

環境応答性レドックスナノ粒子を用いた高機能性スキンケア薬粧品の創製

筑波大学大学院数理物質科学研究科

吉 富 徹

In this study, a redox nanoparticle (RNP), which consists of polymeric micelle containing nitroxide radicals, was developed as nano-sized ROS scavenger for treatment of ultraviolet (UV)-induced skin damage. When RNP was applied to the skin by iontophoresis, UV-induced damage and melanin production in the skin were prevented. In addition, a redox injectable hydrogel (RIG) with prolonged drug retention time in the skin was developed for enhancing the ROS scavenging efficacy, using a redox polyion complex flower micelle containing nitroxide radicals. Both RNP and RIG are anticipated as high performance ROS scavengers for treatment of UV-induced skin damage.

1. 緒 言

紫外線によって多量に発生する活性酸素種 (ROS) は、皮膚を絶えず攻撃している。この過剰な ROS 産生によって、メラニン生成、皮膚癌や炎症などが引き起こされる。この皮膚近傍に産生される ROS の除去は、まさにコスメトロジーの大きな課題の一つである。そこで、効果の高い抗酸化ストレス作用を示すためには、材料を創り込み、最適な素材を提供していくことが非常に重要となる。これまで各種ビタミンやコエンザイム Q10 などの抗酸化剤を含んだ薬粧品が市販されている。しかしながら、ROS と反応した後、抗酸化能が弱まってしまい、効力が長続きしないという問題があった。また近年、触媒的に ROS を消去する白金ナノ粒子・フラーレンなどの抗酸化ナノ粒子が注目を集めている。しかしながら、これらの粒子も特有の着色や汗による皮膚からの脱離などの問題を有している。そこで、我々は、高機能性スキンケア薬粧品を開発するために、触媒的に ROS を消去するニトロキシラジカル (2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド: TEMPO) が結合したレドックスポリマーを新規に合成した (図 1)。このレドックスポリマーは、生体適合性を有するポリエチレングリコール (PEG) と TEMPO が結合した疎水性セグメントから成る両親媒性ポリマー (PEG-b-PMNT) であり、水中で自己組織化し、レドックスナノ粒子 (RNP) を形成する。この RNP は、疎水性コアにアミノ基が導入されているため、癌や炎症組織のような低 pH 環境で崩壊し、ROS を効果的に消去することができる。これまでに、我々は、脳および腎臓虚血再灌流障害や脳出血などの様々な酸

化ストレス疾患に対する RNP の治療・保護効果を明らかにしてきた¹⁻⁹⁾。そこで、これらの成果をベースに RNP によるスキンケアの効果に着目した。興味深いことに、肌の角質層の pH は、酸性 (pH 4.5-7.0) であることが知られているため、この RNP を角質層に導入することができれば、ナノ粒子が崩壊し、抗酸化能が向上することが期待できる。本研究では、荷電性ナノ粒子の経皮投与法として注目を集めているイオントフォレシスを用いて RNP を皮下に導入し、紫外線により惹起されるメラニン生成に対する RNP の保護効果を検証した。

さらに、我々は、次世代のスキンケア素材として、レドックスインジェクタブルゲルを考案した。ナノ粒子の皮下投与は、低分子化合物に比べ長い滞留性を示す。しかしながら、粒子径が約 40 nm であるため、最終的にはリンパ系へと移行してしまう。治療などを考えた場合には、一度の処置で、治療効果が数週間持続することが好ましい。そこで本研究では、皮下で長期に滞留し、機能する ROS 消去剤を開発するため、ニトロキシドラジカル含有ポリイオンコンプレックス (PIC) フラワーミセルを作製し、生体内環境に応答してゲル化するレドックスインジェクタブルゲル (RIG) を開発した (図 2)。

2. 実 験

2.1 紫外線誘発性メラニン生成に対する RNP の効果

本実験では、メラニン生成を惹起するため、メラニン保有ヘアレスマウス (HOS: HRM2, ♂, 4 週齢) に UV 照射 (1-5 日目に 260 mJ/cm², 5-10 日目に 450 mJ/cm²) を行った。照射後、皮膚切片を作成してマッソン・フォンタナ染色 (核: 赤色、メラニン保有細胞: 黒色) を行い、メラニンの生成を観察した。また、回収した皮膚を 2M の水酸化ナトリウムを用いて細胞融解し、450 nm におけるメラニン由来の吸収を測定することによりメラニンを定量した。1, 4, 7 日目に、イオントフォレシスによって RNP を経皮投与し、メラニン生成に対する RNP の効果を観察した。



Development of skin care medicine using environmental-sensitive redox nanoparticles

Toru Yoshitomi

Department of Materials Sciences,
Graduate School of Pure and Applied
Sciences, University of Tsukuba

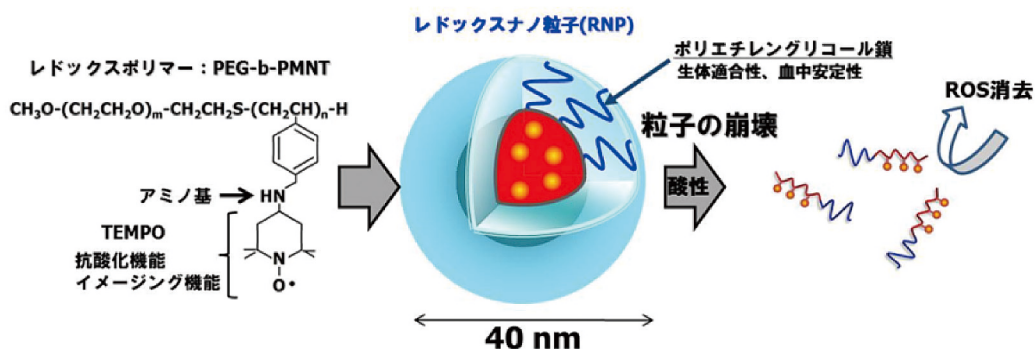


図1 pH低下に伴い崩壊するレドックスナノ粒子 (RNP)

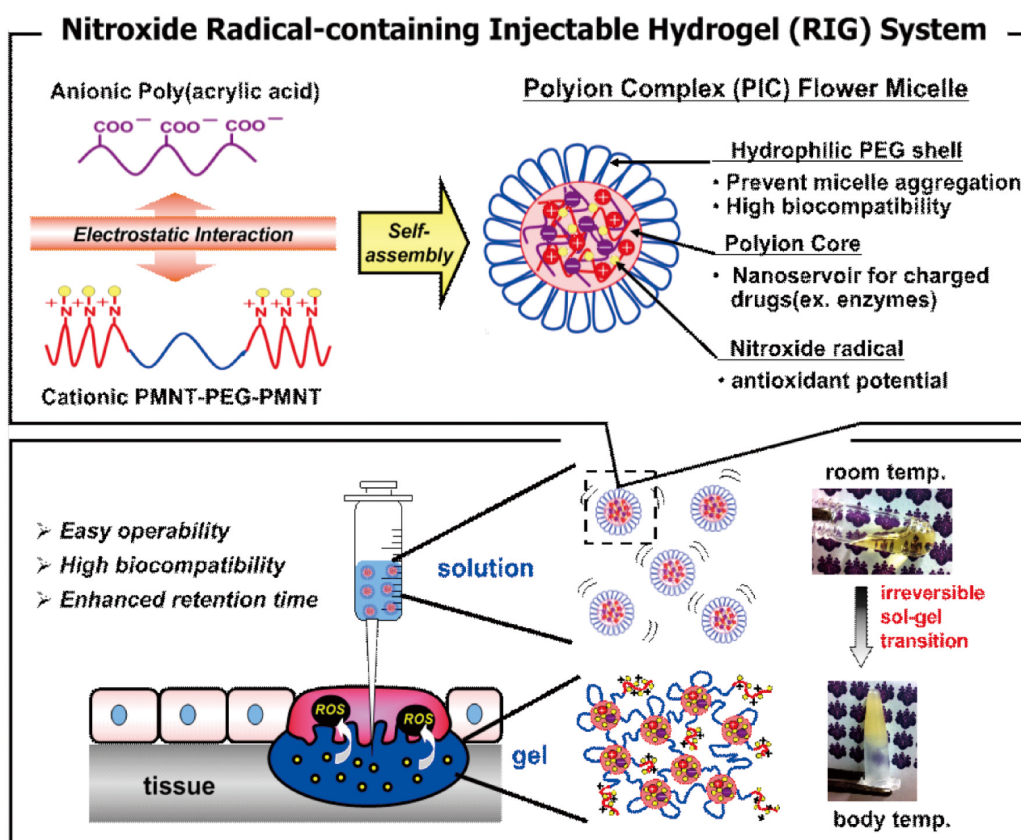


図2 皮下投与後ゲル化するレドックスインジェクタブルゲル (RIG)

2.2 新規RIGの開発と皮下炎症に対する効果の検証

まずはじめに、両末端にメルカプト基を有するポリエチレングリコールをテロゲンとして用いたクロロメチルスチレンのラジカルテロメリゼーションにより、両末端に反応性ポリクロロメチルスチレン (PCMS) を有するトリブロックポリマーの合成を行った (PCMS-PEG-PCMS)。次に、4-アミノ-TEMPOを用いてクロロメチル基のアミノ化反応を行い、疎水性PCMSセグメントに2級アミンを介してTEMPOを導入した (PMNT-PEG-PMNT)。得られたPMNT-PEG-PMNTをプロトン化し、アニオン性ポリアクリル酸 (PAA) 水溶液と混合することによりフラワーミセルを得た。得られたフラワーミセル溶液の濃度を

60mg/ml (イオン強度150mM) に調整し、37℃の水浴中で加熱を行い、ゲル化時間を試験管反転法により測定した。皮下におけるゲルの滞留性は電子スピン共鳴法 (ESR) を用いて測定した。また、皮下炎症モデルとしてカラギーナン誘発性炎症をマウスの足底に作製し、RIGの抗炎症効果を痛覚過敏試験、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性及び炎症性サイトカイン量を測定した。

3. 結果及び考察

3.1 紫外線誘発性メラニン生成に対するRNPの効果

はじめに、UV照射によるメラニン生成を確認した。図3aに示すように、UV照射によって基底層を中心とした表

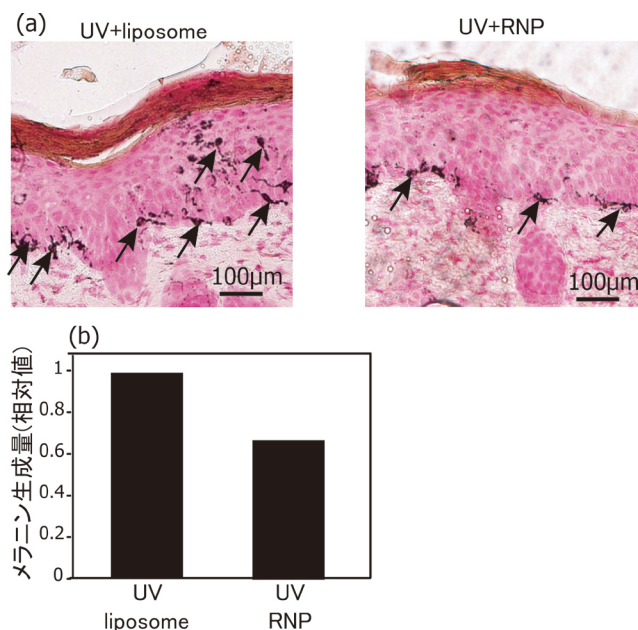
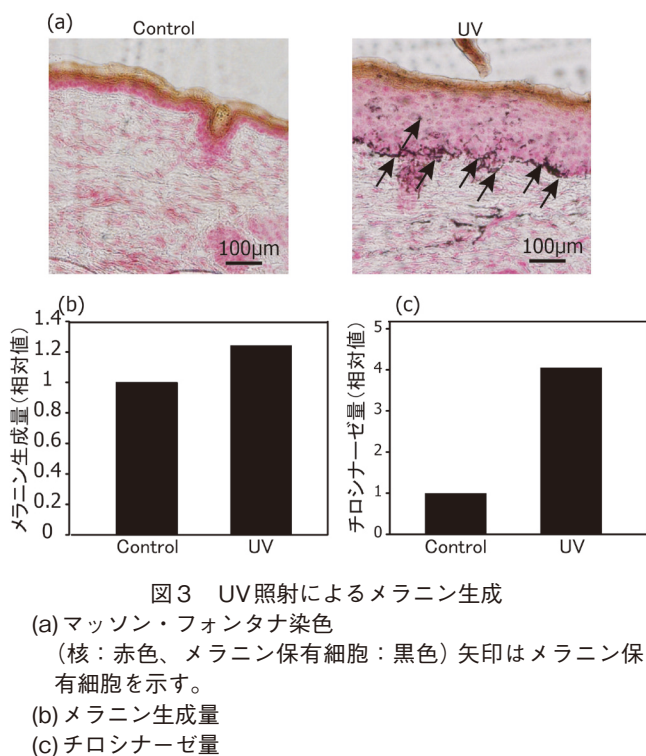
皮膚の肥厚化が確認された。またメラニン量はUV照射により増加し、メラニン生成関連遺伝子であるチロシナーゼは約4倍に増加した(図3bおよびc)。これらの結果により、本実験で用いたUV照射条件によって、マウス皮下にメラニンが生成することが確認された。ここで、RNPを角質層に導入するため、イオントフォレシスを用いた。イオントフォレシスは、電気の力で荷電性ナノ粒子を皮内に導入することができるため、疎水性コアにアミノ基が導入されており正電荷を帯びているRNPを角質層へ導入することができる。そこで、RNPをイオントフォレシスにより投与し、RNPの効果を観察したところ、コントロールとして用いた正電荷リポソームに比べ、RNPを投与した皮膚ではメラニンの沈着が抑制される傾向が観察された(図4a)。また、メラニンの生成量を定量したところ、同様に、RNPがメラニンの生成を抑制していることが明らかとなった(図4b)。

皮膚に強い紫外線に当たると、ROSが発生し、表皮細胞がインターロイキンなどのメラニン生成・放出の情報伝達物質を生成することが知られている。この情報伝達物質がメラノサイトというメラニンを発生させる場所に届くと、必須アミノ酸の一つであるチロシンが酸化され、チロシンがドーパーに変化し、次いで、ドーパーがキノン、キノンがインドールへと反応し、このインドールが重合してシミ、ソバカスのメラニン色素へと変化する。この反応はすべて酸化反応であり、ROSが存在すると、酵素チロシナーゼ

が活性化されて、急速に重合が進行する。本研究で得られた結果は、イオントフォレシスによって経皮投与されたRNPが、この皮膚内でROSを効率的に消去したことにより、メラニン生成を抑制したものと考えられる。

3.2 新規RIGの開発と皮下炎症に対する効果の検証

新規PMNT-PEG-PMNTトリブロックコポリマーの合成は、ゲル濾過クロマトグラフィーと ^1H NMRの結果により確認された。表1に示すように、モル比1:1で調製した粒子の粒子径およびゼータ電位は、それぞれ79nmおよび -0.119mV であった。これは、カチオン性PMNT-PEG-PMNTとアニオン性PAAとの間に静電相互作用が働き、ポリイオンコンプレックスコアを有するPICフラワーミセルが形成されたことを示す。このミセルはPEGの高い運動性によりミセル同士の凝集を防ぐため、沈殿が生じない。よって、高濃度でも体内に注射可能である。得られたフラワーミセルをモル比1:1、濃度60mg/mL、pH6、イオン強度150mMの条件下で37℃に加温したところ、ミセルが2分間以内に不可逆的にゲル化することが明らかとなった(図5)。この結果は、温度の上昇によりミセルがエントロピー的に不安定となり崩壊し、ゲルを形成したと考えられる。そこで、このミセル溶液をマウス皮下に注射したところ、同様にゲル化することが確認された。RIGは、ESRで検出可能な安定ニトロキシドラジカルを有している。よって、体内のRIG濃度をESRを用いて調べるこ



ができる。低分子化合物 (4-アミノ-TEMPO) またはRNPでは、それぞれ1時間と12時間以内に投与部位から消失したのに対し、RIGは72時間後にも40%残存していることが明らかとなった (図6、上図)。また、ニトロキシドラジカルはESRイメージングやMRIを用いて画像化することができるため、図6 (下図) に示すようにRIGの経時変化を非侵襲的に観察することもできる。この結果は、本研究で開発したRIGの高い滞留性を示す。そこで、カラギーナン誘発性炎症モデルマウスを用いてRIGの抗炎症効果を評価した。まず、ニトロキシドラジカルを含有しないフラワーミセル溶液を皮下投与しROS消去能がないゲル (ノンレドックスインジェクタブルゲル: nRIG) を形成させたところ、好中球の浸潤の指標であるMPOの活性化が確認された。一方で、RIGは、その活性化を有意に抑制した (図7)。こ

れらの結果は、RIG自身が炎症惹起を引き起こすことなく、安全であることを示している。さらに、RIGは、カラギーナン投与により誘発される炎症も、有意に抑制することが確認された。また、RIGは、炎症性サイトカインであるTNF- α とIL-1 β の発生も有意に抑制し、カラギーナン誘発性痛覚過敏を効果的に予防した。この結果は、RIG中のニトロキシドラジカルが好中球やマクロファージの産生するROSを効果的に消去していることを示している。

4. 総 括

本研究では、高機能性スキンケア薬粧品の開発を目指し、紫外線誘発性メラニン生成に対するRNPの効果の検証を行った。RNPをイオントフォレシスによって経皮投与することにより、紫外線照射によって生じるメラニン生成を

表1 ニトロキシドラジカル含有ポリイオンコンプレックス (PIC) フラワーミセルの粒子径と表面電荷 (モル比 r =PAAのカルボキシル基のモル量: PMNT-PEG-PMNTのアミノ基のモル量)

Molar ratio r	kcps	Pdl	Size /nm	Zeta potential /mV
4 : 1	207	0.25	48	-3.73
2 : 1	274	0.25	55	-2.24
1 : 1	685	0.23	79	-0.119
1 : 2	724	0.25	89	+1.43

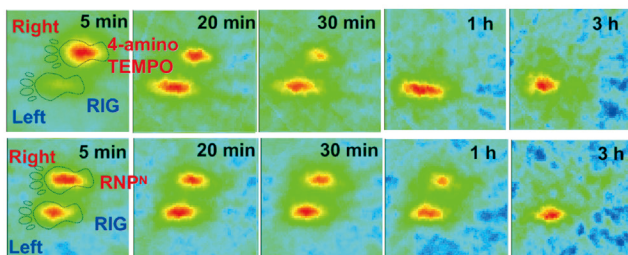
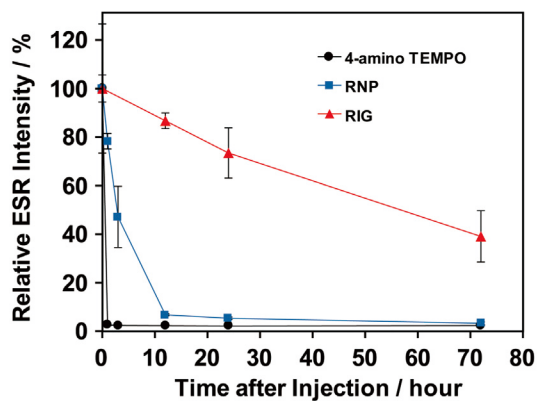


図6 (上図)皮下投与後のニトロキシドラジカル残存量(下図)皮下投与後の非侵襲的ESRイメージング画像。低分子量の4-アミノ-TEMPO, RNPとRIG残存量をESRイメージング装置を用いて評価した。

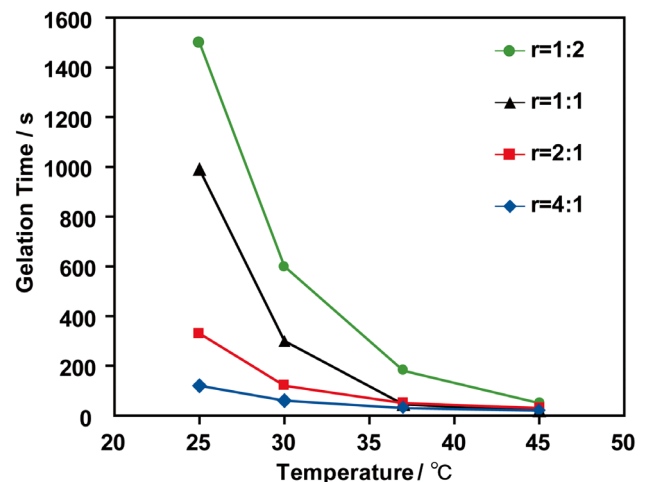


図5 ニトロキシドラジカル含有ポリイオンコンプレックス (PIC) フラワーミセルのゲル化時間 (60mg/ml, イオン強度 150mM, r = 1:2, 1:1, 2:1, 4:1)

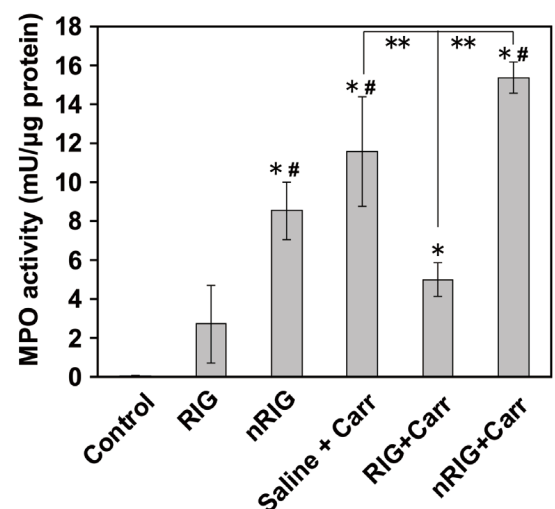


図7 皮下投与した後のRIGの炎症抑制能試験。MPOの活性を測定した。Carrは、カラギーナン投与を示す。

抑制することが明らかとなった。さらに、長期皮下滞留性を有するRIGの開発に成功した。低分子化合物やナノ粒子に比べ、RIGは高い局所滞留性を有し、炎症モデルに対して高い効果を示すことが明らかとなった。これは次世代の皮下のROSを長期間消去するスキンケア薬粧品として期待される。

謝 辞

本研究は、筑波大学数理物質科学研究科 長崎幸夫教授の御指導のもと、研究を行った成果である。イオントフォレシスによるRNPの経皮投与およびメラニン生成の実験に関しては、京都薬科大学 小暮健太郎教授、塩田佳菜子氏らとともに行った結果であり、またRIGの実験に関しては、筑波大学数理物質科学研究科 博士前期課程2年ブアミンリー氏とともに行った結果である。ここに深く感謝致します。

(参考文献)

- 1) Yoshitomi T, Miyamoto D, Nagasaki Y.: Design of Core-shell-type Nanoparticles Carrying Stable Radicals in the Core, *Biomacromolecules*, 10, 596–601, 2009.
- 2) Yoshitomi T, Nagasaki Y.: Nitroxyl radical-containing nanoparticles for novel nanomedicine against oxidative stress injury, *Nanomedicine*, 6, 3, 509–518, 2011.
- 3) Yoshitomi T, Suzuki R, Mamiya T, Matsui H, Hirayama A, Nagasaki Y.: pH-Sensitive Radical-Containing-Nanoparticle (RNP) for the L-Band-EPR Imaging of Low pH Circumstances, *Bioconjugate Chemistry*, 20, 1792–1798, 2009.
- 4) Marushima A, Suzuki K, Nagasaki Y, Yoshitomi T, Toh K, Tsurushima H, Hirayama A, Matsumura A.: Newly Synthesized Radical-Containing Nanoparticles (RNP) Enhance Neuroprotection After Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury, *Neurosurgery*, 68, 1418–1425, 2011.
- 5) Yoshitomi T, Hirayama A, Nagasaki Y.: The ROS scavenging and renal protective effects of pH-responsive nitroxide radical-containing nanoparticles, *Biomaterials*, 32, 8021–8028, 2011.
- 6) Vong LB, Tomita T, Yoshitomi T, Matsui H, Nagasaki Y.: An Orally Administered Redox Nanoparticle that Accumulates in the Colonic Mucosa and Reduces Colitis in Mice, *Gastroenterology*, 143, 1027–1036, 2012.
- 7) Chonpathompikunlert P, Fan CH, Ozaki Y, Yoshitomi T, Yeh CK, Nagasaki Y.: Redox Nanoparticle Treatment Protects Against Neurological Deficit in Focused Ultrasound-Induced Intracerebral Hemorrhage, *Nanomedicine*, 7, 1029–1043, 2012.
- 8) Chonpathompikunlert P, Yoshitomi T, Han J, Toh K, Isoda H, Nagasaki Y.: Chemical nanotherapy: Nitroxyl radical-containing nanoparticle (RNP) protects neuroblastoma SH-SY5Y cells from $\alpha\beta$ -induced oxidative stress, *Ther. Deliv*, 2, 585–597, 2011.
- 9) Chonpathompikunlert P, Yoshitomi T, Han J, Isoda H, Nagasaki Y.: The use of nitroxide radical-containing nanoparticles coupled with piperine to protect neuroblastoma SH-SY5Y cells from $\alpha\beta$ -induced oxidative stress, *Biomaterials*, 32, 8605–8612, 2011.