

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460042

研究課題名(和文) 刺激応答性ロタキサンナノ粒子を用いたタクロリムスの皮膚内動態制御

研究課題名(英文) Controlled disposition of tacrolimus in skin with atopic dermatitis using stimulus-responsible rotaxane nanoparticles

研究代表者

関 俊暢 (SEKI, TOSHINOBU)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：60196946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タクロリムス(TL)は、アトピー性皮膚炎(AD)の治療に用いられている。ADの皮膚は、その生理的状態が種々変化している。我々は、動物モデルを用いて、皮膚バリア機能と血流変化のTL全身吸収との関係を研究した。皮膚バリア機能の低下とTLの全身移行は、AD皮膚においてよく相関し、軟膏を希釈することで、全身移行を抑制できた。TLの全身移行と皮膚中濃度の関係は、2相性であり、TLの皮膚組織への結合が飽和することが示唆された。このTLの皮膚内動態を制御するため、微粒子キャリアのデザインを行った。それを構成するシクロデキストリン誘導体は、TLの膜透過速度を制御する有用なツールとなることが示された。

研究成果の概要(英文)：Tacrolimus (TL) is used topically for atopic dermatitis (AD) treatment. AD skin shows various physiological alterations. Our study using animal models showed alterations of skin barrier function and skin blood flow affected on systemic absorption of TL. We used TL ointment (0.1% ointment) with or without adrenaline (Adr, 0.5 w/w%) in order to suppress systemic absorption of TL. Skin barrier dysfunction correlated positively with systemic absorption of TL in AD skin, and dilution of TL ointment suppressed TL absorption. Although skin blood flow affected on TL absorption as skin barrier disrupted, relation between skin blood flow and TL absorption, and effect of combined-use of Adr were unclear. Relation between blood and skin disposition of TL was biphasic, suggesting bounding saturation of TL to skin tissue. In order to control disposition of TL in skin, carriers were design. Cyclodextrin derivatives were useful to regulate penetration rate of TL through model membranes.

研究分野：薬剤学

キーワード：皮膚内動態 経皮吸収 タクロリムス シクロデキストリン

1. 研究開始当初の背景

(1) タクロリムス(TL)は、アトピー性皮膚炎(AD)の治療に用いられている。ADの皮膚は、その生理的機能が病態に依存して多様に変化しており、TL皮膚適用後の動態は、患者個々において大きく異なることが懸念される。TLは、その薬理作用から、全身においては、その免疫力を低下させ、悪性腫瘍の発生頻度を高めることも報告されていることから、TL皮膚適用後の吸収動態とそれに影響する要因の解析は、大変重要である。

(2) 皮膚は、本来外来異物から体を守るバリアとしてはたらく組織であるが、ADの皮膚では、その機能が低下しており、正常時には皮膚内に侵入しない粒子なども浸透する。そのような粒子の皮膚内の動態制御は、それを有効に活用する上で必須の技術と考えられる。特に、粒子を刺激応答性にすることができれば、多様な機能を付加することも期待できる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、各種動物モデルを用いて、皮膚バリア機能と血流速度の変化、血管透過性亢進などとTL全身移行性との関係を研究した。すなわち、ヘアレスラットを用いて種々状態が異なる皮膚を作成し、また、マウスを用いて、ダニ抗原塗布によるADモデルを作成し、それぞれの皮膚状態とTL全身移行の関係を検討した。

(2) また、TLの皮膚内動態の制御を目的として、刺激にตอบสนองして形状が変化する粒子の設計を試みた。TLが β -シクロデキストリン(CyD)と相互作用することから、 β -CyD誘導体をその粒子の主成分として、その調製に用いる材料の合成を行った。さらに、 β -CyD誘導体のTL膜透過動態の修飾機能について検証を行った。

3. 研究の方法

(1) ヘアレスラットの腹部皮膚の角層を除去し、バリア能低下皮膚とした。さらに起炎剤を投与することで急性炎症を発症させた。加えて、アドレナリン(Adr)を適用して、血管収縮と血流低下の影響を検討した。また、マウスに対してダニ抗原を適用してADモデルマウスとした。このモデルでの皮膚状態を評価するとともに、TLの皮膚適用後の動態を調べた。評価において、全身のTL濃度、皮膚組織ホモジネート中のTL濃度、マイクロダイアリシス(MD)による皮膚組織内遊離TL濃度の測定を行った。

(2) ポリエチレングリコール(PEG)と β -CyDがロタキサンを形成する性質を利用して、その β -CyDに β -CyDが結合した新規材料の合成を試みた。また、 β -CyD誘導体が存在することによるTLの膜内移動動態の変化をラット皮膚およびモデル膜で検討した。

4. 研究成果

(1) TLの経皮吸収動態に影響する要因の解析
ADの患者では、皮膚バリア能が低下し、それがADの悪化にも関係しているが、バリア能の低下を再現した実験において、TLの全身移行がバリア能の低下とよく相関することが示された(図1)。

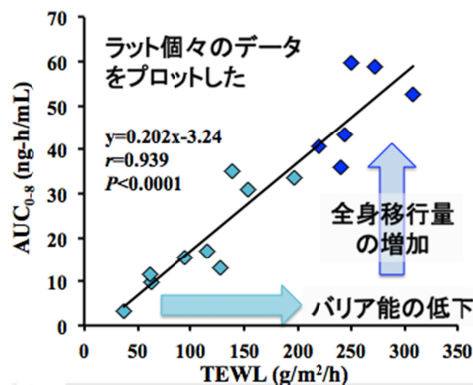


図1 皮膚からのバリア能低下による水分蒸散の上昇(TEWL)とTL血中濃度-時間曲線下面積(AUC)の関係
TEWLの測定は、比較的簡単であり、患者への適用前に測定して、予め全身への過剰な移行を防ぐことも考えられる。その際の方法として、軟膏の希釈は有効な方法である(図2)。

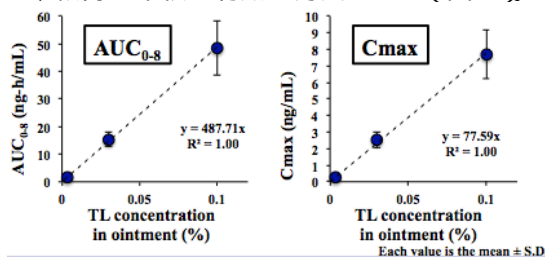


図2 軟膏の希釈とTL全身移行量の関係

バリア能を低下させたラットに対し、さらに起炎剤を適用して急性炎症を作成した場合のTL経皮吸収動態への影響を検討した(図3)。

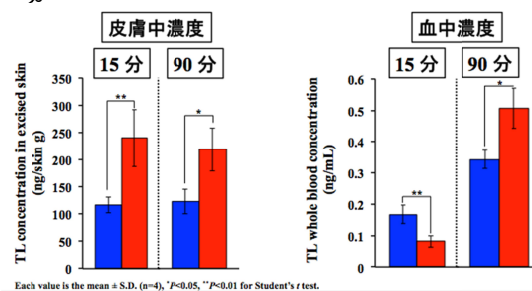


図3 TL皮膚適用後の皮膚中濃度と血中濃度への起炎剤投与の影響；起炎剤投与群(赤)；全て角層は除去してある。

TLの皮膚内濃度においては、起炎剤投与において、いずれも高値であり、これは、TLが血管外に漏出したタンパク質に結合していることによると考えられた。血中濃度への影響は、適用後の時間で異なっており、適用15分では、起炎剤投与群で低値であり、これは、TLが組織で結合することで、全身移行が抑制されたことによると考えられた。90分後には、逆転していることから、この結合は飽和しや

すいと推察される。90分後の高い血中濃度は、炎症による血管透過性の亢進に関係すると考えられる。

Adrの同時投与は、炎症による血流の増加と血管透過性の亢進の両方を抑制すると考えられる。その影響について図4に示す。

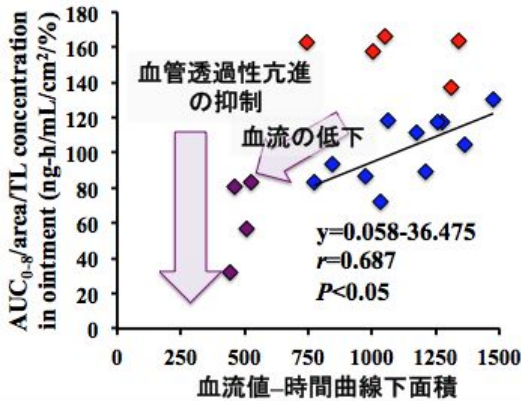


図4 TL皮膚適用後の全身移行へのAdrの影響:角層を除去した皮膚群(青) 帰直線は青のプロットに関するもの;さらに起炎剤を投与した群(赤);赤にさらにAdrを併用した群(紫)

TLの皮膚適用後の全身移行は、Adrの適用による血流速度の低下と血管透過性の亢進の抑制の両方の影響で抑制されていると推察される。

これまでの結果に基づき、TLの皮膚適用において、全身への移行を防いで治療を行うための方法を図5に示す。

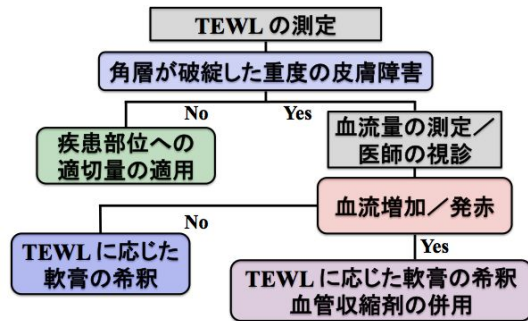


図5 AD治療における安全なTLの皮膚適用のための方法の提案

(2) CyD誘導体によるTLの膜透過動態の制御
図6に研究計画時に設定したロタキサン(PRX)型刺激応答性粒子の概要を示す。

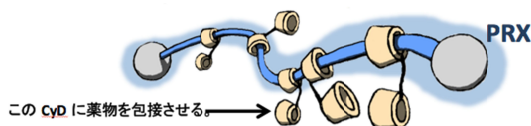


図6 刺激応答性PRX粒子の概要
実際の調製においては、PRXの形成時の反応が進まず、粒子を得ることができなかった。しかし、その過程において、 β -CyDと α -CyDが結合した新規材料を得ることができた。この β -CyD- α -CyD結合体を用いることで、TLの皮膚内の移動過程を制御できる可能性がある(図7)。

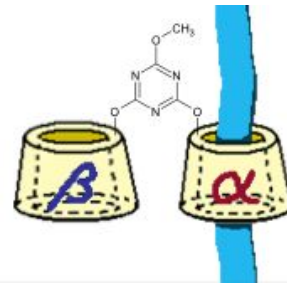


図7 β -CyD- α -CyD結合体とその相互作用
すなわち、 β -CyD部分が線状分子と相互作用し、 α -CyD部分がTLと相互作用することで、TLの皮膚内の移動過程を修飾できると考えた。そこで、各種膜内でのTL移動過程へのCyD誘導体の影響を評価した。また、CyDを皮膚に適用可能な粒子状にする方法についても前もって検討した。

図8に、ジメチル β -CyD(DM- β -CyD)のTL皮膚透過過程への影響を評価した実験方法を示す。

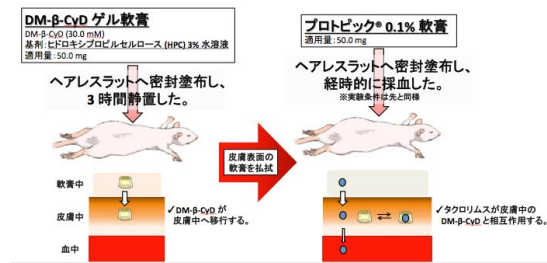


図8 DM- β -CyDのTL皮膚透過過程への影響の実験方法前もって、DM- β -CyDを皮膚に適用し、それを組織内に滞留させることによって、後から適用するTLの移動を制御する実験である。

図9にTLの皮膚適用後の血中濃度へのDM- β -CyD前処理の影響を示す。

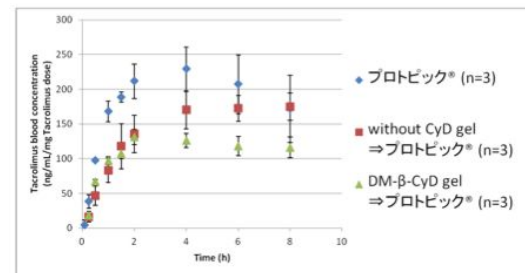


図9 DM- β -CyD前処理によるTL軟膏(プロトピック)適用後の血中濃度への影響

DM- β -CyDの前処理により、TLの全身移行が低下することが示された。TLはDM- β -CyDに包接されるため、皮膚組織内での拡散運動性が低下したと考えられる。DM- β -CyDを含まない軟膏の前処理でもTLの全身移行が低下する傾向があることから、皮膚の水和状態などもTLの皮膚内動態に影響すると考えられる。

この現象をさらに詳細に検討するため、寒天ゲルを利用して模擬真皮組織を作成し、TLの移動動態へのDM- β -CyDの影響を評価した。縦型拡散セルを利用した実験において、DM- β -CyDの同時適用により、TLの透過速度が

低下することが示された(図10)。また、実験終了時の膜内 TL 濃度を測定した結果、TL が DM-β-CyD と複合体を形成し、滞留していることが推察された(図11)。

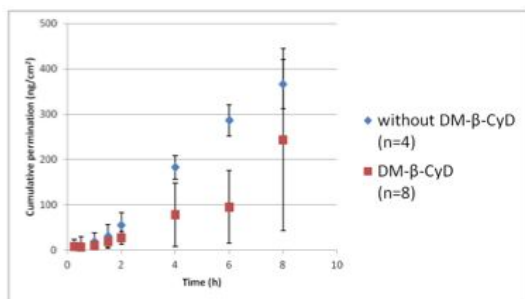


図10 モデル膜のTL透過に及ぼすDM-β-CyDの影響

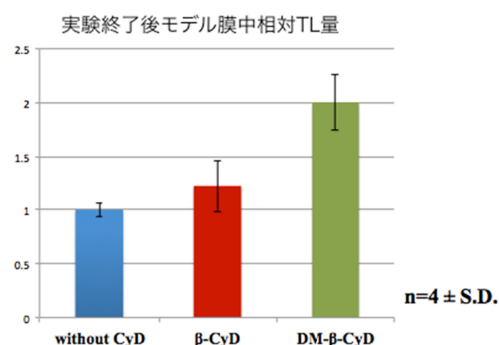


図11 モデル膜へのTL滞留性へのβ-CyD類の影響

今回新たに得られたβ-CyD-DM-β-CyD結合体を利用した実験は、現在進行中である。β-CyD部分がさらに他の分子と相互作用することで、β-CyD部分に取り込まれたTLの移動動態をさらに複雑に制御することが可能になると期待している。また、β-CyD部分に刺激応答の仕組みを組み込むことで、当初の計画のような薬物担体とすることも可能と考えている。

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)

Yutaro Hazama, Toshihisa Maekawa, Ryotaro Miki, Shinji Oshima, Yuya Egawa, Kazuhiro Morimoto, Toshinobu Seki, Effect of physiological changes in the skin on systemic absorption of tacrolimus following topical application in rats, *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 2016, 343-352

Katsunori Shinohara, Miki Yamashita, Wataru Uchida, Chie Okabe, Shinji Oshima, Masahiro Sugino, Yuya Egawa, Ryotaro Miki, Osamu Hosoya, Takashi Fujihara, Yoshihiro Ishimaru, Tohru Kishino, Toshinobu Seki, Kazuhiko Juni, Preparation of poly-pseudorotaxanes composed of cyclodextrin and polymers in microspheres, *Chem. Pharm. Bull.*, 62, 2014, 962-966

〔学会発表〕(計 9件)

田中 雄也、前川 俊久、間 祐太郎、三木 涼太郎、江川 祐哉、関 俊暢、マイクロダイアリシス法による皮膚中タクロリムス濃度の新規測定法に関する検討、第27回マイクロダイアリシス研究会、2016年12月17日、文京区

前川 俊久、間 祐太郎、内田 亘、武井 千弥、小林 由希、三木 涼太郎、大島 新司、江川 祐哉、関 俊暢、タクロリムス皮膚適用後の全身移行性と局所滞留性のラットを用いた評価、日本薬学会第31年会、2016年5月19~21日、岐阜

内田 亘、三木 涼太郎、江川 祐哉、関 俊暢、ポリロタキサン構造を利用した新規薬物担体調製の試み、日本薬学会第136年会、2016年3月27~29日、横浜

間 祐太郎、内田 亘、前川 俊久、三木 涼太郎、大島 新司、江川 祐哉、関 俊暢、アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いたタクロリムス軟膏皮膚適用後の全身および皮膚局所移行性に及ぼす皮膚状態の影響、日本薬学会第136年会、2016年3月27~29日、横浜

間 祐太郎、前川 俊久、Patel Avnish, 三木 涼太郎、大島 新司、江川 祐哉、Lane Majella、関 俊暢、タクロリムス軟膏剤の全身性副作用の回避を目的とした皮膚内吸収動態の検討、日本薬学会第30年会、学生シンポジウムSNPEE2015、2015年5月21-23日、長崎

内田 亘、間 祐太郎、前川 俊久、三木 涼太郎、江川 祐哉、関 俊暢、シクロデキストリンによるタクロリムスの皮膚内動態制御の試み、日本薬学会第135年会、2015年3月26~28日、神戸

前川 俊久、増田 裕行、間 祐太郎、三木 涼太郎、大島 新司、江川 祐哉、関 俊暢、皮膚適用後のタクロリムスの全身吸収への血管収縮剤の影響、日本薬学会第135年会、2015年3月26~28日、神戸

前川 俊久、間 祐太郎、三木 涼太郎、大島 新司、江川 祐哉、関 俊暢、皮膚微小循環の変化がタクロリムス経皮吸収動態に及ぼす影響、第58回日本薬学会関東支部大会、2014年10月4日、町田市

間 祐太郎、増田 裕行、三木 涼太郎、大島 新司、江川 祐哉、関 俊暢、種々炎症モデルヘアレスラットにおけるタクロリムス皮膚内動態の解析、日本薬学会第29年会、2014年5月20~22日、大宮

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

関 俊暢 (SEKI, Toshinobu)
城西大学・薬学部・教授
研究者番号： 60196946

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

三木 涼太郎 (MIKI, Ryotaro)
城西大学・薬学部・助手
研究者番号： 20635437

(4) 研究協力者

間 祐太郎 (HAZAMA, Yutaro)

田中 雄也 (TANAKA, Yuya)

前川 俊久 (MAEKAWA, Toshihisa)

内田 亘 (UCHIDA, Wataru)