

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590101
 研究課題名（和文） アトピー性皮膚炎治療薬の開発：皮膚エステラーゼ機能解析によるプロドラッグデザイン
 研究課題名（英文） Drug development for atopic dermatitis treatment : Rational prodrug design based on function of skin esterases
 研究代表者
 今井 輝子（IMAI TERUKO）
 熊本大学・薬学部・教授
 研究者番号：70176478

研究成果の概要：皮膚内の加水分解活性を担う主な酵素としてカルボキシルエステラーゼを同定し、この酵素をターゲットとした皮膚滞留型のアトピー性皮膚炎治療薬をデザインした。すなわち、皮膚構造、酵素の存在部位および皮膚成分と薬物との親和性を考慮することにより、皮膚患部での活性薬物濃度を維持し、持続的に薬理活性を示すことができる薬物を設計し評価した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：経皮吸収、プロドラッグ、加水分解、カルボキシルエステラーゼ、エステル交換反応、抗アレルギー薬、基質認識性、皮膚

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患は増加傾向にあり、アトピー性皮膚炎については、小学児童の約10%に発症が認められ、その内、中等症と軽症は95%以上である。このように、アトピー性皮膚炎は軽症から中等症の割合が高いため、緩和な効果を示す薬や、掻痒に著効を示す抗アレルギー薬などの外用薬が望まれる。しかしながら、現在臨床応用されている治療

薬としては、ステロイド剤や免疫抑制剤タクロリムスなど薬効の強いものがほとんどである。多くの抗アレルギー薬はその分子構造に基づく物理化学的特性のために、皮膚吸収性が悪く、外用剤として開発できないのが現状である。本研究では角質層への移行・蓄積性が良く、効果が持続する抗アレルギープロドラッグの開発を目的として研究を着手した。

これまで、私は経口投与剤としてのプロドラ

ッグの開発について検討しており、特にプロドラッグの加水分解に關与するカルボキシルエステラーゼの機能、臟器分布、種差について詳細に検討してきた。皮膚にもカルボキシルエステラーゼの発現は認められているが、皮膚エステラーゼに関する情報は極めて少なく、皮膚代謝におけるカルボキシルエステラーゼの寄与については明らかではない。本研究では、皮膚に存在するエステラーゼをこれまでの研究手法を用いて明らかにし、さらに、標的酵素を利用したプロドラッグ設計を目的として研究を開始した。

2. 研究の目的

外用剤の皮膚吸収性に関するバリアーは、皮膚そのものの構造に由来している。すなわち、皮膚最外層の角質層は疎水性バリアーとして親水性薬物の透過を阻止し、角質層に続く表皮・真皮は比較的親水性であるため、疎水性薬物の透過を阻止する。特に、角質層の疎水性バリアーを克服することが、皮膚投与製剤開発の最大のポイントである。多くの抗アレルギー薬も同様に、第一のバリアーである角質層への移行が不十分である。このように、生体防御として皮膚が備えた二段構えの構造上の特徴のために、皮膚適用製剤の開発には制限があり、薬理活性の優れた医薬品を皮膚に適用することができないのが現状である。

プロドラッグはこのような皮膚の特徴を凌駕したドッグデザインと言える。すなわち、薬物の親水基(水酸基、カルボキシル基など)をエステル修飾すると、薬物全体の疎水性が向上する。さらに、プロドラッグの分子構造によって、角質層に対する移行性・蓄積性をコントロールできる。角質層は死細胞であるため、プロドラッグのエステル結合は化学的な加水分解のみを受け、酵素加水分解から保護される。角質層の下層に位置する表皮・真皮は生細胞から構成されるため、細胞内に存在するエステラーゼがプロドラッグを加水分解する。したがって、プロドラッグを皮膚に投与した場合、プロドラッグは角質層に蓄積され、その後、徐々に表皮に移行して、エステラーゼによる加水分解を受けて、親薬物に変換され、表皮および真皮で薬効を示す。皮膚適用プロドラッグは単純明解なストラテジーに基づくにも関わらず、これまでにエステル化を利用したドラッグデザインの例としては、ステロイド化合物の活性増大を目的としたエステル体(アンテドラッグ)のみである。プロドラッグの概念を利用した皮膚投与剤の開発が少ない理由の一つは、皮膚に発現する酵素の種類や発現レベルなどが明らかでないことである。

そこで、本研究では皮膚に発現する加水分解

酵素を同定し、発現量の多い酵素をターゲットとしたプロドラッグの設計を目的として、研究を開始した。モデル薬物として、抗アレルギー薬のフェキソフェナジン(FXD)を選択し、皮膚エステラーゼ感受性のFXDプロドラッグを合成し、その皮膚透過性並びに加水分解特性について検討した。さらに、実験動物として選択したラット皮膚とヒト皮膚に発現する酵素の相違についても検討を加えた。また、皮膚エステラーゼの年齢による発現変動について検討し、皮膚投与を目的としたプロドラッグ化の有用性を評価した。

3. 研究の方法

(1) ヒトおよびラット皮膚に発現する加水分解酵素の同定およびその酵素の発現レベルをタンパク質および mRNA 量により解析した。最終的に、ヒトにおける薬物動態は *invitro* 実験から速度論的手法により予測するが、速度論モデルの妥当性を評価するために、モデル動物としてラットを利用した。

(2) 7 週、46 週、90 週のラット皮膚の mRNA レベルを測定した。また、皮膚ホモジネート 9000g 上清(S9)を調製し、Native PAGE で展開したゲルをエステラーゼ活性を利用して染色した。また、*p*-ニトロフェノールエステル誘導体等の加水分解速度を定量した。さらに、エステル形成反応に対する触媒活性について、安息香酸誘導体を用いて検討した。

(3) 抗アレルギー薬 FXD のエステル体(メチルエステル(M-FXD)およびエチルエステル(E-FXD))を合成し、皮膚 S9 における加水分解活性を検討した。また、皮膚投与剤に添加されることの多いアルコールによる加水分解阻害効果を検討した。

(4) Flow-through タイプの拡散セルを用いて、E-FXD のラット皮膚透過実験を行った。経時的にレセプター相およびドナー相の薬物濃度および皮膚内濃度を測定して、皮膚取り込み速度、透過速度並びに皮膚透過中の加水分解速度を解析し、E-FXD の皮膚内動態を明らかにした。

4. 研究成果

(1) Native PAGE 及び RT-PCR の結果から、ラットおよびヒト皮膚には加水分解酵素として、主に、カルボキシルエステラーゼ(CES)が存在することを見出した。CES の中で、異物代謝に関わるファミリーは CES1 と CES2 ファミリーであるが、両動物の皮膚には、主に、CES1 ファミリーが発現することが示された。すなわち、ヒト皮膚には CES1 A1(hCE1)、ラット皮膚には CES1 F

ファミリーの中でも特に、Hydrolase A が高発現した。

(2) ラット CES1 に分類される酵素は、少なくとも 4 種存在するが、ラット皮膚には Hydrolase A が高発現しており、精巣、肺における CES 発現パターンと類似した。また、基質認識性もこれらの臓器と類似した。しかしながら、皮膚 S9 の加水分解活性は、他の臓器の S9 (肝臓・腎臓・精巣・空腸・肺) と比較して、組織蛋白質あたりの発現量が低いため、その活性は極めて低かった。

(3) ラット Hydrolase A とヒト CES1 A1 は基質認識性が広く、多くの化合物を加水分解した。また、エステル形成反応の触媒活性について、主にヒト CES1 A1 で検討した。その結果、アルコールの添加により、安息香酸誘導体は加水分解されると同時に、添加したアルコールと新たにエステルを形成した。特に、疎水性アルコールの添加によって、加水分解速度よりもエステル生成速度が上回る結果を示した。

(4) 加齢による CES 発現変動について、7、46、90 週齢ラットを用いて検討した結果、Hydrolase A の mRNA レベルは加齢に伴って増大し、皮膚 S9 の Native PAGE でのバンド強度も増大した。また、7 週齢皮膚 S9 の加水分解の基質特異性は、Hydrolase A に加え、他のエステラーゼの寄与も大きかったが、90 週齢皮膚 S9 の加水分解活性は 7 週齢に比べて増大したと同時に、その基質特異性は Hydrolase A のみで説明できるパターンに変化した。一方、肝臓ミクロソームにおける CES 発現に関しては、Hydrolase A を含む 4 種の CES1 ファミリー酵素は加齢に伴って低下し、CES2 ファミリー酵素の発現が増大した。また、肝臓ミクロソームとしての加水分解活性は、CES1 ファミリー酵素の発現増大を反映して、加齢に伴って増大した。このように、加齢に伴う CES アイソザイムの発現変動は臓器によって異なることが明らかとなった。特に、皮膚における加水分解活性は年齢とともに増大する傾向にあり、プロドラッグとしての変換効率が年齢とともに低下しないことが明らかとなった。

(5) 抗アレルギー薬フェキソフェナジン (FXD) は両親媒性化合物であり、等電点の pH7 付近で最大の疎水性を示す化合物である。FXD のカルボン酸をエステル化することにより、プロドラッグは塩基性化合物となり、低い pH 領域での溶解度は高かった。しかしながら、logPC (n-octanol/ pH7.4

phosphate buffer) は FXD が 0.31、M-FXD で 2.91、E-FXD では 3.34 といずれも大きな値を示し、脂溶性の増大が確認された。

(6) FXD プロドラッグは皮膚 S9 で加水分解され、反応速度論的解析の結果、単一酵素による加水分解であることが示された。各種エステラーゼに対する特異的阻害剤を用いた実験から、皮膚 S9 における FXD プロドラッグの加水分解は、主に CES が担っていることが示された。速度論的パラメーターは、Km 値が M-FXD で 25 μ M、E-FXD で 7.5 μ M であり、皮膚エステラーゼとの親和性は比較的高いことが明らかになった。しかし、酵素発現量が少ないために、最大活性は低いことが明らかとなった。

さらに、反応系にアルコールを添加すると加水分解活性は著しく阻害され、添加したアルコールとのエステル誘導体が新たに生成した。

(7) ラット皮膚における E-FXD の透過実験を行ったところ、E-FXD の角質層への取込みは良好で、高濃度で角質層に蓄積した。この角質層への蓄積は E-FXD が疎水的であることに加えて、塩基性であるためと考えられた。E-FXD は皮膚透過中に完全に加水分解され、FXD としてのみ皮膚を透過し、レセプター相には E-FXD は全く透過しないことが明らかとなった。生きた表皮・真皮中に E-FXD は Km 値よりも高い濃度で存在したことから、皮膚内の加水分解は飽和し、FXD は加水分解速度律速で皮膚を透過すると考えられた。さらに、E-FXD 自身はレセプター相に全く透過しないことから、E-FXD は真皮・表皮においても角質層と同様に皮膚成分と相互作用して安定に存在するものと推察された。

親薬物の FXD を皮膚に適用した場合のレセプター相への薬物の透過性と比較すると、透過係数は E-FXD を投与した場合に約 20 倍高い値を示し、角質層への E-FXD の移行性の良さが、皮膚透過の増大に寄与しているものと考えられた。

また、表皮で加水分解生成した FXD はレセプター相だけでなく、ドナー側にも出現し、その Flux はレセプター側の 2 倍であった。この皮膚から体外への加水分解生成物の排出メカニズムを解明するに至らなかったが、単なる受動拡散以外にトランスポーターによる汲み出しも関与する可能性が示唆された。

このように、E-FXD は塩基性で脂溶性が高いという特徴のため、角質層に速やかに分配・蓄積し、生きた表皮及び真皮に徐々に移行したのち、CES によって加水分解を受けることが明らかとなった。また、表皮・真

皮で生成した FXD は薬理活性を示し、血中には親薬物の FXD のみが、加水分解速度に応じた速度で移行することが明らかとなった。

今回得られた知見は、皮膚エステラーゼ活性を利用したプロドラッグ化の有用性を示すものであり、経皮投与に問題のある薬物を皮膚投与剤として開発する際の有益な情報と考えられる。さらに、修飾基の工夫により、加水分解活性や皮膚成分との親和性をコントロールした長時間滞留型のプロドラッグ、皮膚の初回代謝を利用した全身作用型プロドラッグ、皮膚内で加水分解受けずに全身循環に移行するプロドラッグなど、種々のタイプのプロドラッグの開発が可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- (1) Masumi Imoto, Hidekazu Azuma, Ikuo Yamamoto, Masaki Otagiri, Teruko Imai, Permeability of 5-fluorouracil and its prodrugs in Caco-2 cell monolayers: evidence for shift from paracellular to transcellular transport by prodrug formation, *J Drug Deliv Sci Technol.*, 19, 37-41, 2009, peer reviewed.
- (2) Megumi Taketani, Mayumi Shii, Kayoko Ohura, Shinichi Ninomiya, Teruko Imai, Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human, *Life Sci.*, 81, 924-932, 2007, peer reviewed.
- (3) Kenji Masaki, Mitsuru Hashimoto, Teruko Imai, Intestinal first-pass metabolism via carboxylesterase in rat jejunum and ileum, *Drug Metab. Dispos.*, 35, 1089-1095, 2007, peer reviewed.
- (4) 今井輝子, 吸収性改善を目的としたエステル誘導体の体内動態と加水分解, *薬学雑誌*, 127, 611-619, 2007, 査読有.

[学会発表](計10件)

續政哉, 今井輝子, Sf9 を用いた His tag 修飾 hCE2 の発現とその酵素機能の評価, 日本薬学会第 129 年会, 2009.3.28, 京都
續政哉, 今井輝子, 分泌型ヒトカルボキシルエステラーゼ 2 の発現とその触媒活

性の評価, 日本薬物動態学会第 23 回年会, 2008.10.30, 熊本

Teruko Imai, Species Differences of Carboxylesterase Involved in Bioconversion of Ester-based Prodrug, France Japan 8th Drug Delivery Symposium, 2008.10.8, Cannes, France

Kayoko Ohura, Teruko Imai, Prodrug design to improve the oral absorption of fexofenadine, Globalization of Pharmaceutics Education Network 2008, 2008.9.12, Leuven, Kingdom of Belgium
今井輝子, 医薬品開発におけるエステラーゼの種差について, 第 24 回日本 DDS 学会, 2008.6.29, 東京

今井輝子, 粘膜代謝の修飾と経粘膜輸送,

日本薬学会第 128 年会, 2008.3.27, 横浜

今井輝子, カルボキシエステラーゼの部位差・種差, 2007 年度「医薬品の吸収性評価に関する検討会」, 2008.3.19, 滋賀

今井輝子, 薬物動態を考慮した医薬品開発のために, 第 10 回生命化学研究会, 2008.1.11, 熊本

Teruko Imai, Rational prodrug design based on carboxylesterase activity, Thai Annual Research Meeting, 2007.12.12, Bangkok, The Kingdom of Thailand

今井輝子, カルボキシルエステラーゼの基質認識性に基づくプロドラッグ設計, 第 23 回日本 DDS 学会, 2007.6.14, 熊本

[図書](計1件)

今井輝子, 南山堂, 「分子薬物動態学」, 2008, pp.460-470

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 輝子 (IMAI TERUKO)

熊本大学・薬学部・教授

研究者番号: 7 0 1 7 6 4 7 8

(2)研究分担者

(3)連携研究者