

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19912

研究課題名（和文）電気とナノ粒子を組み合わせた抗ウイルスケミカル・ワクチンシステムの創製

研究課題名（英文）Development of antiviral chemical vaccine system by combining electricity and nanoparticles

研究代表者

小暮 健太郎（KOGURE, Kentaro）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・教授

研究者番号：70262540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ケミカル・ワクチンとして、抗ウイルス薬内封脂質ナノ粒子を、微弱電流を用いる皮内薬物送達技術イオントフォレシスにより非侵襲的に皮内送達し、皮内のナノ粒子からの抗ウイルス薬持続的放出により、長期間ウイルスの感染・増殖を抑制しようという試みであった。抗ウイルス薬モデルとしてシチジンをを用い、シチジンを結合したボロン酸ポリマーナノ粒子（PBコア）の構築と、脂質膜被覆に成功した。30%強のボロン酸へのシチジンの結合と、40%のPBコアの脂質膜被覆を確認した。さらに、得られた粒子をマウス背部皮膚上でイオントフォレシスに供し、PBコアが脂質膜で被覆された状態で皮内に送達されていることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イオントフォレシスと脂質ナノ粒子を組み合わせた、抗ウイルス薬の皮内での長期徐放によるケミカル・ワクチンシステムは、これまで誰も提唱しておらず、初めての試みであり、その点に学術的意義がある。また、本システムは様々なRNAウイルス感染症の予測できない感染予防にも有効であると期待され、特に有効なワクチンが無いデングウイルスや、要冷蔵生ワクチンが適さない発展途上国における狂犬病予防などに有効なことが期待される。さらに本システムの開発が達成されることで、新型コロナウイルス等の感染症に対する新しい予防戦略を提案できる点において、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, lipid nanoparticles encapsulating antiviral drugs were noninvasively delivered intradermally by iontophoresis, which is an intradermal drug delivery technology using weak electric current, as a chemical vaccine, to suppress viral infection and multiplication for a long time by sustained release of antiviral drugs from the lipid nanoparticles in the skin. Using cytidine as an antiviral drug model, cytidine-bound boronic acid polymer nanoparticles (PB cores) were successfully constructed and coated with lipid membranes. 30% binding of cytidine to boronic acid and about 40% lipid membrane coverage of PB cores were confirmed. Furthermore, the obtained lipid nanoparticles were subjected to iontophoresis on the back skin of mice, and it was confirmed that the PB cores were delivered intradermally with the lipid membrane coating.

研究分野：薬物送達学

キーワード：イオントフォレシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在治験が行われている HIV 治療用徐放製剤 Islatravir は、薬剤入りストロー状インプラント（長さ約 15cm）を皮下に手術で埋め込むもので、長期的に薬物を徐放し、血中濃度を維持することで予測できないウイルス感染予防が目的である。しかし侵襲的である上にかなり大きく、またインプラントの入れ替え手術など患者の負担が大きい点など問題がある。この製剤の情報を知った時に研究代表者は、「我々の技術を用いれば、非侵襲的で患者フレンドリーなシステムを提供できるのではないかと考えた。上述のように研究代表者は、非侵襲的な皮内薬物送達システムイオントフォレシスによる高分子・ナノ粒子の皮内送達に成功しており、さらに脂質ナノ粒子内への種々の物質封入や表面物性の制御に関する技術を確立している。この二つの技術を組み合わせ、研究分担者が開発した抗ウイルスヌクレオシドを封入した脂質ナノ粒子をイオントフォレシスによって非侵襲的に皮内に送達し、留置することで、長期的に抗 RNA ウイルスヌクレオシドを持続的に放出し新型コロナウイルスのような RNA ウイルスの感染・増殖を制御可能な予防システム、すなわちケミカル・ワクチンシステムが開発できると確信するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、感染症予防に有効な化学合成抗ウイルス医薬によるケミカル・ワクチンという新しい概念を提案し、非侵襲的でありながら長期間ウイルスの感染・増殖を抑制可能な革新的ウイルス感染防止技術の開発を目的とした。具体的には、抗ウイルス薬を内封した脂質ナノ粒子を、微弱電流を用いる皮内薬物送達技術イオントフォレシスにより非侵襲的に皮内へ送達することで、ナノ粒子を皮内に留置する。皮内に留置したナノ粒子からの抗ウイルス薬の持続的放出により、長期間抗ウイルス薬の血中濃度を維持することで、ウイルスの感染・増殖を抑制しようという挑戦的な試みである。従来、ワクチンが抗原への免疫反応に基づいたウイルスの感染・増殖抑制であるのに対し、化学合成抗ウイルス医薬の皮内での持続的放出制御によるウイルスの感染・増殖制御であるため本提案では『ケミカル・ワクチンシステム』と命名した。本研究では、研究分担者の南川が開発した抗ウイルスヌクレオシド 5-ethynyl-(1-β-D-ribofuranosyl)imidazole-4-carboxamide (EICAR) を最終的に用いることを念頭に置いた。EICAR は、デングウイルスや狂犬病ウイルスに効果がある抗 RNA ウイルス薬であり (Okano 他 Bioorg Med Chem 27(2198)2181-2186) 新型コロナウイルスに対する効果も期待され、活性評価も現在行われている化合物である。一方、研究代表者は、イオントフォレシスによる高分子・ナノ粒子の皮内送達と薬物送達用脂質ナノ粒子の構築において多くの研究実績を有しているため、イオントフォレシスと抗ウイルスヌクレオシドを封入したナノ粒子の組み合わせによって、患者負担の少ない非侵襲的で長期徐放制御可能なケミカル・ワクチンシステムの開発を発想するに至った。

3. 研究の方法

脂質ナノ粒子製剤の開発 (小暮・南川): 抗ウイルスヌクレオシドのモデル化合物としてシチジンをを用い、ボロン酸とのジオール結合によるヌクレオシドの固定化を利用して、アルキル鎖を有するボロン酸ポリマーを用いてシチジンをジオール結合させる、粒子化することでボロン酸ポリマーナノ粒子 (PB コア) の構築を行った。得られた PB コアについて、ボロン酸とジオール結合を形成することで蛍光を発するアリザリンレッド (AR) を用いて、ボロン酸含有ポリマーのヌクレオシド修飾率を検討した。脂質薄膜に PB コア懸濁液を添加し、室温で一定時間放置後に超音波処理することで、PB コアの脂質膜による被覆を行い、脂質ナノ粒子を構築した。

脂質ナノ粒子のイオントフォレシス (小暮・南川・福田): 毛を剃ったマウス背部皮膚上で、ヒト心電図用 Ag/AgCl を用い、PB コアを赤色 (AR) で、脂質膜を緑色 (DiO) で蛍光標識して作成した蛍光 2 重標識脂質膜被覆ナノ粒子をイオントフォレシス (0.34 mA/cm², 30 分間) に供した。イオントフォレシス後に、皮膚凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡により解析を行うことで、皮内への送達を確認した。

4. 研究成果

初年度は、抗ウイルス薬封入脂質ナノ粒子製剤の開発、およびイオントフォレシスによる脂質ナノ粒子の皮内送達の達成、について検討を行った。抗ウイルスヌクレオシド (EICAR) の脂質ナノ粒子 (リポソーム) への封入技術は、これまでに確立されていないため、封入技術の確立から取り組んだ。EICAR のモデルとしてヌクレオシド (シチジン) を用い、ボロン酸がジオールと反応し可逆的に結合する特性に着目して、アルキル鎖を有するボロン酸を用いてシチジンのナノ粒子化を試みた。種々検討を行うことでシチジンを結合したボロン酸ナノ粒子の構築に成功した。このナノ粒子をコアとして脂質膜で被覆することで脂質ナノ粒子への封入が完了すると考えており、すでにミセルをリポソームに封入することに成功していることから、問題無く封入できると考えている。また、イオントフォレシスによる脂質ナノ粒子の皮内送達について検討を行った。これまで負電荷脂質ナノ粒子のイオントフォレシスによる皮内送達を試みたことが無かったので、蛍光標識化負電荷リポソームを調製し、マウス背部皮膚上でイオントフォレシスを行い、

皮内への負電荷脂質ナノ粒子の送達を確認することに成功した。2年目は、初年度の成果を基盤として、EICARのモデルとしてヌクレオシド(シチジン)をジオール結合したポロン酸含有ポリマーナノ粒子(PBコア)の脂質膜被覆に成功した。ポロン酸とジオール結合を形成することで蛍光を発するアリザリンレッド(AR)を用いて、ポロン酸含有ポリマーのヌクレオシド修飾率を検討したところ、30%強のポロン酸にヌクレオシドが結合していることを確認した。また、脂質膜での被覆率もARを用いて検討したところ、約40%のPBコアが脂質膜で被覆されていることが確認できた。さらに、PBコアを赤色(AR)で、脂質膜を緑色(DiO)で蛍光標識して作成した脂質膜被覆ナノ粒子を、マウス背部皮膚上でイオントフォレシスに供した後、皮膚凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡観察したところ、マウス皮膚内に赤色蛍光と緑色蛍光が観察され、重ね合わせ画像において黄色を呈していたことから、PBコアが脂質膜で被覆された状態で皮内に送達されていることが確認された。すなわち、PBコア被覆脂質ナノ粒子のイオントフォレシスによる皮内送達に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀬尾明日香、大高晋之、山岡哲二、小暮健太郎
2. 発表標題 ポロン酸基含有ポリマーを使用したヌクレオシド封入ナノ粒子のイオントフォレシスによる皮内送達
3. 学会等名 日本DDS学会 第39回学術集会
4. 発表年 2023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	南川 典昭 (MINAKAWA Noriaki) (40209820)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授 (16101)	
研究分担者	福田 達也 (FUKUTA Tatsuya) (90805160)	和歌山県立医科大学・薬学部・講師 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------