

氏名 (生年月日) 内藤 千尋 (1990年12月23日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第189号

学位授与の日付 2020年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 新規ヒアルロン酸製剤を用いた骨粗鬆症治療薬の経皮吸収性の改善ならびにヒト iPS 細胞由来三次元培養皮膚を用いた薬物の経皮吸収性の評価

論文審査委員 (主査) 教授 山本 昌

(副査) 教授 栄田 敏之

(副査) 教授 西口 工司

論文内容の要旨

序章 (はじめに)

現在、薬物投与は主に経口投与が用いられるが、近年の高齢化に伴い、今後嚥下困難及び寝たきりなど服薬困難者の更なる増加が予想される。一方、経皮投与は、投与が簡便であり、投与時の痛みを伴いにくい、肝初回通過効果を回避できる、など多くの利点を有する。さらに、一目で投与の有無を判別できる、容易に投与を中断できるなどの特長は、介護における投薬管理の点からも有用である。したがって、経皮投与は高齢化社会において益々重要視される投与方法と考えられ、加齢による骨粗鬆症の薬物療法などへの応用が期待される。一方、経皮吸収製剤を開発する際には、動物やヒトの皮膚を用いた薬物透過性や毒性評価が必須であるが、現在実施される動物皮膚、三次元培養皮膚、ヒト皮膚を用いた薬物の皮膚透過性及び安全性評価には、倫理面や種差、安定供給などの点で課題が残る。

そこで本研究では、高齢社会に資する新たな経皮吸収製剤と評価系の構築を目指して、骨粗鬆症治療薬を有効かつ簡便に皮膚から投与可能な各種ヒアルロン酸 (HA) 製剤を開発するとともに、経皮吸収評価におけるヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来三次元培養皮膚の有用性を評価した。すなわち、第1章では、ヒアルロン酸 (HA) にリン酸を加えて生じるゲル化を利用した新規ゲルシートにビスホスホネート系骨粗鬆症治療薬アレンドロネート (ALN) を封入し、効率的な ALN の経皮送達を試みた。第2章では、骨形成作用を示す骨粗鬆症治療薬であるヒト副甲状腺ホルモン 1-34 (hPTH₁₋₃₄) に着目し、HA を素材とした微細針に hPTH₁₋₃₄ を封入した溶解型マイクロニードル (hPTH₁₋₃₄ MN) を用いて、hPTH₁₋₃₄ を効率的に経皮送達可能な DDS を開発した。さらに第3章では、ヒト iPS 細胞由来三次元培養皮膚 (iPSC-based skin) を用いて薬物の皮膚透過性及び毒性を系統的に評価した。

第1章 ヒアルロン酸ゲルシートを用いた骨粗鬆症治療薬アレンドロネートの経皮吸収性の改善

HA は、高い粘弾性、水分保持能及び良好な生体適合性を有し、製剤基剤として広く使用されている。これまでに、HA を化学修飾により分子間で結合させた様々な経皮吸収用ゲルシートが報告されているが、このようなゲルシートは、調製が煩雑であり皮膚に対する安全性も懸念される。本章では、HA 水溶液に、多価アルコール及びリン酸を添加後、乾燥させることで経皮送達用新規 HA ゲルシートを作製した。作製過程においては、HA-多価アルコール混合液にリン酸を添加することで、混合液の粘度が顕著に上昇し、加熱乾燥後にゲルシートが形成された。ゲルシートに水を添加するとゲルシ

ートが溶解し乾燥前の高粘度状態に戻ったことから、HA のゲルシート化は非共有結合を介した可逆的な反応であることが示唆された。同時に、この HA ゲルシートはラットに適用しても皮膚刺激性を示さなかった。HA ゲルシートによる ALN のラット及びヒト皮膚透過量は、それぞれ 109, 7.17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、ラット適用後のバイオアベイラビリティは約 20 % であり、治療に十分な高い経皮吸収性を示した。さらに、骨粗鬆症モデルラットにおいて、ALN-HA ゲルシートの適用により骨量減少が顕著に抑制された。以上より、ALN の経皮送達における HA ゲルシートの有用性が示された。

第2章 ヒアルロン酸マイクロニードルを用いた骨粗鬆症治療薬 hPTH1-34 の経皮吸収性の改善

hPTH₁₋₃₄ は高分子薬物であり通常の経皮吸収製剤による皮膚透過が極めて困難であることから、微細な針の集合体である MN を用いた経皮吸収性の改善がいくつか試みられている。しかしながら、米国 Zosano 社が開発したチタン製の hPTH₁₋₃₄ 封入 MN は、その低い吸収率により臨床試験が中断されるなど hPTH₁₋₃₄ の MN 製剤化には課題がある。そこで本章では、hPTH₁₋₃₄ を効率よく安全に皮膚から吸収可能な経皮適用製剤の開発を目指して、HA で構成される微細針に hPTH₁₋₃₄ を封入し、皮膚の水分で針が膨潤・溶解する溶解型 hPTH₁₋₃₄ MN を開発した。MN 中の hPTH₁₋₃₄ は室温で 1 ヶ月間安定であり、溶液状態と比較して安定であることが示された。hPTH₁₋₃₄ MN をラットに適用すると、針は皮膚表面から約 150 μm の深さまで到達した。hPTH₁₋₃₄ MN はラットに適用 30 分後に先端から約 4 分の 3 が溶解し、また 60 分後には完全に溶解した。これらの結果から、作製した MN は角質層を貫通可能な十分な強度を有し、皮膚に適用した後、溶解することが示された。一方、hPTH₁₋₃₄ MN 適用後の血漿中 hPTH₁₋₃₄ 濃度は、皮下注射時とほぼ同等の推移を示した。また、骨粗鬆症モデルラットに hPTH₁₋₃₄ MN を適用したところ、皮下注射時と同等の明瞭な骨量増加が見られた。以上のことから、hPTH₁₋₃₄ の経皮送達による骨粗鬆症治療における hPTH₁₋₃₄ MN の有用性が示された。

第3章 ヒト iPS 細胞由来三次元培養皮膚を用いた薬物の経皮吸収性及び毒性評価系の構築

第2章までにおいて、HA を用いた新しい経皮吸収製剤の開発に成功したが、こうした経皮吸収製剤の開発においては摘出皮膚または培養皮膚を用いた機能性評価が必須であり、ヒトでの皮膚透過性や毒性の予測が可能な新たな評価系の開発が切望される。iPS 細胞は無限増殖能を有することから、ヒト iPS 細胞由来の三次元培養皮膚が作製できればヒト皮膚様の評価用皮膚モデルの安定供給が実現する。また疾患 iPS 細胞由来の三次元培養皮膚を用いれば、皮膚疾患罹患時の経皮吸収や毒性評価も可能になると考えられる。しかしながら、iPS 細胞由来皮膚の作製はこれまでに、皮膚移植の目的で複数報告されているが、iPS 細胞由来皮膚を薬物透過や毒性評価へ活用した報告は見られない。そこで本章では、経皮吸収製剤の開発における新規経皮吸収評価系の構築を目指して、ヒト iPS 細胞から分化した角化細胞を三次元的に培養することで皮膚組織を作製し、薬物の皮膚透過性及び毒性を評価した。作製した iPSC-based skin において、表皮基底層、有棘層及び顆粒層マーカーの発現が確認され、ヒト皮膚類似の積層構造が観察された。また、皮膚バリア機能の指標である経皮水分蒸散量が顕著に低下したことから、作製した iPSC-based skin は吸収評価が可能な皮膚バリア機能を有することが示唆された。iPSC-based skin を用いた透過実験では、薬物透過初期のラグタイム及び薬物の物性に応じた皮膚透過が見られ、この傾向はラット皮膚や既存の三次元培養皮膚と同様であった。一方、iPSC-based skin で判定した被験物質の刺激性は、OECD テストガイドライン (国際的に化学物質の安全性評価に使用される試験法) の結果とほぼ一致した。従って、作製した iPSC-based skin は、薬物の皮膚透過性及び毒性の評価系として有望であることが示された。

結論

本研究では、ALN 及び hPTH₁₋₃₄ を効率的に経皮送達可能な HA 製剤を開発し、骨粗鬆症治療における有用性を明らかにした。さらに、iPSC-based skin を用いた薬物の吸収性及び毒性評価の結果から、iPSC-based skin は経皮吸収製剤を開発する上で、経皮吸収評価用皮膚モデルとして有望であることを示した。本研究で得られた知見は、骨粗鬆症治療を目的とした経皮吸収製剤の開発と iPSC-based skin を用いた経皮吸収評価系の構築に対して有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

審査の結果の要旨

緒言

現在、薬物投与は主に経口投与が用いられるが、近年の高齢化に伴い、今後嚥下困難及び寝たきりなど服薬困難者の更なる増加が予想される。一方、経皮投与は、投与が簡便であり肝臓での初回通過効果を回避できるなど経口投与に比べて多くの利点を有する。したがって、経皮投与は高齢化社会において益々重要視される投与方法と考えられ、加齢による骨粗鬆症の薬物療法などへの応用が期待される。しかしながら、水溶性の高い薬物や高分子薬物の経皮吸収性は低く、何らかの経皮吸収性の改善が必要になる。そこで本研究では、高齢社会に資する新たな経皮吸収製剤の開発を目指して、骨粗鬆症治療薬を有効かつ簡便に皮膚から投与可能な各種ヒアルロン酸 (HA) 製剤を開発し、骨粗鬆症治療薬の経皮吸収性の改善を試みた。一方、一般に、げっ歯類の皮膚は人に比べて透過性が高く、臨床応用するためにはヒト皮膚での評価が重要である。しかし、ヒト皮膚の入手は困難であり、薬物の経皮吸収性の新たな評価系が求められている。そこで本論文後半では、ヒト iPS 細胞から分化した角化細胞を三次元的に培養することで皮膚組織を作製し、薬物の皮膚透過性を評価した。

審査結果の要旨

第1章 ヒアルロン酸ゲルシートを用いた骨粗鬆症治療薬アレンドロネートの経皮吸収性の改善

本章では、HA 水溶液に、多価アルコール及びリン酸を添加後、乾燥させることで経皮送達用新規 HA ゲルシートを作製した。HA ゲルシートによる ALN のラット及びヒト皮膚透過量は、それぞれ 109, 7.17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、ラット適用後のバイオアベイラビリティは約 20% であり、治療に十分な高い経皮吸収性を示した。さらに、骨粗鬆症モデルラットにおいて、ALN-HA ゲルシートの適用により骨量減少が顕著に抑制された。以上のことから、ALN の経皮送達における HA ゲルシートの有用性が示された。

第2章 ヒアルロン酸マイクロニードルを用いた骨粗鬆症治療薬 hPTH₁₋₃₄ テリパラチドの経皮吸収性の改善

本章では、hPTH₁₋₃₄ を効率よく安全に皮膚から吸収可能な経皮適用製剤の開発を目指して、HA で構成される微細針に hPTH₁₋₃₄ を封入し、溶解型 hPTH₁₋₃₄ MN を開発した。hPTH₁₋₃₄ MN はラットに適用 30 分後に先端から約 4 分の 3 が溶解し、また 60 分後には完全に溶解した。この結果から、作製した MN は皮膚に適用した後、速やかに溶解することが示された。一方、hPTH₁₋₃₄ MN 適用後の血漿中 hPTH₁₋₃₄ 濃度は、皮下注射時とほぼ同等の推移を示した。また、骨粗鬆症モデルラットに hPTH₁₋₃₄ MN を適用したところ、皮下注射時と同等の明瞭な骨量増加が見られた。従って、hPTH₁₋₃₄ の経皮送達による骨粗鬆症治療における hPTH₁₋₃₄ MN の有用性が示された。

第3章 ヒト iPS 細胞由来三次元培養皮膚を用いた薬物の経皮吸収性及び毒性評価系の構築

本章では、ヒト iPS 細胞から分化した角化細胞を三次元的に培養することで皮膚組織を作製し、薬物の皮膚透過性を評価した。作製した iPS 細胞由来皮膚において、表皮基底層、有棘層及び顆粒層マーカーの発現が確認され、また、皮膚バリア機能の指標である経皮水分蒸散量が顕著に低下したことから、作製した iPS 細胞由来皮膚は吸収評価が可能な皮膚バリア機能を有することが示唆された。iPS 細胞由来皮膚を用いた透過実験では、薬物透過初期のラグタイム及び薬物の物性に応じた皮膚透過が見られた。従って、作製した iPS 細胞由来皮膚は、薬物の吸収性の評価系として有望であることが示された。

結論

本研究で得られた知見は、骨粗鬆症治療を目的とした経皮吸収剤の開発と iPS 細胞由来皮膚を用いた経皮吸収評価系の構築に対して有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。