

令和元年6月19日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18950

研究課題名(和文) 難水溶性化合物Nobiletinの応用的製剤化による新規COPD治療薬の創製

研究課題名(英文) Strategic formulation of nobiletin to improve its biopharmaceutical properties for COPD treatment

研究代表者

佐藤 秀行 (Sato, Hideyuki)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：70739242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、今後患者数の爆発的な増加が予測されているが、未だ対症療法のみしか提示されていない慢性閉塞性肺疾患(COPD)に対し、有効かつ効率的な治療法の戦略的開発を目的とする。柑橘類の皮から発見された難水溶性ポリフェノールの一種であるNobiletin (NOB) は炎症、酸化ストレス、組織の線維化、アポトーシスの抑制作用を有しており、これらはCOPD病態に密接に関連している。本研究では、NOBの有する有益な作用を最大限活用すべく各種可溶化技術を適用することでその生物薬剤学的特性改善に成功した。更に、ナノテクノロジーの応用により難水溶性化合物の吸入製剤化に有用な製剤化技術開発を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患(COPD)の患者数は今後爆発的に増加し、WHOの試算によると2020年までに世界第3位の死亡原因になると予想されているにも関わらず、現在のCOPDの診断率は低く、適切な診断・治療が普遍的に実施されていない。また柑橘類由来ポリフェノールであるノビレチン(NOB)はCOPD治療に対するポテンシャルを有するものの、難水溶性をはじめとする物性の悪さのためにCOPDに対する応用研究がほとんどなされていない。本検討では、NOBを効果的に治療するための製剤化研究とその剤形開発を戦略的に実行し、これら技術の有用性を明らかとすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to develop novel inhalable formulation of Nobiletin (NOB) for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). NOB has been known as one of poorly water-soluble polyphenols isolated from citrus peel, which has anti-inflammatory effect, anti-oxidation, inhibition of fibrosis, and anti-apoptotic effect. These beneficial effects might contribute to treat COPD symptoms. Thus, to clarify the applicability of NOB to the treatment of COPD, various kinds of solubilization technologies were applied for developing NOB formulations. We successfully developed solubilized formulation to improve the biopharmaceutical properties of NOB, and a formulation technology to prepare inhalable formulation of poorly water-soluble materials.

研究分野：薬剤学，薬物動態学

キーワード：難水溶性化合物 Nobiletin 溶解性改善 粉末吸入製剤 慢性閉塞性肺疾患

## 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の患者数は今後爆発的に増加し、WHO の試算によると 2020 年までに世界第 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第 10 位の死亡順位となっている。今後訪れる超高齢化社会も相まり、医療費と COPD 患者の生産性損失を勘案すると患者の費用負担は約 2000 億円にのぼると試算される。そのため、現状のままでは COPD の死亡患者の増加のみならず、本邦の更なる医療費高額化も危惧される。しかし、この状況にも関わらず現在の COPD の診断率は低く、適切な診断・治療が普遍的に実施されていない。更に、薬物治療は抗コリン薬や  $\beta_2$  吸入剤等の気管支拡張薬による対症療法が主軸となっており、COPD 病態の根源である慢性炎症並びに肺気腫病変に対する根本治療が行われていないのが実状である。COPD は、その発症原因の 90% 以上が喫煙であるとされ、中枢気道における「慢性炎症病変」と、末梢気道・肺胞における「肺気腫病変」とが様々に組み合わせられて生じる疾患であり、これらの複合的な病変が治療を困難なものとしている。また、COPD 病態の発症・進行には大気汚染やタバコ煙等の様々な要因で引き起こされる「酸化ストレス」が密接に関与しているが、酸化ストレス抑制等の予防的治療は現状、皆無である。このような背景から、COPD 病態に対する優れた治療効果を有する治療薬候補化合物の探索・創製が本邦のみならず世界的に切望されている。

COPD の発症メカニズムは全てが明らかになっているわけではないが、理想的な COPD 治療は「慢性炎症病変」「肺気腫病変」「肺胞アポトーシス」及び「酸化ストレス」のいずれかの改善、あるいはその組み合わせが必要であるが、現時点でこれらを同時に抑制しうる有用な化合物は提示されていない。近年、食品中成分のポリフェノール類について、強力な「抗酸化作用」に加えて化合物ごとに特有の魅力的な薬理作用が報告されている。申請者は、柑橘類の皮から発見された Nobiletin (NOB) が強力な抗酸化作用に加えて「抗炎症作用」「肺胞壁を破壊するプロテアーゼ抑制作用」及び「抗アポトーシス作用」を有することに着目し、COPD の創薬ターゲットとしての可能性を見出した。このように COPD 治療に対して魅力的な作用を有する NOB であるが、その物性の悪さ、特に水に対する溶解度の低さが生体内における吸収性の悪化及び製剤化のネックとなっている。

## 2. 研究の目的

本研究は、今後患者数の爆発的な増加が予測されているが、未だ対症療法のみしか提示されていない慢性閉塞性肺疾患(COPD) に対し、有効かつ効率的な治療法の戦略的開発を目的とする。柑橘類の皮から発見された難水溶性ポリフェノールの一種である Nobiletin (NOB) は「炎症」「酸化ストレス」「組織の線維化」「アポトーシス」の抑制作用を有しており、これらは COPD 病態に密接に関与している。本研究では、NOB の作用を効果的に発現可能な(1) 高溶解性・高分散性の粉末吸入製剤を設計・開発、(2) COPD モデル動物にてその効果を実際に検証し、「気道炎症改善」「肺線維化抑制」及び「病態進行抑制」の 3 者を同時に達成することで、新しい機序を有する治療薬の創出に寄与する研究である。

## 3. 研究の方法

### 新規 NOB 粉末吸入製剤の開発

本研究では、まず NOB の可溶性製剤化に際し、非晶質固体分散体、ナノ結晶固体分散体等の溶解性改善技術を効果的に用いて溶解性改善を指向した NOB の物性改善を実践する。製剤設計の際、NOB の溶解性の改善のみならず製剤安定性や将来的なスケールアップ、製造時におけるハンドリングを考慮し、実生産を考慮した処方設計を実施する。製剤処方を選定した易溶化 NOB 製剤はこれまでの研究で開発した「糖アルコールを利用した新規高分散性粉末吸入製剤」に対して応用し、高溶解性及び高い肺到達率を有する高分散性粉末吸入製剤を開発する。

### COPD モデル動物の最適化・有効性評価

吸入製剤の開発と同時に動物モデルの最適化、すなわち新規タバコ煙抽出液吸入製剤を用いて進行が進んだ COPD の慢性症状を強く反映したモデルを確立ならびに病態評価に最適なバイオマーカーの探索を実行する。更に開発した新規 NOB 粉末吸入製剤を用い、構築した実験的肺疾患モデルラットに対して気道内投与を行い、炎症、酸化ストレス、線維化及びアポトーシス等に関連するバイオマーカーの変動を網羅的に解析し、NOB 吸入製剤の薬理的有効量の探索を *in vivo* 条件で実践、すなわち、臨床現場で実用可能な製剤処方の提示を試みる。

## 4. 研究成果

### 新規 NOB 粉末吸入製剤の開発

NOB の吸入製剤化に際し、まずは NOB の物性、特に溶解性を改善すべくこれまでの検討にて構築してきた固体分散体技術を戦略的に応用した。一般的に、結晶状態と比較し、非晶質状態は高い溶解性を有するため、NOB の溶解性の改善を目指し、凍結乾燥法による非晶質固

体分散体製剤の開発を試みた。担体として hydroxypropyl cellulose 中を用いた非晶質固体分散体製剤は NOB の溶解性を顕著に改善していた。本製剤の吸収特性を評価すべく、経口投与後の吸収量を比較したところ、NOB 原末と比較して有意に高い経口吸収性を示していた。溶解性のみならず高い吸収性、すなわち良好な膜透過性を有することが確認できたため、経肺的投与時においても効率的な薬物吸収が期待できる。しかしながら、このような非晶質製剤の問題点として保存安定性が挙げられる。実際、開発した NOB の非晶質固体分散体は熱湿度条件下の保存によりその溶解特性が大きく低下した。これらの問題点を解決すべく、自転公転型攪拌機によるナノ粒子化を応用し、NOB のナノ結晶を含有するナノ結晶固体分散体を開発した。本製剤は、非晶質固体分散体と比較すると若干溶解性は劣るものの NOB 原末と比較して顕著に高い溶解性を有しており、ラットにおける吸収性は NOB 原末の 13 倍を示した。

これらの製剤を良好な吸入特性を有する粉末吸入製剤とすべく、様々な技術を応用して微粒子設計を試みた。シドニー大学 (オーストラリア)、プリンストン大学 (米国)との共同研究で見出されたナノ粒子設計技術である Multi-inlet vortex mixer を用いた検討ではモデル化合物として使用した難水溶性薬物の安定なナノ粒子懸濁液調製、その懸濁液を噴霧乾燥することで均一性の高いナノ粒子含有マイクロ粒子を調製した。経肺投与に使用する粒子は、粒子径としては大きすぎると吸入時に慣性力のために口腔内に付着し、小さすぎると呼気として排出されるため、呼吸器系への効率的な薬物送達を達成することができず、1~5 μm 程度の粒子径が適しているとされるため噴霧乾燥を使用したマイクロ粒子を調製した。カスケードインパクトを使用した *in vitro* における吸入特性評価では極めて良好な分散性を示し、粉末吸入製剤として適した物理化学的特性を有していることを確認した。更に、本製剤を卵白由来 Ovalbumin を感作物質として用いた喘息・COPD モデルラットにおいて気道内投与した所、気道における炎症兆候やコラーゲン産生等を有意に抑制し、本システムによる呼吸器系への効率的な薬物送達を確認した。この検討では噴霧乾燥法を用いたマイクロ粒子調製を行なったが、本研究期間中、より均一なマイクロ粒子を調製する技術としてプリンタ技術のインクジェットヘッドを応用した微粒子調製技術を見出しその有用性を明らかとした。

#### COPD モデル動物の最適化・有効性評価

COPD の発症メカニズムは全てが明らかになっているわけではないが、タバコの喫煙がその発症に寄与するという報告が数多くなされている。今回、COPD 病態をより模倣するような形でモデル動物を最適化すべく、タバコ煙抽出液 (Cigarette smoke extract: CSE) を吸入製剤化することで進行が進んだ状態の COPD、すなわち慢性症状を強く反映したモデル確立を目指した。これまでの検討にて調製法を確立した CSE を中心とし、その吸入製剤化を試みた種々の最適化を試みた。しかし、調製した CSE 粉末吸入剤の毒性が想定以上に強く、またモデルとしての再現性に乏しかったためモデル構築に関する検討が平成 30 年度前半にまで及んだ。鋭意検討を重ねたが、問題を改善することに至らずこれまでに構築した OVA 感作による気道炎症モデルをモデル動物として使用することとし、吸入製剤評価に用いることとした。

本研究は、対症療法が殆どとなっている COPD 治療の現状を踏まえ、高機能かつ治療効果の高い新しい機序の治療薬開発に寄与しようとするものである。COPD 病態に対して NOB を吸入製剤として適用することで、より効果的な処方設計及び治療コンプライアンスの向上をもたらすと考えられる。今後、NOB 吸入剤の有用性を更に明らかとしていくことにより、COPD 治療に対して有用な治療法開発に貢献することを期待する。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

Hideyuki Sato, Hiroki Suzuki, Keisuke Yakushiji, Jennifer Wong, Yoshiki Seto, Robert K. Prud'homme, Hak-Kim Chan, Satomi Onoue: Biopharmaceutical evaluation of novel cyclosporine A nano-matrix particles for inhalations  
*Pharmaceutical Research*, **33**(9): 2107–2116 (2016)  
<https://doi.org/10.1007/s11095-016-1949-6>

Hiroki Suzuki, Shun Hamao, Yoshiki Seto, Hideyuki Sato, Jennifer Wong, Robert K. Prud'homme, Hak-Kim Chan, Satomi Onoue: New nano-matrix oral formulation of nanoprecipitated cyclosporine A prepared with multi-inlet vortex mixer  
*International Journal of Pharmaceutics*, **516**, 116–119 (2017)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.031>

Hiroki Suzuki, Tatsuru Moritani, Tadahiko Morinaga, Yoshiki Seto, Hideyuki Sato, Satomi Onoue: Amorphous solid dispersion of cyclosporine A prepared with fine droplet drying process: Physicochemical and pharmacokinetic characterization  
*International Journal of Pharmaceutics*, **519**, 213–219 (2017)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.018>

[学会発表](計 9件)

Hideyuki Sato, Hiroki Suzuki, Keisuke Yakushiji, Jennifer Wong, Yoshiki Seto, Robert K. Prud'homme, Hak-Kim Chan, Satomi Onoue: PHARMACOKINETIC CONTROL OF CYCLOSPORINE A EMPLOYING NOVEL NANO-MATRIX PARTICLES FOR INHALATION

The 11th International ISSX Meeting in Busan, 2016

平野 樹、仁平拓也、世戸孝樹、佐藤秀行、尾上誠良: ナノ結晶固体分散体技術による nobiletin の経口吸収性及び腎保護作用向上

日本薬剤学会 第 32 回年会 (大宮)、要旨集 p.143、2017 年

後 英理、仁平拓也、佐藤秀行、世戸孝樹、尾上誠良: 非晶質固体分散体技術適応による nobiletin 尿酸値低下作用向上

日本薬剤学会 第 32 回年会 (大宮)、要旨集 p.108、2017 年

鈴木寛貴、森谷 樹、森永匡彦、世戸孝樹、佐藤秀行、尾上誠良: Fine droplet drying 工法を用いた製剤化による cyclosporine A 経口吸収性向上

日本薬剤学会 第 32 回年会 (大宮)、要旨集 p.143、2017 年

佐藤秀行、鈴木寛貴、薬師寺恵介、Jennifer Wong、Hak-Kim Chan、Robert K. Prud'homme、世戸孝樹、尾上誠良: Flash nano-precipitation 法を用いた新規 Cyclosporine A 粉末吸入製剤開発  
日本薬学会 第 137 年会 第 137 回 日本薬学会 年会 (仙台)、要旨集、2017 年

Hideyuki Sato: Sustained-Release Formulation of Salmon Calcitonin for Inhalation Prepared with Fine Droplet Drying (FDD) Process

Inhalation Asia 2017, Macau, China, 2017,

Hiroki Suzuki: Cyclosporine A-Loaded Nano-Matrix Particle Prepared with Multi-Inlet Vortex Mixer for Treatment of Airway Inflammatory Diseases

Inhalation Asia 2017,

平野 樹、仁平拓也、世戸孝樹、佐藤秀行、尾上誠良: Nobiletin の生物薬剤学的特性向上を指向したナノ結晶固体分散体の開発

第 42 回製剤・創剤セミナー (淡路市)、要旨集 p.68、2017 年

Hideyuki Sato, Hiroki Suzuki, Keisuke Yakushiji, Jennifer Wong, Yoshiki Seto, Robert K. Prud'homme, Hak-Kim Chan, Satomi Onoue: Cyclosporine A-loaded nano-matrix particles prepared with multi-inlet vortex mixer for inhalation

The 54th Japanese peptide symposium, 2017

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。