

常在菌フローラ育成を目指す 肌表面微小環境応答性ポリアミノ酸の開発

東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所

武元 宏泰

Skin flora plays an essential role in skin health conditions. Conventional cosmetic strategies can deliver nutrients to the flora, which often facilitates the growth of not only beneficial bacteria but also bad bacteria. In the present study, a new methodology that delivers the nutrients to beneficial bacteria for the selective growth was developed. In design, glucose as a nutrient was conjugated with poly (amino acid) side chains via boronic ester. Thus, the developed system can release glucose in response to weakly acidic pH, which is suitable for the growth of beneficial bacteria. In fact, incubation of the developed polymer system at pH 5 facilitated the release of glucose payload relative to the incubation at pH 8. Ultimately, when *Staphylococcus epidermidis* was selected as a beneficial bacterium, the growth was selectively accelerated in the presence of the developed polymer at pH 5, relative to the conditions at pH 8 which is suitable for the growth of bad bacteria. The obtained results suggest that the developed polymer system potentially achieves the selective growth of beneficial bacteria for good skin health conditions.

1. 緒言

表皮常在菌は肌表面の環境構築を司るため、その健全な育成は肌の保湿や肌荒れ防止へと直結する。実際に、荒れた肌表面での善玉菌の比率を大きくすることで、肌の保湿能力や肌荒れを改善できる¹⁾。これに関し、表皮常在菌は肌表面に均一に分布するわけではなく、種々の外的要因(pHや栄養物質量等)に応じて異なる集団を形成するため、善玉菌と悪玉菌の数や比率(肌常在菌フローラ)は微小領域ごとに異なると考えられる。そこで本研究では、肌表面の環境の差異に応じて最適な作用を発現する機能性分子(アミノ酸ベース)の開発を通じて、肌常在菌フローラの局所制御を通じた理想的な育成を目指す。具体的には、機能として「善玉菌環境選択的な栄養補充」が組み込まれた分子を開発する(図1)。

肌常在菌フローラの育成には適したpH環境と栄養補充が有用だと考えられる。既存の方法論でpH調整は可能なものの、栄養補充においては多くがオリゴ糖を用いるため善玉菌(代表的には*Staphylococcus epidermidis*)だけでなく悪玉菌(代表的には*Staphylococcus aureus*)への栄養供給が懸念される。そこで本研究では、細菌に取り込まれづらい高分子にオリゴ糖が担持された構造体を着想した。ポリエチレングリコール(PEG)を有する高分子はPEGの排除体積効果のために細胞に取り込まれづらい²⁾。さらに、善玉菌が好む弱酸性pHにおいてオリゴ糖が徐放されるよう

肌表面の微小環境を認識して常在菌分布を局所制御

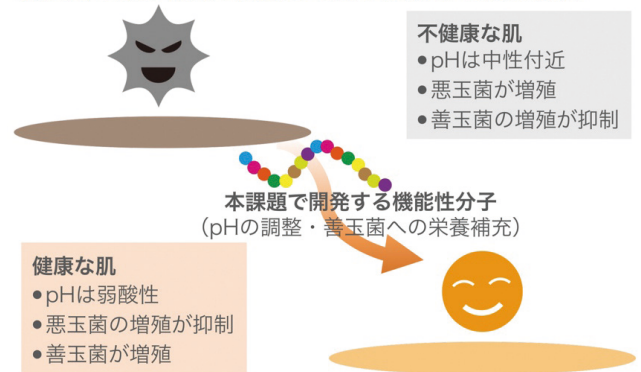


図1 皮膚付属器を有する三次元再生皮膚器官系の構築

に設計することで、悪玉菌が多く存在する領域ではpH上昇に伴ってオリゴ糖放出が阻害される。このような方針のもとに、「善玉菌選択的な栄養補充」を可能とする高分子の開発を着想した。PEGを開始剤としたNCA重合法によりポリアミノ酸誘導体を作成し、側鎖改変によりオリゴ糖を導入する。オリゴ糖の導入には酸性条件選択的に開裂するボロン酸エステル構造を採用した。ボロン酸はジオール構造と可逆的なエステル形成を行うが、ボロン酸エステルはpH7以下にて速やかに加水分解し、ジオール誘導体が放出される³⁾。これに関し、常在菌の育成に有用なオリゴ糖の多くはジオール構造を含む。そのため、善玉菌育成に適したpH約5でオリゴ糖の放出の加速が期待される。本研究では、善玉菌の生育に適したpH環境では栄養を補充し、善玉菌選択的な育成を促すことで、肌表面の理想的な常在菌フローラを構築するための手法を提案する。

2. 方法

2.1. ポリアミノ酸誘導体の合成

反応手法は図2に従った。MeO-PEG-NH₂(分子量10,000)



The development of poly(amino acid) that recognizes microenvironment of skin for healthy growth of skin flora

Hiroyasu Takemoto

Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology

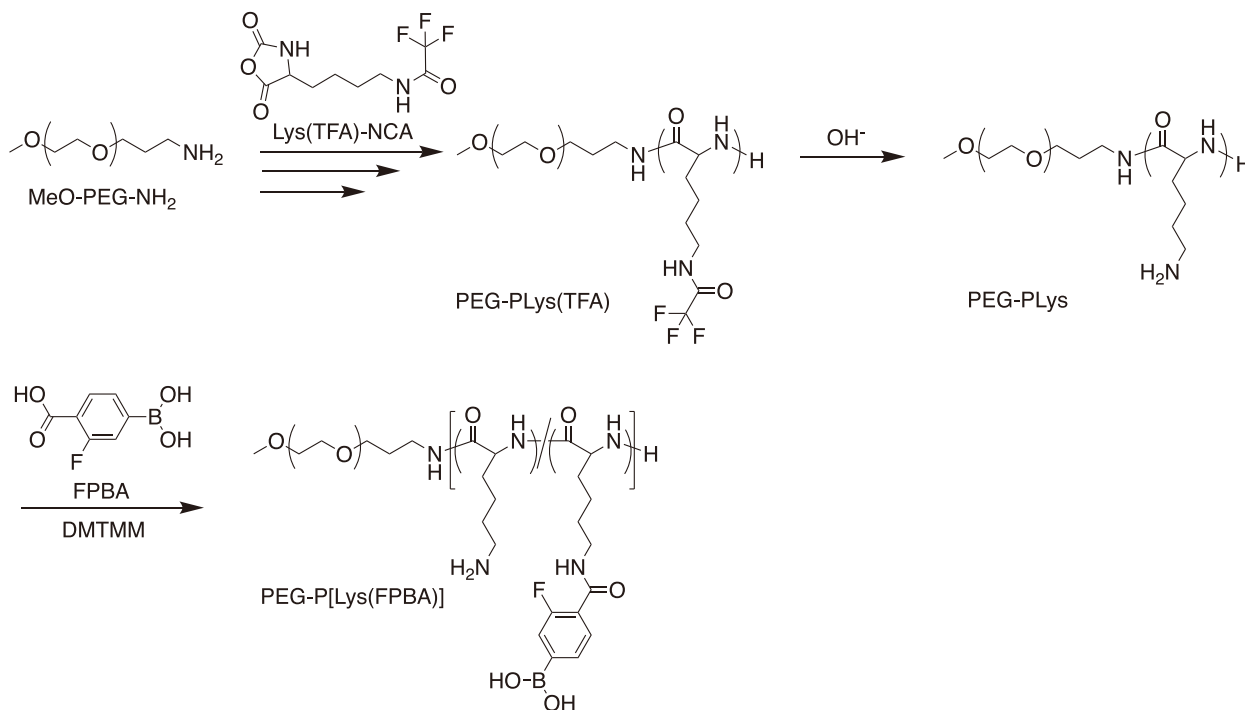


図2 高分子の合成スキーム

と Lys (TFA)-NCA とを DMSO 中で混合した。反応溶液は室温にて 3 日間攪拌し、ジエチルエーテルに対して再沈殿を行った。得られた PEG-P (Lys-TFA) はメタノール / 5M NaOH aq. (4/1, v/v) に再溶解し、室温にて一晩攪拌した。0.01 M HCl での透析、純水での透析の後に凍結乾燥を行い、PEG-PLys を白色粉末として得た。

PEG-PLys へのボロン酸の導入は脱水縮合反応にて実施した。PEG-PLys と FPBA、DMTMM を MeOH と 50mM 炭酸バッファの混合溶液 (1/1, v/v, pH 8.5) に溶解し、一晩攪拌した。反応溶液は 0.01 M HCl、純水にて透析した後に凍結乾燥を行うことで、PEG-P [Lys (FPBA)] を白色粉末として得た。

2. 2. 善玉菌を育成するための糖のスクリーニング

Staphylococcus epidermidis を培地にて培養する際、50 mM のグルコース、グルコサミン、スクロース、ラクトースを添加し、*Staphylococcus epidermidis* の増殖を観察した。*Staphylococcus epidermidis* の培養液中の量は 600 nm での濁度にて測定した。

2. 3. グルコース放出の pH 応答性

PEG-P (Lys-FPBA)₂₀ に対して 20 倍量のグルコースを混合し、50mM の酢酸バッファ (pH5.0) あるいはトリスバッファ (pH8.0) に対して透析した。定期的に外液を採取し、外液に含まれるグルコース量をグルコース定量キット (BioVision) にて測定した。

2. 4. 高分子に基づく善玉菌の増殖促進試験

PEG-P (Lys-FPBA)₄₉ に対してグルコースを 49 倍量混合し、*Staphylococcus epidermidis* を培地にて培養する際に添加した。この際、培地の pH を 5.0 あるいは 8.0 とした。定期的に培地中の *Staphylococcus epidermidis* 量を 600nm の濁度にて測定した。

3. 結果

3. 1. ポリアミノ酸誘導体の合成

PEG-PLys を ¹H NMR 解析すると、その PLys 鎖由来のプロトン強度から Lys 重合度は 40 のものと 100 のものの 2 種類の合成に成功した。続けて、PEG-P [Lys (FPBA)] とした後に ¹H NMR 解析すると、FPBA 由来のプロトン強度より、PLys 鎖への導入率はそれぞれ 50% であった。これ以上 FPBA 導入率を上げると水溶性が著しく低下するため、本研究ではこの導入率を採用した。結果として、PEG-P [Lys (FPBA)₄₉]₁₀₀ と PEG-P [Lys (FPBA)₂₀]₄₀ の 2 種類のポリアミノ酸誘導体の合成に成功した。

3. 2. 善玉菌を育成するための糖のスクリーニング

善玉菌を増殖するのに適した糖成分を選別するために、グルコース、グルコサミン、スクロース、ラクトースを添加した際の *Staphylococcus epidermidis* の増殖を評価した (図 3)。ここでは、*Staphylococcus epidermidis* の量を濁度にて測定している。糖の添加なしの系に比較して、グルコースを添加した系では顕著に *Staphylococcus epidermidis* の

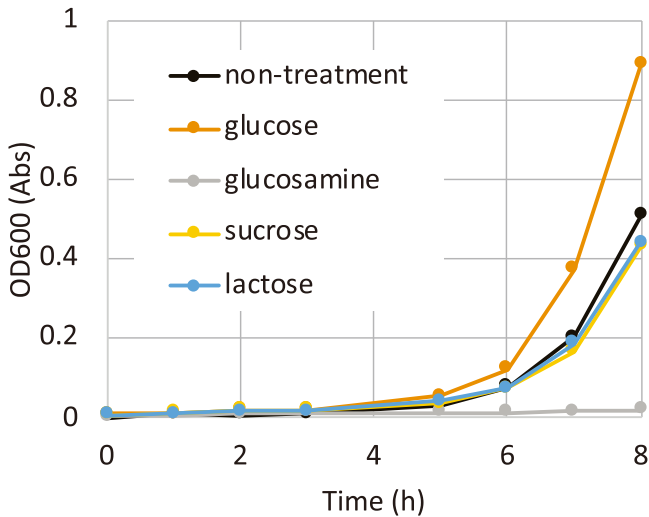


図3 糖を添加した際の*Staphylococcus epidermidis*の増殖

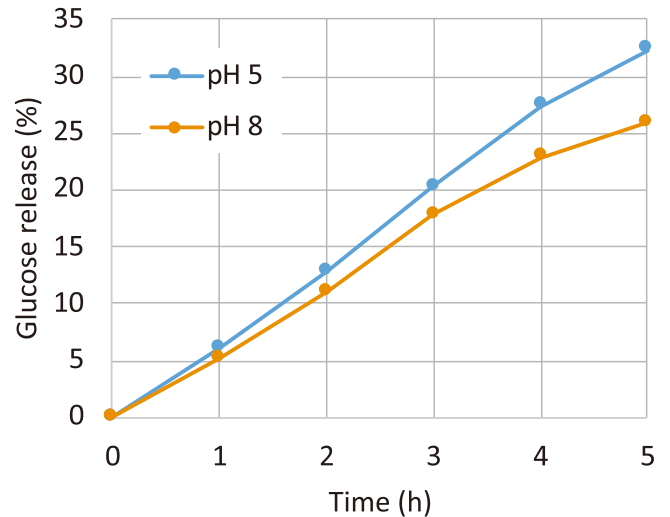


図4 開発したポリアミノ酸誘導体からのグルコース放出とpH応答性

増殖が促進されたことが示された。一方で、ラクトースやスクロースでは目立った増殖の促進はみられず、なおかつグルコサミンでは増殖の低下が確認された。このため、本研究ではポリアミノ酸誘導体に結合させる糖分子として、グルコースを選出した。

3. 3. グルコース放出のpH応答性

*Staphylococcus epidermidis*の増殖に適した糖としてグルコースを選定した。そこで、合成したポリアミノ酸誘導体とグルコースとを混合し、会合体調製をした後に、pH5およびpH8でのグルコース放出能を評価した(図4)。pH8で処理した系においては、5時間後に25%程度のグルコース放出が観察されたのに対し、pH5で処理した系においては33%程度のグルコース放出が観察された。このことから、開発した系において、善玉菌育成環境に適したpHにおいて、グルコース放出の加速が確認された。

3. 4. 高分子に基づく善玉菌の増殖促進試験

善玉菌育成環境下において、開発したポリアミノ酸誘導体がグルコースの放出を加速させることが確認されていた。次に、実際に*Staphylococcus epidermidis*を培養する際、開発したポリアミノ酸誘導体を添加して増殖速度を評価した。ここでは、培養する際のpHも5と8に設定した(図5)。pH8においては、開発したポリアミノ酸誘導体の添加に関わらず、2時間後に増殖をみせたものの、それ以降は目立った増殖を誘導しなかった。一方で、pH5においては、pH8の系に比較して培養液中の*Staphylococcus epidermidis*の増殖が顕著であり、その増殖はポリアミノ酸誘導体の添加によってさらに加速された。特に、8時間後では相対的な*Staphylococcus epidermidis*の数は6%ほど増大していた。

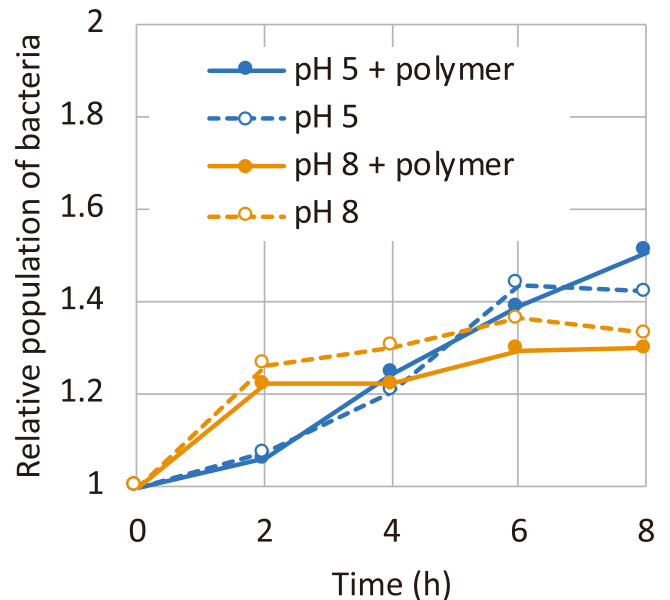


図5 開発したポリアミノ酸誘導体を用いた善玉菌増殖とpH応答性

4. 考察

本研究では、善玉菌環境選択的に栄養物質を放出し、その育成を促進する高分子材料の開発を行った(図1)。善玉菌は弱酸性環境が育成に適するため、弱酸性pHに依存して栄養物質(糖)を放出する分子設計が必要となる。これに関し、本研究ではボロン酸エステル結合に着目した。ボロン酸は糖の有するジオール結合とボロン酸エステル結合を容易に形成するが、それはpH7以下の弱酸性環境下にて開裂が促進される。一方で、悪玉菌環境である弱塩基性pHでは糖分子の放出が抑制されるため、悪玉菌の増殖へは寄与しないことが期待される。高分子の合成から糖分子の選定、糖分子の放出挙動の評価、善玉菌の一つである

*Staphylococcus epidermidis*を用いた増殖評価等を介して、善玉菌フローラの育成における一つの方法論を提唱する。

糖分子を担持する高分子としては、ポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸のブロック共重合体を選択した。ポリエチレングリコールは化粧品に汎用されるバイオマテリアルであり²⁾、そしてポリアミノ酸は生分解性・生体適合性に優れる⁴⁾。なかでも、ポリリシン(PLys)のように側鎖に反応性官能基を有するポリアミノ酸は種々の化学構造を導入可能である。まず、PEGを開始剤としてPEG-PLysを合成した。得られたPEG-PLysに対して脱水縮合反応を介してFPBA(ボロン酸)を導入した(図2)。FPBAは疎水性を有するが、PLys側鎖への導入率を約50%に調節することで、良好な水溶性を有するPEG-P[Lys(FPBA)]の取得に成功した。

得られたPEG-P[Lys(FPBA)]を用いて糖分子の担持体を作成する前に、善玉菌の育成を促進するための糖分子の選定を行った。図3に示すように、糖分子を処置していない群に比較してグルコースを添加した群では明らかな*Staphylococcus epidermidis*の増殖促進が観察された。そのため、本研究ではグルコースをPEG-P[Lys(FPBA)]へと担持させることにした。グルコース分子とボロン酸との反応性は広く知られており、すでにグルコースセンサー等への展開が行われている。そのため、FPBAとグルコースとの速やかなエステル形成反応かつpH依存的な脱離が期待される。

PEG-P[Lys(FPBA)]とグルコースとの会合体は、pH8に比較してpH5においてグルコース放出能が促進された(図4)。透析開始後5時間において、pH5では約30%多くのグルコースがpH8の系に比較して放出されており、弱酸性pHでのグルコース放出の促進が確認された。これに関し、放出は数十分~数時間をかけて徐々に進行したと推察される。実際に使用する際、数秒の時間単位でのグルコース放出は扱いづらいと予想されるが、比較的緩やかなグルコース放出は容易なハンドリングへ繋がると期待される。

最後に、開発したPEG-P[Lys(FPBA)]とグルコースとの会合体を用いて、善玉菌である*Staphylococcus epidermidis*の増殖を評価した。本研究の仮説通り、pH5にてPEG-P[Lys(FPBA)]とグルコースとの会合体を添加した群において最も*Staphylococcus epidermidis*の増殖が促進された。このことから、弱酸性条件下でグルコース放出を促進させる高分子を添加することで、善玉菌環境選択的なフローラ育成を

実現する可能性が示された。一方で、pH5においてPEG-P[Lys(FPBA)]とグルコースとの会合体を添加していない系と比較すると、*Staphylococcus epidermidis*の増殖促進は8時間後で6%程度であり、改善の余地が残されている。これに関し、PEG-P[Lys(FPBA)]とグルコースとの会合体の添加量や、会合体からのグルコース放出能等を最適化する必要があると言える。

肌フローラの状況は個人によって千差万別であり、それに応じて育成を促進すべき菌の種類・量も異なると予想される⁵⁾。本研究では善玉菌として*Staphylococcus epidermidis*を選定し、担持する糖分子としてグルコースを選択した。しかしながら、本研究にて開発されたシステムでは、今回スクリーニングしなかった他の糖も担持することができる。そのため、種々の糖分子を同時に担持し、個別の菌の育成に最適化した分子設計も可能であり、今後の展開として期待される。

謝 辞

本研究は、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の2019年度の研究助成を受けて行ったものである。同財団に心より感謝する。

(引用文献)

- 1) Y. Nodake, *et al.*, Pilot study on novel skin care method by augmentation with *Staphylococcus epidermidis*, an autologous skin microbe –A blinded randomized clinical trial. *J. Dermatol. Sci.*, **79**, 119-126 (2015).
- 2) K. Knop, *et al.*, Poly (ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 6288-6308 (2010).
- 3) G. Springsteen, *et al.*, A detailed examination of boronic acid-diol complexation. *Tetrahedron*, **58**, 5291-5300 (2002).
- 4) K. Miyata, *et al.*, Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2562-2574 (2012).
- 5) T. Iwase, *et al.*, *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization, *Nature.*, **465**, 346-349 (2010).