

平成 23 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790103
 研究課題名 (和文) 慢性閉塞性肺疾患治療を目的とした新規機能性ペプチド及び
 粉末吸入製剤の戦略的開発
 研究課題名 (英文) Development of bioactive peptide derivative and dry powder inhalation
 system for treatment of COPD
 研究代表者
 尾上 誠良 (SATOMI ONOUE)
 静岡県立大学・薬学部・准教授
 研究者番号：00457912

研究成果の概要 (和文)：COPD に治療効果が期待できる VIP について構造改変を行い、安定性の改善した新しい誘導体を得た。また、本化合物を吸入製剤に応用し、COPD モデル動物においてその活性を精査したところ、新規製剤はモデル動物において非常に強い薬理作用を認め、なおかつその薬理作用は比較的持続する傾向にあった。今後の医薬応用が強く期待される興味深い知見を得ることが出来た。

研究成果の概要 (英文)：We developed some VIP derivative with improved stability, and dry powder inhaler system of VIP derivative was also designed for inhalation therapy. Intratracheal administration of VIP-based respirable powder led to significant attenuation of inflammatory events in COPD model rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患，血管作働性腸管ペプチド，粉末吸入製剤

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、1997 年の全世界の志望者は 5220 万人で、そのうち 290 万人が呼吸器疾患であり (全体の 5.6%)、そのほとんどは COPD であった。悪性腫瘍による総死者数が 620 万人 (全体の 11.9%) であることを考慮すれば、この数字は極めて深刻な事態を示すものと言えよう。WHO 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いる。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る、閉塞性換気障害を特徴とする疾患である。閉塞性換気障害は慢性気管支炎による気道病変と肺気腫に起因する肺胞病変とが様々に組み合わせられて起こるものであり、これが薬剤治療を難しくしていると考えられる。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、より優れた治療効果を有する医薬候補物質の探索・創製が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、その患者数急増が予期されているものの十分な治療法がまだ提示されていない慢性閉塞性肺疾患に対して有効かつ安全な治療法開発を目指すものである。すなわち、強力な抗炎症作用ならびに抗アポトーシス活性を有する新規機能性ペプチドを開発し、それを粉末吸入製剤として喘息/慢性閉塞性肺疾患モデル動物に投与することで、「気道炎症改善」「肺胞アポトーシス抑制」「気管支拡張」の3者を同時に達成することにより、新規メカニズムの治療薬創製に寄与しようとするものである。

3. 研究の方法

本研究では、まずこれまでに応募者が見出してきた構造活性相関研究結果を基に、さらなる高安定性・高機能性VIP誘導体開発を行い、これら誘導体の受容体結合・抗アポトーシス活性を指標に、もっとも治療効果が期待できる誘導体を選定する。これと同時に、COPDの病態を反映したモデル動物作製を目指して、微細アルブミンパウダー、タバコ煙抽出液凍結乾燥パウダーを利用した急性/慢性起動炎症モデルを構築する。次に、選定された新規機能性ペプチドを応募者が特許出願している粉末吸入製剤製造技術を用いて製剤化し、本品の薬物動態学的挙動を効果・安全性の面から精査することとする。そして、現在開発中のCOPDモデル動物を用いて、新規機能性ペプチドの抗炎症作用、抗アポトーシス作用及び気管支平滑筋弛緩作用を示す有効投与量を*in vivo*条件下で確認する。最後に、新規機能性ペプチドの作用機構についても、これまでに積み上げてきたバイオマーカー評価技術、特に酸化ストレス及びアポトーシス関連物質挙動評価によって網羅的に解析し、新しい医薬候補物質としての有用性について検証する。

4. 研究成果

(1) COPDモデル動物の構築ならびに血中バ

イオマーカーの探索

新規 COPD/喘息動物モデルの構築を目的として、OVA 粉末吸入製剤を調製し、その物理化学的特性を精査すると共に、OVA 感作ラットに対し OVA 粉末吸入製剤を気管内投与し、その後肺の組織学的観察と炎症性バイオマーカーを精査することで本モデルの COPD/喘息モデルとしての特徴および有用性を検証した。OVA はセルピンスーパーファミリーに属する鶏卵卵白由来淡泊であり 67,385 アミノ酸残基を含み 30.6% の α -ヘリックスと 31.4% の β -シートを有する球形構造を持つ。OVA は実験的炎症モデル動物を作成するために用いられているが、OVA はまた特定の条件下で自己凝集性を示すことが知られており、それにより立体構造が変わる結果、データの質、精度ならびに再現性において制限される可能性がある。一般的に OVA を感作させる際には 10 から 100 mg/mL と比較的高濃度の濃度範囲で OVA 溶液をネブライザーを用いて動物に暴露する方法が採用されている。本研究では 5 mg/mL 以上の OVA 溶液 (pH 6.0) を 24 時間静置したところ、OVA 溶液の濁度に有意な上昇が認められ、すなわち著しい OVA の凝集が観察された。一方、固体の OVA と室温にて 3 年間保管した OVA の微細化粉末製剤では濁度の有意な上昇は見られず、固体の状態では自己凝集を起こさないことが示唆された。また、これらの物理化学的解析により高濃度の OVA を溶液状態で保存することにより自己凝集が加速される可能性が示された。次に、OVA 粉末吸入製剤を走査型電子顕微鏡により morphological な評価を行ったところ、キャリアー粒子の表面に OVA および賦形剤の微細粉末が付着していることが確認され、濁度測定の結果と一致して、今回調製した製剤では自己凝集は認められず製剤学的に安定であることが示唆された。我々は以前の研究でエリスリトールが良好な流動性および分散性を示し、粉末吸入製剤の賦形剤やキャリアーとして適していることを示している。本研究で調製した OVA 粉末吸入製剤について、粒度分布および分散性を解析したところ、微細化粒子の SPAN ファクターは 1.12 と算出され、微細化粒子の粒度分布幅が狭いことが示唆された。また、カスケードインパクトによる実験において、本製剤はステージ 0 から 4 にかけて広範な分布を示し、さらにステージ 1 に比べステージ 2 および 3 においてより多くの OVA 微細粒子が含まれていた。従って、本製剤は良好な分散性を持つことが示唆された。これらの結果より、OVA 微細化粉末吸入製剤は、自己凝集や分解など製剤学的不安定性に起因するモデル動物の個体間変動の抑制が可能となり、肺の炎症動物モデル作成

に有用であると考えられた。次に OVA 微細化粉末吸入製剤を OVA 感作ラットに投与し、炎症応答の特徴を明らかにすることを試みた。まず、SD 系雄性ラットを 3 回 OVA を腹腔内投与し感作を行い、その後麻酔下で OVA 微細化粉末製剤を気管内投与した。OVA 微細化粉末製剤投与後 24 時間において、左肺を摘出、組織切片を作成しヘマトキシリン・エオシン染色、ならびに DAB とヘマトキシリンを用いてペルオキシダーゼ染色を行い、肺組織への顆粒球の浸潤を評価した。その結果、コントロール群と比較し、OVA 粉末吸入製剤投与群では気管支上皮組織への著しい細胞浸潤が確認され、ペルオキシダーゼ染色より浸潤した細胞が主に好酸球や好中球などの顆粒球であることが示された。組織学的観察に加えて、OVA 粉末吸入製剤投与後、MPO, LDH, NO および total ROS レベルなど炎症や酸化ストレスに関連したいくつかのバイオマーカーの変動を評価した。これらのバイオマーカーの測定は気道炎症に関する研究における研究ツールとしての我々の OVA 粉末吸入製剤投与モデルの妥当性を検証するものである。まず、好中球およびマクロファージ由来の炎症の指標となる血漿中 MPO 活性については、OVA 粉末製剤投与後 6 時間より有意な上昇が見られ、活性上昇は 24 時間後まで認められた。これらの結果はネブライザー化した OVA を投与したラットにおいて MPO 活性が著しく上昇したことを示した以前の報告と一致していた。よって、我々は OVA が粉末吸入製剤の状態においても顕著な炎症応答を引き起こすことを初めて示した。次に、細胞障害や細胞死の指標となる血漿中 LDH では OVA 微細化粉末投与後、二相性の活性増加がみられ、気管支上皮組織への細胞浸潤を示した組織学的観察の結果との一致が認められた。Blythe らは抗原感作動物への肺への抗原暴露によって、即時性（暴露後 4 時間）および遅延性（24 時間）の炎症応答が生じることを報告している。即時性炎症は肥満細胞により放出される炎症メディエーターが関与し、一方遅延性の炎症は主にリンパ球や好酸球など他の炎症性細胞の活性化と組織浸潤に高く依存している。故に、血漿中 LDH 活性の二相性の上昇は OVA 粉末吸入製剤による即時性および遅延性の両者に依るものと推察される。MPO, LDH に加え、肺における炎症惹起に関連することが知られている酸化ストレスの指標として血漿中 NO および total ROS レベルを経時測定したところ、興味深いことに OVA 粉末吸入製剤投与後の上昇は見られなかった。一般的に、著しい炎症惹起によって glutaredoxin-1 など抗酸化分子がアップレギュレーションされることが報告されている。本研究結果より

アップレギュレートされたそれらの抗酸化分子が酸化ストレスのバイオマーカーを減弱させた可能性があり、そのことが酸化状態の変動が見られなかった一因として考えられた。Caspase 類はシステインプロテアーゼファミリーに属し、アポトーシス実行過程において重要な役割を担っている。本研究ではアポトーシス誘導経路の最終段階で活性化される Caspase-3/7 の BALF 中における活性を測定したが、OVA 群と Control 群で顕著な差異は認められなかった。OVA 投与モデルを含め、肺炎時における BALF 中の Caspase 活性を測定した報告は僅少であることや、今回測定したタイムポイント以外における Caspase-3/7 活性は不明なため、今後さらなる検討が必要と考えられる。

本検討の結果、OVA 粉末製剤処置ラットが COPD の初期症状とよく似たレスポンスを示しており、COPD 治療薬開発において有用な病態モデル動物となる可能性を示した。

(2) VIP 受容体アゴニストの開発

これまでに実施した種々の構造活性相関研究をもとに VIP のさらなる構造改変を行った。そのうち新規 VIP 誘導体数種は VIP と比して非常に高い化学的安定性を示し（図 1）、また VIP と同程度の受容体結合活性を認めた。肺由来 L2 細胞を用いた *in vitro* 試験では COPD の原因となるタバコ煙抽出液による細胞障害を有意に抑制し、そのメカニズムは caspase-3 と MMP の抑制が関与していることを明らかにした。

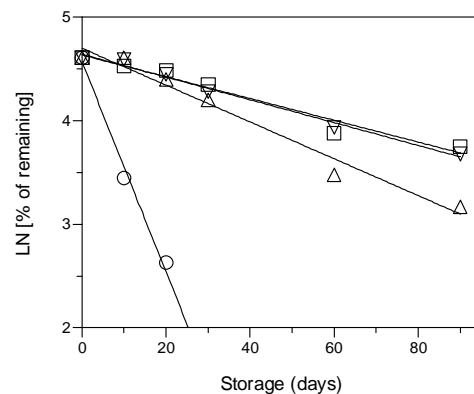


図 1 VIP 誘導体の安定性 (40°C, pH7.4 リン酸緩衝液)。○, VIP; □, 新規誘導体 1; △, 新規誘導体 2; ▽, 新規誘導体 3。

(3) VIP 受容体アゴニストを用いた吸入製剤設計

化学合成された新規誘導体を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、製剤特性につい

て各種精査を実施すると共に、その安定性についても併せて検証した(図 2)。その結果、VIP 誘導体を含有した吸入製剤は非常に高い吸入特性を示し、なおかつ高い安定性を有することを確認した。そこで、本吸入製剤を対象として、先に開発した実験的 COPD モデル動物を用いて、薬理的評価を実施すると共に、各種バイオマーカー探索によってその機序解明を試みた。

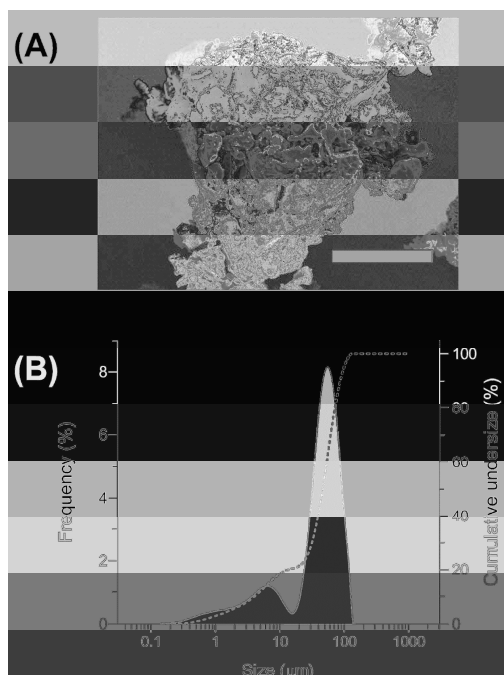


図 2 VIP 誘導体の吸入製剤。(A) 電子顕微鏡写真。バーは 20 μm 。(B) 粒度分布。

(4) COPD モデル動物に対する VIP 受容体アゴニストの効果

作製した新規機能性ペプチド吸入製剤の *in vivo* における抗炎症作用は、ラットに OVA 粉末吸入製剤投与後 24 時間において採取した BALF 中細胞画分に炎症性細胞をフローサイトメトリー法により解析することで評価した。その結果、炎症性細胞のスクアタグラムにより OVA 感作ラットへの OVA 粉末吸入製剤気管内投与は、好中球および好酸球の著しい増加を引き起こし、先に健闘した炎症性バイオマーカー試験結果とよく一致して OVA 粉末吸入製剤を用いたモデルではこれら炎症性細胞が肺に遊走されることが示された。しかしながら、新規機能性ペプチド粉末吸入製剤 (50 $\mu\text{g}/\text{rats}$) を前投与することで、好中球、好酸球共に著明な減少が認められ、OVA 粉末吸入製剤気管内投与によって増加が見られたリンパ球においても同様の傾向が観察された。従って、新規機能性ペプチド粉末吸入製剤が OVA 粉末吸入製剤によって引き起こされる炎症応答を顕著に抑制することで、*in vivo* においても抗炎

症活性を示すことが示唆され、本ペプチド誘導体と吸入製剤の組み合わせによって、効果的な薬理活性発現が期待できると考える。

以上、作製した新規機能性ペプチド吸入製剤を 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 治療の可能性を示唆する知見を得た。特に VIP 誘導体の気道内投与は、二相性の炎症反応のいずれも強く抑制することが明らかとなり、本化合物の強力な気管支平滑筋弛緩作用をあわせて考慮すれば、有望な COPD 治療薬候補として期待されるところである。

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 Satomi Onoue ほか, Development of inhalable nanocrystalline solid dispersion of tranilast for airway inflammatory diseases, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 査読有, 100 巻, 2011, 622-633
- ② Yohei Kawabata, Satomi Onoue ほか, Novel crystalline solid dispersion of tranilast with high photostability and improved oral bioavailability, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 査読有, 39 巻, 2010, 256-262
- ③ Satomi Onoue ほか, Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 査読有, 99 巻, 2010, 1871-1881
- ④ Shingen Misaka, Satomi Onoue ほか, Inhalable powder formulation of a stabilized vasoactive intestinal peptide (VIP) derivative: anti-inflammatory effect in experimental asthmatic rats, *Peptides*, 査読有, 31 巻, 2010, 72-78
- ⑤ Satomi Onoue ほか, Novel dry powder inhaler formulation of glucagon with addition of citric acid for enhanced pulmonary delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 査読有, 382 巻, 2009, 144-150
- ⑥ Satomi Onoue ほか, Physicochemical and pharmacological characterization of novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 査読有, 73 巻, 2009, 95-101
- ⑦ Satomi Onoue ほか, In vitro and in vivo

characterization on amorphous solid dispersion of cyclosporine A for inhalation therapy, *Journal of Controlled Release*, 査読有, 138 巻, 2009, 16-23

- ⑧ Shingen Misaka, Satomi Onoue ほか, Novel dry powder formulation of ovalbumin for development of COPD-like animal model: Physicochemical characterization and biomarker profiling in rats, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 査読有, 37 巻, 2009, 469-476
- ⑨ Satomi Onoue ほか, Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Attenuates Streptozotocin-Induced Apoptotic Death of RIN-m5F Cells Through Regulation of Bcl-2 Family Protein mRNA Expression, *FEBS Journal*, 査読有, 275 巻, 2009, 5542-5551
- ⑩ Junya Hatanaka, Satomi Onoue ほか, Physicochemical and pharmacokinetic characterization of water-soluble Coenzyme Q₁₀ formulations, *International Journal of Pharmaceutics*, 査読有, 363 巻, 2008, 112-117

[学会発表] (計 5 件)

- ① 佐藤 秀行, 尾上 誠良 ほか, Ovalbumin 感作喘息モデル動物における Cyclosporin A 易溶化粉末吸入製剤の薬効および製剤学的評価, 第 11 回応用薬理シンポジウム, 2009 年 9 月 18 日, 静岡
- ② 三坂 眞元, 尾上 誠良 ほか, 持続型 VIP 誘導体微細化粉末吸入製剤のタバコ煙暴露モデルにおける抗炎症作用, 日本薬剤学会第 24 年会, 2009 年 5 月 21 日, 静岡
- ③ 三坂 眞元, 尾上 誠良 ほか, 新規 VIP 誘導体微細化粉末吸入製剤の抗炎症作用, 第 29 回日本臨床薬理学会年会, 2008 年 12 月 5 日, 東京
- ④ 三坂 眞元, 尾上 誠良 ほか, Anti-inflammatory effects novel stabilized vasoactive intestinal peptide derivative on lung inflammation, The Eighth China-Japan International Symposium on Health Sciences, 2008 年 11 月 17 日, Hangzhou, China
- ⑤ 尾上 誠良 ほか, Development of novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability; physicochemical and pharmacological characterization, 第 45 回ペプチド討論会, 2008 年 10 月 29 日, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページにおいて研究成果報告
<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~yakuzai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾上 誠良 (ONOUE SATOMI)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号: 00457912