

令和元年6月7日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18848

研究課題名(和文)花粉症治療を目的とした、デコイ核酸医薬の表面修飾ナノ粒子含有経鼻投与製剤の設計

研究課題名(英文) Design of nasal formulation containing nanoparticles of decoy nucleic acid for the treatment of allergic rhinitis

研究代表者

尾関 法子(小川法子)(Ozeki, Noriko)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：80409359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：花粉症は、一度発症すると、長く付き合っていかなければならない疾患であるため、副作用のない患者に優しい治療薬、また、患者の生活の質低下を緩和できる製剤が求められている。近年、花粉症発症年齢の低下が報告されていることから、副作用のない患者に優しい治療薬が求められている。核酸医薬は、炎症に関連した遺伝子群を効率よく制御することが可能であり、副作用が既存の薬物と比べて少ない。そこで本研究では、花粉症治療を目的とした核酸医薬の鼻局所投与製剤を作製しその効果を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、核酸医薬を含有するナノ粒子の作製に成功し、その物性を確認することができた。また、培養細胞を用いることにより、作製したナノ粒子がin vitroにて抗炎症作用を示すことを確認できた。さらに、鼻アレルギーモデル動物の作製に成功し、血管透過性亢進と組織染色による評価を行った。今後、作製した鼻アレルギーモデル動物を用いた評価を重ね、核酸医薬を含有する生分解性ナノ粒子の鼻アレルギー治療への有効性を明らかにすることで、現在の治療法よりも副作用の少ない花粉症治療薬の提言が期待される。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with allergic rhinitis have been increasing. The formulation which have few side effects and improve patient's quality of life is required, because allergic rhinitis is a chronic disease. Nucleic acid drug can efficiently control genes related to inflammation, and have few side effects compared to the pharmaceuticals currently used. Therefore, in this study we have prepared and evaluated the nucleic acid drug formulation for nasal topical administration.

研究分野：製剤学

キーワード：花粉症治療 核酸医薬 ナノ粒子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症患者はこの10年で10%増加し、2008年の全国調査では全国民の26.5%が罹患していると報告されている。また、20~44歳の男性35.1%、女性39.3%に鼻炎症状があり、6~18歳の小児の33.8%にアレルギー性鼻炎の症状があることも報告されており、まさに“国民病”ともいえる(2010、2012年全国調査)。また、花粉症による年間の経済的損失は、鼻閉等による集中力低下や仕事を休むことによる労働損失に限っても600億円に上るといわれており、花粉症患者の生活の質(クオリティ・オブ・ライフ: QOL)を高めることは経済学的観点からも重要である。

花粉症は、くしゃみ・鼻水・鼻づまり(鼻閉)を主症状とするアレルギー性疾患であり、発症時の炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、症状緩和が期待される。点鼻投与による治療、また鼻粘膜への手術療法等があるが、中でも、アレルギー性鼻炎の疾患部位に、より効率的に薬物を送達できることから、局所投与製剤が多用されている。鼻への局所投与製剤は、経口投与製剤や注射剤と比較して、全身性の副作用が少なく安全性が高いことが利点であり、鼻閉を主症状とする患者に、点鼻用血管収縮薬や鼻噴霧用ステロイド薬がよく処方される。鼻噴霧用ステロイド薬は投与患部局所のみで作用するため、副作用が軽減されているが、点鼻用血管収縮薬は、多用することにより血管が拡張し続け、鼻閉が悪化することが知られている。アレルギー性鼻炎は、一度発症すると長く付き合っていかなければならない疾患であるため、副作用のない、患者に優しい治療薬、また、QOL低下を緩和できる製剤が求められている。

核酸医薬は、低分子医薬や抗体医薬と異なり、塩基配列や構造が既知の核酸やタンパク質を標的とするため、作用機序が明確であり副作用も少ない。炎症・疾患時に過剰活性化される転写調節因子 nuclear factor-kappa B(NFκB)は、アトピー性皮膚炎、眼科疾患、呼吸器疾患、局所的疾患など免疫疾患治療および炎症治療の標的分子として注目されている。1997年に森下らにより NFκB 自体を標的としてデコイ核酸医薬 NFκB デコイ核酸 (NDON)が開発された。NDON は、過剰活性化された NFκB のゲノム DNA への結合を競合阻害することにより NFκB 転写活性を正常レベルに戻して炎症を抑制する。つまり NDON は、炎症に関連した遺伝子群を効率よく制御することが可能であるといえる。しかしながら、NDON は、酸や熱、ヌクレアーゼによって分解を受け、速やかに代謝・排泄される。また、単独では細胞内への導入効率も低いことから、より効果的な治療には DDS が必要であると考えた。

我々は、これまでに生体内分解性・生体適合性高分子であるポリ乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)を基剤としたサブミクロンサイズの薬物送達用ナノ粒子の開発に成功し、新規なドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発に取り組んできた。PLGA ナノ粒子の特徴は、封入した薬物の放出をコントロールすることにより、長期間にわたり薬効を持続化できること、また、含有薬物を標的組織まで、酵素分解などから保護した状態で送達できるため、薬物のバイオアベイラビリティを向上させられることにある。さらに PLGA ナノ粒子の表面を種々の物質で修飾することにより、生体付着性などの新たな機能を付与させることができる。これまでに、カチオン性多糖であるキトサンで表面修飾したナノ粒子が、静電的な相互作用により粘膜への侵入性・付着性が著しく向上することを明らかとしている。上記技術を用いて、NDON の課題(安定性、導入量)に対して、これまでに、NDON 含有 PLGA ナノ粒子の開発に成功し、潰瘍性大腸炎のモデル動物への抗炎症評価において、NDON 単独と比較して有意な有用性を明らかにしている。

### 2. 研究の目的

本研究では、主薬として、炎症に関連した遺伝子群をコントロールする転写因子 NF-κB に結合する配列を有する NDON を用い、花粉症治療を目的とした経鼻投与製剤の設計を行うこととした。NF-κB は、DNA のプロモーター領域にある特異的な部位と結合することで、遺伝子群の発現が促進あるいは抑制され、炎症性サイトカインが産生・放出される。NDON は、多くの炎症性遺伝子発現を誘導する転写調節因子 NF-κB が認識して結合する塩基配列を含む二本鎖オリゴ核酸で、細胞内に取り込まれると“おとり”として NF-κB を結合して遺伝子転写調節領域への結合を阻害する。しかしながら、NDON は、酸や熱、ヌクレアーゼによって分解を受け、速やかに代謝・排泄される。また、細胞内導入も低いことから、単独で投与しても、治療効果を得ることは困難であることが報告されている。上述したように、これまでに我々は、潰瘍性大腸炎の治療や経肺投与を目的として NF-κB デコイ核酸の PLGA ナノ粒子製剤を設計し、その有用性について報告している。そこで本研究では、NDON 含有 PLGA ナノ粒子を用いることとした。

鼻の粘膜や鼻腔は主に体内に異物が侵入しないように防御機能が働いている。鼻腔は気道の最先端に位置して、吸気に含まれるさまざまな異物・刺激物から下気道を保護する air filter としての役割をしている。吸気中の大きい異物はまず鼻毛で捕捉され、鼻腔内に入った小さい異物・刺激物は鼻粘膜を刺激してくしゃみを誘発し、さらに反射的に鼻汁分泌を起こして、異物・刺激物を吹き飛ばし、洗い流す。また鼻粘膜に存在する繊毛が繊毛運動することによって、異物の侵入を阻害している。しかし、花粉症治療のような鼻粘膜局所に薬物を作用させる場合には、作用部位に一定時間、一定量の薬物を滞留させることが必要である。したがって、経鼻投与製剤の設計においては、鼻の防御機能により体外に排泄されにくい製剤設計が必須である。

上記背景のもと、本研究では、アレルギー性鼻炎の治療を目的として、NDON を病巣患部で

ある鼻粘膜表面の広範囲に送達でき、かつ付着による滞留性と細胞への浸入性を付与することにより有効な細胞導入量を獲得できる、新規 DDS 製剤の設計を行うこととした。

### 3. 研究の方法

ナノ粒子を調製し、その粒子径等の物性評価を行った。また、NDON 含有ナノ粒子が炎症性サイトカイン放出に及ぼす効果について、培養細胞を用いて評価した。さらにアレルギー性鼻炎モデル動物を作成し、NDON 含有ナノ粒子を分散させた鼻局所投与製剤について治療効果を検討し、花粉症に対する NDON 含有ナノ粒子製剤の有用性を評価した。

#### 1) ナノ粒子の調製

ナノ粒子は、水中エマルジョン溶媒拡散法にて調製を行った。PLGA を有機溶媒に溶解し、水系溶媒に分散させることで出られたナノ粒子懸濁液を凍結乾燥することにより、ナノ粒子を得た。なお、ナノ粒子は使用するまで冷凍保存し、使用時に解凍して使用した。

#### 2) ナノ粒子の物性評価

ナノ粒子を水系溶媒にて懸濁させ、その粒子径、ゼータ電位、多分散性指数 (PDI) の測定を行った。冷凍保存ナノ粒子を常温に戻し、一定量秤り取り、水系溶媒に分散させた。Zetasizer ZS90 (MALVERN) を用いて、粒子径、ゼータ電位、及び多分散性指数 (PDI) を測定した。

#### 3) マクロファージ様細胞を用いたナノ粒子の *in vitro* 炎症抑制評価

ナノ粒子化による NDON の細胞内への導入について、マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞からの炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6) 産生量を測定することで評価した。また、播種した細胞について BCA protein assay を行い、産生された IL1 $\beta$ 、IL-6 量を細胞量あたりに換算した。

#### 4) 鼻アレルギーモデル動物の作成と感作の評価

9 週齢の Brown Norway ラットに対して、卵白アルブミン (OVA) と水酸化アルミニウムゲル (ALUM) により感作を行った。OVA を生理食塩液に氷冷しながら溶解させ、ALUM を加えて OVA 溶液を調製した。調製した OVA 溶液をラットの腹腔内に投与した。さらに投与 1 週間後、再び OVA 溶液を腹腔内に投与した。感作の確認は、OVA 溶液の投与前と投与 2 週間後に尾静脈より採血し、血清中の IgE に対する ELISA により行った。

#### 5) 鼻アレルギーモデル動物を用いた鼻腔還流法による血管透過性抑制評価

作成した鼻アレルギーラットに、ナノ粒子を鼻腔より投与し、血管透過性抑制評価を行った。血管透過性の評価方法として用いた鼻腔灌流法では、ラットの血管内に色素を投与し、赤血球の染色を行うことで、血管からの血液の漏出量の測定を可能としている。鼻腔還流法は以下の手順で行った。ラットに麻酔を行い、気管を外科的処置により露出させ、ポリエチレンチューブを挿入し、呼吸を確保した。さらに食道からポリエチレンチューブを後鼻腔へ挿入し、他端を Infusion pump につないだ。口腔は外科用接着剤を浸した脱脂綿でふさぎ、灌流液の漏出を防いだ。30 分後、尾静脈から Brilliant Blue FCF を投与した。Infusion pump から生理食塩液もしくは OVA 溶液を鼻腔に灌流させた。灌流させた溶液は試験管に採取し、遠心分離後に上清を吸光度測定することにより、Brilliant Blue FCF を定量した。

#### 6) 抗炎症効果の評価を目的とした組織染色

作成した鼻アレルギーラットに、ナノ粒子を鼻腔より投与した後、鼻組織をホルマリン固定し、次いで脱灰を行った。脱灰後、水道水で流水による洗浄を行った。その後、組織ブロックを、自動固定包埋装置を用いてパラフィン包埋し、その後、マイクロームで切断し組織切片を作製した。作製した組織切片について、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色、AB/PAS 染色、メイグリユンワルド・ギムザ染色を行い、顕微鏡観察を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) ナノ粒子の調製と物性評価

NDON を封入したナノ粒子の調製に成功した。調製したナノ粒子の平均粒子径は 200 nm 程度となり、平均 PDI も、低値であったことから、粒子は凝集していないと考えられた。また、平均ゼータ電位の結果より、正電荷を帯びていることを確認した。

#### 2) マクロファージ様細胞を用いたナノ粒子の *in vitro* 炎症抑制評価

Control (溶媒) と比較して、IL-1、IL-6 とともにナノ粒子投与により抗炎症効果が認められた。

#### 3) 鼻アレルギーモデル動物の作成と感作の評価

作製したアレルギーモデル動物のうち、十分な IgE 濃度の上昇が確認できた個体に対して、鼻腔灌流法での評価ならびに組織染色法に用いた。

#### 4) 鼻アレルギーモデル動物を用いた鼻腔還流法による血管透過性抑制評価

IgE 濃度上昇を確認したアレルギーモデル動物を用いた鼻腔灌流法による血管透過性の抑制効果の評価の結果、薬剤未投与群に関しては、OVA 溶液の灌流により Brilliant Blue 濃度が上昇したことから OVA による炎症の惹起が行われていることが確認できた。一方、NDON 含有ナノ粒子投与群では、未投与群と比較して血管透過性が低い傾向を示した。今後、動物数を増やし実験を重ねていく必要がある。

#### 5) 抗炎症効果の評価を目的とした組織染色

パラフィン包埋試料の作製に成功し、顕微鏡画像より鼻粘膜の染色が確認された。しかし、試料によっては、切片の一部が剥がれてしまうものがあり、組織切片を作製する過程のマイクロームによる切片の切り出しに課題がある。今後、組織切片の作製ならびに染色技術の向上を図り、評価を行う必要がある。

本研究の特色は、粘膜付着性を有する DDS 用の生分解性ナノ粒子に核酸医薬を含有させ、花粉症治療に応用することである。核酸医薬は、有効な治療効果を示すためには、酸や酵素による分解を回避し、また細胞内導入量を改善する必要があるが、病態に関連した遺伝子群を効率よく制御できることから、副作用が少なく有用である。近年、花粉症患者は増加し、小児での発症も多く報告されていることから、より副作用の少ない治療法が求められている。生分解性ナノ粒子は、含有薬物を標的組織まで酵素分解などから保護した状態で送達できる特色を有し、さらに表面特性を制御することが可能である。

本研究の結果、核酸医薬を含有する生分解性ナノ粒子の作製に成功し、その物性を確認することができた。また、培養細胞を用いることにより、作製したナノ粒子が *in vitro* にて抗炎症作用を示すことを確認できた。さらに、鼻アレルギーモデル動物の作製に成功し、血管透過性亢進と組織染色による評価を行った。今後、作製した鼻アレルギーモデル動物を用いた評価を重ねることにより、核酸医薬を含有する生分解性ナノ粒子の鼻アレルギー治療への有効性を明らかにすることで、現在の治療法よりも副作用の少ない花粉症治療薬の提言が期待される。本研究の成果は幅広い年齢層の国民の健康に大きく貢献・寄与すると期待される。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。