

学位論文題名

イオントフォレシスによる機能性核酸の非侵襲的経皮送達
技術の確立と癌治療への応用

学位論文内容の要旨

医薬品の経皮吸収には、従来の投与方法と比較して肝初回通過効果の回避、非侵襲的な投与が可能などの利点があり患者の QOL 向上につながる投与方法である。しかし、皮膚の最外層に位置する角質層が障壁となり皮膚内部の表皮層および真皮層まで到達可能な化合物は脂溶性の低分子化合物に限られる。そこで、経皮吸収に適用可能な医薬品の範囲を拡大するための様々な研究が行われている。我々が着目した物理的手法の一つであるイオントフォレシスは、微弱な電流を適用し電気泳動の原理で荷電を有する化合物の経皮吸収を促進する技術であり、その他の物理的手法と比較して非侵襲的である、という利点を有する。一方で、通電時に陽極から皮膚から皮膚方向へ水の流れ（電気浸透流）が生じるため、イオントフォレシスの適用が検討される化合物は正電荷を有するものがほとんどであるという課題もあった。そこで我々は、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）を用いた検討に取り組みイオントフォレシスが負電荷の化合物に対しても有用であることを明らかとしてきた。機能性核酸は NSAIDs と同様に負電荷を有するが、水溶性の高分子化合物であるため従来では経皮吸収が不可能であると考えられる。しかし機能性核酸は皮膚疾患の新たな治療薬として期待されているため、これらを皮膚内に送達可能なデリバリーシステムを開発する意義は非常に高いと思われる。そこで本研究では、遺伝子の mRNA 配列特異的に結合してその発現を抑制する siRNA および免疫賦活性オリゴ DNA を用いた検討を行い、イオントフォレシスによる機能性核酸の経皮送達技術の確立と疾患治療への応用を目的とした。

まず、Cy3 標識した siRNA をイオントフォレシス（以下 IP）によりラットの皮膚に対して 1 時間かけて投与し、皮膚切片を共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）により観察することで皮膚内に siRNA が浸透するか調べた。siRNA のような水溶性高分子化合物の経皮送達は極めて困難であると予想されたが、IP を用いた場合は siRNA が表皮および真皮層まで到達していた。しかし皮膚中の遺伝子（MAPK1）に対するノックダウンは認められなかった。その原因として、siRNA の皮膚内における安定性、つまりヌクレアーゼによる分解が考えられた。そこで、siRNA の安定性向上のための戦略として siRNA とポリカチオンである protamine または stearyl-octaarginine (STR-R8) から形成されるナノ粒子を投与するという方法を試みた。さらに、ナノ粒子を正電荷に調節することで siRNA を陽極から投与することが可能となり、電気浸透流の寄与を受けることで siRNA の送達量向上が期待された。しかし予想に反して、正電荷のナノ粒子を投与した場合に siRNA の皮膚内への浸透および

MAPK1 に対するノックダウンが認められなかったという結果に対し、負電荷のナノ粒子を投与することで siRNA は naked siRNA 投与時と同様の動態を示し、さらに MAPK1 mRNA レベルを約 70%抑制した。以上の結果から、siRNA のような従来では皮膚を透過しない化合物が IP により皮膚内に送達可能となり、また活性を示すためにはナノ粒子化することによりヌクレアーゼに対する安定性を向上させる必要があることが示唆された。

CpG-ODN は 20mer 前後の一本鎖オリゴ DNA で免疫賦活性を有し、ランゲルハンス細胞などの免疫細胞が豊富に存在する皮膚も標的組織となる。siRNA が IP により皮膚内に浸透したという上記の結果から、本研究で用いた分子量が 6300 の CpG-ODN も同様に送達可能であると予想された。Cy3 標識 CpG-ODN をヘアレスマウスの皮膚に投与した結果、CpG-ODN が表皮層および真皮層に分布する様子が観察され、CpG-ODN も siRNA と同様に IP により経皮送達可能であることが示された。さらに、phosphorothioate 修飾により安定性を向上させた CpG-ODN を IP により投与することで皮膚中におけるサイトカイン mRNA レベルの上昇が認められたことから、IP により CpG-ODN を投与することで皮膚中の免疫細胞を活性化できることが示唆された。

続いて、本デリバリーシステムを疾患の治療へ応用しその有用性を示すことを試みた。CpG-ODN は皮下注射、腹腔内注射、あるいは腫瘍内注射により、免疫活性化を介し単独で抗腫瘍活性を示すことが報告されている。そこで、IP により CpG-ODN を経皮送達し皮膚を介して免疫を活性化することで抗腫瘍効果が誘導されると考え CpG-ODN を用いた抗腫瘍効果に関する検討を行った。抗腫瘍活性の評価には、B16 メラノーマ細胞皮下に移植した担癌モデルを用い 3 日おきに計 4 回 CpG-ODN を各方法で投与した。IP は腫瘍から離れた部位に投与した distal IP treatment、腫瘍の上に投与した local IP treatment の 2 通りについて評価を行い、皮下注射においては腫瘍から離れた部位に投与した。CpG-ODN 単独投与による癌免疫療法においては、投与部位が腫瘍の近傍であるほうが高い抗腫瘍活性を誘導できると報告されているが、経皮的に腫瘍容積を測定した結果 IP による投与では腫瘍から離れた部位に投与しても、腫瘍近傍に投与したときと同等の抗腫瘍活性を誘導可能であることが示された。一方、distal IP treatment と同様の部位に CpG-ODN を皮下注射した群においては、最終投与の day12 以降は抗腫瘍活性が減弱していた。さらに day18 における腫瘍組織切片の免疫染色を行った結果、distal IP treatment のほうが皮下注射よりも抗腫瘍活性を有するエフェクター細胞である NK 細胞、M1 マクロファージ、CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内への浸潤が多いことが明らかとなった。以上の結果から、IP は機能性核酸の標的組織を皮膚とした場合のデリバリーシステムとして有用であり、さらに IP による CpG-ODN の経皮送達は従来の投与方法よりも強力な抗腫瘍活性を誘導可能であることが示唆された。

以上の結果から、イオントフォレシスを利用することで経皮吸収可能となることが本研究において示された。本デリバリーシステムが新規の皮膚疾患治療法、感染症予防および癌治療の開発に繋がると期待される。

学位論文審査の要旨

主査	特任准教授	梶本	和昭
副査	教授	菅原	満
副査	教授	原島	秀吉
副査	教授	小暮	健太郎

(京都薬科大学大学院薬学研究科)

学位論文題名

イオントフォレシスによる機能性核酸の非侵襲的経皮送達 技術の確立と癌治療への応用

皮膚を介した医薬品の投与（経皮投与）は、製剤の取扱いが簡便で安全性が高く、経口や注射に替わり高齢化社会における在宅医療を促進できる投与方法として注目されている。しかしながら、皮膚は本来、外界からの異物侵入を防ぐためのバリアーとしての機能を有するため、低分子化合物と云えども皮膚透過性は極めて低く、製剤化は容易ではない。このような背景から、近年、薬物分子の経皮吸収を促進する技術の開発が精力的に進められており、中でも、イオントフォレシスと呼ばれる微弱電流を用いた経皮吸収促進法は、非常に簡便な装置で、皮膚に大きなダメージを与えることなく、電荷を有する化合物の皮膚透過を促進できる技術として期待されている。しかし、現在までに臨床応用されているイオントフォレシス製剤はリドカインとフェンタニルの2種類のみであり、より多くの医薬品に対する適用、製剤開発が強く望まれている。一方、疾患の原因となる遺伝子の発現を特異的に抑制する siRNA や免疫賦活化作用を有する CpG オリゴ DNA といった機能性核酸は、効果の特異性や応用範囲の広さという観点から次世代医薬として注目されており、皮膚癌や感染症、アトピー性皮膚炎など様々な皮膚疾患に対しても応用が期待されている。しかし、機能性核酸は、生理的条件下で負電荷を帯びた水溶性の高分子であるため、そのままではほとんど経皮吸収されず、種々の皮膚疾患に対して適用することが困難であり、安全で効果的な経皮吸収促進技術の確立が強く望まれている。

本論文は、このような現況にある機能性核酸の経皮吸収を促進する技術としてイオントフォレシスに着目し、活性を保持した状態で効率よく皮膚内へ送達するための製剤的工夫について検討を行うとともに、癌モデル動物を用いた治療効果に関して、組織学的あるいは免疫学的に研究し、経皮免疫の賦活化による制癌効果のメカニズムを解明することで、非侵襲的な癌免疫療法確立につなげることを目的としたもので、学術的にも極めて独創性の高い研究と言える。特に、薬剤学的観点からは経皮吸収が困難とされる分子量 15000 を超える siRNA のような高分子でも、イオントフォレシスを用いることで皮膚内への浸透性が劇的に向上することを見いだした点は、従来の学術的常識を覆す極めて意外な発見である。更に、生体内での

易分解性から効果が不十分な siRNA をナノ粒子化することで分解耐性を高め、*in vivo* で皮膚内の標的遺伝子の発現を特異的に抑制することに世界で初めて成功した。また、CpG オリゴ DNA については、化学修飾型核酸を用いることでナノ粒子化することなく 24 時間以上にわたって持続的に免疫反応を活性化できることを明らかにしており、製剤学的な観点からも極めて有益な知見である。

これに加え、著者は、哺乳動物の皮膚中にはランゲルハンス細胞などの免疫担当細胞が豊富に存在し、外界からの細菌やウイルス感染から生体を防御する免疫器官として機能していることに着目し、CpG オリゴ DNA の免疫賦活化作用を利用して癌治療へ応用できるのではないかとこの作業仮説に基づき、癌モデル動物を用いた検討を行い、仮説通り、持続的な抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。この時、通常ならば可能な限り腫瘍の近傍に投与することで、より高い効果が得られると期待されるが、著者は、敢えて腫瘍から離れた部位に投与した場合についても検討を行い、CpG オリゴ DNA の経皮投与による抗腫瘍効果は投与部位に依存しないことを見いだした。この結果は、体内のどこに腫瘍が形成されている場合でも、あるいは腫瘍部位が特定できない場合であっても、皮膚表面から CpG オリゴ DNA を経皮投与することで全身の免疫反応を活性化し、癌治療を行うことが可能であることを示唆するものであり、臨床応用上、極めて有用性が高い知見と言える。

これを要するに、著者は、イオントフォoresisを用いた機能性核酸の非侵襲的な経皮送達について、従来の常識を打ち破る新知見を得るとともに、疾患治療への応用について、極めて実用性の高い次世代医薬の可能性を見いだしたものであり、日本人の死因の第一位を占める癌に対する治療法の開発という社会的要請に対して、これを飛躍的に促進する新技術の創出に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。