

## 《若手研究者紹介》



## 酸化ストレスおよび骨疾患を対象とした新規 DDS の開発

勝 見 英 正\* Hidemasa Katsumi

京都薬科大学薬剤学分野

## 1. は じ め に

筆者は現在、京都薬科大学、薬剤学分野（山本昌教授主宰）において、「酸化ストレスおよび骨疾患を対象とした新規ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発」をテーマとして掲げ、DDS 研究に取り組んでいる。すなわち、酸化ストレス疾患を対象とした DDS 開発は、京都大学大学院薬学研究科、薬品動態制御学分野（橋田充教授主宰）における大学院時代から一貫して取り組んでいる研究テーマであり、一酸化窒素 (NO) や抗酸化剤を用いた効率的な疾患治療を目指して、化学修飾や微粒子化などの各種製剤技術によるこれらの DDS 開発を進めている<sup>1-3)</sup>。生体内で産生される活性酸素種はその産生系、消去系により常にその量が調節され、低濃度の活性酸素種は代謝、細胞の増殖、エネルギー産生に関わり、生体のホメオスタシス維持に重要な役割を担っている。しかしながら、生体の内因的または外因的要因により多量の活性酸素種が産生されると、生体内抗酸化物質の枯渇などにより生体内の酸化還元状態のバランスが崩れ、過剰な活性酸素種による生体内成分の酸化および炎症性細胞の活性化などが引き起こされ、これが脳梗塞、高脂血症、糖尿病、劇症肝炎、虚血再灌流障害および癌転移など様々な疾患・障害

の発症ひいてはその病態の悪化の要因となる。したがって、活性酸素種の産生や酸化還元バランスを制御する NO や活性酸素種を消去する抗酸化剤を体外から投与することによるこれら疾患治療が期待される。筆者は、化学修飾アルブミンなどの高分子キャリアを利用した NO や還元型チオールなどの抗酸化剤の体内動態制御や、最近では、微粒子性の抗酸化剤であるプラチナナノ粒子の各種投与経路からの体内動態解析や疾患治療への応用について検討を行っている。

一方、骨疾患を対象とした DDS 開発は、京都薬科大学に着任 (2006 年度) 以降に開始した研究テーマであり、骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネートの新規投与形態の開発やビスホスホネートを利用した薬物の骨ターゲティングなどについて精力的に取り組んでいる<sup>4,5)</sup>。人口の高齢化に伴って、近年、骨疾患治療の重要性が高まってきているが、既存の薬物は吸収性や骨移行性などの点において課題があり、こうした欠点を克服する革新的な DDS 開発が望まれている。筆者は、吸収性や服用性に難点がある骨粗鬆症治療薬ビスホスホネートの新たな投与形態 (パッチ製剤、マイクロニードル、吸入剤) の開発や、ビスホスホネートを骨ターゲティング素子として利用した高分子薬物の骨ターゲティングならびに骨ターゲティング型微粒子性キャリアの開発を試みている。

本稿では、大学院時代から研究を進めてきた NO および抗酸化剤の DDS 開発、ならびに最近検討を行っている骨疾患を対象とした DDS 開発 (とくに経皮吸収製剤の開発) について紹介させて頂く。

\*2002 年大阪薬科大学卒業, 2004 年京都大学大学院薬学研究科修士課程医療薬科学専攻修了, 2006 年同大学院博士後期課程医療薬科学専攻中退, 同年 4 月より京都薬科大学薬剤学分野助教 (着任時は助手)。2010 年博士 (薬学) (京都大学) 取得。2012 年度日本薬学会近畿支部奨励賞受賞。研究テーマ: 生物薬剤学, DDS。連絡先: 〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5 E-mail: hkatsumi@mb.kyoto-phu.ac.jp

## 2. 酸化ストレス疾患を対象とした新規 DDS 開発

### 2.1 還元型チオールの抗酸化効果増強を目指した還元型チオール修飾アルブミンの開発

活性酸素種による生体分子の酸化は、劇症肝炎など多くの病態の発症および進行に関与していることから、生体分子の酸化還元反応は生体機能を制御する上で重要である。なかでも、タンパク質中システイン残基のチオール基の酸化還元反応に伴う活性調節機構（レドックス制御）は、生体のホメオスタシス維持に大きく寄与している。したがって、還元型チオールを含む化合物を医薬品として体外から投与することが、活性酸素種により惹起される疾患・障害に対する有効な治療法として期待される。しかしながら、システインやグルタチオンなどの低分子チオールは体内からの消失が速く、これらを投与しても十分量のチオールが疾患部位に供給されない。一方、高分子で比較的血中滞留性が高い血清アルブミンは、分子内に遊離チオールを有しており、生体内の活性酸素種のスキャベンジャーや生体分子を還元するレドックス制御としての役割が報告されている。しかしながら、血清アルブミンには遊離チオールがひとつしか存在しないこと、遊離チオールの反応性が分子表面への露出度や静電気ポテンシャルなどのマイクロ環境により大きく変動することから、還元型チオールの送達効率および機能性は十分とはいえない。

筆者らは、還元型チオールの抗酸化効果増強を目的として、血清アルブミンにポリエチレングリコール（PEG）を導入した PEG 化アルブミンにチオール基を多数導入した還元型チオール修飾 PEG 化アルブミンの開発を試みている<sup>1)</sup>。血清アルブミンへの還元型チオールの導入に用いた N-succinimidyl S-acetylthioacetate (SATA) 試薬は、チオール基がアセチル基で保護された構造を有しており、SATA をタンパク質のアミノ基に結合させた後、中性条件で脱アセチル化処理を行うだけの単純な操作でタンパク質に還元型チオールが導入でき、タンパク質の立体構造への影響が少ないなどの利点を有する。しかしながら、一般に、還元型チオールは反応性が高く、容易に分子間でジスルフィド結合を形成することが知られている。したがって、1分子に多数の還元型チオールを導入するには、分子間でのジスル

フィド結合の形成を抑制する必要があった。筆者らは、水溶性ポリマーである PEG を血清アルブミンに導入することでこの問題を解決し血清アルブミン 1 分子当たり約 10 個の還元型チオールを導入することに成功した。PEG は、PEG-interferon に代表されるように、PEG 周辺に水和層を形成することによりタンパク性医薬品の血中滞留性を向上させる機能性ポリマーであることが知られている。したがって、血清アルブミンに導入した PEG が形成する水和層の立体障害によりチオール基導入時の凝集体形成が抑制されたものと推察される。これまでのところ、還元型チオール修飾 PEG 化アルブミンの血中滞留性は、血清アルブミンと比較して顕著に高いこと、活性酸素がその病態に関与する劇症肝炎に対して優れた治療効果を示すことが確認されている。

### 2.2 還元型チオール修飾アルブミンを利用した一酸化窒素の DDS 開発による肝臓虚血再灌流障害の抑制

血清アルブミンの遊離チオールには、上述のような活性酸素のスキャベンジャーや生体分子のレドックス制御としての機能だけでなく、NO などの生理活性物質やカプトプリルやブシラミンなどのチオール含有薬物のリザーバーとしての機能が知られている。血清アルブミンの遊離チオールと NO が反応して生成する S-ニトロソアルブミンは循環血中で可逆的に NO を放出する NO 供与体として生理学的な研究を中心とした検討が行われており、血清アルブミンの内因性 NO トラフィックタンパク質としての機能に注目が高まっている。

NO は、血管弛緩作用に加えて、血小板の凝集、免疫系の活性化などを制御する細胞間情報伝達物質として、生体のホメオスタシス維持に多彩な役割を果たしている。生活習慣病や虚血・再灌流障害などの酸化ストレス疾患・障害では、体内の NO レベルの低下が活性酸素種の産生に関与していることから、NO を医薬品として体外から投与することが、これら疾患・障害に対する有効な治療法として期待されている。これまでに生体内で NO を放出するニトログリセリン等の NO 供与体が開発され、狭心症を対象疾患として、経口剤、経皮吸収剤、注射剤などが開発され、臨床で使用されている。しかしながら、いずれの製剤においても、体内に吸収された後の NO 供与体の体内からの消失ならびに NO 放出

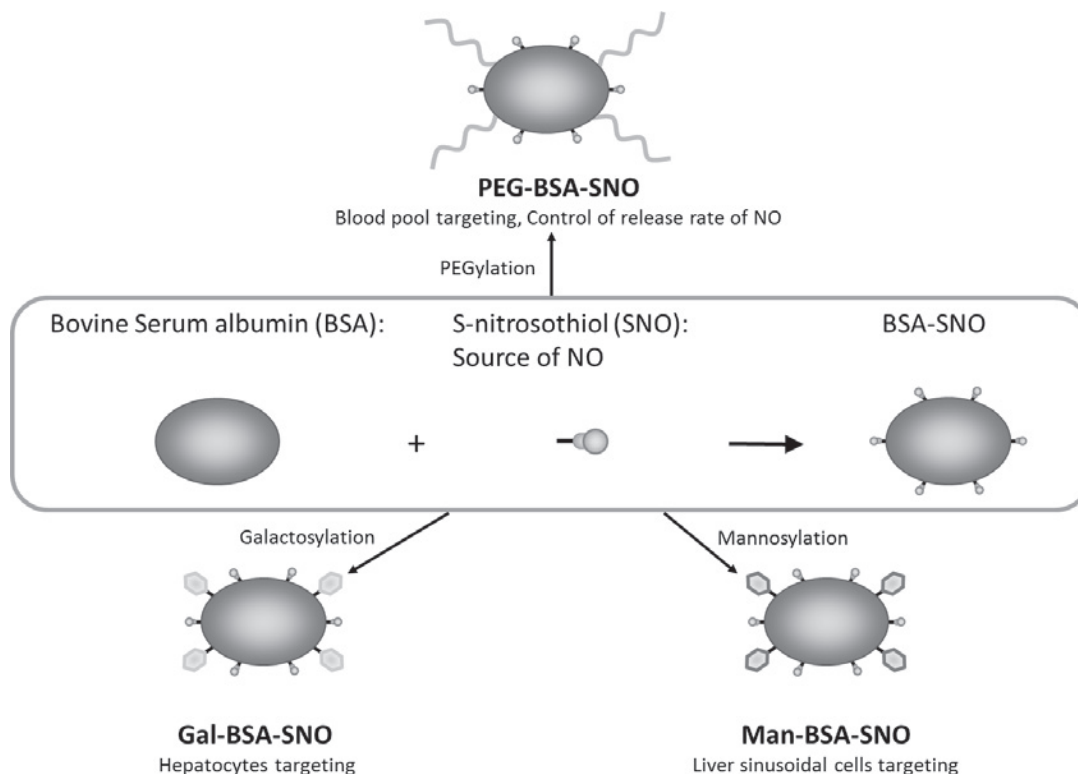


図1 化学修飾アルブミンを利用した一酸化窒素の体内動態制御

PEG-BSA-SNO；PEG化NO結合アルブミン，Gal-BSA-SNO；ガラクトース修飾NO結合アルブミン，Man-BSA-SNO；マンノース修飾NO結合アルブミン PEG-BSA-SNOにはBSA1分子あたり約10分子のS-nitrosothiolが結合している．Man-BSA-SNO，Gal-BSA-SNOにはBSA1分子あたり約5分子のS-nitrosothiolが結合している．

が速すぎるため、NOを必要とする疾患部位に十分量のNOを供給できないことが、狭心症以外の疾患・障害治療への応用における大きな障壁となっている。従って、NO供与体のNO放出速度や体内動態を制御し、疾患部位に効率よくNOをデリバリーすることができれば、既存のNO供与体では不可能な疾患治療に応用可能なDDSが開発できるものと考えられる。

筆者らはこれまでに、NOデリバリーによる疾患治療の実現を目指して、種々の機能性分子を導入した還元型チオール修飾アルブミンにNOを結合させ、NO放出速度および体内動態を制御可能な高分子型NO供与体としての新規NOトラフィックタンパク質の開発を試みてきた<sup>1-3)</sup>。研究を開始するに当たり、NOデリバリーに有用であることが報告されているS-ニトロソアルブミンを血清アルブミンと亜硝酸ナトリウムを反応させることにより合成し、マウスに静脈内投与したところ、生体内でのNO放出が非常に速やかで、目的とするNOの体内動態が得られないことが明らかとなった。この問題は、1)

NO放出を制御する、2) 標的に速やかにデリバリー可能なシステムを構築する、のいずれかで解決できるものと考えられた。また、血清アルブミンにはNOを導入可能な遊離チオールが少ないことも効率的なNOデリバリーには問題であることが見出された。そこでまず、NO放出を制御する方法での解決を目的に、PEG修飾によるNO放出の抑制、ならびに上述の化学修飾を利用した新たな遊離チオール導入によるNO結合数の増加を試みた。その結果、S-ニトロソアルブミンと比較して、NO導入数は約13倍となり、またNO放出の徐放化も実現可能であった<sup>1)</sup>。一方、図1に示すように、標的部位へのデリバリーに関しては、肝細胞が有するアシアロ糖タンパク質レセプターをはじめとする糖鎖認識機構を利用した糖修飾（ガラクトースあるいはマンノース修飾）を利用することで肝臓中のNO濃度増大を実現した<sup>2)</sup>。さらに筆者らは、マウスを用いて徐放型および肝臓ターゲティング型NO結合アルブミンの静脈内投与により肝臓虚血再灌流障害が顕著に抑制されることも明らかにしている<sup>2,3)</sup>。

## 2.3 優れた抗酸化効果を有するプラチナナノ粒子の体内動態解析および疾患治療への応用

最近、筆者らは、ナノ技術を利用した新しい抗酸化剤の開発にも取り組んでいる。近年、溶液中にプラチナを安定に分散させたプラチナナノ粒子は、様々な種類の活性酸素種を持続的に消去可能な新しい抗酸化剤として注目を集めている。筆者らはこうしたユニークな特性を有するプラチナナノ粒子に着目し、各種投与経路からの体内動態解析や疾患治療への応用を試みている。プラチナナノ粒子の抗酸化作用は、製法、粒子径および保護剤の種類に左右されるが、筆者らはこれまでに、塩化白金イオンを還元することにより物性が異なる様々な種類のプラチナナノ粒子を調製することに成功し、各種活性酸素種を効率よく消去可能であること、静脈内投与後の肝臓選択的な体内動態を確認している。その他、肝臓虚血再灌流障害や肝転移治療においても良好な結果が得られていることから、プラチナナノ粒子は酸化ストレス疾患を対象とした抗酸化剤として有望であると考えられる。

## 3. 骨疾患を対象とした新規 DDS 開発

### 3.1 新規親水性パッチ製剤を用いた骨粗鬆症治療薬ビスホスホネートの経皮吸収改善

上述のように、筆者らは酸化ストレス疾患を対象とした DDS 開発を進める一方で、骨粗鬆症などの骨疾患治療を目的とした各種 DDS 開発を試みている。すなわち、筆者らは最近、吸収性と服用性に難点がある骨粗鬆症治療薬ビスホスホネートの新規経皮吸収製剤の開発を精力的に進めており、新規親水性粘着剤を利用することで水溶性薬物の溶解性を高めた親水性パッチ製剤を新たに開発し、高極性で水溶性が高く皮膚からの吸収が困難な骨粗鬆症治療薬ビスホスホネートの経皮吸収改善に成功している<sup>4)</sup>。

ビスホスホネートは、PCPの骨格を有する化合物の総称であり、骨吸収を行う破骨細胞の機能を強力に抑制することから、骨粗鬆症治療の第一選択薬として汎用されている。しかしながら、ビスホスホネートは、高極性で分配係数 ( $\text{Log } K_{o/w}$ ) が -4 以下の水溶性薬物であるため、経口投与した場合、消化管上皮細胞膜に分配しにくく、吸収率が 1~2% と極めて低いことが知られている。また、ビスホスホネートは粘膜刺激性を有していることから、経口投与

後、腹部不快感や消化性潰瘍などの上部消化管粘膜障害が重大な問題となっている。こうした点から、ビスホスホネートによる上部消化管粘膜障害を予防するため、服用後 30 分間は座位を保つ必要があるが、座位の保持は骨粗鬆症患者の約 70% を占める高齢者には大きな負担となっている。さらに、寝たきりの高齢者には経口投与が困難であり、患者のコンプライアンス・QOL を著しく低下させている。したがって、利便性と安全性の観点からビスホスホネートのパッチ製剤が開発できれば、患者のコンプライアンスや QOL が著しく改善できると考えられる。しかしながら、ビスホスホネートは、上述のように高極性で水溶性の高い薬物であることから、消化管と同様、一般的な投与方法では皮膚からの吸収も困難である。また、脂溶性の高い既存の粘着剤に水溶性の高いビスホスホネートは溶解しにくいいため、一般的なパッチの調製方法では、ビスホスホネートのパッチ製剤化は難しい。

そこで、筆者らは水溶性薬物を高濃度に溶解可能な新規親水性粘着剤を用いて代表的なビスホスホネートであるアレンドロネートをパッチ製剤化し、粘着剤中に高濃度に溶解させたビスホスホネートの濃度勾配を駆動力とした経皮吸収改善を試みた。パッチ製剤は、アクリル系の新規親水性粘着剤およびグリセリンを用いて作製し、アレンドロネート 0.1 mg あるいは 1 mg を含有する直径 10 mm のパッチ製剤を得た (図 2A)<sup>4)</sup>。

図 2B に示すフランツ型の拡散セルを用いたラット皮膚透過試験の結果、貼付 24 時間で投与量の約 30% のアレンドロネートが皮膚を透過することが明らかとなった<sup>4)</sup>。アレンドロネートの皮膚透過量とパッチ製剤のアレンドロネート含量に線形性が認められたこと、本パッチ製剤に使用した親水性粘着剤は水溶性薬物に対する拡散性が優れていることなどから、本パッチ製剤によるアレンドロネートの皮膚透過機構には、粘着剤中に溶解した高濃度のアレンドロネート層が皮膚表面上に存在することにより形成される濃度勾配が寄与しているものと考えられた。また、ラットにおけるアレンドロネートの bioavailability は 8.3% を示し (図 2D)、骨粗鬆症モデルラットに対しても高い治療効果を示した。さらに、フランツ型の拡散セルを用いたヒト皮膚透過試験において、貼付 24 時間で投与量の約 10% のアレンドロ

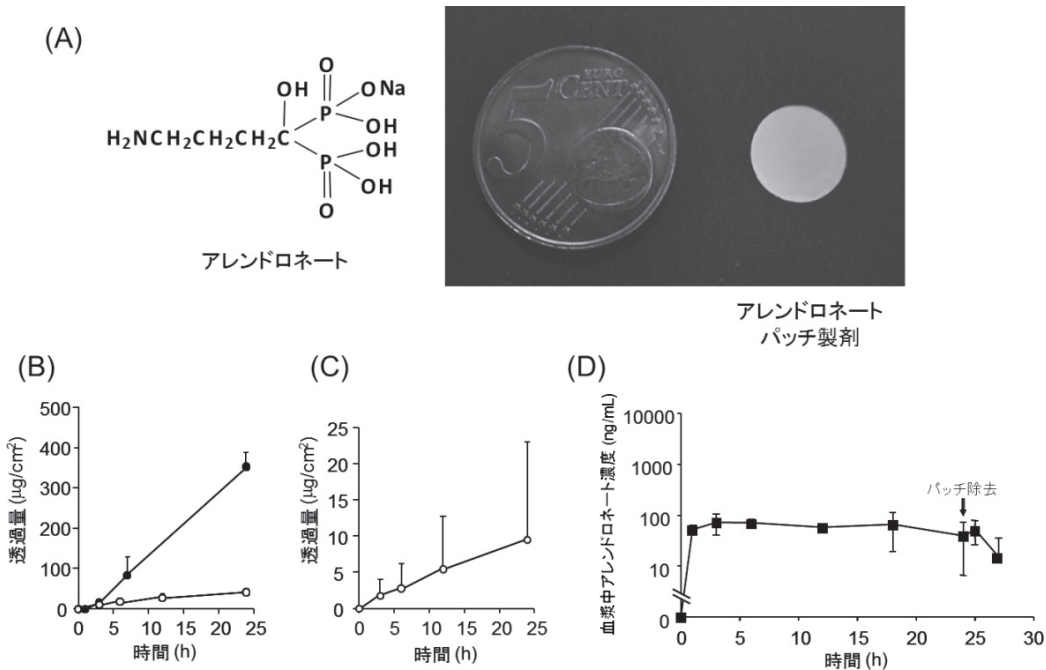


図2 (A) アレンドロネートの構造とパッチ製剤, ラット (B) およびヒト (C) 皮膚におけるアレンドロネートの透過性とラット体内動態 (D)

ネートが皮膚を透過することが示され (図2C), 30 ~ 60 cm<sup>2</sup> のパッチ面積で市販のアレンドロネート経口投与製剤 (週1回投与) と同等の治療効果が期待できることも明らかとなっている<sup>4)</sup>。

ラットを用いた皮膚刺激性試験では, パッチ製剤貼付後, アレンドロネートによる遅延性の軽度の皮膚紅班が観察されたが, 抗酸化剤ブチルヒドロキシトルエン (BHT) をパッチ製剤に添加することにより皮膚紅班は完全に抑制された。さらに, BHT をパッチに加えた際のアレンドロネートの皮膚透過性および薬理効果は, 無添加のアレンドロネートパッチの場合とほぼ同等であり, BHT はパッチの機能に影響を与えることなく, アレンドロネートによる皮膚紅班を抑制することが明らかとなった<sup>4)</sup>。

### 3.2 溶解型マイクロニードルを利用したビスホスホネートの経皮吸収促進と刺激性回避

以上のように, 筆者らは新規親水性パッチ製剤を利用することによりアレンドロネートを皮膚から効率よく吸収させる経皮吸収製剤を開発した。一方で, アレンドロネートを注射のように皮膚から速やかかつ効率的に吸収させる製剤が開発できれば, パッチ製剤とは別に有効な経皮吸収システムが構築できるものと考えられる。そこで筆者らは最近注目を集めているアレイ状微細針, マイクロニードルに着目し,

マイクロニードルを利用したアレンドロネートの経皮吸収システムの開発を試みている<sup>5)</sup>。マイクロニードルは痛みを感じさせない長さ数百ミクロンのアレイ状微細針を皮膚に適用することにより, 微細針に表面塗布または内部に含有された薬物を皮膚内で放出させる経皮投与方法であるが, 本手法を利用することにより, 適用時にアレンドロネートを真皮に直接注入することが可能となり, アレンドロネートが真皮から血中に速やかに移行することで, 1) 注射と同等の高い吸収性, 2) アレンドロネートによる皮膚刺激の回避などが期待できる。

筆者らは生体由来成分であるヒアルロン酸で構成された長さ 800 µm の微細針にアレンドロネートを搭載させたマイクロニードルを作製した (図3A)<sup>5)</sup>。本マイクロニードルは, 皮膚に適用後, 主にヒアルロン酸で構成される微細針が体液により速やかに膨潤, 溶解される「自己溶解型」であるのが特徴である (図3C)。また, マウスを用いた体内動態試験では, 皮下注射とほぼ同等のアレンドロネートの血中濃度推移が得られ (図3B), bioavailability も約 90% を示したことから, 本マイクロニードルを利用することで, アレンドロネートを皮膚から速やかかつ効率的に送達可能であることが実証された。さらに, 本マイクロニードルは骨粗鬆症モデルラットを用い

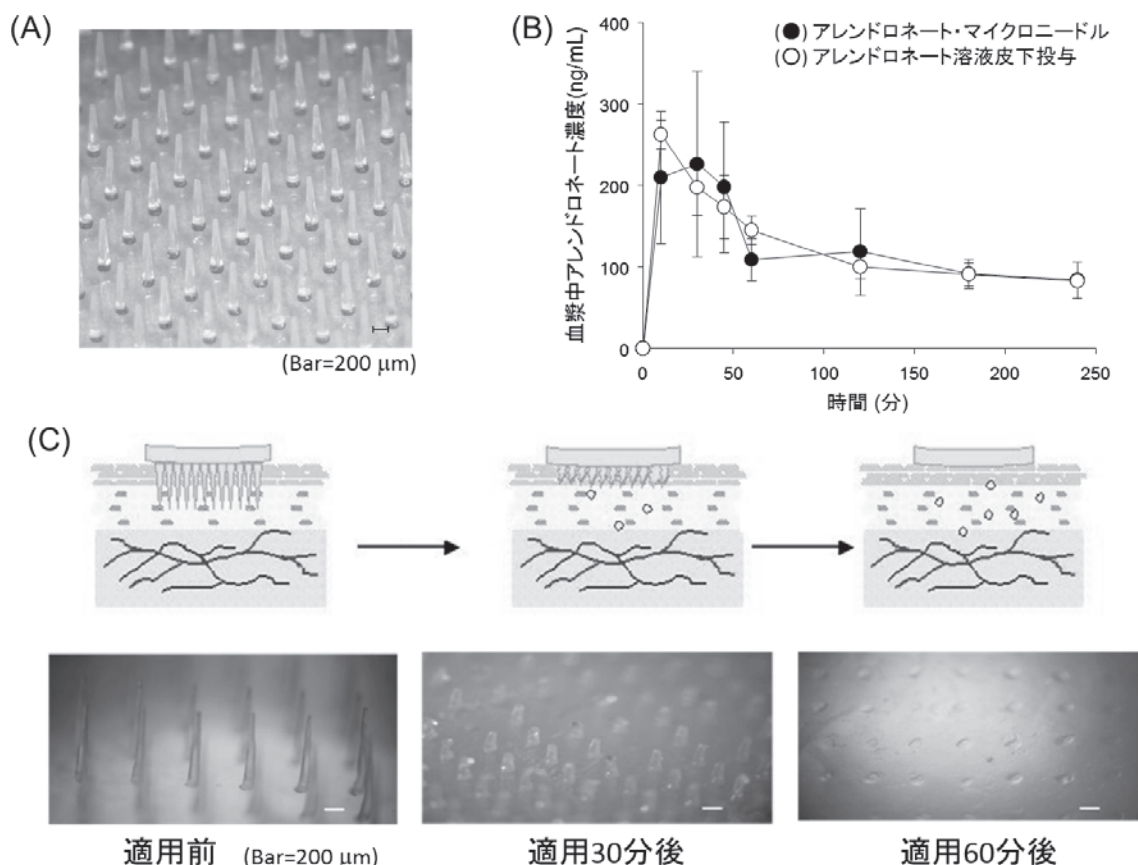


図3 アレンドロネート搭載溶解型マイクロニードルの顕微鏡写真 (A), 各種投与方法におけるアレンドロネートの体内動態 (B) および皮膚適用後のマイクロニードルの溶解性 (C)

た薬理試験においても著効を示した。また、皮膚刺激性の評価において、アレンドロネートによる皮膚紅班が観察されたが、上述のパッチ製剤 (BHT などの刺激防止剤を添加していないパッチ製剤) の場合と比較してその程度は軽微であった<sup>5)</sup>。さらに、最近、アレンドロネートを微細針の先端部のみに搭載させることで、真皮の血管により近いところで薬物が放出され速やかに血中に移行させることが可能となり、アレンドロネートによる皮膚刺激が完全に回避できることも確認されている。以上の結果は、マイクロニードルを利用することにより、アレンドロネートの有効かつ安全な経皮吸収システムが構築できる可能性を示すものと考えられる。現在、研究結果に基づき実用化を目指して、より有効性および安全性に優れたビスホスホネートの経皮吸収製剤の開発を進めている。

#### 4. おわりに

本稿では、筆者が大学院から現在まで取り組んできた研究の一端を紹介した。筆者はこれまで酸化ス

トレスおよび骨疾患の効率的治療の実現を目指して、高分子・微粒子性キャリア、経皮および経肺など様々な DDS 開発に取り組んできたが、これらの研究を進める中で、多くの諸先生方からご指導をいただくことができた。また、京都薬科大学に着任後は、基礎研究のみならず多くの企業と共同研究をさせていただき、実用化を意識した研究を行う機会にも恵まれた。こうした諸先生方に巡り合えたこと、研究の機会を与えていただいたことに感謝しつつ、今後もこうした経験を活かして、DDS 研究に邁進していきたいと考えている。また、本年秋よりカナダのブリティッシュ・コロンビア大学 (Pieter Cullis 教授の研究室) に研究留学する予定であり、研究者としての視野を広げるとともに、英語スキルや国際性を高めたいと考えている。

本稿でご紹介した研究成果は、京都大学大学院薬学研究科 橋田充教授、山下富義准教授、西川元也准教授、川上茂講師 (現 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授)、京都薬科大学薬剤学分野 山本昌教授、

坂根稔康准教授, 草森浩助教, 京都薬科大学代謝分析学分野 安井裕之教授, 大阪薬科大学 掛見正郎教授, 京都大学大学院工学研究科 小山宗孝准教授, コスメディ製薬株式会社 神山文男博士, 権英淑博士, Teikoku Pharma, USA, Inc. 日比徹博士 (現 Pharma Seeds Create CMC Consultant 代表), 米戸邦夫博士 (現 リタファーマ株式会社代表取締役), セラフト株式会社 佐野昌隆代表取締役をはじめとした多くの先生方のご指導ご鞭撻の所産であり, ここに深謝するとともに, 研究に御協力頂きました学生の方々に御礼申し上げます.

#### 引用文献

- 1) H. Katsumi, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida, Development of polyethylene glycol-conjugated poly-S-nitrosated serum albumin, a novel S-Nitrosothiol for prolonged delivery of nitric oxide in the blood circulation *in vivo*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 1117–1124 (2005).
- 2) H. Katsumi, M. Nishikawa, H. Yasui, F. Yamashita, M. Hashida, Prevention of ischemia/reperfusion injury by hepatic targeting of nitric oxide in mice, *J. Control. Release*, **140**, 12–17 (2009).
- 3) H. Katsumi, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida, Prevention of hepatic ischemia/reperfusion injury by prolonged delivery of nitric oxide to the circulating blood in mice, *Transplantation*, **85**, 264–269 (2008).
- 4) K. Kusamori, H. Katsumi, M. Abe, A. Ueda, R. Sakai, R. Hayashi, Y. Hirai, Y. S. Quan, F. Kamiyama, T. Sakane, A. Yamamoto, Development of a novel transdermal patch of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, for the treatment of osteoporosis, *J. Bone Miner. Res.*, **25**, 2582–2591 (2010).
- 5) H. Katsumi, S. Liu, Y. Tanaka, K. Hitomi, R. Hayashi, Y. Hirai, K. Kusamori, Y. S. Quan, F. Kamiyama, T. Sakane, A. Yamamoto, Development of a novel self-dissolving microneedle array of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate: evaluation of transdermal absorption, safety, and pharmacological effects after application in rats, *J. Pharm. Sci.*, **101**, 3230–3238 (2012).