

新規経皮導入法による美白ペプチドを用いた高浸透化粧品の開発

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学

道上 宏之

Topical therapy is the most favored form of treatment for whitening against hyper-pigmentation and sunburn. However, high-molecular-weight, hydrophilic chemicals are difficult to use as transdermal delivery drugs and the use of topical drugs has been highly limited. We applied 11-arginine peptide (11R), a cell-membrane-permeable peptide, as a transdermal delivery system with a skin delivery enhancer, pyrenebutyrate. We performed intracellular peptide screening for melanogenesis inhibitors with several kinds of tyrosinase inhibitory peptides from natural sources. Next, we performed daily repetitive topical application of this LILVLLAI peptide found in gliadin protein, a wheat component, for two weeks against a UV-induced sun-tanning guinea pig model and confirmed significant melanogenesis inhibition in model skin. We showed that 11R using a transdermal drug delivery system with melanogenesis inhibitory peptide is a very safe and promising method for applications from cosmetics to the pharmaceutical industry.

1. 緒言

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 I 型 (HIV-1) が発現する Transactivator of transcription protein (TAT タンパク質) の研究により明らかになった¹⁾。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)による PTD が導入効率の面から優れていることを我々の研究室の松下らが報告している²⁾ (Fig. 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³⁾。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⁴⁾。また、前処置として Pyrenebutyrate という物質を使用した。これは、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を含ませ持つ両親媒性の物質である。これを前処置で使用すると、エンドソーム内のタンパク質が効率良く細胞内で拡散することが報告されている⁵⁾。Pyrenebutyrate 存在下ではエンドソーム内に蓄積することなく、膜透過後、速やかに細胞内全体へ導入できる。そのため、エンドソーム内で機能することなく蓄積していたタンパク質や薬物が、早期に細胞質に拡散し、より迅速で大きな効果が期待出来る⁶⁾。

今回、我々の研究では、このタンパク質導入法および Pyrenebutyrate を、経皮的導入法に応用することとした。まず、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⁷⁾。

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⁸⁾。しかしながら、分子量 500Da 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⁹⁾。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ルート (transcellular route) と細胞間隙を通る細胞間ルート (intracellular 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。

現在、薬物の経皮的導入法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、例えばイオント



The development of whitening peptide with peptide percutaneous drug delivery system

Hiroyuki Michiue

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

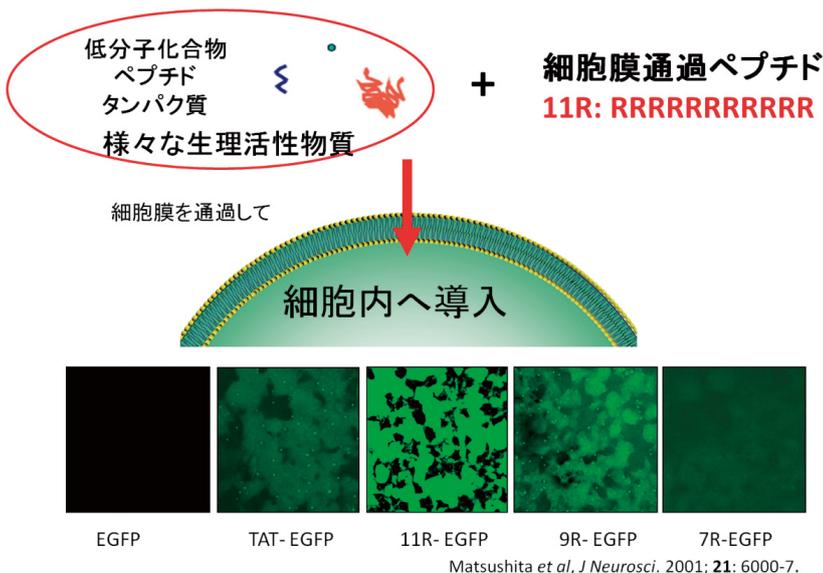


Fig. 1

フォレシス¹⁰⁾やマイクロニードル¹¹⁾が挙げられる。イオントフォレシスは、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導率の高い(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。マイクロニードル法は、角質層(10~20μm)のみを通過する針を有する剣山のようなものを皮膚に適用することで、神経に到達させずに角質層に穴を開け、バリア機能を低下させる方法である。

化学的促進法としては、例えば、リポソーム¹²⁾や界面活性剤¹³⁾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理想的な運搬体と考えられている。しかし、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。

次に、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 (290-320 nm)、UVC (200-290 nm)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。また、この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DOPA、DOPAからDOPA quinoneに変化し、さらに中間体を経て形成さ

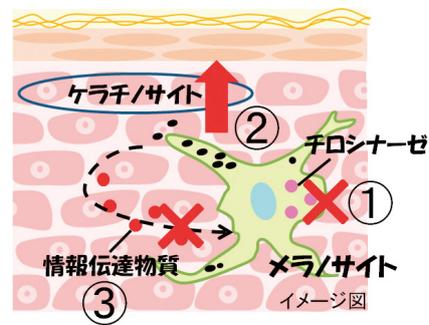


Fig. 2

Table 1¹⁸⁾



細胞膜通過ペプチド

SPOT	Sequence	Protein source
101	APLRVYVE	β-Lactoglobulin
54	VSLLLVGI	α-Lactalbumin
325	ASVSVSFG	b-Conglycinin
195	MKTFLILV	Gliadin
151	SVNVHSSL	Ovalbumin
175	MVLVNAIV	Ovalbumin
53	MMSFVSL	a-Lactalbumin
140	IAIMSALA	Ovalbumin
99	ISLLDAQS	b-Lactoglobulin
196	LILVLLAI	Gliadin
323	LLLGLVFL	b-Conglycinin
55	LVGILFHA	b-Lactoglobulin
121	LACQCLVR	b-Lactoglobulin
186	LFRVASMA	Ovalbumin
176	NAIVFKGL	Ovalbumin
145	QINKVVRV	Ovalbumin
276	TLNRNALR	Gliadin
171	IIRNVLQP	Ovalbumin
181	MPFRVTEQ	Ovalbumin
170	QTNGHIRN	Ovalbumin
232	VVLQQHNI	Gliadin
146	VVRFDKLP	Ovalbumin
252	GSFRPSQQ	Gliadin
51	VRGPFPII	b-Casein
200	VRFPVPQL	Gliadin
347	PFPRPQPR	b-Conglycinin
251	PLGQGSFR	Gliadin
339	IPRPRPRP	b-Conglycinin

れるものとされている¹⁴⁾。Whitening効果を得るためのターゲットとしては、主に三つの機序(Fig. 2)があり、一つ目は、メラニン合成抑制¹⁵⁾、二つ目は、メラニン排出促進¹⁶⁾、三つ目は、メラノサイト刺激物質抑制¹⁷⁾。今回、一つ目のメラニン合成を抑制する機序に焦点を当て、メラニン合成の律速酵素であるチロシナーゼに着目した。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(Table 1)によるチロシナーゼの活性阻害と結合能が論文において報告されている。

さらにその論文において、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している。しかし、これは試験管レベルでの報告しかされていない¹⁸⁾。そこで、我が研究室の手法である、11Rを連結させて細胞内へ導入することで検討を行い、細胞レベルでのスクリーニングを行った。

2. 実験

2.1. ペプチドの作製

今回使用したペプチド¹⁸⁾は、ペプチド合成機を用いてペプチド固相法により作製したもので、近畿大学の研究室に依頼して合成したものである。本実験には、11Rを連結した候補ペプチドと候補ペプチドのみの両方を使用している。

2.2. 細胞内スクリーニング

まず、チロシナーゼ抑制効果を有する候補ペプチドに11Rを連結させて、B16メラノーマ細胞へ導入し、スクリーニングを行った。実験に用いたB16メラノーマ細胞は、マウス悪性黒色腫瘍細胞で、特異的なメラニン産生能を有している。1wellあたり 1×10^5 cellを撒き37℃、5% CO₂下で培養した。一日培養したメラノーマ細胞に希釈した候補ペプチドを添加した。72時間後にトリプシンで剥がし、5000rpmにて10分間遠心して細胞を回収した。その後、1N水酸化ナトリウム水溶液、80℃、2時間で細胞を溶解させ、マルチプレート対応スペクトロフォトメーター (DSファーマバイオメディカル株)で吸光度(405nm)を測定し、メラニン定量を行った。

2.3. WST-1 assayによる細胞毒性の有無の検討

決定したペプチドを用いて、WST-1試薬を用いて、細胞毒性の有無を検討した。1wellあたり、2000cellになるようにメラノーマ細胞をまき、一日培養した。実験には、96穴プレートを使用した。翌日、希釈した候補ペプチドを添加し、72時間培養した。その後、WST-1試薬を添加し、30min、60min後に、マルチプレート対応スペクトロフォトメーター (DSファーマバイオメディカル株)で吸光度(450nm, 690nm)を測定した。コントロールはDMSOを使用した。

2.4. 196ペプチドのAlanine walkの検討

決定した196ペプチドを用いて、ペプチドの各アミノ酸を順番にアラニンに置換するAlanine walkを行った。実験操作は2.2.細胞内スクリーニングと同じである。

2.5. モルモットの背部にて11Rの導入の確認

11Rに蛍光標識のテトラメチルローダミンを連結したペプチド(TMR-11R)をモルモットの背部(4cm²区画、各

50uL)に塗布し、経時的に観察した。青色は、ヘキストによる核染色、赤色は、テトラメチルローダミンで蛍光標識した11Rペプチドである。観察は、共焦点レーザー顕微鏡(FV300、OLYMPUS)で行った。

2.6. 日焼けモデル動物の作成

日焼けモデルとして褐色モルモット (Guinea pig, Weiser-Maples, female, 8w)を採用した。これは、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褐色モルモットに決定した。脱毛したモルモットの背部に、紫外線UVB強度測定装置にてUV強度を測定しつつ、UV照射機により、1日1回紫外線量0.25J/cm²を10日間照射した。照射面積は一区間2cm×2cmを4区間とした。

2.7. 日焼けモデル動物の治療

モルモット日焼けモデルに、Propylene glycolにて調整した500uM Pyrenebutyrateを前処置で50uL塗布した。5分後、Propylene glycolにて調整した候補ペプチドを各50uL、1日1回、14日間塗布した。その後、デルマパンチ(5mm、マルホ)を用いて皮膚サンプルを採取した。

2.8. ヘマトキシリン・エオシン(H.E.)染色

モルモット皮膚サンプルのパラフィン切片を作製し、カラッチヘマトキシリン液を滴下し、5分間静置した。洗浄し、エオシン液を滴下し、30秒間静置した。洗浄し、DIGITAL SIGHT DS-U1 (Nicon)で観察した。

2.9. フォンタナ・マッソン染色

モルモット皮膚サンプルのパラフィン切片を作製し、キシレンに15分間(58℃)、10分間(RT)浸漬し、100%エタノール、95%エタノール、90%エタノールおよび70%エタノールを順に各5分間滴下した。蒸留水で洗浄し、2.5%フォンタナアンモニア銀染色液を滴下し、遮光して16時間静置した。蒸留水で洗浄し、0.25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を1分間滴下した。蒸留水で洗浄し、ケルンエヒトロート液を5分間滴下した。蒸留水で洗浄し、70%エタノール 90%エタノール 95%エタノール 100%エタノールを順に各1分間滴下した。キシレンを5分間滴下し、VECTA MOUNTTMにて封入し、DIGITAL SIGHT DS-U1 (Nicon)観察した。

3. 結果

3.1. 細胞内スクリーニング

黒いメラノーマ細胞が白くなっている候補ペプチドも数種類確認することが出来た。さらにメラノーマ細胞を水酸化ナトリウムにて溶解させた後、吸光度測定(405nm)を

行ったところ、コントロールより低い値を示したペプチドは、以下の8種類であった。また、50%以上のメラニン合成阻害を示したのは、196というスポット番号のペプチドであった。この配列は、小麦に存在するGliadinというタンパク質由来のペプチドである (Fig. 3)。

3. 2. WST-1 assayによる細胞毒性の有無の検討

WST-1 assayの結果より、決定したペプチドは、コントロールと比較して細胞への毒性はないことを確認した

(Fig. 4)。

3. 3. モルモットの背部にて11Rの導入の確認

6時間から48時間まで経時的に観察したところ、塗布12時間頃から、表皮基底層にて11Rペプチドの導入が確認出来た。また、24、48時間と時間が経過するごとに、真皮にまでペプチドが導入出来ていることが確認出来た (Fig. 5)。

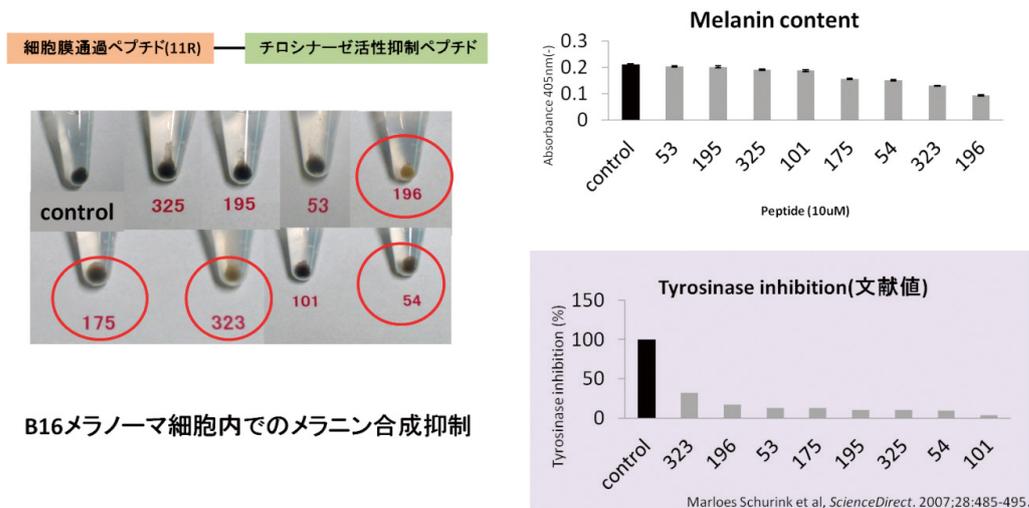


Fig. 3

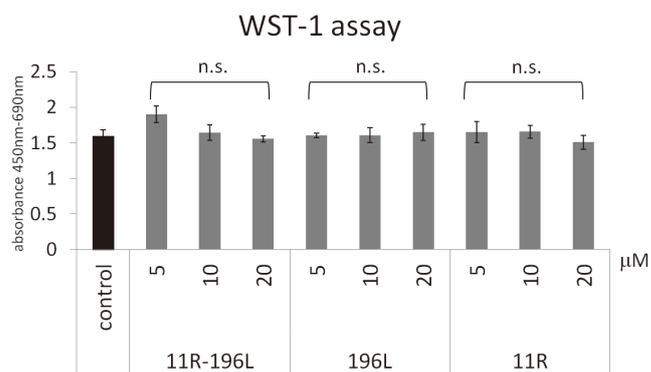


Fig. 4

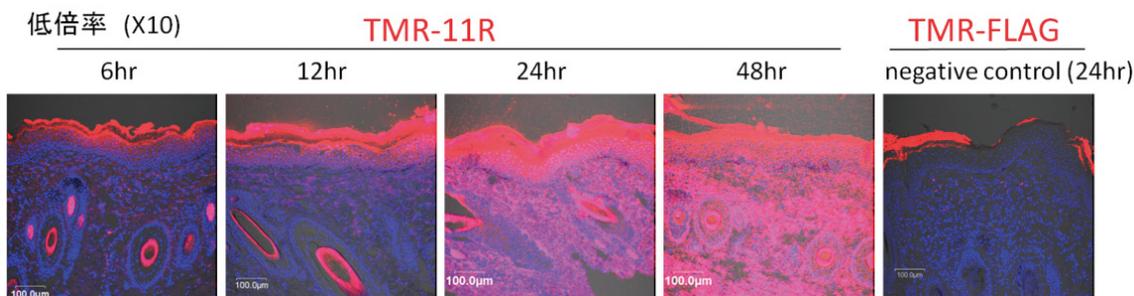


Fig. 5

3. 4. 動物モデルの検討結果

また、PBおよび各薬剤によるモルモット日焼けモデル皮膚サンプルについて、フォンタナ・マッソン染色を行った。control、11R + No.10L、No.10L-11Rを塗布したサンプルでは、表層から皮膚基底層までメラニン陽性細胞が多数観察されたのに対し、11R-No.10Lを塗布したサンプルは、他のサンプルと比較して、メラニン陽性細胞が減少していることを確認した(Fig. 6)。

次に、フォンタナ・マッソン染色によるメラニン陽性細胞数を10ヶ所の視野で、統計学的に検定したところ、PBおよび11R-No.10Lを塗布した皮膚において、メラニン陽性細胞数の有意な減少が見られた(Fig. 7)。

4. 考 察

新たなペプチドをスクリーニングする際に着目したのが、チロシナーゼ抑制に関する論文である。下図¹⁹⁾はチロシナーゼの活性部位(Fig. 8)を示したもので、この活性部位を阻害する天然素材が報告されている。例えば、牛乳、小麦、はちみつ、絹、ハエといったものが報告されている¹⁸⁾。

これらに共通する結論が、“チロシナーゼの活性部位に存在する銅イオンをキレートすることで、チロシナーゼの活性を阻害している”であった。こちらは、試験管内レベルの報告はあるが、細胞レベルや動物レベルの応用例はない。その理由は、これらのWhiteningペプチドを皮膚基底膜にある皮膚色素細胞に送達する手段がないためである。よって、我が研究室の手法である11Rを用いて、細胞レベルそして動物レベルにて検討を行い、さらにスクリーニングを行った。

文献の試験管レベルでのスクリーニングの結果と細胞内スクリーニングの結果より、メラニン合成抑制効果において異なる結果が得られた。これは、細胞内へ導入する際に細胞膜通過ペプチド、11Rを連結したことで、候補ペプチドに何らかの立体構造の障害が起きたと考えられる。例えば、候補ペプチドにマイナスチャージのアミノ酸を含有していた場合、11Rの強い塩基性を持つアルギニンとの静電的相互作用により、アミノ酸同士が接着する可能性が示唆される。決定した196ペプチドにおいて、11RをN末端とC末端のそれぞれに連結した場合、N末端がメラニン合成

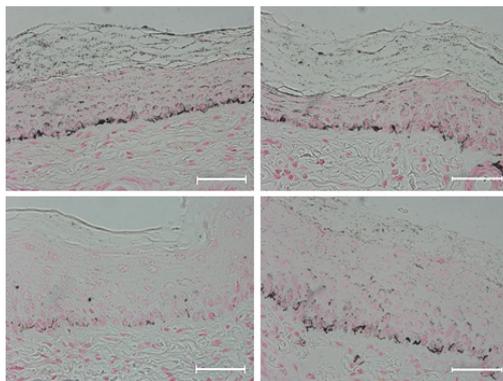


Fig. 6 フォンタナ・マッソン染色結果 scale bar : 50μm

control	11R + No.10L
11R - No.10L	No.10L - 11R

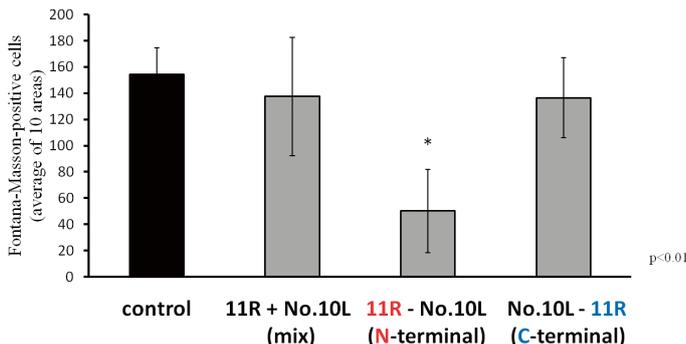


Fig. 7 フォンタナ・マッソン染色によるメラニン陽性細胞数の測定結果

チロシナーゼの活性部位

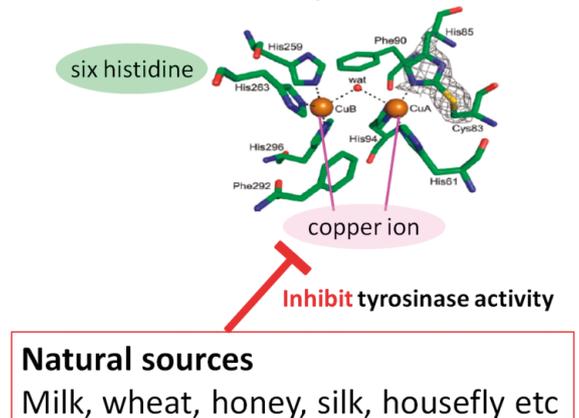


Fig. 8



Fig. 9

抑制効果を示すことも確認している。さらに、褐色モルモットを用いて、日焼けモデル動物を作製し (Fig. 9)、薬剤塗布の検討を行った。その後、H.E.染色、フォンタナ・マッソン染色、メラニン陽性細胞数の統計評価を行い、メラニン陽性細胞の有意な減少効果を認めた。

本研究成果は、The transdermal inhibition of melanogenesis by a cell-membrane-permeable peptide delivery system based on poly-arginine. Ookubo N, Michiue H, Kitamatsu M, Kamamura M, Nishiki T, Ohmori I, Matsui H, *Biomaterials*. 2014 May; 35 (15) :4508-16.

(引用文献)

- 1) Shiroh Futaki : Oligoarginine Vectors for Intracellular Delivery:Design and Cellular-Uptake Mechanisms: *Biopolymers*, 84, 241-249, 2006
- 2) Masayuki Matsushita: A High-Efficiency Protein Transduction System Demonstrating the Role of PKA in Long-Lasting Long-Term Potentiation, *The Journal of Neuroscience*, 16, 6000-6007, 2001
- 3) Jehangir S Wadia : Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis, *nature medicine*, 10, 310-315, 2004
- 4) Joliot A : Transduction peptides : from technology to physiology, *Nature Cell Biology*, 6, 189-196, 2004
- 5) Takeuchi T : Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate, *ACS Chem Biol*, 1, 299-303, 2006
- 6) Gerile Candan:Combining poly-arginine with the hydrophobic counter-anion 4-(1-pyrenyl)-butyric acid for protein transduction in transdermal delivery, *Biomaterials*, 33, 6468-6475, 2012
- 7) Marek Haftek: Compartmentalization of the human stratum corneum by persistent tight junction-like structures, *Experimental Dermatology*, 20, 617-621, 2011
- 8) Saman A. Nasrollahi : Cell-penetrating Peptides as a Novel Transdermal Drug Delivery System, *Chem Biol Drug Des*, 80, 639-646, 2012
- 9) Jan D. Bos: The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Experimental Dermatology*, 9, 165-169, 2000
- 10) Tomasz Ciach : Buccal iontophoresis : an opportunity for drug delivery and metabolite monitoring, *Drug Discovery Today*, 16, 361-366, 2011
- 11) Shital H : Microneedles : an emerging transdermal drug delivery system, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64, 11-29, 2011
- 12) Fang J.Y.: Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes, *Curr Nanosci*, 2, 55-70, 2006
- 13) Simons E.J.: Effect of chemical permeation enhancers on nerve blockade, *Mol Pharm*, 6, 265-273, 2009
- 14) Juan Carlos Espin : Improvement of a Continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Mushroom Polyphenol Oxidase, *J. Agric. Food Chem*, 45, 1084-1090, 1997
- 15) Jie Zhang : Wnt5a Inhibits the Proliferation and Melanogenesis of Melanocytes, *International Journal of Medical Sciences*, 6, 699-706, 2013
- 16) Matsuda H : Studies of cuticle drugs from natural sources.II.Inhibitory effects of Prunus plants on melanin biosynthesis, *Biol Pharm Bull*, 10, 1417-20, 1994
- 17) P.Thanigaimalai, Evaluation of 3,4-dihydroquinazoline-2 (1H)-thiones as inhibitors of α -MSH-induced melanin production in melanoma B16 cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 1555-1562, 2010
- 18) Marloes Schurink: Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity, *ScienceDirect*, 28, 485-495, 2007
- 19) Wangsa T. Ismaya: Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase:Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone, *Biochemistry*, 50, 5477-5486, 2011