

新規な生体親和性化粧品素材ホスファチジル-パンテノールの 抗炎症作用と分子機構の解明

北海道大学大学院水産科学研究院

細川 雅史

Phosphatidyl-panthenol (P-panthenol) is a novel phospholipid prepared by phospholipase D-mediated transphosphatidylation. In this study, we found that P-panthenol suppressed mRNA expression of pro-inflammatory factors such as IL-6, IL-1 β , TNF- α , COX-2 and iNOS in LPS-stimulated macrophages like RAW264.7 cells. In addition, P-panthenol also down-regulated mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in TNF- α stimulated human keratinocytes, HaCaT cells. The suppressive effects by P-panthenol were stronger than those of free panthenol and phosphatidylcholine used as substrate for P-panthenol synthesis. Inhibition of phosphorylation of p38, ERK and JNK in MAPK cascade is suggested to be the mechanism of anti-inflammatory effects by P-panthenol.

1. 緒言

近年、化粧品には美しく見せることを目的とした従来までの基礎化粧品機能に加え、美しい素肌を維持する美白効果やアンチエイジング機能が期待されている¹⁾。それに伴って、安全性の高い新たなスキンケア化粧品素材の探索や開発が進められている。本研究では、そのような機能性素材として panthenol (ビタミンB₅アルコール) の新規リン脂質誘導体に注目した。Panthenolは、皮膚組織に対する抗炎症作用など優れた機能性²⁻⁴⁾が知られているが、水溶性であることから化粧品素材として利用するには、界面活性剤を用いて脂質中に乳化させ生体親和性を高める必要がある。そのような問題を解決し、スキンケアやヘアケアへの幅広い利用が期待できる新素材として phosphatidyl-panthenol (P-panthenol 図1) の合成を検討してきた。P-panthenolは、生体膜の主要な構成脂質であるリン脂質を基本骨格とすることから、生体適合性に優れているばかりでなく両親媒性が付与されるため、水中においてリポソーム形成能をもつ。筆者らは、これまでにホスホリパーゼDを用いたホスファチジル基転移反応により、テルペンアルコールやフェノール化合物のリン脂質誘導法^{5,6)}を開発しており、その反応系を応用し、反応条件を検討することで高収率でのP-panthenolの合成が可能となった。

そこで本研究では、P-panthenolの新規化粧品素材としての優れたスキンケア機能を明らかにするため、美白効果やアンチエイジング効果と密接に関わる抗炎症作用⁷⁾に着目した。具体的には、皮膚組織を構成する角化細胞や浸潤

したマクロファージによる炎症性因子の過剰産生に対する抑制機能である。従来の遊離型 panthenol との効果の比較を行うとともに、分子機構の解明をはかり、新規化粧品素材としての有効性を明らかにすることを目的とした。

2. 実験

2.1. 細胞培養

マウス由来マクロファージ様細胞RAW264.7は大日本住友製薬より購入し、10% FBS含有RPMI1640培地を用いて、37℃、5% CO₂存在下で培養を行った。ヒト角化細胞 HaCaTはCLS (Cell Lines Service, ドイツ)から購入し、10% FBS含有DMEM培地を用いて、37℃、5% CO₂存在下で培養を行った。

2.2. 炎症因子のmRNA発現量の測定

RAW264.7細胞 5×10^4 cellsをRPMI1640培地1mlを用いて24-wellプレートに播種し、24h前培養した。その後、P-panthenolまたは遊離型 panthenol、大豆 phosphatidylcholine (SoyPC)をそれぞれ所定の濃度となるように添加し、24h培養した。なお、試料はエタノール溶液として培地に添加した。エタノールの終濃度は、培地に対して0.1%とし、細胞毒性が見られないことを確認した。次いで、0.1 μ g/mlとなるようにリポポリサッカライド(LPS)を添加して炎症刺激し、6hの培養後にRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。

HaCaT細胞 5×10^4 cellsをDMEM培地1mlを用いて24-wellプレートに播種し、24h前培養した。その後、上記と同様に試料添加し48h培養した。更に0.1 μ g/mlのTNF- α を添加して24hの培養後にtotal RNAを抽出した。

抽出したtotal RNAからcDNAを合成した。炎症因子のmRNA発現量の測定は、定量PCR法により行った。なお、反応試薬はFastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche)を使用し、TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems Japan Ltd.)を用いて、所望の遺伝子



Anti-inflammatory effect of a novel phospholipid, phosphatidyl-panthenol

Masashi Hosokawa

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University

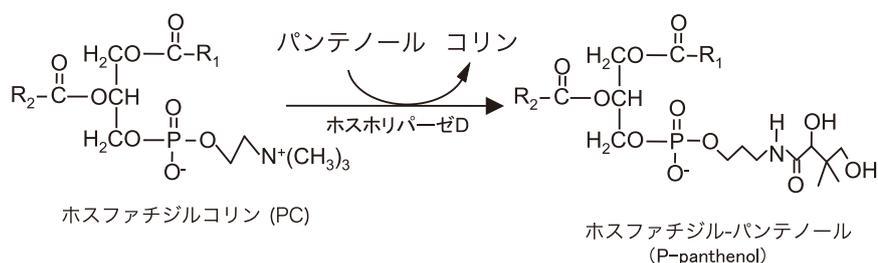


図1 ホスファチジル-パンテノール (P-panthenol) の合成反応

発現を測定した。

2. 3. 炎症性サイトカイン分泌量の測定

RAW264.7細胞を2.2と同様に培養した後、0.1 μg/mlのLPSを添加して炎症刺激し、更に24 hの培養後に培地を回収した。IL-6およびIL-1βの分泌量の測定は、mouse IL-6 ELISA KitおよびIL-1β ELISA Kit (いずれもThermo Scientific)を使用し、添付されたプロトコールに従って行った。HaCaT細胞も2.2と同様に培養した後、0.1 μg/mlのTNF-αを添加して24 hの培養後に培地を回収した。IL-6分泌量の測定は、human IL-6 ELISA Kit (Thermo Scientific)を使用して行った。

2. 4. Western Blotting 法

RAW264.7細胞およびHaCaT細胞 5×10^5 cellsを培地5 mlを用いて6-wellプレートに播種し、24h前培養した。次いで、2.2と同様にP-panthenolを添加してRAW264.7細胞は24h培養した後、0.1 μg/mlのLPSを添加して炎症刺激を行い、45 minの培養後に細胞を回収した。HaCaTは48h培養した後、0.1 μg/mlのTNF-αを添加して15 min培養後に細胞を回収した。その後、細胞タンパク質溶液を調製し、SDS-PAGEによるタンパク質分離を行った。電気泳動したポリアクリルアミドゲルからPVDFメンブレンにトランスファーした後、一次抗体および二次抗体を用いて抗原抗体反応を行い、各タンパク質の発現量は、発光検出試薬はECL (GE Healthcare)またはImmunoStar (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を用いて検出を行った。タンパク質の発光シグナルの検出は ATTO Cold CCD Camera System (アトー株式会社)を用いて行った。

2. 5. 統計学的処理

得られた数値は各群で平均値及び標準偏差として示した。統計処理は、DunnettまたはTukeyの検定を用いて行い、有意水準は $P < 0.05$ 、および $P < 0.01$ とした。

3. 結果

3. 1. P-panthenolの活性化マクロファージに対する炎症因子産生抑制効果

新規リン脂質として合成したP-panthenolの抗炎症作用を評価するため、マクロファージ様RAW264.7細胞に対する炎症因子の産生抑制能を調べた。最初に、P-panthenolの細胞毒性をWST-1法で調べた結果、終濃度100 μMにおいて細胞生残率への影響は見られず、毒性の低い脂質であることを確認した。

RAW264.7細胞培養液にP-panthenolを添加して24h培養後、LPSを用いて炎症を誘発した結果、炎症性サイトカインであるIL-1β、TNF-αおよび炎症関連酵素であるiNOSおよびCOX-2のmRNA発現量がコントロール群(LPS(+))と比較して有意に低下した(図2)。P-panthenolは、IL-6のmRNA発現も抑制したが、同濃度ではpanthenolによる抑制効果は認められず、またSoyPCによる抑制効果と比較しても強い抑制傾向であった(図3)。更に、P-panthenolは、終濃度25 - 50 μM以上でIL-6およびIL-1βのタンパク質産生量を抑制することが示された(図4)。

P-panthenolはビタミンB₅のリン脂質誘導体であるが、ビタミンB₁のチアミンやビタミンB₆のピリドキシンについてもPLDを用いてリン脂質誘導体を調製し、活性化マクロファージにおける炎症因子の産生抑制能を比較した。その結果、終濃度50 μM処理においてホスファチジル-チアミンには、弱いながらもIL-6のmRNA発現を抑制したが、ホスファチジル-ピリドキシンには認められず、P-panthenolの高い抗炎症効果が確認された。

3. 2. P-panthenolの皮膚細胞における炎症因子の産生抑制効果

皮膚組織では、刺激や損傷等によりマクロファージが浸潤し、皮膚表皮細胞と相互作用することによって炎症が進行する。その際、マクロファージから放出されるTNF-αなどの炎症性サイトカインがメディエーターとして重要な

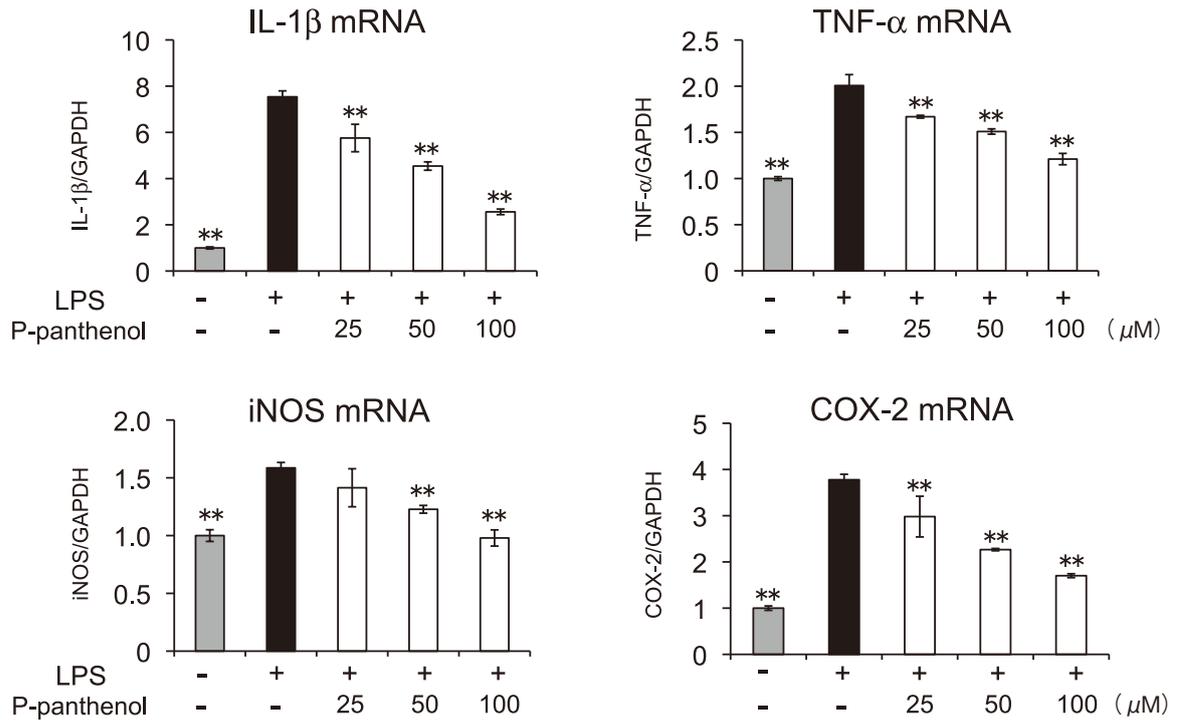


図2 P-panthenol の活性化マクロファージに対する炎症因子遺伝子の発現抑制
** $P < 0.01$ vs. LPS (+)

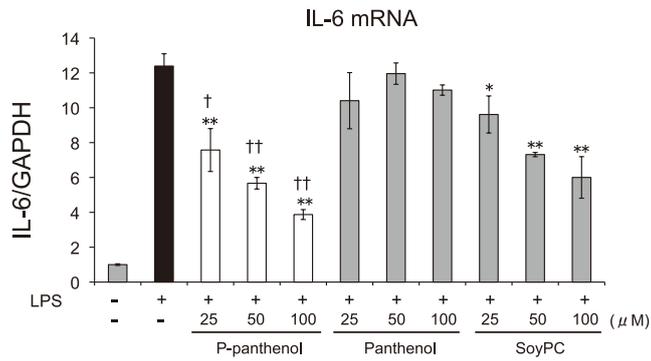


図3 P-panthenol の活性化マクロファージに対する IL-6 mRNA 発現抑制
** $P < 0.01$, * $P < 0.01$ vs TNF- α (+)
†† $P < 0.01$, † $P < 0.05$ vs Panthenol

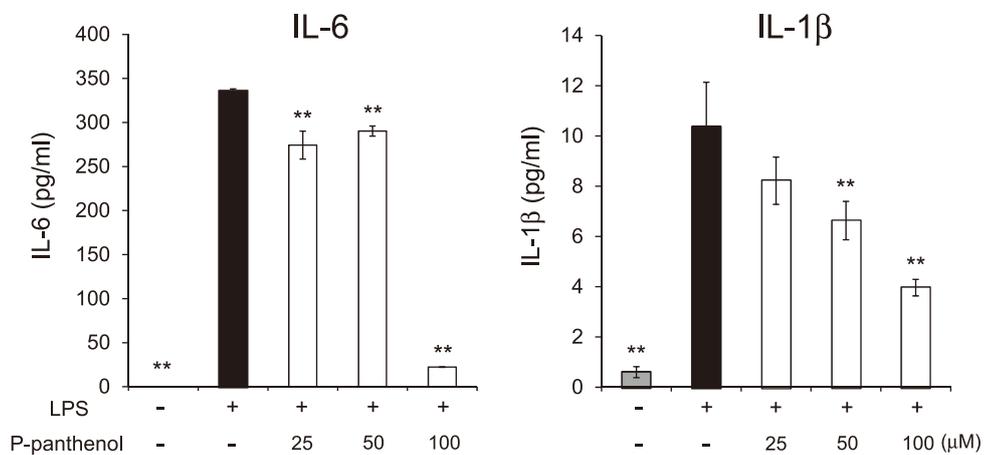


図4 P-panthenol の活性化マクロファージにおける IL-6 および IL-1β の産生抑制
** $P < 0.01$ vs.LPS (+)

役割を担っている。そこで、炎症性サイトカインによる皮膚表皮細胞の活性化に対するP-panthenolの抑制効果を明らかにするため、ヒト角化細胞HaCaTをTNF- α で刺激し、その炎症因子産生に及ぼす影響を評価した。

TNF- α 処理によりHaCaTではIL-6の産生が上昇したが、P-panthenolはそのmRNA発現誘導(図5)およびタンパク質産生を有意に抑制した。一方、合成反応の基質として用いた遊離型のpanthenolやSoyPCには終濃度50 μ M処理においては抑制効果が全く認められなかった。よって、TNF- α によるHaCaTの炎症誘導に対する抑制には、P-panthenolの構造が重要であることが推察される。

このような角化細胞に対するP-panthenolの炎症因子産生抑制効果は、TNF- α による刺激のみならず認められた。すなわち、RAW264.7細胞をLPS処理によって炎症刺激することにより得られた培地を用いてHaCaT細胞を培養したところ、IL-6やTNF- α のmRNA発現量が増加した。これに対し、HaCaT細胞をP-panthenolを用いてあらかじめ

め前処理することによって、それら炎症性サイトカインのmRNA発現量の有意な低下が認められた(図6)。以上の結果は、P-panthenolが皮膚表皮細胞とマクロファージ間の相互作用を効果的に制御して、炎症の誘導や進展を抑制することを示唆している。

3.3. P-panthenolによる炎症因子遺伝子の発現抑制機構

P-panthenolがマクロファージ様RAW264.7細胞およびHaCaT角化細胞のいずれに対しても炎症因子の産生抑制効果を示したことから、それらの制御機構に関わる情報伝達経路としてMAPK経路への影響を調べた。図7に示すように、P-panthenolはLPSで刺激したRAW264.7細胞で見られるp38およびERKのリン酸化を抑制していることが示された。また、HaCaT細胞に対しては、p38に加えJNKのリン酸化を抑制し、それらの因子の活性化を制御していることがわかった(図8)。

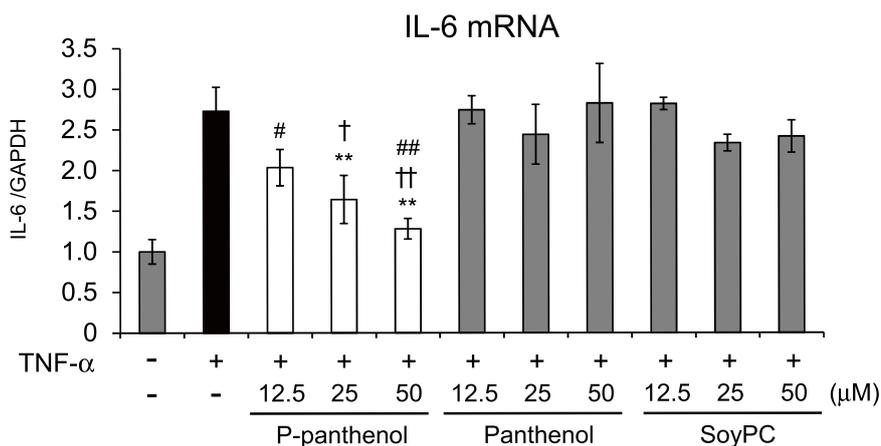


図5 P-panthenolのヒト皮膚細胞に対するIL-6 mRNA発現抑制

** $P < 0.01$ vs TNF- α (+)
 †† $P < 0.01$, † $P < 0.05$ vs Panthenol
 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs PC (同濃度間の比較)

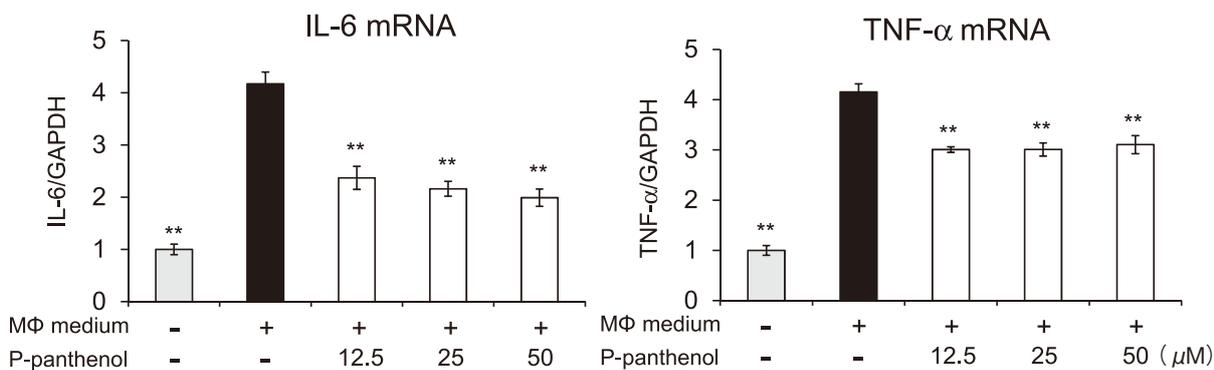


図6 ヒト皮膚細胞のマクロファージ培養液による活性化とP-panthenolによる抑制効果

** $P < 0.01$ vs MΦ medium

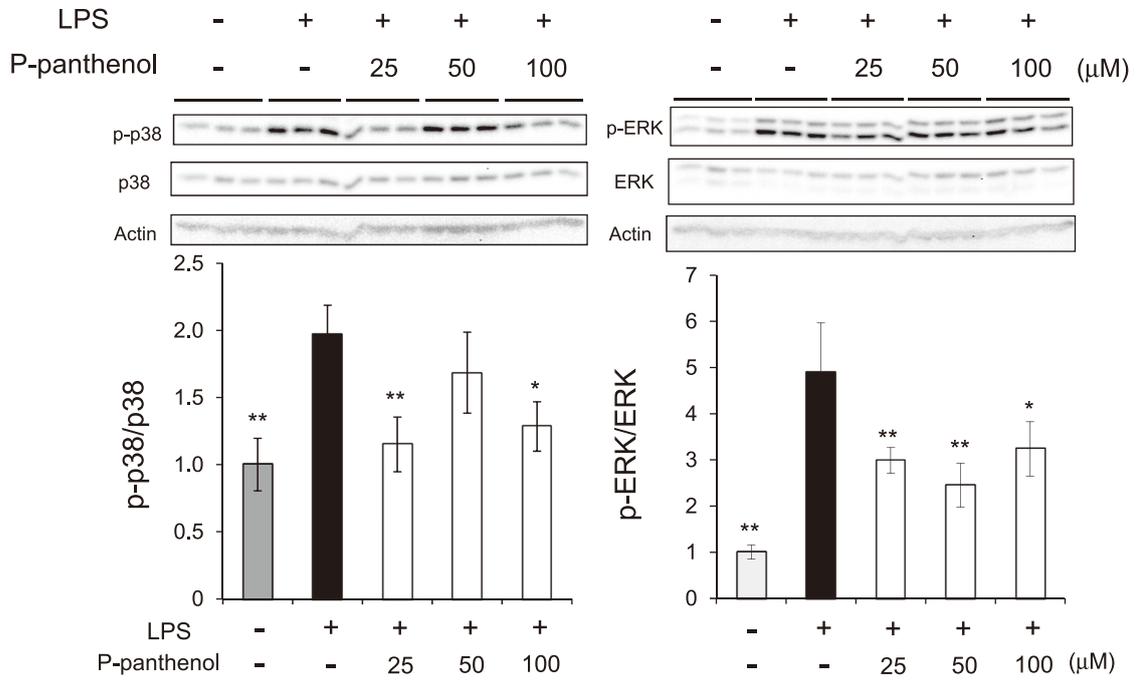


図7 P-panthenol のマクロファージ様 RAW264.7 細胞における MAPK 制御

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs LPS (+)

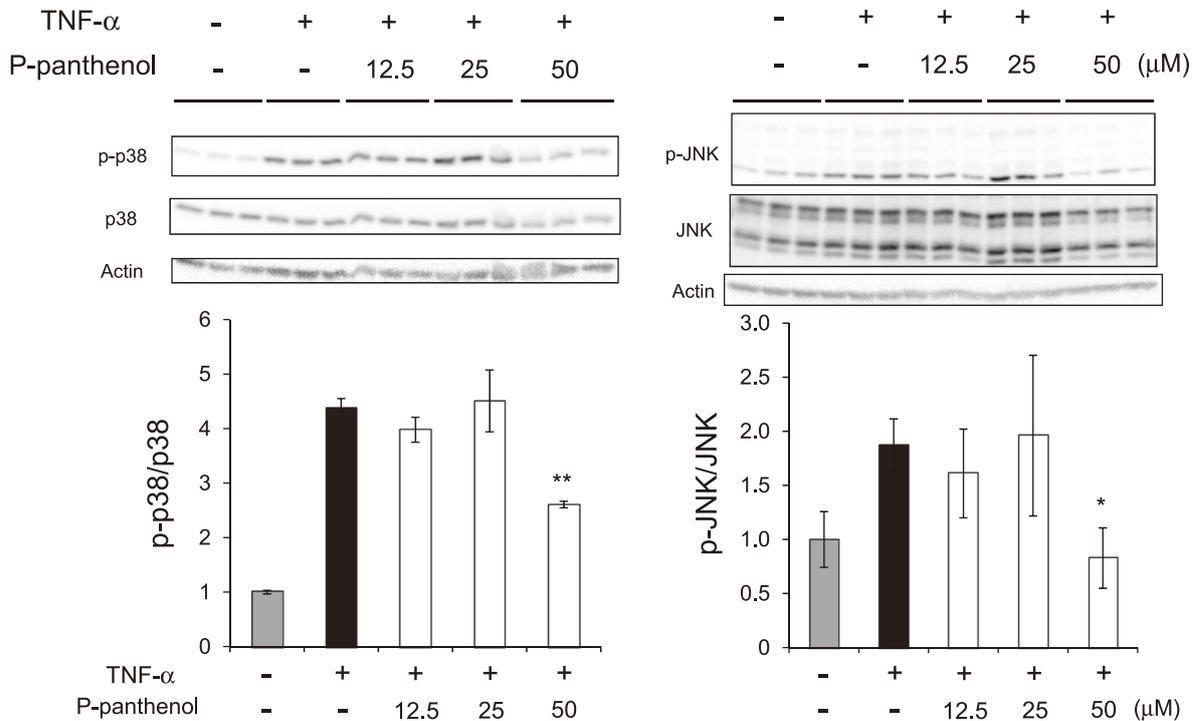


図8 P-panthenol のヒト皮膚細胞 HaCat における MAPK 制御

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs LPS (+)

4. 考 察

近年、男女を問わず化粧品素材の機能性として「スキンケア」が注目されている。スキンケア機能の一つとして皮膚老化や皮膚炎に対する抗炎症効果があり、炎症を予防したり、鎮静化することで健康で美しい肌の維持が期待される。本研究では、新規化粧品素材を開発する目的で、これまでに利用がなされている panthenol に着目した。Panthenolは生体内においてビタミンB₅である panthenic acidに変換されるプロビタミンである。クリームやシャンプー、育毛剤等に広く利用されており、安全性も高い物質といえる。しかし、panthenolは水溶性であるため、組織での滞留性が乏しいことや皮脂バリアを透過しにくいことがあり、応用面での制限が課題である。本研究では、そのような panthenolをリン脂質誘導化することで生体適合性や両親媒性を付与し、利用用途を広げるばかりでなく、その抗炎症作用が増強することを期待した。

生体内の炎症反応では、組織構成細胞に加え、マクロファージが重要な役割をこなす。合成したP-panthenolは、マクロファージ様RAW264.7細胞に対し、LPSによって誘導される炎症因子のmRNA過剰発現を効果的に抑制した。その効果は、従来の遊離型 panthenolよりも強く、リン脂質誘導体の優れた機能性を確認した。これらの発現制御機能は、炎症因子の産生に関わるp38やERKのリン酸化抑制を機序として、複数の経路を制御することによる効果的な作用であることが示唆された。P38やERKなどのMAPKカスケードの下流には、NF- κ B^{8,9)}やAP-1¹⁰⁾といった転写因子が存在し、炎症因子のmRNA発現を制御することから、それらへの影響についても検討することが期待される。また、P-panthenolはマクロファージが産生するTNF- α によって刺激した角化細胞HaCaTに対しても、p38やJNKのリン酸化抑制を介して炎症性サイトカインの産生を抑制したことから、皮膚の炎症時にみられる細胞間相互作用に対しても制御効果を示すものと推察する。

今後、より詳細な作用機構の解明や効果的な利用形態に関して更なる研究を重ねたいと考える。

謝 辞

本研究にご助成いただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

(引用文献)

- 1) 正木 仁編.: 機能性化粧品素材の開発IV, シーエムシー出版, 2006.
- 2) Ebner F, Heller A, Rippke F, Tausch I, : Topical use of dexpanthenol in skin disorders, *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 427-433, 2002.
- 3) Wiederholt T, Heise R, Skazik C, Marquardt Y, Jousen S, Erdmann K, Schröder H, Merk HF, Baron JM.: Calcium pantothenate modulates gene expression in proliferating human dermal fibroblasts, *Exp. Dermatol.*, 18, 969-978, 2009.
- 4) Bissett DL.: Common cosmeceuticals, *Clin Dermatol.*, 27, 435-445, 2009.
- 5) Yamamoto Y, Hosokawa M, Kurihara H, Miyashita K.: Preparation of phosphatidylated terpenes via phospholipase D-mediated transphosphatidylation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85, 313-320, 2008.
- 6) Yamamoto Y, Kurihara H, Miyashita K, Hosokawa M.: Synthesis of novel phospholipids that bind phenylalkanols and hydroquinone via phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation, *New Biotechnol.*, 28, 1-6, 2011.
- 7) 平尾哲二.: 角層サイトカインに着目した皮膚刺激緩和アプローチ, 正木 仁編.: 機能性化粧品素材の開発IV, シーエムシー出版, 2006, 72-79頁.
- 8) Pasparakis M, : Role of NF- κ B in epithelial biology, *Immunol. Rev.*, 246, 346-358, 2012.
- 9) Tsuruta D.: NF-kappaB links keratinocytes and lymphocytes in the pathogenesis of psoriasis, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, 3, 40-48, 2009.
- 10) Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaller HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF, : Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease, *Arthritis Res. Ther.*, 10, 201, 2008.