

角層細胞間脂質の組成制御による 膜透過性ペプチドの経皮吸収に関する研究

千葉科学大学薬学部生命薬科学科

坂本 一民

Skin is the largest organ in the body as a barrier to protect life from environment. Key element of the skin barrier function relies on the structure and function of Stratum Corneum Intercellular Lipids (SCLP). Impairment of SCLP in composition or structure and function causes malfunction of skin or even diseases such as Atopic dermatitis. On the other hand, controlled temporal perturbation of skin barrier function could lead desirable Trans Dermal Drug Delivery System (TDDS).

The objective of this study is to establish a novel method for the Percutaneous Absorption of Cell Penetrating Peptide (or Protein Transduction Domain : PTD) in Relation to the SCLP as an ideal TDDS. Key feature of this TDDS is the combination of SCLP composition and PTD's ability of non invasive membrane penetration. Based on the altered ratio of sphingosine (So) and sphinganine (Sa), which increases from normal to atopic skin condition, model SCLP mixtures are composed and evaluated in terms of barrier function and physicochemical properties.

Atopic Skin (AS) model showed impaired barrier function for the release of Rhodamine- B (RhoB) encapsulated in the SCLP liposome, though there are no differences on the physicochemical properties between AS and Normal Skin (NS) or 3M (Basic SCLP composition without Sphingo lipids). This result, caused by the scares changes of structure and function of SCLP as a whole, indicates the possibility to control barrier function by means of changing SCLP composition.

PTD is a good candidate to combine SCLP composition with its non-harmful spontaneous penetration through the cell membrane. But little is known for its spontaneous translocation mechanism. We have investigated the effect of surface curvature of cell membrane by means of changing outer osmotic pressure. As a result, positive curvature change by decreasing Osmotic Pressure stimulated PTD penetration. Our proposition of the mechanism that PTD introduces local and temporal dynamic transformation of the membrane structure to mesh phase is thus confirmed. Combination of SCLP composition change and PTD application would lead us to create a novel and ideal TDDS.

1. 緒言

皮膚は身体最大の臓器であり、外部環境との境界を成していることから、経皮吸収型薬剤投与の有用性は十分認知されている。しかしながら、皮膚が生体と外界を隔て正常な生体機能を保護・維持する防御機関であるがゆえに、その構造と機能を損なわずに経皮的に薬剤を投与することは容易ではない。皮膚は、表面から表皮、真皮、皮下組織の三層からなり、表皮の最外相には角層と称される死んだ細胞の累積層が存在する。角層の細胞間隙にはセラミド、コレステロール、脂肪酸などの脂質を構成成分とした角層細胞間脂質膜 (SCLP; Stratum Corneum Intercellular Lipids 図1) が存在し、多重ラメラ層を形成することによって皮膚の主たるバリア機能を担っている。一般にSCLPを通るルートが薬物透過における主な経皮吸収経路と言われており、薬物はバリア壁として存在しているSCLPを透過しなければならない。このような堅固なSCLPを透過するため

に、通常イオントフォレシスやソノフォレシス、マイクロニードルといった物理的な構造破壊手段を用いて薬物の吸収促進が行われている¹⁾。これらの手法は、化粧品のように皮膚への作用が緩和である事を前提に万人が使用する製品では、頻回塗布 (使用) に対する安全性の保証やハンドリングの簡便性が実用上の難点である。

一方、バリア疾患病と言われるアトピー性皮膚炎 (Atopic Dermatitis : AD) の発症要因解析から角層の脂質組成がバリア機能の重要な因子であることが判明しつつあり、SCLPの組成とその構造及び機能の関係をj知することは、バリア性欠陥に起因する皮膚疾患の治療のための薬剤開発および健康性維持のための化粧品の製剤化において意義ある課題と考えられる。そこで、本研究はまず角層細胞間脂質膜 (SCLP)²⁾ のモデル組成リポソームを構築し、その自己組織体としての相挙動と形態変化を物理化学的手法で解析し、バリア性との関係を明らかにする事を試みた、次にその知見を基に膜透過性ペプチド (PTD)³⁾ を薬剤担体とし、生体に不快な負荷を与えず部位選択的かつ放出制御下に薬効成分を経皮的に投与する、新たな経皮DDSシステム (TDDS) を構築する事を目的に実施した⁴⁾ (図1)。

ADは湿疹の発生や皮膚の異常乾燥といった角層バリアの機能欠陥による皮膚疾患であるが、近年生命科学的視点からのAD患者及び健康者の比較研究で、SCLPにおけるセラミドの組成や種類が大きく関与している事が明らかに



Percutaneous Absorption of Cell Penetrating Peptide in Relation to the Lipid Composition of Stratum Corneum Intercellular Lipids

Kazutami Sakamoto

Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

されてきた。内田らはADモデルマウスの角層中のセラミドおよびスフィンゴ脂質含有量を分析した結果、セラミドの代謝物であるスフィンゴ脂質組成が健常マウスと異なることを明らかにし、ADにおけるバリア機能低下と関連するとの仮説を立てた⁵⁾。ここで明らかになった脂質全体のわずか4-6 mol % を構成するスフィンゴ脂質の組成変化とバリア機能に注目してモデルリポソームを構築し、SDSの作用による内包された蛍光標識物質の透過性を検討した結果、微量構成成分であるスフィンゴ脂質の組成がADにおけるバリア機能低下と相関する事を見出した⁵⁾。本研究はこれらの結果を踏まえ、スフィンゴ脂質の組成の違いが膜物性に影響を与えていると考え、これを透過機序解明に繋げることを目的にモデル組成の脂質膜に関する物理化学的な視点による解析を行った(図1)。

一方、人体における角層の役割と同様に細胞における生命維持の基本は細胞質(Cytosol)が細胞膜によって外界と隔てられ、物質の膜内外への移動の制御と細胞内での代謝が恒常的に調節されている事にある。ところが、近年チャネルやレセプターなどの関与なしに直接細胞内に透過する物質として、種々の膜透過性ペプチドドメイン(PTD)が

見出されてきた。これは、生体膜のバリア機能を超越する現象で、新たなDDSキャリアとしての期待から多くの研究がなされている。PTDは塩基性アミノ酸に富むペプチドでHIVウイルス由来のTATペプチド^{6,7)}やそのモデル物質としてのArgの8量体(R8)⁸⁾など多種の存在が知られている。PTDはそれ自身のみならず、タンパク質や種々の薬物さらにはリポソームなどを結合させても、さまざまな細胞膜を透過することが実証されているが、その機構についてはいまだに定説がない。PTDの膜透過方式には小胞体として内包化されるタイプの種々のEndocytosis(E透過)と、膜を越えて直接細胞質に移行するCytosolysis(C透過)が知られ(図2)、E透過では細胞内部でさらに細胞質(Cytosol)への移行を必要とする⁹⁾。一方、C透過は直接的な透過故にDDSキャリアとしてより有効である。

このような背景の下、筆者らは数年来経皮デリバリーに関わる研究を推進してきた^{2,10,11)}。本報ではこれらの研究を物理化学(界面科学)的視点から統合してSCLPの脂質組成による構造と機能の変化を理論的に解析・実証し、SCLPに対するPTDの透過性を随意に制御できるインテリジェント経皮薬物送達システム(DDS)開発の研究基盤

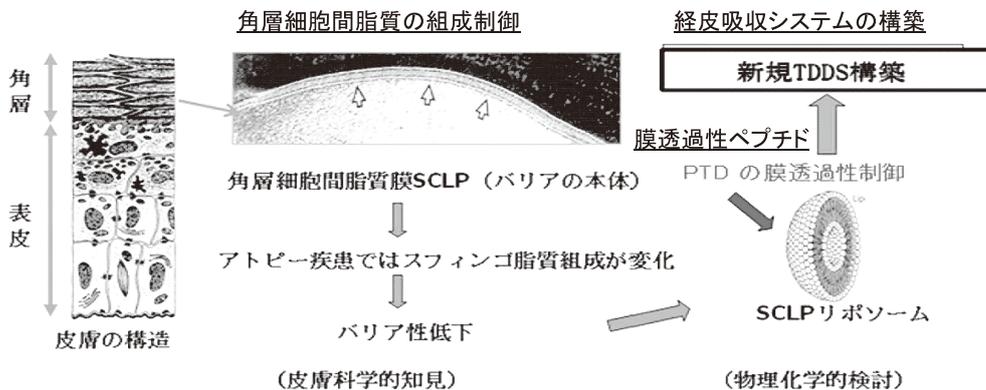


図1 角層細胞間脂質(SCLP)の組成制御による膜透過性ペプチド(PTD)の経皮吸収システムの構築

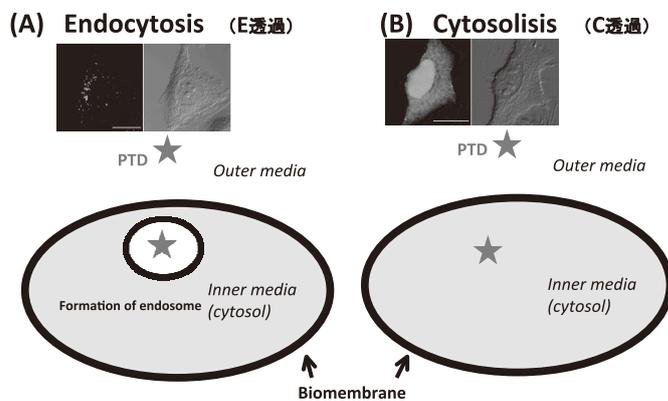


図2 PTDの膜透過機構

(A) : Endocytosis および (B) : Cytosolysis R8-Alexa to Hella Cell Futaki et al, PNAS, ACS Chem. Biol. 1 (5), 299-303 (2006)⁹⁾

確立を目指す(図1)。なお、本報告ではPTDについてはSCLPへの適用の前段階として、通常の生体膜成分であるリン脂質(PC)を用いた巨大リポソーム(GUV)に対する膜透過機構解明を行い、その理論を応用したPTDのSCLPへの適用は今後の課題とした。

2. 実験

2.1 SCLPの脂質組成による構造と機能の変化

試薬として角層細胞間脂質の主要成分であるセラミド2(Cer 2: Matrava製)、パルミチン酸(PA: 東京化成)、コレステロール(Chol: 和光純薬)、またセラミドの代謝関連物質であるスフィンガニン(Sa, D-erythro-dihydrosphingosine: Matrava)、スフィンゴシン(So, D-erythro-sphingosine: Matrava)を用

いた^{2,5)}(図3)。本研究では内田らが明らかにした脂質組成を用いたモデルリポソームを調製した(表1)。リポソームは各脂質をクロロホルムに溶解させ混合、N₂ガスにより乾燥させた後、溶媒完全留去のため遮光下で1日減圧乾燥を行い、PIPES緩衝液を加え80℃湯浴中でボルテックス攪拌と超音波照射により調製した。評価は偏光顕微鏡(PM)、示差走査熱量計(DSC)、小角X線散乱(SAXS)、全反射フーリエ変換赤外分光法(ATR-FTIR)、蛍光異方性測定を用いて行った(図4)。

2.2 PTDのPCのリポソーム膜(GUV)透過性

リン脂質として卵黄レシチン(E-PC)を用いた。膜透過ペプチド(PTD)はアルギニン8個のオリゴマーであるR₈

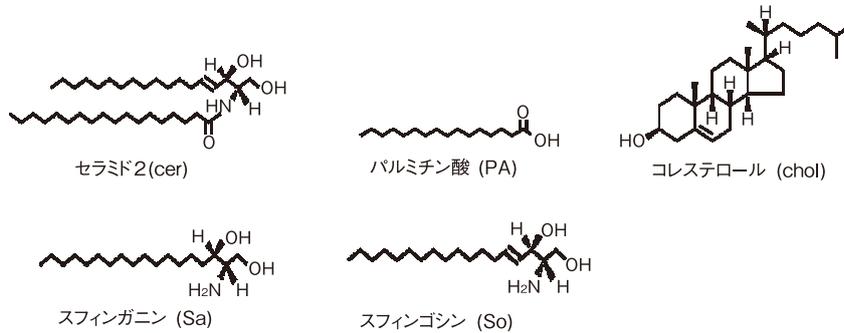


図3 モデルSCLP構成に用いた試薬

表1 SCLP混合モデルの脂質組成

	脂質組成 (モル比)					
	Cer 2	Chol	PA	So	Sa	So/Sa
NS (Normal skin model)	11.9	33.0	50.6	3.80	0.700	5.43
AS (Abnormal skin model)	11.7	32.4	49.8	5.70	0.400	14.3
3M (3 components)	12.5	34.5	53.0	—	—	—

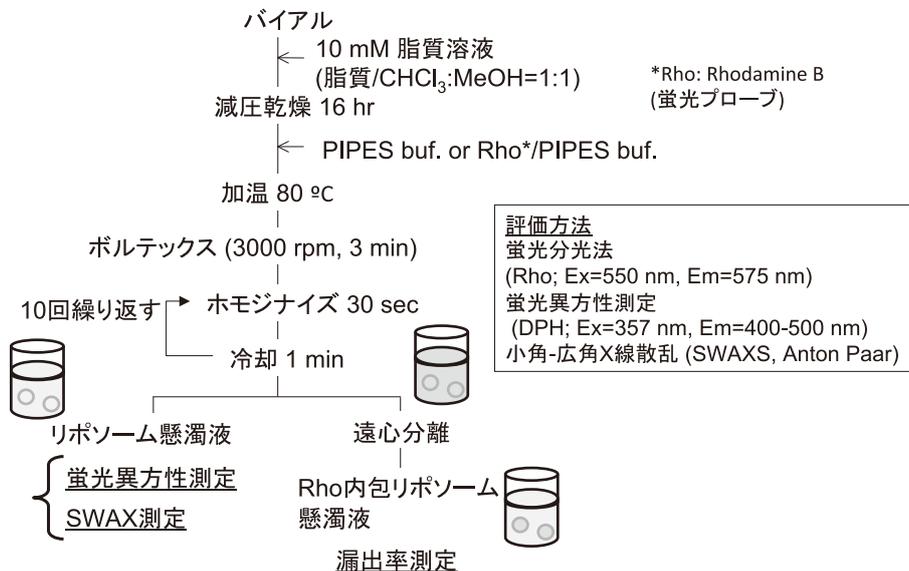


図4 モデルSCLPリポソームの調製法とその評価法

に、蛍光標識としてフルオレセインイソチオシアナート (FITC) を付加したFITC-R₈を用いた (図5)。GUVは定法で調製し (図6)、外相水の浸透圧はリン酸緩衝液 (PBS) 濃度で調製した (表2)。透過量測定にあたり、超遠心によって沈殿させたりポソームのGUV膜を破壊して、内包

していた蛍光物質を漏出させるためにTriton X-100を用いた (図7)。また、PTDのGUVへの透過性実験の際のE-PC膜の安定性は、予めGUVに内包させたローダミンB (RhoB) の漏出から判定した。

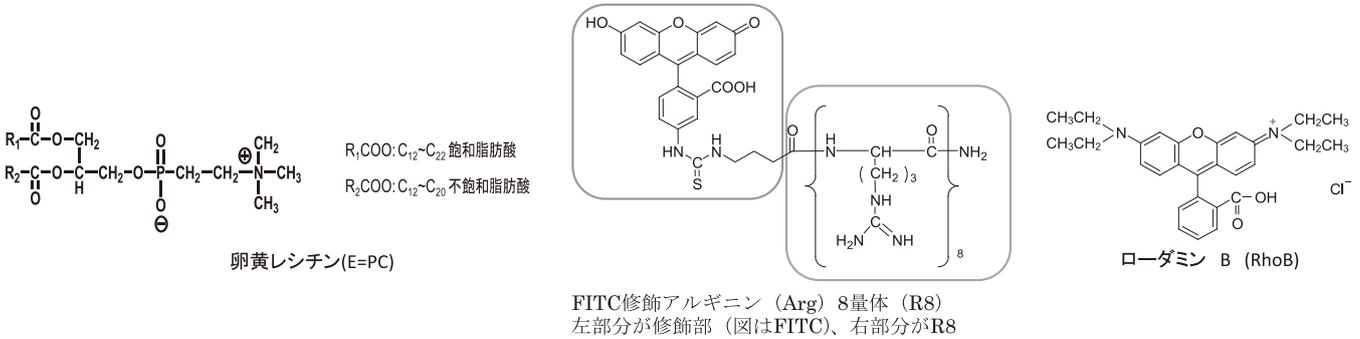


図5 PTDの膜透過機構解明に用いた試薬

表2 PTD 透過性試験における PBS 濃度と浸透圧

浸透圧 (mOsm)	PBS 濃度 (%)				
	5	10	20	30	40
	14	28	56	84	112

← 低張液 等張液 高張液 →

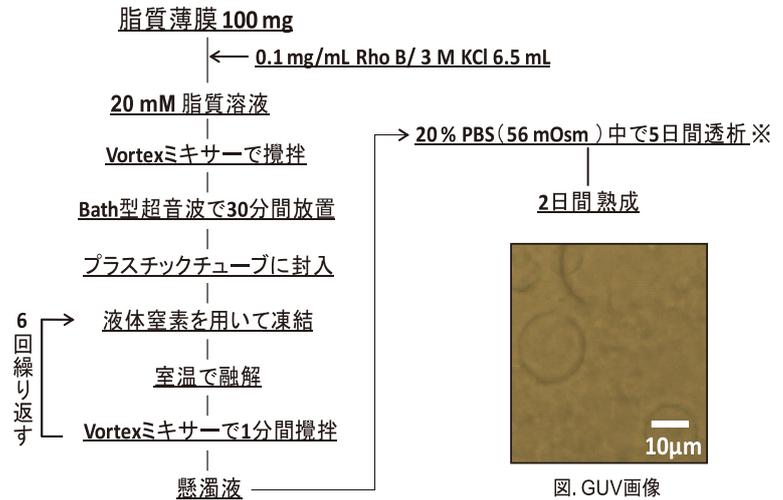


図6 GUVの調製法

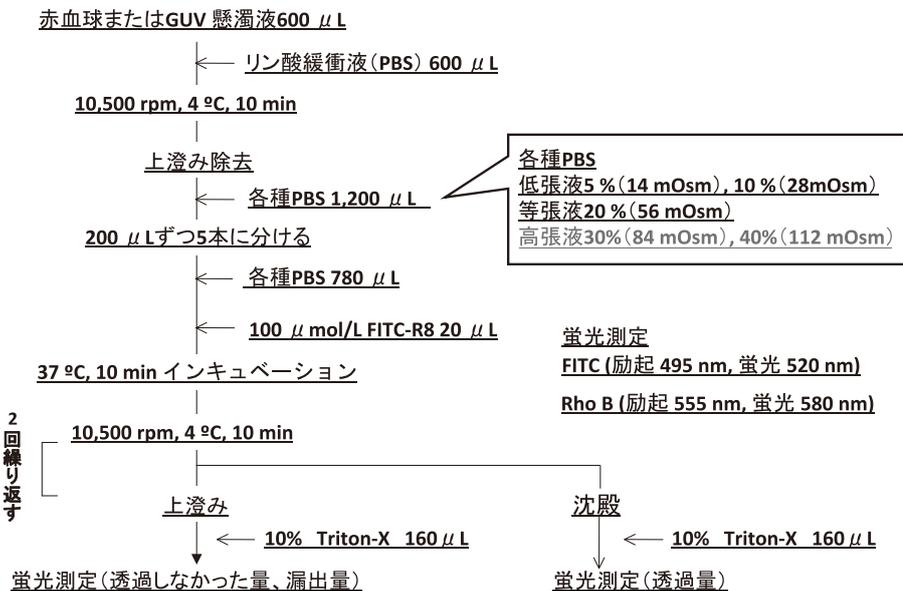


図7 PTDの膜透過性試験法

3. 結果と考察

3.1 微量スフィンゴ脂質の組成による SCLP の構造と機能の変化

表 1 に示す各組成のモデル脂質混合物 (3M, NS, AS) から生成したリポソームの FF-TEM 像およびこれらのリポソームに内包させた Rho B の漏出性を図 8 に示した。図 8 から明らかのように、3M および NS (正常) に比べ、AD モデルマウスの脂質分析結果に基づく AS は顕著な漏出が認められ、内田らの SDS を用いた結果と一致する微小なスフィンゴ脂質比に起因するバリア性の低下が確認された。

次にこれらモデル組成の物理化学的性質を調べた²⁾。3 つの SCLP モデル組成の結果を代表する NS の偏光顕微鏡 (PM) 観察結果を図 9 に、DSC 測定結果を図 10 に示す。これらの測定は 1 °C /min、25 °C ~ 120 °C の温度プログラムで実施した。パルミチン酸由来と示唆される昇温における DSC の吸熱ピーク前後の温度領域では固体から液晶及び液体の共存状態への変化が見られ、降温における二つの発熱ピーク間の温度領域では液体状態のサンプル中にマルチゼクロスが形成が見られた。これらの結果より偏光顕微鏡画像と DSC との相関が確認され、脂質混合物は局所相分離を引き起こしていることが明らかとなった。また昇

温過程においてスフィンゴ脂質添加系の NS、AS では 3M と異なる局所液晶組織像発現を確認したが、組成の相違に基づく明確な液晶発現温度や構造の違いは確認されなかった。

3 つの組成に関する SAXS 測定結果を図 11 に、NS における SAXS 測定の温度依存性を図 12 に示す。図 11 より SAXS 測定において、スフィンゴ脂質添加系である NS、AS のプロファイルはほぼ一致した。各サンプルの小角領域にラメラ相形成を示すピークが確認されたが、3M ではラメラ相の 1 次ピークにスフィンゴ脂質添加系との違いが認められた。広角領域では各サンプルにおいて、ヘキサゴナル側方充填を示す $q=17\text{nm}^{-1}$ (○) のピークと、斜方晶側方充填を示す $q=17\text{nm}^{-1}$ (○) 及び 15nm^{-1} (●) のピーク²⁾ が認められた。

また、各サンプルとも温度上昇に伴うラメラ相を示すピークの位置及び形状変化が認められ、温度上昇により脂質の充填が緩み液晶状態となったことが示唆された (NS のみ図 12 に表示、AS、3M は省略)。これは偏光顕微鏡観察の結果 (図 9) と相関するものである。ATR-FTIR 測定からアシル鎖のメチレン基に由来する CH_2 伸縮振動によって側方充填のコホメーションの秩序を知ることができる。また、 CH_2 はさみ振動によりヘキサゴナル側方充填な

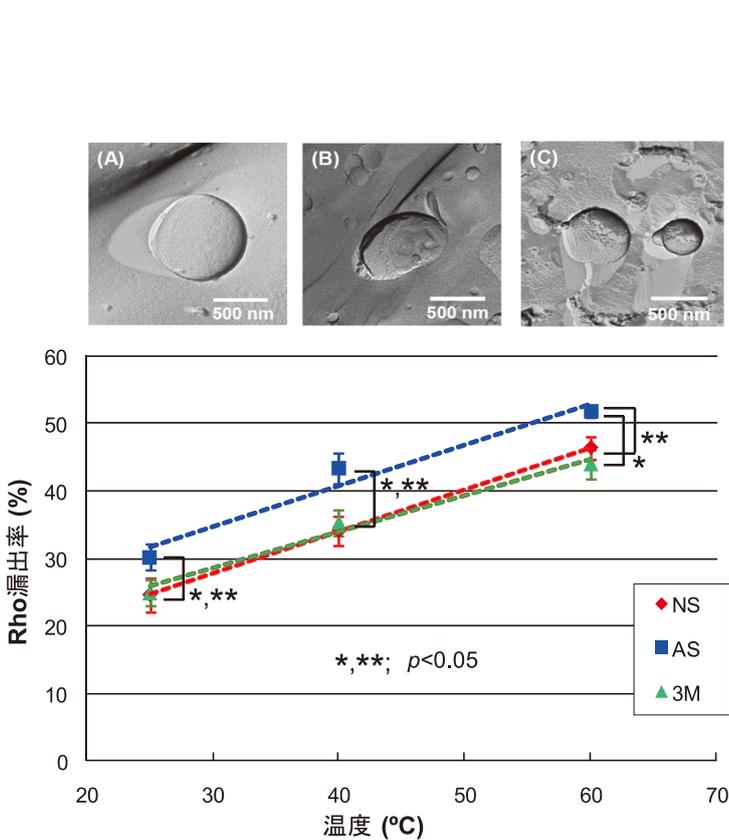


図 8 各モデルリポソームの FF-TEM 像 (A) : NS、(B) : AS、(C) : 3M およびリポソームからの RhoB 漏出率 (3 時間後)

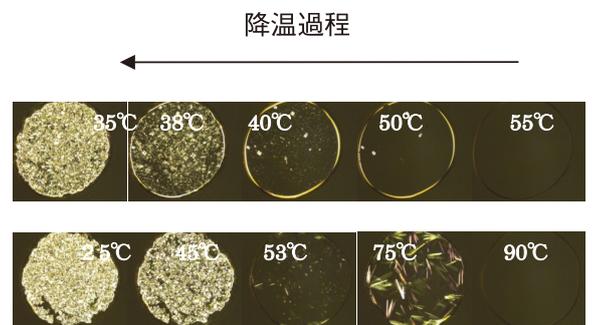


図 9 SCLP 混合物の偏光顕微鏡 (PM) 観察結果 (NS モデル組成)

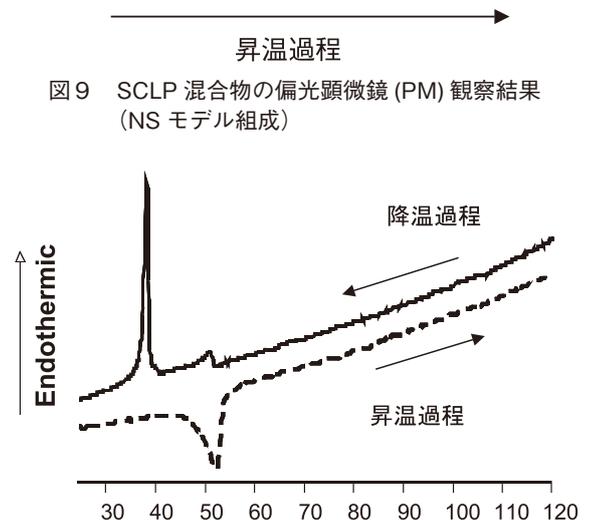


図 10 SCLP 混合物の DSC 測定結果 (NS モデル組成)

らシングレット、斜方晶側方充填ならダブルットとなることも知られている。しかしながら各組成ともこれらのピークの強度や形に差異は認められなかった。(データ省略)

3つの組成に関する蛍光異方性測定結果を(図13)に示す。DPHを蛍光プローブとして用いた蛍光異方性の温度依存性を各組成サンプルについて比較検討した。その結果、図13に示すように3組成とも同様の温度依存性を示した。

以上の結果、リポソームからの溶出試験ではADにおけるスフィンゴ脂質の微小組成変化に対応するモデルでバリア性低下を再現したが、物理化学的手法での構造及び機能解析では3つのモデル間に差異を認めることはできなかった。これは系全体を平均化して測定判別するDSCやSAXSでは組成間の顕著な相違は見られない、すなわち脂質組成により脂質膜全体の構造変化は起こらないが、PM観察で

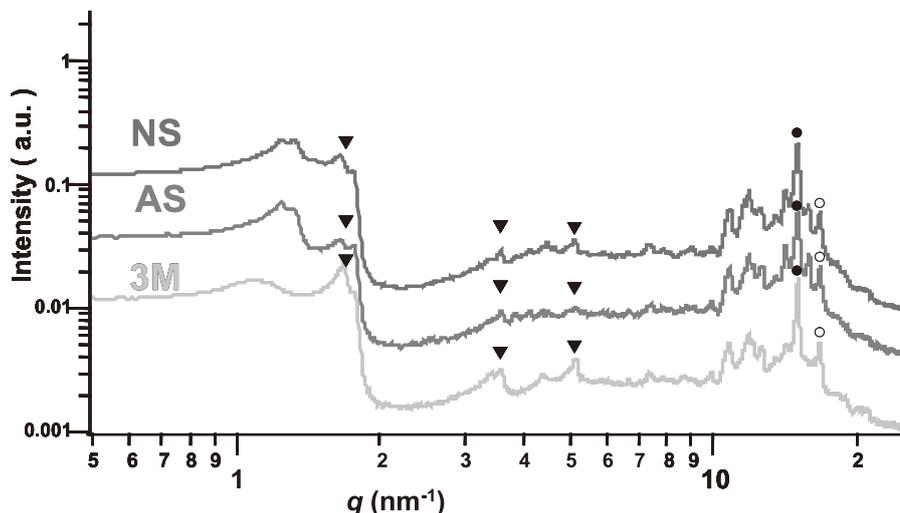


図 11 SCLP モデル組成の SAXS 測定における組成依存性 (25°C)

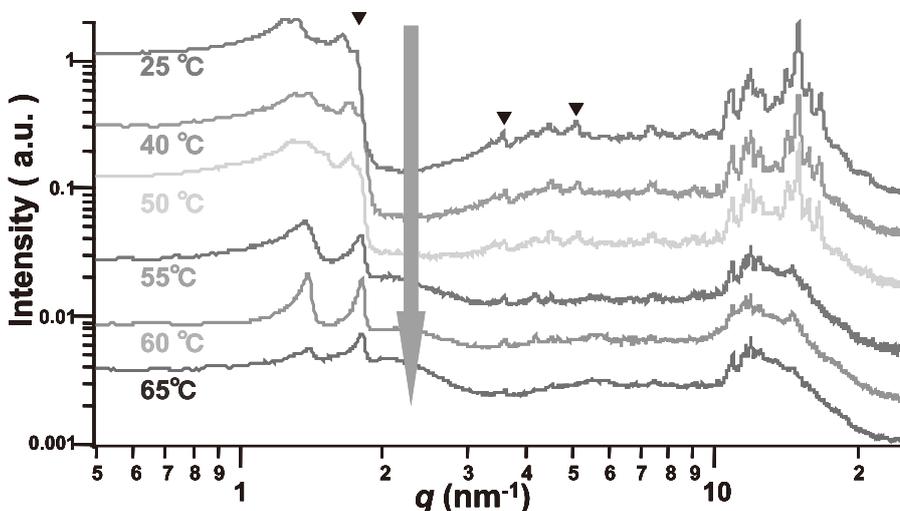


図 12 SCLP モデル組成の SAXS 測定における温度依存性 (NS モデル組成)

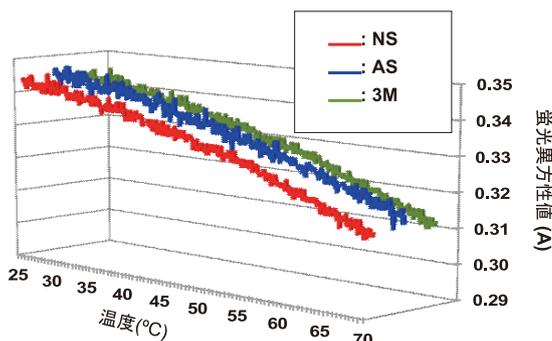


図 13 蛍光異方性測定結果 (蛍光プローブ ; DPH)

示唆されたように局所的な充填密度の不均一さといった微小領域での膜物性変化が生じ、これによりADにおけるバリア性低下が生じているものと推定される。

以上の結果をもとに、現在表1のスフィンゴ脂質の組成比 (So/Sa) を一定に保ちながら全体に占める割合を表1の約5%から段階的に増加することによるバリア性および物理化学的性質への影響を継続検討している。その結果、スフィンゴ脂質の増加に伴っていずれの組成においてもリポソームのバリア性低下が観測され、さらにSAXSや蛍光異方性において温度に依存した構造と機能変化 (温度の上昇で脂質の配向性・運動性が顕著に変化する) も認められている。これはバリア性低下の原因である表1のモデル組成における局所的不均一性 (マイクロドメイン生成) が、スフィンゴ脂質の添加量増加で系全体に影響を示した為と考えられる。他方で、筆者らは角層細胞間脂質膜 (SCLP) の配向構造と運動性がバリア性の鍵である事を電子スピン共鳴法 (ESR) で明らかにしている^{10,11)}。これらの知見を集積し解析することによって、スフィンゴ脂質の役割更には

その組成と添加量を変えることによるSCLPのバリア性の制御あるいは改善の可能性を示唆するものと期待される。

3.2 リポソーム膜 (GUV) を生体膜モデルとしたPTDの透過機構の検討

緒言で述べた通り、PTDの膜透過方式には膜を越えて直接細胞質に移行するCytosolysis (C透過) と、小胞体として内包化される種々のEndocytosis (E透過) とが知られ (図14)、E透過では細胞内部でさらに細胞質 (Cytosol) への移行を必要とするため、直接的な透過であるC透過がDDSキャリアとしてより有効である。E透過については種々の機構が提唱され、PTDの透過にも温度変化や受容体の影響が確認されているが、C透過を説明する機構は確立されていない。

我々は先にPTDをリン脂質系ラメラ液晶に添加すると平衡状態での液晶構造が添加量増加とともに臨界充填因子 (CPP: Critical Packing Parameter)¹²⁾ が減少する結果、界面の曲率が增大する方向、すなわちラメラ液晶 (L_{α} 相)

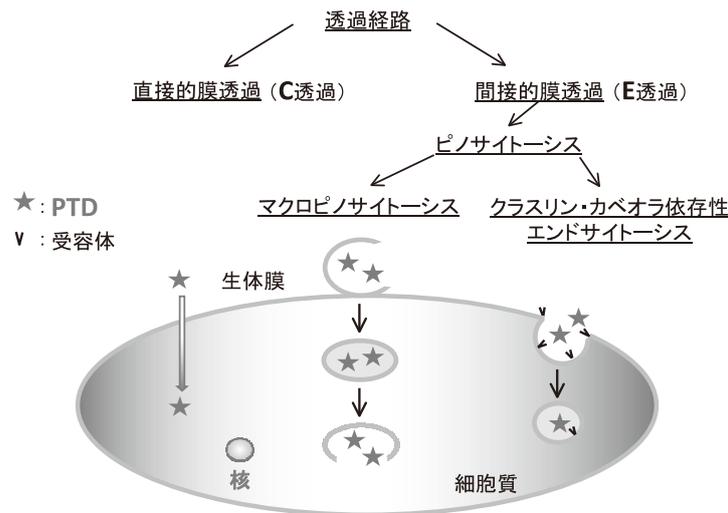


図14 PTDの透過機構

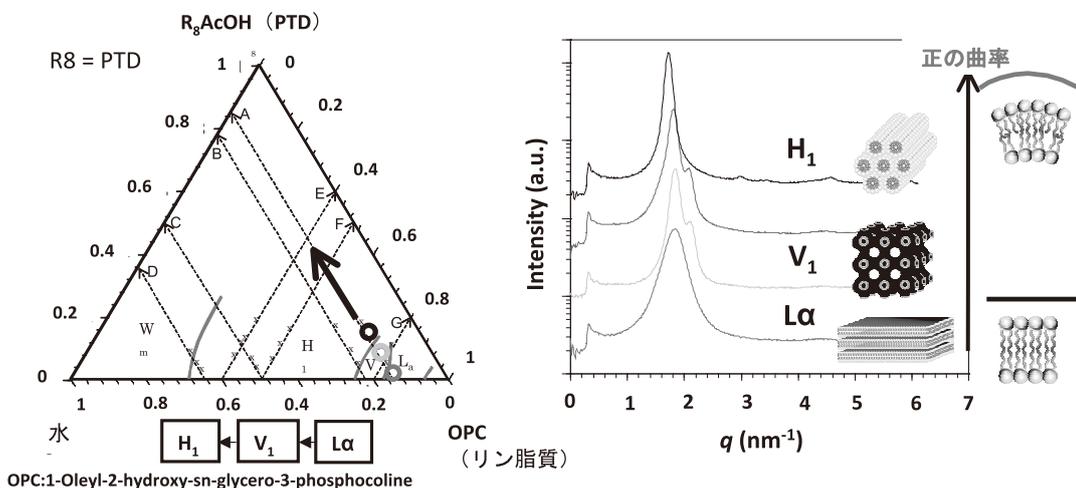


図15 平衡系でのリン脂質が形成する自己組織体のPTD ($R_8\text{AcOH}$) 添加による構造転移

から両連続液晶 (V₁相) 次いでヘキサゴナル液晶 (H₁相) へと変化する事を示した (図15)。L_α相とV₁相の間にはメッシュ液晶 (M₁相) の存在が知られており¹³⁾、L_α相からM₁相への転移エネルギーは極めて少ない事から、生体膜表面とPTDの相互作用によって局所的かつ一時的な動的变化として界面曲率の増大によりM₁相が生じればC透過が起こりうると考え、界面曲率の調整によるPTDの透過性制御法を提案した¹⁴⁾ (図16)。すなわち強いカチオンであるPTD (R8) がバルクから生体膜を構成するPCのリン酸基との相互作用で膜表面に吸着し、その結果液晶状態にあって流動性を持ち、配向性にゆらぎのあるPC分子が局所的・非平衡的にメッシュ相を形成し内相へと移動する。透過したPTDは細胞質 (Cytosol) に溶解した状態すなわ

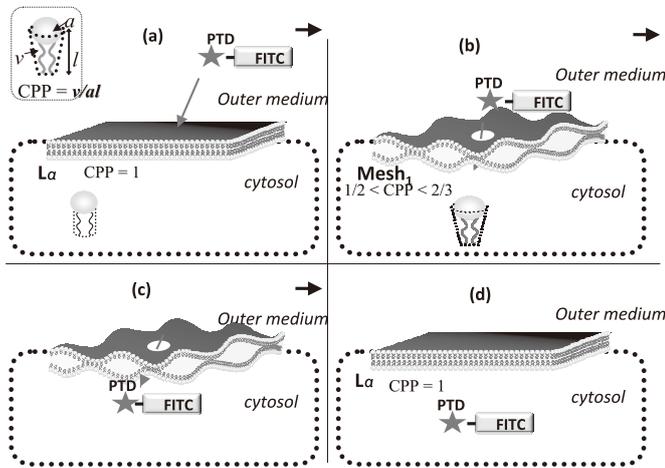


図16 PTDの膜透過機構

(a) PTDの膜表面吸着、(b) 細孔形成 (メッシュ構造への転移)、(c) PTDの膜透過、(d) PTDの膜 (リポソーム) 内移行 (R₈AcOH) 添加による構造転移

ちC透過が実現する。一方細胞質内のPTDは内相のPC表面に吸着しても曲率が負の方向である為、逆向きのプロセスでの外相への漏出は抑制されるので、効率的・効果的なC透過が達成されDDSとして有用なキャリアとして期待できる。

そこで、本研究ではこの仮説を証明する為に、赤血球およびGUVを用い、外相の浸透圧調整によってその界面曲率を変化させた時のPTDの透過性変化を調べた。赤血球を例に外相の浸透圧変化による形状および膜の曲率変化を図17に示した。この曲率制御にあわせてPTDの透過性を調べたところ、図18に示すように、いずれの場合も外相の浸透圧を下げ、膜の界面曲率を増大させると、PTDが脂質との相互作用により局所的に非平衡的にL_α相からM₁相

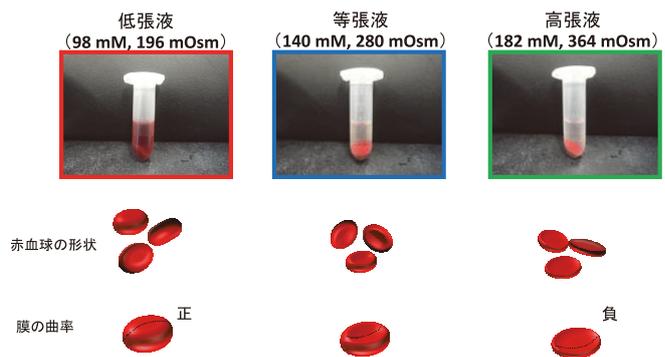


図17 外層浸透圧と赤血球の形状変化

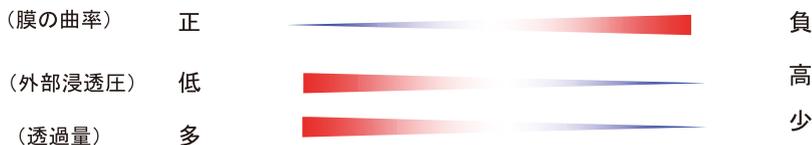
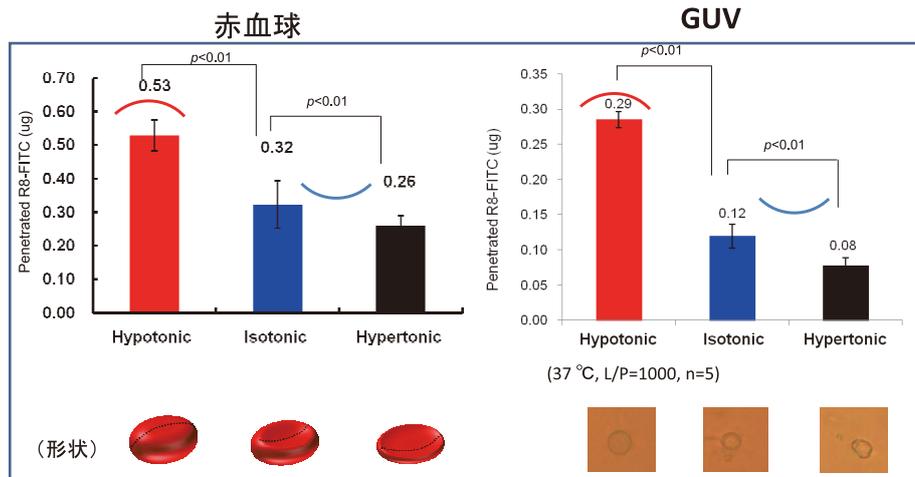


図18 PTDの膜透過性における外層浸透圧の影響

への相転移を起こしてC透過しやすくなる事を示した。これに対し、外相の浸透圧を上げ膜曲率を減少させると、PTDが透過するにはこれに抗して局所の膜曲率を増大させねばならない為、C透過が抑制された。GUVを用いたPTDの透過実験において、図19に示すようにPTDキャリアであるR8(アルギニンオリゴマー)の無い蛍光団(FITC)のみでは浸透圧によらず透過しない事、および予めGUVに内包させたRhoBは同じく浸透圧、更には外相のPTDの存在によらず漏出ししない事から、この透過実験の過程において、GUVを構成するE-PCからなる二分子膜のバリア性は維持されていた事実も上記の仮説をサポートする結果である。以上より、PTDがラメラ液晶状態(L_α相)にある生体膜を直接透過する機構を明らかにした¹⁵⁾。

4. まとめ

生体二分子膜の構造制御に基づくTDDS設計の新たな試みとして、PTDによる生体膜への直接膜透過(C透過)と言う生命にとっては本来抑制すべき現象(生体膜のバリア機能喪失)が起こる原因を、コロイド界面科学の観点からせまる学際的アプローチで検討した。その特徴は熱力学的に安定な平衡系では界面活性剤の幾何学構造(CPP)が自己組織体の曲率と全体構造を規定するとの考えを、生体膜とPTDとの相互作用による膜透過現象にあてはめた点

にある。すなわち、現象論の吟味とその応用が主なために見過ごされてきたPTDの膜透過が「何故おこるか」を、PTDと生体膜の相互作用による動的・局所的な自己組織体の構造変化の現象と捉えることで、生体膜の構造と機能の本質の探索を目指すことが可能になる。さらに、この成果に基づきC透過およびE透過の選択およびそれぞれの透過性を制御する方法の開発に着手し、TDDSへの発展につなげる。すなわち、SCLPの流動性に関する知見から経皮吸収を目的とした製剤には、膜の流動性を誘発する材料選定の必要性が認知されている。しかしながら、膜の流動性を誘起する物質は、一時的ではなく半永久的(平衡状態)に構造を変化させてしまう可能性がある。これはADのようなバリア疾患をもたらす原因ともなり、当然ながら皮膚のバリア機能にとって好ましい状態ではない。“一時的”というキーワードがこの点で重要と思われる。ここで、第二ステップであるPTDの一過的現象に着目する。PTDは膜の揺動(perturbation)を引き起こすが、それ自身膜に留まらず、内部へ浸透していく。プロドラッグとしてPTDに標的薬物を積載すれば、表皮ないし真皮、さらには皮下組織への薬物送達を達成できることが期待される。このようにPTDの曲率変化に基づいた経皮デリバリーシステムは皮膚本来のホメオスタシスを損なわず、薬物を皮内に届ける理想のデリバリーシステムと言える。

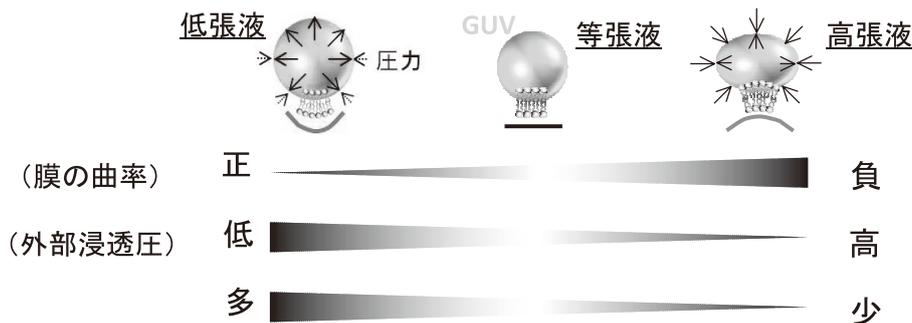
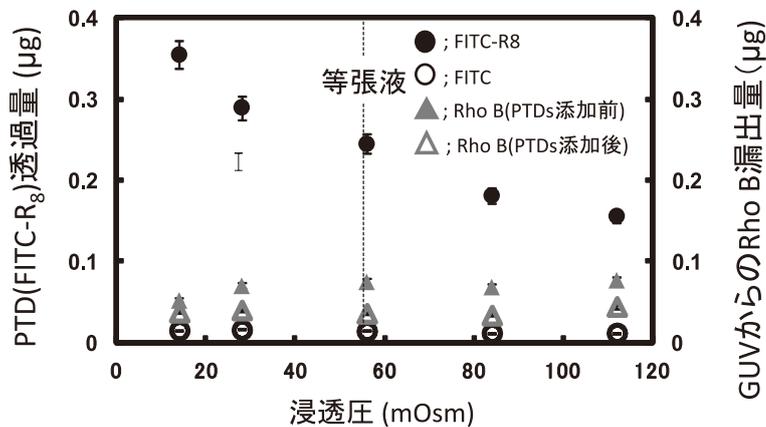


図19 Rho B内包GUVへのPTDの透過の浸透圧依存性

謝 辞

本研究は公益財団法人コスメトロジー研究振興財団の研究助成により達成できたものであり、特に千葉科学大学薬学部における製剤/化粧品科学研究室の実働体制確立の初期活動に大きな支えとなった事を報告し深謝申し上げます。また、本研究のデータは東京理科大学工学部阿部酒井研究室吉野佐江子修士および森下卓学士の研究によるもので、両氏ならびにその直接指導者である、油井研一博士に心より御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) P. M. Elias, *et al.*, *Semin. Dermatol.* **11**, 176 (1992)
- 2) K. Aburai, *et al.*, *J. Oleo Sci.* **60**, 197 (2011)
- 3) 膜透過性ペプチド (PTD) : Cell Penetrating Peptide から CPP と略称されることもあるが、本研究では界面活性物質の臨界充填因子 Critical Packing Parameter を CPP として議論するので、別名称である Protein Transduction Domain の略 (PTD) を用いた。
- 4) 山下裕司, 坂本一民, 千葉科学大学紀要, **6**, 105 (2013)
- 5) Loiseau, N.; Moradian, S.; Elias, P.M.; Holleran W.M. and Uchida, Y. *J. Invest. Dermatol.* **129**, S68 (2009)
- 6) A.D.Frankel, *et al.*, *Cell* **55**, 1189 (1988)
- 7) M.Green, *et al.*, *Cell* **55**, 1179 (1988)
- 8) S. Futaki, *Adv Rev Drug Deliv.* **57**, 547 (2005)
- 9) Futaki *et al.*, PNAS, *ACS Chem.Biol.* **1**(5), 299(2006)
- 10) J. Nakagawa, *et al.*, *Spectrochimica. Acta. Part A.* **63**, 816 (2006)
- 11) E. Yagi, *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* **127**, 895 (2007)
- 12) J.N. Israelachvili, *et al.*, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. II* **72**, 1525 (1976)
- 13) S. Hyde, *et al.*, "The Language of Shape (Chapter4)" pp.141-176, Elsevier, Amsterdam (1997)
- 14) 特開2005 - 154413, K. Sakamoto, *et al.*, ICAMN2011 Keynote 講演 Oct.23, '11
- 15) K. Sakamoto, *et al.*, *Chem. Lett.*, **41**, 1078 (2012)