

骨指向性薬物の創製と骨・関節疾患治療への応用

高橋達雄

Improved Therapeutic Efficacy in Bone and Joint Disorders by Targeted Drug Delivery to Bone

Tatsuo Takahashi

Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University;
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan.

(Received June 16, 2016)

Site-specific drug delivery to bone is considered achievable using acidic amino acid (L-Asp or L-Glu) homopeptides known as acidic oligopeptides. We found that fluorescence-labeled acidic oligopeptides containing six or more residues bound strongly to hydroxyapatite, which is a major component of bone, and were selectively delivered to and retained in bone after systemic administration. We explored the applicability of this result for drug delivery by conjugation of estradiol and levofloxacin with an L-Asp hexapeptide. We also similarly tagged enzymes (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, β -glucuronidase, and *N*-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase) and decoy receptors (endogenous secretory receptor for advanced glycation end products and etanercept) to assess whether these would improve therapeutic efficacy. The L-Asp hexapeptide-tagged drugs, including enzymes and decoy receptors, were efficiently delivered to bone in comparison with the untagged drugs. An *in vivo* experiment confirmed the efficacy of L-Asp hexapeptide-tagged drugs on bone and joint disorders, although there was some loss of bioactivity of estradiol and levofloxacin *in vitro*, suggesting that the acidic hexapeptide was partly removed by hydrolysis in the body after delivery to bone. It was expected that the ester linkage to the hexapeptide would be susceptible to hydrolysis *in situ*, releasing the drug from the acidic oligopeptide. These results support the usefulness of acidic oligopeptides as bone-targeting carriers for therapeutic agents. We present some pharmacokinetic and pharmacological properties of the L-Asp hexapeptide-tagged drugs.

Key words—bone; joint; drug delivery system; acidic oligopeptide

1. はじめに

種々の骨疾患に対する薬物療法を行う上で、薬物の骨組織への移行性を高めることは、優れた治療効果を得るために必要不可欠である。しかし、一般的に骨組織へ薬物を送達し、そこへ薬物を留めておくことは困難だと言われている。このことは、骨組織における循環血液量の少なさに起因すると考えられている。

薬物送達システム (drug delivery system; DDS) とは、薬物を適量、適時に、適所へ到達せしめ、それ以外の部位への分布を抑えるように工夫したものであり、安全でかつ優れた治療効果を得ることを目的としている。中でも、薬物に生体内で特定の標的

に向かう性質を与え、選択的な分布や薬理作用を達成する試みを標的指向化 (ターゲティング) という。

宮本らは、酸性アミノ酸 (アスパラギン酸及びグルタミン酸) のホモペプチドである酸性オリゴペプチドを用いることによって、薬物の骨ターゲティングが可能であると提唱した。これは、骨中の非コラーゲン性タンパク質が酸性アミノ酸の連続配列を有しており、^{1,2)} この独特の構造が骨中の無機成分であるハイドロキシアパタイトに対して高い親和性を示すという化学的・物理的性質に基づいている (Table 1)。実際に、アスパラギン酸のヘキサペプチド (D₆) を蛍光標識し、マウスの静脈内に投与すると、ハイドロキシアパタイトを豊富に含む骨組織の石灰化部表面への吸着が観察された (Fig. 1)。さらに、アスパラギン酸のヘキサペプチドは1週間以上にわたり石灰化部表面に蓄積した。これは、酸性アミノ酸6つ以上からなる酸性オリゴペプチドが薬物の骨輸送キャリアーとして機能することを示唆

北陸大学薬学部医療薬学講座 (〒920-1181 石川県金沢市金川町ホ3番地)

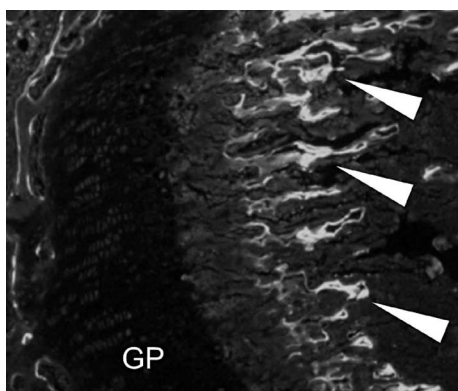
e-mail: t-takahashi@hokuriku-u.ac.jp

本総説は、平成27年度日本薬学会北陸支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Table 1. Binding Parameters of Fmoc-(L-Asp)_n and Fmoc-(L-Glu)_n to HAP

Compounds		K _d (μM)	B _{max} (nmol/h/100 μg HAP)
Fmoc-(L-Asp) _n	n=2	>100	n.d.
	4	12.1 ± 1.3	0.34 ± 0.04
	6	6.0 ± 0.8	1.57 ± 0.16
	8	5.2 ± 0.6	1.61 ± 0.18
	10	2.5 ± 0.2	1.66 ± 0.17
Fmoc-(L-Glu) _n	n=2	>100	n.d.
	4	13.2 ± 1.1	0.42 ± 0.05
	6	6.4 ± 0.7	1.59 ± 0.17
	8	5.2 ± 0.6	1.61 ± 0.13
	10	2.4 ± 0.3	1.66 ± 0.16

Each value represents the mean ± S.E. of three experiments. HAP, hydroxyapatite; K_d, dissociation constant; B_{max}, maximal binding rate; n.d., not determined. Adapted from Ref. 2).

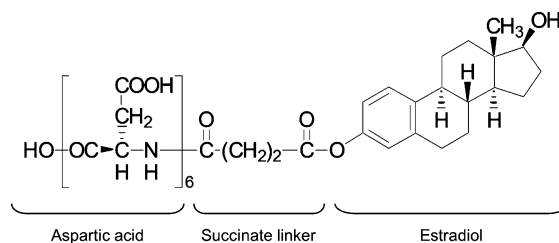
Fig. 1. Bone Distribution of Fluorescein Isothiocyanate-tagged (L-Asp)₆ (FITC-D₆)

FITC-D₆ was injected into mice *via* tail vein at a dose of 1 mg/kg body weight. At 24 h, the femurs were dissected, sectioned, and observed by fluorescent microscopy to evaluate the FITC-D₆ distribution at the metaphyseal region. FITC-D₆ was distributed to the mineralized region (arrow head) but not to the growth plate. GP, growth plate.

する。われわれは、薬物に酸性オリゴペプチドを共役させることで骨指向性を持たせ、種々の骨疾患に対する治療効果を増大させることに成功した。^{3,4)}

2. 骨粗鬆症

骨粗鬆症とは骨量の減少と骨組織の微細構造の劣化を主徴とする全身性の骨疾患であり、骨の脆弱性の亢進と骨折危険率の増大に結びつく疾患と定義されている。閉経後骨粗鬆症は閉経後、数年から十数年かけて起こる急速な骨量減少を特徴とし、閉経に伴う女性ホルモンの急激な分泌低下が主な原因である。

Fig. 2. Structure of Estradiol-3-succinate-D₆ (E₂-3D₆)

エストロゲンは卵巣から分泌される女性ホルモンの総称であり、骨代謝だけでなく、脂質代謝、生殖器、中枢神経など全身的な作用を有することが知られている。エストロゲンは核内受容体であるエストロゲン受容体に結合して作用を発現し、骨代謝においては直接的若しくは間接的に骨芽細胞及び破骨細胞に作用して結果的に骨量を増大させる。このことから、閉経後骨粗鬆症における骨量の減少と骨折リスクの増大を防ぐためにエストロゲン補充療法が行われている。しかし、全身投与されたエストロゲンは骨以外の組織にも分布し、長期間の投与によって子宮内膜炎、乳がん、子宮体がん、子宮内出血などの副作用のリスクが増大する。エストロゲン補充療法の有効性と安全性を向上させるには、エストロゲンを効率的かつ選択的に骨組織へ輸送することが必要だと考えられる。

生体内で分泌されるエストロゲンの中で最も活性の高いものがエストラジオール (E₂) であり、E₂ に骨指向性を持たせるため、E₂ の 3 位にコハク酸エステルを介して D₆ を共役した (E₂-3D₆, Fig. 2).^{5,6)} E₂-3D₆ の骨指向性を確認するため、E₂ 及び E₂-3D₆ をマウスの静脈内に投与して 6 時間後、大腿骨を摘出して骨中薬物濃度を測定した。E₂-3D₆ は E₂ と比較しておよそ 50–100 倍の量が骨中に存在し、驚くべきことに投与した E₂ は投与 1 日後にほとんど骨中から消失したのに対し、E₂-3D₆ は投与後 1 週間かけて徐々に骨中から消失していった。また、骨以外の組織への移行性を比較したところ、E₂-3D₆ は E₂ と比較して子宮を含むほとんどすべての臓器において低い移行性を示した。特に E₂ は子宮への移行性が最も高く、これが子宮における副作用の原因になると思われるが、E₂-3D₆ の子宮への移行性は E₂ よりも明らかに低かった。これらの結果から、E₂-3D₆ は骨へ選択的に移行し、1 週間にわた

り薬理作用を発現するものと考えられる。しかしながら、 E_2 - $3D_6$ のエストロゲン受容体 ($ER\alpha$ 及び $ER\beta$) に対する親和性は E_2 の 1/100 以下であり、さらに E_2 - $3D_6$ の高い親水性と大きな分子サイズのため細胞膜を通過することができないと思われる。つまり E_2 - $3D_6$ が細胞質に存在するエストロゲン受容体に作用するためには、コハク酸エステルの加水分解により E_2 を遊離する必要がある。

E_2 - $3D_6$ の骨粗鬆症に対する治療効果を検討するため、骨粗鬆症モデルとして卵巣を外科的に切除したマウスを作製した。卵巣切除マウスは生体におけるエストロゲンの供給源である卵巣が切除されているため、閉経後骨粗鬆症のモデルとして汎用されている。卵巣を切除して 8 週後、4 週間にわたり E_2 あるいは E_2 - $3D_6$ を背部皮下へ投与した。投与終了後、大腿骨の骨量を測定した結果、 E_2 及び E_2 - $3D_6$ のいずれもが骨量を用量依存的に増加させ、正常なマウスとほぼ同程度にまで増加させた。 E_2 の投与によって子宮重量は増加し、肝臓の肥大化と脂肪変性が認められたが、 E_2 - $3D_6$ の投与ではこれらの変化はほとんど認められなかった。このことから、 E_2 - $3D_6$ は E_2 の投与によって認められる全身性の副作用が軽減され、 E_2 と同様の骨量増加作用を示すことが明らかとなった。 E_2 - $3D_6$ は E_2 と比較して高い親水性と分子サイズの大きさから、骨以外への臓器移行性が低く、 E_2 で認められるような全身性の副作用が軽減されたと考えられる。そして投与直後から骨表面に集積した E_2 - $3D_6$ は徐々に加水分解を受けて E_2 を遊離し、 E_2 は骨関連細胞の細胞質エストロゲン受容体に結合した結果、骨量増加作用を示したと思われる。

このように、酸性オリゴペプチドを共役した E_2 - $3D_6$ は閉経後骨粗鬆症治療薬の候補となり得る。 E_2 - $3D_6$ の骨への選択的な移行と骨における保持時間の長さは投与間隔の延長と投与量の減少を可能とし、全身性副作用の更なる軽減につながることから、 E_2 - $3D_6$ は骨粗鬆症患者の QOL 向上に貢献できるものである。

3. 骨髄炎

骨髄炎とは骨及び骨髓への細菌感染により炎症が起こった病態をいい、整形外科領域において一般的にみられる感染症である。骨髄炎の起炎菌としては黄色ブドウ球菌が多く、小児の血行性骨髄炎におい

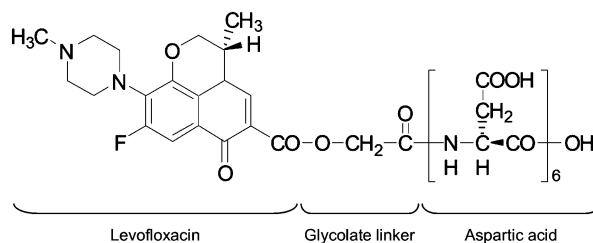


Fig. 3. Structure of Levofloxacin-3-glycolate- D_6 (LVFX- D_6)

ては 60–90% から単離されている。

骨髄炎の治療には主に抗菌薬投与及び壊死組織除去が行われるが、診断が早期になされた場合は抗菌薬のみによる治療が試みられる。抗菌薬による骨髄炎の治療では耐性菌の発現防止及び最適な抗菌作用を得るため、骨において高い抗菌薬濃度を保持しなければならない。抗菌薬の骨への移行性を高めるため、原則、非経口的な投与経路が選択され、速やかに抗菌薬を骨へ移行させるため静脈内投与が用いられる。しかし骨への抗菌薬の移行性の低さと血液循環の少なさから、骨髄炎はしばしば慢性化の経過をたどり、骨の重篤な損傷をまねく。骨で高い抗菌薬濃度を維持するため、抗菌薬の投与量は多量となり、投与期間も 4–6 週と長期にわたる。これは副作用の発現と患者への負担を助長することとなり、これらの問題点を解決するためには骨への選択的な抗菌薬の輸送が骨髄炎の治療において有効であると考えられる。幅広い抗菌スペクトルを持つニューキノロン系抗菌薬の 1 つであるレボフロキサシン (LVFX) の 3 位にグリコール酸エステルを介して D_6 を共役し (LVFX- D_6 , Fig. 3), 骨組織への移行性を高めることによって骨髄炎に対する治療効果の向上を試みた。⁷⁾

LVFX は細菌の II 型トポイソメラーゼを阻害し、DNA の複製を阻害することによって殺菌的に作用する。抗菌活性の指標の 1 つである最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration; MIC) を比較したところ、LVFX- D_6 の黄色ブドウ球菌に対する MIC は LVFX のおよそ 100 倍であった。この理由の 1 つとして、LVFX が作用を発現するには細菌の細胞膜を通過する必要があるが、 D_6 の共役による親水性の増大が LVFX- D_6 の膜透過性を低下させたためと考えられる。もう 1 つの理由として、LVFX の 3 位カルボキシ基は II 型トポイソメラー

ゼへの結合と細胞膜透過に寄与することが知られているため、3位カルボキシ基へD₆を共役したLVFX-D₆の抗菌活性が低下したと考えられる。このことから、LVFX-D₆が抗菌活性を発現するには、グリコール酸エステルの加水分解によるLVFXの遊離が必須のプロセスである。

LVFXあるいはLVFX-D₆をマウスに静脈内投与し、2時間後の骨中薬物濃度を測定したところ、LVFX-D₆はLVFXよりも100倍以上の濃度が検出された。LVFX-D₆は少なくとも投与後1週間にわたり、LVFXよりも100倍以上の濃度で骨中に保持され、さらにLVFX-D₆の投与直後から1週間にわたって骨髄中でLVFXが検出された。これは骨に保持されたLVFX-D₆が骨中で徐々に加水分解を受け、LVFXが遊離したものである。骨以外の臓器移行性をみてみると、投与2時間後、LVFXは中枢神経系を含む多くの臓器に良好な移行性を示したが、LVFX-D₆は腎臓を除いてLVFXよりも低い臓器移行性を示した。LVFXの主要な排泄経路は腎臓であるため、D₆の高い親水性がLVFX-D₆の腎移行性を高めたと考えられるが、LVFX-D₆の腎蓄積は一過性であり、投与4時間後ではLVFXとほぼ同レベルにまで低下した。LVFXの良好な臓器移行性は中枢神経系、循環器系、皮膚、骨格筋、腎臓など多くの臓器における副作用の原因となっているため、LVFX-D₆は腎臓を除く臓器における副作用のリスクが軽減されと考えられる。

骨髄炎に対する治療効果を確認するため、黄色ブドウ球菌をマウスの脛骨へ外科的に播種して骨髄炎モデルマウスを作製した。播種1日後、LVFX又はLVFX-D₆を静脈内に単回投与し、その後、脛骨内の菌数を経時的に測定した。LVFXは一時的に抗菌活性を示したが、投与6日後においては薬物非投与群と同じレベルにまで菌数は増加した。それに対してLVFX-D₆は少なくとも投与後6日間にわたって菌の増殖を抑え続けた。しかしながら、LVFX-D₆は播種した黄色ブドウ球菌の増殖を抑えることはできたが、菌を殺すことはできなかった。LVFXを含むニューキノロン系抗菌薬は濃度依存的な殺菌作用を示すことから、骨においてLVFX-D₆から遊離したLVFX濃度では菌を殺すには不十分であったと思われる。

これらの結果から、酸性オリゴペプチドを抗菌薬

に共役して骨髄炎の治療に用いることは臨床応用可能であると考えられる。本研究ではニューキノロン系抗菌薬を用いたが、骨指向性抗菌薬の骨髄炎に対する治療効果を向上させるには、より抗菌活性の高い抗菌薬を用いることによって可能である。また、LVFX-D₆では速やかな加水分解とそれに続くLVFXの遊離がより強力な抗菌活性の発現に重要であることが明らかとなったことから、骨中で加水分解を受け易い酸性オリゴペプチド共役抗菌薬の創製が必要である。

4. 低ホスファターゼ症

低ホスファターゼ症は組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNSALP) の欠損によって引き起こされ、骨の石灰化障害を特徴とする遺伝疾患である。低ホスファターゼ症患者の臨床症状は主に骨に現れ、骨の石灰化障害に起因するくる病や骨軟化症、四肢の短縮や変形、呼吸不全などがある。骨芽細胞が骨基質を合成し、そこにハイドロキシアパタイトの結晶が沈着することで骨の石灰化が起こる。骨芽細胞の細胞膜に存在するTNSALPは、内因性の石灰化抑制物質であるピロリン酸を分解してリン酸を合成し、これにより局所的にリン酸濃度を高めて石灰化が起こり易い環境を作り出す。TNSALPの活性が不十分であれば、ピロリン酸を分解することができず、ハイドロキシアパタイトの結晶が形成されないため骨の石灰化が起こらなくなる。

低ホスファターゼ症は1つの酵素の欠損によって起こる病気であるため、その治療には酵素補充療法が有効であると考えられる。しかし、過去に実施された低ホスファターゼ症に対する酵素補充療法では満足いく結果が得られなかった。これは静脈内に投与されたTNSALPの大部分が肝臓などの主要臓器に移行し、骨で石灰化を誘導する生理的レベルに達しなかったのが原因の1つであると考えられる。TNSALPに骨指向性を持たせるため、遺伝子工学的手法を用いてTNSALPのC末端にD₆が共役した酵素 (TNSALP-D₆, Fig. 4) を作製し、低ホスファターゼ症に対する酵素補充療法の効果増強を目指した。⁸⁾

TNSALP-D₆はTNSALPと同等の酵素活性を有していた。TNSALPは細胞外でピロリン酸を分解することによって生理作用を発現することから、TNSALP-D₆の薬理作用発現にはD₆部分の除去は

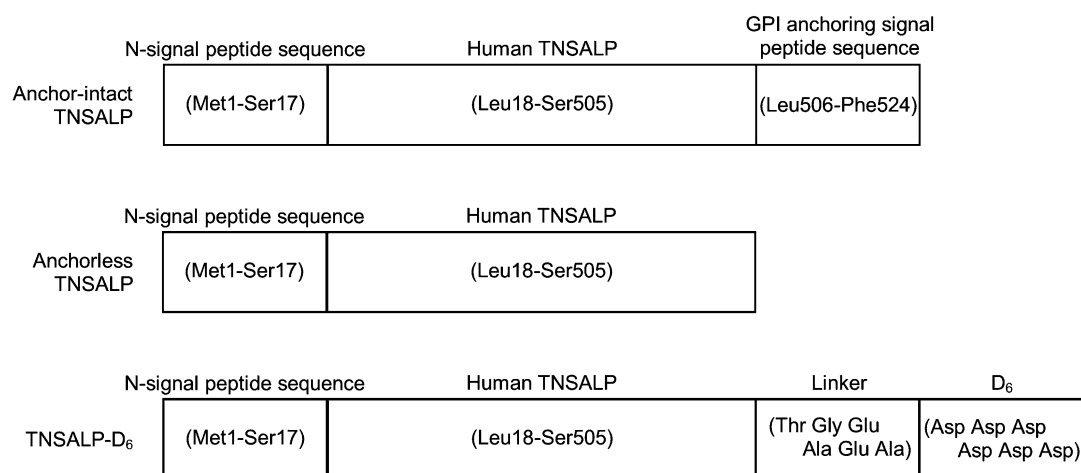


Fig. 4. Schematic Peptide Sequences of Anchor-intact Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNSALP), Anchorless TNSALP, and D₆-tagged TNSALP (TNSALP-D₆)

不要であり、TNSALP-D₆自体が低ホスファターゼ症患者における骨の石灰化を回復させると考えられる。実際に、低ホスファターゼ症患者由来の骨髓細胞培養系においてピロリン酸を加えると石灰化は抑制されたが、TNSALP及びTNSALP-D₆を作用させるとピロリン酸による石灰化抑制が解除された。

TNSALP及びTNSALP-D₆の組織移行性を検討するため、蛍光標識したそれぞれの酵素をマウスの静脈内に投与し、経時的に組織を取り出して組織切片を作製後、蛍光顕微鏡にて観察した。大腿骨における蛍光面積を比較すると、投与6時間後ではTNSALPと比較してTNSALP-D₆はおおよそ4倍であり、その後1週間にわたりTNSALP-D₆の方が2-3倍大きかった。他の臓器(脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓)においては、TNSALPとTNSALP-D₆の間にほとんど違いは認められなかった。

これらの結果から酸性オリゴペプチドを用いた薬物の骨ターゲティングは小分子だけでなく、酵素のような巨大な分子においても可能であることが明らかとなった。その後の研究で、酸性オリゴペプチドを共役したTNSALPが乳幼児の低ホスファターゼ症の患者に投与され、その結果、骨格X線像、呼吸機能及び身体機能の改善が認められたことから、⁹⁾ 酸性オリゴペプチドは低ホスファターゼ症の酵素補充療法に多大な貢献をした。酵素補充療法は低ホスファターゼ症だけでなく、リソソーム病の治療においては確立された治療法である。リソソーム

病の中でゴーシェ病、ファブリー病、ポンペ病、ムコ多糖症(I型、II型、IV型、VI型)に対しては酵素補充療法が臨床で実施されており、主要な臓器においては効果が認められているが、中枢神経と骨の病変に対しては十分な効果を認めていない。われわれは酸性オリゴペプチドがリソソーム病の酵素補充療法に対しても応用可能であると考え、酸性オリゴペプチドを共役した酵素をムコ多糖症IV型及びVII型のモデルマウスに投与し、骨病変が効果的に改善されることを明らかにした。^{10,11)}

5. 関節リウマチ

骨疾患の薬物療法における酸性オリゴペプチドの有用性が認められたことから、更なる試みとしてわれわれは関節疾患に対する酸性オリゴペプチドの効果を明らかにすることとした。代表的な関節疾患の1つである関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)は、持続性の骨膜炎をきたし、骨・軟骨破壊を伴うことを特徴とする自己免疫疾患である。RA患者は関節破壊による関節の変形及び機能的障害を生じるため、QOLの観点からもRAの発症・増悪を防ぐことは重要な課題であると言える。

近年、マクロファージなどから分泌され、種々の炎症性疾患との関連が示唆されているHMGB1がRA患者の滑液中で増加しているのが見い出され、HMGB1がRAの病態進展にも関与していると考えられている。HMGB1は、マクロファージの膜上に発現するその受容体 receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) と結合し、TNF-αなどの炎

	N-signal peptide sequence	Human esRAGE		
esRAGE	(Met1-Gly22)	(Ala23-Met347)		
esRAGE-D ₆	(Met1-Gly22)	(Ala23-Met347)	Linker (Thr Gly Glu Ala Glu Ala)	D ₆ (Asp Asp Asp Asp Asp Asp)

Fig. 5. Schematic Peptide Sequences of Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End Products (esRAGE) and D₆-tagged esRAGE (esRAGE-D₆)

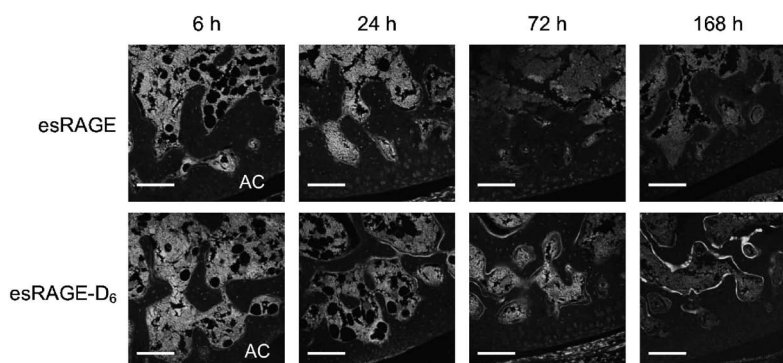


Fig. 6. Bone Distribution of FLuorescence-labeled esRAGE and esRAGE-D₆

Fluorescence-labeled esRAGE or esRAGE-D₆ was intravenously injected into mice at a dose of 1 mg/kg body weight. At the indicated time-points, the femurs were dissected, sectioned, and observed by confocal laser scanning microscope to evaluate the distribution of esRAGE and esRAGE-D₆ at the femoral epiphysis. esRAGE and esRAGE-D₆ were distributed in bone marrow but not in articular cartilage. Only esRAGE-D₆ was additionally distributed and retained in the mineralized region. AC, articular cartilage. Scale bar=100 μm; adapted from Ref. 12).

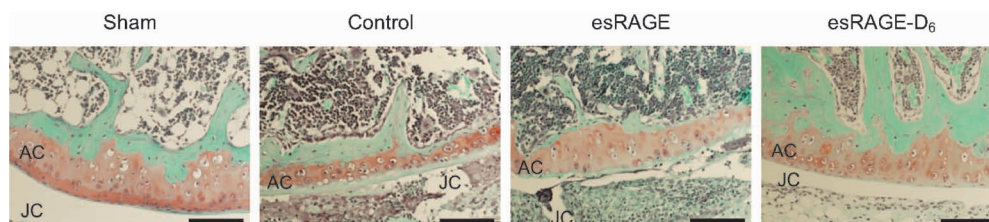


Fig. 7. Improvement of esRAGE-D₆, but not esRAGE, on Histopathological Abnormalities in Knee Joints of Collagen-induced Arthritis Mice

esRAGE or esRAGE-D₆ was once-weekly administered into arthritis mice *via* intraperitoneal injection at a dose of 1 mg/kg body weight. At 3 weeks after first administration of esRAGE or esRAGE-D₆, the legs were dissected and sectioned, followed by Safranin O staining. Treatment of esRAGE-D₆ improved the histopathological abnormalities including depletion of proteoglycan and chondrocytes, and rough surface in articular cartilage, whereas esRAGE did not show significant improvement. AC, articular cartilage; JC, joint cavity. Scale bar=100 μm; adapted from Ref. 12).

症性サイトカイン発現を誘導する。膜貫通領域を持たない可溶性 RAGE (esRAGE) は HMGB1 の「おとり受容体」として機能するため、RA に治療効果を示すと考えられる。われわれは esRAGE の RA に対する生物学的製剤としての応用を最終目標とし、酸性オリゴペプチドによって esRAGE の骨指向性を高め、esRAGE の RA に対する治療効果増強を目指した。

esRAGE の骨指向性を高めるために、esRAGE の C 末端に D₆ を共役した (esRAGE-D₆, Fig. 5).¹²⁾ esRAGE 及び esRAGE-D₆ の骨指向性を明らかにするため、蛍光標識した後、マウスの静脈内に投与した。投与 2, 6, 24, 72, 168 時間後に後肢、肝臓、腎臓を摘出し、組織切片を作製した。その組織切片の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、組織分布を確認した。大腿骨骨端部において、

esRAGE は投与 6 時間後、骨髄への分布が認められたが、72 時間後ではそのほとんどが消失した。esRAGE-D₆ は投与 24 時間後、骨髄への分布が認められ、さらに石灰化部表面への吸着が観察された。また、esRAGE-D₆ は投与 168 時間が経過した後も石灰化部への蓄積が認められた (Fig. 6)。このことから esRAGE-D₆ は、投与後少なくとも 1 週間は骨へ蓄積し、骨において長期間薬理作用を発現するものと考えられた。肝臓及び腎臓においては esRAGE と esRAGE-D₆ の分布に顕著な差は認められなかった。

HMGB1 をマウスマクロファージ (RAW264.7) に作用させると、培養上清中への TNF- α 分泌量が増大し、HMGB1 を作用させてから 6 時間後に最大に達した。esRAGE 及び esRAGE-D₆ は、HMGB1 によって誘導された TNF- α 分泌をいずれも同程度に抑制したことから、esRAGE 及び esRAGE-D₆ は HMGB1 の「おとり受容体」として機能することが確認できた。

esRAGE 及び esRAGE-D₆ の RA に対する治療効果を検討するため、コラーゲン誘発性 RA モデルマウスに esRAGE あるいは esRAGE-D₆ をそれぞれ 1 mg/kg の投与量で週 1 回、3 週間腹腔内投与した。病勢判定は、四肢指趾の発赤・腫脹 (関節炎スコア) 及び後肢膝関節の病理組織切片を観察することにより行った。RA モデルマウスの関節炎スコアは経時的に増加していったが、薬物非投与群と比較して esRAGE 投与群ではわずかに関節炎スコアが減少しただけであったのに対し、esRAGE-D₆ 投与群では顕著な減少が認められた。薬物非投与群の病理組織切片を観察した結果、白血球の浸潤、滑膜の肥厚、関節と骨の破壊が認められ、esRAGE 投与群でも同様の所見が認められた。しかし、esRAGE-D₆ 投与群ではこのような病理像がほとんど認められなかった (Fig. 7)。

esRAGE-D₆ はその高い骨指向性によって少なくとも 1 週間にわたり骨組織で作用を発現し、コラーゲン誘発性 RA モデルマウスにおける滑膜肥厚及び関節・骨破壊を改善した。これは、esRAGE-D₆ によって HMGB1 シグナルを阻害することが RA 治療の選択肢の 1 つになることを立証するものである。

TNF- α が RA の病態の中心的役割を果たしていることから、TNF- α のおとり受容体であるエタネ

ルセプトの臨床における有効性は既に明らかとなっている。われわれはコラーゲン誘発性 RA モデルマウスを用いた検討により、エタネルセプトに酸性オリゴペプチドを共役することで RA に対する治療効果を向上させることに成功している。このように、酸性オリゴペプチドによる薬物の骨ターゲティングは骨疾患だけでなく、関節疾患の治療においても有効であることが明らかとなった。

6. おわりに

上記の研究成果は、酸性オリゴペプチドによる薬物の骨ターゲティングが骨・関節疾患の治療において非常に有効であることを立証するものである。酸性オリゴペプチドとヒドロキシアパタイトとの親和性が高いため、酸性オリゴペプチドによる骨ターゲティングは小分子だけでなくタンパク質のような巨大な分子にも有効である。また、上記の疾患以外にもその他多くの骨・関節疾患に応用が可能であると考えられる。しかしながら同時に酸性オリゴペプチドのヒドロキシアパタイトとの高い親和性は、骨からの薬物遊離を遅らせて十分な薬効を発揮できないことがある。骨からの薬物遊離を考慮したドラッグデザインが重要であり、今後の研究課題である。

謝辞 本研究を遂行する上において、ご指導とご鞭撻を賜りました北陸大学薬学部医療薬学講座教授 古林伸二郎先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行に当たりご指導を賜りました北陸大学薬学部臨床薬学教育センター教授 野村政明先生、金沢大学名誉教授 宮本謙一先生並びにアルフレッド アイデュボン小児病院教授 戸松俊治先生に心より感謝申し上げます。最後に、日本薬学会奨励賞選考委員並びに関係者の先生方に深謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Kasugai S., Fujisawa R., Waki Y., Miyamoto K., Ohya K., *J. Bone Miner. Res.*, **15**, 936–943 (2000).
- 2) Sekido T., Sakura N., Higashi Y., Miya K., Nitta Y., Nomura M., Sawanishi H., Morito K., Masamune Y., Kasugai S., Yokogawa K.,

- Miyamoto K., *J. Drug Target.*, **9**, 111–121 (2001).
- 3) Takahashi-Nishioka T., Yokogawa K., Tomatsu S., Nomura M., Kobayashi S., Miyamoto K., *Curr. Drug Discov. Technol.*, **5**, 39–48 (2008).
- 4) Ishizaki J., Waki Y., Takahashi-Nishioka T., Yokogawa K., Miyamoto K., *J. Bone Miner. Metab.*, **27**, 1–8 (2009).
- 5) Yokogawa K., Miya K., Sekido T., Higashi Y., Nomura M., Fujisawa R., Morito K., Masamune Y., Waki Y., Kasugai S., Miyamoto K., *Endocrinology*, **142**, 1228–1233 (2001).
- 6) Yokogawa K., Toshima K., Yamoto K., Nishioka T., Sakura N., Miyamoto K., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1229–1233 (2006).
- 7) Takahashi T., Yokogawa K., Sakura N., Nomura M., Kobayashi S., Miyamoto K., *Pharm. Res.*, **25**, 2881–2888 (2008).
- 8) Nishioka T., Tomatsu S., Gutierrez M. A., Miyamoto K., Trandafirescu G. G., Lopez P. L., Grubb J. H., Kanai R., Kobayashi H., Yamaguchi S., Gottesman G. S., Cahill R., Noguchi A., Sly W. S., *Mol. Genet. Metab.*, **88**, 244–255 (2006).
- 9) Whyte M. P., Greenberg C. R., Salman N. J., Bober M. B., McAlister W. H., Wenkert D., Van Sickle B. J., Simmons J. H., Edgar T. S., Bauer M. L., Hamdan M. A., Bishop N., Lutz R. E., McGinn M., Craig S., Moore J. N., Taylor J. W., Cleveland R. H., Cranley W. R., Lim R., Thacher T. D., Mayhew J. E., Downs M., Millan J. L., Skrinar A. M., Crine P., Landy H., *N. Engl. J. Med.*, **366**, 904–913 (2012).
- 10) Montañó A. M., Oikawa H., Tomatsu S., Nishioka T., Vogler C., Gutierrez M. A., Oguma T., Tan Y., Grubb J. H., Dung V. C., Ohashi A., Miyamoto K., Orii T., Yoneda Y., Sly W. S., *Mol. Genet. Metab.*, **94**, 178–189 (2008).
- 11) Tomatsu S., Montañó A. M., Dung V. C., Ohashi A., Oikawa H., Oguma T., Orii T., Barrera L., Sly W. S., *Mol. Ther.*, **18**, 1094–1102 (2010).
- 12) Takahashi T., Katsuta S., Tamura Y., Nagase N., Suzuki K., Nomura M., Tomatsu S., Miyamoto K., Kobayashi S., *Mol. Med.*, **19**, 183–194 (2013).