

《研究室紹介》

患者に優しい製剤を目指して

瀬 田 康 生* Yasuo Seta

東京薬科大学薬学部医療薬物薬学科製剤設計学教室

1. はじめに

私, 瀬田は本学に2012年1月に赴任する直前まで製薬企業(現第一三共株式会社)に籍を置いていた。1980年に千葉大学薬学研究科(博士前期課程)を修了後, 当時の三共株式会社に入社。以後30年以上, 研究所で製剤設計とプレフォーミュレーション関係の仕事が続けてきた。この間, 1988~1990年の米国ユタ大学への留学や2007年の企業統合による第一三共株式会社の誕生という研究者あるいは企業人としての大きな変化を経験したが, “医薬品を創り, 育てる”という目的意識は一貫していた。しかし, 今回の変化は, “人を育てる”ことに目的意識が大きく変わることになった。私の企業での経験が, 未来の創薬研究者や薬剤師のお役に立てるのではと考え, 大学へ移ることになった。同時に研究内容も企業での製薬技術を中心としたものから核酸医薬を扱う Drug Delivery System (以下 DDS) や可溶化技術に変わった。核酸医薬のためのキャリアとしてのナノミセルの最適化を目指した製剤設計やナノ粒子化, 自己乳化型 DDS 製剤といった難溶性化合物の可溶化による経口吸収性の向上の検討を行っている。現在は網膜疾患(加齢黄斑変性症など)・脳腫瘍などの未だ有効な治療法がない疾患の治療を目指し, 非侵襲的な点眼ならびに経鼻投与による標的化 DDS 製剤の設計等に取り組んでいる。さらにこれらの研究を通じて, 創薬のできる6年制薬剤師の育成

を目指している。

これらの研究テーマは従来から製剤設計学教室で行われていたもので, 今回ご紹介する当教室の主な研究内容もその大部分は前任者である岡田弘晃先生(現(株)岡田 DDS 研究所所長), 高島由季准教授および金沢貴憲助教の寄与によるところが大きいことを予め述べておく。

2. 核酸医薬とキャリア

病気の原因あるいは進行にかかわる特定の塩基配列や特定のタンパク質を認識して遺伝子発現を抑制したり, タンパク質の機能を阻害したりする, 核酸医薬品が最先端の分子標的医薬として期待されている。がんをはじめ, 眼科疾患, 感染症, 循環器疾患, 炎症や自己免疫疾患, 脳神経疾患などの幅広い領域に対して研究・開発が進められている。核酸医薬にはアンチセンス, リボザイム, small interfering RNA (以下, siRNA), デコイ核酸, アプタマー等があり, それぞれ構造や作用機序が異なる。これらの中で, 海外で多くのアンチセンスと siRNA が開発されている。siRNA は 21-23 塩基よりなる二本鎖 RNA で, 1998 年に発見された RNA 干渉 (RNA interference) により, mRNA を切断して標的タンパクの発現を抑制することで薬効をあらわす。

核酸医薬は, mRNA の特異配列などの従来の医薬品とは全く異なる分子を創薬標的としているため, 特異性が高く, また, 比較的分子量 (必要な配列塩基数が少ない) で化学合成が可能のため, 生産が容易で品質的には安定性が高く, 規格設定等も容易であると考えられる。しかし, 核酸は血液中では短時

*〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1
TEL/FAX : 042-676-4490
E-mail: setayas@toyaku.ac.jp



図1 教室メンバーの集合写真 (2013年4月撮影) 映画・TVドラマのロケで良く使われる正面階段にて前列中央が瀬田, 左隣が高島准教授, 右隣が金沢助教.

間で分解され, 組織・細胞移行性がないため, 化学修飾や細胞膜透過配列の付加, キャリアへの封入などのDDSが必要である. 目的以外の非特異的な遺伝子の発現抑制効果であるオフ・ターゲット効果, インターフェロン産生誘導による副作用等の課題も多い. しかし, 核酸医薬の製剤的および製薬技術的課題であるヌクレアーゼに対する安定性や組織・細胞移行性に関しては各種キャリアの開発も進んでいる. またターゲティング能, 細胞膜透過性や細胞内動態にすぐれたキャリアの開発により投与量が低下すれば製造コストも改善されると期待される.

このように核酸医薬にとり核酸を細胞内に有効な形で配送するDDSであるキャリアは重要な要素となる. 当教室ではsiRNAの体内動態および細胞内動態を最適化する多機能性キャリアが必要であると考
え検討している.

3. 癌疾患治療のための 多機能性 siRNA キャリアの開発

癌治療効果を持つ siRNA の静脈注射によって強力な抗腫瘍効果を発揮するには, 静脈投与後の siRNA の体内動態のみならず, 腫瘍組織到達後の腫瘍細胞内での細胞内動態を向上させるキャリアが必要である. 当教室では, 体内動態, なかでも PEG 鎖による血中滞留性および Enhanced Permeation and Retention (EPR) 効果による腫瘍選択的送達性の付与を目的として水中で容易にナノサイズのみセルを形成する methoxy poly (ethylene glycol)/polycaprolactone diblock copolymers (以下 MPEG-PCL) を検討した. さらに, このポリマーに細胞内動態の向上を期待して, 種々の機能性を付与するためのペプチド誘導体を PCL の空いている末端に結合した MPEG-PCL を検討した. MPEG-PCL は水中で疎水性の PCL 部分がヘアピン状に折れ曲がり, 疎水部

分が中央に、親水性の MPEG とペプチド誘導体部分が外部（水相側）を向いてブロックコポリマー分子が集合し、ナノサイズのみセルを形成しているものと推定している。このナノサイズのみセルは脂溶性の薬物は中心の疎水部に、siRNA のような水溶性の薬物は外側の親水性部分に保持できる。本ナノサイズのみセルでは粒子径によりがん組織への集積性を、外部（表層部）の PEG 鎖の存在により血中滞留性を獲得し、また表面の親水性部分に保持された siRNA に高いヌクレアーゼ耐性を与えていることが示されている。さらに表面のペプチド誘導体を適切に設計することで、各種の機能性を付与することができる。水中で容易にナノサイズのみセルを形成する MPEG-PCL を選択し、さらに、MPEG-PCL の細胞内移行性の向上を期待して、HIV-Tat 由来の細胞移行性ペプチド誘導体である Tat を修飾した MPEG-PCL-Tat を合成し、その機能を評価した。Tat ペプチドは、アルギニンとリジンが豊富な 48-60 残基の塩基性ペプチドで、高い細胞内導入特性およびタイトジャンクション開口作用による組織透過性を示すことが報告されている。その結果、MPEG-PCL-Tat は、細胞実験において、高いヌクレアーゼ耐性、siRNA の細胞内導入効率、サイレンシング効果を示した。さらに、血管新生因子 (VEGF) に対する siRNA (siVEGF) を MPEG-PCL-Tat を用いて担瘤マウスへ静脈注射した際、優れた腫瘍増殖抑制効果を発揮した¹⁾。そこで次に、キャリアの細胞内動態をさらに向上させることを目的として、細胞内導入能に関与するアルギニンとエンドソーム脱出に関与するプロトンスポンジ効果を持ったヒスチジンの両端にシステインを配置させることで細胞内動態を改善した新しい機能性ペプチド (CH₂R₄CH₂) の設計を試みた²⁾。チオール基を持つシステインは細胞外ではジスルフィド架橋により核酸との安定な複合体を形成させ、細胞質内の還元環境下ではジスルフィド架橋が容易に切断されて複合体から核酸が放出されやすくなる。この多機能性ペプチドを Tat にかわるペプチドとして、MPEG-PCL ブロックポリマーに結合 (MPEG-PCL-CH₂R₄CH₂) させたところ、siVEGF の腫瘍増殖抑制効果を増大させることに成功した。

4. 経皮デリバリー

皮膚は表皮・真皮・皮下組織の3層から構成されその最も上層にある厚さ 10~20 ミクロンの角質層は、肌と身体を物理的・化学的な影響（細菌や紫外線、化学物質など）から守るための重要な役割を担っている。角質層は角質細胞間脂質が規則正しく交互にサンドイッチのような層を成している堅固なラメラ構造をとることで、体内の水分蒸散や体外からの細菌およびウイルスなどの異物に対し高度なバリア機能を有している。一方で、その優れたバリア機能は薬物の経皮吸収という点では大きな障害となる。低分子の薬物ですら透過が困難であり、親水性かつ高分子の核酸は受動拡散での皮内への送達は容易ではなく、これらの障壁を克服する核酸デリバリー技術が必要となる。

従来、低分子化合物の経皮投与においては、イオントフォoresis、エレクトロポレーション、マイクロニードルなどの DDS 技術や吸収促進剤を用いた化学的手法など、様々な経皮吸収促進技術が研究されてきた。針なし注射器は経皮投与用デバイスとして開発され、経皮ワクチンや糖尿病患者へのインスリン投与のためのデバイスとして主に米国で利用されている。針なし注射器は、ガスあるいは圧縮空気の圧力によって薬物溶液を皮内に送り込むことができる。我々は、針なし注射器 (ShimaJet, 島津製作所) を用いてラット皮膚に核酸水溶液 (naked plasmid DNA) を投与することで、従来の有針注射器に比べ、一定時間後における皮膚での遺伝子発現効率が約 300 倍向上することを報告している。これは、有針注射器による投与では核酸溶液が皮内の 1 か所で液溜まりとなるのに対し、圧力によって薬液を噴出させる針なし注射器では皮内の広範囲にわたって溶液が分散されるため、より多くの細胞内に核酸が送達されるためであると推察している。

5. 機能性ペプチドをキャリアとする siRNA の皮内デリバリー

siRNA は、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis, 以下 AD)、皮膚がん、感染症などの皮膚疾患治療への応用、および非侵襲的な全身投与の経路として期待できる。NF- κ B は、炎症性サイトカインの転写因子としてアレルギー疾患に深くかかわる因子であ

る。我々は、NF- κ B のサブユニットの一つである RelA に対する siRNA (siRelA) を用いた効果的な AD 治療システムの構築を行ってきた。AD 患者においては、皮脂膜の減少やセラミドの減少による細胞間脂質のラメラ液晶構造が変化し、正常な皮膚に比べ角質層のバリア機能が低下している。このため、主に顆粒層に存在する表皮タイトジャンクションが AD 患者の表皮バリア機能を担っており、皮内への siRNA デリバリーにはタイトジャンクションの制御が重要となる。合成ペプチド AT 1002 は 6 つのアミノ酸から成り、可逆的にタイトジャンクションを開口する特性を持っている。そこで、我々は、AT 1002 および siRNA の投与後の安定化と細胞導入能を持つ細胞透過性ペプチドを利用した siRNA 皮内送達システムを構築した。その結果、siRNA 単独投与と比較して、皮内深部まで siRNA を送達可能であることを見出している³⁾。テープストリッピング法で AD 発症皮膚様に角質層を崩壊させたマウス背部皮膚に AT 1002 および Tat ペプチドとともに蛍光標識した siRNA を塗布することで、表皮、毛穴、真皮深部まで siRNA を送達可能であることが確認されている。塩基性に富む Tat ペプチドと siRNA が形成する複合体は、正電荷を有する約 70 nm のナノ粒子であり siRNA の安定性は向上する。さらに、この siRNA 皮内送達システムを用いて siRelA をアトピー性皮膚炎発症マウスへ適用した結果、強力な治療効果を発揮することを明らかとした。さらに、我々は新たな機能性ペプチドとして、アルギニン、ヒスチジン、システインからなるペプチドをステアリン酸で修飾した STR-CH₂R₄CH₂ の合成に成功しており、これが Tat ペプチドに比べ高い細胞内導入効果を示し、一般に導入が困難とされる樹状細胞に対しても核酸の取り込み効率を向上させることや、AD モデルマウスでの治療効果も確認している。現在は、本システムを利用した皮膚投与型の製剤開発を目指し、創傷治療のドレッシングや細胞増殖の足場として医薬分野への応用が期待されている。絹タンパク質の構成成分セリシンを基剤とした siRNA 含有ハイドロゲルの調製を試みている。このセリシengel に STR-CH₂R₄CH₂ と共に siRelA を複合化し AD 発症モデルマウスに塗布することで、未処置群に比べ AD 症状改善効果が得られることを確認している。

6. 鼻粘膜吸収による脳への薬物の送達システムの構築

脳への薬物の送達は、血液脳関門の存在により非常に困難とされている。一方で、鼻粘膜上皮層から嗅神経経路、脳脊髄液経路、三叉神経経路などを通り脳の嗅球へつながる経路が“Nose-to-Brain”として報告され、低分子やペプチド、核酸など様々な化合物が経鼻投与により脳へ移行することが明らかとなっている。我々は、効果的かつ非侵襲的な脳送達システムとして経鼻投与を選択し、脳への高分子送達についてラットを用いて検討を行っている。

経鼻投与後最初に接触する鼻腔には、粘膜組織のタイトジャンクションや粘膜繊毛クリアランスといった物理的障壁が存在しており、これらが経鼻投与された薬物の脳移行を低下させると言われている。我々は、鼻腔内における粘膜滞留性、粘膜透過性の向上を期待して、MPEG-PCL-Tat を薬物キャリアとして経鼻投与した。その結果、薬物のみを投与した場合と比較して、鼻粘膜上皮を効率よく突破し、静脈内投与に比べ、脳への高い核酸送達性を示すことを見出した。この Nose-to-Brain デリバリーシステムを用いて難溶性薬物の脳移行性を検討した結果、効率的な脳移行性を発揮し、さらに薬物の血中への移行を減少させることを明らかとした⁴⁾。

次に、Nose-to-Brain の脳内移行の機構を検討するために、モデル薬物として、Alexa で蛍光標識した分子量 10,000 のポリアニオン（以下 Alexa-dextran）を用いてラットに Alexa-dextran/MPEG-PCL-Tat ミセルを経鼻投与し、経時的な Alexa-dextran 脳内分布について検討した。その結果、投与後早期において脳先端に位置する嗅球で蛍光が認められた。さらに時間が経過すると、嗅球に加えて脳幹を含む脳後方においても Alexa-dextran の強い分布が認められた。

これらの結果から我々は MPEG-PCL-Tat 複合体は経鼻投与後嗅球を通して脳組織に移行する嗅覚経路と、三叉神経から脳幹に移行する経路の二つの経路を介し脳へ移行すると推察している。さらに、脳腫瘍ラットへアポトーシス誘導 siRNA をこのミセルを用いて経鼻投与したところ顕著な治療効果を示し、この Nose-to-Brain デリバリーシステムが siRNA にも有効であることが示された。

7. 後眼部指向型 DDS 点眼剤の設計

近年、加齢や糖尿病の合併症などにより網膜に異常を来し、視野狭窄、視力低下、失明などの視力障害を引き起こす網膜疾患が増加し、失明原因の上位を占めている。目には外界からの異物の侵入や血流からの眼球内部への物質移行を制限する防御機能として血液-眼関門（血液-房水関門、血液-網膜関門）が存在する。また、前眼部には角膜上皮の密着結合による角膜バリアに加え、角膜の保護や異物除去の働きをする涙液が常に分泌・排泄されている。このため点眼や静脈を介する後眼部への薬物送達には困難とされている。日本でも 2008 年に眼科領域で初めて、加齢黄斑変性症治療薬としてその原因とされる眼底での新生血管に対し抑制作用を持つ RNA アプタマーを有効成分とする核酸医薬品が発売されている。しかしながら硝子体内投与（注射）という侵襲性の高い治療方法である。我々は、非侵襲的な点眼による後眼部への DDS 製剤の開発を目指した。網膜色素上皮細胞（RPE 細胞）に発現するトランスフェリン（Trf）受容体に着目し、Trf を修飾した脂質ナノ粒子を構築した。このナノ粒子は Trf 受容体を介して RPE 細胞に取り込まれること、ラットへの点眼後、Trf 未修飾脂質ナノ粒子に比べ、高効率で後眼部網膜近傍に集積することを見出した⁵⁾。また、この脂質ナノ粒子は pDNA や siRNA などの核酸を内封でき、pDNA については点眼後の網膜近傍での遺伝子発現性を認めている。

8. ナノ粒子化技術による難溶性薬物の製剤設計

近年、創薬における候補化合物の多くが Biopharmaceutics Classification System (BCS) のクラス 2（膜透過性：良、溶解度：低）に分類される難水溶性薬物であり、製剤化においては様々な溶解性改善技術の適用が試みられている。その一つとして、油と界面活性剤から成り、水相と接触することで自発的にナノサイズのエマルションを形成し、難溶性化合物を可溶化する自己乳化型 DDS 製剤 (SMEDDS) が近年注目されている。しかし、薬物に適した SMEDDS 構成成分の適切な選択方法について詳細に検討した報告は少なく、処方設計には多くの成分を用いたスクリーニングが必要とされる。我々は、油および界面活性剤に対する薬物の溶解度

を指標とする SMEDDS の標準処方化についても検討を進めている。HLB を基に分類した SMEDDS の構成成分となり得る複数の油、界面活性剤、補助界面活性剤のうち、難水溶性薬物（フルルビプロフェンなど）に対するこれら成分の溶解度が最大あるいは最小値を示す成分をそれぞれ抜粋し、一定の組合せの処方では SMEDDS を調製することで、ラットにおける消化管吸収性が向上することを見出している。特に、薬物の溶解度が低い油成分、高い溶解度を示す界面活性剤成分を構成成分とすることで、複数の薬物に対してラットでの顕著な AUC 増大を確認しており、薬物の溶解度を指標とした SMEDDS の標準処方化の可能性を示唆している。

また、その他の可溶化技術として、マイクロフルイダイザーを用いた難水溶性薬物のナノ粒子化による溶解性改善について検討を進めている。薬物を水溶性高分子（HPC など）および界面活性剤とともにマイクロフルイダイザーで湿式粉碎することで、100～200 nm のナノ粒子が得られ、薬物の溶解性が顕著に向上することを確認している。

9. おわりに

薬の世界には 30 年以上身を置いてきたが、大学ではまだまだ新米教員である。今でも、教育という新しい仕事と DDS 領域の研究内容の学習中である。30 年以上勤務した製薬企業を辞して飛び込んだ大学の世界であるが、やはり勝手が違い戸惑うことがまだまだ多い。前職である第一三共の製薬技術本部での勤務は、良き上司・同僚に恵まれ、創薬のやりがいと難しさを経験でき、それなりに充実した毎日を送らせていただいていた。それでも、定年を数年後に控えていた私に大学への転職という無謀な挑戦をさせた理由はいくつかあるが、一つは創薬における製薬技術の重要性を伝えたかった、ということである。医療現場で使われている製剤の品質と供給を担っているのが製薬技術である。創薬においても、化学構造式で書かれた候補化合物を製剤の形で治験の場に供給しているのも製薬技術の研究所である。創薬においても製薬技術の役割は大きいこと。製薬企業は若く優秀な製薬技術研究者を求めている、ということをも 6 年制薬学部の子供達に伝えたいと思いで大学に転身して来た。

図 1 の教室員の集合写真を見てその数の多さに驚

かれたかもしれない。東京薬科大学の薬学部はすべて6年制で、4年生から6年生の3学年の学生が教室に配属される。ただし、全員が実験室を使うわけではなく、3年生末の研究室配属時に実験研究コースと調査研究コースとに分かれる。実験研究コースが文字通り実験をすることになる。当教室の場合、年度により多少の変動はあるが、各学年15名、そのうち実験研究コースで10名が配属される。この実験研究コースの学生の配属数は学内の教室の中でも最大であると思う。本学では、修士論文と同レベルの6年制卒業論文を標榜している。4~6年の3年間を研究に専念できるわけではない6年制の薬学教育の中身を考えるとこの目標はかなり高いものであるが、優秀な学生達の努力によりこの目標が達成できている印象である。

まだまだ学ばねばならないことは多いが、幸いにも優秀なスタッフと多くの学生さんに囲まれて教員生活を楽しんでいる。企業での新薬の研究開発を通じて多くのことを学ぶことができた。この知識・経験は私の強みであり、今後の大学での教育・研究に生かしていきたい。今後は私の専門領域の一つである物性関係のテーマの充実や製薬技術的な内容の教

育に力を注いでいきたいと考えている。

引用文献

- 1) T. Kanazawa, K. Sugawara, K. Tanaka, S. Horiuchi, Y. Takashima, H. Okada, Suppression of tumor growth by systemic delivery of anti-VEGF siRNA with cell-penetrating peptide-modified MPEG-PCL nanomicelles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **81**, 470–479 (2012).
- 2) K. Tanaka, T. Kanazawa, T. Ogawa, Y. Suda, Y. Takashima, T. Fukuda, H. Okada, Disulfide crosslinked stearyl carrier peptides containing arginine and histidine enhances siRNA uptake and gene silencing, *Int. J. Pharm.*, **398**, 219–224 (2010).
- 3) T. Uchida, T. Kanazawa, M. Kawai, Y. Takashima, H. Okada, Therapeutic effects on atopic dermatitis by anti-RelA short interfering RNA combined with functional peptides Tat and AT1002, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **338**, 443–450 (2011).
- 4) T. Kanazawa, H. Taki, K. Tanaka, Y. Takashima, H. Okada, Cell-penetrating peptide-modified block copolymer micelles promote direct brain delivery via intranasal administration, *Pharm. Res.*, **28**, 2130–2139 (2011).
- 5) 高島由季, 経眼投与型網膜標的化リポソーム, “ドラッグデリバリーシステムの新展開Ⅱ—核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支えるDDS技術—”, 永井恒司, 岡田弘晃編, シーエムシー出版, 東京, pp. 86–90 (2012).