

製剤設計及び革新的薬物送達システム (DDS) による創薬

岡田 弘晃

Drug Discovery by Formulation Design and Innovative Drug Delivery Systems (DDS)

Hiroaki OKADA

Tokyo University of Pharmacy & Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

(Received May 9, 2011)

This review describes studies on drug discovery using a rational formulation design and innovative, drug delivery systems (DDS) for biomaterials such as therapeutic peptides and nucleotides. The microcapsules of the LH-RH superagonist leuporelin acetate prepared using the new in-water drying method and biodegradable polymers, such as PLGA and PLA, could achieve a long-term sustained release for 1–6 months thereby facilitating easily treatment of hormone-dependent diseases, prostate cancer, endometriosis, and precocious puberty. This DDS technology showed an improvement in patient QOL and highly promoted the clinical value of the agonist. Moreover, PLGA microcapsules of siRNAs against VEGF, cFLIP, Raf-1, and Int6 have also been developed to treat various cancers and arteriosclerosis obliterans. To develop therapeutic nucleotides, a particle design is created using functional peptides, such as cell penetrating peptides (CPP), nuclear localizing signals (NLS), tight junction reversible openers (AT1002), bombesin, and dynein light chain-associated sequences. siRNA use should lead to a paradigm shift in drug discovery against various diseases. Tat analog with NLS could enhance the potency of a vaginal DNA vaccine. The artificial Tat CPP of STR-CH₂R₄H₂C synthesized in our laboratory could efficiently deliver siRNAs into many types of cells and enhance the therapeutic effects for treating sarcoma, atopic dermatitis, allergic rhinitis, and asthma by intratumor injection and inhalation of the nanoparticles. Tat and AT1002 analogs used to treat atopic dermatitis in mice increased cell membrane permeability to siRelA, a siRNA against a subclass of NF- κ B, and exhibited striking therapeutic and preventive effects.

Key words—therapeutic peptides; small interfering RNA (siRNA); drug delivery system (DDS); particle design; functional peptides

1. はじめに

近年、いろいろな革新的創薬技術が開発され広く普及してきた。遺伝子情報とその機能解明による疾患メカニズムの解明によるゲノム創薬では、創薬ターゲットの増加による新薬開発の活性化が期待されたが、画期的創薬には相変わらず困難な挑戦的期間が続いている。創薬の研究開発には自社のみの技術・研究成果に限定することなく、やっとな国内の企業においても医薬品ソースを入手するための世界的なアライアンスが活発になってきた。それに伴い研究開発費は高騰し、それを捻出するための M&A (合併と買収) の波も国内企業に押し寄せている。

巨大化した企業では、それだけ多くの収益が求められ、研究ソースの導入ではなく製品買収のためのビジネスモデルが増えてきた。やはり、将来大きな花を開くことが期待される疾患治療の新たなメカニズムを探索するためのアライアンスや M&A が普及することを願いたい。また、この“創薬の踊り場現象”の中で、既に保有する優れたブロックバスター薬の PLCM (Product Life-Cycle Management) の重要性が一層認識されている。これには真の PLCM が必要で、成功したブロックバスターが “First in class” ではなく “Best in class” であることから、患者の誰にでも必要とは思えない口腔内崩壊錠や合剤などの目先の対策ではない。例えば、効果の持続化ができた第二世代エリスロポエチン (EPO) のダルベポエチン α (ネスプ®静注用) や PEG (ポリエチレングリコール) 修飾 IFN (インターフェロン) - α , G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子),

東京薬科大学 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

e-mail: okada@toyaku.ac.jp

本総説は、平成 22 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

EPO など、活性本体のみのキラル化合物エソメプ
ラゾール (ネキシウム®)、吸収が改善されたシクロ
スポリン自己乳化型油性製剤 (SEDDS) のネオー
ラル®などの素晴らしい真の PLCM 成功例が数多
くあり、これに続くべきである。また、SEDDS な
どの DDS (薬物送達システム, drug delivery sys-
tem) 技術による品質改善のための医薬品の仕立て
直し (reformulation), あるいは適応症の拡大など
は極めて有効な方法である。

多くの企業が、現在の死因の 1/3 を占める難治性
疾患であるがんの治療薬開発に鎧を削っている様子
はたいへん素晴らしいと評価される。しかし、治療
費の高価な抗体薬や分子標的薬のキナーゼ阻害薬で
は費用対効果は全く不十分で、有効ではあるがほん
の数ヶ月の延命効果しか発揮できず、それでいて世
界売上げベスト 10 に 5 品目も位置していることには
全く失望の限りである。完治できる第二世代の抗
体薬や新規メカニズムの新薬、治療薬・予防薬とし
ての有効なワクチンなどの開発が望まれる。

このような創薬の現状にあつて、合理的な「製剤
設計」と薬物の機能を飛躍的に高める DDS の応用
が、創薬のそれぞれの場面で大いに活躍している
(Fig. 1)。特に現在、創薬素材として期待されてい
る、治療ペプチド、タンパク質あるいは核酸などの
バイオ医薬品 (biologics) の創薬においては革新的
DDS の開発が大いに期待されている。特に、
siRNA (small interfering RNA) や miRNA (micro-
RNA) のような生体で極めて不安定で、分子量の
大きな極性化合物の創薬には DDS がなければ医薬
品にはなり得ない。

本稿では、主に武田薬品工業及び東京薬科大学で

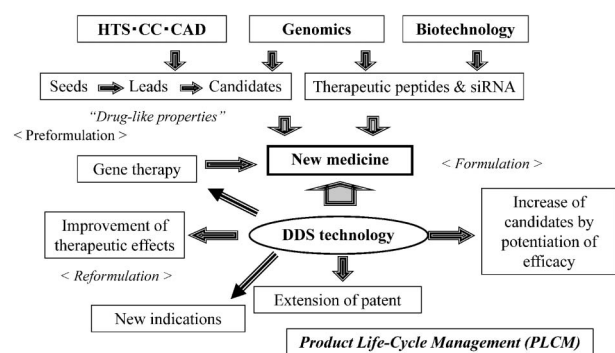


Fig. 1. Drug Discovery by DDS Technology and Product Life-cycle Management

の筆者の研究を中心に記述する。

2. 九州大学薬学部、薬剤学教室 (1968–1970)

九州大学薬学部で薬剤学を専攻し、井口定男教授に薫陶を受けた。経口投与製剤の抗真菌薬グリセオフルビンの家兎を用いた代謝物の同定と、いくつかの抗真菌薬の経皮吸収性の評価法の設定と吸収促進 DDS の開発を行った。さらに、臭いを感じる嗅球 (olfactory bulb) を選択的に除去して凶暴になったラットで、効果が増強した向精神薬ジアゼパムの代謝実験を手がけた。当時、ミラクル化合物として登場したジメチルスルホキシド (DMSO) による顕著な薬物の経皮吸収促進作用をみつけたが、すぐに判明した副作用の問題でこの化合物は実用化されることはなかった。また、嗅球を除去したラットでのジアゼパムの代謝プロファイルに変化はみられなかった。ECD (electron capture detector) 装備の GLC による薬物の高感度定量、経皮吸収や薬物代謝などの生物薬剤学の基礎を学び、DDS 研究に興味を持つことになった。

3. 武田薬品、製剤研究所・DDS 研究所 (1970–2000)

武田薬品工業に入社し、工業技術研究所に配属されて以来、30 年間製剤化研究を通じて新薬の開発に従事してきた。最初のテーマは、抗生物質のリラシリン®注射剤の工業化研究で、生産性を高めるためバイアルでの凍結乾燥を避け、トレーでの凍結乾燥後、粉碎、無菌環境下での小分け充填で生産することにした。最終滅菌を回避し無菌操作での生産には、ずいぶん反対する人がいたが問題なく工場生産にこぎつけた。さらに、この研究の傍らアフター 5 での研究で、この抗生物質のナトリウム塩を塩基性アミノ酸塩に置換することによって無痛化できることを見出し、入社初の特許を 1972 年に取得した。これは、ほとんど上司の藤沢 博博士のアイデアと指導であったが、自主的研究の面白さを学んだ。武田に入社しその後も多くの人に巡り会い、い



岡田弘晃

1970 年九州大学大学院修士課程修了、同年武田薬品工業に入社、1973 年米ガンザス大学に留学、1993 年武田薬品工業、DDS 研究所主席研究員、2001 年東京薬科大学教授、2011 年同、名誉教授。日本薬学会技術賞、恩賜発明賞、CRS/Nagai Innovation Award、日本薬剤学会賞などを授賞。

ろいろなことを学んだが、やはり最大の恩人は DDS 研究の重要性を教えて頂き、楽しい研究時間を存分に与えて頂いた美間博之所長である。

3-1. 抗マラリア薬の経口投与剤の吸収促進 入社早々の 1973 年に、米国 Kansas 大学の Takeru Higuchi 教授（“物理薬剤学の父”，米国薬学会初代会長，世界初の DDS ベンチャー ALZA 社の創設者）と Valentino Stella 教授の下に留学させて頂いた。当時、開発されたばかりの高圧窒素ガスで送液する HPLC を用い、まだ珍しかったビーグル犬を用いて難溶性抗マラリア薬の消化管吸収性の改良研究に従事した。主薬をオレイン酸に溶解してソフトカプセルに充填する製剤で著しい吸収の改善が得られた。¹⁾ 現在の油性経口 DDS 製剤の走りである。臨床試験に入ったが、カプセル内でオレイン酸と主薬が化学反応して副生成物を生じたことから実用化には至らなかった。留学を通じ、米国の広大な緑の大地で、「薬剤学は応用の学問です」の言葉通り展開されていた偉大な Higuchi 先生の様々な DDS 研究と研究に対する真摯な姿勢を学ぶことができた。

3-2. 酢酸リュープロレリンの製剤設計 帰国後、武田薬品工業、製剤研究所で、制がん剤のエマルジョンによる標的化 DDS の研究に着手したが、すぐに、初期候補化合物のプレフォーミュレーション・グループのリーダーとして、現在の探索研究段階の“Early ADME 研究”の先駆けをした。当時から増えていた難溶性薬物の可溶化による吸収促進の処方検討をいくつも行ったが、いずれも前臨床試験の安全性試験の段階で開発中止になっていた。体内での異物として薬物の分布を考えると、吸収促進の処方化研究のみではなく、同時に本質的に化合物の物性を化学的に改善することが重要であることを学んだ。そして 1976 年、黄体形成ホルモン-放出ホルモン (LH-RH) の高活性アゴニストである酢酸リュープロレリン (TAP-144) との出会いが、私の人生を決めた。

3-2-1. 膣投与製剤 1971 年、松尾、Schally ら²⁾によって初めて LH-RH の一次構造が明らかにされて以来、数多くの高活性アゴニストが合成され、それまで天然物からの抽出に頼っていたホルモン療法に画期的な変化がもたらされた。酢酸リュープロレリン (leuprorelin acetate) は、武田薬品の藤野ら³⁾によって世界に先駆けて合成された LH-

RH アゴニストで、9 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドである。天然型の LH-RH より 100 倍近い排卵誘発作用を有し、当初は不妊症治療への応用が考えられていた。しかし、この誘導体は活性が強力なために、高投与量で連続投与すると脳下垂体の受容体の数の減少である“down regulation”を起こし、逆にテストステロンやエストラジオールなどの性ステロイドホルモンの生合成を抑制し、性腺系の抑制（化学的去勢）を誘導することが見い出され、ホルモン依存性の疾患（前立腺がん、子宮内膜症、思春期早発症）の治療に適応できることが見い出された (Fig. 2)。

当初、乳がん治療薬を目標として、自己投与可能な膣坐剤の開発を実施した。治療ペプチドの投与経路として膣を選択し、性周期の影響がありラットの発情前期及び発情間期で 10 倍以上の吸収性が高まること、酸性の pH で、クエン酸などのキレート剤によって吸収促進が可能であることなどを初めて明らかにした。⁴⁾ ジメチルベンズアントラセン (DMBA) の経口投与で誘導したホルモン依存性の乳がんラットモデルを作製し、連続的に膣ゼリー剤 (TAP-144 500 µg/rat) を投与することによって、投与 8 週後には 84% の腫瘍が縮小し、56% の腫瘍が消失する著効が得られた。⁵⁾ しかし、ヒトの乳がんではホルモン依存性が低く 30% 程度で、臨床試験の結果から吸収の変動が大きいことも判明し、残念ながら実用化を断念した。この頃、インスリンを始めとして多くの治療ペプチドの粘膜投与剤の開発に関心が寄せられており、われわれのこの実験は、

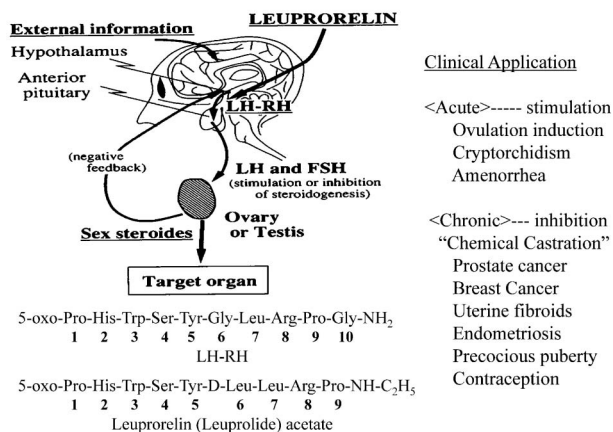


Fig. 2. Pharmacological Effects of Leuprorelin Acetate and Clinical Application

その先駆的な実験として学位论文⁶⁾にするとともに、いくつかの洋書にも執筆させて頂いた。⁷⁾そして、この一連の研究において、米国 NIH より黄体ホルモン (LH), 卵巣刺激ホルモン (FSH) のイムノアッセイキットを入手し、制がん効果と同時にホルモン動態を詳細に検討した。その結果、本誘導体を皮下注射するよりも血中濃度がより持続する膈内投与の場合に、より強力な血中 LH, FSH 濃度の抑制が得られることを見出し、⁸⁾ ホルモン依存性のより高い前立腺がんに適応症を変更することもあって、次の徐放性注射剤の開発研究に方向転換することを決意することになった。

3-2-2. 長期徐放性注射剤 1980年矢敷孝司博士の指導の下、より患者に優しい投与方法である長期徐放性注射剤の開発に着手した。⁹⁻¹⁷⁾ 長期徐放性も患者の QOL を考えると、やはり 2-4 週間に 1 回の注射くらいの、当時では誰も成功していなかった極めて長期の徐放製剤を設計した。当時既に開発され輸入されていた手術後抜糸する必要のない生分解性ポリマーの手術糸に着目し応用することを考えたが、国内ではどの企業もまだ合成していなかった。そこで、Eli Lilly 社の特許を見つけ、金属触媒を使用しない方法を利用して、残存金属触媒のないポリ乳酸・グリコール酸を自ら合成し、ペレット状にして生体内分解性を検討した。これによって使用するポリマーの特性を学ぶことができ、またいろいろな種類のポリマーを合成して薬物放出性の評価を容易に行うことができ、目的の期間の徐放に使用できるポリマーの特定を早期に行うことができた。一方、今まで誰も行ったことがない、親水性ペプチドのマイクロカプセル化技術に挑戦し、悪戦苦闘の結果、新しい液中乾燥法を確立して長期徐放性注射剤 (Lupron® Depot) 誕生の糸口をみつけることに成功した。Figure 3 に、3 ヶ月型徐放性注射剤の製造法を示す。1 ヶ月型注射剤では、最初カプセルへの封入率を高めるためにゼラチンを使用していたが、BSE 問題が起これゼラチンを抜くことを検討した結果、本質的には微小な薬物粒子をポリマーのアルキル鎖で取り囲むことが、高い封入率とポリマーの分解に依存した長期の徐放性を示すことが判明し、いずれの徐放製剤においてもゼラチンを必要としないことを見出した。この現象も重要な発見であった。この方法で調製したマイクロカプセルは Fig. 4

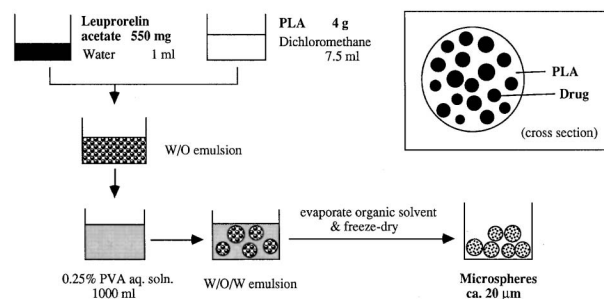


Fig. 3. Preparation Method of 3-month Depot Microcapsule Formulation of Leuporelin Acetate

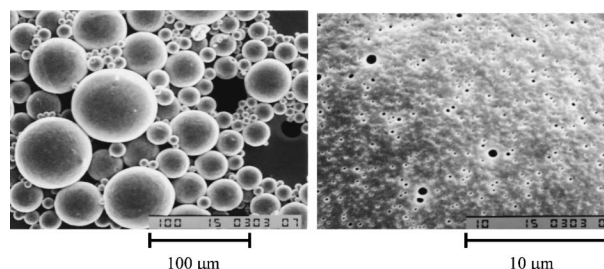


Fig. 4. SEM Photographs of One-month Depot Microcapsules of Leuporelin Acetate

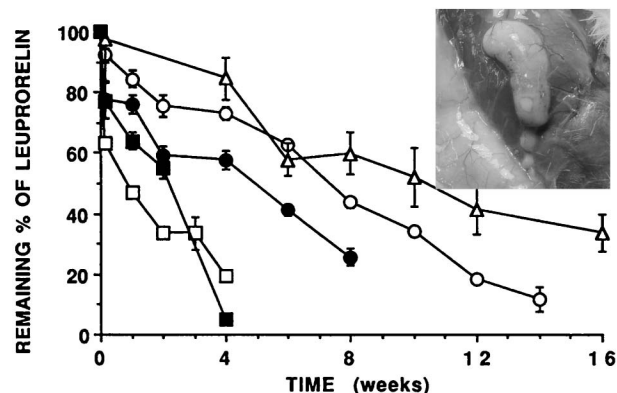


Fig. 5. Releasing Profiles of Leuporelin Microcapsules Prepared with Various Biodegradable Polymers
□: PLA-4700, ■: PLGA (75/25)-15800, ●: PLGA (90/10)-19000, ○: PLA-18200, △: PLA53300. (mean ± S.E., n=5).

に示すように、直径 20-30 μm のよく整球された形状を示し、表面に有機溶媒が蒸発するときにはできたと思われる細孔を有する。中に封入された薬物はしっかりとカプセル化され、ポリマーが加水分解して溶出する過程で薬物が放出された。Figure 5 に示すように、注射されたマイクロカプセルは皮下あるいは筋肉内でコラーゲンの結合織で覆われ、炎症等の局所刺激性がほとんどなく、ポリマーの種類を選択するだけでいろいろな期間連続的に徐放する製剤の

製造が可能であることを見出した。これによって、1回の注射で親水性のペプチドを1-6ヵ月間にわたり放出制御できる製剤の製造を可能にすることができた。薬物の血中濃度の測定及び血中のLH、FSH及びテストステロン濃度の測定 (Fig. 6)、前立腺や精巣などの性腺系臓器の重量変化の測定、さらには作製した子宮内膜症モデルラットでの薬理効果を基にした製剤設計によって徐放性注射剤の処方及び製造法が確立できた。このような *in vivo* 実験系で製剤機能を評価しながらの製剤設計は理想の進め方であり、大学に異動してからもこれに習った教室の研究体制を構築した。

米国で実施した臨床試験によってよく持続した薬物血中濃度 (Fig. 7) が得られることが確認できた。これによって、毎月1回の6ヵ月間の投与によって、それぞれホルモン依存性の割合に近い80%ほどの前立腺がん及び子宮内膜症の治療が可能になった。筆者がDDS研究所を異動する直前に処方化した6ヵ月間徐放型製剤が、昨年、欧州で販売許可された。かくもシンプルな処方で、かくも長期の徐放が得られることは筆者にとっても実に予想外の成果であった。このDDS製剤の開発によって、患者のコンプライアンスを高め、効果を確実にするとともに、毎日の注射の苦痛から患者を解放することがで

き、本化合物の医学的有用性を著しく向上させることができた。本製剤は1989年、LH-RH高活性誘導体の製剤として、米国で最も早く認可され、現在世界80ヵ国以上で使用されている。20年以上にわたりLH-RH製剤の世界市場の60%以上のトップシェアを確保し、20年を超えた現在でも年間2000億円ほどの売上が維持できている。

なお、その後このマイクロカプセル化技術を用いて、エンケファリン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH)、カルシトニン、副甲状腺ホルモン (PTH)、メトトレキサートなどの徐放性注射剤を検討したが、いずれも実用化には至らなかった。酔

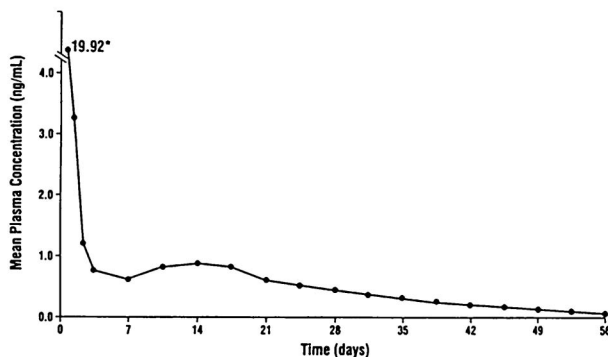


Fig. 7. Mean Plasma Levels of Leuprorelin Acetate following I.M. Injection of Lupron Depot 7.5 mg in Human

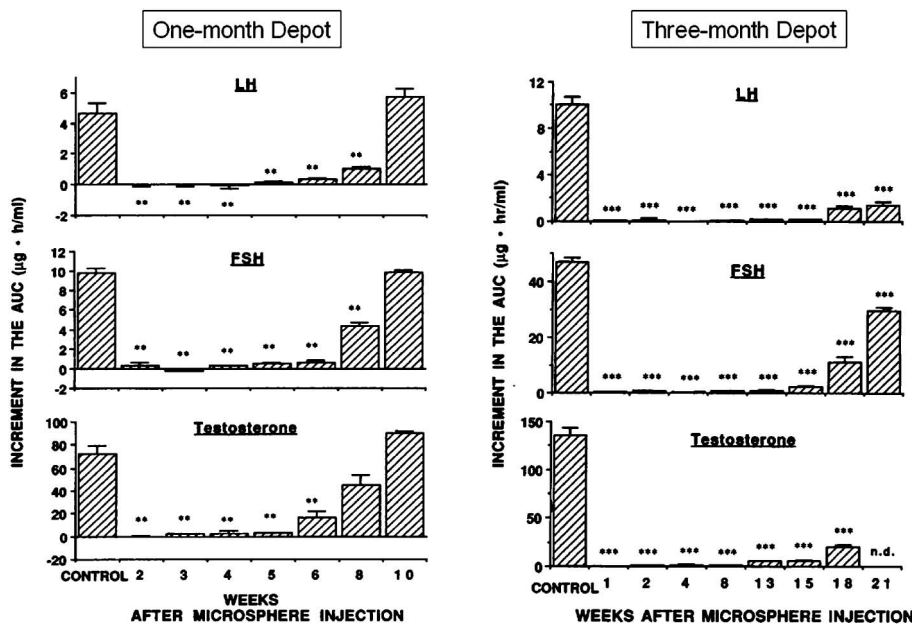


Fig. 6. Suppression of LH, FSH and Testosterone Blood Levels After Single Injection of One- or Three-month Leuprorelin Depot Formulation in Rats

Dose = 100 µg/kg/day, AUC: mean ± S.E., n = 5, **p < 0.05; ***p < 0.01.

酸リュープロレリンの場合は、血液中にある濃度以上の薬物があれば、有効な down regulation を誘導してアンタゴニストとしての確かな有効性が得られるが、ほかの薬物の場合は有効性が維持できない。このようにこの徐放性システムは封入する薬物の薬理作用との相性が重要であり、残念ながらその後、わずかの薬物にしか適用されていない。

3-3. 血管新生阻害薬の化学塞栓 DDS 血管新生抑制による制がん剤の開発を提唱した Harvard 大学の Folkman 教授ら¹⁸⁾と共同プロジェクトで武田薬品が開発した血管新生抑制化合物 TNP-470 について、徐放と化学塞栓を組み合わせた DDS の開発研究を行った。¹⁹⁻²¹⁾ 本化合物は極めて不安定で安定化の必要があり、まず、ポリ乳酸-グリコール酸のマイクロスフェアに調製して、腫瘍の支配動脈に選択的に注入し、化学塞栓と薬物の徐放による制がん効果の増強が得られた。さらに、より安全性を考慮し、中鎖脂肪酸に TNP-470 を溶解して、動脈内注入すると前田らによって提唱されている腫瘍部への集積の向上である EPR (enhanced permeation and retention) 効果によって、家兔の下肢に移植した VX-2 腫瘍とラットの肝臓に移植した Walker 256 腫瘍モデルにおいて極めて顕著な制がん効果を示すことができた。血管新生抑制メカニズムによる創薬は、副作用の少ない制がん効果などが期待できるが、これまで血管新生因子 VEGF を抗原とする抗体のアバスタチン[®]、及びアプタマーで加齢性黄斑変性症治療薬のマクジェン[®]が成功している。

3-4. 脳指向性 DDS 脳の毛細血管は他の臓器の血管と異なり、内皮細胞がタイトジャンクションで密着し、食作用性の取り込みが少なく、極性の高い薬物の透過は極めて低い。いわゆる血液脳関門 (blood brain barrier, BBB) である。しかし、脳細胞に必要な物質の輸送は種々のルートで行われており、例えば、核酸や中性アミノ酸などはトランスポーターを介して、インスリン、トランスフェリンやレプチンなどのペプチドは受容体を介して輸送されている。既に、L-DOPA やバクロフェンなどがトランスポーターを介して輸送され効果を発揮していることは知られており、後者の受容体に対してはその抗体を介して輸送する試みがなされている。^{22,23)} 筆者らは、インスリン受容体に着目し、インスリンに分子量 4 万の西洋ワサビパーオキシダー

ゼ (HRP) を結合して脳毛細血管から脳内部に送達できることを確認した後、血糖効果作用は弱いが脳のインスリン受容体に高い親和性を有するインスリンフラグメントを探索した。既に公知のインスリン分子上の受容体親和性ペプチド鎖を種々組み合わせ化学合成したペプチド鎖を、牛脳から分離した毛細血管内皮細胞の培養膜を使用してその親和性を検討したが、あまり親和性の高いものを見出すことができなかった。しかし、トリプシンで反応させて得られたインスリンフラグメントの中に目的の受容体に高い親和性を有する分子量 4700 で B 鎖の 23-30 位のアミノ酸が切断されたフラグメント F-007 を見出した (Fig. 8)。²⁴⁾ そこで、このフラグメントの A 鎖 21 位に神経成長因子 (NGF) を化学的に結合させた分子型 DDS を合成して BBB の透過を試みたが、NGF の化学的な安定性で断念した。NGF の化学的な失活を防いだ状態で遺伝子操作による融合タンパク質を生合成できれば、目的の分子型 DDS による活性化化合物の脳送達が可能であると考えられるが、いまだ実証に至っていない。

4. 東京薬科大学、製剤設計学教室 (2001-2011)

現在の創薬現場では、相変わらず多くの難溶性化合物が候補化合物に選択され、製剤設計ではその処方化が課題として挙げられている。先に述べたように、武田薬品でのプレフォーミュレーション研究の過程で多くの技術を用いて溶解度を上げ吸収を向上させることに成功したが、いずれも思わぬ副作用の発現で開発中止になった。すなわち、投与量にもよるが水に難溶性のものは体内での臓器分布の偏りに

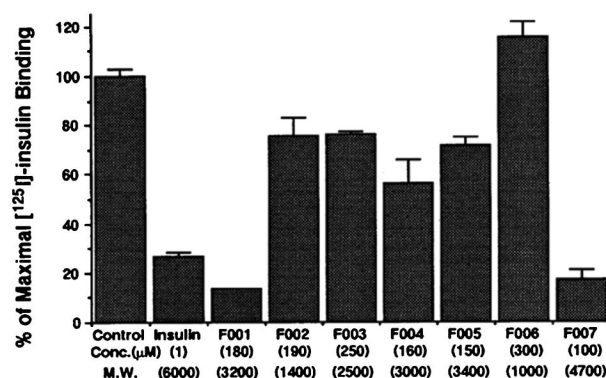


Fig. 8. Competitive Effect of Various Insulin Fragments Prepared Enzymatically on the Binding of [¹²⁵I]-Insulin (0.025 nM) to BMEC Monolayers

F001, F006 and F007 were prepared using trypsin. (mean ± S.E., n=3).

より、本来異物である薬物の副作用を回避できない場合が多いことを経験した。すなわち、早い時期に化学研究者と共同して化合物自身の物性を変え本質的に改良するほうが、結局は短期間に開発できる可能性が強いことに気がついた。しかし、ある程度の難溶性薬物の吸収促進の試みは必要である。また、創薬現場ではこれまで実績のあるペプチドホルモン、抗体やサイトカインを始めとする治療タンパク質・ペプチド薬に加え、新しいバイオ医薬品素材としての核酸薬、特にアプタマー、siRNA や miRNA が注目されている。そしてこれには、画期的 DDS の開発が必須である。

大学に赴任してからは、1) 難溶性化合物のナノ粒子化による吸収促進、2) 微細粒子化による吸入剤の設計、3) ペプチド薬の徐放性注射剤、4) 遺伝子導入用ナノ粒子ベクター、5) 感染症治療を目的とした腔粘膜 DNA ワクチン、6) siRNA の徐放性注射剤、7) siRNA の皮膚投与剤、8) siRNA の経鼻投与剤及び吸入剤、9) 脳腫瘍治療のための局所投与剤、10) 経鼻投与による脳送達などについて、いずれも薬理効果を評価しながら製剤設計研究を行った。その多くはナノ粒子設計によるものであった。主なものについて記述する。

4-1. ナノ粒子化による吸収促進と吸入剤 2つの薬物溶液の噴霧孔がある4流体ノズルスプレードライによって、異なる薬物の複合体 composite 粒子を容易に調製できる噴霧乾燥機があった (Fig. 9)。これを用いて一方に水溶性のマニトールのような医薬品添加物を、他方に水に難溶性の薬物を水に混和する有機溶剤に溶解して噴霧乾燥すると、両者の量比をうまく調整することによって難溶性薬物をナノ粒子としてマニトールに分散し、安定に保存できることを見出した。²⁵⁾ これをラットに経口投与して、消化管吸収性を数倍以上増加させることに成功した。また、この噴霧乾燥されたマニトール粒子径は $5\ \mu\text{m}$ 程度で、そのまま経肺投与製剤として使用することができる。すなわち、膜透過性の低い薬物をこの形で経肺投与することによって、より高い吸収が期待できる。難溶性で難吸収性のモデル化合物プラナルカスト (PLH) をラットに経肺投与すると、マニトールの添加量が4倍、10倍量の時 PLH の粒子径は約 $200\ \text{nm}$ で、ほぼ 100% の BA を得ることができた。

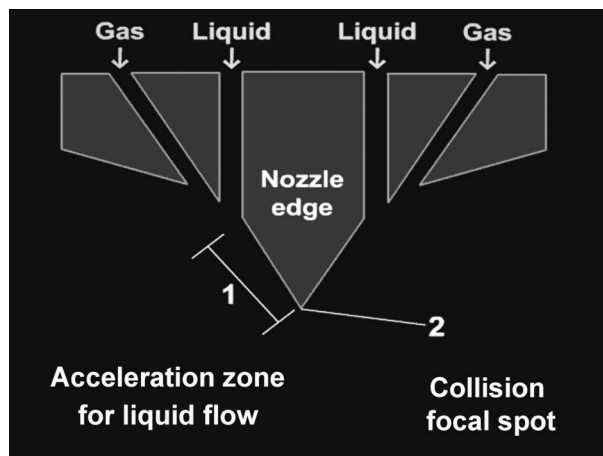


Fig. 9. Schematic Diagram of 4-Fluid Nozzle Spray Dryer

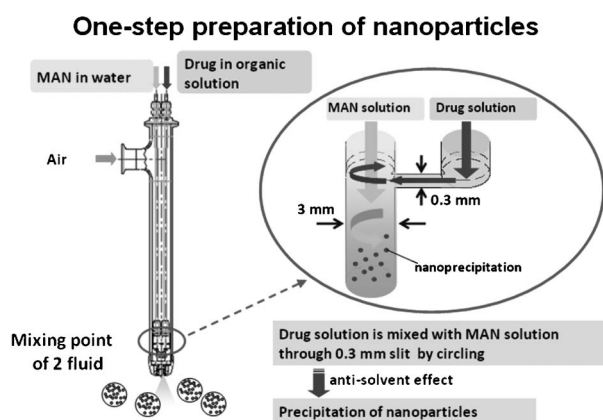


Fig. 10. New Nozzle of Spray Drier for Nanoprecipitation in Liquid Phase

一方、この4流体噴霧乾燥機は、両方の溶液が薄いスリットから噴霧されその先端の空中で衝突し両液が交じり合い混液の中でナノ粒子化 (anti-solvent effect) し乾燥されることから、ナノ粒子化の条件を設定することが困難な場合がある。そこで、われわれは改良型として、空中ではなくノズルの液中でナノ粒子化できる新規ノズルを開発した (Fig. 10)。²⁶⁾ これによってより安定した状態でのナノ粒子分散マイクロ粒子の調製が可能になった。製剤技術の進歩は添加剤と製剤機械の進歩に依存する場合が多い。

その後、さらに消化管吸収を向上させるために、この内部のナノ粒子の薬物の溶解度を向上させるため、ポリマーを用いてナノ固溶体としてマニトール中に分散させる処方を検討した。その結果、難溶性薬物の消化管吸収性をさらに向上させることに成

功した.²⁷⁾ また、水中に投入すると自己乳化する油性製剤 (SEDDS) の標準処方方を検討し、油、界面活性剤、補助界面活性剤のいずれかに溶解度が低いものを選択して調製すれば、良好なナノ粒子化と消化管吸収性の向上が得られることを見出した.²⁸⁾ いずれにしろ、難溶性薬物をナノ化するだけでは無晶化と溶解速度の向上による吸収量の増大が得られるだけで、薬物は消化管で1度溶解する必要があり、さらにBAを高めるには消化管での溶解度を高めることが重要なポイントであることを確認することができた。

4-2. 粘膜 DNA ワクチン 遺伝子治療の臨床試験が始められて既に20年以上が経っているが、ADA欠損症などの遺伝病においては有効性が認められているものの、期待されたがんやAIDSなどの難治性疾患においてははまだ有効性が十分でない。その研究開発は現在極めて低迷している。その原因の1つには使用したウイルスベクターで白血病の副作用が発生したこと、その後、安全な非ウイルス性ベクターの開発が進んでいないことが挙げられる。そこでわれわれは、細胞透過性ペプチドを使用した非ウイルス性遺伝子導入ベクターと針なし注射器を併用して、有効で安全な粘膜DNAワクチンの開発を試みた。まず、ラットの膣にエレクトロポレーションと5%クエン酸含有のルシフェラーゼpDNA (pLuc) を用い、局所障害性の少ない条件を設定して基礎実験を行った。その結果、膣での遺伝子発現には性周期の顕著な影響があり、先のペプチドの粘膜吸収の場合と同様に発情前期及び発情間

期の日には遺伝子発現が大きいことが分かった。また、膣粘膜への遺伝子導入においても粘膜透過障壁があることが示唆された.²⁹⁾ このラットに卵白アルブミン (OVA) のpDNA (pOVA, 100 µg/100 µl) を投与してその免疫反応を検討した結果、皮下投与、鼻粘膜投与よりも膣投与の場合に、膣粘膜でのOVA特異的な局所抗体IgAの産生が最も高く (Fig. 11)、膣の支配リンパである鼠径リンパ節の細胞性免疫の指標であるIFN-γの産生も最も高いことが認められた。すなわち、期待した通りの局所での抗原特異的な細胞性及び体液性免疫活性の増強を確認することができた。^{30,31)} また、このpDNAの細胞透過性ペプチドのTat誘導体及び核移行シグナルのNF-κBを併用することでこの遺伝子の発現は促進された。また、粘膜透過性を高めるためにエレクトロポレーションを用いたが、電圧のわずかな変化で局所での炎症を引き起こすことが危惧され、これに代わる投与方法として圧縮窒素による針なし注射器を使用した。この注射器による投与では、放射線状の広い領域への遺伝子導入が可能で、通常の注射針による投与より6倍以上のルシフェラーゼの発現をみることができ、家兎へのpOVA膣内投与で膣粘膜局所での抗原特異的なIgAの産生が有意に増強された (Fig. 12)。使用した針なし注射器は、膣の入り口から投与できるように注射器の噴射孔を45°の角度に開口し、45°の角度で注射すると粘膜面に直角に注射できるように改良した。

4-3. siRNAの徐放性注射剤 バイオ医薬品として1970年頃から急速に進展した治療ペプチド及

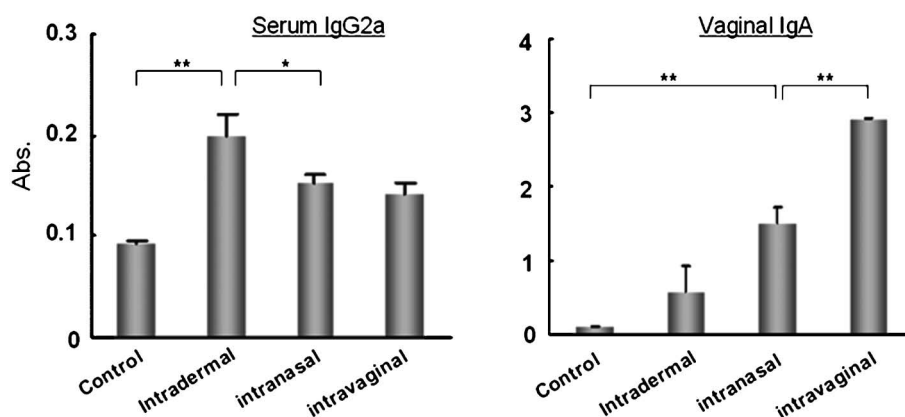


Fig. 11. OVA-specific Serum IgG2a and Vaginal IgA Production by Various Administration Route

C57BL/6 female mice were immunized three times by various route at two-week intervals. Mice were sacrificed 7 days after final immunization, and the IgG2a and IgA were analyzed. as O.D. by ELISA. (mean ± S.E., n=5), *p<0.05; **p<0.01.

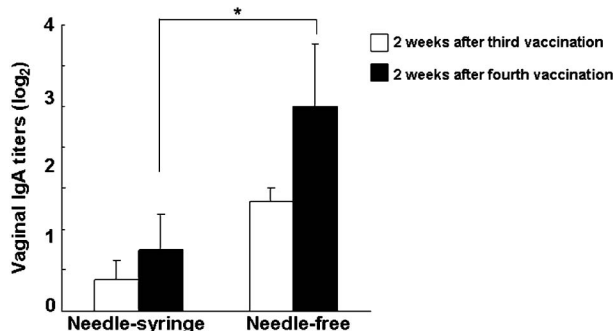


Fig. 12. OVA-specific Vaginal IgA Titer in Rabbits after Vaginal Injection of pOVA by Conventional Needle-syringe Injection or Needle-free Injector

Rabbits were vaginally immunized three or four times by needle-syringe injection or needle-free injector injection of pOVA solution at 2-week intervals. Vaginal washes were collected 2 weeks after vaccination and vaginal IgA titers were analyzed by ELISA. Data are expressed as geometric means (\log_2) of reciprocal dilutions of OVA-specific IgA in vaginal secretions. (mean \pm S.E., $n=3-4$), * $p<0.05$.

びタンパク質による創薬に加え、2001年頃から哺乳類で2本鎖の21-23塩基対のsiRNA (small interfering RNA) が特異的にmRNAの発現を抑制すること (silencing) が明らかになり、疾患関連遺伝子の選択的な抑制による新しい疾病治療の可能性が示された。現在、多くのベンチャー企業で鎬を削る熾烈な開発競争が開始され、グローバル企業も参入して創薬研究が活発化している。根本的な課題は、生体での不安定さと親水性高分子であるため、作用部位への標的化と粘膜障壁の突破及び細胞内導入に画期的DDSの開発が必要なことである。いずれにしろ、このsiRNAは、近年にない強力なバイオ素材であることは間違いない。

このsiRNAの主な課題³²⁾は、安定化と粘膜ないし細胞膜の透過性向上以外に、1)非選択的なmiRNA (micro-RNA) 的 off-target 効果の回避、2)外敵ウイルスの強力な障壁である Toll-like receptor (TLR) を介した非選択的な免疫反応の回避がある。また、siRNAは細胞内での作用が4-5日間は持続するが、さらに長期に作用を持続させる場合は、Lupron® Depot で開発した長期徐放性注射剤の技術の応用が有効であると考えられる。

4-3-1. 血管新生阻害とアポトーシス誘導による制がん効果 ここでは、血管新生因子 (VEGF) の産生を抑制する siRNA (siVEGF) 及びアポトーシス (細胞の自然死) 誘導の阻害因子 (cFLIP) を抑制する siRNA (sicFLIP) を選択し、細胞内導入

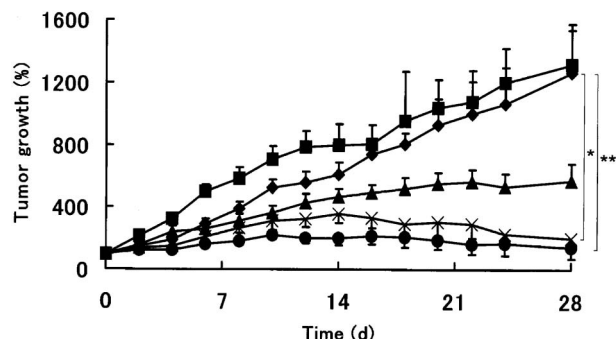


Fig. 13. Anti-tumor Effect of siRNA MSP in Mice Bearing S-180 Sarcoma Cells

PBS (◆), PLGA msp (■), siVEGF msp (12.6 μg , ▲), sicFLIP msp (12.6 μg , ×) and combination msp (sicFLIP 18.5 μg , siVEGF 9.0 μg , ●) were injected into the tumor in mice bearing S-180 cells. (mean \pm S.E., $n=5$), * $p<0.05$; ** $p<0.01$ (t-test).

ベクターのポリエチレンイミン (PEI) と複合体を形成させ、これを w/o/w 液中乾燥法を用いて PLGA75/25-14000 マイクロカプセル (msp) 内に封入し、S-180 担がんマウスの腫瘍内に直接投与して制がん効果を評価した。その結果、Fig. 13 に示すように siVEGF (12.6 μg) のみでも1回の投与で1ヵ月間の腫瘍増殖の抑制が得られたが、³³⁾ sicFLIP の併用 (sicFLIP 18.5 μg , siVEGF 9.0 μg) で更に強力で持続した制がん効果を達成することができた。³⁴⁾

また、同様にアポトーシス抑制因子 Raf-1 を選択的に抑制する siRNA (siRaf-1) の PEI 複合体を封入した PLGA msp を調製し、ラット脳腫瘍モデルの脳内に投与し制がん効果を評価した。³⁴⁾ 脳腫瘍モデルは、Fig. 14 に示すような脳定位固定装置に麻酔下ラット頭部を固定し、頭頂ラムダから右・前方に3mmずつのところにドリルで0.5mmの孔を開け、7mmの深さにグリオーマC6細胞 1×10^6 個/ $10 \mu\text{l}$ をゆっくり注入し脳腫瘍を作製した。1週間後、再び同じ孔にマイクロカプセルが局在するように温度感受性ポリマーゲル (TGP, LCST: 32°C) に分散した siRaf-1 msp (2.5 mg/ $30 \mu\text{m}$) を投与して評価した。その結果、いまだ十分ではないが、12日から15日への延命効果の有意な延長がみられた。脳腫瘍は予後の極めて悪いがんであるが、その治療にはヒトの場合でも局所投与の可能な腫瘍であり、腫瘍切除後の空間に副作用の少ない制がん剤の徐放性 msp を投与することは可能である。

4-3-2. 血管新生による閉塞性動脈硬化症の治療

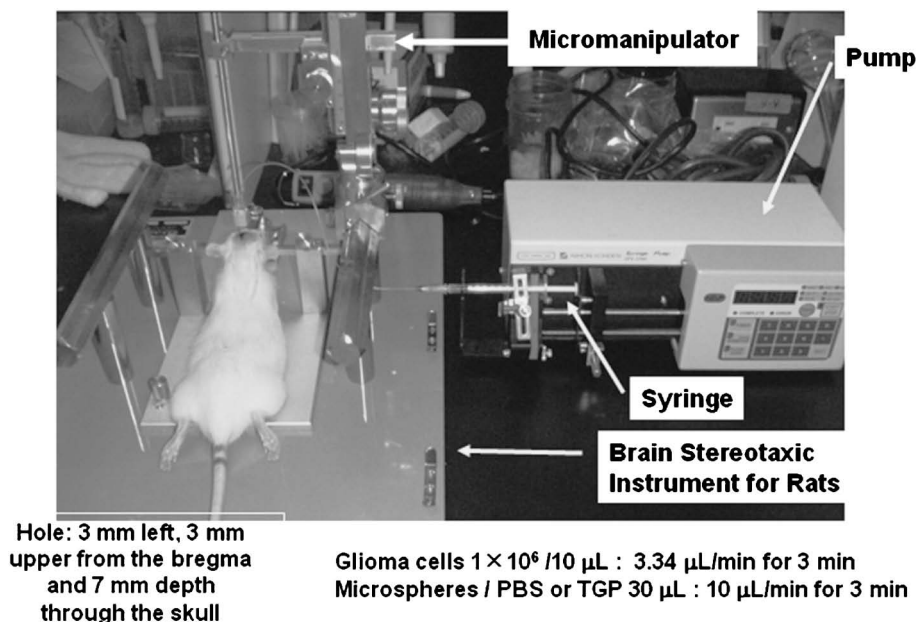


Fig. 14. Micro-injector for Intracranial Injection in Rats of C6 Glioma Cells and siRNA MSP Dispersed in Thermosensitive Gel (TGP)

閉塞性動脈硬化症 (ASO) によってもたらされる間欠性跛行は、糖尿病や高脂血症などに起因することが多い。下肢の虚血が重症化すれば下肢の切断も余儀なくされる場合があり新たな治療法が求められている。アルファジェン社が開発している、血管新生因子の HIF-2 α の分解に関与する Int6 を抑制する siRNA (siInt6) を、PLGA マイクロカプセルに封入し 2 週間放出型徐放性注射剤として虚血部位での血管新生を検討した。この siInt6 は、2 重鎖の分子内に DNA 鎖を導入し、off-target 効果の低下と酵素耐性が得られた RNA/DNA キメラ siRNA として注目されている。³⁵⁾ これを PEI 複合体として w/o/w の水中乾燥法によって PLGA75/25-10000 の msp 内に封入し、ラットの大腿の下肢動脈と静脈を切断して作製した虚血モデルに筋肉内注射して効果を評価した。その結果、siInt6 msp は 1 回の投与で、水溶液を隔日に 7 回注射した群に相当する顕著な血管新生効果をもたらすことが確認でき、閉塞性動脈硬化症治療の可能性が示唆された。³⁶⁾ このように標的因子を常にサイレンシングすることによって強い効果が得られる siRNA の製剤として、生分解性ポリマーを用いた徐放性注射剤は様々な場面で極めて有効な治療効果につながることを期待できる。

4-4. siRNA の皮膚・粘膜投与製剤 siRNA は生体内分解酵素によって極めて速やかに分解され

るため、全身投与による有効性の確保には幾多の困難が予想される。すなわち、前記の徐放性注射剤による局所投与や、粘膜投与製剤としての開発が先行することが予想できる。

4-4-1. アトピー性皮膚炎の治療 アトピー性皮膚炎 (AD) は、悪化・寛解を繰り返す慢性の掻痒性皮膚疾患で難治化し易く、患者の QOL は極めて低い。この治療にはカルシニューリン阻害薬のタクロリムスやステロイド剤などの免疫抑制剤が使用されており、副作用のより少ない治療薬が求められている。われわれは、この皮膚炎の際に放出される TNF α や IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインを産生している NF- κ B のサブクラス RelA に着目し、これをサイレンシングする siRNA (siRelA) を合成し合理的な経皮投与製剤の検討を行った。

AD においては、皮脂のセラミドの減少や角質層の剥離など吸収障壁の低下が知られているが、われわれは皮膚透過性及び細胞導入性をさらに促進するため、タイトジャンクション (TJ) を可逆的に開口できる機能性ペプチドの AT1002 及び HIV の細胞透過性ペプチド Tat の活性誘導体 (Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Cys-Gly-NH $_2$) を合成して、siRNA の皮膚内透過性を検討した。³⁷⁾ この Tat 誘導体は当教室で設計したもので、天然型の C 末端に Cys-Gly-NH $_2$ を付加し安定化と SS 架橋を可

能にした。エンドサイトーシスによってペプチドや核酸あるいはミセルなどのナノ粒子までも細胞膜を透過させることができる。AT1002 (Phe-Cys-Ile-Gly-Arg-Leu-Cys-Gly-NH₂) は、米国のベンチャー企業 Alba Therapeutics 社によってペプチドの経肺吸収の促進剤として開発中の機能性ペプチドである。コレラ毒素の抽出物のペプチドフラグメントで、TJ 関連タンパク質の ZO-1 タンパク質のリン酸化を促進して TJ を可逆的に開口する。³⁸⁾

アトピー性皮膚炎を起こし易い NC/Nga マウスにハプテンとして塩化ピクリルを用い、腹腔内注射及びオリーブ油溶液を耳介皮膚に塗布し皮膚炎を起こした。皮膚炎が発症し始める 11 日目から、siRelA (5 µg)/Tat 複合体溶液と AT1002 溶液を塗布しオリーブ油 20 µl で覆って、隔日に 6 回投与して治療及び予防効果を検討した。³⁹⁾ その結果を Fig. 15 に示す。下段の患部の写真観察でも一目瞭然で、siRelA/Tat/AT1002 溶液を塗布した群では炎症の発症が全く抑制できていた。また、耳介皮膚の肥厚の時間経過及び乾燥・発赤・肥厚・瘡蓋・変形を点数化した臨床スコアにおいても有意な有効性が証明された。さらに、組織学的観察による肥満細胞の浸潤、ELISA で測定した炎症性サイトカイン (TNF-α, IL-4) 及び血清中 IgE の産生量のいずれにおいても、極めて顕著な有意な抑制が得られた。この実験で、吸収促進剤を使用しなかった siRelA 単独投

与でもかなり良好な治療効果が得られたが、AD 症状による角質層の剥離及び炎症性細胞の皮膚表面への浸潤の亢進などに起因したものと考えられる。

4-4-2. アレルギー性鼻炎、喘息の治療 花粉症などのアレルギー性鼻炎は、くしゃみ、鼻水、鼻閉などを主症状とするアレルギー性疾患であり、その罹患数は増加の一途を辿っており、口渇や眠気の副作用のない患者に優しい治療薬が期待されている。この炎症時の炎症性サイトカインの産生を抑制すれば症状の緩和の可能性が期待される。そこで、先の NF-κB に対する siRelA がこのアレルギー性鼻炎の症状緩和に利用できるかを検討した。siRelA (10 µg) の細胞内導入ベクターとして、当教室で開発した Tat 誘導体あるいは次項で記述する細胞質感受性ベクターの STR-CH₂R₄H₂C を N/P 比 15 で 20 µl の複合体 (粒子径 120 nm) としてその 10 µl ずつを、卵白アルブミン (OVA) で誘発した鼻炎ラットの両方の鼻腔内に投与して症状緩和を評価した。⁴⁰⁾ OVA による鼻炎の発症実験では、OVA 24 µg/2.7 mg 水酸化アルミニウム/生理食塩水 120 µl の腹腔内投与によって感作し、15 日目及び 29 日目から 7 日間連続で毎朝 OVA 600 µg/10 µl を左右の鼻腔内に投与し鼻炎を誘発した。siRelA 複合体は OVA 暴露の 5 時間前に投与して、暴露後 5 時間のくしゃみと鼻を掻く動作を計数した。その結果、Fig. 16 に示すように siRelA 投与群では明らかに鼻

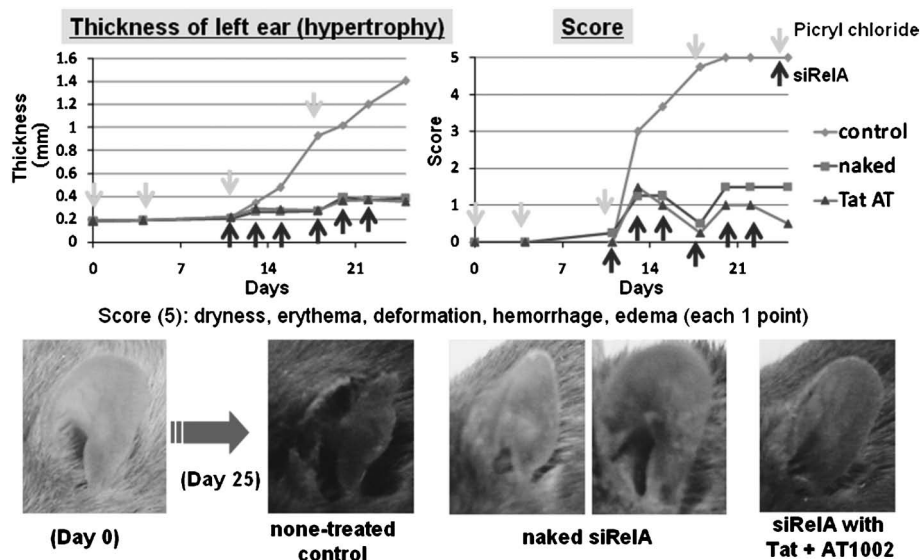


Fig. 15. Therapeutic Effects in the AD Model by Transdermal Administration of siRelA with AT1002 and Tat Analog. (mean ± S.E., n=4-5).

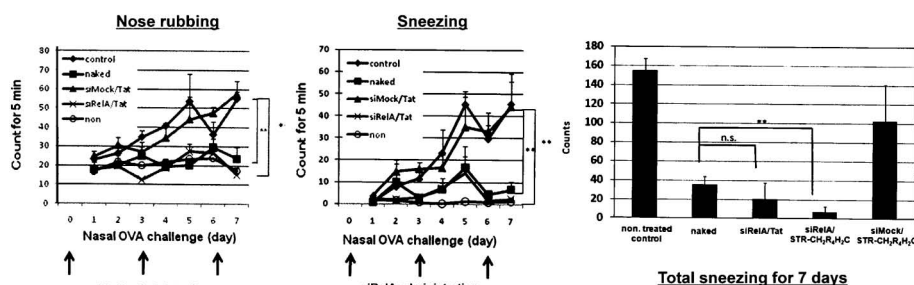


Fig. 16. Suppression of Rhinitis-like Symptoms by Intranasal Administration of siRelA in AR Model Mice

To evaluate the suppression of allergic rhinitis-like symptoms, mice were placed in an observation cage just after intranasal instillation of OVA. The nose rubbing and sneezing times were counted for 5 min after OVA challenge. (mean \pm S.E., $n=3-4$), ** $p<0.01$; vs. $p>0.05$.

炎様症状の顕著な抑制が確認された。また、7日間のくしゃみの回数の合計 (Fig. 16 右端図) は、siRelA 単独でも有意な抑制がみられたが、Tat 複合体及び STR-CH₂R₄H₂C 複合体では更に有意な抑制が確認できた。また、アレルギー性疾患の緩和の指標である OVA 特異的な IgG_{2a}/IgG₁ (Th1/Th2) バランスが未処理対照群に比較して有意に改善していることが確認された。

また、同様に OVA を用いて作製した気管支喘息モデルマウスに対して siRelA の効果を評価した。⁴¹⁾ siRelA/正電荷リポソーム複合体 (180 nm) を 0.2% ロイシン溶液として、噴霧応力で容易に微細な粉末になる凍結乾燥品とし、小動物甲咽頭鏡 (PennCentury, Inc.) で気管を目視しながら同社 (PennCentury, Inc.) の粉末噴霧器を用いて非侵襲的に経気管投与 (OVA 感作後、25, 27, 29 日目) した。喘息の誘発は OVA 及び InjectAlum[®] 溶液を 2 回 (0, 14 日目) 腹腔内投与し、OVA 溶液 40 μ l を経鼻投与 (28, 29, 30 日目) して OVA 暴露し、最後の 30 日目の暴露直後 4 分間の咳の回数を計数した。ランダム配列の mock siRNA 投与群では 12 回/分の咳の回数が、siRelA 投与群では OVA を暴露しない正常マウスと同様の 3.5 回/分に有意に減少した。また、31 日目のマウスにおいて、採取した気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の IL-4 の顕著な抑制と、血中の IgG_{2a}/IgG₁ (Th1/Th2) バランスの改善が確認できた。

4-5. 細胞質感受性機能ペプチドによる核酸薬の細胞内導入 より安全で、効率よく細胞内に核酸薬を導入する DDS として筆者らは細胞透過性ペプチドに注目し、Tat ペプチド誘導体を合成し多糖類のコレステロールプルランなどの自己会合型ナノ粒

子としての利用を検討した。高い導入効果は得られたものの、多糖の有する複雑さにより溶解性と再現性の点で課題がみられた。そこで、Futaki ら⁴²⁾ によって示された 8 個の Arg オリゴペプチドの代わりに、4 個の Arg と、エンドソームから早期に脱出させるための 4 個の His を分子内に持つペプチドを基本構造として、その両端に SS 結合のための Cys を付与し、更に、生体膜親和性の高いステアリン酸 (STR) を N 末端に結合させた自己会合型細胞透過性ベクター (STR-CH₂R₄H₂C) を創製した (Fig. 17)。⁴³⁾ この STR-CH₂R₄H₂C は分子の疎水性・親水性の両シークエンスにより自己会合し、通常の空気条件下で酸化され 2 時間程で 40% がジスルフィド結合 (SS 結合) によって架橋し、より強固な核酸の封入が可能になり、核酸の安定化と細胞内導入効率が高まった。また、このベクターの優位点として、NP 比 1/5 程度で、ほぼ 100% の核酸と結合あるいは封入し、正電荷の 100–200 nm のナノ粒子となり細胞内に導入される。そして、細胞内の還元条件化 (~ 4 mM グルタチオン相当) で、この SS 結合は速やかに解離し核酸を細胞質に放出する。先の PEI 複合体による細胞内導入では細胞内への取り込みは良好であるが、この複合体が強固過ぎて細胞内に導入された後、細胞質に放出されず核内への移行を妨げている様子を蛍光顕微鏡観察で確認している。この細胞質感受性ベクターはウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) 存在下でも COS7 細胞で市販の導入試薬に匹敵する高い遺伝子 (pCMV-Luc) の発現効果を示した (Fig. 18)。また、この細胞内導入様式は、Tat ペプチドで知られているように、マクロピノサイトーシスやいくつかのエンドサイトーシスによって導入されておりエネ

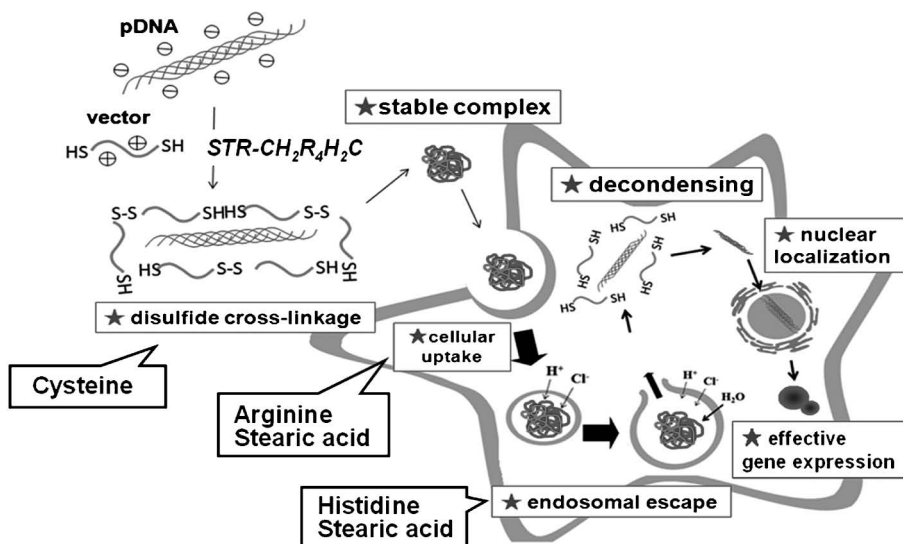


Fig. 17. Cellular Trafficking of Cytoplasm-sensitive Oligo-arginine/histidine Disulfide Complexes

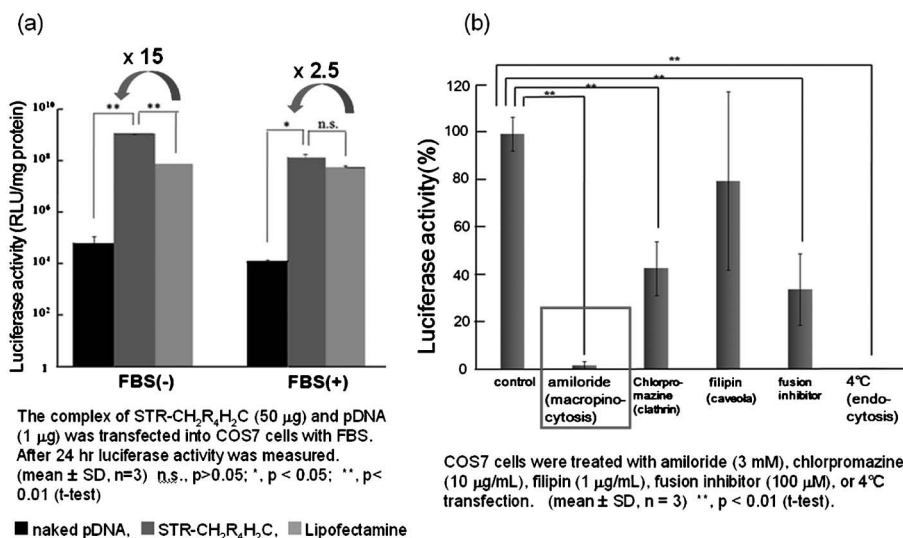


Fig. 18. Transfection Activities of pCMV-Luc in COS7 Cells with STR-CH₂R₄H₂ and Its Mode of Endocytosis

ルギー依存的な取り込みであった。このベクターは、良好な細胞内取り込みを促進した後、siRNAの場合は細胞質でサイレンシング効果を発揮し、pDNAの場合は核への移行及び発現を良好に促進した。また、これらの導入条件での細胞毒性は全くみられなかった。このベクターにさらにNF-κBやSV40由来の核移行シグナル(NLS)の機能性オリゴペプチドを結合するとpDNAの発現がより高まり、DNAワクチンのときに標的細胞になる非分裂性の樹状細胞への遺伝子導入効率を高めることができることを見出ししている。⁴⁴⁾一方、これらの物質の細胞内移動を Fig. 19 に示すが、エンドソームに

取り込まれたままではいずれリソソームと融合し内部の酵素によって分解を受ける。これを避けるため早期にエンドソームを破壊し中から核酸を遊離させることが重要で、STRと弱塩基性のHisがプロトンポンジ効果でエンドソームを破壊し脱出を助ける。また、グルタチオン濃度は、血液では~10 μM、細胞質では~4 mM、核での還元条件は更に高く20 mM相当で、このベクター複合体は、細胞に入る前の組織、血液中ではしっかりとした安定な複合体を形成しているため全身投与での応用も十分期待できると考えている。

このベクターに siVEGF を封入し、S-180 細胞で

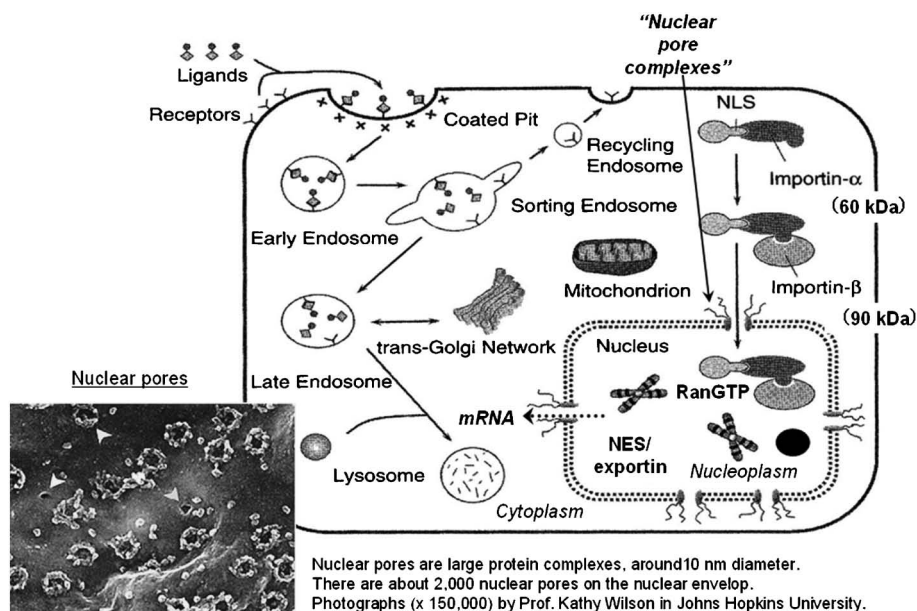


Fig. 19. Cellular Trafficking and Nuclear Transport of Ligands

の高い VEGF 産生の抑制と、低い細胞毒性、及び皮下 S-180 担がんラットでの腫瘍内投与 (siVEGF 5 μ g, 5 日間隔での 3 回投与) によって市販の正電荷リポソーム LipoTrust よりも強力な制がん効果を得ることができた (Fig. 20).^{45,46)}

さらに最近、細胞には細胞膜から核付近に、細胞骨格の微小管をレールとして核へ必須なタンパク質を早急に送達するモータータンパク質 (dynein) が存在することが知られている。そこで、この dynein に親和性を示す機能性ペプチド dynein light chain-association sequences (DLC-AS, Fig. 21) を合成し、これを先の STR-CH₂R₄H₂C に結合して pDNA の発現を測定した結果、発現を高め、発現時間を短縮できることを見出した。⁴⁷⁾

以上のように、遺伝子の pDNA あるいは siRNA を用いて創薬を行う場合には、これら核酸とベクターとの複合体の形成による、安定化、細胞内導入、エンドソームからの脱出、核への移行、核でのベクターからの解離及び mRNA への転写が進むことから、このような細胞内移動 cellular trafficking (Figs. 18 and 19) を十分考慮して設計されなければならない。また、筆者らが開発してきた多くのウイルス、細菌、生細胞などの自然界にある生物の機能性ペプチドを利用した細胞質感受性オリゴペプチドベクターや生理活性添加剤は、極めて安全で pDNA あるいは siRNA の両者の核酸薬に十分応用

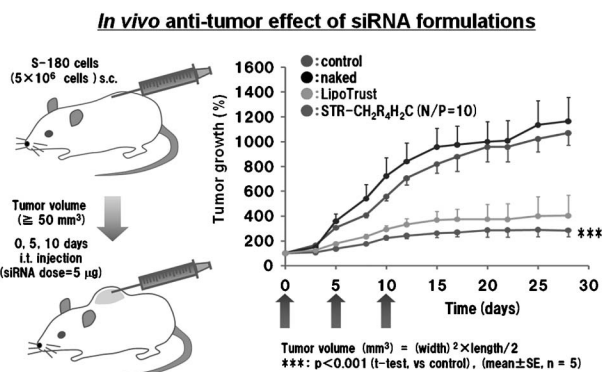


Fig. 20. Anti-tumor Effects after Intratumor Injection of siVEGF/STR-CH₂R₄H₂C Complexes in Mice Bearing S-180 Sarcoma (mean ± S.E., n = 5), ***p < 0.001.

できる素晴らしい DDS 素材であることがわれわれの実験で判明してきた。このようにバイオ素材の製剤設計には特に体内の多くの仕組みを十分に理解する必要があり、今後これらの応用によってより安全で合理的な DDS の構築が進展するものと考えられる。

以上、ペプチド、難溶性薬物、pDNA、siRNA などの製剤設計に関する多くの研究を紹介してきたが、誌面の都合で解説を省略したが、ほかに、リファンピシンの吸入剤の設計による効率のよい抗結核薬の設計、⁴⁸⁾ 脳腫瘍治療薬としての種々の制がん剤の PLGA msp と TGP (thermoreversible gelation polymer) を組み合わせた脳内局所持続性投与製

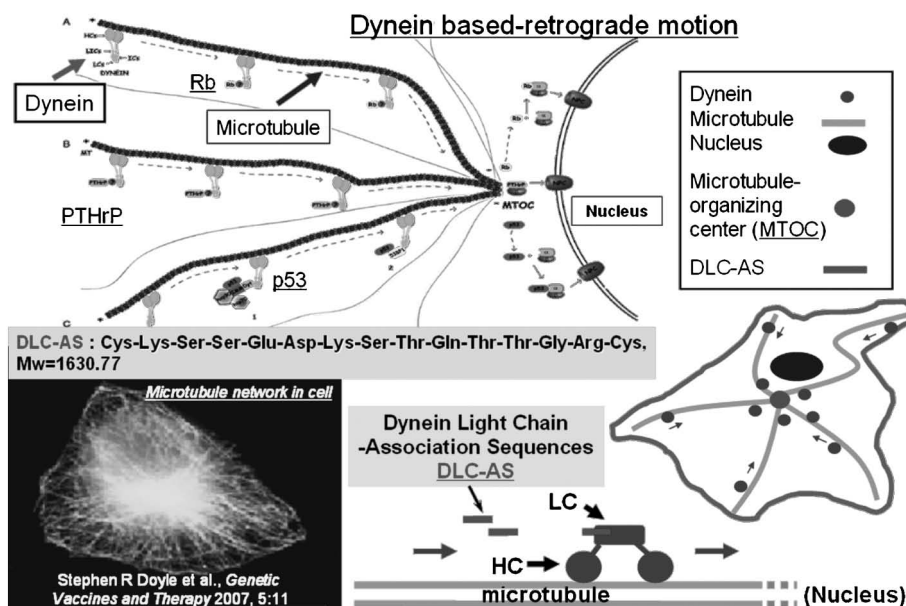


Fig. 21. Dynein Based-retrograde Motion via Microtubule Railway in the Cells and Peptide of Dynein Light Chain-association Sequences

剤,⁴⁹⁾ 高分子ミセルの経鼻投与による鼻粘膜から脳実質への送達と, gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) のリガンドであるボンベシンを結合させた高分子ミセルによる脳腫瘍標的化,⁵⁰⁾ バイオ素材である蚕の絹タンパク質セリシンを用いた線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) の徐放化による骨再生促進⁵¹⁾ などのナノ粒子を用いた研究について, 実用性の高い興味ある実験結果を得ている。

5. あとがき

この 40 年間で携わってきた主にペプチドやオリゴ核酸などのバイオ素材の製剤設計と創薬のための DDS の開発研究は, 1 つのペプチド薬の医学的有用性を顕著に向上させ新薬として世に出すことができた。また, 大学で始めたオリゴ核酸の創薬においては, 極めて早期にこれだけのアプローチができ, 今後の企業における実用化においてなんらかの支援ができたものと期待したい。また新しいバイオ素材として研究が始まったばかりであるが, 体内に 1000 個ほどあるとされる miRNA が, がんの悪性度, 善玉コレステロール HDL-C (high density lipoprotein cholesterol) のホメオスタシスやウイルスの生体内増殖など, 様々な疾患に関与していることが次々に判明し, 新たな創薬ターゲットとして期待されている。siRNA のベンチャー企業 Alnylam 社が米国にいち早く miRNA に特化したベンチャー

企業 Regulus Therapeutics 社を創立した。また, この miRNA は疾患診断のバイオマーカーとしても極めて有力な切り札となることが予想される。筆者はオリゴ核酸のバイオ素材は実に面白く, 今後の創薬素材の切り札として十分期待が持てることを確信している。

筆者は幸いにも, 九州大学で生物薬剤学の基礎と DDS 研究の面白さを教えて頂き, その後, 異なる 2 つの大きな空間において革新的 DDS 開発の研究に没頭できる時間を得ることができた。そして 3 人の偉大な恩師, 井口定男教授, 美間博之博士, 更に Takeru Higuchi 教授に巡り会えたことは人生最大の幸運であった。また, 酢酸リュプロレリンの場合, DDS 技術と薬物の見事なマッチングであり, 私にとっても最大の出会いであった。この研究のおかげで, 遺伝子研究のメッカである米国 Cold Spring Harbor Laboratory での Banbury Center Meeting (New York, 1988), Controlled Release Society 年会 (CRS, Chicago, 1989), Kansas 大学, UCS 大学や Genentech 社など, 多くの招待講演の機会を頂いた。また, 更に日本薬学会技術賞, 恩賜発明賞, 製剤と粒子設計学術賞, 第 1 回 CRS/Nagai Innovation Award, 日本薬学会のタケル・アヤヒグチ記念賞, “製剤の達人” 及び本年 5 月に日本薬学会賞を頂いた。また, 昨年, たいへん光栄にも国際

DDS 学会に相当する CRS より “Fellow of the CRS” の称号が授与された。偏に“幾多の幸運”と、支えて頂いた多くの共同研究者あるいは東京薬科大学でのたいへん優秀で勤勉であった自慢の卒論生及び大学院生の皆さんの努力のおかげだと心から感謝している。

REFERENCES

- 1) Stella V., Haslam J., Yata N., Okada H., Lindenbaum S., Higuchi T., *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1375–1377 (1978).
- 2) Matsuo H., Baba Y., Nair R. M. G., Arimura A., Schally A. V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1334–1339 (1971).
- 3) Fujino M., Fukuda T., Shinagawa S., Kobayashi S., Yamazaki I., Nakayama R., Seely J. H., White W. F., Rippel R. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 406–413 (1974).
- 4) Okada H., Yamazaki I., Yashiki T., Shimamoto T., Mima H., *J. Pharm. Sci.*, **73**, 298–302 (1984).
- 5) Okada H., Sakura Y., Kawaji H., Yashiki T., Mima H., *Cancer Res.*, **43**, 1869–1874 (1983).
- 6) Okada H., *J. Takeda Res. Lab.*, **42**, 150–208 (1983).
- 7) Okada H., “Peptide and Protein Drug Delivery,” ed. by Lee V. H. L., Marcel Dekker, Inc., New York, 1991, pp. 633–666.
- 8) Okada H., Yamazaki I., Sakura Y., Yashiki T., Shimamoto T., Mima H., *J. Pharm. Dyn.*, **6**, 512–522 (1983).
- 9) Okada H., Heya T., Ogawa Y., Shimamoto T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 744–750 (1988).
- 10) Ogawa Y., Yamamoto M., Okada H., Yashiki Y., Shimamoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1095–1103 (1988).
- 11) Okada H., Heya T., Igari Y., Ogawa Y., Toguchi H., Shimamoto T., *Int. J. Pharm.*, **54**, 231–239 (1989).
- 12) Okada H., Heya T., Ogawa Y., Toguchi H., Shimamoto T., *Pharm. Res.*, **8**, 584–587 (1991).
- 13) Okada H., Doken Y., Ogawa Y., Toguchi H., *Pharm. Res.*, **11**, 1143–1147 (1994).
- 14) Okada H., Doken Y., Ogawa Y., Toguchi H., *Pharm. Res.*, **11**, 1199–1203 (1994).
- 15) Toguchi H., Ogawa Y., Okada H., Yamamoto M., *Yakugaku Zasshi*, **111**, 397–409 (1991).
- 16) Okada H., Toguchi H., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **12**, 1–99 (1995).
- 17) Okada H., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 43–70 (1997).
- 18) Ingber D., Fujita T., Kishimoto S., Sudo K., Kanamaru T., Brem H., Folkman J., *Nature*, **348**, 555–557 (1990).
- 19) Okada H., Yanai S., Kuge Y., Saito K., Inoue Y., Kamei S., Toguchi H., “Recent Advances in Management of Digestive Cancers,” ed. by Takahashi T., Springer-Verlag, Tokyo, pp. 732–734 (1993).
- 20) Yanai S., Okada H., Misaki M., Saito K., Kuge Y., Ogawa Y., Toguchi H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1267–1273 (1995).
- 21) Yanai S., Okada H., Saito K., Kuge Y., Misaki M., Ogawa Y., Toguchi H., *Pharm. Res.*, **12**, 653–657 (1995).
- 22) Pardridge W. M., *Endocr. Rev.*, **7**, 314–330 (1986).
- 23) Friden P. M., Walus L. R., Watson P., Dectrow S. R., Kozarich J. W., Backman C., Bergman B., Hoffer B., Bloom F., Granholm A. C., *Science*, **259**, 373–377 (1993).
- 24) Fukuta M., Okada H., Iinuma S., Yanai S., Toguchi H., *Pharm. Res.*, **11**, 1681–1688 (1994).
- 25) Mizoe T., Ozeki T., Okada H., *J. Control. Release*, **122**, 10–15 (2007).
- 26) Takahashi N., Akiyama Y., Ozeki T., Okada H., Fujii M., Takeuchi N., Abstracts of papers, the 128th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Yokohama, March 2008, No. 4, p. 101.
- 27) Nishino Y., Kanazawa T., Takashima Y., Ozeki T., Tanaka T., Fujii M., Okada H., Abstracts of papers, the 54th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, East Branch, Tokyo, October 2010, p. 104.
- 28) Matsumura Y., Kanazawa T., Takashima Y., Okada H., Abstracts of papers, the 130th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Okayama, March 2010, No. 4, p. 187.
- 29) Kanazawa T., Takashima Y., Hirayama S., Okada H., *Int. J. Pharm.*, **360**, 164–170 (2008).
- 30) Kanazawa T., Takashima Y., Shibata Y., Tsuchiya M., Tamura T., Okada H., *J.*

- Pharm. Pharmacol.*, **61**, 1457–1463 (2009).
- 31) Kanazawa T., Takashima Y., Tamura T., Tsuchiya M., Shibata Y., Udagawa H., Okada H., *Int. J. Pharm.*, **396**, 11–16 (2010).
- 32) Jackson A. L., Linsley P. S., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 57–67 (2010).
- 33) Murata N., Takashima Y., Toyoshima K., Yamamoto M., Okada H., *J. Control. Release*, **126**, 246–254 (2008).
- 34) Toyoshima K., Shimizu T., Kanazawa T., Takashima Y., Okada H., Abstracts of papers, 2008 AAPS Annual Meeting and Exposition. Atlanta, November 2008.
- 35) Chen I., Uchida K., Endler A., Shibasaki F., *J. Biol. Chem.*, **282**, 12707–12716 (2007).
- 36) Yokoi Y., Takashima Y., Kanazawa T., Morisaki K., Ohsawa R., Okada H., Abstracts of papers, the 25th Annual Meeting of the Academy of Pharmaceutical Science and Technology, Japan, Tokushima, May 2010, p. 185.
- 37) Uchida T., Kanazawa T., Takashima Y., Okada H., *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 196–201 (2011).
- 38) Gopalakrishnan S., Pandey N., Tamiz A. P., Vere J., Carrasco R., Somerville R., Tripathi A., Ginski M., Paterson B. M., Alkan S. S., *Int. J. Pharm.*, **365**, 121–130 (2009).
- 39) Uchida T., Kanazawa T., Kawai M., Takashima Y., Okada H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, doi: 10.1124/jpet.111.180042 (2011).
- 40) Ikeda H., Kanazawa T., Tamano K., Takashima Y., Okada H., Abstracts of papers, the 26th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System, Osaka, June 2010, p. 294.
- 41) Irie A., Tsuchiya M., Kanazawa T., Tanaka K., Takashima Y., Ibaragi S., Yamashita C., Okada H., Abstracts of papers, the 25th Annual Meeting of the Academy of Pharmaceutical Science and Technology, Japan, Tokushima, May 2010, p. 134.
- 42) Nakase I., Takeuchi T., Tanaka G., Futaki S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 598–607 (2008).
- 43) Ogawa T., Kanazawa T., Suda Y., Takashima Y., Fukuda T., Okada H., Abstracts of papers, the 129th Annual Meeting of the Pharmaceutical Science of Japan, Kyoto, March 2009, No. 4, p. 175.
- 44) Suda Y., Kanazawa T., Hoashi Y., Takashima Y., Fukuda T., Okada H., Abstracts of papers, the 26th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System, Osaka, June 2010, p. 291.
- 45) Tanaka K., Kanazawa T., Ogawa T., Takashima Y., Fukuda T., Okada H., *Int. J. Pharm.*, **398**, 219–224 (2010).
- 46) Tanaka K., Kanazawa T., Ogawa T., Suda Y., Takashima Y., Fukuda T., Okada H., *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 202–207 (2011).
- 47) Tanaka K., Kanazawa T., Sugawara K., Horiuchi S., Takashima Y., Okada H., *Int. J. Pharm.*, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.07.007 (2011).
- 48) Mizoe T., Ozeki T., Okada H., *AAPS PharmSciTech*, **122**, 10–15 (2007).
- 49) Ozeki T., Hashizawa K., Kaneko D., Imai Y., Okada H., *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 1142–1147 (2010).
- 50) Kanazawa T., Taki H., Tanaka K., Takashima Y., Okada H., *Pharm. Res.*, doi: 10.1007/s11095-011-0440-7 (2011).
- 51) Nishida A., Yamada M., Kanazawa T., Takashima Y., Ouchi K., Okada H., *Int. J. Pharm.*, **407**, 44–52 (2011).