

氏 名 (生年月日) なか や ゆ か
 中 矢 有 華 (1986 年 7 月 10 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 第 164 号

学位授与の日付 2017 年 3 月 18 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 *N*-アシルアミノ酸塩及び*N*-アシルタウリン塩による骨粗鬆症治療薬
 アレンドロネートの消化管吸収性の改善及び吸収促進機構の解明

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 山 本 昌
 (副査) 教 授 西 口 工 司
 (副査) 教 授 中 田 徹 男

論 文 内 容 の 要 旨

骨粗鬆症は加齢に伴い骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、相対的に骨吸収が優位となることから、骨折リスクが増大した状態である。わが国においては、人口の急速な老化に伴い骨粗鬆症の患者数が年々増加しつつあり、最も治療が望まれる疾患のうちの一つである。

現在、骨粗鬆症治療薬として様々な薬物が使用されているが、中でも bisphosphonates (BPs) は骨粗鬆症治療薬の第一選択薬として汎用されている。しかしながら、BPs の消化管吸収は非常に低く、バイオアベイラビリティ (BA) は 1~2% であり、また同時投与される薬剤や食物などによってさらに BA は低減される。一方、BPs の経口投与は上部消化管粘膜障害を惹起し、消化器症状を引き起こすことが知られている。このような背景から、BPs の消化管吸収を改善し、なおかつ粘膜傷害性を軽減した投与形態の開発が強く望まれている。

そこで本研究では、新規吸収促進剤である *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩に着目した。また、モデル薬物として典型的な BPs の一種で臨床において汎用されているアレンドロネート (ALN) を選択し、これら吸収促進剤による ALN の消化管吸収改善を試みた。さらに、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構の解明を試みた。

第 1 章 ALN の消化管吸収に及ぼす *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の影響

N-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩には結合する脂肪酸により様々な性質の異なるタイプが存在する。本研究では *in situ* closed loop 法を用いて、ALN の消化管吸収性に及ぼすこれら吸収促進剤の影響を検討した。その結果、いずれの吸収促進剤も ALN の消化管吸収性を増大させ、中でも *N*-アシルアミノ酸塩の一種である sodium palmitoyl sarcosinate (PN) は ALN の吸収を 14 倍に、*N*-アシルタウリン塩の一種である sodium methyl cocoyl taurate (CMT) は 7.7 倍に増大させることが認められた。

しかしこの顕著な吸収促進効果が、粘膜障害性によるものでないことを確認する必要がある。そこで小腸における各種吸収促進剤の粘膜障害性を、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性値及びタンパク質放出量を指標として評価した。その結果、1% sodium myristoyl sarcosinate (MN) を除く吸収促進剤併用時の LDH 活性値及びタンパク質放出量は control 群に比べ有意な差は認められなかったのに対し、3% TritonX-100 投与群を positive control として用いた場合に有意な差が認められた。

したがって、これら吸収促進剤は比較的安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。

一方、連続的で不可逆的な吸収促進剤の作用は副作用を引き起こすため、吸収促進剤の可逆性も安全性を評価する重要な要因の一つとなる。そこで高い有効性及び安全性が認められた PN 及び CMT の吸収促進効果における可逆性を *in situ* closed loop 法を用いて検討した。その結果、PN 及び CMT の吸収促進効果は可逆的であることが示唆された。

以上のことから、*N*-アシルアミノ酸塩及び*N*-アシルタウリン塩は ALN の消化管吸収を改善できる有効かつ安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。

第2章 *N*-アシルアミノ酸塩及び*N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構の解明

第1章で*N*-アシルアミノ酸塩及び*N*-アシルタウリン塩の有効性と安全性が明らかとなったが、吸収促進機構については未だ不明な点が多い。一般に、消化管における薬物の吸収経路としては細胞内経路 (transcellular route) ならびに細胞間経路 (paracellular route) が知られている。本研究では高い吸収促進効果及び安全性が認められた PN 及び CMT を選択し、まず細胞内経路を介した薬物透過性増大作用の寄与を評価するため、蛍光偏光解消法を用いた膜流動性の変化について検討を行った。その結果、PN 及び CMT は脂質膜内部、脂質膜外部及び膜タンパク質の流動性を増大させることが示唆された。このことから、PN 及び CMT の吸収促進機構には一部、細胞内経路を介する薬物透過性増大作用が寄与している可能性が示唆された。

さらに細胞間経路を介した薬物透過性増大作用の寄与を検討するため、細胞間経路を介して透過することが知られている 5(6)-carboxyfluorescein (CF) をモデル薬物に選択し、Caco-2 細胞単層膜を用いた薬物透過実験ならびに膜抵抗値測定実験を行った。その結果、PN 及び CMT 併用により、膜抵抗値は濃度依存的に低下することが認められた。さらに、CF の見かけの透過係数は濃度依存的に増大することが明らかとなった。以上の結果より、PN 及び CMT の吸収促進機構には、一部 tight junction の開口による細胞間経路を介した薬物透過性増大作用が寄与している可能性が示唆された。

Tight junction の形成は tight junction 構成タンパク質が重要な役割を果たしており、その中でも claudin family の発現により細胞間隙の物質の透過が制御されているとの報告がある。そこで claudin-1 及び claudin-4 の発現量に及ぼす PN 及び CMT の影響について Western blot 法を用いて検討した。その結果、PN を投与した際の claudin-4 発現量は顕著に減少したが、この現象は可逆的であることが示唆された。一方、CMT は claudin-1 及び claudin-4 いずれの発現量にも影響を与えなかった。

本研究により、*N*-アシルアミノ酸塩及び*N*-アシルタウリン塩は、難吸収性薬物である ALN の消化管吸収性を顕著に増大する安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。中でも PN は ALN の吸収を 14 倍、CMT は 7.7 倍に増大させる優れた吸収促進剤であることが認められた。また吸収促進効果は可逆的であり、連続的で不可逆的な作用による毒性を生じないことが示唆された。さらに*N*-アシルアミノ酸塩及び*N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構は、脂質膜内部、脂質膜外部及び膜タンパク質の膜流動性を増大させることによる細胞内経路を介する薬物透過性増大作用が一部寄与している可能性が示唆された。さらに tight junction 開口による細胞間経路を介した薬物透過性増大作用も一部寄与している可能性が示唆された。

本研究は BPs の消化管吸収を改善し、粘膜傷害性を軽減した投与形態を開発していく上で有益な基礎的情報を提供するものと思われる。

審査の結果の要旨

現在、骨粗鬆症治療薬として様々な薬物が使用されているが、中でも bisphosphonates (BPs) は骨粗鬆症治療薬の第一選択薬として汎用されている。しかしながら、BPs の消化管吸収はきわめて低く、バイオアベイラビリティ (BA) は 1 ~ 2 % であり、また同時投与される薬物や食物などによってさらに BA は低下することが知られている。一方、BPs の経口投与は上部消化管粘膜障害を惹起し、消化器症状を引き起こすことが知られている。したがって、BPs の消化管吸収を改善し、なおかつ粘膜傷害性を軽減した投与形態の開発が強く望まれている。そこで本研究では、モデル薬物として典型的な BPs の一種で臨床において汎用されているアレンドロネート (ALN) を選択し、新規吸収促進剤である *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩を用いて ALN の消化管吸収改善を試みた。さらに、*N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構の解明についても検討した。

まず、ラット *in situ* closed loop 法を用いて、ALN の消化管吸収性に及ぼすこれら吸収促進剤の影響を検討した。その結果、ALN の消化管吸収性は、これら *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の併用により増大した。中でも *N*-アシルアミノ酸塩の一種である sodium palmitoyl sarcosinate (PN) 及び *N*-アシルタウリン塩の一種である sodium cocoyl methyl taurate (CMT) は、ALN の吸収をそれぞれ 14 倍、7.7 倍に増大させることが明らかとなった。また、これら吸収促進剤併用時の乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase、LDH) 活性値及びタンパク質放出量は control 群に比べ有意な差は認められなかったことから、これら吸収促進剤は比較的安全性の高い吸収促進剤であることが明らかとなった。

次に *N*-アシルアミノ酸塩及び *N*-アシルタウリン塩の吸収促進機構について検討した。まず細胞内経路を介した薬物透過性増大作用の寄与を評価するため、蛍光偏光解消法を用いたラット小腸刷子縁膜の流動性の変化について検討を行った。その結果、PN 及び CMT は脂質膜内部、脂質膜外部及び膜タンパク質の流動性を増大させることが示唆された。このことから、PN 及び CMT の吸収促進機構には一部、細胞内経路を介する薬物透過性増大作用が寄与している可能性が示唆された。

一方、膜抵抗値は、PN 及び CMT 併用により濃度依存的に低下し、5(6)-carboxyfluorescein (CF) の見かけの透過係数は濃度依存的に増大することが明らかとなった。以上の結果より、PN 及び CMT の吸収促進機構には、一部 tight junction の開口による細胞間経路を介した薬物透過性増大作用が寄与している可能性が示唆された。さらに、tight junction 構成タンパク質の一種であり、消化管の tight junction の開口に重要な役割を果たしている claudin-1 及び claudin-4 の発現量に及ぼす PN 及び CMT の影響について Western blot 法を用いて検討した。その結果、CMT は claudin-1 及び claudin-4 のいずれの発現量にも影響を与えなかったが、PN を投与した際の claudin-4 の発現量は顕著に減少し、この現象は可逆的であることが示唆された。

以上、本研究は BPs の有効かつ安全性の高い経口投与製剤を開発していく上で有益な基礎的情報を提供するものと思われる。

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。