

皮膚送達剤を目的としたキノン型ビタミンKの光不安定性および光毒性を克服できる活性型ビタミンKエステル型プロドラッグに関する研究

後藤 将太郎

福岡大学薬学部創剤学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Prodrugs for Skin Delivery of Active Form of Vitamin K, Could Overcome the Photoinstability and Phototoxicity of Quinone-type Vitamin K

Shotaro Goto

Department of Formula Design, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, Nanakuma 8-19-1, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Topical application of vitamin K is beneficial in the treatment of various skin pathologies. However, its delivery to the skin is hampered by the photo-instability and phototoxicity of vitamin K (quinone form). Indeed, topical use of vitamin K is regulated in Europe owing to the photosensitive properties of this molecule. Here, we evaluated the suitability of ester derivatives of vitamin K hydroquinone (VKH), the active form of vitamin K, for topical application to overcome the abovementioned problems of vitamin K. We used the VKH derivatives VKH-1,4-bis-*N,N*-dimethylglycinate hydrochloride (VKH-DMG) and VKH-1,4-bis-hemisuccinate (VKH-SUC) for our studies. Photostability was determined by measuring the residual concentration after irradiation with artificial sunlight and multi-wavelength light. Phototoxicity after ultraviolet A (UVA) irradiation was assessed by measuring drug-induced singlet oxygen and intracellular reactive oxygen species (ROS) generation, and cell viability of a human epidermal keratinocyte cell line (HaCaT). Delivery of VKH into HaCaT cells was assessed by measuring vitamin K epoxide (VKE) levels. The VKH derivatives showed higher photostability than vitamin K. After UVA irradiation, vitamin K induced high singlet oxygen levels and intracellular ROS generation, and reduced cell viability, whereas the VKH derivatives showed no effects. The VKH derivatives increased intracellular VKE levels. $AUC_{VKE(0-72h)}$ values after VKH-DMG and VKH-SUC treatments were equal or higher than that after vitamin K treatment, respectively. In conclusion, VKH derivatives act as VKH prodrugs and are suitable for topical application without the need for special protection from light.

keywords : vitamin K, photostability, phototoxicity, skin application, prodrug

【緒言/目的】

ビタミンK (VK) の皮膚適用は、EGFR阻害剤セツキシマブの副作用である蕁麻疹の予防 [1, 2], 創傷治癒促進 [3, 4], レーザー治療後の色素沈着抑制 [5, 6] などの有益な効果が期待されている。しかし、VKは光不安定性が低く [7, 8], 遮光困難な皮膚への適用は強く制限される。さらに、VKの光分解過程では、VK構造中のキノンと側鎖の二重結合において、一重項酸素やラジカルを生成し、生体組織に対して光毒性を引き起こす可能性がある。欧州では、VK₁ (フィロキノン, PK) の化粧品への使用が禁止された経

緯があり、その根拠の一つに培養皮膚細胞に対する光毒性が示されている [9, 10]。

VKは細胞内で活性体であるVKヒドロキノン(VKH)へ還元され、VK依存性タンパク質(VKDP)を前駆体から活性体へ変換(翻訳後修飾)する γ -グルタミルカルボキシラーゼ(GGCX)の補因子として機能したのち、VKエポキシド(VKO)へ酸化される。VKOはさらにVKへ還元されVKサイクルを形成している。したがってVKの効率的な効果発現には、標的部位へ十分なVKHを送達することが必要となる。しかし、上述のようにVKは光安定性が低いため、露光下では十分なVKH送達性が得られず、さらには光毒性が懸念される。

本研究室では、PKの活性体であるフィロヒドロキノン(PKH)のエステル型誘導体、PKH-1,4-bis-*N,N*-dimethylglycinate hydrochloride (PKH-DMG), PKH-1,4-bis-hemi-succinate (PKH-SUC) およびVK₂(メナキノロン-4, MK-4)の活性体であるメナヒドロキノン-4(MKH)のエステル型誘導体、MKH-1,4-bis-*N,N*-dimethylglycinate hydrochloride (MKH-DMG), MKH-1,4-bis-hemi-succinate (MKH-SUC)を開発しており、キノン型VKとは異なる経路でVKHを細胞内へ送達するよう設計されている(Fig. 1) [11-14]。これらの化合物は、構造中にキノンを有しないため、光曝露後のラジカル生成反応に発展しなければ、VKの光不安定性と光毒性を克服できる可能性があると考えた。

そこで本研究では、VKH誘導体の皮膚外用剤としての有用性を明らかにすることを目的に、キノン型VKとVKH誘導体の光安定性、光毒性、および皮膚細胞へのVKH送達性を評価した。

第一に、キノン型VKとVKH誘導体の光安定性を擬似太陽光照射装置および多波長照射機を用いて評価し、キノン型VKと比較して、VKH誘導体が光に対して安定であることを明らかにした。第二に、キノン型VKはUVA照射により、一重項酸素の生成や表皮角化細胞内での濃度依存的なROS量の増加、それに続く細胞死を引き起こすことを示した。その一方で、VKH誘導体は、UVA照射による一重項酸素の生成、細胞内ROS量の増加および細胞死を示さなかった。第三に、キノン型ビタミンKとVKH誘導体の表皮角化細胞内に対する細胞内取り込みとVKH送達性(再変換性)を評価し、VKH誘導体は、キノン

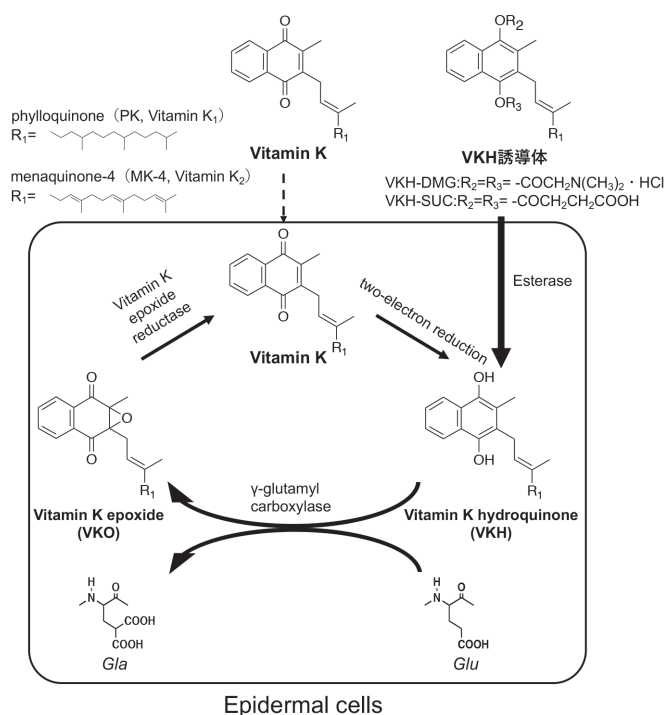


Fig. 1 Concept underlying the epidermal delivery system of VKH, which avoids photo-instability and phototoxicity, using VKH derivatives.

型VKと同等以上のVKH送達性を有するVKHプロドラッグとして機能することを明らかとした。

本研究はVKH誘導体が、キノン型VKの欠点である光不安定性と光毒性を克服でき、特別な遮光をせずに皮膚細胞へVKHを送達できるVKHプロドラッグとして機能することを世界で初めて示したものであり、VKH誘導体の皮膚外用剤としての有用性を強く支持するものであった。

【実験方法】

光安定性試験

キノン型VKおよびVKH誘導体のエタノール（1 μ M）溶液を石英セルに入れ、人工太陽光（SOLAX 100 W XC-100 B, Seric Ltd. Tokyo, Japan）を照射した。光分解の波長特性の検討においては、多波長照射分光計（MM 3, 分光計器株式会社, Tokyo, Japan）を用いて単色光（279, 341, 373, 404, 435 nm）を照射した。残存濃度はLC-MS/MSを使用して測定した。

光毒性試験

溶液中の一重項酸素の測定は、リン酸緩衝液（NaPB, pH 7.4）にUVA（CL-1000L UV Crosslinker, UVP, Upland, CA, USA）を照射し、照射前後の吸光値から算出した。細胞内ROS生成は、2',7'-dichlorofluorescein diacetate（DCFH-DA; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を使用して測定した。細胞生存率はCell Tite-Glo Luminescent Cell Viability Assayを使用して測定した。

皮膚角化細胞へのVKH送達性

HaCaT細胞を24ウェルプレートに 5.0×10^4 cells/wellの密度で播種し、48時間培養後、5 μ Mのキノン型ビタミンKおよびVKH誘導体を含む培地を添加した。一定時間、薬物を細胞に曝露した後、細胞を回収し、methanolおよびn-hexaneを加え、1750 \times gで10分間遠心分離した。n-hexane層をN₂ガス下で乾固したものを細胞内VKO抽出物とし、LC-MS/MSにて濃度の測定を行なった。

【結果/考察】

1. キノン型VKとVKH誘導体の光安定性

皮膚適用を想定した医薬品は、光に曝される可能性が高く、原薬の薬効を最大限に発揮するためにも、光に対する安定性の確保が極めて重要となる。そこで、VKH誘導体の皮膚外用剤としての適用実現を目指す観点から、キノン型VKとVKH誘導体の擬似太陽光に対する安定性と光分解の波長特性について評価を行なった。

エタノール溶液中のPK, MK-4, PKH-DMG, MKH-DMGの残存率は、擬似太陽光照射下において、擬一次反応速度式に従って減少したが、遮光下ではいずれも変化しなかった（Fig. 2A, B, D, E）。一方でsuccinate（SUC）を修飾基に有するPKH-SUCおよびMKH-SUCの残存率は遮光時においても擬一次反応速度式に従って減少し、擬似太陽光照射により加速された（Fig. 2C, F）。PKH-DMGとPKH-SUCの半減期は、PKと比較しそれぞれ40倍、4.5倍長く、またMKH-DMGとMKH-SUCの半減期は、MK-4と比較しそれぞれ50倍、3倍長いことが明らかとなった。

また、光分解の波長特性を評価したところ、キノン型VKの光分解の波長特性は、紫外線から可視光線域にあたる279-435 nmの範囲の単色光の全てにおいて分解を示し、短波長になるにつれ分解速度が増加した。一方で、VKH誘導体は279 nmにおいて光分解し、キノン型VKと比較して光分解の影響を受ける波長域が狭いことが明らかとなった。

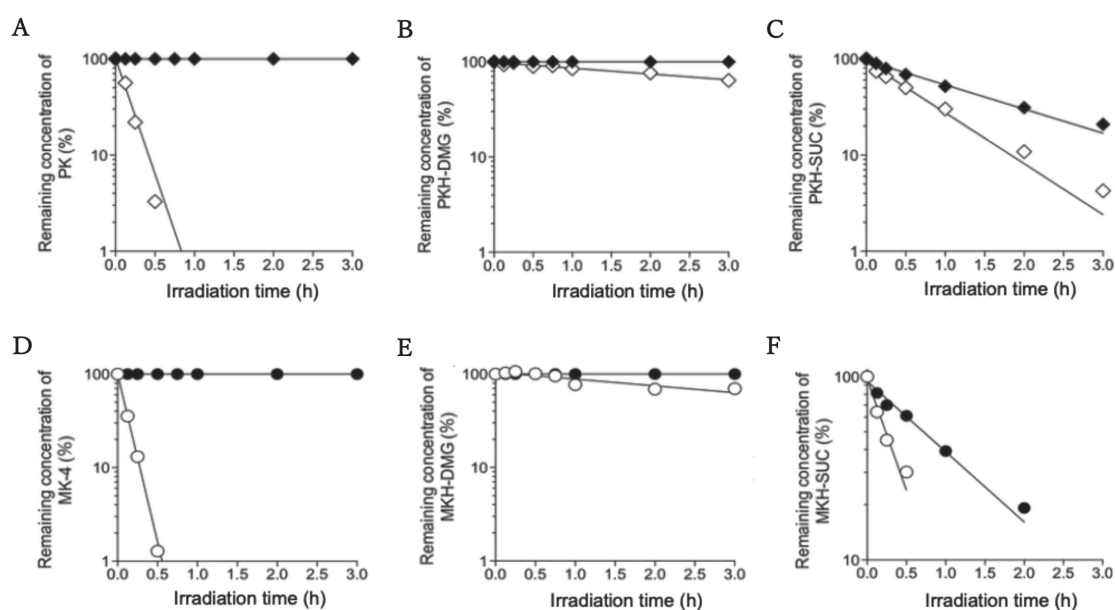


Fig. 2 Semilogarithmic plot of quinone type vitamin K and VKH derivatives (1 μ M in ethanol) after irradiation with artificial sunlight (12000 lx) at 25°C. (A) PK, (C) PKH-DMG and (E) PKH-SUC with (◆) and without (◇) shading and (B) MK-4, (D) MKH-DMG and (F) MKH-SUC with (●) and without (○) shading.

2. キノン型VKとVKH誘導体の光毒性

化粧品や医薬品の原料の一部は、光と反応し皮膚に毒性を引き起こす光毒性反応を示す物質が存在する [15, 16]。光毒性反応では、光エネルギーの吸収によって励起された分子が起点となり、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) やラジカルの生成を介して、DNAやタンパク質に損傷を与える [17, 18]。そのため、光毒性を示す化合物であるかを検討する際、生成するROSを指標とすることができる。そこで、VKH誘導体の光に対する安全性を明らかにするため、ROS生成を指標とした光毒性の評価を行った。

まず光照射による溶液中での一重項酸素の生成を評価した。PBS溶液中のキノン型VKに15 J/cm²のUVAを照射すると、陽性対照のケトプロフェンと同様にUVAエネルギーの用量依存的な一重項酸素生成を示した。対照的に、PBS溶液中のVKH誘導体は陰性対照スリソベンゾンと同様にこの現象を示さなかった (Fig.3)。

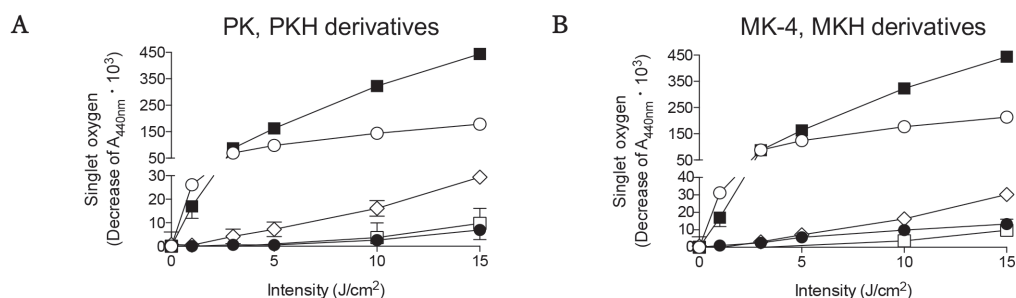


Fig. 3 Singlet oxygen generation in aqueous solutions of quinone type vitamin K and VKH derivatives at different irradiation intensities using UVA (0–15 J/cm²). (A) ○: PK, ●: PKH-DMG, ◇: PKH-SUC, ■: ketoprofen (positive control), and □: sulisobenzone (negative control). (B) ○: MK-4, ●: MKH-DMG, ◇: MKH-SUC, ■: ketoprofen (positive control), and □: sulisobenzone (negative control). Data represent mean \pm SD (n = 3).

次に、光毒性の細胞への影響を検討するために、ヒト表皮角化細胞株であるHaCaT細胞を用いて、UVAを照射したキノン型VKとVKH誘導体による細胞内ROS生成 (Fig. 4A,B) と細胞生存率を評価した (Fig. 4C,D)。UVA照射によりキノン型VKは、細胞内ROS量が増加し、それに続く細胞毒性を示した一方で、VKH誘導体は細胞内ROS量の増加および細胞毒性を示さなかった。以上の結果、VKH誘導体は光毒性を有する可能性が低いことが明らかとなった。

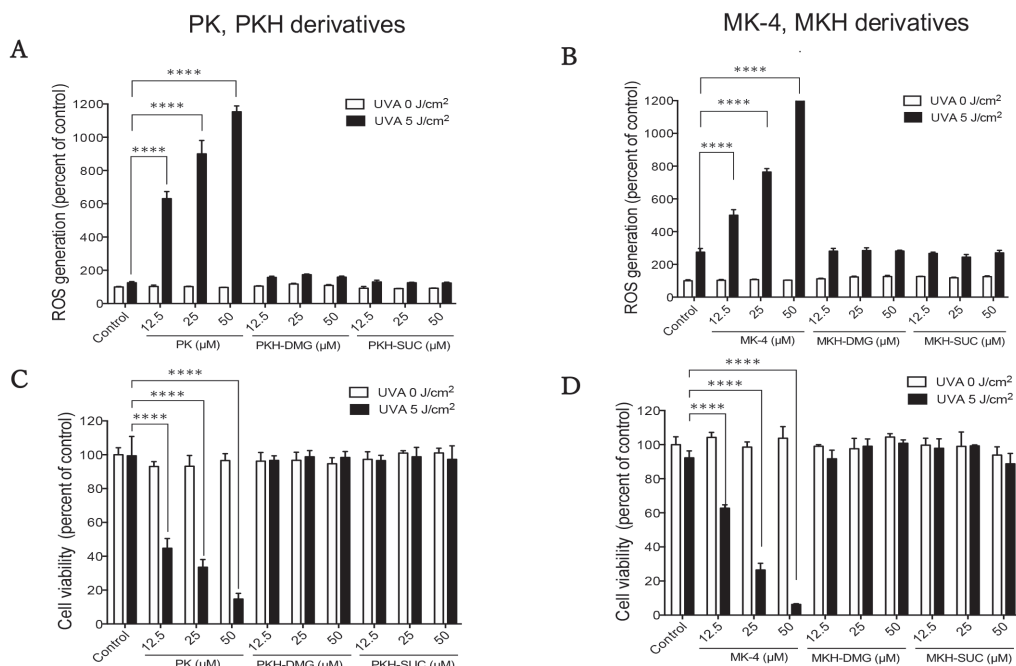


Fig. 4 Percent of intracellular ROS generation in HaCaT cells in aqueous solutions of quinone type vitamin K and VKH derivatives at different concentrations with or without UVA irradiation (5 J/cm²). (A) PK and PKH derivatives. (B) MK-4 and MKH derivatives. Data represent means ± SD (n = 3). **** p < 0.001 by Dunnett's test.

3. キノン型VKおよびVKH誘導体による皮膚角化細胞へのVKH送達性

VKH誘導体が皮膚由来細胞においてVKHプロドラッグとして機能するかを確認するために、HaCaT細胞へのVKH送達性を評価した。VKHは空气中で容易に酸化されやすく、正確に測定することは困難である。そのため、細胞内においてVKHがGGCXの補因子として機能したのちに化学量論的に生成するVKO濃度をVKH送達性の指標として用いた。PK, MK-4により生成するVKOをそれぞれPKエポキシド(PKO), MK-4エポキシド(MKO)として示した (Fig. 5)。

PKH-DMGおよびPKH-SUC添加群のAUC_{PKO} (0-72h) は、PK添加群よりもそれぞれ0.741倍および22.9倍高かった (Fig. 5A)。一方、MKH-DMGおよびMKH-SUC添加群のAUC_{MKO} (0-72h) は、MK-4添加群よりもそれぞれ1.02倍および1.64倍高かった (Fig. 5B)。以上の結果から、VKH誘導体は、キノン型VKと同等以上のVKH送達性を有するVKHのプロドラッグとして機能することが明らかとなった。

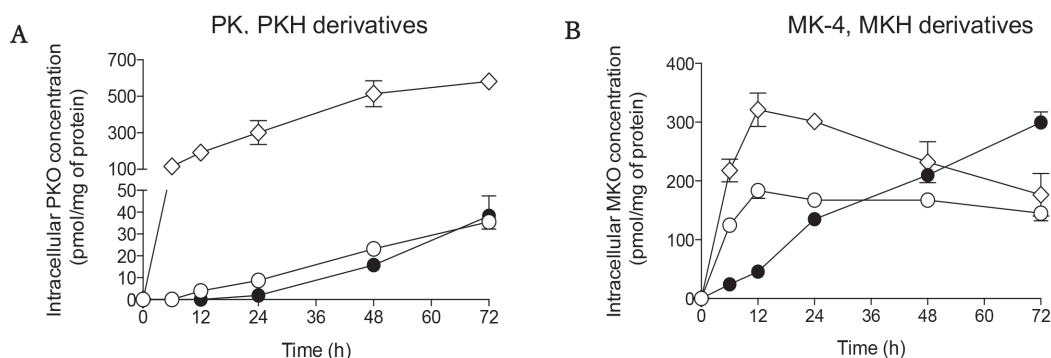


Fig. 5 Intracellular VKO concentrations of HaCaT cells after treatment with quinone type vitamin K and VKH derivatives (5 μ M). VKO concentrations were determined using LC-MS/MS. (A) PKO concentrations after treatment with ○: PK, ●: PKH-DMG, or ◇: PKH-SUC. (B) MKO concentrations after treatment with ○: MK-4, ●: MKH-DMG, or ◇: MKH-SUC. Data represent means \pm SD (n = 3).

【考察】

本研究により、VKH誘導体はキノン型VKの光不安定性および光毒性を克服し、皮膚細胞へVKHを十分に送達できるVKHのプロドラッグとして機能することが明らかとなった。VKH誘導体は、特別な遮光管理を必要とせず、キノン型VKよりも安全にVKHを皮膚送達できる皮膚外用剤として用途が期待できる。3次元皮膚モデルなどの生体皮膚環境を反映できる試験系での評価や、病態モデルへの効果評価が次の課題である。

【参考文献】

1. Ocvirk, J. Management of cetuximab-induced skin toxicity with the prophylactic use of topical vitamin K 1 cream. *Radiology and Oncology* 44, 265-266, doi: 10.2478/v10019-010-0036-6 (2010).
2. Gaiser, M. R. *et al.* Evaluation of EGFR inhibitor-mediated acneiform skin toxicity within the double-blind randomized EVITA trial: A thorough gender-specific analysis using the WoMo score. *Cancer Med*, doi: 10.1002/cam4.2132 (2019).
3. Hemmati, A. A. *et al.* Topical vitamin K-1 promotes repair of full thickness wound in rat. *Indian Journal of Pharmacology* 46, 409-412, doi: 10.4103/0253-7613.135953 (2014).
4. Pazyar, N. *et al.* Wound healing effects of topical Vitamin K: A randomized controlled trial. *Indian Journal of Pharmacology* 51, 88-92, doi: 10.4103/ijp.IJP_183_18 (2019).
5. Shah, N. S. *et al.* The effects of topical vitamin K on bruising after laser treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology* 47, 241-244, doi: 10.1067/mjd.2002.120465 (2002).
6. Lou, W. W. *et al.* Effects of topical vitamin K and retinol on laser-induced purpura on nonlesional skin. *Dermatologic Surgery* 25, 942-944, doi: 10.1046/j.1524-4725.1999.99145.x (1999).
7. Teraoka, R. & Matsuda, Y. Stabilization-oriented preformulation study of photolabile menatetrenone (vitamin K2). *International Journal of Pharmaceutics* 93, 85-90, doi: 10.1016/0378-5173(93)90166-d (1993).
8. Hangarter, M. A. *et al.* Primary photoreactions of phyloquinone (vitamin K-1) and plastoquinone-1 in solution. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2, 524-535, doi: 10.1039/b301808n (2003).
9. Official Journal of the European Union., 2009. Commission Directive 2009/6/EC of 4 February 2009 amending Council Directive 76/768/EEC, concerning cosmetic products, for the purpose of adapting

- Annexes II and III thereto to technical progress. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32009L0006&from=GA>. (accessed on 22 February 2021).
10. Scientific Committees on Consumer Safety of the European Commission, 2010. Opinion on Vitamin K1 (Phytonadione). https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_014.pdf. (accessed on 22 February 2021).
 11. Takata, J. *et al.* Vitamin K Prodrugs: 1. Synthesis of Amino Acid Esters of Menahydroquinone-4 and Enzymatic Reconversion to an Active Form. *Pharmaceutical Research* 12, 18-23, doi:10.1023/a:1016274201137 (1995).
 12. Takata, J. *et al.* Vitamin K prodrugs .2. Water-soluble prodrugs of menahydroquinone-4 for systemic site-specific delivery. *Pharmaceutical Research* 12, 1973-1979, doi: 10.1023/a:1016208409992 (1995).
 13. Takata, J. *et al.* Prodrug for bioreductive activation-independent delivery of menahydroquinone-4: Human liver enzymatic activation and its action in warfarin-poisoned human liver. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 22, 172-178 (1999).
 14. Setoguchi, S. *et al.* Antitumor Effects and Delivery Profiles of Menahydroquinone-4 Prodrugs with Ionic or Nonionic Promoiety to Hepatocellular Carcinoma Cells. *Molecules* 23, doi:10.3390/molecules23071738 (2018).
 15. Fu, P. P. *et al.* Photoreaction, phototoxicity, and photocarcinogenicity of retinoids. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 21, 165-197, doi: 10.1081/GNC-120026235 (2003).
 16. Wang, L. *et al.* Phototoxicity and DNA damage induced by the cosmetic ingredient chemical azulene in human Jurkat T-cells. *Mutat Res* 562, 143-150, doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.06.002 (2004).
 17. Foote, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* 54, 659-659, doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x (1991).
 18. Baptista, M. S. *et al.* Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochemistry and Photobiology* 93, 912-919, doi: 10.1111/php.12716 (2017).