

令和元年6月5日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05223

研究課題名(和文) DDS技術を利用した新規作用機作を有する脳アミロイドーシス治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of drugs for cerebral amyloidosis with novel mechanisms of action using DDS technology

研究代表者

有馬 英俊 (ARIMA, HIDETOSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：50260964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：認知症の患者は増加し続けているが、アルツハイマー病(AD)を根治させる薬物療法は存在せず、新規治療薬の開発が望まれている。本研究では、我々が新規に構築したPAMAM dendrimer/cyclodextrin conjugate (CDE結合体)が、ADの原因として知られるアミロイド線維形成・蓄積およびコレステロール蓄積を同時に制御可能であることを明らかにした。また、脳移行性リガンドとしてラクトースを付与したラクトシル化CDE (BT-CDE) 結合体をマウスに静脈内投与すると、CDE結合体に比べて高い脳移行性を示した。これらの結果から、BT-CDE結合体は新規AD治療薬シーズになりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出したラクトシル化CDE結合体は、患者数の増加が予想されているアルツハイマー病に対して、これまでに開発されてきた化合物とは化学構造が全く異なり、また、ADに関わる複数の因子を同時に制御可能な全く新規の治療薬シーズとなりうる可能性が示された。この研究成果はすでに特許出願を行っており、日本初のAD治療薬になりうることを期待される。

研究成果の概要(英文)：So far, the number of patients with dementia has been increasing, especially Alzheimer's disease (AD) will be more serious. However, there is no curative treatments to AD, so development of new therapeutic agents is strongly desired. In this study, brain-targeting PAMAM dendrimer/cyclodextrin conjugate (BT-CDE conjugate) was prepared and was found to simultaneously regulate not only the formation and accumulation of amyloid fibrils but also accumulation of cholesterol in cells. In addition, intravenous administration of BT-CDE conjugate to mice showed higher brain-localizing properties than CDE conjugate. These results suggest that BT-CDE may have the potential as new drug seeds for AD.

研究分野：応用薬理学 製剤学 薬物送達学

キーワード：脳アミロイドーシス シクロデキストリン デンドリマー 結合体 ドラッグデリバリーシステム アミロイド溶解作用 血液脳関門 脳移行性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳アミロイドーシスとは、アミロイド線維という凝集性の不溶性のペプチド・タンパク質が、脳内に沈着することにより神経障害を引き起こす疾患群のことであり、アルツハイマー病 (AD)、プリオン病、遺伝性アミロイド性脳出血などが知られている。一方、シクロデキストリン (CyD) や PAMAM デンドリマーは、1) アミロイドβペプチド (Aβ) と直接相互作用し、ミスフォールディングを抑制する、2) 脂質ラフト中のコレステロールを低下させ、その構造や機能を変化させる、3) トランスサイレチン型家族性アミロイドポリニューロパチー (ATTR - FAP) の原因タンパク質であるトランスサイレチン (TTR) のアミロイド線維形成を抑制する、4) AD モデルマウスにおいて、ニーマン・ピック病 C 型 (NPC) の治療薬候補として知られるヒドロキシプロピル-β-CyD (HP-β-CyD) の静脈内投与が、記憶障害を改善する、5) β-CyD にオリゴアルギニンを修飾することにより細胞透過性が増大する、ことなどが報告されている。また、PAMAM デンドリマーも 1) Aβ線維形成を抑制する、2) 鼻腔内投与後、脳内の Aβ の蓄積・線維形成を抑制する、3) 全身性アミロイドーシスの原因タンパク質である TTR のアミロイド線維形成を抑制する、ことなどが報告されている。さらに、シクロデキストリン/PAMAM デンドリマー結合体 (CDE 結合体) は、CyD 単独およびデンドリマー単独に比べて、強い Aβ や TTR の線維形成抑制効果ならびに線維溶解作用を示すことを見出した。しかし我々の予備的検討により、静脈内投与された CDE 結合体は、血液脳関門 (BBB) を透過できないことが示された。

### 2. 研究の目的

本研究では、コレステロール蓄積、アミロイド線維形成および蓄積という AD に対する 3 つの危険因子を同時に抑制できる CDE 結合体に、脳移行性リガンドとしてラクトースを付与した脳移行性 CDE (BT-CDE) 結合体を新たに構築し、AD に対する「夢の治療薬」の開発のためのシーズ薬としての可能性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) BT-CDE 結合体の調製と物理化学的性質の評価

PAMAM デンドリマー (G3) に DMSO に溶解したグルクロニルグルコシル-β-CyD (GUG-β-CyD) および DMT-MM を添加し、12 時間攪拌して、CDE 結合体を調製した。次に、脳移行性に優れた結合体の構築を目的に、CDE 結合体にラクトースを修飾した BT-CDE 結合体を調製した。得られた CDE 結合体および BT-CDE 結合体の純度および分子量などを TLC、<sup>1</sup>H-NMR により評価した。CDE 結合体および BT-CDE 結合体の物理化学的性質は粒子径および ζ-電位を測定することにより評価した。

#### (2) アミロイド線維形成抑制作用および溶解促進作用

アミロイド線維形成抑制作用：PBS (pH 7.4) に Aβ および BT-CDE 結合体を混合し、37 °C で 72 時間インキュベーションした後、チオフラビン T 溶液を添加後、さらにインキュベーションした後、蛍光分光光度計でアミロイド線維の形成を定量した。アミロイド線維溶解作用：PBS (pH 7.4) に Aβ を添加後、72 時間インキュベーションし、アミロイド線維を形成させた後、BT-CDE 結合体を添加し、さらに 72 時間インキュベートした後、上記と同様な操作を行った。

#### (3) 細胞取込みおよび BBB 透過実験

細胞取込み実験には、BBB 細胞モデルとして知られる hCMEC/D3 細胞を用いた。細胞上清液に蛍光物質トリメチルローダミン (TRITC) を修飾した BT-CDE 結合体 (TRITC-BT-CDE 結合体) を添加し、60 分後の細胞中の蛍光を蛍光顕微鏡にて観察した。BBB 透過実験は、Transwell® の上相に hCMEC/D3 細胞を播種し、単層膜を作成した。また、Transwell® の下相に、ヒト神経芽細

胞腫 SH-SY5Y 細胞を播種した。細胞上清液に TRITC-BT-CDE 結合体を添加後、経時的に下相溶液中の蛍光強度を蛍光光度計にて定量した。また、SH-SY5Y 細胞への取込みを共焦点レーザー顕微鏡にて観察・定量した。

#### (4) 培養細胞における A $\beta$ およびコレステロール量変化

BT-CDE 結合体存在下、ライソゾームからのコレステロール運搬を阻害する U18666A を処理した SH-SY5Y 細胞におけるコレステロール量をフィリピン染色により定量した。また、水溶性蛍光色素 HiLyte でラベル化した A $\beta$  を U18666A 処理した SH-SY5Y 細胞に添加後、24 時間インキュベーションした後、BT-CDE 結合体を添加し、さらに 24 時間インキュベーション後の細胞内 A $\beta$  レベルを共焦点レーザー顕微鏡により観察・定量した。

#### (5) 健常マウスにおける体内動態と安全性評価

健常マウスに HiLyte を結合した BT-CDE 結合体を静脈内投与 30 分後に各臓器を回収し、in vivo image spectrum (IVIS) により臓器分布を観察・定量した。また、BT-CDE 結合体を静脈内投与後の血液生化学的検査値を測定するとともに、各種臓器を肉眼的に観察し、臓器障害性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) BT-CDE 結合体の合成とそれらの物理的性質の解析

PAMAM デンドリマー (G3) と GUG- $\beta$ -CyD との反応により得られた CDE 結合体分子中の GUG- $\beta$ -CyD の平均置換度は 3 であった。また、CDE 結合体とラクトース水合物との反応により得られた BT-CDE 結合体分子中のラクトース置換度は 7 であった。また、CDE 結合体および BT-CDE 結合体の粒子径、PDI 値およびゼータ電位の値に差は認められず、同様な物性を示すことが示唆された。

#### (2) アミロイド繊維形成抑制作用および溶解促進作用

*In vitro* において BT-CDE 結合体は、A $\beta$  アミロイド繊維形成を著しく抑制作用した。また興味深いことに、BT-CDE 結合体は形成されたアミロイド繊維に対して溶解作用を示した。これらの結果から、BT-CDE 結合体は A $\beta$  アミロイド繊維に対して、形成抑制作用および溶解促進作用の 2 つの作用を併せ持つことが示された。

#### (3) 細胞取込みおよび BBB 透過性実験

hCMEC/D3 細胞において、TRITC-BT-CDE 結合体は TRITC-CDE 結合体に比べて有意に高い細胞取込みを示した。またその取込みは、4 でのインキュベーション、エンドサイトーシス阻害剤の添加、さらにアシアロ糖タンパク質受容体のリガンドであるアシアロフェツインの添加によりいずれも有意に低下した。これらの結果より、BT-CDE 結合体は hCMEC/D3 細胞にラクトースを介した受容体介在性エンドサイトーシスにより取込まれることが示唆された。また、BBB モデルである hCMEC/D3 細胞単層膜において、TRITC-BT-CDE 結合体の膜透過係数は TRITC-CDE に比べて約 2 倍高い値を示した。加えて、Transwell® 下相に播種した SHSY-5Y 細胞への取込みも TRITC-BT-CDE 結合体の方が TRITC-CDE 結合体よりも約 4 倍高い値を示した。また、Transwell® を用いた TRITC-BT-CDE 結合体の透過実験においても、4 でのインキュベーションおよびエンドサイトーシス阻害剤の添加によりその透過は低下した。これらの結果から、BT-CDE 結合体は BBB を透過する能力を有し、BBB 透過後、神経細胞に取込まれる可能性が示唆された。

#### (4) 培養細胞における A $\beta$ およびコレステロール量変化

U18666A を処理した SH-SY5Y 細胞において、BT-CDE 結合体は CDE 結合体に比べて、細胞内のコレステロールレベルおよび A $\beta$  レベルを有意に減少させた。

#### (5) 健常マウスにおける体内動態と安全性評価

健常マウスに静脈内投与後のBT-CDE 結合体はCDE 結合体と同様に主に肝臓および腎臓に移行したが、前者は後者に比べて高い脳移行性を示した。また、これらの効果に CDE 結合体へのラクトース修飾量が関係することが示された。BT-CDE 結合体をマウスに静脈内単回投与後の血液生化学検査値および臓器所見に異常は認められなかった。これらの結果から、BT-CDE 結合体はマウスに静脈内投与後、CDE 結合体に比べて高い脳移行性を示し、アミロイド線維形成・蓄積および脳内コレステロールレベルを制御可能なことおよび血液毒性・臓器毒性を示さないことが示唆された。

以上の結果から、BT-CDE 結合体は新規 AD 治療薬シーズになりうる可能性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者には下線 )

[雑誌論文] ( 計 5 件、すべて査読あり )

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

- (1) Arima H, Hayashi Y, Higashi T, Motoyama K. Recent advances in cyclodextrin delivery techniques. *Expert Opin Drug Deliv* 12(9), 1425-1441, 2016.
- (2) Arima H, Motoyama K, Higashi T. Potential Use of Cyclodextrins as Drug Carriers and Active Pharmaceutical Ingredients. *Chem Pharm Bull* 65(4), 341-348, 2017.
- (3) Arima H, Motoyama K, Higashi T. Potential therapeutic application of dendrimer/cyclodextrin conjugates with targeting ligands as advanced carriers for gene and oligonucleotide drugs. *Ther Deliv* 8(4), 215-232, 2017.
- (4) Higashi T, Iohara D, Motoyama K, Arima H. Supramolecular Pharmaceutical Sciences: A Novel Concept Combining Pharmaceutical Sciences and Supramolecular Chemistry with a Focus on Cyclodextrin-Based Supermolecules. *Chem Pharm Bull* 66(3), 207-216, 2018.
- (5) Inoue M, Ueda M, Higashi T, Anno T, Fujisawa K, Motoyama K, Mizuguchi M, Ando Y, Jono H, Arima H. Therapeutic Potential of Polyamidoamine Dendrimer for Amyloidogenic Transthyretin Amyloidosis. *ACS Chem Neurosci* 10(5), 2584-2590, 2019

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

発表者名 横山龍馬、小野寺理沙子、東 大志、本山敬一、有馬英俊

発表標題 脳アミロイドーシス治療薬としてのデンドリマー/シクロデキストリン結合体の可能性評価

学会等名 日本薬学会第 139 年会

発表年 2019

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 1 件 )

名称：特願 2018-245538

発明者：有馬英俊、本山敬一、東 大志、小野寺理沙子、横山龍馬

権利者：国立大学法人 熊本大学

種類：特許

番号：特願 2018-245538

出願年：2018 年

国内外の別：国内

取得状況 ( 計 0 件 )

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：本山敬一

ローマ字氏名：Motoyama Keiichi

所属研究機関名：熊本大学

部局名：生命科学研究部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50515608

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：東 大志

ローマ字氏名：Higashi Taishi

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院先導機構

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20613409

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：横山龍馬

ローマ字氏名：Yokoyama Ryoma

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。