

大豆ビクニンを用いた日焼け止めクリームの開発

奈良県立医科大学産婦人科

小林 浩

Background: Cytokines are produced as a consequence of photo-damaged DNA and oxidative stress in ultraviolet (UV)-exposed keratinocytes. A soybean Kunitz trypsin inhibitor (KTI) down-regulates the expression of proinflammatory cytokines such as TNF-alpha in tumor cells and inflammatory cells.

Purpose: We analyze the effect of KTI on TNF-alpha production in UV-exposed primary human keratinocytes.

Results: Here, we show 1) UV induced up-regulation of TNF-alpha mRNA and protein expression in keratinocytes; 2) cells treated with KTI before UV irradiation showed a significantly lower accumulation of TNF-alpha protein in a dose-dependent manner and reduces UV-induced up-regulation of TNF-alpha mRNA expression; 3) KTI inhibits the induction of TNF-alpha target molecules interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-6 proteins; 4) UV irradiation transiently activates JNK and Akt signaling but only weakly activates ERK and p38; 5) KTI specifically inhibits UV-induced activation of ERK, JNK and p38, but not Akt; 6) treatment of cells with SP600125, a pharmacological inhibitor of JNK, predominantly suppresses UV-induced up-regulation of TNF-alpha expression; 6) KTI does not enhance suppression of UV-induced JNK phosphorylation by SP600125.

Conclusions: KTI specifically inhibits UV-induced up-regulation of cytokine expression predominantly through suppression of JNK signaling pathway.

緒言

紫外線照射による発赤や皮膚の炎症は身近に経験するが、抗ヒスタミン剤やステロイド等により治療されることが多い。しかし、ステロイドによる反応性皮膚障害の報告もあり、多用・長期使用することは困難である。

最近、我々は、大豆蛋白中に炎症を抑制する成分があることを発見し、精製した結果、この物質は Kunitz trypsin inhibitor (KTI) と呼ばれている分子量 20kDa の蛋白質であった。Kunitz inhibitor は大豆のみならず、羊水・尿にも存在し、国際的にはビクニンと命名されている。ヒトのビクニンの分子量は 40kDa である。ビクニン及び KTI には抗炎症作用があることが報告されている。その作用機序は TNF-alpha や IL-1beta 等のサイトカイン産生抑制である。

紫外線照射によって DNA が損傷したり、酸化ストレスが起こった結果皮膚からサイトカインが産生されるので、もし、紫外線照射による皮膚の炎症をビクニンや KTI が抑制することができるのであれば、日焼け止めクリームとして利用可能であると考えた。

そこで、今回、皮膚の keratinocytes の初代培養系を使用し、KTI が紫外線照射に伴うサイトカイン産生抑制を

おこなうかどうか実験した。

実験

1) 培養細胞

ヒト keratinocytes の初代培養は手術時に採取した組織より調整した¹⁾。培養液は MCDB153 を使い、3-5 代目の培養細胞を今回の実験に用いた。

2) 紫外線照射

培養液を除去後に UV 0-800J/m² のエネルギーで培養細胞に照射した。Westinghouse broad-band sunlamp を使用して培養皿の後面から照射した。290nm の UVC を除去する為に Kodacel TA 401/407 を使用した。細胞に直接照射されたエネルギーは UVB60 - 70%、UVA30 - 40% の構成であった。照射エネルギーのモニタリングは常に UV-340 photometer/photodetector system により監視した。

培養細胞には照射前に KTI や pharmacological inhibitor を添加しておいてから 1 時間後に紫外線照射した。

培養細胞に紫外線照射したときの TNF-alpha 産生に対する KTI の抑制効果をみるために、KTI の濃度を 0.1, 1, 5, 10 microM に設定して事前に添加した。その 2 時間後に紫外線照射を行ない、TNF-alpha 濃度を測定した。この KTI の抑制がどのようなシグナル伝達に関与しているかを見るために、MEK, JNK, p38, EGFR に対するインヒビターを 0.5-1 時間前に投与することにより比較検討した。

培養液を採取し、サイトカイン測定まで凍結保存した。TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 はそれぞれの特異的 ELISA に



Inhibition of ultraviolet-induced sunburn by a soybean Kunitz trypsin inhibitor

Hiroshi Kobayashi

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University

て測定した。実験の一部では、KTIを照射前、照射中、照射後に添加して、その効果を確認した。

細胞障害性はMTTアッセイと培養液中のLDH測定、ならびにトリパンプルー法により評価した。また、アポトーシスはHoechst 33342の取り込みにより蛍光顕微鏡で評価した。Western blotやRT-PCRは既報のごとくである。

結果

1) 紫外線照射後における細胞内シグナル伝達

図1は紫外線照射後、5、15、30、60分後におけるMAPキナーゼとAktのリン酸化と総蛋白量との関係をWestern blotにより示したものである。この実験では400J/m²のエネルギーを照射した場合の結果を示す。紫外線により最も活性化されるのは、JNKとAktであり、いずれも15分後にピークを認めた。ERKとp38のリン酸化は非常に僅かではあるが、これらも活性化されていた。紫外線照射は200–400J/m²のエネルギーでリン酸化が最大を示した。

2) 紫外線依存性のAktのリン酸化はEGFRとPI3Kを介している

図2は紫外線によるAktのリン酸化はEGFRとPI3Kを介していることを示したものである。400J/m²のエネルギー照射によるAktのリン酸化はAG1478(EGFR inhibitor)とLY294002(PI3K inhibitor)およびWortmannin(PI3K inhibitor)により抑制されたが、SP600125(JNK inhibitor)の影響を受けなかった。

3) KTIはMAPキナーゼのリン酸化は抑制するが、Aktのリン酸化は抑制しなかった

図3には紫外線400J/m²で刺激する前に、KTI、LY294002、SP600125を事前投与することにより、JNKとAktのリン酸化を検討した結果を示したものである。KTIは紫外線400J/m²によるJNKのリン酸化は抑制するが、Aktのリン酸化は抑制しなかった。コントロール実験ではJNKのリン酸化はSP600125により抑制されるが、LY294002では無効であった。KTIとSP600125の同時添加によってもSP600125の効果を促進することはなかった。

4) KTIは紫外線照射によるkeratinocytesからのTNF-alpha産生を濃度依存性に抑制する

図4aに示したように紫外線照射によるTNF-alpha産生はSP600125事前添加により著明に減少した。一方、図4bに示したように紫外線照射によるTNF-alpha産生はKTI事前添加により濃度依存性に減少した。50%抑制はKTI約5 microMであった。これはJNKのリン酸化抑制する濃度と類似していた。

5) KTIは紫外線照射によるkeratinocytesからのTNF-alpha mRNA産生を抑制する

図5に示したように紫外線照射によるTNF-alpha mRNA産生はSP600125事前添加により著明に減少した。一方、紫外線照射によるTNF-alpha mRNA産生はSP600125あるいはKTI事前添加により減少した。このデータはTNF-alpha蛋白産生と一致した。

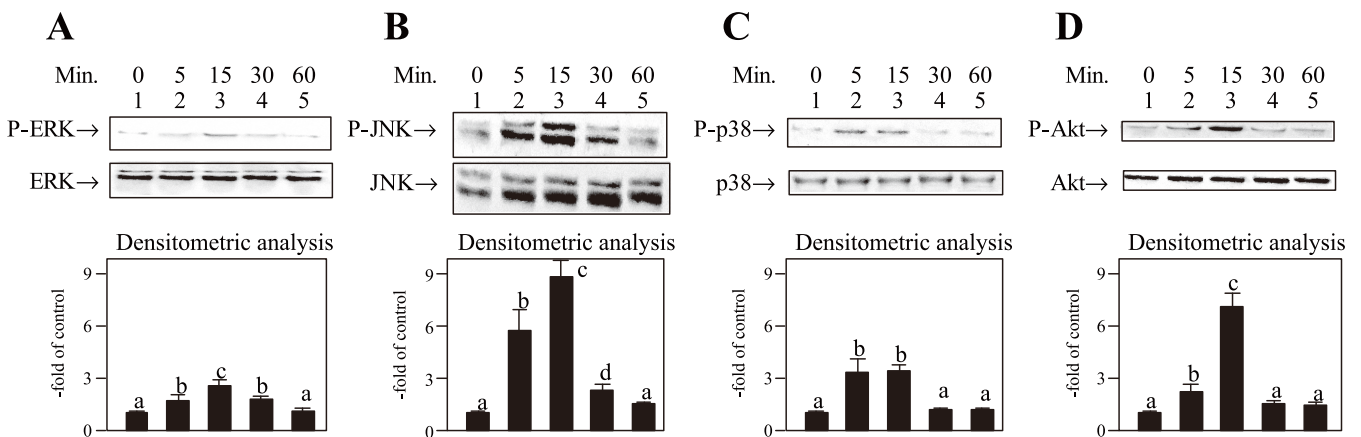


図1 Keratinocytesを培養し400 J/m² UV照射後のERK, JNK, p38, Aktの経時的なリン酸化の状態をWestern blotで示す。AはERKのリン酸化、BはJNKのリン酸化、Cはp38のリン酸化、DはAktのリン酸化を示す。上段はリン酸化蛋白で、下段は総蛋白を示す。a, b, c, dのラベルは5%の有意差があることを示す。

UV	0	400	400	400	400	400
AG1478	0	0	50	0	0	0
LY294002	0	0	0	20	0	0
Wortmannin	0	0	0	0	50	0
SP600125	0	0	0	0	0	50
Lane	1	2	3	4	5	6

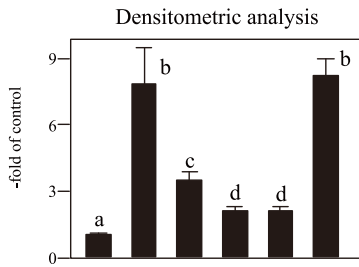
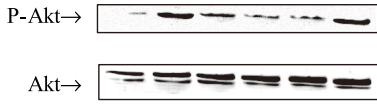


図2 Keratinocytes を培養し 400J/m² UV 照射後の Akt のリン酸化の状態を Western blot で示す。それぞれのレーンには AG1478, LY294002, Wortmannin, SP600125 を前添加してある。上段はリン酸化蛋白で、下段は総蛋白を示す。a, b, c, d のラベルは 5% の有意差があることを示す。

UV	0	400	400	400	400	400
KTI	0	0	5	0	0	5
LY294002	0	0	0	20	0	0
SP600125	0	0	0	0	50	50
Lane	1	2	3	4	5	6

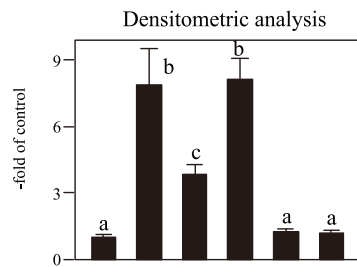
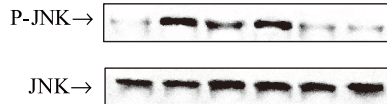


図3 Keratinocytes を培養し 400J/m² UV 照射後の JNK (A) 及び Akt (B) のリン酸化の状態を Western blot で示す。それぞれのレーンには KTI, LY294002, SP600125 を前添加してある。上段はリン酸化蛋白で、下段は総蛋白を示す。a, b, c のラベルは 5% の有意差があることを示す。

UV	0	400	400	400	400	400
KTI	0	0	5	0	0	5
LY294002	0	0	0	20	0	0
SP600125	0	0	0	0	50	50
Lane	1	2	3	4	5	6

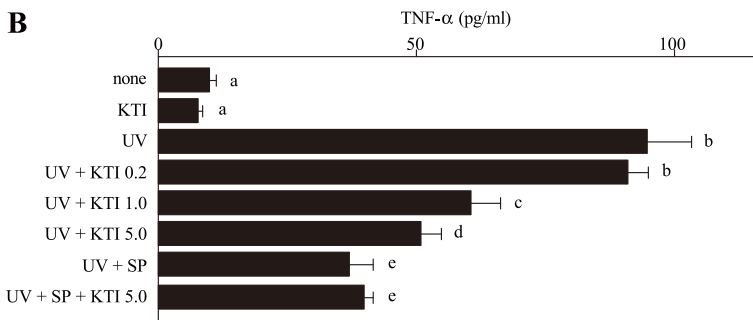
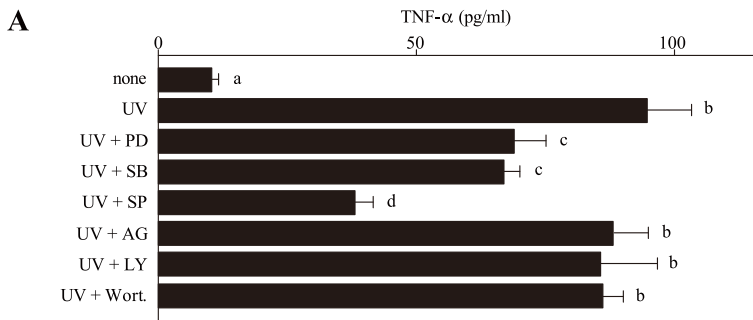
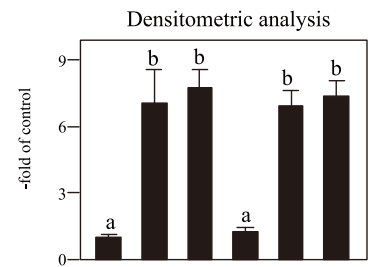
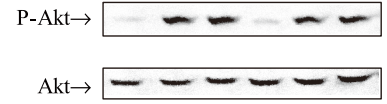


図4 Keratinocytes を培養し 400J/m² UV 照射後の培養液中の TNF-alpha の濃度を ELISA で測定した結果を示す。それぞれのレーンには各種インヒビターを前添加してある。a, b, c, d, e のラベルは 5% の有意差があることを示す。

UV	0	0	400	400	400	400
KTI	0	5	0	5	0	0
SP600125	0	0	0	0	50	0
LY294002	0	0	0	0	0	20
Lane	1	2	3	4	5	6

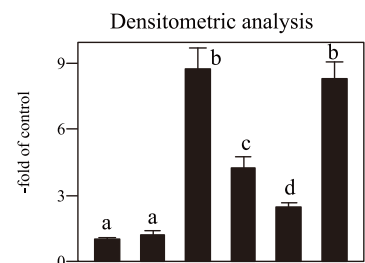


図5 Keratinocytes を培養し 400J/m² UV 照射後の培養細胞中の TNF-alpha の mRNA を示す。それぞれのレーンには各種インヒビターを前添加してある。下段はコントロールとしての beta-actin を示す。a, b, c, d のラベルは 5% の有意差があることを示す。

6) KTI は紫外線照射による keratinocytes からの IL-1beta および IL-6 産生を抑制する

TNF-alpha のターゲットサイトカインである IL-1beta および IL-6 産生についても検討した。予想されたとおり、KTI により IL-1beta および IL-6 産生も抑制された (図 6)。

考案

我々はヒト羊水・尿中より抗炎症作用を有する糖蛋白質としてビクニン (bikunin, urinary trypsin inhibitor [UTI]) を発見し、①切迫早産治療薬、および、②癌転移抑制薬として開発してきた。切迫早産治療薬はすでにウリナスタチン膈座薬として臨床で使用されている。また、癌転移抑制薬としては現在、特許申請も終了した段階である。我々はクニッツ型構造に着目し、類似構造を有する物質を探索してきた。その結果、大豆蛋白中に存在するクニッツ型構造である KTI が、ビクニン同様に、抗炎症作用を有していることが判明した^{2, 3)}。

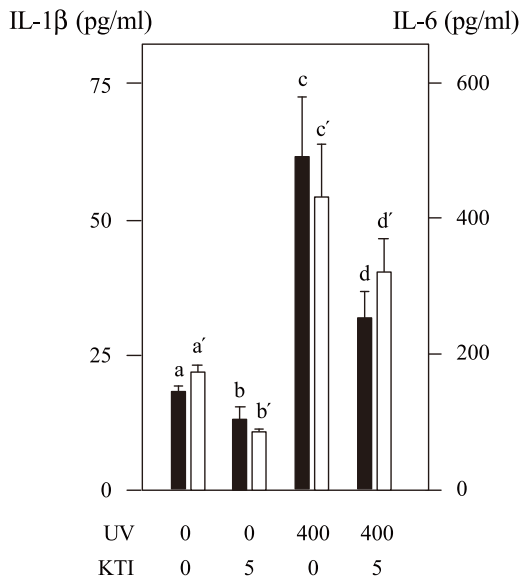


図 6 Keratinocytes を培養し 400J/m² UV 照射後の培養液中の IL-1beta と IL-6 の濃度を ELISA で測定した結果を示す。それぞれのレーンには各種インヒビターを前添加してある。a, b, c, d および a', b', c', d' のラベルは 5% の有意差があることを示す。

今回、ヒト keratinocytes の初代培養を利用して、KTI の持つ抗炎症作用として紫外線照射によるサイトカイン産生抑制が可能であるかどうかを検討した。その結果、KTI の濃度依存性に紫外線照射による TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 産生が mRNA レベルで産生抑制されており、日焼け止めクリームとしての効果を有しているものと推定された。50%抑制濃度は 5 microM であり、十分臨床応用可能な濃度である。この KTI は主に細胞内シグナル伝達の JNK を介する系を制御することにより得られた結果であった。

今後は実際にヒトの皮膚で紫外線照射前に KTI 入りクリームを塗布することにより、日焼けや炎症反応がどの程度抑制されるのかを検討する必要がある。

今回の実験にかかった経費は全て「コスメトロジー研究振興財団」から頂いたものであることを報告する。

総括

現在の日焼け止めクリームはあくまで対症療法が主体であったが、大豆やヒト尿から精製した蛋白は抗ヒスタミン剤やステロイド剤とは異なり、全く副作用がなく、紫外線照射によるサイトカイン産生を抑制することを始めて確認できた。今後は、臨床研究を通して市場への拡大を計っていきたいと考えている。

(文献)

- 1) Fisher G, Tavakkol A, Leach K, et al. Differential expression of protein kinase C isoenzymes in normal and psoriatic adult human skin: reduced expression of protein kinase C-beta II in psoriasis. *J Investig Dermatol* 1993; 101, 553-559.
- 2) Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 159-166.
- 3) Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K, Kondo T, Kurita N, Suzuki M, Kanayama N, and Terao T. Dietary Supplementation of Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor (KTI) Reduces Lipopolysaccharide-induced Lethality in Mouse Model. *Shock* 2005, 23: 441-447.