

創傷治癒を目的とした創薬・創剤研究

東京理科大学 薬学部
薬学科 教授

はなわ
花輪

たけひさ
剛久

東京理科大学 薬学部
薬学科 講師

かわの
河野

やよい
弥生

長崎大学 医学部 大学院医歯薬学総合研究科 准教授

もり
森

りょういち
亮一

東京理科大学 理学部 応用化学科 教授

とりごえ
鳥越

ひでたか
秀峰

山陽小野田市立山口東京理科大学 薬学部 薬学科 准教授

いよだたくや
伊豫田拓也

はじめに

「創傷」とは、皮膚の皮下組織・粘膜などの開放性または皮膚表面やそれに近いところ（表在）の損傷とされている。米国では年間約6,500万人の国民が何らかの創傷治療を受けたこと¹⁾、日本における創傷被覆材の市場は約390億円であったことなどが報告されており、創傷治療剤の世界的ニーズは高い。また日本では、高齢化社会による褥瘡^{じよくそう}患者の増加に伴い、今後ますます創傷被覆材の市場は拡大するものと考えられる。

より望ましい創傷治癒の一般的な指標としては、「創傷が早く閉鎖すること」および「傷痕が残らないこと」が挙げられる。創傷治癒過程において、これらが達成されるためには、1. 表皮細胞の増殖および移動、2. 線維芽細胞の増殖および移動、3. 細胞外マトリックスの再構築、4. 血管新生、5. 白血球の遊走、6. 瘢痕組織の減少、が重要な要素となる（図1）。

現在、創傷治療には「外科的治療」「被覆材による治療」および「薬物療法」等が知られている。なかでも「被覆材による治療」は、医療現場で汎用されており、ドレッシング剤で創傷部を被覆する方法が一般的である。それゆえに、誰でも容易に扱え、しかも機能的な新規素材からなる創傷被覆材の開発が望まれている。

今般、東京理科大学トランスレーショナルリサーチセンター（TR-C）内で組織された、

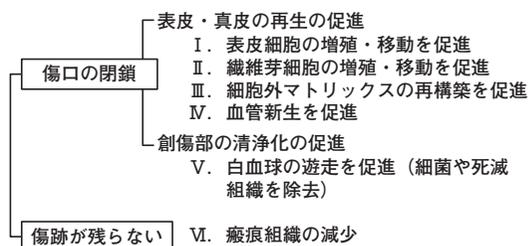


図1 創傷治癒とは

「創傷治癒剤開発グループ」では、創傷治癒を目的とする医薬品および生体適合物質に着目し、それら物質が創傷治癒過程の各ステップにおいて、どのように関わりながら治癒が進行するのかについて、生化学的または製剤学的な見地からの検証を試みた。本グループは、本学理学部の鳥越秀峰教授、長崎大学医学部の森亮一准教授、山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部の伊豫田拓也准教授、そして本学薬学部の河野弥生講師、そして筆者（花輪剛久）により構成された。

本稿では、各種創傷モデルを細胞・動物レベルで作成し、医薬品を適用した際の、生化学的な検証、薬理学的検証ならびにそれら医薬品または生体適合物質を実際の創傷部位に確実に適用するための製剤設計を行った事例を紹介する。

研究内容

(1) 水溶性高分子を用いた

ハイドロゲル製剤の調製と評価

すいえきろう
臍液瘻は、臍臓手術後に高い頻度で発症す

る合併症の一つであり、腭液が持続的もしくは断続的に漏出し、重篤な場合には死に至る場合がある。本研究では、高い生体適合性を持ち、耐酸性・耐塩基性・耐薬品性に優れた合成高分子であるポリビニルアルコール (PVA) のハイドロゲルに着目し、2種類のPVA (Poval[®], Exceval[®]) を用いて、種々の調製方法によりPVAハイドロゲルを調製し、腭液瘻を予防する新規ハイドロゲル製剤の開発を試みた。

凍結融解法で調製したハイドロゲルの物性評価の結果から、濃度および凍結融解回数の増加に伴い、ハイドロゲル内の架橋部分の構造が密となり、膨潤度が低下する一方で、高い強度を有するハイドロゲルを形成することが明らかとなった。

実際に腭液瘻モデルラットを作成して動物実験を行ったところ、3群間での貼付48 hr後の腭酵素値を比較した結果、ハイドロゲル貼付群、ネオベール貼付群、未処置群の順で、腭液瘻予防効果が得られ、未処置群とハイドロゲル群では有意差が認められた。

(2) ヒアルロン酸による創傷治癒効果の 検証と製剤化の検討

生体内におけるヒアルロン酸 (HA) は皮膚・眼球・軟骨に多く存在し、創傷の治癒過程や関節疾患の進行過程において分解により分子量が低下することが報告されている。しかし分子量の違いが生理活性に及ぼす影響については不明な点が多い。そこで本研究では、創傷の治癒過程を早める製剤の開発を行うために、HAの分子量やその濃度が創傷の治癒過程に及ぼす影響について、表皮細胞の細胞増殖と移動に着目し、基礎的な検討を行った。

WST assay と Scratch assay の結果から、分子量が大きく濃度が高いHA含有培地ほどHaCaT細胞の増殖と移動を促進した。本研究で用いた最大分子量のHAは、ヒト成人表皮細胞周囲のHAの分子量に近似しており、

その濃度も既に報告されている0.25%であることから、HAの分子量および濃度が生体内の表皮細胞周囲に近い環境であるほど、細胞の増殖能と移動能が高いと考えられた。さらに動物試験においても、分子量の増加に伴う創傷治癒促進が認められた。以上の結果から、創傷の治癒過程にHAの分子量および濃度が関与することが示唆された。

グレードの異なるプルロニックをマウス皮膚に塗布した際の影響を検討したところ、外観および組織的にも影響ないことが明らかになった。このことから、製剤中にアンチセンスオリゴを導入した際の、細胞・動物レベルでの検証を行い、治癒メカニズムを明らかにするための検討を行っている。

(3) イルソグラジンマレイン酸含有新規創傷 治療用ハイドロゲル製剤の開発

イルソグラジンマレイン酸 (IM) は、*in vitro*において細胞間コミュニケーション活性化作用、胃粘膜血流量低下抑制作用および抗炎症作用等の薬理作用により胃粘膜防御機能を高めることから、粘膜防御性胃炎・胃潰瘍治療剤として市販されている。近年、その薬理作用から創傷治癒効果を有することが確認されているが¹⁾、その有効濃度の検証および製剤化に関する報告はない。

本研究では、まず、IMの皮膚細胞に対する有効性をWST assayにより検証した。ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT細胞) およびヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) にIM含有DMEM培地 (10, 1, 0.1 µg/mL) を添加し、細胞増殖効果を評価したところ、いずれの細胞においても、IMの濃度上昇とともに細胞の生存・増殖率は上昇した。また、Scratch wound assayによる検討では24時間後においてはIM添加による有意な創傷の閉鎖は認められなかったが、48時間後ではIMの添加により創傷の閉鎖が促進される傾向が認められた。IMをハイドロゲルに導入し、ヘアレスマウス (Hos: HR-1系, 雄) の背部に、バイオプシー

パンチを用いて創傷モデルを作成し、IM含有ハイドロゲルの創傷治癒効果を検証した。IM含有ハイドロゲル処置群はコントロール群と比較して、傷の閉鎖が促進され、5日目には有意な差が認められた。

本製剤のコンセプトは従来、粘膜防御性胃炎・胃潰瘍治療剤として医療現場で汎用されてきた医薬品に創傷治癒薬としての薬理作用を見出し、新たな役割を担う、いわゆるドラッグリポジショニングの典型例であり、現在も進行中のテーマである。

(4) miRNA-223発現抑制は

黄色ブドウ球菌感染創を改善する

microRNA (miRNA) は、標的mRNAに作用して蛋白質翻訳抑制に関与する非コードRNAである。

近年我々は、miR-223欠損 (KO) 好中球は、過剰な活性化と相まって、無菌性皮膚創傷治癒を遅延させることを見出した。したがって、病原体排除のために一時的に過度な炎症を必要とする環境では、miR-223 KO好中球は病原体排除に有効であると考えられる。そこで、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 感染モデルを用いて解析を行った。その結果、*S. aureus* 感染miR-223 KOマウスは、膿瘍形成の促進を伴って、皮膚創傷治癒が促進した。また、miR-223標的遺伝子であるinterleukin-6の発現上昇を認めた。次に治療への応用をめざし、細胞移植およびmiR-223アンチセンスオリゴ (AS ODN) およびmiR-223 AS ODNデリバリーシステムの開発を行ったところ、今回我々が新たに開発したP407/P188 binary thermosensitive hydrogelは、従来我々が用いていたPluronic gelより高効率にmiR-223 AS ODNを徐放し、*S. aureus* 感染創を改善する効果を見出した。さらにmiR-223 KO好中球移植は、*S. aureus* 感染創を改善した。次に、ヒト好中球モデル細胞株 (HL-60) を用いてmiR-223発現制御機構の解明を行った。その結果、*S. aureus* を認識した好中球にお

けるmiR-223の発現は、転写因子C/EBP α によって制御されていることが明らかとなった。

今後は、miR-223発現制御に資する化合物同定等を行い、miR-223の人為的制御による慢性皮膚潰瘍などに有効な治療法の開発に繋がりたいと考えている。

おわりに

医薬品の開発は、川の流れに例えられることが多い。上流 (すなわち、基礎研究や創薬研究など) から下流 (製剤化、臨床研究、実際の薬物治療、副作用研究など) への淀みない流れがデスバレーを解消することは誰にでも理解できる。しかし、それをいかに解消するかは実際に多くの研究者たちと連携して初めてその一端を実感することができる。

本稿で紹介した事例は、いずれも創薬、薬理学的、病理学的、そして製剤学的な検証を多施設で実施した事例であり、いずれも実臨床に近づく成果が得られており、現在も進行中である。確かに創傷治癒というテーマは「創傷を治す」という目標が明確であることも共同研究を円滑に進めることができた要因であろう。しかし、TRを単なる共同研究として終わらせないためには最終ゴールが常にエンドユーザーである患者に向いていることを認識することが必要である。このような考え方をシンポジウムなどを通して改めて抱かせてくれる契機を与えてくれた、本学TR-Cのメンバーの方々に感謝するとともに、これまでのTR-Cで培ったノウハウを活かし、今後も精力的に研究開発に取り組んでいきたい。

引用文献

- 1) The Future of the Wound Care Management Market to 2015, Reserch and Markets. October 2009.

