

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成27年度研究進捗評価用〕

平成24年度採択分
平成27年3月12日現在

生体分子の油状ナノ分散化技術を利用した低侵襲性経皮ワクチンの創製

Creation of Transdermal Drug Delivery Systems

Using Solid-in-oil Nano-dispersion Technique

課題番号：24226019

後藤 雅宏 (GOTO MASAHIRO)

九州大学・大学院工学研究院・教授



研究の概要

本研究の目的は、生体分子の油状ナノ分散化技術（S/O技術）を応用し、今まで注射でしか投与できなかったワクチンを塗り薬として投与できる“塗り薬型ワクチン（経皮免疫システム）”を創製することである。本研究では我々が開発した経皮吸収促進(S/O)技術を核として高効率な経皮免疫システムを構築し、人類の生活の質（QOL）向上に貢献することを目的とする。

研究分野：プロセス工学・生物工学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム(DDS)

1. 研究開始当初の背景

ワクチンは特定感染症に対する最も有効かつ経済的な予防策であることが認識されている。しかし、ワクチン投与は一般的に注射により行われるため、痛みやケガ、予期せぬ感染症の原因となるリスクを含んでいる。そこで、経皮経路からワクチンを投与する“塗り薬型のワクチン療法”を創製することにより、接種を受ける人々の安全性や生活の質（QOL）向上に大きく寄与できると考えられる。

2. 研究の目的

皮膚は複雑なバリア機能を有していることから、一般的にワクチンのような親水性高分子の皮膚浸透は困難である。しかし、生体分子を油中にナノ分散化する技術（solid-in-oil, S/O化技術）を利用することで、ワクチンの皮膚浸透および免疫惹起効果が示されたことから [Goto et al., *Chem. Commun.*, **46**, 9200, 2010]、本研究ではこの基盤技術を元に、経皮免疫システムの創製と、経皮ワクチン接種の効率向上を目的とした。

3. 研究の方法

モデル分子として卵白由来アルブミン（ovalbumin, OVA）を用い、S/O化技術を用いて調製したナノ粒子によるマウスの経皮免疫試験を行った。続いて、皮膚浸透経路や細胞中のシグナル伝達経路の活性化機構を調べることで、適切な経皮吸収促進剤および免疫賦活剤等の選択を行い、抗体産生量の高効率化を試みた。さらに、ペプチドならびにタンパク質を含有したS/O製剤を用いてスギ花粉症治療、ガン免疫治療へ応用した。

4. これまでの成果

Solid-in-oil (S/O)化技術を用いた経皮ワクチンの創製

S/O化技術は、親油性の高い界面活性剤を用い、親水性の薬物（タンパク質等）をナノ粒子として油中に分散する技術である [Goto et al., *J. Control. Release*, **131**, 14, 2008]。そこでまず、ナノ粒子を調製する際の界面活性剤の種類、およびタンパク質-界面活性剤比を最適化することで、本技術を用いた免疫活性化効率の向上を目指した。界面活性剤として、炭素鎖12から22までの様々な脂肪酸から構成されるショ糖脂肪酸エステルを候補とした結果、ショ糖ラウリン酸エステルを用い、かつタンパク質と界面活性剤の割合が1:50となるような配合で調製したナノ粒子が、最も高い徐放性を示し、さらに、マウスにおける高い免疫応答を惹起した。

次に、ヒトの皮膚に似た構造を持つ Yucatan micropig (YMP)の皮膚を用いて、S/O ナノ粒子の皮膚浸透機構を調べた。その結果、ナノ粒子中の界面活性剤は、疎水性の高い角層中で剥がれて角層に留まり、放出された親水性のタンパク質のみが、皮膚深部へと浸透していくことが示された。また、ナノ粒子および放出されたタンパク質のどちらも細胞間隙経路を通して浸透することが明らかとなった。

経皮浸透促進ペプチドとしてオリゴアルギニン（R6）を選択し、これを封入したS/O ナノ粒子をマウスの耳介から経皮投与し、抗体産生量を調べた。その結果、OVAとR6をナノ粒子に同時封入した場合にのみ、OVA特

異的な抗体の産生量は増加した。また、抗体産生量はOVAとR6の混合比によっても変化し、1:1の混合比のときに最大でR6無添加時の8倍となり、注射投与に匹敵した。抗体産生量は、ナノ粒子からの徐放性と強く関連を持つことが明らかとなった。以上のことから、S/O化技術を利用したナノ粒子を用い、安定的に経皮免疫システムを構築できた。抗体産生のスピードは注射によるタンパク質投与に比べて緩やかであったが、皮膚浸透促進剤および免疫賦活剤の併用により、注射投与に近い抗体産生量が得られることが判明した。

スギ花粉症治療を目的としたペプチドワクチンの経皮投与

アレルギーの根本的治療として、免疫療法が注目されており、中でも、抗原分子から一部のペプチド配列を抜き出したT細胞エペトープペプチドを利用するペプチド免疫法は、重篤な副作用を引き起こさない治療法として期待される。本研究では、スギ花粉症の高い治療・症状緩和効果が見込まれる7個のエペトープ配列を、トリアルギニンリンカーを介して連結させたペプチドを新たにデザインした。S/O化技術を用いることで、ペプチドを安定的に油中ナノ分散化させることができた。また、YMP皮膚を用いた皮膚浸透試験の結果、S/Oナノ粒子化がペプチドの皮膚への浸透を促進することが確認された。さらに、スギ花粉症モデルマウスへ経皮投与することで、血清中の抗原特異的IgEの産生が抑制された。

低侵襲性経皮ガンワクチンの開発

S/O製剤を用いることで、抗腫瘍性免疫をどの程度誘導できるか検討を行った。マウスに1週間おきに計2度、1回につきOVAが200 µg/匹となるようOVA溶液の注射あるいはS/Oパッチを用いて経皮的に免疫化を行った。最終免疫の1週間後、OVA発現がん細胞であるE.G7-OVA細胞 2.5×10^6 個をマウス背部に皮下注射し、担がんマウスを作製した。作成した担がんマウスの腫瘍サイズを2-3日おきに測定し、腫瘍体積を算出した。

OVAをがん抗原として用いた場合、免疫が誘導されていればOVA発現がん細胞であるE.G7-OVA細胞は傷害され、腫瘍の成長が抑制される。対照実験では、腫瘍の大きさが劇的に増加しているのに対し、注射またはS/O製剤による投与を行った場合には、腫瘍体積の増加が抑制されていることが確かめられ、さらに生存期間の延長も見られた。このことから、いずれの場合においてもOVAによる免疫化が行われていることが示され、S/O製剤を用いて経皮免疫を行った場合には、注射と同程度またそれ以上の抗腫瘍免疫が誘導可能であることが明らかとなった。

5. 今後の計画

スギ花粉症の治療および低侵襲性ガンワクチンの構築へ向けて、S/O製剤を用いた経皮投与のさらなる効率向上を目指す。新たに皮膚浸透促進剤や免疫賦活剤の併用により、経皮ワクチンの効果を高める計画である。

6. これまでの発表論文等

1. A. Tanaka, Y. Fukuoka, Y. Morimoto, T. Honjo, D. Koda, M. Goto, T. Maruyama, Cancer-cell death induced by the intracellular self-assembly of an enzyme-responsive supramolecular gelator. *J. Am. Chem. Soc.*, 137 (2), 770 - 775(2015).
2. M. Kitaoka, A. Naritomi, Y. Hirakawa, N. Kamiya, M. Goto, Transdermal immunization using solid-in-oil nanodispersion with CpG oligodeoxynucleotide adjuvants, *Pharm. Res*, in press (2015).
3. R. Wakabayashi, R. Ishiyama, N. Kamiya, M. Goto, 'A novel surface-coated nanocarrier for efficient encapsulation and delivery of camptothecin to cells', *Med. Chem. Commun.*, 5, 1515-1519 (2014).
4. M. Kitaoka, K. Imamura, Y. Hirakawa, Y. Tahara, N. Kamiya, M. Goto, 'Sucrose laurate-enhanced transcutaneous immunization with a solid-in-oil nanodispersion' *Med. Chem. Commun.*, 5 (1), 20-24 (2014).
5. M. Kitaoka, K. Imamura, Y. Hirakawa, Y. Tahara, N. Kamiya, M. Goto 'Needle-free immunization using a solid-in-oil nanodispersion enhanced by a skin-permeable oligoarginine peptide' *Int. J. Pharm.*, 458(2), 334-339 (2013).
6. Y. Tahara, S. Honda, N. Kamiya, M. Goto, Transdermal delivery of insulin using a solid-in-oil nanodispersion enhanced by arginine-rich peptides, *Med. Chem. Comm.*, 3, 1496-1499 (2012).
7. Y. Tahara, N. Kamiya, M. Goto, Solid-in-Oil Dispersion: A Novel Core Technology for Drug Delivery Systems, *Int. J. Pharm.*, 438, 249-257(2012).

他 14 件

ホームページ等

次世代経皮吸収研究センター：

http://www.bioeng.cstm.kyushu-u.ac.jp/ksu_re_center/index.html

後藤・神谷研究室

<http://www.bioeng.cstm.kyushu-u.ac.jp>