

## ごあいさつ

この度コスメトロジー研究振興財団として、26冊目の研究報告書を刊行いたしました。

設立以来25年以上にわたって、化粧品科学及び関連分野に貢献する研究テーマに対し助成活動を滞りなく継続できたことは、多くの関係者の皆様のご理解ご協力によるものと、改めて感謝申し上げる次第でございます。

当財団の助成領域につきましては、医学、化学、薬学、生理学、心理学、文学、社会学など多岐にわたる分野の研究者のお力添えにより、コスメトロジーという分野が発展してきたといっても過言ではありません。助成させていただいた研究テーマは、新素材設計、ライフサイエンス、化粧品心理、文化論など多種多様であり、化粧品学の発展に有用な貢献ができたと考えております。また当財団の活動がその社会貢献の一助になっていることを幸いに思っております。

今回の報告書では、平成27～28年度に助成を受けられた方の中から30名の方の研究成果を掲載いたしました。

素材、物性に関する分野では、コラーゲンやペプチド素材に関するテーマと安全性・安定性に優れた製剤化研究が顕著であったと思われま

す。生体作用、安全性に関する分野では、皮膚のバリア機能、恒常性維持などにおける新たなメカニズムに関わる研究と皮膚の老化予防・治療に関する研究が中心であったと思われま

す。精神、文化に関する分野の研究につきましては、香りの効果・メカニズムに関する研究や顔面の新しい評価法の研究など大変興味深い内容であったと考えてい

ます。この研究報告書『COSMETOLOGY』誌がより幅広く活用されることを祈念し

ます。当財団は分野の枠や研究機関の属性などにとらわれることなく、化粧品学の発展のために、優れた研究に対して積極的に助成を行っていきたいと考えておりま

す。今後とも、皆さまのますますのご協力とご支援をお願い申し上げます。

平成30年7月

公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団

理事長 小林 保清

# 目 次

## ■ごあいさつ

## ■研究報告

### I. 素材、物性に関する分野

- ・ヘパリン導入コラーゲンからなる G/O エマルションの開発…………… 4  
九州大学大学院工学研究院化学工学部門 井嶋 博之
- ・微細藻類が生産するアスタキサンチンを水溶化するタンパク質の化粧品素材としての開発…………… 8  
東京農業大学生命科学部分子微生物学科・同大学応用生物科学部バイオサイエンス学科 川崎 信治
- ・リン脂質を主成分とする巨大分子集合体の構造発色性を利用した新規化粧品素材の開発…………… 12  
東京都市大学工学部エネルギー化学科 黒岩 崇
- ・特異的に生体コラーゲンに結合するペプチドの分子設計・合成と応用…………… 16  
早稲田大学先進理工学部化学・生命化学科 小出 隆規
- ・低刺激性生体接着材料の開発とその化粧品への応用…………… 22  
新山手病院臨床医用工学研究室 小山 義之
- ・アミノ酸系機能性界面制御剤による革新的な乳化技術の開発…………… 27  
東京理科大学理工学部先端化学科 酒井 健一
- ・化粧品・スキンケア製品に適したコメ糖タンパク質由来生理活性短鎖ペプチド素材の開発…………… 32  
新潟大学自然科学系（工学部機能材料工学科） 谷口 正之
- ・Suspended-state NMR 測定による水分散中の化粧品ナノ粒子の分子状態評価…………… 40  
千葉大学大学院薬学研究院 東 顕二郎

### II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・革新的なシミ予防・治療法の開発…………… 48  
名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 飯田 真智子
- ・ヒト iPS 細胞を利用して、表皮角化細胞の様々な刺激に対する反応性にフィラグリン  
遺伝子の変異が与える影響について検討する…………… 52  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 井川 健
- ・ポリエチレングリコール (PEG) 含有化粧品使用による抗 PEG 抗体誘導と PEG 化  
製剤の薬理効果への影響…………… 56  
徳島大学大学院医歯薬学研究部 石田 竜弘
- ・フィラグリン遺伝子欠損ラットを用いたアレルギーマーチの解明…………… 63  
京都大学大学院医学研究科皮膚科学講座 大塚 篤司
- ・メラニン合成酵素を輸送する Rab32 および Rab38 の不活性化因子 GAP の色素細胞に  
おける機能解析…………… 68  
筑波大学医学医療系生理化学 大林 典彦
- ・創薬のための毛嚢を有する in vitro 人工皮膚モデルの開発…………… 75  
岡山理科大学理学部臨床生命科学科 片岡 健
- ・化学物質の新規リスク評価のためのライブシングルセル解析手法の開発…………… 79  
大阪大学大学院基礎工学研究科 倉岡 功
- ・皮膚アレルギーを制御する $\omega$ 3由来脂肪酸メデイエーターの産生・作用機構の解明…………… 85  
東京大学大学院薬学系研究科 河野 望

・ 皮膚ホメオスタシス制御に向けたアレルギーセラピーの基盤研究とその応用	89
金沢大学医薬保健研究域薬学系衛生化学研究室 鈴木 亮	
・ 皮膚加齢における基底膜蛋白の生理学的意義の解明	94
北海道大学病院皮膚科 夏賀 健	
・ 生体皮膚「質感」「機能」二光子イメージングによる化粧品作用の評価システムの確立	98
自治医科大学分子病態研究部 西村 智	
・ 皮膚の恒常性維持における転写補助因子 MRTF-A/B の役割	102
大阪大学大学院医学系研究科 林 謙一郎	
・ 細胞生存促進効果を有する糖内包化リポソームのアンチエイジング化粧品への応用	107
千里金蘭大学生生活科学部食物栄養学科 日沼 州司	
・ チロシナーゼと基質複合体結晶構造解析に基づいた反応機構の解明	113
大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 藤枝 伸宇	
・ クエン酸による細胞機能の調節機構：美容および美白、老化における役割	117
国立研究開発法人国立成育医療研究センター 宮戸 健二	
・ アレルギー性皮膚炎に対するナノ粒子化ヘパリンの抑制効果	122
京都大学大学院薬学研究科 山下 富義	

### Ⅲ. 精神、文化に関する分野

・ 顔面加齢の評価のための画像解析手法の開発：主観的感覚的評価から客観的定量的評価へ	130
国際医療福祉大学三田病院放射線診断センター 奥田 逸子	
・ 肌の魅力に関する意識構造の年代間、性別間比較	135
関西学院大学理工学部 谿 雄祐	
・ 植物由来の香りが睡眠におよぼす影響の解明	141
東京大学大学院農学生命科学研究科 恒次 祐子	
・ 現代の子ども文化の中に見られる化粧の話題の分析と保護者と保育者の化粧に関する認識	146
筑波大学医学医療系 徳田 克己、水野 智美	
・ 香りのなつかしさの神経メカニズム	153
福井大学医学部脳形態機能学分野 村田 航志	
・ 新しい顔面3次元形状評価法の開発 ―相同モデル化による顔面形状の特徴を定量化する試み―	158
九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座口腔顎顔面外科学分野 森 悦秀	

#### ■記念講演

・ 第28回表彰・贈呈式記念講演 「夢を形に：ナノテクノロジーで創る体内病院」	165
公益財団法人川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター 片岡 一則	

■コスメトロジー研究雑感	177
--------------	-----

#### ■付 録

事業報告書	201
2017年度 研究助成を受けられた方々	203
役員一覧	206



# 研究報告

- 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



## **I . 素材、物性に関する分野**

# ヘパリン導入コラーゲンからなる G/O エマルションの開発

九州大学大学院工学研究院化学工学部門

井嶋 博之

Heparin-collagen conjugate using heparin having affinity for various growth factors was prepared. Furthermore, a gel-in-oil (G/O) emulsion consists of this conjugate was developed. This G/O emulsion was able to immobilize various growth factors including bFGF. In addition, this G/O showed good permeability to the skin. Furthermore, activation of the cultured dermis model was suggested in the application test of bFGF-containing G/O. From the above, the effectiveness of the G/O emulsion as a novel skin care technology having good skin permeability, stabilization of the active ingredient and its sustained release property was expected.

## 1. 緒言

シワやたるみ、シミや黒ずみ、ニキビ、ニキビ跡、髪の毛のダメージ・抜け毛などのトラブルは誰にでも起こる問題であり、精神衛生的観点からもこれら問題を解決することは重要である。近年、増殖因子が注目されており、上皮細胞増殖因子 (EGF) や線維芽細胞増殖因子 (FGF) などが配合された美容液が市販されている。しかしながら、増殖因子は不安定であり容易に失活するため、その安定性の向上が不可欠である。さらに、皮膚は優れたバリア性を有するため分子量数万の各種増殖因子の皮膚透過性は極めて低い。これに対してタンパク質薬物を Solid-in-Oil 化することで疎水性表面の直径数百 nm の微粒子が作製でき、劇的な皮膚浸透性の向上が報告されている<sup>1-2)</sup>。

一方、ヘパリン導入コラーゲンは肝臓<sup>3-8)</sup>、血管<sup>5-6)</sup>、神経組織<sup>10)</sup> に対する再生医療用基材としての有効性が実証されてきた。本基材は生体内コラーゲンと同様に中性近傍において自発的にゲル化し、高い生体親和性を示す。さらに本基材は EGF、FGF、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) などの各種増殖因子と高い親和性を有しており、自発的にそれら増殖因子を固体化保持できる<sup>4-10)</sup>。これにより、増殖因子の失活が阻害され、その細胞活性化効果を長期間良好に維持でき<sup>9-10)</sup>、かつ徐放性が付与される<sup>5-6)</sup> ことにより、効果的な皮膚の活性化が期待される。

そこで本研究では、上記ヘパリン導入コラーゲンのナノゲルからなるエマルションを開発し、従来にないスキんケ

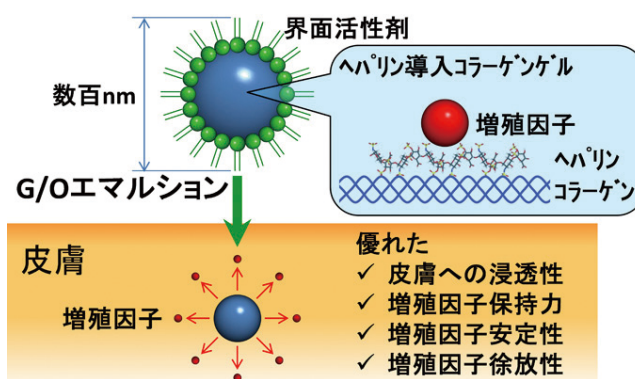


Fig. 1 Image of activation of skin by G/O emulsion

ア技術を創出することを目的とした (Fig.1)。

## 2. 方法

### 2.1. ヘパリン導入コラーゲンゲルへの増殖因子固定化と安定性評価

水溶性カルボジイミド塩酸塩 (EDC) および N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を用いてコラーゲンゲルにヘパリンを導入した。作製したヘパリン導入コラーゲンゲルに塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を固定化し、ELISA 法によりゲル内の bFGF 量を評価した。また、ヘパリン導入コラーゲンゲルに bFGF を固定化して 1 日間インキュベーションした後、ELISA 法によりゲル内の bFGF 量を評価した。

### 2.2. G/O エマルションの開発

ゼラチン溶液の水相と、ショ糖エルカ酸エステル (ER-290) を溶解したシクロヘキサンの油相を混合し、超音波ホモジナイザーを用いて乳化させた。ゲル化後油相を置換し、ミリスチン酸イソプロピル (IPM) に再分散させることで G/O を調製した。G/O 調製時の界面活性剤濃度、水相と油相の体積比、ゼラチン濃度について最適化を行った後、



Development of G/O emulsion consists of heparin-collagen conjugate  
Hiroyuki Ijima  
Dept. of Chemical Engineering, Graduate School, Kyushu University

ヘパリン導入ゼラチン溶液を水相に用いたG/O調製を試みた。G/Oの粒径分布は動的光散乱法(DLS)により測定した。また、G/O内水相のゲル化を動的粘弾性測定により評価した。

### 2.3. G/Oエマルジョンの皮膚浸透性評価

強化緑色蛍光タンパク質EGFPを含むゼラチン溶液の水相1mLと、IPM (ER-290 : 50mg/mL) の油相2mLを用いてEGFP含有G/Oを調製した。拡散セルにマウスの背中皮膚を挟み、PBSを皮膚下面がさらされる程度まで加えた。EGFP含有G/Oを皮膚上面に添加し、インキュベーター内で1日間静置した。その後、皮膚断面の凍結切片を作製して蛍光観察を行った。

### 2.4. 培養真皮モデルを用いたbFGF固定化G/Oの有効性評価

1% コラーゲン溶液と20% FBS添加2倍濃縮DMEMを1:1で混合した溶液にマウス線維芽細胞(L929細胞)を懸濁し ( $6.7 \times 10^5$  cells/mL)、37°C下でゲル化させることで培養真皮モデルを作製した。この培養真皮モデル表面にbFGF固定化G/Oエマルジョンを塗布し培養した。Hoechstを用いたDNAを定量により、培養真皮モデル内の細胞増殖を評価した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. ヘパリン導入コラーゲンゲルへの増殖因子固定化と安定性評価

ヘパリン導入コラーゲンゲル内のbFGF量を評価した結果、有意に多くのbFGFが固定化されていることが確認された。その固定化効率は約71%であった。また、ヘパリン導入コラーゲンゲルに固定化したbFGFは、溶液中のbFGFと比較してその活性を良好に維持していることが期待された (Fig. 2)。これはbFGFが分子構造の比較的安定なヘパリンに結合し、立体構造が安定化したためだと考えられる。

### 3.2. G/Oエマルジョンの開発

ナノゲル粒子をIPMに再分散させたところ、均一に分散させることができ、G/Oの形成が示唆された。G/O調製時の組成について最適化を行った結果、界面活性剤濃度50mg/mL、水相と油相の体積比1:2、ゼラチン濃度5%の条件において、粒子径が小さいG/Oが得られた。この条件下において、ヘパリン導入ゼラチン溶液を水相に用いてG/Oを調製したところ、平均粒径が293nmのG/Oが得られた (Fig. 3 (A))。これより皮膚浸透可能なサイズのG/O作製が示唆された。また、IPM中に分散したG/Oエマ

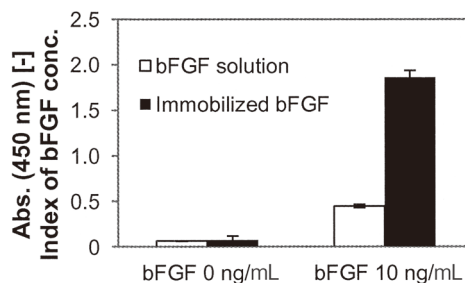


Fig. 2 Immobilized bFGF in heparin-collagen conjugate gel evaluated by ELISA; n=3. Bars represent S.D.

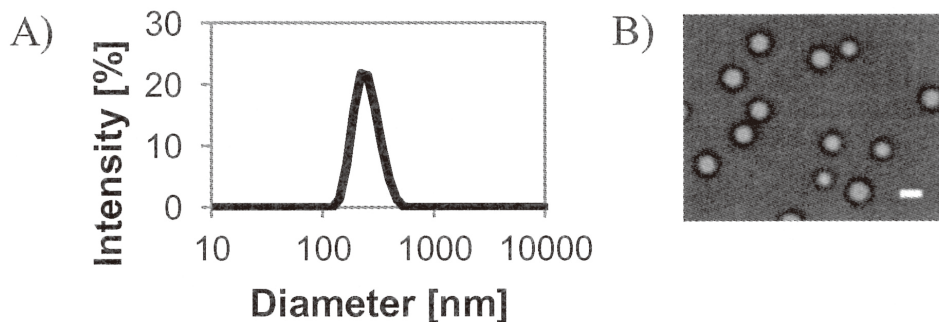


Fig. 3 Characteristics of G/O emulsion. (A) Size distribution of G/O emulsion evaluated with DLS; n=3. (B) Phase-contrast microscopic observation of G/O emulsion. Bar indicates 1 μm.

ルシオンは安定であり、経時的粒径変化は観察されなかった。さらに、G/O粒子の動的粘弾性測定を行った結果、同様に作製したW/Oエマルシオンと比較して硬いことが分かった。これより、G/O内水相のゲル化が期待された。

### 3.3. G/Oエマルシオンの皮膚浸透性評価

EGFP含有G/Oの皮膚浸透試験を行った後、皮膚断面の蛍光観察を行った。EGFPの皮膚浸透性は見られなかったが、G/O化することによりEGFPの皮膚内部への浸透が示された (Fig. 4)。また、G/O調製時にEGFPの活性は失われておらず、皮膚浸透後も活性を維持していることが示された。

### 3.4. 培養真皮モデルを用いたbFGF固定化G/Oの有効性評価

増殖因子不含培地と比較してbFGF含有培地の増殖促進効果は観察されなかった。これはbFGFの安定性の乏しさに起因するものである。また、bFGF固定化W/Oエマルシオンにより培養初期において細胞増殖促進効果が見られたものの、その効果は持続できなかった。一方、bFGF固定化G/Oエマルシオンにおいては他の条件と比較して有意な細胞増殖効果が確認され、少なくとも培養7日間その効果が持続した。よって、G/Oエマルシオンによる培養真皮モデルの活性化が期待された。

## 4. 総括

ヘパリン導入コラーゲンゲルに増殖因子を固定化させることで、増殖因子の活性維持が確認された。また、内水相がヘパリン導入ゼラチンゲルであるG/O (粒径約293nm)

形成が示唆された。EGFP含有G/Oの皮膚浸透試験の結果、EGFPの皮膚浸透が示唆された。さらに、bFGF含有G/Oの塗布試験において培養真皮モデル活性化が示唆された。以上より、皮膚浸透性と有効成分の安定化および徐放性を有する新規スキンケア技術としてのG/Oエマルシオンの有効性が期待された。

### 謝辞

G/Oエマルシオン作製および評価に尽力いただいた長尾征哉氏(九州大学)、山本恵美子氏(九州大学)に心よりお礼申し上げます。また、基材評価にご協力いただいた後藤雅宏教授(九州大学)、三浦佳子教授(九州大学)、小野文靖准教授(九州大学)に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご援助いただきましたことに深く感謝申し上げます。

### (引用文献)

- 1) Wakabayashi, R., Sakuragi, M., Kozaka, S., Tahara, Y., Kamiya, N., Goto, M.. Solid-in-Oil peptide nanocarriers for transcutaneous cancer vaccine delivery against melanoma, *Mol. Pharm.*, 15, 955-961, 2018.
- 2) Tahara, Y., Honda, S., Kamiya, N., Piao, H., Hirata, A., Hayakawa, E., Fujii, T., Goto, M., A solid-in-oil nanodispersion for transcutaneous protein delivery, *J. Control. Release*, 131, 14-18, 2008.
- 3) Ye, J., Shirakigawa, N., Ijima, H., Hybrid organoids consisting of extracellular matrix gel particles and

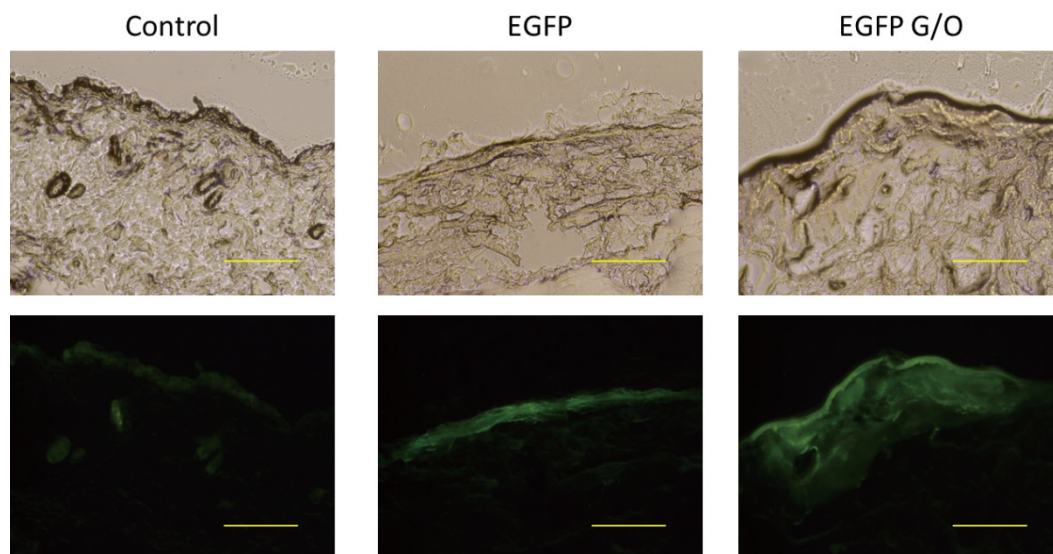


Fig. 4 In vitro evaluation on skin permeability of G/O emulsion using mouse skin. Bars indicate 200μm.

- hepatocytes for transplantation, *J. Biosci. Bioeng.*, 120, 231-237, 2015.
- 4) Nakamura, S., Kubo, T., Ijima, H., Heparin-conjugated gelatin as a growth factor immobilization scaffold, *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 562-567, 2013.
- 5) Hou, Y.-T., Ijima, H., Shirakigawa, N., Takei, T., Kawakami, K., Development of growth factor-immobilizable material for hepatocyte transplantation, *Biochem. Eng. J.*, 69, 172-181, 2012.
- 6) Hou, Y.-T., Ijima, H., Takei, T., Kawakami, K., Growth factor/heparin-immobilized collagen gel system enhances viability of transplanted hepatocytes and induces angiogenesis, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 265-272, 2011.
- 7) Hou, Y.-T., Ijima, H., Matsumoto, S., Kubo, T., Takei, T., Sakai, S., Kawakami, K., Effect of a hepatocyte growth factor/heparin-immobilized collagen system on albumin synthesis and spheroid formation by hepatocytes, *J. Biosci. Bioeng.*, 110, 208-216, 2010.
- 8) Ijima, H., Kubo, T., Hou, Y.-T., Primary rat hepatocytes form spheroids on hepatocyte growth factor/heparin-immobilized collagen film and maintain high albumin production, *Biochem., Eng. J.*, 46, 227-233, 2009.
- 9) Mizumachi, H., Ijima, H., Measuring stability of vascular endothelial growth factor using an immobilization technique, *Adv. Biomed. Eng.*, 2, 130-136, 2013.
- 10) Nagai, T., Ikegami, Y., Mizumachi, H., Shirakigawa, N., Ijima, H., Development of an in situ evaluation system for neural cells using ECM-modeled gel culture, *J. Biosci. Bioeng.*, 124, 430-438, 2017.

# 微細藻類が生産するアスタキサンチンを水溶化する タンパク質の化粧品素材としての開発

東京農業大学生命科学部分子微生物学科  
東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科

川崎 信治

Under extreme environmental conditions such as desiccation and high salinity combined with high light irradiation, it is difficult for higher plants to survive because light energy, in combination with oxygen, leads to the generation of reactive oxygen species (ROS) under water stress conditions. However, microalgae are found to thrive under such conditions. A microalga, strain Ki-4 was previously isolated from asphalt in midsummer, and a novel water-soluble astaxanthin binding protein, named AstaP, was identified from this microalga. This protein is heat-stable and possesses singlet oxygen-quenching activity in water. AstaP is thought to enable the microalga to survive under the extreme photooxidative stress conditions. Our aim is to develop AstaP as a novel functional molecule, which can be produced at high yields, to enable lipid-soluble organic astaxanthin to function in water. In this study, we have been working on developing a system to obtain large amounts of the highly purified AstaP by engineering the cultivation systems of strain Ki-4. In addition, we are determining the possibility of using AstaP as a cosmetic product to protect human cells from the toxic effects of sun light and ROS.

## 1. 緒言

植物は強光が付随する環境ストレス下では、活性酸素の生成を伴う光酸化ストレスを発生し枯死にいたる。申請者らは一般の植物が生存しえない砂漠環境などの極限環境から微細藻類の探索を行い、70株ほどの真核微細藻類を単離・保有している。これら極限環境から単離した藻類は、淡水性でありながら強い乾燥耐性や耐塩性を示し、強光照射下でかつ水分が0%の環境でも数ヶ月間生存するなど強い環境ストレス抵抗性を示すことから、シングルセルを強光毒性から防御するための優れた生命代謝系の存在が推定された。

強光下の真夏のアスファルトから単離した微細藻類Ki-4株は、強光が付随する環境ストレス（強光+乾燥や塩ストレス）に遭遇すると細胞液を赤く変色して生存する（図1）。この赤色に着目して研究をすすめた結果、植物界で初めての発見となるアスタキサンチンを結合する水溶性タンパク質の精製に成功し、AstaPと命名した<sup>1)</sup>（図2）。アスタキサンチンはカロテノイドの中でも特に優れた抗酸化力をもつ脂溶性のカロテノイドであり、エビやカニの甲羅、フラミンゴの羽などに含まれる脂溶性のカロテノイドで、化粧品や機能性食品に広く利用されている。また植物界におけるアスタキサンチンは、真核の微細藻類ヘマトコッカス藻などが細胞内に油滴として蓄積することが知られるのみで

あった。微細藻類Ki-4株はヘマトコッカス藻と同じ緑藻綱に属する微細藻類で、AstaPは本藻類が光酸化ストレスを感知した際に細胞内で大量に生産される（図2）。AstaP

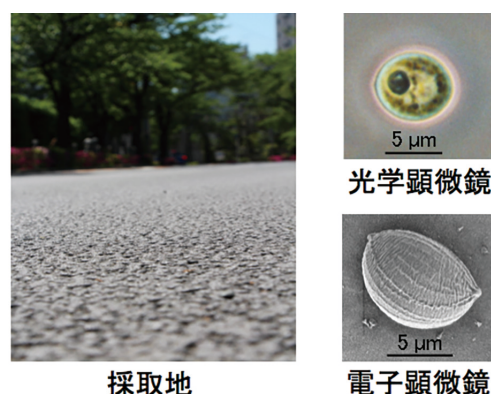


図1 大学前の真夏のアスファルトから単離したKi-4株の顕微鏡写真

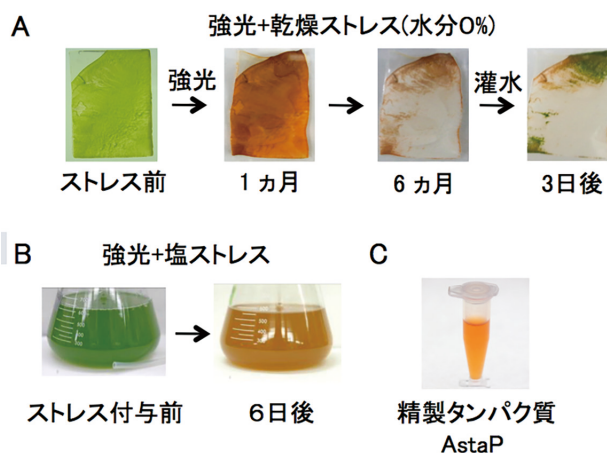


図2

- Ki-4株を寒天培地上で培養し、強光+乾燥ストレスを付与した際の形態変化
- Ki-4株の液体による大量培養とストレス付与後の色彩変化
- 精製後に純水に溶けたアスタキサンチン結合タンパク質(AstaP)



Development of a novel microalgal aqueous astaxanthin binding protein for use in cosmetic products

Shinji Kawasaki  
Tokyo University of Agriculture

はアスタキサンチンを純水に溶かす水溶化能力があり、その水溶特性と1重項酸素除去活性は100℃・1時間の処理後も安定であった。そこで本研究ではAstaPを脂溶性アスタキサンチンの効力を水溶液中で発揮し、かつ大量生産が可能な新奇な機能性素材として認識し、化粧品分野での有効的な利用法の可能性を探ることを目的とする。

## 2. 実験

### 2.1. 大量生産法の確立

水溶性のアスタキサンチン結合タンパク質(AstaP)の商業利用には、まず本品の大量生産系の確立が前提条件となる。そこで微細藻類の大量培養系の確立に着手した。まずは大量培養に向けた培地成分の確立を行った。培地には糖源など有機物を含まない無機塩類をベースとした安価な無機培地を採用し、完全な独立栄養(CO<sub>2</sub>と光のみの供給で生育)にて良好な生育を可能とする培地組成を検討した。次に光酸化ストレス付与に応じて発現するAstaPの最適な誘導条件を決定するために、光強度やCO<sub>2</sub>濃度、塩濃度、培養温度などの光酸化ストレス付与条件と、さらなる発現量の向上を目指して鉄濃度の影響を調査した。また上記で確立した培養条件を用いて、非閉鎖系での屋外培養槽による大量培養試験を実施した(図3)。

### 2.2. 大量精製法の確立

AstaPの商業利用には、AstaPを容易に、かつ高純度に精製する技術が必要となる。AstaPは細胞内で最も高い等電点(pI=10.5)をもつことから、本性質を上手く利用することにより他の細胞内タンパク質との容易な分別精製が可能になることが推定された。そこで前項2.1.で実施した屋外大量培養法で生産した微細藻類から、AstaPの大量精製法の確立を試みた。まず安価でかつ容易な精製系の確立を目的として、イオン交換樹脂の検討と、効率的な精製法

の開発に着手した。

### 2.3. 細胞アッセイ系の確立

AstaPは脂溶性のアスタキサンチンの効力を水溶液中で発揮することが可能な抗酸化物質としてのユニークな機能が期待される。そこで水溶液中での活性酸素除去能力の評価、ならびに1重項酸素除去剤としての能力の評価と安定性に関する試験を行った。AstaPは新規な機能性素材であることから、化粧品素材への応用は各種の安全性試験をクリアする必要がある。その第一歩として、培養細胞を用いた試験を実施した。細胞を用いた毒性試験はアスタキサンチンの抗酸化能力を評価した過去の論文を参考にして実施した。専門家の指導の下で細胞培養系の立ち上げを行い、その後にアスタキサンチンの機能性評価に関する論文を参考にして、マウス胎児由来の線維芽細胞であるNIH3T3細胞を用いて評価を行った。

## 3. 結果

### 3.1. AstaPの大量生産法の確立

培地成分に関する正確な情報を得るために、無菌環境下でKi-4藻の培養を行い、CO<sub>2</sub>の濃度、ならびに光条件の検討を行った。その結果、培養開始後4日目で3×10<sup>6</sup>個/ml(培地)の増殖を可能とする藻細胞培養系の確立に成功した。アスタキサンチン生産用に培養されている微細藻類へマトコッカス藻で報告されている細胞増殖速度は10<sup>5</sup>個/mlのオーダーであることから<sup>2, 3)</sup>、細胞の数として評価すると約10倍の増殖速度に相当する結果を得た。確立した大量培養系にてAstaPの生産効率の向上を試験した。その結果、AstaPは光酸化ストレス下(強光+塩ストレスや乾燥ストレス下)で速やかに遺伝子発現を開始し、ストレス開始後2日目には、細胞内で最も大量に蓄積するタンパク質になることがプロテオーム解析の結果から判明した

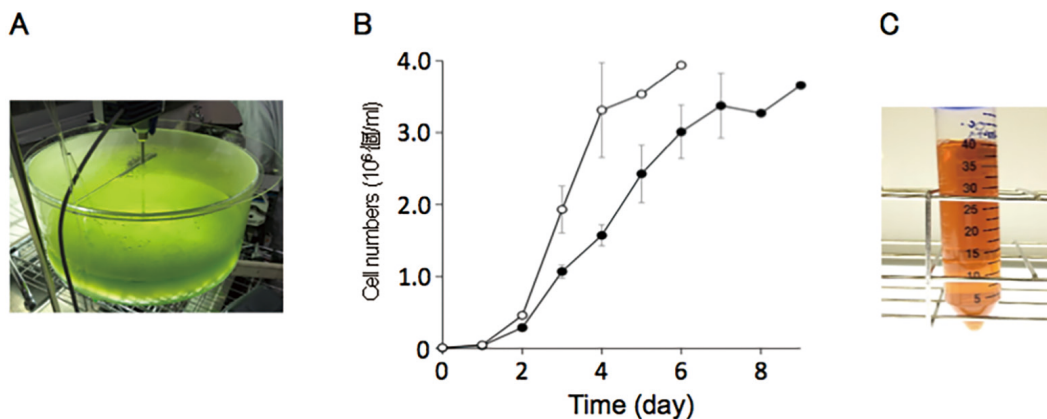


図3

- A. 非閉鎖系培養の様子  
 B. 本研究で最適化した培養法によるKi-4株の生育。○：CO<sub>2</sub>通気培養。●：Air通気培養  
 C. 光酸化ストレスを付与後の藻体から抽出した水溶性画分

(図4)。そこでCO<sub>2</sub>濃度や光の強度、さらにはFeイオンの濃度を変化させ、AstaP発現との相関性に関して解析を行った。その結果、最適な通気CO<sub>2</sub>濃度の条件を決定した(図3)。またヘマトコッカス藻においてFe添加によるアスタキサンチン合成量の上昇が報告されていたことから同様に添加したところ、AstaP発現量の向上が観察された。しかしFe未添加のものに比べて生産量が1.2倍程度高いのみであり、その後の生産プロセスにおけるFeの混入リスクもあることから、以後の実験は全てFe未添加条件で行うこととした。次に、上述で開発した大量培養系を用いて生産したAstaPの効率的な精製法の開発を行った。AstaPは高い等電点を有することから、陽イオン吸着カラムに使用するバッファー組成について検討した。その結果、他のタンパク質が吸着しない高アルカリのバッファーを使用した場合でも陽イオン交換カラムに吸着することが判明したため、カラム1本の使用のみでAstaP溶出画分をほぼ完全に精製できる系の確率に成功した(図5)。現在はAstaPの質量より高分子領域に存在する微量の夾雑タンパク質を完全に除去するための溶出塩濃度のグラジェントの条件を検討している。また本精製は安価なイオン交換樹脂を用いた場合でも可能であったことから、精製法の低コスト化と簡便化に目途が立った。

### 3. 2. 抗酸化活性の評価法の確立

過去の研究において、AstaPは1重項酸素を水溶液中で消去する活性に優れ、AstaP 0.2μM(アスタキサンチン換算)は標準化合物であるNaN<sub>3</sub>(アジ化ナトリウム) 1mMに相当する強い活性を示すことを報告した<sup>1)</sup>。本活性は100℃で1時間のボイル後も失活しない耐熱性がある。現在は精製したAstaPを用いて、1重項酸素消去活性と共に、様々な酸化基質に対する抗酸化活性について解析を行っている。能力の比較に関しては可溶性の抗酸化剤であるアントシアニンやフラボノイド類、ビタミン類、グルタチオンなどの水溶性化合物を用いて、抗酸化活性や各種安定性(光熱、放置)について比較した。その結果、興味深い結果が得られたことから、現在は商業利用に向けた総合的な観点からの評価を継続し、論文化を目指してデータを精査している。

AstaPは新規な機能性素材であることから、細胞や生体への影響は不明である。上記の解析において*in vitro*の系で得られたAstaPの活性を応用的に評価するためにも、細胞培養系の確立と、AstaP共存下における細胞への影響を解析する必要がある。そこで細胞培養系の確立を行った。過去にアスタキサンチンの細胞への機能性を評価した論文<sup>4)</sup>を参考にして、ラット胎児由来の線維芽細胞(NIH3T3

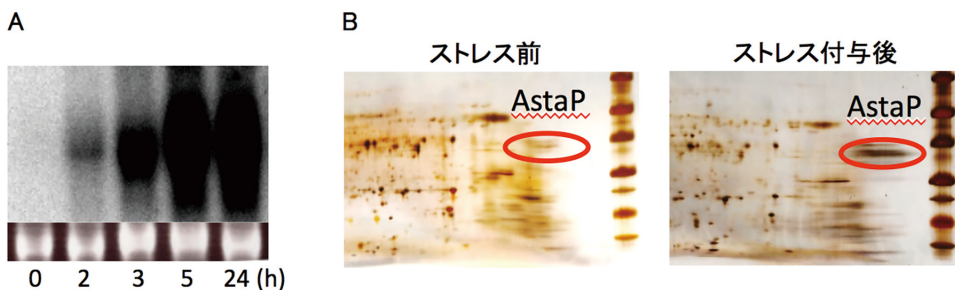


図4

A. AstaP遺伝子の発現。光酸化ストレス付与から2時間後に発現誘導が観察された  
B. AstaPタンパク質の発現。光酸化ストレス付与48h後(右)に大量発現が観察された

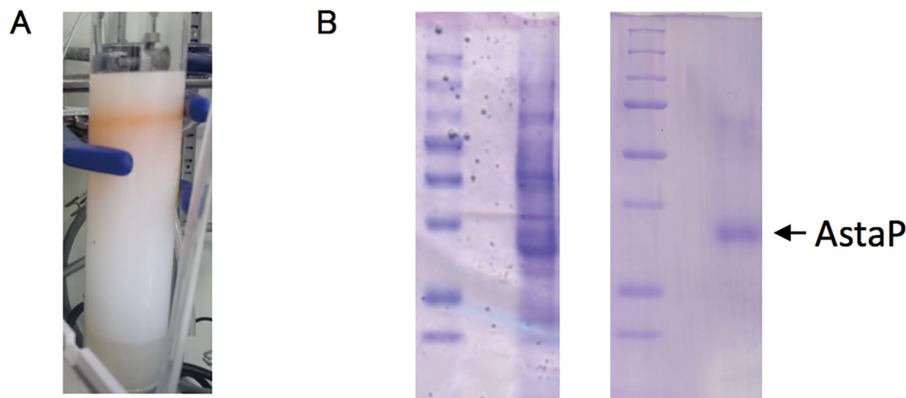


図5

A. AstaPタンパク質精製の様子  
B. 精製タンパク質のSDS-PAGE。カラムクロマトグラフィー前(細胞粗抽出液、左)と後(右)。カラム1本で高純度の精製が可能となった

細胞)の培養系の確立を行った。NIH3T3細胞は理化学研究所のストック株を使用し、DMEM培地に細胞を接種し、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベータで数日間培養したところ、良好に生育した。純水に溶けた濃縮 AstaP を添加して NIH3T3 細胞の生育への影響を観察したところ、これまでに終濃度 15 $\mu$ M までの AstaP (OD484nm=1.5 に相当、濃いオレンジ色になる) を添加した条件下で細胞生育への負の影響は観察されなかった。本研究で細胞培養系と添加実験に関する評価系を確立できたことから、今後は AstaP 共存下で細胞への紫外線照射の影響や活性酸素発生剤の影響などを観察し、細胞保護効果の有無を観察し、さらなる応用研究を進める方針である。

#### 4. 考 察

本研究では微細藻類由来の水溶性アスタキサンチン結合タンパク質の化粧品素材への応用に関して研究を行った。応用研究に着手する際に必要不可欠となる大量生産系の確立を目的として、屋外培養に向けたパイロットスタディを行った。開発した開放培養系での AstaP の生産量を総括すると、パイロットスタディでは約 2 週間の期間でヒトの目で判別される十分なオレンジ色 (OD485nm=0.5) の水溶液 50ml を約 30 本得られる藻体が 10L の培地から得られた。この生産量を基準としてスケール UP が容易な直径 3 m の培養槽で行う場合は約 500 本 (収率 50% として)、やや中規模の直径 10 m の培養槽で行う場合は約 5,000 本 (収率 30% として) の生産が可能と試算した。以上を総括すると、供給面については商業化に必要な諸条件をクリアできる感触を得た。

一方、化粧品素材への利用には、機能性だけでなく安全性を評価する必要がある。細胞への影響を評価したところ、十分なオレンジ色の水溶液では、少なくとも NIH3T3 細胞の増殖に負の影響を与えないことが判明した。今後は、様々な種類の動物細胞を用いてさらに高濃度の AstaP を用

いた安全性評価を実施したい。また AstaP の機能性は、アスタキサンチンの代表的な機能性である 1 重項酸素消去活性の他にも、眼精疲労抑制や免疫賦活、脳梗塞など、新規な効果が続々と報告されている。これらの研究には全て脂溶性のアスタキサンチンが用いられていることから、純水に可溶性 AstaP の利用性は未知の可能性を秘めている。今後は培養細胞の評価系を用いて、脂溶性のアスタキサンチンがもつ機能性が水溶液中でも実現可能かどうかを解析し、AstaP がもつ可能性を評価していきたい。

#### 謝 辞

本研究の実施にご助成いただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

#### (引用文献)

- 1) S. Kawasaki, K. Mizuguchi, M. Sato, T. Kono and H. Shimizu. A novel astaxanthin binding photooxidative stress inducible aqueous carotenoprotein from a eukaryotic microalga isolated from asphalt in midsummer. *Plant Cell Physiol.* 54, 1027-1040, 2013.
- 2) M. Harker, A.J. Tsavalos, and A.J. Young. Factors Responsible for Astaxanthin Formation in the Chlorophyte *Haematococcus Pluvialis*. *Bioresource Technology* 55, 207-214, 1996.
- 3) I. Suh, H. Joo, C. Lee. A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *J. Biotechnol.* 125, 540-546, 2006.
- 4) S. Hama, S. Uenishi, A. Yamada, T. Ohgita, H. Tsuchiya, E. Yamashita, and K. Kogure. Scavenging of Hydroxyl Radicals in Aqueous Solution by Astaxanthin Encapsulated in Liposomes. *Biol. Pharmaceu. Bull.* 35, 2238-2242, 2012.

# リン脂質を主成分とする巨大分子集合体の構造発色性を利用した新規化粧品素材の開発

東京都市大学工学部エネルギー化学科

黒岩 崇

A novel structural color material was developed using millimeter-sized giant molecular aggregates formed in phosphatidylcholine (PC) /cholesterol (Chol) /stearic acid (SAC) / water systems. A lipid mixture consisting of PC, Chol and SAc (5: 5: 1 in molar ratio) was dissolved in *n*-hexane and placed onto aqueous phases with various pH, then *n*-hexane was removed by evaporation under ambient conditions in order to form giant molecular aggregates in the aqueous phase. At low pH (< 8), film-like aggregates were obtained, while spherical aggregates were formed at high pH (> 8). Small/Wide angle X-ray scattering measurements revealed that the molecular aggregates exhibited the liquid crystalline polymorphism. Spherical aggregates formed at high pH exhibited structural color depending on the salt concentration of their external aqueous phase. The measurement results of reflection spectra of visible lights from the giant molecular aggregates indicated that their tunable colorization was attributed to change in the internal structure of the giant molecular aggregates. Above findings would contribute to develop biocompatible colorization materials for potential cosmetic application without any dyes or pigments.

## 1. 緒言

自然界においては、昆虫の翅・表皮や鳥の羽を代表例として、特定の波長の光を吸収する色素によらない鮮やかな色彩がみられる。これらは「構造色」と呼ばれる。構造色は、発色素材の表面にある数百 nm 程度の微細構造に照射された光が回折、散乱、干渉などを起こし、特定の波長域の可視光線が強められることで観察される<sup>1-4)</sup>。構造色は一般に美しい光沢を持ち、色素に比べて退色しにくい性質があるため、構造色を示す微細構造を人工的に作り上げることで新しい表示材料や色彩材料として利用する試みが展開され<sup>5)</sup>、その中でも、近年、分子集合体やゲルなどのソフトマテリアルをベースとする構造発色性材料が注目を集めている<sup>6,7)</sup>。これらの研究では、シリカ微粒子、界面活性剤、高分子ゲルなど、主として人工的に合成された化合物が基材として利用されている。一方で、自然界に広く分布する生物体の構造色の構造的起源の解明が進む中<sup>5,8,9)</sup>、天然物由来の分子材料を利用して人為的環境下で構造発色性を発現させる試みはあまり進んでいない。一部のセルロース誘導体の水溶液が可視光の選択反射に基づく構造発色を示すことが古くから知られているが<sup>10)</sup>、化学修飾を伴わない、天然物由来の生体分子そのものを利用して構造発色材料に利用することができれば、より高い生体適合性が求められる化粧品や食品などの新規分野への展開が期待できる。



Development of a novel cosmetic material based on structural colorization of giant molecular aggregates mainly consisting of phospholipids

Takashi Kuroiwa

Department of Chemistry and Energy Engineering, Faculty of Engineering, Tokyo City University

筆者らの研究グループでは、リン脂質、コレステロールに少量の添加剤を加えた混合脂質系において、従来着目されてこなかったミリメートル以上の大きさをもつ巨大分子集合体の作製方法を開発し、さらにこの巨大分子集合体が温度や外水相の組成といった環境要因によりその形態や外観・色彩を大きく変化させることを見出してきた<sup>11)</sup>。これまでに、リン脂質/コレステロール/長鎖アルキルアミン/水系において、塩濃度依存的に構造発色性を示す分子集合体の作製に成功している<sup>12)</sup>。本研究では、この巨大分子集合体の生体適合性向上と化粧品分野への展開を目指して、長鎖アルキルアミンに代わる添加成分として化粧品分野でも利用される長鎖脂肪酸に注目した。本稿では、リン脂質/コレステロール/長鎖脂肪酸/水系において色彩を自在に制御可能な構造発色素材を開発することを目的として、巨大分子集合体の形状および構造に及ぼす温度および pH の影響、発色性に及ぼす塩濃度の影響を中心に、巨大分子集合体の特性評価を行った結果について報告する。

## 2. 方法

### 2. 1. リン脂質巨大分子集合体の作製

卵黄由来ホスファチジルコリン (PC) にはコートソーム NC-50 (日油株式会社) を使用した。コレステロール (Chol) および *n*-ヘキサンは和光純薬工業株式会社 (現・富士フイルム和光純薬株式会社) より購入し、ステアリン酸 (SAC) は東京化成株式会社より購入した。その他の試薬は和光純薬工業株式会社より特級または分析グレードのものを購入して使用した。いずれも購入後の精製は行わず、そのまま実験に用いた。

PC:Chol:SAC = 5:5:1 のモル比でヘキサンの溶解 (PC 濃度 13mM) し、これを脂質溶液とした。この脂質溶液を種々の pH の緩衝液 (50mM) 上に積層し、25℃ 以上で 24

時間静置してヘキサンを蒸発除去することで、球状または膜状の巨大分子集合体を作製した。このとき、脂質溶液と緩衝液の体積比は1:2とした。得られた巨大分子集合体を外水相とともに超純水中に移し、水相の電導度を測定しながら外水相を超純水で希釈することで外水相の塩濃度を所定の値に調整した。

## 2. 2. 小角/広角X線散乱(SAXS/WAXS) 測定による巨大分子集合体の構造評価

作製した巨大分子集合体に対し、高エネルギー加速器研究機構PF BL-6AステーションにてSAXSおよびWAXS測定を行った。X線の波長は1.5Åとした。試料温度を40℃から5℃まで制御(冷却速度2.5℃/min)しながら、SAXSでは1分おき、WAXSでは2分おきに散乱パターンを撮影し、得られた2次元散乱データを使用して相構造を解析した。

## 2. 3. 巨大分子集合体の発色性の評価

巨大分子集合体の発色の様子は、主としてマクロズームレンズ(TS93005、株式会社杉藤)およびカラーCCDカメラ(STC-TC202USB、センテック株式会社(現・オムロンセンテック株式会社))より構成されるデジタルマイクロスコープシステムにより観察した。巨大分子集合体の可視反射スペクトルは図1に示す装置により測定した。円筒形のガラス製サンプル容器に外水相とともに巨大分子集合体を封入し、光ファイバーを介してハロゲンランプ光源(Megalight 100、株式会社モリテックス)からの光を試料に入射した。測定角 $\theta$ の位置に設置した光ファイバースコープを接続したマルチチャンネル分光器(USB-650 Red Tide、Ocean Optics, Inc.)を用い、種々の測定角における反射スペクトルを測定した。

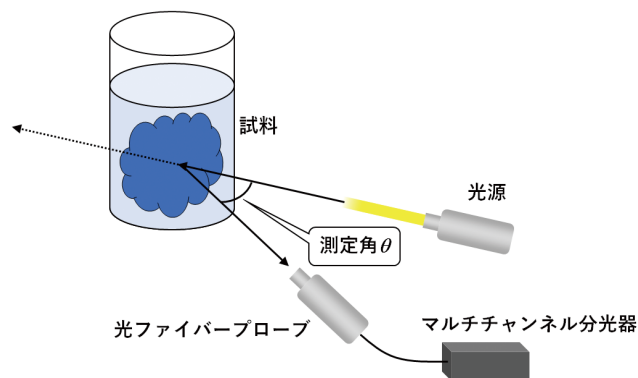


図1 反射スペクトル測定装置の概略

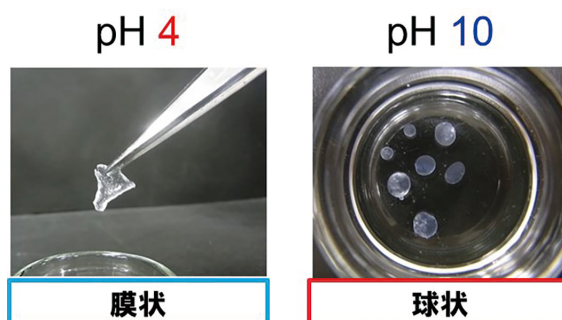


図2 異なるpHで得られた巨大分子集合体の形状の違い

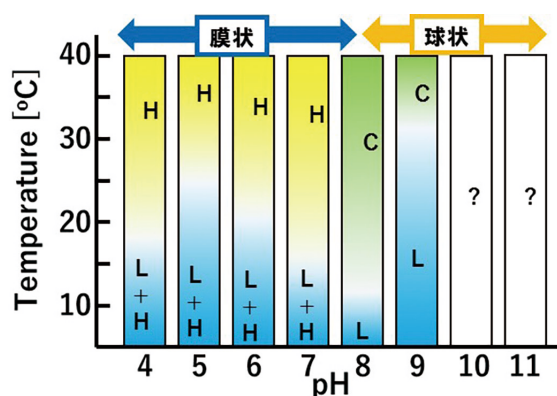


図3 種々のpHおよび温度における巨大分子集合体の相構造(H:ヘキサゴナル相、C:キュービック相、L:ラメラ相、?:相構造の特定には至っていないが、秩序性の低いキュービック相と考えられるスポンジ相の発現が示唆される)

## 3. 結果

### 3. 1. PC/Chol/SAc/水系における巨大分子集合体の作製と構造評価

PC/Chol/SAc/水系において、水相のpHを種々変えて巨大分子集合体を作製した結果、pHが8より低い条件では膜厚1mm程度の透明・膜状分子集合体が、pHが8よりも高い条件では直径0.5mm~2mm程度の透明・球状分子集合体を得られた(図2)。なお、SAcを添加していないPC/Chol/水系(PC:Chol=5:5)では、水相のpH(4~11)によらず膜状の分子集合体を得られ、球状分子集合体の形成は認められなかった。SAXS測定による巨大分子集合体の構造評価<sup>13)</sup>を行った結果を図3に示す。低pH条件で得られる膜状分子集合体においては、30℃~40℃付近でヘキサゴナル相が発現し、低温域でラメラ相が発現していることがわかった。一方、高pH条件で得られる球状分

子集合体においては、30℃~40℃付近でキュービック相が発現し、低温域でラメラ相が発現していることがわかった。WAXS測定の結果、いずれの条件においても分子集合体を構成する脂質のアルキル鎖が低い秩序性を持って充填した液晶状態であることが示され、PC/Chol/SAc/水系で得られる巨大分子集合体は温度およびpHに依存して液晶多形を示すことが明らかとなった。

### 3. 2. 巨大分子集合体の構造色の発現と塩濃度依存性

塩濃度50mM、pH10のホウ酸緩衝液中で得られた透明・球状の巨大分子集合体の外水相を超純水で希釈していくと、

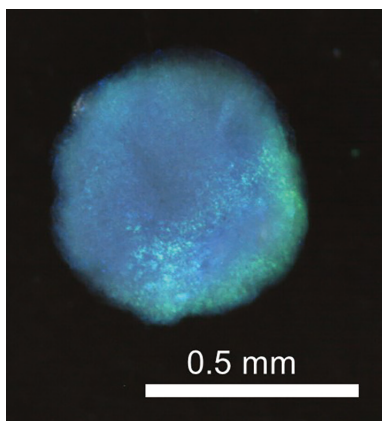


図4 外水相の塩濃度を0.51 mMに調整した巨大分子集合体の発色の様子

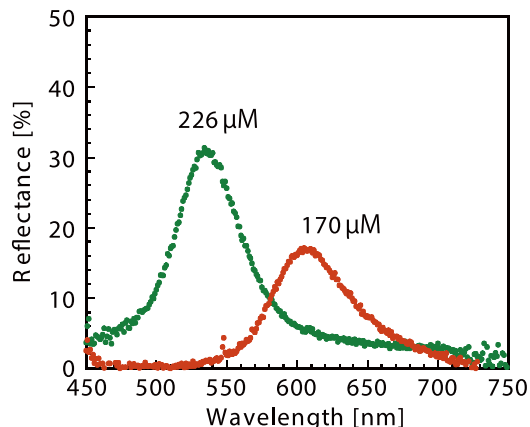


図5 異なる外水相塩濃度に調整した巨大分子集合体の正面反射スペクトル ( $\theta = 0^\circ$ )

巨大分子集合体は膨潤し発色性を示した。図4に示すように、外水相の塩濃度を0.51 mMに調整した場合、分子集合体が青色に発色している様子がわかる。図5には、異なる塩濃度における巨大分子集合体の正面反射スペクトル ( $\theta = 0^\circ$ ) を示す。いずれの塩濃度においても特定の波長域に明確な反射ピークが認められ、塩濃度によって反射波長が異なることが明らかとなった。本巨大分子集合体の構成成分(PC、CholおよびSAc) はいずれも可視光の吸収を示さず無色の化合物であることから、この発色は巨大分子集合体内の特定の構造に起因する構造色であると考えられる。

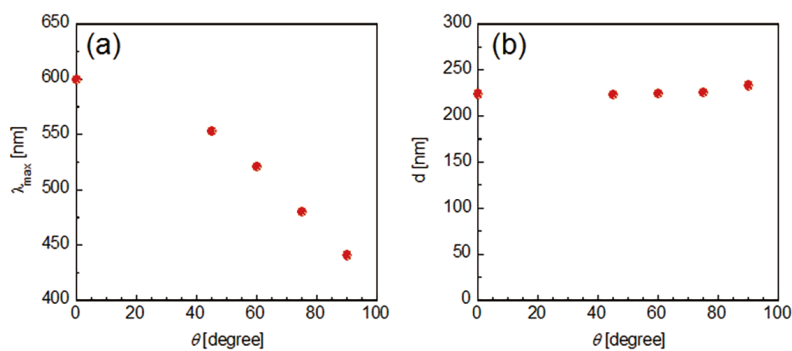


図6

- (a) 外水相塩濃度192 μMにおける最大反射波長の測定角依存性
- (b) 種々の測定角において求められた周期長dの値

### 3.3. 反射スペクトルの角度依存性

塩濃度を192 μMに調整した巨大分子集合体の反射スペクトルを様々な測定角  $\theta$  において測定し、得られたスペクトルから求めた最大反射波長 ( $\lambda_{\max}$ ) を図6(a)に示す。 $\theta$  が大きくなるにつれて最大反射波長は短波長側にシフトした。この結果から、散乱ベクトルの大きさ  $q_0 = (4\pi/\lambda_{\max}) n_e \cos(\theta/2) [\text{nm}^{-1}]$  を求め、 $d = 2\pi/q_0$  の関係より周期長  $d [\text{nm}]$  を算出した<sup>4)</sup>。ここで、 $n_e$  は試料の有効屈折率である。図6(b)には、各測定角において求められた  $d$  値を示す。各  $\theta$  における  $d$  値はほぼ一定であり、これらを平均した平均周期長  $d_{\text{av}}$  は226 nmであった。周期長  $d$  が測定角によらず一定であること、および  $d$  の値が可視光線の波長の半分程度であることは、構造色の特徴の一つである<sup>4, 14)</sup>。種々の塩濃度において同様の測定を行い、対応する  $d_{\text{av}}$  の値を求めた結果を図7にまとめた。図7より、塩濃度が低くなるにつれて  $d_{\text{av}}$  の値が大きくなることが示され、塩濃度を低下させることにより周期長  $d$  が大きくなる傾向が認められた。この結果は、塩濃度により巨大分子集合体内部の周期構造の大きさが変化することで異なる色彩を呈することを示唆

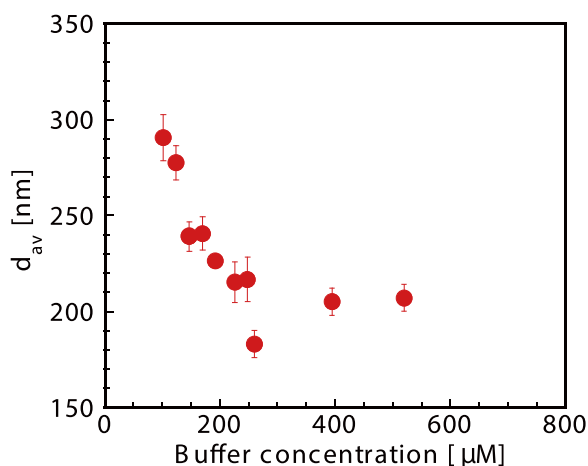


図7 平均周期長  $d_{\text{av}}$  に対する外水相塩濃度の影響

するものであり、外部環境により巨大分子集合体の構造発色特性を制御できる可能性を示すものである。今後、さらに巨大分子集合体の発色および構造に関するデータを蓄積するとともに、内部構造の詳細な分析を行うことで、発色メカニズムの詳細な解明と発色特性のより精緻な制御が可能になると期待される。

## 謝 辞

本研究を助成対象課題として採択いただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より御礼申し上げます。小角および広角X線散乱測定では、筑波大学生命環境系教授 市川創作先生ならびに広島大学大学院生物圏科学研究科生物機能開発学専攻教授 上野聡先生のご支援とご助言を賜りました。ここに記して深謝いたします。研究を進めるにあたり、東京都市大学工学部エネルギー化学科高分子・バイオ化学研究室(機能性バイオ分子グループ)の家才子翔平氏、大藤真琴氏には多大なご協力をいただきました。ありがとうございました。

## (引用文献)

- 1) S. Kinoshita, S. Yoshioka, Y. Fujii, N. Okamoto: Photophysics of structural color in the Morpho butterflies. *Forma*, **17**, 103-121 (2002).
- 2) V. Sharma, M. Crne, J. O. Park, M. Srinivasarao: Structural origin of circularly polarized iridescence in jeweled beetles. *Science*, **325**, 449-451 (2009).
- 3) E. R. Dufresne, H. Noh, V. Saranathan, S. G. J. Mochrie, H. Cao, R. O. Prum: Self-assembly of amorphous biophotonic nanostructures by phase separation. *Soft Matter*, **5**, 1792-1795 (2009).
- 4) H. Noh, S. F. Liew, V. Saranathan, S. G. J. Mochrie, R. O. Prum, E. R. Dufresne, H. Cao: *Adv. Mater.*, **22**, 2871-2880 (2010).
- 5) J. Xu, Z. Guo: *J. Colloid Interf. Sci.*, **406**, 1-17 (2013).
- 6) X. Chen, H. Mayama, G. Matsuo, T. Torimoto, B. Ohtani, K. Tsujii: *J. Colloid Interf. Sci.*, **305**, 308-314 (2007).
- 7) N. Kumano, T. Seki, M. Ishii, H. Nakamura, Y. Takeoka: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 4012-4015 (2011).
- 8) V. Saranathan, C. O. Osuji, S. G. Mochrie, H. Noh, S. Narayanan, A. Sandy, E. R. Dufresne, R. O. Prum: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 11676-11681 (2010).
- 9) V. Saranathan, J. D. Forster, H. Noh, S. F. Liew, S. G. Mochrie, H. Cao, E. R. Dufresne, R. O. Prum: *J. R. Soc. Interface*, **9**, 2563-2580 (2012).
- 10) R. S. Werbowyj, D. G. Gray: *Macromolecules*, **17**, 1512-1520 (1984).
- 11) T. Kuroiwa, T. Saito, A. Kanazawa: Abstract of Asian International Symposium -Materials Chemistry-, The 92nd Annual Meeting of Chemical Society of Japan, No. 2F4-36 (2012).
- 12) 黒岩崇, 勝又ひかり, 市川創作, 金澤昭彦: 日本膜学会第35年会講演要旨集, p. 117 (2013).
- 13) 高分子学会編: 『新高分子実験学第6巻 高分子の構造(2)散乱実験と形態観察』, 共立出版, pp. 229-233 (1997).
- 14) 木下修一: 『生物ナノフォトニクス—構造色入門—』, 朝倉書店(2010).

# 特異的に生体コラーゲンに結合するペプチドの分子設計・合成と応用

早稲田大学先進理工学部化学・生命化学科

小出 隆規

Many collagen-binding peptides have been reported to date. However, most of them seem to be below a practical level. Some do not possess enough affinity to detect collagen, and the others show little binding-specificity to collagen. We report here novel collagen-binding peptides that hybridize to denatured portions of collagen. They are parallel dimers of collagen-like peptides both ends of which are tethered by covalent linkages. The peptides, named cyclic collagen-mimetic peptides (cCMPs), showed approximately two orders of magnitude higher collagen-binding affinity than single-chain counterparts reported by Yu and co-workers. The collagen-detecting sensitivity of cCMPs was comparable to commercially available anti-collagen polyclonal antibodies in western blotting, and fluorescent staining of cultured cells. No collagen type selectivity was found, and the peptide recognized all types of collagen tested. In contrast, the peptides showed strong preference to denatured collagen. The results strongly support the common hybridizing mechanism targeting unfolding strands of collagen triple helix. Molecular dynamic simulations of the hybridized products suggested that the cCMP-collagen hybrid has higher stability than that of the corresponding hybrid with single-chain CMP. Some diseases such as osteoporosis and malignant cancer are suggested to be accompanied by collagen denaturation and/or degradation. It is also suggested that inflammation and mechanical stress also induce collagen denaturation. We expect practical applications of cCMPs to detecting conformational status of collagen *in vivo*.

## 1. 緒言

コラーゲンは動物体内のいたるところに豊富に存在するタンパク質である。コラーゲンに特異的に結合する分子は、生体内でのコラーゲンの検出や描出あるいは、薬物をコラーゲンリッチな組織に停留させるといった目的で有用であると期待されている。これまでに多くのコラーゲン結合ペプチドが様々なソースから探索されてきたが、実用に耐える特異性あるいは親和性を有するものはほとんどなかった。その中で、Yu (ユタ大学) らのグループは、Gly-Pro-Hyp (Hyp: 4-ヒドロキシプロリン)の繰り返し構造を持つ、典型的なコラーゲンモデルペプチド (CMP) が、変性コラーゲンに結合することを見出し、これを上記のような用途に利用しようとする研究を展開している。CMPはコラーゲンの三重らせん構造がほどけた部位を認識し、ハイブリッド三重らせんを形成することで結合すると考えられている (図1a)。彼らはこのCMPを用いて、周辺でコラーゲンの分解が亢進していると考えられている悪性腫瘍を埋め込んだマウスの *in vivo* 蛍光イメージングに成功している<sup>1)</sup>。また彼らは、マウスの尾の腱を引っ張ることによって腱のコラーゲンが変性することを定性的に評価することに成功している<sup>2)</sup>。しかしながら、CMPは、古くからコラーゲン

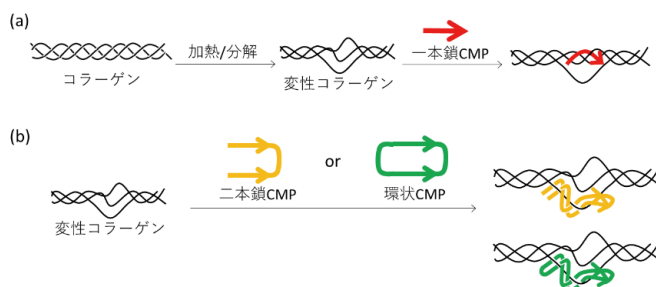


図1 CMPの変性コラーゲン結合モデル  
a) 一本鎖、b) 二本鎖および環状CMP

モデルとして利用されてきたことからわかるとおり、水溶液中で容易に自己集合して、三重らせんを形成してしまう。そして、一旦三重らせんを形成したCMPは、コラーゲン結合能を失うという問題点がある。

今回私たちはコラーゲン結合ペプチドとしてのCMPの能力を格段に向上させることを目的として、CMPを二本平行に束ねた二本鎖CMPを設計した。一本鎖のCMPは変性コラーゲン中の二本のポリペプチド鎖と三重らせんを形成する (1+2 hybrid) と考えられる。その一方で二本鎖CMPは変性コラーゲンの一本のポリペプチド鎖と三重らせんを形成する (2+1 hybrid) と期待できる (図1b)。私たちは三重らせん分子内部のペプチド間を共有結合で架橋させると三重らせん構造が安定化する<sup>3-6)</sup> ことから、2+1 hybridの方が1+2 hybridよりも安定であり、結果として二本鎖CMPは一本鎖CMPよりも高い結合能を持つと考えた。また、二本鎖CMPのもう片方の末端も束ねた環状CMPも同時に合成し、これらのコラーゲン結合能を評価した。



Molecular design, synthesis and application of the peptides that specifically recognize collagen

Takaki Koide

Department of Chemistry and Biochemistry,  
School of Advanced Science and Engineering,  
Waseda University

## 2. 方法

### 2.1. 環状CMPの合成

ペプチド鎖はFmoc固相法を用いて構築した。C末端側にチロシン残基を導入し、ペプチド溶液の濃度を吸光度から求められるようにした<sup>7)</sup>。枝分かれ部分にはFmoc-Lys (Fmoc)-OHを用い、ペプチドを二本に分岐させた。分岐部分のスペーサーとして6-アミノヘキサン酸 (Ahx) を導入した。コラーゲン様配列としては三重らせんモデルして最も典型的なPro-Hyp-Glyを採用し、トリペプチドの繰り返し数が4回ものから7回ものまでを合成した。また、N末端側にCys (Acm) 基を導入し、ジスルフィド結合を用いて環化できるようにした。N末端はピリジンと無水酢酸を用いてアセチル化した。ペプチド鎖は脱保護カクテル (TFA : H<sub>2</sub>O : *m*-cresol : thioanisole : ethanedithiol = 82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5, v/v) を用いて脱保護すると同時に樹脂から切り離した。

二本鎖ペプチドは6Mグアニジン塩酸塩下においてヨウ素で処理することによりジスルフィド結合を形成させることで環化した。得られた粗ペプチドは、逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて精製した。環状CMPは検出のため、ビオチンまたはフルオレセインを標識した。

### 2.2. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によるコラーゲン結合能の評価

コラーゲン溶液 (AteloCell I-PC, 高研) を10mM酢酸水を用いて10 $\mu$ g/mLに希釈し、溶液を95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱処理を加えたもの(変性コラーゲン溶液)と、加えてないもの(コラーゲン溶液)の二種類を用意した。96-well plateにこれらの溶液を50 $\mu$ Lずつ添加し、2日間放置することでそれぞれをコートした。0.5%スキムミルク溶液を用いてブロッキング処理を施した後、5 $\mu$ g/mLに調整したビオチン標識環状CMP溶液を添加した。その際、CMP溶液を使用直前に95 $^{\circ}$ Cで5分間処理し4 $^{\circ}$ Cで1分間冷却したものと、加熱処理を施さないものの2種類を用いた。西洋わさびペルオキシダーゼを結合させたストレプトアビジンをさらに結合させたのち、ABTSと反応させて発色させ、405nm

における吸光度を測定することでコラーゲン結合能を評価した。

### 2.3. 環状CMPを用いたコラーゲンの検出(western blotting)

コラーゲン検出能の比較においては、サンプルとしてI型コラーゲンを用いた。I-V型コラーゲンの検出においては、300ngのI-V型コラーゲンに対してタンパク質分子量マーカーを混合したものをを用いた。これらサンプルを8% SDS-PAGEにより分離したのち、ニトロセルロース膜上に転写した。その後5%スキムミルク溶液を用いてブロッキングし、20 $\mu$ g/mLのビオチン標識環状CMP7、一本鎖CMP溶液または抗コラーゲン抗体を添加し、室温で1時間放置した。環状CMP7および一本鎖CMPは使用直前に95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。続いてCMPを添加したものに対してはビオチン-ストレプトアビジン相互作用を用いてalkaline phosphatase (AP) を標識し、抗体を添加したのものに対してはgoat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody-AP conjugatesを添加して30分間結合させた。続いてAP-conjugate substitute kit (BioRad) を用いてバンドを検出した。また、コラーゲンを転写したニトロセルロース膜は同時に、CBB溶液を用いて染色した。

### 2.4. コラーゲンの蛍光染色

マウス線維芽細胞(MEFs)はL-グルタミン酸、フェノールレッド含有DMEM (low-glucose) に2% FBS、100units/mLペニシリン-ストレプトマイシンおよび200 $\mu$ M L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩を添加した培地で3日間培養したものをを用いた。

線維芽細胞が分泌したコラーゲンの検出に際し、コラーゲンの変性を目的として95 $^{\circ}$ Cに加熱したPBSを添加した。細胞は4% パラホルムアルデヒドで15分間処理することで固定し、3% BSA溶液で1時間処理することでブロッキングした。その後、蛍光標識した一本鎖CMP、環状CMP7を95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し氷上で1分間冷却したもの、または抗I型コラーゲン抗体を添加し1時間室温で結合させた。抗体を添加した細胞に関してはさらに、goat anti-rabbit

表1 合成したCMPの構造

名称	構造	n
一本鎖	Ac-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx-Tyr-Lys-NH <sub>2</sub>	10
二本鎖CMP 4		4
二本鎖CMP 5	Ac-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx \	5
二本鎖CMP 6	Ac-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx-Lys-Tyr-Lys- NH <sub>2</sub>	6
二本鎖CMP 7		7
環状CMP 4		4
環状CMP 5	Ac-Cys-Ahx-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx \	5
環状CMP 6	Ac-Cys-Ahx-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx-Lys-Tyr-Lys- NH <sub>2</sub>	6
環状CMP 7		7

IgG (H+L) secondary antibody-FITC conjugates を 30 分間結合させた。細胞は共焦点顕微鏡で観察した。

細胞内のコラーゲンの染色に際しては、細胞を固定した後に 0.5% Triton X-100 で 5 分間透過処理を施し、上記の方法でブロッキング処理を施した。その後蛍光標識した環状 CMP7 および抗コラーゲン抗体 (ラビット) を anti-GM130 (Mouse) antibody (ゴルジ体マーカー)、または anti-KDEL (Mouse) antibody (小胞体マーカー) 存在下で上記の方法で添加し、1 時間結合させた。続いて細胞に goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody-FITC conjugates および goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 conjugates を添加し、30 分結合させた。細胞は共焦点顕微鏡で観察した。

### 3. 結果

#### 3.1. 環状 CMP7 は変性コラーゲンに対して強い結合能を示す

水溶液中 4℃ で保存しておいたビオチン標識 CMP の I 型コラーゲンに対する結合能を ELISA により評価したところ、これらはほとんどコラーゲンに結合しなかった (図 2a)。そこで一本鎖 CMP に関する先行研究<sup>1)</sup>を参考に CMP 溶液を使用直前に加熱変性させたところ、CMP のコラーゲンに対する有意な結合が検出された (図 2b)。3 種の分子デザイン中では環状 CMP がもっとも結合能が高く、CMP 内部の Pro-Hyp-Gly 繰り返し数が多いほど顕著な結合能を示した。また、これら CMP はコラーゲンよりも変性コラーゲンに強く結合した。この結果は CMP が変性コ

ラーゲンの三重らせん構造がほどけた部分に結合していることを示唆している。さらに環状 CMP7 と一本鎖は、コラーゲンに対して濃度依存的な結合を示した (図 2c)。この結果から環状 CMP7 のコラーゲンおよび変性コラーゲンに対する解離定数 ( $K_D$ ) を算出したところ、変性コラーゲンに対して  $6.6 \times 10^{-8} \text{M}$ 、コラーゲンに対して  $1.1 \times 10^{-7} \text{M}$  と求められた。また、一本鎖 CMP は最大結合量が環状 CMP7 と同じだと仮定することで、変性コラーゲンに対して  $9.5 \times 10^{-6} \text{M}$  と算出されたが、コラーゲンに対しては求めることができなかった。これらの結果から環状 CMP7 は既報の一本鎖 CMP よりも 100 倍以上結合能が高いことが示された。

これらの CMP の 4℃ における二次構造を円偏光二色性 (CD) スペクトル分析したところ、225 nm における正のコットン効果が観測された<sup>8)</sup>。この結果から CMP は 4℃ において自己集合して三重らせん構造を形成していると考えられ、図 2a と合わせて考えると自己集合産物はコラーゲン結合能をもたないことが示唆された。よって以降の実験では CMP 溶液を使用直前に加熱してペプチド同士の自己集合を解消させてから使用した。

#### 3.2. 環状 CMP7 は western blotting でコラーゲンを検出することができる

環状 CMP7、一本鎖 CMP および市販の抗コラーゲン抗体を用いて、I 型コラーゲンの検出感度を western blotting で比較した (図 3a)。結果環状 CMP7 は一本鎖よりも高い検出感度を示し、30 ng を泳動したコラーゲンの  $\alpha 1$  鎖と

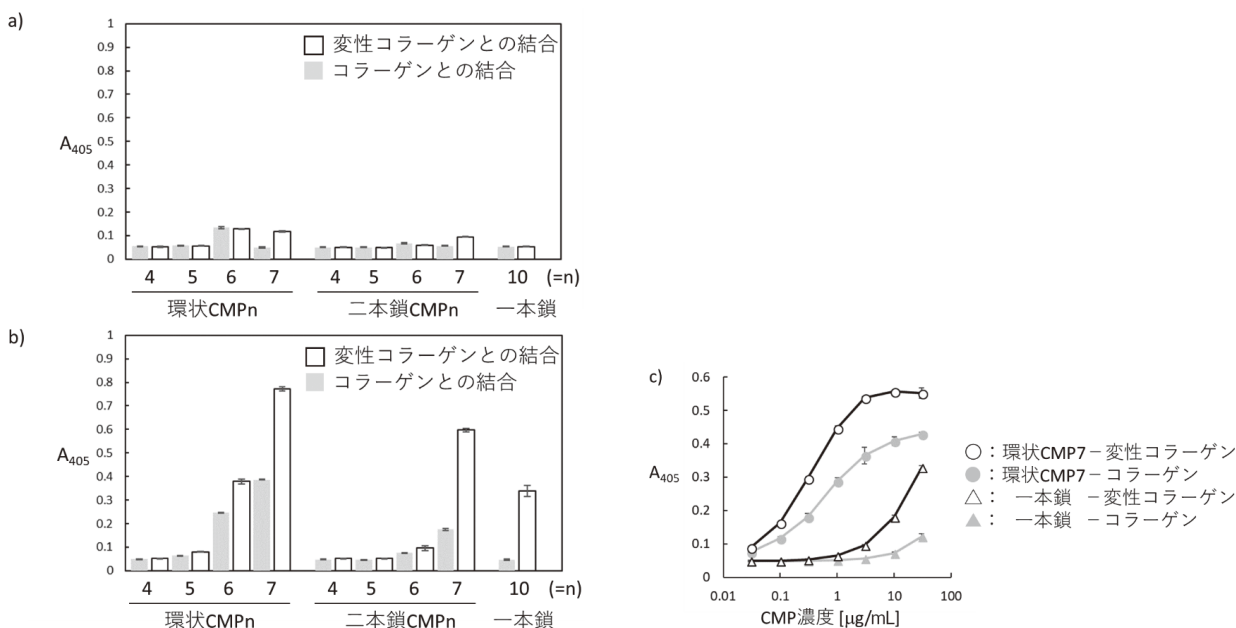


図 2 4℃ における CMP のコラーゲン結合能評価 (mean ± SD, n=3)  
 a) CMP 溶液非加熱、b) CMP 溶液を使用直前に 95℃ で 5 分間加熱、c) 環状 CMP7 と一本鎖の濃度依存的な結合

$\alpha 2$ 鎖をとともに見出し、 $\alpha 1$ 鎖に関しては10ngまで見だされた。これは推奨濃度(1/1000倍希釈)の抗コラーゲン抗体よりも高い見だ感度であり、1/200濃度の抗コラーゲン抗体に匹敵した。また、環状CMP7は分子量マーカーとコラーゲンの混合溶液中からI-V型のコラーゲンを特異的に見出した(図3b)。この結果は環状CMP7がコラーゲン型間に共通するグリシンが三残基ごとに繰り返すアミノ酸配列を認識して結合していることを強く示唆している。

### 3.3. 環状CMP7は線維芽細胞が分泌したコラーゲンを検出することができる

蛍光標識した環状CMP7と一本鎖CMPを用いて線維芽細胞が分泌したコラーゲンの見だを試みた。その際、分泌されたコラーゲンを熱変性させることを目的として、細胞固定処理前に95℃に加熱したPBSを添加したサンプルを用意した。結果として30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の環状CMP7は、熱変性した場合のみコラーゲン線維を強く見だし、その見だ感度はCMP濃度依存적であった(図4a)。それに対して、

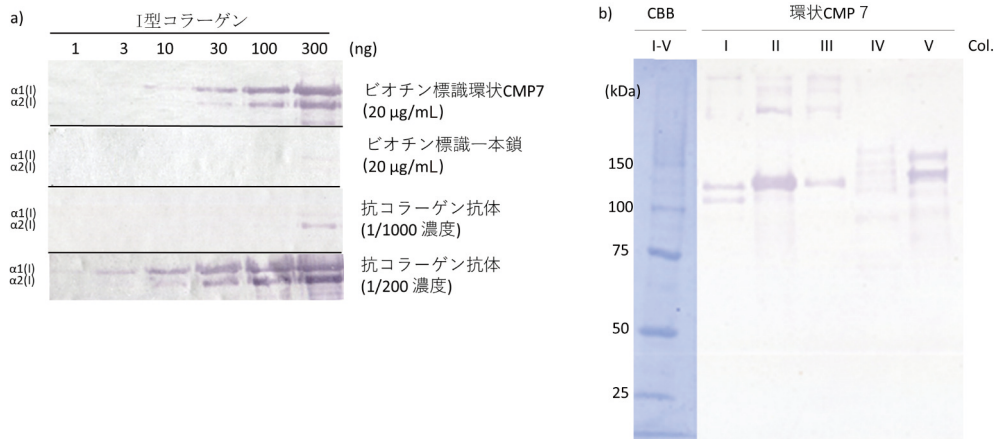


図3 環状CMP7を用いたコラーゲンの見だ

a) 環状CMP7、一本鎖、抗コラーゲン抗体の、コラーゲン見だ感度の比較; b) 環状CMP7を用いたI-V型コラーゲンの見だ

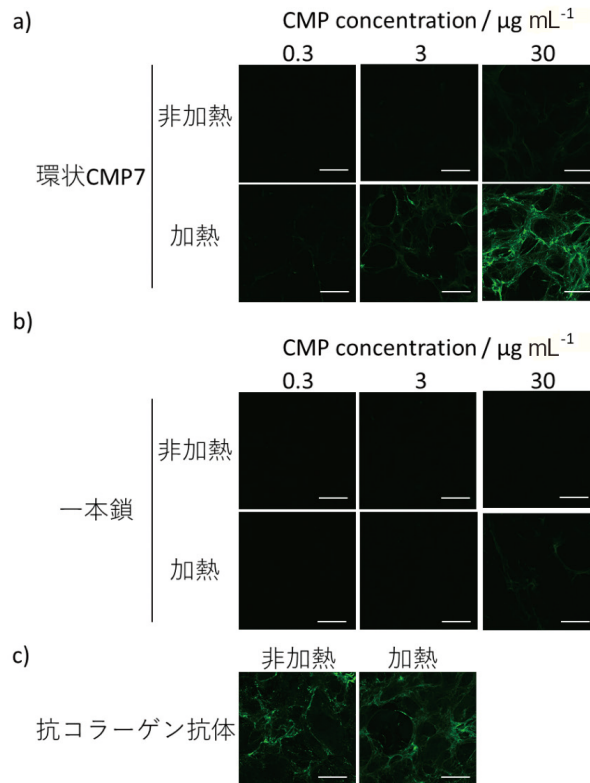


図4 線維芽細胞が分泌したコラーゲンの見だ (scale bar: 50 $\mu\text{m}$ )  
a) 環状CMP7、b) 一本鎖CMP、c) 抗コラーゲン抗体

30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の一本鎖CMPは同濃度環状CMP7の1/100程度のシグナルしか観測されなかった (図4b)。この結果は *in vitro* で環状CMP7は一本鎖CMPよりも100倍程度変性コラーゲンの検出能が高いことを示している。また、抗コラーゲン抗体は熱変性の有無に関わらずコラーゲン線維を検出した (図4c)。以上の結果から環状CMP7は変性したコラーゲンを高感度で描出できることが示された。

### 3. 4. 環状CMP7を用いて線維芽細胞の小胞体に存在するプロコラーゲンのフォールディング中間体を検出することができる

フルオレセイン標識した環状CMP7と抗コラーゲン抗体を用いて、細胞固定処理および透過処理を施した線維芽細胞内部のプロコラーゲンの検出を試みた。図5aに示したように、環状CMP7で検出した際のシグナルは抗KDEL抗体が検出した小胞体のシグナルと重なった。一方、抗コラーゲン抗体で検出した際は抗GM130抗体が検出したゴルジ体のシグナルと重なった (図5b)。この結果は、環状CMP7が抗コラーゲン抗体と異なる特異性をもってプ

ロコラーゲンを認識していることを示している。また、プロコラーゲンが小胞体内部で三重らせんにフォールディングされ、その後ゴルジ体に輸送されることを踏まえると<sup>10)</sup>、環状CMP7は、抗体では検出することが難しい小胞体内部の三重らせん中間体の特異的に検出したと考えられる。

### 3. 5. 環状CMPとコラーゲンのハイブリッド三重らせんは、一本鎖CMPとコラーゲンのそれらよりも安定である

環状CMPが、一本鎖CMPよりもなぜ高い変性コラーゲン結合能を示すのかを調べるために、Ac-(Pro-Hyp-Gly)<sub>7</sub>-OH (一本鎖CMP7) と環状CMP7、二本鎖CMP7または一本鎖CMP7の複合三重らせんをモデル化した。そしてこれらのモデルが三重らせんを形成している場合とほどけている場合のエネルギー差 ( $\Delta G_{\text{bind}}$  score) を、分子動力学 (MD) を用いて *in silico* で求めることで、それぞれのCMPの結合エネルギーを評価した。結果として環状CMP7の  $\Delta G_{\text{bind}}$  scoreは3つのモデルの中で最も小さかった ( $\Delta G_{\text{bind}}$  (環状CMP7) :  $-147.43 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{\text{bind}}$  (二本鎖CMP7) :

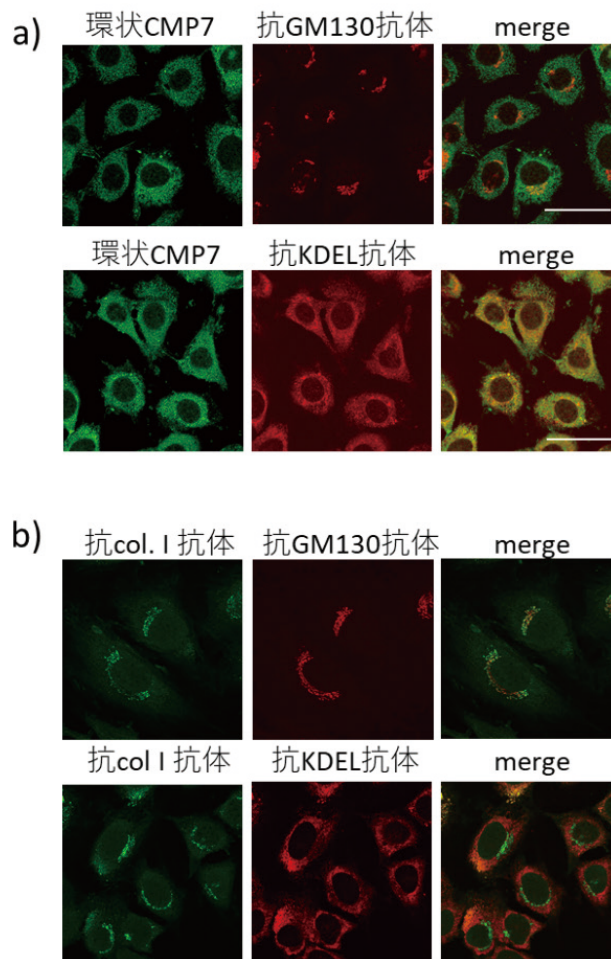


図5 線維芽細胞内部のプロコラーゲンの検出  
a) 環状CMP7、b) 抗コラーゲン抗体

$-138.90 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{\text{bind}}$  (一本鎖CMP7) :  $-128.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ )。これは環状CMPが、当初の期待どおり、他の2つのCMPよりも安定な三重らせんハイブリッドを形成することを示唆している。

#### 4. 総括

私たちは、コラーゲンに特徴的な Gly-Pro-Hyp 繰り返し配列を持つペプチドを二本平行に束ねて環化することで、変性コラーゲンに対して特に高い結合能を持つ新規化合物を開発した。その結合能はELISAとwestern blottingにより既報の一本鎖CMPよりも100倍程度高いことが示された。このペプチドを用いて、western blottingではI-V型までの全てのコラーゲンを検出できることから、環状CMPの認識配列はコラーゲンに共通の Gly-Xaa-Yaa の繰り返し配列であることが示唆された。環状CMPは細胞が分泌したコラーゲンの蛍光染色にも利用できることが示され、抗コラーゲン抗体では評価することができなかったコラーゲンの三重らせん変性の度合いを検出できる可能性が示された。また、環状ペプチドは抗コラーゲン抗体では検出することが難しい小胞体内部のプロコラーゲンを検出することができた。さらにMD計算により、環状CMPは他の2種類のCMPよりも安定なコラーゲン複合体を形成することが示された。これらの結果から環状ペプチドは*in vitro*で変性コラーゲンを検出できる有用な化合物であることが示されたと考える。また、ペプチドの内部配列を最適化することでコラーゲンの型特異性などを付与できる可能性がある。

今回我々が開発した新規ペプチドは、生体中のコラーゲンの蛍光イメージングや薬物のターゲッティングに応用できることが期待され、今後実験動物を用いた*in vivo*での検討を進めていく予定である。

#### 謝辞

本研究の遂行に協力いただいた瀧田講(早稲田大学)、藤井一徳(同)、増田亮(同)、門之園 哲哉(東京工業大学)の各氏に感謝する。また、本研究は公益財団法人コスメトロジー研究振興財団からの援助を得て実施された。

#### (引用文献)

- 1) Y. Li, C. A. Foss, D. D. Summerfield, J. J. Doyle, C. M. Torok, H. C. Dietz, M. G. Pomper, S. M. Yu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *109*, 14767-14772, 2012
- 2) J. L. Zitnay, Y. Li, Q. Zhao, B. H. San, B. Depalle, S. P. Reese, M. J. Buehler, S. M. Yu, J. A. Weiss, *Nature Communications*, *8*, 14913, 2017
- 3) G. Melacini, Y. Feng, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.*, *118*, 10339-10364, 1996
- 4) J. C. Horng, A. J. Hawk, Q. Zhao, E. S. Benedict, S. D. Burke, R. T. Raines, *Org. Lett.*, *8*, 4735-4738, 2006
- 5) I. C. Tanrikulu, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, *136*, 13490-13493, 2014
- 6) N. B. Hentzen, L. E. J. Smeenk, J. Witek, S. Riniker, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.*, *139*, 12815-12820, 2017
- 7) C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, *Protein Sci.*, *4*, 2411-2423, 1995
- 8) C. G. Long, E. Braswell, D. Zhu, J. Apigo, J. Baum, B. Brodsky, *Biochemistry*, *32*, 11688-11695, 1993
- 9) A. Miki, S. Inada, T. Baba, K. Kihira, H. Fukada, M. Oda, *Biosci. Biotech. Biochem.*, *79*, 1603-1607, 2015
- 10) S. Ito, K. Nagata, *Sem. Cell Dev. Biol.*, *62*, 142-151, 2017

# 低刺激性生体接着材料の開発とその化粧品への応用

新山手病院 臨床医用工学研究室

小山 義之

Skin-adhesive materials are expected to be applied to cosmetics such as nose packs or face masks. We have developed a novel biotissue-adhesive polymer complex consisting of poly(acrylic acid) (PAA) and poly(vinylpyrrolidone) (PVP). These polymers are both highly safe synthetic polymers approved as food, drug, and cosmetic excipients. When these polymers are directly mixed in a solution, they form a hydrophobic rigid complex, which does not adhere to tissues. Recently, we succeeded in preparation of a biotissue-adhesive PAA/PVP complex by a solid/solution interface mixing method. When a PAA film prepared on a plate was immersed in a PVP solution, it formed a highly swollen complex with PVP. The swollen PAA/PVP complex gel was dried up to a transparent film, which could be swollen again in water to form a soft bio-adhesive hydrogel.

Those two polymers are linked through hydrogen-bonding to each other, and neutralizing of the carboxyl groups of PAA molecule induces dissociation of the polymers. Thus, if the PAA/PVP complex film was put in a neutral buffer, it soon swelled and then slowly re-dissolved into a clear solution. The swelling and re-dissolving behavior of the PAA/PVP complex much depended on the molecular weight and crosslinking density of the polymers. The PAA/PVP mixing ratio affected the tissue-adhesion strength and mechanical strength of the water-swollen complexes. Complexes with higher content of PAA showed higher adhesion strength, while those made of an equal unit mol of PAA and PVP exhibited the highest mechanical strength.

PAA/PVP complex adhered to wet skin, and after dried up, it could be peeled off without stimulation. It could remove a large amount of blackheads from the skin, showing the high potential of the skin-adhesive complexes as low-stimulus facial- or nose-masks.

## 1. 緒言

生体接着性の高分子材料は、局所止血材、術後癒着の防止材などの医療機器だけでなく、美容パック、化粧クリームのカバーシート材など、化粧用材料としても幅広い応用が期待される<sup>1,2)</sup>。皮膚や粘膜に接着性のある合成高分子材料として、ポリアクリル酸 (PAA) が古くから知られている<sup>3)</sup>。しかし、基材原料としてPAAをそのままでは使用するには、本ポリマーが水溶性であるためその利用は限定される。そこでPAAを橋掛けして水に不溶化したものが各種開発され、粘膜接着性の薬物徐放担体などとしてそのDDSへの応用が広く研究されてきた。しかし、化学的に橋掛けしたゲルは成形性が悪く、また生分解性などに問題があり、実用化はされていない。

そこで我々は、PAAとポリビニルピロリドン (PVP) からなる複合体ゲルに注目した。PAAがPVPと水に不溶な水素結合錯体を形成することは古くから知られている<sup>4)</sup>。生体に直接接触する化粧品材料は生体適合性が良く、生体安全性が高いことが必須であるが、PAAとPVPは、どち

りも医薬品、食品、化粧品添加剤として認可され長く使用されている安全性の高い水溶性高分子である。これらを用いて生体接着性の高分子基材ができれば、有機溶媒などを用いることなく肌にやさしく接着するパッチ、マスク、パック、カバーシートなどの材料が得られると期待される。

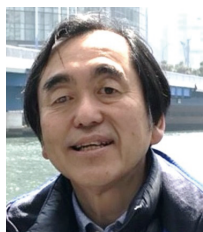
しかし、PAAとPVPは、通常の条件下で溶液中で混合すると、すぐに水に不溶な疎水性複合体となり、生体接着性は失われてしまう。一方我々は、複合体の疎水化の機構を検討し、固体/液体界面での混合によって生体接着性を持った膨潤性PAA/PVP複合体を得る方法を開発した<sup>5)</sup>。

本研究では、固体/液体界面におけるPAA/PVP複合体の形成挙動、並びに得られる複合体の膨潤、生体接着機能を詳しく調べ、このような接着性水和ゲルの化粧品用品への応用について検討した。

## 2. 方法

### 2.1. 生体接着性PAA/PVP複合体の調製

様々な分子量のPAAをエタノールに溶解し、トレー、または細胞培養プレートに入れ、乾燥させてPAAフィルムを得た。続いて様々な分子量のPVPの水溶液を加えて、PAAの膨潤挙動、および生成したPAA/PVP複合体水和ゲルの濁度の経時変化を調べた。膨潤後、水和ゲルを風乾して透明なフィルム状のPAA/PVP複合体を調製した。また、膨潤したゲルを凍結乾燥することで、白色スポンジ状の複合体を調製した。



Development of novel low-stimulus bio-adhesive materials and their application to cosmetics

Yoshiyuki Koyama

Japan Anti-tuberculosis Association Shin-Yamanote Hospital Clinical Medical-Engineering Laboratory

## 2. 2. PAA/PVP 複合体フィルムの膨潤挙動

2. 1. で得た各フィルムを pH 4.0 または pH 7.2 の緩衝液に浸し、膨潤したゲルの重量の変化を測定した。また、ゲルの濁度を測定することで、複合体の白濁、沈殿、相分離の有無を調べた。

## 2. 3. PAA/PVP 複合体フィルムの接着強度

PAA/PVP 複合体フィルムを所定量の水で湿らせた魚肉ソーセージに接着させ、上から垂直に引き上げ、剥離に要する力を測定した。

## 2. 4. PAA/PVP 複合体スポンジのフェイス・パックへの応用

PAA/PVP 複合体スポンジを少量の水で濡らした顔の表面に接着させ、乾燥した後そっと剥がし、スポンジ表面および皮膚の状態を観察した。

## 2. 5. PAA/PVP 複合体スポンジの化粧クリームカバーシートへの応用

目元に薬用化粧クリームを塗った後、周囲の皮膚を少量の水で濡らして上から PAA/PVP 複合体スポンジを貼り付

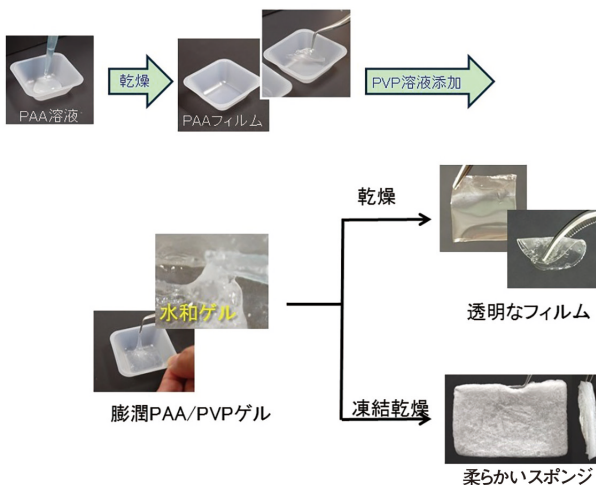
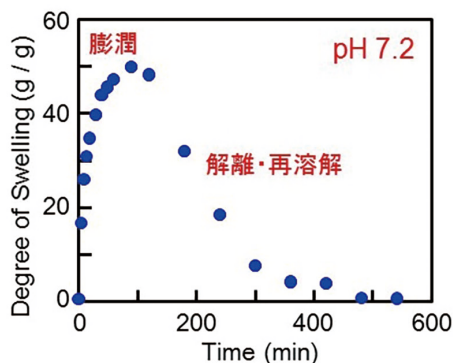


図1 固/液界面混合法による生体接着性PAA/PVP複合体の調製



けた。一晩放置後そっと剥がし、クリーム、皮膚の状態を観察した。

## 3. 結果

### 3. 1. 生体接着性PAA/PVP複合体の調製

初めにPAAとPVPの各水溶液をそのまま混合してみた。すると、両ポリマーは直ちに結合して白濁し、間もなく沈殿した。得られたのは水に溶解も膨潤もしない疎水性の沈殿であり、組織接着性も示さなかった。

一方、PAA溶液を乾燥させ、フィルム状態にした後にPVP水溶液を加えて固/液界面で両ポリマーを接触させたところ、PAAフィルムは徐々に膨潤しながら柔軟な水和ゲル状の複合体を形成した。比較的低分子量(40,000)のPVPを用いた場合にはゲルは次第に白濁し、ゆっくりと沈殿したが、高分子量(360,000)のPVPを加えて得られたゲルは長時間安定で、24時間以上経過しても沈殿、白濁は見られなかった。

得られた水和ゲルは加熱乾燥させると透明なフィルムとなり、また、凍結乾燥すると白色の柔らかなスポンジ状となった(図1)。

### 3. 2. PAA/PVP 複合体フィルムの膨潤・再溶解挙動

上で得られた乾燥フィルムやスポンジは、水を加えると再び高度に膨潤して水和ゲルを形成した。その緩衝液中での膨潤挙動はpHによって大きく変化した。複合体フィルムを pH 7.2 の中性緩衝液に浸すと速やかに膨潤し始め、間もなく透明な柔らかい水和ゲルとなった。その後、ゆっくりと重量が減少し始め、10時間後には完全に溶解して消失した。一方、pH 5 の弱酸性緩衝液中では、フィルムは膨潤したのち、そのまま溶解せずに水和ゲルのままで長時間安定に存在した(図2)。

### 3. 3. PAA/PVP 複合体の接着強度

PAA/PVP 複合体のフィルムやスポンジを湿らせた鳥の皮や豚肉、魚肉ソーセージなどに貼付すると、水分を吸収

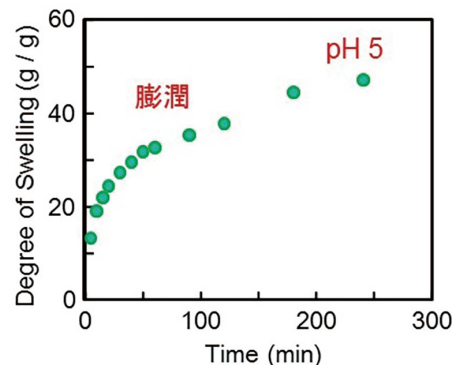


図2 PAA/PVP 複合体フィルムの中性、および弱酸性水溶液中での膨潤・再溶解挙動

して急速にゲル化しながら貼付部位に強固に接着した(図3)。同様の接着は、ヒト表皮、口腔粘膜においても観察された。

PAA/PVP複合体フィルム、またはスポンジを魚肉ソーセージに接着させ、剥離に要する力を測定したところ、その接着力は組織表面の濡れ具合に大きく依存し、適度な水分量のもとでは70~100 g/cm<sup>2</sup>の非常に高い接着力を示した。

### 3.4. PAA/PVP複合体スポンジのフェイス・パックへの応用

少量の水で膨潤したPAA/PVP複合体は、上述のように非常に強固に皮膚などの生体組織に接着するが、乾燥後は端から持ち上げると、ほとんど刺激なく剥がすことができた。そこで、鼻の周辺の皮膚を濡らした後、PAA/PVP複合体スポンジを貼り付け、乾燥後に剥がしてスポンジ表面、および皮膚の状態を顕微鏡で観察した。

剥離したPAA/PVPスポンジの表面には細かな毛や黒ずみが見られ、美容パックとしての高い効果が確認された(図4)。剥離時の皮膚への刺激は小さく、発赤などは全く見られなかった。

### 3.5. PAA/PVP複合体スポンジの化粧クリームカバーシートへの応用

化粧クリームを塗った皮膚の周りを少量の水で濡らして、PAA/PVP複合体スポンジで上からカバーしてそのまま就寝した。PAA/PVP複合体スポンジは翌朝も貼った位置に留まっており、寝間着、枕、寝具へのクリームによる汚染は全くなかった。長時間接着していたにも関わらず、剥離時の皮膚への刺激は小さかった。また接着部位の発赤などは見られなかった。

さらに、PAA/PVPスポンジの上に防水テープを貼り付

け、水の蒸発を遅くしたものについても同様にテストした。防水テープを貼った複合体は翌朝もまだ水分を保持しており、柔軟な水和ゲルの状態を保っていた。痒みなどの副作用はなく、また長時間水和したゲルに接触し続けた皮膚にも発赤などの異常は観察されなかった。

## 4. 考察

### 4.1. 生体接着性PAA/PVP複合体

前述のように、PAAとPVPの各水溶液をそのまま混合しても組織接着性の複合体は得られない。PAAとPVPとの複合体形成はエントロピー変化がプラスであり、疎水結合の関与が報告されている<sup>6)</sup>。溶液状態の高分子を混合すると、両ポリマー分子が自由に動けるためにジッパー構造の結合体を形成し、さらに主鎖同士が強固に疎水結合して、水に溶けない、膨潤もしない沈殿ができたものと思われる。

そこで、PAA溶液を一旦乾燥させ、フィルム状の固体にしたのちにPVP水溶液を加えることで、ポリマーの自由なセグメント運動を抑制し、ジッパー状の主鎖の整列を阻害しながら複合体ゲルを形成させることを試みた。すると期待通り、フィルムは徐々に膨潤しながら柔軟な水和ゲルを形成した。比較的高分子量のPVPから得られた水和ゲルは、長時間放置しても沈殿・懸濁することなく透明な状態を安定に維持した。長いPVPの主鎖が深く絡み合うことで、ポリマー分子の再配列によるジッパーの構築を阻害したものと思われる。得られた水和ゲルは加熱乾燥させると透明なフィルムとなり、また、凍結乾燥すると柔らかなスポンジが得られた。

これらの固/液界面で得られたPAA/PVP複合体フィルム、およびスポンジは、水を加えると再び高度に膨潤して水和ゲルを形成した。そこでこれらの複合体の中性、および弱酸性緩衝水溶液中での挙動を詳しく調べてみた。PAA/PVPフィルムをpH7.2の緩衝液に浸すと、フィルム

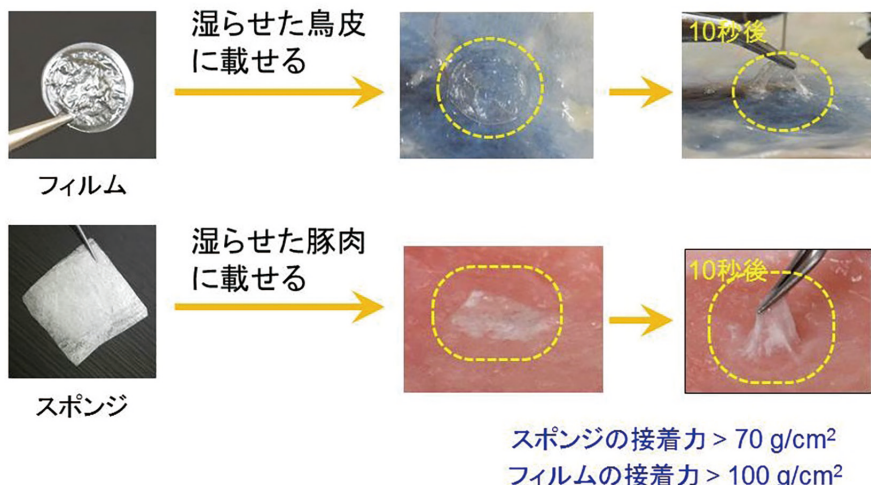


図3 PAA/PVP複合体の生体接着性



図4 PAA/PVP複合体パックで取れた毛、黒ずみ

は瞬時に吸水して膨潤し、水和ゲルを形成した。複合体は、その後しばらく膨潤を続けたが、同時に表面からゆっくりと溶解を始め、数時間後には完全に再溶解して消失した。

PAAとPVPの高分子複合体は、PAA側鎖のカルボキシル基がPVP側鎖のピロリドニル基と水素結合することにより形成される。PAA/PVP複合体を中性緩衝液に浸した直後は、吸収した液が少量であるため、カルボキシル基が持つ酸性によってゲルの内部は弱酸性に保たれ、PAAとPVPは結合した状態を維持している。その後、ゲルの周囲から浸入してくるイオンによってカルボキシル基はゆっくりと中和され、水素結合ができなくなり、しだいにPAAとPVPとの結合が解離していく。その結果、PAA/PVPゲルは中性緩衝液中ではゆっくりと解離して、元の水溶性高分子にもどって溶解し、透明な溶液になったものと思われる(図5)。

この機構を証明するために、PAA/PVP複合体をpH5の弱酸性緩衝溶液に入れ、その挙動を観察した。すると、予想通り酸性緩衝溶液中ではフィルムは一方的に膨潤し続け、高度に膨潤した水和ゲルのままで長時間安定に存在した。弱酸性の条件下であるため、膨潤後もカルボキシル基が中和されることなくピロリドニル基と水素結合し続けたためと考えられる。

溶液混合で得られたPAA/PVP複合体は上述のように生体組織への接着性は示さない。組織接着性はカルボキシル基の持つ生体成分との結合力による。PAAとPVPを通常の溶液混合した場合には、両ポリマーがジッパー状に整列し、カルボキシル基がPVPとの水素結合でほとんど消費されているために、生体接着性はなくなったものと思われる。一方、固/液界面で作成された膨潤性PAA/PVP複合体では、両ポリマーが整列していないために非結合状態のカルボキシル基が多く残り、生体組織への接着性を維持したと考えられる。

乾燥した膨潤性PAA/PVP複合体を湿った鳥皮、豚肉などの表面にあて、その接着力を調べた。その結果、接着力は組織表面の濡れ具合に大きく依存し、適度な水分量のもとでは70～100 g/cm<sup>2</sup>の非常に高い値を示した。また、水分が極端に多いと接着力は著しく低下した。すなわち多量の水を加えることで接着性をなくすことができる。これは、接着が不要となった部位の生体接着性を任意にスイッ

チオフできることを意味する。口腔内や生体内に放置する材料としての応用を考えると、非常に有用な性質である。

#### 4.2. 生体接着性PAA/PVP複合体の化粧品材料への応用

膨潤性PAA/PVP複合体は、有機溶媒や油性の粘着材を使用せず、水だけで柔らかなゼリー状となって皮膚表面にしっかりと接着する。またその素材は安全な合成高分子、ポリアクリル酸とポリビニルピロリドンである。これらの高分子は、どちらもその皮膚へ刺激性、毒性がほとんどないことが報告されている。さらに複合体の状態での安全性を確認するため、培養繊維芽細胞にPAA/PVP複合体を直接加えて、その細胞毒性を調べてみた。複合体添加三日後、生細胞の数を測定すると、何も加えていないコントロールと同じ数の細胞が生存しており、細胞毒性は全く観察されなかった。また、顕微鏡で観察すると、複合体の下にまでびっしりと細胞が増殖している様子が見られ、本研究で得られた膨潤性PAA/PVP複合体は、安全な化粧用材料として使用できることが確認された。

また、皮膚接着性材料でもう一つ問題となるのは、剥離時の皮膚刺激である。本複合体は、少量の水で膨潤して皮膚に強固に接着するが、乾燥後に端から持ち上げるように引くと、皮膚刺激がほとんどなく剥離することができた。近年鼻パックなどの美容材料が広く使用されているが、剥離時の皮膚へのダメージが懸念されている、特に、一定時間以上乾燥させると、堅くなって皮膚に無用な突っ張り感を与えたり、あるいは剥がすのがより困難になって皮膚を傷めることがある。本複合体は、接着後、あるいは乾燥後、長時間放置しても過度の接着を引き起こすことはなかった。そのため、皮膚に優しいパック材としての応用が期待された。

実際に、鼻の付近に添付して、乾燥した後剥離してみたところ、複合体の表面には多数の黒ずみが付着していた。時間を気にしないで、より安全に使用できる、新しいパック材料としての高い可能性が示唆された。

続いてこのような皮膚接着性複合体材料の、化粧クリームカバーシートへの応用について検討した。

近年、くすみや小じわなど、局所をケアするための薬用

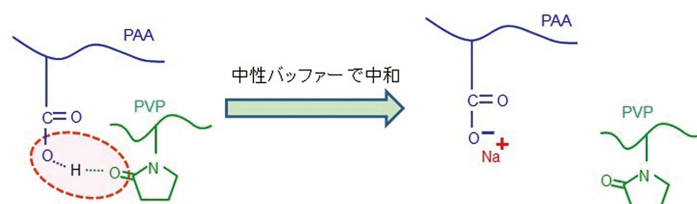


図5 中性溶液中でのPAA/PVP複合体の解離

化粧品が広く普及し、使用されている。一方、皮膚はヒトの異物侵入に対する第一バリアーであり、薬物を効率よく吸収させるのは容易ではない。しかし、過度の吸収促進剤の使用は、組織損傷の危険がある。薬用化粧品成分の効果を適切に引き出すには、適応部位に長時間接触させて、じっくりと吸収させることが必要であるが、化粧水やクリームなどは比較的短時間で乾燥してしまい、薬用成分の皮膚への浸透は小さい。

薬物を含有する水溶液、オイル、ゲルなどを皮膚と一定以上接触させる方法として、上から接着性の保護シートを貼ることが考えられる。クリームを塗った上から絆創膏のようなカバーで覆っておけば、接触時間、皮膚への浸透率は改善される。しかし、既存の皮膚接着性粘着シートは一般に有機溶剤、界面活性剤を含むため、肌への刺激が大きく、皮膚のかぶれやかゆみの原因となり、返って肌荒れの原因となる。また、ニキビ跡や小さな傷がある場合には、これらの成分が組織や神経を刺激し、炎症や痛みの原因ともなる。さらに剥離するときには、上皮の角質や皮脂などの成分をも取り去ってしまうため、肌を荒らす原因となる。特に長時間接着させると、過度の接着力が生じて皮膚へのダメージが大きくなるため、長時間のマスクングとしての使用は困難である。

有機溶媒、界面活性剤などの刺激物質を使わずに皮膚にしっかりと接着し、必要な時間経過後には刺激なく剥離できる被覆材があれば、薬用化粧品の効果を安全に大きく高めることが期待される。これらは同時に、クリームなどが衣服や寝具によってこすり取られ、またこれらを汚染することも防止する。

本研究で開発したPAA/PVP複合体は、上述のように有機溶媒を使用せず、水だけで柔らかなゼリー状となって皮膚表面にしっかりと接着する。そして、乾燥後は、ほとんど皮膚刺激なく剥離ができる。長時間放置しても過度の接着を引き起こすことはない。そのため、染み抜きクリームなどのマスク材としての応用が期待される。

長時間安定に接着すること、皮膚への刺激がないことを確認するため、就寝時に目元に化粧クリームを塗り、周囲を水で軽く濡らし、PAA/PVP複合体スポンジで上からカバーしてみた。PAA/PVP複合体スポンジは翌朝までずれずに貼った位置に留まり、寝具などへのクリームによる汚染を防止した。また、剥離時の皮膚への刺激は極めて小さかった。

化粧クリームに含まれる薬用成分が効率よく皮膚に作用するためには、クリームが乾燥するのを抑えることも必要である。そこでPAA/PVP複合体スポンジの上から防水テープなどを貼り付けて水分の蒸発を抑えたところ、乾燥速度を容易に制御することができた。防水テープをそのまま貼った場合には、12時間経過後もスポンジは水分を保持しており、柔軟な水和ゲルの状態を保っていた。一方、針で小さな穴を多数開けた防水テープを添付した場合には、スポンジはゆっくりと乾燥し、半日後には剥離が容易な状態となった。

## 5. 総括

本研究で開発した高分子複合体は、傷口に直接貼っても痛みがないほどの高い生体適合性、安全性を有しており、水を加えるだけで柔らかなゲルを生成しながら皮膚にしっかりと接着する、安全で使用の容易な皮膚接着性材料である。また、従来のパック材のように、一定時間以上乾燥させると堅くなって皮膚に無用な突っ張り感を与えたり、あるいは剥がすのがより困難になって皮膚を傷めることがないため、就寝時などにも安心して使用することができる。

このような取り扱いやすいカバーシートが容易に使用できるようになれば、従来困難とされていたしみや小じわの改善も可能となり、薬用化粧品の可能性を大きく向上させられると期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団によりご援助いただきましたことに深く感謝いたします。

## (引用文献)

- 1) Khanlari S. et al., *Macromol. React. Eng.*, 7, 573-587 (2013)
- 2) Ryou M. et al., *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 8, 33-37 (2006)
- 3) Smart J.D., *Int. J. Pharmaceutics* 73, 69-74 (1991)
- 4) Bimendina L. A. et al., *Chem. zvestí*, 30, 301-305 (1976)
- 5) Ito T. et al., *MRS Communications*, 5, 291-295 (2015)
- 6) Vasheghani F.B. et al., *Polymer Bulletin* 55, 437-445 (2005)

# アミノ酸系機能性界面制御剤による革新的な乳化技術の開発

東京理科大学理工学部先端化学科

酒井 健一

This report focuses on the preparation and stabilization mechanism of oil-in-water (O/W) type emulsions in the presence of amphiphilic 1:1 stoichiometric complexes of acylglutamic acids ( $C_n\text{Glu}$ ) with tertiary alkylamines ( $C_n\text{DMA}$ ). Relatively stable emulsions were obtained when C16Glu-C16DMA (or C18Glu-C18DMA), hexadecane, and water were homogenized at 80 °C and then stored at room temperature. The gel-liquid crystal phase transition temperature ( $T_c$ ) of C16Glu-C16DMA and C18Glu-C18DMA dispersed in water was determined to be ca. 39 and 53 °C, respectively. This indicates that the complexes form an adsorbed layer at the oil/water interface during the homogenization process above the  $T_c$ , and then change into a gel during storage at room temperature. The gel phase formed at the oil/water interface prevents the oil droplets from coalescing. In contrast, shorter chain analogues (C10Glu-C10DMA and C12Glu-C12DMA) did not yield stable emulsions since their adsorption layers were not able to prevent coalescence of the oil droplets (i.e., the  $T_c$  of these analogues was below the room temperature). The dispersion stability of these emulsion systems can also be controlled by changing the aqueous pH.

## 1. 緒言

互いに混ざり合わない二つの相が接すると、そこには界面が生じる。液体が関与する界面の性質は両親媒性物質(界面活性剤)の存在により変化させることができる。通常、界面活性剤は分子溶解する溶液(連続)相と界面吸着相とに分配されるため、界面状態の制御に直接関与できる分子数はその添加量に比べて減少する。低炭素化社会あるいは持続成長可能な社会の実現という観点からすると、添加量に対する有効量の低減は大いなる課題である。すなわち、界面の性質を最大限有効に制御するためには、添加された両親媒性物質は二相の界面に独立した第三相として局在することが望まれる。このような観点から筆者は、機能性界面制御剤(Active Interfacial Modifier; AIM)と称する物質概念を提唱している。AIMは共存する二相に親和性を有するが、いずれの相にも実質的に分子溶解することはないという点で、通常の“界面活性剤”とはその概念を区別している<sup>1)</sup>。

筆者の所属する研究室では近年、二鎖二親水基(ジェミニ)型のアミノ酸系両親媒性物質に関する研究も展開している。その中で、相挙動<sup>2)</sup>、ひも状ミセルの形成<sup>2, 3)</sup>、αゲルの形成<sup>4)</sup>などに関する成果を報告してきた。また、アシルグルタミン酸にアルキルアミンを複合化させた擬似二鎖型の両親媒性物質はpH感受的にひも状ミセルやハイ

ドロゲルを形成することも見出している<sup>5, 6)</sup>。本課題では、この擬似二鎖型両親媒性物質がAIMとして機能するための乳化条件を検討し、分散安定化機構の理解をめざした。なお、以下で紹介する研究成果は、文献7で報告した<sup>7)</sup>。

## 2. 実験

### 2.1. 試薬

アシルグルタミン酸にアルキルアミンを複合化させた擬似二鎖型の両親媒性物質(以下、 $C_n\text{Glu-C}_n\text{DMA}$ と略して表記する)は既報<sup>5, 6)</sup>のスキームに従い合成した。代表的な化学構造を図1に示す。ここで、 $n$ はアルキル鎖長を表し、本研究では10、12、14、16、ならびに18のものを調製した。水相には、Barnstead NANO Pure DIamond UVシステムにより精製した超純水を用いた。油相には、ヘキサデカン(和光純薬工業)を用いた。pH調整には、1 mol/Lの塩酸(和光純薬工業)と水酸化ナトリウム水溶液(和光純薬工業)を用いた。

### 2.2. 分析装置

示差走査熱量(DSC)測定には、Rigaku DSC8230 熱流束

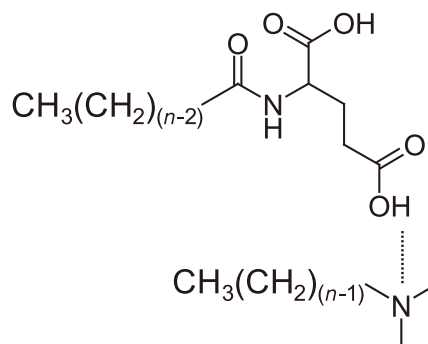


図1  $C_n\text{Glu-C}_n\text{DMA}$ の代表的な化学構造(文献7から許諾を得て転載)



Emulsification by Amino Acid-Type Active Interfacial Modifier

Kenichi Sakai

Department of Pure and Applied Chemistry,  
Faculty of Science and Technology,  
Tokyo University of Science

型示差走査熱量計を用いた。アルミニウム製サンプルパンを試料容器として、 $\alpha$ アルミナ粒子を標準物質としてそれぞれ用いた。昇温速度は1.0℃/min、走査温度範囲は10-60℃にそれぞれ設定した。

動的光散乱(DLS)測定には、Anton-Paar Litesizer™ 500粒子解析装置を用いた。エマルジョンサンプルの透明度が十分ではなく、測定に支障をきたした場合には、適宜、超純水で希釈後に測定した。

凍結割断レプリカ法による透過型電子顕微鏡(FF-TEM)観察には、Hitachi H-7650 透過型電子顕微鏡を用いた。凍結試料の作成にはLeica EM CPC急速凍結試料作製装置、凍結試料の割断とレプリカ膜作成のための蒸着操作にはHitachi FR-7000A フリーズレプリカ作成装置をそれぞれ使用した。電子顕微鏡観察は、印加電圧120kVにて行った。

### 3. 結果と考察

エマルジョンの調製方法を検討するにあたり、複合体水分散液の熱挙動を評価した。これらのサンプルはまず、複合体と水をガラスバイアル中で混合し、80℃に加温、その後、プローブ型超音波ホモジナイザー(Nissei US-300T, 20kHz)で3分間超音波撹拌することで得た。複合体水分散液(5wt%)のDSC測定結果を図2に示す。C10Glu-C10DMAは10-60℃の範囲でピークが検出されなかった一方、C12Glu-C12DMAは約13℃、C14Glu-C14DMAは約24℃、C16Glu-C16DMAは約39℃、そしてC18Glu-C18DMAは約53℃にそれぞれ吸熱ピークを観測した。小角広角X線散乱(SWAXS)測定の結果、これらの吸熱ピークはゲル-液晶相転移に対応していることが示された。

これらの結果をふまえ、以下の乳化プロセスを検討した。乳化法①:複合体0.5wt%を超純水中に加え、常温(約25℃)を維持しながら、プローブ型超音波ホモジナイザーにより撹拌した(3分間)。ここで得られた複合体の水分散液にヘキサデカンを20wt%加え、常温(約25℃)を維持しながら、プローブ型超音波ホモジナイザーにより再び撹拌した(3分間)。調製後の静置は常温(約25℃)で行った。

乳化法②:複合体0.5wt%を超純水中に加え、80℃に加温しながら、プローブ型超音波ホモジナイザーにより撹拌した(3分間)。ここで得られた複合体の水分散液にヘキサデカンを20wt%加え、80℃を維持しながら、プローブ型超音波ホモジナイザーにより再び撹拌した(3分間)。調製後の静置は常温(約25℃)で行った。

乳化法①と②で調製したエマルジョンサンプルの目視観察結果を図3に示す。乳化法①では、C10Glu-C10DMAとC12Glu-C12DMAの系で急速なクリーミングが進行した。また、C16Glu-C16DMAとC18Glu-C18DMAの系ではバイアル上部に油相が分離し、バイアル底部に複合体と思われる沈殿物を確認した。つまり、乳化法①では分散安定性に優れたエマルジョンを得ることはできなかった。一方、乳化法②では、C10Glu-C10DMAとC12Glu-C12DMAの系でクリーミングが進行した一方、C16Glu-C16DMAとC18Glu-C18DMAの系では分散安定性が著しく向上した。すなわち、C16Glu-C16DMAとC18Glu-C18DMAの系については、乳化時の撹拌温度がエマルジョンの分散安定性を決める主要な因子であることがわかった。これ以降の結果はすべて、乳化法②で調製したサンプルに関するものであ

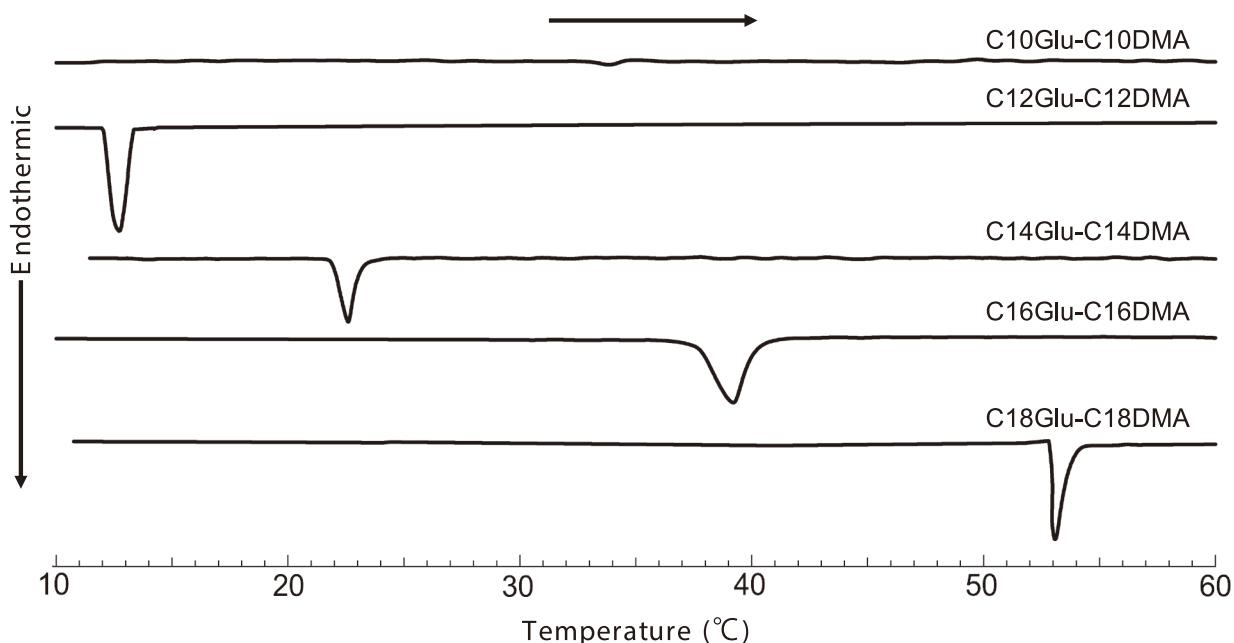


図2 CnGlu-CnDMA水分散液のDSC測定結果(文献7から許諾を得て転載)

る。

油滴径の経時変化を評価するために、DLS測定を行った。結果を図4に示す。調製直後の時点で、すでにC12Glu-C12DMAを用いたエマルションの方がC16Glu-C16DMAを用いたエマルションよりも粒子径が有意に大きくなった。この粒子径の差がクリーミング速度の違いを引き起こしていると考えられる。また、経時変化に注目すると、

C12Glu-C12DMAで安定化を図られたエマルションは1週間後に粒子径が増大したのに対し、C16Glu-C16DMAにより安定化されたエマルションはほぼ粒子径に変化は見られなかった。すなわち、C16Glu-C16DMAを用いたエマルションは油滴間の耐合一性に優れていることがわかった。

油滴の表面状態をFF-TEM観察により評価した。結果を図5に示す。C16Glu-C16DMAで安定化された油滴の表

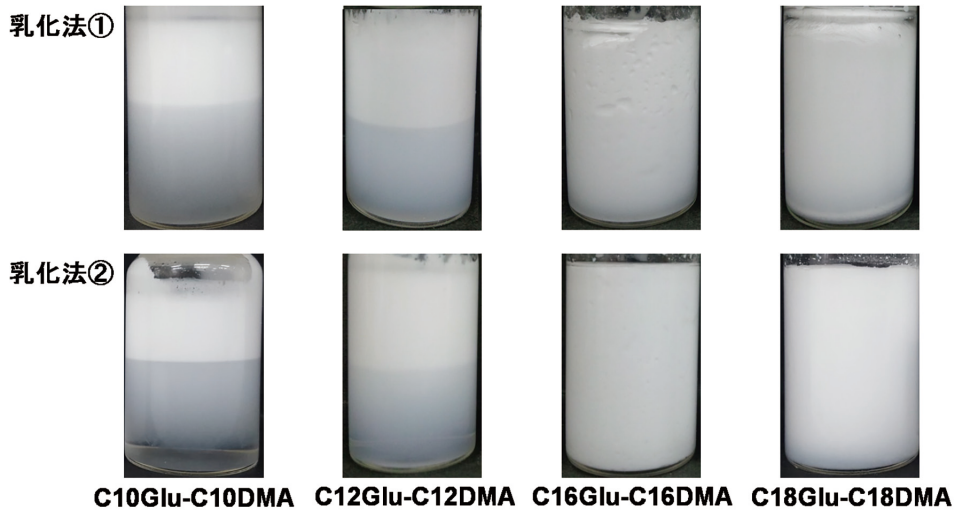


図3 調製されたエマルションの目視観察結果(文献7から許諾を得て転載)

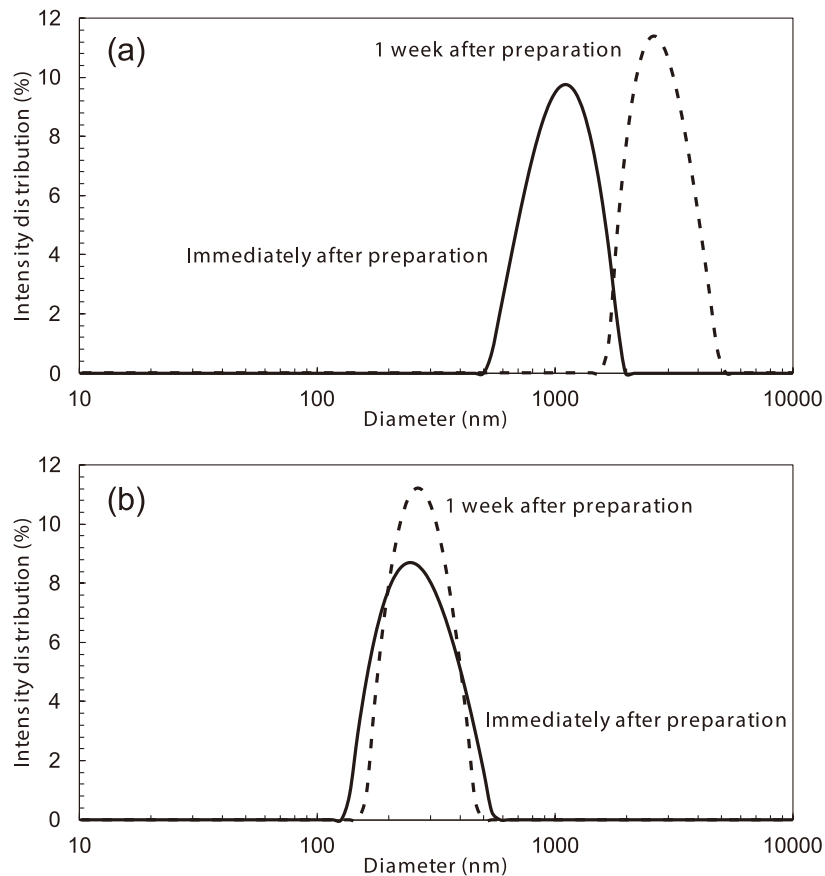


図4 乳化法②で調製したエマルションのDLS測定結果：(a) C12Glu-C12DMA, (b) C16Glu-C16DMA (文献7から許諾を得て転載)

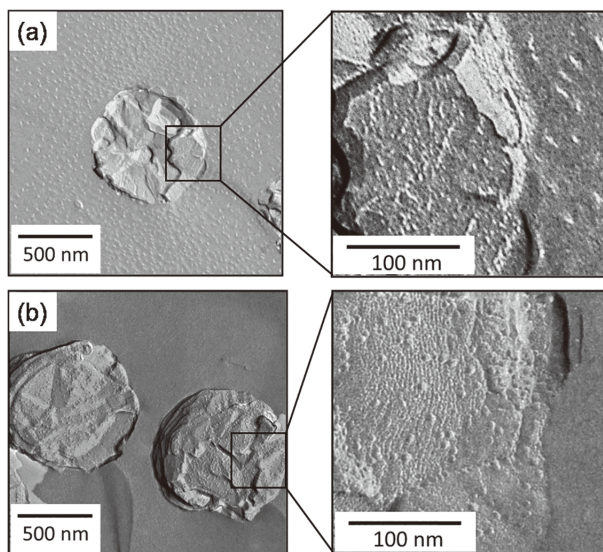


図5 油滴のFF-TEM画像：(a) C12Glu-C12DMA, (b) C16Glu-C16DMA (文献7から許諾を得て転載)

面には、大きなステップ状の構造を観察できた。また、それを高倍率で観察すると、油滴の表面にストライプ状の構造が観察された。以上の観察結果から、C16Glu-C16DMAは油滴の表面でラメラ状の構造体を形成し、耐合一性に寄与していると考えられる。一方、C12Glu-C12DMAで安定化された油滴の表面にも大きなステップ状の構造が観察されたが、ストライプ状の構造は確認できなかった。ゆえに、C12Glu-C12DMAは油/水界面に吸着膜を形成しているが、その秩序性はC16Glu-C16DMA系よりも劣っていることが示唆された。

以上の結果から、C16Glu-C16DMAによるエマルジョンの安定化機構を考察する。DSCの測定結果に基づくと、C16Glu-C16DMAのゲル液晶相転移温度は約39℃である。80℃での乳化攪拌時、C16Glu-C16DMAは水中でアルキル鎖が融解し、運動性を有する状態となっており、ここにヘキサデカンが加わることで油/水界面に吸着膜が形成される。その後、室温(約25℃)まで放冷されることで、複合体のアルキル鎖が凍結し、ゲル化する。その結果、強固な界面膜を形成し、この界面ゲル膜が油滴間の合一を

妨げる役割を担っていると考えられる。一方、C12Glu-C12DMA(ゲル液晶相転移温度は約13℃)によるエマルジョン系では、室温静置時でもアルキル鎖に運動性があり、界面膜が流動的であったため、優れた耐合一性を得られなかったと考えられる。同様な乳化安定化機構は、ホスホリルコリン類似基を有する両性のジェミニ型両親媒性物質についても報告されている<sup>8)</sup>。

液/液界面の性質を制御することで分散安定性に優れたエマルジョンを調製するという界面科学の一分野に絞って現状の研究例を俯瞰すると、

- ①コアとなる液滴の周囲をコロイド次元の固体微粒子で覆うことで、系の分散安定性を向上させるピッカリング乳化法<sup>9)</sup>
- ②リン脂質の二分子吸着膜で液滴を覆い、その分散安定化を図る三相乳化法<sup>10)</sup>
- ③液滴の周囲に液晶相を形成させることで分散安定性を向上させる液晶乳化法<sup>11)</sup>

などが知られている。また、緒言で述べたように、筆者はAIMと称する物質概念を提唱している。AIMにより安定化を図られた場合も含めて、これら乳化系にはクリーミングや凝集による見かけ上の不安定化は起こっても、液滴間の合一は阻害されるという共通現象が存在する。本系においても油/水界面に第三相としてゲル膜が存在し、これが油滴間の耐合一性を高めているという点で、ここに列挙した乳化系との共通性が認められる。

最後に、C16Glu-C16DMAを用いたエマルジョンについて、pH感受性を検討した。乳化法②で得たエマルジョンサンプルにpH調整剤(塩酸もしくは水酸化ナトリウム水溶液)を加え、1分間手振り攪拌後に分散安定性を評価した。1時間経過後の目視観察結果を図6に示す。pH6.2とpH6.9の系は比較的良好な分散性を維持していた。一方、pH5.2の系では、バイアル上部に凝集体と油相の分離を確認した。また、pH11.3の系では、バイアル上部に油相が分離した。すなわち、pH5.2とpH11.3の系は短時間のうちに解乳化した。この解乳化がおきた理由について、それぞれ以下のように考察した。pH5.2のエマルジョンでは、

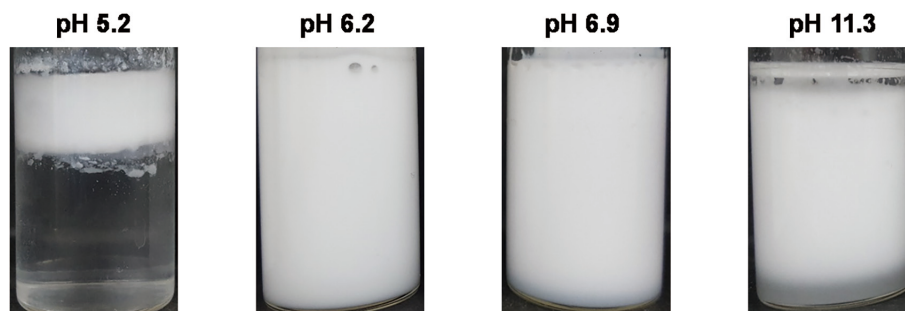


図6 pHを変化させたエマルジョンサンプルの目視観察結果(文献7から許諾を得て転載)

複合体を構成するC16Gluのカルボキシル基がプロトン化されたことで、油滴間の静電反発が減少し、凝集したと考えられる。更に、油/水界面に吸着していた複合体自身も凝集することで脱着し、油滴間の合一が進行したと考えられる。一方、pH 11.3のエマルションでは、C16Gluの二ナトリウム塩とC16DMAに複合体が解離する。C16Glu二ナトリウム塩は複合体に比べて親水性(水に対する溶解性)が高く、油/水界面から連続相(水相)へと移り、C16DMAは非連続相であるヘキサデカンに溶解する。その結果、界面膜の強度が低下し、合一が進行したと考えられる。以上のように、 $C_n\text{Glu}$ - $C_n\text{DMA}$ のpH感受性を利用することで、これにより安定化を図られたエマルションの分散性を制御できることを見出した。

#### 4. 展 望

系に存在する物質が、その求められる機能を過不足なく最大限の効率で発揮している最も典型的かつスマートな複合体は我々生命体である。一例をあげると、生体膜はリン脂質をはじめとする両親媒性物質が自己集合したラメラ状二分子膜であり、外界と生命組織体とを区別する重要な界面科学的機能を担っている。この例に限った話ではなく、省資源、省エネルギーといった現代社会で強く求められている要求を、生命体は適切な機能性物質を効率的に利用することで解決している。AIMという物質概念に基づく研究は、生命体あるいは自然界がすでに確立しているこのような優れたシステムを一般生活環境の中に幅広く反映させることを目標としている。本研究では、 $C_n\text{Glu}$ - $C_n\text{DMA}$ を乳化剤の一例として取り上げてきたが、このコンセプトが新たな商品開発につながることを期待する。

#### 謝 辞

本研究をご支援いただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。また、酒井秀

樹教授(東京理科大学工学部先端化学科)をはじめとする共同研究者の皆様にご礼申し上げます。

#### (引用文献)

- 1) Sakai, K., Ikeda, R., Sharma, S. C., Shrestha, R. G., Ohtani, N., Yoshioka, M., Sakai, H., Abe, M., Sakamoto, K., *Langmuir* **26**, 5349-5354, 2010.
- 2) Shrestha, R. G., Nomura, K., Yamamoto, M., Yamawaki, Y., Tamura, Y., Sakai, K., Sakamoto, K., Sakai, H., Abe, M., *Langmuir* **28**, 15472-15481, 2012.
- 3) Sakai, K., Nomura, K., Shrestha, R. G., Endo, T., Sakamoto, K., Sakai, H., Abe, M., *J. Oleo Sci.* **63**, 249-255, 2014.
- 4) Sakai, K., Ohno, K., Nomura, K., Endo, T., Sakamoto, K., Sakai, H., Abe, M., *Langmuir* **30**, 7654-7659, 2014.
- 5) Sakai, K., Nomura, K., Shrestha, R. G., Endo, T., Sakamoto, K., Sakai, H., Abe, M., *Langmuir* **28**, 17617-17622, 2012.
- 6) Sakai, K., Sawa, M., Nomura, K., Endo, T., Tsuchiya, K., Sakamoto, K., Abe, M., Sakai, H., *Chem. Lett.* **45**, 655-657, 2016.
- 7) Tojinbara, T., Akamatsu, M., Sakai, K., Sakai, H., *Langmuir* **34**, 268-272, 2018.
- 8) Sakai, K., Fukushima, A., Misono, T., Endo, T., Sakamoto, K., Sakai, H., Abe, M., *Chem. Lett.* **44**, 247-249, 2015.
- 9) Pickering, S. U., *J. Chem. Soc. Trans.* **91**, 2001-2021, 1907.
- 10) Tajima, K., Imai, Y., Tsutsui, T., *J. Oleo. Sci.* **51**, 285-296, 2002.
- 11) Suzuki, T., Takei, H., Yamazaki, S., *J. Colloid Interface Sci.* **129**, 491-500, 1989.

# 化粧品・スキンケア製品に適したコメ糠タンパク質由来 生理活性短鎖ペプチド素材の開発

新潟大学自然科学系(工学部機能材料工学科)

谷口 正之

In this study, to prepare the fraction containing multifunctional cationic peptides, we first hydrolyzed rice bran protein (RBP) with pepsin. We separated the enzymatic hydrolysate of RBP into 20 fractions containing peptides with different isoelectric point (pI) values by ampholyte-free isoelectric focusing (autofocusing). Subsequently, we examined the antimicrobial activity of each fraction against four pathogens. In addition, we purified the cationic peptides from fractions exhibiting antimicrobial activity by reversed-phase high-performance liquid chromatography and identified them by matrix-assisted laser/desorption ionization-time-of-flight mass spectroscopy. Of five cationic peptides identified, we chemically synthesized three peptides with high pI values and evaluated their multiple functions, including antimicrobial, lipopolysaccharide-neutralizing and angiogenic activities. Our results demonstrated that the three identified cationic peptides exhibited multiple functions. Fractions containing cationic peptides obtained from RBP hydrolysate have the potential to be used as functional ingredients in cosmetic and skin-care products.

## 1. 緒言

近年、多くの生物が生産する抗菌ペプチドは、感染防御ばかりでなく、炎症制御、創傷治癒、免疫応答の促進などの生体を防御するための作用を兼ね備えていることが報告されており、食品ばかりでなく、化粧品、スキンケア製品、医薬品、医薬部外品の新しい素材として注目を集めている<sup>1-3)</sup>。また、ヒトも生体を防御するために、多くのペプチドを生産している。例えば、唾液中の histatin は、抗炎症作用や抗菌作用を発揮する<sup>4)</sup>。また、好中球などの細胞が産生する LL-37 や  $\beta$ -defensin などのペプチドも、抗菌作用ばかりでなく、免疫調節、抗炎症、創傷治癒、細胞増殖促進などの多くの生体防御機能を有しており、それらの多機能性に着目した医薬品開発が進められている<sup>5,6)</sup>。

コメ糠中には、フィチン酸、イノシトール、トコトリエノール、 $\gamma$ -オリザノール、フェルラ酸などの生理活性成分が含まれており、コメ糠はこれらの機能性成分を製造する原料として有効利用されている。しかし、コメ糠中のタンパク質成分は有効に利用されていない。一方、コムギ、ダイズ、トウモロコシなどの穀類タンパク質の加水分解物、およびそれらに含まれるペプチドには多彩な生理活性があることが報告されている<sup>7-10)</sup>。そこで、筆者らは生理活性ペプチドを生産するための原料として、コメ糠タンパク質に着目した。これまでにコメ糠タンパク質の酵素加水分解

物から美白効果があるチロシナーゼ阻害ペプチドを見出している<sup>11)</sup>。本研究では、コメ糠タンパク質の酵素加水分解物から多彩な生理活性を兼ね備えたカチオン性ペプチドを調製することを目的として、(1)コメ糠タンパク質の酵素加水分解物の調製、(2)等電点電気泳動によるカチオン性ペプチド素材の調製、(3)逆相クロマトグラフィーと質量分析計を用いた素材中のカチオン性ペプチドの同定、および(4)同定した3種類のカチオン性ペプチドの複数の生理活性(抗菌活性、LPS中和活性、および血管新生促進活性)を検討した結果について報告する。

## 2. 方法

### 2.1. コメ糠タンパク質からのペプチドの調製とカチオン性ペプチド画分の調製

最初にコメ糠タンパク質RBP55(タンパク質含有量55%、築野食品工業株式会社)に超純水を加え、POLYTRON Homogenizer (KINRMATICA)を用いて溶液の均質化を行い、透析によって、低分子不純物を除去した。その後、ブタ胃粘膜由来ペプシンを用いて5時間、37℃にて加水分解した。さらに、加水分解物を遠心分離し、得られた上澄液を再び透析することによって生成した低分子成分を除き、出発材料を調製した。次に、出発材料をBio-Rad社の等電点電気泳動(Rotofor Cell System)を用いて、等電点(isoelectric point, pI)の異なる20の画分に分離した。

### 2.2. ペプチド画分の抗菌活性の測定

等電点電気泳動によって分離した20の画分について、ヒト病原微生物に対する抗菌活性を測定した。すなわち、各画分のグラム陰性細菌である歯周病菌(*Porphyromonas gingivalis*)とアクネ菌(*Propionibacterium acnes*)、グラム陽性細菌であるう蝕菌(*Streptococcus mutans*)、および



Development of bioactive short peptides derived from rice bran protein and their application to cosmetic and skin-care products

Masayuki Taniguchi

Department of Materials Science and Technology, Graduate School of Science and Technology, Niigata University

日和見感染真菌 (*Candida albicans*) に対する抗菌活性を測定した。生菌数は、BacTiter-Glo™ reagent (Promega Japan KK) を用いて、生菌に由来する ATP の発光強度を測定することによって評価した。

### 2. 3. 活性画分からのカチオン性ペプチドの精製と同定

次に、抗菌活性が検出された画分から逆相クロマトグラフィーによってペプチドを精製した。必要に応じて粗精製画分をもう一度、逆相クロマトグラフィーによって精製し、単一ピークを得た。各ピーク画分中のペプチドを MALDI-TOF/MS (Bruker) によって解析し、ペプチドの分子量を求め、MS/MS 解析とデータベース検索によって、ペプチドを含むタンパク質とペプチドのアミノ酸配列をそれぞれ決定した。

### 2. 4. 同定したカチオン性ペプチドの抗菌活性の解析

同定したペプチドの中から正味の正電荷が高く、pI が高いカチオン性ペプチドを選択した。それらのペプチドを医学生物学研究所(株)に委託して化学合成し、2. 2. の項に記載した方法に従って、4 種類のヒト病原微生物に対して抗菌活性を測定した。各ペプチドの抗菌活性は、ATP 発光強度の結果から 50% 増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出し、比較した。

### 2. 5. 同定したカチオン性ペプチドの LPS 中和活性の解析

リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) を特異的に検出するカプトガニの血球抽出物から調製した *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) 試薬を用いるリムルステストは、LPS を検出・定量することができる。本研究では、エンドトキシンとして *Escherichia coli* O55:B5 由来の O 抗原を含む smooth 型 LPS を使用した。リムルステストにおいては、LAL 試薬に含まれる Factor C (セリンプロテアーゼ前駆体) と LPS の反応を起点としたカスケード反応により、最終的に LPS の濃度に応じて遊離した *p*-nitroaniline の 405nm における吸光度を測定した。本研究では、予め各カチオン性ペプチドと LPS をインキュベーションした後に反応系に添加し、コントロールと比べたときの吸光度の減少を測定し、LPS 中和活性を評価した。中和活性の強さは、リムルステストの反応を 50% 阻害する濃度、すなわち 50% 有効濃度 (EC<sub>50</sub>) として表した。

### 2. 6. 同定したカチオン性ペプチドの血管新生の解析

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞である (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) を用いて、次のようにして、各ペプチドの血管新生 (管腔形成) 促進活性を測定し

た。96 ウェルプレートにコラーゲン様マトリゲルを用いて人工基底膜を作製し、30 分間、37℃にてインキュベーションした。次に、HUVEC と各ペプチドまたはポジティブコントロールとして創傷治癒作用を有するヒトのペプチドである LL-37 を含む培地 HuMedia-EG2 を、各ウェルに添加した。CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 15 時間、37℃にて 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養した後、顕微鏡を用いて管腔構造を形成した、すなわち血管様に増殖した細胞を観察し、5 ウェルについて写真を撮った。その後、それぞれの画像中の血管様の細胞の長さを、NIS-Elements BR Analysis software (株式会社ニコン) を用いて測定し、平均値を算出した。ペプチドを添加しないときの細胞の長さの平均値を 100% として、各ペプチドの血管新生促進活性を評価した。

## 3. 結果

### 3. 1. ペプシン加水分解物の調製と等電点電気泳動によるペプチドの分画

最適な酵素加水分解条件を検討するために、コメ糖タンパク質 (RBP55) をパパイン、トリプシン、ペプシン、またはトリプシンとキモトリプシンの混合物を用いて、時間を変えて加水分解した。得られた加水分解物を等電点電気泳動によって分離し、各画分の抗菌活性について検討した結果、ペプシンを用いて 5 時間加水分解したときに、高い抗菌活性を有する画分を得ることができた。コメ糖タンパク質をペプシンによって 5 時間加水分解したサンプルを、等電点電気泳動によって分画した結果を図 1 に示す。pH が低い画分を除いて、各画分の回収率は、それぞれ 3-5% 程度であり、pI の違いによって、ペプチドを 20 の画分に分離することができた。また、画分 16 から 20 の pH は、10 以上であり、これらの画分にカチオン性ペプチドが含まれていると考えられた。

### 3. 2. 等電点電気泳動によって分離した各画分の抗菌活性

ヒト病原微生物として、歯周病菌 (*P. gingivalis*) とアクネ菌 (*P. acnes*)、う蝕菌 (*S. mutans*)、および日和見感染真菌 (*C. albicans*) を用いた。各画分の濃度を 3 mg/mL として抗菌活性を測定した結果を図 2 に示す。縦軸は、生菌数を表す ATP の発光強度から求めた生残率を示す。ペプチドを添加しないコントロール (図中の C) の発光強度を 100% とした。いずれの病原微生物に対しても、pI が高いカチオン性の画分から高い抗菌活性が検出された。特に、画分 20 のサンプルは、4 種類の病原微生物に対して、いずれも高い抗菌活性を示すことがわかった。そこで、画分 18, 19, および 20 からカチオン性ペプチドを精製し、同定することにした。

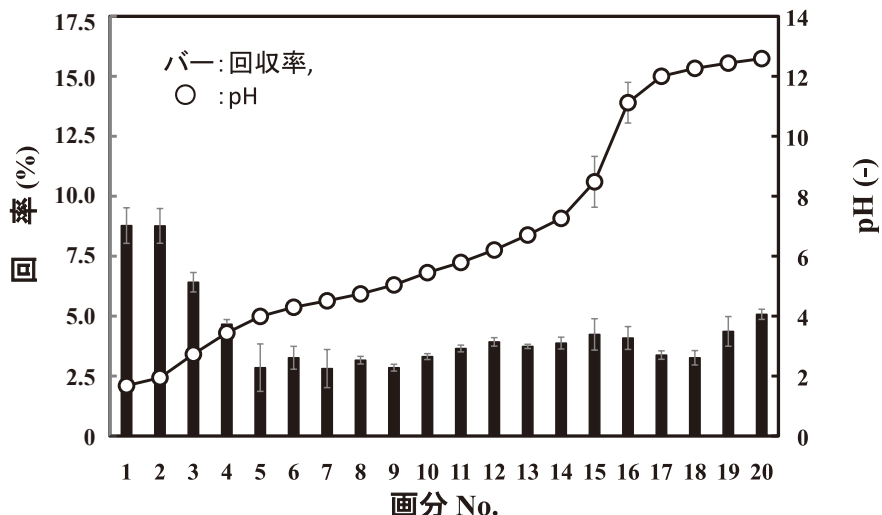


図1 等電点電気泳動によるコメ糖タンパク質酵素加水分解物の分画

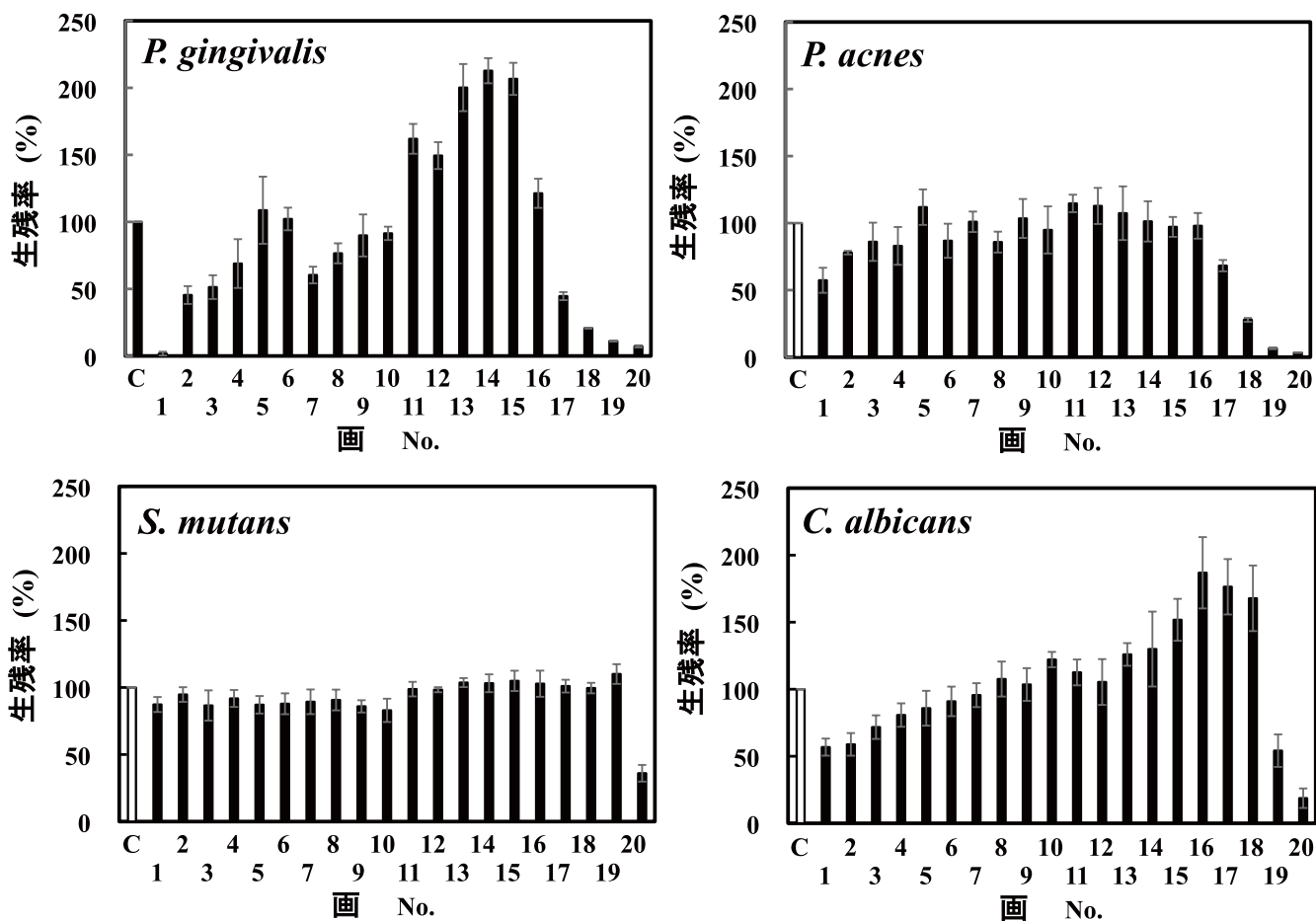


図2 等電点電気泳動によって分離した各分画の病原微生物に対する抗菌活性  
C: ペプチドを添加していないときの生残率(100%)

### 3. 3. カチオン性ペプチドの精製と同定

画分 18, 19, および 20 から逆相クロマトグラフィーによって、それぞれペプチドを精製した。さらに、MALDI-TOF/MS によってペプチドの分子量を求め、MS/MS 解析とデータベース検索によって、ペプチドを含むタンパ

ク質とペプチドのアミノ酸配列を決定した。同定できたペプチドの中で、同定の信頼性が高く、pI が高く、かつ正味の電荷が正のペプチドを表 1 に示す。画分 18 から 4 種類、画分 19 からは 1 種類のペプチドがそれぞれ同定できたが、画分 20 からは、信頼性の高いペプチドを同

表1 コメ糖タンパク質酵素加水分解物から同定した短鎖カチオン性ペプチド

フラクション No.	分子量 (Da) (測定値)	ペプチドの略称	アミノ酸配列	タンパク質	位置	等電点	正味の電荷
18	1597.0156	LRR	LRRHASEGGHGPHW	63kDa globulin-like protein	286-299	9.62	+1
	1110.4941	—	<u>FSKGVQRAAF</u> <sup>c</sup>	globulin-like protein, partial	135-144	11.00	+2
	1667.8685	EKL	EKLLGKQDKGVIIRA	globulin-like protein, partial	152-166	9.70	+2
	1284.7872	SSF	<u>SSFSKGVQRAAF</u> <sup>c</sup>	globulin-like protein, partial	133-144	11.00	+2
19	1284.5777	SSF	<u>SSFSKGVQRAAF</u> <sup>c</sup>	globulin-like protein, partial	133-144	11.00	+2

アンダーラインは、同一のアミノ酸配列を示す。

定することができなかった。例えば、SSFSKGVQRAAFは、コメの globulin-like protein の133番目から144番目の12残基のアミノ酸配列であり、このペプチドのpIは12.0、正味の電荷は+2であった。また、ペプチドSSFSKGVQRAAFは画分18と19からそれぞれ同定され、ペプチドFSKGVQRAAFはSSFSKGVQRAAFの部分配列であることがわかった。そこで、3種類のペプチド(LRRHASEGGHGPHW, EKLLGKQDKGVIIRA, およびSSFSKGVQRAAF)を化学合成し、それらの生理活性を測定することにした。

### 3. 4. 同定したペプチドの抗菌活性

同定した3種類のペプチドを化学合成し、それらの4種類のヒト病原微生物に対する抗菌活性を測定した結果、ペプチドLRRHASEGGHGPHW(略称LRR)は*C. albicans*に対して、ペプチドEKLLGKQDKGVIIRA(略称EKL)とペプチドSSFSKGVQRAAF(略称SSF)はそれぞれ*P. gingivalis*に対して抗菌活性を示した。各ペプチドの抗菌活性の濃度依存性を図3に示す。これらのデータに基づいて、各ペプチドのIC<sub>50</sub>を算出した結果、ペプチドLRRの*C. albicans*に対するIC<sub>50</sub>の値は289 μM、ペプチドEKLとSSFの*P. gingivalis*に対するIC<sub>50</sub>の値はそれぞれ75.6 μMと78.5 μMになった。

### 3. 5. 同定したペプチドのLPS中和活性

ペプチドの抗炎症活性の1つとして、LPS中和活性を測定した。同定した3種類のペプチドは、図4に示すように、LPSによって引き起こされるリムルステストの反応を濃度依存的に阻害した。したがって、これらのリムルステストの結果から、同定した3種類のペプチドは、LPSに結合し、中和活性を発揮することがわかった。

図4のデータに基づいて計算した結果、ペプチドLRR, EKL, およびSSFのEC<sub>50</sub>の値は、それぞれ1.07 μM, 0.86 μM, および1.41 μMとなった。これらのEC<sub>50</sub>の値は、polymyxin Bの値と比較して、10倍程度であることから、同定した3種類のペプチドは、比較的強くLPSを中和でき

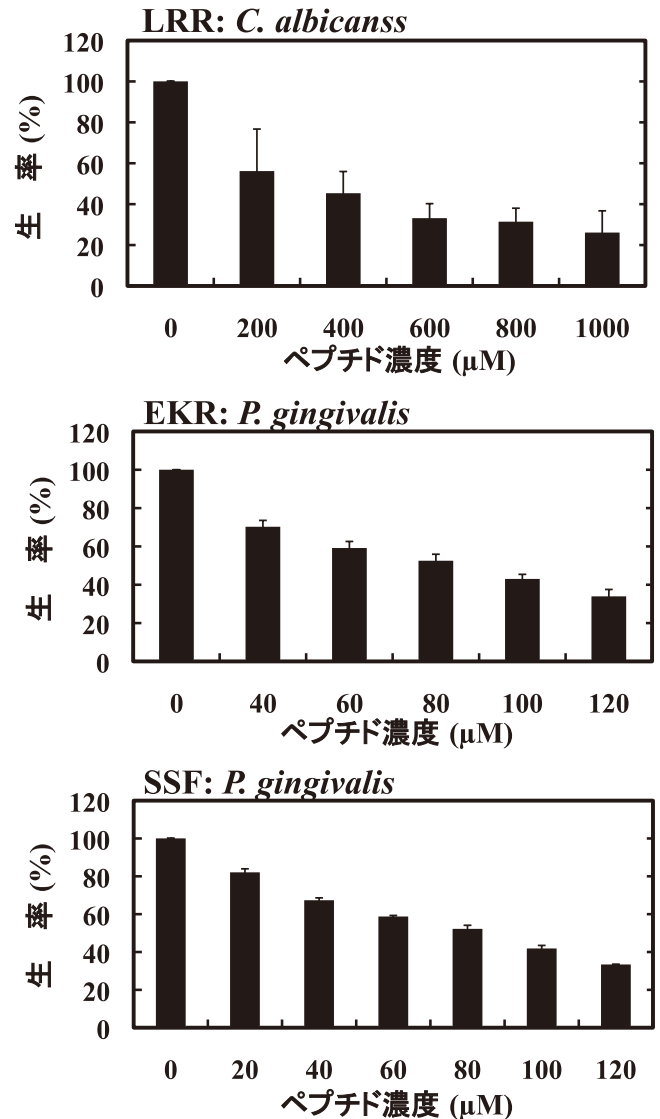


図3 同定した3種類のカチオン性ペプチドの抗菌活性

ることがわかった。

### 3. 6. 同定したペプチドの血管新生促進活性

ペプチドの創傷治癒活性の1つとして、HUVECを用いて血管新生促進活性を測定した。血管新生促進活性を有するヒトの生体防御ペプチドとして知られているLL-37をポ

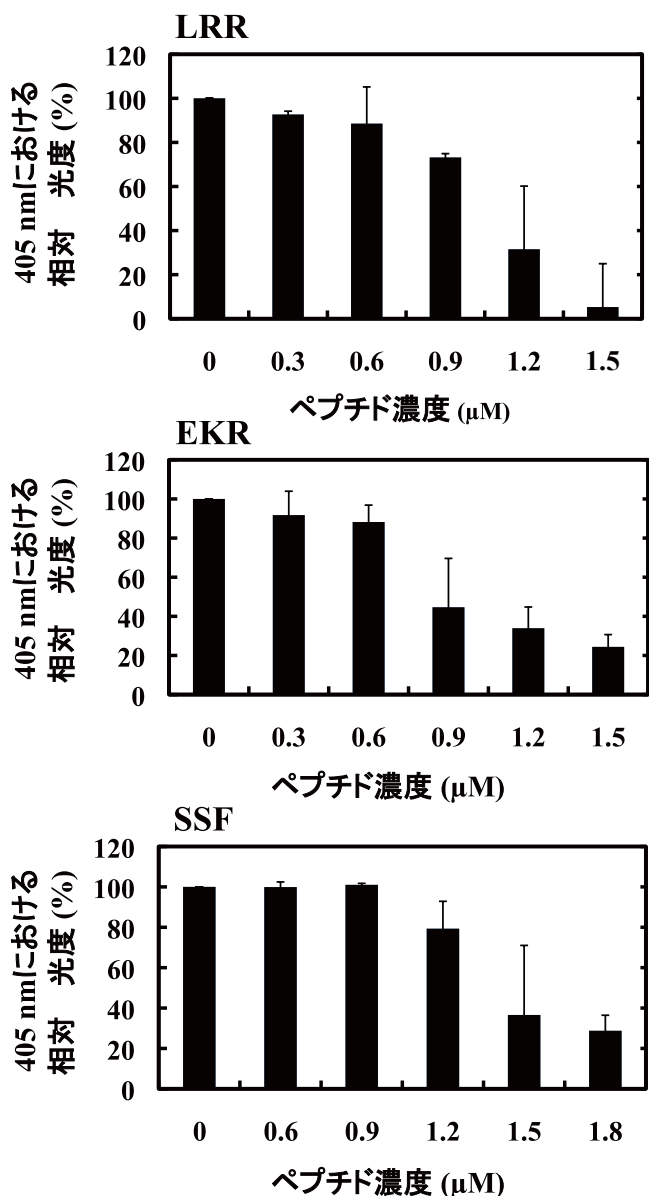


図4 同定した3種類のカチオン性ペプチドのLPS中和活性

ジティブコントロールとして、同定した3種類のペプチドの血管新生促進活性を測定した結果を、図5に示す。同定した3種類のペプチドは、LL-37と同じように、血管新生促進活性を発揮した。すなわち、細胞懸濁液に1 μMまたは10 μMの各ペプチドを添加した後、15時間培養し、マトリゲル内で管腔(血管様)構造を有するHUVECを、顕微鏡を用いて40倍の倍率で観察し、その細胞の長さを計測した。その結果、写真からもわかるように、ペプチドSSFは、LL-37と同じ濃度(1 μMと10 μM)において血管新生促進活性を示し、その作用は添加した濃度に依存していた。一方、ペプチドLRRとEKLは1 μMと10 μMにおいてほぼ同じ血管新生促進活性を示した。以上の結果から、同定した3種類のペプチドは、LL-37と同じように、HUVECの血管新生を促進する活性を有することから、創傷治癒活

性を示すことがわかった。

#### 4. 考察

##### 4.1. 食品タンパク質酵素加水分解物から得られた生理活性ペプチド

ミルク、卵、魚などの動物性タンパク質ばかりでなく、ダイズ、コムギ、コメ、ノリなど植物性タンパク質の酵素加水分解物から生理活性があるペプチド画分やペプチドが得られている。特に、angiotensin I-converting enzyme (ACE) 阻害、dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) 阻害、抗酸化、コレステロール低減などの生理活性があるペプチドに関して、多くの研究報告がある<sup>7-10)</sup>。しかし、植物性タンパク質由来の多機能性ペプチドに関する報告は、抗酸化、抗炎症、癌細胞増殖阻害、コレステロール低下などの作用を兼ね備えたダイズタンパク質(アルブミン)由来のlunasin<sup>12)</sup>、ACE阻害と抗酸化の作用を兼ね備えたアサ種子由来の5種類のペプチド(WYT, WVYY, SVYT, PSLPA, およびIPAGV)<sup>13)</sup>などに限られており、また、これらのペプチドはカチオン性ではない。さらに、コメ糖タンパク質由来の生理活性ペプチドとして、抗酸化活性を有するペプチド(VAGAEDAANK, AAVVQGGQVEK, GGHELK, CQHHDQWKなど)<sup>14)</sup>、癌細胞増殖阻害活性を有するペプチド(EQRPR)<sup>15)</sup>、DPP-IV阻害活性を有するジペプチド(LP, IP)<sup>16)</sup>などが報告されているが、いずれも単独の生理活性を示すペプチドであり、多機能性ペプチドに関する研究報告はない。

##### 4.2. コメ糖タンパク質酵素加水分解物から得られたカチオン性ペプチドの多機能性

本研究では、粗精製のコメ糖タンパク質から生理活性がある低分子成分を除去し、さらにペプシンで加水分解した後にもう一度、アミノ酸や低分子ペプチドを除去して、出発材料を調製した。両性担体を使用しない等電点電気泳動によって、この出発材料を画分した結果、pIが高い画分18, 19, および20が得られた。重量を基準とした3つの画分の回収率は、合計で13%であった。これらの画分からカチオン性ペプチドを精製し、同定した結果、最終的に3種類のペプチドが得られた。3種類のペプチドは*P. gingivalis*または*C. albicans*のどちらかの病原微生物に対して抗菌活性を発揮したが(図3)、*P. acnes*や*S. mutans*に対して抗菌活性を示さなかった。したがって、画分18, 19, および20(特に画分20)にはまだ同定されていない抗菌ペプチドが存在していると考えられる。今後、これらのペプチドを精製し、同定する必要がある。また、同定した3種類のペプチドは、いずれもLPS中和活性(図4)と血管新生促進活性(図5)を発揮した。

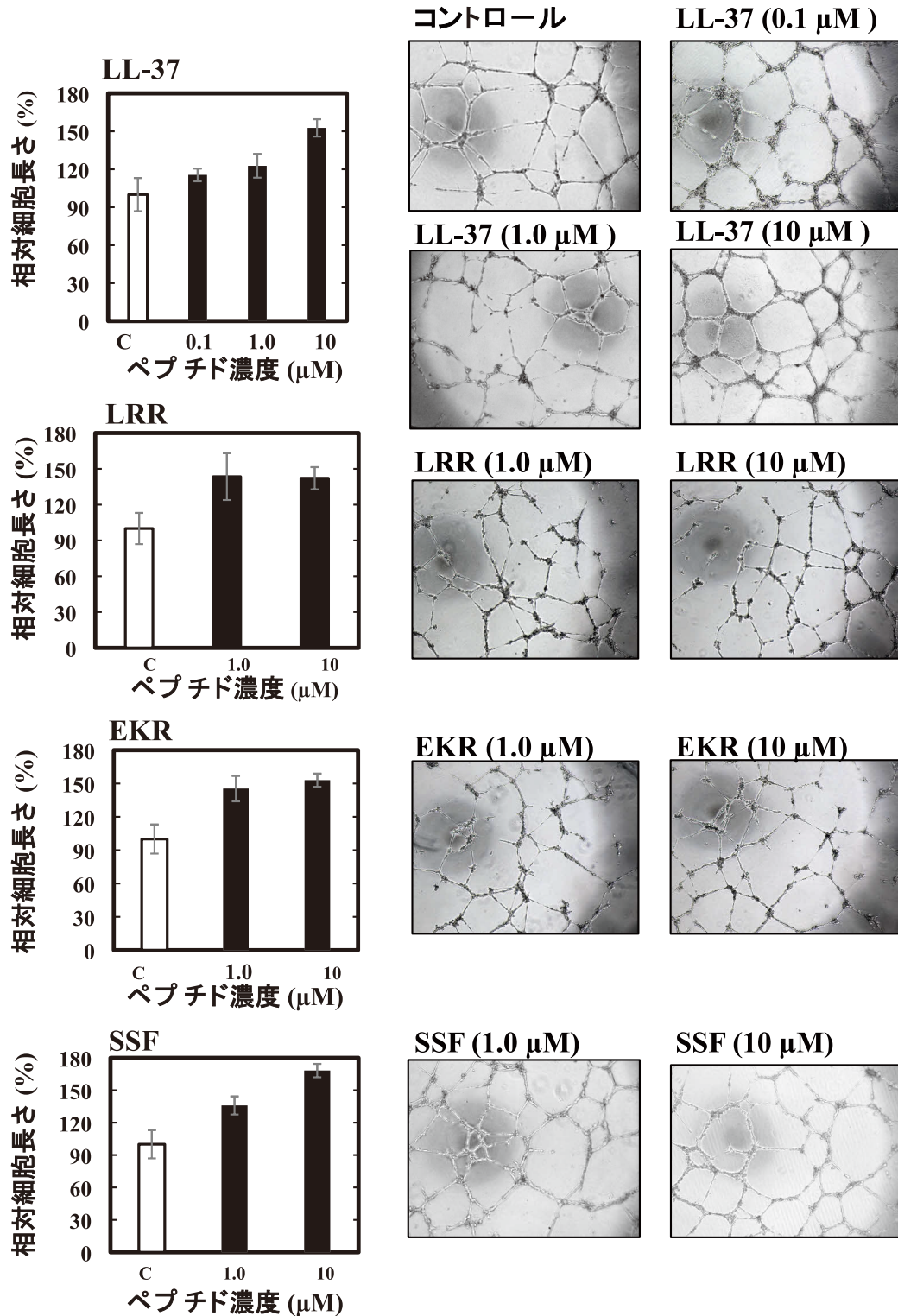


図5 同定した3種類のカチオン性ペプチドとLL-37の血管新生促進活性

#### 4. 3. カチオン性ペプチドの多機能性とそれらの作用機構

ペプチドが抗菌活性を発揮するためには、負に荷電した微生物の細胞膜(リン脂質)と静電的な相互作用によって結合する必要がある。また、細胞膜内に入り込むか、細胞膜を通過して抗菌活性を発揮するためには、細胞膜の疎水性

部分と相互作用する必要がある。したがって、多くの抗菌ペプチドは、リジンやアルギニンを多く含み、かつ疎水性のアミノ酸を有している。すなわち、多くの抗菌ペプチドはカチオン性であり、かつ両親媒性である<sup>17-19)</sup>。一方、LPS中和活性を有する多くのペプチドは、LPSのlipid A部分(毒性の本体)と相互作用することが知られている<sup>20,21)</sup>。

このlipid Aには負に荷電したリン酸基があり、また疎水性の脂肪酸の鎖がある。そのため、抗菌活性を発揮する多くのペプチドの場合と同じように、カチオン性であり、かつ疎水性アミノ酸を有するペプチドは、lipid Aに結合してLPSの毒性を中和すると考えられる。実際、同定した3種類のペプチド(LRR, EKL, およびSSF)は、いずれもリジンやアルギニンを有し(表1)、ロイシン、トリプトファン、バリン、フェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸も含まれていることから、抗菌活性とLPS中和活性を発揮したと考えられる。ペプチドの血管新生促進作用に関しては、その作用機構は完全には解明されていない。LL-37の場合には、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のレセプターに作用して、その後のシグナル伝達経路を活性化して、細胞の増殖を促進していると考えられている<sup>22, 23)</sup>。本研究で同定したペプチドの血管新生促進の作用機構に関しては、現在、VEGFのレセプターの阻害剤を用いて検討を進めている。

## 5. 総括

カチオン性ペプチドの各生理作用の機構を解明するためには、リジンやアルギニンをアラニンに置換した変異体、または特定のアミノ酸をアルギニンやリジン、またはロイシンやトリプトファンに置換した変異体を合成して、それらの各生理活性の変化を解析し、カチオン性アミノ酸と疎水性アミノ酸の各生理活性への寄与を解明する必要がある。

本研究において、コメ糠タンパク質加水分解物から抗菌、LPS中和、血管新生などの生理活性を有するペプチド混合物を調製することができた。今後、これらのペプチドが、ニキビ予防、シワやタルミの防止、炎症の抑制、保湿などを目的とした化粧品やスキンケア製品の素材として応用されることが期待される。また、ペプチド混合物から同定できたカチオン性ペプチドの生理活性とその作用機構を解明して、コメ糠タンパク質由来ペプチドの有用性に関する科学的な根拠を実証する必要がある。

### (引用文献)

- 1) R. J. S. de Castro, H. H. Sato: Biologically active peptides: Process for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Res. Int.*, 74: 185-198, 2015.
- 2) N. B. da Cunha, N. B. Cobacho, J. F. C. Viana, L. A. Lima, K. B. O. Sampaio, S. S. M. Dohms, A. C. R. Ferreira, C. la Fuente-Núñez, F. F. Costa, O. L. Franco, S. C. Dias: The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discov. Today*, 22: 234-248, 2016.
- 3) B. Mishra, S. Reiling, D. Zarena, G. Wang: Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 38: 87-96, 2017.
- 4) L.T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel: The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, 29: 464-472, 2011.
- 5) T. H. Nan, J.-K. Bang, B. Jacob, I.-S. Park, S. Y. Shin: Prokaryotic selectivity and LPS-neutralizing activity of short antimicrobial peptides designed from the human antimicrobial peptide LL-37. *Peptides*, 35: 239-247, 2012.
- 6) F. Semple, J. Dorin:  $\beta$ -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J. Innate Immun.*, 4: 337-348, 2012.
- 7) T. A. Egorov, T. I. Odintsova, V. A. Pukhalsky, E. V. Grishin: Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, 26: 2064-2073, 2005.
- 8) B. P. Singh, S. Vij, S. Hati: Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54: 171-179, 2014.
- 9) C. G. Rizzello, D. Tagliacozzi, E. Babini, G. S. Rutella, D. L. T. Saa, A. Gianotti: Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *J. Funct. Foods*, 27: 549-569, 2016.
- 10) E. Maestri, M. Marmiroli, N. Marmiroli: Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. *J. Proteomics*, 147: 140-155, 2016.
- 11) A. Ochiai, S. Tanaka, T. Tanaka, M. Taniguchi: Rice bran protein as a potent source of anti-melanogenic peptides with tyrosinase inhibitory activity. *J. Natural Products*, 79: 2545-2551, 2016.
- 12) V. K. Lule, S. Garg, S. D. Pophaly, Hitesh, S. K. Tomar: Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide. *J. Food Sci.*, 80: R485-R494, 2015.
- 13) A. T. Girgih, R. He, S. Malomo, M. Offengenden, J. Wu, R. E. Aluko: Structure and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *J. Funct. Foods*, 6: 384-394, 2014.
- 14) L. Wattanasiritham, C. Theerakulkait, S. Wickramasekara, C. S. Maier, J. F. Stevens: Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chem.*, 192: 156-162, 2016.
- 15) A. Kannan, N. S. Hettiarachchy, L. O. Lay, R. Liyanage: Human cancer cell proliferation inhibition

- by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides*, 31: 1629-1634, 2010.
- 16) T. Hatanaka, Y. Inoue, J. Arima, Y. Kumagai, H. Usaki, K. Kawakami, M. Kimura, T. Mukaiharu: Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chem.*, 134: 797-802, 2012.
- 17) K. L. Brown, R. E. W. Hancock: Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.*, 8: 24-30, 2006.
- 18) L. T. Nguyen, E. F. Haney, H. J. Vogel: The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, 29: 464-472, 2011.
- 19) M. Mihajlovic, T. Lazaridis: Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818: 1274-1283, 2012.
- 20) S. Takayama, K. Hashimoto, E. Kokubu, M. Taniguchi, K. Tajima, A. Ochiai, E. Saitoh, A. Saito, K. Ishihara, T. Kato: Inhibitory effects of a novel cationic dodecapeptide [CL(14-25)] derived from cyanate lyase of rice on endotoxic activities of LPSs from *Escherichia coli* and periodontopathic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb. Pathogen.*, 94, 2-11, 2016.
- 21) M. Taniguchi, R. Toyada, T. Sato, A. Ochiai, E. Saitoh, T. Kato, T. Tanaka: Effects of arginine- and leucine-substitutions on anti-endotoxic activity and mechanisms of action of a cationic and amphipathic antimicrobial octadecapeptide from rice  $\alpha$ -amylase. *J. Peptide Sci.*, 23: 252-260, 2017.
- 22) Y. Brudno, A. B. Ennet-Shepard, R. R. Che, M. Aizenberg, D. J. Mooney: Enhancing microvascular formation and vessel maturation through temporal control over multiple pro-angiogenic and pro-maturation. *Biomaterials*, 34: 9201-9209, 2013.
- 23) H. Tomioka, H. Nakagami, A. Tenma, Y. Saito, T. Kaga, T. Kanemori, N. Tamura, K. Tomono, Y. Kaneda, R. Morishita: New anti-microbial peptide SR-0379 accelerates wound healing via the P13 kinase/Akf/mTOR pathway. *Plos One*, 9: e92597, 2014.

# Suspended-state NMR 測定による水分散中の化粧品ナノ粒子の分子状態評価

千葉大学大学院薬学研究院

東 顕二郎

We investigated the formation and stabilization mechanisms of drug/poloxamer 407 (P407) nanosuspensions by suspended-state NMR spectroscopy. Indomethacin (IMC) and piroxicam (PXC) used as models of poorly water-soluble drugs are nonsteroidal anti-inflammatory drugs. For IMC, the three different polymorphs of  $\gamma$ -form,  $\alpha$ -form and amorphous form were used to evaluate the effect of initial crystal form of drug. P407, a tri-block copolymer composed of polyethylene glycol (PEG)<sub>101</sub>-polypropyleneoxide (PPO)<sub>56</sub>-PEG<sub>101</sub>, was used as a stabilizer. Mean volume diameter in every suspension prepared with wet-milling was 240-270 nm with unimodal size distribution. Cryogenic transmission electron microscopy images of nanoparticles obtained using  $\gamma$ -form IMC indicated a rhombic-plate shape. In contrast, needle-like nanoparticles were observed in the nanosuspensions of  $\alpha$ -form and amorphous IMC. The nanoparticle obtained with PXC showed an irregular shape. Suspended-state cross polarization <sup>13</sup>C NMR measurements directly detected the molecular states of drug in nanosuspensions. IMC existed in its initial crystal form when  $\gamma$ -form and  $\alpha$ -form IMC were used; amorphous IMC transformed into crystalline  $\alpha$ -form IMC. The PXC in the nanoparticle existed as the mixture of amorphous and crystalline states. Suspended-state <sup>13</sup>C pulse saturation transfer NMR measurements revealed the molecular state of P407 in the nanosuspensions. P407 could only adsorb to the surface of the IMC nanoparticles because IMC existed as crystals in the GM suspension. Conversely, the larger numbers of P407 were involved in the PXC nanoparticles where some of PXC existed as amorphous state. The difference between the nanoparticle structures in the IMC and PXC systems could be a consequence of the interaction strength of each drug with P407. The peaks of the PPO chains of P407 in the spectra of GM suspensions were split at lower and higher magnetic fields. The equilibrium of P407 between micelle and nanoparticle was slower than the NMR time scale, which could stabilize the dispersion of the nanoparticles in water.

## 1. 緒言

近年、スクリーニング技術の発展に伴い多数の医薬品・化粧品の新規候補薬物が見出されている。一方、それら候補薬物の70%以上は難水溶性であり、その低い薬物吸収量のため薬効を最大限発揮できず、開発が断念されるケースもある。今後も、薬物の分子量の増大・化学構造の複雑化により溶解性が低い候補化合物は益々増えていくと予想される。そのため、難水溶性薬物の溶解性改善技術の開発は製剤研究における重要な課題の1つであり、これまでに、結晶形の制御、塩や共結晶、シクロデキストリン包接化合物及び非晶質固体分散体の調製などが広く適用されている。また2000年以降、薬物ナノ粒子化も溶解性改善手法として注目されている<sup>1)</sup>。薬物ナノ粒子は、その界面はポリマーや界面活性剤などの安定化剤で被覆されているが、そのコア部分は主に薬物相から形成されている。薬物ナノ粒子製剤のアプリケーションとして、筋肉内投与、静脈投与、経肺投与、経皮投与、経眼投与などがあるが、最も論文報告が多くまた市販されている製品数が多いのは経口投与で

ある。薬物粒子をナノ化することにより、薬物溶解速度の向上、薬物溶解度の上昇、消化管粘膜への付着性の増加が見込まれる。これにより、薬物経口吸収性改善が期待できる。懸濁液のナノ粒子内部あるいは固液界面の薬物と安定化剤の状態を分子レベルで評価できれば、ナノ粒子製剤の処方設計及び品質評価・制御において有用な指針となる。しかし、懸濁液は液相(溶解成分)と固相(ナノ粒子)の2相からなるため、固体試料と同様に評価するのは困難である。そこで、懸濁液を乾燥して試料を固化した後、固体試料の測定法(粉末X線回折測定、熱分析、各種分光測定等)を適用して評価がなされている。しかし、乾燥後において、ナノ粒子内部あるいは固液界面にある薬物と安定化剤が懸濁状態の物性をそのまま保持しているかどうかは疑問である。NMRは、分子を構成する原子1つ1つを区別して観察する方法であり、他の測定法では得られにくい原子核レベルの情報を取得できる。また、NMRではピークの線幅や緩和時間測定などから、分子運動性に関する情報も得られる。我々は固体NMRで用いられているマジック角回転(magic-angle spinning: MAS)及び双極子デカップリング(dipolar decoupling: DD)の2つの手法を応用して(Fig. 1)、水に分散したナノ粒子中の薬物と安定化剤の分子状態を直接評価する試みを行っており、これをsuspended-state NMRと称している<sup>2-4)</sup>。Suspended-state NMRでは、試料の漏洩がないように工夫されたカプセル型容器に薬物ナノ懸濁液を封入し、これを固体NMRの試料管にセットする。そして、外部磁場( $B_0$ )に対して $3\cos^2\theta - 1 = 0$ を満たす



Evaluation of molecular state of cosmetic nanoparticles dispersed in water by suspended-state NMR spectroscopy

Kenjiro Higashi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

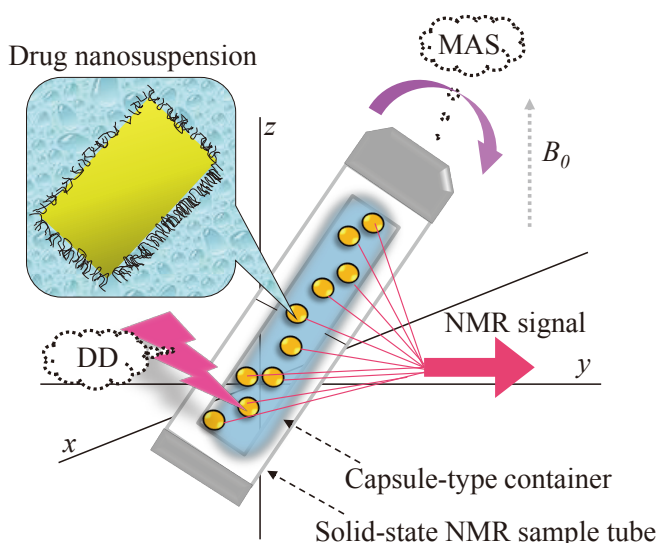


Fig. 1 A schematic representation of suspended-state NMR

$\theta = 54.7^\circ$ の角度(マジック角)で、試料管を数kHz～数十kHzで高速回転させるMASを適用する。さらに、NMR信号を取得する時に、 $^1\text{H}$ 核の共鳴周波数の強い高周波数のラジオ波を連続的に照射するDDを適用する。MASとDDの併用により、固体試料のスペクトルの広幅化の原因となっている化学シフト異方項及び $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 双極子相互作用の両方を消去・軽減する。結果として、溶液NMRでは観察できない運動性の低い固体成分でも高分解能 $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルの取得が可能となる。従ってsuspended-state NMRでは、懸濁液中にある運動性の低いナノ粒子のコアにある薬物や固液界面にある安定化剤のNMRスペクトルを、乾燥工程なしに直接得ることができる。

本稿では、suspended-state NMR法を用いて、湿式粉碎により調製した2種類の薬物ナノ懸濁液について評価した結果を報告する。難水溶性薬物のモデルとしてインドメタシン(indomethacin: IMC、非ステロイド性抗炎症薬)及びピロキシカム(piroxicam: PXC、非ステロイド性抗炎症薬)を用いた。IMCには7つの結晶多形が報告されている<sup>5)</sup>。ここでは、最安定形の $\gamma$ 形IMCに加えて準安定形の $\alpha$ 形IMC及び非晶質IMCを使用し、粉碎前のIMC結晶形が湿式粉碎より得られるナノ粒子の形態やIMC分子状態に及ぼす影響を評価した。また、安定化剤として、ポリエチレンオキサイド(polyethyleneoxide: PEO)<sub>101</sub> - ポリプロピレンオキサイド(polypropyleneoxide: PPO)<sub>56</sub> - PEO<sub>101</sub> からなるトリブロックコポリマーであるポロキサマー407(P407)を用いた。薬物とP407を水に分散させて湿式粉碎することで、薬物ナノ懸濁液を調製した。そして、得られた薬物ナノ懸濁液中の薬物及びP407の分子状態をsuspended-state NMR測定により評価し、各薬物ナノ粒子の構造について考察した。

## 2. 方法

### 2.1. 薬物ナノ懸濁液の調製

P407を濃度50 mg/mLとなるよう蒸留水に溶解させP407溶液を得た。薬物( $\gamma$ 形IMC、 $\alpha$ 形IMC、非晶質IMC、PXC)を仕込み濃度100 mg/mLでP407溶液中に分散し、ボルテックスミキサーを用いて3分間混合し、物理的混合物(physical mixture: PM)懸濁液を得た。PM懸濁液と直径5 mmのジルコニアボール100個を容量50 mLのジルコニア製粉碎ジャー(Verder Scientific Co. Ltd., Tokyo, Japan)に入れ、遊星型ボールミル(PM100: Verder Scientific Co. Ltd., Tokyo, Japan)により回転速度400 rpmで粉碎を行うことにより、混合粉碎物(ground mixture suspension: GM)懸濁液を調製した。

### 2.2. 粒子径測定

MICROTRAC 9340-UPA (MicrotracBEL Corp., Japan)を用いて動的光散乱法により、ナノ粒子の体積平均径(mean volume diameter; MV)を算出した。

### 2.3. 極低温透過型電子顕微鏡(Cryo-transmission electron microscopy: Cryo-TEM)測定

JEM-2100F (JEOL Co., Ltd., Japan)を用い、加速電圧120 kVでcryo-TEM測定を行った。マイクログリッド膜貼付グリッド(Cu200, Nisshin EM Co. Ltd., Japan)のフィルム被膜側をHDT-400 (JEOL Co., Ltd., Japan)により40秒間親水化処理した後、各試料液2  $\mu\text{L}$ を吸着させた。過剰な溶液を濾紙で吸い取った後、液体窒素の自動供給により温度を約 $-170^\circ\text{C}$ にコントロールした液体エタン内で急速凍結させcryo-TEM試料とした。Cryo-TEM試料をGatan 626 cryo-holder (Gatan, Inc., CA, USA)に液体窒素中で装着し、 $-170^\circ\text{C}$ 以下の温度を維持してTEM測定を行った。

### 2.4. Suspended-state NMR測定

JNM-ECA 600 (JEOL Resonance Co., Ltd., Japan: 外部磁場強度: 14.01 T)を用い、suspended-state  $^{13}\text{C}$  NMR測定を行った。測定シーケンスは、MAS 5 kHz条件下において、交差分極(cross polarization: CP)及びパルス飽和移動(pulse saturation transfer: PST)測定を行った。また、spinning sidebandを消去するためtotal suppression of spinning sideband測定を合わせて用いた。Suspended-state NMR測定では、MAS下における試料の漏出を防ぐため、特殊カプセル内に試料を封入した後、NMRサンプル管内に挿入した。MASによる高速スピニングの影響で、測定試料のサンプル管壁への偏析が認められた。しかし、この試料は再分散が可能であり、平均粒子径もMAS回転

前とほぼ同等であった。このことから、MASによる試料の変化は起こらないと判断し、以降の解析を行った。

### 3. 結果・考察

#### 3.1. 粒子径及び形態評価

Fig. 2左に各GM懸濁液の動的光散乱法による粒子径測定結果を示す。GM懸濁液のMVは240-270 nmであり、その粒子径分布は単峰性であった。この結果より、いずれの結晶形のIMC及びPXCを用いた場合でも湿式粉碎により薬物ナノ懸濁液が形成されることが明らかとなった。一方、cryo-TEM測定の結果 (Fig. 2右)、初期の薬物結晶形及び薬物の種類に依存して得られる薬物ナノ粒子の形態は異なった。 $\gamma$ 形IMCを用いて調製したGM懸濁液では、菱形板状の形態が観察された。これに対して、 $\alpha$ 形IMC及び非晶質IMCを用いて調製したGM懸濁液では、針状のナノ粒子が認められた。各IMC粉末について走査型電子顕微鏡測定を行った結果、 $\gamma$ 形IMC結晶は菱形板状、 $\alpha$ 形IMC結晶は針状の形態を呈した (data not shown)。この結果より、 $\gamma$ 形IMC及び $\alpha$ 形IMCを用いて調製した場合、それぞれの初期結晶に特徴的な形態を保持したままナノ粒子化したのに対して、非晶質IMCを用いた場合にはナノ粒子化に伴い形態が変化することが示された。さらに、PXCを用いた系ではIMCの系とは異なり、粒子の形態は不定形となり、またナノ粒子と水の固液界面にP407由来すると考えられる厚い表面層が認められた。

#### 3.2. Suspended-state NMR測定

##### 3.2.1 CP測定

Suspended-state NMR測定により各GM懸濁液中の薬物とP407の分子状態を評価した。Fig. 3には各GM懸濁液について、CP法を用いて測定したNMRスペクトルを示す。CP法は双極子相互作用を介して $^1\text{H}$ 核から $^{13}\text{C}$ 核へ磁化を移動させる手法である。分子運動性の高い成分は双極子相互作用が平均化されるためCPスペクトルに反映されにくいものに対して、分子運動性の低い成分はCPスペクトルに強調されて観察される。すなわち、懸濁液では運動性の高い溶解成分はCPスペクトルに反映されにくいものに対して、運動性の低い粒子成分は強調して観察される<sup>6)</sup>。 $\gamma$ 形IMC及び $\alpha$ 形IMCを用いて調製したGM懸濁液のIMCピークは、それぞれ $\gamma$ 形IMC及び $\alpha$ 形IMC結晶の化学シフト値と一致した。一方、非晶質IMCを用いて調製したGM懸濁液のIMCピークは、 $\alpha$ 形IMC結晶と同様であった。すなわち、結晶性IMCより調製したGM懸濁液では粉碎過程で初期結晶形を維持したままIMCがナノ粒子化した一方、非晶質IMCを用いたGM懸濁液ではナノ化する過程で $\alpha$ 形IMCへと転移して結晶化したことが明らかとなった。また、本結果より Fig. 2の cryo-TEM像で観察されたIMCナノ粒子

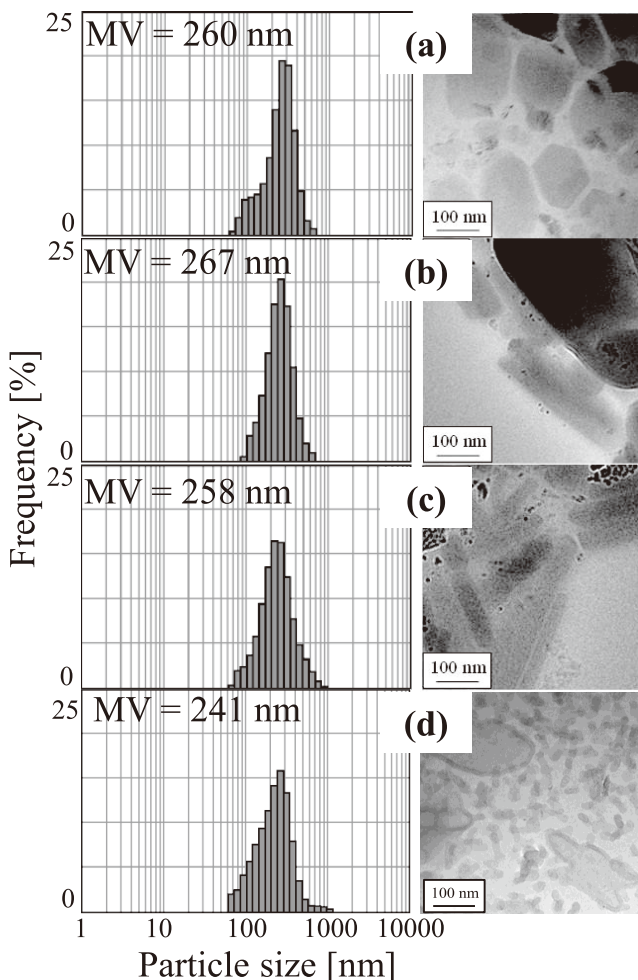


Fig. 2 (left) Particle size distribution patterns and (right) cryo-TEM images of a GM suspensions prepared with (a)  $\gamma$  form IMC, (b)  $\alpha$  form IMC, (c) amorphous IMC and (d) PXC

の形態の相違が、ナノ粒子中のIMC結晶形の違いに由来することを確認できた。PXCを用いたGM懸濁液においては、PXCピークが先鋭化なピークと広幅なピークの重ね合わせとして観察された。この先鋭なピークと広幅なピークはそれぞれ結晶と非晶質状態のPXCを反映しており、GM懸濁液においてはPXCが結晶状態のみならず非晶質状態で存在することが示された。湿式粉碎により調製したナノ粒子中の薬物は通常結晶状態であることから、ナノ粒子中のPXC非晶質化は興味深い事象と言える。

さらに、いずれのGM懸濁液のCPスペクトルいずれにおいても、P407由来するピークが20及び70ppm付近に認められた。CP法は運動性の低い成分を強調して観察する手法であることから、GM懸濁液中には運動性の抑制されたP407成分が存在することが明らかとなった。すなわち、このP407ピークはナノ粒子と水の固液界面に吸着した成分あるいはナノ粒子に取り込まれた成分に由来すると考えられる。また、P407のピーク強度はPXCを用いたGM懸濁液の方が、各結晶形のIMCを用いたGM懸濁液よ

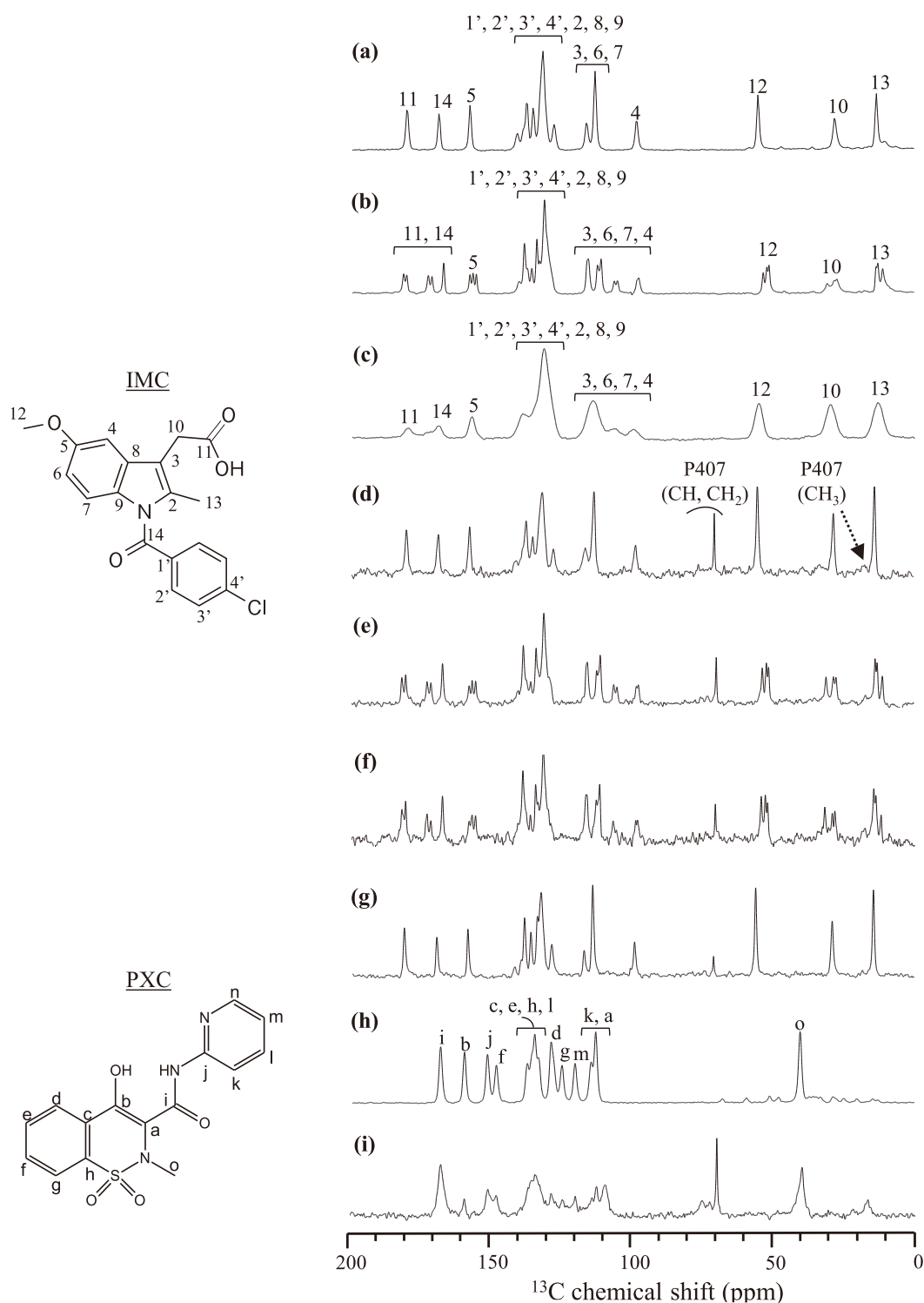


Fig. 3  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectra of (a)  $\gamma$ -form IMC, (b)  $\alpha$ -form IMC, (c) amorphous IMC, (d) GM suspension prepared with  $\gamma$  form IMC, (e) GM suspension prepared with  $\alpha$  form IMC, (f) GM suspension prepared with amorphous IMC, (g) PM suspension prepared with  $\gamma$  form IMC, (h) crystalline PXC, and (i) GM suspension prepared with PXC

りも顕著に大きくなった。このことから、PXCを用いたGM懸濁液ではIMCを用いたGM懸濁液と比較して、より多くのP407がナノ粒子成分として存在していると考えした。

### 3.2.2 PST測定

各GM懸濁液中に存在するP407の分子状態をより詳細

に評価する目的で、PST法による評価を行った。PST法では、運動性の高い成分(溶解成分)及び低い成分(ナノ粒子成分)の両方がスペクトル上に観察される。Fig. 4に、 $\gamma$ 形IMC/P407 PM懸濁液と各GM懸濁液のスペクトルを、70 ppm 付近のPEOのメチレンピークに対してノーマライズした結果を示す。PM懸濁液のスペクトルでは、PEO

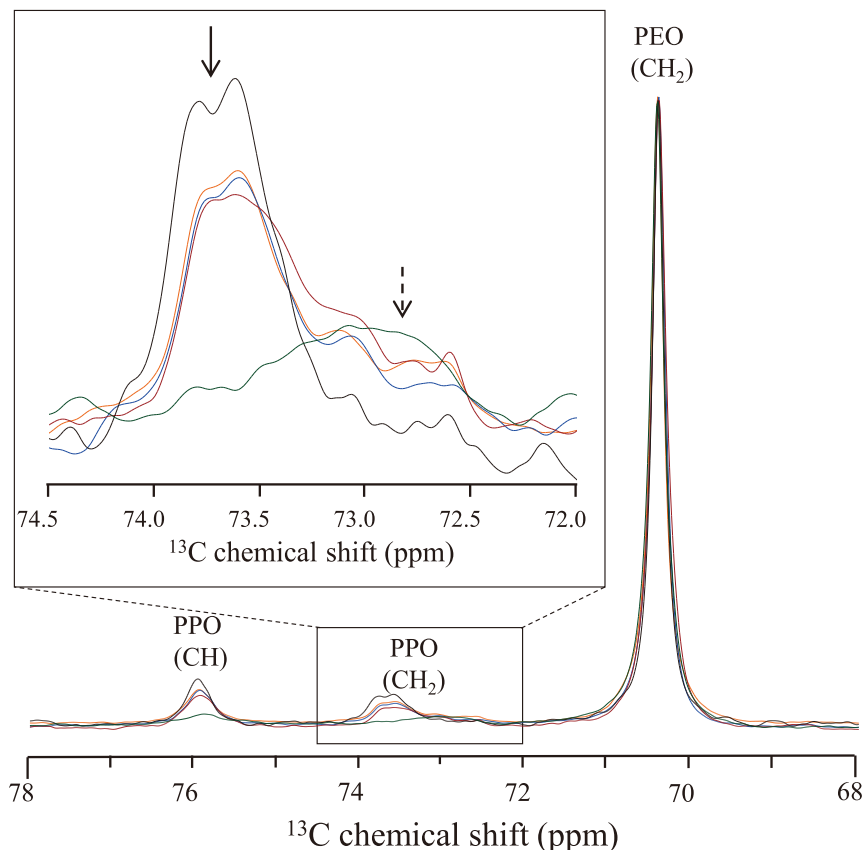


Fig. 4  $^{13}\text{C}$  PST/MAS NMR spectra of GM suspension prepared with  $\gamma$  form IMC (orange line), GM suspension prepared with  $\alpha$  form IMC (blue line), GM suspension prepared with amorphous IMC (red line), PM suspension prepared with  $\gamma$  form IMC (black line), and GM suspension prepared with PXC (green line). Solid and dotted arrows indicate the P407 forming polymeric micelles, and immobilized on the surface of nanoparticles, respectively.

鎖と PPO 鎖のメチレンピークは共に先鋭であった。PM 懸濁液においては P407 はほぼすべてが高分子ミセルとして存在しており、その速い等方性回転 (相関時間  $10\ \mu\text{s}$ ) のため、先鋭なピークが観察されたと考えられた<sup>6)</sup>。GM 懸濁液においては、PEO ピークの線幅と化学シフトは PM 懸濁液のものとはほぼ一致した。GM 懸濁液においては P407 は薬物ナノ粒子 (200–300 nm) と高分子ミセル (10–20 nm) の両方に存在する。薬物ナノ粒子と高分子ミセルでは、そのサイズ及び拡散速度は大きく異なるにも関わらず、PEO ピークの形状は同程度に先鋭であった。この理由として、ナノ粒子の PEO 鎖は主にナノ粒子と水の固液界面に存在しており、水和層を形成しているため分子運動性が高く、高分子ミセルの PEO 鎖と同様の分子状態にあることが考えられる<sup>7)</sup>。これに対して、74 ppm 付近の GM 懸濁液中の PPO のメチレンピークでは、低磁場側の高分子ミセルに由来するピーク (実線矢印) に加えて、高磁場側にナノ粒子成分である P407 に由来すると考えられる肩ピーク (破線矢印) が観察された。PPO 鎖のピークが低磁場側と高磁場側に分裂して観察された結果より、P407 のナノ粒子と高

分子ミセル間の吸着・脱着は NMR のタイムスケールよりも遅いことが示された<sup>6)</sup>。溶液中における粒子への吸着は高分子と低分子の界面活性剤で大きく異なる。低分子界面活性剤では粒子界面とミセル間での吸着・脱着は極めて速い。一方、高分子界面活性剤では、多数あるモノマーが粒子界面でそれぞれ相互作用するため、高分子鎖の部分的な吸着・脱着は起きるものの高分子鎖全体の吸着・脱着は抑制される<sup>8)</sup>。特に、粒子がナノサイズの場合には、高分子鎖の脱着は顕著に抑制される。よって、本 GM 懸濁液においても、P407 の疎水部である PPO 鎖のモノマーがそれぞれナノ粒子中で薬物と多数の疎水性相互作用を形成しており、この疎水性相互作用が協同的に働く。そのため、ナノ粒子に強く吸着した P407 の脱着は極めて抑制されていると推察された。

Fig. 5 に suspended-state NMR より考察した IMC/P407 GM 懸濁液 (Fig. 5a) 及び PXC/P407 GM 懸濁液 (Fig. 5b) の模式図を示す。湿式粉碎により、 $\gamma$  形 IMC を用いた GM 懸濁液では  $\gamma$  形 IMC ナノ結晶が、 $\alpha$  形 IMC 及び非晶質 IMC を用いた GM 懸濁液では  $\alpha$  形 IMC ナノ結晶が形成された。

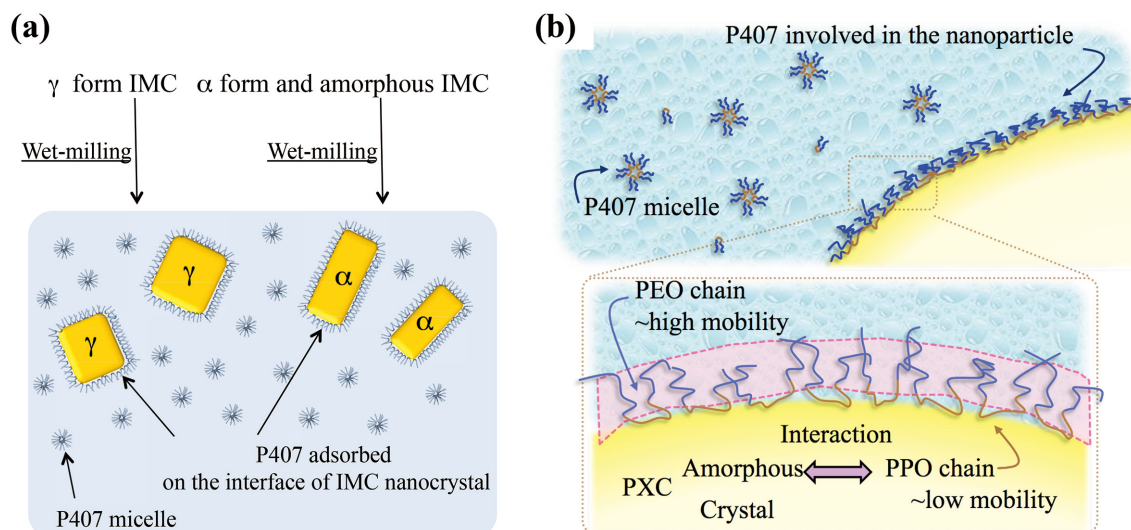


Fig. 5 Schematic representations of (a) IMC/P407 and (b) PXC/P407 GM suspensions

各IMC/P407 GM懸濁液中においては、液相成分としてP407の高分子ミセル、固相成分としてIMCナノ結晶及びその結晶界面に吸着したP407が存在している。IMCナノ結晶界面に吸着したP407は、疎水性のPPO鎖の疎水性相互作用によりIMC結晶に強く相互作用する一方、親水性のPEOの水和層形成によりIMCナノ結晶の分散安定化に寄与していると考えられる。PXC/P407 GM懸濁液でも、IMC/P407 GM懸濁液と同様に、液相成分であるP407高分子ミセル及び固相成分であるPXCナノ粒子からなる。そして、固相のP407は主にナノ粒子界面近傍に存在し、親水性の高いPEO鎖を液相側に突き出し、また疎水性の高いPPO鎖は粒子界面で固定された構造を形成する。IMC/P407 GM懸濁液ではIMCが結晶で存在するのみであるのに対して、PXC/P407 GM懸濁液ではPXCの結晶と非晶質が共存する。PXCの非晶質は非常に不安定であり、室温でも速やかに結晶化する。したがって、水溶液中でPXC非晶質が単独で安定に存在するのは困難で、P407がPXC非晶質形成に寄与していると予想される。ナノ粒子界面において、P407のPPO鎖が粒子内部を向いていることから、このPPO鎖がPXCと相互作用を形成し、PXC非晶質を安定化していると考えた。IMCよりもPXCの方がPPO鎖との分子間相互作用が強い。そのため、より多くのP407がナノ粒子に取り込まれ、ナノ粒子中の一部のPXCが非晶質化したと推察した。

#### 4. 総括

Suspended-state NMRにより、湿式粉碎により調製したIMC/P407及びPXC/P407ナノ懸濁液中の薬物の結晶形やナノ粒子に吸着したP407の分子状態を評価できた。Suspended-state NMRは、薬物ナノ懸濁液中の薬物と添加剤について原子レベルの詳細な情報が得られる。一

方、MASによる遠心力の影響を考慮する必要があり、またNMRの感度の低さから測定に時間を要し、適用が薬物濃度の高い薬物ナノ懸濁液のみに限られる。そのため、今後のsuspended-state NMRの汎用的な応用については更なる発展が必須である。しかし、近年のNMR技術の目覚ましい発展を背景に、将来的には薬物ナノ懸濁液の物性評価法として確立され、様々な薬物ナノ懸濁液の分子状態・界面構造評価に用いることができると見込んでいる。そして、効率的な高品質の薬物ナノ粒子製剤の処方設計及び精密な品質評価・管理に貢献するものと期待している。

#### (引用文献)

- 1) M. Malamataris, K. Taylor, S. Malamataris, D. Douroumis, K. Kachrimanis, *Drug Discov. Today*, 23, 534-547 (2018)
- 2) J. Zhang, K. Higashi, W. Limwikrant, K. Moribe, K. Yamamoto, *Int. J. Pharm.* 423, 571-576 (2012)
- 3) Y. Kuroiwa, K. Higashi, K. Ueda, K. Yamamoto, K. Moribe, *Int. J. Pharm.* 537, 30-39 (2018)
- 4) Y. Hasegawa, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe, *Mol. Pharm.* 12, 1564-1572 (2015)
- 5) K. Higashi, K. Ueda, K. Moribe, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 117, 71-85 (2017)
- 6) C. Mayer, *Ann. R. NMR S.* 55, 205-258 (2015)
- 7) K. Abe, K. Higashi, K. Watabe, K. Kobayashi, W. Limwikrant, K. Yamamoto, K. Moribe, *Colloids Surf. A.* 474, 63-70 (2015)
- 8) K. Sigfridsson, U. Skantze, P. Skantze, S. Johansson, I. Grant, B. Smedsrød, B. Fuglesteig, K. Elvevold, L. Lindfors, *Int. J. Pharm.* 518, 29-40 (2017)



## **Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野**

# 革新的なシミ予防・治療法の開発

名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学

飯田 真智子

Hyperpigmentation (e.g., melasma, freckles, senile pigment freckles, and post-inflammatory pigmentation) is a common skin disorder that progress with exposure to sunlight and is generally intractable. Hydroquinone, tranexamic acid, corticosteroids and kojic acid are well-established agents for treating hyperpigmentation. However, problems of limited efficacy, recurrence and side effects such as hypopigmentation remain. Model mice would be important for the development of effective drugs. However, unlike human skin, the amount of melanin and the number of melanocytes are very limited in the epidermis of wild-type haired mice and hairless mice. Therefore, model mice having pigmented skin would be a useful tool for studying the mechanisms of hyperpigmentation and for developing effective drugs. Recently, an original mouse with pigmented skin was developed in our laboratory. In this study, we examined whether hyperpigmentation is induced by UVB radiation in the skin from our original mouse.

## 1. 緒言

一般的にシミと呼ばれる肝斑・雀卵斑・老人性色素斑・炎症後色素沈着等は、難治性の色素沈着症(疾患)であると同時に、美容の観点から心理的負担も大きい<sup>1)</sup>。治療法としては、トラネキサム酸、ステロイド等の薬剤を組み合わせる方法、あるいは、narrow-band UVBを用いた治療が一般的である<sup>2)</sup>。一方、色素沈着等の副作用や再発の問題、あるいは、長い治療期間を要する等の問題がある<sup>1)</sup>。より画期的な予防・治療法の開発には、ヒトあるいはヒト類似の疾患動物モデルを用いた色素沈着症の病態解明、および、その科学的エビデンスに基づいた動物代替法による薬剤評価システムの確立が重要である。

野生型の有毛マウス皮膚では、メラノサイトおよびメラニン毛根内に存在し、表皮にはほとんど存在しない<sup>3)</sup>。一方、無毛のヘアレスマウスの表皮には、メラニン・メラノサイトが分布する<sup>4)</sup>。しかしながら、その量・数は僅かであり、肉眼的に皮膚メラニンの変化を観察・評価することは難しい。従って、紫外線等による色素沈着の再現、機序解明、予防・治療剤の評価を行うには感度が十分とは言えない。

近年、当研究室において、肉眼的に皮膚メラニンを観察可能な無毛でかつ有色皮膚を持つマウス(Hairless mice with hyper-pigmented skin; HL-HPSマウス)が開発された。この皮膚メラニン保有マウスを用いれば、より鋭敏に

色素沈着を再現することが可能になるのではないかと着想した。もし、ヒト類似の色素沈着症が再現されれば、その分子基盤に基づいた薬剤選別のための動物代替法開発への発展も可能である。本研究では、まず、本モデルマウスがヒト色素沈着症のモデルとしての有効性を検証する第一歩として、本モデルマウスに紫外線を照射し、色素沈着症が高感度に再現可能かどうかを検討した。

## 2. 方法

### 2.1. マウス

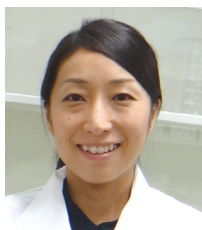
野生型 Hairless マウス(HL-マウス)<sup>5)</sup>、および、オリジナルに開発した皮膚にメラニンを保有するオリジナルマウス(Hairless mice with hyper-pigmented skin; HL-HPSマウス)の5-10週齢の雄マウスを用いた。動物実験は、名古屋大学動物実験委員会における厳正な審査を経て行った(承認番号: no. 29031)。

### 2.2. 皮膚色の測定

皮膚の黒さは、色彩色差計(CR-400; Konica Minolta, Inc.)を用いて非侵襲的に測定した。皮膚の明るさの指標であるL\*にて評価した<sup>5)</sup>。L\*値が低いほど、皮膚が黒いことを示し、L\*値が高いほど、肌が明るい(肌が白い)ことを示す。L\*値は、当該皮膚領域をランダムに3回測定し、その平均値を使用した。

### 2.3. 組織学的解析

サンプリングした皮膚は、10%中性緩衝ホルマリン(v/v)にて4℃で一晩固定し、パラフィン包埋を行った。パラフィン切片(4μm)を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。フォンタナー・マッソン(FM)染色は、同様に脱パラフィンを行った後、アンモニア銀液(40592; Muto Pure Chemicals Co., Ltd.)に浸漬(暗所1



Development of model mice for skin hyperpigmentation

Machiko Iida

Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine

晩)、その後、0.25% チオ硫酸ナトリウム水溶液(7772-98-7; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) に浸漬した(室温1分)。マウントクイック (DM-01; Daido Sangyo Co. Ltd) にて封入した後、フォンタナマッソン染色によって検出した表皮メラニン密度は、画像解析ソフト WinROOF (Mitani cooperation) により数値化した。WinROOFに取り込んだ画像について、フォンタナマッソンで染色されたメラニン顆粒だけが選択されるようカットオフ値(2値化)を設定し、同じ試験内の評価はすべて同じカットオフ値にて評価した。

## 2. 4. 紫外線照射

紫外線照射ランプは、FL20S.E-30/DMR; spectral irradiance, 290-330 nm; peak wave, 305 nm; Toshiba Medical Supply Co. Ltd.) を用いた<sup>5)</sup>。麻酔下にて紫外線照射を行った。また紫外線照射領域以外の皮膚はアルミ箔で覆った。

## 3. 結果

### 3. 1. オリジナルモデルマウス(HL-HPSマウス)の皮膚メラニン

HL-HPSマウスの皮膚色は、HLマウスの皮膚色と比べ肉眼的に明らかに黒く(図1)、皮膚色を色彩色差計で測定した結果、HL-HPSマウスのL\*値の平均は62.0、HLマウスのL\*の平均は54.0であった。また、両者は、統計学的に有意であった(p<0.01)。ヘマトキシリン・エオシン染色では、HLマウスでは、ほとんど表皮メラニンが観察されなかった。一方、HL-HPSマウスの表皮では、基底層・有棘層にメラニンが観察された。さらに、メラニンを強調するために、フォンタナマッソン染色を行ったところ、HL-マウスにおいても表皮基底層におけるメラニン分布が確認された。HL-HPSマウスの表皮では、さらに広範囲(基底層、有棘層、顆粒層、角化層)に顕著なメラニンの分布が確認された。HL-HPSマウスでは、特に表皮細胞のapical側に、メラニンキャップと呼ばれる形態をとってメラニンが分布することが確認された。WinROOF画像解析ソフトを用いて、フォンタナマッソン染色にて染色されたメラニン密度を解析したところ、HL-HPSマウスの表皮メラニン密度は、HL-マウスのそれと比べ約26倍高く、また統計学的にも有意であった(p<0.01)。

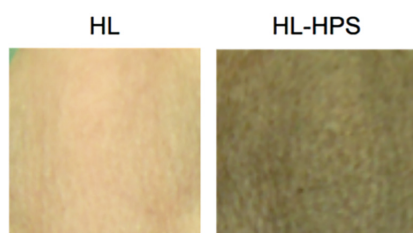


図1 オリジナルモデルマウスの皮膚メラニン  
6週齢のHL-マウス(HL)およびHL-HPSマウス(HL-HPS)の背部皮膚の肉眼所見。

### 3. 2. 紫外線によるサンタンの誘導

HL-HRPマウスにおいて、紫外線による色素沈着症が高感度に再現可能かどうかを検証するため、HLマウスおよびHL-HRPマウスの右背部皮膚にUVBを単回照射した。左背部皮膚は、UVBが照射されないようアルミ箔で覆った。UVB照射から5日後、HLマウスのUVB照射部と非照射部の皮膚色には肉眼的な変化はみられなかった(図2)。一方、HL-HPSマウスのUVB照射部では、非照射部と比べ、肉眼的にも皮膚の黒さの亢進(サンタン)しているのが確認された(図2)。皮膚色を色彩色差計で測定した結果、HLマウスの皮膚では、非照射部の皮膚のL\*値と比べ、照射部のL\*が有意(p<0.01)に減少していた。次に、UVB照射後5日目の皮膚を採取し、パラフィン切片を作製し、フォンタナマッソン染色を行った。HLマウスでは、UVB照射部と非照射部でもメラニン産生の亢進はみられなかったのに対し、HL-HPSマウスでは、非照射部と比べ、照射部の基底層、有棘層、顆粒層、角化層において顕著なメラニン産生の亢進が観察された。また、画像解析ソフト(WinROOF)によりメラニン密度を定量したところ、HLマウスでは、非照射部と比べ、照射部における有意なメラニン密度の亢進はみられなかったが、HL-HPSマウスでは非照射部と比べ、UVB照射部において有意(p<0.01)なメラニン密度の増加が確認された。

### 3. 3. UVB照射によるサンタンの回復

HL-HPSマウスに生じたサンタンの経日変化をL\*値により評価した。UVB照射部のL\*値は、UVB照射から5日目で非照射部と比べて有意に低くなり、UVB照射から1週間後、L\*値は最も低値を示した(最も黒くなった)。その後、皮膚のL\*は緩やかに上昇し(明るさが回復し)、UVB照射から約1ヶ月で、UVB非照射部の皮膚と同等のL\*まで回復した。UVB照射後5日目から40日目までのHL-HPSマウスの皮膚のL\*値の変化は、非照射のL\*値と比べ統計学的に有意(p<0.05)であった。一方、HLマウスでは、約1ヶ月

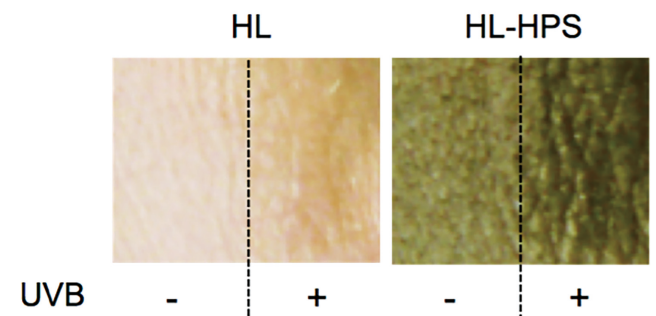


図2 UVB照射によるサンタンの発症

UVB照射から5日後のHL-マウス(HL)およびHL-HPSマウス(HL-HPS)の背部皮膚の肉眼所見。点線の左側はUVB非照射領域(UVB-)、右側はUVB照射領域(UVB+)。

月追跡しても顕著な皮膚色の変化は観察されず、有意なL\*値の変化もみられなかった。

### 3. 4. 遅延性色素沈着の出現

興味深いことに、UVB単回照射から約4ヶ月後、HL-HPSマウスでは、一度は回復した色素沈着部において、再び色素沈着が発症した。一方、HLマウスの皮膚では、このような遅延性の色素沈着はみられなかった。フォントナマッソン染色により、メラニンを検出したところ、HL-HPSマウスの遅延性色素沈着領域では、基底層、有棘層、顆粒層、角化層にメラニンが観察され、主に基底層に顕著なメラニン沈着が確認された。また、WinROOF画像解析ソフトを用いたメラニン密度の定量解析からも、HL-HPSマウスで誘導された遅延性色素沈着領域のメラニン密度は、HLマウスと比べ有意(p<0.01)に亢進していた。さらに、サンタンとは異なり、HL-HPSマウスの遅延性色素沈着は、生涯消失することはなかった。

## 4. 考 察

表皮に顕著なメラニンを保有するHL-HPSマウスに紫外線を単回照射することで、一時的なメラニン産生亢進(サンタン)、および、サンタン回復後に遅延性に発症する自然回復しない色素沈着症(シミ)を再現することに成功した。一方、HLマウスでは、サンタンも遅延性色素沈着症も発症しなかった。

一般に、ヒトでは、紫外線に曝露されると数時間後から翌日にかけてサンバーン(日光皮膚炎)が生じ、その数日後にサンタンと呼ばれるメラニン産生の亢進による皮膚の黒化がみられる。紫外線によって産生されたメラニンは、表皮細胞核apical側に分布し、メラニンキャップ(supranuclear melanin cap)と呼ばれる分布様式をとることが知られる<sup>6)</sup>。このsupranuclear melanin capは、核内DNAを紫外線から守るための防御システムと考えられている<sup>6,7)</sup>。ヒト正常表皮のターンオーバーは、個人差や年齢の違いはあるものの、28-56日で完結すると報告されている<sup>8,9)</sup>。紫外線によって一時的に産生されたメラニンも、このターンオーバーに伴い、早くて概ね1ヶ月で角質と共に体外へ排出され、サンタンが回復すると考えられている。本研究で用いたオリジナルモデルマウス、HL-HPSマウスでも、UVB照射から5-10日にかけて色素沈着が観察され、産生されたメラニンはsupranuclear melanin capの形態をとった。また、この色素沈着は紫外線照射から約40日をかけて徐々に回復した。HL-HPSマウスに誘導されたUVB照射による一時的な色素産生亢進(サンタン)は、少なくとも上記の点においてヒトと類似する。

一時的なメラニン産生の亢進(サンタン)は、自然回復可能であるのに対し、肝斑等の色素沈着症(シミ)は、通

常、そのままでは回復が困難である<sup>1)</sup>。また、その発症は、サンタンと比べると、紫外線等の曝露から比較的長い時間を経て発症する<sup>10)</sup>。肝斑(シミ)等の色素異常症の病理学的解析では、メラニン沈着は表皮層全体で見られるものの、特に表皮基底細胞において顕著であることが報告されている<sup>2)</sup>。HL-HPSマウスで観察された遅延性色素沈着も、最初のUVB照射から16週間後に発症した。また、自然回復がみられず、メラニンの表皮基底細胞への顕著な蓄積が観察された。以上の点において、HL-HPSマウスに発症したUVB誘発性の遅延性色素沈着は、ヒトの肝斑等の色素沈着症と類似している。

さらに、特筆すべきことは、本モデルマウスでは、僅か1回のUVB照射によって遅延性色素沈着を生じたことである。さらに、遅延性色素沈着を認めるまでに要した時間は、16週であった。過去に、本研究においてコントロールとして使用したHL-マウスに紫外線を1週間に3回、4週間にわたって連続照射することにより、28週後に遅延性の色素沈着が発症することが報告されている<sup>11)</sup>。このHL-マウスを用いた研究では、野生型マウスで遅延性色素沈着の誘導している点で優れており、このマウスでもヒト類似の色素沈着が誘導されている<sup>11)</sup>。一方、我々のモデルマウスでは、遺伝子改変マウスを用いることで、1回の紫外線照射によりヒトと類似した色素沈着を短時間で再現できるため、より鋭敏な色素沈着のモデルマウスとして有用である。

## 5. 総 括

当研究室にて開発された有色皮膚を持つオリジナルモデルマウス(HL-HPSマウス)において、ヒト類似の紫外線誘発性サンタン、および、遅延性色素沈着が鋭敏に再現された。肝斑、日光黒子等の色素沈着(シミ)は、紫外線によって増悪することが知られる。色素沈着症は難治性疾患であり、革新的な治療薬の開発が求められる。一方、美容的にも悩まれる患者さんも多い。化粧品の開発に実験動物を用いることは禁忌であり、今後、本モデルマウスに発症した色素沈着症の病態解明を進め、その分子基盤をもとにした鋭敏な動物代替法による薬剤選別法の開発が重要である。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なるご援助を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

## (引用文献)

- 1) Torok HM. A comprehensive review of the long-term and short-term treatment of melasma with a triple combination cream. *Am. J. Clin. Dermatol.* 7,

- 223-230, 2006.
- 2) Sehgal VN, Verma P, Srivastava G, Aggarwal AK, Verma S. Melasma: treatment strategy. *J. Cosmet. Laser Ther.* 13, 265-279, 2011.
  - 3) Yoshida H, Kunisada T, Grimm T, Nishimura EK, Nishioka E, Nishikawa SI. Melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 6, 1-5, 2001.
  - 4) Yajima I, Kumasaka MY, Iida M, Oshino R, Tanihata H, Al Hossain A, Ohgami N, Kato M. Arsenic-mediated hyperpigmentation in skin via NF-kappa B/endothelin-1 signaling in an originally developed hairless mouse model. *Arch Toxicol.* 91, 3507-3516, 2017.
  - 5) Kato M, Iida M, Goto Y, Kondo T, Yajima I. Sunlight exposure-mediated DNA damage in young adults. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 20, 1622-1628, 2011.
  - 6) Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 1493-1506, 2009.
  - 7) Kobayashi N, Nakagawa A, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, Ishigaki Y, Ohnishi T, Mori T. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 110, 806-810, 1998.
  - 8) Halprin KM. Epidermal "turnover time"--a re-examination. *Br. J. Dermatol.* 86, 14-19, 1972.
  - 9) Weinstein GD, Van Scott EJ. Autoradiographic analysis of turnover times of normal and psoriatic epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 45, 257-262, 1965.
  - 10) Jadotte YT, Schwartz RA. Melasma: insights and perspectives. *Acta. Dermatovenerol. Croat.* 18, 124-129, 2010.
  - 11) Naganuma M, Yagi E, Fukuda M. Delayed induction of pigmented spots on UVB-irradiated hairless mice. *J Dermatol Sci.* 25, 29-35, 2001.

# ヒト iPS 細胞を利用して、表皮角化細胞の様々な刺激に対する反応性にフィラグリン遺伝子の変異が与える影響について検討する

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野

井川 健

Previously, we have already successfully generated transgene-free and mutation-free human iPSCs (hiPSCs) from human dermal fibroblasts by using the piggyBac transposon system. Moreover, we successfully differentiated these hiPSCs into epidermal keratinocytes (iKCs; induced keratinocytes).

Incidentally, recent advances in the development of genome editing technologies based on programmable nucleases such as zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated nuclease Cas9 (CRISPR/Cas9) have substantially improved our ability to make precise changes in the genomes of human cells.

With our established systems of obtaining iKCs from hiPSCs and new technology of programmable nucleases, especially CRISPR/Cas9 system, we tried to clarify the precise effects of filaggrin gene (*FLG*) mutations in keratinocytes.

A guide RNA that targeted appropriate site of human *FLG* was designed by web-based tool and cloning into the backbone vector of CRISPR/Cas9 (*hFLG*-CRISPR/Cas9). We transfected *hFLG*-CRISPR/Cas9 into hiPSCs and obtained the several clones of hiPSCs which possessed random mutations in *FLG*. Then, original hiPSC and *FLG*-mutated hiPSCs were differentiated into epidermal keratinocytes using our established protocols and we obtained the normal iKCs and *FLG*-mutated iKCs. Under this condition, we can compare the phenotypes of normal and *FLG*-mutated iKCs of the same genetic background.

Thus, the results obtained from this system should be "true" meanings of *FLG* mutation in keratinocytes and should be important information for the understanding of AD pathogenesis.

## 1. 緒言

アトピー性皮膚炎は慢性に経過する炎症性皮膚疾患としてよく知られているが、難治であることもあり、常にその病態メカニズムの解明、治療法の開発の対象となっている疾患である。近年、このアトピー性皮膚炎の少なくない population において、フィラグリン遺伝子の変異が見いだされる (10%~30%) ことが報告されている。フィラグリンが皮膚のバリア機能を構成するタンパク質の一つであることから、この遺伝子の変異とアトピー性皮膚炎の発症には大きな意味合いがあるとされており、そのことについて様々な研究がなされている<sup>1)</sup>。しかしながら、その遺伝子に異常があることと、個々の細胞 (ここでは標的となる細胞は表皮角化細胞である) のふるまいに異常がみられるのかどうか、ということ、を、本当の意味で詳細に検討することについては、これまで検証できるシステムがなく、行われていなかった。

ところで、2006年に京大の山中らによって、iPS細胞の確立が報告<sup>2)</sup>されて以降、また、2012年に山中らがこの

業績によってノーベル賞を受賞して以降、このシステムを利用した研究は驚くべきスピードで発展しており、また、そのシステムを臨床に応用しようとする試みは世界中で進行している。そのような中で、我々も、リプログラミング因子を、トランスポゾンベクターを利用して細胞に導入し、ヒト iPS 細胞を作製することに成功している<sup>3)</sup>。また、そのヒト iPS 細胞を、表皮角化細胞に分化させ、さらには誘導された表皮角化細胞を *in vitro* において重層化させ、再構成表皮類似の構造を作ることも可能としている<sup>3)</sup>。

本研究では、我々が確立したヒト iPS 細胞作製から表皮角化細胞誘導、再構成表皮類似構造の作製というシステムと、遺伝子改変技術を組み合わせ、フィラグリン遺伝子変異があることによる表皮角化細胞の機能に関して、様々な外来性の刺激 (炎症性刺激や感染症関連の刺激など) に対する反応性への影響という面から、詳細に検討することを目的としている。

## 2. 方法

### 2.1. フィラグリン遺伝子変異の有無のみに違いのある一組のヒト iPS 細胞の作製

このためには、ヒト iPS 細胞において、ある程度の自在性をもって、遺伝子変異を導入するシステムの確立が必須である。ヒト ES 細胞/iPS 細胞における遺伝子改変は、マウス ES 細胞/iPS 細胞におけるそれに比して困難であるとされていたが、近年の技術の進歩により、人工ヌクレアーゼを利用することによって、比較的自在に行うことができ



Examination of 'true' meanings of filaggrin mutation in keratinocytes for various external stimuli

Ken Igawa

Department of Dermatology, Tokyo Medical and Dental University

るようになっている(ゲノム編集)<sup>4)</sup>。本研究においては CRISPR/Cas9 を利用して遺伝子改変を行った。

導入する変異は、本来は、実際のアトピー性皮膚炎患者でみられるフィラグリン遺伝子変異をそのまま導入すべきであるが、システムの確立も同時並行で行う必要もあり、また、黒白はっきりとした結果を得ることも考えて、まずはフィラグリン遺伝子をノックアウトすることを目的とした。フィラグリン遺伝子において、設定した標的配列を認識するガイド配列を作製し、CRISPR/Cas9 発現ベクターにクローニングする。このベクターをヒト iPS 細胞に導入し、DNA の 2 重鎖切断後の non homologous end joining (NHEJ) を利用したランダムな変異挿入がなされたヒト iPS 細胞を採取してくる。

## 2.2. 表皮角化細胞への分化プロトコルの確認

このようにしてフィラグリン遺伝子に変異を導入した(ノックアウトした)ヒト iPS 細胞を、これまでに確立したプロトコルに従って表皮角化細胞に分化させる。さらには、変異を導入していないオリジナルの iPS 細胞も表皮角化細胞へ分化させ、この二つの表皮角化細胞をもって互いの差異を検討する。近年、表皮角化細胞への分化プロトコルは我々も含めて確立されたと考えられていたが、もう一度そのプロトコルについて検討、確認を行うこととした。

## 2.3. ヒト iPS 細胞由来の線維芽細胞の誘導

確立したヒト iPS 細胞から、線維芽細胞を誘導した。既に報告されている方法<sup>5)</sup>を参照して作製した。

## 2.4. ヒト iPS 細胞由来の線維芽細胞と表皮角化細胞を利用した 3 次元培養皮膚モデルの確立

ヒト iPS 細胞由来の線維芽細胞と表皮角化細胞(以前に

確立したもの)を利用して、3次元培養皮膚モデル作製を行った。カルチャーインサートにまず分化誘導された線維芽細胞を播種し、数日培養を行う。培養液を変更し、線維芽細胞が重層し、真皮部分を形成するようにする。その後、真皮部分の上部に iPS 細胞から誘導された表皮角化細胞を播種し、さらに培養液を変更。数日培養後、表面を空気暴露し、角化細胞の重層と角化を促した。

## 3. 結果

### 3.1. フィラグリン遺伝子変異を有するヒト iPS 細胞の樹立

トランスポゾンシステムを利用して作成したヒト iPS 細胞において、CRISPR/Cas9 のシステムを使うことによって、フィラグリン遺伝子にヘテロで欠失をもつものを数種類樹立した(図1)。iPS 細胞の状態においては、形態的な変化はみられない。

### 3.2. 表皮角化細胞への分化プロトコルの確認

これまでに我々を含めて報告にある表皮角化細胞分化プロトコルに従って、ヒト iPS 細胞を分化させたところ、ことごとく失敗、という結果になった。そのため、ヒト iPS 細胞から表皮角化細胞を誘導するプロトコルについて再確認を行った。以前確立したプロトコルを改変して(詳細は省く)検討したところ、図2に示すように、得られた細胞においては、表皮角化細胞の遺伝子発現が確認された。少なくとも表皮角化細胞の系に分化していることを確認した。

ただし、このプロトコルは、以前のプロトコルの半分の日程であり(2週間程度)、それ以上の継続培養を続けることが不可能であり、さらに、継代も不可能であった。



図1

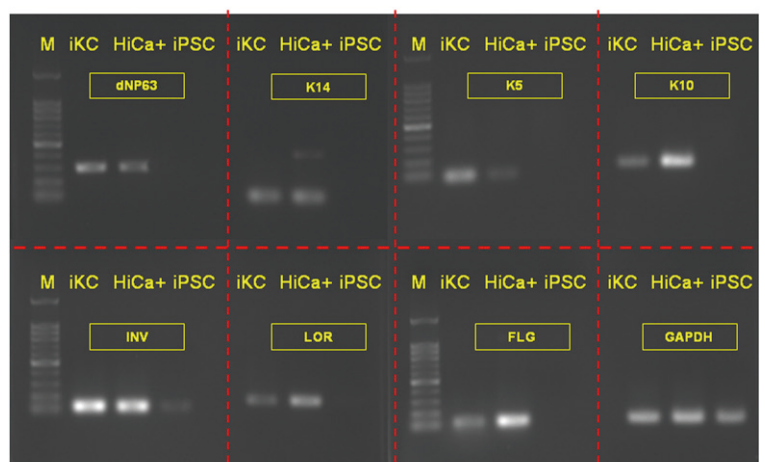


図2

### 3.3.

ヒトiPS細胞から、すでに報告されている方法により線維芽細胞(様細胞)を誘導することができた(図3)。

### 3.4.

以前に、すでにプロトコール(フル)によって分化誘導し、保存しておいた表皮角化細胞と、今回、誘導した線維芽細胞(様細胞)を利用して、図4に示すような、真皮様構造の上に、重層化した表皮様構造をもつ構造物を作製することに成功した。

## 4. 考察／5. まとめ

本研究は、ヒトiPS細胞を用いて、フィラグリン遺伝子に変異があることが、アトピー性皮膚炎にどのような意味合いをもつのか、ということを確認に評価する、ということにつながることを期待して行ったものである。

我々が確立しているシステムとゲノム編集技術を利用した遺伝子変異挿入を組み合わせると、他の遺伝子背景は同じで、標的の遺伝子、ここではフィラグリン遺伝子を選択したが、その変異があるかどうかのみに違いのある、一組のiPS細胞を得ることができる。この一組のiPS細胞をこれまでに確立した方法に従って表皮角化細胞へ分化させることによって、はじめて、フィラグリン遺伝子の変異のみに違いがあり、他はすべて同じ、という表皮角化細胞を得ることができる。

この一組の表皮角化細胞について、様々な外来性の刺激に対する反応性の違いを比較検討することによって、フィラグリン遺伝子の変異が表皮角化細胞のふるまいに与える影響を、本当の意味で詳細に検討することができることになる。

今回の研究では、表皮角化細胞の分化プロトコールの見直し、ならびに、研究者の所属が変わったことによる影響

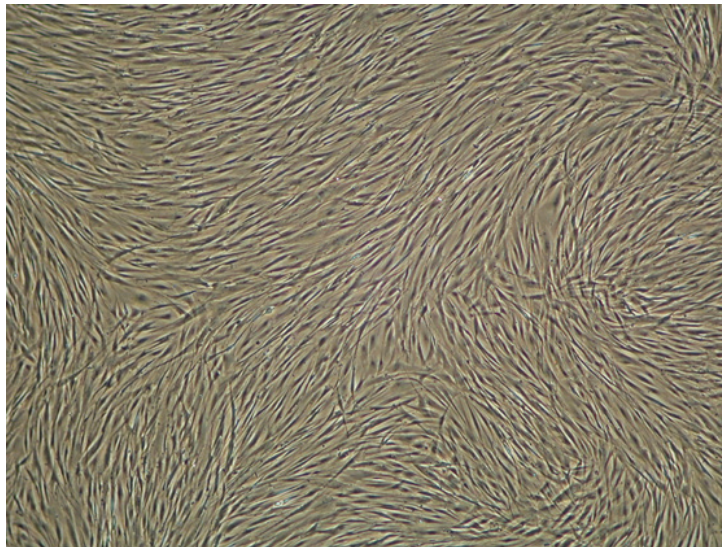


図3

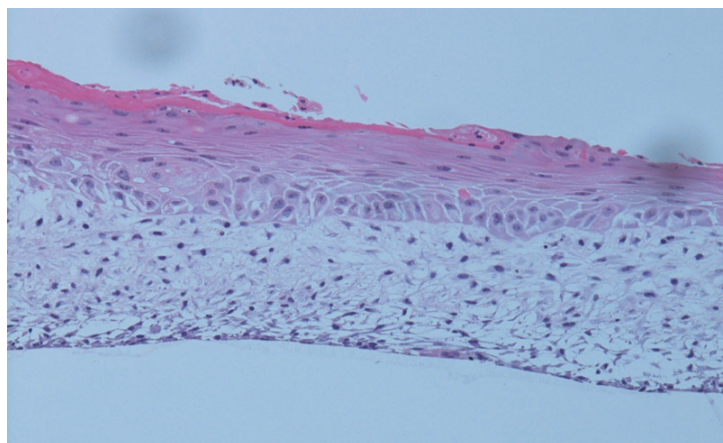


図4

もあって、フィラグリン遺伝子変異の有無による外部刺激への反応の違いについては検討することができなかったが、それを検討するための前段階までは到達することができたと考えている。

表皮角化細胞のシングルセルの状態における、細胞のふるまいを検討するのみならず、今回の研究で成功したように、より、正常の皮膚構造に近い状態（3次元培養皮膚様構造）において検討を行う用意ができたことは大きいと思われた。

ただし、先にも述べたように、表皮角化細胞への分化がうまく行われない状況がしばらく続いており、改変したプロトコルで得られた表皮角化細胞（様細胞）は、継代培養が不可能であり、3次元培養にもっていくことも不可能である。この部分においては、さらなる改変が必要であり、引き続き行う検討においては、しばらくの間は、シングルセルの状態における検討、ということになる。

このように、本研究は、アトピー性皮膚炎においてフィラグリン遺伝子の変異がもつ本当の意味に迫ることが可能となることにつながり、さらに、その遺伝子変異が表皮角化細胞において存在することの本来の意味を知ることができると思われ、コスメトロジーにも大きな意義をもつ成果となったと考える。

#### (引用文献)

- 1) Irvine AD, McLean WH, Leung DY: Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med* 2011;365:1315-1327.
- 2) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
- 3) Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J: Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:992-1001.
- 4) Kim H, Kim JS: A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 2014;15:321-334.
- 5) Itoh M, Umegaki-Arao N, Guo Z, Liu L, Higgins CA, Christiano AM. Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *PLoS One*. 2013 Oct 11; 8 (10): e77673.

# ポリエチレングリコール (PEG) 含有化粧品使用による抗 PEG 抗体誘導と PEG 化製剤の薬理効果への影響

徳島大学大学院医歯薬学研究部

石田 竜弘

Polyethylene glycol (PEG) is considered as non-toxic and non-immunogenic material, and surface modification with it can improve the immunogenicity and pharmacokinetics of nanocarriers. However, we recently reported that PEGylated liposome loses their long circulating properties when they are administered twice in same animal with certain interval (accelerated blood clearance (ABC) phenomenon). We elucidated that anti-PEG IgM, secreted in response to the first dose of PEGylated liposome, is responsible for the rapid clearance of the second dose via initiation of complement activation. We further elucidated that such anti-PEG IgM production is caused in nude mice (no T-cells), while it was not caused in SCID mice (no B and T cells) and splenectomized mice (no spleen). These suggest that spleen B cells produce the anti-PEG IgM in a T-cell independent manner. It appears that PEGylated liposome activates the immunity in spleen as T-cell independent antigens do. In addition, we recently reported that nucleic acids such as siRNA and pDNA in SL further enhances anti-PEG IgM production via toll like receptors (TLRs) (TLR 7 for siRNA, TLR9 for pDNA) in their sequence dependent manner. Our studies clearly demonstrate that any PEGylated formulations may display unexpected pharmacokinetic behavior upon repeated injection if such formulation induce anti-PEG IgM production and, as a consequence, may show less therapeutic efficacy or even cause undesirable side-effects. In this study, we paid an attention to PEG in the cosmetics and studied if the PEG induces anti-PEG immunity after sequential addition for 60 days. The result clearly demonstrated that the cosmetic containing PEG induces anti-PEG IgM, not anti-PEG IgG, and accordingly the cosmetic may be a major cause to induce pre-existing anti-PEG IgM observed in sera of healthy volunteers.

## 1. 緒言

PEG (ポリエチレングリコール) はエチレングリコールが重合した構造からなるポリマーであり、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ている。化粧品における PEG の用途としては界面活性剤、クレンジング剤、乳化剤および保湿剤などがあり、これらに含まれている PEG の一般的な分子量は 200 ~ 10,000 程度である。また、分子量の調節や脂溶性基の導入により、さまざまな物性を持たせることができるため、数百種類以上の誘導体も使用されている。このように PEG には幅広い用途があるため、化粧品成分として汎用されており、我々も日常的に PEG に暴露されている。

一方、PEG は医薬品においても重要な役割を果たしている。PEG を修飾した医薬品は、有効成分がゆるやかに放出され、血中濃度が長時間保たれるという特徴を有するため、血中で分解を受けやすい薬や、抗がん剤など毒性が発現しやすい薬においてよく用いられる。一方、我々は、PEG 修飾リポソームの投与によって PEG に対する抗体 (抗 PEG-IgM) の分泌が誘導されることを明らかにし、これに

よって 2 回目に投与した PEG 修飾リポソームが速やかに血中から排除されることを報告した<sup>1)</sup>。

これらの抗体はあくまで、PEG を修飾した医薬品の投与によって誘導されたものと考えられていたが、最近の臨床研究から、PEG 修飾医薬品による治療歴のない患者の一部が抗 PEG-IgM を保有していることを明らかとした。実際、東京大学医学部・女性外科・松本医師との共同研究において、これらの患者に卵巣がんの特効薬である Doxil (ドキシソルビシン封入 PEG 修飾リポソーム) を投与した場合、Doxil の血中濃度の急激な低下が観察され、通常得られる治療効果がほとんど得られないことも明らかとした。

これらの患者が抗 PEG 抗体を保有するに至った原因は明らかではない。前述のように、日常的に使用する化粧品の中に PEG を含むものが多く存在するため、これらの化粧品の日常的な使用により、PEG に対する抗体が誘導されたのではないかと考えた。PEG の皮膚透過性について、分子量 4,000 (PEG-75) 以上の PEG は皮膚から吸収されないが、それよりも小さい分子量の PEG は皮膚から最小限に吸収されることが知られている<sup>2)</sup>。また、傷害された皮膚に対しては PEG の分子量に関係なく、透過性を示すことが明らかとなっている<sup>3)</sup>。また、化粧品に含まれている PEG の毒性について、Bárányi らは PEG や PEG 誘導体はヒトの皮膚に対してはほとんど刺激を与えないが、経表皮水分消失 (TEWL) を増加させ、角質バリア機能を目に見えないレベルで傷害していることを報告しており<sup>4)</sup>、透過した PEG が PEG に対する免疫反応を誘導していても何ら不思議ではない。



Immunological response against PEG in cosmetics

Tatsuhiko Ishida

Tokushima University, Institute of Biomedical Sciences

このような仮説を検証するため、PEG 含有化粧品をラットに塗布した際の抗体産生評価ならびに化粧品によって誘導される抗 PEG 抗体による PEG 修飾医薬品の動態変化について検討を行った。

## 2. 方法

### 2.1. 実験動物

実験動物として HWY 雌性ラット (体重 150 ~ 250 g) を日本 SLC (静岡、日本) より購入して用いた。実験動物は SPF (specific pathogen free) 環境下で生育させた。また、全ての実験動物は徳島大学動物実験委員会によって承認を受けた上で行った。

### 2.2. 塗布用化粧品

PEG 含有化粧品として以下の 3 種類を用いた。

- ・化粧品：資生堂 AQUALABEL モイスチャーローション(S)

含有成分：水、DPG、エタノール、グリセリン、PEG-6、PEG-32、PEG/PPG-14/7 ジメチルエーテル、エリスリトール、アセチルヒアルロン酸 Na、ヒアルロン酸 Na、乳酸、塩化 Mg、PCA、アンズ果汁、塩化 Ca、水添レシチン、ポリクオタニウム-51、水溶性コラーゲン、PEG/ポリブチレングリコール-44/15 メチルエーテル水添ダイマージリノレイル、クエン酸 Na、EDTA-2Na、クエン酸、BG、水酸化 Na、トコフェロール、PEG-30 ダイブステロール、水酸化 K、EDTA-3Na、フェノキシエタノール、香料

- ・日焼け止め：資生堂メン UV プロテクター

含有成分：水、シクロメチコン、BG、変性アルコール、メトキシケイヒ酸オクチル、ジメチコン、ポリメチルシロキサン、PEG-9 ポリジメチルシロキシエチルジメチコン、ジステアルジモニウムヘクトライト、グリセリン、エリスリトール、スクワラン、フルオロ(C9-15) アルコールリン酸、トリメチルシロキシケイ酸、PEG/PPG-14/7 ジメチルエーテル、グルタミン酸 Na、メントール、ポリクオタニウム-51、ワイルドタイムエキス、チオタウリン、イソステアリン酸、(アクリル酸アルキル/ジメチコン) コポリマー、ジステアリン酸 Al、水酸化 Al、PEG-150、EDTA-3Na、DPG、BHT、フェノキシエタノール、香料、酸化亜鉛、酸化チタン

- ・シャンプー：花王 エッセンシャル リッチダメージケア シャンプー

含有成分：水、ラウレス硫酸アンモニウム、エタノール、ラウレス-4 カルボン酸 Na、ラウリルヒドロキシステアリン酸、ジステアリン酸グリコール、ラノリン脂肪酸、リンゴ酸、クエン酸、ヒマワリ種子油、ミリスチルアルコール、ステアリンアルコール、PPG-7、PPG-3 カプリルエーテル、ココミド MEA、グアーヒドロキシプロピルトリモニウムク

ロリド、イソデシルグリセリルエーテル、ポリクオタニウム-10、ポリクオタニウム-52、ラウレス-4、ラウレス-16、ラウレス-23、ラウレス硫酸 Na、ビスセテアリアルアモジメチコン、ステアロキシプロピルジメチルアミン、ジメチコン、水酸化 Na、安息香酸 Na、ベンジルアルコール、フェノキシエタノール、香料

### 2.3. 上記化粧品の塗布

ガムテープを用いて腹部に 10 回程度テープストリッピングを行い、コットンに適量の PEG 含有化粧品を染み込ませ、腹部に塗布した。この操作を 1 日 1 回行った。

### 2.4. Anti-PEG antibodies の測定

麻酔下で化粧品処置したラットから血液を採取し、血液を血清分離剤入りチューブ (栄研、東京、日本) に採取した。採取した血液は 30 分間室温で放置した後、3000 rpm (KUBOTA2800) で 20 分間遠心分離し、上清のみを回収した。血清は使用するまで -20℃ で保存した。

ELISA 用 96 ウェルプレート (Costar<sup>®</sup>, Corning, NY, USA) を用意し、mPEG2000-DSPE を 50μL 各ウェルに分注し、室温で 1 晩インキュベーションした。Blocking Solution を 350μL 分注し、1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、Wash Solution を用いて 3 回洗浄した。血清をそれぞれを 100μL 分注し 1 時間インキュベーションした。Wash Solution を用いて 5 回洗浄後、Blocking Solution を用いて 5000 倍希釈した二次抗体を 100μL 分注し、1 時間インキュベーションした。Wash Solution を用いて 5 回洗浄後、Enzyme Substrate を 100μL 分注し、5 ~ 30 分インキュベーションした。酵素反応を止めるために Stopping Solution を 100μL 分注した。その後 Microplate reader (TECAN, Männedorf, Switzerland) を用いて吸光度を測定した (λ=492 nm)。Goat anti-Rat IgM Antibody HRP Conjugated, Goat anti-Rat IgG-Fc Fragment Antibody HRP Conjugated を二次抗体として使用した。

### 2.5. Doxil の血中濃度測定

ラット尾静脈より Doxil を急速投与した。投与 5 日後に、血液を採取した。採取した血液は 30 分間室温で放置した後、20 分間遠心分離し、上清のみを回収した。血清中のドキソルビシン濃度は定法に従って HPLC を用いて測定した。

## 3. 結果

### 3.1. PEG 含有化粧品による anti-PEG IgM 産生

まず、PEG 含有化粧品によって anti-PEG IgM が誘導されるか検討を行った。PEG 成分が含まれている化粧品、日焼け止め、シャンプーのいずれかを 1 日 1 回ラットの腹部に塗布し、塗布開始 16、37、60 日後に血清を採取した。採取

した血清中のanti-PEG IgM量をELISAにより評価した。

その結果、化粧水塗布ラットにおいてanti-PEG IgM量の増加が確認された。抗体量は塗布開始37日後にピークとなったが、60日後には抗体量が減少していることが明らかとなった。また、日焼け止めとシャンプーを塗布したラットにおいてはanti-PEG IgMの誘導が確認されなかった。この理由の一つとして、日焼け止めとシャンプーは化粧水に比べて皮膚透過性が低く、表皮樹状細胞であるランゲルハンス細胞にまで到達しなかったために、抗体産生が生じなかった可能性が考えられる。また、IgGの誘導に関しても同様の検討を行った結果、PEG含有化粧品によるanti-PEG IgGの誘導は生じないことが確認された。

### 3. 2. PEG含有化粧水誘導anti-PEG IgMの抗体力価

続いて、化粧水で誘導されたanti-PEG IgMの抗体力価の評価を行った。Fig. 1において最もanti-PEG IgM量が多かった化粧水塗布37日後No.4の血清を用い、この血清中のanti-PEG IgMがPL投与によって誘導されるanti-PEG IgMと比較してどの程度の抗体力価を持っているのか検討を行った。

その結果、化粧水塗布によって誘導されたanti-PEG IgMは、PLを $10^{-4}$   $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg 静脈内投与したときに誘導されるanti-PEG IgMと同程度の抗体力価を持つことが確認された(Fig. 2)。

次に、この抗体力価がDoxilをどの程度クリアランスす

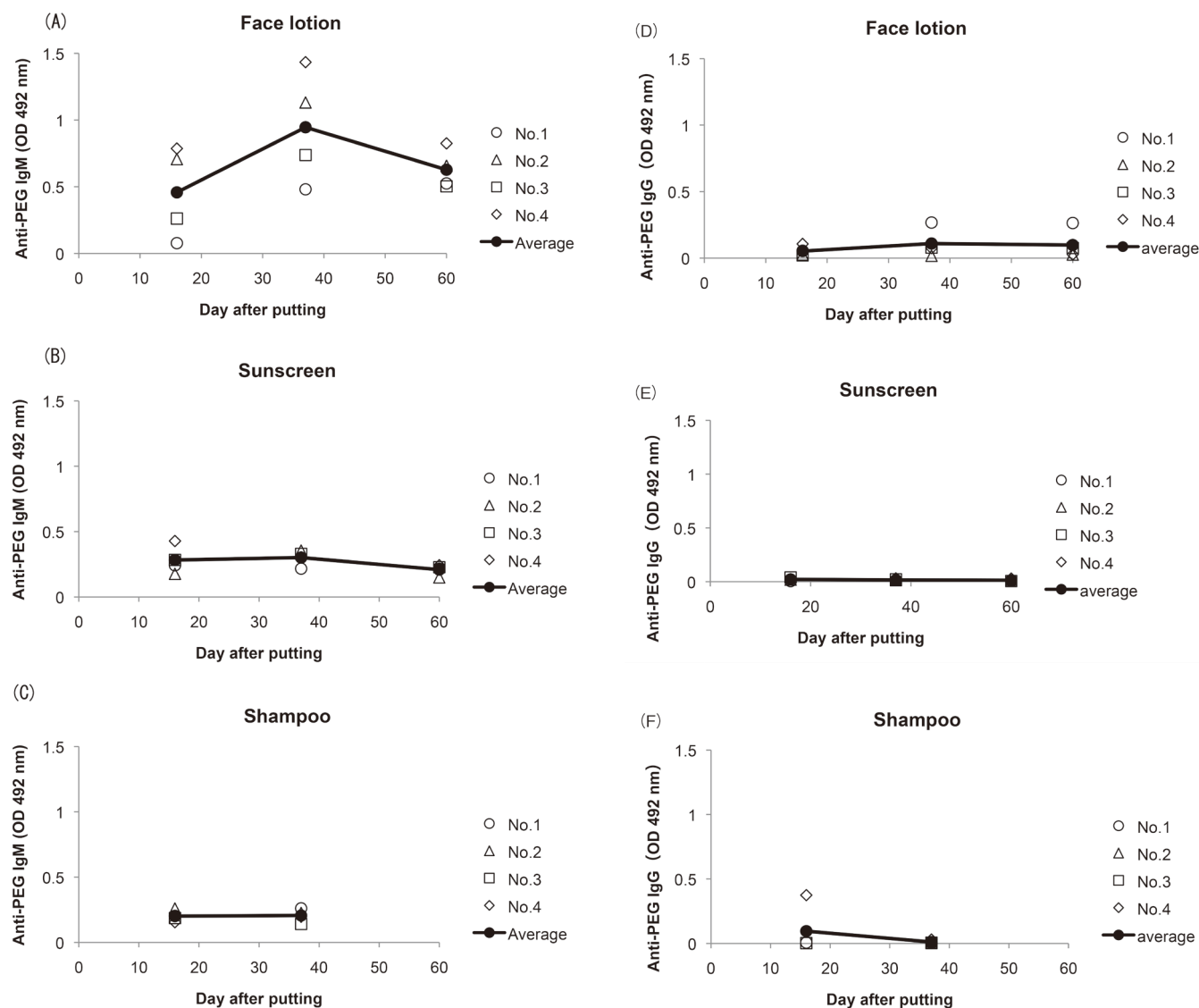


Fig. 1 Anti-PEG IgM and IgG production following putting PEG-including cosmetics on skin.

Face lotion (A, D) or sunscreen (B, E) or shampoo (C, F) including PEG was put on hairless rat's skin every day, respectively. Serum was collected on day 16, 37, 60 after putting. Anti-PEG IgM and IgG were determined using ELISA. Data are presented as absorbance at 492 nm.

るのかを検討するために、PEG 修飾リポソーム ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$   $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg) 静脈内投与によって anti-PEG IgM が誘導されたラットに Doxil (0.7mg doxorubicin/kg) を静脈内投与し、投与 4 時間後の Doxil の血中濃度を HPLC で測定した。

その結果、化粧水によって誘導された anti-PEG IgM と

同程度の抗体力価を持つ PEG 修飾リポソーム ( $10^{-4}$   $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg) で誘導された anti-PEG IgM は、PEG 修飾リポソームを投与していない無処置のラットと比較して、Doxil の血中濃度を投与 4 時間後に 50% 程度低下させることが明らかとなった。

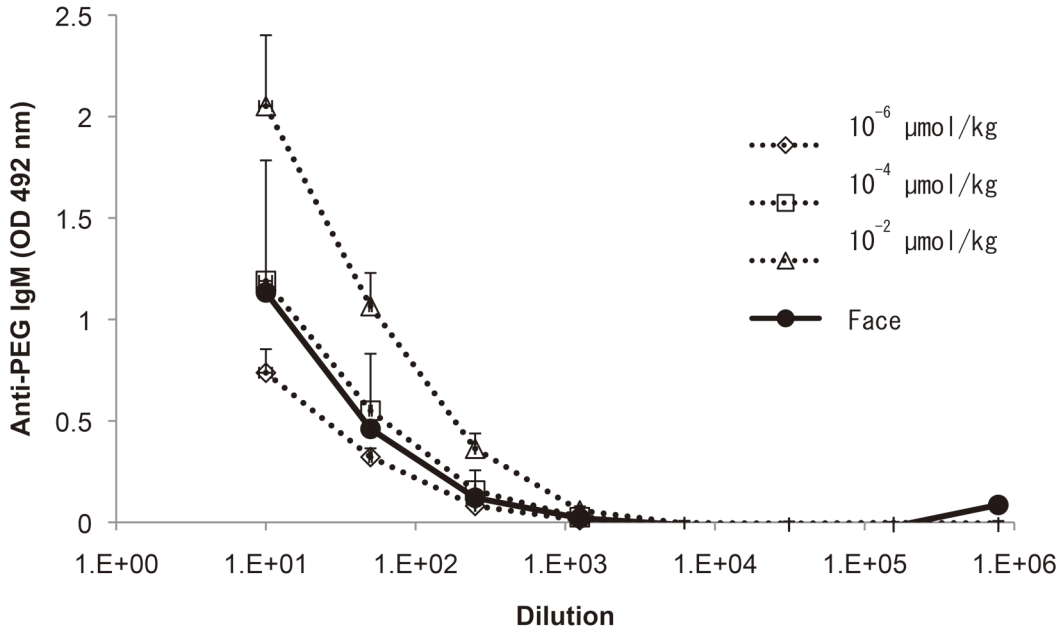


Fig. 2 Titer of anti-PEG IgM induced by putting lotion.

Face lotion was putting on hairless rat's skin every day and serum was collected on day 37 (●), the serum which has highest titer among 4 sera was used as sample. PL was intravenously injected into hairless rat at a dose of  $10^{-6}$   $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg (◇),  $10^{-4}$   $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg (□), or  $10^{-2}$   $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg (△) and serum was collected on day 5 after injection. Each value (PL pretreated) represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3), Face lotion treated (n=1).

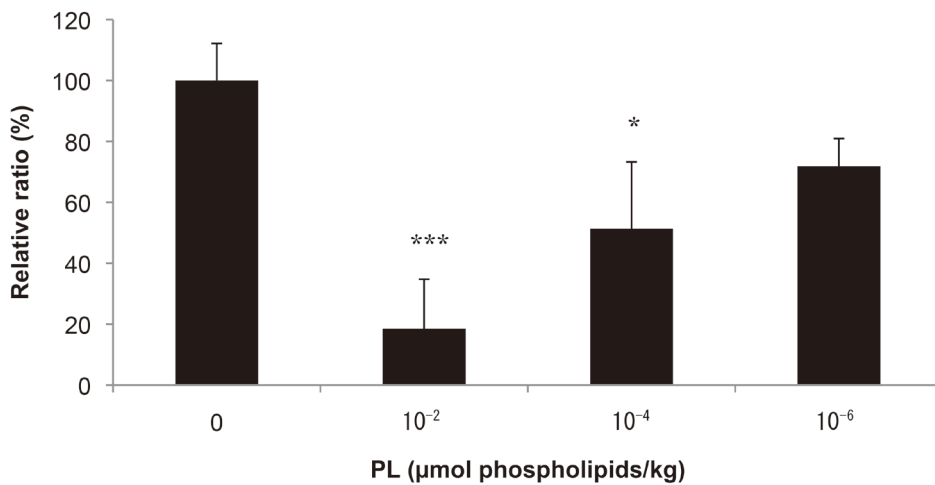


Fig. 3 Blood retention of Doxil in PEGylated liposomes-pretreated rat.

PEGylated liposomes ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$   $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg) was intravenously injected into hairless rat. Five days later, Doxil (0.7 mg doxorubicin/kg) was intravenously injected into the rat. Serum was collected at 4 hr after injection. Serum concentration of Doxil was determined using HPLC. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=3). The p-value indicates the statistical difference between the control rats and PL pretreated rats. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001.

### 3. 3. PEG含有化粧水誘導anti-PEG IgMの特性評価 (親和性、補体)

Fig. 3において、化粧水塗布によって得られた抗体力価と同程度のanti-PEG IgMをPEG修飾リポソーム投与によって誘導した場合、Doxilの血中からの速やかなクリアランスが確認された。しかし、化粧水塗布によって誘導されたanti-PEG IgMと、PEG修飾リポソーム投与によって誘導されたanti-PEG IgMは性質が異なる可能性が考えられる。Doxilに対してABC現象が発現するには、anti-PEG IgMのDoxilに対する親和性や補体活性化能の有無が重要となる。化粧水で誘導されたanti-PEG IgMの性質を調べるため、これまでとは別に、ヘアレスラットに新たに

PEG含有化粧水を塗布し (Fig. 4)、これによって誘導されたanti-PEG IgMのPEG修飾リポソームへの結合性と補体活性化能の有無を評価した。

これまでの結果と同様に、化粧水の塗布によってanti-PEG IgMの誘導が確認された (Fig. 4)。また血液中にanti-PEG IgMを分泌すると考えられるPEG特異的細胞の存在も確認された。さらにPEG修飾リポソームと競合ELISAを行った結果、化粧水で誘導されたanti-PEG IgMは、PEG修飾リポソームで誘導されたanti-PEG IgMと同様に、PEG修飾リポソームに対しても結合性を示すことが確認された (Fig. 5)。このことから、化粧水で誘導されたanti-PEG IgMはPEG修飾リポソームを認識する抗体であるこ

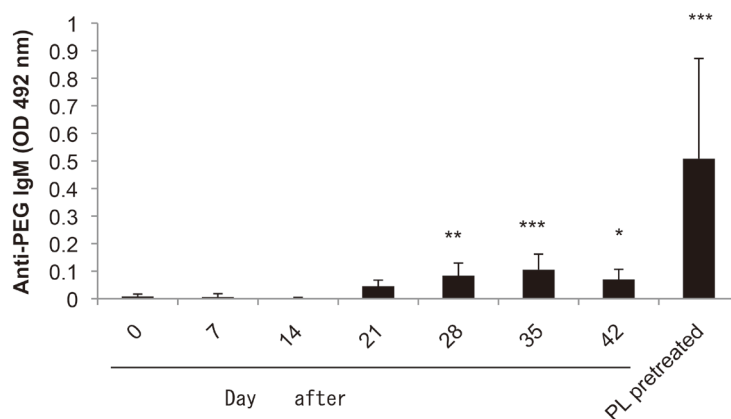


Fig. 4 Anti-PEG IgM production following putting of PEG-including face lotion. Face lotion including PEG was put on hairless rat's skin every day. Serum was collected on day 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 after putting. Anti-PEG IgM was determined using ELISA. Serum from PL-pretreated rat ( $10^{-2}$   $\mu$ mol phospholipids/kg) was used as a positive control. Data are presented as absorbance at 492 nm. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=7). The p-value indicates the statistical difference between the control rats and PL pretreated rats. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

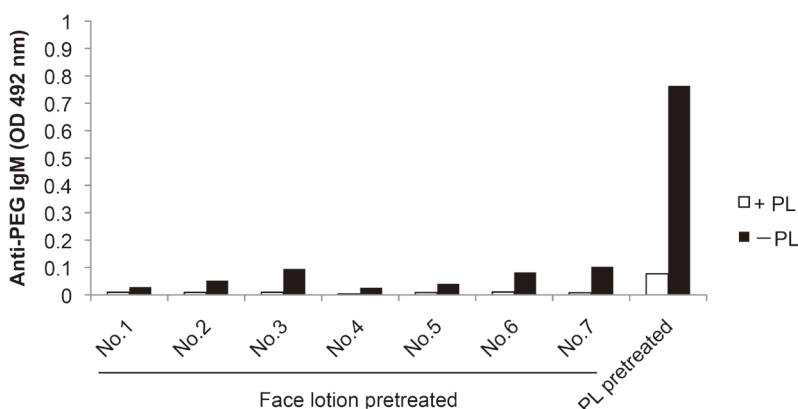


Fig. 5 Affinity of anti-PEG IgM induced by face lotion to PL.

Face lotion was putting on hairless rat's skin every day. Forty two days later, serum was collected. Binding of anti-PEG IgM to PL was determined by competitive ELISA. The binding of anti-PEG IgM in 100-times diluted serum to mPEG<sub>2000</sub>-DSPE on the plate were determined in the presence of competitor (PL 0.5  $\mu$ mol phospholipids/mL). Serum from PEGylated liposome-pretreated rat ( $10^{-2}$   $\mu$ mol phospholipids/kg) was used as a positive control.

とが明らかになった。続いて、anti-PEG IgMによる補体活性化が生じているか、CH50キットを用いて検討を行った。

本実験では血清中の補体量に比例して抗体依存的な補体の活性化が生じ、EA (感作ヒツジ赤血球)が溶血する。そのため、PLに血清中のanti-PEG IgMが結合して補体を活性化すると、血清中の補体量が減少するためEAの溶血量が減り、溶血率は低下すると考えられる。また、本実験で用いた血清に、補体を消費することが知られているzymosanを添加すると溶血率が低下したことから、いずれの血清も補体が含まれていることを確認している (Fig. 6)。

Fig. 6より、化粧水を塗布したヘアレスラット由来の全

ての血清においてPEG修飾リポソーム添加による溶血率の減少は生じなかった。一方で、PEG修飾リポソームを投与したヘアレスラット由来の血清にPEG修飾リポソームを添加した場合は、溶血率の減少が生じた。このことから、化粧水で誘導されたanti-PEG IgMによる補体活性化は生じていないことが明らかとなった。補体活性化が生じなかった原因として、①化粧水で誘導されたanti-PEG IgMに補体活性化能がない、②化粧水誘導のanti-PEG IgMは補体活性化能を持つが、抗体価が低いため古典経路を活性化させるのに十分な抗体量が得られていなかった、の2点が考えられる。以前の検討においても、PEG修飾リポソームによって誘導されたanti-PEG IgMがPEG修飾タンパク

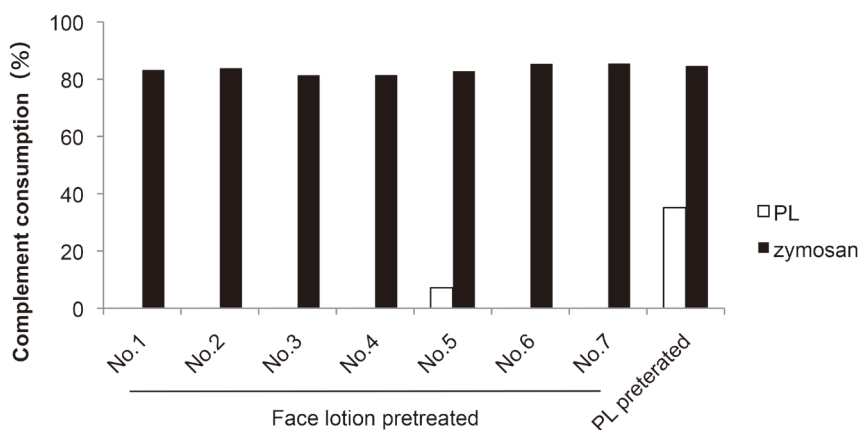


Fig. 6 Complement consumption following incubation of serum with PL.

Face lotion was put on hairless rat's skin every day. Forty two days later, serum was collected. Complement consumption following incubation with either PL or zymosan was measured using CH50 kit. Serum from PL-pretreated rat ( $10^{-2}$   $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg) was used as a positive control.

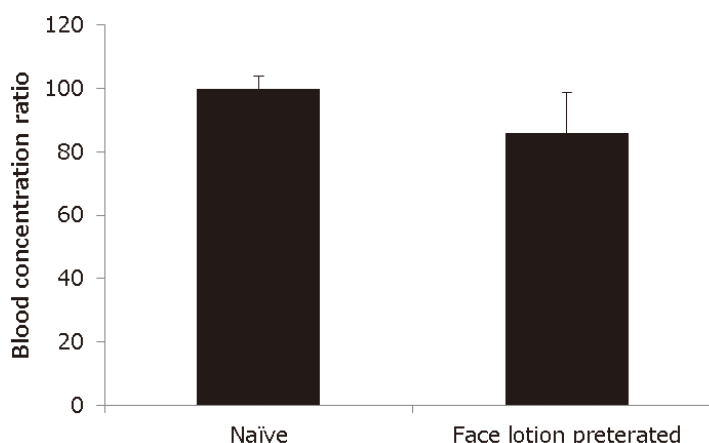


Fig. 7 Blood retention of Doxil in rat treated with face lotion.

Face lotion was put on hairless rat's skin every day. Forty two days later, Doxil (1.5mg/kg) was intravenously injected into the hairless rat. Serum was collected at 4 hr after injection. Serum concentration of Doxil was determined using HPLC. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (n=7). The p-value indicates the statistical difference between the control rats and face lotion pretreated rats. \*\*\*p < 0.001.

に結合した後、補体活性化を生じさせないことを明らかにしており、化粧水によって誘導された anti-PEG IgM も同様の現象を引き起こしたと考えられる。

### 3. 4. PEG 含有化粧水誘導 anti-PEG IgM が Doxil の血中滞留性に与える影響

次いで、化粧水で誘導された anti-PEG IgM によって Doxil のクリアランスが生じるか検討を行った。PEG 含有化粧水塗布 42 日後に Doxil を 1.5 mg doxorubicin/kg 静脈内投与し、その 4 時間後の Doxil 血中濃度を HPLC で測定した。

その結果、Doxil 投与 4 時間後の血中濃度は化粧水塗布ラットと無処置ラットで大きな差はなく、Doxil のクリアランスは生じないことが確認された。Fig. 3 において PEG 修飾リポソームで誘導された anti-PEG IgM によって Doxil のクリアランスが生じたにも関わらず Fig. 7 において大きな血中濃度の低下が確認されなかった原因として、抗体力価が低いことや Fig. 6 において化粧水誘導の anti-PEG IgM による補体活性化が生じなかったことが考えられる。その結果、マクロファージによる取り込みがみられず、血中濃度の劇的な低下が生じなかったと考えられる。

## 4. 考 察

本研究では、PEG 含有化粧品によって anti-PEG IgM の分泌が生じるか、さらに、この anti-PEG IgM によって Doxil の血中濃度に影響が生じるか検討を行った。本検討の結果から、皮膚に浸透しやすい化粧水によって anti-PEG IgM の分泌が生じ、このピークは塗布開始 35 日前後となることが分かった。PEG 含有化粧水による anti-PEG IgM 分泌量はラットの個体差が大きい結果となったが、最も anti-PEG IgM 分泌量の多かったラットの抗体価は PEG 修飾リポソームの  $10^4 \mu\text{mol}$  phospholipids/kg 投与によって誘導される anti-PEG IgM と同程度の抗体力価を持つことが確認され、これは Doxil 投与 4 時間後の血中濃度を 50% 程度低下させる力価を保持していた。また、PEG 含有化粧水誘導の anti-PEG IgM は PEG 修飾リポソームに対して高い親和性を持っていた。しかしながらこの anti-PEG IgM は、補体活性化能はなく、Doxil の動態変化を引き起こす可能性は低いと考えられる。実際に PEG 含有化粧水塗付によって anti-PEG IgM が誘導された状態のラットに

Doxil を投与しても、血中濃度の低下は確認されなかった。

本検討の結果より、PEG 含有化粧水によって anti-PEG IgM が誘導されるが、補体活性化は生じないため、他の PEG 修飾製剤の体内動態変化を発現させる可能性は低いことが示唆された。そのため、Doxil のような血中濃度と薬効が相関する薬剤に対しては治療効果に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。その一方で、PEG 化タンパク製剤のような中和抗体の存在を考慮しなければならない薬剤に対してはその薬効を減弱させる可能性も考えられるため、注意が必要である。

## 5. 総 括

本検討により、PEG を含有する化粧品によって実際に抗 PEG-IgM が誘導されることが明らかとなった。今後、化粧品によって誘導された抗 PEG-IgM による PEG 修飾医薬品の効果減弱が実際に引き起こされるかについて検討を行いたいと考えている。

PEG 修飾医薬品は、血中濃度が長時間維持されるという利点を有しており、がんや肝炎などの疾患の治療薬として重要な位置を占めている。化粧品によって誘導された抗体がこれらの治療薬の効果を減弱してしまうことが証明された場合、これまで化粧品成分として安全と考えられてきた PEG の使用が望ましくないと考えられる。

### (引用文献)

- 1) Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T, The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: Clinical challenge and approaches to manage. *J. Control. Release*, 172, 38-47 (2013)
- 2) Smyth Jr. HF, Some pharmacological properties of polyethylene glycols of high molecular weight ("carbowax" compounds) *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 24, 281-284 (1942)
- 3) Herold DA, Rodeheaver GT, Bellamy WT, Fitton LA, Bruns DE, Edlich RF, Toxicity of topical polyethylene glycol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 65, 329-335 (1982)
- 4) Bárány EI, Lindberg M, Lodén M., Unexpected skin barrier influence from non-ionic emulsifiers. *Int. J. Pharmacol.*, 195, 189-195 (2000)

# フィラグリン遺伝子欠損ラットを用いたアレルギーマーチの解明

京都大学大学院医学研究科皮膚科学講座

大塚 篤司

Allergy March (atopic march) means a series of allergic diseases induced by one allergic disease. In recent years, atopic dermatitis has attracted attention as a first step of allergy march. From the mouse model or human genetic analysis, the mechanism of allergy march is gradually being elucidated. In allergy march, percutaneous sensitization is regarded as important for the induction of other allergic diseases, and among them, there is a high possibility that the mutation of the filaggrin gene responsible for the skin barrier function is triggered. The application of zinc-finger nucleases (ZFNs) as a gene-targeting technology has been successful in rats, which is faster and more efficient than embryonic stem cell-mediated knockout technology. Herein, we report the generation and characterization of Flg knockout (Flg KO) rats. FLG KO rats showed an increase in transepidermal water loss. we found that OVA-induced asthma exacerbated using atopic dermatitis-induced FLG KO rat compared to that of wild type rat. It is expected that new allergy march therapy development focusing on filaggrin expression control will be developed in the future.

## 1. 緒言

フィラグリンは皮膚バリア機能を担う重要なタンパクである。アトピー性皮膚炎 (AD) の約 20-30% の患者にフィラグリン遺伝子の変異が認められるだけでなく、アトピー性皮膚炎の患者のほぼ全てでフィラグリンタンパクの発現が低下している。このことから、アトピー性皮膚炎発症とフィラグリンタンパクの関係は世界中で大きな注目を集めている。我々はこのフィラグリンの発現を亢進する新規化合物を発見し、この化合物を投与したモデルマウスではアトピー性皮膚炎が改善することを世界で初めて報告した<sup>1)</sup>。

アトピー性皮膚炎、特にフィラグリン遺伝子の変異がアレルギーマーチの誘因に関与する可能性が海外で提唱されている。エアロアレルゲンの経皮感作マウスでは全身の Th2 免疫応答が誘導され、アレルギー性鼻炎が誘導されやすくなるとの報告がある<sup>2)</sup>。さらに、経皮感作によって誘導されたアトピー性皮膚炎モデルマウスでは、経気管支によるアレルギー反応が誘導されやすくなる<sup>3)</sup>。

ヒトでは、重症 AD 患者の 70% がその後喘息及びアレルギー性鼻炎を併発する<sup>4)</sup>。フィラグリン遺伝子変異を持つ AD 患者はフィラグリン遺伝子に変異を持たない AD 患者比で喘息に罹患する可能性が高い<sup>5)</sup>。また、フィラグリン遺伝子に変異を持つ喘息患者ほど治療が難治するとの報告もある<sup>6)</sup>。さらに、フィラグリン遺伝子変異は食物ア

レルギー発症のリスクを高め、10歳でオッズ比が2.86、18歳ではオッズ比が4.25にのぼる<sup>7)</sup>。ピーナッツアレルギーのリスクがフィラグリン遺伝子の変異に依存するとの報告もある<sup>8)</sup>。アレルギーマーチのメカニズムを説明する上で抗原の交差性も指摘されている。ピーナッツのアレルゲンはスギ花粉などのエアロアレルゲンとの交差性を認める<sup>9)</sup>。このようにアトピー性皮膚炎、特にフィラグリン遺伝子の変異とアレルギーマーチの関連を示唆する多くの傍証はあるものの、そのメカニズムに関しての詳細は不明である。

そこで本研究申請課題では、申請者らが作成した新規モデル動物であるフィラグリン遺伝子欠損ラットを用いて、フィラグリン遺伝子異常から始まる喘息発症のメカニズムを解析し、アレルギーマーチ全貌の解明につなげることを目的とする。

## 2. 方法

### 2.1. フィラグリンラットの作成

近年、遺伝子ターゲティング技術としてのジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) が開発され、胚性幹細胞によるノックアウト技術よりも速く効率的な遺伝子改変モデルの作成が可能となっている<sup>10)</sup>。ラットフィラグリン遺伝子の第2エキソンを、従来のZFN試薬を用いて標的化した。確認されたZFN mRNAを受精したF344/Stm卵母細胞にマイクロインジェクションした後、偽妊娠Crj:WI雌ラット (偽妊娠里親) の卵管に移した。8匹の新生動物をスクリーニングすると、4匹 (50%) が免疫組織化学的染色により確認されたように、FLGタンパク質発現の完全な喪失をもたらすフレームシフト突然変異である7bp~2622bpの欠失を含む突然変異を有していることが明らかとなった。



Mechanism of atopic march using filaggrin knockout rat

Atsushi Otsuka

Department of Dermatology, Kyoto University

## 2. 2. 喘息モデルの作成

アトピー性皮膚炎モデルは、OVA アルブミンタンパクを経皮的に感作し続ける OVA-ODT モデルが一般的に広く用いられている。毛剃りしたマウスの背部に OVA タンパクを数日間貼付け密封し、それを 2 週間以上繰り返すことで、OVA 特異的 IgE がマウス内で上昇し、OVA タンパクを貼付けた部位には皮膚炎が誘導され、組織学的にはアトピー性皮膚炎に近いことが知られている。そこでまず、FLG KO ラットと野生型ラットを用いてアトピー性皮膚炎モデルの構築を行う。皮膚における炎症の評価、全身性 Th2 反応の変化を観察する。続いてアトピー性皮膚炎モデルを誘導したラットを用いて、喘息モデルの評価を行う。密閉した箱内でラットを飼育し OVA タンパクを生食に溶解させネブライザーで噴霧させる。この惹起を 2 回ほど行い、気道内浸潤細胞の評価、肺気道上皮の組織学的解析、また Th2 サイトカインの発現の変化を観察する。皮膚局所での炎症浸潤細胞とサイトカインの発現変化、また肺気道上皮でのそれら変化を比較し、アレルギーマーチの誘導に重要な標的物質の同定を試みる。

## 3. 結果

### 3. 1. フィラグリン遺伝子変異 (FLG KO) ラットの解析

Flaky tail マウスとは、フィラグリン遺伝子に変異 (5303delA) を有するマウスであり、申請者が所属する研究室において Flaky tail マウスがダニ抗原を用いた接触皮膚

炎反応を亢進することを報告している<sup>11)</sup>。しかしながら、Flaky tail マウスはフィラグリン遺伝子のみならず matted 遺伝子の変異を認めるため、フィラグリン遺伝子と皮膚の表現系の関連性は直接的に証明されていなかった。2012 年 Kawasaki らによってフィラグリン遺伝子欠損マウスが作製され、皮膚に特徴的な所見は認めないことが報告された<sup>12)</sup>。我々はこのマウスと人のフィラグリン遺伝子変異による表現系の違いが表皮の厚さによるものではないかと考え、マウスに比べ表皮の厚いラットを用いてフィラグリン遺伝子欠損動物を作成した。フィラグリン遺伝子欠損 (FLG KO) ラットを作成にあたり、Zink finger protein を用いた。ラットフィラグリン遺伝子の第 2 エキソンを、従来の ZFN 試薬を用いて標的化した。確認された ZFN mRNA を受精した F344/Stm 卵母細胞にマイクロインジェクションした後、偽妊娠 Crlj:WI 雌ラット (偽妊娠里親) の卵管に移した。8 匹の新生動物をスクリーニングすると、4 匹 (50%) が免疫組織化学的染色により確認されたように、FLG タンパク質発現の完全な喪失をもたらすフレームシフト突然変異である 7bp ~ 2622bp の欠失を含む突然変異を有していることが明らかとなった。

このラットは、尾部に絞扼輪を伴い臨床所見を有する (図 1 A)。遺伝子改変ラット (KO) では尾部に絞扼輪を認め背部の皮膚はダーモスコーピーにて表皮が変化していることがわかった。また、ラットフィラグリン抗体を用いた免疫染色では、KO ラットのフィラグリン発現が完全に消失して

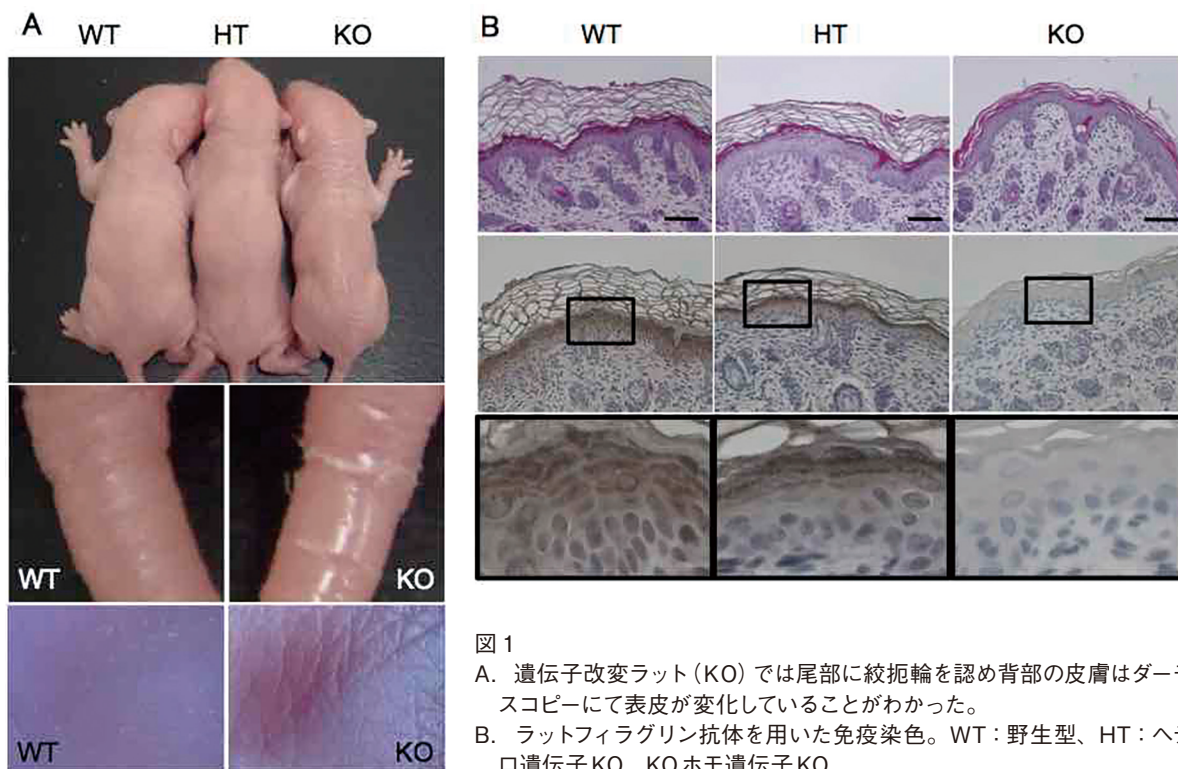


図 1  
A. 遺伝子改変ラット (KO) では尾部に絞扼輪を認め背部の皮膚はダーモスコーピーにて表皮が変化していることがわかった。  
B. ラットフィラグリン抗体を用いた免疫染色。WT: 野生型、HT: ヘテロ遺伝子 KO、KO ホモ遺伝子 KO

いることを確認した(図1B)。このラットを用いて皮膚バリア機能の基礎的な解析を行った。経皮水分喪失量と皮膚コンダクタンスは、FLG KOラットで明らかに減弱していることが明らかとなった。また、共焦点ラマン分光装置を用いて角質層における天然保湿因子の含有量の評価を行ったところ、水分保持量がFLG KOラットで優位に減弱していることを見出した。

### 3. 2. フィラグリン遺伝子変異 (FLG KO) ラットの解析

FLG KOラットと野生型ラットを用いてアトピー性皮膚炎モデルを構築した。続いてアトピー性皮膚炎モデルを誘導したラットを用いて、喘息モデルの評価を行った。気管支肺胞洗浄液中の総細胞数は、野生型ラットに比べてFLG KOラットで優位に上昇していた。さらに細胞分画を比較したところ、好酸球がFLG KOラットで優位に上昇していることを見出した(図2A, B)。

### 4. 考 察

今回、我々はFLG KOラットの作成に成功した。フィラグリン遺伝子欠損(FLG KO)ラットを作成にあたり、Zink finger proteinを用いた。ラットフィラグリン遺伝子の第2エクソンを、従来のZFN試薬を用いて標的化した。確

認されたZFN mRNAを受精したF344/Stm卵母細胞にマイクロインジェクションした後、偽妊娠Crlj:WI雌ラット(偽妊娠里親)の卵管に移した。8匹の新生動物をスクリーニングすると、4匹(50%)が免疫組織化学的染色により確認されたように、FLGタンパク質発現の完全な喪失をもたらすフレームシフト突然変異である7bp~2622bpの欠失を含む突然変異を有していることが明らかとなった。このFLG KOラットでは、尾部に絞扼輪を認め背部の皮膚はダーモスコピーにて表皮が変化していることがわかった。また、ラットフィラグリン抗体を用いた免疫染色では、KOラットのフィラグリン発現が完全に消失していることを確認した。さらに、水分保持量がFLG KOラットで優位に減弱していることを見出した。FLG KOラットと野生型ラットを用いてアトピー性皮膚炎モデルを構築した。続いてアトピー性皮膚炎モデルを誘導したラットを用いて、喘息モデルの評価を行った。気管支肺胞洗浄液中の総細胞数は、野生型ラットに比べてFLG KOラットで優位に上昇していた。さらに細胞分画を比較したところ、好酸球がFLG KOラットで優位に上昇していることを見出した。以上より、FLG KOラットでは、アトピー性皮膚炎誘導に伴い、喘息の増悪がみられることが明らかとなった。

ヒトの体全体を覆う皮膚は、面積が1.6m<sup>2</sup>、重量は体重

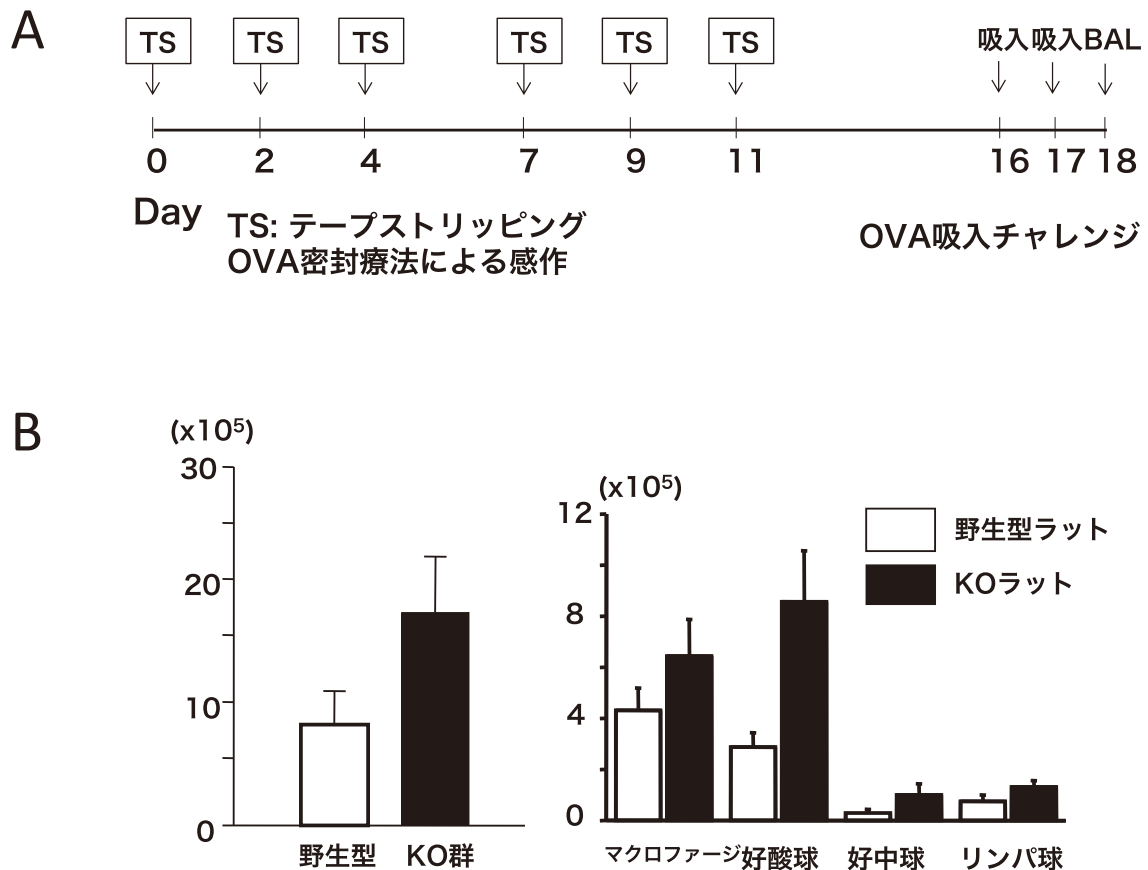


図2

の16%を占める人体最大の臓器である。皮膚は外界との接触がある臓器であるため生命を維持するための様々な機能を有している。主な機能として、水分の喪失や透過を防ぐ、体温を調整する、微生物や物理化学的な刺激から生体を守る、感覚器としての役割を果たす、などがある。皮膚は外層から表皮、真皮、皮下組織の3層の構造を有する。表皮は角化細胞で構成され、外層から角層、顆粒層、有棘層、基底層の4つに分類される。基底層にある基底細胞は皮膚外層に向かい分裂しそれぞれの層を構成することとなる。最終的に核が脱落し角層になるまで約45日のターンオーバー時間がかかるといわれている。

皮膚の最外層である角層では、細胞は脱核し死んだ角化細胞は落ち葉を敷き詰めたように重層化する。約10層からなる角層は表面から順に垢としてはがれ落ちる。フィラグリンはその角層の主要な構成成分の一つである。その働きは強度や柔軟性、水分保持、皮膚のPH、生体内化合物へのバッファー作用など多岐にわたる。フィラグリン遺伝子は角化細胞の他の最終分化に関連するタンパクと同様にクロモソーム1q21に存在する。フィラグリンはプロフィラグリンとしてまず産生される。プロフィラグリンは分子量約400KDa、10-12のフィラグリンリピート構造を有する。角化細胞の最終分化に伴いプロフィラグリンは脱リン酸化し、様々なプロテアーゼ的作用により37KDaのフィラグリンへと分解される。この脱リン酸化とプロテアーゼによる分解はカルシウム濃度、セリンプロテアーゼCAP1/Prss8、そしてプロテアーゼ阻害剤(LEKTI)によって制御されていることが報告されている<sup>13-16)</sup>。モノマーになったフィラグリンはケラチンフィラメント同士を凝集させる線維間凝集物質として働く。この間フィラグリンは角層での強度や柔軟性に大きく貢献する。フィラグリンがない状態では角層細胞ははがれやすく、経皮的な内と外との浸透性が上昇する。このことからフィラグリンがない状態では経皮水分喪失量(trans epidermal water loss, TEWL)が上昇する<sup>17)</sup>。角層の外層部ではフィラグリンは更に分解し、アミノ酸、ウロカニン酸などの天然保湿因子(NMF)になる(図1)。NMFは角層における水分保持量を担保し、PHを維持しバッファー効果を有する。このことで表皮細胞の正常分化を促し、病原性細菌の集落形成を減少させる<sup>18)</sup>。

本研究は、我々の研究室で作成した世界初のFLG KOラットを用いてアレルギーマーチメカニズムの解明を目指した。今後喘息モデルのみならず他のアレルギーモデルを適応することでアレルギー疾患に広くアプローチができるものと考えられる。アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患は今後更に増加することが予想される。現在解析しているフィラグリン遺伝子異常から始まるバリア機能の破綻とアレルギーマーチの誘導メカニズムは、皮膚の健康がアレルギーの予防という新しいコンセプトを提供可能であ

り、今後のコスメトロジーに大きな影響を与えるものと考えられる。

我々は、本研究にてFLG KOラットの作成に成功した。我々はこれまで、FLGの発現をコントロールする化合物の同定に成功し報告した<sup>1)</sup>。具体的には、培養表皮細胞を用いて約1,200種類の市販の化合物ライブラリーからフィラグリンの発現を亢進する化合物のスクリーニングを行った。この結果、JTC801という化合物が培養表皮細胞のフィラグリン(プロフィラグリン)の発現を亢進させた。また、JTC801は、ヒトの皮膚に近い構造を持つ3次元表皮培養においても、フィラグリンの発現を亢進させた。ヒトアトピー性皮膚炎患者ではフィラグリン遺伝子のヘテロ変異がほとんどである。そこでフィラグリン遺伝子にヘテロ変異を有するマウスにJTC801を投与させたところ、フィラグリンの発現が亢進した。また、JTC801を投与したマウスでは経皮水分喪失量の低下が見られた。さらに、アトピー性皮膚炎モデルであるNC/Ngaマウスを用いた実験では、JTC801を内服させたマウス群でフィラグリンタンパクの発現が亢進し、アトピー性皮膚炎様の症状が改善された。以上より、皮膚でのフィラグリンの発現を上昇させ、バリア機能を亢進させることにより、アトピー性皮膚炎の発症を抑制させる可能性があることが示唆された。しかしながら、JTC801を用いたヒトを対象とした臨床治験を行うには安全性試験など多くの課題が残されている。また、マウスの皮膚はヒトとは違い、表皮が薄いことが知られている。そのため、新規化合物や薬剤のヒトでの有効性が検討可能なモデル動物の開発が必要である。本研究で開発した、FLG KOラットは、ヒトの皮膚に近いラットにてアトピー性皮膚炎のモデル動物を作成できたことに大きな意義がある。

今回、我々は世界初のFLG KOラットの作成に成功した。また、このKOラットを用いたアトピー性皮膚炎モデルでは、喘息が増悪することが明らかとなった。今後、このモデル動物を用いてアレルギーマーチの解明のみならず、新規薬剤の検討が可能となるだろう。

#### (引用文献)

- 1) Otsuka, A., *et al.* Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 139-146 e131-110 (2014).
- 2) Akei, H.S., *et al.* Epicutaneous aeroallergen exposure induces systemic TH2 immunity that predisposes to allergic nasal responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 62-69 (2006).
- 3) Spergel, J.M., *et al.* Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis

- and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J. Clin. Invest.* **101**, 1614–1622 (1998).
- 4) Zheng, T., Yu, J., Oh, M.H. & Zhu, Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy, asthma & immunology research* **3**, 67–73 (2011).
  - 5) Henderson, J., *et al.* The burden of disease associated with filaggrin mutations: a population-based, longitudinal birth cohort study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 872–877 e879 (2008).
  - 6) Palmer, C.N., *et al.* Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 64–68 (2007).
  - 7) Venkataraman, D., *et al.* Filaggrin loss-of-function mutations are associated with food allergy in childhood and adolescence. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2014).
  - 8) Asai, Y., *et al.* Filaggrin gene mutation associations with peanut allergy persist despite variations in peanut allergy diagnostic criteria or asthma status. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 239–242 (2013).
  - 9) Niggemann, B., Schmitz, R. & Schlaud, M. The high prevalence of peanut sensitization in childhood is due to cross-reactivity to pollen. *Allergy* **66**, 980–981 (2011).
  - 10) Mashimo, T., *et al.* Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One* **5**, e8870 (2010).
  - 11) Moniaga, C.S., *et al.* Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Am. J. Pathol.* **176**, 2385–2393 (2010).
  - 12) Kawasaki, H., *et al.* Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1538–1546 e1536 (2012).
  - 13) O'Regan, G.M., Sandilands, A., McLean, W.H. & Irvine, A.D. Filaggrin in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 689–693 (2008).
  - 14) O'Regan, G.M. & Irvine, A.D. The role of filaggrin in the atopic diathesis. *Clin. Exp. Allergy* **40**, 965–972 (2010).
  - 15) Irvine, A.D. Fleshing out filaggrin phenotypes. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 504–507 (2007).
  - 16) List, K., *et al.* Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *J. Cell Biol.* **163**, 901–910 (2003).
  - 17) Elias, P.M. & Schmutz, M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **9**, 437–446 (2009).
  - 18) Irvine, A.D. & McLean, W.H. Breaking the (un) sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1200–1202 (2006).

# メラニン合成酵素を輸送する Rab32 および Rab38 の不活性化因子 GAP の色素細胞における機能解析

筑波大学医学医療系生理化学

大林 典彦

Rab32 and Rab38 (Rab32/Rab38) have been proposed as regulating the trafficking of melanogenic enzymes, including tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 (Tyrp1), to melanosomes in melanocytes. Rab32/Rab38 are known to function as switch molecules that cycle between a GDP-bound inactive form and a GTP-bound active form; the cycle is thought to be regulated by an activating enzyme, guanine nucleotide exchange factor (GEF), and an inactivating enzyme, GTPase-activating protein (GAP), which stimulates the GTPase activity of Rab32/Rab38. Although BLOC-3 has already been identified as a Rab32/Rab38-specific GEF that regulates the trafficking of tyrosinase and Tyrp1, physiological GAP for Rab32/Rab38 in melanocytes has never been identified, and it has remained unclear whether Rab32/Rab38 are involved in the trafficking of dopachrome tautomerase (Dct), another melanogenic enzyme, in melanocytes. In this study, we investigated RUTBC1, which was originally characterized as a Rab9-binding protein and GAP for Rab32 and Rab33B *in vitro*, and the results demonstrated that RUTBC1 functions as a physiological GAP for Rab32/Rab38 in the trafficking of all three melanogenic enzymes in melanocytes. The results of this study also demonstrated the involvement of Rab9A in the regulation of the RUTBC1 localization and in the trafficking of all three melanogenic enzymes. We discovered that either excess activation or inactivation of Rab32/Rab38 achieved by manipulating RUTBC1 inhibits the trafficking of all three melanogenic enzymes. These results collectively indicate that proper spatiotemporal regulation of Rab32/Rab38 is essential for the normal trafficking of all three melanogenic enzymes in melanocytes.

## 1. 緒言

メラニン合成酵素は色素細胞において生合成された後、トランスゴルジ網からエンドソームを経てメラノソームに輸送される。そして、輸送されたメラニン合成酵素の働きによりメラノソームでメラニンが産生・貯留される。このメラニン合成酵素の輸送過程に異常をきたす疾患の1つとして、白皮症を呈するヘルマンスキー・パドラック症候群 (HPS) が知られている。HPS様の病態を呈するモデル動物はいくつか報告されているが、その中でも、*chocolate* マウスや *ruby* ラットは Rab38 が責任遺伝子である<sup>1)</sup>。Rabは低分子量Gタンパク質の1つで、GTP結合型の活性化体とGDP結合型の不活性化体をサイクルすることで、その機能を発揮する。Rab38は一次構造が類似したRab32と冗長的にメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送を調節している<sup>2)</sup>。近年、HPSの原因因子の1つである biogenesis of lysosome-related organelles complex-3 (BLOC-3) と呼ばれる HPS1 と HPS4 分子から構成される複合体が、Rab32 および Rab38 (以下、Rab32/Rab38) の GEF (Guanine nucleotide exchange factor) として機能し、Rab32/Rab38 を活性化することが報告されている<sup>3)</sup>。一

方で、色素細胞において実際に Rab32/Rab38 を不活性化する GAP (GTPase-activating factor) については謎に包まれており、Rab32/Rab38 の調節機構については十分には理解されていなかった。そこで、本研究では *in vitro* で Rab32 と Rab33B (Rab38 とは異なるアイソフォーム) に対して GAP 活性を有することが報告された Run and TBC domain-containing 1 分子 (RUTBC1, SGSM2 としても知られる) に着目し<sup>4)</sup>、色素細胞における RUTBC1 の機能を解析し、メラニン合成酵素輸送における Rab32/Rab38 の制御機構を精緻に理解することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 試薬類

Rab32、Rab38、チロシナーゼ、Tyrp1、Dct に対する抗体は、精製した各タンパク質あるいはペプチドをウサギに免疫することにより得た。活性化型 Rab32/Rab38 に特異的に結合する VPS9-ankyrin repeat protein (Varp) の単離は既に行っており、これを用いた<sup>5)</sup>。ヒト RUTBC1 cDNA は、かずさ DNA 研究所 (千葉、日本) より得た。マウス RUTBC1 に対する 2 種類の siRNA は、ニッポンジーン (富山、日本) より得た。

### 2.2. 細胞蛍光免疫染色

マウス由来の色素細胞株 melan-a 細胞は、Dorothy C. Bennett 教授から提供された。各種発現ベクターや siRNA は、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて melan-a 細胞に導入した。染色された細胞を共焦点蛍光顕微鏡 (FluoView 1000-D、オリンパス、東京、日本) により観察



Functional analysis of a GAP for Rab32/Rab38 that regulate melanogenic enzymes trafficking in melanocytes

Norihiko Ohbayashi

Department of Physiological Chemistry,  
Faculty of Medicine, University of  
Tsukuba

した。共焦点顕微鏡で無作為に 20 細胞ずつ蛍光シグナルを取得し、MetaMorph ソフトウェア (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) で定量した。ダネット検定またはスチューデント t 検定を用いて統計解析を行い、 $p$  値  $< 0.05$  を統計学的に有意とみなした。

### 2. 3. 共免疫沈降とブルダウンアッセイ

Lipofectamine-LTX Plus (Invitrogen) を用いて T7-GST-Varp または T7-GST 発現プラスミドを COS-7 細胞に導入した。可溶化バッファー (50mM HEPES-KOH pH7.2, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, プロテアーゼ阻害剤 (Roche)) を用いて細胞を溶解し、細胞溶解物をグルタチオンセファロースビーズと共に 4°C で 2 時間インキュベートした。ビーズを洗浄バッファー (50mM HEPES-KOH pH7.2, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% Triton X-100) で 3 回洗浄し、Varp ビーズを調製した。次に、T7-RUTBC1 野生型 (WT) / R803A および FLAG-Rab32 / Rab38 を共発現した COS-7 細胞抽出物と Varp ビーズを反応させ、FLAG-Rab32 / Rab38 の活性化レベルを定量した。

T7-Varp 発現プラスミドをトランスフェクションした COS-7 細胞抽出物を可溶化バッファーで溶解し、抗 T7 タグ抗体結合アガロースビーズと 4°C で 2 時間反応させた。ビーズを洗浄バッファーで 3 回洗浄し、次いで RUTBC1 ノックダウン melan-a 細胞の可溶化物と共に 4°C で 2 時間インキュベートした。そして、ビーズに結合した内在性 Rab32 / Rab38 タンパク質をイムノブロットで定量し、内

在性 Rab32 / Rab38 の活性化レベルを評価した。

## 3. 結果

### 3. 1. RUTBC1 はメラニン合成酵素の輸送に関わる

RUTBC1 の機能を解析するため、RUTBC1 を色素細胞に過剰発現させたところ、チロシナーゼ、Tyrp1、Dct すべてのメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送が阻害され、それらの色素細胞における発現が大幅に低下した (図 2)。Rab32 と Rab38 がともに不活性化したときに、これらメラニン合成酵素の輸送が阻害されることから<sup>2)</sup>、RUTBC1 が色素細胞内で Rab32 / Rab38 に対する GAP として機能する可能性が示唆された。

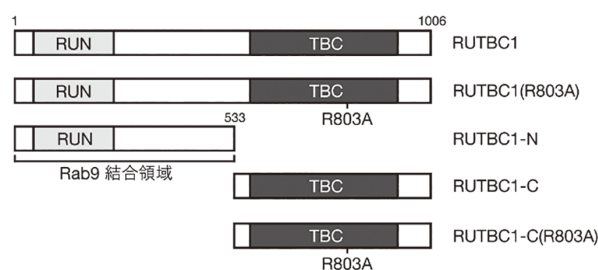


図 1 本研究で用いたヒト RUTBC1 およびその変異体 (RUTBC1-N, RUTBC1-C, および R803A 変異体) の模式図。

RUTBC1 は、Rab9 結合活性を有する N 末端 RUN ドメイン (薄灰色のボックス) および、*in vitro* で Rab32 および Rab38B に対して GAP 活性を示す C 末端 TBC ドメイン (暗灰色のボックス) を有している。

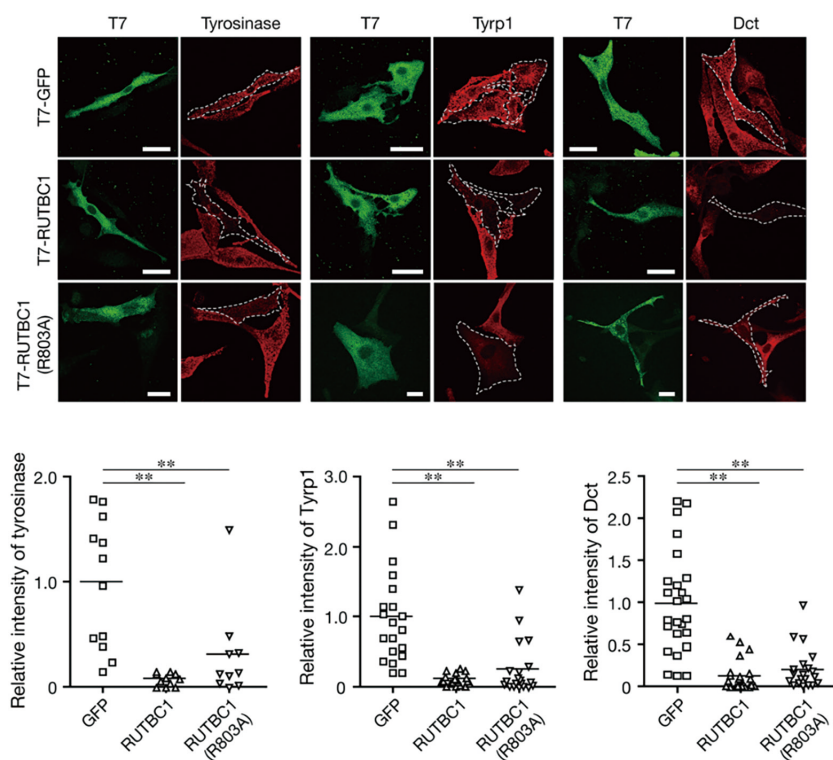


図 2 色素細胞におけるメラニン合成酵素のメラノソーム局在に対する RUTBC1 の過剰発現の影響。

上図は、T7-RUTBC1、T7-RUTBC1 (R803A)、そしてコントロールとして T7-GFP を発現する色素細胞の画像を示す。Melan-a 細胞に T7 タグを付加した各タンパク質発現プラスミドをトランスフェクションし、チロシナーゼ、Tyrp1、Dct に対する抗体で染色した。T7 タグタンパク質を発現する細胞は、破線で示されている。スケールバー: 20  $\mu$ m。

下図は、上図で示されたチロシナーゼ / Tyrp1 / Dct シグナルを定量化したグラフである。バーは 20 細胞におけるシグナルの平均値を示している。

### 3. 2. RUTBC1のTBCドメインはメラニン合成酵素の輸送に関わるが、TBCドメイン以外もメラニン合成酵素の輸送に必要である

メラニン合成酵素の輸送阻害がRUTBC1におけるTBCドメインのGAP活性によるものかどうかを確認するために、N末端側のRUNドメインを欠いたRUTBC1-CおよびTBCドメインの活性中心に点変異を導入したRUTBC1-C (R803A)を作製した(図1)。RUTBC1-Cの発現により、チロシナーゼ、Typr1、Dctすべてのメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送を阻害されたが、RUTBC1-C (R803A)の発現ではほとんど影響が認められなかった(図3)。これらの結果から、RUTBC1-Cによるメラニン合成酵素の阻害は、RUTBC1の基質となるRabの強制的な不活性化による可能性が高いと考えられた。しかしながら、予期せぬことに、全長のRUTBC1 (R803A)変異体を過剰発現させても、すべてのメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送の阻害が観察されたことから(図2)、TBCドメインによるGAP活性に依存しない、すなわちRUTBC1のN末端側の作用によって仲介される何らかの分子メカニズムの存在が想定された。

### 3. 3. RUTBC1はRab32とRab38に対してGAP活性を有する

RUTBC1によるRabの不活性化機構を明らかにするため、Rab32/Rab38をRUTBC1あるいはRUTBC1 (R803A)変異体と共発現させ、その細胞抽出液よりVarp分子を用

いて活性化型Rab32/Rab38をブルダウンした。その結果、RUTBC1 (R803A)変異体はRab32/Rab38を不活性化できないのに対し、RUTBC1分子は顕著にRab32/Rab38を不活性化することを明らかにした(図4)。

一方、色素細胞からRUTBC1をノックダウンし、その細胞可溶液を用いて同様にして活性化型Rab32/Rab38を定量したところ、細胞内のRab32/Rab38の発現量自体は変化が認められないものの、活性化型Rab32/Rab38の量がコントロールに比べて顕著に増加することを見出した(図5)。さらに細胞免疫染色により、RUTBC1ノックダウン色素細胞では、メラノソーム上のRab32/Rab38シグナルがより増強する結果を得た(図5)。これはRUTBC1ノックダウン色素細胞においてRab32/Rab38が過剰に活性化され、メラノソーム膜に持続的に局在することを示唆している。

### 3. 4. Rab32とRab38の過剰な活性化は、メラニン合成酵素の輸送を阻害する

Rab32/Rab38はメラニン合成酵素輸送を促進することが知られており<sup>2)</sup>、RUTBC1ノックダウン色素細胞においてRab32/Rab38が活性化したことから、RUTBC1ノックダウン色素細胞ではメラニン合成酵素輸送が促進されるものと予想した。しかしながら、RUTBC1ノックダウン色素細胞を用いてメラニン合成酵素の細胞内局在や発現量を評価したところ、メラニン合成酵素輸送が顕著に抑制されるという全く相反する結果を得るに至った(図6)。

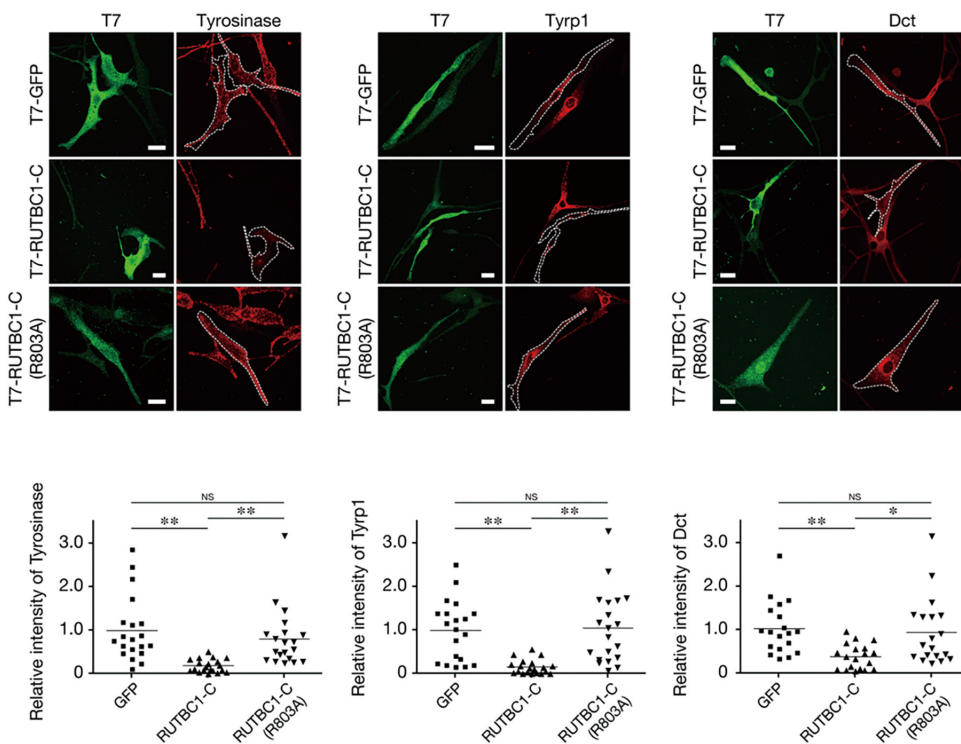


図3 RUTBC1のC末端TBCドメインのGAP活性は、色素細胞におけるチロシナーゼ/Typr1/Dct輸送に関与する。

T7-GFP、T7-RUTBC1-C、またはT7-RUTBC1-C (R803A)を発現する色素細胞の画像を示す。Melan-a細胞にT7タグを付加した各タンパク質発現プラスミドをトランスフェクションし、チロシナーゼ、Typr1、Dctに対する抗体で染色した。T7タグタンパク質を発現する細胞は、破線で示されている。下図は、上図で示されたチロシナーゼ/Typr1/Dctシグナルを定量化したグラフである。バーは、20細胞シグナルの平均値を示している。

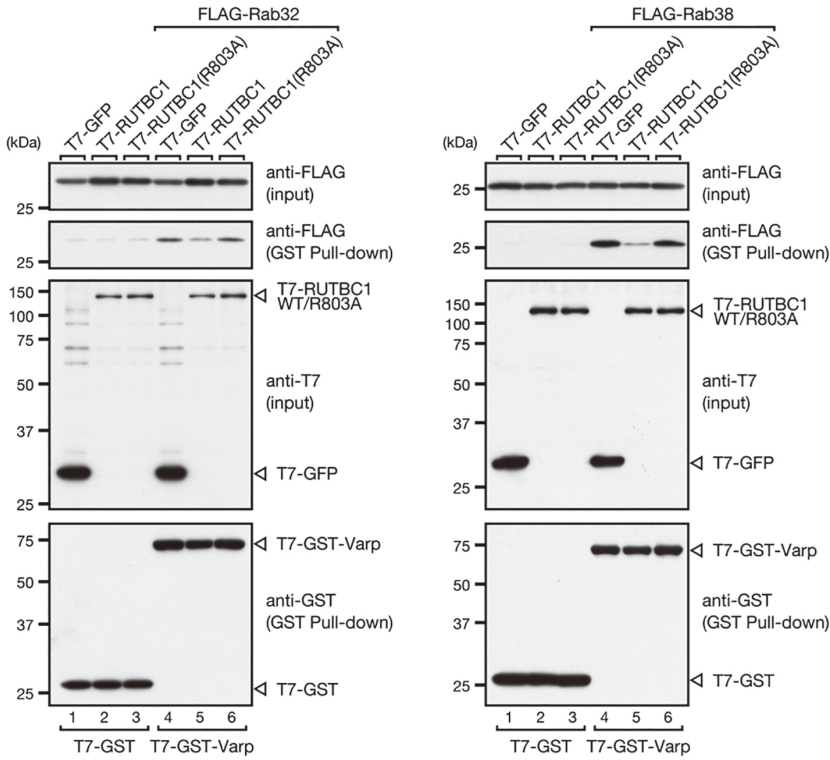


図4 RUTBC1は細胞内でRab32およびRab38の両方を不活性化する。  
T7-GFP、T7-RUTBC1またはT7-RUTBC1(R803A)とともにFLAG-Rab32あるいはFLAG-Rab38を発現するCOS-7細胞を可溶化し、Rab32/Rab38エフェクターであるVarpを結合したグルタチオンセファロースビーズを用いて活性化型Rab32およびRab38をプルダウンした。

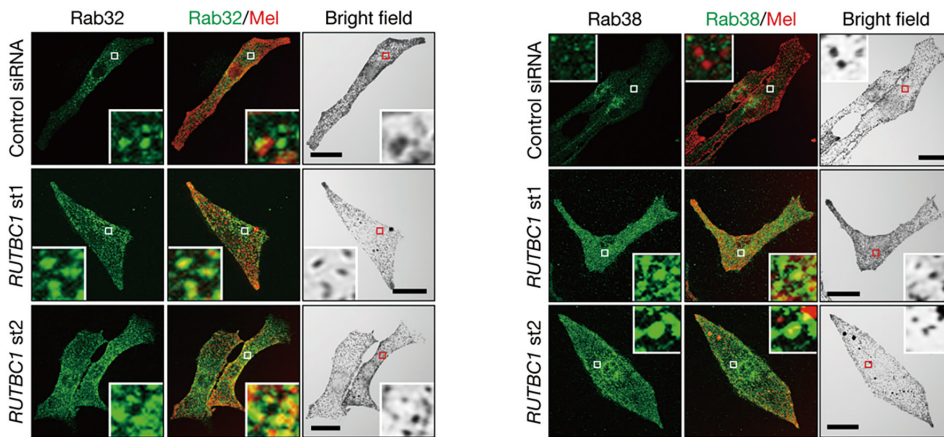
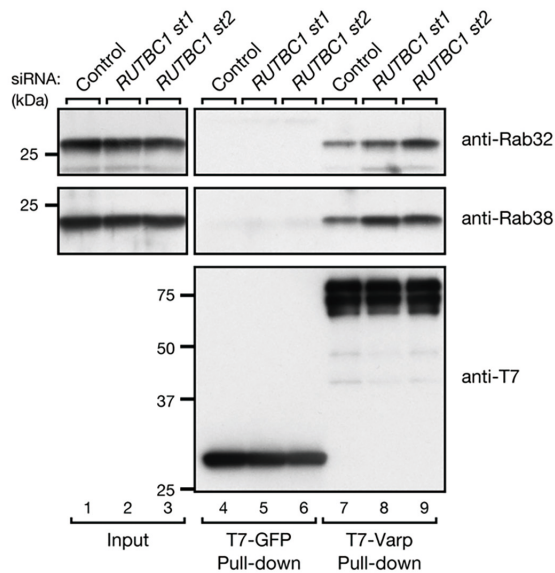


図5 RUTBC1ノックダウンは、Rab32 / Rab38のメラノソーム発現を増加させる。  
抗Rab32抗体(左上図)または抗Rab38抗体(右上図)で染色されたRUTBC1ノックダウン色素細胞の典型的な画像およびそれらに対応する明視野画像を示す。挿入図は、ボックス領域の拡大図を示す。メラノソームにおけるRab32 / Rab38陽性シグナルは、コントロールsiRNA処理色素細胞においてメラノソーム(Mel、擬似赤色)と共局在しており、そのシグナルはRUTBC1ノックダウン色素細胞において明らかに増加した。(下図) T7-GFPまたはT7-Varpと結合した抗T7タグ抗体結合アガロースビーズを、RUTBC1ノックダウン色素細胞の可溶化液とともにインキュベートした。免疫沈降したT7-GFPまたはT7-Varpおよび共免疫沈降した内在性Rab32 / Rab38が、示された抗体によるウェスタンブロットにより検出された。



### 3. 5. Rab9Aはメラニン合成酵素の輸送に関与する

GAP活性を欠損した全長RUTBC1 (R803A) 変異体の過剰発現の結果として、メラニン合成酵素の輸送が阻害された分子基盤の解明を試みた。C末端側のRUTBC1-C (R803A) 変異体は阻害活性を示さなかったことから、RUNドメインを含むRUTBC1のN末端側領域が、メラニン合成酵素の輸送に付加的な機能を果たしている可能性が考えられた。興味深いことに、RUTBC1はRab9エフェクターとして同定されており<sup>4)</sup> (図1)、RUTBC1のN末端側領域はRab9結合に重要な役割を果たすことが報告されている。色素細胞では、Rab9Aアイソフォームのみを発現し、Rab9Bアイソフォームを発現しないことから(データ未掲載)、RUTBC1と共にRab9Aを色素細胞に発現させた。その結果、Rab9AおよびRUTBC1 (WT / R803A)

はしばしばメラノソームにおいて共局在した(図7)。単独の発現ではRUTBC1の大部分は細胞質全体に散らばったことから(図7)、RUTBC1のメラノソームにおける局在は、Rab9Aによって仲介されると考えられた。興味深いことに、Rab9AとRUTBC1を共発現した色素細胞では、メラニン合成酵素輸送が顕著に阻害されるのに対し、Rab9AとRUTBC1 (R803A) 変異体を共発現した色素細胞では、メラニン合成酵素の輸送に異常は認められなかった(図7)。

最後に、BLOC-3のサブユニットであるHPS4もまたRab9のエフェクター分子であることから<sup>6)</sup>、Rab9AとRUTBC1との機能関係を解析するため、HPS4に焦点を当てて解析を行った。これまでの報告に一致するように、HPS4とRab9Aの結合、および、RUTBC1とRab9Aの結合を確認した(図8)。次いで、競合実験を行うことにより、

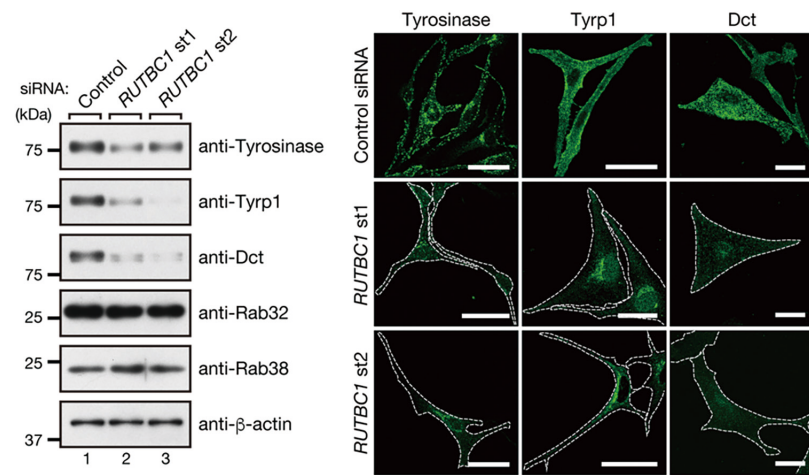


図6 色素細胞におけるRUTBC1のノックダウンは、3つのメラニン合成酵素すべての発現を減少させる。

RUTBC1ノックダウンは、Rab32/Rab38の発現を変化させることなく、色素細胞における3つのメラニン合成酵素(チロシナーゼ、Tyrp1、Dct)全ての発現を強く抑制した。右図は3つのメラニン合成酵素それぞれに対する抗体を用いて染色されたRUTBC1ノックダウン色素細胞の画像を示す。破線は細胞膜を示す。

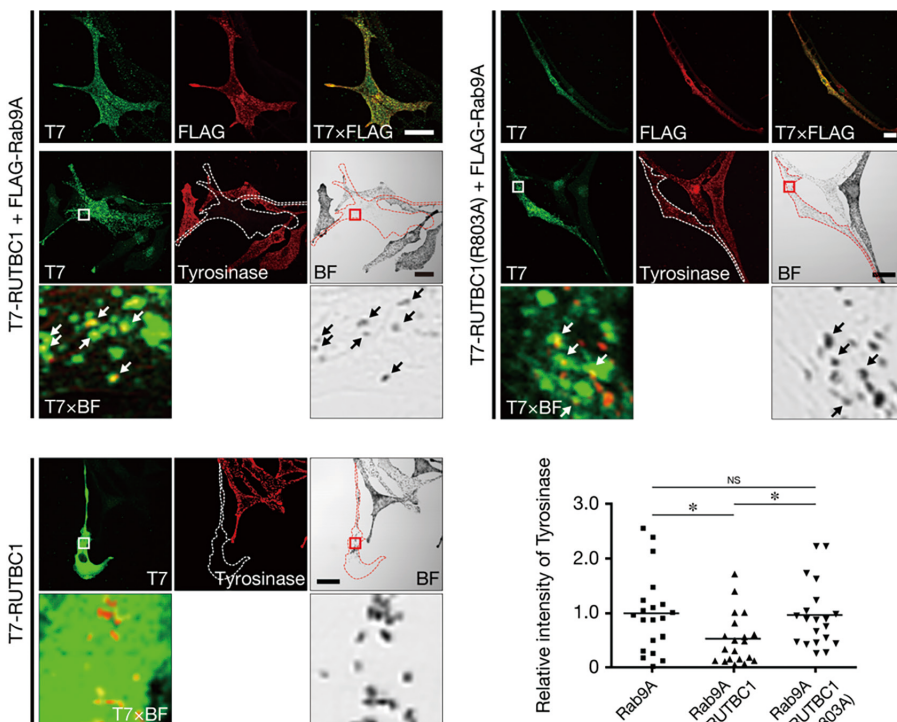


図7 Rab9Aはチロシナーゼのメラノソームへの適切な輸送に関与している。

T7-RUTBC1またはT7-RUTBC1 (R803A) とFLAG-Rab9Aを共発現する色素細胞の画像を示す。抗T7抗体、抗FLAG抗体、抗チロシナーゼ抗体を用いて細胞を染色し、対応する明視野(BF)画像を示す。赤色あるいは白色の破線は、T7-RUTBC1 (WT/R803A) またはFLAG-Rab9Aを発現する細胞を示す。挿入図は、ボックス領域の拡大図を示す。T7-RUTBC1+FLAG-Rab9Aを発現する色素細胞ではチロシナーゼシグナルが減少したが、T7-RUTBC1 (R803A)+FLAG-Rab9Aを発現する色素細胞では減少しなかったことに留意されたい。

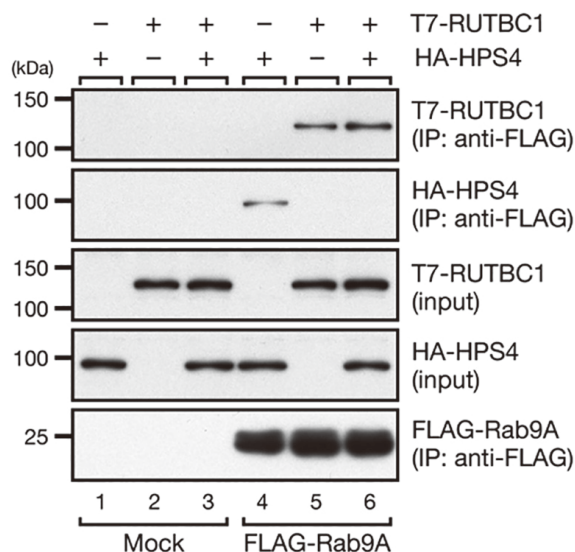


図8 RUTBC1はHPS4と競合してRab9Aと結合する。

HA-HPS4またはT7-RUTBC1と共にFLAG-Rab9Aを発現したCOS-7細胞溶解液を、抗FLAGタグ抗体結合アガロースビーズで免疫沈降させ、FLAGビーズに結合したタンパク質を示された抗体を用いてイムノブロットした結果を示す。

RUTBC1がHPS4とRab9A間の結合を阻害することを見出した(図8)。これらの結果は、RUTBC1が少なくとも2つの作用、すなわち①TBCドメインを介するRab32/Rab38の直接的な不活性化能、②Rab9AとBLOC-3から構成される複合体形成を阻害することによる間接的なRab32/Rab38の不活性化能を有していることを示している。

#### 4. 考察

RUTBC1はRab32およびRab38に対してGAP活性を有すること、そして*in vitro*ではRab38に対して約10倍低いGAP活性を有することが報告されていたが、その生理機能については不明であった。本研究では、RUTBC1がメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送に重要なRab32/Rab38の生理学的なGAPであることを裏づけるいくつかの研究成果を得ることができた。まず、RUTBC1-C末端のTBCドメインを色素細胞に発現させるとメラニン合成酵素の輸送が阻害されるのに対し、その変異体RUTBC-1(R803A)を発現させても何ら影響が認められなかった。第二に、RUTBC1ノックダウン色素細胞では、メラノソーム上のRab32/Rab38シグナルの増強が観察された。第三に、生化学的手法によりRUTBC1が活性化型Rab32および活性化型Rab38の量を劇的に減少させ、一方でRUTBC1ノックダウン色素細胞では活性化型Rab32および活性化型Rab38量の増加が観察された。これらの知見から、RUTBC1が色素細胞におけるRab32/Rab38の機能的なGAPであると結論づけた。

次に、RUTBC1の過剰発現およびノックダウンによりメラニン合成酵素の輸送が阻害されたことから、メラニン合成酵素輸送にはRab32/Rab38の適切な活性化・不活性化のサイクル(すなわちGTP-GDPサイクル)が必要であると考えられた。

予期しなかった別の発見として、全長RUTBC1のGAP活性変異体であるRUTBC1(R803A)の過剰発現もまた、野生型RUTBC1の過剰発現と同じく、メラニン合成酵素すべての輸送異常を引き起こしたことがあげられる。C末端のRUTBC1-C(R803A)変異体は全く効果がなかったことから、RUTBC1のN末端領域の重要性が示唆された。

RUTBC1のN末端領域は、Rab9と相互作用するため、RUTBC1(R803A)変異体による阻害効果は、色素細胞における内在性Rab9Aを捕捉することにより、内在性Rab9Aと内在性RUTBC1の相互作用を抑制した可能性が考えられる。RUTBC1(R803A)変異体をRab9Aと共に過剰発現した際には、メラニン合成酵素の輸送阻害は認められなかったという結果は、この可能性を裏づけていると考えられる。さらに本研究では、RUTBC1がRab9AとBLOC-3のサブユニットであるHPS4との相互作用を阻害することを示した。したがって、RUTBC1過剰発現は、Rab32/Rab38のGAP活性を促進することによる直接的な阻害、さらに、Rab9AとBLOC-3の相互作用を阻害することによりRab32/Rab38の活性化を間接的に阻害する、というモデルを提唱するに至った<sup>7)</sup>。

#### 5. 総括

本研究では、Rab9結合タンパク質であるRUTBC1がRab32/Rab38を不活性化することにより色素細胞における3つのメラニン合成酵素の輸送を抑制すること、また、RUTBC1ノックダウンにより、メラニン合成酵素の輸送が抑制されることを明らかにした。これらの発見により、メラノソームへのメラニン合成酵素の輸送が正常に行われるためには、Rab32/Rab38の適切なGTP-GDPサイクルが必要であることが示唆された。

Rab32/Rab38の活性化レベルを制御することは、メラノソームの成熟(暗色化)の制御につながるため、Rab32/Rab38の活性化制御は重要な創薬のターゲットと考えることができる。しかし、低分子量Gタンパク質には化合物が相互作用できるポケットが極めて少なく、低分子量Gタンパク質自身をターゲットとした新薬の開発は非常に困難であると考えられている。本研究結果をふまえ、Rab32/Rab38とRUTBC1の相互作用を阻害するような化合物の開発は、メラニン合成酵素のメラノソームへの輸送を調節できる可能性が考えられる。本アプローチは、アルブチンをはじめとするメラニン合成酵素自身の活性化制御をターゲットとする既存のアプローチとは異なっている点に特色

があり、メラニン産生を多面的な角度から制御することは、今後のコスメトロジー研究の発展に不可欠であると考えられる。

(引用文献)

- 1) Oiso N, Riddle SR, Serikawa T, Kuramoto T, Spritz RA: The rat Ruby (*R*) locus is Rab38: identical mutations in Fawn-hooded and Tester-Moriyama rats derived from an ancestral Long Evans rat sub-strain, *Mamm. Genome*, 15, 307-314, 2004.
- 2) Gerondopoulos A, Langemeyer L, Liang JR, Linford A, Barr FA: BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor, *Curr. Biol.*, 20, 2135-2139, 2012.
- 3) Tamura K, Ohbayashi N, Maruta Y, Kanno E, Itoh T, Fukuda M: Varp is a novel Rab32/38-binding protein that regulates Tyrp1 trafficking in melanocytes, *Mol. Biol. Cell*, 20, 2900-2908, 2009.
- 4) Wasmeier C, Romao M, Plowright L, Bennett DC, Raposo G, Seabra MC: Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes, *J. Cell Biol.*, 175, 271-281, 2006.
- 5) Nottingham RM, Ganley IG, Barr FA, Lambright DG, Pfeffer SR: RUTBC1 protein, a Rab9A effector that activates GTP hydrolysis by Rab32 and Rab33B proteins, *J. Biol. Chem.*, 23, 33213-33222, 2011.
- 6) Kloer DP, Rojas R, Ivan V, Moriyama K, van Vlijmen T, Murthy N, Ghirlando R, van der Sluijs P, Hurley JH, Bonifacino JS: Assembly of the biogenesis of lysosome-related organelles complex-3 (BLOC-3) and its interaction with Rab9, *J. Biol. Chem.*, 285, 7794-7804, 2010.
- 7) Marubashi S, Shimada H, Fukuda M, Ohbayashi N: RUTBC1 Functions as a GTPase-activating Protein for Rab32/38 and Regulates Melanogenic Enzyme Trafficking in Melanocytes, *J. Biol. Chem.*, 291, 1427-1440, 2016.

# 創薬のための毛嚢を有する in vitro 人工皮膚モデルの開発

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

片岡 健

The skin has a complex tissue architecture composed of a large variety of cell types of ectodermal and mesodermal origins. Most of these cells are produced from corresponding progenitor/stem cells by tightly regulated mechanisms. In our previous studies, we have demonstrated the utility of in vivo skin reconstitution assay. The characteristics of this assay system we used are that the cells in a mixed suspension segregate from each other and actively form tissue architecture through cell-cell and cell-environment interactions.

However, few studies have succeeded in generating a three-dimensional (3D) tissue-like structure. During embryogenesis, the cells accumulate and form complicated organ structure. Cellular interactions of epithelial, mesenchymal and endothelial progenitors are very important steps of this early organogenesis.

In this study, we have generated a 3D tissue-like structure in vitro using mouse skin epidermal and dermal cells mixed with human umbilical vein endothelial cells and mesenchymal stem cells. These cells formed a 3D spheroid within 72 hours after inoculation on a Matrigel-coated dish. Epidermal keratinocytes were mainly located at the surface of the spheroids and endothelial cells were positioned inside of the spheroids. Mixed cell spheroids formed hair follicles 3 weeks after subcutaneous transplantation into the back skin of nude mice.

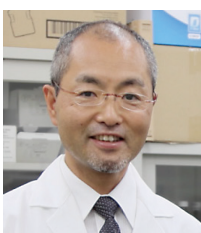
## 1. 緒言

皮膚は身体の表面を覆う最大の組織であり、微生物や抗原などによる身体への侵入を防ぐための被覆・防御機能が発達した組織の1つでもある。皮膚の構造は表面より表皮層、真皮層、脂肪や筋層などの皮下組織に分類される。さらに付属器と呼ばれる毛嚢、汗腺、皮脂腺などを有することにより、体温調節や乾燥予防、排泄などの複合機能を発揮する。これらの機能を維持するために、表皮に存在する幹細胞が絶えず体細胞分裂を繰り返している。この幹細胞はバルジと呼ばれる皮脂腺の根元部分に存在し、上下方向に分化することで皮膚表面と付属器の両方へ表皮細胞を供給していることが知られている。このバルジには毛嚢の幹細胞と色素幹細胞も存在していることより、皮膚は幹細胞に富んだ組織でもある<sup>1)</sup>。また容易に採取することもできるため、皮膚は組織細胞を用いた治療が最も進んだ組織でもある。初めてヒト表皮細胞の培養に成功したのは1970年代である<sup>2,3)</sup>。その後、重症熱傷患者から採取した表皮細胞を培養して表皮細胞シートを作製し、その患者へ移植したことが1981年に報告されている<sup>4)</sup>。これが組織工学の手法を用いた再生医療による世界初の治療症例であった。通常、真皮に到達していない、または付属器が残存し

ている浅い損傷であれば、バルジから供給される表皮幹細胞や周囲の細胞の進展によって速やかに治癒に至る。しかし、皮下組織の脂肪組織や筋層まで損傷が達し付属器が残存していない時、周囲の細胞による完全な治癒には非常に長い時間がかかる。その場合、患者の皮膚を採取して移植する自家植皮法が行われる。さらに広範囲な損傷においては自家植皮に使用できる皮膚が不足するため、代わりに同種・異種の培養皮膚シートを利用した治療が現在行われている<sup>5)</sup>。この皮膚シートは表皮ケラチノサイトと真皮線維芽細胞により構成され、皮膚の被覆・防御機能は有している。しかし、毛嚢、汗腺、皮脂腺などの付属器を欠損している。このように創傷治癒した皮膚が付属器を欠損していることは、皮膚の美容や体温調節など生理的に大きな問題であり、付属器を有する正常により近い皮膚の供給が望まれている。

これまでの研究において我々は、移植したマウスの表皮細胞と真皮細胞に由来するほぼ完全な皮膚組織が形成される in vivo 皮膚付属器形成モデルを開発した<sup>6)</sup>。これは胎生16日目ICRマウスより単細胞として回収した表皮細胞と真皮細胞を  $1.0 \times 10^7$  cells ずつヌードマウスの背側部にシリコンチャンバーを用いて移植する方法である。この方法により移植3週間後には、ICRマウスに由来する毛嚢や皮脂腺などの付属器を有したほぼ完全な皮膚組織が形成されていた。一方で、このような付属器を有する皮膚組織を in vitro で作製することは非常に困難である。

近年、武部らは、iPS細胞に由来する肝臓細胞を血管内皮細胞と間葉系幹細胞と共に培養しマウスへ移植すると、機能を有する肝臓組織を形成する肝臓の組織原基の作製に成功した<sup>7)</sup>。これは複数種の細胞が3次元構造を形成しな



In Vitro Artificial Skin Model with Appendages for Drug Discovery

Ken Kataoka

Department of Life Sciences, Okayama University of Science

から分化できる環境を保証することで、発生初期のプロセスを培養環境内で再現し組織を形成させる方法である。この方法を皮膚の組織原基へ応用した。またChih-Chiangらは付属器の再生過程においてマクロファージが重要な役割を果たすと報告した<sup>8)</sup>。

以上より、我々は武部らの方法を参考にin vitroにおける組織原基形成実験を行い、混合培養に使用した各細胞の局在を調べた。並びにマクロファージを加えて作製した組織原基をマウスへ移植する皮膚組織形成実験を行い、付属器を有する正常により近い皮膚組織の形成を目指し検討した。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞の調製

妊娠16日目ICRマウス(日本クレア)胎仔より採取した背部皮膚を、ディスパーゼII溶液に浸して4℃で24時間処理し表皮層と真皮層に分離した後、トリプシン・EDTA溶液処理(15分)により単細胞とした。ヒト血管内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC)、ヒト間葉系幹細胞(Human Mesenchymal Stem Cells: hMSC)の初代培養細胞(クラボウ)を推奨されている培地を用いて培養し、3次元培養用に調製した。マクロファージはICRマウス(8週齢メス、日本クレア)の腹腔へ3.84g/dLに調整したチオグリコレート培地2mLを投与し、72時間後に腹腔より回収した。

### 2.2. in vitro 組織原基形成実験

あらかじめマトリゲルでコーティングした24wellプレートに表皮細胞、真皮細胞、HUVEC、hMSCを2:2:3:1の割合で総数 $2.0 \times 10^6$  cells/wellとなるように播種し、表皮細胞用培地と血管内皮細胞用培地を等量混ぜ合わせた培地を用いて3次元混合培養を行った。マウスへ移植する実験にのみマクロファージを $2.5 \times 10^5$  cells/wellとなるよう

に混ぜ合わせた。

### 2.3. 免疫染色

混合培養72時間後の細胞塊をOCTコンパウンドで包埋し、液体窒素を用いて凍結ブロックを作製した。薄切はクリオスタットを用いて7μmの厚さに調整し、蛍光免疫染色に用いた。一次抗体には抗体Pan-Cytokeratin抗体(Sigma)、CD31抗体(DAKO)を用い、二次抗体には抗Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488抗体とAnti-mouse IgG Alexa Fluor 594抗体を用いた。

### 2.4. 細胞のラベリングとその観察

混合培養に使用する細胞をあらかじめ蛍光色素でそれぞれラベリングした。このラベリングにはmolecular probesキット(Life technologies)を利用した。混合培養に使用する細胞をあらかじめPKH67(真皮細胞)、PKH26(hMSC)、CLARET(HUVEC)でラベリングし混合培養した後、凍結ブロックを作製しクリオスタットを用いて7μmに薄切し蛍光観察した。

## 3. 結果

### 3.1. in vitro 組織原基の形成

我々が武部らの手法を参考にマウス胎児由来の表皮細胞、真皮細胞をhMSC、HUVECと混合してマトリゲル上で培養したところ、散在していた細胞は徐々にまとまり始めた。培養24時間後には播種した細胞はほぼまとまり、72時間後には1つの球状な細胞塊を形成していた(図1)。

### 3.2. 形成された組織原基の免疫染色

3次元混合培養により形成された細胞塊において、構成細胞であるマウス表皮細胞、マウス真皮細胞、HUVEC、hMSCの配置を明らかにするために蛍光免疫染色を行った。細胞塊の蛍光免疫染色では細胞塊の表層にケラチン陽性の

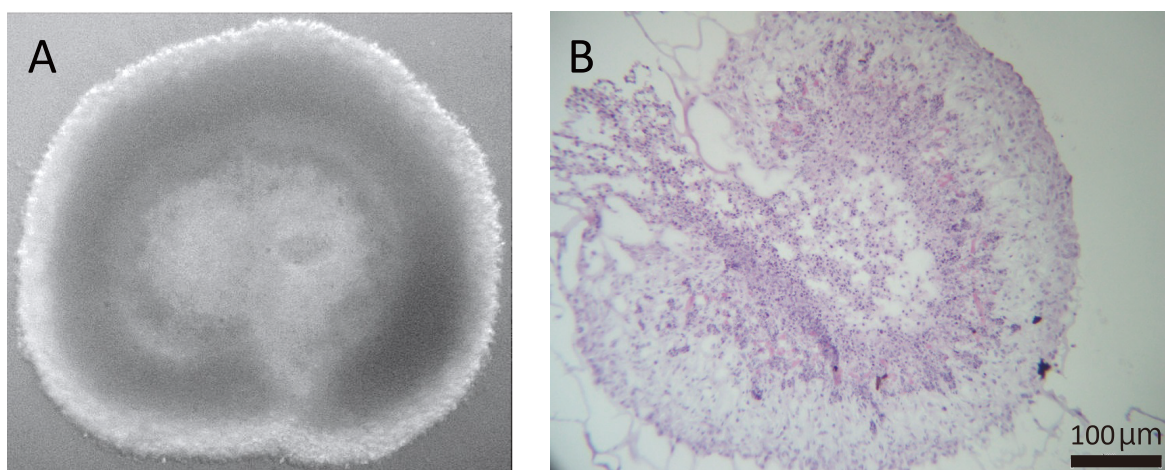


図1 形成された皮膚組織原基(培養3日目) A. 位相差顕微鏡像、B. H&E染色像

表皮細胞が局在しており、内部にはCD31 陽性の血管内皮細胞が存在していた(図2)。

### 3. 3. ラベリングした細胞の追跡

播種する細胞をラベリングした後に3次元培養を行い、組織原基を形成した。形成された組織原基(細胞塊)を蛍光観察したところ、真皮細胞とHUVECが共局在し、hMSCは細胞塊中に散在していた。

### 3. 4. 組織原基の移植による組織形成実験

さらにこの細胞塊をヌードマウス皮下に移植したところ、数は少ないが移植部分に毛嚢形成が観察された(図3)。さらにマクロファージを加えて作製した細胞塊をヌードマウスの背側部へ皮下移植し、その3週間後に組織形成能を評価するために移植部位の皮膚を採取してHE染色を行った。興味深いことに、マクロファージが細胞塊中に存在していた方が移植細胞の定着率がよかった。これらの実験結果が

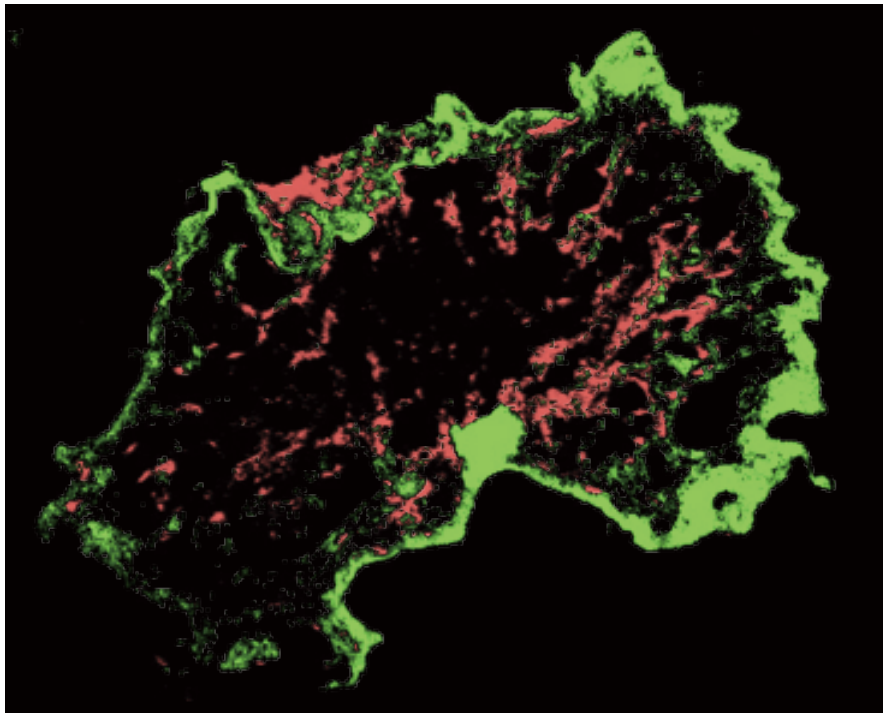


図2 形成された皮膚組織原基の免疫染色像 緑：Pan-cytokeratin、赤：CD31

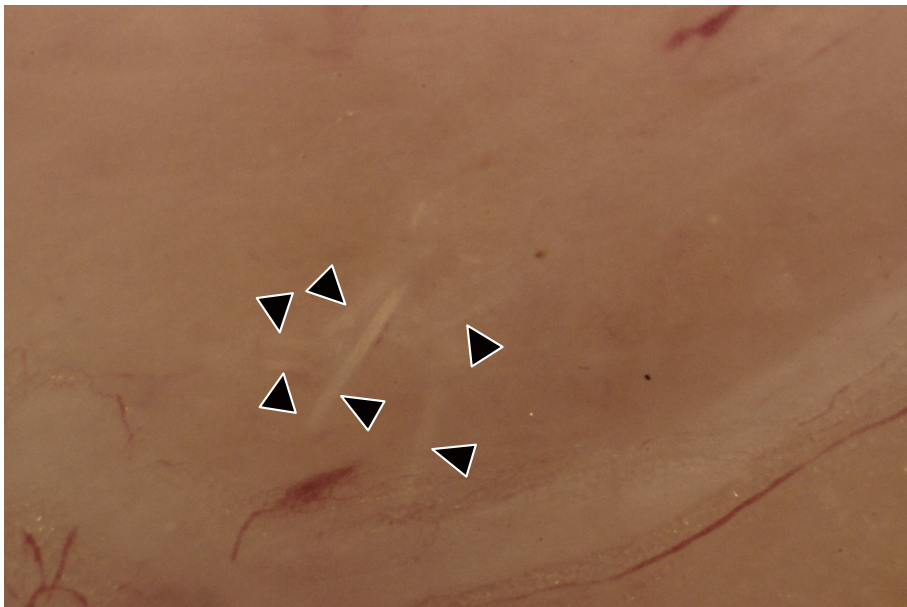


図3 皮膚組織原基移植3週後のヌードマウス皮膚組織(翻転して真皮側より観察している)  
矢頭：形成された羽毛芽原基

らこの細胞塊は培養内で作成された人工的な皮膚付属器原基と考えられた。

#### 4. 考察とまとめ

in vitro組織原基形成実験において、細胞塊を構成している4種の細胞の局在をほぼ明らかにした。細胞塊の表層が表皮細胞、内部が血管内皮細胞により構成されている理由として、身体の表面を覆う役割に特化した表皮細胞の特性が大いに影響していると思われる。また真皮細胞と血管内皮細胞が局在していた理由として、真皮中には毛細血管が網状に張り巡らされており、生体環境の組織構造をそのまま反映しているのではないかと想定された。

ヌードマウスに移植した細胞塊から形成された毛嚢が少数であった原因として、生体細胞を培養系に移すことによって皮膚幹細胞の多分化能が失われたことが考えられる。この問題を克服するためには、生体の微小環境に近い培養環境内で3次元混合培養し細胞の能力の低下を最小限に抑えた状態で移植するのが良いと考えられる。今後この原基のヌードマウスへの移植効率を改善する方法を開発したい。

#### (引用文献)

- 1) Nishimura E. K. et al: Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307: 720-724, 2005
- 2) Rheinwald JG and Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-343, 1975
- 3) Green H et al: Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Nature science* 76: 5665-5668, 1979
- 4) O' Connor NE et al. *The Lancet* 317: 75-78, 1981
- 5) 井家 益和 : *生物工程学* 92: 110-114, 2014
- 6) Kataoka K et al: Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution on skin. *Am J Pathol* 163: 1227-1231, 2003
- 7) Takebe T et al: Vascularized and functional human liver from a iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499: 481-484, 2013
- 8) Chih-Chiang C et al: Organ-level quorum sensing directs regeneration in hair stem cell populations. *Cell* 161: 277-290, 2015

# 化学物質の新規リスク評価のためのライブシングルセル解析手法の開発

大阪大学大学院基礎工学研究科

倉岡 功

Risk assessment studies of chemical substances that induce DNA lesions are important, because DNA lesions in genomic DNA result in cancer in humans. Many classes of DNA lesions induced by chemical agents are eliminated via DNA repair nucleotide excision repair (NER) for the maintenance of genomic integrity. Ames test is one of the most commonly applied tests in toxicology. In the test, NER-deficient mutant bacterial cells are used to detect the mutagenic capacity of chemical substances. Unscheduled DNA synthesis test is also popular test for toxicology and measures DNA repair synthesis after excision of oligonucleotides containing DNA lesions during NER. And in human, individuals with NER-defective xeroderma pigmentosum are cancer-prone. For toxicology research in human, therefore, it might be important to identify NER-repairable bulky DNA lesions induced by chemical substances. So far, simple and quick assays to detect such damaging agents have not been developed using human living cells. Here, we report a simple, non-isotopic assay for determining DNA damaging agents that induce NER-repairable DNA lesions by visualizing gene expression from treated fluorescent protein vectors in a mammalian living cell system. This assay is based on a comparison of fluorescent protein expression in NER-proficient and NER-deficient living cells. When we tested UV-irradiated fluorescent protein vectors, the fluorescent protein was observed in NER-proficient living cells, but not in NER-deficient living cells. Similar results were obtained for vectors treated with the anticancer drug, cisplatin. By contrast, when treated with the DNA alkylating agent methyl methanesulfonate, believed to cause no NER-repairable lesion, no difference in gene expression was observed in between NER-proficient and NER-deficient living cells. Using fluorescent protein expression and living test cells, our assay can specifically detect DNA-damaging agents that induce NER-repairable DNA lesions, and could be used to analyze chemicals with the potential to cause cancer.

## 1. 緒言

化学物質のデータベースであるケミカルアブストラクト誌によれば、地球上に存在する化学物質は1億種をこえ、日常生活において7万以上の化学物質に囲まれ、さらに新規の化学物質が毎日のように登録されている。このような無数とも思われる物質があるため、迅速に人に対する健康影響を予測し、その影響の大きさの順位づけを行い、安全対策に結びつけるということは重要なことであると考えられる。しかしながら、人に影響を与える化学物質をすべて網羅して、分析し評価することは困難を極め、さらに環境中の化学物質は混合した状態で存在し、その影響はより複雑かつ複合的に示される。

現在、化学物質の安全性評価の方法は、復帰突然変異試験および染色体異常試験で基本解析されている。この2つの試験法は比較的簡便にまた短期間で化学物質の安全性を評価することができる。しかしながら、それぞれ遺伝子組換え生物および細胞分裂の時間を必要とするし、またそれぞれ突然変異誘発性および染色体異常誘発性を指標として

おり、これらは分子生物学的観点からすると明らかに複雑でまた遅い反応である。またこれらの方法論は50年以上昔の生物学基盤により開発されている。

今回、申請課題の基になるバイオアッセイは、上記の化学物質に係る試験よりさらに簡便でまた短期間にその安全性を評価することができる。なぜならば、近年の分子生物学から得られた知見を基に従来の試験法と異なった指標(損傷に应答した転写反応)を用いているからである。我々は、このバイオアッセイを従来の細胞株を用いて構築し、毒性に应答した転写反応およびその有用性を報告した<sup>1-4)</sup>。今回さらにその応用として、生きたヒト細胞を用いて生きたままりアルタイムで、化学物質の安全性を評価できる方法を開発することを目標とした。

当初、DNA修復によってタンパク質の蓄積が観察できるCSBタンパク質を標的として、予定の実験を開始した。このタンパク質は、化学物質などで生じたDNA損傷を修復するヌクレオチド除去修復機構に関するもので、特に転写と共役することからその反応は非常に早いことが予測された。また幾つかの論文によれば、確かにCSBおよびそれに関連する修復遺伝子の細胞内局在はそれぞれ細胞核内の核小体に高頻度で存在することが報告されていた。そのため我々はそれらのタンパク質と蛍光タンパク質を融合した発現ベクターを構築し、まずヒト細胞株であるHeLa細胞およびHEK293細胞に導入してその遺伝子発現を解析した。発現はウエスタンブロットにより確認し、タンパク質が確かに目的の大きさに観察できることが明らかになっ



A new method for detecting new biological risk assessment of chemical substance using live cell analysis

Isao Kuraoka

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

た。また細胞内の局在を解析し、蛍光タンパク質としての発現も確認することができた。しかしながら、その発現が安定せず、結果的に細胞においてこのタンパク質が分解されやすいということがわかった。加えて、これらのタンパク質発現安定発現株の構築を試みたが、これも細胞内での局在が安定しなかった。この原因として、融合タンパク質としては、予定した修復タンパク質は不安定であり、今回の我々の目的とした方法論では観察できないということがわかった。

以上の結果から、当初想定していた方法論ではリスク評価をすることは困難だと考え、新規の実験を行うことにした。この新規方法では、蛍光タンパク質発現ベクターをDNA損傷剤(テスト試薬)と反応させることで、DNA上に損傷を生み出し、その損傷が修復されるかどうかを観察することで、損傷剤の危険性を評価する。また、この損傷を評価するために特にヌクレオチド除去修復機能を欠損した細胞(XPA欠損細胞)、さらにこの修復機能を相補した細胞(XPA相補細胞)を作成し、その差異によって評価することとした(Fig. 1)。これは化学物質を評価する最も多く用いられているエームス法においては、DNA修復特にヌクレオチド除去修復を欠損した細菌を用いて、損傷を検出しやすくしている。そこでこの実験方法においても同様にヌクレオチド除去修復を欠損したヒトXPA欠損細胞を用いることとした<sup>5)</sup>。この方法だと実際に生じたプラスミド上のDNA損傷の修復を生きた細胞を蛍光顕微鏡で観察することができるはずである。これらの作業仮説をもとに、以下に示すように実験を行い、予測された通り一定のDNA損傷を測定することができた。さらに今回我々が構築した試験細胞株はXP細胞であるため、基本的にはNERで修復されるはずのDNA損傷を検出していることになった。XP患者が高頻度発がんおよび精神神経症状を呈することから<sup>6)</sup>、このNERで修復されるDNA損傷は高頻度発がんおよび精

神神経症状を引き起こす原因の一つとも考えられ、その損傷を検出できることが示唆された。これによって、化学物質のリスク評価を求める新規の実験方法を構築できたと考えられる。

## 2. 方法

### 2. 1. 試験プラスミド、導入確認用のプラスミドおよびXPA発現ベクターの構築

試験プラスミドとして、pEBMulti-Neo-tdTOMATOおよび導入確認用のプラスミドとして、pBluescript II KS(-)-EGFPをそれぞれ以下のように作製した。

#### 2. 1. 1 pEBMulti-Neo-tdTOMATO

赤色発光タンパク質をコードしたtdTOMATO cDNAを挿入するために、wtTDP43 tdTOMATOHA<sup>7)</sup> プラスミドを鋳型としてPCRにより両端に*Bam*H Iと*Xho* Iの制限酵素サイトをもつtdTOMATO cDNAを増幅した。このPCR産物をpEBMulti-Neoの*Bam*H Iおよび*Xho* I制限酵素部位にT4 DNA Ligaseを用いて挿入した。

試験用のプラスミドには、紫外線、シスプラチンおよびMMSによりDNA損傷が導入された。

#### 2. 1. 2 pBluescript II KS(-)-EGFP

緑色発光タンパク質をコードしたEGFP cDNAを挿入するために、pEGFP-C1 プラスミドを鋳型としてPCRにより両端に*Bss*HIIIの制限酵素サイトをもつEGFP cDNAを増幅した。このPCR産物をpBluescript II KS(-)の*Bss*HIII制限酵素部位にT4 DNA Ligaseを用いて挿入した。

#### 2. 1. 3 XPA発現ベクター

DNA修復タンパク質をコードしたXPA cDNAをサブクローニングし、PCRにより両端に*Bam*H Iと*Xho* Iの制限酵素サイトをもつXPA cDNAを増幅した。このPCR産物をpEBMulti-Neoの*Bam*H Iおよび*Xho* I制限酵素部位にT4 DNA Ligaseを用いて挿入した。また、全てのプラ

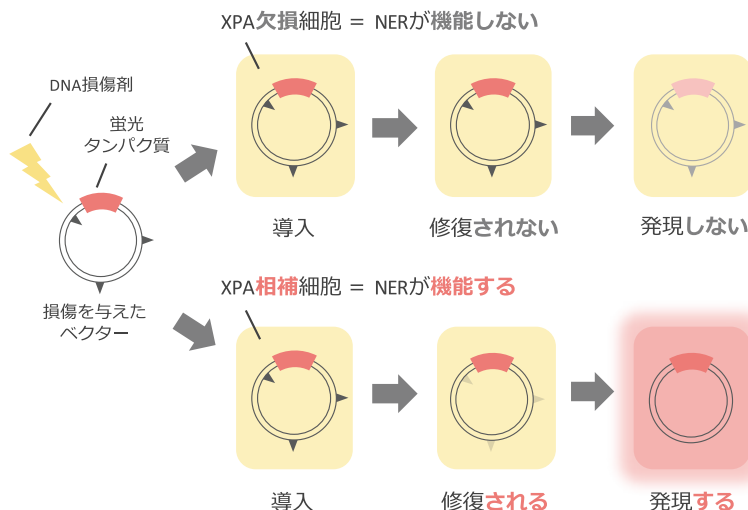


Fig. 1 検出系の概要

スミドベクターの塩基配列は、シークエンサーによって確認された。

## 2. 2. 試験細胞の構築

修復タンパク質XPAが欠損したXP-A患者の細胞(XP2OS細胞)に、今回作成したXPAを発現するpEBMulti-XPAベクターを導入した。使用したpEBMulti-Neoベクターには、Neomycin耐性遺伝子が組み込まれている。Neomycin耐性遺伝子が組み込まれているベクターを細胞に導入し、その細胞を抗生物質であるG-418 Sulfateを含む培養液で増殖させることで、DNAが正しく導入された細胞のみを選択することができる。ベクターを導入したXP2OS細胞をG-418 Sulfateを含む培養液で培養し、ベクターが正しく導入され、生存した細胞のみを選択した。また、これらの樹立された細胞におけるXPAタンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより確認し、試験細胞である(XP2OS/pEBMulti-XPA細胞：XP2OS/XPA細胞)を樹立した。さらにこの時、同様にしてpEBMulti-Neoベクターのみを導入し、Neomycin耐性で選択をしたコントロール細胞(XP2OS/pEB細胞)も樹立した。これらの試験細胞(XP2OS細胞、XP2OS/pEB細胞、XP2OS/XPA細胞)は、10% FCS (ウシ胎仔血清) を添加したDMEM培地を用いて、37度5%二酸化炭素濃度を保ったCO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養された。

加えて、それぞれの試験細胞に紫外線を照射し、その感受性を確認したところ、XPAを発現する細胞のみが紫外線に抵抗性であった。このことは外来のXPAタンパク質が細胞内で機能していることを示している。

## 2. 3. 修復試験テスト(紫外線)

2つの1.5mL tubeに①OPTI-MEM、pEBMulti-tdTOMATO、pBS-GFP、②OPTI-MEM、損傷を与えたpEBMulti-tdTOMATO、pBS-GFPを加えた。OPTI-MEMとLipofectamine® 2000 Reagentを混合したものを加え、室温でインキュベートした(5min)。前日に12well plateに撒いたXP2OS細胞、XP2OS/pEB細胞、XP2OS/XPA細胞(8.0 × 10<sup>5</sup> cells/mL)の1wellずつに125 μLずつ加え、37度5%二酸化炭素濃度を保ったCO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養された(O/N)。24h後に細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

また画像処理ソフトImage Jにより、蛍光強度を測定した。

## 3. 結果

本研究におけるアッセイを検証するために、UVによるDNA損傷を検証した。

太陽光など、UVにより生じるDNA損傷として、隣接チミン同士が架橋したcyclobutane pyrimidine dimer (CPD)

や6-4 pyrimidone photoproducts ((6-4)光産物)が知られている<sup>8)</sup>。これらのUV損傷DNAは隣接ピリジン塩基間において光環化反応が起こることで生じる。生成の割合はCPDが80~90%、(6-4)光産物が10~20%程度であるが、(6-4)光産物は構造の変化の大きさからCPDよりも変異原性が高いことが知られている。そしてこれら2つの損傷は、いずれもNERにより修復されることが分かっている。よって、UV損傷DNAを用いることで、このアッセイが正しく機能するかを確かめた。また実際にDNA修復段階を明らかにするため、まず細胞内で確かに修復されるか、また修復時間がどのように変化するかを検討するため、UV非照射のベクターおよび照射ベクターをそれぞれ作製した試験細胞に導入した。その結果、UV非照射のベクターを導入した全ての細胞は導入後24h後にRFPを産生し、蛍光が観察された(Fig. 2)。UV照射されたベクターを導入したXP2OS/XPA細胞もRFP遺伝子が発現し、蛍光が見られた。しかし、XP2OS細胞およびXP2OS/pEB細胞では蛍光は観察されなかった。これは、UVにより生じたDNA損傷が蛍光タンパク質ベクターにおける遺伝子発現を妨害し、この損傷は、XPAタンパク質の存在下ではNERにより修復され得ることを示唆した。

しかしこの方法では、試験に用いる発現ベクターが6時間までに導入されていない可能性も考えられる。またXP2OS細胞およびXP2OS/pEB細胞には発現ベクターが導入されにくい可能性およびトランスフェクションによる細胞死の可能性も考えられる。そこで我々は、これらのことを回避すべく、pEB-RFPベクター同時に試験細胞に

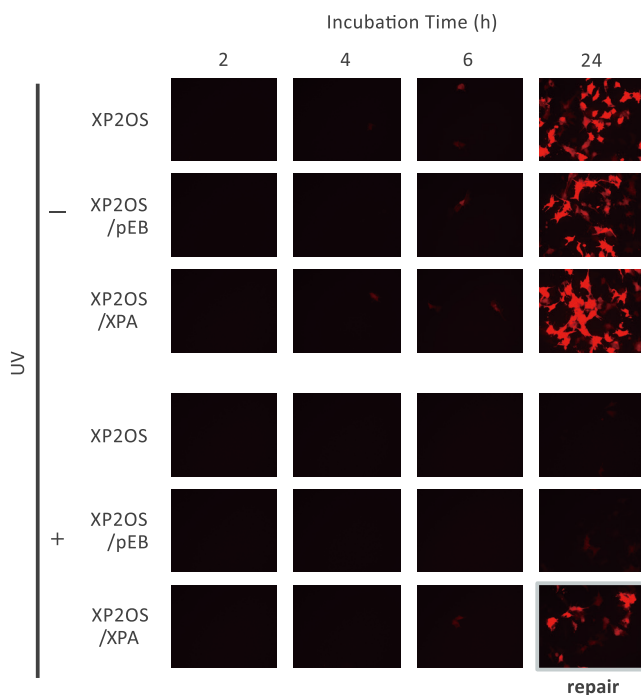


Fig. 2 UV損傷を与えたpEB-RFPを導入した試験細胞の時間経過

導入するモニターベクター (pBS-EGFP) を作製した。これを試験するため、UVを照射して損傷を与えているpEB-RFPベクター、およびUVを照射していないpEB-RFPベクターと、損傷を与えていないpBS-GFPベクターを同時に試験細胞に導入した。損傷を与えていないpEB-RFPとpBS-GFPを導入した3つの細胞は、全ての細胞においてGFPおよびRFP遺伝子を発現し、蛍光が見られた。損傷を与えたpEB-RFPとpBS-GFPを導入した細胞については、XPAタンパク質を産生しているXP2OS/XPA細胞においては、GFPとRFP両方の蛍光が観察された (Fig. 3 & 4)。これは、DNAの細胞中の核内への導入が正しく行われ、NERにより修復が可能であるDNA損傷が除去されたということを示唆している。一方で、XPAタンパク質が存在せずNERが欠損した細胞であるXP2OS細胞およびXP2OS/pEB細胞においては、GFP遺伝子のみ発現していた。これにより、この検出系が正しくNERによる損傷を検出しているということがわかった。

続けて我々はシスプラチンにより生じるDNA損傷が検出可能かを検討した。シスプラチンは広く利用されている抗がん剤であり、がん細胞におけるその細胞毒性活性は複製または転写を阻害するシスプラチン-DNA付加物に起因する歪みによって媒介されると考えられている。最も多いシスプラチンによるDNA損傷であるシスプラチン-DNA付加物は、鎖内架橋 (intrastrand crosslink) である1,2-intrastrand d(GpG) crosslinkおよびd(ApG) crosslinkであるが、これに加え、1,3-intrastrand d(GpNpG) crosslinkや鎖間架橋 (interstrand crosslink) を少量生じる<sup>9)</sup>。NERは、これらのintrastrand crosslinkを効果的に除去するが、interstrand crosslinkはNERとは別の機構である相同組み換え修復で修復されると考えられている。

pEB-RFPベクターをシスプラチンと処理し、G-25カラムに通して精製した後に試験細胞にトランスフェクトした。高濃度(10~100 $\mu$ M)のシスプラチン処理の細胞においては、全ての試験細胞でGFPの蛍光は観察されたが、RFPの蛍光は観察されなかった。これは、シスプラチンが遺伝子発現を妨害するいくつかのDNA損傷を生じ、それらがNERでは修復されないinterstrand crosslinkを含むより複雑なDNA損傷であり得ることを示唆している<sup>10)</sup>。一方で、1 $\mu$ Mのシスプラチン処理をした細胞においては、XP2OS/XPA細胞ではRFP遺伝子が発現したが、XP2OS細胞、XP2OS/pEB細胞では発現しなかった (Fig. 5 & 6)。よって、この濃度においては、RFPベクターにNERで修復が可能なDNA損傷を生成することが示唆された。

次に、NERとは異なる経路で修復されることが分かっているmethyl methanesulfonate (MMS)で損傷を与えた。MMSは、7-メチルグアニン(7-meG)および3-メチルアデニン(3-meA)のようなベクターDNA中のDNAアルキル化

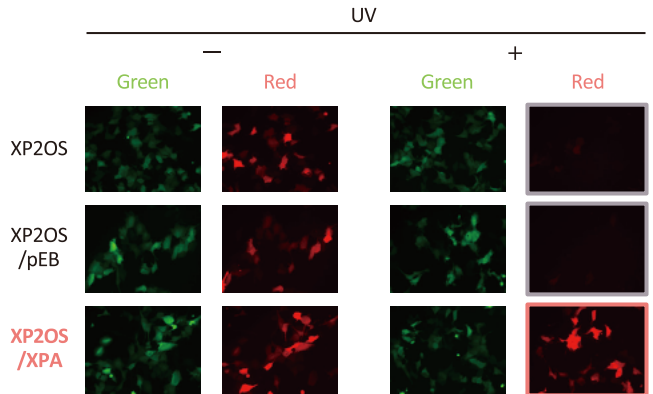


Fig. 3 UV損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光観察

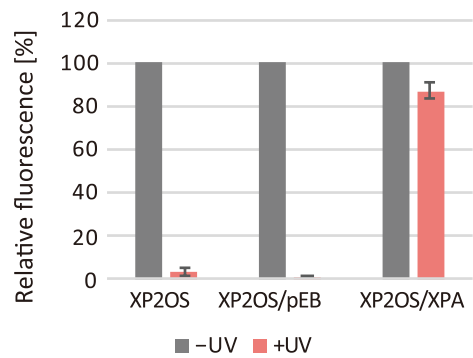


Fig. 4 UV損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光定量化

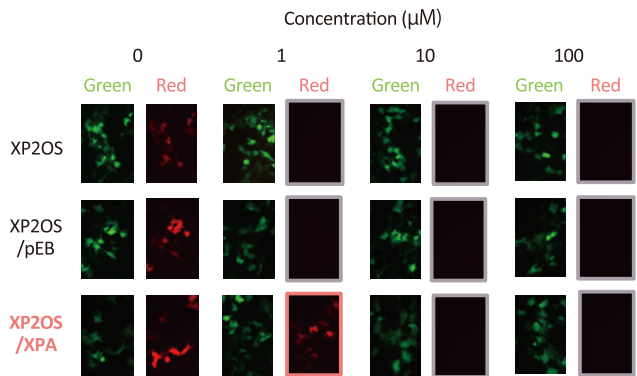


Fig. 5 シスプラチン損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光観察

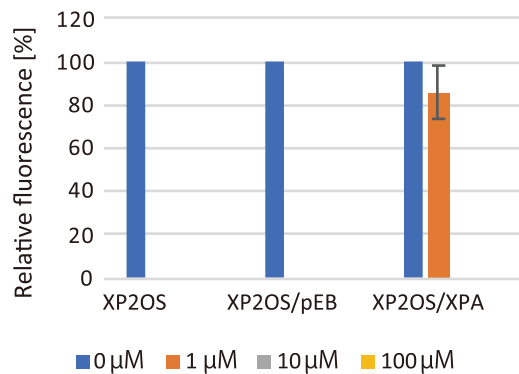


Fig. 6 シスプラチン損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光定量化

塩基損傷、並びにAPサイトを誘導することができる<sup>11)</sup>。DNA修復酵素のアルキルアデニンDNAグリコシラーゼは、DNA上の損傷塩基を認識し、アルキル塩基を除去してAPサイトを生成する<sup>12)</sup>。MMSにより誘発されるDNA損傷は、塩基除去修復(BER)の対象と考えられており、NERとは別の経路で修復されると考えている。よって、XPAが欠損しておりNERが機能しない細胞であってもBERは機能すると考えられるため、損傷を受けた蛍光タンパク質によっても蛍光が観察されることが予想される。

pEB-RFPベクターをMMSと処理し、G-25カラムに通じて精製した後に試験細胞にトランスフェクトした。すると、予想通りに全ての細胞においてGFPとRFP遺伝子の発現が観察された(Fig. 7 & 8)。これは、MMSにより誘発されるDNA損傷は遺伝子発現に影響を及ぼさず、本研究におけるアッセイはBERにより修復されるDNA損傷の検出には使用することができないことが示唆された。しかし、1mMのMMSでは濃度が小さすぎて、損傷が適切に誘導されなかった可能性も否定することはできない。

#### 4. 考 察

本研究では、DNA損傷を与えた蛍光タンパク質をNERが欠損しているXP-A患者の細胞に導入し、損傷が修復されれば蛍光タンパク質遺伝子の発現を蛍光顕微鏡で検出することができるという原理を用いて、DNA損傷の検出系を開発した。

UV照射したpEB-RFPベクターを細胞にトランスフェクションすると、UV照射されていないpEB-RFPベクターが全ての細胞においてRFPを産生したのに対し、NER欠損細胞(XP2OS細胞およびpEBベクターのみがトランスフェクトされたXP2OS/pEB細胞)ではRFPは産生されず、一方でNER相補細胞(XP2OS/XPA細胞)ではRFPの蛍光を観察することができた。同様に、嵩高いDNA損傷を誘発するDNA損傷剤であるシスプラチンで処理すると、NER相補細胞では濃度が小さい場合には蛍光タンパク質を産生するが、NER欠損細胞では全く蛍光が観察されなかった。一方、DNAアルキル化塩基損傷を誘発するMMSと共にインキュベートされたベクターを導入した試験細胞では、全ての細胞において蛍光タンパク質の蛍光を観察することができた。UVおよびシスプラチンはNERで修復が可能なDNA損傷を誘発するが、MMSはBERで修復されるDNA損傷を誘発するので、本研究ではNERによって修復されたDNA損傷を誘発するDNA損傷剤を検出することができる結論づけた。

一般的に使用されているDNA損傷剤のスクリーニング法であるエームス試験は、NERが欠損している突然変異細菌細胞を用いて特定の化学物質が突然変異を誘発する可能性を分析することができる。しかし、転写や複製を妨害

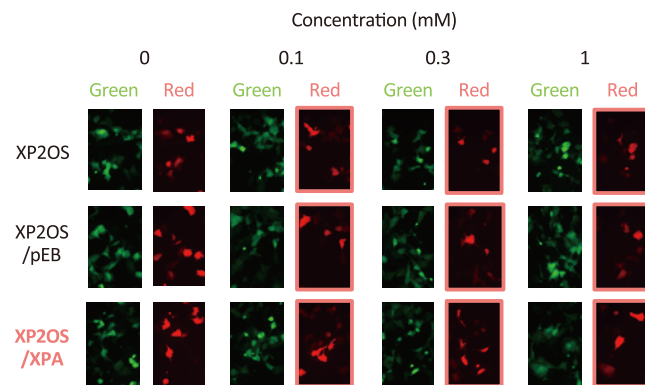


Fig. 7 MMS損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光観察

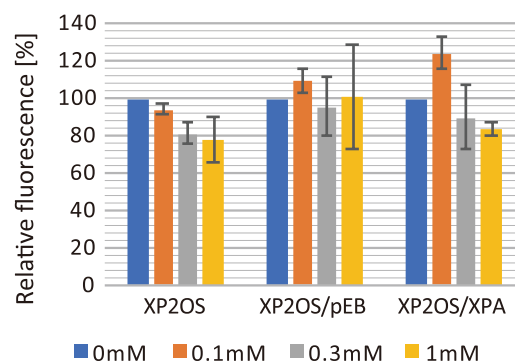


Fig. 8 MMS損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光定量化

するDNA損傷は、化学物質の細胞毒性作用によりほとんど検出されない。さらに、細菌細胞と哺乳類細胞のDNA代謝には大きな差異があるため、哺乳類細胞中で分析することが求められる。

また、UDS試験は、哺乳類培養細胞中の細胞周期のS期のDNA合成に進まないDNAに、放射性トリチウム標識チミジン(<sup>3</sup>H-dT)を組み込むことに基づいており、取り込まれた<sup>3</sup>H-dTは、X線に感受性を示すオートラジオグラフィにより、ハロゲン銀粒子として検出されることによりDNA損傷を検出している<sup>13)</sup>。UDS試験は、古くから一般的に用いられている*in vivo*における遺伝毒性試験であり、XP相補性診断試験としても使用されている。しかし、UDS試験は複雑な過程を経る必要があり、さらに放射性同位体の使用を余儀なくされる。

本研究における検出系では、これらの欠点を克服することができる。損傷をプラスミド自体に与えるため、細胞への影響はなく細胞毒性を考慮する必要は少ない上に、細菌細胞ではなくヒトの生細胞を用いているため、よりヒトにとって有害である化学物質を見極めることができる。さらに、過程は蛍光タンパク質遺伝子発現ベクターに損傷を与え、細胞に導入するだけの簡単なものであるし、放射性同位体も用いる必要はない。

さらに多くの試験試薬を用いて損傷と修復の関係を検討する必要はあるものの、この検出系は、エームス法などのようにDNA損傷を誘発するさらなる新しいDNA損傷剤の発見、すなわち新規の化学物質の評価法に役立つことが期待できる。

## 5. 総括

当初は、損傷を受けた細胞内のタンパク質の局在変化によって、生きた細胞で化学物質の安全性を評価する実験系を確立することを目指した。しかしながら、局在変化では様々な細胞の状態（遺伝的背景の違いおよび損傷の生成頻度）により損傷による局在変化が観察されなかった。そこで従来の生化学的手法および遺伝学的手法の延長線上として今回の検出法を考案した。この方法では、試験細胞を遺伝学的に統一することで安定した細胞を確保し、また損傷の生成頻度も外来遺伝子である発現プラスミドを用いることにより克服し、さらに発現プラスミドのモニターとして蛍光タンパク質を用いることで生きた細胞でリアルタイムに損傷のタイプおよび修復の効率を考察することができる実験系を確立することができた。細胞を様々な変異株を用いることで、また、発現プラスミドをさらに改変することによって応用研究が発展できることが期待できる<sup>14)</sup>。

### (引用文献)

- 1) Hasegawa M, Iwai S, Kuraoka I. A non-isotopic assay uses bromouridine and RNA synthesis to detect DNA damage responses. *Mutat Res.* 699. 62-66. 2010
- 2) Morita Y, Iwai S, Kuraoka I. A method for detecting genetic toxicity using the RNA synthesis response to DNA damage. *J Toxicol Sci.* 36. 515-521. 2011
- 3) Kametani Y, Iwai S, Kuraoka I. An RNA synthesis inhibition assay for detecting toxic substances using click chemistry. *J Toxicol Sci.* 39. 293-299. 2014
- 4) Sonohara Y, Iwai S, Kuraoka I. An in vitro method for detecting genetic toxicity based on inhibition of RNA synthesis by DNA lesions. *Genes Environ.* 1. 37:8. doi: 10.1186/s41021-015-0014-8. eCollection 2015
- 5) Tanaka K, Miura N, Satokata I, Miyamoto I, Yoshida MC, Satoh Y, et al., Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain, *Nature* 348. 73-76. 1990
- 6) Lehmann AR, McGibbon D, Stefanini M. Xeroderma pigmentosum, Orphanet J. Rare Dis. 6. 70. 2011
- 7) Yang C, Tan W, Whittle C, Qiu L, Cao L, Akbarian S, Xu Z. The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism. *PLoS One* 5. e15878. 2010
- 8) Mori T. et al., Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA, *Photochem Photobiol.* 54. 225-232.1991
- 9) Moggs JG, Yarema KJ, Essigmann JM, Wood RD. Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *J Biol Chem.* 271.7177-7186. 1996
- 10) Wood RD. Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. *Environ Mol Mutagen.* 51. 520-526. 2010
- 11) Karran P, Macpherson P, Ceccotti S, Dogliotti E, Griffin S, Bignami M. O<sup>6</sup>-methylguanine residues elicit DNA repair synthesis by human cell extracts. *J Biol Chem.* 268. 15878-15886. 1993
- 12) O'Brien PJ, Ellenberger T. Human alkyladenine DNA glycosylase uses acid-base catalysis for selective excision of damaged purines. *Biochemistry.* 42. 12418-29. 2003
- 13) Kelly CM, Latimer JJ. Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair, *Methods Mol. Biol.* 291. 303-320. 2005
- 14) Takatsuka R, Ito S, Iwai S, Kuraoka I. An assay to detect DNA-damaging agents that induce nucleotide excision- repairable DNA lesions in living human cells, *Mutat Res.* 8201-8207. 2017

# 皮膚アレルギーを制御する $\omega$ 3由来脂肪酸メディエーターの 産生・作用機構の解明

東京大学大学院薬学系研究科

河野 望

Allergic diseases such as atopic dermatitis and asthma are becoming very common in developed countries. Allergy is associated with increased serum IgE levels and mast cell activation. Association of an antigen with IgE on the mast cell surface causes cross-linking of the high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI), leading to exocytosis of granule-associated mediators and proteases (degranulation) as well as new synthesis of cytokines and lipid mediators. Therefore, uncovering molecular mechanisms that regulate mast cell activation could provide crucial insights into the pathophysiology of mast cell-associated diseases. We recently found that omega-3 fatty acid epoxides are produced in mast cells dependently of PAF-AH (II), an oxidized phospholipid-selective phospholipase A2 and are critical for proper IgE-mediated mast cell activation. In this study, we demonstrated that PAF-AH (II) preferentially hydrolyzed omega-3 epoxide-containing phospholipids in mast cell membrane to liberate omega-3 epoxides. We also identified Cyp4a12a and Cyp4a12b as enzymes involved in the epoxidation of omega-3 fatty acids in mast cells. We further revealed that the omega-3 epoxides promoted IgE-mediated activation of mast cells by downregulating Srcin1, a Src-inhibitory protein that counteracts Fc $\epsilon$ RI signaling. Thus, the Cyp4a12-PAF-AH (II)-omega-3 epoxide-Srcin1 axis presents new potential drug targets for allergic diseases.

## 1. 緒言

アトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー疾患は、先進諸国において罹患率が過去20年間で2-3倍に急増しており、大きな社会問題となっている。マスト細胞はアレルギー反応において中心的な役割を担う免疫細胞であり、免疫グロブリンE (IgE)によって感作されたマスト細胞が抗原刺激を受けると、脱顆粒を引き起こし、ヒスタミン、脂質メディエーター、サイトカインなどの炎症性物質を放出する。これまでに、抗原刺激を受けたマスト細胞が脱顆粒に至るまでの細胞内シグナル伝達経路は非常によく研究されているものの、このマスト細胞活性化シグナルを調節する因子については、未解明の部分が多い。

私は、これまでに生体膜リン脂質の酸化防御に関する研究に従事してきた<sup>1-4)</sup>。その中で、酸化リン脂質に選択的なホスホリパーゼであるPAF-AH(II)のノックアウト(KO)マウスを樹立し、PAF-AH(II)が酸化リン脂質を分解することにより、過度な酸化ストレスによる組織障害に対する防御機構として機能することを示してきた。最近、このKOマウスでは、皮膚アレルギー反応が減弱していることを見だし、さらにPAF-AH(II)はマスト細胞においてEPAやDHAといった $\omega$ 3脂肪酸がエポキシ化された酸化脂肪酸を選択的に産生し、マスト細胞活性化を正に制御し

ているという、まったく予想外な現象を捉えた。すなわち、PAF-AH(II)が単なる酸化リン脂質の消去酵素ではなく、新規の生理活性酸化脂肪酸の産生酵素であることが示唆された。

本研究では、マスト細胞機能を制御するエポキシ $\omega$ 3脂肪酸の産生機構、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸の作用機構を解明することを目的とした。

## 2. 方法

骨髄由来マスト細胞は、マウス骨髄細胞をIL3存在下で培養することにより得た。骨髄由来マスト細胞の活性化はIgEと抗原(ジニトロフェニル化ヒト血清アルブミン)により刺激後、 $\beta$ ヘキソサミニダーゼの放出を常法に従い検出した。骨髄由来マスト細胞におけるSrcin1のRNAiはSrcin1に対するshRNAを発現するレトロウイルスを感染させることによりおこなった。エポキシ $\omega$ 3脂肪酸およびエポキシ脂肪酸を持つリン脂質の測定にはUHPLC-QTRAP4500を用いた。エポキシ $\omega$ 3脂肪酸含有リン脂質の分解アッセイは、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸含有リン脂質を含む培養マスト細胞膜画分にリコンビナントPAF-AH(II)を作用させることによりおこなった。Cyp4a12a/b二重欠損マウスはCyp4a12a/bに対するsgRNAとCas9 mRNAを受精卵にインジェクションすることにより得た。

## 3. 結果

### 3.1 エポキシ $\omega$ 3脂肪酸含有リン脂質の測定系の確立

エポキシ脂肪酸を持つリン脂質の高感度な検出・定量系をUHPLC-MS/MSを用いて構築した。その結果、マスト細胞からエポキシ $\omega$ 3脂肪酸を含有するリン脂質分子種を複数検出することに成功した(図1)。またマスト細胞のり



The mechanisms of production and action of omega-3-derived fatty acid mediators regulating skin allergy

Nozomu Kono

Graduate School of Pharmaceutical Science, the University of Tokyo

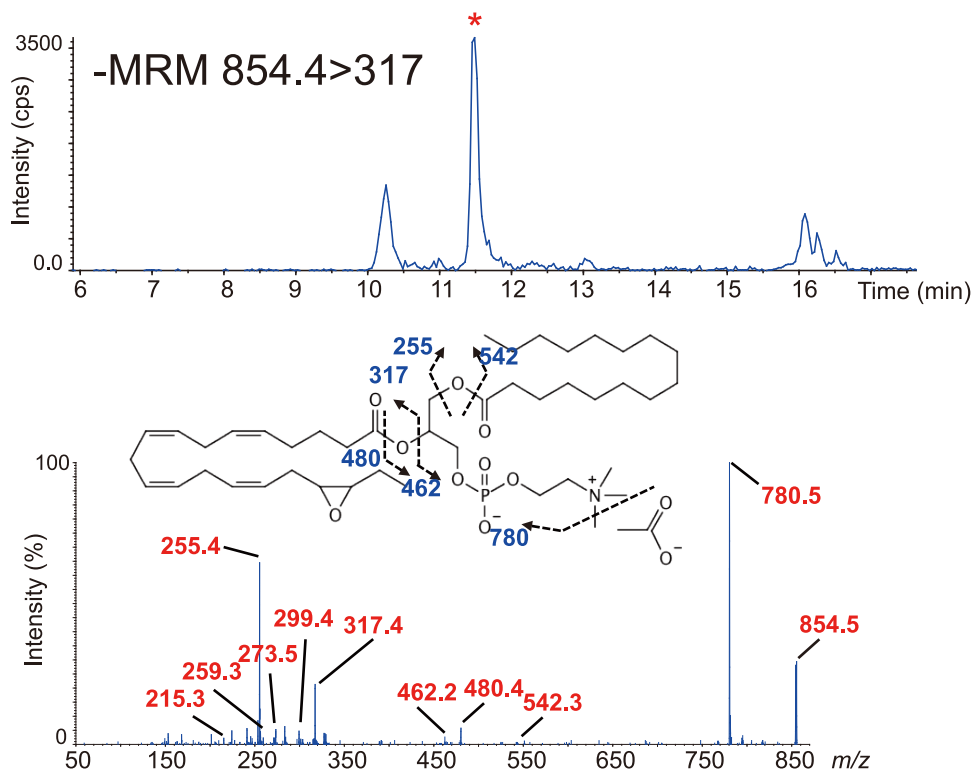


図1 マスト細胞におけるエポキシ $\omega$ 3脂肪酸含有リン脂質の検出  
 (上) エポキシ $\omega$ 3脂肪酸含有リン脂質(1-palmitoyl-2-17, 18-EpETE PC)を検出するMRMチャネルのイオンクロマトグラム。  
 (下) \*でしめしたピークのMS/MSスペクトル。

ン脂質画分中のエポキシ $\omega$ 3脂肪酸を定量したところ、リン脂質中に含まれる全 $\omega$ 3脂肪酸の1%程度がエポキシ $\omega$ 3脂肪酸であることが明らかとなった。

### 3.2. PAF-AH (II) によるエポキシ $\omega$ 3脂肪酸含有リン脂質の分解

培養マスト細胞にエポキシ $\omega$ 3脂肪酸を添加すると、すみやかに膜画分に取り込まれ、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸を含有するリン脂質が産生される。このようなエポキシ $\omega$ 3脂肪酸を含有するリン脂質に富む脂質膜にリコンビナントPAF-AH (II)を *in vitro* で作用させたところ、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸を含有するリン脂質が減少し、遊離エポキシ $\omega$ 3脂肪酸の増加がみられた。一方、酵素活性を失ったPAF-AH (II)<sup>S234C</sup>変異リコンビナントではそのような活性はみられなかった(図2)。

### 3.3. エポキシ $\omega$ 3脂肪酸を持つリン脂質の産生酵素の同定

$\omega$ 3脂肪酸のエポキシ化には複数のシトクロームP450(CYP)が関わるということが知られており、CYP2とCYP4ファミリーの中には脂肪酸を基質とするものが多く存在する<sup>5)</sup>。実際、培養マスト細胞にCYP阻害剤を添加したところ、CYP4選択的阻害剤HET0016を添加したときに、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸を持つリン脂質が顕著に減少した。そこで、

培養マスト細胞のマイクロアレイデータから、マスト細胞に発現しており $\omega$ 3脂肪酸のエポキシ化に関わる可能性のあるCYPを探索したところ、PAF-AH (II)の組織分布と非常に良く似た分布を示すCyp4a12a、Cyp4a12bを見出した。Cyp4a12aおよびCyp4a12bをそれぞれ培養細胞に発現させたところ、添加した $\omega$ 3脂肪酸からエポキシ $\omega$ 3脂肪酸への変換が顕著に増加した。Cyp4a12a、Cyp4a12bはアミノ酸レベルで98%以上の相同性を示し、ゲノム上で100 kb以内に近接して存在している。そこで、CRISPR/Cas9法によりCyp4a12a/bの二重欠損マウスを作成したところ、二重欠損マウス由来の培養マスト細胞ではエポキシ $\omega$ 3脂肪酸の産生の顕著な減少がみられた。

### 3.4. エポキシ $\omega$ 3脂肪酸によるマスト細胞活性化促進の作用メカニズムの解明

PAF-AH (II) KOマウス由来の培養マスト細胞にエポキシ $\omega$ 3脂肪酸を添加すると、IgE/抗原刺激時の脱顆粒能が回復する。この作用はIgE/抗原刺激の直前の添加ではみられず、添加から24時間以上の時間が必要である。このことから、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸は遺伝子発現を介してマスト細胞機能を制御していることが示唆された。そこで、脂肪酸をリガンドとする核内受容体であるペロキシソーム増殖因子活性化受容体(peroxisome proliferator-activated

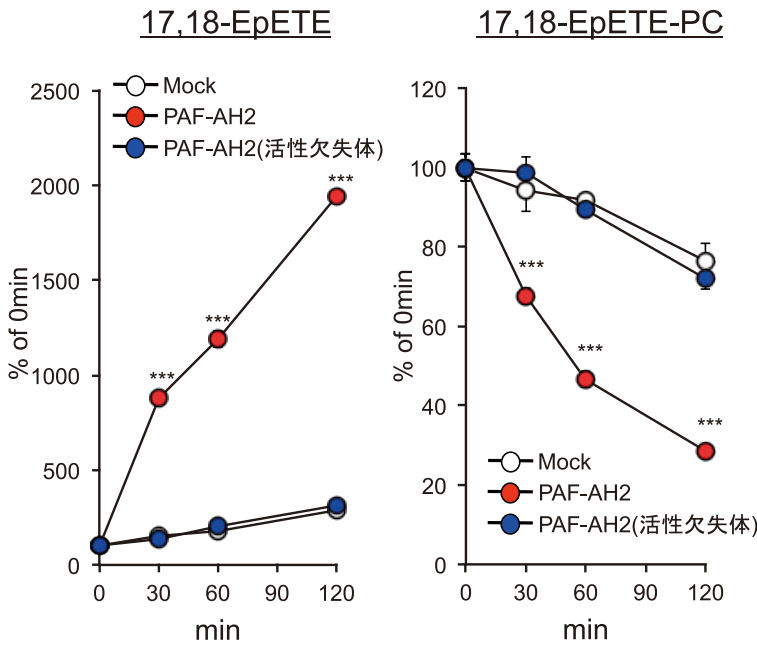


図2 PAF-AH(II)によるエポキシ $\omega$ 3脂肪酸含有リン脂質の分解  
 (左) PAF-AH(II)による17,18-EpETEの産生。  
 (右) \*PAF-AH(II)によるエポキシ $\omega$ 3脂肪酸含有リン脂質の分解。  
 \*\*\* $p < 0.001$ 。

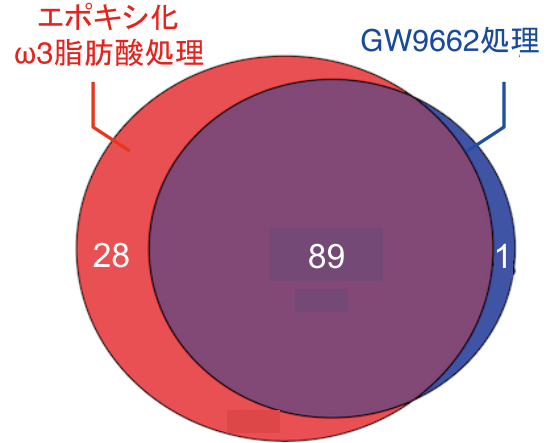


図3 エポキシ $\omega$ 3脂肪酸とPPAR $\gamma$ アンタゴニストGW9662で共通の遺伝子が発現減少する。

receptor, PPAR)に着目し、PPARの各種アゴニスト、アンタゴニストの添加実験をおこなったところ、PAF-AH(II) KOマウス由来のマスト細胞にPPAR $\gamma$ のアンタゴニスト(GW9662)を添加したときに、脱顆粒能が野生型マウスと同程度まで回復した。次にエポキシ $\omega$ 3脂肪酸およびGW9662をそれぞれ処理したPAF-AH(II) KOマスト細胞の遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイにより比較したところ、GW9662で1/4以下に発現が低下した遺伝子群のほとんどがエポキシ $\omega$ 3脂肪酸によっても1/4以下に発現低下していることがわかった(図3)。発現低下した遺伝子の内、Srcin1 (Src kinase signaling inhibitor 1)に着目した。Srcin1はSrcとCsk (carboxy-terminal src kinase)に結合する足場タンパク質であり、CskはSrcin1を介してSrcと結合することにより、SrcのC末端のチロシンをリン酸化し、Srcを不活化する<sup>6)</sup>。SrcファミリーキナーゼであるLynやFynはマスト細胞のIgE/抗原刺激時の活性化に必須であること、Srcin1はPAF-AH(II) KOマスト細胞で発現上昇しており、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸によってそれが抑えられたことから、Srcin1がエポキシ $\omega$ 3脂肪酸の作用に関与する可能性が考えられた。そこでPAF-AH(II) KOマスト細胞においてSrcin1を発現抑制したところ、KOマスト細胞の活性化不全がWTレベルまで回復した(図4)。

#### 4. 考察

エポキシ $\omega$ 3脂肪酸の産生において、PAF-AH(II)とCyp4a12a/bの重要性が明らかとなった。マスト細胞にお

いて、まずCyp4a12a/bにより $\omega$ 3脂肪酸からエポキシ $\omega$ 3脂肪酸が生成し、一旦膜リン脂質に取り込まれた後、PAF-AH(II)により切り出され、生理活性を発揮していると考えられる。エポキシ $\omega$ 3脂肪酸がなぜ一旦膜リン脂質に取り込まれるのかは不明であるが、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸の安定性向上や代謝回転の重要性が関係しているかもしれない。リポキシゲナーゼの中には遊離脂肪酸のみならず、リン脂質に結合した脂肪酸も基質にするものも存在することから<sup>7)</sup>、Cyp4a12a/bがリン脂質中の $\omega$ 3脂肪酸を直接エポキシ化している可能性もある。

またエポキシ $\omega$ 3脂肪酸は、Srcin1の遺伝子発現抑制を介してマスト細胞の活性化を促進しているという、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸の作用機構の1つが明らかとなった。PPAR $\gamma$ のアンタゴニストGW9662はエポキシ $\omega$ 3脂肪酸と同様の効果を示したが、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸はPPAR $\gamma$ レポーターアッセイにおいて、PPAR $\gamma$ の活性化を抑制できなかった。したがって、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸はPPAR $\gamma$ の直接のアンタゴニストとして働いているのではなく、別の標的分子があることが示唆された。核内受容体のなかには未だリガンドが不明なものが数多く存在しており<sup>8)</sup>、それらの中にエポキシ $\omega$ 3脂肪酸をリガンドとするものがあるのかもしれない。

#### 5. 総括

本研究から、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸の産生におけるPAF-AH2の重要性が明らかとなり、エポキシ $\omega$ 3脂肪酸が酸化

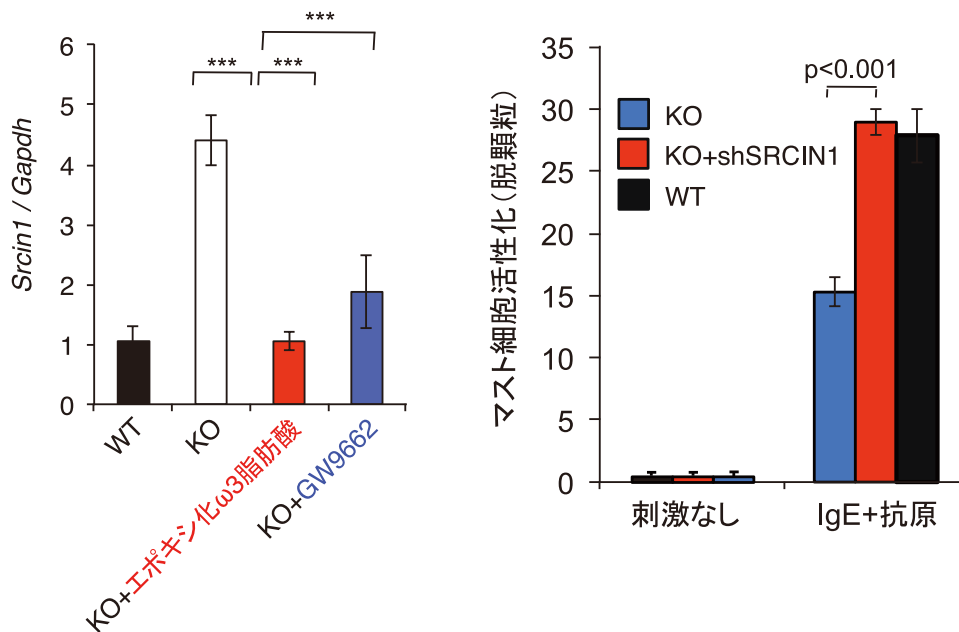


図4 Srcin1 はエポキシω3 脂肪酸のエフェクターである。  
 (右) Srcin1 の定量PCR。(左) Srcin1 発現抑制によるPAF-AH (II) KO マスト細胞活性化不全の回復。\*\*\* $p < 0.001$

リン脂質を介して産生されるという、従来のアラキドン酸カスケードとは異なる脂肪酸メディエーターの産生経路の存在が示唆された<sup>9)</sup>。本経路はマスト細胞を賦活化しており、本研究の成果は、皮膚アレルギーを制御する新たな方法論の開発等へ貢献できると期待される。

(引用文献)

- 1) Kono N, Arai H. Intracellular Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, Type II: A Unique Cellular Phospholipase A2 That Hydrolyzes Oxidatively Modified Phospholipids. *Enzymes*. 38:43-54, 2015.
- 2) Kono N, Arai H. Intracellular transport of fat-soluble vitamins A and E. *Traffic*. 16(1) :19-34, 2015.
- 3) Kono N, Ohto U, Hiramatsu T, Urabe M, Uchida Y, Satow Y, Arai H. Impaired α-TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency. *Science*. 340 (6136):1106-10, 2013.
- 4) Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsusue T, Itabe H, Niki E, Aoki J, Arai H. Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II platelet-activating factor acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo. *J Biol*

*Chem*. 283(3) :1628-36, 2008.

- 5) Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck WH. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep*. 62 (3) :536-47, 2010.
- 6) Cabodi S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P. Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer*. 10 (12) : 858-70, 2010.
- 7) Ivanov I, Kuhn H, Heydeck D. Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene*. 573 (1) :1-32, 2015.
- 8) Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*. 116 (Pt 4) : 585-6, 2003.
- 9) Shimanaka Y, Kono N, Taketomi Y, Arita M, Okayama Y, Tanaka Y, Nishito Y, Mochizuki T, Kusuhara H, Adibekian A, Cravatt BF, Murakami M, Arai H. Omega-3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that control the magnitude of IgE-mediated mast cell activation. *Nat Med*. 23 (11) :1287-1297, 2017.

# 皮膚ホメオスタシス制御に向けた アレルゲンセラピーの基盤研究とその応用

金沢大学医薬保健研究域 薬学系 衛生化学研究室

鈴木 亮

Allergy is an inappropriate immune response to allergens. Allergy requires initial sensitization with a specific allergen. The subsequent exposure to the same allergen result in patho(physio)logical responses mediated by immunoglobulin E (IgE) and mast cells. We have investigated high-affinity receptor for IgE (FcεRI) signals that control mast cell activation, especially focusing on the complexity of FcεRI activation and of the signaling network in response to different affinity of allergens. What we found is that IgE and FcεRI activate a complex regulatory network by the affinity of allergens that governs the type of allergic disease symptoms. In the mouse model, both high- and low-affinity allergens led to similar levels of immune cells infiltrating the site of inflammation. However, the types of infiltrating cells differed depending on whether the allergens used were high- or low-affinity. Whereas neutrophils were the dominant cell type infiltrating under a high-affinity antigen challenge, monocyte/macrophages were more abundant with the low-affinity antigen challenge. The physiological relevance of the differences in immune cell recruitment is still unclear. In this study, we explore the roles of different immune cell recruitment on physiological relevance on allergic diseases. Thus, we develop novel theories for allergen affinity-dependent immunotherapy for keeping skin homeostasis.

## 1. 緒言

人類は太古から「美」を追求し、様々なコスメティックを研究・開発してきた。現代社会において化粧は、単に「美しくなる」という目的を超え、社会的・医学的に大きな役割を担うようになってきた。例えば「コスメティックセラピー」という言葉に代表されるように、心理・健康面においても多大な影響を及ぼすことが、経験的そして科学的にも明らかになりつつある。

「化粧」には、その基本となる健康的な皮膚が不可欠であることは明らかである。ところが近年、住環境（乾燥、紫外線など）や生活環境（食生活、多種のコスメティックなど）の変化によって、我々の皮膚は様々なトラブルを抱えることが多くなってきている。そして、アトピー性皮膚炎、接触性アレルギーをはじめとするアレルギー性皮膚炎、花粉症が起因となる皮膚炎症症状など、皮膚の健康維持（ホメオスタシス）に多大なダメージを与え大きな社会問題になっている。

これら多くのアレルギー疾患には、マスト細胞が重要な役割を担っている。マスト細胞は細胞膜上にIgE受容体（FcεRI）を発現し、アレルゲン特異的IgEと結合している。アレルゲンによってIgE受容体が架橋・凝集することによって、マスト細胞が活性化される。その結果、分泌反応が



図1 マスト細胞の活性化と分泌反応

促進されアレルギー反応が惹起される(図1)。

我々は、アレルギー疾患モデル動物を用いた *in vivo* 解析から、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。高親和性アレルゲンでは好中球が、一方、低親和性アレルゲンでは単球・マクロファージが浸潤していることを見いだした<sup>1)</sup>。一般的に、好中球は、細菌・真菌を異物として貪食・分解することで生体防御反応を担っている。また、単球・マクロファージは死細胞や変性物質の補食・消化などクリーナーとしての役割を持つ。このことは、アレルゲン親和性選択的な浸潤細胞が、皮膚アレルギー炎症の病態(終息、増悪)決定に多大な影響を及ぼしていることを強く示唆していた。しかしながら、これらの病態決定におけるマスト細胞と浸潤細胞の相互作用の生理機能は全く明らかになっていない。

そこで本研究では、アレルゲンによって誘導される浸潤細胞とマスト細胞の相互作用という視点から、アレルギー



New insight on allergen immunotherapy for keeping skin homeostasis

Ryo Suzuki

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

疾患の実体を明らかにし、皮膚ホメオスタシス制御機構を明らかにすることを試みた。

## 2. 方法

### 2.1. 骨髄由来マスト細胞の分化と骨髄好中球の単離・精製方法

骨髄由来マスト細胞 (BMMC: bone marrow-derived mast cell) は成体マウス (C57BL/6) の大腿骨から骨髄細胞を採取し、10% FBS、IL-3、SCF、MEM Non-Essential Amino Acids、Sodium Pyruvate、Penicillin、Streptomycin を加えた RPMI Medium 1640 中で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 1 ヶ月間培養し、マスト細胞に分化させた。骨髄好中球はマウス骨髄細胞を同様に採取し、赤血球溶血後 Percoll を用いた密度勾配遠心分画法により単離・精製した。

### 2.2. フローサイトメータによるマーカー蛋白質の解析

マウス骨髄細胞から分化及び単離・精製した骨髄由来マスト細胞と骨髄好中球の確認には、フローサイトメータを用い、マーカー蛋白質の発現解析により行った。マスト細胞の確認には、マスト細胞のマーカー蛋白質である IgE 受容体 (FcεRI) を用い、IgE 受容体 α 鎖に対する特異的抗体を用いて行った。また、好中球の解析には、マウス好中球のマーカー蛋白質である Ly6G に対する特異的抗体を用いた。これらマーカー蛋白質の定量的な発現解析にはフローサイトメータ (FACS Verse) を用いた。

### 2.3. *In vitro* 共存培養システムの確立

骨髄由来マスト細胞 ( $1.0 \times 10^6$  cells) と骨髄好中球 ( $6.0 \times 10^6$  cells) をマトリゲルコートしたガラスボトムディッシュ上で 24 時間共存培養し実験に用いた。共存培養した骨髄由来マスト細胞を抗 DNP (Dinitrophenyl)-IgE 抗体で感作し、抗原 (DNP-HSA) 刺激に伴う両細胞の細胞間相互作用を追究した。

### 2.4. 細胞内カルシウムイオン動態と細胞骨格蛋白質の局在解析

骨髄由来マスト細胞と骨髄好中球の細胞内カルシウムイオン動態の解析には、カルシウム蛍光指示薬 (Fluo4-AM) を用い、共焦点レーザー顕微鏡による画像解析により行った。取得した蛍光強度の解析には Image J を用いた。細胞骨格蛋白質の局在解析には、好中球と共存培養させたマスト細胞を抗原により特異的に活性化させたものを用いた。アクチンの染色には FITC 標識ファロイジンを用い、チューブリンの染色には Alexa Fluor 647 標識チューブリン抗体を用いた。画像の取得には共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) を用い、相互作用の解析には Image J を用いた。

### 2.5. 走査型及び透過型電子顕微鏡による撮影

電子顕微鏡による相互作用の解析には、マトリゲルをコートしたカバーガラス上で共存培養した細胞を用いた。走査型電子顕微鏡のサンプルは 1% グルタルアルデヒド、0.5% タンニン酸及び 1% 四酸化オスミウムで処理後、70~100% エタノールで脱水処理した。透過型電子顕微鏡のサンプルの場合には、2% グルタルアルデヒド、2% 四酸化オスミウム、30~100% エタノールで処理後、エポキシ樹脂で包埋した。作製したサンプルは、走査型電子顕微鏡 (HITACHI, S-4300) 及び透過型電子顕微鏡 (花市電子顕微鏡技術研究所 HITACHI, H-7600) により撮影した。

## 3. 結果

### 3.1. マスト細胞と好中球の *in vitro* 共存培養システムの確立

我々の研究から、アレルギー親和性選択的な浸潤細胞がアレルギー疾患の病態を制御していることが明らかになった<sup>1)</sup>。特に、高親和性抗原の場合には好中球が有意にアレルギー炎症部位に浸潤しマスト細胞と相互作用していた。そこで、マスト細胞と浸潤細胞 (好中球: 高親和性抗原) との相互作用を追究するため、マウス骨髄由来マスト細胞と単離・精製マウス好中球を用いた *in vitro* 共存培養システムの確立を試みた。

マウス大腿骨から骨髄細胞を採取し、骨髄由来マスト細胞への分化を行った。骨髄細胞は、SCF 及び IL-3 の存在下で 1 ヶ月間培養を行い、骨髄由来マスト細胞を得た。骨髄由来マスト細胞の分化レベルの確認には、マスト細胞マーカー蛋白質である FcεRI を用い、α 鎖に対する特異的抗体によるフローサイトメータ解析を行った。その結果、95% 以上の細胞でマスト細胞に分化していることが明らかになった (図 2)。また、マウス骨髄好中球の単離・精製には、マウス大腿骨の骨髄細胞について Percoll を用いた密度勾配遠心分画法により行った。骨髄好中球の確認には、マウス好中球マーカー蛋白質である Ly6G を用いた。フローサイトメータで解析した結果、約 85% の細胞で Ly6G の発現が確認され、骨髄から好中球の単離・精製に成功したと考えられた (図 2)。

先述した方法により得た骨髄由来マスト細胞と単離・精製した骨髄好中球を用いて、両細胞を用いた *in vitro* 共存培養システムの確立を行った。マスト細胞と好中球を共存培養すると、どちらの細胞も球形をしており、好中球はマスト細胞 (直径: ~12 μm) と比較し、やや小さい (直径: ~7 μm) ことがわかった。そこで、マスト細胞を特異的に抗原で活性化した際の両細胞間での相互作用について、細胞形態及び動態を指標にイメージング解析を行った。マスト細胞を抗原で特異的に刺激すると、抗原によって活性化されたマスト細胞では、脱顆粒反応 (ケミカルメディエー

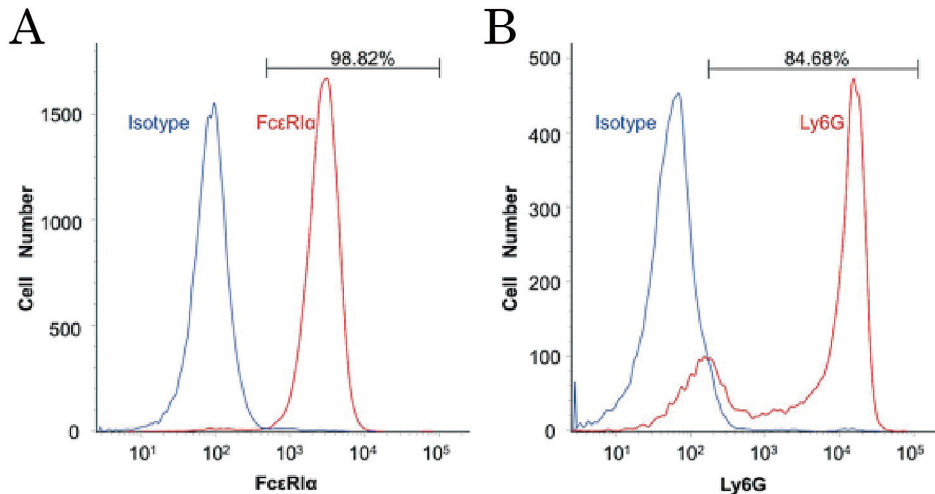


図2 フローサイトメータによる骨髄由来マスト細胞と骨髄好中球の確認  
 (A) マスト細胞マーカー蛋白質FcεR1αの発現確認  
 (B) マウス好中球マーカー蛋白質Ly6Gの発現確認

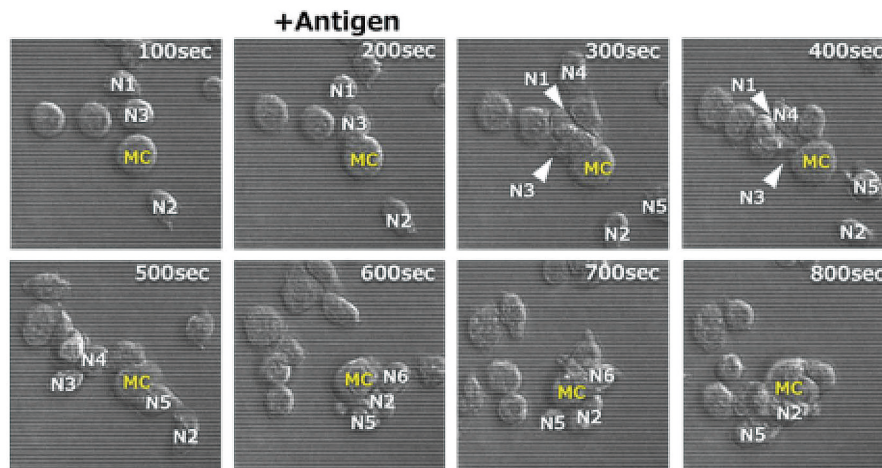


図3 骨髄由来マスト細胞の抗原刺激応答に伴う骨髄好中球の動態  
 マスト細胞(MC)に好中球(N1-6)が集積し相互作用している。

タの開口放出)が誘導され、それに伴う形質膜の波打現象(ラッフリング)が観察された。その後、丸い形態をしていた好中球が、紡錘形に変化しマスト細胞の方向へ移動する様子が観察された。そして複数の好中球が、脱顆粒をしているマスト細胞と相互作用(接着)している様子が観察された(図3)。

### 3. 2. *In vitro* 共存培養システムを用いた細胞間情報伝達機構の解析

細胞内カルシウムイオン濃度は、様々な細胞機能の調節に関与しており、細胞活性化状態を知る上で極めて重要な指標になることが、これまでの多くの研究から明らかになっている<sup>2,3)</sup>。特にマスト細胞においては、抗原依存的な細胞の活性化が小胞体からのカルシウムイオンの放出と細胞外部からのカルシウムイオンの流入を引き起こすことによって脱顆粒反応が誘導され、各種メディエータ放出に重

要な役割を担っている<sup>4,5)</sup>。一方、好中球の細胞膜上には遊走刺激因子を感知する各種受容体が存在し、受容体の活性化にともなう様々なシグナル分子の活性化と細胞内カルシウムイオン動態の制御を行っていることが明らかになっている<sup>6,7)</sup>。ここでは、様々な細胞機能において重要な役割を担う細胞内カルシウムイオンに着目し、両者の接着に伴う相互作用が、細胞間情報伝達においてどのような影響を及ぼすのか追究した。その結果、好中球単独培養の場合には、抗原の刺激応答に伴う細胞内カルシウムイオン濃度変化は観察されなかった。一方、マスト細胞と共存培養した場合においては、抗原でマスト細胞を特異的に刺激すると、はじめにマスト細胞でカルシウムイオン濃度の上昇が観察された。その後、好中球がマスト細胞に向かって動き、接着する様子が観察された。そしてマスト細胞と接着した好中球において一過的に細胞内カルシウムイオン濃度が上昇している様子が観察された(Data not shown)。このこ

とから、マスト細胞と好中球が相互作用(接着)した結果、好中球に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が誘導されている可能性が示唆された。現時点では、これら相互作用に伴うカルシウムイオン動態変化の生理的役割については不明であるが、現在慎重に検討中である。

### 3. 3. 細胞間情報伝達を制御する分子基盤の解析

免疫細胞の細胞間相互作用において、様々な分子がその相互作用部位において特徴的な局在変化を行い、それら適切な局在変化が起こることによって機能的な細胞間相互作用と情報伝達が行われていることが明らかになっている<sup>8,9)</sup>。

そこで相互作用の足場として重要な細胞骨格に着目し、マスト細胞と好中球の相互作用にともなう細胞骨格蛋白質の局在変化について追究した。ここでは、様々な細胞間相互作用において、接着部位で細胞骨格蛋白質の変化が明らかになっているFアクチンの集積やチューブリンの極性などについて、共焦点レーザー顕微鏡を用いた画像解析により追究した。はじめに、チューブリンについて、相互作用に伴うチューブリンの極性変化を免疫染色法によって追究したところ、共存培養を行った細胞と共存培養していない細胞では明確な極性変化は観察されなかった(Data not shown)。次に、アクチンについて相互作用に伴うFアクチンの局在変化を、ファロイジンを用いたFアクチンの特異的染色法により追究した。その結果、マスト細胞と好中球が相互作用(接着)している部分で、Fアクチンが顕著に集積している様子が観察された(図4)。このような接着面でのFアクチンの集積は、接着していないマスト細胞や好中球では観察されなかった。また、マスト細胞・好中球相互作用に関与する分子の同定についても幾つか成功しており、マスト細胞と好中球の相互作用には、細胞骨格をはじめとする様々な機能分子が関与している可能性が示唆された。現在は、個々の機能分子について相互作用における役割について検討を行っている途中である。

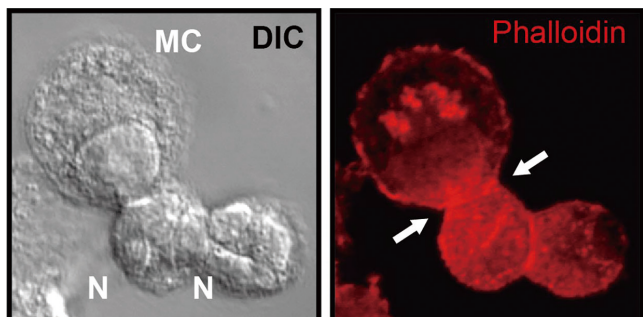


図4 マスト細胞と好中球の相互作用部位におけるFアクチンの集積  
マスト細胞(MC)と好中球(N)の相互作用の接着部位においてFアクチンの集積が観察された(矢印)。

### 3. 4. 電子顕微鏡を用いたマスト細胞と好中球の相互作用の追究

抗原刺激応答に伴いマスト細胞と好中球が接着し、ダイナミックに相互作用する様子が観察された。そこで、マスト細胞の好中球の接着形態や相互作用をより詳細に観察するために、走査型及び透過型電子顕微鏡を用いて追究した。はじめに走査型電子顕微鏡を用いて両者の接着形態を観察したところ、抗原刺激前は球形をしていた好中球が紡錘形に形態を変化させ、マスト細胞に密接に接着している様子が観察された(Data not shown)。また、透過型電子顕微鏡を用い解析では、抗原刺激により活性化されたマスト細胞から分泌された顆粒内物質を好中球が貪食している様子が観察された(Data not shown)。このことから、好中球がマスト細胞から放出された炎症性メディエータを貪食しアレルギー炎症応答を制御している可能性が示唆された。

## 4. 考 察

マスト細胞と好中球との相互作用を追究するための*in vitro*共存培養システムの確立に成功した。確立したシステムを用いた解析から、好中球はマスト細胞の活性化に伴い、遊走し接着することが明らかになった。また、両者の接着部位では細胞骨格をはじめとする様々な機能分子の集積が起こっていることが明らかになった。さらに細胞内カルシウムイオン動態の解析から、両細胞間ではカルシウムイオン動態を制御する情報交換が起こっていることも明らかにした。そして電子顕微鏡を用いた解析からは、好中球がマスト細胞の分泌メディエータを貪食することによってアレルギー応答を制御している可能性が示唆された。

## 5. 総 括

本研究で確立した*in vitro*共存培養システムは、これまで明らかになっていなかった細胞間相互作用について、様々な分子基盤の研究を可能にし、相互作用が担う生理機能を明らかにする上で極めて有用な研究システムであった。本研究で確立した*in vitro*共存培養システムを用い、さらに分子・細胞レベルでの研究を行うとともに、それらの知見を基盤にした*in vivo*研究へ展開することによって、相互作用が担う生理機能の一端が明らかになり、皮膚の健康維持に関する戦略的な治療方法の確立を行えるものと考えられる。また*in vitro*共存培養システム確立に向けた条件検討段階であるマスト細胞と単球・マクロファージの相互作用研究においても、*in vitro*及び*in vivo*研究を遂行することによって、これまで不明であった、アレルギー応答における単球・マクロファージの新たな生理機能が明らかになることが予想される。これらの取り組みによって、新たな視点からアレルギー疾患の原因を究明するとともに、「コスメトロジー」における新たな展開をもたらせるものと考え

えられる。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご支援を頂きましたことを、心より感謝申し上げます。

#### (引用文献)

- 1) 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).
- 2) Rivera J, Fierro NA, Olivera A, Suzuki R. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. *Adv Immunol*, **98**, 85-120 (2008).
- 3) Suzuki R. The Emerging Picture of Mast Cell Activation: The Complex Regulatory Network of High-Affinity Receptor for Immunoglobulin E Signaling. *Biol Pharm Bull*, **40**, 1828-1832 (2017).
- 4) Suzuki R, Liu X, Olivera A, Aguiniga L, Yamashita Y, Blank U, Ambudkar I, Rivera J. Loss of TRPC1-mediated  $Ca^{2+}$  influx contributes to impaired degranulation in Fyn-deficient mouse bone marrow-derived mast cells. *J Leukoc Biol*, **88**, 863-875 (2010).
- 5) Ikeya M, Yamanoue K, Mochizuki Y, Konishi H, Tadokoro S, Tanaka M, Suzuki R, Hirashima N. Orai-2 is localized on secretory granules and regulates antigen-evoked  $Ca^{2+}$  mobilization and exocytosis in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **451**, 62-67 (2014).
- 6) Putney JW, Steinckwich-Besancon N, Numagata Tomita T, Davis FM, Desai PN, D'Agostin DM, Wu S, Bird GS. The functions of store-operated calcium channels. *Biochim Biophys Acta*, **1864**, 900-906 (2017).
- 7) Jaconi ME, Rivest RW, Schlegel W, Wollheim CB, Pittet D, Lew PD. Spontaneous and chemoattractant-induced oscillations of cytosolic free calcium in single adherent human neutrophils. *J Biol Chem*, **263**, 10557-10560 (1988).
- 8) Hashimoto-Tane A, Saito T. Dynamic Regulation of TCR-Microclusters and the Microsynapse for T Cell Activation. *Front Immunol*, **7**, 255 (2016).
- 9) Dustin ML, Baldari CT. The Immune Synapse: Past, Present, and Future. *Methods Mol Biol*, **1584**, 1-5 (2017).

# 皮膚加齢における基底膜蛋白の生理学的意義の解明

北海道大学病院皮膚科

夏賀 健

In skin, epidermal basement membrane zone (BMZ) is served as niche for epidermal stem cells and involves in regulating cell homeostasis. Type XVII collagen (COL17) is a hemidesmosomal protein located at the epidermal BMZ. COL17 deficiency in mice and human exhibits early aged phenotype as gray hair and hair loss. In that context, COL17 has been known to engage in maintaining melanocyte stem cells and hair follicle stem cells. However, the role of COL17 in regulating stem cells in interfollicular epidermis has not been elucidated. Here we show that COL17 distribution in epidermal basal cells is altered with aging and this change also induces epidermal proliferation. Notably, overexpression of human COL17 in aged mice epidermis restores COL17 distribution and epidermal quiescence. These findings demonstrate that COL17 is crucial for maintaining epidermal homeostasis. Our study implicates that faulty epidermal BMZ is involved in uncontrolled cell proliferation, phenocopying aged skin and oncogenesis.

## 1. 緒言

皮膚は全身を覆う人体最大の臓器であり、外表面に位置していることから老化の表現型を容易に捉えることができる。皮膚の上皮である表皮は、表皮幹細胞の自己複製と分化によって維持されている。表皮幹細胞は、表皮基底膜をニッチにしており<sup>1)</sup>、加齢においても表皮基底膜の変化が生じると考えられている<sup>2)</sup>。本研究の目的は、加齢に伴う表皮基底膜の変化を詳細に解析し、それに伴って生じる幹細胞の異常を解明することである。

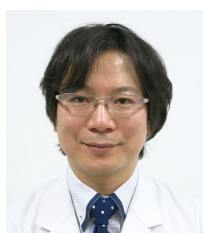
## 2. 方法

6週齢(若年群)と18~24ヶ月齢(加齢群)野生型(C57BL/6)マウスを安楽死させ、掌蹠皮膚(毛包間表皮)をサンプリングし、凍結切片あるいはパラフィン固定切片を用いて組織学的解析を行った。また、RNA抽出からRT-PCR、定量PCRを行った。同様に、ヒト17型コラーゲン(COL17)を表皮特異的(K14プロモーター)に強制発現させるK14-hCOL17マウス<sup>3)</sup>皮膚についても、組織学的解析を行った。同マウスは、Kim Yancey教授から供与された。BrdU標識のため、8.33 µg/gのBrdU (BD Pharmingen)を安楽死の4時間前にマウスへ腹腔投与した。

## 3. 結果

### 3.1. 加齢に伴って毛包間表皮は過増殖する

若年群と加齢群の毛包間表皮を比較したところ、表皮



Identification of physiological roles of epidermal basement membrane zone proteins on skin aging

Ken Natsuga

Department of Dermatology, Hokkaido University Hospital

層数は加齢群で増加しており、増殖マーカーであるPH3、BrdU、PCNAいずれでも加齢群で陽性細胞数が増加していた(図1)。

### 3.2. 加齢に伴って毛包間表皮のCOL17の分布は変化する

若年群と加齢群の毛包間表皮における遺伝子発現を比較したところ、分化マーカーであるPpl、Evplはやや加齢で低下する傾向を認めた(図2上)。また、幹細胞マーカーであるItga6やItgb1は加齢で有意に低下していたが、同様な幹細胞マーカーであるCol17a1は遺伝子発現に変化はなかった(図2上)。一方、COL17の分布は、若年群で表皮基底細胞を取り囲むように分布するのに対し、加齢群では表皮真皮境界部に局在するようになった(図2下)。

### 3.3. COL17の強制発現によって、加齢に伴う毛包間表皮の過増殖は消失する

COL17の加齢における役割を明らかにするため、加齢したK14-hCOL17マウス毛包間表皮を解析したところ、対照群と比較してK14-hCOL17マウスでは表皮層数が減少し、各種の増殖マーカーの陽性細胞数も減少していた(図3)。

## 4. 考察

本研究により、加齢によって毛包間表皮は過増殖に至ること、COL17に代表される表皮基底膜領域蛋白の分布が変化するること、COL17を表皮で強制発現させることによって加齢による過増殖の表現型が解除されることを明らかにした(図4)。毛包幹細胞では、タンパク分解酵素ELANEの活性が上昇することによって、COL17が加齢に伴って減少するとされるが<sup>5)</sup>、毛包間表皮でのELANEの発現は確認できなかったため(data not shown)、毛包と毛包間表皮におけるCOL17の制御は異なるものと考えられた。本研究

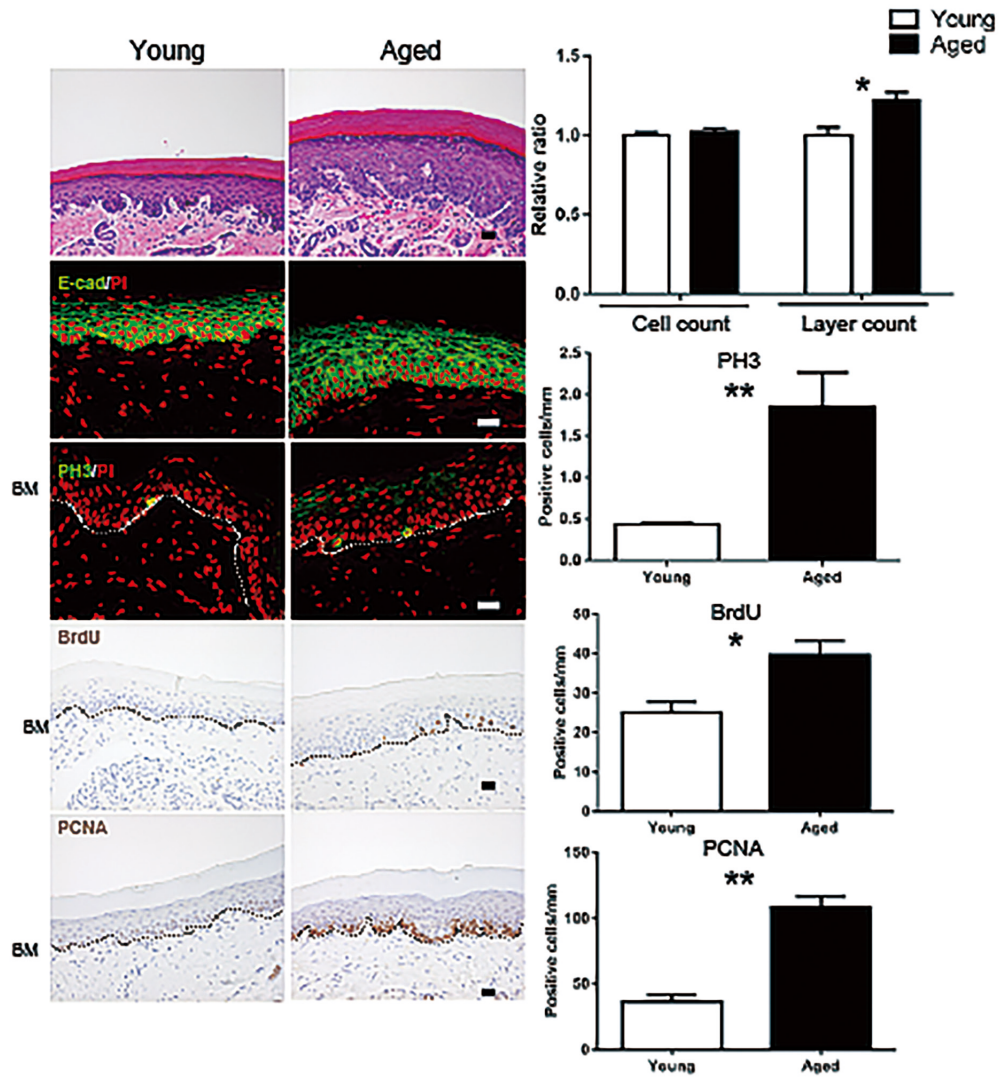


図1 加齢による毛包間表皮の増殖能の変化(文献4から改変)  
 BM: basement membrane, E-cad: Eカドヘリン, PI: 核染色

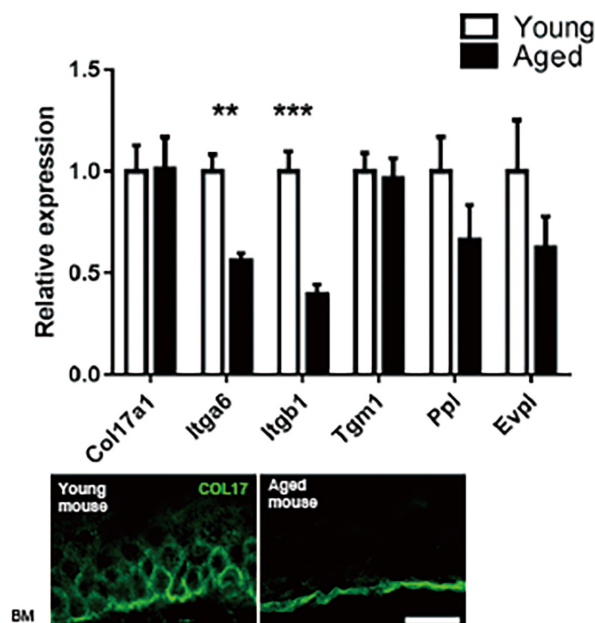


図2 加齢毛包間表皮における遺伝子発現解析とCOL17の分布(文献4から改変)

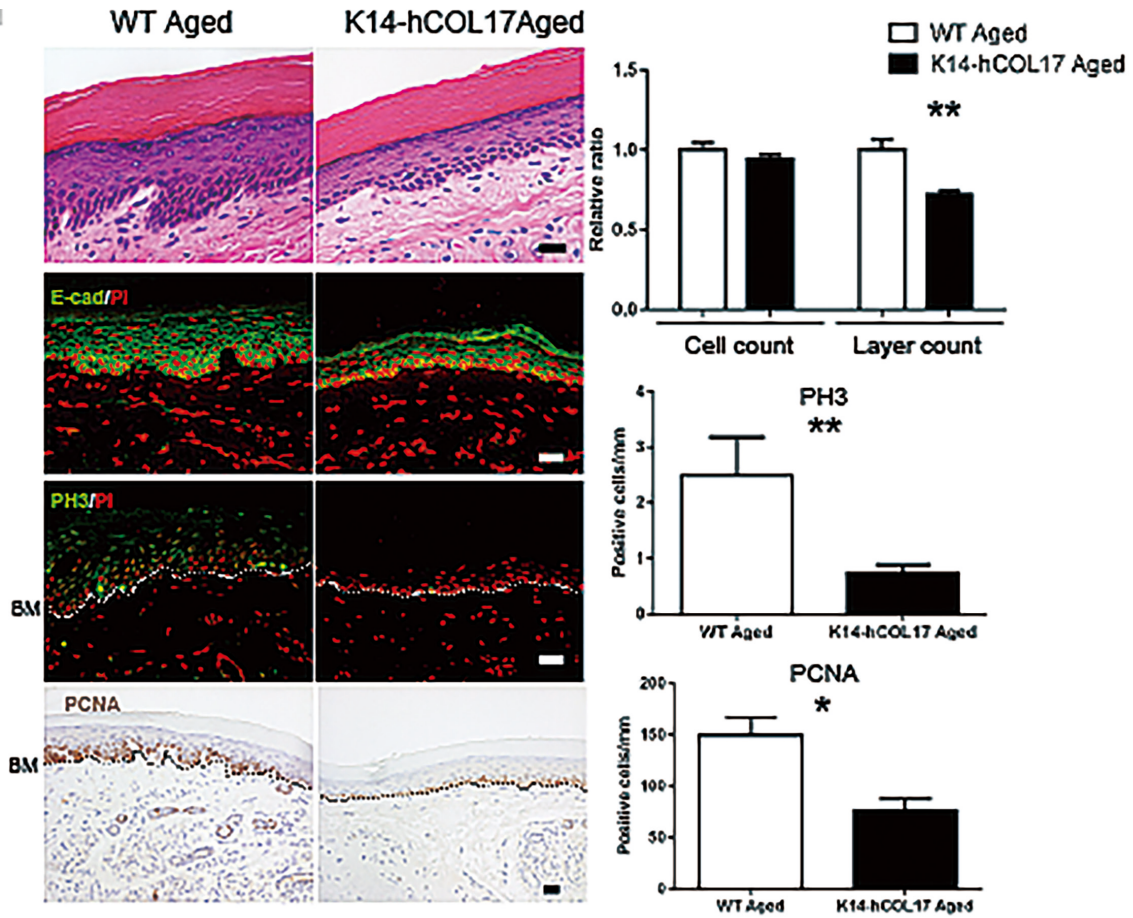


図3 加齢したK14-COL17 マウス毛包間表皮の解析(文献4から改変)

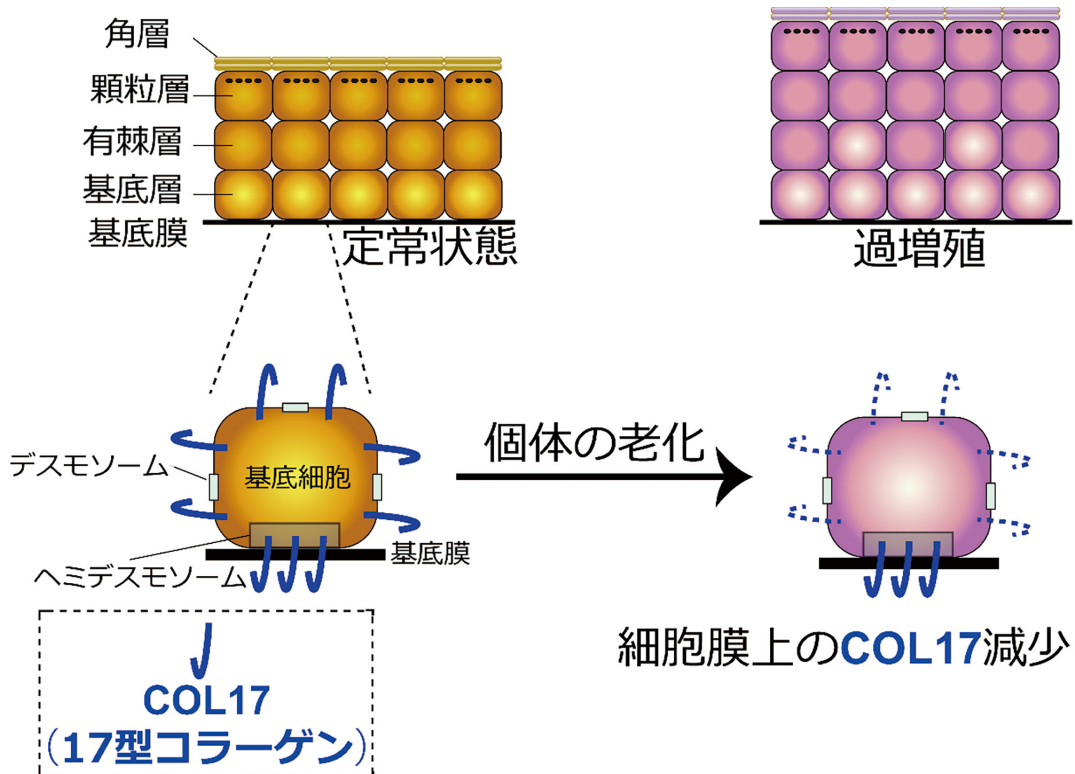


図4 毛包間表皮の加齢の模式図(文献4から改変)

と、毛包におけるCOL17の抗加齢効果を報告した先行研究<sup>5)</sup>によって、COL17が皮膚の老化を抑える重要な分子であることが解明された。今後は、COL17の発現を調整する抗加齢医学の進歩が望まれる。なお、本報告書に記載した実験結果を含む内容で、2017年に論文発表した<sup>4)</sup>。

#### 謝 辞

本研究をサポートして下さった公益財団法人コスメトロジー研究振興財団の関係者の皆様に深謝いたします。

#### (引用文献)

- 1) Watt FM, Fujiwara H: Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a005124, 2011
- 2) Amano S: Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging. *J Investig Dermatol Symp Proc* 14: 2-7, 2009
- 3) Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, Sakai K, Nakamura H, Olasz E, Yancey KB, Akiyama M, Shimizu H: Humanization of autoantigen. *Nat Med* 13: 378-383, 2007
- 4) Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Kobayashi Y, Donati G, Suzuki S, Fujimura Y, Ujiie H, Shinkuma S, Nakamura H, Murakami M, Ozaki M, Nagayama M, Watt FM, Shimizu H: Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis. *Elife* 6: e26635, 2017
- 5) Matsumura H, Mohri Y, Binh NT, Morinaga H, Fukuda M, Ito M, Kurata S, Hoeijmakers J, Nishimura EK: Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. *Science* 351: aad4395, 2016

# 生体皮膚「質感」「機能」二光子イメージングによる 化粧品作用の評価システムの確立

自治医科大学分子病態研究部

西村 智

We visualized skin-lesions in living mice by two photon microscope, and observed inflammatory responses after scratch injuries. We also developed hand-held skin imaging device which can cover broad time-and-space scale. System can be minimized to hand-held size, and weighs less than 300g. This device can replace current pathological and radiographic examination, and daily outpatient skin lesion observations. Skin barrier or immune functions can be recorded with outlooks in real-time, after skin treatment or drug administrations.

## 1. 緒言

我々は非線型光学現象を用いたイメージングシステムにより、多様な疾患領域でのバイオイメージングを行っている。基礎的には、血管イメージングでは生体スキャンの高速性を活かして、リアルタイムで広視野・高解像度でのイメージングを行っている。本研究ではまず生体皮膚に特化して二光子顕微鏡をベースとしたイメージングデバイスの作り込みを行った。元来、生体皮膚はイメージングの良い適応であり、皮膚疾患の治療から化粧品作用の検証まで広く用いることができた。二光子顕微鏡では生体親和性が高く、平均エネルギーの低い近赤外レーザーで局所的に光励起が可能であり、生体皮膚の良好な画像が我々のシステムでも得られた。同時に、生体皮膚に傷害をくわえ、創傷治療の全過程をイメージングするなど、皮膚機能や外観の解析が行われた。

一方で、皮膚科外来診療での皮膚病変の観察・記録や、あるいは、美容分野での皮膚観察に焦点をあて、最小化した顕微鏡システムを開発した。本システムでは、手持ちサイズで、完全オートフォーカス、完全オートシャッター、無限焦点可変、無限倍率可変を実現した。一見、荒唐無稽にみえる広スケールのイメージングを新規光学デザインにより可能にしているため、独自性が高く今後の展開に期待が持たれた。

## 2. 二光子顕微鏡による生体皮膚観察について (方法・結果)

まず、我々は、血管イメージングで実績のある二光子顕



Development of two photon microscope and imaging system for evaluation of skin outlooks and functions after treatment.

Satoshi Nishimura  
Jichi Medical University

微鏡を用いて皮膚観察を行った。マウスの広い皮膚を観察対象とする際でも、三次元的な取得情報を増やしていく際には、生物用の瞳の小さい顕微鏡レンズや光学系、現在のサイズの素子を用いるとかならず一定の理論的境界が存在することが初期検討で明らかになった。生体の質感を十分に表すことはしばしば困難であった。皮膚外観はマイクロでの質感と、マクロでの大きな形態情報、の両者が重要であり、二光子顕微鏡での視野の狭さは大きな限界であった。従来の観察システムは、高解像度では0.1mm視野であり、サイズを広げていくと画質・解像度の劣化が著明であった。

皮膚全体、マクロ・マイクロの統合的な外見解析のためには、広視野・高解像度の光学的な両立が欠かせない。従来の顕微鏡では、光路がわずかφ25mmに固定されており、なおかつ視野範囲と解像度にはトレードオフが存在していた。ダーマトグラフィとして使用するためには視野範囲の拡大が必須と考えられるため、その制約を外すことを検討した。一眼レフカメラ、半導体用レンズ、あるいは、天体望遠鏡のようなサイズの光学系を考えると、マウスのマクロ観察に必要な要件を達成することができる。そこで、我々は、

- ・広視野・低倍率・高NAレンズによる顕微鏡マイクロイメージング
- ・低F値・高倍率・低収差マクロレンズによる体表スキャン

を行った。

三次元的な光線追跡再現まで視野にいれ生体皮膚質感のマイクロ情報は主に二光子顕微鏡を用いてスキャンを行った。皮膚に最適化を行い、空間解像度200nm、30fpsでのリアルタイム4色イメージングを皮膚で達成した。

図1・図2のように手指や腹部皮膚のイメージングを行い、体表面から皮膚角質全層、さらには、皮下結合組織・血管まで可視化が可能であった。画質は観察部位に大きく依存したが、皮膚前処置や皮膚表面のコーティング、液浸レンズの使用により改善が可能であった。

さらに図3のように固定処理を行えば、特定のタンパク

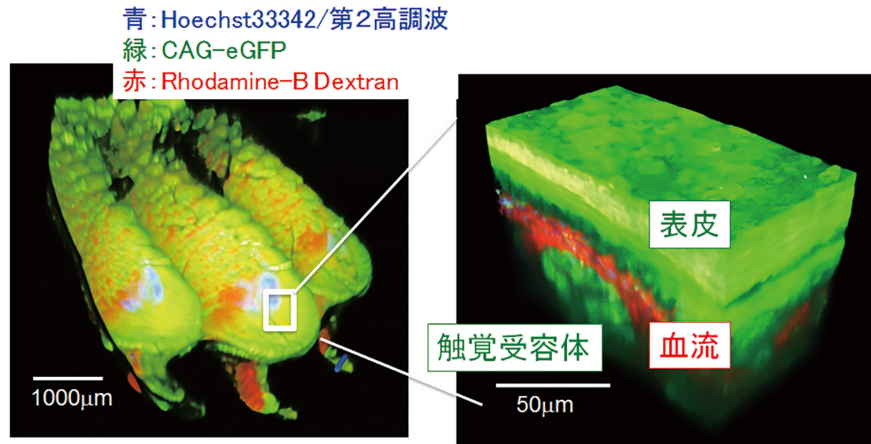


図1 マウスの足の指表面の二光子励起顕微鏡画像

CAG-eGFP マウスに Rhodamin-B デキストランを静脈注射後、麻酔下で顕微鏡ステージに乗せ、足指先皮膚の深部観察を行った(緑:表皮・機械受容器、赤:血流)。指先の皮膚は0.2mm程の厚い表皮に覆われており、その下には触覚受容器様の小体(被包神経終末)と思われる構造物が観察できた。

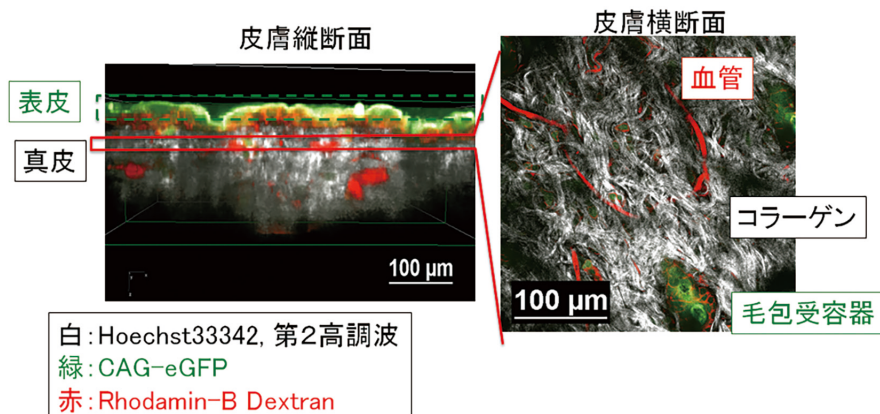


図2 マウス腹部の皮膚の二光子励起顕微鏡画像

CAG-eGFP マウスに Rhodamin-B デキストランを静脈注射後、腹部を脱毛し、麻酔下で腹部皮膚の深部観察を行った。図1の指先の画像とは異なり、腹部では皮膚真皮のコラーゲン線維網(白)が、第2高調波測定により詳細に観察できた。また、コラーゲン線維に密に包まれて点在する毛包受容器(緑)や血管の走行(赤)も詳細に観察できた。

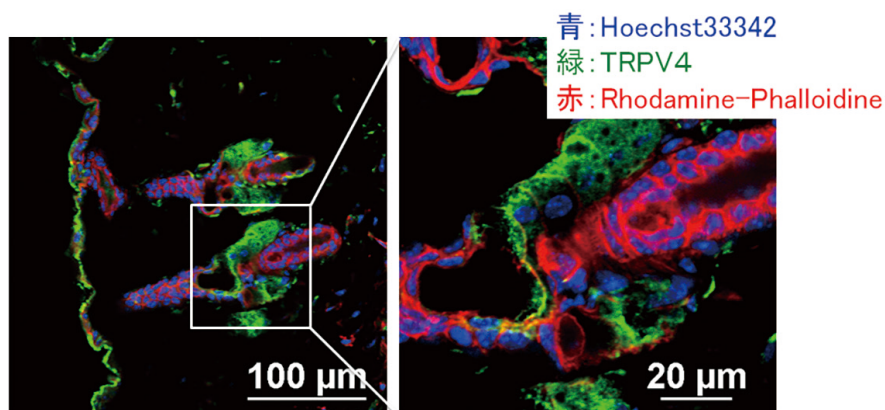


図3 皮膚の免疫染色画像

マウスの脚を脱毛処理した後、4mm角の皮膚を採取して凍結標本を作成した。免疫組織化学により皮膚断面の構造を共焦点顕微鏡により観察した(青:核、緑:TRPV4チャンネル、赤:アクチン)。触覚受容体の1つであるTRPV4チャンネルを染色したところ、表皮・毛包受容器もふくむ皮膚構造だけでなくチャンネル分布もイメージングが可能であった。毛根部位は細胞骨格のアクチンフィラメントを多く発現しており、Rhodamin-phalloidine色素により観察可能であった。

質の分布をホールマウントでも切片でも高解像度での皮膚表面での画像化が可能であった。

また、我々は皮膚の機械的傷害を加え実時間で、皮膚反応を観察し、炎症性の細胞浸潤を画像としてリアルタイムにとらえている(図4)。化粧品や美容処置、薬剤投与による反応観察にも活用可能と思われた。

本システムはきわめて量子効率の高い高感度検出器・フェムト秒レーザーを用いており、可視化に伴う生体への影響は最小限である。マウスにおいて安全性を担保すれば、ヒトにも理論的には用いることができる。しかし、解像度を維持するためにはある程度のサンプル側への制約がある。システムのサイズやコストからもヒトへの応用にはやや遠いと考えられた。なおかつ、極端に広い視野での画像取得は技術的に困難であり、体表面や皮膚病変全体の一度でのスキャンは困難である。そこで、次項ではマクロ・ミクロの両極端での広いスケールを網羅しながらも、手持ちサイズで運用可能なシステム開発を目指した。

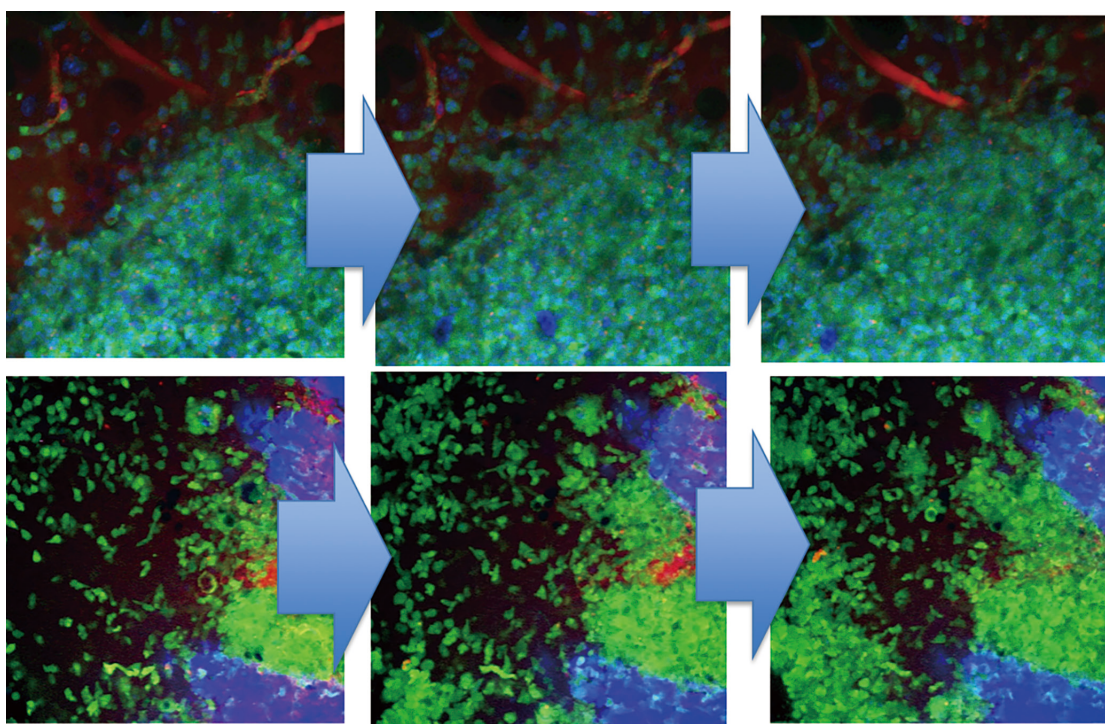
### 3. 手持ちサイズシステムによる生体皮膚観察について(方法・結果)

若年群と加齢群の毛包間表皮を比較したところ、表皮生体皮膚観察では、現在ダーマトスコープが頻用されている。しかし、イメージングへのニーズは幅広く十分なソリューションとはいえない。ユーザー(美容医、皮膚科医、化粧品メーカー)の声をまとめていくと、おそらく

- 小さいものから大きなものまで撮影したい
- 高解像度撮影を簡単に手持ちで行いたい
- フォーカシングや位置だしから解放されたい
- 手ぶれはいやだ
- 調節ダイヤルをあつかいたくない
- コストは最小限に

といったところと予測された。

ダーマトスコープを補完するためにズームタイプのシステムが考えられる。しかし、従来のズーム型の顕微鏡やマ



青: Hoechst33342/第2高調波  
 緑: CAG-eGFP  
 赤: Rhodamine-B Dextran

図4 皮膚傷害後のリアルタイムイメージング

フレーム間隔は5分。実時間で細胞浸潤が二つの画像例からもよみとれる。より長期には、皮膚の線維化、創傷治癒、炎症反応のすべてを可視化可能とおもわれた。美容処置・化粧品や薬剤投与後のリアルタイムイメージングとしても活用可能である。

クロズームレンズでは、ズーム両端(実質的な常用域)では収差により解像度が低下し、像も明るくない。また、これらのカメラ部品は調節箇所が多く、不安定な皮膚を対象とするとハンドリングがきわめて困難である。そこで、我々はあらたな光路設計、結像設計をデザインし、マクロミクロを完全にオーバーラップした撮影を可能にした。リアルタイムで高速で像モードを切り替え、フォーカス、ズーム、像モード転換を一度に行っている。ユーザーの操作部をほぼフリーにしているが、解像度やシステム重量とのトレードオフを避け、実効的提案とした。

最小化した顕微鏡システムでの超高解像度と超広視野の両立例。生体観察をリアルタイムで行えるため、図5のように皮膚観察が可能になった。マクロミクロの網羅、全焦点位置での撮影・無限大ズームファクターの恩恵に簡単にあずかれるようになっている。一本一本の毛根、毛包構造、そこにある細胞輪郭まで無染色で可視化されている。表面

だけでなく、深部構造の情報まで得られており、顕微鏡結像の特性が生かされている。

#### 4. 考察および総括

生体二光子顕微鏡観察がごく低侵襲な赤外レーザーでも可能であることの実証が行われた。これは、美容処置・薬剤投与を行った際の皮膚反応を実時間で観察できるということを意味している。ヒトにおいても、無染色でも同様のイメージングは理論的には可能である。残るは、長期的な安全性評価だが、理論的には自然光とかわらない範囲と予測できる。化粧品をほどこした際に、どのように皮膚のミクロな変化がおきるのか、アレルギー反応はおきていないのか、といった評価が行われるため、開発研究にも用いられる。同時に、皮膚科診療にも大きなメリットが予測される。悪性腫瘍の鑑別だけでなく、乾癬をはじめとする皮膚の機能的診断にも本システムは有用と考えられた。

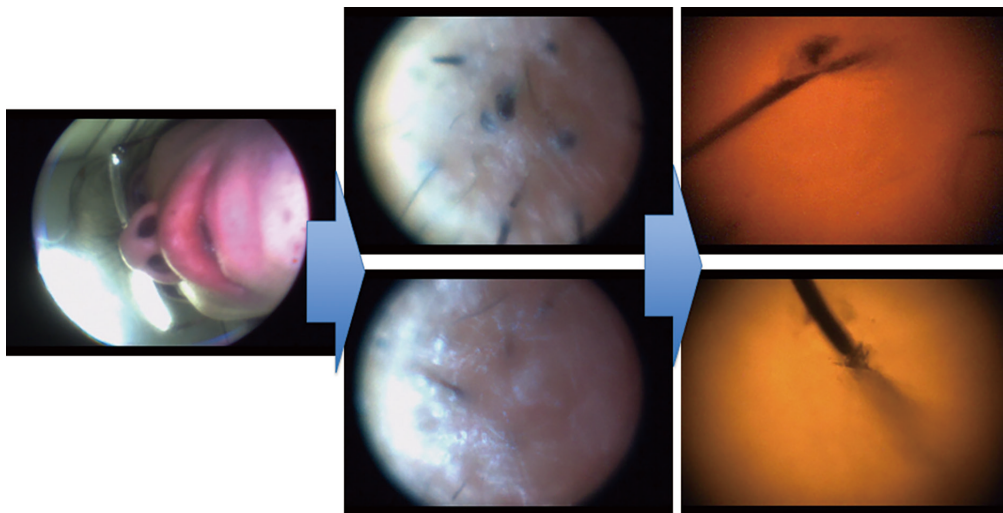


図5 生体・ヒト皮膚観察のリアルタイムイメージング

# 皮膚の恒常性維持における転写補助因子 MRTF-A/B の役割

大阪大学大学院・医学系研究科

林 謙一郎

Skin fibroblasts themselves are the cells that produce extracellular matrix (ECM), but their ability to produce ECM and motility are low under the normal conditions. In contrast, when skin tissues are injured, they are changed to myofibroblasts. Myofibroblasts exhibit an enhanced motility and accumulate at the injured area. There, they vigorously produce ECM for wound healing. Such phenotypic modulation of skin fibroblasts is caused by the inflammatory response as follows. Skin injury activates the secretion of inflammatory cytokines such as transforming growth factor- $\beta$ s (TGF- $\beta$ s) from inflammatory cells and the normal skin fibroblasts stimulated by these cytokines are converted into myofibroblasts. However, this mechanism has not been fully characterized. In this study, I addressed this molecular event and found that factor X (anonymity because of unpublished results) plays a critical role in the myofibroblastic phenotypic modulation of skin fibroblasts. Novel findings revealed by this study are as follows: 1) Myocardin related transcription factors A and B (MRTF-A/B) play a critical role in exhibition of myofibroblastic phenotype of skin fibroblasts, 2) In skin fibroblasts, MRTF-A/B are usually localized in the nuclear but their functions remain inactivated because of low level expression of factor X, 3) The expression levels of myofibroblasts markers such as  $\alpha$ SM-actin and collagens are up-regulated concomitant with the increase in the expression of factor X in TGF- $\beta$ -stimulated skin fibroblasts, 4) siRNA-mediated knockdown of factor X suppresses the TGF- $\beta$ -induced up-regulation of these myofibroblastic markers, 5) Factor X binds to both of serum response factor (SRF) and MRTF-A and activates the SRF/CArG-box mediated transcription.

## 1. 緒言

皮膚は表皮と真皮の2層構造になっており、外部からの刺激(紫外線、乾燥や温度変化)から、内部の器官を守り、体温の調節や体内の水分・体液を保持するバリア機能を果たしている。表皮層はケラチノサイトとそれが分化(角化)し上層へ移行した細胞(角質化細胞)から構成されている。表皮構成細胞はケラチンを多量に含みバリア機能と体内の水分が過剰に蒸散するのを防ぐ保湿機能を担っている。真皮層は細胞外マトリクス(ECM)(コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸)とこれらを産生する線維芽細胞から構成され、皮膚の形状維持や弾力性を保つ機能を果たしている<sup>1)</sup>。線維芽細胞はECM産生細胞であるが、炎症のない正常状態ではこの活性は弱くかつ細胞運動能も低く保たれている。しかしながら、創傷による炎症反応が起こるとマクロファージなどの炎症細胞からサイトカイン(TGF- $\beta$ など)が分泌される。これらの刺激を受けた線維芽細胞はECM産生能及び運動能の亢進した筋線維芽細胞に形質転換し創傷治癒を促す<sup>2)</sup>。治癒が完了した後はTGF- $\beta$ 受容体の発現低下により筋線維芽細胞の形質発現は減衰し、正常線維芽細胞へ戻る。

$\alpha$ SM-actin及びコラーゲンの発現増強は筋線維芽細胞マーカーとして知られている。これらの遺伝子の転写調節領域(プロモーターやそれと関連した領域[イントロン])にはCArG-boxと呼ばれる転写因子、serum response factor (SRF)の結合サイト(シスエレメント)が存在し、SRF/CArG-boxを介して正の転写制御を受ける<sup>3)</sup>。この転写制御にはSRFの転写補助因子であるmyocardin related transcription factors (MRTF-A及びMRTF-B [MRTF-A/B])の活性化を必要とする。一般的にはMRTF-A/Bは細胞内に局在し、Rhoの活性化による細胞内での単量体G-actin量の減少(アクチンダイナミクス)に伴い一過性に核内移行する。核内でSRFはMRTF-AまたはMRTF-Bと複合体を形成しCArG-boxに結合することでSRFの転写因子としての機能を活性化させる。我々の研究グループはこのアクチンダイナミクスに依存したMRTF-A/Bの活性化(核内移行)の分子機構を解明した。この概略を以下に記す。MRTF-A/Bの核移行シグナル(NLS)はN末に存在するG-actin結合ドメイン(RPEF motifs)の間隙に位置するためG-actin量の多い状況下ではG-actinとRPEL motifsとの結合が優先し、importin  $\alpha/\beta$ 1とNLSとの結合は拮抗的に阻害される。このため、MRTF-A/Bは細胞質に留まる。一方、G-actin量が減少した状況下ではimportin  $\alpha/\beta$ 1とNLSとの結合が可能になり、核内移行する<sup>4)</sup>。核内から核外への移行はCrm1を介して行われる<sup>5)</sup>。

MRTF-A/Bの活性化はSRF/CArG-boxを介した転写を促進し、細胞骨格タンパク質及びコラーゲンなどのECMやその受容体タンパク質(integrinなど)の発現を誘導する。その結果、細胞運動が亢進する。しかしながら、



The roles of MRTF-A/B in the homeostasis of skin

Ken'ichiro Hayashi

Graduate School of Medicine, Osaka University

コスメトロジーの観点から皮膚における MRTF-A/B の役割及びその制御機構に関する研究は限定的で十分な解析はなされていない。MRTF-A/B による細胞機能制御が皮膚の恒常性維持に関わり、傷害に応答した創傷治癒や老化または紫外線による皮膚機能低下と MRTF-A/B の制御が連携すると考えた。この可能性を探究し、コスメトロジーに新たな研究視点を導入することを目指して本研究を開始した。本研究を立案した時点で初代培養正常皮膚線維芽細胞では他の培養細胞とは異なり Rho の活性化に依存せず MRTF-A/B は恒常的に核局在することを見いだしていた。

炎症に伴う筋線維芽細胞の慢性的な活性化は線維化疾患（肝硬変、肺腎線維症や強皮症）惹起の要因であると考えられている。筋線維芽細胞のオリジンとして正常線維芽細胞の他、間質細胞、血中に存在する骨髄由来の幹細胞や上皮・内皮細胞が知られている。上皮・内皮細胞から筋線維芽細胞への形質転換は上皮・内皮間葉転換という概念として研究が進められており、この場合も TGF- $\beta$  を介したシグナル伝達系の関与が明らかにされている。しかしながら、筋線維芽細胞への形質転換の分子機構の完全解明には至っていない(図1)。

前述したように、正常皮膚線維芽細胞では MRTF-A/B は恒常的に核局在するため、筋線維芽細胞への形質転換の過程での MRTF-A/B の活性化は細胞内局在変化では説明できない。これまでに得た知見から正常皮膚線維芽細胞では MRTF-A/B が恒常的に核局在するが、筋線維芽細胞様

の形質発現が抑制されていると考えた。この仮説に立脚すると核内での MRTF-A/B 機能 on/off 機構の存在が示唆された。本研究では皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換における核内での MRTF-A/B の機能制御に焦点を当て解析を行った。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞培養

ヒト初代培養皮膚線維芽細胞 (ATCC CRL-2072) を種々の ECM でコートした培養プレートに接種し DMEM-10% FCS で培養を行った。

### 2.2. 遺伝子及びタンパク質発現解析

細胞運動や ECM 産生の関わる遺伝子の発現を mRNA 及びタンパク質レベルで解析した。解析方法として定量的リアルタイム RT-PCR (RT-qPCR) 法及びイムノブロット法を用いた。指示された条件化で培養した皮膚線維芽細胞から RNA を抽出・粗精製した後、cDNA 合成を行い、SYBR Green により増幅遺伝子を検出する RT-qPCR を行った。イムノブロットの場合は 2% SDS サンプルバッファーで溶解させた細胞総抽出液を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で含有されているタンパク質を分離後、ウェスタンブロット法により PVDF メンブレンに転写し、目的とするタンパク質の抗体を用いてイムノブロットを行い解析した。

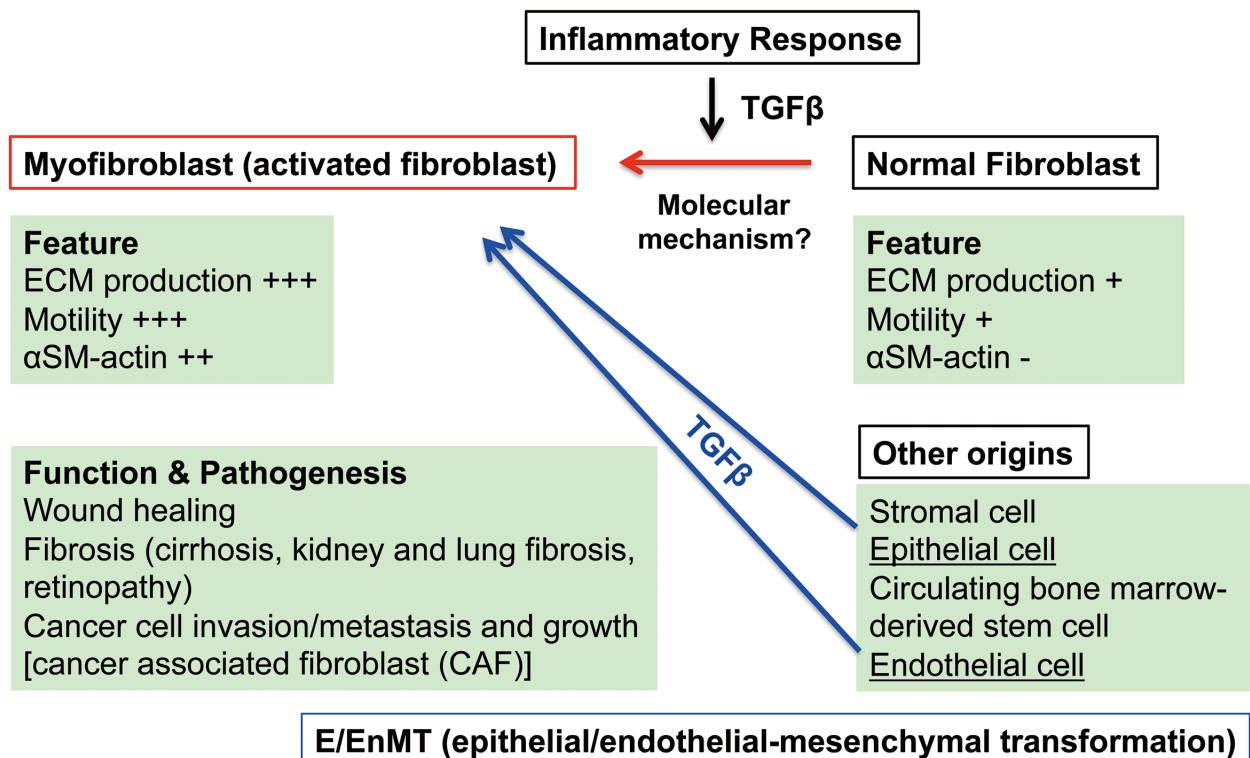


図1 筋線維芽細胞への形質転換経路の概略

### 2. 3. siRNAの導入

siRNAはシグマアルドリッチ社から購入した。siRNAの細胞への導入はLipofectamine RNAiMAXを用いた。

### 2. 4. プロモーターアッセイ

レポーターとして3×CArG-luciferase<sup>3)</sup>を用いてSRF/CArG-boxを介した転写活性の定量的解析を行った。このレポーターと指示された発現 plasmidsを培養細胞に導入し、48時間後に転写活性を計測した。導入効率の違いによる luciferase 活性のばらつきを補正する目的でSV40プロモーターから転写されるβ-galactosidase発現ユニットがコードされた補正用 plasmidも共に導入した。SRF/CArG-boxを介した転写活性はβ-galactosidase活性で補正した luciferase 活性に基づき比較した。

### 2. 5. 細胞運動能の解析

二次元的な細胞運動は創傷治癒アッセイにより解析を行った。100%コンフレントな培養細胞の培養プレートをスクラッチして一定サイズの帯状の創傷を作成し、細胞遊走によってふさがり様子を観察した。細胞遊走を定量化するため、スクラッチ前と一定期間後の同視野を撮影し遊走面積を計測した。

### 2. 6. 細胞染色

種々の条件下で培養した皮膚線維芽細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、指示された抗体で免疫染色を行った。Alexa Fluor 568で標識された2次抗体を用いて標的タンパク質を検出した。同時にHoechst 33342で核を染色した。

### 2. 7. タンパク質-タンパク質相互作用

In vitro 転写・タンパク質合成システム (Promega)を用いて調製したそれぞれのTag付きタンパク質溶液を混合し、指示されたTag抗体を用いて免疫沈降を行った。共沈降した分画に存在するタンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離後、ウェスタンブロットを行い、指示されたTag抗体を用いたイムノブロットによりタンパク質-タンパク質相互作用を解析した。

## 3. 結果

### 3. 1. 培養条件に依存した皮膚線維芽細胞の形質発現

初代培養正常ヒト皮膚線維芽細胞(以降、皮膚線維芽細胞と省略する)を通常の培養条件下(コラーゲンなどのECMでコートしない培養プレート培養)で培養を行うと、筋線維芽細胞のマーカーであるαSM-actin及びコラーゲンの著明な発現が認められた。これらの遺伝子はSRF/CArG-boxを介した転写制御を受けるため、SRF転写補助

因子であるMRTF-A/Bの発現をsiRNAの導入によりノックダウンさせた。この結果、αSM-actin及びコラーゲンの発現は著明に低下し、細胞運動能も低下した(創傷治癒アッセイによる)(図2)。

以上の結果から、通常の培養条件下では皮膚線維芽細胞は筋線維芽細胞様の形質発現することが判明し、この形質発現はMRTF-A/Bに依存することが明らかになった。培養条件が皮膚線維芽細胞の形質発現に及ぼす影響を検討する目的でECMコートしたプレートで培養を行い筋線維芽細胞のマーカーの発現を検証した。ECMとしてコラーゲンゲル、コラーゲンフィルム(希釈したコラーゲンを薄くコーティング)及びマトリゲルを試した。いずれのECMでコートしたプレート上で培養した皮膚線維芽細胞では著明な筋線維芽細胞マーカーの発現低下が認められた。筋線維芽細胞マーカーの発現低下は基質の硬さに影響されなかった(軟らかい基質:コラーゲンゲル及びマトリゲル;硬い基質:コラーゲンフィルム)。これらの実験結果から接着した基質の硬さではなくECMとの接着が筋線維芽細胞様の形質発現を抑制していることがわかった。一般的にMRTF-A/Bの機能発現は細胞内局在変化に依存しているため、上記の結果はMRTF-A/Bの細胞内局在変化に起因する可能性が考えられた。このため、MRTF-A/Bそれぞれの抗体で免疫染色を行い、細胞内局在を検証した。この結果、皮膚線維芽細胞では恒常的にMRTF-Aは核にMRTF-Bは核と細胞質の両方に局在することが判明した。EMCの有無に関わらず、いずれの培養条件下でもMRTF-A/Bの局在には相違が認められなかった(図3)。従って、MRTF-A/Bの細胞内局在制御ではなく核内においてMRTF-A/Bの機能を直接制御する機構の存在が示唆された。

### 3. 2. 皮膚線維芽細胞の形質発現制御因子の探索と検証

更なる検証のため、細胞運動や筋線維芽細胞への形質転換に関連する遺伝子発現のECM依存性をRT-qPCRによ

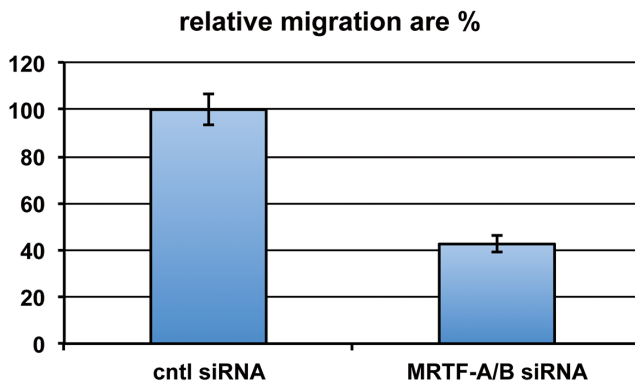


図2 創傷治癒アッセイによる細胞運動能の比較  
コントロール(cntl) siRNA 導入した細胞の移動領域を100%として表示。

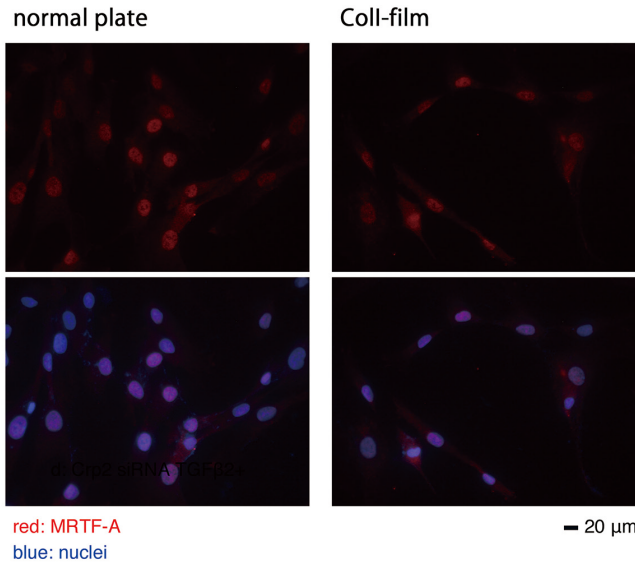


図3 MRTF-Aの細胞内局在の比較(通常の培養プレートvsコラーゲンフィルム)

MRTF-Bについても培養条件の相違による細胞内局在変化は認められない。

り比較した。この結果、細胞質と核の両方に局在するタンパク質(未発表のためX因子として表記)の発現がECM上で培養した場合に筋線維芽細胞のマーカーと同様に著明に減少することを見いだした(図4)。

この因子と筋線維芽細胞形質発現との相関を明らかにする目的でTGF- $\beta$ により誘導される遺伝子発現を解析した。通常の培養条件下で培養した皮膚線維芽細胞をTGF- $\beta$ で刺激すると、さらなる筋線維芽細胞マーカーの発現が増強される。予め、皮膚線維芽細胞にX因子のsiRNAを導入しておくこと、このTGF- $\beta$ に依存する筋線維芽細胞マーカーの発現増強が著明に抑制された。さらに、X因子のsiRNAを介したノックダウンは細胞運動能を大幅に減弱させた。この結果からX因子が筋線維芽細胞形質発現に重要な役割を果たしていることが判明した。

このX因子の関わる現象の分子機構の解明を目指して解析を続けた。まず、転写レベルでの解析のためプロモーターアッセイを行った。レポーターとしてベータGalプロモーターの上流にSRFのシスエレメントであるCArG-boxをタンデムに3個挿入した3 $\times$ CArG-luciferaseを用いた。皮膚線維芽細胞にこのレポーターとMRTF-AとX因子の発現 plasmidsを導入すると著しいluciferase活性の上昇が認められたが、X因子の発現 plasmidのみを導入した場合には活性上昇は起こらなかった。以上の結果から、X因子の機能としてMRTF-Aを介したSRF/CArG-boxによる転写調節における正の制御が示唆された。最近の我々の研究で、ヒト初代培養血管内皮細胞(以降、血管内皮細胞と省略する)でもMRTF-A/Bは恒常的に核に局在するがSRF/CArG-boxを介した転写系を活性化せず、NF $\kappa$ B

	Coll-gel	Coll-film
$\alpha$ SM-actin	↓	↓
Coll	↓	↓
X factor	↓	↓
TGF- $\beta$ 1	—	↓
TGF- $\beta$ 2	↓	↓
Thymosin $\beta$ 4	—	—
SRF	—	—
MRTF-A	↑	↑
MRTF-B	↑	↑
GATA4	—	↓
GATA5	↑	↓
GATA6	↑	↓

図4 ECMが皮膚線維芽細胞の遺伝子発現に及ぼす影響  
通常の培養プレート(ECMなし)で培養した場合を基準にした結果。(↑:発現上昇、↓:発現減少、—:変化なし)

と結合してNF $\kappa$ Bを介した炎症性遺伝子の発現を抑制する役割を担っていることを明らかにしている<sup>6)</sup>。皮膚線維芽細胞と血管内皮細胞の間でX因子の発現を比較すると、血管内皮細胞ではX因子の発現は極めて弱いことが判明した。そこで、血管内皮細胞で3 $\times$ CArG-luciferaseを用いたプロモーターアッセイを行ったところ、X因子の発現 plasmidを共発現させることでluciferase活性の上昇が認められた。この実験結果は前述したX因子の機能を強く支持するものである。

X因子の機能を検証する目的でin vitroでのタンパク質-タンパク質相互作用を調べた。この結果、X因子はSRF及びMRTF-Aと結合することが判明した。以上の結果から、X因子はSRF/CArG-boxを介した転写活性を促進させる機能を有することが判明した。

#### 4. 考察・総括

本研究で皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換にはMRTF-A/Bが重要な役割を担うことを明らかにし、さらに細胞内局在変化以外の新たなMRTF-A/Bの活性化のメカニズムを見いだした。一般的な細胞ではMRTF-A/Bは細胞質に局在し、Rhoの活性化した条件下でアクチンダイナミクス依存性に細胞質から核内に移行することで活性化される。しかしながら、皮膚線維芽細胞では恒常的にMRTF-A/Bは核局在するため、その活性化は細胞内の局在変化では説明できない。本研究での一連の解析によりMRTF-A/Bの活性化は皮膚線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換に重要で、このプロセスにX因子は決定的な機能を果たすことが判明した。

正常皮膚線維芽細胞ではMRTF-A/Bは恒常的に核局在するが、ECMの過剰産生や細胞運動の亢進などの筋線維芽細胞的な形質発現を發揮せず恒常性が維持される。わかりやすく説明すると、創傷が癒えた後、その傷痕が少し盛り上がった状態で治癒することが見られる。この盛り上がっているのが線維化した皮膚組織である。しかしながら、傷害のない皮膚組織ではこのような状態にならず、正常な状態が維持される。つまり、正常皮膚線維芽細胞では核局在するMRTF-A/Bの機能が抑制されている。本研究ではこの抑制されたMRTF-A/B機能発現を活性化する因子としてX因子を同定した。X因子の発現はTGF- $\beta$ に依存性は発現上昇するが、ECMと接着した状況では発現が抑制される。従って、ECMを介したシグナル伝達系がX因子の発現を抑制することが示唆されるが、この分子機構の解明は今後の課題である。これまでの研究結果から、以下のモデルが提唱できると考えている。正常皮膚組織の線維芽細胞はECM層に存在するため、X因子の発現は抑制されるため核内のMRTF-A/B機能は阻害された状態が維持され、過剰なECM産生や細胞運動能の亢進は抑えられている。しかしながら、皮膚組織傷害によるECM層の損傷により皮膚線維芽細胞はECMから剥離し、さらに炎症細胞から分泌されるTGF- $\beta$ 刺激を受けることでX因子の発現増強が誘起される。この結果、X因子がSRF及びMRTF-A/Bと結合し、MRTF-A/B機能が活性化され、皮膚線維芽細胞から筋線維芽細胞への形質転換が惹起される。このモデルは皮膚の恒常性維持に限定されたものではなく、筋線維芽細胞の寄与が示唆されている疾患（肝硬変、肺腎線維症、強皮症、網膜症などの線維化症やガン関連線維芽細胞[ガン組織の微小環境に局在する筋線維芽細胞]を介した扁平上皮ガンの浸潤・転移)の発症・進展にも関わり、これらの疾患の病態解明にも適応できると考えている。さ

らに、X因子の機能阻害はこれら線維化疾患の予防や治療に応用できると思われ、新たな創薬ターゲットになる可能性がある。このような視点から今後の研究を進めてゆきたい。

(引用文献)

- 1) Wang Y, Viennet C, Robin S, Berthon JY, He L, Humbert P. Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation. *J. Dermatol. Sci.* 88: 159-166. (2017)
- 2) Glim JE, van Egmond M, Niessen FB, Everts V, Beelen RH. Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair Regen.* 21: 648-60. (2013)
- 3) Morita T, Mayanagi T, Sobue K. Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J. Cell Biol.* 179: 1027-1042. (2007)
- 4) Nakamura S, Hayashi K, Iwasaki K, Fujioka T, Egusa H, Yatani H, Sobue K. Importin  $\alpha/\beta$ 1 heterodimer-mediated nuclear import of myocardin family members. *J. Biol. Chem.* 285: 37314-33723. (2010)
- 5) Hayashi K, Morita T. Differences in the nuclear export mechanism between myocardin and myocardin-related transcription factors A. *J. Biol. Chem.* 288: 5743-5755. (2013)
- 6) Hayashi K, Murai T, Oikawa H, Masuda T, Kimura K, Muehlich S, Prywes R, Morita T. A novel inhibitory mechanism of MRTF-A/B on the ICAM-1 gene expression in vascular endothelial cells. *Sci. Rep.* 5: 10627. (2015)

# 細胞生存促進効果を有する糖内包化リポソームの アンチエイジング化粧品への応用

千里金蘭大学生生活科学部食物栄養学科

日 沼 州 司

In this study, we examined the effect of maltose-encapsulated liposomes (ML) on cell survival of mouse fibroblast cell line L929 sub-clone (L929-S) in culture with glucose-deficient media. Under our experimental conditions, almost all of cells died within two days in culture without the addition of glucose, when cell viability was determined by trypan blue dye exclusion test. Even in the presence of 50  $\mu\text{g/ml}$  glucose or empty liposomes, almost all of cells died within a similar range of time. Intriguingly, the combination of 50  $\mu\text{g/ml}$  glucose and empty liposomes (G + L) prolonged the cell survival one day or so, suggesting that low concentration of glucose and liposomes synergistically act on cells to promote the survival. However, ML promoted the cell survival evidently more than G + L. In assays using WST-8, ML showed greater formazan formation in cells than the others including G + L. Therefore, the action mechanism of ML on the cell survival was considered to differ from that of G + L. To elucidate the mechanism of ML for promoting the cell survival, we examined by WST-8 assays whether ML separated by a dialysis membrane (ML/cup) could influence on the cell survival. ML/cup promoted the survival than maltose by the same treatment, suggesting that maltose consistently released from ML promoted the cell survival. However, the cell survival-promoting activity of ML/cup was apparently less than that of ML administered directly to cells, suggesting that ML acted on cells by not only the sustained release of maltose but also direct incorporation of liposomes into cells. Consequently, our results suggest that saccharide-encapsulated liposomes would be applicable for developing one of ingredients useful for cosmetics to activate skin cells whose metabolism lowered by such as aging.

## 1. 緒 言

リポソームは、細胞膜や生体膜の構成成分であるリン脂質を利用して人工的に作成するナノメートルサイズの粒子である。リン脂質は、両親媒性分子のため、水中では親水基同士と疎水基同士がそれぞれ集合する性質があり、二重膜構造を持つ粒子を形成する<sup>1,2)</sup>。リポソームは内部に薬物やタンパク質などを内包化することができるため、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の搬送体として利用が期待されている。細胞膜は基本的にタンパク質や遺伝子は透過できないが、リポソームは細胞にエンドサイトーシスによって取り込まれる性質を持つので、タンパク質や遺伝子などの目的とする物質をリポソームに内包化して細胞内に搬送することが可能である<sup>3)</sup>。また物質を内包化したリポソームは徐々に分解されて、内容物を放出することから、目的物質の長期間の徐放の手段としても有用である。研究代表者らは、リポソームの機能調節に食品成分の内包化が有用であることを見出している<sup>4,5)</sup>。

しかし、これまでリポソームについては、糖の細胞への送達にリポソームを利用した報告はあまり見当たらない。グルコースはグルコーストランスポーターを介して細胞に

取り込まれ、代謝されてATPの産生などに働くことが知られている。糖をリポソームに内包化して、細胞に投与し、通常の糖の培地への添加と比較すれば、糖の投与形態の違いによる細胞への影響の違いを明らかにすることができるのではないかと着想し、実験によりそれを確認することにした。そこで本研究ではマルトースを内包化した直径約100 nmのリポソームを作製し、培養したL929-S細胞に加えた場合に、細胞の生存にどのような影響を及ぼすのかを検討した。その結果、糖を枯渇した培地で培養すると、MLは、同等量の糖や空のリポソームを単独に加えた場合よりも細胞を長期に生存させることができることを見出した。老化によって糖の利用の効率は低下することが知られている<sup>6)</sup>。本研究で作製したMLは、アンチエイジング化粧品の開発に利用できる可能性があると考えられる。

## 2. 試料および実験方法

### 2. 1. リポソームの作製

リポソーム作製のための脂質としては、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC; NOFCo)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC; NOFCo)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE; NOFCo) を用いた。MLは次のように作製した。DOPC (6 mg) と DOPE (6 mg) の計12 mgのDOPC/DOPEを4 mLのクロロホルムに溶解し、500 mLのナス型フラスコに入れて、エバポレーター (N1000; EYELA) を使って有機溶媒を蒸発させて、5~10分フラスコを回転させながら脂質フィルムを形成させた。次にマルトース (和光) あるいはスクロース (2 g) を溶解したTAPSバッファー (4 mL) を加えて、



Application of saccharide-encapsulated liposomes providing activities to promote cell survival for anti-aging cosmetics

Shuji Hinuma

Senri Kinran University, Faculty of Human Life Science, Department of Food and Nutrition

ボルテックス処理し、さらにスターラーで45℃、1時間攪拌した。空のリポソームを作製する場合は、リン酸緩衝液 (PBS) を加えて、同様の処理をした。攪拌後、リポソーム懸濁液をガラス試験管に入れて、超音波水槽 (Ultrasonic Cleaner VS-100III; ASONE) で28、45、100Hzのサイクルで超音波処理を3時間行った。超音波処理後、100nmのフィルターを装着したエクストルーダー (Avanti polar Lipids) による処理を行い、直径約100nmのリポソームを得た。その後、リポソーム懸濁液を透析膜チューブ (排除分子量1,000,000; Millipore) に入れてPBSで、4~5日間透析処理を行った。透析終了後、0.22 μm (Millipore) のフィルター処理をして滅菌し、実験に使用した。調整後のリポソームの粒子サイズとゼータ電位はZetasizer nano ZSP (Malvern) を使って測定した。

## 2. 2. リポソーム懸濁液の脂質の定量

作製したDOPC/DOPEリポソーム懸濁液の脂質量は、sulfo-phospho-vanillin法(7)で定量した。リポソーム懸濁液からの脂質の抽出は、リポソーム懸濁液75 μLをマイクロチューブにとり、等量のクロロホルム75 μLを加えてボルテックスで2分攪拌した。攪拌後、遠心機 (Hitachi) で4000 rpm、5分遠心した。クロロホルム層をマイクロピペットで別のマイクロチューブに移した。その後、得られたクロロホルム溶液を小型スピッツガラス試験管に10 μLとり、遠心エバポレーター (CVE-200; EYELA) で40℃、10分処理し、有機溶媒を除去した。標準検体としてはエタノールに溶解したDOPC/DOPE溶液を使用した。リポソームの脂質の定量は、次のように行った。試料に200 μLの硫酸を加えて、ボルテックスで攪拌し、100℃で10分処理後、冷水中で5分冷却した。1mLのPhospho-vanillin reagentを加えて、ボルテックスで攪拌し、37℃で15分処理した後、分光光度計 (U5110; Hitachi) を使用して波長530 nmの吸光度を測定した。標準検体の検量線から検体中の脂質量を決定した。

## 2. 3. リポソーム懸濁液の糖の定量

リポソーム懸濁液の糖含量はアンスロン法により行った(8)。リポソーム懸濁液50 μLをマイクロチューブに入れ、クロロホルム100 μLを加えてボルテックス処理した後、蒸留水300 μLを加え、さらにボルテックスで攪拌した。攪拌後、遠心機 (himac CT 13R; Hitachi) で4℃、10,000 rpm、5分間遠心し、水層を検体として使用した。リポソームに内包されていない糖量は、リポソーム懸濁液を限外濾過フィルター付チューブ (分子量300,000カット; Sartorius) で、4℃、4,000 rpm、30分遠心し (2700; Kubota)、濾液の糖量から求めた。検体とアンスロン試薬との反応は、検体250 μLを、小型スピッツガラス試験管に入れた冷却した

アンスロン試薬1mLに重層した。重層後、ボルテックスにより混和し、100℃、10分処理した後、直ちに冷却した。糖によるアンスロン試薬の発色は、分光光度計により620 nmの吸光度を測定した。既知濃度の糖水溶液を標準検体にして検量線を作成し、検体中の糖濃度を決定した。

## 2. 4. L929-S細胞の培養

リポソームの影響を調べるための細胞としては、マウス線維芽細胞株のL929 (JCB細胞バンク) を当研究室で長期培養し、糖飢餓に感受性が高くなったL929-S細胞を使用した。L929-S細胞は、グルタミンとHEPES含有RPMI1640培地 (Gibco) に非働化した10%ウシ胎児血清 (FCS; Biowest) にペニシリンとストレプトマイシン (Gibco) を加えた培地で、組織培養用フラスコ (Corning) を使って継代したものを使用した。リポソーム添加実験のときは、0.25% Trypsin-EDTA (Gibco) を用いてL929-S細胞を剥離し、PBS (Wako) で2回遠心洗浄して、glucose-free RPMI1640培地 (Gibco) に非働化した10% dialyzed FCS (Gibco) とペニシリンとストレプトマイシンを加えた培地で、 $4 \times 10^5$ /mLに浮遊し、等量のリポソーム液 (PBSで希釈) と1:1で混合した。必要な場合には、PBSに溶解した糖を加えた。組織培養用マイクロプレート (Corning) に加えて、炭酸ガス培養器で5% CO<sub>2</sub>、37℃で培養した。

半透膜で仕切った状態でのMLの投与には、底面に半透膜が張られた微量透析装置 (EasyStep; Tomy) にリポソーム懸濁液 (100 μL) を加え、24穴マイクロプレート (Corning) で培養した細胞の培養液 (400 μL) に半透膜が接するように微量透析装置を設置して培養を行った。

## 2. 5. トリパンブルー色素排除試験

培養細胞の生存を確認するためにトリパンブルー色素排除試験を行った。培養液を除去し、細胞培養液量の1/25の0.4%トリパンブルー溶液 (Sigma-Aldrich) を加えた後、倒立顕微鏡 (CKX41; Olympus) で画像をCCDカメラ (Visualix-Pro2; Visualix) で撮影した。画像からトリパンブルーで染色されていない細胞の割合を、画像解析ソフト (画像内カウントツール4; Nihon system developer Co.) により解析し、細胞生存率として求めた。細胞数としては1画像当たり100個以上になるようにカウントした。

## 2. 6. フォルマザン生成試験

細胞の生存を示す活性の指標として、WST-8 (Cell counting kit-8; Dojindo) を利用したフォルマザン生成試験を行った<sup>4)</sup>。L929-S細胞を前述の培養条件で96穴マイクロプレート (Corning) を使って、100 μL/wellで培養した。24穴マイクロプレートで培養する場合には500 μL/wellで培養した。WST-8による発色反応は、細胞培養液の

1/10量のWST-8液を加えて、4時間培養後、発色反応を450 nmの吸光度で、マイクロプレートリーダー(Maltiskan Ascent plate reader ; Labsystems)を使って測定した。

### 3. 結果

#### 3.1. 調製したリポソームの性状

調製したリポソームについて性状解析した結果を表1に示した。空のDOPC/DOPEリポソームとMLのいずれも約100 nmのリポソームが得られた(図1)。Z-potentialはマイナスの値を示したことから調製したリポソームはマイナスの電荷を持っていることがわかった。1回のリポソームの調製で、約2.4 mL程度の懸濁液を得ることができた。したがって、脂質の回収率は約90%と推定された。一方、リポソーム内包化のために投入したマルトースの回収率は約50%と推定された。ML懸濁液については、リポソームに内包化されているマルトースの量は90%以上と推定された。

本研究では、リポソームに内包化する糖として、グルコースではなくマルトースを利用したが、グルコースは脂質二重膜の透過性が高く、グルコースを内包化したリポソームの作製が困難であった。そのため糖内包化リポソームを作製するための糖としてマルトースを使った。MLは4℃では安定であったが(未発表データ)、図2に示すように37℃ではマルトースが経日的に徐々に放出されることがわかった。したがってMLは、細胞培養液中でマルトースの徐放効果を発揮していることが示唆された。

#### 3.2. グルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞の生存に対するMLの影響

MLの細胞の生存への影響を調べる目的で、グルコースを含有しない基礎培地でL929-S細胞を培養し、MLを添加したときの影響を調べた。MLを添加すると培養3~4日目でも細胞の生存率は90%以上であった(図3、ML)。一方、何も添加しなかった場合には、3~4日間の培養で、生存率は10%以下に低下した(図3、None)。興味深いことにMLと同等量のマルトースを添加した場合(図2、M)やグルコースを添加した場合(図3、G)では、3日目ではまだ生細胞はある程度認められたが、4日目では生存率は10%以下に低下した。同じ培養条件で、L929-S細胞は、グルコース1,000 µg/mLの添加では、1週間以上、細胞の生存率の顕著な低下は認められなかった(未発表データ)。したがって、低濃度(50 µg/mL)のマルトースやグルコースではL929-S細胞は3~4日でほぼ死滅することがわかった。MLと同等量の脂質量の空のリポソームを加えた場合には、顕著な細胞の生存促進効果は認められなかった(図3、L)。しかし低濃度のグルコースに空リポソームを加えた場合(図3、G+L)には、糖や空リポソームを単独で加えた場合と比較して、3日目で明らかに生存を促進している傾向が認められた。L929-S細胞は、生存と増殖に十分量のグルコースが存在することが必須であるが、マルトースでもグルコースよりも若干効率は低下するが、代替できることがわかっている(未発表データ)、L929-S細胞はマルトースを分解して、グルコースとして利用できると考えられる。低濃度のグルコースに空リポソームの組

表1 調製したリポソームの性状

リポソーム	直径(nm)	Z-potential	脂質濃度(mg/mL)	マルトース濃度(µg/mL)	n
DOPC/DOPE	107.1 ± 11.6	-12.7 ± 7.4	4.6 ± 0.9	0	16
ML	99.9 ± 27.6	-16.7 ± 3.9	4.2 ± 1.8	450.4 ± 244.5	8

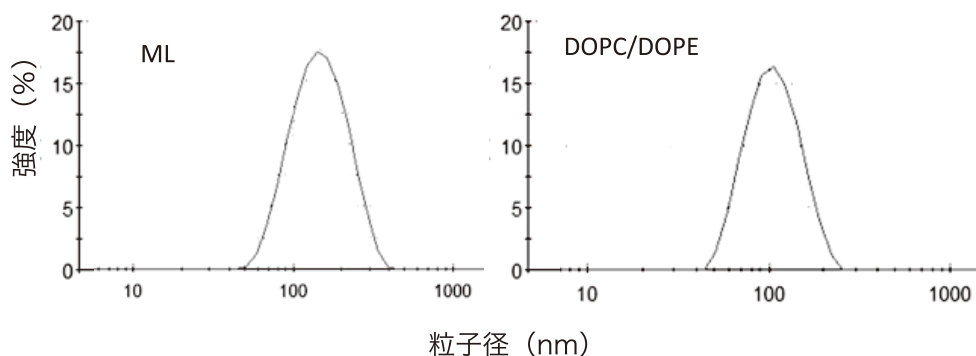


図1 調製したリポソームの粒子径の分布

MLおよび空のDOPC/DOPEリポソームの粒子径を測定した結果の代表例を示した。

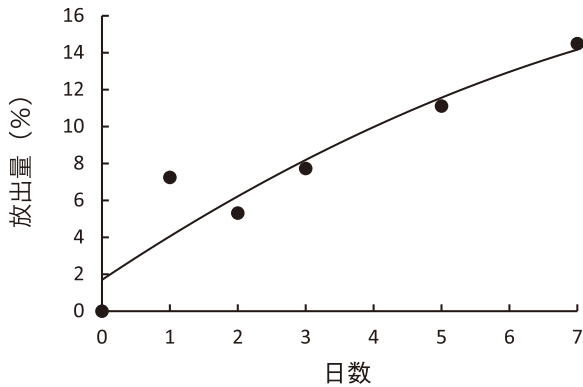


図2 MLからのマルトースの徐放

ML (マルトースとして1mg/mL)をPBS (1mL)に懸濁してエッペンドルフチューブに、37°Cで処理後、リポソムの外に放出されたマルトース量を限外濾過処理により測定した。放出量 (%)は37°C処理する前のマルトース濃度を100%として求めた。

み合わせがそれぞれ単独で添加した場合に比較して、細胞の生存を延長する傾向が見られたことは、両者がL929-S細胞に対して生存延長に相乗的な働きをしていることが示唆された。しかしMLは糖と空リポソムの組み合わせよりもはるかに強い細胞生存促進作用を示した。これらの結果は、MLは空リポソムの組み合わせとは異なる作用機序でL929-S細胞の生存を延長させていることを示しているものと考えられた。

### 3. 3. グルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞のフォルマザン生成活性に対するMLの影響

WST-8は細胞内脱水素酵素により還元されて、フォルマザンを形成して発色することが知られているが、生細胞の指標として、一般的に使われている。そこでグルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞のフォルマザン生成活性に対するMLの影響を調べた。複数回実験を行ったが、その結果の代表例を図4に示す。MLは培養1日目までフォルマザン生成活性が最大に達し、培養4日目まで、徐々に活性は低下していったが、4日目でもフォルマザン生成活性が認められた(図4, ML)。無添加(図4, None)と空リポソムのみの添加(図4, L)では、培養開始時点(培養0日目)でもほとんど検出されなかったことより、フォルマザン生成は糖の代謝と密接に関連していることが示唆された。低濃度(50 µg/mL)のマルトース(図4, M)やグルコース(図4, G)では培養1日目までは明確なフォルマザン生成活性が認められたが、2日目ではほとんど検出されなくなった。低濃度の糖と空リポソムの組み合わせ(図4, M+L, G+L)では、糖単独よりは0日目と1日目より強いフォルマザン生成活性を示したが、2~4日目ではほとんどフォルマザン生成活性は認められなかった。しかし低濃度の糖と空リポソムの組み合わせは、ML処理

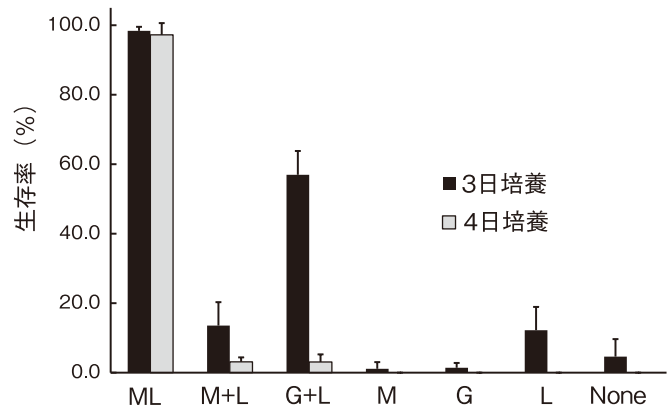


図3 グルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞に対するMLの生存促進作用

ML: マルトース (50µg/mL) 含有リポソム (106µg/mL) 添加; M+L: マルトース (50µg/mL) と空リポソム (106µg/mL) 添加; G+L: グルコース (50µg/mL) と空リポソム (106µg/mL) 添加; M: マルトース (50µg/mL) 添加; G: グルコース (50µg/mL) 添加; L: 空リポソム (106µg/mL) 添加; None: 無添加。

細胞の生存率はトリパンプルー試験により測定し、データは平均値とSDで示した(n=3)。

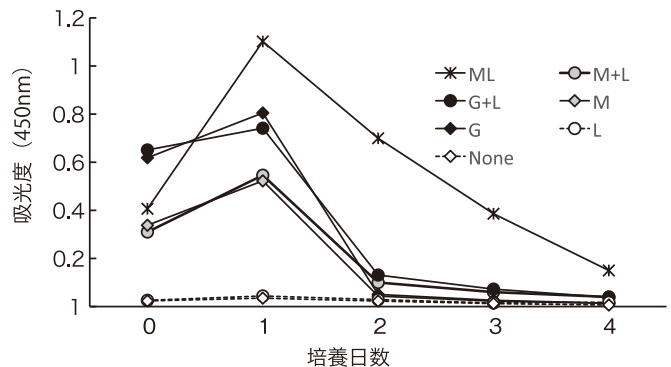


図4 グルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞のフォルマザン生成に対するMLの効果

ML, M+L, G+L, M, G, Noneの表記は図3と同じ。フォルマザン生成試験はWST-8を用いて行った。データ(n=2)は培地のみ吸光度を測定値から引いた値の平均値を示した。誤差は平均値の10%以内であった。

した細胞のフォルマザン生成活性に比較すると1~4日目ではるかに低かった。フォルマザン形成活性として見ると、ML>M+L, G+L>M, Gの強さの順になっていたが、これらの結果は、トリパンプルー試験の結果とおおよそ一致していた。

### 3. 4. MLの作用機序の検討

MLのL929-S細胞に対する生存促進効果の作用機序を明らかにする目的で、MLを培地中に直接投与した場合(図5, ML)と、半透膜で仕切られたカップに入れて投与した場合(図4, ML/cup)の細胞のフォルマザン生成活性に与える影響を比較検討した。この実験では、MLを投与した

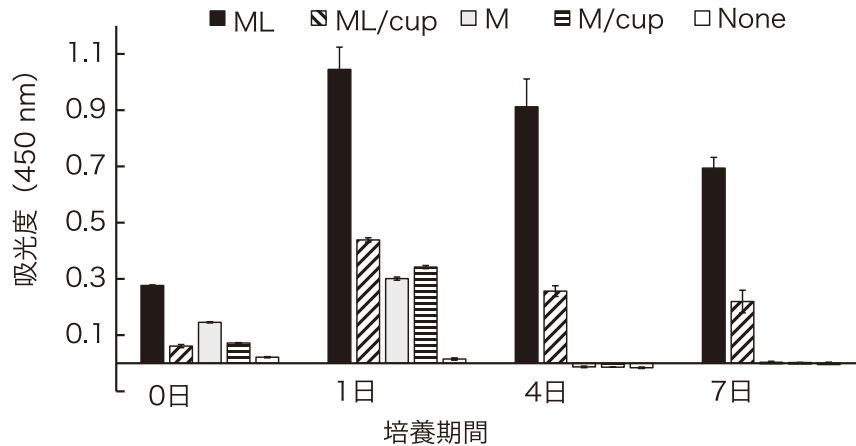


図5 MLを半透膜で仕切ってL929-S細胞に投与したときの効果

ML、M、Noneの表記は図2、3と同じ。ML/cupは半透膜で仕切ったカップに入れてMLを投与、M/cupはマルトースを半透膜で仕切ったカップに入れて投与したことを示す。フォルマザン生成試験はWST-8を用いて行った。データ (n=2) は培地のみの吸光度を測定値から引いた値の平均値で示した。誤差は縦線で示した。

場合には、7日後でも明確なフォルマザン生成活性が認められた (図5, ML)。半透膜で仕切られたMLを投与した場合 (図5, ML/cup) は、ML粒子は半透膜を透過できないので、MLは直接細胞に接触することはできないが、7日後でもフォルマザン形成活性が検出された。この結果は、半透膜を透過できるマルトースがMLから持続的に遊離し、半透膜と透過して作用したマルトースがL929-S細胞のフォルマザン形成活性の維持に働いていたことを示しているものと考えられた。しかしMLと比較するとML/cupのフォルマザン形成活性は半分から1/4程度であった。このことは、MLはマルトースの徐放以外に直接細胞に接触し、取り込まれることによって、細胞の生存延長効果を発揮している部分もあることを示唆しているものと考えられた。

#### 4. 考察および総括

本研究では、L929細胞株のsub-cloneであるL929-S株を実験に使用した。L929-Sは糖飢餓に対する感受性が高く、グルコース飢餓培養条件下では、約2日以内にほぼ死滅する性質を持つので、MLの細胞生存延長効果の判定がやり易いので使用した。親株のL929細胞は、グルコース飢餓条件下でも1週間近く生存が認められた (未発表データ)。リポソームに内包化する糖としてはマルトースを利用した (表1)。DOPC/DOPEリポソームに内包化すると4℃では数週間安定だが、37℃ではマルトースが徐々に放出されることがわかった (図2)。しかしグルコースを内包化したDOPC/DOPEリポソームは非常に不安定で37℃処理では、1日以内にほとんどが放出されてしまった (未発表データ)。グルコースは脂質二重層の膜を透過しやすいので、内包化するための糖としては、グルコースよりもマルトースの方が適当だと考えている。またスクロースを内

包化したリポソームも作製して、MLと同様の細胞生存延長試験を行って見たが、スクロース内包化リポソームにはグルコース欠乏培地で培養したL929-S細胞に対する細胞生存促進作用は全く認められなかった (未発表データ)。これはL929-S細胞にはマルトースを分解してグルコースとして利用するためのグリコシダーゼが存在するが、スクロースを分解して利用するサッカラーゼが存在しないためではないかと考えられた。どのような糖をリポソームに内包化するとより細胞生存延長効果に有効かについては、さらに検討する余地があると考えている。MLは、グルコース飢餓条件下で培養したL929-Sに対して、同等量のグルコースやマルトースを添加した場合や、同等量の空のリポソームを添加したよりも強力な細胞生存延長効果を示した (図3, 4)。興味深いことに、低濃度の糖や空リポソームをそれぞれ単独で加えた場合よりも、低濃度の糖と空リポソームを組み合わせると投与した場合の方が、単独よりも若干生存を促進する効果が認められた (図3, 4)。これらの結果は、空リポソームも糖の存在下で、細胞の生存に何らかの生存促進作用を有していることを示唆している。我々は、MLに蛍光物質のカルセインを取り込ませたものを作製し、細胞に投与すると、細胞に取り込まれることを確認している (未発表データ)。したがって、細胞培養系に投与したりポソームの少なくとも一部は、細胞内に取り込まれることによって、細胞生存の促進作用に関与しているものと考えている。リポソームは、リン脂質からできていて、それ自体が細胞の代謝によるエネルギー産生の原料となるとは考えにくいですが、糖の存在下で細胞に取り込まれたリン脂質が代謝されて脂質代謝による脂肪酸のβ酸化の系路の促進に働いている可能性が想像されるが、この点の検証については今後の課題である。

MLの細胞生存促進作用の機序を調べるためにリポソームが透過できない半透膜で仕切った状態で細胞に投与したところ、その状態でもある程度、細胞生存の延長効果を示した(図5)。この結果は、MLからマルトースが徐放され遊離した微量のマルトースが、細胞の長期的な生存維持に働いている重要な機序の一つであることを強く示唆している。この結果は、図2に示したように、MLが37℃において(おそらくリポソームの分解や膜構造の不安定化により)マルトースの徐放効果を示したという結果と一致しているように思われた。しかし半透膜で仕切られたMLのフォルマザン形成活性は、MLを直接細胞に投与した場合に比較して、明らかに低かった。この結果はMLが細胞に取り込まれることが、MLが十分な細胞生存促進効果を発揮するためには重要であること示唆している。上述したような、リン脂質の取り込みによる糖の存在下での脂質代謝を介したエネルギー産生系の亢進がMLの効果の発揮には必要なのではないかと考えている。これらの点の確認は今後さらに検討が必要である。

本研究では、糖内包化リポソームのMLを調製し、糖欠乏培地で培養した繊維芽細胞に対して、強力な細胞生存促進効果を示すことを見出し、その機序についても一部解明することができた。糖内包化リポソームは高齢化に伴い代謝が低下した化粧品成分として利用できる可能性があるのではないかと期待している。

#### 謝 辞

本研究にご協力、ご助言いただいた千里金蘭大学、藤田和代助教および大阪大学、黒田俊一教授に深謝いたします。

#### (引用文献)

- 1) Sessa G, Weissmann G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res.* 1968 May;9(3):310-8.
- 2) Alipour E, Halverson D, McWhirter S, Walker GC. Phospholipid bilayers: stability and encapsulation of nanoparticles. *Annu Rev Phys Chem.* 2017 May 5;68:261-283. Deciphering the Functional Composition of Fusogenic Liposomes. Kolašinac R, Kleusch C, Braun T, Merkel R, Csiszár A. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 24;19 (2).
- 3) Amano C, Minematsu H, Fujita K, Iwashita S, Adachi M, Igarashi K, Hinuma S. Nanoparticles containing curcumin useful for suppressing macrophages in vivo in mice. *PLoS One.* 2015 Sep 11;10(9) *J Clin Invest.* 1986 Jun;77(6):2034-41.
- 4) Fujita K, Hiramatsu Y, Minematsu H, Somiya M, Kuroda S, Seno M, and Hinuma S. Release of siRNA from liposomes induced by curcumin. *Journal of Nanotechnology Volume 2016 (2016), Article ID 7051523, 6 pages*
- 5) Fink RI, Wallace P, Olefsky JM. Effects of aging on glucose-mediated glucose disposal and glucose transport. *J Clin Invest.* 1986 Jun;77(6):2034-41.
- 6) Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phosphovanillin method. *Clinical Chemistry vol. 18, No. 7, 1972*
- 7) Morris DL. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone Reagent. *Science.* 1948 Mar 5;107 (2775):254-5.

# チロシナーゼと基質複合体結晶構造解析に基づいた反応機構の解明

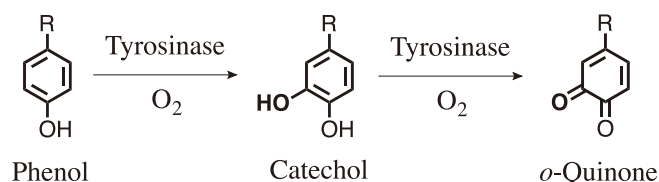
大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

藤枝 伸宇

Tyrosinase is a copper enzyme widely distributed in nature and has anti-ferromagnetically coupled binuclear copper ions in the active site, where the dioxygen molecule can be reductively activated into  $[(\mu-\eta^2:\eta^2\text{-peroxide})\text{dicopper(II)}]$  species. This active oxygen species play a central role in catalyzing the hydroxylation of phenols to catechols and the subsequent oxidation of catechols to o-quinones. However, the details of the binding mode of substrate tyrosine have been still a long-standing mystery to be resolved. We have reported the high-resolution crystal structures of recombinant pro-form tyrosinase from yellow mold. In the pro-form tyrosinase, the active site is covered by C-terminal shielding domain, which functions as copper chaperone and can be proteolytically cleaved off to induce the catalytic activity. In this work, we have determined the crystal structure of the active-form tyrosinase in order to compare the structures between the pro- and active-form tyrosinase. First, the active-form tyrosinase was prepared by trypsin treatment of pro-form tyrosinase and purified by gel filtration chromatography. The purified protein was crystallized by hanging-drop vapor diffusion method using the precipitant solution containing polyethylene glycol. X-ray diffraction data was collected at Spring-8 and determined the crystal structure of the active-form tyrosinase. There was little difference in overall structures of pro- and active-form tyrosinase. We have succeeded in determining the crystal structures of complex with inhibitors. Kojic acid was stacked on histidine coordinated to copper ion. Based on the details of their binding modes, the reaction mechanism will be updated and discussed.

## 1. 緒言

チロシナーゼはヒトからバクテリアまで幅広い生物が持つ銅含有酵素であり、生体内でのメラニン色素の合成などに関与している。チロシナーゼは酸素を酸化剤としてL-チロシンの水酸化反応を触媒し、生じたL-ドーパを酸化することでドーパキノンを生産する (Scheme 1)。ドーパキノンはその後、自己重合反応などを経てメラニンとなり、細胞を紫外線から守る色素となる。チロシナーゼは活性中心に2つの銅イオンを持ち、この銅イオンに酸素分子が結合した銅-活性酸素種オキシ体がチロシンなどフェノール類の水酸化反応を行い、続いて銅2価種のメット体がドーパなどカテコール類の酸化を行うと考えられている。その後、デオキシ体に酸素が結合し再びオキシ体が生成することで触媒サイクルが完了する。このようにチロシナーゼは芳香族炭素を位置選択的に直接水酸化することから、触媒としての工業的利用が期待できる。一方で、生体内で皮膚の色素沈着や食品の褐変などの原因になることから、その阻害剤の開発も活発に行われている。そのためチロシナーゼの反応機構を解明することは、触媒、医薬、食品など広範な分野への貢献となる。特に、メラニン形成は肌のシミの直接的原因であり、コスメトロジーへの影響は大きい。



Scheme 1 Tyrosinase catalytic reaction

このような背景のもと、長年、チロシナーゼの酵素反応の機構について多くの研究が行われてきた。当研究室をはじめとし多くの研究者がモデル錯体や実際の酵素を用いた詳細な速度論的研究を行いチロシナーゼ水酸化反応の機構が提案されている。この機構によると基質フェノールがフェノレートとして銅イオンに配位し、芳香族求電子置換反応によりフェノールの芳香族炭素と酸素の結合が形成される。また近年、チロシナーゼのX線結晶構造解析に成功した例がいくつか報告されてきた。マッシュルーム由来のチロシナーゼの活性中心では、2つの銅イオン (CuAとCuB) がそれぞれ3つのヒスチジン残基に配位されていることが知られている<sup>1)</sup>。また別のグループからは活性中心の金属を亜鉛に置換し、活性のない状態でのチロシナーゼと基質のL-チロシンとの複合体結晶構造が報告されている<sup>2)</sup>。しかし、これらの結晶構造を重ね合わせてみるとCuAとZnAでその位置が大きく異なっていることがわかり、活性のある銅イオンが結合した本来の基質結合状態であるかどうか明確ではない。併せて分解能も現状では詳細な相互作用が議論できるほど高くない。

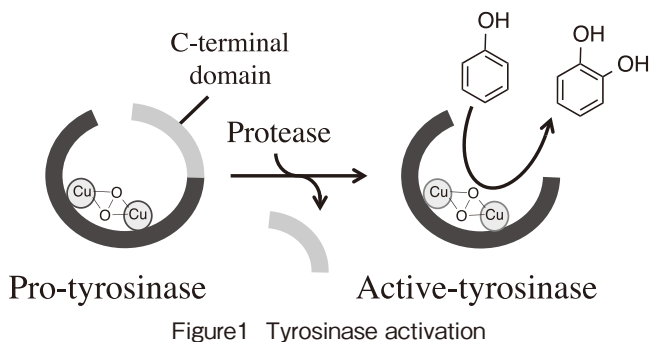
一方で、当研究室では麹菌由来プロチロシナーゼの高分解能構造解析に成功してきた<sup>3)</sup>。プロチロシナーゼは今まで示したチロシナーゼとは異なり、銅結合触媒ドメインに



Structural Approach to Molecular Mechanism of Tyrosinase

Nobutaka Fujieda

Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University



加えC末端ドメインを持つチロシナーゼの前駆体型であることが明らかとなった (Figure1)。これら結果より、我々はこのC末端ドメインがチロシナーゼの活性中心を覆い隠すことで細胞毒となる酵素活性を抑えており、酵素反応が必要になるとC末端ドメインがプロテアーゼにより切断され活性を持つ活性型チロシナーゼとなることを提唱してきた。本研究ではこのプロチロシナーゼからプロテアーゼ処理によって活性型チロシナーゼを調製し、銅イオンが結合した活性型のチロシナーゼと基質との複合体結晶構造を詳細な議論が可能な高い分解能で決定し、チロシナーゼの反応機構について議論することを目的とした。

## 2. 方法

まずは常法に従い野生型プロチロシナーゼの大腸菌による発現とアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。SDS-PAGEで単一のバンドが見られ、プロチロシナーゼが精製できたことを確認した。次にプロチロシナーゼを活性型チロシナーゼに変換するために、トリプシンによってプロテアーゼ処理を行ったところ、活性型チロシナーゼは自身の持つチロシン残基を酸化し、その後重合によって褐変、沈殿してしまうことが明らかとなった。そこで野生型ではなく酵素活性を下げた変異体を用いた。麴菌由来チロシナーゼは活性中心の銅イオンに配位しているヒスチジンのうちの1つ

が近傍のシステイン残基と共有結合による架橋を形成しているが、今回このシステインをアラニンに変え架橋をなくした変異体を用いた。この変異体では活性の指標となる触媒回転数 $k_{cat}$ が一桁程度低下するが、活性種のオキシ体は野生型同様に生成し、他のチロシナーゼと比較しても十分な活性を維持していることがわかっている。この変異体を用い、まずは野生型同様プロ型で精製を行った。その後トリプシンを用いてプロテアーゼ処理を行い、ゲル濾過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーによって活性型変異体の精製を行った。これらクロマトグラフィーの溶出グラフから単一の分子として活性型チロシナーゼを精製できたことが確認された。精製した活性型変異体の結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法によって行った。

## 3. 結果

SPring-8でX線回折データを測定し、1.6 Åの分解能で活性型変異体の結晶構造の決定に成功した。活性型ではC末端ドメインが完全に取り除かれていることが確認でき、さらには重ね合わせると全体構造はプロチロシナーゼの銅結合触媒ドメインからほぼ変化しておらず、C末端ドメインの除去による構造変化はほぼ見られなかった。しかし、活性中心を見てみると、銅イオンの位置に大きな変化が見られた。プロチロシナーゼではCuA、CuBともに3つのヒスチジンが配位している構造であるのに対し、活性型チロシナーゼではCuA側で3つのヒスチジンが配位したCuA1に加えて、2 Å離れた位置にヒスチジン103が外れ、残りのヒスチジン2つと水分子1つが配位したCuA2の状態が見られた (Figure 2)。プロ型ではC末端ドメインにあるフェニルアラニン513が活性中心に貫入しているが、活性型ではフェニルアラニンが塞いでいた活性中心に水分子がアクセスできるようになり、銅に配位することでヒスチジン103の配位が外れたと考えられる。CuAサイトの銅イオン占有率は20%がCuA2、80%がCuA1の状態で存在し、CuA1とCuA2の間で平衡があることがわかる。

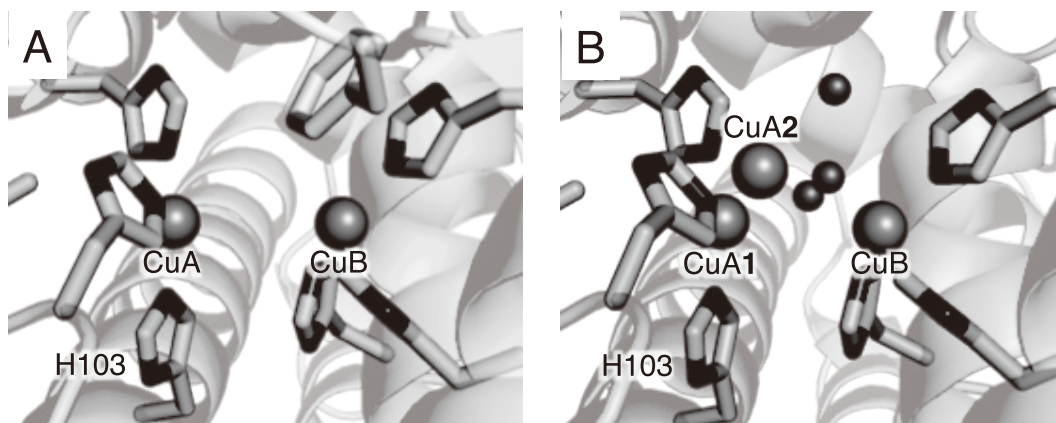


Figure2 Crystal structures of (A) pro-form and (B) active-form

次に基質L-チロシンとの複合体結晶構造解析を試みた。チロシンの濃度と浸漬時間を検討し、10mMのチロシン溶液に1分間活性型チロシナーゼの結晶を浸けることでチロシン複合体の結晶構造を1.42 Åの分解能で得ることに成功した。活性中心にはチロシンに由来する電子密度がはっきりと観測され、さらにチロシン溶液への浸漬時間を10分に延ばすと、チロシンのオルト位に水酸基に由来する電子密度が観測され、結晶中で反応が進行することを明らかにした。チロシンはヒスチジン332との $\pi$ - $\pi$ 相互作用、バリン359とのCH- $\pi$ 相互作用、アスパラギンとセリンとの水素結合、そしてCuA2への配位結合によって活性中心に結合していた。相互作用に関与するアミノ酸残基をアラニンに変えるとチロシンに対する親和性を示すミカエリス定数 $K_m$ 値が上昇し、親和性が低下するという結果も間接的にこれらのアミノ酸残基が基質結合に寄与していることを支持した(Figure 3)。

チロシンが配位することによってCuA2の占有率は20%から30%に増加した。さらに銅イオンを持たないアポ体の結晶をチロシン溶液に浸漬したところ、銅イオンがある場合と全く同じ場所にチロシンが結合している様子が観測され、チロシンは銅イオンへの配位結合がない状態で、アミノ酸残基との相互作用のみによって活性中心に結合できることがわかった。これらの結果は、チロシンが銅イオンに接近するという今までの定説とは逆に、銅イオンがチロシンに対して接近する可能性を示唆しているものであった。今回得られたチロシン複合体の結晶構造と以前報告されている亜鉛置換チロシナーゼ-チロシン複合体結晶構造の重ね合わせを行ったところ、2つの結晶ではチロシンのフェノール部分はほぼ同じ位置にあり、チロシンの結合したCuA2とZnAが同じ位置であることがわかった。これにより、上で述べた亜鉛イオンの位置が異なっていたのは金属の違いによるものではなく、基質の結合によって起こったものであることがわかった。ここまで得られた結晶

構造をもとに修正したチロシナーゼの反応機構は以下のようになる。活性種オキシ体のチロシナーゼに対し、チロシンがこれらのアミノ酸残基との相互作用によって結合する。そしてCuA1の状態から、ヒスチジン103が外れCuA2にシフトし、チロシンと結合した後、芳香族求電子置換反応でチロシンの水酸化が進行する。その後カテコールの酸化に伴い、銅イオンはCuA2からCuA1の位置に戻り、生成物の解離を促進する。

最後に活性種である酸素結合状態、オキシ体の構造についてCuA1とCuA2で比較を検討した。活性型チロシナーゼではオキシ体は不安定で発生後数分で消滅するが、プロチロシナーゼの状態ではC末端ドメインが酸素結合部位を覆い隠すためオキシ体を安定化することが当研究室の先行研究によってわかっている。そこで、プロ型の変異体と、さらにヒスチジンを欠損させた二重変異体を用いた。二重変異体はヒスチジンが1つ外れているCuA2の状態を擬似的に生じさせるためにヒスチジン103をフェニルアラニンにした変異体になる。調製後、UV-visスペクトルからどちらの変異体でもオキシ体の形成が確認できた。また共鳴ラマンスペクトルでも、サイドオン型で結合した銅酸素種に由来するピークが観測された。結晶構造では二重変異体では銅が完全にCuA2の位置にシフトし、酸素-酸素間の距離は長く、銅-酸素間の距離は短く変化していた。これらはUV-visスペクトルでバンドが短波長シフトしたこと、ラマンスペクトルでCu-O伸縮の値が大きくなったことと一致する。CuA1からCuA2への遷移によって銅-酸素間の結合が強まり、酸素-酸素間の結合は弱まることを示唆された。2つのオキシ体を重ね合わせるとヒスチジンはほぼ重なっており、銅イオンがCuA1からCuA2に動くときに、結合した酸素はただ引き上げられるだけでなく、片側の酸素原子がチロシンのオルト位に近づくように向きが変化することが示唆された。これらの結果から、CuA1からCuA2への遷移は酸素をより活性化し反応に適した向きに変化させると予想される。

#### 4. 考察

このように本研究では麹菌由来チロシナーゼ変異体を用いて活性型チロシナーゼの結晶構造を高分解能で決定することに成功した。また基質との複合体結晶構造を決定し、それらの結合様式を明らかにするとともに、触媒サイクルにおいて活性中心の銅イオンの一方が基質の結合に伴い、結合部位や配位構造を変化させ、反応を進行させるという興味深い現象を捉えることに成功した。つまり、銅と酸素が動くことで反応が進行していることが示唆された。従来、一般的に金属酵素においては、触媒に関与する金属は配位するアミノ酸残基に強固に保持されたまま機能すると考えられてきたが、近年、分析手法の発展により、反応の際に

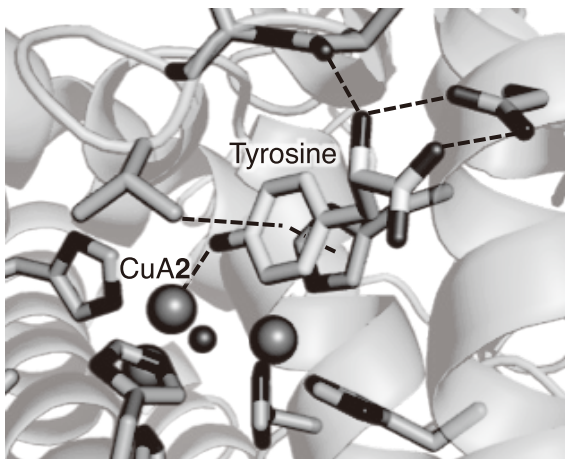


Figure3 Complex with tyrosine

金属の配位子や配位構造が大きく変化することを示す観測結果が報告されている。アルコール脱水素酵素では基質の結合に伴って配位しているアミノ酸残基を変えながら反応を進行させていることが示唆され、古典的な反応機構と新しい反応機構で議論が起こっている最中である。本研究結果は触媒サイクル中で柔軟に動く動的な金属中心という新規な機構を支持する証拠の一つになると考えられる。チロシナーゼのフェノール水酸化反応機構に関して、これまでチロシンが銅イオンに接近し、配位することで反応が進行すると考えられていた。しかしながら、複合体結晶構造から、第1段階としてアミノ酸残基によって形成されている基質結合部位にチロシンが結合することが示唆された。さらにこの結合したチロシンのフェノール性水酸基に対して銅イオンが接近・配位し反応が進行することが考えられる。また、反応後、CuAがCuA2からCuA1に移動することでカテコールや*o*-キノンなどの配位性生産物の解離を促進していると推測される。このように、本研究で得られた結果は活性中心の金属イオンが反応に伴い、大きく結合部位や配位構造を変化させるという過去に見られたことのない現象を初めて直接的に観測したものである。これらの情報

はチロシナーゼの反応機構解明に貢献すると共に、金属酵素における金属中心の柔軟な配位構造の重要性を示す一例となるものと言える。

(引用文献)

- 1) Ismaya WT, Rozeboom J, Weijn A, Mes JJ, Fusetti F, Rozeboom HJ, Wichers HJ, Dijkstra BW: Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone, *Biochemistry* 50, 5477, 2011.
- 2) Goldfeder M, Kanteev M, Isaschar-Ovdat S, Adir N, Fishman A: Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins *Nat. Commun.* 5, 4505, 2014.
- 3) Fujieda N, Yabuta S, Ikeda T, Oyama T, Muraki N, Kurisu G, Itoh S: Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation, *J. Biol. Chem.* 288, 22128, 2013.

# クエン酸による細胞機能の調節機構： 美容および美白、老化における役割

国立研究開発法人国立成育医療研究センター

宮戸 健二

Citric acid is a substance produced naturally in citrus fruits, such as grapefruits, oranges and lemons, and makes an addition of sour taste to foods and drinks. Citrate synthase (CS) produces citric acid and initiates citric acid cycle (also known as tricarboxylic acid cycle [TCA] and the Krebs's cycle) that assumes respiratory activity in mitochondria of all types of cells. In general, chemical properties of CS are beneficial for skin care and often contained in skin care products; however, its cosmetic effect is still unproven scientifically. To address this issue, we studied a physiological role of citric acid by producing mice lacking a gene encoding extra-mitochondrial citrate synthase (hereafter, eCS). eCS proteins are expressed in several types of cells such as neurons, sperm and hair sheath cells in mice. The eCS proteins are also produced in human cells; nonetheless, its biological role is unclear. From general knowledge about citric acid, we assumed that eCS deficiency might reduce cellular activity, presumably causing metabolic problems. Expectedly, *eCs*-deficient mice exhibited hypopigmented hairs due to the reduction of cellular activity of melanocyte stem cells, regardless of male or female. Furthermore, the frequency of mating behavior of the male mice was low, and their sperm-fertilizing ability decreased age-dependently, resulting in male subfertility. Moreover, graying hairs went age-dependently forward to white hairs in addition to hair loss. Interestingly, the supplementation of cyclic AMP (cAMP) improved lower cellular activities in sperm and melanocytes isolated from *eCs*-deficient mice under the in vitro condition, although the supplementation of citric acid was unaffected. We discovered the role of eCS in pigmentation and reproduction. We further propose that enhancement of eCS activity (or local application of cAMP) not only suppresses hair graying, but also improve male sexual dysfunction.

## 1. 緒言

クエン酸は、細胞内小器官であるミトコンドリアで働くクエン酸回路（TCA回路またはKrebs回路）を動かす8種類の酸のうちの1つである。酵母からヒトまで、真核生物のあらゆる細胞がミトコンドリアをもっており、クエン酸合成から始まるクエン酸回路によって細胞のエネルギー源であるアデノシン三リン酸（ATP）が産生される。一方、細胞質にはクエン酸回路の前段階にあたる解糖系が存在し、クエン酸回路に比べて効率が悪いもののATPを産生することができる。

多くの細胞では、好氣的条件下ではクエン酸回路を使ったATP産生が行われる。一方、癌細胞では好氣的な環境下であっても解糖系を使ってATPが産生されることが知られており、Warburg効果（ワールブルク効果、または好氣的解糖）と呼ばれ<sup>1, 2)</sup>。癌細胞においてWarburg効果が生じるメカニズムは未だに不明であるものの、解糖系からクエン酸回路への切り替えにはクエン酸合成が必須であることから、クエン酸合成酵素の何らかの機能異常または機能獲得がWarburg効果を引き起こしている可能性が考え

られる。

クエン酸は柑橘系果物の果汁の主成分だけでなく、補助食品（サプリメント）としても販売されており、容易に体内に摂取することができる。さらに、クエン酸には様々な効能があることが知られている。最も知られているのは疲労回復効果であり、クエン酸には筋肉における乳酸の濃度を低くする作用が知られている。また美容に関しても、皮膚の弾力性を高める作用が知られている。一方、クエン酸摂取によって癌細胞が形成されにくくなるといった作用が知られている。それ以外にも、骨粗鬆症の予防効果、高血圧の予防効果、通風や結石の改善効果などが知られている。しかしながら、実はクエン酸の効能については実際に証明された例は少なく、科学的根拠が乏しいのが現状である。例えば、クエン酸の作用として知られる「疲労回復」、「筋肉や神経の疲労予防」について、科学的に検証を試みたものの証明に至らず、最近では否定的な見方もされている。さらに、クエン酸を主成分とする医薬品がないことも、クエン酸の健康への効果が疑問視される一因となっている。

ただし、クエン酸による細胞毒性は報告されておらず<sup>3)</sup>、クエン酸が細胞の呼吸活性の制御に必須であるという事実については疑う余地がない。そのため、クエン酸を効率よく細胞に摂取する方法、または、細胞内におけるクエン酸合成酵素の活性を上昇させる方法（例えば、食材や飲料成分）が明らかになれば、クエン酸は「若さの持続」のカギを握る物質として再認識されるかもしれない。そこで本研究では、クエン酸の健康や美容における効果を科学的に検証するとともに、クエン酸の摂取方法およびクエン酸合成酵



Regulation of cell function by citric acid:  
Roles in beauty care, skin whitening and  
anti-aging

Kenji Miyado

National Research Institute for Child  
Health and Development

素を活性化させる物質の同定についても検討した。

## 2. 方法

### 2.1. 遺伝子改変マウスの作製

クエン酸合成酵素 (citrate synthase, 以下CS) は、ミトコンドリア内に存在する酵素であるが、一方ではミトコンドリア外の細胞質にも存在する。しかしながら、このことはあまり知られていない。我々は、ミトコンドリア外に存在するCS (extra-mitochondrial CS, 以下eCS) をコードする遺伝子を欠損させたマウス (*eCs* 遺伝子欠損マウス) を作製して解析を行った。*eCs* 遺伝子欠損マウスは米国の Knockout Mouse Project (KOMP) Repository に作製を依頼した。作製されたヘテロ欠損マウスの交配によってホモ欠損マウスを作製した。マウスの飼育および関連するすべての実験は国立成育医療研究センター研究所・動物実験規則に基づいて行った(機関内承認番号#2004-04)。

### 2.2. 色素細胞(メラノサイト)の体外培養

*eCs* 遺伝子欠損マウスの胎仔から皮膚を分離した後、コラゲナーゼ処理によって組織片からメラノサイトを単離した後、培養シャーレに播種した。細胞が増殖するまで培養し、カルシウム波の測定および免疫染色を行った。野生型細胞のコントロールとしてC57BL/6Jマウスの胎仔からもメラノサイトを単離、培養した。

### 2.3. 細胞内のカルシウム波の測定

培地中にカルシウム結合性の蛍光試薬 (Oregon Green BAPTA-1 AM) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR) を最終濃度 2 μM になるように添加し、細胞に取り込ませた後、培地を交換して高感度 CCD カメラ (Andor Technology, Belfast, UK) を用いて経時的に観察を行った。

### 2.4. 免疫染色

新生仔の皮膚から分離したメラノサイトを培養した後、2%ホルムアルデヒド溶液で固定し、1%スキムミルク溶液でブロッキングした後、1次抗体(抗eCS抗体、抗c-kit抗体、抗TRP2抗体)を含む1%スキムミルク溶液中で室温2時間振盪させ、さらに蛍光物質 (Alexa488 または Alexa564) と結合させた2次抗体を含む1%スキムミルク溶液中で室温1時間振盪させた。ハンクス溶液で洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いて蛍光像を撮影した。また、対比染色としてヘキスト 33324 によって染色体DNAを染色した。

### 2.5. ウェスタンブロット解析

皮膚組織の抽出物を SDS 電気泳動によって分離した後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜にタンパク質を転写した。

PVDF膜を1次抗体(抗eCS抗体、抗DCT抗体、抗β-アクチン抗体)を含む1%スキムミルク溶液中で室温2時間振盪させ、セイヨウワサビ由来ペルオキシダーゼ (HRP) を結合させた2次抗体を含む1%スキムミルク溶液中で室温2時間振盪させた。1%Tween 20 溶液によって洗浄した後、Enhanced ChemiLuminescence (ECL) Plus 検出試薬を用いて目的のタンパク質を検出した。

## 3. 結果

### 3.1. *eCs* 遺伝子欠損マウスにおけるメラニン色素産生異常

CSは、ミトコンドリア内に存在する酵素である一方、ミトコンドリア外の細胞質にも存在するが、このことはあまり知られていない<sup>4)</sup>。CSはすべての細胞の呼吸系を司る酵素であるため、CS変異マウスは発生初期の段階で致死になるはずである。そのため、*Cs* 欠損マウスを用いて成体におけるクエン酸の役割を解析することは困難である。ただし、マウスでは、CS以外に、ミトコンドリア外CS(*eCs*) をコードするもう1つの遺伝子 (*eCs*) が存在する。そこで、常法に従って胚性幹細胞を用いて *eCs* 遺伝子欠損マウスを作製した。

マウスの遺伝的背景を黒色系統のC57BL/6にしたところ、*eCs* 遺伝子欠損マウス (以下、KOマウス) は灰色を呈した (図1A)。1990年代までに毛色を決定する遺伝子はすべて同定されたはずであるが、*eCS* は色素形成を調節しているタンパク質として働いている可能性が出てきた。そこで、マウスの背中中の4種類の毛のうち2種類 (Awl と Zigzag) を比較したところ、KOマウスでは明らかに含有されるメラニン色素の量が少なかった (図1B)。そこで毛を回収し、抽出液中に含まれるメラニン色素の量を吸光度

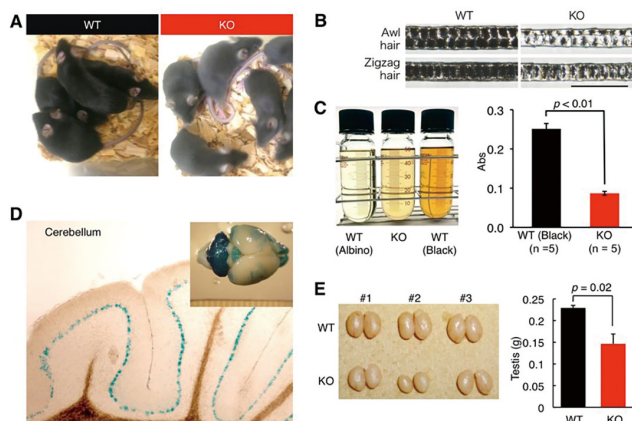


図1 *eCs* 欠損マウスにおけるメラニン色素形成異常および生殖能低下

A, 色素形成異常. B, マウス体毛のメラニン色素沈着. C, 毛から抽出したメラニン色素含量の定量化. D, 小脳での *eCs* の発現 (LacZ 染色). E, 精巣重量の低下. WT, 野生型マウス; KO, *eCs* 欠損マウス.

で測定したところ、有意な差が認められた (図 1C, D)。また、*eCs* 遺伝子を欠損させた領域には  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*LacZ*) 遺伝子を挿入していたため、*LacZ* 染色によって *eCs* 遺伝子の発現領域を調べたところ、小脳の特定の神経細胞層に *eCS* の発現が認められた (図 1D)。

一方、精巣にも発現が認められ、さらに精巣の重量が KO マウスでは有意に低下していることもわかった (図 1E)。メラニン色素の量が低下した原因として、(1)メラニン色素の合成量の低下、(2)メラノサイトの細胞数の低下、が推測された。そこでこれらの点について検討を行ったところ、メラノサイトの細胞数が KO マウスでは有意に低下していることが明らかになった (図 2A, B)。

続いて、*eCS* が関与するメラニン色素の産生過程を明らかにすることを試みた<sup>5)</sup>。メラニン産生にはメラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) を介したシグナル伝達系によってチロシンがドーパミンに変換され、さらに、2種類のメラニン色素 (フェオメラニンおよびユーメラニン) がチロシナーゼ関連タンパク質 (Tyrosinase-related protein-1, -2, 以下 TRP1, 2) によって生成される。そこでまずメラノサイトにおける *eCS* の発現の有無と、メラノサイトにおける TRP1, 2 の発現量を比較した。

マウスの背側の皮膚から凍結切片を作製して抗 *eCS* 抗体で免疫染色したところ、*eCS* はメラノサイトが存在する毛包の基部ではなく、毛幹に沿って存在する上皮細胞層に広く発現していることがわかった (図 3A, B)。この領域はバルジ領域に存在する幹細胞がメラノサイトへと分化する過程で通過する領域である。さらに KO マウスの凍結切片について TRP1, 2 に対する抗体で免疫染色を行ったところ (図 3C)、TRP1 について KO マウスでは有意に発現が低下しており、TRP2 についても低下する傾向が認められた (図 3D)。一方、KO マウスに対して飲用水に混ぜることで  $\alpha$ -MSH を投与したものの、KO マウスの毛に含まれるメラニン色素の蓄積量を増やすことはできなかった (図 4A)。さらに、チロシンについても同様の方法で KO マウスに投与したものの、KO マウスの毛に含まれるメラニン色素の蓄積量には影響を与えなかった (図 4B)。

次に、図 2C の模式図でチロシナーゼの活性を制御するサイクリック AMP (cAMP) によって KO マウスから単離したメラノサイトを処理したところ、メラニン色素の産生量が上昇することがわかった。すなわち、毛幹の上皮細胞層から分泌される cAMP が幹細胞からメラノサイトへの分化を制御していることが推測された。さらに、*eCS* は cAMP の毛幹の上皮細胞層における産生および分泌に重要な役割を果たしていることが考えられた。

### 3. 2. *eCS* による雄の生殖能力の制御

図 1 E に示したように *eCS* は雄の生殖能力にも関与して

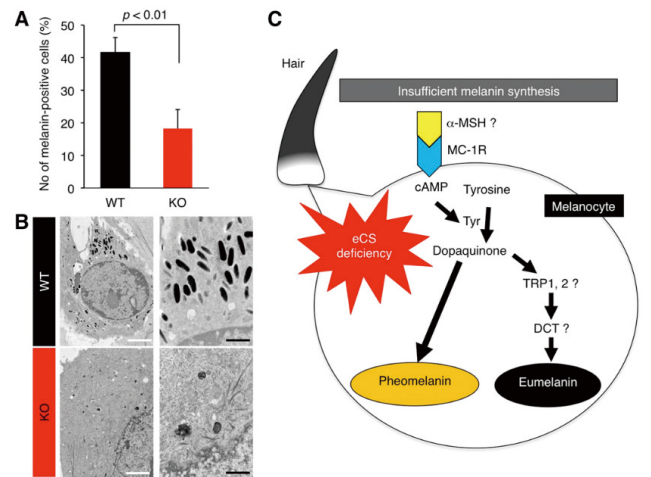


図 2 *eCs* 欠損マウスにおけるメラノサイト数の低下  
A, メラノサイト数の低下. B, メラノサイトの透過型電子顕微鏡画像. C, メラノサイトにおけるメラニン色素形成と *eCS* の役割の模式図. WT, 野生型マウス; KO, *eCs* 欠損マウス.

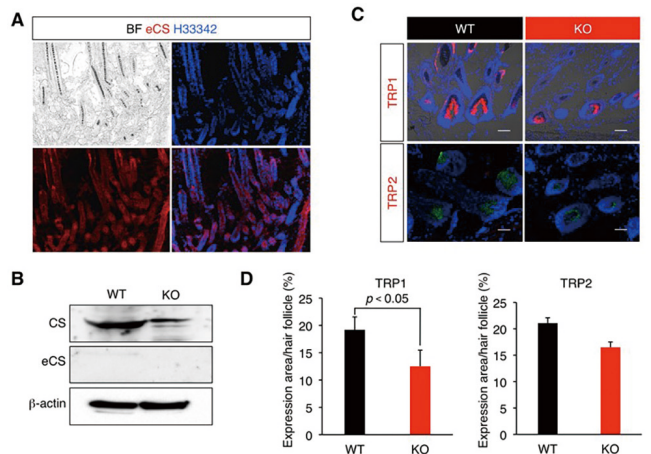


図 3 *eCS* 発現部位およびメラニン色素生成への関与  
A, *eCS* 発現組織. Red, *eCS*; blue, ヘキスト 33342. B, ウェスタンブロット解析. C, メラノサイトにおける TRP1, 2 の発現. D, メラノサイトにおける TRP1, 2 の発現. WT, 野生型マウス; KO, *eCs* 欠損マウス.

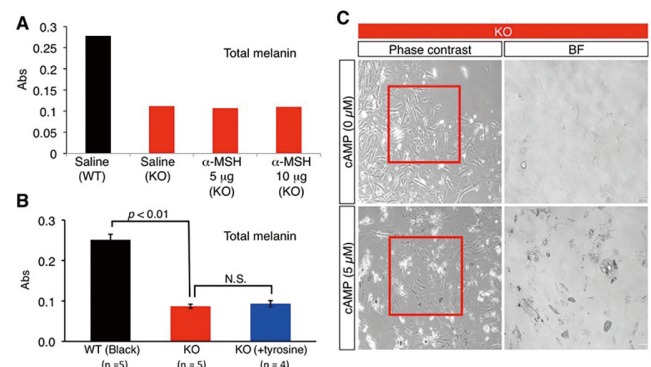


図 4 *eCs* 欠損マウスのメラノサイトへの薬剤投与の効果  
A, 飲料水による  $\alpha$ -MSH 投与の効果. B, 飲料水によるチロシン投与の効果. C, メラノサイトへの直接投与による cAMP の効果. WT, 野生型マウス; KO, *eCs* 欠損マウス.

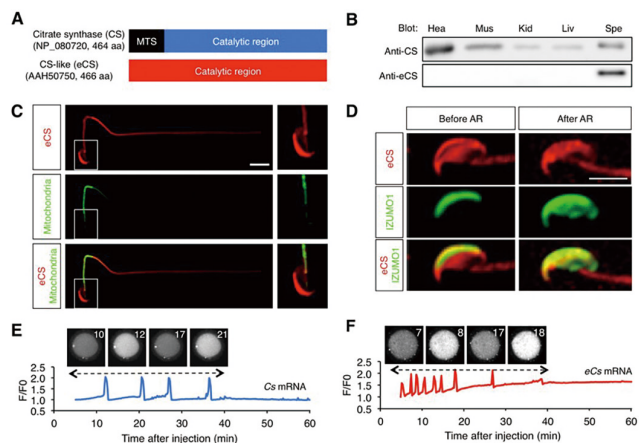


図5 精子におけるeCSの役割

A, CSおよびeCSタンパク質のドメイン比較. B, CSおよびeCSの組織での発現. C, 精子でのeCSの発現部位. D, 先体反応前後での精子頭部におけるeCSの発現. E, マウス未受精卵へのCs mRNAインジェクション後のカルシウムオシレーション. F, マウス未受精卵のeCs mRNAインジェクション後のカルシウムオシレーション.

いる可能性が考えられた。そこで、eCSタンパク質の発現を調べたところ、精子で発現していることがわかった(図5A, B)。さらに野生型精子を抗eCS抗体によって免疫染色したところ、精子頭部に発現量が多いことがわかり、明らかにミトコンドリアの局在とは異なっていた(図5C)。eCSが受精に関与する可能性が考えられたが、精子外膜は卵との融合前に脱落するため、eCSが精子外膜の脱落后に精子頭部に存在するか否かによって関与するステップが異なってくる。そこで、精子外膜の脱落后でのeCSの局在を調べたところ、eCSは精子外膜の脱落后でも精子頭部に留まることがわかった(図5D)。加えて、イモリではCSが受精後の細胞周期の再開(卵活性化)を誘導することが報告されていることから<sup>6)</sup>、CSおよびeCSをコードするメッセンジャーRNA(mRNA)を野生型の未受精卵にマイクロインジェクションしたところ、どちらのmRNAでも卵活性化に必要なカルシウム波(カルシウムオシレーション)を誘導することが明らかになった(図5E, F)。同様に、メラノサイトにおいてもカルシウムオシレーションが起こること、さらにKOマウスのメラノサイトにおいては頻度が極めて少なくなることがわかった。

一般的に、精子による卵活性化はホスホリパーゼCzeta(PLCz1)によって誘導されることが知られている<sup>7)</sup>。そこで、KOマウスから採取した精子におけるPLCz1の発現を調べたところ、野生型精子と同程度のPLCz1の発現が確認された(図6A)。また、KOマウス由来精子ではCS活性が低下していることがわかった(図6B)。

次にKO精子を用いて体外受精を行ったところ、有意差は認められなかったものの、交配による産仔数は生後6ヶ月(人間では30歳に相当)の雄ではほぼゼロになることが

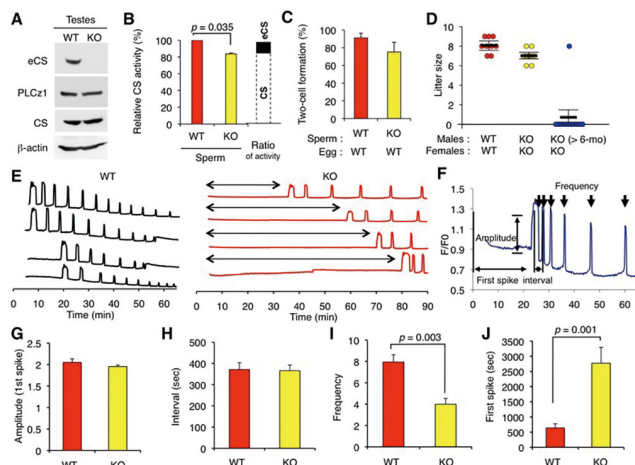


図6 精子におけるeCSの役割

A, ウェスタンブロット解析. PLCz1の発現. B, クエン酸合成活性(WT v.s. KO). C, 体外受精. D, 交配による産仔数. E, カルシウムオシレーション(WT v.s. KO). F, カルシウムオシレーション評価のパラメータ. G, 波形の高さ. H, 間隔. I, 頻度. J, 開始の時間. WT, 野生型マウス; KO, eCs欠損マウス.

わかった(図6D)。さらに体外受精によって融合したKO精子による卵でのカルシウムオシレーションのパターンを調べたところ、開始が極めて遅くなることがわかった。図5Fの結果と合わせて考えると、eCSは卵活性化因子として融合直後から40分までのカルシウムオシレーションを誘導する因子であると推測された。すなわち、卵活性化には2つの因子が関わっており、前半(開始)と後半(持続)で役割を分担している可能性が考えられた。

#### 4. 考察

本研究ではeCSが「メラノサイトによるメラニン色素の生成」および「男性の生殖機能」の両方に必須であることを初めて明らかにした(図7A, B)。さらに、cAMPの塗布によってメラノサイトのメラニン合成系が活性化されることも新しい発見である。本研究の成果は、脱色やカラーリングといった方法ではなく、cAMPとcAMPの競合阻害物質(アンタゴニスト)を用いて、メラノサイトにおけるメラニン色素産生能を可逆的に制御する方法の開発につながる。投与方法については現在検討中であり、近い将来には皮膚への塗布によって簡便に物質をメラノサイトに導入することが可能になる。

メラノサイトはメラニン色素を産生して真皮に紫外線が届かないようにすることで、炎症反応から肌を守ってくれる細胞である。日焼け止めスプレーには物理的・化学的に肌を守るための紫外線保護成分が含まれているが、紫外線を吸収した際に生じる化学反応で、かえって肌にダメージを与えてしまい、かぶれ、湿疹、吹き出物につながってしまう場合があり、シミやシワを防ぐために日焼け止めを塗

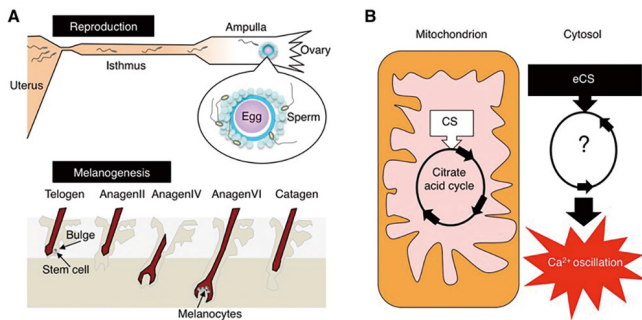


図7 eCsのメラニン色素形成および生殖における役割

A, 生殖および毛髪のリサイクルの模式図。B, 細胞におけるCSおよびeCSの役割分担。

布しているにも関わらず、別の症状で悩まされることになってしまう。一方、cAMPの塗布でメラノサイトが活性化され、メラニン色素が促進されれば、科学的にも根拠が明確であり、日焼け止めの代替法として有用である。

一方、eCSが男性の生殖機能に関与することは、イモリの研究から予想していたものの、精子でもCSが発現しているため、明確な結果が出ることは予想していなかった。ところが、年齢依存的に(人間では30歳からに相当)、KOマウスの産仔数が激減することから、男性の生殖機能におけるeCSの関与は予想よりも大きいと考えられる。また、女性の生殖機能にも、年齢依存的に(やはり人間の30歳からに相当)、KOマウスの産仔数が激減するといった結果も得られており、今後は男性・女性の両方向からの検討が必要である。

小脳におけるeCSの発現についてはまだ検討段階である。小脳も「うつ病」「自律神経失調症」との関連があることから今後検討する必要がある。一方、動物、植物、微生物に存在するホルモンとして知られるメラトニンは、概日リズムを司り、我々の睡眠を制御する物質であるが、メラトニンの分泌とメラニン色素生成、さらには生殖機能には深い関係があることが報告されている。また、我々の研究からも生殖系に異常を生じるマウスにおいて、神経系にも異常を示すことを報告している<sup>8, 9)</sup>。神経系、色素形成、生殖系が何らかのメカニズムによってつながっている可能性が考えられる。

## 5. 総括

本研究から、ミトコンドリア以外に存在するクエン酸合成酵素の重要性が明らかになった。クエン酸は、我々にとって容易に摂取できるものであるため、その生理作用については正確な知識が必要である。本研究から、クエン酸の

役割について科学的根拠が提示され、クエン酸合成酵素の新しい機能の解明につながると考えられる。この成果は、脱色や毛染めといった方法ではなく、ミトコンドリア外のクエン酸合成酵素の活性制御、またはcAMPの投与によって体全体のメラニン色素の量をコントロールできることを示している。すなわち、白髪といった毛色の変化に対して、毛染めではなく、cAMPの塗布によって自然な黒色に戻すことができるかもしれない。皮膚の老化や、小脳の機能へのeCSの関与についても今後検討する必要がある。

## (引用文献)

- 1) Vander Heiden, M. G. & DeBerardinis, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **168** (4), 657-669 (2017).
- 2) Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324** (5930), 1029-33 (2009).
- 3) Fiume, M. M. *et al.* Safety Assessment of Citric Acid, Inorganic Citrate Salts, and Alkyl Citrate Esters as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol* **33** (2 suppl), 16S-46S (2014).
- 4) Huang, Y. C. *et al.* Disruption of the peroxisomal citrate synthase CshA affects cell growth and multicellular development in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Microbiol* **53** (1), 81-91 (2004).
- 5) Steingrimsson, E., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Melanocyte stem cell maintenance and hair graying. *Cell* **121** (1), 9-12 (2005).
- 6) Harada, Y., Kawazoe, M., Eto, Y., Ueno, S. & Iwao, Y. The Ca<sup>2+</sup> increase by the sperm factor in physiologically polyspermic newt fertilization: its signaling mechanism in egg cytoplasm and the species-specificity. *Dev Biol* **351** (2), 266-276 (2011).
- 7) Sanders, J. R. & Swann, K. Molecular triggers of egg activation at fertilization in mammals. *Reproduction* **152** (2), R41-50 (2016).
- 8) Miyado, K. *et al.* Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287** (5451), 321-324 (2000).
- 9) Ishibashi, T. *et al.* Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *J Neurosci* **24** (1), 96-102 (2004).

# アレルギー性皮膚炎に対するナノ粒子化ヘパリンの抑制効果

京都大学大学院薬学研究科

山下 富義

Allergic contact dermatitis is a delayed hypersensitivity reaction triggered by contact with particular substances or haptens. Molecular mechanisms of the inflammatory disorder are yet to be well established, but in recent years have been suggested to involve activation of natural immunity via Toll-like receptors (TLRs) or Nod-like receptors (NLRs). We have previously developed a glycol-split heparin-sphingosine conjugate and found that it forms self-assembling nano-sized micelles and exhibits an anti-inflammatory effect associated with down-regulation of TLR4 signaling pathway. The present study was initiated to apply self-assembling heparin derivatives to treatment and prevention of contact dermatitis disorders. Firstly, we synthesized the derivatives of glycosaminoglycans (heparins, chondroitin sulfates, and hyaluronic acids), and found that glycol-split low-molecular-weight heparin-stearylamine conjugate (gs-LHST) was the greatest inhibitory effect against lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  production in primary cultured murine peritoneal macrophages. Then, we prepared polyethylene glycol ointment containing nano-dispersed gs-LHST, and applied it to a dinitrofluorobenzene (DNFB)-sensitized mouse contact dermatitis model. DNFB-induced ear thickening was significantly suppressed when gs-LHST-containing ointment was applied 2 hours prior to every DNFB sensitization. The anti-inflammatory effect of gs-LHST-containing ointment was comparable to that of prednisolone-containing ointment. However, the effect of gs-LHST-containing ointment was not observed in the genetically TLR4-mutated strain C3H/HeJ, suggesting that blockade of TLR4 signaling pathways by gs-LHST might be attributed to suppression of DNFB-induced ear thickening. Real-time polymerase chain reaction (PCR) analyses indicated that gs-LHST-containing ointment can reduce elevated mRNA expression levels of anti-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and oxidative stress-responsive gene (HO-1). These results suggested that gs-LHST might be effective to inhibit cyclic inflammatory chain reactions involving TLR4 and reactive oxygen species.

## 1. 緒言

接触性皮膚炎は種々の化学物質や金属などのハプテンにより引き起こされる遅延型のアレルギーである<sup>1)</sup>。その症状は丘疹や発赤など外見の変化を伴うため、患者のQuality of Life (QOL)を大きく損なうことも少なくない。接触性皮膚炎が発症する詳細なメカニズムは依然不明であるが、その一部でToll様受容体 (TLR) やNod様受容体 (NLR)などを介した自然免疫の活性化と、それに伴う炎症反応の関与が近年の研究から示唆されている<sup>1-4)</sup>。これまでに、TLR4リガンドであるLPSや熱ショックタンパク質により接触性皮膚炎が増悪することや<sup>5,6)</sup>、接触性皮膚炎を引き起こす代表的な金属であるニッケルがヒトのTLR4を直接刺激することが報告されてきた<sup>7)</sup>。また、TLRの刺激で産生されるTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインが角化細胞の増殖やT細胞の浸潤に関与することも示されている<sup>8)</sup>。

我々はこれまでに、ヘパリンのウロン酸部位を開環した低抗凝固作用ヘパリンにD-エリスロスフィンゴシンを縮

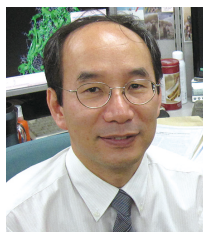
合させたヘパリン誘導体が、水溶液中でナノミセル粒子を形成するとともに、LPS活性化マクロファージからの炎症性サイトカインの産生を強力に阻害することを明らかにした<sup>9,10)</sup>。さらに、本ヘパリンナノ粒子は、マクロファージをLPSで刺激した後のIRAK-1のリン酸化やIkB $\alpha$ の分解およびNF $\kappa$ Bの核内への移行を抑制したことから、TLR4シグナル伝達経路を抑制することが示唆されている<sup>9)</sup>。

そこで、本研究では、ヘパリンナノ粒子の接触性皮膚炎治療への応用を最終的な目的として、次に示す実験を行った。まず、種々のグリコサミノグリカンがヘパリンと同様に抗炎症作用を有する点に着目し<sup>11,12)</sup>、グリコサミノグリカンに脂肪族アミンを縮合させた結合体を合成し、高い抗炎症効果を持ったグリコサミノグリカンナノ粒子を創製した。次に、そのスクリーニングによって見出された低分子量ヘパリン(以下、LHP)由来ナノ粒子の皮膚疾患への応用を目的に軟膏剤を調製し、2,4-ジニトロフルオロベンゼン(DNFB)誘発接触性皮膚炎モデルに対する治療効果を検討した。以下、これらの研究成果について報告する。

## 2. 方法

### 2.1. グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の合成

各種グリコサミノグリカン1gを0.1M過ヨウ素酸ナトリウム溶液20mLに溶解し4°Cで72時間反応させた。未反応の過ヨウ素酸ナトリウムをグリセロールで分解、透析、凍結乾燥して得られた白色粉末を0.2M水素化ホウ素ナト



Suppressive effect of self-assembling nano-sized heparin on allergic dermatitis

Fumiyo Yamashita

Kyoto University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences

リウム溶液に溶解し、4°Cで72時間反応させた。反応液を蒸留水中で2日間透析した後凍結乾燥することで、各種グリコール開裂グリコサミノグリカンを得た。次に、この20mgをホルムアミド1.5mLに溶解し、EDC 10mgで活性化した後、ステアリルアミン5mgを添加し、25°Cで24時間反応させた。反応終了後、エタノール沈殿法により生成物を回収し、蒸留水中で2日間透析することにより精製し、凍結乾燥することによって、目的のグリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体を得た。

## 2. 2. グリコサミノグリカンナノ粒子の物性測定

各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体を0.01 mg/mLの濃度で蒸留水に溶解し、37°Cで5分間、42 KHzの超音波を照射することで微細化を行った。粒子径およびゼータ電位はMalvern社製ゼータサイザーナノZSを用いて測定した。各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の臨界ミセル濃度は、ピレンを用いた蛍光プローブ法<sup>13)</sup>により測定した。各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の水分散溶液を異なった濃度で調製し、ピレン溶液と混和した。ピレンの最終濃度は $7.5 \times 10^{-8}$  Mであった。混合液は12時間静置して平衡化し、励起波長339 nm、発光波長390 nmで蛍光測定を行った。

## 2. 3. LPS刺激マウス腹腔マクロファージに対する抗炎症効果の評価

5週齢のICR系雌性マウスに2.9%チオグリコレート培地を1 mL腹腔内投与し、4日後にRPMI1640培地5 mLを用いて腹腔マクロファージを採取した。採取された腹腔マクロファージは10% ウシ胎児血清を含有するRPMI1640培地に再懸濁した後、96 wellマイクロプレートに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>の条件で培養した。2時間後に培地交換して非接着細胞を取り除いた。24時間後培地をOptiMEMに交換し、異なる濃度の各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体を添加した後、LPSを最終濃度20 ng/mLで添加した。24時間培養後、上清中のTNF- $\alpha$ 量をmurine TNF- $\alpha$  ELISA Kitを用いて定量した。細胞毒性の評価はWST-1アッセイ法により評価した。

## 2. 4. グリコール開裂低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体含有水性軟膏の調製

グリコール開裂低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体 (gs-LHST) は、前述の方法により合成した。水性軟膏は、ポリエチレングリコール4000、ポリエチレングリコール400、および水を重量比4:4:1の割合で加熱混合した溶液にgs-LHSTを添加し、ホモジナイザーで攪拌しながら徐々に冷却することによって調製した。

## 2. 5. 接触性皮膚炎モデルマウスにおける抗炎症作用の評価

重量比4:1の割合で混合したアセトン-オリーブオイル混合液に、2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を0.5%の濃度で溶解した。6週齢のBALB/c系雌性マウス (一部の実験では、C3H/HeJ、C3H/HeNマウスを用いた) の腹部を除毛し、0日目および翌日に0.5% DNFB溶液25  $\mu$ Lを塗布した。5日目から3日間に渡って0.3% DNFB溶液10  $\mu$ Lをマウスの右耳介に塗布することで再感作し炎症を惹起させた。コントロール群として、DNFBを含まない溶液のみを塗布した。抗炎症実験では、0.3% DNFB溶液を耳介に適用する2時間前に、0.2%もしくは0.5%のgs-LHSTを含有するポリエチレングリコール水性軟膏10 mgを塗布した。ネガティブコントロールとしては薬物を含有しない軟膏基剤、ポジティブコントロールとしては0.5%プレドニゾロン軟膏を用いた。各軟膏の抗炎症作用は、0.3% DNFB溶液を適用24時間後の耳介厚をデジタルシックスゲージにより測定するとともに、最終日(8日目)に耳介を摘出し、各種炎症マーカー遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により測定することによって評価した。

## 3. 結果

### 3. 1. 各種グリコサミノグリカンナノ粒子の物性評価

未分画ヘパリン、低分子量ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸の4つのグリコサミノグリカンに対して、過ヨウ素酸化によるグリコール開裂を行い、ステアリルアミンとの結合体を合成した (以下、それぞれをgs-HPST、gs-LHST、gs-CSST、gs-HASTと称する)。各グリコサミノグリカン誘導体を分散して得られるナノ粒子の粒子径は100~150 nm程度、ゼータ電位は-20~-40 mVであり、臨界ミセル濃度も0.014-0.018 mg/mLと各誘導体間で大きな差は認められなかった。

### 3. 2. LPS刺激マウス腹腔マクロファージに対する抗炎症効果

LPS刺激時にマクロファージから産生されるTNF- $\alpha$ 量をELISA法により定量したところ、コンドロイチン硫酸を除いてグリコサミノグリカン存在下TNF- $\alpha$ 産生がわずかに減少した。グリコサミノグリカンをグリコール開裂するとTNF- $\alpha$ の産生抑制効果は完全に消失したが、ステアリルアミンと縮合させることによって、通常のグリコサミノグリカンに比べて強力にTNF- $\alpha$ の産生を抑制できるようになった。各グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体のTNF- $\alpha$ 産生抑制効果に関して用量依存性を評価し、IC<sub>50</sub>値を算出したところ、gs-LHSTで最も効果が高く(0.010 mg/mL)、次いでgs-HPST (0.018 mg/mL)、gs-CSST (0.033 mg/mL)、gs-HAST (0.113 mg/mL)の

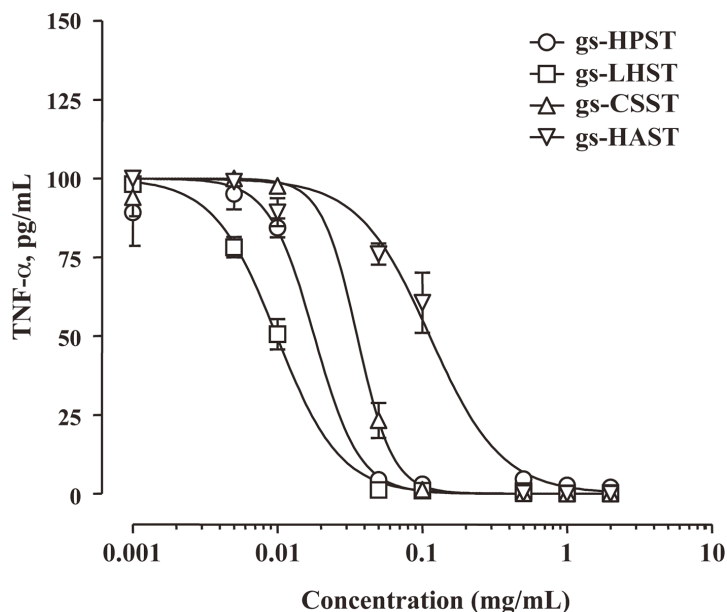


Figure 1 Concentration-dependent effect of glycol-split glycosaminoglycan (GAG)-stearylamine conjugates on TNF- $\alpha$  production from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse peritoneal macrophages.

順となった(Figure 1)。

### 3. 3. 各種 Toll 様受容体リガンド刺激によるサイトカイン産生に対する抑制効果

グリコサミノグリカン-ステアリアルアミン結合体の抗炎症効果がLPS特異的かどうかを確認するために、TLR2のリガンドである Pam2CSK4 と TLR3 のリガンドである Poly (I:C) を用いて、前項と同様の実験を行った。Pam2CSK4 の刺激に対しては、LPS の場合とは異なり、いずれのグリコサミノグリカン-ステアリアルアミン結合体も TNF- $\alpha$  産生抑制効果を示さなかった。一方、Poly (I:C) の刺激に対してはgs-HASTを除くすべてにおいて、LPSに比べ弱いもののTNF- $\alpha$ 産生が抑制される傾向にあった。ただし、Poly (I:C) の添加により細胞毒性が認められたことから、このTNF- $\alpha$ 産生抑制はPoly (I:C)の細胞傷害性と関連する可能性もあり、TLR3経路に対する効果については結論できなかった。

### 3. 4. DNFB 誘発接触性皮膚炎モデルにおける耳介肥厚抑制効果

先の検討において、低分子量ヘパリンの誘導体すなわちgs-LHSTからなるナノ粒子ミセルが最も強力な抗炎症作用を示すことが明らかになった。そこで、gs-LHSTを含有する水性軟膏を調製し、DNFB刺激により誘発されるマウス耳介肥厚に対する抑制効果を検討した(Figure 2)。DNFBを含まないアセトン：オリーブ油(4：1)溶液で再感作しても、マウスの耳介厚はほとんど変化しなかった

が、0.3% DNFB溶液で再感作すると経日的にマウス耳介の肥厚が生じた。一方、0.3% DNFB溶液で再感作する2時間前に0.2% gs-LHST軟膏を耳介部に塗布したマウスにおいては、0.5%プレドニゾロン軟膏と同程度に、耳介の肥厚が有意に軽減された。軟膏中のgs-LHST濃度を0.5%に増加させたところ、0.2%に比べやや増強傾向にあったが、有意な差は認められなかった(Figure 2)。

8日目にマウス耳介を摘出し、マウス耳介の組織学的評価を行った。DNFBで感作することによって、表皮・真皮の厚みが増し、細胞の浸潤が認められた。一方、0.2% gs-LHST含有軟膏を前投与した群では、0.5%プレドニゾロン軟膏塗布群と同様、DNFBによる組織学的異常が軽減されることが確認された(Figure 3)。

DNFB誘発接触性皮膚炎モデルにおけるgs-LHSTの治療的効果がTLR4を介するか否かを検討するために、TLR4遺伝子に変異のあるC3H/HeJマウスを用いて同様の検討を行った。その結果、C3H/HeJマウスでもDNFB感作による耳介肥厚は観察されたが、gs-LHSTによる抑制作用は認められなかったのに対し、野生型のTLR4が発現しているC3H/HeNマウスでは、BALB/cマウスの場合と同様、0.5% gs-LHST軟膏による耳介肥厚の抑制効果が認められた(Figure 4)。

### 3. 5. DNFB 誘発接触性皮膚炎モデルでの炎症性遺伝子マーカー発現に対する影響

炎症性サイトカインおよび酸化ストレスマーカー遺伝子の発現に対するgs-LHST含有軟膏塗布の影響について、リ

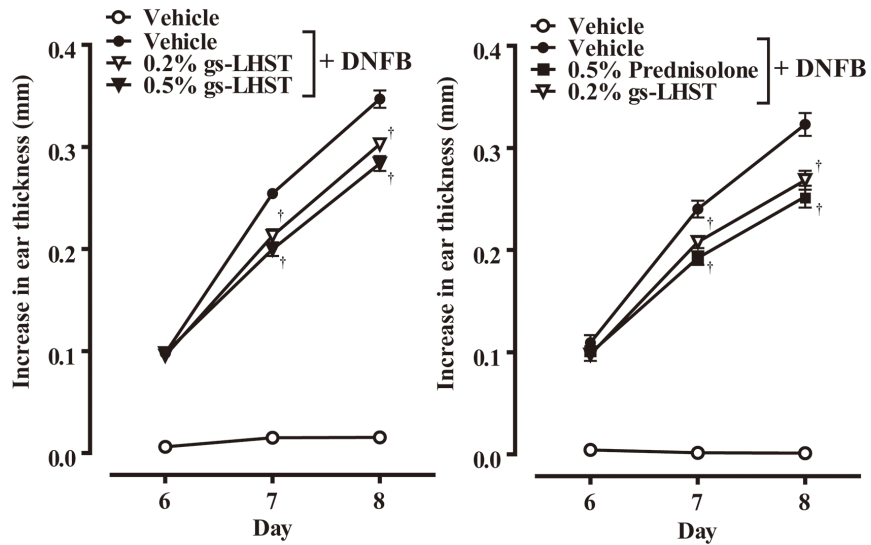


Figure 2 Inhibitory effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST)-containing ointment on 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced ear thickening in BALB/c mice.

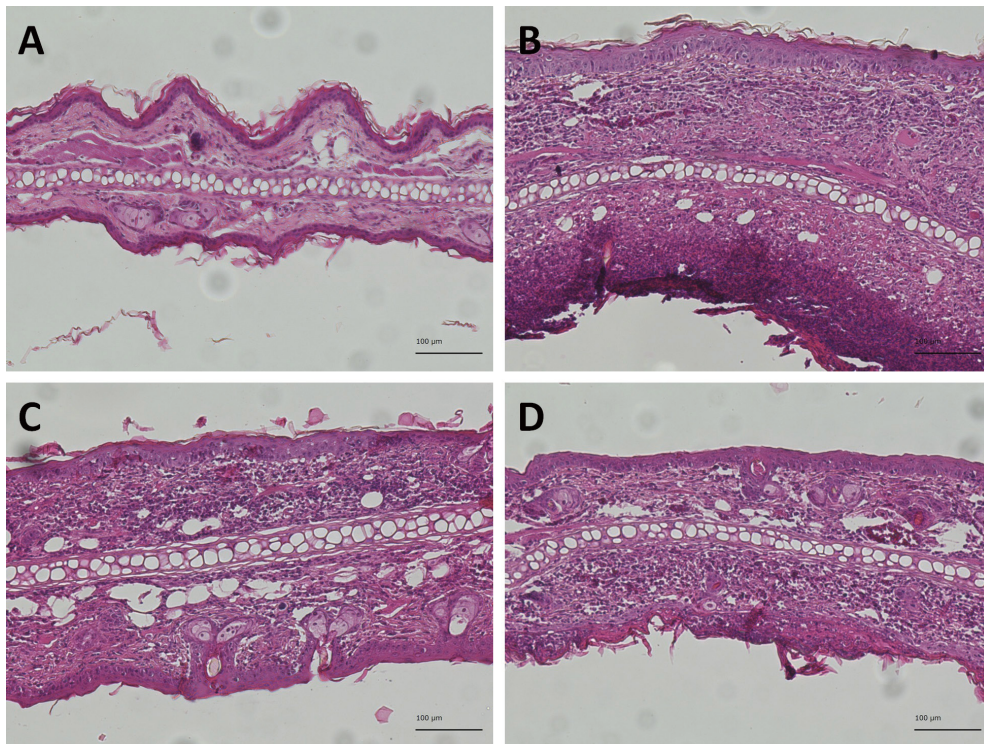


Figure 3 Histological assessment in a 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced mouse contact dermatitis model.

At 24 h post the last DNFB stimulation (day 8), mouse pinnae were excised and fixed with 10 % formalin neutral buffer solution and embedded in paraffin. Paraffin-embedded pinnae were sectioned at 5 $\mu$ m and stained with hematoxylin and eosin. (A) Non-treatment, (B) DNFB plus drug-free ointment base, (C) DNFB plus 0.5% prednisolone, and (D) DNFB plus 0.2% gs-LHST.

アルタイムPCR法によって検討した。DNFBの感作により上昇した炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ の発現はgs-LHST含有軟膏塗布によって有意に抑制されたの

に対し、IL-12の発現上昇に対しては影響が認められなかった (Figure 5)。また、接触性皮膚炎において、ハプテン刺激によって産生される活性酸素種が炎症を進行させるこ

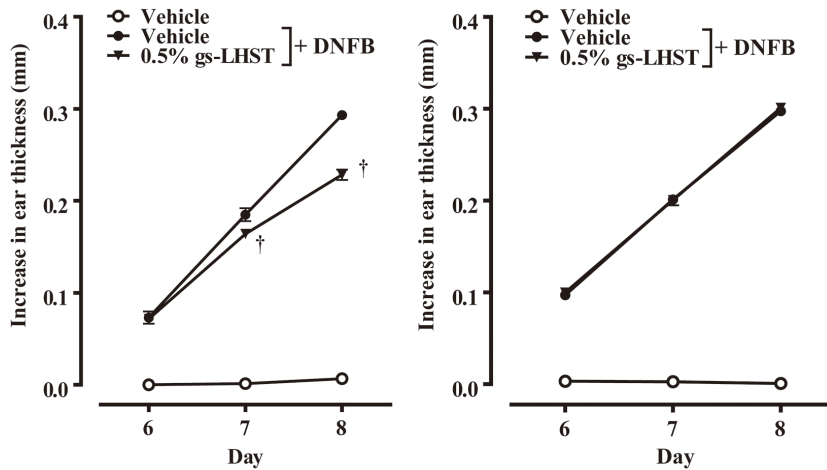


Figure 4 Inhibitory effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST)-containing ointment on 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced ear thickening in C3H/HeN (left) and C3H/HeJ (right) mice.

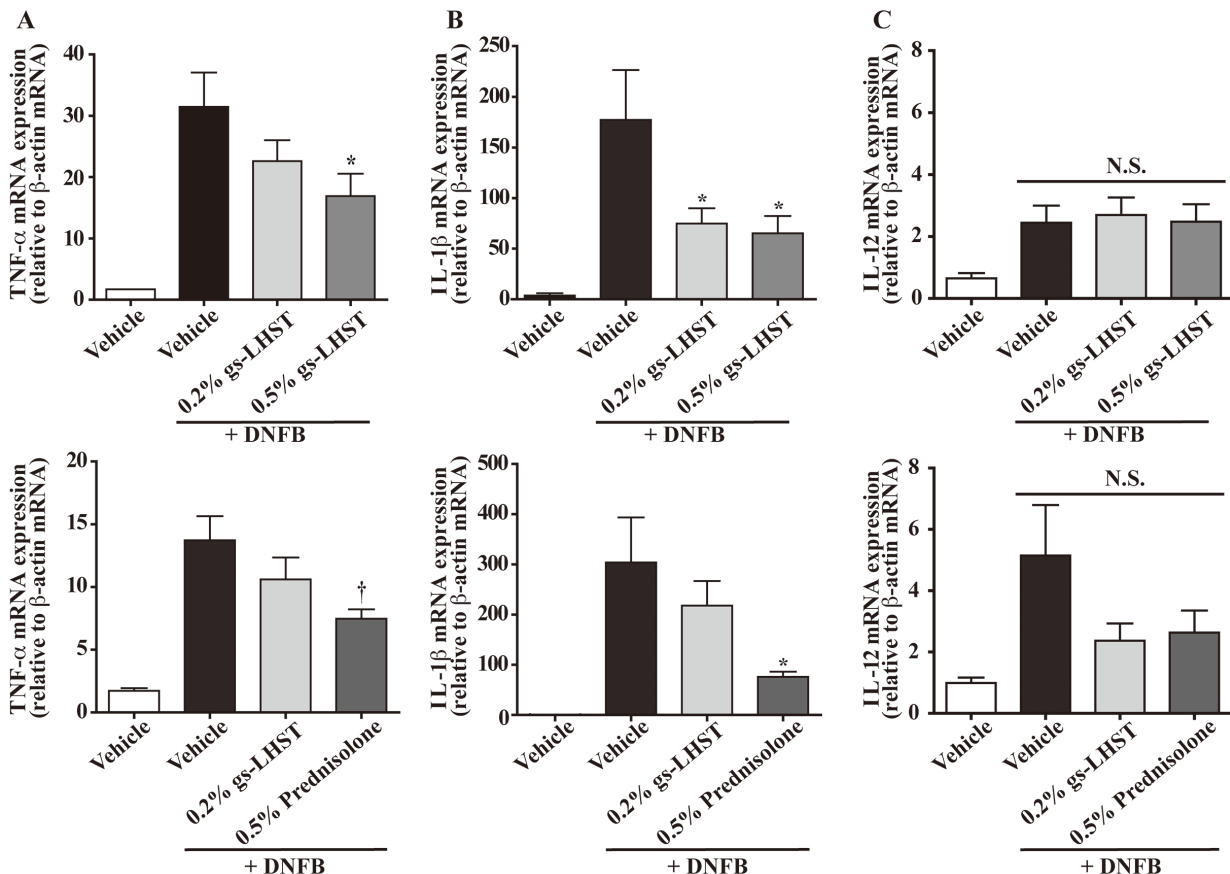


Figure 5 Effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) on (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , and (C) IL-12 mRNA expression in a 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced mouse contact dermatitis model.

Mouse pinnae were treated for three consecutive days with (upper) 0.2% or 0.5% gs-LHST ointment, (lower) 0.2% gs-LHST or 0.5% prednisolone ointment. The vehicle group was treated with the drug-free ointment base. After 2 h mouse pinnae were stimulated with solution containing 0.3% DNFB. At 24 h post the last stimulation with DNFB, mRNA was extracted from pinnae and analyzed by real-time PCR. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 7-8). \*P < 0.05. † P < 0.01.

とから<sup>1,4)</sup>、酸化ストレス応答性転写因子 Nrf-2 によって転写活性化されるヘム酸化酵素 (HO-1) および NAD (P) H キノン還元酵素 (NQO-1) の発現を測定したところ、gs-

LHST 含有軟膏塗布することによって軽微ではあるものの HO-1 の mRNA 発現が有意に減少した。

#### 4. 考 察

我々の過去の検討では、グリコール開裂ヘパリンにD-エリスロスフィンゴシンを結合させた誘導體で、LPS刺激マクロファージにおける抗炎症反応の抑制効果が観察された<sup>9, 10)</sup>。しかし、本研究においてD-エリスロスフィンゴシンをステアリルアミンに変更しても有効であり、より安価にヘパリンナノ粒子による抗炎症効果が期待できることが示された。また、多くのグリコサミノグリカンが抗炎症作用をもつということから<sup>14-16)</sup>、本研究では各種グリコサミノグリカンを用いて検討を行ったところ、脂肪族アミンの修飾によるナノ粒子化による抗炎症効果の増大は、ヘパリンに限らずコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸においても認められ、普遍性をもつことが明らかとなった。ただし、抗炎症効果の強さはグリコサミノグリカンの種類によって異なり、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸の順であった。その原因の一つとして、グリコサミノグリカンの硫酸化度の違いが考えられる。ヘパリンは高度に硫酸化されたグリコサミノグリカンであり2糖繰り返し構造あたり平均2~3分子硫酸化されている。これに対し、コンドロイチン硫酸はヘパリンに比べて硫酸化度が低く2糖繰り返し構造あたり平均0~2分子しか硫酸化されておらず、ヒアルロン酸では全く硫酸化されていない<sup>14)</sup>。グリコサミノグリカンの硫酸化度はタンパクとの相互作用に影響することが示されており、例えばTGF- $\beta$ に対する結合力はグリコサミノグリカンの硫酸化度が上昇するにつれて増大する<sup>17)</sup>。今回の検討でも、LPS刺激に対するTNF- $\alpha$ 産生抑制効果は、グリコサミノグリカンの硫酸化度とよく対応していた。また、我々の過去の研究では、ヘパリン骨格中の6位の硫酸基を脱硫酸化した際には抗炎症効果が減弱することを明らかにしている<sup>9)</sup>。6位の硫酸基を持たないヒアルロン酸においてTNF- $\alpha$ 産生抑制効果が著しく低かったのは極めて合理的な結果である。

接触性皮膚炎の惹起相では、ハプテンによる再感作によりT細胞や顆粒球の浸潤、角化細胞の増殖が起こり、ハプテンが接触した部位で肥厚が生じる<sup>8)</sup>。本研究では、グリコール開裂低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体gs-LHSTを含有するポリエチレングリコール水性軟膏を投与すると、DNFBで誘発される接触性皮膚炎による肥厚が有意に抑制された。しかし、TLR4遺伝子に変異のあるC3H/HeJマウスではDNFBによる耳介肥厚が起こるものの、gs-LHST含有軟膏の効果は観察されなかった。in vitroにおいてgs-LHSTの抗炎症反応抑制効果はLPSに特異的であり、他のTLRアゴニストでは認められないことを併せて考えると、DNFB誘発接触性皮膚炎に対する抗炎症効果はTLR4を介していることが示唆される。一般に、ハプテンによる接触性皮膚炎において活性酸素種が発生す

ることが知られており<sup>1, 4)</sup>、酸化ストレスにより熱ショックタンパク質や酸化脂質などのダメージ関連分子パターン(DAMPs)が産生され、DAMPsがTLR4を刺激し再び活性酸素種が産生するという炎症サイクルが提唱されている<sup>4, 18)</sup>。本研究においてもDNFB処理によって酸化ストレスマーカー遺伝子であるHO-1やNQO-1の発現上昇が認められており、活性酸素種の産生が起こっていることは確実である。gs-LHST含有軟膏を投与した際には、NQO-1では無効であったものの、代表的な酸化ストレス因子であるHO-1のmRNA発現は有意に抑制されており、gs-LHSTによるTLR4シグナル経路の抑制が酸化ストレスを介した炎症サイクルの活性化抑制に関与している可能性が示唆された。

#### 5. 総 括

本研究では、各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体を合成し、グリコール開裂低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体gs-LHSTがLPSによる炎症反応の抑制に最も有効であることを明らかにした。さらに、DNFB誘発接触性皮膚炎モデルに対して、gs-LHST含有水性軟膏を適用したところ、マウス耳介の肥厚および炎症性サイトカインや酸化ストレスマーカー遺伝子の発現を有意に抑制することを見出した。その効果にはgs-LHSTによるTLR4シグナル経路の遮断が一部関与することが示唆された。これらの結果は、ハプテンによる接触性皮膚炎に対する治療や予防に有用な知見を提供するものと期待される。

#### (引用文献)

- 1) Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., Gaspari, A. A., Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.*, **12**, 114-124 (2012).
- 2) Ptak, W., Bryniarski, K., Ptak, M., Majewska, M., Gamian, A., Lobo, F. M., Szczepanik, M., Toll-like receptor ligands reverse suppression of contact hypersensitivity reactions induced by epicutaneous immunization with protein antigen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **139**, 188-200 (2006).
- 3) Nakamura, N., Tamagawa-Mineoka, R., Ueta, M., Kinoshita, S., Katoh, N., Toll-like receptor 3 increases allergic and irritant contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, **135**, 411-417 (2015).
- 4) Martin, S., Esser, P., Weber, F., Jakob, T., Freudenberg, M., Schmidt, M., Goebeler, M., Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy*, **66**, 1152-1163 (2011).
- 5) Yusuf, N., Nasti, T. H., Huang, C. M., Huber, B.

- S., Jaleel, T., Lin, H. Y., Xu, H., Elmets, C. A., Heat shock proteins HSP27 and HSP70 are present in the skin and are important mediators of allergic contact hypersensitivity. *J. Immunol.*, **182**, 675-683 (2009).
- 6) Yokoi, S., Niizeki, H., Iida, H., Asada, H., Miyagawa, S., Adjuvant effect of lipopolysaccharide on the induction of contact hypersensitivity to haptens in mice. *J. Dermatol. Sci.*, **53**, 120-128 (2009).
- 7) Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P. J., Galanos, C., Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat. Immunol.*, **11**, 814-819 (2010).
- 8) Grabbe, S., Schwarz, T., Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today*, **19**, 37-44 (1998).
- 9) Babazada, H., Yamashita, F., Yanamoto, S., Hashida, M., Self-assembling lipid modified glycol-split heparin nanoparticles suppress lipopolysaccharide-induced inflammation through TLR4-NF- $\kappa$ B signaling. *J. Controlled Release*, **194**, 332-340 (2014).
- 10) Babazada, H., Yamashita, F., Hashida, M., Suppression of experimental arthritis with self-assembling glycol-split heparin nanoparticles via inhibition of TLR4-NF- $\kappa$ B signaling. *J. Controlled Release*, **194**, 295-300 (2014).
- 11) Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Traina, P., Samà, D., Calatroni, A., Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *J. Cell. Biochem.*, **106**, 83-92 (2009).
- 12) Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Traina, P., D'Ascola, A., Calatroni, A., Glycosaminoglycans reduced inflammatory response by modulating toll-like receptor-4 in LPS-stimulated chondrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **491**, 7-15 (2009).
- 13) Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolivar, J., Ruiz, C. C., On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method. *J. Colloid Interface Sci.*, **258**, 116-122 (2003).
- 14) Page, C., Heparin and related drugs: Beyond anticoagulant activity. *ISRN pharmacology*, **2013**, 910743, (2013).
- 15) Mazieres, B., Combe, B., Phan Van, A., Tondut, J., Grynfeltt, M., Chondroitin sulfate in osteoarthritis of the knee: a prospective, double blind, placebo controlled multicenter clinical study. *J. Rheumatol.*, **28**, 173-181 (2001).
- 16) King, S. R., Hickerson, W. L., Proctor, K. G., Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery*, **109**, 76-84 (1991).
- 17) Hintze, V., Miron, A., Moeller, S., Schnabelrauch, M., Wiesmann, H., Worch, H., Scharnweber, D., Sulfated hyaluronan and chondroitin sulfate derivatives interact differently with human transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). *Acta Biomaterialia*, **8**, 2144-2152 (2012).
- 18) Lucas, K., Maes, M., Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol. Neurobiol.*, **48**, 190-204 (2013).

### Ⅲ. 精神、文化に関する分野

# 顔面加齢の評価のための画像解析手法の開発： 主観的感覚的評価から客観的定量的評価へ

国際医療福祉大学三田病院放射線診断センター

奥田 逸子

Facial aging is caused not only by age-related changes in the skin, but also by changes in muscles, subcutaneous soft tissues, and adipose tissues. Gravitational effects also affect to the aging appearance. CT and MRI allow the depiction of the state of those facial structures. We focused on the gravity and evaluated the gravitational effect to the facial appearance. Our diagnostic imaging analysis based on the degree of sagging can be used as an objective evaluation of the state of the face and is useful to the elucidation of the mechanism for facial aging process. Furthermore, it will contribute to the development of the facial anti-aging prostheses and the technical application to the police scientific criminal investigation.

## 1. 緒言

抗加齢(アンチエイジング)や美容への関心は、高齢化社会になるにつれてますます高まっている。そのための美容施術の発展・発達は多くの精神的満足をもたらすと同時にその効果に対する期待値も高まっている。現在のところ顔面加齢の評価は、容貌の衰え、皮膚のたるみ、あるいは、口角の下垂など、主に視覚的かつ主観的な評価などでしばしば行われている。顔面加齢に対する客観的な評価法は確立しておらず、抗加齢・美容医学のエビデンスは十分とはいえない状況である。

今日の高度に発展した多列CT装置である Multidetector-row CT (MDCT) ならびに高磁場の 3.0-T Magnetic resonance imaging (MRI) 装置の普及と画像解析技術の進歩によって、高精度で詳細な三次元画像を容易に作成することが可能となり、疾患の診断だけでなく、体表や体内の状態を立体的に確認することが可能となった<sup>1-3)</sup>。我々は、これらの高度に進んだ画像診断法を抗加齢・美容医学と結びつけ、顔面加齢の客観的評価法の確立を試みた。CT・MRIの画像データは多くの解剖学的情報を含んでおり、3次元画像を構築することで、若さや老いの容貌を立体的、かつ、リアルに捉えることが可能である(図1)。さらに、断面表示することで、容貌と内部の解剖学的関係を描出することができる。そこで、重力荷重が中顔面に及ぼす影響に着目し、たるみによる容貌変化の要因を画像解剖学的に評価した。

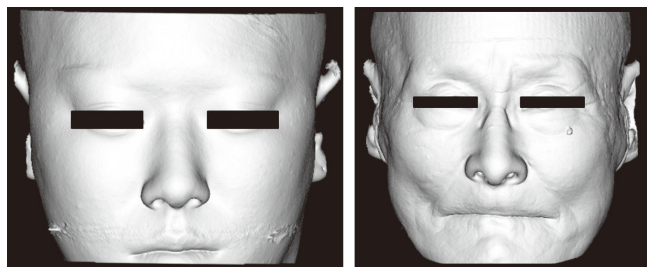


図1 三次元CT画像：若年者と高齢者の容貌  
左：20歳代、右：70歳代

CT画像データは多くの解剖学的情報を含んでおり、3次元画像を構築することで、若さや老いの容貌を立体的、かつ、リアルに描出することができる。右では目袋、ゴルゴライン、頬の下垂、鼻唇溝(ほうれい線)やマリオネットラインの深化などの加齢性変化が明瞭に描出されている。

## 2. 対象および方法

本研究は国際医療福祉大学三田病院の臨床試験審査委員会(Institutional Review Board : IRB)にて承認を受け施行した。顔面加齢の大きな要因の一つである重力による頬の下垂に着目し、本研究をデザインした。

### 2.1. 対象

対象は20歳以上の成人である。以下の被検者は除外した。

- i. 顔面の表在性構造に影響を及ぼす外傷性変化がある被検者
- ii. 妊娠および妊娠の可能性のある被検者
- iii. 閉所恐怖症を有する被検者

選定基準に基づき、14症例の被検者を登録した。その内訳は男性6名、女性8名で、平均年齢は $41.9 \pm 7.1$ 歳であった。

### 2.2. 使用機器および撮像法

多列CT装置(Aquilion ONEまたはAquillion64, キヤノンメディカルシステムズ株式会社製, 日本)を使用し、顔面を中心に撮像した。撮像条件は管電圧120kVp、管電流



Development of the imaging analysis method for the facial aging: Establish of the objective evaluation method

Itsuko Okuda, MD, PhD

Department of Diagnostic Radiology, International University of Health and Welfare, Mita Hospital

150-200mA、撮像スライス厚 0.5mm、関心領域 (Field of view: FOV) は 18-20cm である。最初に仰臥位 (体位 A) にて顔面を撮像した。次に顔面に重力を荷重し、たるみを顕在化するように体位を変換 (体位 B) し撮像した。得られた画像データは Digital Imaging and COmmunication in Medicine (DICOM) 規格にて画像保存した。

### 2.3. 画像解析法

DICOM 画像を画像解析ソフトウェア (ZioCube, ザイオソフト株式会社, 東京) がインストールされた専用パソコンに転送し、画像の解析を行った。3次元画像を作成するとともに、以下の項目について解析した。合わせて、それらの結果と年齢との関係を分析した。

#### a. 重力荷重による容貌変化

重力荷重前の体位 A で撮像した 3次元画像の容貌と重力荷重を行った体位 B で撮像した 3次元画像の容貌を比較し、見た目のエイジングレベルの変化を観察した。

- ・ 顕著に増加 (markedly increased : MI)
- ・ 軽度増加 (slightly increased : SI)
- ・ 変化なし (not changed : NC)
- ・ 減少 (decreased : D)

#### b. 頬骨部脂肪体の頂部 (Malar top) の移動方向と移動距離 (図 2)

体位 A において、頬が最も高い部位を Malar top とし基準 A を設定した。次に、体位 B における Malar top を基準 B とし設定した。このとき、基準 A および B を正確に決定

するために、正面像および側面像の 3次元画像を作成し、頬の最も高い点を検出した。重力荷重による基準点の移動方向を観察し、基準点 A-基準点 B の移動距離を計測した。距離の計測は水平方向と垂直方向の計測も行った。さらに、基準点の移動距離と年齢との相関を評価した。

#### c. 頬骨部脂肪体の厚み (Malar mount) の変化 (図 3)

基準 B のレベルの横断像を参照し、基準 B と同じレベルの体位 A の横断像を選択し、基準 A' とした。上顎骨前縁と皮膚表面の距離を Malar mount と定義し、基準 A' と基準 B の横断像にて Malar mount の厚みを計測した。厚みの変化と年齢との相関を評価した。

## 3. 結果

### 3-a. 重力荷重による容貌変化

体位 A と体位 B の 3次元画像で認める容貌を比較した結果、MI 11 例、SI 3 例、NC 0 例、D 0 例であった。変化の程度に個人差があったが、14 例の全例で容貌変化を認めた。重力荷重によって、見た目のエイジングレベルが上昇していた。MI の平均年齢は 46.0 歳、SI の平均年齢は 26.0 歳であった。すなわち、若年者は重力荷重を行っても容貌変化は少ないが、年配者では重力の影響による容貌変化が顕著であった。

### 3-b. Malar Top の移動方向と移動距離 (図 4)

重力荷重による Malar top の変化として、基準点 A に対し基準点 B は 14 例全例で内尾側に移動することが確認さ

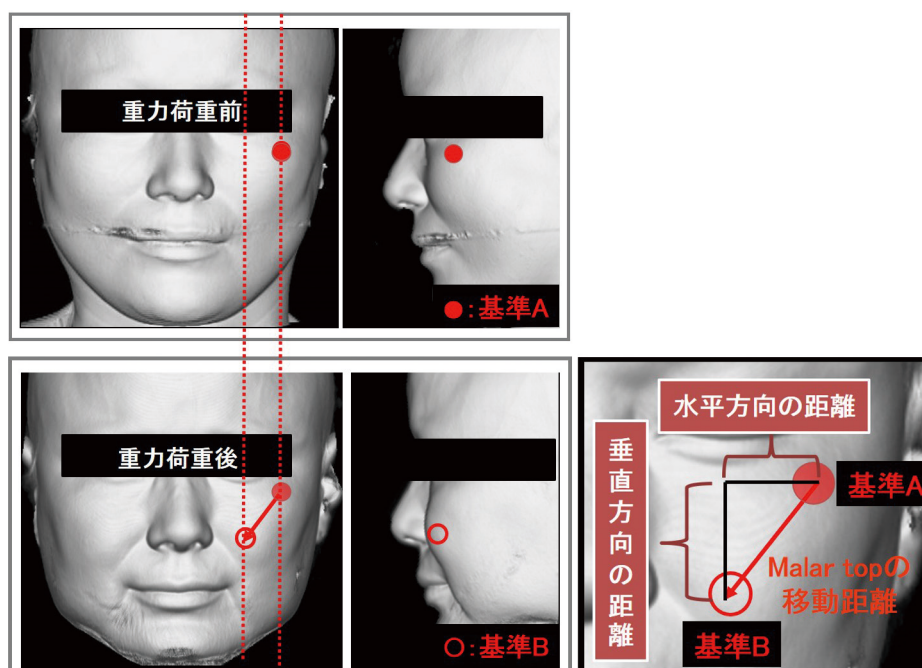


図 2 Malar top の移動方向と移動距離の計測法

顔面の正面像と側面像の 3次元画像を作成し、頬の最も高い位置を検出し、基準点である Malar top を決定した。重力荷重前の基準点 A と重力荷重後の基準点 B の距離を計測するとともに、水平方向と垂直方向を計測した。

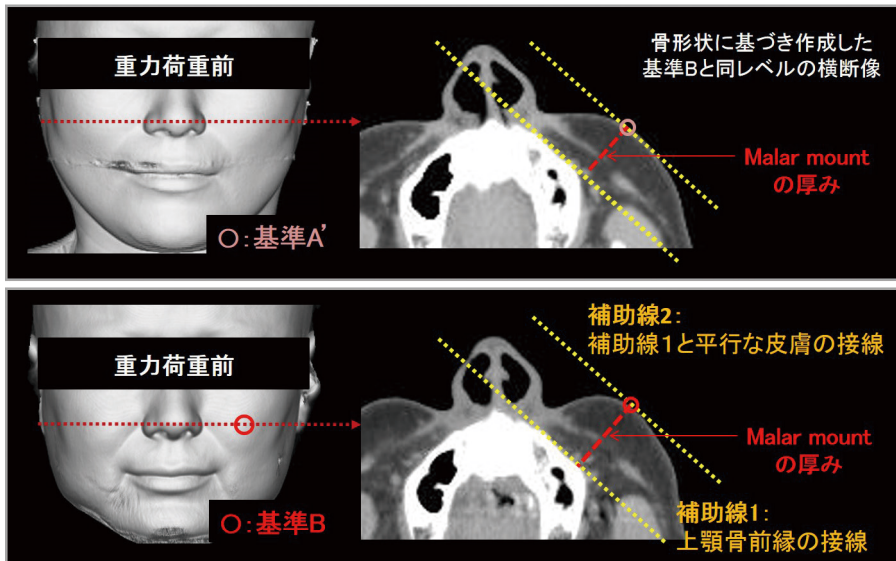


図3 Malar mountの変化の計測法

重力荷重によって軟部の形状が変化しているが、顔面骨の形状が同じであることから同一レベルであることが分かる。基準Bと同一レベルの体位Aの横断像の頬頂部を基準A'とした。上顎骨前縁に接する補助線1を引き、それと平行な皮膚の接線を補助線2とした。補助線1と補助線2の間に垂線を引き、補助線1-補助線2の距離をMalar mountと定義した。基準A'と基準Bの横断像にてMalar mountの厚みを計測した。

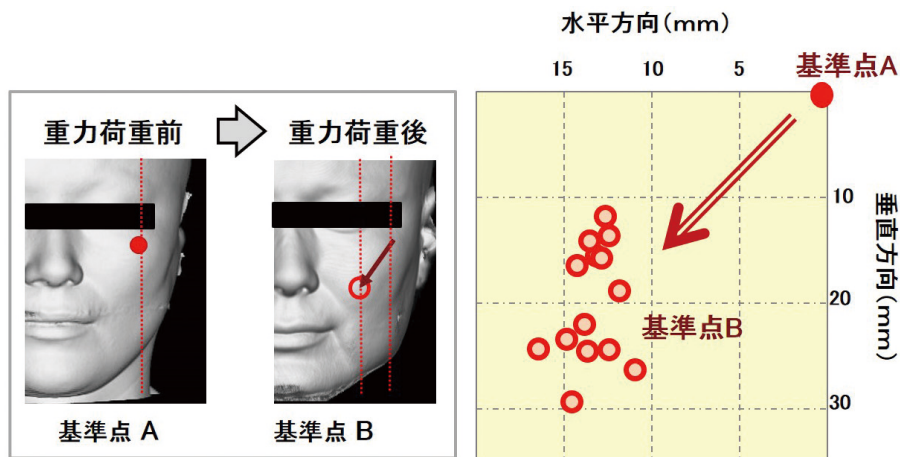


図4 Malar Topの移動方向と移動距離

灰色枠内の左右は同一人物である。重力荷重によってたるみは増強し、見た目のエイジングレベルが増加している。14例全例で基準点Aに対し基準点Bは内側下方に位置している。移動距離の平均は $24.3 \pm 4.79$  mmである。

れた。Malar Topの移動距離の平均は $24.3 \pm 4.79$  mmであった。内側に平均 $13.3 \pm 1.37$  mm、尾側には平均 $20.1 \pm 5.55$  mmと移動した。Malar topの移動距離と年齢の相関は $r=0.69$  ( $P<0.01$ )であった。

### 3-c. Malar mountの厚みの変化(図5)

体位Aおよび体位Bの横断像において、同一レベルのMalar mountの厚みは、基準A'では平均 $15.4 \pm 2.27$  mm、基準Bでは平均 $19.9 \pm 3.22$  mmであった。重力を荷重することでMalar mountの厚みは有意に増加した ( $P<0.01$ )。

厚みの変化と年齢の相関は $r=0.72$  ( $P<0.01$ )であった。

## 4. 考察

近年のコンピュータの進歩の恩恵を受け、画像診断装置および画像解析装置は著しい発展を遂げた。CTは物質のX線吸収差を利用し、構造物を画像化する画像診断装置である<sup>4,5)</sup>。1989年にヘリカルCTが登場して以来、CTはさらに進化発展してきた<sup>6)</sup>。今日の診療現場ではMultidetector-row CT (MDCT) が一般的に使用されている。MDCTは複数のX線検出器が配列されており、X線管球が体周囲を

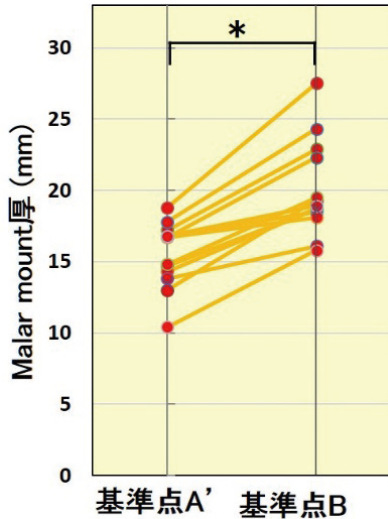


図5 Malar mountの厚みの変化

重力荷重前の基準点A'のMalar mountの厚みの平均 $15.4 \pm 2.27$ mmである。重力荷重後のMalar mountの厚みは14例全例で増加した。基準点Bは平均 $19.9 \pm 3.22$ mmとMalar mountの厚みは統計学的に有意に増加した ( $P < 0.01$ )。

1回転する間に複数の画像を一度で撮像できる。X線管球は連続的に高速回転しており、短時間で広範囲を撮像することが可能である。そのため、MDCTは容積情報を有する薄く鮮明な画像を短時間で多量に収集でき、任意断面の画像や3次元画像の作成が可能になった。同時に、コンピュータの進歩によって画像解析装置の機能も向上し、3次元CT画像の作成が容易になった。画像解析装置を用いると、様々な表示条件の三次元画像を作成できる。Volume renderingとは容積画像データから三次元画像を作成する方法である(図1)。さらに、CT画像はコンピュータによる計算画像であることから、三次元画像を部分的に切り取ると、目的とする内部構造物が描出される。顔面の場合、1回の検査で約300枚の画像データが収集でき、高精細で詳細な画像情報が大量に含まれている。加齢に関わる解剖学的情報を引き出すことで、加齢容顔およびその内部構造を評価可能である。しかし、現在の問題点は加齢の評価法が標準化されておらず、客観的評価法が確立していないことである。

加齢による容顔変化は皮膚の老化に加え、皮下の加齢性変化も関与する<sup>7)</sup>。皮下の解剖学的構造物には表情筋や筋膜、脂肪織、骨などがある<sup>8)</sup>。これらの構造物の加齢性変化が複合的に積載されることによって、年齢とともに容顔変化が生じてくる。さらに、重力が加齢容顔に対して促進方向に働き、たるみが増強されるとされる<sup>7)</sup>。今回、我々は顔面に重力を荷重することで、疑似的に加齢性変化を促進させ、中顔面の容顔変化について客観的評価を試みた。

本研究では、最初に重力が加齢容顔を促進させるか否かを検証した。重力荷重した容顔と非荷重の容顔を比較すると、14例全例で重力荷重を受けた容顔の見た目のエイジングレベルは上昇していた。とくに、高齢者ほど加齢容顔が顕著に現れた。次に、この結果に基づき中顔面の形態変化を分析した。エイジングレベルを上昇させた形態的变化として頬頂部の移動と厚みの変化が確認された。具体的には、頬頂部は平均 $20.1 \pm 5.55$ mmと下垂するだけでなく、内側に平均 $13.3 \pm 1.37$ mmと偏移していた。さらに、下垂した頬の厚みは平均 $15.4 \pm 2.27$ mmから平均 $19.9 \pm 3.22$ mmに増加しており、下垂した頬の厚みが明らかに増加することが確認された。これらの変化は年齢との関連性が高いとの結果を得た。

3次元CT画像とともに横断面で顔面の皮下構造を観察すると、これらの中顔面の解剖学的要因として皮下脂肪織の形態変化が主として認められた。表面の皮膚形状や脂肪織内を走行する表情筋の位置も変動していたが、これらの変化は脂肪織の位置移動に伴う変化と考えられた。興味深いことに、頬の内側に位置する鼻唇溝(ほうれい線)はそれ自体に厚みの変化はなく、頬の下垂と厚みの増強が鼻唇溝の深化を強調していた。

本研究において、重力荷重による疑似的な加齢性変化を顔面に誘発し、その変化をCTで評価した。症例数が少ないにも関わらず、加齢とともに頬頂部は内尾側に下垂し、下垂した頬厚が増加することが確認でき、それらが加齢容顔をまねくことを実証したといえる。さらに、加齢容顔の解剖学的要因の一部を明らかにすることができた。今後、症例数の増加による知見の蓄積を図りたいと考える。

## 5. まとめ

今日の進歩した画像診断学的技術や評価法は加齢に関与する解剖学的構造物を可視化し、高い客観性を有する。顔面加齢のメカニズムを解析するための有用な手段であり、抗加齢・美容医学に対し科学的エビデンスの構築に貢献する。さらに、本手法を普及させることで抗加齢化粧品や美容施術法の開発、加齢顔画像作成等の警察の鑑識捜査への技術応用など、社会的にも貢献すると考えられる。本研究によって得られた成果は関連領域の多くの研究者に積極的に広く発信していきたいと考える。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く御礼申し上げます。本研究の継続がコスメトロジーの進歩と発展の一助になると幸いです。

(引用文献)

- 1) 奥田 逸子, 煎本 正博, 中島 康雄: 顔面のたるみの画像解析技術の最前線. *Cosmetic stage*. 8, 6-10, 2014.
- 2) Okuda I, Irimoto M, Nakajima Y, et. al. Using multidetector row computed tomography to evaluate baggy eyelid. *Aesthetic Plast Surg*. 36, 290-4, 2012.
- 3) Okuda I, Udagawa H, Takahashi J, Yamase H, et al. Magnetic resonance -thoracic ductography: imaging aid for thoracic surgery and thoracic duct depiction based on embryological considerations. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 57, 640-6, 2009.
- 4) Ambrose J, Hounsfield G. Computerized transverse axial tomography. *Br J Radiol*. 46 (542): 148-149, 1973.
- 5) Hounsfield GN. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. *Br J Radiol*. 46 (552) : 1016-1022, 1973.
- 6) Kalender WA, Seissler W, Klotz E, Vock P. Spiral volumetric CT with single-breath-hold technique, continuous transport, and continuous scanner rotation. *Radiology*. 176: 181-183, 1990.
- 7) Larrabee WF, Makielski KH, Henderson JL. *Surgical Anatomy of the Face* (second edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- 8) Standring S, Berkovitz BK. Face and scalp. In: Standing S, editor. *Gray's anatomy*, 39th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005.

# 肌の魅力に関する意識構造の年代間、性別間比較

関西学院大学理工学部

谿 雄祐

The visually perceived *shitsukan* of the skin, such as translucency and glossiness, is important information in the human communication. The makeup is one of the methods that realize the ideal *shitsukan*. The way of makeup is different according to ages. The hypotheses in this study were as follows; the age-related difference of the ideal *shitsukan* of the skin would underlie the difference of makeup, and the attractive skin that is wanted to get has different *shitsukan* from the generally attractive skin. To investigate these hypotheses, 3 experiments were executed. To execute these, the words that express the condition and *shitsukan* of the skin were collected from the web sites of the cosmetic companies and the web site that the users freely write about their impression of the cosmetics. The frequently appeared words from both sources were almost the same. This suggested that the gap between producer and customer was small. The evaluation of the subjective importance of the *shitsukan* for the "ideal" attractive skin and "real" attractive skin showed that the age- and gender-related difference was not evident. The results of the paired comparison suggested that the visual *shitsukan* is more important than the tactile *shitsukan*, and that the males regard whiteness as less important relative to the females. The results of the skin image evaluation experiment showed that the important *shitsukan* was highly correlated the attractiveness of the skin, that the attractive skin showed some color deviation, and that the order of the attractiveness of the skin images used as the stimuli almost the same for all ages and genders.

## 1. 緒言

反射、透過、吸収、散乱と言った肌の光学特性は、皮脂分泌量や血行など健康状態に影響され、肌の透明感やつや感などの質感を左右する。視覚的に認識された肌の健康状態は顔の魅力と相関する<sup>1,2)</sup>など、対人関係や自己実現にとって重要な要素であるため、我々は自他の区別なく肌の状態に注意を払い、肌の質感を維持、向上させるために日々の手入れを行っている。一方、肌の質感に対する意識は年代によって異なることが知られている<sup>3)</sup>。これらのことを鑑みると、評価者自身の年代によって魅力的だと感じる肌も異なる可能性がある。さらに、自らの肌を魅力的に装うための手段である化粧の嗜好も年代によって異なるだけでなく、化粧をする習慣の有無によっても肌の質感に関する意識構造が異なる可能性がある。

本研究では様々な年代の男女を対象に、魅力的だと感じる肌が有する質感に関する調査を行い、年代、性別ごとに肌質感や魅力に関する意識構造を明らかにすることを目的とした。まず、肌質感に関する言語表現を収集し(課題1)、肌の魅力において広く重要視されている肌の質感や状態を明らかにした。次に、評価者自身がそうなりたいと願う「現実的」に魅力的な肌と、抽象化された「理想的」な魅力的な

肌が異なる可能性を考慮し、それぞれについて課題1で収集した肌質感や状態の重要度について調査した(課題2)。課題2の結果から、年代と性別による顕著な違いは認められなかったため、回答の種類によって評価者を群分けした。この群の間で重要度のばらつきが大きかった項目のうち、視覚的質感2語と触覚的質感2語について、新たな評価者を対象に、評価者にとっての現実的に魅力的な肌における重要度を一対比較実験により検討した(課題3)。さらに、課題2の回答者の一部を対象に、コンピュータグラフィックス技術により作成した肌画像の魅力判断を行わせる実験を実施した(課題4)。

## 2. 課題1：肌質感関連語収集

広く通用することが保証された肌質感を表現する語句を以後の課題で使用することを保証するために、学術研究で使用された語句ではなく、化粧品会社と化粧品ユーザーが用いる言語表現から収集することとした。

### 2.1. 方法

大手化粧品会社4社のブランド紹介サイトにおけるベースメイクに関するページと、一般ユーザーが書き込む化粧品口コミサイトのうち化粧水、ベースメイク、チークに関するページを対象として、肌の質感と状態を表現する言語表現の抽出を行った。口コミサイトからは、対象とした化粧品に関する20代、30代、40代、50代、60代ユーザーによる投稿について、年代ごとに収集時点で最新の10ページ分を収集対象とした。各webページのHTMLデータをプログラミングにより収集し、そこから当該部分を抽出した後、著者が内容を読み、文脈と対象が適切であること



The concept of the attractiveness of the skin

Yusuke Tani

Kwansei Gakuin University

を確認しながら言語表現を収集した。

## 2.2. 結果と考察

化粧品会社のサイトからは延べ65語を、口コミサイトからは延べ955語を抽出した。次に、表記のゆれを調整して同一内容と見なせるものをまとめた上で出現頻度の全語数に対する割合を求めた。この出現割合の上位30語を選抜した結果を表1に示す。

口コミサイトからは一般ユーザーが用いる言語表現が中心的に収集され、化粧品会社のサイトから得られる専門家が用いる言語表現とは様相が異なることが期待されたが、上位30語のうち、口コミサイトからのみ収集された言語表現は「明るさ」、「血色の良さ」、「毛穴の目立ち具合」、「てかり」のみであり、残り26語は共通して収集された語であった。このことは、化粧品会社各社が一般ユーザーに訴求する語句の選択を適切に行っていることを示唆するが、一般ユーザー独自の表現や観点も残されている可能性も同時に示していると考えられる。

## 3. 課題2：肌質感重要度調査

課題2では、課題1で得た30語が肌の魅力を評価する上でどの程度重要だと考えられているのかを知ることを目的とした。その際、自分が手に入れたいと考える魅力的な肌と、自分が手に入れるかどうかは別にして魅力的だと感じられる肌における重要度を分けて調査した。本稿では以後、前者を現実的魅力肌、後者を理想的魅力肌と呼ぶ。調査はインターネット会社を介して集められた20代から60代の一般成人男女を対象にweb上のアンケート形式で行った。

### 3.1. 方法

調査対象はインターネット調査会社にモニターとして登録している20代から60代の成人男女で、無作為に選ばれて調査に関する案内を受け取り、調査サイトにアクセスした方々であった。各カテゴリについて、回答を完了した順に110名、総数1,100名を回答者として報酬を支払った。一般人の感覚における重要度を知ることを目的としたため、

表1 webサイトから収集した肌質感関連語

明るさ*	小じわ	肌荒れ
若々しさ	上品さ	色っぽさ
毛穴の目立ち具合*	血色の良さ*	強さ
ハリ	もちもち感	くすみ
滑らかさ	クマの目立ち具合	みずみずしさ
シミ	色味	健康的
均一さ	華やかさ	キメの整い
潤い/乾燥	透明感	つや
やわらかさ	自然さ、ナチュラル感	色ムラ
てかり*	光沢感、輝き	すべすべ感

\* 口コミサイト固有語

年齢と性別を回答させた後、スクリーニングのために、肌に関する専門的知識を要する化粧品や美容関連業種への勤務について回答させた。年齢と性別はモニター登録情報に含まれていたが、登録モニター本人の回答であることを担保するために回答させた。なお、調査会社から送られた案内および調査サイトの冒頭には調査内容、守秘義務、報酬に関する説明が記載されており、回答者はそれらに同意した上で回答を開始した。

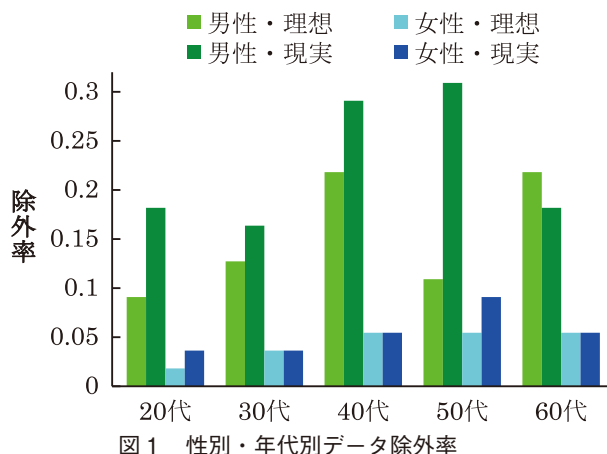
肌に関する専門的知識を有していないことが確認された回答者に対して、[1] 現実的魅力肌と理想的魅力肌のどちらか一方を想起させ、それが有する要素をできるだけ多く記述させた。どちらの魅力肌を想起させるかはランダムであったが、各カテゴリで半数ずつになるようにした。

次に、課題1で収集した30語のそれぞれについて、[2] 想起した魅力肌においてどの程度重要であると考えているかを「まったく重要ではない」、「重要ではない」、「どちらともいえない」、「重要である」、「決定的に重要である」の5段階評定させた。

最後に、[3] 再度想起した魅力肌についてそれが有している特性についてできるだけ詳しく記述するよう求めた。

### 3.2. 結果と考察

質問[1]において重要だと考える項目が特にないと回答した回答者131名を分析から除外し、969名分のデータを分析した。除外対象が最も多かったのは40代男性で全体の1/4近い38名であった。全年代を通じた除外率の平均は男性が18.9%、女性が4.9%であった。現実的魅力肌を想起させた50代男性の除外率が30.9%、40代男性で29.1%となるなど、男性については理想的魅力肌に比べて現実的魅力肌に関する回答を要求された回答者で除外率が高い傾向が認められた。一方、女性回答者についてはすべての年代で想起した魅力肌によらず除外率が低かった(図1)。これらは、女性の肌に関する意識が男性よりも強いことを示していると考えられる。



次に、質問[2]で得た肌質感関連語の重要度を、「まったく重要ではない」を1点、「重要ではない」を2点、「どちらともいえない」を3点、「重要である」を4点、「決定的に重要である」を5点として各群の平均を算出した。全群で30項目のほとんどが有意に3点を上回ったが、有意に4点を超えた項目があったのは、男性では現実的魅力肌・60代(「健康的」と、理想的魅力肌・60代(「若々しさ」、「健康的」)のみであった。一方、女性では現実的魅力肌・60代において平均評定値が有意に4点を超えた項目がなかった以外は、すべての群で4点以上の重要度評定値となった項目が確認できた(片側t検定、有意水準は5%)。

すべての評価項目について、想起した魅力肌の種類、回答者の年代と性別の3要因混合計画の分散分析を行ったところ、魅力肌の種類の効果が有意となったのは「シミ」(単純・単純主効果:20代女性)、「もちもち感」、「クマの目立ち具合」(単純主効果:20代)、「くすみ」、「キメの整い」、「つや」の5項目であり、「クマの目立ち具合」を除いて理想的魅力肌における重要度が現実的魅力肌における重要度より有意に高かった。すべての項目で何らかの主効果あるいは交互作用が有意であり、回答者の年代と性別によって肌

の魅力に関して重要視する項目が異なることが示唆された。そこで、分析対象とした969名の30項目に対する評価点に対して階層クラスター分析を行い、20クラスターに分類した結果と実験群(想起させた魅力肌・年代・性別)の関係を表2に示す。

表2から明らかなように、評定結果から回答者のカテゴリを推測することは困難である。すなわち、肌の魅力を判断する際に重要視する肌質感は、想起する魅力肌、回答者の年代、性別によって明確に異なっているとは言えないことが明らかになった。

階層クラスター分析結果は、回答者を3クラスターに分類することが適切であることを示していた。その群はすべての項目を重要と考える群、中程度に重要と考える群、どちらともいえないと考える群の3群であり、群内の男女差も明確ではなかった。そこで、評定結果を回答者ごとに標準得点化し、それに対して階層クラスター分析を行ったところ、4群(A群、B群、C群、D群)に分割することが適切との結果を得た。評価項目を横軸に取った重要度評定プロファイルを作成すると、プロファイルのピーク位置と振幅が異なることが確認できた(図2)。このプロ

表2 評価結果に基づくクラスタリングと回答者群の比較

	クラスター分析によるクラスター																				計
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
現実・20代・男性	5	3	13	2	1	1	1	0	0	8	1	1	3	1	4	1	0	0	0	0	45
現実・30代・男性	4	5	8	1	0	1	1	0	2	7	0	1	2	5	4	1	1	2	1	0	46
現実・40代・男性	5	3	6	0	1	2	0	0	0	2	0	3	3	7	2	2	0	2	1	0	39
現実・50代・男性	2	3	12	3	1	1	1	0	0	1	0	0	1	6	3	4	0	0	0	0	38
現実・60代・男性	6	2	5	2	0	3	1	0	1	4	1	2	0	5	0	9	1	1	1	1	45
現実・20代・女性	6	9	0	3	0	2	10	0	0	0	0	1	6	0	6	8	0	2	0	0	53
現実・30代・女性	6	7	3	1	1	1	8	0	0	2	1	0	8	1	4	8	0	2	0	0	53
現実・40代・女性	7	9	1	1	1	3	5	0	0	1	2	1	2	8	1	8	1	1	0	0	52
現実・50代・女性	6	5	1	2	1	4	3	0	1	2	1	2	1	8	0	11	1	1	0	0	50
現実・60代・女性	3	6	3	3	0	4	2	0	0	3	0	1	0	7	1	15	1	1	2	0	52
理想・20代・男性	11	2	9	2	3	3	2	1	1	2	2	3	1	3	2	1	1	1	0	0	50
理想・30代・男性	7	5	7	4	0	2	2	0	1	1	2	2	3	4	4	2	0	1	1	0	48
理想・40代・男性	8	2	7	3	2	3	5	0	0	2	0	2	2	4	0	3	0	0	0	0	43
理想・50代・男性	4	1	11	2	1	4	2	0	0	8	1	0	2	4	0	9	0	0	0	0	49
理想・60代・男性	7	8	2	4	0	2	1	0	2	2	0	2	1	3	0	7	1	0	1	0	43
理想・20代・女性	7	10	0	4	1	3	2	0	2	1	2	2	5	2	4	3	1	4	0	1	54
理想・30代・女性	9	9	0	0	0	3	7	0	0	0	0	3	4	1	3	7	0	7	0	0	53
理想・40代・女性	7	10	0	3	0	5	7	0	0	2	3	1	1	4	2	2	0	3	0	2	52
理想・50代・女性	1	7	2	2	0	1	4	0	0	2	2	2	5	6	4	11	0	3	0	0	52
理想・60代・女性	4	6	3	6	0	3	6	0	0	2	0	2	2	10	1	5	0	1	1	0	52
合計	115	112	93	48	13	51	70	1	10	52	18	31	52	89	45	117	8	32	8	4	969

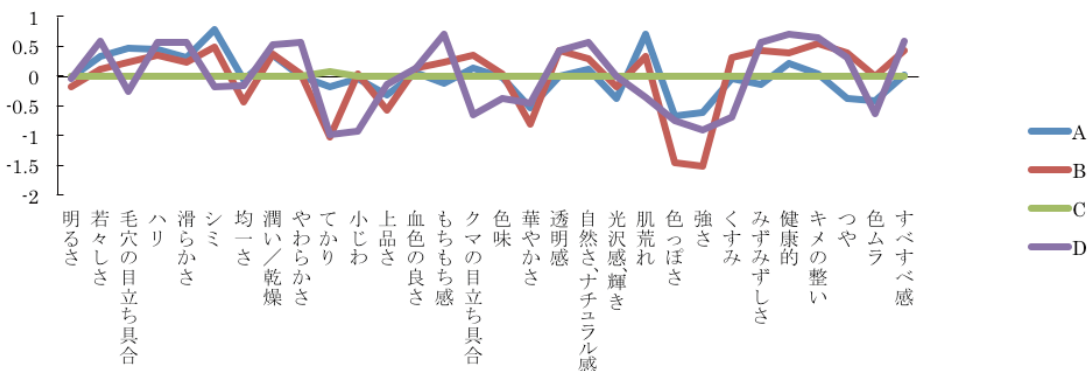


図2 評価者クラスターごとの重要度評定プロファイル

ファイルで大きく評価が異なる項目のうち、視覚的な肌質感である「シミ(しみが無い)」、「色味(色白)」と触覚的な肌質感である「もちもち」、「すべすべ」について、現実的魅力肌における重要度を比較する実験を課題3として、新たな評価者を対象に実施した。これらの肌質感は回答者の自由記述において高い頻度で出現したものでもあった。

また、2つのクラスタリング結果を組み合わせ、全参加者を12クラスターに分類し、評価傾向の異なる4クラスター620名を対象として課題4を実施した。

#### 4. 課題3：肌質感重要度比較実験

計画では、評価者の年代と性別、想起する魅力肌によって重要視される肌質感が異なる可能性が示されたことを受けて、特定の年代と性別の群について詳細は比較実験を行うこととしていた。しかし、調査結果はこの仮説を支持しなかったため、再度全年代の男女を対象として、重要度の高い肌質感のうち、視覚的な「シミ」と「色白」、触覚的な「もちもち」と「すべすべ」についてそれらの重要度を直接比較させる一対比較実験を行うこととした。

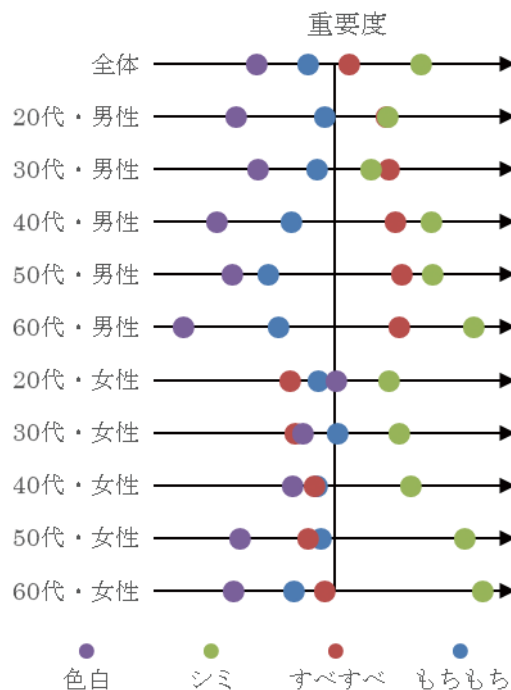


図3 肌質感重要度一対比較結果

#### 4.1. 方法

参加者はインターネット調査会社にモニターとして登録している20代から60代の男女1,000名であった。彼らは調査会社によって無作為に抽出された候補者のうち、各年代、性別で早期に回答を終了した100名ずつであった。実験は各参加者がそれぞれの環境でwebブラウザを使用して行った。調査会社から送られた案内および実験用ページには実験内容、守秘義務、報酬に関する説明が記載されており、参加者はそれらに同意した上で実験を開始した。

参加者の課題は、自身が手に入れたいと考える現実的魅力肌を想起しながら、対提示される2つの肌質感のうち、想起した現実的魅力肌にとってより重要である方を回答することであった。比較させた肌質感は「シミがないこと」、「色白であること」、「もちもちであること」、「すべすべであること」の4つであった。すべての組み合わせを一度ずつ比較させたため、質問数は6であった。参加者には所定の報酬が後日支払われた。

#### 4.2. 結果と考察

比較対ごとに選択率を算出し、標準正規分布の累積分布関数の逆関数の値へと変換し、平均値を取ることで各肌質感の選好尺度値とした。参加者全体で見ると、「シミがないこと」が突出して高く、「すべすべであること」、「もちもちであること」と続き、「色白であること」が最も低かった(図3)。この結果は、視覚的な肌質感が触覚的な肌質感より重要視される傾向を示していると考えられる。色白であることは一般的には良いこととされているが、結果を見る

と、特に男性では重視されていなかった。これは適度に日焼けをしている方がたくましく健康的であり、男性にとってはより好ましいからであると考えられる。過度な色白はともすると病的な印象を与えることもあり、現実的魅力肌においては健康的であることが重要であることが示唆された。

参加者のカテゴリごとに結果を見ると、男性はほぼ一貫して「シミがないこと」、「すべすべであること」、「もちもちであること」、「色白であること」の順となっていた。年代が高くなるほど色白であることの重要度が下がりすべすべであることの重要度が高くなっていた。これは男性が一般的に、女性に比べて保湿や日焼け対策などの肌ケアをしないことと関連していると考えられる。色白については先に述べた通りである。一方、すべすべであることがより重要になる理由としては、日々のひげそりによるダメージの蓄積と加齢に伴う皮脂分泌量の低下が原因であると考えられる。

年代による傾向の違いは女性でより顕著であった。20代では「色白であること」は触覚的な質感よりも重要であったが、年代が高くなるにつれて重要度が低くなった。それに伴って、若年代では重要度が低かった「すべすべであること」の重要度が高まり、高い年代では「もちもちであること」よりも重要とされた。「色白であること」の重要度が低下することは、加齢に伴って素肌の明度が低下する傾向があること<sup>4)</sup>と関連していると考えられる。

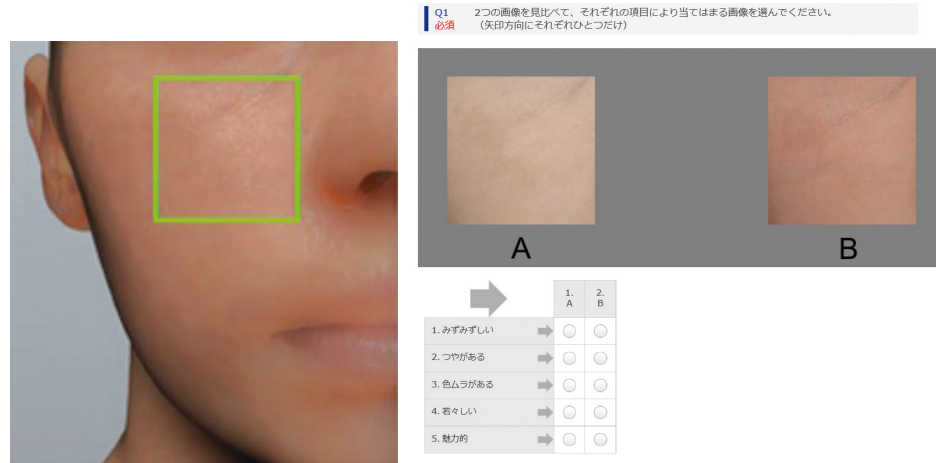


図4 実験画面

## 5. 課題4：肌画像評価実験

課題2において、30項目の評定結果に基づいて評価者を類型化した結果は参加者の年代と性別と対応しないことが示された。そこで、評価項目間の重要度に違いを持っていてなおかつ多くの項目を重要だと見なしている評価者を対象に、肌の画像を見比べて4つの肌質感と魅力の優劣を回答させる一対比較実験を実施した。

### 5.1. 方法

実験参加者の候補者は、課題2の結果に基づいて、課題2の評価者から選抜した620名とした。その内訳は、30項目の重要度が比較的均等に低いクラスターの92名(Lタイプ)、30項目のいくつかの重要度が低く、他は重要だと考えているクラスターの287名(M1タイプ)、30項目の半分程度の項目について重要だと考えているクラスターの151名(M2タイプ)、すべての項目を重要だと考えており、かついくつかの項目を非常に重視しているクラスターの90名(Hタイプ)であった。

実験への協力依頼に応じた332名が参加者となった(男性168名、女性154名)。実験は参加者各自がwebサイトにアクセスする形で実施したため、観察環境については統制されていないが、十分な大きさと刺激画像を観察させる必要があったため、スマートフォンでの参加を禁止し、PCでの参加を条件とした。

参加者は案内およびwebサイト先頭ページに記載された実験課題、秘密保持、報酬に関する説明を読み、理解した上で実験への参加に同意して課題を開始した。参加者には後日報酬が支払われた。

課題は対提示された2枚の肌画像を見比べて、「みずみずしい」、「つやがある」、「色ムラがある」、「若々しい」、「魅力的」の各語により当てはまると感じた方を回答することであった。画像は4種類あり、そのすべての組み合わせに

ついて比較させた(図4右)ため、総試行数は6であった。画像は皮膚の層構造と各層における透過率、反射率を色素量によって決定し、光の挙動をシミュレーションすることで画像化するコンピュータグラフィックス技術<sup>5)</sup>を用いて作成した、右頬部の肌画像であった(図4左)。比較する肌質感は、候補者のクラスターを判別する判別関数に含まれた変数のうち、視覚的に判断可能なものであった。

### 5.2. 結果と考察

肌画像の選択率から選好尺度値を算出した。全参加者の結果から算出した選好尺度値は、画像2が最も魅力的であり、次いで画像1が魅力的であることを示していた。魅力と肌質感の各項目の相関はいずれも高く、これらが密接な関係にあることが示唆された。「みずみずしい」、「つやがある」、「若々しい」は「魅力的」と順位が完全に一致したが、「色ムラがある」は順位が正反対とはならず、画像2は画像1よりも色ムラがあると評価されていた。このことから、魅力的な肌は部位によってある程度色が異なっていることが明らかになった。参加者のカテゴリごとに見ても魅力の順位に大きな変動は見られなかった(図5)。この結果も年代と性別によって魅力的だと感じる肌を持つ要素に大きな差はないことを示している。

## 6. 総括

本研究では化粧品会社のサイトと一般ユーザーによる口コミサイトの両方から肌質感を表現する語句を収集したが、収集総数に占める割合の上位30語のうち26語は両方から収集されたものであった。これは、専門家と一般人が用いる言語表現の乖離が小さいことを示唆している。得られた語句が魅力的な肌にとってどれくらい重要であるかについて、年代と性別、想定した魅力肌による明確な差異は認められなかった。このことは年代や性別による魅力と関連の強い肌質感の違いは個人差その他の要因と比べて大きいも

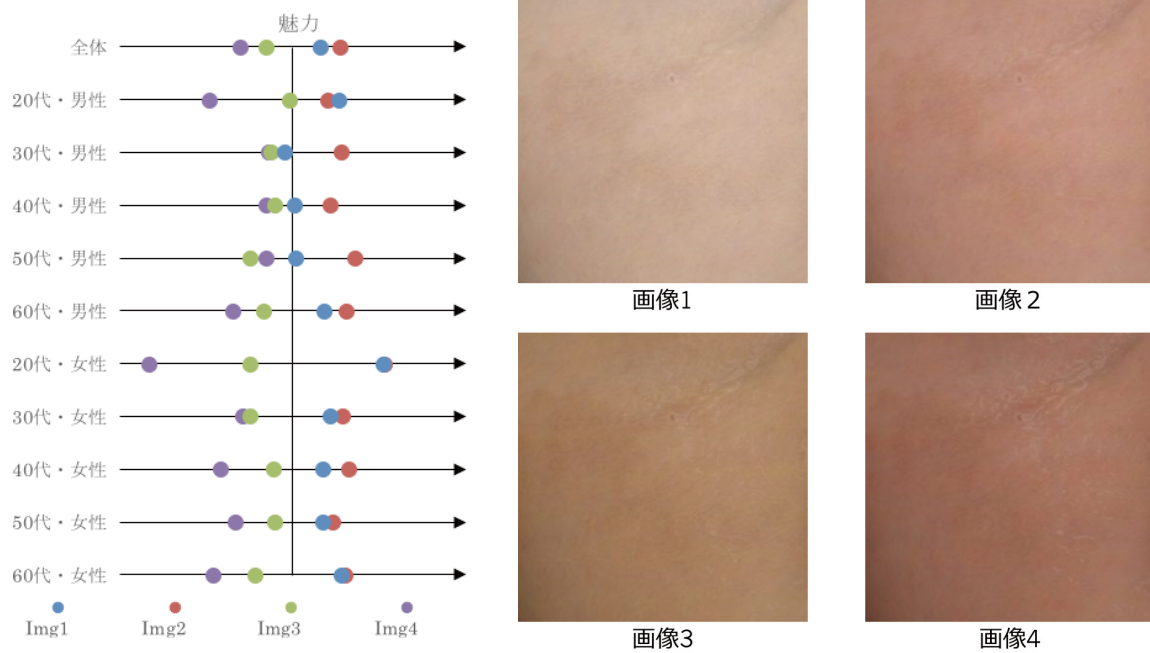


図5 肌画像の魅力

のではないことを意味している。今後は魅力と関連の強い肌質感に対する評価が年代や性別によってどのように異なるのかを、課題4のような画像に対する評価実験を通じてより詳細な検討を加えていくことが必要である。

(引用文献)

1) Jones, BC., Little, AC., Burt DM., Perrett, DI. Perception, 33, 569-576. (2004).  
 2) Matts, PJ., Fink, B., Grammer, K., Burquest, M.

Journal of the American Academy of Dermatology, 57, 977-984. (2007).

3) 征矢智美・野村美佳・林照次・長谷川敬. 日本化粧品技術者会誌, 38, 115-124. (2004).  
 4) 菊地久美子・片桐千華・溝上陽子・矢口博久. 日本色彩学会誌, 41, suppl.44-47. (2017).  
 5) Iglesias-Guitian, JA., Aliaga, C., Jarabo, A., Gutierrez, D. Computer Graphics Forum, 34, 44-55. (2015).

# 植物由来の香りが睡眠におよぼす影響の解明

東京大学大学院農学生命科学研究科

恒次 祐子

Effects of the odor of  $\alpha$ -pinene, an odorous compound found in extracted oils of various plants including coniferous trees, were investigated in terms of sleep quality. Lavender essential oil, which has been reported to have a positive influence on sleep, was used for purposes of comparison. Eight male university students wore a wrist actigraph and heart rate monitor for several nights while they slept inhaling the odor of  $\alpha$ -pinene, lavender, or no odor (control). They also filled in the OSA-MA sleep inventory and a sleep diary in the morning. Subjective odor intensity was significantly higher for  $\alpha$ -pinene and lavender compared to that of the control. The average score for the factor IV of the OSA-MA sleep inventory (recovery from fatigue) was higher, and sleep latency determined by actigraphy was shorter under the  $\alpha$ -pinene condition compared to the control. No significant difference was observed in heart rate and heart rate variability indices among three conditions. Since there are several limitations in this study, such as a small sample size or less controlled sleep environment, further studies are needed to precisely assess the effects of  $\alpha$ -pinene on sleep quality.

## 1. 緒言

厚生労働省の平成27年国民健康・栄養調査<sup>1)</sup>によると、20代以上の男女で「睡眠時間が足りなかった」「睡眠全体の質に満足できなかった」という回答が全体で約20%あり、特に20代、30代では27.1%、28.1%と高かった。また「寝つきにいつもより時間がかかった」「夜間、睡眠途中で目が覚めて困った」「起きようとする時刻よりも早く目が覚め、それ以上眠れなかった」などの回答も一定数あり、睡眠の質に問題を抱える人が多いことがうかがわれる。これまでに睡眠時間や不眠は死亡率やその他さまざまな疾患と関係していることが報告されており<sup>2)</sup>、睡眠の改善は重要な問題であるといえる。

睡眠改善を目的とした服薬を伴わない介入のひとつとして、香りを用いた、いわゆるアロマセラピーが挙げられる。オレンジ精油やラベンダー精油、ヒバ、ローズマリー、セージなど、様々な植物由来のにおいに気分改善効果があることが報告されており<sup>3-6)</sup>、睡眠への効果が期待されている。韓国で出版された論文の系統的レビューでは<sup>7)</sup>、13報の論文のメタ分析により、精油を用いたマッサージやにおいの吸引が睡眠改善に有効であること、におい吸引がマッサージより効果的であること、においの種類としてはラベンダーおよびベルガモットが最も多く使われていることが報告されている。欧米の論文を中心としたレビュー<sup>8)</sup>においても、多くの論文でにおい吸引による睡眠の効果が認め

られており、特にラベンダー精油で効果があるとした論文が多いことが報告されている。またこのレビューでは、吸引の量や頻度の問題、さらにどのようににおいが睡眠質を改善するかというメカニズムが今後の研究課題として挙げられている。

我々はこれまでに、においが人間に及ぼす影響を、人の生理的な反応を指標として明らかにする研究を行ってきた。例えば成人を対象とした研究により、植物に含まれるにおい成分のうち「 $\alpha$ -ピネン」という物質が血圧や心拍数を低下させるなど、生体に鎮静的に作用することを明らかにしてきている<sup>9)</sup>。 $\alpha$ -ピネンは様々な植物に含まれる芳香性の化学物質であり、近年は森林浴による免疫細胞活性化効果の一端を担っている可能性が示唆されている<sup>10-11)</sup>。また我が国の人工林の主要樹種であり、木造住宅の主な材料であるヒノキ、マツ、スギなどにも多く含まれており、いわゆる「木の家の香り」の主な成分でもある。最近内装を木質化した居室において睡眠質が改善される可能性が報告されており<sup>12)</sup>、 $\alpha$ -ピネンのにおいによる睡眠への影響を解明することは興味深い課題であるとともに、身近な資源の活用にもつながるものと考えられる。

そこで本研究では若年成人男性を対象とし、睡眠効果に関する既往報告の多いラベンダーと $\alpha$ -ピネンとの比較を行うこととした。アロマセラピーの睡眠への影響について、従来の報告では実験室における終夜睡眠実験が多く、実環境でのデータが不足している<sup>8)</sup>との指摘をふまえ、研究対象者の自宅における通常の睡眠ににおいを導入する方法を取ることにした。

## 2. 方法

### 2.1. 実験方法

研究対象者は20代の男子大学生8名とした。事前に実験の目的や方法に関する説明を十分に行い、実験参加に関



Effects of plant-derived odors on sleep

Yuko Tsunetsugu

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

する同意書に署名を得た。なお本研究は、国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所の倫理審査委員会の審査および承認を経て行われた。

研究対象者には自宅において通常通り睡眠をとるように指示した。4名は第一夜ににおいのない状態で測定を行い、その後一夜ずつ $\alpha$ -ピネンまたはラベンダーのにおいを体験した。また4名については測定に慣れるように第一夜、第二夜はにおいのない状態で測定を行い、第三夜以降に $\alpha$ -ピネン、ラベンダー、および対照としてにおいのない状態での測定を2夜ずつ行った。対照を含むにおいの呈示順は研究対象者によりランダムとした。

自宅で簡便ににおいを呈示する方法として、 $\alpha$ -ピネンならびにラベンダー精油を含浸させたシール付きシートを試作した。活性炭、熱可塑性樹脂などを混合した担体に、市販の $\alpha$ -ピネン(和光純薬工業株)またはラベンダー精油(東香産業株)を含浸させ、不織布でカバーしたものであり、片面に両面テープが付いている (Fig. 1)。研究対象者にはこのシートを寝衣の右胸内側または外側の襟付近(においが弱く感じた場合)に貼り付けて就寝するように指示した。

睡眠評価は手首式活動量計(Actigraph社 GT3X)、睡眠日誌、OSA睡眠調査票MA版13)にて行った。活動量計は3軸加速度計を搭載したものであり、重さ約19gであった。さらに、睡眠中の自律神経系活動を評価するために、小型心拍モニター(ユニオンツール社 WHS-2)を用い心拍RR間隔の測定を行った。あわせてにおいの強度に関する主観評価を無臭(0)～強烈なにおい(5)の6段階で実施した。

研究対象者には日中は通常通りに過ごし、就寝前に活動量計および心拍モニターを装着するように、また起床後直ちにOSA睡眠調査票および睡眠日誌、においの強度に関する主観評価質問紙に記入するように指示した。測定日の就床時刻、照明条件、直前の食事からの時間、その他室内環境が普段と大きく変わらないように留意し、測定日には過度の飲酒、過度の運動を避けるように依頼した。

## 2.2. 試作したシートからのにおい物質放散

睡眠時ににおいを発生させるために試作したシール付きシートについて、小形チャンバー法(JIS A 1901)によりにおい物質の放散速度を測定した。ラベンダー精油60 $\mu$ Lを含浸させたシートを20Lのチャンバー内に1枚静置し、捕集管はTenaxTAを用いた。測定時間は48時間までとした。

## 2.3. 解析

睡眠日誌およびOSA睡眠調査票MA版から自己申告による総睡眠時間を算出した。OSA睡眠調査票MA版により得られた回答は所定の方法により集計し、因子I(起床時眠気)、因子II(入眠と睡眠維持)、因子III(夢み)、因子



Fig.1 試作したにおい発生シート

IV(疲労回復)、因子V(睡眠時間)をにおい別に算出した。においの強度に関する主観評価については、無臭(0)～強烈なにおい(5)の6段階での回答について、におい別に平均値を求めた。

また活動量計にて得られたデータを用い、解析用ソフトウェア(ActiLife 6, Actigraph社)を用いて睡眠評価を行った。解析アルゴリズムとして、成人でより精度が高い<sup>14)</sup>との報告があるCole-Kripke式を用い、入眠潜時、総睡眠時間、中途覚醒時間・回数、平均覚醒時間、総体動量、睡眠効率を算出した。心拍RR間隔はMemcalc法により周波数解析を行い、5分ごとに低周波成分(LF:0.04～0.15Hz)および高周波成分(HF:0.15～0.4Hz)を算出し、HFを副交感神経系活動、LF/(LF+HF)を交感神経系活動の指標とした。また睡眠深度との相関が報告されているHF/(LF+HF)<sup>15)</sup>を求めた。心拍数は5分ごとのRR間隔の平均値の逆数として算出した。

質問紙および主観評価データはFriedman検定を用い、においの種類による影響が有意であった場合、Wilcoxonの符号付順位和検定(Bonferroni補正)にてにおい間の差を検定した。その他の各指標についてはにおいの種類を要因とした一元配置分散分析を用いて検定を行った。解析は統計ソフトウェア(SPSS 25, IBM社)を用いて行い、有意水準は5%とした。

## 3. 結果

### 3.1. シートからのにおい物質放散

シートからの揮発性物質の放散は測定開始後1時間から徐々に減少し、24時間後以降はほとんど放散が認められなくなった (Fig. 2)。測定開始から1時間後の時点において濃度が高かったのは、上位からリナロール、リナリルアンスラニレートであると考えられた。これら2物質についても、24時間後以降はほとんど放散が認められなかった。

### 3.2. おい強度とOSA睡眠調査票MA版

主観的なにおい強度はにおいの種類により有意に異なっ

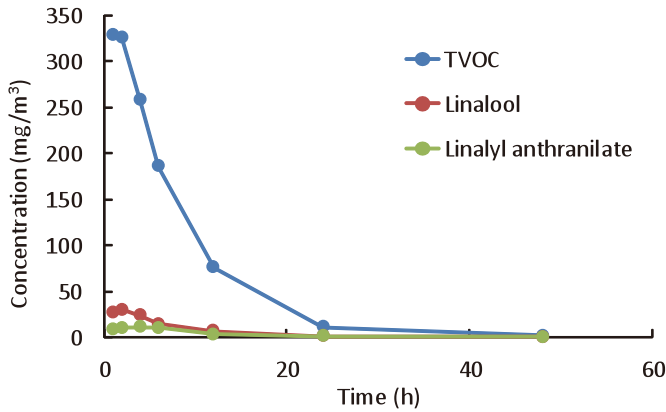


Fig. 2 揮発性有機化合物濃度の変化

TVOC：総揮発性有機化合物（ $\alpha$ -ピネン換算）Linalool, Linalyl anthranilate：開始から1時間後の時点において濃度の高い上位2物質。ライブラリ検索による定性的な同定。（ $\alpha$ -ピネン換算）

ており ( $p < 0.01$ )、下位検定の結果、対照（においなし）に比較してラベンダー条件、 $\alpha$ -ピネン条件ともににおい強度が有意に高かった（どちらも  $p < 0.01$ ）。また、ラベンダー条件と $\alpha$ -ピネン条件の間にも有意な差異が認められ ( $p < 0.05$ )、ラベンダーの方がにおい強度が高く評価されていた (Fig. 3)。

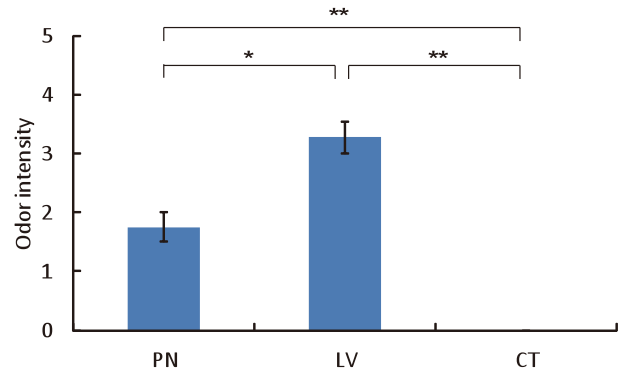
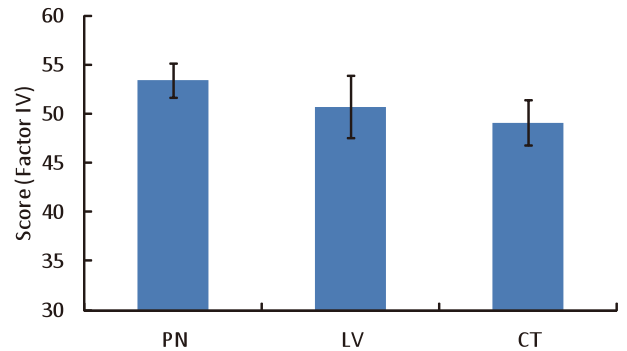
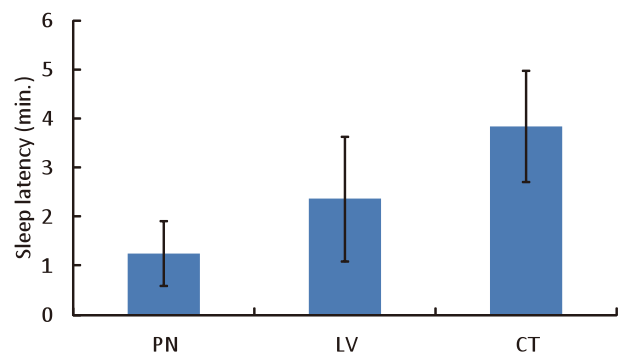
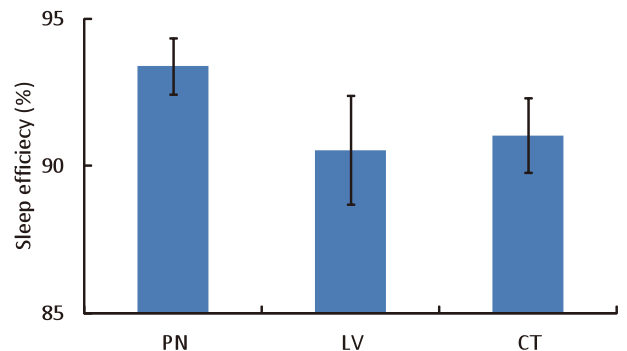
OSA睡眠調査票MA版の各因子についてはにおいの種類による影響は有意ではなかったが、因子IV（疲労回復）で有意傾向 ( $p < 0.07$ ) であり、下位検定により、 $\alpha$ -ピネン条件で対照よりも疲労回復の点数が高い傾向 ( $p < 0.06$ ) が認められた (Fig. 4)。

### 3.3. 睡眠指標

活動量計による睡眠評価については、すべての指標（入眠潜時、総睡眠時間、中途覚醒時間・回数、平均覚醒時間、総体動量、睡眠効率）でにおいの主効果は有意とならず、睡眠質におよぼす影響は認められなかった。一元配置分散分析では有意ではなかったものの、入眠潜時は $\alpha$ -ピネン条件で1.25分、対照では3.83分であり、下位検定 (Bonferroni補正) により $\alpha$ -ピネン条件で有意に入眠潜時が短いという結果であった ( $p = 0.012$ ) (Fig. 5)。また、有意ではないものの、 $\alpha$ -ピネン条件では、中途覚醒時間および平均覚醒時間が短く、総体動量が少ない傾向にあった。その結果として睡眠効率 (全就床時間中の睡眠時間の割合) は $\alpha$ -ピネン条件で最も高かった (Fig. 6)。

### 3.4. 心拍数および心拍変動性

心拍数、HF、LF/(LF+HF)、HF/(LF+HF) のいずれの指標についてもにおいの種類の主効果は有意ではなかった。

Fig. 3 各におい条件における主観的におい強度  
PN： $\alpha$ -ピネン，LV：ラベンダー，CT：対照Fig. 4 各におい条件における因子IV（疲労回復）の得点  
PN： $\alpha$ -ピネン，LV：ラベンダー，CT：対照  
平均値±標準偏差，N=11（ラベンダー），12（ $\alpha$ -ピネン，対照）Fig. 5 各におい条件における入眠潜時  
PN： $\alpha$ -ピネン，LV：ラベンダー，CT：対照  
平均値±標準偏差，N=11（ラベンダー），12（ $\alpha$ -ピネン，対照）Fig. 6 各におい条件における睡眠効率  
PN： $\alpha$ -ピネン，LV：ラベンダー，CT：対照  
平均値±標準偏差，N=11（ラベンダー），12（ $\alpha$ -ピネン，対照）

## 4. 考 察

本研究では $\alpha$ -ピネンのおいによる睡眠への影響を明らかにするために、活動量計、心拍モニター、および質問紙を用いた睡眠評価を試みた。比較対象としてこれまでに睡眠への効果が多く報告されているラベンダー精油を用い、においのない対照条件とあわせて3条件を設定した。本研究用に試作したにおい発生シートを用いて、研究対象者の普段の睡眠環境に対してにおいを導入することを試みた。

においシートからのにおい物質放散測定では、測定開始後24時間までにほとんどの揮発性成分が放散し、その後は放散する成分は少なくなった。測定は規格に従いチャンバーの換気回数を0.5回/時として行っており、実際の睡眠実験の環境でシートが置かれる環境よりは換気量が多く、放散速度が速かった可能性がある。本実験では1晩に1シートを用いるように指示しており、総就床時間は最も長いケースでも10時間半であったため、就床中のシートからのにおい放散量は十分であったと推測される。実際におい強度は対照よりもにおいのある2条件で有意に高かった。加えて、ラベンダー条件で $\alpha$ -ピネン条件よりも有意に強度が高く、ラベンダーでは「楽に感じるにおい」と「強いにおい」の間、 $\alpha$ -ピネンは「何のおいにか分かる弱いにおい」と「楽に感じるにおい」の間であった。このにおい強度の差により睡眠への影響にも差異があった可能性もあり、におい強度の調整は課題として残った。

本研究における $\alpha$ -ピネン条件では、対照よりも主観的な疲労回復感が高く、入眠潜時が短くなる可能性が示唆された。また睡眠効率も3条件の中で高い傾向にあり、 $\alpha$ -ピネンが睡眠に良い影響を与える可能性があるのではないかと推察される。一方、心拍モニターを用いた評価では、既報<sup>15)</sup>でOSA睡眠調査票の各因子や睡眠ポリグラフ検査による睡眠ステージとの関係が報告されている各指標とも、においによる影響は認められなかった。本研究では研究対象者が自分で自宅にて簡単に装着できることを重視し、小型のウェアラブル測定器を用いた。実験後のヒアリングによると、研究対象者にとってはストレスなく使用することができる測定器であったといえそうであるが、得られた終夜の心拍データにノイズが多く混入したり、睡眠中に測定器が外れるなどのケースもあった。より精度の高い測定を行うことで、異なる結果が得られる可能性もある。

本研究において測定を試みたどの指標でも、従来睡眠への効果が多く報告されているラベンダーについて睡眠質に影響するとの結果は得られなかった。本研究は少人数での検討に留まっていることや、におい導入の期間が短かった可能性、ラベンダーのにおい強度が高すぎた可能性など、様々な原因が考えられるが、現時点では理由は不明である。本研究は研究対象者の自宅という実環境での測定を目指し

たことで、様々な条件の統制が難しい面があった。既往研究により研究対象者の自宅において、ラベンダーのにおい導入を週に4回、8週間続けた際に睡眠に効果があったことが報告されており<sup>16)</sup>、本研究においても、より長期間の測定を行うことで、妥当性の高い結果が得られる可能性は考えられる。しかしそのためには比較的生活が規則正しく、ある程度の長期間に渡りあまり生活スタイルが変わらないグループを研究対象とする必要があることに注意が必要である。

いくつかの課題がある一方で、本研究により $\alpha$ -ピネンのおいが睡眠を改善する可能性が見出されたことは重要な成果であると考えられる。今後は、実験室などの統制された環境下で睡眠ポリグラフなどを用いた終夜睡眠実験を行うなどの方法もあわせ、より詳細な検討を進めることが必要である。

## 謝 辞

研究実施にあたって貴重な助言をいただいた国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 北村真吾室長、におい発生シートの試作にご協力をいただいた東香産業株式会社様、シートからの揮発性成分の放散測定について多大なご協力をいただいた国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所 宮本康太室長に厚く御礼申し上げます。

## (引用文献)

- 1) 厚生労働省, 平成27年国民健康・栄養調査報告, 2017
- 2) 土井由利子, 日本における睡眠障害の頻度と健康影響, 保健医療科学, 61(1):3-10, 2012
- 3) Lehrner J, Marwinski G, Lehr S, Johren P, Deecke L, Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. *Physiology & Behavior*. 86(1-2):92-95. 2005.
- 4) Itai T, Amayasu H, Kuribayashi M, Kawamura N, Okada M, Momose A, Tateyama T, Narumi K, Uematsu W, Kaneko S. Psychological effects of aromatherapy on chronic hemodialysis patients. *Psychiatry Clin Neurosci*. 54(4):393-7. 2000.
- 5) Diego MA, Jones NA, Field T, Hernandez-Reif M, Schanberg S, Kuhn C, McAdam V, Galamaga R, Galamaga M. Aromatherapy positively affects mood, EEG patterns of alertness and math computations. *Int J Neurosci*. 96(3-4):217-24. 1998.
- 6) Johnson AJ. Cognitive facilitation following intentional odor exposure. *Sensors (Basel)*. 11(5):5469-88. 2011.
- 7) Hwang Eunhee and Shin Sujin, The Effects of

- Aromatherapy on Sleep Improvement: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis, *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 21 (2) : 61-68, 2015
- 8) Lillehei Angela S. and Halcon Linda L., A Systematic Review of the Effect of Inhaled Essential Oils on Sleep, *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 20 (6) : 441-451, 2014
- 9) (恒次他, 2005)
- 10) Li Q, Morimoto K, Nakadai A, Inagaki H, Katsumata M, Shimizu T, Hirata Y, Hirata K, Suzuki H, Miyazaki Y, Kagawa T, Koyama Y, Ohira T, Takayama N, Krensky AM, Kawada T., Forest bathing enhances human natural killer activity and expression of anti-cancer proteins. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 20 (2 Suppl 2) :3-8. 2007
- 11) Li Q, Nakadai A, Matsushima H, Miyazaki Y, Krensky AM, Kawada T, Morimoto K. Phytoncides (wood essential oils) induce human natural killer cell activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 28 (2) : 319-33, 2006
- 12) 西村 三香子, 伊香賀 俊治, 平田 潤一郎, 小川 聡, 土屋 遼太, 住宅の内装木質化が睡眠と日中の知的生産性に及ぼす影響, *日本建築学会関東支部研究報告集*, 86: 225-228, 2016
- 13) 山本由華史, 田中秀樹, 高瀬美紀, 山崎勝男, 阿住一雄, 白川修一郎, 中高年・高齢者を対象としたOSA睡眠調査票(MA版)の開発と標準化, *脳と精神の医学*, 10 (4) : 401-409, 1999
- 14) Quante M, Kaplan ER, Cailler M, Rueschman M, Wang R, Weng J, Taveras EM, Redline S, Actigraphy-based sleep estimation in adolescents and adults: a comparison with polysomnography using two scoring algorithms. *Nat Sci Sleep*. 18;10:13-20, 2018.
- 15) 谷田恵子, OSA 睡眠調査票による睡眠感と睡眠中の心拍変動パワースペクトル指標との関連, *日本看護技術学会誌*, 9 (3), 19-26, 2010.
- 16) Keshavarz Afshar M, Behboodi Moghadam Z, Taghizadeh Z, Bekhradi R, Montazeri A, Mokhtari P, Lavender fragrance essential oil and the quality of sleep in postpartum women, *Iran Red Crescent Med J*. 17 (4): e25880, 2015

# 現代の子ども文化の中に見られる化粧の話題の分析と 保護者と保育者の化粧に関する認識

筑波大学医学医療系

徳田 克己、水野 智美

In this study, 2 researches are done. Firstly, the analysis for makeup toy in young children's magazine and clarified where makeup is position in the Japanese children's culture. Secondly, we conducted a survey to parents with young children and nursery teachers and asked about their awareness on makeup for children.

As a result, there are a lot of makeup in magazine and toys. It goes beyond pretend play and they can color eyeshadows, cheeks, and lipsticks in coloring sheet and there are some that they can put makeup directly on their skin. Also, more than 70% of the children in the magazine was wearing makeup.

The result of the survey to the parents and nursery teachers showed that most of the children put makeup on special occasions such as performance and Shichigosan ceremony and many parents and nursery teachers had negative feeling toward makeup such as "makeup is not good for children's body and skin".

It is not good to deny that children are interested in dressing up but it is not desirable that children's cosmetics is in trend and accept children to put on makeup from early age as culture.

## 1. 緒言

現代の幼児向け雑誌の中には、化粧に関する話題が多く取り上げられ、付録として子ども用のコスメが付いていることは珍しいことではない。また、玩具店には様々な種類の子ども用のコスメが販売されている。さらに、テレビや雑誌などで、化粧をした子どもが映し出される機会も増えてきた。このような状況により、幼児にとってコスメが身近なものとなり、化粧への憧れが強くなってきている。雑誌に掲載されている子どもモデルのような化粧をしたいと言いつけたり、幼稚園や保育所に化粧をして行きたがったりするという話題について幼児を持つ保護者から頻りに耳にする。一方で、幼児を持つ保護者や保育者の中には、幼児期の子どもが化粧をすることにとまどいを感じたり、強い拒否感を抱いたりする者もいる。同じ幼稚園に勤務する保育者間でも認識が異なり、ある保育者は子どもが化粧をすることを容認するが、別の保育者は禁止するという事態も生じている。

そこで本研究では、大きく2つの調査を行った。1番目の調査として、幼児向けの雑誌やコスメ玩具の分析を行い、幼児がどのように化粧に触れているのか、日本の幼児文化の中に化粧がどのように位置づけられているのかを明らかにする。2番目の調査として、幼児を持つ保護者と保育者を対象にして、幼児期の子どもの化粧に関する認識を尋ね

る質問紙調査を行う。その中で、子どもはどのように化粧をしているのかを明らかにするとともに、保護者や保育者の持っているいかなる特性が幼児の化粧に関する拒否感に関連しているのかを明確化する。

## 2. 幼児向け雑誌および玩具におけるコスメの扱われ方

### 2.1. 幼児向け雑誌におけるコスメの扱われ方

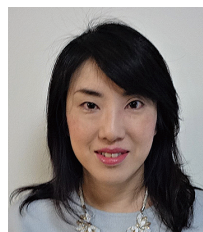
#### (1) 分析対象と手続き

2016年4月～2017年3月に発行された主に就学前の幼児を対象としている6種類の雑誌、計52冊(5138頁)、付録数55個であった。雑誌名と冊数(頁数)は、女兒の雑誌として、ぷっちぐみ12冊(1318頁)、ひめぐみ3冊(184頁)、キャラぱふえ7冊(962頁)、ピンク6冊(372頁)、男女とも読む雑誌として、たのしい幼稚園12冊(1158頁)、おともだち12冊(1144頁)であった。分析対象アイテムは、顔に関係するもの(チーク、口紅、ファンデーション、アイシャドウ、つけまつげなど)に限定し、ヘア化粧、マニキュア、装飾品は除いた。

#### (2) 結果と考察

雑誌の内容を、キャラクター漫画、キャラクターぬり絵、キャラクター製作、キャラクター紹介、まちがい探し、本誌内容紹介、コスメ紹介、懸賞、コスメ広告、通販、映画紹介、次号紹介、書籍紹介、他誌紹介、付録、綴込み付録、綴込みシール、付録説明、その他の19項目に分類し、コスメに関係するものが掲載されているページを計数した。

その結果、コスメに関する内容が掲載されていたのは158頁であり、全体の3.1%であった。19項目の中で最も多かったのは懸賞(39頁)であった。賞品としてキャラクター玩具、キッズコスメ



\*\* Analysis of the Topic of Makeup in Modern Children's Culture and Awareness of the Parents and Nursery Teachers

Katsumi Tokuda\*, Tomomi Mizuno\*\*

University of Tsukuba, Faculty of Medicine

商品(子ども用のリップやチークなど、子どもが直接、肌に塗るもの)、化粧玩具(木製やプラスチック製のコスメの形をした玩具であり、子どもの肌に直接には塗らないもの)などが当たるといった内容であった。次に多かったのが、キラリスというコスメキャラクター(しばが口紅の形をしている)やリカちゃんが登場するキャラクター漫画であった(35頁)。また、リカちゃんの友だちの「化粧が上手なつばさちゃん」がしばしば登場しており、口紅、アイシャドー、フェイスペイントの方法などが載っていた(図1)。つばさちゃん人形の懸賞もあった。

化粧玩具の広告(16頁)や紹介(7頁)では、ラメ入りリップなどの子どもが化粧をするためのキッズコスメ商品が取り扱われていた。その頁には派手な化粧をしている子どもモデルが載っているものが多く、読者にとっては購買意欲が増すことが推測された。

幼児雑誌に特徴的であったのはキャラクターぬり絵であった(9頁)。例えば、頁に大きくラプンツェルの顔が載っ

ており、そこに色鉛筆を使って、まゆげ、チーク、口紅を塗るというものであった(図2)。頁内には化粧の見本が示されていた。ただし、色鉛筆ではなく、付録の「メイクぬりえコンパクト」を使ってぬり絵をさせるものもあった(図3)。これらは大人が使用しているコンパクトやチップにとともよく似た玩具であり、この絵の具が子どもの顔などに付着することが心配である(保護者への注意書きで保護者の管理下で使用するように書かれている)。

コスメに関連した付録は3個であった。1つは前述の「メイクぬりえコンパクト」であり、その他に「たからものボックスリップペン(ケースの中の赤い口紅の形状の赤色水性ペン)」、「ひかるおけしょうコンパクト(コンパクトの中に、鏡、パフ、チップ、押すと光る部分がある)」の2つがあった。リップペンは子どもが自分の唇に塗ってしまう危険性があると思われた(注意書きはある)。

分析対象の5,138頁のうち、女兒の写りが載っているのは401頁であった。そのうち、明らかに化粧をしていると



図1 リカちゃん人形を取り上げる中で、化粧の仕方を紹介している頁



図2 色鉛筆で化粧のぬり絵をする頁



図3 付録の「メイクぬりえコンパクト」を用いてぬり絵をする頁



図4 化粧をした女兒の写真

判断された写真が載っているのは283頁(女児の写真のうちの70.1%)であった(図4)。

## 2.2. 幼児向け玩具におけるコスメの扱われ方

### (1) 分析対象と手続き

インターネットの大手通販サイト2社において「化粧+おもちゃ」「コスメ+おもちゃ」「メイク+おもちゃ」「キッズコスメ」を検索ワードとして検索された玩具に目を通した上で、東京都内の大型玩具店3店舗、東京おもちゃショー2016年、東京おもちゃショー2017年に行き、市場でどのような幼児向けのコスメ玩具が販売されているのかを観察し、玩具の分析をした。

### (2) 結果と考察

販売されている幼児向けのコスメ玩具は、1)キッズコスメ商品(実際に子どもが自分の肌や爪、髪に塗って遊ぶもの)、2)木製あるいはプラスチック製で、見立てて遊ぶ化粧玩具、3)ぬり絵用紙や人形に塗って遊ぶ化粧玩具の3つに分類できた。

1)キッズコスメ商品の中には、ディズニーのプリンセスシリーズやバービーなどのキャラクターを使用したものが目立った。これらのキャラクターを使用した商品は、色付きリップ(リップグロスを含む)、アイシャドー、ネイル(ネイルストーン、ネイルシールを含む)、アクセサリ(ティアラ、指輪)などがセットあるいは単品で売られており、子どもがキャラクターになりきることができるように作られていた(図5、図6)。

約7割の商品の対象年齢は6歳以上となっていた。しかし、玩具店で観察していると、購入する子どもの年齢が対象年齢以下である(おそらく3~5歳)と思われるケースがほとんどであり、対象年齢を確認している保護者はいなかった。

また、約半数の商品に「保護者の監視のもとで遊ぶこと」「乳幼児の手の届かないところに保管すること」という注意書きが書かれていたが、現実には保護者が監視していないところで幼児が使用している可能性があると思われる。

一部の商品には、化粧落としやリムーバーを用いなくても、水やせっけんで落ちること、子どもの肌に負担が少ない成分を使っていることを明記していた。ただし、すべての商品に化学物質が含まれており、あくまでも大人のコスメよりも皮膚への負担が軽いというだけに過ぎないと言える。また、国産の商品はごく一部しかなく、ほとんどが中国や韓国で製造された輸入品であった。国産であれば、薬事法によって感作性の強い色素などの使用が禁止されているが、輸入品の場合にはそれらが含まれている危険がないとは言えない。

- 2)木製あるいはプラスチック製の玩具の化粧玩具は、口紅、アイシャドー、チーク、化粧ブラシなどがポーチあるいはドレッサーとセットになっていた。実際に肌に色を付けることはできないが、精巧にできており、化粧をする気分を味わうことができる内容であった(図7)。
- 3)ぬり絵用紙や人形に塗って遊ぶ化粧玩具は、化粧パレツ



図5 キッズコスメ商品1



図6 キッズコスメ商品2



図7 木製の化粧道具



図8 ぬり絵用紙に塗って遊ぶ化粧玩具

トに口紅、アイシャドー、チークの絵具とコスメチップやパフがセットされており、ぬり絵用紙や人形の顔にコスメチップやパフを使って色を塗っていくようになっていた(図8)。すべての玩具の注意書きに「肌や髪にしようすることができない」と書かれていたが、幼児向け雑誌の付録と同様に、子どもが肌に塗ってしまう危険があると感じられた。なお、「玩具安全基準に適合した色素を用いている」ことを明記する玩具が一部にあった。

### 3. 幼児期の子どもの化粧に関する保護者、保育者の認識

#### 3.1. 保護者に対する質問紙調査

##### (1) 目的

幼児を持つ母親を対象に、幼児期の子どもが化粧することについての認識、自分の子どもが化粧をした経験や状況、母親自身の化粧の経験などを明らかにする。

##### (2) 方法

###### ①調査対象者

埼玉県、茨城県、沖縄県で開催された幼児を持つ保護者を対象とした講演会(それぞれの県で1か所ずつ)に参加した母親480名を調査対象とし、282名から回答を得た(回収率59%)。そのうち、回答に不備のあるものを除き、228名の回答を分析対象とした。

###### ②調査手続き

任意による無記名自記式質問紙調査を行った。調査時期は、2016年1月～3月であった。

###### ③倫理的配慮

筑波大学医学医療系医の倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号1026)。

##### (3) 結果

###### ①調査対象者の属性

調査対象者の属性を表1に示した。調査対象者の年齢は30代と40代が9割以上を占めており、20代はわずかであった。また、子どもは2人以下が7割以上を占めた。また、女児のいる者は63%であり、小学生以上の女児がいる者は26%であった。

###### ②わが子の化粧経験

小学生以下の女児を持つ者( $n=139$ )を対象に、子どもが幼児期に化粧をした経験があるかどうかを尋ねたところ、「ある」と答えた者は85%(118名)と、大半を占めた。子どもが化粧をしたことがある者に、子どもがはじめて化粧をしたのはいつかを尋ねたところ(表2)、3歳と答えた者が7割以上であり、その他の年齢ではごくわずかであった。子どもがどのような時に化粧をするかを尋ねたところ(表3)、「発表会や七五三などの特別な日」と答えた者が大半であったが、「家の中での遊び」と回答した者も約2割いた。お出かけや幼稚園、保育所にしていく子どもは非常に少な

かったことから、基本的には特別な日以外は、家の外にしていけない家庭がほとんどであると言える。

子どもが化粧をする頻度を尋ねたところ(表4)、1年に1、2日以下と答えた者が6割であり、1か月に1回以上化粧する子どもは1割に過ぎなかった。

子どもが化粧をしたことによって生じた問題を尋ねたところ、「化粧品によって皮膚に異常が発生した」と答えた者が2%(2名)、「化粧が禁止されている場所(幼稚園や保育所など)に化粧をしていきたいと駄々をこねた」2%(2名)が挙げられたにすぎなかった。

###### ③幼児の化粧に関する保護者の認識

幼児期の子どもが化粧することについて、どの程度、

表1 調査対象者の属性 (N=228)

年齢	20代	3% (8名)
	30代	63% (144名)
	40代	32% (72名)
	無回答	2% (4名)
子どもの人数	1人	24% (55名)
	2人	52% (119名)
	3人	14% (32名)
	4人以上	2% (3名)
	無回答	8% (19名)
女児の有無	女児あり	3% (143名)
	女児なし	37% (85名)
小学生以下の女児の有無	女児あり	61% (139名)
	女児なし	39% (89名)

表2 子どもがはじめて化粧をした年齢 (n=118)

2歳	7% (8名)
3歳	71% (84名)
4歳	2% (2名)
5歳	1% (1名)
6歳	2% (2名)
無回答	18% (22名)

表3 子どもはどのような時に化粧をするのか(選択式) (n=118)

発表会や七五三などの特別な日	87% (103名)
家の中での遊び	19% (23名)
デパートへの買い物や外食などのお出かけ	2% (2名)
幼稚園や保育園に行く時	2% (2名)
その他	2% (2名)

表4 子どもはどのくらいの頻度で化粧をするのか(選択式) (n=118)

ほぼ毎日	1% (1名)
1週間に3、4日程度	0
1週間に1、2日程度	1% (1名)
1か月に1、2日程度	8% (9名)
半年に1、2日以下	12% (14名)
1年に1、2日以下	60% (71名)
無回答	18% (22名)

抵抗があるかについて、「非常に抵抗がある」から「全く抵抗がない」までの5段階のリッカート尺度で尋ねた(得点が高い方が、抵抗が強いことを示す)。母親の年代(20代、30代、40代)によって抵抗感に違いがみられるかどうかについて、分散分析を用いて確認したところ(表5)、有意な差は認められなかった。また、子どもが化粧をする頻度(1か月に1回以上化粧をするか、1回未満か、化粧をしたことがないか)によって、化粧への抵抗感に違いがみられるかについて、分散分析を用いて確認したところ(表6)、有意な差が認められた。多重比較を行ったところ、1か月に1回未満の者と1か月に1回以上の者、化粧をしたことがない者と1か月に1回以上の者との間に、それぞれ有意な差が認められ、1か月に1回以上の化粧を子どもがしている者は他の群と比べて抵抗感が低いこと、1か月に1回未満の者は化粧をしたことがない者と抵抗感に違いがないことがわかった。

化粧に関する意見について、どの程度賛成をするかを「非常に賛成する」から「非常に反対する」までの5段階のリッカート尺度で尋ねた(得点が高い方が、賛成の程度が高いことを示す;表7)。その結果、「化粧をして幼稚園や保育所に行ってはいけない」と認識する傾向が強い一方で、「特別な日に化粧をするのは問題ない」とも考える傾向がみられることから、幼児の化粧は、発表会や七五三などの特別な日だけにするものであり、幼稚園や保育所などの日常生活ではすべきではないと考えていることが確認できた。また、「子どもは化粧をしなくてもかわいいので化粧をする必要はない」と認識する傾向が強いため、「子どもの身体に安全な化粧品ならば子どもに使わせてもよい」「子どもが喜ぶならば化粧をしてもよい」「化粧後に丁寧に落としてあげれば子どもに化粧することに問題はない」という意見には反対であった。

幼児の化粧に対する抵抗感に、調査対象者のどのような認識が影響しているのかを明らかにしたいと考え、幼児が化粧をすることへの抵抗感を目的変数とし、表7に示した8項目の認識を説明変数として、重回帰分析を行った(表8)。なお、重回帰分析を行うにあたっては、強制投入法を用いた。その結果、「化粧品は子どもの皮膚や身体によくない」という認識が化粧への抵抗感に影響を与えていることがわかった。

### 3.2. 保育者に対する質問紙調査

#### (1) 目的

幼稚園、保育所、子ども園に勤務する保育者を対象に、幼児期の子ども化粧に対する認識、自分が担当した子どもが化粧をした経験や状況、保育者自身の化粧の経験などを明らかにする。

#### (2) 方法

表5 母親の年齢の違いによる抵抗感

	M	SD	F値
20代	3.40	.548	0.75 (2,178)
30代	3.75	.974	
40代	3.60	.999	

表6 子どもの化粧の頻度(1か月に1回以上化粧をしているか)による化粧に対する抵抗感

(n=139) (小学生以下の女兒がいる家庭のみ)

	M	SD	F値
1か月に1回以上	2.50	0.85	12.21** (2,123)
1か月に1回未満	3.82	0.95	
化粧経験なし	4.11	0.69	

\*\*p<0.01

表7 幼児が化粧することに関する保育者の認識

(N=228)

	M	SD
化粧をして幼稚園や保育所に行ってはいけない	4.74	0.82
子どもは化粧をしなくてもかわいいので化粧をする必要はない	4.64	0.78
特別な日(発表会や七五三など)に化粧をするのは問題ない	4.57	0.65
化粧品は子どもの皮膚や身体によくない	4.23	0.81
子どもの身体に安全な化粧品ならば子どもに使わせてもよい	2.74	1.10
化粧をすることによって子どもが自信を持つことができるならば化粧をしてもよい	2.49	1.10
子どもが喜ぶならば化粧をしてもよい	2.48	1.02
化粧後に丁寧に落としてあげれば子どもに化粧することに問題はない	2.22	1.04

表8 幼児が化粧することに関する認識と抵抗感の関係

(重回帰分析の結果)

	$\beta$
化粧品は子どもの皮膚や身体によくない	.470**
子どもが喜ぶならば化粧をしてもよい	-.145*
特別な日(発表会や七五三など)に化粧をするのは問題ない	-.600
化粧をして幼稚園や保育園に行ってはいけない	-.035
子どもは化粧をしなくてもかわいいので化粧をする必要はない	-.147*
子どもの身体に安全な化粧品ならば子どもに使わせてもよい	-.172*
化粧後に丁寧に落としてあげれば子どもに化粧することに問題はない	-.095
化粧をすることによって子どもが自信を持つことができるならば化粧をしてもよい	.117
$R^2$	0.44**

\*\*p<0.01、\*p<0.05

#### ①調査対象者

埼玉県、茨城県、沖縄県で開催された保育者を対象とした研修会(それぞれの県で1か所ずつ)に参加した女性保育者550名を調査対象とし、378名から回答を得た(回収率

69%)。そのうち、回答に不備のあるものを除き、357名の回答を分析対象とした。

## ②調査手続き

任意による無記名自記式質問紙調査を行った。調査時期は、2016年1月～3月であった。

## ③倫理的配慮

筑波大学医学医療系医の倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号1026)。

## (3) 結果

### ①調査対象者の属性

調査対象者の属性を表9に示した。年齢は20代が最も多かった。また、所属は保育所(私立、公立)が多かった。子どもがいる者は36%のみであった。

### ②担当した子どもの化粧経験

これまでに担当したクラスの子どもの化粧をして登園した経験の有無を尋ねたところ、「化粧をしてきた子どもがいる」と答えた者は13% (48名)であった。化粧をしてきた子ども(担当した子どもの中で化粧をしてきた子どもが複数いた場合には、最も化粧をする頻度が高い子ども)がどれぐらいの頻度で化粧をしてきたのかを尋ねたところ(表10)、「頻繁に化粧をしてきた」と答えた者はわずかであり、数回程度にとどまっていた。化粧の内容を尋ねたところ(表11)、口紅(色付きリップを含む)が最も多かった。

子どもがどのような時に化粧をしてきたのかを尋ねたところ(表12)、半数は「特に理由はわからない」と答えたが、「発表会などの園の行事の日」「子どもが自分用の化粧道具を買ってもらった後」の回答があった。

### ③幼児が化粧することに関する保育者の認識

幼児期の子どもが化粧することについて、どの程度、抵抗があるかについて、「非常に抵抗がある」から「全く抵抗がない」までの5段階のリッカート尺度で尋ねた。保育者の年代(20代、30代、40代、50代、60代以上)によって抵抗感の違いが見られるかどうかについて、分散分析を用いて確認したところ(表13)、有意な差が認められた。残差分析をした結果、40代以上の保育者は、20代の保育者と比べて抵抗感が有意に強いこと、50代以上の保育者は30代以上の保育者よりも抵抗感が有意に強いことを確認した。つまり、保育者の年齢が高いと抵抗感がより強く表れると言える。

化粧に関する意見について、どの程度賛成をするかを「非常に賛成する」から「非常に反対する」までの5段階のリッカート尺度で尋ねた(表14)。その結果、「子どもは化粧をしなくてもかわいいので化粧をする必要はない」「化粧品は子どもの皮膚や身体によくはない」という認識が強く、「化粧をすることによって子どもが自信を持つことができるならば化粧をしてもよい」「化粧後に丁寧に落としてあげれば子どもに化粧をすることに問題はない」という意見には

表9 調査対象者の属性 (N=357)

年齢	20代	44% (158名)
	30代	20% (71名)
	40代	14% (49名)
	50代	19% (66名)
	60代以上	2% (9名)
	無回答	1% (4名)
所属	公立幼稚園	9% (31名)
	公立保育所	18% (64名)
	公立こども園	3% (10名)
	私立幼稚園	14% (52名)
	私立保育所	39% (140名)
	私立こども園	10% (36名)
	無回答	7% (24名)
保育歴	12.12 (±11.39)	
子どもの有無	子どもあり (女兒あり)	36% (129名) (23% (93名))
	子どもなし	62% (222名)
	無回答	2% (6名)

表10 担当した子どもの化粧の頻度(選択式)

(n=48) (化粧をして登園した子どもを担当した者のみ)

頻繁に化粧をしてきた	6% (3名)
時々化粧をしてきた	32% (15名)
1、2回だけ化粧をしてきた	52% (25名)
その他	4% (2名)
無回答	6% (3名)

表11 担当した子どもの化粧の内容(選択式)

(n=48) (化粧をして登園した子どもを担当した者のみ)

口紅(色付きリップを含む)	81% (39名)
チーク	29% (14名)
アイシャドウ	15% (7名)
その他	23% (11名)

表12 担当した子どもはどのような時に化粧をしたか(選択式)

(n=48) (化粧をして登園した子どもを担当した者のみ)

発表会などの園の行事の日	23% (11名)
子どもが自分用の化粧道具を買ってもらった後	19% (9名)
子どもが家族と外出した翌日	13% (6名)
特に理由はわからない	50% (24名)
その他	13% (6名)

表13 保育者の年齢の違いによる化粧に対する抵抗感

(N=357)

	M	SD	F値
20代	3.74	0.94	15.12** (4,333) 40代=50代=60代以上>20代 50代=60代以上>30代
30代	3.88	0.93	
40代	4.32	0.89	
50代	4.63	0.73	
60代以上	4.88	0.35	

\*\*p<0.01

表 14 幼児が化粧することに関する保育者の認識

(N=357)

	M	SD
子どもは化粧をしなくてもかわいいので化粧をする必要はない	4.74	0.62
化粧をして幼稚園や保育園に来てはいけない	4.39	1.06
化粧品は子どもの皮膚や身体によくない	4.39	0.84
特別な日(発表会や七五三など)に化粧するのは問題ない	4.15	0.94
子どもの身体に安全な化粧品ならば子どもに使わせてもよい	2.47	1.14
子どもが喜ぶならば化粧をしてもよい	2.32	1.12
化粧をすることによって子どもが自信を持つことができるならば化粧をしてもよい	2.23	1.06
化粧後に丁寧に落としてあげれば子どもに化粧することに問題はない	2.09	1.02

賛同しない傾向がみられた。

幼児が化粧することへの抵抗感には、保育者のどのような認識が影響しているのかを明らかにしたいと考え、幼児が化粧することへの抵抗感を目的変数とし、表14に示した8項目の認識を説明変数として、重回帰分析を行った(表15)。なお、重回帰分析を行うにあたっては、強制投入法を用いた。その結果、母親と同様、「化粧品は子どもの皮膚や身体によくない」という認識が化粧への抵抗感に影響を与えていることがわかった。逆に、「子どもが喜ぶならば化粧をしてもよい」と考えることは、抵抗感を弱めることに影響することを確認した。

#### 4. 総括

本研究の結果より、幼児向け雑誌や玩具の中にコスメが多く取り入れられており、化粧のまねをする遊びを超えて、ぬり絵などで子どもが口紅やアイシャドー、チークの塗り方を体験できるようになっていたり、直接、子どもが肌に塗って遊ぶことができるようになっていたりしていた。また、雑誌に登場する子どもの7割以上が化粧をしていた。このように、キッズコスメが子どもの日常に近

表 15 幼児が化粧することに関する認識と抵抗感の関係

(重回帰分析の結果)

	$\beta$
化粧品は子どもの皮膚や身体によくない	0.35**
子どもが喜ぶならば化粧をしてもよい	-0.24**
特別な日(発表会や七五三など)に化粧するのは問題ない	-0.01
化粧をして幼稚園や保育園に来てはいけない	0.15
子どもは化粧をしなくてもかわいいので化粧をする必要はない	0.01
子どもの身体に安全な化粧品ならば子どもに使わせてもよい	-0.12*
化粧後に丁寧に落としてあげれば子どもに化粧することに問題はない	-0.14*
化粧をすることによって子どもが自信を持つことができるならば化粧をしてもよい	0.01
$R^2$	0.46**

\*\* $p < 0.01$ 、\* $p < 0.05$

い存在になってきたと言える。

ただし、保護者および保育者の調査結果より、大半の子どもは、発表会や七五三などの特別な行事に限って化粧しており、日常の遊びの中で化粧をしているケースは少数であることが確認できた。このことは、保護者も保育者も「化粧品は子どもの皮膚や身体によくない」と考え、幼児が化粧をすることに否定的であったことが大いに関係していると思われる。つまり、子どもが雑誌や玩具から影響を受けて化粧に憧れを抱いても、多くの家庭では、大人が日常に取り入れることを制止しているのであろう。

子どもがおしゃれに関心を持つことを否定してはいけない。しかし、雑誌や玩具でキッズコスメの流行を作り、年齢が早い時期から子どもが化粧をすることを容認する文化を作ることは望ましいことではない。幼児期の子どもは母親や保育者のまねをしたがり、化粧やファッションなどを大人と同じようにやることで、大人の仲間入りをしたという感覚を抱く。しかし、子どもには、キッズコスメをすることで皮膚や身体に支障が生じる可能性があるとは考えにくく、大人と同じようにできるのであれば、当然ながらやりたいと考えてしまう。子どもが喜ぶからと言って、雑誌や玩具でキッズコスメ商品を開発し、進めていくことに警鐘を鳴らしていく必要があると考える。

# 香りのなつかしきの神経メカニズム

福井大学医学部脳形態機能学分野

村田 航志

Olfaction is a unique sensory modality in that it can strongly bring memories back and induce physiological and psychological responses. Odor sensation associated with old memories often accompanies comfortable feelings. However, neural mechanisms of such emotional responses are still unclear. We recently reported that odor-induced attractive behaviors accompanies activation of the olfactory tubercle (OT) in mice. The anteromedial domain of the mouse OT was activated by learned odor cues that induced approach behaviors. In addition, a larger number of dopamine receptor D1 type neurons were activated than D2 type neurons. In this study, we addressed whether the D1 type neurons in the anteromedial OT is involved in attractive behaviors induced by odor cues associated with environment where mice spent infant period. We at first confirmed that mice acquired attractive behaviors to odors associated with bedding where they spent infant periods. Activation of D1 type neurons in the anteromedial OT was observed when mice showed approaching behavior to the odor cue associated with the bedding. We confirmed that optogenetic activation of D1 type neurons in the anteromedial OT induced real-time place preference. These results raise a possibility that the D1 type neurons in the anteromedial OT can be activated by environmental odors which mice experienced in infants and plays a role in attractive behaviors.

## 1. 緒言

母親が使っていた化粧品の香りには懐かしさや安心を感じるが、脳はいかにしてこの感覚をつくりだすのだろうか。匂いに対する情動的な反応に関わる脳領域として近年注目されているのが嗅結節である<sup>1,2)</sup>。マウスを用いた我々の研究で、食べ物の在りかと関連づけた匂いに対する誘引行動には、嗅結節の前内側部のドーパミン受容体D1陽性ニューロンの活性化がともなうことがわかった<sup>3)</sup>。また、マウス嗅結節内側部は異性の尿に対する誘引行動に関わることが報告されている<sup>4)</sup>。嗅結節前内側部は匂いに対する広義の誘引的な質感形成に関わるのではないかと予想された。

本研究では母親に養育されたときに経験した匂いが成体期に誘引的な行動を引き起こす神経メカニズムへの嗅結節の関与を明らかにするため、以下の実験を行った。

1. 幼少期に経験した匂いに対する誘引的な行動が、ヒトだけではなくマウスでも見られるかを調べた。具体的には養育環境の違い（スギ・ヒノキ製床敷または紙製床敷）によるマウスのヒノキ精油への行動反応の違いを観察した。
2. ヒノキ精油に誘引行動を示すマウスで嗅結節の活性化が生じるかを評価した。
3. 活性化が見られた嗅結節神経回路をオプトジェネティ

クスの手法で操作し、誘引行動が生じるかを検証した。

## 2. 方法と結果

### 2.1. マウスにおける幼少期の養育環境臭の違いが成体期の匂い嗜好性に与える影響

実験に使うマウス (C57BL/6J 雄) はスギ・ヒノキ製チップの床敷で養育した群(スギ・ヒノキ群)と、ヒトが嗅いでも匂いのほとんどしない紙製チップの床敷(ペパークリーン、日本SLC)で養育した群(紙群)の2群を用意した。スギ・ヒノキ群は生後4-5週齢まで母親マウスとスギ・ヒノキ製おがくずを入れたケージで飼育し、4-5週齢の時点で紙製チップを入れたケージに母親から離し、同腹の雄同士で集団飼育した。紙群では妊娠期の母親マウスを紙製チップを入れたケージで飼育し出産、仔を養育させ、4-5週齢の時点で紙製チップを入れたケージに母親から離し、同腹の雄同士で集団飼育した。マウスはそれぞれ8-10週齢まで飼育し、行動試験を行った(図1A)。

行動試験は事前の実験環境への慣らし(day 1: habituation)をした後に、テストを行った(day 2: test) (図1B)。匂い嗜好性の測定試験では水とヒノキ精油、および酢酸アミルをマウスに提示した。脱脂綿に各物質を100%濃度で10 $\mu$ Lずつを染み込ませ、ステンレス製のメッシュ(18-8ボール茶漉4.5cm、ビクトリー)に脱脂綿を包み、匂い源を用意した。匂い源は透明なケージ(W175×D245×H125cm, TP-106 東洋理工)の右端中央に設置し、マウスをケージに移した後に3分間自由行動させた。3分間の自由行動後は一度マウスの行動をビデオ録画し、マウスが鼻先を匂い源から3cm以内に近づけてスニフリングする時間を実験者が目視で測定した(図1C)。day 1の実験環境の慣らしでは、同じ条件で水を提示し、10分間の自



Neural mechanisms of comfortable feeling induced by odors bringing back of memories

Koshi Murata

Division of Brain Structure and Function, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

A

	4-5週齢まで母マウスとともに飼育		8-10週齢まで母マウスから離して飼育	
スギ・ヒノキ養育群	スギ・ヒノキ製チップ		紙製チップ	
紙養育群	紙製チップ		紙製チップ	

B

day 1: habituation

テストケージで水提示(10分)	インターバル(5分)	テストケージで水提示(10分)
-----------------	------------	-----------------

day 2: test

水 (慣らし)	インター バル	水 (テスト)	インター バル	ヒノキ オイル	インター バル	酢酸 アミル
------------	------------	------------	------------	------------	------------	-----------

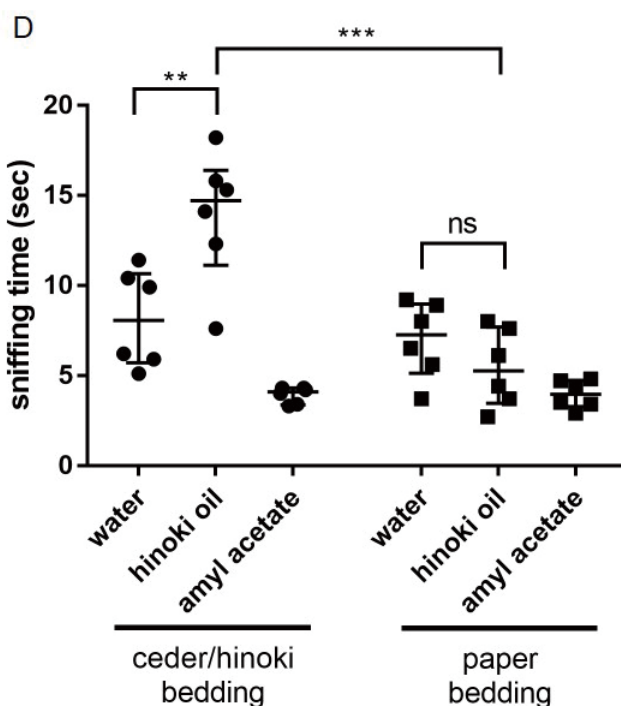


図1 養育環境の匂いに対する誘引行動の獲得  
 A. 授乳期の養育環境が異なるマウスを2群用意した。片方はスギ・ヒノキ製床敷で飼育し、もう一方は紙製床敷で飼育した。B. 行動試験のスケジュール。C. マウスが匂い源に接近しスニフリングする様子。D. スニフリング時間の測定結果。

由行動を2回経験させた。

スギ・ヒノキ養育群が水よりも有意に長い時間ヒノキオイルの匂いを嗅いだのに対し、紙養育群ではそのような有意な増加は見られなかった(図1D)。対照実験として提示した酢酸アミルでは、どちらのマウス群も水に比べて時間が短い傾向が見られた。これらの結果は、養育環境の匂いに対して、成体期においてもその環境の匂いに対する誘引行動を示すことを支持する。

## 2. 2. ヒノキ精油に誘引行動を示すマウスにおける嗅結節の活性化

2. 1. と同様の手順でスギ・ヒノキ養育群のマウスに水またはヒノキ精油を提示し、30分後にペントバルビタールの腹腔内注射で麻醉し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。取り出した脳を凍結し、20mm厚の嗅結節切片を作製後、*in situ* hybridization法により最初期遺伝子 *c-fos* の発現応答およびドーパミン受容体D1の発現を観察

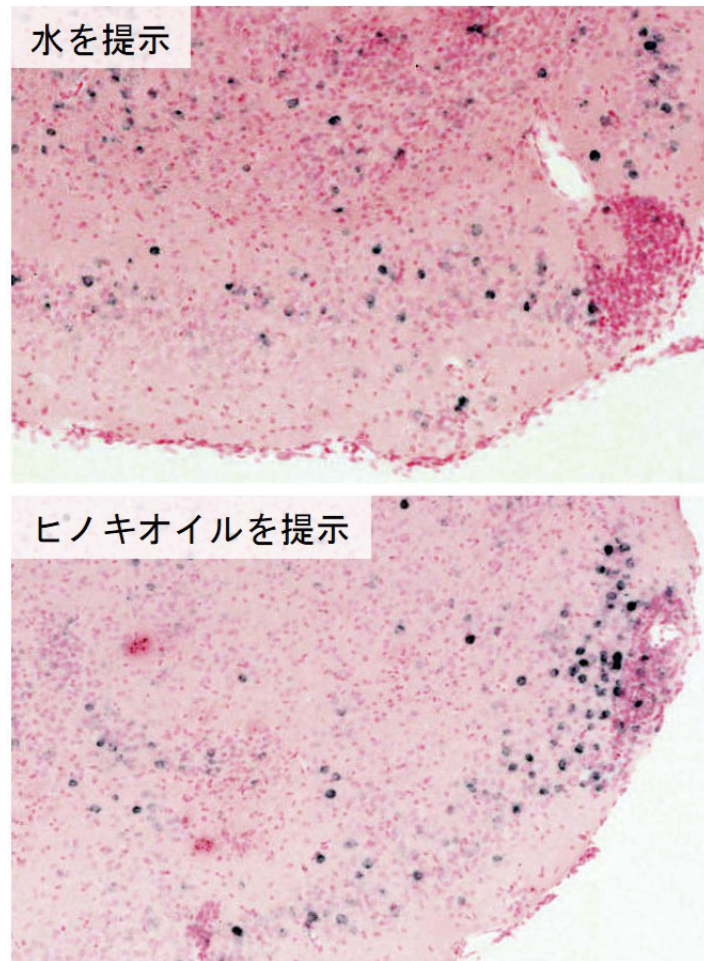


図2 ヒノキオイルに誘引行動を示したマウスの嗅結節前内側部のc-fos 発現応答

した(図2)。養育時に嗅いだことのあるヒノキの匂いに対して誘引行動を示したマウスでは、嗅結節の前内側部D1ニューロンの活性化がともなった。

### 2.3. オプトジェネティクスによる嗅結節神経回路の操作と場所嗜好性試験

2.2. で神経細胞の活性化が見られた嗅結節前内側部のD1ニューロンが誘引的な行動に関わるかどうかを検証するためにオプトジェネティクス(optogenetics, 光遺伝学)を導入し、リアルタイム場所嗜好性試験によって誘引作用の有無を調べた<sup>5)</sup>。

オプトジェネティクスでは、神経細胞にチャンネルロドプシンという光感受性のイオンチャンネルを発現誘導し、脳内留置した光ファイバーによって青色光を照射することで特定の神経細胞群を操作することができる。嗅結節の神経細胞群の中でもD1ニューロンだけを操作するために、D1ニューロンがDNA組換え酵素であるCreを発現する遺伝子改変マウス(D1-Creマウス)を用いた。D1-Creマウスの

嗅結節前内側部にアデノ随伴ウイルスベクターを用いてCre依存的にチャンネルロドプシンを発現誘導した。同マウスの嗅結節前内側部に光ファイバーを慢性留置し、青色レーザー光源と接続し、D1ニューロンの操作を行った。

マウスの誘引行動の観察にはリアルタイム場所嗜好性試験を用いた。この試験では暗いチャンバーと明るいチャンバーを自由に行き来できる状況下で、マウスの嗅結節前内側部D1ニューロンを操作した。マウスは夜行性のため、通常は暗いチャンバーに長時間滞在する。明るい部屋に滞在している間、ニューロンを操作することで、通常は避ける明るいチャンバーの滞在時間が変化するかを検証した。ニューロンの操作をしない対照群としては、チャンネルロドプシンを発現させずに光ファイバーを嗅結節前内側部に留置したD1-Creマウスを用いた(図3)。

実験ではマウスを行動試験チャンバーに入れてから20分間自由に探索をさせた。前半の10分間は光照射をせず、後半の10分間は明るいチャンバー滞在時に光照射をした。前半では、チャンネルロドプシンを発現させたマウスと対照

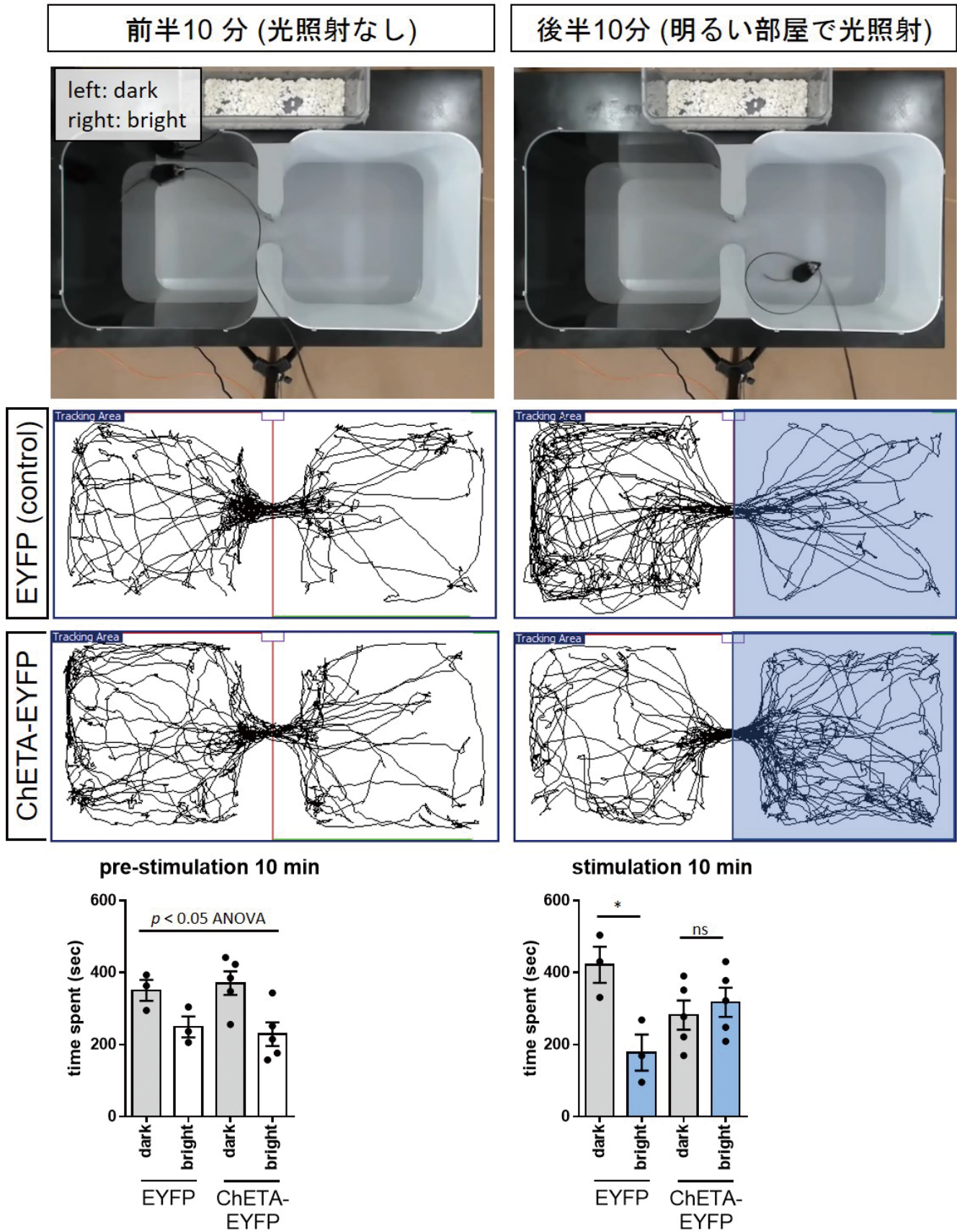


図3 嗅結節前内側部 D1 ニューロンの光操作による場所嗜好性の獲得

群マウスともに暗いチャンバーの滞在時間が明るいチャンバーの滞在時間よりも長かった。後半では、チャンネルロドプシン発現マウスでは明るいチャンバーの滞在時間が延びたのに対し、対照群マウスではそのような明るいチャンバーの滞在時間の延長は見られなかった。この結果から、嗅結節前内側部D1ニューロンの神経活動は、マウスに対して誘引的に作用することがわかった。

### 3. 考察

スギ・ヒノキチップで養育されたマウスはヒノキオイルに誘引行動を示し、その誘引行動には嗅結節の活性化がともなった。活性化が見られた嗅結節前内側部D1ニューロンをオプトジェネティクスによって操作すると、マウスは誘引行動を獲得した。嗅結節は、えさの匂いに対する誘引行動だけではなく、幼少期に経験した匂いに対する誘引性など、より広義な香りの誘引性に関わる可能性が示唆された。母親から養育を受けた環境は動物にとって安全な環境であり、嗅結節を介してその環境の匂いに対して誘引的な情動を生じさせるのかもしれない。

### 4. 総括

様々な情動的要素をともなう香りの質感は、どのようにして脳で作りだされるのかはよくわかっていなかった。最近の嗅覚生物学および神経科学的手法の発展により、ようやく手がかりがつかめてきた。今回の研究期間でできなかった実験として、1つは養育環境の匂いを紙製チップに人為的につけ(例：酢酸アミル)、成体期でその匂いに対する誘引行動を評価する実験が挙げられる。もう1つは、嗅結節の機能の阻害実験で、幼少期の養育環境の匂いに対す

る誘引行動への嗅結節の必要性を検証したい。本研究の今後の発展により、嗅覚が誘引的な意欲・情動を直接的に引き起こす神経メカニズムが明らかになり、今後の化粧品香料の開発に役立つデータを提供できると期待される。

### (引用文献)

- 1) Yamaguchi M. (2017) Functional Sub-Circuits of the Olfactory System Viewed from the Olfactory Bulb and the Olfactory Tubercle. *Front Neuroanat.* 2017 Apr 11;11:33.
- 2) Wesson DW, Wilson DA. (2011) Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell: hedonics, sensory integration, and more? *Neurosci Biobehav Rev.* 2011 Jan;35 (3): 655-68.
- 3) Murata K, Kanno M, Ieki N, Mori K, Yamaguchi M. (2015) Mapping of Learned Odor-Induced Motivated Behaviors in the Mouse Olfactory Tubercle. *J Neurosci.* 2015 Jul 22;35 (29):10581-99.
- 4) DiBenedictis BT, Olugbemi AO, Baum MJ, Cherry JA. (2015) DREADD-Induced Silencing of the Medial Olfactory Tubercle Disrupts the Preference of Female Mice for Opposite-Sex Chemosignals. *eNeuro.* 2015 Sep 22;2 (5). pii: ENEURO.0078-15.2015.
- 5) Zhang Z, Liu Q, Wen P, Zhang J, Rao X, Zhou Z, Zhang H, He X, Li J, Zhou Z, Xu X, Zhang X, Luo R, Lv G, Li H, Cao P, Wang L, Xu F. Activation of the dopaminergic pathway from VTA to the medial olfactory tubercle generates odor-preference and reward. *Elife.* 2017 Dec 18;6. pii: e25423.

# 新しい顔面 3 次元形状評価法の開発 — 相同モデル化による顔面形状の特徴を定量化する試み —

九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座口腔顎顔面外科学分野

森 悦 秀

**Introduction:** Recently, “homologous modeling” is frequently adopted as a new quantitative evaluation method of the face on the study field of human morphometry. In this research, three dimensional (3D) models of smile and straight faces from same persons were converted into homologous models and investigated to distinct smile and straight faces by the principal component analysis (PCAs).

**Materials and Methods:** Twenty-two volunteers (19 males and 3 females, 22 smile and 22 straight faces) who had no medical history cooperated with us for this research. The experimental protocol was approved by the ethics committee of Kyushu University medical campus. Volunteers were photographed to create smile and blank looks by the VECTRA 3D, and each data from them was converted into STL file and redundant regions, e.g. neck, hair and so on, was removed by an editorial software. Nine highly anatomic reproducible landmarks on the surfaces were plotted to trace changes in the expressions. Each homologous model was manufactured to lay over those with a generic face, which was a standard model depending on the 9 landmarks. Then, the PCAs was performed and its components that can distinguish between homologous models of smile and straight faces were searched.

**Results:** From 1st to 8th components of PCA could estimate over 78% in the all. The 2nd and 6th component showed significant differences between smile and straight faces. Both elements influenced homologous models in raising up or drooping of eyelid and cheilion. But the 2nd component seemed to influence in size of facial contour more.

**Discussion:** These findings showed that the 6th component of PCA influenced most strongly between smile and straight faces. It was suggested that the homologous models reconstructed by the single component of PCA would be useful to analyze the movement of landmarks’ quantitatively.

## 1. 緒 言

笑顔は人の印象に大きな影響を与えるため、“良い笑顔”は歯科治療の重要なゴールの一つである<sup>1)</sup>。これまでの“良い笑顔”に関する研究では、正面からの写真等の材料を用いて解剖学的特徴点の垂直的および水平的距離の変化を、2次元あるいは3次元に計測されてきた<sup>2)</sup>。しかしながら、笑顔は表情筋等複数の構成要素が同時にかつ複雑に変化しており、これを解析するための明確な評価方法は確立されていない<sup>3)</sup>。

筆者の研究室では、これまでに下顎前突患者の笑顔を主成分分析し、性別による違いを報告してきた<sup>4, 5)</sup>。これによりこの解析法は、従来の解析法と比較してより詳細に顔貌の変化を評価できることが示された。近年、人体の3次元計測方法の一つとして、対象物の3次元モデルを相同モデル化して主成分分析を行う方法が開発された<sup>6-9)</sup>。この方法は、主成分分析の結果を視覚的に確認することができ、解析結果を直感的に捉えることができる非常に有用な方法である。



Development of new facial three dimensional evaluation method –Quantitative evaluation of facial morphology by homologous modeling–

Yoshihide Mori

Section of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Maxillofacial Diagnostic and Surgical Sciences, Faculty of Dental Science, Kyushu University

そこで、本研究では顔貌を相同モデル化し、主成分分析法を用いて“笑顔”と“真顔”の違いに関して検討を行った。

## 2. 方 法

### 2.1. 対 象

対象は、本研究の実施計画（九州大学医系地区臨床研究倫理委員会承認）を説明し、実施することに同意をした健康成人 22 名（男性 19 名、女性 3 名）とした。平均年齢は、24.8 歳（23-28 歳）であった。3D 画像撮影解析装置（VECTRA H1, Canfield Scientific, Parsippany, NJ）を用いて、“笑顔”と“真顔”の撮影を行った。撮影時は、頭部の固定は行わず、2つの表情は撮影者の指示のもと複数回の練習の後に撮影し、1組の“笑顔”と“真顔”の3次元データを得た。すべての撮影は、1人の撮影者が行った。

### 2.2. 方 法

3D 画像撮影解析装置で撮影した顔面データをもとに、3次元再構築ソフトウェア（Mimics, Materialize, Leuven, Belgium）を用いて3次元画像を作成し、STLデータで保存した。次に、これを相同モデル化支援ソフトウェア（HBM-Rugle, Medic Engineering Corporation, Kyoto）を用いて、画像のトリミングを行った。相同モデル化に必要な解剖学的ランドマークは、これまでの報告を参考に試行錯誤し、最適と考えられた9点を定義した（Fig. 1, Table 1）。また、相同モデル化に必要なプレートデータは、3次元CADソフトウェア（Geomagic Studio 9, 3D Systems,

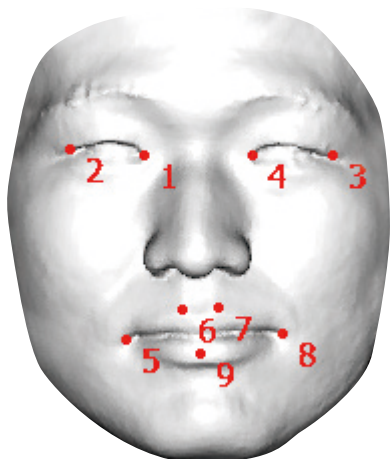


Fig. 1 Position of landmarks

Rock Hill, SC) を使用して顔のテンプレートモデルを生成した。顔面形状を構成する頂点数は 9,695 点であった。相同モデル化とは、テンプレートモデルを個別にスキャンされた顔面データの点群に自動的にフィットさせることであり、テンプレートモデルの頂点は最初に設定した解剖学的ランドマークと一致するように、フィッティングした。この作業を相同モデル化ソフトウェア (HBM, Digital Human Technology, Yokohama) および相同モデル化支援ソフトウェア (HBM-Rugle) を用いて各サンプルについて顔面データの相同モデル化を行った。

22 名、44 個の顔面相同モデルのデータを相同モデル化ソフトウェア (HBM) を用い、形状を構成する頂点の XYZ 座標 (9,695 点) を説明変数にして主成分分析し、“真顔”と“笑顔”の差を JMP5.1.2 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて、paired-t 検定あるいは Wilcoxon 順位和検定を用いて分析した。

### 3. 結果

主成分分析の結果、第 1 主成分の寄与率は 21.6 %、第 1-8 主成分までで累積寄与率は、78 % を超えていた (Table 2)。“笑顔”と“真顔”の判別では、第 2 主成分および第 6 主成分で有意差を認めた (Wilcoxon 順位和検定,  $p < 0.05$ ) (Table 3)。第 2 主成分および第 6 主成分で顔面データを可視化したところ、第 2 主成分は、顔の大きさの成分を含んでおり (Fig. 2)、“笑顔”と“真顔”の違いを主に表しているのは、第 6 主成分であると考えられた (Fig. 3)。第 6 主成分では、“笑顔”は、頬部が盛り上がり、鼻唇溝が深くなり、口角が挙上する違いがあることが明らかとなった (Fig. 3)。一方、第 2 主成分は顔の大きさ (特に垂直方向) 以外に口輪筋の動きを表しているように思われた (Fig. 2)。

### 4. 考察

本研究の目的である顔面形状の特徴を定量化するにあたり、

Table 1 Definition of landmarks

Landmarks	Category	Definitions
No. 1,4	Medial canthus	End point of medial canthus
No. 2, 3	Lateral canthus	End point of lateral canthus
No. 5, 8	Cheilion	Lateral commissure
No. 6, 7	Crista philtri	Edge of upper lip at cupid bow
No. 9	Labiale inferius	Midpoint of the lower vermillion line

Table 2 The result of principal component analysis

PCAs	eigenvalue	cumulative contribution ratio (%)
1 <sup>st</sup>	6339.6	21.67
2 <sup>nd</sup>	5080.9	39.05
3 <sup>rd</sup>	3568.6	51.25
4 <sup>th</sup>	2430.4	59.55
5 <sup>th</sup>	2015.5	66.44
6 <sup>th</sup>	1762.1	72.47
7 <sup>th</sup>	1201.6	76.57
8 <sup>th</sup>	953.28	78.83

Table 3 The result of principal component analysis between straight face and smile face

PCAs	average of sigenvalue		P value
	smile	straight	
1 <sup>st</sup>	26.046	18.954	0.0689
2 <sup>nd</sup>	30.136	14.864	<0.0001*
3 <sup>rd</sup>	26.136	18.864	0.0620
4 <sup>th</sup>	24.772	20.227	0.2453
5 <sup>th</sup>	25.136	19.864	0.1771
6 <sup>th</sup>	27.046	17.954	0.0195*
7 <sup>th</sup>	24.727	20.272	0.2549
8 <sup>th</sup>	24.500	20.500	0.3072

り、様々なパラメーターの関与が予想される。研究の第一歩として客観的に判別できる形状を明確にすることが必要であるため、同一人物の表情変化すなわち“笑顔”と“真顔”を解析することが有用と考えた。

スマイルはコミュニケーションを円滑に行う上で大きな影響を及ぼすといわれている。そのため、筆者のように顎顔面領域の治療を行う歯科医師にとって、“良い笑顔”を獲得させることは治療のゴールを設定する上で重要な因子の 1 つである。これまで“笑顔”に関する研究では、写真などを用いて 2 次元的に評価する方法や、模型や 3 次元画像を用いて 3 次元的に評価する方法が用いられてきた。しかしながら、3 次元的な評価であっても、解剖学的特徴点の距離や角度を計測して評価する方法が主流であり、複雑な形

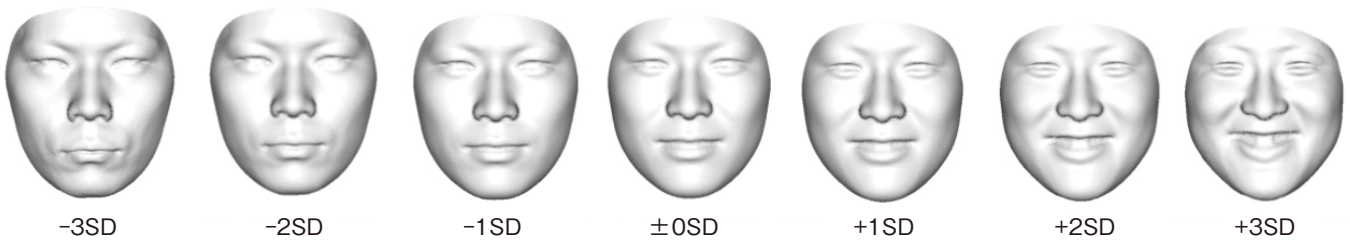


Fig. 2 Virtual shapes constructed by the 2nd component

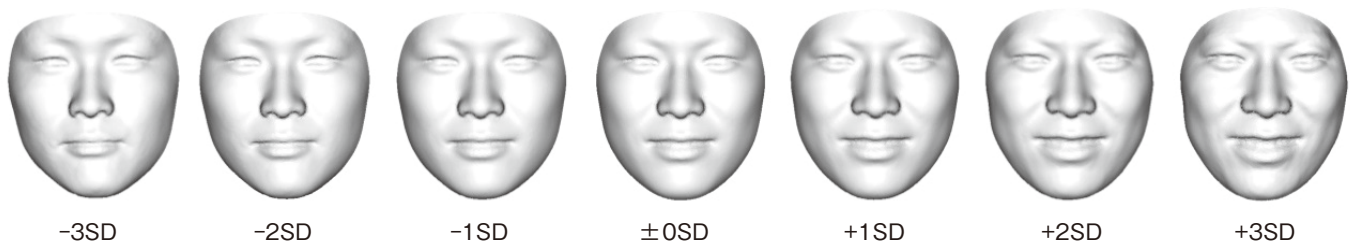


Fig. 3 Virtual shapes constructed by the 6th component

状を複合的かつ定量的に評価することは困難であった。近年、相同モデル化という概念が確立された。相同モデル化とは、人体形状データの統計処理を可能にするために、すべての個人の人体形状を解剖学的に対応づけられた同一頂点数、同一位相幾何構造のポリゴンで表現することであり、本技術は足、体型の計測やメガネフレーム作製などの産業技術の分野で用いられている<sup>6, 8, 9)</sup>。筆者は、これまでにこの方法を用いて“笑顔”時の口唇の変化に関して主成分分析法を用いて検討し、口唇の動きは男女差があることを明らかにした<sup>5)</sup>。主成分分析法はデータ群の分散の大きな軸(主成分)を順に見つけていく解析法であり、データの特徴を解析するのに有用な方法である。しかし、筆者らが解析を始めた時点ではテンプレートデータの作成が難しく、口唇等の限局的な変化を評価することはできるものの、顔貌すべてを評価することは困難であった。

その後相同モデル化の技術は進歩し、テンプレートを free form deformation法を用いて、対象の物体形状に対応するように自動的に変形させる方法が開発され<sup>7)</sup>、Inoueらはこの方法を用いて、下顎骨の形状を詳細に評価する方法を確立した<sup>10)</sup>。この方法の利点は相同モデルを統計処理することによって、平均形状、分布の端に位置する個別の仮想形状等も計算し合成することができることである。このため、形状の違いを視覚的に捉えることが可能で、評価結果を可視化できる。これにより、様々な変化が複雑に生じていても、少しずつ変化させて可視化することにより主成分が示すデータの傾向を総合的に判断することができる。この方法を用いることにより、第6主成分が示す“笑顔”では、“真顔”と比較して口角が挙上するだけで

なく、同時に頬部の膨らみや、同時に鼻唇溝が深くなることが明らかとなった (Fig. 3)。すなわち、この手法を用いることにより、“真顔”から“笑顔”に変化する際の複合的な変化を定量的に評価することが可能であったと考えられる。一方、第2主成分が示す顔面の変化を観察すると、+3SDでは“笑顔”のように見えるが、-3SDでは口唇周囲が緊張し、“真顔”ではなく“緊張した顔”のように見える。±0SDが“真顔”に近いと判断し、顔面高の増大も見られたことから第6主成分が“笑顔”と“真顔”を判断する成分と判断した (Fig. 2, 3)。

今回表示した顔面データ (Fig. 2, 3) は被験者のデータすべてを用いて作成した平均顔であるが、それぞれ個々の顔面データの加工も可能であり、今後この手法を用いれば個々にあった笑顔を予測することが可能となり、われわれ歯科医師にとっては治療のゴールの設定の一助になると考えられる。また、精神的なトラウマなどの理由により“いい笑顔”を作ることができなくなった患者などの治療に用いることができるのではないかと考えている。本方法の用途はこれに止まらず、様々な顔面形状の解析に利用可能だけでなく、テクスチャマッピングを用いて各頂点の色情報を付与すれば化粧法の解析などにも応用できるのではと推測している。

## 5. まとめ

今回、われわれは顔面形状の特徴を定量化するために、“相同モデル化”を用いて主成分分析を行うことにより良好な結果を得た。

## 謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に助成を頂いた公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に感謝致します。

研究計画の立案と実施に際し、ご支援いただいた九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野 山田朋弘准教授ならびに九州大学病院 顔面口腔外科 中野旬之講師に深謝致します。また、研究実施にご協力頂いた九州大学大学院歯学府 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野 安田光祐学士に感謝致します。

## (引用文献)

- 1) Shafiee R, Korn EL, Pearson H, et al. Evaluation of facial attractiveness from end of treatment facial photographs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 133, 500-508, 2008.
- 2) Janson G, Branco NC, Fernandes TMF, et al. Influence of orthodontic treatment, middle position, buccal corridor and smile arc on smile attractiveness. *Angle Orthod* 81; 155-163, 2011.
- 3) Schabel BJ, Franchi L, Baccetti T, McNamara JA Jr. Subjective vs objective evaluations of smile esthetic. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 135; S72-S79, 2009.
- 4) Mishima K, Nakano A, Umeda H, Shiraishi R, Ueyama Y. Gender differences in posed smiles using principal component analysis. *J Craniofac Surg* 43 (1): 144-148, 2015.
- 5) Mishima K, Shiraishi R, Kawai Y, Umeda H, Nakano H, Ueyama Y. Characteristics of Posed Smiles for Class 3 Female Patients Before and After Osteotomy Using Principal Component Analysis. *J Craniofac Surg* 27(7) : 1754-1758, 2016.
- 6) Mochimaru M, Kouchi M, and Dohi M. Analysis of foot forms using the FFD method and its application in grading shoe lasts. *Ergonomics* 1999; 43: 1301-1313.
- 7) Kouchi M, Mochimaru M. Inter-individual variations in intra-individual shape change patterns. *SAE Digital Human Modeling for Design and Engineering Conference* 2006; 2006-01-2353.
- 8) Mochimaru M, Kouchi M. Statistics for 3D human body forms. *SAE Digital Human Modeling for Design and Engineering Conference* 2000; 2000-01-2149.
- 9) Kouchi M, Mochimaru M. Simulation of the body shape after weight change for health-care services. In: Duffy VG, ed. *Advances in Applied Digital Human Modeling*. Indiana: CRC Press, 2010: 217-222.
- 10) Inoue K, Nakano H, Sumida T, et al. A novel measurement method for the morphology of the mandibular ramus using homologous modeling. *DentmaxillofacRadiol* 44(8); doi:10.1259/dmfr.20150062, 2015.



# 記念講演

●  
第 28 回表彰・贈呈式記念講演 片岡 一則  
●



# 夢を形に：ナノテクノロジーで創る体内病院

公益財団法人川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター長  
片岡 一則

かたおか・かずのり

1974年東京大学工学部合成化学科を卒業、79年同大学大学院工学系研究科、博士課程、工学博士を修了。同年から東京女子医科大学助手、講師、助教授を経て、1989年、東京理科大学基礎工学部助教授、94年同教授に就任。1998年、東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻教授に就任、2004年東京大学大学院医学系研究科付属疾病生命工学センター教授を兼務、昨年より現職の公益財団法人川崎市産業振興財団副理事長およびナノ医療イノベーションセンターセンター長ならびに東京大学名誉教授・政策ビジョン研究センター特任教授に就任され、また、米国ノースカロライナ大学薬学部非常勤教授も務められ、この間、パリ大学、ミュンヘン大学、浙江大学などの客員教授や物質・材料研究機構、生体材料研究センターのディレクター等も務められました。

・専門分野：高分子材料工学分野、医用生体工学、ナノ医療技術分野

・その他：日本学術会議会員（第3部）、文部科学省各種科学技術関連委員、他多数参加



大変過分なご紹介をいただきまして、ありがとうございました。きょうは、このコスメトロジー研究振興財団の研究助成の表彰式ということで、助成を受けられた方々は、大変おめでとございます。実は、私にとってもこの財団は特別な思い入れがございまして、第2回の平成3年の11月にこちらがそうなんですけど、私自身がこの財団の研究助成を頂きました。そのときのタイトルは『新しいDDS剤形としての高分子ミセルの設計と機能開発』で、ちょうど東京理科大にいたときなんですけど、研究室を開いて2年ぐらいのところで、立ち上げに大変苦労していたときに、この研究財団から貴重な助成金を頂きまして、研究を離陸させることができました。そういう点でも大変ありがたいと思っていますし、その財団で講演をさせていただくということで、私自身、きょうは大変に感激しております。

それで、今日は若い方も多いので、タイトルが、少し前向きと言うのですか、もちろん体内病院というのは今あるわけではなくて、将来こういうものができたらいいなということで、われわれが今、このナノ医療イノベーションセンターという所で研究開発を行っている内容の一端を、ご紹介させていただきたいと思います。これは建物ですが、多分、こんなものどこにあるか誰も知らないと思うのですが、これは羽田空港の多摩川のちょうど反対側がKing Sky Frontと言うんですけども、これは昔、いすゞの自動車工場だったんですが、そこを再開発しまして、国立医薬品食品衛生研究所が用賀から移ってまいりました。それを中核にして、今、医薬品、医療機器関係の研究所が周りを取り囲むようにして立ち上がってきております。

ここで一体、何をやろうとしているのかということなんですけど、これは医療イノベーションセンターですからイノベーションをやろうっていうわけなんですけども、実はわれわれの身近にあるイノベーションで思い付くのは、カメラとか電話とかパソコンとかオーディオっていうのが昔はバラバラにあったわけなんですけど、今、ご存じのようにこれが一つになることによってスマートフォンができて、われわれのライフスタイルが大きく変わりました。医療の分

野では、聴診器、お医者さんや薬、病院、医療機器というのがそれぞれあったわけなんですけど、だったら、これを一つにしちゃおうと、これがスマートナノマシンということになりまして、こういうものができると未来が変わるだろうと。未来がどう変わるのかと言うと、病院が体内にできちゃうという、そういうお話なんです。体内病院のシステムの考え方は、医療コンセプトは、現在はもちろん病気を治すというシックケアが中心で、皆さん病院に行くわけなんですけども、これはもう今、言われているように在宅にだんだんなるだろう、さらには、ウェアラブルになるだろうと。もっと先は何なんだろうという、これは体内病院になるんじゃないかと。つまり体内病院というのはどういうものかという、いわば検出機能があると。体内の隅々まで張り巡らせた異常監視検知システムであり、また、診断と治療を行う、つまり体内で発生するあらゆる異常に対して対応する能力、これが三位一体になって機能するという、そういう仕組みが必要なんです。これは言ってみれば、体内の持つ生体防御システムという免疫システムがありますよね。要は免疫システムと非常に似てるわけなんですけども、免疫システムを人工的につくるというよりかは、そういうものを補完供用する総合システムというものを体内病院というふうに考えようということです。

そうすると、その中核技術は何かと言うと、体内を自律的に循環して、いつも異常の検出と診断と治療をするウイルスサイズのスマートナノマシンという技術が必要になってくるだろうと。そういうものには、特定の細胞を撃つ、体内のバリアーを超える、負担をかけずに治す、老化、外敵から防ぐ、体内の微小環境を診ると、これができる社会が変わると。こういった撃つ、超える、治す、防ぐ、診る、変えるという機能を搭載していく必要があるわけです。こういう話をすると、私ぐらいの世代はすぐこういう映画を思い出すんです、『ミクロの決死圏』という。これ、多分、若い方は知らないんじゃないかと思うんですけど、私と同じぐらいの世代のここにおられる方はご存知かと思うんですけど、ハリウッドのSF映画でして、これは人間の体の中、

血管の中なんです。これ、お医者さんです。乗り物ごとうんと小さくして、送り込む。血管の中から病気を診断、治療するという奇想天外な映画なんです。私が見たのは、多分、高校生ぐらいかと思うんですけども、これを見て大変感激したことを覚えています。ですから、これはいつかみれば、まさにインボディーホスピタルというわけです。こういうものを創りたいということです。

そうは言っても、こんな奇想天外なことに研究費が出るのかということなんです。実は出てるんです。それはどこから出てくるのかと言うと、文部科学省から出てまして、文部科学省の中にセンター・オブ・イノベーションという仕組みがあります。これは10年プロジェクトなんですけども、10年後、あるいは20年後の社会を頭に描いて、その社会を実現するために必要な要素技術を10年かけて開発していくというプロジェクトでありまして、われわれが行っているのは、ここにある、ちょっと長いんですけど、「スマートライフケア社会への変革を先導するものづくりオープンイノベーション拠点」、COINSというふうに呼んでいますが。このCOINSのプロジェクトが、現在、ナノ医療イノベーションセンター iCONMで行われています。

このCOINSの目標は、この拠点の名前にもあるように、スマートライフケア社会をつくらう。それ一体何なんだって言う、要するにいつでも、どこでも、誰もがと、つまりごく少数の人だけじゃなくて、誰もがいつでも社会的負荷の大きい疾患から解放されて、気づかないうちに健康になるという、この夢みたいな社会をつくりたいというのが目標なんです。こういうものを実現するには、気づかないうちに健康になっちゃうわけですから、病院に行くこと自体が、もう気づいちゃっているわけです。だから、病院に行かずに済むと言うと、必然的に体内病院ということになるわけです。

そうは言っても、こんなものをどうやってつくるんだと言うと、これは大きさがウイルスサイズですから、当然のことながら歯車を組み合わせたり、材料を切ったりして作るわけにはいかない。代わりにどうするのかと言うと、これはモレキュラーエンジニアリングであろうと。つまり、分子を組み上げてつくっていくということになるわけです。私のバックグラウンドは高分子化学ですから、高分子を使うんですけども、ここにあるのは1本の高分子、長さは大体10ナノメートル。ところが、高分子の分野にはいろんな高分子があるんですが、これはブロックを連結した高分子、ブロックポリマーと言いまして、ちょうどレンガブロックが並んだような形になっています。こちら側がポリエチレングリコールで親水性、こちらは体の中に入れて使いますから、やたらなものはいけませんので、例えばポリアミノ酸、こういうものを使います。この1本の高分子の中に、いわば位置選択的にいろんな機能を合成化学的に作り込

んでいくわけです。つまり標的細胞に選択的に結合する機能とか、薬や造影剤を担持する機能とか、ここが大事なんですけども、細胞の中、あるいは組織の中の環境に応答して構造が変化していく機能と、こういうものを作り込みます。では、どんな環境が変化するのかと。これは後でお話ししますが、例えばpHが変わる、あるいは酸化還元電位が変わる、あるいはATPの濃度が変わる、そういうものを検出して構造を変えていくということになります。

こういうものを水中に置くと、これは自己組織化と言いますが、自然に自己会合して、ウイルスサイズの会合体、高分子ミセルと言うんですけども、これがわれわれが作ろうとしているナノマシンのプロトタイプです。これ、電子顕微鏡写真なんですけども、これ100ナノメートル、だから、粒径が大体50ナノメートルです。これはちょうどC型肝炎ウイルスと同じぐらいのサイズになります。もちろんこれはウイルスではありません。完全な合成物でありますけども、周りがポリエチレングリコールという親水性の高分子で覆われていますから、これによって血中にこういうものを入れると、ウイルスなんかを注射すると、すぐ異物として免疫に引っ掛かってしまうんですが、ポリエチレングリコールでくるむことによって、そういった認識から免れる。言ってみれば、ステルス爆撃機のような機能を獲得することができるわけです。

動画で、今のお話をもう一回お示しすると、こういうふうに水になじむ高分子と水になじまない高分子を作って、例えばそこにこういった抗がん剤を結合します。これを今のように水中に置くことによって、これが自動的に会合をしていって、こういった高分子の会合体ができてくるわけです。今日は、このお話はしませんが、こういった単純な構造だけでなく、中空粒子を作ったり、あるいはタバコモザイクウイルスのようなものを作ったりとか、もちろん、そういうことがいろいろできますが、いずれにしても、この外側の殻が大変大事です。

そうは言っても、どのぐらいステルスになるんだって言うことです。最近、顕微鏡の技術が大変進歩しまして、こういうものを体に入れたときに何が起こるのかということが、ちゃんと顕微鏡で見られるようになりました。これは今、マウスの耳の毛細血管の中を見てまして、血小板という血栓形成に関与する小さな血球、1から4ミクロン、これは緑の蛍光色素で標識しています。ナノ粒子は100ナノメートル以下ですから、はるかにこれより小さいはずなんです。ところが、ポリエチレングリコールの殻がない状態で血中に投与すると、血小板と大きさが同じになってる。つまり、これは一瞬のうちにダマができちゃうんです。ダマができて、しかも黄色の部分が見えますから、これは血中でベタベタと血小板にくっついているというわけです。ですから、こういうことが起きると、これはまずいわけ

でありまして、例えば肺で塞栓を起こしたり、脳で梗塞を起こしたりするわけです。ところが、この同じものの表面を、完全にポリエチレングリコールで覆うだけで状況は全く変わります、全くダメはなくなるんです。これによって、要するにステルス性を獲得することができるようになりました。そうは言っても、ただ血中をぐるぐる回っているだけでは仕事はしませんので、目的の細胞を見つけて中に入って行って、細胞内の信号物質、例えば pH とか ATP とか、そういうものを検出して、動的に構造が変化して、細胞内で診断治療をするという。こういうことができることによって、ナノデバイス、さらにはナノマシンに進化していくだろうというわけです。

今日は、pH とか、あるいは光や超音波と組み合わせたときのお話をしたいと思いますが、こういう体内病院へ向けた研究を今やってるんですけども、この COINS では、10 年後の世界と言いましたからビジョンが必要だということで、われわれがどんなビジョンを持ってるかと言うと、こういう技術がどんどん進むことによって、国民ががんの不安から解放され、アルツハイマー病は克服されると。年齢を問わずスポーツが楽しめ、社会が医療コストの負担から解放されると。病気が国民の精神的身体的負担にならなくなり、医療が日本の基幹産業になるという、多分、これ以上、楽観的なビジョンはないんじゃないかということです。でも、もともと私、工学部なので、工学者というのはオプティミスティックでないとできないんです。

ただ、そうは言っても、このまんまだと、これは単なる政治家の公約になっちゃいます。単なると言うと、怒られちゃいますけども。これはサイエンスですから、ミッションがあるわけです。つまり、なんでがんが不安か。再発性があるからだろうと。それを抑えればいだろうと。そのためには、がん細胞だけに目的物を確実に到達させよう。なんでアルツハイマーが克服できないのか。薬が要するに脳に入らないと。血液脳関門を突破する技術をつくらうという。実際には、この青に書いてある技術というのが実際行っている研究開発なんです。これがそれぞれ撃つ、超える、防ぐ、診る、治す、変えるに相当するんです。

がんのところからお話をしたいと思いますが、皆さんもよくご存じのように、今、日本でがんで年間に亡くなる人は 36 万人とか、それ以上です。だから、日本人の 3 人に 1 人が、がんで死んでいます。ですから、死亡率を下げるには数十万人規模に適用可能な治療法を開発しない限り難しい。でも、いろんな方法があるではないかと。例えば手術もあります、放射線もある、重粒子線もある、最近では免疫療法が発達してきましたが、やはり限界があるんです。例えば転移がんには、手術、放射線、重粒子線は使えない。あるいは免疫療法は、まだ適用可能ながんの種類に限られています。また、患者さんの内、約 2 割しか奏功しないと

いったようなことなんです。ですから、ここでやりたいこと、つまり次世代の DDS によって標的治療を行うことなんです。それによって内包薬物を幅広く選択して、手術と併用して、比較的早期の多数の患者さんに適用可能な技術をつくる。それによって、5 年生存率を上げていこうというわけです。

どんながんを対象にするかですが、これはもちろん部位で言うと、胃がんや膵臓がんということになるんですが、治療が困難ながんという分類をすると、先ほどお話しした転移がんです。がんによっては、薬が効かなくなってしまう薬剤耐性がんもあります。あるいは、もともと脳腫瘍のようなものは、薬が行きにくいし、最近ではがんの幹細胞という、治療抵抗性のがんがあるという問題が出てきています。ですから、これをどうやって克服していくかということなんです。

先ほどお話しした、この高分子ミセルのようなものが、血中でぐるぐる回るのはともかくとして、どうしてがんが集まるのかということです。これに関して一番有力な方法は、比較的、化学工学的な考えなんですけども、血管があると、低分子の抗がん剤だったらいろんな所から抜けてってしまいますから、これでいろんな所について副作用が出るわけです。ところがウイルスサイズの粒子というのは、通常の血管の壁を通れませんから、通常の組織には入っていかないわけです。こうやってぐるぐると回るんですけども、がんの部位は、後でもお示しますが、血管の透過性が非常に上がっています。ですから、ウイルスサイズであっても、がんの部位では比較的選択的に集積していくことができるという、こういった単純と言えば単純なんですが、こういう方法論で集まっていくわけです。

そうは言ってもこれマンガですから、本当に集まるのかというわけです。これは、ちゃんと証明しなくちゃいけない。われわれは先ほど顕微鏡をお示しましたが、この技術を今、最大限に使ってございまして、これを使うと、これは高速走査型の共焦点顕微鏡と言うんですが、実際にマウスに移植したがんをそのまま直接見ることができます。どのぐらいきれいに見えるのかって言うと、一例ですけど、これは緑色蛍光タンパクです。GFP を発現しているがん細胞を見てるんですけど、この緑の粒々の一個一個が、がん細胞の核です。この黄色が毛細血管です。これが 1 ミリですから、直径数ミリのがんを、このぐらいきれいに見ることが可能になりました。

この技術を使って、がんの部位をまず静脈から蛍光ラベルした高分子ミセルを投与して、ずっとこのがんの所を観察し続けます。そうすると、こういうふうになるんです。これはがんの中で、これを見ていくと、この赤い矢印を見ていただいておりますが、ここでベントのような噴出がみられます。つまりここで、要するに血管が破裂するというんですか、

ゆっくりと開いて、中のものが出ているということが分かりました。これ、実際に動画で見るとこういうふうになりまして、この部位からナノマシン、ミセルが出てるんです。面白いのは、右と左の画像でミセルの粒径がちょっと違うんです。30と70ナノメートル。大した違いはないじゃないかと思われるかもしれませんが、これは大変な違いがありまして、70ナノメートルのミセルは血管から出ても、そこで全部スタックして止まっちゃうんです。30ナノメートルまで粒径を下げると、出た後でぱーっとがんの中に広がっていくということが分かりました。ですから、ここで粒径というものが実は非常に重要であるということが分かったのです。

こういうふうにして、がんの組織に入ったとして、その後は一体どうなるのか。これは当然、ウイルスサイズですから、膜は通れないので、がん細胞の中には、細胞膜の一部にくるまれて入ります。この小胞は、エンドソームと言うんですけども、いわば細胞の消化器官なんです。ですから、この中で、人間の胃袋と同じようにpHが下がります。実はわれわれのミセルは、pHが下がると薬が放出するような仕掛けを持っていますので、核の近くに近づいた所で、ちょうどトロイの木馬のように薬が出るということです。つまりマンガでもう一度お示ししますと、がんが耐性になるというのはいろんなメカニズムがありまして、これだけではありません。ただ、白金の抗がん剤なんかの場合によく言われていることは、抗がん剤が細胞の中に入ってくると、それを解毒してしまうような物質が細胞の中でいっぱい作られます。それが薬を解毒してしまうために、効かなくなります。ところが、高分子ミセルは、細胞の中に、今お話したように膜に包まれてトロイの木馬のように入っていきます。細胞核の近くまで行って、pHが下がったところでワッと薬が出て、核に集積して耐性がんをやっけるという仕掛けができるわけです。

これは本当ですかということですね。これもちゃんと証明しなくてはいけませんので、先ほどのブロックポリマーの、ポリエチレングリコールの先端に緑の蛍光色素をつけて、反対側に赤い蛍光色素を付けます。ミセルを作ると赤い蛍光色素はこのコアの中に入ってしまうので、完全に消光してしまいます。つまり安定なミセルは緑色です。ところが、ひとたび、こういうふうになると、赤い蛍光が出てくるんです。本当にそうですかということなので、これは培養しているがん細胞を顕微鏡で見っていきます。そうすると、時間とともに、中が緑になります。つまり、安定なミセルが入っていききました。ところが、40時間ぐらいたつと、この一個一個のがん細胞の中がぱーっとオレンジ色になるんです。つまり、これで確かにミセルが壊れていったということが分かりました。

しかし、そうは言っても、これはシャーレの中ですから、

本当に体の中でこんなことが起きるのかということですから、それを証明しなくてはいけません。それで、先ほどの生体内共焦点顕微鏡を使って観察を行いました。投与した直後は、これは全身投与した後です、がんの中は最初真っ暗ですけども、やがて、この毛細血管の中が蛍光の色で緑になります。この黒い粒々は赤血球です。ですから、安定なミセルが血中を回ってるんです。12時間後、もっと高倍率で見ます。どうなったかと言うと、まだ血管の中は緑ですけども、がんの中は、がん細胞の膜は青で染めています。そうすると、一個一個のがん細胞が見えて、核が黒く抜けてるんですが、そのがん細胞の中が、実はこういうふうには黄色とかオレンジ色になっています。これはつまり、先ほどお話したように、ミセルが壊れて薬が出てるということを示しているわけです。ですから、こういうふうにして、このナノスケールのトロイの木馬は、確かに一個一個のがん細胞の中にまで薬を送り届けることができるということが分かりました。このシステムは、現在、アメリカで臨床試験をやっていますが、実際、これは腫瘍の大きさが普通の抗がん剤は耐性になっているから効かないんですけども、ミセル化することによって、かなりがんの増殖を抑えることができるということが分かりました。

ですから、こういうふうには、がんと一口に言っても、集まるだけでは駄目でして、このがんという組織の中にどんどん入っていく、つまり浸透していく機能というものが非常に重要です。それが特に重要なのは、膵臓がんのように治りにくいがんです。膵臓がんがなぜ治りにくいかというと、もちろん一つは血管密度が低いんですけども、もう一つは間質と言って、線維質が非常に多いんです。これが、その病理像ですけども、非常にヘテロです。この濃い青の部分のがん細胞の集まったクラスターでして、赤が間質線維です。緑が血管で、血管は実は間質の中にしかありません。ですから、血管から出ても、この間質の中をずっと通っていかないと、がん細胞の集積の所まで行けません。実際、今使われているリポソームなんかは、全部この血管の周りに集まっていて、そこから奥に入れられないということが分かりました。

しかし、先ほどのあの画像で見せたように、こういった自己組織化の粒子というのは、粒径コントロールができます。そこで、先ほどお話したように、30ナノメートルと70ナノメートルのミセルを作りまして、30ナノメートルは緑でラベルし、70は赤でラベルします。両方混ぜると黄色ですから、血管の中は黄色なんです。実はがんの中は緑なんです。つまり何を意味してるかと言うと、30ナノメートルのミセルだけが、確かに膵臓がんの中まで入って行けるということが分かりました。70ナノメートルのミセルは、全部、血管の壁にへばりついてます。

こういうものを使うと、例えば、これはより人の臨床に

近いがんなんですけども、自然発生膀胱癌と言って、遺伝子改変を起こして、自然に膀胱癌ができてしまうようなモデルマウスです。そういうマウスであっても、このミセルを使うことによって、70日間にわたって全例生存するという結果を得ることができました。この膀胱癌は腹膜に転移して、こういうふうに腹水が出ちゃうんですけども、ミセルの場合は全くそういうことが起こりませんし、それから、腹水がなくなるだけでなく、肝臓や消化管への転移も非常に抑えられるということも明らかになりました。このシスプラチンのミセルは、今、膀胱癌の患者さんに適用して臨床試験が行われていますけども、標準治療に比べて生存期間が飛躍的に延びるといった結果というのも、今現在、得られてきています。

あともう一つは、副作用がなくなるということも非常に重要でして、シスプラチンなんかの場合は、腎臓への毒性が一番問題なんですけども、もう一つ問題なのが耳が聞こえなくなっちゃうんです、内耳毒性という。実際、これはプライエル反射って、大きな音を出すんです。きょう、音が出ませんが、下はシスプラチンを投与したモルモットで、全く耳が聞こえないので、実際はーんと音を出しているんですけども、全くどこ吹く風っていう感じなんです。ところが、上はミセルを投与したモルモットですから、音をぼんと出しますと、こういうふうにびくっと、こうです。これだと、ちょっと何だか分からないので、ちゃんとした聴力検査をすると、ミセル化することによって聴力損失は全くないということですから、こういった点も非常に大きな利得であるというわけです。

現在、こういったわれわれが開発してきたものをベースにしたミセルの内の幾つかは臨床試験に入っていて、第1相、第2相、第3相といきます。第1相は安全性、第2相は少数の患者さんで効果を見て、第3相で大規模な臨床試験を行うんですけども、このパクリタキセル、シスプラチン、ダハプラチン、エピルピシン、こういったようなものが今現在、日本とアジアと、それからアメリカ、最近ヨーロッパでも始まり国際的な臨床試験というものが行われています。

このようにして幾つかのがんはここまでできていますが、まだ難しいがんがあるんです。それが脳腫瘍です。脳腫瘍はなんで難しいかって言うと、先ほど、これEPR効果っていうんですけども、要するに血管の透過性が上がると言いましたが、何のがんでも上がるわけではありません。上がらないがんもあります。その代表例が脳腫瘍でして、血液脳腫瘍関門と言って、要するに脳の血管は非常にバリアー性が高いので、がんになっても透過性が上がりません。ですから、隙間からいくという方法論は全く効かないんです。そうすると、全く別の方法が必要になるわけで、もっと能動的にいきたいということで次に考えたのが、ミセル

の表層にリガンドを付けるということです。

ここで選んだのは、環状RGDペプチドという小さなペプチド分子なんです。なんでこれを選んだかって言うと、こういう構造なんですけど、これはがんの腫瘍血管によく発現するインテグリンというタンパク質があるんですけども、それに非常によく結合します。ですから、考え方としては、これを使うことによって腫瘍血管への結合性を高めようということです。高めるだけでなく、実は驚くべきことに、どんどんがんの脳腫瘍の中に入っていけるということが分かりました。これがその画像なんですけど、これも生体内の顕微鏡で見えています。ここでは、環状のRGDを付けたミセルを赤で標識して、コントロールを緑で標識して、やはり混ぜてあるんです。これ脳腫瘍の中です。投与した直後は腫瘍の中は真っ暗ですけど、5時間たつと赤くなります。つまり、RGDミセルだけがどんどん入っていくわけです。実は、この二つのミセルはサイズが全く同じです。物性は全く同じですから、隙間から入るとしたら、両方入らなければいけないですよ。ところが、RGDだけ付いたものが入っていることは何を意味しているかと言うと、能動輸送が行われていると。つまり、このRGDが結合したミセルが内皮細胞のインテグリンに結合して、能動的にがんの組織に輸送されているということが分かりました。ですから、これを使えば、非常に治療が難しいといわれているグリオブラストーマ、脳腫瘍に対しても治療ができるのではないかとこのわけです。

実際、これはいろんな抗がん剤で試してうまくいくことが分かりましたけど、最近、期待されている核酸医薬にも、この方法論が使えるということが分かりました。これは名古屋大学と共同研究でやったんですけども、長鎖非翻訳RNAというのがあるんです。これをターゲットにするアンチセンス核酸をこのミセルに搭載して、患者さん由来の悪性脳腫瘍に対して、全身投与で確かに効くということを確認しました。それはどういうことかと言うと、患者さんの脳から脳腫瘍を摘出して、そこからがんの幹細胞を取り出します。このがん細胞をマウスの脳に同所移植をいたしまして、そして、このナノマシンミセルの中に、これRGDが付いてるんですけど、この長鎖非翻訳RNAであるTUG1と言うんですけども、これを標的とするアンチセンス核酸を搭載して全身投与を行ったわけです。

本当にこういう形で脳腫瘍に行くことをまず確認しました。こちらがそうなんですけども、確かにこれがそうです。脳の中にどんどん入っていけるということが分かりました。どのぐらい効くかということで、効果を見たわけです。ここではマウスを三つの群に分けています。一つはコントロールです。これは全然関係ないアンチセンス核酸を入れています。二つ目はTUG1に対するアンチセンス核酸を入れています。3番目は全く違う低分子の薬で、ガンマ・セク

レターゼ・インヒビターという今、臨床試験が行われている脳腫瘍に対する新しい抗がん剤です。これをコントロールにして使って、検討をいたしました。これが脳腫瘍でして、この紫色の部分が脳腫瘍です。こんなに大きかったものが治療後、ここまで小さくなり、非常に劇的な効果があることが分かりました。実際見ると、これががんの大きさでして、これが何もしない場合、これがガンマ・セクレターゼ・インヒビター、これがわれわれのミセルでして、圧倒的に効くということが分かりました。実際、本当にこのTUG1というものが、ちゃんとサイレンシングされているかということで、これは遺伝子のノックアウトを見てるんですけども、確かにきちんとサイレンシングをされているということが分かりましたので、この方法を使えば、核酸医薬を脳の腫瘍に送り届けるということもできそうだなということになってきたわけでありまして。

他のほうはどうかということですが、いろいろありますが、この中で、例えば負担なく正確な予防診断技術というのを、どうやってこれで実現していくのかということですが、こういった診断技術としていろんなものがあるんですが、皆さんがよくご存じなのは、MRIです。磁気共鳴イメージング。これは今、非常に注目されています。というのは、これはもう既に国内で約6000台が稼働しています。それから、これは放射線照射が不要ですから完全無侵襲ということで非常に安全なんです。解像度は非常にいいんです。どんどん使えばいいだろうということなんですが、ただ弱点がありまして、感度が低いんです。ですから、必ずPET/MRIとかCT/MRIという形でPETやCTと組み合わせる必要がある。PETやCTは被ばくをしてしまいます。ですから、もしMRI単独でできれば、もっといいだろうというわけです。そのためには造影剤が必要であろうというわけです。

そういう訳で、私たちはこのミセル型、ナノマシン型造影剤というものを最近、開発をいたしました。これがそうなんですけども、これは高分子ミセルの中に無機物が入っています。何が入っているのかと言うと、リン酸カルシウムなんです。リン酸カルシウムとはなんですかと言うと、骨の成分です。ですから、全く無毒です。このリン酸カルシウムの中に造影剤が入ってるんですけど、それは、マンガニオンなんです。必須金属でありますから、これも大量に入れば毒ですけども、少量であれば全く毒性がありません。どういうアイデアかと言うと、この状態では実は全く造影能がないんです。ところが、皆さんご存じのように骨は酸で溶けるんです。ですから、がんの所は若干pHが低いんです。pH6.5から7です。そういう状態でリン酸カルシウムが溶け始めます。するとマンガニオンが出ます。このマンガニオンがタンパク質に結合して、一気に造影効果が出るんです。

実際、どのぐらいきれいに見えるかと言うと、ここにあるのががんです。造影剤がないと、ほとんど見えないんですけども、投与すると、これだけきれいに見えるようになるということが分かりました。実際、こういうふうによいのがんが造影されます。信号強度も圧倒的に既存の臨床のMRIに比べて、はるかに高い信号強度が出るということが分かりました。単に感度が上がるだけではなくて、小さな転移まで見つけることができます。これが実は肝臓に転移した小さな大腸がん、直径が1ミリから2ミリなんですけども、白くぽーっと見えますよね。こういうふうに見ることができました。

今、臨床に使われている造影剤がこちらなんですけども、これは陰性造影剤って言いまして、がんが黒く抜けます。そうすると、黒く抜ける陰性造影剤っていうのは、血栓なんかができたり出血したりしても黒くなってしまいますので、いわゆる疑陽性と区別がつかないんですけども、これは完全な陽性造影剤ですから、非常にきれいに造影ができるということが分かったわけでありまして。ですから、こういうふうによい造影剤を使うことによって、より安全にかつ的確にMRIだけががんの診断というものが可能になりそうだなということが分かりました。

それでは、この入院不要、日帰り治療というのはどうなんだろということですが、皆さんもよくご存じのように、特に開腹手術なんか行くと、入院を1カ月しなくてはいけない。そうなると、赤ん坊とか高齢の方には大変負担になります。ですから、なるべく入院を避けたい。これは元気な人でも、入院してる間は結局、仕事ができなくなりますから、お金も掛かるし、経済的負担も大きいわけです。それに対して、われわれが将来こういう形になるといいなと思っているのは、ナノマシンを全身投与して患部に集めた後に、そこに光とか超音波とか中性子を当てることによって、切らない手術をしてしまおうというわけです。こういうふうなんです。これは薬剤をそこで作っちゃったりとか、あるいは、きょうはお話ししませんが、ホウ素、ボロンをここに集めて、中性子を当てて、中性子補足療法を行うなんていうのも可能なんです。例えば、今、カプセル内視鏡っていうのがだんだん普及していますから、カプセル内視鏡を飲むと、ナノマシンがカプセル内視鏡からの光刺激によって患部で作動して薬を作ったりとか、あるいはナノマシンによる信号を内視鏡が検出して診断をするとか、そういったようなことも将来はできるんじゃないかなと思って研究開発をみんなで進めているわけです。

これは、まだもちろんできてないんですけども、きょうは、できたことをお話ししたいと思います。それは超音波との併用なんです。皆さん、超音波診断ってよくご存じだと思います。広く使われています。ところが、超音波も集束超音波と言いまして、要するにある1カ所にビームを絞

ってというか、超音波を集中させると非常に大きなエネルギーを出すことができます。実際、尿路結石とか腎結石とかを、これで破壊するという手術は既に行われているんですが、しかし、軟部組織に集束超音波を当てるとダメージが大きいので、なかなか難しい。そこでわれわれが考えたのは、この集束超音波とナノマシンを組み合わせようということです。つまり、抗がん剤を搭載した高分子ミセルが既に臨床試験に入っていますので、これをまず患部に投与して、そこに集束超音波を当てるといって、これ音響化学療法と言うんですけども、そういう方法を行いました。ここで使ったのはエピルピシンという抗がん剤でして、これは超音波を当てるとラジカルが発生します。ですから、エピルピシン自体が持っている抗がん効果と超音波を当てることによる活性ラジカルの効果のダブルパンチで、がんをやっつけちゃおうっていうんです。そうすると、こちらにあるように薬剤の投与量を6分の1に下げて、集束超音波の強度を15分の1に下げても、十分に効くということが分かりました。つまり、より安全に治療ができるわけです。

実際にうまくいきそうだということで、これは実は完全な医工連携状態でやってまして、興和、これは薬の会社なんですけど、デンソーとか日立とかそういう会社が全部一緒になって、研究開発を行っています。ですから、これは医療機器と薬の合体したものなんです。まずは人に実際適用する前に、疾患愛玩犬、いわゆるペットのがんを治そうという、それを行いました。ここでは患犬って書いてあるのは、患者じゃないからです。これは実験動物という移植したがんではありません。本当にがんになったワンちゃんです。これはミニチュアシュナウザーという種類のワンちゃん、軟骨肉腫ができて、歩けなくなっちゃっている。ですから、例えばこういうワンちゃんに対して、今のような治療を行いました。

左側が治療前でありまして、全く歩けないんです、こういうふうに。肉腫がお尻の所にできてしまっているために、全く歩けない状態でした。こういうワンちゃんに対して、薬剤を、要するにミセルを投与して、1日後に集束超音波を当てました。1週間後がこの右側の画像でありまして、歩いている。歩くだけならともかく、走っちゃうという劇的な回復を見せたわけです。この1例だけでなく、大体十数例で、こういう効果が確認されて、今年の4月から女子医大、東京医大で実際にこのナノマシンと集束超音波を組み合わせた、がんの音響化学治療の臨床試験が開始されました。これは世界で初めてでありまして、対象のがんは膵臓がんです。今のところ順調に患者さんの状態も非常に良好であるというふうに聞いています。ですから、こういうふうにする事によって、一見、超音波と薬って関係なさそうに見えますけども、実は組み合わせることによって非常に優れた効果を出すことができるということが

分かりました。

年齢を問わずスポーツを楽しむという夢のような状態がつくれるのかということです。やっぱりスポーツをするには走ったり飛んだりしなくちゃいけないので、運動器、特に関節ですよ。関節がやられちゃうと、スポーツなんかできなくなってしまいます。関節の病気として一番問題なのが変形性関節症なんです。そうすると、これは変形性関節症だから再生医療だと、細胞の移植かなと思われると思うんですが、われわれは細胞をなるべく使わないで再生医療をやりたいというふうに思っています。

どうするのかっていうと、一番考えつくのは遺伝子治療なんですけども、将来、遺伝子治療もできるとは思いますが、遺伝子治療っていうのはゲノムをいじりますから、例えば発がんするんじゃないかとか、染色体にインテグレーションしちゃうんじゃないかっていうことがよくいわれます。実際、本当は可能性は少ないんですけど。それでも、そういうことはゼロではないだろうと。もっと安全でなくてはいけないということで、われわれが着目したのは、実はDNAの遺伝情報からタンパク質ができるわけではなくて、これがいったんメッセンジャーRNAに転写されます。このメッセンジャーRNAの情報に従って、これが翻訳されて治療用のタンパク質ができますから、メッセンジャーRNAを使えばいいんじゃないか。治療用タンパク質でももちろんあるんですが、残念ながら組織再生に関係するタンパク質っていうのは非常に不安定なんです。半減期が非常に短い。例えば5分しかありません。ですから、そういうものを外から入れるというのは非常に難しいんですが、メッセンジャーRNAは触媒みたいなものですから、標的細胞がいれば、そこに入って行ってタンパク質を作ることができます。だから、ここに着目をしたんです。

こんなものがあるんだったら、なんで、今までみんなやってないんだということです。実は二つ問題がありまして、メッセンジャーRNAっていうのは体内ですぐに壊れちゃう、加水分解されちゃう。もう一つは、免疫反応を誘導します。裸のメッセンジャーRNAを入れると、細胞の中のツール・ライク・レセプターって言うんですけども、そういうものにすぐ認識されて、激しい免疫応答が起こります。だから、炎症反応が起きちゃうんです。この二つの理由で使えなかったんですが、われわれは最近、このメッセンジャーRNAを非常にきれいに、ナノマシン化することができて、そうすると、メッセンジャーRNAの分解が起これなくなりまして、免疫反応も抑制されます。そうすると、これを使えば、例えばいろんなことができて、これは実際にマウスの脳で治療用のタンパク質ができてるっていうのを見てるんですけども。それから、脊髄損傷にも、もちろん適用ができます。

さっきお話しした変形性関節症っていうのは、国内の推

計患者さんの数が1,000万人と言われていています。寝たきりの原因の約10パーセントです。ただし、どういうふうに進んでいくかと言うと、最後は末期ってこんなになっちゃうんですけども、一番問題なのはこの辺りでして、今ちょうど初期の進行している所に適用する方法がないんです。例えばヒアルロン酸なんか打ってますけど、気休めに近い状態です。末期になると、もちろん細胞移植しなきゃいけないんですけども、これまた大変です。そこで、われわれが目をつけたのはこの辺り、先制医療です。早期介入をしよう。そこにメッセンジャーRNAを使うわけです。それはどうするかって言うと、メッセンジャーRNAを搭載したナノマシンを関節内に投与します。このメッセンジャーRNAとしては、軟骨誘導性転写因子と言いまして、要するに軟骨細胞に入ると、軟骨をどんどん作ってくれる。それを作ることを、要するに刺激するタンパク質なんです。これをコードしたメッセンジャーRNAを入れました。そうすると、コントロールの場合は、これ関節で、これはモデル動物なんです。もう関節が、がたがたになっちゃってるんです。ところが、治療用のメッセンジャーRNAを入れた場合は、非常にスムーズになってるということが分かりました。つまり、こういう方法を使えば、変形性関節症を本質的に治療することができるだろうというわけです。

非常に重要なことは、このメッセンジャーRNAを入れた高分子ミセル、ナノマシンは、凍結乾燥できます。つまりカップヌードルと同じなんです。だから、その辺に置いて、お湯を入れたら壊れますけども、生理食塩水を入れて注射すればいいんです。だから、町の整形外科のお医者さんの所でもこの治療はできますから、大きな細胞を培養する施設であるとか、それを輸送するためのコストが分かりません。ですから、私たちは、これは将来、再生医療の大衆化って言うてるんですけども、再生医療を大衆化する上で、こういう方法論というのが非常に重要なんじゃないかと思っています。ただし、何でもこれで行けるわけじゃないんです。ですから、細胞がいなくなったら駄目です。それは、もう細胞を入れなくちゃいけないですけども。だけど、より早い時期、まだ細胞がちゃんといるときに、こういう方法を行えば、歩けなくなりそうな人がまた再び運動ができるようになるだろうというのが、われわれが考えている理想の状態ということになるわけです。

アルツハイマーです。これは一体どうするんだと、脳に薬が行かないだろうというわけです。しかしながら、これも最近、行かせることができるようになりました。これはどうするかと言うと、これが血液脳関門と言いまして、要するに脳の血管の内皮細胞は非常にバリアー性が高いんです。ですから、なかなか入りません。もちろん隙間から入るのなんか、ほとんど不可能です。われわれが目をつけたのは、しかし、そうは言っても、内皮細胞の表面にある特

定のタンパク質が多く発現します。何かと言うと、グルコーストランスポーターなんです。

つまり脳はグルコースが必要ですから、そのグルコースを脳内に取り込むトランスポーターが非常に多く発現しています。そこで、このミセルの表面にグルコースを結合しました。それだけで入るんですか。入りません。どうすんだ。これはちょっと工夫がありまして、血液の中のグルコース濃度をちょっとコントロールします。簡単に言うと、皆さん、糖尿病の検査ってありますね。グルコース負荷試験。これは一晩ご飯を食べないで、お医者さんに行つて、グルコースを打つわけです。それと全く同じことをやると、これ面白いんですけど、グルコーストランスポーターが一気にグルコースを脳の中に送り込む。要するにトランスポーターのリサイクリングが起きるんです。それにつられて、ミセルも一緒に脳の中に入っちゃうということが分かりました。これは実際に、このマウスの脳の中を見ています。この緑の所は脳です。この黒い管が血管で、赤がナノマシンです。今まさに脳の中に、このナノマシンが侵入していつてるというところを、リアルタイムで観測しています。こういうことができるということが分かりました。実際にどのくらい入るのかって言うと、これ、ずっと奥の深い所まで見てるんですけども、これは脳の表層です。赤が血管です。この赤い粒々が高分子ミセルです。ですから、血管の中にもありますが、明らかに脳の実質までちゃんと入ってきてるということが分かりました。

これを踏まえて今、実際にわれわれがやってることは、このミセルの中に核酸医薬を搭載して、アルツハイマーに関係する遺伝子をノックアウトするという実験をやってまして、きょうはちょっとまだ論文になってないので、スライドは持ってきてませんが、1回の投与でBACE1という、要するにアルツハイマーに関係する酵素の発現を1回だけの投与で約30パーセント、サイレンシングできるという結果が現在得られています。そうすると、将来は非常に楽天的なお話ですけど、これまでに薬物療法で病態そのものの進行を遅らせるだけだったんですけど、これがうまくいくと、本質的に到達困難であった薬剤を脳に送り届けることができるだろうということが考えられます。

さらに、もうちょっと先になりますと、脳の中で薬作っちゃおうということです。先ほどメッセンジャーRNAのお話をしました。実はメッセンジャーRNAからタンパク質ができます。抗体もできます。実際に、抗体のフラグメントを脳の中で作らせるということにも成功しています。ですから、われわれがやりたいことは、このメッセンジャーRNAをミセルの中に搭載して、それをBBBを超えて送り込んで、脳の中でメッセンジャーRNAを働かせて抗体薬を作る。そうすると、抗体を静脈注射して、わざわざBBBを超えなくても、脳の中で抗体ができちゃいます

から、より効果的な治療ができるんじゃないかなというふうに思って、今、実際に研究開発を進めているわけです。

もっと先になると、どうなんだろうかと。この辺になってくるとSFになってくるんですけども、このCOINSの研究チームにいっぱい若い人がいるんです。だから、若い人たちに、僕はちょっとできないけど、君たちならできるんじゃないのって言って、やったらって言ってるのがこういう方法で、皆さんは小惑星探査機の「はやぶさ」って知ってますよね。これはなんですごいかって言うと、小惑星まで行くだけじゃなくて、そこで科学情報を採取して戻ってくるっていうサンプリング機能があるんです。これ、私、非常に感動しまして、こういうものが体の中でできないかと。つまり、体内を自律巡回するナノマシンが疾患部位に行って、そこで診断して、治療をするだけじゃなくて、疾患情報を採取してくる。

きょうは、お話ししませんが、実はCOINSでは体内埋め込み型の診断チップっていうのも研究してるんです。どんどん小さくしていく。そうすると、このナノマシンが体内に埋め込んだ診断チップに集合して、そこで分析が行われて、その診断情報が外部にICTで発信されると。こ

こまでいけば、これはナノマシンと呼んでもいいんじゃないかというわけで、これはまだできてませんが、こういうことがぜひ、いつになるんですかね、10年後か、20年後にはできるようになったらいいなというふうに思っています。

こういうお話をすると、こんなばかげたこと誰が考えてんだっていうふうに言うかもしれませんが、実は最近、Googleが全く同じコンセプトを出してきました、Googleの研究所で今現在、こういう研究がやられているっていうお話ですので、Googleが相手だとちょっと大変かなと思うんですけど、何とか日本発のこういった技術ができてくるといいなというふうに思っています。

そういうわけで、きょうのお話は、もちろんわれわれの研究グループだけでは当然できないことでありまして、国立がん研究センター、循環器病センター、それから東京大学をはじめとする各大学医学部の附属病院、そういった所の臨床の先生方との共同研究でございまして、まさに医工連携なんですけども、この場を借りて、厚く御礼を申し上げます。どうもご清聴ありがとうございます。



# コスメトロジー研究雑感



平成 27 年度 研究助成

## コスメトロジー研究雑感

井嶋 博之

私はこれまで、生物化学工学および機能性バイオマテリアルの融合による医用工学分野について研究を続けてきました。特に、ハイブリッド型人工肝臓や移植用肝グラフト創出研究など、重篤な患者の救命に向けた実用的技術開発について20年以上にわたり強力な医工連携研究を遂行しています。同時にこれら研究開発の中で様々な新規知見の獲得や画期的な技術の創出があり、研究分野の新たな展開を考えていました。

特に、開発技術の特性とより多くの方々のためになる研究へ展開したいという想いとマッチングから、創傷治癒ならびに皮膚の活性化に関する研究を計画・準備していました。ただし、恥ずかしながら当該分野に疎く、どうしたものかと思案しておりましたところ、幸運にもコスメト

ロジー研究振興財団ならびに本研究助成のを知り、喜び勇んで申請させていただいた次第です。

当然ながら、私にとって新たな研究開発分野ということで採択課題開始直後は研究の核となる基材開発などにおいてトラブルが続出し大変苦勞しましたが、研究期間および助成金の使い勝手が良く、何とか満足のいく成果を得ることができました。現在これら成果の発表に向けた準備を進めており、さらに得られた成果の実用化に向けた発展的応用研究に尽力するつもりです。

コスメトロジー研究への参入と研究遂行の実現を可能にいただいたコスメトロジー研究振興財団に心から感謝申し上げます。  
(九州大学大学院工学研究院)

平成 27 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

川崎 信治

近年、目に見えない微生物を発見する技術や難培養微生物を培養する技術が目覚ましく進歩し、人間の生活、健康、病気に関連するあらゆる場面に微生物が善にも悪にも深く関与することがわかってきました。私は約25年前から微生物を使用して研究をしてきたこともあり、微生物がもつ未知の能力には無限の可能性があると思っています。本研究は1つの微生物との出会いからスタートしました。微生物の細胞も我々の細胞も同じ成分でできていますが、その生命力の強さは計り知れません。得意・不得意は個々の微生物で異なりますが、強光、乾燥、高塩、高温など、細胞成分が不得意な環境下でも、微生物は細胞成分の変性を何らかのシステムで防ぐことで平気で生き抜く力を秘めています。その秘密を発見できれば、ヒトの細胞にも応用できると信じて研究をすすめています。

これまで私は化粧品業界とは無縁で、その中身は化学式の分野だと思っていました。化粧品の説明書きを見ると、見慣れない化学物質がたくさん書いてあるからです。確か

に安全性の観点からは、安全性が既知の化学成分で構成される化粧品は魅力的だと思います。一方、お肌には多種多様な生きた微生物が棲んでいることがわかってきました。共生か寄生かわかりませんが、お肌の世界にも微生物が善にも悪にも働いていることは、間違いないと思っています。

未来の化粧品は、この目に見えない微生物たちのお付き合いになりそうな予感がします。微生物の制御の観点から化粧品開発に取り組んでいる方も多いと思いますが、ヒトの個性に応じて棲んでいる微生物も異なることから、その制御はとても難しいのではと想像します。アスタキサンチン研究をきっかけに勉強を始めた化粧品分野ですが、微生物がもつ素晴らしい能力の可能性をさらに追求して、化粧品産業に少しでも貢献できるよう精進したいと思います。末筆になりましたが、本研究を進めるにあたり、コスメトロジー研究振興財団から研究助成をいただきましたことを心から御礼申し上げます。

(東京農業大学生命科学部分子微生物学科)

## コスメトロジー雑感

黒岩 崇

2009年に続き、全く異なる研究テーマで2回目の助成を賜りました。重ねてのご支援に心より御礼申し上げます。前回採択いただいたのは、現勤務校に着任した1年目でした。研究室を立ち上げたばかりで、設備も十分でない中で研究助成は大変ありがたく、またテーマを採択いただけたことに大いに勇気づけられたことを覚えております。前回の「雑感」で、「工学部エネルギー化学科」にも化粧品に関わる科学や技術に関心のある学生が一定数いることに驚かされる、と書かせていただきました。あれから8年が過ぎ、研究室で卒業論文や修士論文を指導した学生のうち、実際

に化粧品分野に就職した卒業生が今では何人もいます。ふだんの暮らしの中で、卒業生が関わった化粧品に出会えることを励みに、私自身も微力ながらコスメトロジーの発展に貢献できればとの思いで、今回の研究を進めてまいりました。今回、再び採択いただけたことを契機に、(公財)コスメトロジー研究振興財団にはもちろんのこと、共に頑張ってくれた卒業生と、今まさに汗を流している現役学生にも深く感謝しつつ、今後とも教育に研究に精進してまいりたいとあらためて実感いたしました。

(東京都市大学工学部エネルギー化学科)

## コラーゲンは厚化粧

小出 隆規

あれ？タイトルが間違っているぞ。「コラーゲンで厚化粧」が正しいのではないですか？と、ご自分のお母様や奥様(あるいはご自身…失礼)の顔を思い浮かべられた方、これは間違いではありません。

アミノ酸が多数つながってできた紐(ポリペプチド)は、一定のかたちに折り畳まれ立体構造をとることで機能をもったタンパク質になります。コラーゲンは三重らせん構造を特徴とするタンパク質で、長い3本のポリペプチドが互いにより合わされたかたちをとっています。私たちの体の中のタンパク質は、体温で立体構造がほどけてしまわない程度の熱安定性をもっています。そして、その熱安定性はタンパク質ごとに固有のアミノ酸配列によって規定されています。つまり、一般的にはタンパク質の熱安定性は生ま

れながらに決まっているといつてよいと思います。

さて、コラーゲンの場合はどうでしょうか？ 実はコラーゲンのアミノ酸配列は、三重らせん構造を体温で保つには不十分なのです。コラーゲンのポリペプチドは、細胞の中で翻訳後修飾を受けることによってはじめて、安定な三重らせん構造を形成できるようになります。コラーゲンの修飾の大部分を占めるのはプロリンの水酸化です。またその量は極めて多く、構成する全アミノ酸の10%以上に修飾が施されています。言い換えれば、コラーゲンは生まれながらの姿では全くの役立たずで、大層な厚化粧をすることで私たちの役に立つようになるのです。

(早稲田大学先進理工学部化学・生命化学科)

平成 27 年度 研究助成

## 皮膚接着性材料の化粧品材料への応用を検討して

小山 義之

私が生体接着性材料の研究を始めたのは、28年ほど前、粘膜接着性 DDS 材料に興味を持ったのがきっかけでした。当時はポリアクリル酸が消化管などの粘膜に接着性を持つことが話題となり、その接着メカニズムや、薬物徐放担体などへの応用が広く研究されていました。私は、ポリアクリル酸とポリビニルピロリドンを油性の材料で練り、徐放性座薬の基材などを作っておりましたが、油なしでは接着性の複合体が作れず、あまり大きな展開はできませんでした。ところが、数年前に私の研究室の伊藤智子研究員が、両ポリマーの混合法を工夫することにより、油なしでも生体に接着する複合体を調製する手法を見出しました。

得られた生体接着性複合体は乾燥させると透明なフィルムやスポンジ状になり、局所止血材や癒着防止材として様々な応用が可能となりました。特に、傷口を水和ゲルで塞いで止血する効果は高く、歯科・口腔外科の用途では、抜歯後の止血を目的としたものが実用化され、現在医療機器としての販売を開始しています。

一方、いろいろな方に皮膚への接着性などを試して頂いたところ、剥離時の刺激が小さい、という新たな長所をご指摘頂きました。それでは、と思い立ち、検討を始めたのが本研究で行った、美容パック、化粧クリームのカバーシートへの応用です。

身近な人たちに、思い思いの方法で試みて頂き、現在までに高い評価を頂いており、化粧用途という新たな分野への興味が改めて高まりました。今後とも安全性を含めて詳しい検討を続け、多くの方に喜んで頂けるような材料の開発に繋がりたいと思っております。特に、皮膚の弱い方、天然素材や刺激性物質などに過敏な方たちにも安心してご利用頂けるものが開発できれば、それは私たち材料開発者にとって大きな喜びとするところです。

最後になりましたが、本研究をご支援くださいました、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団および関係者の皆様に心から御礼申し上げます。

(新山手病院臨床医用工学研究室)

平成 27 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

酒井 健一

阿部正彦先生(現・東京理科大学研究推進機構教授)から引き継ぐかたちで、酒井秀樹先生(理工学部先端化学科教授)と連名研究室を運営することになり、まもなく4年が過ぎます。コスメトロジー研究振興財団からの研究助成は、「酒井・酒井研究室」になってまもなくの時期に採択されたので、たいへん印象深く、またこの度のご支援により本研究課題をおおいに推進することができました。関係する皆様に厚く御礼申し上げます。

さて、当研究室は40名超の学生をかかえる大所帯であり、コロイド・界面化学を学術基盤として、基礎から応用まで幅広く研究を行っています。阿部先生時代からの研究テーマを発展させつつ、社会的ニーズに適った新しいテーマへの挑戦も心がけています。社会的ニーズを知る最も確かな方法は、民間企業にお勤めの方からお話をうかがうことであり、こうしたことをきっかけに、共同研究に発展するケースもあります。一例をあげると、当研究室では界面

活性剤に関する研究を長く続けていますが、これの応用として、最近では潤滑油に関連した研究にも取り組んでいます。潤滑油産業において、界面活性剤は油性剤(あるいは油性向上剤)とも呼ばれています。分野が異なると使用する専門用語が変わってしまい、当初は戸惑いもありましたが、「言葉が違うだけで考え方は同じ」ということに気がつくのと、逆に新鮮な気持ちで、この新しい分野を眺めることができるようになりました。また、新しい分野で得た知識を、何らかのかたちで「本業」に活かせないか、思いめぐらす時間も貴重なひとときになっています。コスメトロジーは、コロイド・界面化学と密接に関係しており、小生にとっては「本業」に近い実学分野です。今後も関連業界にお勤めの方との意見交換を通じて、社会からのニーズに適った成果の発信に努めていきたいと思っております。

(東京理科大学理工学部先端化学科)

## 多機能性ペプチドの魅力

谷口 正之

食品タンパク質由来の機能性ペプチドの研究を本格的に開始してから8年が過ぎました。チロシナーゼやプロテアーゼなどの酵素の阻害ペプチドからスタートして、現在は、抗菌ペプチド、抗炎症ペプチド、創傷治癒ペプチドとその対象を拡大してきました。アミノ酸は20種類存在しますので、ジペプチドは400種類、トリペプチドは8,000種類、テトラペプチドは16万種類が存在する可能性があります。10残基のアミノ酸から構成されるデカペプチドは、実に10兆2,400億種類が存在する可能性があります。この多様性の魅力に取り憑かれてしまいました。

現在は、10から20残基程度のアミノ酸からなるペプチドを主な研究対象にしておりますが、種類の多さだけではなく、1つのペプチドが複数の生理活性を示すことを発見しました。これは、ペプチドの第一の魅力です。例えば、米の酵素 $\alpha$ -amylaseの部分配列である18残基のアミノ酸残基から構成されるペプチドは、プロテアーゼ阻害活

性、9種類の病原微生物に対する抗菌活性、リポ多糖(LPS)で刺激したマクロファージによる一酸化窒素(炎症の指標成分)産生の抑制作用、血管内皮細胞の血管新生促進作用や細胞遊走促進作用などを兼ね備えています。このペプチドは、生体防御に関して多機能性を示すことがわかりました。また、ペプチドの各活性や機能に対する構成するアミノ酸の寄与を解明するために、特定のアミノ酸を性質の異なる別のアミノ酸に置換したペプチドを合成することができます。例えば、グリシンをアルギニンに置換したペプチドを合成した結果、LPS中和活性が約17倍向上することを見出しました。これは、ペプチドのもう一つの魅力です。

今後、食品タンパク質由来の多機能性ペプチドの研究をさらに展開して、皆さんの健康に役立つペプチド素材を開発したいと考えております。将来、これらのペプチド素材が化粧品、医薬品、食品などの多方面の分野で利用されることを期待しています。(新潟大学工学部機能材料工学科)

## コスメトロジー雑感

東 顕二郎

近年、化粧品に用いられる新規有効成分として、curcumin、CoQ<sub>10</sub>、hesperetin、fullerene (C<sub>60</sub>)等が挙げられます。これらの新規成分はいずれも難水溶性であり、薬物ナノ粒子化技術は有効な化粧品を創製するために有用と期待されます。事実、上記の物質の薬物ナノ懸濁液調製に関する研究報告は数多く存在するものの、その詳細な物性についての評価はほとんど行われていません。本研究で示したように、suspended-state NMR法を用いてこれら薬物ナノ懸濁液の分子状態を明らかにすることができれば、これまでトライ&エラーであった薬物ナノ粒子創生の効率化、最適化など処方設計に有用な指針を示すことができます。具体的には、①薬物と安定化剤の相互作用を基にした、界面活性剤の選択、②薬物の分子状態(結晶or非晶質)評価・制御による、薬物ナノ粒子からの薬物溶解速度のコントロール等が考えられます。また、安全で質の高い製剤を安定供給す

ることが求められる化粧品製剤において、suspended-state NMRはその品質管理・保証に役立つ有用な測定法になると期待できます。

コスメトロジー研究振興財団から研究助成に採択されたこと、資金面でありがたかったことはもちろんですが、研究内容や計画が認められたことが大変嬉しく、研究を進める上で高いモチベーションとなりました。そして頂いた助成を基に、本研究を遂行し、得られた成果を様々な国内外の学会や研究論文(Int. J. Pharm. 537, 30-39(2018))として発表することができました。この場を借りて改めて、コスメトロジー研究振興財団に感謝の意を示させていただきます。今後は、本研究で得られた知見を基に更に研究を進めていき、より高品質の化粧品・医薬品創製に向けて貢献していきたいと思っております。(千葉大学大学院薬学研究院)

平成 27 年度 研究助成

## メラニン機能の多様性

飯田 真智子

皮膚・毛髪・眼のメラニン・メラノサイトは、皮膚色・毛色・眼色を決定し、個体のアイデンティティ形成に関わる大変ユニークな生体分子である。外界と体内を隔てる皮膚は、紫外線、摩擦、有害化学物質などの物理的あるいは化学的刺激を日常的に受けており、これらの刺激は、皮膚メラニン産生を亢進させる。メラニンは、紫外線などの有害光の吸収、フリーラジカル除去、有害物質の吸着や排出する機能を持つ。皮膚メラニン産生の亢進は、美白を好む人々にとっては大きな悩みである。しかし、視点を変えれば、メラニン産生は、それが正常な範囲であれば、様々な外的要因による皮膚のストレスレベルを示すバロメータであり、生体防御システムの1つとして機能しているとも

考えられる。一方、メラニン(特にフェオメラニン)は、正常範囲を超える強力な紫外線を吸収すると、フリーラジカルを産生し、細胞障害をもたらす可能性が示唆されている。このように、メラニンは、その環境により生体防御と細胞障害の2つの局面を持つ。メラニン・メラノサイトは、内耳・脳・心臓にも分布し、聴覚・肥満・神経系・循環器系の生理機能との関わりも報告されている。このようにメラニン・メラノサイトは、生体の実に広範囲に分布し、その機能も多岐にわたる点で興味深い。今後も、メラニン・メラノサイトの研究を通じて人々の美容と健康の向上に貢献していきたい。(名古屋大学大学院医学系研究科)

平成 27 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

井川 健

この度は、コスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択いただき、2年間の研究をサポートいただいたことに、厚く御礼を申し上げます。

自分は、iPS細胞や遺伝子改変技術を皮膚科の一般的な疾患に応用していくことを一つのテーマとして研究を遂行しておりました。今回のテーマであります、表皮角化細胞におけるフィラグリン遺伝子変異の、本当の意味での役割、ということに関しては、やはり自分のこだわりがありまして、なんとか成し遂げたいと考えておりましたので、まだ道半ばではありますが、そこをサポートしていただいたことについては、ただ感謝しかありません。

この2年の間で、思いがけず自分の所属もかわりまして、

そのせいもあって、本来到達すべき結果までは出せなかったことが悔いの一つではありますが、新しく異動した施設においても、継続して研究を遂行していくことができる基盤となる成果は出せたと考えております。コスメトロジーに貢献する、という意味では、今回到達した結果を基盤として、これから行っていく研究の方こそが本来であろうかと思われませんが、そこは、これからの自分の研究の発展に期待していただければと考えております。

最後になりましたが、もう一度、この2年間のご支援を賜りました、コスメトロジー研究振興財団に感謝を申し上げます。(獨協医科大学皮膚科)

## コスメトロジー雑感

石田 竜弘

ポリエチレングリコール(PEG)は以前から汎用されており、化粧品だけでなく医薬品や食品に添加剤として含まれており、私たちは生まれたときからPEGに暴露されてきています。理論上、重合度が高いPEG(分子量が大きい)は、皮膚も小腸も透過しませんし、透過するような分子量の小さなPEGは腎臓の糸球体でろ過されて速やかに排泄されるため、特に問題とされることはありませんでした。実際、これまでPEGの摂取による健康被害などは報告されていません。一方、今回の検討でお示したように、化粧品中のPEGによって抗体が生じる可能性があり、それが高価なPEG修飾製剤を投与した患者さんにおいて、薬効の発現を妨げる可能性があることが示唆されました。この発見もまた、副作用に直接繋がるものではなく、単に期待した薬効が得られない患者さんが出るかもしれない、というだけですので、問題にはならないかもしれません。医薬品の治療効果には個人差があることは常識であり、抗PEG抗

体を有するという事は、そういう運の悪い個人がいるということでもよいのかもしれませんが。患者さんも、そのご家族もPEGに対する抗体を持っているから効果が得られなかったという認識は皆無です(高い薬価は患者さんと国が支払い、多くの場合海外に流れます)。しかしながら、個別化医療が推進され、遺伝子変異などを見極めての治療が行われている中で、それでよいのかと考えます。化粧品が原因となっているかもしれない事象に対して注意喚起を行うのは化粧品などの嗜好品の販売で利益を得ている業界としてはあるべき姿ではないでしょうか。本研究成果をインパクトの高い雑誌に掲載させ、問題提起をしたいと考えています。

研究助成をいただきました、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団には心より深謝いたします。

(徳島大学大学院医歯薬学研究部)

## コスメトロジー雑感

大塚 篤司

私が行った研究は、新規フィラグリン遺伝子欠損ラットの作成とアレルギーマーチの解明です。

フィラグリンは皮膚バリア機能を担う重要なタンパクです。アトピー性皮膚炎(AD)の約20-30%の患者にフィラグリン遺伝子の変異が認められるだけでなく、アトピー性皮膚炎の患者のほぼ全てでフィラグリンタンパクの発現が低下しています。このことから、アトピー性皮膚炎発症とフィラグリンタンパクの関係は世界中で大きな注目を集めています。アトピー性皮膚炎、特にフィラグリン遺伝子の変異とアレルギーマーチの関連を示唆する多くの傍証はあるもののそのメカニズムについての詳細は不明でした。

今回、我々はフィラグリンノックアウト(FLG KO)ラットの作成に成功しました。フィラグリン遺伝子欠損(FLG KO)ラットを作成にあたり、Zink finger proteinを用いました。このFLG KOラットでは、尾部に絞扼輪を認め背部の皮膚はダーモスコピーにて表皮が変化していることがわかりました。また、ラットフィラグリン抗体を用いた

免疫染色では、KOラットのフィラグリン発現が完全に消失していることを確認しました。さらに、水分保持量がFLG KOラットで優位に減弱していることを見出しました。FLG KOラットと野生型ラットを用いてアトピー性皮膚炎モデルを構築しました。続いてアトピー性皮膚炎モデルを誘導したラットを用いて、喘息モデルの評価を行いました。気管支肺胞洗浄液中の総細胞数は、野生型ラットに比べてFLG KOラットで優位に上昇していました。さらに細胞断面を比較したところ、好酸球がFLG KOラットで優位に上昇していることを見出しました。以上より、FLG KOラットでは、アトピー性皮膚炎誘導に伴い、喘息の増悪がみられることが明らかとなりました。

今後、このモデル動物を用いてアレルギーマーチの解明のみならず、新規薬剤の検討が可能となると考えます。また、フィラグリン遺伝子異常から始まるバリア機能の破綻とアレルギーマーチの誘導メカニズムは、皮膚の健康がアレルギーの予防という新しいコンセプトを提供可能であり、

今後のコスメトロジーに大きな影響を与えるものと考えます。  
最後になりましたが、コスメトロジー研究振興財団の関

係者の皆様に深謝致します。

(京都大学大学院医学研究科皮膚科学講座)

平成 27 年度 研究助成

## 小胞輸送とコスメトロジー

大林 典彦

真核細胞の細胞内では、タンパク質や脂質をはじめ様々な生体物質が小胞に包まれて、細胞内の複雑に張り巡らされたネットワーク間を輸送されています。この小胞輸送の巧みな仕組みに魅せられて、小胞輸送を調節する Rab や Arf といった低分子量 G タンパク質の機能解明にこの 10 年間で費やしてきました。特に、色素細胞内に存在するメラノソームは、直径が 0.5 $\mu$ m ほど他のオルガネラに比べて大きく、さらにメラニンを蓄えているためハイコントラストであり、光学顕微鏡下で極めて容易に観察が可能となっています。それ故に、メラノソームの細胞内運動は、オルガネラダイナミクスを研究する上では、際立った輸送モデルと考えられています。メラノソーム研究をはじめた初期のころは、色素細胞内のアクチン線維や微小管といった細胞骨格上を成熟したメラノソームが運動する様に焦点を当てて研究を行いました。その後、色素細胞が活性化された後、その形態をダイナミックに変化させてメラニンを近傍のケラチノサイトに受け渡していく機構や、このたび助

成を賜りましたメラニンを生み出すメラニン合成酵素の輸送機構というように、徐々に色素細胞が続べる生命現象の対象を広げていき、それらに関する包括的な小胞輸送システムを理解しようと日々試みています。

このたびの被助成研究の結果、Rab32/Rab38 の活性化制御は重要な創薬のターゲットと考えられることがわかりました。本成果をふまえ、Rab32/Rab38 とその不活性化因子である RUTBC1 の相互作用を阻害するような化合物の開発は、メラニン合成酵素の輸送制御、すなわちメラノソームの成熟制御へとつながるものと期待されます。本アプローチは、アルブチンをはじめとするメラニン合成酵素自身の活性化制御をターゲットとする既存のアプローチとは異なるもので、メラニン産生を多面的に制御する選択肢を提唱することは、コスメトロジー研究におけるアカデミズムの役目の 1 つであろうと思います。

(筑波大学医学医療系生理化学)

平成 27 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

片岡 健

この度は、コスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択して頂き、関係する皆様に厚くお礼申し上げます。

私は皮膚組織の発生過程などで 3 次元構造が形成される原理に興味があり、in vitro および in vivo の実験系を用いて研究を進めて参りました。in vivo ではバラバラにした細胞を移植することで付属器を有する皮膚組織 (3 次元) が形成されるのに対して、in vitro では表皮・真皮細胞シー

ト (2 次元) の形成が限界です。このような差が生じる原因を突き止めることができれば、組織形成の原理の解明、さらには再生医療への応用も夢ではないと信じて日々研究をしております。

末尾になりましたが、コスメトロジー研究振興財団のますますのご発展を心より祈念申し上げます。

(岡山理科大学理学部臨床生命科学科)

## コスメトロジー雑感

倉岡 功

今回コスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択していただき、本研究を遂行できましたことをお礼申し上げます。私は、DNAの損傷とその修復に関する研究を通して、ヒトにおける突然変異誘発機構を調べています。どちらかと言えば、細胞の中で生じている基本的な分子機構を解析するというのが私のスタンスになりますが、この研究助成で支援していただくことによって、より応用研究に向かう足がかりを得たように感じています。それは私たちの環境中に存在する化学物質が私たちの思っている以上に私たちのDNAを傷つけていることがわかってきたからです。

環境中の化学物質は、加速度的に増加しています。化学物質のデータベースであるケミカルアブストラクト誌によれば、その数は1億種を超えております。少なくとも日常生活においても7万以上の化学物質に囲まれています。少し考えると不思議な気にもなりますが、化学物質に関わらない時がないとも言えます。さらにコスメトロジーにおいて、化学物質とヒトとの関わりは避けることのできない問

題だと言えます。

それに対して現在の化学物質の安全性評価の方法は、比較的簡便にまた短期間で化学物質の安全性を評価することができる復帰突然変異試験および染色体異常試験により解析されています。しかしながら、これらの手法は分子生物学的観点からすると明らかに古くなっており、これらの方法論は50年以上昔の生物学基盤により開発されています。

私の個人的な意見ではありますが、有用性の高い化学物質を安全に用いていくためには、化学物質の安全性評価法はより開発されていく必要があるように思います。少なくとも化学物質が生まれ社会に広く使用されることが必要になればなるほど、より確かな評価法の開発が重要になるでしょう。

最後になりましたが、今回の助成により、私たちの結果が原著論文として報告できたことを感謝したいと思います。どうもありがとうございました。

(大阪大学大学院基礎工学研究科)

## コスメトロジー雑感

河野 望

このたびは貴財団の研究助成に採択していただき、厚くお礼申し上げます。今回の助成対象としていただきましたのは、アレルギーを引き起こすマスト細胞の活性化に関する脂肪酸メデイエーターの研究についてです。

脂肪酸は生体内脂質の基本的な構成要素であり、そのほとんどは生体膜リン脂質に結合した形で存在しています。脂肪酸には炭素数や二重結合数が異なる様々な脂肪酸が生体内に存在しますが、アラキドン酸という脂肪酸は酵素的に酸化されて、エイコサノイドとよばれる一連のシグナル分子(脂肪酸メデイエーター)へと変換され、特異的な受容体を介して多彩な生理活性を発揮します。一方、生体膜リン脂質中の脂肪酸は酸化を受けやすく、酸化された脂肪酸をもつリン脂質「酸化リン脂質」が生成されます。この酸化リン脂質の酸化脂肪酸を切り出す活性をもつ酵素としてPAF-AH (II) が知られていたのですが、本酵素が生体内でどのような機能を担っているのかはほとんど明らかに

なっていませんでした。

私は、10年ほど前から「PAF-AH (II)によって酸化リン脂質から切り出された酸化脂肪酸が脂肪酸メデイエーターとして働くのではないか」という仮説のもと、研究をおこなってきました。最近ようやくPAF-AH (II)によって酸化リン脂質から切り出されたエポキシオメガ3脂肪酸がマスト細胞の活性化に重要であることを見出すことができました。そのような折に、本研究助成をいただけたことは大変励みになりましたし、この研究をさらに推進させる原動力となりました。

PAF-AH (II)の阻害剤はマウスのアレルギーモデルを抑制することも見出しており、本研究で見出したマスト細胞活性化の調節機構を制御することで、アレルギーをコントロールする新たな方策を打ちだせる可能性があります。本研究が、化粧品の安全性、機能性という面において少しでも貢献できれば幸いです。(東京大学大学院薬学系研究科)

平成 27 年度 研究助成

## 「アレルギー研究」と「コスメトロジー」

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、研究が展開できましたことを、この場をお借りして御礼申し上げます。

私はこれまで一貫してアレルギー研究に従事してまいりました。アレルギー疾患症状の一つとして、皮膚炎症があります。そして、「アレルギー研究」と「コスメトロジー」は密接に繋がっていることを様々な場面で目にすることがあります。例えば、皮膚炎の患者さんは、外出を控える傾向があります。また、その間化粧品をすることを制限され、益々外出することに抵抗を持ち、それが原因で精神疾患を患ってしまうことすらあります。このように、現代社会における化粧品には、単に「美しくなる」という目的を超

え、「健康的に美しくなる」という役目が課されていると思います。一方で現代社会は、住環境(乾燥、紫外線など)や生活環境(食生活、多種のコスメティックなど)の急激な変化や、新たに開発された化粧品(新規機能成分など)により、これまでと比較して皮膚は様々なトラブルを抱えやすくなってきています。そのような意味において、様々な視点から「コスメトロジー」を研究する試みは豊かな社会の構築に今後も益々重要な役割を担っていくと考えております。私は、「アレルギー研究」という視点から皮膚の健康維持を目指した研究活動を行うことによって「コスメトロジー」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衛生化学研究室)

平成 27 年度 研究助成

## 加齢と掌蹠の皮膚

夏賀 健

加齢なんて若い頃は全く興味がわかなかったのですが、自分の顔に“しみ”や“しわ”を発見したり、おでこが広がったりすると、研究の方向性もモチベーションもすっかり変わってしまって、老化とは何かみたいなことを考え出したのが、助成を受けた研究課題のはじまりです。私のメンターである北海道大学皮膚科の清水宏教授、西江渉准教授、そして弘前大学皮膚科に移られた澤村大輔教授らの作成した17型コラーゲンノックアウトマウス(Nishie W et al., Nat Med 2007)は、3ヶ月齢の段階で白髪と脱毛をきたす“早老化モデル”であったことから、この研究では加齢表皮と17型コラーゲンについて注目しました。とはいえ、全身のどの部分の皮膚を扱うかによって研究戦略も変わってきますが、私たちはマウスの毛周期に影響されない部分の表皮を扱うのが良いと考え、掌蹠の皮膚を対象として選びました。当初、加齢した掌蹠の表皮は薄くなるものと仮説を立てていたものの、結果が仮説を覆し、加齢すると過増

殖に至ることがわかったときにはとても驚きました。ヒト皮膚を用いた多くの実験結果では、加齢によって表皮が菲薄化すると報告されていますが、これは対象としている皮膚が露光部であり、紫外線による表皮細胞ならびに真皮への影響から表皮が菲薄化するものと考えられます。逆に、マウスの掌蹠のように、紫外線曝露がなく、恒常的に物理的刺激を受ける部位では、加齢によって表皮が過増殖に至るようです。17型コラーゲンを表皮特異的に発現させたマウスでは、加齢しても表皮が過増殖とならないため、17型コラーゲンは毛包間表皮にて抗加齢分子として作用すると言えます。本研究の内容は、大学院生の渡邊美佳さんがコツコツとデータを重ねて2017年に論文発表しました(Watanabe M, Natsuga K et al., Elife 2017)。予想外の結果が、科学の進歩につながることを実感した研究でした。

(北海道大学病院皮膚科)

## コスメトロジー雑感

西村 智

生物・医学研究におけるバイオイメージングでは「見ることは何を意味するのか？」という意識が希薄なことが多く、画像を撮影して論文につかえて満足というタイプの研究が非常に多いと感じています。個人的には、「見たことで何かを変えられない」研究スタイルに、ずっと違和感をもっていましたので、今回の提案では、生体の皮膚という非常にわかりやすい部分で「観察により幸せや変革をもたらされるような」特化したイメージング研究を行いました。皮膚の生体観察、ときくと、研究テーマとしてニッチだと指摘する生物学者がいるかもしれません。しかし、皮膚というわかりやすい場所で、美容から皮膚科診療まですべてをカバーすることに結果的になり、研究テーマとし

ては広がりを作ることができると自負しています。朝昼逆転、誰にも会わない、ラボにこもって文字通り機材と寝食をともにして作っているイメージングデバイスですので、愛着の大きさは半端ではありません。必ずや、今回の提案システムが多くの方の手にわたり、多くの方の Happy を演出できる、と信じたいと思います。ヒトは外観の助けを借りながらアイデンティティを作り、コミュニケーションをとっています。その多くには、体表面のテクスチャが関与していると思われます。リアルタイムで手に取りながら観察を行えば、美容や薬剤塗布、スキンケアなど、多くの範囲で、体表面への適切な対処が可能になるでしょう。

(自治医科大学分子病態研究部)

## コスメトロジー研究助成での研究成果のさらなる発展

林 謙一郎

この度はコスメトロジー研究振興財団から研究助成を頂き、深くお礼申し上げます。

Serum response factor (SRF) の転写補助因子である myocardin related transcription factors (MRTF-A 及び MRTF-B [MRTF-A/B]) は私の研究ターゲットの一つで、この転写補助因子の機能発現制御の研究を長年行っています。MRTF-A/B の活性化は上皮・内皮細胞から筋線維芽細胞への形質転換(上皮・内皮間葉転換)や筋線維芽細胞の機能発現(コラーゲン等の細胞外マトリクス [ECM] 産生)に重要な役割を演じていることが明らかにされ、多くの研究報告がなされています。しかしながら、皮膚線維芽細胞での MRTF-A/B に関する研究はごく少数(4~5 報)に留まっているのが現状です。このような状況下で皮膚線維芽細胞での MRTF-A/B 絡みの研究を模索中に見いだしたのが以下の知見です。これらが本研究の立案のきっかけになりました。

- 1) 正常皮膚線維芽細胞を MRTF-A 抗体を用いて免疫染色したところ、恒常的に核局在することを見いだした。
- 2) 正常皮膚線維芽細胞を ECM 上で培養した場合には筋線維芽細胞マーカーの発現は抑制されるが、通常の培養

条件下 (ECM コーティングなし) ではこれらの発現が増強される。

一般的には MRTF-A は細胞質に局在し、血清刺激により核内移行し SRF 機能を活性化します。しかしながら、皮膚線維芽細胞では MRTF-A は恒常的に核局在するため、細胞内での局在変化では機能発現制御を説明できず、核内での MRTF-A 機能の on/off に関わる新たな制御機構の存在が示唆されました。本研究でこの新たな制御機構の探究を行い X 因子が MRTF-A の機能発現に重要であることを明らかにすることができました。これまでの研究で、X 因子は皮膚組織の恒常性維持以外にもガン関連線維芽細胞を介した扁平上皮ガンの間質への浸潤や網膜色素上皮細胞の筋線維芽細胞への形質転換に関わることを明らかにしています。現在、これら一連の研究成果をまとめた論文を作成中のため匿名の X 因子とさせて頂きました。この論文が受理されましたら、改めて研究報告書を提出させて頂きたく存じます。

最後に、本研究遂行をサポートして頂きましたコスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(大阪大学大学院医学系研究科)

平成 28 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

日沼 州司

まずは、本研究の実施にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。教育の傍ら、小規模な女子大で、十全とは言い難い研究環境ではありますが、研究を少しでも進めたいと考えて仕事している小職にとっては、コスメトロジーの研究助成が本研究を推進するうえで、大きな支えになりました。若い頃に米国の研究所に留学し、当時の所長がノーベル賞を受賞したデビット・バルチモアでしたが、彼が small science を提唱していて、感銘を受けました。small science というのは、生命科学は、小規模の数多くの研究の中から革新的なものが生まれるという考え方で、big science とは逆の考え方になります。しかしそれから数十年を経て、時流は結局、研究資金を特定の有望と思われる対象に集中的につき込むという方向に進んでいき、我が国

の研究に関しても、研究者間で研究資金の面でも大きな格差が生じるようになってきました。また近年、総合的に見て日本の研究の国際的な競争力も低下していることが、様々な面から指摘されるようになってきました。資源の乏しい小さな島国である我が国にとって、科学技術を発展させることは、日本が繁栄するための必須の要件であることは、多くの人の共通認識だと思いますが、残念ながら次第に研究環境は危機的な状況になってきています。そのような現状において、コスメトロジー研究振興財団の研究助成は、公的資金がカバーできない small science の育成にも資するものだと理解しています。小職も一研究者として、微力ではありますが、コスメトロジーを含めた生命科学の進展に少しでも役立つように今後も精進したいと考えています。

(千里金蘭大学生生活科学部食物栄養学科)

平成 28 年度 研究助成

## 黒髪と白髪

藤枝 伸宇

人それぞれ感じ方に違いはあるものの、健やかな髪や肌は健康のパロメーターであり、また、一生を通じてそうありたいと思うものの一つと言えるだろう。大雑把に言えば、これらを司っている酵素、チロシナーゼは黒髪に対しては味方であり、一方で白髪に対しては敵とみなすことができる。面白いもので人は相反するものを同時に手に入れたいくなるようである。あるところでは抑制し、あるところでは増幅させる、これらコントロールの根幹はその反応機構に隠されていると考えているわけであるが、なかなかこれが複雑である。見れば見るほどその神秘は奥へ奥へと隠れていっているようにも見える。これはまさに基礎研究の醍醐味でもあり、終わりが無いように見えるのは応用・展開を考える上では大問題である。

今回、非常に基礎研究によったテーマに対して援助頂き、

コスメトロジー研究振興財団と関係者の皆様には感謝の言葉もありません。本研究ではチロシナーゼのごくごく微細な空間における金属の挙動について研究させていただいた。得られた結果にもとづいて、新たな領域にチャレンジし、次の結果を残すことが最良の恩返しかと次の展開について日々思慮にふけている。単純に考えれば阻害剤の設計には確実に影響する結果が得られていることに加えて、チロシナーゼの活性を増幅させ、タンパク質線維を染色するなど、半人工毛の産出にも貢献できるかもしれない。本研究はまだ、道半ばではあるが、今後重要な意味を持つ研究成果として期待している。最後に今後も貴財団とコスメトロジー分野のさらなる発展を祈念し、私の雑感としたい。

(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

## 感謝の気持ちを込めて

宮戸 健二

研究費を頂いて感謝の気持ちでいっぱいである。研究費に採択されることが、私たち研究者の生命線であり、どんなに素晴らしいアイデアを持っていても研究費がなければ実現することはできない。また研究費がなければ、有能な若手研究者が、研究を続ける以前に生活することができない。そういった諸々のことを含めて感謝の気持ちでいっぱいである。

今回の研究費助成で私は、果実に含まれる酸っぱい成分(クエン酸)の働きを「美容」や「若々しさ」の観点から研究を行った。結果として、クエン酸には白髪を防ぐ作用があることを発見した。一方でこの研究は、出発点が不妊研究であるという点が、他のコスメトロジー研究とは大きく異なっている。しかしながら、私の研究経験から考えると、それぞれの生命現象は思わぬところでつながっている場合があり、例えば「生殖と免疫」、「生殖と神経系」、「生殖と

細菌の共生」は根っこの部分でつながっている。そういった相互のつながりを見つけることが研究の醍醐味の一つである。クエン酸は、細胞内小器官であるミトコンドリアによって作られ、すべての細胞の呼吸に必要であるため、当然、細胞の代謝にも必要不可欠である。ただし、クエン酸の生合成系がミトコンドリア以外にも存在することは、ほとんど知られていない。私の研究はこのミトコンドリア以外に存在するクエン酸合成酵素に着目した研究であり、「白髪を予防し、黒髪・美髪をキープする」だけでなく、「生殖機能の維持」または「不妊」の予防にも発展する研究であり、詳細は省略したものの、「癌予防」への展開も考えられる。クエン酸を摂取する方法、摂取するタイミング、最適な摂取量など検討課題は多々あるものの、クエン酸といった容易に摂取できる物質にどのような可能性が秘められているのか、楽しみも多い。(国立成育医療研究センター)

## コスメトロジー雑感

山下 富義

外見の美しさを保ち精神的な内面の安寧をもたらす化粧品には、装飾としての性格はもちろんのこと、自身の一部である皮膚そのものに対する悩みを解消し健康を与えるスキンケアシステムとしての性格も必要と考えています。皮膚炎では身体症状として痒みがあり、見た目の変化を伴うため、罹患者のQOLが著しく損なわれ、日常生活や社会的活動に支障をきたしてしまうことも少なくありません。こうした苦しみから解放する、あるいは苦しみに至らないように予防する機能を持った素材の開発は、化粧品化学の分野の重要なテーマとっていました。私自身、20数年前に薬物の経皮吸収に関するテーマで博士号の学位を取得しました。医薬品も化粧品も皮膚に適用する化学物質という意味では同じで、昔から化粧品分野に親近感を持っていました。しかし、薬機法では医薬品/医薬部外品と化粧品は明確に区別されますので、これまでに「化粧品」について研究する機会をもつことは残念ながらありませんでした。

今回の研究のきっかけとなったナノ粒子化ヘパリンは、DDSのための天然素材を探索する中で偶然見つけたものです。薬物を含有させることなくそのまま抗炎症作用を発現することを見出しました。天然多糖のヘパリンを出発原料とすること、保湿や血行改善のためのヒルドイド(ヘパリン類似物質)が化粧品にも配合されることを考え合わせると、ナノ粒子化ヘパリンによる皮膚炎の抑制は化粧品分野の関心の高いテーマに違いないと確信しました。今回、コスメトロジー研究振興財団より助成をいただき、期待通りの成果を収められたことで、これまで何かしら“近くて遠い”と感じていた化粧品の研究分野に初めて貢献できた気がしています。研究機会を頂戴した貴財団に深く感謝しますとともに、今回の成果を糧にしながら新たな研究の開拓に邁進していきたいと思っております。

(京都大学大学院薬学研究科)

平成 27 年度 研究助成

## たるみの内部構造について思う

奥田 逸子

この度は大変お世話になりました。

私は大学病院に勤務しており、日頃は病気の診断をしています。診療をしながら、老いや若さの本質を画像で見ることができたら面白いことだと考えておりました。ある日、顔面の外傷や炎症を診断するため3次元CT画像を作成した時、加齢現象を画像化できることに気が付いたことがこの研究のきっかけでございます。最初は、数人の画像診断医や解剖学者などで加齢現象の内部画像について研究しておりました。しかし、少ない人数で取り組むにはもったいないことと思ひ始め、日本化粧品学会などで発表させて頂き、多くの方々と意見交換をしまいいりました。そうしているうちに、さらに多くの方々と交流できるようになり、この問題を扱う加齢画像研究会を2012年に立ち上げ、意見交換を続けてまいりました。この研究会においては顔面のみならず、頭皮や乳房など広い範囲の研究が行われ、発表をしまいいりました。

顔面のたるみ、とくに、頬のたるみが加齢容貌に大きな関わりがあることはよく知られていることです。しかしながら、頬のたるみの要因を客観的に評価した研究が少ないことが分かり、それを解明することは、これまで経験則に

頼っていたたるみの原因や予防を科学的な手法を用いて評価できることが予想されました。そこで、私達は公益財団法人コスメトロジー研究振興財団の助成を得て、“顔面加齢の評価のための画像解析手法の開発：主観的感覚的評価から客観的定量的評価へ”について研究を行うこととしました。その結果、加齢とともに頬頂部は内下方に下垂し、下垂した頬厚が増加することが確認でき、それらが加齢容貌をまねくことを実証したといえます。さらに、加齢容貌の解剖学的要因の一部を明らかにすることができたと考えております。

今日の進歩した画像診断学的技術や評価法は容貌のエイジングレベルや加齢に関与する皮下構造物を可視化し、高い客観性を有するといえます。本研究によって得られた成果は、美容や化粧品開発などの関連領域の研究者に積極的に広く発信していきたいと考えております。今後とも、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団のご支援を賜りたく宜しくお願い申し上げます。最後になりましたが、貴財団の益々の発展をお祈り申し上げます。

(国際医療福祉大学三田病院放射線診断センター)

平成 28 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

谿 雄祐

私にとって、本研究助成は日本学術振興会の特別研究員以来の研究助成でした。自分自身の興味のみから発する研究に取り組むのは、大学院生以来のことのように思われ、それだけでも大変ありがたいものでした。その反面、チームではなく個人で研究をすべて担当するのも久しぶりのことでした。その苦勞と楽しさを再認識させていただいたことで、研究者として一段階進めたような気がします。

本研究課題では、肌の質感と魅力の関係について検討するために、肌の質感を表現する語句を収集することから始めました。関連する研究で使用されている語句を用いることが一般的のように思われますが、化粧品会社によるブランド紹介サイトと一般ユーザーが書き込む口コミサイトから収集しました。権利や私の技術の問題もあり、小規模で

はありましたがプログラミングを利用しました。産業界においてビッグデータの活用が常識化しつつあるようですが、人工知能の飛躍的な発展を受けて、今後様々な研究分野においてもビッグデータを活用することが必須となることが予想される中、この機会を活用させていただきました。

今回、初めてインターネット調査会社を利用した大規模なデータ収集を行いました。これまでは実験室で行う実験を行っていたため、その違いを体験できたことも大きな収穫でした。実験を実施する上で留意すべき点について、データを見てから気づくこともありましたが、最低限見ようと考えていた内容はデータから見ることができたように思っています。データの規模が大きいため、報告内容以外の分析もまだ可能であると考えていますので、それらから得

られた知見は今後発表していきたいと思っております。

最後になりましたが、本研究で得られた知見が化粧品開発に携わっておられる方々にとって、少しでも参考になる

ものであれば幸いに思いつつ、このような機会をいただいたことの感謝を述べさせていただきます。ありがとうございました。  
(関西学院大学理工学部)

平成 27 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

恒次 祐子

この度はコスメトロジー研究振興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。わたしは植物、特に樹木のおいが人間に与える影響を研究対象としており、中でも日本の人工林の主要樹種であり、木造住宅の主な材料であるスギやヒノキのおいを対象に研究を行ってきました。樹木には抽出成分と呼ばれるごく微量の化合物が含まれており、その組み合わせにより樹種に固有なおいが形成されます。このにおい成分は、例えば昆虫を誘引したり忌避したり、菌類による腐朽を防ぐなど、樹木にとって様々な役割をしていることが知られています。これまでの研究で、針葉樹に含まれる $\alpha$ -ピネンという化合物のおいへの短時間曝露が、成人で血圧や脈拍数を低下させ、副交感神経系活動を上昇させる可能性が示唆されました。より長期的な影響へ研究を広げたいと思い、睡眠への影響を調査したいと希望しておりましたが、今回の研究助成をいただいたことで、新たに研究に着手することができ、大変ありがたく存じております。

新たな研究分野に挑戦したこともあり、測定においては

かなりの試行錯誤がありましたが、今後の研究継続に向けて自分なりに多くの知見を得ることができたと考えております。スギやヒノキは長くわたしたちの住生活を支え、国土保全の一端を担っている身近な樹木ですが、一般に我が国では森林への関心はあまり高いとは言えず、特にスギにいたっては最近花粉症の元凶として嫌われものになっています。コスメトロジーという新たな切り口からアプローチすることで、身近な樹木の新たな価値を見出し、国内の森林利活用の活性化に貢献できる可能性があるかもしれません。今回の研究を端緒に、今後も粘り強くにおいによる睡眠や健康への影響解明に取り組みたいと思います。

本研究助成のように、広い分野を対象とし、研究者の自由な発想を支援する寛容な研究助成は昨今では貴重なものとなったようにも思います。重ねてご援助に感謝申し上げますとともに、コスメトロジー研究振興財団のますますのご発展をお祈りします。

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

平成 27 年度 研究助成

## 子どもと化粧

徳田 克己

女の子は、TV・雑誌の子役やモデル、母親や保育者の化粧にあこがれ、遊びの中に化粧を取り入れながら成長していく。子ども学を専門にしている私たちは、女の子はいつ頃から、またどのように化粧に興味を持っていくのか、母親や保育者の化粧の様子や化粧観が子どもにどのように影響しているか、現代の幼児向け雑誌や化粧玩具では化粧がどのように扱われているかなどについて興味を持っていた。大変ありがたいことに、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団から研究助成金をいただくことができ、これらについてじっくりと調べることができた。

幼児雑誌の中に出てくる子どもモデルは男女ともきれいに化粧をしており、また「上手なリップのぬり方のページ」や「光るお化粧コンパクトの付録」などがあり、リップの形をしたキャラクターが登場している。化粧玩具は高価なものも多く、大きなドレッサーの玩具まで売られている。さらに実際に肌に塗るキッズコスメ商品も多数ある。これらのことは、大きな驚きであった。

化粧人生は七五三で始まる。化粧好きな母親の子どもは幼少の頃から化粧に興味を持っていた。多くの子どもが「おかあさんのようにきれいになりたい」と思ってリップを

いたずらして叱られていた。母親も保育者も多くは「子どもの化粧は肌に悪い」と言っている。子どものことを思っていることだ。しかし、子どもにとってみれば「私もきれいになりたい。どうしてママは化粧をしていいのに私はダメなの？」となる。だから幼児雑誌や化粧玩具では、リップやチークの方法を子どもに教え、自分ではなく、人形などに化粧をさせる。母親は「もう少し大きくなったらお化粧

をしてもいいよ」と言って、来るべき化粧解禁の日を待たせている。でも子どもはそれほど長くは待てない。化粧は、酒やたばこのように解禁年齢が明確に区切られているわけではないので、年齢が長じるにつれて徐々に化粧デビューの女の子が増えていく。そして大学のキャンパスは化粧美人でにぎわうのである。（筑波大学医学医療系）

平成 27 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

村田 航志

この度はコスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択していただき、心より感謝申し上げます。御支援をいただいた時期がちょうど現在の研究室に着任した初年度でしたので、実験環境を立ち上げて研究を開始するにあたり大変励みになりました。

本研究では香りのなつかしさの神経メカニズムをテーマに掲げ、幼少期に経験した匂いに対する心地よさがどのような脳神経回路によって生じるかを明らかにしようとしています。このテーマを着想したきっかけは、マウスの匂いの好き嫌いを調べるために様々な香料を嗅がせて行動反応を観察していたことでした。観察を進めるなかで、マウスが植物精油に対して強い誘引行動を示すこと、その誘引行動が見られる個体と見られない個体がわかれることがありました。原因として立てた仮説が養育環境の違いであり、本研究の結果から、木材のおがくずを床敷とした場合と紙

製チップを床敷とした場合で、成体期に木材精油への行動反応に違いが生じることがわかりました。本研究ではさらに誘引行動が生じる神経メカニズムにせまるため、嗅結節という脳領域に着目し、誘引行動が生じるときの神経活動と、神経活動を操作したときの行動変化を解析しました。申請当初の研究計画どおりには研究が進まず、方針を変更した点もありましたが、嗅結節という脳領域と嗅覚で生じる行動反応の関係について少し理解を深めることができました。マウス実験で得られた本研究の成果が、どこまでヒトの香りの感じ方に当てはまるかはわからないところもあります。嗅覚の神経メカニズムは未解明な点が多いからこそ、今後も研究を続け、香りで生じる様々な生理・心理作用の仕組みを明らかにしたいと存じます。

（福井大学医学部脳形態機能学分野）

平成 27 年度 研究助成

## 顔の計測

森 悦秀

私が治療・研究対象としているのは口の先天異常である口唇口蓋裂、あるいは下顎前突、上顎前突、非対称など顎の先天的・後天的異常である顎変形症の患者さんです。「(歯科)口腔外科」を標榜していますので、口唇、鼻、顎など嫌でも目につく部分の外科治療が仕事です。このため、顔の計測と評価を主に研究してきました。1980年代中頃から、三角測量の原理を応用したレンジファインダーを使って顔面形状を3次元的に計測し、評価をしてきましたが、顔面はなだらかな曲線で構成されており、再現性の高い特徴点

(ランドマーク)が少なく、大きさにも個体差があり、ランドマーク間の距離や角度の平均値にどれくらい意味があるのか疑問を感じていました。今回用いた相同モデル化技術は産業技術総合研究所で開発されたものです。計測された顔面形状は3次元空間に散布された点の集合(クラウド)ですが、これらの点をつないで小さな三角形を作り、サーフェスモデルが出来上がります。計測対象物の平均的な形状をもとにサーフェスモデルのテンプレートを作り、個々の顔面形状のクラウドにフィットするようにテンプレート

を変形させたのが相同化モデルです。もとのテンプレートは共通ですので、モデルを形作る点の数、三角形の面の数は共通で、すべての相同化モデルの点は1対1で対応しています。このため、多変量解析による統計処理が行えます。今回用いた主成分分析法は大量の変数(説明変数)をより少ない指標(合成変数)に要約しようとする統計手法ですが、抽出された主成分が顔面のどのような特徴を表してい

るかは、モデルの形状を変化させて人間が直感で見つける必要があります。一方、個々のモデルにその変化を反映できるため、テーラーメイド医療には最適です。今回の研究手法と結果はより詳細に検討する必要がありますが、新しい形状計測法として有用と考えられます。

(九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座口腔顎顔面外科学分野)

## 「ASMB Workshop 2017 on Basement Membranes」に参加して 吉川 大和

この度、コスメトロジー研究振興財団の国際交流助成を受け、2017年7月12-14日に米国テネシー州ナシュビルのバンダービルト大学で開催された基底膜に関するワークショップ「ASMB Workshop 2017 on Basement Membranes」に参加しました。

このワークショップは、バンダービルト大学のDr. Roy Zentとワシントン大学のDr. Jeffrey H Minerにより企画され、会場および宿泊も大学の施設を使用し、研究者間のコミュニケーションを行いやすくするだけでなく、最新の知見を発表しやすいように要旨集を作成しないスタイルを取り入れて行われました。ワークショップでは、基底膜を研究するための新しい技術、基底膜の物性、基底膜の生合成および安定性、基底膜と細胞のコミュニケーション、基底膜分子の遺伝学、基底膜の分解、基底膜の機能に関連する疾患およびその治療法といった8つのセッションに分かれて討論が行われました。70名ほどの少人数ということもあり、多くの参加者がポスターだけでなくオーラルでの

発表の機会を得ていました。このワークショップでは、要旨集が作成されなかったため、どの発表もしっかりと聞くことが求められるだけでなく、発表においても十分な背景の説明が求められました。今回のワークショップの発表では、競い合う2つのグループによるラミニンのインテグリン結合部位の構造についての発表が、その全容解明までであともう少しであり、とても印象的でした。さらに、モデル動物を使用した基底膜形成過程の視覚化が可能になり、基底膜形成メカニズムへのアプローチが複数のグループによりなされているのも印象的でした。また、基底膜は皮膚組織を支える必須な構造であることから、皮膚科領域の研究者が多く参加していました。

最後に、ご支援を賜ったコスメトロジー研究振興財団に改めて感謝を申し上げるとともに、今後も基底膜の研究という面からコスメトロジーにも貢献してまいりたいと思います。  
(東京薬科大学薬学部病態生化学)

## 第 10 回プロテオグリカン国際会議 参加報告

渡辺 秀人

このたび、コスメトロジー研究振興財団・学術集会支援助成を頂戴し、第 10 回プロテオグリカン国際会議に参加させて頂きました。

本国際会議は 1999 年夏に初回が日本にて開催され、以降世界各地にて隔年で開催されています。今回は 2017 年 9 月 10-14 日(日-木)の期間、ミラノからバスで約 1 時間のイタリア北部の観光地ヴァレーセにて Alberto Passi 博士会長の下、開催されました。

プロテオグリカンは、蛋白質とこれに共有結合するグリコサミノグリカンの複合体の総称です。グリコサミノグリカンの代表としてはヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸がよく知られています。皮膚科領域、整形外科領域ではお馴染みの分子群といえます。これらの分子群は細胞の増殖・分化・遊走等の挙動を制御したり、細胞外に存在して成長因子等の生理活性物質の機能を制御したり、弾力性、可塑性等、器官・組織の物性を規定する等、多彩な機能を生体内で発揮しています。

さて発表に関してですが、事前に主催者側が「たとえ未完成であっても構わないので未発表データを発表する」というポリシーを強く打ち出していたこともあって、殆どは

未公表の研究内容でした。発生学や構造科学の内容は減り、疾患(特に炎症と癌)や医療応用に関する内容が目立ちました。数年前と比較すると大きく様変わりした感があります。

国際会議は旧知の仲の研究者と再会できるのが楽しみのひとつです。旧知の仲の研究者は皆さんお元気でそのバイタリティに驚愕する一方で、自分を含めて「随分歳をとったなあ」とも感じました。元気で活躍している姿を見るのは嬉しいことですが、一方で若手研究者の育成は当該研究分野でも大きな課題です。そのためには分野全体の底上げが重要で、プロテオグリカンが病態制御を始めとして生体内で多彩な機能を持ち疾患治療のみならず健康長寿にも役立つ分子群であることをアピールすることが必要だと思いました。

本研究分野はまさに、「皮膚を清潔に保ち、美しく装う」という化粧品学(コスメトロジー)の趣旨に沿う研究分野といえます。本研究分野の研究成果は化粧品学の発展に繋がるものと期待しています。この度ご支援を賜りました貴財団に重ねて御礼申し上げます。

(愛知医科大学分子医科学研究所)

## 国際交流とコスメトロジーとの結びつきについて

小山 秀紀

今回の国際交流では、ドイツ、ヨーロッパ圏の産業現場をフィールドとして、応用人間工学の領域で作業-生理学的手法の開発と応用について、先進的な研究を進めている、Helmut Strasser 先生（ドイツ・ジーゲン大教授）を招聘し、日本人間工学会第 26 回システム大会にて、「The “Art of Aging” from an Ergonomics Point of View – Wisdoms on Age」の講演をお願いした。大会には大学教員や院生、企業の研究・開発者（化粧品メーカーの参加者もあった）など約 60 名の参加があった。

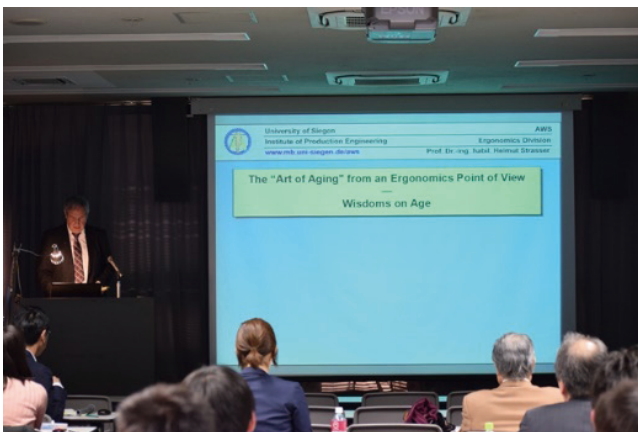
講演では、加齢による人間特性（筋力や組立能力、視覚・聴覚特性、神経・認知機能）の変化に関する基礎知識、それらを定量的に評価するための手法について説明された。また、高齢者の経験の豊富さや、予測実行能力など、加齢の肯定的な諸点についても説明され、年齢や経験に応じた道具や環境の最適化の重要性について述べられた。さらに、著名な哲学者・芸術家・詩人の文献を引用し、先人の知恵と照らし合わせながら、年を重ねることの洞察について、

ユーモアを交えながら語られた。講演後には、参加者と活発な意見交換が行われ、若手研究者や技術者の育成の観点からも有意義であった。

高齢社会の中で、加齢影響に関わる調査研究と対策は、今後も重要な課題と思われる。今回の講演、国際交流では、加齢影響の人間工学的知識だけではなく、人が豊かに生きるためのヒントを与える先人の知恵にも触れることができた。人が年を重ねるとはどういうことなのか、美しさとはどういうことなのか、科学と芸術の相違と共通点、美の探究と製品応用の可能性について考えさせるものであった。ドイツと日本、先人と若手、異文化や世代を超えた国際交流による知識と知恵の伝授と共有は、将来的に、より美しく豊かな人間生活の実現に寄与するのではないかとと思われる。

最後に、国際交流という貴重な経験の機会を与えていただきました、貴財団に感謝申し上げます。

（東北大学大学院医工学研究科）



## 第 39 回日本光医学・光生物学会開催報告

西田 絵美

第 39 回日本光医学・光生物学会を森田明理会頭、松本貴裕副会頭のもと、2017 年 7 月 21 日、7 月 22 日の 2 日間、名古屋駅の KITTE3 階の JP タワー名古屋ホール&カンファレンスにて開催した。今回の学会のテーマは、「最先端光の融合型研究と光の臨床の発展をめざして」で、あらたな「光」に関する医学・生物学・化学・工学の分野の発展を実感してもらうような工夫をした。振り返れば、1978 年 8 月 3・4 日に港湾会館（名古屋市港区）において光医学・光生物研究会が開催された。主催者は名古屋市立大学医学部皮膚科の水野信行教授であり、当初就任 10 周年記念の 1 回限りの研究会としての企画でしたが、50 演題を超える研究会となり、成功裡に終わったことから、本学会の前身「日本光医学・光生物学研究会」の第 1 回となった。「光に関係する異分野の方々が集まって、お互いにそれぞれの立場から他の分野の問題を批判・検討することは、独善的概念をしりぞけ普遍的原理へと導き、また他の分野での研究が自分の分野の新しいテーマの端緒ともなってくると考えるのであります」と述べられ、光を共通項とした横断的学会組織の必要性を強く感じておられた。29 年ぶりに名古屋市立大学医学部皮膚科が同学会を主催することとな

った。

学会は 2 つの会場の他、ハンズオンセミナー会場、展示会場に分かれ開催された。1 日目は第 1 会場にて森田会頭による開会の辞に始まり、2 名の奨励賞受賞者による講演、平山秀樹先生、影山龍一郎先生による特別講演、臨床領域から 2 名の先生のスポンサードセミナー、臨床と研究を結ぶ内容で 2 名の先生のランチョンセミナー、半導体についての 3 名の先生のシンポジウム、2 名の先生のスイーツセミナー、一般講演 21 演題が行われた。また今回初めてハンズオンセミナー会場にて、4 社の企業が機器を持ち込み、その場で機器に触れ、実際の操作方法、特徴を含めた具体的な説明を受けることができるブースを設置。また 2 日も皮膚科の臨床について 2 名のモーニングセミナー、生体光イメージングについて近藤科江先生、再生医療の応用につき難波大輔先生より特別講演、光線療法と薬物療法について 2 名のランチョンセミナー、一般講演 14 演題を行い、最後には次期会頭中林孝和先生の閉会の辞をもって無事閉会となった。2 日間で、内容のみならず、120 名を超える人数の参加と非常に盛況な会となった。

(名古屋市立大学大学院医学研究科)

## 日本動物実験代替法学会第 30 回大会への支援のお礼

小島 肇

日本動物実験代替法学会第 30 回大会は、2017 年 11 月 23～25 日に、大田区産業プラザ(東京・大田区蒲田)で開催されました。お陰様で 711 名の方にご参加頂き、無事盛会のうちに終了いたしました。これも、コスメトロジー研究振興財団の支援により、中国人および韓国人の専門者を招聘し、ランチョンセミナーでの講演を開催できたことが大きな反響を呼んだためと考えております。

11 月 25 日に開催されたランチョンセミナーでは、2 会場で同時に開催され、A および B 会場で以下のような講演がなされました。

### A 会場

- ・ Recent developments of toxicological alternative methods in China
  - Xingfen Yang (School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou, P.R.China) ら
- ・ Current activities for the development and validation of alternative test methods in Korea
  - Tae Cheon Jeong (College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan, Republic of Korea) ら

### B 会場

- ・ An in vitro co-culture system to assess lipophilic chemicals and petroleum chemicals for skin sensitization

—Shujun Cheng (Guangdong Inspection & Quarantine Technology Center, Guangzhou, China) ら

・ An integrated testing strategy for in vitro skin irritation and corrosive assessment using EpiSkin™ skin model

—Junming Huang (Guangdong Province Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, China) ら

いずれの会場も各 150 席が満席の盛況ぶりであり、改めて中韓の行政や研究動向に参加者が興味を持っていることを実感できました。中国人および韓国人の専門家とは、2016 年 11 月に佐賀県・唐津市で開催された第 1 回アジア動物実験代替法学会で協力関係を築き、2018 年 10 月に中国・広州で開催される予定の第 2 回アジア動物実験代替法学会にて、その関係を深めつつあります。今後も、動物実験の福祉や安全性試験法の開発を通して、益々日中韓の結びつきが強くなっていくものと考えております。

繰り返しになりますが、これもコスメトロジー研究振興財団の皆様のご協力のお蔭です。改めまして、財団の支援に御礼申し上げます。今後とも、化粧品の安全性評価に動物実験を用いない検討を行っていく“日本動物実験代替法学会”へのご支援をよろしく賜りますようお願い申し上げます。  
(国立医薬品食品衛生研究所)



# 付 録

●  
事業報告書  
役 員  
●



## 事業報告書

(自平成 29 年 4 月 1 日 至平成 30 年 3 月 31 日)

### 《研究助成関連》

2017	5	8	公募開始	全国 601 の大学、病院、研究機関等へ公募要領及び推薦書を送付、関連学術雑誌 2 誌、当財団 HP 他 11 機関 HP に公募要領を掲載
	7	10	公募締切り	応募総数123件
	7/14	~ 8/25		各選考委員による個別審査
	9	1	選考委員会(第2分科会)	生体作用、安全性に関する分野の選考
	9	5	選考委員会(第1分科会)	素材、物性に関する分野の選考
	9	8	選考委員会(第3分科会)	精神、文化に関する分野の選考
	9	29	本選考委員会	各分科会の結果を総合的に判断して研究助成35課題を選考
	11	21	理事会	本選考委員会より答申、助成課題決定
			第28回 表彰・贈呈式 記念講演	研究助成対象35課題の代表者へ、助成金贈呈書を授与 演題：夢を形に：ナノテクノロジーで創る体内病院 講演者：片岡 一則 先生 公益財団法人川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター長
	12	11	助成金交付	採択課題に対し研究助成金を交付 総額4,000万円
2017	2	20	選考委員への承認(書面)	2018年度研究助成公募要領他

### 《国際交流助成関連》

2017	4	14	審査	国際交流(派遣)：基底膜ワークショップ及びプロテオグリカン国際会議の審査
	4	25	助成金交付	国際交流助成金の交付 50万円
	4	14	審査	国際交流(招聘)：日本人間工学会第26回システム大会の審査
	12	25	助成金交付	国際交流助成金の交付 50万円

### 《学術集会支援助成関連》

2017	7	6	審査	学術集会支援：第39回日本光医学・光生物学会の審査
	7	10	助成金交付	学術集会支援助成金の交付 50万円
	9	11	審査	学術集会支援：日本動物実験代替法学会第30回大会の審査
	9	25	助成金交付	学術集会支援助成金の交付 50万円

### 《理事会関連》

2017	5	23	第一回通常理事会	平成28年度事業報告及び収支決算報告の承認 株主としての議決権行使の承認、報告事項
	10	6	理事への承認(書面)	平成29年9月29日開催の選考委員会決定内容の承認
	11	21	第二回通常理事会	平成29年度収支予算書の一部変更の承認 平成29年度(第28回)研究助成者等の承認 平成30年度の事業計画及び予算案の承認、報告事項

### 《評議員会関連》

2017	6	9	定時評議員会	平成28年度事業報告及び収支決算報告の承認、報告事項
	11	27	評議員への報告(書面)	第二回通常理事会議決事項、表彰・贈呈式その他の報告

《その他》

1) 報告書発行

2017	5	1	中間報告書	研究業績 中間報告集 第26号
	9	1	完了報告書	コスメトロジー研究報告 Vol. 25 (2017)、CD版を作成

2) 行政届出関連

2017	6	14	内閣府へ平成28年度事業報告書等の提出	
2018	1	15	内閣府へ平成30年度事業計画、収支予算書の提出	

3) 情報公開 (当財団HP)

2017	4	7	公募要領	2017年度「コスメトロジー研究」公募要領を掲載
2018	6	30	事業報告及び収支決算	平成28年度事業報告書及び収支決算報告書を掲載
	9	1	研究報告書	「コスメトロジー研究報告 Vol. 25 (2017)」を掲載
	11	22	予算書一部修正	平成29年度予算書の一部修正
			研究助成者及び課題名	2017年度 (第28回) 研究助成者名及び研究課題名を掲載
2017	3	1	事業計画及び収支予算	平成30年度事業計画及び収支予算書等を掲載

## 2017年度助成を受けられた方々

## 1) 第27回研究助成(35名)

## 第1分野：素材、物性に関する分野(10名)

氏名	所属	職位	研究課題
犬丸 啓	広島大学大学院 工学研究科	教授	紫外光照射下での酸化チタン粒子からの活性酸素の放出を完全に防止するナノ構造コーティングの開発
井上 元基	明治薬科大学	助教	シクロデキストリンを用いたサーファクタントフリーエマルションの安定化メカニズムの解明
内野 智信	静岡県立大学 薬学部臨床薬理学分野	講師	ナノ粒子の物性の違いが角層作用過程におけるナノ粒子と角層の相互作用に与える影響の検討－放射光X線を用いたアプローチ
大貫 義則	富山大学大学院 医学薬学研究部(薬学)	客員教授	MRIと時間温度換算則を応用したエマルション化粧品の高精度乳化安定性予測
岡本 浩明	山口大学大学院 創成科学研究科	准教授	化粧くずれの低減を目的とした新規な非水素結合性有機ゲル化剤の開発
紀和 利彦	岡山大学大学院 自然科学研究科	准教授	テラヘルツ波を用いた皮膚への化粧水浸透評価手法の開発
棚谷 綾	お茶の水女子大学 基幹研究院自然科学系	准教授	皮膚疾患に有効な新規骨格を有するビタミンD誘導体の創製
戸塚 裕一	大阪薬科大学 薬学部	教授	ケルセチン含有化粧品の最有効使用のための有機ナノコンポジット設計
平井 洋平	関西学院大学 理工学部生命医化学科	教授	化粧品原料の次世代スクリーニング用細胞の創製：ES/iPS細胞の多重遺伝子加工
山野 喜	広島大学大学院 医歯薬保健学研究科生命薬科学	助教	モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュを用いた安全なメラニン産生抑制活性物質の創薬研究

## 第2分野：生体作用、安全性に関する分野(18名)

氏名	所属	職位	研究課題
佐々木栄太	東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻	助教	細胞の損傷や老化により生成する脂質過酸化物のバイオイメーキング
清水 史郎	慶應義塾大学 理工学部応用化学科	教授	メラニン生成関連タンパク質における新規糖修飾の解析と応用への展開
下田 浩	弘前大学大学院 医学研究科	教授	革新的ハイブリッド型三次元ヒト皮膚モデルの開発
白土 明子	金沢大学 医薬保健研究域薬学系 生体防御応答学	准教授	ナノマテリアルによる細菌遺伝子発現の制御と感染調節
世戸 孝樹	静岡県立大学 薬学部 薬物動態学分野	講師	動物実験の3Rsに寄与する化学物質の光安全性評価法の戦略的开发
徳村 雅弘	静岡県立大学 食品栄養科学部 環境生命学科	助教	化粧品成分の安全性評価のための製品性状を考慮した経皮曝露量推算スキームの構築－マニキュア用可塑性剤の経皮曝露を考慮したリスクトレードオフ評価－
仲村 英也	大阪府立大学大学院 工学研究科化学工学分野	准教授	ナノ粒子が細胞膜を透過する現象の理解：分子動力学計算および平面脂質膜法による解析

氏名	所属	職位	研究課題
野口 範子	同志社大学 生命医科学部	教授	皮膚細胞を保護するタンパク質の分泌機構の解明と分泌促進因子の探索
樋浦 仁	東北大学大学院 医学系研究科	助教	ヒト未分化胎盤幹 (TS) 細胞を用いた合成香料 (HHCB) の安全性評価システムの開発
堀 昌平	東京大学大学院 薬学系研究科	教授	制御性T細胞による皮膚恒常性維持メカニズムの解明
水谷 健一	神戸学院大学大学院 薬学研究科 幹細胞生物学研究室	特命教授	創傷治癒過程において、血管網の再構築が表皮幹細胞の分裂制御に果たす役割
村田 光麻	京都大学 医学研究科 皮膚科学講座	研修員	カルシウムイオンに着目した角層形成メカニズム・角化症の病態解析
茂木精一郎	群馬大学大学院 医学系研究科皮膚科学	講師	皮膚の酸化ストレス障害に対する間葉系幹細胞の治療効果と制御機構の解明
森山 博由	近畿大学 薬学総合研究所	准教授	皮膚老化予防に寄与する新規オートファジー制御機構の解明
保嶋 智也	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	助教	メラノソーム膜に局在するOCA4型アルビノ原因遺伝子MATPを標的としたメラニン合成阻害剤の開発
山上 淳	慶應義塾大学 医学部医学科	専任講師	表皮細胞間接着分子の発現増強条件と皮膚機能の総合的検討
山本 圭	徳島大学大学院 社会産業理工学研究部 生物資源産業学域	准教授	プラズマローゲン型リゾリン脂質代謝系を基軸とした皮膚の恒常性と疾患調節の作用機序の解明
善本 隆之	東京医科大学 医学総合研究所 免疫制御研究部門	教授	化学物質のアレルギー感受性 in vitro 評価法の開発

第3分野：精神、文化に関する分野（7名）

氏名	所属	職位	研究課題
麻生 典	九州大学大学院 芸術工学研究院	助教	香りの文化と法的保護
有賀 敦紀	広島大学大学院 総合科学研究科	准教授	化粧品の濃さと社会的文脈の循環的相互作用に関する行動経済学的アプローチ
小井川広志	関西大学 商学部	教授	化粧品原料オイルとしてのパーム油の可能性と課題
大場健太郎	東北大学 加齢医学研究所 人間脳科学研究分野	助教	懐かしい香りを用いた回想法の効果検証および脳メカニズム解明
五島 史行	独立行政法人国立病院機構 東京医療センター 臨床研究センター聴覚平衡覚障害 研究部平衡覚障害研究室	室長	眼瞼裂幅測定による耳鼻咽喉科心身症患者の客観的評価のこころみ
藤原 寿理	福島県立医科大学 医学部システム神経科学講座	助教	化粧がもたらす社会的効用 —その神経基盤を探る
横山由香里	日本福祉大学 社会福祉学部医療福祉専修	准教授	視覚障害者自らによる「化粧」が視覚障害者の Quality of Life に与える多面的な影響に関する研究

## 2) 国際交流助成 (2件)

受入責任者	派遣・招聘者	目的
愛知医科大学 分子医科学研究所 教授・所長 渡辺 秀人	東京薬科大学 吉川大和 愛知医科大学 渡辺秀人	基底膜ワークショップへ派遣 (平成29年7月12日～14日、米国、バンダービルト大学) 第10回プロテオグリカン国際会議へ派遣 (平成29年9月9日～14日、イタリア、ヴァレーゼ)
東北大学大学院 医工学研究科 客員准教授 小山 秀紀	University of Siegen Helmut Strasser	日本人間工学会システム大会への招聘 The Art of Aging 老化の美学 (平成30年3月12日～13日、早稲田大学理工キャンパス)

## 3) 学術集会支援助成 (2件)

実施責任者	職位	集会名
西田 絵美	名古屋市立大学大学院 医学研究科	第39回日本光医学・光生物学会 (平成29年7月21日～22日、JPタワー名古屋ホール&カンファレンス)
小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部	日本動物実験代替法学会第30回大会 (平成29年11月23日～25日、大田区産業プラザ)

## 役員

2018年7月1日現在

理事長	小林 保清	株式会社コーセー 名誉会長
副理事長	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	関根 茂	日光ケミカルズ株式会社 取締役会長
理事	長野 哲雄	東京大学創薬機構 客員教授
理事	二木 鋭雄	東京大学 名誉教授
理事	西川 武二	慶應義塾大学 名誉教授
理事	野呂 影勇	早稲田大学 名誉教授
理事	廣部 雅昭	東京大学 名誉教授
理事	山崎 幹夫	元新潟薬科大学 学長
監事	岩渕 信夫	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	齊藤 勲	元厚生省大臣官房審議官
評議員	仙名 保	慶應義塾大学 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
評議員	西岡 清	東京医科歯科大学 名誉教授
評議員	花輪 隆昭	元昭和館 館長
評議員	原田 敬之	東京女子医科大学 名誉教授
評議員	宮崎 榮三	東京工業大学 名誉教授



\*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 コスメトロジー研究振興財団

〒104-0032 東京都中央区八丁堀三丁目11番8号  
ニチト八丁堀ビル五階  
電話 03(3206)7721

コスメトロジー研究報告 Vol. 26 / 2018

非売品

2018年9月1日発行

編集責任者 亀山 浩一  
発行 公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団  
〒104-0032 東京都中央区八丁堀三丁目11番8号  
電話 03(3206)7721  
制作 エイエム企画  
〒171-0014 東京都豊島区池袋四丁目24番7号  
電話 03(3590)5375  
印刷 太陽印刷工業

表紙デザイン監修：株式会社コーサー 商品デザイン部デザイン室

©2018

不許複製 禁無断転載