

受賞対象論文

Ookubo N, Michiue H, Kitamatsu M, Kamamura M, Nishiki T, Ohmori I, Matsui H : The transdermal inhibition of melanogenesis by a cell-membrane-permeable peptide delivery system based on poly-arginine. *Biomaterials* (2014) 35, 4508-4516.

大久保 奈々子

Nanako Ookubo



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生理学

Department of Physiology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

<プロフィール>

平成元年生まれ

平成24年3月 岡山大学工学部生物機能工学科卒業

平成24年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科医歯科学専攻修士課程入学

平成26年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科医歯科学専攻修士課程修了

平成27年4月 アイビーシステム株式会社勤務

現在に至る

研究の背景と経緯

1. 経皮導入法の現状と問題点について

皮膚生理学は、皮膚という人体最大の器官を対象とした分野において発展した学問であり、外部環境との接点としての防御機能を有する器官から、皮膚の美しさや毛髪の発育などの美を対象とした器官としてなど、多くの研究が行われてきた。その中においても、経皮的導入法は、皮膚機能を制御する上で最も大切な技術の一つで、化粧品などの日常品から、皮膚科治療薬・一般臨床治療薬に至るまで、非常に多方面において利用されている。経皮的導入法における利点として、①局所における選択的な薬効を得られること、②繰り返しの投与が簡便に行えること、③無麻酔科での投与が可能であること、④長時間の徐放作用が得られること、⑤全身に与える影響が軽微であること、などが挙げられる。しかしながら、化学物質や細菌等の物質を体内に侵入させない皮膚角質層のバリア機能が薬剤の導入を強く阻んでおり、経皮的ドラッグデリバリーシステム (transdermal drug delivery system, TDDS) における大きな問題となっている。

TDDS は、薬物の吸収システムにより大別して物理的アプローチと化学的アプローチに分けられる。両ア

プローチには、それぞれ短所と長所があり、導入する物質により手法が選択されている。物理的アプローチとしては、例えばイオントフォレーシスやマイクロニードルが挙げられる。イオントフォレーシスは、皮膚の離れた2点に陽極、陰極をセットし、酸性薬物（負に帯電）では陰極側に、塩基性薬物（正に帯電）では陽極側の基剤に封入する。その後、低電圧を負荷させることで、比較的電気抵抗の低い部分である毛嚢や汗腺等の付属器官を介し、角質下の水分に富み電気電動率の高い（電気を通し易い）表皮・真皮部に電流が流れ、同時に荷電した薬物が電気泳動の要領で表層から皮膚深部へと移動し、経皮吸収される。マイクロニードルは、角質層（10～20 μ m）のみを通過する針を皮膚に適用することで、角質層のみに穴を開け、バリア機能を低下させる方法である。

化学的アプローチとしては、リポソームや界面活性剤などが挙げられる。リポソームは、リン脂質からなる数十から数百nmの粒径をもつ微小なカプセルであり、その内部に様々な分子を封入することができると共に、生体適合性や生分解性にも優れていることから、その発見以来、薬物や生理活性物質の運搬体と考えられているが、導入効率など問題点が多く残されており、薬物の極性、分子量に依存しない経皮的導入法は確立

されていない。

2. 細胞膜通過ペプチドとは

タンパク質導入法とは、protein transduction domain (PTD) と呼ばれる10~20個のアミノ酸からなるペプチドを融合することによりタンパク質、ペプチド、低分子化合物などの様々な生理活性物質を細胞内に導入し機能させる技術である。タンパク質が直接細胞内に導入されることは、ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) が発現する trans-activator of transcription protein (TAT タンパク質) の研究により明らかになった。TAT タンパク質の11個のアミノ酸からなる PTD は細胞膜透過性の性質を有していることが報告されている。TAT domain (MYGRKKRRERRR) の特徴は、11個のアミノ酸の内、8個のアミノ酸がアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸で構成されていることである。このことから、正電荷を帯びていることが膜透過性に重要であることが示唆され、7~11個の塩基性アミノ酸からなる数種類の PTD が発見された。そのうち、11個のアルギニン (11R: RRRRRRRRRR) による PTD が導入効率の面から優れている事を我々の研究室の松下らが報告している¹⁾。

PTD による細胞内導入では、エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスにより、エンドソームという小胞に包まれた形で細胞内に導入される。よって、PTD を付加したタンパク質や薬物が細胞内で活性を発揮するには、エンドソームから脱出して細胞膜に移行する、さらなるステップが必要となる。京都大学薬学部の二木教授のグループの報告によると、PTD によるタンパク質導入の前処置として pyrenebutyrate (PB) という物質を使用すると、その後の細胞質内での拡散がスムーズに起こる、とされている²⁾。PB は、ベンゼン環を有する脂溶性の部分とカルボニル基を有する水溶性の部分の両親媒性の物質である。これを前処置で使用し、細胞膜通過ペプチド11R を連結した生理活性物質を導入したところ、エンドソーム内の導入されたタンパク質が効率良く細胞内で拡散されることを確認した。当研究室の榎田らは、導入効率の低い 3R ドメインを PB と併用し、細胞質内で早期にエンドソームより放出させた。さらに p53 の転写活性能を計測すると、導入効率の良い p53-11R よりも p53-3R の方が高い転写活性能を持つことを証明した。これは、細胞内導入後は、核において11R よりも 3R の方が結合している転写活性因子が

機能しやすいことを示唆したと、報告した³⁾。

3. 細胞膜透過型ペプチドを用いた経皮的導入法の確立

近年、タンパク質導入法は、容易な手法で且つ安全であるという理由にて、in vivo レベルでの報告が散見される。その中でも、我々は、タンパク質導入法を用いたペプチドによる経皮導入法 (pTDA: peptide transdermal approach) の応用に着目した。皮膚は表皮、真皮及び皮下組織の3層構造をとっている。表皮は表層より角質層、顆粒層、有棘層、基底層からなる。メラニンを産生するメラノサイトは、表皮の最下層である基底層に存在する。角質層は疎水性であり、外因性物質に対するバリアの役割を果たしており、経皮的導入においても大きな障害となる。外用剤を皮膚に適用した時、含有される薬物の主な皮膚透過・吸収の経路は、毛包や汗腺等の付属器官を介する経付属器官ルートと角質層実質を透過する経角質層ルートの2通りが考えられている。付属器官を介した皮膚透過は皮膚実質を通るより速やかであるが、皮膚表面積に対する付属器官の割合は0.1%以下である。しかしながら、分子量500 Da 以上の物質や極性物質等では、皮膚実質をほとんど通過出来ないために毛包等の付属器官に集まると言われている。物質が皮膚実質を通る場合は、皮膚透過の最大のバリアである角質層中を拡散する必要がある。角質層を通る経路には角質細胞内を通る経細胞層ルート (trans-cellular route) と細胞間隙を通る経細胞間ルート (intra-cellular route) がある。角質層バリアの克服こそが経皮導入の最大の課題となっている。

pTDA による経皮的導入法の報告はこれまでにいくつもの報告がされていたが、高濃度のペプチドやタンパク質が必要である場合や、皮内へ導入されていても機能していないことが問題点としてあげられていた。我々の研究室では、eGFP-11R タンパク質を人の皮膚構造と類似しているモルモット皮膚より導入後、時間経過にて観察したところ、皮内には導入されているものの、細胞と細胞との間の細胞間隙に強く局在しており、細胞内へとほとんど導入されていないことに注目した。そこで、まず、皮膚導入後の生理活性物質が皮膚細胞内で十分に機能するために、皮膚内の拡散を助ける物質を検討した。先述した PB を前処置として塗布し、5分経過後、同部位に11R 付加の緑色蛍光タンパク質を塗布したところ、皮膚全層に蛍光が拡散

していることを、我々の研究室の参丹らが報告した⁴⁾。

4. 日焼けとチロシナーゼについて

日焼け後の色素沈着やシミ、ソバカスについて説明する。これらの原因となる紫外線は、UVA (320-400 nm), UVB (290-320nm), UVC (200-290nm) に大別される。これらは、一般に皮膚の紫外線暴露による刺激やホルモンの異常又は遺伝的要素等によって皮膚基底層に存在するメラノサイトが活性化されメラニン産生が亢進した結果、生じるものと考えられている。美白効果を得るためのターゲットとしては、メラニン合成抑制、メラニン排出促進、メラノサイト刺激物質抑制の3つの機序がある。メラニンは、チロシンよりドーパミンを経て合成される。その合成における律速酵素が、チロシナーゼである。多くの製薬会社や化粧品会社が、美白剤を作製するときに標的とするのが、このチロシナーゼである。

研究成果の内容

1. メラニン合成抑制ペプチドの探索

チロシナーゼ活性を抑制するペプチドに関しては、単体アミノ酸及び8つ連結したアミノ酸によるチロシナーゼの活性阻害と結合能がいくつか報告されている。また、単体アミノ酸では、バリン、ロイシン、イソロイシンといった疎水性アミノ酸がチロシナーゼの

活性を阻害すると報告されている。しかし、これらの結果は、チロシナーゼの試験管内レベルの報告であり、メラニン合成細胞レベル、動物皮膚レベルでの検討は報告されていない。そこで、我が研究室の手法である、細胞膜通過ペプチドの11Rと様々なチロシナーゼ阻害ペプチドを連結させて、悪性黒色腫細胞 (B16 4A5) へ投与し、細胞内でのメラニン合成抑制効果を下にスクリーニングを行った。参考論文では、チロシナーゼへの結合能を有し、チロシナーゼ活性抑制効果を有しているペプチドが報告されていたが、我々のスクリーニングでは、メラニンの合成阻害を起こしていないものが多く見られた。この理由としては、11Rを連結したことによるアミノ酸の立体構造の変化である。11個のアルギニンで構成されている11Rは、非常に強いプラスチャージを持っているため、候補ペプチドにマイナスチャージを含む場合は、静電相互作用により、候補ペプチド本来の効果が阻害されてしまった可能性が示唆される。しかし、今回は皮膚よりの導入を考えているため、細胞内でのスクリーニングが重要となる。28種類の候補ペプチドを用いて、細胞内のスクリーニング施行後の結果より、グリアジン (34 kDa) と呼ばれる小麦タンパク由来のペプチド (LILVLLAI) が最も強くメラニン合成を抑制させた (図 Step A)。細胞内におけるメラニン合成抑制効果を透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察したところ、ペプチド投与群に

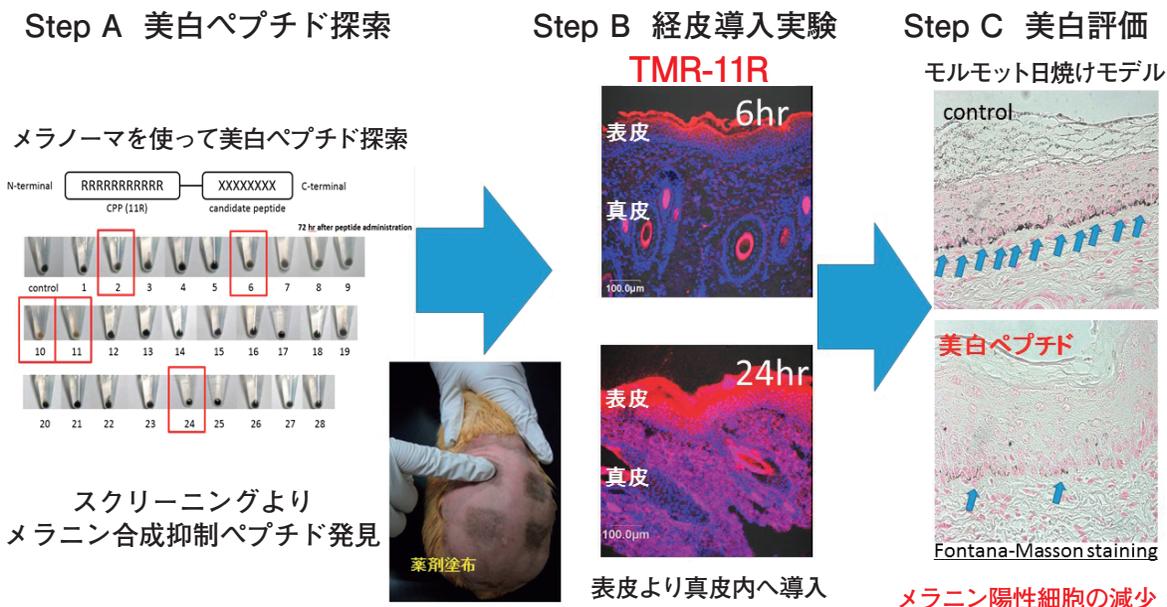


図 美白ペプチドの探索よりペプチド経皮導入

において著名な細胞内のメラニン減少を観察した。

2. モルモット日焼けモデルに対する美白効果の検証

経皮的な DDS において、皮膚透過の最大の課題は、角質層バリアの克服である。水溶性の物質や分子量 500 Da 以上の物質は、角質層をほとんど通過できない。赤色蛍光 (TMR: tetramethylrhodamine) を結合した TMR-11R ペプチドを、PB 前処置 5 分後にモルモット皮膚に塗布し、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間後に皮膚サンプルを回収し、導入効果における経時的検討を行った。投与後 6 時間にてモルモット皮膚表皮基底層へ達し、その後 24 時間にて表皮、真皮、皮下組織、筋層に至るまでペプチドの拡散を認めた (図 Step B)。一方、negative control の TMR-FLAG では、表皮よりの導入はなく、皮膚表面にペプチドが付着したのみであった。ペプチドスクリーニングの中で最もメラニン合成を抑制していた LILVLLAI のペプチドは 11R の付加により毒性を示さなかったことを確認した。さらに、動物の中でも体表面積が大きいこと、またヒトと同様のメラニン形成を行うといった点から、日焼けモデルとして褐色モルモットを使用した。日焼けモデルに、11R-LILVLLAI を塗布したサンプルにおいて、組織学的にメラニン陽性細胞数の減少が示された (図 Step C)。また、治療による明らかな副作用は確認されなかった。これらの結果により、PTD と PB 併用の 11R-LILVLLAI は組織学的に、whitening 効果を発揮することが明らかになった。

研究成果の意義

メラニンはメラノサイトの中で生合成される銅含有酵素チロシナーゼの働きによって、チロシンから L-DOPA (ジヒドロキシフェニルアラニン)、dopaquinone に変化し、最終的にはメラニンが生成される。チロシナーゼの活性部位には、2 つの銅イオンが存在し、その周囲に 6 つのヒスチジンが囲む形で存在することが報告されている。ここで、着目したのが、チロシナーゼの活性部位を阻害する天然素材である。一般的に天然素材は、合成物質と比較して安全性が高いと言える。報告されている天然素材として、例えば、牛乳、小麦、蜂蜜、絹、イェバエ由来のタンパク質やペプチドがある。これらのチロシナーゼ阻害ペプチドを利用して、さらにメラニン合成抑制、動物レベルでの効果評価でも同様の結果が出たことは、非常に意義深い事と思わ

れる。

今回天然由来のチロシナーゼ阻害ペプチドを選択した背景としては、その後の臨床応用を考慮して、美白 (whitening) 効果を、安全な生理活性物質で得たい、との方向性がある。さらに図で示すような細胞内での探索研究 (Step A) に始まり、ペプチド経皮導入実験 (Step B) 法、さらにモルモット日焼けモデルに対する美白効果の検証 (Step C) に至るまで系統的な研究を行うことが、今後の新しい創薬につながると考えられた。

今後の展開ならびに展望

ペプチド経皮導入法 (pTDA) により、これまでに我々は、低分子・タンパク質・ペプチドなどを、PB 前処置による新規経皮導入を行った。その結果、毛母細胞の細胞周期制御による育毛剤の開発、表皮基底層のメラノサイトのメラニン産生制御による美白材開発に成功した。こうした、ペプチド経皮導入法の応用研究が、今後の創薬並びに化粧品開発へと発展する可能性を十分に秘めていると考えられた。

文 献

- 1) Matsushita M, Tomizawa K, Moriwaki A, Li ST, Terada H, Matsui H: A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation. *J Neurosci* (2001) 21, 6000-6007.
- 2) Takeuchi T, Kosuge M, Tadokoro A, Sugiura Y, Nishi M, Kawata M, Sakai N, Matile S, Futaki S: Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chem Biol* (2006) 1, 299-303.
- 3) Hitsuda T, Michiue H, Kitamatsu M, Fujimura A, Wang F, Yamamoto T, Han XJ, Tazawa H, Uneda A, Ohmori I, Nishiki T, Tomizawa K, et al.: A protein transduction method using oligo-arginine (3R) for the delivery of transcription factors into cell nuclei. *Biomaterials* (2012) 33, 4665-4672.
- 4) Candan G, Michiue H, Ishikawa S, Fujimura A, Hayashi K, Uneda A, Mori A, Ohmori I, Nishiki T, Matsui H, Tomizawa K: Combining poly-arginine with the hydrophobic counter-anion 4-(1-pyrenyl)-butyric acid for protein transduction in transdermal delivery. *Biomaterials* (2012) 33, 6468-6475.

平成27年5月受理
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話: 086-235-7105 FAX: 086-235-7111
E-mail: hmichiue@md.okayama-u.ac.jp