

博士学位論文

タクロリムス封入リポソームとイオントフォレシス

を組み合わせた効果的な乾癬治療法の開発

Development of an effective psoriasis treatment  
by combining tacrolimus-encapsulated liposomes and iontophoresis

徳島大学大学院薬学研究科 創薬科学専攻

博士後期課程 3 年

衛生薬学分野

中村 聖子

# 目次

第1章 序論	3
第2章 ItP時の微弱電流処理が皮膚に及ぼす影響の検討	6
2.1. ItPについて	
2.2. 実験方法	
2.3. 実験結果及び考察	
第3章 FK506封入リポソーム製剤の調製とItPによる皮内送達	14
3.1. リポソームの調製と粒子径、ゼータ電位及びFK506封入率の評価、並びにItPによる皮内送達の評価	
3.2. 実験方法	
3.3. 実験結果及び考察	
第4章 乾癬モデルラットに対するFK-Lipo/ItPの治療効果の検討	20
4.1. 乾癬モデルラットの作成とFK506-LipoのItP	
4.2. 実験方法	
4.3. 実験結果及び考察	
第5章 総括	29
参考文献	30
謝辞	33

## 略語一覽

cDNA:	complementary DNA
CH <sub>3</sub> CN:	Acetonitrile
DCP:	Dicetyl Phosphate
DDS:	Drug Delivery System
DiI <sub>C18</sub> :	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate
EPC:	Egg Phosphatidylcholines
FKBP:	FK506 binding protein
GAPDH:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HE:	Hematoxylin and Eosin
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
IL:	Interleukin
IMQ:	Imiquimod
ItP:	Iontophoresis
mRNA:	messenger RNA
mTOR:	mammalian target of rapamycin
ODS:	OctaDecyl Silyl
PBS:	Phosphate-Buffered Saline
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PD-10:	Disposable Desalting-10
PDI:	Poly Dispersity Index
QOL:	Quality of life
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA:	small interfering RNA
TGF:	Transforming Growth Factor
THF:	Tetrahydrofuran
TLR7:	Toll-like receptor 7
TNF- $\alpha$ :	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

## 序論

乾癬は、世界で最も一般的な皮膚疾患の一つであり、慢性の T 細胞介在性自己免疫疾患である。我が国の乾癬患者数は約 50～60 万人（人口の約 0.4～0.5%）と少ないものの、欧米における患者数は多く、先進国で報告されている乾癬の発症率は 0.09～11.4%であり、全世界では少なくとも 1 億人が罹患している疾患である。しかし、近年は研究が進み、乾癬の発症メカニズムに関する知見が集積されている。遺伝的もしくは環境的な要因により、皮内の免疫細胞が異常に活性化され、腫瘍壊死因子（TNF）- $\alpha$ などのサイトカインが過剰発現する。それによって、表皮細胞や上皮細胞が増殖し、真皮の新生血管形成が誘導される。乾癬には、紅斑、肥厚、鱗屑、落屑などの症状があり、長期に渡る治療が必要となるため、患者の QOL は大きく影響を受ける<sup>1,2)</sup>。

乾癬の治療法には光線療法、全身療法の他に、近年新たな治療薬として抗体医薬品が承認されている。例えば、抗 TNF- $\alpha$  抗体医薬のインフリキシマブ（レミケード®）、アダリムマブ（ヒュミラ®）などが臨床適用され、既存療法で症状改善できない患者に対しても十分な効果を生み出している。しかし、投与された抗体医薬品の全身への非特異的分布により、感染症や悪性腫瘍発現の割合が高いことが報告されている<sup>3,4)</sup>。また、抗体医薬品の投与方法も問題である。すなわち、皮下注射が必要なため、痛みを伴うだけでなく、注射針の挿入による皮膚刺激は炎症を悪化させる可能性もある。このように、乾癬治療法に関する研究は進歩しているが、課題もまだ残されているため、外用療法が依然として第一選択療法である。現在、ステロイド、ビタミン D 及び免疫抑制剤の塗り薬が汎用されている<sup>5)</sup>。しかし、表皮の角質層はバリアとして働いているため<sup>6)</sup>、薬剤の皮内浸透は容易ではない<sup>7)</sup>。経皮吸収における薬物送達を促進するため、様々な方法が開発されている。すなわち、吸収促進剤で皮膚を処理することで浸透性を促進する化学的促進法<sup>8)</sup>と、電気や超音波などの物理的刺激を用いて皮膚の透過性を高める物理的促進法<sup>9)</sup>に大別される。物理的促進法のうち、イオントフォレシス（Iontophoresis : ItP）は、皮膚表面で微弱電流（0.3～0.5 mA/cm<sup>2</sup>）を印加することにより荷電性薬物を皮内に浸透させる技術である<sup>10)</sup>（Fig. 1）。

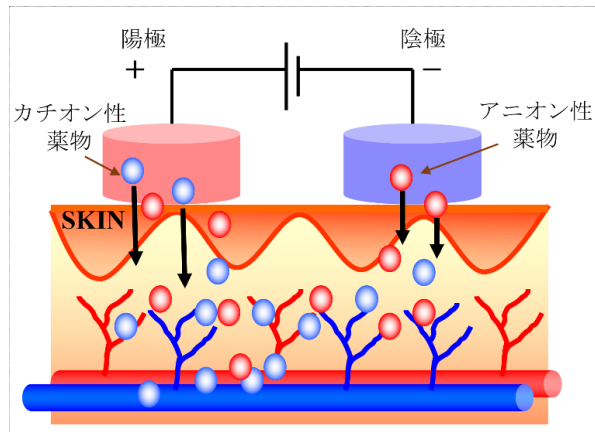


Fig. 1 ItP の概要

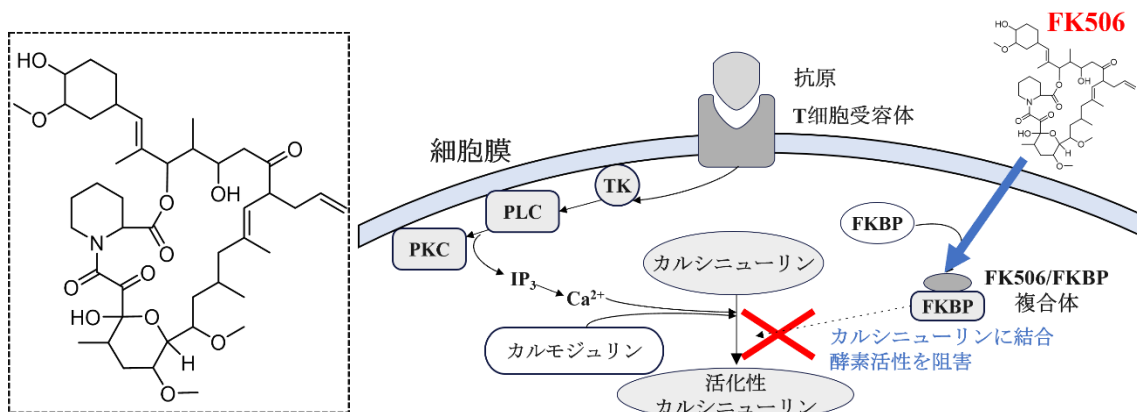


Fig. 2 FK506 の構造式と作用機序

ところで、タクロリムス (FK506) はマクロライド系の免疫抑制剤である (Fig.2) <sup>11)</sup>。FK506 は、生体内で FK506 結合蛋白質 (FKBP) と FK506/FKBP 蛋白質複合体を形成し、T 細胞の活性化に關与するカルシニューリンを不活性化させる <sup>12)</sup>。その結果、サイトカイン遺伝子転写のカスケードを阻害することや T 細胞の増殖を司る mTOR の作用を抑制することにより免疫抑制作用を發揮する (Fig.2) <sup>13)</sup>。FK506 は、その有効性により乾癬治療において広く用いられており、軟膏製剤の商品名プロトピックとして、市販されている。しかし、プロトピックの吸収率が低いことや皮膚深層への薬物送達が十分ではないことが報告されている <sup>14,15)</sup>。その原因として、FK506 の分子量が 500 Da 以上あり、角質層からの吸収効率が低いことが挙げられる <sup>16)</sup>。FK506 の吸収率を上げる手段として申請者は ItP に着目したが、FK506 は電荷を有していないため荷電性の薬物担体が必要であると考えた <sup>17)</sup>。さらに、FK506 は難水溶性であり水系に溶解・懸濁できず取り扱いが煩雑であることから、FK506 を水に分散できるような製剤化が必要であると考えた。これらの問題点を解決できるものとしてリポソームに着目した。我々の研究グループはこれまでに、ItP によるインスリン封入リポソームの皮内送達に成功しており <sup>18)</sup>、この経験に基づき、FK506 封入リポソームを ItP により皮内送達することで、乾癬病態における FK506 の治療効果を向上できるのではないかと考えるに至った。

そこで本研究では FK506 をリポソーム製剤化 (FK-Lipo) するとともに、ItP と併用することによる乾癬治療を検討した。

第 2 章では、皮膚に対する ItP の影響を検討した。ItP の微弱電流処理によって細胞間隙が開裂することで物質が皮内に浸透できることが過去の検討から明らかになっている。そのとき微

弱電流が、細胞シグナル系を活性化することが明らかになっているため<sup>19)</sup>、炎症性サイトカインなどの発現量を増加させることで乾癬が悪化してしまう可能性が危惧された<sup>20)</sup>。そこで、まず ItP が皮膚に及ぼす影響を検討した。

第 3 章では、脂質膜水和法によりリポソーム製剤を調製し、粒子径、表面電荷、薬物封入率など、物理的及び化学的特性を評価した。さらに、ItP によるリポソーム製剤の皮内浸透を検討した。

第 4 章では、乾癬誘発モデル皮膚に対する FK-Lipo の ItP による治療効果を調べるため、FK-Lipo の ItP 後の皮膚における炎症性サイトカインの発現レベル、及び炎症誘発性表皮肥厚化に対する影響を評価した。

# 本論

## 第2章 ItP時の微弱電流処理が皮膚に及ぼす影響の検討

### 2.1. ItP について

薬物の投与方法には経口、注射、経皮などが存在し、様々な利点と欠点がある。経口投与は服用が容易なため、最も汎用される方法であるが、肝初回通過効果により代謝を受けるため生体利用率は低くなる。注射投与の場合、肝初回通過効果を回避できるが、侵襲的であり、急激な薬物濃度上昇が問題となる場合もある。それに対して、経皮投与は一般に非侵襲的であるとともに、肝初回通過効果を回避できることや安定した血中濃度を維持できること、特に標的部位に局所投与できることにより、良好な治療効果が見込まれる。その一方で、経皮投与可能な薬物は皮膚角質層を浸透可能な脂溶性低分子に限られると考えられており、また皮膚浸透速度が遅い点も問題である。これらの点を解決する手段として ItP が注目されている。

ItP は、物理的経皮薬物浸透促進技術であり、微弱電流 ( $0.3\sim 0.5\text{ mA/cm}^2$ ) を用いて荷電性薬物を皮内に浸透させることができる。ItP では、皮膚表面に薬物溶液を浸漬させた不織布などを設置し、その上に電極を貼付することで電流を印加し、電気的反発力とイオンの移動に伴う水の流れ（電気浸透流）によって薬物を皮内に浸透させると考えられている。米国においては、リドカインなどの局所麻酔薬の急速経皮投与方法として承認されている。ItP は、「非侵襲的」であり、「投与途中での浸透中止が可能」などの利点を有しているが、適応可能な薬物が疎水性で低分子であり、さらに電荷を有するものに限定されると考えられてきた<sup>21)</sup>。ところが、申請者の所属する研究室においては、親水性高分子である siRNA を ItP で皮内投与し、特定の遺伝子発現をノックダウンすることに成功している<sup>22)</sup>。他にも、CpG オリゴ DNA などの核酸や抗体医薬など種々の高分子の皮内送達に成功している。さらに、その作用機序については、ItP 時の微弱電流により皮膚組織の細胞間隙が開裂するとともに、細胞内取り込みが促進されることが明らかになっている。これらの組織・細胞生理の変化は、微弱電流によって細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入することで細胞内シグナル伝達系が活性化されることが原因であることが示唆されている<sup>23)</sup>。すなわち、ItP において組織・細胞が微弱電流刺激を受けることで細胞シグナル伝達などの様々な反応が活性化されることが予想され、それによって乾癬などの炎症性皮膚疾患を増悪させてしまう可能性が危惧された。

そこで本研究では、ItP 時の微弱電流刺激による炎症性皮膚疾患増悪の可能性の有無を検証するために、ItP の皮膚に及ぼす影響を検討することとした。具体的には、微弱電流が細胞シグナル伝達系を活性化することで炎症などが惹起される可能性を調べるために、種々の炎症性サイトカインの mRNA 発現及び皮膚組織の形態学的変化に対する影響を検討した。対象としたサイトカインはインターロイキン (IL) -6、IL-10、形質転換因子 (TGF) - $\beta$  及び TNF- $\alpha$  を選択した。それらはいずれも炎症に深く関与する因子であるため、その変動を評価することで皮膚における炎症惹起の可能性を判断できると考えた。また、ItP 処理後の皮膚切片における表皮層の形態学的変化 (肥厚化) を観察することによっても、炎症などを評価できると考え、検討を行った。



## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 動物と実験材料

Wistar ラット (7 週齢、雄) は日本 SLC 株式会社 (静岡、日本) より購入した。購入後、固形飼料と水を自由に摂取させ、午後 7 時から午前 7 時まで消灯する環境で飼育した。実験動物の取り扱い、徳島大学動物実験管理規則に則って行った。NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> はナカライテスク株式会社 (京都、日本) より購入し、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> は関東化学株式会社 (東京、日本) より購入した。イソフルランおよびトリクロロアセトアルデヒド水和物 (クロラール水和物) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) より購入した。動物吸入麻酔器 (SMALLANIMALANESTHETIZER TK-40) はバイオマシナリー株式会社 (千葉、日本) のものを使用した。テルモシリンジ (2.5 mL)、テルモ注射針 (23G) はテルモ株式会社 (東京、日本) より購入した。Tissue-Tek® O.C.T. コンパウンド、Tissue-Tek® クリオモールド 3 号はサクラファインテックジャパン株式会社 (東京、日本) より購入した。スライドガラス、カバーガラスは松浪硝子工業株式会社 (大阪、日本) より購入した。クライオスタットは Leica Microsystems GmbH (Wetzlar、ドイツ) の CM3050S を使用した。TaKaRa BioMasher Standard (Sterile)、5×PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)、TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、Forward Primer、Reverse Primer、Sealing Film for Real Time はタカラバイオ株式会社 (滋賀、日本) より購入した。PCR プライマーはユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京、日本) より購入した。Nano Drop 8000 は Thermo Fisher 株式会社 (Waltham、米国) より購入した。遠心機はトミー精工株式会社 (東京、日本) の微量高速冷却遠心機 MX-160 を使用した。Real-Time PCR 装置はタカラバイオ株式会社の Thermal Cycler Dice® Real Time System III を使用した。微弱電流処理装置は Transcutaneous Technologies 株式会社 (東京、日本) の 3 チャンネル定電流装置を使用した。医療脱脂綿は川本産業株式会社 (大阪、日本) より購入した。Ag-AgCl 電極はレッドダット™ 心電図検査用電極 2360 を使用し、3M 社 (St. Paul、米国) より購入した。DC ケーブルはテイシン電機株式会社 (埼玉、日本) より購入した。MOUNTANT PERMAFLUOR は Thermo Fisher Scientific (MA、米国) より購入した。RNeasy Plus Midi Kit、Allprotect Tissue Reagent、Tissue Ruptor II、QIAzol Lysis reagent は Qiagen 株式会社 (ヒルデン、ドイツ) より購入した。倒立型蛍光顕微鏡は BZ-9000 (Keyence、大阪、日本) を使用した。

### 2.2.2. 試薬の調製

PBS 溶液は NaCl (40 g)、KCl (1 g)、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 g)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g) を脱イオン水 500 mL に溶解し、20 分間スターラーを用いて攪拌したのち、10 倍希釈して調製した。

### 2.2.3. ItP

Wistar ラットにイソフルラン吸入麻酔を行い、50 mg/mL 抱水クロラール PBS 溶液を腹腔内に投与した (1.6 mL/200 g)。ラットの四肢を固定して背部の毛を剃り、露出した背部皮膚上に脱脂綿を貼り付け、その上から Ag-AgCl 電極を設置した。その後陽極 (Anode,+)、陰極 (Cathode,-) の脱脂綿に PBS を染みこませて微弱電流処理 (0.34 mA/cm<sup>2</sup>) を 1 時間行った。無処理群の皮膚にも同様に PBS を染みこませた脱脂綿を置き、電流をかけずに 1 時間静置した。ItP 処理を終了してから 3 時間後と 24 時間後にラットを安楽死させ、脱脂綿の下から 200~250 mg の皮膚を採取した。

### 2.2.4. RNA 抽出と逆転写

各群から採取した皮膚サンプルを Allprotect Tissue Reagent に浸し、抽出前に RNA を安定化させた。次に、Tissue Ruptor II を用いて、採取した皮膚を 5 mL の QIAzol Lysis 試薬の中でホモジナイズした。室温で 5 分間静置してから RNeasy Plus Midi Kit のプロトコールに従い、RNA を抽出した。Nano Drop 8000 で  $\lambda=260,280$  nm における吸光度から RNA 濃度を測定した。氷上で 200 ng 相当の total RNA と 2  $\mu$ L の 5 $\times$  PrimeScript RT Master Mix を混合し、RNase free water を添加して総量 10  $\mu$ L とした。MJ Mini Personal Thermal Cycler を用いて 37 °C で 15 秒間、85 °C で 5 秒間加熱し、cDNA を作製した。

### 2.2.5. Real time-PCR 法による mRNA の定量

プライマーの配列を Table. 1 に示した。TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 12.5  $\mu$ L、Forward Primer 0.2  $\mu$ L、Reverse Primer 0.2  $\mu$ L、RNase free water 10.1  $\mu$ L を混和し、PCR 反応液を調製した (計 23  $\mu$ L)。各種炎症性サイトカイン、内在性コントロール遺伝子 GAPDH それぞれに対して PCR 反応液を調製した。MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 mL) のウェル 1 箇所に対し、作製した cDNA 溶液 2  $\mu$ L と PCR 反応液 23  $\mu$ L を氷上でアプライした。1 種類

の PCR 反応液について、1 種類の cDNA を 3 箇所アプライした。アプライ後、Sealing Film for Real Time を天面に貼り、スピンドウンしてから Thermal Cycler Dice® Real Time System III を使用して Real-time PCR 反応を行った (95 °C で 30 秒間の熱処理後、熱変性を 95 °C で 5 秒間、60 °C で 30 秒間という条件で 40 回繰り返す)。さらに、95 °C で 15 秒間、60 °C で 30 秒間、95 °C で 15 秒間の条件で解離曲線解析をした。IL-6、IL-10、TGF-β、TNF-α の mRNA 量は  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法で定量化した。

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
GAPDH	CCCCCAATGTATCCGTTGTG	TAGCCCAGGATGCCCTTAGT
IL-6	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
IL-10	GCCTGCTCTTACTGGCTGGA	TCTGGCTGACTGGGAAGTGG
TGF-β	AGATTCAAGTCAACTGTGGAG	AAGCCCTGTATTCCGTCTC
TNF-α	CGTAGCAAACCACCAAGCA	CCCTTGAAGAGAACCTGGGAGTA

Table.1 プライマーの配列

## 2.2.6. 組織切片の作成とヘマトキシリンエオジン (HE) 染色による皮膚の組織学的な観察

採取した組織を、Tissue-Tek® O.C.T.コンパウンドを満たした Tissue-Tek® クリオモールド 3 号に皮膚の縦断面を観察できるように包埋した。クライオスタットを用いて 10 μm の凍結皮膚切片を作成した。

4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液に 10 分間浸したラットの皮膚切片を PBS で洗浄した。次に、マイヤーヘマトキシリン溶液を添加して室温で 10 分間インキュベートし、紫色から青色に変化するまで流水で洗浄した。0.125%エオシン Y 溶液を添加して室温で 1 分間インキュベートした。その後、80~100%エタノールに浸漬し、脱水した組織をキシレンに浸漬させ、組織内のエタノールを除去した。疎水性マウント剤 Entellan® New でマウントし、カバーガラスで封入し、倒立型蛍光顕微鏡 BZ-9000 を使い、皮膚の組織学的な観察をした。

### 2.3. 実験結果及び考察

本章では、ItP による皮膚組織の炎症性サイトカインの発現変動の有無と、皮膚の形態学的変化に対する影響を検討した。

ItP の皮膚に対する影響を評価するために、ItP 後の IL-6、IL-10、TGF- $\beta$  及び TNF- $\alpha$  の mRNA 発現レベルを Real time-PCR 法で測定し、その変化によって、皮膚の炎症状態を評価した (Fig. 3)。これらのうち、IL-6、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  は主要な炎症性サイトカインとして作用し、IL-10 は主に抗炎症作用を担っている<sup>24)</sup>。さらに、TNF- $\alpha$  は乾癬の重症度に関係しており、乾癬治療の標的として考えられている<sup>25)</sup>。検討の結果、通常条件 (0.34 mA/cm<sup>2</sup>) では、抗炎症性サイトカインである IL-10 が、若干の上昇傾向 (3 時間後の陰極、24 時間後の陽極) を示したが、いずれのサイトカインも有意な変動は示さなかった (Fig. 3)。さらに、電流を上げた条件 (1.0 mA/cm<sup>2</sup>) では、通常条件よりもばらつきが大きく、ほとんどのサイトカインが上昇傾向を示した。特に、24 時間後の IL-6 と IL-10 が増加する傾向を示した。より強力な電流強度は、皮膚における炎症性サイトカインの発現を誘導し、炎症反応を誘起する可能性があることが示された。すなわち、通常条件 (0.3~0.5 mA/cm<sup>2</sup>) を超える電流強度を用いなければ、炎症の誘導は防ぐことができると考えられる。

次に、ItP 処理が皮膚形態に与える影響を評価するため、皮膚切片を HE 染色した後、顕微鏡で観察した。その結果、通常条件で ItP 処理してから 3 時間後、陰極及び陽極下から採取した皮膚組織の形態は、無処理皮膚と同様であり、表皮の損傷や肥厚化などは確認されなかった (Fig. 4A)。また、ItP 処理してから 24 時間後の皮膚も同様に、表皮の損傷や肥厚化は認められなかった (Fig. 4B)。したがって、微弱電流処理は皮膚に形態学的な変化も誘起しないことが示唆された。

以上の結果から、通常条件の電流強度では、ItP は炎症反応などを誘起せず、皮膚の肥厚化も誘導しないことが確認された。したがって、ItP は乾癬などの炎症性皮膚疾患を増悪させない安全な経皮薬物の送達技術であると考えられる。

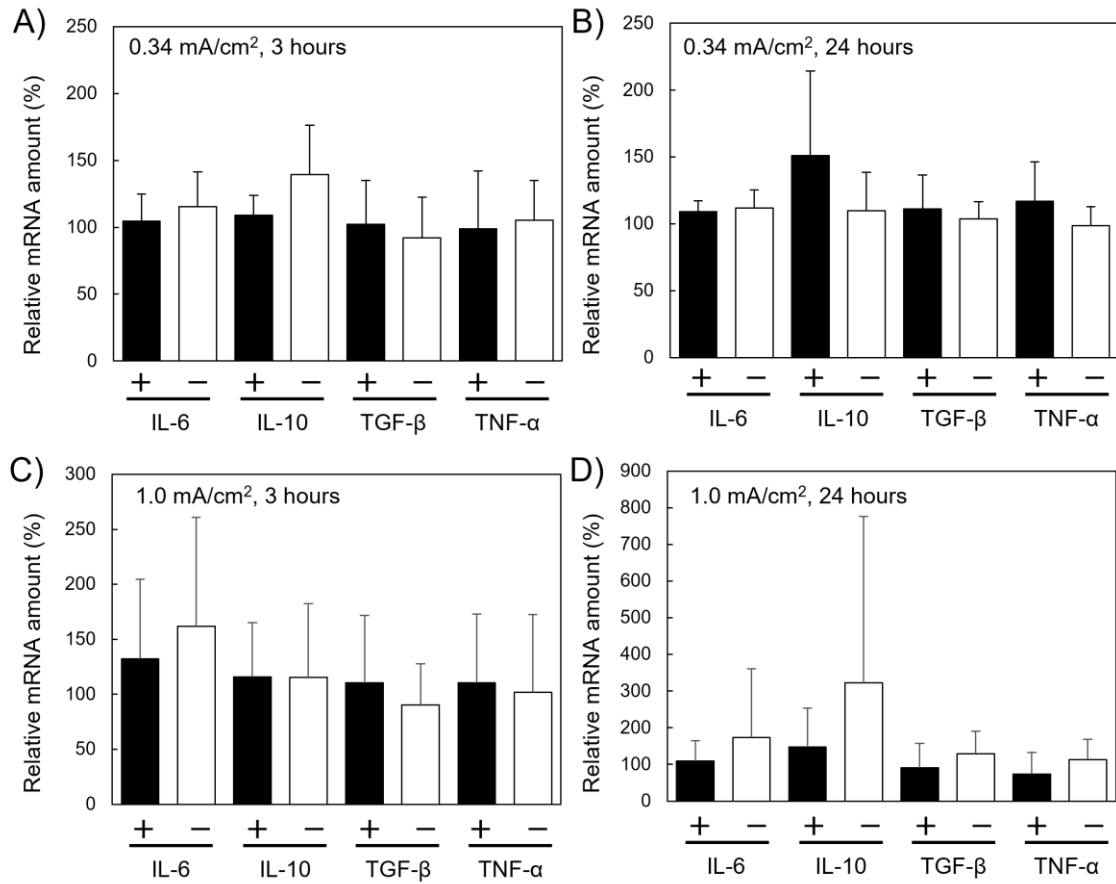


Fig. 3 ItP 後の mRNA 相対発現率

ItP を行ってから、皮膚（陽極側+、陰極側-）における各炎症性サイトカイン mRNA 発現量を測定した。グラフの縦軸（mRNA 相対的発現量）は内在性コントロール遺伝子の GAPDH で補正し、無処理群の皮膚を 100% とした相対発現量（百分率）で表した（n=3）。

A) 通常の ItP（0.34 mA/cm<sup>2</sup>）の 3 時間後； B) 通常の ItP の 24 時間後；

C) 高めの ItP（1.0 mA/cm<sup>2</sup>）の 3 時間後； D) 高めの ItP の 24 時間後。

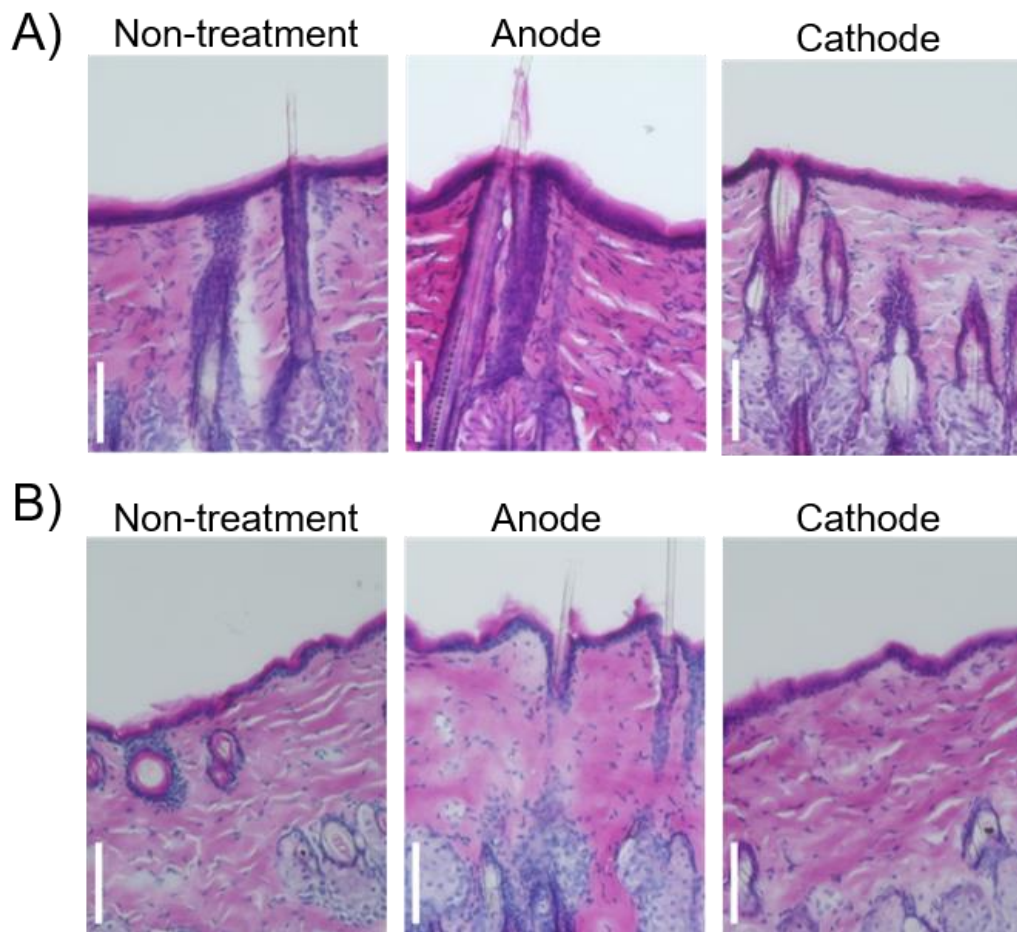


Fig. 4 ItP 処理後の皮膚の組織学的な観察

ItP ( $0.34 \text{ mA/cm}^2$ ) を行ってから、陽極側 (Anode) と陰極側 (Cathode) から皮膚凍結切片を作成し、HE 染色による組織学的な観察を行い、無処理群 (Non-treatment) と比較した。

A) ItP の 3 時間後の皮膚切片； B) ItP の 24 時間後の皮膚切片。

スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。

### 第3章 FK506封入リポソーム製剤の調製とItPによる皮内送達

#### 3.1. リポソームの調製と粒子径、ゼータ電位及び FK506 封入率の評価、並びに ItP による皮内送達の評価

本章ではリポソームの調製と粒子径、ゼータ電位及び FK506 封入率の評価、並びに ItP による皮内送達の評価を行った。

リポソームは、両親媒性脂質分子の二分子膜からなる膜小胞であり、親水性物質を内水相に疎水性物質を脂質膜中に封入できる。サイズや電荷を制御可能なことや機能性分子の表面修飾が可能であるなどの利点により、DDS に広く利用されている。また、薬物の全身循環への吸収を最小限に抑えることにより、クリアランスを減少させ、薬物の送達効率を向上させることができる<sup>26)</sup>。ItP にリポソームを用いるためには、荷電を付与する必要がある。一般に荷電性リポソームにはカチオン性とアニオン性があるが、カチオン性リポソームは細胞毒性などが知られているため、本研究では、アニオン性リポソームを用いることにした。

リポソームは卵黄ホスファチジルコリン (EPC) を基本脂質組成とし、マイナス電荷を付与するため、ジセチルリン酸 (DCP) を使用し、可視化のために蛍光標識脂質 1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiIC<sub>18</sub>) を添加した。さらに、FK506 溶液を脂質溶液に混合し、脂質膜水和法と凍結融解法によりリポソームを調製した。得られた FK506 封入リポソーム (FK-Lipo) の粒子径、表面電荷及び PDI を測定し、HPLC 定量により FK506 の封入率を算出した。

リポソームの薬物放出性は製剤の特性を評価するのみならず、投与後の効果を見積もる重要な指標となるため、透析膜分離法により FK-Lipo から FK506 の *in vitro* 放出特性を評価した。

次に非侵襲的な薬物送達技術である ItP により、リポソーム製剤が皮内への浸透を評価した。

## 3.2. 実験方法

### 3.2.1. 実験材料

EPC は日油株式会社（東京、日本）より購入した。DCP と SDS は Sigma-Aldrich 株式会社（東京、日本）より購入した。DiIC<sub>18</sub> は Invitrogen 株式会社（CA、米国）より購入した。エタノールとテトラヒドロフラン（THF）は関東化学株式会社（東京、日本）より購入した。HPLC グレードのクロロホルム、アセトニトリル（CH<sub>3</sub>CN）、NaHCO<sub>3</sub>、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O はナカライテスク株式会社（京都、日本）より購入した。FK506 はコスモ・バイオ株式会社（東京、日本）より購入した。膜分子量 300 kDa の CE 透析用チューブ（スペクトラ/ポア、10 mm φ × 16 mm、10 m）はフナコシフィルム株式会社（東京、日本）より購入した。PD-10 カラムは GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社（東京、日本）より購入した。その他試薬は第 2.2.1.節を参照する。

### 3.2.2. 脂質膜水和法によるリポソームの調製

まず、脂質組成モル比 EPC/DCP/DiIC<sub>18</sub> = 6/4/0.1 となるようにクロロホルム溶液を混合し、最終脂質濃度 10 mM の FK506 フリー脂質溶液を調製した。FK506 含有脂質溶液を調製するため、上記脂質混合液に 25 mg/mL の FK506 エタノール溶液を、モル比 EPC/DCP/FK506/DiIC<sub>18</sub> = 6/4/1/0.1 となるように混合した。脂質溶液を窒素ガスで蒸発乾固させ、有機溶媒を完全に除去した後、PBS を 1 mL 入れて 60 °C の湯浴で水和した。その後、エタノールとドライアイスを用いて凍結融解を 3 回行い、10 分間の超音波処理によってサイズを調整した。FK-Lipo 懸濁液からフリーの FK506 を除去するため、PD-10 カラムによるろ過を行い、リポソーム画分のみを採取した。精製後のリポソーム懸濁液を PBS で 100 倍希釈後、ZETASIZER NANO (Malvern Instruments, Malvern) を用い、粒子径と多分散度指数 PDI、及び表面電荷 ζ-potential を測定した。

### 3.2.3. FK506 封入率の測定

FK506 の封入量は HPLC（島津、日本）を用いて既報の条件を用いて測定した<sup>27)</sup>。ODS カラムは TSKgel ODS-80TM（150 mm × 4.6 mm, 5 μm）のものを使用した。FK506 エタノール溶液を 5、10、50、100、500 μg/mL の濃度で調製し、検量線を作成した。リポソーム溶液 60 μL と 100% THF 140 μL を加え、HPLC により、FK-Lipo の中へ封入された FK506 を定量した。移動相は DDW/CH<sub>3</sub>CN（60/40, v/v）、送液速度は 1.0 mL/min、検出器が 214 nm を使用した。



FK506 の封入効率 (EE%) は以下の式で算出した。

$EE\% = (\text{封入された薬物の量} / \text{添加された薬物の総量}) \times 100\%$ 。

#### 3.2.4. FK-Lipo の in vitro 放出試験

放出液は NaCl (0.67 g)、NaHCO<sub>3</sub> (0.20 g)、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0.008 g) を脱イオン水 100 mL に溶解し、0.1% SDS を添加して調製された。1 mL の FK-Lipo を 300 kDa 透析チューブに移し、100 mL の放出液に入れ、34 °C で 100 rpm で攪拌した。スタートしてから 2、4、6、8、10、12、24 時間後に、1 mL ずつの放出液を抜き取り、同量の新しい放出液を加えて一定量を維持した。採取した試験液試料を 10,000 × g、5 分間で超遠心分離することでリボソームを沈降させ、薬物が溶解した上澄み液を採取した。取れた上澄み液及び放出前の FK-Lipo 中に含まれる FK506 含量を第 3.2.3.節の HPLC 条件で測定し、薬物放出率を算出した。

#### 3.2.5. ItP による DiIC<sub>18</sub> 標識リボソーム製剤の皮内投与と動態観察

健常 Wistar ラットを用いて実験し、麻酔は第 2.2.3.節に述べた方法で行った。露出したラット背部皮膚上に表面積 1 cm<sup>2</sup> の脱脂綿を置き、100 μL の DiIC<sub>18</sub> 標識した FK506 フリーリボソーム溶液を添加後、Ag-AgCl の陰極側に取り付けた (陽極 : 100 μL PBS)。0.34 mA/cm<sup>2</sup> で 1 時間の ItP を行い、3 時間放置後、皮膚を PBS で洗浄した。ラットを安楽死させ、その直後に陰極下の皮膚を切除し、凍結切片を作成した (Lipo ItP)。対象群 (PBS ItP) には、表面積 1cm<sup>2</sup> の脱脂綿に 100 μL の PBS を添加し陰極側に取り付けた (陽極 : 100 μL PBS)。処理部皮膚組織切片の作成は第 2.2.6.節に述べた方法で行った。切片をカバーガラスに封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて DiIC<sub>18</sub> 標識リボソームの皮内動態を観察した。

### 3.3. 実験結果と考察

脂質膜水和法によって調製したリポソーム製剤の物性評価を行った (Table.2)。 $\zeta$ -Potential は-12~14 mV が得られ、リポソームがアニオン性であることが確認された。FK506 フリーリポソームの粒子径が  $162.7 \pm 6.1$  nm であったのに対し、FK-Lipo は  $352.7 \pm 57.5$  nm となり、PDI も 2 倍以上増加した。HPLC 定量により、FK-Lipo における薬物封入率は  $45.2 \pm 14.6\%$  であることが確認できた<sup>28)</sup>。

FK506 封入による粒子径の増加は、FK-Lipo の凝集に由来すると考えられる。FK506 の構造中に 3 つの OH 基が離れて存在しており、それぞれリポソーム膜の中で界面に位置すると考えられるため、OH 基以外の疎水的な部分が膜に横たわるような形で存在することにより、FK506 の疎水性部分がある程度膜界面に露出されている可能性がある。すなわち、FK-Lipo 表面は、負電荷脂質の DCP によりマイナスの電荷を持っているものの、疎水的な部分が露出されることで、疎水コロイドとしての性質を有すると考えられる。疎水コロイドは、少量の電解質が存在するとゆるく凝集するため、FK-Lipo がゆるく凝集することで粒子径が大きくなり、また PDI も大きくなったと推察された。おそらく、FK-Lipo は概算すると約 6 個程度のリポソームが集まって構成された凝集体となることで FK506 を含まないリポソームの約 2 倍の直径を示すようになったのではないかと推察している。

	Size (nm)	$\zeta$ -Potential (mV)	PDI	EE%
EPC/DCP=6/4 0.1%DiIC <sub>18</sub> (FK506 Free)	162.7±6.1	-12.4±0.5	0.2±0.0	-
EPC/DCP=6/4 0.1%DiIC <sub>18</sub> (FK506 10%)	352.7±57.5	-13.9±3.1	0.5±0.0	45.2±14.6

Table 2.リポソーム製剤の物性評価

次に、FK-Lipo の *in vitro* 放出プロファイルを検討した。先行研究では、FK506 を封入したリポソーム溶液から 1~3% ぐらいの薬物放出が報告されたため、同じ試験液から FK-Lipo も同様

な放出傾向を示すと期待していた<sup>29)</sup>。しかしながら、いずれの FK-Lipo 放出液からも FK506 に該当するピークが検出されなかった。すなわち、薬物が放出されなかったか、放出されても非常に微量なため検出不可であった。予想との違いが生じた原因として、参考文献の実験で使われたリポソーム製剤の構成成分が本研究と異なり、界面活性剤の胆汁酸が含まれていたからではないかと考えている。すなわち、胆汁酸存在下では、放出液の中でミセルが形成され、極少量ながらも難水溶性化合物の溶出が可能になったと考えられる。一方、FK-Lipo の構成成分は脂質及び FK506 のみとなっているため、疎水性が高い FK506 は水系へ放出し難いのではないかと推察した。

ナノ粒子から FK506 の *in vitro* 放出特性をさらに検討するため、別の参考文献の実験方法に着目した<sup>30)</sup>。こちらの FK506/MPEG-PLA 封入したナノ粒子に関する論文には、FK506 の溶解度を上げるため、放出液として 0.5% の Tween80 を添加した PBS 溶液を使用し、最終的に 100% の薬物放出まで検出していた。当該試験液を用いて FK-Lipo の放出性を再検討することを考えたが、リポソームの安定性が新たな課題となった。FK506/MPEG-PLA ナノ粒子は構成成分として高分子 Poly(D,L-lactide)を用いたため、界面活性剤の Tween80 が 0.5% 入った緩衝液中でも崩壊しなかったと思われる。一方、脂質のみで構成された本研究のリポソーム製剤を界面活性剤入りの緩衝液に添加すると、脂質膜は崩壊してしまうため、正確な放出特性を測定できないと考えた。すなわち、FK506 を溶解させるために、放出試験液に界面活性剤を添加しなければならないが、その添加によるリポソーム製剤の崩壊が免れないという大きなジレンマがあるため、FK-Lipo の *in vitro* 放出性の測定は非常に困難であると判断し、本研究では *in vitro* における放出性評価を断念した。

次に、健常ラットにおける ItP 後の DiC<sub>18</sub> 標識リポソームの皮内動態観察を行った。PBS のみの存在下で ItP を行ったコントロール皮膚では、皮内に蛍光は観察されなかった (Fig. 5, PBS ItP)。一方、DiC<sub>18</sub> 標識リポソーム存在下で ItP を行い、処理 3 時間後に皮膚組織切片を共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、皮膚表面から皮内の約 61  $\mu\text{m}$  の深さまで DiC<sub>18</sub> 由来の赤色蛍光が確認された。さらに、毛穴の深部やその周囲にも蛍光が観察され、リポソームが毛穴にも浸透したことが示唆された。この結果により、DiC<sub>18</sub> 標識リポソームが ItP によって、皮内に送達されることが確認された (Fig. 5, Lipo ItP)<sup>28)</sup>。ItP により、皮内送達されたリポソームの生体内安定性については、我々の過去の文献において検討している<sup>18)</sup>。その論文中では、脂質膜を緑色

の蛍光色素 NBD で標識し、内水相に赤色蛍光色素ローダミンを封入することで、二重標識したリポソームをラット背部皮膚上で ItP に供した後、共焦点レーザー顕微鏡でリポソーム膜及び内封薬物の皮内動態を観察している。その結果、NBD の緑色蛍光とローダミンの赤色蛍光が共局在して黄色として観察されており、リポソームは ItP の後も小胞としての構造を保持したまま皮内に送達されたことが明らかになっている。そのため、本研究においてもリポソームが小胞としての構造を保持した状態で皮内に送達でされていると考えている。

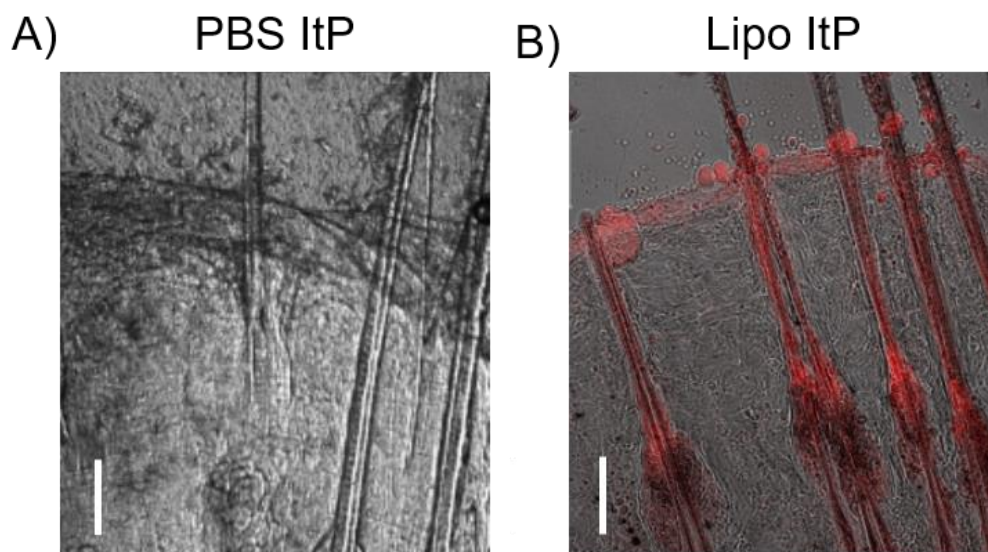


Fig. 5 ItP 後の DiIC<sub>18</sub> 標識リポソームの皮内動態の観察

健常ラットの背部皮膚に DiIC<sub>18</sub> 標識リポソームの ItP (0.34 mA/cm<sup>2</sup>) を 1 時間行い、3 時間後の処理部皮膚の凍結切片を作成し、DiIC<sub>18</sub> 標識リポソームの皮内動態を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

A) 陰性対照群の PBS の ItP ; B) DiIC<sub>18</sub> 標識リポソームの ItP。

赤色 : DiIC<sub>18</sub> 標識リポソーム ; スケールバー : 100 μm。

## 第4章 乾癬モデルラットに対する FK-Lipo/ItP の治療効果の検討

### 4.1. 乾癬モデルラットの作成と FK506-Lipo の ItP

本章では、乾癬モデルラットを用いて、ItP によって皮内送達された FK-Lipo の治療効果を評価した。

まず、先行研究と同じ方法により<sup>31)</sup>、イミキモドクリーム (IMQ) による乾癬モデルラットの作成を行った (IMQ 群)。IMQ が皮膚に塗布されると、表皮の肥厚化などの乾癬様組織学的な症状が観察されるため、乾癬動物病態モデルの誘発剤として広く使われている (Fig. 6A)。そのメカニズムとして、IMQ が皮内のランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞など免疫細胞に発現する TLR7 を刺激し、種々の炎症性サイトカインの発現を誘導することによって乾癬様症状を誘発することが提唱されている。序論で述べたように、乾癬の発症には TNF- $\alpha$  などの複数の炎症性サイトカインが関連している。TNF- $\alpha$  は病態形成に関与する因子であり、樹状細胞やケラチノサイトにおける IL-1 $\beta$  や IL-6 のサイトカイン産生を誘導する。さらに、IMQ 誘発性乾癬様皮膚疾患モデルでは、IL-6 がケラチノサイトの増殖、表皮過形成、繊維化及び制御性 T 細胞による免疫抑制阻害に関与することが知られている<sup>32,33,34)</sup>。

本研究では、ラット背部皮膚に IMQ を 4 日間 24 時間毎に塗布した乾癬誘導モデルラットに対し、FK-Lipo の ItP を行い、炎症性サイトカインの mRNA 発現の変動から治療効果を検討した。また、皮膚切片の HE 染色によって表皮肥厚化に対する抑制効果を評価した (Fig. 6B)。

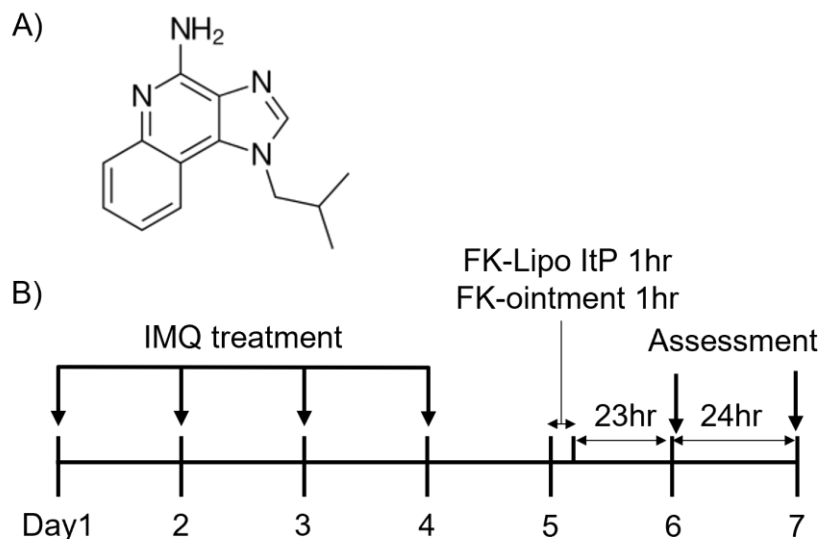


Fig. 6 A) IMQ の構造式 ; B) 実験スケジュール

## 4.2. 実験方法

### 4.2.1. 実験材料

IMQ クリーム（ベセルナクリーム 5%）は持田製薬株式会社（東京、日本）より購入した。プロトピック軟膏（FK506 水和物 0.1%）はマルホ製薬株式会社（日本、大阪）より購入した。その他試薬は第 2.2.1.節、第 3.2.1.節を参照する。

### 4.2.2. 乾癬モデルラットの作成

Wistar ラットにイソフルラン吸入麻酔を行い、露出した 6 cm<sup>2</sup>の背部皮膚に、60 mg のベセルナクリーム 5%（IMQ, 3 mg）を 24 時間毎に 4 日間連続塗布した。4 回目の投与から 48 時間後と 72 時間後にラットを安楽死させ、IMQ 処理した皮膚組織を採取した。

### 4.2.3. 乾癬モデルラットにおける FK506 の治療

FK-Lipo/ItP 群には、4 回目の IMQ 投与から 24 時間後に、IMQ 誘発乾癬ラットを麻酔し、100 μL の FK-Lipo（FK506, 25 μg）を添加した 1 cm<sup>2</sup>の脱脂綿を背部乾癬性皮膚に置き、陰極電極を設置した（陽極：100 μLPBS）。その後、0.34 mA/cm<sup>2</sup>の電流強度で 1 時間 ItP 処理をし、23 時間後と 47 時間後にラットを安楽死させ、陰極下の皮膚組織を採取した。

プロトピック軟膏処理治療群ラットには、4 回目の IMQ 投与から 24 時間後に、25 mg のプロトピック軟膏（FK506, 25 μg）を背部乾癬性皮膚に局所的に塗布し、処理面積は 1 cm<sup>2</sup>とした。1 時間後に、プロトピック軟膏処理 1hr 群のみを対象に、プロトピック軟膏を拭き取った。23 時間後と 47 時間後に、ラットを安楽死させ、処置部位の皮膚組織を採取した。

### 4.2.4. RNA 抽出、逆転写と Real time-PCR 法による mRNA の定量

第 4.2.2.節と第 4.2.3.節より得られた皮膚に対し、RNA 抽出や逆転写及び Real Time-PCR 法による mRNA の定量を行った。RNA 抽出と逆転写及び-PCR の操作手順は第 2.2.5.節の方法を用いた。

### 4.2.5. 組織切片作成、HE 染色と皮膚肥厚化評価

第 4.2.2.節と第 4.2.3.節より得られた皮膚の組織切片を作成し、操作手順は第 2.2.6.節の方法に

より行った。10 $\mu$ m の皮膚切片を HE 染色に供した。各群の切片を倒立顕微鏡で観察し、BZ-9000 画像解析ソフトウェアを用いて、3 個体 HE 染色の画像を 20 枚ずつ、それぞれの画像の 3 か所を計測し、表皮厚さの平均値を算出した。

#### 4.2.6 統計学的に解析

統計的差異に関して、Student's t-test、one way ANOVA with post-hoc LSD 検定により統計処理を行った。すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準偏差 (S.D.) で表した。**\*\*p<0.01**、**\*p<0.05** を有意差ありとした。

#### 4.3. 実験結果と考察

乾癬誘導処理を行った皮膚には、2日目から紅斑、肥厚と鱗屑が観察され、6日目まで徐々に増強してきた (Fig.7)。まず、皮膚から抽出したRNAを用いて、Real time-PCR法による炎症性サイトカインの相対的発現量を評価した。その結果、IMQ処理群では、健常ラットと比べてTNF- $\alpha$ 及びIL-6のmRNA発現量がそれぞれ2.97倍及び7.19倍となり、有意に増加していた。このことにより、IMQ処理により炎症性サイトカイン発現が皮内で誘導されることが確認された (Fig.8)。

次に、ItPにより皮内送達されたFK-Lipoによる炎症性サイトカイン発現への影響を検討した。FK-LipoのItP及びFK-ointment処理をIMQ処理後に行い、TNF- $\alpha$ 相対発現量を定量した。その結果、FK-Lipo/ItP群がIMQ群の70%、FK-ointment 24hr群がIMQ群の36%であり、それぞれTNF- $\alpha$ 発現が減少することが明らかとなった。一方、IMQ群と比較して、FK-ointment 1hr群ではTNF- $\alpha$ の減少は見られなかった。FK-Lipo/ItP群とIMQ群の間には有意差が見られなかったものの、FK-Lipo/ItPによってTNF- $\alpha$ の相対発現量が下がる傾向にあることが確認された。同様に、IL-6のmRNA発現レベルを評価した結果、FK-Lipo/ItP群がIMQ群の26%、FK-ointment 24hr群がIMQ群の8.4%となり、いずれも有意に減少していた。また、FK-ointment 1hr群もIMQ群の67%に減少したが、その差は有意ではなかった。すなわち、FK-Lipo/ItPによって、IL-6発現量が有意に抑制され、FK-ointment 1hr群よりも2倍以上高い治療効果が得られた。これらの結果により、FK-ointmentでは24hr程度を要するのに対して、FK-LipoとItPの組み合わせにより短時間で乾癬炎症性サイトカインを効率よく抑制できることが示唆された (Fig.8)<sup>28)</sup>。



Non-treatment



Control (IMQ)



Fig.7 健常ラットとIMQ処理した乾癬病態ラット (Day 6) の背部写真

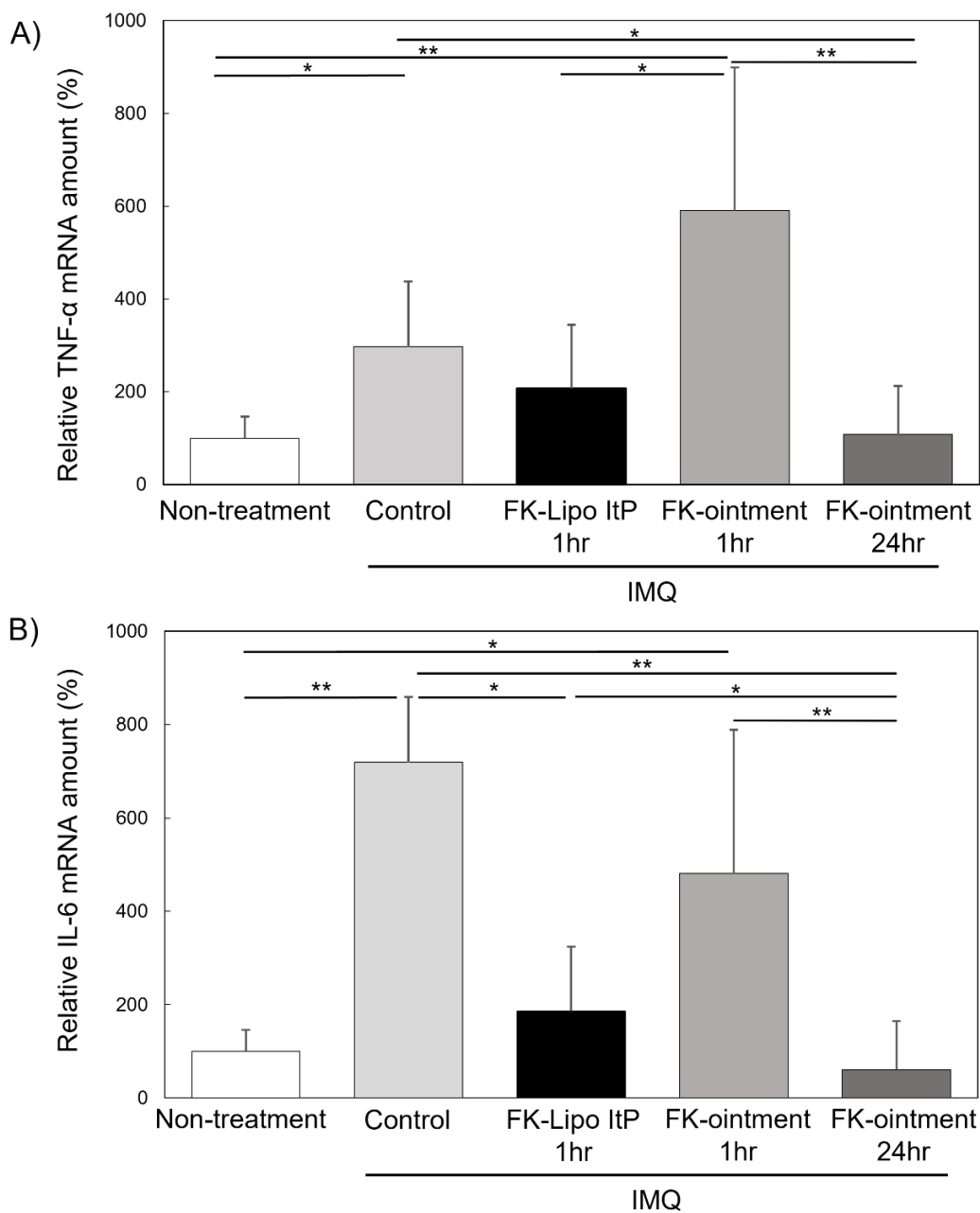


Fig. 8 実験第6日目における皮内 TNF- $\alpha$  及び IL-6 mRNA 発現量  
 健常ラット、IMQ 群、各種 FK506 処理群の皮膚を対象に、RealTime-PCR  
 法による mRNA の発現量を定量化した。イオントフォレシス治療は FK-  
 Lipo ItP 1hr 組のみに行った。グラフの縦軸 (mRNA 相対的発現量) は内  
 在性コントロール遺伝子の GAPDH で補正し、健常ラット mRNA 発現量  
 を 100%とした相対量で表している (n $\geq$ 3) ; \*\*p<0.01 ; \*p<0.05。

次に、IMQ 処理による皮膚の組織学的変化を観察した。その結果、健常ラット表皮の平均厚さが  $22.1\ \mu\text{m}$  であるのに対して、IMQ 群では  $94.2\ \mu\text{m}$  であり、4.26 倍まで増加していた。このことから、IMQ 処理がケラチノサイトの過形成を引き起こしたことによって表皮の肥厚化が誘発されたことが示唆された。これに対して、FK-Lipo/ItP 群では、表皮の平均厚さが  $79.0\ \mu\text{m}$  まで減少し、IMQ 群の 84%であった<sup>28)</sup>。一方、FK-ointment 1hr/24hr 処理群のいずれも表皮肥厚化に有意な抑制は確認できなかった (Fig. 9)<sup>28)</sup>。したがって、三つの FK506 処理群のうち、FK-Lipo/ItP 群のみ表皮肥厚化に対する抑制効果が確認された。本研究では、FK-ointment 24hr 群における炎症性サイトカイン相対発現量が最も低かったことから、最も強い皮膚肥厚化抑制効果も同群に現れるはずであろうと予想していたが、有意な皮膚肥厚化抑制効果は FK-Lipo/ItP 群のみで検出された。現在の乾癬治療は、根治よりも症状のコントロールを基本としているため、FK-Lipo/ItP 群で確認された皮膚肥厚化に対する抑制効果が重要であるため、その効果をさらに検討した。Fig. 6 のスケジュールのように乾癬モデルラットを作成し、第 6、7 日目のそれぞれの IMQ 群の表皮平均厚さを 100%とし、FK-Lipo/ItP 及び FK-ointment 1hr 群の皮膚肥厚化抑制率を算出した。その結果、FK-Lipo/ItP 群では、皮膚肥厚化抑制率は 16% (6 日目) から 22% (7 日目) となり、約 6%増加した。一方、FK-ointment 1hr 群の皮膚肥厚化抑制率は 2.7% (6 日目) から 4.1% (7 日目) になり、1.4%しか上昇しなかった<sup>28)</sup>。第 6 日目から第 7 日目にかけての 24 時間において、FK-Lipo/ItP 群は FK-ointment 1hr 群より約 4.3 倍の抑制率が向上したことになる。すなわち、FK-Lipo/ItP 群では、時間依存的な治療効果が得られたことになる。その理由として、FK-Lipo が ItP により皮内送達された後、皮膚中において、リポソームから FK506 が徐放されたことが推察された。In vitro 試験ではリポソームからの徐放性が評価できなかったが、この in vivo の時間依存的な治療効果の結果から、ItP の投与された FK-Lipo が皮内で FK506 を徐放することで高い治療効果を示すことが示唆された (Fig. 10)。

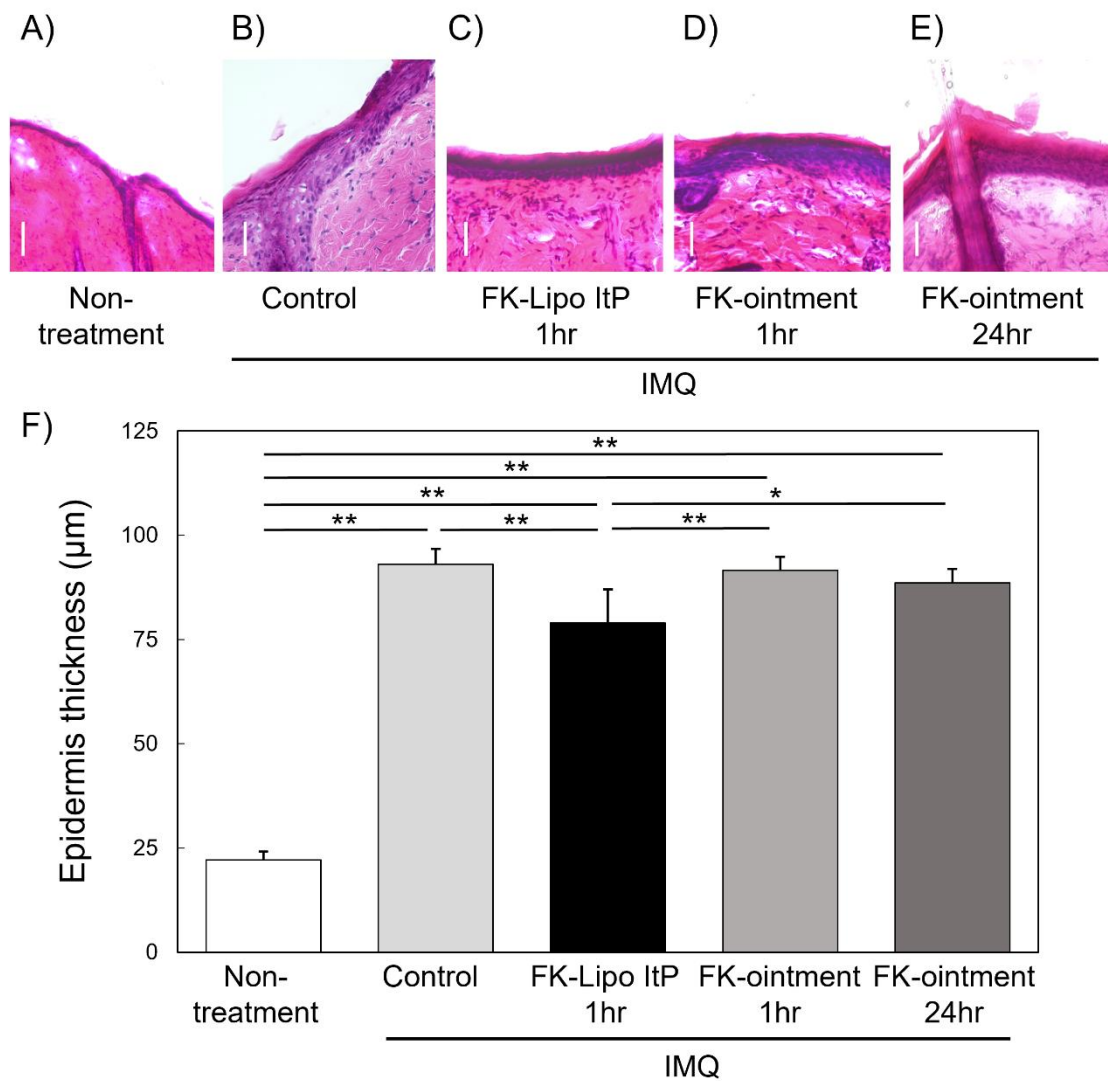


Fig.9 実験第6日目における皮膚の組織学的観察

健常ラット、IMQ群、各種FK506処理群のラット皮膚凍結切片をHE染色し、組織学的な観察を行った（上図、スケールバー：100 μm）。イオントフォレシス治療はFK-Lipo ItP 1hr組のみに行った。表皮の厚さはHE染色の画像より平均値を算出した（下図のグラフ；n=3）；\*\*p<0.01；\*p<0.05。

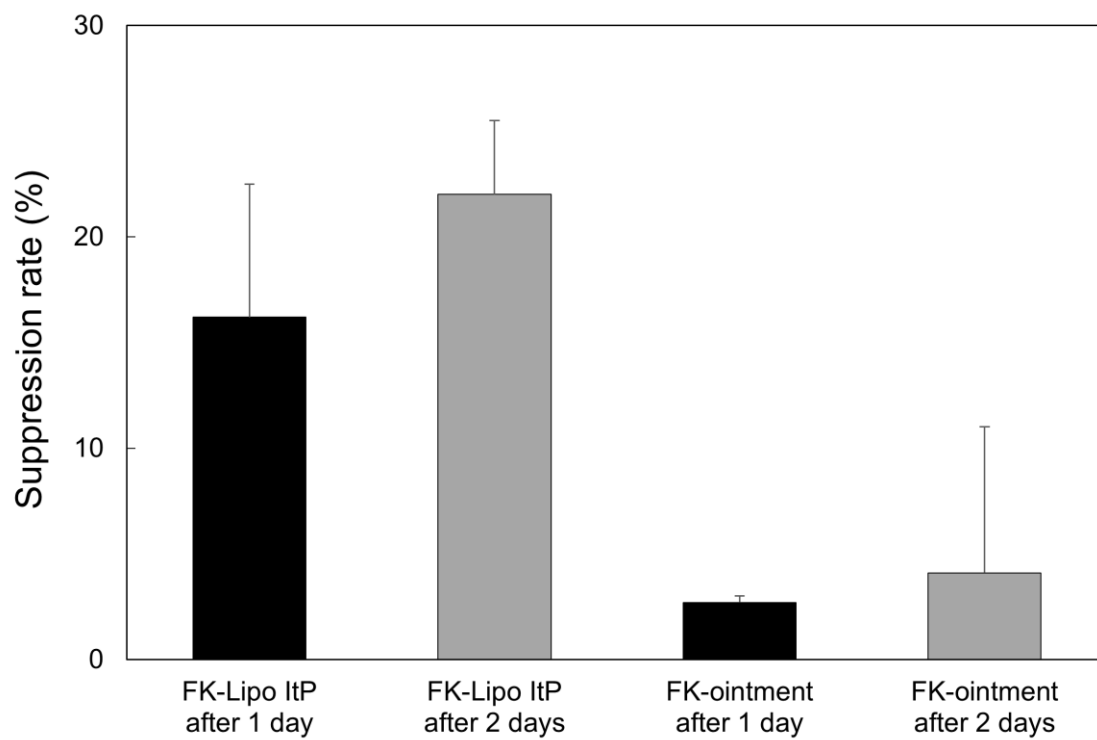


Fig. 10 FK506 治療後の異なる時間における皮膚肥厚化の抑制率  
 FK-Lipo/ItP と FK-ointment 治療してから 1 日後 (6 日目) と 2 日後 (7 日目) の皮膚凍結切片を HE 染色し、組織学的な観察を行ったことにより、IMQ 群を 100%とした皮膚肥厚化抑制率を算出した (n=3)。

## 総括

本研究では、FK506 をリポソーム製剤化するとともに、ItP との併用による効果的な乾癬治療法の開発を試みた。

まず、安全性の解析として、ItP が皮膚に及ぼす影響を検討した。通常条件 ( $0.34 \text{ mA/cm}^2$ ) 及び高電流条件 ( $1.0 \text{ mA/cm}^2$ ) において ItP を 1 時間実施後、皮膚における炎症性サイトカイン mRNA 発現量などの変動を評価した。その結果、通常の電流強度では炎症性サイトカインの有意な増加や皮膚の肥厚化や損傷も観察されず、安全な経皮投与薬物送達技術であることが示された。次に、FK-Lipo 製剤化及び ItP との併用による乾癬治療の効果を評価した。疎水性で荷電を有していない FK506 を ItP に適用するために、負電荷脂質を用いた FK-Lipo 製剤を脂質膜水和法によって調製し、得られた FK-Lipo の物理的及び化学的特性を評価した。さらに、DiIC<sub>18</sub> で標識リポソームの ItP による皮内動態を検討した。そして、IMQ 処理によって乾癬を誘発したモデルラットに対して、FK-Lipo を ItP により皮内送達することによる治療効果を検討した。その結果、FK-Lipo の ItP 処理によって炎症性サイトカインの mRNA 発現量が有意に抑制された。また、FK-Lipo/ItP 処理によって表皮の肥厚化が顕著に抑制された。さらに、治療効果は時間依存的であり、皮内に浸透した FK-Lipo からの薬物徐放効果によることが示唆された。

本研究において、ItP と免疫抑制剤 FK506 を封入したリポソームの組み合わせは効果的な乾癬治療法であることが示された<sup>28)</sup>。今後、ItP とリポソームの組み合わせについて更なる知見を得ることで、有用な乾癬治療法が確立されることを期待している。

## 参考文献

- 1) Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Stuart PE, Tejasvi T, Voorhees JJ, Abecasis GR, Nair RP. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology. *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 1213-1226 (2010).
- 2) Goldminz AM, Au SC, Kim N, Gottlieb AB, Lizzul PF. NF- $\kappa$ B: an essential transcription factor in psoriasis. *J. Dermatol. Sci.*, **69**, 89-94 (2013).
- 3) Dixon WG, Hyrich KL, Watson KD, Lunt M, Galloway J, Ustianowski A. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). *Ann. Rheum. Dis.*, **69**, 522-528 (2010).
- 4) Micic D, Komaki Y, Alavanja A, Rubin DT, Sakuraba A. Risk of cancer recurrence among individuals exposed to antitumor necrosis factor therapy: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin. J. Gastroenterol.*, **53** (1), e1-11 (2019).
- 5) Raharja A, Mahil SK, Barker JN. Psoriasis: a brief overview. *Clin Med (Lond.)*, **21**, 170-173 (2021).
- 6) Prausnitz MR., Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1261-1268 (2008).
- 7) Zhang Z, Tsai PC, Ramezanli T, Michniak-Kohn BB. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **5**, 205-218 (2013).
- 8) Kováčik A, Kopečná M, Vávrová K. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opin Drug Deliv.*, **17**, 145-155 (2020).
- 9) Higo N. Recent trend of transdermal drug delivery system development. *YAKUGAKU ZASSHI*, **127**, 655-662 (2007).
- 10) Kalia YN, Naik A, Garrison J, Guy RH. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 619-658 (2004).
- 11) Lebwohl M, Freeman A, Chapman MS, Feldman S, Hartle J, Henning A. Proven efficacy of tacrolimus for facial and intertriginous psoriasis. *Arch. Dermatol.*, **141**, 1154 (2005).
- 12) Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther. Drug. Monit.*, **17**, 584-591 (1995).
- 13) Lan CC, Yu HS, Wu CS, Kuo HY, Chai CY, Chen GS. FK506 inhibits tumour necrosis factor-alpha

- secretion in human keratinocytes via regulation of nuclear factor-kappaB. *Br. J. Dermatol.*, **153**, 725-732 (2005).
- 14) Boguniewicz M, Fiedler VC, Raimer S, Lawrence ID, Leung DY, Hanifin JM. A randomized, vehicle-controlled trial of tacrolimus ointment for treatment of atopic dermatitis in children. Pediatric Tacrolimus Study Group. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **102**, 637-644 (1998).
- 15) Kang S, Lucky AW, Pariser D, Lawrence I, Hanifin JM. Long-term safety and efficacy of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in children. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **44**, S58-64 (2001).
- 16) Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000).
- 17) Nitin D, Vikas B, Sanjula B, Alka A, Javed A. Iontophoresis-An Approach for Controlled Drug Delivery: A Review. *Curr. Drug. Deliv.*, **10**, 1-10 (2007).
- 18) Kajimoto K, Yamamoto M, Watanabe M, Kigasawa K, Kanamura K, Hirashima H, Kogure K. Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. *Int. J. Pharm.*, **403**, 57-65 (2011).
- 19) El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **34**, 203-222 (2008).
- 20) Hama S, Kimura Y, Mikami A, Shiota K, Toyoda M, Tamura A, Nagasaki Y, Kanamura K, Kajimoto K, Kogure K. Electric stimulus opens intercellular spaces in skin. *J. Biol. Chem.*, **289**, 2450-2456 (2014).
- 21) Hasan M, Khatun A, Kogure K. Iontophoresis of Biological Macromolecular Drugs. *Pharmaceutics.*, **14**, 525 (2022).
- 22) Kigasawa K, Kajimoto K, Hama S, Saito A, Kanamura K, Kogure K. Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. *Int. J. Pharm.*, **383**, 157-160 (2010).
- 23) De Vuyst ED, Wang N, Decrock E, De Bock M, Vinken M, Van Moorhem M, Lai C, Culot M, Rogiers V, Cecchelli R, Naus CC, Evans WH, Leybaert L. Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell. Calcium.*, **46**, 176-187 (2009).
- 24) Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *CHEST.*, **117**, 1162-1172 (2000).
- 25) Hänel KH, Cornelissen C, Lüscher B, Baron JM. Cytokines and the skin barrier. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**,



6720-6745 (2013).

26) Maghraby GM El, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **34**, 203-222 (2008).

27) Toyota H, Asai T, Oku N. Process optimization by use of design of experiments: Application for liposomalization of FK506. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **102**, 196-202 (2017).

28) Nakamura S, Ozono M, Yanagi K, Kogure K. Development of an effective psoriasis treatment by combining tacrolimus-encapsulated liposomes and iontophoresis. *Biol. Pharm. Bull.*, **47**, 196-203 (2024).

29) Dai Y, Zhou R, Liu L. Liposomes containing bile salts as novel ocular delivery systems for tacrolimus (FK506): in vitro characterization and improved corneal permeation. *Int. J. Nanomedicine.*, **8**, 1921-1933 (2013).

30) Xu W, Ling P, Zhang T. Toward immunosuppressive effects on liver transplantation in rat model: Tacrolimus loaded poly (ethylene glycol)-poly (d, l-lactide) nanoparticle with longer survival time. *Int. J. Pharm.*, **460**, 173-180 (2014).

31) Fukuta T, Oshima Y, Michiue K, Tanaka D, Kogure K. Non-invasive delivery of biological macromolecular drugs into the skin by iontophoresis and its application to psoriasis treatment. *J. Control. Release.*, **323**, 323-332 (2020).

32) Neuner P, Urbanski A, Trautinger F, Möller A, Kimbauer R, Kapp A, Schöpf E, Schwarz T, Luger TA. Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, **97**, 27-33 (1991).

33) Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 6367-6371 (1989).

34) Goodman WA, Levine AD, Massari JV, Sugiyama H, McCormick TS, Cooper KD. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J. Immunol.*, **183**, 3170-3176 (2009).

## 謝辞

本研究の遂行及び本論文の執筆に当たり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院医歯薬学研究部衛生薬学分野教授小暮健太郎先生、准教授山崎尚志先生並びに助教大園瑞音先生に深く御礼申し上げます。本研究遂行に当たりご協力して頂きました、徳島大学薬学部衛生薬学分野の皆様、特に卒業生の柳香蓮様に深く感謝致します。

本研究の機会を与えてくださり、特段の御便宜を賜りました、大塚製薬株式会社薬事部部长西野潤一様、CMC 本部长神野淳一様、製剤研究所前任所长加藤雄介様に厚く御礼申し上げます。

日頃から有益な御指導、御鞭撻を賜りました大塚製薬株式会社の諸先輩、同僚の皆様から心から御礼申し上げます。

最後に、研究を継続できる環境を与えてくれた家族に心より感謝致します。