

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590200

研究課題名(和文)ペプチド性薬剤の体内動態制御を主軸とした肺線維症治療法の戦略的創出

研究課題名(英文)Strategic studies on pharmacokinetic control of bioactive peptides for treatment of pulmonary fibrosis

研究代表者

尾上 誠良 (ONOUE, SATOMI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：00457912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、患者数の爆発的増加が予想されているものの未だ対処療法しか提示されていない慢性閉塞性肺疾患と肺線維症に対して有効かつ安全な治療法の戦略的開発を目指すものである。これまでに我々が見いだしてきた構造活性相関データを基に高安定性・高機能性VIP誘導体開発を行った。選定された新規機能性ペプチドを新規粉末吸入製剤技術に適用し、その薬物動態学的挙動を効果・安全性の双方から精査した。そして、実験的肺線維症・COPDモデル動物を用いて薬効を検証し、臨床現場で有用性が期待される新規製剤処方を提示した。

研究成果の概要(英文)：Vasoactive intestinal peptide (VIP), an octacosapeptide, is a member of the glucagon/secretin superfamily, which acts as major peptide transmitters in central and peripheral nervous systems. Although VIP and its derivatives have been thought to be promising drug candidates for airway inflammatory diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), the therapeutic potential of VIP and its derivatives is highly limited because of rapid metabolic degradation and systemic side effects following systemic administration. The present study aimed to design a PEGylated VIP derivative with improved metabolic stability, and develop its respirable powder (RP) formulation for inhalation therapy. PEGylation of a VIP derivative, as well as its strategic application to the RP formulation, may be a viable approach to improve its therapeutic potential for the treatment of airway inflammatory diseases.

研究分野：薬剤化学

キーワード：ペプチド DDS 吸入剤

1. 研究開始当初の背景

近年、呼吸器疾患の一種である慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) の罹患率は上昇の一途をたどり、世界保健機構 (WHO) の World Health Report によれば、COPD は 2020 年には世界第 3 位の死亡原因になると予想されており、本邦においても現在は第 10 位の死亡原因とされており、これら COPD の急性増悪は、死亡率を増加させ、また、医療費の高額化をきたす原因ともなっている。COPD の医療費 (外来および入院) の総額は約 1700 億円であり、これ以外にも在宅治療、合併症治療が相俟って、高齢者の医療費高額化を来す理由となっている。この状況にもかかわらず、低い診断率、十分な治療法がまだ開発されていないことから、適切な治療が普遍的に実施されるに至っていないのが現状である。COPD は、主にタバコ煙や大気汚染を原因として慢性気管支炎、肺気腫または両者の併発により惹起され、閉塞性換気障害は慢性気管支炎による気道病変と重篤な肺繊維症に起因する肺胞病変とが様々に組み合わさって起こるものであり、これが薬剤治療を困難なものにしている。現状では COPD 治療薬としては抗コリン薬、 β_2 吸入剤が主に用いられているが、これらは気管支喘息患者における気道閉塞に対しては顕著な改善がみられるものの、COPD において気道閉塞の改善は対症的で、しかもわずかな程度に留まっている。この観点から、COPD ならびにそれに伴う肺繊維症に対して、より優れた治療効果を有する医薬候補物質の探索・創製が本邦のみならず全世界的に強く望まれているのである。

COPD の発症機序はまだ全てが必ずしも明らかにされているわけではないが、病態改善には気道閉塞・炎症・肺胞アポトーシス抑制のいずれか、あるいはその組み合わせが必須と考えられる。しかしながら、現在までのところ炎症や肺胞アポトーシスを抑制しうる有用な物質は医薬品として提示されるに至っていない。我々は、これまでに血管作動性腸管ペプチド (Vasoactive intestinal peptide: VIP) 受容体アゴニストが強い気管支平滑筋弛緩作用・抗炎症作用を有することを見出し、COPD や深刻な喘息症状に対して改善をもたらせることを *in vitro/in vivo* モデル実験において実証してきた。さらに VIP 誘導体を投与することによってアポトーシス関連酵素であるカスパーゼ類や COPD 患者において高発現が確認されているマトリックスメタロプロテアーゼ類の著しい低下を認めた。この観点から VIP やその同属ペプチドが COPD 治療薬としての可能性を有していることが示唆されるところである。しかしながら、実際に VIP 誘導体を医薬品に用いる際には生体内に広く発現した VIP 受容体による数多くの副作用、特に予想される循環器系への影響を回避せねばならない。そこで、先に我々は粉末吸入製剤技術を VIP 誘

導体に世界で初めて適用し、治療部位である肺に局所投与とすることで VIP 誘導体の薬理効果発現を肺組織に限定し循環器系への副作用を回避することに成功した。

2. 研究の目的

これまでの *in vitro/in vivo* 実験データから考慮すれば、VIP 誘導体吸入製剤によって有効な COPD 治療を行う際には一日に複数回の吸入が必要であり、治療コンプライアンスの改善が重要な課題として残っている。この命題を解決すべく、(1) より代謝安定性が高い VIP 誘導体の開発、(2) 新規な粘膜付着型徐放製剤技術を導入した粉末吸入製剤の適用を考案した。これまでに得られた構造活性相関情報を基に、(1) VIP の生体内酵素による切断部位付近のアミノ酸を糖鎖修飾、(2) VIP の活性に影響が出にくいと考えられる C 末端にポリエチレングリコールを付与、そして (3) 24 位で起こりやすい脱アミノ化を抑制するために同族ペプチドの配列を考慮して置換する。これらの検討によってさらなる生体内安定性をもたらす COPD 治療において効果的な作用持続型の高安定誘導体を獲得できると作業仮説をたてた。これに加えて、我々は先にペプチド性医薬品ならびに低分子医薬品を対象として、糖アルコールを利用した新規高分散性粉末吸入製剤開発に成功しており、この技術をさらに発展させ、粘膜付着性粒子設計技術や生分解性ポリマーを用いた徐放製剤技術を戦略的に吸入剤に導入し、VIP 誘導体の肺局所における持続的曝露を実現する。すなわち、新規誘導体デザインと DDS の組み合わせによってこれまでに実現が難しかった有効性と安全性を共に考慮したペプチド吸入療法を提示するものである。

3. 研究の方法

これまでの研究成果をベースに次の通り研究を計画した。本研究における到達目標をより迅速に達成するために、主として 3 つのサブチームを結成し、(1) 生理活性ペプチド誘導体の化学合成と物理化学・生物化学的評価、(2) 実験的 COPD モデル動物作製ならびにバイオマーカーによるバリデーション、(3) 高い治療コンプライアンスのための粉末吸入製剤作製をそれぞれ検討した。1 年目は (1) と (2) に注力して、すなわち望ましい治療効果が期待できるシーズの探索を行うと共に、*in vivo* 評価の為にツールとしてモデル動物を構築した。そして 2 年目は (1) と (2) の成果をさらに発展させるべく、治療コンプライアンスとバイオアベイラビリティ向上が期待できる粉末吸入製剤を新規ペプチド誘導体に適用した。3 年目には開発した粉末吸入製剤のモデル動物での効果・体内動態を検証するとともに、これらの結果を考慮したうえで更なる製剤設計の最適化を戦略的に実施した。本計画に基づき、VIP の

構造を種々のペプチド合成技術を用いて化学改変し、その各種物理化学的特性（安定性ならびに高次構造）と肺胞由来 L2 細胞を用いた生物学的特性（受容体結合活性、アデニル酸シクラーゼ活性、in vitro アポトーシスモデル実験）を評価した。本データ群を指標にして、最も高い活性を有するペプチド誘導体を選定した。そして肺繊維症・COPD の各種病態を反映させたモデル動物についてラットを用いて精査し、主に新規開発プレオマイシン粉末吸入製剤投与による肺線維症モデルラットを作製した。さらに、モデル動物作成条件を改変することによって各種血中マーカーや肺組織における各種遺伝子発現レベルを精査・比較し、適切なモデル動物となっているか否か判断した。新たに設計した VIP 誘導体について粘膜附着性徐放製剤システムを導入し、各種物性評価の後に粉末吸入製剤へと戦略的に展開し、in vitro 吸入特性や肺内部における放出挙動を検証した。新規開発吸入製剤を COPD モデル動物に気道内投与した際の血中暴露量、病態変化ならびに各種バイオマーカーをモニタリングし、開発した新規機能性ペプチドの肺繊維症・COPD 治療薬としての可能性を評価するとともに、投与量ならびに製剤処方最適化を模索した。

4. 研究成果

1. 新規機能性ペプチド創製

既に確立した glucagon-secretin family peptides 構造活性相関情報に基づき、(a) 特定されたアミノ酸の置換あるいは糖鎖アミノ酸を導入した種々のペプチドをデザインし、固相合成法によって化学合成し、さらには (b) 高活性ペプチド誘導体の活性に影響が出ない部位にポリエチレングリコールを結合させた安定化誘導体もあわせて化学合成した。合成されたペプチドについてラット肺胞由来 L2 細胞を用いた cAMP 産生作用ならびに受容体結合活性を ELISA 法と放射性リガンドを用いる受容体結合測定法により定量し、さらに細胞内カスパーゼ活性を指標とした抗アポトーシス機能についても評価した。さらに円二色性スペクトルやフーリエ変換型赤外分光光度計等を用いて高次構造を評価し、更なる構造活性相関情報を探り、本情報を反映させた新規機能性ペプチドのデザイン・化学合成を試みた。その結果、Lys 残基を Arg に置換し、なおかつ 17 位 Met を Leu に改変した誘導体が VIP の高次構造を保持すると共に高い生理活性を有することを明らかにした。

2. 実験的肺繊維症・COPD モデル動物の構築ならびにバイオマーカーの探索

COPD において確認される肺組織繊維化を再現するため新規プレオマイシン粉末吸入製剤による肺線維症モデル動物を作製し、血中の炎症・アポトーシス関連バイオマーカー

(LDH, 単核球由来ペルオキシダーゼ, カスパーゼ, 活性酸素種, 8-OHdG) を LC/MS, ELISA, その他各種生化学的手法を用いて検証した。その結果、単核球由来ペルオキシダーゼが最も有効なバイオマーカーとなることが明らかとなり、その発現レベルは肺の炎症状態をよく反映していた。この実験的肺繊維症・COPD モデル動物を対象とし、肺組織を摘出しアポトーシスならびに炎症関連物質の発現について RT-PCR 法, 免疫組織化学的手法を用いて COPD 様の病態形成が誘導されていることを確認した。さらに、肺の病理切片についてアポトーシス検出のために TUNEL 染色を実施し、他のモデル動物との相違点を明確にし、本モデルの有用性を網羅的に精査する。残念ながら必ずしも肺線維症を特異的にミミックしたモデルにはなっていなかったが、炎症性肺疾患のモデルとして有用であることを検証できた。

3. 新規機能性ペプチドの粉末吸入製剤

新規 VIP 誘導体を、ペプチド製剤用粉末吸入製剤システムに適用して気道内投与用の製剤を得た。作用持続の観点から PLGA ナノスフェアを作成し、なおかつ表面をポリアルギニンでコートすることによって肺粘膜附着性を付与した。得られた粉末をキャリアー型の粉末吸入製剤へと応用し、持続的薬効発現に寄与できる有効な投与形態の提示を行った。作製した製剤についてはレーザー回折法, 粒度評価, カスケードインパクトによる in vitro 動態予測を行い、粉体の吸入特性について各種精査すると共に、その物理化学的安定性についても併せて試験した。その結果、得られた製剤は加湿によって特性が著しく変化するものの、適切な保存条件を維持できれば高い吸入特性を有することを明らかにした。新規機能性ペプチド吸入製剤について気道内投与用実験器具を用いて、実験的 COPD モデル動物に投与し、炎症・アポトーシス関連各種血中バイオマーカーの変動ならびに肺組織形態変化を指標として、合成した新規誘導体の効果を評価し、新規機能性ペプチドによる COPD 治療の可能性を網羅的に調査した。また、血中ペプチド濃度も LC/MS/MS にて定量し、薬理データと併せて考慮して投与量の最適化を行った。ラットに対する有効投与量はペプチド誘導体含量として 100 µg 程度であった。そのため、機器分析による体内動態モニタリングでは十分な動態パラメーターを得ることが難しく、それ故、血中バイオマーカーによる薬理作用評価に注力した。その結果、肺炎症部位における好中球浸潤ならびに単核球由来ペルオキシダーゼはペプチド吸入製剤によって有意に低下し、また、肺粘膜における過形成もペプチド吸入剤前投与によって顕著な抑制を認めた。本結果から新規ペプチド誘導体は炎症性肺疾患の治療に有効な候補物質であり、なおかつ吸入製剤技術の戦略的応用はペプ

チド投与量の低下に貢献すると共に副作用発現を抑制する有用なアプローチと考えられる。

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 10 件)

1) Yoshiki Seto, Gen Suzuki, Sharon Shui Yee Leung, Hak-Kim Chan, Satomi Onoue [Development of an Improved Inhalable Powder Formulation of Pirfenidone by Spray-Drying: In Vitro Characterization and Pharmacokinetic Profiling] *Pharmaceutical Research*, in press (2016) [doi:10.1007/s11095-016-1887-3]

2) Hiroki Suzuki, Yoshiki Kojo, Keisuke Yakushiji, Kayo Yumiki, Naofumi Hashimoto, Satomi Onoue [Strategic application of self-micellizing solid dispersion technology to respirable powder formulation of tranilast for improved therapeutic potential] *International Journal of Pharmaceutics*, **499(1-2)**: 255-62 (2016)

3) Satomi Onoue, Hiroki Suzuki, Yoshiki Kojo, Saori Matsunaga, Hideyuki Sato, Takahiro Mizumoto, Kayo Yuminoki, Naofumi Hashimoto, Shizuo Yamada [Self-micellizing solid dispersion of cyclosporine A with improved dissolution and oral bioavailability] *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **62**: 16-22 (2014)

4) Satomi Onoue, Shizuo Yamada, Hak-Kim Chan [Nanodrugs: pharmacokinetics and safety] *International Journal of Nanomedicine*, **9**: 1025-37 (2014)

5) Chika Taniguchi, Yohei Kawabata, Koichi Wada, Shizuo Yamada, Satomi Onoue [Microenvironmental pH-modification to improve dissolution behavior and oral absorption for drugs with pH-dependent solubility.] *Expert Opinion on Drug Delivery*, **11 (4)**: 505-16 (2014)

6) Satomi Onoue, Naohiko Terasawa, Tatsuya Nakamura, Kayo Yuminoki, Naofumi Hashimoto, and Shizuo Yamada [Biopharmaceutical characterization of nanocrystalline solid dispersion of coenzyme Q10 prepared with cold wet-milling system] *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **53**: 118-25 (2014)

7) Satomi Onoue, Shizuo Yamada [Pirfenidone in respirable powder form for the treatment of pulmonary fibrosis: a safer alternative to the current oral delivery system?] *Therapeutic Delivery*, **4(8)**: 887-9 (2013)

8) Satomi Onoue, Takuya Matsui, Masashi Kato, Takahiro Mizumoto, Baosheng Liu, Liang Liu, Shin-ichiro Karaki, Atsukazu Kuwahara, and Shizuo Yamada [PEG-VIP Chemical Synthesis and Formulation Design of a PEGylated Vasoactive Intestinal Peptide Derivative with Improved Metabolic Stability] *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **49(3)**: 382-9 (2013)

9) Masanori Ochi, Ryo Inoue, Yukinori Yamauchi, Shizuo Yamada, Satomi Onoue [Development of meloxicam salts with improved dissolution and pharmacokinetic behaviors in rats with impaired gastric motility] *Pharmaceutical Research*, **30(2)**: 377-86 (2013)

10) 尾上 誠良「粉末吸入製剤開発を指向した動態制御学並びに薬剤科学の統合研究」*薬学雑誌*, **133(1)**: 93-98 (2013)

[学会発表](計 10 件)

1) Satomi Onoue: How inhaled nano-medicines can control pharmacokinetic responses. Inhalation Asia 2015, Shenyang, China, September 8-11, 2015

2) Satomi Onoue: Formulation studies on bioactive peptides for inhalation therapy. 19th Korean Peptide Protein Symposium, Taean, Korea, July 5-8, 2015

3) 尾上 誠良: Nano-drug delivery system for pharmacokinetic control. 日本薬剤学会 相互作用 FG / 英語セミナー共催シンポジウム (東京) 2015 年 2 月 17 日

4) Satomi Onoue: Award lecture "Strategic development of nano-drug delivery system for pharmacokinetic control" 19th North American ISSX Meeting/29th JSSX Meeting, San Francisco, CA, October 19 -23, 2014

5) Satomi Onoue: Invited lecture "Nanodrugs: pharmacokinetics and safety" International Pharmaceutical Technology Symposium 2014, Antalya, Turkey, September 9, 2014

6) Satomi Onoue, Hiroki Suzuki, Takahiro Mizumoto: Dry powder inhalation system of vasoactive intestinal peptide derivative for respiratory inflammatory diseases. 33rd European Peptide Symposium, Sofia, Bulgaria, August 30 - September 5, 2014

7) 尾上 誠良: 特別講演 生理活性ペプチドを「モノ」にする薬剤科学研究. 第 46 回 若手ペプチド夏の勉強会 (京都), 2014 年 8 月 3 日

8) 尾上 誠良: 肺疾患治療を指向した粉末吸

入製剤の開発. 第 5 回 粉末吸入剤研究会シンポジウム(富山), 2013 年 11 月 27 日

9) Satomi Onoue, Yoshiki Kojo, Hiroki Suzuki, Yohei Kawabata, Kayo Yuminoki, Naofumi Hashimoto, Shizuo Yamada: Development of novel solid dispersion of tranilast using amphiphilic block copolymer for improved oral bioavailability. The 2013 AAPS Annual Meeting and Exposition. (San Antonio, USA), Nov 10-14, 2013

10) Satomi Onoue, Takuya Matsui, Masashi Kato, Takahiro Mizumoto, Baosheng Liu, Liang Liu, Shizuo Yamada : Synthesis and formulation design of PEGylated vasoactive intestinal peptide derivative with high metabolic stability. 32th European Peptide Symposium, Athens, Greece, Abst. P137, September 2-7, 2012

〔図書〕(計 2 件)

1) 尾上 誠良, 山田 静雄 “非経口投与製剤の開発と応用”(山本 昌 監修, シーエムシー出版)「シクロスポリン A の新規吸入製剤の開発」113-7 (2013)

2) 尾上 誠良, 山田 静雄 “ペプチド医薬の最前線”(山本 昌 監修, シーエムシー出版)「ペプチド性粉末吸入製剤の開発」142-7 (2013)

〔産業財産権〕
特になし.

〔その他〕
ホームページ等
<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/yakuzai/>

6 . 研究組織
尾上 誠良 (ONOUE SATOMI)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号 : 00457912