

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07204

研究課題名(和文)核酸の非侵襲的経皮送達を可能とする非ラメラ液晶含有スプレー製剤の開発

研究課題名(英文)Development of spray formulation that enable non-invasive transdermal delivery of nucleic acid with non-lamellar liquid crystal.

研究代表者

藤堂 浩明 (Todo, Hiroaki)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：10383184

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)：非ラメラ液晶形成脂質は、皮膚バリア機能を担う角層間脂質構造に可逆的に作用し、難皮膚透過物質の透過性を著しく改善することができることから、次世代の透過促進剤として注目されている。また、中分子・高分子医薬品の開発は目覚ましく、非侵襲的にこれらを吸収させる試みが多くなされている。本心算研究では、アトピー性皮膚炎の治療薬として注目されている炎症性サイトカインの転写因子であるNF- κ Bを標的としたデコイオリゴヌクレオチドを含有した非ラメラ液晶形成脂質を含有した外用エアゾール剤を調製した。その結果、調製した外用エアゾール剤は、治療効果が期待できる量の核酸薬を経皮送達できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非侵襲的に核酸を送達できる手法の開発は、生活の質の改善に大きく貢献できることから、強く望まれている。本手法は、これまで困難であった中分子量の薬物を送達できることから、学術的にも社会的にも大きな意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Non-lamellar liquid crystal-forming lipids are attracting attention as next-generation skin permeation enhancers because they act on the intercellular lipid structure that responsible for the skin barrier function. Currently, the development of medium- and high-molecular drugs is remarkable, and many attempts have been conducted to absorb them by parenteral means. In this application study, an aerosol formation with non-lamellar liquid crystal forming lipid containing decoy oligonucleotide NF- κ B, which has an attracting attention as a treatment for atopic dermatitis, was prepared. As a result, it was suggested that the prepared topical aerosol formulation can transdermally deliver an amount of nucleic acid drug that can be expected to be therapeutically effective.

研究分野：薬剤学、薬物送達学

キーワード：経皮送達 核酸 脂質 非ラメラ液晶

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中分子・高分子医薬品の開発は目覚ましく、非侵襲的にこれらを吸収させる試みが多くなされている。これらバイオ医薬品は、従来の医薬品が狙えない細胞内の標的をターゲットにすることができ、また、標的選択性・結合能が高いため副作用が少ないと考えられることから、今後の利用が期待されている。特に核酸医薬は、低分子医薬と同じく化学合成により調製が可能であるメリットも有している。

核酸医薬品などの中分子や抗体医薬の経皮デリバリーに関する研究は非常に盛んに研究されており、最も容易にアクセスできる医薬品の投与経路として、今後も検討が進むと考えられる。しかしながら、皮膚の最外層に位置する角層は、非常に高いバリア能を有していることから、分子量 500 以上の物質の透過は著しく低いことが知られている。分子量 1000 以上の中分子・高分子医薬品の皮膚透過性を改善するための手法として、マイクロニードル (MN) やイオントフォレーシス (IP) など、角層に物理的に小孔を形成させることで、薬物透過性を高める方法が用いられている。これらの手法は、貼付剤のように一回の使用で適用できる面積が限られており、全身作用を期待する中分子・高分子医薬品の適用方法として優れていると考えられる。実際に、MN を用いたワクチンやペプチドデリバリーに関しては、臨床試験が進んでいる。一方、アトピー性皮膚炎や乾癬治療や乾癬など皮膚局所作用を期待するバイオ医薬品の適用方法としては、広範囲に薬物を適用することが容易な軟膏やスプレー剤のような剤形が望ましい。

軟膏やスプレー剤には、糖エステル (ショ糖ラウリン酸エステル) やアルコールエステル (ミリスチン酸イソプロピル) などが皮膚バリアを突破する化学促進剤として利用されてきた。しかしながら、これらの吸収促進剤は、分子量 500 以下の低分子医薬品の皮膚透過性改善には有用であるものの、分子量 1000 以上の物質の皮膚透過性を改善するには十分ではない。そのため、中分子・高分子の経皮デリバリーに関する研究では、リポソーム、カーボンナノチューブや脂質ナノ粒子やこれら薬物キャリアと細胞透過性ペプチド、ペプチドエンハンサーや吸収促進剤の併用が有用とされている。しかしながらこれらの報告は、角層除去皮膚や著しく角層バリア能が著しく低下した皮膚での検討が多く、さらに、24 時間以上製剤を無限量系 (実用量の 100 倍以上の用量) で適用し、実使用条件下とはかけ離れた試験条件である。

2. 研究の目的

次世代のドラッグデリバリーシステム (DDS) キャリアとして、非ラメラ液晶 (NLLC) が注目されている。NLLC は、親水基を外側に配したラメラ液晶よりも、複雑な内部構造を有しており、薬物の極性に関わらず高い薬物内封率を示すだけでなく、高い生体膜融合能や高分子医薬品の高次構造安定化能を有していることが報告されている。グリセロールモノオレイン酸エステル (GMO) やグリセロールファルネシル酢酸エステル (MGE) などの一部のポリオールエステルが NLLC を自己形成することが知られており、我々は、GMO とは異なり、室温で低粘性液体である新規 NLLC 形成脂質である MGE を用い、低分子薬物をキュービック液晶や逆ヘキサゴナル液晶に封入した検討を行っている。NLLC ゲルを健常な摘出ヒト皮膚適用した場合は、十数倍の透過促進効果が得られているが、分子量 1000 以上の核酸医薬品の効率的に到達させるためには十分とは言えない。よって、核酸医薬品の経皮透過性を高めるために、角層バリアを突破するアプローチが必要となる。すでに、核酸医薬品である NF- κ B デコイオリゴを含有した軟膏製剤を用い、アトピー性皮膚炎患者を対象とした臨床試験が実施されているが、低分子の既存薬と比較して有効性に有意差が得られていない。この理由は明らかとなっていないものの、ヒト皮膚では十分な皮膚透過性が得られなかったことが原因の一つであると考えられる。

我々の研究グループは、MGE は生体内でも NLLC を自己形成可能であることを見出した。NLLC を皮膚適用した場合、NLLC は主に角層表面にのみ作用することで皮膚透過促進作用を示す。ここで、MGE が体内の水分と作用し NLLC を構築できる特性を利用し、NLLC を角層内で形成できれば、核酸医薬品の角層バリア突破が可能であると考えた。MGE の皮内浸透が課題となるが、MGE を高揮発性溶媒とともに皮膚に噴霧することで、短時間で MGE を角層に浸透させることが可能である。また、MGE とリン脂質を任意の割合で混合することで、高分子医薬品の放出性が制御できることも見出している。これらの技術を組み合わせることで、角層バリア能が異なる場合でも一定速度で透過する角層を核酸医薬品の貯留部位とする皮膚適用製剤が可能となる。そこで、本研究では、本応募研究では、中分子および高分子医薬品のモデルとして分子量の異なる FITC-dextran (M.W. 4,000~40,000) および NF κ B デコイオリゴを用い、非侵襲的に効率的な中分子および高分子医薬品の経皮デリバリーを可能とする MGE 含有スプレー剤の開発を目的とする。

3. 研究の方法

3.1. 適用製剤の調製

FD-10 または FITC labeled NF- κ B decoy ODN を精製水で調製し、薬物濃度を FD-10:2.5 mg/g、FITC labeled NF- κ B decoy ODN : 58.5 μ g/g とした。これを薬物水溶液 (sol.) とした。また、精製水で調製した FD-10 または FITC labeled NF- κ B decoy ODN 水溶液に Plu を加えた。Plu 含有

薬物水溶液と MGE が重量比 1:1 となるよう、秤量皿に入れ、スパーテルのヘラ部分を使用し、2 分間混合することでゲル製剤 (gel) を調製した。なお、gel 中薬物濃度は sol 中濃度と同様に FD-10 : 2.5 mg/g、FITC labeled NF- κ B decoy ODN : 58.5 μ g/g とした。精製水で調製した FD-10 水溶液または FITC labeled NF- κ B decoy ODN 水溶液を、EtOH 中へ溶解させた MGE および非イオン性界面活性剤の Plu と混合し、これを LPG と共にエアゾール規格容器 (株式会社ダイソー、神奈川、日本) へ充填し、外用エアゾール剤 (aerosol) を調製した。なお、外用エアゾール剤中の LPG や EtOH は皮膚適用後揮発すると仮定し、揮発後の薬物濃度が FD-10 : 2.5 mg/g、FITC labeled NF- κ B decoy ODN : 58.5 μ g/g となるように調製した。

3.2. 偏光顕微鏡観察

種々製剤をスライドガラス (S9215、松浪硝子工業株式会社、岸和田、大阪、日本) に 10 μ L 滴下したのち、カバーガラス (松浪硝子工業株式会社、岸和田、大阪、日本) を被せ、軽く圧着させ厚みを均一にした。偏光顕微鏡 (VHX-5000、株式会社キーエンス、大阪、日本) を用いて製剤の液晶構造の有無を評価した。

3.3. NLLC 構造の同定

小角 X 線散乱装置 (SAXS) (Nano-Viewer、リガク株式会社、東京、日本) を用いて調製した NLLC 製剤の X 線散乱測定を行った。

3.4. *In vitro* 皮膚透過試験

摘出したヘアレスマウス腹部皮膚を縦型拡散セル (セル容量 : 6 mL、有効透過面積 : 1.77 cm^2) に装着した後、直ちにレシーバー溶液として pH7.4 リン酸緩衝液 (PB) を真皮側へ 6 mL、角層側に 1 mL 適用し、1 時間水和した。このとき、皮膚の電気抵抗値測定を行い、5 ($\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) より高い皮膚を用いた。なお、AD モデルマウスを用いた場合には、5 ($\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) より低い皮膚を用いた。皮膚透過試験は 8 時間実施し、得られたサンプル溶液は適宜 PB で希釈し、分光蛍光光度計 (FP-8300、日本分光株式会社、東京、日本) にて測定した。

3.5. 共焦点レーザー顕微鏡観察

皮膚凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW、FV3000、株式会社オリンパス、日本) にて観察した。

3.6. 薬物の定量法

i) FD-10 の定量法

In vitro 皮膚透過試験で得られたサンプル溶液中の FD-10 濃度は、適宜 PB で希釈し分光蛍光光度計を用いて測定した。測定条件は励起波長 495 nm、蛍光波長 520 nm とした。

ii) FITC labeled NF- κ B decoy ODN の定量法

In vitro 皮膚透過試験で得られたサンプル溶液中の FITC labeled NF- κ B decoy ODN 濃度は、適宜 PB で希釈し分光蛍光光度計を用いて測定した。測定条件は励起波長 492 nm、蛍光波長 518 nm とした。

4. 研究成果

4.1. 調製製剤の NLLC 構造形成能評価

調製したエアゾール剤をシャーレに噴霧後、偏光顕微鏡観察を行った。観察結果より、噴霧から約 6 分後には偏光画像を確認することができたため、NLLC 構造を形成している可能性が示唆された。

つぎに、偏光画像が確認できたため、ゲル製剤およびエアゾール製剤の SAXS 測定を行った。NLLC の各構造は固有の面間隔比を有するため、SAXS 測定の結果から構造の同定が可能である。SAXS 測定の結果から、いずれの製剤も面間隔比の一致が確認できたため、 $Pn3m$ 構造を形成していることがわかった。

4.2. 薬物の皮膚浸透評価

調製製剤からの FD-10 のヘアレスマウス皮膚透過を調べた。水溶液と比較して、エアゾール剤化により約 40 倍の透過促進効果が得られたものの、ゲル製剤適用による透過促進効果は認められなかった。FITC labeled NF- κ B decoy ODN のヘアレスマウス皮膚透過試験の結果を調べた結果、ゲル製剤では、水溶液製剤と比較して透過促進効果は認められなかったものの、エアゾール剤化により約 6 倍の透過促進効果が得られた。これらの結果より、揮発性剤に溶解している MGE が噴霧により角層に浸透することが中分子薬物の透過促進に寄与している可能性が考えられた。

皮膚透過試験においてエアゾール剤による透過促進効果が得られたため、皮膚浸透性の確認を行った。FD-10 を用いた健常皮膚での試験では、エアゾール剤を適用した皮膚において角層除去後 (str) も皮膚内に FD-4 由来の緑色蛍光が確認できた。一方、透過促進効果がみられなかった

ゲル製剤、水溶液を適用した皮膚では str の状態でははっきりとした緑色蛍光は認められなかった。つぎに、FITC labeled NF- κ B decoy ODN を用いた健常皮膚での試験では僅かではあるものの、FD-10 と同様にエアゾール剤を適用した皮膚の str において蛍光が確認できた。

4.3. 薬物の AD モデル皮膚浸透評価

4.2.にてヘアレスマウス健常皮膚での薬物透過促進が確認できたため、次に AD モデルマウス皮膚を用いた透過試験を行った。Figure 1 に調製製剤からの FITC labeled NF- κ B decoy ODN の AD モデルマウス皮膚透過を調べた結果を示す。抽出した AD モデルマウス皮膚を介した FITC labeled NF- κ B decoy ODN の皮膚透過は、ゲル製剤では、水溶液製剤と比較して高い透過促進効果は認められなかったものの、エアゾール剤化により約 14 倍の透過促進効果が得られた。

4.4. AD モデルマウスへの NF- κ B decoy ODN 含有外用エアゾール剤投与試験

AD モデルマウスにエアゾール剤を噴霧し、その治療効果を確認した。Figure 2 に AD モデルマウス後頸部の写真を示す。(b)AD 誘導 21 日後の皮膚の状態は乾燥がみられ発赤が確認できた。(c)エアゾール剤を 4 回噴霧試験したのちの皮膚は、赤みが落ち着いている様子が確認できた。AD モデルマウス後頸部の TEWL と血清中 IgE 濃度を測定した結果、TEWL は、AD 誘導後の最も高い値から、外用エアゾール剤を繰り返し噴霧することにより減少がみられた。また、血清中 IgE 濃度においてもわずかではあるものの、噴霧回数を増やすことにより数値の減少がみられた。このことから、外用エアゾール剤により NF- κ B decoy ODN の皮内送達による治療効果が期待できることが示唆された。

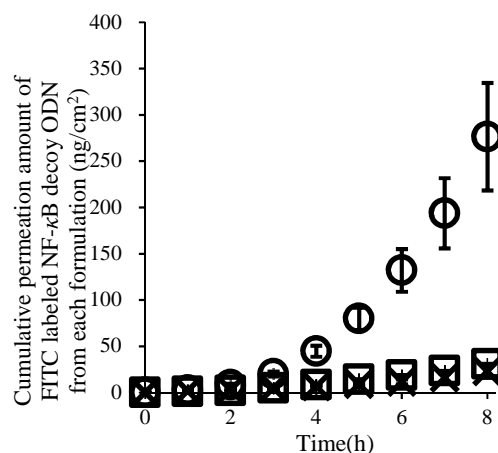


Figure 1. Skin permeation profiles of FITC labeled NF- κ B decoy ODN through AD model mouse skin after application of formulations. Symbols: aerosol (○), FITC labeled NF- κ B decoy ODN sol (×), FITC labeled NF- κ B decoy ODN gel (□). Each point shows the means \pm S.D. (n=3-4).

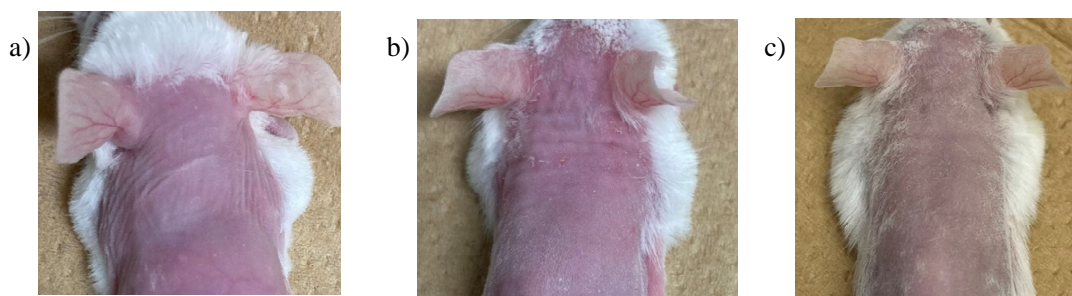


Figure 2. Observation of the mouse skin surface condition.

(a) Non-treated skin (normal skin), (b) 21 days after sensitization with DNCB and (c) four aerosol treatments on sensitized skin. Spray application twice times a week.

5. まとめ

高分子薬物を含有した外用エアゾール剤の調製に成功し、MGE 含有外用エアゾール剤による皮膚透過・浸透性促進効果を確認した。健常皮膚および AD モデルマウスのいずれを用いた倍でも中分子薬物の透過促進能を改善することができ、また、AD マウスを用いた試験では治療効果を確認することができた。このことから、治療効果を期待できる量の NF- κ B decoy ODN が皮内に送達できたことが示唆された。

以上の結果より、本手法は、中分子薬物を皮内に非侵襲的に送達させる方法として有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------