

簡便かつ非侵襲的皮膚アレルギー治療に有用な 経皮吸収オリゴ DNA の開発

研究代表者：伊保 澄子（医学部 助教）

電話：0776-61-8671、メールアドレス：ihosumik@u-fukui.ac.jp

共同研究者：番戸 博友（日華化学株式会社 グループリーダー）

猪爪 優子（日華化学株式会社 主任研究員）

概 要	本研究は、皮膚の免疫調節を介し、簡便かつ非侵襲的に扱える、皮膚アレルギー治療法を開発するものである。本学において開発された免疫刺激オリゴ DNA G91 (特許第 3976742 号) には、アレルギーモデルマウスにおいて、皮膚アレルギーの発症を抑制する作用がある。その外用療法を確立するため、本年度は、ヒトの表皮モデルを用いて、G91 の表皮通過を 2 倍以上増強する薬物送達システムキャリアの検討を行った。G91 単独の表皮通過率は低く、G91 をリボソームで包含すると通過はさらに抑制された。キャリア A は表皮の外から内へ水分を通過させることが示された。このキャリア A を媒体にすると G91 の表皮通過量がやや増加した。キャリア A の成分及び G91 の構造の改良により、吸収効率のよい経皮吸収オリゴ DNA が創出可能と思われる。
関連キーワード	皮膚アレルギー、CpG DNA、DDS、IFN- α 、形質細胞様樹状細胞

研究の背景

近年、アレルギー疾患保有者数は増加の一途を辿っている。その背景には感染症罹患率の減少が一因としてあると考えられ、疫学調査では結核感染とアレルギーの発症に負の関係が認められている。BCG ワクチンのアレルギー発症予防効果も報告されており、その機序として、BCG 投与によって増強した Th1 免疫が、アレルギー発症の免疫学的要因である Th2 偏奇を是正することが提唱されている。

本学において開発された G91 は、パリンδροーム様配列 GACGATCGTC の 5 末端側にグアニンカルテットを有する 20 鎖の BCG ゲノム疑似免疫刺激オリゴ

DNA (CpG DNA) である。ヒトとマウスに、形質細胞様樹状細胞の TLR9 を活性化して、IFN- α の産生を誘導する特徴がある。マウス耳介皮下への投与では、投与箇所の皮膚組織に Th1 免疫が誘導され、アレルギー性皮膚炎の発症が 80% 以上抑制される (本学重点研究成果集 2006、2007；産学官連携本部企業支援部年報 2008；地域共同研究センター年報 2007)。ヒト細胞の試験管内アレルギー反応も、形質細胞様樹状細胞の活性化と Th1 免疫の増強を伴って抑制されることから、G91 は、免疫調節を介したアレルギーの発症予防・治療技術の開発に有用と思われる。

研究の目的

本研究は皮膚の免疫調節を介した非侵襲的アレルギー治療法を開発するものである。

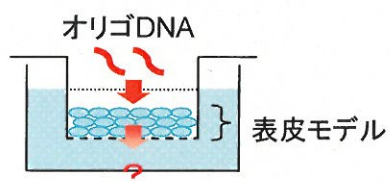
CpG DNA はアレルギー治療に有望と考えられ、国内外で研究が進められている。しかし最近、ヌクレアーゼの活性に耐性のある S 化 CpG DNA は、マウスに全身投与すると、重篤な副作用を引き起こすことが報告されてきた。これに対し、ホスホジエステル結合からなる G91 は、皮膚投与マウス、経鼻投与マウスのいずれにおいても副作用の発生は認められず、実用化が期待できる。

アレルギーの治療は、患者 QOL の観点から安全で痛みを伴わず簡便に扱える方法が望ましい。そのためには、皮膚外用療法が適切であると思われるが、G91 の正常皮膚への吸収は悪い。そこで研究者らは、経皮吸収効率のよい G91 剤剤の開発を計画した。経皮吸収型 G91 が実用化されると、皮膚アレルギー保有者が日常生活を営みながら自宅で安全かつ簡便に扱うことが可能になる一方、使用のオン・オフも容易になる。また、G91 の経皮吸収技術は、新興・再興感染症や癌のワクチン創製にも応用し得るため、社会的・経済的効果も期待できる。

本年度は、G91 の経皮吸収を促進する薬物送達システム(以下 DDS)キャリアを検討する。

研究の成果

G91 の経皮吸収を促進する DDS キャリアの候補、白色ワセリン、リポソーム、開発中のキャリア A のそれぞれについて、G91 との混液を作成した。混液をヒトの表皮モデル(下図)の上層へ加えて 37℃ で培養した。24 時間後に、上層、下層、それぞれの溶液を回収して G91 の濃度を測定し、表皮モデルの上層から下層へ移動した量を指標に、G91 の表皮通過能を評価した。本年度は、G91 単独の通過を 2 倍以上増強する DDS キャリアの確立を目指した。回収した表皮モデルは MTT 染色を行い、細胞生存率を測定した。



G91 と DDS キャリアの混液の免疫刺激活性は、健康成人の末梢血から分離した形質細胞様樹状細胞の IFN- α 産生を指標に評価した。ヒト血液を用いた研究は、福井大学医学部倫理審査委員会にて承認された事項を順守し実施した。

軟膏基剤として使用される白色ワセリンは G91 の IFN- α 誘導活性を抑制した。そこで、細胞膜と同様にリン脂質から構成されるリポソームで G91 を包含し、G91 の表皮通過能を測定した。G91 は単独でもわずかながら表皮を通過したが、リポソームで包含すると通過は抑制された。

キャリア A を表皮モデルの上層に加えると水分が表皮を通過して下層へ移動した。その移動に伴い G91 の通過もやや増加したが、目標値の 2 倍を超えることはできなかった(図 2)。

G91 の抗アレルギー効果を効率よく得るためには、キャリア A の成分または G91 の構造を改良して、G91 の経皮吸収率を上げる必要があると思われる。

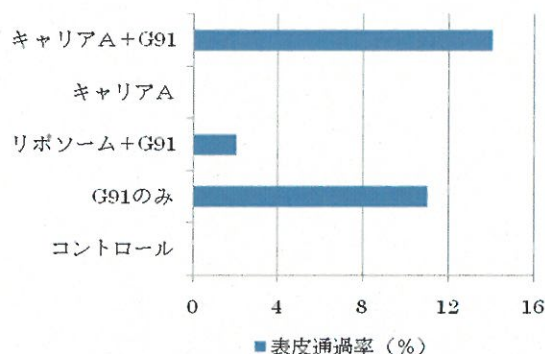


図 1. G91 の経皮吸収試験 (いずれの条件も細胞生存に影響を与えなかった)

G91 が経皮吸収されると、皮膚の形質細胞様樹状細胞が活性化され、結果皮膚の Th1 免疫が強化されて Th2 免疫とのバランスが改善され、皮膚アレルギーの発症が抑制されると予想される。経皮吸収型オリゴ DNA は国内外に報告がなく、その確立はステロイド対症療法にかわる新しいアレルギー治療法を創出し得ると思われる。

特記事項・発表論文など

「特記事項」

G91 は米国特許が認可された(W02005/083076A1)。皮膚モデル試験は日華化学株式会社にて、pDC 活性化の評価は福井大学で行った。

「本研究に関わる発表論文」

1. Iho, S., Osawa, Y., Takatsuka, H., Maeyama, JI., Kitagawa, H., Matsuki, T., Yamamoto, S. Unique characteristics of palindromic CpG-oligodeoxynucleotide. In BCG vaccine and adjuvant (in press).
2. Hosono, N., Iho, S., Kishi, S., Urasaki, Y., Yoshida, A., Kurooka, H., Yokota, Y., Ueda, T. Glutathione S-transferase M1 inhibits dexamethasone-induced apoptosis in association with the suppression of Bim through dual mechanisms in a lymphoblastic leukemia cell line. Cancer Sci (in press).
3. Maeyama, JI., Iho, S., Komiyama, T., Takahashi, M., Matsuki, T., Yamamoto, S. Newly-identified phospho-diester CpG-DNA has mucosal adjuvant activity by intranasal administration with diphtheria toxoid. 14th International Congress of Immunology, Aug. 22-27, 2010, Kobe (submitted).
4. 大澤陽子、伊保澄子、藤枝重治. 先端医学講座：花粉症に対する DNA ワクチン療法. アレルギーの臨床. 27(12):965-969, 2007.
5. Osawa, Y., Iho, S., Takauji, R., Takatuka, H., Yamamoto, S., Takahashi, T., Horiguchi, S., Urasaki, Y., Matsuki, T., Fujieda, S. Collaborative action of NF- κ B and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN- α and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. 177(7): 841-4852, 2006.