

氏 名 いそべ ともゆき
磯部 友之

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 237 号

学位授与年月日 平成 29 年 3 月 1 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 新規緑内障治療薬リパスジル開発における薬物動態および房
水動態解析
(Characterization of pharmacokinetics and aqueous humor
dynamics in development of ripasudil as a novel
antiglaucoma agent)

論文審査委員

(主査)	教授	藤 秀人
(副査)	准教授	安東 嗣修
(副査)	教授	細谷 健一 (指導教員)

論文内容の要旨

緑内障は現在の日本において失明原因第一位の疾患となっている。視野狭窄が緩和に進行し自覚症状が乏しく最終的には失明に至ることから、緑内障は早期に発見し治療することが重要である。緑内障の病態は房水流出の低下により眼圧が上昇した結果、視神経が障害を受ける状態である。そのため、眼圧下降が唯一の確立された薬物治療のエビデンスとなっている。これまでの緑内障治療薬は作用機序により大きく分けて2種類あり、 β 受容体遮断薬や炭酸脱水酵素阻害薬などの房水産生を抑制する薬物とプロスタグランジン関連薬などのぶどう膜強膜から房水流出を促進する薬物がある。一方、ヒトにおける房水流出は線維柱帯-シュレム管を介する主流出路がその多くを占めていることから、主流出路へ作用する新規作用機序を有する薬物が望まれていた。

リパスジル塩酸塩水和物；4-fluoro-5-[[*(2S)*-2-methyl-1,4-diazepan-1-yl]sulfonyl]isoquinoline monohydrochloride dihydrate (リパスジル) は Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) 阻害作用を有する化合物として興和株式会社において開発された薬物である。セリン/スレオニンキナーゼの1つである ROCK は低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho の標的タンパクであり、ミオシンのリン酸化を制御し、細胞の収縮・弛緩に関与する。ROCK 阻害薬は心血管系疾患を中心とした様々な疾患の治療に有用である可能性が示唆されているが、眼科領域では緑内障への適用が考えられる。ROCK 阻害薬は線維柱帯-シュレム管へ作用し主流出路からの房水流出を促進することにより眼圧を下降させるとされ、既存の緑内障治療薬と異なる作用機序を有している。

緑内障治療には点眼薬が広く用いられているが、薬物を薬効部位へ到達させるまでにはいくつかのバリアが存在する。眼表面では涙液による希釈や涙液の排出に伴い、薬物の多くが除去され、一部しか眼内へ移行することができない。眼内移行は角膜を通る経路と結膜・強膜を通る経路があり、それぞれの膜はいくつかの密接な細胞層を形成し、物質移行を制御している。したがって、緑内障治療点眼薬の開発には眼内移行特性の良いものを選択することが重要となる。

本研究では、リパスジルの代謝特性の観点から点眼剤への適用を判断し、点眼剤としての眼圧下降作用とその機序、さらに眼内移行とその影響因子について解析することを目的とした。

1. リパスジルの代謝と点眼剤への適用¹⁾

ヒトおよび動物の肝 S9 および肝細胞を用いてリパスジルの代謝クリアランス並びに代謝物プロファイルを解析した結果、顕著な種差が示された。ヒトおよびサル(注: 原文は「ヒトおよびサル」)の肝 S9 においてはチトクローム P450 (CYP) の補酵素である NADPH の非存在下でも代謝され、特異的な阻害剤や単一酵素発現系を用いた解析により、ヒトにおいてリパスジルから主代謝物 M1 への代謝にはアルデヒドオキシダーゼ (AO) が関与

することが明らかとなった。AO は non-CYP 代謝酵素として近年注目されており、種差や個体差が大きく、ヒトにおいて代謝活性が高い。それゆえに、AO が主代謝酵素であるリパスジルは経口薬としては十分な循環曝露が得られないことが推測され、緑内障を標的とした点眼薬として開発することを判断した。実際に *in vivo* での解析において、ラットへ経口投与後の血漿中には M1 から M6 まで 6 つの代謝物が示されたのに対し、ヒトへ点眼後の血漿中リパスジルは速やかに消失し、代謝物は M1 のみが高濃度で推移した。肝 S9 や単一酵素発現系を用いた速度論解析により、ヒトでは M1 への代謝以外にも M2 の生成、さらに M2 から M6 の代謝反応に AO が関与することが示された。その他、リパスジルは CYP3A4/3A5 で M2 へ、CYP2C8/3A4/3A5 で M4 へと一部代謝された。

2. リパスジル点眼後の眼圧下降作用および房水動態²⁾

最初に *in vitro* において、ROCK および他のセリン/スレオニン蛋白リン酸化酵素に対する酵素阻害活性を解析し、リパスジルは ROCK に選択的かつ強力な阻害作用を示すことを見出した。次に、*in vivo* での薬効を解析した結果、ウサギおよびサルにおいて眼圧下降作用を示すことが明らかとなった。正常眼圧白色ウサギでは 0.0625% から 0.5% リパスジル点眼液で濃度依存的な眼圧下降作用を示し、最大眼圧下降値は 0.5% 点眼液の点眼 1 時間後に示した 8.55 mmHg であった。この作用発現は非常に速やかなものであり、かつ上強膜静脈圧値近くまで眼圧を下げるほど強力な効果であった。正常眼圧サルでは 0.1% から 0.4% リパスジル点眼液で濃度依存的な眼圧下降作用を示し、最大眼圧下降値は 0.4% 点眼液の点眼 2 時間後に示した 4.36 mmHg であった。この効果は緑内障治療薬の第一選択薬であるプロスタグランジン受容体作動薬のラタノプロスト点眼液 0.005% と比べ有意に高い値を示した。

眼圧下降作用機序を解明するために、白色ウサギを用いて房水動態に対する作用を解析した。0.4% リパスジル点眼液の単回点眼により房水流出率の有意な増加が示された一方で、ぶどう膜強膜経路（副流出路）を介した房水流出および房水流量（房水産生能）に影響を示さなかったことから、リパスジルの眼圧下降作用機序として線維柱帯-シュレム管を介する主流出路からの房水流出増加作用であることが明らかとなった。

3. リパスジル点眼後の眼内移行および眼内移行に及ぼす種々の影響³⁾

点眼後の眼内薬物動態について、主にウサギを用いて解析した。片眼点眼後のリパスジル濃度において、循環血を介した移行により涙腺中濃度は両側で同程度の値を示したのに対し、眼内濃度は点眼側で反対側よりも有意に高く、点眼部位からの直接移行であることが示された。さらに、人工膜 PAMPA やウサギ角膜および結膜を用いて *in vitro* および *ex vivo* 膜透過性を解析した結果、リパスジルは他の緑内障治療薬と比較し高い膜透過性を示したことから、リパスジルは点眼後速やかに角膜を透過し眼内へ移行することが明らかとなった。点眼により薬効を示すには作用部位に隣接する組織である眼房水への到達が重要であり、加えて後眼部である網膜・

脈絡膜への到達も示された。リパスジルはメラニン親和性を有しており、有色ウサギへ点眼後の眼内濃度では虹彩・毛様体および網膜・脈絡膜での濃度が高く、反復点眼により濃度は増加した。その他、眼内移行へ及ぼす影響として併用薬および涙液動態を解析した。0.4%リパスジルと0.005%ラタノプロストおよび0.5%チモロールの配合剤を有色ウサギへ併用点眼したとき、各有効成分の眼房水中濃度に大きな影響は示されなかった。一方、ウサギ、イヌおよびサルへ点眼投与した際の眼房水中リパスジル濃度には種差が示され、ウサギでは点眼後の初期濃度が高かった。この理由として点眼部位である涙液中濃度に起因することが考えられ、実際にウサギにおけるリパスジルの涙液中での消失速度はイヌやサルよりも低く、角膜を透過しないモデル化合物である FITC-dextran と同程度であった。したがって、涙液ターンオーバーも眼内濃度に影響する要因の一つであることが明らかとなった。

結論

本研究において、リパスジルの代謝に種差があること、並びにその要因として AO が M1 への代謝に関与していることを明らかにした。リパスジルは選択的かつ強力な ROCK 阻害作用を有し、点眼により明確な眼圧下降作用を示した。その薬効作用機序は線維柱帯-シュレム管を介する主流出路からの房水流出増加作用であった。また、高い膜透過性を持ち、点眼後に角膜を介した眼房水への速やかな移行が示された。さらに、後眼部への直接移行も示された。以上のことから、リパスジルは緑内障治療点眼薬として薬物動態学および薬理学的に優れた特性を有していることを見出した。リパスジルは新規作用機序を有することから単独効果だけでなく併用効果も期待でき、緑内障治療に貢献できる新薬として開発された。

参考文献

- 1) Isobe T, Ohta M, Kaneko Y, Kawai H. (2016). Species differences in metabolism of ripasudil (K-115) are attributed to aldehyde oxidase. *Xenobiotica*. 46:579-590.
- 2) Isobe T, Mizuno K, Kaneko Y, Ohta M, Koide T, Tanabe S. (2014). Effects of K-115, a rho-kinase inhibitor, on aqueous humor dynamics in rabbits. *Curr Eye Res*. 39:813-822.
- 3) Isobe T, Kasai T, Kawai H. (2016). Ocular penetration and pharmacokinetics of ripasudil following topical administration to rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther*. 32:405-414.

学位論文審査の要旨

リパスジル塩酸塩水和物（リパスジル）はRho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) 阻害作用を有する化合物として興和株式会社において開発された薬物である。ROCK阻害薬は線維柱帯 - シュレム管へ作用し主流出路からの房水流出促進することにより眼圧を下降させる作用があり、既存の緑内障治療薬と異なる作用機序を有している。緑内障治療には点眼薬が広く用いられているが、薬物を薬効発現部位へ到達させるまでにはいくつかのバリアが存在する。眼表面では涙液による希釈や涙液の排出に伴い、薬物の多くが除去され、一部しか眼内へ移行することができない。眼内移行は角膜を通る経路と結膜・強膜を通る経路があり、それぞれの膜はいくつかの密接な細胞層を形成し、物質移行を制御している。したがって、緑内障治療点眼薬の開発には眼内移行特性の良いものを選択することが重要となる。本研究では、リパスジルの代謝特性の観点から点眼剤への適用を判断し、点眼剤として眼圧下降作用とその機序、さらに眼内移行とその影響因子について解析することを目的とした。本研究の内容の骨子および審査結果は次のとおりである。

リパスジルの代謝と点眼剤への適用

ヒトおよび動物の肝S9および肝細胞を用いてリパスジルの代謝クリアランス並びに代謝物プロファイルを解析した結果、顕著な種差が示された。リパスジルはNADPHの非存在下でも代謝され、特異的な阻害剤や単一酵素発現系を用いた解析から、ヒトにおいてリパスジルから主代謝物M1への代謝にはアルデヒドオキシダーゼ (AO) が関与することが明らかとなった。AOが主代謝酵素であるリパスジルは経口薬としては十分な循環曝露が得られないことが推測され、緑内障を標的とした点眼薬として開発することを判断した。ラットへ経口投与した際の血漿中にはM1からM6まで6つの代謝物が示されたのに対し、ヒトへ点眼後の血漿中リパスジルは速やかに消失し、代謝物はM1のみが高濃度で推移した。

リパスジル点眼後の眼圧下降作用および房水動態

ROCKおよび他のセリン/スレオニン蛋白リン酸化酵素に対する酵素阻害活性を解析した結果、リパスジルはROCKに選択的かつ強力な阻害作用を示すことを見出した。動物での薬効解析の結果、ウサギおよびサルにおいて眼圧下降作用を示すことが明らかとなった。正常眼圧白色ウサギでは0.0625%から0.5%リパスジル点眼液で濃度依存的な眼圧下降作用を示し、最大眼圧下降値は上強膜静脈圧近くまで眼圧を下げるほど強力であった。正常眼圧サルでは0.1%から0.4%リパスジル点眼液で濃度依存的な眼圧下降作用を示し、最大眼圧下降値はラタノプロスト点眼液0.005%と比べ有意に高い値を示した。眼圧下降作用機序を解明するために、白色ウサギを用いて房水動態に対する作用を解析した。0.4%リパスジル点眼液の単回点眼により房水流出率の有意な増加が示された一方で、ぶどう膜強膜経路を介した房水流出および房水産生能に影響を示さなかったことから、リパスジルの眼圧下降作用機序として線維柱帯 - シュレム管を介する主流出路からの房水流出増加作用であるこ

とが明らかとなった。

リパスジル点眼後の眼内移行および眼内移行に及ぼす種々の影響

片眼点眼後のリパスジル濃度において、涙腺は循環血を介した移行により両側で同程度の濃度を示したのに対し、眼内濃度は点眼側で反対側よりも有意に高く、点眼部位からの直接移行であることが示された。人工膜PAMPAやウサギ角膜および結膜を用いたリパスジルの膜透過性は良好であり、点眼後速やかに角膜を透過し眼内に移行することが明らかとなった。点眼により薬効を示すには作用部位に隣接する組織である眼房水への到達が重要であり、加えて後眼部である網膜・脈絡膜への到達も示された。リパスジルはメラニン親和性を有しており、有色ウサギの眼内では虹彩・毛様体および網膜・脈絡膜での濃度が高く示された。併用点眼した際の眼房水中濃度への大きな相互の影響は示されなかったが、ウサギ、イヌおよびサル（イヌ）の眼房水中濃度には種差が示された。ウサギにおけるリパスジルの涙液中での消失速度はイヌやサルよりも低く、角膜を透過しないモデル化合物であるFITC-dextranと同程度であったことから、涙液ターンオーバーも眼内濃度に影響する要因の一つであることが明らかとなった。

以上申請者は、リパスジルが緑内障治療点眼薬として薬物動態学および薬理学的に優れた特性を有していることを見出した。申請者が明らかとしたリパスジルの特性は点眼薬を開発する上で有用な知見であり、緑内障治療への貢献が期待されると判断される。

主査及び副査は、磯部友之氏に面接試験を行うとともに論文内容について審査を行い、博士（薬科学）を授けるに値すると判定した。

- Isobe T, Ohta M, Kaneko Y, Kawai H. Species differences in metabolism of ripasudil (K-115) are attributed to aldehyde oxidase. **Xenobiotica**. 46: 579-590 (2016).
- Isobe T, Mizuno K, Kaneko Y, Ohta M, Koide T, Tanabe S. Effects of K-115, a rho-kinase inhibitor, on aqueous humor dynamics in rabbits. **Curr Eye Res**. 39: 813-822 (2014).
- Isobe T, Kasai T, Kawai H. Ocular penetration and pharmacokinetics of ripasudil following topical administration to rabbits. **J Ocul Pharmacol Ther**. 32: 405-414 (2016).