

微弱電流による薬物の皮内送達 —皮膚組織細胞の生理機能変化を利用して—

徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学域)衛生薬学分野 教授

小暮 健太郎 (2003~2006 年 旧教員)

薬物の皮内送達において、表皮角質層が最大のバリアであり、分子量 500 以上または親水性分子は皮内浸透できないと言われている。そのため、様々な皮内浸透促進法が開発されており、化学的方法と物理的方法に大別される。化学的方法は、*l*-メントールなどの化学物質によって皮膚の透過性を化学的に向上させるものである。一方の物理的方法は、超音波や電流等によって薬物の皮膚浸透性を増大させるものである。筆者は、北大薬学部寄附講座在職時(2003 年~2006 年)に物理的な皮内薬物浸透促進技術であるイオントフォレシス(Iontophoresis: ItP)に関わることとなり、以降 ItP による様々な物質の皮内送達およびメカニズム解析研究を行ってきた。本稿では、これまでの研究と現在挑戦している内容について紹介させていただく。

イオントフォレシス ItP

ItP は、皮膚上に貼付した電極から微弱電流(0.3~0.5 mA/cm²)を流すことで荷電性薬物の皮内浸透を促進する技術であり、薬物の電荷との電気的反発およびイオンの移動に伴う水の流れ(電気浸透流)が薬物を浸透させると考えられている(図 1)¹⁾。ItP は、非侵襲的でありアドヒアランスがよい等の利点を有しているため今後臨床現場での使用が期待されている。しかし、ItP には適用できないと考えられてきた薬物が多く、経口製剤や注射のように汎用されるには至っていない。一般的に ItP に適用できる

薬物の性質として、ある程度の疎水性と荷電を有すること、分子量 10,000 を超えないこと、などの制限があると考えられてきた。すなわち、親水性が高く分子量の大きいタンパク質や核酸医薬などは困難だと考えられていた。ところが、我々が北大において素人ながら ItP に挑戦したところ、様々な薬物・物質が ItP によって皮内送達可能であることが明らかになり、ItP の大きな可能性が見出されてきた。

核酸医薬 siRNA のイオントフォレシスによる遺伝子発現抑制

我々は、実用的な核酸医薬である siRNA(分子量約 12,000)の ItP に挑戦した。アトピー性皮膚炎モデルラットの毛を刈った背部皮膚上に蛍光標識 siRNA 溶液(10 μg)を浸み込ませたコットンを置き、その上にヒト心電図用の Ag/AgCl 電極を貼ることで ItP を行った。1 時間の ItP 実施後に回収した皮膚の凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、皮膚中に siRNA の蛍光が観察され、ItP によって siRNA が皮内に浸透することが確認された²⁾。すなわち、分子量 10,000 を超える親水性高分子である核酸医薬の ItP による皮内浸透に初めて成功した例であった。しかし、siRNA は皮膚組織中に浸透しただけでは機能を発揮できない。そこで、抗原タンパク質処理によって誘導されるサイトカイン Interleukin (IL)-10 の mRNA に対する siRNA を ItP に供した後、皮膚中の IL-10 mRNA を定量したところ、有意に mRNA 量が減少したことを確認した²⁾。このことは、siRNA が ItP によって皮膚中に浸透しただけでなく、細胞質にまで送達されたことを意味している。我々は、このメカニズムに興味を持ち、さらなる検討を行った。

イオントフォレシスによる皮内送達における新しいメカニズムの発見

従来、電気的反発とイオンが動くことに伴う水の流れ(電気浸透流)が ItP による皮内薬物浸透のメ

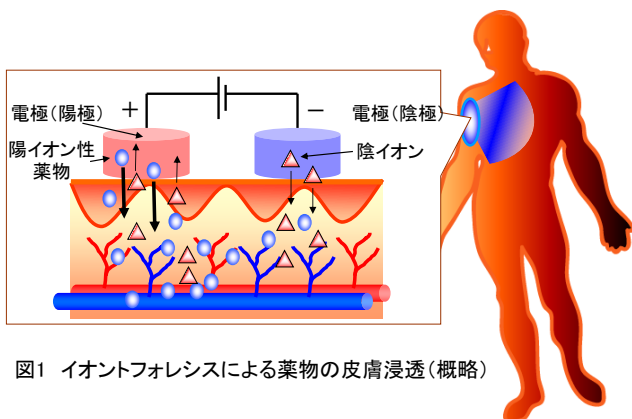


図1 イオントフォレシスによる薬物の皮膚浸透(概略)

カニズムであると考えられてきた。しかし、高分子物質が皮膚に浸透する理由は、従来の ItP のメカニズムでは説明できないため、我々は「ItP の微弱電流によって組織細胞間接着が開裂しているに違いない」という新しい仮説を考え検証した。ItP (微弱電流処理)を行ったラット皮膚切片について、細胞間接着 gap-junction タンパク質コネキシン Cx43 の免疫染色を行ったところ、Cx43 のリン酸化が亢進するとともに、Cx43 量が減少することが明らかになった³⁾。この結果から、微弱電流によって細胞膜上にあった Cx43 のリン酸化が亢進し、リン酸化 Cx43 タンパク質がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれて分解されることで Cx43 量が減少したことが示唆された。同様に細胞骨格を形成する tight-junction 関連タンパク質である重合化アクチン量が、微弱電流処理によって著しく減少することを見出した³⁾。すなわち、微弱電流処理によって重合化アクチンの脱重合が促進され、それによって細胞骨格が変化し、tight-junction が開裂することが示唆された。これらの現象は、培養細胞を用いた検討においても確認されている。さらに、培養細胞を微弱電流処理したときに、細胞内への Ca²⁺流入が促進すること、さらに細胞シグナル伝達系が活性化されることを見出した³⁾。これらのことから、ItP の微弱電流処理によって、細胞膜電位が変化し、細胞外から Ca²⁺が流入することで細胞シグナル伝達系が活性化され、Cx43 のリン酸化亢進や重合化アクチンの脱重合が誘導されることで、細胞間隙が開裂し、siRNA 等の親水性高分子が皮膚細胞間隙に浸透できるようになったことが示唆された。

また、微弱電流による外来物質の細胞内送達メカニズムについても検討を行った。培養細胞を用いた検討において、微弱電流処理によって培地中の蛍光標識 siRNA が細胞に取り込まれ、その細胞取り込みがマクロピノサイトーシスおよびカベオラ介在性エンドサイトーシスの阻害剤によって抑制されたことから、微弱電流処理によってエンドサイトーシスが誘起されることで細胞外の核酸医薬等が細胞内に取り込まれることが示唆された⁴⁾。問題は、エンドサイトーシスで取り込まれたものが、どうやって細胞質に到達するのか、であった。そこで、分子量の異なる蛍光標識デキストラン(分子量 10,000 と 70,000)を含有する培地中で培養細胞を微弱電流処理し、24 時間後に各デキストランの細胞内動態を観察したと

ころ、分子量 10,000 のデキストランは細胞質に拡散していたのに対して、分子量 70,000 はドット状であり、エンドソーム内に留まっていることが推察された⁵⁾。このことから、微弱電流処理によってエンドサイトーシスが誘起され、あるサイズ(分子量<70,000)までの物質は、エンドソームから細胞質に漏出することが示唆された。種々の検討を行った結果、微弱電流処理によって細胞内セラミドが増加することが明らかとなり、増加したセラミドがエンドソーム膜に「孔」を形成することで、一定分子量以下の物質が細胞質に漏出できるのではないかと推察している⁵⁾。

mRNA のイオントフォレシスによるがんワクチン

siRNA の ItP によって皮膚組織細胞の細胞質にまで核酸医薬が送達可能であるという事実に基づき、我々は ItP を利用したがんワクチン開発のために、がん抗原ペプチドをコードする mRNA の ItP と腫瘍成長抑制に挑戦した。皮膚はヒトの体の中で最大の免疫組織でもあるので、ItP によるがん免疫誘導は理想的ながんワクチンであると期待される。mRNA については、通常の polyA 部分が長すぎるため、名古屋大学の阿部洋教授に相談して、polyA 数が非常に少ない short mRNA を合成していただき、ItP によるがんワクチンを検討した。マウスメラノーマ B16F1 細胞を移植することで作成した担がんマウスの背部皮膚上で、メラノーマ gp100₂₅₋₃₃ ペプチド(KVPRNQDWL)をコードする mRNA の ItP を 3 日おきに 5 回行い、腫瘍サイズを経時的に測定したところ、約 70%も腫瘍成長を抑制することに成功した(図 2)⁶⁾。さらに、皮膚および腫瘍における炎症性サイトカイン Interferon γ (INF- γ) や IL-12 な

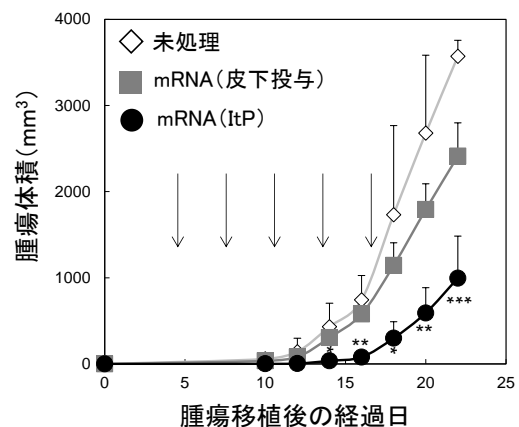


図2 腫瘍成長に対するmRNA ItP投与の影響
* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

どの mRNA 発現量の著しい増大を確認したことから⁶⁾、mRNA の ItP により免疫系を活性化することで腫瘍成長を抑制できたと考えている。同時に、比較として mRNA の皮下注射を行ったが、有意な腫瘍成長抑制およびサイトカイン産生は確認されなかった。これらのことは、ItP が mRNA を単に皮内に浸透させるだけでなく、皮膚中の免疫担当細胞の細胞質にまで送達することで免疫反応が誘導され、がんワクチンとしての効果を発揮できたことを意味しており、ItP でなければ達成できない現象であると考えている。

体内臓器へのイオンフォレシス

上述したように、ItP の微弱電流による組織細胞間隙の開裂と細胞内取り込みの促進は、皮膚細胞以外の細胞にも同様に誘導されることを確認していたことから、皮膚以外の体内臓器にも ItP を適用することで、疾患治療を行えるのではないかと発想するに至った。すなわち、肝臓などの体内臓器表面に電極を貼付し、微弱電流を流すことで核酸医薬等を直接臓器細胞内に送達できるのではないかと考えた。siRNA 製剤オンパットロなどの脂質ナノ粒子製剤が肝臓疾患治療薬として用いられているが、肝臓以外の組織にも送達される危険性があるとともに、製剤中に含まれる様々な成分が意図しない反応を誘導する可能性もあることから、核酸医薬のみを標的臓器細胞内に送達することが理想的であると思われる。しかしこの場合、体内臓器表面を露出させる必要があるが、近年進歩の著しい腹腔内視鏡技術を用いることで最小限の切開で体内臓器における ItP が可能になり、ヒトへも適用できると考えている。体内臓器への siRNA の ItP が可能か否かを検証するため、マウス肝臓表面で蛍光標識オリゴ DNA の ItP を実施したところ、肝臓組織切片において蛍光シグナルを認めることができた。さらに、肝線維症モデルマウスを用いて治療標的遺伝子 Hsp47 に対する siRNA の ItP を肝臓表面で実施したところ、Hsp47 mRNA を著しく減少させることに成功した⁷⁾。さらに、線維化肝臓切片のコラーゲン染色により病態観察を行ったところ、肝臓表面での siRNA の ItP により肝線維症が有意に改善されることが確認できている⁷⁾。このことから、ItP は皮膚だけでなく肝臓や膵臓等の体内臓器に核酸医薬等を直接送達できる技術として有用であると考えている。

参考文献

- 1) M. Hasan, A. Khatun, K. Kogure. Iontophoresis of Biological Macromolecular Drugs. *Pharmaceutics* 14, 525 (2022).
- 2) K. Kigasawa, K. Kajimoto, S. Hama, A. Saito, K. Kanamura, K. Kogure. Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. *Int J Pharm* 383, 157-160 (2010).
- 3) S. Hama, Y. Kimura, A. Mikami, K. Shiota, M. Toyoda, A. Tamura, Y. Nagasaki, K. Kanamura, K. Kajimoto, K. Kogure. Electric stimulus opens intercellular spaces in skin. *J Biol Chem* 289, 2450-2456 (2014).
- 4) M. Hasan, A. Nishimoto, T. Ohgita, S. Hama, H. Kashida, H. Asanuma, K. Kogure. Faint electric treatment-induced rapid and efficient delivery of extraneous hydrophilic molecules into the cytoplasm. *J Control Release* 228, 20-25 (2016).
- 5) M. Hasan, N. Tarashima, K. Fujikawa, T. Ohgita, S. Hama, T. Tanaka, H. Saito, N. Minakawa, K. Kogure. The novel functional nucleic acid iRed effectively regulates target genes following cytoplasmic delivery by faint electric treatment. *Sci Technol Adv Mater* 17, 554-562 (2016).
- 6) RA. Husseini, N. Abe, T. Hara, H. Abe, K. Kogure. Use of Iontophoresis Technology for Transdermal Delivery of a Minimal mRNA Vaccine as a Potential Melanoma Therapeutic. *Biol Pharm Bull* 46, 301-308 (2023).
- 7) M. Hasan, T. Fukuta, S. Inoue, H. Mori, M. Kagawa, K. Kogure. Iontophoresis-mediated direct delivery of nucleic acid therapeutics, without use of carriers, to internal organs via non-blood circulatory pathways. *J Control Release* 343, 392-399 (2022).

同窓会 HP:2023 年 5 月 23 日公開