やかさと美しさを保つことを目的とした国際共同プロジェクトに一步踏み出すきっかけ作りの場とした。

また、教育講演では合同会社のあさとうリンパ浮腫研究所代表佐藤佳代子先生より「小児リンパ浮腫に対する複合的理学療法の実践」についてご講義頂いた。スイーツセミナー「リンパ浮腫ケアの在宅医療と遠隔化」では、ディピューラメディカルソリューションズ株式会社代表取締役

社長の岡田正規先生、リムズ徳島クリニック院長の小川佳宏先生、石川県立看護大学准教授の松本智里先生より、病院と在宅をつなぐアプリケーション、リンパ浮腫ケアの在宅医療と遠隔化、リンパ浮腫患者に対する遠隔保存療法指導の試みについて講義頂き、住み慣れた地域で浮腫と共に安心して暮らす社会構築について討論を行った。

一般演題では、浮腫の診断と治療、浮腫の評価とケア、症例報告・実践報告と多領域にまたがり医師、看護師、工学系研究者らからの12演題の口演発表がなされた。また、参加型ワークショップ「エコーアセスメントとリンパドレナージ体験」を開催し、皮膚の健康を保つ専門的スキルを体験できる場とした。

参加者らは現場の浮腫ケア・治療の課題から様々な視点を持って今後の解決策に取り組む議論を交わすことができ、本学術集会が“皮膚の健やかさと美しさ”を向上・維持させる方法の普及・発展の場となっていたと感じている。

(第12回国際リンパ浮腫フレームワーク・ジャパン研究協議会学術集会大会長／石川県立看護大学成人・老年看護学講座)

第45回日本バイオマテリアル学会大会の開催を終えて 名井 陽

【実施内容・参加状況】

2023年11月6～7日、神戸国際会議場にて第45回日本バイオマテリアル学会大会会期を終えました。開催にあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の学術集会支援助成や多くのご支援とご協力を頂きました。

本大会では多くの人々の救命や生活の質の維持、改善に貢献するバイオマテリアルの研究・開発に着目するとともに、現代社会が直面している様々な課題を解決する最先端のバイオマテリアルの研究開発の発表の場として、「いのち輝くバイオマテリアル」をテーマに掲げました。

大会企画プログラムとして主に、昨年本学会大会にて科学功績賞を受賞したJoachim Kohn先生と、NIH所属の小林久隆先生をお招きして特別講演を実施しました。

本大会受賞講演として学会賞3演題と科学奨励賞3演題の受賞講演を行いました。医歯薬工連携シンポジウムとして「持続可能な社会を実現するための環境問題に取り組むバイオマテリアル研究」をテーマに5名の先生にご登壇頂き、創発的研究シンポジウムでは4名の先生にご登壇頂きました。臨床と研究の目線から実用化を考えるMeet the Doctorsでは臨床医と研究分野で活躍する先生方をお招きし、循環器、硬組織、軟組織、画期的モダリティ・新時代医療機器と領域ごとにセッションを行いました。

実用化セミナーでは医療機器の開発戦略についてとアカデミア発医療技術開発の実際について計8名の先生にご登

壇頂きました。Seminars by Up-and-coming Scientistsでは4名の先生にご発表を頂き、大会前日には教育セッションも実施し、大会長講演も行うなど多彩なプログラムを設けました。これらに加え、一般演題として口演128、ポスター194の計322演題のご発表がありました。その他、企業によるブース出展、医療機器開発における薬事・保険相談会や募金活動も行いました。

大会参加人数は出展企業の方や大会スタッフを含め、905名でした。

【コーセーコスメトロジー研究財団との関連性】

皮膚科学、コスメトロジー分野に関する発表として、Seminars by Up-and-coming Scientistsにて京都大学医学研究科形成外科学の仲野孝史先生によるネットモールド法を用いた長期三次元培養によるヒト真皮線維芽細胞からの培養真皮の開発に関するご発表や、皮膚再生医療、創傷被覆材に関する複数の一般演題のご発表がありました。これらの発表では活発な議論や情報交換がなされていたので、今後のコスメトロジー分野の発展にも貢献できることを期待しています。

貴財団より受けました助成については、感染予防用の消毒液の購入や、当日配布し、参加者から好評を頂いたポケットプログラムの作成・印刷費用に使用させて頂きました。この度は誠にありがとうございました。深く御礼申し上げます。
(大会長/大阪大学医学部附属病院)

学術集会から得た経験と学び：酸化ストレスと3Rs

大野 彰子

本学会は、活性酸素や酸化ストレスに関する国際的な学術団体である Society for Free Radical Research International の日本支部である日本酸化ストレス学会の関東地区の支部会として開催された。この学会には、酸化ストレスのメカニズムや人への影響について様々な方面の研究者ら88名が参加した。

主催テーマは「基礎と臨床を結ぶ酸化ストレス化学」であり、酸化ストレスに関する基礎研究と臨床研究において、基礎から臨床まで幅広い分野の研究者が集い、フリーラジカルの化学に焦点をあてることで、課題解決に向けた議論が行われる場となった。特に若手の研究者の最新の研究成果を発表・ディスカッションする重要な活躍の場としても位置付けられるものであった。

本学会は、一般演題発表、特別講演、教育講演、シンポジウム、イブニングフォーラムなど、様々な形式でのプレゼンテーションが実施された。なかでも一般演題のフラッシュトークとポスターセッションの組み合わせの発表形式やイブニングフォーラムでの産学協同を目指した議論や情報共有は、本会で初めての試みであったが、深い議論の場を設けることができ、非常に有意義なセッションである印

象を得た。

近年、3Rsという国際原則が注目され、動物実験の適切な実施が求められている。化粧品、医薬品、農薬の分野で動物実験が禁止に向けた3Rsを考慮した研究・開発が必要とされる現代は、この原則の重要性を象徴するものである。国際的な化粧品企業は、*in vitro/in silico* 試験法で皮膚感作のリスクを評価する試験は、OECDガイドラインに記載されており、酸化ストレスの毒性評価は、動物実験の適切な施行や代替法において重要な役割を果たしている。本大会の教育講演「動物実験代替法の開発と酸化ストレス」で産官学の研究者らと3Rsの推進と普及のための実用的な問題や取組み、酸化ストレスが関連する老化のメカニズムや*in vitro/in silico* 試験法による代替法の重要性等について活発に議論されたことは、3Rsの研究推進に大きく貢献できるものと確信している。

本学会を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団のご支援に深く感謝申し上げます。

(国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部)

「第26回日本アロマセラピー学会学術集会」を終えて

竹ノ谷 文子

この度、コーセーコスメトロジー研究財団より学術集会支援助成をいただきまして、神奈川県立保健福祉大学での対面形式（2023年11月18・19日）と、後日、オンデマンド（12月1日～27日）による2つの形式にて、第26回日本アロマセラピー学会学術集会を開催させて頂くことができました。この場をお借りしまして、貴財団をはじめ、選考して頂きました先生方および関係者の皆様に厚く感謝申し上げます。

学術大会は「人と人をつなぐ優しさのあるアロマセラピー～未来に向けて確かな効果を目指すメディカルアロマとスポーツアロマ～」というテーマを掲げ開催し、352名の方にご参加を頂きました。本学会は、精油を用いたメディカルアロマセラピーを医療に導入することをはじめとし、美容や健康などにも幅広く応用することを目的としています。そのため、精油の効果を科学的に検証し、学術としてのアロマセラピーの確立を目指してきました。

当学術集会の研究発表では、精油の様々な薬理効果が発表されました。その中には精油の効果を分子レベルで明らかにした研究発表もあり、機能性を有すコスメ商品開発につながる有効なエビデンスになると思われました。一方、今回の学術集会では、健康の維持増進に欠くことのできない「運動（スポーツ）」と様々な薬理効果を持つ「アロマセラピー」を融合させた「スポーツアロマ」が注目されました。今後、スポーツアロマの研究者が増えることにより、精油研究の新しいキーワードに「健康」という単語が入ってくることが予想され、本学術集会はコスメトロジーの学際的な研究の広がりにも貢献できたのではないかと思います。

最後になりましたが、多大なご支援をいただきました貴財団と関係者の方々に重ねて感謝申し上げますと共に、ますますのご発展を心より祈り申し上げます。

（星薬科大学運動科学研究室）

付 録

●
事業報告書

2023年度 表彰および助成を受けられた方々
役 員



事業報告書

(自 2023 年 4 月 1 日 至 2024 年 3 月 31 日)

《研究助成関連》

[コスメトロジー研究助成]

2023	5	8	公募開始	全国 710 の大学、病院、研究機関等へ公募要領を送付し、学術雑誌 3 誌、10 学会 HP、および当財団 HP に公募要領を掲載
	7	7	公募締切	応募総数101件、各分科会ごとに選考委員による個別審査
	9	6	選考委員会第一分科会	第 1 分野の書類選考通過 11 課題の承認
	9	12	選考委員会第二分科会	第 2 分野の書類選考通過 16 課題の承認
	9	7	選考委員会第三分科会	第 3 分野の書類選考通過 8 課題の承認
	9	19	選考委員会	2023 年度コスメトロジー研究助成採択候補 35 課題の承認
	10	2	臨時理事会 (書面)	選考委員会から 2023 年度コスメトロジー研究助成候補課題の答申を受け採択者を決定
	11	30	第34回表彰・贈呈式	研究助成採択 35 課題の代表者に対し、助成金贈呈書を授与
	12	15	助成金交付	研究助成金を交付 総額 6,000 万円
2024	2	28	臨時選考委員会(書面)	2024 年度選考委員会実施計画他

[大学講座研究助成]

2023	7	31	選考委員会	2020 年度採択 3 件の継続プログラム審査、継続助成を承認
	12	10	助成金交付	追加助成金 (3 年の研究期間延長) 交付 総額 9,000 万円

[国際交流助成および学術集会支援助成]

2023	10	2	臨時理事会 (書面)	選考委員会で内定した国際交流助成および学術集会支援助成について採択決定
------	----	---	------------	-------------------------------------

《表彰事業》

[コーセーコスメトロジー奨励賞]

2023	4	4	趣意書発送	2018年度以降のコスメトロジー研究助成採択者177名に趣意書を発送
	8	31	受付終了	昨年度までの提出分も含めて、研究者41名から論文延べ68報の調査
	9	19	選考委員会	論文実績が優れた研究者を表彰候補者として選出
	10	2	臨時理事会 (書面)	選考委員会から提案された候補者を受賞者に決定
	11	30	第34回表彰・贈呈式	受賞者1名に対し、表彰状と副賞200万円を贈呈

《研究報告会事業》

[皮膚の健康科学セミナー ～皮膚バリア研究のフロンティア～]

2023	7	31	講演収録	
	8	7	オンラインセミナー開催	8/25まで

《表彰・贈呈式》

2023	11	30	第34回表彰・贈呈式	新型コロナウイルス感染症の5類感染症移行に伴い、特段の予防対策は行わず開催
------	----	----	------------	---------------------------------------

《理事会関連》

2023	5	23	第一回通常理事会（書面）	2022年度事業報告及び収支決算報告（含監査報告）を承認する件 任期満了に伴う評議員候補者の選出に関する件 理事長、および専務理事の職務執行状況の報告
	10	2	臨時理事会（書面）	2023年度研究助成者等を承認する件 2023年度「コーセーコスメトロジー奨励賞」受賞者を承認する件
	11	30	第二回通常理事会	2023年度事業計画および予算案を承認する件 株主としての議決権行使について 理事長、および専務理事の職務執行状況の報告

《評議員会関連》

2023	6	9	定時評議員会	2022年度事業報告および収支決算報告（含監査報告）を承認する件 任期満了に伴う評議員の選任に関する件 報告事項（第一回通常理事会、財団の活動状況）
	12	7	評議員への報告（書面）	第二回通常理事会議事等の報告

《その他》

1) 報告書発行

2023	5	1	中間報告書発行	研究業績中間報告集 第32号
	9	1	完了報告書発行	コスメトロジー研究報告 Vol. 31 (2023)

2) 行政届出関連

2023	4	13	内閣府	公2 研究報告会事業の追加、変更認定
	6	15	内閣府	令和4年度事業報告書等の提出
	6	28	内閣府	変更の届出（評議員名簿）
2024	2	5	内閣府	変更の届出（公1 事業内容の一部変更および評議員名簿）
	2	15	内閣府	令和6年度事業計画書等の提出

3) 情報公開（当財団HP等）

2023	3	27		2023年度 事業計画等の掲載
	5	8		2023年度 コスメトロジー研究助成公募開始
	5	8		「皮膚の健康科学セミナー」特設ページ開設
	6	14		事業報告、新役員等の掲載
	7	7		2022年度 コスメトロジー研究助成公募終了
	9	1		コスメトロジー研究報告Vol. 31の発行およびHPへの本文掲載
	12	1		2023年度 表彰および研究助成受賞者等の掲載
	12	11		2024年度 国際交流助成、学術集会支援助成公募開始
2024	2	16		2024年度 事業計画等の掲載

2023年度 表彰および助成を受けられた方々

1) コーサーコスメトロジー奨励賞

氏名	所属	職位	研究課題
山田 勇磨	北海道大学大学院薬学研究院	教授	第29回コスメトロジー研究助成受賞（2018） ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の開発

2) コスメトロジー研究助成（35名）

第1分野：素材、物性に関する分野（11名）

氏名	所属	職位	研究課題
秋田 紘長	日本大学生産工学部 教養基礎科学系	助教	皮膚バリア機能を促進するD-アミノ酸の酵素合成法の開発
板倉 祥子	東京理科大学薬学部	助教	皮膚の健康増進を目的とした植物由来ナノ粒子の機能性評価
古賀 智之	同志社大学理工学部 機能分子・生命化学科	教授	アミノ酸系高分子を基盤とするスマートゲル材料の開発
新藤 充	九州大学先端物質化学研究所	教授	UV-Aの全領域をカバーする強力な非芳香族系紫外線吸収剤の開発
塚崎 智也	奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科	教授	L-システイン発酵生産を資した硫黄系トランスポーターの構造基盤
原 貴史	徳島文理大学薬学部	准教授	皮膚毛包幹細胞の分化系譜における必須ミネラルの役割と毛包再生への応用
藤森 厚裕	埼玉大学大学院理工学研究科	准教授	界面活性剤修飾ナノダイヤモンドの集積・積層化による構造色発現と、抗菌性チキソトロピー塗膜の開発
細川誠二郎	早稲田大学先進理工学部 応用化学科	准教授	太古に学ぶ安定錯体色素の多様化合成と化粧品素材研究
細田奈麻絵	物質・材料研究機構	グループリーダー	昆虫のグルーミングから学ぶマイクロコームの開発
叶 深	東北大学大学院理学研究科 化学専攻	教授	極低濃度のオゾンによる生体膜構造と安定性への影響に関する基礎研究
吉田 和弘	千葉大学大学院理学研究院	准教授	新しいアミノ酸の開発と応用

第2分野：生体作用、安全性に関する分野（16名）

氏名	所属	職位	研究課題
池ノ内順一	九州大学大学院理学研究院 生物科学部門	教授	コレステロールによるタイトジャンクションの制御機構
石原 康宏	広島大学大学院 統合生命科学研究科	教授	新規アンチポリューション素材の探索を指向したPM2.5/太陽光同時曝露システムの開発
伊藤佐生智	名古屋市立大学大学院薬学研究科	准教授	黄色ブドウ球菌バイオフィルムによるtype2炎症発症増悪機構の解明
内野 智信	静岡県立大学薬学部 臨床薬学分野	講師	コレステロール類を含めた角層細胞間脂質の成分および構造評価に関する研究
大川 祐樹	大阪府立病院機構 大阪国際がんセンター研究所	チームリーダー	抗炎症性糖鎖による皮膚炎制御機構の解明

氏名	所属	職位	研究課題
神沼 修	広島大学原爆放射線医科学研究所	教授	化粧品の影響評価に役立つステロイド抵抗性皮膚炎モデルの開発
川口耕一郎	京都工芸繊維大学応用生物学系	講師	表皮角化細胞ターンオーバーにおけるFABP5の役割解明と皮膚組織の老化制御に資する分子基盤の構築
江目 宏樹	山形大学大学院理工学研究科	准教授	超短時間過渡吸収測定とふく射-身体熱流動複合解析による熱中症ダイナミクスの解明
菅澤 薫	神戸大学バイオシグナル総合研究センター	教授	紫外線に対する防御機構としてのDNA損傷認識を制御する新規標的分子の探索
前田 憲成	九州工業大学大学院生命体工学研究科	教授	細菌クォーラムセンシングに着眼したアクネ菌病原性抑制技術の開発
松本 信圭	東京大学大学院薬学系研究科	助教	保湿剤を塗布された四肢による触覚の脳内表象機構の解明
松本 征仁	順天堂大学大学院医学研究科	特任教授	細胞の運命を変換する新たなアンチエイジング技術の実用的開発
三浦 太一	量子科学技術研究開発機構量子生命・医学部門放射線医学研究所	主任研究員	自家幹細胞エイジングケアを一新する間葉系幹細胞の“若返り誘導法”の開発
山本 博之	愛知淑徳大学健康医療科学部健康栄養学科	教授	非視覚組織の皮膚はどのように波長を区別しているのか？-レチノール代謝を介した青色光の識別機序の解明-
渡邊 美佳	北海道大学北海道大学病院皮膚科	助教	表皮損傷がもたらす幹細胞の時空間的記憶の全容解明
渡辺 玲	大阪大学大学院医学系研究科	特任准教授	皮膚 resident memory T細胞の老化に対する皮膚脂質構成の影響

第3分野：精神、文化に関する分野（8名）

氏名	所属	職位	研究課題
河瀬 彰宏	同志社大学文化情報学部文化情報学科	准教授	化粧品選択とメイクアップ行動に関する大規模データベース構築と計量的分析による化粧品アイテム間の相互作用の解明
神崎 晶	国立病院機構東京医療センター感覚器センター	室長	香料を用いた嗅覚刺激による認知機能改善についての効果
北村 尊義	香川大学創造工学部	准教授	プロテウス効果による内発的な肌の潤い向上・保持支援システムの検討
坂本 雅行	京都大学大学院生命科学研究科	准教授	イメージング技術を応用した匂い識別の回路メカニズムの解明
田中 秀明	追手門学院大学心理学部心理学科	准教授	口紅の方が髪の変化よりも女性の顔の魅力を高めて顔知覚に関わる脳神経時系列処理へ強い影響を与える -高密度脳波計による検討-
長松 隆	神戸大学大学院海事科学研究科	教授	ファンデーションの塗りムラ検出手法に関する研究
橋本 翠	吉備国際大学心理学部心理学科	教授	メイクにおける心理学的効果（錯視）の利用は、顔の魅力アップに影響を与えるのか？ -事象関連電位を用いた生理心理学的検討-
和田 雅子	藤女子大学人間生活学部人間生活学科	特任教授	大学由来の原料を使用した化粧品開発プロジェクト ～プロジェクトマネジメント学で実践する産学連携研究～

3) 大学講座研究助成 (2020年度採択4年目)

代表研究者	所 属	職位	研究課題
天谷 雅行	慶應義塾大学医学部皮膚科	教授	表皮角層形成機序の解明と角層機能制御によるアレルギー疾患予防法の開発
栂島 健治	京都大学大学院医学研究科皮膚科	教授	アトピー性皮膚炎の発症機序の時空間的理解とアレルギー克服を目指した研究
月田早智子	帝京大学先端総合研究機構	教授	上皮バリアの分子細胞生物学研究を基盤とした皮膚疾患の病態解明と治療予防法の開拓

4) 国際交流助成 (2件)

派遣者	所 属	派遣目的
岡崎 勲	東日本国際大学	Professor Massimo Pinzani 講演会、パレスホテル東京 (2023年4月22日)
森 貴裕	東京大学大学院薬学系研究科	Jing-Ke Weng 招聘、第59回植物化学シンポジウム、東京大学山上会館 (2023年11月8日～12日)

5) 学術集会支援助成 (6件)

実施責任者	所 属	学術集会
伊藤 正俊	日本美容皮膚研究会	第41回日本美容皮膚科学会総会・学術大会 (市民公開講座) 京王プラザホテル (2023年8月19日～20日)
伊藤 晃成	千葉大学大学院薬学研究院	日本動物実験代替法学会第36回大会 千葉大学西千葉キャンパス (2023年11月27日～29日)
臺 美佐子	石川県立看護大学	第12回国際リンパ浮腫フレームワーク・ジャパン研究協議会学術集会 石川県立看護大学 (2023年9月17日)
名井 陽	大阪大学医学部附属病院	第45回日本バイオマテリアル学会大会 神戸国際会議場 (2023年11月6日～7日)
大野 彰子	国立医薬品食品衛生研究所 安全性子測評価部	第36回日本酸化ストレス学会関東支部会 LiSE 川崎生命科学・環境研究センター (2023年12月3日)
竹ノ谷文子	星薬科大学	第26回日本アロマセラピー学会学術総会 神奈川県立保健福祉大学 (2023年11月18日～19日)

役員

2024年7月現在

理事長	小林 一俊	株式会社コーセー 代表取締役社長
専務理事	亀山 浩一	(常勤)
理事	天谷 雅行	慶應義塾 常任理事、慶應義塾大学医学部 教授
理事	井上 英史	東京薬科大学 名誉教授・特命教授
理事	岩橋 楨夫	北里大学 名誉教授
理事	関根 茂	日光ケミカルズ株式会社 代表取締役名誉会長
理事	長野 哲雄	東京大学 名誉教授
理事	野口 範子	同志社大学生命医科学部 教授
理事	宮地 良樹	静岡社会健康医学大学院大学 学長・理事長、京都大学 名誉教授
監事	小林 久美	公認会計士
監事	村上 實	弁護士
評議員会長	内藤 昇	元 株式会社コーセー 常務取締役
評議員	伊藤 正俊	東邦大学 名誉教授
評議員	岡崎 勲	東日本国際大学 客員教授
評議員	齊藤 勲	元 厚生省 大臣官房審議官
評議員	齋藤 美穂	早稲田大学 副総長・名誉教授
評議員	仙名 保	慶應義塾大学 名誉教授
評議員	辻 勉	星薬科大学 名誉教授
評議員	中村 陽子	元 厚生省 医薬安全局安全対策課 安全対策企画官

*本財団についてのお問い合わせは下記に
お願いいたします。

公益財団法人 コーセーコスメトロジー研究財団

〒103-0028 東京都中央区八重洲一丁目5番17号
八重洲香川ビルディング4階
電話 03(6860)2190

コスメトロジー研究報告 Vol. 32/2024

非売品

2024年9月1日発行

編集責任者 亀山 浩一
発行 公益財団法人 コーセーコスメトロジー研究財団
〒103-0028 東京都中央区八重洲一丁目5番17号
電話 03(6860)2190
制作 エイエム企画
〒362-0034 埼玉県上尾市愛宕一丁目2番7号
電話 048(778)7943
印刷 株式会社サンセー

表紙デザイン監修：株式会社コーセー 商品デザイン部デザイン室

©2024

不許複製 禁無断転載