

《若手研究者紹介》



安全, 安心な医薬品の提供をめざして

吉 田 寛 幸* Hiroyuki Yoshida

国立医薬品食品衛生研究所薬品部

1. は じ め に

筆者は, 大学4年次より京都大学大学院薬学研究科・高倉喜信教授主宰の病態情報薬学分野に配属され, それが薬剤学との出会いとなった。6年間の研究生活では, 新たな発見をする研究の楽しさだけでなく, その何倍もの研究の難しさも経験させていただいた。現在は, 国立医薬品食品衛生研究所薬品部にて医薬品の評価研究に携わっている。今回, 有り難くも本コラム欄の執筆の機会をいただいたので, 筆者のこれまでの研究について紹介させていただきたい。

2. 病 院 実 習

大学院の研究活動は病院実習から始まった。当時の修士課程には, 薬剤師として半年間の病院実習を履修できる臨床薬学コースが設けられていた。薬剤師としての職に興味があった筆者は, 修士課程1年次の5月から10月までの6ヶ月間, 京都大学医学部附属病院薬剤部にて薬剤師として, 乾賢一教授(現, 京都大学名誉教授, 京都薬科大学学長), 寺田智祐助手(現, 滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部教授・薬剤部長), 尾上雅英先生のご指導のもと, 貴重な臨床実習を経験させていただいた。薬剤部の各部署を一通り経験した後に, 応用実務実習として午前中は注射剤の調剤および注射剤の病棟配置薬の整備を行

い, 午後は尾上先生とともに第一外科にて病棟業務を行った。新規入院患者の持参薬のチェックから入院患者の処方薬や検査値のモニタリング, 服薬指導など, 現場の薬剤師にとっては当たり前の業務であるが, 現場から離れて医薬品の研究をする身となった今となっては, 実際に医薬品を使用される患者さんを目の当たりにしてその実情を肌身で感じる事ができたのは非常に良い経験となったと思う。第一外科は主に消化器を中心とした癌患者が多くを占めており, その大部分が手術や癌化学療法を目的として入院されていた。特に, 術後であったり癌化学療法による副作用のため食事摂取が困難となり, 薬剤や栄養補給を輸液に頼る患者が多かったことから, 注射薬の適正使用のための服薬管理についてまとめ, 実習を終えた。癌化学療法は常に副作用との闘いであるが, 副作用が原因で治療を中止せざるをえない患者さんのあまりの多さに驚き, 薬剤学の重要性を強く感じたのを覚えている。病院実習の終わり頃は, 就職活動が始まる時期であった。筆者は実習を通して薬剤師としての職に魅力を感じる一方, (毎日輸液を扱っていただけに) 某製薬メーカーの会社見学など企業への就職も考えたが, どうにも自分がメーカーで働くところがイメージできなかったこと, また患者さんと接する現場で働きたいという思いもあり, 当時は大学院を卒業後は薬剤師として働くことに決めていた。

余談になるが, 病院実習が始まった頃から定期的に献血に通うようになった。ラボでマウスの採血をする一方, プライベートではせつせと血を抜かれていたわけである。薬剤学の研究者の生活活動強度は一般に低いと思われるが, 400 mL全血または成分献

*2004年3月京都大学薬学部総合薬学科卒業。2009年3月京都大学大学院薬学研究科博士課程修了。2009年4月より国立医薬品食品衛生研究所薬品部研究員, 現在に至る。趣味: 草野球, 献血。連絡先: 〒154-0016 東京都世田谷区上用賀 1-18-1
E-mail: h.yoshida@nihs.go.jp

血であれば、採取血液から15項目の生化学検査・血球計数検査を実施し結果を報告してくれるので、定期的な献血は健康管理の一助にもなると思われる。ここを読まれた方は、今年のうちぜひ一度献血に行かれて、マウスの気分になって採血されてみてはいかがだろうか。

3. 大学院での研究

研究室に戻り最初に取り掛かったテーマは、初代培養細胞を用いたプラスミドDNA (pDNA)、特に非メチル化CpG DNAに対する免疫応答の評価であった。高倉研では、核酸を用いた遺伝子治療・DNAワクチン療法の開発を一つのテーマとして掲げており、本テーマは其中でも治療における副作用評価や作用増強を目指した研究として位置づけられる (Fig. 1)。また核酸に対する免疫応答の評価は、核酸を抗原とする全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの自己免疫疾患における免疫応答惹起のメカニズム解明にも繋がることから、非常に興味を持って取り組ませていただいた。まずpDNAの静脈内投与時に誘導される炎症性サイトカイン産生に寄与する細胞群について検討した。マウス尾静脈よりpDNAを静脈内投与した場合、その多くが肝臓や腎臓、脾臓に集積することが確認されていることから、これらの臓器中に存在する食食系の細胞をターゲットとした。具体的には、肝非実質細胞、脾臓マクロファージ (M ϕ)、腎臓からはメサングウム細胞、加

えて常在性の腹腔M ϕ を単離・培養することになったわけだが、筆者の技術的な未熟さもあり、免疫応答の評価以前に、細胞の単離・培養にてこずる毎日であった。その間、研究室内で毎週チーム別に行われていたグループディスカッションでは、報告できるデータがないという状況が続き、今振り返っても辛い時期であったのを覚えている。初代培養細胞は十分なToll-like receptor-9 (TLR9)発現を示し、CpG DNAに対する応答性もTLR9発現量におおよそ依存していた。一方で、マウスM ϕ 培養細胞株であるRAW264.7細胞と比較すると、初代培養細胞はtumor necrosis factor- α (TNF- α)産生量が少ないことを明らかとした¹⁾。

博士課程に進学後は、修士課程の研究で見出された免疫応答の細胞間の違いについてさらに検討することとなった。腹腔M ϕ とRAW264.7細胞を比較すると、TNF- α 産生量はTLR9発現量やpDNAの細胞内取り込み量とは全く相関しないことが明らかとなり、それ以外の因子がCpG依存的TNF- α 産生誘導を制御していると推察された。高倉研では、以前、DNAの細胞内取り込みに関与する細胞表面受容体の候補分子としてFibronectin (FN)に着目したことがあり、腹腔M ϕ の細胞表面に多くのFNが存在していることを確認していた。FNは、古くよりコラーゲンやヘパリン、DNAとの結合ドメインの存在が知られており、また細胞表面の各種インテグリンと結合し、mitogen-activated protein kinase経路

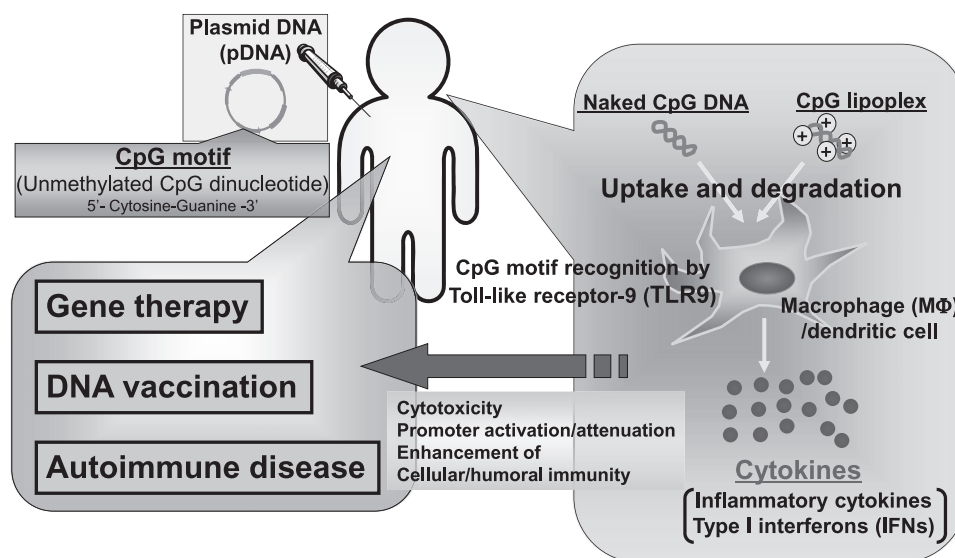


Fig. 1. Influence of macrophage and dendritic cell activation on *in vivo* gene therapy, DNA vaccination and autoimmune diseases.

や種々の転写因子活性を促進することが報告されている。特にインテグリン $\alpha 5\beta 1$ と結合することで、CpG/TLR9 経路への関与が示唆される src ファミリーキナーゼの活性化の報告もあったことから、FN の存在が CpG 依存的な TNF- α 産生に関与していると仮定し、検討することとなった。CpG 依存的 TNF- α 産生能が高い RAW264.7 細胞および同じくマウス M ϕ 様細胞株である J774A1 細胞は FN 発現量が非常に低い一方で、CpG 依存的 TNF- α 産生能が低い常在性腹腔 M ϕ およびチオグリコレート誘導腹腔 M ϕ は、細胞表面および細胞内に豊富な FN の存在が確認され、FN が CpG 依存的 TNF- α 産生に抑制的に働いていると推察された。そこで FN 発現量が低い RAW264.7 細胞に対し pDNA とともに血清 FN を添加したところ、FN 濃度依存的に TNF- α 産生が抑制されたのに対し、他の細胞外マトリックスであるラミニンやコラーゲンには認められなかった (Fig. 2)²⁾。さらに検討を進めるうちに、血中や培地中で想定される濃度の Ca²⁺ や Mg²⁺ などの二価カチオン存在下では、pDNA は FN とは結合しないことが明らかとなり、FN は pDNA とは結合することなしに CpG 依存的 TNF- α 産生を抑制する可能性が示唆された。その後も pDNA の細胞内取り込み量や細胞内挙動への影響など、FN による TNF- α 産生抑制のメカニズムについて検討を重ねたが、残念ながらポジティブな結果を得られることなく博士論文をまとめねばならなかった。本現象は、生体内において M ϕ が過剰な CpG/TLR9 応答を惹起することなく、安全に DNA を処理するための機能とも考えられ、さらなる検討が望まれる。

修士課程 2 年次より 4 回生の学生を毎年一人ずつ指導する機会をいただいた。指導と言っても当初は筆者自身も十分な知識や技術を持ち合わせておらず、実験も二人三脚の状態非常に頼りなかったかもしれない。一緒に取り組んだ研究の中で、博士課程 3 年次には、関節リウマチ患者の炎症部位に集積が認められる酸化 DNA (8-hydroxydeoxyguanine, oxo-dG を含有する DNA) による免疫応答増強作用について取り上げた。これは、筆者が病院実習を終えてラボに戻った際、西川元也准教授から一度いただいたテーマであったが、酸化 DNA の調製がうまくいかず断念した経緯があり、今度こそという思いで取り組ませていただいた。酸化 DNA は自前で調

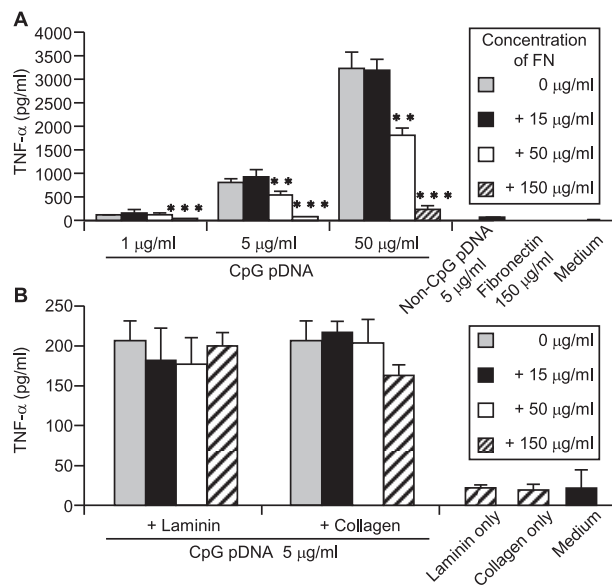


Fig. 2. Effect of protein on the cytokine production induced by CpG DNA in murine macrophages. (A), RAW264.7 cells were incubated with pDNA in the presence of fibronectin at 0 μ g/ml (gray bars), 15 μ g/ml (closed bars), 50 μ g/ml (open bars) and 150 μ g/ml (hatched bars). (B), The cells were incubated with pDNA in the presence of laminin or collagen at 0 μ g/ml (gray bars), 15 μ g/ml (closed bars), 50 μ g/ml (open bars) and 150 μ g/ml (hatched bars). The supernatants were collected 8 h after addition of pDNA and the concentration of TNF- α secreted from the cells was quantified by ELISA. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Significantly different from the FN-free group. Each result represents the mean \pm SD of triplicate values.

製する以外にも、ODN を oxo-dG 修飾した市販品を手に入れることが可能であったが、高額であったため購入の許可を得る必要があった。そこで、指導していた 4 回生に研究室セミナーで酸化 DNA と免疫応答に関連する情報を整理して発表してもらい、再度先生方の興味を引くことで、酸化 DNA 購入の GO サインをいただき研究を始めることができた。non-CpG ODN であっても酸化 DNA の関節腔内投与により CpG motif 非依存的に炎症を惹起するとの報告があったが、筆者らが RAW264.7 細胞を用いて検討したところ、酸化 DNA 自体に TNF- α 産生誘導能はなく、一方で酸化 DNA を CpG ODN と同時に添加することで CpG 依存的な TNF- α 産生が増強されることを見出した³⁾。この酸化 DNA が TNF- α 産生増強作用を発揮するにはある程度の鎖長が必要であり、また偶然にも酸化 DNA の構成成分について検

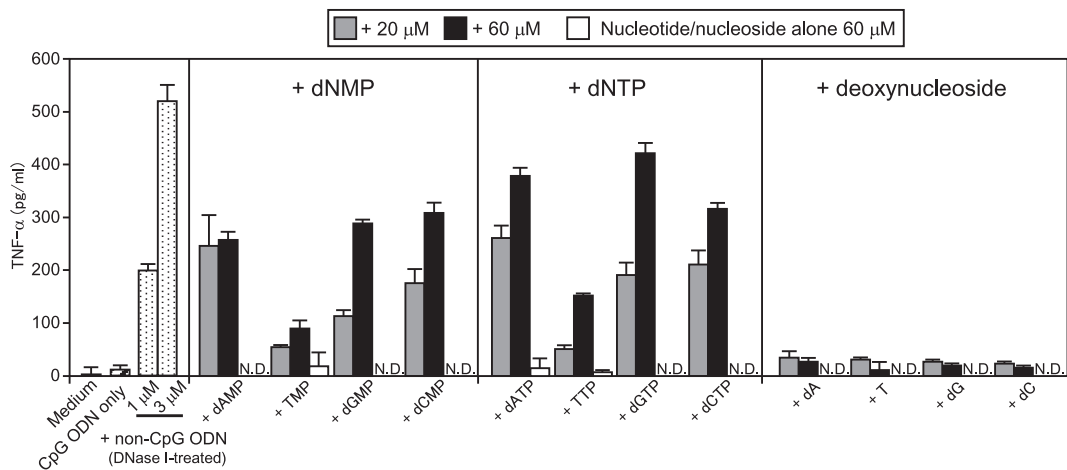


Fig. 3. Effect of DNA components on CpG DNA-dependent TNF- α production in RAW264.7 cells. The cells were incubated with CpG ODN (1 μ M) in the presence or absence of DNase I-treated non-CpG ODN, dNMPs, dNTPs or deoxynucleosides, or in the presence of dNMPs alone, dNTPs alone or deoxynucleosides alone. After 8 hr, the supernatants were collected, and the concentration of TNF- α was determined by ELISA. N. D., not detected. Results are typical of two independent experiments and are expressed as mean \pm SD of triplicate values.

討する過程で、酸化物でなくともリン酸基を一つ以上持つ deoxynucleotide (dNMP, dNTP) は、その塩基種にかかわらず CpG 依存的 TNF- α 産生を増強するという興味深い現象が明らかとなった (Fig. 3)。これは、DNaseI 処理により断片化された DNA による免疫応答増強作用として、幸運にも一つの論文として報告することができた⁴⁾。CpG motif 依存的細胞活性化のメカニズムについては、受容体である TLR9 こそ同定されているものの不明な点も多く、CpG DNA が TLR9 と結合する際に 2 本鎖 DNA として結合するのか、1 本鎖 DNA に分かれて結合するのか、4 回生と共にソラレンを用いて 2 本鎖 DNA を共有結合させて免疫応答作用の検討を試みたこともあった。はじめは大変な大学院での研究生活であったが、4 回生や他の院生らの助けもあり、最後は本当に楽しく実験や研究をできたと思う。

4. 医薬品の評価研究

2009 年 4 月より国立医薬品食品衛生研究所薬品部に赴任し、川西徹部長 (現、国立医薬品食品衛生研究所所長)、四方田千佳子室長のご指導のもと、有効性・安全性・品質確保を目指した医薬品の評価研究に携わることとなった。大学院時代は博士号を取得後に薬剤師として働くつもりであった筆者であるが、博士課程 3 年次の薬剤師の募集が始まる直前に

当所の求人話を聞き、薬剤師として目の前の患者さんのために働くことも非常にやりがいのある仕事ではあるが、一歩下がって、より広く影響力のあるところで薬に関わる仕事をするのも面白いのではないかと考え、悩んだ末に現職を選んだ。まだまだ内容的に乏しいものではあるが、現在取り組んでいる研究について少し紹介したい。

薬品部に赴任した当初、核酸医薬品の評価をしたと考えたが、核酸医薬の市販製剤はほとんどなかったことから、古くからあるものの評価法の標準化が不十分であると感じた吸入剤を取り上げることとなった。当時、日本薬局方にはエアゾール剤はあったものの吸入剤は収載されておらず (第 16 改正日本薬局方に初めて収載)、当部においても吸入剤についての評価経験が全くなかった。また肺・気道表面の特殊な環境における薬物の溶出挙動の制御について興味を覚えたことも、吸入剤を取り上げた理由の一つである。肺局所をターゲットとした場合、空気力学的粒子径を 1~5 μ m にすることが肝要であり、その粒子径を管理することが吸入剤の品質確保につながると考えられる。一方、到達した気管支または肺胞において薬効を示すには、到達した部位で溶解しなければならず、特に難溶解性であるステロイド製剤の場合、その溶解速度が薬効に影響を与えると考えられることから、経口固形製剤と同様に、吸入

剤についても薬物の溶出挙動の評価法の開発を試みた。肺胞の表面積は70 m²以上に及ぶのに対し、その表面に存在する肺液量は10~20 mLと非常に少なく、薬物の溶解に利用される水分量は経口固形製剤と比較してもずっと小さい。そこで、より肺胞表面に近い *in vitro* モデルを作製するため、ヒトII型肺胞上皮細胞であるA549細胞を用いて気液界面培養を行った。これにより、界面活性作用を有し薬物の溶出にも影響すると考えられる肺サーファクタントタンパク質を分泌し、粘液層の厚さが約60 μmである *in vitro* 肺胞表面モデルを作製した。この細胞とアンダーセン型カスケードインパクト (ACI) を組み合わせることにより、吸入剤を粒子径別に分けて溶出速度を評価することが可能であった。今後は添加剤の影響等も含めて製剤間の比較検討を試みる予定である。また、送達量均一性試験と併せて空気力学的粒子径の評価試験の方法について日米欧の国際調和も進められていることから、現在最も汎用されているACIを用いた粒子径測定をより再現よく評価するために、試験における変動要因について検討中である。

5. おわりに

以上、筆者のこれまでの研究についてまとめてさせていただいた。振り返ると、常に壁にぶつかり右往左往しながらの研究生活で残念ながら中途半端で終わった研究も多々あるが、今こうして一研究者としての自分があるのは、ご指導くださった諸先生方

や多くの先輩・後輩方のお陰であるとおつくづく感じる。近年のDDS技術の進展もあり、新薬のみならず後発医薬品においても高機能性製剤が増えてきている。これらの医薬品の品質の担保、また同等性を保証するのに必要十分な試験法を開発することは、製薬企業の不必要な負担を減らし、また患者さんが安心して服用できる医薬品の提供につながるものと信じている。より適切な評価法の開発/設定を目指して、産側の意見に耳を傾けつつ、またアカデミアの皆様にご教を請いながら、柔軟な姿勢で今後の研究活動に臨んでゆく所存である。

引用文献

- 1) H. Yoshida, M. Nishikawa, S. Yasuda, Y. Mizuno, Y. Takakura, Cellular activation by plasmid DNA in various macrophages in primary culture, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 4575–4585 (2008).
- 2) H. Yoshida, M. Nishikawa, S. Yasuda, H. Toyota, T. Kiyota, Y. Takahashi, Y. Takakura, Fibronectin inhibits cytokine production induced by CpG DNA in macrophages without direct binding to DNA, *Cytokine*, **60**, 162–170 (2012).
- 3) H. Yoshida, M. Nishikawa, T. Kiyota, H. Toyota, Y. Takakura, Increase in CpG DNA-induced inflammatory responses by DNA oxidation in macrophages and mice, *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 424–431 (2011).
- 4) H. Yoshida, M. Nishikawa, T. Kiyota, S. Uno, H. Toyota, R. Takahashi, M. Narita, Y. Takakura, 5'-Phosphate oligodeoxynucleotides enhance the phosphodiester-CpG DNA-induced inflammatory response in macrophages, *Eur. J. Immunol.*, **41**, 425–436 (2011).