

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17958

研究課題名(和文)プロドラッグ/アンテドラッグ分子修飾体の徐放型関節内投与DDS製剤設計への応用

研究課題名(英文) Application of prodrug and antedrug approach to design of sustained release DDS formulation for intra-articular administration

研究代表者

大浦 華代子 (Ohura, Kayoko)

熊本大学・大学教育統括管理運営機構・特任助教

研究者番号：80452879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、変形性膝関節症の関節内投与製剤の開発を目指して、DDS製剤化に応用できる関節内の加水分解酵素の特性を解析するため、加水分解酵素の中でも種類の多いセリンエステラーゼの有効なプローブであるFluorophosphonate-biotinを利用して、特異的抗体を用いずにセリンエステラーゼの発現量を定量する方法を確立した。また、加水分解酵素のソフトドラッグに対する認識性の一部を明らかにした。さらに、Butyrylcholinesteraseの活性にCa<sup>2+</sup>イオンが及ぼす影響について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて構築したセリンエステラーゼの定量方法は、関節内に存在する加水分解酵素だけでなく、その他の組織に存在する新たな加水分解酵素の同定にも応用可能と期待される。また、これまでに詳細な検討のなかったParaoxonase 1やButyrylcholinesteraseの血漿加水分解酵素の基質認識性および特性を本研究では一部、明らかにすることができ、今後、血漿加水分解酵素を利用したプロドラッグおよびソフトドラッグを設計する上で有用な情報になるものと確信できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, a quantitative western blotting method was established using fluorophosphonate-biotin, a universal probe of serinesterases, to investigate the characteristics of esterases present in the knee joint. In addition, it was found that the anticholinergic soft drug, 2R3'-R-SGM, was mainly hydrolyzed by plasma paraoxonase 1 in the human. Furthermore, the effect of calcium ion on the hydrolysis of cationic and anionic substrate by human butyrylcholinesterase was clarified.

研究分野：薬剤学

キーワード：変形性膝関節症 血漿加水分解酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症は加齢とともに膝関節の軟骨が摩耗し、関節の変形と疼痛を生じる疾患である。変形性膝関節症の有病者数は2,500万人、その中で日常生活に障害をもたらす疼痛を伴う患者は800万人にも及ぶと推計されており、超高齢化社会を迎えた日本では「国民病」とも言われるほど患者数が増加している。変形性膝関節症の治療は、対症療法的な投薬治療が主であり、初期の段階では抗炎症薬の内服、その後、病状の進行に従って軟骨保護薬のヒアルロン酸、あるいは疼痛抑制のためのステロイドが関節内投与される。末期まで進行すると関節形成術や人工関節置換術を行うしかない。現在、根本的治療を目指して、軟骨マトリックス破壊を進行する分子を標的とした薬の開発が進められている。最も注目されているのは、軟骨マトリックスの主成分である型コラーゲンやアグリカンを分解すると言われているマトリックスメタロプロテアーゼ 13 (MMP-13)、トロンボスポンジンモチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ 5 (ADAM-TS5) であり、これらのプロテアーゼに対する低分子量の阻害剤の探索が行われている。

対症療法、根本的治療のいずれにせよ、変形性膝関節症の薬物療法では、投与が長期になるために全身性の副作用回避、また関節内での薬物濃度を高くするために関節内への局所投与が前提となる。しかしながら、関節内に投与された低分子の薬は速やかに消失されてしまい、有効な薬物濃度を長時間維持できないばかりか、関節内に投与したにも関わらず、全身性の副作用を発生してしまう。この原因は、関節特有の構造にある。関節は滑膜組織と繊維組織からなる関節包によって囲まれており、その内部は滑膜細胞が分泌する滑液に潤されている。関節には滑膜・血液関門が存在するが、関節内で炎症が惹起されると、毛細血管透過性が亢進して滑膜・血液関門が破綻し、LDLを含む高分子量の血漿成分が大量に流入して関節腔に滑液が貯留する。すなわち、変形性膝関節症患者では、関節内に投与された低分子の薬が容易に滑膜層を通過できるため、関節内から極めて速やかに消失してしまう。同じ理由から、血液を介して薬が関節内に移行する割合は低く、経口投与や静脈内投与された薬の薬効は期待できない。分子量90万~600万のヒアルロン酸ですら数日で消失される。患者の負担や感染の危険性から頻回の関節内注射は避けるべきであり、薬物の徐放化を目指してリポソームやPLGA ナノスフェアなどの微粒子製剤を応用する研究も進められている。

### 2. 研究の目的

薬物の徐放化は高い薬効をもたらす点についてはよいが、逆に、関節内に薬物濃度を長時間維持させるために深刻な副作用が生じる可能性が予測される。そこで、関節内に投与される薬物をプロドラッグ化、またはアンテドラッグ化することにより副作用を克服できないかと考えた。これまでに、関節液には、血漿酵素のブチリルコリンエステラーゼ (BChE) や HDL に結合して存在するパラオキシナーゼ 1 (PON1) が存在することを明らかにしている。滑膜細胞の酵素については同定までには至っていないが、システインエステラーゼとカルボキシシルエステラーゼ (CES) 様のセリンエステラーゼの発現を確認している。プロドラッグの活性化、アンテドラッグの不活性化には加水分解酵素が利用されることが多い。プロドラッグおよびアンテドラッグの設計においては、代謝速度を制御するために、利用する酵素の機能特性を十分に把握することが重要である。しかし、関節内に存在する加水分解酵素機能に関する情報は少ない。そこで、本研究では有効で安全な関節内投与製剤の開発を目指して、加水分解酵素の中でも特に発現の多いセリンエステラーゼの検出および定量方法の最適化、さらに、関節内に存在する血漿加水分解酵素の特性について詳細に検討した。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の内容について検討した。

#### (1) セリンエステラーゼの検出および定量方法の構築

セリンエステラーゼの有効なプローブである Fluorophosphonate (FP) にビオチンを標識した FP-biotin を用いた組換えセリンエステラーゼの発現量の定量法確立および滑膜細胞のセリンエステラーゼの同定を行った。市販のブタカルボキシシルエステラーゼ 1 (CES1、PLE)、ヒト CES1 (hCE1)、ヒト BChE の精製酵素と組換え CES 安定発現 HEK293 細胞 S9 分画を FP-biotin と反応させ、Western Blotting 法にて HRP 標識アビジンにより検出した。ヒト滑膜細胞 (HFLS) ホモジネートを Native-PAGE 後、活性染色によりバンドを検出した。同時に FP-biotin と反応したサンプルを Native-PAGE ゲルに展開し、検出されたバンドと同じ移動度のゲル片を採取した。ゲル片から抽出した FP-biotin 化タンパク質をストレプトアビジン磁性粒子により分離した。

#### (2) ソフトドラッグを用いた血漿加水分解酵素の機能解析

ソフトドラッグのモデル化合物として、ムスカリン性抗コリン薬 Glycopyrrolate からデザインされたソフトドラッグ 2R3 ' R-SGM を用い、ヒト血漿における加水分解について、加水分解酵素に対する各種阻害剤を用いて検討した。さらに、ヒト血漿から PEG 沈殿法により HDL 分画を分離し、HDL 結合型 PON1 の加水分解機能について評価した。

#### (3) 精製ヒト BChE の機能解析

ヒト BChE 活性は  $Ca^{2+}$  イオンにより影響されるとの報告があるが、各基質に対する影響については詳細には検討されていない。 $Ca^{2+}$  イオンが精製ヒト BChE 活性に及ぼす影響について、アニオン性の基質である Aspirin、カチオン性の基質である Butyrylthiocholine (BTC) および

*O*-*n*-Butyryl propranolol を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) セリンエステラーゼの検出および定量方法の構築

FP-biotinと精製セリンエステラーゼの PLE、hCE1 および BChE の反応性は同様であり( 図 1 )、0.4-3.4 pmol/lane の範囲で直線性を示した。これらの各種精製酵素の検量線から算出したヒトとサルとの組換え CES (hCE1、hCE2、mfCES2A、mfCES1A) 発現量に相違はなかった。FP-biotin は異なる酵素であっても活性中心のセリン残基に 1:1 の割合で結合でき、ユニバーサルに組換えセリンエステラーゼの発現量定量に使用可能であることが明らかとなった。次に、HFLS ホモジネートの 4-methylumbelliferyl butyrate を基質に用いた Native-PAGE 活性染色した結果、3 本のバンドが検出された。これらの 3 本のバンドには多くの FP-biotin 化タンパク質が含まれていた。以上のことより、この評価系では滑膜細胞に存在するセリンエステラーゼの特異的抗体を必要とせずに、ユニバーサルに組換えセリンエステラーゼの発現量が定量できる可能性が示され、滑膜細胞に限らず、様々な細胞におけるセリンエステラーゼの発現量定量に応用可能と期待される。

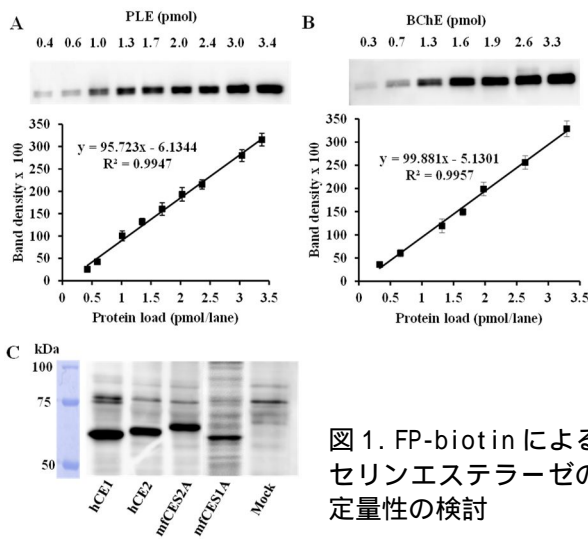


図 1. FP-biotin によるセリンエステラーゼの定量性の検討

##### (2) ソフトドラッグを用いた血漿加水分解酵素の機能解析

ムスカリン性抗コリン薬 Glycopyrrolate からデザインされたソフトドラッグ 2R3' R-SGM はヒト肝臓および小腸では加水分解されなかった。一方、ヒト血漿では半減期 16.9 ± 1.23 min で加水分解されることが明らかとなった。さらに、血漿加水分解酵素に対する各種阻害剤を用いて 2R3' R-SGM の加水分解酵素について解析した結果、PON1 の阻害剤である Paraoxon および EDTA により加水分解がされ、PON1 の補因子である Ca<sup>2+</sup> イオンにより活性が増大した( 図 2 )。PEG 沈殿により分離した HDL 分画において 2R3' R-SGM は加水分解されたことから、2R3' R-SGM は主に PON1 により不活化されることが明らかとなった。ソフトドラッグに対する血漿加水分解酵素の PON1、BChE、Albumin の基質認識性の相違についてはこれまでほとんど詳細に検討されておらず、今回の結果はソフトドラッグの設計において有用な情報を提供できると期待される。

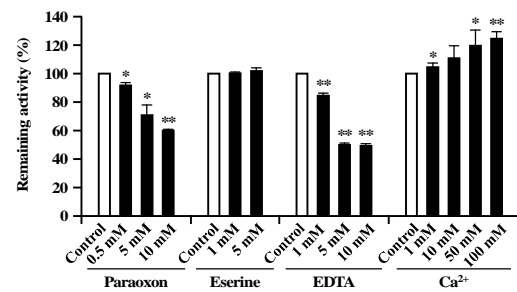
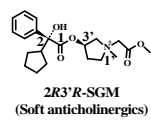


図 2. ヒト血漿における 2R3' R-SGM の加水分解への各種加水分解酵素阻害剤の影響

##### (3) 精製ヒト BChE の機能解析

Ca<sup>2+</sup> イオンが BChE 活性に及ぼす影響について検討した結果、アニオン性の基質である Aspirin に対する活性は Ca<sup>2+</sup> イオン濃度の増加に依存して増大した( 1 mM Ca<sup>2+</sup> 存在下の相対活性: 9.4 ± 1.0、2 mM Ca<sup>2+</sup> 存在下の相対活性: 10.0 ± 1.5、10 mM Ca<sup>2+</sup> 存在下の相対活性: 25.9 ± 1.2、20 mM Ca<sup>2+</sup> 存在下の相対活性: 32.3 ± 0.2 )。一方、カチオン性の基質である BTC に対する活性は若干、低下しただけで、大きな変動はなかった。また、同じカチオン性基質の *O*-*n*-Butyryl propranolol に対する活性は Ca<sup>2+</sup> イオン濃度を変化させても変動しなかった。図 3 に示すように BChE 活性への Ca<sup>2+</sup> イオンの影響はアニオン性基質とカチオン性基質で異なることが明らかとなった。

Anionic substrate	Cationic substrate	
Aspirin	Butyrylthiocholine	<i>O</i> - <i>n</i> -Butyryl propranolol
<chem>CC(=O)OC1=CC=C(C=C1)C(=O)O</chem>	<chem>CCCC(=O)SC</chem>	<chem>CCCC(=O)OC1=CC=C2C=CC=C12</chem>
Effect of Ca <sup>2+</sup> on the hydrolysis of substrate by human BChE	Increase	Slight decrease

図 3. Ca<sup>2+</sup> イオンがヒト BChE の各種基質の加水分解に及ぼす影響

本研究にて構築したセリンエステラーゼの定量方法は新たな加水分解酵素の同定に応用できると期待される。また、これまで具体的な検討のなかった血漿加水分解酵素のソフトドラッグに対する認識性の一部を明らかにすることができた。また、基質の正電荷の相違により  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが BChE 活性に及ぼす影響が異なることを明らかにでき、これら血漿加水分解酵素を利用したプロドラッグおよびソフトドラッグの設計において有用な情報になるものと確信できる。将来、これらの情報を利用して設計されたプロドラッグ・ソフトドラッグをリポソームや PLGA ナノスフェアに封入するなどの DDS 技術を組み合わせることにより、副作用の少ない、且つ有効な関節内投与製剤の開発が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ahmed Samir, Kayoko Ohura, Nicholas Bodor, Teruko Imai	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Identification of major esterase involved in hydrolysis of soft anticholinergic (2R3' R-SGM) designed from glycopyrrolate in human and rat tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2019.03.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Abdel-Daim Amira, Ohura Kayoko, Imai Teruko	4. 巻 114
2. 論文標題 A novel quantification method for serine hydrolases in cellular expression system using fluorophosphonate-biotin probe	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 267 ~ 274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejps.2017.12.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai Teruko, Bahar Fatma Goksin, Ohura Kayoko, Toda Akihisa	4. 巻 109
2. 論文標題 Effect of Calcium on the Hydrolysis Activity of Human Butyrylcholinesterase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 1417 ~ 1420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2019.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Amira Abdel-Daim, Kayoko Ohura, Naoki Kishimoto, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, Teruko Imai
2. 発表標題 Applications of fluorophosphonate biotin probe in qualitative and quantitative analysis of serine hydrolases.
3. 学会等名 日本薬物動態学会第32回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大浦華代子、Amira Abdel-Daim、岸本直樹、高宗暢暁、三隅将吾、今井輝子
2. 発表標題 セリン加水分解酵素の定性・定量分析におけるフルオロリン酸ビオチンプローブの応用
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----