

# 核内受容体PPARを介して皮膚の美容効果を発揮する 化粧品素材の探索

大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野

橘 敬 祐

The permeability barrier is required for terrestrial life and it is localized at the outermost layer of the epidermis, the stratum corneum, where extracellular lipid membranes inhibit water movement. The stratum corneum is the end product of keratinocyte differentiation and comprises a layer of cross-linked proteins and lipids. Epidermal homeostasis and the barrier function integrity depend on the tight coordination of keratinocyte proliferation, differentiation, and programmed death.

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) is a ligand-activated transcription factor belonging to the nuclear hormone receptor superfamily. PPAR $\alpha$  is mainly expressed in the liver, and is also present in the epidermis. PPAR $\alpha$  binds to peroxisome proliferator responsive element (PPRE) and activates several target genes, which leads to fatty acid catabolism. PPAR $\alpha$  ligands have been used to treat dyslipidemia by reducing plasma triglycerides and increasing high-density lipoprotein cholesterol. On the other hand, various cell culture and in vivo approaches suggest that PPAR $\alpha$  contributes to fetal skin development, epidermal barrier maturation, and sebocyte activity. Thus, PPAR $\alpha$  represents a research target for understanding and improving the recovery of skin barrier function.

Previously, we established a tightly tetracycline-regulated human hepatoblastoma cell line that can be induced to express human PPAR $\alpha$  (HepG2-tet-off-hPPAR $\alpha$ ). We subsequently engineered reporter cell line expressing the luciferase gene that can be used to quantify the PPAR $\alpha$  activity by modulators using HepG2-tet-off-hPPAR $\alpha$ .

In this study, we evaluated extracts of approximately 200 natural products and found an extract that enhanced reporter gene activity. Furthermore, this extract up-regulated the expression of adipose differentiation-related protein (ADRP), which is a known PPAR $\alpha$  target gene. These findings suggest that the extract is a candidate agent for improving epidermal permeability barrier function.

## 1. 緒 言

ヒトの表皮は、基底膜に接する表皮ケラチノサイトが分裂、分化、成熟することにより形成される。表皮には、水分の蒸散を防ぐバリア機能が備わっている。バリア機能には細胞間脂質が大きな役割を果たしており、この機能が損なわれると肌が乾燥状態になり、荒れ肌になる。一方、バリア機能が正常に保たれていると、皮膚は適度に水分を保持することができ、きめが整った美しい肌を維持できる。すなわち、バリア機能を改善する物質は、優れた化粧品素材になり得る<sup>1,2)</sup>。

核内受容体ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )は、PPREとよばれる認識配列に結合し、リガンドや翻訳後修飾により活性化されることで標的遺伝子群の発現を調節し、機能を発揮する転写因子である<sup>3)</sup>。PPAR $\alpha$ は肝臓で脂肪酸の代謝や善玉コレステロール(HDL)の産生を促し代謝を改善することから、PPAR $\alpha$ のリガンドは高脂血症治療薬として用いられている<sup>4)</sup>。また、PPAR $\alpha$ は表皮にも発現しており、ケラチノサイトの分化

誘導、脂質産生の促進、バリア機能の向上、皮膚炎症の抑制などに関わっており、その機能に注目が集まっている<sup>5)</sup>。これらのことから、皮膚のPPAR $\alpha$ の活性を調節できる化合物(PPAR $\alpha$ モジュレーター)は、皮膚疾患の改善、美容の用途に貢献できる可能性が期待でき、機能性化粧品の素材として有望と考えられる。

我々はこれまでに、ヒトPPAR $\alpha$ の機能を解析するために、テトラサイクリン誘導システムを用いたPPAR $\alpha$ の発現量を制御できるヒト細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いてトランスクリプトーム解析を行った結果、本細胞株においてもヒトPPAR $\alpha$ が脂肪酸代謝や脂質の代謝に深く関わる事が明らかになった<sup>6-9)</sup>。さらに、樹立した細胞株にレポーター遺伝子を組み込むことで、全長のヒトPPAR $\alpha$ の発現量を制御でき、かつ、PPAR $\alpha$ の転写活性を生体内に近い環境で簡便・迅速に測定できる、セルベースのPPAR $\alpha$ モジュレータースクリーニングシステムを構築した。

本研究課題では、構築したスクリーニングシステムを用いて、約200種類の天然物抽出エキスの中から、PPAR $\alpha$ の機能を制御し、皮膚疾患やバリア機能改善等の美容効果を発揮し得る素材の探索を行った。

## 2. 実 験

### 2・1 PPAR $\alpha$ モジュレータースクリーニング細胞を用いた活性測定試験

PPAR $\alpha$ モジュレータースクリーニング細胞は、DMEM



Screening of natural products to find cosmetic agents that modulate PPAR function

Keisuke Tachibana

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

(10% charcoal/dextran treated FBS, 100IU/mL penicillin, 100 $\mu$ g/mL streptomycin, 2 $\mu$ g/mL tetracycline, 300 $\mu$ g/mL G418, 0.5 $\mu$ g/mL puromycin, 2 $\mu$ g/mL blasticidin) 中で培養した。PPAR $\alpha$ の発現誘導は、トリプシン処理後回収した細胞を1 $\times$ PBS (-) で3回洗浄し、tetracyclineを除去することにより行った。Tetracycline除去後、96穴マイクロプレートに、各ウェルあたり150 $\mu$ LのDMEM (10% charcoal/dextran treated FBS, 100IU/mL penicillin, 100 $\mu$ g/mL streptomycin) 培地中に $2.5 \times 10^4$ 個になるように細胞を播種し、24時間培養した。培地を除去後、各種天然物抽出エキスを3、10、30 $\mu$ g/mLになるように調製したDMEM (10% charcoal/dextran treated FBS, 100IU/mL penicillin, 100 $\mu$ g/mL streptomycin) を150 $\mu$ L添加し、48時間培養した。培地を除去後、70 $\mu$ Lの細胞溶解液 (25mM Tris-phosphate (pH7.8), 2mM DTT, 2mM *trans*-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (CDTA), 10% glycerol, 1% Triton X-100) を加えて室温下15分以上攪拌し、細胞を溶解した。20 $\mu$ Lの細胞溶解液に、50 $\mu$ Lの発光基質液 (20mM Tricine-NaOH (pH7.8), 2.67mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1mM EDTA, 33.3mM DTT, 270 $\mu$ M Coenzyme A, 530 $\mu$ M ATP, 470 $\mu$ M luciferin) を添加して、ルミネッセンスプレートリーダーを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。なお、PPAR $\alpha$ を発現させていないコントロールとして、培地に終濃度2 $\mu$ g/mLのtetracyclineを添加して培養した細胞を用い、同様の処理を行い活性を測定した (Fig. 1)。

## 2・2 天然物からの活性成分の探索

スクリーニング検体として、植物を中心とする約200種類の天然物抽出エキスをを用いた。

天然物抽出エキスの分画精製は、常法に従い以下のように行った。まず、天然物をMeOHで抽出し、得られたMeOHエキスをEtOAcと水で分配した。水層は*n*-BuOHを用い、*n*-BuOH可溶部と水可溶部に分配した。一方、EtOAc可溶部は、*n*-hexaneと90%MeOHで分配した。さらに、*n*-hexane-CHCl<sub>3</sub>系、CHCl<sub>3</sub>-MeOH系、または、CHCl<sub>3</sub>-EtOAc系の溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、それぞれの画分を得た。これら画分のうち活性の見られた画分については、さらに、MeOH-CHCl<sub>3</sub>の溶媒系でODSカラムを用いたHPLCにより分画した (Fig. 2)。

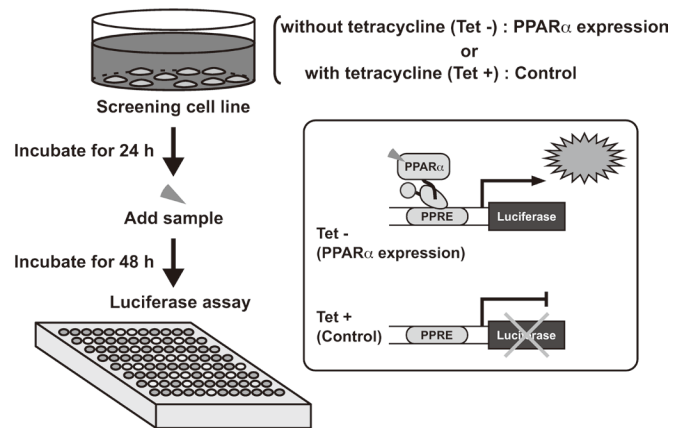


Fig. 1 Screening system of PPAR $\alpha$  modulators.

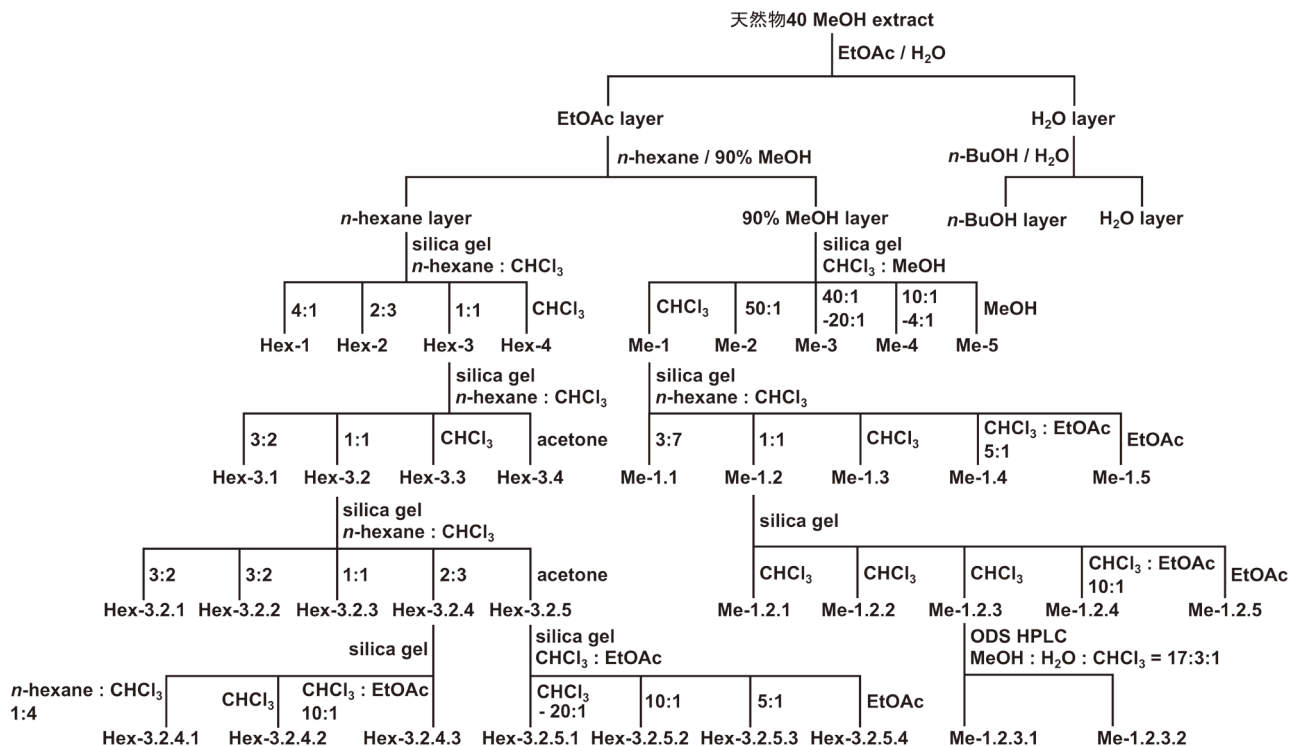


Fig. 2 Extraction-fractionation scheme of the natural product 40.

### 2・3 定量 RT-PCR

培養細胞からの total RNA の抽出は、QuickGene RNA cultured cell kit S を用いてキットに添付のプロトコールに従って行った。SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR を用いて、キットに添付のプロトコールに従い、抽出した total RNA から cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit を用いて定量的 real-time PCR を行った。

## 3. 結果

### 3・1 天然物抽出エキスのスクリーニング

PPAR $\alpha$  の活性を調節する天然物抽出エキスのスクリーニングには、我々が開発した PPAR $\alpha$  モジュレータースクリーニング細胞を用いた。本スクリーニング細胞は、テトラサイクリン誘導システムを応用した PPAR $\alpha$  の発現を制御できるヒト肝癌由来細胞株 HepG2-tet-off-hPPAR $\alpha$  細胞を用いて樹立した<sup>6,7)</sup>。すなわち本細胞株は、培地中に tetracycline が存在すると PPAR $\alpha$  は発現せず (Tet+)、tetracycline を除去することで発現量が上昇する (Tet-)。さらに、この細胞のゲノムには、PPAR $\alpha$  の応答配列 PPRE を含むプロモーターの下流にルシフェラーゼをコードする遺伝子が組み込まれている。従って、ルシフェラーゼ活性を指標にすることで、各種サンプルの PPAR $\alpha$  に対する活性化効果を評価することができる。このように、本スクリーニング細胞株は、全長のヒト PPAR $\alpha$  の発現量を制御可能であり、またレポーター遺伝子もゲノム上に組み込まれていることから、生体内に近い条件で活性の評価を行える優れたスクリーニング細胞株である。

上記スクリーニング細胞株を用いて、約 200 種類の天然物抽出液のスクリーニングを行った。スクリーニングの手順を以下に示す (Fig. 1)。まず、リガンドスクリーニング細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し、tetracycline を除去した培地で培養することで PPAR $\alpha$  の発現を誘導した (Tet-)。24 時間培養後、各種天然物抽出液を 3 $\mu$ g/mL または 30 $\mu$ g/mL になるように添加した。添加 48 時間後にルシフェラーゼアッセイを行い、ルシフェラーゼ活性を指標に各種抽出液による PPAR $\alpha$  の転写活性化効果を評価した。なお、コントロールとして tetracycline を除去せずに、PPAR $\alpha$  を発現させていない条件でもアッセイを行った (Tet+)。

その結果、Fig. 3 に示すように tetracycline を除去し PPAR $\alpha$  を発現させた時に、既知の PPAR $\alpha$  リガンドであるフェノフィブリン酸 (終濃度 50 $\mu$ M) よりも高い活性化効果を示した抽出液が 7 種類得られた (サンプル 10、16、40、42、61、241、264 番の抽出液)。特に、サンプル 40 番の抽出液では、3 $\mu$ g/mL の濃度でもフェノフィブリン酸と同程度の活性が認められた。

### 3・2 天然物 40 番からの活性成分の探索

PPAR $\alpha$  の転写活性の上昇が認められた 7 種類の抽出液の中から、3 $\mu$ g/mL の濃度でも活性が認められたサンプル 40 番を選択し、本抽出液に含まれる活性成分のさらなる探索研究を行った。

まず、サンプル 40 番の MeOH 抽出エキスを EtOAc と水で分配した。さらに、水層を *n*-BuOH と水で分配した。これら MeOH 抽出エキス、EtOAc 可溶部、*n*-BuOH 可溶部、水可溶部の 4 つの抽出画分を用いてスクリーニングを行った。その結果、EtOAc 可溶部および *n*-BuOH 可溶部において濃度依存的な活性化効果が認められた。この時、EtOAc 可溶部では、10 $\mu$ g/mL 以上の濃度において、他の画分よりも強い活性化効果が認められた (Fig. 4)。

そこで、EtOAc 可溶部をさらに *n*-hexane と 90% MeOH で分配した。まず、MeOH 可溶部を CHCl<sub>3</sub>-MeOH 系溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Me-1~5 の 5 つの画分を得た。これら画分を用いてスクリーニングを行った結果、Me-1 画分に活性が認められた (Fig. 5A)。そこで、Me-1 画分をさらに *n*-hexane-CHCl<sub>3</sub> 系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、Me-1.1~1.5 の 5 つの画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Me-1.1、1.2、1.3 の画分に活性化効果が認められた (Fig. 5B)。興味深いことに、Me-1.2 画分は 3 $\mu$ g/mL の低い濃度で最も高い活性化効果が得られた。そこで、Me-1.2 画分を選択し、CHCl<sub>3</sub>-EtOAc 系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、Me-1.2.1~1.2.5 の 5 つの画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Me-1.2.2~1.2.4 の画分に転写活性の上昇が認められた (Fig. 5C)。そこで、Me-1.2 画分と同様に 3 $\mu$ g/mL の濃度で活性の認められた Me-1.2.3 画分を選択し、MeOH-CHCl<sub>3</sub> 系の溶媒系で ODS カラムを用いた HPLC により精製した。得られた画分 Me-1.2.3.1 および Me-1.2.3.2 を用いて活性を評価した結果、Me-1.2.3.1 画分に転写活性化効果が認められた (Fig. 5D)。

一方、*n*-hexane 可溶部は *n*-hexane-CHCl<sub>3</sub> 系の溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-1~4 の 4 つの画分を得た。これら画分を用いてスクリーニングを行った結果、Hex-3 画分に活性が認められた (Fig. 6A)。そこで、Hex-3 画分をさらに *n*-hexane-CHCl<sub>3</sub> 系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-3.1~3.4 の 4 つの画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Hex-3.2 画分にフェノフィブリン酸と同程度の活性化効果が認められた (Fig. 6B)。Hex-3.2 画分をさらに *n*-hexane-CHCl<sub>3</sub> 系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-3.2.1~3.2.5 の 5 つの画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Hex-3.2.4 画分と Hex-3.2.5 画分に活

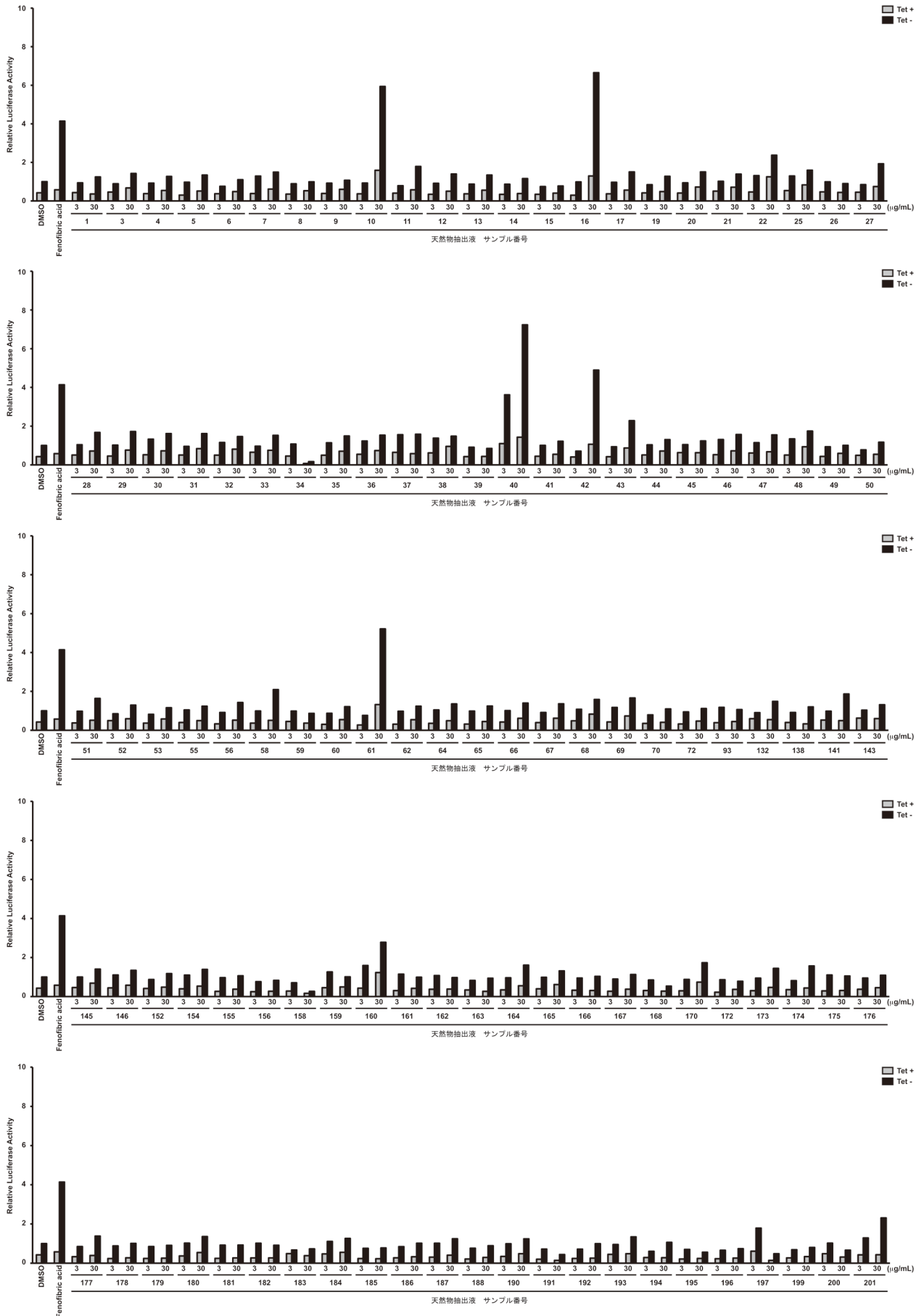


Fig.3 Screening of the MeOH extracts of the natural products for PPAR $\alpha$  modulators.

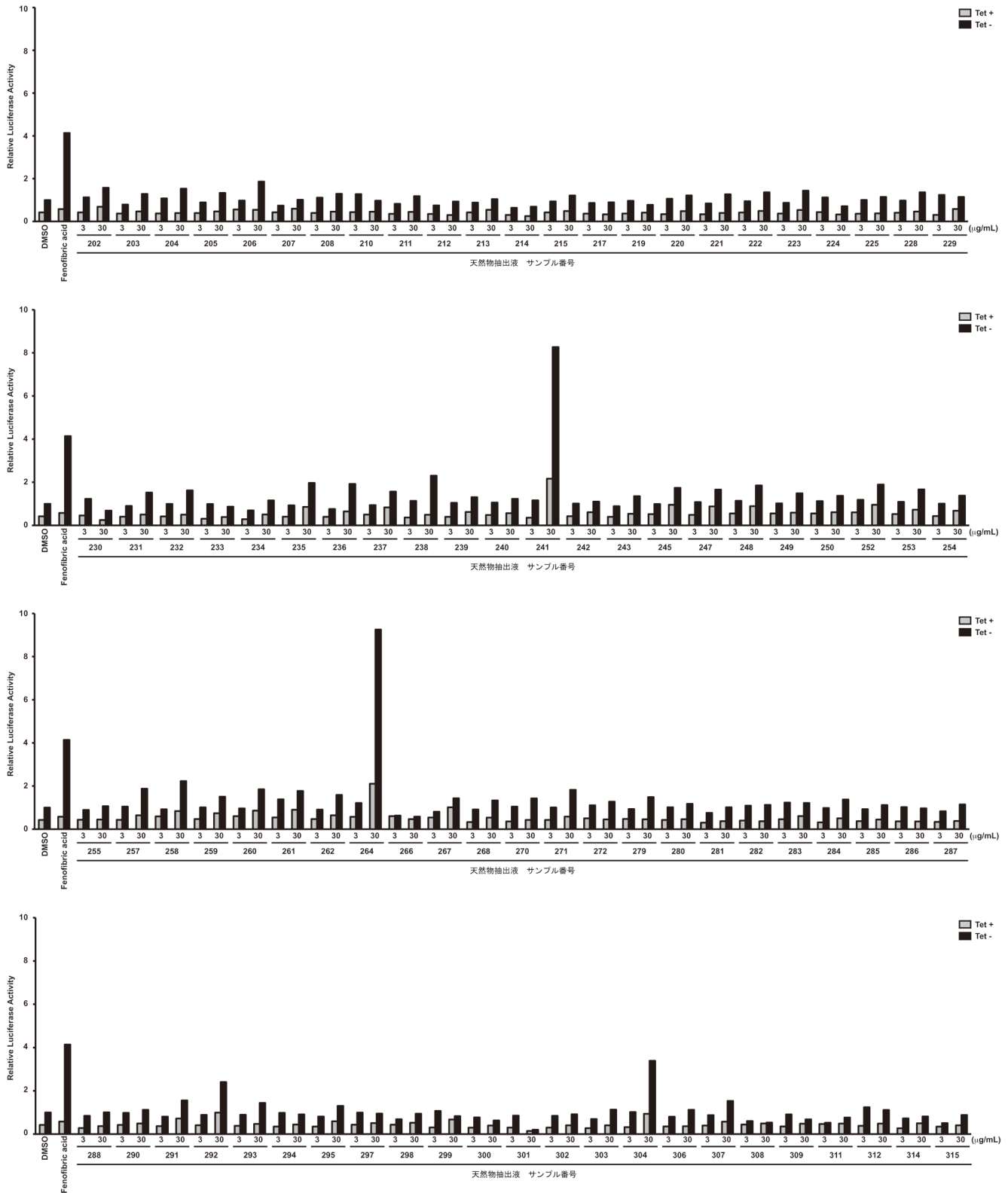


Fig.3 -continued.



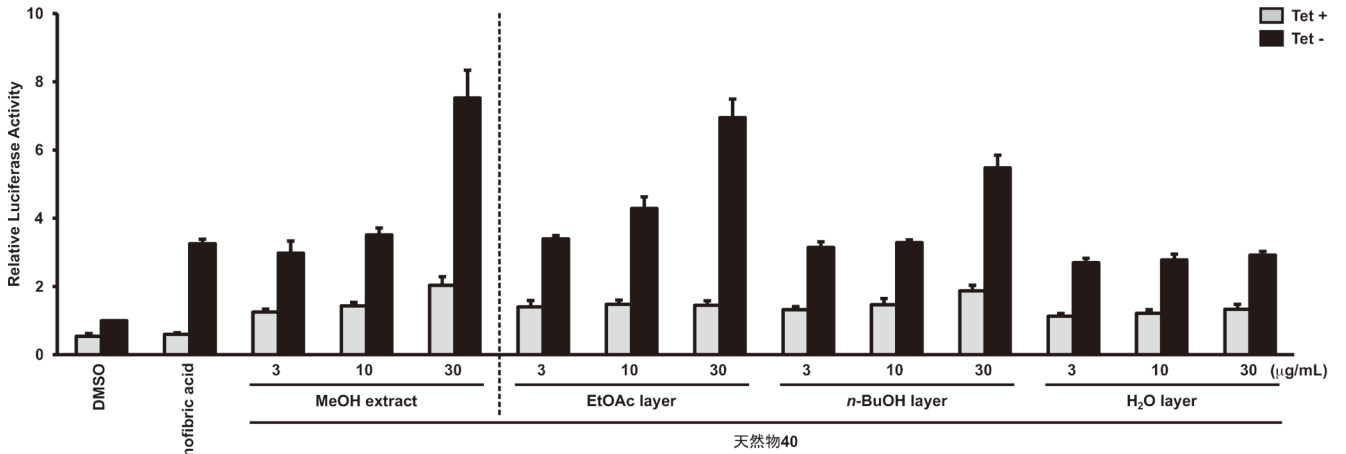


Fig. 4 Screening of the natural product 40 extracts for PPAR $\alpha$  modulators.

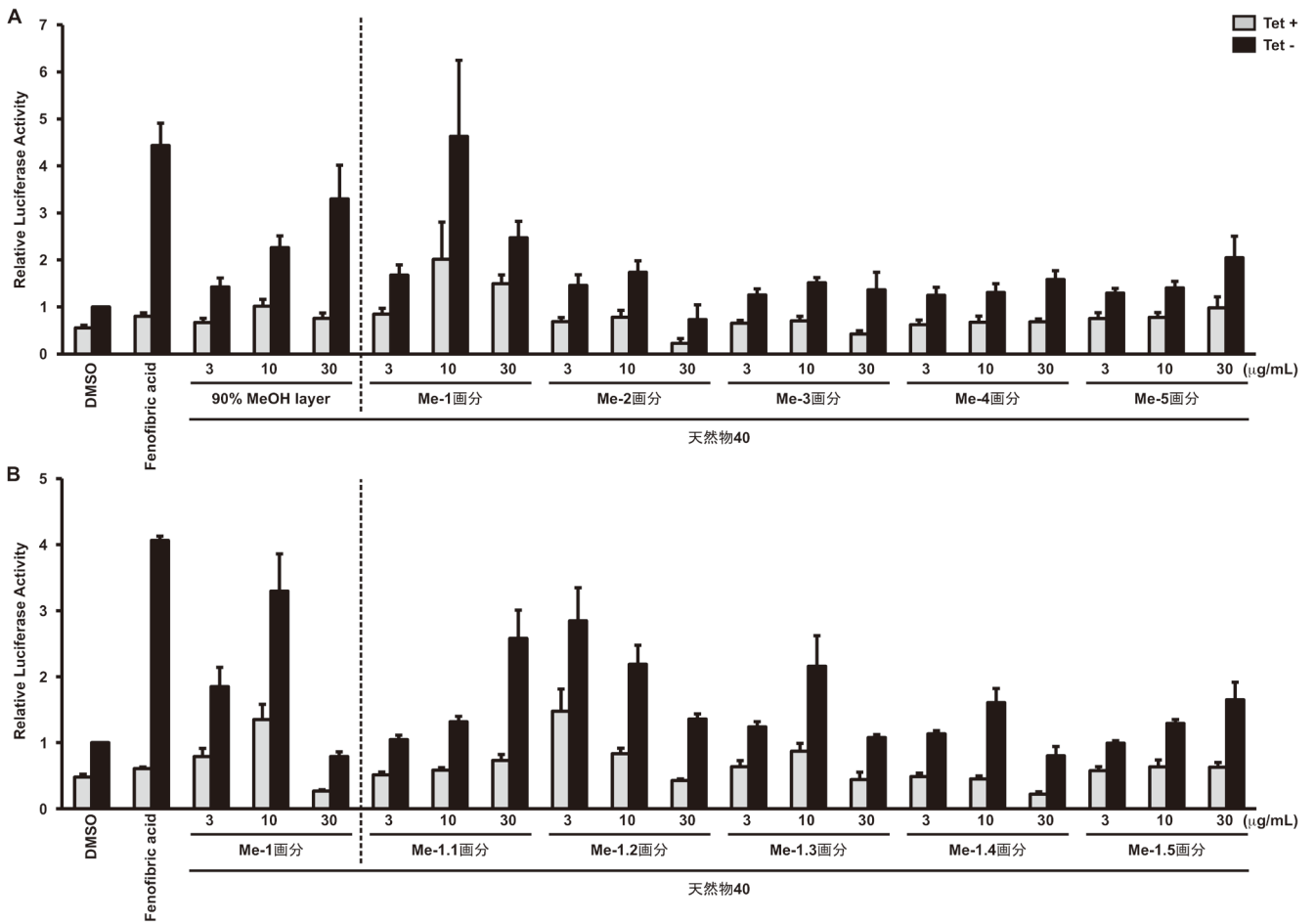


Fig. 5 Screening of the MeOH layer of the natural product 40 for PPAR $\alpha$  modulators.

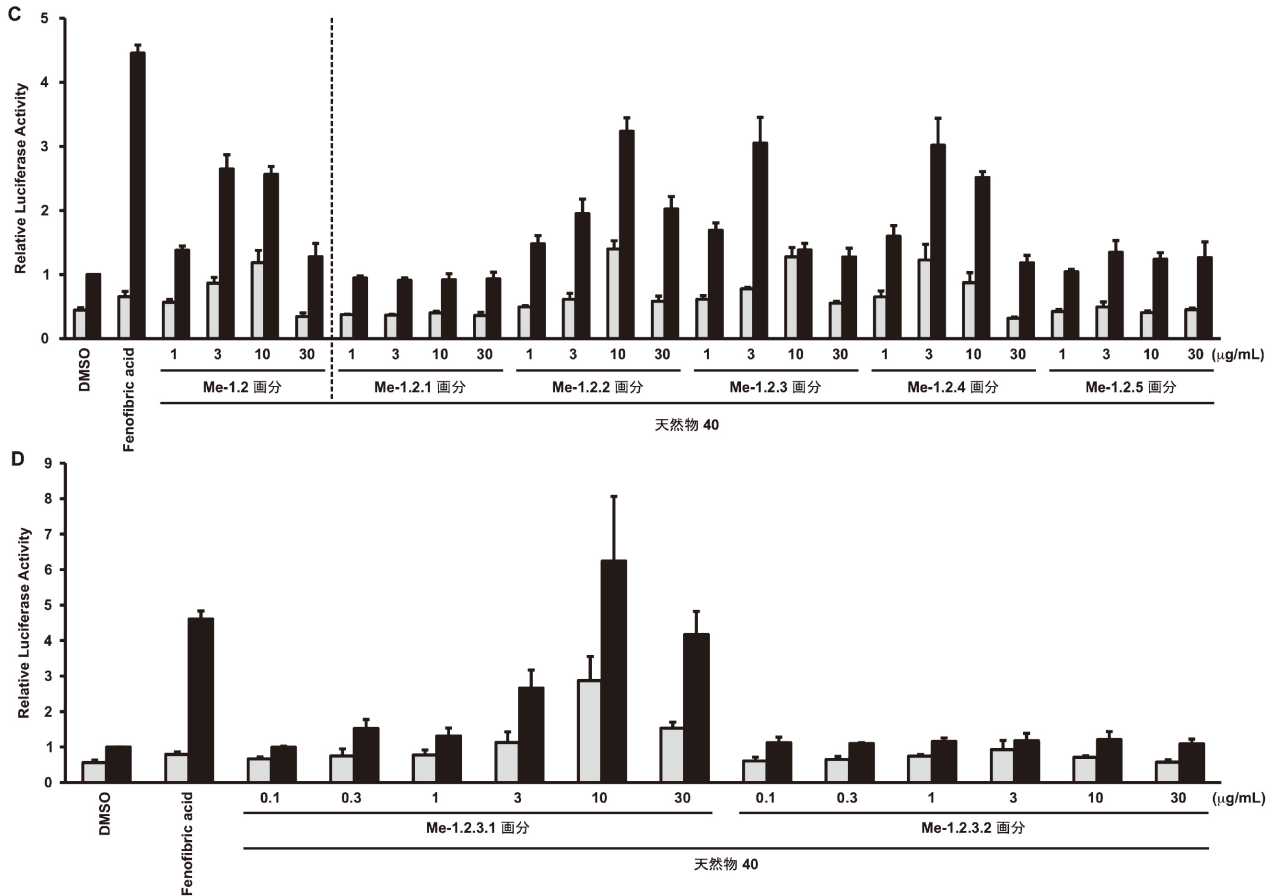


Fig. 5 -continued.

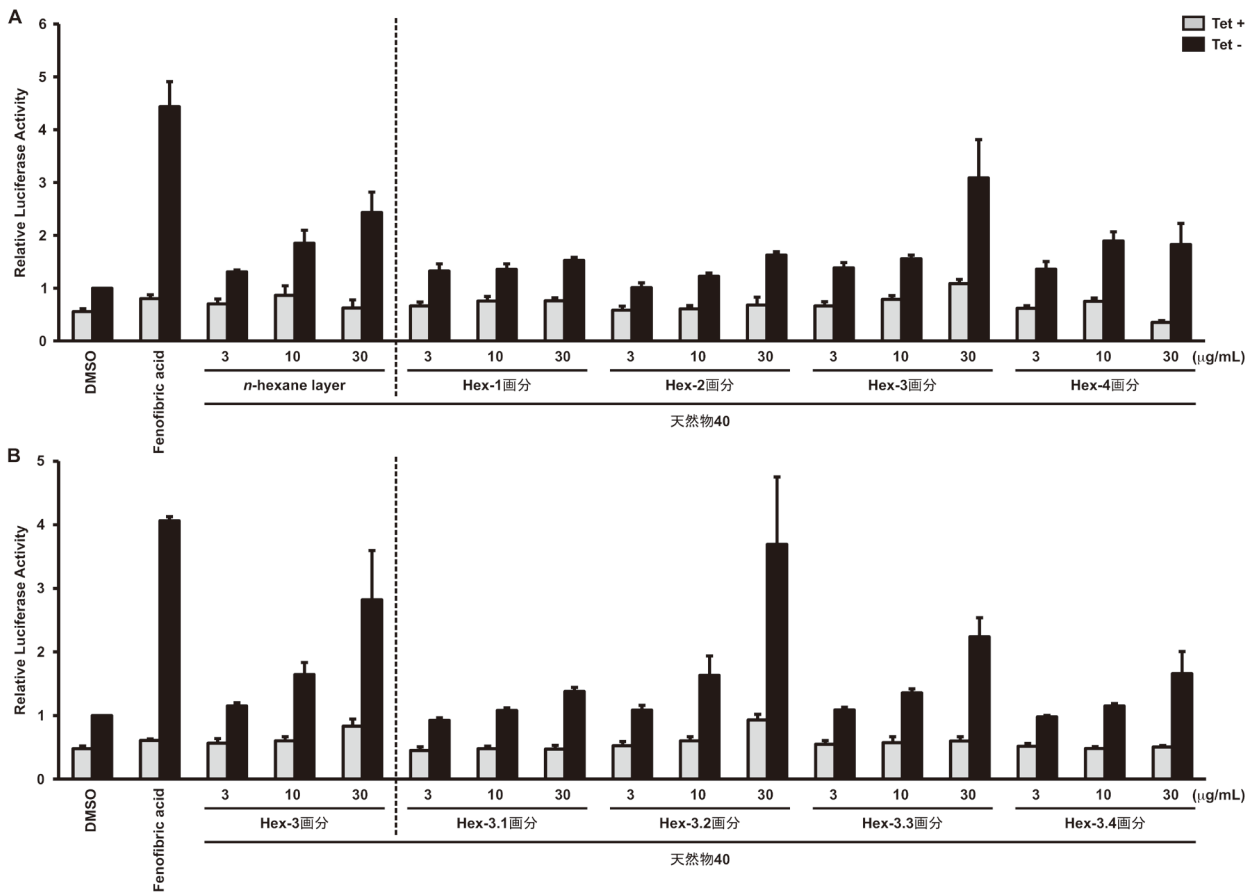


Fig. 6 Screening of the *n*-hexane layer of the natural product 40 for PPAR $\alpha$  modulators.

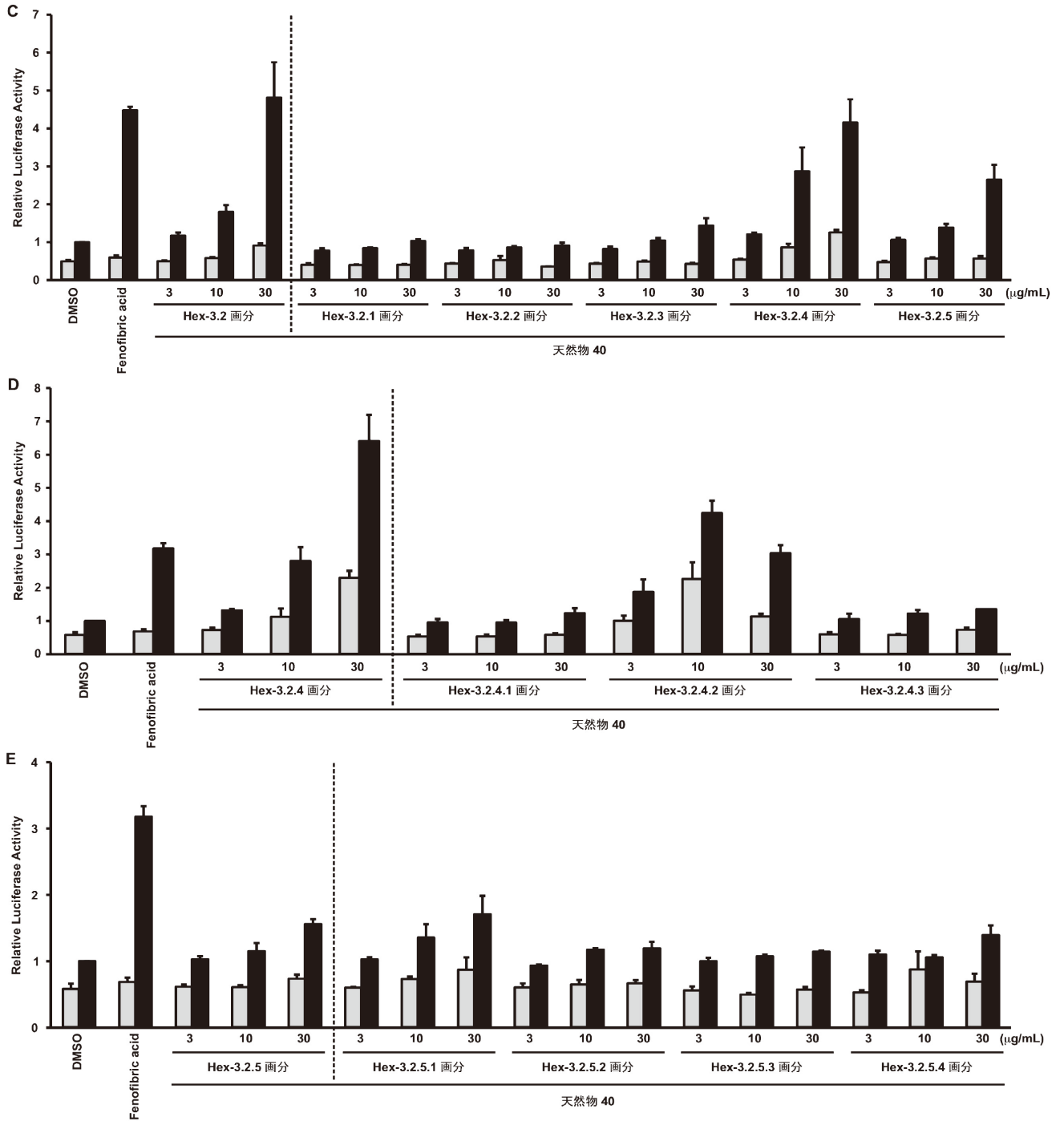


Fig. 6 -continued.

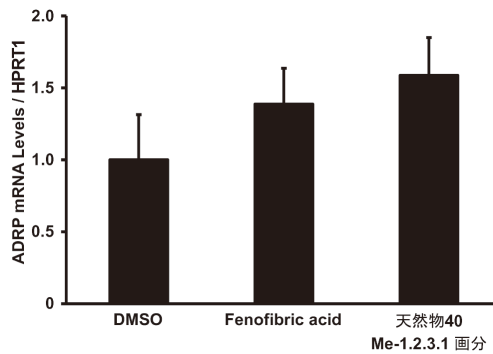


Fig. 7 Me-1.2.3.1 fraction up-regulated the expression of ADRP.



活性化効果が認められた (Fig. 6C)。まず、Hex-3.2.4画分を、*n*-hexane-CHCl<sub>3</sub>-EtOAc系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-3.2.4.1～3.2.4.3画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Hex-3.2.4.2画分に活性化効果が認められた (Fig. 6D)。一方、Hex-3.2.5画分は、CHCl<sub>3</sub>-EtOAc系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-3.2.5.1～3.2.5.4画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、弱いながらもHex-3.2.5.1画分に活性化効果が認められた (Fig. 6E)。興味深いことに、これら画分を薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて解析した結果、これら画分にはそのスポットのパターンよりMe-1.2.3.1画分に含まれる成分と同じものが含まれていることが明らかになった。

### 3・3 活性成分を用いた遺伝子発現解析

スクリーニングの結果、サンプル40番から精製したMe-1.2.3.1画分に含まれる成分が、本スクリーニング系で活性を示す成分として考えられた。そこで、本成分を用いて、PPAR $\alpha$ の標的遺伝子の発現が誘導されるか否かを調べた。PPAR $\alpha$ の発現が確認されているヒト肝癌由来Huh-7細胞を<sup>8)</sup>、Me-1.2.3.1画分で処理し、48時間後にtotal RNAを回収した。回収したtotal RNAからcDNAを合成し、PPAR $\alpha$ の標的遺伝子である脂肪滴形成に関わるadipose differentiation-related protein (ADRP) 遺伝子<sup>6)</sup>の発現を解析した。その結果、Me-1.2.3.1画分の添加によってADRPの発現量が、約1.5倍程度に上昇した (Fig. 7)。

## 4. 考 察

我々が構築したスクリーニング系を用いて、PPAR $\alpha$ の転写活性化能を促進する成分の探索を行った。今回、約200種類の天然物抽出エキスを評価した結果、7種類の天然物抽出エキスをPPAR $\alpha$ を活性化する成分が含まれている可能性が示唆された。このうち、サンプル40番の抽出エキスをさらに分画した結果、PPAR $\alpha$ を活性化する成分を、Me-1.2.3.1画分にまで絞り込むことに成功した。今後、この画分に含まれる成分を同定すると共に、どのようなメカニズムでPPAR $\alpha$ の活性を制御するのかを、アンタゴニストなどの薬剤を用いてさらに詳細に解析する必要がある。

一方、Me-1.2.3.1画分はPPAR $\alpha$ の標的遺伝子であるADRPの発現量を増加させた。これまでに、表皮ケラチノサイトにおけるADRPの発現量の上昇に伴う脂質の増加が、SDSなどの刺激による細胞膜の損傷の修復に関わっていることが報告されている<sup>10)</sup>。従って、Me-1.2.3.1画分に含まれる成分も、皮膚のバリア機能向上による肌荒れ防止、改善作用を有している可能性が考えられる。

今後本研究課題で得た知見をもとに、皮膚における

PPAR $\alpha$ の生理機能を明らかにすると共に、PPAR $\alpha$ を活性化する成分が皮膚の恒常性や機能を改善し美容を促進するという、新たな化粧品素材開発へのアプローチを提唱することで、コスメトロジーの発展に寄与したい。

## 5. 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、御支援頂きました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

### (引用文献)

- 1) Feingold KR, : Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis., *J Lipid Res*, 48, 2531-2546, 2007.
- 2) Rawlings AV & Harding CR, : Moisturization and skin barrier function., *Dermatol Ther*, 17 Suppl 1, 43-48, 2004.
- 3) Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, et al., : The role of PPARs in cancer., *PPAR Research*, Volume 2008, Article ID 102737, 2008.
- 4) Evans RM, Barish GD & Wang YX, : PPARs and the complex journey to obesity., *Nat Med*, 10, 355-361, 2004.
- 5) Michalik L, & Wahli W, : Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease., *Biochim Biophys Acta*, 1771, 991-998, 2007.
- 6) Tachibana K, Kobayashi Y, Tanaka T, et al., : Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms., *Nuclear Receptor*, 3, 3, 2005.
- 7) Tachibana K, : Application of the Human Hepatoblastoma Cell Lines Inducibly Expressing Peroxisome Proliferator-activated Receptors (PPARs), *Yakugaku Zasshi*, 127, 1223-1229, 2007.
- 8) Tachibana K, Anzai N, Ueda C, et al., : Regulation of the human PDZK1 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha., *FEBS Letters*, 582, 3884-3888, 2008.
- 9) Tachibana K, Takeuchi K, Inada H, et al., : Regulation of the human SLC25A20 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human hepatoblastoma cells., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389, 501-505, 2009.
- 10) Corsini E, Viviani B, Zancanella O, et al., : Induction of adipose differentiation related protein and neutral lipid droplet accumulation in keratinocytes by skin irritants., *The Journal of investigative dermatology*, 121, 337-344, 2003.