

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：23701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22713

研究課題名(和文) Naked pDNA粉末眼球直接塗布による自己投与可能な遺伝子治療剤の開発

研究課題名(英文) Development of ophthalmic gene therapy by direct application of naked pDNA powder to the palatal conjunctiva.

研究代表者

伊藤 貴章 (Ito, Takaaki)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20878160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、遺伝子治療薬の plasmid DNA (pDNA) を粉末製剤化することで、遺伝子導入剤を添加することなく遺伝子治療を達成することを発見した。本研究では、眼科領域への展開を目指し、非侵襲的な眼局所投与型製剤の有用性実証を目的とした。その結果、in vitroにおいて naked pDNA 製剤の遺伝子発現を実証した。遺伝子発現効率は調製方法と賦形剤組成に依存しており、マンニトールを賦形剤に用いた噴霧急速凍結乾燥粉末剤において優れた遺伝子発現を達成した。また、ポリビニルアルコールを賦形剤に用いた電界紡糸法ファイバーにおいて優れた眼内薬物移行を示す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

緑内障や網膜疾患は、現状では治療が難しいアンメットメディカルニーズの高い疾患である。既存の治療法として、外科的治療や眼科用医薬があるが、いずれも病気の悪化を防ぐことが目的である。遺伝子治療薬は治療法として開発が望まれているが、遺伝子治療薬は一般的に自己治療が困難な注射剤であるため、通院による負担を伴う。本研究で得られた知見は、遺伝子治療薬を眼瞼に投与することで、低侵襲かつ自己投与で難治性眼部疾患を治療可能な画期的な製剤となる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：The applicant discovered that plasmid DNA (pDNA) without a vector (naked pDNA) exhibits high gene expression by administration as a powder formulation. This assignment attempted to develop the ocular-topically applied naked pDNA formulation as a noninvasive and self-administered drug. As a result, we confirmed that the naked pDNA powder exhibited gene expression in the human corneal epithelial cell. The gene expression depended on preparation methods and excipients, the naked pDNA powder containing mannitol prepared by spray-freeze-drying exhibited the superior gene expression. Moreover, the electrospun fiber formed by polyvinyl alcohol suggested excellent retinal drug delivery.

研究分野：製剤学、薬物送達学

キーワード：眼部治療 遺伝子治療 ドラッグデリバリー 噴霧急速凍結乾燥法 電界紡糸法 凍結乾燥法 naked pDNA

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

緑内障や網膜疾患は、現状では治癒することが難しいアンメットメディカルニーズの高い疾患であり、症状の進行が比較的遅く自覚症状に乏しいことが、視覚障害の発症リスクを引き上げている。既存の治療法として、外科的治療、点眼剤や眼内注射を含む眼科用医薬があるが、いずれも病気の悪化を防ぐことが目的であるため、疾患を治癒できる治療薬として遺伝子治療薬の開発が望まれている。一方で遺伝子治療薬は製剤学的課題が残っており、眼科領域で実用化には至っていない。例えば、遺伝子治療薬は自己治療が困難な注射剤が一般的で通院による負担、ウイルスベクターやリポソームなど導入剤による眼部障害性の懸念などである。申請者は、in vivo において導入剤を含まないnaked pDNAを粉末剤として投与することで、組織局所的に高い遺伝子発現を示す現象を報告した。Naked pDNA製剤は導入剤由来の細胞障害性や変性を回避することができるほか、細胞外では核酸分解酵素によって分解されるため、標的組織以外への副作用発現の可能性が低いなど、数多くの製剤学的メリットを有している。一方で、naked pDNA粉末剤はこれまでの遺伝子治療薬開発と異なる製剤コンセプトであり、眼科領域におけるnaked pDNA粉末剤の遺伝子発現効果、組織障害性、遺伝子導入メカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は眼科領域における遺伝子治療薬の製剤基盤構築を最終目標に、naked pDNA粉末剤を眼組織へ直接塗布する自己投与可能な遺伝子治療製剤の開発を試みた。製剤化プロセスおよび賦形剤の違いが、眼組織遺伝子導入効率へ及ぼす影響を解析し、naked pDNA粉末剤調製の最重要ファクターとpDNA導入メカニズムを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 眼科用粉末剤の調製

モデル遺伝子として、ホタルルシフェラーゼ (Luc) をコードした pDNA を用いた。また、薬物の細胞内導入メカニズムを解明するため、蛍光標識した水溶性高分子であるフルオレセインイソチオシアナート-デキストラン (FD20) を用いた。賦形剤として、マンニトール (Man)、ヒアルロン酸 (HA) およびポリビニルアルコール (PVA) を用いた。試料の粉末化方法には、凍結乾燥 (FD) 法、噴霧急速凍結乾燥 (SFD) 法および電界紡糸 (ES) 法を採用した。

(2) Naked pDNA 粉末剤の物理化学的性質評価

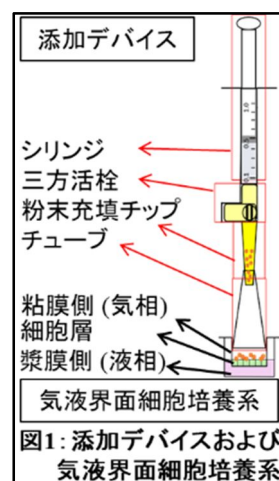
走査型電子顕微鏡を用いて各種粉末剤の形態を観察した。粉末製剤化後の pDNA 完全性を、アガロースゲル電気泳動により確認した。

(3) 気液界面細胞培養系を用いた in vitro 評価

不死化ヒト角膜上皮細胞 (HCE-T) を用いて、細胞表面が空気と接触した状態の気液界面細胞培養系を作製し、角膜表面を再現した。FD 法または SFD 法で調製した naked pDNA 粉末剤は、試料を充填したデバイス (図 1) を細胞上部にセットし、シリンジで圧縮した空気を開放して粉末を分散添加した。ES 法 naked pDNA ファイバーは、気液界面細胞層に直接付着させた。

細胞障害性の指標として、各種 naked pDNA 製剤添加 52 時間後の総タンパク量および経上皮膜抵抗値の変化を算出した。BCA タンパク質アッセイは、細胞を回収して凍結融解することでサンプル液を得た。経上皮膜抵抗値は、粉末分散添加前後における変化率を算出した。遺伝子発現効果の評価するため、Luc の基質であるルシフェリンを添加し、ルミノメーターを用いて発光を定量した。

気液界面細胞層における薬物動態を評価するため、FD20 を含む各種粉末剤を気液界面細胞培養系に添加した。粉末剤添加後 6 時間までの経時的な FD20 細胞層透過挙動、添加後 6 時間時点で細胞層内に取込まれた薬物量と細胞層上部に残存した細胞層不透過量を定量比較した。



(4) マウス眼瞼投与による in vivo 評価

(3)において最適化した naked pDNA 粉末を麻酔下のマウス前眼部へ投与し、眼組織の Luc 由来の発光を検出することで naked pDNA 製剤の眼科用医薬としての応用価値を検証した。また、薬物の眼組織動態と細胞内動態を観察するため、FD20 をマウス前眼部へ投与した。FD 法または SFD 法で調製した粉末剤は、粉末をマウス眼球へ自由落下することにより投与した。ES 法 naked pDNA ファイバーは、マウス結膜嚢へファイバーを直接付着させた。各種粉末剤投与後、任意の

時間においてマウス眼瞼および眼球を摘出しサンプルとした。遺伝子発現効果の評価するため、各組織をホモジナイズし組織を凍結融解した後、Lucの基質であるルシフェリンを添加し、発光を検出した。さらに、FD20粉末製剤による薬物の眼組織動態を観察するため、製剤添加後、眼瞼・角膜・網膜の組織切片を作成し、蛍光顕微鏡を用いてFD20由来の蛍光を検出した。

4. 研究成果

(1) 眼科用固形製剤の調製および粉末剤の物理化学的性質評価

種々の調製法を用いてnaked pDNA製剤を調製した。収率はFD法およびES法は95%以上、SFD法は約60%だった。SFD法は試料溶液を液体窒素へ噴霧する過程で試料液滴が損失した。走査型電子顕微鏡を用いて各種製剤を観察した結果、調製法および賦形剤に依存して粒子形状が変化することが分かった(図2)。SFD法で調製した粉末製剤は、中空多孔な直径約10 μ mの球形粒子が観察された。ES法で調製したファイバー製剤は、直線性に優れた不規則な繊維構造を形成した。アガロースゲル電気泳動の結果、pDNAの完全性はFD法が最も高かった。SFD法では一部の分解が確認されたものの、pDNAは粉末製剤化後も安定に存在することが確認できた。液体窒素への滴下による凍結乾燥では、pDNAの完全性に影響を及ぼさなかったことから、SFD法におけるpDNAの部分的な分解は、噴霧によるせん断力に起因していると考えられている。

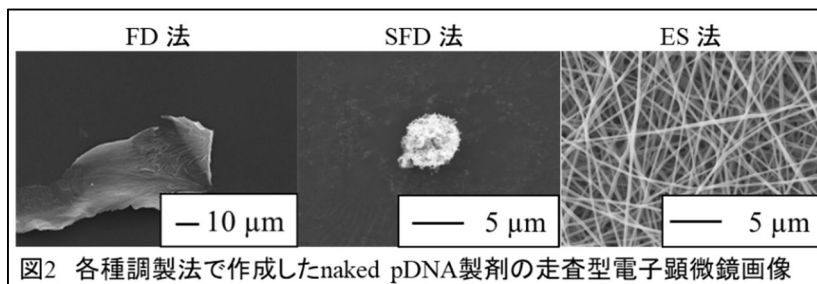


図2 各種調製法で作成したnaked pDNA製剤の走査型電子顕微鏡画像

(2) 角膜気液界面細胞培養系を用いた in vitro 細胞障害性評価および遺伝子発現評価

HCE-T細胞を用いて作成した気液界面細胞培養系に各種naked pDNA製剤を添加し、気液界面細胞培養系の総タンパク質量をBCAタンパク質アッセイで定量し、製剤添加による細胞障害性を評価した。その結果、製剤を添加した後も未添加群と同等のタンパク量が検出された。さらに、各種naked pDNA製剤添加前後の経上皮膜抵抗値を測定した結果でも、製剤添加による抵抗値の変化は認められなかった。以上より、粉末剤添加による細胞層へのダメージは少ないと考えられ、naked pDNA製剤の優れた安全性を実証した(図3)。また、SFD法で調製したnaked pDNA粉末剤を用いて、粉末曝露時間による細胞障害性への影響を評価した結果、曝露時間の違いによる細胞障害性は確認されず、優れた安全性を示した。

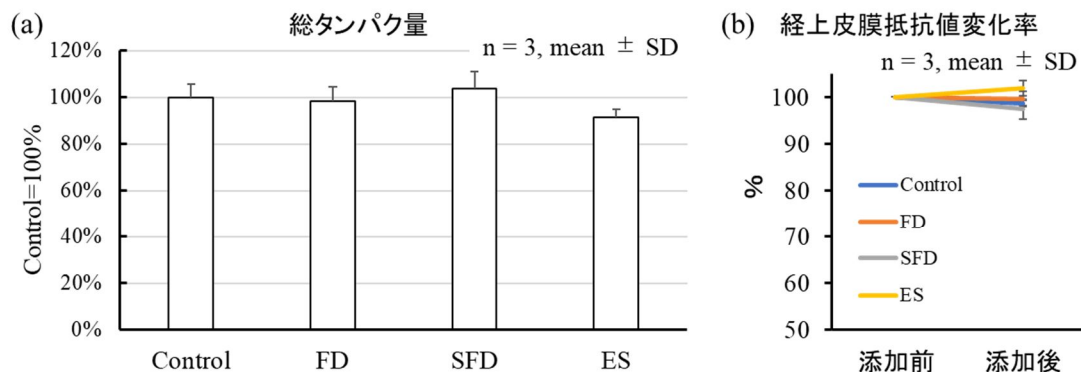
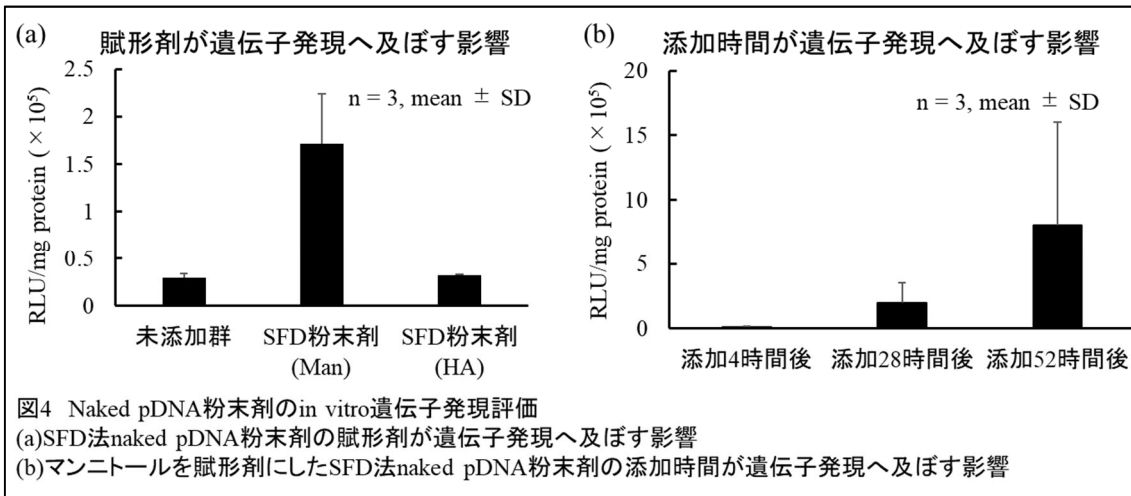


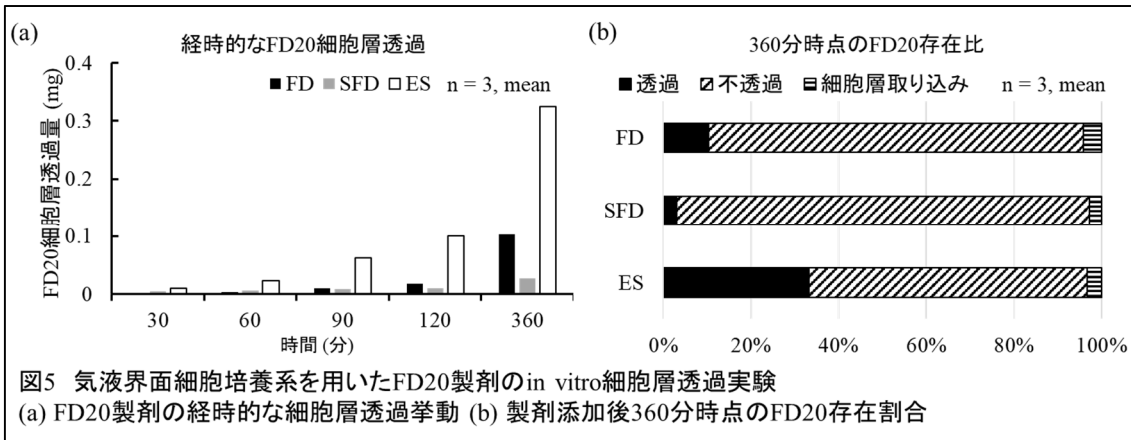
図3 各種調製法で作成したnaked pDNA粉末剤の細胞障害性評価

(a) BCAタンパク質アッセイによる総タンパク質量定量 (b) 粉末剤添加前後の経上皮膜抵抗値変化率

HCE-T細胞を用いて作成した気液界面細胞培養系にnaked pDNA製剤を添加し、Luc由来の発光検出を試みた結果、naked pDNA製剤が眼細胞において遺伝子発現を達成することを明らかにした(図4)。Naked pDNA製剤の遺伝子発現は製剤化プロセスおよび製剤の賦形剤に依存しており、賦形剤にManを用いSFD法で調製したnaked pDNA粉末剤が最も高い遺伝子発現を達成した。これまでも、賦形剤がnaked pDNA製剤の遺伝子発現に影響を及ぼさず結果が確認されており、エンドサイトーシスなどエネルギー依存的な細胞層取り込み経路の存在を予想している。また、SFD法で調製したnaked pDNA粉末剤を用いて、粉末曝露時間による遺伝子発現への影響を評価した結果、曝露時間依存的に遺伝子発現が高くなる傾向を示した。要因として、in vitro実験ではpDNAが排泄されることなく系内に滞留するためと考察している。



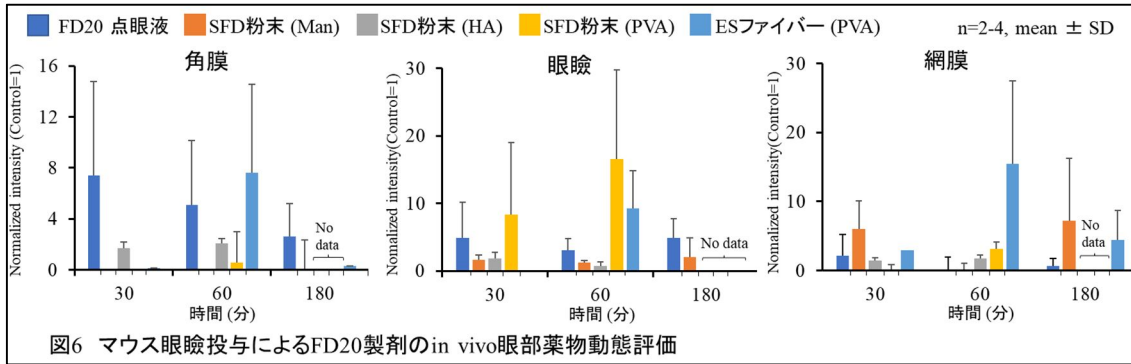
FD20 を含む各種粉末剤を気液界面細胞層に添加し薬物動態を評価した結果、FD20 は経時的に細胞層を透過した。細胞層透過量は粉末剤の製剤化プロセスによって異なり、ES 法で調製したFD20 ファイバー製剤が最も高い細胞層透過を示した (図5)。これは、エンドサイトーシスなどエネルギー依存的な薬物透過の他、ES 法ファイバーの賦形剤である高分子量ポリマーのPVA が気相側の少量の水分によって膨潤し、大きな浸透圧差を形成したためと考察している。本研究期間中には、メカニズムの解明まで至らなかった為、今後検討を継続していく。



(3) マウス眼瞼塗布による in vivo 遺伝子発現評価

各種調製法で作成した naked pDNA 粉末を麻酔下のマウス前眼部へ投与し、眼組織における Luc 由来の発光を検出することを試みた。しかし、本研究期間中に in vivo における遺伝子発現を検出するには至らなかった。これは、製剤添加後の涙液増加および鼻涙管からの薬物排泄が原因と考察している。前項 in vitro 実験において気液界面細胞培養系で遺伝子発現が確認された一方で、naked pDNA 製剤添加前の気相側をリン酸緩衝液で被覆した場合、遺伝子発現は確認できなかった。これは、naked pDNA 製剤が細胞層に直接付着することで pDNA の細胞内導入を達成することを示唆している。Naked pDNA 製剤を添加したことでマウス涙液が増加し、naked pDNA 製剤の付着阻害が起きていると予想している。また、in vitro 実験では pDNA が排泄されることなく系内に滞留するのに対し、in vivo 投与では、マウスの鼻涙管からの排泄を考慮する必要がある。今後、遺伝子発現に必要な pDNA 量の検証および涙液産生の少ない睡眠時に長時間投与可能な製剤設計を検討していく予定である。

FD20 を含む粉末製剤を用いて、薬物の眼組織動態を観察した。その結果、眼内における FD20 の薬物挙動は製剤化プロセスの違いおよび賦形剤によって大きく異なることを明らかにした (図6)。角膜では、対照群として投与した FD20 点眼液において FD20 由来の蛍光強度が検出された一方、各種固形製剤は FD20 を検出できなかった。その一方で、眼瞼および網膜では、SFD 法で調製した FD20 粉末製剤および ES 法で調製した FD20 ファイバー製剤が高い薬物移行を示すことを明らかとした。いずれも、賦形剤に PVA を用いており、PVA に由来する高粘度が涙液および鼻涙管からの薬物排泄を回避したと考察している。また、FD20 の眼瞼および網膜における蛍光は、多くの製剤において 60 分で極大を迎えた。これはマウスの鼻涙管からの排泄によって、in vitro 実験と比較して速やかな薬物排泄が起こったためと予想している。今回得られた薬物動態学的知見は、今後の製剤設計を構築するうえで重要な結果である。



以上の結果より、pDNA を粉末製剤化することで導入剤を加えずとも、in vitro において遺伝子発現を達成することが明らかとなった。pDNA の遺伝子発現や FD20 の薬物動態は、用いる製剤化プロセスおよび賦形剤に依存して変化することが示唆された。特に、ES 法で調製した PVA ファイバーにおいて優れた細胞層透過挙動および網膜移行を確認した。今後、in vivo における遺伝子発現実証を目指し、引き続き製剤設計を試みる。

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