

細胞間バリア破壊薬をコーティングした真皮送達型マイクロニードルパッチの開発

岐阜薬科大学 薬学部 生化学研究室

五十里 彰

1. はじめに

塗り薬や貼り薬などの経皮吸収製剤は内服が困難な人でも使いやすく、飲み忘れも防ぐことができるため、乳児や高齢者が利用しやすい薬剤投与方法である。しかし、皮膚には強固な分子バリアが存在し、バイオ医薬品などの高分子化合物や水溶性化合物の吸収効率が低いことが課題である。このバリアは角質層バリアと顆粒層バリアの二重構造である（図 1）。両者のバリア形成因子は異なっており、角質層バリアはヒアルロン酸やコラーゲンなどの保湿因子で、顆粒層バリアは細胞間接着分子のクローディン（CLDN）で形成される。CLDN には 27 種類のサブタイプが存在し、顆粒層に数種類の CLDN サブタイプが発現するが、ノックダウンマウスやヒト病態皮膚を用いた研究により、特に CLDN1 が細胞間バリア分子として重要な役割を果たすことが解明された¹⁾。

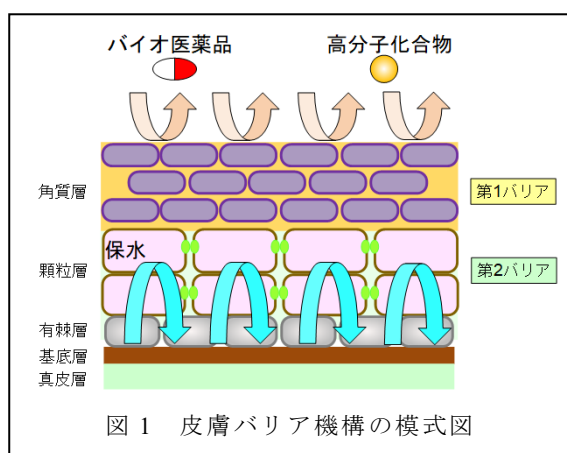


図 1 皮膚バリア機構の模式図

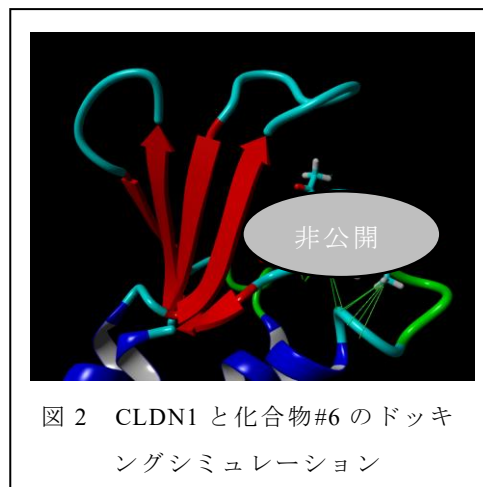
加齢によりヒアルロン酸やコラーゲンなどの合成量が減少し、皮膚の保湿機能が低下する²⁾。そのため、保湿因子が皮膚に直接塗布されるが、ヒアルロン酸やコラーゲンの分子サイズが大きいため角質層・顆粒層バリアを通過することができず、十分な保湿効果が得られない。また、ヒアルロン酸やコラーゲンは顆粒層より下部の真皮層でも機能することが報告されているため³⁾、皮膚の深部まで浸透させる経皮吸収促進法の開発が期待される。

マイクロニードルは 0.1 mm レベルの微細な針で形成され、角質層バリアへの保湿因子の送達を目的として美容業界で利用されている。また、鎮静剤を配合したマイクロニードルパッチが開発され、日本では現在第Ⅱ相臨床試験が実施されている。さらに、ワクチン、インスリン（糖尿病治療薬）、麻酔薬などの経皮投与に向けた研究が進められている。しかし、マイクロニードルパッチは角質層バリアの薬剤透過性を亢進させるが、顆粒層バリアには効果がない。したがって、この課題を解決するには、顆粒層の細胞間バリアの破壊作用をもつ薬剤や器具の開発が必要である。

顆粒層の細胞間バリアを完全に破壊すると、生命の維持が難しくなる。さらに、細菌感染のリスクがあるため、部分的かつ可逆的な破壊が必要である。そこで本研究では、CLDN1 の発現低下作用をもつ薬を探索し、角質層・顆粒層バリア透過型の経皮吸収促進製剤としての有用性を検証した。

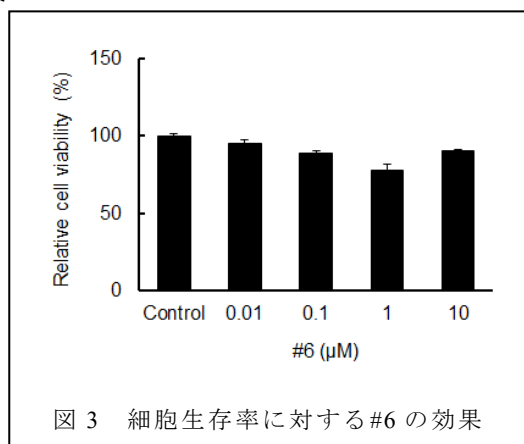
2. CLDN1 の発現低下作用をもつ化合物の探索

CLDN は 4 回膜貫通型タンパク質で、細胞外に 2 つのループ構造を有する。カルボキシ側の第 2 細胞外ループを介して、CLDN はホモフィリックまたはヘテロフィリックに結合する⁴⁾。そこで、CLDN1 の第 2 細胞外ループの結合を阻害することにより、CLDN1 のバリア機能が阻害されると考えた。FDA 承認済化合物ライブラリー(約 1,700 種類)を用いて CLDN1 の第 2 細胞外ループとのドッキングシミュレーションを実施し、CLDN1 への結合が予測される化合物を選出した(図 1)。上位 11 種類の化合物を購入し、その効果を検討したところ、3 種類(#5、#6、#10)に CLDN1 タンパク質の細胞局在の変化が認められた。本研究では化合物#6(特許申請の都合上、化合物名は非公開)に着目して検討を行った。

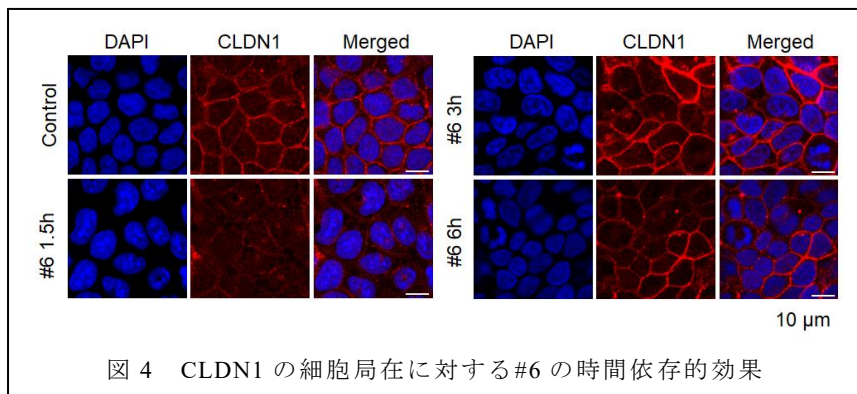


3. CLDN1 の細胞局在に対する化合物#6 の効果

ヒト表皮由来 HaCaT 細胞を用いて、WST-1 assay により細胞毒性を評価したところ、化合物#6 は 0.01 ~100 μM の濃度において大きな毒性を示さなかった(図 3)。蛍光免疫染色法により CLDN1 タンパク質の細胞局在を調べたところ、細胞隣接部位のタイトジャンクションに分布していた CLDN1 は、10 μM #6 の 1.5 時間処理により局在量が減少した(図 4)。3 時間および 6 時間処理によりタイトジャンクションにおける局在が回復したことから、#6 の作用は一過性であることが示された。一方、CLDN4 の細胞局在は、#6 処理によって大きく変化しなかったことから、#6 は CLDN1 に選択的に作用することが示唆された。



次に、CLDN1 の mRNA 量とタンパク質量に対する#6 の効果を検討した。リアルタイム PCR 解析において、10 μM #6 の 1.5 時間および 6 時間処理により CLDN1 mRNA 量は有意に変化しなかった。ウエスタンブロット解析において、



同様の結果が得られた。以上の結果から、10 μM #6 の 1.5 時間処理により、CLDN1 のタンパク質量は変化しないが、タイトジャンクションにおける局在量が減少することが示唆された。

3. 化合物#6 の作用機序

#6 処理により CLDN1 の mRNA 量やタンパク質量は変化しなかったが、タイトジャンクションにおける局在量が減少したため、タイトジャンクションにおける安定性の低下が示唆された。これまでに我々は、CLDN の細胞内取り込みにクラスリン依存性エンドサイトーシス機構が関与することを報告した。そこで、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤であるモノダンシルカダベリン (MDC) の効果を検討したところ、タイトジャンクションにおける CLDN1 の局在量が回復した (図 5)。一方、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤であるメチル- β -シクロデキストリン (M β CD) は阻害効果を示さなかった。以上より、#6 は CLDN1 のクラスリン依存性エンドサイトーシスを促進し、タイトジャンクションにおける局在量を低下させることが示唆された。CLDN の細胞局在はリン酸化やニトロ化などの翻訳後修飾によって制御される。CLDN1 の翻訳後修飾に対する #6 の効果を検討したが、スレオニンリン酸化量とニトロ化チロシン量は有意に変化しなかった。そのため、エンドサイトーシスの促進機構は、さらに検討する必要がある。

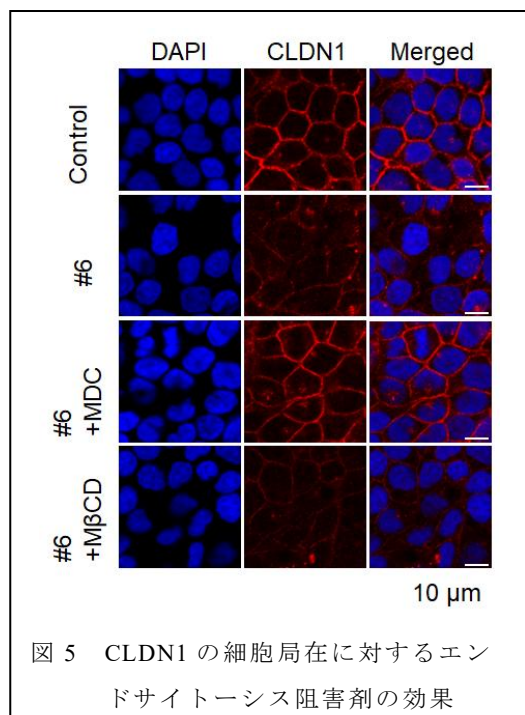


図 5 CLDN1 の細胞局在に対するエンドサイトーシス阻害剤の効果

4. 細胞間バリア機能に対する化合物#6 の効果

細胞間バリア機能を評価するため、HaCaT 細胞をトランスウェルに培養し、上皮膜間電気抵抗値 (TER) と水溶性低分子化合物であるルシファーイエロー (LY) の透過性を調べた。化合物#6 の 1.5 時間処理により TER が低下した。この効果は MDC の共処理によって阻害されたが、M β CD では阻害されなかった。同様に、化合物#6 の 1.5 時間処理により LY 透過性が増大し、この効果は MDC の共処理によって阻害された。これらの変化は、CLDN1 の細胞局在変化と一致したため、#6 による細胞間バリア機能の低下に、CLDN1 の局在変化が関与することが示唆された。

5. ヒト 3 次元表皮モデルにおける化合物#6 の効果の検証

培養細胞を用いて化合物#6 の効果が明らかになったため、ヒト 3 次元培養表皮の LabCyte EPI-MODEL 24 (株式会社ジャパン・ティッシュエンジニアリング) を用いて、化合物 #6 の効果を検討した。Volt ohmmeter を用いて TER を測定した

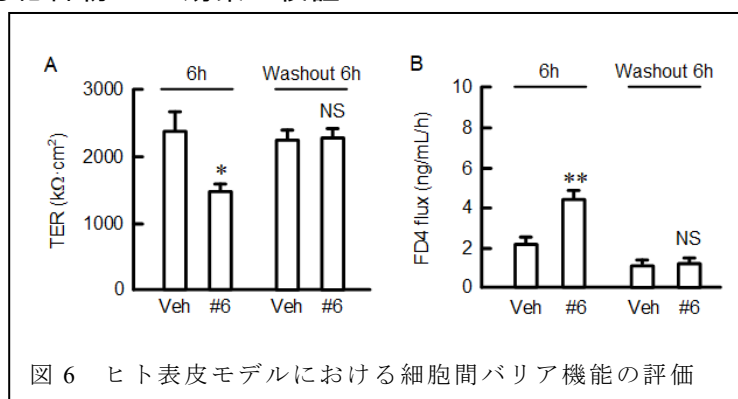


図 6 ヒト表皮モデルにおける細胞間バリア機能の評価

ところ、化合物#6 処理により TER が低下し、除去 6 時間後の細胞では元の状態に回復した（図 6）。次に、皮膚組織表面側となる培養カップ内側に FITC 標識デキストラン 4,000（FD4）を添加し、1 時間後に体内側となるアッセイプレートの溶液を回収した。その結果、化合物#6 処理により FD4 透過性が増大し、除去 6 時間後の細胞では元の状態に回復した。以上の結果から、化合物#6 は 3 次元培養表皮のバリア機能を低下させ、分子量が 4,000 程度の化合物の透過性を亢進させることが示された。

6. マウスにおける化合物#6 の効果の検証

化合物#6 の効果を生体で検証するため、C57BL/6J 雄性マウスを用いて、皮膚透過性実験を行った。マウス背部皮膚に、水（コントロール群）または化合物#6 を浸漬したパッチを貼り付け、FD4 の透過性を測定した。コントロール群において CLDN1 は主に細胞膜周辺に分布していたのに対し、化合物#6 の 6 時間処理群において CLDN1 は細胞質にも拡散して分布していた（図 6）。化合物#6 の可逆性を評価するため、除去してから 6 時間後に観察したところ、CLDN1 は主に細胞膜周辺に分布した。CLDN1 を免疫染色した同一のサンプル

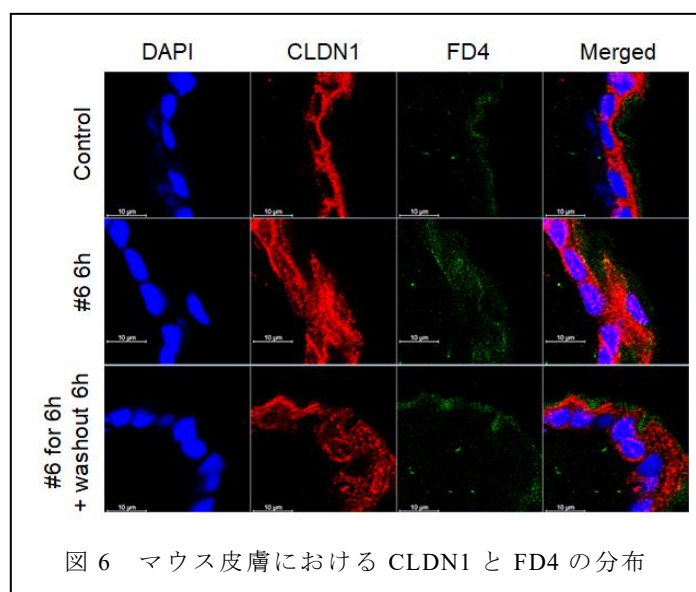


図 6 マウス皮膚における CLDN1 と FD4 の分布

で FD4 の透過性を調べたところ、コントロール群において FD4 は主に角質層に分布していたのに対し、化合物#6 の 6 時間処理群において顆粒層の CLDN1 と共局在する FD4 の分布量が増加した。以上の結果から、化合物#6 は CLDN1 の細胞局在を変化させ、FD4 の透過性を亢進させることが示唆された。しかし、皮膚深部への透過は観察されなかったため、処理濃度や処理時間などを再検討し、条件の最適化が必要である。

7. まとめ

本研究では、マイクロニードルパッチの高機能化を目的として、経皮吸収促進剤を探索した。実験を通じて、化合物#6 が顆粒層の細胞間バリア機能を低下させ、パッチに浸漬した化合物の皮膚透過性を亢進させることを示した。化合物#6 を用いることにより、皮膚深部への水溶性化合物や高分子化合物の送達が可能になると期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、天野工業株式会社から多大なご支援を頂きました。ここに記して感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., Tsukita, S., "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice," *J Cell Biol*, vol. 156, pp. 1099-1111, 2002.
- 2) Baumann, L., "Skin ageing and its treatment," *J Pathol*, vol. 211, pp. 241-251, 2007.
- 3) Vinshtok, Y., Cassuto, D., Belenky, I., "Pneumatic Delivery of Hyaluronan for Skin Remodeling: A Comparative Review," *J Drugs Dermatol*, vol. 19, pp. 170-175, 2020.
- 4) Schlingmann, B., Overgaard, C.E., Molina, S.A., Lynn, K.S., Mitchell, L.A., Dorsainvil White, S., Mattheyses, A.L., Guidot, D.M., Capaldo, C.T., Koval, M., "Regulation of claudin/zonula occludens-1 complexes by hetero-claudin interactions," *Nat Commun*, vol. 7, pp. 12276, 2016.