

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590660

研究課題名(和文) プロドラッグを利用した関節内DDS投与システムの開発

研究課題名(英文) Development of long acting therapeutic system for arthritis by using prodrug contained in nanoparticle

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症の関節内投与製剤として、関節腔から消失しにくいサイズのナノ粒子にプロドラッグを封入し、滑膜細胞内でプロドラッグから代謝生成した活性医薬品を細胞内にlock inして、徐々に薬効を示す持続性製剤の開発を目的として検討した。まず、血管への漏出を防ぐためのナノ粒子のサイズを明かにし、プロドラッグ活性化に利用できる加水分解酵素について関節液および滑膜細胞を用いて検討した。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is a design of long acting therapeutic system for arthritis or osteoarthritis. Our strategy is followed; a prodrug is sustainedly released from nanoparticle with long retention into articular cavity and then prodrug taken up into synovial cells is converted to active drug that is locked in synovial cells to show its pharmacological effect. It was expected that more than 100nm of size was required for retention of a nanoparticle into articular cavity because paraoxonase associated with high-density lipoprotein (diameter: about 10nm) presented in human synovial fluid. Also, butyrylcholinesterase was detected as a dimer and a monomer as well as a tetramer. In analysis of esterases in synoviocytes using native PAGE, human and rabbit synoviocytes showed two major esterase with different mobility of their plasma esterases. The different expression of esterase between synovial fluid and synoviocytes facilitates the development of prodrugs.

研究分野：薬物動態学

キーワード：プロドラッグ 変形性膝関節症 プチリルコリンエステラーゼ 滑膜細胞 パラオクソナーゼ ドラッグ  
ゲデリバリーシステム 関節液 エステラーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症の年間発症数は約 90 万人に登り、要介護高齢者の 10~15%は変形性関節症が生活機能の低下の原因と推定されている。関節は周囲を覆っている滑膜組織が関節包を形成し、関節全体は 1つの閉鎖空間としてまとめ、内部は滑膜細胞が分泌する滑液に潤されている。関節軟骨が傷つき炎症をおこすと過剰な滑液が分泌されると同時に、血液成分がリークしやすくなり、関節腔に滑液が溜まる。炎症の初期の段階では、抗炎症薬の内服、その後、病状の進行に従って軟骨保護薬としてのヒアルロン酸の関節内投与、ステロイド薬の関節内投与あるいは経口投与がなされ、最終的には関節形成術や人工関節置換術などの外科的な治療が施される。このように、変形性膝関節症に適用される医薬品は数も種類も非常に少ない。この原因は、関節特有の構造にある。すなわち、関節表面の軟骨に栄養を供給する滑液と血液との間に関門はなく、関節に投与された薬物はすぐに血管へ移行する。分子量 90 万のヒアルロン酸でさえ消失は速い。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非常に低く、経口投与や静脈内投与された薬の薬効は期待できない。したがって、関節に投与した後、関節内に滞留して、徐々に薬効を発揮する持続放出型の医薬品が期待される。

### 2. 研究の目的

関節に直接投与して長時間、薬効を発揮する医薬品として、サイズ制御により血管への漏出を防ぎ、関節内での医薬品の持続放出には、プロドラッグを利用した投与システムの開発を企図した。ストラテジーとしては、「関節腔から消失しにくいサイズのナノ粒子にプロドラッグを封入し、滑膜細胞内でプロドラッグから代謝生成した活性医薬品を細胞内に lock in して、徐々に薬効を示す」というものである。そのためにまず、血管に漏出しないサイズを関節腔に存在する血漿成分から明らかにし、次に、プロドラッグの変換に利用できる加水分解酵素について、関節液および滑膜細胞を用いて検討した。

### 3. 研究の方法

変形性関節症患者の関節液は、熊本大学疫学・一般研究倫理委員会の承認(承認番号:倫理第 681号)を得て、インフォームドコンセントが得られた患者より提供していただいた。また、熊本大学大学院生命科学研究部等生命倫理に関する規則に基づき、健常成人より血液を採取した。滑膜細胞として、ヒトおよび関節炎のモデル動物に利用されるウサギを用いた。ヒト培養滑膜細胞(HFLS; Cell Applications, Inc. Catalog No. 408-05a)およびウサギ培養滑膜細胞(HIG-82; ATCC® Catalog No. CRL-1832TM)を用い、培養後細胞ホモジネートを調製した。関節液および細胞ホモジネートを Native PAGE (7.5%ゲル

200V, 1h)で分離して、4-Methylumbelliferyl acetate (4-MUA)、1-Naphthyl acetate、2-Naphthyl acetate および Butyryl thiocholine iodide を基質として、加水分解活性に基づくエステラーゼ活性により染色をした。滑膜細胞へのポリスチレンビーズ (Polysciences Inc,)の取り込みは 6well に播種した細胞に各濃度のビーズを添加し、24 時間後の細胞を顕微鏡下で観察した。また、ビーズ取り込み後のエステラーゼ活性は 4-MUA を基質として検討した。

### 4. 研究成果

#### 1) 関節液に存在する血漿成分の解析

血管に漏出しないサイズを明らかにするために、関節液に存在する血液由来の加水分解酵素を加水分解活性に基づいて染色した。血中には分子量 340kDa の 4 量体として存在する Butyrylcholinesterase (BChE) および高比重リポタンパク質 (HDL) に結合して存在する Paraoxonase (PON) などの加水分解酵素が分子量の大きなタンパク質として存在する(1)。変形性膝関節症患者の関節液を Native PAGE で泳動した結果、図 1 に示すように、PON が病状の進行に応じて増大した。HDL の直径は約 10nm であり、病状の進行に伴って、血管から移動しやすくなることが示された。したがって、関節に留めるためのナノ粒子のサイズとしては、数 100nm 以上のサイズが必要と考えられた。また、PON よりも移動度が大きいバンドとして、分子量 340kDa の BChE が観察された。

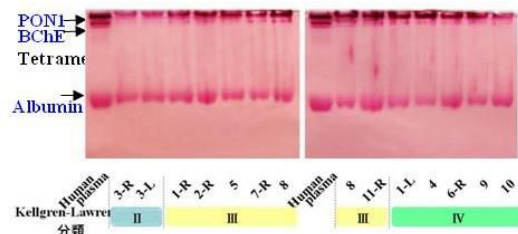


図 1. 変形性膝関節症患者の関節液の活性染色の結果 (基質 2-naphthyl acetate)

#### 2) 病態グレードと関節液中 BChE との相関

BChE は肝臓で生成され、4 量体として血漿に分泌される。その会合状態は環境によって変動し、微量の単量体、2 量体も共存する。会合状態の異なる BChE を NativePAGE のバンド強度から検討した結果、4 量体はグレード 3 まで増大したが、グレード 4 ではその量は低下した。一方、2 量体は病状の進行に従って増加し、2 量体と 4 量体の比はグレード 4 で急激に大きくなった。病態グレードは X-線写真により判断されているが、治療のために除去する関節液中の BChE を測定することによって、病状を判断することが出来れば、患者の負担は軽減される。このように、BChE の 4 量体と 2 量体の存在比は新しい診断マーカー

として可能性が期待された。しかしながら、会合状態の変動要因については、解明するに至らなかった。

また、BChE は亜鉛イオンと強く結合することを明にしてきた(2)。変形性膝関節症の悪化には Matrix metalloproteinase (MMP) の活性化との関連が示されているが、MMP の活性は亜鉛を必要とすることから、亜鉛の供給原としての BChE の関与について、関節液内の亜鉛濃度と BChE 濃度との相関性を検討した。亜鉛濃度と BChE 活性あるいは発現量との間に相関は認められたが、アルブミン濃度と亜鉛との相関性を凌駕するには至らなかった。

3) 滑膜細胞に存在するエステラーゼの検討  
滑膜細胞に存在するエステラーゼを調べるため、細胞ホモジネートを NativePAGE で泳動後、4-MUA、1-Naphthyl acetate に対する加水分解活性に基づいて検出した。その結果、いずれの基質を用いた場合も同様のバンドが観察され、図2に示すように、ウサギ滑膜細胞には3種のエステラーゼが検出された。ヒト滑膜細胞では、移動度の最も大きなバンドは観察されなかったが、2種のエステラーゼはウサギ滑膜細胞と同じ移動度に検出された。また、各種阻害剤を用いた実験から、ウサギおよびヒトで観察された2種の酵素(移動度の遅い順にバンドAおよびB)はセリンエステラーゼ阻害剤である paraoxon および diisopropyl fluorophosphates (DFP) によって阻害された。また、バンドBはカルボキシシルエステラーゼ阻害剤の bis(*p*-nitrophenyl) phosphate (BNPP) 高濃度条件下で阻害され、システインエステラーゼ阻害剤の *p*-chloromercuri benzoate (pCMB) でも阻害されたことから、活性中心近傍にシステインを有するセリンエステラーゼと考えられた。

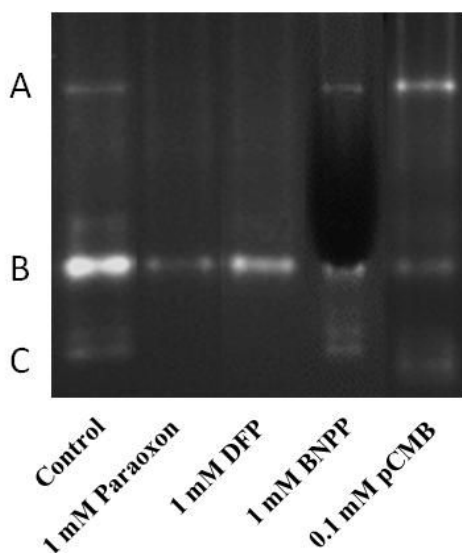


図2. ウサギ滑膜細胞に発現する加水分解酵素 (4-MUA を基質とした活性染色)

一方、バンドAの酵素はBNPPで阻害されず、pCMBで活性化されており、MMPのように酵素前駆体がpCMBによって活性化される可能性が考えられた。ヒト滑膜細胞で検出されたAおよびBに相当する酵素の阻害プロファイルはウサギと同様であり、類似の酵素が存在するものと考えられた。また、ウサギ滑膜細胞にのみ発現が認められたバンドCの酵素は paraoxon、DFP および高濃度の pCMB で阻害され、セリンエステラーゼの可能性が示された。

#### 4) 滑膜細胞の貪食作用とそれによる加水分解酵素の発現変動

滑膜細胞は粒子を取り込む特性があり、コラゲナーゼやゲラチナーゼ活性が上昇すると報告されていることから(3)、ウサギ培養滑膜細胞を用いて、粒子径1 $\mu$ mのポリスチレンビーズの細胞への取り込みを観察した。ウサギ滑膜細胞にポリスチレンビーズを添加して、24h後の細胞を顕微鏡下で観察した結果、細胞内へのビーズの取り込みが確認された。また、ビーズを取り込んだ細胞をトリパンブルー処理した結果、細胞障害は認められなかった。さらに、4-MUAの加水分解活性は、ビーズを取り込むことによって約15%増大し、バンドBに相当する酵素のバンド強度の増大が確認された。

滑膜細胞は貪食能が高いことから、関節内に投与されたナノ粒子は、滑膜細胞に取り込まれ、ナノ粒子から放出されたプロドラッグを滑膜細胞内の加水分解酵素(主にセリンエステラーゼ)によって、医薬品に変換して薬理効果を持続する可能性が示された。

#### 引用文献

- 1) Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma. FG. Bahar, K. Ohura, T. Ogihara, T. Imai, *J Pharm Sci.*, 101(10):3979-3988, 2012
- 2) Aspirin hydrolysis in human and experimental animal plasma and the effect of metal cations on hydrolase activities. FG. Bahar, T. Imai, *Drug Metab Dispos.*, 41(7):1450-1456, 2013
- 3) HIG-82: an established cell line from rabbit periarticular soft tissue, which retains the "activatable" phenotype., Hl. Georgescu, D. Mendelow, CH. Evans, *In Vitro Cell Dev Biol.*, 24:1015-1022, 1988.

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 5 件)

岩本大祐, Bahar Fatma Goksin, 大浦華代子, 今井輝子, ヒトおよびウサギ滑膜細胞におけるエステラーゼの同定, 医療薬学フォーラム2012/第20回クリニカルファーマシーシンポジウム, 2012.07.14-15, 福岡

Kayoko Ohura, Daisuke Iwamoto, Fatma Goksin Bahar, and Teruko Imai, Evaluation of synovial esterase for development of soft-drugs, Globalization of Pharmaceutics Education Network 2012, 2012.11.28-12.01, Melbourne, Australia

今井輝子, Fatma Goksin Bahar, 鹿毛文乃, 大浦華代子, 関節投与プロドラッグ開発のためのヒト関節液に存在する酵素の同定と特性評価, 日本薬剤学会第28年会, 2013.05.23-25, 名古屋

大浦華代子, 中川祐良, 岩本大祐, 水田博志, 今井輝子, 関節液および滑膜細胞における加水分解酵素の発現プロファイルと変形性膝関節症進行と関連, 日本薬学会第135年会, 2015.03.26-28, 神戸

中川祐良, 大浦華代子, 水田博志, 今井輝子, 変形性膝関節症の重症度と関節液における加水分解酵素の発現プロファイルとの相関, 日本薬剤学会第30年会 2015.05.21-23, 長崎

## 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：70176478