

厚生労働科学研究費補助金

(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(国際水準臨床研究分野))

分担研究報告書

分担研究5) 抗マラリア薬、抗C型肝炎薬のFirst in Manの実施とPhase Ⅱへ向けた 剤型改善に関する研究

研究分担者 土居 弘幸 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

徐放性化が可能で肝臓初回通過効果を回避することができる経皮投与に着目し、N-251の溶液状態での経皮投与を試みた。その結果、経口投与時より投与回数を軽減してもマラリア感染マウスが完治できる体内動態解析結果を得た。また、低コストと低用量をベースにN-251の欠点を補う次世代の化合物の探索を行い、N-251と同様の抗マラリア活性を示すN-89に焦点をあて、N-89の製造工程を確立した。N-89のGMP/GLP 規格に対応可能な合成工程の検討を行い、純度99%以上のN-89 (non-GLP) を60g/バッチで得ることができた。このN-89を用いてN-251と同様の経皮投与における体内動態解析と抗マラリア薬効の再現性を検討した結果、優れた抗マラリア活性を示した。

ORL8細胞を使用することで、今年度初めて当該化合物に抵抗性(約20倍)を示す細胞を作出することに成功した。この抵抗性細胞と親細胞のORL8を丹念に比較することにより、抵抗性の原因がウイルス側に依るものなのか宿主側に依るものなのかを今後、明らかにすることができると期待される。これにより抗HCV標的を明らかにすることができれば、当該化合物の抗HCV活性の作用機序解明につながることを期待される。

A. 研究目的

本研究は新規抗マラリア化合物N-251を経皮吸収型製剤として最適化をはかり、マラリア流行地でPhaseⅠからシームレスにPhaseⅢを実施できるよう準備するとともに、難治性C型肝炎患者に対する医師主導治験を、平成28年度を目途に実施することを目的とする。

B. 研究方法

抗マラリア薬

本研究では種々の基剤と溶媒、既存の素材を用いてN-251製剤を作製し、マウスマラリアモデルにおいて抗マラリア効果を評価する。また、各種基剤を用いたN-251製剤を投与したマウスの薬物体内動態解析を行い、経皮吸収率並びに生物学的利用能BAを調べ、最適な投与スケジュールを計画する。以上の研究から治療効果の高い経皮吸収型製剤を見出し、抗マラリア治療効果、予防効果を調べる。

各種基剤及び溶媒を検討することで

N-251の経皮吸収率を改善出来ると考える。有望なN-251製剤に関しては薬物放出調節（制御）膜、薬物基剤を保持させる高分子マトリックスの検討を行い、薬物の皮膚移行性を調節可能な貼付剤もしくはテープ剤とし、ラットの皮膚を用いた皮膚透過性試験を実施してその有効性を検討する。上記の研究成果を、新規抗マラリア化合物N-251の経皮吸収型製剤に応用し、マラリア流行地（熱帯の発展途上国）で臨床使用できる貼付剤もしくはテープ剤の開発を目指す。

抗C型肝炎薬

N-251 に抵抗性を示すヒト細胞評価系の作出のために、全長 HCV-RNA 複製細胞である OR6 細胞（ヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来）や ORL8 細胞（ヒト肝癌細胞株 Li23 由来）に N-251 を連続的に添加して、G418 (0.3 mg/ml)存在下でも増殖できる（N-251 添加で HCV-RNA 量が低下すると G418 感受性となり細胞は死滅するようにアレンジされている）細胞コロニーを得ることを試みた。使用した N-251 の濃度や添加方法については、適時変化させて行った（詳細は研究結果の項目に記載した）。

抗 HCV 活性の評価は、24 ウェルプレートにそれぞれ 2×10^4 個の細胞を播き、N-251 或いは N-89（各種濃度）を添加して 72 時間後にレニラルシフェラーゼ活性を測定することにより行った。得られた測定値から添加化合物の 50% 阻害濃度（EC₅₀）を算出した。

細胞毒性については、別途 96 ウェルプレートにそれぞれ 1×10^3 個の細胞を播き、N-251 或いは N-89（各種濃度）を添加して 72 時間後に WST-1 アッセイを行った。得られた測定値から 50% 細胞毒性濃度（CC₅₀）

を算出した。選択性指数（SI）は CC₅₀/EC₅₀ にて算出した。

（倫理面への配慮）

抗マラリア薬

本研究ではネズミマラリア原虫

（*Plasmodium berghei*）を用い、マウスに感染させて抗マラリア薬効試験を行う。薬物体内動態解析研究にはマウスを使用する。経皮吸収型製剤の皮膚透過性試験には、腹部由来の皮膚、あるいは、背部を剃毛したマウスを使用する。本研究で行うすべての動物実験は岡山大学の動物実験関係規則に基づき、動物実験委員会の申請・承認を得て進める。

また、感染性廃棄物処理や実験場所に関しては、関係法令・指針、及び研究施設の設けた基準を遵守して研究を行う。

抗 C 型肝炎薬

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものである。本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C . 研究結果

抗マラリア薬

昨年度に用いた白色ワセリンとオイル（4 : 1 の配合比）の配合剤を用いて N-251 経皮吸収型製剤の結果をもとに今年度は界面活性剤（特許申請の関係で詳細は省略）を主とする溶液状態の経皮投与剤の体内動態解析を行なった。N-251 が 2% 以上となる

ように含有された N-251 溶液を 150mg/kg、となるように調整した N-251 溶液を切断したカーゼに乗せ、除毛したマウスの背中に乗せ、外れないようにフィルムと伸縮テープで覆って経皮投与した。薬剤投与 0、4、8、12、16、20、24 時間後の血漿中 N-251 濃度を測定した。これら実験は数回に分けて行なった。採血した血液は遠心後、血漿のみを集め、アセトニトリルを加えて除タンパク質した後に、N-251 を濃縮し、LC-MS/MS を用いて測定した。その結果、N-251 は界面活性剤に溶解した溶液状態での経皮投与で投与 4 時間目から 40ng/ml 付近で N-251 を維持し、16 時間目まで同様の血漿中濃度を維持した。それから約半分程度の 20ng/ml の濃度を 24 時間まで維持した。

この結果より、単回の経皮投与で抗マラリア薬効を示す十分な血中濃度を維持することが判った。年度途中のヒアリングで N-251 を臨床開発する為には合成ステップが多く、実際の臨床試験に持って行くためには低コストで提供可能な化合物が必要となった。そこで、N-251 の親化合物である、N-89 を用いて再度検討することになった。N-89 は N-251 と同様な抗マラリア活性を有することが以前に判っている。まず、N-89 の GMP/GLP 規格に対応可能な合成工程の検討を行い、純度 99 % 以上の N-89 (non-GLP) を 60g/バッチで得ることができた。この N-89 を用いて N-251 と同様の経皮投与における体内動態解析と抗マラリア薬効の再現性を検討した。N-89 を 2 % 含む溶液を調製し、N-251 と同様の経皮投与に体内動態解析の結果、37mg/kg 及び 55mg/kg 投与では 28 時間目まで 4ng/ml の N-89 を維持し、最高血漿中濃度も 6ng/ml であった。

これは N-251 の投与量に比例して N-89 の血漿中濃度が低いことが判る。次に、新たに合成した N-89 を用いて 4-day suppressive test を行い、抗マラリア薬効の再現性を調べた結果、iv, ip, sc, po の 4 経路で優れた抗マラリア活性を示し、従来の古いロット間の違いは見られなかった。

抗 C 型肝炎薬

これまでの解析から、N-251 や N-89 の抗 HCV 活性機序は既知の抗 HCV 機構とは異なることが予想された。この抗 HCV 活性の作用機序を解明する方法として、当該化合物に抵抗性を示す全長 HCV-RNA 複製細胞を作出できれば、当該化合物に感受性を示す親細胞と比較することにより作用機序を解明できると考えた。そこで、まず、長期継代培養により HCV の遺伝的多様性を獲得した HCV レプリコン複製細胞や全長 HCV-RNA 複製細胞に N-251 を数日ごとに投与しながら濃度を徐々に上げていく方法(1 μ M から 5 μ M)を試みた。しかしながら、いずれも治癒細胞となり目的の抵抗性細胞を得ることができなかった。これらの結果から、HCV の遺伝的多様性より細胞クローンの特殊性が重要ではないかと考え、次に抗 HCV 活性の評価細胞系である OR6 細胞や ORL8 細胞への N-251 の添加実験を行った。OR6 細胞へは N-251 の濃度を 4 μ M から 8 μ M に徐々に上げて行く方法で行ったが、N-251 に抵抗性を示す細胞を得ることは出来なかった。しかし、ORL8 細胞については、4 日ごとに 1 μ M の N-251 を 10 回投与後、3 μ M まで徐々に濃度を上げていくことにより、N-251 に抵抗性を示す細胞コロニーが多数得られた。これらの細胞コロ

ニーをプールして増殖させ、ORL8 N-251r 細胞と命名した。ORL8 N-251r 細胞における N-251 の EC_{50} 値は $2 \mu M$ となり、親細胞である ORL8 と比較して 20 倍抵抗性であることが分かった。N-89 の EC_{50} 値も $1.9 \mu M$ となり、ORL8 細胞と比較して 21 倍抵抗性であった。

D . 考察

抗マラリア薬

N-251 の薬効を最大限に引き出し、臨床での応用を目指した投与設計を行った。今年度の成果として経皮投与における N-251 の体内動態を解析し、高濃度で N-251 が持続することが判った。単回、あるいは 1 日 1 回の投与で抗マラリア活性を示す新しいタイプの抗マラリア剤形を見出すことができた。一方、投与量において臨床に適用するための低コストにフォーカスを絞り、N-251 周辺の化合物を再度評価し、N-251 の母化合物である N-89 を用いた臨床開発を試みることにした。N-89 の抗マラリア活性は N-251 と同様で合成工程が極めて短い。そのため、低コストでの臨床開発が可能となると期待できる。Non-GLP での合成工程の確立と N-89 の体内動態解析、抗マラリア薬効の評価を終え、本格的に N-89 の剤形の改善に向け、製薬企業の専門家の知見を取り入れ研究を進めて行く予定である。

抗 C 型肝炎薬

これまで N-251 や N-89 の抗 HCV 活性の作用機序は不明で、薬剤耐性が生じにくいところを標的にしていると考えられていた。事実、N-251 に耐性を示す HCV-RNA 複製細胞の作出は困難であった。しかし、

ORL8 細胞を使用することで、今年度初めて当該化合物に抵抗性 (約 20 倍) を示す細胞を作出することに成功した。この抵抗性細胞と親細胞の ORL8 を丹念に比較することにより、抵抗性の原因がウイルス側に依るものなのか宿主側に依るものなのかを今後、明らかにすることができると期待される。これにより抗 HCV 標的を明らかにすることができれば、当該化合物の抗 HCV 活性の作用機序解明につながることを期待される。

E . 結論

抗マラリア薬

徐放性化が可能で肝臓初回通過効果を回避することができる経皮投与に着目し、N-251 の溶液状態での経皮投与を試みた。その結果、経口投与時より投与回数を軽減してもマラリア感染マウスが完治できる体内動態解析結果を得た。また、低コストと低用量をベースに N-251 の欠点を補う次世代の化合物の探索を行い、N-251 と同様の抗マラリア活性を示す N-89 に焦点をあて、N-89 の製造工程を確立した。また、抗マラリア活性の再現性を確認し、N-89 の経皮投与における体内動態解析結果より、臨床での薬剤量の軽減が期待できる予備結果を得た。

抗 C 型肝炎薬

N-251 や N-89 に抵抗性を示す全長 HCV-RNA 複製細胞の作出に成功した。これにより当該化合物の抗 HCV 活性作用機序の解明に向けた研究基盤を得た。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Imada, C., Takahashi, T., Kuramoto, M., Masuda, K., Ogawara, K., Sato, A., Wataya, Y., Kim, H.-S. and Higaki, K. Improvement of oral bioavailability of N-251, a novel antimalarial drug, by long-chain fatty acid-based self-microemulsifying drug delivery system. *Pharmaceutical Research* (in press).
2. Morita, M., Koyama, T., Sanai, H., Sato, K., hiramoto, A., Masuyama, A., Nojima, M., Wataya, Y. and Kim, H.-S. Stage specific activity of synthetic antimalarial endoperoxides, N-89 and N-251, against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Int.*, 64, 113-117, 2015.
3. Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*, 462-463:166-174 (2014).
4. Kato N. Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. *PLoS ONE*, 9(3):e91156 (2014).
5. Komoto, Kaoru Kanai, Akira Sato, Yuji Kurosaki, Kazutaka Higaki and Yusuke Wataya.大韓寄生虫学・熱帯医学会。第56 回総会及び学術大会。釜山（韓国）2014 年 10 月 30 日-31 日。
3. Antimalarial drug development of synthetic N-251 compound as new drug.
Hye-Sook Kim, Yuka Nakamura, Risa Komoto, Akira Sato, Yusuke Wataya, Daniel Adjei Boakye. 13th International congress of parasitology, Mexico City, August 10th-15, 2014.
4. 上田 優輝、金 惠淑、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、土居 弘幸、綿矢 有佑、加藤 宣之。抗マラリア薬候補で強い抗 HCV 活性を示す N-251 の臨床応用に向けた研究と DAA との併用効果。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月。
5. 上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之。臨床応用に向けた抗マラリア薬候補 N-251 の抗 HCV 活性作用機序の解析。第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW)。神戸、2014 年 10 月。
6. Ueda Y, Kim HS, Hiromichi Dansako H, Satoh S, Ikeda M, Doi H, Wataya Y, Kato N. Characterization of anti-HCV activity of N-251, a preclinical antimalarial drug, and its combination effect with DAA. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014 年 9 月。

2 . 学会発表

1. 抗マラリア候補・環状過酸化物の開発現況。金 惠淑。第 84 回日本寄生虫学会大会、東京、2015 年 3 月 21-22 日。
2. Antimalarial drug development of synthetic endoperoxides as new drug.
Hye-Sook Kim, Yuka Nakamura, Risa

G . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

特許出願

3-1 抗マラリア剤。金 恵淑、綿矢 有
佑、佐藤 聡、土居 弘幸。特願
2014-214605。

3-2 抗マラリア剤。金 恵淑、綿矢 有
佑、佐藤 聡、土居 弘幸。特願
2014-214606。