

平成15年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

# 目 次

課題番号		
文献NO 20030933A KH61061	医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証に関する研究	森川 馨 …… 1
KH61062 954A	生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究	土屋利江 …… 20
KH61063 955A	標的指向型DDS製剤を用いた腎疾患治療方法の開発	名取泰博 …… 29
KH61064 956A	新規体外循環システムの創製と評価技術の開発	渋谷統寿 …… 32
KH61065 957A	健康被害をもたらす有害生物の制御・処理技術に関する研究	高鳥浩介 …… 36
KH62080 958A	ヒト肝特異的有機アニオントランスポーター遺伝子LST-1およびLST-2導入肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓組織の開発	松野正紀 …… 44
KH62083 959A	活性タンパク利用技術としての新規ドラッグ・デリバリー・システムの開発研究	五十嵐理慧 …… 47

## 活性タンパク利用技術としての新規ドラッグ・デリバリー・システムの開発研究

所属 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター  
研究者 五十嵐理慧

### 分担研究者

- (1) 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 武永美津子、山口葉子、上野幸生  
(2) 東京慈恵会医科大学総合医学研究所 D D S 研究所 木村道夫、水島裕

研究要旨 PCSOD は酸化ストレスを除去することにより神経細胞分化を正常化し、ラット外傷性脊髄損傷モデルにおいて著明な後肢運動機能回復効果を示した。ヨード基導入 BDNF の細胞外合成の基礎検討をおこなった。レチノイン酸ナノカプセル化外用剤は顕著な HBEGF 産生増強作用を示した。

### A. 研究目的

「生理活性ペプチドを医薬品として臨床実用化する」ために新規ドラッグ・デリバリー・システム(DDS)技術の確立を目的とする。

具体的内容としては(1)スーパーオキシドデイスムターゼ(SOD)および脳神経細胞由来神経栄養因子(BDNF)にレシチン誘導体を有機合成的に結合したレシチン化 SOD (PCSOD) およびレシチン化 BDNF (PCBDNF) について外傷性脊髄損傷モデルにおける運動機能低下の回復(神経再生)効果で評価する。さらに前年度著明な摂食抑制効果を報告した PCBDNF の薬理効果増強の機序を解明する。(2)細胞外遺伝子操作による修飾生理活性ペプチドの合成。生理活性ペプチドの化学修飾はこれまで有機合成法で作製されているが、ペプチドの修飾部分の特定が困難である上、ペプチド1分子あたりの修飾基導入数も分布をもち、医薬品として開発するための規格化が困難であった。そこで細胞外遺伝子操作によるペプチド合成法による修飾生理活性ペプチド合成すなわち修飾部位の特定化や導入数を計画的に決定できる精度の高い修飾ペプチド合成法の確立を目的とする。具体的には我々が多くの情報を持っている PCBDNF の細胞外遺伝子操作による合成を計画した。(3)成長因子の徐放機能を持つスキャホールドとして応用可能なグリコサミノグリカンおよび PLGA を用いたペプチドのマикроカプセル化を目的とする。さらに HBEGF 産生作用を持つオールトランスレチノイン酸(atRA)をナノカプセル化したナノ atRA の外用剤を作製し、HBEGF 産生作用や皮膚再生作用の増強効果を検討する。

### B. 研究方法

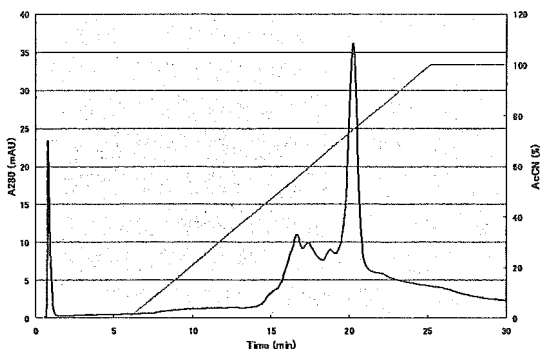
#### 1. 外傷性脊髄損傷におけるPCSODおよびPCBDNFの効果

ラット加重負荷および落錘法による外傷性脊髄損傷モデルにおいて PCSOD 投与および PCBDNF 処理 ES 細胞移植の効果を検討した。加重負荷法はラットの T11 位に 25gr の錘で 5 分間負荷をかけた。落錘法(この系がヒト脊髄損傷モデルとされる)は 2.5cm の高さから 10g の錘を落下させた。脊髄損傷 30 分後 PCSOD を投与した。その後、後足の運動機能、形態を観察し BBB(Basso-Beattie-Bresnahan)スコアで評価した。さらに損傷局所の過酸化脂質量とタンパク変性の指標として遊離 SH 基量を測定した。さらに損傷局所における分化細胞の種類(ニューロン、コンドロサイト、アストロサイト)の割合についても調べた。

2. 前年度までに報告した PCBDNF の薬理効果増強の機序の解明のために BDNF のレセプターである trkB を発現している PC12-pAB1 細胞の MAPK(ERK1/2)活性化(リン酸化)や p38 リン酸化の時間経過をウエスタンブロッティング法で検出した。すなわち PC12-pAB1 細胞を 0.3%FCS 含有培地で培養し細胞周期 G0 に同調し、その後無血清培地に交換し 1 時間培養後 PCBDNF [100ng/ml] を添加した。添加 1 時間、4 時間、8 時間、12 時間、16 時間後に細胞を lysis し Western blotting によってリン酸化 MAPK(ERK1/2)の検出を行った。

3. 無細胞系において PCBDNF を合成する際、生物活性低下を最小限に抑えるために PC 修飾位置を検討した。ヨウ素置換された非天然アミノ酸を無細胞ペプチド合成系によりペプチドに導入し、その後 Sonogashira 反応を利用してペプチドの部位

特異的修飾反応をすすめるために Sonogashira 反応に用いるレシチン誘導体の合成を検討した。細胞外遺伝子操作による BDNF の合成は BDNF の成熟部分のみを発現ベクターに組み込み大腸菌由来のたんぱく質合成液中終夜 29 度でインキュベーションし BDNF を合成した。このとき不溶性の沈殿物を精製しリホールディングを試みた。



### BDNF のリホールディング処理後の SP クロマトグラフィー

非天然アミノ酸の導入はヨードチロシンかヨードフェニルアラニンで行うため活性に影響をあたえないと考えられるヨードチロシンかヨードフェニルアラニンを考察したところ N 末から 63 番目のチロシンが修飾を受けても活性低下が見られないことが判っているためこの位置にヨードチロシンを導入することを目的としてこの位置にアンバーをコドンにした BDNF 発現ベクターを作製し変異型 BDNF を無細胞系で効率よく発現させる条件検討を始めた。また Sonogashira 反応を利用して BDNF 中のヨードチロシンあるいはヨードフェニルアラニンとレシチン誘導体との結合条件を検討するために BDNF の部分ペプチド Asn-Pro-Met-Gly-Tyr(3-iodo)

-Thr-Lys-Glu-Gly-Cys を用いてレシチン誘導体との結合性の検討を行った。

4. CRCX4 拮抗剤は溶媒除去法によって PLGA 製剤とした。bFGF はヒアルロン酸と亜鉛で結合体を作製し、血管再生効果と TNF 産生量を検討した。オールトランスレチノイン酸 (atRA) を無機塩でナノカプセル化(ナノ・ATRA)したナノ・ATRA を含有する外用剤を作製し、皮膚再生作用を検討した。

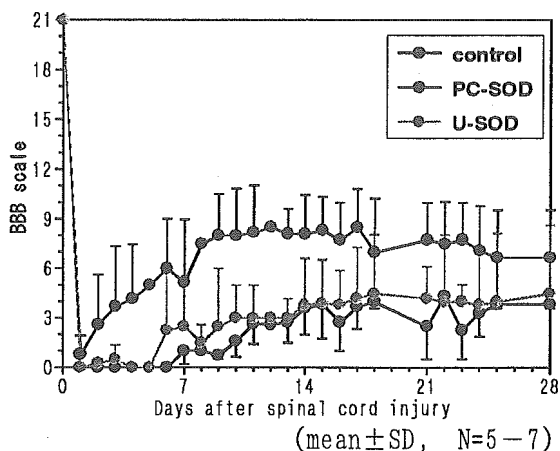
(倫理面への配慮)

研究全体について倫理面への配慮を行った。動物実験においては聖マリアンナ医科大学動物実験倫理委員会のガイドラインに沿って行った。

### C & D 研究成果と考察

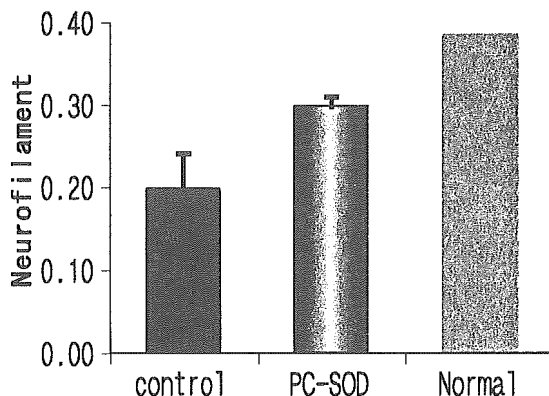
### 1. レシチン化生理活性ペプチド (PCSOD, PCBDNF) の評価

ラット脊髄損傷モデル(加重付加法、落錘法とも)において PCSOD は脊髄損傷による後肢運動機能低下の回復効果において有用性が示唆された。

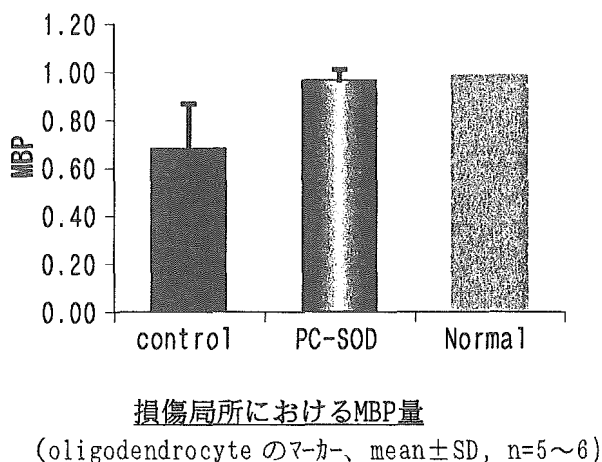
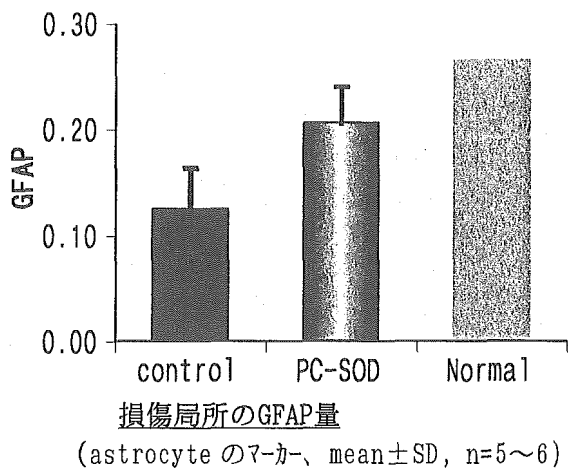


### 脊髄損傷モデルにおける PCSOD の効果

さらに損傷局所における過酸化脂質量と遊離SH基量を測定した結果、PCSOD の投与により正常化されていることが判明した。活性酸素が外傷性脊髄損傷に関与しているのではないかとの報告は以前よりなされていたが、これらの結果によりラジカルの関与が明らかになった。さらに頻回投与をしても初期単回投与と比較して薬理効果はそれほど変わらないことから、損傷初期の PCSOD による活性酸素の消去が効果的であることが示唆された。今後さらに詳細な機序について検討する予定である。さらに神経細胞種 (ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト) について neurofilament, GFAP (glial fibrillary acid protein), MBP (myelin basic protein) をマーカーとして EIA で定量したところ PCSOD 投与群は正常ラットの数値に近づいていることが判明した。

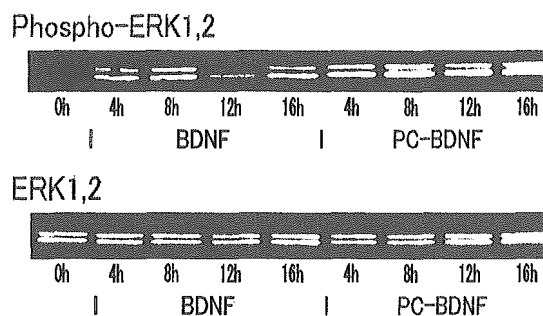


### 損傷局所の neurofilament 量 (neuron のマーカー) (mean ± SD, n=5~6)



以上のデータはPCSODが酸化ストレスを低減することによって脊髄損傷による後肢運動機能低下を改善している可能性を示唆している。外傷性脊髄損傷の治療薬としてはステロイドが第一選択肢で他に治療薬がないことからPCSODが治療薬の選択肢を増やすことが期待される。

PCBDNFについて前年度まではC57BL/Ksj-db/db miceを用いてPCBDNFの薬理活性の増強を報告してきた。その薬理効果の増強が何に起因するかについては、PC-pAB1に対する*in vitro*細胞増殖活性、投与後の血漿BDNF濃度を検討したが非修飾BDNFと比較してそれほど差は見られなかった。中枢神経系への集積については、非修飾BDNF投与群に比してPCBDNF投与群のほうが高い集積性を示す傾向は見られたが、中枢神経系へのターゲット性のみで薬理効果の増強が説明できるものではないと考えられた。本年度はPC-pAB1細胞の細胞周期をG0期にそろえて検討した結果PCBDNFの添加によって細胞のMAPKは著明な持続を示すデータが得られた。細胞の形態も分化傾向にあること示唆する形態を示していた。



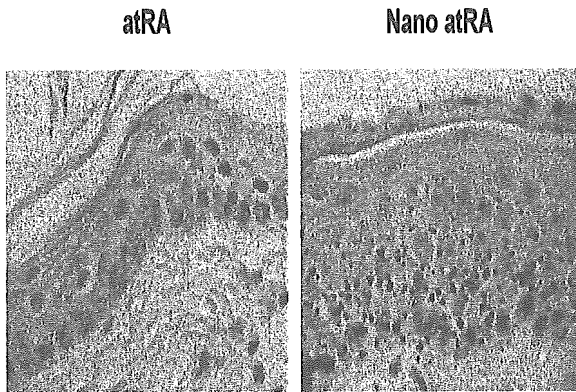
### PCBDNFによるMAPK持続的活性化

レシチンがアンカーとなって細胞に強固に結合する結果、MAPK活性化の持続化がみられると考えられるが長時間のMAPKリン酸化は細胞を分化に向かわせたり細胞内情報を変化させるとされ、これまで得られたPCBDNFの薬理効果増強の機序の一つが持続的なMAPK活性化に起因する可能性が示唆された。今後さらに詳細な機序について検討する予定である。またES細胞由来の神経前駆細胞をPCBDNF処理し移植したところやはり運動機能回復効果が得られ、今後は細胞移植とPCSODの併用効果を見当する予定である。

2. 細胞外遺伝子操作によるPCBDNFの作製: まず変性BDNFから活性をもつ構造への巻き戻しとその精製をおこなった。BDNF合成が達成できたが収率は10%以下であり改善・検討すべき点が多い。Sonogashira反応によるBDNFの部分ペプチドとレシチン誘導体との結合についてはレシチン誘導体末端に3重結合を導入する検討をすすめている。この細胞外遺伝子操作によるペプチド合成法は計画的に修飾部位の特定化が可能であることから医薬品のための修飾活性ペプチド合成法として全く新規で画期的な技術となることが期待される。

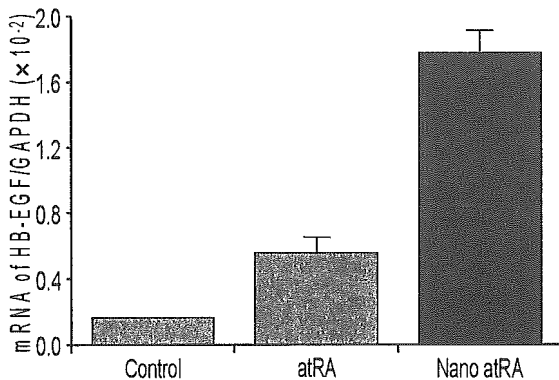
3. CXCR4拮抗薬についてPLGA製剤を作製し、その薬理活性をB16-B16メラノーマの転移抑制効果で検討した結果、有意なメラノーマ転移抑制活性を示し、徐放効果による薬理効果の増強が証明された。前年度に続いて、ヒアルロン酸と亜鉛イオン、bFGFについて結合体を作製し検討した結果、高いVEGFの発現量を示し、ラット皮下投与においては約1週間皮下にとどまり、投与部位において著明な血管新生作用の増強がみられた。この製剤処方HGFやBDNFなどに応用可能な方法であり、PLGA

徐放製剤とともに再生医療における成長因子徐放性機能付加スキャホールドへの有用性が期待される。



#### ナノ・ATRA 塗布による肥厚とヒアルロン酸産生

ナノ・ATRA による表皮の肥厚とヒアルロン酸(黒点)の生成 ナノ・ATRA 投与群のほうが肥厚も厚く、かつヒアルロン酸生成が見られる。



#### HBEGF の mRNA 産生量

ラットにナノ・ATRA を塗布し、表皮から RNA 抽出を行い、HBEGF の mRNA を定量した。ナノ・ATRA 塗布群は高い HBEGF mRNA を示した。

以上のようにナノ ATRA 外用剤は HBEGF 産生、ヒアルロン酸産生、表皮組織の肥厚を高めることが判明し、今後皮膚再生において有効で画期的 DDS 製剤となることが期待される。

#### E 結論

これまで報告してきたレシチン化 BDNF (PC-BDNF)薬理効果増強の機序について神経系ニューロン細胞 PC12h trk B transfected (PC-pAB1) を用いて、ウエスタンブロッティングで検討したところ、MAPK 活性化の持続が証明された。レシチン

ンがアンカーとなって細胞に強力に結合することで持続的な MAPK 活性化がおりその結果薬理効果の増強が得られる可能性が示唆された。活性酸素が関与していると考えられる外傷性脊髄損傷モデルにおいて PCSOD が高い運動機能回復効果を示した。局所の過酸化脂質量、NF, MBP, GFAP について定量した結果、PCSOD の投与によって正常値に近づいていることが判明し、酸化ストレスの除去による神経細胞分化の正常化による薬理効果と考えられた。レシチン化の技術は HGF, NGF, GDNF, NT-3 などへも応用可能であり神経系の再生において有用性の高い基盤技術となると考えられる。

有機合成法によるペプチド修飾は修飾部位が特定化できないことや導入数が分布をもつことから、細胞外遺伝子操作による PCBDNF 合成技術を立ち上げている。現在未だ基礎検討中である。

生分解性ポリマーである PLGA とヒアルロン酸をキャリアーとした PLGA-CXCR4 拮抗薬およびヒアルロン酸-FGF 製剤を作製し徐放性とその効果を確認した結果、いずれも徐放効果により薬理効果の増強が得られた。この製剤は再生におけるスキャホールドとしても応用可能と考えられる。

無機塩を用いてナノ・ATRA 外用剤を作製し皮膚再生を検討したところ著明な薬理効果の増強が見られ、画期的なナノテクノロジーになる可能性が示唆された。

以上のように臨床応用に向けて新規 DDS 技術の確立を推進している。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

・ Shigeto Shiimura, Rie Igarashi, Hiromoto Yamaguchi, Yoshie Ohashi, Jun Shimazaki, Kazuo Tsubota Lecithin-bound superoxide dismutase in the treatment of non-infection corneal ulcers. American J Ophthalmology in press 2003

・ 五十嵐理慧. DDS 製剤「基礎から臨床へ」. 生物工程学, 81(5), 179-182, 2003

##### 2. 学会発表

・ 五十嵐理慧、水島裕、上野晃憲 レシチン化 SOD のポルフィリン症治療薬への可能性. 第 31 回ポルフィリン研究会 6, 2003

・ 五十嵐理慧. レシチン化 SOD の臨床応用に向けて. 第 19 回日本 DDS 学会 6, 2003

・山口葉子、五十嵐理慧．レチノイン酸硬質  
ナノパーティクルの皮膚再生への試み．第 19  
回日本 DDS 学会 6, 2003

・武永美津子、都倉享恵、上野幸生、山口葉  
子、北川晶、川合眞一、水島裕、五十嵐理慧．  
外傷性脊髄損傷後の運動機能障害修復におよ  
ぼすレシチン化 superoxide dismutase  
(PC-SOD)の有用性．第 19 回日本 DDS 学会 6,  
2003

・山口葉子、中村なつみ、長澤輝明、武永美  
津子、川合眞一、水島裕、五十嵐理慧．オー  
ルトランスレチノイン酸 (ATRA) のナノ粒子  
化による加齢皮膚再生効果の増強．第 24 回日  
本炎症・再生医学会 11, 2003

・武永美津子、都倉享恵、山口葉子、川合眞  
一、水島裕、岡野栄之、五十嵐理慧．外傷性  
脊髄損傷後の運動機能回復におよぼすレシチ  
ン化 SOD(PCSOD)の有用性．第 24 回日本炎症・  
再生医学会 11, 2003

・五十嵐理慧 (シンポジウム)．再生医療に  
おける DDS 技術の有用性．第 24 回日本炎症・  
再生医学会 11, 2003

・ Mizushima Y & Igarashi R. Innovative  
nano-technology for DDS. The 7<sup>th</sup> US-JAPAN  
symposium on drug delivery systems. 12,  
2003 in Maui

・ Yamaguchi Y, Nagasawa T, Nakamura N,  
Takenaga M, Kawai S, Mizushima Y, Igarashi  
R. Nano atRA-New form of all-trans  
retinoic acid- . The 7<sup>th</sup> US-JAPAN  
symposium on drug delivery systems. 12,  
2003 in Maui

・ Takenaga M, Tokura Y, Yamaguchi Y,  
Kitagawa A, Kawai S, Mizushima Y, Igarashi  
R. Lecithinized-superoxide dismutase  
improved spinal cord injury-induced motor  
dysfunction. The 7<sup>th</sup> US-JAPAN symposium  
on drug delivery systems. 12, 2003 in Maui

## 6. 知的所有権の取得状況

なし

---

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社