表皮バリア機構に立脚した新規経皮吸収促進法の開発

大阪大学大学院薬学研究科
渡利　彰浩

The tight junction (TJ) is responsible for the epithelial barrier function of the skin. A TJ is composed of membrane proteins such as claudins, occludin, and ZO-1. It has previously been thought that only the stratum corneum is responsible for skin barrier function; however, knock-out mouse analysis has shown that claudin-1 is essential for skin barrier function. Furthermore, other TJ components including claudin-4 and occludin also contribute to the skin TJ-barrier. Homoharringtonine (HHT) is an alkaloid derived from the evergreen tree Cephalotaxus harringtonia. HHT reduces intestinal epithelial barrier function by inducing a change in the expression and localization of TJ components. However, the effect of HHT on the skin TJ barrier remains unclear. In the present study, we investigated HHT's influence on the skin TJ barrier and the compound's potential to enhance transdermal absorption. HHT decreased transepithelial membrane electrical resistance (TEER) values and enhanced the paracellular flux of FD-4 in NHEK cells in a dose-dependent manner. The protein expression of TJ components such as claudin-1, claudin-4, and occludin was decreased by HHT in NHEK cells. HTT also reduced the expression of TJ components that are important for construction of the skin TJ barrier, including claudin-1, claudin-4, and occludin. Examination of the transdermal absorption-promoting activity of HHT *in vivo* showed that the amount of FD-4 absorbed over 24 h of treatment was increased by HHT in a dose-dependent manner. A time-course of FD-4 absorption indicated that HHT increased the amount of FD-4 absorbed starting after about 6 h of treatment. Analysis using model dextrans showed that compounds with molecular weights of up to 10,000 were absorbed. These findings indicated that HHT acts on the epidermal TJ barrier and may serve as a novel transdermal absorption-promoting agent that permits the passage of high-molecular-weight drugs such as biopharmaceuticals.

1．緒　言

昨今の皮膚生理学の進展に伴い、しみやそばかすの要因や老化に伴うしわなどの生成メカニズムが明らかになってきており、色素沈着を阻害する物質、抗酸化物質、コラーゲン合成促進物質などが美白成分やアンチエイジング成分として注目されている。これら有効成分の効果を十分に発揮させるには、皮膚内の作用部位（皮下に存在するメラノサイトや真皮領域など）まで到達させなければならず、単に皮膚表面に塗布しただけでは目的部位に浸透する割合は極めて低い。表皮は大まかに角質層と生きた表皮細胞層からなり、生きた表皮細胞層の顆粒層には、隣接する細胞間に密着結合（タイトジャンクション：TJ）が形成され、TJにより細胞間隙をシールすることで生きた表皮細胞層での物質透過が制限されている。近年、TJを構成する膜タンパク質claudin（CLDN）が表皮TJバリアの中心的な役割を担うことが明らかとなり[1, 2]、表皮TJバリアを制御することによる経皮吸収促進法開発の可能性が提唱されている。しかしながら、角層バリアを克服するための技術は多く開発されているのに対し、表皮TJバリア制御に焦点を当てた経皮吸収促進法の開発はほとんど行われていないのが現状である。

当グループはこれまでに、アルカロイドの一種であるHomoharringtonine（HHT）がTJ構成タンパク質であるCLDNの発現低下や局在変化を誘導することで、腸管上皮細胞のバリア機能を低下させることを見出している[3]。しかしながら、HHTによる表皮TJバリア機能制御活性に関しては明らかにされていない。そこで本研究は、HHTによる表皮TJバリア制御活性の解析、ならびに化粧品有効成分を見据えた高分子モデル物質の*in vivo*経皮吸収活性の検証を行うことで、メラノサイトや真皮領域に対して効率的に各種有効成分を送達する経皮吸収促進技術の基盤研究を行った。

2．方　法

ヒト表皮細胞であるNormal Human Epidermal Keratinocytes（NHEK）細胞を用い、HHTの表皮TJバリア制御活性を検証するため、TJバリア機能を評価する方法として汎用されている膜電気抵抗値（transepithelial electrical resistance, TER）の測定、ならびにトレーサー分子の細胞間隙透過性を評価するtracer flux assayを行った。また、HHTの細胞傷害性を評価するためLDH release assayを行った。HHT作用時の細胞間接着分子への影響は、Western Blotting法により検証した。HHTを作用させた際のマウス皮膚でのTJ構成タンパク質への影響を組織免疫染色法により検証した。

Development of transdermal penetration enhancer by regulating epidermal tight junction barriers
Akihiro Watari
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

3．結　果

3．1．Homoharringtonineの上皮バリア制御能の検証

HHTの表皮TJバリア制御活性を検証するため、膜電気抵抗値（TER）および細胞間隙透過性の評価を行った。TER assayの結果、HHTを24時間作用させた時点でのTER値がHHT濃度依存的に低下していた（Fig. 1a）。さらにこの際、Top側に添加した4kDaのFITC-dextran（FD-4）のBottom側への移行量を測定した。Tracer flux assayの結果、TER assayの結果と相関して、HHTを添加した細胞群では、Controlに比べ細胞間隙透過性の亢進が認められた（Fig. 1b）。また、LDH release assayにより、HHT添加時の細胞傷害性を確認したところ、バリア機能低下が観察されたHHT濃度においても傷害性は認められなかった（Fig. 1c）。以上の結果から、HHTはNHEK細胞において細胞傷害性を示すことなく、TJバリア減弱作用を示し、細胞間隙透過性を亢進することが明らかとなった。

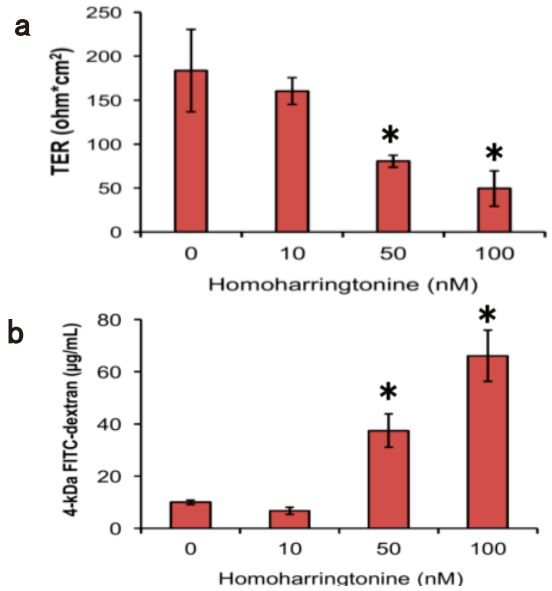

Fig. 1a, b　NHEK細胞におけるHHTの上皮バリア制御活性の検証

(a)　NHEK細胞におけるHHTによる膜電気抵抗値の変化

(b)　NHEK細胞におけるHHTによるFD-4の細胞間隙透過性の変化

NHEK細胞をtranswell plateに播種。細胞がコンフルエントに達してから、1.8mM $CaCl_2$を含む培地に交換し、さらに2日間培養。(a) 0, 10, 50, 100nMのHHTを添加24時間後のTERを測定。(b) 0, 10, 50, 100nMのHHT添加24時間後、FD-4をTop側に添加し、1時間インキュベーション後、Bottom側の培地中に含まれるFD-4の濃度を測定。Data are means ± SD (n=3), *P < 0.05 vs. vehicle treated groups. (Dunnett's test)

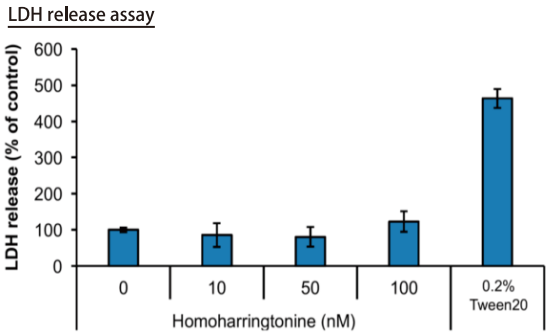

Fig. 1c　NHEK細胞におけるHHTの上皮バリア制御活性の検証

(c)　LDH release assay

Transwellのの Top側、Bottom側に0, 10, 50, 100nMのHHTを添加。24時間後、非処理群のTop側を0.2% Tween-20に調節した培地に交換。15分後、全ウェルのTop側より1μLを96-well plateに移し、PBSで50倍に希釈後、培地中のLDHを検出。

3．2．HHTによる細胞間接着分子への影響の検証

NHEK細胞におけるHHTのTJバリア抑制能が示されたため、HHT作用時の細胞間接着分子への影響をWestern Blotting法により検証した。腸管バリア機能に関する検討において発現が低下していたCLDN-1、-4、またはTJ構成タンパク質の一つであるOccludin（OCLN）、CLDNやOCLNの裏打ちタンパク質であるZO-1、上皮組織における接着装置の一つであるAdherens junctionの主要構成因子のE-Cadherinについて検討を進めた。その結果、CLDN-1、CLDN-4、OCLNの発現低下が確認された。一方、ZO-1やE-Cadherinの発現低下は確認されなかった（Fig. 2）。以上の結果から、HHTによるバリア機能減弱時において、細胞接着分子の中でもTJ構成因子の発現が低下していることが確認された。

3．3．HHTによるモデル分子の経皮吸収促進活性の評価

表皮細胞を利用した検証により、HHTの上皮バリア制御能が確認されたため、マウス皮膚でのHHTによる経皮吸収促進活性の評価を行った。まず、異なる濃度のHHTを作用させた際のマウス皮膚から吸収された血漿中蛍光基質濃度を調べた。本検証ではHHTによる表皮TJバリアへ

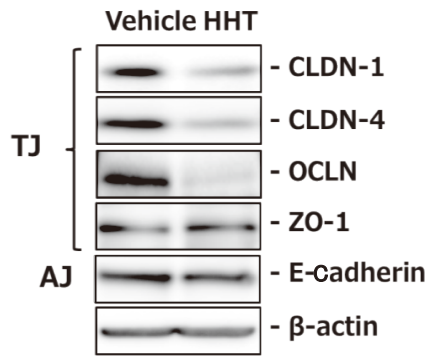

Fig. 2　HHT作用時の細胞間接着分子発現への影響

50nMのHHTを添加24時間後、SDS pageを行い、CLDN-1、CLDN-4、OCLN、ZO-1、E-Cadherin、β-actinの抗体を用いて、Western Blotting解析を行った。

の影響を確認するため、除毛5日後にTape-strippingを8回行うことにより角質層は除いたC57BL/6J ♂ 7週齢マウスの皮膚に貼付体を貼付することにより評価を行った。

HHT（0mM、0.1mM、0.5mM、1mM）を作用させて0時間から24時間までのFD-4吸収量を比較した結果、濃度依存的なAUCの増加が確認された（Fig. 3a）。この際、1mMのHHT作用マウスにおいて経時的に血漿中蛍光基質濃度を測定したところ、Tape-strippingの影響で貼付直後の吸収増加も確認されるが、貼付約6時間後以降に吸収量が上昇することが確認された（Fig. 3b）。また、HHTを作用させて24時間後のマウスの皮膚の様子を観察したところ、皮膚障害性は見られず（Fig. 4）、約2週間後には再び体毛が生え変わることも確認された（data not shown）。

Tape-strippingにより角質を除去したマウスの皮膚から、HHTの作用により4kDaのトレーサーの吸収促進活性が確認されたことから、次に、HHTによりどの程度のサイズのトレーサーが吸収促進できるのかについて検証を行った。モデル分子として分子量4,000、10,000、20,000（FD-4、FD-10、FD-20）のトレーサーを用い、1mMのHHTによる皮膚からの吸収量を調べた。その結果、Control群と比べて、分子量10,000までのトレーサー分子が有意に吸収されることが確認された（Fig. 5）。

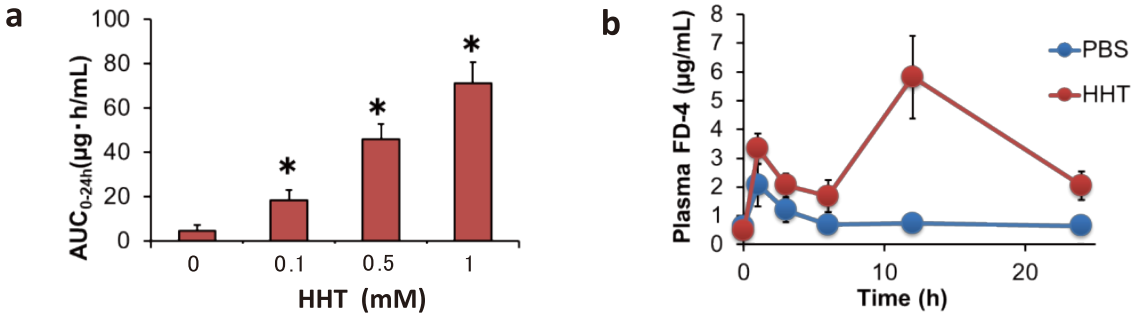

Fig. 3　HHTによるマウス経皮におけるFD-4吸収促進活性

(a)　HHT濃度別におけるFD-4貼付24時間のAUCの比較

(b)　FD-4貼付24時間までの血漿中蛍光基質濃度の推移

除毛5日後、Tape-strippingを8回行い、20mg/mL FD-4を貼付体に染み込ませ皮膚に貼付。0, 1, 3, 6, 12, 24時間において血漿中蛍光基質濃度を測定。Data are means ± SE (n=6), *P < 0.05 vs. vehicle treated groups. (Dunnett's test)

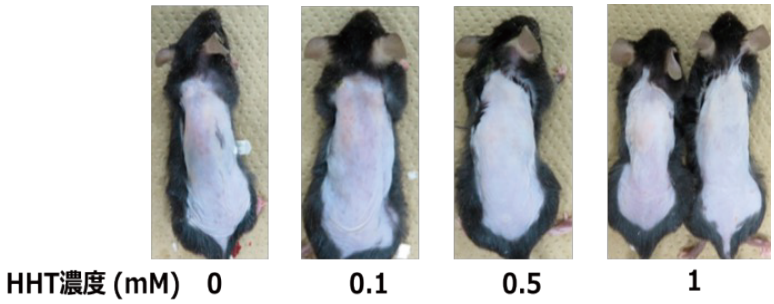

Fig. 4　HHT作用後の皮膚の状態

除毛5日後Tape-strippingを8回施行し、HHTを24時間作用させた後のマウスの皮膚の様子。

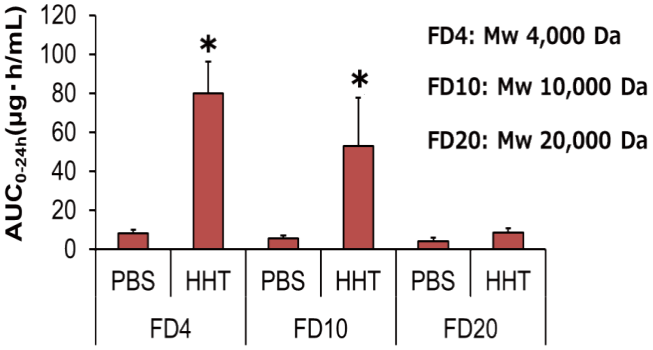

Fig. 5　HHTによる各分子量の蛍光基質の吸収量

除毛5日後、Tape-strippingを8回行い、貼付体に1mMのHHTを含む薬液を染み込ませ、24時間作用させた。各蛍光基質（FD-4、-10、-20）はそれぞれ20mg/mL含有。0, 1, 3, 6, 12, 24時間において蛍光基質濃度を測定し、AUCを算出。Data are means ± SE (n=6), *P <0.05 vs. PBS treated groups. (Student t-test)

3．4．HHTによる表皮TJ構成タンパク質への影響

HHTによるマウス表皮組織でのバリア機能低下作用についてメカニズムを探るために、HHTを作用させた際のTJ構成タンパク質への影響を蛍光免疫染色法により検証した。ヒト表皮細胞でのWestern Blotting解析による検証において発現低下が確認されたCLDN-1、CLDN-4について解析を進めた。その結果、CLDN-4の発現量や局在の変化は観察されなかった。一方、CLDN-1の局在に変化は見られなかったが、顆粒層での発現量が低下していることが確認された(Fig. 6)。以上の結果から、HHTが表皮バリア機能を低下させるメカニズムとして、CLDN-1の発現量低下が関与することが示唆された。

3．5．HHTによる経皮透過作用の検証

これまでの上皮バリアに関する研究において、分子量600程度のトレーサー分子を皮下に注入すると、野生型マウスでは、細胞間隙を透過したトレーサー分子がTJの存在部分でとどまるのに対し、CLDN-1 KOマウスでは表皮TJバリアが破綻しているため、トレーサー分子が細胞間隙を透過し、TJを超え、角質層まで移動することが報告されている[1)]。この報告をうけ、HHTを作用させたマウスの皮膚でのトレーサー分子の透過性を観察した。その結果、Control群と比べて、HHTを作用させたマウスの表皮では、トレーサー分子がTJを超え角質層付近まで透過している領域が多くみられたことから、TJバリア領域におけるトレーサー分子の透過率が増加していることが確認された（Fig. 7)。以上の結果から、HHTによりCLDN-1の発現が低下することで、上皮バリア機能が抑制され、上皮透過性が上昇していることが示唆された。

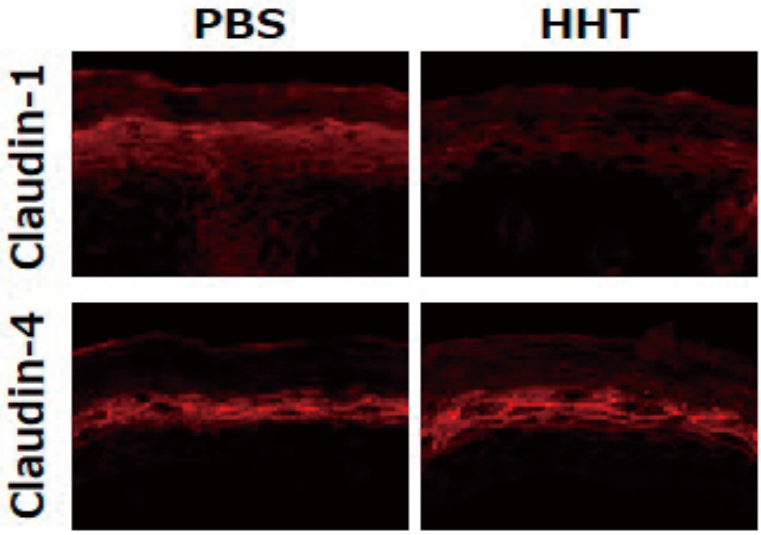

Fig. 6 HHTによるCLDN-1、CLDN-4への影響

除毛5日後、Tape-strippingを8回行い、PBS（10% DMSO）または1.0mM（10% DMSO）HHTを24時間作用させた。薬液を作用させた箇所の皮膚組織を回収し、凍結切片を作製した。CLDN-1、CLDN-4の1次抗体、2次抗体Cy®3を用いて免疫染色を行った。

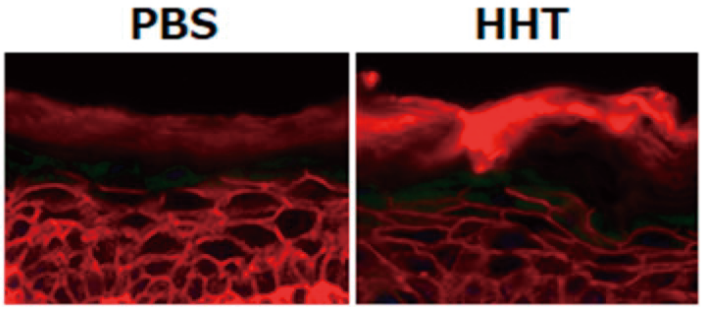

Fig. 7　HHTによる上皮透過性への影響

生後2日の新生児マウスにTape-strippingを3回行い、PBS（10% DMSO）または1.0 mM（10% DMSO）HHTを24時間作用させた。貼付体除去後、10mg/mLのbiotinを含む薬液（1 m M $CaCl_2$含）を50μL皮下に投与し、30分間インキュベーションした。薬液を作用させた箇所の皮膚組織を回収し、凍結切片を作製した。OCLNの1次抗体、2次抗体FITC（OCLNに対して）、Strepttavidin, Alexa Fluor®555 conjugate（biotinに対して）を用いて免疫染色を行った。

4．考　察

本研究では、HHTによる表皮TJバリア制御能を検討することで、表皮TJの経皮透過における重要性を検証し、表皮TJバリアに焦点を当てた新規経皮吸収促進法開発の可能性を探るため、*in vitro*および*in vivo*におけるHHTの経皮吸収促進活性の検証、また、HHT作用時のTJ構成タンパクの変動の検証を行った。

ヒト表皮細胞であるNHEK細胞を用い、TER assayおよびtracer flux assayを行った結果、HHT濃度依存的なTER値の低下、および細胞間隙透過性が亢進していたことから、HHTは表皮TJバリア制御活性を示すことが明らかとなった。また、この際、HHTによる細胞間接着分子への影響をWestern Blotting法により解析した結果、HHTはCLDN-1をはじめとしたTJ関連分子の発現低下を誘導することが確認されたため、HHTによる表皮TJバリア機能の低下はTJ構成タンパク質の変動によるものであると考えられる。続いて、角質層を除いたマウス皮膚において、HHTによる経皮吸収促進活性を評価したところ、分子量4,000のモデル分子が皮膚から吸収され、血中にまで移行することが明らかとなった。この際、分子レベルでの影響を検証するため、免疫染色法による解析を行ったところ、HHTを作用させたマウスの皮膚において、CLDN-1の発現量減少がみられた。以上の結果より、HHTの表皮TJバリア制御活性により高分子量の薬物が透過可能であることが示された。

続いて、HHTによる経皮吸収促進が可能な分子量の検証を行ったところ、分子量10,000までのトレーサー分子の有意な経皮吸収促進活性が確認された。通常、皮膚は分子量600以下のものであれば通過するとされているが[4-6]、Tape-strippingを行った皮膚では、HHTにより分子量10,000までのトレーサーの吸収が可能であり、低分子医薬品（分子量500以下）やペプチド（分子量500-2,000程度）、またはタンパク質製剤（分子量10,000-30,000程度）や、核酸医薬品（分子量3,000-10,000程度）の一部などのバイオ医薬品を経皮吸収促進する活性を有すると考えられる。

経皮吸収量の経時的変化を検証した結果、Tape-strippingの影響で貼付後すぐの吸収も見られるが、HHTを貼付してから6時間以降で有意な吸収促進効果がみられたことから、HHTによる吸収促進効果が示されるまでには数時間を要することが分かった。この理由として、TJ構成因子のターンオーバーが関わっていると考えられる。HHTは、タンパク質翻訳阻害活性をもつことが知られている[7-10]。HHTがTJ構成タンパク質の翻訳を阻害し、TJ構成因子の発現低下が認められるまで数時間を要するため、バリア抑制能を示すまでに約6時間かかると考えられる。今後さらにHHT作用濃度や作用時間などの検討を行うことにより、体内への吸収量の調整なども可能であると考えられる。

本研究ではHHTの表皮TJバリアへの影響を検証するため、除毛5日後、Tape-strippingを8回行うことにより角質層は除いた皮膚において検証を進めている。今後、より実用的な非侵襲性投与法として応用するためには、角質層バリア透過を可能にする技術と併用する必要がある。例えば、透過させたい薬物によって、Azoneやエタノールなどの化学的吸収促進、イオントフォレシスやソノフォレシスなどの物理的吸収促進法等[4,11,12]との最適な組み合わせを検証していく必要がある。

4．総　括

本研究では、表皮バリア機能の中でも表皮TJバリアに着目し、表皮TJの経皮透過における重要性の検証、また、HHTによる経皮吸収促進活性、およびTJ構成タンパク質への影響を検証した。本研究で得られた最も重要な知見は、HHTがCLDN-1の発現量を低下させることにより表皮TJバリア機能を抑制すること、また、化粧品有効成分の経皮吸収促進活性を示す可能性が示唆されたことである。本研究では、TJ構成タンパク質においてのみ、発現の影響の検証を行ったが、今後は、HHTを作用させた際のTJ構成タンパク質以外の分子への影響の検証、また、HHTの分子レベルでの作用機序の解明等さらに詳細な検証を進めていく必要がある。本研究により得られた成果は、皮膚バリア機能において重要な表皮TJバリアに関する基礎知識の蓄積に資するのはもちろんのこと、近年開発が進んでいる美白成分やアンチエイジング効果を示す機能性ペプチドや既存の有効成分の皮膚内への効率的な送達法開発に繋がる可能性を有し、コスメトロジーの分野に貢献するものと期待される。

（引用文献）

1）Furuse M. et al., Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice., *J Cell Biol.*, 156（6）, 1099-111, 2002.

2）Nakajima M. et al., Claudin-1 Binder Enhances Epidermal Permeability in a Human Keratinocyte Model., *J Pharmacol Exp Ther.*, 354（3）, 440-7, 2015.

3）Watari A. et al., Homoharringtonine increases intestinal epithelial permeability by modulating specific claudin isoforms in Caco-2 cell monolayers., *Eur J Pharm Biopharm.*, 89:232-8, 2015.

4）Barry B.W., Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery., *Eur J Pharm Sci.*, 14, 101-114, 2001.

5) Mitragotri S., Immunization without needles., *Nat Rev Immunol*., 5.12, 905-916, 2005.
6) Han S., et al., Epidermal kinetics and skin condition: I. Stripping technique for quantitating stratum corneum turnover in hairless mouse skin., *J. Toxicol-Cut. & Oculur Toxicol*., 8, 539-553, 1989-1990.
7) Perdue, R. E., et al., Cephalotaxus-source of harringtonine, a promising new amti-cancer alkaloid., *American Horticultural Society*., 49.3, 19-22, 1970.
8) Baaske, D.M., and P. Heinstein., Cytotoxicity and cell cycle specificity of Homoharringtonine., *Antimicrob. Agents Chemother*., 12, 298-300, 1997.
9) Shen, J. P., et al., Cytotoxicity of Homoharringtonine on leukemic stem-like cells in AML cell line KG-1., *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*., 41.5, 485-490, 2012.
10) Kantarjian, H. et al., Effectiveness of Homoharrinhtonine (omacetaxine mepesuccinate) for treatment of acute myeloid leukemia: a meta-analysis of Chinese studies., *Chin, Lymphoma Myeloma Leuk*., 15, 13-21, 2015.
11) Veena K., et al., Investigation on the synergistic effect of a combination of chemical enhancers and modulated iontophoresis for transdermal delivery of insulin., *Drug Dveloopment and industrial Pharmacy*., 36.8, 993-1004, 2010.
12) Brown MB. et al., Transdermal drug delivery system: skin perturbation devices., *Methods Mol Biol*., 437, 119-39, 2008.