

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15161

研究課題名(和文) 表皮タイトジャンクションバリア制御による新規経皮吸収促進法の開発

研究課題名(英文) Development of transdermal penetration enhancer by regulating epidermal tight junction barriers

研究代表者

八木 清仁 (Yagi, Kiyohito)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：70166479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルカロイドの一種であるHomoharringtonine (HHT) の経皮吸収促進効果を評価した。HHTは、10,000 Daまでのトレーサー分子の経皮吸収促進効果を示し、claudin-1、claudin-4、occludinを含む表皮TJバリアの構築に重要なTJ構成分子の発現を減少させた。さらに、HHTはDNA/RNAヘテロ2本鎖核酸の経皮吸収促進効果を示した。これらの知見は、HHTが表皮TJバリアに作用し、バイオ医薬品のような高分子薬物の経皮吸収を可能にする新規経皮吸収促進法としての可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the transdermal absorption-promoting effect of Homoharringtonine (HHT) both in vitro and in vivo. HHT exhibited a transdermal absorption-promoting effect for macromolecules up to 10,000 Da in size, and reduced the expression of TJ components that are important for construction of the skin TJ barrier, including claudin-1, claudin-4, and occludin. Furthermore, HHT enhanced absorption of DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide through skin. 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.

研究分野：生物薬学

キーワード：経皮吸収 表皮 Homoharringtonine Tight Junction Claudin

1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬品は、高い有効性と安全性が得られることから、急速に利用が増加しており、新薬に占める割合は年々増加している。一方で、バイオ医薬品として用いられるペプチド、核酸、抗体は易分解性や高分子量であることから、その投与法のほとんどが注射による投与を余儀なくされており、患者の QOL や医療機関の負担を考慮すると、経皮投与技術を含む非侵襲性投与法の開発がバイオ医薬品のさらなる普及において重要課題の 1 つと考えられている。

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)-1 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、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 (*J Cell Biol*, 2002)。

当研究グループはこれまでに TJ において物質透過を制限する CLDN に着目し、従来まで困難であると考えられてきた細胞間隙経路を介した組織特異的な薬物送達法の開発を試みてきており、世界に先駆けて CLDN バリアを標的とした薬物送達研究に着手してきた。その成果として CLDN バリアを制御することで難吸収性ペプチド医薬品が経腸・経鼻・経肺から吸収されることを見出す (*Biochem Pharmacol*, 2010) など、上皮 TJ バリア制御の研究において多くの成果を残している。最近、アルカロイドの 1 種である Homoharringtonine (HHT) が表皮 TJ バリア機構に重要な CLDN-1 を含む様々な CLDN の機能制御活性を有することを発見した (*Eur J Pharm Biopharm*, 2015)。しかしながら、HHT の表皮 TJ バリア制御活性については不明であった。Fig. 1 に HHT の構造を示す。

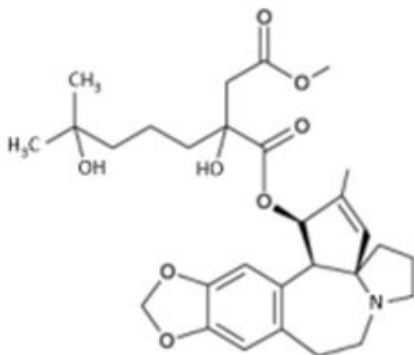


Fig. 1 Homoharringtonine の化学構造

2. 研究の目的

本研究では、表皮 TJ バリア機構の主要因子 CLDN-1 に着目し、これまでに当研究グル

ープが見出した CLDN-1 機能制御活性を有する HHT を利用することで、表皮 TJ バリアを制御することによる初めての経皮吸収促進法の開発を試みた。

3. 研究の方法

in vitro において、HHT による表皮 TJ バリア制御活性を検証するため、膜電気抵抗値 (TER) assay および tracer flux assay を行った。*in vivo* において、HHT によるマウス皮膚での透過性促進作用を検証するため、テープストリッピングにより角質を除去し、分子量 4,000, 10,000 及び 20,000 Da の Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD) の皮膚からの血中への吸収量を測定した。また、核酸医薬のモデル薬物として高い遺伝子抑制効果を示すヘテロ核酸 (HDO) を用い、HHT による HDO の経皮吸収促進効果を検証するため、HDO の肝臓への移行を観察した。また、HDO の遺伝子抑制効果を確認するため、HDO のターゲット遺伝子であるアポリポタンパク B 遺伝子の肝臓での発現を qPCR により測定した。

4. 研究成果

HHT による表皮 TJ バリア制御活性を検証するため、ヒト表皮細胞を用い、TER 値の測定、ならびに trace flux assay (4,000 Da) を行った。その結果、HHT 濃度依存的な TER 値の低下とともに、細胞間隙透過性も亢進していたため、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。

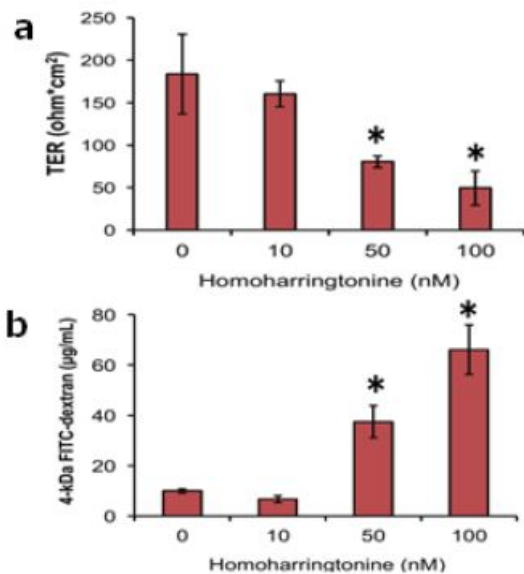


Fig. 2 NHEK 細胞における HHT の上皮バリア制御活性の検証

(a) 膜電気抵抗値の変化

(b) FD-4 の細胞間隙透過性の変化

また、細胞間接着分子への影響を Western Blotting 法により調べた結果、CLDN-1、-4 ならびに TJ 構成タンパク質の一つである

Occludin の発現低下が確認され、HHT は TJ 構成因子の発現低下を特異的に誘導することが確認された。

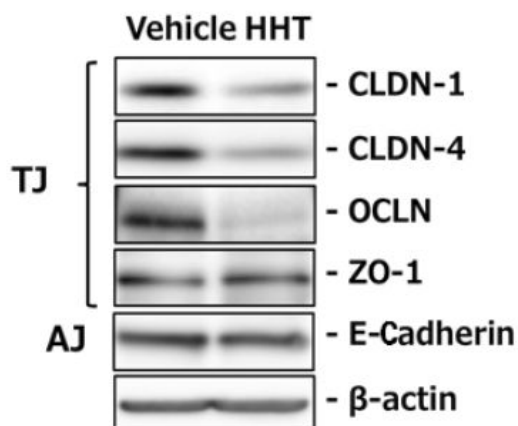


Fig. 3 HHT 作用時の細胞間接着分子発現への影響

続いて、HHT を作用することで分子量 4,000 のモデル分子が角質層を除いたマウス皮膚から血中へ移行するか調べた結果、HHT の濃度依存的な移行量増大が確認された。また、分子量 4,000, 10,000, 20,000 のモデル分子を用いて検討した結果、分子量 10,000 までのモデル分子が吸収されることが確認された。

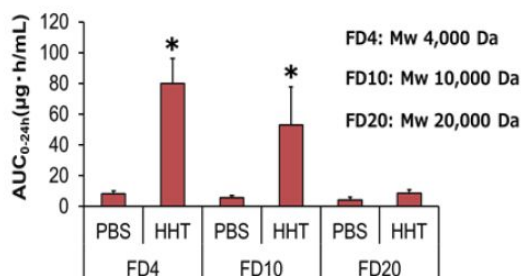


Fig. 4 HHT による各分子量の蛍光基質の吸収量

そこで、核酸医薬品候補の1つである分子量約 9,000 の HDO が、HHT により経皮吸収可能かどうか検証した。その結果、吸収された HDO が肝臓まで送達されることが観察され、HDO ターゲット遺伝子の抑制効果も確認された。

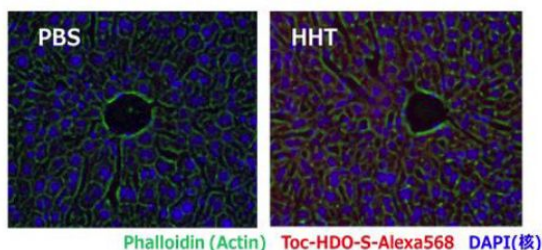


Fig. 5 HHT による HDO の肝移行

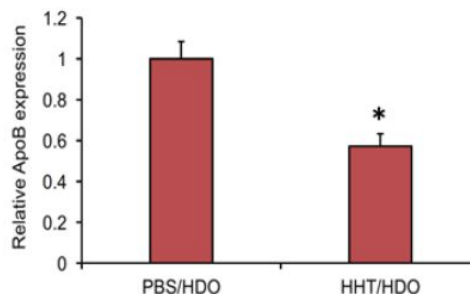


Fig. 6 HHT によって肝移行した HDO のターゲット遺伝子抑制効果

また、免疫染色による解析では、TJ 構成タンパク質の細胞内局在変動は確認されなかったが、CLDN-1 の発現量の低下が観察され、経皮透過性の亢進作用も観察された。

以上の結果から、HHT は表皮 TJ バリアを減弱化させることにより表皮バリアの透過性を高めることが確認され、高分子薬をも透過させる新たな経皮吸収促進法としての可能性を有することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1 K. Yagi, A. Watari, K. Fujiwara, N. Suzuki, M. Kondoh, Homoharringtonine enhances transdermal absorption in the skin by regulating epidermal tight junction barriers., ASCB/EMBO 2017 meeting, Dec 2-6 2017, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

2 K. Yagi, A. Watari, K. Fujiwara, T. Kurachi, N. Suzuki, M. Kondoh, Development of Homoharringtonine as a Penetration Enhancer for Transdermal Drug Administration., The 2017 AAPS Annual Meeting and Exposition programming, Nov 12-15 2017, San Diego, USA.

3 渡利 彰浩、藤原 果奈、倉智 彩夢、近藤 昌夫、八木 清仁, Homoharringtonine による経皮吸収促進効果の検討, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 2017 年 7 月 6-7 日, 京都

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：経皮吸収促進剤
発明者：渡利 彰浩、八木 清仁、近藤 昌夫、
横田 隆徳、永田 哲也
権利者：大阪大学、東京医科歯科大学
種類：特許
番号：特願 2017-014957
出願年月日：2017 年 1 月 31 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 清仁 (YAGI, Kiyohito)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：70166479

(2) 研究分担者

渡利 彰浩 (WATARI, Akihiro)
大阪大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：80452465

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()