

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14960

研究課題名(和文) 経皮送達性に優れたリポソームの探索と創製

研究課題名(英文) Development of liposomes with excellent dermal delivery

研究代表者

茨木 ひさ子 (Ibaraki, Hisako)

東京薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：50736444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の遂行により、リポソームの表面電荷や表面水和層、構成脂質や組成が経皮送達性に与える影響をマウス皮膚ならびにヒト皮膚培養モデルを用いて網羅的に検討し、経皮デリバリーに優れたリポソームの特性を明らかにした。さらに、経皮送達性の向上が確認された特性を全て兼ね備えたりポソーム(負電荷・DOPE含有・PEG修飾リポソーム)を新たに作製し、in vivo皮内送達性を評価したところ、皮内深部有棘層への高い局在を実証した。本成果は、患者に身体的・精神的苦痛のない低侵襲的で自己投与可能な難治性皮膚治療システム構築への手がかりを提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だ知見の少ない経皮送達性に寄与するリポソームの特性を明らかとし、ナノキャリアを用いた経皮デリバリーの可能性を明らかとした。本研究で得られた成果は、皮内深部への薬物移行が必要な難治性皮膚疾患に対する非侵襲的薬物治療システム開発における重要な知見となり得ることから学術的にも意義深い。さらに、本知見は経皮ワクチン開発や化粧品分野等様々な用途においても応用展開可能であり、皮膚科学分野全般へ貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effects of the surface charge, surface hydration layer, constituent lipids and composition of liposomes on dermal delivery were comprehensively investigated using mouse skin and human skin culture models. As a result, liposomal characteristics that improve dermal delivery was be clarified. In addition, a novel liposome (negative charge, DOPE-containing, PEG-modified liposome) having all the liposome characteristics confirmed to be improved in dermal delivery was prepared, and in vivo dermal delivery was evaluated. It demonstrated high localization to the deep intradermal stratum spinosum. This results provide a clue to the construction of a minimally invasive, self-administerable intractable skin treatment system that does not cause physical or mental distress to patients.

研究分野：薬物送達学、医療系薬学

キーワード：経皮投与 経皮デリバリー リポソーム 脂質ナノ粒子 核酸医薬 難治性皮膚疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、アトピー性皮膚炎をはじめとする根本的治療法の無い皮膚疾患に対する新規治療薬として、原因タンパクを特異的に分解できる siRNA 等の核酸医薬が注目を集めている。しかしながら、親水性高分子である siRNA は、経皮投与による単独投与では効果が望めない。さらに皮膚疾患の多くは免疫担当細胞の存在する皮内深部に到達されることが必須であり、安全で効率的な経皮送達システムの構築が必要不可欠である。研究代表者は、アルギニン含有ナノ粒子を核酸キャリアとして用いることで皮内深部への高い送達性を示すことを報告し、経皮投与におけるナノキャリアの必要性を確認した (Ibaraki H 他, *Molecules* 21(10), 1279 (2016))。現在までに、薬物皮内送達性を促進させる技術としてマイクロニードルや界面活性剤含有ナノ粒子を利用する報告があったが、本研究では、キャリア自身とそれに付与した特性を最大限活かすという患者に優しい経皮薬物送達システム開発を目指して、経皮吸収促進剤としても利用され、生体適合性に優れたリン脂質からなるナノキャリア、リポソームに着眼した。リポソームは、脂質組成の制御により様々な性質を付与できるという特筆すべき利点を有する。また研究代表者は、リポソームを利用した核酸経皮送達システム開発へ向けた基礎検討として、リポソーム自体の特性 (電荷・構造) が経皮送達性に影響を与える、という現象は導き出していたものの、皮内深部への効率的な薬物送達に必要なリポソームの特性については未だ解明できておらず、国内外の報告も少なかった。そこで本研究は、リポソームの表面電位、表面水和層、構成脂質の種類や処方が経皮送達性に与える影響について詳細に検証し、経皮投与による送達性に優れたリポソーム特性の探索と創製を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、難治性皮膚疾患治療に向けて、免疫担当細胞が豊富に存在する皮膚深部まで、安全かつ効率的に薬物送達可能な経皮デリバリーシステムの構築を目指して、リポソームを用いて経皮送達性に優れたナノキャリアの特性を明らかにし、さらに新規皮内浸透性リポソームの開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 表面電荷の異なるリポソームの調製と経皮送達性評価

表面電荷が経皮送達性に与える影響について検討した。正電荷脂質 (DOTAP: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) 中性電荷脂質 (DOPC: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 負電荷脂質 (DOPS: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine) およびコレステロール誘導体を組み合わせ、表面電位 (mV) が +60、+40、+20、±0、-20、-40、-60 の計 7 種のリポソーム調製のための脂質処方条件を設計した。調製は薄膜法にて行い、脂質薄膜を 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) で水和後、プローブ型超音波処理により空リポソームを調製し、試料溶液とした。各リポソームの粒子径とゼータ電位は、Zetasizer nano (Malvern P analytical, Malvern, UK) を用いて測定した。次に、6 週令 ICR マウスの腹部を除毛後テープストリッピング法で角質層を除去した皮膚またはヒト 3 次元培養皮膚モデル (LabCyte EPI-MODEL 6D, J-TEC) に、ATTO647 標識 DOPE 脂質を 0.1 mol% 含有させた各リポソーム (総脂質量 1 μmol/匹) を塗布した。5 時間後に皮膚組織を摘出し PBS で洗浄後、凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000D IX81; Olympus) を用いてリポソームの皮内局在を観察した。さらに、FV1000D IX81 解析ソフトウェアを用いて、画像の蛍光強度を輝度として半定量解析することで経皮送達性を評価した。また、各リポソームの皮膚刺激性は、ヒト 3 次元培養皮膚モデル (LabCyte EPI-MODEL 6D) を用いた MTT アッセイにより生細胞率を算出することで評価した。

#### (2) ポリエチレングリコール (PEG) の分子量と修飾率が異なるリポソームの調製と経皮送達性評価

PEG 分子量: 550、2000、5000 の DSPE-PEG (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)]) を用いて、修飾率 5、10、20 mol% の DOPC/Cholesterol リポソームを薄膜法により調製し、その物性および経皮送達性を (1) と同様の方法で評価した。

#### (3) Cholesterol、DOPE 含有率の異なるリポソームの調製と経皮送達性評価

DOPC 脂質をベースとして、Cholesterol 含有率 0、10、20、30、40、50 mol% のリポソームを薄膜法により調製した。同じく、DOPC 脂質と Cholesterol をベースとして、DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) の含有率 0、10、20、30、40、50 mol% のリポソームを薄膜法により調製した。物性および経皮送達性評価は (1) と同様の方法で評価した。

#### (4) *In vivo* 皮内浸透性に優れたリポソームの創製

(1) ~ (3) の結果から得られた経皮送達性に優れたリポソーム特性を全て兼ね備えたりポソームを新たに作製し、その経皮送達性について評価した。物性および経皮送達性評価は (1)

と同様の方法で評価した。

#### 4. 研究成果

リポソームをはじめとするナノキャリアと薬物を併用し経皮投与することで、皮内への送達性が向上することが報告されているものの、「どのような特性を持つリポソームが皮内深部への送達性に優れるか」という課題について網羅的に検討した報告は少ない。そこで、リポソームの表面電位、表面水和層、構成脂質の種類や処方に焦点を当てて、表面電荷、ポリエチレングリコール (PEG) の分子量と修飾率、Cholesterol、DOPE の含有率の異なるリポソームを各々調製し、*in vivo* 経皮送達性を比較検討し、皮内送達性に優れるリポソーム特性の探索と創製を行った。

##### (1) 表面電荷の異なるリポソームの調製と経皮送達性

先行研究により、*in vivo* 経皮送達性には、ナノキャリアの表面電荷が寄与していることを突き止めたものの、どの程度の電荷が必要なのかは不明な点が多かった。そこで表面電荷が +60、+40、+20、±0、-20、-40、-60 mV の 7 種類のリポソームを調製し、その経皮送達性について比較検討した。正電荷脂質、中性電荷脂質、負電荷脂質を組み合わせ、目的とする表面電荷を有するリポソームを調製するための脂質処方条件を確立した。粒子径は全て約 50 nm を示した。次に、蛍光標識脂質を含有させた表面電荷の異なる 7 種類のリポソームをマウス皮膚に経皮投与し、5 時間後の皮膚切片を共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、表面電荷の絶対値が低い +20、±0、-20 mV のリポソームでは、皮内送達性は低く、表面にのみ局在した。一方で、表面電荷の絶対値が高い +60、+40、-40、-60 mV リポソームでは、皮内広範囲へ分布が観察された。加えて、ヒト表皮細胞から分化させた 3 次元培養表皮モデルを用いて検討したところ、同様の結果を得た。以上のことから、正電荷、負電荷に関わらず、絶対値 40 mV 以上の表面電荷をリポソームに付与することにより、皮内広範囲への効率的な経皮送達が可能であることを新たに明らかとした。また、ヒト 3 次元培養表皮モデルを用いて MTT アッセイを行い、各リポソームの皮膚刺激性を評価したところ、+60 mV リポソームで皮膚刺激性が示されたことから、-40 mV 以上の負電荷リポソームが有用かつ安全な経皮キャリアであることが示唆された。

##### (2) ポリエチレングリコール (PEG) の分子量と修飾率が異なるリポソームの調製と経皮送達性評価

リポソーム表面に水和層を形成させる PEG の分子量と修飾率による影響を明らかにするため、分子量の異なる DSPE-PEG 修飾率 5、10、20 mol% のリポソームによる経皮送達性を比較検討した。テープストリップ皮膚において、PEG 未修飾リポソームでは皮内局在は観察されなかったのに対し、PEG 修飾リポソームではいずれも皮内広範囲に蛍光が確認された。分子量による影響については PEG 分子量 550 > 2000 > 5000、修飾率については 5 > 10 > 20 mol% の順で経皮送達性は向上し、特に、分子量 550 かつ修飾率 5 mol% のリポソームにおいて皮内広範囲への蛍光分布が観察され、顕著な経皮送達性を示した。

##### (3) Cholesterol、DOPE 含有率の異なるリポソームの調製と経皮送達性評価

不飽和脂質ベースのリポソームにおいて、Cholesterol の添加は、膜の流動性や透過性低下させ、膜安定化に寄与する。不飽和脂質 DOPC ベースのリポソームにおける Cholesterol 含有率が経皮送達性に与える影響について評価した。物性は、粒子径はコレステロールの含有率が高いほど増大し、表面電荷はいずれも約 -10 mV 付近となった。経皮送達性評価の結果、Cholesterol 含有率 40 mol% のリポソームにおいて皮内広範囲への高い送達性が認められた。

次に、DOPE 含有率の違いが経皮送達性に与える影響について評価した。先行研究にて、DOPE ベースのリポソームが柔軟性を有し、DOPE 未含有リポソームと比較して高い経皮送達能を有することを確認しているものの、DOPE 含有率の差異による詳細な検討は行っていないことから、DOPE 含有率 0 ~ 50 mol% の DOPC ベースのリポソームを調製し、その経皮送達性評価した。物性評価の結果、いずれのリポソームも粒子径約 60 nm、ゼータ電位は約 -15 mV となった。経皮送達性評価の結果、DOPE 含有率 30 ~ 40 mol% において、皮内深部への広範囲への送達性が確認された。

##### (4) *In vivo* 皮内浸透性に優れるリポソームの創製

(1) ~ (3) の結果から、負電荷、PEG 修飾、Cholesterol 含有率 40 mol%、DOPE 含有率 30 mol% の各々のリポソームが安全で効率的な経皮送達性を有することを確認したことから、これらの条件を兼ね備えたリポソームを新たに作製し、その *in vivo* 経皮送達性について評価した。DOPS を用いて負電荷とした DOPC/Cholesterol リポソーム (Cholesterol 含有率 40 mol%) をベースとして、DOPE (30 mol%)・PEG 修飾、DOPE、PEG 修飾、DOPE・PEG いずれも未含有 (DOPS ベースの DOPC/Cholesterol リポソーム)、コントロールとした DOPC/Cholesterol リポソーム、により比較検討した。~ の物性は、いずれも粒子径 40 ~ 50 nm、表面電荷 -30 ~ -40 mV となった。経皮送達性評価の結果、DOPE・PEG 修飾リポソームにおいて皮内深部への高い送達性が確認され、免疫担当細胞が存在する皮内深部に棘層にお

ける局在を確認した。またリポソームの経皮送達性は、 $\text{DOPE} > \text{DOPE} + \text{PEG} > \text{DOPE} + \text{Chol} > \text{DOPE} + \text{Chol} + \text{PEG}$  の順となった。このことから、負電荷・DOPE含有・PEG修飾は相乗的にリポソームの皮内浸透性を向上させることが示唆され、負電荷・DOPE含有・PEG修飾リポソームは有用な経皮送達キャリアとして期待される。

以上のことから、リポソームの表面電荷、PEGの分子量・修飾率ならびにCholesterolやDOPE含有率が経皮送達性に影響を与えることを実証し、その最適化により経皮送達性が向上することを明らかとした。本研究より見出した知見や、負電荷・DOPE含有・PEG修飾リポソームによる経皮送達システムは、皮内深部への移行が肝要な難治性皮膚疾患治療や経皮ワクチン製剤開発等に大きく貢献できるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ibaraki Hisako, Kanazawa Takanori, Kurano Takumi, Oogi Chihiro, Takashima Yuuki, Seta Yasuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Anti-ReIA siRNA-Encapsulated Flexible Liposome with Tight Junction-Opening Peptide as a Non-invasive Topical Therapeutic for Atopic Dermatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1216 ~ 1225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-00259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hisako Ibaraki, Takanori Kanazawa, Chihiro Oogi, Yuuki Takashima, Yasuo Seta	4. 巻 50
2. 論文標題 Effects of surface charge and flexibility of liposomes on dermal drug delivery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Drug Delivery Science and Technology	6. 最初と最後の頁 155 ~ 162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jddst.2019.01.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 茨木ひさ子
2. 発表標題 細胞間隙ルートを標的とした組織内浸透型siRNA DDSの開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 廣地慶江、茨木ひさ子、金沢貴憲、高島由季、瀬田康生
2. 発表標題 物理的特性の異なるリポソームによる in vivo皮内デリバリー
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 古賀雅良、茨木ひさ子、黒澤菜菜美、金沢貴憲、高島由季、瀬田康生
2. 発表標題 抗原封入柔軟性リポソームの最適化とその皮内抗原デリバリー
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 大芦和紀、茨木ひさ子、廣地 慶江、金沢貴憲、高島由季、瀬田康生
2. 発表標題 リポソームの皮内浸透性に及ぼすPEG脂質とCholesterol組成の影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 押田佳奈恵、茨木ひさ子、黒澤菜菜美、金沢貴憲、高島由季、瀬田康生
2. 発表標題 フレキシブルリポソームと機能性ペプチド併用による抗原タンパクの細胞内取込および皮内浸透性の向上
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 茨木ひさ子、金沢貴憲、高島由季、瀬田康生
2. 発表標題 局所・全身投与によるsiRNA治療に貢献する組織内浸透型DDSの開発
3. 学会等名 第28回DDSカンファランス
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Koga M, Ibaraki H, Kanazawa T, Oogi C, Takashima Y, Seta Y
2. 発表標題 Evaluation of liposomal surface charge for effective siRNA dermal delivery
3. 学会等名 The 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 廣地慶江, 茨木ひさ子, 金沢貴憲, 高島由季, 瀬田康生
2. 発表標題 リポソームの表面電荷とPEG修飾が皮内デリバリーに及ぼす影響
3. 学会等名 第25回創剤フォーラム若手研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 大木知紘, 茨木ひさ子, 金沢貴憲, 高島由季, 瀬田康生
2. 発表標題 リポソームの皮内送達性における表面電荷の影響
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 廣地慶江, 茨木ひさ子, 金沢貴憲, 大木知紘, 高島由季, 瀬田康生
2. 発表標題 異なる表面電荷を有するリポソームによる経皮送達性評価
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 皮内デリバリーに及ぼすリポソームの表面電荷の影響
2. 発表標題 茨木ひさ子、金沢貴憲、大木知紘、高島由季、瀬田康生
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2018年～2019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