

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19925

研究課題名(和文) イオン液体を利用した革新的経皮デリバリー技術の開発

研究課題名(英文) Development of transdermal drug delivery system by ionic liquid

研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：50325271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんワクチンは、がん特異的なCTLを誘導して抗腫瘍効果を発揮する。免疫細胞が豊富に存在する皮内に抗原やアジュバントを送達するために、イオン液体を経皮吸収促進剤として用い、経皮吸収型がんワクチンの開発を試みた。本研究では、がん抗原としてWT1(Wilms tumor gene 1)タンパク由来のペプチドを、アジュバントとしてtoll-like receptor 7のアゴニストのレシキモドを用いた。抗原およびアジュバントをイオン液体に溶解して貼付することにより皮膚透過性が向上し、Lewis肺癌細胞を移植したマウスに本製剤を貼付すると、WT1特異的CTLの誘導とそれに伴う腫瘍成長抑制効果が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

注射でしか投与できない高分子医薬品を貼付剤に換えることができれば、患者にとってのメリットは絶大である。また、イオン液体は高電気伝導性であり、磁性を有しているものもあるため、電流や磁場などの物理的な刺激と併用することでさらに透過性の向上をはかることができる。また、本技術はタンパク・ペプチドのみならず、核酸などの様々な高分子にも応用することが可能であり、新たな領域の開拓にも寄与することができる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed an efficient transdermal delivery system with ionic liquid for insulin, peptides and siRNAs. We confirmed increased skin accumulation of insulin, peptides and siRNA in the presence of ionic liquid and increased their therapeutic effect on each animal disease model. We found that ionic liquids are powerful tool to achieve increased skin permeation of molecules, having high molecular weight and water soluble, that are never skin permeable.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：イオン液体 経皮吸収 ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬品(高分子医薬品)で治療されている疾病には、患者数の多いがん、糖尿病、C型肝炎、慢性腎不全などだけでなく、患者数の少ない血友病、ファブリー病、発育不全、多発性硬化症、クローン病などもあり、世界中で併せて3億5千万人以上が当該バイオ医薬品の利用対象者となっている。バイオ医薬品の投与は注射が基本であり、腸管や皮膚などの生体バリアを突破して非侵襲的に吸収されることはない。注射投与は、患者の苦痛や負担となっており、コンプライアンスが守られない状況となりやすい。この状況を改善するには、非常に簡便で患者の苦痛や負担が少なく、湿布剤のような皮膚に貼るだけで投与ができる経皮投与方法が最適である。このような概念から多くのアプローチ(吸収促進剤の開発、マイクロニードルの活用、物理的刺激の利用など)がなされてきたが、実用化に至ったものはない。研究代表者らは、種々の医薬品の経皮吸収剤の開発に携わってきた。この中で、イオン液体の性質に着目し、これをペプチドの溶媒として使用したところ、驚くべきことにイオン液体がペプチドの透過促進剤として機能することを見出した。このような報告はこれまでなされておらず、研究代表者のグループ独自の発見である。このような背景から本研究課題を提案するに至った。

2. 研究の目的

タンパクや核酸など高分子医薬品の低侵襲的投与方法として、経皮投与技術の開発が切望されている。最大のバリアである皮膚の角質層を突破させるため、透過促進剤やマイクロニードルの活用、超音波や電気などの物理的な刺激を利用する方法などが提案されてきた。しかし、高分子医薬品の透過に成功した報告は乏しく、実用化に進む可能性のある技術の開発は未達である。本研究の目的は、イオン液体をキャリアとし、皮膚角質層の突破という最も大きな課題を一気に解決するための高分子医薬品の低侵襲的投与方法を開発することである。

3. 研究の方法

まず、ペプチドよりも大きなインスリンを用いての検討を行った。

・病態モデルマウスの作製

BALB/c マウスにストレプトゾトシン(200 mg/kg)を腹腔内投与し、1週間後に血糖値を測定した。血糖値が300 mg/dL以上となったものを糖尿病モデルマウスとした。

・治療効果の検討

インスリン含有イオン液体もしくはコントロール(インスリン 250 U/kg)をモデルマウスの腹部皮膚に貼付し、経時的に血液を回収し、血糖値を測定した。また、インスリン溶液(10 U/kg)をモデルマウスに皮下注射し、経時的に血液を回収し、血糖値を測定した。

・皮膚透過性試験

Dylight 680 蛍光標識インスリンを作製した。蛍光標識インスリン含有イオン液体もしくはコントロールをモデルマウスに貼付し24時間後に皮膚組織を得、皮膚切片中の蛍光標識インスリンを蛍光顕微鏡(BioRevo, KEYENCE, Japan)で観察した。

次いで、中分子の核酸である siRNA を用いて検討を行った。

・病態モデルマウスの作製

C57BL/6N マウスにイミキモドクリームを4日間塗布して乾癬モデルマウスを作製した。

・治療効果の検討

5種類の異なる配列の siRNA を RAW 細胞に添加して培養した後に LPS を加え、IL-23 の発現量を測定して至適な siRNA 配列を選択した。また、乾癬モデルマウスに IL-23 siRNA 製剤を塗布し、表皮の厚さを測定して乾癬症状の1つである皮膚の肥厚を指標とし治療効果を確認した。ポジティブコントロールとして免疫抑制剤のタクロリムス、ネガティブコントロールとして GFP siRNA 含有製剤を使用した。

・皮膚透過性試験

蛍光標識 siRNA 含有イオン液体製剤をマウスに塗布した際の siRNA の皮膚透過性を蛍光顕微鏡(BioRevo)で観察した。

次いで、がんペプチドを用いて検討を行った。

・In vitro 皮膚透過性試験

マウスの腹部皮膚の約 8.5 cm² (23 mm ラウンド)を切除し、その切除したマウスの皮膚を 0.1% ウシ血清アルブミン(BSA)で満たしたアクセプターに取り付けた。経表皮水損失(TEWL)は Vapometer で測定した。レセプターからサンプル(0.2 mL)を 2、4、6、8 および 24 時間でそれぞれ採取した。透過したペプチドおよびアジュバントの R848 をそれぞれ HPLC システムで測定し、累積皮膚透過量を算出した。

・WT1 ペプチド/R848 製剤における CTL 誘導効果の検討

C57BL/6N マウスの腹部または背中に WT1 ペプチド(10 µg)および R848(10 µg)を含むイオン液体を含有させた製剤パッチを貼付し、24 時間後にパッチをマウスから剥がした。陽性対照と

して、完全フロイントアジュバント(CFA)で乳化された WT1 ペプチドをマウスに皮下注射した(毎週3回繰り返した)。それぞれ最後に投与した1週間後に、脾臓をマウスから摘出し、脾臓懸濁液を調製した。WT1 特異的 CTL は T-セレクト H-2Db WT1 テトラマー-RMFPNAPYL-PE および抗マウス CD8-FITC(MBL)で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。

・WT1 ペプチド製剤+R848 製剤の組み合わせ製剤における CTL 誘導効果の検討

R848 を含むイオン液体含有製剤パッチを C57BL/6N マウスの剃毛した腹部に貼付し、1日後または4日後にパッチを剥がした。パッチを貼付していた皮膚中の細胞を回収し CD45 および CD11c で染色し、白血球細胞および樹状細胞を同定した。死んだ細胞は、7-AAD で染色した。

・LLC 細胞移植マウスモデルにおける WT1 ペプチド製剤+R848 製剤の組み合わせ製剤の抗腫瘍効果の検討

ルイス肺がん由来細胞株(LLC)を皮下接種し、マウス腫瘍モデルを調製した。WT1 ペプチド/R848 イオン液体製剤を細胞皮下接種から7日目に腹部に貼付し、翌日製剤を剥がし、同様の貼付を14日目に再度行った。対照として、無処置担がんマウスを用いた。腫瘍体積は、腫瘍体積(mm³)=0.5×(長さ)×(幅)²の式を用いて算出した。

4. 研究成果

【インスリン・デリバリー】

インスリン含有イオン液体貼付群では、貼付前と比較して血糖値が4時間後に50%低下し、血糖降下作用は24時間後まで持続していた。コントロール貼付群と比較しても、イオン液体貼付群の方が有意に血糖値を低下させた。皮下注射群では血糖値が1時間後に80%低下したものの、4時間後では血糖降下作用は消失しており、持続的な効果はみられなかった。これらの結果から、イオン液体によるインスリンの経皮吸収増加は、持続的な血糖コントロールを可能にすることが示された。

皮膚は、外側から表皮、真皮という構造をとっている。表皮の最外層がバリアである角質層であり、真皮には血管が存在している。経皮吸収された薬物は、この真皮中の血管を介して全身血循環へと到達し、薬効を発揮する。そのため、経皮吸収製剤開発では、角質を突破していかに多くの薬物を真皮まで届けるかが重要となる。マウスの表皮の厚さは20μmほどであるため、皮膚切片を観察することでインスリンの真皮への送達を評価した。検討の結果、コントロール処置24時間後において、インスリンは角質に局在していた。一方、イオン液体処置群では、20μm以上の深さまでインスリンが到達していた。このことから、イオン液体はインスリンの真皮への送達を可能にすることが示唆された。

【siRNA デリバリー】

RAW 細胞に LPS を添加することによって IL-23 の発現が増加したが、IL-23 siRNA の前処置によって発現上昇が抑制された。

5種の異なる配列の siRNA の中から発現抑制効果が高かった配列を選択し、これを使用して in vivo 試験を行った。蛍光標識 siRNA 含有イオン液体製剤を乾癬モデルマウスの皮膚に塗布したところ、一部が角質を通過して表皮に到達していた。また、乾癬モデルマウスの治療を行った結果、GFP siRNA 含有イオン液体製剤の塗布では治療効果は確認できなかったが、IL-23 siRNA 含有イオン液体製剤の塗布において皮膚の紅斑・肥厚の減少が確認され、乾癬様症状が改善された。また IL-23 siRNA による治療効果はタクロリムスより大きかった。

以上の結果より、IL-23 siRNA 含有イオン液体製剤は経皮吸収製剤として乾癬治療に有効であることが示された。

【がんペプチドワクチン】

イオン液体なしでは、WT1 ペプチドも R848 も皮膚浸透効果は低かった。しかし、イオン液体の存在下では、R848 の浸透は4時間から開始され、24時間まで増加した。WT1 ペプチドの透過率は R848 よりも低く遅かったが、イオン液体によって有意に増強された。これらの結果は、イオン液体製剤中の WT1 ペプチド/R848 が WT1 ペプチドおよび R848 の透過範囲および速度を増加したことが示唆された。

イオン液体に溶解させた WT1 ペプチド/R848 による免疫は、角質層の存在に関係なく WT1 特異的 CTL を有意に誘導した。また、この誘導効果は貼付部位によって影響されなかった。これらの結果より、イオン液体が角質層の WT1 ペプチドおよび R848 の透過性を増強し、WT1 特異的な CTL の誘導を増強したことが示された。

R848 を含むイオン液体製剤貼付1日後では、皮膚中の白血球細胞および樹状細胞の一時的な増加が見られた。しかし、4日間貼付すると増加は認められなくなった。また、WT1 ペプチドおよび R848 の同時投与で CTL の十分な誘導効果があることが確認された。

イオン液体に WT1 ペプチドおよび R848 を同時に含む製剤を貼付し、マウスモデルで抗腫瘍効果の評価したところ、8日目において有意な腫瘍成長抑制効果が観察され、また19日目においても顕著な抗腫瘍効果が維持されていた。これらの結果から、イオン液体に溶解させた WT1

ペプチド製剤と R848 は、角質を突破して皮内に移行することで、より優れた抗腫瘍効果を発揮することが示された。したがって、イオン液体を用いたペプチドワクチンは経皮投与用製剤としてがん治療に使用できることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ishida, T.
2. 発表標題 Immunological responses against PEGylated liposomes: Application for cancer vaccine.
3. 学会等名 13th France-Japan Drug Delivery Systems Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishida, T., Shimizu, T.
2. 発表標題 Immunological responses against PEGylated liposomes: the application of ABC phenomenon into cancer vaccine.
3. 学会等名 12th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田竜弘
2. 発表標題 微粒子製剤に対する免疫反応：PEG修飾リポソームに対するABC現象とCARPA
3. 学会等名 製剤種差検討会第7回事例報告会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	異島 優 (ISHIMA Yu) (00457590)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・准教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	清水 太郎 (SHIMIZU Taro) (30749388)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・特任助教 (16101)	