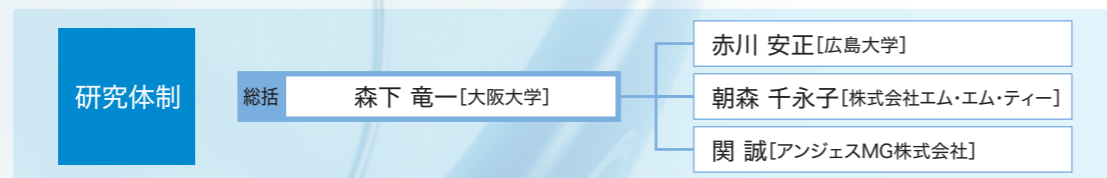


新規高機能付加型医療機器の開発

研究期間 平成17年度～平成21年度(予定)



※平成21年度における研究体制

薬剤付与型次世代人工骨の開発

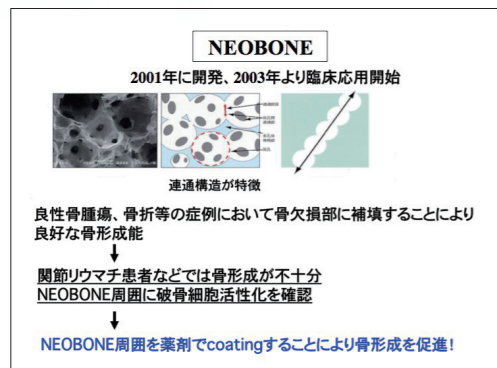
Project KeyWord

| | |
|------------|--|
| 人工骨(ネオボーン) | ハイドロキシアパタイトの人工骨(ネオボーン)は連通構造が特徴です。すでに臨床応用されており、骨腫瘍、骨折等の症例において骨欠損部に補填することにより良好な骨形成能を示している。 |
| 核酸医薬 | デコイ核酸、siRNA、アンチセンス等の核酸医薬品は、標的分子に対して特異性が強いことから、副作用なしに強い薬理作用を有する医薬品となりうる大きな期待を集めている。 |
| NF-κBデコイ | NF-κBデコイ核酸とは、種々の炎症性サイトカインの遺伝子発現を制御する転写因子NF-κBの活性化を抑制するおとり型核酸医薬。 |

1 研究の背景・意義

次世代人工骨は破骨細胞の活性化制御が重要

ネオボーンは臨床で用いられている優れた人工骨であり、連通構造が特徴であり2003年より臨床応用されている。骨腫瘍摘出後あるいは骨折などに生じた骨欠損部に対して、現行医療では他の部位の骨の自己骨移植などの治療法が行われるが、骨再生能力が低下している高齢者では自己骨の代わりにこの人工骨で代用し、補填することによって骨形成能を促進させる。しかし、骨粗鬆症や関節リウマチなどの疾患を有する患者では、骨形成能が低下していることから、このような疾患を有する患者に強い骨を早く作るためのさらなる課題として、埋め込み周囲に認められる破骨細胞の活性化制御が極めて重要であることが分かった。そこで、高齢化社会に向けてニーズの高い骨粗鬆症や関節リウマチの新規高機能付加型医療機器として薬剤流出人工骨の開発を目指す。薬剤としては、二重鎖核酸化合物である転写因子制御剤デコイの高機能化を進め、世界に通用する新規性の高い医療機器の開発を目指す。

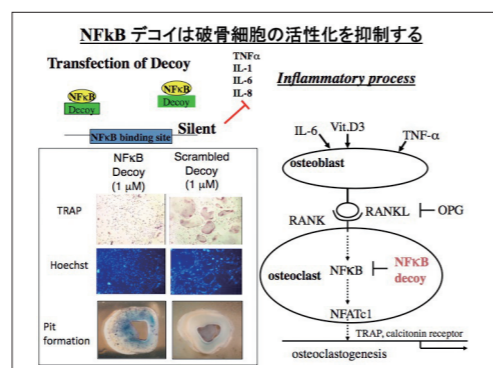


▲ネオボーン周囲に破骨細胞が活性化されている関節リウマチ患者などでは骨形成が不十分である。

2 研究プロジェクトの目標

NF-κBデコイを用いた薬剤流出人工骨

破骨細胞の活性化制御機能を付加した薬剤流出人工骨の開発に向けて、二重鎖核酸化合物である転写因子制御剤デコイを用いた。破骨細胞(osteoclast)は骨芽細胞(osteoblast)表面に発現するRANKL(receptor activator for NF-κB ligand)が破骨細胞に発現するRANK(receptor activator for NF-κB)に結合することによって活性化され、NF-κBの活性化を介して破骨細胞の活性化に重要な因子であるNFATを活性化させることで骨吸収活性を獲得し骨粗鬆症を促進することが分かっている。一方、核酸医薬であるNF-κBデコイは転写因子のNF-κBと結合することにより、活性化したNF-κBの核内へ移行を阻害して遺伝子の転写活性化を抑制する。また、NF-κBは多くの炎症性サイトカインの上流に位置していることから、NF-κBデコイは炎症性サイトカインの発現制御にも有効であることが分かっている。実際に我々の検討において、破骨細胞にNF-κBデコイを導入することにより、その活性化は強力に阻害された。

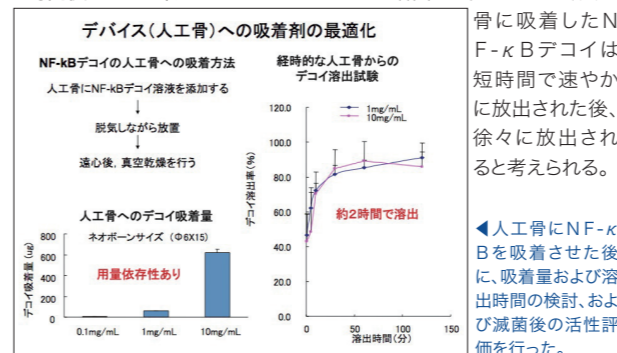


▲NF-κBは破骨細胞の活性化における重要な転写因子であり、この活性化制御にNF-κBデコイが有効である。

3 研究プロジェクトの成果

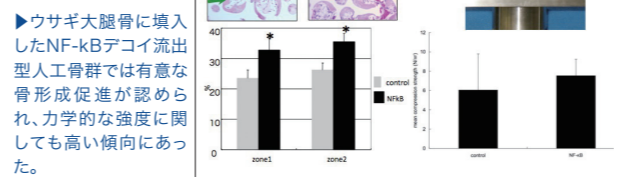
人工骨への薬剤吸着法の確立

人工骨にNF-κBデコイを吸着させた後、溶出試験において人工骨へのNF-κBデコイの吸着量を測定した結果、吸着時におけるNF-κBデコイ濃度に比例し吸着量が増加した。また、人工骨に吸着したNF-κBデコイの溶出速度について検討した結果、溶出開始10分後において約70%、2時間後において約90%のNF-κBデコイが溶出した。したがって、人工骨に吸着したNF-κBデコイは短時間で速やかに放出されると考えられる。



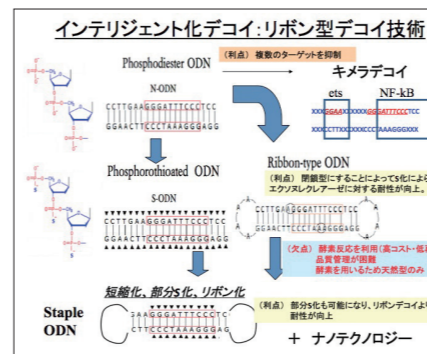
薬剤流出型人工骨の薬効試験

ウサギ大腿骨にNF-κBデコイ吸着人工骨を填入し、ウサギ大腿骨の骨形成率及び圧縮実験において填入後における人工骨の最大強度を評価した結果、NF-κBデコイ吸着人工骨群(NF-κB)は人工骨群(control)と比較して有意な骨形成率の向上を示し、骨形成促進作用が認められた。また、cathepsin K免疫染色での評価においてNF-κBデコイ吸着人工骨群は有意な破骨細胞数の減少を示し、骨吸収抑制作用が認められた。



改良型(インテリジェント)デコイの開発

デコイの安定性の改良として、体内で分解が進みやすい2本鎖の段端を繋ぐことで安定な"リボン型"デコイ、さらに部分S化を加えたStapleデコイの合成に成功した。さらにコスト削減のためより短いデコイの作成にも成功した。また、二つのデコイを組み合わせることで二つの転写因子を同時に



阻害できるキメラデコイの開発も行い、この両者を組み合わせたリボン型キメラデコイの開発を行った。

▲デコイの安定性の改良として、2本鎖の段端を繋ぐ"リボン型"デコイの合成、さらに部分S化を加えたStaple型デコイを開発した。

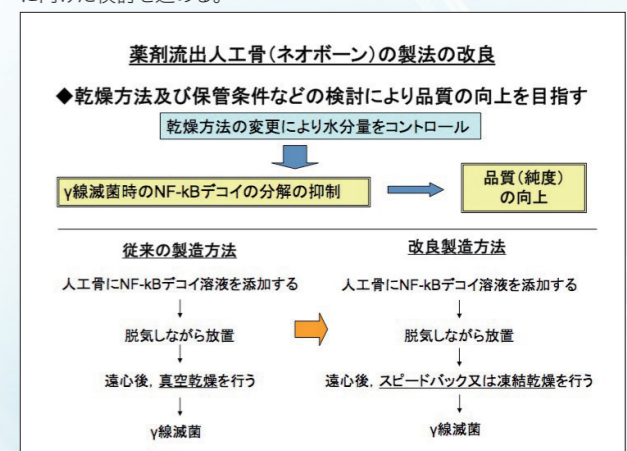
4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

NF-κBデコイ吸着人工骨の製法の確立

実用化に向けて、製品化を念頭においた人工骨(ネオボーン)への薬剤コーティング法の最適化およびデコイを吸着させた人工骨に対する滅菌法を確立、安定性及び医療用具として要求される安全性試験を行い、臨床研究に向けてプロトコルの作成・患者選定などの準備を進める。同時に並行して開発を進めてきたインテリジェント化デコイに関しても薬剤流出人工骨(ネオボーン)の薬効試験・比較試験を行い、最適化されたインテリジェント化デコイ・ナノデコイに関して、薬剤流出人工骨として将来的な治験に向けた開発研究を行う。

安全性試験の一環として行った埋植試験では、NF-κBデコイ吸着ネオボーン群、対照群である通常ネオボーンいずれの群においても、ラットの一般状態の変化および死亡例は認められず忍容性は良好であった。埋植1ヵ月後に採取されたネオボーンはどちらの群においても全例で結合組織の浸潤および癒着が生じており、周辺組織はいずれも顕著な変性像は認められなかった。以上の結果から、デコイ吸着によりネオボーンの生体親和性および安全性が変化する可能性は低いと考えられた。

製品化に向けたさらなる課題として、高効率な滅菌方法の開発が挙げられる。製品化のステップの中でNF-κBデコイを人工骨に吸着させた後に全体を滅菌する必要があるが、吸着操作およびガンマ線照射によって、NF-κBデコイの結合活性能には影響がないことは当プロジェクト中に確認できた。しかし、HPLCを用いて詳細に解析を行ったところ、従来の製法ではNF-κBデコイ自体が滅菌工程で分解してしまうため、滅菌工程の工夫を行った。これまでの滅菌法の検討においてNF-κBデコイは原薬単独でガンマ線滅菌に対して非常に強くほとんど分解されないが、溶液の状態では著しい分解が認められていた。一方、人工骨への吸着ステップでNF-κBデコイ溶液を乾燥する際、乾燥能力の優れたスピードバック又は凍結乾燥の手法を用いることで分解が抑制されたことから、デコイの分解原因が従来の乾燥方法(真空乾燥)のみでは水分が十分除去できていない可能性が判明した。今後、乾燥工程はスピードバック又は凍結乾燥工程を加えた検討を行い、NF-κBデコイ吸着人工骨の製法を確立し、その保管方法などを含めた製品化に向けた検討を進める。



▲薬剤流出人工骨(ネオボーン)の製法の改良を目指した乾燥方法及び保管条件などの検討

参考文献

Shimizu H, Nakagami H, Tsukamoto I, Morita S, Kunugiza Y, Tomita T, Yoshikawa H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. NFκappaB decoy oligodeoxynucleotides ameliorates osteoporosis through inhibition of activation and differentiation of osteoclasts. Gene Ther. 13:933-41, 2006.

Osaka KM, Tomita N, Nakagami H, Kunugiza Y, Yoshino M, Yuyama K, Tomita T, Yoshikawa H, Ogihara T, Morishita R. Increase in Nuclease Resistance and Incorporation of NF-κB Decoy Oligodeoxynucleotides by Modification of 3'-Terminus. J Gene Med 2007;9(9):812-9.

Miyake T, Aoki M, Masaki H, Kawasaki T, Oishi M, Kataoka K, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Regression of abdominal aortic aneurysms by simultaneous inhibition of nuclear factor kappaB and ets in a rabbit model. Circ Res. 2007;101(11):1175-84