

氏 名	関 戸 徹
生 年 月 日	
本 籍	愛知県
学 位 の 種 類	博士(薬学)
学 位 記 番 号	博甲第442号
学位授与の日付	平成13年9月28日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	酸性オリゴペプチドによるエストラジオールの骨選択的バイオターゲティング法の開発と評価
論文審査委員(主査)	辻 彰(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医病院・教授)
	森本 一洋(北海道薬科大学薬学部・教授)
	玉井 郁巳(薬学部・助教授) 横川 弘一(医病院・助教授)

学 位 論 文 要 旨

Estrogens have proved useful in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. However, prolonged therapy may increase the risk of endometriosis, breast cancer and uterus cancer. Then, a selective drug delivery system to bone is desirable for osteoporosis therapy without adverse reactions. Bone matrix protein have repeating sequences of acidic amino acids (Asp or Glu). It was considered that the repetitive acidic amino acid sequences may be binding sites to the hydroxyapatite component of bone, and attempted to use acidic oligopeptides for drug delivery to the bone. Therefore, in this study, bone-selective bio-targeting of estradiol conjugated with acidic oligopeptide were developed and evaluated.

Acidic oligopeptides [poly (D- or L-Asp or Glu)] of various lengths were synthesized. In the in vitro binding assay to hydroxyapatite, the affinities of these oligopeptides depended only on the number of amino acid residues. In an in vivo experiment involving a single intravenous injection of Asp-oligopeptides into mice, peptides consisting of over six Asp residues were selectively distributed to the bone, and the longer peptides showed higher clearance in plasma and higher concentration in bone. Based on the results, a conjugate of estradiol linked at position 3 and 17 β with L-Asp-hexapeptide (E_2 -3D₆ and E_2 -17 β D₆) were designed.

The affinities of E_2 -3D₆ and E_2 -17 β D₆ for human estrogen receptor (ER α and ER β), were about 100-fold and 10,000-fold less than that of estradiol, respectively.

A pharmacokinetic study of E_2 -3D₆ and E_2 -17 β D₆ after intravenous injection in mice showed selectively distribution in the bone and gradually decreased during 7 days.

Based on the results, E_2 -17 β D₆ was selected for better candidate and examined its anti-osteoporotic effect in ovariectomized (OVX) mice, in comparison with those of estradiol. When E_2 -17 β D₆ (0.11, 0.37, 1.1 μ mol/kg, sc, every seventh day) or estradiol (0.37 μ mol/kg, sc, every

third day) was administered to OVX mice for 4 weeks, estradiol increased the bone mineral density (BMD) together with weights of liver and uterus, whereas E₂-17βD₆ increased only the BMD, in a dose-dependent manner. Estradiol enhanced the *c-fos* mRNA in bone and uterus of OVX mice at 1 hr after administration. E₂-17βD₆ enhanced the *c-fos* mRNA in bone at 1 and 4 hr after administration and bone matrix proteins (type I collagen (α2), osteopontin, bone sialoprotein) mRNA at 4 hr after administration, but estradiol did very slightly.

These results indicate that the prodrug of estradiol conjugated with acidic oligopeptide was delivered to the bone, where it gradually released estradiol, thereby ameliorating bone loss and avoiding the side effects. This E₂-17βD₆ is a good candidate as a drug used for estrogen replacement therapy without the adverse side effects of estradiol.

高齢化社会の進行で、加齢にともなう起こる疾患の予防と治療に関する社会的な要求は高まってきている。骨粗鬆症はその代表的な疾患であり、その大半は閉経後骨粗鬆症である。その予防と治療にはエストロゲン補充療法が理論的にかなっており、基本的な治療法として確立している。しかし、長期間のエストロゲン投与は乳癌、子宮内膜症、子宮癌をはじめとした各種の副作用が問題となっている。

エストロゲンの副作用を回避するには、エストロゲンを骨組織に選択的に分布させることで骨組織での作用を増強させ、他の組織での作用を軽減する、いわゆるドラッグデリバリーシステムの利用が考えられる。骨マトリクスを構成する蛋白 (bone matrix protein) は、その構成にアスパラギン酸 (Asp) やグルタミン酸 (Glu) といった酸性アミノ酸の繰り返し配列が多く見られる。Bone matrix protein はこれらの配列を足がかりにして骨の主要成分である hydroxyapatite と結合しているものと思われることから、エストロゲンにアスパラギン酸またはグルタミン酸を修飾することにより骨への選択的なドラッグデリバリーが可能ではないかと考えた。

本研究においては閉経後骨粗鬆症のエストロゲン補充療法におけるエストラジールの副作用軽減を目的として、酸性オリゴペプチドによるエストラジールの骨選択的バイオターゲティング法の開発と評価をおこなった。

1. 酸性オリゴペプチドの骨選択的ドラッグデリバリーの検討

(L-Asp)_n, (D-Asp)_n, (L-Glu)_n (n=2~10) について hydroxyapatite との in vitro binding assay 及び (D-Asp)_n (n=2~10) 及び (L-Asp)₆ の単回投与後の血漿中及び組織中濃度推移を検討した。

その結果、hydroxyapatite との結合親和性及び結合量には構成アミノ酸の違いによる大きな差を認めなかった。しかし、いずれのオリゴペプチドもペプチド数が増すにつれて hydroxyapatite と結合しやすくなり、特に、ペプチド数が 6 以上で著しく結合親和性が増す傾向が認められた。In vivo における検討においてもペプチド数が 6 以上で骨への分布が認められ、ペプチド数が多くなるほど骨への分布は多くなった。血中からの消失はペプチド数が多いほど速くなった。DL 体の違いの検討では、L-ペプチドの方が血漿中からの消失が速かった。また、D-ペプチドの方が骨への分布性は高いが、骨からの消失が明らかに遅かった。

骨選択的薬物送達のキャリアとしては分布の骨選択性が高いとともに血漿中からの消失が速く、骨組織からも適当な速度で消失するものを選択したいことから、最適なキャリアーは L 体の酸性ペプチドによるペプチド数 6 以上のオリゴマーと考えられた。

2. 酸性オリゴペプチド結合エストラジオールのエストロゲン受容体に対する結合親和性の検討

エストラジオール (E_2) と (L-Asp)₆ のコンジュゲート (E_2 -3D₆ 及び E_2 -17βD₆) を用いて、human estrogen receptor α (ER α) と human estrogen receptor β (ER β) との結合親和性を検討した。

その結果、 E_2 -17βD₆ の結合親和性はエストラジオールの約 10000 分の 1、 E_2 -3D₆ の結合親和性はエストラジオールの約 100 分の 1 であった。従って、 E_2 -17βD₆ 及び E_2 -3D₆ そのものの自体のエストラジオール活性は極めて低いものと考えられた。

3. エストラジオールと(L-Asp)₆ のコンジュゲートのマウスにおける単回投与後の血漿中および組織中濃度

8 週齢の ddY 系雌性マウスにエストラジオール、 E_2 -3D₆ 若しくは E_2 -17βD₆ を 3.7 μmol/kg 静脈内投与し、血漿中及び骨中濃度を経時的に測定した。また、投与後 6 時間に剖検し、各組織内濃度を測定した。

その結果、(L-Asp)₆ コンジュゲート投与群の血漿中濃度は常にエストラジオール投与群より常に高く推移し、AUC_{0-6h} 及び全身クリアランス (CL_{tot}) はエストラジオール投与群と (L-Asp)₆ コンジュゲート投与群の間で 2 倍以上の差が認められた。一方、分布容積 (V_{dss}) は (L-Asp)₆ を結合することによってやや減少し、MRT は (L-Asp)₆ を結合することによって延長した。

投与後 6 時間の (L-Asp)₆ コンジュゲート投与群の大腿骨中エストラジオール濃度はエストラジオール投与群の約 100 倍高かった。また、エストラジオール投与群の骨中エストラジオール濃度は 1 日で生理的水準まで落ちていたが (L-Asp)₆ コンジュゲート投与群は生理的水準まで低下するのに約 7 日間を要した。

組織中濃度は、エストラジオール投与群では測定したすべての組織で血漿中よりも高い傾向を示した。見かけの組織中—血漿中濃度比 (K_{p,app}) は子宮が最も高く、次いで大腿骨が高かった。一方、(L-Asp)₆ コンジュゲート投与群はエストラジオール投与群に比べると大腿骨の K_{p,app} 値は著しく高いものであったが、その他の組織においては、子宮での K_{p,app} 値が若干高いものの、いずれもエストラジオール投与群に比べると小さいものであった。

従って、(L-Asp)₆ コンジュゲートの全身投与後の骨移行性はエストラジオール単独の投与と比較して顕著に増大した。また血漿中濃度が速やかに消失するにもかかわらず、骨中濃度は投与後長時間維持された。

4. 骨粗鬆症モデルマウスにおける酸性オリゴペプチド・エストラジオールコンジュゲートの治療効果

酸性オリゴペプチド (L-Asp)₆ をエストラジオールに結合させることによりエストラジオールは骨特異的に分布して骨以外の組織へは分布しにくくなり、さらにコンジュゲート自体はエストロゲン活

性を示さないことから、子宮等で起こる副作用の軽減が期待された。また骨に長く持続して分布することから、骨に分布したコンジュゲートから遊離したエストラジオールが持続的にエストロゲン活性を示すことで、骨粗鬆症に対して高い治療効果を発揮することが期待された。そこで、エストロゲン受容体への親和性がより低い $E_2-17\beta D_6$ を選び、この骨粗鬆症治療効果を卵巣摘出マウスを用いて検討した。

卵巣摘出マウスに $E_2-17\beta D_6$ を 0.11, 0.37, 1.1 $\mu\text{mol/kg}$, 7 日に一度、4 週間背部皮下に投与した。比較のため、エストラジオールを 0.37 $\mu\text{mol/kg}$, 3 日に一度、4 週間背部皮下に投与した。対照として、卵巣摘出マウス (Control 群) 及び疑似手術マウス (Sham 群) に溶媒 (olive oil) を 3 日に一度、4 週間背部皮下に投与した。投与終了後、大腿骨の Bone mineral density (BMD) 値及びアルカリによって軟組織を除去した骨標本の縦断面を形態学的に観察するとともに、その他の主要臓器に対する影響を検討した。

その結果、Control 群は BMD 値が Sham 群に比べて有意に低値となっていた。エストラジオール投与群の BMD 値は Sham 群と有意な差がなかった。 $E_2-17\beta D_6$ 投与群では投与量依存的な BMD 値の増加が認められ、0.37 $\mu\text{mol/kg}$ 以上の投与群で Sham 群と有意な差がなかった。また、形態学的観察結果においては Control 群において骨梁減少とマトリックス構造の喪失が認められたが、エストラジオール投与群では Sham 群と同程度の回復が認められた。 $E_2-17\beta D_6$ 投与群では投与量依存的な骨梁の増加が認められた。

主要臓器重量において Control 群や Sham 群との間に有意な変化が認められたのは、エストラジオール投与群の肝臓と子宮のみで、 $E_2-17\beta D_6$ 投与群では大きな変化は認められなかった。

5. 卵巣摘出マウスにおける各種遺伝子発現に対する影響

卵巣摘出マウスにエストラジオールと $E_2-17\beta D_6$ をそれぞれ 0.37 $\mu\text{mol/kg}$ 背部皮下投与後、1 時間及び 4 時間での骨と投与後 1 時間での子宮における *c-fos* mRNA の発現量及び投与後 4 時間の骨における bone-matrix proteins (type I collagen ($\alpha 2$), osteopontin, bone sialoprotein) の mRNA の発現量を RT-PCR 法で検討した。

その結果、骨における *c-fos* mRNA の発現は $E_2-17\beta D_6$ 投与群ではエストラジオール投与群に比べて強く、また持続して誘導されていた。子宮における *c-fos* mRNA の発現は $E_2-17\beta D_6$ 投与群では Control 群と比べて変化はみられなかったが、エストラジオール投与群では *c-fos* mRNA の発現が有意に増大した。bone-matrix protein mRNAs の発現量はエストラジオール投与群では Control 群と同程度であったが、 $E_2-17\beta D_6$ 投与群は Control 群に対していずれの mRNA も発現量が増加していた。

以上の結果、骨指向性キャリアーとしての有用性が示された酸性オリゴペプチドをエストラジオールと結合させることで骨への特異的な分布を示し、またそれ自体は活性を持たないプロドラッグを開発することが出来た。エストラジオールは、きわめて脂溶性が高く、全身的に投与した場合骨以外の組織にも容易に移行して、副作用を示すおそれがある。エストラジオールを酸性オリゴペプチドとのコンジュゲートとすると骨以外への移行が少なくなり、しかもコンジュゲート自身はエスト

ラジオール活性を持たないことから、骨以外でのエストラジオールの副作用が回避されると考えられた。一方、骨においては hydroxapatite に強く結合したコンジュゲートから徐々にエストラジオールが放出される結果、骨に対する選択性と作用の持続が期待された。このエストラジオール・酸性オリゴペプチドコンジュゲートを骨粗鬆症モデルマウスに投与した結果、肝臓及び子宮におけるエストラジオールによる変化を伴わずに骨形成作用を示したことから、閉経後骨粗鬆症のエストロゲン補充療法に用いる薬物として有力な候補であることが示唆された。

学位論文審査結果の要旨

閉経後骨粗鬆症の治療にはエストロゲン補充療法が用いられているが、乳癌、子宮内膜症、子宮癌をはじめとした各種の副作用を起こすことが問題となっている。申請者はエストロゲンを骨組織に選択的に分布させることで副作用を回避できると考え、骨マトリックス蛋白のなかの bone sialoprotein や osteopontin のアミノ酸配列に酸性アミノ酸の繰り返し配列が多く存在することに着目し、酸性オリゴペプチドによるエストラジオールの骨選択的バイオターゲティング研究に着手した。

まず、酸性オリゴペプチド (L-Asp) n, (D-Asp) n, (L-Glu) n (n=2~10) の hydroxyapatite (HA) との *in vitro* 結合実験を行ったところ、構成アミノ酸に関係なくペプチド数 6 以上のオリゴペプチドで HA との結合親和性が著しく上昇すること、L-アミノ酸からなるオリゴペプチドは血中からの消失が早いにもかかわらず、高い骨指向性を保持しながら他の組織への分布が極めて少ないことを明らかとした。そこで、エストラジオールと (L-Asp) 6 のコンジュゲート (E2-3D6 及び E2-17βD6) を作成して選択的骨粗鬆症治療薬としての可能性を検討して以下の知見を得た。1) E2-17βD6 と E2-3D6 のヒトエストロゲン受容体 (ER α , ER β) との結合親和性はエストラジオールの約 1/10000~1/100 であった。2) マウス静脈内投与後の各コンジュゲートの分布容積は小さく、骨以外の組織内濃度は著しく低いが、E2-3D6 より E2-17βD6 の方が骨組織選択性が高く、投与後 7 日間程度持続して骨組織に滞留した。3) 卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおいて E2-17βD6 を 1 週間に 1 回の皮下投与で、主要臓器に影響を及ぼすことなく、用量依存的に骨密度を増加させた。4) E2-17βD6 投与群では、子宮における *c-fos* mRNA の発現が見られず、骨における *c-fos* mRNA の発現はエストラジオール投与群に比べて強く、持続的であり、骨マトリックス蛋白 mRNAs 発現も明らかに上昇していた。

以上の結果、エストラジオール・酸性オリゴペプチド結合体は骨選択的ドラッグデリバリーが達成できる、まったく新規なエストラジオールの副作用を著しく軽減したプロドラッグであることを実証した。本研究成果は、今後の骨粗鬆症治療薬の開発研究に多大な影響を与えるものと考えられるため、博士(薬学)論文に値するものと判定された。