薬 剤 学, **67** (3), 176–181 (2007)

≪若手研究者紹介≫

生体膜輸送特性を利用したDDS

豊 福 秀 一 Hidekazu Toyobuku
大塚製薬株式会社 製剤研究所

1. は じ め に

編集部の方に本稿執筆のお話をいただいたときには，正直自分が若手？と感じた．しかし，研究の面ではまだまだ未熟者であると痛感しており，また折角のご依頼であり，これまでに自分が携わった研究活動を振り返るよい機会だと考え，筆を取らせていただいた．

筆者は半人前ではあるが，これまでに医薬品研究開発の過程を通して，克服しなければならない課題に多々直面した．中でも，製剤研究が大きく関与する作用発現部位である標的細胞への薬物送達は，薬物の生体内における利用効率をあげ，副作用を低減化し，ひいては患者さんに最も望ましい医薬品を提供する点においても，克服しなければならない課題のひとつである．本稿では，私が製剤研究と出会い，そして製剤研究に魅了され，生体膜輸送特性を利用したDDSにより，細胞への薬物送達という課題を少しでも解決するために行ってきた，これまでの研究活動について紹介したい．

2. 生体膜由来脂質微粒子を利用したDDS

筆者が製剤研究と出会ったのは，川島嘉明教授(現愛知学院大学薬学部教授)が主宰されていた岐阜薬科大学薬学部製剤学教室に配属されたときである．配属されてからは，竹内洋文先生（現岐阜薬科大学教授）のご指導のもと生体膜由来脂質より構成されるリポソームの表面を高分子で被覆する機能性リポソームに関する研究に従事させていただいた．当時，リポソーム表面の高分子修飾に関する研究では，ステルス性を付与するためにポリエチレングリコール修飾に関する研究が多数行われていた．しかしながら，リポソームを薬物担体として用いる新剤形を開発する上では必要不可欠な，生体内環境における酵素，血液成分，胆汁酸等に対する安定性や実用的な面を考慮した製造保存時の安定性に関する物理化学的な側面から検討を行った研究はほとんどなされていなかった．そこでポリマーとして末端に疎水基を導入したポリビニルアルコール（PVA-R）を用いて，これらの問題を解決するためにポリマーコーティングリポソームの設計に関する研究を行った．ポリマーによる表面修飾により，保存や製造時におけるストレスからリポソームを保護し，薬物の放出を制御する，あるいは生体内因子に対する安定性を向上することができたことを今でも鮮明に記憶している．

リポソーム膜の表面特性は，生体内環境における動態や安定性をも支配する重要な因子である．ポリマーによる表面修飾により，表面の電位もコントロールすることができ，能動的に薬物の動態を制御することも可能である．さらに，実用的な面においても製造時における凍結乾燥等のストレスにも耐えうるバリヤー機能をもつ粒子を設計することも可能である．これらの研究を通して，生体膜由来の脂質より構成されるリポソーム技術と高分子修飾化技術を積極的に利用して，薬物が持っている不安定要因を回避することが可能であることを学んだ．このこ

筆者紹介：1993年3月岐阜薬科大学大学院薬学研究科修了，小野薬品工業株式会社を経て1997年9月大塚製薬株式会社入社．2003年3月金沢大学大学院自然科学研究科博士課程修了．現在に至る．研究のモットー：あきらめるまえに，やれるだけのことはやる．趣味：読書，将棋，野菜栽培．

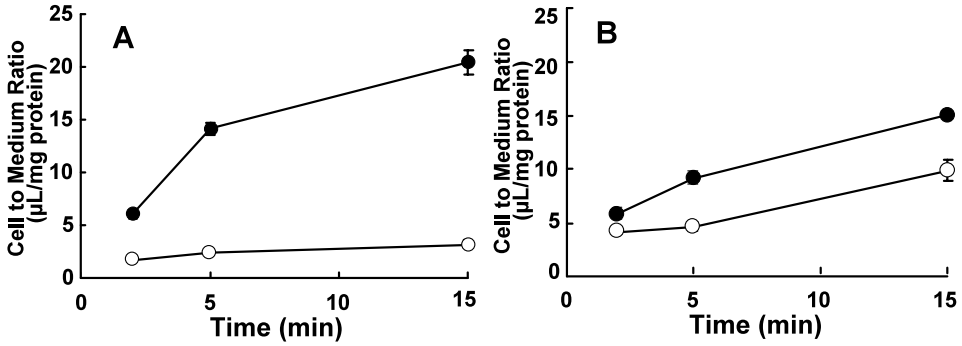

Fig. 1. Uptake of L-[^{3}H] Carnosine by HepG2 and WIFB9 Cells Transduced with AdhPEPT1-EYFP. Time courses of L-[^{3}H] carnosine uptake were measured in by HepG2 (A) and WIFB9 (B) cells. Cells were non transduced (○) or were transduced with AdhPEPT1-EYFP at MOI 40 (●). Uptake of L-[^{3}H] carnosine (100 nM) by transduced HepG2 and WIFB9 cells was measured at 37°C by incubating cells in HBSS at pH 6.0. Data are presented as means ± SEM of four experiments. When SEM was smaller than symbol, it was not shown.

とは主薬の生体内におけるパフォーマンスそのものを，製剤技術で変えることができることをも意味し，学生時代の私はいたく感動し，それ以来DDSに関する研究にすっかりと魅了されてしまった．

現在では，リポソームの表面修飾化技術に関しては，PEGリポソーム等の医薬品が商品化されすっかり定着化している．リポソームに限らず蛋白等においても高分子修飾化技術に関する研究は盛んに発展を続けている．本分野の研究に携われたことを感謝している．ここで研究させていただいた物理系薬剤を中心とした高分子被覆による機能性リポソームの設計に関する研究は，後の製薬企業における製剤設計を行う上での基盤となって，今でも私を支えている．

3. トランスポーターを利用したDDS

製薬企業での研究活動も7年程経過した時に，小富正昭製剤研究所所長から，外部の研究機関で勉強する機会を与えていただいた．このときはまさに，人との出会いは，その後の研究活動の方向性をも変えてしまうほど重要であると感じた．これまでのものづくりを中心とした研究活動から一変して，生体内における薬物の輸送特性を眺めるために，金沢大学薬学部辻彰教授が主宰される研究室で勉強させていただくことになった．まさに，これまでの物理系薬剤中心であった研究活動から生物系薬剤への挑戦であった．慣れない分野での研究ではあったが，それでも何とか，辻彰先生，玉井郁巳先生（現東京理科大学薬学部教授）および崔吉道先生（現共立薬科大学助教授）のご指導のもと研究のスタートを切ることができた．はじめは，アデノウイルスを用いてヒトペプチドトランスポーター遺伝子（hPEPT1）を外来遺伝子として異所性に肝臓あるいは血液脳関門（Blood-Brain-Barrier, BBB）へ発現することにより，ペプチド性化合物を肝臓あるいは脳へ選択的にデリバリーすることが可能かに関する研究に挑戦させていただいた[1,2]．

本研究では，まずhPEPT1およびEYFP（Enhanced yellow fluorescent protein）の融合遺伝子をコードするアデノウイルスの構築（AdhPEPT1-EYFP）を行った．*In vitro* において，分極性を有する肝モデル細胞HepG2細胞およびWIFB9細胞にウイルスの感染を行い，ペプチド輸送活性が誘起されることを確認した（Fig. 1）．さらに，*in vivo* においてはAhhPEPT1-EYFPをマウスに導入したところ，ペプチドトランスポーターの基質であるL-[^{3}H] carnosineの肝臓への移行性が選択的に顕著に増加した（Fig. 2）．また，BBBを構成する脳毛細血管内皮細胞のモデル細胞RBEC1へペプチドトランスポーターを外来遺伝子として発現することにより，ペプチド性薬物の移行性が顕著に増加した．さらに，ラットの頸動脈カニュレーションによりAdhPEPT1-EYFPウイルス感染を行ったところ，ラット脳においてPEPT1-EYFPの発現が確認され，基質であるセファドロキシルの脳におけるK_p値は，AdhPEPT1-EYFPを感染したラットでは非感染およびコントロールウイルスを感染したラットと比較して約2倍に上昇した．これらのことから肝

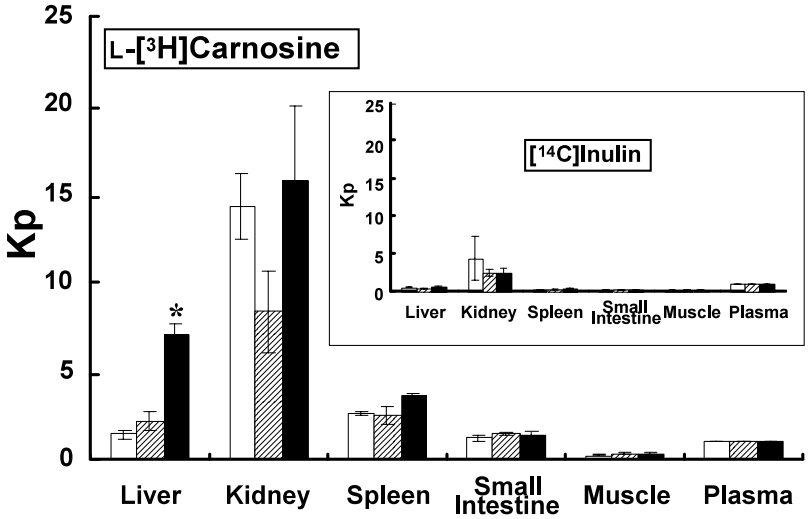

Fig. 2. Tissue-to-Plasma Concentration Ratio (K_p Value) of L-[^{3}H] Carnosine and [^{14}C] Inulin (Inset) in Various Organs of Mice without Transduction (Open Column) or with Transduction of AdhPEPT1-EYFP (Closed Column) and AdGFP (Striped Column).
K_p values were obtained 30 min after intravenous administration of these compounds in mice with or without transduction of adenovirus. Each value represents the mean ± SEM of three mice.
*, Significantly increased at a dose of 1×10^{10} PFU/mouse compared with non-transduced mice by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

臓あるいは血液脳関門へのペプチドトランスポーター遺伝子導入は，PEPT1 の基質となる薬物の臓器選択的なデリバリーに有用である可能性が示された．

この研究で，一番苦労したことは，分子生物学に関する自分の知識および理解不足を補いながらテーマに望まなければならないことであった．辻先生の研究室におられた当時の 4 年生や大学院生についていくのが必死だったことを記憶している．また，本研究でトランスポーター遺伝子発現後の細胞内での局在を研究するために用いるキメラ遺伝子とアデノウイルスの構築になんと半年程も要してしまったのには，さすがに焦りの色を隠せなかった．恐らく先生方のお気持ちは，それ以上だったとお察しする．このころから，研究には謙虚さと我慢と体力が必要条件であることを痛いほど身にしみてわかるようになった．現実化という点では，克服しなければならない点が多数あるが，先生方の親身なご指導のもと本研究の方向性が見出せた点では非常に勉強になったと感じている．

次に，消化管に発現する吸収型あるいは排泄型トランスポーターの輸送特性に着目した薬物デリバリーに関する研究に関わらせていただいた[3,4]．消化管には栄養物質と栄養物質と構造が類似する化合物を効率的に能動輸送するトランスポーター群が発現していることが報告されている．中でも，ペプチドトランスポーター（PEPT1）は，小腸上皮細胞に発現し，ジペプチドおよびトリペプチドのみでなくβ-ラクタム抗生物質を輸送する．このような，吸収型トランスポーターを標的にして，L-doap のペプチド誘導体化により消化管吸収改善を試みた医薬品開発上興味深い報告がなされている[5]．しかしながら，*in vitro* の実験系においてペプチドトランスポーターに認識されることが判明されているにもかかわらず，経口での吸収性が実際には低い化合物が存在する．そこで，次の研究課題として，PEPT1 の基質でありながら，*in vivo* における吸収性が低い化合物の吸収特性を，PEPT1 の駆動力すなわち pH により *in vivo* レベルで制御が可能かを明確にする研究に着手させていただいた[3,6]．

PEPT1 の駆動力を利用してペプチドおよびペプチド性化合物の吸収を改善するために，Eudragit L100-55 をプロトン供給が可能なモデル高分子として選択した．本高分子は，医薬品開発において腸溶性高分子としての使用実績があり，また分子構造内にカルボキシル基を有しているため，腸管内でプロトンをリリースする特性を有している．本研究では，本高分子の添加量とともに，緩衝液の pH が低

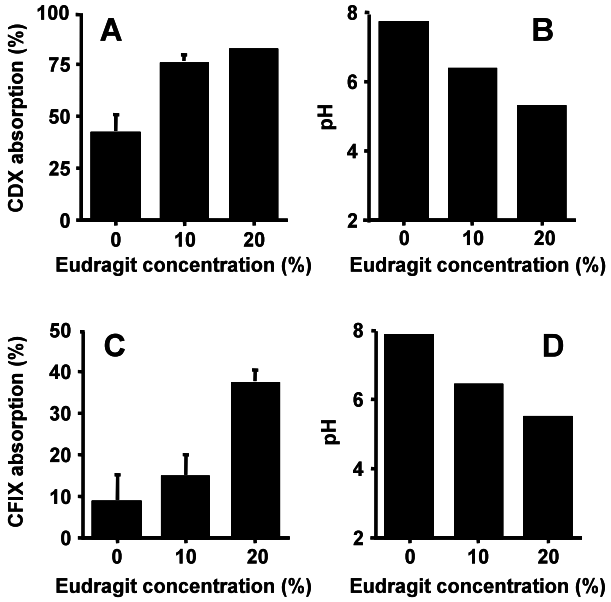

Fig. 3. Influence of Eudragit L100-55 on the *In Situ* Absorption Profile of Zwitterionic β-Lactam Antibiotic Cefadroxil or Dianionic Cefixime and pH of the Intestinal Content Expelled from the Segment.
One mM cefadroxil or 0.5 mM cefixime was administered to intestinal loop of SD rats. (A) cefadroxil (CDX) absorption; (B) pH of the intestinal content in the presence of CDX; (C) cefixime (CFIX) absopiton; (D) pH of the intestinal content in the presence of CFIX. Each column represents the mean ± S.E.M. of three experiments.

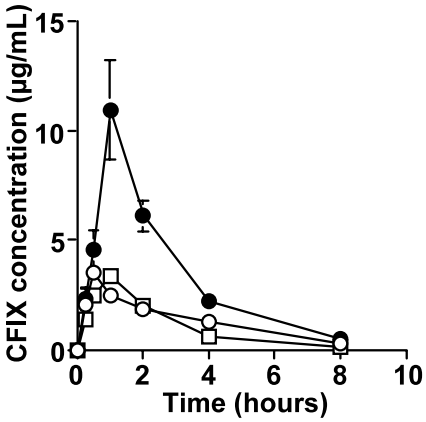

Fig. 4. Oral Absorption Profile of Cefixime after Administration of the Drug (2.3 mg/kg) to Rats in the Absence of Polymer (○), in the Presence of Eudragit L100-55 (500 mg/kg) (●) and in the Presence of Eudragit RS PO (500 mg/kg) (□).
Each point represents the mean ± S.E.M. of five experiments. When SEM was smaller than symbol, it was not shown.

下し，基質としてセファドロキシルおよびセフィキシムのラット回腸からの吸収が増加した（Fig. 3）．さらに，ラット *in vivo* においても Eudragit L100-55 の同時投与によりセフィキシムの経口吸収性が顕著に増加した（Fig. 4）．これらのことから消化管管腔内において酸性高分子を用いて，一過的に pH をコントロールすることによりペプチドトランスポーターに認識される化合物の吸収性が改善されることが示された．トランスポーターの駆動力を制御することにより難吸収性化合物の輸送特性を向上できたことは，今後高分子により生体膜輸送バリヤーの低減化ができる可能性を感じて，研究当時は非常に感銘をうけた．また，本手法を用いることにより，ペプチド性化合物の経口投与での治療効果を，低用量で実現させることも期待できる．

医薬品開発における薬物吸収，薬物ターゲティングあるいは生体内における薬理活性の最適化を行う上で，トランスポーターを考慮することは重要な要素となってきている．また，薬物相互作用や毒性を考える上でも重要な位置を占めている．このように製薬企業においても，トランスポーターを利用する試みは日増しに高まっている．今後もキーを握る本研究分野に触れることができて非常に感謝している．

4. 脂質組成物を利用した核酸分子の肺細胞への DDS

会社に戻ってからは，小富所長からこれまでに培った経験を生かして製剤分野で肺細胞デリバリーに着目した新しいことに挑戦せよというお言葉をいただいた．企業における研究活動としては，再出発であった．ありがたい言葉であるが，非常に厳しい言葉でもあった．幸いにも，辻先生の教室でトランスポーターの機能阻害のためにアンチセンスを用いた研究を進めていたため，遺伝子阻害に関する研究については興味を抱いていた．現在，遺伝子の発現レベルを mRNA レベルで阻害するアンチセンスおよび siRNA 等の核酸分子は，低分子化合物では治療が困難な難治性疾患に対する治療薬としての開発が期待されている．核酸分子を投与する経路としては，全身および局所投与経路が考えられ，それぞれ多数の試みがこれまでにもなされている．筆者らは，局所投与経路が適応できる臓器の中で，肺とい

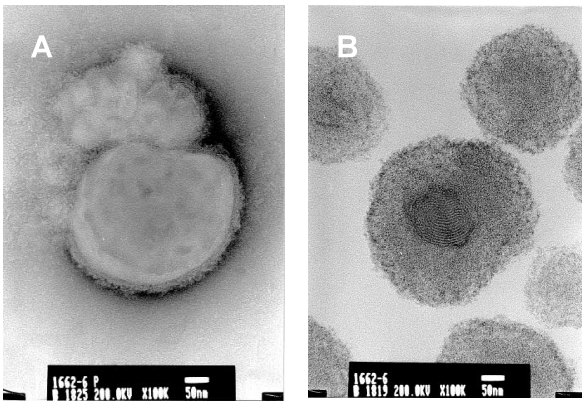

Fig. 5. Transmission Electron Micrographs of Lipid/siRNA Complexes.
(A) Surface structure of lipid/siRNA complexes revealed by negative staining electron microscopy. (B) Inner structure of lipid/siRNA complexes revealed by freeze-fracture electron microscopy

う組織は，全身性の副作用を低減し，肺局所内において薬物濃度を維持できる点に着目し，siRNA分子の肺細胞へのデリバリーについて研究を行っている．

これまでの研究では，核酸分子の肺細胞への送達のために肺細胞脂質輸送特性に焦点をあてて核酸送達用組成物の構築検討を中心に行ってきた．そのうち，核酸と送達用組成物で構成されるキャリヤーは，通常のリポソーム構造とは異なり，内部に膜構造をとり外部がアモルファス構造をとることがわかった（Fig. 5）．現在，本構造体が形成されるメカニズムとともに本DDSキャリヤーの肺における機能性を中心に研究の展開を図っている[7]．

DDSキャリヤーの開発を行う上では，DDSとしての新規機能性を探索する研究と同時に，安全性をも考慮する必要がある．特に，慢性疾患の場合には，頻回投与が要求され，キャリヤー投与後の安全性面を十分に懸念する必要がある．このような観点から，肺に存在する生体内物質である肺胞サーファクタントを，DDSキャリヤーとして用いる試みもなされている[8,9]．肺胞サーファクタントの中には，医薬品として承認されているものもあり，安全性の面からは比較的使用に耐えうる可能性は高いと考えられる．また，肺細胞における肺胞サーファクタントの生体内輸送機構に関する研究も製剤とは異なった視点から行われている[10]．こうしたアプローチと安全性面をも加味して，肺細胞へのデリバリーを構築することは今後重要であると考えている．

一方，核酸分子を治療薬として開発する上では，核酸分子に由来するインターフェロン反応やオフターゲット機能についても問題点として考慮しなければならない．また，それ以上に，デリバリーの問題は必須課題である．製剤研究所戸口始顧問からは，治療薬として核酸分子の開発を行うには，1にも，2にも，3にもDDSが必要であるというご助言をいただいている．まさにDDSが成功の鍵を握っているといっても過言ではない．本研究分野において，DDS研究が新たな切り口を提供し，益々の研究が進展することを期待しているところである．

5. お わ り に

本稿においては，筆者が生体膜の輸送特性を利用した低分子および高分子薬物のデリバリーに関してこれまでに携わることができた研究活動について紹介させていただいた．製薬企業における研究活動では，スピード感が要求されまた社内事情に適応して研究テーマが変容することもある．振り返ってみると，これまでの研究活動の多くは，幸運にも生体膜に関連した研究に関わることができた．生体膜輸送特性を利用したデリバリーについては，製薬企業において候補化合物を標的細胞に効率よくデリバリーし，治療効果を最大限にまでに引き上げ医薬品開発を合理的に進める上でも重要であると考えている．また，薬物に新たな付加価値特性を付与するのは薬物送達技術に依存するところが大きい．今後も，生体膜輸送特性を利用したより安全で患者にやさしい新製剤技術の開発を目指した研究を行い，医療に貢献したいと考えている．

引 用 文 献

1) H. Toyobuku, Y. Sai, I. Tamai, A. Tsuji, Enhanced delivery of drugs to the liver by adenovirus-mediated heterologous expression of the human oligopeptide transporter PEPT1, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 812–819 (2002).
2) H. Toyobuku, Y. Sai, T. Kagami, I. Tamai, A. Tsuji, Delivery of peptide drugs to the brain by adenovirus-mediated heterologous expression of human oligopeptide transporter at the blood-brain barrier, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 40–47 (2003).
3) T. Nozawa, H. Toyobuku, D. Kobayashi, K.

Kuruma, A. Tsuji, I. Tamai, Enhanced intestinal absorption of drugs by activation of peptide transporter PEPT1 using proton-releasing polymer, *J. Pharm. Sci*., **92**, 2208–2216 (2003).
4) H. Toyobuku, I. Tamai, K. Ueno, A. Tsuji, Limited influence of P-glycoprotein on small-intestinal absorption of cilostazol, a high absorptive permeability drug, *J. Pharm. Sci*., **92**, 2249–2259 (2003).
5) I. Tamai, T. Nakanishi, H. Nakahara, Y. Sai, V. Ganapathy, F.H. Leibach, A. Tsuji, Improvement of L-dopa absorption by dipeptidyl derivation, utilizing peptide transporter PepT1, *J. Pharm. Sci*., **87**, 1542–1546 (1998).
6) 辻　彰, 玉井郁巳, 崔　吉道, 小富正昭, 豊福秀一, 特願 2003-6005.
7) 豊福秀一, 宮尾英男, 佐藤正子, 関口和生, 特願 2005-303497.
8) J.J. Haitsma, U. Lachmann, B. Lachmann, Exogenous surfactant as a drug delivery agent, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 197–207 (2001).
9) C. Vermehren, S. Frokjaer, T. Aurstad, J. Hansen, Lung surfactant as a drug delivery system, *Int. J. Pharm*., **307**, 89–92 (2006).
10) K. Osanai, C. Tsuchihara, R. Hatta, T. Oikawa, K. Tsuchihara, M. Iguchi, T. Seki, M. Takahashi, J. Huang, H. Toga, Pulmonary surfactant transport in alveolar type II cells, *Respirology*, **11**, S70–S73 (2006).