

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790049

研究課題名（和文）機能性ペプチドを用いたアトピー治療用 siRNA の皮内送達システム構築と経皮製剤化

研究課題名（英文）Development and transdermal formulation of intradermal siRNA delivery system using functional peptides for atopic dermatitis therapy

研究代表者

金沢 貴憲（KANAZAWA TAKANORI）

東京薬科大学 薬学部 製剤設計学教室

研究者番号：60434015

研究成果の概要（和文）：本研究では、機能性ペプチドを基盤とした siRNA 皮内送達システムの開発を目的とし、皮内送達性、治療効果の検討を行った。機能性ペプチドとして、細胞透過性ペプチドとタイトジャンクション開口ペプチドを併用することで siRNA の皮内送達性が向上し、siRNA として抗 NF κ B siRNA をアトピー性皮膚炎モデルマウスに投与することで優れた治療効果が示された。さらに、機能性ペプチド/siRNA 含有ハイドロゲル製剤とすることで治療効果が増強させることを確認した。

研究成果の概要（英文）：In this study, to develop the intradermal siRNA delivery system using functional peptides, the intradermal siRNA delivery and therapeutic effect of siRNA in atopic dermatitis (AD) induced mice were investigated. Combination of cell-penetrating peptide and tight junction opener increased the intradermal siRNA delivery and therapeutic effect of anti-NF κ B siRNA in AD mice. In addition, the therapeutic effects by functional peptides/siRNA containing hydrogel increased compared with the peptides/siRNA solution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：薬物送達学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：siRNA、機能性ペプチド、AT1002、ハイドロゲル、アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎を代表とするアレルギー疾患は、肉体活動、精神活動および社会活動が妨げられ QOL の著しい低下を引き起こす。現在、その根治療法はほとんど無く、新しい作用機序を持った新規治療法の開発が期待

されている。近年、バイオテクノロジーの進歩に伴い遺伝子発現を制御することで病気を治療する新しい医薬品の開発が盛んに行われており、その 1 つとして siRNA が挙げられる。siRNA は疾患の原因タンパクを配列特異的に分解するためアレルギー疾患に対す

る新規治療薬として期待されている。

我々はこれまでにNF κ Bの構成タンパクの1つであるRelAを標的としたsiRNA(siRelA)がアトピーモデルマウスの症状発症を予防・治療できることをすでに見出している。

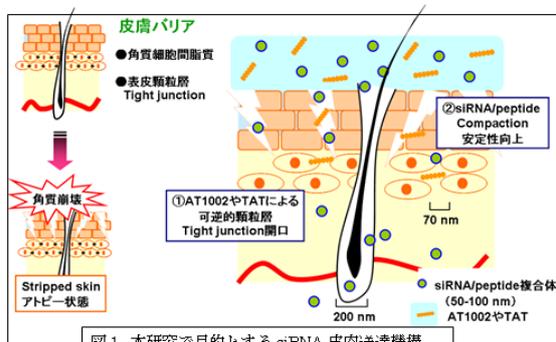
しかし、siRNAは水溶性の高分子であるため、動物やヒトへの実用化を可能とするには対象疾患に適した投与部位・経路の選択、さらに標的細胞内への高い導入効率を有しかつ安全なキャリアを組み合わせた非侵襲的なsiRNA投与システムの開発が最大の課題となっている。

我々は、これまで細胞内でsiRNAの効果を最大限発揮させる事を目的として、①siRNAと安定な複合体の形成能、②細胞内への効率的な取り込み能、③エンドソーム内から細胞質への効率的な脱出能、④細胞質でのsiRNA放出能を満たす効率的な多機能性ペプチドの設計に着手し、siRNAを用いた細胞実験においても、非常に低い細胞毒性と高い細胞内取り込効率を示している。

2. 研究の目的

本研究では、角質および表皮などの障壁を突破し、さらに標的細胞である炎症細胞内へのsiRNAの効率的導入を可能とするために必要な機能を保持するsiRNAの新規皮内送達システムの構築とその製剤化を目指した。

具体的には、図1に示すような皮膚に塗布するだけで、50-100 nmまで凝縮した細胞導入能をもつ多機能性ペプチドとのsiRNA複合体が、タイトジャンクション開口作用ペプチドAT1002により開いた皮内細胞間隙を角層や毛穴から標的部位的の標的細胞内へ送達可能なsiRNA皮内送達システムの開発、また、このシステムを用いて、アトピー性皮膚炎モデルマウスにsiRelAを投与した際の治療効果、さらには種々の製剤技術を駆使しこれらの送達システムを保有したハンドリング性のある非侵襲的かつ安全なsiRNA皮膚投与製剤の開発することを目的とする。



3. 研究の方法

機能性ペプチドを基盤としたsiRNA皮内送達システムの開発と製剤化を目指し、(1)機能性ペプチドを用いたsiRNAの皮内送達性

評価、(2)機能性ペプチド/治療siRNA(NF κ Bの構成タンパク質であるRelAに対するsiRNA、以下siRelA)のアトピー性皮膚炎マウス治療効果の検討、(3)ハイドロゲル製剤の調製と評価について検討を行った。

(1) 機能性ペプチドを用いたsiRNAの皮内送達性評価

当研究室にて開発したステアリン酸(STR)、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)、システイン(S)からなる多機能性ペプチド(STR-CH2R4H2C)、細胞透過性ペプチドTat、タイトジャンクション開口ペプチドAT1002との蛍光標識siRNA複合体をマウス背中に塗布し、10時間後の皮内の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。また、TAT/siRNA複合体、STR-CH2R4H2C/siRNA複合体の粒子径、表面電位、RNaseに対する安定性についても検討した。

(2) 機能性ペプチド/siRelAのアトピー性皮膚炎マウス治療効果の検討

NC/Ngaマウスにハプテンを感作・暴露することで、アトピー性皮膚炎症状を誘発したマウスを作製した。暴露の前日より週3回計6回、機能性ペプチド/siRelAを投与し、耳の肥厚、臨床スコア、炎症性サイトカイン産生を測定した。

(3) ハイドロゲル製剤の調製と評価

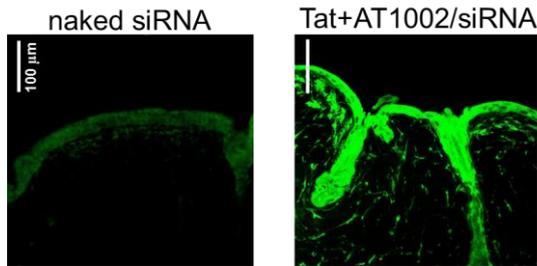
絹蛋白質の一つであるセリシンをハイドロゲル基剤として、siRNA含有ハイドロゲル製剤を調製し、siRelAによる治療効果をゲル化していないsiRNA溶液群と比較検討した。ハイドロゲルの安全性について検討するため、マウス背部皮膚塗布後の外観ならびに組織を観察した。さらに、機能性ペプチド/siRNA含有ハイドロゲルを調製し、そのsiRNA皮内送達性とsiRelAによる治療効果をゲル化していない機能性ペプチド/siRNA溶液群と比較検討した。

4. 研究成果

(1) 機能性ペプチドを用いたsiRNAの皮内送達性

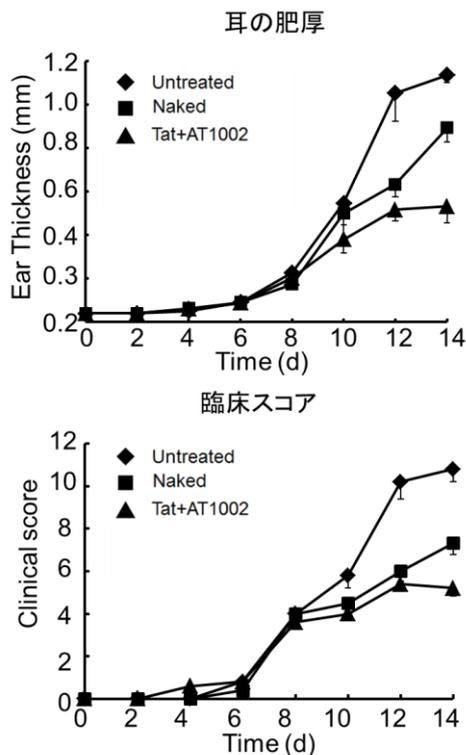
Tat/siRNA複合体は、粒子径約100 nm、ゼータ電位10 mVを、STR-CH2R4H2CとsiRNAとの複合体は、約200 nm、20 mVを示した。また、naked siRNAでは、RNA分解酵素混合後5時間でほとんど分解されていたのに対し、TATでは60%以上が、STR-CH2R4H2Cでは80%以上のsiRNAが安定であった。マウス皮膚を用いて蛍光標識siRNAの皮内送達性を検討した結果、Tat、STR-CH2R4H2C、AT1002はいずれも高いsiRNAの皮内送達性を示し、さらにAT1002にTatあるいはSTRCH2R4H2Cを併用することで、naked siRNAに比べて、siRNAの

皮内送達性を著しく向上させることを明らかとした。以上より、Tat、STR-CH2R4H2C や AT1002 は siRNA の皮内送達システムの有用なツールであることが示された。



(2) 機能性ペプチドを用いた siRelA のアトピー性皮膚炎マウス治療効果の検討

機能性ペプチド TAT、AT1002 を併用して siRelA をモデルマウスの発症部位である耳介へ適用した結果、naked siRelA 投与群に比較して、耳の肥厚および臨床スコアを著しく改善した。さらに、耳局所の炎症性サイトカイン産生を測定した結果、未処置群、naked siRelA 群に比較し、機能性ペプチド (Tat+AT1002)/siRelA 群において炎症性サイトカイン産生を抑制した。よって、本研究で確立した機能性ペプチドによる siRNA 皮内送達システムが siRNA を用いたアトピー性皮膚炎治療に対して有効であることが示唆された。



(3) ハイドロゲル製剤の調製と評価

はじめに、皮膚塗布型 siRNA 製剤の開発を目的とし、絹蛋白質の構成成分であるセリシンを基剤とした siRNA 含有ハイドロゲル製剤を調製し、その治療効果についてアトピー性皮膚炎症状を発症させたマウス耳を用いて検討した結果、siRNA 溶液に比べ皮膚炎による耳の肥厚、臨床スコアを有意に抑制した。次に機能性ペプチド/siRelA 含有ハイドロゲル製剤を調製した。はじめに、マウス背部皮膚塗布後の siRNA 皮内送達性について検討した結果、機能性ペプチド/siRNA 溶液群と同等の皮内送達性を示した。さらに、機能性ペプチド/siRelA 含有ハイドロゲル製剤をモデルマウスに適用した結果、機能性ペプチド/siRNA 溶液群に比べ、機能性ペプチドとハイドロゲルを併用することで優れた治療効果を発揮した。また、安全性の検討として、基剤のみで調製したハイドロゲルをマウス皮膚に適用した際の適用部位を観察した結果、皮膚の肥厚や外観変化は観察されなかった。以上より、機能性ペプチドと共に siRNA を含有させたハイドロゲル製剤の調製に成功し、さらにこれら製剤が安全性と治療効果に優れてい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 3 件)

- ① T. Uchida, T. Kanazawa, M. Kawai, Y. Takashima, H. Okada. Therapeutic effects on atopic dermatitis by anti-RelA short interfering RNA combined with functional peptides Tat and AT1002. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 査読有 338 巻, 2011, 443-50
- ② T. Uchida, T. Kanazawa, Y. Takashima, H. Okada. Development of an efficient transdermal delivery system of small interfering RNA using functional peptides, Tat and AT-1002, *Chem. Pharm. Bull.* 査読有 59 巻, 2011, 196-201
- ③ K. Tanaka, T. Kanazawa, T. Ogawa, Y. Takashima, T. Fukuda, H. Okada. Disulfide crosslinked stearyl carrier peptides containing arginine and histidine enhance siRNA uptake and gene silencing. *Int. J. Pharm.* 査読有 398 巻, 2010, 219-224

[学会発表] (計 13 件)

- ① 遠藤隆博、金沢貴憲、武内麻由、志澤由紀、玉野くに子、有馬尚紀、高島由季、岡田弘晃、瀬田康生. ステアリン酸修飾機能性ペプチドによる抗 NF κ B siRNA の皮内送達性およびアトピー性皮膚炎治療効果. 第 133 年会 日本薬学会 2013. 3. 横浜

- ②金沢貴憲、武内麻由、志澤由紀、高島由季、岡田弘晃、瀬田康生. 異なる表面電荷を持たせた siRNA/ペプチドキャリア複合体の皮膚投与後の siRNA 皮内送達性. 第 28 回日本 DDS 学会 2012. 7. 札幌
- ③金沢貴憲、西田渉、志澤由紀、武内麻由、高島由季、山田昌樹、瀬田康生、岡田弘晃. アトピー性皮膚炎治療に向けた抗 NF- κ B siRNA 含有セリシingle 剤の開発. 東京医科大学・東京薬科大学 免疫・アレルギー研究会 2012. 5. 東京
- ④志澤由紀、金沢貴憲、武内麻由、玉野くに子、西田渉、高島由季、山田昌樹、岡田弘晃. 皮膚塗布型 siRNA 含有セリシingle 剤の開発とアトピー性皮膚炎治療効果. 第 21 回アンチセンスシンポジウム 第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム合同シンポジウム. 2011. 9. 大阪
- ⑤金沢貴憲、西田渉、志澤由紀、武内麻由、高島由季、山田昌樹、岡田弘晃. 皮膚に塗布する抗 NF- κ B siRNA 含有セリシingle 剤の開発とアトピー性皮膚炎治療効果. 第 3 回日本 RNAi 研究会. 2011. 8. 広島
- ⑥金沢貴憲、田中晃、高島由季. 核酸薬/細胞質感受性ペプチドベクターナノ粒子による疾患治療. 第 1 回医薬工 3 大学包括連携推進シンポジウム 2011. 7. 東京
- ⑦金沢貴憲、西田渉、志澤由紀、武内麻由、高島由季、山田昌樹、岡田弘晃. アトピー性皮膚炎治療に向けた経皮投与型抗 NF- κ B siRNA 含有セリシingle 剤の開発. 日本薬剤学会第 26 年会. 2011. 5. 東京
- ⑧ H. Okada, T. Kanazawa, Y. Yokoi, T. Uchida, K. Tanaka. DDS technologies for drug discovery using a new biomaterial of siRNA. 2010 International Conference of the Korean Society of Pharmaceutical Sciences and Technology. 2010. 12. 済州、韓国
- ⑨ Y. Takashima, T. Uchida, M. Kawai, K. Tanaka, T. Kanazawa, H. Okada. Transdermal siRNA delivery using liquid crystal with functional peptides, AT1002 and Tat analog FIP PSWC 2010 in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition 2010. 11. ニューオーリンズ、米国
- ⑩志澤由紀、河合美紗子、内田珠愛、金沢貴憲、高島由季、岡田弘晃. Tat および AT1002 併用による液晶剤の siRNA 皮膚透過性の向上. 第 54 回 日本薬学会関東支部会 2010. 10. 東京
- ⑪田中晃、金沢貴憲、内田珠愛、河合美紗子、高島由季、岡田弘晃. Tat および AT1002 併用液晶剤による siRNA 皮膚透過性の促進. 遺伝子・デリバリー研究会第 10 回シンポジウム 2010. 6. 札幌
- ⑫T. Kanazawa, T. Uchida, Y. Takashima, H.

Okada. Non-invasive intradermal siRNA delivery system using functional peptides, Tat and AT1002 analogs, for treating atopic dermatitis. 37th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. 2010. 7. ポートランド、米国

⑬田中晃、金沢貴憲、内田珠愛、河合美紗子、高島由季、岡田弘晃. 抗 NF- κ B siRNA/タイトジャンクション開口ペプチド/細胞透過性ペプチドによるアトピー性皮膚炎治療日本薬剤学会第 25 年会 2010. 5. 徳島

〔図書〕(計 2 件)

- ①岡田弘晃、小河崇也、田中晃、金沢貴憲、機能性ペプチドを用いた細胞質応答性 siRNA キャリア、「先端バイオマテリアルハンドブック」、秋吉一成、石原一彦、山岡哲二監修、株式会社エヌ・ティー・エス、2012. 6.
- ②岡田弘晃、小河崇也、田中晃、金沢貴憲、細胞質感受性核酸 DDS、「ドラッグデリバリーシステムの展開 II —核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術—」、永井恒司、岡田弘晃監修、シーエムシー出版、2012. 3.

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/seizaisek/kei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢 貴憲 (KANAZAWA TAKANORI)
 東京薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：60434015

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし