

ヒト摘出皮膚を用いたパスウェイ解析による 化粧品成分の網羅的な有用性評価

株式会社ニコダームリサーチ 山村 雅章

1. はじめに

化粧品開発における有用性や安全性評価は、素材や製剤の開発において重要なプロセスである。従来、これらの評価には動物実験が広く用いられてきたが、動物愛護の観点から、動物実験代替法の開発が求められている。近年、ヒト由来の細胞や組織を用いた*in vitro*試験や、コンピューターシミュレーションによる*in silico*試験など、様々な動物実験代替法が開発されている¹⁾。ヒトを対象とした臨床研究においては、侵襲性が大きい外部刺激を直接行うことは倫理的な面から困難であるため、代替となる試験法の開発が望まれている。

本研究では、ヒトを対象とした臨床研究や動物実験の代替法の1つとして、ヒト摘出皮膚を用いたパスウェイ解析による網羅的な有用性評価法の応用可能性に着目した。ヒト摘出皮膚は、ほかの実験系と比べ実際のヒト皮膚の構造と機能を有しており、化粧品成分の皮膚への影響をより正確に評価できると考えられている²⁾。また、パスウェイ解析は、細胞内の遺伝子やタンパク質の発現変化から分子間の相互作用ネットワーク（パスウェイ）を網羅的に解析する手法であり、消化器や眼科領域に留まらず皮膚科領域でも使用されている^{3~5)}。この手法を応用することにより、化粧品成分が皮膚に与える影響をより包括的かつ詳細に

評価することができ、パスウェイ解析により得られる生物学的プロセスにおける変化から、化粧品成分の皮膚への影響を詳細に評価することが可能であると考えられる。筆者らは、新鮮なヒト摘出皮膚を入手できる提携先であるOxiProteomics社と連携し、同社が有する網羅的かつ高精度なパスウェイ解析シミュレーションシステムを活用することで、化粧品開発への応用を検討している。本稿では、この提携に基づき実施したヒト摘出皮膚を用いたパスウェイ解析の具体的な事例について述べ、その結果が化粧品の新規コンセプト開発や開発期間の短縮に貢献する可能性について考察する。

2. 化粧品有効成分を含むクリーム状製剤のポテンシャル評価

2.1. 研究目的

本研究は、ヒト摘出皮膚 (*ex vivo*) を用いた比較プロテオミクスフェノタイピングアプローチにより、ヒト摘出皮膚に供したX製剤の効果を評価することを目的とした。

2.2. 実験方法

2.2.1. 試験試料

特定の化粧品有効成分（成分X）を含むクリーム状製剤（X1、X2、X3）及び成分Xを含まない基

■表1 試験試料概要

名称	詳細
X1	クリーム(成分 X 含有)、30g
X2	クリーム(成分 X 含有)、30g
X3	クリーム(成分 X 含有)、30g
対照	クリーム(基剤のみ)、30g

剤(対照)を試験試料とした(表1)。

2.2.2. ヒト摘出皮膚

美容外科手術に際して摘出された余剰皮膚を、35歳女性ドナー(スキンフォトタイプII/III)よりインフォームド・コンセントを得た上で、ヒト摘出皮膚として実験に供した。

2.2.3. ヒト摘出皮膚への製剤の適用

ヒト摘出皮膚を適切なサイズにカットし、各群(X1群、X2群、X3群、対照群)に3回ずつ割り当てた。最適化された培養条件下で、各群に対し製剤(X1、X2、X3)または基剤を1日2回、6回局所塗布した(2mg/cm²)。最終塗布後、摘出皮膚をPBSで洗浄し、急速凍結後-80℃で保存した。

2.2.4. プロテオミクス解析

摘出皮膚から最適化した溶解バッファーによりタンパク質を抽出し、ブラッドフォード法を用いてタンパク質濃度を測定し、SDS-PAGEによりタンパク質の品質を確認した。各サンプル由来のタンパク質50 μgをLC-MS/MSにて分析後、得られたスペクトルデータをソフトウェアDIA-NN

ク質(赤色で表示)または減少したタンパク質(緑色で表示)と定義した。

2.2.6. パスウェイ解析

観察されたタンパク質発現変動の生物学的意義を解明するため、プロテオームデータセットに対しIngenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いた解析を実施した。この解析により、検出されたタンパク質の発現プロファイルに基づき、関連する生物学的機能の活性化または阻害を予測し、特に皮膚に関連する機能を同定した。活性化及び阻害の程度はz-scoreにて評価し、正の値は活性化、負の値は阻害を示すものとした。

IPAソフトウェアのCanonical Pathway Analysisを実施し、細胞恒常性に関与する主要なカノニカル経路における皮膚機能関連パスウェイの活性状態を予測した。さらに、Upstream Regulator Analysisにより、本データセットで観察されたタンパク質発現変動に基づいて、それらの上流に位置する転写因子の活性状態を評価し、パスウェイ全体の制御機構を推定した。加えて、

これ以降の閲覧を希望の場合は、本誌をご購読ください。