

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 8日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591452

研究課題名（和文） ナノニードルを用いる皮膚を標的とする効率的な薬剤供給戦略

研究課題名（英文） Effective systems delivering drugs to the skin using nanoneedle.

研究代表者

花田 勝美（HANADA KATSUMI）

弘前大学・医学部附属病院・病院長

研究者番号：80091627

研究成果の概要（和文）：治療効果のある分子を、標的となる臓器に効率よく供給するデリバリーシステムの開発は、治療法を飛躍的に進歩させ得る。そのため、我々はナノニードル法に注目した。このニードルの中に薬物を封入し、実際に皮膚に刺入すると、この針は皮膚で折れて皮膚にとどまり、中にある薬物をゆっくり放出する戦略である。今回、まずどのぐらいの針の長さが適切であるかを検討した。次に、ニードルの材質について検討した。その結果をもとに、色素の導入を試みたところ、皮膚に色素の存在が確認された。しかし、臨床応用での蛋白や遺伝子による治療を考えた場合、さらに導入効率の改善が必要であると考えられた。以上より、本法は将来分子を皮膚に導入する方法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Development of the delivery systems which can introduce therapeutic molecules into targeting organs surely make a progress of treatments in clinical practice. We pay strong attention to a nanoneedle method. The needles containing drugs go into the skin, are broken, are remained and release the drugs to the skin. In this study, we first examined the appropriate length of the needle and then checked material properties of the needle. Next, we tried to introduce some dye into skin using the nanoneedles and we found the dye in the skin. However, introducing rate was not enough for protein and genes in the aspect of clinical use and we need to improve the introducing rate. In conclusion, this method is suggested to be potential for delivering the molecules into the skin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

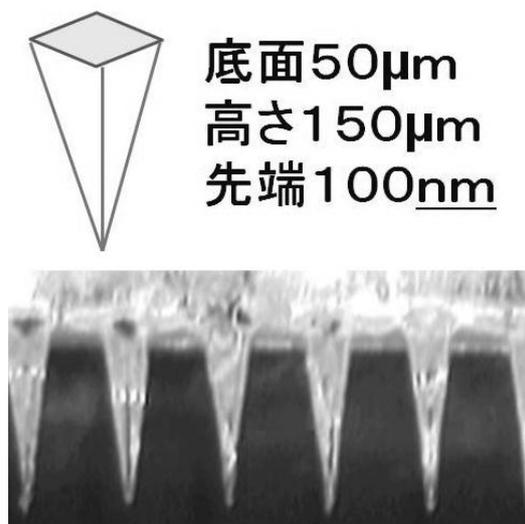
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：ナノニードル、皮膚、核酸、蛋白質、合成化合物、デフェンシン、フィラグリン、治療

1. 研究開始当初の背景

治療効果のある分子を標的となる臓器に効率よく供給するデリバリーシステムの開発は、治療法を飛躍的に進歩させ得る。皮膚を母地とする種々の難治性疾患があり、それに対して有効と考えられる薬剤は多いが、皮膚への導入がうまくいかず臨床応用されていない。そのため、皮膚に効率よく薬物を供給するシステムが開発されれば、おおきなブレークスルーとなる。

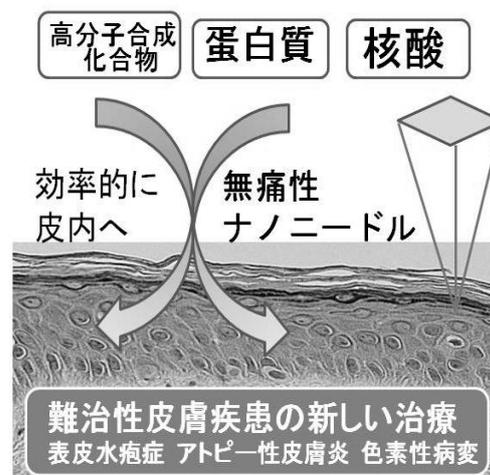


無痛性ナノニードル

そのシステムとして薬剤の外用療法が行われているが、皮膚への薬剤導入効率はそれほど高くない。それは、皮膚の最外層に角質という物理的なバリアーがあるためである。ステロイドや抗生剤などの低分子の薬物は、皮膚表面から皮内へと拡散していくため、ある程度の治療効果を得ることができる。一方、分子量の大きい化合物、あるいは蛋白やDNAやRNAなどの核酸は外用しただけでは、皮膚の中には全く入っていかない。

そこで我々は、皮膚疾患の治療に有効と考えられる、高分子化合物、核酸、蛋白をこの角

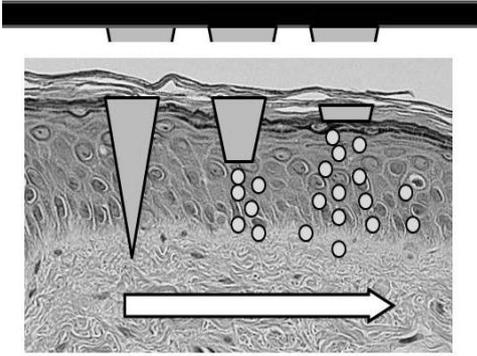
層のバリアー機能を破壊することなく、効率よく皮膚に供給する新しいシステムであるナノニードル法に注目した。そしてこのニードルの中に薬物を封入し、実際に皮膚に刺入すると、この針は皮膚で折れて皮膚にとどまり、中にある薬物をゆっくり放出する戦略である。



皮膚への新しい薬物供給戦略

2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノニードル戦略の臨床応用のための基礎を確立することにある。そのため、以下の3つの研究を予定した。従来、我々はナノニードルの長さを表皮の厚さである150μmを基準にしてきた。そこで、本研究では、いろいろな長さ、あるいは可能な生体材質のニードルを作製し、導入効率が変わるか、また、皮膚のいろいろなレベルで薬物を効かせることができるのかを検討する。次に、いろいろな薬効物質をニードルの中に組み込みそれぞれの導入効率と効果を検討する。



折れたニードルから薬剤が徐放

3. 研究の方法

ナノニードルの長さの検討：ナノニードルの作成については、立命館大学マイクロシステムセンターの宮野尚哉教授に委託し、供給を受けた。いろいろな長さのナノニードルを作成し、その中に青色色素カルセインを混入する。そのニードルをヘアレスマウスやヘアレスラット皮膚に貼付したあと、24時間後に皮膚を採取して、カルセインの入ったレベルを確認した。ナノニードルの材質の検討：現在我々は、マルトースを基本としてナノニードルを作成しているが、ニードルの弾力が少し弱い点が問題となっていた。近年、ポリエチレングリコールを混入することにより、さらにニードルの弾性を増加させることができた。今回の研究でも、マルトースとポリエチレングリコールが種々の割合で含まれるニードルの作成を行った。それをういて皮膚を刺し、さらに、24時間から72時間まで、異物反応や炎症反応などがないことを確認する。またカルセイン入りの針を作成し、処置部の皮膚を採取し、その色素の入る程度を光学顕微鏡で観察する。合成化合物皮膚への導入基礎実験：アスコルビン酸とアルブチンは、チロジナーゼの発現を抑制し、色素病変に効果があると考えられている。そこで、アスコルビン酸融合体とアルブチンを含むナ

ノニードルを作成した。有色モルモット背部皮膚に刺入後、処置部の色素の変化を観察した。さらに、皮膚を採取し、メラニンを観察した。蛋白の皮膚への導入基礎実験：我々はβデフェンシン2、3遺伝子を組み込んだ発現ベクターを有しているので、293細胞に導入して恒常発現する細胞を選択し、リコンビナント蛋白を精製した。まず、予備実験として、リコンビナント蛋白が100ngから100μgの濃度を含む生食を局注した。経時的に皮膚を採取し、皮膚内蛋白の濃度をウエスタンブロットに測定した。また、蛍光抗体法に使用可能な抗体が商業ベースで入手可能であるので、免疫組織学的にも検討した。遺伝子の皮膚への導入基礎実験：我々はβガラクトシダーゼ遺伝子を組み込んだ発現ベクターを有しているので、それを大腸菌で大量に生成した。まず、予備実験として、DNAを含む生食を動物の背部に局注した。その後、組織を採取して組織学的ならびに遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

ナノニードルの長さの検討については、表皮の約100μmであり、まずこの長さのナノニードルを使用して研究を行った。実体顕微鏡で観察すると、多くのナノニードルが皮膚に入る時に折れてしまうことが確認された。また、皮膚がやわらかく、先端の鋭さが必要と思われた。次に200μmについて行ったが、これも腰の弱さが目立った。25と50μmについては皮膚に挿入されていた。カルセイン入りのナノニードルを使用した場合、組織学的には、すべてのナノニードルでカルセインの存在が皮膚に認められが、100と200μmに比較して、25と50μmのナノニードル針の方の効率がよかった。ナノニードルの材質の検討：上の実験からマルトースを基本としたナノニードルは弾力が少し弱かったので、ポリエチ

レングリコールを混入したものを検討してみた。結果同様の結果で、すべてのナノニードルでカルセインの存在が皮膚に認められ、100と200 μm に比較して、25と50 μm のナノニードル針の方の効率がよかった。合成化合物皮膚への導入基礎実験：アスコルビン酸とアルブチン入りのナノニードルを作成したし、動物に色素の低下が認められるか行なったが、肉眼的に色素の低下は認められなかった。しかし、今回の実験では、アスコルビン酸とアルブチンの効果が低いのか、あるいは、導入効率が低いことによるものなのかは、判断できなかった。さらに、追加実験を検討する。蛋白と遺伝子の皮膚への導入基礎実験：蛋白と遺伝子の実験については、予備実験として、アルブミンと β ガラクトシダーゼの遺伝子を直接、ラット皮膚の導入する実験をまず行なったが、アルブミンと β ガラクトシダーゼの十分な存在を検出することができなかった。今回の実験では、ナノニードルにより皮膚の分子を導入可能であることが分かったが、その量は十分なものではなかった。将来の蛋白や遺伝子による治療を考えた場合、さらに導入効率の改善が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ①Amagai M, Ikeda S, Shimizu H, Iizuka H, Hanada K, Aiba S, Kaneko F, Izaki S, Tamaki K, Ikezawa Z, Takigawa M, Seishima M, Tanaka T, Miyachi Y, Katayama I, Horiguchi Y, Miyagawa S, Furukawa F, Iwatsuki K, Hide M, Tokura Y, Furue M, Hashimoto T, Ihn H,

Fujiwara S, Nishikawa T, Ogawa H, Kitajima Y, Hashimoto K.
Pemphigus Study Group. A randomized double-blind trial of intravenous immunoglobulin for pemphigus.
J Am Acad Dermatol, 2009; 60(4): 595-603. 査読有
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962208012401>

- ②Matsuzaki Y, Kimura K, Nakano H, Hanada K, Sawamura D.
Localized pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp disease) in early childhood.
J Am Acad Dermatol, 2009; 61(1): 120-123. 査読有
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962208013741>

[学会発表] (計0件)

[図書] (計2件)

- ①花田勝美、弘前大学出版協会、教師のための紫外線講座-紫外線が子どもをねらう-、2010、88
②花田勝美、文光堂、皮膚疾患診療実践ガイド、2009、526-527, 530-535.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花田 勝美 (HANADA KATSUMI)

弘前大学・医学部附属病院・病院長

研究者番号：80091627

(2) 研究分担者

澤村 大輔 (SAWAMUERA DAISUKE)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60196334

松崎 康司 (MATSUZAKI YASUSHI)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50322946

(3) 連携研究者

()

研究者番号：