

—平成16年度 岐阜薬科大学特別研究費（一般）—

## 眼科領域においてデコイ型核酸治療を可能にするため の生体親和性ナノ粒子の設計と評価

竹内 洋文

### 1. 緒言

デコイ (decoy) 型核酸を用いる核酸医薬品治療は、特異的に標的遺伝子の発現を抑制する方法であり、アンチセンス、リボザイムと並んで有望とされる遺伝子治療法の一つである。この内、転写因子 NF- $\kappa$ B は循環器領域だけではなくアトピーなどにも効果があることが分かっている。その有効性は大いに期待されるものの、デコイ型核酸は血中では不安定であり、局所適用に限定されており、またその目的部位への送達が課題とされている<sup>1)</sup>。

眼科領域におけるこのような核酸医薬品治療は一般的ではないが、一部の眼科医はその可能性に大きな期待を寄せている。例えば、眼科領域における局所の炎症性疾患（重症アレルギー性結膜炎・虹彩毛様体炎・強膜炎など）に対してその効果が期待されている。また、NF- $\kappa$ B の抗炎症作用はステロイドのそれに対して副作用がないことが大きな魅力である。ステロイド点眼治療に対する無反応症例、ステロイドによる眼副作用（眼圧上昇）を来たす症例に対してはこの特徴が有効に発揮されると考えられる。

眼科領域での薬物療法としては、薬物溶液の点眼が圧倒的に多い。点眼は本研究課題の核酸医薬品治療に限らず、その効率が極めて低い。点眼後の薬物溶液は前眼部での滞留の割合は小さく、また、ごく少数の特異的な透過性を有する薬物以外は後眼部へはほとんど送達されない。

我々は、すでに、粘膜に親和性を有するポリマーで表面修飾した微粒子にペプチド性薬物を封入して経口投与すると、その薬理効果が確認され、薬物吸収が促進されることを明らかにしている<sup>2)</sup>。これらの微粒子製剤を用いて眼科領域での薬物治療を達成するためには、まず、微粒子の膜親和性、薬物透過性向上のメカニズム、毒性などを明らかにし、さらに、点眼後の微粒子の挙動を明らかにする必要がある。また、微粒子への核酸の封入、眼内への薬物送達量の評価も大きな課題である。

これらの課題にチャレンジするために、本研究ではリポソームを薬物キャリアーとして選択し、まず、キトサン

で表面修飾することによる内封薬物の膜透過性、取り込みに及ぼす影響、表面修飾物質が細胞に及ぼす影響を培養細胞を用いて調べた。さらに、微粒子の眼内移行性を評価することも試みた。

### 2. 実験

#### 薬物透過性に及ぼす微粒子キャリアーの影響

モデル物質 FITC-デキストラン (FD-4) を用いて、薄膜水相法により FD-4 封入リポソームを調製した。脂質組成は、DSPC/DCP/Chol./=8/2/1 である。得られたリポソームにキトサン溶液を混合、インキュベーションすることにより、キトサンコーティングリポソーム (CS-Lip) を得た。

膜透過性の評価は、トランスウェル上に Caco-2 細胞を培養し、単層膜形成後、試料を添加し、透過した FD-4 を経時的に測定した。また、膜抵抗測定器：Millicell ERS (Millipore<sup>®</sup>) を用いて、膜抵抗値の経時変化、およびポリマー修飾リポソームを除去した後の、膜抵抗値の変化を測定した。

#### 細胞への微粒子取り込み及び毒性評価

薄膜水相法により蛍光マーカー (DiI) 標識リポソームを調製した。調製したリポソームとキトサン溶液、部分疎水化ポリマーである PVA-R、HPMC-R 溶液を混合してポリマー修飾リポソームを調製した。調製した DiI 標識リポソームを Dish 上に培養した Caco-2 細胞上に添加し、1 時間後の取り込み量を定量した。また、各リポソームを Transwell 上に培養した Caco-2 細胞上に添加し、経時的に膜抵抗値 (TEER) を測定した。各種ポリマー溶液、ポリマーコーティングリポソームの毒性試験は、96 穴プレートに Caco-2 細胞を培養し、MTS 法により評価した。

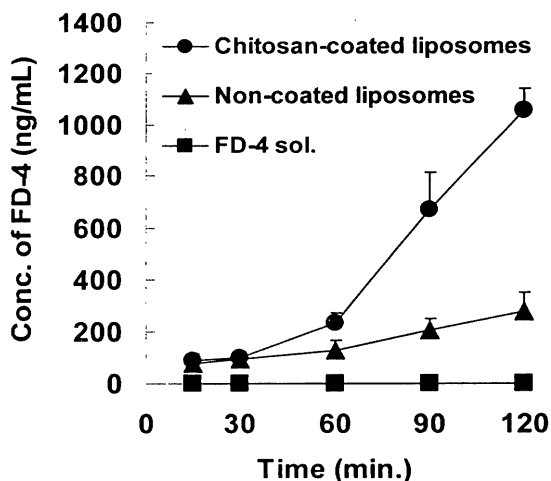
#### 眼内粒子移行性

脂溶性色素 DiI より蛍光標識して得られた MLV に超音波照射することにより粒子径約 200nm の SUV を得た。リポソーム懸濁液を家兎に点眼し、一定時間後に摘出した眼球をクライオスタットにより切片を作成し、共焦点顕微鏡により観察した。なお、クライオスタットにより作成した

切片の厚みは約  $10\ \mu\text{m}$  である。

### 3. 結果・考察

Caco-2 細胞を用いて、薬物透過試験を行ったところ、FD-4 溶液を用いた場合は、透過は確認されなかった。一方、FD-4 をリポソームに封入することで、膜透過性の向上が認められた。これはリポソームが単層膜上で、薬物を放出することで、膜近傍での薬物濃度が上昇したことによると推察された。さらにリポソームをキトサンで表面修飾することにより、膜透過性の有意な向上が認められた (Fig.1)。この場合、使用したリポソームが粒子径数  $\mu\text{m}$  の MLV であることを考えると、粒子の膜内透過は考えられない。粒子表面のキトサンにより細胞-粒子間の親和力が増大したためか、キトサン自身の薬物透過性向上の効果が現れたものと推定された。なお、ポリビニルアルコール (PVA)、部分疎水化水溶性ポリマー (PVA-R) でコーティングした場合にはこのような透過性改善は認められなかった。



**Fig.1** Effect of chitosan-coated liposomes on permeability of FD-4 across Caco-2 monolayers

Dose; 0.5mg, n=3~6, #34~38, chitosan conc.; 0.15%

透過性向上の原因を確認するために、膜抵抗値の変化を調べた。未修飾リポソーム添加系では変化は認められなかったが、キトサン修飾リポソーム添加系では、投与開始後すぐに膜抵抗値の減少が確認された。その値は、時間経過とともに減少傾向にあった。この結果より、キトサン修飾リポソームによる FD-4 の膜透過性向上の要因として、細胞間のタイトジャンクション開口作用が働いていることが推定された。

キトサン濃度を変化させると、その濃度の増大に伴い、FD-4 の透過量の増大、膜抵抗値の減少が確認された。しかし、キトサン修飾リポソームを除去すると、膜抵抗値は徐々に回復し、84 時間で実験前の値に戻り、その作用は可逆的あることが明らかとなった。

脂溶性蛍光マーカーを封入したリポソームを用いて、Caco-2 細胞へのリポソームの取り込み実験を行ったところ、リポソームをキトサンで修飾することにより、細胞との相互作用は有意に増大することが確認された。この場合も、膜抵抗値 (TEER) の減少が観察された。粒子を除去することにより TEER は上昇し、取り込み実験条件下では、24 時間後に約 100% まで回復した。

他のポリマーを用いて、同様な取り込み試験を行ったところ、検討した 2 種の部分疎水化水溶性ポリマーである PVA-R、HPMC-R いずれの場合もリポソーム取り込み量は低下した。ラット腸管を用いた粘膜付着試験においてはこれらのポリマーも、コーティングしてない場合に比べて付着効果が認められていることから<sup>3)</sup>、粘膜と細胞表面ではポリマーの親和性は大きく異なるといえる。ラット腸管を用いた付着試験では粘膜表面の粘液層 (ムチン層) との親和性が支配的であるためと考えられる。部分疎水化水溶性ポリマーによるコーティングは粒子分散安定性などの点では効果は高いが、点眼剤用コーティング物質としてはキトサンを用いる必要性が明らかとなった。

なお、Caco-2 細胞を用いた毒性試験からは、キトサンを含むいずれのポリマーにも顕著な毒性は認められなかった。また、これらのポリマーで表面修飾したリポソームにも顕著な毒性は認められなかった。

粒子の眼内移行に関しては、大阪大学医学部眼科学教室において点眼、摘出された家兎眼球を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した所、表面修飾していないリポソーム粒子と比較してキトサンコーティングしたリポソームの角膜上皮での滞留性ははるかに多く、また、一部網膜側への移行も確認された。現在、より定量的な評価へと展開している。また、NF- $\kappa$ B のリポソームへの封入に関しては、FITC 標識 NF- $\kappa$ B を用いて、約 70% の封入が確認された。これらの結果に基づいて今後本課題について共同研究として展開していく予定である。

### 4. 引用文献

- 1) 森下竜一: *Folia Pharmacol. Jpn.*, **115**, 123-130 (2000)
- 2) H. Takeuchi et al.: *Advanced Drug Deliv. Reviews*, **47**, 39-54 (2001)
- 3) H. Takeuchi et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1954-1956 (1994)