

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07030

研究課題名(和文) 経皮免疫治療のための高分子キャリアを用いたナノDDS製剤の開発

研究課題名(英文) DDS using polymer nanoparticles for transcutaneous immunization

研究代表者

牧野 公子 (Makino, Kimiko)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：40147509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳清タンパク質である α -ラクトグロブリン含有ナノ粒子の開発と、げっ歯類皮膚を用いた皮膚透過試験を行い、抗原タンパク質をナノ粒子化しイオントフォレシス(IP)を用いて投与することの有用性を見出した。鶏卵白リゾチーム(HEL)含有ナノ粒子の調製およびそのアレルギー免疫療法への応用可能性に関する研究を行い、ナノ粒子化とIPの併用によりHELが毛嚢に効率的に送達され抗原提示細胞に取り込まれ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

高分子を用いた抗原タンパク質含有ナノ粒子は、IPと併用することで、抗原タンパク質を効率的に皮内に送達可能であることが示された。皮膚を介した治療物質の投与は、投与が簡便であり投与量が調節し易いという特徴がある。本研究の成果は、効率的で副作用が少ないアレルギー免疫療法の確立に寄与するものである。また、分子量が比較的大きな抗原タンパク質がナノ粒子化可能であることが示されたことから、低分子化合物以外への高分子ナノ粒子の利用を促進するものである。

研究成果の概要(英文)：We prepared α -lactoglobulin-loaded nanoparticles and performed skin permeation tests using rodent skin. It was shown that administration of the antigenic protein using nanoparticles and iontophoresis (IP) is effective. We prepared hen egg-white lysozyme (HEL)-containing nanoparticles and investigated their applicability to allergen immunotherapy. It was suggested that HEL is efficiently delivered to the hair follicles and taken up by antigen-presenting cells by the combined use of nanoparticulation and IP.

研究分野：薬品物理化学、ドラッグデリバリーシステム

キーワード：経皮投与 DDS アレルギー免疫療法 ナノ粒子 イオントフォレシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 食物アレルギーに対する治療法として、わが国では経口免疫治療が一般的であるが、低酸素脳症などの副作用の問題が生じている。

(2) 過去の研究において、平均粒子径 100 nm および 50 nm の乳酸 グリコール酸共重合体(PLGA) ナノ粒子が開発された。薬物の皮膚吸収促進法のひとつであるイオントフォレシス(IP)を用いた皮膚透過試験の結果、本ナノ粒子は皮膚角層と毛嚢に分布することが確認された。

(3) 皮膚の免疫系で主要な働きをするのは表皮ランゲルハンス細胞(LC)や真皮樹状細胞(DC)であり、皮膚から侵入した抗原はLCやDCにより取り込まれ、リンパ節でT細胞に抗原提示を行い、免疫反応が誘導される。ワクチン接種では、毛嚢内およびその周辺に存在するDCは、濾胞間表皮のDCよりも局所的に適用されるワクチンにアクセスしやすい可能性がある。

これらのことから、経皮投与後に角層および毛嚢に分布するという特徴を有する PLGA ナノ粒子は、皮膚を介したアレルギー免疫療法における抗原タンパク質の送達において有用である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、安全で効率的な経皮免疫治療法の開発を目指し、抗原タンパク質のナノ粒子化による経皮吸収促進効果について明らかにすることである。そのために、以下の研究目標を掲げた。

(1) 経皮免疫療法の実現には、抗原タンパク質の効率的な皮内送達が不可欠である。そこで、抗原タンパク質を蛍光標識した上で *ex vivo* 皮膚吸収試験を実施することにより、ナノ粒子化が抗原タンパク質の皮内分布に与える影響を明らかにする。

(2) 皮内に送達されたナノ粒子は、抗原提示細胞に取り込まれることが望ましい。ナノ粒子化が、抗原提示細胞への抗原タンパク質の取り込みに与える影響について確認する。

(3) ナノ粒子化が *in vivo* 条件における抗体産生量の変化に与える影響について調査することで、経皮免疫療法における有用性を評価する。

3. 研究の方法

(1) Hen egg-white lysozyme (HEL) をモデル抗原として用い、貧溶媒拡散法を使用することで、平均粒子径が約 100 nm の HEL 含有 PLGA ナノ粒子を調製した。なお、PLGA ナノ粒子表面は、Chitosan hydroxypropyltrimonium chloride (CS) で被覆した。皮膚透過経路観察のために、蛍光色素を含有させたナノ粒子も調製した。ナノ粒子の粒度分布およびゼータ電位は、ゼータ電位・粒子径測定システム (ELSZ-2, Otsuka Electronics Co., Ltd., Hirakata, Japan) を用いて測定した。ナノ粒子中の薬物および蛍光色素の含有量は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定し、粒子外観は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。

(2) HEL の皮膚吸収試験は、Fluorescein isothiocyanate (FITC) を用いて蛍光標識した HEL (FITC-HEL) および Franz 型拡散セルを使用して、マウスから摘出した皮膚を用いて実施した。比較のため、ナノ粒子化していない FITC-HEL 溶液に関しても同様に試験を行った。試験後、その皮膚切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、皮内における HEL の分布を確認するとともに、皮内 HEL 濃度の測定も行った。

(3) 抗原提示細胞への取込み試験は、マウス骨髄細胞から分化させた DC を用いて行った。FITC-HEL 溶液または FITC-HEL 含有 PLGA ナノ粒子懸濁液を添加した後、BD FACSCalibur™ (FACS, Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) を使用して平均蛍光強度を測定した。コントロールとして、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を使用した。

(4) 経皮免疫療法に対する有用性を評価するため、マウスを用いて HEL 特異的 IgG1 および IgG2a の力価を測定した。25 ng の HEL が、2 週間間隔で 5 回投与された。また、血清総 IgE 抗体価の測定も行った。測定は酸素結合免疫吸着測定法 (ELISA) で実施した。

4. 研究成果

(1) 平均粒子径 98.4 ± 36.8 nm の HEL 含有 PLGA ナノ粒子の調製に成功した。粒子表面を CS で被覆したことで、表面電荷密度は正の値となった。SEM を用いた粒子外観観察により、調製したナノ粒子は球形で分散していることが示された。同様に、FITC-HEL 含有 PLGA ナノ粒子を調製した。物性測定の結果から、FITC による HEL の標識化が、ナノ粒子の物性値に大きな影響を与えないことを確認した。

(2) マウス皮膚を用いた皮膚吸収試験後の皮膚における HEL 濃度を図 1a に示す。IP 無しでは、ナノ粒子化は皮内 HEL 濃度に影響を与えなかったが、IP を併用することで、有意に皮内 HEL 濃度増大することが明らかとなった。さらに、IP を適用した場合において、FITC-HEL 含有 PLGA ナノ粒子投与群の皮膚 HEL 濃度は、FITC-HEL 溶液投与群の HEL 濃度の 2.1 倍となった。皮膚吸収試験後の皮膚切片を観察すると、IP 無しでは、ほとんど皮内に FITC-HEL が蓄積しなかったが、ナノ粒子化と IP を併用することで、角層および毛嚢深部に FITC-HEL が分布することが明らかとなった。これらの結果には、ナノ粒子化による抗原タンパク質の表面電荷密度の改善が寄与していると考えられる。

(3) FACS 測定結果を分析すると、FITC-HEL 含有 PLGA ナノ粒子の平均蛍光強度は、FITC-HEL 溶液の平均蛍光強度の 5.6 倍であることが示された。正に帯電したナノ粒子は細胞膜に対する親和性が向上することから、CS によるナノ粒子の被覆は、経皮免疫療法において有用であることが示唆された。

(4) マウス血清中の HEL 特異的 IgG1 および IgG2a の力価の測定結果から、ナノ粒子化と IP の併用群では、それぞれ HEL 溶液を皮下注射した場合と比較して、同等および有意に高い値を示すことが明らかとなった (図 2)。また、血清総 IgE 抗体価の結果から、抗原タンパク質のナノ粒子化と IP の併用により、抗体産生が抑制傾向にあることが明らかとなった。

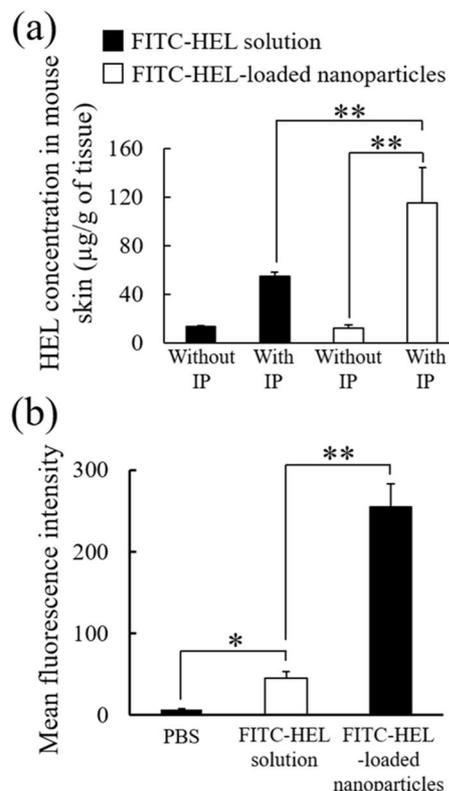


図 1. (a) マウス皮内における HEL 濃度 (b) FACS による平均蛍光強度 (mean \pm S.D., n = 4, * p < 0.05, ** p < 0.01, Tukey's test)

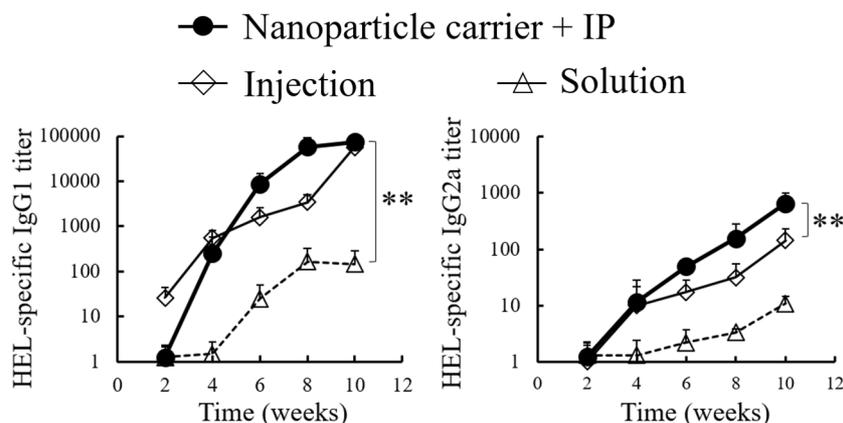


図 2. HEL の投与方法による抗 HEL IgG1 および抗 HEL IgG2a 抗体価の経時的変化 (mean \pm S.D., n = 6, ** p < 0.01, Tukey's test)

以上のことから、PLGA を用いた抗原タンパク質のナノ粒子化は、IP と併用することで、抗原タンパク質を効率的に皮内に送達し、抗原提示細胞に取り込ませることが可能であることが示された。本研究成果は、PLGA ナノ粒子の経皮免疫療法における有用性を示すだけでなく、抗原タンパク質のような比較的分子量が大きな物質を含有可能であることを示唆するものである。

< 引用文献 >

I. Takeuchi, et al., *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **608** (2021) 125607

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeuchi Issei, Suzuki Takaaki, Makino Kimiko	4. 巻 608
2. 論文標題 Iontophoretic transdermal delivery using chitosan-coated PLGA nanoparticles for transcutaneous immunization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 125607 ~ 125607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.colsurfa.2020.125607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内一成、日高優那、鈴木孝明、押坂勇志、武井千弥、森健二、杉林堅次、牧野公子
2. 発表標題 食物アレルギーにおける経皮免疫療法のためのキトサン修飾 PLGA ナノ粒子
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田 華苗、日高 優那、竹内 一成、斎藤 顕宜、牧野 公子
2. 発表標題 食物アレルギー経皮免疫療法のためのキトサン修飾PLGANANO粒子
3. 学会等名 東京理科大学薬学部DDSシンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日高 優那、竹内 一成、牧野 公子
2. 発表標題 キトサン修飾PLGANANO粒子の食物アレルギー経皮免疫治療法への応用
3. 学会等名 東京理科大学DDSシンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日高優那、竹内一成、牧野公子
2. 発表標題 食物アレルギー経皮免疫治療を目指したPLGAナノ粒子製剤の開発
3. 学会等名 第5回東京理科大学総合研究院再生医療とDDSの融合研究部門シンポジウム、第17回東京理科大学薬学部DDS研究センターシンポジウム
4. 発表年 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
研究 分 担 者	竹内 一成	城西国際大学・薬学部医療薬学科・准教授	
	(Takeuchi Issei) (10734931)	 (32519)	

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