

# 皮膚再生を促す non-drug 細胞間脂質類似構造体 (リオトロピック液晶) の開発

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター DDS 研究室

五十嵐 理慧

Tissue in body must quickly recognize injury to response to the rapid pace of epidermal growth. In skin, the epidermal cells must also react to danger signals from the surrounding extracellular lipid of the stratum corneum spaces and immediately participate by initiating the wound repair process. The topical administration of lyotropic liquid crystal on stratum corneum rapidly broke down the lipid lamella structure which would be recognized as a wound without organ-change. This can activate a variety of biological processes. This study set out to determine if the occur of the phase transition of lipid to neighbour different physicochemical structure can stimulate keratinocyte cells and what mechanism is responsible for this response. Using small angle x-ray scattering (SAXS) analysis, the response to the transient structural change of lipid was detected because it might result the diffusion of oil and/or water from liquid crystal towards lipid lamella phase. Simultaneously, significant increase of the growth factors and inflammatory cytokines were detected after the administration of liquid crystal. Not only the excess expression of cytokines but also the extent of TEWL as the barrier marker of skin increased. These observations suggest that the structural change of lipid can stimulate to trigger recognition of a slight injury in the wound defence and repair response as homeostasis. This method actually succeeded the improvement of photo-induced hyperpigmentation on human face.

## 1. 緒言

加齢や光老化による顔面の日光性（老人性）色素斑、いわゆるシミやしわ（顔面の陥凹、変形を含む）の改善は、Quality of Life (QOL) を重要視するこれからの高齢化社会において非常に重要な問題のひとつになると予想される。従来から、シミやしわの改善については化粧品業界が中心的に商品開発を行い、美白効果がある様々な薬物を発見・開発している。近年では、長期使用しなければ効果が得られにくい化粧品や医薬部外品では消費者の満足が得られにくくなってきたため、確実に効果が上がる形成外科や皮膚科におけるレーザー治療、医師主導で開発された化粧品（ドクターズコスメ）に人気が集まっている。我々の研究室では、皮膚再生に効果の高い薬物であるビタミン A 活性体（all-trans Retinoic Acid, atRA）<sup>1, 2)</sup> を新規ナノテクノロジー技術によって Drug Delivery System (DDS) 化した外用剤（nanoegg®）を開発した。表皮ターンオーバーを加速することでシミの排出を促し、同時に表皮細胞にヒアルロン酸産生を誘導したことからしわの改善も達成することが可能となった<sup>3, 4)</sup>。

このように、皮膚再生研究は表皮もしくは真皮における細胞の分化・増殖を促す薬物を用い、種々の方法（角質軟

化剤やイオントフォレシス、マイクロニードル法など）によってより効率良く角質層の透過性を向上させる技術開発が主流である。しかしながら、一方生体は本来自然治癒を促す能力、ホメオスタシスを備えている。例えば皮膚が創傷した際、器質的に変化が生じる、すなわち機械的損傷を伴う場合と、器質的に変化が生じない場合の2通りに大きく分類される。一般に創傷時は炎症性サイトカインが産生し、炎症状態を引き起こす。器質的な変化が生じた場合は、生体は自然治癒するため様々なサイトカインやケモカインを細胞に産生させ、細胞の修復や遊走が起こり治癒する方向に向かう。一方、器質的な変化が生じない場合の詳細な検討は今のところなされていない。これは、外観上の変化がないために研究として重要視されていないものと予想される。しかしながら、物理的概観変化なしに皮膚再生を引き起こすことが出来れば、新たな治療法として有効であると考えられる。そこで我々は、ホメオスタシス誘導による皮膚再生を目指し、バリア機能を有する皮膚角質層に着目した。角質層の細胞間脂質の一過性の物理的変化が器質的な変化なしの創傷に相当すると仮定し、新たな皮膚再生誘導法として研究を行っている<sup>5)</sup>。

細胞間脂質はリオトロピックラメラ液晶構造を形成し、外界からの細菌の侵入や水分の蒸散をコントロールしバリアーとしての機能を果たしている。我々は、リオトロピック液晶を作製した。本稿では、リオトロピック液晶を皮膚に塗布した際の皮膚再生効果とその機序について報告する。

## 2. 実験

### 2.1 リオトロピック液晶の作製

水、極性油、界面活性剤を様々な配合で混合し、相平衡



Development of intercellular lipids (lyotropic liquid crystal) which can induce skin regeneration

Rie Igarashi

Institute of Medical Science, St. Marianna University, School of Medicine

図を作成した。リオトロピック液晶領域内で、小角 x 線散乱を用い、領域内液晶の構造を同定した。

## 2.2 in vivo 皮膚塗布実験

2.1 で作製した非イオン界面活性剤、油、水からなるリオトロピック液晶を、ddY mice (5-week, male) 背部  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  に 30 mg を塗布し、2 日後に皮膚を採取、コロイド鉄染色（ヒアルロン酸を検出するための染色方法で併せて表皮部位の認知も出来る染色方法）を行った。

## 2.3 皮膚組織染色及び解析

ddY mice (5-week, male) 背部に塗布し 2 日後に採取した皮膚を、ホルマリン固定後、コロイド鉄染色（ヒアルロン酸を検出するための染色方法で併せて表皮部位の認知も出来る染色方法）を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 リオトロピック液晶塗布による皮膚再生効果

ddY マウスに塗布した結果を Fig. 1 に示す。

皮膚再生効果がある場合、表皮細胞のターンオーバーが促進されるため表皮の肥厚化（keratinocyte の増殖・分化の結果）として検出される。Fig. 1 の赤色で染色されている上層部分が表皮層に相当する。液晶を形成している各成分にはほとんど表皮肥厚効果はないが、液晶塗布では明らかに表皮は肥厚していることがわかる。そこで、次に液晶の表皮肥厚に対する濃度依存性について検討した結果を Fig. 2 に示す。同様にエマルジョンローション溶液に配合されている液晶濃度に応じて表皮は肥厚し、30% 配合では

表皮基底及び有棘細胞間隙にヒアルロン酸（青く染色されている部分）が産生されていた。液晶を皮膚に塗布すると、単回塗布にもかかわらず表皮は肥厚し、その肥厚の程度から最適液晶濃度が存在することが Fig. 1 と Fig. 2 の結果から明らかとなった。この肥厚は、基底細胞の増殖（増殖時に発現する Ki-67 の免疫染色が陽性）と、有棘細胞及び顆粒細胞の分化（cytokeratin 1 の蛍光染色が強く陽性で、loricrin の発現は wild-type と大きく変わらない）の増強のために、顕著な効果が得られたと考えられる<sup>5)</sup>。

### 3.2 リオトロピック液晶による皮膚再生メカニズム

創傷治癒時に細胞はヒアルロン酸を産生すると言われている<sup>6)</sup>。液晶塗布が創傷治癒と同じ状態を促しているならば、ヒアルロン酸の産生だけでなく、炎症性サイトカイン（tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  や interleukin (IL)  $1\beta$  など）量も増加しているはずである。Fig. 3 は keratinocyte の増殖・分化に大きく関わっているサイトカインである heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF)<sup>7)</sup> mRNA や Transforming growth factor (TGF)- $\beta 1$ <sup>8)</sup> mRNA の産生量も測定している。無処置に比べ、HB-EGF や TGF- $\beta 1$  の産生は 4 倍以上であり、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ <sup>9)</sup> や IL- $1\beta$  の産生も高いことがわかる。この結果は、液晶塗布による皮膚再生は増殖・分化に関わるサイトカインの産生に大きく依存していることが理解されるが、同時に炎症性サイトカイン産生も増加していたことから、ホメオスタシスに基づく創傷治癒状態に近いことも予想された。

液晶塗布により皮膚に何が起きているのかを理解する

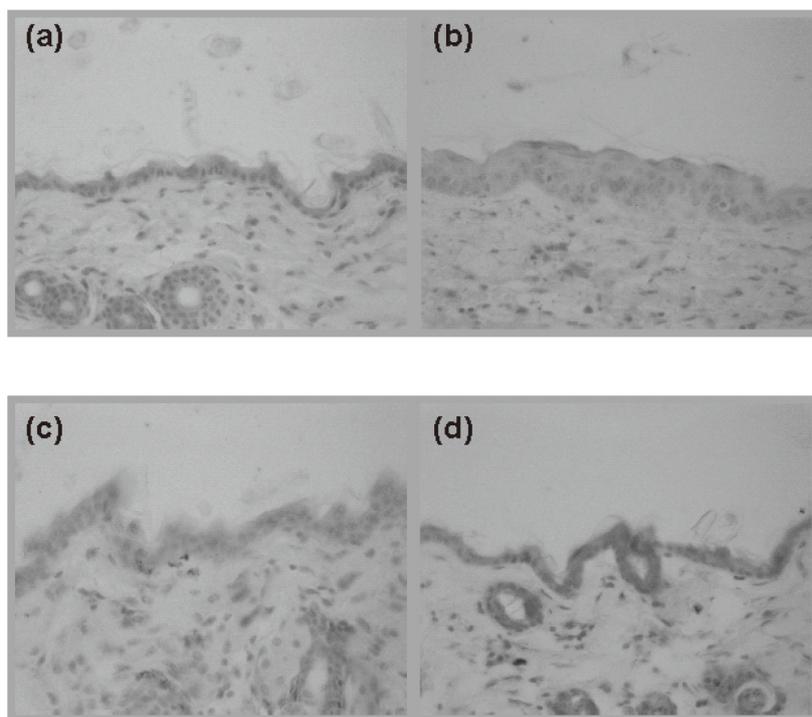


Fig.1 Histological researches of topical administration of liquid crystal. The dorsal areas of ddY mice (male, 5-week) were used as in vivo. (a) non-treatment (b) liquid crystal treatment (c) oil (d) surfactant

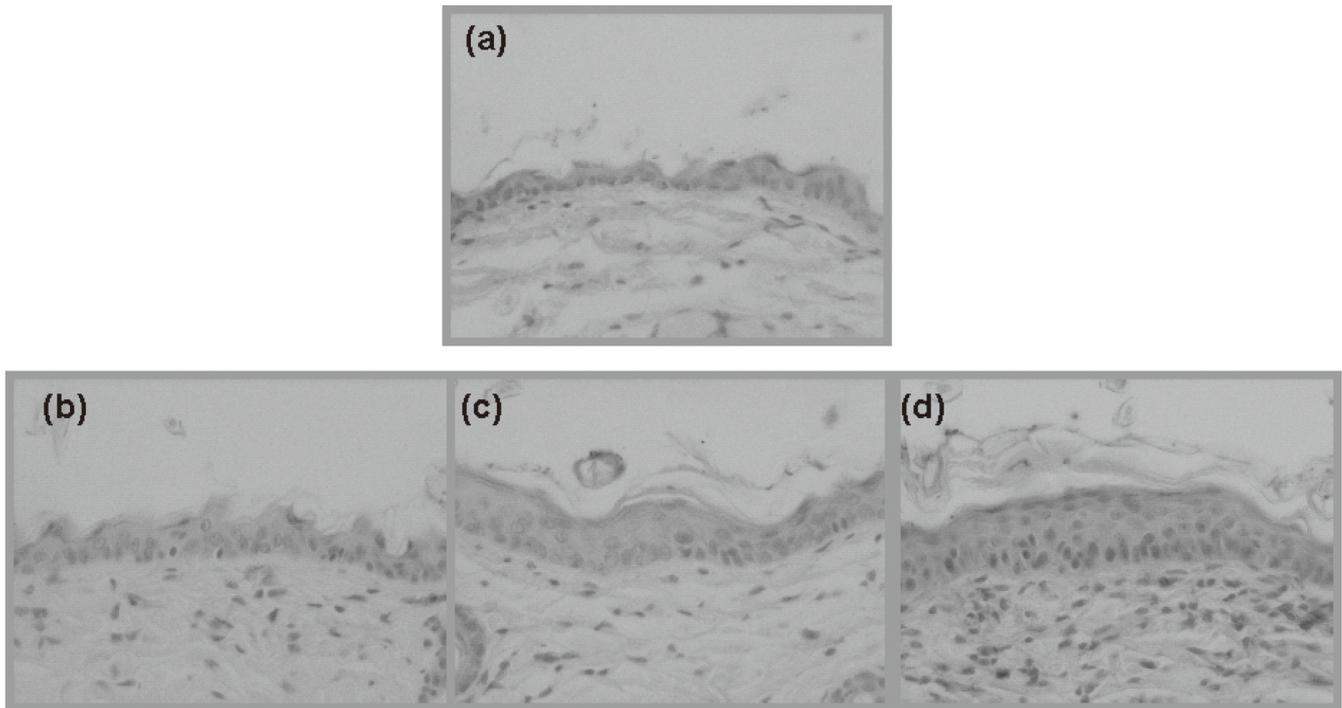


Fig.2 Dose dependence of liquid crystal. The dorsal areas of ddY mice (male, 5-week) were used as in vivo. (a) liquid crystal 0% (b) liquid crystal 10% (c) liquid crystal 20% (d) liquid crystal 30%

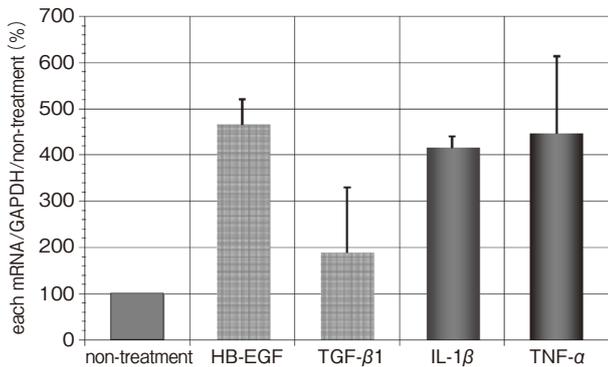


Fig. 3 Expression of mRNAs of several cytokines HB-EGF, TGF-β1 for the proliferation and differentiation of keratinocytes, and IL-1β, TNF-α for the inflammation. The expression of each cytokines was estimated the level of non-treatment sample as 100%, respectively. The liquid crystal 30mg was administered on mice dorsal areas, and the tissue was taken at 2-day after one time treatment with liquid crystal.

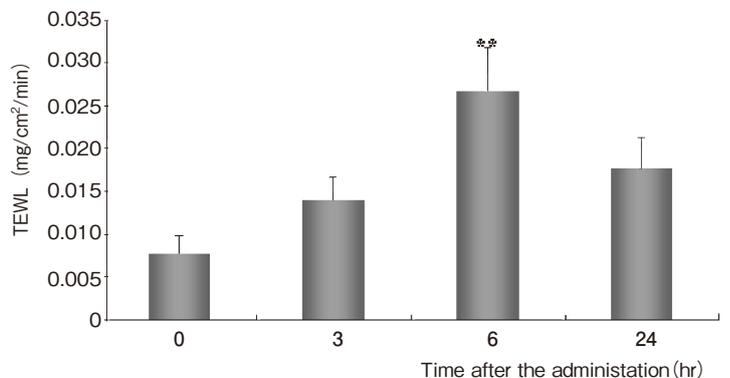


Fig. 4 Change of TEWL degree after the topical administration of liquid crystal on the mouse dorsal area 2 × 2cm<sup>2</sup>. 50mg of liquid crystal was administered one time (n=5).

ために、マウスへの液晶塗布後の transdermal water loss (TEWL) 値を測定した (Fig. 4)。塗布後 6 時間まで徐々にバリアー機能は崩壊し、1 日後にはほぼ戻っていることがわかった。崩壊の程度は正常が 0.02mg/cm<sup>2</sup>/min であることからそれほど大きくはない。バリアー機能崩壊は、バリアー機能を中心的に担う角質層の細胞間脂質変化に基づくものと考えられる。

#### 4. 総括

液晶に使用されている各成分は塗布と同時に細胞間脂質への受動拡散、もしくは細胞間脂質成分の塗布液晶内への拡散が起こり、その結果細胞間脂質構造相転移が引き起こされたと想定できる。塗布後短時間で細胞間脂質の秩序構造崩壊が誘導されスピノーダル分解による chaotic structure に変化する。時間経過とともに本来の細胞間脂

質構造であるラメラ構造は bicontinuous cubic phase への転移が誘導される。しかしながら、この相転移は一過性で、塗布後 24 時間ではほぼ元の状態に戻ると考えられる。この仮説は TEWL 値変化 (Fig. 4) から理解できる。液晶構造が皮膚再生能にどのように影響するかを検討するため、preliminary experiment として液晶の面間隔変化と表皮肥厚現象の関係を検証する予定である。液晶の面間隔を示す SAXS 散乱カーブと、マウス切片の HE (hematoxylin Eogin) 染色の関係を検証することで、新たな皮膚再生のメカニズムを明らかにし、薬物を使用せずに生体の本来持つ自然治癒力を促して皮膚再生を実現するといった従来にないまったく新しい概念を構築していきたいと考えている。

## 謝 辞

本研究は、聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター先端医薬開発部門 DDS 研究室の山口葉子氏、長澤輝明氏、中村なつみ氏、松本香代氏、平田圭一氏らの研究に基づくものである。ここに記して感謝する。

## (参考文献)

- 1) Klingman, L.H., Duo, C.H., Klingman, A.M., *Connect. Tissue Res.*, 12 (1984) 139.
- 2) Klingman, A.M., Grove, G.L., Hirose, R., Leyden, J.J. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 15 (1986) 836.
- 3) Y.Yamaguchi, T.Nagasawa, N.Nakamura, M.Takenaga, M.Mizoguchi, S.Kawai, Y.Mizushima, R.Igarashi, *J.Controlled Release*, 104 (2005) 29
- 4) Y.Yamaguchi, N.Nakamura, T.Nagasawa, A.Kitagawa, K.Matsumoto, M.Mizoguchi, R.Igarashi, *Die Pharmasie*, (2006) 6,117-121
- 5) Y.Yamaguchi, T.Nagasawa, A.Kitagawa, N.Nakamura, K.Matsumoto, H.Uchiwa, K.Hirata, R.Igarashi, *Die Pharmasie*,(2006) 6,112-116
- 6) Kristen R.Taylor, Janet M. Trowbridge, Jennifer A. Rudisill, Christian C.Termeer, Jan C.Simon, Richard L.Gallo, *J.Bio. Chem.* 279 (2004) 17079
- 7) Stoll S.W., Elder J.T., *Exp. Dermatol.*, 7 (1998) 391.
- 8) Jennings MT, Pietenpol JA. *J Neurooncol* 36(1998) 123
- 9) Hatano Y. Terashi H, Arakawa S, Katagiri K. *J Invest Dermatol* 124 (2005) 786