

原 著

マトリックスメタロプロテアーゼの発現および
活性に対する過酸化ベンゾイルの作用

マルホ株式会社

藤 川 昂 樹¹・平 野 尚 茂¹・田 村 理 絵¹
 林 直 樹¹・北 野 高 道¹・藤 川 み か¹
 大 寄 美 保¹・関 口 皓 太¹・松 田 翔 一¹
 泉 水 友 洋¹・遠 山 かほり¹・森 幸¹
 松 本 辰 美²・池 田 文 昭²

要 旨

Matrix metalloproteinases (MMPs) および MMPs の活性を制御する tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) は、尋常性ざ瘡での炎症反応に関与すると考えられている。本研究では、これらの発現に対する過酸化ベンゾイル (BPO) の作用を検討するために、BPO を 2.5% 含有するゲル (2.5% BPO ゲル) を反復塗布 (1, 4, 7, 21, 35 および 49 日間) したヘアレスマウスの耳介表皮中の MMP-1, -2, -3, -8, -9 および -13 ならびに TIMP-1, -2, -3 および -4 の mRNA 発現量を測定した。2.5% BPO ゲルの反復塗布により、MMP-1b, -2, -3, -9 および -13, ならびに TIMP-1, -2 および -3 の mRNA 発現量がプラセボ塗布群と比べ有意に低下し、特に MMP-9 の顕著な低下が認められた。加えて、49 日間塗布後の MMP-9 および TIMP-1 のタンパク質発現量を測定した結果、2.5% BPO ゲル塗布群の MMP-9 発現量および MMP-9/TIMP-1 比はプラセボ塗布群と比べ有意に低かった。

次に、MMP-1, -2, -3, -8, -9 および -13 に 3.7~300 μ M の BPO を作用させた結果、各種 MMPs の活性を阻害する傾向がみられ、特に MMP-2 に対して強い阻害作用を示した。

本研究において、2.5% BPO ゲルのマウス耳介への反復塗布により、表皮中の MMP-9 発現量および MMP-9/TIMP-1 比が低下することが見出された。また、BPO には MMP-2 の活性を直接的に阻害する作用も認められた。以上から、これらの作用が BPO の尋常性ざ瘡に対する治療効果に寄与する可能性が考えられた。

1: 開発研究部 (現・研究部) 2: 探索研究部 (現・事業開発部)

責任著者連絡先: マルホ株式会社 研究部 藤川昂樹

〒600-8815 京都市下京区中堂寺粟田町93

キーワード: 過酸化ベンゾイル, 尋常性ざ瘡, 皮疹, MMP, TIMP

緒言

尋常性ざ瘡は、思春期以降に発症する顔面、胸背部の毛包脂腺系を場とする脂質代謝異常、角化異常、*Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) 等の細菌の増殖が複雑に関与する慢性炎症性疾患である¹⁾。尋常性ざ瘡の病態は、肉眼では見ることができない微小面皰を前段階とし、非炎症性皮疹である面皰（閉鎖面皰，開放面皰），続いて炎症性皮疹（丘疹，膿疱，結節）へと進展していく。そのため，尋常性ざ瘡の治療では，炎症性皮疹の治療のみならず，微小面皰および非炎症性皮疹を治療することで，炎症性皮疹への進展を抑制することも重要である。

Matrix metalloproteinases (MMPs) は，様々な細胞外マトリックス構成成分や非マトリックスタンパク質を分解する亜鉛依存性エンドペプチターゼである²⁾。ヒトでは24種類のMMPsが確認されており，ドメイン構造と基質特異性の違いによって，コラゲナーゼ群 (MMP-1, -8, -13および-18)，ゼラチナーゼ群 (MMP-2および-9)，ストロムライシン群 (MMP-3, -10および-11)，膜型MMPs群 (MMP-14, -15, -16, -17, -24および-25)，マトリライシン群 (MMP-7および-26) の大きく5つのグループに分類することができ，他のMMPs (MMP-12, -19, -20, -21, -23, -27および-28) はその他に分類される³⁾。MMPsの活性はtissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) により制御され，TIMPsには4種類のアイソフォーム (TIMP-1~4) が存在する^{3,4)}。MMPsは関節リウマチやアテローム性動脈硬化症を含む多くの炎症性疾患に関与することも知られており^{5,6)}，ざ瘡患者の炎症性皮疹部位などではMMP-1, -2, -3, -8, -9および-13のmRNAやタンパク質の発現が認められている^{7~11)}。加えて，*C. acnes*がケラチノサイトからのMMP-9発現量を増加させることで，ざ瘡の炎症を誘発する可能性も報告¹²⁾されている。以上の報告から，MMPsがざ瘡の炎症

にも関与している可能性が考えられる。

過酸化ベンゾイル (BPO) は，欧米では1960年代から外用ざ瘡治療薬として使用され¹³⁾，現在は標準的な外用ざ瘡治療薬として世界中で汎用されている^{14,15)}。日本では2014年12月に2.5% BPO含有ゲル剤（ベピオ[®]ゲル2.5%，マルホ株式会社）が尋常性ざ瘡治療薬として承認されている。本剤は，*C. acnes*に対する抗菌作用^{16)~19)}，角層剥離作用および面皰縮小作用²⁰⁾により治療効果を発揮すると考えられており，非炎症性皮疹および炎症性皮疹のどちらにも有効である^{21)~23)}。しかしながら，炎症性皮疹部で発現しているMMPsに対してBPOにどのような作用があるのかはわかっていない。そこで本研究では，MMPsおよびTIMPsの活性を制御するTIMPsの発現に対するBPOの作用を検討するために，2.5% BPOゲルを反復塗布したヘアレスマウスの耳介表皮中のMMPsおよびTIMPsのmRNA発現量およびタンパク質発現量を評価した。また，MMPs活性に対するBPOの直接的な阻害作用もあわせて評価した。

I 材料と方法

1. 動物

ヘアレスマウス (Hos: HR-1, 雄性, 7週齢) は日本エスエルシー株式会社から購入した。マウスは室温20~26℃，湿度30~70%，照明時間12時間 (明期: 7時~19時，暗期: 19時~7時) の環境下で飼育し，飼料および飲水は自由摂取とした。5日間馴化飼育した後，実験に使用した。なお，全ての動物実験はマルホ株式会社の動物実験倫理規定に準じて実施した。

2. 薬物投与

ヘアレスマウスの両耳に2.5% BPOゲル (ベピオゲル2.5%，マルホ株式会社) およびプラセボとしてベピオゲル2.5%の基剤成分 (マルホ株式会社) を1日1回20μL (両面10μL

ずつ) ずつ, 1, 4, 7, 21, 35および49日間
反復経皮投与した。

3. 耳介表皮中のmRNA発現量およびタンパク質発現量の測定

1) 耳介表皮シートの作製

最終投与から24時間後にマウスを安楽死させ、両耳介を採取した。Yokouchiらの方法²⁴⁾を参考に、採取した耳介から表皮シートを作製した。耳の外側(背側)の皮膚をピンセットで剥がして、内側(顔側)の皮膚に付着している軟骨を取り除き、皮膚シートを作製した。作製した皮膚シート2枚を角層が上になるように1mmol/L CaCl₂含有 phosphate-buffered saline (以下、PBS) に浮遊させて洗浄した。15000PU/mL ディスパーゼ[®] II (合同酒精株式会社) 溶液に、皮膚シートを角層が上になるように浮遊させた後、37°Cで8分間インキュベートした。その後に皮膚シートから真皮を剥離することで表皮シートを作製した。

2) mRNA発現量の測定

作製した左耳介の表皮シートからRNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。その後、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA, TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を混合し、QuantStudio[™] 7 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により real time PCR を行い、MMP-1a (Assay ID: Mm00473485_m1), MMP-1b (Assay ID: Mm00473493_g1), MMP-2 (Assay ID: Mm00439498_m1), MMP-3 (Assay ID: Mm00440295_m1), MMP-8 (Assay ID: Mm00439509_m1), MMP-9 (Assay ID: Mm00442991_m1), MMP-13 (Assay ID: Mm00439491_m1), TIMP-1 (Assay ID: Mm01341361_m1), TIMP-2 (Assay

ID: Mm00441825_m1), TIMP-3 (Assay ID: Mm00441826_m1) および TIMP-4 (Assay ID: Mm01184417_m1) の mRNA 発現量を測定した。なお、コントロール遺伝子は GAPDH (Assay ID: Mm99999915_g1) を用いた。

3) タンパク質発現量の測定

作製した右耳介の表皮シートにホモジナイズバッファー (1% Protease inhibitor および 0.01% Tween 20 含有 PBS) を加え、シェイクマスター[®] (株式会社バイオメディカルサイエンス) で破碎した後に、遠心分離し、上清を回収した。回収した上清から Quantikine[®] ELISA, Mouse Total MMP-9 Immunoassay (R&D Systems) で MMP-9 発現量, Quantikine[®] ELISA, Mouse TIMP-1 Immunoassay (R&D Systems) で TIMP-1 発現量および Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で総タンパク質量を測定した。なお、測定した MMP-9 および TIMP-1 発現量は、総タンパク質量で補正した。

4. 蛍光基質を用いた MMPs 活性測定

Reaction buffer [50mM HEPES (pH 7.5), 10mM CaCl₂, 0.01% Brij 35, 0.01% BSA, 1% DMSO] に各種 MMPs を添加した。MMPs を添加した Reaction buffer に BPO を終濃度が 3.7, 11.1, 33.3, 100 および 300 μM となるように添加して、室温で20分間インキュベートした。インキュベーション後、蛍光標識ペプチド基質を添加して、室温で120分間、5分毎に蛍光強度 (励起波長: 485 nm, 蛍光波長: 520 nm) を測定した。得られた測定値から、直線域の傾き (蛍光強度/時間) を算出し、傾きの比から各 BPO 濃度での阻害率を算出した。各種 MMPs に対する BPO の IC₅₀ 値は Graphpad Prism (ver. 4.01) を用いて作成した回帰曲線から算出した。

5. 統計解析

mRNA 発現量およびタンパク質発現量の実験結果は平均値 ± 標準誤差で、MMPs 活性の

実験結果は平均値で示した。mRNA 発現量については、各塗布日数のプラセボ塗布群と2.5% BPOゲル塗布群の間で、タンパク質発現量についてはプラセボ塗布群と2.5% BPOゲル塗布群の間でStudentまたはAspin-Welchのt検定を行い、統計学的有意水準は5%未満とした ($p < 0.05$, 両側検定)。

II 結果

1. 2.5% BPOゲル塗布によるマウス耳介表皮中のMMPsおよびTIMPsのmRNA発現量に及ぼす影響

2.5% BPOゲルおよびプラセボを1, 4, 7, 21, 35および49日間塗布したヘアレスマウスの耳介表皮中のMMP-1b, -2, -3, -9および-13, ならびにTIMP-1, -2, -3および-4のmRNA発現量をFigure 1に示す。2.5% BPOゲル塗布群のMMP-1bのmRNA発現量は21および49日間塗布で、MMP-2のmRNA発現量は4, 7および21日間塗布で、MMP-3のmRNA発現量は21および49日間塗布で、MMP-9のmRNA発現量は4, 7, 21, 35および49日間塗布で、MMP-13のmRNA発現量は21および49日間塗布で、プラセボ塗布群と比較して有意に低下した [Figure 1-(a)~(e)] {[MMP-1b : $p = 0.0289$ (21日間塗布), $p = 0.0011$ (49日間塗布)] [(MMP-2 : $p = 0.0024$ (4日間塗布), $p = 0.0226$ (7日間塗布), $p = 0.0189$ (21日間塗布))] [MMP-3 : $p = 0.0226$ (21日間塗布), $p = 0.0002$ (49日間塗布)] [MMP-9 : $p = 0.0001$ (4日間塗布), $p = 0.0004$ (7日間塗布), $p = 0.0001$ (21日間塗布), $p = 0.0027$ (35日間塗布), $p = 0.0002$ (49日間塗布)] [MMP-13 : $p = 0.0346$ (21日間塗布), $p = 0.0213$ (49日間塗布)]}。また、TIMP-1のmRNA発現量は21および49日間塗布で、TIMP-2のmRNA発現量は7日間塗布で、ならびにTIMP-3のmRNA発現量は4, 7, 21, 35および49日間塗布で、プラセボ塗布群と比較して有意に低かった

[Figure 1-(f)~(h)] {[TIMP-1 : $p = 0.0003$ (21日間塗布), $p = 0.0103$ (49日間塗布)] [TIMP-2 : $p = 0.0200$ (7日間塗布)] [TIMP-3 : $p = 0.0001$ (4日間塗布), $p = 0.0000$ (7日間塗布), $p = 0.0027$ (21日間塗布), $p = 0.0050$ (35日間塗布), $p = 0.0051$ (49日間塗布)]}。プラセボおよび2.5% BPOゲル塗布群のMMP-1aおよびMMP-8のmRNA発現量は、いずれの塗布期間でも検出できなかった(データ非掲載)。2.5% BPOゲル塗布群のTIMP-4のmRNA発現量は、いずれの塗布期間でも、プラセボ塗布群と比較して有意な低下がみられなかった [Figure 1-(i)]。

2. 2.5% BPOゲル塗布によるマウス耳介表皮中のMMP-9発現量およびMMP-9/TIMP-1比に及ぼす影響

2.5% BPOゲル塗布群において、MMP-9のmRNA発現量の低下が、4~49日間の塗布期間で認められたこと、また*C. acnes*がケラチノサイトや単球からのMMP-9発現量を増加させることで、ざ瘡の炎症を誘発する可能性も報告¹²⁾されていることから、49日間塗布後のMMP-9のタンパク質発現量を測定した。また、TIMP-1はMMP-9のカウンターパートナーの1つとしてよく知られており^{25)~27)}、TIMPsはMMPsと非共有結合によって1:1の複合体を形成することで、MMPsの活性を阻害することから³⁾⁴⁾²⁸⁾、TIMP-1のタンパク質発現量を測定し、MMP-9/TIMP-1のタンパク質発現量比も算出した。

2.5% BPOゲルおよびプラセボを49日間塗布したヘアレスマウスの耳介表皮中のMMP-9発現量、TIMP-1発現量およびMMP-9/TIMP-1比をFigure 2に示す。2.5% BPOゲル塗布群のMMP-9発現量およびMMP-9/TIMP-1比は、プラセボ塗布群と比較して、いずれも有意に低下したが [Figure 2-(a)(c)] (MMP-9発現量 : $p = 0.0209$, MMP-9/TIMP-1比 : $p = 0.0004$)、TIMP-1発現量は2群間で有意な差はみられなかった [Figure 2-(b)]。

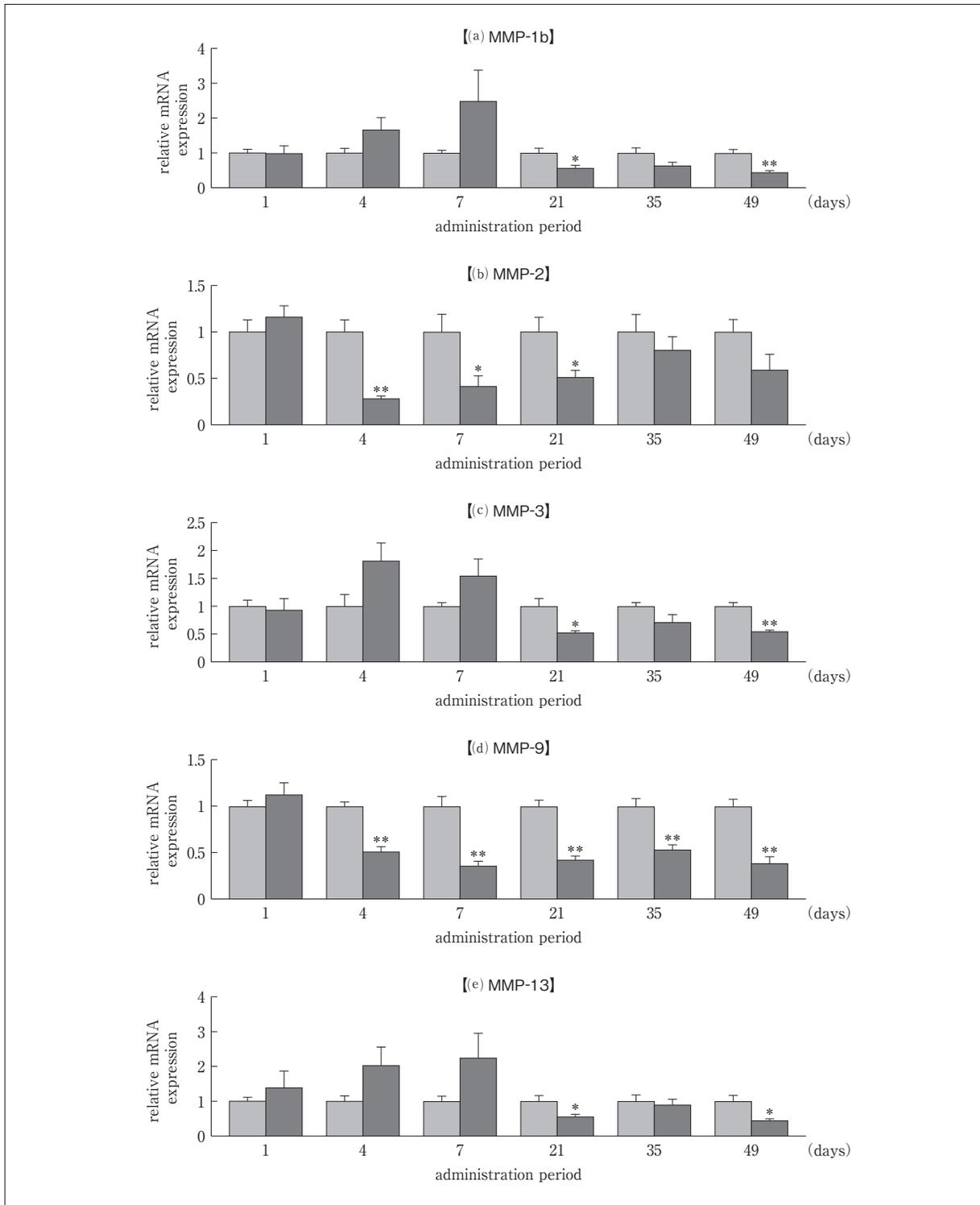
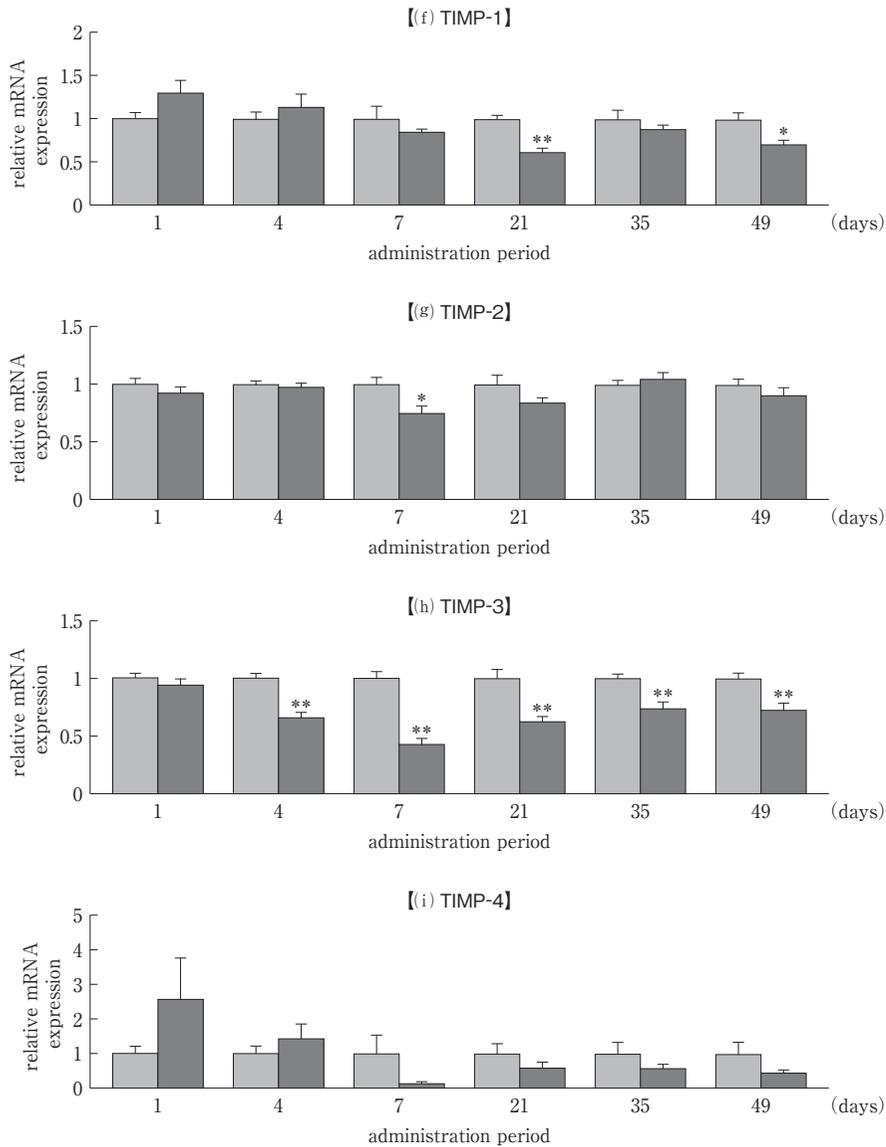


Figure 1 mRNA levels of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of



■ BPO gel placebo ■ BPO gel

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. BPO gel placebo (Student's or Aspin-Welch's *t*-test, 2 side)

BPO gel placebo or 2.5% BPO gel was topically applied to each side of the left ear (20 μ L in total) once a day for 1, 4, 7, 21, 35 and 49 days, and the ear was collected. Epidermal sheets were prepared from the collected ear and cDNA was prepared from them. Thereafter, mRNA expressions of MMP-1b, -2, -3, -9 and -13, TIMP-1, -2, -3 and -4 were measured by real time PCR. These mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA levels. Gene expression levels are shown relative to BPO gel placebo group. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 5-9).

metalloproteinases (TIMPs) in hairless mice given repeated topical administration of 2.5% BPO gel

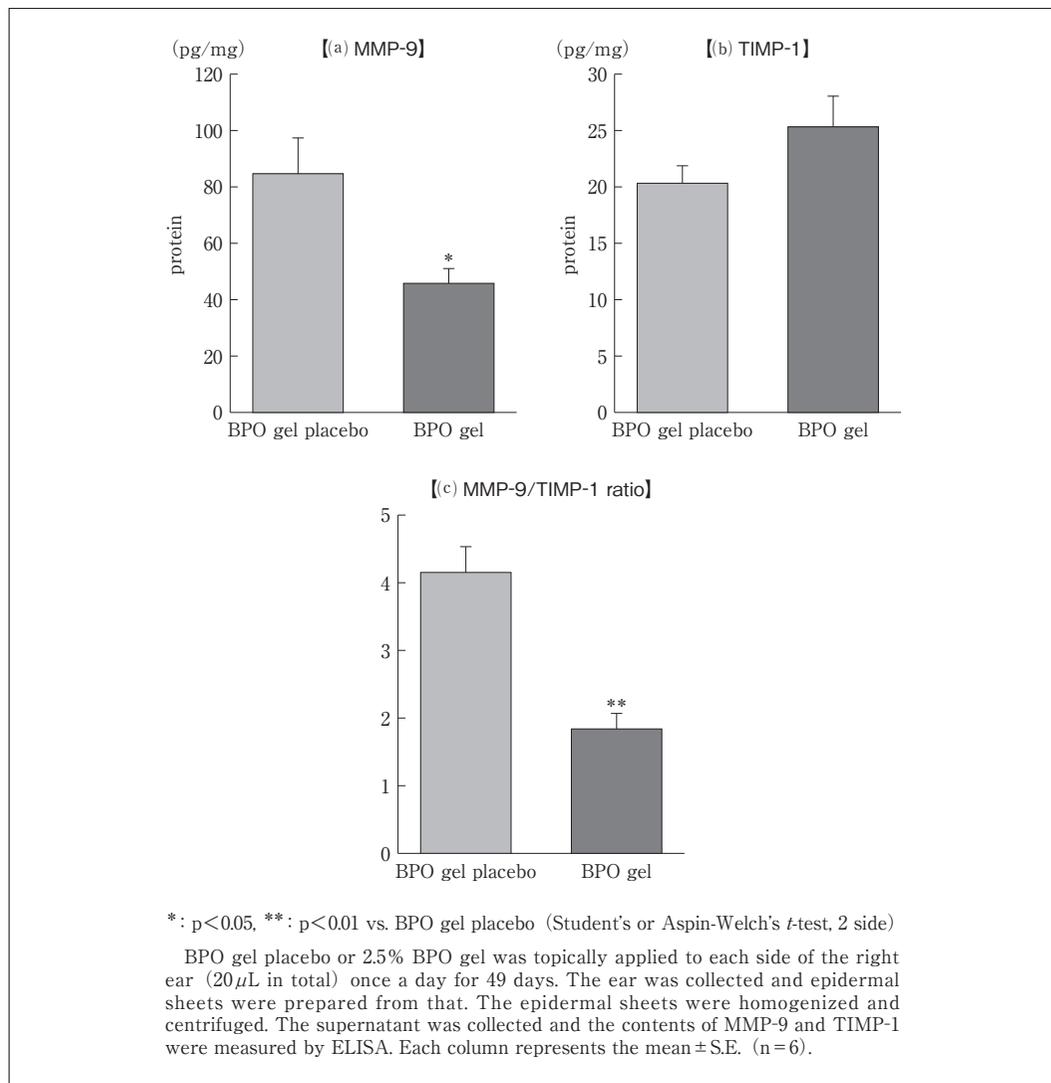


Figure 2 Expression of MMP-9 and TIMP-1 in hairless mice given repeated topical administration of 2.5% BPO gel for 49 days

3. BPOのMMPs活性に対する作用

BPOのMMP-1, -2, -3, -8, -9および-13活性に対する阻害作用の濃度反応曲線をFigure 3に、各種MMPsに対する50%阻害濃度 (IC₅₀値)をTable 1に示す。BPOは3.7~300 μ Mの濃度域において、MMP-2に対して濃度依存的な阻害作用を示し、そのIC₅₀値は157 μ Mであった [Figure 3-(b)およびTable 1]。また、BPOにはMMP-2以外のMMPs活性も阻害する傾

向がみられたが、今回検討した濃度域ではIC₅₀値を評価できなかった [Figure 3-(a)(c)~(f)およびTable 1]。

III 考察

尋常性ざ瘡患者の炎症性皮膚疹部などではMMPsの発現が認められている^{7)~11)}。本研究ではBPOを2.5%含有するゲル (2.5% BPOゲ

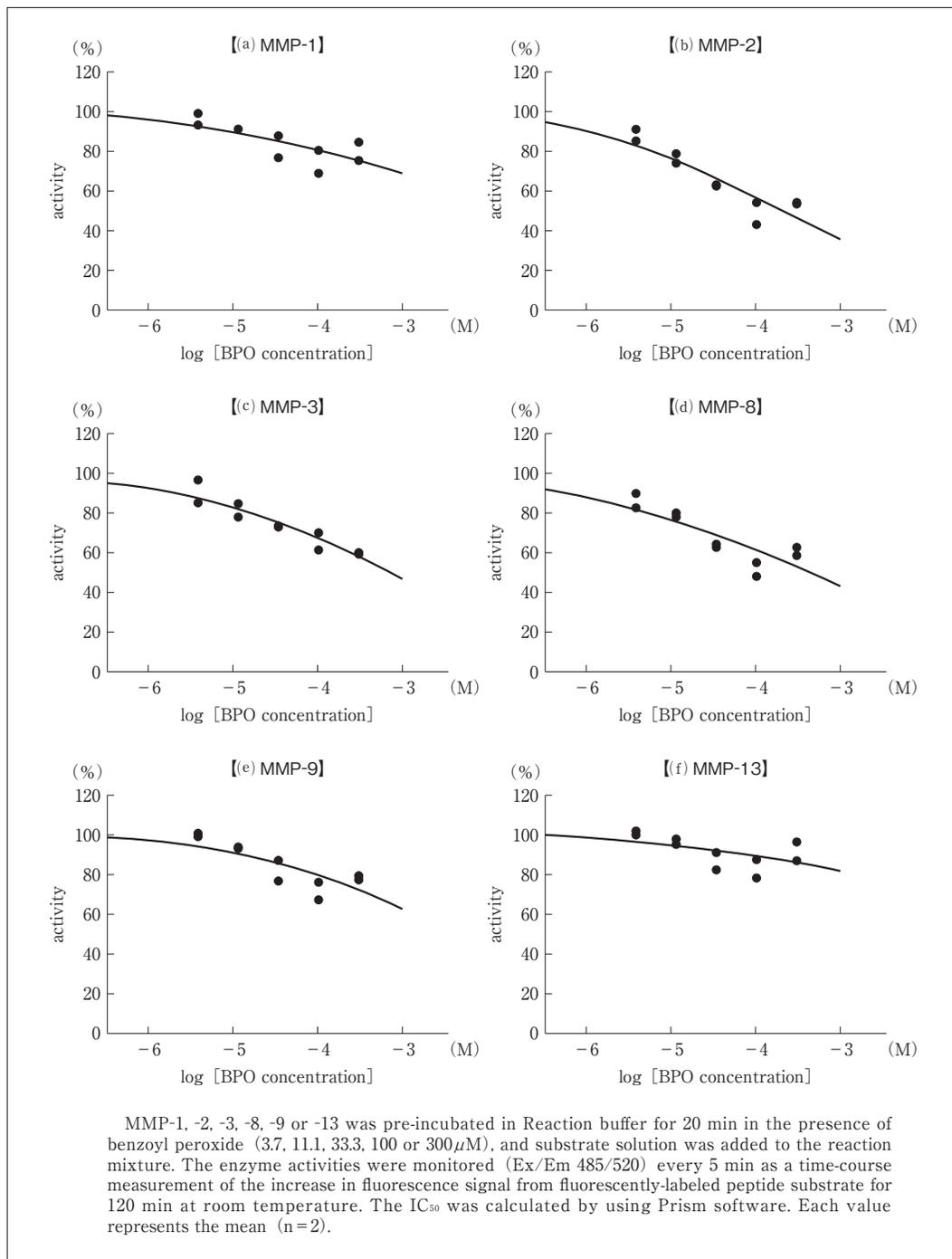


Figure 3 Effect of benzoyl peroxide on MMPs activity

Table 1 Effect of benzoyl peroxide on MMPs activity

	IC ₅₀ (μmol/L)
MMP-1	>300
MMP-2	157
MMP-3	>300
MMP-8	>300
MMP-9	>300
MMP-13	>300

ル)をヘアレスマウスの耳介に最長49日間反復塗布し、その表皮中におけるMMPsおよびTIMPs活性を制御するTIMPsのmRNA発現量およびタンパク質発現量に及ぼす影響を調べた。その結果、2.5% BPOゲルを塗布することによりMMP-2および-9のmRNA発現量は4日間塗布後以降、49日間塗布後まで持続的な低下が認められた。一方で、MMP-1b, -3および-13のmRNA発現量は、4および7日間塗布後において統計的に有意ではないものの、一時的に増加傾向を示した後、21, 35および49日間塗布後では低下が認められ、21および49日間塗布後での低下は統計学的に有意であった。そこで塗布期間を通して明確なmRNA発現量の低下が認められたMMP-9についてより詳細に解析するために、2.5% BPOゲルを49日間反復塗布した耳介表皮中のMMP-9およびTIMP-1のタンパク質発現量を調べた。その結果、2.5% BPOゲル塗布群ではプラセボ塗布群と比較してTIMP-1タンパク質発現量には差がなかったものの、MMP-9タンパク質発現量は有意に低く、またMMP-9/TIMP-1比も低値であった。これらの結果から、BPOはMMP-9のタンパク質発現量を低下させることで、MMP-9/TIMP-1比が低下し、その結果MMP-9活性を抑制的に制御すると考えられる。一方、MMP-1b, -3および-13のmRNA発現量は21日間塗布後以降で、MMP-2のmRNA

発現量は4日間塗布後以降で、有意な低下および低下傾向がみられた。したがって、BPOはMMP-9だけではなく、MMP-1b, -2, -3および-13のタンパク質発現量も低下させた可能性がある。しかしながら、MMP-1b, -3および-13のmRNA発現量が4および7日間塗布後で一時的に増加傾向を示した原因およびMMP-2のmRNA発現量に対するBPOの作用が49日間塗布後まで経日的に減弱した原因は不明である。今後、MMP-9以外の各MMPsのタンパク質発現量に対するBPOの作用についても確認が必要であると考えられる。

また、BPOのMMPsの活性に対する作用を検討したところ、MMP-2に対して濃度依存的な阻害作用を示し、そのIC₅₀値は157 μMであった。なお、BPOは他のMMPsに対しても濃度依存的な阻害作用を示したものの、阻害作用の測定に用いたReaction bufferに対してBPOが溶解する限界濃度である300 μMでも50%を超える阻害が認められなかったため、IC₅₀値を算出できなかった。

MMPsは炎症に関与することが知られており⁵⁾⁶⁾、尋常性ざ瘡患者の炎症性皮膚疹部などにMMP-1, -2, -3, -8, -9および-13が発現している^{7)~11)}。また、MMP-9が皮膚の炎症性疾患に関与していること²⁹⁾、ならびに*C. acnes*がケラチノサイトからのMMP-9発現²⁾および単球からのMMP-1および-9発現をそれぞれ増加させる¹⁰⁾ことで、ざ瘡の炎症を誘発する可能性が報告されていることから、MMP-9が尋常性ざ瘡の炎症に関与していることが考えられる。さらに、MMPsはMMPs間で相互作用することで活性化されることも知られており、MMP-2が直接的、またはMMP-13の活性化を介して間接的にMMP-9を活性化することも報告²⁾されている。本研究の結果から、BPOは表皮のMMP-9産生の抑制によるMMP-9/TIMP-1比の低下に加えて、MMP-2活性を直接的に阻害することにより、総じてMMP-9活性を抑制することにより尋常性ざ瘡の炎症

性皮膚疹に対する治療効果に寄与する可能性がある。本研究ではヘアレスマウスの正常皮膚のMMPsおよびTIMPsの発現量に対する25% BPOゲル反復塗布の作用を評価したが、尋常性ざ瘡患者の患部皮膚では炎症性皮膚疹を特徴とする炎症像がみられる。したがって、ヘアレスマウスの正常皮膚に発現するMMPsに対するBPOの作用が、尋常性ざ瘡患者の皮膚疹部に発現するMMPsに対しても同様に認められるか検証する必要があると考える。

尋常性ざ瘡での炎症性皮膚疹が軽快したあとに、皮膚の陥凹、すなわち萎縮性瘢痕が生じることがあり¹⁾、ほとんどの萎縮性瘢痕は丘疹および膿疱のような炎症性皮膚疹部位で形成され³⁰⁾、ざ瘡の重症度とともに萎縮性瘢痕の発症率が増加することが報告³¹⁾されている。加えて、萎縮性瘢痕の形成は、ざ瘡の炎症性皮膚疹における過剰なコラーゲン分解による皮膚マトリックスの喪失が原因と考えられている⁷⁾。したがって、炎症性皮膚疹におけるBPOによるMMP-9産生量の低下やMMP-2活性の阻害が炎症を抑えるだけでなく、ざ瘡瘢痕の形成も抑制する可能性が考えられる。また、MMP-1および-9はざ瘡の炎症性皮膚疹だけでなく、萎縮性瘢痕の形成後にも発現が認められている³²⁾。萎縮性瘢痕に対する治療効果が認められているレーザーやマイクロニードル治療では、治療部位のコラーゲン量が増加することが報告³³⁾されている。BPOもMMP-9活性を低下させることにより、萎縮性瘢痕部位のコラーゲン量が増加し、ざ瘡瘢痕に対して効果を示す可能性も考えられる。

結 論

本研究により、BPOが表皮中のMMP-9産生量を低下させること、ならびにMMP-2活性を直接的に阻害することが明らかになった。これらの作用は、BPOの尋常性ざ瘡の炎症性皮膚疹に対する治療効果に寄与する可能性が考えられた。

<謝辞>

本研究にご協力いただいた熊谷雄介氏ならびに是洞成美氏に感謝致します。

利益相反

本研究に関する費用はマルホ株式会社が負担した。また、藤川昂樹、平野尚茂、田村理絵、林直樹、北野高道、藤川みか、大崎美保、関口皓太、松田翔一、泉水友洋、遠山かほり、森幸、松本辰美および池田文昭はマルホ株式会社の社員である。

引 用 文 献

- 1) 林 伸和, 赤松浩彦, 岩月啓氏ほか. 尋常性瘰癧治療ガイドライン2017. 日本皮膚科学会雑誌 2017; 127(6): 1261-1302.
- 2) Chakraborti S, Mandal M, Das S, et al. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 2003; 253(1-2): 269-285.
- 3) Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(8): 827-839.
- 4) 早川太郎. TIMPの構造と機能. *Connective Tissue.* 2001; 33(1): 33-42.
- 5) Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci.* 2006; 11: 529-543.
- 6) Tayebjee MH, Lip GY, Tan KT, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2005; 96(3): 339-345.
- 7) Kang S, Cho S, Chung JH, et al. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in inflammatory acne lesions *in vivo*. *Am J Pathol.* 2005; 166(6): 1691-1699.
- 8) Papakonstantinou E, Aletras AJ, Glass E, et

- al. Matrix metalloproteinases of epithelial origin in facial sebum of patients with acne and their regulation by isotretinoin. *J Invest Dermatol.* 2005 ; **125**(4) : 673-684.
- 9) Trivedi NR, Gilliland KL, Zhao W, et al. Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling. *J Invest Dermatol.* 2006 ; **126**(5) : 1071-1079.
- 10) Jalian HR, Liu PT, Kanchanapoomi M, et al. All-trans retinoic acid shifts *Propionibacterium acnes*-induced matrix degradation expression profile toward matrix preservation in human monocytes. *J Invest Dermatol.* 2008 ; **128**(12) : 2777-2782.
- 11) Choi JY, Piao MS, Lee JB, et al. *Propionibacterium acnes* stimulates pro-matrix metalloproteinase-2 expression through tumor necrosis factor-alpha in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2008 ; **128**(4) : 846-854.
- 12) Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, et al. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol.* 2005 ; **153**(6) : 1105-1113.
- 13) Sagrafsky M, Yentzer BA, Feldman SR. Benzoyl peroxide : a review of its current use in the treatment of acne vulgaris. *Expert Opin Pharmacother.* 2009 ; **10** : 2555-2562.
- 14) Strauss JS, Krowchuk DP, Leyden JJ, et al. Guidelines of care for acne vulgaris management. *J Am Acad Dermatol.* 2007 ; **56** : 651-663.
- 15) Nast A, Dréno B, Bettoli V, et al. European Evidence based (S3) guidelines for the treatment of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012 ; **26**(Suppl. 1) : 1-29.
- 16) Decker LC, Deuel DM, Sedlock DM. Role of lipids in augmenting the antibacterial activity of benzoyl peroxide against *Propionibacterium acnes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 ; **33** : 326-330.
- 17) Eady EA, Farmery MR, Ross JJ, et al. Effects of benzoyl peroxide and erythromycin alone and in combination against antibiotic-sensitive and -resistant skin bacteria from acne patients. *Br J Dermatol.* 1994 ; **131** : 331-336.
- 18) Nakatsuji T, Kao MC, Fang JY, et al. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes* : its therapeutic potential for inflammatory acne vulgaris. *J Invest Dermatol.* 2009 ; **129** : 2480-2488.
- 19) Okamoto K, Ikeda F, Kanayama S, et al. In vitro antimicrobial activity of benzoyl peroxide against *Propionibacterium acnes* assessed by a novel susceptibility testing method. *J Infect Chemother.* 2016 ; **22** : 426-429.
- 20) 岡本和明, 田村理絵, 田原圭祐ほか. マウスにおける過酸化ベンゾイルの面皰縮小作用および角層剥離作用. 新薬と臨牀 2015 ; **64** : 1324-1333.
- 21) Mills OH Jr, Kligman AM, Pochi P, Comite H. Comparing 2.5%, 5%, and 10% benzoyl peroxide on inflammatory acne vulgaris. *Int J Dermatol.* 1986 ; **25**(10) : 664-667.
- 22) Kawashima M, Sato S, Furukawa F, et al. Twelve-week, multicenter, placebo-controlled, randomized, double-blind, parallel-group, comparative phase II/III study of benzoyl peroxide gel in patients with acne vulgaris : A secondary publication. *J Dermatol.* 2017 ; **44**(7) : 774-782.
- 23) Kawashima M, Nagare T, Katsuramaki T. Open-label, randomized, multicenter, phase III study to evaluate the safety and efficacy of benzoyl peroxide gel in long-term use in patients with acne vulgaris : A secondary publication. *J Dermatol.* 2017 ; **44**(6) : 635-643.
- 24) Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, et al. Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. *J Dermatol Sci.* 2015 ; **77**(1) : 28-36.
- 25) Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue

- inhibitors of metalloproteinases : structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997 ; **74**(2) : 111-122.
- 26) Nagase H, Murphy G. Tailoring TIMPs for selective metalloproteinase inhibition. In : Edwards D, Hoøer-Hansen G, Blasi F, Sloane BF, eds. *The Cancer Degradome : Proteases and cancer biology*. New York, NY : Springer ; 2008. p.787-810.
- 27) Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) : an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010 ; **1803**(1) : 55-71.
- 28) 藤本 昇, 岩田和士. マトリックスメタロプロテイナーゼとそのインヒビターの酵素免疫定量法. *Connective Tissue.* 1994 ; **26** : 237-244.
- 29) 小林孝志. 皮膚の炎症性疾患における matrix metalloproteinase-9 の役割—Leptomycin B 投与による治療の可能性について—. 日本炎症・再生医学会雑誌 2004 ; **24** : 578-583.
- 30) Tan J, Bourdès V, Bissonnette R, et al. Prospective study of pathogenesis of atrophic acne scars and role of macular erythema. *J Drugs Dermatol.* 2017 ; **16**(6) : 566-572.
- 31) Tan J, Kang S, Leyden J. Prevalence and risk factors of acne scarring among patients consulting Dermatologists in the USA. *J Drugs Dermatol.* 2017 ; **16**(2) : 97-102.
- 32) Lee WJ, Jung HJ, Lim HJ, et al. Serial sections of atrophic acne scars help in the interpretation of microscopic findings and the selection of good therapeutic modalities. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013 ; **27**(5) : 643-646.
- 33) Soliman YS, Horowitz R, Hashim PW, et al. Update on acne scar treatment. *Cutis.* 2018 ; **102**(1) : 21-25, 47-48.

Effects of Benzoyl Peroxide on Expression And Activity of Matrix Metalloproteinases

Koki Fujikawa¹, Takashige Hirano¹, Rie Tamura¹, Naoki Hayashi¹, Takamichi Kitano¹, Mika Fujikawa¹, Miho Osaki¹, Kota Sekiguchi¹, Shoichi Matsuda¹, Tomohiro Sensui¹, Kahori Toyama¹, Sachi Mori¹, Tatsumi Matsumoto² and Fumiaki Ikeda²

1 : Drug Development Research Laboratories (Current affiliation : Research Dept.), Maruho Co., Ltd.

2 : Drug Discovery Research Dept. (Current affiliation : Global Business Development Dept.), Maruho Co., Ltd.

Corresponding author : Koki Fujikawa
Research Dept., Maruho Co., Ltd.
93 Chudoji Awata-cho, Shimogyo-ku, Kyoto 600-8815, Japan

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) have been thought to be associated with chronic inflammation in acne vulgaris. In this study, to examine the effect of benzoyl peroxide (BPO) on expression of MMPs and TIMPs in skin, we determined mRNA expression levels of MMP-1, -2, -3, -8, -9 and -13, TIMP-1, -2, -3 and -4 in epidermis of the ear of hairless mice given

repeated topical administration of 2.5% BPO gel for 1, 4, 7, 21, 35 or 49 days. The mRNA expression levels of MMP-1b, -2, -3, -9 and -13, TIMP-1, -2 and -3 in 2.5% BPO gel-treated mice were decreased compared to placebo-treated mice, and in particular, the decrease in MMP-9 expression level was robust. Additionally, MMP-9 protein levels and MMP-9/TIMP-1 ratio in 2.5% BPO gel-treated mice were significantly decreased compared to those in placebo-treated mice.

Next, we examined the effect of BPO (3.7-300 μ M) on enzymatic activity of MMP-1, -2, -3, -8, -9 and -13. As a result, BPO showed a tendency to inhibit all of the MMPs activity, and particularly strongly inhibited MMP-2.

This study demonstrated that repeated application of 2.5% BPO gel to mouse ear skin decreases protein level of MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio in the epidermis of the skin, and that BPO directly inhibits the enzymatic activity of MMP-2. These actions of BPO may contribute to its therapeutic effect on patients with acne vulgaris.

(受理日：2021年12月3日)