

**Development of conjugate of prednisolone with chondroitin sulfate
and its potentiality for the treatment of arthritis**

コンドロイチン硫酸－プレドニゾロン結合体の開発と関節炎治療への可能性
に関する研究

DS108 松山 誠孝 (Matsuyama Mototaka)

論文内容の要旨

現在、臨床で用いられる薬物の中には有効性が高いものの、何らかの副作用のために投与量、投与期間に制限が設けられているものが多く存在している。この原因は、薬物が目的とする組織以外の部位にも分布し作用することによって引き起こされると考えられている。薬物の持つ薬効を最大限に発揮させ、副作用を最小限にするためには、薬物の薬物動態、体内分布をコントロールし、薬物の疾患部位における量的、時間的、空間的な最適化がはかられる必要がある。

本アプローチはドラッグデリバリーシステム (DDS) と呼ばれている。その中で、薬物を疾患部位に集積させようとする試みはターゲティング療法と呼ばれ DDS の中核をなす研究領域であり、現行薬、並びに新薬の更なる薬効拡大、副作用軽減につながり、これまで多くの検討が試みられてきた。

ターゲティング療法には、疾患局所に直接適用する方法や疾患部位の生理学的特徴を利用あるいは標的分子を狙う方法がある。後者については、癌、炎症性疾患などにおいて活発に検討されてきた。とくに、疾患部位の特徴に基づいたターゲティング療法としては、EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect) と呼ばれる現象を利用したものが中心的である。癌、炎症組織の新生血管は、血管の内皮細胞形成が疎であり、正常血管では認められない血液中の血漿成分が漏出しやすい性質をもっている。さらに、通常、漏出成分は近傍のリンパ管から再吸収されるが、これら組織ではリンパ管が未発達なため漏出成分は貯留する状態となる。ターゲティング療法で検討されてきた製剤にはリポソーム製剤、ナノ粒子化製剤、高分子薬物結合体制剤などがある。これまでの

種々の動物モデルでの検討の結果、効率よく薬物を疾患部位に送達させることに成功している。しかしながら、これらのターゲティング型製剤を臨床応用可能とするためには、薬物が放出された後の製剤の組織残存性や製剤への免疫反応性などの問題を解決必要があり、安全性に優れた製剤の開発が求められている。

ステロイド性薬物は、関節リウマチ（RA）を含む炎症性疾患で使用され、臨床においては欠くことのできない有効性の高い薬物である。しかし、本薬物には、易感染症、骨粗鬆症、消化性潰瘍等の様々な副作用のため臨床においては常に注意を払いつつ使用されている。そのような副作用の多くは全身吸収に基づくものであり、炎症部位に集中させ、全身吸収を抑制し薬効を向上することにより、問題解決が図られると考えられる。プレドニゾロン（PD）は、RA はじめ多くの炎症性疾患に使用されている代表的な抗炎症薬であるが、やはりその副作用ゆえに使用が制限されている。本研究では、PD に高分子キャリアーとしてコンドロイチン硫酸（CS）を結合させた新規結合体を作製し、抗リウマチ薬、抗炎症薬の評価に繁用されているラットアジュバント関節炎を用いて薬効と体内動態を調べ、その有用性について評価検討を行った。PD と CS との結合については、エステル結合で薬物を担持するためにリンカーとしてアミノ酸であるグリシンを用いた。通常、エステル結合は生体内のエステラーゼによって速やかに分解されるが、CS を結合させることにより、エステル結合部位に構造的な立体障害が生じエステラーゼからの分解が抑制される可能性が推測された。また、CS は生体内のグルコサミノグルカンの一つで、体内直接投与可能な医薬品として使用されており、広くサプリメントとしても使用され、極めて安全性が高く、キャリアーとして理想的な物質と考えられることから、選択した。

第 1 章では、主として結合体の調製と *in vitro* における性質の検討を行った。すなわち、PD と CS との新規結合体を合成し、各種緩衝液中での PD の放出特性を検討した。また、予備的にラットアジュバント関節炎モデルでの効果も合わせて検討した。

結合体作製は、第一段階としてプレドニゾロンの 21 位の水酸基にグリシンを脱水縮合させ、出来上がったトリチルグリシンプレドニゾロンを酢酸で加水分解し、グリシン-プレドニゾロンエステルを（GP）を合成した。第二段階として、GP にさらにコンドロイチン硫酸をカルボジイミド法にて縮合させてコンドロイチン硫酸グリシルプレドニゾロン結合体（CS-GP）を得た。

さらに、GP 及び CS-GP のプロドラッグとしての機能性を *in vitro* で評価した。pH 4、6、7.4、8 の各種 pH 緩衝液における GP からの PD 放出を調べたところ、pH 上昇に伴い加水分解速度は増し、pH 7.4 では 4 時間で約 80 % の放出が認められた。CS-GP も pH 上昇に伴い加水分解速度は増したが、GP に比較して安定性がよく pH 7.4 では 4 時間で約 30 % の放出が認められ、24 時間以上わたって PD を徐放することが認められた。次に、PBS にラット血漿を添加した系での PD の放出を検討したところ、GP、CS-GP 何れの場合にも前述の緩衝液に比べ PD の放出速度の亢進が認められたが、CS-GP では PD の徐放性が維持された。以上のことから GP、CS-GP は pH に依存した放出挙動を示し、プロドラッグとして機能することが見いだされた。GP、CS-GP の放出挙動は擬一次速度式で解析したところ、pH 上昇に伴い、GP、CS-GP 共に放出速度定数が大きくなることが見出された。

CS-GP の動物モデルでの効果を予備的に把握するため、アジュバント関節炎モデルラットを用いて効果を検討した。アジュバント投与後、16 日目、17 日目の 2 回、CS-GP を (PD 換算量 2 mg/kg) 投与し、足浮腫抑制を指標に評価したところ、対照群と比較し有意な低下が認められた。

第 2 章では、第 1 章の結果を踏まえ、まず、PD 含量の異なる CS-GP を合成し、薬物含有率の違いに基づく PD 放出性について比較検討した。次に CS-GP のラットアジュバント関節炎での有効性を詳細に検討した。また、健常ラットを用いて血中濃度推移、主要臓器分布について検討を行った。第 1 章で記したのと同様の方法で、PD 量の異なる CS-GP を合成するため、CS-GP 作製時の GP 仕込み量を 15 mg, 30 mg, 60 mg と変化させたところ、合成された CS-GP 中の PD 含量もそれに応じて増加した。これら PD 含量が異なる CS-GP の pH 6、7.4 での放出速度は、各々の pH においてはほぼ同様であった。24 時間後の放出率は pH 6 では、9-14 %、pH 7.4 では 46-58 %であった。関節炎を生じた関節腔内の pH は約 6-7 と報告されており、CS-GP が炎症関節に分布した後は、緩やかに PD を放出し続けるプロドラッグになることが予測された。

CS-GP のアジュバント関節炎モデルラットでの有効性を詳細に検討した。関節炎を発症させるため、ラット後肢にアジュバントを皮内投与後、14、15 日目に 2 回薬剤を頸静脈投与し、足浮腫抑制効果を評価した。投与薬剤は、PD (2.5 mg/kg)、CS-GP (2.5 mg PD eq./kg)、CS (60 mg/kg)、CS/PD 混合物 (60 mg/kg、2.5 mg/kg)、対照 (無治療)、PD (5 mg/kg) の 6 群で評価した。その結果、CS-GP

は、有意に足浮腫を抑制したが、他の群では殆ど有意な抑制効果を認めなかった。CS-GP は PD (5mg/kg) よりも足浮腫を抑制する傾向が認められた。また、CS-GP は体重変化にも影響を与えなかった。

健常ラットにおける CS-GP の体内動態を検討したところ、CS-GP は PD と比較して高い血漿中濃度を維持した。一方、CS-GP 投与時の遊離 PD は低く、PD 単独投与時と類似していた。CS-GP は、EPR 効果による炎症部位への集積が期待された。また、CS-GP は主要臓器への蓄積も殆ど認められず、臓器蓄積による副作用は回避される可能性が予測された。










第 3 章では、薬効メカニズムの解析を行うために、アジュバント関節炎モデルラットを用いて、CS-GP、PD の体内動態特性、並びに炎症関節部位への移行性、滞留性について検討した。CS-GP (2.5 mg PD eq./kg) の AUC は PD (2.5mg/kg) 単独投与に比べ著しい高値を示した。一方、CS-GP 投与群の血漿中の遊離 PD 濃度は、PD 投与群と同様に低値を示した。

次に炎症関節への薬物移行を検討した。PD 投与群では、炎症関節濃度は 1 時間値は 1.2-1.7 $\mu\text{g/g}$ と高かったが、24 時間後は 0.12-0.14 $\mu\text{g/g}$ と低い値となった。一方、CS-GP 投与群では 0.55-0.97 $\mu\text{g/g}$ (結合体+遊離：1-24 時間値)、0.06-0.14 $\mu\text{g/g}$ (遊離：1-24 時間値) であった。

血漿中では、見かけの CS-GP の分子量は大きくなる傾向が見られた、血中成分との相互作用し、高い血漿貯留性を引き起こし炎症部位への薬物の偏向を導いたのかもしれないことが推察された。CS-GP による抗炎症作用能の亢進は良好な炎症部位での薬物濃度レベルの持続によることが判明した。

学位授与機関	星薬科大学
氏名（本籍）	<small>マツヤマ モトカ</small> 松山 誠孝 (東京都)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	甲 第174号
学位授与年月日	平成26年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者
学位論文の題名	Development of conjugate of prednisolone with chondroitin sulfate and its potentiality for the treatment of arthritis

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	松山 誠孝												
論文審査担当者	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%; text-align: center;">主 査</td> <td style="width: 15%; text-align: center;">教 授</td> <td style="width: 40%; text-align: center;">大西 啓</td> <td style="width: 30%; text-align: center;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">副 査</td> <td style="text-align: center;">教 授</td> <td style="text-align: center;">高山 幸三</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">副 査</td> <td style="text-align: center;">教 授</td> <td style="text-align: center;">杉山 清</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> </table>	主 査	教 授	大西 啓		副 査	教 授	高山 幸三		副 査	教 授	杉山 清	
主 査	教 授	大西 啓											
副 査	教 授	高山 幸三											
副 査	教 授	杉山 清											
題 目	Development of conjugate of prednisolone with chondroitin sulfate and its potentiality for the treatment of arthritis												
<p>関節リウマチは、慢性および難治性の疾患であることから、先進国では大きな課題となっている。近年、生物学的製剤の登場によって、その治療は飛躍的に進展したが、副作用やコストの問題から、従来型の薬物も未だ重要な位置を占めている。ステロイド性抗炎症薬もそのひとつであり、奏効性が優れていることから汎用されているが、副作用回避の観点から、使用制限がある。その副作用は主として全身性の吸収によることから、薬物を炎症組織に集中させることで副作用回避が期待され、少量で薬効が効果的に発揮できることが考えられる。すなわち、炎症部位へのターゲティング型 DDS の開発が有用と考えられる。関節リウマチのような炎症部位では、新生血管が発達しており、血管透過性の亢進と組織への漏出物の長期的滞留が可能である、いわゆる EPR 効果が知られている。これまでにリポソーム製剤やナノ粒子製剤による薬効改善が報告されているが、臓器分布、免疫応答、薬物担体の残留性等の改善すべき点も知られており、本研究では、安全性が高く、体内直接投与も認められているコンドロイチン硫酸 (CS) を高分子担体を選択し、高分子結合型 DDS の開発に着手した。ステロイド性抗炎症薬としてプレドニゾロン (PD) を選択し、グリシンをリンカーとしてコンドロイチン硫酸-グリシルプレドニゾロン (CS-GP) を DDS として新規に作成した。CS-GP の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> での挙動や薬効を調べることで、有用性について評価を行った。その結果、以下のような有用な知見が得られた。</p> <p>1) CS-GP の調製と薬物放出: PD にトリチルグリシンを反応させエステル体を得た。それを脱トリチル化して PD のグリシンエステル (GP) を得た。GP は、カルボジイミド法で CS に導入された。得られた結合体 CS-GP は、エステル結合で PD を担持して</p>													

いることが確認された。CS-GP は、GP を放出することはなく、pH 依存的に PD 自身を放出する高分子プロドラッグとして機能することが認められた。生理的 pH では 24 時間以上にわたって薬物放出する徐放性プロドラッグとして機能し、中性及び弱酸性下ではさらに緩やかに放出し、数日から 1 週間程度薬物放出することが認められた。CS-GP の徐放性は、エステラーゼが多く含まれるラット血漿を添加した場合においても、維持された。エステル酵素的分解に対し、CS が立体障害となることが考えられた。CS-GP は、体内において徐放性高分子プロドラッグとして機能することが示唆された。

2) CS-GP の薬効評価と健常ラットにおける薬物動態特性： 薬効評価はアジュバント関節炎モデルラットを用いて行った。CS-GP は、PD、CS、PD と CS の混合物に比べ高い薬効を発揮し、対照群に対して唯一有意な効果を示した。また、2 倍用量の PD よりも優れた薬効を示す傾向が示された。健常ラットに静脈内投与した際、高い血中への分布を示し、CS の代謝排泄によると考えられる消失を認めた。24 時間後の主要臓器への分布は低く、臓器への蓄積性は低いことが示された。投与直後の高い血中への局在化から、EPR 効果による炎症部位への分布が考えられた。CS の主要臓器への分布は低く、高い安全性が示唆された。

3) 関節炎モデルラットにおける体内動態と炎症部位への薬物分布： アジュバント関節炎モデルラットを用いて、静脈内投与後の血中濃度、関節部位への薬物分布を総（結合型＋遊離型）PD 濃度と遊離型 PD 濃度について調べた。病態動物でも CS-GP は血中に高く局在化し、遊離の PD 濃度は低く推移した。CS-GP は、PD 単独に比べ関節炎部位への貯留性が極めて高く、長時間にわたって炎症部位に分布することが認められた。同時に、低濃度ではあるが、有効な PD 濃度がほぼ一定に維持されることが見出された。CS-GP の抗炎症作用の亢進は、炎症部位での薬物濃度の良好な持続によることが見出された。さらに、健常ラットでは、CS-GP の関節部位への分布が低下することから、CS-GP は炎症部位への受動的ターゲティング能を有することが示唆された。

以上、本論文は、関節炎症に対するターゲティング型 DDS として CS-GP を新規に調製し、*in vitro*、*in vivo* で検討することによって、有用性につながる有益な知見を得ており、博士（薬学）の学位にふさわしいものである。