

令和 6 年 9 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19936

研究課題名（和文）患者フレンドリーな次世代経皮薬物送達技術の開発

研究課題名（英文）Development of transdermal absorption enhancers

研究代表者

近藤 昌夫（Kondoh, Masuo）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：50309697

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、予備検討の結果を踏まえ、独自かつ随一のTJ modulator/binder技術を皮膚バリア制御の観点から捉え直し、画期的バイオ医薬シーズの経皮投与に資する皮膚シールド制御技術の開発に挑戦し、以下の4つの成果を得た。1）皮膚バリアを担うTJシールド構成蛋白質を同定、2）当該構成蛋白質発現制御活性物質探索系を構築、3）当該構成蛋白質発現制御分子候補を複数同定、4）バリアを減弱させる活性を有する分子、バリアを強固にする活性を有する分子を複数単離。これらの成果は、バイオ医薬の経皮投与の基盤技術としての展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、予備検討の結果を踏まえ、独自かつ随一のTJ modulator/binder技術を皮膚バリア制御の観点から捉え直し、画期的バイオ医薬シーズの経皮投与に資する皮膚シールド制御技術の開発に挑戦し、複数の皮膚シールド制御分子候補を得た。この成果は、経皮投与の積年の隘路であった皮膚バリア透過をはじめ克服するものであり、これまで注射による投与を余儀なくされていた核酸や環状ペプチド等の中分子医薬のみならず、経口投与されている全ての医薬品を貼る薬として製剤化する基盤技術となりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, based on the results of preliminary research, we reconsidered the innovative tight junction (TJ) modulator/binder technology from the perspective of skin barrier control. Our aim was to develop a technology for skin shield control that could contribute to the transdermal delivery of pioneering biopharmaceuticals. We tackled this challenge and achieved the following four results: Identification of the key proteins constituting the TJ shield that play a role in the skin barrier, Construction of a search system for active substances that regulate the expression of these proteins, Identification of multiple candidate molecules that regulate the expression of these proteins, and Isolation of several molecules with activities that either attenuate or strengthen the barrier. These results are expected to serve as foundational technology for the transdermal administration of biopharmaceuticals

研究分野：薬物送達学

キーワード：経皮吸収 皮膚バリア

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム・プロテオーム創薬研究の進展には目覚ましいものがあり、ペプチド・蛋白質・核酸医薬品等の画期的バイオ医薬シーズが生まれつつある。しかしながら、バイオ医薬は、生体膜透過性に乏しい上に消化酵素によって分解されやすく、注射による投与を余儀なくされているのが現状である。消化酵素による分解を回避できること、非侵襲性であることから、経皮投与が理想的な投与方法であるものの、元来皮膚は外部環境から生体内環境を保護するバリアとして機能しており、一部を除き皮膚バリアを効率よく透過しうる薬物は少なく、ここに経皮投与薬創製の難しさがある。

## 2. 研究の目的

本研究では、予備検討の結果を踏まえ、独自かつ随一の TJ modulator/binder 技術を皮膚バリア制御の観点から捉え直し、画期的バイオ医薬シーズの経皮投与に資する皮膚シールド制御技術の開発に挑戦する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト claudin-1 (CLDN-1) modulator 探索用細胞株の樹立

hCLDN-1 promotor 活性を指標にしたスクリーニング系を確立するため、CLDN-1 ゲノム配列の転写開始点付近から上流約 1.9 kbp の領域 (-1696 to +156) を CLDN-1 promotor 領域とし、この領域下に NanoLuc レポータータンパク質および、分解シグナル (PEST 配列) を発現させる pNL2.2[NlucP-Hygro]\_hCLDN1\_(-1696 to +156) と TK promotor 下にホタル Luciferase を発現させる pGL4.54-luc2-TK-EF-BsdTK を構築し、western blotting により、CLDN1 の発現が確認された (Fig.1B) ヒト表皮角化細胞株 HaCaT に導入した。前者を Hygromycin, 後者を Blasticidin で選択することで HaCaT hCLDN-1 promotor N-Luc/TK-Luc 安定発現細胞を樹立した (Fig.1A)。ルシフェラーゼ活性の認められたクローンについて、genome DNA の PCR により、上記プロモーター領域全域が genome に組み込まれていることを確認した (Fig. 1C)。

得られた2種類のクローン HaCaT-hCLDN-1-TK-Luc2-EF-Bsd # 1107 および HaCaT-hCLDN-1-TK-Luc2-EF-Bsd # 2203 のうち HaCaT-hCLDN-1-TK-Luc2-EF-Bsd # 2203 をスクリーニング評価系に使用した。これまでに hCLDN-1 の発現制御について、報告されている3つの化合物を作用させ、ルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を評価した。Homoharringtonine (60S リボソーム阻害剤) 及び 17-AAG (HSP90 阻害剤) は非特異的にルシフェラーゼ活性を抑制し、GF109203X (PKC 阻害剤) は、hTERT-HPDE 細胞において FBS による CLDN-1 mRNA の転写誘導を抑制する (Am J Pathol, 2010, 177, 698)。Fig.2 に示すように、Homoharringtonine, 17-AAG, GF109203X の添加により、CLDN-1 promotor Nluc 活性が濃度依存的に低下しており、特に GF109203X は TK-Luc 活性には影響を及ぼさない、特異的な変化を示した。

### (2) hCLDN-1 promotor 活性を指標にしたスクリーニング系の構築

384 plate を用いた、ハイスループットスクリーニング (HTS) を行うため、予備実験を経て、以下の条件を確立した。ライブラリー化合物は、2 mM DMSO 溶液 300 nL を ECHO アコースティック分注システムで分注(薬学研究科附属化合物ライブラリー・スク

リーニングセンターにご協力いただいた)したのち、HaCaT-hCLDN-1-TK-Luc2-EF-Bsd # 2203, 15000 cells/ well を Multidrop COMBI で播種、24 時間培養後に、Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System 試薬を Nano liquid Flex5 を用いて添加した。ONE-Glo EX ルシフェラーゼ(TK-Luc) アッセイは 25°C 3 min 900 rpm, NanoLuc ルシフェラーゼアッセイは 25°C 30 min 900 rpm 反応させた後、GloMax Discover system で 0.3 sec 測定した。100% 対照を溶媒コントロールである 1%DMSO、0% 対照を 10 μM Homoharringtonine として計測し、 $Z' = 1 - (3 \times SD_{100\%} + 3 \times SD_{0\%}) / (Av_{100\%} - Av_{0\%})$  を算出、CV 値が 10%以下、Z'が 0.5 以上のスクリーニング系であることを確認した。

### (3) hCLDN-1 promotor 活性を指標にしたスクリーニング

前述の条件で、FDA-approved drug library:1134 化合物と Library of Pharmacologically Active Compounds (LOPAC<sup>®1280</sup>):1280 化合物をあわせた 2414 化合物について、1<sup>st</sup> screening を行った (Fig.3A, 3B)。

2<sup>nd</sup> screening に向けて、以下の条件を満たす候補化合物を選別した。

条件 1: hCLDN1-Nluc %activity が Mean ± 3SD である 40.74%より小さい値、  
または 159.26%より大きい値を示す。

条件 2: ratio activity hCLDN-1 Nluc / TK-Luc が 1.25 より大きい値、  
または 0.75 より小さい値を示す。

条件 3: TK-Luc % activity が Mean ± 2SD の範囲内の値を示す。

hCLDN1 promoter 活性を上昇させた化合物 44 個, hCLDN1 promoter 活性を低下させた化合物 84 個のうち上位 50 個を選別し、同時に modulator screening を行った hCLDN2, hCDN4, hCLDN5 での候補化合物とあわせた 315 化合物について、2<sup>nd</sup> screening を行った。Fig.3C に、同一化合物に対する、1<sup>st</sup> screening と 2<sup>nd</sup> screening の hCDN1-Nluc relative activity の相関を示した。1<sup>st</sup> screening と 2<sup>nd</sup> screening の再現性に乏しい化合物も散見された。hCLDN-1- Nluc relative activity を基準に、hCLDN-1 promotor 活性を上昇させた化合物上位 50 個 (Fig.3D)、hCLDN-1 promotor 活性を低下させた化合物上位 50 個 (Fig.3 F) およびそれぞれに対応する TK-Luc relative activity (Fig.3F, 3G)を示した。2<sup>nd</sup> screening のデータを基に以下の条件を満たす 10 化合物を最終選定化合物とした。

条件 1. hCLDN1-Nluc reative activity を活性の高い順および低い順にランキング

条件 2. TK-Luc relative activity 100 ± SD 範囲内 (Fig.3F, 3G 点線内)

### (4) Caco-2 細胞を用いたバリア制御活性の解析

候補化合物がタイトジャンクションのバリア機能に及ぼす影響を調べるため、トランズウェルで単層培養したヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞に化合物を添加し、経上皮電気抵抗 (TER)を測定した。2<sup>nd</sup> screening により選択した 10 化合物について、Cell counting kit-8 (CCK-8) により、Caco-2 細胞の増殖に影響を及ぼす濃度を把握したのち、3 点の濃度で添加、TER を経時的に測定した。それぞれの化合物で、TER の変動が最も大きかった濃度での relative TER

(%) の一覧を Fig.4A に示した。そのうち、比較的変動の大きい 2 化合物については、CCK-8 assay の結果と、relative TER (%) の経時的变化を Fig4.B,C,D,E に示した。

#### 4. 研究成果

非侵襲性の経皮投与を可能とする、皮膚タイトジャンクションバリア機能を調節する化合物を、遺伝子転写レベルに依存してスクリーニングできる新たな細胞株を樹立し、2000 余の化合物について、スクリーニングを行った。経上皮電気抵抗測定により、バリアを制御している可能性のある化合物が取得できており、細胞株およびスクリーニング系の有用性を実証できた。

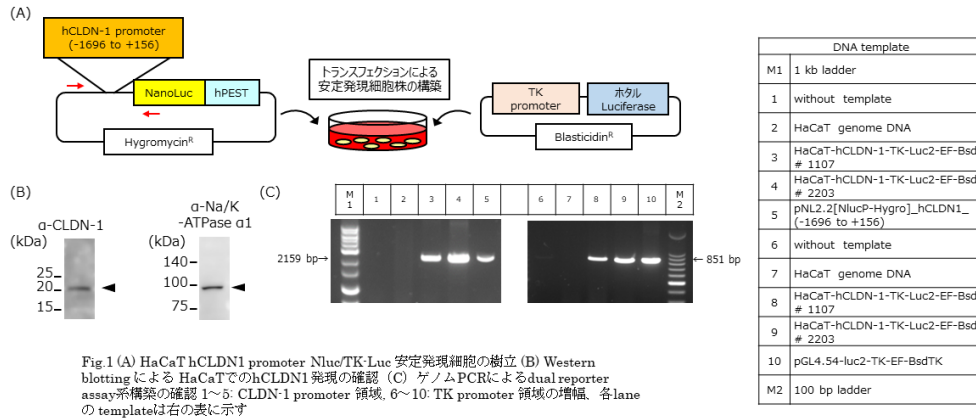


Fig.1 (A) HaCaT hCLDN1 promoter Nluc/TK-Luc 安定発現細胞の樹立 (B) Western blotting による HaCaTでのhCLDN1発現の確認 (C) ケムPCRによるdual reporter assay系構築の確認 1~5: CLDN-1 promoter 領域, 6~10: TK promoter 領域の増幅、各laneの templateは右の表に示す

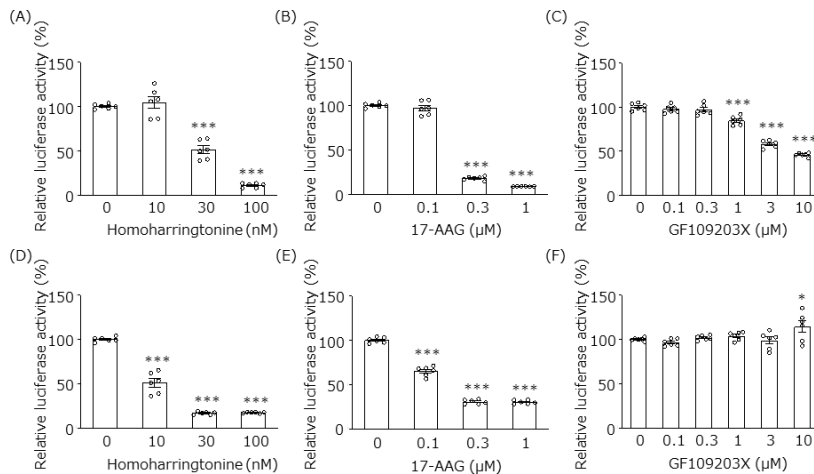
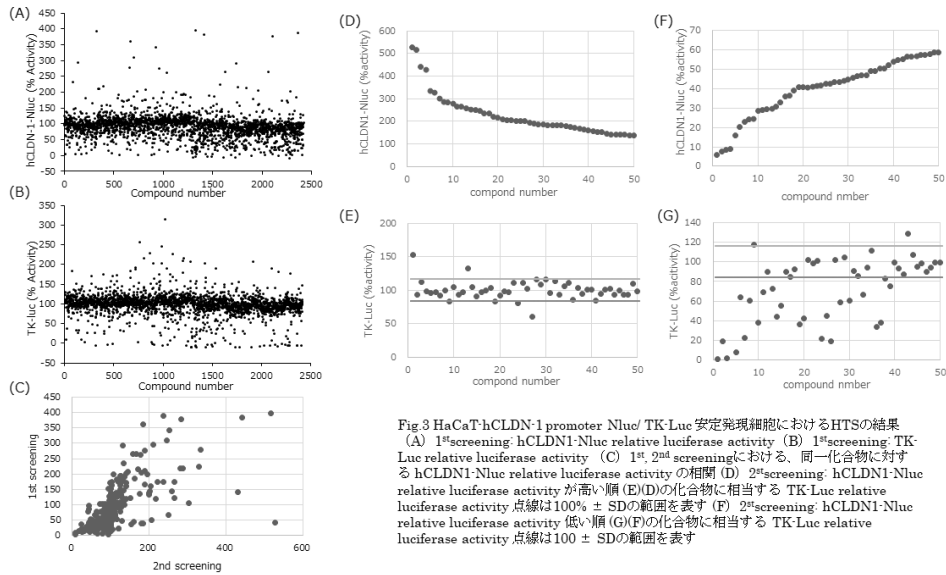
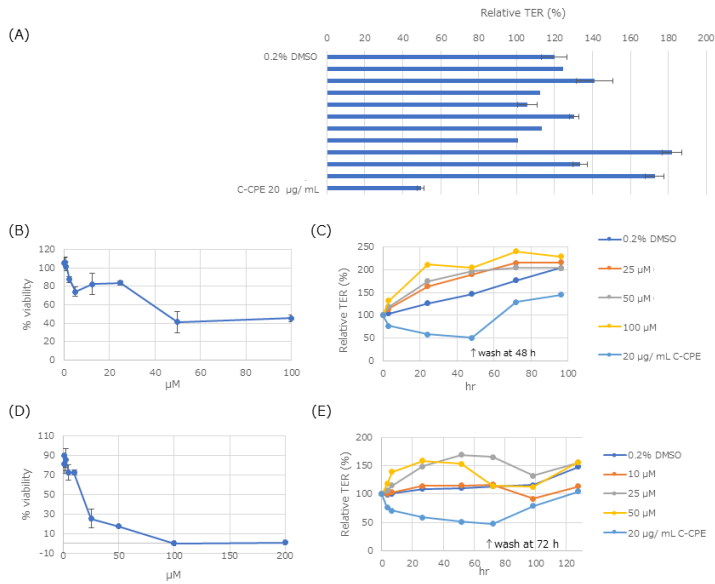


Fig.2 HaCaT hCLDN1 promoter Nluc/TK-Luc 安定発現細胞のluciferase 活性に及ぼす化合物の影響 (A) Homoharringtonine (B) 17-AAG (C) GF109203X 各添加24時間後のhCLDN-1-Nluc promoter 活性 (D) Homoharringtonine (E) 17-AAG (F) GF109203X 各添加24時間後のTK-Luc promoter活性 各々、means ± S.E.M. (n = 6) を示す \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 (Dunnett's test, vs 0 mM)

2



3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 杉村早耶香、橘敬祐、近藤昌夫
2. 発表標題 吸収促進剤のレギュラトリーサイエンス研究～細胞間隙作用性吸収促進剤の薬事上の論点整理～
3. 学会等名 日本DDS学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤楓、橘敬祐、安藤大介、伊豆津健一、近藤昌夫
2. 発表標題 溶解型マイクロニードルアレイ製剤の皮膚バリア機能への影響の評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masuo Kondoh
2. 発表標題 Tight junction-targeted drug development : How I met claudins, what we have done, and what we will do
3. 学会等名 The Retreat of DFG Research Training Group “TJ-train” in Berlin (Web参加) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiki Kuzu, Yosuke Hashimoto, Erika Wakayama, Itsuki Nishino, Keisuke Tachibana, Yoshiaki Okada, Yasushi Fujio, Ryuichi Hirayama, Hiroki Kuniyasu, Masuo Kondoh
2. 発表標題 Safety assessment of modifying the blood-brain barrier by targeting claudin-5 in a cynomolgus monkey model
3. 学会等名 SOT 62nd Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 健康・医療イノベーションを担う レギュラトリーサイエンス人材育成戦略
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------