

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460225

研究課題名(和文)皮膚老化の進行過程を抑制するための抗酸化作用を有する物質の皮内送達法の探索

研究課題名(英文) Delivery to the skin of a substance having an antioxidant action to control the process of skin aging

研究代表者

鈴木 豊史 (SUZUKI, Toyofumi)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：20267115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、赤ワインに含まれる機能性ポリフェノールであるレスベラトロール(RES)に着目し、経皮送達性ならびに脳内移行性を検討した。RESの誘導体であるプテロスチルベン(PTE)とアセチルPTEを合成し、それらのメラニン産生抑制作用を検討した。RESの皮膚累積透過量は吸収促進剤である脂肪酸エステルC8の併用により、促進剤がない場合と比較して、約12倍増大した。C8は、RESの皮膚透過性を促進させるだけでなく、皮内送達も向上させる作用があることを明らかにした。また、RESと同様にPTEとアセチルPTEは、少なくともチロシナーゼ阻害活性阻害機構によりメラニン産生抑制作用を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study investigated transdermal delivery and permeability to the brain of resveratrol (RES), which is functional polyphenol contained in red wine. Pterostilbene and acetylpterostilbene were synthesized as a RES derivative, and they were evaluated for their inhibitory activities of melanogenesis in B16 mouse melanoma cells. The amount of accumulated penetrations of RES with the fatty ester C8 in 8 hours increased to the skin by about 12 times as compared with the case where there is no absorption enhancer. We demonstrated that C8 is not only to promote the skin permeability of RES as absorption enhancers, but to have the action which also raises the transportability in the skin simultaneously. Like RES, PTE and the acetyl PTE have melanogenesis inhibition and showed clearly that one of mechanism has tyrosinase activity inhibition.

研究分野：医療薬学

キーワード：レスベラトロール プテロスチルベン メラニン細胞 経皮吸収 アマンタジン

1. 研究開始当初の背景

美容や長寿をめざした内科的なアンチエイジング治療としてホルモン補充療法、抗酸化療法、キレート療法なども米国を中心にアンチエイジング医学として盛んに試みられている。胎盤エキス(プラセンタエキス)の注射は、チロシナーゼ活性阻害作用によってメラニンの生成を抑え、しみ、ソバカスを防ぐことから、皮膚の細胞そのものが加齢とともに減少してくる我々にとって皮膚の若々しさ(張り、ツヤ、弾性)に必要なアンチエイジング療法として注目されている。しかし、これらのいずれも臨床効果のエビデンスはまだ乏しいのが実状である。見た目のアンチエイジングと呼ばれる外科的なアンチエイジング治療は、その7割が後遺症に悩まされており、また最近、ヒト組織の成分や細胞などを使った再生医療の研究が進み、皮膚(培養皮膚、培養線維芽細胞によるシワ治療)がターゲットになっているが臨床研究が始まったばかりである。

本研究は、皮膚老化の進行を抑制するため、抗酸化作用を有する物質によるアンチエイジング効果を目指した皮内送達法を確立することを目的としている。活性酸素の働きは、体内のタンパク質、脂質、DNAなどを酸化させ、細胞やDNAが損傷し、老化が促進されたり、がんや心臓病といった病気になるリスクが高まったりする。このような活性酸素による細胞などへの攻撃を防ぐ効果を抗酸化物質は持っている。しかし、これらの物質をいかにして皮内に送達させるか、非侵襲的に効率よく、しかも安全性の高い手法はこれまでに確立されていない。本研究は難水溶性の抗酸化物質について、皮内送達の可能性を明らかにし、皮膚老化の遅延の可能性を追求するものである。

2. 研究の目的

(1) シミなど肌が黒くなる理由として、「メラニンの生成」があり、メラニンはチロシンから生成される。その生成過程にチロシナーゼという酵素が関わっている。多くの美白化粧品はこのチロシナーゼを阻害することにより美白作用を示す。しかしながら、美白作用が強すぎてしまうと、肌がただらに白くなる白斑を起こしてしまう危険がある。2013年5月カネボウのロドデノール配合美白化粧品による白斑が問題となり、白斑症状を訴える人は1万人を超えた。その被害の大きさから、アンチエイジングの中でも美白ニーズが高いことがうかがえ、安全性の高い美白剤が求められている。そこで本研究では、赤ワインに含まれる機能性ポリフェノールであるレスベラトロール(RES)に着目し、経皮送達性ならびに脳内移行性について検討した。

(2) プテロスチルベン(PTE)はレスベラトロール(RES)のジメチル化誘導体であり、それらの構造的な類似性にもかかわらず、

PTE(80%)はRES(20%)より高い生物学的利用能を有する¹⁾。PTEの抗酸化活性は、抗発がん性、神経疾患の変調、抗炎症、血管系疾患の減少、および糖尿病の改善などの予防や治療効果に関与することが、*in vivo*および*in vitro*モデルで報告されている²⁾。そこで本研究では、PTEの経皮吸収化に加えて、皮膚に対する抗酸化効果を目指して、RES誘導体であるPTEとアセチルPTEをそれぞれ合成し、それらのメラニン産生抑制作用を比較検討した。

3. 研究の方法

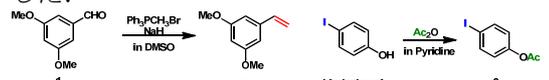
(1) フランツ型拡散セルにヘアレスマウス摘出皮膚を装着し、皮膚透過試験を行った。ヘアレスマウス摘出皮膚にResをミリスチン酸イソプロピル溶液に10%含有させ適用した。レシーバー区画には、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を7mL入れ、600rpmで攪拌した。透過試験開始後、2時間間隔で8時間までレシーバー区画から1mL採取し、0.45μmフィルターでろ過した。Resの定量にはHPLC法を用いた。

レスベラトロール(Res)の脳取り込み輸送は、マウス脳灌流法を用いて解析した。ペントバルビタール麻酔下、マウス総頸動脈にヘパリンを充填したカニューレ(SP10)を挿入した。³H-Res(1μCi/mL, 53nM)と¹⁴C-イヌリン(0.1μCi/mL)を含むKrebs-Henseleit Bufferの灌流液(pH7.4)を1mL/minの流速で灌流し、一定時間後に断頭した。摘出した脳を溶解剤に溶かした後、その組織中ならびに灌流液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

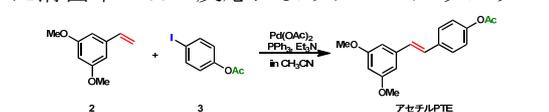
(2) RES誘導体であるPTEおよびアセチルPTEはともにスチルベン骨格を有するため、スチレン2とハロゲン化アリール3を溝呂木-Heck反応によるクロスカップリングで合成できると考えた。



スチレン2は市販されていないため、3,5-Dimethoxybenzaldehyde 1を出発原料としてWittig反応により合成した。また、ハロゲン化アリール3は4-Iodophenolを無水酢酸とピリジンを用いたアセチル化により合成した。

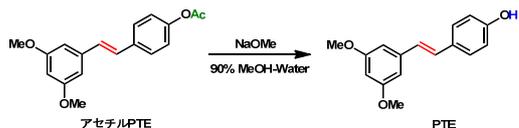


得られた2および3をPd(OAc)₂触媒を用いた溝呂木-Heck反応によりクロスカップリン



グし、アセチルPTEを良好な収率(52%)で得た。

また、アセチル PTE を加水分解することで PTE を合成し、これを用いて活性を評価した。



細胞内メラニン産生抑制は、マウス B16メラノーマ細胞 (1.0×10^5 cells) を用いて、細胞播種 24 時間後に各試料を添加 48 時間の効果を評価した。RES 誘導体による細胞毒性試験およびチロシナーゼ阻害活性試験を検討した。

4. 研究成果

(1) レスベラトロール (RES) の皮膚透過性を調査するため、その浸透性に及ぼす角質層の影響を検討した。ヘアレスマウス摘出皮膚の角質層を剥離した場合、角質層がある場合と比較して、試料処置後 8 時間後での RES の累積透過量は 10 倍に増加し、皮内滞留時間は 1/3 に短縮され (0.83 h)、透過速度は 10 倍 ($8.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) に増大した。この結果より、皮膚の最外層である角質層が RES の皮膚浸透の最大障壁であることがわかった。

角質層を介した RES の皮膚浸透性を向上させるため、各種吸収促進剤の効果を検討した。皮膚に試料処置後 8 時間での RES の累積透過量は脂肪酸エステル C8 の併用により、促進剤がない場合と比較して、約 12 倍に増加した。一方、生活習慣病を予防・改善するモノ不飽和脂肪酸のオレイン酸、天然のエキス精油成分リモネンにはそれぞれ吸収促進作用はなかった。また、環式モノテルペンのメントール、精油である成分ネロリドールはわずか 2 倍程度しかそれぞれ透過が促進しなかった。これらの結果から、皮膚角質層から RES を血液中まで経皮吸収させるためには、吸収促進剤として脂肪酸エステル C8 が有用であることが明らかになった。

RES の皮膚内蓄積性を明らかにするため、放射性標識体 ^3H -RES を用いて、各種吸収促進剤の併用による皮膚内蓄積率に及ぼす影響を検討した。皮膚に試料処置後 8 時間での RES の皮膚蓄積率は、適用した全量に対して脂肪酸エステル C8 で約 20%であり、そのときの累積透過量もほぼ同程度 (約 20%) であった。一方、上述したその他の吸収促進剤では、RES の皮内蓄積量および累積透過量とも促進剤がない場合と比較して変化がなかった。これらの結果から、脂肪酸エステル C8 は、吸収促進剤として RES の皮膚透過性を促進させるだけでなく、同時に皮膚内送達性も向上させる作用を有することが明らかになった。

RES が皮膚を透過し循環液中に到達した場合について、その脳への移行性についてマウス脳灌流法を用いて検討することから、既存の中樞作用薬と比較した。 ^3H -RES の脳内分布容積は、脳灌流の時間経過に伴い増加し、

少なくとも 120 秒までの灌流時間内であれば、血液側から脳側への一方向性の取り込みを追跡できることがわかった。RES の血液脳関門輸送には、排出トランスポーターである P-糖タンパク質の関与が示唆された。RES の構造類似体であるプテロスチルベンは P-糖タンパク質の阻害剤となる可能性が示唆された。 ^3H -RES の血液脳関門透過固有クリアランスは、アマタジン約 1.5 倍、アポモルヒネの約半分の値であることが明らかとなった。レスベラトロールの脳内移行性は、既存のパーキンソン病治療薬であるアマタジンやアポモルヒネと同程度であった。このことから、認知症などの予防効果を裏付ける手がかりになる可能性が期待された。

(2) 細胞内メラニン産生量は、 $50 \mu\text{M}$ のアルブチンおよび $1 \mu\text{M}$ のコウジ酸の添加により、それぞれ約 10% および約 25% 抑制された。ロドデノールは、細胞内メラニン産生を $1 \mu\text{M}$ から濃度依存的に抑制し、 $100 \mu\text{M}$ で約 30% の抑制効果が認められた。細胞内メラニン産生量は、 $50 \mu\text{M}$ の RES、RES 誘導体である $1 \mu\text{M}$ の PTE および $20 \mu\text{M}$ のアセチル PTE の添加により、それぞれ約 35%、約 30% および約 30% の抑制効果が認められた。

RES の脂溶性を高めた PTE とアセチル PTE は、RES に比べ、細胞内に移行しやすいため、より低濃度でメラニン産生抑制作用が発揮されると示唆された。RES は $75 \mu\text{M}$ までの濃度範囲において添加 48 時間後で細胞毒性が見られなかったのに対し、RES 誘導体である PTE およびアセチル PTE は $50 \mu\text{M}$ で有意な細胞毒性が認められた。

チロシナーゼ活性を阻害することが知られるアルブチン、コウジ酸およびロドデノールは、それぞれ濃度依存的なチロシナーゼ活性阻害作用を示した。RES、RES 誘導体である PTE およびアセチル PTE は、チロシナーゼ活性阻害作用を有することが明らかとなった。各物質 $2 \mu\text{M}$ の濃度においては、 $\text{PTE} > \text{アセチル PTE} > \text{RES}$ の順に活性阻害作用が強かった。

PTE と PTE 誘導体は、RES と同様にメラニン産生抑制作用を有しており、その機構の 1 つはチロシナーゼ活性阻害であることを明らかにした。PTE は RES に比べ、その脂溶性から細胞膜透過性に優れ、低濃度で皮膚に対して安全性の高いメラニン産生抑制作用を有することが示唆された。RES によるメラニン産生抑制作用はチロシナーゼ活性阻害だけでなく、色素細胞分化増殖制御因子 (MITF) やチロシナーゼ関連タンパク質 (TRP-1,2) も阻害することに起因している³⁾。PTE においても同様なメカニズムが関与している可能性も考えられ、ロドデノールで知られるチロシナーゼ分解促進などの作用も併せもつかもかもしれない⁴⁾。今後は、PTE による細胞内酸化活性も含めた PTE の有用性を明らかにして経皮吸収化を進めていく必要がある。

<引用文献>

- 1) Izet M. Kapetanovic, Miguel Muzzio, Zhihua Huang, Thomas N. Thompson, David L. McCormick, Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats, *Cancer Chemother Pharmacol*, 68: 593-601 (2011).
- 2) Denise McCormack and David McFadden, A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Hindawi Publishing Corporation (2013).
- 3) Taek Hwan Lee, Jae Ok Seo, So-Hyeon Baek and Sun Yeou Kim, Inhibitory Effects of Resveratrol on Melanin Synthesis in Ultraviolet B-Induced Pigmentation in Guinea Pig Skin, *Biomol Ther*, 22: 35-40 (2014).
- 4) Abe Y, Okamura K, Kawaguchi M, Hozumi Y, Aoki H, Kunisada T, Ito S, Wakamatsu K, Matsunaga K, Suzuki T, Rhododenol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin, *J Dermatol Sci*, 81: 35-43 (2016).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- 1) Toyofumi Suzuki, Takahiko Aoyama, Naoto Suzuki, Masaru Kobayashi, Toshiro Fukami, Yoshiaki Matsumoto and Kazuo Tomono, Involvement of a Proton-Coupled Organic Cation Antiporter in the Blood-Brain Barrier Transport of Amantadine, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, in press, 2016 (査読有). DOI: 10.1002/bdd.2014.
- 2) Toyofumi Suzuki, Toshiro Fukami, and Kazuo Tomono, Possible Involvement of Cationic-Drug Sensitive Transport Systems in the Blood-to-Brain Influx and Brain-to-Blood Efflux of Amantadine across the Blood-Brain Barrier, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 36, 126-137, 2015 (査読有). DOI: 10.1002/bdd.1926.
- 3) Takayuki Furuishi, Yukiko Kato, Toshiro Fukami, Toyofumi Suzuki, Tomohiro Endo, Hiromasa Nagase, Haruhisa Ueda, Kazuo Tomono, Effect of terpenes on the skin permeation of lomerizine dihydrochloride, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 16, 551-563, 2013 (査読有). DOI: なし.

[学会発表] (計7件)

- 1) 鈴木 豊史, 三浦 基文, 高松 健人, 鈴木 直人, 本橋 重康, 伴野 和夫, プテロステルベンによるマウスメラノーマ細胞の

メラニン産生抑制, 日本薬学会第136年会, 2016年3月26日~2016年3月29日, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜).

- 2) 唐 彩華, 満元 愛彩美, 鈴木 豊史, 大橋 由紀, 鈴木 直人, 山本 佳久, 深水 啓朗, 伴野 和夫, ケトプロフェン含有テープ剤の皮膚透過性と使用期限の影響, 第59回日本薬学会関東支部大会, 2015年9月12日, 日本大学薬学部 (千葉・船橋).
- 3) 高松 健人, 鈴木 豊史, 坂本 光咲, 中村 知子, 三浦 基文, 鈴木 直人, 本橋 重康, 深水 啓朗, 伴野 和夫, レスベラトロール誘導体によるメラニン産生抑制とチロシナーゼ阻害活性, 第59回日本薬学会関東支部大会, 2015年9月12日, 日本大学薬学部 (千葉・船橋).
- 4) 深水 啓朗, 瀧波 磨理江, 久田 浩史, 大橋 由紀, 鈴木 豊史, 伴野 和夫, ケトプロフェン含有テープ剤の膏体部における主薬の分子状態に関する研究, 日本薬学会第135年会, 2015年3月26日~2015年3月28日, 神戸サンボーホール (兵庫・神戸).
- 5) 伊藤 主馬, 古石 誉之, 鈴木 豊史, 深水 啓朗, 長瀬 弘昌, 上田 晴久, 伴野 和夫, インドメタシンとリドカイン複合体の溶解度と経皮及び経口投与の検討, 第58回日本薬学会関東支部大会, 2014年10月4日, 昭和薬科大学 (東京・町田).
- 6) 鈴木 豊史, 青山 隆彦, 深水 啓朗, 松本 宜明, 伴野 和夫, アマンタジンの血液脳関門輸送における H^+ /カチオン交換輸送体の関与, 2014年5月22日~2014年5月24日, 埼玉ソニックシティ (埼玉・さいたま).
- 7) 鈴木 豊史, 生体内組織移行の視点からレスベラトロールの有用性を探る, サプリメント医療薬学研究会 2013年度勉強会 (招待講演), 2013年11月30日, 千葉市生涯学習センター (千葉・千葉).

[その他]

ホームページ等

皮膚の老化を遅らせることは可能か?!

—健康な皮膚を, 若々しく持続する手がかりを探る—

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/page-2182.html>

日本大学薬学部ホームページ・薬学の研究・科学研究費補助金ケーススタディ 22

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 豊史 (SUZUKI, Toyofumi)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号: 20267115