

氏名（本籍）	加藤 詠子	（千葉県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲 第165号	
学位授与年月日	平成25年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	トコフェリルリン酸ナトリウムの抗炎症効果と皮膚水分保持能改善効果及びその機構に関する研究	
論文審査委員	主査	教授 高橋 典子
	副査	教授 福井 哲也
	副査	教授 辻 勉

論文内容の要旨

【背景】

トコフェリルリン酸ナトリウム (TPNa) は、 α -トコフェロール (α -Toc) のクロマン環の水酸基をリン酸エステル化したもので、1940 年に Karrer らによって合成された。親化合物の α -Toc は脂溶性ビタミンに属し、淡黄色で粘稠性の油状物質で、生体内において抗酸化作用を示す。 α -Toc は有機溶媒によく溶けるが水に溶けないこと、及び酸化剤によって容易に酸化され不安定であることから、取り扱いが難しい化合物であった。そこで、 α -Toc をリン酸エステル化することで安定化し、Na 塩にすることで水溶性化して TPNa が開発された。TPNa は、わが国では 2004 年に医薬部外品主剤（肌あれ予防）、その後医薬部外品添加剤（酸化防止剤）として厚生労働省に認可され、機能性化粧品原料として使用されている。

Gianello らは 2005 年に、微量の α -トコフェリルリン酸 (TP) が生体内で生成し、肝臓や皮下脂肪組織に存在することを確認した。それと前後して、TP の細胞情報伝達系に関与する可能性が報告され、その作用メカニズムの詳細は現在も解明途上にある。一方、1990 年頃から、親化合物である α -Toc の生理作用も注目され、既知の抗酸化作用のほかに、細胞内シグナル伝達や遺伝子発現調節への作用が報告されるようになり、現在も作用メカニズムの解明が行われている。

皮膚は生体の最外層に位置する組織で、表層から順に、角層、表皮層、真皮

層の順に 3 層構造をとっている。これによって皮膚は、生体を傷害や乾燥から守り、刺激に対して体温及び水分調節などの機能を担っている。このような構造の皮膚を健やかとするには、表皮層の恒常性を保ち、正常な機能を有する角層を形成し、維持することが重要であると考えられている。近年、地球環境と生活環境の変化や高齢化が進み、紫外線、ストレス、乾燥などによる皮膚のトラブル、即ち角層や表皮層の恒常性の乱れが増加している。それらを予防・改善する機能が医薬部外品や化粧品に求められ、機能性原料開発の主要な課題として認識されている。

そこで本研究では、抗酸化作用以外の機能が期待される TPNa に着目し、皮膚の抗炎症作用とそのメカニズムの解明、及び、皮膚水分保持機能改善作用とそのメカニズムの解明を目的とした。

【方法及び結果】

1) 抗炎症効果の検討

ヒト 3 次元培養モデル皮膚を用いて皮内での α -Toc への変換と紫外線 B 波 (UVB) 照射に対する防護効果を調べた。TPNa をヒト 3 次元培養モデル皮膚に経皮投与すると、浸透して皮膚内で α -Toc に変換されることを確認した。また、UVB 照射による損傷細胞の形成を抑制し、同時に炎症性物質であるプロスタグランジン E_2 (PGE_2) の産生を抑制することを確認した。

ヒト表皮角化細胞 (NHEK(F)) を用いて、 PGE_2 の産生抑制効果を調べた。このとき、肌荒れ予防効果を示す医薬部外品主剤で薬用化粧品に汎用されている酢酸トコフェロール (TA) とグリチルリチン酸ジカリウム (G2K) を対照として用いた。炎症誘発因子には UVB 照射、炎症トリガーのインターロイキン-1, β ($IL-1\beta$)、過酸化物の *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (tBHP) 及び過酸化水素 (H_2O_2) を用いた。その結果、全ての炎症誘発因子において TPNa は PGE_2 の産生を抑制し、その効果は TA や G2K よりも顕著で大きかった。以上より、TPNa は様々な炎症誘発因子により誘導される PGE_2 産生に関わる炎症反応を抑制することを明らかとした。

次に、 PGE_2 産生酵素である Cox-2 の mRNA 発現への TPNa の前処理による影響を NHEK(F) を用いて調べたところ、TPNa は Cox-2 mRNA 発現も抑制した。また、NHEK(F) に UVB 照射した際の PGE_2 産生は p38 MAP キナーゼ (MAPK) 阻害剤により抑制されたことから、p38 MAPK 経路を介していることを見出し、TPNa が Cox2 mRNA の発現制御に関わる p38 MAPK のリン酸化を

抑制していることを明らかとした。これらの結果は TPNa による PGE₂ 産生抑制の結果とよく相関していた。

さらに、アスコルビン酸誘導体（リン酸アスコルビルマグネシウム, APM）と併用することによって PGE₂ 産生抑制効果が増強することを確認した。

これらの結果は、TPNa が TA や G2K 等の既知の抗炎症剤よりも優れた抗炎症物質であることを示した。また、TPNa は UVB 照射及び過酸化物質といった外因性刺激や炎症性サイトカインといった内因性刺激による炎症反応を予防し、皮膚組織を健やかに保つ物質であることを示した。その作用メカニズムは、TPNa が p38MAPK のリン酸化を阻害することにより、Cox-2 遺伝子発現を抑制して、PGE₂ 産生を抑えるというもので、p38MAPK リン酸化を介するさまざまな炎症反応を抑制する可能性を示唆した。

以上より、TPNa は化学的に安定なトコフェロール誘導体として、皮膚を保護する有用な抗炎症物質であることが明らかとなった。

2) 皮膚水分保持機能改善効果の検討

ヘアレスマウスを用いて、*in vivo* での皮膚水分保持機能への影響を調べた。TPNa をヘアレスマウスの皮膚に 4 週間連続で投与し、水負荷試験によって皮膚の吸水能と保水能を調べたところ、それぞれが向上しており、皮膚角層の水分保持能が増強したことが明らかとなった。この試験の際に採取した皮膚角層を調べたところ、セラミド含量が増加していた。

そこで、NHEK(F) を用いて、*in vitro* でセラミド合成への影響を調べたところ、TPNa の投与によりセラミド量が増加することが明らかとなった。このとき、セラミド分解酵素の遺伝子発現には変化が無いが、セラミド合成酵素の遺伝子の発現が亢進していることを確認した。これらの結果は、TPNa が、表皮角化細胞においてセラミド合成酵素の発現を促し、角層のセラミドを増加させた結果、皮膚水分保持能を改善させることを示唆した。

角層は、積層した角質細胞とその細胞間の間隙を埋めるように存在する細胞間脂質とから構成され、外界環境に対するバリアとして機能している他、水分を保持し皮膚に柔軟性や潤いを与えている。これらの保湿機能に寄与している天然保湿因子（NMF, natural moisturizing factor）と、細胞間脂質（セラミド、コレステロール類、遊離脂肪酸など）は、表皮角化細胞が、有棘細胞・顆粒細胞と分化・成熟しながら表層へ移動して角質細胞となる過程で産生すること、及び表皮角化細胞の分化誘導因子がカルシウムイオンであることはよく知られている。

そこで、表皮角化細胞の分化に着目し、NHEK(F) を用いて分化マーカー酵素及びタンパク質の遺伝子発現について検討したところ、TPNa 処理によりトランスグルタミナーゼ 1 (TGM1), ケラチン 10 (KRT10), インボルクリン (IVL) の発現の亢進を認めた。またその際、細胞内カルシウムイオン濃度が増加することを確認した。これらの結果は、TPNa が表皮角化細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させ、細胞分化を誘導することを示唆していた。

以上より、TPNa は、表皮角化細胞へのカルシウムイオンの供給を促進し分化を誘導することで、セラミド合成酵素の発現を促し、表皮角化細胞のセラミド量を増加させる物質であることが明らかとなった。そして、これらメカニズムによって皮膚角層のセラミド量が増加し、角層の吸水能と保水能が向上する、という TPNa の皮膚水分保持機能改善効果の機構が解明された。

TPNa は化学的に非常に安定で、肌荒れ予防、抗酸化、抗炎症などの作用だけでなく、皮膚自らの水分保持能を改善する効果を持ち、保湿剤としても有用な化合物であることが明らかとなった。

【結論】

以上の結果をまとめると、TPNa は、肌荒れ予防や抗酸化作用だけでなく抗炎症剤としても有効で、その効果は医薬部外品及び化粧品に汎用されている既知の抗炎症剤に比べて優れている。さらに、保湿機能に寄与する因子の発現及び産生を促進し、皮膚自らの水分保持能を改善する効果を持ち、保湿剤としても有用な成分である。これらの知見から、TPNa は健康な皮膚の維持において優れた化合物であり、皮膚の予防薬、医薬部外品主剤としての利用が大いに期待される。

論文審査の結果の要旨

トコフェリルリン酸ナトリウム (TPNa) は、 α -トコフェロール (α -Toc) のクロマン環の水酸基をリン酸エステル化したものである。親化合物の α -Toc は脂溶性ビタミンに属し、淡黄色で粘稠性の油状物質で、生体内において抗酸化作用を示す。 α -Toc は有機溶媒によく溶けるが水に溶けないこと、及び酸化剤によって容易に酸化され不安定であることから、取り扱いが難しい化合物であった。そこで、 α -Toc をリン酸エステル化することで安定化し、Na 塩にすることで水溶性化して TPNa が開発された。TPNa は、わが国では医薬部外品主剤 (肌あれ予防)、医薬部外品添加剤 (酸化防止剤) といった機能性化粧品原料として使用されている。生体内で微量の α -トコフェリルリン酸 (TP) が生成し、肝臓や皮下脂肪組織に存在すること、TP の細胞情報伝達系に關与する可能性が報告され、その作用メカニズムの詳細は現在も解明が進められている。一方、親化合物である α -Toc の抗酸化作用以外の作用も注目され、細胞内シグナル伝達や遺伝子発現調節への関与が報告されるようになり、現在も作用メカニズムの解明が行われている。

皮膚は、生体を傷害や乾燥から守り、刺激に対して体温及び水分調節などの機能を担っている。このような構造の皮膚を健やかに保つためには、表皮層の恒常性を保ち、正常な機能を有する角層を形成し、維持することが重要である。近年、地球環境と生活環境の変化や高齢化が進み、紫外線、ストレス、乾燥などによる皮膚のトラブル、即ち角層や表皮層の恒常性の乱れが増加していることから、それらを予防・改善する機能が医薬部外品や化粧品に求められ、機能性原料開発の主要な課題となっている。

本研究の目的は、皮膚トラブルの改善と健康な皮膚の維持することであり、抗酸化作用以外の機能が期待される TPNa に着目し、TPNa の新たな効果 (皮膚の抗炎症作用、皮膚水分保持機能改善作用) とそのメカニズムの解明研究を行った。

先ず、TPNa の抗炎症効果の検討を行った。ヒト 3 次元培養モデル皮膚を用いて皮内での α -Toc への変換と紫外線 B 波 (UVB) 照射に対する防護効果を調べた。TPNa をモデル皮膚に経皮投与すると、浸透して皮膚内で α -Toc に変換されることを確認した。また、UVB 照射による損傷細胞の形成を抑制し、同時に炎症性物質であるプロスタグランジン E_2 (PGE_2) の産生を抑制することを見出した。肌荒れ予防効果を示す医薬部外品主剤で薬用化粧品に汎用され

ている酢酸トコフェロール (TA) とグリチルリチン酸ジカリウム (G2K) を対照として用い、ヒト表皮角化細胞 (NHEK(F)) 中の PGE₂ の産生抑制効果を調べた。その結果、全ての炎症誘発因子 (UVB 照射、インターロイキン-1 β 過氧化物) において TPNa は PGE₂ の産生を抑制し、その効果は TA や G2K よりも顕著で大きかった。さらに、PGE₂ 産生酵素である Cox-2 の mRNA 発現への TPNa の前処理による影響を調べたところ、TPNa は Cox-2 mRNA 発現も抑制した。また、NHEK(F) に UVB 照射した際の PGE₂ 産生は p38 MAP キナーゼ (MAPK) 阻害剤により抑制されたことから、p38 MAPK 経路を介していることを見出し、TPNa が Cox2 mRNA の発現制御に関わる p38 MAPK のリン酸化を抑制していることを明らかとした。これらの結果は TPNa による PGE₂ 産生抑制の結果とよく相関していた。さらに、アスコルビン酸誘導体 (リン酸アスコルビルマグネシウム, APM) と併用することによって PGE₂ 産生抑制効果が増強することを確認した。以上の結果は、TPNa が TA や G2K 等の既知の抗炎症物質よりも優れていることを示した。また、TPNa は、外因性刺激 (UVB 照射、過氧化物) や内因性刺激 (炎症性サイトカイン) による炎症反応を抑えることから、皮膚組織を健やかに保つ物質であることが判った。その効果は TPNa が p38MAPK のリン酸化を阻害することで、Cox-2 遺伝子発現を抑制し、PGE₂ 産生を抑えるというメカニズムで行なわれことが明らかとなり、TPNa は p38MAPK リン酸化を介するさまざまな炎症反応を抑制する可能性を示した。以上、TPNa は皮膚を保護する有用な抗炎症化合物であることが明らかとなった。

次に、ヘアレスマウスを用いて皮膚水分保持機能への影響を調べた。TPNa をヘアレスマウスの皮膚に 4 週間連続で投与し水負荷試験行ったところ皮膚の吸水能と保水能が向上していたことから、TPNa 塗布により皮膚角層の水分保持能が増強したことが明らかとなった。その際、皮膚角層セラミド含量が増加していた。そこで、NHEK(F) を用い *in vitro* でセラミド合成への影響を調べたところ、TPNa の投与によりセラミド量が増加すること、その際、セラミド分解酵素の遺伝子発現には変化が無いが、セラミド合成酵素の遺伝子の発現が亢進していることを確認した。これらの結果は、TPNa が表皮角化細胞のセラミド合成酵素の発現を促し、角層のセラミドを増加させた結果、皮膚水分保持能を改善させることを示した。角層は、外界環境に対するバリアとして機能している他、水分を保持し皮膚に柔軟性や潤いを与えている。これらの保湿機能に寄与している天然保湿因子と細胞間脂質 (セラミドなど) は、表

皮角化細胞が分化・成熟しながら表層へ移動して角質細胞となる過程で産生しており、表皮角化細胞の分化誘導因子がカルシウムイオンであることはよく知られている。NHEK(F) への TPNa 処理が分化マーカー酵素及びタンパク質の遺伝子発現の亢進と細胞内カルシウムイオン濃度の増加を引き起こしたことから、TPNa が表皮角化細胞内のカルシウムイオン濃度を増加させ、細胞分化を誘導することを示唆した。以上の結果から、TPNa は表皮角化細胞へのカルシウムイオンの供給を促進し分化を誘導することで、セラミド合成酵素の発現を促し、表皮角化細胞のセラミド量を増加させる物質であることが明らかとなった。これら段階を経て皮膚角層のセラミド量が増加し、角層の吸水能と保水能が向上させるという TPNa の皮膚水分保持機能改善メカニズムが解明された。TPNa は皮膚自らの水分保持能の改善効果を持つ保湿剤としても有用な化合物であることが明らかとなった。

以上の成果は、TPNa が化学的に安定なトコフェロール誘導体として、肌荒れ予防や抗酸化作用だけでなく抗炎症物質としても有効で、その効果は医薬部外品及び化粧品に汎用されている既知の抗炎症剤に比べて優れていることを明らかにした。また、TPNa が保湿機能因子の発現及び産生を促進し、皮膚自らの水分保持能を改善する効果を持ち、保湿剤としても有用な化合物であることを示した。

本研究は、TPNa の抗酸化剤以外の新しい有用性（抗炎症、保湿）を示し、TPNa が健康な皮膚の維持において優れた化合物であることから皮膚の予防薬、医薬部外品主剤としての利用が大いに期待される。また、全く皮膚とは異なる視点で捉えると、本研究は慢性的な炎症反応が強く関与していることが示唆されている癌、動脈硬化性疾患（心筋梗塞・脳血管障害等）、変性疾患（アルツハイマー病等）、自己免疫疾患等の発症・進行・重症化の新しい治療薬、予防薬として可能性を提案した。本研究は新たな医薬品、予防薬の開発に大いに貢献するものと考えられ、博士（薬学）の学位を授与するに十分な価値のあるものと判定した。