# ごあいさつ

コーセーコスメトロジー研究財団の29冊目の研究報告書をお届けします。

本財団は、1990年に株式会社コーセーの創業者小林孝三郎により設立され、昨年は創立30周年を迎えることができました。この間、本財団がコスメトロジー（化粧品科学）の発展をめざして研究助成活動を滞りなく継続できましたことは、多くの関係者の皆様のご理解とご協力によるものと、心より感謝申し上げる次第でございます。

化粧品科学は、医学、生命科学、化学、心理学、社会学など幅広い学問領域を基盤に成り立っており、これら様々な専門分野の研究者が集って化粧品分野の研究に参画することで、今日のコスメトロジーが体系づけられてきたといえます。

本財団が助成した研究テーマも、化粧品の新素材や物性評価など工学的なテーマから、健康な皮膚を保つための皮膚科学や安全性の研究、さらには化粧心理や化粧文化といった化粧行為を研究対象にしたものなど多岐にわたります。これら研究助成の成果を通して、これまで本財団がコスメトロジーの発展に微力ながら貢献できましたことは、私どもの大きな喜びとするところでございます。

今回の報告書は、2018年度から2019年度に助成を受けられた研究者39名の研究報告を掲載しております。また「コスメトロジー研究助成を受けて」と題して、研究助成を受けられた先生方の所感を収載しています。

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

引き続き、本財団は、独創的な研究テーマを積極的に助成してまいる所存でございます。今後とも、皆様からますますのご協力とご支援を賜りますようお願い申し上げます。

2021年9月

公益財団法人 コーセーコススメトロジー研究財団

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

・天然スキンケア原料としてのマイコスポリン様アミノ酸：生産基盤開発と機能解明…… 4
名城大学理工学部　景山　伯春

・機能性化粧品として期待できる皮膚ガス応答性発色素材の研究開発…… 8
島根大学大学院自然科学研究科　笹井　　亮

・乳酸菌オリゴ DNA による上皮細胞の炎症制御と経皮核酸素材への展開…… 13
信州大学農学部　下里　剛士

・β-アミノ酸から構築する人工コラーゲンの創製 …… 18
芝浦工業大学システム理工学部生命科学科　須原　義智

・超分子架橋を施した高保水性コラーゲン微粒子の創製…… 25
東京医科歯科大学生体材料工学研究所　田村　篤志

・高分子ベシクル積層膜の秩序構造とダイナミクス…… 31
大分大学理工学部　檜垣　勇次

・強紫外光が照射された部位選択的な治療を可能とする分子システムの開発…… 36
大阪薬科大学　平野　智也

・化粧品原料微粒子の液中での分散・凝集状態評価技術の開発…… 40
法政大学生命科学部　森　　隆昌

・エマルション重合過程におけるミクロ生体高分子ゲルの粘弾性測定法の開発…… 46
東京大学大学院総合文化研究科先進科学研究機構　柳澤　実穂

・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…… 49
広島大学大学院医系科学研究科薬学分野　山野　　喜

・CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた紫外線防御剤となる多機能光回復酵素の開発…… 57
大阪大学大学院基礎工学研究科　山元　淳平

Ⅱ．生体作用、安全性に関する分野

・*In vitro/in silico* 試験による皮膚感作性の毒性学的懸念の閾値（TTC）コンセプトの確立…… 62
国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部　足利　太可雄

・シリカナノ不織布を用いた汎用皮膚三次元モデルの開発…… 67
横浜国立大学大学院工学研究院　飯島　一智

・黄色ブドウ球菌免疫かく乱タンパク質を介したアトピー性疾患発症・増悪機構の解明…… 71
名古屋市立大学大学院薬学研究科医療機能薬学専攻衛生化学分野　伊藤　佐生智

・転写因子 SOX2 による皮膚虚血再灌流障害（急性期褥瘡）における制御機構の解明
および新規治療法の開発 …… 77
群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学　内山　明彦

・皮膚で発現する化学物質受容体が体の温度適応に与える影響…… 81
甲南大学大学院自然科学研究科 / 統合ニューロバイオロジー研究所　太田　茜、高垣　菜式

・脂肪酸の構造ダイバーシティを活用する生理活性物質創製…… 86
東京大学大学院薬学系研究科　大和田　智彦

・EGF が皮膚炎に与える影響とメカニズム …… 89
熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座　押海　裕之

・アトピー患者に対する化粧品の皮膚刺激性・保護作用を評価する新規皮膚炎モデルの開発…… 93
広島大学原爆放射線医科学研究所　神沼　　修

・メラニン色素合成の解明に向けて～チロシナーゼ関連タンパク質の金属要求性に関する基盤研究～… 97
京都大学大学院生命科学研究科　神戸　大朋

・神経ペプチドシグナルを介したアレルギー発症メカニズムの解明と皮膚炎軽減効果…… 102
北海道大学遺伝子病制御研究所　北村　秀光

・アシル CoA 合成酵素 ACSVL4 による皮膚バリア形成機構…… 109
北海道大学大学院薬学研究院　木原　章雄

・ロドデンドロールによる細胞死へのフェロトーシスの関与の可能性…… 115
山形大学大学院医学系研究科　小林　　翔

・食薬用植物からの育毛活性物質の探索…… 120
筑波大学生命環境系　繁森　英幸

・アトピー性皮膚炎発症者に高度に定着する黄色ブドウ球菌と健常者皮膚細菌の菌種間干渉の解析 …… 125
静岡県立大学食品栄養科学部　島村　裕子

・アトピー性皮膚炎における新規オートファジーの関与とそれを応用した治療法開発…… 131
東京医科歯科大学難治疾患研究所　清水　重臣

・皮膚付属器官を有する三次元再生皮膚器官系の開発…… 135
国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センター　武尾　　真

・常在菌フローラ育成を目指す肌表面微小環境応答性ポリアミノ酸の開発…… 141
東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所　武元　宏泰

・ヒト嗅覚受容体センサーによる匂いのデジタル化を応用した香水設計手法の確立…… 145
大阪大学産業科学研究所　立松　健司

・高分子水溶性ナノ粒子の皮膚浸透挙動を題材とした高分子化合物の皮膚浸透メカニズムの解明…… 150
城西大学薬学部　徳留　嘉寛

・有害物侵入を最前線で防ぐ新規な皮膚細胞機構の発見と皮膚保護剤創製への応用…… 157
岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻　中村　元直

・ヒト iPS 細胞に由来する若齢および加齢様の性質を示す積層および立体皮膚オルガノイドの作製…… 164
関西医科大学大学院医学研究科医科学専攻
イノベーション再生医学 iPS・幹細胞再生医学講座　服部　文幸

・アレルギー性化合物を感知する自然免疫受容体の同定とそれを利用した感作抗原性評価系の樹立…… 167
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科　原　　博満

・ヒト皮膚に発現する薬物トランスポーター遺伝子多型・発現解析と経皮吸収への影響…… 170
九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野　廣田　　豪

・創傷治癒に関わる細胞挙動に対するソフトマテリアルによるメカノストレスの影響評価…… 175
大阪府立大学大学院理学系研究科　森　　英樹

・ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の開発…… 181
北海道大学大学院薬学研究院　山田　勇磨

**Ⅲ．精神、文化に関する分野**

・ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用…… 188
筑波大学生命環境系　青柳　秀紀

・香りが認知能力に与える影響…… 191
名古屋大学大学院理学研究科　上田（石原）奈津実、福枡　直人、布施　尚城、木下　専

・桜の香りによる脳に及ぼす影響の機能生理学的解析…… 195
星薬科大学運動科学教室　竹ノ谷　文子

**■コスメトロジー研究助成を受けて**・…… 205

**■付　録**

**事業報告書**　…… 227
**2020 年度　研究助成を受けられた方々**　…… 229
**役員一覧**　…… 232

# 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

# 天然スキンケア原料としてのマイコスポリン様アミノ酸：生産基盤開発と機能解明

名城大学理工学部
景山　伯春

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are a group of water-soluble, low-molecular-weight secondary metabolites known as a natural biological sunscreen. Since it has been suggested that MAAs possessed multiple bioactivities for health and beauty, a universal production process of MAAs from biomass is an important subject. Here, we developed a broadly applicable and cost-effective method for the purification of MAAs from cyanobacterial cells. Because of their photoautotrophic property, the cyanobacteria, which are photosynthetic microorganisms, are of interest as a natural source of useful compound production. The purification method presented here was designed and developed by using a halotolerant cyanobacterium *Halothece* sp. PCC7418, which could produce a rare MAA, mycosporine-2-glycince (M2G). A three-step separation process using low pressure liquid chromatography yielded high-purity M2G. Moreover, the most common MAAs, shinorine (SHI) and porphyra-334 (P334) could also be successfully purified from commercialized sunscreen reagent Helioguard®365 by utilizing this method. The experimental parameters obtained in this study might allow for a scale-up of the MAA production process for future commercialisation. From the viewpoint of application as skin care ingredient, antioxidative activities of purified MAAs were evaluated by the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay. Inhibitory activities of these MAAs toward tyrosinase, which is known to be an enzyme involved in melanin biosynthesis, was also investigated.

## 1．緒　言

シアノバクテリアは光合成によって光エネルギーと二酸化炭素を様々な有機化合物に変換することができる。その光合成能、増殖力および遺伝子操作の容易さから、シアノバクテリアは有用物質の工業生産への応用が期待されている。本研究で着目するマイコスポリン様アミノ酸（Mycosporine-like amino acid, MAA）は水溶性の二次代謝産物であり、シアノバクテリア、海洋性紅藻、サンゴや陸棲地衣類などの多様な生物において合成されることが知られている[1)]。これまでに30種を超えるMAAが報告されており、これらの吸収極大は紫外線（UV）領域である268～362nmの範囲に存在する[1)]。この特性を利用して、MAAはUV-A吸収製剤Helioguard 365などとして既に製品化されている。Helioguard 365にはリポソーム化された紅藻由来のshinorine（SHI）およびporphyra-334（P334）が含まれている。シアノバクテリアにおけるMAAの生理的な役割はまだ完全には明らかにされていないが、UV防御や細胞内の浸透圧調節を担うと考えられている[2)]。さらに、近年になってMAAの様々な生物学的活性が報告されている。例えば、耐塩性シアノバクテリアから単離したmycosporine-2-glycine（M2G）は、フリーラジカル消去活性[3)]、酸化ストレスによる細胞死の抑制[3)]、コラゲナーゼ活性阻害[4, 5)]や蛋白質の糖化抑制[5)]といった活性を示すことが報告されている。図1にM2G、SHIおよびP334の分子構造を示す。

将来的に、さらなるMAAの機能評価を行う際には、高純度の標品が必須である。これまでに、シアノバクテリア細胞に存在するMAAについて、汎用性の高い抽出手法および同定方法の提案があった[6)]が、広範囲のシアノバクテリア種に適用可能な単離精製手法については報告されていなかった。そこで、本研究では株種に関わらずシアノバクテリアから効率よく高純度でMAAを獲得するためのプロセス開発を目指した。その結果、コストメリットの高い低圧クロマトグラフィーを適用し、耐塩性シアノバクテリアからM2Gを高純度で獲得する手法を確立した。この手法は、Helioguard 365に含まれるリポソーム化されたSHIおよびP334の単離精製にも適用可能だった。また、精製MAAを用いて皮膚のアンチエイジングに関わる生理活性である抗酸化活性およびチロシナーゼ阻害活性の評価を行った。

## 2．方　法

### 2．1．MAAの抽出

耐塩性シアノバクテリア*Halothece* sp. PCC7418の培養液から細胞を回収し、適量のメタノールを加えた後に超音波処理を施すことで細胞を破砕した。遠心分離によって得られた上清をメタノール抽出液とした。メタノール抽出液を減圧遠心乾燥した後、乾燥物に純水を加えて溶解した。遠心分離によって不溶性物質を除いた後に得られた上清に対してクロロホルムを若干量加えた。懸濁後、遠心分離によって得られた上層（水層）を回収した。クロロホルム



Mycosporine-like amino acids as natural skin care ingredients: Production development and investigation of biological functions

Hakuto Kageyama

Faculty of Science and Technology, Meijo University

中に色素が溶解するため、この操作を行うことで水層の色は濃緑色から無色に近くなる。続いて、限外ろ過によって3,000Da以上の溶解物を除き、これを低圧クロマトグラフィーに供するM2Gの抽出液とした。

SHIおよびP334については、Helioguard 365より抽出した。Helioguard 365はエイチ・ホルスタイン社より提供いただいたサンプルを用いた。まず、Helioguard 365を減圧遠心濃縮し、適量の純水と混合した。遠心分離によって不溶性物質を除いた後に得られた上清に対して、上清と等量程度のクロロホルムを加えた。懸濁後、遠心分離によって得られた上層（水層）を低圧クロマトグラフィーに供するSHIおよびP334の混合抽出液とした。

### 2．2．MAAの分離

#### 2．2．1．溶離液として1%酢酸水溶液を用いた逆相クロマトグラフィー

Cosmosil 40$C_{18}$-PREP（ナカライテスク社製）をポリカーボネート製の空カラム（18×300mm）に充填したカラムを用いた。溶離液として1%酢酸水溶液を使用して、流速3.0mL/minでMAA抽出液を分画した。各画分の吸光度（330nm）を分析し、MAAが含まれる画分を回収した後に凍結乾燥した。

#### 2．2．2．溶離液として0.1 M 酢酸アンモニウム水溶液を用いた逆相クロマトグラフィー

2．2．1．において凍結乾燥した試料を適量の0.1M酢酸アンモニウム水溶液に溶解し、2．2．1．と同様のカラムを用いて分離した。溶離液として1%酢酸水溶液を使用して、流速3.0mL/minで対象のMAAを分画した。各画分の吸光度（330nm）を分析し、MAAが含まれる画分を回収した後に凍結乾燥した。

#### 2．2．3．ゲルろ過クロマトグラフィー

2．2．2．において凍結乾燥した試料を適量の純水に溶解し、ゲルろ過クロマトグラフィーに供した。Sephadex G-10（GEヘルスケア社製）をポリカーボネート製の空カラム（14 × 500mm）に充填したカラムを用いた。溶離液として純水を使用して、流速2.0mL/minでMAA抽出液を分画した。各画分の吸光度（330nm）を分析し、MAAが含まれる画分を回収した後に凍結乾燥したサンプルを最終精製物とした。

### 2．3．精製MAAの同定

精製したMAAは、吸収スペクトル解析および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）解析によって標準物質と比較した。HPLC分析においては、ShimPack FC-ODS column（3μm; 150 ×4.6mm）をメインカラムとし、ガードカラムとしてShimPack FC-ODS column（3μm; 30×4.6mm）を接続した。カラムを35℃に保ち、移動相として1%酢酸水溶液を用いて流速0.4mL/minで分離した。検出波長は330nmとした。また、LC/MS解析によって各MAAの分子量を測定すると共に、AVANCE III HDによる核磁気共鳴（NMR）解析によってMAAの分子構造を確認した。

### 2．4．精製MAAの抗酸化活性測定

2,2’-azino-bis（3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid）（ABTS）法を利用した。ABTSをペルオキソ二硫酸カリウムと反応させて、ABTSラジカルカチオンを調製し、これをMAA試料と反応させた。MAAの抗酸化力によって消失したABTSラジカルカチオン量を吸光度（413nm）により定量し、陽性対照として用いたTroloxの抗酸化力と比較した。

### 2．5．精製MAAのチロシナーゼ阻害活性測定

メラニン生合成における中間体物質のL-DOPAを基質として用い、マッシュルーム由来のチロシナーゼの触媒作用によって酸化されたDOPAキノンを経て生成したDOPAクローム量を吸光度（492nm）により定量した。陽性対照としてコウジ酸を使用し、MAAのチロシナーゼ阻害活性を評価した。

## 3．結　果

### 3．1．M2Gの単離

本研究で確立した手法を用いることで、湿重量1.0gの*Halothece* sp. PCC7418細胞あたり87～140μgの精製M2Gが得られた。HPLC分析におけるM2Gのピーク面積

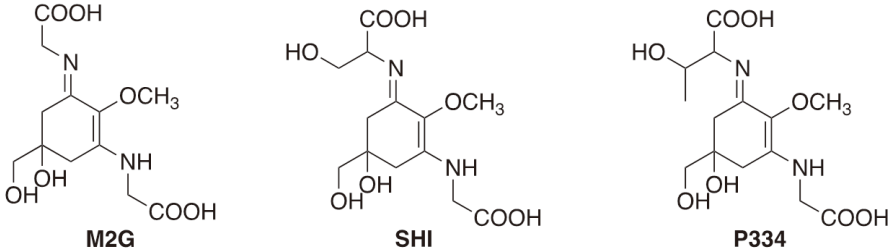



図1　本研究において用いたMAAの分子構造
M2G、SHIおよびP334の分子構造を示す。

は99.8%以上となった(図2)。また、$^{1}$Hおよび$^{13}$C NMRスペクトル解析によっても精製M2Gが高純度であることが示された。

### 3. 1. 1. M2Gの各抽出処理

まずメタノール抽出液の吸収スペクトルを確認したところ、330nm付近にM2Gと推定される吸収極大が検出された(図3A)。また、クロロフィルやカロテノイドなどの光合成色素類の吸収極大が400～700nmの範囲に検出された(図3A)。次に、抽出物を乾燥させて純水に溶解させた後に得られた上清では400nm以上の吸光が著しく低下しており、色素類化合物の大半が除去されていることが分かった(図3B)。さらにクロロホルムを添加した後に得られた上層(図3C)では、400nm以上の波長の吸収はほとんど検出されなくなった。一方、限外ろ過処理をした試料では、処理前と比較して吸収スペクトルに顕著な違いは見出せなかった(図3D)。

### 3. 1. 2. 低圧液体クロマトグラフィーによるM2Gの精製

1%酢酸水溶液を用いた逆相モードによる一段階目の精製処理では、260nm付近の大きな吸収極大が残存した(図3E)。その吸収波長から、核酸系の不純物が混入していると推定された。その後、溶離液として0.1M酢酸アンモニウム水溶液を用いた逆相モードによって処理することで、これらの不純物とM2Gを分離することができた(図3F)。最後にゲルろ過クロマトグラフィーによって溶解液を純水に置換して最終産物を得た(図3G)。

## 3．2．SHIおよびP334の単離

本研究で確立した手法を用いることで、上述したM2Gと同レベルの純度でSHIおよびP334を精製することができた。1.0mLのHelioguard 365からそれぞれ110μg(SHI)および160μg(P334)を取得することができた。

## 3．3．精製MAAの抗酸化活性

本研究で精製したMAAを用いてABTSラジカルカチオンの消去能を調査したところ、$IC_{50}$値はそれぞれ40μM(M2G)、94μM(SHI)および133μM(P334)と求められた。一方で、陽性対照であるTroloxの$IC_{50}$値は10μMだった。これらの結果から、本研究で確立した手法で精製したMAAが抗酸化活性を保持しているが明らかになった。

## 3．4．精製MAAのチロシナーゼ阻害活性

精製MAAを用いてチロシナーゼ活性への阻害効果を調査したところ、最終濃度6.4mM(M2G)、8.4mM(SHI)および7.5mM(P334)で各MAAをアッセイ系に添加しても阻害活性は検出できなかった。一方で、陽性対照のコウジ酸は60μMでチロシナーゼ活性を50%以下まで低下させた。これらの結果から、今回の調査に用いたMAAはチ

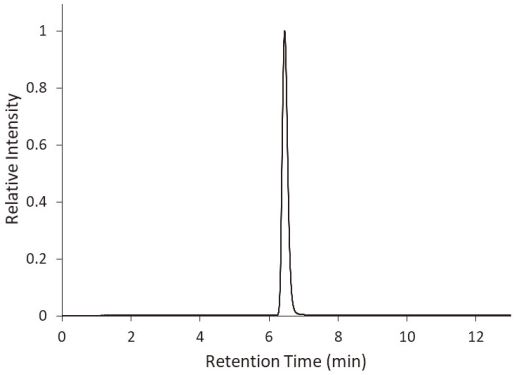



図2　最終M2G精製産物のHPLCクロマトグラム
M2Gのピーク強度を1.0とした相対値を用いたクロマトグラムを示す。

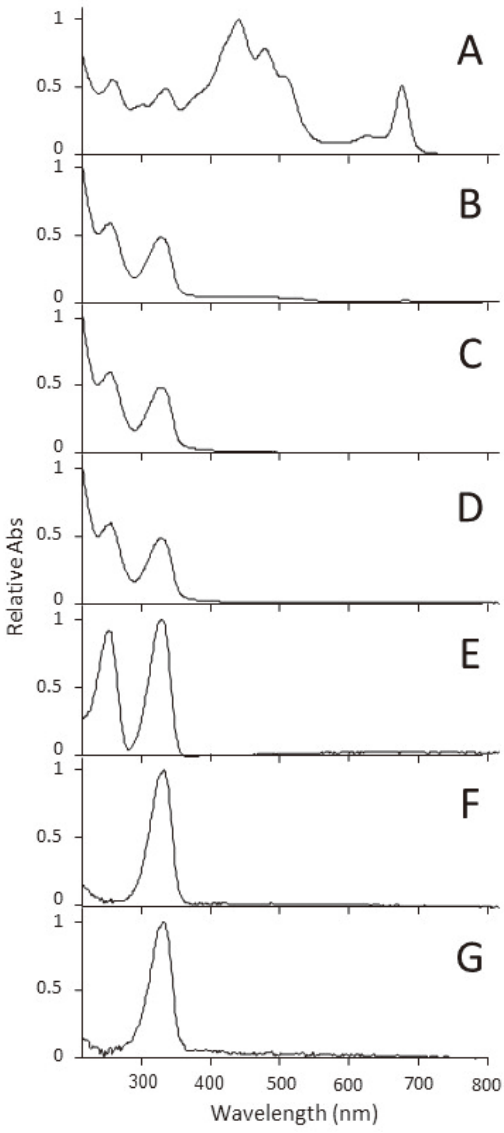



図3　M2Gの各抽出および精製ステップにおける試料の吸収スペクトル
各パネルはそれぞれA: メタノール抽出液、B: メタノール抽出液の乾燥物を水に溶解した後の上清、C: クロロホルム処理後の上清、D: 限外ろ過後の試料、E: 一段階目の逆相分離後の試料、F: 二段階目の逆相分離後の試料、G: ゲルろ過分離後の試料を示す。スペクトルは、220～800nmの範囲で最も吸光度の大きい値を1.0とした相対値で示してある。

ロシナーゼ阻害活性を有しないことが示唆された。

## 4．考　察

本研究で提案した精製手法は、MAAの抽出液を二段階の逆相クロマトグラフィーに供すものである。逆相クロマトグラフィーはその分離特性、理論段数および再現性の高さから広く物質の分取精製に用いられている。しかしながら、分取カラムおよび分取HPLCシステムはスケールが大きくなる程に高価となるため、より低コストの手法が望ましい。本研究においては、コストメリットの大きい粒子径40μmの汎用型オクタデシルシリル担体をポリカーボネート製カラムに充填し、低圧システムによって分離操作を行うこととした。酸性溶離液（1％酢酸水溶液）および中性溶離液（0.1M 酢酸アンモニウム水溶液）を用いた二段階の分離処理により、不純物を効率よく除去することができた（図3）。同一のカラムを用いた二段階の処理は、低コスト化に貢献できると考えられる。逆相分離に続いて行うゲルろ過クロマトグラフィーにおいては溶離液として純水を用いており、凍結乾燥した最終産物には溶離液に由来する化合物は含まれない。それ故に、本手法によって精製したMAAは多様な評価試験に適用可能である。

本研究では精製したM2G、SHIおよびP334を用いて抗酸化活性をABTS法によって評価し、テストしたMAA全てが活性を示すことを明らかにした。一方で、メラニン生合成に関与する酵素であるチロシナーゼに対する阻害活性は検出されなかった。しかしながら、皮膚の弾力性やハリを保つコラーゲンを分解するコラゲナーゼの阻害活性を有することが既に分かっているなど[4, 5]、スキンアンチエイジング剤応用へのMAAの期待は大きい。今後も、関連する物性の評価を行い、ネガティブな結果を含めて知見を積み上げることが重要である。

### 本研究助成により得られた成果


1）Ngoennet, S.; Nishikawa, Y.; Hibino, T.; Waditee-Sirisattha, R.; Kageyama, H. A method for isolation and characterization of mycosporine-like amino acids from cyanobacteria. *Methods and Protoc.* 1, 46. 2018.

2）Kageyama, H.; Waditee-Sirisattha, R. Antioxidative, anti-inflammatory, and anti-aging properties of mycosporine-like amino acids: Molecular and cellular mechanisms in the protection of skin-aging. *Mar Drugs* 17, 222. 2019.

3）Patipong, T.; Hibino, T.; Waditee-Sirisattha, R.; Kageyama, H. induction of antioxidative activity and antioxidant molecules in the halotolerant cyanobacterium *Halothece* sp. PCC7418 by temperature shift. *Nat Prod Commun.* 14, 1-6. 2019.

4）Waditee-Sirisattha, R.; Honda, M.; Hibino, T.; Kageyama, H. Potential inhibitory effects of plant and cyanobacteria-derived natural products on advanced glycation end-product formation. In *A Closer Look at Glycation: A Potential Hotspot for Age-Related Complication and Diseases*; ansari, N.A., Ed.; Nova Science publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2021; pp. 201-224.



### 謝　辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団（旧公益財団法人コスメトロジー研究振興財団）よりご助成いただきましたことに心より感謝申し上げます。


### （引用文献）


1）Wada, N.; Sakamoto, T.; Matsugo, S. Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidant* 4, 603-646. 2015.

2）Kageyama, H.; Waditee-Sirisattha, R. Mycosporine-like amino acids as multifunctional secondary metabolites in cyanobacteria: From biochemical to application aspects. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 59, 153-194. 2018.

3）Cheewinthamrongrod, V.; Kageyama, H.; Palaga, T.; Takabe, T.; Waditee-Sirisattha, R. DNA damage protecting and free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine from the Dead Sea cyanobacterium in A375 human melanoma cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B* 164, 289-295. 2016.

4）Hartmann, A.; Gostner, J.; Fuchs, J.E.; Chaita, E.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, L.; Ganzera, M. Inhibition of collagenase by mycosporine-like amino acids from marine sources. *Planta Med.* 81, 813-820. 2015.

5）Tarasuntisk, S.; Patipong, T.; Hibino, Y.; Waditee-Sirisattha, R.; Kageyama, H. Inhibitory effects of mycosporine-2-glycineisolated from a halotolerant cyanobacteriaumon protein glycation and collagenase activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 67, 314-320. 2018.

6）Volkmann, M.; Gorbushina, A.A. A broadly applicable method for extraction and characterization of mycosporines and mycosporine-like amino acids of terrestrial, marine and freshwater origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 286-295. 2006.

# 機能性化粧品として期待できる皮膚ガス応答性発色素材の研究開発

島根大学大学院自然科学研究科
笹井　亮

In this research, I investigated the molecular detectable ability of the hybrid films of dyes with ion-exchangeable layered inorganic compounds. It was found that the protonation reaction of cationic porphyrin derivatives rapidly proceeded in the interlayer space of layered α-zirconium phosphate modified with decylamine, even when the concentration of proton is relatively low. In the case of the hybrid film of anionic pyrene with layered double hydroxide (LDH), the photoluminescence intensity ratio of between monomer and excimer species of pyrene linearly depended on the toluene concentration in ethanol solution. I show for the first time that the LDH sheet film with fluorescein dyes and 1-butanesulfonate could quantitatively detect ammonia in an aqueous solution by its photoluminescence intensity. These results are indicted that film materials which can detect specific molecules dissolved in solution can be prepared by hybridizing suitable dyes with ion-exchangeable layered inorganic compounds. Moreover, the present materials will be applicable for molecular detection of specific molecules in skin-gas and sweat.

## 1．緒　言

イオン交換性を有する無機層状化合物が構造中に有する層空間は，性質の異なる様々な分子を複数種取り込むことができる（共存）だけでなく，同一空間でそれぞれの分子がお互いに邪魔することなく本来の特性を発揮できる（共栄）空間となる．著者はこれまでにこのような複数の機能分子が共存共栄できる系（複数機能共存共栄系）を，イオン交換性無機層状化合物として粘土鉱物の一種であるスメクタイトや層状複水酸化物（LDH），層状チタン酸を用い，その層間に界面活性剤などで創製できる分子吸着場と，吸着分子の酸化分解のための光触媒部位や特定の分子吸着の可否を示す環境応答性部位とを共存共生させた系を実現してきた[1-16]．特に吸着場と環境応答性部位の複合機能共存共栄系では，これまでに相対湿度，高湿度下でのアンモニウム，二酸化窒素，芳香族化合物などを発光強度変化により簡易定量検知できる材料の創製に成功している[4-7, 9-11, 13-16]．このように特定分子の検知が可能な材料は，吸着場や環境応答性部位の組み合わせにより，本研究が最終目標とする皮膚ガス中に含まれる各種分子を吸着・濃縮・検知できる材料となりうることが期待できる．そこで本研究では，イオン交換性層状無機化合物として層状αリン酸ジルコニウム（αZrP）および層状複水酸化物（LDH）を用い，その層間に両親媒性分子と色素を複合化した透明膜の創製と，その分子検知能について評価した．さらに材料化に向けた取り組みの一つとして，LDHシートの検知材料化も行った．



Research and Development of Promising Skin-Gas Responsive Coloring Materials as Functional Cosmetics
Ryo Sasai
Graduate School of Natural Science and Technology, Shimane University

## 2．方　法

### 2．1．　αZrPをホストとした複合透明膜の創製と検知能評価

既報[13]に従って，第一稀元素化学工業㈱より提供されたαZrP粉末をTetramethylammonium hydroxide水溶液に分散することにより調製したαZrPナノシート水懸濁液を減圧ろ過することにより得られるゲル状のろ取物をガラス基板上に転写すること（ろ過膜転写法）によりαZrP透明膜を作製した．このαZrP透明膜をbutylamine（BA）とα, β, γ, δ-tetrakis（-methylpyridinium-4-yl）porphyrin（TMPyP）との混合水溶液に浸漬することで，複合透明膜（αZrP/BA/TMPyP透明膜）を作製した．得られたαZrP/BA/TMPyP透明膜の評価は，XRD，紫外可視吸収スペクトルおよび発光スペクトル測定により行った．このαZrP/BA/TMPyP透明膜中のTMPyPのピロール基のプロトン化挙動について評価することで，水溶液中のプロトン濃度検知能を明らかにした．TMPyPのプロトン化は，濃度の異なる塩酸（[HCl]＝0～0.01 mol/L）にαZrP/BA/TMPyP透明膜を浸漬した後に，αZrP/BA/TMPyP透明膜の紫外可視吸収スペクトルを透過法により測定することにより評価した．

### 2．2．LDHをホストとした複合透明膜の創製と検知能評価

既報[14]に従って，協和化学工業㈱製の炭酸イオン型LDHを原料として，NaClを含む酢酸緩衝溶液を用いた脱炭酸イオン化およびプロピオン酸イオンとの陰イオン交換反応により得られるプロピオン酸イオン型LDHを水に分散することにより調製したLDHナノシート水分散液を用いてろ過膜転写法によりLDH透明膜を作製した．この

LDH透明膜を1-pyrenesulfonic acid（Py）のEtOH溶液に浸漬することで，複合透明膜（LDH/Py透明膜）を作製した．得られたLDH/Py透明膜の評価は，XRD，紫外可視吸収スペクトル測定および発光スペクトル測定により行った．このLDH/Py透明膜をトルエン濃度の異なるEtOH溶液中に浸漬した場合の発光スペクトル変化を精査することで，このLDH/Py透明膜のトルエン検知能を評価した．

### 2．3．LDHシートへの両親媒性分子と色素の複合化と水中アンモニア検知能評価

㈱日本触媒より提供されたLDHが保持・固定化された膜材料であるLDHシートを出発物質として次の方法により色素複合材料の作製を行った．既報[9]で報告したLDH粉末へのブタンスルホン酸（C4S）とフルオレセイン色素（AFD）の複合化手法を参考にして，まずLDHシートを窒素気流下で酢酸－EtOH溶液に浸漬することで酢酸イオン型LDHシートを作製した．この酢酸イオン型LDHシートを所定量のC4S（LDHの陰イオン交換容量（AEC）に対して300 %）およびAFD（AECに対して0.025 %）を溶解した混合水溶液に，窒素気流下で浸漬することでLDH/AFD/C4Sシートを作製した．得られたLDH/AFD/C4Sシートの評価は，XRD，FT-IR（ART法），拡散反射スペクトルおよび発光スペクトル測定により行った．このLDH/AFD/C4Sシートの検知能評価は，濃度の異なるアンモニア水に浸漬した後のLDH/AFD/C4Sシートの拡散反射スペクトルおよび発光スペクトルの変化により評価した．

## 3．結果・考察

### 3．1．　αZrPをホストとした複合透明膜の創製と検知能評価[13)]

本研究で作製したαZrP/BA/TMPyP透明膜を酸性水溶液に浸漬すると，図1のように膜の色調が変化することが明らかとなった．これは図2に示すようなTMPyPの構造中に存在するピロール部位のプロトン化反応が進行したことを示すものである．様々なプロトン濃度の水溶液に浸漬した場合の紫外可視吸収スペクトル測定の結果，典型的には図3に示すようなスペクトル変化を示す．BAで修飾されたαZrP層間に取り込まれていてもTMPyPのプロトン化反応は，水溶液中と同様に進行した．紫外可視吸収スペクトルの成分解析を詳細に行った結果，TMPyPのプロトン化反応の$pK_a$値が水溶液中の値（0.80と2.06）とは異なり，αZrP/BA/TMPyP透明膜中では2.4と2.6という値を示すことが明らかとなった．このようにαZrP/BA/TMPyP透明膜中ではTMPyPのプロトン化反応が低プロトン濃度で効率よく進行するようになることが明らかになった．酸性水溶液浸漬後のαZrP/BA/TMPyP透明膜のXRD測定の結果，プロトン化反応の進行に伴い，層間距離の低下が観測された．この結果は，BAが層間から脱離したことを示唆する．また，このαZrP/BA/TMPyP透明膜の酸性水溶液への浸漬により生成したプロトン化TMPyPの脱プロトン化反応は，塩基性水溶液に浸漬しても進行しなかった．これは層間にBAが存在しないため，層間に固定化されたプロトンが脱離されないためと考えら

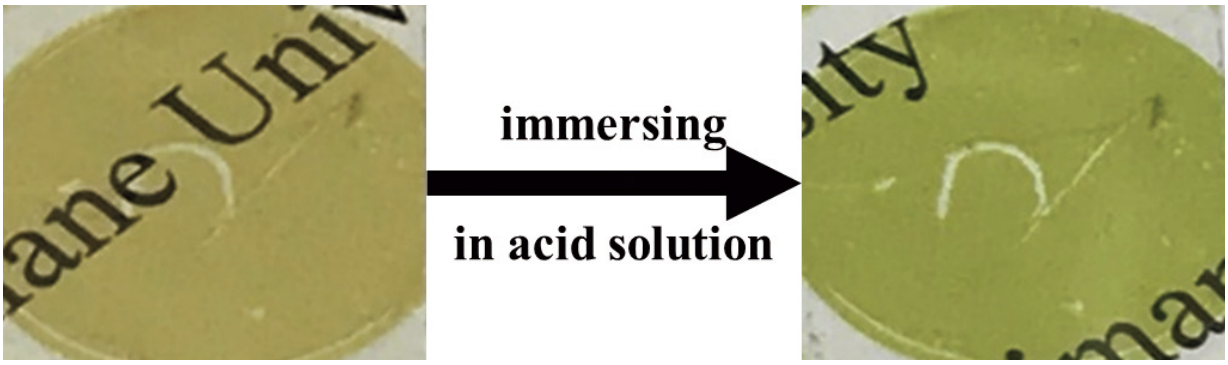



図1　αZrP/BA/TMPyP 透明膜の酸性水溶液浸漬前後の色調

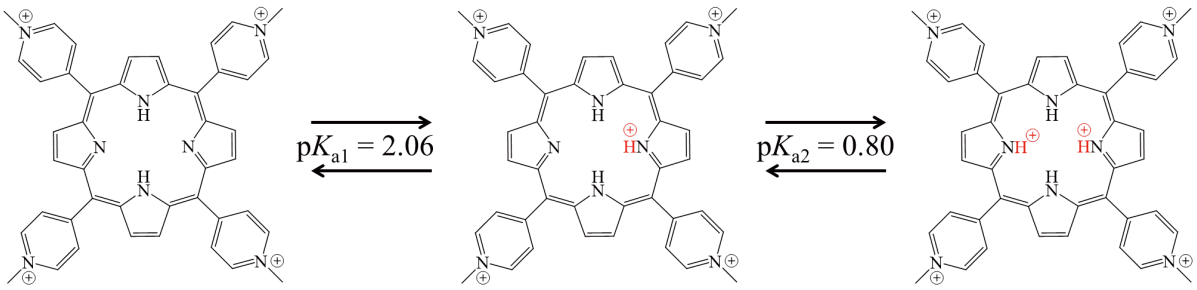



図2　水溶液中における TMPyP のプロトン化反応

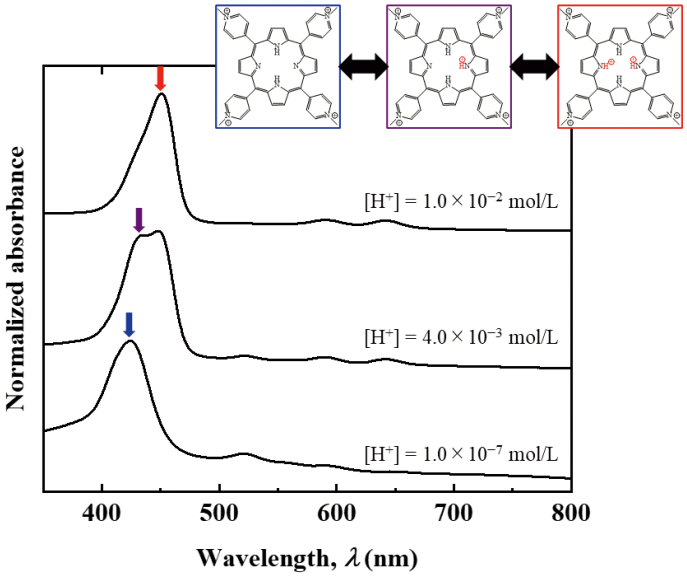



図３　αZrP/BA/TMPyP 透明膜の異なるプロトン濃度での紫外可視吸収スペクトル

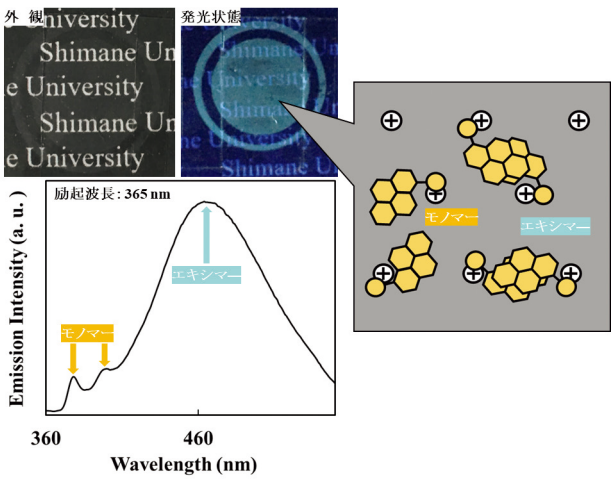



図４　LDH/Py 透明膜の外観，紫外線照射下での発光状態，発光スペクトルおよび LDH 上での Py 分子の存在状態のモデル図

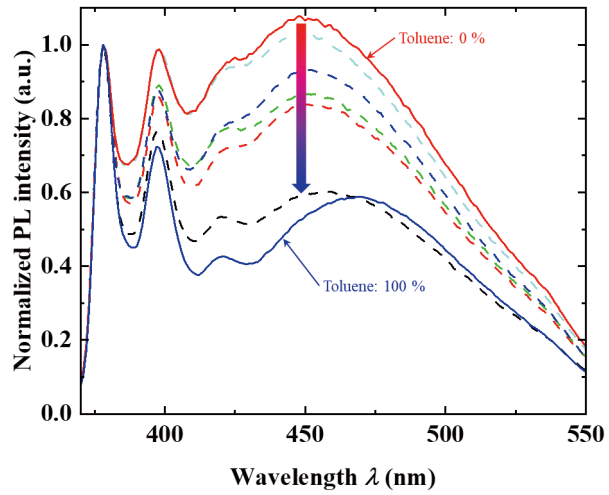



図５　異なるトルエン含有量の EtOH 溶液に浸漬した場合の LDH/Py 透明膜の発光スペクトル．励起光波長：365 nm

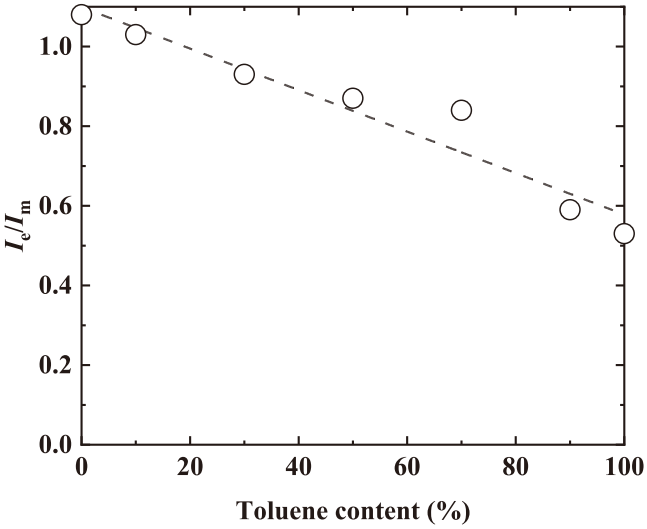



図６　EtOH 中のトルエン含有量に対する $I_e/I_m$ 値依存性

れる．このことからこのαZrP/BA/TMPyP透明膜は，発汗などにより発生する皮膚上の体液の酸性度の微小な変化の検知に利用できる可能性を秘めたものであると考えられる．

## 3．2．LDHをホストとした複合透明膜の創製と検知能評価[14)]

図４に作製したLDH/Py透明膜の外観，紫外線照射下での発光状態，発光スペクトルおよびLDH上でのPy分子の存在状態のモデル図を示す．図４の通りLDH/Py透明膜は，透明かつPy由来の発光を示した．また，観測された発光のほとんどは，モデル図に示すような分子間相互作用をしたPy分子由来のエキシマー発光であることがわかった．このような発光特性を有するLDH/Py透明膜を異なるトルエン濃度のEtOH溶液に浸漬した場合の発光スペクトルを図５に示す．約370 nmに観測されるPyモノマー由来の発光強度に対して約450 nmに観測されるPyエキシマー由来の発光強度が，トルエン濃度の増加に伴い減少することが明らかとなった．この現象は，LDH/Py透明膜が溶媒中のトルエンをPyエキシマー由来の発光強度の変化により検知できる材料であることを示唆するものである．また，Pyモノマー由来の発光強度（$I_m$）に対するPyエキシマー由来の発光強度（$I_e$）の比（$I_e/I_m$）は，EtOH中のトルエン含有量の増加とともに直線的に減少した（図６）．これは強度比によりEtOH中トルエン含有量を定量評価できることを示唆するものである．このような発光強度比変化は，LDH/Py透明膜中に存在するエキシマー発光種がトルエン分子の吸着によりモノマー発光種に変換されることによると考えられる．この発光種の変換には，LDH/Py透明膜中の

Py分子周辺の親水性と疎水性のバランスが大きく影響していると考えられる．今後，水溶液中や気相中でのトルエン検知能に関する研究が必要であるが，今回の結果は，LDH/Py透明膜がシックハウス症候群や芳香族中毒の検知に有用な材料であろう．

### 3．3．　LDHシートへの両親媒性分子と色素の複合化と水中アンモニア検知能評価[16)]

すべてのイオン交換性層状無機化合物と色素の複合体の透明膜が必ずしも作製できるとは限らない．そこで透明ではないがイオン交換性層状無機化合物の一種であるLDHを担持・固定化したシートであるLDHシート（㈱日本触媒より提供）を用いたLDH/AFD/C4Sシートの作製を試みた．得られたLDH/AFD/C4Sシートは，図7に示すようにAFD由来の黄色を示すとともに，ブラックランプ下でAFD由来の発光を示した．この結果は，既報で示したLDH/AFD/C4S粉末を相対湿度40％以上の環境に置いた場合と同じであることから，出発原料をLDHシートとした場合でもLDH/AFD/C4S粉末試料と同等の性能を示すLDH/AFD/C4Sシートが得られたことを示唆するものである．この得られたLDH/AFD/C4Sシートを濃度の異なるアンモニア水に浸漬した場合に得られる470nmで励起して得られる発光スペクトルを図8(a)に示す．図8(a)に示すように水中のアンモニア濃度の増加とともに，発光強度も増加することが明らかとなった．この結果は，このLDH/AFD/C4Sシートが水中のアンモニアの存在を発光増強により検知できるだけでなく，その濃度を定量的に検知できる可能性を示唆するものである．定量性を確かめるために，図8(b)に発光ピークでの発光強度のアンモニア濃度依存性を示す．このアンモニア濃度依存性から，このLDH/AFD/C4Sシートの発光強度は，アンモニア濃度の対数に対しておおよそ比例した．特にアンモニア濃度が10ppm以下では比較的良好な直線性を示していることから，このLDH/AFD/C4Sシートは，水に溶存したアンモニアを，特に低濃度において発光強度により定量的に検知できる材料として利用できる可能性をもつことが明らかである．図9にLDH/AFD/C4Sシートを様々な濃度のアンモニア水に浸漬した場合に得られる拡散反射スペクトルをピークでの光吸収強度で規格化したスペクトルを示す．このスペクトルから，460nm付近に観測される吸収の強度がアンモニア濃度の増加に伴い減少していることがわかった．この460nm付近の吸収は，AFDがモノアニオン体（図10）として存在する場合に観測される吸収帯であることから，アンモニアが存在しない場合にLDH/AFD/C4Sシート中に存在しているAFDのモノアニオン体が，アンモニア濃度の上昇に伴い上昇するpHの影響を受け，モノアニオン体よりも高輝度発光を示すジアニオン体へと変化したためと考えられる．人が緊張状態に置かれるなど，身体的・精神的ストレス（疲労）にさらされると皮膚ガス中のアンモニア濃度が増加するとの報告もある点を考慮すると，ここで得られたLDH/AFD/C4Sシートのアンモニア検知能をさらに高感度化することで，このLDH/AFD/C4Sシート

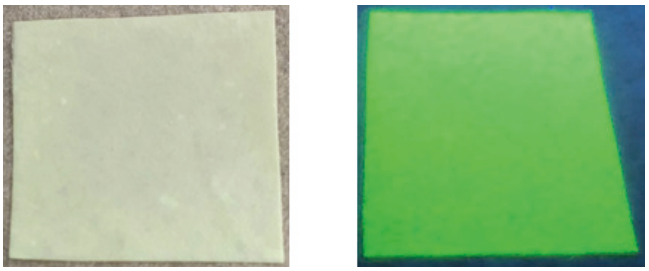


図7　LDH/AFD/C4Sシートの外観（左）とブラックランプ下での発光外観（右）

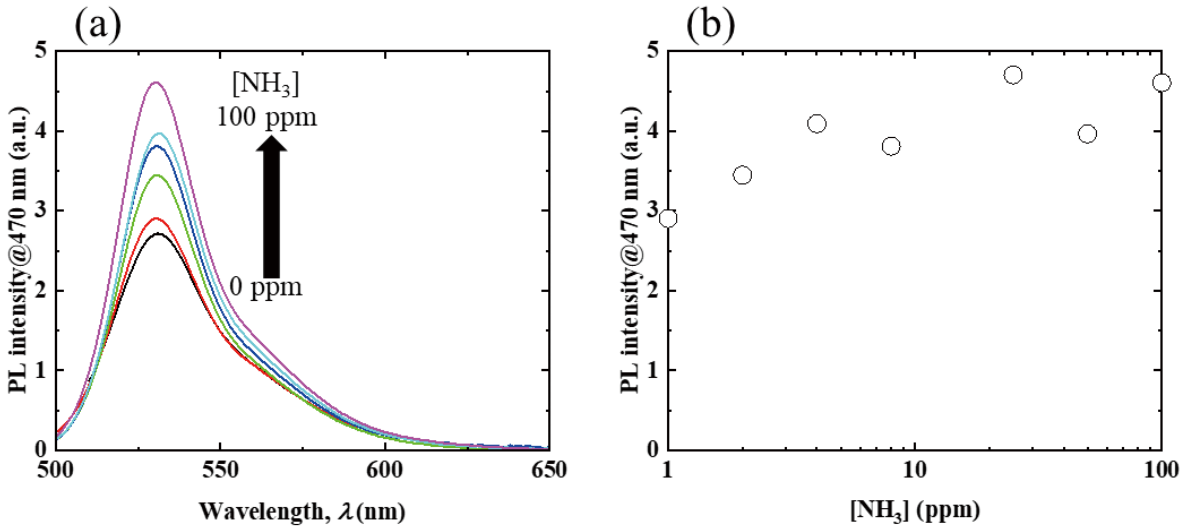



図8　(a)LDH/AFD/C4Sシートを異なるアンモニア濃度の水溶液に浸漬した際に得られる発光スペクトル．励起光波長：470 nm．(b)ピーク波長での発光強度のアンモニア濃度依存性

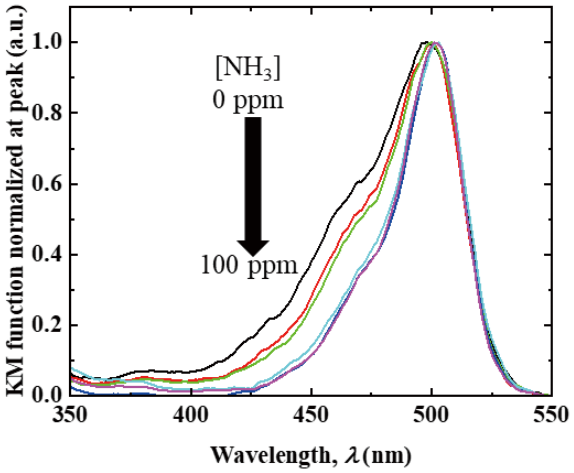
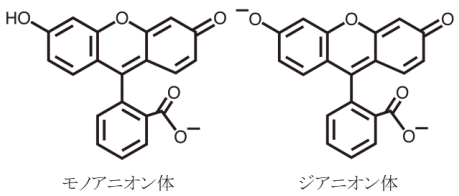



図９　LDH/AFD/C4S シートを異なるアンモニア濃度の水溶液に浸漬した際に得られる拡散反射スペクトル．縦軸は，ピークでの吸収強度で規格化した値

がアンモニアを指標とした疲労やストレス検知素材として利用可能であろう．機能性化粧品としての利用を考えた場合には，このLDH/AFD/C4Sシートに高いアンモニア吸着除去能の付与が課題の一つとして挙げられよう．

## ４．総　括

本研究では，大気中や水中に存在する特定の分子に対して色調や発光特性の変化を示す材料として，イオン交換性層状無機化合物をホストとして色素と複合化した材料の創製とその評価を行った．特に将来のデバイス化を見据え，“膜”材料に注目した研究を展開した．その結果，今回用いた層状αりん酸ジルコニウムや層状複水酸化物が，このような材料のホスト材料として非常に有用であることを明らかにできた．特にこのような層状化合物の場合には，その層間に選択的検知を実現できる“場”の作り込みや，色調や発光変化の起源となる色素を層間にどのような状態で担持するかが重要であることが明らかとなった．すなわち，層間の特性を十分に制御することができ，そこに応答性を付与することができれば，様々な分子に対して特異的な応答を示す材料を，自在に作ることができる可能性を示せたものと考える．今回の結果に基づき，今後さらに２次元ナノ空間の特性制御を進め，そこに応答性をもつ色素を効果的に配置することにより，特定の分子を選択的に検知可能な材料のラインナップを増やしていく予定である．ラインナップの拡充により，化粧品分野さらにメディケア分野に利用可能な皮膚ガス検知材料へと今後深化させていく予定である．


HO
O
O
O

# 乳酸菌オリゴDNAによる上皮細胞の炎症制御と経皮核酸素材への展開

信州大学農学部

下里　剛士

Research into the action of probiotics against infectious and inflammatory diseases and allergies has recently attracted considerable attention in both the medical and food sciences. My research group has identified immunomodulatory DNA sequences from immunoregulatory probiotics (immunobiotics) and confirmed that several synthetic oligodeoxynucleotides (ODNs) derived from these sequences maintain the immunomodulatory properties. To develop ODNs that retain functionality after oral administration, my research group attempted to produce acid-resistant ODN particles by encapsulating ODNs in carbonate apatite particles (ODNcaps) using a cell transfection method with carbonate apatite particles. These edible ODNs retained their immunomodulatory activity when taken up by intestinal mucosal cells. We have also developed ODN particles for transdermal absorption. The ability to produce particles containing immunomodulatory ODNs opens the possibility of using ODN particles in studies involving mouse disease models. If the therapeutic efficacy of ODN particles can be achieved without parenteral injection, the cost, complexity and inconvenience of immunomodulatory therapy could be dramatically reduced. In addition, this approach may lead to the development of novel immunobiotic foods and cosmetics that will contribute to the prevention or suppression of many types of infectious, allergic, inflammatory, and autoimmune diseases.

## 1. 緒　言

細菌由来のゲノムDNAが免疫増強作用を有するという発見（*Nature*, 374, 546-549, 1995）以降、多彩な免疫機能を有するオリゴDNA（ODN, DNA短鎖）が次々と見出されている。とくに、感染症・ガン・アレルギー・炎症性疾患の予防や治療を目的とした機能性核酸分子として研究が進められてきた。オリゴDNAを用いた臨床試験も進んでおり、「核酸医薬」領域で実現に向けた段階に突入した。これまでにODNを用いて、様々な動物試験が行われ、その投与方法としては、腹腔内投与（i.p.）、皮下投与（s.c.）、鼻腔に滴下（i.n.）などの手法が一般的で、尾静脈からの投与（i.v.）例もある。またオリゴDNAの投与量としては、マウス1匹あたり100-500μgといった報告が多い。すなわち、注射器を用いて、直接血管内部や組織内に注入する方法が採用されている。筆者は、注射に頼らない―食べる乳酸菌DNA―を掲げ、2015年、胃液に溶けず腸まで届くDNAナノカプセルの開発に成功した。本成果により、オリゴDNAを有効成分とする機能性食品や家畜飼料・ペットフードなどの開発に向けた展開が可能となった。残された投与ルートは経皮ルートであるが、オリゴDNAを経皮ルートから動物試験を実施した例は、以下3例に限定される。(i)コラーゲンタンパク質＋オリゴDNAの混合液の創傷治癒効果（マウス試験）[1]、(ii)コラーゲンタンパク質＋オリゴDNAの混合液の創傷治癒効果（サル試験）[2]、(iii)アセトン＋オリゴDNAの混合液の抗腫瘍作用[3]。いずれの報告も、大容量のオリゴDNAを傷口や炎症部位に直接塗布する手法が採用されており、オリゴDNAの簡便かつ経済的な経皮ルートはいまだ確立されていない。筆者は、オリゴDNAの経皮ルートの構築を目指し、コスメトロジーの概念を組み合わせたスキンケア素材の開発研究を行った。



Regulation of Inflammation in Epithelial Cells by *Lactobacillus* Oligodeoxynucleotides and Development to Novel Transdermal Oligodeoxynucleotide Materials

Takeshi Shimosato

Faculty of Agriculture, Shinshu University

## 2. 方　法

### 2. 1. ODN

ODNの合成はIntegrated DNA Technologies, Inc（Coralville, IA, USA）社に合成を外注委託した。

- GpC-ODN$_{1612}$, 5'-G*C*T*A*G*A*G*C*T*T*A*G*G*C*T-3' [4]
- CpG-ODN$_{1555}$, 5'- G*C*T*A*G*A*C*G*T*T*A*G*C*G*T -3' [5]
- CpG-ODN$_{MsST}$, 5'-C*A*G*G*A*C*G*T*T*G*T*A*T*C*A*C*T*G*A*A-3' [6]

以上のPhosphorothioate bond（PS）-ODN、Phosphodiester bond（PO）-ODNをそれぞれ合成した。なお、*はPS bondを示している。

### 2. 2. ODN-炭酸アパタイト微粒子の合成

ODN-炭酸アパタイト微粒子の合成は、Wangらの方法を参考に一部改変して作製した[7]。すなわち、ODNを1mg/mLとなるよう滅菌PBSで希釈し、ODN溶液とした。次に、塩化カルシウム二水和物$CaCl_2 \cdot 2H_2O$（ナカライテスク, Kyoto, Japan）を7.35g電子天秤で秤量し、50mLチューブに取り、ミリQ水でfinal 50mLにメスアップして1M $CaCl_2$とした。さらに、滅菌済み200mLビーカーにDMEM（Invitrogen, CA, USA）を26mL×チューブ4本分

に当たる約100mL(+α)を取った。50mLチューブ4本にDMEMを26mLずつピペッターで正確に分注した。事前にウォーターバスを37℃に設定し温めておき、DMEM 26mLにODN溶液150μL(ODN量150μg)を加えた。ODN+DMEMと1M $CaCl_2$を37℃、5minウォーターバスで温めた後、ODN含有DMEMに1M $CaCl_2$を4mL加えた。37℃、5minウォーターバスで温めた後、3,000g×20min遠心分離し、アスピレーターで上清を丁寧に除去した。2mLの滅菌済みPBSで懸濁し、2mLチューブ(アズワン株式会社, Osaka, Japan)に回収した。8,000g×5min遠心分離し、ピペッターで上清を丁寧に除去した上で、−30℃冷凍庫に一晩静置した。翌日、フリーズドライヤーDC401(ヤマト科学株式会社)を用いて凍結乾燥した。作製したODN微粒子は−80℃にて保存した。特性解析として、1wt %リン酸カルシウム水分散液を調製し、1分間の超音波照射の後、粒径を測定した(FPAR-1000, 大塚電子株式会社, Osaka, Japan)。

### 2. 3. マウス細胞を用いた免疫機能解析

C57BL/6マウスを、頸椎脱臼により安楽死させ、脾臓細胞および腹腔マクロファージを回収した。細胞は、遠心分離(2,000rpm, 20℃, 5min)し、10mLのRPMI-1640培地(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)に10% fetal calf serum (FCS; Sigma), 100 U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, 25mM HEPES, 1.0mM sodium pyruvate, nonessential amino acids, 0.0035% 2-mercaptoethanolを加えたコンプリート培地に懸濁した。細胞懸濁液はセルストレイナー(日本BD, Tokyo, Japan)、メッシュサイズ40μmに通すことで凝集細胞を除去した。上記コンプリート培地にて2回洗浄後、細胞を回収し、カウンテス自動セルカウンター(Invitrogen)を用いてトリパンブルー染色法により生細胞数をカウントした。細胞を12well plate(Thermo Fisher Scientific, IL, USA)に$2 \times 10^6$cells/wellで播き、37℃、5%$CO_2$条件下で3hr培養した。その後、GpC-ODN微粒子、CpG-ODN微粒子で刺激し、6hr後の細胞を回収した。Total RNAとPrime Script® RT reagent Kit (TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan)を用い、逆転写反応によりcDNAを合成した。cDNAを鋳型としてマウスプライマーを用いて、リアルタイムPCR法により発現解析を行った。

### 2. 4. 共焦点レーザー走査顕微鏡による6FAM-ODN微粒子の取り込み解析

腹腔マクロファージをPBS, 6FAM-ODN微粒子(500μg/mL, containing 5μg/mL ODN)を用いて37℃、1h処理した。そして腹腔マクロファージに4%PFAを添加し室温で15min固定した。6FAM-ODN微粒子の取り込みを共焦点レーザー走査顕微鏡(FV1000D-IX81, Olympus, Tokyo, Japan)により解析した。画像は、(Fluoview software Olympus)を用いて分析した。

### 2. 5. 走査型電子顕微鏡による粒子形態観察

ODN微粒子懸濁液をナノパーコレータ試料載台(JEOL, Tokyo, Japan)に35μL添加した。10mLシリンジ(TERUMO Corporation, Tokyo, Japan)を用いて液体を吸い、試料をよく定着させたのち、12-well plate(Nippon Genetics)に500μLずつ分注した2.5%グルタルアルデヒド(TAAB Laboratories Equipment, Ltd, Berks, UK)に1hr十分に浸すことで固定した。以降液体試薬による静置および洗浄は12-well plateに500μLずつ試薬を分注し行った。完全に脱水するため、100%エタノールにて30min静置し、100%エタノールを交換して静置する工程を2回行った。脱水完了後、t-ブチルアルコール(Nacalai Tesque)に浸し52℃、30minで2回静置し、−80℃で保管した。フリーズドライヤ DC401 (Yamato Scientific)で凍結乾燥したのちオスミウムコーターNeoc-AN (Meiwafosis CO., Ltd., Tokyo, Japan)を用いてオスミウムコーティングを行い、卓上走査型電子顕微鏡 JCM-7000F (JEOL, Tokyo, Japan)により観察した。

## 3. 結　果

本研究は、感染症、アレルギーなどの予防や治療に有効なODN化粧品、医薬品の創製へと繋げる基盤研究として、ODN微粒子を作成する技術の開発研究を実施した。

### 3. 1. ODN-炭酸アパタイト微粒子の特性解析

核酸成分の細胞へのトランスフェクションには、主にカチオン性脂質などが採用されている。近年では、新たに金ナノ粒子、カーボンナノチューブ、生分解性ポリケタルナノ粒子と核酸成分との結合・包接技術が開発され、哺乳類細胞への新たな遺伝子導入技術として開発が進められている。とくに(a)分解酵素による消化から核酸を保護する(b)核酸の生体内における滞留時間を延ばす(c)核酸のエンドサイトーシスによる取り込み効率を向上させる(d)標的細胞に核酸を安定的に届ける(e)長い時間をかけて核酸をゆっくりと運搬体の外へと放出する(f)核酸量を抑えることによる低コスト化など、優れた運搬媒体が検討されている。本研究では、Wangらの開発した炭酸アパタイト粒子を用いた微粒子作成技術を改良し、その特性解析を行った。ODN-炭酸アパタイト微粒子は、ODNをカルシウムイオンに吸着させ、ナノサイズにまで成長させたものである。その粒子は直径100nm-150μmのナノ-マイクロサイズであることが示された(図1)。

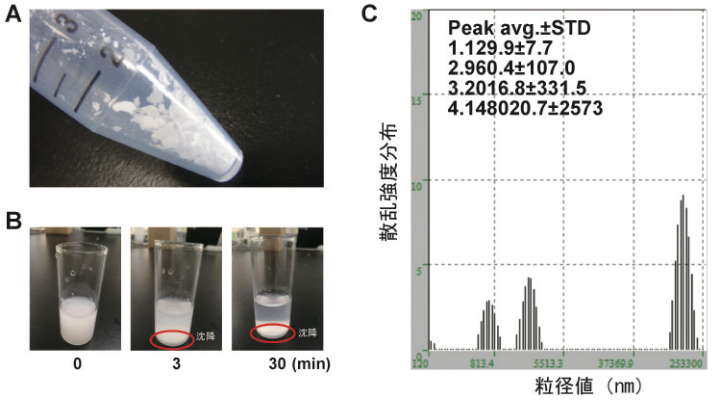



図１　ODN-炭酸アパタイト微粒子（A）の特性解析．リン酸カルシウム水分散液を調製し、1分間の超音波照射(B)を行い、粒径を解析した(C)

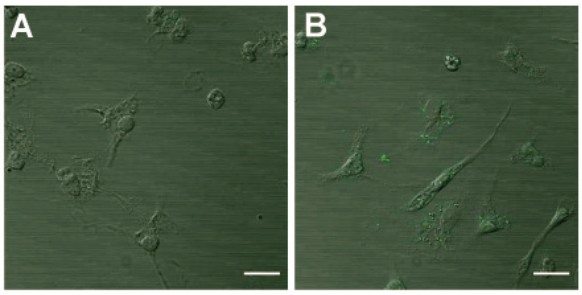



図２　腹腔マクロファージ細胞における6FAM-ODNおよび6FAM-ODNカプセルの取り込み解析（Bar＝5μm）無処理細胞(A)，ODN微粒子処理細胞(B)

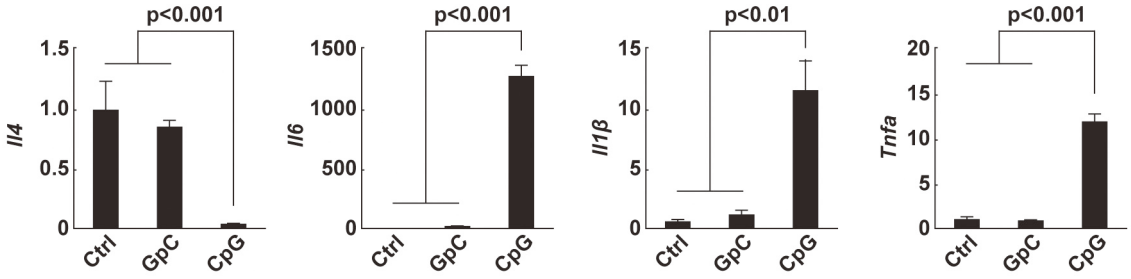



図３　ODN微粒子で処理したマウス脾臓細胞における*Il4*，*Il6*，*Il1β*，*Tnfa* mRNAの発現解析

### 3. 2. ODN微粒子の取り込み解析

マウス腹腔マクロファージ細胞を調製し、6FAM-ODN微粒子を用いて取り込み解析を*in vitro*で行った。SP細胞をPBSおよび6FAM-ODN微粒子で処理し、蛍光標識を追跡した。コントロールにおいて、16.01%，9.83%，16.88%であった蛍光値に対し、6FAM-ODN微粒子における値は66.64%，69.64%，64.36%を示した。共焦点レーザー顕微鏡による解析の結果からも、6FAM-ODN微粒子を取り込む腹腔マクロファージ細胞が観察された(図2)。生体防御システムの最前線に分布するマクロファージおよび樹状細胞は、抗原を取り込み後、抗原提示して免疫応答を誘導することが知られている。すなわち、腹腔マクロファージにおけるODN微粒子の取り込みは、能動的に行われている可能性が示唆された。

### 3. 3. ODN微粒子の免疫特性解析

C57BL/6雄マウスから脾臓細胞を調製し、コントロール(Ctrl)としてPBS、GpC-ODN微粒子、CpG-ODN微粒子で6時間培養後、リアルタイムPCR法を用いて、IL-4, IL-6、IL-1βと炎症性サイトカインであるTNF-αを測定した。GpC-ODN微粒子と比較して、CpG-ODN微粒子では*Il1β*、*Il6*、*Tnfa*の発現増加が見られた。一方で、*Il4*については強力に抑制された(図3)。

### 3. 4. ODN微粒子を塗布したマウス耳介における影響

これまでに乳業用乳酸菌*Streptococcus thermophilus*ゲノム配列中より同定したCpG-ODNが、マウスの脾臓細胞培養系においてIFNγおよびIL-33を強く誘導することを発見している[8, 9]。4週間にわたる連続投与試験を実施した後、マウスより耳介を採取し、耳介組織切片（パラフィン切片）を作成した。HE染色により、濃い紫色で染色されている箇所が表皮(Epidermis)である。光学顕微鏡下において、各群より表皮の厚さを5ポイント測定した。Ctrl群およびGpC-ODN微粒子群と比較して、CpG-ODN微粒子群において有意に高い数値となり、皮膚の肥厚が細胞組織レベルで観察された(図4)。

### 3. 5. 高機能ODN微粒子および乳化剤の開発

高機能微粒子作成装置（ファルマバレーセンター，Shizuoka，Japan）を用いた微粒子作成技術の提供を受け、球状粒子のオリゴDNA微粒子の試作を行った。コーティング基剤として、アルギン酸ナトリウムを採用し、水溶性のアルギン酸ナトリウムとオリゴDNAを高機能微粒子作成装置により均一に射出後、ドライヤーにより粒子化し、中間体［アルギン酸ナトリウム-ODN］を得た。さらに［アルギン酸ナトリウム-ODNを塩化カルシウム溶液に投入し、水に不溶で球体を呈する粒子体を得ることに成功した

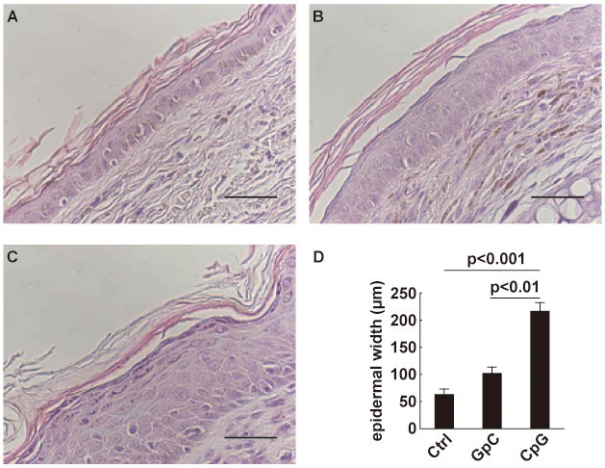



図４　マウス耳病理組織切片の観察 Bar ＝ 200μm

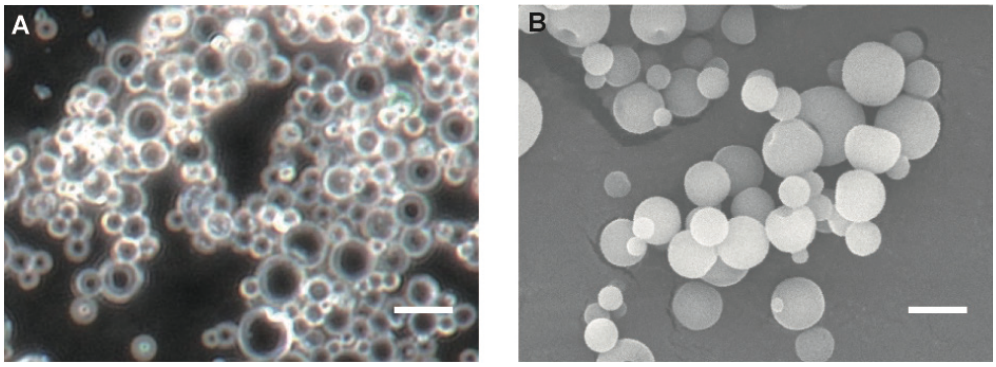



図５　球状を示す ODN 微粒子の走査型電子顕微鏡画像（Bar ＝ 5 μm）

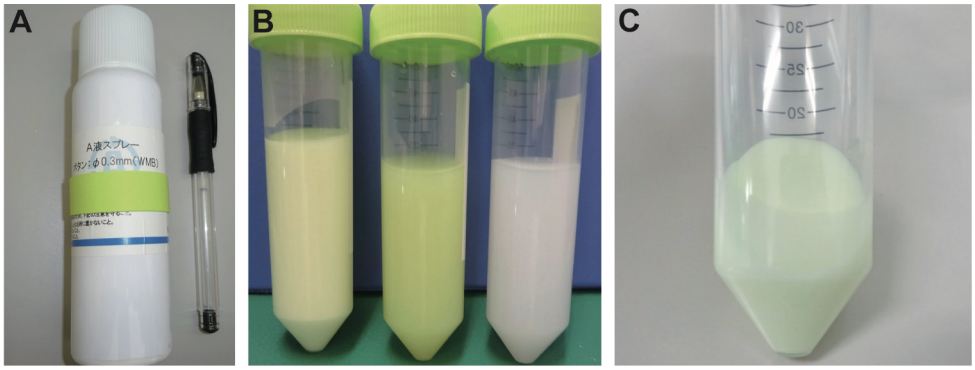



図６　ODN 微粒子噴霧用スプレー（試作品）（A），ODN ヒアルロン酸ナトリウム乳化液（B, C）

（図 5）。

また、噴霧型 ODN 微粒子の作成を目指し、ODN 粒子体の調製液をエアゾール缶に充填した試作品を作製した。さらに微粒子の乳化、分散、破砕技術を駆使して、経皮投与を目的とした ODN の粒径均一化に取り組んだ。1％ヒアルロン酸ナトリウムに混合した ODN に対して乳化処理（ナノヴェイタ-電動式 C-ES, 三重ナノテク生産技術センター）を繰り返すことで、均一に分散した乳化 ODN 微粒子の開発に成功した（図 6）。

## 4．考　察

ODN や miRNA（micro RNA）、siRNA（small interfering RNA）、さらには plasmid DNA（pDNA）など、核酸成分の細胞へのトランスフェクションには、カチオン性リポソームなどの脂質分子が長年利用されてきた。しかしながら、脂質性のトランスフェクション試薬は非常に高価であることから、近年では、ポリケタル粒子、金ナノ粒子、カーボンナノチューブ（CNT）や四塩化ケイ素ナノ粒子と核酸成分との結合・包接技術が開発され、哺乳類細胞

への新たな遺伝子導入技術として期待されている。これらすべて*in vitro*細胞培養系レベルでのtransfectionを想定したデリバリーシステムであるが、最近では、siRNAやCpG ODNの*in vivo*デリバリーシステムが検討されている。Titta らは、界面活性ポリオール（Pluronic F-127）とプロピレンスルフィドより合成したナノ粒子（NPs）とCpG ODNの複合体（NP-CpG）を用いて、メモリー型細胞傷害性T細胞（メモリーCD8$^{+}$T細胞）の再活性化を強力に誘導することを発見した。また、マウスフットパッドへの皮下投与（*intradermal injection, i.d.*）によって、ガン細胞の移植に対してマウスの生存率を高め、抗ガン作用を示すことを明らかにした[10]。Fanらは、カーボンナノチューブ（CNT）とCpG ODNの複合体（CNT-CpG）の皮内投与（*subcutaneous injection, s.c.*）、頭蓋内投与（intracranial, i.c.）が、同じく抗ガン作用を示すことを報告している[11]。その他、プロタミン-CpG ODN、脂質性リン酸カルシウム-pDNAなど様々な核酸キャリアーが提案されている。しかしながら、核酸分子は安定性に乏しく、腸管粘膜への経口送達は、いまだ課題とされているが、筆者は、これまでに胃酸耐性を有するODNナノカプセル（ODNcap）の開発に成功した[7]。本成果を踏まえ、本研究で作成した改良型ODN微粒子は、これまで様々な核酸分子キャリアーが提案されている中で、大幅なコストカットを達成した。一方で、包摂率が約70％であることから、さらなる包摂効率の改善が望まれる。

現在、上皮細胞培養系を用いて、粒子化、乳化ODN微粒子による抗炎症効果について検証を進めている。今後は、ヌードマウスを用いた塗布試験も計画しており、経皮的に浸透したODNAの皮内における分布状況について経時的に解析を行う予定である。ODNの経皮投与は、前人未到の投与ルートである。併行して実施したODN微粒子の粒度分布の狭小化により、気管支関連リンパ組織（BALT）や腸管関連リンパ組織（GALT）への送達性と取り込み効率の向上が期待された。経気道投与法の構築にあたっては、ODN微粒子体調整液を充填したエアゾール缶の試作を行い、最適なデバイス構築に向けた研究開発を開始しており、将来的には呼吸器アレルギー疾患や呼吸器悪性疾患、さらには呼吸器感染症に対する吸入核酸医薬の研究開発につながる成果と考える。また核酸医薬の耐胃酸性の問題は、炭酸アパタイトを基材とすることで克服されたことから、ODN炭酸アパタイト粒子体を作成し、ファルマバレーセンターとの協働による高機能微粒子作成装置を用いることで、狭い粒度分布が再現され、経口摂取後のGALTへの送達・取り込み向上が期待された。このように、ODN微粒子体の特性を明らかにし、経口、経気道に加えて、経皮ルート開発に向けた道筋を見出した。以上本研究は、抗炎症作用の知られたODNを有効性成分とする、スキンケア化粧品等の開発に向けた取り組みとして位置づけられる。

（引用文献）


1） T. Sato, M. Yamamoto, T. Shimosato, D. M. Klinman, Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9. *Wound Repair Regen* 18, 586-593 (2010).

2） M. Yamamoto, T. Sato, J. Beren, D. Verthelyi, D. M. Klinman, The acceleration of wound healing in primates by the local administration of immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Biomaterials* 32, 4238-4242 (2011).

3） H. Ikeuchi, T. Kinjo, D. M. Klinman, Effect of suppressive oligodeoxynucleotides on the development of inflammation-induced papillomas. *Cancer Prev Res* (*Phila*) 4, 752-757 (2011).

4） S. Klaschik, I. Gursel, D. M. Klinman, CpG-mediated changes in gene expression in murine spleen cells identified by microarray analysis. *Mol Immunol* 44, 1095-1104 (2007).

5） T. Sato, T. Shimosato, A. Ueda, Y. Ishigatsubo, D. M. Klinman, Intrapulmonary Delivery of CpG Microparticles Eliminates Lung Tumors. *Mol Cancer Ther* 14, 2198-2205 (2015).

6） S. Nigar *et al.*, Synergistic oligodeoxynucleotide strongly promotes CpG-induced interleukin-6 production. *BMC Immunol* 18, 44 (2017).

7） Y. Wang *et al.*, Inhibitory/suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis in mice. *Mol Ther* 23, 297-309 (2015).

8） T. Shimosato *et al.*, CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 81-86 (2010).

9） T. Shimosato *et al.*, Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from Streptococcus thermophilus lacZ. *Anim Sci J* 80, 597-604 (2009).

10） A. de Titta *et al.*, Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 19902-19907 (2013).

11） H. Fan *et al.*, Intracerebral CpG immunotherapy with carbon nanotubes abrogates growth of subcutaneous melanomas in mice. *Clin Cancer Res* 18, 5628-5638 (2012).

# β-アミノ酸から構築する人工コラーゲンの創製

芝浦工業大学システム理工学部生命科学科

須原　義智

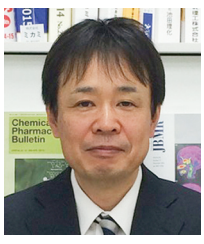
We synthesized a collagen-mimetic peptide for the purpose of increasing of biological and physical stability. Collagen is one of the most important proteins in mammalian body that maintains structural integrity of the organs and tissues. It has been used for a biomaterial such as regenerative medicine because of excellent biological compatibility. The consensus sequence of a general collagen model peptide is known as $(X\text{-}Y\text{-}Gly)_n$ (for X and Y, it corresponds to proline (Pro) or hydroxyproline (Hyp)), however, it is unstable to hydrolytic enzymes. Most collagen used as biomaterials derived from animals, which can be supplied inexpensively and in large quantities. But many problems such as immune reactions and contamination of pathogens are existed. In order to increase the stability to hydrolytic enzyme and its thermodynamic stability and overcome those problems, we synthesized a collagen mimetic by converting one of the basic sequence Pro-Hyp-Gly into β-amino acid. In short, our mimetic contains one of β-proline (βPro), β-hydroxyproline (βHyp) and β-alanine (βAla), which is substituted from one of Pro, Hyp, and Gly in the consensus sequence.

The synthetic strategy was following. First, three amino acid residues of the basic sequence Pro-Hyp-Gly containing β-amino acid such as Pro-βHyp-Gly, βPro-Hyp-Gly and Pro-Hyp-βAla were respectively synthesized, and then they were repeatedly elongated to 30 amino acids residues such as $(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_{10}$, $(Pro\text{-}\beta Hyp\text{–}Gly)_{10}$, $(\beta Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_{10}$, and $(Pro\text{-}Hyp\text{-}\beta Ala)_{10}$ by a solid-phase synthesis method. The resulting collagen mimetics were investigated the helical formation and stabilities for application to biomaterials. Furthermore, we also studied an anti-skin cancer activity of those tripeptide residue to apply for a biologically active agent.

## 1．緒　言

コラーゲンは腱、軟骨、骨の有機間質、眼の角膜のような結合組織や皮膚に見られる重要なタンパク質であり、人工臓器をはじめとした再生医療へ応用するための材料として注目されている。コラーゲンを構成するトリペプチド（Collagene Tripeptide: CTP）は、X-Y-Glyを基本配列としてもっている（XおよびYは通常ProかHypが相当する）（図1A）。このCTPが多数繋がることで螺旋構造をもつポリペプチド鎖を形成する。さらに、その左巻きのポリペプチド鎖が寄り集まって右巻きの３本鎖ヘリックス構造をとることで、線維組織や骨格の構造維持に必要な性質を示すことが知られており、化学的にも興味深い物質である。しかしながら、天然のコラーゲンはα-アミノ酸から形成されているため、コラゲナーゼをはじめとした体内の加水分解酵素に対する安定性の問題などが実用化への大きな障壁となっている。これまでにコラーゲン三重鎖ヘリックスの構造や化学的安定化をはかるための類縁体研究がHolmgrenらやGoodmanらを中心に世界中で行われている[1, 2]。それらは主にコラーゲンを構成するα-アミノ酸であるL-ヒドロキシプロリンの類縁体を合成して組み込むことが試みられているが未だ有効な手法は見つかっていない。

そこで我々はα-アミノ酸を、コラーゲンの元々の性質を保持しながら安定に存在できる人工コラーゲンの創製を目指した。体内の加水分解酵素に安定なペプチド化合物として、β-アミノ酸から構成されるβ-ペプチドが知られている。β-ペプチドは天然のα-ペプチドに最も近く、特有の堅いコンフォメーションをもっている。我々は、コラゲナーゼをはじめとする各種の加水分解酵素に耐性をもつ安定な人工コラーゲンの創製を目的として、コラーゲンを構成するα-アミノ酸をβ-アミノ酸に変換した化合物の創製を行った（図1B）。



Synthesis of artificial collagen-mimetic peptide derived from β-amino acids

Yoshitomo Suhara

Department of Bioscience and Engineering, College of Systems Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology

## 2．方　法

### 2．1．コラーゲンペプチドに組み込むためのβ-アミノ酸の選択

本研究では、コラーゲンを構成する Pro-Hyp-Glyのそれぞれのα-アミノ酸を、β-アミノ酸に変換した人工コラーゲンを構築して天然のコラーゲンとの比較を行うことにした。これらβ-アミノ酸の中でグリシン（Gly）をβ-アミノ酸に変換したものは、市販のβ-アラニン（βAla）が相当する。一方、β-ヒドロキシプロリン（βHyp）やβ-プロリン（βPro）は、カルボン酸が環に沿って移動した**1**とカルボン酸側へ一炭素増炭した**2**の２種類が考えられる（図2）。本研究では合成の簡便さから、**2**の形式をとったβ-アミノ酸を合成して、Pro-Hyp-Gly に組み込んだβ-ペプチド化

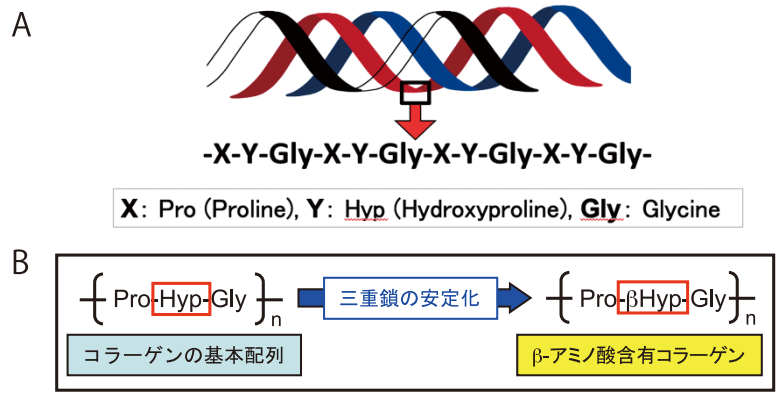



図１　コラーゲンの構造とβ-ヒドロキシプロリンを含む人工コラーゲンの創成

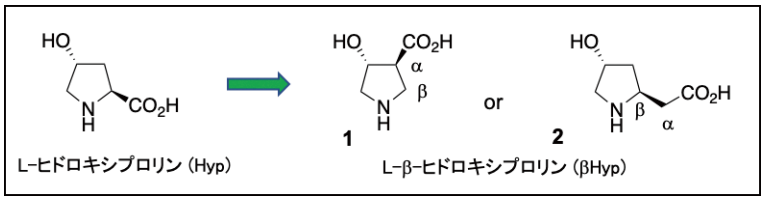



図２　α-アミノ酸からβ-アミノ酸へ変換した化合物

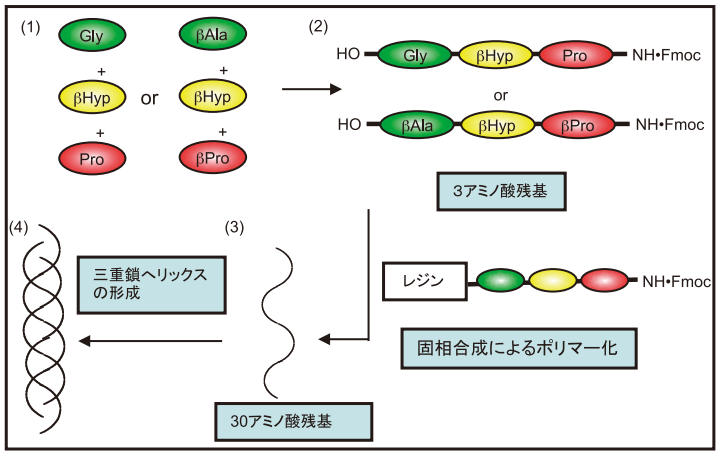



図３　人工コラーゲン(30mer)の合成方法

合物を創製することにした。本研究では合成の簡便さから、2の形式をとったβ-アミノ酸を合成する。

## 2. 2. コラーゲンペプチド鎖の合成方法

目的とするコラーゲンペプチド鎖の合成は図3に示す方法で行う。まず(1)上記で示したβ-アミノ酸を合成する。次に(2)Pro、Hyp、Glyもしくはそれらのβ-アミノ酸を液相法により順次カップリングして、N末端をFmocで保護したCTP残基(Fmoc•Pro-Hyp-Gly-OH、Fmoc•βPro-Hyp-Gly-OH、Fmoc•Pro-βHyp-Gly-OH、Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH)を得る。(3)無保護のC末端を樹脂に固定化し、自動ペプチド合成装置により上記のCTPとのカップリングを9回繰り返した後、樹脂からの切り離しと保護基の脱保護を同時に行い、HPLCで精製して目的とする30merを得る。(4)得られたペプチド鎖から三重鎖ヘリックスを形成させる。以上で得られたコラーゲンペプチドの物理化学的性質を調べ、天然型とβ-アミノ酸を組み込んだペプチドの違いを検討した。

## 2. 3. 扁平上皮がんにおけるCTPの生物活性解析

CTPは経口投与や皮膚塗布によって紫外線誘発性の皮膚障害が改善されたことが報告されている[3]。しかし、CTPの作用メカニズムや紫外線が発症要因とされる皮膚がんの治療法は未だ報告されていない。現在の皮膚がんの治療法は副作用を起こすものが殆どであるため、低抗原性、低アレルゲン性であるCTPと皮膚がんの関連を解明することができれば、低リスクの治療法開発への寄与が期待できる[4]。そこで、本研究で合成したCTPに関して生理活

性物質への応用を検討する一助として、扁平上皮がん培養細胞株を用いて扁平上皮がんにおけるCTPの生物活性評価を行った。

## 3．結　果

### 3. 1. ビルディングブロックとなるβ-アミノ酸（βPro、βHyp）の合成

コラーゲンペプチドを合成するためのビルディングブロックとなるβHyp誘導体**3**は、図4に示すようなスキームで合成した。まず、Z-*O*-*tert*-butyl-L-hydroxyproline（**5**）を出発原料として、ジアゾメタン存在下でクロロギ酸エチルを反応させ、アゾ化合物**6**を80％収率で得た。次にトリフルオロ酢酸銀、トリエチルアミンによって転位反応により、60％収率で一炭素増炭したカルボン酸**7**に変換した。最後にアミノ基の保護基をZ基からFmoc基に付け替えることで目的とする**3**を得ることができた（図4）。

次にN末端をFmoc基で保護したβPro誘導体**4**は、図5に示すスキームで合成した。すなわち、（*S*）-pyrrolidin-2-ylmethanol（**8**）を出発原料として、そのヒドロキシ基に*p*-toluene sulfonyl基を導入して**9**とした後、KCNにより高収率でシアノ基に変換した**10**とした。その後、濃塩酸と酢酸の混合溶液によって、シアノ基を酸加水分解してカルボン酸**11**とし、最後にアミノ基をFmoc基で保護することで、90％収率で目的とする**4**を得ることができた（図5）。

### 3. 2. CTPの合成

上記のようにして合成したβ-アミノ酸をビルディングブロックとして、液相法によりN末端をFmocで保護したCTP残基（Fmoc•Pro-Hyp-Gly-OH、Fmoc•βPro-Hyp-Gly-OH、Fmoc•Pro-βHyp-Gly-OH、Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH）の合成を行った。

#### 3．2．1．βProを組み込んだCTP（Fmoc•βPro-Hyp-Gly-OH）（12）の合成

βProを組み込んだCTP誘導体は、以下のように合成した。最初に、上記で合成したβPro（**11**）のアミノ基をZ基で保護した**15**を90％収率で得た。ペプチドカップリング試薬であるCOMUを用いて、**15**のカルボン酸残基とHyp（tBu-Hyp-Me）のアミノ基の間でカップリングさせ、74％の収率で二量体**16**とした。さらに**16**のメチルエステルを加水分解してカルボン酸**17**にした後、同様にGlyのアミノ基とカップリングさせて高収率で三量体**18**を得た。最後にN末端とC末端のZ基とBn基を脱保護して、N末端のみをFmoc基で保護することで、目的とするCTP（Fmoc•βPro-Hyp-Gly-OH）（**12**）を得ることに成功した（図6）。

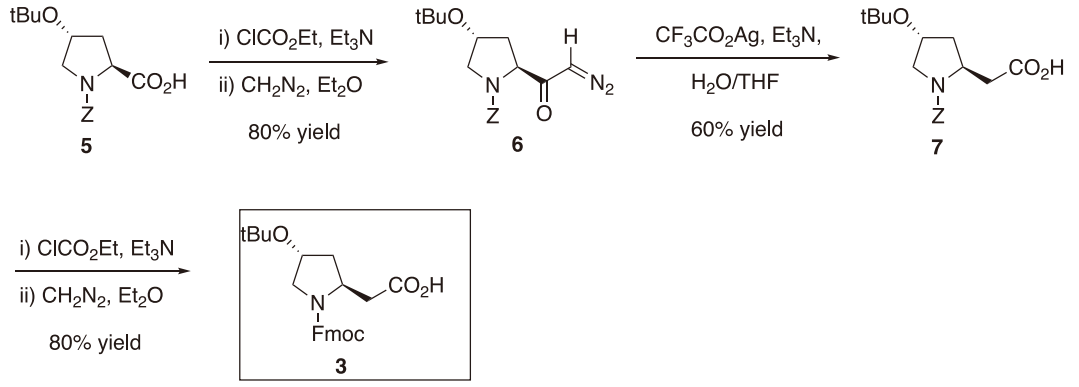



図4　βHyp誘導体の合成

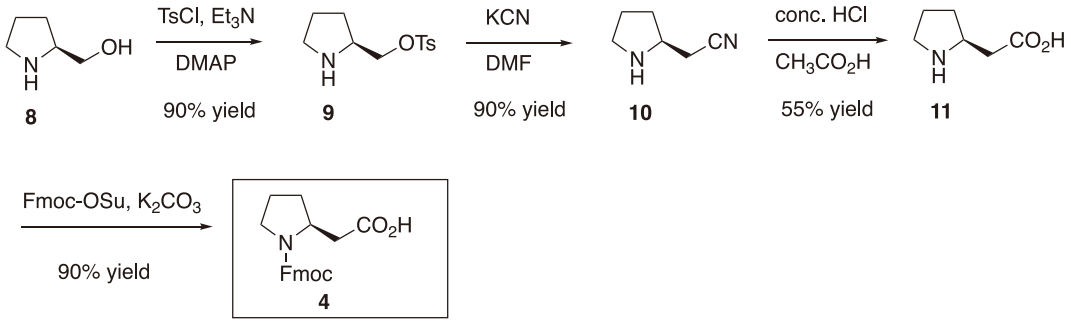



図5　βPro誘導体の合成

### 3．2．2．　βHypを組み込んだCTP（Fmoc•Pro-βHyp-Gly-OH）（13）の合成

βHypを組み込んだCTP誘導体**13**の合成は、以下のような方法で行った。上記で合成した**6**をメチルエステル体**19**に変換した後、接触水素化により、アミノ基のみを無保護とした**20**を高収率で得た。この**20**のアミノ基をZ基で保護したPro（ZPro）のカルボン酸とカップリングさせ、60％の収率で二量体**21**とし、さらにアルカリ加水分解によりカルボン酸体**22**とした。**22**にC末端をベンジル基で保護したGlyをカップリングさせ三量体**23**を得た後、最後にベンジル基とZ基の脱保護とN末端のFmoc化を行い、目的とするCTP（Fmoc•Pro-βHyp-Gly-OH）（**13**）を得ることができた（図7）。

### 3．2．3．　βAlaを組み込んだCTP（Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH）（14）の合成

βAlaを組み込んだCTP誘導体**14**の合成は、以下のような方法で行った。まず、ZPro（**24**）を出発原料とし、これにHypをカップリングさせ、二量体**25**を得た。次にC末端のメチルエステルをアルカリ加水分解してカルボン酸体**26**とし、引き続きβAlaベンジルエステルとカップリン

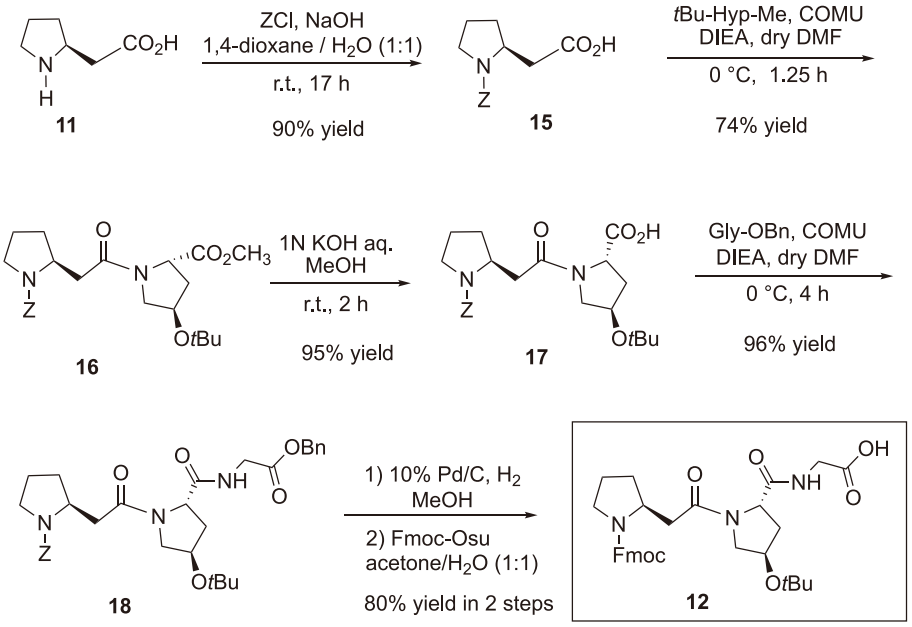



図6　βPro を組み込んだ CTP（Fmoc • βPro-Hyp-Gly-OH）（**12**）の合成

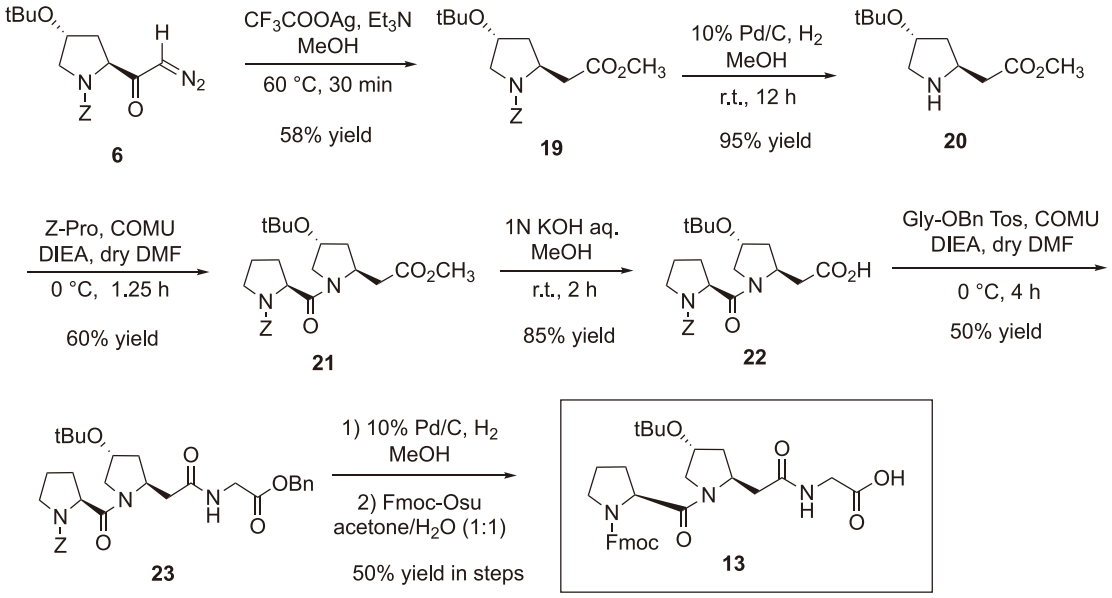



図7　βPro を組み込んだ CTP（Fmoc • Pro-βHyp-Gly-OH）（**13**）の合成

グすることで三量体 **27** とした。最後に接触水素化によりベンジル基とZ基の脱保護を行い、N末端のFmoc化を行うことで目的とするCTP（Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH）（**14**）を得ることができた（図8）。

### 3. 3. 固相合成による30merの合成

上記で得られたCTP **13** は、上記の2. 2. に示した方法に従って30merを合成した。それぞれレジンに固定し、固相合成法により9回繰り返してカップリングした後、レジンから切り離して、最後にHPLC精製することで（Pro-βHyp-Gly）$_{10}$ を得ることができた。

### 3. 4. 合成した（Pro-βHyp-Gly）$_{10}$の熱安定性

合成したコラーゲンペプチドの30merである（Pro-βHyp-Gly）$_{10}$ について、天然型の（Pro-Hyp-Gly）$_{10}$ と比較した。CDスペクトルにより熱安定性を調べたところ、（Pro-Hyp-Gly）$_{10}$ は58℃でヘリックス構造が壊れたものの、興味深いことにβ-アミノ酸を組み込んだ（Pro-βHyp-Gly）$_{10}$ では80℃以上でもヘリックス構造を維持していた。このことからも今回我々が合成した人工コラーゲンは熱安定性が非常に高いことが示された。

### 3. 5. 計算化学により推定した立体構造

#### 3. 5. 1. CPTの立体構造

このように合成したコラーゲン類縁体のうち、それらを構成するCTPであるPro-Hyp-GlyとPro-βHyp-Glyの構造を、計算化学によって解析した。本研究では、合成した30merのGly-Hyp-Proの繰り返し構造であるトリペプチドについて最安定化構造を求めた。このとき、*C*-末端と*N*-末端はメチル基で置換し、計算方法はBLYP/DNP//MMFFs（COSMO in Water）で行った。その結果、天然のコラーゲンはGly-Hyp-Proで一回転し、GlyからProまでの距離は6.509オームストロングであったのに対し、Hypをβ-アミノ酸に置換したPro-βHyp-Glyでは6.970オームストロングであった。この結果より、β-アミノ酸を組み込むことによって、ヘリックス構造の一回転あたりの距離はわずかに変化するものの、構造自体は天然のヘリックス構造に類似していると予想できた（図9）。

#### 3. 5. 2. （Pro-Hyp-Gly）$_{10}$ および（Pro-Hyp-βAla）$_{10}$ の立体構造

コラーゲンペプチドの30merについて、計算化学の手法により（Pro-Hyp-Gly）$_{10}$ とβ-アミノ酸を組み込んだ

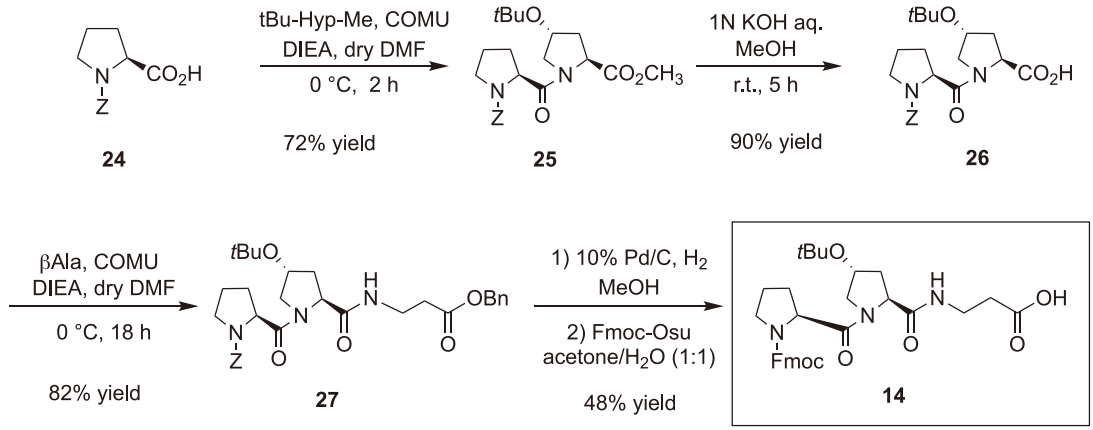



図8　βAlaを組み込んだCTP（Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH）（**14**）の合成

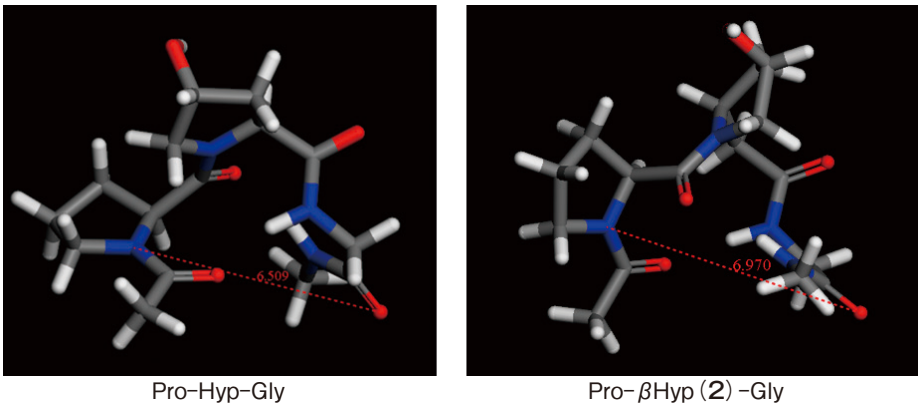



図9　計算化学によるCTPの推定構造
計算方法：BLYP/DNP//MMFFs（COSMO in Water）

(Pro-Hyp-βAla)$_{10}$を比較した(図10)。その結果、二つのペプチドは類似した立体構造を有していることが明らかとなった。また、β-アミノ酸を組み込んだペプチドのほうが安定に存在できることも示唆された。

### 3. 6. CTPの生物活性評価

次に、合成したCTP(Gly-Hyp-Pro)とその誘導体(Gly-βHyp-Pro)を様々な濃度でヒト扁平上皮がん細胞(A431)に添加して、その細胞生存率を調べることでがん細胞増殖抑制効果を評価した。さらにウエスタンブロット法により、タンパク質の発現量解析を行い、がん細胞に対するCTPおよびCTP 誘導体の作用メカニズムの探索を行った。

その結果、それぞれを10μMおよび100μMの添加濃度では、がん細胞の生存率に有意な変化はみられなかった。そこで、CTPおよびCTP誘導体を高濃度の1000μMで曝露したところ、図11に示すように有意な生存率の減少が確認された。コラーゲンコート上で培養したヒト扁平上皮がん細胞においても同様に、CTPおよびCTP誘導体の高濃度曝露による細胞生存率の有意な減少を確認したが、コラーゲンコートの有無による細胞生存率の変化はみられなかった。以上の細胞生存率測定では、CTPの違いによる細胞生存率の違いは観察されなかった。

CTPおよびCTP誘導体による細胞生存率減少のメカニズムを解明するために、ウエスタンブロットを行った。細胞周期制御に関与するタンパク質の一つであるp21の検出を行ったところ、CTPおよびCTP誘導体曝露によるp21の発現量の変化は観察されなかった。

## 4. 考　察

これまでにコラーゲンを模倣した化合物の研究が世界中で行われているが、その多くはHypを別の化合物に置き換えたものである。それに対し本研究では、CTP(Gly-Hyp-Pro)を基にして、構成するアミノ酸をβ-アミノ酸に変換したコラーゲンペプチドを創製したため、計算化学に

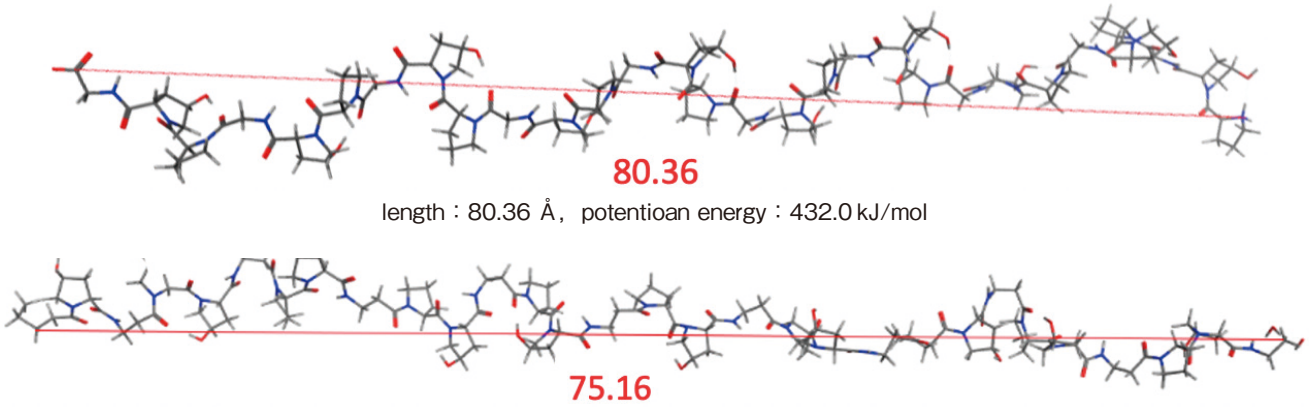



図10　計算化学による30merの立体構造

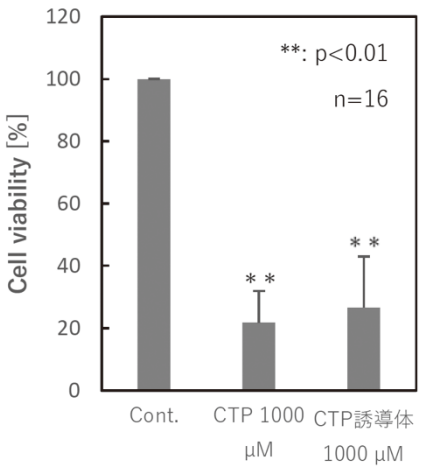



図11　CTPおよびCTP誘導体1000μM曝露時の細胞生存率

よる構造解析の結果からも、天然に近い性質をもっていると考えられる。さらに、得られたペプチドは熱安定性の高い強固なヘリックス構造をもっていることが明らかとなった。このコラーゲンペプチドの加水分解酵素に対する安定性はまだ調べていないが、もしも天然のコラーゲンに比べて著しく高い安定性を有していれば、新しい機能性材料として生物化学分野に応用できる可能性がある。

また、創薬科学分野への応用の可能性についても検討した結果、今回は予備的な実験ではあるが、CTPおよびCTP誘導体はヒト扁平上皮がん細胞に高濃度で曝露することで細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。CTPおよびCTP誘導体による細胞生存率減少のメカニズムとして、細胞周期やアポトーシスへの関与が考えられる。CTP により細胞生存率が減少したのに対し、細胞周期制御タンパク質の一つであるp21はCTPによる影響がみられなかったため、今後他の細胞周期に関わるシグナルや、アポトーシス誘導タンパク質においても同様の実験が必要である。

## 5．総　括

β-アミノ酸を組み込んだ人工コラーゲンは、天然のコラーゲンと類似した立体構造をもち、さらに天然に比べて熱安定性が非常に高いことを見出した。またそれを構成するCTPは、生理活性物質に応用できる可能性も示された。したがって、今後もさらに詳細に研究を続けることにより、再生医療やコスメトロジーの分野への新規の機能性材料へ応用可能な人工コラーゲンを創出することは、十分可能であると考えられる。

**謝　辞**

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

**（引用文献）**

1）Holmgren SK, Bretscher LE, Taylor KM, Raines RT. A hyperstable collagen mimic. Chem. Biol. 1999, 6, 63-70.

2）Goodman M, Bhumralkar M, Jefferson EA, Kwak J, Locardi E. Collagen mimetics. Biopolymers, 1998, 47, 127-142.

3）Pyun HB et al. Effects of Collagen Tripeptide Supplement on Photoaging and Epidermal Skin Barrier in UVB-exposed Hairless Mice. *Prev Nutr Food Sci*. 2012 Dec; 17 (4): 245-53.

4）Hakuta A et al. Anti-inflammatory effect of collagen tripeptide in atopic dermatitis. J Dermatol Sci. 2017 Dec; 88(3): 357-364

# 超分子架橋を施した高保水性コラーゲン微粒子の創製

東京医科歯科大学生体材料工学研究所
田村　篤志

In order to fabricate collagen microparticles with high water content and chemical stability, the collagen microparticles cross-linked with carboxylmethylated α-cyclodextrin (α-CD)-threaded polyrotaxanes (CMPRs) were prepared. First, the cross-linking of collagen hydrogels with CMPRs were tested. CMPR-cross-linked collagen hydrogels showed higher mechanical and swelling properties than those of EDC/NHS-cross-linked and carboxymethyl cellulose (CMC)-cross-linked collagen hydrogels. These results suggest that the mobility of cross-linking points in CMPR-cross-linked collagen hydrogels contributed to improving mechanical and swelling properties. Additionally, the chemical compositions of CMPR greatly affected mechanical and swelling properties of CMPR-cross-linked collagen hydrogels, and CMPR comprising high molecular weight axle polymer and high α-CD threading ratio was suitable for improving the functions of collagen hydrogels. Moreover, CMPR-cross-linked collagen hydrogels showed high adhesiveness of mouse fibroblasts compared with EDC/NHS-cross-linked and CMC-cross-linked collagen hydrogels, presumably due to the high elasticity of CMPR-cross-linked collagen hydrogels. Finally, CMPR-cross-linked collagen microparticles with 3.38 ± 1.42 μm in diameter were successfully prepared. These cross-linked collagen microparticles showed excellent chemical stability. Altogether with these results, the cross-linking of collagen with CMPR is an effective method to modulate the mechanical properties and cytocompatibility, and CMPR-cross-linked collagen microparticles would be applied as a cosmetic ingredient.

## 1．緒　言

真皮などの生体組織を構成するコラーゲンは、医療、食品、美容製品など様々な分野で利用されている生体由来高分子である。コラーゲンはヒドロゲルなどへの成型加工も容易であり、組織適合性や保水性（保湿性）に優れることから美容製品分野では美肌成分として利用されている[1, 2]。このような目的で用いるコラーゲンは角質層に留まり、肌表面の保湿剤として機能すると考えられる[2]。また、コラーゲンのヒドロゲルは医療分野では再生医療や癒着防止膜などの外科的な利用まで幅広く研究されている。コラーゲンゲルは単体で使用される場合も多いが、医療目的では力学的な強度を増大させる目的で化学架橋が検討されている[1]。これまでに検討されている代表的なコラーゲンの架橋法として、グルタルアルデヒドや縮合剤によるコラーゲン分子鎖同士の架橋、ポリエチレングリコールなど親水性ポリマーを用いた架橋が挙げられる[1]。これらの架橋により破断強度の増大は達成されるが、コラーゲン本来が有しているJ字型の応力－歪み特性（低歪み時には応力が小さく、J字のように応力が増加）は喪失し、プラスチックのようなS字型応力－歪み特性（低歪み字に応力が大きく、S字を描いて応力が増加）を示す。すなわち、生体組織の動きに追従するようなしなやかさは失われ、硬くて脆い構造になる。また、架橋方法や条件によっては細胞毒性が生じるといった問題も指摘されている[3]。

このような従来の化学架橋ヒドロゲルの力学特性を改善することを目的に、当研究室ではこれまでに鎖状高分子が多数の環状糖類α-シクロデキストリン（α-CD）空洞部に貫通した超分子ポリロタキサンによるゼラチンの架橋を検討した[4, 5]。ポリロタキサン中のα-CDは軸高分子上を自由に移動するといった特徴があり、α-CD同士を架橋することで、可動性の架橋構造を有するヒドロゲルが得られる[6]。本ゲルは架橋点が滑車のように軸高分子を移動するため、伸張しても滑車様の運動により高分子の切断が回避され、破壊エネルギーの蓄積を防ぐといった特徴がある[6, 7]。実際に、ポリロタキサンを用いてゼラチンを架橋した結果、破断強度が増大するとともに低応力高歪な力学特性を示すことを見出している[1]。そこで本研究では、ポリロタキサンによるコラーゲンの化学架橋を行い力学特性、細胞接着性を明らかにするとともに、美容分野への応用に向けたポリロタキサン架橋コラーゲンマイクロ粒子の調製を検討した。



Design of collagen microparticles by introducing supramolecular cross-linkers
Atsushi Tamura
Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

## 2．方　法

### 2．1．カルボキシメチル化ポリロタキサンの合成

環状分子としてα-CD（塩水港精糖社製）、軸高分子として平均分子量10,000、35,000のカルボキシ末端PEG（Sigma-Aldrich社製）、封鎖基として1-アダマンチルアミン（富士フイルム和光純薬社製）を用いたポリロタキサンは既報に従い合成した[8]。次に、ポリロタキサンを1.5 M水酸化カリウム水溶液に溶解させ、2-ブロモ酢酸（東京化

成社製）を添加し、室温で24時間反応させた。反応終了後、分画分子量35,000の透析膜を用いて、純水に対して透析を行うことで精製し、凍結乾燥により粉末状のカルボキシメチル化ポリロタキサン（CMPR）を得た。CMPR中のα-CD貫通数、及びカルボキシメチル基修飾数は$^{1}$H NMR（Avance III 400, Bruker Biospin）測定により決定した。

### 2. 2. コラーゲンゲルの化学架橋と力学特性の評価

アテロコラーゲン粉末（高研社製）に1 mM塩酸を加え、氷冷下で溶解させた。次に、水酸化ナトリウム水溶液でコラーゲン溶液を中和し、テフロン性の鋳型に加え、37℃で24時間静置することでコラーゲンゲルを調製した。次に、CMPRをエタノール－純水の混合溶媒（エタノール：純水＝3：7）に溶解し、縮合剤として1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC、東京化成社製）、及び*N*-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS、東京化成社製）をCMPR中のカルボキシ基：EDC：NHS＝1: 10: 10のモル比となるように加え、15分攪拌した。その後、コラーゲンゲルをCMPR溶液に浸漬し、室温で24時間静置し、化学架橋を行った。反応終了後、コラーゲンゲルはリン酸緩衝溶液（PBS）に浸漬し、未反応のCMPR、及び縮合剤を除去した。本操作を計3回繰り返すことで精製し、架橋コラーゲンゲルを得た。比較対象として、可動性の架橋構造を有していないカルボキシメチルセルロース（CMC、数平均分子量 139,000、東京化成社製）で架橋したコラーゲンゲル、及びEDC/NHSのみで化学架橋を行ったコラーゲンゲルを調製した。

コラーゲンゲルの力学特性は引張強度測定、及び動的粘弾性測定によって評価した。引張強度はダンベル型に成形したゲルを作成し、RE2-33005B（山電社製）により測定した。動的粘弾性はRheosol-G3000（UBM社製）により測定した。

### 2. 3. 架橋コラーゲンゲルへの細胞接着性評価

24ウェルプレート内に上記と同様に架橋コラーゲンゲルを作成し、マウス線維芽細胞株であるBALB/3T3細胞を$2\times10^{3}$ cells/cm$^{2}$の密度で播種した。所定時間経過後、位相差顕微鏡により細胞を観察し、細胞接着数を計測した。

### 2. 4. 架橋コラーゲンゲル微粒子の調製と評価

Span-20を溶解させた流動パラフィン溶液に、中和したコラーゲン溶液を添加し、ホモジナイザーによって乳化させた。その後、上記と同様に、CMPR、EDC、NHSを溶解した水溶液を滴下し、24時間攪拌した。反応修了後、2-プロパノールを用いて3回洗浄し、精製を行った。位相差顕微鏡により観察し、粒径を計測した。

## 3. 結　果

### 3. 1. ポリロタキサン架橋コラーゲンゲルの調製

本研究では、軸高分子分子量、及びα-CD貫通数の異なる4種類のCMPRを調製した。$^{1}$H NMR測定より求めた各CMPRの軸高分子分子量、α-CD貫通数、ならびにカルボキシメチル基修飾数をTable 1に示す（ポリロタキサン中のα-CDはエチレングリコール2ユニットを包接するため、軸高分子の重合度よりα-CD貫通率を計算）。架橋コラーゲンゲル微粒子作成の条件検討に先立ち、コラーゲンゲルを用いてCMPRによる架橋の検討と物性評価を行った。コラーゲンは分子中にリシンに由来する一級アミノ基を有しているため、カルボキシ基を有する化合物と縮合反応により結合が可能である。そこで、あらかじめ調製したコラーゲンゲルをCMPR溶液に浸漬することで架橋反応を行った（Fig. 1）。反応後、各架橋コラーゲンゲル中に残存するアミノ基を定量した結果、いずれの架橋コラーゲンゲルにおいても残存アミノ基は20％以下であり、アミノ基の大部分が架橋されたことを確認した。

次に、各架橋コラーゲンゲルの力学特性を引張強度より評価した（Fig. 2）。NHS/EDCで架橋したコラーゲンゲルやCMC架橋ゲコラーゲンゲルでは、歪みに対して応力がほぼ直線的に増加する傾向が認められた。どちらの架橋コラーゲンゲルも歪みがおよそ10％程度で破断し、破断時において2MPa以下の応力を示した。一方、CMPR架橋ゲルでは、J字型の応力－歪み曲線を示した。これは、伸長時に架橋点となるポリロタキサン部位が異動することに起因すると考えられる。また、破断時の歪みも1.5～2倍程度増大するとともに、破断強度も大幅に向上した。特に、軸高分子が短く、α-CD貫通率の低いCMPR（CMPR-17％-10k）ほど低応力高歪みであった。また、軸高分子が長く、

Table 1　CMPRの化学組成

| Sample code | $M_n$ of PEG axle | Number of threading α-CDs onto PRX (threading ratio) | Number of CME groups on PRX (per α-CD) | $M_n$ |
|---|---|---|---|---|
| CMPR-17%-10k | 10,000 | 19.5 (17%) | 52.4 (2.68) | 32,300 |
| CMPR-37%-10k | 10,000 | 41.9 (37%) | 122 (2.92) | 58,300 |
| CMPR-20%-35k | 35,000 | 82.3 (20%) | 275 (3.34) | 132,000 |
| CMPR-37%-35k | 35,000 | 147 (37%) | 495 (3.35) | 208,000 |

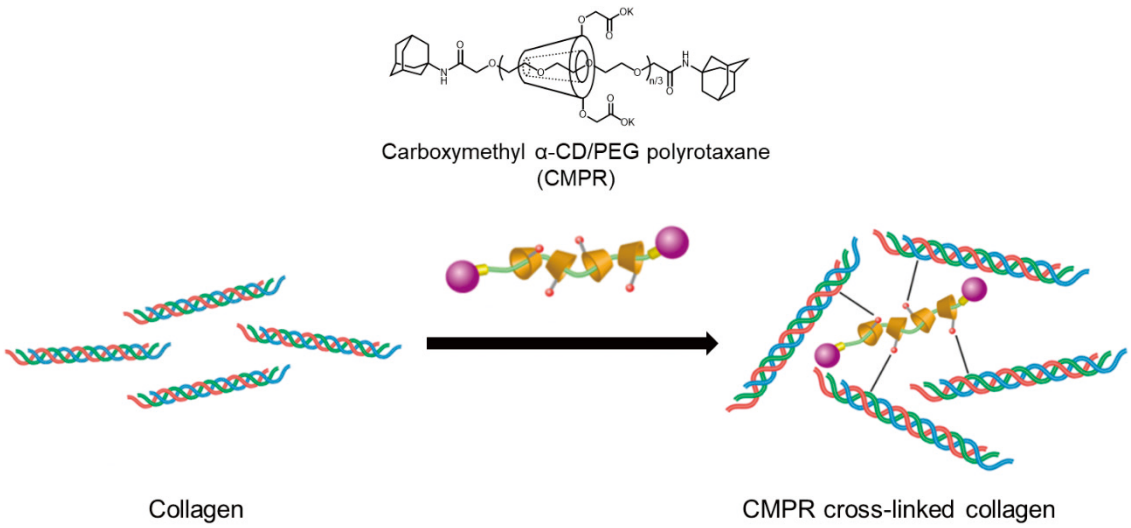



Fig. 1　カルボキシメチル化ポリロタキサン（CMPR）によるコラーゲンの化学架橋

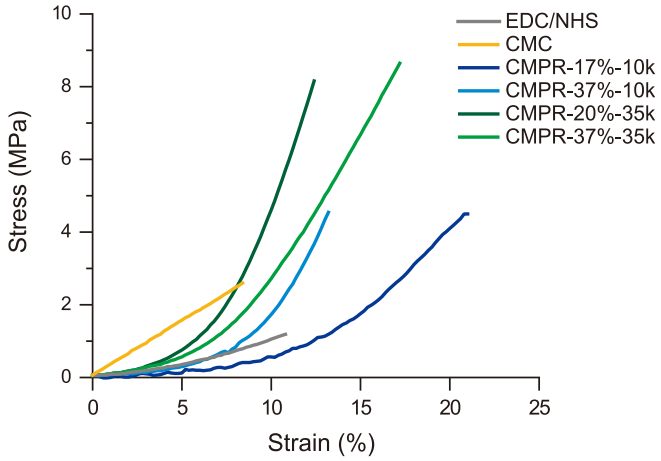



Fig. 2　各架橋コラーゲンゲルの応力ー歪み曲線

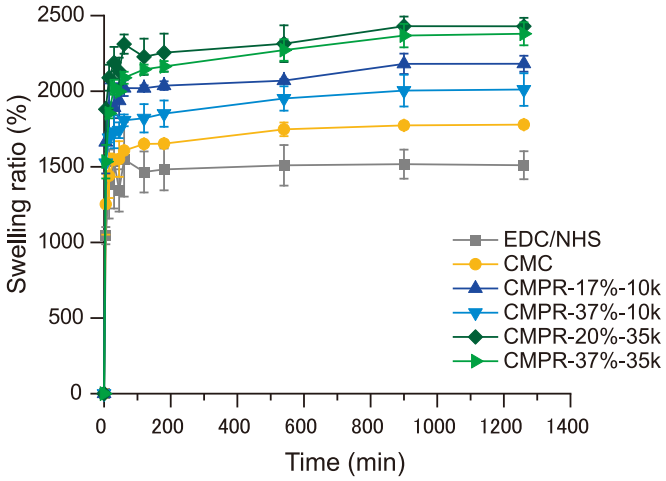



Fig. 3　各架橋コラーゲンゲルの PBS 中での膨潤特性

α-CD 貫通率の低い CMPR（CMPR-37%-35k）では破断強度が最も高い値を示した。また、各架橋コラーゲンゲルの動的粘弾性測定を行った結果、破断強度の値と相関して、貯蔵弾性率が上昇した。以上の結果より、CMPR による化学架橋によりコラーゲンゲルの力学特性を大きく改善できるとともに、CMPR の化学組成によって力学特性が変化することを明らかにした。

各架橋コラーゲンゲルの膨潤特性を明らかにするために、乾燥状態のゲルを PBS に浸漬後の重量変化を調べた（Fig. 3）。その結果、NHS/EDC で架橋したコラーゲンゲルや CMC 架橋コラーゲンゲルと比較して、CMPR 架橋コラーゲンゲルでは膨潤度が大きく増大する様子が観察された。特に、軸高分子の分子量が大きい CMPR-20%-35k、及び CMPR-37%-35k で架橋したコラーゲンゲルにおいて大きな膨潤度を示した。

### 3. 2. ポリロタキサン架橋コラーゲンゲルへの細胞接着性

次に、各架橋コラーゲンゲルの生体親和性を明らかにするために細胞接着性を評価した。細胞として、マウス線維芽細胞である BALB/3T3 細胞を使用した。細胞播種直後から 24 時間後までは徐々に接着、伸展する細胞数が増加する様子がどのゲルでも観察された（Fig. 4）。しかしながら、72 時間後にはポリロタキサン架橋コラーゲンゲル上で伸展した細胞数が顕著に増加している様子が観察された。実際に、細胞接着数を計測した結果、分子量 35,000 の PEG を軸高分子として用いた CMPR 架橋コラーゲンゲル上で細胞数が有意に増加していることが確認された（Fig. 5）。また、接着細胞の形態とアスペクト比を計測した結果、2 時間後では CMPR-37%-35k で架橋したコラーゲンゲルにおいて細胞接着面積の増大が確認され、早期に細胞が

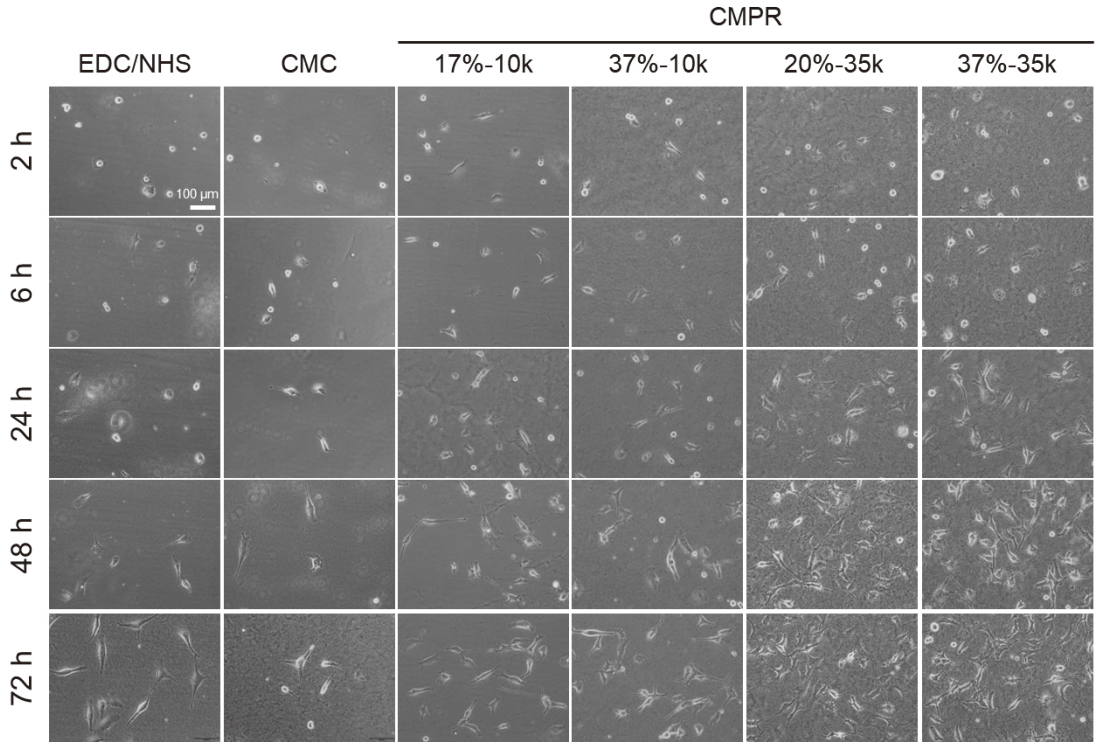



Fig. 4　各架橋コラーゲンゲル上に播種した BALB/3T3 細胞の位相差顕微鏡像

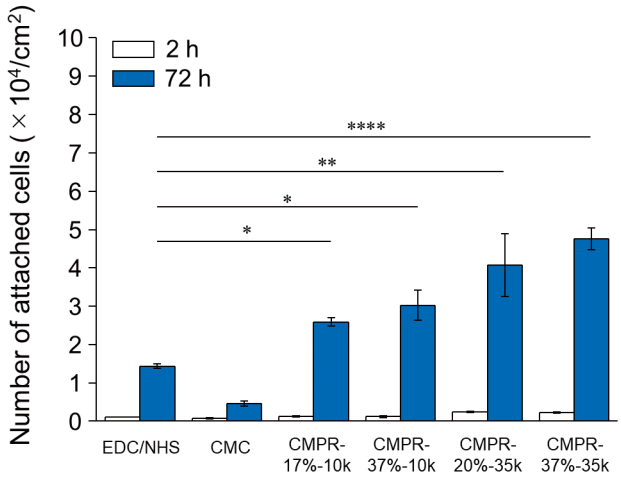



Fig. 5　各架橋コラーゲンゲル上における BALB/3T3 細胞の接着数

伸展していることが示唆された。しかしながら、24～72時間後の細胞では、各架橋コラーゲンゲル間で接着面積やアスペクト比に有意な差は認められなかった。以上の結果を総合して考えると、力学特性、膨潤度、細胞親和性に優れるコラーゲンゲルを調製するためには軸高分子が長く、α-CD貫通率の高いCMPRが好適であり、微粒子調製の実験ではCMPR-37%-35kを使用することとした。

### 3. 3. コラーゲンマイクロ粒子の調製

これまでに報告されているコラーゲン微粒子の作成方法を踏襲し、CMPR架橋コラーゲンゲル微粒子の調製を行った。コラーゲン水溶液と流動パラフィンを混合し乳化後、ただちにCMPR溶液を加えることで架橋反応を行った。最終的には、Fig. 6に示すような球状の粒子が得られた。粒子の平均直径は3.38±1.42μmであった。粒径のヒストグラムは単峰性であったものの、変動係数は0.42と大きく、粒系分布は比較的大きいことが明らかになった。本CMPR架橋コラーゲンゲル微粒子をPBS中に分散させ、37℃で浸透しても1週間以上は同様の粒子形状を保持していた。一方で未架橋コラーゲンゲル微粒子は1週間後に

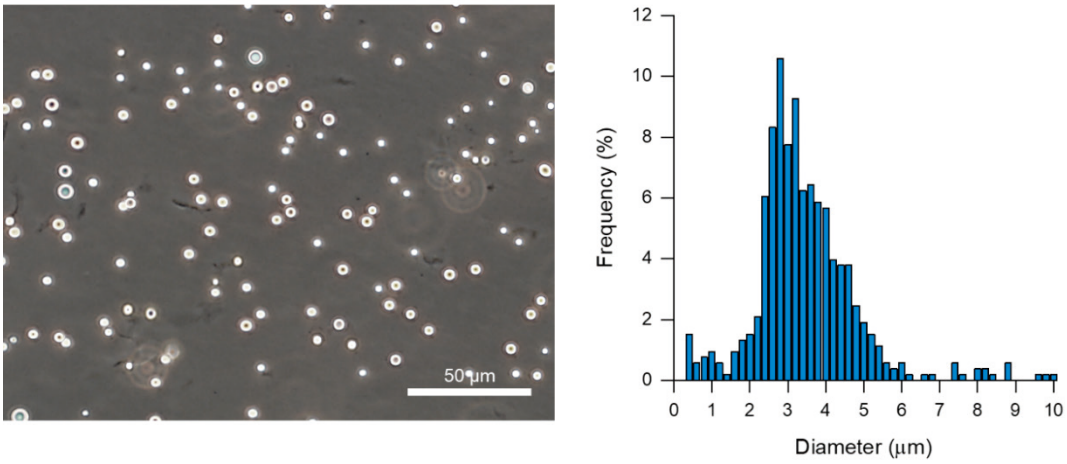



Fig. 6　CMPR 架橋コラーゲンゲル微粒子の位相差顕微鏡像と、粒径のヒストグラム（n=529）

は消失していたことより、CMPRによる架橋が施されていることが確認された。以上の結果より、化学的に安定なCMPR架橋コラーゲンゲル微粒子が調製されたと言える。

## 4．考　察

本研究では、コラーゲンゲルの新たな架橋方法として分子可動性を有するポリロタキサンによる架橋を検討した。グルタルアルデヒドなどの従来の化学架橋では、コラーゲンゲルの力学特性や化学的安定性が改善されるが、応力－歪み特性が天然のものから大きく変化してしまう点や、細胞接着性が低下することが課題であった。本研究では、種々の化学組成のCMPRを用いてあらかじめ調製したコラーゲンゲルの架橋を行った。予備的な検討としてコラーゲン溶液中でCMPRと反応後、ゲル化を行ったが、ゲル化しないサンプルがあったことや、力学特性の改善が見られなかった。これは、CMPRの添加によりコラーゲンの分子間相互作用によるゲル化が阻害されたと考えられる。一方、あらかじめ調製したコラーゲンゲルの架橋ではゲル化の条件は変化しないが、ゲル内部まで均一に架橋できるかが課題である。実際に得られた架橋コラーゲンゲルではほとんどのアミノ基が反応していたことより、内部まで十分架橋されていると考えられる。

CMPRで架橋したコラーゲンゲルでは力学的な強度や膨潤度などの物性が、EDC/NHS架橋コラーゲンゲルや分子可動性のないCMC架橋コラーゲンゲルと比較して大幅に向上していた。特に、軸高分子が長く、α-CD貫通率の高いCMPRでは膨潤度や力学特性に優れることを明らかにした。これは、高分子量の軸高分子を用いることで化学架橋の架橋点間距離が延長されたためであると予想される。また、CMPR-37％-35kで架橋したコラーゲンゲルは細胞の進展や増殖にも優れることが明らかになった。CMPR-37％-35kで架橋したコラーゲンゲルでは、弾性率の上昇が確認されており、このような力学的特性の違いによって細胞の早期進展や増殖性に変化が表れたと考えられる[9]。

また、CMPR-37％-35kで架橋したコラーゲン微粒子では、同様に調製したコラーゲン微粒子（10～20μm）よりも粒径が小さいものが得られた[10, 11]。コラーゲン微粒子の粒径は界面活性剤の濃度や攪拌速度によって変化する。架橋剤として添加したCMPRは親水性であり、ただちに水層に分配されると考えられるが、親水性の高分子であるため界面活性剤として機能し、粒径が小さくなったと考えられる。しかしながら、軸高分子の分子量や、あらかじめ油層に溶解した界面活性剤の濃度を詳細に検討することによって、コラーゲン微粒子の粒径は制御できると考えられる。

## 5．総　括

本研究では、分子可動性を有するポリロタキサンによるコラーゲンゲルの架橋を検討するとともに、架橋コラーゲン微粒子の調製を行った。適切な化学組成のCMPRを用いてコラーゲンゲルを架橋することで、力学特性、膨潤度、ならびに細胞接着性に優れる架橋コラーゲンゲルが得られることを明らかにした。また、本手法を利用してコラーゲン微粒子の調製に成功した。CMPR架橋コラーゲン微粒子は、化学的安定性、細胞親和性、膨潤度に優れることから化粧品成分として有用であると考えられ、今後の応用展開が期待される材料である。

**謝　辞**

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

（引用文献）

1） R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Molecules* 3, 1863-1887（2010）.

2） M. I. A. Rodríguez, L. G. R. Barroso, M. L. Sánchez. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J. Cosmet. Dermatol.* 17（1）, 20-26（2018）.

3） M. A. Awang, M. A. B. Firdaus, M. B. Busra, S. R. Chowdhury, N. R. Fadilah, W. K. Wan Hamirul, M. Y. Reusmaazran, M. Y. Aminuddin, B. H. I. Ruszymah. Cytotoxic evaluation of biomechanically improved crosslinked ovine collagen on human dermal fibroblasts. *Biomed. Mater. Eng.* 24（4）, 1715-1724（2014）.

4） D. H. Lee, A. Tamura, Y. Arisaka, N. Yui. Mechanically reinforced gelatin hydrogels by introducing slidable supramolecular cross-linkers. *Polymers* 11（11）, 1787（2019）.

5） D. H. Lee, Y. Arisaka, A. Tonegawa, T. W. Kang, A. Tamura, N. Yui. Cellular orientation on repeatedly stretching gelatin hydrogels with supramolecular cross-linkers. *Polymers* 11（12）, 2095（2019）.

6） L. F. Hart, J. E. Hertzog, P. M. Rauscher, B. W. Rawe, M. M. Tranquilli, S. J. Rowan. Material properties and applications of mechanically interlocked polymers. *Nat. Rev. Mater.* in press（2021）DOI: 10.1038/s41578-021-00278-z

7） A. B. Imran, K. Esaki, H. Gotoh, T. Seki, K. Ito, Y. Sakai, Y. Takeoka. Extremely stretchable thermosensitive hydrogels by introducing slide-ring polyrotaxane cross-linkers and ionic groups into the polymer network. *Nat. Commun.* 5, 5124（2014）.

8） J. Araki, C. Zhao, K. Ito. Efficient production of polyrotaxanes from α-cyclodextrin and poly（ethylene glycol）. *Macromolecules* 38, 7524-7527（2005）.

9） M. G. Haugh, C. M. Murphy, R. C. McKiernan, C. Altenbuchner, F. J. O'Brien. Significantly influence cell attachment, proliferation, and migration within collagen glycosaminoglycan scaffolds. *Tissue Eng.* Part A 17, 1201-1208（2011）.

10） B. Rössler, J. Kreuter, D. Scherer. Collagen microparticles: preparation and properties. *J. Microencapsul.* 12（1）, 49-57（1995）.

11） N. Nagai, N. Kumasaka, T. Kawashima, H. Kaji, M. Nishizawa, T. Abe. Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 1891-1898（2010）.

# 高分子ベシクル積層膜の秩序構造とダイナミクス

大分大学理工学部
檜垣　勇次

Polymer micelles are valid for the bio-compatible smart molecular system in the field of nanomedicine. Double zwitterionic diblock copolymers composed of a poly(carboxybetaine methacrylate) (PCB) chain and a poly(sulfobetaine methacrylate) (PSB) chain (PCB-*b*-PSB) were synthesized by radical addition fragmentation chain transfer polymerization. Well-defined diblock copolymers with narrow molecular weight distribution were systematically produced. The hydrodynamic radius of gyration of the particles produced by the PCB-*b*-PSB aggregation was determined by dynamic light scattering measurement. The PCB-*b*-PSB diblock copolymers with high molecular weight PSB block produced uniform micellar aggregates with narrow size distribution in the salt-free aqueous solution. Because the sulfobetaines show electrostatic and/or dipolar cohesive interactions to produce sulfobetaine couples in salt-free water, the PSB chains yield insoluble core with network structure to produce micellar aggregates. The micellar structure depends on the concentration of co-existing zwitterions. The PCB-*b*-PSB micellar aggregates transformed in the presence of sulfobetaine compounds, whereas the other zwitterions including glycine and taurine hardly induced the transformation of the aggregates. The zwitterion-specific structure modulation is rationalized by the complementary interaction of the zwitterions depending on the charged groups, charge density balance, and geometric form. The micellar structure transform efficiency also depends on the charge spacer length (CSL) of the sulfobetine compounds. The dissociation of PCB-*b*-PSB chains from the micellar aggregates was preferentially induced through the interactions with sulfobetaines with long CSL. The electrostatic and dipolar interactions are encouraged in the long CSL sulfobetaines because the dipole moment and charge density are augmented by separating the charges.

## 1．緒　言

両親媒性分子の媒質中における会合により形成されるミセル状分子集合体や中空球状分子集合体であるベシクルは，薬物や美容有効成分の輸送や徐放，微小反応場など，物質科学分野や医療分野における実用化の可能性から多大な注目を集めている。ベシクル内部に薬剤を直接内包した薬物内包ベシクル，ベシクルに酵素を内包した生体内反応性ベシクル，腫瘍への集積を促進するターゲッティング機能を付与したベシクルキャリアなど，数多くの機能性ベシクルが提案されている。しかしながら，脂質分子で構成されたベシクルは，構造安定性が低い上に，膜透過性が高く，選択的物質輸送に課題がある。さらに，細胞膜では内葉と外葉を構成する脂質の組成が非対称であるため膜貫通タンパク質の配向が制御されており選択的物質輸送が実現されるのに対し，脂質分子の自己集合により形成される人工ベシクルは対称構造であるため，膜構成物質の配向制御や，内層と外層の独立した膜機能の制御に課題がある[1]。一方，非対称多成分高分子鎖であるブロック共重合体の集積により構築される高分子ミセル／ベシクルは，高分子量鎖状分子の集合体であるため低分子量両親媒性分子である界面活性剤や脂質と比較して，会合体の構造安定性が高く，分子量の制御や分子鎖の部分的な修飾によって，会合体の形態と環境応答性の設計が容易である（Fig. 1）[2,3]。

正電荷と負電荷が炭化水素鎖で連結された双性イオンを側鎖に有する双性イオン高分子は，電荷と水との強い相互作用により極めて親水性が高く，実効電荷が中性であるため生体高分子を含む荷電粒子との相互作用が弱く，非特異的吸着が抑制されるため，生体適合性高分子として注目されている[4,5]。双性イオン高分子は，双性イオン構造，分子量，高分子濃度に応じて多様な自己集合特性を示す。ポリカルボキシベタイン（PCB）は水中で高度に水和して溶解する。一方，ポリスルホベタイン（PSB）は水中でスルホベ

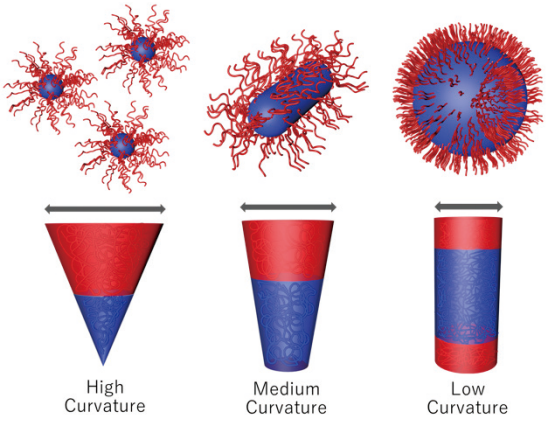



Fig. 1 Schematic representations of aggregate geometry depending on the volume fraction of block copolymer components.



Ordered Structure and Dynamics of Polymer Vesicle Multi-Layered Films
Yuji Higaki
Faculty of Science and Technology, Oita University

タイン基同士の相互作用により凝集する。スルホベタイン凝集体はイオンにより相互作用が遮蔽されるため，電解質水溶液中では分子鎖が解離する[6]。したがって，双性イオン高分子を適切に分子設計することで，ブロック共重合体の固体表面への集積とナノメートルスケールの秩序構造形成の制御が実現され，隔離された層に局在化した内包分子が計画的に徐放される積層ラメラ膜が構築されると着想した。

そこで本研究では，PCBとPSBで構成される双性イオン高分子ブロック共重合体（PCB-*b*-PSB）が固体表面で形成する高分子構造体の秩序構造とそのダイナミクスの解明を目的とした。PCB-*b*-PSBの合成，PCB-*b*-PSBが水溶液中で形成する高分子会合体の構造と環境応答性形態変化の解明まで研究が進捗したので，研究成果を報告する。

## 2．方　法

### 2. 1. PCB-*b*-PSB双性イオン高分子ブロック共重合体の合成

可逆的付加開裂連鎖移動（RAFT）重合により，PCB高分子連鎖移動剤（PCB Macro-CTA）を合成した。PCB Macro-CTAよりPSB鎖をRAFT重合によって鎖延長することでPCB-*b*-PSBを合成した（Fig. 2）[7]。反応溶液を透析精製した後，溶液をメタノールに滴下し，沈殿物を遠心分離により回収した。

合成したブロック共重合体のPCB/PSB組成は$^1$H-NMR測定，数平均分子量（$M_n$）と分子量分布（$M_w/M_n$）はGPC測定により計測した。$^1$H-NMR測定は，AVANCE-III 400（Bruker Co., Ltd.）を用い，室温，400 MHzで測定した。重溶媒には200 mM NaCl重水溶液を用いた。GPC測定は，島津製作所製高速液体クロマトグラフィーシステムを用い，TSKgel G5000PWXLとTSKgel G3000PWXLを連結したカラムを用いて，溶離液を200 mM NaCl水溶液とし，流速0.6 mL/min，カラムオーブン温度40℃で測定した。ポリエチレンオキシド標準試料でキャリブレーションした。

### 2. 2. PCB-*b*-PSB水溶液中における会合体構造の解析

動的光散乱（DLS）測定は，Zetasizer Nano ZS（Malvern）にて，He-Neレーザー（波長633 nm）を用い，測定温度25℃，測定角度173°で行った。溶液のPCB-*b*-PSB濃度は1.0 mg/mLとし，孔径0.20 μmの親水化PTFEフィルター（Advantec, HP020AN）で濾過して測定に供した。散乱光強度の自己相関関数から計測した緩和時間より算出した剛体球の拡散係数より，Stokes-Einstein式に基づき流体力学的半径（$R_h$）を求めた。

## 3．結果・考察

### 3. 1. PCB-*b*-PSB双性イオン高分子ブロック共重合体の合成

合成したPCB Macro-CTAとPCB-*b*-PSBのGPC測定により計測した数平均分子量（$M_{n,\,GPC}$）と分子量分布（$M_w/M_{n,\,GPC}$），$^1$H-NMR測定により計測したPSB鎖の重合度に基づき算出した数平均分子量（$M_{n,\,NMR}$），PCB鎖とPSB鎖の重合度から算出したブロック共重合体の重合度比をTable 1に示す。PCB Macro-CTAの分子量分布は十分に狭く，高度に分子量制御された高分子鎖が得られた。PCB

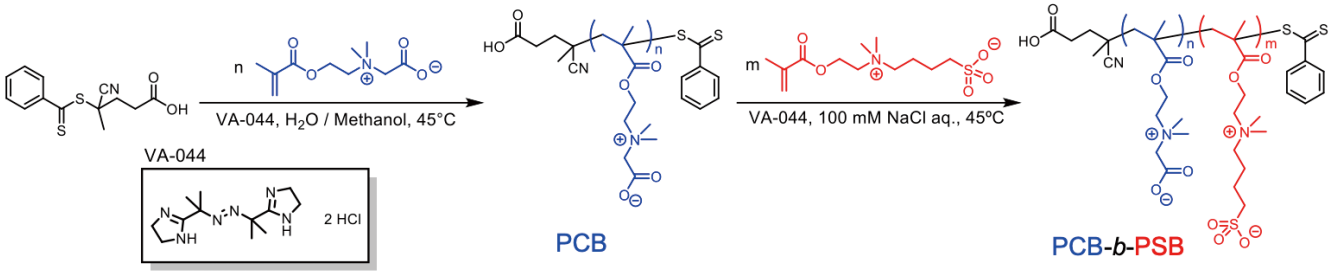



Fig. 2　Preparation of the PCB Macro-CTA and PCB-*b*-PSB diblock copolymers

Table 1　Characteristics of the PCB Macro-CTA and PCB-*b*-PSB diblock copolymers

| Sample | $M_{n,\,GPC}$ [a] | $M_w/M_{n,\,GPC}$ [a] | $M_{n,\,NMR}$ [b] | PCB/PSB$_{NMR}$ [b] |
|---|---|---|---|---|
| $PCB_{43}$ Macro-CTA | 9,500 | 1.11 | – | – |
| $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{40}$ | 21,100 | 1.11 | 21,200 | 1/0.93 |
| $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{100}$ | 32,100 | 1.10 | 38,800 | 1/2.33 |
| $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{166}$ | 55,800 | 1.08 | 58,200 | 1/3.86 |

[a] The data were determined by GPC measurements, [b] The data were determined by the integration of $^1$H-NMR signals assigned to methyl protons of quaternary ammonium cations.

Macro-CTAをRAFT重合で鎖延長してPSB鎖の分子量を制御することでPCB/PSB組成比の異なるPCB-*b*-PSBブロック共重合体を系統的に合成した。PCB-*b*-PSBの$^1$H-NMRスペクトルには，PCBの四級アンモニウムカチオンメチル基(3.35ppm)とPSBの四級アンモニウムカチオンメチル基(3.24ppm)に帰属されるシグナルがそれぞれ観測され，それらの積分比よりPSB鎖の重合度を算出してPCB-*b*-PSBの数平均分子量を算出した($M_{n,NMR}$)。$M_{n,GPC}$と$M_{n,NMR}$がよく対応しており，GPC測定で計測された分子量，分子量分布は十分に正確であると考えられる。

## 3. 2. PCB-*b*-PSB水溶液中における会合体構造の解析【分子構造依存性】

$PCB_{43}$-*b*-$PSB_{166}$は純水中で$R_h$=40.5nmの粒径分布の狭い均質な会合体を形成した(Fig. 3(a))。ブロック共重合体を構成するPCB鎖とPSB鎖は共に親水性であるが，PSBは水中で側鎖のスルホベタイン基同士が静電的相互作用，あるいは双極子相互作用により凝集する。したがって，PCB-*b*-PSBはPSB鎖が凝集したコアを形成し，PCB鎖が水和膨潤したシェルを形成することにより，コアシェル型球状会合体を形成していると考えられる。透過型電子顕微鏡による相補的な解析が必要であるが，ブロック共重合体が形成する高分子ベシクルは，$R_h$>100nmとなることが多いため，計測されている会合体はミセル状会合体であると解釈している。

一方，PSB組成比の低い$PCB_{43}$-*b*-$PSB_{100}$と$PCB_{43}$-*b*-$PSB_{40}$は，会合体由来のシグナルと単分子鎖由来のシグナルがそれぞれ観測された(Fig. 3(b), (c))。PSBの重合度が低下すると，分子鎖間で相互作用するスルホベタイン基の数が減少するため，会合駆動力が低下する。したがって，孤立分子鎖に相当する$R_h \fallingdotseq 4$nmの散乱体が発生していると推測する。また，PCBとPSBの重合度が同等である$PCB_{43}$-*b*-$PSB_{40}$では，ブロック共重合体の分子量が小さいにもかかわらず，会合体のRhが大きくなった。PCB鎖とPSB鎖の体積比が均等になるとブロック共重合体凝集体の界面曲率が低下して二分子膜状の会合体を形成する。すなわち，ミセル状会合体からベシクル状会合体への構造転移を起こしていると考えられる。あるいは，PCB鎖とPSB鎖の界面曲率が低下したために会合数が増大していると解釈することもできる。ただし，$R_h$が小さいほど散乱光強度が弱いため，大部分の分子鎖は孤立鎖として存在している。

$PCB_{43}$-*b*-$PSB_{166}$，$PCB_{43}$-*b*-$PSB_{100}$は純水中でミセル状会合体を形成していたが，塩濃度の増加に伴い，分子鎖が会合体から脱離した(Fig. 4(a), (b))。PSB側鎖のスルホベタイン基間相互作用が水溶液中のイオンにより阻害されるためであると考えられる。一方，$PCB_{43}$-*b*-$PSB_{40}$は会合形態の変化がみられなかった(Fig. 4(c))。二分子膜状会合体は球状会合体と比較して分子鎖の狭雑によるエントロピー損失が小さいことに加え，PSB分子鎖の分子量が低いためイオンによる会合阻害の影響が低かったと考えられる。

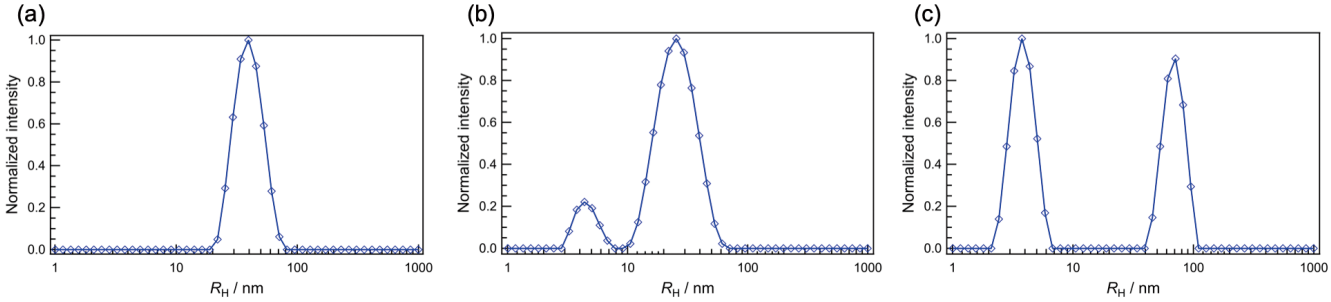



Fig. 3 $R_h$ distributions of (a) $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{166}$, (b) $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{100}$, (c) $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{40}$ aggregates in salt-free water.

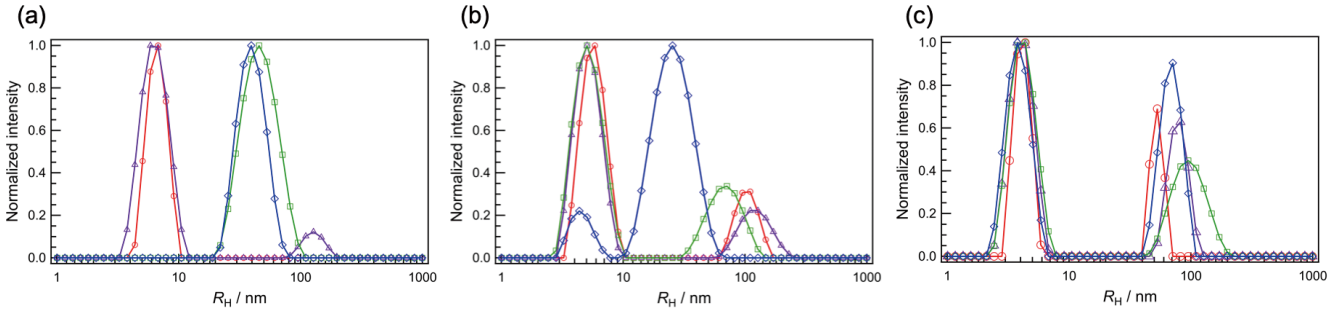



Fig. 4 $R_h$ distributions of (a) $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{166}$, (b) $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{100}$, (c) $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{40}$ aggregates in salt-free water (blue), 10mM NaCl aq. (green), and 100mM NaCl aq. (red).

### 3. 3. PCB-*b*-PSB水溶液中における会合体構造の解析【双性イオン選択的相互作用】

双性イオン高分子PCB-*b*-PSBは，スルホベタイン基が選択的に会合することでミセル状会合体を形成する。すなわち，スルホベタイン，カルボキシベタインは双性イオン選択的に会合し分子構造体を形成している。したがって，この分子組織体は共存する双性イオンの構造に応じて構造変化が誘導されると考えられる。

純水中で最も均質な会合体を形成する$PCB_{43}$-*b*-$PSB_{166}$について双性イオン特異的な会合形態変化を研究した。実験に用いた双性イオンの構造をFig. 5に示す。$PCB_{43}$-*b*-$PSB_{166}$が形成する$R_h$=40.5 nmの均質会合体の形態は，共存するスルホベタイン(SB4)の濃度増大に応じて不安定化，粗大化し，孤立鎖に解離した(Fig. 6)。PSB側鎖のスルホベタイン基と溶液中に存在するSB4が相互作用するため，スルホベタイン側鎖間の凝集が解離することでPCB-*b*-PSBの会合が阻害されたと考える(Fig. 7)。また，電荷間スペーサー炭素数6のスルホベタインが最も効果的に会合を阻害した(Fig. 8)。電荷間距離が離れているため双極子モーメントが大きく，分子形態の自由度が高いことに加え，

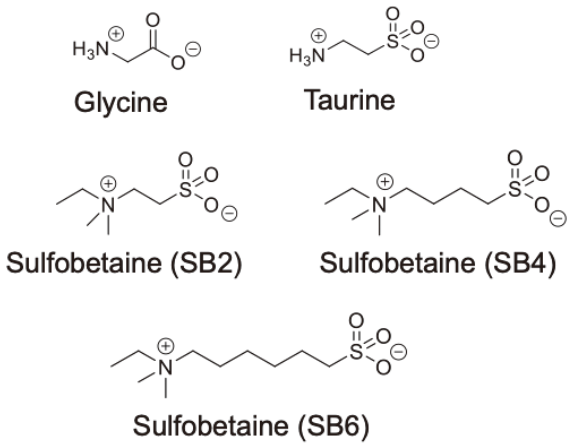



Fig. 5 Chemical structure of zwitterions employed in this study.

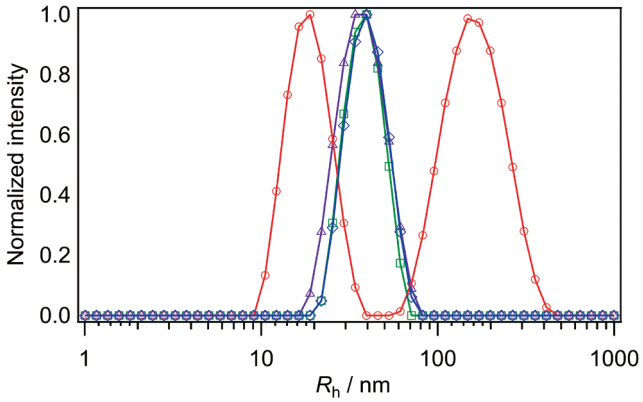



Fig. 6 $R_h$ distributions of $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{166}$ in (a) salt-free water (blue), (b) 10 mM SB4 aq. (green), (c) 100 mM SB4 aq. (purple), and (d) 1000 mM SB4 aq. (red).

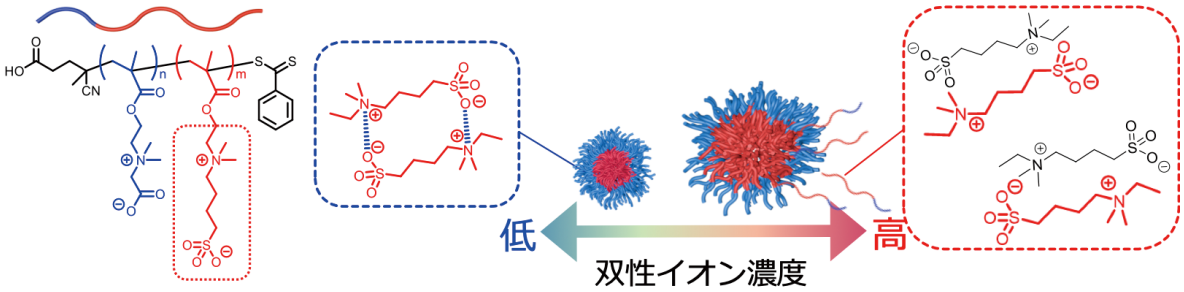



Fig. 7 Schematic representation of PCB-*b*-PSB aggregate form variation through the association and dissociation of zwitterions depending on the co-existing zwitterion species and the concentration.

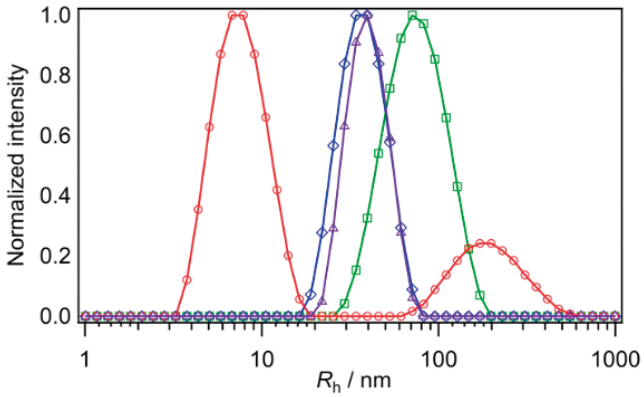



Fig. 8 $R_h$ distributions of $PCB_{43}$-*b*-$PSB_{166}$ in (a) salt-free water (blue), (b) 100 mM SB2 aq. (green), (c) 100 mM SB4 aq. (purple), and (d) 100 mM SB6 aq. (red).

正電荷と負電荷が干渉しないため電荷密度が高く，電荷間の相互作用が強く働くためであると考える。一方，グリシン水溶液とタウリン水溶液では会合体の形態変化は誘導されなかった。グリシンとタウリンはスルホベタインと同じく双性イオンであるが，電荷部位の構造，電荷間距離，電荷密度についてスルホベタインとの対称性が低く，スルホベタイン基の会合が阻害されないためであると考える。すなわち，PCB-*b*-PSB会合体の形態は共存する双性イオンとの双性イオン特異的な相互作用により大きく変化することが示された。

## 4．総　括

合成したPCB-*b*-PSB双性イオン高分子ブロック共重合体は，ブロック共重合体の分子量とPCB/PSB組成比に応じて水溶液中で多様な形態の会合体を形成することが明らかとなった。両双性イオン高分子ブロック共重合体は，双性イオン高分子鎖における水溶性の非対称性と環境応答性を利用した新たな会合性高分子群として位置づけられる。本研究の目的である固体表面に集積したブロック共重合体会合体の秩序構造とそのダイナミクスの解明のため，固体表面に吸着したブロック共重合体が形成する構造を中性子反射率測定[8]，相互作用ポテンシャルを反射干渉顕微鏡[9]により計測する実験をそれぞれ実施する予定である。今年度は，感染症拡大による移動制限のため当初計画していた中性子反射率測定による吸着膜の構造解析，および反射干渉顕微鏡実験を実施することができなかった。

**謝　辞**

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

また，本研究は当研究室の清水 茜 氏の尽力によるものであり，動的光散乱測定装置を用いた研究にあたり一二三 恵美 教授（大分大学全学研究推進機構）にご協力いただきました。この場をお借りいたしまして厚く御礼申し上げます。

**（引用文献）**

1）Peyret, A.; Zhao, H.; Lecommandoux, S., Preparation and Properties of Asymmetric Synthetic Membranes Based on Lipid and Polymer Self-Assembly. *Langmuir* **2018**, *34*, 3376-3385.

2）Blanazs, A.; Armes, S. P.; Ryan, A. J., Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 267-277.

3）Cabral, H.; Miyata, K.; Osada, K.; Kataoka, K., Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 6844-6892.

4）Shao, Q.; Jiang, S., Molecular Understanding and Design of Zwitterionic Materials. *Adv. Mater.* **2014**, *27*, 15-26.

5）Paschke, S.; Lienkamp, K., Polyzwitterions: From Surface Properties and Bioactivity Profiles to Biomedical Applications. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2*, 129-151.

6）Shao, Q.; Mi, L.; Han, X.; Bai, T.; Liu, S.; Li, Y.; Jiang, S., Differences in Cationic and Anionic Charge Densities Dictate Zwitterionic Associations and Stimuli Responses. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 6956-6962.

7）Lim, J.; Matsuoka, H.; Yusa, S.; Saruwatari, Y., Temperature-Responsive Behavior of Double Hydrophilic Carboxy-Sulfobetaine Block Copolymers and Their Self-Assemblies in Water. *Langmuir* **2019**, *35*, 1571-1582.

8）Higaki, Y.; Kobayashi, M.; Takahara, A., Hydration State Variation of Polyzwitterion Brushes through Interplay with Ions. *Langmuir* **2020**, *36*, 9015-9024.

9）Higaki, Y.; Fröhlich, B.; Yamamoto, A.; Murakami, R.; Kaneko, M.; Takahara, A.; Tanaka, M., Ion-Specific Modulation of Interfacial Interaction Potentials between Solid Substrates and Cell-Sized Particles Mediated via Zwitterionic, Super-Hydrophilic Poly（sulfobetaine）Brushes. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 1396-1404.

# 強紫外光が照射された部位選択的な治療を可能とする分子システムの開発

大阪薬科大学
平野　智也

Methods utilizing the irradiation of light are powerful tools for various fields of scientific research, as well as in industry and in medical application, because they enable non-invasive and spatio-temporal control. In those methods, the molecules, whose functions such as emission of light and cleavage of covalent bonds have been utilized. Coumarin has been utilized as a core structure of those photofunctional molecules, such as fluorescent sensors and photoremovable protecting groups. Here, we have developed photoremovable protecting groups that could function under a specific condition, that is, a specific range of pH or the presence of hydrogen peroxide, respectively, derived from coumarin-based fluorescent sensors. Those groups could potentially be utilized in photo-releasing a drug selectively around diseased tissues.

## 1．緒　言

光は植物における生合成だけでなく、ヒトにおいても活性型ビタミンDの生合成などの生理機能において必須である。その一方で、過剰な光、特に紫外線の照射は活性酸素種の産生を引きおこし、皮膚への障害、シミなどだけでなく、がんなどの疾患の要因にもなる。そのため、有害な量の紫外光を防ぐ、もしくは障害を予防、治癒する機能を持つ分子は有用となる。一方、光分解性保護基とは、特定の波長の光照射により共有結合の切断がおこる分子団である。光分解性保護基をcAMP、グルタミン酸などの生理活性分子に導入した分子はCaged化合物と呼ばれる。Caged化合物は任意の部位、タイミングでの光照射によって、生理活性分子を生成させることを可能とするため、様々な生物学研究において用いられてきた。本研究では、こうした光分解性保護基の光分解反応を制御することにより、弱酸性や活性酸素種存在下などの特定の環境選択的に機能する光分解性保護基の開発を行った。開発した光分解性保護基を、生理活性、治療効果がある分子と組み合わせたCaged化合物は、疾患組織選択的に活性分子を光放出する分子システムとなる（図1）。例えば、強紫外光によって活性酸素が生成している部位選択的に機能する光分解性保護基は、光による障害がおきている部位選択的な治療、保護を可能とする分子システムになりえる。



Development of molecular system for the treatment of the area irradiated by strong ultraviolet light
Tomoya Hirano
Osaka University of Pharmaceutical Sciences

## 2．特定のpH領域で機能する光分解性保護基の開発

### 2. 1. 方　法

特定の環境選択的な光分解性保護基としてまず、特定のpH領域で機能する光分解性保護基の開発を行った。生体内におけるpHは、エンドソーム、リソソーム、ミトコンドリアなどの細胞内小器官ごとに異なるだけでなく、がん組織近傍においては弱酸性になるなど、細胞、組織の状態に応じても変化する。そのため、特定のpH選択的に機能する光分解性保護基は、生理機能解析および、図1に示す分子システムの構築に有用となる。

図2に示すBhcは、光分解性保護基として汎用されている分子団である。我々はこれまで、Bhcの母核であるクマリン骨格を持つ、様々な蛍光センサーを開発してきた[1)]。その結果、pHの変化に伴い、蛍光強度がOFF-ON-OFFと変化する蛍光センサー1などを開発した[2, 3)]。pHの変化に伴い、蛍光強度がOFF-ONと変化する蛍光センサーはこれまで数多く開発され、様々な生理機能解析に応用されてきた。その一方で、OFF-ON型のセンサーは、例えばpH6以下の環境を検出することはできるものの、pHがさらに低下した環境とを識別することができない。一方、1などのOFF-ON-OFF型の変化を示し、特定のpH領域を検出する蛍光センサーはこうした問題を解決した有用なセンサーとなりえる。我々は、センサーの機能を光分解性保護基に付与することができれば、特定のpH領域で機能する光分解性保護基になりえると考えた。具体的には図2に示すように、センサー1とBhcの構造要素を組み合わせた化合物群2をデザインした。これらの化合物を合成し、pHを変化させた際の光分解反応効率をHPLCにより解析した。

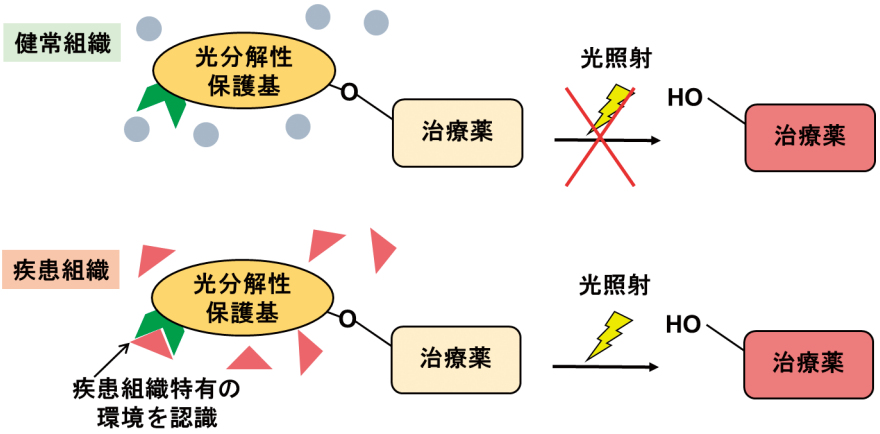



図１　本研究で開発を目指す分子システムの概要

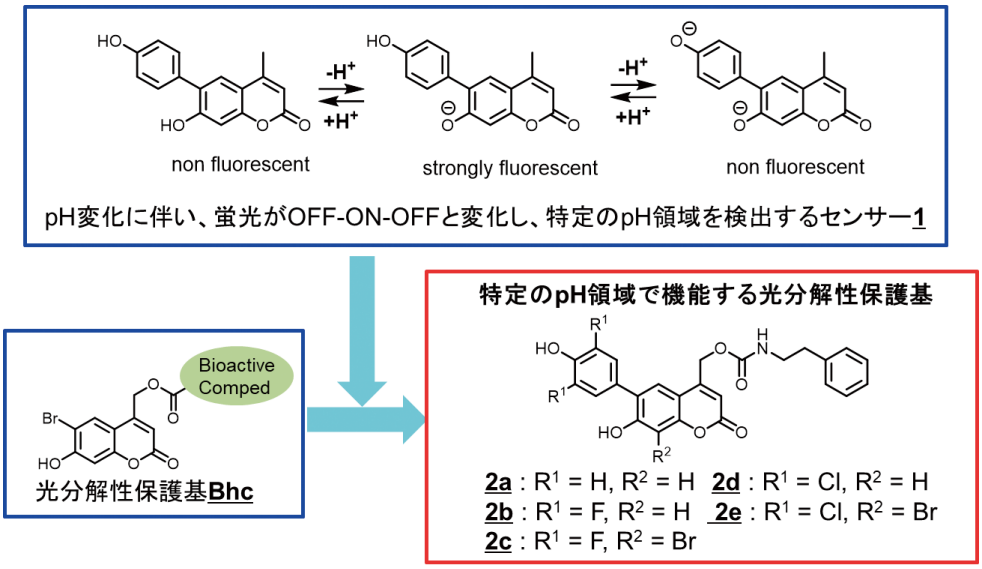



図２　特定の pH 領域選択的に機能する光分解性保護基のデザイン

### 2. 2. 結果と考察

合成した 2 の機能を解析した結果、いくつかの化合物において、pH が増大するのに伴い、光分解反応効率が OFF-ON-OFF と変化することが明らかとなった[4]。例えば、2a は pH3、pH6 では光分解反応がおこらないが、pH9 では反応が進行し、pH12 では進行しない（図 3）。さらに光分解反応がおこる pH は、導入したハロゲン原子の数、位置に応じて変化することも明らかとなった。すなわち、2 つの塩素原子と 1 個の臭素原子を有する 2e では、pH3 では光分解反応がおこらないが、pH6 では進行し、pH9 ではおこらなかった。図 2 に示すように蛍光センサー 1 の蛍光強度変化は、二つの水酸基の脱プロトン化による制御される。すなわち、7 位の水酸基が脱プロトン化されたモノアニオン型で強い蛍光を持つが、6 位に導入したフェノール性水酸基も脱プロトン化され、ジアニオン型となると蛍光を失う。化合物群 2 においても同様の脱プロトン化がおこり、モノアニオン型となったときに光分解反応が進行すると考えられる。また、モノアニオン型が存在する pH は、二つの水酸基の $pK_a$ を変化させるハロゲン原子によって調整される。すなわち、2a では pH9、2e では pH6 と、光分解反応がおこる pH が変化したと考えられる。開発した光分解性保護基の中でも 2e は、pH6 というがん組織近傍で見られる環境で光分解反応がおこるため、がん選択的に治療薬を光放出する分子システムに応用できると考えられる。

## 3．活性酸素種存在下で機能する光分解性保護基の開発

### 3. 1. 方　法

活性酸素種は、生体に対して障害を与える因子としてだけでなく、生体内でのシグナル伝達分子として機能するなど多様な作用を持つ。そのため、活性酸素種存在下で機能する光分解性保護基は、生理作用解析のみならず、図 1 に示したような、活性酸素が関与する疾患の治療、保護に有

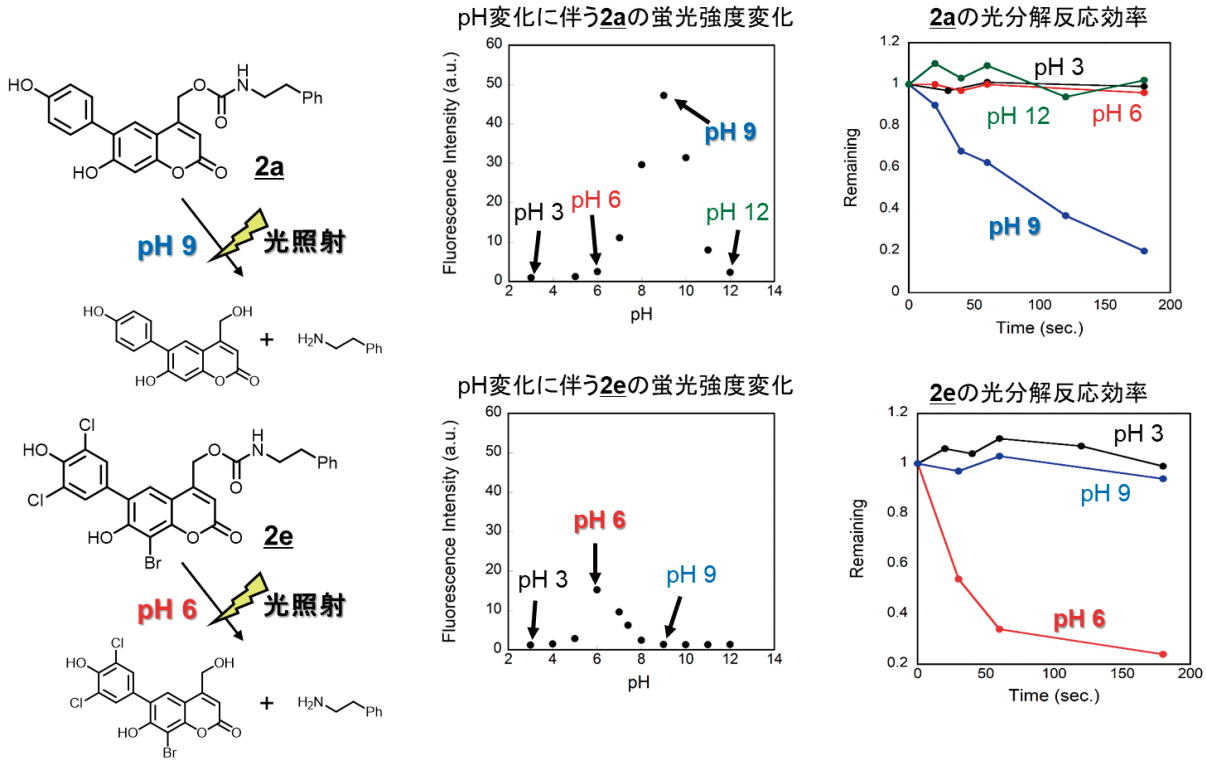



図３　化合物 2 の機能解析

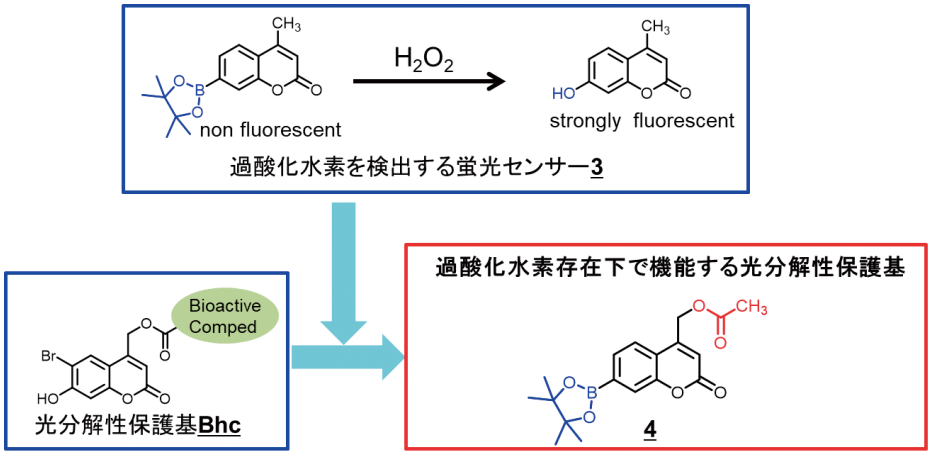



図４　過酸化水素存在下で機能する光分解性保護基のデザイン

用な分子システムに用いることができる。我々は、活性酸素種の中でも過酸化水素に着目し、2 節で述べた研究と同様の戦略、すなわち蛍光センサーと Bhc の構造要素を組み合わせることによって、過酸化水素存在下で機能する光分解性保護基の開発を行った。これまでに報告されている過酸化水素を検出する蛍光センサーにおいては、ボロン酸ピナコールエステルが過酸化水素により水酸基へと変換される反応が利用されている。我々は本反応をクマリン骨格に応用することにより、過酸化水素を検出する蛍光センサー 3 を開発していた（図 4）。そこで、この蛍光センサーと光分解性保護基の構造要素を組み合わせた化合物 4 を合成し、その機能を解析した。

## 3. 2. 結果と考察

種々の活性酸素存在下における、化合物 4 の光分解反応効率を解析した結果を図 5 に示す。検討した活性酸素種の中で、過酸化水素存在下において、水酸基への構造変化と光分解反応によって生成する化合物 6 が、最も高収率で得られた。選択性において改善の余地があるものの、化合物 4 は過酸化水素存在下で機能する光分解性保護基になりえることが明らかとなった。

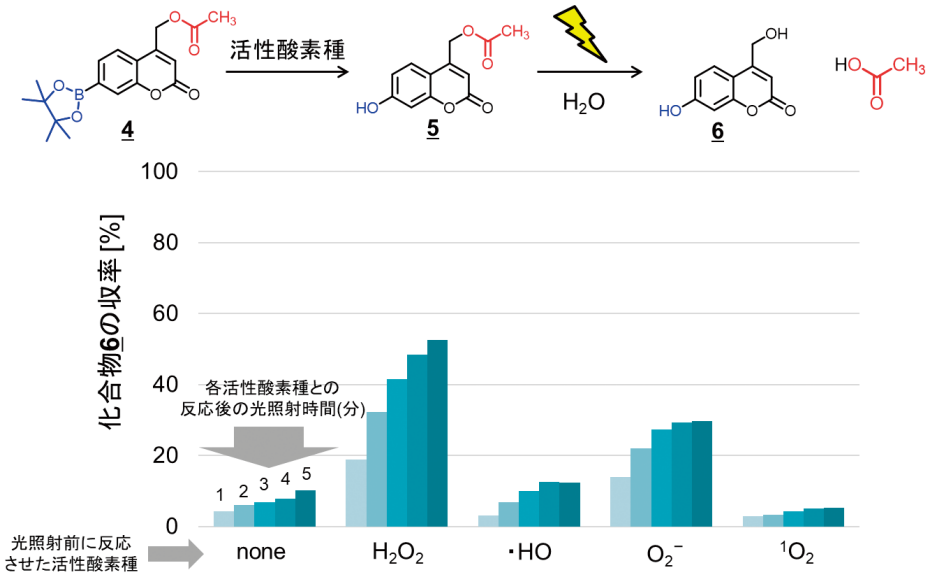



図５　化合物 4 の機能解析

## ４．総　括

本研究により我々は、蛍光センサーの構造とクマリン骨格を基に、特定のpH領域または過酸化水素存在下で機能する光分解性保護基の開発に成功した。蛍光センサーの開発は現在、世界中で爆発的に進行しており、多種、多様のセンサーが報告されている。本研究の戦略にこうしたセンサーを用いることによって、個々の疾患特有の環境選択的に機能する光分解性保護基の開発は可能になると考えられる。こうした研究成果は、光を利用した治療、予防を行うための新たな分子システム開発の基盤となる。

（引用文献）

1）Shiraishi T, Kagechika H, Hirano T: 6-Arylcoumarins: versatile scaffolds for fluorescent sensors. New J Chem 39: 8389-8396, 2015

2）Shiraishi T, Saito T, Kagechika H, Hirano T: Development of a novel fluorescent sensor to detect a specific range of pH. Tetrahedron Lett 55: 6784-6786, 2014

3）Hirano T, Noji Y, Shiraishi T, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H: Development of an 'OFF-ON-OFF' fluorescent pH sensor suitable for the study of intracellular pH. Tetrahedron 72: 4925-4930, 2016

4）Kato D, Shiraishi T, Kagechika H, Hirano T: 6-Arylcoumarin as a Scaffold of Photofunctional Molecules with OFF-ON-OFF Type Regulation. J Org Chem 86: 2264-2270, 2021

# 化粧品原料微粒子の液中での分散・凝集状態評価技術の開発

法政大学生命科学部
森　隆昌

It is important to characterize and control the particles dispersion state in slurries in order to obtain the products with desirable properties. Thus, the particles dispersion state in various aqueous slurries were investigated by using the hydrostatic pressure measurement and the osmotic pressure measurement. The particles dispersion state in slurries were changed by adding a dispersant or controlling the slurry pH value. For the hydrostatic pressure measurement, the particle dispersion state of not only spherical particles but also irregular shaped particles such as platy $ZrO_2$, could be successfully evaluated. It was shown that the packing fraction of green body had a good connection not to the apparent viscosity and the median diameter of particle size distribution, but to the settling time determined by hydrostatic pressure measurement. For the osmotic pressure measurement, it was demonstrated that the amount of coarse particle that simulated the aggregates in the nano particle slurry could be estimated from the osmotic pressure change. It was also found that the nano composite with relatively homogeneous microstructure could be obtained from the well-dispersed nano particles slurry which displayed relatively large osmotic pressure.

## 1．緒　言

化粧品製造分野において、原料粒子の液中での分散・凝集状態は、製品の性能を決定づける重要な因子であり、製品の更なる高性能化のためには、これまで以上に高度に制御しなければならない。例えば、光学特性に優れる板状粒子や、一次粒子径が100nm以下のいわゆるナノ粒子が用いられているが、これらは粒子が分散している状態で使用されることではじめて優れた特性を発揮することができる。液中での粒子の分散状態を高度に制御するためには、まず、液中での粒子の分散状態を的確に評価できなければならない。さらに、最終製品がスラリーではなく、スラリーを成形して製品を得る場合においては、スラリーの充填性を合わせて評価できることが求められる。最適な分散剤や表面修飾剤の決定、添加量の決定などはいずれも的確な粒子分散状態・充填性の評価がなければ、本当の意味で最適条件を決定できたことにならないからである。

そこで本研究では、化粧品原料微粒子の液中での分散・凝集状態を的確に評価できる技術及びそれを実現する装置を開発する。化粧品原料微粒子の中でも特に評価が難しい、

(1) 不規則形状粒子

(2) ナノ粒子

の液中での分散・凝集状態を的確に評価できる技術及び装置の開発を目指す。まず不規則形状粒子の分散状態評価では、我々の独自技術である沈降静水圧測定法[1]（すでに商品化し、現在㈱JHGSよりHYSTAPという商品名で販売中）を、ナノ粒子の分散状態評価では、やはり我々の独自技術である浸透圧測定法[2]（特許第5723735号）を用いて、それぞれを化粧品原料微粒子（不規則形状粒子及びナノ粒子）に適した形に最適化し、評価技術・装置を確立する。スラリーの様々な「圧力」に注目することで、既存の評価方法よりも的確に分散状態が評価できることを示す。



Development of evaluation technique of particles dispersion and aggregation state in liquid for cosmetic powders

Takamasa Mori

Faculty of Bioscience and Applied Chemistry, Hosei University

## 2．方　法

### 2．1．不規則形状粒子スラリーの沈降静水圧測定

試料粉体は長さ1μmに対して0.3μm程度の厚みを持つ六角板状の酸化亜鉛（堺化学工業株式会社、XZ-1000）を用いた。粒子の等電点はpH9.8、粒子密度は5.6g・$cm^{-3}$である。

まずZnOが粒子体積濃度20vol%となるようにZnO、分散剤（ポリカルボン酸アンモニウム、以下PCAと略記）、イオン交換水を混合し、1hボールミル処理した。PCA添加量は0.48，0.50，0.55，0.60，0.70 mg･$g^{-1}$ ZnOとした。その後スラリーを分離回収し、5min真空脱泡を行ったものを試験用スラリーとした。

試験用スラリーは、沈降静水圧測定、見かけ粘度測定、粒子径分布測定（レーザー回折散乱法、X線透過型）で評価した。沈降静水圧測定は図1に示すように、粒子の沈降に伴う静水圧減少速度を測定するもので、静水圧の減少速度の大小から粒子の分散状態が評価できる。粘度測定はコーンプレート型レオメーターで見かけ粘度を測定した。粒子径分布測定ではスラリーを希釈し、異なる原理の評価装置でそれぞれ粒子径分布を測定した。さらに調製した試験用スラリーを石膏板上に置いた樹脂製の型に流し込み成形し、成形体充填率をアルキメデス法で求めた。

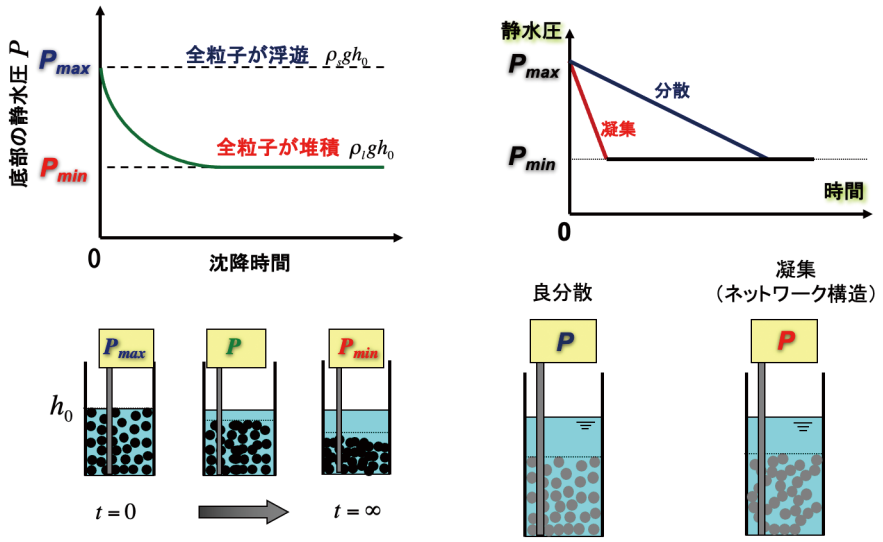



図１　沈降静水圧測定の原理

## 2. 2. ナノ粒子スラリーの浸透圧測定

$ZrO_2$ナノ粒子スラリー（ZR-30BFN、日産化学工業、粒子径15nm）に凝集体に見立てた$ZrO_2$粗大粒子（SPZ、第一稀元素化学工業、粒子径1.5~2.5μm）を添加後、スラリー中の総$ZrO_2$濃度が7vol%になるまでイオン交換水で添加し、超音波バスで10分間分散処理した。粗大粒子の割合はナノ粒子スラリー中に含まれる$ZrO_2$粒子に対し、質量割合で99：1～50：50とした。

図2に浸透圧測定装置の概要を示す。スラリーと分散媒を隔てる半透膜として、限外濾過膜（PLHK04710、Merck、分画分子量100000）を用いた。まずはじめに、分散媒室にスラリーと同じpHのNaOH水溶液を注入し、バルブを閉め、密閉した。その後、スラリー室にスラリーを注入し、分散媒室に接続した圧力センサーで浸透圧を15時間測定した。さらに、スラリー中粒子の粒子径分布を動的光散乱式粒径分布測定装置（堀場製作所、LB-550）を用いて測定した。

またナノ粒子スラリーの浸透圧測定結果の有効性を検証するために、ナノコンポジットの微構造と浸透圧の関係を調査した。$SiO_2$ナノ粒子スラリー（ST-40、日産化学工業、15vol%、粒子径10-15nm、pH10.1）にHCl、NaOHを添加することでpH調整を行い、分散･凝集状態を変化させた。調製したスラリーの浸透圧を測定するとともに、以下の手順でナノコンポジットを作製した。アクリレート系ラテックススラリー（LX857X2、日本ゼオン、粒子径200nm）のpHをナノ粒子スラリーと同一に調整した後、アクリレート系ラテックススラリーに$SiO_2$ナノ粒子スラリーを5wt%の割合で添加し、400rpm撹拌下で10min混合した。混合したスラリーをテフロン製シャーレに膜厚500μmになる量だけ滴下し、室温で24h乾燥させた。得られた膜

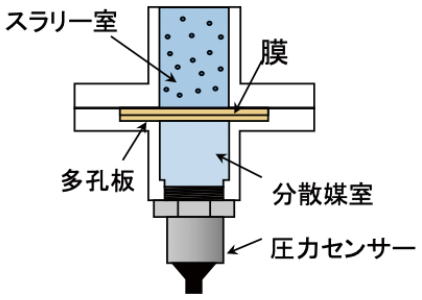



図２　ナノ粒子スラリーの浸透圧測定装置概要

を80℃でさらに12h静置した。

作製したナノコンポジットの粒子配列微構造を、走査型電子顕微鏡（SU8020、日立ハイテクノロジーズ）を用いて観察した。

## 3．結果及び考察

### 3. 1. 不規則形状粒子スラリーの沈降静水圧測定結果

図3にPCA添加量に対する成形体充填率を示す。PCAの添加量が増加するとともにPCA吸着量が増加し、PCAの立体障害及び静電反発力が大きくなったため、PCA添加量とともに成形体充填率が向上したと考えられる。

図4に見かけ粘度と成形体充填率の関係を示す。従来、見かけ粘度は粒子分散の指標とされており、粒子が分散するほど見かけ粘度は低下し、成形体充填率は向上すると言われてきたが、この粒子に関してはそのような関係は見られない。成形プロセスはスラリーの濃縮・乾燥過程であるため、粒子濃度一定条件で評価する見かけ粘度では結果が一致しないと考えられる。

図5、6に粒子径分布測定結果から得られたメジアン径と成形体充填率の関係を示す。粒子が凝集しているスラリ

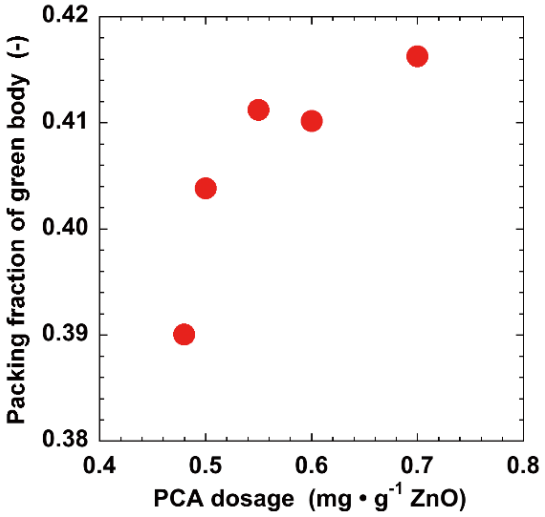



図３　PCA 添加量に対する成形体充填率の変化

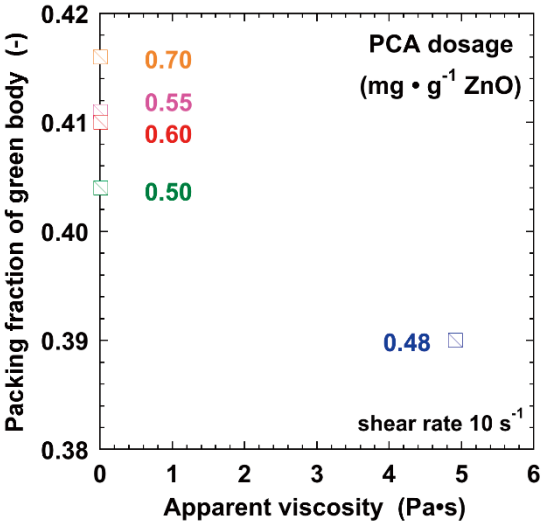



図４　スラリーの見かけ粘度と成形体充填率の関係

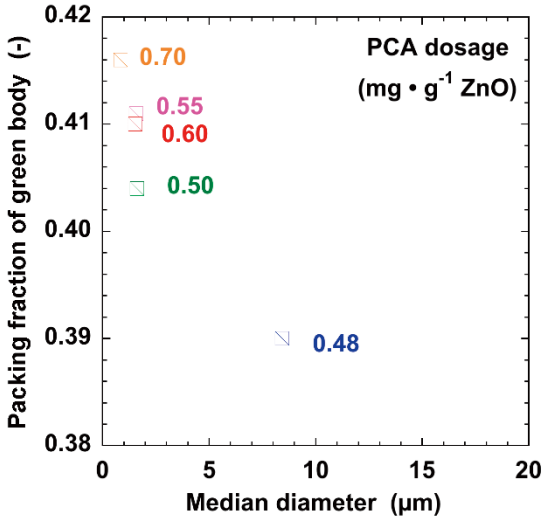



図５　メジアン径（レーザー回折）と成形体充填率

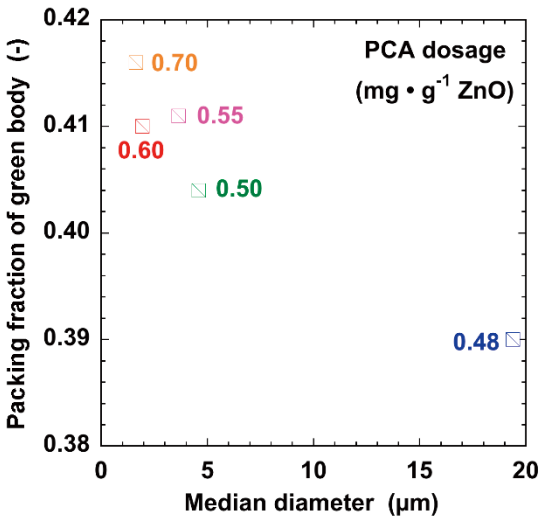



図６　メジアン径（X 線透過）と成形体充填率

ーほどメジアン径は大きくなるため、メジアン径が小さいスラリーの方が成形体充填率は大きくなると考えられる。図を見ると概ね粒子径が大きくなると成形体充填率が低下していると見ることはできるが、精度はそれほど高いとは言えない。これは濃厚系スラリーの場合、既存の粒子径分布測定装置で粒子径分布を測定するためには相当に希釈しなければならないことに原因があると考えられる。希釈操作によって凝集体がほぐれること、希釈後は粒子間距離が広がるため粒子の衝突頻度が低下し凝集しにくいことから、全体的にメジアン径は小さくなる方にシフトすることが懸念され、その結果、希釈前のスラリーでは粒子分散状態に差があっても、粒子径分布にその差が現れない場合があると考えられる。特にレーザー回折ではＸ線透過に比べさらに希釈を必要とするため希釈による分散の影響が大きく、メジアン径がほぼ等しいスラリーでも成形体充填率には違いが現れたと考えられる。さらに、レーザー回折散乱式の粒子径分布測定装置の場合（図５）は、粒子形状が不規則な場合は測定結果の再現性に影響が出るため、今回のような不規則形状粒子の場合は特に評価が難しいと考えられる。

図７に沈降静水圧測定の結果得られた沈降終了時間と成形体充填率の関係を示す。同一原料の場合、粒子が分散しているほど沈降終了までの時間は長くなる。さらに沈降試験では、粒子濃度が見かけ上増加していく濃縮過程であるため、濃縮過程における粒子分散の違いを評価することができ、これはすなわちスラリーの充填性を評価していることに相当する。図からわかるように沈降終了までの時間が長い充填性の良いスラリーほど成形体充填率が大きくなっていることがわかり、沈降静水圧測定が最も成形体充填率を的確に予測できることが示された。スラリー原料から成形により製品を得るプロセスでは、これまでのような粒子

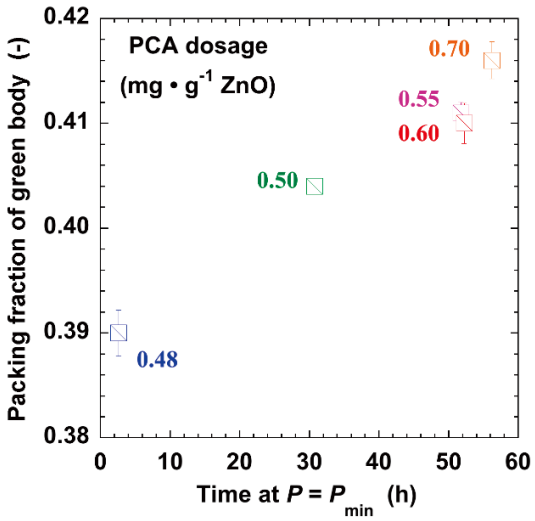



図７　静水圧が $P_{min}$ に達する時間と成形体充填率の関係

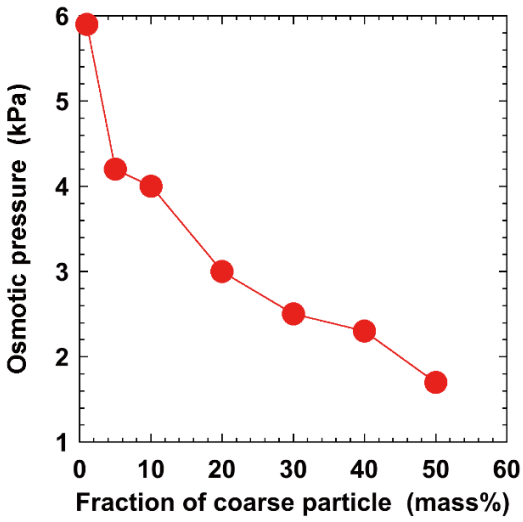



図８　粗大粒子割合が浸透圧に及ぼす影響

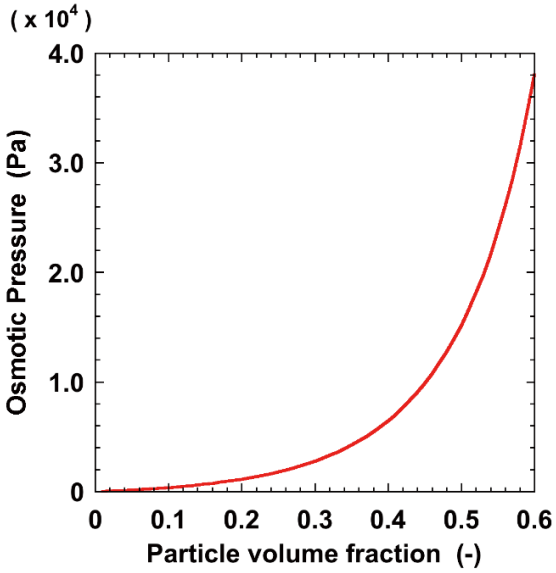



図９　CS 式による浸透圧に及ぼす粒子体積分率の影響の推算

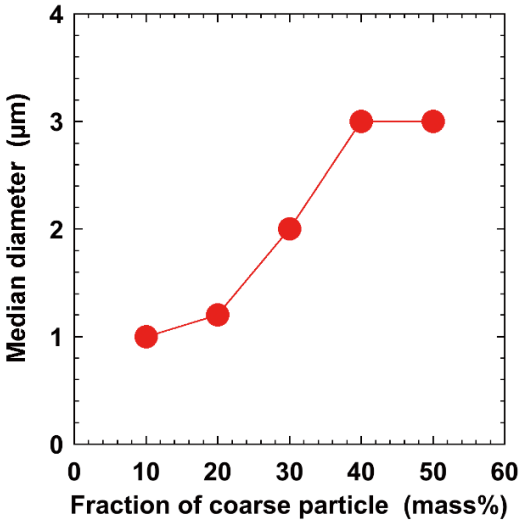



図 10　粗大粒子割合が DLS で測定したメジアン径に及ぼす影響

分散性の評価のみを行ってスラリー最適条件を決定するのではなく、スラリーの充填性（濃縮過程における粒子分散状態の変化）を評価した上で最適条件を決定することが良いことが示唆された。

### 3. 2. ナノ粒子スラリーの浸透圧測定

図８に粗大粒子割合別の浸透圧測定結果を示す。これより、粗大粒子の割合が増加するとともに浸透圧測定値が減少した。

粒子分散系の浸透圧は完全にモデル化されてはいないが、浸透圧に及ぼす粒子濃度の影響は、例えば以下の Carnahan-Starling の式[3]に表されるように、粒子濃度の影響を大きく受ける。

$$P = \frac{6k_BT\eta}{\pi D^3} \cdot \frac{1+\eta+\eta^2-\eta^3}{(1-\eta)^3}$$

図９に Carnahan-Starling の式の粒子体積分率が浸透圧に及ぼす影響を示したが、粒子濃度が高い領域では、わずかな粒子濃度の差で浸透圧が大きく変化することが見て取れる。今回のスラリーはいずれも粒子体積濃度が同じではあるが、浸透圧には明確な違いが見られた。これはスラリーに含まれている粗大粒子は沈降速度が大きく、測定中に底部に堆積していることから、浸透圧の発現には寄与していないことが原因であると考えられる。よって、沈降・堆積する粗大粒子の割合が大きいほど浸透圧は低くなったと考えられる。したがって、スラリーの浸透圧測定によって、スラリー中に含まれる少量の粗大粒子・凝集粒子を検出できることが示唆された。

図 10 には動的光散乱により測定した粒子径分布のメジアン径を示す。全体的に粒子径分布は原料の粒子径よりも、粗大粒子の粒子径に強く影響を受けていることがわかる。

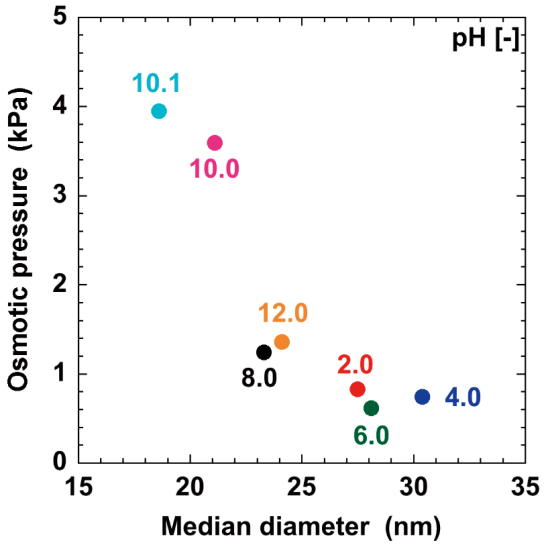



図 11　DLS で測定したメジアン径と浸透圧の関係

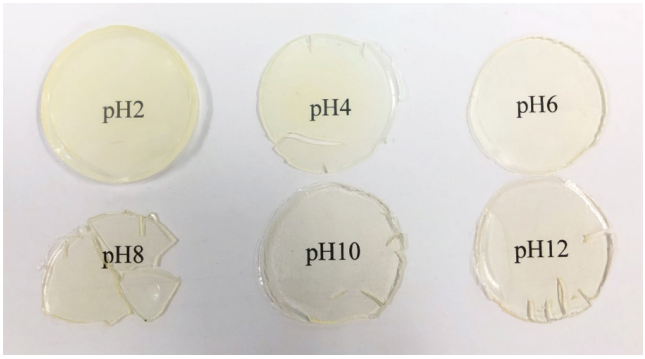



図 12　ナノコンポジットの外観

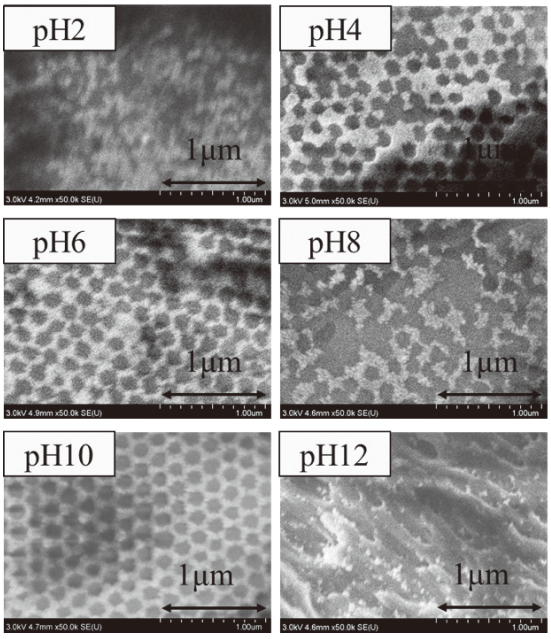



図 13　ナノコンポジットの微構造観察結果

したがって、動的光散乱でもスラリー中の粗大粒子割合の違い、すなわち、凝集の程度の違いを評価できるものと考えられるが、粒子径が極端に大きい粒子があるとそれに隠れて、大部分の粒子径が小さい粒子の情報が得られないことが懸念される。今後、粒子分散系の浸透圧のモデルについて検討し、粒子径分布を求めることで、ナノ粒子から粗大粒子までを含んだ全体の粒子径分布の推定ができるようにすることが重要であると考える。

pH の異なる $SiO_2$ スラリーの浸透圧と DLS によって測定されたメジアン径の関係を図 11 に示す。浸透圧が高いほど DLS で測定されたメジアン径は小さいことから 2 つの評価には良い相関があった。

$SiO_2$ とアクリレート系ラテックスの混合スラリーによって作製されたナノ複合材料膜の写真を図 12 に示す。種々のスラリー評価により、原料となるナノ粒子スラリーの分散状態は条件によって異なることが明らかになった一方で、作製されたナノコンポジットの外観には大きな違いは見られなかった。

pH の異なる $SiO_2$ スラリーを用いて作製されたナノコンポジットの粒子配列微構造 SEM 像を図 13 に示す。SEM 画像中の黒い円がラテックス粒子で、色の薄い箇所がそこに充填されたナノ粒子である。浸透圧測定値が最も高い、すなわち最も粒子が分散している pH10 の条件において、最も均質に粒子が配列している様子が確認された。

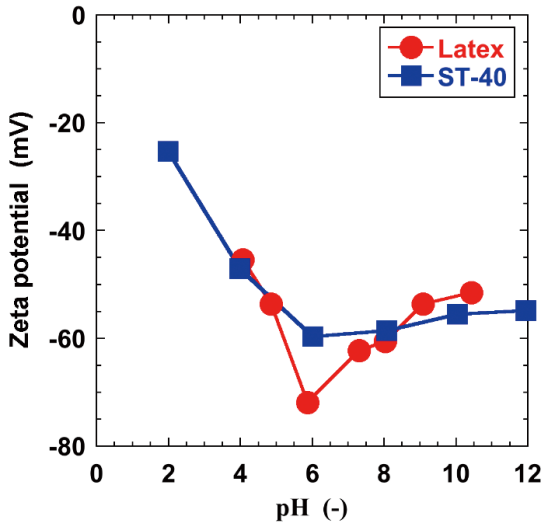



図 14　ゼータ電位の pH 依存性

ナノコンポジット作製に用いたラテックス粒子及び$SiO_2$粒子のゼータ電位を図 14 に示す。この結果から本実験で用いた 2 種の粒子は全ての実験条件において負に帯電していることがわかった。このことから、本実験の条件においては異種粒子間の凝集の影響は小さく、ナノ粒子の分散・凝集状態がナノ複合材料の粒子配列微構造に影響を及ぼしたと考えられる。

## 5．総　括

スラリー中の粒子分散状態、特に評価が難しい不規則形状粒子とナノ粒子の分散状態評価について検討した。不規則形状粒子のスラリーにおいては、球形もしくはそれに近い粒子と同様に沈降静水圧を測定し、その減少速度から粒子の分散状態並びに濃縮に伴う粒子分散状態の変化（充填性）を評価することができた。ナノ粒子スラリーについては、スラリーの浸透圧測定から粒子分散状態を評価することができた。今後は、これらの粒子を利用した製品特性とスラリー中の粒子分散状態、充填性との関係を明らかにしていくことで、実プロセスにおけるスラリー評価の有用性を実証していく。

（引用文献）

1）T. Mori, K. Kuno, M. Ito, J. Tsubaki, T. Sakurai, “Slurry Characterization by Hydrostatic Pressure Measurement –Analysis Based on Apparent Weight Flux Ratio–” Adv. Powder Technol., 17 (3) , 319-332 (2006)

2）T. Mori, H. Nagashima, Y. Ito, Y. Era, J. Tsubaki, Agglomeration of Fine Particles in Water Upon Application of DC Electric Field, Miner. Eng., 133, 119-126 (2019)

# エマルション重合過程におけるミクロ生体高分子ゲルの粘弾性測定法の開発

東京大学大学院総合文化研究科先進科学研究機構

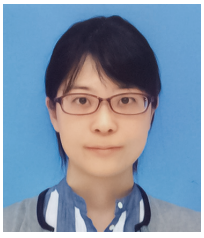
柳澤　実穂

Although biopolymer microgels are used in a variety of applications, their viscoelastic properties have been difficult to determine due to their difficulty in analysis. In this study, the surface viscoelasticity of gelatin microgels prepared in lipid droplets were investigated using cyclic micropipette aspiration. It was found that the gelatin gel gelled inside the small droplets with a radius of about 50 μm or less covered with a lipid membrane was about 10 times harder than the bulk gel. By changing the aspiration pressure cyclically, we also evaluated their storage modulus $E'$ (reflecting elasticity) and loss modulus $E''$ (reflecting viscosity). Then, the microgels have a smaller $E''/E'$ ratio than the corresponding bulk gels, meaning the microgels have a distinct nanostructure from bulk gels. Nanostructure analysis showed that small microgels contained more beta sheets in their structures than bulk gels. Our findings indicate that the confinement of gelling polymers in lipid membranes contributes to the variation in viscoelasticity of protein-based microgels through changes in secondary structure.

## 1．緒　言

コラーゲンから得られるタンパク質由来のゼラチンや海藻から得られる多糖類由来のアガロースなど、多くの生体高分子ゲルはその優れた生体親和性や生分解性により、化粧品や医薬品、食品などの材料として活用されている。特に油中液滴（エマルション）中でのゲル化（エマルション重合法）により得られる１ミリメートル以下の小さなミクロゲルは、その大きな表面積・体積比により、周囲の環境変化にすばやく応答し、例えば体積変化に応じてゲル中に内包した薬物を放出する医薬用カプセルなど、高度な機能性材料として注目されている。こうしたミクロゲルの基本的機能は、そのナノ構造と粘弾性特性に依存しているが、ミクロゲル分散液としての解析が進む一方、実際に機能を担うミクロゲル単体に対しては未解明な点が多い。

エマルション重合により形成されるミクロゲルは、重合時に常にゲル化高分子が膜界面と接しており、界面物性がミクロゲルの構造や物性へ影響することが予想される。生体高分子ゲルでは、ゲル構造がタンパク質の２次構造であるヘリックス構造やベーターシート構造であることから、膜界面の電荷などを含む物性がそれら２次構造転移を変化させる可能性が高い。実際に筆者らは、生体高分子ゲルとしてゼラチンを用い、リン脂質からなるエマルション中でゲル化させて得られるミクロゲルに対し、表面弾性（ヤング率）の測定とナノ構造解析を行った。その結果、半径が約50μm以下のミクロゲルは、従来のバルクゲルよりも約10倍ゲル弾性が高くなること、従来知られてきたナノ構造であるヘリックス構造だけでなく、ベーターシート構造も多く含まれることを見出した[1)]。これらのサイズ依存性から、エマルション重合によりゼラチン・ゲルにベーターシートが形成され、それが新たな架橋点となることでゲル弾性が上昇したと考えられる。しかし、なぜエマルション重合がゼラチン・ミクロゲルのナノ構造変化とゲル弾性上昇を招いたのかは不明である。そこで本申請研究では、この問いに対し(i)膜界面効果として考えられる膜の電気的特性や界面に働くラプラス圧とヤング率の相関関係を解析すること、(ii)そしてナノ構造をより強く反映する粘弾性を１つのミクロゲルに対して測定する手法を開発し、その解析からナノ構造変化の要因へ迫ることを目的とした。



Viscoelastic analysis of biopolymer microgel prepared from emulsion polymerization

Miho Yanagisawa

Komaba Institute for Science, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

## 2．方　法

### 2．1．エマルション界面の影響評価

エマルション重合過程における膜界面効果として、膜物性特性と膜によるミクロ空間閉じ込めに伴うラプラス圧、膜との直接的接着による影響をそれぞれ個別に評価するため、膜物性と油水界面に生じる界面張力が異なる２種のリン脂質：1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine（DOPC）、1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine（DOPE）、界面活性剤：Span 80を用いてゼラチン・ミクロゲルを作製した。膜表面電荷は基本的に全て負に帯電しており、その大きさはDOPC < DOPE < Span 80の順であることが知られている。また、界面張力の大きさは、DOPC < Span 80 < DOPE << 活性剤無しの順で大きくなる。ゼラチン・ミクロゲルは、これらのリン脂質や界面活性剤を溶解したミネラルオイルと高温（約60℃）のゼラチン溶液を攪拌してエマルション化し、その後ゲル化温度（30℃）以下に冷却することで作製した。さらに、ゲル化

しない高分子であるポリエチレングリコール(PEG)とゼラチンからなる2成分混合溶液を、均一相状態でエマルション化し、部分濡れ型の相分離パターン形成後にゲル化させることで、膜接触有りと膜接触無しの異なる2面を持つヤヌス型のミクロゲルを作製できる[2]。これより、ゲル化時に同じDOPC膜で覆われたミクロ空間へ閉じ込められているが、膜接着している部分と膜接着していない部分を有するミクロゲルが形成できる。このそれぞれの部分に対してヤング率とナノ構造を解析すれば、膜への直接的接触と膜によるミクロ空間閉じ込めのどちらが弾性率上昇やナノ構造転移へ影響をもたらしているのかを導くことができる。

### 2. 2. ベーターシートの蛍光可視化

ミクロゲル中に形成されたベーターシート構造を可視化するため、ベーターシートに富むアミロイド構造の蛍光観察に使用されるThioflavin T(ThT)をゲル化前のゼラチン溶液に添加し、温度をゲル化温度以下に冷却した後での蛍光強度変化を、共焦点レーザー顕微鏡(FV1200, オリンパス)にて観察した[1]。

### 2. 3. ミクロゲル表面の粘弾性測定

ミクロゲルの表面弾性(ヤング率)は、ゲル表面をガラスキャピラリーにより微小吸引し、吸引圧$P$と吸引長さ$L$の比例関係から求めた[1]。本研究ではさらに、ゲル化過程で膜に接していた部分と接していなかった部分の異なる2面を備えたミクロゲルに対し、局所的なヤング率を測定することで、膜への直接的接触がヤング率へ及ぼす影響を導く[3]。さらに、キャピラリーの吸引圧$P$をサインカーブのように周期的に変化させることで粘弾性を評価するシステムを構築した(図1)[4]。吸引圧力と変形長さの時間変化に対して、その振幅と、圧力と変形の間の遅延に該当する位相差δを用いて、貯蔵弾性率E', 損失弾性率E" を求めることで粘弾性を評価する。これにより、ミクロゲルの弾性が支配的であったとしても、微小変形に伴うミクロゲル表面の粘弾性を評価できるようになる。

## 3. 結果と考察

### (i) 膜界面の効果

はじめに、異なる脂質や界面活性剤を用いて半径が50 μm以下の球形のゼラチン・ミクロゲルを作製し、その表面のヤング率と膜物性の相関関係を調べた。エマルション重合過程では、膜界面に働く張力の大きさに比例するラプラス圧による影響を受ける。そこで、膜界面張力値の異なる4つの系(DOPC < Span 80 < DOPE << 活性剤無し)に対して、ヤング率を比較したところ、系統的な違いは見られなかった。次にエマルションを覆う膜の電気物性との相関関係を調べた。その結果、帯電の度合が増すにつれて

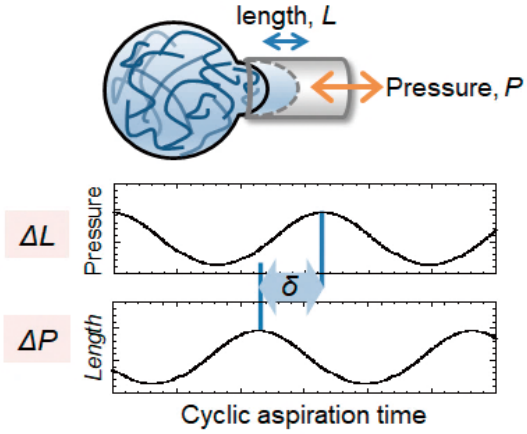



図1　ミクロゲルの周期的吸引による表面粘弾性測定(上)と、吸引に伴うキャピラリー内への変形長さ$L$と吸引圧$P$の時間変化(下)を示す模式図

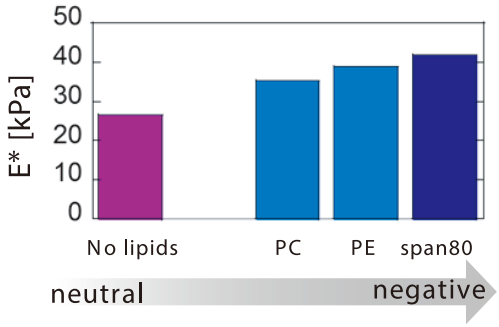



図2　球形ミクロゲルを覆う膜の負帯電度とゲル表面のヤング率の相関関係

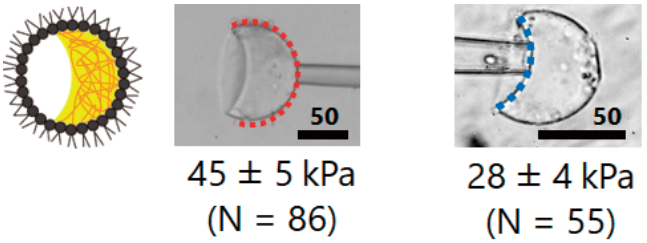



図3　非球形のゼラチン・ミクロゲルにおける局所的なヤング率(Ave. ± SE.)。凸面(脂質膜接触有り)と凹面(脂質膜接触無し)でのヤング率の違い。N はゲル数。

(DOPC < DOPE < Span 80 の順)、ヤング率が大きくなることが分かった(図2)。負に帯電する界面活性剤をゲル化する生体高分子に添加すると、ヘリックス形成が阻害されることが報告されており[5]、我々の実験においても、負帯電した膜がヘリックス形成を阻害し、逆にベーターシート形成を促進したためにヤング率が上昇した起源と考えられる。

つぎに、直接的な膜接触が表面ゲル弾性へ与える影響を導くため、膜接触有りと無しのそれぞれの面に対して弾性測定を行った(図3)。その結果、接触有りの面が接触無しの面よりも高弾性となったものの、バルクゲルの弾性(5 kPa)と比べると共に遥かに高弾性であった[3]。このことは、

膜接触がゲル弾性を高めるが、ミクロ閉じ込めによりその効果が内部まで到達すると解釈できる[2]。さらに、この相分離したミクロゲルに対してThTを添加したところ、ゲル化に伴いミクロゲルの中央まで蛍光強度が均一に上昇した（図4）。この結果は、膜の負電荷により形成が誘起されるベーターシート構造が、膜近傍だけでなく、ミクロゲルの内部まで生じることを意味している。

### (ii) ミクロゲルの粘弾性特性

次に、キャピラリー吸引の圧力を周期的に変化させることで、弾性を反映する貯蔵弾性率$E'$と粘性を反映する損失弾性率$E''$の相関を調べた。バルクゲルでは、粘弾性比$E''/E'$はゼラチン濃度によらず、また低周波数領域（$f < 0.1$ Hz）ではほぼ一定となる（図5）。そこで、周波数を$f = 0.01$ Hzに固定して、ミクロゲルとバルクゲルに対して、粘弾性比率を測定し比較した（図6）。その結果、ミクロゲルの方が小さな$E''/E'$値をもつことが分かった[6]。この値の違いは、ゼラチン濃度では説明できないことから、ミクロゲルがバルクゲルとは異なるナノ構造を持つことを支持する。ミクロゲルでは、トリプルヘリックスだけでなく、多量のベーターシートも形成されていることから、従来の未反応なランダムコイル部位がベーターシートへ転移することで粘性が低下し、$E''/E'$値が減少したと考えられる。

## 5．総　括

本申請研究では、エマルション重合によりナノ構造とヤング率が上昇するゼラチン・ミクロゲルに対し、その理由を膜物性と膜接着、ラプラス圧による膜界面効果の評価と、ゲル表面の粘弾性測定から迫ることを目的とした。その結果、膜の負帯電と膜によるミクロ閉じ込めがゲル弾性上昇を生むこと、ランダムコイルがベーターシートへ転移することで従来のバルクゲルとは異なる粘弾性比を持つことが明らかとなった。この知見は、ゼラチン・ゲルに限定されず、他の生体高分子ゲルに対しても成り立つことが期待される。また、本研究により構築したキャピラリー吸引による粘弾性評価は、その他のミクロ材料の力学評価として役立っており[7,8]、今後は同様のサイズを持つ生細胞などの力学的評価にも応用可能であることを実証していきたい。

### 謝　辞

本研究にご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深くお礼申し上げます。

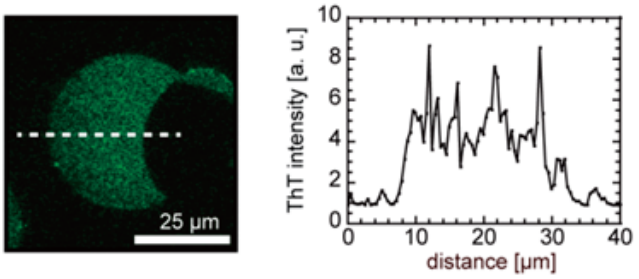



図4　相分離ミクロゲルのThT蛍光画像

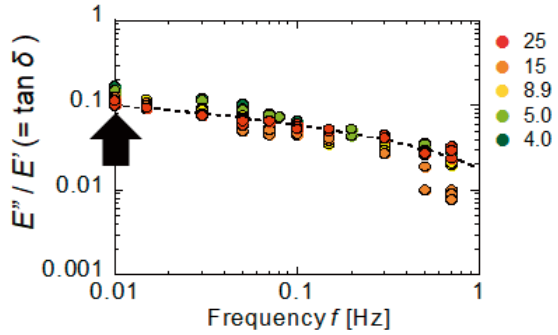



図5　バルクサイズのゼラチン・ゲルにおける粘弾性比（$E''/E'$）と周波数$f$の関係

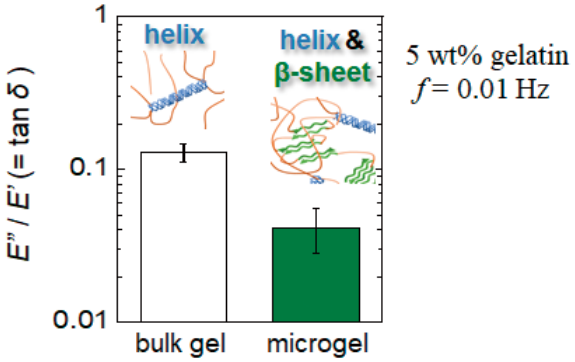



図6　周波数f＝0.01Hzの5.0wt%ゼラチンのバルクゲルとミクロゲルに対する粘弾性比（$E''/E'$）の比較

（引用文献）

1）A. Sakai, Y. Murayama, K. Fujiwara, T. Fujisawa, S. Sasaki, S. Kidoaki, and Miho Yanagisawa, ACS Cent. Sci., 4, 477-483 (2019).

2）M. Yanagisawa, S. Nigorikawa, T. Sakaue, K. Fujiwara, M. Tokita, *PNAS*, 111, 15894-15899 (2014)

3）Sakai, N. Hiro-oka, S. Sasaki, S. Kidoaki, M. Yanagisawa, Nihon Reoroji Gakk., 47, 55-59, (2019).

4）特願2020-15270, 柳澤実穂, 酒井淳,「粘弾性測定方法および粘弾性測定装置」

5）R. Wustneck, E. Buder, R. Wetzel, H. Hermel, Cholloid Polym. Sci., 267, 429-433 (1989).

6）A. Sakai, A. Sakai, Y. Murayama, M. Yanagisawa, Langmuir, 36: 5186-5191 (2020).

7）Y. Kurashina, M. Tsuchiya, A. Sakai, T. Maeda, Y. Jung Heo, F. Rossi, N. Choi, M. Yanagisawa, H. Onoe, *Appl. Mater. Today*, 21, 100937 (2021).

8）S. Hayasaki, M. Shimizu, Y. Katsurada, A. Sakai, M. Yanagisawa, Y. Atomi, T. Watanabe, J. Fiber Sci. Technol., 76: 288-295 (2020).

# 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

広島大学大学院医系科学研究科薬学分野
山野　喜

In Europe, animal testing on cosmetics has been banned without exception since 2013, and globally, animal testing tends to be avoided. The international trend of conducting animal experiments based on the concept of the 3Rs (Reduction, Replacement, Refinement) is becoming more and more established, and when conducting animal experiments, it is required to use animal species with as little or no sensation as possible. Meanwhile, in the process of searching for new cosmetic raw material candidates, it is desirable to discover more effective and safer ones at an early stage.

In this study, we used zebrafish, a well-known vertebrate model organism, to search for new cosmetic materials from natural resources and to verify the usefulness of zebrafish as a method for evaluating new cosmetic material candidates. Zebrafish from the embryonic stage to just after hatching were used to screen for natural resource samples that inhibit melanin pigment production in zebrafish, and a total of five compounds were isolated from two microbial culture extracts. Of these, compounds S2 and F1 effectively inhibited melanin pigment production in zebrafish without any obvious toxicity. For the purpose of comparison, a search study was performed from plant extracts that show tyrosinase inhibitory activity *in vitro* but not melanin pigment inhibitory activity in zebrafish. As a result, 20 compounds were isolated, three of which were new compounds. None of the obtained compounds showed melanin pigment inhibitory activity in zebrafish, and some of them showed hatching inhibitory activity. These results suggest that the search for melanin production inhibitors using zebrafish is a useful approach for early evaluation of the efficacy and potential toxicity of candidate materials for cosmetics to the living body.

## 1. 緒　言

EUでは2013年から化粧品開発における動物実験が全面禁止となり、世界的にも同様に動物実験は忌避されるようになってきている。毒性試験や研究開発において必要な動物実験に関しても“動物実験の3R（Reduction（削減）、Replacement（置き換え）、Refinement（苦痛の軽減）”の考えに則って行うという国際的な流れがあり、できる限り合理的かつ生体に対する苦痛の少ない実験手法を選択し、可能な限り意識や感覚の少ない低位の動物種を使用することが求められている。そのため、ヒトに近い動物であるからというだけの理由で安易にラット等を用いて毒性や効能の評価を行うことは避けるべき状況となっている。

しかし、化粧品や医薬品の開発過程において、製品に用いる可能性のある化合物がもつ生体への潜在的な毒性や効能をできる限り早い段階で評価することは、安全で高品質な化粧品や医薬品を作り出す上で重要であり、何かしらの方法でそれらを行う必要がある。

そこで本研究では、脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを用い、天然資源由来のメラニン色素産生抑制物質の探索を行うことを通して哺乳類を用いた動物実験の代替法としてのゼブラフィッシュを用いた研究開発手法の有用性の検証を行った。

ゼブラフィッシュは体長4~5cm程度のインド原産の小型熱帯魚で、コイ科コイ目に属し、金魚やコイに近い種である（Fig. 1）。丈夫で飼育、繁殖が容易であり、一つの水槽で多数飼育ができ、多産で、卵が透明であることからその発生過程を顕微鏡で観察できるなどといった、実験動物として用いる上で重要な多くの利点を有しており、脊椎動物のモデル生物として長く用いられてきた歴史がある。当初は発生生物学と分子遺伝学の分野において用いられていたが[1, 2]、その後哺乳類との生理学的類似性の高さが確認され[3, 4]、その利便性が認められたことで様々な分野で用いられるようになり、現在では創薬や毒性研究にも利用されている[5, 6]。

メラニン色素産生抑制活性の評価のためのモデル生物として、ゼブラフィッシュは多くの利点を有している。まず、ゼブラフィッシュを用いた実験は、メラニン合成に関わる酵素の阻害活性試験や細胞培養などの*in vitro*系とは異なり、生体全体を用いた*in vivo*評価系であることから、複雑な生体内環境においても被験物質が実際に期待した効果



Drug discovery research for a safe melanin production inhibitor using zebrafish as a vertebrate model

Yoshi Yamano

Department of Pharmacognosy, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University



Fig. 1　ゼブラフィッシュ

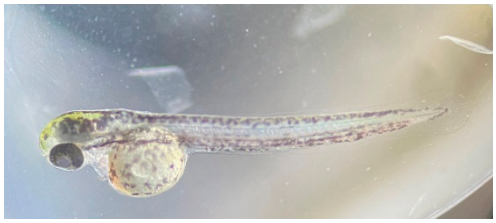


Fig. 2　受精後72時間におけるゼブラフィッシュのメラニン産生

を示すかどうかという本質に関わる点を評価することができる。ゼブラフィッシュの卵は受精後24時間で器官形成が見られ、48時間で尾部におけるメラニン産生（黒い斑点の形成）が見られるようになる（Fig. 2）。卵は96 wellプレートの各wellにピペットで複数個ずつ入れることができ、その飼育水に被験物質を添加しておくだけで、比較的短い時間（2~3日）でメラニン産生抑制活性を顕微鏡で確認することができる。また、ゼブラフィッシュは卵から発生初期を通して7日間までは、飼育水に含まれる物質を主に皮膚から吸収するため、その吸収様式がヒトの皮膚吸収のモデルに近いといわれている[7,8]。

一方、ゼブラフィッシュの発生過程において、被験物質が正常な器官形成プロセスを阻害するような作用を有していると、孵化阻害や生育遅延、奇形の発生などを誘発することから、ゼブラフィッシュは被験物質の有害性を確認する手段としても用いられている。そのため、ゼブラフィッシュを用いてメラニン色素の産生抑制活性を評価することで、同時に被験物質の潜在的な毒性も評価することが可能であり、被験物質の生体への効能と安全性を一度に評価できる優れた手法であると考えられる。

本研究では、微生物や植物などの天然資源からメラニン色素合成阻害活性をもつ化合物を探索することで、ゼブラフィッシュを評価系に用いた探索手段の有用性の検証を行った。研究手順としては、まず当研究室が保有する植物・微生物培養抽出物ライブラリーを用いて、メラニン色素生合成を担う酵素であるチロシナーゼの阻害活性を*in vitro*において評価し、続いてその阻害活性を示したサンプルからゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示すサンプルを選別し（微生物BLS-1-3-3, BLS-1-4-4）、その活性を指標に化合物を探索した。また、対照実験として、チロシナーゼ阻害活性は見られたがゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性は見られなかったハウチワノキ材部から、そのチロシナーゼ阻害活性を指標に化合物を探索し、それぞれの天然資源から得られる化合物の構造と活性の関係を比較した。

## 2. 方　法

### 2. 1. 植物および微生物の活性評価用抽出物の調整

植物は主に沖縄県で採集したものを用い、methanolを用いて室温抽出し活性評価用の抽出物を得た。微生物は液体培地（Seed broth）で2週間静置培養後、ポテト培地に移しさらに2週間静置培養したものを、acetoneにて抽出し、得られた粗抽出物をさらに水と2-butanoneを用いて分配し、2-butanone層を活性評価用抽出物とした。すべての抽出物はDMSOによって濃度調整しスクリーニングに用いた。

### 2. 2. チロシナーゼ阻害活性試験法

酵素はMushroom tyrosinase（Sigma）を用いた。96 wellプレートの各wellに、濃度調整した被験サンプル溶液10 μLと0.25 mg/mLに調整したL-tyrosine入りK-phosphate buffer（0.05 M, pH 6.8）を40 μLずつ加え、475 nmにおけるbackgroundの吸光度を測定した。続いて100 units/mLに調製したmushroom tyrosinase溶液（K-phosphate buffer）を50 μLずつ加えて、25 ℃で10分間反応させたのち、475 nmにおける吸光度を測定し、この値からbackgroundの吸光度を引いた値を基に、酵素反応阻害率を算出した。各サンプルの試験は少なくとも3回行い、その平均値と標準偏差値を示した。half maximal inhibitory concentration value（$IC_{50}$値）は阻害率50%を跨ぐ2点のサンプル濃度と阻害率の値から2点直線法を用いて算出した。

### 2. 3. ゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性試験法

ゼブラフィッシュは14 hours/10 hoursの明暗サイクル下、水温26 ℃で飼育した。採卵日の前日に雄と雌を同じ水槽にいれておき、次の日に水槽の底から受精卵を採取した。滅菌蒸留水で受精卵をよく洗浄したのちEmbryo medium中に分散させた。続いて96 wellプレートの各ウェルに被験サンプル溶液を1 μL添加しておき、そこに受精卵3個と99 μLのEmbryo mediumを分注した。72 hour後に顕微鏡観察およびメラニン色素の吸光度測定によりメラニン産生抑制活性を評価した。メラニン色素の定量には被験サンプルに晒したゼブラフィッシュを10匹用い、PBSで洗浄後、1% Triton X-100を含むPBS中でホモジナイズした。遠心分離により上清を取り除いたのち、100 μLの1N NaOH/10% DMSOを加え、よく攪拌後、80 ℃で2 hourおくことでメラニンを溶解させた。続いて遠心分離後上清をとり、405 nmの吸光度を測定しControlの吸光度の値との比較からメラニン色素産生抑制活性を算出した。各化合物の試験は少なくとも3回行い、その平均値と標準偏差値を示した。$IC_{50}$値は阻害率50%を跨ぐ2点のサンプル濃度と阻害率の値から2点直線法を用いて算出した。

### 2. 4. 微生物の簡易同定

スクリーニングの結果メラニン産生抑制活性を示した微生物を、16S rRNA配列をもとに簡易同定した。まず各微

生物株をMH broth中で増殖させたのち、CTAB法を用いてgenome DNAを単離した。続いてそのgenome DNAをテンプレートに27F（AGAGTTTGATCMTGGCTCAG）および1492R（GGYTACCTTGTTACGACTT）プライマーを用いて16S rRNA領域をPCRで増幅し、精製後、サンガー法により塩基配列を解析した。得られた塩基配列をGenBankのデータベースでBlast検索することにより、微生物を同定した。

### 2. 5. 抽出物からの化合物の精製・構造解析

ゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性もしくはチロシナーゼ阻害活性が確認された抽出物をヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水の各種溶媒を用いて分配した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODSカラムクロマトグラフィー、HPLCを用いて順次精製を行った。単離した化合物の構造は、MS、NMR、IRなどの各種物理化学データを解析することにより決定した。

## 3. 結　果

### 3. 1. 探索サンプル決定のためのスクリーニング

当研究室が保有する微生物および植物の抽出物ライブラリーを用いて、一次スクリーニングとしてチロシナーゼ阻害活性試験を行った。研究室に保有するおよそ1000サンプルをスクリーニングし、そのうち23サンプルが100μg/mLの濃度で50%以上のチロシナーゼ阻害活性を示した（Fig. 3）。

続いてこの23サンプルを用いて、ゼブラフィッシュに対するメラニン産生抑制活性試験を行った結果、8サンプルが100μg/mLの濃度で明確な抑制活性を示し、そのうち特に再現性に優れていた2サンプル（BSL1-3-2, 1-4-4株）を本研究の探索源に決定した（Fig. 4b, c）。また、対照実験として、ゼブラフィッシュに対するメラニン産生抑制活性は見られなかったが（Fig. 4d）チロシナーゼ阻害活性を示したサンプルである沖縄産植物ハウチワノキ材部から、チロシナーゼ阻害活性化合物を探索し、ゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性をもつ抽出物から単離される化合物との機能と構造の比較を行った。

### 3. 2. BSL1-3-2株の同定と単離した化合物

同定：BSL1-3-2株は広島県広島市の宇品海岸で採取した海水から分離培養した細菌である。微生物種の同定のために本細菌の16S rRNA領域の塩基配列を解析し、GenBankに登録されている微生物16S rRNAからBlast検索を行ったところ、*Staphylococcus* sp. strain H62の16S rRNAと100%

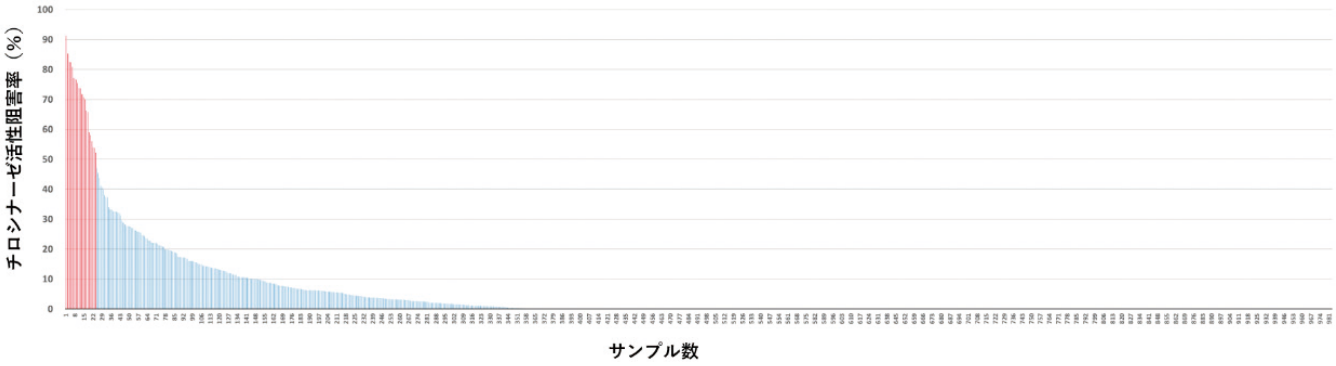



Fig. 3　チロシナーゼ阻害活性スクリーニングの結果（100μg/mL，赤線：50%以上の阻害活性を示したサンプル）

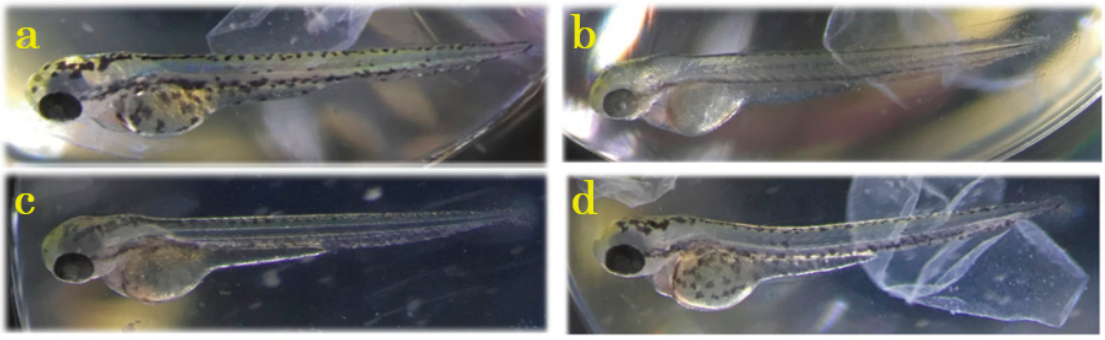



Fig. 4　メラニン産生抑制活性スクリーニングの結果（100μg/mL）　a：Control，b：BSL1-3-2，c：BSL1-4-4，d：ハウチワノキ材部

の相同率を示したことから、本菌種を*Staphylococcus* sp. であると推定した。

培養：本株をSMS寒天培地上で培養し得られたコロニーを液体培地Seed broth 500mLに植菌し2週間培養後、固体培地であるポテト培地5kgに移し2週間培養した。

化合物の精製：菌体抽出物を分配し、各画分のうちゼブラフィッシュのメラニン色素産生抑制活性が最も強かった酢酸エチル層5.7gから化合物の精製を行った。その結果、3つの化合物maltol（S1. 7.0mg）、5-hydroxymaltol（S2. 21.3mg）、monomethyl succinate（S3. 14.5mg）を単離同定した（Fig. 5）。

### 3. 3. BSL1-4-4株の同定と単離した化合物

同定：BSL1-4-4株はB1-3-2株と同様に広島県広島市の宇品海岸で採取した海水から分離培養した細菌である。同様に16S rRNA領域の塩基配列を解析し、GenBankにおいてblast検索したところ、*Francisella uliginis* strain TX07-7310の16S rRNAと99%の相同率を示したことから、本種を*Francisella uliginis*もしくはその近縁種であると推定した。培養・精製方法もBSL-1-3-2と同様の手順で行い、ゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性の最も強かった酢酸エチル層4.8gから、4つの化合物5-hydroxymaltol（F1. 25.6mg）、4-[formyl-5-(methoxymethyl)-1H-pyrrol-1-yl] butanoic acid（F2. 0.7mg）[9]、succinic acid（F3. 3.0mg）、monomethyl succinate（F4. 9.0mg）を単離同定した（Fig. 6）。

### 3. 4. 沖縄産植物ハウチワノキから単離した化合物

2004年に沖縄県中頭郡にて採取した植物ハウチワノキ（学名*Dodonaea viscosa*）の材部900gの抽出物 58.9gから化合物の探索を行った。その結果、3個の新規ジテルペン化合物（D1. 4.4mg, D2. 138mg, D3. 7.5mg）（Fig. 7）と、17個の既知化合物として4つのジテルペン labd-13(E)-en-8, 15-diol（D4. 12.3mg）[10,11]、ent-15, 16-epoxy-9αH-labda-13（D16. 27.5mg）、14-diene-3α, 8β-diol（D5. 970 mg）[12]、hutriwaic acid（D6. 26.9mg）[13,14]、6-hydroxyhardwickjic acid（D7. 4.1mg）[15]、4つのフラボノイド viscosine（D8. 53.3mg）[16]、7, 4′-trihydroxy-3′-(4-hydroxy-3-methylbutyl-5′-(trimethylbut-2-enyl)-3, 6-dimethoxyflavone（D9. 48.4mg）[10,17]、alizarin（D10. 31.8mg）[17,18]、dodovisone C（D11.6.0mg）[19]、3つのクマリンscopoletin（D12. 25.0mg）[20]、isofraxidin（D13. 4.3mg）[21,22]、fraxetin（D14. 15.6mg）[23]、1つのリグナン（+）-pinoresinol（D15. 8.0mg）[24]、そして他の5つの化合物protocatechuic acid（D16. 27.5mg）[25]、(E)-cinnamic acid（D17. 19.6mg（D18と の mixture）[26]、methyl hydrogen azelate（D18. 19.6mg（D17とのmixture）[27]、β-hydroxylpropiovanillone（D19. 11.1mg）[28]、4-hydroxyacetophenone（D20. 2.7mg）[29]であった（Fig. 8）。

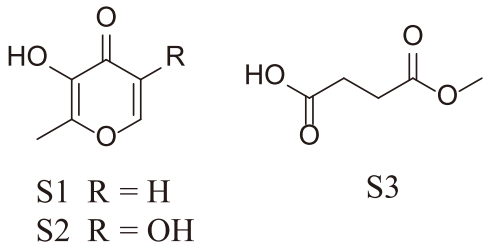



Fig. 5　BSL1-3-2株から単離された化合物

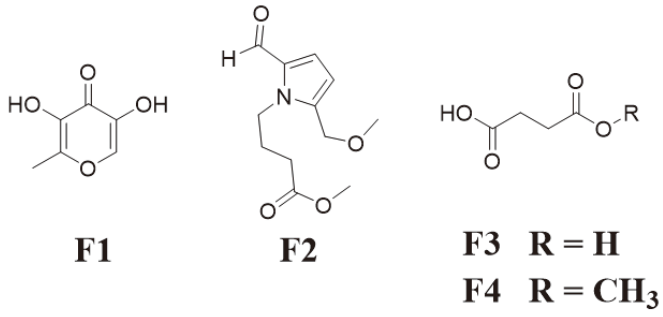



Fig. 6　BSL1-4-4株から単離された化合物

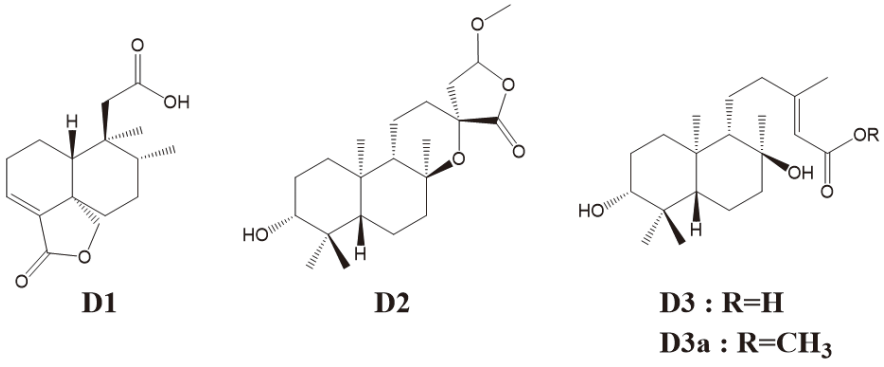



Fig. 7　ハウチワノキ材部から単離された新規化合物

なお、D17とD18はmixtureの状態で得られたため、活性試験の対象からは外した。

### 3. 5. 単離化合物のチロシナーゼ阻害活性

BSL1-3-2株、BSL1-4-4株およびハウチワノキ材部より得られた計25種の化合物に対してチロシナーゼの阻害活性を評価した（Fig. 9）。ポジティブコントロールにはArbutinを用いた。それぞれ1mg/mLおよび100μg/mLの化合物濃度でのチロシナーゼ阻害活性を評価した結果、S2およびF1が最も強い活性を示した。S2およびF1の

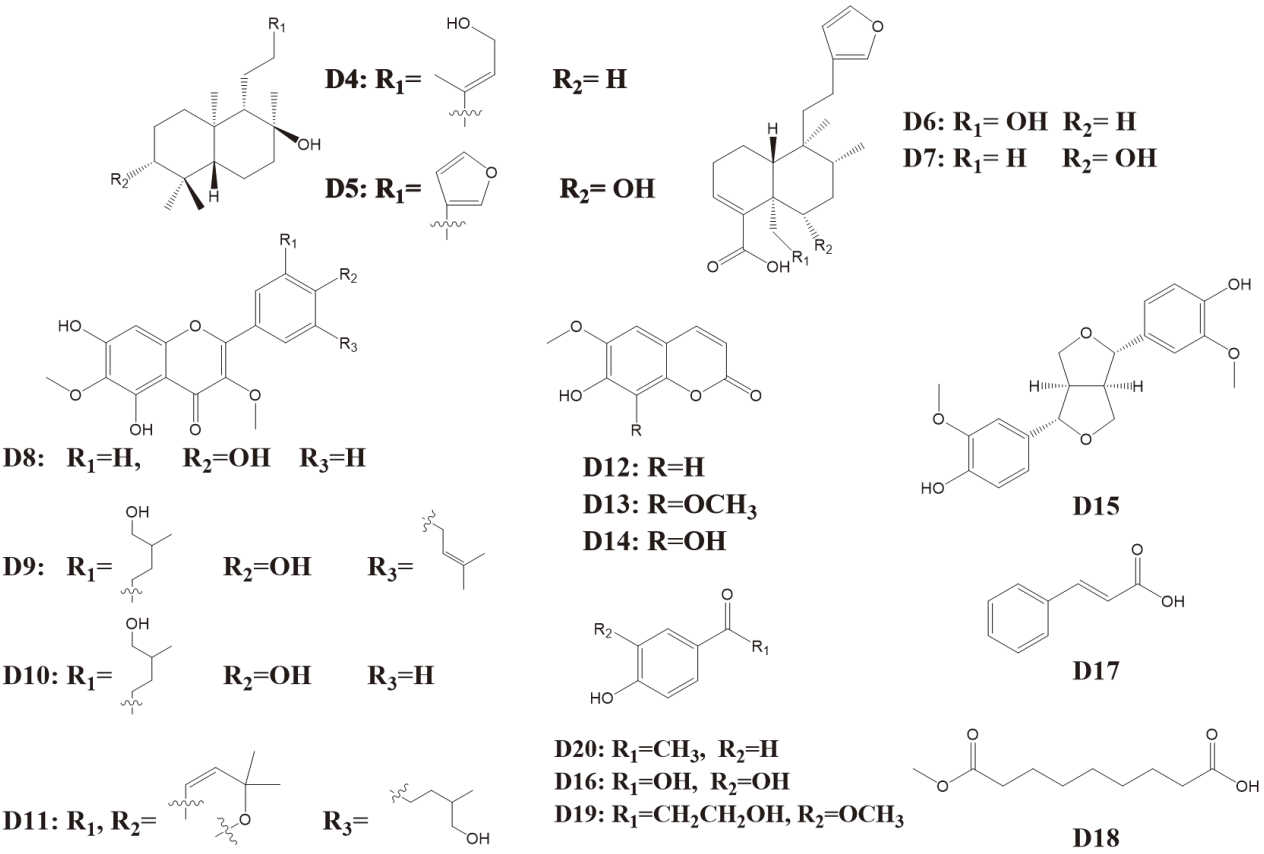



Fig. 8　ハウチワノキ材部から単離された化合物

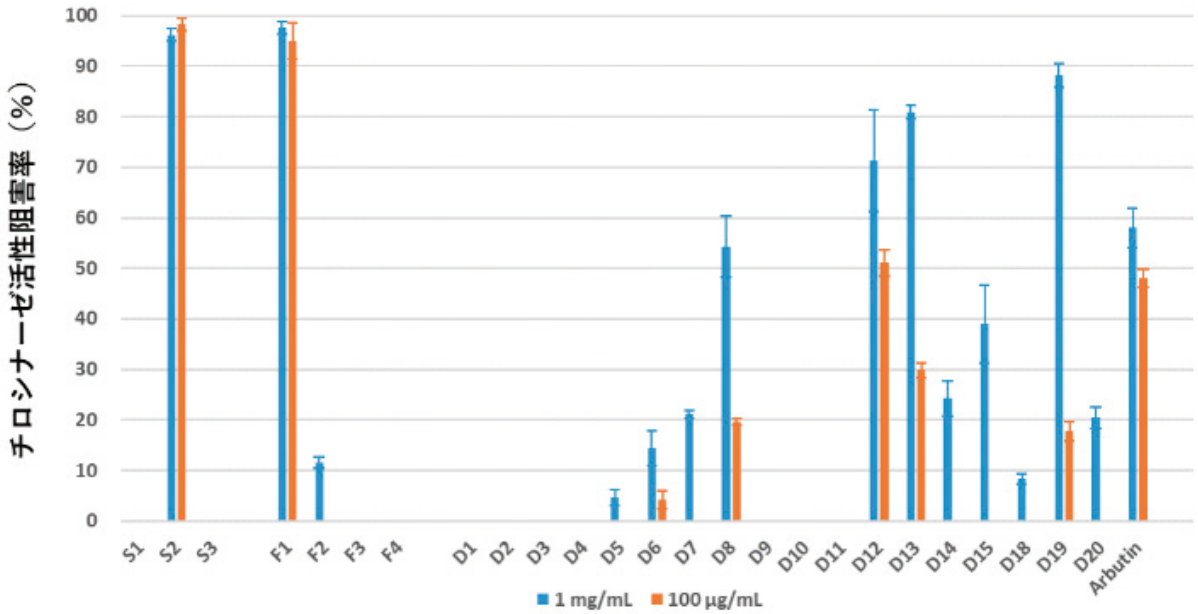



Fig. 8　ハウチワノキ材部から単離された化合物

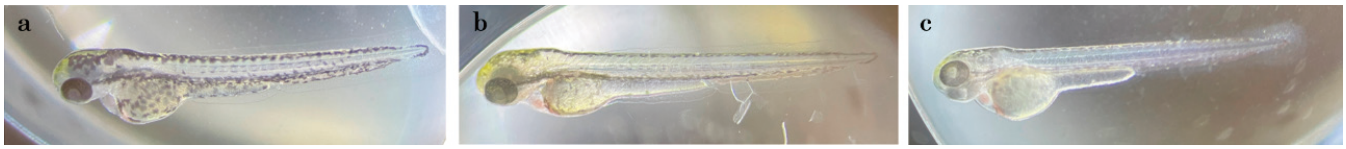



Fig. 10　メラニン色素産生抑制活性試験の結果　a：Control，b：S2（100μg/mL），c：Kojic acid（2mg/mL）

$IC_{50}$ 値はそれぞれ 2.76±0.32，3.24±0.22μg/mL であった。またハウチワノキ由来の化合物としてはD12，D13，D19 が比較的強い活性を示した。

### 3. 6. 単離化合物のゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性

チロシナーゼ阻害活性と同様に本研究で得られた計 25 種の化合物を用いてゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性を評価した。化合物濃度は 100μg/mL とし、十分な孵化率（80％以上）を示し明確なメラニン産生抑制活性が見られた化合物に関しては、ホモジネートの吸光度からその阻害率も算出した。

活性試験の結果、5-hydroxymaltol（S2 およびF1）がゼブラフィッシュに対し毒性を示さず、メラニン産生抑制活性を示し、溶媒のみを添加したゼブラフィッシュに比べそれぞれ 46.8±10.2％と 38.2±8.4％メラニン色素の産生を抑制した（Fig. 10）。ポジティブコントロールとして用いたKojic acid は 2mg/mL の濃度で 66.2±5.5％の産生抑制活性を示した。

その他の結果としては、S1 が阻害率 12.0％と弱い活性を示し、S1，S2，F1 以外の化合物では明確なメラニン産生抑制活性が見られなかった。一方、F2，D2，D4，D5，D8~D13，D19 はゼブラフィッシュに対して 100μg/mL の濃度で強いふ化阻害活性を示し、全てゼブラフィッシュの孵化を 90％以上阻害した。またF2 を添加したゼブラフィッシュの中で、孵化に成功した個体には、奇形が見られた（Fig. 11）。

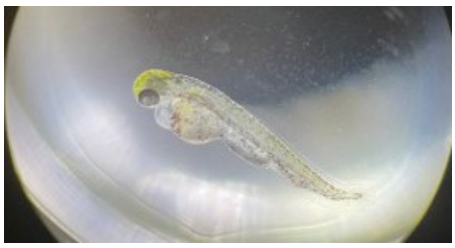


Fig. 11　化合物F2添加により発生した奇形

## 4. 考　察

本研究ではゼブラフィッシュをメラニン産生抑制活性の機能評価系として用いることで、サンプルの安全性と有効性を正確かつ迅速に評価することができるかどうかを検証した。具体的には *in vitro* でメラニン合成酵素の阻害活性を示すサンプルをスクリーニングし、そこからさらに *in vivo* でゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示すものをスクリーニングし、両方の試験において活性を示したサンプルからその活性化合物の探索を行った。また比較のために *in vivo* でメラニン産生抑制活性は見られなかったが、*in vitro* では活性を示したサンプルからもその活性化合物の探索を行った。その結果、微生物株BSL1-3-2 と 1-4-4 から計 7 個の化合物を単離し、そのうちS2、F1 が強いゼブラフィッシュメラニン産生抑制活性を示した。一方、比較のために探索を行った植物ハウチワノキ材部から 20 個の化合物を同定したが、いずれの化合物もゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示さなかった。さらにF2，D2，D4，D5，D8~D13，D19 は ゼブラフィッシュのふ化阻害や奇形発生といった毒性を示した。

スクリーニングの段階でゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示したサンプル（微生物株BSL1-3-2，1-4-4）からは期待通り *in vivo* でもメラニン産生抑制活性を示すS2、F1 が得られた。このことから、本活性試験法は混合物および単一化合物のいずれの状態においても *in vivo* で作用するサンプルを評価できることが示された。活性化合物であるS2 およびF1 はいずれも 5-hydroxymaltol であり、本化合物はチロシナーゼ阻害剤としてすでに化粧品に用いられているコウジ酸と同じ分子量であり、分子サイズや官能基の位置も似ていることから、類似した細胞内浸透性とチロシナーゼ阻害機構を有すると推定される。ゼブラフィッシュを評価系に用いた探索の結果、実際に市販品に用いられている化合物と似た化合物が得られたことも、本評価系が有効性の高いサンプルを選別するのに適していることを示唆している。5-hydroxymaltol はTA100 に対する変異原性を示すことが報告されているという懸念事項があるが[30]、この変異原性は同論文中でコーヒー、紅茶、アルコール飲料や現在医薬部外品の美白剤として承認されているコウジ酸も同様に示すことが記されていることから、特別な注意を要するものではないと推定される。5-hydroxymaltol はその構造からだけでも、コウジ酸と同様にチロシナーゼ阻害活性をもつことが容易に推定されるが、意外なことに筆者が調べた範囲ではそのチロシナーゼ阻害活性に言及した文献が見当たらないことから、本研究で初めてそのメラニン産生抑制効果が示された可能性がある。

BSL1-4-4から単離されたF2はゼブラフィッシュに対するふ化阻害および奇形の発生を引き起こすという結果が示された。このような毒性はエキスの段階では見られなかったが、F2の単離量は0.7mgと活性化合物である5-hydroxymaltolの25.6mgと比べ微量にしか含まれていなかったことから、エキスの段階ではその毒性はマスクされていたと考えられる。このことからゼブラフィッシュを用いた評価系は、混合物としてのサンプルの有効性を総合的に評価できる一方で、各構成化合物の潜在的危険性の評価にも用いることができることが示唆された。これまでに報告されているF2に関する論文[9,31,32]からは、F2はいくつかの細胞に対しての影響が見られているが強い細胞毒性を示すという表記は見当たらないことから、*in vitro*での細胞毒性では評価できなかったF2の生体に対する毒性をゼブラフィッシュを用いることで初めて確認できた可能性がある。

対照実験として行った、チロシナーゼ阻害活性を示し、ゼブラフィッシュのメラニン産生抑制活性を示さなかったハウチワノキ材部抽出エキスから得られた化合物は、単離後もゼブラフィッシュメラニン抑制活性を示さなかった。一方、D12, D13, D19は*in vitro*においてチロシナーゼ阻害活性を示したが、*in vivo*においては卵のふ化阻害を引き起こした。

*in vitro*における酵素阻害活性試験は迅速に結果が得られる優れた試験法であるが、細胞内浸透性が低い化合物や生体への毒性が強い化合物、非特異的に多くの酵素を阻害する化合物など実用上問題がある化合物を判別することができないというデメリットもあり、今回得られた化合物ではそれらの判別されなかった特徴が毒性という形で現れた可能性がある。

本研究結果から、ゼブラフィッシュを用いるメラニン色素産生抑制活性試験法は、生体に対して毒性が低くかつ生体内でメラニン産生抑制活性を示す原料を開発の初期段階から効果的に選別できる可能性が示された。

## 5. 総　括

ゼブラフィッシュのタンパク質は、ヒトのオルソログとの同一性は70％以下であるが、基質結合領域（多くの場合、薬物結合標的）などの機能ドメインでの保存性はかなり高く、100％の類似性に近づいており、これが多くの薬剤がゼブラフィッシュとヒトで同等の効果を示すというこれまで報告されてきた実験結果の科学的根拠となっている[7]。ゼブラフィッシュを用いた評価系では、本研究でも示されたように、その成分の有効性だけでなく、短期・長期毒性に関しても同時に評価できるという利点があり、胚発生、メラニン色素産生、稚魚の生死、血流、内臓機能、行動量など、化合物が生体に与える影響を包括的に評価することができる。化粧品はその効能の強さと同時に高い安全性が求められるものであることから、ゼブラフィッシュを用いた新規素材開発や毒性評価はそれらの目的に沿ったモデルになるのではないかと期待している。

### （引用文献）


1）Driever, W.; Solnica-Krezel, L.; Schier, A. F.; Neuhauss, S. C. F.; Malicki, J.; Stemple, D. L.; Stainier, D. Y. R.; Zwartkruis, F.; Abdelilah, S.; Rangini, Z.; Belak, J.; Boggs, C. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*, 123, 37-46 (1996)

2）Eisen, J. S. Zebrafish make a big splash. *Cell*, 87, 969-977 (1996)

3）Kimmel, C. B. Genetics and early development of zebrafish. *Trends. Genet.*, 5, 283-288 (1989)

4）Fishman, M. C. Zebrafish genetics : the enigma of arrival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10554-10556 (1999)

5）den Hertog, J. Chemical genetics : drug screens in zebrafish. *Biosci. Rep.*, 25, 289-297 (2005)

6）Pichler, F. B.; Laurenson, S.; Williams, L. C.; Dodd, A.; Copp, B. R.; Love, D. R. Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nat. Biotechnol.*, 21, 879-883 (2003)

7）Langheinrich, U. Zebrafish:a new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays*, 25, 904-912 (2003)

8）Cha, S.-H.; Ko, S. -C.; Kim, D.; Jeon, Y. -J. Screening of marine algae for potential tyrosinase inhibitor : Those inhibitors reduced tyrosinase activity and melanin synthesis in zebrafish. *The Journal of dermatology*, 38, 354-363 (2011)

9）Chin, Y. -W.; Lim, S. W.; Kim, S.-H.; Shin, D. -Y.; Suh, Y. -G.; Kim, Y. -B.; Kim, Y. C.; Kim, J. Hepatoprotective pyrrole derivatives of *Lycium chinense* fruits. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 79-81 (2003)

10）Feliciano, A. S.; Medarde, M.; Lopez, J. L.; Miguel del Corral, J. M.; Puebla, P.; Barrero, A. F. Terpenoids from leaves of *Juniperus thurifera*. *Phytochemistry*, 27, 2241-2248 (1988)

11）Zdero, C.; Bohlmann, F.: Niemeyer H.M. *Seco*-Labdanes and other constituents from *Ophryosporus floribundus*. *Phytochemistry*, 29, 3247-3253 (1990)

12）Mata, R.; Contreras, J. L.; Crisanto, D.; Pereda-Miranda, R.; Castañeda, P.; Del Rio, F. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, XVIII. New secondary metabolites from *Dodonaea viscosa J.*

*Nat. Prod*., 54, 913–917 (1991)
13) Huang, Z.; Jiang, M. –Y.; Zhou, Z. –Y.; Xu, D. Two new clerodane diterpenes from *Dodonaea viscosa*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: A Journal of Chemical Sciences*, 65, 83–86 (2010)
14) Jefferies, P. R.; Payne T.G. Diterpenes of the cascarillin group from *Dodonaea species*. *Tetrahedron Lett*., 48, 4777–4782 (1967)
15) Zdero, C.; Bohlmann F.; Mungai G.M. Clerodanes, seco-clerodanes, geranyl geraniol derivatives and unusual sesquiterpenes from *Conyza hypoleuca*. *Phytochemistry*, 30, 575–581 (1991)
16) van Heerden, F. R.; Viljoen, A. M.; van Wyk, B.-E. The major flavonoid of *Dodonaea angustifolia*. *Fitoterapia*, 71, 602–604 (2000)
17) Zhang, L. B.; Ji, J.; Lei, C.; Wang, H. Y.; Zhao, Q. S.; Hou, A. J. Isoprenylated Flavonoid and Adipogenesis-Promoting Constituents of *Dodonaea viscosa*. *J. Nat. Prod*., 75, 699–706 (2012)
18) Muhammad, A.; Anis, I.; Khan, A.; Marasini, B. P.; Choudhary, M. I.; Shah, M. R. Biologically active C-alkylated flavonoids from *Dodonaea viscosa*. *Arch. Pharm. Res*., 35, 431–436 (2012)
19) Gao, Y.; Fang, Y.-D.; Hai, P.; Wang, F.; Liu, J. K. Isoprenylated flavonoids and clerodane diterpenoids from *Dodonaea viscosa*. *Nat. Prod. Bioprospect*., 3, 250–255 (2013)
20) Vasconcelos, J. M. J.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris subsp. maritima, Phytochemistry*, 49, 1421–1424 (1998)
21) Tsukamoto, H.; Hisada, S.; Nishibe, S. Coumarins from bark of *Fraxinus japonica* and *F. mandshurica var. japonica*. *Chem. Pharm. Bull*., 33, 4069–4073 (1985)
22) Hu, H. –B.; Zheng, X. –D.; Jian, Y. –F.; Liu, J. –X.; Zhu, J. –H. Constituents of the root of *Anemone tomentosa*. *Arch. Pharm. Res*., 34, 1097–1105 (2011)
23) Yasuda, T.; Fukui, M.; Nakazawa, T.; Hoshikawa, A.; Ohsawa, K. Metabolic Fate of Fraxin Administered Orally to Rats. *J. Nat. Prod*., 69, 755–757 (2006)
24) Moon, S. -S.; Rahman, A. A.; Kim, J. -Y.; Kee, S. -H. Hanultarin, a cytotoxic lignan as an inhibitor of actin cytoskeleton polymerization from the seeds of *Trichosanthes kirilowii*. *Bioorg. Med. Chem*., 16, 7264–7269 (2008)
25) Zhang, H. L.; Nagatsu, A.; Okuyama, H.; Mizukami, H.; Sakakibara, J. Sesquiterpene glycosides from cotton oil cake. *Phytochemistry*, 48, 665–668 (1998)
26) Chaloner, P. A. Geminal and vicinal carbon–13–carbon–13 coupling constants in carboxylic acid derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*., 1028–1032 (1980)
27) Khlebnikova, T. B.; Pai, Z. P.; Fedoseeva, L. A.; Mattsat, Y. V. Catalytic oxidation of fatty acids. II. Epoxidation and oxidative cleavage of unsaturated fatty acid esters containing additional functional groups. *React. Kinet. Catal. Lett*., 98, 9–17 (2009)
28) Achenbach, H.; Stocker, M.; Constenla M. A. Constituents of tropical medicinal plants. Part 31. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*, 27, 1835–1841 (1988)
29) Zander, W.; Mohr, K. I.; Gerth, K.; Jansen, R.; Muller, R. *p*-Hydroxyacetophenone amides from *Cystobacter ferrugineus*, strain Cb G35. *J. Nat. Prod*., 74, 1358–1363 (2011)
30) Kosuge, T.; Tsuji, K.; Nukaya, H.; Terada, A.; Ochiai, M.; Wakabayashi, K.; Nagao, M.; Sugimura, T. Isolation and Identification of 5–Hydroxymaltol, a Mutagenic Substance in Glucose Pyrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 881–883 (1983)
31) Le, T. P. L.; Lee, J. W.; Kim, J. G.; Han, J. S.; Kwon, H.; Lee, D.; Lee, M. K.; Hwang, B. Y. Tetrahydroprotoberberine N–Oxides from Chelidonium Majus and Their Inhibitory Effects on NO Production in RAW 264.7 Cells. *Phytochemistry Letters*, 41, 38–42 (2021)
32) Xiong, J.; Huang, Y.; Wu, X. -Y.; Liu, X. -H.; Fan, H.; Wang, W.; Zhao, Y.; Yang, G. -X.; Zhang, H. -Y.; Hu, J. -F. Chemical Constituents from the Fermented Mycelia of the Medicinal Fungus Xylaria Nigripes. *Helv. Chim. Acta*., 99, 83–89 (2016)

# CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた紫外線防御剤となる多機能光回復酵素の開発

大阪大学大学院基礎工学研究科
山元　淳平

Ultraviolet (UV) exposure of DNA causes formation of harmful DNA damage, such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine(6–4)pyrimidone photoproducts (6-4PPs), which block DNA replication and induce mutagenesis, leading to carcinogenesis. Repair of these lesions is a vital pathway to maintain genetic integrity, and thus loss of the genes responsible for DNA repair causes cell death or cancer. Among the DNA repair systems, photoreactivation is the simplest pathway, in which a sole photo-responsive enzyme, photolyase (PL), can repair UV-induced DNA lesion in a light-dependent manner. Therefore, PLs are molecules applicable to the UV protectant under sunlight.

PLs are classified into two major classes, CPD photolyase and (6–4) photolyase, depending on their target substrates (CPD and 6-4PP, respectively). If a hybrid type of PL that can recognize and repair both CPDs and 6-4PPs is developed, such a molecule excellently inhibits formation of UV-induced DNA damage and functions as a UV protectant. In this study, I intended to develop the hybrid photolyase by combination of CRISPR-Cas9 genome editing technology and directed evolution of photolyase. Plasmids were designed to knock the modified PL genes in human cells via homology-independent targeted integrity, with a promoter and antibiotic-resistant gene. After transfection of the plasmid with Cas9 and gRNA-producing plasmids, however, antibiotics-resistant strains were not obtained, although the target genes were integrated into the AAVS1 site. Thus, the plasmid was used for functional screening of the hybrid PL in bacteria, the results of which are shown in this report.

## 1．緒　言

生体中の遺伝情報を含むDNAは紫外線の曝露により化学構造の変化が誘起され、隣接するピリミジン塩基間において光架橋反応が起こり、シクロブタン型ピリミジンダイマー（CPD）や（6-4）光産物といった紫外線損傷DNAが形成される。これら紫外線損傷DNAの修復はヌクレオチド除去修復機構（NER）が担っており、その修復経路の遺伝的欠損は色素性乾皮症などの紫外線高感受性症状を伴う重篤な疾病の原因であることが知られている。一方、大腸菌からヒトを除く高等生物に広範に保存されている光回復と呼ばれるDNA修復経路は、フラビンタンパク質のひとつである光回復酵素が紫外線損傷の直接認識・修復を担っており、紫外線損傷DNAを単一の酵素で、かつ太陽光中の青色光を用いて修復することができるユニークな酵素である[1)]。

ヒトは光回復酵素を有していないため、光回復酵素を外来からヒト細胞中へと導入、もしくは適切な条件で表皮塗布することで、上記疾患の遺伝子治療や紫外線防御効果が期待される。一方で、光回復酵素は高い基質選択性を有しており、CPDおよび(6-4)光産物のそれぞれの修復を担う酵素が存在する（図1）。ヒト培養細胞に対して光回復酵素を導入する試みは2000年代前半からなされ始め、CPD光回復酵素をHeLa細胞へ導入することで、紫外線によって誘起されるアポトーシスの減少[2)]や、UVB曝露に起因する炎症作用の軽減[3)]といった効果が報告されている。さらに、CPD光回復酵素を有するトランスジェニックマウスが作成され、高い紫外線耐性を持つことが報告されている[4)]。また、より効率よくかつ簡便にCPD光回復酵素の遺伝子を導入するため、mRNAとして初代ケラチノサイトへの導入がなされ、医療応用への方向性が示された[5)]。いずれの報告例も、CPD光回復酵素のみを用いており、(6-4)光回復酵素を導入した報告例は見当たらない。単一の酵素で両方の損傷を修復することのできるハイブリッド型光回復

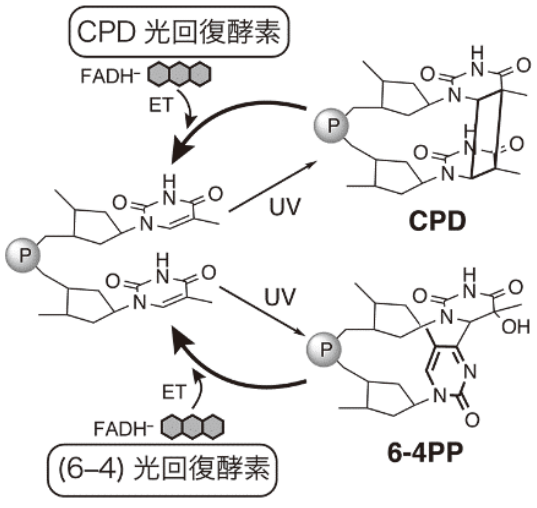
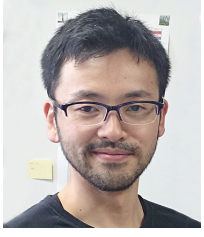



図1　光回復酵素について



Development of multi-functional photolyase as an ultraviolet protectant using CRISPR-Cas9 genome editing

Junpei Yamamoto

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

酵素を調製できれば、前述の治療応用が可能になることが期待される。過去に、(6-4)光回復酵素の一部のアミノ酸をCPD光回復酵素の相同アミノ酸へと置換することで、(6-4)光回復酵素でありながら、CPDの修復が可能となることを報告している[6]。しかし、この酵素は(6-4)光回復酵素としての機能が喪失しており、ハイブリッド型としての遺伝子治療やコスメトロジーへの応用には十分ではない。

本研究では、(6-4)光回復酵素を基本骨格とし、(6-4)光産物修復能を保持したままCPD光回復能を持たせたハイブリッド型光回復酵素を、Error-prone PCRおよびヒト線維芽細胞に対するCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を組み合わせることで開発することを計画した。

## 2. 方　法

### 2. 1. プラスミド構築

基本骨格となるプラスミドにはpBluescript II SK(-)を用い、XhoI/SacIサイトに諸々のPCR産物を導入した。PCRはPrimeSTAR MAX DNA polymeraseもしくはPrimeSTAR GXL DNA poymerase(タカラバイオ)を用いた。PCR増幅産物はアガロースゲル電気泳動によって分離・精製した。PCR増幅産物を用いたプラスミドの構築には、In-fusion HDキット(タカラバイオ)を用いた。構築したプラスミドを用いて大腸菌Stellar competent cells(Clontech)を形質転換し、得られたプラスミドのDNA配列はコロニーPCR産物のシーケンス解析により確認した。本研究で構築した基本プラスミドを、pGE-XbaI-IPAと名付けた。目的配列を有する大腸菌コロニーを培養し、プラスミドをNucleoBond Xtra Midiキットで精製した。

pGE-XbaI-IPAのクローニングサイトXbaI部位に、*Methanosarcina mazei*由来CPD光回復酵素(MmCPDII)もしくは*Xenopus laevis*由来(6-4)光回復酵素(Xl64)を導入したプラスミドpGE-MmCPD-IPAおよびpGE-Xl64-IPAは同様に作成した。

### 2. 2. Error-prone PCR

Xl64に対するランダム変異導入は既報[7]に従いError-prone PCRにより行った。100μLの反応混合液(0.3μMプライマー, 10ng pGE-Xl64-IPA, rTaq DNA polymerase, 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 1mM $MnCl_2$, 1.5mM dATP, 1.5mM dGTP, 1mM dCTP, 1mM TTP)を調製し、変性(95℃ 30s)・アニーリング(55℃ 30s)・伸長(68℃ 2min)のサイクルを35回行った。PCR産物はアガロースゲル電気泳動により分析・精製した。

### 2. 3. スクリーニング

DNA修復活性の有無のスクリーニングには、DNA修復能を失った大腸菌SY2株を利用したUVサバイバルアッセイを用いた。制限酵素XbaIによって線状化したpGE-XbaI-IPAと2. 2. で調製したPCR産物をIn-fusion HDキットによって環状プラスミドとし、反応処理後の溶液を用いてSY2を形質転換し、薬剤を含む寒天培地プレート上に撒いた。そのプレートに対し、0.2J/$m^2$の紫外光を照射後、白色光を30分照射した。その後、暗所37℃にて静置し、得られたコロニーについてコロニーPCRを行った。PCR産物のDNA配列を解析し、変異導入された位置を調べた。

## 3. 結　果

### 3. 1. 実験系のデザイン

CRISPR-Cas9による遺伝子導入には従来相同組換え(HR)が用いられるが、非分裂細胞ではHRの頻度が低いため、非相同末端結合(NHEJ)を介したHomology-Independent Targeting Integration(HITI)法[8]による導入を計画した。そのために、図2に示すプラスミドDNAを設計･作成した。CRISPR-Cas9による遺伝子導入部位はヒトゲノム上のセーフハーバーであるAAVS1とし、2つのAAVS1認識配列でヒトPGKプロモーター・大腸菌EM7プロモーター・サブクローニング用制限酵素サイト(XbaI)・内部リボソーム進入部位(IRES)・ピューロマイシン耐性遺伝子(PuroR)・ポリAを挟んでいる。このプラスミドをpGE-XbaI-IPAと名付けた。プラスミドをAAVS1認識ガイドRNAおよびCas9発現プラスミドとともにヒト細胞に導入すれば、クローニングサイトにサブクローニングした任意の遺伝子をAAVS1へ導入することができる。また、本系は大腸菌の合成プロモーターであるEM7を保有しているため、XbaIサイトに導入した遺伝子を大腸菌中でも発現することができる。

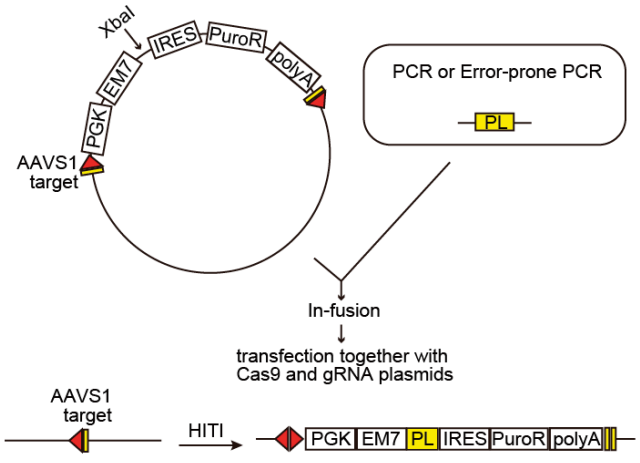



図2　設計したプラスミドとHITIによるゲノム導入

### 3. 2. ヒト細胞を用いたプラスミドの機能確認

本システムの確認のため、制限酵素サイトにCPD光回復酵素および(6-4)光回復酵素の遺伝子をpGE-XbaI-IPAにサブクローニングしたプラスミドpGE-MmCPDII-IPAおよびpGE-Xl64-IPAを調製し、NERが欠失したXP2OS細胞にこれらのプラスミド、AAVS1のgRNA用プラスミド、およびCas9プラスミドとともに導入した。トランスフェクション7日後からピューロマイシンによる薬剤セレクションを行ったが、薬剤耐性を獲得した細胞は得られなかった。

トランスフェクション後の細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRをしたところゲノム中への遺伝子挿入は確認された。コントロールで用いた別の遺伝子導入プラスミドでは、ピューロマイシン耐性遺伝子はEF1αプロモーター下流に存在し、こちらは薬剤耐性が獲得された。このことから、XP2OS細胞ではPGKプロモーターの働きが弱く、薬剤耐性が充分に獲得されたなかったものと考えられる。したがって、ヒト細胞を用いたスクリーニングはできないと判断した。

### 3. 3. 大腸菌SY2によるサバイバルアッセイ

構築したプラスミドは大腸菌のプロモーターも含むため、今回目的としたスクリーニングは大腸菌でも実施可能である。そこで、各種DNA修復関連遺伝子を薬剤耐性遺伝子で置換した大腸菌株SY2および今回構築したプラスミドを用いてスクリーニングが実施可能であるかどうか検証した。

このSY2株は内在性の組換え修復、光回復、およびヌクレオチド除去修復ができないため、紫外線照射によって極めて容易に死滅する。ここに光回復酵素遺伝子を保有するプラスミドを導入することで、紫外線照射につづく白色光照射により、紫外線損傷DNAを修復することが可能となり、生存率の向上が見られることが期待される。

まず、今回構築したプラスミドpGE-XbaI-IPA、pGE-MmCPDII-IPA、およびpGE-Xl64-IPAを用いてSY2株を形質転換し、その紫外線損傷DNAの修復に伴う生存率の向上が見られるかどうか調べた。その結果、CPD修復能を有するMmCPDIIを導入したプラスミドで形質転換を行った場合、生存率の大幅な向上が観測された。Xl64を含むプラスミドでは、光回復酵素を含まないものと比較すると小程度の生存率の向上が見られた(図3)。これらのことから、今回構築したプラスミドがSY2株の中で機能していることがわかった。MmCPDIIとXl64の生存率の差は、生成する紫外線損傷の種類に対応していると考えられる。一般的に、紫外線照射によって生成する損傷としては、6-4PPよりもCPDの方が多くなることが報告されており、6-4PP修復能しか持たないXl64の導入ではCPDの修復はできないため、限定的な生存率の向上となったと考えられる。

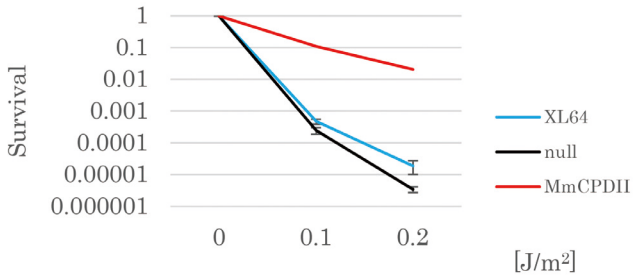



図3　UV サバイバルアッセイの結果

### 3. 4. Error-prone PCRによる変異導入および機能スクリーニング

これらの結果から、Xl64に対して変異導入を行いCPD修復能が獲得された場合、生存率の大幅な向上が期待できる。そこで、Xl64をテンプレートとし既報に従いError-prone PCRを行って変異導入を行った。XbaIサイトで線状化したpGE-XbaI-IPAに対してPCR産物をIn-fusion法にて連結し、SY2大腸菌株を形質転換した。プレート上に塗布した後、0.2J/$m^2$の紫外線を照射し、白色光30分照射ののち、37℃でインキュベートしたところ、コロニーの形成が確認された。このうち、10個のコロニーをピックアップし、DNA配列を解析した。結果をTable 1に示す。

Table 1　Error-prone PCR による Xl64 の変異導入パターン

| Entry | 変異導入塩基 | 変異のタイプ | アミノ酸の変異 |
|---|---|---|---|
| 1 | T483A | Transversion | なし(Gly161Gly) |
| | A1436T | Transversion | Asn479Ile |
| | A1510G | Transition | Asn504Asp |
| 2 | C246T | Transition | なし(Phe88Phe) |
| | A356C | Transversion | Glu119Ala |
| | T1556C | Transition | Val519Ala |
| 3 | C734T | Transition | Thr245Ile |
| 4 | A428G | Transition | Asn143Ser |
| | G574A | Transition | Val192Ile |
| | A900G | Transition | なし(Ala300Ala) |
| | T1055C | Transition | Ile352Thr |
| 5 | A1093G | Transition | Thr365Ala |
| 6 | A1041G | Transition | なし(Arg347Arg) |
| | T1227C | Transition | なし(Phe409Phe) |
| 7 | T940C | Transition | Cys314Arg |
| | A1128T | Transversion | なし(Gly376Gly) |
| | A1519G | Transition | Lys507Glu |
| 8 | リード失敗 | | |
| 9 | C1089T | Transition | なし(Phe363Phe) |
| | T1278C | Transition | なし(Asp426Asp) |
| 10 | T694C | Transition | Cys232Arg |
| | A1128G | Transition | なし(Gly376Gly) |

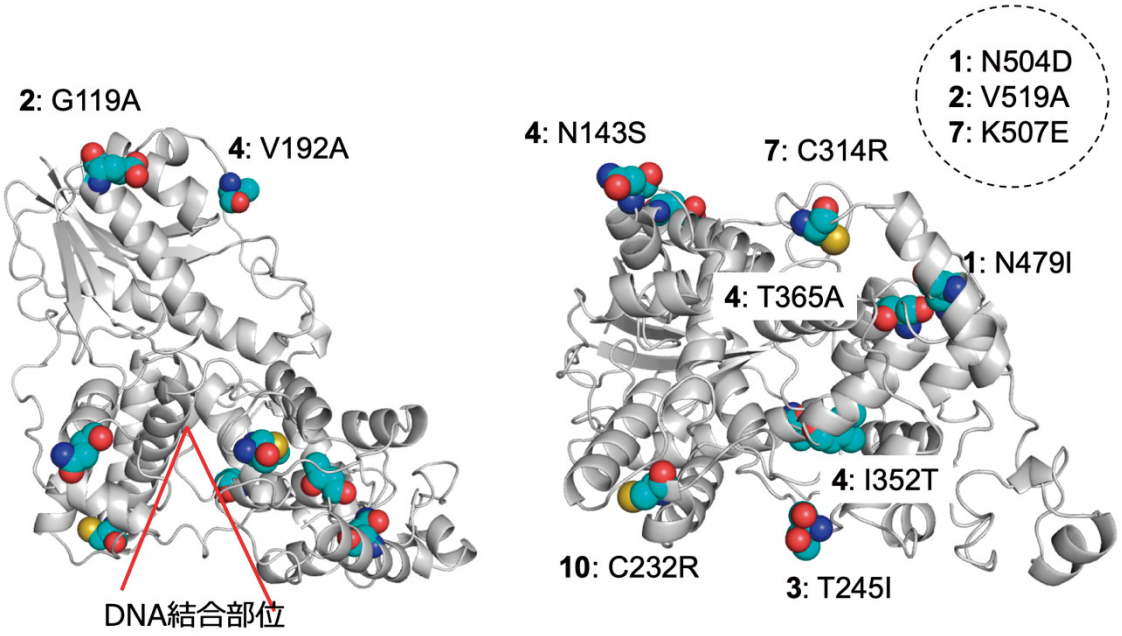



図４　Error-prone PCR により変異導入された Xl64 のアミノ酸

エントリー４においては、Xl64 遺伝子配列 1545 塩基のうち、４箇所の変異が確認された一方で、他のエントリーにおいてはそれよりも少ない変異導入数であった。また、変異導入によってアミノ酸変異が導入されない場合も多く見られ、エントリー６や９では、アミノ酸配列としては Xl64 野生型と同一であった。図４に、導入された変異の場所を示す。

## ４．考　察

今回の変異導入では、主としてトランジション変異が起こっており、アミノ酸の大幅な変化につながっていないことがわかった。より高度に変異導入することで、広範なライブラリ形成につながるため、別の手法による変異導入を試みる必要がある。また、今回のスクリーニングで得られた変異体のうち、エントリー４についてはDNA結合部位の近傍に２箇所の変異が導入されていることから、この配列を有するタンパク質を遺伝子組換え体として得、タンパク質の機能解析に供する価値がある可能性がある。一方で、本スクリーニングでは、Xl64 と機能的に変化がない場合においても生存コロニーとして得られたことから、スクリーニング法として改善の余地があると考えられる。今回は In-fusion 反応産物を直接SY２へと導入してスクリーニングに供する方法を採用したが、一度、別の大腸菌に導入後にプラスミドを回収してから、SY２株にてスクリーニングする方法も検討する必要がある。

以前の研究では、(6-4) 光回復酵素のDNA結合部位の内部で損傷部位と直接相互作用するアミノ酸を置換することでCPD修復能を獲得できることを報告している[6]。今回導入されたアミノ酸の変異はDNA結合部位の周辺であり、損傷と直接相互作用するアミノ酸側鎖ではなかった。そのため、今後は変異導入を行う範囲を限定することで、より現実的な多機能酵素の開発につながると考える。

### (引用文献)

1) Yamamoto, J., Plaza, P., Brettel, K., *Photochem. Photobiol.* **93**, 51-66 (2017).
2) Chigancas, V., Miyaji E. N., Muotri, A. R., Jacysyn, J. F., Amarante-Mendes, G. P., Yasui, A., Menck, C. F. M., *Cancer Res.* **60**, 2458-2463 (2000).
3) Stege, H., Roza, L., Vink, A. A., Grewe, M., Ruzicka, T., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1790-1795 (2000).
4) Schul, W., Jans, J., Rijksen, Y. M. A., Klemann, K. H. M., Eker, A. P. M., de Wit, J., Nikaido, O., Nakajima, S., Yasui, A., Hoeijmakers, J. H. J., van der Horst, G. T. J., *EMBO J.* **21**, 4719-4729 (2002).
5) Boros, G., Miko, E., Muramatsu, H., Weissman, D., Emri, E., Rozsa, D., Nagy, G., Juhasz, A., Juhasz, I., van der Horst, G., Horkay, I., Remenyik, E., Kariko, K., Emri, G., *J. Photochem. Photobiol. B* **129**, 93-99 (2013).
6) Yamada, D., Dokainish, H. M., Iwata, T., Yamamoto, J., Ishikawa, T., Todo, T., Iwai, S., Getzoff, E. D., Kitao, A., Kandori, H., *Biochemistry* **55**, 4173-4183 (2016).
7) Cadwell, R. C., Joyce, G. F., *Genome Res.* **2**, 28-33 (1992).
8) Suzuki, K. et al., *Nature* **540**, 144-149 (2016).

# Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

# *In vitro/in silico* 試験による皮膚感作性の毒性学的懸念の閾値（TTC）コンセプトの確立

国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部
足利　太可雄

Recently, several *in vitro* skin sensitization tests have been listed in the OECD guidelines. The threshold of toxicological concern (TTC) is a threshold value for human exposure that does not show any obvious adverse effects at the lower doses for all chemicals. In this study, we aimed to develop a quantitative prediction model using *in vitro/in silico* dataset and establish a TTC concept for skin sensitization.

The EC3 value, which is the endpoint of the LLNA, was used as the objective variable, and data on 120 substances were extracted from the dataset published by Cosmetics Europe. *In vitro* tests (DPRA, KeratinoSens™ and h-CLAT) data and physico-chemical properties were used as the explanatory variables. A quantitative prediction model for EC3 was developed using support vector regression (SVR), which is a machine learning approach. Predicted EC3 values were used to establish a no expected sensitization induction level (NESIL), and acceptable exposure level (AEL) for each chemical was calculated by dividing NESIL by sensitization assessment factor (SAF). Then by fitting gamma distribution of the AELs using a negative log (10) scale, 95 and 99 percentile probability were calculated as the Dermal Sensitization Threshold (DST) value. Finally, conversion of the DST to the threshold concentration of a women's face cream was done as an example of the application of this concept.

This prediction model was validated by 3-hold cross validation, and the accuracy of prediction of potency class in five categories was 45.8%. Assuming 20% of all chemicals to be skin sensitizers, the DST (μg/cm$^2$) for women's face cream was calculated as 0.129 (99 percentile) and 3.99 (95 percentile), respectively. Furthermore, the threshold concentration of this type of products was calculated as 0.008 % (for DST 99 percentile) and 0.26% (for DST 95percentile). This TTC concept will be useful for the safety evaluation of, for example, impurities in cosmetic ingredients as a non-animal approach.

## 1．緒　言

毒性学的懸念の閾値（TTC：Threshold of Toxicological Concern）とは、あらゆる化学物質についてそれ以下の曝露量では明らかな有害影響が現れないとするヒト曝露の閾値として設定される値であり、その手法は過去の毒性試験データの統計学的解析により発展してきたものである。TTC手法は毒性未知の化学物質について毒性試験を行わずにリスクを評価するアプローチであり、対象物質の化学構造の情報とヒト曝露量に関する情報のみが必要とされるため、毒性学的情報は極めて限られているが曝露量が通常極めて低い化学物質群を包括的に評価するために有用であると考えられている。TTC手法はこれまで主に経口曝露の全身毒性について検討されており、香料[1]や医薬品の不純物[2]など一部では公的規制においても受け入れられている。一方、経皮曝露による主要な毒性である皮膚感作性についても、SaffordによりTTCコンセプト（DST：Dermal Sensitization Threshold）が提案されて以来研究が進んでいる[3, 4]。動物実験の廃止、原料調達の多様化、安全性保証の厳格化など化粧品開発をとりまく最近の状況において、皮膚感作性におけるTTC手法は、原料中の不純物や天然物中の微量成分などヒト曝露量が非常に低いと考えられる物質に関する、毒性試験を伴わない包括的安全性評価法として強く期待されている。

最近*in vitro*皮膚感作性試験が相次いでOECDガイドラインに収載され、*in silico*試験法も含めた試験法の組み合わせについてもOECDガイダンスが公開された[5]。また日欧の化粧品工業会は重要課題として*in vitro/in silico*試験法による皮膚感作性のリスク評価に取り組んでいる[6, 7]。さらに最近、日本化粧品工業連合会による日本人女性の化粧品使用量の調査[8]があった。

こうした状況から、最近国際的主要化粧品メーカーでも皮膚感作性のTTCコンセプトの実用化が検討されている。そこで本研究では、従来用いられてきた*in vivo*試験データの代わりに将来増加が見込まれる*in vitro/in silico*試験データによる皮膚感作性のTTCコンセプトの確立を目指し、検討を行った。



Establishment of a threshold of toxicological concern (TTC) concept for skin sensitization by *in vitro/in silico* approaches

Takao Ashikaga

National Institute of Health Sciences, Division of Risk Assessment

## 2．方　法

### 2．1．データセットの確立

マウス皮膚感作性試験LLNAのエンドポイントであるEC3（%）を精度よく予測可能なモデルを構築するために、Cosmetics Europeにより公表された、*in vivo/in vitro*データセット[7]のうち全ての試験データが揃っている120化合物のデータを用いた。予測モデル作成のため、そのうち

90化合物をtraining set、30化合物をtest setとしてランダムに分割して使用した。目的変数は同一化学物質で複数の*in vivo*データがある場合、LLNA EC3（μmol/cm²）の中央値とした。説明変数は、*in vitro*試験のDPRA, h-CLAT, KeratinoSens™それぞれにおいて、LysおよびCysを含むペプチド減少率（%）、CV75（μM）およびMIT（μM）、EC1.5（μM）およびIC50（μM）を用いた。さらに説明変数として、主に皮膚透過性に関わる被験物質の物理化学定数（Molecular weight, LogP, LogS, Boiling point, Melting point）を用いた。データの欠損値処理として、LLNA陰性物質のEC3の中央値を150%（後にμmol/cm²に単位変換）、DPRAペプチド減少率が0のものを0.001%、h-CLAT陰性物質のMIT値を10,000μg/mLとした。さらにLLNAおよび*in vitro*試験データについては、常用対数変換を行った。

## 2. 2. 機械学習による強度（EC3値）予測モデルの開発

説明変数から目的変数を予測するために非線形の機械学習モデルであるSupport Vector Regression（SVR）を選択した。データセットとして準備した120化合物について3-fold cross validationによる性能評価を行った。モデルの評価指標としては$R^2$（決定係数）とRMSE（平均平方二乗誤差）を用いた。RMSEは値が小さいほど予測値と実測値の誤差が小さいことを示す。また、$R^2$は予測モデルが適切にデータを表現できるかを示し1に近づくほど良いモデルといえる。RMSEと$R^2$の計算式は下記に記した。

$$\text{RMSE (root mean squared error)} = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(y_i - f_i)^2}$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - f_i)^2}{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \tilde{y}_i)^2}$$

$y_i$：実験値
$\tilde{y}_i$：実験値の平均値
$f_i$：予測値

## 2. 3. 皮膚感作性DST値の設定

得られた予測EC3（%）値を単位面積当たりの曝露量（μg/cm²）に変換後、既知の関係式[3]からヒトにおける無感作誘導濃度（NESIL：No Expected Sensitization Induction Level）を算出した。さらに、個人間変動、製剤系（スキンケアやシャンプーなど）および使用状況（髭剃り後など）から設定した感作評価係数（SAF：Sensitization Assessment Factor）[9]で除することで許容曝露濃度（AEL：Acceptable Exposure Level）を算出し、最終的に各化学物質のAELを常用対数に変換した値について、ヒストグラムを作成した。市販の統計解析ソフトであるJMPを用い、最尤法によりこのヒストグラムをガンマ分布にフィッティングした。このようにして得られたAELの予測モデルと、*in vivo*試験結果から得られた従来モデルを2種のパラメーター（形状母数と尺度母数）を指標に比較した。Negative Log（10）AELの99パーセンタイルと95パーセンタイルの値から、DST（99 percentile）とDST（95 percentile）値を算出した。さらに、代表的な化粧品の製品タイプである女性用フェースクリームを例として、本モデルと従来の動物実験によるDST値の比較を行った。最後に日本化粧品工業連合会の調査結果による製品タイプ別の使用量と曝露面積[8]から日本人女性におけるフェースクリームの曝露量（CEL：Consumer Exposure Level）を算出し、CEL=DST値とした場合の製品中の配合濃度閾値を計算した。

## 3. 結　果

作成したEC3値予測モデルの予測値と実測値の散布図を図1に示す。training setとtest setの$R^2$値の平均は、それぞれ0.584, 0.585であり、RMSE値はそれぞれ0.545, 0.653であった。各cross validationの$R^2$とRMSEを表1

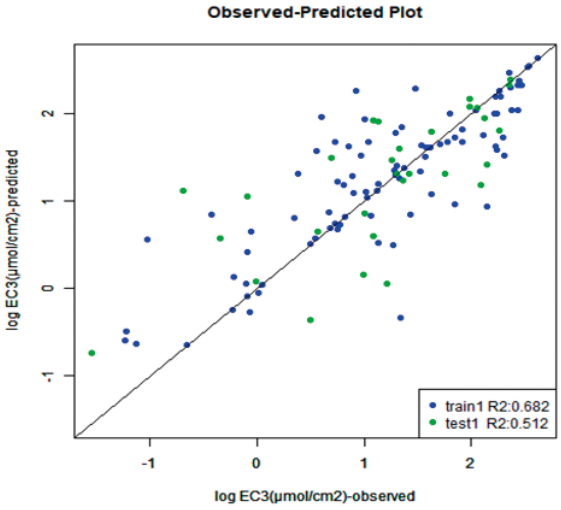



図1　EC3（μmol/cm²）の予測値と実測値の対応

表1　3-fold cross validationにおける$R^2$とRMSE

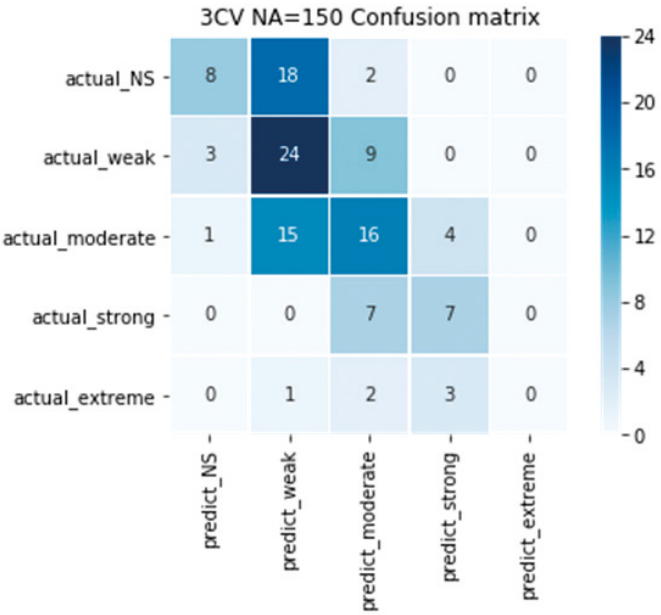
| | $R^2$ | | RMSE | |
|---|---|---|---|---|
| | training set | test set | training set | test set |
| 1st-iteration | 0.648 | 0.463 | 0.508 | 0.758 |
| 2nd-iteration | 0.561 | 0.623 | 0.536 | 0.632 |
| 3rd-iteration | 0.543 | 0.657 | 0.587 | 0.570 |
| average | 0.584 | 0.585 | 0.544 | 0.653 |

に示す。またカテゴリー分類（Extreme, Strong, Moderate, Weak, Non-Sensitization）における予測値と実測値の一致率は45.8％であった。120化学物質中、予測値と実測値のカテゴリーが1区分以内のずれに収まったのは114化学物質であり、全体の90％以上であった。予測値と実測値のカテゴリーごとの対応を表2に示す。

次に得られたEC3値予測モデルにより、LLNA陽性90物質についてEC3予測値を算出し、各種数値変換後、最終的にNegative Log（10）AELを算出した。なお、女性用フェースクリームのSAFはInternational Fragrance Association（IFRA）の基準に従って100とした[9]。図2に、Negative Log（10）AELのヒストグラムおよびガンマ分布にフィッティングした結果を示す。得られたガンマ分布の形状母数と尺度母数はそれぞれ1.98、0.73であった。

全化学物質の20％が皮膚感作性陽性と仮定し、今回得られたガンマ分布から、女性用フェースクリームのNegative Log（10）AELの各パーセンタイルを算出した。99パーセンタイルと95パーセンタイルの値は、それぞれ0.901，−0.601であった。これらの値をAELに変換し、それぞれをDST値とすると、DST（99 percentile）＝0.126（μg/cm$^2$）、DST（95 percentile）＝3.99（μg/cm$^2$）であった。

表2　予測値と実測値のカテゴリーごとの対応




予測と実測のカテゴリーが一致した物質:
55 substances（45.8％）

予測と実測のカテゴリーが1区分ずれた物質:
59 substances（49.1％）

予測と実測のカテゴリーが2区分ずれた物質:
5 substances（4.1％）

予測と実測のカテゴリーが3区分ずれた物質:
1 substances（4.1％）

さらに女性用フェースクリームの使用量（0.84 g/day、日本人女性90 percentile）と曝露面積（551 cm$^2$、日本人女性頭部面積の半分）から、CELを算出すると、1.52（mg/cm$^2$/day）であった。そこでCEL=DSTとして、化学物質の女性用フェースクリームの配合濃度閾値を算出すると、DST（99 percentile）において0.008％、DST（95 percentile）において0.262％とそれぞれ算出された。

## 4．考　察

今回開発に用いた*in vivo*のLLNAデータは、Cosmetics Europeにより公表され、現在開発中であるOECD Defined Approachによる皮膚感作性試験テストガイドラインでも使用されている信頼性の高いものである。予測モデル開発において目的変数の質は大変重要であるため、現時点で最も信頼性の高いと考えられるデータセットを使用した。

開発したSVMによるEC3値予測モデルは、$R^2$が0.585であり、カテゴリー分類の一致率も45.8％であったため、予測可能であると判断された。また、各$R^2$とRMSEについてtraining setとtest setは大きな差がなく、汎化性能に問題ないと考えられた。EC3値予測モデルの予測性が良好と判断し、LLNAにおける陽性物質について予測EC3（％）値をNESILに変換後AELを算出し、常用対数に変換してNegative Log（10）AELを算出し、ヒストグラムを作成したところ、ガンマ分布にフィッテイング可能と考えられた。ガンマ分布の2種のパラメーターである形状母数と尺度母数はそれぞれ、1.98、0.73であり、LLNAの実測値から求めたガンマ分布の形状母数と尺度母数はそれぞれ、2.57、0.57であったことから、今回開発したEC3値予測モデルによる予測値の強度分布は実測値のそれと類似していることが示された。

今回得られたDST（99 percentile）＝0.126、DST（95 percentile）＝3.99は、従来報告されたLLNAによるDST（99

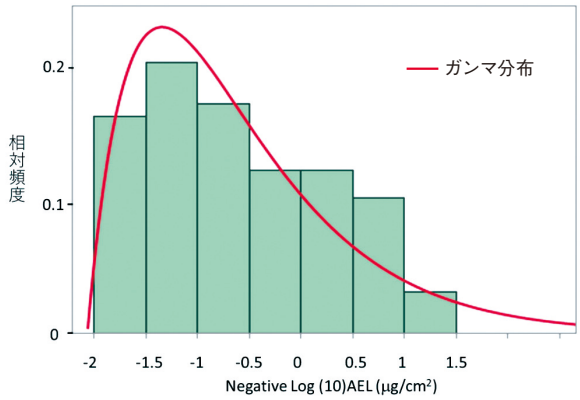



図2　Negative Log（10）スケールにおける皮膚感作性物質のAELの分布

percentile）=0.06、DST（95 percentile）=1.6[3]と比較して約2倍であった。また皮膚感作のAOP（Adverse Outcome Pathway）において重要なKey Eventであるタンパク質との結合の観点からHigh Potency Category（HPC）に分類される皮膚感作性物質のDST（95percentile）=1.5とする報告もある[10]。今回用いた90品のLLNA陽性物質には、EC3（%）の予測値がextremeに分類される0.1未満のものがなく、そのことが強度分布に影響を与えた可能性が考えられた。今後強度がextremeに分類される皮膚感作性物質をデータセットに追加するべきと考える。

今回試算したDST値は、Cosmetics Europeにより公表された120化合物のデータを用いたこと、作成したEC3予測モデルにより求めたNegative Log（10）AELがガンマ分布をとること、全化学物質の20%が皮膚感作性陽性であること、CEL=DSTとしたことなど様々な前提条件に基づいており、今後それらの妥当性に関して検証が必要である。さらに、今回acceptable riskのprobabilityは99パーセンタイルと95パーセンタイルを採用したが、どの値を用いるべきかについても議論が必要である。

また、TTCコンセプトは実務上様々な利点がある一方で、以下に示すデメリットも知られている[11]。

・化学物質の複合曝露の影響を考慮していない。
・データセットの量と質の限界
・TTC は確率に基づくものであり、すべての化学物質から守るものではない。
・適用範囲が限られており、タンパク質などトレーニングセットに入っていない不適格要件の明確化が必要

さらに、本DST値を用いる場合に注意すべき点として、ヒトにおける無感作誘導濃度（NESIL）を用いていることから明らかなように、あくまでも感作未成立状態における閾値であることが挙げられる。したがってすでに感作が成立している個体の場合、今回求めたDST値よりかなり少ない曝露量で皮膚炎が誘発する可能性がある。

以上の課題などから、皮膚感作性におけるTTCコンセプトは、アイデアとして提唱されているものの、未だ行政的規制の受け入れには至っておらず、今後上記の点も含めて幅広い議論が必要になると思われる。それらを踏まえた上で、今回得られたDST値は、適切な適用範囲のもとで、皮膚感作性試験を伴わない包括的安全性評価の基準になる可能性があると考えられた。

今回設定したDST値を用いて、製剤（女性用フェースクリーム）中の化学物質の配合濃度閾値を算出した。経皮適用する製剤は、サンスクリーンなど全身に使用するもの、シャンプーなど洗い流すものなど様々であり、今回例として挙げた女性用フェースクリーム以外の製品タイプについても、配合濃度閾値を算出してその妥当性を議論する必要がある。また、製品使用量は、日本化粧品工業連合会の調査による90パーセンタイルの値を用いた。製品使用量や曝露面積は化粧習慣や人種により違いがあると考えられるため、同様の調査結果がある欧州のSCCSガイダンス[12]なども参照し、設定条件による違いを確認すべきと考える。

本研究では、機械学習であるSVRを用いて強度予測モデルを作成した。これまでも機械学習による皮膚感作性の強度予測モデルはいくつか開発されており[13-15]、最近アメリカ環境保護庁（EPA）において、Artificial Neural Network[16]による皮膚感作性強度予測モデルによるイソチアゾリノン系防腐剤のリスク評価が行われたことは注目に値する。今後こうした機械学習による皮膚感作性の強度予測モデルによる原料の配合許容濃度予測の実用化が期待されている。

## 5．総　括

化粧品開発における動物実験が困難になる中、皮膚感作性のTTCコンセプト（DST）の実用化が急務となっている。本コンセプトが確立されれば、閾値未満の曝露量の範囲で安全性試験を行わずに、被験物質（例えば化粧品原料）の原料情報と配合濃度のみで安全性評価が可能になることが期待できるためである。具体的な活用の例として、動物実験以外では特に評価が困難とされる、化粧品原料中の不純物や天然物中の微量成分の安全性評価に効率的で有用な手法となることが挙げられる。皮膚感作性のTTCコンセプトを確立するためには、多様な感作性陽性物質からなる信頼性の高いデータセットが鍵となるが、LLNAなど*in vivo*のデータセットの拡充が期待できない現状を考えると、*in vitro*試験のデータセットの拡充に期待したい。

今回機械学習の手法であるSVRの採用により、予測精度および頑健性の良好な強度予測モデルの開発が可能となった。本モデルにより非動物実験結果による定量的リスク評価（QRA）が可能になり、製品中の配合許容濃度の算出などへの応用が期待できる。

いずれにしても化粧品開発における動物実験が困難になりつつある現在、曝露量が極めて少ない場合に限られるものの、*in vitro*試験さえも不要となる皮膚感作性のTTCコンセプトの確立はニーズが高いと考えられ、本研究がそのきっかけとなれば幸いである。

**謝　辞**

本研究は、名古屋市立大学大学院薬学研究科 医薬品安全性評価学分野および国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部第四室との共同研究により行われたものであり、関係者の皆様に深く感謝いたします。

また本研究の遂行にご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に篤く御礼申し上げます。

（引用文献）


1) EFSA: Scientific Opinion on Exploring options for providing advice about possible human health risks based on the concept of Threshold of Toxicological Concern (TTC), *EFSA Journal*, 10 (7), 2750 (2012).

2) L. Müller, R.J. Mauthe, C.M. Riley, M.M. Andino, D. De Antonis, C. Beels C, A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44, 198–211 (2006).

3) R. J. Safford, he Dermal Sensitization Threshold –A TTC approach for allergic contact dermatitis, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51, 195–200 (2008).

4) R. J. Safford, A. O. Aptula, N. Gilmour, Refinement of the Dermal Sensitization Threshold (DST) approach using a larger dataset and incorporating mechanistic chemistry domains, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 60, 218–224 (2011).

5) Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for skin sensitisation, https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-the-reporting-of-defined-approaches-and-individual-information-sources-to-be-used-within-integrated-approaches-to-testing-and-assessment-iata-for-skin-sensitisation_9789264279285-en

6) O. Takenouchi, S. Fukui, K. Okamoto, S. Kurotani, N. Imai, M. Fujishiro, D. Kyotani, Y. Kato, T. Kasahara, M. Fujita, A. Toyoda, D. Sekiya, S. Watanabe, H. Seto, M. Hirota, T. Ashikaga, M. Miyazawa, Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals, *Journal of Applied Toxicology*, 35 (11), 1318–1332 (2015).

7) S. Hoffmann, N. Kleinstreuer, N. Alépée, D. Allen, AM. Api, T. Ashikaga, E. Clouet, M. Cluzel, B. Desprez, N. Gellatly, C. Goebel, P. S. Kern, M. Klaric, J. Kühnl, J. F. Lalko, S. M-Teissier, K. Mewes, M. Miyazawa, R. Parakhia, E. van Vliet, Q. Zang, D. Petersohn, Non-animal methods to predict skin sensitization (I) : the Cosmetics Europe database, *Critical Reviews in Toxicology*, 48 (5), 344–358 (2018).

8) M. Yamaguchi, D. Araki, T. Kanamori, Y. Okiyama, H. Seto, M. Uda, M. Usami, Y. Yamamoto, T. Masunaga, H. Sasa, Actual consumption amount of personal care products reflecting Japanese cosmetic habits, *J. Toxicol.* Sci., 42 (6)., 814 (2017).

9) A. M. Api, D. A. Basketter, P. A. Cadby, M-F. Cano, G. Ellis, G. F. Gerberick, P. Griem, P. M. McNamee, C. A. Ryan, R. J. Safford, Dermal sensitization quantitative risk assessment (QRA) for fragrance ingredients, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 52, 3–23 (2008).

10) T. Nishijo, A. M. Api, G. F. Gerberick, M. Miyazawa, D. W. Roberts, R. J. Safford, H. Sakaguchi, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 117, 104732 (2020).

11) M.N. Mons, M.B. Heringa, J. van Genderen, L.M. Puijker, W. Brand, C.J. van Leeuwen, Use of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) approach for deriving target values for drinking water contaminants. *Water Res.*, 47 (4), 1666–78 (2013).

12) THE SCCS'S NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC SUBSTANCES AND THEIR SAFETY EVALUATION 8TH REVISION, http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_006.pdf

13) J. Jaworska, A. Natsch, C. Ryan, J. Strickland, T. Ashikaga, M. Miyazawa, Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: A decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy, *Archives of toxicology* 89 (12), 2355–2383 (2015).

14) M. Hirota, T. Ashikaga, H. Kouzuki, Development of an artificial neural network model for risk assessment of skin sensitization using human cell line activation test, direct peptide reactivity assay, KeratinoSens™ and in silico structure alert parameter, *J. Appl. Toxicol.*, 38 (4), 514–526 (2018).

15) H. Li, J. Bai, G. Zhong, H. Lin, C. He, R. Dai, H. Du, L. Huang, Improved defined approaches for predicting skin sensitization hazard and potency in humans, *ALTEX*, 36 (3), 363–372 (2019).

16) Hazard Characterization of Isothiazolinones in Support of FIFRA Registration Review, https://www.linkedin.com/pulse/us-epa-hazard-characterization-isothiazolinones-support-passman

# シリカナノ不織布を用いた汎用皮膚三次元モデルの開発

横浜国立大学大学院工学研究院
飯島　一智

In this study, epidermal and epidermal-dermal skin models were constructed using silica nano-nonwoven fabrics. To construct the epidermal skin model, epidermal keratinocyte line, HaCaT cells, or primary normal human epidermal keratinocytes (NHEK) were seeded onto silica nano-nonwoven fabrics placed in cell culture inserts and cultured at the air-liquid interface for two weeks in keratinocyte differentiation medium. In order to construct the epidermal-dermal skin model, fibroblast cell line, NIH3T3 cells, or primary normal human dermal fibroblasts (NHDF) were seeded and cultured for five days in silica nano-nonwoven fabrics prior to seeding of keratinocytes. Constructed models were evaluated by microscopic observation after hematoxylin and eosin staining, trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurement and quantification of various epidermal/dermal-related gene expressions using real-time PCR. The thickness of epidermis of the models constructed with silica nano-nonwoven fabrics was thicker than that constructed in cell culture inserts. The expression of genes such as *hTGM1* and *hLOR* in epidermal models constructed on silica nano-nonwoven fabrics were much higher than those of cell culture inserts. This means that silica nano-nonwoven fabrics may mimic the basal lamina structure and increase the functions of keratinocytes. In the construction of epidermal-dermal skin models, similar positive effect of silica nano-nonwoven fabrics were observed. Finally, the prepared three-dimensional epidermal and epidermal-dermal skin models were evaluated by a method similar to the OECD TG skin corrosiveness test. The three-dimensional skin models met the evaluation criteria of the skin corrosiveness test. These results suggested the usefulness of the silica nano-nonwoven fabrics-based three-dimensional skin models.

## 1．緒　言

EU圏内における化粧品製品および原料の動物実験の完全禁止を受け、我が国の化粧品メーカー各社も動物実験廃止を表明しており、その代替法の開発が進められている。皮膚刺激性試験としては、OECDテストガイドラインに収載されている代替法としてコラーゲンマトリックスを用いた人工皮膚三次元モデル[1]などが用いられているが、非常に高価である。今後、発展途上国を含めた世界中で実験動物を用いない皮膚刺激性試験法を普及させるためには、より安価で取り扱いの簡便な三次元皮膚モデルの開発が必要と考えられる。

我々はシリカナノ不織布を用いた細胞の三次元培養法の開発に取り組んできた[2-4]。ゾル-ゲルプロセスを介して電界紡糸により作製されるシリカナノ不織布は高い生体適合性を示すとともに、シリカのもつ高い熱安定性のためオートクレーブにより滅菌することができる。さらに、シリカナノ不織布は、細胞外マトリックス（ECM）を形態的に模倣することで細胞の高機能化に寄与する。高い空孔率を有し、細胞は多くの交互連結した孔を通じて不織布中を移動し三次元に分布することができ、十分な機械的強度により長期的な細胞培養に伴う収縮を防ぐこともできる。さらに高い物質拡散性を有し、三次元培養において問題となる内部への栄養、酸素、増殖因子などの十分な供給が可能となる。また、近年、シリカナノ不織布中で培養することで、線維芽細胞のコラーゲン産生能が顕著に増加することを見出した[4]。

本研究では、シリカナノ不織布を細胞足場として用い、表皮層のみ、あるいは、真皮層と表皮層からなる人工皮膚三次元モデルを作製した。作製した人工皮膚三次元モデルについては、従来法である表皮モデルやコラーゲンを用いた真皮-表皮モデルと比較し、シリカナノ不織布が表皮角化細胞や線維芽細胞に与える影響について解析を行った。



Development of a versatile three-dimensional skin model using silica nano-nonwoven fabrics

Kazutoshi Iijima
Yokohama National University

## 2．方　法

### 2．1．細胞剥離方法の検討

皮膚モデルの作製にあたり、まず真皮層を構成する線維芽細胞の剥離方法の検討を行った。通常のトリプシン-EDTAを用いた剥離と感温性培養プレートを用いた剥離について、それぞれの手法で剥離した細胞を播種した際のシリカナノ不織布への侵入能を評価した。両者に有意な差は認めなかったため、以降の実験ではより安価なトリプシン-EDTAを用いた細胞剥離手法を採用することとした。

### 2．2．表皮のみからなる三次元皮膚モデルの作製

表皮のみからなる三次元皮膚モデルは、セルカルチャーインサート内にセットしたシリカナノ不織布上にヒト表皮

角化細胞株HaCaTまたは正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を播種し、市販の角化培地で14日間気-液界面培養し角化させることで作製した（シリカ表皮モデル）。対照として、セルカルチャーインサートに直接HaCaTまたはNHEKを播種し、シリカ表皮モデル同様に角化培地で14日間の気-液界面培養により角化させた（インサート表皮モデル）。播種細胞数は用いるセルカルチャーインサートのサイズによるが、例えば12ウェルセルカルチャーインサートを用いる場合には、播種細胞数は$2.5\times10^5$ cellsとした。

### 2. 3. 表皮と真皮からなる三次元皮膚モデルの作製

表皮と真皮からなるモデルは、マウス胎児線維芽細胞株NIH3T3または正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）をシリカナノ不織布へ播種し5日間培養した後、上部からHaCaTまたはNHEKを播種し表皮モデルと同様に角化させることで作製した（シリカ真皮・表皮モデル）。対照は、NIH3T3またはNHDFを含むコラーゲンゲルを作製し、培養することなくその上部にHaCaTまたはNHEKを播種し角化させて作製した（コラーゲン真皮・表皮モデル）。播種細胞数は用いるセルカルチャーインサートのサイズによるが、例えば12ウェルセルカルチャーインサートを用いる場合には、播種細胞数は線維芽細胞が$5\times10^5$ cells、表皮角化細胞が$2.5\times10^5$ cellsとした。

### 2. 4. 作製した各種三次元皮膚モデルの評価

作製した各種三次元皮膚モデルについては、形態、バリア機能および遺伝子発現に基づいて評価を行った。形態観察のための試料はパラフィン包埋ブロックをミクロトームにより薄切後、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色を行うことで作製した。バリア機能は経上皮電気抵抗（TEER）測定により評価した。遺伝子発現解析では、各種表皮関連遺伝子および真皮関連遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより定量した。リアルタイムPCRは*hGAPDH*および*mGAPDH*をコントロールとし、ΔΔCt法により定量化した。さらに、OECD TG皮膚腐食性試験[5]に準ずる手法により、作製した各種三次元皮膚モデルを用いた皮膚腐食性試験を行った。具体的には、陽性対照の8N KOHおよび14.4% HCl処理後の生存率を3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide（MTT）アッセイにより定量化し、陰性対照の水に対する相対値で表した。

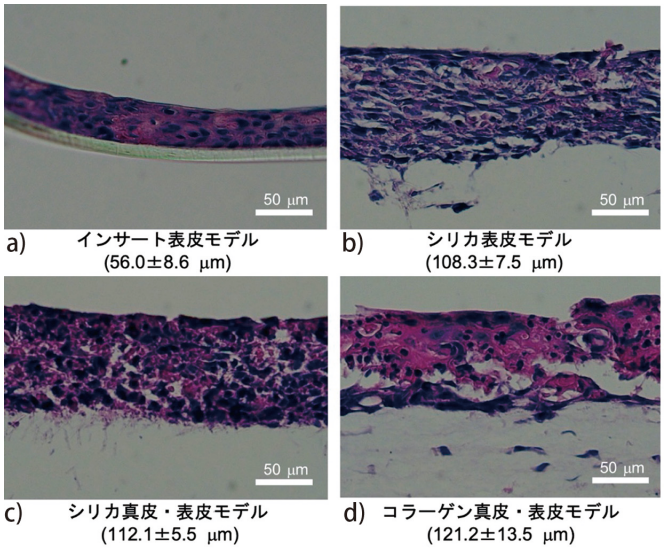



Fig. 1 Hematoxylin and eosin staining of skin model constructed with immortalized cell lines

## 3. 結　果

### 3. 1. 不死化細胞株を用いた三次元皮膚モデルの作製と評価

Fig. 1に不死化細胞株を用いた皮膚モデルの組織像を示す。シリカ表皮モデルにおいて表皮角化細胞はシリカナノ不織布中には侵入せず、その表面において角化が起こっていることがわかった。シリカ表皮モデル（Fig. 1b）の表皮層の厚みはインサート表皮モデル（Fig. 1a）と比較してより大きく、扁平重層構造が観察された。一方、シリカ真皮・表皮モデル（Fig. 1c）の表皮層の厚みはコラーゲン真皮・表皮モデル（Fig. 1d）と同程度であった。

不死化細胞株を用いた三次元皮膚モデルの構築では、表皮層を構成する表皮角化細胞HaCaTがヒト由来、真皮層を構成する線維芽細胞NIH3T3がマウス由来の細胞株であるため、表皮層と真皮層の遺伝子発現を区別して評価することができる。遺伝子発現解析の結果の概要をFig. 2にまとめた。シリカ表皮モデルでは、インサート表皮モデルと比較して*hTGM1, hLOR, hIVL, hFLG, hZNF750*の有意な発現上昇がみられた。さらにNIH3T3細胞を播種したシリカ真皮・表皮モデルでは、コラーゲン真皮・表皮モデルと比較して、*hTGM1, hTGM2, mCol4*の発現が有意に高かった。

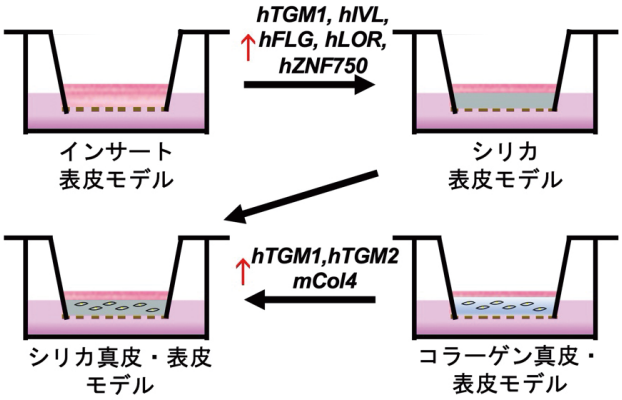



Fig. 2 Summary of gene expression in skin models constructed with immortalized cell lines

### 3. 2. 初代培養細胞株を用いた皮膚モデルの作製

次に、より生体に近い初代ヒト細胞を用いて各種皮膚モデルを作製した。各種モデルについてMTTアッセイにより細胞活性を評価した。結果、シリカ表皮モデルはインサート表皮モデルよりも、シリカ真皮・表皮モデルはコラーゲン真皮・表皮モデルよりも高い活性を示した。

遺伝子発現解析の結果の概要をFig. 3にまとめた。シリカ表皮モデルではインサート表皮モデルと比較して*hTGM2*の発現上昇がみられた。また、シリカ真皮・表皮モデルでは、シリカ表皮モデルと比較して*hTGM1, hTGM2, hZNF750*が高発現であった。さらにシリカ真皮・表皮モデルは、コラーゲン真皮・表皮モデルと比較して*hTGM2, hCOL1, hCOL3, hCOL4*の発現が上昇した。

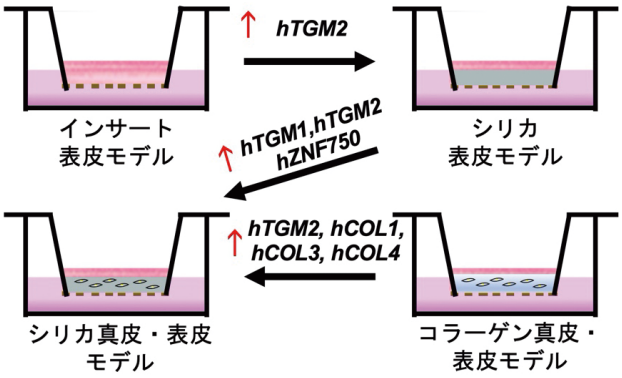



Fig. 3　Summary of gene expression in skin models constructed with human primary cells

### 3. 3. 皮膚モデルとしての利用可能性の評価

作製した各種三次元皮膚モデルについて、OECD TG皮膚腐食性試験[5]に準ずる手法により評価を行った。シリカ表皮モデルにおいて皮膚腐食性の評価基準である、陽性対照物質添加後3 minにおける生存率50 %以下、または添加後60 minにおける生存率15 %以下のいずれかを満たしていた(Fig. 4)。

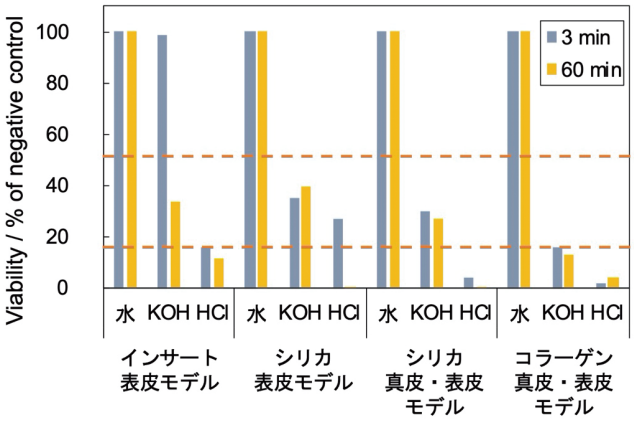



Fig. 4　MTT assay of primary cell skin models conducted according to protocol of skin corrosion test

## 4. 考　察

シリカナノ不織布を細胞足場として用い、不死化細胞株または初代培養細胞より表皮のみからなる皮膚三次元モデル(シリカ表皮モデル)および、真皮と表皮からなる皮膚三次元モデル(シリカ真皮・表皮モデル)を作製した。

シリカ表皮モデルは扁平重層構造を有しており、表皮層の厚みは、セルカルチャーインサート内で作製される従来の表皮モデルと比較して2倍程度の厚みを有していた。インサート表皮モデルと比較してシリカ表皮モデルにおいて発現が亢進していた遺伝子群について詳細に調べると、*hTGM1*および*hLOR*は角化マーカーであり、*hIVL*および*hFLG*はバリア機能に関連するタンパク質をコードし、*hZNF750*はマーカー細胞増殖・接着マーカーである。これより表皮層の厚みの増加は、表皮角化細胞の高機能化(表皮の角化、バリア機能上昇や細胞増殖の促進)によるものと推測された。シリカナノ不織布の剛性の高い繊維構造が形態的に基底膜構造を模倣することで、その上部に播種された表皮角化細胞の機能が亢進された可能性が考えられる。

一方、シリカ真皮・表皮モデルの表皮層の厚みはコラーゲン真皮・表皮モデルと同程度であったが、表皮角化細胞の角化に関わる*hTGM1*、表皮の基底層付近の細胞において高発現する*hTGM2*および真皮の基底膜付近の細胞において高発現する*mCol4*の発現が有意に高かった。シリカ表皮モデルと同様にシリカナノ不織布の剛性の高い繊維構造が基底膜を模倣することで表皮の角化を促進するとともに、過去の我々の報告[4]と同様にシリカナノ不織布中における三次元培養が線維芽細胞の機能を高めたと考えられる。

次に、より生体に近い初代ヒト細胞を用いて各種皮膚モデルを作製した。MTTアッセイにおいてシリカ表皮モデルはインサート表皮モデルよりも、シリカ真皮・表皮モデルはコラーゲン真皮・表皮モデルよりも高い活性を示した。シリカナノ不織布を用いて作製した両方の三次元皮膚モデルでは細胞数が多く、播種後の増殖能が高い可能性が示唆された。

遺伝子発現解析の結果、シリカ表皮モデルではインサート表皮モデルと比較して*hTGM2*の有意な発現上昇が確認された。*TGM2*は表皮の基底層付近の細胞において高発現することが知られている。さらにシリカ真皮・表皮モデルでは、コラーゲンモデルと比較して*hTGM2, hCOL1, hCOL3, hCOL4*の発現が有意に上昇した。これらの結果は、初代培養細胞を用いた場合にも、不死化細胞の結果同様に表皮細胞の高機能化がもたらされることを表している。興味深いことに、シリカ真皮・表皮モデルではシリカ表皮モデルと比較して*hTGM1, hTGM2, hZNF750*の有意な発現上昇が確認され、線維芽細胞との共培養による影響が

不死化細胞株を用いた時と比較してより顕著にみられた。これはおそらく、初代培養細胞においては線維芽細胞が分泌し表皮角化細胞に影響を与える因子の分泌量が多い、あるいは表皮角化細胞のこれらの因子への感受性が高い、ためと考えられる。

最後に、作製した各種三次元皮膚モデルについて、OECD TG皮膚腐食性試験[5]に準ずる手法により評価を行った。作製した各種三次元皮膚モデルは、皮膚腐食性試験の評価基準を満たしていた。

三次元皮膚モデルのバリア機能を評価するために実施したTEER測定では、シリカナノ不織布とセルカルチャーインサートとの間に生じる空隙の影響のため、極端に低い値を示し、正確な評価を行うことができなかった。今後、作製した三次元皮膚モデルを固定するなどの対策を講じたうえで、物質透過性とともに評価を行う予定である。

## 5．総　括

シリカナノ不織布を細胞足場として用い、表皮層のみ、または真皮層と表皮層からなる皮膚三次元モデルの作製に成功した。シリカナノ不織布は表皮角化細胞や線維芽細胞の機能を高め、優れた皮膚三次元モデルの構築を可能にすることが示された。さらに、化学合成されるシリカナノ不織布は動物由来のコラーゲンのような供給リスクなどもなく、安価で安定的に供給可能である。今後、皮膚腐食性試験における被験物質の種類を拡大して検証を行うことで、シリカナノ不織布を用いた新規皮膚モデルの有効性を明らかにする予定である。

**（引用文献）**

1）OECD TG439
2）Iijima K, Ishikawa S, Sasaki K, Hashizume M, Kawabe M, Otsuka H, Osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in electrospun silica nonwoven fabrics, *ACS Omega*, **3**, 10180–10187 (2018).
3）Ishikawa S, Iijima K, Sasaki K, Hashizume M, Kawabe M, Otsuka H, Cartilage differentiation of bone marrow–derived mesenchymal stem cells in three–dimensional silica nonwoven fabrics, *Appl. Sci.*, **8**, 1398 (2018).
4）Ishikawa S, Iijima K, Matsukuma D, Iijima M, Osawa S, Otsuka H, Silica-based nonwoven fiber fabricated by electrospinning to promote fibroblast functions, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **93,** 477–481 (2020).
5）OECD TG431

# 黄色ブドウ球菌免疫かく乱タンパク質を介したアトピー性疾患発症・増悪機構の解明

名古屋市立大学大学院薬学研究科医療機能薬学専攻 衛生化学分野

伊藤　佐生智

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) colonizes approximately 30% of the population asymptomatically but causes various diseases such as food poisoning, suppurative disease, sepsis, or systemic infections. *S. aureus* is associated with atopic dermatitis (AD); it frequently colonizes in the skin of atopic dermatitis. *S. aureus* is notorious for producing a series of exotoxins and immune disturbing proteins, however none of the staphylococcal exotoxins except with δ-toxin and phenol soluble modulins had been reported to activate mast cells and basophils, critical immune cells involved in the development of Th2 cell-mediated allergic inflammation such as atopic dermatitis. In this study, we aimed to identify staphylococcal exotoxins that activate mast cells and basophils. We found that α-hemolysin, a principal small β-barrel pore-forming toxin, did not activate mast cells individually, but it augmented the degranulation induced by other stimuli. We showed that among 14 members of staphylococcal superantigen-like protein, SSL12 induced the degranulation and cytokine production of mast cell in an IgE-independent manner, and SSL12 evoked local inflammation in vivo. We also showed that SSL12 induced the production of IL-4 in bone marrow derived basophils and freshly isolated murine basophils in bone marrow cells. These results propose the novel immune regulatory activity of α-hemolysin and SSL12 by activating mast cells and basophils that contributes to the development of allergic inflammation disorders such as atopic dermatitis.

## 1．緒　言

アトピー性皮膚炎は皮膚の炎症を伴う疾患であり，その炎症においてはマスト細胞が中心的な役割を果たしている．また血液中の存在割合は少ないが多量のIL-4を産生する好塩基球もアトピー性皮膚炎の病態形成に関与している．一方，黄色ブドウ球菌は一部の健常人においても検出される常在菌であるが，食中毒，化膿性疾患や敗血症の起因菌でもある．黄色ブドウ球菌はアトピー性皮膚炎患部で高頻度に検出されることが知られており，本菌とアトピー性皮膚炎との関連が指摘されている．黄色ブドウ球菌は溶血毒素ヘモリジンや白血球崩壊毒素ロイコシジン，MHCとTCRを非特異的に架橋してT細胞の非特異的活性化を引き起こすスーパー抗原，スーパー抗原活性も示す腸管毒素エンテロトキシンなど多彩な外毒素を産生する．さらに本菌はIgGのFc部に結合し，抗体の機能を阻害するProtein Aをはじめとする，多彩な免疫かく乱タンパク質を産生する．以前より黄色ブドウ球菌由来タンパク質がアトピー性皮膚炎の発症・増悪に関与している可能性が指摘されていたが，マスト細胞や好塩基球を活性化する毒素は見出されていなかった．最近黄色ブドウ球菌のペプチド性溶血毒素であるδ毒素やPSM（phenol soluble modulin）がマスト細胞の脱顆粒を引き起こすことが示され[1, 2]，これらのペプチド性毒素がアトピー性皮膚炎増悪因子の一つであるという考えが受け入れられている．しかしながら他の黄色ブドウ球菌毒素もアトピー性皮膚炎の発症増悪に関与している可能性は依然残されている．本研究ではマスト細胞と好塩基球を活性化する黄色ブドウ球菌毒素を探索し，その生理機能を解析することで，黄色ブドウ球菌とアトピー性皮膚炎の毒素を介した関係を明らかにすることを目指した．



Involvement of staphylococcal immune-distubing proteins in atopic dermatitis

Saotomo Itoh

Department of Molecular and Cellular Health Science, Graduate School of Pharmaceutical Science, Nagoya City University

## 2．方　法

### 2．1．組換え黄色ブドウ球菌毒素の調製

黄色ブドウ球菌毒素，免疫かく乱タンパク質は大腸菌を用いた組換えタンパク質として調整した．黄色ブドウ球菌ATCC27733株のゲノムよりPrimestar GxL（Takara）を用いて増幅後，発現プラスミドpCold-II（Takara）にクローニングした後，エンドドキシンの産生能を欠いたClearColi（Lucigen）に形質転換した．続いてIPTG及びコールドショックにより組換え毒素をN末端6xHis融合タンパク質として発現誘導した．大腸菌を回収し，超音波処理により破砕後，Niセファロース6FF（GE healthcare）を用いて精製し，PBSに対して透析して調製した．

### 2．2．好塩基球・マスト細胞の調製

マスト細胞はBALB/cマウス骨髄細胞を10％ FBS，ペニシリン，ストレプトマイシン，2-メルカプトエタノール及びマウスIL-3を添加したRPMI1640培地で存在下4週間培養することにより調製した．好塩基球はマウス骨髄細胞を上述の条件で2週間培養したのち，c-Kit陽性細胞をビオチン化抗c-Kit抗体（BioLegend）とストレプトアビジ

ンを共有結合した磁気ビーズ（IMAG Streptavidin Particles Plus DM，BD Bioscience）を用いて除去することにより調製した．調整したマスト細胞，好塩基球の確認はc-Kit及びFcεRIの発現をフローサイトメーター（FACD Verse，BD Bioscience）で解析することにより行った．

### 2. 3. マスト細胞，好塩基球細胞機能に対する組換え毒素の影響

組換え毒素のマスト細胞の脱顆粒誘導活性及び細胞傷害活性は各々顆粒酵素β-ヘキソサミニダーゼ（βHex），細胞質酵素乳酸脱水素酵素（LDH）の放出により評価した．タイロード液に懸濁したマスト細胞（$1\times10^5$/well）を毒素存在下で37℃，30分インキュベート後，遠心して上清を回収した．上清中のβHexの酵素活性をp-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコピラノシド（富士フィルム）を基質として測定することで脱顆粒誘導活性を評価し，LDHの酵素活性をCytotoxicity LDH Assay Kit-WST（同仁化学）を用いて測定することで細胞傷害活性を評価した．好塩基球およびマスト細胞のサイトカインmRNAの発現は定量的RT-PCRにより評価した．$10^6$の細胞を毒素で処理し，3時間後に細胞を回収し，RNAを抽出した．全RNAをPrimescript RTMastermix（Takara）を用いて逆転写したのち，Thermal cycler Dice Real-Time System及びSYBR Green Premix Ex Taq Kit（Takara）を用いて個々のサイトカインmRNA発現量を測定した．サイトカインタンパク質はELISAにより測定した．$10^6$の細胞を毒素で処理し，24時間後に培養上清を回収し，上清中のサイトカイン量をeBioscience ELISA Ready-SET Go（Thermo fisher）を用いて定量した．

### 2. 4. 組換え毒素による局所炎症誘導作用

毒素による局所炎症惹起作用はエバンスブルー漏出試験により評価した．BALB/cマウスに1%エバンスブルー溶液を尾静脈より投与し，耳介に組換え毒素を皮内投与した．30分後，血管からのエバンスブルーの漏出を観察した．写真撮影後，耳介をホルムアルデヒドで抽出し，620nmの吸収を測定することでエバンスブルー漏出量を評価した．

## 3．結　果

### 3. 1. 溶血毒素αヘモリジンによるマスト細胞の応答増強作用

αヘモリジン（Hla）は黄色ブドウ球菌の産生する代表的な溶血毒素であり，標的細胞表面でホモ7量体からなる膜孔を形成し，標的細胞を傷害する．Hlaはマスト細胞の活性化を惹起しないことがすでに報告されているが[2]，免疫複合体など他の刺激によるマスト細胞活性化に対する影響は検証されていなかった．そこでHlaのマスト細胞の活性化に対する影響を解析した．先行研究と同様に，Hlaは30μg/mL以下の濃度でマスト細胞を傷害せず，脱顆粒も誘導しなかった．一方でマスト細胞をIgE-抗原複合体，イオノフォアで処理した際に誘導される脱顆粒はHla存在下で2倍程度に増強された（図1AB）．この脱顆粒増強作用はHlaの濃度依存的であり，10μg/mL以上のHlaの存在下で増強作用が観察された（図1C）．またHlaによる脱顆粒増強作用はカリウムイオンとナトリウムイオンの濃度を細胞内の濃度に一致させた緩衝液中では観察されなかった（図1D）．膜孔形成能を欠いた二つのHlaの変異体｛Hla（H35L）；溶血不全変異体，Hla（PSGS）；膜孔の本体であるβ-ステムに相当する領域をPSGSの4アミノ酸に置換した変異体｝では脱顆粒増強能が認められなかった（図1E）．以上よりHlaは単独ではマスト細胞の脱顆粒を惹起しないが，他の刺激によるマスト細胞の脱顆粒を増強すること，この脱顆粒増強作用にはHlaによる膜孔形成が必要であることが示された．

### 3. 2. Staphylococcal superantigen-like 12によるマスト細胞の活性化作用

黄色ブドウ球菌のStaphylococcal superantigen-like（SSL）ファミリーはスーパー抗原と類似の立体構造をとりながら，スーパー抗原活性を示さない14種からなる分泌毒素である．私たち及び海外のグループにより，SSLファミリーは種々の免疫関連分子を標的とし，その機能を阻害することで免疫回避に働く免疫かく乱タンパク質であることが示されている[3]．しかしながらSSLファミリーのマスト細胞に対する作用は解析されていなかった．そこでSSLファミリーがマスト細胞を活性化するか否かを検討した．14種のSSLのうち，SSL1からSSL11及びSSL13はマスト細胞の脱顆粒を誘導しなかったが，SSL12はマスト細胞の脱顆粒を惹起し，SSL14もSSL12に比べ1/20程度であるが脱顆粒を誘導した（図2AB）．SSL12によるマスト細胞の脱顆粒の誘導は濃度依存的であり，1.1μg/mL以上のSSL12によって有意に脱顆粒が誘導された（図2C）．先に報告されているδ毒素はマスト細胞に対しβHexと同時にLDHの漏出を引き起こしたが，SSL12は30μg/mLまでの濃度においてLDHの漏出を引き起こさなかった（図2D）．またSSL12はマスト細胞のIL-6及びIL-13のmRNAの発現とタンパク質分泌を誘導した（図2E~H）．さらにあらかじめエバンスブルーを静脈投与したマウスの耳介に10μgのSSL12を投与したところ，エバンスブルーの血管外への漏出が認められた（図3）．以上よりSSL12は直接マスト細胞を活性化し，局所炎症を惹起することが示された．

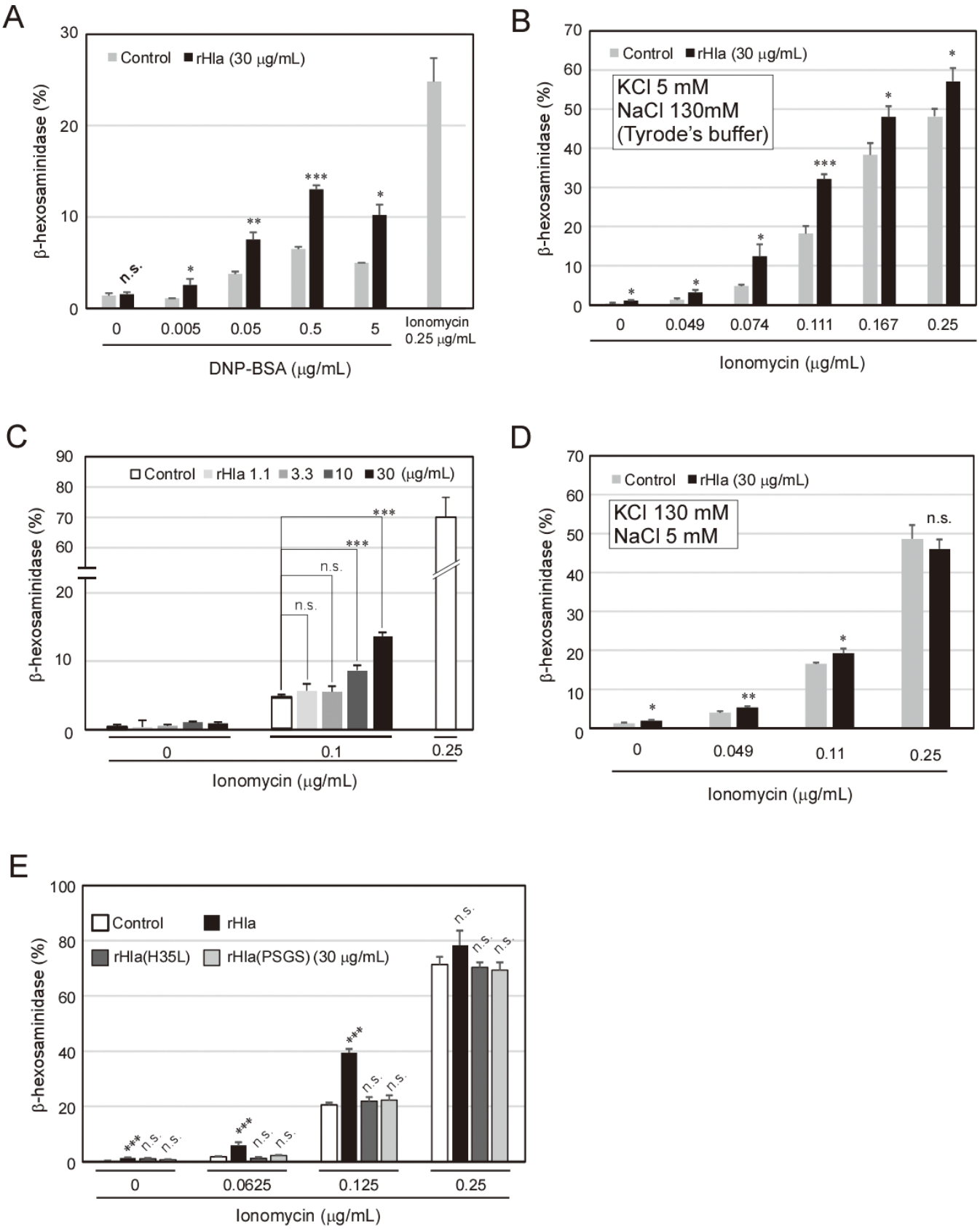



図1　Hlaによるマスト細胞の脱顆粒増強作用

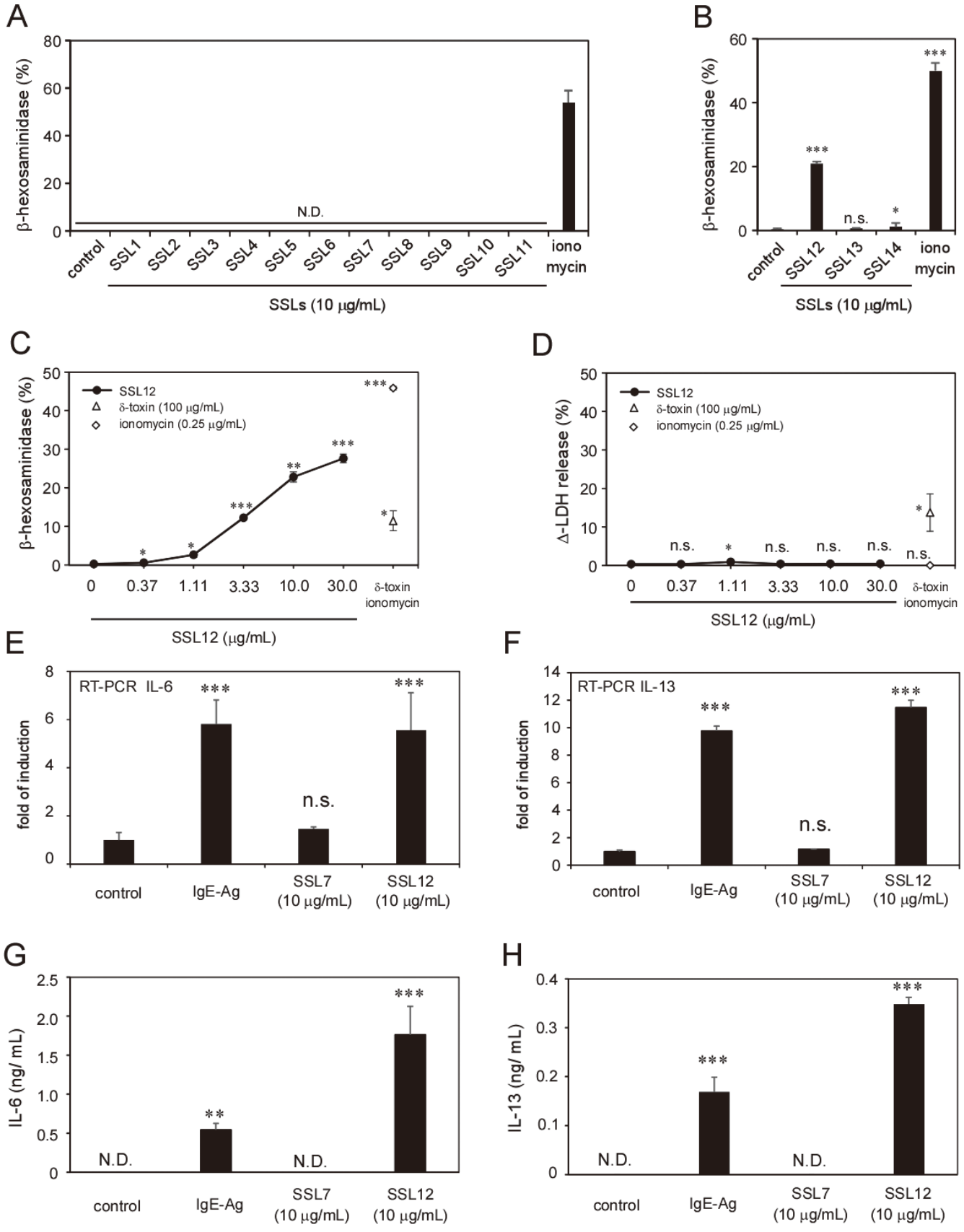



図2　SSL12によるマスト細胞の活性化

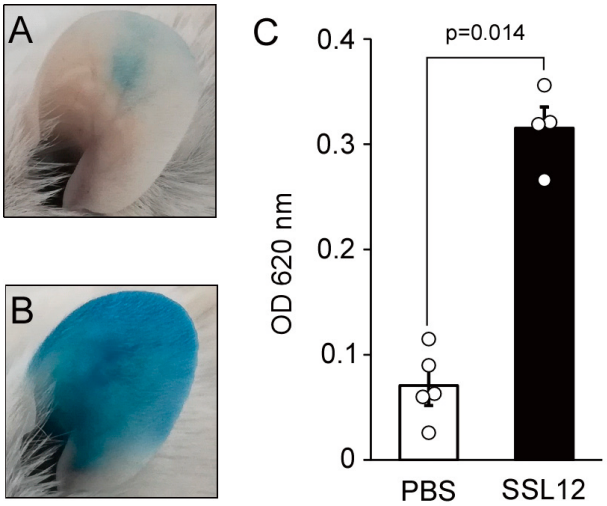



図3　SSL12の局所炎症誘導作用

### 3. 3. SSL12による好塩基球からのIL-4産生の誘導

好塩基球の存在比率は血液中顆粒球の1％以下であるが，刺激に応答して大量のIL-4を産生することが知られている．好塩基球はIL-4産生を介してTh2型免疫反応を制御することからアトピー性皮膚炎への関与も示されている．そこでSSLファミリーが好塩基球を活性化するか否かを検討した．骨髄細胞を14日間IL-3存在下で培養することで，FcεRI (+) c-Kit (−) の好塩基球のフェノタイプを示す細胞に分化する（図4A）．このIL-3処理骨髄細胞を用いてSSLファミリーのIL-4誘導活性を検討した．SSL12で処理したIL-3処理骨髄細胞からIL-4の産生が認められ，SSL10，SSL14もSSL12と比して量は少ないがIL-4の誘導が認められた（図4B）．このIL-3処理骨髄細胞からc-Kit陽性細胞を除去して好塩基球を調製し（図4C），SSL10，SSL12，SSL14によるIL-4産生を評価したところ，SSL12のみが好塩基球からのIL-4産生を誘導した（図4D）．また熱処理したSSL12ではIL-4誘導能は認められなかった（図4D）．SSL12による好塩基球からのIL-4産生は濃度依存的であり，0.1μg/mL以上のSSL12によって有意なIL-4産生が認められた（図4E）．SSL12によるIL-4産生はマウスより単離した直後の骨髄細胞においても認められた．以上よりSSL12は好塩基球からのIL-4産生を誘導することが示された．

## 4．考　察

本研究によりHlaは単独ではマスト細胞の傷害も活性化を引き起こさないが，他の刺激による脱顆粒を増強することが示された．変異型Hlaを用いた解析により，Hlaによるマスト細胞の脱顆粒増強作用にはHlaによる膜孔形成を必要とする．また細胞外のカリウム，ナトリウム組成を変更した条件での解析よりHlaによる脱顆粒の増強には，Hlaの形成した膜孔を介してのカチオンの流出入が必要である．マスト細胞が免疫複合体によって脱顆粒を誘導される際にはカリウムチャネル$K_{Ca}3.1$を介して細胞内のカリウムが流出し，その後のカルシウムイオンの流出と脱顆粒を促進することが知られている[4]．マスト細胞に結合し，膜孔形成したHlaはイオンの通り道として機能し，カリウムの流出を促進することで脱顆粒を促進していると考えられる．

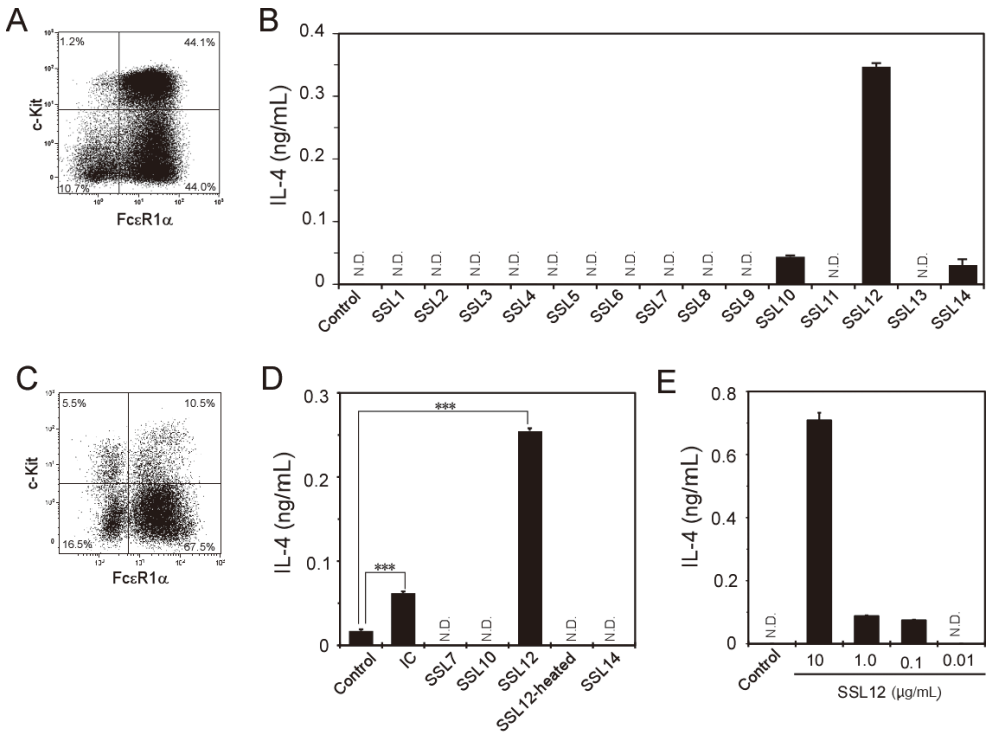



図4　SSL12による好塩基球からのIL-4産生

14種存在するSSLファミリーは構造的に類似性のない種々の免疫関連分子を標的とし，免疫かく乱作用を示すことが知られている．本研究によりSSLの一つSSL12がマスト細胞の脱顆粒とサイトカイン産生を誘導することが示された．マスト細胞を直接活性化する黄色ブドウ球菌毒素としてはペプチド性溶血毒素δ毒素とPhenol soluble modulinが報告されている．δ毒素はマスト細胞に対し，脱顆粒と同時に膜傷害を引き起こすが，SSL12は膜傷害を引き起こさずに脱顆粒を誘導することから，SSL12はδ毒素とは異なったメカニズムでマスト細胞を活性化していると考えられる．本研究で行った*in vitro*の実験はIgE及び抗原が存在しない条件下で行われている．したがってSSL12によるマスト細胞の活性化はIgE非依存的経路による．私たちはSSL12がマスト細胞の表面に結合すること，SSL12によるマスト細胞からのサイトカイン産生はチロシンキナーゼの阻害薬等で抑えられることを見出しており，SSL12は何らかの受容体を介してマスト細胞を活性化していると考えられる．

本研究によりSSL12が好塩基球からのIL-4産生を誘導することも示された．好塩基球のIL-4産生を誘導する因子としてはIgE-抗原複合体，IL-3などのサイトカイン，寄生虫由来のプロテアーゼや細菌細胞壁成分などが知られている．本研究で見出したSSL12は細菌の外毒素としては初めてのIL-4誘導因子である． IL-3処理骨髄細胞を用いた解析ではSSL12だけでなくSSL10，SSL14も少ないながらIL-4を誘導したが，一方で調製した好塩基球においてはSSL12のみがIL-4を誘導した．したがってIL-3処理骨髄細胞におけるSSL10，SSL14によるIL-4産生は好塩基球の調製過程で除去されたc-Kit陽性細胞によるものであると考えられる．SSL14はマスト細胞においてSSL12の1/20程度であるが脱顆粒を誘導したこと，SSL10はIgG，プロトロンビンとホスファチジルセリンに結合することが報告されている．SSL10とSSL14は好塩基球以外の細胞に対し，SSL12とは異なった細胞に対してIL-4産生を誘導すると考えられる．SSL12は*in vitro*で調製した好塩基球だけでなく，好塩基球をわずか(0.5％)に含む，単離した直後の骨髄からもIL-4産生を誘導した．したがってSSL12は*in vivo*においてもIL-4産生を誘導しうると考えられる．SSL12による好塩基球からの*in vitro*でのIL-4産生の解析はIgE及び抗原が存在しない条件下で行われている．したがってSSL12はIgE非依存的に好塩基球を活性化すると考えられる．

## 5．総　括

本研究により，すでに報告されているδ毒素やPhenol soluble modulinだけでなく，黄色ブドウ球菌毒素HlaとSSL12が炎症のエフェクター細胞であるマスト細胞に対し活性化作用を示すことを明らかにできた．またSSL12が好塩基球を刺激してIL-4産生を誘導するという知見は，黄色ブドウ球菌が毒素を介して免疫応答をTh2優位に導き，免疫アレルギー疾患の発症増悪に関わる可能性を示すものである．今回見出した黄色ブドウ球菌毒素によるマスト細胞と好塩基球の活性化作用により，アトピー性皮膚炎と疾患患部での黄色ブドウ球菌の常在の関係を説明できる可能性がある．本研究の成果は，アトピー性皮膚炎をはじめとする免疫アレルギー性疾患の予防法，治療法の開発に寄与し，アレルギー患者の肉体･精神･社会的な健康の獲得･維持に貢献すると考えている．なお本報告書に記載した結果を含む内容で2019，2020年に論文発表を行った[5-7]．

**(引用文献)**


1) Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, Chan SM, Munoz-Planillo R, Hasegawa M, et al. Staphylococcus delta-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. Nature. 2013; 503 (7476) : 397-401.

2) Hodille E, Cuerq C, Badiou C, Bienvenu F, Steghens JP, Cartier R, et al. Delta Hemolysin and Phenol-Soluble Modulins, but Not Alpha Hemolysin or Panton-Valentine Leukocidin, Induce Mast Cell Activation. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2016; 6: 180.

3) 伊藤佐生智．黄色ブドウ球菌の産生する免疫かく乱毒素ファミリー staphylococcal superantigen-like proteins. 生化学. 2017; 89 (6): 861-5.

4) Shumilina E, Lam RS, Wolbing F, Matzner N, Zemtsova IM, Sobiesiak M, et al. Blunted IgE-mediated activation of mast cells in mice lacking the $Ca^{2+}$-activated $K^+$ channel $K_{Ca}3.1$. J Immunol. 2008; 180 (12) : 8040-7.

5) Nishiyama S, Urabe A, Morikawa A, Kobayashi M, Onozaki K, Itoh S, et al. Staphylococcal superantigen-like 12 induces the production of interleukin 4 in murine basophils. Biochem Biophys Res Commun. 2020; 532 (2): 200-4.

6) Hayashi K, Itoh S, Morikawa A, Onozaki K, Taki S, Tsuji T, et al. Staphylococcal alpha-hemolysin does not induce cell damage in murine mast cells but it augments the degranulation induced by FcepsilonRI cross-linking and ionomycin. Biochem Biophys Res Commun. 2019; 508 (1): 263-9.

7) Kobayashi M, Kitano T, Nishiyama S, Sanjo H, Onozaki K, Taki S, et al. Staphylococcal superantigen-like 12 activates murine bone marrow derived mast cells. Biochem Biophys Res Commun. 2019; 511 (2): 350-5.

# 転写因子 SOX2 による皮膚虚血再灌流障害（急性期褥瘡）における制御機構の解明および新規治療法の開発

群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学

内山　明彦

Cutaneous ischemia-reperfusion (I/R) injury is engaged with the early pathogenesis of cutaneous pressure ulcers (PUs). Our previous work identified that the induction of genes that were consistently upregulated in the oral mucosa, especially transcription factor *SOX2*, accelerate wound healing in skin. The aim of this study was to investigate the effect of SOX2 on the formation of PUs after cutaneous I/R injury and determine the molecular and cellular mechanisms. We found that induction of SOX2 in the keratinocytes significantly suppress the formation of PUs. The induction of SOX2 in the keratinocytes suppressed the numbers of infiltrating inflammatory cells ($MPO^+$ neutrophils, $CD68^+$ macrophages) in the skin area after I/R injury. In SOX2 expressing ice, the number of $CD31^+$ endothelial cells was significantly increased, and hypoxic area was significantly decreased when compared with control mice. In SOX2/OKD-48 (Keap1-dependent oxidative stress detector, No 48-luciferate) mice, Nrf2 antioxidant response pathway was significantly enhanced with respect to control OKD-48 mice. *In vitro*, SOX2 expressing keratinocytes significantly decreased the numbers of apoptotic cells under $H_2O_2$ stimulation. These results suggest that the induction of SOX2 in the keratinocytes might protect against the development of PUs after cutaneous I/R injury by enhancement of anti-oxidative response, resulted in suppression of apoptosis, protection of vascular damages and inhibition of infiltration of inflammatory cells.

## 1．緒　言

褥瘡は自立体動が困難な高齢者や知覚神経や動機能障害を呈する様々な疾患に関連して発症する皮膚疾患である。超高齢化社会である本邦において、褥瘡発症のリスクは今後さらに高まることが予想される。褥瘡は急性期（紅斑・紫斑期）を経て慢性期（潰瘍形成期）に到る。潰瘍形成後は様々な外用治療が行われているが、難治や再発を繰り返す症例が多く、医療界ならびに社会的問題となっている。しかし、潰瘍形成前の急性期褥瘡（紅斑・紫斑期）において、その後の潰瘍形成を防ぐ有効な治療は未だ確立されていない。そのため、患者のQOLの向上や治療期間・医療費の削減のためにも、急性期褥瘡に対する新たな治療法の開発が期待されている。我々はこれまでに急性期褥瘡（皮膚虚血再灌流障害）の病態において酸化ストレスや血管障害が重要であり、それらを抑制することでその後の潰瘍形成を予防できることを見出した[1]。

口腔粘膜では皮膚と比べて創傷が早期にかつ瘢痕形成を残さずに治癒することが知られている。我々はこの知見をもとに口腔粘膜上皮と皮膚表皮細胞の遺伝子発現の違いによる創傷治癒制御機構の違いについて検討を行った。その結果、創傷治癒皮膚の表皮細胞には発現せず、高い創傷治癒能を有する口腔粘膜表皮に発現する転写因子SOX2を同定した[2]。また表皮細胞に発現させたSOX2は創傷部位における血管新生やヒアルロン酸の産生の亢進、EGFRシグナルを活性化させることで皮膚創傷治癒を促進させることも明らかにした[3]。しかし、転写因子SOX2における皮膚虚血再灌流障害（急性期褥瘡）及び酸化ストレスの制御機構については未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、これまでに解明されていない転写因子SOX2による皮膚虚血再灌流障害に関する制御機構及び治療効果の有無を明らかにすることを目的とした。



The role of transcription factor SOX2 in the regulation of cutaneous I/R injury

Akihiko Uchiyama

Department of Dermatology, Gunma University Graduate School of Medicine

## 2．方　法

### 2．1．皮膚虚血再灌流モデル

2枚の磁石（1180G）を用いて背部の皮膚を両方向から12時間圧迫（虚血）させた後に磁石を外した（再灌流）。連日虚血再灌流部位の写真撮影を行い潰瘍部の面積をImageJ softwareを用いて計測した。

### 2．2．マウス

タモキシフェン投与下に表皮細胞特異的にSOX2を発現するマウス（K14CreERTM/LSL-SOX2）[4]（SOX2マウス）を用いてコントロール群（DMSO：100μL）とタモキシフェン群（DMSO：タモキシフェン1.5mg/100μL）を5日間連日で腹腔内投与し、1週間後から実験を行った（図1）。また酸化ストレス可視化マウス（OKD-48）[5]とSOX2マウスを掛け合わせてSOX2/OKD-48マウスを作成し、皮膚虚血再灌流後における酸化ストレスに関して評価した。

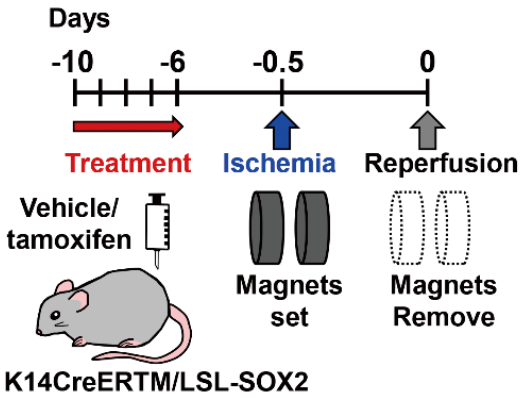



図1　SOX2マウスを用いた皮膚虚血再灌流モデル

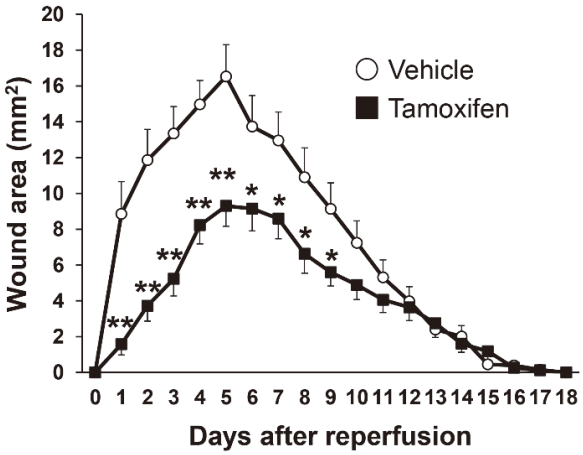



図2　虚血再灌流部位の潰瘍面積の比較

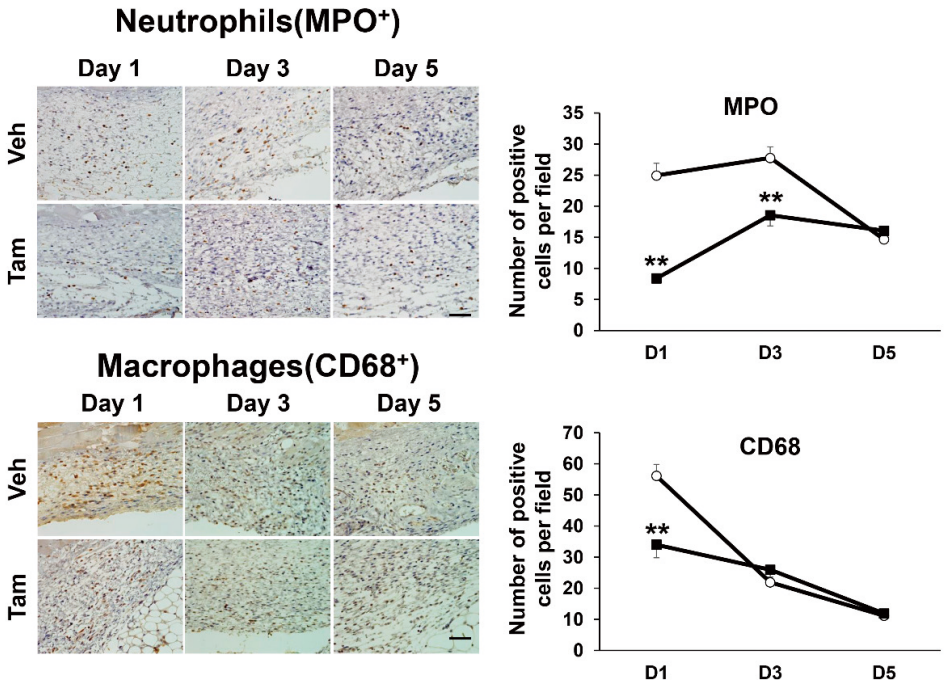



図3　炎症細胞浸潤の評価

### 2. 3. マウス初代表皮細胞培養

SOX2マウスの出生後0～2日目の表皮シートから初代表皮培養細胞を作成した[6]。過酸化酸素0.5mM刺激下におけるアポトーシス細胞数についてTUNEL染色を用いて比較、検討した。

### 2. 4. 酸化ストレス可視化

SOX2/OKD-48マウスを用いて皮膚虚血再灌流後の皮膚組織を採取しルシフェリン溶液(0.3mg/mL)で処理した後にIVIS (PerkinElmer)で輝度を測定した。

## 3. 結　果

### 3. 1. 皮膚虚血再灌流後に生じる潰瘍形成の検討

SOX2マウスを用いて、表皮細胞に発現させたSOX2の皮膚虚血再灌流障害により生じる潰瘍形成に対する影響を評価した。コントロール群と比較してタモキシフェン投与群では潰瘍形成が虚血再灌流後1日目から8日目まで有意に抑制された(図2)。

### 3. 2. 皮膚虚血再灌流後に生じる炎症細胞浸潤の検討

SOX2マウスを用いて、表皮細胞に発現させたSOX2の皮膚虚血再灌流障害により生じる炎症細胞浸潤について免疫染色にて検討を行った。タモキシフェン投与群において浸潤する好中球(MPO陽性)の数は1日目、3日目に、またマクロ―ファージ(CD68陽性)の数は1日目においてコントロール群と比較して有意に低下した(図3)。

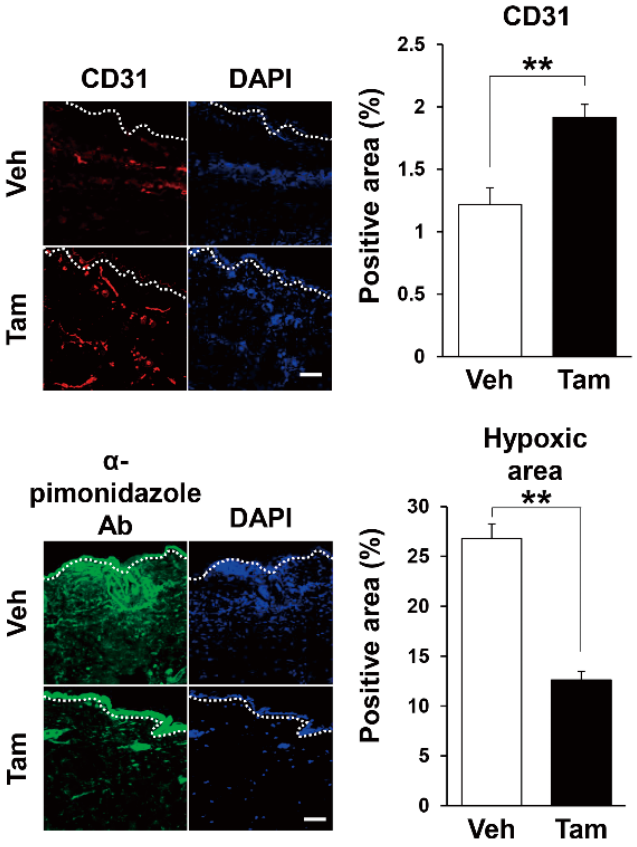



図4　血管量と低酸素領域の評価

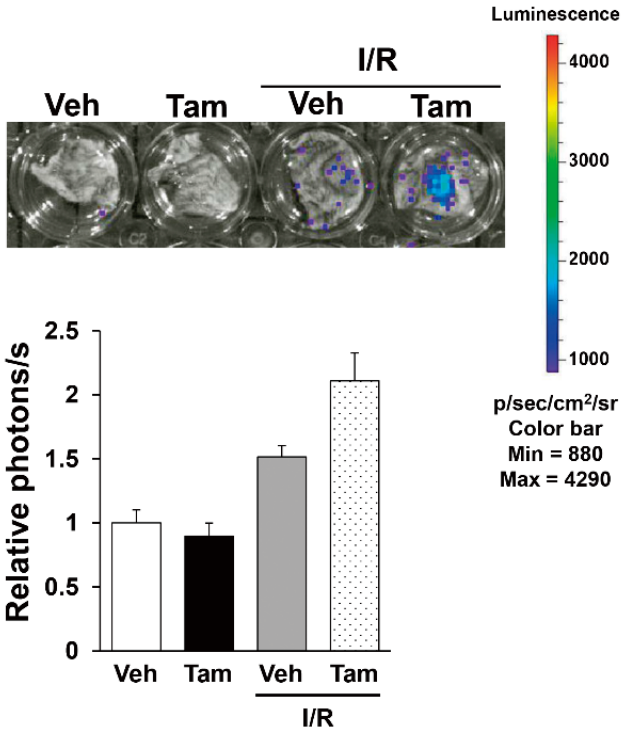



図5　酸化ストレス応答の検討

### 3. 3. 皮膚虚血再灌流後の低酸素領域、血管傷害の検討

次にSOX2マウスにおけるコントロール群、タモキシフェン投与群で皮膚虚血再灌流部での低酸素領域、血管傷害について免疫染色法で検討を行った。タモキシフェン投与群では血管内皮細胞（CD31陽性）の割合がコントロール群と比較して有意に増加していた。さらに低酸素領域（α-pimonidazole抗体陽性）についても同様に検討を行ったところ、タモキシフェン投与群ではコントロール群と比較して低酸素領域が有意に低下した（図4）。

### 3. 4. SOX2による酸化ストレス応答に対する検討

SOX2/OKD-48マウスを用いて皮膚虚血再灌流後における酸化ストレス防御機構（Nrf2-Keap1系）について検討を行った。タモキシフェン投与群ではコントロール群と比較して皮膚虚血再灌流後の皮膚部位においてNrf2-Keap1の活性化が上昇する傾向がみられた（図5）。さらにSOX2マウス由来初代表皮細胞培養の実験系において過酸化水素（$H_2O_2$）により生じるアポトーシス細胞についてTUNEL染色によって検討を行った。タモキシフェン投与群ではコントロール群と比較して酸化ストレスにより生じるアポトーシス細胞数が有意に抑制した（図6）。

## 4. 考　察

表皮細胞特異的SOX2発現マウスを用いた皮膚虚血再灌流障害（褥瘡モデル）の検討により、通常SOX2を発現しない皮膚表皮細胞にSOX2を発現させることで皮膚虚血再灌流後に生じる潰瘍形成が抑制されることが明らかとなった。SOX2が潰瘍形成を抑制する要因として、虚血再灌流障害後に生じる酸化ストレスに対するNrf2-Keap1系の活性化が関与している可能性が示唆された。その結果、表皮細胞のアポトーシスを抑制し、炎症性サイトカイン産生の低下などによる血管傷害の軽減、低酸素領域の低下及び炎症細胞浸潤の減少が生じた可能性が考えられた。今後は転写因子SOX2による皮膚虚血再灌流障害の制御機構において、SOX2がターゲットとする遺伝子の同定やSOX2による酸化ストレス応答に関する制御機構に関して詳細な検討を行う。SOX2と同等の効果が得られる薬剤の同定によって褥瘡発症予防につながる革新的な新規治療薬が期待できる。急性期褥瘡において、その後に生じる潰瘍形成を抑制することができれば患者の疼痛の軽減や潰瘍治癒後の瘢痕形成を防ぐことができる。その結果医療費や人件費、労働量の軽減につながることが予想され、高齢化社会への高い貢献が期待できる。

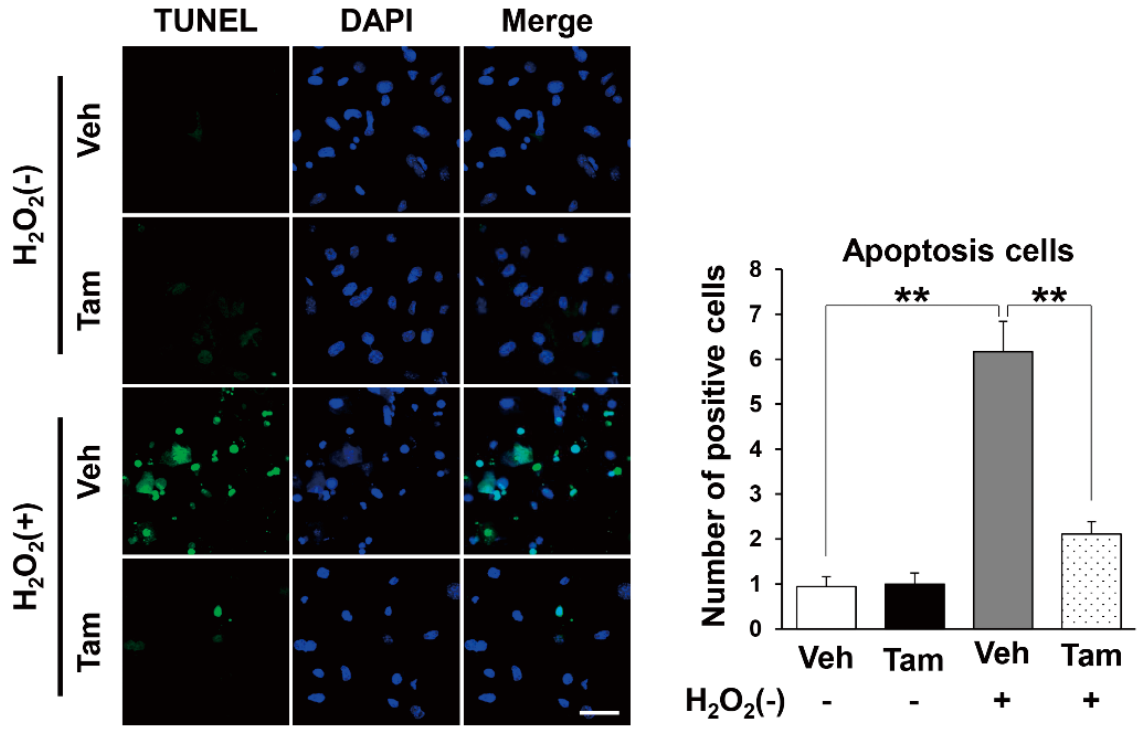



図6　酸化ストレスとアポトーシス細胞の検討

（引用文献）

1）Sekiguchi A *et al.* Botulinum toxin B suppresses the pressure ulcer formation in cutaneous ischemia-reperfusion injury mouse model: Possible regulation of oxidative and endoplasmic reticulum stress. *J Dermatol Sci.* **90**, 144–153 (2018).

2）Iglesias-Bartolome R. *et al.* Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing. *Sci Transl Med.* **10**, eaap8798 (2018).

3）Uchiyama A. *et al.* SOX2 epidermal overexpression promotes cutaneous wound healing via activation of EGFR/MEK/ERK signaling mediated by EGFR ligands. *J Invest Dermatol.* **139**, 1809–1820 (2019).

4）Yun, L. *et al.* Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS One.* **5**, e11022 (2010).

5）Oikawa D. *et al.* A transgenic mouse model for monitoring oxidative stress. *Sci Rep.* **2**, 229 (2012).

6）Lichti Ulrike. *et al.* Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nat Protoc.* **3**, 799–810 (2008).

# 皮膚で発現する化学物質受容体が体の温度適応に与える影響

甲南大学大学院自然科学研究科／統合ニューロバイオロジー研究所
太田　茜、高垣　菜式

Animals senses temperature information for acclimation and habituation to dynamically changing environmental temperature conditions. However, their molecular and cellular machinery has not been well known. In this analysis, nematode *Caenorhabditis elegans* was utilized to study molecular and cellular machinery of temperature tolerance. Through the analysis, chemical receptor expressing in cuticle was involved in temperature acclimation of the body.

## 1. 緒　言

温度は生体に影響を与える重要な環境情報であり、体温の1℃の変化が生体の状況に大きな影響を与える。これまでに環境温度に対する生体調節について、主に生化学的な視点から解析が行われてきたが、その分子機構については、未知の点が多く残されている。そのような背景において、従来の神経系に加えて表皮や皮下組織における温度の受容やその制御が、個体の温度に対する適応や耐性に重要である可能性が考えられている。そこで、本研究では、全細胞数が約1000個と非常に少ない線虫*Caenorhabditis elegans*を解析系として、表皮で発現している受容体が個体の温度耐性に関わるかどうかを、分子遺伝学的に検証した。特に、ヒトにおいて神経系や表皮で発現している機械刺激受容体が実際に温度を受容して、個体の温度耐性を制御しているかを調べ、その変異体における体内の脂肪酸比率を測定したため、その現状を記載する。

我々ヒトを含む動物が生息している地球上では、その地域や昼夜によって劇的に温度が変化する。例えば、砂漠地区では日中の温度差が約50℃を超えることもあり、一年の最低と最高の気温差を見ると日本でも約40℃近い温度の変化幅の中で生活をしている。このような生物の機構として、高温適応や低温適応が存在する。そのなかでも低温適応については、植物から動物まで幅広く研究が行われている。生物が示す低温への適応としては、普段生息している温度よりも低い温度で生息すると、より低温にさらされてもダメージが少ない現象である。このような現象は、植物や昆虫でも観察され、それらにおいては、細胞内において凍結しにくいトレハロースなどの糖やアミノ酸を集積させたり、細胞膜の組成を不飽和脂肪酸に置き換えることで低温耐性を獲得していると考えられている。このように、低温への適応や耐性に関して、最終的な脂質や糖の蓄積による不凍化が知られている一方で、このような不凍化を引き起こすまでの温度情報の受容や温度情報伝達に関しては、未知の点が多く残されている。その理由として、膨大な細胞によって構成される生物種では、それらの細胞からなる細胞間ネットワークと温度適応との相関性を解明するためのタイムスケールが大きくなるためである。そのような背景をふまえて、本研究においては、シンプルなモデル動物*C. elegans*を利用して、温度適応を司る新規分子の同定を目指した。

*C. elegans*は土壌自活性の体長が約1mmの非寄生性の線虫であり、その体は959個の体細胞で構成されている。ゲノムDNAは、モデル動物の中でも小さく、約100Mbである。*C. elegans*の全遺伝子の約36％は、ヒトにも相同遺伝子が存在し、ヒトと対応付けした解析が行われている。*C. elegans*のライフサイクルは25℃で約2.5日、15℃で約7日とモデル動物の中では短く、精子と卵を一個体中に持つ雌雄同体であるため、系統維持が非常に容易であり、約0.1％の頻度で雄が出現するため、それを利用した交配を行うことで遺伝学を用いることができる。

*C. elegans*の温度に対する応答としては、温度走性や高温耐性が40年以上前から解析されているが[1]、近年、低温耐性や低温馴化と呼ばれる現象が報告され、その分子組織機構が少しずつ見つかってきている[2]。例えば、25℃で飼育した個体は2℃に置かれると死滅してしまうのに対して、15℃で飼育した個体は2℃でも生存することができる（図1）[3]。さらに、25℃で飼育された個体をわずか3時間から5時間だけ15℃に置くことで、2℃に置かれた際に生存できるようになる[2, 4]。この現象は低温馴化と呼ばれている。低温耐性と低温馴化の分子機構が最近、少しずつ見つかってきている。低温耐性において、環境温度は頭部に存在するASJとADLと呼ばれる2対の感覚ニューロンで受容され、ASJからインスリンやステロイドホルモンが分泌され、それらが腸の受容体で受け取られる（図2）[2, 5]。



*Effects of skin-expressed chemical receptors on body temperature acclimation

*Akane Ohta, Natsune Takagaki

Graduate school of Natural Science / Institute for Integrative Neurobiology, Konan University

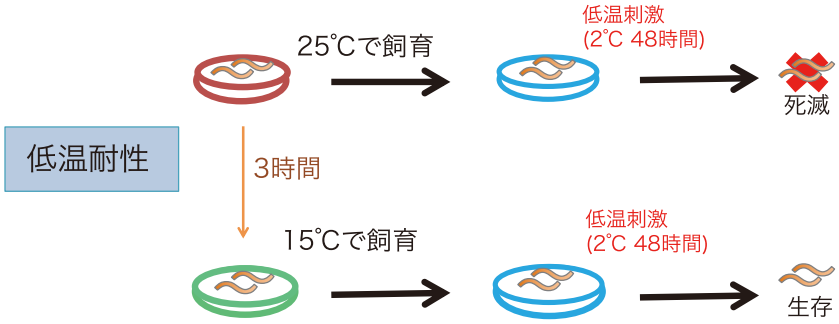



図1　*C. elegans*の低温耐性

15℃で飼育した*C. elegans*は2℃で48時間の低温にも耐えられるが、25℃で飼育した*C. elegans*は低温に耐えられず、死滅する。
25℃飼育個体を3時間以上15℃に静置することで、2℃で48時間の低温でも生存できるようになる。

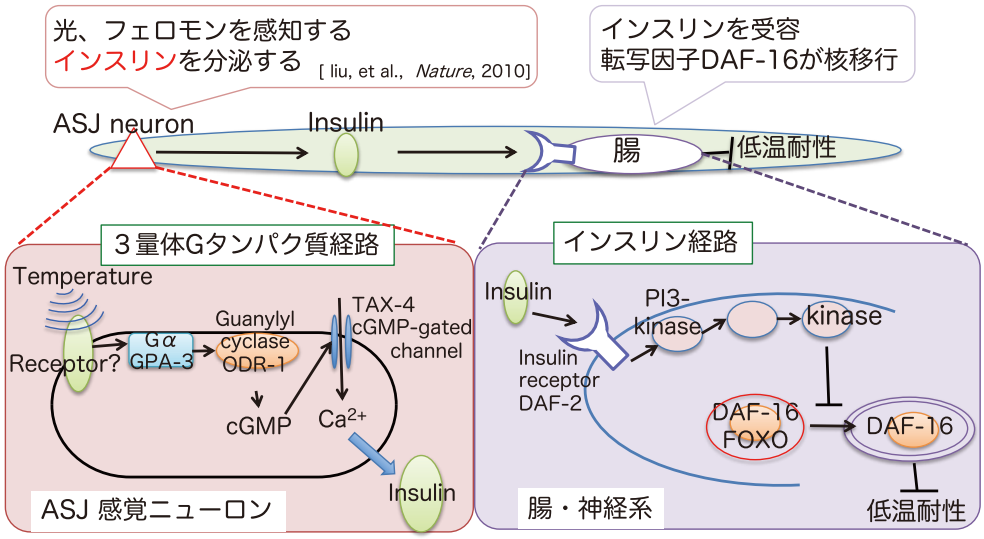



図2　既知の低温耐性の分子組織ネットワーク

頭部に存在するASJ感覚ニューロンが温度を受容すると、ASJからインスリンが分泌され、腸や神経系がインスリンを受容し、低温耐性が制御されている。

腸においてインスリン受容体情報伝達を介して、フォークヘッド型の転写因子であるDAF-16が遺伝子発現を誘導し、体内の脂質合成系の遺伝子などを発現する（図2）[2]。また、腸からステロイドホルモンが分泌され、それが精子に働きかけ、さらに、精子が頭部のASJ温度受容ニューロンをフィードバック制御する[6]。低温馴化に関しては、ADL温度受容ニューロンで受容される温度情報が、ADLと局所神経回路を構築している酸素受容ニューロンからの酸素濃度の情報と統合され、環境の酸素濃度依存的な低温馴化の制御が行われる[7]。ADLにおける温度情報伝達にはTRPチャネルとKQT型カリウムチャネルが関与している。これらのASJとADL温度受容ニューロンを介した温度情報伝達は、低温耐性や馴化を負に制御する経路である[8]、一方で、低温耐性を正に制御する分子経路はほとんど未知であった。本研究では、*C. elegans*の低温耐性の実験系を利用して、温度受容に関わる新規の分子の同定を目指した。その中で、皮下組織で発現しているGPCR型の受容体が温度適応に関与していることが見つかった、また、ヒトの機械刺激の受容に関わるDEG/ENaC型のメカノ受容体が温度に応答することが見つかり、そのホモログを欠損したシンプルなモデル動物*C. elegans*では、低温耐性の異常が観察され、体内の脂肪酸構成比が変化していることが示唆されたため報告する[9]。

## 2．実　験

### 低温耐性テスト

15℃で飼育された*C. elegans*の2～4個体を新しい培地に乗せ（P0）、解析目的となる飼育温度で一晩飼育し産卵させる。その後にP0個体を取り除き、卵（F1）を各飼育温度で飼育する。F1が成虫に成長した後に、飼育培地を氷

上に20分間置き、タッパーに入れ、2℃のメディカルキャビネットで48時間静置し、低温刺激温度を与える。その後、キャビネットからタッパーを取り出し、15℃で一晩置き、生存率を顕微鏡下で測定する[3]。1回の解析につき、3枚の飼育培地を用意し、1系統につき少なくとも9枚分の解析を行った。

### *in vivo* カルシウムイメージング

2%(v/w)アガロースパッドに線虫系統を1～数匹置き、医療用接着剤で固定し、M9バッファーに浸して丸型カバーガラスをかぶせた。サンプルを倒立顕微鏡に装備されているITOガラスプレートタイプの温度制御装置の上に置いた。W-Viewoptical systemを用いて蛍光を観察し、蛍光画像はEM-CCDカメラで撮影した。画像の蛍光強度はMetaMorphにより解析した。細胞内のカルシウム濃度の相対変化はイエローカメレオン(yelow cameleon 3.60(YC3.60))のacceptor/donor(YFP/CFP)もしくはGCaMP8とtag-RFP(pKOB006 *gcy-5p::tag-RFP*[10])のacceptor/donor(GFP/RFP)蛍光の比で計算した。温度変化刺激は、温度制御装置を用いて与え、約5分間ニューロンの細胞体内の$Ca^{2+}$濃度の変化を測定した。

## 3. 結　果

### 1 皮膚で発現する化学物質受容体分子が低温耐性に関与

低温耐性に関わる新規の分子を同定するために、温度受容ニューロンと味覚ニューロンを用いた1細胞トランスクリプトーム解析を行った。その結果、温度受容ニューロンでのみ強く発現している化学受容体様分子の遺伝子が見つかってきた。その遺伝子の発現をGFPなどを用いて解析したところ、上皮細胞において発現が観察された。さらに、ノックアウト変異体を作成して、その低温耐性を調べたところ、低温耐性の低下が観察された。この結果から、上皮細胞で発現している化学受容体様分子が、個体の温度適応関与している可能性が考えられた。

### 2 接触刺激を受容する受容体が低温耐性に関与

低温耐性を正に制御する分子はこれまでにほとんど同定されていなかったため、順遺伝学的解析から低温耐性が低下している変異体を単離した。その変異体の原因遺伝子を次世代DNAシークエンサーなどを駆使して同定した結果、低温耐性を制御する新規遺伝子*xdh-1*を同定した。この遺伝子の産物は、ヒトのプリン体代謝経路において、ヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸への酸化を触媒する酵素であるキサンチンデヒドロゲナーゼ(XDH)のホモログであった。*xdh-1*変異体において、特定の細胞のみで野生型の*xdh-1*遺伝子を発現させる細胞特異的な回復実験を行った結果、AINとAVJと呼ばれるわずか2対の介在ニューロンにおいてXDH-1が低温耐性を制御していることが見つかった。AINとAVJは介在ニューロンであるため、それらが温度を受容している可能性もあるが、一般的にはそれらの介在ニューロンの上流に温度を感知する感覚ニューロンが存在する可能性が考えられた。そこで、AINとAVJ介在ニューロンの上流に位置する感覚ニューロンを神経回路データベースから調べたところ、ASG感覚ニューロンなどのメカノレセプターが発現している感覚ニューロンが複数存在していた。そこで、メカノレセプターに焦点を当て、メカノレセプターの変異体を用いて低温耐性の異常の有無を調べたところ、Degenerin/Epithelial Sodium Channel(DEG/ENaC)タイプのメカノレセプターDEG-1の変異体において、低温耐性の低下異常が見られた。DEG-1はAIN介在ニューロンの上流に位置するASG感覚ニューロンで発現しているため、$Ca^{2+}$イメージング法を用いてASGの温度に対する応答性を測定した[11, 12]。野生株のASGは温度に対して大きな応答を示した。それに対して、*deg-1*変異体ではその反応が低下していた。以上の結果から、DEG-1は温度受容情報伝達に関与していることが示唆された。実際に、DEG-1が温度を受容するのかを調べるために温度を受容しない細胞にDEG-1を発現させて、温度に応答するようになるかをカルシウムイメージング法で測定したところ、温度に応答するようになった。そこで、DEG-1の温度感受性を直接的に調べるために、*Xenopus* oocyteにDEG-1を発現させて、電気生理解析を行ったところ、温度に対する反応が見られた。さらに、ヒトのDEG/ENaCタイプの

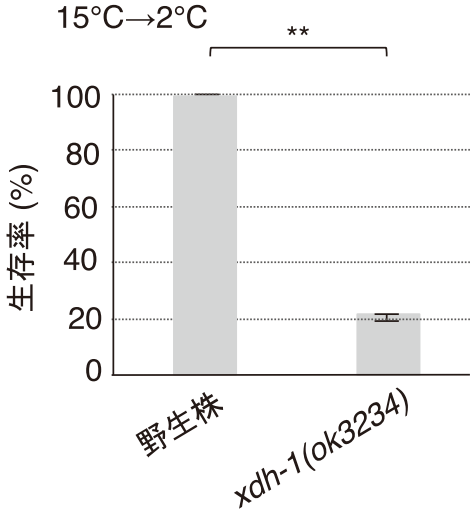



図3　*xdh-1*変異体の低温耐性
成虫期における、*xdh-1*変異体の低温耐性解析(アッセイ数 ≥ 9)。
エラーバー：SEM。**p < 0.01 (Tukey-Kramer)。
*xdh-1*変異体はが低温耐性異常を示した。

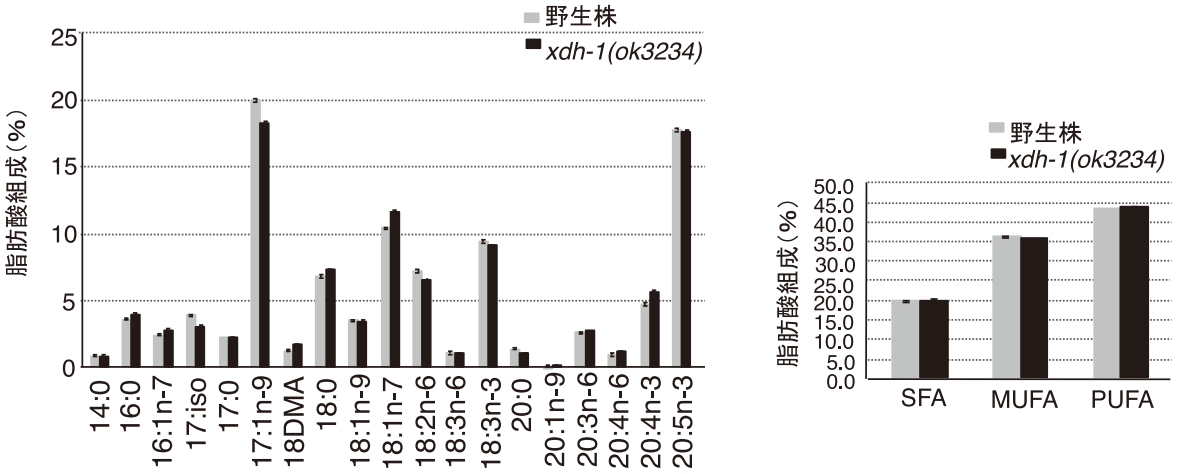



図4　成虫期の野生株と成虫期の*xdh−1*変異体の脂肪酸組成比率測定

左図は、成虫期の野生型および成虫期の*xdh-1*変異体の個々の脂肪酸種の比率を示す。右図は、飽和脂肪酸（SFA）、モノ不飽和脂肪酸（MUFA）、およびポリ不飽和脂肪酸（PUFA）。左右の図共に、各アッセイでN=3。エラーバーはSEMを示す。 文献[9]より引用一部改変。

メカノレセプターであるMDEGを*Xenopus* oocytesに発現させ、温度変化を与えたところ、温度に対する反応が見られた。つまりDEG-1だけでなく、ヒトのDEG/ENaCタイプのメカノレセプターであるMDEGも機械刺激だけではなく温度も受容していることがわかった[9]。

### 3 低温適応時の脂質構成率の変化

DEG/ENaCタイプのメカノレセプターDEG-1の変異体において、体内の脂肪酸構成率の変化が起きているかをMS解析などで調べた。多くの生物において、体を構成する飽和および不飽和脂肪酸の比率は環境温度によって変化するため、野生株と*deg-1*変異体の脂肪酸の脂質割合を測定した。その結果、SFA（飽和脂肪酸）、MUFA（単不飽和脂肪酸）そしてPUFA（多価不飽和脂肪酸）のいずれにおいても野生株と*deg-1*変異体において差が存在した。さらに、個々の脂肪酸種に関しもそれらの構成比率を比較したところ、*deg-1*変異体においても20:4n-3の増加が存在した[9]。つまり、DEG-1の異常により、体内の膜脂質の構成が変化し、低温耐性に影響を与えている可能性が考えられる。

## 4．考　察

温度シフトにおいてのGPCRをコードする複数の遺伝子の発現量が変化していた。そのなかでも、皮膚で発現するGPCRをコードする変異体について低温耐性を測定したところ、低温耐性や馴化の異常が観察されたことから、この受容体の低温耐性への関与が示唆された。このGPCR遺伝子は、皮膚に加えて幾つかの神経細胞などでも発現していたため、今回見つかった低温耐性の異常がどの細胞の異常によるかについては、今後の細胞特異的な回復実験などで明らかになると考えられる。さらに、順遺伝学的解析から得られたヒトの触角刺激受容に関わるメカノ受容体のホモログが低温耐性に関与しており、ヒトのMDEGも温度受容に関わっていた。これはヒトを含む動物でメカノレセプターDEG/ENaCが個体の温度耐性を制御している初めてケースである[9]。今後は、これらの分子が関わる温度受容についての生理学的解析がより必要になると考えられる。

### （引用文献）

1） A. Ohta, A. Kuhara, Molecular mechanism for trimeric G protein-coupled thermosensation and synaptic regulation in the temperature response circuit of Caenorhabditis elegans. *Neuroscience research* **76**, 119-124 (2013).

2） A. Ohta, T. Ujisawa, S. Sonoda, A. Kuhara, Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in Caenorhabditis elegans. *Nature communications* **5**, 4412 (2014).

3） T. Ujisawa, A. Ohta, O. M., S. S., A. Kuhara, Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in C. elegans. *Protocol Exchange*, (2014).

4） M. Okahata *et al.*, Natural variations of cold tolerance and temperature acclimation in Caenorhabditis elegans. *J Comp Physiol B* **186**, 985-998 (2016).

5） T. Ujisawa *et al.*, Endoribonuclease ENDU-2 regulates multiple traits including cold tolerance via cell autonomous and nonautonomous controls in

Caenorhabditis elegans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2018).

6) S. Sonoda, A. Ohta, A. Maruo, T. Ujisawa, A. Kuhara, Sperm Affects Head Sensory Neuron in Temperature Tolerance of Caenorhabditis elegans. *Cell reports* **16**, 56-65 (2016).

7) M. Okahata, A. D. Wei, A. Ohta, A. Kuhara, Cold acclimation via the KQT-2 potassium channel is modulated by oxygen in Caenorhabditis elegans. *Sci Adv* **5**, eaav3631 (2019).

8) T. Ujisawa, A. Ohta, M. Uda-Yagi, A. Kuhara, Diverse Regulation of Temperature Sensation by Trimeric G-Protein Signaling in Caenorhabditis elegans. *PloS one* **11**, e0165518 (2016).

9) N. Takagaki *et al*., Mechanoreceptor-mediated circuit regulates cold tolerance in Caenorhabditis elegans. *bioRxiv* **5**, (2019).

10) K. Kobayashi *et al*., Single-Cell Memory Regulates a Neural Circuit for Sensory Behavior. *Cell Rep* **14**, 11-21 (2016).

11) A. Kuhara, N. Ohnishi, T. Shimowada, I. Mori, Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviours in Caenorhabditis elegans. *Nat Commun* **2**, 355 (2011).

12) T. Ujisawa, A. Ohta, A. Kuhara, Long-term calcium imaging of ASJ sensoryneuron controlling cold tolerance in C. elegans. *Protocol Exchange*, (2014).

# 脂肪酸の構造ダイバーシティを活用する生理活性物質創製

東京大学大学院薬学系研究科
大和田　智彦

There are scattered reports that fatty acids have different effects on ω-3 and ω-6; supplements of DHA and EPA, which are ω-3 fatty acids, are available, but not so often for ARA, which is an ω-6 fatty acid. Fatty acids have a high degree of structural diversity in terms of the total number of carbons, the number of double bonds, the position of the double bonds, and the geometric isomerism of the carbon-carbon double bonds, since they usually contain Z-olefines also E-olefines. The structural diversity of fatty acids not only refers to the diversity of molecular formulae due to geometric isomerism and differences in the number of carbons, but also refers to the fact that there are many conformations of a single fatty acid based on bond rotations. There should be present endogenous ligands that are fatty acids themselves or have fatty acids as substructures, and there are corresponding receptor proteins. It is certain that fatty acids are involved in a part of the signal transduction mechanism in vivo. We studied herein rational design and synthesis of molecules with fixed conformations based on the structure of fatty acids, which will lead to the creation of substances with bioactive functions such as cosmetology and pharmaceutical supplements.

## 1．緒　言

脂肪酸は、カルボキシル基とメチル基を持つ炭素鎖長の異なる分子である。多価不飽和脂肪酸（PUFA）は、2つ以上の二重結合を含む脂肪酸分子のグループで、ω-3（炭素数3）とω-6（炭素数6）PUFAの2つの主要なグループに分かれ、これらのグループのメンバーは生物活性脂質メディエーターの多くのレパートリーの前駆体である。ω-3脂肪酸の役割は、中性脂肪を減らし、血圧を下げ、動脈のプラークの蓄積を遅らせると報告されている。ω-6脂肪酸の役割は、血糖値のコントロールと血圧の低下作用が報告されているが詳細な機構は不明である。脂肪酸はω-3とω-6で作用が異なるという報告が散見される。ω-3脂肪酸であるDHAやEPAのサプリメントは販売されているが、ω-6脂肪酸であるARAは違う。脂肪酸は全長の炭素数、二重結合の数、二重結合の位置、通常はZ体であるがE体を含むため炭素-炭素二重結合の幾何異性の区別など高い構造ダイバーシティを有している。脂肪酸の構造ダイバーシティとはこのような幾何異性や炭素数の違いによる分子式のダイバーシティを意味するだけではなく、1種類の脂肪酸（たとえばDHA：ドコサヘキサエン酸）についても、結合回転に基づく多数の立体配座が存在することを指している（図1）[1, 2]。

サプリメントだけではなく、脂肪酸そのもの、あるいは脂肪酸を部分構造として持つ内因性リガンドが存在し、対応する受容体タンパク質が存在している。脂肪酸が生体内シグナル伝達機構の一端に関与しているのは確実である。脂肪酸の構造を利用し立体配座を固定した分子を合理的に設計合成すれば、コスメトロジーをはじめ医薬品的サプリメントなど生理活性機能を有する物質創製につながるはずである。

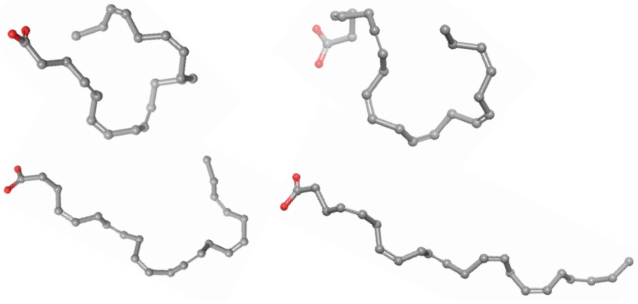


図1　Diversity of Conformations of DHA

## 2．方　法

溶媒や膜中、受容体結合サイト内などの様々な周辺環境で脂肪酸（DHA）の長時間MDやレプリカ交換、メタダイナミックス計算を実施する。構造探索の網羅性が重要であり、複数の計算理論を実施・比較する。構造を類似性で分類し、各小分類から複数の代表構造を選択する。特にDHAについて研究し、方法論の妥当性を検討する。

溶液中の脂肪酸の立体配座は加速型分子動力学法の一種replica exchange with solute tempering（REST）法にて網羅的に発生させた[3, 4]。相似行列（similarity matrix）を、Schrödinger社製のCanvasによって生成される3D pharmacophore fingerprintとTanimoto類似度（Tanimoto similarity metric）から作成した。クラスタリングは各脂肪



Creation of Bioactive Substances by Utilizing Structural Diversity of Fatty Acids
Tomohiko Ohwada
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

酸について収集したすべての立体配座について行い、重要な立体配座を抽出するのに用いた。クラスター数は30以下になるようにして、Kelly's基準値とクラスター間のdistanceを考慮してクラスターをmergeした。

## 3．結　果

### 脂肪酸サロゲートのデザイン

DHAサロゲートはcis-炭素－炭素二重結合をベンゼン環で置き換えることによってデザインした。炭素数を同じように揃えるようにした(例をFig.3に示した)[5]。

### PUFAの立体配座空間の収集

PUFAの立体配置空間の収集において加速分子動力学シミュレーションの利用した。 DHAを含む柔軟なPUFAの全立体配座空間を収集するために，加速分子動力学シミュレーションの一つであるREST法を用いて,多数の立体配置を生成した。RESTは、レプリカ交換法による分子動力学シミュレーションの一種で、対象となる分子を選択的に加熱する一方で、周囲の環境は低温のままにしておく方法である。対象分子を選択的に加熱することで、立体配座間の変換が促進され、少ないレプリカ数でもアクセス可能な立体配座を保存することができる。本研究では，カルボン酸イオンが生物学的環境で一般的に観察されることから，PUFAのイオン化形態を最小化して使用した。ピコ秒ごとに立体配座を抽出することで、1000個のユニークな立体配座が収集された。立体配座の性質をよりよく理解するために、クラスタリングを行い、DHAの立体配座の傾向を調べた。結果的にこの手法で効率的に立体配置が得られることが分かった。

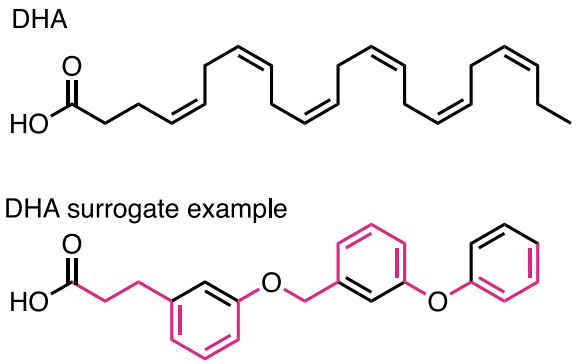



図2 DHAサロゲートの例

### 立体配座のクラスタリング法

立体配座を分類するための最適な条件を確立するために、いくつかの典型的なクラスタリング手法をテストした。

### 重み付けセントロイド連結法

DHAがとる主要な立体配座を出力すると考えられたため、最初に重み付けセントロイド結合を選択した。クラスター数をKelly's Penalty 10の最小値に設定したところ、

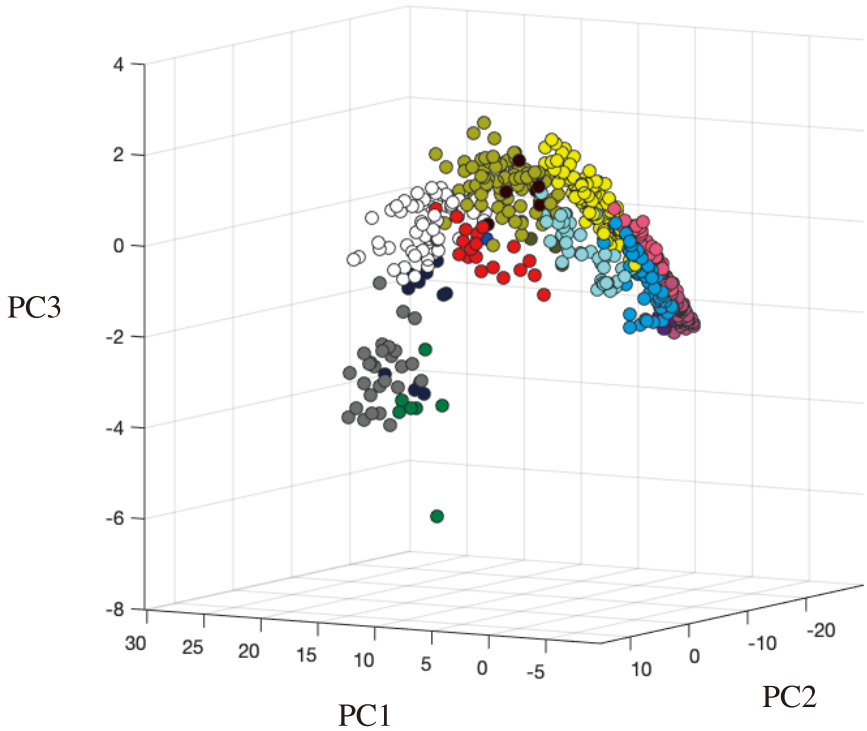



図3　DHAの立体配座の分類（主成分解析の場合）

加重セントロイド結合では、全体の70–90%をカバーする高度に変形した過密なクラスターが得られ、結合法の信頼性が低いことに気付いた。例えば、水中のDHAコンフォーマーの場合、1000個の立体配座を加重セントロイド結合法で20個のクラスターにクラスタリングすると、871個の立体配座が同じクラスターに入る。しかし、この主要なクラスターに含まれる立体配座は、高い類似性を持っているわけではない。クラスター分散は、メンバー数が10以下のマイナークラスターに比べて著しく大きい。そのため、より適切な結合方法を模索する必要がある。

### 記述子の選択

PUFAの単純で柔軟な構造をさらに特徴づけるために、我々は現在利用可能な分子記述子のリストを測定した。一般に、分子指紋や分子記述子は、QSAR/SAR解析、仮想分子スクリーニング、標的分子のランク付け、薬物のADME予測などの創薬プロセスで使用される。 そのため、ほとんどの分子指紋や記述子は、2次元的な構造の違いを説明するものとなっている。つまり、トポロジー的に異なる分子を区別することしかできない。我々の研究では、立体配座を区別したいだけなので、限られた数の指紋や記述子を評価することができる。実際、3Dファーマコフォア指紋は、使用できる唯一の指紋でありながら、前節で述べた階層型クラスタリングに有効であることが分かった。一方で、いくつかの3次元記述子は、立体配座の特性評価において、ユニークな視点を与えた。FOSA と FISA は我々が重要な記述子として選択した2つの記述子で、それぞれ全溶媒到達表面積（SASA）の疎水性成分と親水性成分を表している。表面積は立体配座のフォールディングに大きく依存し、フォールディングの度合いが高いほどSASAは低くなる。私たちは、これらの3つの記述子を、末端炭素距離とともに、3Dプロットの座標として用いることで、最小限のデータで立体配座を表現することを考えた。DHAの1000個の立体配座をプロットし、色でクラスターを区別している。図3に示すように、この3つの記述子、末端炭素距離と疎水性（FOSA）と親水性（FISA）がうまくクラスターを区別している。

しかし、研究を進めるとこの記述子のセットには致命的な問題があることが判明した。表面積は大きさに依存するため、分子サイズの異なる分子では、立体配座の類似性が高いにもかかわらず、互いに離れた座標を与えてしまう。この点は、PUFA立体配座とそのサロゲート立体配座を比較する際に問題となる。したがって、立体配座を3次元空間にプロットするためには、別の記述子が必要となり現在検討を継続している。

## 4．考　察

多価不飽和脂肪酸の立体配座を水中またはn-オクタノール中で、それぞれREST法で網羅的に発生させたところ、この2つの極性の異なる溶媒中での立体配座の和で、全立体配座空間をカバーできることが分かった。このことは、タンパク質に結合する際、脂肪酸の立体配座は、多数のDHAの溶液立体配座から選択される可能性を示唆している。

### （引用文献）


1）Horrocks LA, Yeo YK; Health benefits of docosahexaenoic Acid（DHA）. Pharmacol. Res., 40, 211, 1999.

2）Dyall SC; Interplay between N-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids and the endocannabinoid system in brain protection and repair, Lipids, 52, 885, 2017.

3）Liu P, Kim B, Friesner RA, Berne BJ; Replica exchange with solute tempering: a method for sampling biological systems in explicit water. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102, 13749, 2005.

4）Wang L, Friesner RA, Berne BJ; Replica exchange with solute scaling: a more efficient version of replica exchange with solute tempering（REST2）. J. Phys. Chem. B, 115, 9431, 2011.

5）Jung S, Inoue A, Nakamura S, Kishi T, Uwamizu A, Sayama M, Ikubo M, Otani Y, Kano K, Makide K, Aoki J, Ohwada T; Conformational constraint of the gycerol moiety of lysophosphatidylserine, an emerging lysophospholipid mediator, affords compounds with receptor subtype selectivity, J. Med. Chem. 59, 3750, 2016.

# EGF が皮膚炎に与える影響とメカニズム

熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座
押海　裕之

Epidermal growth factor (EGF) has been used as a component of many cosmetics. EGF has been believed to promote the turnover of the skin and has an anti-aging ability. Recently, we found that EGF regulates the expression of pro-inflammatory cytokine expression in a DDX60 RNA helicase-dependent manner. Pro-inflammatory cytokines are well known to increase vessels permeability leading to swelling, redness and pain. Our data imply that EGF can suppresses the inflammation in the skin. In this study, we further assessed the role of EGF on the inflammatory immune responses, and found that EGF suppressed delayed type hypersensitivity in mice. However, EGF did not reduce the phagocytosis ability of macrophages required for excluding waste product in the skin. Recently, severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus-2 (SARS-CoV-2) causes coronavirus disease-2019 (COVID-19). SARS-CoV-2 infects host through mucosal epithelial cells, and thus it is unclear whether EGF within the cosmetics affect the immune response against SARS-CoV-2. Therefore, we investigated the effect of EGF on the antiviral activities of epithelial cells. Interestingly, EGF in the culture medium suppressed vesicular stomatitis virus (VSV)-induced cytopathic effect (CPE) on epithelial cells, although EGF attenuated the IL-6 expression from VSV-infected cells. EGF-promoted antiviral activities were also observed when cells were infected with seasonal influenza A virus. EGF attenuated the CPE of cells infected with influenza A virus, and reduced IL-6 expression levels. Interestingly, moderate reduction of SARS-CoV-2 replication was observed when EGF existed in cell culture medium. These findings elucidated novel useful aspects of EGF within the cosmetics.

## 1. 緒　言

上皮成長因子（EGF: Epidermal Growth Factor）は、様々な化粧品に配合され、美容液、スキンケアクリーム、パック、化粧水、ファンデーションなどの成分として加えられ、加齢に伴う肌のターンオーバーの遅れの解消やコラーゲンの生成を促進するなどの効能が期待されている。一方で、EGF はその受容体である EGFR は非小細胞肺癌を含め多くの悪性腫瘍で発現が高いため、EGF を過剰に存在することが発がんなどに与える影響についての指摘などがあり、EGF を安易に化粧品の成分として使用することの安全性については懸念もある。しかし、現状として、アンチエイジングなどを謳い EGF が配合された化粧品は現在でも数多く販売されている。

免疫と肌の透明感やハリなどは密接に関連し合うことが近年明らかとなりつつあり、特に、老廃物の除去には強い貪食能を有する皮膚のマクロファージが重要な役割を果たすことや、マクロファージなどから産生される過剰な炎症性サイトカインは局所の炎症を誘導し赤みなどの原因となることが知られている。EGF は上皮細胞の成長に影響を与えるのみならず、免疫応答などにも影響を与えることから、EGF の免疫応答に与える影響を新たに明らかとすることは EGF を化粧品の成分として加えることの効果や、その安全性を考える上でも重要である。

EGF と免疫応答の関連として、特に EGF がサイトカイン受容体の下流で働く STAT3 のリン酸化が EGF 受容体の活性化により促進することは古くから報告されている[1]。STAT3 は IL-6、IL-8、IL-35 などによっても活性化し、転写因子として様々な免疫応答を誘導する。一方で、EGF による免疫制御のメカニズムについては不明な点も多く存在する。我々の研究室ではこれまで自然免疫応答の研究を続けてきており、その中で DDX60 と呼ばれるヘリカーゼが炎症性サイトカインの産生に重要な役割を果たすことを発見した[2]。興味深いことにこの DDX60 について、EGF が DDX60 分子のチロシンリン酸化を誘導することで炎症を抑えることを明らかとした[3]。これは EGF が DDX60 分子の機能を介して炎症を抑える役割を果たすことを示唆するが、これらが皮膚炎などの炎症に与える影響については十分に解明されていない。

一方で 2020 年に始まった新型コロナウイルス感染症（COVID-19: coronavirus disease-2019）のパンデミックによりウイルス感染症の問題がある。EGF は化粧水などにも配合されており、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）が感染する目や鼻や口などの粘膜にも触れる機会が多い。そのため、化粧品に配合された EGF が免疫に影響を与えることで感染に抵抗性や感受性を与える可能性もあり、その検証も喫緊の課題となる。

本研究では「自然免疫」という視点から特に DDX60 ヘリカーゼと細胞外小胞の機能に焦点をあて、EGF がこれら



Effect of EGF on hypersensitivity in the skin and its underlying mechanism
Hiroyuki Oshiumi
Department of Immunology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

の分子を介して肌のターンオーバーや健康に与える影響を解明し、EGF配合化粧品の新たな効能と機能を解明することを目的として研究を進めた。

## 2．方　法

### 2. 1. 接触性過敏反応

マウス近郊系としてC57BL/6系統の野生型マウスとDDX60遺伝子をノックアウトしたマウスを実験に使用した。動物実験にあたっては熊本大学の動物実験委員会の承認を得た実験計画書に基づいて実験を実施した。接触性過敏反応の実験系としてDNFB（dinitrofluorobenzen）の反復塗布を実施した。炎症誘導後にはEGFを添加し、炎症の増悪を組織切片の観察とサイトカイン産生を指標に評価した。

### 2. 2. フローサイトメトリー

マクロファージに与える影響としてTHP-1やRAW264.7細胞を用いて、CRISRP-Cas9の系を用いてDDX60のノックアウト細胞を作成した。貪食に与える影響として蛍光ラベルしたビーズの取り込みをフローサイトメトリーにより解析を行った。フローサイトメトリーではFACSキャリバーを用いて実験を実施した。

### 2. 3. サイトカイン量の測定

ヒト上皮細胞株であるHEK293細胞やHeLa細胞株はそれぞれ10％の牛胎児血清（FCS）を含むD-MEM（low Glc）とEagle's MEMを用いて培養した。EGFについてはそれぞれヒト組換えEGFを用い実験を実施した。炎症性サイトカインの測定においては、細胞からRNAを抽出し逆転写後に定量PCR法により定量した。また、細胞上清中のサイトカイン量についてはELISA法を用いて実施した。

### 2. 4. ウイルス

牛水疱性口内炎ウイルス（VSV）はVero細胞を用いて増殖させた。ウイルスの力価はVero細胞を用いたプラーク法を用いた。インフルエンザウイルスは鶏卵を用いて増殖させた。力価はMDCK細胞を用いてプラーク法により決定した。SARS-CoV-2は国立感染症研究所より分与いただいたCOVID-19患者由来のウイルス株を用いた[4]。ウイルスの増殖およびプラーク法による力価測定はVeorE6/TMPRSS2細胞を用いて実施した。新型コロナウイルスのウイルス量についてはTCID50法により測定した。

## 3．結　果

### 3. 1. EGFがマクロファージ貪食能に与える影響

マクロファージ様の細胞株であるTHP-1細胞とRAW264.7細胞に対してDDX60遺伝子をノックアウトするためにCRISPR-Cas9の実験系でそれぞれエクソン11を除去しノックアウト細胞株を作成した。DDX60遺伝子がノックアウトされたことについては定量PCR法によりmRNAの発現量で確認した。

野生型とDDX60ノックアウト細胞株に対して、その培養液にEGFを添加し、それぞれの貪食能を蛍光ラベルしたビーズの取り込み量でFACSにより評価した。その結果、EGF添加により濃度依存的に野生型のマクロファージ細胞株の貪食能の増加が観察された。一方で、DDX60をノックアウトしてもマクロファージの貪食能は低下しなかった。これらのことはEGFが制御するDDX60の機能はマクロファージの貪食能には関与しないことが示唆された。

### 3. 2. EGFが過剰な炎症を抑制するメカニズム

DDX60分子は通常ウイルス由来のRNAを認識して活性化するが正常の細胞株にはウイルスは存在しない。しかしDDX60の欠損細胞では定常時での炎症性サイトカインの産生も減少することが明らかとなったため、DDX60の内在性のリガンドを探索した。細胞質内のウイルス認識受容体であるRIG-IとMDA5は通常は内在性のLINE-1やAluなどのレトロエレメントを認識しないが、RIG-IやMDA5のアミノ酸変異によりこれらのレトロエレメントを認識することが知られている。MDA5のG495R変異はAGSの患者で発見されヒトのAlu配列を過って認識するようになることが知られている。我々はこのMDA5-G495R変異を野生型とDDX60のKO細胞に発現させI型インターフェロンとIL-6などの炎症性サイトカインの産生量を比較したところ、MDA5-G495R変異によるIL-6の産生はDDX60のノックアウトにより減弱することを発見した。これらは、内在性のレトロエレメントがDDX60を介して炎症性サイトカインを誘導すること、また、EGFがこれを抑制することで過剰な炎症を制御できることを示唆する。

### 3. 3. EGFが過敏反応に与える影響（マウス動物モデル）

マウスの接触型過敏反応の動物モデル実験において野生型とDDX60ノックアウトマウスで比較した。DNFBをマウスの耳に反復塗布し、接触過敏反応による腫れの程度を測定したところ、DDX60ノックアウトマウスでは腫れが野生型マウスと比較し緩和されることが示唆された。一方で、この過敏反応に関与する因子としてリンパ節や脾臓のT細胞数などを測定したが、野生型とDDX60ノックアウトマウスでは有意な差が見られず、そのメカニズムの解明については今後の課題である。

### 3. 4. EGFによる抗ウイルス作用

DDX60 分子はウイルス感染時のサイトカイン産生に関与しており、EGF がDDX60 依存的なサイトカイン産生を抑制することから、ウイルス感染時の免疫応答における EGF の役割について検討した。

VSV は実験室で古くから用いられているウイルスでありヒト上皮細胞を含め様々な細胞に感染する。我々は EGF 存在下で培養したHeLa 細胞へVSV を感染させ、36 時間後に細胞をホルマリンで固定した後にクリスタルバイオレットで染色し生細胞を観察することでVSV の細胞傷害活性（CPE: Cytopathic effect）について調べた。実験の結果、ウイルスによる細胞傷害活性がEGF によって濃度依存的に抑制されることが明らかとなった（図１）。一方で、EGF はVSV 感染時のI型インタフェロン産生を増加させたのに対し、逆にIL-6 の産生を抑制することが示された（図2）。これはEGF がサイトカイン産生を抑え炎症を抑制しながらもVSV に対して抗ウイルス作用を示すことを示唆する。

次に季節性インフルエンザウイルスに対する影響について調べた。EGF を培養上清に加えることで、ウイルスの増殖については抑制する傾向が観察された（図3）。一方でウイルス感染後のサイトカイン産生に与える影響について調べたところ、I型インターフェロン産生がEGF により増加したのに対しIL-6 を含む炎症生サイトカイン産生は逆に低下することが明らかとなった（図3）。

2020 年にCOVID-19 パンデミックの原因となったSARS-CoV-2 に対する影響について次に調べた。国立感染症研究所より分与された、COVID-19 患者より単離さ

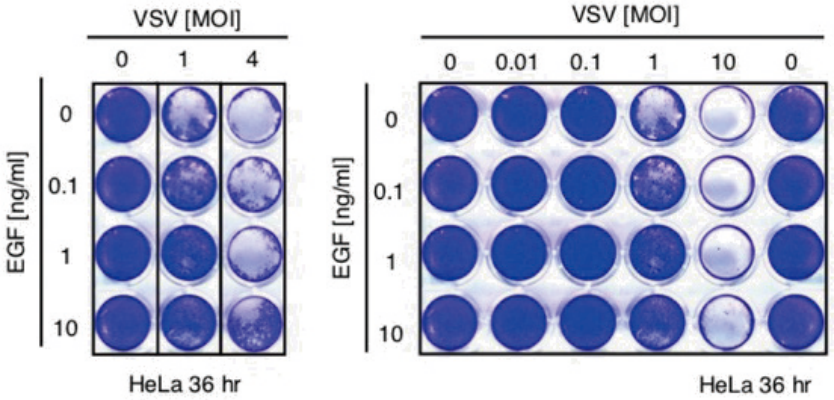



図1　VSVによる細胞傷害活性におけるEGFの効果

HeLa細胞を図に示す濃度のEGFを含む培養液で培養し、VSVをMOI＝0，1，4で感染させた。感染後36時間の時点で細胞をホルマリンで固定したのちにクリスタルバイオレットを用いて生細胞を染色した。EGFの転化により細胞傷害が抑制されることが示唆された。

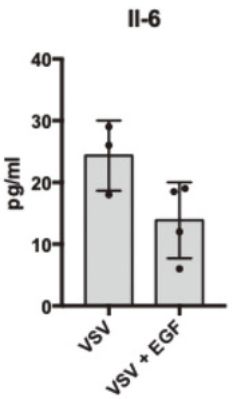



図2　VSVによるIL-6産生誘導におけるEGFの役割

HeLa細胞をVSVでMOI＝1の条件で感染させ、感染後24時間の時点での細胞上清中のIL-6のタンパク量についてELISAにより測定した。培養液中のEGFによりIL-6の産生量が減少した。

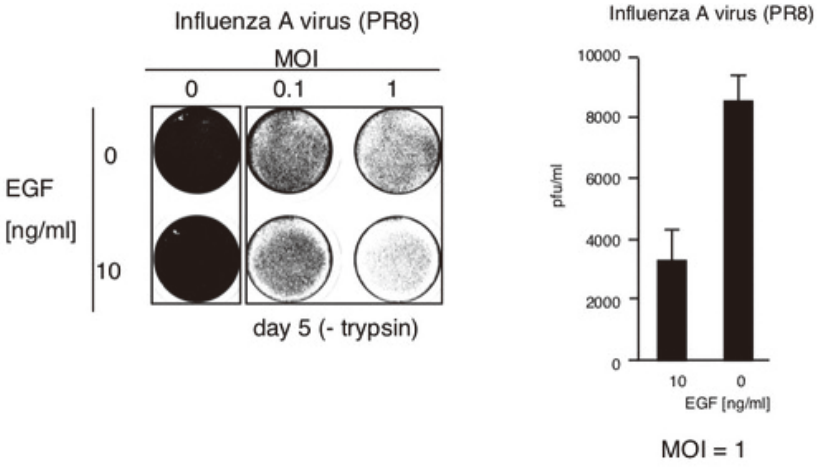



図3　インフルエンザウイルス感染に対するEGFの効果

細胞培養液に10 ng/mLのEGFを添加することでインフルエンザウイルスによる細胞傷害が抑制されることが示唆された（図左）。一方で、このときの培養上清中のウイルス量を比較するとEGF存在下ではウイルス量が低下していた。

れたSARS-CoV-2株について、EGFの有無によるウイルス量の違いについてACE2を過剰発現させたHEK293細胞を用いて調べた。SARS-CoV-2感染2日後の細胞上清のウイルス量についてTCID50法により測定したところEGF存在下ではウイルス量がやや減少する傾向が観察された。

## 4．考　察

EGFは上皮の成長を促し肌のターンオーバーなどを促進することから一時期は多くの化粧品に配合され使用されており、アンチエイジングを謳う数多くの商品にも配合されていた経緯がある。一方で、悪性腫瘍でEGFの受容体が過剰発現するなど健康への影響についても懸念が指摘されることがある。

EGFと免疫との関連についてはこれまで十分に解明されてこなかった。創傷治癒の過程で初期の傷口では外来からの病原体などの異物が免疫応答により排除される。その際には高い貪食能を示す好中球に加えてマクロファージなどの細胞も重要な役割を果たす。その過程ではオプソニン化された異物の貪食に加えて、炎症を誘導するIL-1β、IL-6、TNF-αなどの炎症生サイトカインが産生される。一方で異物が除去され上皮細胞の増殖とともに創傷治癒が完了する段階ではEGFが重要な働きをする。このEGFが上皮の成長を促す以前の免疫応答にどのような影響を与えるのかについては十分な役割が解明されてこなかった。このような状況の中で我々は以前にEGFがDDX60分子のリン酸化を誘導し、それにより炎症生サイトカインの産生が抑制され、炎症の抑制につながることを発見した。

本研究ではEGFのDDX60分子を介した免疫制御機構について調べたところ、1）EGFはマクロファージの貪食を促すが、DDX60分子は関与しないこと、2）EGFは内在性レトロエレメントによるDDX60依存的な炎症性サイトカイン産生を抑制すること、3）EGFは過敏反応の抑制に弱いながら寄与すること、などが明らかとなった。DDX60が制御するTNF-αやIL-6などの炎症性サイトカインは毛細血管の内皮細胞の透過性を亢進し、炎症を誘導することが知られている。これらのことから、EGFはマクロファージの貪食能の亢進による老廃物の除去を促し上皮の成長を促進する効果があることに加え、赤み、かゆみ、腫れなどの原因となる炎症を抑制する働きがあることが示唆された。

2020年に入りSARS-CoV-2によるCOVID-19のパンデミックが世界的な問題となっている。SARS-CoV-2は粘膜上皮細胞に感染すると考えられており、上気道と下気道より感染する。一方で、他の粘膜上皮から感染するウイルスと同様に目などの粘膜からも感染すると考えられている。そのため、化粧水やパックなどにEGFが含まれていた場合には、これらが目などの上皮細胞に触れ、免疫応答に影響を与える可能性が考えられた。本研究ではEGFが上皮細胞の抗ウイルス作用に与える影響についても調べた。EGFはDDX60の機能を抑制しサイトカイン産生を抑制することから、DDX60依存的な抗ウイルス作用を抑制することが懸念されたが、実験の結果は反対にEGFが上皮細胞の抗ウイルス作用を強めることを発見した。ウイルス実験で古くから用いられているVSVに対してはEGFが上皮細胞のウイルスによる細胞傷害活性を抑制することが示され、季節性インフルエンザについてはその増殖を抑制することが示唆された。一方でCOVID-19のパンデミックとなるSARS-CoV-2に対する影響では、ウイルスの増殖をやや抑制する傾向が見られた。これらの結果、EGFはDDX60依存的なサイトカイン産生を抑制するものの上皮細胞の抗ウイルス活性は抑制せず、むしろ活性化することが示唆された。これらはEGFを配合する化粧品などが新型コロナウイルス感染に対しては特に悪影響がないことを示唆する。

## 5．総　括

EGFの効果については肌のターンオーバーを促進しアンチエイジング効果があると謳われる一方で、悪性腫瘍の増殖促進など負の側面があることも懸念されている。本研究ではEGFの効果として肌に影響を与える炎症を抑制する効果があることを示した。さらに、近年問題となっている新型コロナウイルス感染に対する免疫応答にも悪影響を示さないことが示唆された。これらは化粧品にEGFを配合することの効果や効能についての根拠を提示するものであり、化粧品の安全性や機能についての理解と安心につながると期待される。

**（引用文献）**


1）Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J.E., Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264**, 95-98 (1994).

2）Miyashita, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M. & Seya, T. DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol Cell Biol* **31**, 3802-3819 (2011).

3）Oshiumi, H. et al. DDX60 Is Involved in RIG-I-Dependent and Independent Antiviral Responses, and Its Function Is Attenuated by Virus-Induced EGFR Activation. *Cell Rep* **11**, 1193-1207 (2015).

4）Matsuyama, S. et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 7001-7003 (2020).

# アトピー患者に対する化粧品の皮膚刺激性・保護作用を評価する新規皮膚炎モデルの開発

広島大学原爆放射線医科学研究所

神沼　修

Stimulating activity for skin, including that of patients with atopic dermatitis, is one of the most important issues for the development of cosmetics. I have recently proven that antigen-specific T cells have potential to induce allergic inflammation in various tissues including skin, without assistance of IgE/mast cell-dependent pathway. Here, I aimed to establish a new mouse model of skin inflammation that enable to evaluate the stimulating and protective effects of cosmetics on atopic patients' skin. Hairless mice in which antigen-specific T cell receptor (TCR) is expressed on all peripheral T cells is generated by mating BALB/c-background Hr mice with cloned mice that we recently established from mite-specific T cells. Th1 and Th2 cells were differentiated from splenic $CD4^+$ T cells of ovalbumin (OVA)-specific TCR-transgenic mice by *in vitro* stimulation culture. BALB/c mice were adoptively transferred with the antigen-specific Th1 and Th2 cells, then the back skin was challenged with topical application of OVA solution. In addition to the inflammatory features observed in the histological specimens, accumulation of eosinophils and antigen-specific Th2 cells, evaluated by the elevation of eosinophil peroxidase activity and by flow cytometry, respectively, in the skin was induced by antigen challenge, despite the absence of antigen-specific IgE. Neither antigen-specific Th1 nor naive $CD4^+$ T cells induced eosinophil accumulation, although Th1 cells by themselves migrated into the skin. The accumulation of eosinophils and Th2 cells in the skin was suppressed by administration of dexamethasone and FK506, indicating an essential role for Th2 cells in the eosinophil recruitment. Based on the rapid development of atopic dermatitis-like pathological features and its responsiveness to therapeutic drugs prescribed, the usefulness of our skin inflammation model for the evaluation of stimulating and protective effects of cosmetics on the skin of atopic patients was indicated.

## 1. 緒　言

腐食性を含めた皮膚刺激性は、化粧品を開発する上で最も重要な検討項目とされ、さまざまな実験系が実用化されている。一方、皮膚のバリア機能が低下したアトピー等の皮膚炎患者に対する皮膚刺激性の問題も大きいが、現在それを的確に評価できる実験系はない。このことから、多くの化粧品において、アトピー患者等への使用は回避せざるを得ない状況となっている。

アトピー患者の皮膚に対する化粧品の影響評価が困難な要因として、迅速かつ安定的に発症し、さまざまな化合物の影響評価に資する皮膚炎モデルが樹立されていないことが挙げられる。アトピー性皮膚炎を模した自然発症および抗原誘発動物モデルは多いが、いずれも発症に長期間を要する上、個体間のバラツキが大きいため、本来影響がないことを前提に開発される化粧品類の微細な影響を解析するのに適しているモデルはない。

一方、申請者は独自に開発したマウスモデルを用い、アトピー性皮膚炎発症に重要と考えられてきたIgE／マスト細胞系が活性化されなくても、抗原特異的T細胞が存在するだけで、皮膚炎を含めたあらゆるアレルギー疾患病態が発症することを明らかにしてきた[1)]。さらに最近、抗原特異的T細胞由来のクローンマウス樹立に世界で初めて成功し、そのマウスを用いれば、わずか3日という短期間でアレルギー病態を誘発できることを見いだした[2)]。

そこで本研究は、この新たに樹立した抗原特異的T細胞クローンマウスを活用し、化粧品のアトピー患者皮膚に対する刺激性や、場合によってはその逆となる保護作用の有無ならびに程度を的確に評価できる、迅速かつ安定的に発症する皮膚炎モデルの開発を目指した。その成果を元に、健常人だけでなく、化粧品の必要性をより強く感じているアトピー患者達でも安心して利用できる、安全な化粧品の開発を後押しするため、本モデルを用いた評価系の普及に努めてゆきたい。



Development of a new skin inflammation model useful for the evaluation of stimulating and protective effects of cosmetics on the skin of atopic patients

Osamu Kaminuma

Research Institute of Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University

## 2. 方　法

### 2. 1. 抗原特異的TCRを発現するヘアレスマウスの作出

クローンマウスのバックグラウンド系統であるBALB/c由来のヘアレスマウスであるHrと、申請者が独自に開発し、現在維持している8種類のT細胞クローンマウスのうち[1)]、ダニ抗原（Der f）特異的な2種類のT細胞クローンマウス（Df#1, Df#2）を交配した。尾ゲノムを抽出してPCRを行うことにより、産仔の遺伝子型判定を行った。

### 2. 2. T細胞依存性皮膚炎病態の解析

T細胞クローンマウスおよび卵白アルブミン（OVA）特

異的T細胞受容体(TCR)遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの脾細胞より、磁気細胞分離システムを用いてCD4$^+$T細胞を分離した。それをそれぞれ特異抗原およびX線照射したBALB/cマウス脾臓細胞と共培養することにより、OVA特異的T細胞を*in vitro*で樹立した。その際、Th1およびTh2細胞を分化誘導するために、それぞれIL-12＋抗IL-4抗体およびIL-4＋抗IFN-γ抗体を培養開始時に添加して7-10日間培養した。樹立した抗原特異的T細胞を回収し、5(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(CFSE)で染色した後、BALB/cマウスに尾静脈より移入した。その24間後、除毛した背部皮膚または耳介に抗原溶液を投与した。陰性コントロールとして、分化誘導前のナイーブCD4$^+$T細胞移入マウス群および非特異的抗原であるウシ血清アルブミン(BSA)投与群を設定した。抗原チャレンジに伴う皮膚炎病態の発症を、病理組織学的変化を指標として評価した。また皮膚組織への好酸球浸潤を、組織ホモジネート中のeosinophil peroxidase(EPO)活性を測定することにより評価した。組織に浸潤した抗原特異的T細胞は、フローサイトメーターでCFSE陽性細胞を計数することにより解析した。

### 2. 3. T細胞依存性皮膚炎モデルに対する薬剤の効果

2. 2. で樹立した皮膚炎モデルに対する各種薬剤の効果を検討した。ステロイド薬であるdexamethasoneおよび免疫抑制薬であるタクロリムス(FK506)をphosphate-buffered saline(PBS)に懸濁し、抗原チャレンジの30分前に皮下投与した。

## 3. 結　果

HrマウスとDf#1およびDf#2マウスを交配し、遺伝子型判定を行うことにより、ダニ抗原特異的TCRおよびヘアレス遺伝子の双方をヘテロに持つ雌雄マウスが確保できた。

また、そのヘアレスクローンマウスの樹立を待つ間、T細胞依存性皮膚炎病態の解析を進めた。In vitroで樹立した抗原特異的Th1およびTh2細胞をBALB/cマウスに移入し、その皮膚に抗原チャレンジすると、皮膚組織の肥厚および炎症細胞浸潤を伴う皮膚炎病態を惹起できた(図1)。ナイーブCD4$^+$T細胞を移入したコントロール群では、明らかな炎症応答はみられなかった。皮膚における好酸球浸潤に伴うEPO活性の変化を解析した結果、Th2細胞を移入した場合には好酸球が多く浸潤するが、Th1細胞移入マウスでは著しい好酸球浸潤はみられなかった(図2A)。一方、移入したT細胞は、Th1およびTh2細胞移入マウスの両者で、抗原チャレンジに伴い皮膚局所への有意な浸潤がみられた(図2B)。

Th2細胞移入モデルにデキサメサゾン(Dex)およびタクロリムス(FK)を投与したところ、いずれも抗原誘発皮膚好酸球および抗原特異的T細胞浸潤を有意に抑制した(図3)。アトピー性皮膚炎に対するステロイド薬および免疫抑制薬の効果が、Th2細胞移入モデルで再現できた。

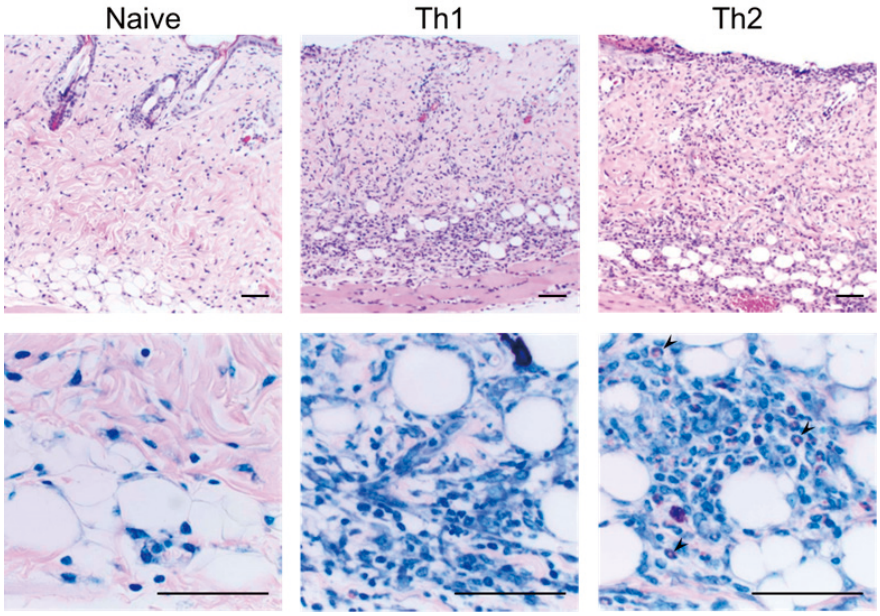



図1　T細胞移入マウスにおける抗原誘発皮膚炎反応
In vitroで樹立したOVA特異的ナイーブCD4$^+$ T、Th1およびTh2細胞を移入したマウスの背部皮膚にOVAチャレンジした。チャレンジ96時間後に皮膚組織を採取し、H&E染色を行って弱拡大(上段)および強拡大(下段)で鏡検した。スケール;50μm。矢印;好酸球。

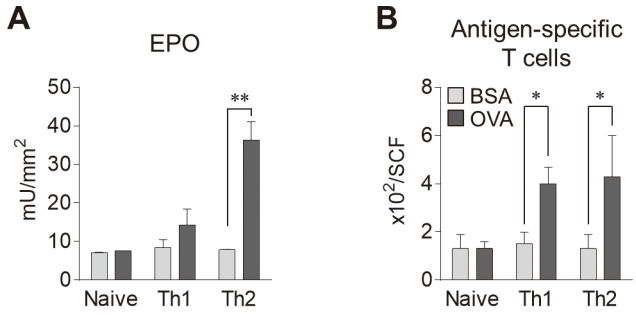



図2　T細胞移入マウスにおける抗原誘発皮膚細胞浸潤反応
OVAおよびBSAチャレンジ24時間後における、皮膚組織のEPO活性(A) および抗原特異的T細胞浸潤(B) 解析した。

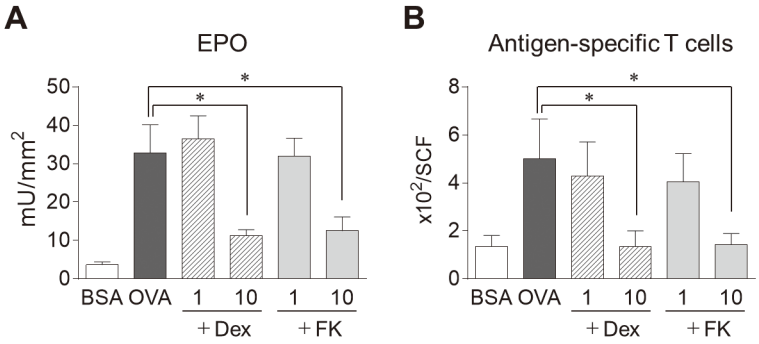



図3　Th2細胞移入マウスにおける抗原誘発皮膚炎に対する治療薬の作用
Th2移入マウスにデキサメサゾン(Dex) およびタクロリムス(FK) を1および10mg/kg皮下投与し、OVAおよびBSAチャレンジして、皮膚組織のEPO活性(A) および抗原特異的T細胞浸潤(B) 解析した。

## 4．考　察

これまで、アトピー性皮膚炎を模した動物モデルとして、NC/Tnd (Nga) マウスの他[3]、OVA他抗原の反復投与による惹起モデル[4]、CASP1[5]、IL-18[6]およびIL-33[7]等の遺伝子導入マウス等が報告されている。しかし、いずれも発症に長時間を要する上、症状の不均一性や誘発工程の煩雑性等が問題となり、アトピー患者に対する化粧品を含めた化学物質の安全性を評価するための標準的な試験系とすることは難しい。

一方、本研究課題を実施する上で、アトピー性皮膚炎における発症機構の理解も重要となる。これまでは、多くの患者で血中IgEの上昇が観察され、そのIgEが抗原を介して架橋されることにより、掻痒等を誘発する主物質であるヒスタミンがマスト細胞から放出されるため、IgE／マスト細胞系がその病態形成にも重要であると考えられてきた。しかし申請者はそのパラダイムに逆行し、各種アレルギー疾患発症における共通の責任細胞として、T細胞が重要な役割を担うことを示してきた[1]。その成果は最近、代表的なT細胞サイトカインのIL-5およびその受容体に対するモノクローナル抗体が気管支喘息を対象に、またIL-4およびIL-13の受容体に対する抗体がアトピー性皮膚炎に対する治療薬として上市されたことによって、臨床的にも実証された。

本研究でも、T細胞移入マウスにおいて、IgE／マスト細胞系の関与がなくても明らかな皮膚炎症状がみられたことは意義深い。その迅速かつ安定的に発症する性状に加え、明確な発症メカニズムならびに治療薬応答性の面からも、化粧品の皮膚刺激性・保護作用を評価する標準的試験系としての高い有用性が示唆された。

## 5．総　括

短期間に安定して皮膚炎症状が惹起できるアトピー性皮膚炎モデルが樹立できた。ヘアレスクローンマウスを確立できれば、より簡便に多くの化合物による影響をスクリーニング的に評価できるようになることから、アトピー患者皮膚に対して影響がないものだけでなく、それに対する保護・治癒作用を有する物質を見いだせる可能性がある。すなわち、これまでアトピー患者皮膚に対する悪影響を懸念して試験することも忌避されていた、多くの化粧品材料を

ライブラリーとした探索研究を実施することにより、コスメトロジー発の新たな皮膚炎治療薬開発に結びつくことも期待される。

**（引用文献）**


1） Miura K, Inoue K, Ogura A et al: Role of CD4 (+) T Cells in Allergic Airway Diseases: Learning from Murine Models. Int J Mol Sci **21**, 2020.

2） Kaminuma O, Katayama K, Inoue K et al: Hyper-reactive cloned mice generated by direct nuclear transfer of antigen-specific $CD4^{+}$ T cells. EMBO Rep **18**: 885-893, 2017.

3） Matsuda H, Watanabe N, Geba GP et al: Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. Int Immunol **9**: 461-466, 1997.

4） Wang G, Savinko T, Wolff H et al: Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice. Clin Exp Allergy **37**: 151-161, 2007.

5） Asahi K, Mizutani H, Tanaka M et al: Intradermal transfer of caspase-1 (CASP1) DNA into mouse dissects: role of CASP1 in interleukin-1beta associated skin inflammation and apoptotic cell death. J Dermatol Sci **21**: 49-58, 1999.

6） Konishi H, Tsutsui H, Murakami T et al: IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 11340-11345, 2002.

7） Imai Y, Yasuda K, Nagai M et al: IL-33-Induced Atopic Dermatitis-Like Inflammation in Mice Is Mediated by Group 2 Innate Lymphoid Cells in Concert with Basophils. J Invest Dermatol **139**: 2185-2194. e2183, 2019.

# メラニン色素合成の解明に向けて
# ～チロシナーゼ関連タンパク質の金属要求性に関する基盤研究～

京都大学大学院生命科学研究科
神戸　大朋

Melanin biosynthesis requires tyrosinase protein family consisting of tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), and tyrosinase-related protein 2 (TYRP 2). These three proteins show high sequence identify. TYR has oxidase activity, and possesses two copper ions coordinated at the active center. The Golgi-resident copper transporter ATP7A plays a pivotal role in the coordination of TYR with copper. In contrast, the coordination metals for TYRP1 and TYRP2 have not yet been clarified, although it was suggested that they have a homologous structure to TYR, and thus copper ions would be coordinated at their active site. The crystal structure of TYRP1 was recently reported, which showed that TYRP1 has homologous structure to TYR, as expected. However, it was a surprising result that the coordinated metals at the active center are not copper ions but zinc ions. Currently, information about the metals coordinated at the active center of TYRP1 and TYRP2 is complicated. In this study, we tried to address this unappreciated issue using the gene disruption/re-expression evaluation strategy. We first confirmed that TYR activation requires ATP7A using the cells deficient in *ATP7A* gene. We then showed that two Zn transporter (ZNT) complexes, specifically ZNT5-ZNT6 heterodimers and ZNT7 homodimers, which locate to the compartments of the early secretory pathway, play essential roles for TYRP1 expression. Moreover, we showed that the cells deficient in both *ZNT5* and *ZNT7* genes changed the color from black to brown in cell pellets, indicating that both ZNT complexes contribute to melanin synthesis. These results provide novel insights into the molecular mechanism underlying the melanin biosynthesis and TYRP1 expression.

## 1. 緒　言

メラニン色素は、メラニン細胞においてメラノソーム中で、チロシンから数段階の酵素反応を経て合成される[1, 2]。このメラニン合成に関わる酵素として、チロシナーゼ(TYR)、チロシナーゼ関連タンパク質1(TYRP1)、チロシナーゼ関連タンパク質2(TYRP 2)の3つが存在する[3, 4]。TYRは、活性中心に銅イオンを配位するタイプ3銅タンパク質であり、そのモノフェノールモノオキシゲナーゼ活性の発現には、活性中心への銅の配位が不可欠となる。また、この銅の配位にはトランスゴルジネットワークに局在する銅トランスポーターATP7A(メンケスタンパク質)が必須の役割を果たす[5]。そのため、ATP7Aの変異マウスはいずれも斑模様やうすい色を特徴とする被毛を呈する[6, 7]。一方、TYRP1とTYRP2に関しては、TYRと高い相同性を有すること、さらに相同の活性部位を持つと予想されることから、以前よりタイプ3銅酵素に分類されており、これまで十分な解析が実施されてこなかった[2, 3]。このような状況下、最近TYRP1の結晶構造解析から、TYRP1はTYRと相同な活性中心を持つものの、配位している金属は銅ではなく、亜鉛であることが報告された[8, 9]。



Studies on the mechanism how melanin biosynthesis is regulated by metals

Taiho Kambe

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

ヒト体内のタンパク質の中で亜鉛含有タンパク質は10%程度、また、銅含有タンパク質は多くても0.5%程度と予想されている[10, 11]。細胞内におけるこれらのタンパク質の生合成や活性発現には、亜鉛や銅が正しく配位される必要があるため、亜鉛や銅の運搬を担うトランスポーターは厳密に制御されている[12, 13]。上述の通り、TYRの活性中心に配位する銅はATP7Aにより供給されるが[5]、本研究では、TYRP1・2に亜鉛を供給する亜鉛トランスポーターが存在すると仮定して解析を実施した。尚、我々のこれまでの解析から、亜鉛要求性のエクト型酵素は、亜鉛トランスポーター複合体であるZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体が機能することが明らかとなっているため[14, 15]、これを指標とし、補因子の観点からメラニン色素生合成の一端を解明することを試みた。

## 2. 方　法

### 2. 1. 細胞培養、トランスフェクション、亜鉛・銅トランスポーター欠損株の作成

ヒトメラノーマ細胞であるSK-MEL-2(JCRB細胞バンク)の培養には10% FCSを添加したRPMI1640(和光純薬工業株式会社)を用いて、5% $CO_2$、37℃の条件下で10cm dishにて培養、および継代維持を行った。一方、別のヒトメラノーマ細胞であるHMV-Ⅱ(理研BRC)にはRPMI1640ではなく、Ham's F-12 buffer(和光純薬工業株式会社)を用いた。亜鉛トランスポーターZNT5およびZNT7、銅トランスポーターATP7A欠損株を樹立するために、pX330-B/Bベクターにそれぞれの遺伝子のgRNAを接続したプラスミドを作成した。この作成したプラスミドをブ

ラストサイジンS耐性遺伝子発現ベクターと共にSK-MEL-2細胞およびHMV-II細胞にLipofectamine 2000を使用して導入し、薬剤耐性株を指標にそれぞれのトランスポーター欠損株（ZNT5ZNT7二重欠損株とATP7A単独欠損株）を樹立した。また、TYR、TYRP1、TYRP2および、トランスポーターの発現ベクターの導入にもLipofectamine 2000を使用した。

### 2. 2. Western blotting

膜タンパク質20μgを2×SDS sample buffer（375mM Tris-HCl（pH6.8）, 30% Glycerol, 6% SDS, 0.5M DTT, 0.1% BPB）に溶解し、37℃で15分間反応させサンプル溶液とした。8% SDS-polyacrylamide gelを用いて電気泳動を行った後、0.45μm PVDF膜（Immoblion-P）にtransferした。以下に示した一次抗体にて4℃で一晩抗体反応を行い、PBS-Tで10分間の洗浄を3回行った後、二次抗体を反応させた。Immoblion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate（Millipore）を用いて化学発光させ、Image Quant LAS 500（GE Healthcare Life Science）にて検出した。一次抗体には、anti-TYRP1（1:3000; Sigma）、anti-Rab27a（1:1000; Cell Signaling technology）、anti-Halo Monoclonal Antibody（1:1000; Promega）、anti-ATP7A（1:3000）を使用した。二次抗体には、GE Healthcare社のHRP標識抗IgG抗体（1:3000）を使用した。

### 2. 3. 免疫蛍光染色

カバーガラス上で2日間培養したSK-MEL-2細胞をPBSで洗浄した後、中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業株式会社）にて固定した。PBSで3回の洗浄後、0.1% Triton（Nacalai Tesque）によって透過処理を15分間行った後、6% BSA/PBS溶液（アルブミン，ウシ血清由来，フラクションV, pH7.0（和光純薬工業株式会社））でブロッキングした後、2% BSA/PBS溶液に一次抗体を希釈して4℃で一晩抗体反応を行った。PBSで10分間の洗浄を3回行った後、同様に二次抗体、三次抗体それぞれを室温で1時間反応させた後、SlowFade Antifade kit（Molecular Probes）を用いてカバーガラスに封入した。蛍光観察には蛍光顕微鏡FSX100（Olympus）を使用した。一次抗体には、anti-TYR［T311］（1:1000; Santa Cruz Biotechnology）、anti-TYRP1（1:1000; Sigma）、anti-TYRP2［C-9］（1:1000; Santa Cruz Biochemistry）を用いた。二次抗体、三次抗体にはMolecular Probes のAlexa標識抗 IgG 抗体を使用した。核の染色には4,6-diamino-2-phenylindole（DAPI）（1:1000; Abcam）を用いた。

### 2. 4. ザイモグラフィー

調整した膜タンパク質50μgに6 × SDS buffer: DTT（-）（375mM Tris-HCl（pH6.8）、30% Glycerol、6% SDS、0.1% BPB）を8μL加え、37℃で20分間インキュベートした。Novex WedgeWell 4-12% Tris-Glycine Gels（Invitrogen）を用い、10mA、4℃の条件で3時間程度、電気泳動を行った。バッファーの置換とゲルの平衡化のため、泳動後のゲルを50mM phosphate buffer（pH6.0）で室温にて3時間振とうした。平衡化したゲルはcolor formation buffer（10mM phosphate buffer（pH6.8）、1.5 mM L-DOPA、4mM MBTH）中において37℃で1時間反応させた。TYRによるL-DOPA酸化産物であるDOPA chromeのバンドの生成を褐色の色素として確認した。

## 3．結　果

### 3. 1. TYR活性はATP7Aによって制御される

TYRP1の解析を実施するにあたり比較対象となるTYRの銅依存性に関する解析を実施した。CRISPR/Cas9を使用してATP7Aを欠損させたSK-MEL-2細胞株を樹立した。TYR、TYRP1、TYRP2を一過的に発現させたところ、*ATP7A*欠損株および親株のどちらにおいてもメラノソームと思われる小胞への局在が観察された（図1A）。一方、ザイモグラフィーにおいては、*ATP7A*欠損株におけるTYR活性を検出することができなかった（図1B）。これらの結果から、*ATP7A*欠損株においては、TYRはアポ型酵素として存在することが明らかとなった。一方、TYRP1およびTYRP2の発現は、野生株と*ATP7A*欠損株において差違はみとめられず、両者の発現にATP7Aは必要でないことが明らかとなった（Fig. 1A）。

### 3. 2. *ZNT5ZNT7*二重欠損株ではTYRP1は安定に発現できない

次に、SK-MEL-2 細胞において、亜鉛トランスポーターZNT5とZNT7を共に欠損させた*ZNT5ZNT7*二重欠損株を樹立した。本二重欠損株にTYR、TYRP1、TYRP2を一過的に発現させてImmunoblot解析を実施したところ、TYRとTYRP2は野生株と同様に欠損株においても発現が確認された。一方、TYRP1の発現は、欠損株においてみとめることができなかった。TYR、TYRP1、TYRP2の発現や局在へのZNT5とZNT7の影響をさらに詳細に解析するため、TYR、TYRP1、TYRP2を野生株と*ZNT5ZNT7*二重欠損株に一過的に発現させ、免疫蛍光染色によるタンパク質発現と局在解析を行った。TYRとTYRP2はメラノソームと思われる小胞への発現が確認されたが、TYRP1は、野生株で観察された発現が欠損株においては消失していた（図2）。したがって、ZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体の発現が、TYRP1の安定発現に不可欠であることが示唆された。

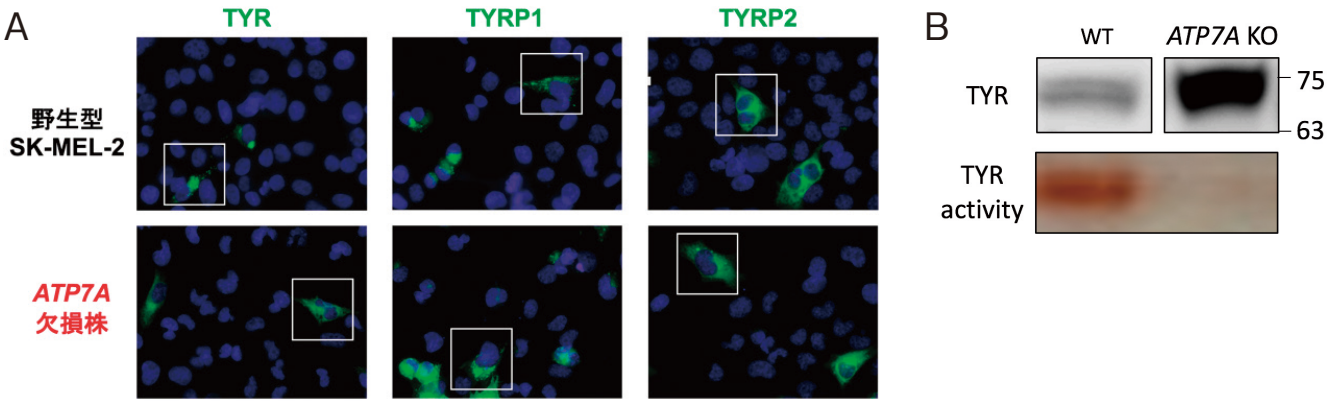



図１　*ATP7A*欠損SK-MEL-2細胞に発現させたTYR、TYRP１、TYRP２の免疫染色の結果
A. *ATP7A*欠損株と野生株において、TYR、TYRP１、TYRP２の発現に顕著な変化はみとめられない。
B. *ATP7A*欠損株においてはTYRの酵素活性は消失する。TYRの活性はザイモグラフィーによって検出した。

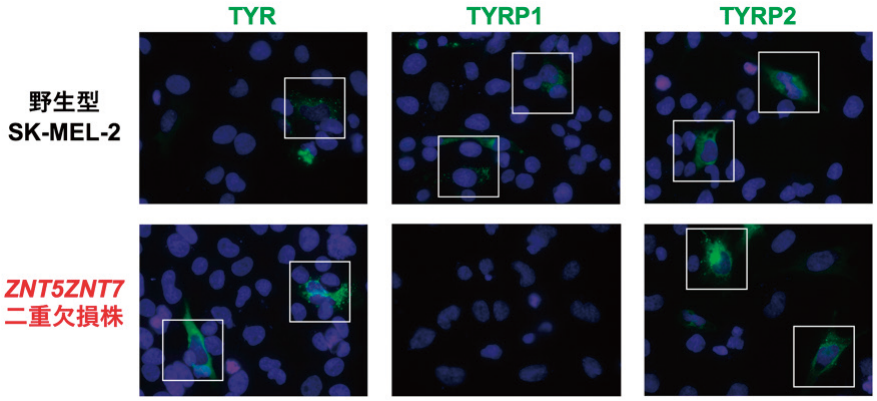



図2　*ZNT5ZNT7*二重欠損SK-MEL-2細胞に発現させたTYR、TYRP１、TYRP２の免疫染色の結果
*ZNT5ZNT7*二重欠損株においては、野生株で検出されたTYRP１の発現が完全に消失する。一方、TYRとTYRP２の発現には変化はみとめられない。

### 3. 3. TYRP1の発現にはZNT5-ZNT6ヘテロ二量体およびZNT7ホモ二量体が輸送した亜鉛が不可欠である

TYRP１の発現がZNT５とZNT７の輸送する亜鉛に依存しているのか明らかにするため、亜鉛輸送活性を失ったZNT５変異体を用いた解析を試みた。ZNT５の属するZNTファミリーには膜貫通領域内に高度に保存された２つのヒスチジン残基（H）と２つのアスパラギン酸残基（D）からなるHD-HDモチーフが存在する[13]。このHD-HDモチーフ内のアミノ酸残基をアラニン（A）に置換した変異体$ZNT5_{H451A}$と$ZNT5_{D599A}$は、ZNT６と正常にヘテロ二量体を形成できるが亜鉛結合能を失うため、どちらも亜鉛輸送活性をもたない変異体となる[16]。野生株と*ZNT5ZNT7*二重欠損株にTYRP１と共に、ZNT５、$ZNT5_{H451A}$または$ZNT5_{D599A}$を一過的に発現させたところ、野生株においては、いずれのZNT５においてもTYRP１は発現した。これに対し、欠損株においてはZNT５を発現させた場合のみTYRP１が検出され、$ZNT5_{H451A}$または$ZNT5_{D599A}$を発現させた場合にはTYRP１の発現はみとめられなかった（図3）。以上の結果より、TYRP１の発現には、ZNT５とZNT６が結合したZNT５-ZNT６ヘテロ二量体の亜鉛輸送活性が必要であることが明らかとなった。また、ZNT７および亜鉛輸送活性を持たないZNT７変異体を用いても同様の結果が得られた（結果省略）。

### 3. 4. HMV-II 細胞の*ZNT5ZNT7*二重欠損株ではメラニン生成が障害される

ZNT５-ZNT６ヘテロ二量体とZNT７ホモ二量体（両ZNT複合体）がTYRP１の発現に影響を与えたことから、両ZNT複合体のメラニン色素生合成に与える影響を解析した。SK-MEL-２細胞は、メラニン生合成ができないメラノーマ細胞であったため、本解析では、黒色を呈するヒトメラノーマであるHMV-II細胞を使用した。HMV-II細胞の*ZNT5ZNT7*二重欠損株と野生株のメラニン色素量を比較したところ、欠損株の黒色が肉眼で観察できるほど減少していた（図４）。このことより、両ZNT複合体が輸

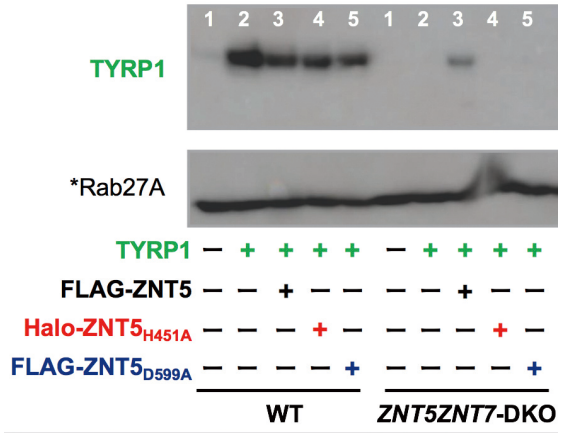



図3　TYRP1の発現にはZNT複合体が輸送した亜鉛が不可欠である

*ZNT5ZNT7*二重欠損株において消失したTYRP1の発現が、ZNT5の再発現で回復する。

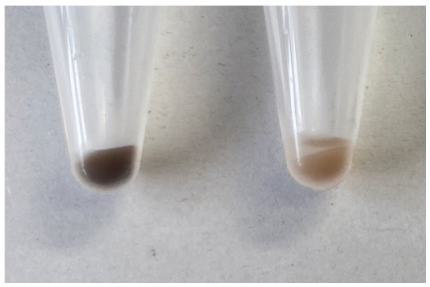


図4　*ZNT5ZNT7*二重欠損株ではメラニン生成が障害される

野生株および*ZNT5ZNT7*二重欠損株の細胞ペレットの写真。

送した亜鉛がメラニン色素生成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 4．考察とまとめ

これまで、TYRとTYRP1およびTYRP2の補因子の観点からの成熟化過程についてはほとんど明らかにされていなかったが、本研究では、その分子メカニズムの一端を解明した。SK-MEL-2を用いたATP7AおよびZNT5-ZNT6ヘテロ二量体とZNT7ホモ二量体（両ZNT複合体）欠損株による解析の比較、さらに亜鉛輸送活性を持たないZNT5変異体である$ZNT5_{H451A}$と$ZNT5_{D599A}$を用いた解析などから、TYRP1は両ZNT複合体によって輸送された亜鉛によって制御されることを示している。これまで、TYRP1はTYRと同じタイプ3銅タンパク質であると考えられてきたが、本結果は、TYRP1の結晶構造で亜鉛が配位していることを報告した論文の内容に呼応する結果と考えている[8, 9]。

本解析では、主にSK-MEL-2細胞を用いてTYR、TYRP1、TYRP2の発現解析を実施した。Western BlottingにおいてTYRP1が特異的に検出されなかった。*ZNT5ZNT7*二重欠損株において過剰発現させたTYRP1でさえ安定に存在できない事実は、細胞内で両ZNT複合体が存在しない場合、TYRP1の分解が極めて迅速に行われることを示唆する。TYR、TYRP1、TYRP2導入細胞から調整したRNAを鋳型にしたRT-PCR解析では、TYRP1もTYRとTYRP2と同様に発現していることが確認できており（結果省略）、この結果も本仮説を支持する。今後は、この素早いTYRP1の分解機構に関しても解析を進めていく予定である。

TYR、TYRP1、TYRP2はメラノソームマーカーとしても用いられるタンパク質である。ATP7A欠損細胞にTYRを発現させると、TYRの活性は消失するが、TYRタンパク質はメラノソームと予想される細胞内小胞に局在した。今後、この局在がメラノソームであるのかメラノソーム特異的タンパク質との比較により検討する予定である。また、このアポ型のTYRが正しくメラノソームに輸送される事実は、亜鉛が配位しないと速やかに分解されると考えられるTYRP1の結果と対比すると非常に興味深い。

以前の論文で、TYRP2の活性が亜鉛に依存していると報告されていたため[17]、本解析は当初、*ZNT5ZNT7*二重欠損株におけるTYRP2の発現に関して解析を進めていた。しかしながら、TYRP2の発現に関しては、欠損株において全く変化がみとめられなかった。したがって、上述の報告が間違いだった可能性もある。しかしながら、この報告を引き続き支持する場合、TYRP2への亜鉛供給は、両ZNT複合体以外の亜鉛トランスポーターが担っていると考えられる。細胞外や細胞小器官で機能する亜鉛酵素の多くは、両ZNT複合体によって亜鉛が輸送されると思われるため、本結果は非常に興味深い例となり、メラノソーム局在型の亜鉛トランスポーターが存在する可能性も浮上する。

これまで、本研究のように金属の中でも特に亜鉛に焦点を当て、メラニン生合成との関わりに着眼した研究は、ほぼ皆無であった。メラニン生合成は、TYR酵素群の補酵素となる金属の観点からも複雑な活性発現制御機構が存在することが想定される。本研究の解析を進展させ、メラニン色素生合成の分子機序の解明に繋げたいと考えている。その成果は、美白効果を持つ化粧品などの開発に幅広く応用されることが期待される。

（引用文献）


1）Yamaguchi, Y., and Hearing, V. J., Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4** (2014).

2）Solano, F., On the Metal Cofactor in the Tyrosinase Family. *Int J Mol Sci* **19**, 633 (2018).

3）Aguilera, F., McDougall, C., and Degnan, B. M., Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the *Metazoa*. *BMC Evol Biol* **13**, 96 (2013).

4）Decker, H., and Tuczek, F., The Recent Crystal Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 (HsTYRP1) Solves an Old Problem and Poses a New One. *Angew Chem Int Ed Engl* **56**, 14352-14354 (2017).

5）Petris, M. J., Strausak, D., and Mercer, J. F., The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet* **9**, 2845-2851 (2000).

6）Bennett, D. C., Huszar, D., Laipis, P. J., Jaenisch, R., and Jackson, I. J., Phenotypic rescue of mutant brown melanocytes by a retrovirus carrying a wild-type tyrosinase-related protein gene. *Development* **110**, 471-475 (1990).

7）Guyonneau, L., Murisier, F., Rossier, A., Moulin, A., and Beermann, F., Melanocytes and pigmentation are affected in dopachrome tautomerase knockout mice. *Mol Cell Biol* **24**, 3396-3403 (2004).

8）Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., and Dijkstra, B. W., Structure of Human Tyrosinase Related Protein 1 Reveals a Binuclear Zinc Active Site Important for Melanogenesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **56**, 9812-9815 (2017).

9）Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., and Dijkstra, B. W. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry* **24**, 47-55 (2018).

10）Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A., Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* **5**, 196-201 (2006).

11）Blockhuys, S., Celauro, E., Hildesjo, C., Feizi, A., Stal, O., Fierro-Gonzalez, J. C., and Wittung-Stafshede, P., Defining the human copper proteome and analysis of its expression variation in cancers. *Metallomics* **9**, 112-123 (2017).

12）Kambe, T., Metalation and maturation of zinc ectoenzymes: A perspective. *Biochemistry* **59**, 74-79 (2020).

13）Kambe, T., Taylor, K. M., and Fu, D., Zinc transporters and their functional integration in mammalian cells. *J Biol Chem* **296**, 100320 (2021).

14）Takeda, T. A., Miyazaki, S., Kobayashi, M., Nishino, K., Goto, T., Matsunaga, M., Ooi, M., Shirakawa, H., Tani, F., Kawamura, T., Komai, M., and Kambe, T., Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and cell culture models. *Commun Biol* **1**, 113 (2018).

15）Suzuki, E., Ogawa, N., Takeda, T. A., Nishito, Y., Tanaka, Y. K., Fujiwara, T., Matsunaga, M., Ueda, S., Kubo, N., Tsuji, T., Fukunaka, A., Yamazaki, T., Taylor, K. M., Ogra, Y., and Kambe, T., Detailed analyses of the crucial functions of Zn transporter proteins in alkaline phosphatase activation. *J Biol Chem* **295**, 5669-5684 (2020).

16）Fukunaka, A., Suzuki, T., Kurokawa, Y., Yamazaki, T., Fujiwara, N., Ishihara, K., Migaki, H., Okumura, K., Masuda, S., Yamaguchi-Iwai, Y., Nagao, M., and Kambe, T., Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J Biol Chem* **284**, 30798-30806 (2009).

17）Solano, F., Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Liarte, J. H., Garcia-Borron, J. C., Jara, J. R., and Lozano, J. A., Molecular mechanism for catalysis by a new zinc-enzyme, dopachrome tautomerase. *Biochem J* **313** (**Pt 2**), 447-453 (1996).

# 神経ペプチドシグナルを介したアレルギー発症メカニズムの解明と皮膚炎軽減効果

北海道大学遺伝子病制御研究所

北村　秀光

Not a few people are suffering from allergic skin diseases such as atopic dermatitis and psoriasis. With the development of medicine, patients with skin diseases are relieved by the treatment with anti-inflammatory or steroidal drugs. However, there are some patients having not only side effects such as drug allergies and anaphylaxis but also refractory patients. Therefore, it is important to elucidate the onset and aggravation mechanisms of skin diseases from a new perspective. In the previous studies, we revealed that a neurokinin A receptor, NK2R-mediated neuropeptide signals, activated in a STAT1-dependent manner, augmented antigen presentation ability of dendritic cells and induced allergen-specific T cell immune responses.

In this study, we investigated the involvement of STAT1-mediated neuropeptide signals in the onset and clinical condition of skin diseases by using a psoriasis mouse model. We established a psoriasis model by the treated with imiquimod (IMQ) to the skin and found that body weight loss scale formation and thickness of skin in STAT1-deficient mice were significantly reduced compared to wild-type mice. Ly6C-expressing myeloid cells were transiently induced in the IMQ-treated wild-type mice were significantly lower in the STAT1-deficient mice. Furthermore, we confirmed that IL-17A and NK2R gene expression levels were down-regulated in the spleen cells of IMQ-treated STAT1-deficient mice compared to that of wild type mice. These data suggested that STAT1 activation were closely related to the pathogenesis of in the IMQ-induced psoriasis model mice.

Base on the present findings, we speculate that STAT1-mediated neuropeptide signaling cascade and the related molecules may be promising drug targets to improve skin diseases such as psoriasis.

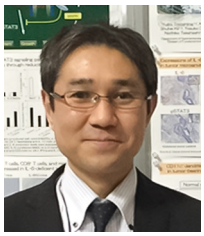
## 1．緒　言

アトピー性皮膚炎などの免疫・アレルギー性皮膚疾患に苦しむ方が増えている。近代医学の発展により、効果の高い抗炎症薬、抗アレルギー薬、またはステロイド薬が開発され、数多くの患者さんを救済している。しかしながら、薬剤アレルギー・アナフィラキシーなど副作用の発生や完全に寛解できない患者さんも存在することから、これまでの視点とは異なる皮膚疾患の発症、重篤化メカニズムの解明と副作用の少ない安全な治療法の開発は重要であると考える。

これまでの先行研究で、痛みやストレス、あるいは侵襲などの刺激により神経系から放出される神経ペプチドタキキニン類の一つ、ニューロキニンＡの受容体であるNK2RがⅠ型インターフェロン（IFN-α/β）あるいはⅡ型インターフェロン（IFN-γ）の刺激により、STAT1依存的に免疫細胞の一つである樹状細胞に発現誘導され、炎症・免疫応答の重篤化に関与すること、さらにNK2Rに対する拮抗阻害薬がアレルゲン特異的Ｔ細胞の誘導と活性化を有意に抑制することを見出した[1]。またIFN-γ誘発ステロイド抵抗性重篤化喘息マウスモデルを構築し、これにNK2R拮抗阻害薬を投与することで、病態の発症、重篤化が軽減されるデータを得た[2, 3]。これらの発見は、IFN-STAT1の活性化によるNK2Rの発現誘導を介した神経ペプチドシグナルが、過剰な免疫応答により誘導される慢性炎症に密接に関与することを示唆する。

乾癬は、角化細胞の分化不全と過剰増殖を特徴とする慢性皮膚疾患で、患者の割合は世界人口の約２～３％であると推定されている。一般的に、乾癬の症状として、皮膚表面が隆起する肥厚、そこに境界明瞭な赤い発疹である紅斑が生じ、その表面に乾燥した銀白色の角質が付着する鱗屑が認められる[4, 5]。これまで、乾癬の治療には紫外線療法やCD4陽性 Ｔ細胞やマクロファージの活性化を抑制するシクロスポリン製剤のような免疫抑制剤や、乾癬に関与するサイトカインに作用する抗TNF-α、IL-12、IL-23、IL-17抗体などの生物学的製剤などが使用されており、症状の軽減や早期治療による効果は認められている。しかしながら、現在まで乾癬の根治には至っておらず、強い免疫抑制作用による副作用や治療の長期化が問題となっている[6-8]。

イミキモドは、イミダゾキノリン系の低分子化合物で、樹状細胞やマクロファージが発現するtoll様受容体（TLR7）のアゴニストで、インターフェロン制御因子によるIFN-α/βの産生が起こる。またマウスの皮膚に対してイミキモドの塗布により、乾癬様の病態が誘発されることが報告されている[9]。イミキモドによって誘発された皮膚炎症では、紅斑、角化細胞の過剰増殖による表皮肥厚や分化不全による鱗屑が観察され、ヒトにおける乾癬の症状と



Elucidation of the onset mechanism of allergy mediated by neuropeptide signals and the relieving effect on dermatitis

Hidemitsu Kitamura

Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University

非常によく似ていることが知られている[10-12]。

そこで本研究では、皮膚炎症性疾患の改善・寛解を目指し、イミキモド誘発乾癬マウスモデルを作出し、その病態の発症と重篤化および炎症・免疫細胞におけるIFN-STAT1依存的な神経ペプチド受容体NK2Rの発現増強を介した神経ペプチドシグナルの活性化制御メカニズムの解明を行うとともに、皮膚疾患の発症・重篤化との関連を検討した。

## 2. 方　法

### 2. 1. イミキモド誘発乾癬モデルの作出

野生型C57BL/6マウスあるいは同系のSTAT1欠損マウスを使用し、はじめに背部の剃毛を行った2日後、自然免疫系の活性化に重要なToll様受容体TLR7/8のアゴニストで、IFN-α/βを産生誘導する作用効果のあるイミキモドを含む市販クリーム（BESELNA CREAM 5%，持田製薬株式会社，Tokyo, Japan）をマウスの皮膚に塗布した。コントロールとして市販のワセリンを使用した。塗布を開始した日をDay0とし、Day6までの7日間、連続塗布し、その翌日まで、マウスの体重の変化を計測するとともに、皮膚の炎症の程度を解析、評価した（図1）。

### 2. 2. 乾癬様皮膚炎症の重症度スコア

重症度指数（PASI：Psoriasis Area Severity Index）を用いて背部皮膚の炎症状態を評価した。スコアは炎症面積を考慮せず評価を行った。紅斑、鱗屑および皮膚の厚さは0から4の範囲（0、なし 1、軽度 2、中程度 3、重症 4、極めて重症）で採点した。総合スコアは上記3つの項目の合計（0～12）で表した。

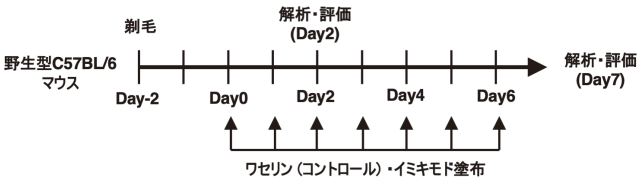



図1　イミキモド誘発乾癬モデルの構築と解析・評価

### 2. 3. 皮膚の組織学的解析

イミキモドクリームを2日、あるいは7日間塗布した後、マウス背部の皮膚を採取し、サンプルを4%パラホルムアルデヒドで固定した後、HE染色標本を作成し、光学顕微鏡による組織学的な観察を行った。

### 2. 4. イミキモド誘発乾癬モデルにおける免疫担当細胞の解析

イミキモドクリームを2日、あるいは7日間塗布した後、マウスより脾臓細胞を回収し、フローサイトメトリーにて各種免疫担当の解析を行った。また、各種炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現レベルを定量PCR法により評価した。

### 2. 5. 統計解析

有意差検定は、Studentの$t$検定を用いて行い、有意水準は$P<0.05$とした。

## 3. 結　果

### 3. 1. イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおける病態の発症とNK2Rの発現

皮膚炎症性疾患領域における新たな制御メカニズムの解明を目指し、イミキモド誘発乾癬マウスモデルを作出し、病態の発症における神経ペプチドシグナルの関与について検討した。イミキモド誘発乾癬モデルマウスの体重を計測したところ、イミキモド塗布後、1から2日において、一過性に体重が減少することを見出した（図2A）。さらに7日後、皮膚の外観より、肥厚と鱗屑の症状が認められるとともに、皮膚の組織学的観察から、表皮および真皮の肥厚、

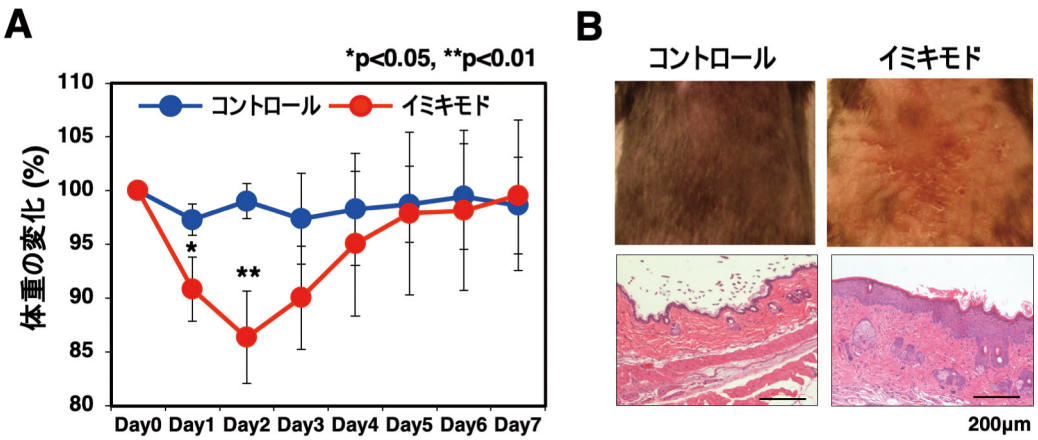



図2　イミキモド誘発乾癬モデルマウスの体重変化および皮膚の外観とHE染色像

血管の造成および炎症・免疫細胞の浸潤を確認した（図2A）。

そこで、イミキモド塗布2日後に、マウスから脾臓を回収し、フローサイトメトリーによる、各種免疫担当細胞を解析した結果、Ly6Cを中程度発現し、Ly6Gを発現しない単球系の細胞およびLy6CとLy6Gを共発現する顆粒球系の細胞の割合が増加することを見出した（図3）。

さらにイミキモド塗布2日後、マウス脾臓細胞において、各種サイトカインおよび神経ペプチド関連遺伝子の発現を解析した結果、炎症性サイトカインIL-6および神経ペプチドタキキニン類の一つニューロキニンAの受容体NK2Rの発現レベルが有意に増加することを確認した（図4）。

以上の結果から、イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおける病態の発症過程においてNK2Rを介した神経ペプチドシグナルの関与の可能性が示唆された。

### 3. 2. イミキモド誘発乾癬モデルマウスの病態発症におけるSTAT1の関与

次に、STAT1欠損マウスを使用し、イミキモド誘発乾癬モデルの病態発症におけるSTAT1の活性化とシグナル伝達の関係について検討した。イミキモド塗布1−5日後において、野生型マウスの体重減少の割合がSTAT1欠損マウスでは有意に減弱するとともに（図5A）、皮膚の外観から肥厚や鱗屑の症状が野生型マウスに比べ、STAT1欠

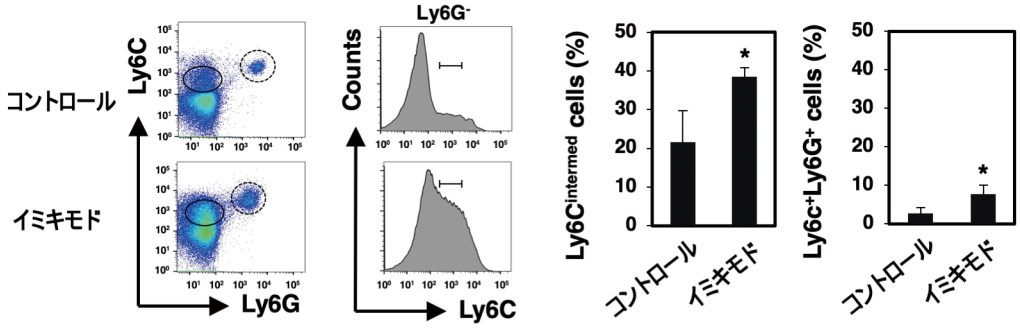



図3　イミキモド誘発乾癬モデルマウス脾臓細胞のLy6C/Ly6G陽性細胞の解析

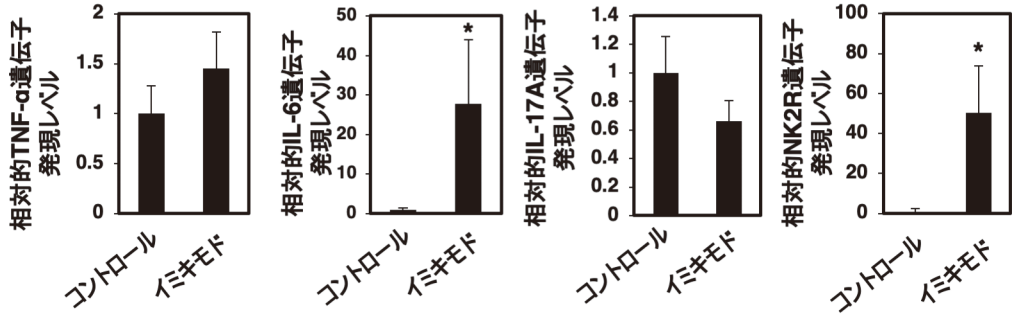



図4　イミキモド誘発乾癬モデルマウス脾臓細胞のサイトカインおよびNK2R遺伝子発現の解析

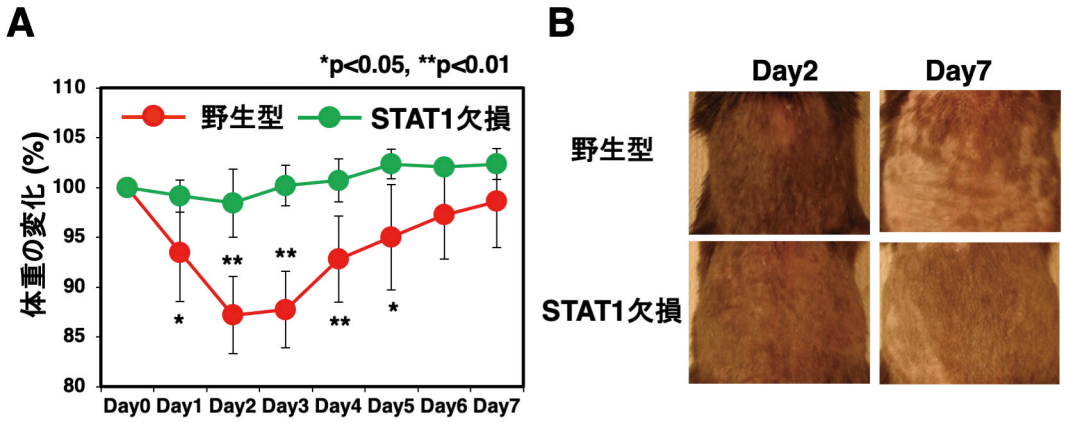



図5　イミキモド誘発乾癬モデルマウスの体重変化および皮膚の外観におけるSTAT1の効果

損マウスにおいて、軽減されることを認めた(図5B)。

さらに、PASIを用いてイミキモド誘発乾癬モデルの病態に対するSTAT1の関与を検討した。イミキモドの塗布により野生型マウスにて生じた皮膚の肥厚・鱗屑および総合のスコア増加が、STAT1欠損マウスにおいては、特に6日から7日後、有意に抑制されることが明らかになった(図6)。

さらに皮膚の組織学的観察から、野生型マウスに比べ、STAT1欠損マウスにおける真皮の肥厚が著しく減弱することを確認した(図7)。

以上のデータから、イミキモド誘発乾癬マウスモデルにおける病態の発症と重篤化においてSTAT1の活性化とそのシグナル伝達機構が重要であることが示唆された。

### 3. 3. イミキモド誘発乾癬モデルマウスの炎症反応・免疫応答におけるSTAT1およびNK2Rの関与

STAT1欠損マウスを使用したイミキモド誘発乾癬モデルにおける炎症・免疫担当細胞の誘導および活性化を検討した。野生型マウス脾臓細胞において、イミキモド塗布2日後一過性に誘導されるLy6Cを中程度発現し、Ly6G を発現しない単球系の細胞の割合が、STAT1欠損マウスにおいて有意に減少することを認めた(図8A)。一方、Ly6CとLy6Gを共発現する顆粒球系の細胞の割合は、イミキモド塗布2日後および7日後のいずれにおいても、野生型マウスに比べSTAT1欠損マウスにおいて増加することを確認した(図8Aおよび8B)。

イミキモド塗布2日後、野生型およびSTAT1欠損マウスの脾臓細胞において、各種サイトカインおよびNK2R遺伝子の発現レベルを解析した。その結果、STAT1欠損マウス脾臓細胞において、IL-17A遺伝子の発現レベルが有意に減弱するとともに、NK2R遺伝子の発現レベルが減少する傾向にあることを確認した(図9)。

以上のデータから、イミキモド誘発乾癬モデルマウスの炎症反応と免疫応答において、STAT1はIL-17の産生誘導とNK2Rを介した神経ペプチドシグナルの制御に関与する可能性が示唆された。

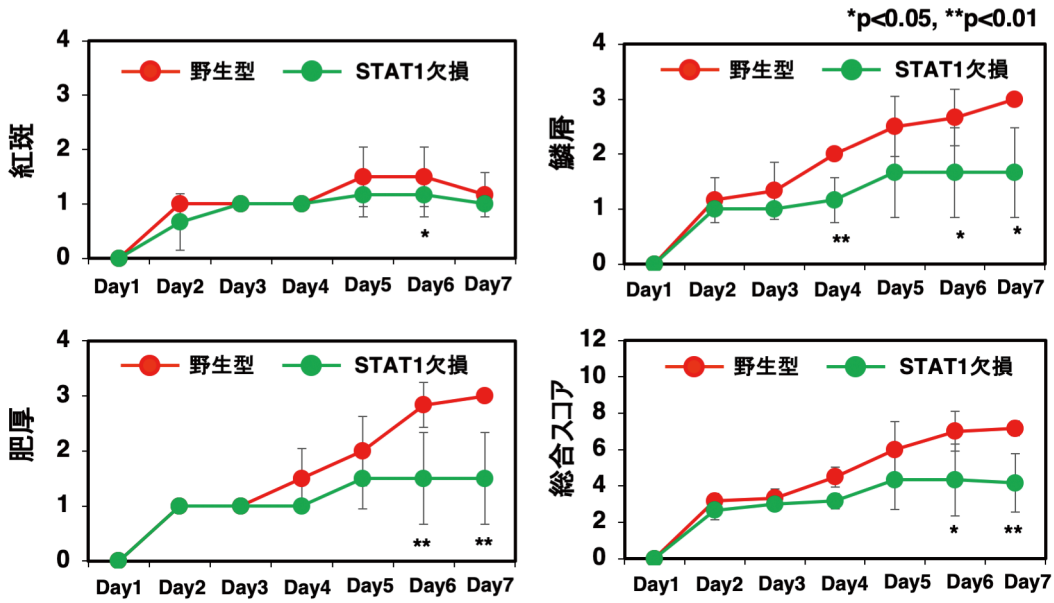



図6　イミキモド誘発乾癬モデルマウスの病態におけるSTAT1の効果

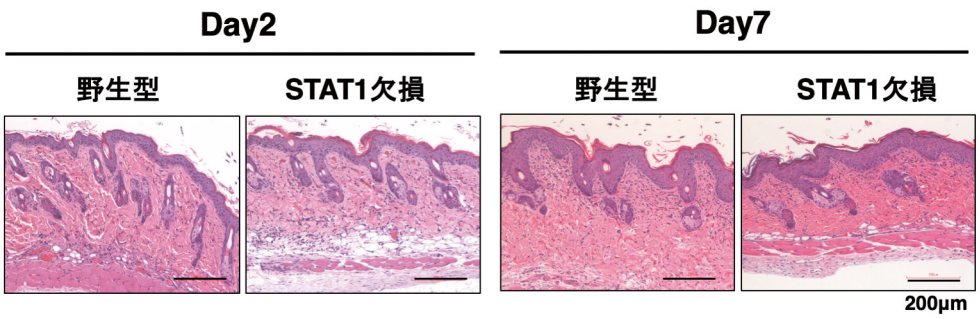



図7　イミキモド誘発乾癬モデルマウスの皮膚組織におけるSTAT1の効果

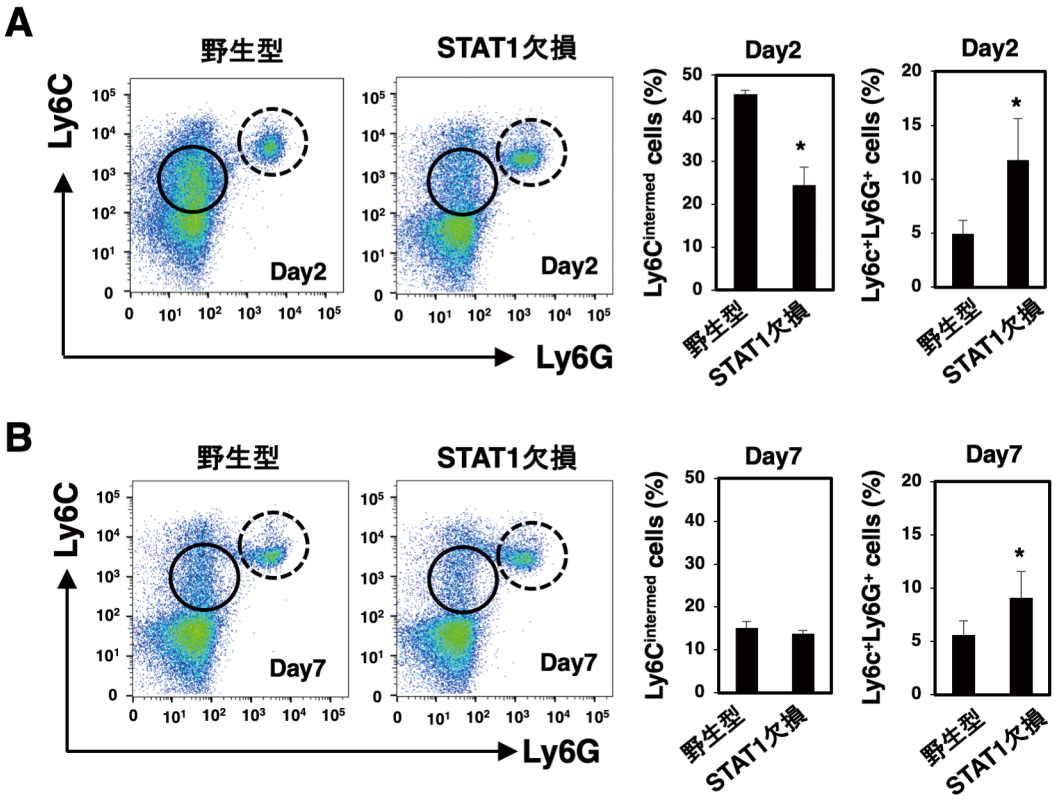



図8　イミキモド誘発乾癬モデルマウス脾臓細胞のLy６C/Ly６G細胞におけるSTAT１の効果

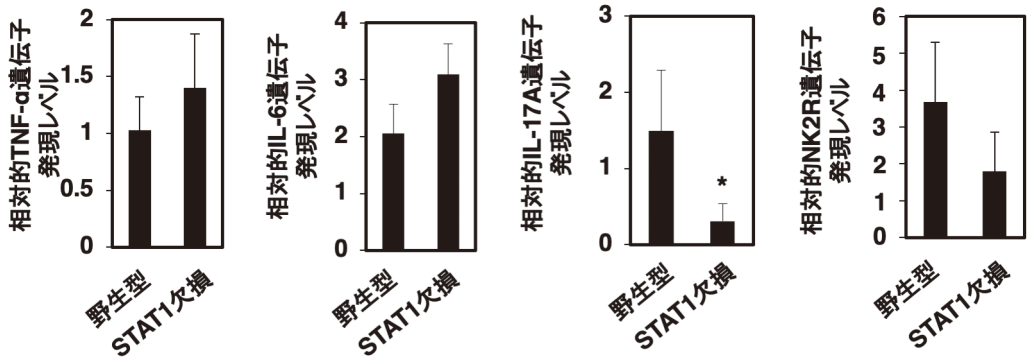



図9　イミキモド誘発乾癬モデルマウス脾臓細胞のサイトカインおよびNK２R遺伝子発現におけるSTAT１の効果

## ４．考　察

乾癬は紅斑、丘疹、鱗屑、異常な角化を特徴とする難治性の慢性皮膚疾患であり、これまで、効果の高い抗炎症薬、副作用の少ないステロイド薬に加えて、TNF-αやIL-23、IL-17を標的とする治療薬も開発されている[6-8]。最近、乾癬患者において、STAT１およびその下流標的、関連分子の発現レベルと病態との関連が報告され[13, 14]、またヒト遺伝子発現プロファイルの解析においても、乾癬の病態とSTAT１との関連が示されている[15]。

本研究のイミキモド誘発乾癬マウスモデルにおいて、STAT１が欠損した条件では、一過性に誘導されるLy６Cを中程度発現し、Ly６Gを発現しない単球系の細胞の割合がするとともに、IL-17産生レベルの低下、および乾癬の発症、病態の重篤化が軽減することを見出した。また我々はSTAT１が欠損した条件では、IFN-α/βあるいはIFN-γ刺激による樹状細胞の活性化や抗原特異的Ｔ細胞の応答性が著しく減弱することも確認している（未投稿データ）。一般に乾癬の病態発症および重篤化の過程で、CD４陽性Ｔ細胞からTh１、Th17への分化が誘導され、Th１からIFN-γ、Th17からIL-17、IL-22が産生されることが知られ、特にTh17と病態に関する報告が多くなされている[16]。

本研究成果および先行研究による知見から、イミキモド誘発乾癬モデルにおいて、IFN-STAT１の活性化とそれ

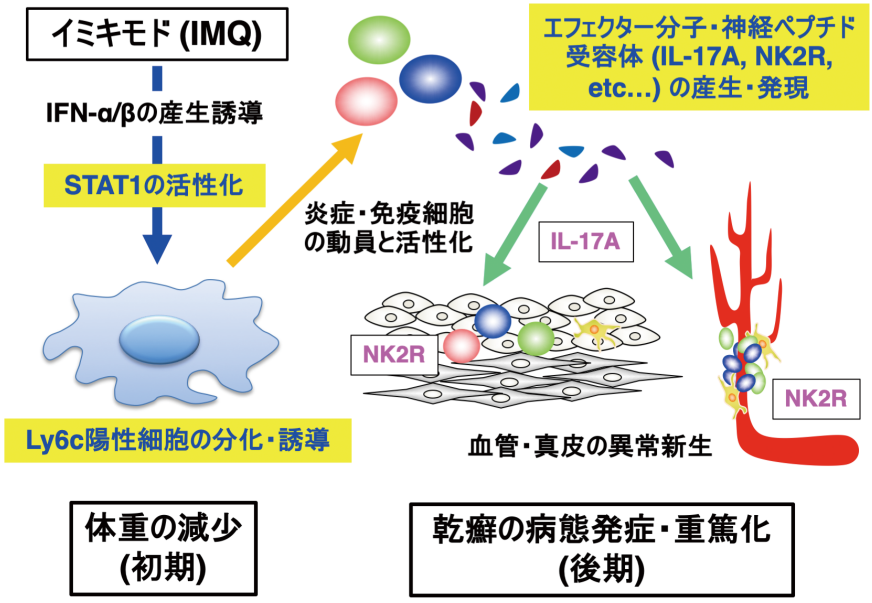



図10　イミキモド誘発乾癬モデルマウスの病態発症および重篤化におけるSTAT1－NK2R関与モデル

に引き続く炎症反応・免疫応答の過程で発現誘導されるIL-17とNK2Rを介した神経ペプチドシグナルが、皮膚疾患の発症および重篤化において関与することが考えられた(図10)。

これまで我々の研究グループは、ヒト単球由来樹状細胞についてIFN-α/βで刺激することによりニューロキニンA受容体NK2Rが発現誘導されるとともに、NK2Rに対する拮抗阻害薬がヒト樹状細胞に作用し、シラカバ花粉抗原特異的T細胞応答を有意に抑制することを見出した[1)]。またマウス樹状細胞においてもIFN-γの刺激でSTAT1依存的にNK2Rが発現誘導されるとともに、IFN-γ誘発ステロイド抵抗性重篤化喘息モデルマウスに対してNK2R拮抗阻害薬を投与することで、病態の発症、重篤化が軽減されるデータを得ている[2, 3)]。また他の研究グループからも、*in vitro*細胞培養評価系およびイミキモド誘発乾癬モデル、あるいはヒト臨床検体を使用した臨床研究において、JAK-STAT1シグナル伝達経路の活性化とその阻害による病態の減弱効果が報告されている[17-22)]。従って、今後、乾癬モデルの炎症・免疫担当細胞について詳細な解析を引き続き行い、IFN-STAT1依存的なNK2Rの発現制御メカニズムを解明するとともに、NK2Rを介した神経ペプチドシグナルによる病態の発症、重篤化への関与を検証することで、皮膚炎症領域における新たな予防・改善法や治療ターゲットの同定と創薬に繋ぐ科学的エビデンスが得られると考えられる。

## 5．総　括

本研究により、イミキモド誘発乾癬モデルにおいてSTAT1依存的な炎症・免疫応答の惹起と神経ペプチド受容体NK 2Rの発現増強、およびそれらの病態の発症および重篤化への関与が示された。今後、STAT1依存的な神経ペプチドシグナルの制御は、新たな皮膚疾患の予防、改善法あるいは治療戦略の一つとして期待できる。

**謝　辞**

本研究における乾癬モデルの構築および評価法について、信州大学農学部の田中沙智先生にご指導頂きました。また病態や免疫担当細胞の解析について、当教室大学院生の沈輝棟君に協力頂きました。最後に、本研究のご援助受け賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

**(引用文献)**

1) Ohtake J, Kaneumi S, Tanino M, Kishikawa T, Terada S, Sumida K, Masuko K, Ohno Y, Kita T, Iwabuchi S, Shinohara T, Tanino Y, Takemura T, Tanaka S, Kobayashi H, Kitamura H. Neuropeptide signaling through neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors augments antigen presentation by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.*, 2015, 136, 1690-1694.

2) Kobayashi M, Ashino S, Shiohama Y, Wakita D, Kitamura H, Nishimura T. IFN-γ elevates airway hyper-responsiveness via up-regulation of neurokinin A/neurokinin-2 receptor signaling in a severe asthma model. *Eur J Immunol*. 2012, 42, 393-402.

3) Kitamura H, Kobayashi M, Wakita D, Nishimura T. Neuropeptide signaling activates dendritic cell-mediated type 1 immune responses through neurokinin-2 receptor. *J Immunol*., 2012, 188, 4200-4208.

4) Rosa P, Deborah P.M. S, Christopher E.M. G, Darren M. A. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. *J Invest Dermatol*, 2013, 133, 2, 377-385.

5) Boehncke WH, Schon MP. Etiology and Pathogenesis of Psoriasis. PlumX Metrics, 2015, 386, 983-994.

6) Papp KA, Tyring S, Lahfa M, Prinz J, Griffiths CEM, Nakanishi AM, Zitnik R, Van De Kerkhof PCM. A global phase III randomized controlled trial of etanercept in psoriasis: safety, efficacy, and effect of dose reduction. *Br J Dermatol*, 2005, 152, 6, 1304-1312

7) Mark L, Bruce S, Alan M, Kenneth G, Jolanta W, Dr.Med., Lluis P, Kim P, Lynda S, Darryl T, Francisco K, April W. A, Georg S. Phase 3 Studies Comparing Brodalumab with Ustekinumab in Psoriasis. *N Engl J Med*, 2015, 373, 1318-1328.

8) Kenneth BG, Andrew B, Kim AP, Richard GL, Thomas L, Mamitaro O, Kristian R, David A, Susan GB, Daniel KB, Gregory SC, Janelle E. Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med*, 2016, 375, 345-356.

9) Wu, JK, Siller G, Strutton G. Psoriasis induced by topical imiimod. Australas. *J. Dermatol*. 2004, 45, 47-50.

10) Fujisawa H, Shivji G. M, Kondo S, Wang B, Tomai M. A, Miller R. L, Sauder D. N. Effect of a novel topical immunomodulator, S-28463, on keratinocyte cytokine gene expression and production. *J Interferon Cytokine Res*, 1996, 16, 555-559.

11) Kono T, Kondo S, Pastore S, Shivji GM, Tomai MA, McKenzie RC, Sauder DN. Effects of a novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocyte cytokine gene expression. *Lymphokine Cytokine Res*, 1994, 13, 71-76.

12) Lowes, Bowcock MA, Krueger AM. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 2007, 445, 866-873.

13) Hald A, Andrés RM, Salskov-Iversen ML, Kjellerup RB, Iversen L, Johansen C. STAT1 expression and activation is increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 2013, 168, 302-310.

14) Grabarek B, Krzaczyński J, Strzałka-Mrozik B, Wcisło-Dziadecka D, Gola J. The influence of ustekinumab on expression of STAT1, STAT3, STAT4, SOCS2, and IL17 in patients with psoriasis and in a control. *Dermatol Ther*., 2019, 32, e13029.

15) Zeng F, Liu H, Lu D, Liu Q, Chen H, Zheng F. Integrated analysis of gene expression profiles identifies transcription factors potentially involved in psoriasis pathogenesis. *J Cell Biochem*., 2019, 120, 12582-12594.

16) Leslie F, Sabine M, Jane SAV, Marius K, Louis B, Jon DL, Ferry C, Anne-MM, Edwin F, Errol PP, Erik L. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J Immunol*, 2009, 182, 9, 5836-5845.

17) Qin X, Chen C, Zhang Y, Zhang L, Mei Y, Long X, Tan R, Liang W, Sun L. Acitretin modulates HaCaT cells proliferation through STAT1- and STAT3-dependent signaling. *Saudi Pharm J*., 2017, 25, 620-624.

18) Li B, He S, Liu R, Huang L, Liu G, Wang R, Yang Z, Liu X, Leng Y, Liu D, Ye C, Li Y, Chen Y, Yin H, Fang W. Total glucosides of paeony attenuates animal psoriasis induced inflammatory response through inhibiting STAT1 and STAT3 phosphorylation. *J Ethnopharmacol*., 2019, 243, 112121.

19) Morelli M, Scarponi C, Mercurio L, Facchiano F, Pallotta S, Madonna S, Girolomoni G, Albanesi C. Selective Immunomodulation of Inflammatory Pathways in Keratinocytes by the Janus Kinase (JAK) Inhibitor Tofacitinib: Implications for the Employment of JAK-Targeting Drugs in Psoriasis. *J Immunol Res*., 2018, 2018, 7897263.

20) Li L, Zhang HY, Zhong XQ, Lu Y, Wei J, Li L, Chen H, Lu C, Han L. PSORI-CM02 formula alleviates imiquimod-induced psoriasis via affecting macrophage infiltration and polarization. *Life Sci*. 2020, 243, 117231.

21) Lin SH, Chuang HY, Ho JC, Lee CH, Hsiao CC. Treatment with TNF-α inhibitor rectifies M1 macrophage polarization from blood CD14+ monocytes in patients with psoriasis independent of STAT1 and IRF-1 activation. *J Dermatol Sci*., 2018, 91, 276-284.

22) Clarysse K, Pfaff CM, Marquardt Y, Huth L, Kortekaas Krohn I, Kluwig D,Lüscher B, Gutermuth J, Baron J. JAK1/3 inhibition preserves epidermal morphology in full-thickness 3D skin models of atopic dermatitis and psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*., 2019, 33, 367-375.

# アシル CoA 合成酵素 ACSVL4 による皮膚バリア形成機構

北海道大学大学院薬学研究院
木原　章雄

Acylceramides are lipids that play an essential role in the formation of the permeability barrier in the skin, and the impairment of their synthesis causes the skin disorder ichthyosis. However, the acyl-CoA synthase (ACS) that converts ω-hydroxy fatty acid to ω-hydroxy acyl-CoA in the acylceramide synthesis pathway still remained unidentified. In the present study, we examined the possibility that *ACSVL4* (ACS very long-chain, member 4), which is the causative gene for ichthyosis prematurity syndrome, is the unidentified ACS involved in acylceramide production. *Acsvl4* knockout (KO) mice exhibited neonatal lethality and severe skin barrier defect phenotype. Histological analyses showed hyperkeratosis and abnormal lipid lamellar formation in *Acsvl4* KO mouse epidermis. The amount of acylceramides in *Acsvl4* KO mice was reduced to about 10% of that in wild-type mice. In addition to the role as an ACS, ACSVL4 has been implicated in a fatty acid transporter, and reduced fatty acid uptake has been assumed to be a cause of the ichthyosis pathogenesis. However, the amount of fatty acids and triglycerides were not decreased in the epidermis of *Acsvl4* KO mice. *In vitro* experiments revealed that ACSVL4 indeed exhibits ACS activity toward ω-hydroxy fatty acids. From these results, we conclude that the skin symptom of ichthyosis prematurity syndrome is not caused by decreased fatty acid uptake, but by impaired acylceramide synthesis. Our findings contribute to the elucidation of the molecular mechanism of skin barrier formation and the pathogenesis of hereditary ichthyosis.

## 1．緒　言

皮膚は強力な透過性バリアを有し，外界からの病原体やアレルゲン，化学物質などの異物の透過を阻止することで，感染症やアレルギーの防止に重要な働きを担っている。また，この皮膚の透過性バリアは体内からの水分の損失も防いでおり，この機能は陸上動物の生命維持に必須である。皮膚の透過性バリアは極めて強力なため，通常皮膚からの感染はほとんど起きない。しかし，火傷により皮膚バリアが損なわれると感染症のリスクは大幅に上昇する。また，先天的に皮膚バリア異常を示す疾患として乾燥，肥厚，鱗屑を主徴とする魚鱗癬がある。アトピー性皮膚炎患者では皮膚バリア機能が低下して，アレルゲンが侵入しやすくなっている。

脂質の高い疎水性は物質の透過を阻むことから，脂質は透過性バリアの形成に適している。実際，表皮の最外層（角質層）には脂質の多層構造体（脂質ラメラ）が存在し，皮膚バリア形成において中心的な役割を果たしている。脂質ラメラは主にセラミド，脂肪酸，コレステロールで構成されている。セラミドは生体膜脂質スフィンゴ脂質の疎水骨格であり，長鎖塩基と脂肪酸の２本の疎水鎖から構成される。表皮にはこの通常のセラミドに加え，皮膚バリア形成に特化した特殊なセラミドクラス，アシルセラミド（オメガ-*O*-アシルセラミド）が存在する。アシルセラミドはセラミドの脂肪酸部分（炭素数（C）30-36）のオメガ位にリノール酸が結合した３本鎖構造をもつ（図1）。アシルセラミドの特殊な構造は脂質ラメラを形成し，維持するために重要である。アシルセラミドは皮膚バリア形成に必須であり，アシルセラミド産生に関わる遺伝子の変異はヒトでは魚鱗癬の中でも重症なタイプの魚鱗癬（常染色体潜性先天性魚鱗癬）を引き起こし，マウスでは皮膚バリア異常によって新生致死を引き起こす[1, 2]。また，ヒトのアトピー性皮膚炎患者ではアシルセラミド量の減少が観察されている[3]。

アシルセラミドの皮膚バリアにおける重要性にも関わらず，アシルセラミド産生の分子機構が解明され始めたのは最近のことである。アシルセラミド中のC30-36脂肪酸の伸長には脂肪酸伸長酵素ELOVL1およびELOVL4，アミド結合形成にはセラミド合成酵素CERS3，脂肪酸オメガ水酸化にはシトクロームP450の１つであるCYP4F22，リノール酸とのエステル結合形成にはトランスアシラーゼPNPLA1が関わっている[2, 4-6]。表皮は四層で構成されており，内側から基底層，有棘層，顆粒層，角質層である。ケラチノサイトは基底層で増殖後，分化しながら外側に向



Skin barrier formation by the acyl-CoA synthetase ACSVL4
Akio Kihara
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

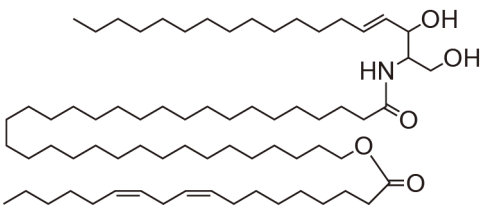



図1　アシルセラミドの構造

けて移動する。有棘層から顆粒層にかけてアシルセラミドは産生される。アシルセラミドはグルコースの付加を受け，アシルグルコシルセラミドへ変換後，層板顆粒内に蓄えられる。アシルグルコシルセラミドはその後顆粒層と角質層の境界部で細胞外へ放出され，グルコースが除去されて再度アシルセラミドとなり，脂質ラメラの構成成分となる。

我々は上述のアシルセラミドのC30–36脂肪酸のオメガ位を水酸化する脂肪酸オメガ水酸化酵素遺伝子*CYP4F22*を同定した[5]。*CYP4F22*は先天性魚鱗癬の原因遺伝子であり，*CYP4F22*遺伝子変異をもつ患者ではアシルセラミド量が大きく減少していた。また，我々は*in vitro*における解析からCYP4F22の基質が脂肪酸であることを見出した。脂肪酸はアシルCoAの状態で脂肪酸伸長酵素によって伸長される。そのため，脂肪酸伸長酵素によって産生された超長鎖アシルCoAがCYP4F22の基質になるためには，一旦CoAが加水分解される必要がある。一方，脂肪酸と長鎖塩基間のアミド結合を形成するセラミド合成酵素の基質はアシルCoAであるため，CYP4F22によって産生されたオメガヒドロキシ超長鎖脂肪酸は再度CoA体へ変換される必要がある。しかし，この反応に関与するアシルCoA合成酵素（ACS）は未だ不明なままである。

アシルセラミドの皮膚バリア機能における重要性を考えると，アシルセラミド産生経路上の未同定*ACS*遺伝子の変異は先天性魚鱗癬を引き起こすと予想される。哺乳類には26種のACSが存在する。その中で*ACSVL4*（別名*FATP4*，*SLC27A4*）は症候性魚鱗癬である魚鱗癬未熟児症候群の原因遺伝子である[7]。魚鱗癬未熟児症候群は魚鱗癬症状に加えて早産および新生児の呼吸停止を特徴とし，*Acsvl4* KOマウスは無気肺および皮膚バリア異常を伴って新生致死となる[8]。我々はこのヒトとマウスにおける症状／表現型から，*ACSVL4*こそがアシルセラミド産生経路上で働く未同定*ACS*遺伝子であると考えた。これまで，*ACSVL4*遺伝子変異が魚鱗癬未熟児症候群の魚鱗癬症状を引き起こすメカニズムは不明であった。*ACSVL4*がアシルセラミド合成へ関与することは考えられたことがなく，*Acsvl4* KOマウスの表皮において通常のセラミドクラスの短鎖化は観察されているものの，アシルセラミドの測定はなされていない。これまではむしろ，*ACSVL4*の別名である*FATP4*（Fatty acid transporter 4）の名前が示す通り，*ACSVL4*が脂肪酸の取り込みに関与し，その異常が魚鱗癬未熟児症候群の症状を引き起こすという説が有力であった。

本研究では，*ACSVL4*変異による魚鱗癬未熟児症候群の皮膚症状発症の原因がこれまで提唱されてきた脂肪酸のトランスポート活性低下なのか，我々が新たに提唱したアシルセラミド産生不全によるものかを明らかにするために*Acsvl4* KOマウスの解析を行った。

## 2．方　法

### 2. 1. マウスの作製と飼育

本実験ではC57BL/6J マウスおよびCRISPR/Cas9システムを用いて作成した*Acsvl4* KOマウスを使用した。マウスの飼育は，室温23±1℃，湿度50±5％，明／暗12時間サイクルに維持された飼育室において，摂餌は自由に摂取できる条件下で行った。

### 2. 2. 皮膚透過性バリアアッセイ

経皮水分蒸散量（TEWL）は経皮水分蒸散量測定器VAPO SCAN（Asch Japan）を用いて胎生18.5日（E18.5）のマウスの背中に密着させることで測定した。トルイジンブルー染色はE18.5マウスをメタノールに5分間浸し，PBSで洗浄後，0.1％トルイジンブルー PBS溶液に4℃で2時間浸すことで行った。

### 2. 3. 形態学的解析

E18.5マウスから採取した皮膚を3.7％ホルムアルデヒドで固定し，アルコールで脱水後，パラフィンに包埋した。マイクロトームで厚さ4μmのホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し，Tissye-Tek DRS 2000（Sakura Torrance）を用いてヘマトキシン／エオジン（H/E）染色を行った。

### 2. 4. プラスミド

N末端に3×FLAGタグを融合したタンパク質を発現させる哺乳類発現用ベクターpCE-puro 3×FLAG-1の*Bam*HI-*Not*I 切断部位へ*ACSVL4*遺伝子を導入し，pCE-puro 3× FLAG-ACSVL4を作製した。

### 2. 5. 脂質解析

脂質の解析は液体クロマトグラフィー（LC）連結タンデム質量分析（MS/MS）によって行った。LCには逆相カラム（AQUITY UPLC CSH C18 column：粒径1.7μm，内径2.1mm，長さ100mm；Waters）を用いた。カラム温度は55℃に設定し，イオン化はエレクトロスプレーイオン化法を用い，三連四重極型質量分析計（Xevo TQ-S；Waters）を用いて検出した。各脂質分子種は，多重反応モニタリング（MRM）モードで分子種ごとに特異的な親イオン（Q1），娘イオン（Q3）の質量電荷比，コリジョンエネルギーを設定し，ポジティブイオンモードで検出した。データの解析にはMassLynx software（Waters）を使用し，定量は内部標準との割合を計算して行った。

### 2. 6. *In vitro*アシルCoA合成アッセイ

HEK 293T細胞にpCE-puro 3×FLAG-1（ベクター）またはpCE-puro 3 × FLAG-ACSVL4をトランスフェクシ

ョンして24時間後，膜画分を回収した。酵素反応は膜画分(20μg)に基質である脂肪酸(1μM リグノセリン酸，1μMネルボン酸，または30-ヒドロキシトリアコンタン酸)と0.5mM CoAを加えて，インキュベート(37℃，1時間)することで行った。生成されたアシルCoAはLC-MSMSで解析した。

## 3．結　果

### 3. 1. *Acsvl4* KOマウスにおける皮膚バリア機能と表皮形態の異常

*Acsvl4* KOマウスは，野生型(WT)マウスに比べて皮膚にしわが少なく張っており，新生致死であった。E18.5日に帝王切開により得られたマウスの生存率を経時的に調べたところ，KOマウスは摘出後2時間以内に全て死亡した。親元から離してミルクが飲めないこの条件ではWTマウスは摘出後22時間まで生存していた。このように，*Acsvl4* KOマウスは出生後極めて短時間で死亡することが明らかとなった。帝王切開によって得られたE18.5のKOマウスはWTに比べて体重が軽く，体内から体外への皮膚透過性バリア機能の指標であるTEWLはWTマウスの4.4倍高い値を示した(図2A)。次にトルイジンブルー染色により体外から体内への皮膚透過性バリア機能を調べたところ，WTマウスでは色素の浸透は見られなかったのに対し，KOマウスでは強い色素の浸透が見られた(図2B)。これらの結果から，*Acsvl4* KOマウスでは皮膚バリア機能が低下していることが確認された。

次に*Acsvl4* KOマウスの表皮の形態学的な変化を調べるため，H/E染色を行った。WTマウスの角質層では，脂質ラメラの存在を示す角質細胞間の間隙が観察され，10層未満の角質層が存在していた(図3)。一方，KOマウスでは角質層の数の増加が観察され，角質細胞間の間隙は不明瞭であった。このことは，過角化と脂質ラメラ形成不全を示していた。また，KOマウスでは有棘層が顕著に肥厚していた。

### 3. 2. *Acsvl4* KOマウス表皮におけるアシルセラミド量の低下

*Acsvl4*のアシルセラミド産生への関与を調べるために，マウス表皮中のアシルセラミド量をLC-MS/MSによって解析した。*Acsvl4* KOマウスではすべてのアシルセラミド分子種がWTマウスに比べて減少しており，総量では約9.8%にまで低下していた(図4A)。飽和と一価不飽和のアシルセラミドは共に同程度減少していた(飽和，7.4%；一価不飽和，11%)。次にアシルグルコシルセラミドを測定したところ，*Acsvl4* KOマウス中の総アシルグルコシルセラミド量は野生型マウスの約37%であった(図4B)。特に飽和タイプではアシルセラミドと同様にKOマウスで大きく減少しており，野生型マウスの9.1%であった。一方，一価不飽和タイプではアシルセラミドの時とは異なってKOマウス中での減少が小さく，合計量は野生型マウスの46%であった。以上のことから，ACSVL4がアシルセラミド合成に関与することが明らかとなった。

### 3. 3. *Acsvl4*遺伝子欠損は表皮への脂肪酸の取り込みを低下させない

脂肪酸の組成をLC-MS/MSによって解析したところ，*Acsvl4* KOマウスではC24以下の鎖長の殆どの脂肪酸の量がWTマウスに比べて増加していた(図5A)。一方，C26以上の飽和脂肪酸の量は差が見られず，一価不飽和脂肪酸では増加していた。脂肪酸総量では*Acsvl4* KOマウスではWTマウスに比べて約2.1倍増加していた。これまで，ACSVL4の脂肪酸トランスポーターとしての機能が想定されてきたが，*Acsvl4* KOマウスでの脂肪酸量の増加はこの可能性を否定した。アシルセラミドの構成要素であるリノール酸(C18:2)は，哺乳類の生体内では合成できない必須脂肪酸であるため，表皮の細胞は外部から取り込む必要がある。リノール酸の量に関しても*Acsvl4* KOマウス表皮中で増加していた。

アシルセラミド中のリノール酸はトリグリセリドに由来し，トランスアシラーゼPNPLA1がトリグリセリド中のリノール酸をオメガ水酸化セラミドに転移する[6]。*Acsvl4* KOマウスの表皮におけるリノール酸含有トリグリセリド量を調べた結果，いずれの分子種もWTマウスよりも増加していた(図5B)。これらの結果は*Acsvl4* KOマウスにおける皮膚バリア形成不全とアシルセラミド量の減少がリノール酸の取り込み異常に起因するのではないことを示している。

### 3. 4. ACSVL4はオメガ水酸化脂肪酸に対してACS活性を示す

ACSVL4はアシルセラミド合成経路上でオメガ水酸化脂肪酸をオメガ水酸化アシルCoAへ変換させるACSであると考えられる。これまで，ACSVL4は長鎖から極長鎖の非水酸化脂肪酸に対して活性を示すことは報告されているが，アシルセラミドに使用されるオメガ水酸化超長鎖脂肪酸に活性があるかは調べられていない。そこで，本実験ではヒトACSVL4のオメガ水酸化C30脂肪酸に対するACS活性を，ACSVL4を過剰発現させたHEK 293T細胞の膜画分を用いた*in vitro*の実験によって調べた。その結果，コントロールに比べ，ACSVL4 過剰発現によってオメガ水酸化C30:0脂肪酸に対するACS活性は9.8倍増加した(図6)。また，ACSVL4過剰発現により，C24:0脂肪酸へのACS活性は6.6倍，C24:1脂肪酸へのACS活性は3.6倍増加した。これらの結果からACSVL4は，アシル

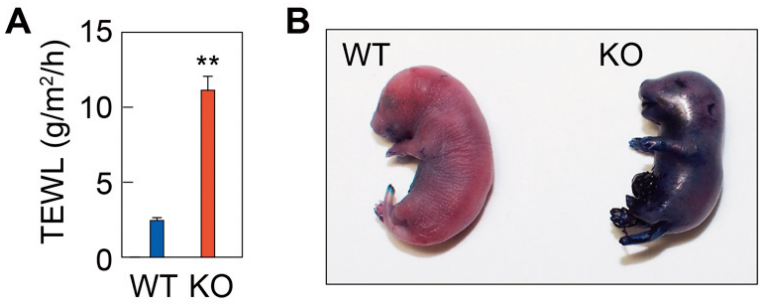



図2　*Acsvl4* KOマウスにおける皮膚バリア異常
A. TEWLの測定（n=4; Student's t-test; **$P$<0.01）。
B. トルイジンブルー染色。

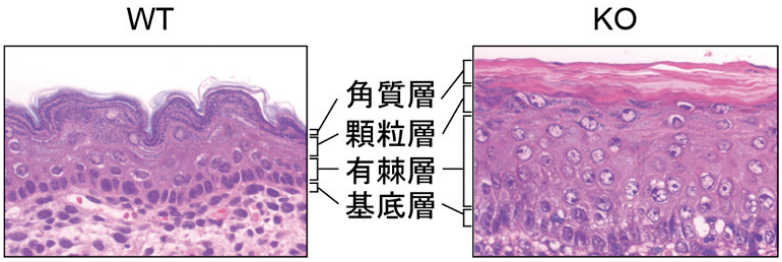



図3　*Acsvl4* KOマウスにおける過角化と脂質ラメラ形成不全

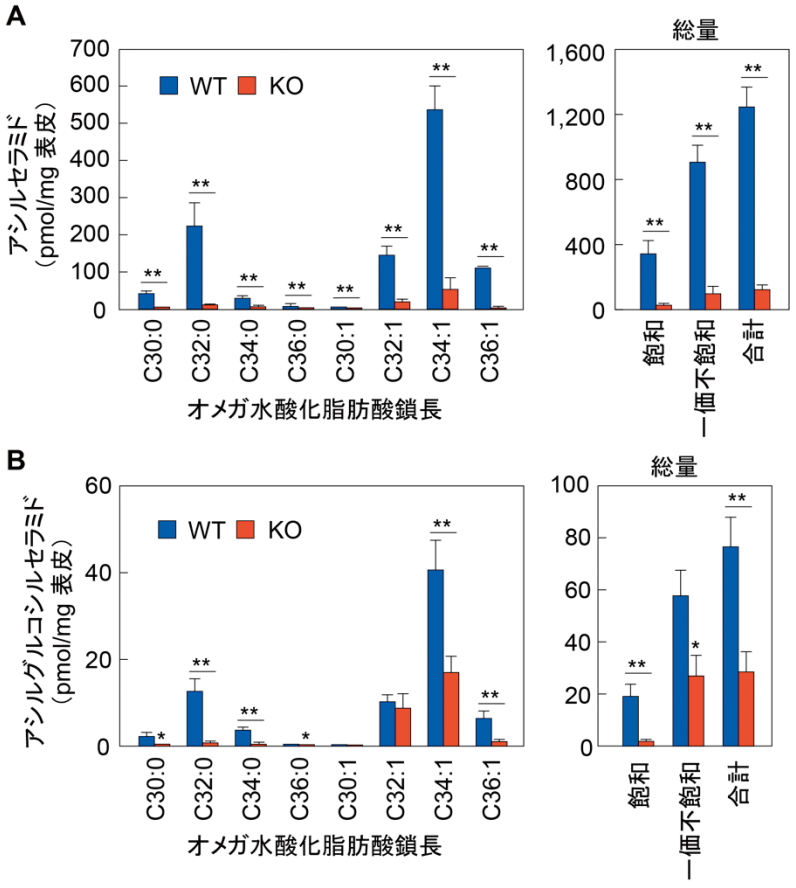



図4　セラミド組成
A. アシルセラミド量，B. アシルグルコシルセラミド量（n = 3; Student's t-test; *$P$<0.05, **$P$<0.01）。

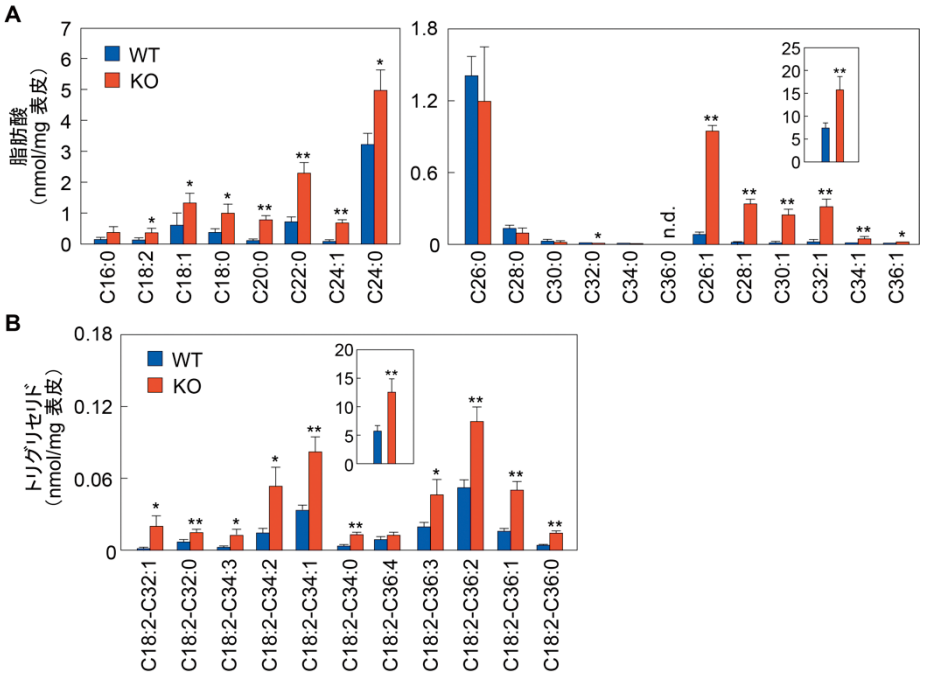



図5 脂肪酸とトリグリセリド量

A. 脂肪酸量，B. トリグリセリド量（挿入は総量; n = 3; Student's t-test; *$P$<0.05, **$P$<0.01）。

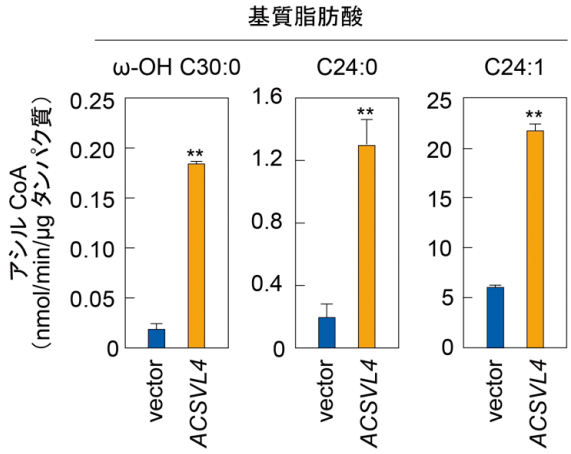



図6　アシルCoA合成酵素活性

セラミド合成に必要なオメガ水酸化アシルCoAの合成活性を示すことが明らかになった。また，ACSVL4は非水酸化／オメガ水酸化に関わらず，長鎖から超長鎖に至るまでの幅広い脂肪酸に対して活性を示すことも示された。

## 4．考　察

アシルセラミドは皮膚透過性バリア形成に必須な脂質分子であり，その産生異常はヒトにおいては魚鱗癬，マウスにおいては新生致死を引き起こす。しかし，アシルセラミドの産生に関わる遺伝子の全ては明らかになっていない。アシルセラミド産生経路にはC30–C36アシルCoAがチオエステラーゼによるC30–C36脂肪酸への変換，脂肪酸オメガ水酸化酵素CYP4F22によるオメガ水酸化脂肪酸への変換，ACSによるオメガ水酸化アシルCoAへの変換ステップが含まれる。これらのうち，チオエステラーゼとACSは未同定であった。本研究ではアシルセラミド合成に関わるACSとしてACSVL4を同定した。

*Acsvl4* KOマウスは15年以上前に作成され，激しい皮膚バリア異常を示すことが報告されたが，その原因は不明なままであった[8]。これまではACSVL4/FATP4の脂肪酸トランスポーター活性の低下が皮膚バリア異常の原因であるという説が有力であった。近年，多くのアシルセラミ

ド関連遺伝子の同定が同定され，そのKOマウスが作成された。それらのKOマウスで観察された激しい皮膚バリア異常は，*Acsvl4* KOマウスで見られるものと極めて類似していた。そこで我々は*Acsvl4* KOマウス／魚鱗癬未熟児症候群で見られる魚鱗癬症状はアシルセラミド合成低下に起因すると考え，実際本研究においてこのことを実証した。*Acsvl4* KOマウスの表皮ではリノール酸を含む多くの脂肪酸およびリノール酸含有トリグリセリドの量は低下しておらず，むしろ増加していた。これらの結果から*Acsvl4*遺伝子欠損による脂肪酸の取り込み低下が皮膚バリア異常を引き起こされるという説は否定された。

## 5．総　括

本研究によって，アシルセラミド産生経路のうちのミッシングリンクの１つを解明した。また，魚鱗癬未熟児症候群の原因がこれまで想定されていた脂肪酸の取り込み低下ではなく，アシルセラミド産生不全であることが明らかとなった。我々の発見は魚鱗癬未熟児症候群の皮膚症状発症の機構を解明しただけではなく，皮膚バリア形成の分子機構の解明に寄与した。

**（本研究助成により得られた成果）**

・Yamamoto H, Hattori M, Chamulitrat W, Ohno Y, Kihara A. Skin permeability barrier formation by the ichthyosis-causative gene *FATP4* through formation of the barrier lipid ω-*O*-acylceramide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**, 2914–2922 (2020).

**（引用文献）**


1） Akiyama M, Shimizu H. An update on molecular aspects of the non-syndromic ichthyoses. *Exp. Dermatol.*, **17**, 373–382 (2008).

2） Kihara A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog. Lipid Res.*, **63**, 50–69 (2016).

3） Ishikawa J, Narita H, Kondo N, Hotta M, Takagi Y, Masukawa Y, Kitahara T, Takema Y, Koyano S, Yamazaki S, Hatamochi A. Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 2511–2514 (2010).

4） Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Nishioka C, Kashiwagi T, Hirayama T, Akiyama M, Taguchi R, Shimizu H, Itohara S, Kihara A. Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking Elovl1, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 2787–2796 (2013).

5） Ohno Y, Nakamichi S, Ohkuni A, Kamiyama N, Naoe A, Tsujimura H, Yokose U, Sugiura K, Ishikawa J, Akiyama M, Kihara A. Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**, 7707–7712 (2015).

6） Ohno Y, Kamiyama N, Nakamichi S, Kihara A. PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid ω-*O*-acylceramide. *Nat. Commun.*, **8**, 14610 (2017).

7） Klar J, Schweiger M, Zimmerman R, Zechner R, Li H, Törma H, Vahlquist A, Bouadjar B, Dahl N, Fischer J. Mutations in the fatty acid transport protein 4 gene cause the ichthyosis prematurity syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 248–253 (2009).

8） Herrmann T, van der Hoeven F, Gröne HJ, Stewart AF, Langbein L, Kaiser I, Liebisch G, Gosch I, Buchkremer F, Drobnik W, Schmitz G, Stremmel W. Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermopathy. *J. Cell Biol.*, **161**, 1105–1115 (2003).

# ロドデンドロールによる細胞死へのフェロトーシスの関与の可能性

山形大学大学院医学系研究科
小林　翔

Rhododendrol is metabolized to rhododendrol quinone by tyrosinase in melanocytes. Reactive oxygen species, such as hydroxyl radical and singlet oxygen, are produced and cause oxidative damage in melanocytes. Recent study has revealed that ferroptosis, a non-apoptotic, iron-dependent cell death, appears to be involved in pathogenesis of a variety of diseases. It is likely that rhododendrol-induced leukomelanodermia is also caused by ferroptosis by means of lipid peroxidation products produced during rhododendrol oxidation in melanocytes. Singlet oxygen also induces feroptosis, and, on the contrary, radical scavenger edaravone effectively suppresses feroptosis caused by cysteine deprivation. Singlet oxygen is commonly produced via photon-mediated energy transfer reaction and also tyrosinase-catalyzed rododendrol metabolism, so that it is likely that ferroptosis is induced by resulted singlet oxygen in melanocytes upon UVB irradiation.

Here we first established a rat monoclonal antibody (FerAb) against Hepa 1-6 cells that had been cultivated in cystine-deprived media. Binding of the resulting antibody increased during advancing ferroptosis which was caused, not only by cystine deprivation but also treatment with xCT inhibitor erastin or GPX4 inhibitor RSL3, although apoptotic cell death induced by a staurosporine treatment had no effect on the binding. Thus, FerAb appears to be the useful tool to detect ferroptosis. When we examined effects of rhododendrol on human melanocyte MNT1 cells, it damaged the cells only at high dose. However, precise analyses of the cells by means of FACS indicated that only less-differentiated cells containing low levels of melanin appeared to die by the rhododendrol treatment. This is similar to the *in vivo* situation, and hence this cell culture system using the MNT1 cells may be ideal model system for rhododendrol-induced melanocyte death.

## 1. 緒　言

白樺などの植物由来のフェノール化合物であるロドデンドロールはメラノサイトに作用し、メラニン合成における律速酵素・チロシナーゼにより代謝されてロドキノンとなる。ロドキノンはチロシナーゼ酵素を阻害することで美白効果を発揮するが、過剰に作用するとグルタチオン含有量を低下させ、細胞死を誘導して白斑の原因となる。この時の細胞死はアポトーシスによると報告されているが、本病態では炎症細胞の関与が示されている[1]ことから、アポトーシス以外の細胞死の関与も考えられる。

ロドデンドロールによる細胞障害過程では活性酸素が生成し、グルタチオンが低下する[2]ため、抗酸化能の減弱が細胞死に関わる可能性がある。一方、その過程でオートファジーが活性化される[3]など、2012年にはじめて報告された鉄依存性細胞死・フェロトーシスに酷似している。フェロトーシス誘導には次の２つの経路が知られている[4]。1) システイン供給不足もしくはグルタチオン低下により、グルタチオンペルオキシダーゼ４(GPX4)が正常に機能せず、増加した脂質過酸化物が細胞死をもたらす[5]。2) 癌抑制遺伝子のp53が活性化して酸化型システイン(シスチン)の取込みに働くxCTの遺伝子発現を抑制して細胞死をもたらす。またロドデンドロールによる白斑は日光を浴びている皮膚に顕著なことから、紫外線による増強効果が指摘されている[6,7]が、紫外線の照射によりロドデンドロール代謝物から実際に一重項酸素が生成することが確認されている[8]。これまで我々は、フェロトーシス抑制に果たすxCTの役割について、培養細胞ならびに遺伝子欠損マウスを用いて研究してきた[9-11]。またドナー化合物を用いて、一重項酸素が肝癌由来のHepa1-6細胞にフェロトーシスを誘導することを確認しており[12]、本化合物を用いることで、ロドデンドロールによる白斑形成に一重項酸素が関与することを検証することができると考える。

これまでのところロドデンドロールによるメラノサイトの障害作用とフェロトーシスとの関連についての報告はないが、ロドデンドロールがオートファジーを活性化し、活性酸素・ラジカルが細胞死に関わることから、図１に示すようにフェロトーシスが関与する可能性が高いと考えている。本研究では、*in vivo*におけるフェロトーシス細胞の検出を可能にするモノクローナル抗体を作製し、さらにヒト由来のMNT1メラノサイトを用いて、ロドデンドロールによる細胞死へのフェロトーシスの関与と、その抑制剤による細胞保護作用を調べた。

## 2. 方　法

### 2. 1. フェロトーシス認識抗体の作製

マウス肝癌由来のHepa1-6細胞をシスチン(酸化型シ



Potential involvement of ferroptosis in cell death by rhododendrol

Sho Kobayashi

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medical Science, Yamagata University

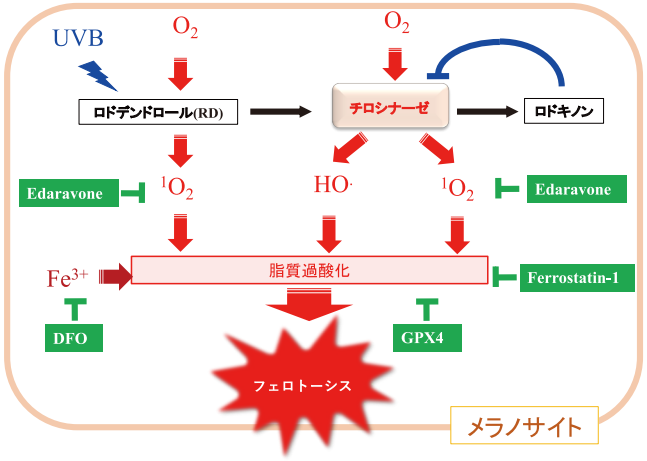



図1　ロドデンドロール(RD) によるメラノサイト細胞死がフェロトーシスによる可能性を示す模式図。一重項酸素, $^1O_2$; ヒドロキシルラジカル, HO·

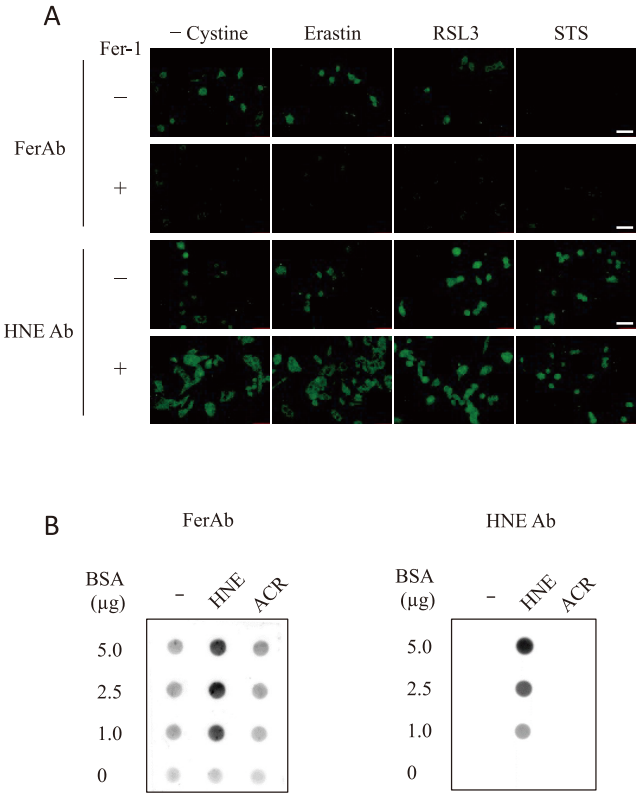



図2　抗フェロトーシス抗体の特異性の検討。免疫細胞染色による抗フェロトーシス抗体(FerAb)と抗HNE抗体(HNE Ab) との比較。(A) Fer-1はフェロトーシス抑制剤ferrostatin-1を示す。HNEおよびアクロレイン(ACR) 修飾ウシ血清アルブミン(BSA) を用いたドットブロット解析の検討結果(B)。

ステイン二量体) 欠乏培地で培養してフェロトーシスを誘導し、それを抗原としてラットに免疫した。単離したリンパ球とマウスミエローマ細胞・SP2を細胞融合し、得られたハイブリドーマの培養上清の中からフェロトーシス細胞を特異的に認識する抗体を免疫細胞染色により選抜し、ラットモノクローナル抗体・FerAbを得た。

### 2. 2. ロドデンドロールの細胞生存への影響

ヒト由来のMNT1メラノサイトを培養し、ロドデンドロール添加後の生細胞数をCellTiter-Blue® Cell Viability Assay kit (Promega) による測定やトリパンブルー色素排除試験法による細胞数計測を行い、ロドデンドロールが細胞生存に与える影響を調べた。

### 2. 3. 細胞内活性酸素と脂質過酸化物の定量

活性酸素種 ($H_2$DCF-DA と DHR123) と脂質過酸化物 (C11-BODIPY$^{581/591}$) を認識する蛍光プローブを使用し、フローサイトメーターを用いて解析した。

## 3. 結　果

### 3. 1. フェロトーシス認識抗体の作製

フェロトーシス研究のほとんどは培養細胞を用いて行われてきたが適切なマーカーがないため、その判定が難しいことが問題点として挙げられる。そこで生体内でフェロトーシスを検出することを目的として、フェロトーシス細胞を認識するラットモノクローナル抗体を作製した[13]。768クローンから最終的に1つのクローンを選別し、FerAbと命名した。本抗体は、シスチン欠乏培地での細胞培養、ならびにシスチン細胞内取込みの阻害剤・erastinや脂質過酸化を抑制するGPX4の阻害剤・RSL3で処理してフェロトーシスを誘導した細胞と強く反応したが、スタウロスポリン処理によりアポトーシスを誘導した細胞には全く反応しなかった。代表的な脂質過酸化物である4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE) を認識する抗体 (HNE Ab) もフェロトーシス細胞に結合したが、生細胞とも強く結合するため、特異性についてはFerAbの方が優れていた (図2A)。FerAbはHNE修飾BSAとの反応性を示した (図2B) が、ウエスタンブロット解析では正常細胞とフェロトーシス細胞の間で反応性に違いを認めず、タンパク質自体ではなくHNE類似の構造を認識していると考えられた。細胞内におけるFerAb結合部位を共焦点レーザ顕微鏡により調べたところ、生細胞では細胞膜の仮足様構造に結合し、フェロトーシス細胞では細胞内全体に不均一に結合し、またミトコンドリアなどの細胞小器官にも部分的な結合を認めた。

### 3. 2. ロドデンドロールのMNT1メラノサイトに対する作用

ヒト由来のMNT1メラノサイトをロドデンドロール処理し、生細胞数を測定することで、ロドデンドロールが細胞生存に与える影響を調べた。その結果、ロドデンドロールの濃度依存性に細胞死を認めたが、予想に反して高濃度

を必要とした（図3A）。そこで、約半数が細胞死を起こす7mMの濃度を用いて、シスチンを含む通常培地と、含まないシスチン欠乏培地で細胞死について検討した。まず、通常培地で培養した細胞に、広くフェロトーシスを誘導するerastinを投与したところ部分的に細胞死が認められ、その程度はロドデンドロールの存在によって増強された（図3B）。次にシスチン欠乏培地で培養したところ、同様に部分的な細胞死を認めた。ロドデンドロールが存在すると7割程度まで細胞死が増強された。フェロトーシス抑制剤の効果について調べたところ、脂質過酸化を抑えるferrostatin-1、鉄のキレート剤であるDFO、およびラジカル消去剤のEdaravoneはいずれも細胞死を抑制する傾向を示したが、その効果はわずかであった。

次に細胞内に活性酸素種が生じ、脂質過酸化が起こっているかどうかについて調べた。活性酸素の検出プローブとして$H_2$DCF-DAを用いて、FACS解析を行ったところ、ロドデンドロール処理しない細胞では、蛍光強度の低い小さなピークと、強い大きなピークに分かれ、ロドデンドロール処理により蛍光強度の小さなピークが選択的に消失した（図4）。同様の傾向がDHR123を用いた場合にも認められた。しかし、過酸化脂質を検出するC11-BODIPY$^{581/591}$によってはこのような違いを認めなかった。

## 4．考　察

ロドデンドロールによる白斑は日本国内で問題となったことから、関連する研究のほとんどは国内で行われている。フェロトーシスについては、その引き金となるのは鉄イオン依存性に生じる活性酸素・ラジカルと考えられており、シスチン欠乏によるフェロトーシスは、ラジカル消去剤であるエダラボン（商標名：ラジカット）により抑制される[14]。今回作製したFerAbは、ヒト子宮頸癌由来のHela細胞や、種々の刺激でフェロトーシスを誘導したHepa1-6にも結合したことから、動物種や刺激を問わずフェロトーシスを起こした細胞を共通に認識すると考えられる。FerAbはフェロトーシス細胞を特異的に検出できるため、フェロトーシスの機構や各種の病態への関与を解明する研究に有用と考えられる。

MNT1メラノサイトに対するロドデンドロールの作用については、細胞死の誘導に高濃度を必要とすることから、一見したところでは細胞毒性は低いように思われる。しかしながら、蛍光強度の低い細胞と高い細胞は、これまでの知見から、次のような違いに基づくと考えられる。すなわち、MNT1メラノサイトには分裂を終えて大きくなりメラニンを合成している分化の進んだ細胞と、分裂したばかりで小さく蛍光強度の低いメラニンの少ない細胞が存在する。分化度の低い細胞は内在性の蛍光物質、すなわちメラニンが少ないと考えられる。メラニンには抗酸化活性があり活性酸素種に対して耐性であるため、ロドデンドロール処理に対しても耐性となっており、分化度の低い細胞が選択的に死滅したと考えられる。この小さな細胞に限定すると、ロドデンドロールによる致死効果が大きいことが分かる。ロドデンドロールを塗布した皮膚では、メラニンを有するメラノサイトはすぐに減少することはなく、時間を経た後に白斑が生じることから、未分化な細胞が選択的に死滅していると考えられ、本知見とも一致する。したがって、ロドデンドロールによるMNT1メラノサイトの傷害は、生体内のメラノサイトの傷害機構を調べるモデル細胞系として有用と考えられる。今後、この未分化な細胞に焦点を当てて解析することで、フェロトーシスの関与を明確にし、その予防や治療に応用できる可能性がある。

xCTの阻害やシステインの欠乏によって誘導されるフェロトーシスには、ミトコンドリアの関与が報告されている。我々は電子伝達複合体Ⅲから生成するスーパーオキシドを特異的に抑制する阻害剤を用いて、この複合体由来のスーパーオキシドが関与することを明らかにしている[15]。ロドデンドロールによるメラノサイトの細胞死についても、同様に電子伝達複合体Ⅲが関与するかどうか検討を予定している。紫外線による白斑形成については一重項酸素の関与が考えられている[8]ため、ドナー化合物を用いて紫外線曝露時の一重項酸素の関与についても検討を行う予定である。

## 5．総　括

本研究により、フェロトーシス細胞を特異的に検出するラットモノクローナル抗体・FerAbの作製に成功した。MNT1メラノサイトはロドデンドロールによる白斑形成のモデル系として有用であり、本細胞を用いることで、ロドデンドロールによる皮膚の白斑へのフェロトーシスの関与とその機構を解明することができると考える。

**（引用文献）**


1）Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukai K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, Suzuki T, Katayama I. An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododenol-induced leukoderma patients. *J. Dermatol. Sci.*, **77**, 185-188 (2015)

2）Ito S, Wakamatsu K. Biochemical Mechanism of Rhododendrol-Induced Leukoderma. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 552 (16 page) (2018)

3）Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I. 4-(4-hydroroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma. *J.*

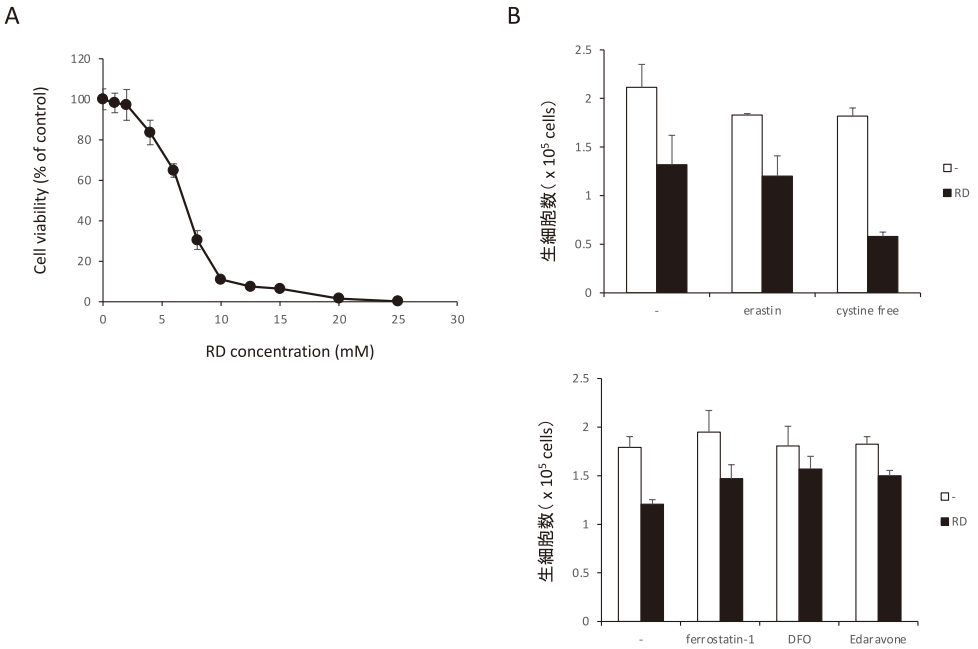



図3　ロドデンドロール(RD) によるメラノサイト(MNT1) 細胞死の誘導。ロドデンドロール濃度依存性(A) と7 mM RDとフェロトーシスの誘導剤ならびに抑制剤の併用効果(B)。平均±標準偏差(n=3) を示す。

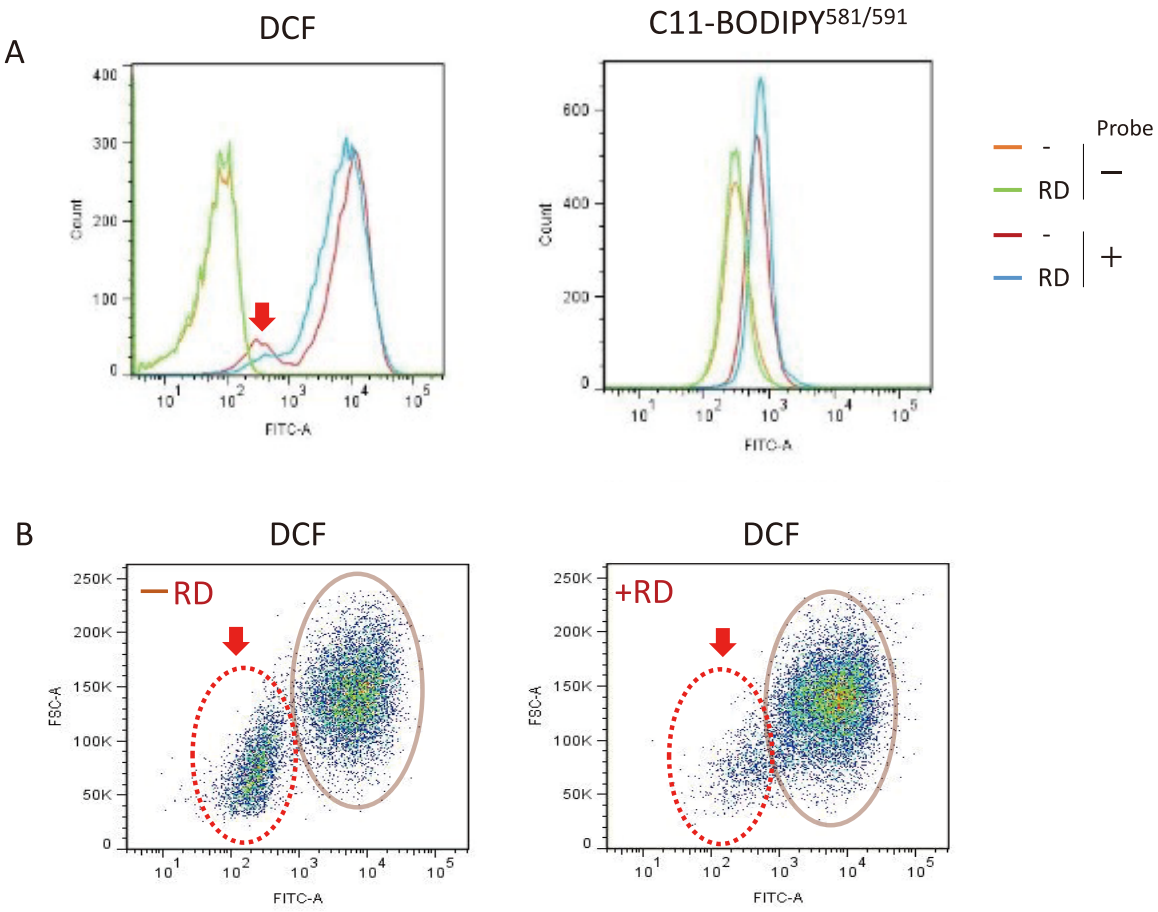



図4　ロドデンドロール(RD) の作用のFACS解析。DCFおよびC11-BODIPY581/591を用いたヒストグラム(A) と7mM RD処理前後の細胞の分布の比較(B)。A図の赤矢印で示すピークと、B図の矢印内の細胞集団は一致する。

*Dermatol. Sci.*, **77**, 182–185 (2015)
4) Fujii J, Homma T, Kobayashi S. Ferroptosis caused by cysteine insufficiency and oxidative insult. *Free Radic. Res.*, **23**, 1–12 (2019)
5) Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Rådmark O, Kobayashi S, Bornkamm GW, Wanke R, Forster H, Yefremova O, Heinrichmeyer M, Hanschmann EM, Geissler EK, Stockwell BR, O'Donnell VB, Schick JA, Conrad M. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell. Biol.*, **16**, 1180–1191 (2014)
6) Ito S, Wakamatsu K. A convenient screening method to differentiate phenolic skin whitening tyrosinase inhibitors from leukoderma-inducing phenols. *J. Dermatol. Sci*, **80**, 18–24 (2015)
7) Goto N, Tsujimoto M, Nagai H, Masaki T, Ito S, Wakamatsu K, Nishigori C. 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol)-induced melanocyte cytotoxicity is enhanced by UVB exposure through generation of oxidative stress. *Exp. Dermatol.*, **27**, 754–762 (2018)
8) Miyaji A, Gabe Y, Kohno M, Baba T. Generation of hydroxyl radicals and singlet oxygen during oxidation of rhododendrol and rhododendrol-catechol. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **60**, 86–92 (2017)
9) Kobayashi S, Sato M, Kasakoshi T, Tsutsui T, Sugimoto M, Osaki M, Okada F, Igarashi K, Hiratake J, Homma T, Conrad M, Fujii J, Soga T, Bannai S, Sato H. Cystathionine is a novel substrate of cystine/glutamate transporter: implications for immune function. *J. Biol. Chem.*, **290**, 8778–8788 (2015)
10) Kang ES, Lee J, Homma T, Kurahashi T, Kobayashi S, Nabeshima A, Yamada S, Seo HG, Miyata S, Sato H, Fujii J. xCT deficiency aggravates acetaminophen-induced hepatotoxicity under inhibition of the transsulfuration pathway. *Free Radic. Res.*, **51**, 80–90 (2017)
11) Kobayashi S, Hamashima S, Homma T, Sato M, Kusumi R, Bannai S, Fujii J, Sato H. Cystine/glutamate transporter, system $x_c^-$, is involved in nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *Nitric Oxide*. **78**, 32–40 (2018)
12) Homma T, Kobayashi S, Fujii J. Induction of ferroptosis by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **518** 519–525 (2019)
13) Kobayashi S, Harada Y, Homma T, Yokoyama C, Fujii J. Characterization of a rat monoclonal antibody raised against ferroptotic cells. *J. Immunol. Methods.*, **489**, 112912 (9 page) (2021)
14) Homma T, Kobayashi S, Sato H, Fujii J. Earavone, a free radical scavenger, protects against ferroptotic cell death in vitro. *Exp. Cell Res.*, **384**, 111592 (9 page) (2019)
15) Homma T, Kobayashi S, Sato H, Fujii J. Superoxide produced by mitochondrial complex III plays a pivotal role in the execution of ferroptosis induced by cysteine starvation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **700**, 108775 (9 page) (2021)

# 食薬用植物からの育毛活性物質の探索

筑波大学生命環境系
繁森　英幸

Hepatocyte growth factor (HGF) has mitogenic, motogenic, and morphogenic activities in epithelial cells. Induction of HGF production may be involved in organ regeneration, wound healing and embryogenesis. HGF is also known to act on human and animal hair follicles to promote hair growth. In this study, the effects of naturally occurring compounds, which were isolated from edible and medicinal plants, on HGF production in Neonatal Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) were investigated. Clovamide, one of the caffeic acid derivatives significantly induced HGF production dose-dependent manner. To know the important substructure for HGF production activity, we next investigated the effect of the partial structure of these caffeic acid derivatives. From the results, clovamide showed strong activity on the promotion of HGF production. It was suggested that the caffeoyl moiety of caffeic acid derivatives such as clovamide and its related compounds is essential for accelerated production of HGF. The compound which has the caffeoyl moiety may be useful for the treatment of some intractable organ diseases in addition to hair growth activity.

## 1．緒　言

肝細胞増殖因子（Hepatocyte growth factor, HGF）は、当初肝細胞に対する最も強力な増殖促進因子として同定されていたが、腎尿細管や気管支上皮、ケラチノサイトなど様々な上皮系細胞に対しても増殖促進因子として機能することが知られている[1)]。また最近では、血管内皮細胞、軟骨細胞、造血幹細胞などの間葉系細胞の増殖を促進させることも明らかにされている。さらに、HGFはヒトおよび動物の毛包に働き、発毛・育毛を促進することも知られている[2)]。成長期毛包の毛乳頭細胞からは、HGF、インスリン様増殖因子-1、血管内皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、退行期にはトランスフォーミング増殖因子-βなどの因子が産生され、これらが毛母細胞などに作用することで、ヘアサイクルが制御されていると考えられている[3)]。また、毛髪の成長期移行シグナルであるシグナル伝達兼転写活性化因子3（STAT3）は、HGFにより活性化されることが知られている。当研究グループでは、これまでに寄生植物のアメリカネナシカズラやヤセウツボから単離したカフェオイルキナ酸（CQA）類ならびにフェニルエタノイド配糖体（PHEG）類などのカフェ酸誘導体に、正常ヒト皮膚線維芽細胞に対する顕著なHGF産生促進活性があることを見出した[4)]。また一方で、ジンチョウゲから単離したDaphnane型ジテルペン化合物にも顕著なHGF産生促進活性を見出している[5)]。そこで本研究では、食薬用植物を含む天然素材から新たなHGF産生促進活性物質を探索するとともに、CQA類、PHEG類やDaphnane型ジテルペン化合物と併せて、それらの化合物の機能を解明することを目的とする。



Search for hair growth-promoting compounds from edible and medicinal plants

Hideyuki Shigemori

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

## 2．方　法

### 2．1．天然由来化合物のHGF産生促進活性

#### 2．1．1．活性試験用化合物

当研究室で食薬用植物や微生物から単離した化合物[6-10)]：Acteoside、Arctigenin、Antimycin A3a、Palmaenone A、Palmaerin A、Daphnodorin C、Clovamide、Piceatannol およびScirpusin B

#### 2．1．2．細胞培養

正常ヒト皮膚線維芽細胞（Normal human dermal fibroblasts：NHDF）（Kurabo Co.）を、10% FBSを加えたダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（Sigma-Aldrich Co.）を用いて、37℃、5% $CO_2$ 加湿雰囲気中で培養し、各実験に使用した。

#### 2．1．3．NHDF細胞への化合物投与

フラスコで培養したNHDF細胞をトリプシン処理し、96well plateに$5.0\times10^4$ cells/mLになるように100μLずつ播種して、コンフルエントになるまで培養し、化合物を0.5% FBS DMEMで希釈し、培地交換の要領で96well plateに100μL/wellで添加し96h培養した。

#### 2．1．4．サンドイッチ酵素結合免疫吸着検査法（Enzyme-linked immuno-sorbent assay：ELISA）

ELISA用の96well plate（Nunc）に抗ヒトHGF抗体（R&D Systems）を播種し、4℃で一晩インキュベートした。各wellを0.05% Tween 20 in PBS（TBS/T）で洗浄し、ブロッキング剤（5% Tween 20、5% Sucrose含有PBSで溶解した1% BSA）を添加し1h静置した。これ以降の実験操作は室温で行った。溶液の除去ならびにTBS/T洗浄を行い、上記の細胞上清を添加した。同時に、標準曲線用にhuman HGF standard（R&D Systems）を0～50ng human

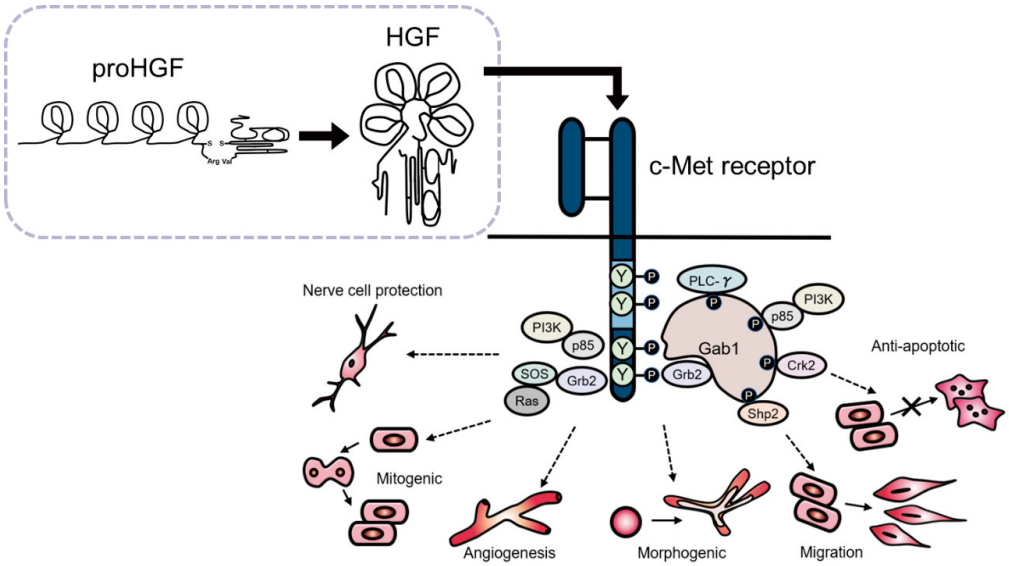



図1　HGFが関与する生理作用

HGF/mLの範囲で添加した。2h静置した後、溶液の除去ならびにTBS/T洗浄を行い、ビオチン化抗HGF二次抗体（R＆D Systems）を添加し2h静置した。溶液の除去およびTBS/T洗浄を行い、ストレプトアビジン標識ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（Horseradish peroxidase: HRP）（R&D Systems）を添加した。インキュベート（30 min）後、溶液の除去ならびにTBS/T洗浄を行い、酵素基質 2,2'-Azinobis（3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazole-6-sulfonic acid）（ABTS）溶液を添加してアルミホイルで遮光し30min静置した。最後に反応停止剤として2M硫酸を添加した後、410nmで吸光度を測定した。得られた値より検量線を作成し、1wellあたりのHGF産生量を求めた。

### 2．1．5．BCAタンパク質定量法

ELISAアッセイに用いる上清を取り除いた後の96well plateをTBS/Tで軽く洗浄し、0.5% Triton X-100含有PBSを添加して20minほどシェイカーで振盪し細胞層を回収した。新たな96well plateに回収した細胞サンプルまたはBSA standardとWorking solutionを添加し、562nmで吸光度を測定した。得られた値より検量線を作成し、サンプル内のタンパク質量すなわちプレートに生着していた細胞数を求めた。

上記の2つのアッセイ結果より、単位タンパク質量あたりのHGF産生量（pg/μg protein）を算出し、各化合物によるHGF産生促進活性を調べた。

### 2．1．6．HGF産生に関与するmRNAの発現量測定

NHDFを6cm dishに播種しコンフルエントになってから化合物を添加した。化合物処理後、培地を除去してPBSで洗浄後、RNA抽出用試薬ISOGEN 1mL/wellを添加し、かき取ってチューブに回収して5min室温静置した。これに、0.2mLクロロホルムを添加し室温で3min静置した後、遠心（12000rpm、15min、4℃）し、水層（上層）を新しいチューブに移した。0.5mLイソプロパノールを添加して室温で5-10 min静置した。遠心（12000rpm、10min、4℃）した後、上清を除去して70%エタノール（1mL）を添加し、さらに遠心（7500rpm、5min、4℃）した後、上清を除去して風乾し、水で希釈してtotal RNA溶液を調製した。

一方で、氷上で試薬とRNA溶液を混ぜ、65℃で5 min（RNA変性）、37℃で5 min（ゲノムDNA除去）、37℃で15min、50℃で5 min、98℃で5 min（逆転写活性および酵素失活反応）の条件で反応終了後にサンプルを回収した（cDNA）。このcDNAサンプルと試薬およびプライマーを混ぜPCR用の96 well plateに播き、フィルムをして定量的逆転写PCR（RT-qPCR）を行った。

### 2．1．7．HGF産生経路に関わる酵素に対する阻害剤を用いたHGF産生促進活性

阻害剤：KT5720（プロテインキナーゼA：PKA）、PD98059（分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ／細胞外シグナル調節キナーゼ：MAPK/ERK）、SB203580（p38分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ：p38MAP）、SP600125（c-Jun *N*-terminal kinase：JNK）、Wortmannin（ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ：PI3K）およびBisindolylmaleimide 1（プロテインキナーゼC：PKC）

2．1．1．における活性試験用化合物中で最も顕著なHGF産生促進活性が認められたClovamideを用いて上記の阻害剤を添加してNHDF細胞からのHGF産生量を2．1．4．サンドイッチELISA法と2．1．5．BCAタンパク質定量法と同様の方法を用いて測定した。

## 3．結　果

### 3. 1. 1．天然由来化合物によるHGF産生促進活性

HGF産生促進活性が知られている血小板由来成長因子（platelet-derived growth factor: PDGF）をポジティブコントロールとして、9種類の天然由来化合物（Acteoside、Arctigenin、Antimycin A3a、Palmaenone A、Palmaerin A、Daphnodorin C、Clovamide、PiceatannolおよびScirpusin B）について、各5μMを用いてサンドイッチELISA法によりHGF産生促進活性を調べた。その結果、ActeosideおよびClovamideに顕著なHGF産生促進活性が認められた（図2）。Acteoside のHGF産生促進活性についてはすでに当研究室で報告していることから、これ以降の実験では、Clovamide（図3）を用いて検証することとした。

そこで、Clovamideの濃度（0.5、1、5および10μM）を変えて経時変化（48hおよび96h）を調べたところ、濃度依存的ならびに時間依存的にHGF産生促進活性が増強した（図4）。

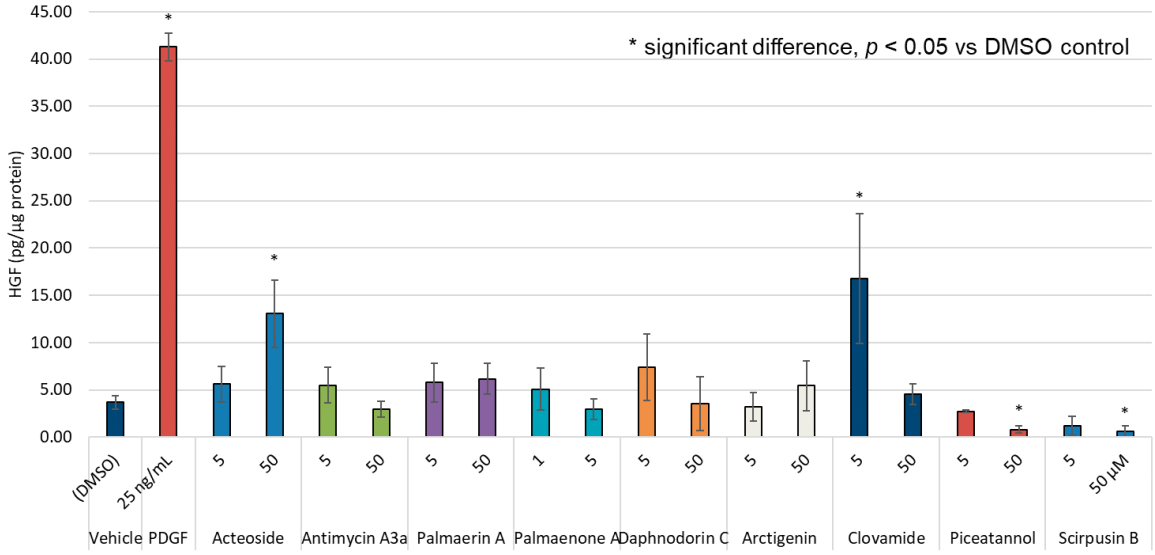



図2　天然由来化合物のHGF産生促進活性

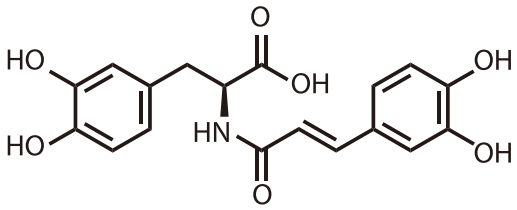



図3　Clovamideの構造式

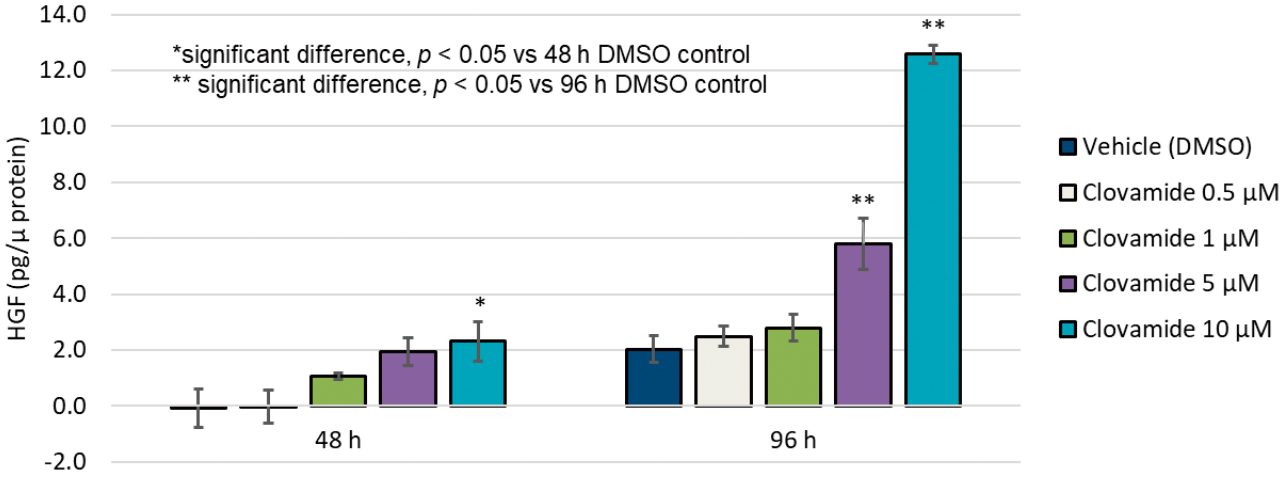



図4　Clovamideの濃度および時間依存的なHGF産生促進活性

### 3. 1. 2. HGF産生に関与するmRNAの発現量測定

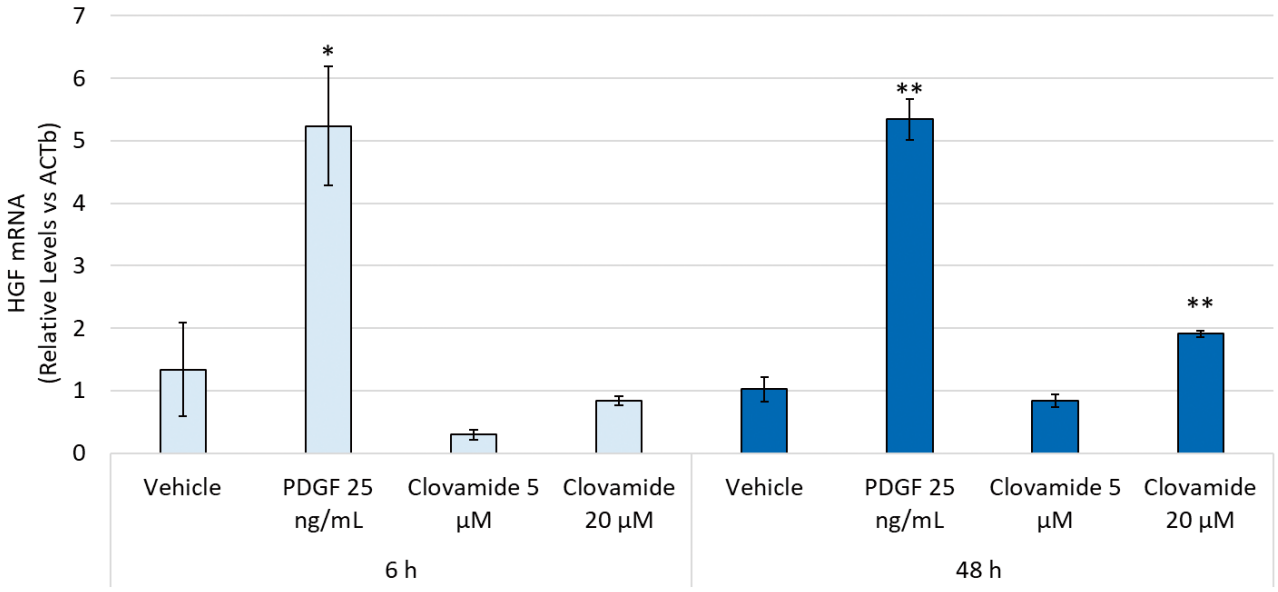
RT-qPCR を用いてClovamideの添加(5および20μM)によるHGF mRNA発現量を調べた結果、6h処理では有意差は見られなかったが、48h処理においてClovamide(20μM)では有意差が見られた(図5)。

### 3. 1. 3. ClovamideによるHGF産生促進経路の解明

HGF産生経路に関わると想定した酵素の阻害剤(KT5720、PD98059、SB203580、SP600125、Wortmannin および Bisindolylmaleimide 1)を用いて、Clovamideとの共処理によるHGF産生量を調べた結果、PKA阻害剤であるKT5720を添加した際にHGF産生量が減少することが観測された(図6)。したがって、HGF産生にはPKA経路の関与が重要であることが示唆された。

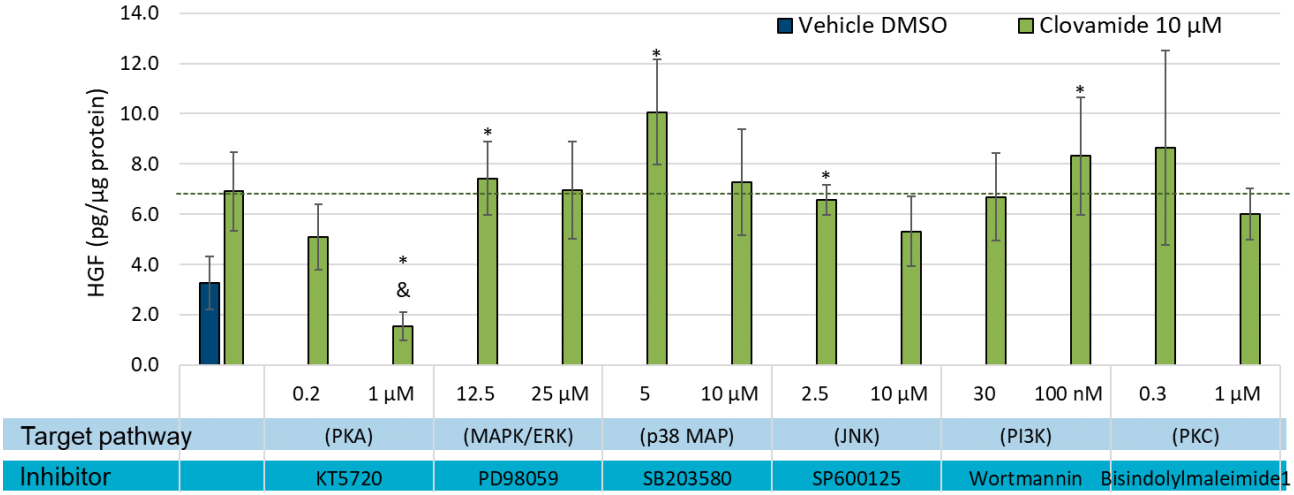
## 4. 考　察

9種類の天然由来化合物を用いてサンドイッチELISA法によりHGF産生促進活性を調べた結果、ActeosideおよびClovamideに顕著なHGF産生促進活性が認められたことから、先行研究で活性が認められたCQA類やPHEG類などのカフェ酸誘導体と同様にカフェ酸構造に含まれるカ




* significant difference, $p < 0.05$ vs Vehicle, ** significant difference, $p < 0.01$ vs Vehicle

図5　Clovamide処理によるHGF mRNA発現量




* significant difference, $p < 0.05$ vs DMSO control, & significant difference, $p < 0.05$ vs Clovamide (10 μM)

図6　酵素阻害剤を用いたClovamideによるHGF産生量の変化

テコール構造が活性発現に重要であることを明らかにした。そこで本研究では、Clovamideを用いてHGF産生促進活性についてさらなる機構解明を行った。Clovamideの濃度を変えて経時変化を調べたところ、濃度依存的ならびに時間依存的にHGF産生促進活性が増強したことから、Clovamideに顕著なHGF産生促進活性を有していることを確認した。また、RT-qPCR を用いてClovamideの添加によるHGF mRNA発現量を調べた結果、時間依存的に発現量が増加してることから、遺伝子発現レベルでもHGF産生が促進されていることを明らかにした。さらに、酵素阻害剤を用いた実験において、ClovamideによるHGF産生促進活性発現機構にはPKA経路が重要であることを明らかにした。

## 5．まとめ

HGFは健康状態の時はあまり産生されておらず、病気になった時に血中のHGF量が増加する。実際に、肝炎の患者では数倍から10数倍にも上昇することから、HGFは組織や臓器に傷害が加わることで産生されることが知られている。一方で、加齢とともにHGF産生能力は低下し、このことが高齢化に伴う生活習慣病が発症しやすくなる原因とも言われている。さらに、HGFは育毛・発毛作用があり、頭髪の再生も行うため、加齢に伴うHGF産生量の低下が脱毛や薄毛の原因ともなっている。すでに筋萎縮性側索硬化症（ALS）や脊椎損傷などに対してのHGF投与による臨床試験が行われているが、脱毛や薄毛の治療の場合はそこまでの療法は適していないと思われる。そこで、HGF産生を促進する化合物を食品やサプリメントまたは化粧品として摂取することで体内のHGF産生を向上させることが有効な方法と考えられる。すでに、先行研究において顕著なHGF産生促進活性が認められたCQA類ならびにPHEG類は、サツマイモ、ゴボウ、プロポリス、コーヒーならびにオリーブなどの食用植物に含まれている。また、今回活性が認められたClovamideもカカオ豆やコーヒー豆に含まれている成分でもあることから、ココア、チョコレートおよびコーヒーにも含まれている。したがって、これらを日常的に摂取することによって加齢に伴って減少したHGFの産生を促進することで、脱毛や薄毛を予防する育毛剤の開発につながるものと思われる。このような化合物は皮膚への安全性はもちろんのこと、生体内に投与しても健康に対する害はほとんどないことが示唆される。したがって、これらの化合物を配合したサプリメントや化粧品の安全性は高く、このような天然由来化合物を配合した育毛剤の開発に貢献するものと考えられる。

（引用文献）


1） Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. Kidney Int. 59: 2023–2038, 2001.

2） Lee Y-R, Yamazaki M, Mitsui S, Tsuboi R, Ogawa H. Hepatocyte growth factor (HGF) activator expressed in hair follicles is involved in *in vitro* HGF-dependent hair follicle elongation. J Dermatol Sci 25: 156–163, 2001.

3） Philpott MP, Sanders DA, Kealey T. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth *in vitro*. J Invest Dermatol. 102: 857–861, 1994.

4） Kurisu M, Nakasone R, Miyamae Y, Matsuura D, Kanatani H, Yano S, Shigemori H. Induction of hepatocyte growth factor production in human dermal fibroblasts by caffeic acid derivatives. Biol Pharm Bull 36: 2018–2021, 2013.

5） Nakasone R, Kurisu M, Onodera M, Miyamae Y, Matsuura D, Kanatani H, Yano S, Shigemori H. Promoting effects on hepatocyte growth factor production of daphnane diterpenoids from *Daphne odora*. Heterocycles 87: 1087–1092, 2013.

6） Kurisu M, Miyamae Y, Murakami K, Han J, Isoda H, Irie H, Shigemori H. Inhibition of amyloid β aggregation by acteoside, a phenylethanoid glycoside. Biosci Biotech Biochem. 77: 1329–1332, 2013.

75) Higashinakasu K, Yamada K, Shigemori H, Hasegawa K. Isolation and identification of potent stimulatory allelopathic substances exuded from germinating burdock (*Arctium lappa*) seeds. Heterocycles 65: 1431–1437, 2005.

8） Matsumoto T, Hosoya T, Tomoda H, Shiro M, Shigemori H. Palmaenones A and B, two new antimicrobial chlorinated cyclopentenones from discomycete *Lachnum palmae*. Chem Pharm Bull 59 : 1559–1561, 2011.

9） Tanabe Y, Matsumoto T, Hosoya T, Sato H, Shigemori H. Palmaerins A–D, new chlorinated and brominated dihydroisocoumarins with antimicrobial and plant growth regulating activities from discomycete *Lachnum palmae*. Heterocycles 87: 1481–1491, 2013.

10） Tsunoda T, Takase M, Shigemori H. Structure-activity relationship of clovamide and its related compounds for the inhibition of amyloidβ aggregation. Bioorg Med Chem 26: 3202–3209, 2018.

# アトピー性皮膚炎発症者に高度に定着する黄色ブドウ球菌と健常者皮膚細菌の菌種間干渉の解析

静岡県立大学食品栄養科学部
島村　裕子

*Staphylococcus aureus* has been reported to overgrow in the skin of patients with atopic dermatitis. It has been reported that some bacteria in normal human skin have the ability to suppress the growth of *S. aureus* and contribute to the barrier function of the skin. However, the effect of *Corynebacterium* spp., which has a high occupancy in the human skin flora, on the growth and expression of virulence factors of *S. aureus* are unclear. In this study, the effects of *Corynebacterium* spp. on the growth and expression of virulence factors of *S. aureus* were examined. Furthermore, the inhibitory effect of cell free culture medium (CFCM) of *Corynebacterium* spp. on *S. aureus*-induced inflammation was evaluated.

CFCM of *Corynebacterium* isolates ⑥-3 (Cory ⑥-3) significantly suppressed the growth of *S. aureus* in the early stage of culture and the expression of virulence factors RNAIII, *hla* and *spa*. When *S. aureus* MVs were added to RBL-2H3 cells, the release rate of β-hexosaminidase was significantly increased. On the other hand, CFCM of Cory ⑥-3 significantly reduced the release of β-hexosaminidase induced by *S. aureus* MVs. *S. aureus* MVs enhanced the expression of normal human epidermal keratinocytes (NHEK) inflammation-inducing genes, and Cory ⑥-3 CFCM significantly suppressed the expression of these genes. Our studies are the first to demonstrate the effect of *Corynebacterium* isolates on the inflammatory responses induced by *S. aureus* MVs in cultured keratinocytes.

## 1. 緒　言

アトピー性皮膚炎（AD）患者の皮膚では、常在菌の種類が著しく減り、その過半数を黄色ブドウ球菌（*Staplylococcus aureus*）が占める異常な状態が起きていることが報告されている[1)]。また、*S. aureus*が産生するメンブランベシクル（membrane vesicle; MVs）は、20～400nmの球状構造体であり、ADを悪化させることが知られている[2, 3)]。一方、正常なヒトの皮膚細菌叢は、多様性に富んでいることから、皮膚細菌叢の正常なバランスを維持することがADの予防、悪化防止につながると考えられる。これまでに、ADのモデルマウスでは、*S. aureus*と*Corynebacterium bovis*が皮膚細菌叢の多くを占めていることが報告されている[4)]。一方、我々は、成人皮膚常在細菌叢から分離した*Corynebacterium*属菌の中に、*S. aureus*の増殖を抑制するものが存在することを見出している。しかし、*Corynebacterium*属菌による*S. aureus*の増殖抑制メカニズムについては明らかになっていない。

そこで、本研究では、AD発症者の皮膚細菌叢について、16Sメタゲノム解析を用いて調査し、皮膚細菌叢の動態および各細菌群の病態への関与を解析した。次いで、AD発症者から得られた*S. aureus*と、健常者の皮膚から分離した*Corynebacterium*属菌を共培養して、*S. aureus*の増殖および病原因子の発現の抑制効果について解析した。また、RBL-2H3細胞のβ-hexosaminidase放出率を測定することで、*S. aureus*由来分子を含むMVsおよび*Corynebacterium*属菌の培養液から菌体を除去したcell free condition medium（CFCM）が、I型アレルギー反応である脱顆粒に及ぼす影響を調べた。さらに、マイクロアレイ解析を用いて、表皮角化細胞（NHEK）の免疫関連遺伝子の発現に対する*S. aureus* MVsおよびCFCMの影響を網羅的に解析した。将来的には、正常皮膚細菌叢由来の菌体外成分を利用したADに対する新規スキンケア方法の開発を目指す。



Interference between *Staphylococcus aureus* showing skin colonization in atopic dermatitis patients and healthy skin bacteria

Yuko Shimamura

School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

## 2. 方　法

### 2. 1. AD発症者の皮膚細菌叢

20代のAD発症者8名（男性2名および女性6名）と、20代の皮膚炎症状のない健常者9名（男2名、女7名）の前額より皮膚細菌叢を採取した。Biostic® Bacteremia DNA Isolation Kit（MO BIO）を用いてDNAを抽出し、PCRによる16S rRNA遺伝子の増幅を行った。その後、アガロースゲルからのライブラリを調製し、The Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit（Life Technologies）を用いて、Ion PGM® sequencer（Life Technologies）で塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、QIIMEを用いて解析した。なお、本研究は、本学研究倫理審査委員会の承認（承認番号29-21）を得て実施した。

### 2. 2. *S. aureus*の増殖および病原因子発現に及ぼす*Corynebacterium*分離株の影響

得られた皮膚細菌叢より、*S. aureus*および*Corynebacterium*属菌を分離した。*Corynebacterium*属菌よりCFCMを調製し、AD発症者から分離した*S. aureus*の増殖および病原因子

の発現に与える影響を調べた。病原因子は、*S. aureus*の*agr*制御系によって発現が調節されているRNAIII、*hla*（α毒素）、および*spa*（protein A）遺伝子を標的とした。

### 2. 3. *S. aureus*由来MVsの調製

AD発症者から分離した*S. aureus* ①-1をBHI培地に接種し、37℃、110rpmで一晩振とう培養した。菌液を3,000*g*、15分間で遠心分離後、菌体ペレットを除去した。上清を0.2μmフィルターでろ過後、限外ろ過して、100 kDaで濃縮し、さらに、超遠心機を用いて150,000*g*、3時間、4℃で超遠心分離し、上清を除去した。PBS 50μLでMVsを懸濁し、タンパク質量を測定後、使用時まで－20℃で保存した。

### 2. 4. RBL-2H3を用いた脱顆粒試験

24well plateに、RBL-2H3細胞を$2.0\times10^5$cells/400μL/wellとなるように播種し、24時間培養した。培地を除去し、細胞をPBS 500μL/wellで2回洗浄した後、releasing mixture 160μL/well + *S. aureus*由来MVs（0.05μg/μL protein）20μL/well、または、releasing mixture 160μL/well + *S. aureus*由来MVs（0.1μg/μL protein）10μL/well + CFCM（0、0.03、0.04、0.05、0.07、0.1、0.2、0.4および1.0mg/μL）10μL/wellを添加し、37℃で10分間インキュベートした。さらに、A23187を終濃度5μMとなるように20μL/wellずつ添加し、37℃で30分間インキュベートした後、10分間氷冷して反応を停止した。培養上清50μLを96well plateに移し、5mM substrate solutionを50μL/wellずつ添加し、37℃で30分間インキュベートした。Stop bufferを200μL/wellずつ添加し、マイクロプレートリーダーにて405nmにおける吸光度を測定した。

### 2. 5. 正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）の炎症惹起に対するCFCMの抑制作用

*S. aureus* MVs（3.5μg/μL protein）およびCFCM（5μg/μL）を添加して培養したNHEKからtotal RNAを抽出した。Agilent RNA 6000 Nano Kit（Agilent Technologies, Inc., cat.# 5067-1151）およびAgilent 2100 Bioanalyzer（Agilent Technologies, Inc.）を用いてTotal RNAの品質を確認した。NHEKから回収したTotal RNAを用いて、GeneChip™ Scanner 30007G（Thermo Fisher）によるDNAマイクロアレイ（ClariomTM S Assay, human）解析を行った。

### 2. 6. CFCM中の脂肪酸のGC分析

約200mgのCFCMの凍結乾燥物または標品として29.85 mgのtuberculostearic acid（終濃度100ppm）に、0.5 M NaOH-$CH_3OH$溶液1.5mLと、ラウリン酸（内部標準物質）2mgを加え、100℃のドライブロックバスにて、9分間加熱した。加熱後、三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液2mLを加え、再びドライブロックバスを用いて100℃で7分間加熱した。冷却後、ジクロロメタン2mLを加え、30秒間攪拌抽出を行った後、3分間超音波で混和した。混和後、飽和食塩水5mLを加えて、軽く振とうし、1,500rpm、10分間で遠心分離した。ジクロロメタン層（下層）を褐色バイアル瓶に採取し、GC-FID測定用試料とした。

## 3. 結　果

### 3. 1. AD発症者の皮膚細菌叢

16Sメタゲノム解析の結果を、Fig. 1に示した。被験者より採取した前額（Fig. 1（A））と右頬（Fig. 1（B））の皮膚細菌叢では、多くのサンプルで*Propionibacterium*属菌が大部分を占めていた。*S. aureus*を含む*Staphylococcus*属菌は、被験者ごとに占有率が大きく異なった。*Corynebacterium*属菌は、被験者ごとに占有率が大きく異なっていたが、17名中15名の皮膚に存在が確認された。

### 3. 2. *S. aureus*の増殖および病原因子発現に及ぼす*Corynebacterium*分離株の影響

*Corynebacterium*属菌のCFCM（Cory ①-4、Cory ⑤-1、Cory ⑥-3、Cory ⑦-4、Cory 6-2、Cory 6-5およびCory 18-4）を添加して培養を行ったところ、*S. aureus*の増殖は有意に抑制された（Fig. 2）。これら7つの菌株は、*rpoB*遺伝子に基づいて作成した*Corynebacterium*分離株の系統樹において、同様のクラスターに含まれていた。また、熱処理した*Corynebacterium*分離株CFCMを*S. aureus*に添加した場合においても、同様の結果が得られた。

そこで、*S. aureus*の増殖を最も抑制したCory ⑥-3 CFCMを添加して、*S. aureus*の病原因子発現に及ぼす影響について調べた。その結果、Cory ⑥-3 CFCMは、*S. aureus*の病原因子であるRNAIII、*hla*および*spa*の遺伝子発現量を有意に抑制した（Fig. 3）。

### 3. 3. RBL-2H3を用いた脱顆粒試験

A23187を添加し、calcium ionophores刺激により細胞内の$Ca^{2+}$を増大させたRBL-2H3細胞の脱顆粒に対する*Corynebacterium*属菌のCFCMおよび*S. aureus* MVsの影響を検討した。その結果、9株の*Corynebacterium*属菌のCFCMの添加によりβ-hexosaminidaseの放出率が有意に減少した（Fig. 4（A））。また、*S. aureus* MVs（Fig. 4（B））の添加によりβ-hexosaminidaseの放出率が有意に増加した（Fig. 4（C））。さらに、*S. aureus* MVsとCory ⑥-3 CFCMを同時に添加したところ、*S. aureus* MVsとPBSを添加した場合と比較して、β-hexosaminidaseの放出率が有意に減少した（Fig. 4（C））。そこで、*S. aureus* MVsによるRBL-2H3細胞の脱顆粒を最も抑制するCory ⑥-3

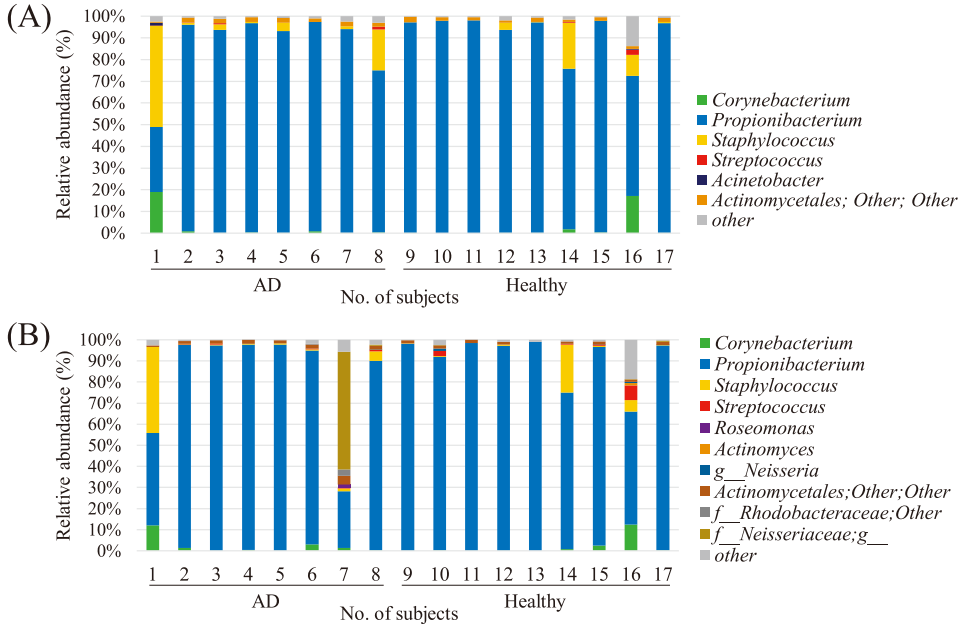



Fig. 1: The skin microbiome composition of patients with atopic dermatitis (AD) and healthy subjects at the genus level.
(A) The skin microbiome composition of human forehead. (B) The skin microbiome composition of human cheek. AD: patients with atopic dermatitis, Healthy: healthy subjects.

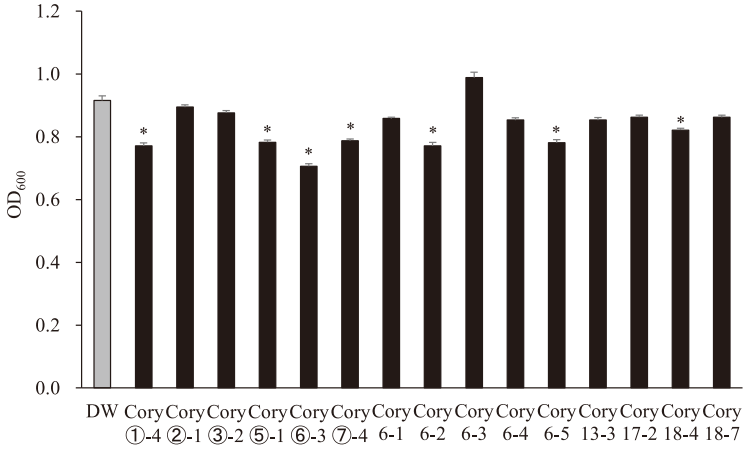



Fig. 2 Effect of *Corynebacterium* CFCM on the growth of *S. aureus*.
The cell concentration was measured by the optional density at 600 nm ($OD_{600}$). Error bars represent SE. Distilled water (DW) was used as a negative control. * represents $p < 0.01$ compared to the DW.

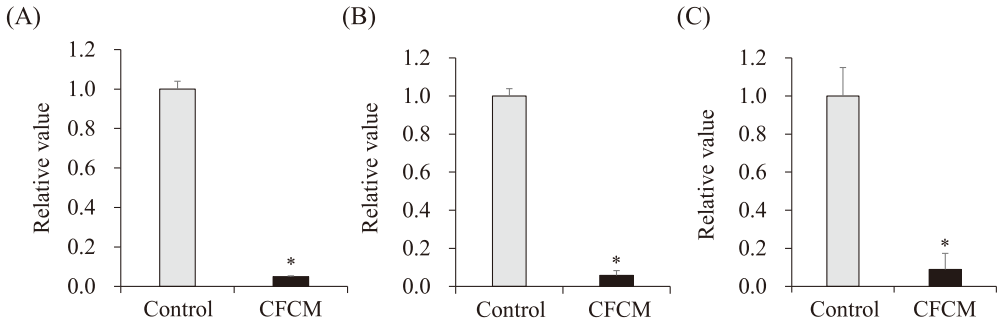



Fig. 3 Effect of *Corynebacterium* CFCM on virulence gene expression.
*S. aureus* were cultured for 5h with CFCM isolated from *Corynebacterium* spp. Gene expression of RNAIII (A), *hla* (B) and *spa* (C) mRNA was determined by real-time RT-PCR. Distilled water (DW) was used as a negative control. Error bars represent SE. * represents $p < 0.05$ compared to the DW, ** $p < 0.01$ compared to the DW.

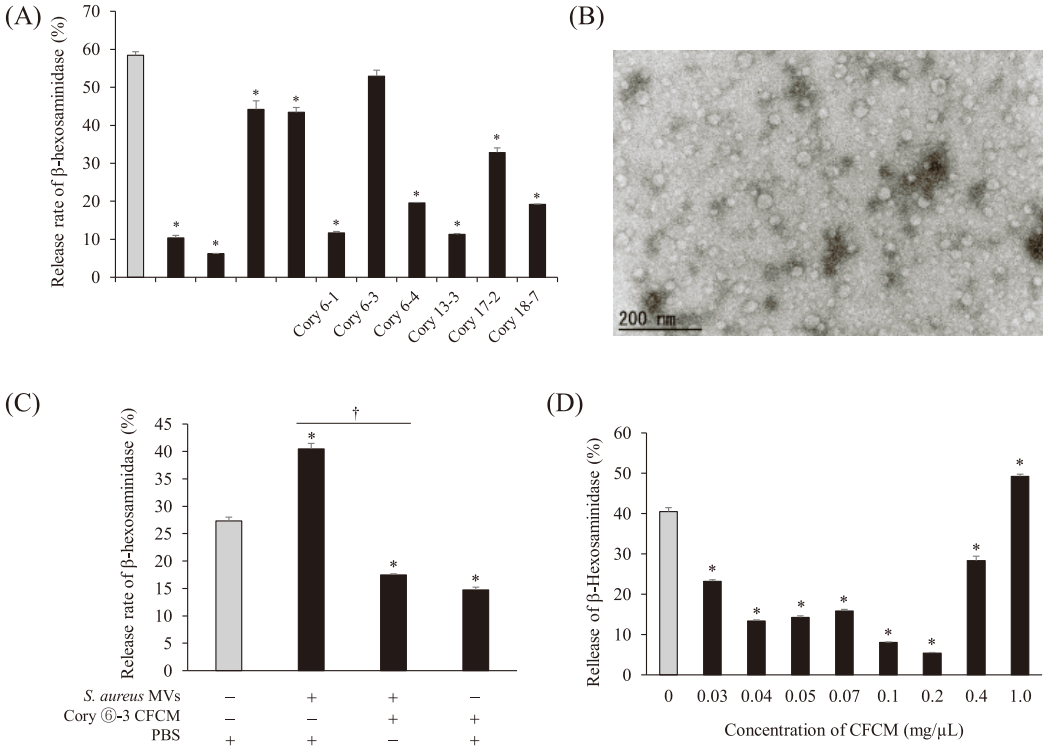



Fig. 4　Inhibitory effect of *Corynebacterium* CFCM on β-hexosaminidase release from RBL-2H3 cells.
(A) Inhibitory effect of *Corynebacterium* CFCM on β-hexosaminidase release from A23187-stimulated RBL-2H3 cells. (B) Transmission electron microscopic analysis of *S. aureus* membrane vesicles (MVs). (C) Inhibitory effect of Cory ⑥-3 CFCM on β-hexosaminidase release from *S. aureus* MVs. (D) Concentration dependence of *Corynebacterium* CFCM on inhibition of β-hexosaminidase release from *S. aureus* MVs. *represents $p < 0.01$ compared to the control. † $p < 0.01$; unpaired, two-tailed student' *s *t*-test.

CFCMの濃度を検討した。*S. aureus* MVsと共に、0、0.03、0.04、0.05、0.07、0.1、0.2、0.4および1.0mg/μLのCory ⑥-3 CFCM凍結乾燥物のPBS溶解液をRBL-2H3細胞に添加し、β-hexosaminidaseの放出率を測定した。その結果、*S. aureus* MVsと0.2mg/μLのCory ⑥-3 CFCM凍結乾燥物のPBS溶解液をRBL-2H3細胞に添加した際に、β-hexosaminidaseの放出率が最も減少した(Fig. 4(D))。一方、1.0 mg/μLのPBS溶解液をRBL-2H3細胞に添加したところ、β-hexosaminidaseの放出率が増加した(Fig. 4(D))ことから、CFCMの脱顆粒抑制には、最適な濃度が存在すると考えられた。

### 3. 4. 正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) の炎症惹起に対するCFCMの抑制作用

*S. aureus* MVsおよびCory ⑥-3 CFCMがNHEKの免疫関連遺伝子に対して与える影響を網羅的に解析するため、マイクロアレイ解析を行った。各群のサンプルデータにおいて、ratio (= fold-change) >1.7およびratio < − 0.6で発現が変動した遺伝子を抽出し、DAVIDのpathway解析に供し、有意な変動が認められる免疫応答系シグナル経路を探索したところ、TNF signaling pathwayおよびCytokine-cytokine receptor interactionが抽出された。*S. aureus* MVs添加群、*S. aureus* MVs + Cory ⑥-3 CFCM添加群およびCory ⑥-3 CFCM添加群のpathway解析結果におけるシグナル経路に含まれる遺伝子のratio (=fold-change) をTable 1に示した。CXCL1、BCL3、IL1B、TNFAIP3、IL22RA1、TNFSF10およびCD40遺伝子の発現は、*S. aureus* MVs添加群で増加し、NFκBIA (NFκB Inhibitor Alpha)遺伝子を除き、*S. aureus* MVs + Cory ⑥-3 CFCM添加群で減少した(Table 1)。

### 3. 5. CFCM中の脂肪酸のGC分析

15菌株の*Corynebacterium*分離株CFCM中に含まれる脂肪酸をGC-FIDによって分析したところ、全てのサンプルにおいて、標準物質溶液(ジクロロメタン)と内部標準物質(ラウリン酸メチル)以外に、3つのピークが検出された(Fig. 5(A))。Tuberculostearic acidの保持時間は44.7分であったが、サンプル由来の検出ピーク中に同一の保持時

Table 1　Summary of differential gene expression in normal human epidermal keratinocytes.

| Gene Accession | EntrezGene ID | Gene Symbol | *S. aureus* MVs | *S. aureus* MVs + CFCM | CFCM |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_001511 | 2919 | CXCL1 | 2.81 | 2.62 | 1.57 |
| NM_021258 | 58985 | IL22RA1 | 2.28 | 1.81 | 1.50 |
| NM_005178 | 602 | BCL3 | 1.91 | 1.40 | 1.14 |
| NM_000576 | 3553 | IL1B | 1.88 | 1.63 | 1.40 |
| NM_001270507 | 7128 | TNFAIP3 | 1.74 | 1.51 | 0.97 |
| NM_020529 | 4792 | NFKBIA | 1.71 | 1.88 | 1.16 |
| NM_001250 | 958 | CD40 | 1.71 | 1.66 | 1.45 |

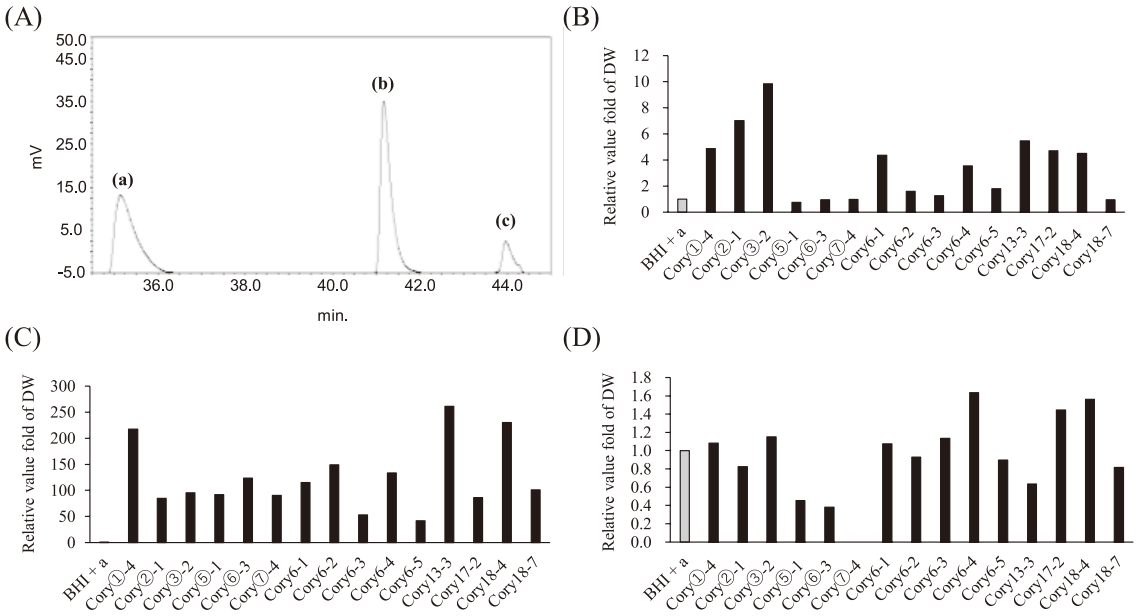



Fig. 5: GC analysis of fatty acids in CFCM from *Corynebacterium* isolate.
(A) GC-FID chromatogram of fatty acid from *Corynebacterium* CFCM (Cory ⑥-3). (a) A peak at retention time (RT) 35.0 min. (b) RT 41.1 min. (c) RT 43.9 min. (B) Comparison of relative abundances of fatty acid from *Corynebacterium* CFCM of the peak at RT 35.0 min, (C) RT 41.1 min, and (D) RT 43.9 min. Relative abundances were calculated from peak areas in gas chromatograms (n = 2).

間のものは存在しなかったことから、*Corynebacterium*分離株CFCM中に含まれる脂肪酸の中には、tuberculostearic acidは存在しないことが示唆された。

得られた3つのピークの脂肪酸について、凍結乾燥物の質量と内部標準物質のクロマトグラムによって面積値の補正を行い、BHI+α培地中に含まれる脂肪酸量を1として、*Corynebacterium*分離株CFCM中に含まれる脂肪酸量を相対比較した。各種*Corynebacterium*分離株CFCM中に含まれる脂肪酸量を相対比較したところ、菌種による差は認められなかった(Fig. 5(B)-(D))。

## 4. 考　察

*S. aureus*は、AD発症者の皮膚で異常増殖することが報告されており[1]、菌体自体やその産生物がADを悪化させることが示唆されている[2, 3]。これまでに、一部の正常ヒト皮膚常在細菌は、*S. aureus*の増殖抑制能を有し、皮膚のバリア機能に寄与することが報告されているが、ヒト皮膚細菌叢における占有率が高い*Corynebacterium*属菌[5]が*S. aureus*に与える影響については明らかになっていない。そこで、本研究では、*Corynebacterium*属菌が*S. aureus*の増殖および病原因子の発現に与える影響、さらに*S.*

*aureus*誘導性ADに対する作用について調べた。

*Corynebacterium*分離株由来CFCMを*S. aureus*に添加して培養したところ、*Corynebacterium*分離株⑥-3（Cory ⑥-3）のCFCMにおいて、*S. aureus*の培養初期段階における増殖および病原因子であるRNAIII、その下流遺伝子である*hla*および*spa*の発現を有意に抑制した。RNAIII遺伝子は、*agr*制御系遺伝子群の発現を調節している[6]ことから、Cory ⑥-3の菌体外成分がquorum sensing機構を阻害している可能性が考えられた。また、calcium ionophoresで前処理したRBL-2H3細胞に*S. aureus* MVsを添加したところ、β-hexosaminidaseの放出率が有意に増加し、脱顆粒を誘導した。一方、Cory ⑥-3のCFCMは、*S. aureus* MVsが誘導したβ-hexosaminidaseの放出を有意に減少させ、脱顆粒反応を抑制した。マイクロアレイ解析の結果、*S. aureus* MVsは、NHEKの炎症誘導関連遺伝子の発現を亢進させ、Cory ⑥-3 CFCMは、これら遺伝子の発現を有意に抑制した。これらの結果より、*S. aureus* MVsは、NHEKの炎症誘導に関連する遺伝子を増大させ、それに対して、Cory ⑥-3の菌体外成分は、*S. aureus* MVs自体に作用することで、炎症反応の増悪を抑制している可能性が示唆された。15菌株の*Corynebacterium*分離株CFCM中に含まれる脂肪酸をGC-FIDによって分析したところ、菌種による差は見られなかったことから、*S. aureus*の増殖および病原因子の発現抑制には、脂肪酸以外の物質が関与している可能性が考えられた。

## 5．総　括

本研究の成果より、ヒト皮膚常在細菌である*Corynebacterium*属菌の菌体外成分は、*S. aureus*の増殖および病原因子の発現を抑制することを明らかにした。さらに、*Corynebacterium*属菌の菌体外成分は、*S. aureus* MVsによる脱顆粒およびAD様皮膚病変の誘発を抑制することが示唆された。今後、*Corynebacterium*属菌の菌体外成分を明らかにすることにより、*S. aureus*誘導性ADに対する正常ヒト皮膚常在細菌を利用した新規スキンケア方法の開発が望まれる。

**（引用文献）**


1） Kong, H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E., Beatson, M., Nomicos, E., Polley, E., Komarow, H., Murray, P., Turner, M., Segre, J.: Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res.*, **22**: 850-859 (2012).

2） Wang, X. , Thompson, C., Weidenmaier, C., Lee J.: Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nature Commun.*, **9**: 1-13 (2018).

3） Gurung, M., Moon, D., Choi, C., Lee, J., Bae, Y., Kim, J., Lee, Y., Seol, S., Cho, D., Kim, S., Lee, J.: *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS ONE*, **6**: 1-8 (2011).

4） Kobayashi, T., Glatz, M., Amagai, A., Nagao, K.: Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* colonization drives inflammation in atopic dermatitis. *Immunity*, **42**: 756-766 (2015).

5） Grice, E., Segre, J.: The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**: 244-253 (2011).

6） Vuong, C., Saenz, L., Götz, F., Otto, M.: Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Dis.*, **182**: 1688-1693 (2000).

# アトピー性皮膚炎における新規オートファジーの関与とそれを応用した治療法開発

東京医科歯科大学難治疾患研究所
清水　重臣

We aimed to elucidate the role of autophagy in skin development. There are two types of autophagy, namely canonical autophagy and alternative autophagy, and we generated various skin-specific autophagy gene-knockout mice. Although simple knockout mice of canonical autophagy and alternative autophagy did not show any remarkable abnormalities, double-knockout (Beclin1-knockout) mice died within a day after birth owing to impairment of epidermal barrier. Furthermore, we found that Beclin 1 deficiency causes mislocalization of integrins, abnormal cell detachment of basal cells and their immature differentiation, and abnormal skin development.

We also screened a low–molecular weight compound library to identify chemicals with alternative autophagy-inducing activities and successfully identified candidate compounds. By the application of these compounds to atopic dermatitis model mice, we obtained TMD-AD129 compound which exhibited strong anti-dermatitis activity. At present, we are optimizing this compound for development as drugs.

## 1. 緒　言

ヒトの皮膚には200種以上の菌が共生しているが、皮膚には、角質層などによる「物理的バリア」、表皮角化細胞から分泌される抗菌ペプチドによる「自然免疫バリア」、細胞内に侵入した細菌を殺菌するオートファジー機構「ゼノファジー」の３種のデフェンス機構が備わっており、微生物による侵入を阻止し恒常性を保っている。しかし、宿主側の変調や微生物叢のプロファイルに変化が生じると、恒常性が破綻し（dysbiosis）、アトピー性皮膚炎などの疾患発症へとつながっていく。

オートファジー（自食現象）とは、細胞内の自己構成成分（例えば、不要なタンパク質や傷害を受けたオルガネラなど）を分解する細胞機能であり、細胞内浄化作用を有するため、その変調は様々な疾患や病態の原因となる。皮膚細胞においても、オートファジー機構は存在しており、紫外線を浴びたときなどにオートファジーが活性化されることが知られている。皮膚細胞を含めて、全ての細胞は２種類のオートファジー機構を有している。即ち、Atg5分子に依存して小胞体膜に由来する通常型オートファジーとAtg5分子を利用せずゴルジ体膜に由来する新規オートファジーである[1,2]（図1）。両者ともに、初期段階では、隔離膜と呼ばれる小さな２重膜構造物が形成される。この隔離膜は伸長すると共に湾曲し、細胞質やオルガネラを囲い込み、最終的には両端が融合したオートファゴソームができ上がる。オートファゴソームが形成されると、その後にリソソームが直接融合し、リソソームの消化酵素によってその内容物が消化される。リソソームには、カテプシンなどのタンパク質分解酵素、酸性リパーゼ、DNA分解酵素など様々な種類の消化酵素が含まれているため、内容物はほぼ完全に消化されることとなる。２種類のオートファジーは、これらのオートファジー形態に関しては、ほとんど差異が認められない。一方、２つのオートファジーは、(1)誘導する刺激の種類、(2)オートファジー膜の由来、(3)実行分子の種類、(4)分解する基質の種類が異なっており、細胞内では、全く異なる役割を果たしている[3-5]。

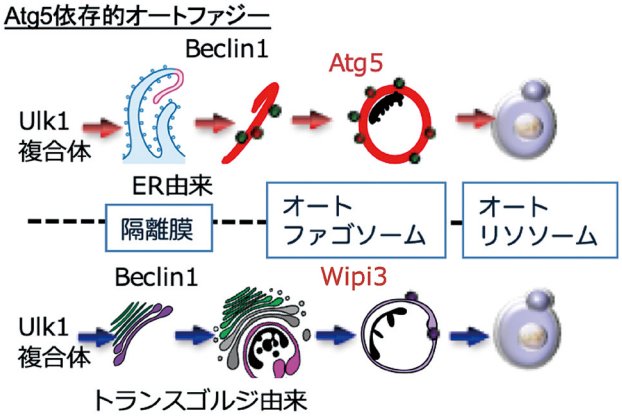



図1　全ての細胞は、Atg5依存的オートファジーと新規オートファジーの２つの機能を有している。両者は、①膜の由来、②実行分子、③分解基質を異にしている。

前述のごとく、アトピー性皮膚炎の発症には、宿主側の変調が大きく関わっているため、オートファジーの変調はその原因のひとつとなりうる。そこで、本研究では、まず皮膚においてオートファジーがどのような役割を果たしているかを明らかにした。次に、新規オートファジーを活性化できる化合物を探索して、アトピー性皮膚炎の治療への



The role of alternative autophagy in atopic dermatitis and its therapeutic use

Shigeomi Shimizu

Tokyo Medical and Dental University, Medical Research Institute

応用を目指した。

## 2. 方　法

### 2. 1. 皮膚におけるオートファジーの役割を明らかにする

**方法１：**

オートファジー分子を欠損したマウスを複数作製し、neonate ならびに adult mice においてその表現系を観察した。皮膚に異常が見られた場合には、皮膚からの水分蒸散量（TWEL）を TWEL 測定器を用いて計測した。また、皮膚の組織を採取し、免疫組織染色ならびに western blotting による解析を行った。基底細胞の分裂方向の測定には、survivin 染色法を用いた。

### 2. 2. アトピー性皮膚炎に有効な新規オートファジー誘導天然物／化合物を開発する

**方法２：**

約 20000 種類の低分子化合物と約 5000 種類の天然物から、新規オートファジー誘導化合物／天然物をハイスループットアッセイにより同定した。

ダニ抗原塗布による皮膚炎を作製し、各化合物を塗布（n=5、１日おき、200 μL 患部に塗布／匹）し、８日後に皮膚炎の程度をスコア化した。

## 3. 結　果

**課題１：皮膚におけるオートファジーの役割を明らかにする**

上記課題のために、皮膚特異的オートファジー欠損マウスを複数種類作成した[6]。

１：通常型オートファジー欠損マウス：Atg5 flox マウス、Atg7 flox マウス、Atg14 flox マウスを、それぞれ keratin 5（K5）-cre マウスと交配して、皮膚特異的通常型オートファジー欠損マウスを作製した。しかしながら、皮膚に明らかな異常を認めるマウスはなかった。

２：新規オートファジー欠損マウス：Wipi3 flox マウスを K5-cre マウスと交配して、皮膚特異的新規オートファジー欠損マウスを作製した。しかしながら、皮膚の顕著な異常は認められなかった。

３：両オートファジー欠損マウス：両方のオートファジーに共通して機能する Beclin 1 の flox マウスと K5-cre マウスと交配して、皮膚特異的両オートファジー欠損マウスを作製したところ、当該マウスはすべて生後１日以内に死亡した。また、死因は皮膚のバリア形成機構の不全による多量の水分蒸散量が原因であると思われた（図 2）。さらに、皮膚の詳細な解析を行ったところ、K5 の発現量が多い一方、K10 や Filaggrin の発現量が低く、基底層からの皮膚細胞分化に異常があることが判明した（図３）。

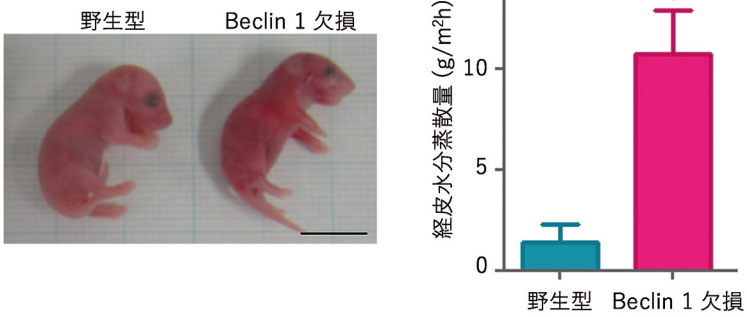



図２：皮膚特異的Beclin1欠損マウスは、皮膚のバリア形成機構の不全によって、水分蒸散量が多く、生後1日以内に死亡した。

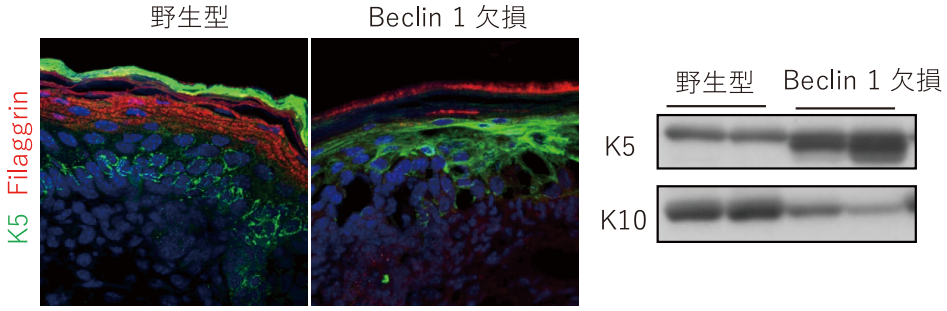



図3　皮膚特異的Beclin1欠損マウスは、K5の発現量が多く、一方、K10の発現量やFilaggrinの発現量が低く、基底層からの皮膚細胞の分化に異常があることが判明した。

このため、基底層細胞の分裂方向を、Survivin染色にて観察したところ、正常よりも垂直方向の分裂が多く、細胞が十分に分化しないまま基底層から上層に上がっているものと思われた(図4)。また、この原因が細胞接着に機能するインテグリンの局在異常に起因する可能性が考えられた。即ち、本来細胞膜に存在して細胞外マトリックスと結合するインテグリンが細胞内にとどまっていたため、これが原因であると思われた(図5)。

以上より、皮膚において、2つのオートファジーは代償しながら、基底細胞の細胞分化を正常に保っていること、これにより、正常な皮膚が形成されることが明らかとなった。

**課題2**：約20000種類の低分子化合物と約5000種類の天然物を新規オートファジーモニター細胞に投与し、ハイスループットスクリーニングにて、約110種類の新規オートファジー誘導化合物／天然物を見いだした(図6)。

ビオスタAD誘発NC/Ngaマウス皮膚炎モデルを作製

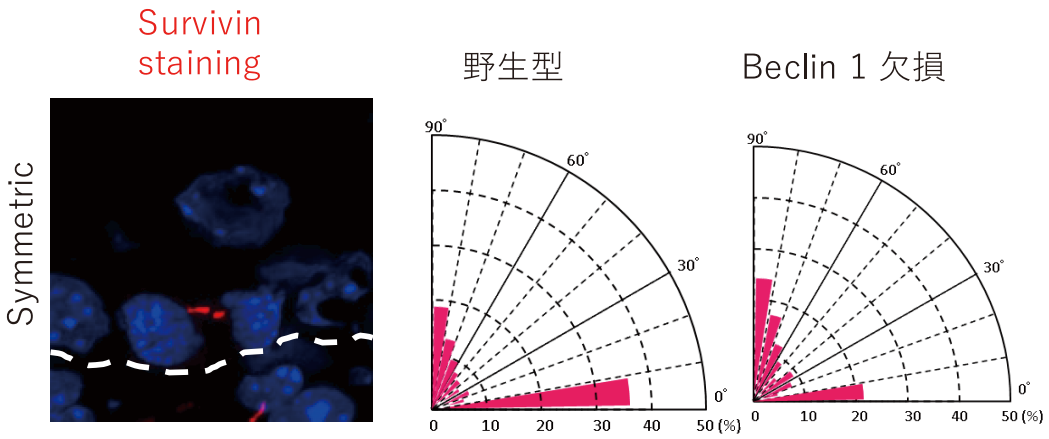



図4　Survivin染色により、基底層細胞の分裂方向を解析したところ、皮膚特異的Beclin1欠損マウスでは、水平方向より垂直方向の分裂が多く、未分化のまま上層に上がっていることが示された。

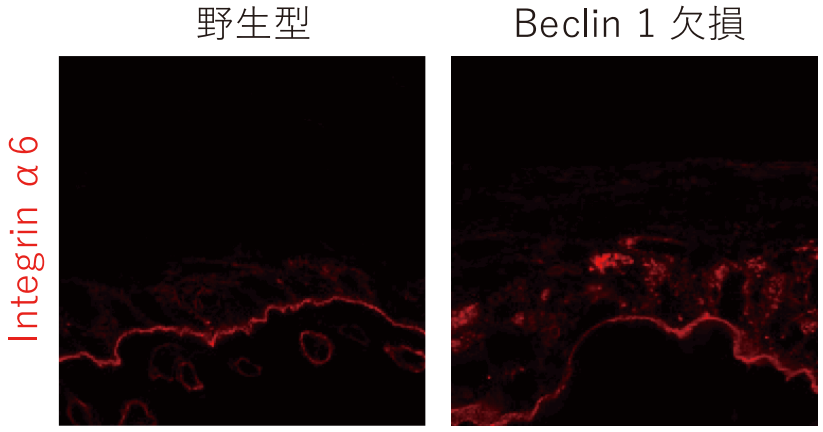



図5　皮膚特異的Beclin1欠損マウスでは、インテグリンの局在が異常であった。

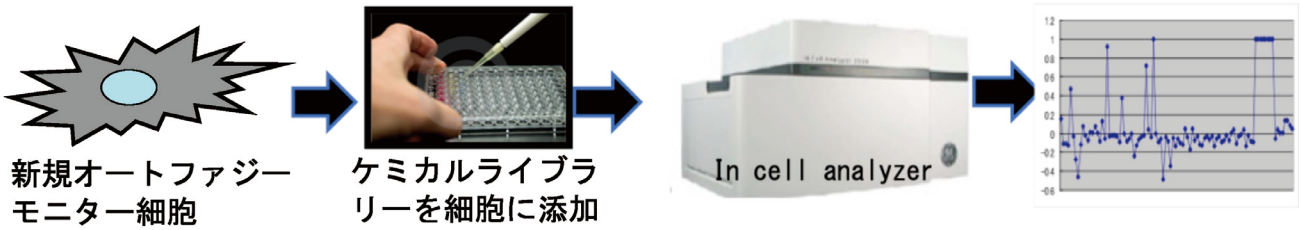



図6　ハイスループットを用いた新規オートファジーの計測

新規オートファジーモニター細胞に化合物ライブラリーを投与して、その後の、新規オートファジー誘導をCell Imagerで定量測定する。

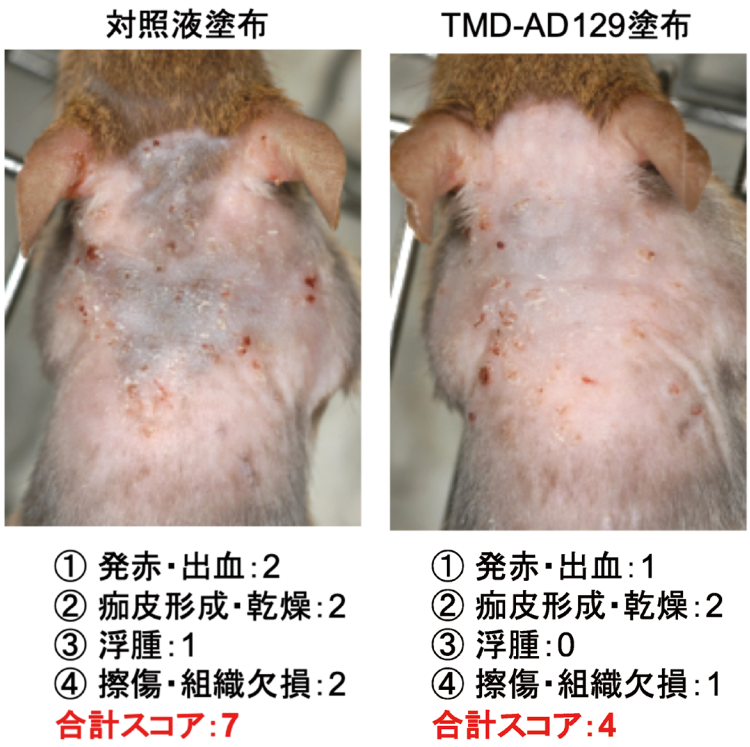



図7 TMD-AD129を隔日に塗布したマウスは皮膚炎が改善した。

し、各化合物(200μL)を隔日に塗布し、8日目に皮膚の性状をスコア化した。その結果、化合物TMD-AD129を塗布したマウスにおいて、皮膚炎の顕著な改善を認めた(図7)。また、このマウスにおいては、脾臓の重量も0.1032 ± 0.032g(対照は0.142 ± 0.024g)と腫大が顕著に抑えられていた。

これらの結果より、新規オートファジー誘導化合物の塗布により、アトピー性皮膚炎が改善することが示された。

## 4. 考　察

本研究によって、皮膚形成を正常に行うために、2つのオートファジーが代償的に機能していること、その主な機序が、インテグリンの細胞膜への局在制御によることが明らかとなった。新規オートファジーは、ゴルジ体から細胞外あるいは細胞膜にタンパク質を輸送する際に、その量の調節を行っている。即ち、過剰な分子が輸送されようとするときに、新規オートファジーが活性化されて、これらを分解するのである。皮膚においては、インテグリンが新規オートファジーの分解基質となっているため、新規オートファジーが破綻すると、インテグリンが細胞内に異常に蓄積する(図5)。すると、新たなインテグリンが合成されずに細胞膜上のインテグリン量が減少し、細胞接着性が低下するものと考えられる。さらに、細胞接着性が低下すると、未分化細胞が分化されないまま脱接着して上層に上がり(図4)、皮膚の形成不全が起こる(図1)ものと考えられた。新規オートファジーの機能不全は通常型オートファジーによって代用されうるので、両者のオートファジーを欠損させたときにのみ皮膚形成異常が出現するものと考えられる。

このように、オートファジーは皮膚形成に関わっているために、皮膚炎等の病態においても何らかの関与があるものと思われた。実際に、アトピー性皮膚炎の皮膚に新規オートファジー誘導化合物を塗布することによって、劇的な皮膚症状の改善ならびに脾臓重量の改善が認められている。今後、インテグリンの局在を含めて、新規オートファジー誘導化合物の作用メカニズムを明らかにすることが重要である。

## 5. 総　括

本研究により、2つのオートファジーは代償しながら、正常な皮膚形成に機能していることが明らかとなった。また、新規オートファジーの誘導により、アトピー性皮膚炎の改善が期待できることが明らかとなった。

**謝　辞**

本研究の遂行にご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に篤く御礼申し上げます。

**(引用文献)**

1) Nishida, Y.; Arakawa, S.; Fujitani, K.; Yamaguchi, H.; Mizuta, T.; Kanaseki, T.; Komatsu, K.; Otsu, K.; Tsujimoto, Y.; Shimizu, S. *Nature* **2009**, *461*, 654-658.
2) Honda, S.; Arakawa, S.; Nishida, Y.; Yamaguchi, H.; Ishii, E.; Shimizu, S. *Nature Commun.* **2014**, *5*, 4004.
3) Yamaguchi, H.; Arakawa, S.; Kanaseki, T.; Miyatsuka,T.; Fujitani,Y.; Watada,H.; Tsujimoto,Y.; Shimizu, S. *EMBO J.* **2016**, *35*, 1991-2007.
4) Torii, S.; Yamaguchi, H.; Nakanishi, A.; Arakawa, S.; Honda, S.; Moriwaki, K.; Nakano, H.; Shimizu, S. *Nature Commun.* **2020**, *11*, 17544.
5) Yamaguchi, H.; Honda, S.; Torii, S.; Shimizu, K.; Arakawa, Katoh, K.; Miyake, K.; Miyake, N.; Fujikake, N.; Sakurai, H.; Arakawa, S.; Shimizu, S. *Nature Commun.* **2020**, *11*, 5311.
6) Noguchi, S.; Honda, S.; Saitoh, T.; Matsumura, H.; Nishimura, E.; Akira,S.; Shimizu, S. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 37.

# 皮膚付属器官を有する三次元再生皮膚器官系の開発

国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センター
武尾　真

The skin plays essential roles in temperature control, barrier, bacteriostatic action, buffering action, and excretory action. Three-dimensional (3D) human skin equivalents (HSEs) are widely used for researches in the field of cosmetology and skin care biology as alternative model for animal experiments. However, the conventional HSE has quite simple structure consists of epithelium and dermis, and can partially mimics the physiological function of natural skin due to the lack of skin appendages such as hair follicles, sebaceous glands, and sweat glands.

In this study, we aimed to develop a three-dimensional regenerated skin organ system with the same tissue structure and function as the natural skin. To this end, 1) we developed a novel HSE that maintains the normal ECM and cellular alignment observed in the natural skin in accordance with tension by reproducing tensional homeostasis. 2) We established a technology to regenerate mature hair follicles *in vitro* and succeeded in constructing a skin organ system (Bioskin) *in vitro* by incorporating the mature hair follicles into functional three-dimensional human skin. This Bioskin was able to maintain hair shaft growth, demonstrating usefulness of the Bioskin as an *in vitro* evaluation model that have similar function as a natural skin organ system. Our study will provide the basic technology and novel skin model not only for cosmetology but also for clinical field.

## 1. 緒　言

皮膚は表皮層、真皮層、皮下脂肪層の三層から成り、さらに毛包や汗腺、皮脂腺などの皮膚付属器が複雑に三次元配置された「器官系」であり、温度調節機能、バリア機能、静菌・緩衝作用、排泄作用などを有し生体の恒常性の維持において重要な役割を担っている。このため、スキンケアやコスメトロジーにおける研究開発においては、安全性は当然のことながら、機能性の評価が重要となってくる。現在欧州を中心に研究開発における動物実験の縮小を求める社会的需要が世界的に普及しつつあり、動物実験代替法として三次元培養ヒト皮膚モデルが広く用いられている。しかしながら、従来のヒト皮膚モデルは上皮と真皮という非常に単純な構造であり、正常ヒト皮膚に存在する毛包・皮脂腺・汗腺などの皮膚付属器や皮下組織が存在せず、構造的、機能的に不十分なモデルである（図1）。一方、より生体に近い条件での安全性、有効性の試験のために国外から輸入したヒト生体皮膚もしくは死体皮膚が使用されているが、個体差に起因するロット間差や皮膚の絶対量の不足などの問題がある。これまでに本研究グループは、三次元的な細胞操作技術である「器官原基法」を開発し、幅広い器官再生の研究に道を拓いた[1]。この再生した器官原基を歯や毛髪、分泌腺を失った部位に移植することにより、完全な歯や毛髪、分泌腺が発生し、生体器官と同じように機能することを実証した[2-5]。また、iPS細胞から作製した胚様体から毛包や皮脂腺を含む皮膚器官系を再生する技術を世界に先駆けて開発した[6]。そこで本研究課題ではこれらの技術を応用し、人工皮膚に生体外で発生させた毛包や皮脂腺を組み込み、生体の皮膚と同等の構造と選択透過性や径毛穴透過性などの機能を有する三次元再生皮膚器官系（バイオスキン）を構築することを目的とした。本研究の成果としての天然皮膚と同等の構造と機能を持つ次世代三次元人工皮膚モデルは、動物実験代替法としてより生体に近い状態での安全性試験を行うことを可能とするだけではなく、これまでの人工皮膚モデルでは不可能であった機能性、有効性の評価も可能とし、コスメトロジーの発展に大きく寄与すると期待できる。

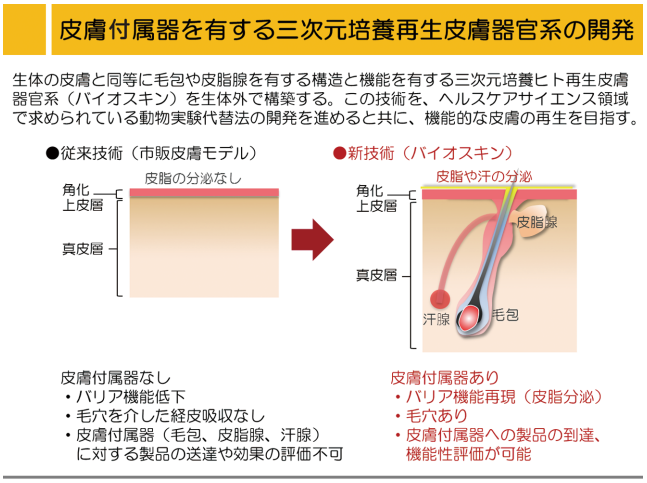



図1　皮膚付属器を有する三次元再生皮膚器官系の構築



Development of regenerative skin organ system with skin appendages

Makoto Takeo

RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research

## 2. 方　法

### 2. 1. 実験動物

C57BL/6Nマウスは、日本SLC株式会社より購入した。また、この研究は理化学研究所神戸支部施設内動物管理使用委員会によって承認されたプロトコールに従って実施した。

### 2. 2. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞（NHEK；Kurabo, Osaka, Japan）、ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF；Kurabo）は37℃、5% $CO_2$ 環境下でそれぞれの専用培地（Humedia-KG2, 10% FBS, 1% Penstrep, 10ng/mL bFGF含有DMEM）を用いて培養を行い、皮膚モデルの作製に供した。

### 2. 3. 人工皮膚モデルの作製

THSモデル；コラーゲン溶液（KOKEN, Tokyo, Japan）に異なる濃度のNHDFをそれぞれ混合し、カルチャーインサート（Corning, NY, USA）に積層し固化させた（Dermal equivalent, DE）。これをSnapwellインサート（Corning）に挟み込み、上層にNHEKを播種した。4日間浸漬培養後、7日間気相培養を行った。TRSモデル；THSモデルと同様に細胞を播種し、気相培養4日目にSnapwellインサートから外し、さらに3日間気相培養した。Bell型モデル；コラーゲン溶液にNHDFを混合し固化させた後7日間浮遊培養し収縮させた。その後上層にNHEKを播種し4日間浸漬培養後、7日間気相培養を行った。（図2）

### 2. 4. 再構成原基の作製および生体外培養

E18胎児皮膚由来上皮細胞および間葉細胞、もしくは、成体マウスヒゲ由来バルジ領域上皮細胞および初代培養毛乳頭細胞を用いて「器官原基法」により再構成原基を作製した。これらをカルチャーインサート上に置き、専用培地にて培養を行った（図3）。

### 2. 5. 組織学的解析

作製した人工皮膚を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィンまたはティシュー・テック O. C. T.コンパウンド（Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan）に包埋した。パラフィン組織切片（10μm厚）を作製後、HE染色を行い、Axio Scan.Z1（Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）にて撮影した。また、パラフィン組織切片（10μm厚）または凍結組織切片（10μm厚または50μm厚）を作製後、免疫染色を行い、LSM780共焦点顕微鏡（Carl Zeiss）にて撮影した。

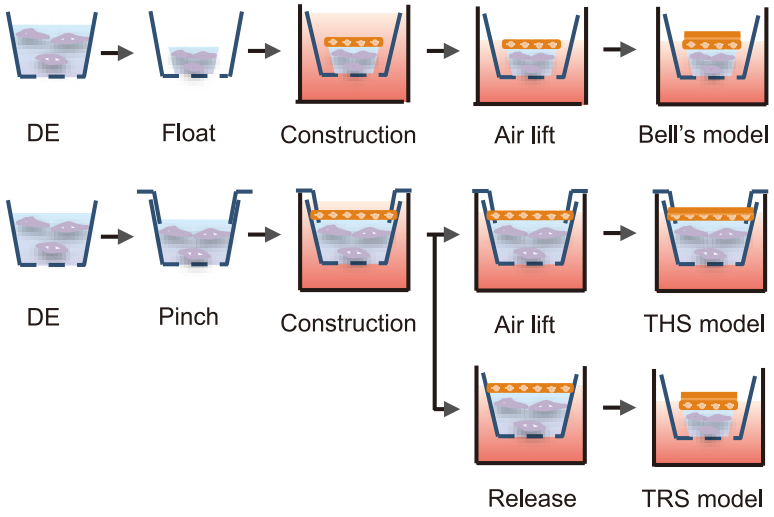



図2　皮膚モデル作製方法の概略図

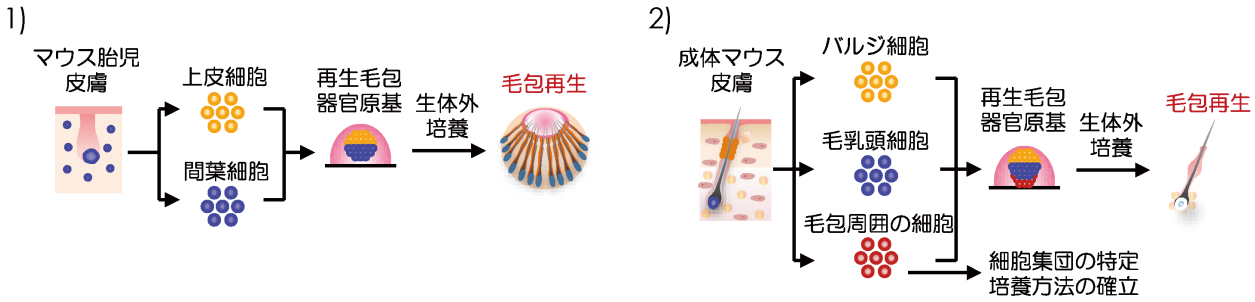



図3　再構成原基作製方法の概略図

### 2. 6. バリア機能測定

表皮バリア機能はOECDテストガイドラインに従って評価した。各濃度のSDS溶液を人工皮膚表面に1時間塗布し、24時間培養後の細胞生存率をMTTアッセイにより評価した。TEER測定は、EndOhm（World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA）を用いて行った。TEWL測定は、VAPO SCAN system（ASAHI BIOMED, Kanagawa, Japan）を用いて行った。

### 2. 7. 遺伝子発現解析

RNeasy Plus Mini kit（QIAGEN, Venlo, Netherlands）を用いて人工皮膚からRNAを抽出し、SuperScript VILO（Thermo Fisher Scientific, MA, USA）を用いてcDNAを合成した。Real-time PCRは、Applied Biosystems Quant Studio 12K Flex（Thermo Fisher Scientific）を用いて行った。

## 3. 結　果

### 3. 1. 張力均衡型人工皮膚の構築および構造評価

はじめに、バイオスキンの土台となる機能的人工皮膚の構築を行った。皮膚は圧迫や引張といった外的な力だけでなく、組織内部で細胞同士がコラーゲン線維を介して引っ張り合うことで生じる内的な力も存在し、これらの張力が均衡した状態にある。この張力の均衡は機械的ストレス信号を介して皮膚器官の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしている[7]。従来のBell型モデルは、コラーゲンゲル中に線維芽細胞を播種した後に浮遊培養し、線維芽細胞の収縮力による人工真皮の収縮がコラーゲン線維の再編成を促すとされてきた。しかし、従来のこの工程は切除皮膚同様に組織全体が収縮しており、張力均衡は喪失している。そこで、コラーゲンゲル中に線維芽細胞を播種した後、すぐにSnapwellインサートに人工真皮を固定することにより、横方向の牽引力バランスを再現する張力恒常性皮膚モデル（Tensional Homeostasis Skin model ; THS モデル）を構築した。このTHSモデルは、培養中に容器から切り離されると天然皮膚同様に収縮する（Tension Release Skin model ; TRS モデル）ことから、張力均衡の再現が示された（図4A）。線維芽細胞の三次元的な形態とコラーゲン線維を比較すると、天然皮膚やTRSモデルは張力方向に配向性をもって引張された形態をとるのに対し、Bell型モデルやTRSモデルではその配向性を失っていた（図4A）。さらに、THSモデルでは、表皮細胞層が分化し、気層培養から7日目には、ケラチン5（KRT5）、ケラチン10（KRT10）、フィラグリン（FLG）、クローディン1（CLDN1）などのケラチノサイト分化マーカーの局在が表皮層で観察され、天然皮膚と同様に基底層、有棘層、顆粒層、角質層の細胞層に組織化されていることが確認された（図4B）。

### 3. 2. 張力均衡型人工皮膚の皮膚機能評価

次に、THSモデルとTRSモデル、Bell型モデルの皮膚機能を比較評価した。化学物質の安全性評価項目の一つであるSDS塗布による皮膚一時刺激性評価では表皮バリア機能については、THSモデルは従来モデルと同レベルの細胞生存率、TEWL値、TEER値を示した（図5A-D）。また、フルオレセインを使用した局所投与試験では、PBS塗布群と比較するとSDS塗布群ではフルオレセインの表皮層への劇的な拡散が見られた（図5E, F）。これらの結果から、THSモデルは既存の人工皮膚モデルと同様のバリア

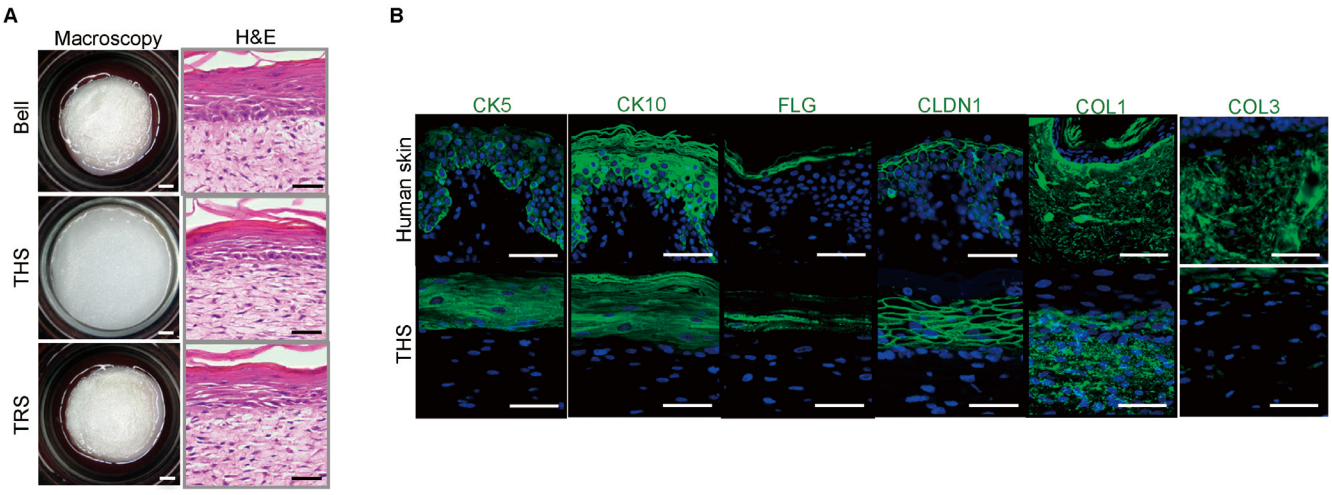



図4　張力均衡型人工皮膚の構造

A. 各人工皮膚モデルの実体像およびHE染色像、Scale bars, 1mm（実体像）or 50μm（HE染色像）
B. 天然ヒト皮膚およびTHSモデルの免疫染色像、Scale bars, 50μm

機能試験に使用することができることが示された。

次に真皮機能として、線維症や老化に伴うしわ、たるみの形成に重要な役割を果たす細胞外基質関連タンパク質の遺伝子発現と線維形成を評価した。その結果、THSモデルではコラーゲン・エラスチン線維形成機能の向上が確認された（図6A）。更に、老化に伴う真皮細胞外基質の減少に対して効果的とされるレチノイン酸誘導体（ATRA）を各人工皮膚に添加したところ、THSモデルにおいて顕著なコラーゲンおよびヒアルロン酸合成遺伝子の発現促進とコラーゲン線維の形成促進が確認された（図6B）。この薬物に対する応答性は、内服・血中投与を想定した培地への薬物添加だけでなく、外用剤塗布を想定したローション製剤の塗布によっても確認された（図6C）。以上の結果から、THSモデルは既存の人工皮膚と比較し、より生体に近い機能性を有することが示された[8)]。

### 3. 3. 毛包の生体外培養方法の構築

皮膚器官系の生体外での再構築に向けて、生体外培養において成熟毛包を再生する技術の確立を行った。初めに、マウス胎児皮膚由来細胞を用いて「器官原基法」により再生毛包原基を作製し、生体外で発生させる培養条件の検討を行った。その結果、毛包発生時に作用するサイトカインシグナルの制御下で培養することにより、再生毛包原基の初期発生誘導から成長期VI期の毛包にまで成熟させること

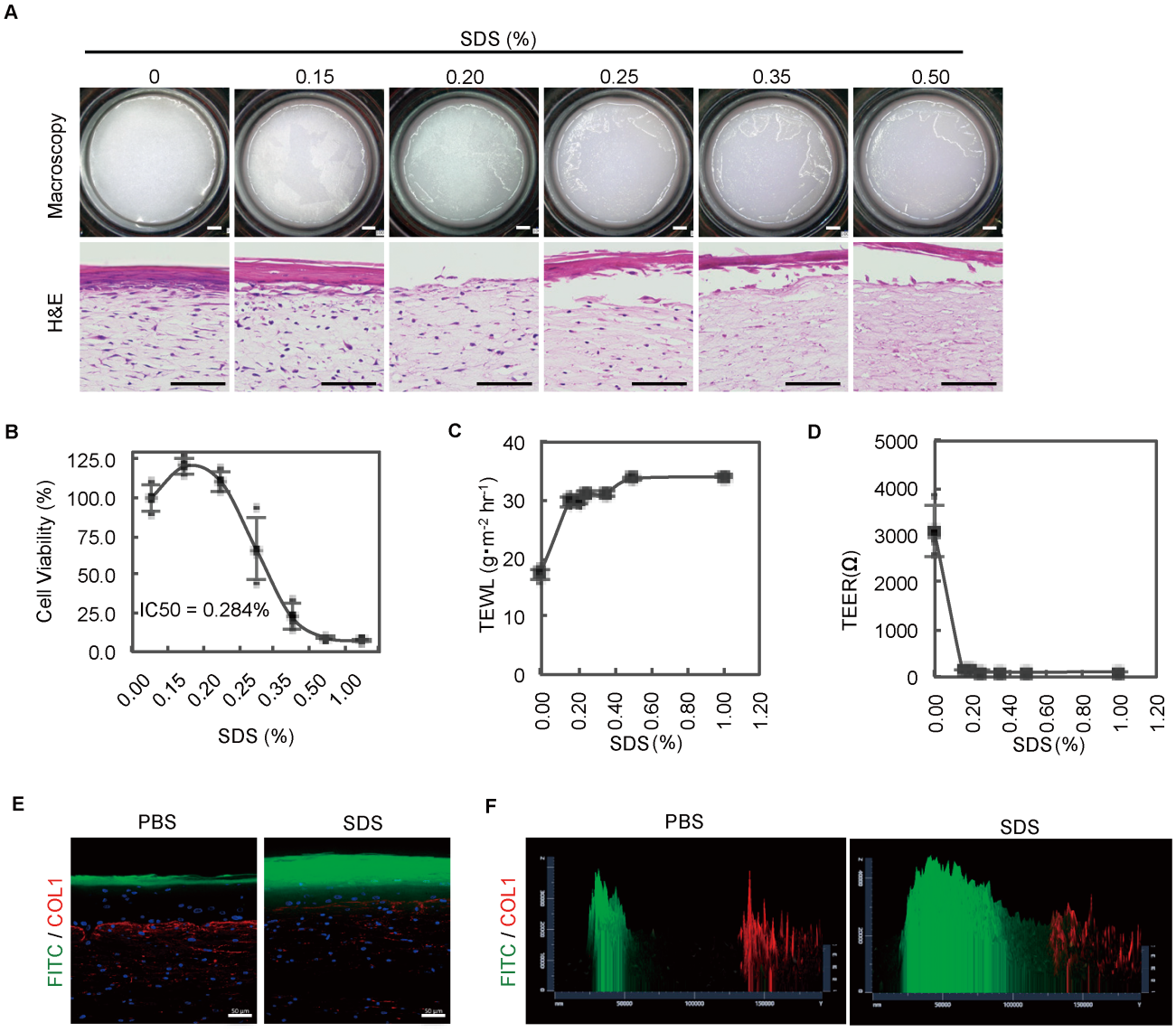



図5　THSモデルの皮膚バリア機能の解析

A–D. SDSを用いた皮膚刺激性試験　A. 実体像およびHE染色像、Scale bars, 1 mm（実体像）or 50 µm（HE染色像）
B. 細胞生存率　C. TEWL分析　D. TEER分析　E. F. フルオレセインを用いた局所投与アッセイ 垂直断面の共焦点画像(E)、2.5D強度プロット(F) Scale bars, 50 µm

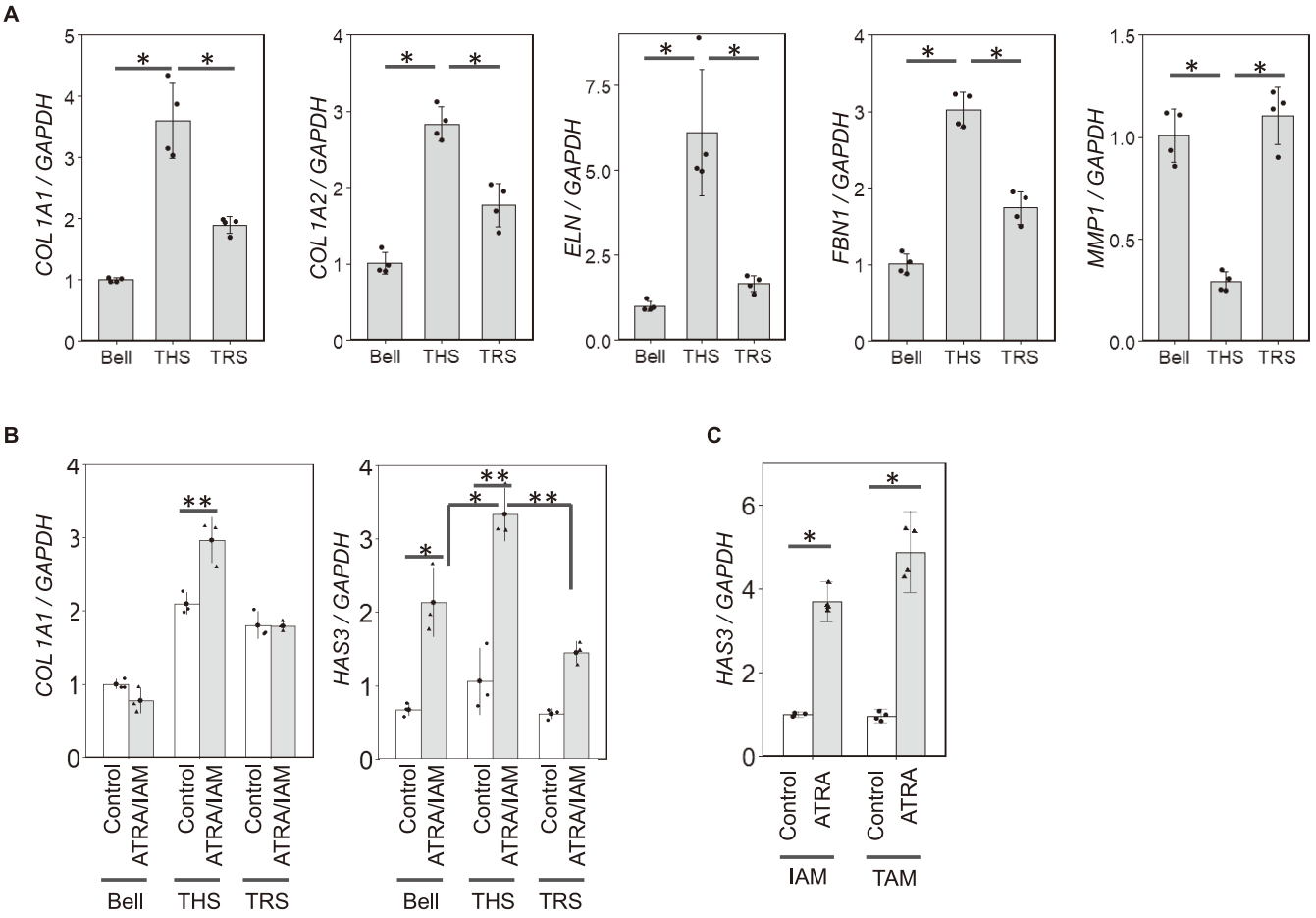



図6　THSモデルの真皮機能の解析
A. 真皮ECM関連タンパク質のReal-time PCR解析　B. C. 人工皮膚モデルのATRAに対する反応性
試験、IAM ; the intravenous administration model、TAM ; the topical application model

に世界に先駆けて成功した。さらに、これまでに生体外増幅に成功している毛包間葉性幹細胞である毛乳頭細胞と毛包上皮性幹細胞を用いて作製した成体マウスヒゲ由来再生毛包原基の初期発生も同様に誘導可能であり、間葉系幹細胞を毛包周囲に配置することにより、成長期VI期まで成熟することが明らかとなった。

次に、3. 1. で作製した機能性三次元人工皮膚に成体マウス由来成熟再生毛包を組み込んだところ、再生毛の上皮組織と人工皮膚の表皮組織が接続し、毛幹が伸長し、健全な毛包組織が維持されていたことから、成体由来体性幹細胞を用いた生体外人工皮膚器官系(バイオスキン)構築に向けた概念が実証された。

## 4. 考　察

本研究において、三次元人工皮膚に張力を付加することにより、天然皮膚に近い組織構造と生体反応を示すことが明らかとなり、組織および器官の機械的刺激が組織・器官構造と機能発現に重要な役割を果たしていることが示された。また、胎児性および成体組織幹細胞を用いて生体外で毛包を発生させることに世界で初めて成功し、この毛包を人工皮膚へ組み込むことによって長期的な毛幹形成が認められ、バイオスキンの概念が実証された。

近年、化粧品・ヘルスケア業界では科学的根拠に基づく製品開発への期待と関心が高まっている。しかしながら動物実験の規制や動物実験代替法が十分でなく、機能評価可能な人工皮膚の開発に期待が寄せられている。しかし、これまで組織再生によって構築された皮膚は正常ヒト皮膚に存在する毛包・皮脂腺・汗腺などの皮膚付属器や皮下組織が存在せず、不完全な皮膚構造であり、十分な高度化がなされていないという現状にある。本研究課題における成果により、これまで克服できなかった組織からの器官再生、さらに皮膚付属器である毛包を有する三次元人工皮膚器官系の再生が達成可能であることが示された。また、本研究において得られた既存の人工皮膚に様々な付属器官や細胞を組み込むための技術と知見は、樹状細胞や活性型肥満細胞、抗原特異的リンパ球などの組み込みを可能とし、皮膚

炎やアクネ菌感染モデル、非アレルギー性皮膚炎モデル、アレルギー性皮膚炎モデルなど、研究のニーズに応じた様々な評価系へとカスタマイズできる可能性を示しており、コスメトロジーのみならず医薬品分野を含む多くの研究分野の進歩・発展において、多大なる貢献が可能であると期待される。今後は、皮膚器官系としての機能評価および生体外評価モデルとしての機能評価を行い社会実装を目指す。

**謝　辞**

本研究を遂行するにあたりご支援を頂きました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に感謝いたします。

**（引用文献）**

1）Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T. The development of a bioengineered organ germ method. *Nature Methods* **4**, 227–230 (2007)

2）Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, MizunoM, Kasugai S, Tsuji T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 13475–80 (2009)

3）Toyoshima K, Asakawa K, Ishibashi N, Toki H, Ogawa M, Hasegawa T, Irie T, Tachikawa T, Sato A, Takeda A, Tsuji T. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nature Commun.* **3**, 784 (2012)

4）Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Ikeda K, Shimmura S, Kawakita T, Tsubota K, Tsuji T. Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nature Commun.* **4**, 2497 (2013)

5）Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Nakajima K, Hirayama M, Tachikawa T, Tsuji T. Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nature Commun.* **4**, 2498 (2013)

6）Takagi R, Ishimaru J, Sugawara A, Toyoshima K, Ishida K, Ogawa M, Sakakibara K, Asakawa K, Kashiwakura A, Oshima M, Minamide R, Sato A, Yoshitake T, Takeda A, Egusa H, Tsuji T. Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an *in vivo* transplantation model. *Sci. Adv.* **2**, e1500887 (2016)

7）Hsu CK, Lin HH, Harn HIC, Hughes MW, Tang MJ, Yang CC. Mechanical forces in skin disorders. *J. Dermatol. Sci.* **90**, 232–240 (2018)

8）Kimura S, Tsuchiya A, Ogawa M, Ono M, Suda N, Sekimoto K, Takeo M, Tsuji T. Tissue-scale tensional homeostasis in skin regulates structure and physiological function. *Commun. Biol.* **3**, 637 (2020)

# 常在菌フローラ育成を目指す
# 肌表面微小環境応答性ポリアミノ酸の開発

東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所
武元　宏泰

Skin flora plays an essential role in skin health conditions. Conventional cosmetic strategies can deliver nutrients to the flora, which often facilitates the growth of not only beneficial bacteria but also bad bacteria. In the present study, a new methodology that delivers the nutrients to beneficial bacteria for the selective growth was developed. In design, glucose as a nutrient was conjugated with poly (amino acid) side chains via boronic ester. Thus, the developed system can release glucose in response to weakly acidic pH, which is suitable for the growth of beneficial bacteria. In fact, incubation of the developed polymer system at pH 5 facilitated the release of glucose payload relative to the incubation at pH 8. Ultimately, when *Staphylococcus epidermidis* was selected as a beneficial bacterium, the growth was selectively accelerated in the presence of the developed polymer at pH 5, relative to the conditions at pH 8 which is suitable for the growth of bad bacteria. The obtained results suggest that the developed polymer system potentially achieves the selective growth of beneficial bacteria for good skin health conditions.

## 1. 緒　言

表皮常在菌は肌表面の環境構築を司るため、その健全な育成は肌の保湿や肌荒れ防止へと直結する。実際に、荒れた肌表面での善玉菌の比率を大きくすることで、肌の保湿能力や肌荒れを改善できる[1]。これに関し、表皮常在菌は肌表面に均一に分布するわけではなく、種々の外的要因（pHや栄養物質量等）に応じて異なる集団を形成するため、善玉菌と悪玉菌の数や比率（肌常在菌フローラ）は微小領域ごとに異なると考えられる。そこで本研究では、肌表面の環境の差異に応じて最適な作用を発現する機能性分子（アミノ酸ベース）の開発を通じて、肌常在菌フローラの局所制御を通じた理想的な育成を目指す。具体的には、機能として「善玉菌環境選択的な栄養補充」が組み込まれた分子を開発する（図1）。

肌常在菌フローラの育成には適したpH環境と栄養補充が有用だと考えられる。既存の方法論でpH調整は可能なものの、栄養補充においては多くがオリゴ糖を用いるため善玉菌（代表的には*Staphylococcus epidermidis*）だけでなく悪玉菌（代表的には*Staphylococcus aureus*）への栄養供給が懸念される。そこで本研究では、細菌に取り込まれづらい高分子にオリゴ糖が担持された構造体を着想した。ポリエチレングリコール（PEG）を有する高分子はPEGの排除体積効果のために細胞に取り込まれづらい[2]。さらに、善玉菌が好む弱酸性pHにおいてオリゴ糖が徐放されるように設計することで、悪玉菌が多く存在する領域ではpH上昇に伴ってオリゴ糖放出が阻害される。このような方針のもとに、「善玉菌選択的な栄養補充」を可能とする高分子の開発を着想した。PEGを開始剤としたNCA重合法によりポリアミノ酸誘導体を作成し、側鎖改変によりオリゴ糖を導入する。オリゴ糖の導入には酸性条件選択的に開裂するボロン酸エステル構造を採用した。ボロン酸はジオール構造と可逆的なエステル形成を行うが、ボロン酸エステルはpH7以下にて速やかに加水分解し、ジオール誘導体が放出される[3]。これに関し、常在菌の育成に有用なオリゴ糖の多くはジオール構造を含む。そのため、善玉菌育成に適したpH約5でオリゴ糖の放出の加速が期待される。本研究では、善玉菌の生育に適したpH環境では栄養を補充し、善玉菌選択的な育成を促すことで、肌表面の理想的な常在菌フローラを構築するための手法を提案する。

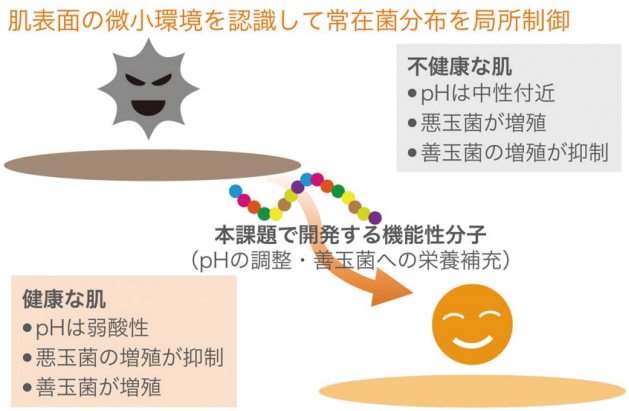



図1　皮膚付属器を有する三次元再生皮膚器官系の構築

## 2. 方　法

### 2. 1. ポリアミノ酸誘導体の合成

反応手法は図2に従った。MeO-PEG-$NH_2$（分子量10,000）



The development of poly(amino acid) that recognizes microenvironment of skin for healthy growth of skin flora
Hiroyasu Takemoto
Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology

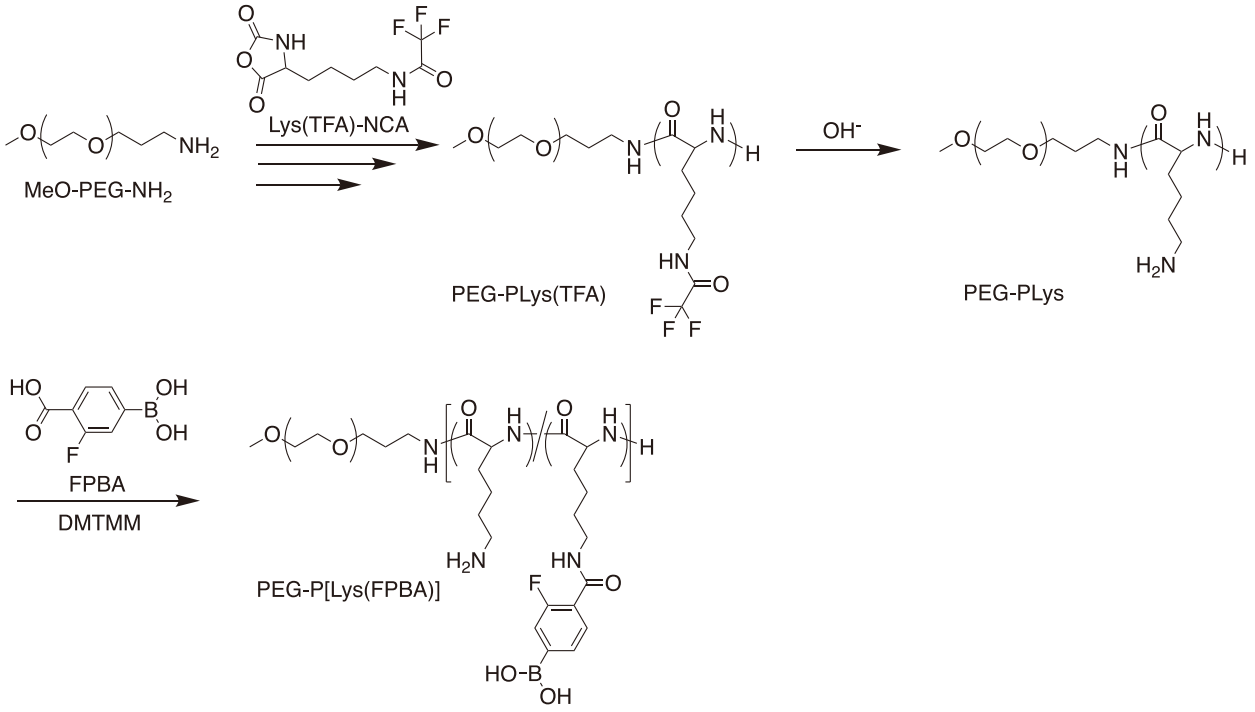



図2　高分子の合成スキーム

とLys（TFA）-NCAとをDMSO中で混合した。反応溶液は室温にて3日間撹拌し、ジエチルエーテルに対して再沈殿を行った。得られたPEG-P（Lys-TFA）はメタノール／5M NaOH aq.（4/1、v/v）に再溶解し、室温にて一晩撹拌した。0.01 M HClでの透析、純水での透析の後に凍結乾燥を行い、PEG-PLysを白色粉末として得た。

PEG-PLysへのボロン酸の導入は脱水縮合反応にて実施した。PEG-PLysとFPBA、DMTMMをMeOHと50mM炭酸バッファーの混合溶液（1/1、v/v、pH 8.5）に溶解し、一晩撹拌した。反応溶液は0.01 M HCl、純水にて透析した後に凍結乾燥を行うことで、PEG-P［Lys（FPBA）］を白色粉末として得た。

### 2. 2. 善玉菌を育成するための糖のスクリーニング

*Staphylococcus epidermidis*を培地にて培養する際、50 mMのグルコース、グルコサミン、スクロース、ラクトースを添加し、*Staphylococcus epidermidis*の増殖を観察した。*Staphylococcus epidermidis*の培養液中の量は600 nmでの濁度にて測定した。

### 2. 3. グルコース放出のpH応答性

PEG-P（Lys-$FPBA_{20}$）$_{40}$に対して20倍量のグルコースを混合し、50mMの酢酸バッファー（pH5.0）あるいはトリスバッファー（pH8.0）に対して透析した。定期的に外液を採取し、外液に含まれるグルコース量をグルコース定量キット（BioVision）にて測定した。

### 2. 4. 高分子に基づく善玉菌の増殖促進試験

PEG-P（Lys-$FPBA_{49}$）$_{100}$に対してグルコースを49倍量混合し、*Staphylococcus epidermidis*を培地にて培養する際に添加した。この際、培地のpHを5.0あるいは8.0とした。定期的に培地中の*Staphylococcus epidermidis*量を600nmの濁度にて測定した。

## 3．結　果

### 3. 1. ポリアミノ酸誘導体の合成

PEG-PLysを$^1$H NMR解析すると、そのPLys鎖由来のプロトン強度からLys重合度は40のものと100のものの2種類の合成に成功した。続けて、PEG-P［Lys（FPBA）］とした後に$^1$H NMR解析すると、FPBA由来のプロトン強度より、PLys鎖への導入率はそれぞれ50%であった。これ以上FPBA導入率を上げると水溶性が著しく低下するため、本研究ではこの導入率を採用した。結果として、PEG-P［Lys（FPBA）$_{49}$］$_{100}$とPEG-P［Lys（FPBA）$_{20}$］$_{40}$との2種類のポリアミノ酸誘導体の合成に成功した。

### 3. 2. 善玉菌を育成するための糖のスクリーニング

善玉菌を増殖するのに適した糖成分を選別するために、グルコース、グルコサミン、スクルース、ラクトースを添加した際の*Staphylococcus epidermidis*の増殖を評価した（図3）。ここでは、*Staphylococcus epidermidis*の量を濁度にて測定している。糖の添加なしの系に比較して、グルコースを添加した系では顕著に*Staphylococcus epidermidis*の

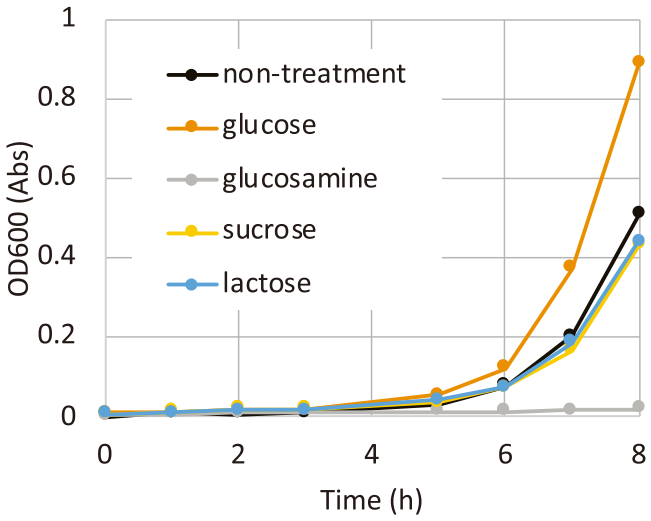



図３　糖を添加した際の*Staphylococcus epidermidis*の増殖

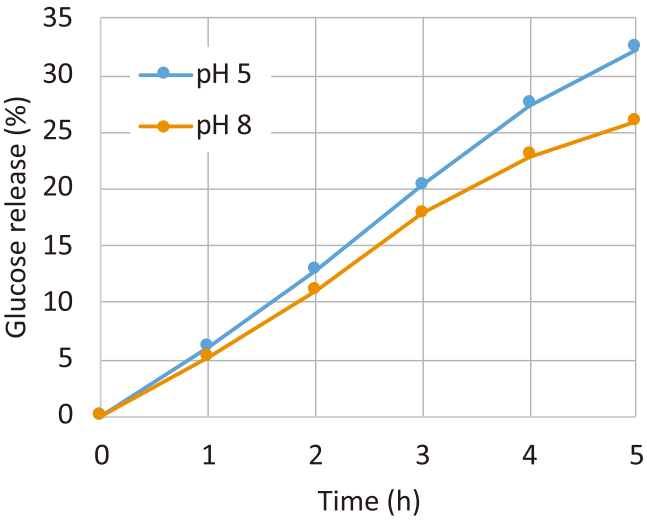



図４　開発したポリアミノ酸誘導体からのグルコース放出とpH応答性

増殖が促進されたことが示された。一方で、ラクトースやスクロースでは目立った増殖の促進はみられず、なおかつグルコサミンでは増殖の低下が確認された。このため、本研究ではポリアミノ酸誘導体に結合させる糖分子として、グルコースを選出した。

### 3. 3. グルコース放出のpH応答性

*Staphylococcus epidermidis*の増殖に適した糖としてグルコースを選定した。そこで、合成したポリアミノ酸誘導体とグルコースとを混合し、会合体調製をした後に、pH5およびpH8でのグルコース放出能を評価した(図4)。pH8で処理した系においては、5時間後に25%程度のグルコース放出が観察されたのに対し、pH5で処理した系においては33%程度のグルコース放出が観察された。このことから、開発した系において、善玉菌育成環境に適したpHにおいて、グルコース放出の加速が確認された。

### 3. 4. 高分子に基づく善玉菌の増殖促進試験

善玉菌育成環境下において、開発したポリアミノ酸誘導体がグルコースの放出を加速させることが確認されていた。次に、実際に*Staphylococcus epidermidis*を培養する際、開発したポリアミノ酸誘導体を添加して増殖速度を評価した。ここでは、培養する際のpHも5と8に設定した(図5)。pH8においては、開発したポリアミノ酸誘導体の添加に関わらず、2時間後に増殖をみせたものの、それ以降は目立った増殖を誘導しなかった。一方で、pH5においては、pH8の系に比較して培養液中の*Staphylococcus epidermidis*の増殖が顕著であり、その増殖はポリアミノ酸誘導体の添加によってさらに加速された。特に、8時間後では相対的な*Staphylococcus epidermidis*の数は6%ほど増大していた。

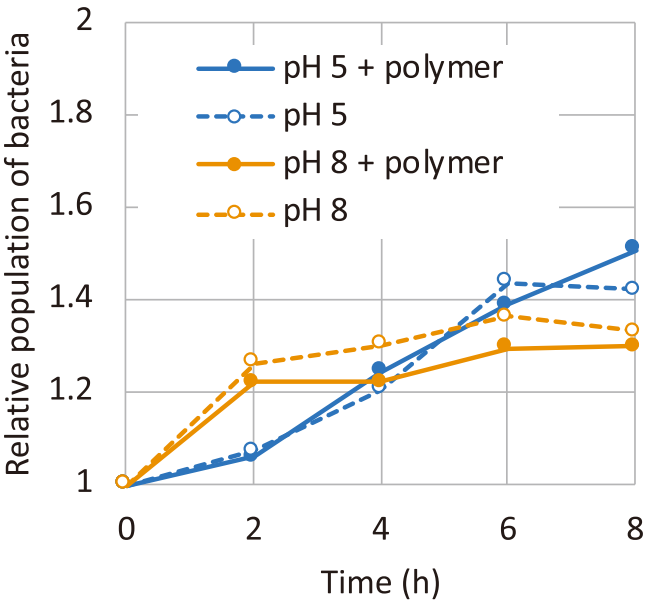



図５　開発したポリアミノ酸誘導体を用いた善玉菌増殖とpH応答性

## 4. 考　察

本研究では、善玉菌環境選択的に栄養物質を放出し、その育成を促進する高分子材料の開発を行った(図1)。善玉菌は弱酸性環境が育成に適するため、弱酸性pHに依存して栄養物質(糖)を放出する分子設計が必要となる。これに関し、本研究ではボロン酸エステル結合に着目した。ボロン酸は糖の有するジオール結合とボロン酸エステル結合を容易に形成するが、それはpH7以下の弱酸性環境下にて開裂が促進される。一方で、悪玉菌環境である弱塩基性pHでは糖分子の放出が抑制されるため、悪玉菌の増殖へは寄与しないことが期待される。高分子の合成から糖分子の選定、糖分子の放出挙動の評価、善玉菌の一つである

*Staphylococcus epidermidis* を用いた増殖評価等を介して、善玉菌フローラの育成における一つの方法論を提唱する。

糖分子を担持する高分子としては、ポリエチレングリコール（PEG）とポリアミノ酸のブロック共重合体を選択した。ポリエチレングリコールは化粧品に汎用されるバイオマテリアルであり[2]、そしてポリアミノ酸は生分解性・生体適合性に優れる[4]。なかでも、ポリリシン（PLys）のように側鎖に反応性官能基を有するポリアミノ酸は種々の化学構造を導入可能である。まず、PEGを開始剤としてPEG-PLysを合成した。得られたPEG-PLysに対して脱水縮合反応を介してFPBA（ボロン酸）を導入した（図2）。FPBAは疎水性を有するが、PLys側鎖への導入率を約50%に調節することで、良好な水溶性を有するPEG-P［Lys（FPBA）］の取得に成功した。

得られたPEG-P［Lys（FPBA）］を用いて糖分子の担持体を作成する前に、善玉菌の育成を促進するための糖分子の選定を行った。図3に示すように、糖分子を処置していない群に比較してグルコースを添加した群では明らかな *Staphylococcus epidermidis* の増殖促進が観察された。そのため、本研究ではグルコースをPEG-P［Lys（FPBA）］へと担持させることにした。グルコース分子とボロン酸との反応性は広く知られており、すでにグルコースセンサー等への展開が行われている。そのため、FPBAとグルコースとの速やかなエステル形成反応かつpH依存的な脱離が期待される。

PEG-P［Lys（FPBA）］とグルコースとの会合体は、pH8に比較してpH5においてグルコース放出能が促進された（図4）。透析開始後5時間において、pH 5では約30%多くのグルコースがpH8の系に比較して放出されており、弱酸性pHでのグルコース放出の促進が確認された。これに関し、放出は数十分～数時間をかけて徐々に進行したと推察される。実際に使用する際、数秒の時間単位でのグルコース放出は扱いづらいと予想されるが、比較的緩やかなグルコース放出は容易なハンドリングへ繋がると期待される。

最後に、開発したPEG-P［Lys（FPBA）］とグルコースとの会合体を用いて、善玉菌である *Staphylococcus epidermidis* の増殖を評価した。本研究の仮説通り、pH5にてPEG-P［Lys（FPBA）］とグルコースとの会合体を添加した群において最も *Staphylococcus epidermidis* の増殖が促進された。このことから、弱酸性条件下でグルコース放出を促進させる高分子を添加することで、善玉菌環境選択的なフローラ育成を実現する可能性が示された。一方で、pH 5においてPEG-P［Lys（FPBA）］とグルコースとの会合体を添加していない系と比較すると、*Staphylococcus epidermidis* の増殖促進は8時間後で6%程度であり、改善の余地が残されている。これに関し、PEG-P［Lys（FPBA）］とグルコースとの会合体の添加量や、会合体からのグルコース放出能等を最適化する必要があると言える。

肌フローラの状況は個人によって千差万別であり、それに応じて育成を促進するべき菌の種類・量も異なると予想される[5]。本研究では善玉菌として *Staphylococcus epidermidis* を選定し、担持する糖分子としてグルコースを選択した。しかしながら、本研究にて開発されたシステムでは、今回スクリーニングしなかった他の糖も担持することができる。そのため、種々の糖分子を同時に担持し、個別の菌の育成に最適化した分子設計も可能であり、今後の展開として期待される。

**謝　辞**

本研究は、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の2019年度の研究助成を受けて行ったものである。同財団に心より感謝する。

**（引用文献）**

1） Y. Nodake, *et al.*, Pilot study on novel skin care method by augmentation with Staphylococcus epidermidis, an autologous skin microbe –A blinded randomized clinical trial. *J. Dermatol. Sci.*, **79**, 119-126 (2015).
2） K. Knop, *et al.*, Poly (ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 6288-6308 (2010).
3） G. Springsteen, *et al.*, A detailed examination of boronic acid-diol complexation. *Tetrahedron*, **58**, 5291-5300 (2002).
4） K. Miyata, *et al.*, Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2562-2574 (2012).
5） T. Iwase, *et al.*, *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization, *Nature.*, **465**, 346-349 (2010).

# ヒト嗅覚受容体センサーによる匂いのデジタル化を応用した香水設計手法の確立

大阪大学産業科学研究所
立松　健司

Smell sensory testing is very important in the development of a wide range of odor-related products such as cosmetics, foods, and air fresheners. However, the accuracy of the sensory test is limited to human ability, and both of reproducibility and throughput are low. In addition, it was difficult to share odor information across time and space. Since a perfumer needs to memorize many odors, the training period is at least 5 years, usually 10 years, which is very costly to grow. On the other hand, chemical odor sensors and gas chromatography are detection methods based on the structure of compounds, and it is impossible to directly link these measurement data with the sensory test results. Our group created an olfactory receptor sensor using cultured cells expressing all 388 subtypes of human olfactory receptors, and which was able to quantify all the odors that humans can perceive. In this study, the odor of commercially available perfume was measured and quantified by the olfactory receptor, and the odor of perfume was quantified. In the future, this technology will be able to transform fragrance blending that relies on experiences and intuitions into evidence-based blending.

## 1. 緒　言

近年の生活水準向上に伴い、香り関連製品は、アロマや香粧品、芳香剤や消臭剤、食品香料などだけではなく匂い環境関連製品を含めて大きな市場を形成している。様々な製品の香り付けにおいて、適切な香調を作り出す際には、これまで官能試験が中心的な役割を果たしてきた。官能試験においては、「ウッディー」や「スモーキー」といった匂い質を言語化して、これらの匂いの特徴を持つ“基準臭”を調合により設定し、各基準臭と検査対象物を嗅ぎ比べて、多くの場合6段階の匂い強度で匂い質を評価、記録している。このような言語表現を介在させた記録は検査者のそのときの体調や個人差による影響を排除できず、正確な嗅覚情報の数値化、記録は困難であり、時間、空間を超えた香りの伝達は不可能であった。また、多種多様な匂いを嗅ぎ分けて適切な言語表現に置き換えることができる熟練した調香師の育成には、10年以上の教育期間がかかり、それにともなうコストも問題となる。以上のような官能試験の問題点を解決するために、機器分析により客観データとして香りを記録することを目指して、多数の電気センサー素子をアレイ化したもの（例：島津製作所、におい識別装置 FF-2020）やガスクロマトグラフィー（例：アルファ・モス、フラッシュ GC ノーズ Heracles NEO）を用いたものが開発、市販されている。しかしながら、これらは化合物の構造に基づく検出方法であり、原理的にヒトが嗅ぐことができないような分子を匂い分子と区別して解析対象から除外することが不可能である。そのため従前の香り解析装置は、たとえばコーヒーの香調といったようなごく限られた範囲内での応用にとどまり、ヒト嗅覚の主観と結びつけることが困難であった。一方で視覚については、ヒトの赤・緑・青・白の光を検出する4種類の光受容タンパク質の応答強度とその位置情報に由来する情報から構成されており、視覚情報をヒトの光受容タンパク質と関連するわずかな数値（RGB＋明度＋座標）で表現可能であり、すでに視覚は時空間を超えた情報伝達に成功している。映像に関係する産業の規模は、香り関係の産業に比して巨大である。嗅覚における匂い分子の識別は、嗅覚受容体の立体構造に依存しており、匂い分子をヒトの嗅覚と同様に検出するためにはヒトの嗅覚受容体を用いることが最も正確である。そこで、いくつかの研究グループでは、ヒトの嗅覚受容体そのものをセンサー素子として、匂いを数値化することを目指しており、先行している米国デューク大学の松波らを含む多くのグループは、嗅神経の細胞内シグナル伝達経路（図1）を培養細胞において模倣している[1]。

哺乳動物の嗅神経細胞は、それぞれ1種類の嗅覚受容体を発現している。嗅覚受容体は7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体（G protein coupled receptor, GPCR）であり、嗅覚受容体サブタイプの総数は、ヒトで388種[2]と報告されている。嗅神経において嗅覚受容体が匂い分子により刺激されると嗅覚受容体に特異的な$G_{\alpha olf}$がアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内のcAMP濃度が上昇し、CNGチャネル（cyclic nucleotide gated channel）が開き、細胞外カルシウムイオンが流入するという多段階のシグナル増幅を経て最終的には活動電位を発生する。また嗅神経内のカルシウム応答以外のシグナル伝達経路では、PKA（Protein kinase A）はcAMPと結合して活性化され、転写因子CREB（cAMP response element-binding protein）の



Establishment of perfume design method applying odor digitization by human olfactory receptor sensor
Kenji Tatematsu
Department of Biomolecular Science and Reaction, The Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR), Osaka University

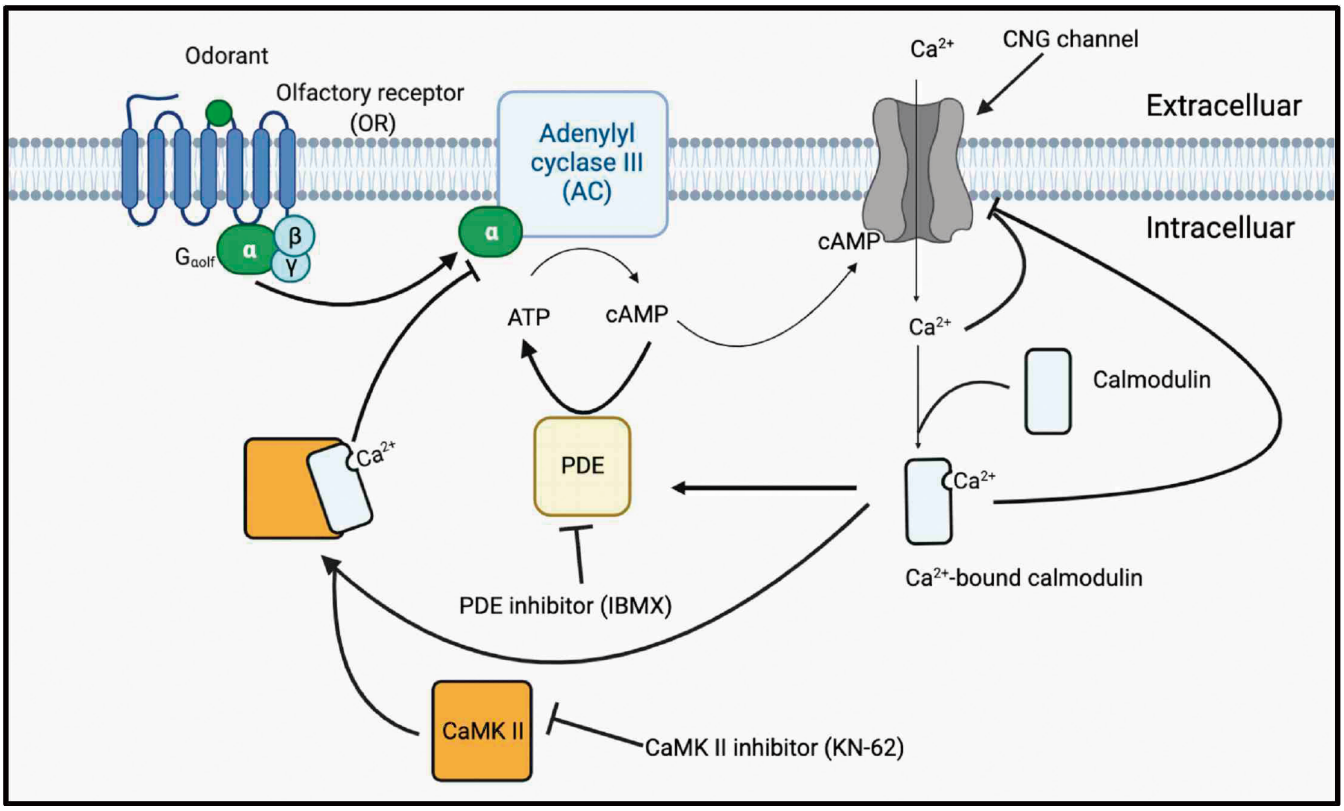



図１　嗅神経の細胞内シグナル伝達経路

リン酸化を触媒し、CREBによる転写が活性化されている。松波らをはじめとして多くの研究グループは、CREB結合配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターを用いて、ヒト嗅覚受容体約400種類すべてを網羅した匂い分子に対する嗅覚受容体レパートリーの解析を行っている[1)]。しかしながらルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイは、レポーター遺伝子の転写と翻訳の時間が必要であるために様々な問題をともなう。まず、官能において重要な嗅覚受容体応答の経時変化の情報は得られず匂いに対する嗅覚受容体の応答強度のみの情報しか得られない上に、後述するネガティブフィードバックによる匂いへの馴化も検出できないことが弱点である。極性が小さい匂い分子種は多く、これらの匂い分子はレポーター遺伝子の発現を待つ間に細胞培養液から蒸散してしまう問題もある。またチオールのような反応性の高い匂い分子は、数時間の培養時間でも化学反応により異なる分子種へと転換されて、反応前と異なる嗅覚受容体が応答してしまうこともある。極性が小さく分子量も小さな匂い分子は、細胞膜透過性が高いために嗅覚受容体以外の細胞内シグナル伝達経路に干渉することも考えられる。このルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイは、ウェルプレートで実施されており、各ウェルへの細胞播種とウェルごとに異なる嗅覚受容体サブタイプの発現プラスミドを導入する手順が必要とされるために測定の準備が非常に煩雑であった。これらルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにおける弱点を解消するために、私たちはまず嗅神経細胞内の匂いシグナル伝達経路を模倣した培養細胞を作製した。この嗅神経模倣細胞は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイに用いられているのと同様の細胞にさらにCNGを発現させたものである。この細胞の培地に匂い分子を添加し、匂い分子が嗅神経模倣細胞の発現する嗅覚受容体に結合したときは、嗅神経と同様に細胞外のカルシウムイオンが流入して細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。細胞内カルシウムイオン濃度は、細胞に事前導入したカルシウムイオン蛍光指示薬で定量できるため、脳に伝わる嗅神経の情報と同義の匂い情報をリアルタイムに蛍光輝度として検出できる。また、この細胞は嗅神経と同様にカルモジュリン（Calmodulin）、ホスホジエステラーゼ（Phosphodiesterase, PDE）、カルモジュリンキナーゼII（Calmodulin kinase II, CaMK II）、カルシウムイオン排出システムを持ち、嗅神経と同様に匂い分子に対する応答後のネガティブフィードバックが観察される。私たちの研究グループでは、この細胞に388種のヒト嗅覚受容体全サブタイプを発現させて、各受容体サブタイプ発現細胞を20 × 20区画のグリッドに整列化したヒト嗅覚受容体発現細胞アレイを開発し[3)]、ヒト嗅覚受容体センサーと命名した（図2）。

ヒト嗅覚受容体センサーは、嗅神経細胞と同様に匂い分子添加直後から細胞が応答し、なおかつ応答の開始から収

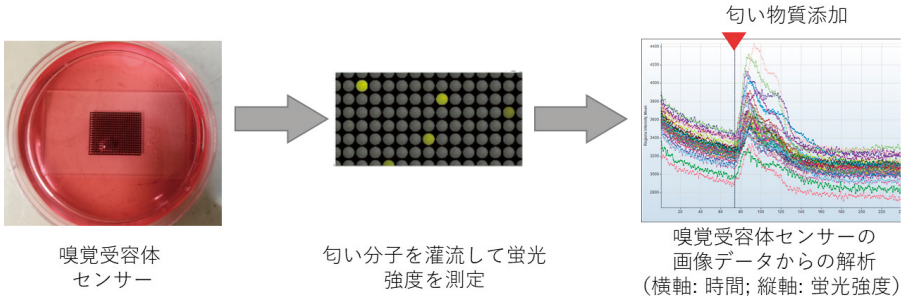



図２　嗅覚受容体センサーと取得されたデータ

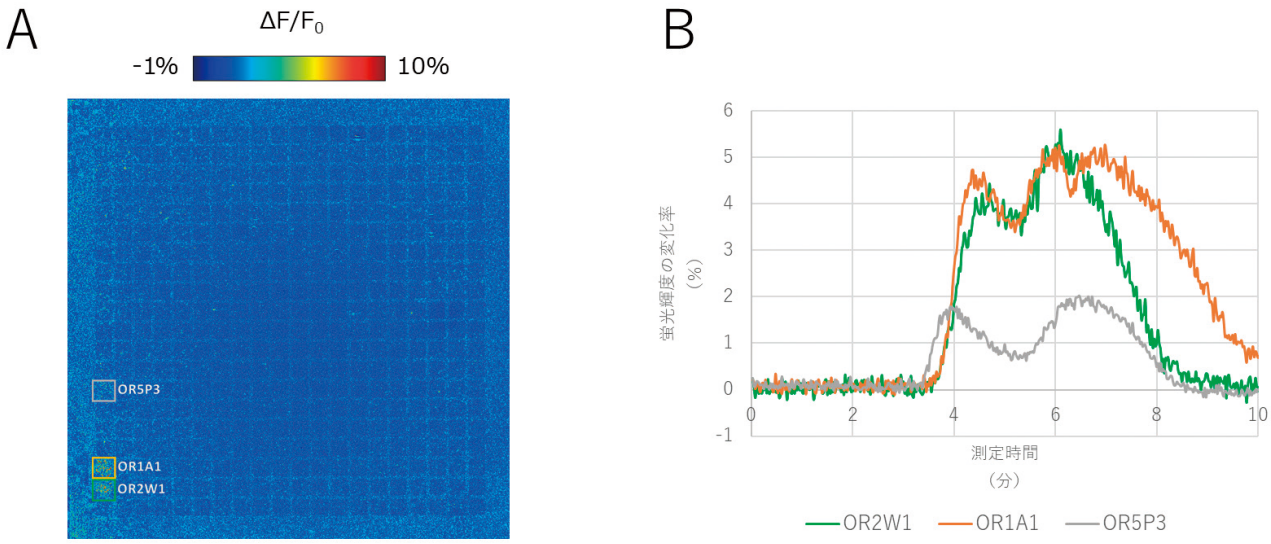



図3　嗅覚受容体センサーによる香水の測定結果

束までは数分間であるため、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイに比べると匂い分子の細胞内への浸透により惹き起こされる偽陽性や偽陰性、匂い分子の蒸発や変性の影響は低減されており、なおかつヒト嗅覚受容体レパートリーをハイスループットに解析することを可能としている。また、匂い応答の時間軸の情報が得られるため、匂いの刺激性や余韻といった官能との関連付けにおいて重要なデータが得られることも期待されている。ヒト嗅覚受容体センサーのこれらの特性により、これまでにない切り口で匂い関連製品・サービスを提供できる。そこで本研究では市販香水の匂いをヒト嗅覚受容体センサーにより測定して、香水に応答する嗅覚受容体を明らかにし、香水の調香に資することを目指した。

## 2. 方　法

### 2. 1. ヒト嗅覚受容体センサーの作製

スライドガラス上に 20 × 20 区画のグリッドを疎水性インクで形成した。次に Lipofectamine（Thermo Fisher Scientific）とヒト嗅覚受容体発現プラスミドからなるリポプレックスをヒト嗅覚受容体の全サブタイプ 388 種類について調製し、前記のスライドガラスのグリッド区画ごとに１種類の嗅覚受容体発現プラスミドからなるリポプレックスを印刷した。このスライドガラスに嗅神経模倣細胞を播種し 10%（v/v）ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium で培養し、スライドガラス上のリポプレックスをエンドサイトーシスにより細胞へ導入し、ヒト嗅覚受容体を細胞に発現させてヒト嗅覚受容体センサーとした。

### 2. 2. ヒト嗅覚受容体センサーによる香水の測定。

リンゲル液［140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 50 mM HEPES（pH7.2）, 1 mM ピルビン酸ナトリウム］でスライドガラス上の細胞を洗浄した後、細胞内のカルシウムイオン濃度の変動を測定するためにカルシウムイオンの蛍光指示薬 Calbryte 520（AAT Bioquest）を溶解したリンゲル液でスライドガラスを 30 分間インキュベーションした。その後リンゲル液を 3 分間、50 分の 1 に希釈した香水ポールスミス エクストリーム メン オードトワレを 2 分間、リンゲル液を 5 分間スライドガラスに灌流し、灌流中のヒト嗅覚受容体センサーの蛍光を蛍光顕微鏡により 1.5 秒間隔で撮影した。

## 3．結　果

香水溶液灌流前の蛍光強度を100％（$F_0$）としたときの灌流時の最大蛍光強度時の蛍光強度（F）の変化率（$\Delta F/F_0$）を疑似カラーで示す（図3A）。香水に応答した嗅覚受容体のサブタイプは、OR2W1、OR1A1、OR5P3であった。図3Bに応答した嗅覚受容体の蛍光強度変化率をグラフで示した。応答したすべての嗅覚受容体において、香水灌流直後から蛍光輝度の上昇がみられた。また、OR2W1とOR5P3は香水を除いた後4分以内に香水添加前の蛍光強度に復帰したのに対して、OR1A1は香水を除いた後も5分間以上経過しても香水添加前の蛍光強度に復帰せず、嗅覚受容体ごとに細胞内のカルシウムイオン濃度の経時変化が異なる結果となった。

## 4．考　察

OR2W1とOR1A1は、1-ヘプタノン、1-オクタンチオール、β-シトロネロールなど、幅広い官能基を持つ匂い分子に応答し[4]、匂い分子としては比較的長い炭素鎖の部分で匂い分子を認識しているかもしれない。両嗅覚受容体共に今回測定した香水（以下、本香水）に含まれるリナロールやシトロネロールに応答した可能性は高い。OR5P3は、クマリンに応答することが報告されており[4]、本香水にもクマリンが含まれているためこれを検出した可能性が高い。またOR5P3は、1-オクタノールのような長い炭素鎖を持つ匂い分子を応答し、嗅覚受容体をその応答する匂い分子の構造をもとにしてクラスタリングするとOR5P3は、OR2W1やOR1A1と相関が高いことが示されており[5]、これらの嗅覚受容体は共通の匂い分子に応答している可能性がある。

今回の測定では、3種類の嗅覚受容体の応答が検出されたが、本香水の成分表示では12種以上の純品香料が含まれていることが示されており、香調の複雑さからもこの香水を嗅いだときのヒトの嗅覚では、より多くの嗅覚受容体が応答していると思われる。本来応答すべき嗅覚受容体の応答を今回検出できなかった原因としては、まず香水の成分が挙げられる。本香水を50分の1に希釈してから測定しているものの嗅覚受容体への香水主成分であるアルコールの干渉は否定できない。また、本香水に含まれるゲラニオールは、それ自体が匂いを持つが同時にCNG阻害能もあわせ持つことが報告されており[6]、ヒト嗅覚受容体センサーの感度を下げて、その結果として応答の検出に成功できた嗅覚受容体の種類が減少した可能性がある。他の原因としては細胞の構造や神経回路の有無の違いが挙げられる。嗅神経には複数の線毛があり、ここに多数の嗅覚受容体分子が局在しているが、嗅神経模倣細胞は線毛を持たないために表面積は嗅覚受容体に比べて小さい。嗅覚の神経回路では、同じ嗅覚受容体を持つ複数の嗅神経の嗅覚受容体応答の情報は、糸球体により束ねられてから大脳に伝達されるが、私たちのヒト嗅覚受容体センサーは、一つ一つの嗅神経模倣細胞の応答を画像として記録はしているが、各細胞の応答を束ねるような数値化は行っていない。今後、画像処理を工夫することにより、画像の中でノイズに埋もれているかもしれない多数の嗅神経模倣細胞の応答を検出することが課題として考えられる。

香水は、速度の異なる多数の香料から構成されており、その香調は蒸発開始から時間の短い順にトップノート、ミドルノート、ラストノートと呼称される。香水は、時間の経過にともない様々な香調を楽しめるように匂い分子種ごとに異なる蒸発速度を考慮に入れて様々な匂い分子を組み合わせて設計されている。今回の本香水の測定では、香水に含まれる全ての匂い分子を同時に測定しているが、香水の分留を行うことによりトップノート、ミドルノート、ラストノートを分けて測定することが可能となるであろう。また分留により香水のアルコール濃度を下げることにより、より希釈率の低い高濃度な香水をヒト嗅覚受容体センサーで測定できるかもしれない。

現在、嗅覚受容体の細胞内シグナル伝達経路に介入して、ネガティブフィードバック経路を抑制することにより、匂い分子に対する感度を上昇することを試みている。これまでのところPDE阻害剤のIBMXやCaMK II阻害剤KN-62を用いることにより（図1）、ヒトの嗅覚検知閾値が、78pptであるところ[7]、ヒト嗅覚受容体センサーで4L空気中の濃度10pptのイソ吉草酸に対する嗅覚受容体応答の検出に成功している[8]。香水の測定にもこれら阻害剤を用いることにより、より多くの嗅覚受容体応答を検出できるはずである。

## 5．総　括

嗅覚受容体センサーによる香水の測定により、香水設計（調香）のリバースエンジニアリングや測定データに基づく理論的な香水調香の可能性を示すことができた。

**（引用文献）**


1）Mainland J. D., Li Y. R., Zhou T., Liu W. L. L., Matsunami H. Human olfactory receptor responses to odorants. *Sci. Data*, 2, 150002, 2015

2）Niimura Y., Nei M. Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 100, 12235-40, 2003

3）黒田俊一　匂いの定量方法、それに用いる細胞及びその細胞の製造方法。特願2019-536790

4）Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H., Mainland, J. D. Odor Coding by a Mammalian Receptor

Repertoire. *Sci. Signal*. 2, ra9–ra9, 2009

5） Audouze K., Tromelin A., Le Bon A. M., Belloir C., Petersen R. K., Kristiansen K., Brunak S., Taboureau O. Identification of odorant–receptor interactions by global mapping of the human odorome. *PLoS One*. e93037. 2014

6） Takeuchi H., Ishida H., Hikichi S., Kurahashi. T. Mechanism of olfactory masking in the sensory cilia. *J. Gen. Physiol*. 133, 583–601, 2008

7） 永田好男　三転比較式臭袋法による臭気物質の閾値測定結果。日本環境センター所報 17, 77–89, 1990

8） Lian Y., Tatematsu K., Sakai H., Sato S., Kuroda S. Improving the sensitivity of odor molecule detection in olfactory receptor-expressing cells. 日本農芸化学会 2021 年度大会

# 高分子水溶性ナノ粒子の皮膚浸透挙動を題材とした高分子化合物の皮膚浸透メカニズムの解明

城西大学薬学部
徳留　嘉寛

Skin administration is a simple method of therapeutic and cosmetic application. However, the protective barrier provided by the skin makes it challenging to achieve delivery of high molecular weight compounds. Efforts to improve the penetration of hyaluronic acid (HA) have yielded nanoparticulate polyion complexes of HA with poly-L-lysine (HANP), which act as vehicles for delivering HA deeper into the skin. However, the mechanism for this effect and the response of HANP to the skin environment have not been explored. In this study, the penetration of HANP in skin is compared with that of HA, and differences in the pathways are identified. In addition, the properties of the particles in a simulated skin environment are assessed and HANP are found to show morphological changes in response to ions. These findings are expected to pave the way for future transdermal delivery of other high molecular weight ionic compounds such as proteins.

## 1. 緒　言

皮膚を介する物質の皮膚透過は、投与の簡便さや中断の容易さ、肝初回通過効果の回避が可能であるといった点から注目されている。しかし、皮膚の最外層に存在する角層は、物質の透過に対してバリア機能を有しており、経皮吸収における最大の障壁となっている。一般的に受動拡散で皮膚を透過できる物質は分子量が500 Da以下で、比較的脂溶性の高い化合物とされている[1, 2]。難皮膚浸透性化合物の浸透を向上させるために経皮吸収促進技術が多くの研究者により盛んに研究されている。経皮吸収促進技術は物理的促進法と化学的促進法に大別される。物理的促進法としては、マイクロニードル[3]、イオントフォレーシス[4]等の技術が高分子化合物の皮膚浸透性を向上させるための研究として報告されている。しかし、これらにはわずかに皮膚を損傷させる、あるいは特別な機械を用いるため利便性に欠けるといった問題点がある。一方、化学的促進法として、良く知られているエタノール[5]や$\ell$-メントール[6]等が報告されている。しかしこれらは、比較的低分子化合物の応用に限られ、高分子化合物には効果が高くない。その他、最近は溶媒としてイオン液体を用いる手法[7]等も報告されている。特に高分子化合物の皮膚浸透性の向上は多くの研究者にとって大きな課題である。九州大学の後藤先生らのグループでは、非侵襲的に化合物を皮膚内に浸透させるため、水溶性薬物をナノコーティングし油状基材中に分散させるOil-in-solid製剤[8]が研究されている。しかし、S/O製剤は調製の段階で凍結乾燥を行う必要があり、薬物の変性が懸念される。

本研究では調製が容易であり、有機溶媒や界面活性剤を使用せずにナノ粒子を形成できるPolyion complex（PIC）技術に着目した。PICは反対に帯電した高分子電解質間の強い静電的相互作用により、互いの電荷を打ち消し合って形成される集合体であり[9, 10]、生体適合性の高い試薬を用いることで安全性の高いナノ粒子の調製が可能であると考えられている。また、水に溶解した化合物を加工せずに用いるため、温度による変性等を考慮する必要がない。

PICを用いた以前の研究で我々は、アニオン性化合物にHAを用いてHyaluronic acid nano particle（HANP）を調製することで、HAの皮膚浸透性が向上したことを報告している[11]。HAは分子量が約数百万の水溶性高分子であるため、一般的には受動拡散での皮膚内への浸透は困難であると考えられていた。皮膚の水分・弾力性維持に重要なはたらきを担っているHAの皮膚浸透性を向上させたHANPは、シワやたるみの改善といった皮膚機能改善効果が期待される。しかし、HANPが皮膚をどのような経路を介して通過しているのか、粒子の形態を保ったまま皮膚に浸透しているのかといった具体的な浸透のメカニズムはいまだ解明されていない。

本研究課題では、アニオン性化合物にHA、カチオン性化合物にPoly-L-lysine hydrochloride（PLL）を用いてHANPを調製し、この粒子を用いて高分子水溶性ナノ粒子の皮膚浸透挙動を題材とした高分子化合物の皮膚浸透メカニズムの解明を目的に検討を行った。

## 2. 方　法

### 2. 1. 実験材料

ヒアルロン酸ナトリウム（FCH-120, M.W. 1,200 kDa, 純度：99.9%）はキッコーマンバイオケミファ（東京、日本）を用いた。ポリリジン（PLL）、アセトアルデヒド、シクロ



The skin penetration mechanism of high molecular weight compounds based on the skin penetration behavior of hyaluronic acid nanoparticles

Yoshihiro Tokudome, Ph.D.

Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University

ヘキシルイソシアニド、コレステロール、パルミチン酸、コレステロール硫酸はシグマ製（St. Louis, MO, USA）のものを使った。5-アミノフルオレセイン、ケラチンは東京化成工業（東京、日本）から購入した。ジパルミトイルフォスファチジルコリンは日本精化（兵庫、日本）から供与されたものを用いた。その他溶媒は、富士フィルム和光純薬工業（大阪、日本）から購入した。その他の試薬は特級グレード以上のものを精製せずに用いた。

### 2. 2. 蛍光標識ヒアルロン酸の調製

Fluorescence-labeled HA（FL-HA）は、アルデヒド、アミン、イソシアニド、カルボン酸の4成分縮合反応で調製した[12]。調製したHL-HA中に未反応の5-FLの混入を除くためにセルロースチューブを用いて24時間透析を行った。FL-HA溶液を凍結乾燥し、FL-HA粉末とした。

### 2. 3. ヒアルロン酸ナノ粒子の調製

1mMのFL-HA水溶液と0.1mMのPLL水溶液をFL-HA：PLL = 1：2となるように混合し、室温で15分間撹拌することでFL-HANPを得た。また、0.1mMのHA水溶液と0.1mMのPLL水溶液をHA：PLL = 1：1となるように混合してHANPを得た。

### 2. 4. *In vitro* 皮膚浸透性試験

動物の取り扱いは城西大学動物実験管理委員会により承認された方法に従って実施した。6週齢の雄性ヘアレスマウスは、株式会社星野試験動物飼育所（茨城、日本）から購入した。マウスから採取した全層皮膚と、採取後にテープストリッピングによって角層を除去した角層除去皮膚を使用した。縦型フランツ拡散セル（有効透過面積：1.77 $cm^2$）に表皮側を上にして皮膚を装着した。レシーバ側を5mLの精製水で満たし、ドナー側にFL-HA水溶液またはFL-HANP水溶液を1mL適用した。セルの温度は32℃に保ち、24時間皮膚浸透性試験を行った。24時間後に、角層除去皮膚と全層皮膚からそれぞれ凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で皮膚中の蛍光を観察した。さらに全層皮膚からは角層を剥離し、顕微鏡で角層の表面を観察した。

### 2. 5. リン脂質リポソームへの吸着性の評価

Dipalmitoyl phosphatidylcholine（DPPC）をクロロホルムに溶解し、溶媒を留去することで薄膜を作製した。精製水で水和後、凍結融解後、超遠心機により、289,000×g、4℃の条件で15分間遠心分離した。得られた沈殿に精製水を1mL加えて再分散させたものをリン脂質リポソームとした。リン脂質リポソームとHA水溶液またはHANP水溶液が1：19の比率になるように混合し、24時間撹拌した。289,000×g、4℃の条件で15分間遠心分離し、上清のHAをHPLCで定量した。

上清中のHAは、YMC-Pack Diol-300カラム（300×8.0 mm, S-5μm, 30nm）を用いたHPLCによって確認した。移動相は10mM酢酸アンモニウム：メタノール= 8：2、流速は1mL/minに設定した。注入量は50μLとし、210 nmの波長で紫外線検出を行った。

### 2. 6. HAのケラチンへの吸着性の評価

ケラチンパウダーにHA水溶液、またはHANP水溶液を1mL添加し、24時間撹拌した。0.45μmのフィルタでケラチンパウダーを濾過し、（リン脂質リポソーム）と同様の条件でろ液中のHAを定量した。

### 2. 7. 角層細胞間脂質リポソーム（SCLL）への吸着性の評価

クロロホルムに溶解したセラミド（40%）、コレステロール（25%）、パルミチン酸（25%）、コレステロール硫酸（10%）を混合し、溶媒を減圧留去して薄膜を作製した。精製水で水和後、超遠心機により、289,000×g、4℃の条件で15分間遠心分離した。得られた沈殿に精製水を1mL加えて再分散したものをSCLLとした。SCLL分散液とHA水溶液またはHANP水溶液が1：19の比率になるように混合し、24時間撹拌した。289,000×g、4℃の条件で15分間遠心分離し、上清のHAをHPLCで定量した。

### 2. 8. 全反射型フーリエ変換赤外分光法による角層細胞間脂質の流動性の評価

ヘアレスマウスの全層皮膚を採取し、精製水、0.05 mM HA水溶液、0.05mM PLL水溶液、HANP水溶液、FL-HANP水溶液に1、6、24時間浸漬させ、FTIRで測定を行った（測定条件；積算回数：40、分解能：0.9 $cm^{-1}$、測定温度：32℃）。

### 2. 9. HANPの形態観察

HANPの形態を2%リンタングステン酸溶液によるネガティブ染色を用いて、透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope：TEM）（JEM-1400Plus、JEOL Ltd.、東京、日本）で観察した。また、PBSを最終濃度が150 mMとなるように添加したHANPの形態をTEMにより観察した。

### 2. 10. 統計分析

全てのデータは少なくとも3回の独立した結果からの平均±標準偏差（SD）とした。Student's t-test、Dunnett's testで統計処理を行った。

## 3．結　果

### 3. 1. ヒアルロン酸ナノ粒子の調製

FL-HAとPLLからFL-HANPを、HAとPLLからHANPを調製した。FL-HANPは粒子径が242.5 ± 22.7 nm、PDIが0.58 ± 0.10、ゼータ電位が−49.8 ± 3.9mVのナノ粒子であった。HANPは粒子径が92.2 ± 7.8nm、PDIが0.20 ± 0.03、ゼータ電位が−29.5 ± 2.6mVのナノ粒子であった（Table 1）。

### 3. 2. *In vitro*皮膚浸透性試験

角層除去皮膚を用いてFL-HA、FL-HANPの皮膚浸透性を調査した。FL-HA適用群では皮膚表面にFL-HA由来の蛍光が観察された。FL-HANP適用群では非粒子のHAよりも皮膚深部へのFL-HAの浸透が観察された。この結果より、HAを粒子化することによる皮膚への浸透性の向上が示された（Fig. 1a, b, c and d）。

また、全層皮膚にFL-HA水溶液またはFL-HANP水溶液を適用し、皮膚浸透性試験を行ったところ、FL-HANP適用群で角層に強い蛍光が確認された。しかし、角層以下へのFL-HAの浸透は見られなかった（Fig. 1e, f, g and h）。皮膚表面から角層を剥離し、表面を観察したところ、FL-HA適用群では角質細胞に、FL-HANP適用群では角層細胞間脂質にFL-HA由来の蛍光が観察された（Fig. 2）。

Table 1　Physical properties of HANP and FL-HANP

| Sample | Particle diameter（nm） | PDI | Zeta potential（mV） |
|---|---|---|---|
| FL-HANP | 242.5 ± 22.7 | 0.58 ± 0.10 | − 49.8 ± 3.9 |
| HANP | 92.2 ± 7.8 | 0.20 ± 0.03 | − 29.5 ± 2.6 |

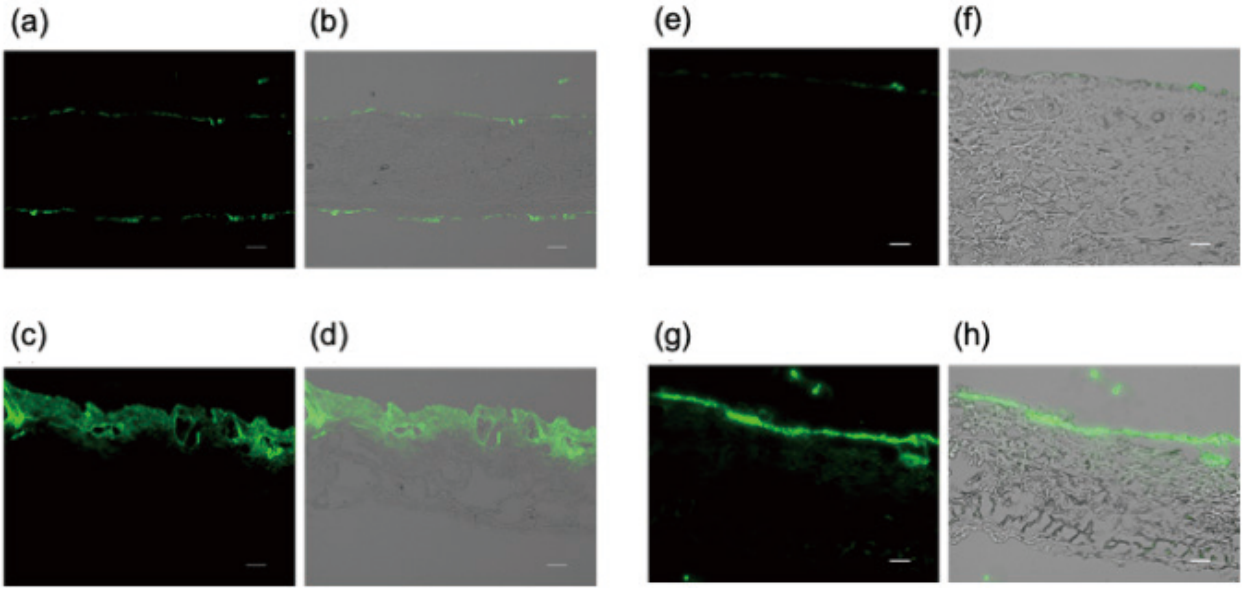



Fig. 1　Cross-sectional fluorescence image of hairless mouse skin.
（a）Stripped skin, fluorescence image, HA application,（b）Stripped skin, bright field image, HA application,（c）Stripped skin, fluorescence image, HANP application,（d）Stripped skin, bright field image, HANP application,（e）Full thickness skin, fluorescence image, HA application,（f）Full thickness skin, bright field image, HA application,（g）Full thickness skin, fluorescence image, HANP application,（h）Full thickness skin, bright field image, HANP application. Scale bars indicate 50 µm.

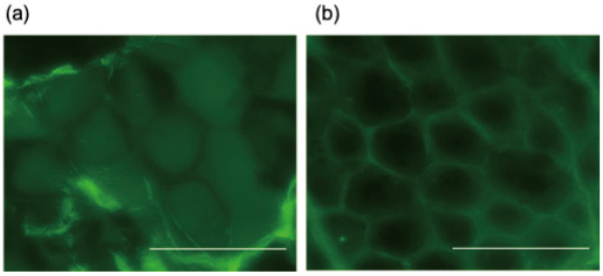



Fig. 2　Skin surface fluorescence image of hairless mouse.
（a）Fluorescence image, HA application.（b）Fluorescence image, HANP application. Scale bars indicate 50 µm.

これらの結果より、HAは細胞内経路、HANPは細胞間経路を通って皮膚に浸透している可能性が示された。HAをナノ粒子化することで、透過経路が変化する可能性が示された。

### 3. 3. HANPの皮膚構成物の吸着性（*in vitro*での検討）

角層除去皮膚を用いた皮膚浸透性試験の結果より、FL-HANP適用群でFL-HAの皮膚深部までの浸透が確認された。HAをナノ粒子化することで生体膜との相互作用が変化する可能性がある。ここでは、生体膜のモデルとしてリン脂質リポソームとの吸着を、角質細胞のモデルとしてケラチンとの吸着を、また、角層細胞間脂質のモデルとして、角層細胞間脂質から構成したリポソーム（SCLL）との吸着を確認した。

生体膜の代替としてリン脂質リポソームを用いることで、HANPと生体膜の間で起こる相互作用を推察した。HANPはHAよりも有意に高い吸着率を示した（Fig. 3a）。したがって、HANPは生体膜と強く相互作用する可能性があることが想定された。

次に角質細胞の主成分であるケラチンを用いてHAと角質細胞の相互作用を調査した。HAはHANPよりも有意に高い吸着率を示した（Fig. 3b）。したがって、HAはHANPと比較して角質細胞と強く相互作用する可能性がある。

最後にSCLLとの吸着を確認した。HANPはHAよりも有意に高い吸着率を示した（Fig. 3c）。したがって、HANPは角層細胞間脂質と強く相互作用する可能性があることが想定された。

### 3. 4. ATR-FTIRを用いた検討

2850 $cm^{-1}$付近に現れるCH2対称伸縮振動、2920 $cm^{-1}$付近に現れるCH2逆対称伸縮振動由来のピークが高波数側へシフトすることで脂質の流動性が上昇することが知られているが、全ての群において、ピークの高波数側への有

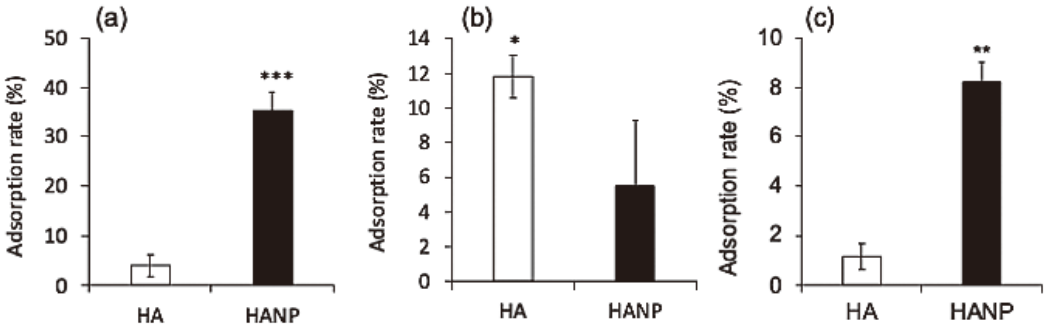



Fig. 3　Adsorption of HANP and HA on (a) phospholipid liposomes, (b) keratin, or (c) SC lipid liposomes. Values represent the mean and standard deviation (SD) of three independent results. Statistical processing was performed using Student's t-test. *p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001.

Table 2　Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) measurements of CH symmetric (a) and asymmetric (b) stretching vibrations in the stratum corneum after 1, 6, and 24 h.

(a)

| | 1 h | 6 h | 24 h |
|---|---|---|---|
| Control | 2850.1 ± 0.1 | 2849.9 ± 0.1 | 2849.9 ± 0.2 |
| Distilled water | 2850.0 ± 0.0 | 2849.8 ± 0.0 | 2849.8 ± 0.2 |
| HA | 2849.8 ± 0.2 | 2850.1 ± 0.1 | 2849.9 ± 0.1 |
| PLL | 2849.8 ± 0.0 | 2849.8 ± 0.1 | 2849.8 ± 0.0 |
| HANP | 2849.9 ± 0.1 | 2849.9 ± 0.1 | 2849.8 ± 0.0 |
| FL-HANP | 2850.1 ± 0.2 | 2849.8 ± 0.1 | 2849.9 ± 0.1 |

(b)

| | 1 h | 6 h | 24 h |
|---|---|---|---|
| Control | 2917.6 ± 0.3 | 2917.6 ± 0.1 | 2917.3 ± 0.2 |
| Distilled water | 2917.4 ± 0.2 | 2917.4 ± 0.1 | 2917.6 ± 0.4 |
| HA | 2917.3 ± 0.2 | 2918.0 ± 0.3 | 2917.7 ± 0.2 |
| PLL | 2917.3 ± 0.2 | 2917.5 ± 0.0 | 2917.6 ± 0.1 |
| HANP | 2917.3 ± 0.2 | 2917.5 ± 0.4 | 2917.8 ± 0.6 |
| FL-HANP | 2917.8 ± 0.3 | 2917.6 ± 0.2 | 2918.0 ± 0.1 |

Samples: Control (stratum corneum only), Distilled water (vehicle), HA (hyaluronic acid), PLL (poly L-lysine), HANP (hyaluronic acid nanoparticle), FL-HANP (fluorescently labeled HANP). Values represent the mean and standard deviation (SD) of three independent results.

意なシフトは見られなかった(Table 2)。

### 3. 5. TEMによるHANPの形態観察

皮膚に適用されたHANPは、ナノ粒子の形態を保ったまま皮膚に浸透しているのか、結合がほどけてHAとして皮膚に浸透しているのかを調査するため、HANPにPBSを添加した。PBSの最終濃度が150mMとなるようにHANPに添加することで、皮膚に接触した後のHANPの形態を推測した。

HANPは粒子径200nmほどの球形の粒子であり(Fig. 4)、時間が経過しても変化しなかった(Fig. 4a, b)。共存イオン存在下では形態の変化が観察された(Fig. 4c, d)。物性値も大きく変化した(Fig. 5)。

## 4. 考　察

本研究課題では、ヒアルロン酸ナノ粒子を用いて高分子水溶性ナノ粒子の皮膚浸透挙動を題材とした高分子化合物の皮膚浸透メカニズムの解明を目的に検討を行った。

1mMのFL-HAと0.1mMのPLLを1：2の比率で混合して調製したFL-HANPをヘアレスマウスの角層除去皮膚に適用し、24時間皮膚浸透性試験を行った。FL-HA適用群と比較し、FL-HANP適用群で皮膚深部へのFL-HAの

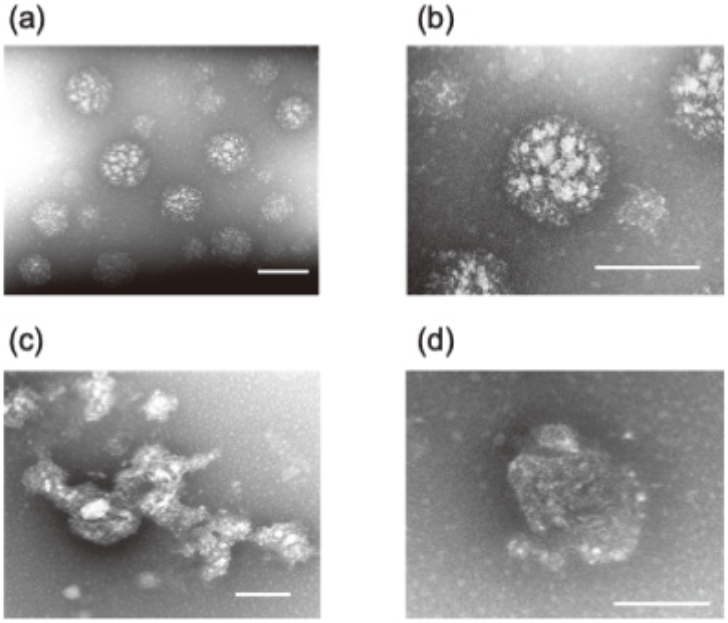



Fig. 4　Observation of HANP morphology by transmission electron microscopy (TEM)
(a) HANP and distilled water, (b) HANP and PBS (final concentration: 150 mM), (c) HANP and distilled water (enlarged view), (d) HANP and PBS (final concentration: 150 mM) (enlarged view). Scale bar indicates 200 nm.

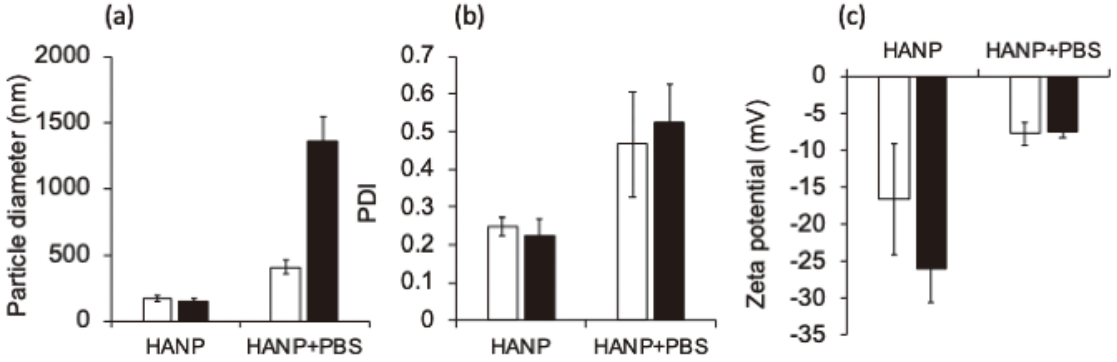



Fig. 5　Particle diameter, PDI, and zeta potential of HANP and HANP on addition of PBS (final concentration of 150 mM).
(a) Particle diameter, (b) PDI, (c) zeta potential. Values represent the mean and standard deviation (SD) of three independent results.

浸透が確認された。この結果から、一般的に皮膚への浸透が困難であるとされている水溶性高分子化合物のHAをナノ粒子化することで、皮膚への浸透性が改善されることが示唆された。

次いで、角層を除去した皮膚へのHAまたはHANPの浸透メカニズムを解明することとした。角層除去皮膚の表面は、生細胞の細胞膜であると考えられるため、リン脂質リポソームを用いた疑似的な生細胞膜への吸着性を調査した。HA群と比較して、HANP群でリン脂質リポソームへの吸着性が有意に高かった(Fig. 3a)。この結果は角層除去皮膚を用いた皮膚浸透性試験により得られた切片画像と似た傾向を示しており、非粒子のHAよりもHANPの皮膚浸透性が高いことを支持する結果となった。このことから、HANPは生体膜へのより強い相互作用によって皮膚浸透性が高まると考えられる。

皮膚浸透性試験後の全層皮膚から角層を剥離し、皮膚表面から蛍光顕微鏡で観察すると、FL-HA適用群では角質細胞に、FL-HANP適用群では角層細胞間脂質に蛍光が確認された(Fig.2)。このことから、HAとHANPでは角層を通過する経路が異なる可能性を考え、角質細胞および角層細胞間脂質に対して、それぞれがどのような相互作用をしているのかを調査することとした。まず、角質細胞の主成分であるケラチンへの吸着性から、HAまたはHANPと角質細胞の相互作用を調査したところ、HA群でケラチンへの吸着性が有意に高かった(Fig. 3b)。また、角層細胞間脂質と組成が類似しているSCLLへの吸着性から、HAまたはHANPと角層細胞間脂質の相互作用を調査したところ、HANP群で有意にSCLLへの吸着性が高かった(Fig. 3c)。これらの結果は、Fig. 2(角層表面の顕微鏡画像)の画像を支持する傾向を示していた。水溶性高分子であるHAは角質細胞への吸着性が高いため皮膚深部まで浸透せずに表面で留まり、HANPは小さな粒子を形成しているほか、細胞間脂質への吸着性が高いことで細胞間脂質を介して皮膚に浸透することが示唆された。角質細胞を介する細胞内経路は少なくとも細胞膜を2回透過する必要がある。また、細胞間脂質の表面積を考慮すると細胞間経路を介する浸透の方が有利である。そのため、ナノ粒子化をすることによって、より浸透が有利な経路を介して水溶性高分子化合物を皮膚に浸透させることができる可能性が示された。また、リン脂質リポソームへの吸着性の結果から、HANPは角層を通過した後に、生細胞膜に対して高い吸着性を示すことが考えられる。よって、PIC技術によるナノ粒子は、非粒子の化合物と比較して、角層を通過した後により皮膚深部まで浸透する可能性が示された(Fig. 3a)。

HANP適用後の角層の流動性をATR-FTIRで調査した。角層に特異的に検出される2850$cm^{-1}$、2920$cm^{-1}$付近のピークは、それぞれ$CH_2$対称伸縮振動、$CH_2$逆対称伸縮振動由来のピークとされる。これらのピークの高波数側へのシフトは、トランス配座からゴーシュ配座への立体配座の変化を表しており、ゴーシュ配座が増加することで脂質の充填効率が低下する。つまり、赤外吸収の波数は脂質の流動性上昇に伴い高波数側にシフトする。Control群と比較してHANP、HANPの構成成分であるHA、PLL等の全サンプルで、ピークの高波数側への有意なシフトは確認されなかった(Table 2)。すなわち、角層流動性に大きな変化はなかったことから、HANPは脂質の流動性を乱して皮膚に浸透している可能性は低く、従来の浸透促進技術よりも皮膚バリア機能に対し大きな影響を与えないと考えられる。

最後に、皮膚に適用した後のHANPは、粒子化したまま皮膚に浸透しているのか、もしくは結合が崩壊してHAとPLL単体として浸透しているのかを調査するために、HANPにPBSを加えることで生体に接触したときと同条件(PBS 150mM)を想定し、物性値を測定した。PBSを加えることで粒子径とPDIは増大、ゼータ電位の絶対値は減少した(Fig. 5)。また、TEM画像においても、PBSを加えることでHANPの形態が変化した(Fig. 4)ことから、HANPは共存イオンの影響によって崩壊した可能性がある。この現象はイオンによってPICの静電相互作用が乱れることが原因で誘発されると考えられるため、HANPを皮膚に適用した際に、皮膚中のイオンと反応して同様の現象が起こると推測した。このことから、皮膚浸透後にHANPは崩壊し、皮膚中でHA単体として水分・弾力性維持の機能を果たすことが期待できる。HANPとしての生体に対する安全性はいまだ不明であるため、粒子としての形態を保ったまま皮膚に浸透するよりも、皮膚中で崩壊して非粒子のHAとなることで安全性が高まると考えられる。しかし、HANPは角層に接触した際に皮膚表面で崩壊するのか、角層に浸透した後に皮膚中で崩壊するのかは定かではない。前述のようにHANPの崩壊にはイオンが大きく影響すると考えられることから、よりイオン強度の高いところで崩壊する可能性が高い。これらのことから、HANPは皮膚適用直後に崩壊するのではなく、皮膚に浸透する過程で徐々に崩壊することが予想されるが、引き続き調査が必要である。また、PLLの挙動についてもいまだ不明な点があるため、HANPとして皮膚に適用した後のPLLの局在を引き続き調査する必要がある。

以上の本研究課題結果から、水溶性高分子をナノ粒子化することで皮膚浸透経路が異なることで高分子の皮膚浸透性を向上させた可能性があることがわかった。

**(引用文献)**

1) Bos J.D., Meinardi M.M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs,

*Exp Dermatol*. **9**, 165–169 (2000).
2) Flynn G.L., S.H. Yalkowsky S.H., Correlation and prediction of mass transport across membranes I: Influence of alkyl chain length on flux-determining properties of barrier and diffusant, *J Pharm Sci*. **61**, 838–852 (1972).
3) Henry S., McAllister D.V., Allen M.G., Prausnitz M.R., Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery, *J Pharm Sci*. **87**, 922–925 (1998).
4) Langkjær L., Brange J., Grodsky G.M., Guy R.H., Iontophoresis of monomeric insulin analogues in vitro: Effects of insulin charge and skin pretreatment, *J Control Release*. **51**, 47–56 (1998).
5) Marjukka Suhonen T., Bouwstra J.A., Urtti A., Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations, *J Control Release*. **59**, 149–161 (1999).
6) Kunta J.R., Goskonda V.R., Brotherton H.O., Khan M.A., Reddy I.K., Effect of menthol and related terpenes on the percutaneous absorption of propranolol across excised hairless mouse skin, *J Pharm Sci*. **86**, 1369–1373 (1997).
7) Zakrewsky M., Lovejoy K.S., Kern T.L., Miller T.E., Le V., Nagy A., et al., Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization, *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. **111**, 13313–13318 (2014).
8) Kitaoka M., Wakabayashi R., Kamiya N., Goto M., Solid-in-oil nanodispersions for transdermal drug delivery systems, *Biotechnol J*. **11**, 1375–1385 (2016).
9) Dautzenberg H., Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems. 1. Effect of salt: Polyelectrolyte complex formation in the presence of NaCl, *Macromolecules*. **30**, 7810–7815 (1997).
10) Schatz C., Lucas J.-M., Viton C., Domard A., Pichot C., Delair T., Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers, *Langmuir*. **20**, 7766–7778 (2004).
11) Tokudome Y., Komi T., Omata A., Sekita M., A new strategy for the passive skin delivery of nanoparticulate, high molecular weight hyaluronic acid prepared by a polyion complex method, *Sci Rep*. **8**, 2336 (2018).
12) de Belder A.N., Wik K.O., Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate, *Carbohydr Res*. **44**, 251–257 (1975).

# 有害物侵入を最前線で防ぐ新規な皮膚細胞機構の発見と皮膚保護剤創製への応用

岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

中村　元直

G-protein coupled receptors (GPCRs) are pivotal targets in medical and pharmaceutical research fields because a wide variety of disease-related processes are critically controlled by the signal transduction mediated by these receptors. Type 2 better taste receptors (TAS2Rs) comprise a large family of GPCRs with 25 distinct isoforms encoded in the human genome. Recent studies have shown that TAS2Rs are not only expressed in the taste buds of the tongue, but also in the skin. In the present study, we showed the functional expression of all human TAS2Rs in the human keratinocytes. Interestingly, these TAS2R proteins are not localized on the plasma membrane, mainly detected in the cytoplasmic regions in the immune-fluorescent staining experiments of the keratinocytes. The expressions of TAS2Rs in these cells were enhanced by the stimulation with bitter compounds, such as denatonium, diphenhydramine and saccharine. Furthermore, the stimulation of bitter compounds further increased the expression of three ABC-transporters, ABC-B1, ABC-C1 and ABC-G2, which are involving in the multidrug-resistance of various cancer cells. These results raise the possibility that the activation of TAS2Rs by the bitter compounds enhances the exclusion of these substances from the keratinocytes through the ABC-transporters. The analyses of the signaling pathway evoked by the TAS2Rs revealed the coupling of these receptors with Gαi and/or Gα12/13, followed by the activation of NF-κB. Together, these results suggest that the keratinocytes possess TAS2Rs in the cytoplasmic organelles, and recognize the infiltrated substances, including bitter compounds, resulting in the activation of the ABC-transporters, such as ABC-B1, ABC-C1 and ABC-G2, to exclude the substances.

## 1. 緒　言

ヒトは自然界で生きる限り様々な有害物に触れる。生命をも脅かすこうした異物は２つに分類される。１つはウイルスや細菌などの病原微生物であり、もう１つは有害化合物である（図1）。ヒトは前者に対しては免疫防御システムで対抗する。しかし後者に対しては、苦味感覚による拒絶反応こそあるものの、皮膚などに侵入した有害物を感知し、排出する機構については十分解明されていない。我々は、苦味受容体が有害物排除に深く関わると予測している。即ち、皮膚に発現する苦味受容体は、細胞内に侵入した有害物をリガンドとして感受して活性化され、排除機構発動シグナルを惹起することで有害物を細胞外に排出するという仮説である（図2）。ところで、ヒト苦味受容体遺伝子には多様性があり、個々人で若干の配列差異が存在する。この配列多様性は異物排除能の個人差に直結する。ある苦味受容体が皮膚細胞内に侵入した炎症原因物質を感受できない配列の場合、当該物質を細胞外に排除できず、蓄積してしまうことで皮膚に悪影響を及ぼすであろう。これが有害物侵入に起因する皮膚炎の個人差と考える。こうした人のためには無害な苦味受容体賦活剤を創製し、これを炎症部位に塗布することで排除機構を作動させ、蓄積有害物の排除を促進することで皮膚炎悪化を回避させることができるかもしれない。こうした奇抜な発想を実現化するために基盤的な知見を積み上げるのが本課題の目的である。



Functional expression of the bitter taste receptors in human keratinocytes

Motonao Nakamura

Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science

## 2. 方　法

### 2. 1. 苦味受容体の皮膚組織、細胞株での発現解析

ヒトケラチノサイト（−/＋分化）、および、ヒト表皮角化細胞株であるHaCaT細胞での25種類の苦味受容体遺伝子の発現確認は、これら細胞よりRNAを調製してcDNAを合成後、これを鋳型としたRT-PCR法で行った。なお、ヒトケラチノサイトの分化誘導は、1mM塩化カルシウム添加下での３日間培養で行った。

### 2. 2. ヒト皮膚組織での苦味受容体タンパクの発現解析

ヒト皮膚組織切片を用いた苦味受容体タンパク（25種類のうち、TAS2R14とTAS2R38を解析）の発現解析は、市販の抗TAS2R14抗体と抗TAS2R38抗体を用いて行った。本解析は、東京大学医学部皮膚科の住田隼一医師に依頼し、実施して頂いた。解析に用いたヒト皮膚組織切片は、健常人から作製した組織とアトピー性皮膚炎患者から作製したものの２種類を用いた。

### 2. 3. 苦味受容体の細胞内局在解析

φ35mmのディッシュ（glass bottom）で培養したHaCaT細胞を固定化し、透過処理後、一次抗体反応（抗TAS2R14抗体と抗calnexin抗体、抗transferrin receptor抗体、抗

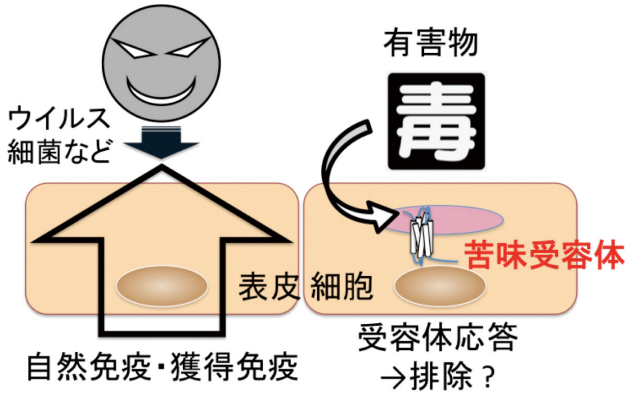



図１　ヒトが持つ２つの生体防御システム

生命を脅かす異物は2つに分類される。1つはウイルスや細菌等の病原微生物であり、もう1つは有害化合物である。ヒトは前者に対しては免疫防御システムで対抗する。しかし後者に対しては、皮膚などに侵入した有害物を感知し、排出する機構については十分解明されていない。我々は、苦味受容体が有害物排除に深く関わると予想している。

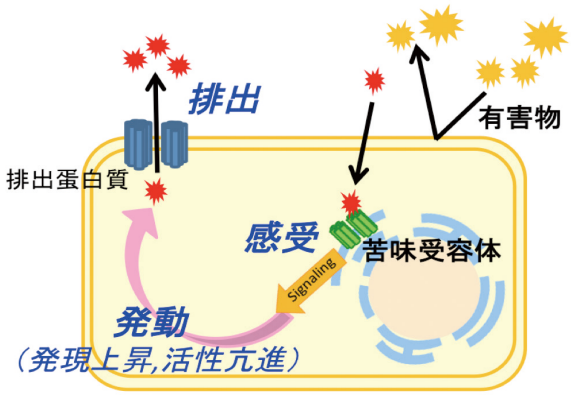



図２　皮膚細胞への有害物の侵入（作業仮説）

皮膚は様々な危険物質に曝される。大きい物質や親水性物質は角質層や脂質二重膜によって細胞内侵入を阻止できるが、疎水性低分子は細胞内に侵入する。苦味受容体の局在部位はどこか（感受）、リガンド（苦味物質）結合後、どのような情報伝達を発信するのか（発動）、受容体の活性化が有害物排除のトリガーとなるのか（排出）、本研究ではこの3つの課題に取り組む。

Golgin-97 抗体、抗EEA1 抗体、抗CD71 抗体、或いは、抗COX IV抗体の組合せ）を行った。その後、二次抗体反応（AF-546 標識抗ラビットIgG抗体［TAS2R14 抗体用］とAF-488 標識抗マウスIgG抗体［オルガネラマーカー抗体用］）を行い、PBSで洗浄後、共焦点蛍光顕微鏡を用いて苦味受容体とオルガネラマーカーの細胞内局在観察を行った。

### 2. 4. 分化ヒトケラチノサイトを苦味物質で刺激した際の苦味受容体遺伝子の発現上昇

ヒトケラチノサイトの分化誘導は、1mM塩化カルシウム添加下での３日間培養で行った。分化ヒトケラチノサイト、および、線維芽細胞を1mMデナトニウムで15時間刺激後、これら細胞よりRNAを調製してcDNAを合成し、苦味受容体やABCトランスポーター（ABC-B1、ABC-C1、および、ABC-G2）の発現変動（mRNA量）を定量PCR法で行った。苦味受容体の解析は25種類の苦味受容体のうちTAS2R14とTAS2R38について実施し、β-アクチンをコントロールとして評価した。

### 2. 5. ルシフェラーゼレポーター系を活用した苦味受容体情報伝達解析

HEK293T細胞にTAS2R38と５種類いずれかのGPCRシグナル応答性レポーター（CRE、SRE、AP-1、NFAT、或いは、SRFエレメントのいずれかを連結した深海エビルシフェラーゼ［NanoLuc］）を導入し、TAS2R38リガンド（フェニルチオカルバミド; PTC、或いは、6-n-プロピルチオウラシル; PROP）で刺激した際のルシフェラーゼ活性の上昇を評価した。リガンド刺激はいずれも1mM濃度で、15時間刺激した。

### 2. 6. NF-κBの活性化の評価

1mM塩化カルシウム添加下での３日間培養で分化誘導したヒトケラチノサイトを1mMデナトニウムで15時間刺激後、Hypotonic緩衝液で細胞を破砕し、遠心分離により核画分を単離した（上清は細胞質画分として解析に供した）。その後、この核画分を核タンパク質抽出緩衝液に懸濁することで核タンパク質を抽出し、核タンパク質画分として解析に供した。本実験では古典的経路に着目し、検出はNF-κBの構成サブユニットのうち、p65に着目して解析を行った。即ち、細胞質タンパク質画分と核タンパク質画分に存在するtotal p65比較と核内リン酸化p65の量をWestern blottingでの検出バンドの濃さで比較した。

## 3. 結　果

ヒトはGタンパク質共役型受容体（GPCR）に属する25種類の苦味受容体遺伝子を持つ。本研究ではまず、苦味受容体に関する以下の３つの知見を得ることを目指した。(i) この受容体群は皮膚細胞に発現する、(ii) この受容体は形質膜ではなく細胞内に局在する、(iii) 皮膚細胞を苦味物質で刺激すると異物排出に関わるABCトランスポーターの発現が増強する。

### 3. 1. 苦味受容体群のヒトケラチノサイト における発現解析

ヒトケラチノサイトにおける25種類の苦味受容体遺伝子の発現をRT-PCRにて解析した結果、1mM塩化カルシウムでの分化誘導によって角化系細胞に分化後、いずれの

受容体も明らかな発現上昇が認められた（図3）。なお、この発現上昇は定量PCRでも確認している（data not shown）。また、同様の25種類の苦味受容体遺伝子発現はヒト表皮角化細胞株であるHaCaT細胞においてもRT-PCR法で確認している（data not shown）。

### 3. 2. ヒト皮膚組織での苦味受容体タンパクの発現解析

ヒト皮膚組織切片を用いた苦味受容体タンパク（25種類のうち、TAS2R14とTAS2R38を解析）の局在解析は、市販の抗TAS2R14抗体と抗TAS2R38抗体を用いて行った。本解析は、東京大学医学部皮膚科の住田隼一医師に依頼し、実施して頂いた。解析に用いたヒト皮膚組織切片は、健常人から作製した組織とアトピー性皮膚炎患者から作製したものの２種類を用いた。解析の結果、両受容体とも表皮付近に高い発現が認められたが、健常人とアトピー性皮膚炎患者との間に特筆すべき差異は認められなかった（図4）。

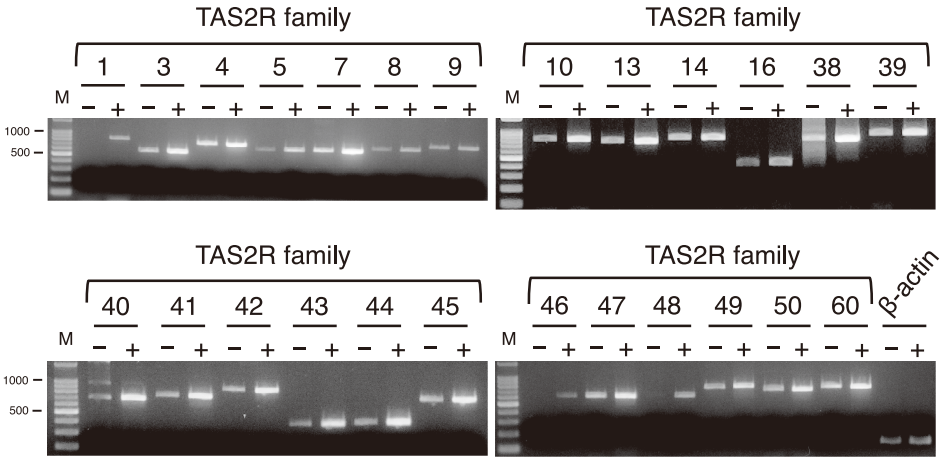



図3　ヒトケラチノサイトでの25種類の苦味受容体遺伝子の発現解析

ヒトケラチノサイト由来のcDNAを鋳型とした発現解析の結果を示す。ケラチノサイトは1mM 塩化カルシウム添加有無によって未分化（−）、分化（＋）の２つの状態のものを用いた。これら細胞からRNAを調製し、このRNAから合成したcDNAを用いてRT-PCRを行った。いずれの細胞株からも25種類全ての苦味受容体の発現が認められた。

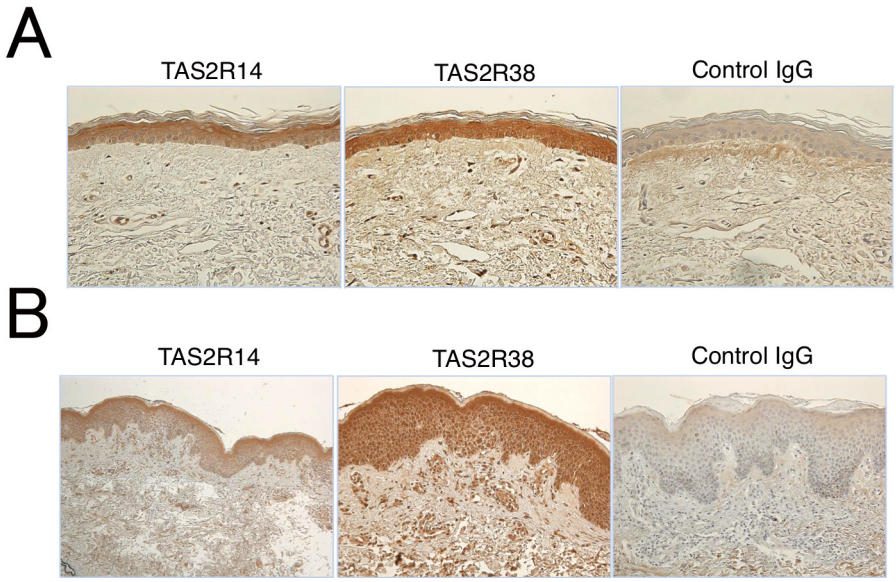



図4　ヒト皮膚組織におけるTAS２R14、および、TAS２R38タンパクの発現

ヒト皮膚組織におけるTAS２R14、および、TAS２R38タンパクの免疫染色実験の結果を示す。解析に使用したヒト皮膚組織切片は全て東京大学医学部にて倫理委員会の承認のもと、調整されたものである。Aは健常人から調整した皮膚組織、Bはアトピー性皮膚炎患者から調整した皮膚組織である（東京大学医学部皮膚科の住田隼一医師との共同研究）。

### 3. 3. 皮膚系細胞株における苦味受容体の細胞内局在解析

共焦点顕微鏡を用い、HaCaT細胞での当該受容体の細胞内局在を免疫染色で調べた結果、抗TAS2R14（図5）、抗TAS2R38（data not shown）のいずれの抗体を用いた解析でも受容体の局在は形質膜ではなく、細胞内を示唆するものであった。先行研究で皮膚組織における苦味受容体発現の報告はあるものの、細胞内局在への言及については全くない[1)]。なお、小胞体（calnexin）、ゴルジ体（Golgin-97）、リサイクリングエンドソーム（transferrin receptor）、初期エンドソーム（EEA1）、リソソーム（LAMP-1）、ミトコンドリア（COX IV）などの局在マーカーを用い、共局在性を検討したが、何のマーカーに対しても有意な共局在性を示すものはなかった。なお、同様の細胞内局在はヒトケラチノサイト でも確認している（data not shown）。

### 3. 4. ヒトケラチノサイト を苦味物質で刺激した際の苦味受容体の発現増強

前述の分化ヒトケラチノサイトと線維芽細胞のそれぞれを1mMのデナトニウムで15時間刺激し、苦味受容体遺伝子発現量の変化を定量PCR法で調べた。図6に示すように、両受容体とも分化ヒトケラチノサイトでは苦味物質刺激で発現の上昇が認められたが、線維芽細胞では認められなかった。なお、同様の苦味物質刺激（1mMのデナトニウム、1mMサッカリン、0.1mM キニーネ塩酸塩など）による苦味受容体自身の発現増強はHaCaT細胞においても認めている（data not shown）。

### 3. 5. ヒトケラチノサイトを苦味物質で刺激した際のABCトランスポーターの発現増強

前述の分化ヒトケラチノサイトを1mMデナトニウムで

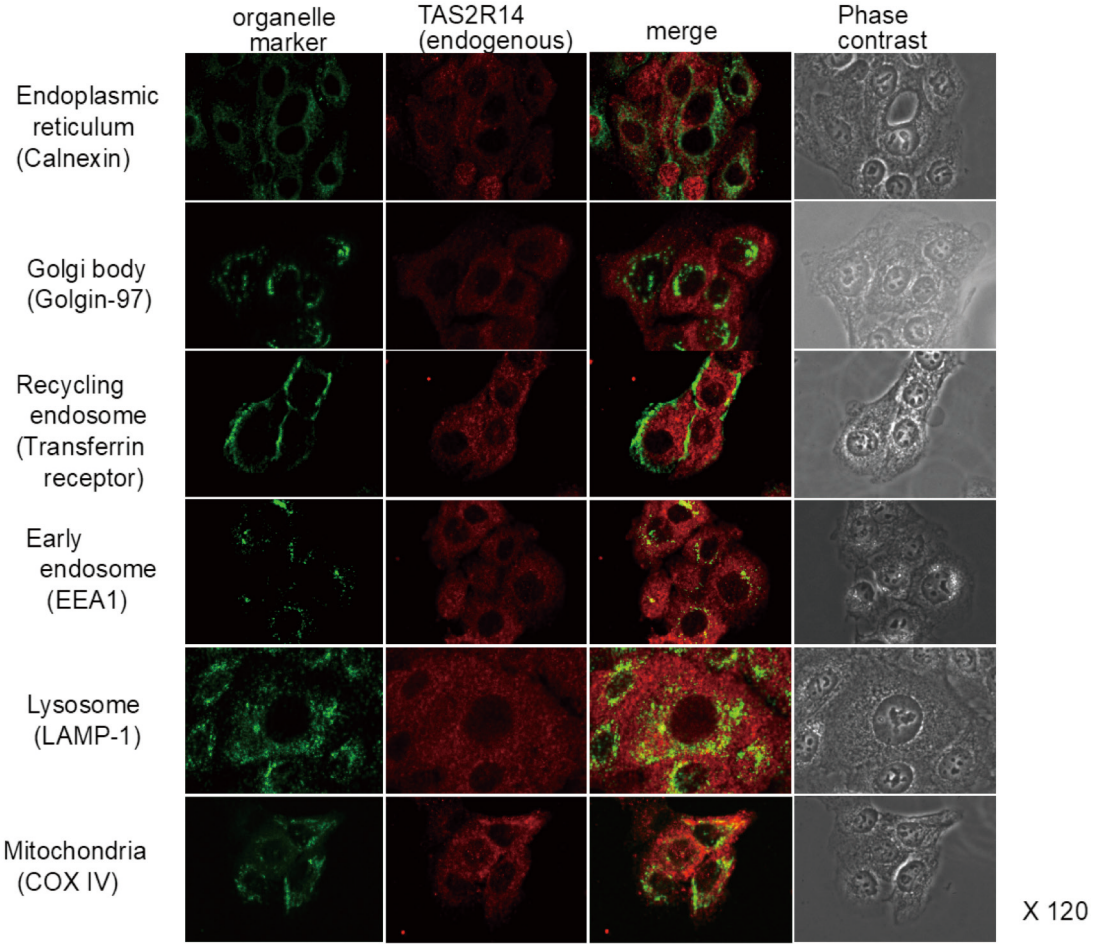



図5　HaCaT細胞における苦味受容体の細胞内局在解析

HaCaT細胞に発現しているTAS2R14と6つのオルガネラ（Endoplasmic reticulum、Golgi body、Recycling endosome、Early endosome、Lysosome、Mitochondria）特異的タンパクを市販抗体で染色し、共焦点顕微鏡で共局在性を評価した。緑；抗オルガネラタンパク抗体で反応後、Alexa Fluor（AF）488標識抗マウスIgG 抗体で蛍光染色した。赤；抗TAS2R14抗体で反応後、AF546標識抗ウサギIgG抗体で蛍光染色した図。Merge；TAS2R14と各オルガネラマーカーの局在を重ね合わせた図。Phase contrast；明視野で細胞を観察した図。

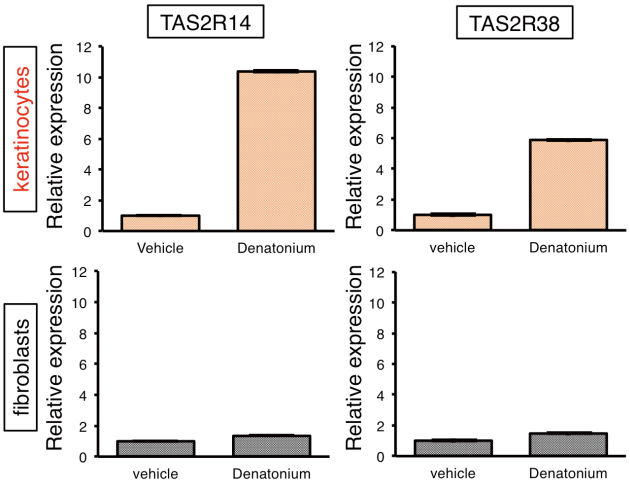



図6　ヒトケラチノサイトをデナトニウムで刺激した際の苦味受容体の発現上昇

分化ヒトケラチノサイトと線維芽細胞を1mMデナトニウムで15時間刺激した際の苦味受容体遺伝子(TAS2R14、TAS2R38)の発現上昇を定量PCRで調べた。β-アクチン遺伝子の発現量をコントロールとした。

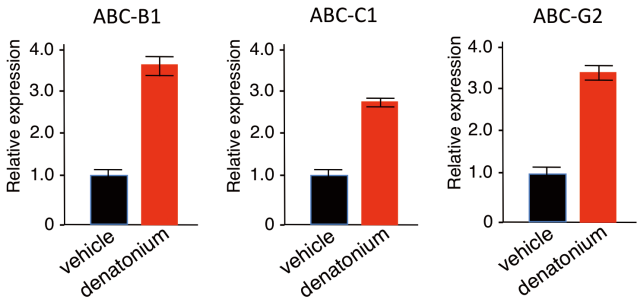



図7　苦味物質刺激による異物排出ABCトランスポーターの発現増強

分化ヒトケラチノサイト を1mMデナトニウムで刺激した際のABC-B1、ABC-C1、および、ABC-G2の発現上昇を定量PCRで調べた。β-アクチン遺伝子の発現量をコントロールとした。

15時間刺激した細胞よりRNAを調製し、cDNA合成後、定量PCR法によりABCトランスポーターの遺伝子発現変動を解析した。なお、本実験では、ABCトランスポーターの中でも抗がん剤排出への関与が報告されている3つのトランスポーター、ABC-B1、ABC-C1、ABC-G2に着目し、これらの発現量変化を解析した。その結果、苦味物質刺激に伴い、ABC-B1、ABC-C1、ABC-G2いずれの遺伝子も発現が有意に上昇することが示唆された(図7)。なお、同様の苦味物質刺激(1mMのデナトニウム、1 mMサッカリン、0.1mM キニーネ塩酸塩など)によるABC-B1、ABC-C1、ABC-G2の発現増強はHaCaT細胞においても認めている(data not shown)。

### 3. 6. 苦味受容体から発信される情報伝達

苦味受容体群はGPCRファミリーに属する。この受容体群から発信される情報が何のGタンパク質を介したものかを知るために、以下の実験を行った。HEK293T細胞にTAS2R38と5種類いずれかのGPCR応答性レポーター(CRE、SRE、AP-1、NFAT、或いは、SRFエレメントを連結した深海エビルシフェラーゼ)を導入し、TAS2R38のリガンドとして認知されているフェニルチオカルバミド(PTC)、或いは、6-n-プロピルチオウラシル(PROP)で15時間刺激した際のルシフェラーゼ活性の上昇を評価した[2]。その結果、どちらの刺激もSREおよびSRFエレメントを活性化する結果が認められた(図8)。我々はこの実験によって苦味受容体に共役しているGタンパク質に関しては、$G\alpha_i$型と$G\alpha_{12/13}$型の関与を予想した。

### 3. 7. NF-κBの活性化評価

先行研究より、ABC-B1の発現にNFκ-Bの活性化が深く関与し、抗がん剤耐性回避の標的分子として注目されている[3-6]。そこで、前述の分化ヒトケラチノサイトを1mMデナトニウム、1mM PTC、1mMサッカリン、1mM サリシン、或いは、0.1mM キニーネ塩酸塩で15時間刺激し、p65の核移行量や核移行p65のリン酸化度合いからNFκ-Bの活性化を評価した。その結果、これら苦味物質の刺激でNFκ-Bが有意に活性化されていることが示唆された(図9)。なお、同様の苦味物質刺激(1 mMのデナトニウム、1mMサッカリン、0.1mM キニーネ塩酸塩など)によるNFκ-Bの活性化はHaCaT細胞においても認めている(data not shown)。

## 4. 考　察

冒頭で述べたように、本研究では苦味受容体に関する以下の3つの知見の確保を目指した。(i) この受容体群は皮膚細胞に発現する、(ii) この受容体は形質膜ではなく細胞内に局在する、(iii) 皮膚細胞を苦味物質で刺激すると異物排出に関わるABCトランスポーターの発現が増強する。(i) に関しては、ケラチノサイトや表皮角化細胞株での25種類全ての苦味受容体遺伝子の発現のみならず、ヒト皮膚組織での苦味受容体タンパクの確認などから、外界に最も接する表皮組織に苦味受容体が発現していることを示唆できた。(ii) 興味深いことに、これら苦味受容体は形質膜ではなく細胞内に局在するが、本研究期間ではその局在部位を明確にすることはできなかった。細胞破砕後の分画で当該受容体は膜画分に検出されることからいずれかのオルガ

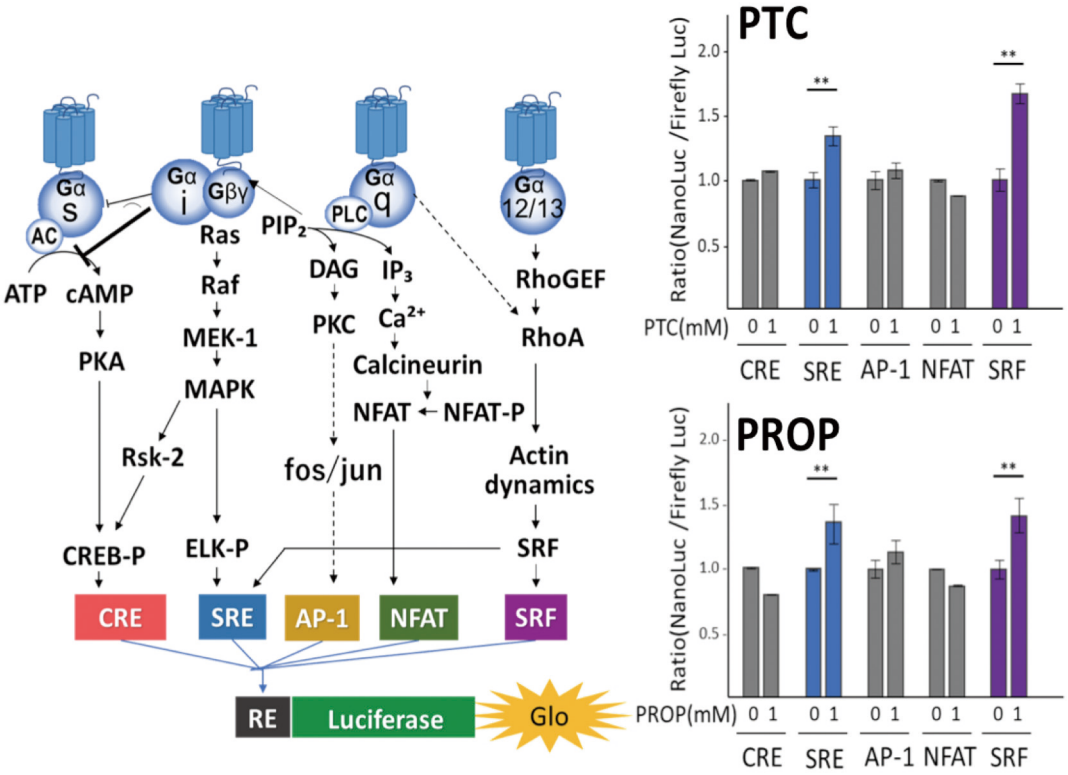



図８　GPCRシグナル応答性レポーターを活用した苦味受容体情報伝達経路の解析

HEK293TにTAS2R38と5種類いずれかのGPCRシグナル応答レポーター（CRE、SRE、AP-1、NFAT、或いは、SRFエレメントを連結した深海エビルシフェラーゼ）を導入し（左）、TAS2R38リガンド（PTC或いは、PROP）で刺激した際のルシフェラーゼ活性の上昇を評価した。どちらの刺激もSREおよびSRFエレメントの活性化が認められた（右）。

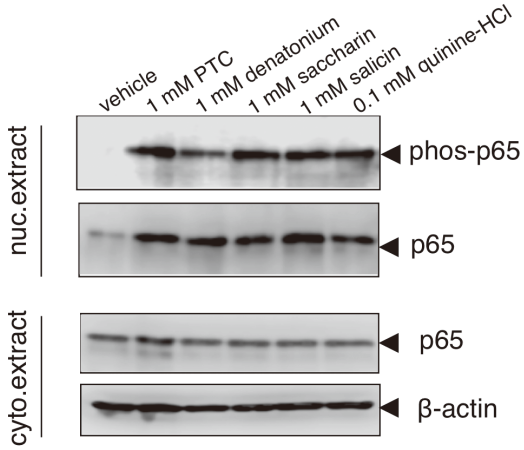



図９　分化ヒトケラチノサイトにおける苦味物質刺激後のNFκ-Bの活性化

分化ヒトケラチノサイトを1mM PTC、1mMデナトニウム、1 mM サッカリン、1mM サリシン、或いは、0.1 mM キニーネ塩酸塩で刺激した際のNFκ-Bの活性化。p65；NFκ-Bのp65サブユニット、phos-p65；NFκ-Bのp65サブユニットのリン酸化体

ネラ膜に局在するものと推察する。小胞体なのか？ゴルジ体なのか？或いは、それ以外なのか？解明が今後の大きな課題である。（iii）図２に示す作業仮説からすれば、苦味物質で刺激を受けたケラチノサイトや表皮角化細胞株では異物排出のためのタンパク質が増加/作動することが予想できる。我々はまずABCトランスポーターに着目し、その中でも異物排出能の報告があるABC-B1、ABC-C1、ABC-G2に関して解析を行った[7]。なお、ヒト結腸腺癌細胞株であるCaco2細胞での苦味受容体を介したABC-B1の発現上昇や[8]、皮膚組織でのABC-B1の発現については先行研究で既に報告されている[9]。本研究において、我々は分化ケラチノサイトの苦味物質刺激に伴いABC-B1、ABC-C1、ABC-G2の発現が増加すること見出した。実際に細胞自体がこうしたタンパク質の発現増加で異物排出能を高めているか否かを今後行う予定である。例えば、蛍光ローダミンを細胞に取込ませ、苦味受容体刺激で排泄能が高まるか否かを調べる計画である[10]。

本研究から、創薬に関して我々は以下の提案をする。苦味受容体遺伝子には配列多様性があり、これは異物排除能の個人差に直結する。皮膚炎原因物質を感受できない配列を持つ場合、当該物質を排除できず、蓄積によって皮膚炎が発症するであろう。こうした人のために、無害な苦味受容体賦活剤を創製し、これを炎症部位に塗布することで排除機構を作動させ、蓄積有害物の排除を促進することで皮

膚炎悪化を回避させる考えである（図10）。苦味受容体を創薬標的として捉えた点では前例のない研究である。GPCRは形質膜から情報発信すると考えられてきたが、本研究はこうした概念も覆す。細胞内GPCR情報伝達という新たな研究領域を提唱できる可能性も秘めている。生体防御の観点からも、こうした防御機構の提唱はこれまで全くなかった。本研究は新規創薬への挑戦でもある。

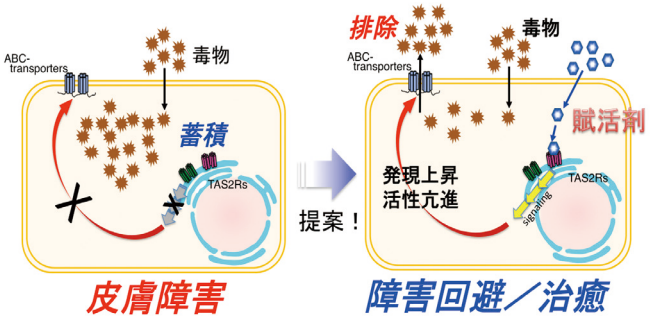



図10　苦味受容体を標的とした創薬アイデア
25種類の苦味受容体の中で配列個人差のない受容体を標的とし、これを活性化する無害な賦活剤を創製すれば、皮膚細胞内へ蓄積した有害物質を細胞外に排出させることができる。

## 5．謝　辞

ヒト皮膚組織切片を用いた苦味受容体の発現解析にご協力頂いた東京大学医学部皮膚科の住田隼一医師に感謝いたします。本研究の遂行にあたり、助成をしてくださった公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝いたします。助成金により遂行された本研究成果は、国内外の学会や国際学術雑誌に発表することで社会に還元し、貢献することをお約束します。

（引用文献）

1）Wolfle U., Elsholz FA, Kersten A, Haarhaus B, Muller WE, Schempp CM: Expression and functional activity of the bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R38 in human keratinocytes. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 28,137-146, 2015

2）Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M: The molecular receptive of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses*. 35, 157-170, 2010

3）Kuo MT, Liu Z, Wei Y, Lin-Lee Y, Tatebe S, Mills GB, Unate H: Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NKκ-B signaling. *Oncogene*, 21, 1945-1954, 2002

4）Sun J, Yeung CA, Co NN, Tsang TY, Yau E, Luo K, Wu P, Wa JCY, Fung K-P, Kwok T-T, Liu F: Clitocine reversal of P-glycoprotein associated multi-drug resistance through down-regulation of transcription factor NKκ-B in R-HepG2 cell line. *PLOS One*,7, e40720, 2012

5）Davoudi Z, Akbarzadeh A, Rahmatiyamchi M, Movassaghpour A, Alipour M, Nejati-Koshki K, Sadeghi Z, Dariushnejad H, Zarghami N: Molecular target therapy of AKT and NKκ-B signaling pathway and multi-drug resistance by specific cell penetrating inhibitor peptides in HL-60 cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15, 4353-4358, 2014

6）Wu W, Yang J-J, Wang Y-L, Wang H, Tao M, Wang L, Gu J-J, Cai Y, Shi Y, Yao D-F: Reversal of multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells by metformin through inhibiting NKκ-B gene expression. *World J. Hepatol.*, 8 (23), 985-993, 2016

7）Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo A, Bates SE, Gottesman MM: Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18, 452-464, 2018

8）Jeon TII, Seo YK, Osborne TF: Gutbitter taste receptor signaling induces ABCB1 though a mechanism involving CCK. Biochem J., 438 (1), 33-37, 2011

9）Skazik C, Wenzel J, Marquardt Y, Kim A, Merk HF, Bickers DR, Baron JM: P-glycoprotein（ABCB1）expression in human skin is mainly restricted to dermal components. *Experimental Dermatology*, 20, 450-452, 2011

10）Kim HG, Hein TT, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Kang KW, Kwon K-il, Kim B-H, Kim SK, Song GY, Jeong TC, Jeong HG, Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NKκ-B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *British J. Pharmacol.*, 162, 1096-1108, 2011

# ヒトiPS細胞に由来する若齢および加齢様の性質を示す積層および立体皮膚オルガノイドの作製

関西医科大学大学院医学研究科医科学専攻 イノベーション再生医学 iPS・幹細胞再生医学講座

服部　文幸

It goes without saying that healthy skin is the most important foundation of cosmetics. Easily evaluate the benefits of new ingredients such as protective ingredients from external stimuli such as ultraviolet rays and dryness, and ingredients supplied from the dermis to the epidermis in order to maintain a higher degree of skin health against aging. That is important. On the contrary, it is also important to predict the negative effects on skin health by applying or drinking these new ingredients in order to prevent the occurrence of side reactions. Traditionally, these evaluations have been performed exclusively with animals. However, physiological difference between spiecies that have hindered accurate screening has not been overcome, yet. Furthermore, in recent years, the spirit of animal protection and the development of laws and regulations have rapidly become widespread, and there is a social demand for the complete abolition of animal experiments, especially in the field of cosmetics. Under such circumstances, human iPS cells have few ethical problems in establishment and can be widely used in industry. Human iPS cells are theoretically infinitely self-renewable and can differentiate into any somatic cell, so the merit of utilizing them in the field of cosmetology is immeasurable. Therefore, we created a three-dimensional skin model using human iPS cells derived from a Japanese Werner Syndrome patient. Furthermore, we introduced a p16INK4A reporter that is activated in senescent cells into the above cell line to develop a system that can observe aging in real time. Using this system, we also found that the aging of them was accelerated by exposure to Doxorubicin.

## 1．緒　言

健やかな皮膚は、コスメトロジーにおいて最も重要な基盤であることは言うまでもない。加齢に抗して皮膚の健康状態をより高度に維持するために、紫外線や乾燥など外部刺激からの防御成分や、真皮から表皮への供給成分など、新規成分の有益性を簡便に評価することは重要である。また、逆にこれら新規成分の塗布や飲用により、皮膚健康に与える負の影響を予見することも、副反応の発現を未然に防ぐために重要である。従来、これらの評価は、専ら動物を用いて実施されてきた。しかしながら、従来の動物を用いた試験には根本的な種差の壁があり、正確なスクリーニングが妨げられてきた。さらに、昨今では動物愛護精神と法令の整備が急速に普及し、特にコスメトロジー分野では、動物実験を完全に廃止することが社会的に求められている。

このような状況にあって、ヒトiPS細胞は、樹立における倫理的問題も少なく、産業界で広く活用できる。ヒトiPS細胞は、理論的に無限に自己複製可能であり、またどの体細胞へも分化できる点で、コスメトロジー分野で利活用するメリットは計り知れない。

そこで、我々は、日本人の早老症（Werner Syndrome）由来のヒトiPS細胞を用いて立体皮膚モデルを作製した。さらに老化細胞で活性化されるp16INK4Aレポーターを遺伝子導入し、リアルタイムに老化を観察できるシステムを構築した。さらにこの老化がDoxorubicinの暴露により加速されることを見出した。



Preparation of laminated and three-dimensional skin organoids derived from human iPS cells showing young and age-like properties

Fumiyuki Hattori

Department of Innovative Regenerative Medicine Kansai Medical University Graduate School of Medicine

## 2．方　法

### 2．1．細胞

日本人、健常人およびWerner患者由来iPS細胞は、共に理研細胞バンクから入手した。

### 2．2．細胞分化

ヒトiPS細胞の未分化維持培養方法は、文献1に基づき一部改良を加えた。

ヒトiPS細胞の線維芽細胞分化は、文献2および文献3の方法に基づき実施した。

ヒトiPS細胞のケラチノサイト分化は、文献4の方法に基づいて行った。

立体皮膚モデルの作製方法は、文献2の方法を一部改良して実施した。

### 2．3．p16INK4Aレポーター株の作製

老化指標としてp16INK4Aの発現をリアルタイムで観察するために、レポーターを作製し、ヒトiPS細胞に対し恒常的遺伝子導入を行い、遺伝子導入株を作製した。レポーターは、p16INK4Aプロモーター領域をクローニングし、この支配下にEGFPを配した。さらにこの遺伝子発現ユニットをPiggyBacプラスミドへと薬剤耐性遺伝子の恒常的発現ユニットとタンデムに挿入した。ウェルナー症候群患者由来iPS細胞に対して上記のレポータープラスミド

をリポフェクション法により遺伝子導入した。恒常的遺伝子導入株の選別を薬剤耐性により実施し、数株のクローンを得た。

### 2. 4. 人工的老化誘導の実施

人工的な老化を発生させるために、ゲノムの二重鎖切断を発生させる抗がん剤: Doxorubicinを低濃度20, 30, 50 nMで5日間暴露し、その後増殖促進培地において1週間培養を行ってから、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

## 3. 結　果

### 3. 1. 積層皮膚モデルの構築

コラーゲンなどの細胞外マトリックスの混合物に対し、分散したヒトiPS細胞由来線維芽細胞を懸濁した後、半透膜培養カップ上に播種を行った後にゲル化処理を行った。これにより、細胞外マトリックス真皮の構造を模した。培養直後は、ゲル中に均一に分散して存在した線維芽細胞は、1週間の後には、線維芽細胞どうしが相互作用した編み目状の構造を呈した。さらに、緑色蛍光タンパク質を恒常的に発現させる遺伝子組み換えを行ったヒトiPS細胞から分化誘導したケラチノサイトを真皮上に播種したところ、迅速に接着、平面状に広がった。これらにより構築された立体皮膚モデルは、構築後2ヶ月以上安定して維持できた(図1)。

健常人およびWerner syndrome患者由来iPS細胞から線維芽細胞およびケラチノサイトを分化誘導することに成功した。

### 3. 2. 老化レポーターiPS細胞株の作製

次に、皮膚細胞の老化度をリアルタイムに検出し、選別可能とするために、老化レポーターを有するヒトiPS細胞株の樹立を行った。プラスミド遺伝子の構造は図2Aのとおりであり、ウェルナー症候群患者由来iPS細胞への遺伝子導入株(図2B)は、正常な増殖能と多分化能を維持していた。未分化状態では蛍光レポーターを発現することはなかった。

### 3. 3. ウェルナー症候群患者由来分化細胞の自然老化

ウェルナー症候群由来iPS細胞から自然分化した細胞を5回継代したところ、増殖性が低下し細胞体が大きくなる

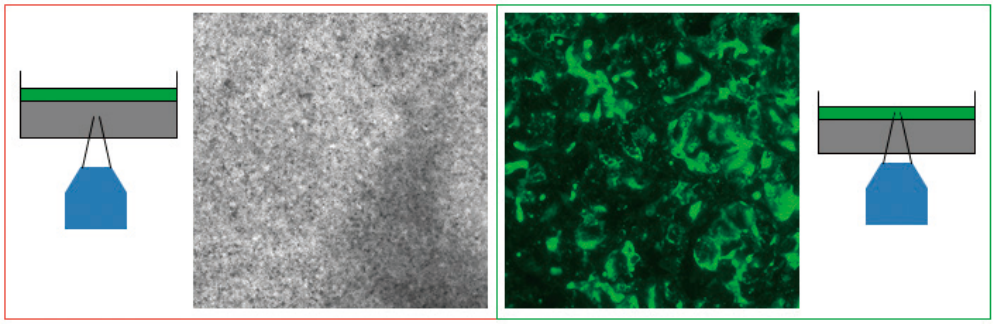



図1　積層皮膚モデル

トランスウェル上において、下層にヒトiPS細胞由来の線維芽細胞を、上層にヒトiPS細胞由来のケラチノサイトを培養した。ケラチノサイトにはGFPを恒常的に発現させた。

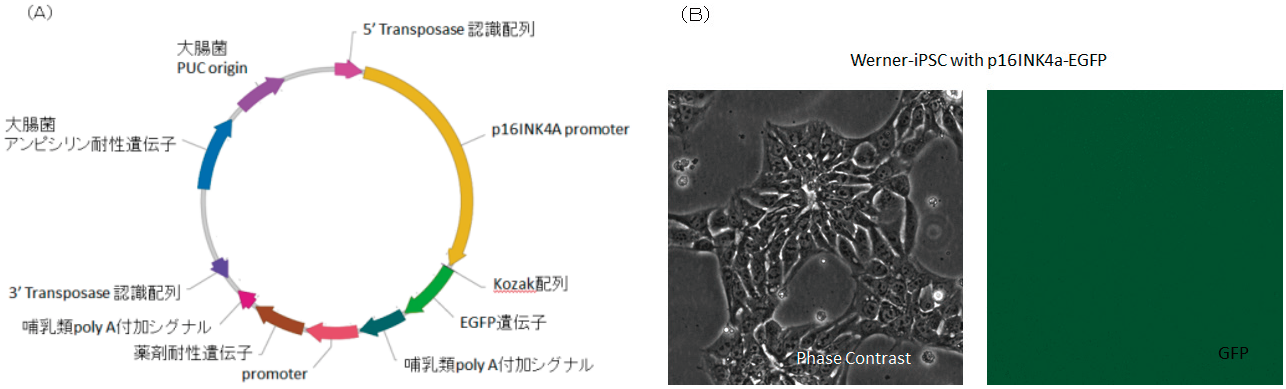



図2　p16INK4Aレポータープラスミドと導入したウェルナー症候群患者iPS細胞

(A) レポータープラスミドの構造を示した。(B) 遺伝子導入したウェルナー症候群患者由来iPS細胞とその緑色蛍光(老化していない細胞ではGFPを発現していない)。

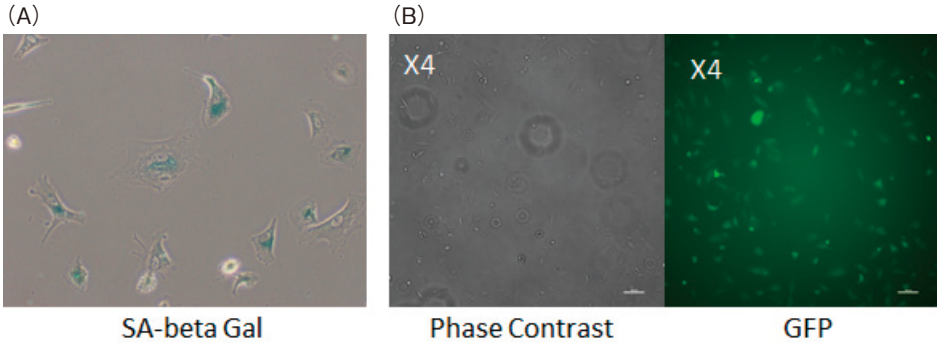



図３　ウェルナー症候群患者由来iPS細胞から分化した細胞の老化
ウェルナー症候群由来iPS細胞から分化した細胞を継代し得られた老化形質細胞。

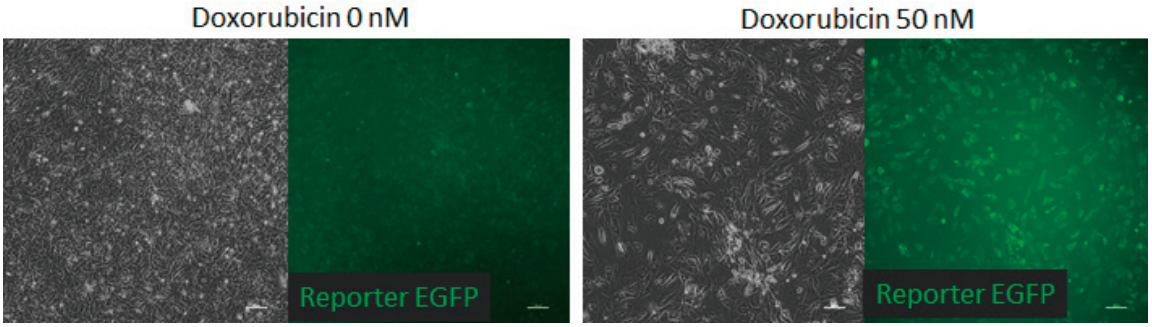



図4　ウェルナー症候群患者由来iPS細胞から分化した細胞の人工的老化促進

肥大を呈する状態に至った。この細胞のレポーターGFP発現状態を確認したところ、図3Bのように蛍光性を示した。同時に、この細胞を老化依存的βgal染色に供したところ、陽性を示した(図3A)。

### 3. 4. ウェルナー症候群患者由来線維芽細胞の人工的老化促進

続いて、p16INK4Aレポータープラスミドを導入したウェルナー症候群患者由来iPS細胞から、線維芽細胞を分化誘導した。この細胞は継代を3回経た状態では、蛍光性を示さなかった。この細胞に抗がん剤であり二本鎖DNA切断を惹起するDoxorubicinを5日間添加し、その後増殖可能な培地に交換して7日間培養を行った。Doxorubicin処理を行った細胞では、増殖が完全に停止し、細胞体が大きくなる、いわゆる老化細胞の様態を示した。この時にレポーターGFPの発現を観察したところ、図4に示すように、Doxorubicinに暴露された細胞にだけ強い蛍光シグナルを検出した。

## 4．考察と今後

ウェルナー症候群患者由来iPS細胞から分化誘導した線維芽細胞およびケラチノサイトから成る積層皮膚モデルを構築した。この時、ケラチノサイトの生存期間が単体で培養している時よりも著明に延長されたことは興味深い。次に老化の状態をリアルタイムで観察できるように、p16INK4Aのプロモーター配列を用いた「老化レポーターiPS株」を作製した。この株を線維芽細胞に分化誘導した直後においては、老化レポーターの発現は見られなかったが、分化後の継代を重ねることでレポーターの発現が誘導された。さらにDNAの二重鎖切断を引き起こす抗がん剤Doxorubicinを低濃度で長期間処理したところ、細胞の増殖性は完全に失われ、細胞質の肥大を呈する、いわゆる老化細胞様の形質を示した。この細胞においては、極めて強い老化レポーターの発現が観察された。このことから、ウェルナー症候群由来iPS細胞と、p16INK4Aレポーターの組み合わせにより、比較的短期間に老化の形質を呈する細胞を生きたまま入手可能であること、さらにDoxorubicinへの暴露により、老化形質細胞の出現を加速できることが示唆された。今後、老化レポーターを有するウェルナー症候群患者および正常人由来のiPS細胞から積層皮膚モデルを作成し、様々な抗老化候補物質の探索や効能確認に応用してゆく。

(引用文献)

1) Sci Rep. 2014 Jan 8; 4: 3594.
2) PLoS One. 2013 Oct 11; 8 (10) : e77673.
3) Stem Cell Res. 2011 Jan; 6 (1) : 83-9.
4) PLoS One. 2015 Aug 26; 10 (8) : e0136713.

# アレルギー性化合物を感知する自然免疫受容体の同定とそれを利用した感作抗原性評価系の樹立

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

原　博満

A variety of small reactive organic compounds, called haptens, induce allergic contact dermatitis (ACD), which is caused by T cells reactive to haptens. In the previous study, we identified that IL-1 secretion through immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-Syk-CARD9 signal activation is essential for dendritic cells to prime hapten-reactive T cells during the sensitization of contact hypersensitivity (CHS), an experimental model of ACD in mice. This finding implicates the presence of ITAM-coupled innate immune receptors that sense haptens. In this study, we sought to identify ITAM-coupled receptors expressed on myeloid cells that are responsible for CHS sensitization. We have identified two candidate receptors, IgSFR2 and IgSFR6, by screening for hapten-binding capacity using receptor-Ig fusion proteins and for ITAM-NFAT signal-activating capacity using receptor-expressing NFAT-GFP reporter cells. To evaluate the requirement of IgSFR2 and IgSFR6 for the induction of CHS, we performed TNCB-induced CHS using mice deficient for either IgSFR2 or IgSFR6, or both. However, deficiencies of these receptors did not affect the induction and severity of CHS as compared to wild-type mice. These results suggested that innate immune activation through IgSFR2 and IgSFR6 is not sufficient for CHS sensitization and other relevant ITAM-coupled receptors might exist and cooperatively act for hapten recognition and CHS sensitization together with IgSFR2 and IgSFR6.

## 1．緒　言

接触皮膚炎は職業現場において最も頻発する皮膚疾患である。中でも、アレルギー性接触皮膚炎（Allergic contact dermatitis: ACD）は日用品、医薬品や化粧品に含まれる様々な化合物がT細胞を感作することによって引き起こされる疾患であり、社会的にも大きな問題となっている。接触アレルゲンとなる感作性化合物（ハプテン）は宿主の蛋白質と結合することで抗原性を獲得するが、これまで3000種類近くの化合物がハプテンとして報告されている。化粧品や医薬品の開発過程で、配合成分の化合物の感作性を適切に評価することが必要となるが、現状では動物を用いたアレルギー性試験が主流である。その煩雑性や、環境や個体差から生じるデータの不安定性もさることながら、近年では動物愛護の倫理的観点から、その使用が量的にも質的にも制限されている。従って、これに替わる信頼度の高い*in vitro*評価系が求められている。特に、EUを中心に拡大しつつある「動物実験をして開発した製品の販売禁止」の世界的動向への対応は、我が国の産業界に迫られている喫緊の課題でもある。

免疫学の一般的理論として、ナイーブT細胞が抗原によってプライミングされ、エフェクターT細胞へと分化するためには、抗原を提示する樹状細胞（DC）がToll様受容体（TLR）などのパターン認識受容体（PRRs）を介して病原体成分（PAMPs）や内因性危険因子（DAMPs）を認識し、活性化（成熟）すること必要である。これはTLRによる微生物成分の認識を例に考えると理解しやすいが、構造的、化学的に多種多様なハプテンがどのような自然免疫受容体を介してDCを活性化、成熟させるのかについては明らかではなかった。

DCやマクロファージなどの自然免疫細胞が発現するC型レクチン受容体（CLR）やIgスーパーファミリー受容体（Trem、CD300ファミリーなど）の一部は、Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs（ITAM）を介して細胞内シグナルを活性化するITAM共役型受容体である[1]。骨髄系細胞のITAMの下流ではSykキナーゼの活性化が誘導され、さらにCARD9シグナル経路が活性化することでサイトカインなどの遺伝子発現が誘導される。近年、これらのITAM共役型受容体が様々なPAMPsやDAMPsを認識して様々な疾患の病態形成に関わることが明らかになってきている。我々は、ハプテンがDCのITAM-Syk-CARD9シグナルを活性化し、これによってDCから分泌されたIL-1がT細胞受容体の副刺激となって働くことで、ハプテン反応性のT細胞がプライミングされることを見出した[2]。この結果は、ハプテンを感知してDCを活性化する未知のITAM共役型受容体の存在を示唆するものであった（図1）。そこで本研究では、アレルギー性化合物を感知するITAM共役受容体の同定を試み、その受容体のACD発症における役割を明らかにすることを目指した。ACD発症に関わる受容体が同定された場合、その反応性を指標として化合物のアレルゲン性を評価する*in vitro*システムの開発が期待される。



Identification of innate immune receptors that sense allergic compounds for the development of novel assay systems to evaluate allergenicity

Hiromitsu Hara

Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

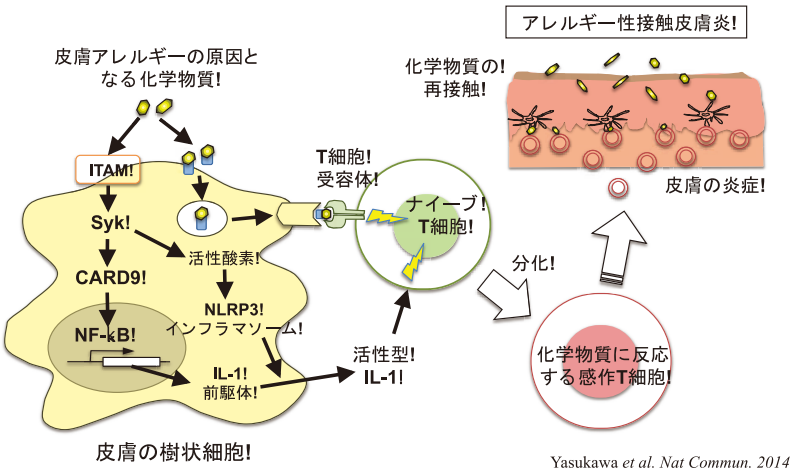



図1　アレルギー性化合物は、ITAM-Sykシグナルを介してNLRP3インフラマゾームとCARD9経路を活性化し、T細胞のプライミングに必須なIL-1を樹状細胞から分泌させる

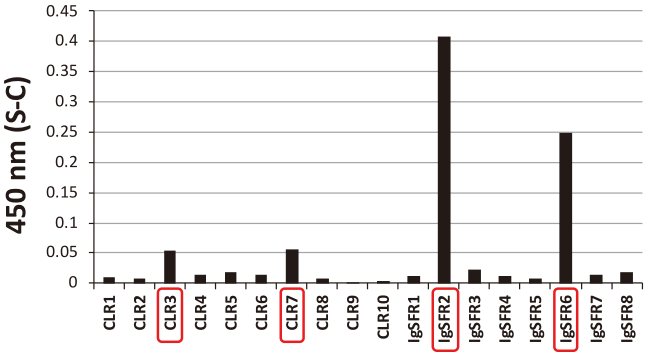



図2　TNCBに結合性を示すITAM共役受容体（受容体名は通し番号であり、分子名ではない）

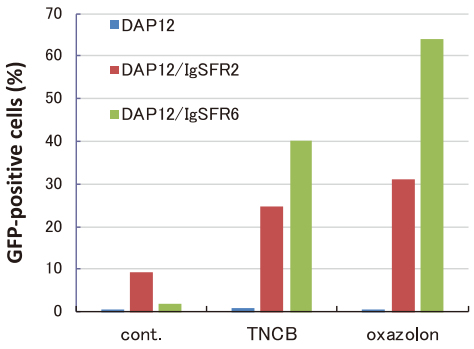



図3　IgSFR2とIgSFR6はハプテンを認識ITAM-NFATシグナルを活性化する

## 2. 方　法

### 2. 1. ITAM共役受容体-Igライブラリーを用いたハプテン結合試験

ハプテンに結合するITAM共役受容体の探索を行うため、これまで報告されている22種類の骨髄系ITAM共役受容体（CLR、Igスーパーファミリー受容体（TREM, LMIRなど）の細胞外ドメインとhuman IgG1-Fc領域との融合蛋白（ITAMR-Ig蛋白）を作製した。このライブラリーを用い、ELISAシステムを用いて数種類のハプテン（TNCB、DNCB、Oxazolone、FITC）との結合性を調べた。

### 2. 2. NFAT-GFPレポーター細胞株を用いたハプテン反応性試験

ハプテン結合性を示した候補ITAM共役受容体とその会合ITAMアダプター分子を安定発現したNFAT-GFPリポーターT細胞株（43.1）を作成し、これらの細胞のハプテン反応性を、GFP発現量あるいは上清中のIL-2産生量を指標として評価した。

### 2. 3. ハプテン誘導性contact hypersensitivity（CHS）試験

ハプテン結合性を示した候補ITAM共役受容体をそれぞれ、あるいは両方欠損するマウス（IgSFR2-KO、IgSFR6-KO、IgSFR2/6-DKO）を用いて、ACDのマウスモデルであるハプテン誘導性contact hypersensitivity（CHS）試験を実施した。CHS試験は、ハプテンTNCBをマウスの腹部に塗布して感作させ、5日後に耳にTNCBをチャレンジして、48時間後の耳介の肥厚を測定した。

## 3. 結　果

### 3. 1. ハプテンを認識するITAM共役受容体の同定

ITAM共役受容体-Igライブラリーを用いたハプテンとの結合スクリーニングの結果、異なるハプテンに対して結合性を示し（図2）、さらにITAM-NFATシグナルを活性化する（図3）受容体として、IgSFR2、IgSFR6の二つを同定した。これらはいずれもIgスーパーファミリーに属し、DAP12に会合して活性化シグナルを伝達することが報告されている。これらの候補受容体がハプテンと結合するこ

とでITAMシグナルを活性化できるかを調べるため、各受容体とDAP12を安定発現する43-1細胞を作成し、これをハプテンで刺激してNFAT活性化（GFP発現）あるいはIL-2産生を解析した。その結果、IgR2およびIgR6の両方ともNFAT活性化やIL-2産生を誘導できることがわかった。さらに、これら二つの受容体の反応性は試験したハプテン毎に異なることから、それぞれが異なる化学構造を認識していることが推測された。

### 3. 2. 候補受容体のCHS発症における役割の検討

IgSFR2およびIgSFR6のACD発症における役割を調べるため、これら受容体の遺伝子欠損マウス（IgSFR2-KO、IgSFR6-KO）を用いてTNCB誘導性のCHS試験を実施した。また、コントロールマウスとして野生型マウスとDAP12欠損マウスを用いた。過去の報告で我々は、DAP12欠損マウスがCHSを発症しないことを報告している[2)]。実験の結果、DAP12欠損マウスではTNCBチャレンジ後の耳介の腫脹がほとんど生じないのに対し、IgSFR2およびIgSFR6欠損マウスは、野生型マウスと同等の腫脹が観察された。この結果から、IgSFR2あるいはIgSFR6の単独の欠損はCHS発症に影響しないことがわかった。*In vitro*の結合試験において、IgSFR2およびIgSFR6の両方ともTNCBに結合性を示したことから、これらの受容体が協調的にTNCBの認識に関わっていると考え、両方の受容体を欠損するマウス（IgSFR2/6-KO）を作成してCHS試験を実施した。しかしながら、IgSFR2/6-KOでも野生型マウスと同等のCHSの誘導が観察された（図4）。

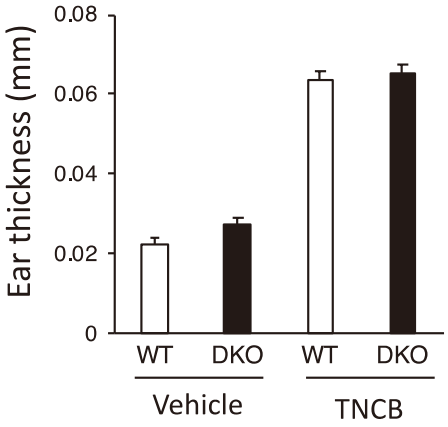



図4　IgSFR2とIgSFR6のダブル欠損マウスでもCHS発症に影響しない

## 4. 考　察

本研究において、ハプテン化合物に結合するITAM共役型受容体のスクリーニングによって二つの候補受容体（IgSFR2、IgSFR6）を同定した。これらの受容体はそれぞれTREMファミリーとCD300ファミリーに属する受容体であり、DAP12に会合して細胞内シグナルを伝達することが過去に報告されており、レポーター細胞を用いた試験において、実際にどちらの受容体もDAP12を介してITAM下流のシグナルを活性化することを確認した。我々は過去の報告で、CHSの感作には樹状細胞が発現するDAP12シグナルが必要であることを見出していたことから[2)]、今回同定した2つの受容体がハプテン化合物を感知する有力な受容体候補であると判断し、それぞれの受容体の欠損マウスを用いたCHS試験を実施してその病理的重要性の評価を行った。しかしながら、いずれの受容体を単独で欠損するマウスあるいは両方欠損するマウスにおいても、TNCB誘導性のCHS反応は野生型と遜色がないものであった。この結果から、IgSFR2とIgSFR6がハプテンの認識とCHS感作に全く必要でないか、あるいはこれら受容体以外の複数の未知のハプテン受容体が存在し、それらが協調してハプテンの認識と自然免疫の活性化に関わっている可能性が考えられた。

## 5. 総　括

本研究は、感作性化合物を認識する宿主受容体を用いた化合物の*in vitro*感作性評価試験系の樹立を目指して立案した。しかし、ハプテン結合性の受容体の同定には至ったものの、これらの受容体のアレルギー性接触皮膚炎感作における重要性を見いだすことができず、その結果、目標とする評価試験系の樹立には至らなかった。ITAM-Syk-CARD9経路の活性化を利用した評価試験法として、受容体を同定し、それを利用するものではなく、何らかの形でこの細胞内シグナル経路を検出、定量するシステムを考案する方が現実的であるのかもしれない。今後もハプテン受容体の同定を続けるとともに、有用な新しい感作性試験法の創出を模索していきたいと思う。

**（引用文献）**

1）Hara H and Saito T: CARD9 vs. CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends in immunol.* 2009, 30 (5) : 234-242.

2）Yasukawa S, Miyazaki Y, Yoshii C, Nakaya M, Ozaki N, Toda S, Kuroda E, Ishibashi K-I, Yasuda T, Natsuaki Y, Mi-ichi F, Iizasa EI, Nakahara T, Yamazaki M, Kabashima K, Iwakura Y, Takai T, Saito T, Kurosaki T, Malissen B, Ohno N, Furue M, Yoshida H, and Hara H: An ITAM-Syk-CARD9 signaling axis triggers contact hypersensitivity by stimulating IL-1 production in dendritic cells. *Nat Commun.* 2014, 5: 3755.

# ヒト皮膚に発現する薬物トランスポーター遺伝子多型・発現解析と経皮吸収への影響

九州大学大学院薬学研究院薬物動態学分野

廣田　豪

Membrane transporters have broad specificity and facilitate the uptake and efflux of their substrates across plasma membranes. Two major superfamilies, the ATP-Binding Cassette (ABC) and Solute Carrier (SLC) families, strongly influence the absorption, distribution, and excretion of drugs. Although the skin penetration of xenobiotics was previously attributed to passive diffusion, increasing evidence indicates that transporters have a function in the biochemical barrier of skin epithelial cells beneath the stratum corneum. The identification of drug transporters expressed in human skin and inter-individual differences in gene expression are important for understanding the role of drug transporters in human skin. Twenty-two ABC and 15 SLC transporters were expressed at detectable levels in human skin, and ABCC3, SLC22A3, SLCO3A1, SLC16A7, ABCA2, ABCC1, and SLCO2B1 were strongly expressed in skin. The expression of ABCC3 (MRP3) and SLC22A3 (OCT3) mRNAs showed large inter-individual variabilities. None of the SNPs tested (−1767G>A, −1328G>A, −1213C>G, −897delC, −260T>A, and −211C>T) in the promoter region of the ABCC3 gene showed a significant change in ABCC3 mRNA levels. ABCC3 expression levels negatively correlated with the methylation status of the CpG island (CGI) located approximately 10 kbp upstream of ABCC3 (Rs: −0.323, $P < 0.05$). As a result of systematic screening in the 5'-flanking region of SLC22A3, fourteen SNPs were identified; of these variants, 4 were novel. Of the 14 SNPs the variant, −1603G>A suppressed transcriptional activity in reporter assays and was associated with lower expression levels of SLC22A3 in skin samples obtained from Caucasian female origin. In humans, the concentration of squalene in samples taken from the back at baseline was significantly lower in homozygotes for −1603A/A than in homozygotes for −1603G/G. These results suggest that the genetic mutation contributes to the variation in the expression and activity of the drug transporter in human skin.

## 1. 緒　言

薬物トランスポーターは薬物の生体への取り込み及び生体からの排泄を担う膜タンパク質の総称で、薬物吸収を司る小腸、薬物排泄を担う肝臓及び腎臓、薬物の膜透過を制限する血液脳関門等、広範な組織に発現している。薬物トランスポーターは薬物の吸収、分布及び排泄の支配要因になることが明らかになっている[1)]。実際、近年では臨床上重要な薬物間相互作用の原因についても、一部又は全てを薬物トランスポーターにより説明できることが報告されている[2)]。また、薬物トランスポーターの発現量・活性の個人差が薬物の体内動態に影響する事例も数多くの研究で報告されており[3)]、その個人差要因を解明する研究も個別化医療を実現する上で重要となる。

遺伝子発現の個人差に影響する要因としては一塩基多型（SNPs）が広く知られており、薬物の体内動態及び薬物応答を担う数多くの遺伝子についても、SNPsが個人差の原因となることが報告されている[1, 3, 4)]。また、近年では遺伝子の塩基配列の変異を伴わない遺伝子発現制御機構である「エピジェネティクス」も注目されている。その代表的な制御機構は、ゲノム中でCpGジヌクレオチドの出現頻度が高いCpG islandsと呼ばれる領域内のシトシンがメチル化を受けるDNAメチル化であり[5)]、特に癌等の疾患における遺伝子発現の変動とエピジェネティック修飾との関連研究については多数報告されている[6)]。

皮膚は、成人で表面積1.4～1.7$m^2$、総重量3.2～4.8 kgにも及び、人体で最大の臓器である肝臓よりも大きい組織と言える。皮膚は皮膚表面から角質層を有する表皮、真皮及び皮下組織から成り、経皮水分蒸散量の制御や微生物及び化学物質侵入の防御といった両方向性バリアとして機能している。皮膚は薬物の投与部位の一つでもあり、初回通過効果を回避できること、投与及び投与中止が簡便であること、非侵襲的な投与が可能であること、頻回投与することなく血中薬物濃度を維持できる可能性があること等、他の投与経路にはない利点が数多くある。しかし、元来皮膚は外部環境から生体を保護する役割を担っており、消化管等からの吸収に比べると皮膚からの薬物の吸収は極めて少なく、吸収速度や効果発現に要する時間も遅い。また、長らくの間、薬物の皮膚透過は受動拡散によるものと考えられてきたため、これまでの経皮吸収に関する研究では、物理的バリアである角質層の克服に主眼が置かれ、薬物をいかに効率よく透過させ、標的部位に運ぶかという製剤的な技術開発が中心であった。そうした中、近年、皮膚にも薬物トランスポーターが発現し、皮膚において生化学的バリアとして機能することを示す研究が報告されるようになった。正常ヒト角化細胞を用いた研究では、MRPファミリー及びOATPファミリートランスポーターが構成的に



Analysis of genetic polymorphisms and expression of drug transporter genes in human skin and their effects on transdermal absorption

Takeshi Hirota

Department of Clinical Pharmacokinetics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

発現することが報告されている[7,8]。本研究では、ヒト皮膚組織における薬物トランスポーターの発現プロファイル、発現量及び個人差に関する情報を整理するとともに、個人差要因並びに皮膚における機能解明を試みた。

## 2. 方　法

### 2. 1. ヒト皮膚組織

ヒト皮膚組織は、白人の女性由来であり、部位は腹部又は胸部からなる48例である。本研究は、九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会による審査を経て、承認を得たものである。

### 2. 2. 遺伝子多型解析

ヒト皮膚組織で最も高発現であり個人差も大きかった分子種について、5' 上流域の遺伝子多型解析を実施した。対象は皮膚組織検体48例とした。ヒト皮膚組織約20～30 mgよりgenome DNAの抽出及び精製を行った。変異の有無をスクリーニングした後、ダイレクトシークエンス法により遺伝子型を決定した。

### 2. 3. DNAメチル化解析

トランスポーター遺伝子周辺のCpG island内のシトシンについて、Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) 法によりメチル化頻度を解析した。転写開始点を起点に前後20,000 bpの領域に存在するCpG islandを、CpG island searcher (http://cpgislands.usc.edu/) を用いて検索した。調製したbisulfite変換genome DNAを鋳型とし、各CpG island領域を増幅した。得られたPCR産物に対して制限酵素処理を用い、アガロースゲル電気泳動を行い、メチル化シトシン及び非メチル化シトシン由来のバンド強度に基づき、以下に示す相対メチル化頻度を算出した。

相対メチル化頻度＝メチル化シトシン由来バンド強度/非メチル化シトシン由来バンド強度

### 2. 4. 臨床試験によるヒト皮脂量及び皮脂成分に対するトランスポーターの遺伝子多型の影響

本試験は、九州大学病院臨床研究倫理審査委員会の審査、承認を得て実施した。同意の得られた20歳以上60歳未満の健康成人男性91名より全血2 mLを採取した。血液からgenome DNAを抽出し、ダイレクトシークエンス法によりSLC22A3遺伝子の-1603G>Aの遺伝子診断を実施した。診断結果に基づき、-1603Gホモ型及び-1603Aホモ型それぞれ10及び6名を選択した。額及び背部に正中線を挟んで左右対称に3×3cmの皮脂評価部位を2カ所設定し、一方を皮脂量、もう一方を皮脂成分評価用とした。

## 3. 結　果

### 3. 1. ヒト皮膚組織に発現する薬物トランスポーターの探索

白人女性皮膚組織由来cDNAのプール試料 (n=20) を用い、ABCファミリートランスポーター26種 (ABCA1～10、12、ABCB1、ABCC1～6、8、10～12、ABCG1、2、5、8) 及びSLCファミリートランスポーター25種 (SLC15A1、2、SLC16A1、3、7、8、SLC22A1～8、10、11、SLC46A1、SLC47A1、2、SLCO1A2、1B1、1B3、2B1、3A1、4A1) の発現をリアルタイムPCR法により探索した (Table 1)。ヒト皮膚には、ABCファミリー8種 (ABCA1、2、5、7、ABCC1、3、5、ABCG1) 及びSLCファミリー8種

Table 1　ABC and SLC transporter expression in human skin

| Gene | $C_t$ Mean | Gene | $C_t$ Mean | Gene | $C_t$ Mean | Gene | $C_t$ Mean |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *ABCA1* | 28.9 | *ABCC2* | 33.4 | *SLC15A1* | 30.6 | *SLC22A8* | >35 |
| *ABCA2* | 29.1 | *ABCC3* | 27.0 | *SLC15A2* | 32.5 | *SLC22A10* | >35 |
| *ABCA3* | 31.1 | *ABCC4* | 32.2 | *SLC16A1* | 29.7 | *SLC22A11* | >35 |
| *ABCA4* | >35 | *ABCC5* | 28.4 | *SLC16A3* | 33.3 | *SLC46A1* | 32.5 |
| *ABCA5* | 29.0 | *ABCC6* | 32.2 | *SLC16A7* | 30.0 | *SLC47A1* | 29.2 |
| *ABCA6* | 32.3 | *ABCC8* | >35 | *SLC16A8* | >35 | *SLC47A2* | 30.4 |
| *ABCA7* | 30.7 | *ABCC10* | 33.2 | *SLC22A1* | 32.9 | *SLCO1A2* | >35 |
| *ABCA8* | 31.2 | *ABCC11* | 33.6 | *SLC22A2* | >35 | *SLCO1B1* | >35 |
| *ABCA9* | 32.1 | *ABCC12* | >35 | *SLC22A3* | 28.6 | *SLCO1B3* | >35 |
| *ABCA10* | 31.2 | *ABCG1* | 29.9 | *SLC22A4* | 33.0 | *SLCO2B1* | 30.1 |
| *ABCA12* | 31.8 | *ABCG2* | 32.9 | *SLC22A5* | 30.2 | *SLCO3A1* | 28.9 |
| *ABCB1* | 32.1 | *ABCG5* | 34.4 | *SLC22A6* | >35 | *SLCO4A1* | 33.7 |
| *ABCC1* | 29.3 | *ABCG8* | >35 | *SLC22A7* | >35 | | |

For easy comparison (1st screening), mean cycle threshold (Ct) values of each transporter were calculated. Sixteenth of the pooled cDNA was used as template for real-time PCR. Pooled cDNA was prepared by mixing identical volume of cDNA (n=20). The Ct values of >35, in the range 31 to 35 and <31 were interpreted as absence of gene expression, presense of gene expression but being below the limit of quantitation and presence of gene expression being at the quantitative level, respectively.

Table 2　Absolute expression levels of ABC and SLC transporter mRNAs in human skin showing the lowest and highest values, means and standard deviations

| Gene | Minimum[a)] | Maximum[a)] | Mean[a)] | SD[a)] | Fold Change[b)] |
|---|---|---|---|---|---|
| *ABCA1* | 2.05 | 7.73 | 4.81 | 1.67 | 3.8 |
| *ABCA2* | 2.69 | 10.8 | 6.46 | 2.12 | 4.0 |
| *ABCA5* | 0.837 | 6.32 | 2.79 | 1.29 | 7.6 |
| *ABCA7* | 0.546 | 3.66 | 1.83 | 0.83 | 6.7 |
| *ABCB1* | 0.664 | 4.43 | 1.99 | 0.91 | 6.7 |
| *ABCC1* | 3.15 | 12.1 | 5.42 | 1.99 | 3.8 |
| *ABCC3* | 5.11 | 47.7 | 20.1 | 12.6 | 9.3 |
| *ABCC5* | 1.23 | 6.96 | 3.57 | 1.73 | 5.6 |
| *ABCG1* | 1.11 | 6.27 | 2.52 | 1.19 | 5.7 |
| *ABCG2* | 0.0370 | 0.635 | 0.338 | 0.182 | 17.1 |
| *SLC15A1* | BD | 15.3 | 4.00 | 4.44 | 40.8 |
| *SLC16A1* | 1.48 | 4.92 | 2.97 | 1.06 | 3.3 |
| *SLC16A7* | 2.65 | 17.5 | 6.95 | 4.26 | 6.6 |
| *SLC22A3* | 2.96 | 26.9 | 7.84 | 5.49 | 9.1 |
| *SLC22A5* | 0.894 | 7.80 | 3.08 | 1.65 | 8.7 |
| *SLC47A2* | 0.221 | 20.8 | 2.45 | 4.71 | 93.9 |
| *SLCO2B1* | 2.38 | 11.7 | 5.35 | 2.41 | 4.9 |
| *SLCO3A1* | 8.76 | 30.8 | 17.9 | 7.2 | 3.5 |

a) $\times 10^{-3}$ mol/mol GAPDH
b) Maximum/Minimum ratio
BD: Below detection

(SLC15A1、16A1、16A7、22A3、22A5、47A2、SLCO2B1、3A1)が中～高発現していた(Ct < 31)。また、ABCファミリー14種(ABCA3、6、8~10、12、ABCB1、ABCC2、4、6、10、11、ABCG2、ABCG5)及びSLCファミリー7種(SLC15A2、16A3、22A1、22A4、46A1、47A1、SLCO4A1)は低発現であり(31 ≤ Ct ≤ 35)、それ以外のトランスポーター(ABCファミリー4種及びSLCファミリー10種)については発現を確認できなかった(35 < Ct)。

### 3. 2. ヒト皮膚組織に発現する薬物トランスポーターmRNAの定量

前項で中～高発現に分類された16分子種、並びにマウス皮膚で輸送活性が報告されているABCB1/MDR1及びABCG2/BCRPについて、個体別のcDNA(n=18)を用いて絶対検量線法により発現量を定量した(Table 2)。その結果、ヒト皮膚ではABCC3/MRP3の発現量が最も多く、20.1 ± 12.6($\times 10^{-3}$mol/mol GAPDH)を示した。次いで、SLCO3A1/OATP3A1、SLC22A3/OCT3、SLC16A7/MCT2、ABCA2/ABC2及びABCC1/MRP1で高い発現が認められ、それぞれ17.9 ± 7.2、7.84 ± 5.49、6.95 ± 4.26、6.46 ± 2.12及び5.42 ± 1.99($\times 10^{-3}$mol/mol GAPDH)であった。これらの結果に基づき、ヒト皮膚組織に構成的に発現する薬物トランスポーター総量に対する個々の相対的発現量比(平均値)を算出したところ、最も高発現であるABCC3/MRP3が20.0%を占め、次いでSLCO3A1/OATP3A1、SLC22A3/OCT3がそれぞれ17.8及び7.8%で続き、上位3分子種で約50%を占めた。発現量が多かった上位3分子種について、例数を追加してPfaffl法により発現量の個人差をさらに検討した。ヒト皮膚ではSLC22A3/OCT3の発現量の個人差が最も大きく、変動係数(%CV)は61.8%を示した。次いで、ABCC3/MRP3の個人差が大きく(%CV：58.0)、SLCO3A1/OATP3A1は上位3分子種の中で最も個人差が小さかった(%CV：40.0)。

### 3. 3. ヒト皮膚組織におけるABCC3/MRP3発現に対するDNAメチル化の影響

ABCC3/MRP3発現に対する5' 上流域の遺伝子多型の解析を行ったが、影響を認めなかった。このため次いでDNAメチル化の影響を検討した。CpG island searcher(http://cpgislands.usc.edu/)を用い、CpG islandを探索した結果(%CG：50%以上、ObsCpG/ExpCpG：0.60以上、Length：200 bp以上、Gap between adjacent islands：100 bp以上)、10カ所のCpG islandを同定した(Table 3)。

### 3. 4. ヒト皮膚組織におけるABCC3/MRP3発現量とDNAメチル化頻度の相関解析

DNAメチル化頻度とABCC3/MRP3 mRNA発現量との相関解析を行った。その結果、−19895位(CpG island

Table 3　Location of CpG islands within 20 kbp up- and down-stream of the TSS in the ABCC3 gene

| No. | Start | End | %GC | Obs/Exp | Length (bp) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | −20090 | −19881 | 53.3 | 0.603 | 210 |
| 2 | −16357 | −16153 | 56.6 | 0.6 | 205 |
| 3 | −15643 | −15423 | 50.7 | 0.608 | 221 |
| 4 | −13873 | −13600 | 60.6 | 0.604 | 274 |
| 5 | −13448 | −13221 | 57.5 | 0.603 | 228 |
| 6 | −9874 | −9674 | 57.7 | 0.6 | 201 |
| 7 | −680 | −532 | 67.1 | 0.602 | 149 |
| 8 | −429 | 502 | 70.7 | 0.732 | 931 |
| 9 | 9717 | 10205 | 54.4 | 0.611 | 489 |
| 10 | 19852 | 20429 | 53.6 | 0.657 | 578 |

No.1）ではCG siteのメチル化頻度とABCC3/MRP3 mRNA発現量に正の相関を認めた（$P < 0.05$）。同様に、−9718位（CpG island No.6）では負の相関（$P < 0.05$）、−13222位（CpG island No.5）では正の相関傾向（$P < 0.10$）を認めた。以上より、ヒト皮膚組織におけるABCC3/MRP3 mRNA発現制御に、これらCpG islands内のDNAメチル化が関与する可能性が示された。

### 3. 5. ヒト皮膚組織におけるSLC22A3/OCT3発現に対する5'上流域の遺伝子多型の影響

白人女性皮膚（n=48）より抽出したgenome DNAを用い、SLC22A3遺伝子の5' 上流域約2 kbpに存在する遺伝子多型を網羅的に解析した。その結果、14種のSNPsを同定し、そのうち−1672C>T、−632insGCCCT、−626 ～ −622delGCCCT、−295G>Aの4種は未報告の変異であった。また、アレル頻度が50%以上と高頻度で存在する変異が5種、10 ～ 30%と比較的高頻度の変異が3種存在した。

### 3. 6. ヒト皮膚におけるSLC22A3/OCT3発現量と5'上流域の遺伝子多型の関係

同定したSNPsがヒト皮膚におけるSLC22A3/OCT3 mRNA発現に及ぼす影響を検討した。その結果、−1603G>Aでは変異による有意な発現量の低下を認めたが（P=0.008）、残りの遺伝子多型では有意な影響は認めなかった。

### 3. 7. ヒト皮脂量及び皮脂成分に対するSLC22A3遺伝子5'上流域−1603G>Aの影響

これまでの検討の結果、ヒト皮膚における発現量の個人差に5' 上流域のSNP（−1603G>A）が寄与する可能性が示された。SLC22A3/OCT3はテストステロン及びプロゲステロンの輸送に関わるトランスポーターであり、両ホルモンは皮脂分泌の促進に関与すると考えられていることから、皮脂に着目しその個人差とSLC22A3遺伝子5' 上流域−1603G>Aとの関連について検討を加えた。同意の得られた健康成人男性（20歳代、86名）より採取した全血からgenome DNAを抽出し、SLC22A3遺伝子5' 上流域−1603G>Aの遺伝子検査を実施した。解析の結果、野生ホモ型、ヘテロ型及び変異ホモ型はそれぞれ55、25及び6名で、アレル頻度は21.5%であった。被験者16名（−1603Gホモ型：10名、−1603Aホモ型6名）について、額及び背部の皮脂量を測定した。測定の結果、皮脂量は背部に比べ額で多く、また、定常皮脂量の方が回復皮脂量より多い傾向であった。遺伝子型と皮脂量との関係について、背部の定常皮脂量では遺伝子型による差がある傾向であった。

## 4．考察と総括

「ヒト皮膚組織に発現する薬物トランスポーターの定量とその個人差要因の解析」と題し、薬物の皮内動態及び皮内応答性に関与しうる薬物トランスポーターの発現探索及び定量と、その個人差要因並びに機能解明に関する研究を展開した。薬物動態に重要とされる分子種を中心に、ヒト皮膚組織における発現プロファイルを検討し、定量可能と判断した分子種についてその絶対発現量を評価した。合わせて、最も高発現であったABCC3/MRP3については、発現の個人差要因の一部を解明した。比較的多数例の皮膚組織を用いて取得できたこれらの知見は、皮膚での毒性・薬効発現の個人差を考察する上で重要であり、皮膚における薬物トランスポーターの生理機能等の類推にも役立つと考えている。また、ヒト皮膚におけるSLC22A3/OCT3発現の局在及び個人差要因を検討し、臨床研究にて皮脂量及び皮脂成分に対するSLC22A3/OCT3の影響を評価した。SLC22A1/OCT1及びSLC22A3/OCT2のparalogであるSCL22A3/OCT3が皮膚で比較的高発現であり、皮膚における局在及び個人差要因を解明できたことは、臨床上意義のある知見に繋がる可能性があると考えている。本研究では「ヒト皮膚と薬物トランスポーター」について、基礎的知見の収集から臨床研究の遂行に至るまで多岐にわたる

検討を実施できた。皮膚は薬物の投与部位としてますます多くの注目を集めているが、薬物の皮内動態及び制御に関する研究はまだ始まったばかりである。齧歯動物皮膚及びヒト皮膚由来細胞では、薬物トランスポーターが薬物輸送に寄与することが報告されていることから、ヒト皮膚（臨床）における薬物トランスポーターの寄与について明らかとしていくことが今後の課題のひとつと考える。また、各薬物トランスポーターの基質群の特性から、皮膚の恒常性維持に薬物トランスポーターが重要な役割を果たしていることを類推でき、薬物輸送のみでなく、皮膚の機能維持及び疾患発症との関連研究を展開していくことも重要と言える。本研究における成果がそうした研究の駆動力となり、皮膚科学研究が推進されることを期待する。

**謝　辞**

本研究の遂行にあたり、助成してくださいましたコーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝いたします。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

**（引用文献）**

1）Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther*. 112, 457-73 (2006).

2）Schneck DW, Birmingham BK, Zalikowski JA, Mitchell PD, Wang Y, Martin PD, Lasseter KC, Brown CD, Windass AS and Raza A. The effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 75, 455-63 (2004).

3）Maeda K and Sugiyama Y.: Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 23, 223-35 (2008).

4）Ieiri I, Higuchi S, Sugiyama Y. Genetic polymorphisms of uptake (OATP1B1, 1B3) and efflux (MRP2, BCRP) transporters: implications for inter-individual differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of statins and other clinically relevant drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 5, 703-29 (2009).

5）Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 293, 1068-70 (2001).

6）Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*. 22, 4632-42 (2004).

7）Baron JM, Höller D, Schiffer R, Frankenberg S, Neis M, Merk HF, Jugert FK. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 116, 541-8 (2001).

8）Schiffer R, Neis M, Höller D, Rodríguez F, Geier A, Gartung C, Lammert F, Dreuw A, Zwadlo-Klarwasser G, Merk H, Jugert F, Baron JM. Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 120, 285-91 (2003).

# 創傷治癒に関わる細胞挙動に対するソフトマテリアルによるメカノストレスの影響評価

大阪府立大学大学院理学系研究科
森　英樹

We evaluated the migration ability of fibroblasts and vascular endothelial cells by scratch assay. To evaluate the cell migration ability, cell images were acquired over time as the cells were cultured after cell detachment by scratch treatment. Since both cells filled the detached area by proliferation and migration within 48 hours, the migration rate and direction of each cell was determined by image analysis and calculation based on the temporal images of the cells during 48 hours of culture. Compared to fibroblasts, vascular endothelial cells tended to migrate more perpendicular to the boundary with the detached area. In addition, the migration rate of vascular endothelial cells was slower than that of fibroblasts. By analyzing the migration characteristics of individual cells, we were able to find differences in the migration characteristics of different cell types, which cannot be determined by the conventional method of measuring the total area covered by cells. To investigate the effect of covering with a soft hydrogel as a wound dressing on cell migration, a scratch assay was performed on vascular endothelial cells covered with gelatin-alginate gel after cell detachment. The gel-covered vascular endothelial cells lost their polarity in the direction of migration, and their migration rate became slower. Covering with a soft gelatin-alginate gel seemed to have the effect of delaying the migration of cells to re-cover the wound.

## 1. 緒　言

創傷治癒には、皮膚を構成する線維芽細胞やケラチノサイトだけでなく、血管を構成する血管内皮細胞など多くの細胞が関わる。外傷の治療に用いられる創傷被覆材には繊維や軟らかいハイドロゲルなどが用いられるが、その材質や硬さ(粘弾性)はそれらの細胞の移動や形態を含めた様々な挙動に影響を与えると考えられる。近年、物理的刺激の1つとして細胞の足場の硬さに対する細胞の応答メカニズムが明らかになってきているが、細胞種によってその応答性は異なる[1-3]。複数種類の細胞からなる生体組織の再生を促すために用いられる生体材料の選定には、それぞれの細胞の材料の硬さに対する応答性も考慮する必要がある。近年の情報科学技術の進歩に伴い、研究に利用できる性能をもったカメラやコンピュータを比較的安価に入手できるようになり、比較的情報量の大きい経時的な培養細胞の画像データを簡便に保存、解析できるようになった。培養細胞の経時的な画像は個々の細胞の移動や形態などに関する非常に多くの情報を含んでいると考えられる。そこで本研究では、インビトロ創傷治癒アッセイ法として利用されているスクラッチアッセイを用いて、線維芽細胞と血管内皮細胞の運動能の違いを調べるとともに、創傷被覆材などに利用されるアルギン酸カルシウムゲルで細胞を被覆した時に細胞の移動能がどのように変化するかを調べることを目的とした。



Evaluation of the effect of mechanostress by soft materials on cellular behaviors related to wound healing

Hideki Mori

Graduate School of Science, Osaka Prefecture University

## 2. 方　法

### 2. 1. 細胞の培養

実験にはマウス線維芽細胞の株化細胞であるSNLとマウス血管内皮細胞の株化細胞であるb.End3とUV＋2を用いた。細胞は10% FBSおよび抗生物質を含むDMEM培地を用い、ポリスチレン製培養皿上に播種し、炭酸ガスインキュベータ内で37℃、5% $CO_2$条件下で培養した。

### 2. 2. スクラッチアッセイ

細胞を3cm培養皿上で80%コンフルエントの状態になるまで培養し、滅菌済ピペットチップの先で接着した細胞の上を1回引掻くことで、幅約700μmの直線状の傷をつけるように細胞を剥がした(図1)。更に、その細胞を引き続き2日間培養する様子を、炭酸ガスインキュベータ内に

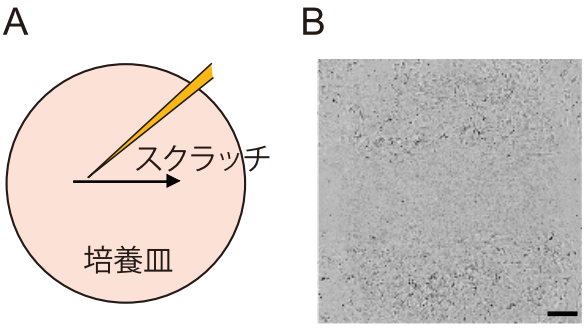



図1　細胞の剥離方法
(A) 細胞の剥離方向と (B) 剥離した細胞の画像
(scale bar=100μm)

設置した細胞顕微観察装置CytoWatcher（アトー社製）を用いて、20分間或いは30分間隔で経時的に撮影した。

### 2. 3. 細胞の画像解析

経時的に得られた細胞画像をもとに、画像解析プログラムImageJを用いて各画像における各細胞の座標を求めた。連続的に細胞を撮影することができた計110～130個の細胞の座標データから各細胞の6時間毎の移動方向と移動距離を求めた。図2には細胞の移動方向$\theta$と移動距離$l$を図示した。細胞の移動速度$v = l \times (t_1 - t_0)^{-1}$とした。

### 2. 4. ゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルの作製

アルギン酸ナトリウムが1％、ゼラチンが8％になるように蒸留水に溶解し、ゼラチン-アルギン酸ナトリウム混合液を作製した。ゼラチン-アルギン酸ナトリウム混合液をアルミ製円筒形金型に入れ、18℃ 24時間、10℃2時間、4℃ 24時間の順に冷却し、直径15mm、高さ5mmの円筒形ゲルを作製した。更にこのゲルを0.5M塩化カルシウム溶液に24時間浸漬した後にオートクレーブ処理を施し、HEPES緩衝液に3日間浸漬したものを実験に用いた。スクラッチアッセイを実施する直前に、観察する細胞の上からゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲル（ハイドロゲル）を被せた（図3）。

## 3. 結　果

細胞の移動特性を知るためにスクラッチ処理によって細胞を剥離した部分は、いずれの細胞でも増殖と移動によって剥離後48時間程度で細胞が剥離部を埋めた。剥離部を埋めるまでの48時間における細胞の移動特性を評価するために、12時間毎の細胞の移動方向と移動速度の分布を解析し、図4および図5に示した。線維芽細胞SNLは、スクラッチ処理後12時間ではスクラッチ方向に対して垂直な方向（0±22.5°）へ向かう細胞が全体の約8割を占めていたが、12～24時間では全体の4割程度であり、48時間以降では移動方向の極性がほとんど見られなくなった（図4A）。SNLの細胞移動速度は、スクラッチ処理後24時間までは約9割の細胞が130μm/hより低い移動速度で、様々な速度の細胞が見られた。細胞移動速度の平均値はスクラッチ処理後12～24時間で74μm/hと最も高く、24時間以降では徐々に低下した（図4B）。

一方、血管内皮細胞b.End3では、スクラッチ処理後24時間までスクラッチ方向に対して垂直に進む細胞は全体の7割以上を占め、24～36時間でも半数の細胞が垂直方向へ移動しており、SNLに比べて移動方向に極性が見られた（図5A）。移動速度に関しては大部分の細胞が80μm/hよりも低い速度で移動しており、SNLよりも低かった。スクラッチ処理後12～24時間における移動速度の平均値が

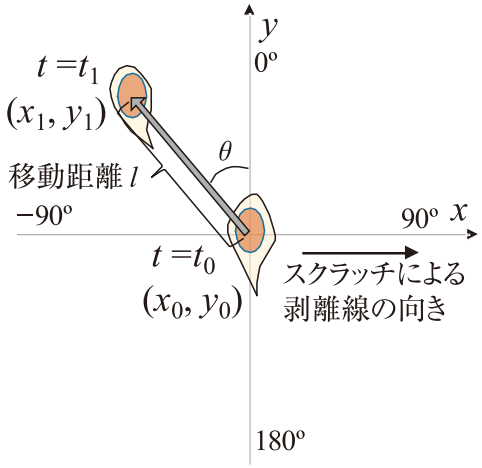



図2　画像解析による細胞移動の距離と移動方向の表し方

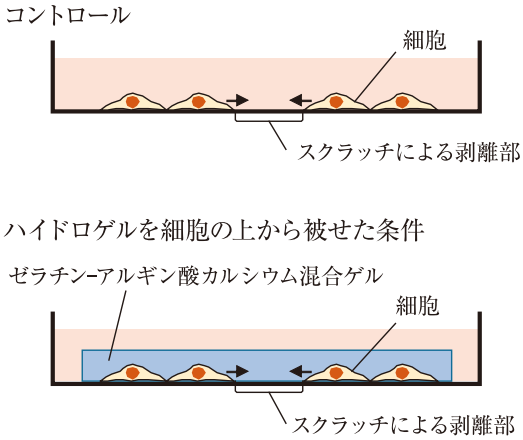



図3　細胞へのハイドロゲルの被せ方

34μm/hで各培養期間の中で最も高かった（図5B）。

ヤング率50kPa程度の弾性をもつハイドロゲルであるゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルを細胞に被せた時の血管内皮細胞UV♀2の移動方向と移動速度に関して、移動速度が最も高くなるスクラッチ処理後12時間における値をもとに解析した。ゲルを被せていない対照条件ではUV♀2の移動方向は垂直方向（$\theta = 0 \pm 22.5°$）に明らかな極性が見られたが、ゲルを被せて培養した条件では細胞の移動方向は360°を24分割したすべての方向にわたっており、移動方向に大きな偏りが見られなかった（図6）。細胞の移動速度もゲルを被せて培養した条件の平均値は20μm/hで、対照条件の平均値39μm/hに比べ低下した（図7）。また、対照条件では細胞移動速度$v$=10-20μm/hが最頻値であるのに対し、ゲルを被せて培養した条件では細胞移動速度$v$=0-10μm/hが最頻値であった。軟らかいゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルを被せることによって、被せられた血管内皮細胞の移動特性に変化が生じた。

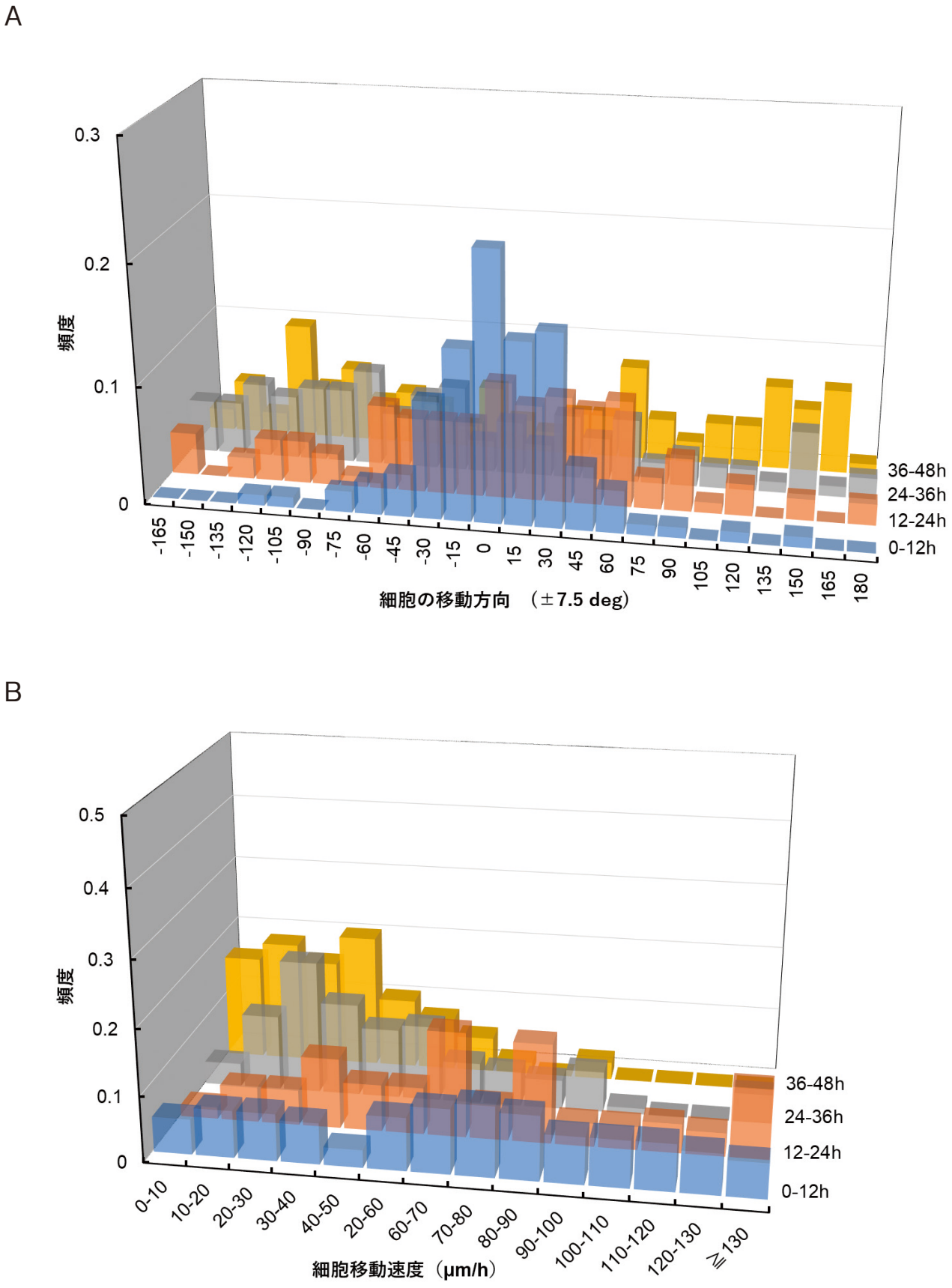
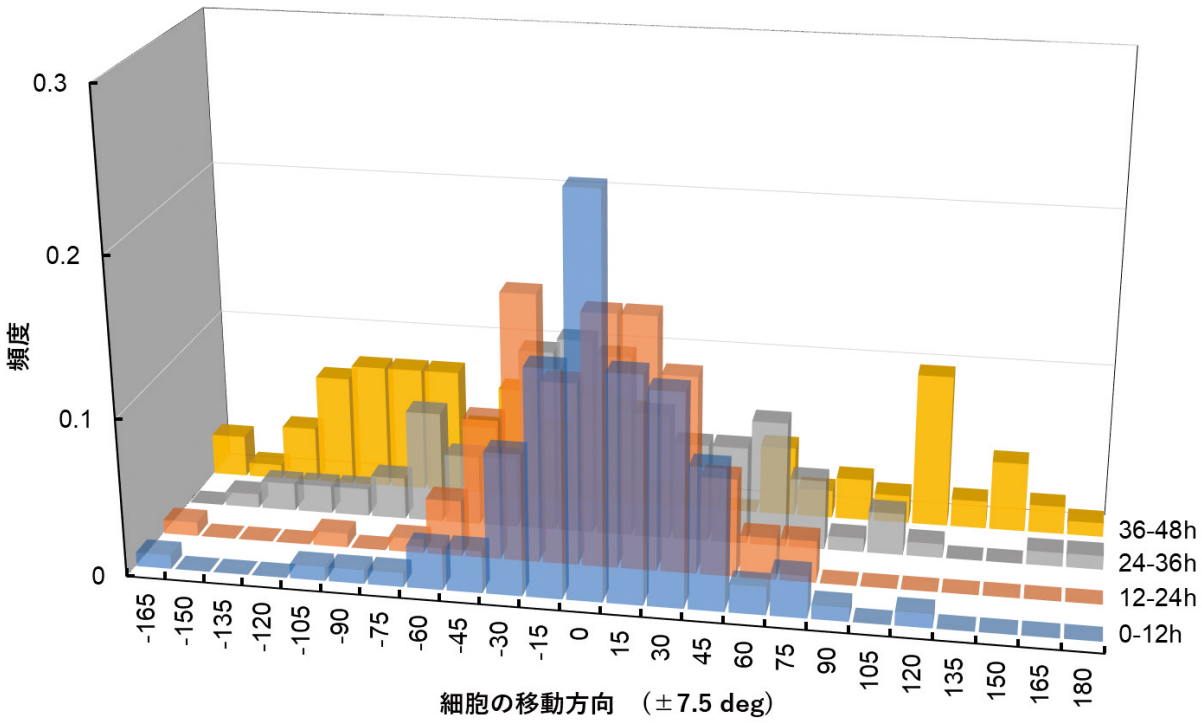



図4　スクラッチアッセイにおける線維芽細胞の移動特性
線維芽細胞SNLの（A）移動方向と（B）移動速度のヒストグラム

A




B

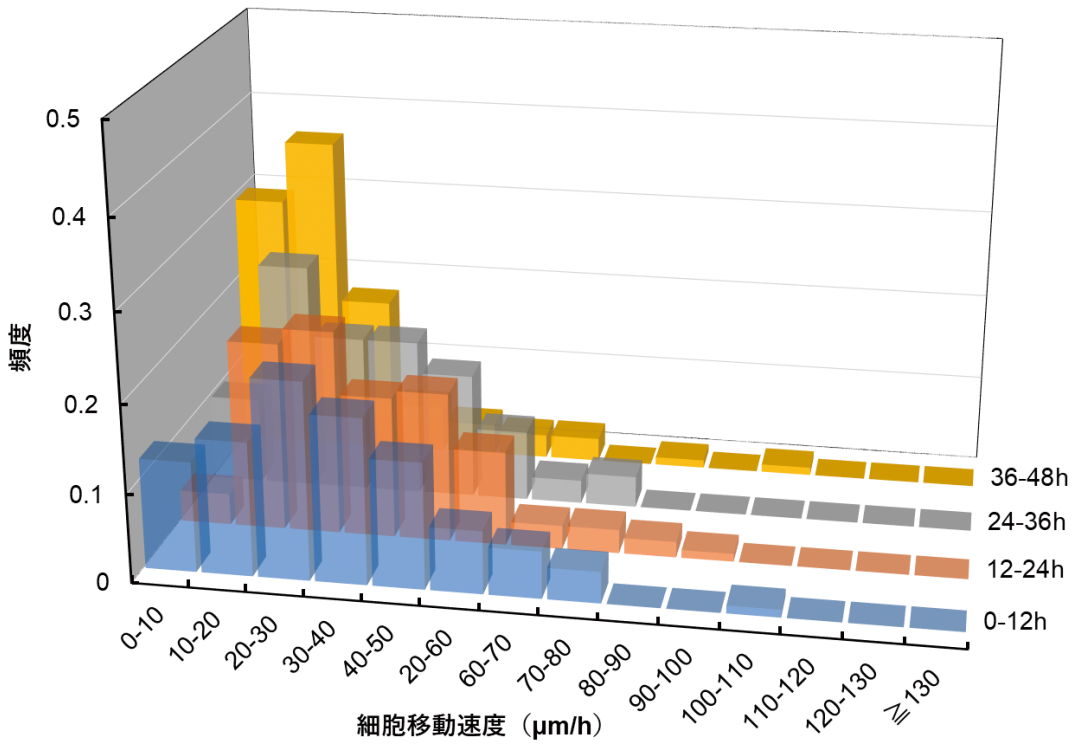



図5　スクラッチアッセイにおける血管内皮細胞の移動特性
血管内細胞b.End3の（A）移動方向と（B）移動速度のヒストグラム

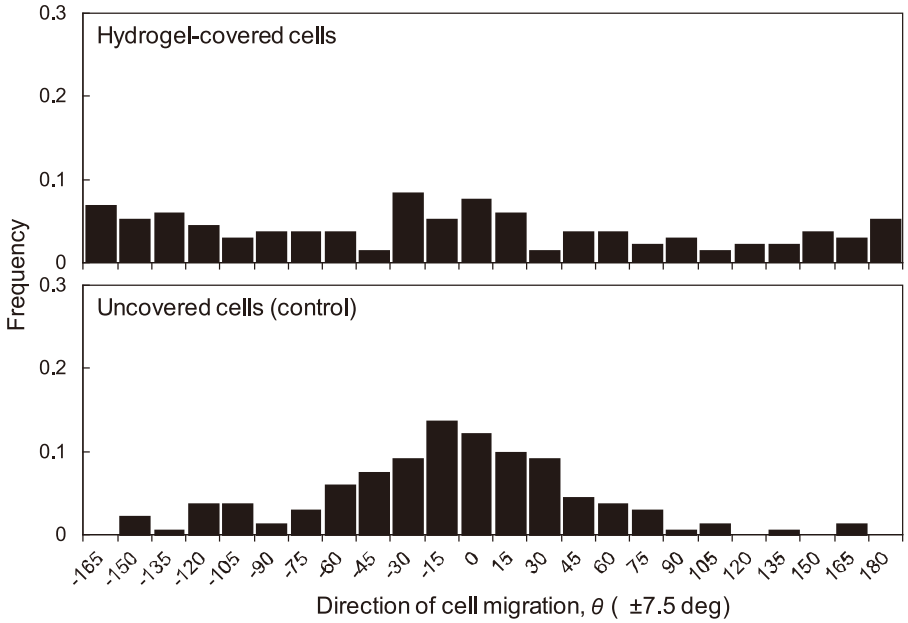



図6　ハイドロゲル被覆培養時の血管内皮細胞UV♀2の移動方向の分布

## 4．考　察

スクラッチアッセイは*in vitro*で簡便に細胞の移動を評価できる創傷治癒アッセイ法として、皮膚の再生に関わる細胞挙動の研究や塗布薬として効果が期待される低分子化合物の評価など多くの研究に用いられている[4-6]。しかし、これらのスクラッチアッセイの評価方法の多くは、スクラッチあるいは専用の型によって細胞培養容器中に細胞剥離部を作製し、その剥離部が細胞によって再び覆われる様子を観察し、細胞の再被覆面積の経時変化を定量するものである[7]。細胞剥離部の再被覆面積の計測は、創傷治癒に対する薬効を簡便に判断できる利用しやすい指標であるが、その細胞による再被覆のメカニズムを知るためには個々の細胞の挙動を注意深く観察し、適切なパラメーターで評価する必要がある。本研究では、細胞の移動方向と移動速度の2つのパラメーターに絞って評価した。線維芽細胞由来のSNLと血管内皮細胞由来のb.End3では移動方向と移動速度のどちらの特性も異なっていた。細胞剥離部を細胞が再被覆する面積および速度を議論する上で、細胞移動速度だけでなく、細胞の移動方向の極性についても考慮する必要がありそうである。最近、細胞集団運動の方向性が細胞間におけるセリン／トレオニンキナーゼであるERKの活性伝搬によって決まることが報告された[8]。血管内皮細胞由来のUV♀2はゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルを被せたことによって移動の方向性の極性が見られなくなったことはゲルの粘弾性がERK活性伝搬に何らかの影響を及ぼしているかもしれない。今後、これらの因果関係について細胞種やパラメーターを増やし、更に研究を進める必要がある。

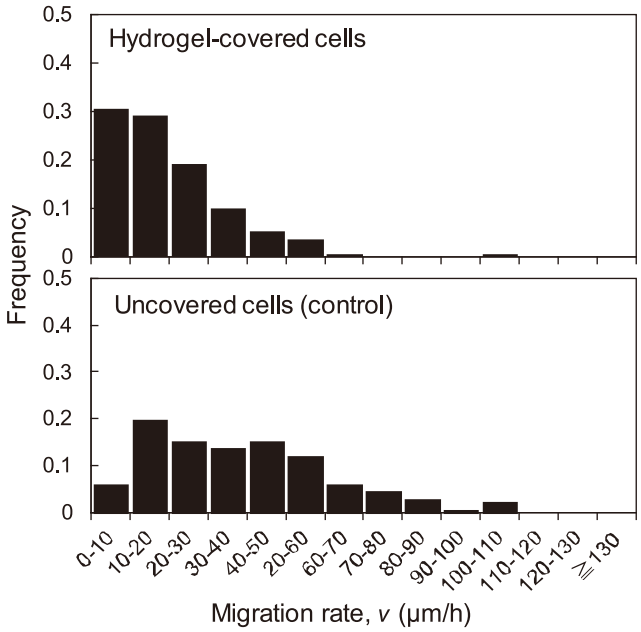



図7　ハイドロゲル被覆培養時の血管内皮細胞UV♀2の移動速度の分布

## 5．総　括

スクラッチアッセイによって得られた細胞の経時的な画像をもとに、個々の細胞の2種類の移動特性（移動方向、移動速度）を評価した。線維芽細胞と血管内皮細胞の間で細胞種による移動特性の違いを見つけた。また、ゼラチン-アルギン酸カルシウム混合ゲルを血管内皮細胞の上に被せて培養すると、細胞の移動方向に偏りが見られなくなり、移動速度を低下させることを見つけた。本研究で用いた2つの移動特性は創傷治癒に関する細胞挙動評価パラメータ

ーとして、創傷被覆材を評価する指標になることが期待できる。

**（引用文献）**


1） S. Dupont, L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, S. Piccolo, Role of YAP/TAZ in mechanotransduction, *Nature*, 474, 179–185 (2011).

2） H. Mori, A. Takahashi, A. Horimoto, M. Hara, Migration of glial cells differentiated from neurosphere-forming neural stem/progenitor cells depended on the stiffness of the chemically cross-linked collagen gel substrate, *Neurosci. Lett.*, 555, 1–6 (2013).

3） P. A. Janmey, D. A. Fletcher, C. A. Reinhart-King, Stiffness Sensing by Cells, *Physiol. Rev.*, 100, 695–724 (2020).

4） C. -C. Liang, A. Y. Park, J. -L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nature Protocols*, 2, 329–333 (2007).

5） A. Grada, M. Otero-Vinas, F. Prieto-Castrillo, Z. Obagi, V. Falanga, Research techniques made simple: Analysis of collective cell migration using the wound healing assay, *J. Invest. Dermatol.*, 137, e11–e16 (2017).

6） P. Sarkhail, L. Navidpour, M. Rahimifard, N. M. Hosseini, E. Souri, Bioassay-guided fractionation and identification of wound healing active compound from *Pistacia vera* L. hull extract, *J. Ethnopharmacol.* 248, 112335 (2020).

7） F. Cappiello, B. Casciaro, M. L. Mangoni, A novel in vitro wound healing assay to evaluate cell migration, *J. Vis. Exp.*, 133, e56825 (2018).

8） K. Aoki, Y. Kondo, H. Naoki, T. Hiratsuka, R.Í E. Itoh, M. Matsuda, Propagating wave of ERK activation orients collective cell migration, *Dev. Cell*, 43, 305–317 (2017).

# ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の開発

北海道大学大学院薬学研究院
山田　勇磨

Mitochondria, which have a variety of functions, are attracting the interest of scientists, since they are organelles that can contribute to the realization of innovative disease treatments, the maintenance of beauty and health, and development in the life sciences. To date, data related to commercially available cosmetic products that deliver functional molecules to mitochondria to exert cosmetic effects have not been reported. The aim of this study is to develop a nanocapsule-type functional cosmetic product that targets mitochondria. To accomplish this, we propose to use a nanocapsule (MITO-Porter) to deliver molecules to mitochondria in human skin cells. The proposal includes "Construction of drug-encapsulated nanocapsules", "Verification of cellular uptake and mitochondrial delivery of the nanocapusule" and " Functional evaluation of mitochondria".

## 1. 緒　言

多彩な機能を有するミトコンドリアは、革新的疾患治療の実現、美容・健康の維持、ライフサイエンスの発展に寄与するオルガネラとして注目されている。本オルガネラは、抗酸化効果およびアンチエージング効果に深く関連する、活性酸素シグナル調節、エネルギー（ATP）産生を担うため、化粧品のターゲットとしても注目される。現在までに市販されている化粧品において、細胞内部のオルガネラに機能性分子を送達・作用させ、美容効果を発揮させた商品の報告例は皆無である。

本研究では、皮膚細胞のミトコンドリアに作用して細胞のATP産生能・代謝能を亢進させるアンチエージング効果の獲得、ミトコンドリアで産生される余剰活性酸素を除去し抗酸化能の獲得を可能とする『ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品』の開発を目指す。ミトコンドリアの分子送達に関しては、ミトコンドリア標的型ナノカプセル・MITO-Porter[1-3]を基盤カプセルとし、ヒト由来皮膚細胞のミトコンドリア内部に機能性分子を送達する戦略を試みる。送達分子候補としては、ATP酸性の補酵素であり抗酸化能を有するコエンザイム$Q_{10}$（$CoQ_{10}$）などを用いる。

本申請研究では、「薬剤封入ナノカプセルの構築（1. $CoQ_{10}$-MITO-Porterの構築）」、「細胞導入、ミトコンドリアへの分子送達の検証（2. 培養細胞を用いた細胞内動態観察）」、および「機能評価（3. ミトコンドリアの機能評価）」の順に研究を進めた。本報告書では、特に、「1. $CoQ_{10}$-MITO-Porterの構築」および「2. 培養細胞を用いた細胞内動態観察」について詳細を報告する。



Development of nanocapsule-type functional cosmetics for targeting mitochondria

Yuma Yamada

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

## 2. 方　法

### 2. 1. $CoQ_{10}$-MITO-Porterの調製

#### 2. 1. 1.　マイクロ流体デバイスを利用したナノカプセル調製の検討

本研究では、ATP酸性の補酵素であり抗酸化能を有する$CoQ_{10}$をMITO-Porter[1]に内封した$CoQ_{10}$-MITO-Porterの調製を行った。MITO-Porterは北海道大学・大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室（以下、当研究室と略す）で開発したミトコンドリア標的型ナノカプセルであり、ミトコンドリア膜融合を有する脂質二重膜小胞（リポソーム）からなる（Fig. 1）。MITO-Porterを用いた戦略では、ミトコンドリア膜との膜融合を介して内封分子を放出させるため、送達分子の種類やサイズによらない送達が可能となる[2-4]。

当研究室では、$CoQ_{10}$-MITO-Porterの構築を種々の調製法を用いて検討を進めていた。単純水和法、逆相蒸発法、エタノール希釈法を用いた検討において、エタノール希釈法（以下、従来法）を用いた際に、$CoQ_{10}$の搭載率が高い$CoQ_{10}$-MITO-Porterを構築できることを報告していた[5]。

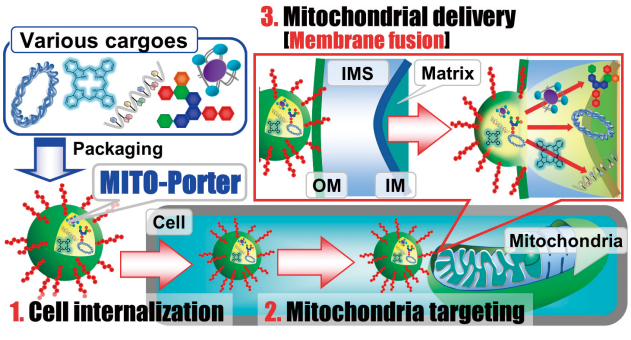



Fig. 1　Mitochondrial delivery using a MITO-Porter system

一方で、$CoQ_{10}$の難水溶性により、リポソーム調製の効率を低下させ、粒子径が不均一であり、1回の調製に得られる収量が微量であることなどが問題であった。

本申請研究では、実用化を見据え、均一性の高いナノ粒子を無菌的に大量調製が可能なマイクロ流体デバイスを利用した粒子調製を試みた。具体的には、共同研究者である北海道大学・大学院工学研究院・渡慶次学教授、真栄城正寿助教が開発したマイクロ流体デバイス（invasive lipid nanoparticle production（iLiNP）device）を用いて、エタノール希釈法の原理を利用した$CoQ_{10}$-MITO-Porterの構築を検討した[6]。エタノール希釈法では、脂質のエタノール溶液に水系緩衝液を加え脂質の溶解度を下げることで脂質の自己集合化を促し脂質を粒子化する。iLiNPによって脂質懸濁液（$CoQ_{10}$を含む）と緩衝液を急速に混合・攪拌することで均一な粒子調製、連続調製を可能とする（Fig. 2）。

iLiNPを用いた脂質粒子調製では、①脂質相の組成、②水相の種類、③総流速、④流速比（水相/脂質相の流速の比率=EtOH希釈濃度に相当）を変化させることにより多彩な粒子設計が可能となる。①脂質相の組成には、MITO-Porterを構成するナノカプセル材料［1, 2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine（DOPE）/ sphingomyelin（SM）/ 1,2-Dimyristoyl-sn-glycerol, methoxy polyethylene glycol 2000（DMG-PEG 2000）/ Stearylated R8（STR-R8）］および$CoQ_{10}$を含有するエタノール懸濁液を準備した。②水相には、phosphate buffered saline（PBS）(-)およびHEPES glucoseを用いて検討を進めた。③総流速は500 μL/minに固定し、④流速比は、EtOH希釈濃度が10%、20%、30%、40 %となるように設定して検討を進めた。最終工程として、iLiNPで調製した$CoQ_{10}$-MITO-Porter溶液は、透析（2時間、4℃）を行い含有するエタノールを除去した。粒子物性の測定方法については次項に記載する。

### 2. 1. 2. $CoQ_{10}$-MITO-Porterの物性評価および保存安定性の検証

前項に記載の方法で、$CoQ_{10}$を含有した$CoQ_{10}$-MITO-Porterを調製し、粒子径、PdI（均一性の指標であり、値が小さい方が均一性が高い）、ゼータ電位（表面電位）を測定し、構築した粒子物性の最適化を図った。粒子径およびPdIは動的光散乱法を、ゼータ電位は電気泳動法を利用した原理に基づき、Zetasizer Nano ZS（Malvern Instruments Ltd., Malvern, WR, UK）を用いて測定した。

また、調製した粒子の安定性を評価するために、4℃および25℃、遮光下にて14日間保管し、経時的に物性を評価した。

## 2. 2. 培養細胞を用いた細胞内動態観察

マイクロ流体デバイスでを用いて調製した$CoQ_{10}$-MITO-Porter［μ］および従来法で調製した$CoQ_{10}$-MITO-Porter［ED］の細胞内動態を観察した。ヒト由来皮膚細胞を含む培養細胞で検討を行ったが、特許出願準備中のため、ここではヒト子宮頸がん由来細胞（HeLa細胞）を用いた研究成果を紹介する。

### 2. 2. 1. 細胞取り込み能評価

$CoQ_{10}$-MITO-Porter［μ］および従来法で調製した$CoQ_{10}$-MITO-Porter［ED］の細胞導入能を評価するために、蛍光標識（DOPE-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazole-4-yl)（NBD-DOPE）を脂質量の0.5mol%含有）を施した。粒子を

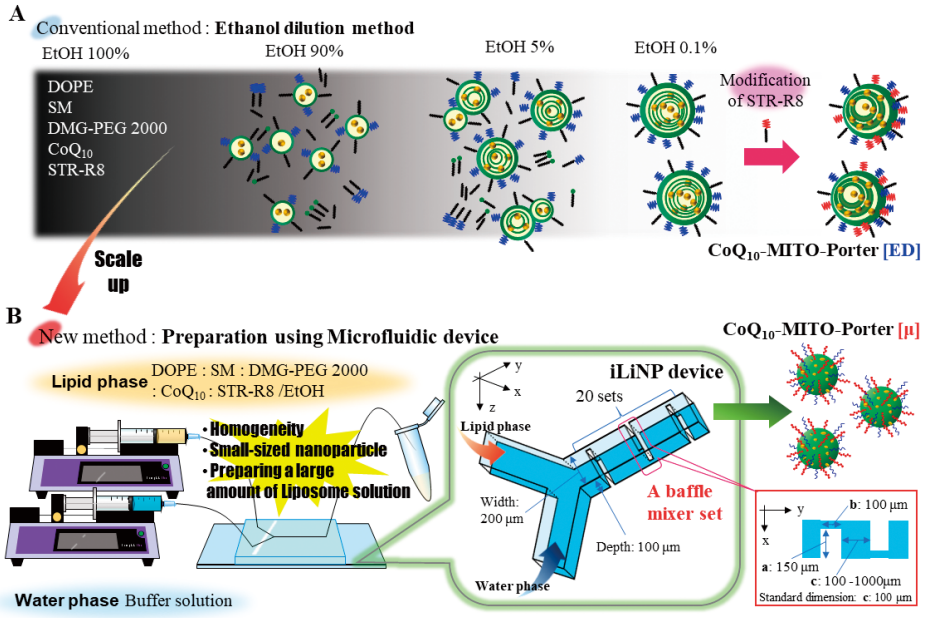



Fig. 2　Schematic image showing the preparation of the $CoQ_{10}$-MITO-Porter by ethanol dilution（A）and by using microfluidic device named iLiNP device（B）.

HeLa細胞に添加し、1時間インキュベーションした（37℃, 5% $CO_2$）。細胞に取り込まれた粒子の蛍光量をフローサイトメリー（FACS）（Gallious; Beckman Coulter Inc., Pasadena, MA, USA）を用いて平均蛍光強度を測定し、細胞取り込み能を評価した。

### 2. 2. 2. 細胞内局在観察

上記に従い調製した蛍光標識粒子（緑色）をHeLa細胞添加し、インキュベーションした（37℃, 5% $CO_2$）。赤色のミトコンドリア染色試薬Mito Tracker Deep Red（Thermo Fisher Scientific）でミトコンドリアを染色した後、粒子添加より3時間後の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）を用いて観察した。緑色の粒子が赤色に染色したミトコンドリアに局在した場合には、黄色のシグナルとして観察される。また、画像解析を行い、下記の式1に従い、ミトコンドリア占有率を算出した。

$$\text{ミトコンドリア占有率（\%）} = \frac{\text{1細胞中の黄色領域（共局在）の面積平均}}{\text{1細胞中の赤色領域（染色したミトコンドリア）の面積平均}} \times 100 \quad \cdots\text{式1}$$

### 2. 3. ミトコンドリアの機能評価

$CoQ_{10}$-MITO-Porter［μ］添加時のミトコンドリア機能を評価するために、ミトコンドリア酸素消費量（OCR）をAgilent Seahorse XFp extracellular flux analyzer（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）を用いて評価した。ミトコンドリア機能の指標として基礎呼吸能（mitochondrial basal respiration）および最大呼吸能（Maximal respiration）を計測した。本評価の詳細な方法は既報を参考にして頂きたい[7]。

## 3. 結果・考察

### 3. 1. $CoQ_{10}$-MITO-Porterの調製

#### 3. 1. 1 マイクロ流体デバイスを利用したナノカプセル調製の検討

iLiNPを用いた$CoQ_{10}$-MITO-Porter［μ］の調製において、①脂質相の組成、②水相の種類、③総流速、④流速比（水相／脂質相の流速の比率＝EtOH希釈濃度に相当）の条件を検討した。Fig. 3に検討結果を示す[6]。本検討では、①脂質相にはMITO-Porterを構成するナノカプセル材料［DOPE/SM/DMG-PEG/STR-R8］および$CoQ_{10}$を含有するエタノール懸濁液を充填し、③総流速は500μL/minに固定して検討を進めた。

④流速比は、エタノール希釈濃度が10%、20%、30%、

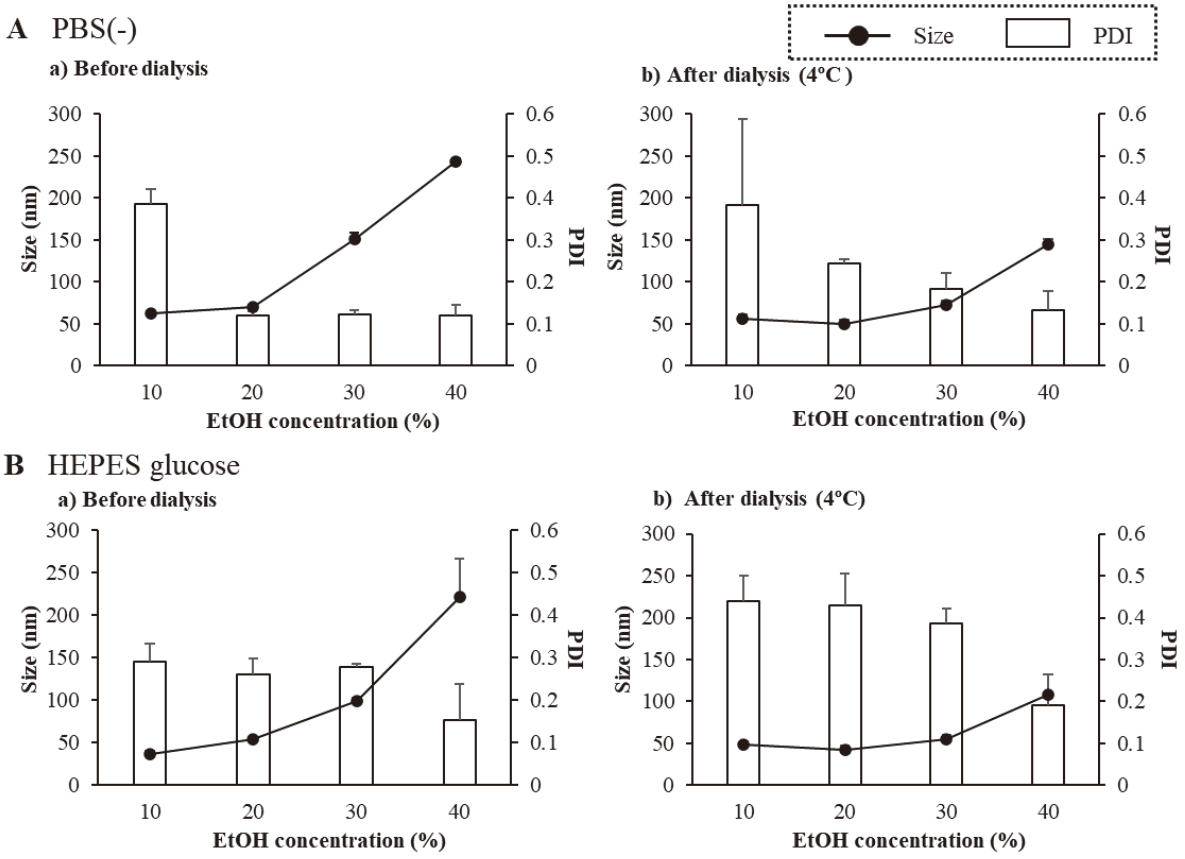



Fig. 3 Effect of ethanol dilution concentration on the physicochemical properties of the $CoQ_{10}$-MITO-Porter［μ］. Particle size and PDI of the $CoQ_{10}$-MITO-Porter［μ］prepared in PBS (-) (A) and HEPES glucose (B) are shown.

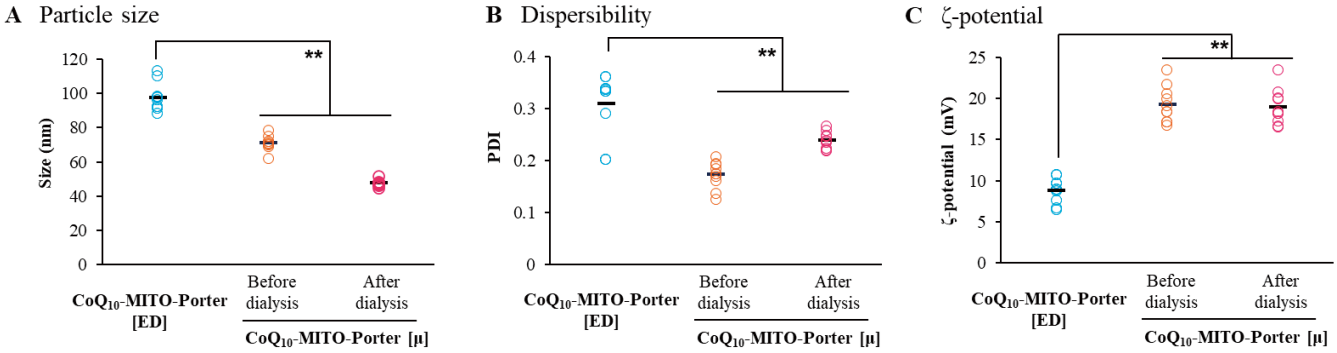



Fig. 4　Comparison of physicochemical properties between the $CoQ_{10}$-MITO-Porter [ED] and the $CoQ_{10}$-MITO-Porter [$\mu$]. The particle size (A), dispersibility (B) and ζ-potential (C) are shown.

40％となるように検討を進めた。②水相の種類をPBS(-)とした際の粒子形成後の物性評価結果をFig. 3A(a)に、HEPES glucoseとした際の結果をFig. 3B(a)に提示する。エタノール希釈濃度の低下に依存して粒子径が小さくなった。水相にPBS(-)を用いた群では、エタノール希釈濃度が20～30％の時、PdIは約0.12と単分散であったが、エタノール希釈濃度10％では他の希釈濃度よりも多分散であった(Fig. 3A(a))。一方、水相にHEPES glucoseを用いた場合には、PBS(-)群と比較してPdI値が大きく単分散性は低かった(Fig. 3B(a))。

最終工程として、iLiNPで調製した$CoQ_{10}$-MITO-Porter溶液を透析した際の粒子物性を(Fig. 3A(b))および(Fig. 3B(b))に示す。粒子径は両溶媒とも小さくなる傾向を認めたが、PdIについては増加が認められた。特にHEPES glucoseを用いた際には、PdIの増加が顕著であった。ここまでの検討より、②水相の種類をPBS(-)、④流速比を20％に設定し$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]を調製することとした。

### 3. 1. 2　$CoQ_{10}$-MITO-Porterの物性評価および保存安定性の検証

従来技術を用いて調製した$CoQ_{10}$-MITO-Porter[ED]と比較し、iLiNPを用いた調製した$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]は、粒子径が小さく(Fig. 4A)、PdIも小さい傾向にあった(Fig. 4B)。特に透析後は、均一な精度の高い粒子が調製できた[6]。iLiNPを用いることにより粒子径は約50nmと従来技術より1/2倍小さな粒子となった(Fig. 4A)。ゼータ電位においても約+20mVであり(Fig. 4C)、ほぼ一定して正電荷ペプチドであるOctaarginine(R8)を修飾できたと考えられる。

調製した$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]の安定性を評価するために、4℃および25℃、遮光下にて14日間の安定性試験を行った[6]。その結果、25℃においては経時的に粒子径が増大した。一方、4℃では粒子径が約50nm付近を維持し、安定な$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]の保存には4℃が適切な保存温度であることを確認した(Fig. 5)。

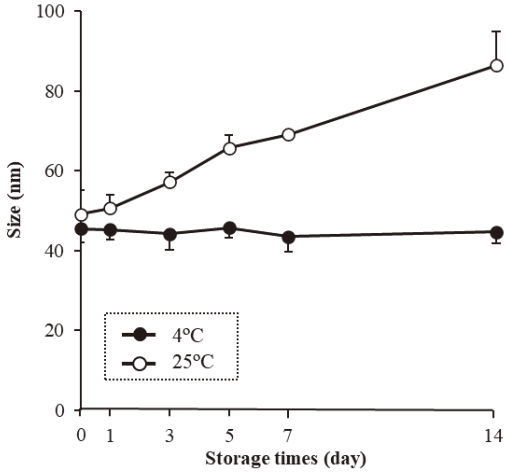



Fig. 5　Evaluation of the stability of $CoQ_{10}$-MITO-Porter [$\mu$].

調製量も従来技術ではμLオーダーであったが、iLiNPを用いた方法では実験室でもLオーダーでの大量調製が見込める。調製時間も大容量になるほどiLiNPを用いた調製法の方が、短時間で調製ができる。従って、iLiNPを用いた$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]調製は微小化・均一・大量調製を可能にする技術として期待できる。

## 3. 2. 培養細胞を用いた細胞内動態観察

### 3. 2. 1　細胞取り込み能評価

$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ](粒子径48nm)および従来法で調製した$CoQ_{10}$-MITO-Porter[ED](粒子径96nm)の細胞導入能を評価した[6]。その結果、50nm程度の$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]の細胞取り込みを評価した結果、従来型MITO-Porter(100nm程度)と比較して有意に高い細胞取り込みを確認した(Fig. 6)。

### 3. 2. 2　細胞内局在観察

$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]の細胞内局在を観察した[6]。その結果、従来法($CoQ_{10}$-MITO-Porter[ED])と比較して細胞内に多くの緑蛍光シグナルが観察され、細胞への導入効

率が優れていることを確認した(Fig. 7A(a), (c))。さらに、緑色の$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]と赤色に染色したミトコンドリアとの共局在を示す黄色シグナルが観察され(Fig. 7A(b), (d))、$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]がミトコンドリアに集積することを確認した。

顕微鏡で取得した画像を解析し、粒子のミトコンドリア占有率を算出した結果をFig. 7Bに示す。その結果、$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]は、$CoQ_{10}$-MITO-Porter[ED]と比べて優位に高いミトコンドリア占有率を示した。

過去の報告で、理論計算および実験データより、効率的な細胞取り込みに最適な粒子径は40〜60nmとの報告がある。従って、iLiNPで調製した約50nmの$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]、効率よく細胞に取り込まれ、ミトコンドリアへ集積量も向上したと推察される。

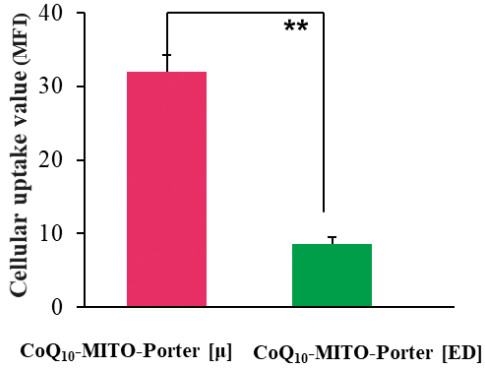



Fig. 6 Cellular uptake of the $CoQ_{10}$-MITO-Porter by HeLa cells.

### 3. 3. ミトコンドリアの機能評価

$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]をヒト由来皮膚細胞に添加し、その後にミトコンドリア機能の指標としてミトコンドリア基礎呼吸能およびミトコンドリア最大呼吸能を計測した。特許出願準備中のため、詳細は開示できないが、構成を最適化した$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]を用いた際には、CoQ単独投与では観察されなかったミトコンドリア機能の向上が確認されている。

## 4. 総　括

本報告書では、以下の内容を報告した。

(1)マイクロ流路デバイスを利用して微小な$CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]を調製することに成功した。

(2) $CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]が高効率に細胞に取り込まれミトコンドリアへ集積することを確認した。

(3) $CoQ_{10}$-MITO-Porter[μ]が細胞のミトコンドリア機能を向上させることを確認した。

市販されている化粧品には、抗酸化効果やアンチエージング効果を宣伝している商品があるが、機能性分子が作用部位である皮膚細胞膜や細胞内部に導入されていることは示されていない。美容効果が得られることは確認されていると思われるが、その能力を最大限には発揮できていないと思われる。さらに、細胞内部のオルガネラに機能性分子を送達・作用させ、美容効果を発揮させた商品の報告例は皆無である。そのため、抗酸化効果およびアンチエージング効果に深く関連するミトコンドリアに機能性分子を導入

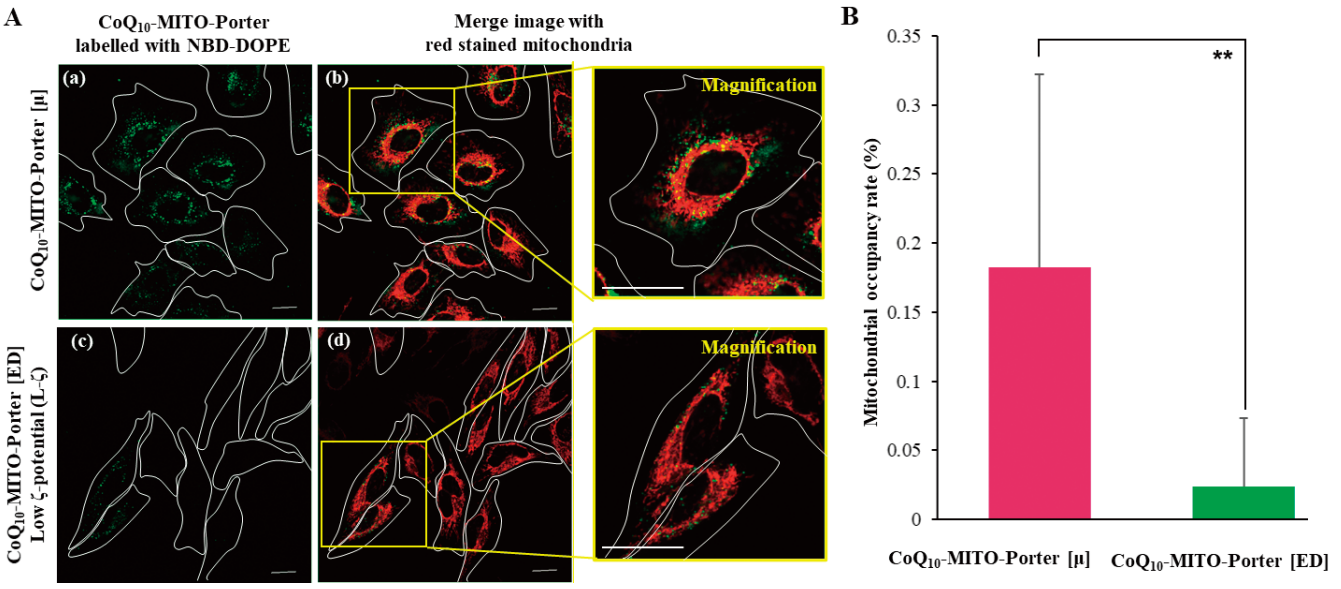



Fig. 7 Intracellular trafficking of the $CoQ_{10}$-MITO-Porter. Intracellular observation of the $CoQ_{10}$-MITO-Porter using CLSM (A). Based on such images, mitochondrial occupancy rate (B) was estimated.

する本研究で開発するナノカプセル型機能性化粧品は、化粧品分野に新たな市場を創生すると確信している。

現在は、「皮膚組織を用いたナノカプセルの皮膚細胞ミトコンドリアへの分子送達の検証」を進めており、3D細胞培養法を用いた新しい評価法を確立中である。今後は、本研究をさらに発展させ、ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の基盤技術の確立を目指す。

**謝　辞**

ここで紹介した研究成果は北海道大学・大学院薬学研究院・薬剤分子設計学研究室【Team Mitochondria】に所属する学生諸氏の日々の努力の賜物であり、学生各位に心より感謝する。また、本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団のご支援を頂きましたことに深く御礼申し上げます。

**（引用文献）**

1）Y. Yamada *et al.*, *Biochimica et biophysica acta*, **1778**, 423-432 (2008).
2）Y. Yamada, H. Harashima, *Adv Drug Deliv Rev*, **60**, 1439-1462 (2008).
3）Y. Yamada *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev*, **154-155**, 187-209 (2020).
4）Y. Yamada *et al.*, *J Control Release*, **327**, 533-545 (2020).
5）Y. Yamada *et al.*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **40**, 2183-2190 (2017).
6）M. Hibino *et al.*, *J Pharm Sci*, **108**, 2668-2676 (2019).
7）Y. Yamada *et al.*, *Mitochondrion*, **55**, 134-144 (2020).

# Ⅲ． 精神、文化に関する分野

# ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用

筑波大学生命環境系
青柳　秀紀

Fecal matter of *Horornis diphone* has been used as a cosmetic (facial cleanser and skin stain remover, etc.) for the last 1,000 years until recently. Due to the enforcement of the Law for the Protection and Management of Birds and Animals, it has become difficult to obtain fecal matter and to manufacture the cosmetic products utilizing this component. The mechanism of the cosmetic effects of feces of *H. diphone* has been little investigated, and one of the main components of the feces (the intestinal microflora) is still unknown. In this study, I attempted to analyze the properties of feces as well as the intestinal bacterial flora present in the feces of *H. diphone*. Elemental analysis of the fecal matter showed that the nitrogen content of the feces was higher than that of their feed. This suggests that the feed is digested and degraded as it passes through the digestive tract of the warbler and that the feces may contain proteins such as enzymes. In addition, the fecal matter exhibited weak activity of protease and trypsin, and also possessed antioxidant activity. Next-generation sequencing was used to analyze the intestinal bacterial community structure in the fecal matter of *H. diphone*. Analysis at the genus level, *Lactococcus*, *Macrococcus*, and *Weissella* were detected as abundant bacteria.

## 1. 緒　言

ウグイス（*Horornis diphone*）は日本全域に分布し、その糞は化粧品（洗顔料）や肌のシミ抜きとして古くは平安時代（1,000年以上前）より用いられ、海外にも輸出販売されてきた。1980年、鳥獣保護管理法によりウグイスの捕獲や飼育は禁止され、糞の入手が困難となった。その後、ウグイスの代わりにソウシチョウ（*Leiothrix lutea*）、メジロ（*Zosterops japonicus*）の糞を使用して類似の化粧品の製造販売がなされてきたが、2002年の鳥獣保護管理法により捕獲や飼育は禁止され、糞の入手が困難となり、製造ができなくなった。

ウグイス糞が化粧品として使用されてきたことはよく知られているが、“なぜ、ウグイスの糞が優れた化粧品機能を示すのか？”については学術的に解明されておらず未知な部分が多い。一つの説として、ウグイスは昆虫食であるため、腸内で強いタンパク質分解酵素が分泌されており、消化管が短いため、消化酵素（プロテアーゼ）が糞に含まれ、それがヒトの肌に作用していることが言われている。さらに、ウグイスの糞の主な要素である細菌叢（腸内由来）についても未解明である。

このような現状を踏まえ、私はウグイスの糞に興味を持ち、これまで未解明であったウグイスの糞が化粧品機能を示す仕組みを解明し、その知見を活用・模倣することができれば、現在は入手困難なウグイスの糞に代わる、より優れた新規化粧品（素材）を開発できるのではないかと考えた。さらに私は、ウグイス糞に含まれる微生物（腸内細菌）が化粧品機能に関与しているのではないかとも考えた。

以上の背景を基盤に本研究では、ウグイスの糞が化粧品的効能を示す機構の解明とその利用を最終目的に、今回はその基礎として、ウグイス糞の諸特性と糞の主要な要素である細菌叢（ウグイス腸内細菌由来）の解析と培養化を試みた。



Characteristics and bacterial flora of *Horornis diphone* fecal and its utilization

Hideki Aoyagi

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

## 2. 方　法

### 2. 1. ウグイスの糞の成分元素分析と諸活性の測定

任意の量のウグイスの糞をオートクレーブ滅菌後、凍結乾燥した試料のC、H、N元素量を、2400 II CHN Elemental Analyzer（Perkin-Elmer）を用いて定量した。

ウグイスの糞のプロテアーゼ活性の測定は、1%（w/v）カゼイン溶液に種々の濃度に希釈した糞の試料液を加えて混和後、37℃、30 min反応させた。5%（w/v）トリクロロ酢酸（500 μL）を加えて反応を停止させた後、遠心分離を行い、その上清の吸光度（$A_{280}$）を測定した。1 minあたり$A_{280}$を1上昇させる反応液全体のプロテアーゼ量を1Uと定義した。

ウグイスの糞のトリプシン活性の測定は、96ウェルプレートに、100 mM Tris·HCl（pH8.0）+0.1% Tween 20を60 μL、種々の濃度に希釈した試料液を30 μL、100 μM MCA（蛍光基質：Boc-Gln-Ala-Arg MCA［Peptide Institute］）溶液を90 μL添加し、37℃、30 min反応後、遊離したAMC（7-Amino-4-methylcoumarin）の蛍光強度（励起波長355 nm、測定波長460 nm）を測定した。活性は1 nmolのAMCが1分間に遊離する量を1 mLあたりに換算し、1 mUと定義した（1 mU = 1 nmol AMC/min/mL）。

ウグイスの糞の抗酸化活性はDPPHラジカル消去活性に基づき測定した。

### 2. 2. 次世代シークエンサー（MiSeq）によるウグイスの糞の細菌群集構造解析

ウグイスの糞試料をQuickGene DNA tissue kit S（Kurabo）を用いて調製後、Quick Gene-Mini80（Kurabo）でDNAを抽出した。16S rRNA遺伝子のV4領域を増幅するため、1st_PCR_515Fプライマーと1st_PCR_806Rプライマー、ExTaq HS DNA Polymerase（Takara Bio）を用いて1段階目のPCR反応をおこなった。PCR産物をAMpure XPビーズ（Beckman Coulter）で精製し、20μLで溶出した。さらに、溶出液2μLを鋳型とし、MiSeqでの解析に必要な共通配列とサンプル識別をおこなうためのMID配列でデザインされたプライマーを用いて、20μLの反応系で2段階目のPCRを行った。PCR産物を再び、AMpure XPビーズ（Beckman Coulter）で精製し、20μLで溶出しMiSeqでペアエンドシーケンシングした。MiSeqから得られたリードデータは以下の①～③の基準に基づき、sickle ver 1.33を用いてフィルタリングをおこなった。①両鎖の読み始めがプライマーと完全一致する配列であること、②プライマー領域、および低精度配列のトリムをおこない両鎖とも規定以上の長さを保っていること、③両鎖が結合できること。Fastx toolkit ver 0.0.13.2を用いて低品質の塩基対を除去した。トリミングしたリードはFLASH ver 1.2.10を用いてペアエンド結合した。キメラ配列チェックにはUSEARCH ver 8.0.1623_i86linux64を用いた。微生物群集構造はQIIME ver 1.9.0を用いて分析した。配列は相同性97%を基準とし、操作的分類単位（Operational Taxonomic Unit=OTU）にクラスタリングし、Greengenes databaseに基づいて分類学上の決定をおこなった。

## 3．結果および考察

成分元素分析の結果を表1に示した。C（炭素）は約0.78倍、H（水素）は約0.77倍に減少していた。一方、N（窒素）は約1.35倍に増加していた。窒素はタンパク質や酵素の構成元素である。今回の結果から、消化管を通る間に糞に窒素源であるタンパク質や酵素などが含まれた可能性が考えられた。

ウグイスの糞のプロテアーゼ活性とトリプシン活性を測定した結果、それぞれ約11.8U/mg、1.75U/mgの活性が得られた。一方、ウグイスの餌のプロテアーゼ活性やトリプシン活性を測定した結果、いずれの活性も検出されなかった。この結果は、ウグイスの餌が消化管内を通過する間に、プロテアーゼやトリプシンが糞に含まれることを示唆している（現在、プロテアーゼやトリプシンが腸内で分泌される消化酵素由来なのか？、糞に含まれる腸内細菌由来なのか？、について解析中である）。今回、得られたウグイスの糞のプロテアーゼやトリプシンの活性は高くはなく、これまで、ウグイスの糞が化粧品的効能を示す一つの説として、ウグイスの消化酵素（プロテアーゼ）が糞に含まれていることが言われてきたが、その真偽については引き続き検証する必要がある。

表1　ウグイスの餌と糞の元素分析

| 試料 | 含量（w/w %） | | |
|---|---|---|---|
| | C | H | N |
| 餌 | 44.72 | 7.10 | 4.90 |
| 糞 | 35.00 | 5.48 | 6.60 |

ウグイスの糞のDPPHラジカル消去活性に基づく抗酸化活性を測定した結果、ウグイス糞の懸濁液の抗酸化活性は125～500μg/mLで容量依存的に増加したが、アスコルビン酸の$IC_{50}$値（DPPHを50%消去できる濃度）と比較した場合、その活性は1/60程度の低いものであった（ウグイスの餌には抗酸化活性はほとんど検出されなかった）。

次世代シーケンサーを用いてウグイスの糞に含まれる細菌群集構造を属レベルで解析した結果、14試料から計74属が検出された（図1）。優占属は、*Lactococcus*（22.43%）、*Macrococcus*（14.73%）、*Weissella*（14.39%）、*Leuconostocaceae*科の同定されなかった属（14.19%）であった。しかしながら、試料によってその存在比は大きく異なった（*Lactococcus*で2.3～60.8%、*Macrococcus*で2.9～41.3%、*Weissella*で0.2～50.4%、*Leuconostocaceae*科の同定されなかった属で0.2～29.0%）。ウグイスの糞に含まれる細菌叢は腸内由来の細菌であることが考えられる。これまで国内外を通じて野鳥の腸内細菌（叢）に関する研究は少なく[1-3]、ウグイスについては初めての報告である。

また、種々の寒天平板培地を用いてウグイスの糞に含まれる細菌の単離培養を試みたところ、ウグイス糞に存在する全微生物の0.5%程度の種類しか単離培養できなかった。また、ウグイスの糞の試料からプロテアーゼ産生細菌を対象に、単離培養を試みた結果、16種類の細菌の単離培養に成功したが、いずれも次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造解析において存在比が非常に低い細菌のみであった。

以上の結果から、ウグイス糞中には未培養微生物が多く存在していることが示唆され、今後、これらの未培養微生物の培養化が求められる。現在、ウグイス糞からの細菌の培養効率の向上や、毒素除去能、メラニン生成抑制能、皮膚炎症抑制能、バイオサーファクタント生産能、金属ナノ粒子の生成能などの機能を有する新規細菌の培養化、取得についても検討中である。

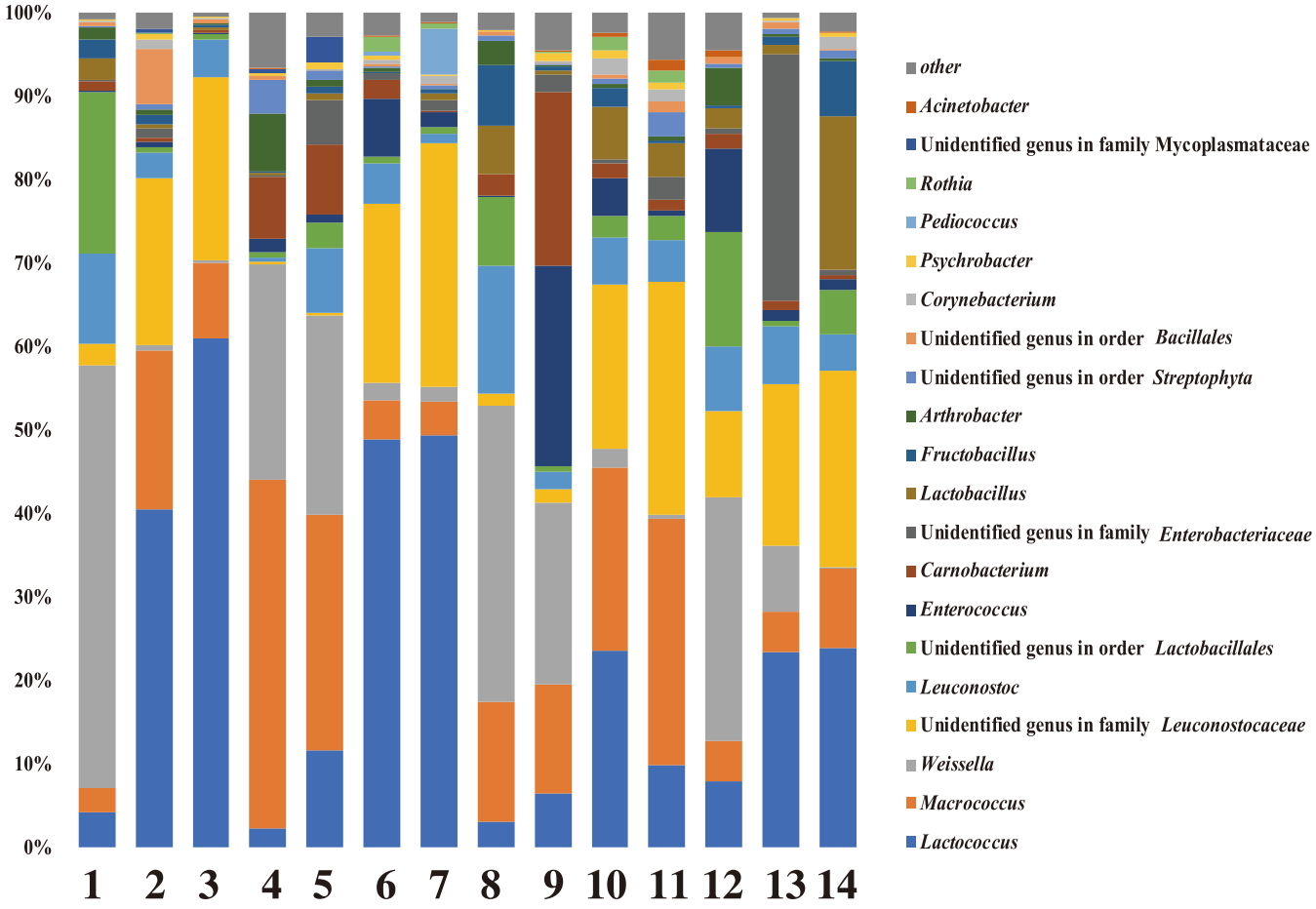



図１　次世代シーケンサー（MiSeq）を用いたウグイスの糞に含まれる属レベルでの細菌群集構造の解析.

## ４．総　括

ウグイスの糞は洗顔料やシミ抜きとして古来より国内外で商業利用されてきたが、これまで学術的検討が乏しく、その諸特性や糞の主要な要素である細菌叢（ウグイス腸内細菌由来）は未解明であった。本研究において、これまで未解明であったウグイス糞の諸特性や腸内細菌群集構造をはじめて解析し、その一端を明らかにした。今後、本研究成果を基盤に研究を推進することで、ウグイス糞が化粧品機能を示す仕組みの解明や有用な新規微生物の取得が期待できる。さらに、得られた知見を模倣したり、取得した有用微生物を活用することで、現在は入手困難なウグイスの糞に代わる、より優れた新規化粧品（素材）の開発が期待できる。

（引用文献）

1）Waite, D. W., Taylor, M. W. Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in Microbiology*, **5**, 223 (2014).

2）Ushida, K., Segawa, T., Tsuchida, S., Murata, K. Cecal bacterial communities in wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **78**, 251-257 (2016).

3）Wang, W., Zheng, S., Sharshov, K., Cao, J., Sun, H., Yang, F., Wang, X., Li, L. Distinctive gut microbial community structure in both the wild and farmed Swan goose (*Anser cygnoides*). *Journal of Basic Microbiology*, **56**, 1299-1307 (2016).

# 香りが認知能力に与える影響

名古屋大学大学院理学研究科
上田(石原) 奈津実、福枡 直人、布施 尚城、木下 專

Japan faces the super-aged society on which the increasing number of patients with dementia is becoming a fast social problem. It reported that individuals diagnosed with mild cognitive impairment show deficits in pattern separation and the decline of the hippocampal function due to aging induces the disability to separate similar patterns. However, the molecular basis is still unclear. The molecular basis about simple memory formation such as fear memory formation, is well understood now. On the other hand, in addition to intrinsic factors, external factors such as aroma and exercise etc., are intricately involved in memory retention decline. Therefore, there is not enough information to stop the progression of forgetfulness with age.

We have been studying the physiological significance of the neural network formation, rearrangement and maintenance of the septin cytoskeleton consisting of the nucleotide binding protein family SEPT1-14 (Ageta-Ishihara et al., Nature Commun 2013, 2015, Neurochem Int 2018, Neurosci Res 2020). In the course of this study, we found that *Septin*-deficient mice retain memory of spatial context for 2h, but not for 24h in the spatial pattern separation paradigm (unpublished).

In this study, we developed a new behavioral paradigm to examine the influence of external factor on memory retention, evaluated this new pattern separation paradigm in *Septin*-deficient mice and assessed effects of aroma (Vanilla Musk) on cognitive ability. Our new behavioral paradigm sheds light on providing new lifestyle modification (using aroma) as the scientific basis for prevention of "forgetfulness" in elderly people.

## 1. 緒　言

我が国において急速に高齢化が進展する中、健康寿命の延伸や要介護人口の減少は重要な課題である。認知機能に焦点をあてると、認知症の中核症状は進行性の学習・記憶の障害であり、日常生活に支障をきたすこともある。初期の段階では記憶障害の程度は軽いため、この時点で進行を抑制することが望まれるが、頭部MRI画像などで異常を発見できるのは中後期となってしまう。近年、認知症患者と診断される数年前の時点でも視空間認知障害として空間弁別(既知と未知の場所を区別できない)などの高次機能が低下することが報告され[1)]、遺伝的要因の解明が注目されている。一方で、空間弁別に影響を与える環境的要因については、運動で促進される神経新生は空間弁別能力を向上させ[2-3)]、カフェイン摂取がこのパターン分離の成績を高めることも示されている[4)]。興味深いことに、レモンやローズマリーなどのアロマの刺激は物忘れや認知症を防ぐ可能性があると期待されているが、空間弁別に与える影響は全く評価されていない。我々は、重合性ヌクレオチド結合蛋白質セプチン細胞骨格に着目し、神経系での生理機能の解明を行っている[5)]。セプチンは出芽酵母の温度感受性致死変異体の単離から細胞周期に異常がみられる変異体として発見された[6)]。分裂細胞においては収縮環、鞭毛や繊毛のリングの構成成分であり、多数の分子を集積し相互作用させる足場として、また、細胞の微小領域における分子の局在や非対称性を保証する拡散障壁としての役割が報告されている[7-8)]。興味深いことに、セプチンは最終分化した神経系の細胞で最も高発現することから[9)]、細胞質分裂を超えたセプチン系の未知の生体機能を探索する必要性が示唆されている。我々はこの問題にアプローチする過程で、セプチン細胞骨格欠損マウスの行動レベルでの異常を精査した結果、セプチン細胞骨格欠損マウスは正常な空間定位能力をもつ一方で、異なる形状の空間の弁別試験において記憶保持で低成績を示すことを見出した(投稿準備中)。しかしながら、既存の空間弁別試験では新奇と既知の空間への暴露の待機時間が2時間から24時間で設定されており、数日以上にわたる環境的要因の影響を評価することができない。そこで本研究では、香りが空間弁別能力に与える影響を評価し、遺伝的要因により低下した能力を向上しうることを確認する目的で、空間弁別試験に環境的要因を暴露できる実験系を構築し、この実験系において遺伝的要因により記憶保持低下マウスが従来法と同様の成績低下を示すかを検証した。続いて、構築した実験系にアロマの香りを組み合わせ、行動解析を実施した。



*

Effects of scent on cognitive ability

*Natsumi Ageta-Ishihara, Naoto Fukumasu, Naoki Fuse, Makoto Kinoshita

Division of Biological Science, Nagoya University Graduate School of Science

## 2. 方　法

### 2. 1. 実験動物

実験には野生型マウス(C57BL/6NまたはC57BL/6J系統)の雄を日本SLCから購入して用いた。セプチン細胞

骨格欠損マウスを用いた行動試験においては、*Septin*$^{+/-}$マウス同士の交配により、雄の*Septin*欠損群（*Septin*$^{-/-}$）と同性、同生育環境対照群（*Septin*$^{+/+}$）を作製し、毛並みやひげの状態を記録し、健康状態を確認したうえで実験に使用した。明暗サイクルを12時間（8：00－20：00が明期）とした部屋で飼育を行い、行動実験は9：00から19：00の間に行った。行動解析装置内は、装置中央が100luxになるよう調光した。実験の30分前にはマウスを行動解析装置付近の待機場所に入れて実験環境に慣らした。各マウスの試行終了後、次亜塩素酸水もしくは70％エタノールを用いて殺菌消毒し、匂いによる影響を最小限にした。

全ての動物実験は名古屋大学の動物実験委員会の許可を受け、動物実験ガイドラインに従い行った。

### 2. 3. 空間弁別試験

6－18週齢の同生育環境の野生型雄マウスに対し、外部からの視覚刺激を可能な限り排除するため、試験開始3－4日前にケージ周囲に白色のケージカバーを装着した。試験前日は、マウスに不定形（四角と丸の性質をもつ）の箱を10分間自由に探索させることで、新奇空間探索行動量に群間有意差がないことを確認したうえで、実験者による接触・拘束によるストレス負荷（ハンドリング）を5分間、7日間連続で与えて実験環境に馴化させた。1日目から4日目は、マウスの尾をつかんだ状態を維持し、マウスの背側を撫でることで実験者によるマウス個体への接触に馴化させた。この時、噛まれても強引に引き離すことはせず、マウスに不快感をもたせないよう留意した。5日目から7日目は、マウスが跳ねないようであれば尾を放して自由に手のひらの上を歩かせつつ体を触った。マウスの尾を放した状態でマウスが実験者の手のひらから降りようとせず、尾が下がった状態かつ触れても恐怖を感じない（すくみ反応を示さない）状態を、マウスが実験者に馴化した状態と見なした。形状のみが異なる新奇空間、1辺30cmの立方体または直径34cm, 高さ30cmの円筒を探索させ、移動距離を6分間計測した後、ホームケージに戻し、24時間の遅延時間後に異なる空間での移動距離を3分間計測した。遅延時間前後の移動距離の比を算出した。

### 2. 4. 環境的要因を評価しうる空間弁別試験

6－18週齢の同生育環境の野生型もしくはセプチン細胞骨格欠損雄マウスに対し、容器（白い四角箱、縦×横×高さ: 17.5×16.5×30cm）と、同素材、同色、同面積である容器（白い円筒形、直径×高さ: 17×27cm）を用い試験を実施した。1試行目に円筒の容器にマウスを5分間入れ、探索行動量（移動距離）を測定した。これを8日間連続で行った。9日目に1試行目とは異なる（新奇）容器に3分間入れ、探索行動量（移動距離）を測定した。8もしくは9試行目の前半の3分間の探索行動量を1試行目の前半の3分間の探索行動量でそれぞれ割り、100を掛け、パーセンテージで表したものを用いて既知もしくは新奇の探索行動量として比較を行った。アロマ（Vanilla Musk）はケージの端にプラスチック容器を設置し、1滴（約10ml程度）をたらし1日目の試行の後に暴露を開始し、試験当日まで継続した。

### 2. 5. データ解析と統計処理

マウス行動データの取得及び解析には、ビデオ・トラッキング・システム（Ethovision）もしくはImage J（NIH）を用いた。統計解析はソフトウェアPrismを利用した。グラフは平均値と標準誤差で示した。統計解析によって求められたp値が0.05未満であることをもって有意であると判断した。

## 3．結　果

### 3. 1. 環境的要因（香りの効果）を評価しうる空間弁別試験の確立

空間弁別評価のために汎用的なパラダイムは1試行目に立方体または円筒の容器にマウスを入れ、探索行動量（移動距離）を測定し、24時間後に新奇もしくは既知の容器にマウス入れ行動量を測定することで、新奇もしくは既知空間の認識を評価している（図1A, B）。今回は、揮発性成分の行動解析に与える影響を評価するため、同一個体において、新奇と既知の測定をし、環境的要因として揮発性成分の暴露の有無により既知と新奇の認識率の変化を評価する必要がある。そこで、新たに環境的要因を評価できる空間弁別試験の構築を行った。様々な条件を検討した結果、マウスが実験操作に慣れすぎると、活動性が自然に増加する傾向がみられることがわかったため、実験期間を9日間に設定した（図1C）。試行2－8は既知空間への暴露を継続した。試行3－8に関しては、実験系の再現を繰り返しても有意差がなく、この間に揮発性成分への暴露の有無を組み合わせて実験を行い、試行3－8での行動変化をモニターしながら、9試行目の成績を評価できることがわかった（図1D）。8試行目の前半の3分間の探索行動量を1試行目の前半の3分間の探索行動量で割った値（既知：30.19 ± 4.77％ n=7）は9試行目の前半の3分間の探索行動量を1試行目の前半の3分間の探索行動量で割った値（新奇：46.65 ± 4.42％ n=7）と比べ優位に低下しており（p=0.0263）、新奇と既知空間の認識可能な実験系が構築できた。

### 3. 2. 環境的要因（香りの効果）を評価しうる空間弁別試験における遺伝的要因の影響

遺伝的要因により空間弁別の記憶保持が低下したセプチン細胞骨格欠損マウスを用いて、新たに構築した実験系を用いて行動試験を実施した。その結果、野生型マウスは既

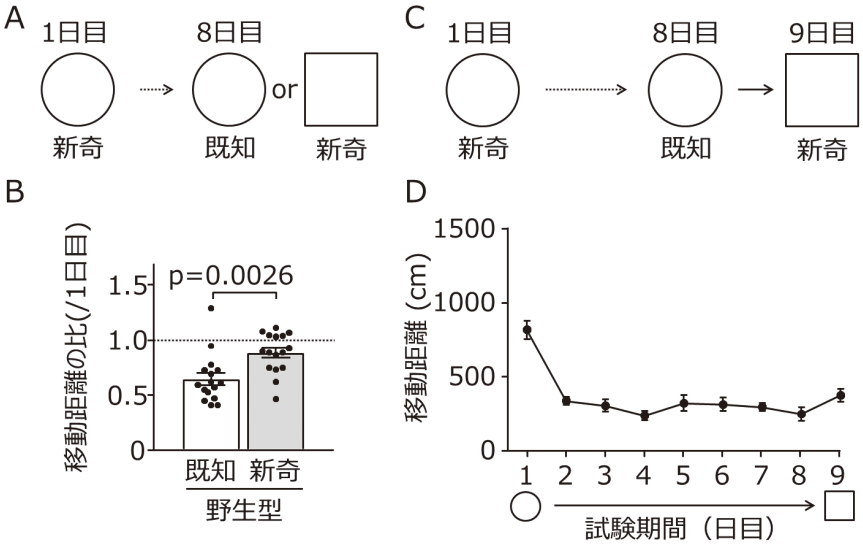



図１　既存の空間弁別試験と環境的要因（香りの効果）を評価しうる空間弁別試験
A）既存の空間弁別試験　B）既知空間と新奇空間における移動距離の比　C）環境的要因を評価しうる新たな空間弁別試験　D）移動距離の推移

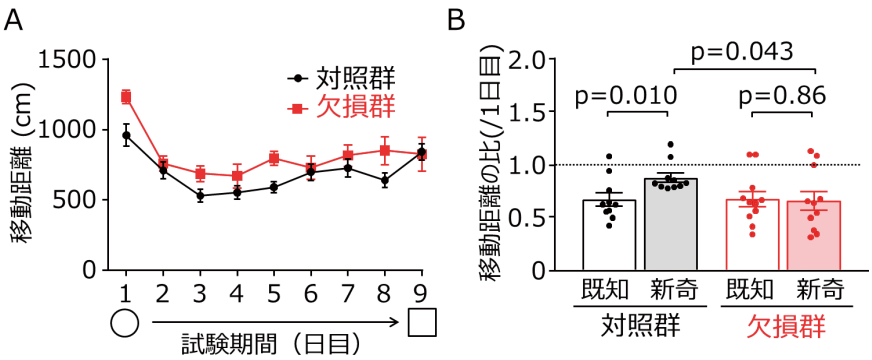



図2　新たな実験系におけるセプチン細胞骨格欠損マウスの空間弁別試験における訂正性の再現
A）移動距離の推移　B）移動距離の比

知空間（8日目）より新奇空間（9日目）で有意に高い移動距離を示した（68 ± 6.4 vs. 85 ± 4.4％, p=0.010, n=10）が、セプチン細胞骨格欠損は両空間で同等の移動距離を示した（68 ± 7.3 vs. 66 ± 8.8%, p=0.86, n=11）。

### 3. 3. 空間弁別試験における香りの効果

野生型マウスを用いて、新たに構築した実験系を用いてVanilla Muskの香りの有無で行動試験を実施した。その結果、香り暴露群では記憶の保持に異常が認められた（80 ± 7.4 vs. 85 ± 5.5%, p=0.64, n=7, 8）。一方で、対照群では有意差は認められないものの、新奇と既知空間を判別している傾向が認められた（77 ± 7.8 vs. 95 ± 6.9%, p=0.11, n=7）。

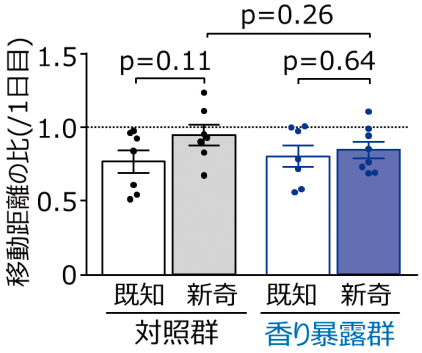



図3　香り暴露が空間弁別試験に与える影響

## 4．考　察

本研究の遂行により、揮発性成分を含む外的要因（環境的要因）の行動解析に与える影響を評価しうる空間弁別試験系の構築に成功した。さらに、遺伝的要因により従来広く用いられている空間弁別試験において低成績を示すことを見出しているセプチン細胞骨格欠損マウスにおいても、外的要因を評価系に組み込んだ試験でも同様に、空間弁別の記憶保持の機能低下が認められることを見出した。今回使用したアロマの香りでは認知機能の向上は認められなかったが、今後はさらにこの系を用いて、様々な香りや揮発性成分を暴露し、認知機能を向上させる物質を同定することを目指す。最終的には、空間弁別の記憶保持障害マウス（セプチン細胞骨格欠損マウス）に空間弁別試験の向上を引き起こす匂い物質を暴露し、試験結果が向上するかを評価することで、揮発性低分子化合物を含むフラグレンスなど日常に取り入れやすい形での香りを用いて認知症に対する処方介入の提案を目指す。

認知機能の向上に効果が見出された揮発性低分子化合物に関しては、この成分を含む形の製品開発を進めることで日常に取り入れやすい形での香りの提供につながる。さらに、補完代替医療としての臨床メディカルアロマテラピーも徐々に普及してきており、医療機関や介護施設で取り入れるところが出てきている。メディカルアロマセラピーは科学的根拠が不足していることなどが原因で、積極的に取り入れている医療現場はまだ少ないが、本研究を通じて香りの認知に与える影響に対して科学的根拠を示すことができれば、空間弁別記憶保持向上を指標に同定した香り成分を含む芳香浴をより多くの医療現場で取り入れていただくことが可能となる。この基礎研究成果が「医療」や「健康」といった産業展開につながる成果の蓄積の一助となり、コスメや関連商品が健康寿命にも影響を与える製品として波及することを期待する。

**謝　辞**

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。また研究の遂行にあたり木下専教授（名古屋大学理学研究科）に温かいご指導をいただきました。この場をお借りいたしまして厚く御礼申し上げます。

**（引用文献）**

1）Stark SM, Yassa MA, Lacy JW, Stark CE. A task to assess behavioral pattern separation(BPS) in humans: Data from healthy aging and mild cognitive impairment, *Neuropsychologia*, 51(12) : 2442-2449(2013)

2）Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD Jr, Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation, *Science*, 325 (5937) : 210-213 (2009)

3）Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation, *Nature*, 472 (7344) : 466-470 (2011)

4）Borota D, Murray E, Keceli G, Chang A, Watabe JM, Ly M, Toscano JP, Yassa MA. Post-study caffeine administration enhances memory consolidation in humans, *Nat Neurosci.*, 17 (2) : 201-203 (2014)

5）Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Developmental and postdevelopmental roles of septins in the brain, *Neurosci Res.*, S0168-0102 (20) : 30440-30445 (2020)

6）Hartwell LH. Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast, *J Bacteriol.*, 93 (5) : 1662-1670 (1967)

7）Sharma S, Quintana A, Findlay GM, Mettlen M, Baust B, Jain M, Nilsson R, Rao A, Hogan PG. An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated $Ca^{2+}$ entry, *Nature*, 499 (7457) : 238-242 (2013)

8）Koch S, Acebron SP, Herbst J, Hatiboglu G, Niehrs C. Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation, *Cell*, 163 (5) : 1225-1236 (2015)

9）Kinoshita A, Noda M, Kinoshita M. Differential localization of septins in the mouse brain, *J Comp Neurol.*, 428 (2) : 223-239 (2000)

# 桜の香りによる脳に及ぼす影響の機能生理学的解析

星薬科大学運動科学教室
竹ノ谷　文子

We have focused on a low-temperature vacuum extraction method that can extract aroma components derived from natural products, extracting them with cell extracts (CE) from various plants, and performing functional evaluation so far, in order to utilize the pharmacological effects of various plants widely and effectively. Here, we used a technique of cold vacuum extraction to extract cell extracts (SCEs) from pupal flowers in order to exploit the potency and scent of pupal preferred by Japanese people. We discovered that its main component was benzaldehyde (BzA). We also found increased cerebral blood flow in the brain upon human exposure to SCE. In addition, the scent of SCE was reported an anti-stress effect and even an effect of hypereuphoria by promoting oxytocin secretion. In addition, we confirmed the physiological action of a single component of BzA, the main component of SCE. Consequently, BzA exposure to humans showed a marked increase in cerebral blood flow medial to the frontal lobe of the cerebral cortex. BzA exposure also measured the amount of various hormones secreted in saliva. These results confirmed a significant decrease in cortisol levels and a significant increase in secretory IgA and oxytocin. These data suggest that BzA, a major component of SCE, activates brain function, enhances immune function and provides euphoria. Moreover, the stress lowering effect of the patient was observed as a result of the aroma bathing of SCE in patients of the clinical field. In addition, there were no adverse events in the aroma bath verification of SCEs. These results suggest that SCE can be used in cosmetics and medical care, and are expected to be a material that can be applied to the healthcare of people.

## 1. 緒　言

日本古来より親しまれている「さくら」には、咳止め、解熱、解毒効果、および神経鎮静作用など、様々な薬理的効果[1,2]があることが報告されている。その他、抗炎症効果[3]、老化促進の因子である糖化の抗糖化作用[4]などの皮膚老化防止作用[5]をもつことからも、さくらを利用した美容や化粧品が製造されている。しかし、天然のさくらは開花期間は短く、花びらも大変繊細であること、また、香り成分も微量であることから、素材となるさくらの芳香成分の抽出は容易ではない。これまで、香り成分の抽出法は、水蒸気蒸留法が代表的であるが、その他、圧搾法、溶剤抽出法、さらには超臨界流体法などの手法が知られているが、通常の芳香成分を抽出する水蒸気蒸留法などでは、さくらの有効成分を得ることは非常に難しいのが現状である。

そこで近年我々は、5℃前後の低温により、植物水分が自然に移行し、植物由来成分の含有率が高いセルエキストラクト（CE）が抽出できる低温真空抽出法に注目し、特にこの抽出法は芳香成分などを得る際は大変有効であることを報告してきた[6]。そこで我々は、超微量成分や熱に弱い成分でも、自然に近い原料を抽出できるこの低温真空抽出法を用い、さくらの花びらから香り成分のさくらセルエキストラクト（以下：SCE）を抽出し、その成分分析および抗酸化能を検討した。次に、SCEを人に嗅がせ、脳機能への影響やストレスホルモンをはじめとした種々のホルモンや免疫賦活作用をしらべ、さくらの香りが持つヒトへの生理・薬理作用の詳細を明らかにした。さらにSCEの主成分であるベンズアルデヒド（以下：BzA）の単一成分がどのような生理作用をもつかをNIRSおよび唾液中の各種ホルモン分泌量から検討した。

近年、香りを用いたアロマセラピーは医療分野において、リラクセーション効果や、さらには病気の治療や症状の緩和などに利用され、その有効性を示す報告も多く見られる[7]。そこで我々は、体動困難な患者を対象にSCEの暴露による抗ストレス作用を検討した。このような日本独自のさくらの香りのもつ有効成分や、その生理作用が明らかになれば、新たな化粧品開発や商品の高負荷価値につながることが期待される。



Functional physiological analysis of the effect of the scent of cherry blossoms on the brain

Fumiko Takenoya

Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

## 2. 方 法

### 2. 1. 低温真空抽出法による五泉さくらのセルエキストラクトの抽出

新潟県五泉市の八重桜（*Prunas lannesiana*）の花びらを採取し、低温真空抽出法を用い、さくら花びらの細胞水であるSCEと乾燥粉末を抽出物とした。

### 2. 2. SCEの成分分析

成分分析はGCMS-QP2010 SE GC/MS分析機（株式会社島津製作所，京都）を用い、解析を行った。化合物の同

定は、標品のGC/MSスペクトルの保持時間（RT）と化合物の沸点、およびMSのデータベースを用いた。化合物の推定はNIST 11 データベースを利用し、装置の化合物推定プログラムで各ピークの化合物を推定した[8]。

### 2. 3. SCEおよびSCE単一成分の香り暴露による脳血流量の測定

被験者を環境に適応させた後、測定は非侵襲的に脳神経活動を測定するNear-infrared spectroscopy：NIRS（近赤外光脳機能イメージング装置, OEG-16, 島津製作所）を用いた。NIRSは近赤外光を用いて生体内のヘモグロビン（Hb）酸素代謝変化を測定することで、脳神経活動量の指標となる脳血流量を測定することが可能である[9, 10]。被験者は座位なり、頭部フォルダーおよび測定プローブを装着後、閉眼・安静の状態を維持させ、ムエットの先端にSCEまたはBzAを1滴（約0.01 mL）滴下し、鼻孔から5 cm先に近づけて香りを暴露した。大脳皮質前頭前野近傍部および大脳皮質側頭葉近傍部の脳血流量を測定部位とした。測定方法として香り暴露前に30秒間の安静後、120秒間のSCEまたはベンズアルデヒドを暴露し、暴露終了後に30秒間安静を取り、脳血流量の変化を測定した。NIRSの測定結果はBrainSuite/View（ビー・アール・システムズ株式会社）を用いて解析した。

### 2. 4. SCEおよびSCE単一成分（BzA）の香り暴露による唾液中各種ホルモン量の測定

SCE暴露による唾液中のホルモンはコルチゾール、アミラーゼ、デヒドロエピアンドロステロン（以下：DHEA）、オキシトシン、および分泌型IgAはEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（ELISA法）を用いた。アミラーゼは唾液中のα-Amylase活性を基質との反応により比色定量により測定したが、その他コルチゾール、DHEA、オキシトシン、および分泌型IgAはマイクロプレートに目的タンパク質に対する抗体を固相化し、目的物質の酵素標識抗原を同一マイクロプレート内で同時に反応させ、反応後にマイクロプレートに残る酵素活性を検出する競合法ELISAによって測定した。。なお、ヒトでの本実験は、星薬科大学倫理審査委員会の承認を得て行われた（承認番号：28-005）。

### 2. 5. 臨床現場のSCE 暴露による抗ストレス作用

急性期医療施設に入院中の、意識清明ではあるが病態や治療（がん患者、脊髄損傷患者、骨折患者、うつ病患者）などが起因によって体動が困難な患者（20 ～ 70歳代）を対象した。対象患者の同意を取得し、SCEの香りを好まない場合は、患者に不快を与える可能性があることを考慮し、対象者から除外した。また嗅覚に障害のない者を対象とした。コルチゾールの日内変動などを考慮し、比較的身体が安定するであろうと思われる14 ～ 16時に測定を行った。対象群はSCEを、コントロール群は水をそれぞれ30 mLずつディフューザーで暴露し、対象者の病室にて30分間の芳香浴を行った。唾液は暴露前、暴露15分後、暴露終了時の3回を採取し、2. 4.と同様な方法にて唾液中コルチゾール値を測定した。

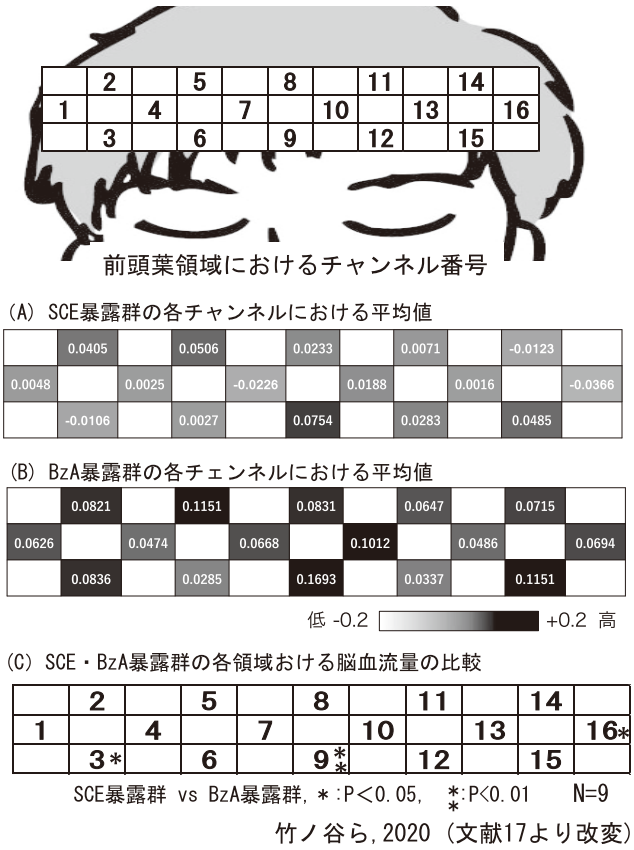
## 3．結　果

### 3. 1. GC/MS解析によるSCEの成分分析の結果

SCEの成分は主に3つが検出され、約90％がBzAであり、残りの10%はベンジルアルコールとクマリンであることが明らかとなった。また、検出できなかった超微量成分の存在のあることも明らかになった。

### 3. 2. ヒトのSCEとBzA暴露による前頭葉の脳血流量の測定

被験者にSCEおよびBzAを暴露し、NIRSにて前頭葉の脳血流量を測定し、その結果を図1に示した。1から16のすべてのチャンネル領域において、SCE暴露群よりもBzA暴露群の値が高かった（図1-A, B）。前頭葉外側領域の3および16チャンネルで有意な血流量の増加（P<0.05）が見られ（図1-C）、特に前頭葉内側領域の9チャンネルに




竹ノ谷ら, 2020（文献17より改変）

図1　SCEおよびBzAの香り暴露による前頭葉の脳血流量

おいて有意な血流量の増加(P<0.05)が確認された(図1-C)。これらの実験結果から、前頭葉の脳血流増加は、SCE 暴露群よりもBzA暴露群の方が高くより内側領域で顕著であることが分かった。

### 3. 3. ヒトのSCEとBzA暴露による側頭葉の脳血流量の測定

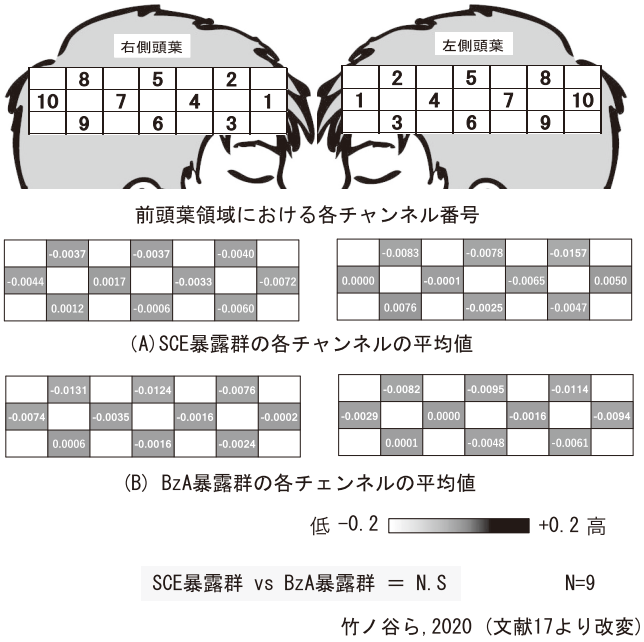
3. 2. の実験と同様に、SCEおよびBzAを暴露し、側頭葉についての脳血流量を比較検討した。その結果、両暴露群とも、ほとんどの領域で脳血流の数値はややマイナスの値を示した(図2)。また、左右の側頭葉とも両暴露群の脳血流量に有意な差異はみられなかった(図2-A, B)。この実験結果から、側頭葉のSCE暴露とBzA暴露は両者ともやや低下することは明らかとなった。

### 3. 4. ヒトにおけるSCEおよびBzA暴露による唾液中各種ストレスホルモン量の測定

SCEおよびBzAの香りがヒトにどのような生理的影響を及ぼすかをしらべるため、SCEの香り暴露による唾液中の様々なホルモン分泌を、暴露前、暴露30分後、および暴露終了30分後で比較した。その結果、ストレスホルモンであるαアミラーゼは、SCE暴露30分後に有意な低下(P<0.01)がみられ(図3-A)、一方のBzA暴露群では増加傾向がみられたものの有意な差はみられなかった(図3-A)。さらにコルチゾールはSCE暴露群では低下傾向がみられたが有意な差はみられず、BzA 暴露群では暴露終了30分後に有意な低下(P＜0.05)がみられた(図3-B)。またDHEAはSCE暴露群では暴露終了30分後に有意な増加(P<0.05)がみられたが、BzA暴露群では変化は見られなかった(図3-C)。

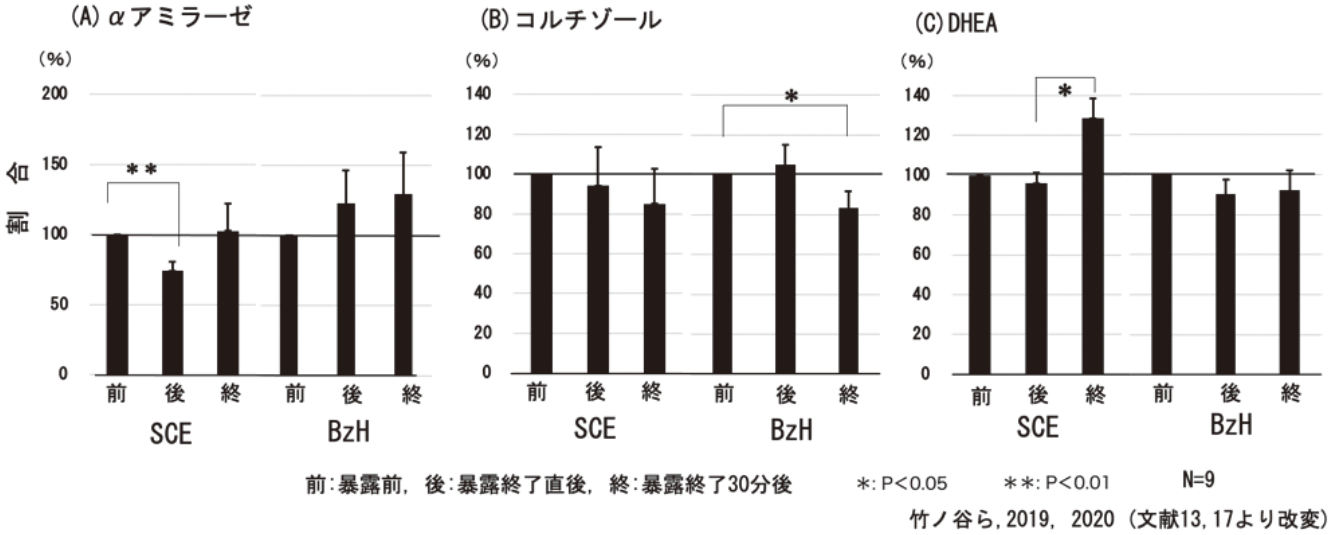
さらに、SCEおよびBzA暴露による液性免疫に影響を与えるか否かを検討するため、免疫に関与する分泌型IgAホルモン量の変化を測定した。その結果、分泌型IgAはSCE暴露群では変化はみられなかった。しかし、BzA暴露群では暴露終了30分後に有意な増加(P<0.05)がみられた(図4-A)。

さらに、SCEおよびBzAの香り暴露によるオキシトシン分泌量を測定した結果、SCE暴露では、暴露前と比較し、暴露終了直後と暴露終了30分後で有意な増加(P<0.05)が見られた(図4-B)。さらにBzA暴露においても暴露終了




竹ノ谷ら, 2020 (文献17より改変)

図2　SCEおよびBzAの香り暴露による側頭葉の脳血流量




竹ノ谷ら, 2019, 2020 (文献13, 17より改変)

図3　SCEおよびBzAの香り暴露によるストレス関連のホルモン量の変化

30分後で有意な増加(P<0.05)がみられた(図4-B)。

### 3. 5. 体動困難な患者におけるSCE 暴露による抗ストレス作用の検討

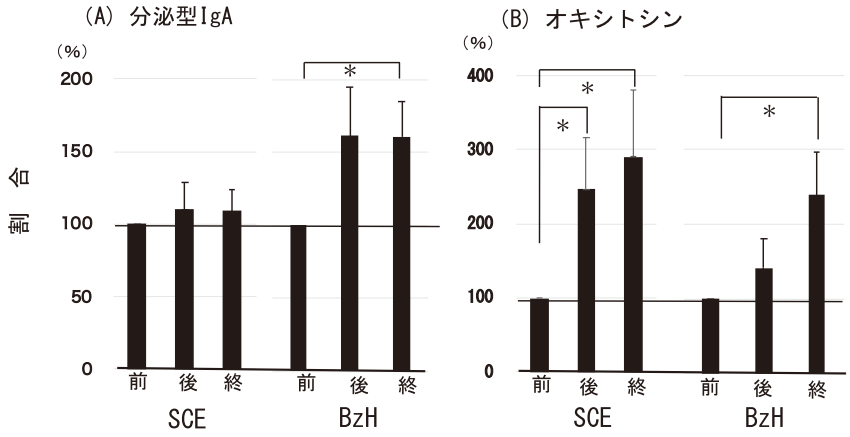
体動困難者のSCEの香り暴露前のコルチゾール値は、0.18012±0.1196μg/dL,香り暴露中は0.15460±0.09412μg/dL,そして30分間の香り暴露終了時には0.14150±.07381μg/dLと暴露前よりも暴露中、または暴露後にコルチゾール値が低下した(図5)。

それぞれ各個人のSCE暴露前後のコルチゾール値をみると暴露前よりも暴露中にコルチゾール値の低下がみられた者は10人中5名(50%)であり、また暴露前よりも暴露30分後にコルチゾール値が低下した者は、10人中8名(80%)であった。一方、対象患者11名のうち、1名が、SCEの香りが苦手という理由から途中中断した事例があった。しかし、SCEの香り暴露での気分不快や体調の変化など有害事象を認めた事例はなかった。

## 4. 考　察

我々は植物のもつ芳香成分や薬理的作用を発揮させる素材の成分が担保されているか否かはその効果を大きく左右する。そこで我々は、その抽出法の違いにおける様々な効果の違いを検討した結果、様々な抽出法のうち、特に低温真空抽出から得られたSEは自然由来に近く、高い機能評価をもつことを報告してきた[11, 12]。これまで、植物から抽出され芳香療法に使用される精油やCEはラベンダーやローズ系などといった西洋的な植物から抽出される芳香成分が主であり、日本古来のさくらの香りによる脳機能や生理作用を解析した研究はほとんどみられない。そこで今回の研究では、さくらに注目し、超微量成分や熱に弱い成分でも自然に近い原料を抽出できる低温真空抽出法からSCEを抽出した[13]。

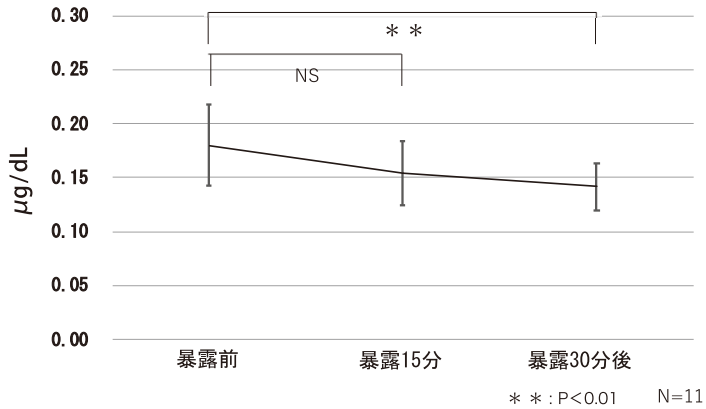
SCE を成分分析した結果、芳香成分は約9割をBzAが占めていた。このBzAは、抗炎症作用[14]、抗菌作用[15]な




前:暴露前, 後:暴露終了直後, 終:暴露終了30分後　　N=9　　*: P<0.05

竹ノ谷ら, 2019, 2020 (文献13, 17より改変)

図4　SCEおよびBzAの香り暴露による免疫および愛情関連ホルモン量の変化




＊＊: P<0.01　　N=11

図5　体動困難な患者のSCEの香り暴露によるコルチゾール値の変化

どの薬理作用も報告されているが、芳香族アルデヒドに分類される有機化合物の一つに属し、特異な臭いを有するものが多く、アーモンドや杏仁などの香り成分でもあることがしられている。しかし、さくらの香りやBzAの香り暴露によるヒトへの生理作用についての報告はほとんどみられない。また、これまでNIRSを用いた様々な香りによる脳血流を観察した報告は多数みられるが、さくらの香り暴露による脳機能を評価した報告はみられない。NIRSは酸素化ヘモグロビン濃度と脱酸素化ヘモグロビン濃度の変化量を記録しているが酸素化ヘモグロビンの変化が局所脳血流の変化と高い相関を示している。また神経が活動するためには酸素と栄養が必要なため、その両者を供給する局所脳血流増加は、その部位の神経活動の増加を示すことが報告されている[16]。

今回我々は、NIRSを用いてSCEおよびBzA単独の香り暴露による前頭葉と側頭葉の血流量を測定した。その結果、前頭葉ではSCEおよびBzAの両者の香り暴露で、脳血流量の増加がみられ、その作用はBzA単一暴露群の方が有意に高かった。しかし、側頭葉では、両暴露群ともに前頭葉に比べ、脳血流量は低下傾向を示し、さらに左右の側頭葉とも両暴露群の部位による差はみられなかった（図2）。この結果から、さくらの香りは、特に前頭葉内側領域を活性化させることが明らかとなり、その作用はBzAが担っている可能性が示唆された[17]。

これまで、アロマセラピーでの用途の高いラベンダー精油の香り暴露による脳血流量をNIRSから解析した報告は多数みられるものの必ずしも一致した結果ではない。しかし、ラベンダー精油暴露による生理作用は沈静化を示す報告が多くみられる[18]。今回、我々の行ったさくらの香り暴露による脳血流は前頭葉で活性化がみられ、側頭葉では沈静化の傾向を示した。このような結果から、今後の研究課題としてPETなどを用いたより詳細な脳機能の解析の必要性のあることが考えられる。

近年我々は、レモングラスの香り暴露により、大脳皮質前頭葉内側領域の脳血流量の増加を観察した[19, 20]。また、レモン、ユーカリさらにローズマリー精油を健常人に暴露することにより、大脳皮質の脳血流量の増加を観察報告している。一方、前頭葉の脳血流量を低下させ鎮静化傾向を示す精油の種類には、ローズやオレンジ[21]また、和の香りであるひのき[22]などが報告されている。また近年我々は、動物用の核磁気共鳴機能画像法（fMRI）を用い、ラット脳における脳血流量の変化をしらべた結果、ジンジャーまたはティートリー精油暴露では、前脳内側部や視床下部外側部での脳血流量増加を確認し、神経内分泌系の摂食調節作用の関与を示唆する可能性を報告している[23, 24]。

このように香りの種類により脳の活動や活性部位が異なることを考えると、香りを上手く利用することによって、心身のヘルスケアに応用できることが期待できる。実際、認知症患者を対象とし、日中はローズマリーカンファーやレモン精の香りで活性化を狙い、夜は沈静化を目的としベンダーやスイートオレンジの香りを用いて、心身のオンとオフを図り、認知症を改善した事例[25]などがある。今回我々が用いたSCEのさくらの香りは脳血流に変化を与えることからも、心身に変化を与える香りとして十分に活用できることが期待される。

一方、今回我々は、SCE暴露後、各種ホルモン分泌量を報告してきた。αアミラーゼは特に負荷的ストレス反応は早く、さらに精神的ストレスにおいて増加がみられるホルモンである。今回、SCE暴露によりαアミラーゼ分泌量は、暴露30分後で有意な増加がみられ、BzAの単独暴露では、αアミラーゼ分泌量に変化はみられなかった。これは、SCEのベンズアルデヒド以外の芳香成分がαアミラーゼ分泌量に関与した可能性が推測されるが、詳細は不明である。また、ストレスマーカーであるコルチゾールはSCE暴露群では有意差はないものの経時的な低下傾向を示し、BzA暴露では、暴露終了30分後において顕著な減少を示したことから、BzAが抗ストレス作用に大きく貢献していることが示唆された。

さらにDHEAはストレス評価の一つであり、ストレスに対抗する「抗ストレスホルモン」として知られ、一方では中枢系や免疫系においてコルチゾールとは反作用をもちコルチゾールのバランスを取ることが知られている。今回、SCE暴露ではDHEA量は暴露前と比較し、有意な増加がみられたが、BzA暴露では変化はみられなかった。これらの結果から、DHEAの抗ストレスに関する作用はBzA以外の芳香成分の関与が考えられるが、その実態の解明は今後の課題である。

さらに我々は、免疫関連で口腔などの粘液にあり免疫機能に重要な役割をもつ分泌型IgAのホルモン分泌量について調べたが、唾液中の分泌型IgAは、不快情動の生体影響を解析する指標として知られている。SCE暴露は暴露前と比較して変化はみられないものの、BzA暴露では暴露終了30分後で有意な増加（$P<0.05$）がみられた（図4-1）。これらの結果から、さくらの香りの免疫亢進作用にはBzAの貢献が高いことが予想された。これまでの研究で香りと免疫に関した報告はいくつかみられるが、レモンおよびラベンダーの香り暴露は免疫亢進作用がみられること[26]、さらにベルガモット精油の口腔内免疫能亢進が報告されている[27]。しかし、好みまたは心地よい香りが免疫能を促進させている可能性も示唆されている[28]こともあり、香りと免疫についてはより詳細な研究を行っていく必要があると思われる。

一方、オキシトシンは視床下部で産生される下垂体後葉分泌ホルモンで子宮収縮や母乳の射乳を引き起こすことが

知られているホルモンであるが、抗鎮痛作用、抗不安作用[29]などの薬理的作用を有すことが知られている。また、オキシトシンはコミュニケーションにおける信頼関係、共感感情、さらには愛情をもたらす効果をもつなどの幸せホルモンとしても知られている[30]。今回の実験では、オキシトシンはSCE暴露により、暴露30分後および暴露終了30分後ともに有意な増加（P<0.05）がみられた。さらにBzAの単独暴露においても、暴露終了30分後で有意な増加（P<0.05）がみられた。これらの結果から、さくらの香りの多幸感についてもBzAの関与が示唆された。

さらに我々は今回の研究で、香りがもつ抗ストレス作用や薬理的作用を医療現場で導入するため、移動困難な患者を対象にSCEの芳香浴の効果を検討した。今回、12名患者が検証に参加したが、SCEの香りが好まない理由から途中、参加中止者が1名あった。SCE香りを使用した芳香浴では、8割以上の対象者が芳香浴前と比較し、唾液コルチゾールの低下が確認され、医療現場での体動困難な患者に対して、ストレス緩和作用がみられたことが明らかとなった。また今回の検証では、さくらの香りを利用した芳香浴での有害事象がみられた者はいなかったことから、患者への心身の負担や侵襲性がないことが明らかとなり、SCEを利用した芳香浴の安全性が示されたと思われる。しかし、合成の芳香成分を利用したさくらの香りの芳香浴は、必ずしも安全性が担保されないことからも、芳香浴を行う際の精油やCEの選択には十分な注意が必要であり、特に医療現場では有効成分を確認することは勿論のこと、天然物由来の香りを使用した芳香浴を推奨すべきと考える。

今回のような医療現場での芳香浴の効果や安全性の検証は重要であり、様々な角度からのエビデンスの構築が必要であると考える。今後、我々は被験者数を増やして、詳細な検証を行っていく予定である。しかし、今回の検証でも香りを利用した医療現場の導入が期待される十分な結果が得られたと思われる。

さらに近年我々は、ヒト腫瘍細胞に対するさくらの葉由来のCE添加による細胞増殖抑制効果を報告し、さくらのもつ新しい薬理作用を報告している[31]。このような、さくらの多様な薬理・生理作用に加え、今回の研究により、SCEの香りによる脳血流促進、抗ストレス、免疫亢進作用が明らかになった。今後、SCEの香りはコスメへの応用は勿論のこと、ヘルスケア商品などの医療分野においても幅広い用途が期待される。

## 5. 総　括

今回の研究により、SCEの主成分であるBzAの単独暴露は、前頭葉の脳血流量の増加、抗ストレス作用、免疫亢進作用さらには多幸感作用などの生理作用をもつことが確認された。さらに、さくらの花の香りには、主成分であるBzAが重要な役割を持つ可能性が示唆された。今後、さくらの薬理的作用とさくらの香りのもつ生理的作用を活かすとともに、ヘルスケアーとコスメの融合によって、単なる美容や健康維持のみならず医療分野においても人々の心身の健康に役立つことを願っている。

### （引用文献）


1）東京農業大学出版会:東京農業大学短期大学部生活科学研究所編，桜さくらサクラ100の素顔，2000.（さくらの木の皮、咳などの薬理作用）P133

2）鈴木洋 著: 漢方のくすりの事典 第2版 生ぐすり・ハーブ・民間薬. P44 2016.

3）Zhang YQ et al.: The anti-inflammatory effect of cherry blossom extract（*Prunus yedoensis*）used in smoothing skincare product. *Int J Cosmet Sci* 36（6）: 527-530. 2014.

4）Alikhani Z et al.: Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J. Biol. Chem.* 280, 12087-12095. 2005.

5）Wang Yet al.: Protective skin aging effects of cherry blossom extract（*Prunus yedoensis*）on oxidative stress and apoptosis in UVB-irradiated HaCaT cells. *Cytotechnology* 71（2）: 475-487. 2019.

6）塩田浩二、伊藤歌奈子：低温真空抽出による細胞水（セルエキストラクト）の有用性（特集 芳香蒸留水を再評価する，フレグランスジャーナル社. 23（3）, 57-60, 2014.

7）今西二郎：1章アロマセラピー序論. *補完・代替医療 メディカル・アロマセラピー*. 2-4. 金芳堂.（2006）

8）Robert S et al.: Characterization of lavender essential oils by using Gas Chromatography-Mass Spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two dimensional Gas Chromatography, *Journal of Chromatography A* 970: 225-234. 2002.

9）Hoshi Y et a.,: Interpretation of near-infrared spectroscopy signals a study with a newly developed perfused rat brain model. *J. Applied Physiology* 90: 1657-1662, 2001.

10）福田正人：精神疾患の診断・治療のための臨床検査としてのNIRS測定, *MEDIX*, 39: 4-10, 2003.

11）佐藤和恵ほか：低温真空抽出法によるラベンダー精油の成分検討, *日本アロマセラピー学会誌* 13（1）, 24-30, 2014.

12）塩田清二 著：〈香り〉はなぜ脳に効くのか，*NHK出版新書* 2012.

13）竹ノ谷文子ほか: さくらの花びらセルエクストラクト

の生理機能解析～五泉さくらの抗酸化能と生理作用～*日本アロアセラピー学会誌* 18 (1), 14-21, 2019
14) Kim KN et al.,: 5-Bromo-2-hydroxy-4-methyl-benzaldehyde inhibited LPS-induced production of pro-inflammatory mediators through the inactivation of ERK, p38, and NF-κB pathways in RAW 264.7 macrophages. *Chem Biol Interact* 25 (258): 108-114, 2016.
15) Ramos-Nino ME et al.,: QSARs for the effect of benzaldehydes on foodborne bacteria and the role of sulfhydryl groups as targets of their antibacterial activity. *J Appl Microbiol* 84 (2): 207-212, 1998.
16) 上田　孝：意識障害に対するアロマテラピー香りが脳に及ぼす影響―三次元的局所脳血流量の変化から―, *BRAIN NURSING*, 16, 1398-1403, 2000.
17) 竹ノ谷文子ほか：さくら花びらの主成分であるベンズアルデヒドの生理作用―さくら花びらの主成分の機能解析―*日本アロアセラピー学会誌* 19 (1), 1-9, 2020.
18) 大久典子 ほか：香り刺激による心拍変動と脳神経細胞の酸素代謝, *自律神経* 41 (4), 2004.
19) 塩田清二、匂いによるアルツハイマー型認知症の治療研究とその展開, *AROMA RESEARCH* 15: 103-107, 2014.
20) 塩田清二、竹ノ谷文子：香りによるアルツハイマー型認知症の予防・治療法について *食品加工技術* 37: 41-46, 2017.
21) Igarashi M et al. : Effects of olfactory stimulation with perilla essential oil on prefrontal cortex activity. *J Altern Complement Med* 20 : 545-549, 2014.
22) Ikei H, et al., : Physiological effect of olfactory stimulation by Hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*) leaf oil. *J Physiol Anthropol* 22: 34: 44, 2015.
23) 近藤高史ほか：精油のにおいと脳活動変化、*日本アロマセラピー学会誌* 3 (1) 23-28, 2004.
24) Kondoh Tet al.: Central Olfactory Pathway in Response to Olfactory Stimulation in Rats Detected by Magnetic Resonance Imaging, *Chem. Senses* 30: 172-173, 2005.
25) Jimbo D et al.: Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatorics* 9: 173-179, 2010.
26) Kiecolt-Glaser JK, et al.: Olfactory influences on mood and autonomic, endocrine, and immune function. *Psychoneuroendocrinology* 33: 328-39, 2008.
27) 枝 伸彦ほか：エッセンシャルオイルによる香り刺激が口腔内免疫能に及ぼす影響についての生理心理学的研究, *アロマテラピー学雑誌* 20: 28-37, 2019.
28) Watanuki S, Kim YK. : Physiological responses induced by pleasant stimuli. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 24: 135-138, 2005.
29) Okimoto, N et al.: RGS2 mediates the anxilolytic effect of oxytocin. *Brain Res* 1453: 26-33, 2012.
30) Uvnas-Moberg K et al.: Oxytocin, a mediator of anti-stress, well-being, social interaction, growth and healing med sychosom. *Med Psychother* 51(1): 57-80, 2005.
31) Shibato J et al.,: Towards identification of bioactive compounds in cold vacuum extracted double cherry blossom (Gosen-Sakura) leaves. *Plant Signal Behav* 14 (10) : e1644594, 2019.

# コスメトロジー研究助成を受けて

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

景山　伯春

このたびはコーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき誠にありがとうございました。今回採択いただいた課題は、シアノバクテリアが生合成する二次代謝物質マイコスポリン様アミノ酸（MAA）の単離精製プロセス開発と物性評価です。私はもともと（現在も）シアノバクテリアに備わる普遍的な分子機構に興味をもっており、MAAを取り扱うきっかけとなったのもシアノバクテリアの塩ストレス応答機構の研究でした。はじめは、耐塩性シアノバクテリア細胞内に蓄積したMAAの浸透圧調節能に着目して研究を進めていました。その時には、MAAが水によく溶け、紫外線を吸収し、抗酸化活性をもつことが分かっていました。さらに研究を進めていくと、酸化ストレスによるDNA損傷の緩和作用や蛋白質の糖化を抑制する能力など、MAAが興味深い活性を有することが徐々に明らかになってきました。このような背景で、従前からの基礎生物学的な研究を継続すると共に、MAAを用いてアンチスキンエイジングに関わるやや応用的なテーマもやってみようという気になってきました。その上で、本助成で行った精製プロセス開発は、一見地味ですが、純度の高いMAAの物性評価用標品を取得するという大変重要な研究基盤となりました。このような研究計画を採択いただけることは我々研究者にとって大変ありがたいものです。本研究をご支援いただいたことに改めて厚く御礼申し上げると共に、コーセーコスメトロジー研究財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。　（名城大学理工学部化学教室）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

笹井　亮

この度、「機能性化粧品として期待できる皮膚ガス応答性発色素材の研究開発」という課題を採択していただき、誠にありがとうございました。私はこれまで今回の研究課題でも取り上げたように、粘土のようなイオン交換性層状無機化合物の層間に色素を複合化することにより得られる光機能性材料の創製を行ってきました。その中で、層間に取り込まれた色素の分光学的特性が、材料の周辺環境や分子吸着により劇的に変化する現象を明らかにしてきました。特に、私の材料が高湿度下での分子検知に有用であることがわかり、どのような分野に利用可能かをいろいろと調査・検討していた折に、貴研究助成の存在を知り、化粧品への適用の可能性を考える機会を得ることができました。そうした調査活動の中で、皮膚ガス中の成分の精査により、健康状態を非侵襲的に診断できる可能性が研究されていることを知りました。ちょうど私の開発した材料の膜化に目途が立ち始めたころであったことも相まって、健康状態を示す化粧品（機能性化粧品）に有用な材料になるのではないかと考え、申請をし、採択いただき、研究をはじめ、現在に至ります。報告書に示した通りいくつかの系で可能性のある検知素材の創製にたどりつけつつあると思っているところですが、まだまだ皮膚ガス中の分子の検知には至っていません。今後、今回の研究助成をきっかけとして、最終的には皮膚ガス中に含まれ、健康状態につながる分子を高感度かつ選択的に検知し、色素の色調や発光状態の変化により“視える化”できる材料の創製を実現していきたいと考えています。最後になりましたが、化粧品という身近な分野に私の材料が使える可能性を見出す機会をいただいた、貴研究財団の事務局を含む関係の方々ならびに審査をいただいた先生方に深謝いたします。

（島根大学大学院自然科学研究科）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

下里　剛士

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成金を賜り、財団関係者の皆さまをはじめとして、大変お忙しい中ご審査頂きました審査員の先生方に心より御礼申し上げます。農学分野からの研究提案にも関わらず、助成採択の判断を頂きましたことに対して、研究主宰者として重ねて御礼申し上げます。私が軸を置く、研究分野の性質上、食品や家畜の飼料など経口的なルートに特化した新たな素材開発を行ってまいりました。乳酸菌やビフィズス菌などの有用微生物のゲノムDNAの経口ルートの開発に成功し、機能性食品・飼料素材としての利活用を目指してまいりました。その中で、所属大学の工学部の先生よりお声がけがあり、幕張メッセにて開催されたCOSME Tech 2018化粧品開発展に出展させて頂きました。そちらで、筆者が成功したオリゴDNAの経口ルートの開発事例についてプレゼンを行ったところ、数名の来場者より経皮ルートに対する要望と期待が多く寄せられました。本研究では、未開の経皮ルートの確立を目指した、挑戦的な課題提案となっています。現在、上皮細胞培養系を用いて、粒子化、乳化オリゴDNAによる炎症制御作用について検証を進めています。具体的な成果として、ヒアルロン酸ナトリウムとオリゴDNAを混合し、乳化処理を施した素材の開発に成功したことから、ヌードマウスを用いた塗布試験も計画しており、経皮的に浸透したオリゴDNAの皮内における分布状況について経時的に解析を行う予定があります。以上本研究は、抗炎症作用の知られたオリゴDNAを有効性成分とする、スキンケアクリームやローション等の開発基盤の構築を目指した取り組みとして位置づけられます。今回、貴財団より助成頂いたことを励みに、経皮ルートの開発研究を一層加速させていく所存です。末筆ながら、コーセーコスメトロジー研究財団のますますのご発展を、心よりご祈念申し上げます。

（信州大学農学部）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

須原　義智

この度はコスメトロジー研究助成に採択を頂き誠に有難うございました。私の研究室では創薬化学分野の研究を中心に行っており、新規化合物を化学合成して薬のタネになりうる化合物を探索しています。今回採択を頂いたのは、β-アミノ酸をコラーゲンの基本配列に組み込んだ化合物を創製する研究です。コラーゲンはプロリン、ヒドロキシプロリン、グリシンからなるトリペプチド(Collagene Triprptide: CTP）を基本構造として、それが多数繋がることで螺旋構造を持つ1本のポリペプチド鎖となります。その3本が寄り集まって右巻きの3本鎖ヘリックス構造をとることで、線維組織や骨格の構造維持に必要な性質を示すことがわかっています。私たちはこのコラーゲンの物理化学的な性質や、CTPの生理活性物質としての可能性に興味を持ち、研究を進めております。

今回の研究で最も難しかったのが、β-アミノ酸を組み込んだCTPを10個繋げたコラーゲンペプチド（Pro-βHyp-Gly）$_{10}$を合成することでした。これは固相合成という手法でCTP（Pro-βHyp-Gly）を9回繰り返して合成するのですが、非天然のアミノ酸を組み込んでいるため、通常の天然のアミノ酸の場合とは異なり、ペプチド鎖の伸長の過程でできた立体構造次第では途中で伸長ができない可能性がありました。また、CTPを繋げるためのユニットとなるFmoc･Pro-βHyp-Glyの純度を99%以上に上げないと十分に反応が進行しないことがわかりました。

今回採択して頂きましたテーマを含め、普段は学生と一緒に試行錯誤を繰り返し、切磋琢磨しながら研究を進めております。それまでにうまくいかなかった化学合成を克服し、苦労して最終化合物を得たときは何事にも替えられない喜びがあります。このような貴重な機会を与えてくださいましたコーセーコスメトロジー研究財団に心より御礼申し上げます。

（芝浦工業大学システム理工学部生命科学科）

2019 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

田村　篤志

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択して頂き、財団ならびに関係者の方々に深く感謝申し上げます。今回採択頂いた研究課題は美容製品の成分として耳にする機会の多いコラーゲンに関する研究です。これまでの自身の研究は、合成高分子や超分子構造ポリマーに関する研究が中心であり、天然由来高分子の研究を行った経験がほとんどなかったため、自身にとっては挑戦的な課題でした。具体的には、我々のグループで研究を行ってきた超分子材料ポリロタキサンによるコラーゲンの機能化を目的とした研究ですが、新鮮な気持ちで新たなテーマに取り組むことができました。

コラーゲンを超分子で架橋するという研究は、突拍子のない研究だと思われる方もいると思いますが、ポリロタキサンの分子可動性を利用した材料設計は注目を集めており、様々な分野で研究が進められています。私の所属研究室では、ポリロタキサンの生体材料としての利用を検討しておりますが、これまでの知見や材料設計の手法を美容製品への応用を目指した研究で行うことは初めてであり、新たに学ぶことの多い研究となりました。結果としては、ポリロタキサンの架橋に関するこれまでの知見と矛盾しない結果が得られましたが、コラーゲンでも超分子架橋の効果が得られたことは興味深い成果だと考えています。コラーゲンは美容製品だけではなく医療材料としても用いられておりますので、美容製品から着想した本テーマは、医療材料としての応用も期待できると考えております。また、この度頂いた研究の機会は、これまでの自身の研究とは視点が異なる研究であり、柔軟な発想で研究に取り組むことの重要性を再認識しました。今後も研究を継続し、コスメトロジー分野の発展に寄与する材料が創出できればと考えております。

（東京医科歯科大学生体材料工学研究所）

2019 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

檜垣　勇次

コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただきましたことに、心より感謝いたします。この度拝受いたしました研究費を活用して、環境応答性会合特性を示す新規両親水性ブロック共重合体の創成と会合体形態変化発現機構についての研究を遂行することができました。おかげさまで、双性イオン高分子で構成される非対称高分子鎖が、双性イオン選択的相互作用により水溶液中で分子鎖の構造に応じてミセル状会合体を形成し、特定の双性イオンとの特異的相互作用によって会合形態変化が誘導される現象を見出しました。疎水性相互作用により水溶液中で構造安定性の高い会合体を形成する両親媒性ブロック共重合体が会合性高分子として一般的ですが、本研究で対象とした異種親水性高分子で構成される両親水性ブロック共重合体は分子鎖と水の相互作用に応じて会合体形成が誘導される新たな自己組織化高分子群として、高分子化学分野、コロイド・界面化学分野における新境地となると考えています。また、この新たな自己組織化高分子群の研究は、スキンケアや化粧品等のコスメトロジーに関連する製品への応用、さらには物質輸送の制御による新たな医用分子システムとしての応用も見込んでいます。研究助成申請書では、会合性高分子鎖の界面集積と秩序構造形成を制御し、形成されるナノ積層構造多層膜のダイナミクスの計測までを視野に入れた研究計画でしたが、COVID-19 感染拡大による移動制限のため当初計画していた実験が遅延してしまったことが大変心残りです。

私事ではございますが、2018 年 7 月に九州大学から本学に異動し、わずかなスペースと実験台しかない状況で、2019年4月に配属された学部生4名と共に研究室を立ち上げました。実験環境を整えるための資金がなければ研究を始めることすらままならない不安定な状況で、研究を支援していただきましたことに心より厚く御礼申し上げます。末筆ながら、コーセーコスメトロジー研究財団と関係者各位に重ねて御礼申し上げるとともに、貴財団のますますのご発展を心よりお祈り申し上げます。（大分大学理工学部）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

平野　智也

この度は、コスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき、ありがとうございました。2019 年 4 月より現職に異動し、研究室を新たに主宰することになるタイミングでこのような助成をいただけて、本当に助かりました。重ねて、御礼申し上げます。

私はこれまで、ケミカルバイオロジー、創薬化学の分野の研究を行い、蛍光物質、光分解性保護基などの光により機能する分子を開発してきました。お恥ずかしながら、コスメトロジーという言葉の意味もよく知りませんでした。そんな折、貴財団の研究助成の応募書類を読んだとき、光というキーワードによって、私の研究はコスメトロジーの分野と繋がるのでは？と考えました。その結果、考案し、提案した研究は、光によって発生する活性酸素種が存在するときに、同じ光によって共有結合の切断が起こる光分解性保護基の開発です。この光分解性保護基を、抗酸化剤、疾患に対する治療薬などの生理活性をもつ分子を結合させる。保護基が結合した状態では生理活性を失っていますが、強い紫外光が照射され、さらに活性酸素種も生成した部位では、光分解反応が進行して抗酸化剤などが生成し、保護、治療効果が発揮される分子システムになるのでは、と考えました。今になって思えばチャレンジングな研究でしたし、率直に申し上げて、研究は道半ばと言わざるを得ません。しかしながら、こうした萌芽的な研究にも可能性を見出していただいたことは、本当にうれしかったです。研究助成期間が終わっても、私のコスメトロジーの研究は続きます。今後は、より実用的な分子の開発と応用を目指していきます。どうもありがとうございました。　（大阪薬科大学）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

森　隆昌

この度は我々の研究に助成頂きありがとうございました。我々の研究は液中の粒子分散状態の評価技術を作るというやや地味な印象を受ける（と思われる）ものです。しかし我々は液中の粒子分散状態の制御こそが化粧品のみならず、全スラリー技術の基盤となるものとの信念のもとに研究をしております。一見すると目立たない、しかし、重要な技術であるという所をご理解頂けたのではないかと思うと大変うれしく思います。

今回の助成研究の中では、不規則形状粒子やナノ粒子の分散という、分散評価の中でもやや困難を伴うスラリーにチャレンジしました。おかげさまで、これまで独自に開発してきた分散評価技術（沈降静水圧測定法、浸透圧測定法）で不規則形状粒子やナノ粒子の分散についても上手く評価できるのではないかという結果を得ることができました。今回得られた成果をもとに、今後も様々な不規則形状粒子やナノ粒子のスラリーの評価を継続していくことで、我々の技術を「実プロセス」で利用頂けるようになることを目指します。今回の助成研究以外にも、液中での粒子分散に関する独自の評価技術やスラリー調製技術を開発していますが、これらはいずれも実際の産業現場の課題に向き合い、その中にある学術的な問題を明確化したことによって生まれたものです。スラリー評価の研究を継続していると、ともすると「評価できるものをとりあえず評価してみよう」という姿勢に陥りやすくなると感じております。しかし、それでは、実プロセスの課題を解決することはできないでしょう、完全な自己満足です。今回の助成研究のように、評価すべきものを評価する、そして評価する方法がなければ新たに作るという姿勢で「現場に役立つ基礎研究」を発展させていきたいと思っています。　（法政大学生命科学部）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

柳澤　実穂

この度は、コスメトロジー研究財団の研究助成事業に採択していただき、誠にありがとうございました。採択時は、東京農工大学大学院工学研究院に在籍しておりましたが、申請研究が始まる2019年1月より東京大学大学院総合文化研究科へ移籍したため、今回の2年間にわたる助成は非常に有難く、お蔭様で無事に研究室を立ち上げることができました。今回採択していただきました研究内容は、化粧品学においても馴染みの深い生体高分子ミクロゲルの力学特性やナノ構造に関するものです。ミクロゲルの分散溶液に対する理解が進展する一方、機能を担う1つのミクロゲルに対する評価法は、その小ささゆえに限られていました。これに対して我々は、ミクロゲルサイズ以下の細さを持つ長いガラスキャピラリーを用いて、ゲル表面を周期的に吸引変形させて粘弾性を評価する手法を確立し、例えばエマルション重合(乳化法)により形成されるゼラチン・ミクロゲルが、従来のバルク系で形成されるミクロゲルとは異なる粘弾性特性を持つことを明らかにしました。またその要因として、マイクロメートルサイズのエマルションを覆う膜物性が、ゲルのナノ構造を変化させることを導きました。本研究により得られた知識は、上記のタンパク質由来のゼラチンだけでなく、アガロースなど他の生体高分子ゲルに対しても成り立つことを見出しており、今後の生体高分子・ミクロゲルからなる化粧品製造において役立つことが期待されます。さらに、今回確立したミクロゲルの粘弾性評価法は、従来のレオロジー測定では不可能であったマイクロメートルサイズのミクロ力学評価を実現する系として役立つはずです。今後も、こうしたソフトマター物理や高分子物理の視点から、コスメトロジー研究へ貢献したいと考えております。

(東京大学大学院総合文化研究科先進科学研究機構)

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

山元　淳平

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択して頂きまして、心より感謝申し上げます。これまで、光回復酵素と呼ばれるDNA修復酵素の基礎的な点に注目して研究を進めてきた中、もっと応用研究へと展開できるのではないか、と提案してくださった境慎司教授(大阪大学大学院基礎工学研究科)の言を受けて、コスメトロジーへの応用を真面目に考え始めたのが、この研究のきっかけでした。調べてみますと、過去には光回復酵素の医療応用が真面目に考えられており、現在の技術を使えばコスメトロジーへの応用に供することが可能であろうと思い立ち、最終目標を高々と掲げて申請書を書いた次第です。残念ながら、研究期間内に最終目標に到達することはできなかったですが、これまでとは大幅に異なる研究方針や実験手法に取り組むことができ、現在では本課題を通して得た知見・技術を改良してスピード感のある研究ができています。また、本研究を通して多面的な考え方を身につけることができ、その後の研究費申請にも良い影響を与えたと確信しています。

本研究では、CRISPR-Cas9ゲノム編集と機能スクリーニングを掛け合わせることで、新たな酵素機能の発現を目指しました。これまでCRISPR-Cas9を用いた研究については着手したことがなく、大阪大学高等共創研究院の鈴木啓一郎教授とともに本課題を進める中で、私が持っている技術を鈴木教授の技術と組み合わせることで、本課題のほかに新たな研究を始めることができました。貴財団助成がきっかけとなり、停滞していた状況の好転へとつながっており、感謝の一念しかありません。助成期間は終了いたしましたが、本課題はまだ道半ばですので、今後も引き続きコスメトロジー研究への貢献ができるよう一層精進してまいります。末筆ながら、本課題の選考・支援に携わって頂いた関係各位に重ねて感謝を申し上げるとともに、コーセーコスメトロジー研究財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。

(大阪大学大学院基礎工学研究科)

2018 年度　研究助成

# 新しい時代の化粧品の安全性評価の確立を目指して

足利　太可雄

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき、厚く御礼申し上げます。

本研究のきっかけは、私が株式会社資生堂から国立医薬品食品衛生研究所に職場を移し、動物実験が困難な状況においてコスメトロジーの発展にために何をすべきかを改めて自らに問いかけたことです。幸いこれまで私は、特に動物を用いない皮膚感作性評価について実務を行うとともに、様々な研究機関との共同研究や業界活動を経験しており、化粧品の安全性評価を担当している現場が実際に何を必要としているかを肌感覚で知っているつもりです。そこで、新しい時代の化粧品の安全性評価法として、動物実験に依存しない皮膚感作性のリスク評価（強度予測）と毒性学的懸念の閾値の開発という大きな目標を設定しました。

化粧品の安全性評価の現場では、対象とする原料の情報は限られており、しっかりとした評価のためには様々な分析試験や安全性試験を検討することになります。言うまでもないことですが、化粧品開発において最も重要なことは安全性の確保であり、説明責任を含めてこれができないメーカーは、お客様に化粧品を提供する資格はないと思います。一方で動物実験は困難となり、国際的な規制動向の把握、膨大な原料の切り替え対応、新規原料の開発など現場の苦労は尽きません。

こうした状況を踏まえ、私は本研究を通して、共同研究者に恵まれたことに加え、国内の様々な現場の研究者と率直な意見交換をしてまいりました。スタートしたばかりの本研究が社会実装されるためには、国際的にも様々な立場からの専門家との交流を通じた発展が必要になるため、今後は本研究成果を積極的に国際的に発信していきたいと思います。道のりは遠く、非才な私には荷が大きすぎると思いますが、今後も皆様とともに、新しい時代の化粧品の安全性評価の確立を目指して一歩ずつでも進んでまいりたいと思っています。

（国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

飯島　一智

2018 年 4 月に現所属に異動し研究室を立ち上げた際、最初に採択いただいた研究課題が本研究助成でした。私はそれまで細胞足場材料の研究を主に再生医療を志向して行ってきましたが、独立を機に安全性評価に関する研究を立ち上げようと「シリカナノ不織布を用いた汎用皮膚三次元モデルの開発」を提案いたしました。現在、安全性評価に関する研究は当研究室の主要なテーマのひとつになりました。

研究期間の後半約 1 年間は COVID-19 の影響を大きく受けました。大学への入構が約 2 ヶ月間禁止され、解除後も学生の滞在時間の制限や試薬・消耗品の納入遅れなど、研究の遂行が難しい時期が続きました。

一方で新たな発見もありました。これまで消費者としては香粧品とは無縁の暮らしを送ってきましたが、会議や講義、ゼミなどがオンラインで行われるようになったことで自身の加齢を実感するとともに見た目を意識するようになり、白髪染めやスキンケアを始めました。外出自粛で鬱々とする中で、少し若返ったように感じられる自分の顔を見ると元気が湧いてくる感覚がありました。コーセーコスメトロジー研究財団が医学・生物学、化学分野にとどまらず、精神、文化に関する研究分野のご支援もされていることを思い出し、その意義を再認識いたしました。

最後になりましたが、研究をご支援いただきましたコーセーコスメトロジー研究財団および関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

（横浜国立大学大学院工学研究院）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

伊藤　佐生智

コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただき、2 年間の研究をサポートしていただいたことに厚くお礼申し上げます。私は細菌毒素に興味があり、黄色ブドウ球菌毒素の新たな機能、特に免疫かく乱作用の発見を目指して研究を進めております。これまでは生化学的な手法により黄色ブドウ球菌毒素の新規標的分子の探索を行っておりましたが、数年前からこの手法での標的分子の探索に限界を感じていました。本助成を受けて新たにマスト細胞と好塩基球を用いた実験系を導入いたしました。これらの細胞の免疫応答に影響を及ぼす毒素を探索した結果、溶血毒素αヘモリジン（Hla）がマスト細胞の活性化を増強すること、機能未知であったStaphylococcal superantigen-like（SSL）12がマスト細胞と好塩基球を活性化することを見出すことができました。Hlaの研究を通じて、古くから多くの研究がなされているHlaのような既知毒素でも新しい視点から解析することで新機能を見出せる、未だ研究の余地があるのだと考えさせられました。またSSL12の研究は、これまで毒素による免疫抑制作用に着目していた自分にとって、毒素の免疫活性化作用という、逆の生理作用の発見であり、新たな研究のフィールドが開けたように感じました。振り返ってみると、私にとってコスメトロジー研究助成を受けたことは、毒素研究の突破口であり転換点であったように思います。今後は毒素の作用機序の解明、毒素のアレルの生理活性の比較など見出した毒素による免疫細胞の活性化機構の解明を進めることでコスメトロジー研究に貢献したいと思います。

（名古屋市立大学大学院薬学研究科衛生化学分野）

2019 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

内山　明彦

この度はコーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき誠にありがとうございました。私は皮膚科領域におけるcommon diseaseである褥瘡に関する研究を行っています。現在も有効な治療方法が確立されていない急性期の褥瘡（紅斑や紫斑のみの状態）に対して、潰瘍化の抑制や潰瘍の早期治癒につながる革新的な治療アプローチについてこれまでに様々な検討を行ってきました。私は現在NIHでの留学にテーマにしていた転写因子SOX2の皮膚疾患への治療応用の可能性に関して日々様々な検討を行っています。本研究では転写因子SOX2による急性期褥瘡における制御機能についてマウスモデルを用いて検討しました。大学院生と一緒に取り組んでいますが当初は期待していた実験結果が出ない日々が続いていたため、頑張って実験に取り組む院生へ非常に申し訳ない思いを抱いていました。その後、SOX2は虚血再灌流障害に対する酸化ストレス応答作用を増強し、組織へのダメージを軽減することを示すことができました。本研究成果を基礎として、老化などの酸化ストレスが関連する皮膚疾患に対するSOX2やそのターゲットを用いた新たな治療開発につながることを期待しています。

（群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学）

2019 年度　研究助成

# 皮膚で発現する化学物質受容体が体の温度適応に与える影響

太田　茜

このたびは貴財団の第 30 回研究助成に採択い頂きまして、深く感謝申し上げます。研究のターニングポイントとなっておりましたため、貴重な機会となりました。本助成研究のテーマは、皮膚で発現する化学物質受容体が体の低温耐性に与える影響を線虫をつかい解析するものです。貴財団に研究進展の背中を押して頂いたと同時に、期待に応えられるよう結果を出すために精進したいと思いました。

本研究では、*C. elegans* とよばれる体長 1 mm ほどの線虫をつかって、動物がどうやって周りの環境温度を受容し温度に適応するのかを解明する目的で行っています。具体的には、*C. elegans* の温度に対する応答である低温耐性に着目し、ヒトを含む動物の温度受容機構や、温度環境に馴れる仕組みを解き明かそうと進めています。これまでの研究から、温度の感覚や記憶に関わる幾つかの遺伝子が見つかりまして、それらは人間にも存在していました。

本研究助成では、皮膚で発現する化学物質受容体が体の温度適応に与える影響を解析しました。その中で、予想外の結果が一部得られ、従来、ヒトにおいて接触刺激などを受容するメカノレセプターとして知られていた分子が、温度を受容することを見つけました。さらにその *C. elegans* ホモログの変異体において、低温耐性が異常であり、体内の脂肪酸比率が変化ししていることが見つかりました（Takagaki, et al., 2020）。また、皮下組織で発現している GPCR も低温耐性に関与していました。

今後は以上の結果をもとに、より応用に近い研究も進めていきたいと考えています。シンプルな動物の胚スループットな応答解析系をつかっても、動物の温度応答機構の全貌を解き明かすには時間がかかりますが、全力で取り組みたいと思います。これからも、本助成を受けられる多くの研究者の皆様のご活躍と貴財団のさらなる御発展をお祈り申し上げます。

（甲南大学大学院自然科学研究科／統合ニューロバイオロジー研究所）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

大和田　智彦

不飽和脂肪酸、例えばDHAはサプリメントとして販売され、通販でもよくみられる化合物で、その作用の多彩さがよく知られています。この数年サプリメントから医薬品シードができるかも知れないとの発想から研究を行っていますが、新しいことを学びながらの展開でなかなか思うようにいきません。このコーセーコスメトロジー研究財団の研究助成の成果も完成版とは大変かけ離れたものです。一方でこの研究助成を受けている間に未曾有のコロナウイルス感染拡大が起こり、学生の感染防止やその中での研究室の運営、講義のオンライン化への対応で手探り状態が続き、記憶が残らないくらい次から次へ考えることが出て来て大変だったというのが正直な所です。今回のパンデミックが、日本のハードだけではなくソフトも時代の変化に対応できていないことを見せつけられました。一見無駄なように見える研究にも投資し、ある幅広さが科学・技術には不可欠な様です。また、このコロナ禍で、何よりも身体的・精神的な面からの健康が重要であることを痛感致しました。コスメトロジーにも既にセルフメディケーションの発想が組み込まれていると思いますが、コロナ禍を経験している今、日頃からのセルフメディケーションが今後ますます重要になると思います。コーセーコスメトロジー研究財団のますますの貢献を祈って止みません。この度は公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成を受けることができ心より感謝申しあげます。

（東京大学大学院薬学系研究科）

2018年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

押海　裕之

免疫応答は病原性を有する異物に対しての生体防御機構としてヒトの身体に備わったシステムである。一方で、この免疫系の異常が花粉症などを引き起こし本来無害である異物に対しても過剰に反応することがヒトにとって悪い影響を及ぼす。そのため化粧品に含まれる成分に対しても免疫応答が生じた場合には皮膚や肌に大きな影響を与える。それが重大な社会問題として発展した例として「茶のしずく石鹸」によるアレルギー誘発問題が有名である。この石鹸に含まれていた小麦加水分解物はもともと身体に害悪のないものであり、多くの人にとっても健康や美容の面からも何の影響もなかったことに対して、一部の人にはアレルギーを誘導し大きな問題を引き起こした。またこれ以外にも硫酸ニッケルや塩化コバルトなどを含めた様々な化粧品の成分がアレルゲンとして問題となるケースも稀に存在する。そのことから化粧品の成分が免疫に与える影響は重要な問題となる。

私たちの研究室では以前から自然免疫の研究を進め、その研究の中で上皮成長因子（EGF：Epidermal Growth Factor）がDDX60と呼ばれる分子のリン酸化を介して炎症性サイトカインの産生を制御することを明らかとした。EGFは肌のターンオーバーを誘導しアンチエイジングを謳う数多くの化粧品に配合されている。炎症性サイトカインは毛細血管の透過性を亢進することで赤発や腫脹を伴った炎症の原因となることからEGFがこれらの肌の炎症に与える影響を調べることが重要と考えられた。今回、コスメトロジー研究助成を受けてEGFと免疫との関連について新たにEGFが炎症を抑えることを明らかとして、さらに、炎症を抑えながらも上皮の抗ウイルス作用は阻害しないことを明らかにすることができた。これらの発見はEGFを化粧品に含ませることの効果や安全性を考えるための重要な基礎データになると期待される。

（熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座）

2018年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

神沼　修

本研究を遂行するにあたり、大変貴重な研究助成を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深謝申し上げます。

100万人単位で死者の出るパンデミックとなった新型コロナウイルス感染症に対し、漸くワクチン・治療薬が供給されるようになってきました。そのような多くの人命を救いうる医薬品においても、連日副作用の問題が報道されるにつれ、コスメトロジー領域における安全性の問題は、より厳格に議論されるべきものではないかと実感します。

勿論これまで、化粧品を開発する上で最も重要な検討項目とされる皮膚刺激性を含め、その安全性を評価するさまざまな実験系が実用化されています。その一方、皮膚のバリア機能が低下したアトピー等の皮膚炎患者に対する化粧品の利用はより慎重になるべきですが、私は、そのような皮膚炎患者に対する皮膚刺激性を的確に評価できる実験系が充実していないことに気づきました。

そこで今回、自身が開発した抗原特異的T細胞由来のクローンマウスを利用して、そのようなアトピー患者皮膚に対する化粧品の影響を、スクリーニングレベルで簡便に検討できるマウスモデルの作製に挑みました。一部計画通りに進まないところもありましたが、それでもアトピー性皮膚炎様病態を、迅速かつ安定して発症するモデルの樹立に成功し、ステロイド薬やタクロリムス等、既存のアトピー性皮膚炎治療薬の有効性も確認することができました。

今後このモデルを、アトピー患者皮膚に対する化粧品安全性評価系のスタンダードとなるよう、さらに熟成してゆく計画です。またその利活用を促すことにより、より良い化粧品の提供を通じて人々を笑顔にする、元来コスメトロジーが持つ意義を高めることに、微力ながら貢献してゆきたいと考えています。

最後になりましたが、今回のご支援を賜りましたことに改めて御礼申し上げますと共に、貴財団の益々のご発展を心より祈念致しております。

（広島大学原爆放射線医科学研究所）

2018 年度　研究助成

# チロシナーゼと金属

神戸　大朋

私は長年にわたり亜鉛を研究対象としてきたのですが、留学先で銅酵素であるチロシナーゼの研究をかじったことがあります。帰国後 10 年を過ぎ、偶然目にした論文で、チロシナーゼには他に 2 つの相同分子が存在しており（TYRP1・TYRP2）、チロシナーゼとの相同性の高さからそれらの金属配位が銅であると思われていたところ、亜鉛の可能性が出てきたという混沌とした状況にあることを知りました。銅と亜鉛といった拮抗する 2 つの微量金属が協調して機能する連続的な酵素反応を解析した例は、現在までのところ報告されておらず、私は、チロシナーゼこそ、この謎を解明するのに相応しい酵素ではないかとの考えに至り、本研究助成にご採択いただいたことをきっかけに、研究に着手しました。

細胞で発現するタンパク質の 30% には金属が配位しており、正しい金属が的確なタイミングで配位することは、タンパク質がその機能を発揮することに不可欠です。そのため、生命活動においてこの制御は極めて重要なこととなります。これらのことを考えますと、本研究の目的はメラニン色素合成の理解を深めることではありますが、これに留まらず、生命金属の細胞内動態と生理作用の統合的な理解にまで貢献できるのではないかと期待しています。

チロシナーゼは、美白との関連からもこれまで多くの研究が実施されており、コウジ酸などは、作用点がチロシナーゼであることが明らかにされています。コウジ酸と同じ効果は、チロシナーゼに配位した銅を除去する銅キレート剤でも実現可能であることも分かっています。本研究成果によって、TYRP1 や TYRP2 を阻害する成分が同定できれば、チロシナーゼを阻害する成分を組み合わせることで、好みに合わせた色を作り出すこれまでにないオーダーメード化粧品の創成といった新たな価値を持つ化粧品開発に結びつくのではないかと、日々夢を膨らませて研究を進めています。

（京都大学大学院生命科学研究科）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

北村　秀光

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき、誠にありがとうございました。

私は、現在、健康維持にとって重要な神経系と免疫系のクロストークについての研究を展開し、特に神経ペプチド受容体を介した神経ペプチドシグナルによる免疫機能の調節効果および免疫関連疾患の予防法の確立を目指して研究を進めています。その中で、痛みやストレスにより産生されるタキキニン類の一つニューロキニン A による免疫調節作用に関する研究を行い、これまで IFN-γ 誘発ステロイド抵抗性重篤化喘息モデルの病態の発症と重篤化、またシラカバ花粉抗原に対するヒト免疫応答において、ニューロキニン A の受容体である NK2R を介した神経ペプチドシグナルによる制御メカニズムについて検討しました。その結果、抗原提示細胞の一つである樹状細胞において IFN-STAT1 依存的に NK2R が発現誘導されるとともに、NK2R を介した神経ペプチドシグナルが過剰なアレルゲン特異的 T 細胞応答を惹起し、慢性炎症やアレルギー疾患に関わることを発見しました。

本研究では、イミキモド誘発乾癬モデルマウスを作出し、IFN-STAT1-NK2R 信号伝達経路による乾癬の病態発症と重篤化への関与を示唆するデータを得ました。本研究成果をもとに、引き続き、IFN-STAT1 依存的な NK2R の発現誘導を介した神経ペプチドシグナルの制御による皮膚炎の改善効果について明らかすることで、将来、皮膚炎に苦しんでいる患者さんたちに少しでもお役に立つ情報、知見を発信したいと考えています。

最後に、本研究を遂行するにあたり、共同研究を行っている先生方や研究室の学生さんに深く感謝するとともに、ご支援いただいたコーセーコスメトロジー研究財団および関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

（北海道大学遺伝子病制御研究所）

2018年度　研究助成

# セラミドとコスメトロジー

木原　章雄

この度は研究助成を賜り、ありがとうございます。今回採択していただいた研究課題はアシルセラミドと呼ばれる皮膚透過性バリア形成に必須な脂質の産生の分子機構に関するものです。近年、セラミドは多くの化粧品に配合されるようになり、「セラミド＝皮膚機能の改善」というイメージが一般の人にも広く認められるようになってきましたが、セラミドと一口に言っても多様なクラスと分子種が存在します。この多様なセラミドクラスの中でもアシルセラミドは皮膚バリア機能に最も重要です。私たちはこれまでアシルセラミド産生に関わる多くの遺伝子を同定してきましたが、本研究課題の対象である*ACSVL4*はその最後の遺伝子になります。私は基礎の脂質生化学者として長年セラミド研究に従事してきましたが、必ずしも皮膚あるいはアシルセラミドに限らず様々な組織における多様なセラミドの重要性、産生の分子機構に関する研究を行ってきました。セラミドはスフィンゴ脂質という生体膜の脂質成分の疎水骨格をなすため、全ての組織、細胞に存在します。しかし、一般的な組織におけるセラミドはスフィンゴ脂質生合成経路の中間体という側面が大きく、量的にはそれほど多くありません。一方、表皮角質層においてセラミドは脂質多層構造体(脂質ラメラ)の主要な構成成分として重要であり、他の組織に比べて数十倍量存在しています。このようにセラミドが多くかつ多様な分子種が存在しているというのは表皮の大きな特徴の１つです。私はセラミド研究会というセラミドに関する学術集会の副会長を務めています。この研究会は14年前に発足し、アカデミアと民間(特に化粧品、食品メーカー）の研究者が参加して年に一度情報交換を行っています。もし、セラミドに興味のある方がおられましたら、是非一度ご参加ください。末筆ながら、コーセーコスメトロジー研究財団の今後ますますのご発展を祈念いたします。

（北海道大学大学院薬学研究院）

2019年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

小林　翔

この度は、コスメトロジー研究助成に採択頂きまして誠にありがとうございました。今後の研究の発展の基盤となる成果を得ることができ、コーセーコスメトロジー研究財団および関係者の皆様には心より感謝いたします。

これまで私は生体内の酸化ストレスに対する抗酸化防御機構について遺伝子改変動物およびそれら動物由来の培養細胞を用いて研究を行ってきました。特に、細胞の主要な抗酸化物質であるグルタチオン（GSH）の代謝とその合成に必要不可欠なシステインの供給経路について一貫して続けています。近年、GSHの枯渇は過酸化脂質の蓄積が特徴的な鉄イオン依存的細胞死・フェロトーシスを誘導することが明らかになり、GSH代謝の観点からフェロトーシスを制御する分子機構の解明を目指した基礎研究を進めています。最近、私達は一重項酸素がフェロトーシスを誘導することを確認しており、紫外線の照射によりロドデンドロール代謝物から実際に一重項酸素が生成されることから、ロドデンドロールによる白斑形成にフェロトーシスが関与するのではないかと仮説を立て、本研究に取り組んできました。しかし、フェロトーシスを直接判断する方法が無かったため、生体での病態への関与についての解析が不十分でした。本研究の成果の一つとしてフェロトーシス細胞を特異的に認識するラットモノクローナル抗体の樹立に成功致しました。今後、この抗体を用いて、ロドデンドロールによる白斑などの皮膚疾患と共に、酸化ストレスが発症に関わる癌や神経変性疾患などの病理標本に使用し、病態とフェロトーシスとの関係の解明のため詳細な解析を続けていく所存です。

本研究を進める中でご協力を賜りました多くの共同研究者の先生方や学生には深く感謝すると共に、研究成果を社会に還元できるように邁進していきたいと思います。

（山形大学大学院医学系研究科）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

繁森　英幸

高齢化が進むにつれて、老化に関わる薄毛や脱毛に悩む方は年々増加しています。重篤な病気ではありませんが、精神的なことを考慮するとその対策は重要であると思われます。これまでに多くの育毛剤が開発されてきており、一定の効果は現れていると思いますが、一方においては副作用なども問題になっているのが現状です。そこで、より安全で安心な育毛剤の開発においては、副作用の少ない薬剤ひいては日常的においても摂取することのできる化合物を用いることが適切だと思われます。そこで本研究では、肝細胞増殖因子（HGF）に着目して、そのHGF産生を促進する化合物を育毛剤へと応用することを目的としました。HGFは細胞増殖、血管新生、細胞死抑制および形態形成などの活性を有していますが、育毛・発毛作用もあり、頭髪の再生にも関わることが知られています。本研究では、ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）を用いてHGF産生促進を有する天然由来化合物の探索を行いました。その結果、カフェ酸誘導体の１つであるクロバミドという化合物に、顕著なHGF産生促進活性を見出しました。クロバミドはカカオ豆やコーヒー豆に含まれる成分でもあることから、ココア、チョコレートおよびコーヒーにも含まれており、これらを日常的に摂取することによって加齢に伴って減少したHGFの産生を促進することで、薄毛や脱毛を予防することができるものと期待されます。さらには、HGF産生を促進することによってアルツハイマー型認知症や筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの難治性神経変性疾患にも効果を有することが見出されており、クロバミドはこのような疾病の予防への応用にも期待されます。最後になりましたが、本研究助成に採択していただいたコーセーコスメトロジー研究財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

（筑波大学生命環境系）

2018 年度　研究助成

# 新たな観点からの黄色ブドウ球菌の研究

島村　裕子

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成を賜り、２年間の研究をサポートしていただきましたことに、心よりお礼を申し上げます。

私は、これまで、食品衛生学的観点から、食中毒起因菌である黄色ブドウ球菌を研究してきました。３年前のある日、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では、常在菌の種類が著しく減り、その過半数を黄色ブドウ球菌が占めるという論文を読んだ学生が「アトピー性皮膚炎に関与する皮膚常在菌」として黄色ブドウ球菌を研究してみたいと熱い希望をぶつけてきてくれました。それをきっかけに、初めて、「学生と一緒」に研究費の申請書を作成しました。研究助成に採択された時は、資金面でのサポートをいただけることに加え、研究内容が認められたことが大変嬉しく、研究の原動力となりました。新たな研究分野に挑戦したこともあり、思うようにいかないこともありましたが、学生の頑張りや主任教官の増田修一教授のサポートもあり、黄色ブドウ球菌の放出する膜小胞と皮膚常在菌の代謝物との関連性の解明を目指すテーマへと発展させることができました。ヒト皮膚上に常在する細菌の代謝物が黄色ブドウ球菌を正常な数に戻す、またはその病原性を抑制することにより、宿主防御に関与していることを明らかにすることができれば、アトピー性皮膚炎の治療につながるだけでなく、高齢者や皮膚炎症状のない健常者においても、日常のスキンケア法としての活用が期待できると考えています。今後は、本研究で得られた成果をもとに、正常ヒト皮膚常在細菌の菌体外成分を明らかにすることにより、黄色ブドウ球菌が誘導するアトピー性皮膚炎に対するスキンケア方法の確立に向けて、研究を進めていきたいと思います。

（静岡県立大学食品栄養科学部）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

清水　重臣

このたびは、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成によりご支援いただき、まことに有難うございました。私は、「新規オートファジー」という新たな細胞内タンパク質分解機構を発見し、その生体での機能解析と疾患との関連性を研究しております。体を構成するすべての細胞が有する機能ですので、皮膚においてももちろん機能しております。様々な臓器の細胞において新規オートファジーの役割を解析することにより、臓器ごとにその役割が異なっていることを見出しておりますが、興味深いことに、いずれの臓器の細胞においても、新規オートファジーはその本質的な機能に密接に絡んでおります。今回の皮膚に関する研究においては、バリア機能の一翼を担っていることが明らかになりましたが、これは即ち、バリア機能こそが皮膚細胞の最も本質的な機能であると考えられます。新規オートファジーを入り口に、さらに深く解析を進めることにより、バリア機能の新たな側面がわかるのではないかと期待しております。

また、本研究では、新規オートファジーを活性化して皮膚のバリア機能を向上させる化合物の同定にも成功しました。本化合物の開発を進めることにより、アトピー性皮膚炎に限らず、シミ取りや美白などの肌の美容に対しても、科学的な根拠に基づいた効果が得られるのではないかと期待しております。このように、今回ご支援いただいた研究を今後もさらに発展させていきたいと考えております。

（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

2019 年度　研究助成

# 天然の人工皮膚を目指して

武尾　真

この度は貴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す。関係者の皆様には厚くお礼を申し上げます。

現在、日本の人口の約２人に１人は何らかのアレルギー疾患にり患していると言われており、また昨今の新型コロナウイルス対策で手洗いや手の消毒の機会が増えたことにより、肌のアレルギー反応や肌荒れが問題となっています。私自身も肌が弱く、特定の洗顔料以外では顔が荒れ、ガビガビになってしまいます。このため、化粧品の安全性や、副反応について、さらに注意を払う必要が求められています。化粧品開発において、動物実験の代替法として人工皮膚が使われていますが、より生体皮膚の反応に即した安全性・機能性試験が必要とされます。

今回助成金を受け、張力という機械的な刺激を付加することにより、これまでの皮膚代替物と比較して、より天然の皮膚に近い生理活性を示す三次元人工皮膚を開発することに成功いたしました。また、生体外での毛包の再構築方法を確立し、この毛包を人工皮膚へと組み込むことによって、毛の生えた人工皮膚を開発することもできました。毛包は様々な物質の体表面から皮膚内への浸透の経路となり、また毛包の皮脂腺から分泌される皮脂は皮膚のバリア機能を高めることが知られています。これらのことから、今回開発した毛の生えた人工皮膚は従来の皮膚代替物に比べ、より天然の皮膚に近い状態での安全性・機能性試験の実施が可能であると期待されます。

今回の研究において得られた、人工皮膚に様々な皮膚付属器や細胞を組み込むための技術と知見は、組み込む細胞種を変えることにより研究のニーズに応じた様々な評価系へとカスタマイズできる可能性を示しています。また、人工皮膚をさらに高度化することによって「天然の（皮膚と同等の）人工皮膚」を作り上げることにより、コスメトロジーのみならず再生医療分野を含む多くの研究分野の進歩・進展に貢献していきたいと考えています。

（国立研究開発法人理化学研究所生命機能科学研究センター）

2019 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

武元　宏泰

自身の専門分野が高分子化学及びそのバイオマテリアルへの展開であり、その技術に立脚して肌フローラ育成という研究を着想した。医療応用を目指す研究には経験があるため、生体適合性や毒性等へ配慮しながらの材料設計を行った。しかしながら、医療応用においては体内にて機能を発揮する分子設計が求められるのに対し、肌フローラ育成ということで体外での機能発現が重要である。そのため、外気との接触等にも耐えられるようなタフな材料設計を行うように苦心した。

提案した課題の遂行においては分子の設計や合成、分子の機能の物理化学的評価や菌類を用いての生物学的評価が含まれており、包括的な内容となっていた。頂戴した研究資金の自由度が高いため、それらの一連の研究遂行へのハードルは低く、有り難かった。コロナ禍で研究時間等が厳しく制限されたものの、全体を通してのフィージビリティの確認までこぎつけたのは、先述の研究資金の使いやすさによるものが大きいと考えている。

現在、医療の世界では個人の状態（時には遺伝子情報）に応じたテーラーメード型の治療への展開が叫ばれつつある。同様に、化粧品においても個人の状況に応じて最適な成分組成が存在するはずである。これに関し、本研究ではその一環として肌フローラにおける善玉菌を選択的に育成する手法の開発に取り組んだ。開発された手法においては、弱酸性 pH に依存して栄養物質を放出するように分子が設計されている。そのため、悪玉菌優勢な弱塩基性環境では栄養物質の放出が抑制されるが、善玉菌優勢な弱酸性 pH では栄養物質の放出及び菌の増殖の促進が誘導される。肌表面のミクロな環境での pH 変化を認識できるように設計することで、その時々の肌の状態に適した機能発現が可能となる。開発された分子設計は種々の栄養物質にも適用できる。今回は Staphylococcus epidermidis に着目して研究を遂行したが、将来的には様々な表皮常在菌に適応した素材開発へと取り組んでいきたい。

（東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所）

2019 年度　研究助成

# コーセーコスメトロジー研究財団研究助成事業の可能性

立松　健司

このたびは、コスメトロジー研究助成によりご支援賜りまして、誠に感謝申し上げます。今回の受賞者表彰式に際して開催頂いた立食パーティーで、受賞された多数の研究者、株式会社コーセー様の研究者と話が弾みました。他財団の例を挙げて恐縮ですが、助成金研究の終了後も毎年受賞式典への参加が可能で、サロンとして研究者交流の場となっている例もございます。コーセーコスメトロジー研究財団様もこのような交流の場を設けて頂ければ、コスメトロジー分野のさらなる発展つながるのではと感じています。また、株式会社コーセー様の研究所研究員の方への共同研究提案の場としても機能するかもしれません。今後のコーセーコスメトロジー研究財団様の活動として御一考頂ければ幸いです。

（大阪大学産業科学研究所）

2018年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

徳留　嘉寛

この度はコスメトロジー研究助成に採択を頂きまして関係の皆様に感謝申し上げます。化粧品に関わる基礎的、応用的な研究に対する研究助成はあまり多くなく、様々な公的な競争的研究費の中では珍しいなかで、大変ありがたく思っています。私は研究活動として、化粧品科学を中心に行っていますので、自分の研究を化粧品研究そのものとして申請し、採択して頂けたことに関し本当にありがたく思っています。

話が少し変わりますが、私は大学院生時代に、静岡県立大学で奥 直人先生（現帝京大学薬学部長）の研究室でリポソームを用いた研究を行っておりました。当時は、固形がんや転移がんを治すことを目指したリポソーム研究を行っておりましたが、その横の実験台ではある企業の方がリポソームを化粧品に応用することを試みていました（その時点では、モイスチャーリポソームの基礎的研究はすでに終わっていたようですが)。その時には化粧品の研究にピンときてなかったのが正直なところですが、そういう意味では化粧品に関わる研究に大学院生時代にはすでに触れており、そこにまた立ち戻っているという不思議な感覚があります。研究は視野を広く、そして境界はないことを実感できる研究室でした。

化粧品に関わる研究は、基礎研究も応用研究もありますが、その一部は商品化にも将来的にはつながるものもあると思います。良い化粧品は、人々の気分を明るくし、人々の生活を良くすることが考えられます。さらに景気も良くすることも考えられます。そのような分野の研究助成をしてくださるコーセーコスメトロジー研究財団様には本当に感謝を申し上げますとともに私自身もより一層、この研究分野に関わり、さらにより良い成果を出せるように精一杯努力したいと思います。繰り返しになりますが、この度はコスメトロジー研究助成を頂きまして感謝申し上げます。

（城西大学薬学部）

2018年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

中村　元直

この度のコーセーコスメトロジー研究財団研究助成への採択には心より御礼申し上げます。私は19年間、民間製薬企業で創薬に従事し、2006年に東京大学大学院医学系研究科に准教授として着任してからは本格的にGタンパク質共役型受容体（GPCR）研究をスタートさせました。ただ、私のGPCR研究は1991年の血小板活性化因子受容体遺伝子のクローニングにさかのぼります。以来約30年、GPCRの創薬標的としての魅力に取り憑かれて研究を続けてまいりました。民間企業の研究員時代はテーマの制約等で挑戦的な課題にはなかなかチャレンジできませんでしたが、その反動か、アカデミックな世界に移ってからは誰もやらないこと、誰も思いつかないこと、即ち、『独創性』をキーワードに様々なGPCRを対象とした研究を節操なく続けてまいりました。そんな中でも本採択課題は奇抜な類いのテーマと言えます。①苦味を感受する受容体が皮膚細胞に存在する、②しかも形質膜ではなく細胞内オルガネラ膜に局在する、③その意義は、細胞内に侵入した有害物質の結合で活性化され、有害物排出機構の作動シグナルを惹起することで細胞障害を回避させる、まさに妄想とも言える作業仮説です。“独創性は、最初は少数派、多くの人から共感を得たら独創性は薄れる”とは思いつつも、こうした私の妄想的研究課題をご理解いただき、助成に採択していただいたことを本当に嬉しく思っております。私が考えている仮説が実証できれば新奇な生体防御機構の提唱のみならず、皮膚の保護剤開発にも発展する夢のあるテーマだと確信しております。こんな話を研究室で学生としておりますと、妄想の輪が広がり、学生の目が輝いてくるのがわかります。研究には夢があります。若い研究者達と一緒に夢を育てることにも財団の助成を活用させていただいております。妄想とは言いつつ、自身の提案には責任を持ち、着実に証拠を積み上げて実証に向けて努力を続けております。後に振り返った時、今回の助成が研究成功へのスタートであったと言えるよう、精いっぱい研究に精進していく所存です。今後の財団のますますのご発展を祈念いたします。

（岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻）

2018 年度　研究助成

# 高齢社会に美と健康をもたらす研究を志して

服部　文幸

2002 年より、ヒトiPS細胞を用いた心臓再生医療一筋に研究活動を行ってきましたが、2018 年に現職に就いて以来、より広い分野へのiPS細胞の応用を模索してまいりました。中でも、かねてより興味を持っていた皮膚やその付属器官へのアプローチを展開する最初の一歩を貴財団に助けて頂きました。この場をお借りして、貴財団に関わられておられる方々に心から御礼を申し上げます。今回、「ヒト老化皮膚モデル」という切り口で採択を頂き、報告書に記述致しましたように、ある程度の達成を得たものと考えております。今後この研究を発展させ、実用価値をさらに高めてゆきたいと考えております。特筆させて頂きたいのは、この研究をさせて頂いている過程で、様々な気付きやアイデアが出現し、女学生および女性研究者（20 代～ 60 代）らとの議論が、次の目標や夢を生みつつ、大変に熱く盛り上がっていることです。この経験から、アピアランスに対するウォンツの計り知れない大きさを実感できました。今後も、医療・医薬品分野からコスメトロジー分野への応用は加速する一方であろうと予想されます。我々のように医療的な視点からコスメトロジーを考えてゆくことが益々重要であると同時に、コスメトロジー分野のマーケティングや研究開発部門と我々医療研究者の緊密な交流の必要性を思わずにはおられません。最後とはなりますが、コーセーコスメトロジー研究財団の益々のご発展を祈念いたしております。

（関西医科大学大学院医学研究科医科学専攻）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

原　博満

今回、コスメトロジーの研究助成を受けましたことに深く感謝をしております。結果的には、私の研究者としての見通しの甘さから、しっかりとした結論にまで至ることができませんでした。しかし、自分としては大変挑戦的な研究課題に取り組ませていただくことができました。この研究期間は、私の研究人生の新鮮かつ貴重な経験として今後の成長の糧になるであろうと強く感じております。今後ともぜひ、萌芽的、挑戦的な基礎研究課題に引き続き数多くのご支援をしていただいて、近年、目に見えて衰退の道をたどっている日本の基礎科学力の再興にお力添えをいただければ大変嬉しく思います。貴財団の崇高な理念を称え、感謝し、今後のますますの発展をお祈りしております。

（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

廣田　豪

この度はコスメトロジー研究助成を賜りまして心より感謝申し上げます。助成頂いた研究内容は、ヒト皮膚における薬物トランスポーター発現の個人差要因の解明です。皮膚は薬物の重要な投与部位の一つでもあり、投与や投与中止が簡便であることことから、他の薬物投与経路にはない利点が数多くあります。しかし、元来皮膚は外部環境から生体を保護する役割を担っており、消化管等からの吸収に比べると皮膚からの薬物の吸収は極めて少なく、吸収速度や効果発現に要する時間も遅いことが知られております。また、薬物の皮膚透過は受動拡散によるものと考えられてきたため、これまでの経皮吸収に関する研究では、物理的バリアである角質層の克服に主眼が置かれ、薬物をいかに

効率よく透過させ、標的部位に運ぶかという製剤的な技術開発が中心でありました。今回の研究により、皮膚には重要な薬物トランスポーターが存在しその発現量には幅広い個人差があることが明らかとなりました。また、トランスポーター発現量と皮脂量との関係も示唆されました。このことは、経皮投与に基づく薬物治療の最適化に大きく寄与することが期待されます。

今回明らかとなったメカニズムは薬物治療の最適化のみならず、皮膚美容においても重要な知見となると考えられます。すなわち、皮膚におけるトランスポーター発現の個人差を考慮した新たなテーラーメードによるコスメトロジーの応用展開です。近年、薬物治療においては、個別最適化による効率的・経済的な医療が進められております。薬物治療と同様に、皮膚におけるトランスポーターの発現量に応じて、個人個人に合った最適な化粧品の選択が今後の本研究の展開により期待できると考えております。今後も、コスメトロジー研究を推進することで、本学問分野のさらなる発展に貢献していきたいと思います。最後になりましたが、コーセーコスメトロジー研究財団のますますの発展をお祈り申し上げます。

（九州大学大学院 薬学研究院 薬物動態学分野）

2018年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

森　英樹

この度はコーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき、誠にありがとうございました。私は細胞が接着するための生体材料とそれに対する細胞の応答性の違いについて研究しております。その研究の中で、タンパク質や多糖類などの天然高分子で作製したハイドロゲルを用いて細胞を培養しようとすると、想定していたほど細胞が接着しなかったり、接着しても細胞が進展しなかったりすることがあります。特に同じゲル上で複数の細胞を共培養しようとするとそのような問題がよく生じます。その原因の一つとして、ハイドロゲルのような非常に軟らかい足場材料上で移動できるか否かといった細胞の特性が細胞の種類によって異なることが挙げられます。実際の生体内における組織形成の過程で、周辺にある複数の細胞や細胞から作られた細胞外基質の粘弾性から生じる力学的刺激が、組織を構成するそれぞれの細胞の挙動にどのようの影響しているのか非常に複雑だと考えられ、興味が湧くところです。最近の研究では細胞膜上にあるチャネルタンパク質、細胞−基質間接着タンパク質、それと繋がっている細胞骨格、核内裏打ちタンパク質など機械的刺激に応答する、いわゆるメカノセンサーと考えられる様々な機構が発見されています。生体組織を維持するために細胞レベルで様々なメカノセンサーが巧みに働いているということでしょう。これらのメカノセンサーと合わせて細胞培養組織の形成過程が説明できるように今後も更に研究を進めたいと考えております。また、このような研究がコスメトロジー研究の一助となればと思います。

最後になりましたが、本研究をご支援いただきましたコーセーコスメトロジー研究財団と関係者の皆様に改めて感謝申し上げると共に、ますますのご発展をお祈り申し上げます。

（大阪府立大学大学院理学系研究科）

2018年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

山田　勇磨

この度は、「ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の開発」に研究助成をしていただき、心より御礼申し上げます。私はこれまでに、ミトコンドリア標的型脂質二重膜小胞（リポソーム）、MITO-Porterの開発研究を進めてまいりました。MITO-Porterに関する研究では、特に医薬品開発を目標とした研究テーマに注力してまいりました。ミトコンドリアは、抗酸化効果およびアンチエージング効果に深く関連する、活性酸素シグナル調節、エネルギー産生を担うため、化粧品のターゲットとしても注目されております。そのため、ミトコンドリアを標的と

した機能性化粧品に関する研究を幾度となく計画いたしましたが、残念ながら研究を進める機会を得ることはできませんでした。この度の助成によって、はじめて「MITO-Porterを活用した美容研究」に挑戦する機会を与えて頂きました。

リポソームなどのナノカプセルが配合された化粧品は既に販売されておりますが、化粧品成分として、ナノカプセル、ビタミン類などの化粧品素材、添加剤などを単に混合した緩衝液としている商品が大半を占めているように思っておりました。そのため、真に化粧品素材をナノカプセルに含有した化粧品の開発は、目的の効果を発揮するための重要な課題であると考えました。また、本研究で開発を進めたナノカプセルは、皮膚組織上に留まるだけではなく、細胞内部さらにはミトコンドリアに機能性素材を送達するため、新しいコンセプトのナノカプセル化粧品を世界に先駆けて提供する革新的技術になりうると期待しております。

現段階では、皮膚細胞のミトコンドリアに機能分子を送達し、ミトコンドリア機能を変化させるところまで研究を進めることができました。これから、さらなる検討が必要になると思いますが、今後も研究を継続し、微力ながらコスメトロジー分野の発展に寄与していきたいと考えております。

末筆ながら、本研究にご支援頂いたことに重ねて感謝申し上げるとともに、コーセーコスメトロジー研究財団の今後のますますの発展をお祈り申し上げます。

（北海道大学大学院薬学研究院）

2019年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

青柳　秀紀

このたびは、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただきまして誠にありがとうございます。ウグイスの糞は化粧品素材（洗顔料や肌のシミ抜きなど）として、古くは平安時代から近年まで利用されてきました（鳥獣保護管理法により、現在はウグイスの糞の入手が困難となり、製品の製造ができない状況にあります）。長年にわたり広く使用されてきたウグイスの糞ですが、これまで学術的研究はほとんどなく、化粧品的効能を示す機構や糞の主な要素である細菌叢（腸内由来）など、大部分が未解明な状況にありました。この現状を踏まえ、本研究では、ウグイスの糞が化粧品的効能を示す機構の解明とその利用を最終目的に、今回はその基礎として、ウグイス糞の諸特性と糞の主要な要素である細菌叢（ウグイス腸内細菌由来）の解析と培養化を試みました。本研究助成により今後の研究の基盤となる基礎的研究成果が得られ、現在も研究を推進中です。

近年、人生100年時代が謳われ、100年時代を豊かに生き抜く力として“無形の力（財産）”の重要性が叫ばれています。“無形の力（財産）”の一つに異分野の多様性に富んだユニークな“人脈”があげられています。コーセーコスメトロジー研究財団は30年以上の歴史があり、そこで形成された研究者集団は非常に多様性に富んでいます（「創立30周年記念誌 コスメトロジー研究30年のあゆみ」を拝見いたしますと、医学、歯学、医療学、看護学、生活科学、薬学、工学、理学、農学、教育学、人文学、芸術、観光学など、非常に幅広い）。今後、このユニークな“無形の力（財産）”の発展、活用、展開、社会への還元、が重要になると思います。たとえば、コスメトロジー分野（あるいはその他の分野）の大きな課題（テーマ）に対して、貴財団のユニークな“人脈”を活用し、みんなで知恵を出し合い、協力し、取り組むような取り組みや、“人脈”を交流、発展させる機会を作るのも面白いと思います（新たなイノベーションや価値観を創成できる）。

最後に貴財団の今後のますますのご発展を祈念申し上げます。

（筑波大学生命環境系）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジー研究助成を受けて

上田（石原）　奈津実

私は分子神経科学の研究に学位取得時から携わっており、コスメトロジーの分野の研究者ではございませんが、今回、環境的要因（香り）と遺伝的要因の関与が示唆されている記憶保持能力について研究する機会をいただきました。もともと、遺伝的要因により記憶保持能力が低下したマウスを見出し（未発表）、このマウスを使って環境的要因の影響を探索することで、社会問題となっている認知症の治療につながる提案ができないかと考えたことが、研究テーマ提案のきっかけです。本助成金は萌芽的な研究提案も受け付けて下さったため、分野外の研究者で挑戦的な研究テーマになりますが、応募してみました。実際に研究を進めると、匂い物質の選定の際に購入可能な材料という点で選択肢が限られてしまい、記憶保持を向上させる匂いの同定には至りませんでした。一方で、十分な助成をいただいたことで、記憶保持能力の評価系に匂い物質の暴露を組み合わせた実験系の構築と、遺伝的要因により記憶保持能力が低下したマウスを用いて環境的要因の影響を評価可能な実験系を構築することに成功いたしました。私のように分野外の研究者が自身の持つ研究成果をコスメトロジーに波及させる一助として、今後の採択課題に関しましては、必要に応じて貴社との共同研究などを通じ、匂い物質など提供可能な研究素材を使用させていただく機会をご提示いただければ、分野外の研究者が持つ研究成果をコスメトロジーで生かすきっかけ作りを提供して下さる助成金としても機能するのではと感じました。最後になりましたが、社会問題となっている健康寿命の向上に対して貢献可能な研究を展開する第一歩を提供して下さった、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の関係者の皆様に感謝申し上げます。このきっかけをさらに飛躍させ、将来的には基礎研究成果が医療や健康といった産業展開につながる成果の蓄積の一助となるよう精進してまいります。

（名古屋大学大学院理学研究科）

2018 年度　研究助成

# コスメトロジーの受賞を受けて

竹ノ谷　文子

私の研究助成を採択頂きまして、コーセーコスメトロジー研究財団の30年という節目であります今年度に、このような研究成果を報告させて頂きますことに感謝申し上げます。

私の研究は、日本独自の花として愛されております、さくらの香りの持つ有効成分を化粧品などの関連製品開発に繋げるのは勿論のこと、ヘルスケアへの応用に活かすため、動物実験を基本として、ヒトでの検証実験を目指してきました。薬理的作用を持つ植物の芳香成分などの抽出は水蒸気蒸留法で行われることが殆どでありますが、私どものグループでは、天然物由来の成分を抽出できる低温真空抽出法にこだわりを持ち、その有効性を評価してきました。今回、私どもは、この抽出法により、繊細なさくらの花びらからセルエキストラクトを抽出し、その香りが脳に与える影響やその生理作用の解析にチェレンジしてまいりました。特にさくらの香り暴露によるホルモン分泌や脳機能解析を行うには、既存の研究費だけでは到底研究を遂行すること大変難しいことであります。しかし、今回の助成金によりまして、その検証をヒトまで進めることができ、さらに測定のパラメーターを増やすことが可能になりました。このようなことは研究室の活性化にも繋がってきました。さらには臨床現場での香りの導入を目指すための第一歩として、体動困難な患者様での検証も行うことができました。今後、この研究を契機として、香りを美容やヘルスケアのみならず、医療分野にも活用または応用していけるような、新しいコスメトロジーの創生を目指して研究を行えればと考え、更に研究を進めていく所存でございます。このような考えに至りましたのも、ひとえに、コーセーコスメトロジー研究財団のサポートによるものと深く感謝申し上げます。

（星薬科大学運動科学教室）

● 学術集会支援助成（1 件）

2020 年度　学術集会支援助成

# 第1回レドックスR&D戦略委員会公開シンポジウムを終えて

伊藤　健

この度はコーセーコスメトロジー研究財団より学術集会支援助成をいただき、第１回レドックスR&D戦略委員会シンポジウムを開催しました。貴財団と選考にあたっていただいた先生方、関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

レドックスR&D戦略委員会はレドックス制御に関連した健康科学(創薬、機能性食品、化粧品など)の推進とその産業応用の促進を目的として令和２年８月８日に設立された産学官連携委員会です。記念すべき第１回の本シンポジウムでは、テーマを「レドックスホメオスタシスと認知症・生活習慣病」とし、サテライトシンポジウム「超硫黄分子が加速するレドックスバイオロジーのパラダイムシフト」を含め基調講演１件と18件のレドックスに関わる最先端の研究発表を２日間にわたり行いました。

酸化ストレスは、ヒトを含む生物の老化や疾患に関与し「コスメトロジー」の分子基盤の１つです。本シンポジウムでは、DNAやタンパク質への酸化・親電子性物質修飾の化学的基盤から個体レベルでの生体防御応答や生活習慣病に至るまで、様々な角度からレドックスホメオスタシスと健康であることの関係を俎上に載せて議論しました。

新しい生活様式の元年とも言える令和２年度、本シンポジウムも全ての講演をオンラインで実施しました。その結果、学界と企業を合わせて129名の方に参加いただくことができました。当委員会は学会を主体とする学術集会とは一線を画し、企業会員が運営にも携わっているという特色があります。本シンポジウムでもその特色が活かされ、画面越しからも産学一体の熱気が伝わる盛会になったことを大変ありがたく思っております。

いつまでも健康で美しく長生きしたいという要望は、誰もがもっている人間らしさなのかもしれません。このような要望に当委員会はいかに応えるのか、そのような問いかけに当委員会が目指すべき方向が示された気がいたします。

末筆となりましたが、今後とも当委員会の活動がコーセーコスメトロジー研究財団の目指す美と健康への一助となることを願いつつ、貴財団の益々のご発展を心よりお祈り申し上げます。

（弘前大学大学院医学研究科）

# 付　　録

事業報告書
役　　員

# 事 業 報 告 書

（自 2020 年 4 月 1 日　　至 2021 年 3 月 31 日）

## 《研究助成関連》

**［コスメトロジー研究助成］**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2020 | 5 | 7 | 公募開始 | 全国 649 の大学、病院、研究機関等へ公募要領を送付し、関連学術雑誌 3 誌及び 12 関連機関 HP と当財団 HP に公募要領を掲載 |
| | 7 | 10 | 公募締切り | 応募総数110件、各分科会毎に選考委員による個別審査（7/18 ～ 8/28） |
| | 9 | 5 | 選考委員会分科会（書面） | 書類審査による予備選考と本選考委員会決議を選考委員長へ一任する旨の承認 |
| | 9 | 29 | 第二回選考委員会 | 選考委員長出席の下、研究助成候補33課題を選考 |
| | 10 | 9 | 第二回臨時理事会（書面） | 選考委員会から候補課題を答申、助成採択課題の決定 |
| | 11 | 25 | 創立30周年記念式典 | 研究助成採択33課題の代表者に対し、助成金贈呈書を授与 |
| | 12 | 10 | 助成金交付 | 研究助成金を交付　総額5,500万円 |
| 2021 | 2 | 5 | 選考委員への報告（書面） | 2021年度研究助成公募要領他 |

**［大学講座研究助成］**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2020 | 1 | 10 | 公募開始 | 全国 601 の大学と附属研究機関へ公募要領の送付及び関連学術雑誌 1 誌と当財団 HP に公募要領を掲載 |
| | 3 | 12 | 公募締切り | 応募総数48件 |
| | 3 | 30 | 創立30周年記念実行委員会（書面） | 予備選考通過課題20件の決定後、選考委員全員による個別審査（4/1 ～ 5/10） |
| | 5 | 25 | 第一回選考委員会（書面） | 採択候補者3名を内定、選考委員長裁定により最終採択候補者3名の決定 |
| | 6 | 22 | 第一回臨時理事会（書面） | 選考委員会から最終採択候補者を答申、助成採択者決定 |
| | 11 | 25 | 創立30周年記念式典 | 研究助成採択3課題の代表研究者に対し、助成金贈呈書を授与 |
| | 12 | 10 | 助成金交付 | 研究助成金を交付　総額8,000万円 |

**［国際交流助成］**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2020 | 10 | 9 | 第二回臨時理事会（書面） | 選考委員会で承認を得た1件について採択決定 |

**［学術集会助成］**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2020 | 10 | 9 | 第二回臨時理事会（書面） | 選考委員会で承認を得た3件について採択決定 |

## 《表彰事業》

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2020 | 3 | 30 | 創立30周年記念実行委員会（書面） | 1990年から2017年までのコスメトロジー研究助成採択者を対象に論文実績を調査し、被引用件数が優れた候補者の中から表彰候補者3名を選出 |
| | 6 | 22 | 第一回臨時理事会（書面） | 「創立30周年記念コーセーコスメトロジー奨励賞」表彰者を決定 |
| | 11 | 25 | 創立30周年記念式典 | 表彰者3名に対し、表彰状と副賞300万円を贈呈 |

## 《創立30周年記念式典》

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2020 | 11 | 25 | 出席者は財団理事会メンバーと当年度の表彰・贈呈対象者に限定し、「創立30周年記念コーセーコスメトロジー奨励賞」の表彰式、助成金贈呈式及び受賞者記念写真撮影のみ実施 |

## 《理事会関連》

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2020 | 5 | 22 | 第一回通常理事会(書面) | 2019年度事業報告及び収支決算報告（含監査報告）を承認する件 |
| | | | | 任期満了に伴う選考委員の選任に関する件 |
| | | | | 任期満了に伴う理事候補者の選出に関する件 |
| | | | | 補欠監事候補者の選出に関する件 |
| | | | | 「選考委員会規則」の一部改定に関する件 |
| | | | | 株主としての議決権行使について |
| | 6 | 22 | 第一回臨時理事会(書面) | 代表理事及び業務執行理事の互選に関する件 |
| | | | | 事務局長の選任に関する件 |
| | | | | 常勤役員の報酬に関する件 |
| | | | | 2020年度大学講座研究助成採択者を承認する件 |
| | | | | 「30周年記念コーセーコスメトロジー奨励賞」表彰者を承認する件 |
| | 10 | 9 | 第二回臨時理事会(書面) | 2020年度コスメトロジー研究助成者等を承認する件 |
| | 11 | 25 | 第二回通常理事会 | 2020年度収支予算書の一部変更を承認する件 |
| | | | | 2021年度事業計画及び予算案を承認する件 |
| | | | | 理事長、副理事長及び専務理事の職務執行状況の報告 |

## 《評議員会関連》

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2020 | 6 | 12 | 定時評議員会（書面） | 2019年度事業報告及び収支決算報告（含監査報告）を承認する件 |
| | | | | 任期満了に伴う理事の選任に関する件 |
| | | | | 監事の選任に関する件 |
| | 6 | 26 | 評議員への報告（書面） | 第一回臨時理事会について |
| | 11 | 30 | 評議員への報告（書面） | 第二回通常理事会議事、報告事項について |

## 《その他》

### 1）報告書発行

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2020 | 5 | 1 | 中間報告書 | 研究業績中間報告集　第29号 |
| | 9 | 1 | 完了報告書 | コスメトロジー研究報告　Vol. 28（2019)、CD版を作成 |
| 2021 | 3 | 1 | 創立30周年記念誌 | 「コスメトロジー 30年のあゆみ」 |

### 2）行政届出関連

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2020 | 6 | 17 | 内閣府　令和元年度事業報告書等の提出 |
| | 6 | 24 | 法務局　変更登記申請（役員の変更） |
| | 7 | 7 | 内閣府　変更の届出（役員の変更） |
| | 9 | 9 | 内閣府　公益法人行政担当室による立入検査 |
| 2021 | 2 | 8 | 内閣府　令和3年度事業計画書等の提出 |

### 3）情報公開（当財団HP等）

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2019 | 12 | 2 | 2020年度 大学講座研究助成公募要領の掲載 |
| 2020 | 1 | 10 | 2020年度 大学講座研究助成公募開始 |
| | 3 | 2 | 2020年度 事業計画等の掲載 |
| | 3 | 12 | 2020年度 大学講座研究助成公募終了 |
| | 4 | 6 | 2020年度 コスメトロジー研究助成公募要領の掲載 |
| | 5 | 7 | 2020年度 コスメトロジー研究助成公募開始 |
| | 6 | 30 | 事業報告、新役員等の掲載 |
| | 7 | 10 | 2020年度 コスメトロジー研究助成公募終了 |
| | 9 | 1 | コスメトロジー研究報告Vol. 28の発行及び掲載 |
| | 11 | 27 | 2020年度 表彰および研究助成者受賞者等の掲載 |
| 2021 | 2 | 19 | 2021年度 事業計画等の掲載 |

# 2020年度　助成を受けられた方々

## (1) コスメトロジー研究助成（33名）

第１分野：素材、物性に関する分野（９名）

| 氏　名 | 所　属 | 職位 | 研究課題 |
|---|---|---|---|
| 池田　将 | 岐阜大学工学部化学生命工学科 | 教授 | 刺激応答性DNAナノ構造体の構築 |
| 伊村くらら | お茶の水女子大学基幹研究院<br>自然科学系 | 講師 | ソフトな界面分子膜を足場とした機能性ゲル薄膜構築手法の開発 |
| 宇田　亮子 | 奈良工業高等専門学校 | 教授 | 紫外線応答型リポソームの膜融合性を用いた送達システムの開発 |
| 岡村　陽介 | 東海大学工学部応用化学科 | 教授 | 装着感のない皮膚貼付型ナノ透明薄膜の創製と芳香・消臭能の精密制御 |
| 唐澤　悟 | 昭和薬科大学薬学部 | 教授 | 多くの水分子を保持した機能性親水コロイドの開発 |
| 北山雄己哉 | 大阪府立大学大学院工学研究科 | 助教 | 天然物由来高分子を利用した新規サンスクリーンカプセルの創出 |
| 通阪　栄一 | 山口大学大学院創成科学研究科 | 准教授 | 多孔性高分子粒子を用いた自発的乳化技術の開発 |
| 長井　紀章 | 近畿大学薬学部医療薬学科 | 准教授 | 毛根への薬物直接送達を可能とするナノ結晶ハイドロゲルの開発 |
| 湊　遥香 | 信州大学繊維学部 | 博士<br>研究員 | 開閉制御可能なナノシャッター構造を有する高分子微粒子担体の開発 |

第２分野：生体作用、安全性に関する分野（16 名）

| 氏　名 | 所　属 | 職位 | 研究課題 |
|---|---|---|---|
| 五十里　彰 | 岐阜薬科大学薬学部 | 教授 | 皮膚細胞間バリアの破壊に関わる光センサーの解明と予防薬の開発 |
| 大田　昌樹 | 東北大学大学院環境科学研究科 | 准教授 | ヒトの視覚と嗅覚を制御する新しい抽出分離素材の開発 |
| 大森　深雪 | 愛媛大学大学院医学系研究科<br>感染防御学講座 | 講師 | 皮膚-免疫増幅サイクルの遮断によるアレルギー性皮膚炎の病態制御 |
| 北浦　次郎 | 順天堂大学大学院医学研究科<br>アトピー疾患研究センター | 先任<br>准教授 | 皮膚の偽アレルギーを誘導する分子のスクリーニング法確立 |
| 小暮健太朗 | 徳島大学大学院医歯薬学研究部<br>（薬学域）衛生薬学分野 | 教授 | イオン導入時の微弱電流による皮膚への安全性の厳密な検証と美容効果の検討 |
| 小林麻己人 | 筑波大学医学医療系 | 講師 | 乳酸菌がもつ抗酸化作用の分子基盤解明 |
| 櫻井　文教 | 大阪大学大学院薬学研究科 | 准教授 | 病原体由来および自己由来二本鎖RNAがインターフェロン非依存的にコラーゲン産生を抑制する機構の解明 |
| 志馬　寛明 | 名古屋市立大学大学院医学研究科<br>免疫学分野 | 講師 | 紫外線で誘導される制御性T細胞が創傷治癒を促進するメカニズムの解明 |
| 下田　将之 | 慶應義塾大学医学部病理学教室 | 准教授 | 皮膚老化・美容に関わる生体内ヒアルロン酸代謝機構の解明 |
| 高杉　征樹 | 大阪市立大学大学院医学研究科<br>分子生態医学講座 | 助教 | ヒアルロン酸とデスモソームタンパクとの新規結合が皮膚機能に及ぼす影響の解明 |
| 田中　知明 | 千葉大学大学院医学研究院<br>分子病態解析学 | 教授 | 脂肪細胞移植治療応用に資する脂肪細胞多様性の単一細胞解析とエピジェネティクス制御を介した脂肪細胞機能調整法の開発 |

| 氏　名 | 所　属 | 職位 | 研究課題 |
|---|---|---|---|
| 津田　雅貴 | 広島大学大学院<br>統合生命科学研究科 | 助教<br>(テニュアトラック) | 新規変異評価システムを用いた長波長の紫外線（UVA）による突然変異誘発機構の解明 |
| 南雲　陽子 | 筑波大学生命環境系 | 助教 | 天然由来物質によるclaudin-1を介した高分子送達の科学的基盤研究 |
| 林　良太 | 新潟大学医歯学総合病院皮膚科 | 助教 | 日本人における接触皮膚炎とバリア機能に関与する遺伝子変異の解析および3Dスキンモデルを用いた接触皮膚炎の最適な治療法の探索 |
| 原口　省吾 | 昭和大学医学部生化学講座 | 講師 | 加齢に伴い皮膚で産生量が減少する新規皮膚ステロイドホルモンの機能解明 |
| 日浅　未来 | 岡山大学薬学部 | テニュア<br>助教 | コラーゲン合成に必須なビタミンC輸送メカニズムの解明 |

第３分野：精神、文化に関する分野（８名）

| 氏　名 | 所　属 | 職位 | 研究課題 |
|---|---|---|---|
| 石川　正昭 | 兵庫県立尼崎総合医療センター | 医長 | 他覚的定量評価を伴った嗅覚検査の開発 |
| 伊藤　文人 | 高知工科大学<br>フューチャー・デザイン研究所 | 講師 | リアルワールドパラダイムと脳機能イメージングによる顔印象認知の神経基盤の検討 |
| 鎌田　泰彰 | 国際医療福祉大学保健医療学部<br>視機能療法学科 | 助教 | 瞳孔振動と心拍変動解析を用いた香りが自律神経に及ぼす影響 |
| 田中　明 | 福島大学共生システム理工学類 | 教授 | 顔の動画像解析による脈波の多点抽出と皮下の血行動態の評価法の開発 |
| 新美　亮輔 | 新潟大学人文学部 | 准教授 | 顔魅力の知覚に服および行動の知覚が与える影響の検討 |
| 松原　恵理 | 国立研究開発法人森林研究・<br>整備機構森林総合研究所 | 主任<br>研究員 | 木の香りによる作業効率への影響解析 |
| 若林　一道 | 大阪大学歯学部附属病院 | 助教 | 分光イメージング装置を用いた天然歯のグラデーションの数理解析 |
| 和佐野<br>浩一郎 | 国立病院機構東京医療センター<br>臨床研究センター聴覚障害研究室 | 室長 | 顔面神経麻痺に対する重症度診断AIソフトを用いたより効果的なメイクアップ法の開発 |

### (2) 大学講座研究助成（３名）

| 氏　名 | 所　属 | 職位 | 研究課題 |
|---|---|---|---|
| 天谷　雅行 | 慶應義塾大学医学部皮膚科 | 教授 | 表皮角層形成機序の解明と角層機能制御によるアレルギー疾患予防法の開発 |
| 椛島　健治 | 京都大学大学院医学研究科<br>皮膚科学 | 教授 | アトピー性皮膚炎の発症機序の時空間的理解とアレルギー克服を目指した研究 |
| 月田早智子 | 帝京大学戦略的イノベーション<br>研究センター（SIRC）、<br>大阪大学大学院生命機能研究科 | 教授 | 上皮バリアの分子細胞生物学的研究を基盤とした皮膚疾患の病態解明と治療予防法の開拓 |

### (3) 国際交流助成（１件）

| 実施責任者 | 招聘目的 |
|---|---|
| 東海大学工学部医用生体工学科<br>衛藤　憲人 | 第29回日本人間工学会システム大会　Dr. Menozzi Jackli, ETH Zurichの招聘<br>（2021年3月から2022年3月へ延期） |

### (4) 学術集会助成（3件）

| 実施責任者 | 招聘目的 |
|---|---|
| 大阪大学微生物病研究所<br>原　英二 | 国際細胞老化研究会（ICSA）2020年度学術会議（2020年11月から2021年6月へ延期） |
| 北海道大学大学院薬学研究院<br>脇本　敏幸 | 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム（2020年10月から2021年10月へ延期） |
| 弘前大学大学院医学研究科附属<br>高度先進医学研究センター<br>伊東　健 | レドックスR&D戦略委員会第一回学術集会（2021年3月4日～5日オンライン開催） |

### 「創立30周年記念コーセーコスメトロジー奨励賞」を受けられた方々

| 氏　名 | 所　属 | 職位 |
|---|---|---|
| 阿部　正彦 | 東京理科大学研究推進機構総合研究院 | 教授 |
| 石原　一彦 | 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 | 教授 |
| 片岡　一則 | （公財）川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター | センター長 |

# 役　　員

2021 年 7 月現在

| | | |
|---|---|---|
| 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 | 岩橋　槇夫 | 北里大学 名誉教授 |
| 理　事 | 関根　　茂 | 日光ケミカルズ株式会社 代表取締役名誉会長 |
| 理　事 | 長野　哲雄 | 東京大学 名誉教授 |
| 理　事 | 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 | 宮地　良樹 | 京都大学 名誉教授・静岡社会健康医学大学院大学 学長 |
| 監　事 | 小林　久美 | 公認会計士 |
| 監　事 | 村上　　實 | 弁護士 |
| 評議員会長 | 内藤　　昇 | 元 株式会社コーセー 常務取締役 |
| 評議員 | 伊藤　正俊 | 東邦大学 名誉教授 |
| 評議員 | 奥　　直人 | 静岡県立大学 名誉教授・帝京大学薬学部 教授 |
| 評議員 | 齊藤　　勲 | 元 厚生省大臣官房審議官 |
| 評議員 | 齋藤　美穂 | 早稲田大学 名誉教授・常任理事 |
| 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・兵庫医科大学 常務理事 |
| 評議員 | 宮﨑　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 コーセーコスメトロジー研究財団

〒103-0028 東京都中央区八重洲一丁目5番17号
八重洲香川ビルディング4階
電話 03(6860)2190

**コスメトロジー研究報告 Vol. 29／2021** 非売品

2021年9月1日発行

編集責任者 亀山 浩一
発　　行 公益財団法人 コーセーコスメトロジー研究財団
〒103－0028 東京都中央区八重洲一丁目5番17号
電話 03(6860)2190
制　　作 エイエム企画
〒362－0034 埼玉県上尾市愛宕一丁目2番7号
電話 048(778)7943
印　　刷 株式会社サンセー

表紙デザイン監修：株式会社コーセー 商品デザイン部デザイン室

©2021 不許複製 禁無断転載