

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21898

研究課題名（和文）イオン液体を利用した革新的腸管吸収デリバリー技術の開発

研究課題名（英文）Enhanced absorption 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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、中分子医薬品の新規経口投与法を開発した。見出したイオン液体は、対象のペプチド性中分子をよく溶解させ、溶解したペプチドを保存中の分解から保護するとともに、ペプチドを腸管内へ直接投与した際には吸収促進作用を示すことを確認した。さらに、培養Caco-2細胞をモデルとしてイオン液体のペプチド性中分子の透過促進機構について検討したところ、細胞間のタイトジャンクションの形成に寄与するタンパクの一過性の発現抑制が生じていることが示され、イオン液体による腸管吸収向上には細胞間の隙間が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中分子医薬品の経口投与技術の開発が切望されている。最大のバリアである小腸での吸収性を改善させるため、界面活性剤、キレート剤などの透過促進剤が提案されてきたが、中分子医薬品の吸収改善には至っていない。本研究では、イオン液体をキャリアとし、腸管上皮細胞の突破という最も大きな課題を解決できる可能性を示すことができた。注射でしか投与できない中分子医薬品を経口投与と製剤化できる可能性が示唆されており、患者や介護者、医療関係者にとってのメリットは非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a new technology which can enhance adsorption of peptide-derived drugs after oral administration. We successfully obtained an ionic-liquid which increased solubility of peptide-derived drugs, stability of peptide-derived drugs during storage and permeability of peptide-derived drugs via intestinal tract after direct injection into the intestinal space in mice. We could confirm that the direct intestinal administration with Glucagon-like peptide-1 type drug can control blood sugar level in diabetes model mouse. In vitro Caco-2 permeability assay indicated that the ionic liquid induces suppression of protein expression composed of cell-cell tight junction with gradual recovery of protein expression after treatment.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：イオン液体 経口投与

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

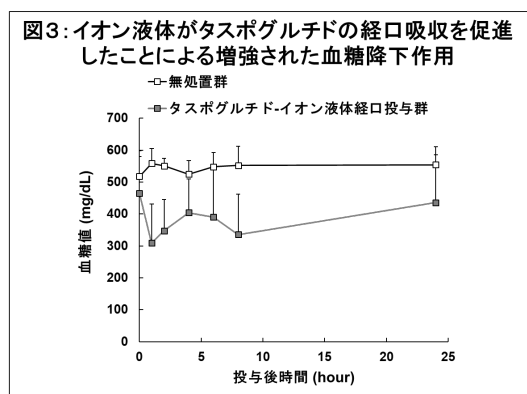
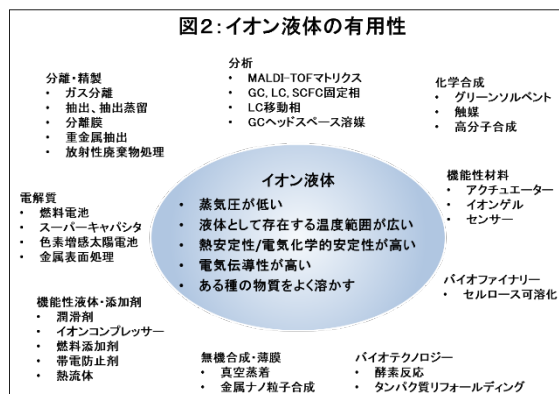
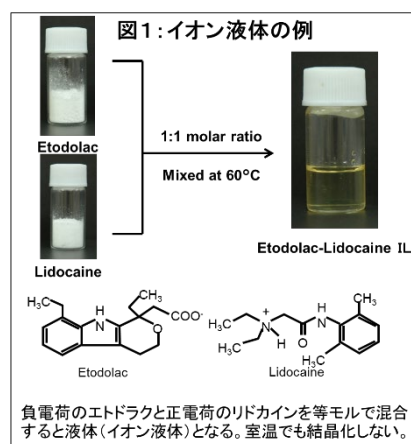
1. 研究開始当初の背景

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、アドヒアランスが守られない状況となりやすくなっている。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い経皮投与法や経口投与法が最適である。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、中分子医薬品で実用化に至ったものはなかった。研究代表者は、バイオベンチャーとの共同研究により、イオン液体を用いた中分子医薬品の経皮吸収剤の開発に携わり、インスリン、がんペプチド、siRNAを角質のバリア機能を突破して経皮吸収させることに成功していた。また、経口投与剤への応用を考え、GLP-1受容体作動薬であるタスポグルチドを溶解したイオン液体を腸内直接投与したところ、持続的な血糖低下作用が観察され、腸管上皮細胞のバリアを突破できる可能性を示唆する結果を得ていた。このような報告はこれまでなく、当該研究課題を想起するに至った。

2. 研究の目的

中分子医薬品であるバイオ医薬品の経口投与技術の開発が切望されている。最大のバリアである小腸での吸収性を改善させるため、界面活性剤、キレート剤などの透過促進剤が提案されてきたが、中分子医薬品の吸収改善には至っておらず、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、腸管上皮細胞の突破という最も大きな課題を一気に解決し、中分子医薬品の経口投与法を開発することである。

イオン液体（図1）は陽イオンと陰イオンからなる常温で液体の物質であり、その特徴的な性質から新たな電池材料や溶剤としてなどグリーンケミストリーの素材として活用されてきている（図2）。研究代表者は経皮



吸収剤の開発に特化したバイオベンチャーと共同でイオン液体がタンパクやペプチドなどの高分子をその性質に依らず溶解させること、さらに皮膚に貼付するとタンパクやペプチドの皮膚透過性が飛躍的に改善されることを明らかにした。この驚くべき成果を基盤とし、GLP-1受容体作動薬であるタスポグルチド(MW 3,340)を溶解したイオン液体を小腸に直接投与したところ、持続的な血糖降下作用を示した（図3）。注射でしか投与できない中分子医薬品を経口投与剤にすることができれば、患者にとってのメリットは絶大である。また、本技術は様々な中分子に応用可能であり、新たな領域の開拓にも寄与することができる。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* 透過試験: ThinCertにCaco-2細胞を 3×10^4 cells/wellになるように播種し、約3週間継続的に培養し、細胞の層を形成させた。細胞単層膜の完全性の確認は、FITC標識デキストランの透過性がないことで判断した。イオン液体自体の細胞単層膜への影響に関しては、イオン液体自体を緩衝液で10, 100, 1,000, 10,000倍にそれぞれ希釈したものを100 μ L/well添加し、その後経時的(0, 1, 2, 3, 4時間後)に抵抗値測定システムを用いてTEERの変化を評価することで行った。

た。薬物の透過性は、モデル薬物として Lixisenatide (Lix) を用い、イオン液体に Lix を溶解させた。Lix を 60 ng/100 μ L/well で添加し、経時的 (1, 2, 3, 4 時間) に下部区画に透過した Lix 量を Lixisenatide-EIA KIT を用いて定量的に評価した。

(2) イオン液体による透過促進機構の検討：細胞間相互作用に寄与する Claudin 3 に着目し、イオン液体処置による Claudin 3 発現の影響について検討した。ガラスボトムディッシュに Caco-2 細胞を 8.6×10^5 cells/dish で播種し、Caco-2 の細胞単層膜を調製した。完全性を確認した後、緩衝液で 1,000 倍希釈したイオン液体を添加し、37°C で 2-4 時間インキュベーションした。その後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。ウサギ抗 Claudin 3 抗体および Cy3 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を連続して反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で Cy3 の蛍光を観察した。

(3) In vivo 吸収試験：イオン液体または蒸留水に FITC 標識デキストラン (平均分子量 3,000~5,000) を溶解し、一晩絶食させた BALB/c mouse に 125 μ g/50 μ L/mouse で経口投与した。その 1 時間後に採血し、血清中の FITC 標識デキストラン由来の蛍光強度を測定した。また、同様に 10 kDa (平均分子量 10 kDa)、20 kDa (平均分子量 20 kDa)、40 kDa (平均分子量 40 kDa)、70 kDa (平均分子量 70 kDa)、150 kDa (平均分子量 150 kDa) の FITC 標識デキストランを用いても検討を行った。

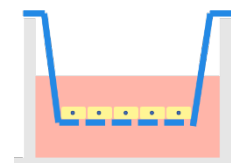
(4) In vivo 安全性試験：イオン液体投与後の腸管の様子を以下の通り評価した。イオン液体または蒸留水と様々な FITC 標識デキストランを溶解させた。それらを一晩絶食させた BALB/c mouse に 125 μ g/50 μ L/mouse あるいは 250 μ g/100 μ L/mouse で経口投与した。その 1 時間後、マウスの空腸、回腸、結腸を採取し、それぞれ凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で FITC 由来の蛍光を観察した。

(5) In vivo 血糖降下試験：健常動物として ICR マウス、あるいは糖尿病モデル動物として BKS.Cg-m +/+ *Lepr^{db}/Jcl* マウスをそれぞれ用いた。一晩絶食した後、イオン液体に溶解した Lix を経腸投与 (1,000 μ g/kg)、あるいは生理食塩水に溶解した Lix を皮下投与 (10 μ g/kg) した。投与 1 時間後にグルコースを腹腔内投与 (1~2 g/kg) し、実験動物用測定器 LAB Gluco を用いて血糖値を経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) In vitro 透過試験

薬物の経口投与において、吸収を最も大きく制御しているバリアは小腸上皮細胞である。イオン液体の吸収促進効果を確認するために、in vitro での検討を行った。具体的には、右図に示す装置を用いた。即ち、上部区画と下部区画を小腸上皮細胞様細胞である Caco-2 の細胞の単細胞層による仕切りを設け、上部区画にイオン液体を添加し、細胞間隙経路の開孔の指標となる TEER (経上皮電気抵抗) を経時的に測定するとともに、下部区画に移行したマーカーや中分子化合物を測定した。



イオン液体自体の 1,000 倍希釈群、10,000 倍希釈群で濃度・時間依存的に TEER が減少し、イオン液体処置によって細胞間隙が開孔することが示された。10 倍希釈群、100 倍希釈群は添加直後に TEER が急激に低下したことから、細胞が障害を受けて支持膜から剥離したものと考えられた。

次に、同様の方法で、Lixisenatide (Lix, M.W. 4858.49) の透過性について検討を行った。希釈したイオン液体に Lix を溶解させ、上部区画に添加し、添加 1, 2 時間後に下部区画から回収したサンプル中の Lix 量を定量した。1 時間後を比較すると、細胞層のある群ではどの群でも透過量は同程度に低い値を示すのに対して、2 時間後を比較すると Lix-イオン液体 (1,000 倍希釈) 群は透過量が急増した。Lix-イオン液体 (10,000 倍希釈) 群では、透過量が全く増加しなかったことから、10,000 倍希釈ほどの低濃度のイオン液体では、中分子に相当する Lix (分子量: 約 4858) の透過を促進させるほど、細胞間隙を開孔させられなかったものと考えられた。以上のことから、イオン液体が細胞層透過促進効果を持つことが示された。

(2) イオン液体による透過促進機構の検討

中分子の Caco-2 細胞由来の単細胞膜透過性をイオン液体がどのように向上させているかを理解することは、非常に重要である。分子が細胞の層を透過する経路は、経細胞経路と細胞間隙経路の 2 つに大別される。経細胞経路は細胞膜を透過する必要があるため、分子量の大きな親水性分子がこの機構を介して透過しているとは考えにくい。一方、細胞間隙は水で満たされた空間であるため親水性分子が通過しやすい環境であると言える。通常、細胞間隙経路は密着結合によって物質の移動が強力に制御されており、その間隙は極微小 (3~10 Å) であるため、低分子であっても容易に透過することはできないことが知られている。イオン液体がこの密着結合を開孔させることができるのか、検討を行った。

過去に、ある種のイオン液体 (Cholin And GEranete : CAGE) が細胞の層の TEER を減少させ、細胞間隙経路の透過性の指標となる FITC 標識デキストラン (4 kDa) の透過を促進したことが報告されている。細胞間隙開孔の要因として、隣り合う小腸上皮細胞同士を繋ぐことで様々な物質が細胞間を通過するのを防ぐ役割を持つ密着結合があり、イオン液体が密着結合を構成する主要なタンパク質である Claudin に作用することでその効果を発揮している可能性を考えた。

Claudin とは、密着結合を構成する主タンパク質であり、実質的にタンパク-タンパク相互作用によって、細胞間隙を閉塞させている。そこで、小腸に最も高発現している Claudin 3 に着目して検討を行った。Caco 2 由来単細胞膜にイオン液体を添加し、1~4 時間のインキュベーションした後、免疫染色によって Claudin 3 を観察した。その結果、イオン液体添加によって、時間依存的に Claudin 3 の発現が減少することが明らかとなった。以上から、イオン液体によって Claudin 3 が減少することで、密着結合の構造が変化し、細胞間隙が開孔する可能性が示唆された。Claudin は細胞膜表面に発現しており、Claudin 3 がタンパク間相互作用することで密着結合を構成し、細胞間隙を塞いでいる。イオン液体はこのタンパク間相互作用を阻害、またはタンパクを変性させることで、Claudin 3 量を減少させていると考えられた。

以上の検討から、イオン液体は Claudin 3 に作用することで細胞間隙を開孔させていることが明らかとなった。吸収促進剤は小腸の構造を変化させて吸収を促進させるという作用機序から安全性が懸念されたため、イオン液体が吸収促進剤として臨床で使用されることを考慮すると、投与後の小腸上皮細胞の構造の回復性が非常に重要である。そのため、イオン液体添加によって発現が低下した Claudin 3 の回復性について評価した。3 週間以上培養した Caco 2 細胞にイオン液体を添加し、4 時間インキュベーションした。その後、培養培地に交換しさらに 24 時間インキュベーションし、免疫染色によって Claudin 3 の発現を観察した。イオン液体処置 (4h) 群は Control と比較して Claudin 3 量が明らかに減少した。一方、イオン液体処置 (4h) +回復 (24 h) 群では、イオン液体処置 (4h) 群と比較して、Claudin 3 量が増加しており、24 時間の追加のインキュベーションによって Claudin 3 量が回復傾向にあることが示された。本検討では、イオン液体除去 24 時間後においても、その Claudin 3 量は Control には及ばなかったが、小腸の細胞は体内で最も活発にターンオーバーがなされているといわれており、体内では Claudin 3 の発現がもっと早く回復している可能性が考えられた。

(3) In vivo 吸収促進試験

モデル化合物として、中分子に相当する分子量 3~5 kDa の FITC 標識デキストランを用いて検討を行った。結果として、親水性イオン液体を用いた場合のみ、血清中の蛍光強度の増加が観察された。以上のことから、イオン液体はその組成に依存するものの、分子量 3~5 kDa 程度の親水性化合物の腸管での吸収性を向上させることが確認された。

次いで、分子量が抗体に相当する 150 kDa の FITC 標識デキストランをモデル化合物として検討を行った。結果として、ほとんど吸収は促進されなかった。したがって、本検討で用いたイオン液体では 150 kDa 程度の分子量の化合物の腸管吸収を促進することは難しいと考えられた。

以上の検討より、透過できる分子量の境界は、5~150 kDa の間にあることが分かった。そこで、その境界を確定させるため、様々な分子量 (10~70 kDa) の FITC 標識デキストランを用いて同様の検討を行った。その結果、10 kDa および 20 kDa の FITC 標識デキストランでは吸収が観察されたのに対して、40 kDa および 70 kDa の FITC 標識デキストランではほとんど吸収は観察されなかった。以上のことから、今回用いたイオン液体による吸収促進効果は、20 kDa 程度の水溶性化合物にまで適用可能であることが示唆された。

上皮細胞から吸収が促進されている場合、2つの透過経路が考えられる。1つはトランスサイトosisなどによる経細胞経路、もう1つは細胞間の結合が弱まることによる細胞間隙経路である。経細胞経路では小腸上皮細胞に生来から存在する輸送系によって輸送され、細胞間隙経路では密着結合が弱まり細胞間隙が開孔することで輸送される。CAGE と呼ばれるイオン液体は、Caco-2 を用いた実験で、細胞間隙経路膜透過の指標である FITC 標識デキストラン及び Lucifer yellow の膜透過を促進したことが報告されている。イオン液体の組成は異なるものの、CAGE と同様に本検討で使用したイオン液体も細胞間の密着結合に作用し細胞間隙経路の膜透過を促進することで FITC 標識デキストランの血中移行を果たしたと考えられる。

以前の報告によると、現在臨床で用いられている吸収促進剤であるカプリン酸ナトリウムによって細胞間隙は 1.5 nm まで開くようである。カプリン酸ナトリウムとイオン液体では構造的な違いから吸収促進メカニズムも異なると考えられるものの、イオン液体が細胞間隙を開くのであれば、イオン液体によって開く細胞間隙の大きさも 1.5 nm から大きくかけ離れていないと考えられる。よって、イオン液体によって開孔する細胞間隙の大きさが分子量 40 kDa の粒子径未満であり、40 kDa 以上の FITC 標識デキストランでは粒子径が大きすぎて細胞間隙を通過できなかったものと考えられる。事実、20 kDa の FITC 標識デキストラン、40 kDa の FITC 標識デキストランは粒子径がそれぞれ、3.3、4.5 nm であることから、イオン液体によって開孔する細胞間隙の大きさは 4.5 nm 以下であるものと考えられる。

本検討で見出したイオン液体によって 20 kDa 程度の分子量まで化合物の吸収が促進可能であれば、糖尿病治療薬であるインスリン (5.7 kDa) や、骨粗鬆症治療薬であるテリパラチド (4.1 kDa) などのペプチド医薬品、抗がん剤であるインターロイキン 2 (17.2 kDa) や成長ホルモン (22 kDa) などのタンパク質医薬品の腸管吸収が可能となるものと期待される。

(4) In vivo 安全性試験

イオン液体による吸収が腸管のどの部分で促進されているかを特定するために、FITC 標識デキストラン-イオン液体投与後のマウス腸管内の FITC 標識デキストランの蛍光を観察した。空

腸では、顕著に FITC 標識デキストランの蛍光が観察されたのに対して、回腸ではその傾向は弱くなり、結腸においては FITC 標識デキストランの蛍光はほとんど観察されなかった。したがって、イオン液体によって FITC 標識デキストランは主として空腸から吸収され、血中に移行したものと考えられた。

また、イオン液体を処置した空腸を見ると、柔毛の構造がやや崩壊している様子が観察された。これは、イオン液体の吸収促進に伴う細胞障害性と考えられるが、この細胞障害性はイオン液体の濃度調整によって制御が可能であった。次に、前項で観察された細胞障害性とイオン液体濃度の関係について検討を行った。5 v/v% または 20 v/v% に希釈したイオン液体に FITC 標識デキストランを溶解させて経口投与し、その 1 時間後の空腸を観察した。希釈したイオン液体を用いると、どの群においても柔毛の構造は保たれていた。しかし、20 v/v% 群では、若干ながら柔毛構造の損傷が確認できたのに対して、5 v/v% では全く細胞障害性は観察されなかった。これらのことから、イオン液体の細胞障害性はイオン液体を希釈することによって抑制できることが示された。

人間の消化液分泌量は 8 L/日であり、体重換算するとマウスでの消化液分泌量は 2.7 mL/日となる。1 回の食事あたりの分泌量が 0.9 mL だとすると、飲水量などの要因を無視しても、投与したイオン液体 50 μ L は 20 倍に希釈されることになる。したがって、ある程度濃度の低いイオン液体を吸収促進剤として用いれば、障害性の軽減が実現できるものと考えられた。

(5) In vivo 血糖降下試験

健常動物として ICR マウスにグルコースを腹腔内投与したところ、投与 30 分で血糖値が 100 mg/dL から 420 mg/dL まで上昇し、その後徐々に減少して、投与 2 時間で基底値まで戻ることを確認した。これに対し、イオン液体に溶解した Lix を経腸投与したところ、グルコース投与 30 分後の血糖値上昇を顕著に抑制することが明らかとなった。また、生理食塩水に溶解した Lix の皮下投与でも、Lix/イオン液体と同程度の血糖値上昇抑制が認められた。

糖尿病モデル動物として BKS.Cg-m^{+/+}Lep^{ob}/Jcl マウスを用いても同様に検討を行った。グルコースを腹腔内投与したところ、一過性の血糖値上昇が認められたのに対し、イオン液体に溶解した Lix を経腸投与することで、血糖値上昇を顕著に抑制することを示した。また、生理食塩水に溶解した Lix の皮下投与でも、同等の血糖値上昇抑制が認められた。以上より、イオン液体を基剤として Lix を経腸投与することで、Lix の薬理効果を健常動物および糖尿病モデル動物の両方で発現させることができることを示した。

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 角南尚哉、安藤英紀、丸山敦也、三輪泰司、濱本英利、清水太郎、異島優、石田竜弘
2. 発表標題 イオン液体を用いたGLP-1受容体作動薬の腸管吸収性検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（Web開催）
4. 発表年 2021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)	
研究分担者	安藤 英紀 (ANDO Hidenori) (00735524)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・特任助教 (16101)	

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