

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790513

研究課題名（和文） 癌骨転移治療薬ゾレドロネートの次世代型経皮吸収剤の創製と治療への応用

研究課題名（英文） Development of transdermal patch of zoledronate for the treatment of bone metastasis

研究代表者

勝見 英正 (KATSUMI HIDEMASA)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30434666

研究成果の概要（和文）：

ビスホスホネートの一種であるゾレドロネートは骨転移治療薬として汎用されているが、投与方法は注射に限定されている。本研究では、ゾレドロネートの新たな投与形態の開発を目的として、ゾレドロネートの新規経皮吸収剤を開発した。骨転移モデルマウスを用いた検討において、ゾレドロネートパッチ製剤を貼付することにより骨転移が顕著に抑制されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Bisphosphonates are widely used for the treatment of bone diseases. In this study, we successfully developed a novel transdermal patch of zoledronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, for the treatment of bone metastasis. The zoledronate patch effectively reduced the number of tumor cells in the bone in model mice with bone metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

抗癌治療の進歩により原発腫瘍の治療はほぼ可能となったが、遠隔臓器への転移の抑制はいまだに困難であり、癌患者が死亡する最大の要因である。骨は肺・肝臓に匹敵する癌転移好発臓器であり、特に、乳癌、前立腺癌、甲状腺癌、肺癌などは骨に高頻度に転移する。骨転移は、耐え難い骨痛、病的骨折、運動制限、高カルシウム血症などの骨関連事象を併発するため、癌患者のQOLを著しく低

下させ、死期を早めることから、その抑制法の開発が切望されている。

従来の骨転移治療においては、放射線治療、外科的治療、鎮痛薬の投与などが行われてきたが、いずれも、骨に転移した癌の脊髄圧迫による痛みの抑制を目的とした対症療法であった。また、骨は、薬物が移行しにくい組織構造であることから、抗癌剤の骨移行性は十分に高いとはいえず、通常の化学療法による骨転移治療は極めて困難であり、癌骨転移

の進行そのものを抑制する方法はほぼ皆無であった。近年、骨に転移した癌の増殖、代謝は、破骨細胞から産生する増殖因子に依存することが明らかとなってきたことから、骨に選択的に移行する体内動態特性を有し、破骨細胞の機能を強力に抑制する Bisphosphonate (BP) が、骨転移に対する有効な治療薬として注目され、現在では、BP は、骨転移の標準治療法として、アメリカ臨床腫瘍学会 (American Society for Clinical Oncology; ASCO) から推奨を受けている。BP の中で最も強力に破骨細胞の機能を抑制するゾレドロネートは、多発性骨髄腫や乳癌など多くの癌の骨転移に対して有効性が証明されているが、特に、乳癌患者に対して広く使用されており、骨転移の進行を抑制し、難治性癌性疼痛などの骨関連事象を緩和するなど、有益な効果を示すことが明らかとなってきた。さらに、ゾレドロネートは、ホルモン療法に抵抗性の前立腺癌に対しても有効であることも証明されている。しかし、ゾレドロネートは、経口投与後の吸収率は投与量の 1~2%と極めて低く、副作用である上部消化管障害が重大な問題となることから、ゾレドロネートの投与は、臨床、注射による投与に限定されている。さらに、注射による投与は、投与時の痛みに加えて、急激な血中増大により惹起される腎臓障害を回避するため、15 分間かけて点滴静脈内注射する必要があることから、癌骨転移治療の効率と癌患者のコンプライアンス・QOL を著しく低下させる。したがって、利便性と安全性の観点から注射に代わるゾレドロネートの新しい投与形態の開発が強く望まれている。

一方、経皮吸収剤は、従来、薬物の局所的な治療効果を目的に用いられてきたが、最近では、全身的治療効果を目的とした利便性の高いパッチ製剤も多く開発されていることから、患者のコンプライアンス・QOL を向上させる投与形態として有用と考えられる。

そこで本研究では、ゾレドロネートを皮膚から効率よく吸収させるパッチ製剤を創製し、有効性と安全性に優れたゾレドロネートの新規経皮吸収システムの開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、注射剤として汎用される癌骨転移治療の第一選択薬であるゾレドロネートの次世代型経皮吸収剤を開発し、ゾレドロネートによる癌治療の改善と癌患者のコンプライアンス・QOL の向上を目指すものである。物的にパッチ製剤化が困難とされているゾレドロネートのパッチ製剤化を実現し、有効性と安全性に優れたゾレドロネートの経皮吸収システムを構築することを目的とする。本研究は、癌骨転移に対し画期的な治療法が提唱できる可能性が高く、癌治療に大

きく貢献できる研究と位置づけられる。

3. 研究の方法

本研究ではまず、ゾレドロネートのパッチ製剤化と経皮吸収性に関して検討を行った。フランチ型拡散セルを用いて、ラット皮膚透過性を評価し、ラット皮膚貼付後の経皮吸収性についても検討した。続いて、マウスを用いて、ゾレドロネートパッチ製剤貼付による癌骨転移抑制効果ならびに安全性について評価した。さらに、より有効性及び安全性に優れたパッチ製剤の開発を目指して、微細針を利用したビスホスホネートパッチ製剤を新たに調製した。

(1) ゾレドロネートの定量方法の確立

ゾレドロネートの血漿中濃度を測定するために、まず血漿中における薬物の定量法を LC-MS を用いて確立した。ゾレドロネートをメチル化誘導体にすることで LC-MS による定量法を確立した。

(2) ゾレドロネート経皮吸収型製剤の作製

ゾレドロネートが溶解する良溶媒を検索した後、粘着剤中にゾレドロネートが飽和溶解したパッチ製剤を作製した。

(3) パッチ製剤のラット皮膚透過性

剃毛したラットの腹部皮膚をフランチ型拡散セルに装着し、ラット皮膚にパッチを貼付した後、経時的にレセプター層をサンプリングし、ゾレドロネートの皮膚透過量を測定した。

(4) パッチ製剤貼付後の体内動態

作製したパッチ製剤を剃毛したラットの腹部皮膚に貼付した後、経時的に採血し、血漿中のゾレドロネート濃度を測定した。また、ゾレドロネートの静脈内投与後の血漿中薬物濃度推移についても検討し、AUC の計算から bioavailability を求めた。

(5) ゾレドロネートパッチ製剤の骨転移抑制効果

骨転移抑制効果は遺伝子導入で細胞標識した癌細胞を用いて *in vivo* imaging により評価を行った。骨転移モデルは、エーテル深麻酔下、B16BL6/Luc をマウス左心室内に投与することにより作製した。投与 2 週間後にホルタルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを腹腔内投与し、発光した癌細胞を *in vivo* imaging 装置を用いて検出した。ゾレドロネートパッチ製剤による骨転移抑制効果は、B16BL6/Luc を左心室内に投与した後、ゾレドロネートパッチ製剤を貼付し *in vivo* imaging により骨転移を観察した。

(6) 腎臓障害性評価

ゾレドロネートの副作用である腎臓障害について、血清クレアチニン濃度を指標に評価した。

(7) パッチ製剤の皮膚刺激性

皮膚刺激性は経皮吸収実験終了後のラット皮膚を観察し、Draize 法及び経表皮水分蒸散量を指標に評価した

(8) 微細針を利用した新規パッチ製剤の開発

より有効性及び安全性に優れたパッチ製剤の開発を目指して、微細針にビスホスホネートを封入したパッチ製剤を新たに調製し、ラット皮膚における皮膚透過性とラットにおける体内動態を評価した。また皮膚刺激性について、Draize 法及び経表皮水分蒸散量を指標に評価した。

以上の動物実験は、所属機関である京都薬科大学で策定された京都薬科大学動物実験実施規定に則ってプロトコルを作成し、委員会によって承認を受けると共に、実験遂行時にはプロトコルを遵守した。

4. 研究成果

ゾレドロネートの新規定量法を LC-MS を用いて確立するとともに、ゾレドロネートを高濃度に封入した新規親水性パッチ製剤の創製に成功した(図 1)。フランチ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 30~40%のゾレドロネートが皮膚を透過することが明らかとなった。また、ゾレドロネートの皮膚透過量とパッチ製剤のゾレ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ゾレ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ゾレ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。

骨転移モデルマウスに対してゾレドロネートパッチ製剤を貼付したところ、下肢骨中癌細胞の増殖が顕著に抑制された。ゾレドロネートパッチを繰り返し貼付することにより、転移抑制効果が増大することも明らかにした(図 2)。ゾレドロネートをマウスに注射した場合に認められた副作用である腎障害は、ゾレドロネートパッチ製剤を貼付した場合には認められなかったことから、パッチ製剤を利用することによりゾレドロネートによる腎障害が回避できる可能性が示された。

また、ゾレドロネートパッチ製剤をラット皮膚に貼付し皮膚刺激性を評価したところ、

パッチ製剤剥離後ゾレドロネートによる遅延性の軽度の皮膚紅班が観察され、経表皮水分蒸散量の上昇も認められたが、抗酸化剤ブチルヒドロキシトルエンをパッチ製剤に添加することにより皮膚紅班及び経表皮水分蒸散量の上昇を顕著に抑制可能であることを明らかにした。また、ブチルヒドロキシトルエン添加はパッチ機能及び薬理効果に影響しなかった。

以上、ゾレドロネートを効率よく皮膚から吸収させる新規親水性パッチ製剤の創製及びその安全性を高めることに成功した。さらに、最近、微細針を利用することでビスホスホネートの皮膚透過性と安全性を高めたパッチ製剤を新たに開発することにも成功し、骨転移治療への応用の可能性が示されている。以上の知見は、ゾレドロネートの新規投与形態の開発ひいては新たな癌骨転移治療法の構築に有用な情報を提供するものと考えられる。



図 1. ゾレドロネートパッチ製剤

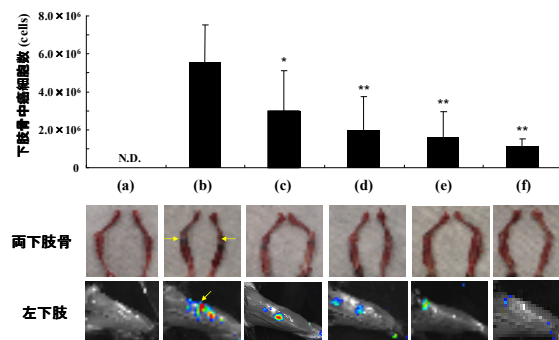


図 2. ゾレドロネートパッチによる骨転移抑制効果

(a)未処置, (b)B16BL6/Luc, (c) B16BL6/Luc + ゾレドロネートパッチ 5 mg/kg 単回投与, (d) B16BL6/Luc + ゾレドロネートパッチ 5 mg/kg 繰り返し投与, (e) B16BL6/Luc + ゾレドロネート静脈内投与 5 mg/kg 単回投与 (f) B16BL6/Luc + ゾレドロネート静脈内投与 5 mg/kg 繰り返し投与 有意差は(b)に比べ(*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ を示す。

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 1 件)

① Hidemasa Katsumi, Shu Liu, Yutaro Tanaka, Kaori Hitomi, Rie Hayashi, Yuka Hirai, Kosuke Kusamori, Ying-shu Quan, Fumio Kamiyama, Toshiyasu Sakane, Akira 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. Journal of Pharmaceutical Sciences, 査読有, 2012 doi: 10.1002/jps.23136.

〔学会発表〕(計5件)

① 林 理恵, 勝見英正, 他、親水性パッチ製剤を利用したゾレドロネートの経皮吸収性及び関節リウマチの骨破壊抑制効果 第27回日本DDS学会 2011年6月9日 東京

② 人見佳緒里, 勝見英正, 他、自己溶解型マイクロニードルを用いたアレンドロネートの次世代型経皮吸収製剤の開発とその治療への応用 第27回日本DDS学会 2011年6月9日 東京

③ 平位由佳, 勝見英正, 他、自己溶解型マイクロニードルを用いたアレンドロネートの次世代型経皮吸収製剤の開発とその治療への応用 日本薬剤学会第26年会 2011年5月29日 東京

④ 勝見英正, 他、癌骨転移治療薬ゾレドロネートの経皮吸収製剤の創製とその治療への応用 第26回日本DDS学会 2010年6月17日 大阪

⑤ 勝見英正, 他、癌骨転移治療薬ゾレドロネートの経皮吸収製剤の創製とその治療への応用 日本薬剤学会第25年会 2010年5月14日 徳島

〔図書〕(計1件)

① 勝見英正, 他、シーエムシー出版、次世代経皮吸収製剤の開発と応用、2011、197-204

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝見 英正 (KATSUMI HIDEMASA)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：30434666

(2) 研究協力者

山本 昌 (YAMAMOTO AKIRA)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00166779