

《若手研究者紹介》



ドラッグデリバリーシステムに導かれた人生

奥 田 知 将* Tomoyuki Okuda

名城大学薬学部薬物動態制御学研究室

1. は じ め に

本コラムの執筆に当たり、未だ30代半ばである若輩者の筆者にとっては気恥ずかしい壮大な題を付けさせて頂いたが、それほど筆者の人生において『ドラッグデリバリーシステム (DDS)』はかけがえない存在である。筆者とDDSとの出会いは、高校3年生の時に何気なく手に取り読んだ科学書籍に掲載されていた『リポソーム』に関するもので、その魅力にとりつかれて以来、大学での9年間全くぶれずにアカデミアでのDDS研究者となる道を志してきた(これが筆者の唯一の誇りである)。筆者は大学4年生から博士前期課程までの間、岡山大学大学院自然科学研究科(現、医歯薬学総合研究科)・木村聰城郎教授(現、特任教授)主宰の薬物動態制御学分野に在籍して『安全性に優れた吸収促進剤の開発』に関する研究に従事し、その後、博士後期課程からは京都大学大学院薬学研究科・橋田 充教授主宰の薬品動態制御学分野に移籍して『腫瘍内滞留型ナノ粒子製剤の開発』に関する研究に従事してきた。その間、非常に多くの恩師の先生方と仲間を支えられ、卒業後に名城大学薬学部・岡本浩一教授主宰の薬物動態制御学研究室で助教として採用頂き、アカデミアで研究者となる夢を結実することができた。現在は、『肺をターゲットとした吸入型DDS製剤の開発』

に関する研究を中心に進めている。

読者数としては決して多くないと思うものの、特にこれからアカデミアで研究者となる将来を考えている学生にとって本稿が少しでも参考になれば幸いである。

2. 博士前期課程での研究活動

岡山大学薬学部に在学していた筆者は、4年生からの研究室配属に当たり、迷わず木村研究室を志願した。学生からの人気が高い研究室で定員を超える多数の志願者がいた中で、無事に配属が決まり、DDS研究をスタートすることができた。吸収改善、徐放化、標的指向化とDDS研究が幅広く展開されていた中で、筆者には研究テーマとして『アミノ酸含有低粘膜傷害性吸収促進剤の開発』を頂いた。

投与の簡便さおよび患者のコンプライアンスの観点から、経口および経粘膜が最も望まれる投与経路である一方、粘膜透過性が乏しい医薬品シーズが多い現状にある。この問題の改善に向けて、古くから吸収促進剤の探索・開発が進められており多くの候補化合物が見出されてきたものの、実用化にはその粘膜傷害性が大きな障壁となっている。

木村研究室のこれまでの研究成果において、脂肪酸塩の中でラウリン酸ナトリウム(C12)が比較的広範囲の分子量を持つ薬物に対して優れた吸収促進効果を発揮するとともに、タウリンやL-グルタミンなどのアミノ酸との併用によりC12の吸収促進作用を維持しつつその粘膜傷害性を軽減できることが見出されていた。筆者の研究テーマは、C12の吸収促進・粘膜傷害作用に対して各アミノ酸がどのような作用をもたらしているのかについて、特にカルシウ

*2003年岡山大学薬学部総合薬学科卒業。2005年同大学大学院自然科学研究科博士前期課程修了。2008年京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。名城大学薬学部薬物動態制御学研究室助教。研究のモットー:『あきらめたらそこで試合終了ですよ』(『SLAM DUNK』安西先生の名言) 連絡先: 〒468-8503 名古屋市天白区八事山150 E-mail: tokuda@meijo-u.ac.jp

ムシグナルに焦点を当てて機構解明を行うものであった。培養細胞を用いた阻害実験の結果から、C12がホスホリパーゼCの活性化を介したイノシトール三リン酸経路とカルシウムチャンネルを介した細胞外からのカルシウム流入の2経路により細胞内カルシウム濃度を上昇させることを見出し、その上昇がC12による細胞間隙経路の透過性亢進および粘膜炎傷害作用の両方に一部関与していることを明らかにした(図1)¹⁾。また、併用したアミノ酸が細胞膜カルシウムATPアーゼの活性化およびミトコンドリア内へのカルシウム取り込み亢進により、C12による細胞内カルシウム濃度上昇を抑制することを見出し、その作用が粘膜炎保護効果の一部に関与していることが示唆された(図1)¹⁾。一方、細胞内経路の透過性に関わる細胞膜の流動性をC12が上昇させるのに対して、併用したアミノ酸は影響を及ぼさないことを明らかにした。

最初に研究の大きな方向性についてディスカッションした後は、卒業まで自由に研究に取り組ませて頂き、曜日・昼夜を問わず研究活動に没頭することができた。研究活動に重きを置く余り、日曜日に実施されていた薬剤師国家試験対策の講義ならびに模試をボイコットし、1人で研究していたところを木村教授に見つかり何度も注意を受けたことも、今では良い思い出である(無事に一発で国家試験に合格できたことが、せめてもの罪滅ぼしであった)。『自ら考え、行動し、実証する』という研究者としての

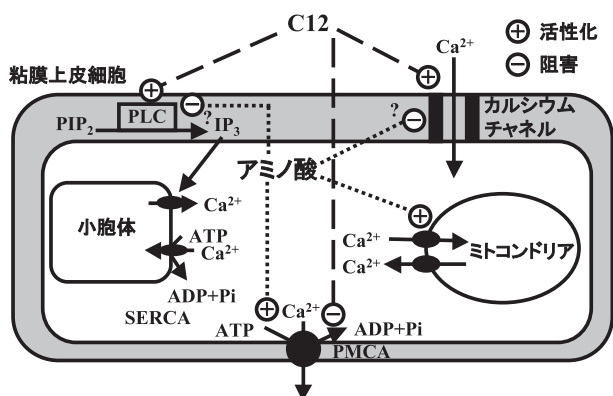


図1 細胞内カルシウム動態に及ぼすC12およびアミノ酸の影響

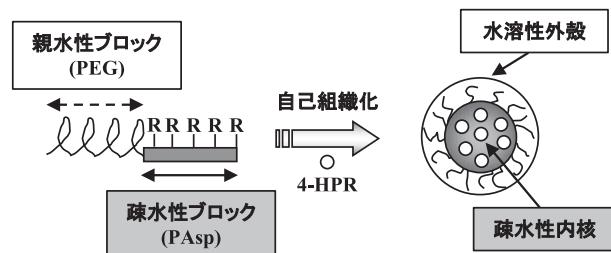
PIP₂: ホスファチジルイノシトール三リン酸, IP₃: イノシトール三リン酸, PLC: ホスホリパーゼC, ATP: アデノシン三リン酸, ADP: アデノシン二リン酸, Pi: 無機リン酸, SERCA: 小胞体カルシウムATPアーゼ, PMCA: 細胞膜カルシウムATPアーゼ。

基本姿勢を培うことができたのも、学生の主体性が重んじられた研究環境と、時に研究成果を競い合い時に研究内容を相談し合った研究室仲間との協力の賜物であったように思う。

博士後期課程への進学は決めていたものの、木村研究室に残るか、新天地として橋田研究室に移籍するかについて、これまでの人生の中で最も悩んだことを記憶している。悩んだ末に木村研究室に残る覚悟を決めて、直接の研究指導者であった檜垣和孝助教授(現、教授)にその旨を伝えたものの、その後すぐに(記憶が正しければ約1週間後)、筆者が橋田研究室への移籍を考えていることを先輩づてで聞いていた大河原賢一助手(現、准教授)の御厚意により、周山サマーセミナー(京都)の場で橋田研究室所属の川上茂助教(現、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授)と話をする機会を頂き、新天地での研究への期待に気持ちが高まり、橋田研究室への移籍に転向した。新天地での進学を支えて下さった木村教授、『まっ、お前の人生やからな』と謀反者を温かく送り出して下さった檜垣助教授、新天地での進学の大きなきっかけを与えて下さった大河原助手の各先生方には、感謝の気持ちでいっぱいである。

3. 博士後期課程での研究活動

橋田研究室に移籍してからは、新規がん治療薬として期待されているレチノイド(ビタミンAとその誘導体の総称)の腫瘍内滞留型製剤、特に、神奈川県科学技術アカデミー高分子ナノメディカルプロジェクトの横山昌幸プロジェクトリーダー(現、東京慈恵医科大学医学部准教授)から御提供頂いたブロック共重合体を用いた高分子ミセル製剤の開発を中心に行った(図2)。



ブロック共重合体

PEG: ポリエチレングリコール
PAsp: ポリアスパラギン酸
R: 疎水性ブロックに導入した脂溶性官能基

4-HPR封入高分子ミセル

図2 4-HPR封入高分子ミセルの概略図

レチノイドは、培養細胞による検討では従来の抗がん剤に匹敵する優れた抗がん活性が報告されているものの、生体内投与後に十分ながん治療効果が認められた報告は極めて少ない。レチノイドによるがん治療効果発現に要する腫瘍内濃度-時間パターンを達成する新規製剤開発に当たり、レチノイドの脂溶性の高さを利用して疎水性相互作用を介して効率的に封入するとともに血中滞留性に付随した enhanced permeability and retention (EPR) 効果によるがんターゲティングが期待できる微粒子製剤化が最適と考えた。そこで、高分子ミセルをはじめ、リポソームや o/w エマルジョンなど様々なナノ粒子を用いて、種々のレチノイドの微粒子製剤化に着手した。研究1年目は、①手に入るレチノイドの検索→②脂溶性および抗がん活性に関する情報収集→③抗がん活性の確認(実験)→④ナノ粒子への封入・組成検討→⑤マウス静脈内投与後の血中濃度-時間パターン解析の流れで try & error のひたすら繰り返してであった。ナノ粒子へのレチノイドの封入は比較的容易に達成できたが、ほとんどの場合に血液中にナノ粒子からレチノイドが速やかに放出される現象に直面した。リポソームや高分子ミセルを薬物万能のキャリアーと思い込んでいた筆者にとって、血液中に薬物を安定にナノ粒子中に保持することの難しさは驚愕であった。研究2年目に差し掛かり、N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) について、高分子ミセルへの封入により血中滞留性が劇的に延長する結果を得て、思わずガッツポーズをしたのが一番の思い出である。さらに、構造が異なる脂溶性官能基を疎水性ブロックに導入した種々のブロック共重合体を用いて検討したところ、4-HPR の血中滞留性を獲得するにはベンジル基の導入が最も有効であることを見出した²⁾。最適化した4-HPR封入高分子ミセルは血中滞留性のみならず、期待していたEPR効果による腫瘍内滞留性を獲得し、皮下腫瘍モデルマウスにおいてがん治療効果を達成するに至った。その他、カチオン性 o/w エマルジョンに4-HPRを封入した局所投与型製剤の開発を進め、皮下腫瘍モデルマウスにおいて腫瘍内投与後の4-HPRの腫瘍内滞留性の獲得およびがん治療効果を見出すとともに、4-HPRの副作用として知られる血中レチノール濃度低下作用を回避できる可能性が示唆された。

現在、多くの学生に研究テーマを与える身となり、当時研究テーマの立ち上げから着手させて頂いたことが大きな経験となっている。在籍中は、新規研究テーマの立案や研究結果について川上助教と頻りにディスカッションする中で多くの駄目出しと助言を頂いた。それらを基に研究の軌道修正を行い、ある程度の自信を持って全体のミーティングに臨むも、橋田教授と山下富義准教授から盲点および弱点を突かれることの連続であった。本当に価値ある研究テーマおよびその成果を出すことの難しさ・大切さを痛感し、研究者としてたくましく育てて頂いたことに感謝の気持ちでいっぱいである。

また在籍中に得た大きな経験として、2006年の日本薬学会第126年会(仙台)で初めて企画された大学院生シンポジウムにおいて『微粒子関連製剤の最近の動向』の演題の下、オーガナイザーを務めさせて頂いた。シンポジストの人選に始まり、微粒子型DDS製剤の開発経緯と今後の方向性についてスライドにまとめ上げるとともに、シンポジウムの司会・進行の業務に携わり、学生としては大変貴重な体験を経ることができた。シンポジウムを終えた後には、一般発表では得られなかった何とも言い難い達成感に満ち溢れていたことを今でもよく覚えている。このシンポジウムをきっかけとして、全国のDDS研究に従事する若手研究者(教員・学生)が集う親睦会が定期的(ほぼ毎年)に開催されている。多い時には総人数で100人近くになることもあり、重要な出会い・情報交換の場となっている。筆者にとっても非常に楽しみな会であり、その場で交わされるDDS研究仲間との話が、今でも研究遂行の大きなモチベーションとなっている。現在は教員の立場で同シンポジウムに足を運び、学生の講演を聞かせてもらっているが、年を経るごとに講演内容のレベルが上がっていることには驚くばかりである(学生に許された自由奔放で奇抜な発想・提案が少なくなっているという面では少し寂しさを感じる)。日本薬学会年会においても同様の企画(SNPEE)が組み込まれ、現在では恒例のシンポジウムとして周知されるに至っているが、特にこれからアカデミアで研究者となる将来を考えている学生には、ぜひオーガナイザーあるいはシンポジストとしてこれらの企画に積極的に参加することを強くお勧めしたい。

4. 現在の研究活動

卒業後は、岡本研究室の助教として採用頂き、長年夢に描いていたアカデミアでの研究者としての第一歩を踏み出すことができた。赴任直後に岡本教授から『自分の好きなように研究を進めてください』と激励のお言葉を頂き、研究室の大部分の研究活動を任されてから今日まで、配属学生とともに切磋琢磨しつつ研究を進めることができています。赴任当時から岡本研究室では製剤学を専門とする粉末製剤化研究、とりわけ吸入粉末剤としての実用化を目指した粉末微粒子の設計・開発が精力的に進められており、それまでの研究で溶液試料しか取り扱ったことのない筆者にとっては大変新鮮で興味深いものであった。当時研究室に在籍していた大学院生と一緒に研究を進める中で、彼らから製剤学的な知識・技術を学ぶことも非常に多かった。粉末製造後に薬理活性が大幅に減弱する、はたまた粉末微粒子が速やかに吸湿して液状化するなど、思いもよらない現象に驚きの毎日であった。このような状況で、これまでに培ってきた知識・技術を生かして吸入粉末剤研究を進めるに当たり、筆者が最も注目したのが『粉体としての生物学的作用』である。吸入粉末剤研究の主流は構造・粒子径・結晶性・付着凝集性など設計・製造した粉末微粒子の物性評価であるが、呼吸器系上皮細胞に沈着した粉末微粒子がどのような生物学的作用を及ぼすかについて詳細に評価・解析した報告は極めて少ない。そこで、吸入粉末剤の生物学的作用評価に適した *in vitro/in vivo* 評価系を確立するとともに、それらの評価に基づいて肺内送達性と治療効果の双方に優れた新規吸入用粉末微粒子の開発を推進してきた。以下、筆者がこれまでに得た研究成果の一部について、簡単に紹介したい。

4.1 吸入パターン・吸入器性能に依存しない吸入用粉末微粒子の開発

吸入器に充填された粉末微粒子を肺深部まで送達するには、服薬時の吸入動作で生じる気流により容易に一次粒子にまで分散する必要がある。付着凝集性を克服するための緻密な粒子構造設計ならびに粒子径制御が求められる。また患者の吸入パターンや吸入器の分散性能の違いに依らず、安定した肺内送達性が得られることが望ましい。

筆者らは噴霧急速凍結乾燥 (spray freeze drying:

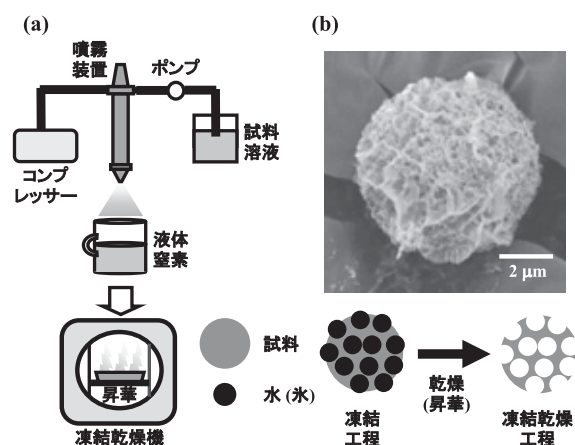


図3 噴霧急速凍結乾燥法 (SFD 法)

(a)装置の概略図 (b)SFD 微粒子の電子顕微鏡写真

SFD) 法で得られる多孔性粉末微粒子に注目し、吸入粉末剤応用に向けた組成・調製条件の最適化を進めてきた (図3)。粒子構造の低密度化により、肺内送達性に適した空気力学的粒子径を達成しつつ、幾何学的粒子径を増加することで付着凝集性の問題を解決できる。最適化を進める中で、疎水性アミノ酸の一種である L-ロイシン (Leu) を組成中に組み込むことにより、SFD 微粒子の肺内送達性が飛躍的に向上することを見出した。さらにヒト吸入パターン再現装置を用いた吸入特性評価から、Leu を添加した SFD 微粒子が有する優れた肺内送達性が吸入パターンおよび吸入器の分散性能の違いに依らず得られることを明らかにした。これらの結果より、SFD 微粒子を吸入粉末剤に応用することで、吸入パターンが異なった様々な患者が服薬しても、治療に要する十分な肺内送達量が保証され、安定した治療効果を得ることが期待できる。

4.2 核酸含有吸入粉末剤の開発

核酸 (DNA および RNA) は、セントラルドグマによる遺伝子発現作用のみならず、アプタマーによる蛋白質機能抑制作用あるいは small interfering RNA (siRNA) による遺伝子発現抑制作用などの新たな機能が近年多数見出されており、新薬候補として注目されている。その最大の課題は DDS 技術の確立であり、肺疾患治療への応用に向けては吸入剤開発に大きな期待が寄せられている。一方、有用な核酸含有吸入粉末剤を創出するためには、核酸の構造を維持しつつ吸入剤応用に適した粒子設計が可能な粉末製造技術の確立が必要不可欠である。

筆者らはキトサンを始めとしたカチオン性ポリマ

ーを遺伝子ベクターとして、SFD法および超臨界二酸化炭素晶析（supercritical fluid precipitation：SCF）法により、プラスミドDNA（pDNA）およびsiRNAを含有した核酸吸入粉末剤の開発を進めてきた。カチオン性ポリマーを添加することで、製造した粉末微粒子中で核酸の構造が維持されるとともに、その粉末微粒子を水で溶解すると粉末製造前と同様の粒子径・表面電荷を持つ核酸/カチオン性ポリマー静電的複合体を形成することを明らかにした^{3,4}。pDNA含有粉末微粒子をマウス肺内に投与したところ、肺での局所的な遺伝子発現効果が認められた³。またsiRNA含有粉末微粒子についても、肺転移がんモデルマウスへの肺内投与により、肺に転移したがん細胞に対して遺伝子発現抑制効果が認められた⁴。最近得た興味深い結果として、粉末製造後に核酸/カチオン性ポリマー静電的複合体の作用を増強する賦形剤を見出し、現在、その機構解明に向けた検討に着手している。

4.3 近赤外蛍光イメージングを応用した吸入粉末剤の肺内送達量評価

小動物を用いた吸入粉末剤の動態・薬理試験において、自発呼吸の影響で粉末微粒子の肺内送達量を厳密に制御することは極めて困難である。そのため、試験結果が不明瞭となる場合も多く、個々の小動物における肺内送達量を簡便かつ非侵襲的に把握する評価法が強く求められている。

この評価法として、筆者らはインドシアニングリーン（ICG）を含む近赤外蛍光ラベル化粉末微粒子を用いた *in vivo* 蛍光イメージング評価を試みてきた。キトサンを遺伝子ベクターとしたpDNA含有粉末微粒子の *in vivo* 試験にこの評価を応用したところ、肺内送達量と遺伝子発現量の間に関連関係が得られることを確認し、*in vivo* で遺伝子発現効果を発揮するのに最適なN/P比（pDNA中のリン酸基に対するキトサン中のアミノ基のモル比）の決定を達成できた³。肺がん治療への応用に向けて開発した抗がん剤含有粉末微粒子においても、同様に肺内送達量と肺がん治療効果の間に有意な相関関係が得られ、近赤外蛍光イメージングによる肺内送達量評価の有用性が示された。さらにICGと比較してカチオン性化合物との相互作用が弱く、より長期間正確に肺内送達量評価が可能な高分子型近赤外蛍光ラベル剤（PEG-conjugated near-infrared fluorescent

probe；PEG-NIRF）の開発に成功している⁵。

4.4 気液界面培養細胞評価系を用いた吸入粉末微粒子の *in vitro* 評価

細胞の粘膜側を空気に曝した状態で培養して構築する気液界面培養細胞評価系（air-liquid interface cell culture system；AIC）は、タイトジャンクションの形成や粘液分泌能の獲得など呼吸器内環境をより反映した *in vitro* 評価系として注目されている。

筆者らは吸入粉末剤の生物学的作用評価にAICを応用すべく、細胞層上に粉末微粒子を簡便かつ均一に分散添加可能な添加デバイスの開発を行った。この添加デバイスとAICを用いて粉末微粒子添加後の薬物透過性を評価したところ、溶液として添加した場合よりも薬物透過量が増加する興味深い結果が得られた。この透過量増加効果は吸収促進剤として汎用されるカプリン酸ナトリウムを添加した場合に匹敵し、数百から一万までの分子量が異なった薬物においてほぼ同程度の効果が認められた。一方、膜抵抗値変化や粘膜傷害など細胞層への影響は認められなかった。現在、この透過量増加効果の詳細な機構解明を進めるとともに、賦形剤間の毒性比較評価など新たな吸入粉末剤試験に展開している。

5. おわりに

吸収改善から標的指向化と学生時代に幅広くDDS研究に携われたことが、現在、吸入粉末剤研究を展開・推進する大きな原動力となっている。薬学部の6年制移行に伴って筆者の頃とは異なり、学生が研究に従事できる時間は大幅に短縮されている。研究活動の努力が成果として実り始めたタイミングで実験を終了し、卒論としてまとめ上げなければならない学生も多く、研究の面白さを伝えきれていない現状を歯痒く思っている。一方、配属生のうち、短い研究活動の中で研究に興味を持ち、博士課程に進学する学生が比較的多いこと（一昨年度、昨年度ともに各2人）を大変嬉しく思う。筆者が教員として初めて指導した当時大学院の修士2年生だった2人が、ともに博士課程に進み、その後、筆者と同じようにアカデミアで研究者として活躍していることも、大きな刺激となっている。今後も、精力的に研究を進めるとともに、『自ら考え、行動し、実証する』という研究活動の醍醐味を多くの学生に伝えられるよう努めていく所存である。

引用文献

- 1) T. Okuda, K. Kadotsuji, C. Takayama, K. Hanada, F. Mukaizawa, K. Ogawara, K. Higaki, T. Kimura, Involvement of intracellular Ca^{2+} dynamics in cytoprotective action by amino acids and cytotoxicity by sodium laurate, an absorption enhancer, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 2256–2265 (2006).
- 2) T. Okuda, S. Kawakami, M. Yokoyama, T. Yamamoto, F. Yamashita, M. Hashida, Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide into polymeric micelles in mice, *Int. J. Pharm.*, **357**, 318–322 (2008).
- 3) K. Mohri, T. Okuda, A. Mori, K. Danjo, H. Okamoto, Optimized pulmonary gene transfection in mice by spray-freeze dried powder inhalation, *J. Control. Release*, **144**, 221–226 (2010).
- 4) T. Okuda, D. Kito, A. Oiwa, M. Fukushima, D. Hira, H. Okamoto, Gene silencing in a mouse lung metastasis model by an inhalable dry small interfering RNA powder prepared using the supercritical carbon dioxide technique, *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1183–1191 (2013).
- 5) T. Okuda, Y. Kobayashi, S. Yanamoto, H. Okamoto, PEG conjugation of a near-infrared fluorescent probe for noninvasive dual imaging of lung deposition and gene expression by pulmonary gene delivery, *J. Drug Target.*, **20**, 801–812 (2012).