

令和元年9月4日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08208

研究課題名(和文)肥満症に対する新規治療システムの開発：鼻腔内投与による生理活性ペプチドの脳内送達

研究課題名(英文)The development of a new therapeutic system for the obesity: Transnasal delivery of the peptide drug to the brain

研究代表者

坂根 稔康 (Sakane, Toshiyasu)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50215638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：副作用が少なく自然な抗肥満作用を示す新規薬物(CPN)を用いて、新しい肥満治療法の開発を試みた。CPNは脳に作用して、効果を発揮する。CPNを効率的に脳に送り届けるために、CPNを鼻腔に投与した。CPNを鼻腔に投与すると、血管内への注射に比べて血中濃度は低かったが、脳内濃度は高かった。動物の体重変化を測定することで、抗肥満作用を確認した。CPNを血管内に注射しても、体重の増加は抑制されなかったが、同じ量を鼻腔に投与すると、体重増加が抑制された。CPNを鼻腔に投与することで、肥満症を治療できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、肥満症の治療に用いられてきた医薬品は対症療法の域を出ず、有効性、安全性ともに問題があったが、CPNは安全性に優れ、鼻腔内投与することで、有効性を担保することができた。また、CPN以外にも脳疾患に優れた効果を示すペプチドが存在するが、治療に応用するためには、脳への送達が課題である。本研究で検討を行った鼻腔内投与は他のペプチドの脳内送達にも有用であり、社会問題となりつつある認知症に対する画期的な治療法開発の可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The development of the new therapeutic system for the obesity was attempted, using new drug candidate (CPN), which exhibits the safe antiobesity potency. CPN was applied to the nasal cavity for the improvement of the brain delivery of CPN, because CPN acts on the brain. After nasal application, the brain concentration of CPN is higher in spite of the lower plasma concentration, as compared to intravenous injection. The antiobesity effect of CPN was examined by the body weight change of the animals. No inhibition of body weight gain was observed after intravenous injection. On the other hand, after nasal application of the same dose, significant inhibition of the body weight gain was observed. The findings suggest the possibility of the development of the new therapy for the obesity by nasal application of CPN.

研究分野：薬物動態学

キーワード：肥満症 鼻腔内投与 生理活性ペプチド 脳

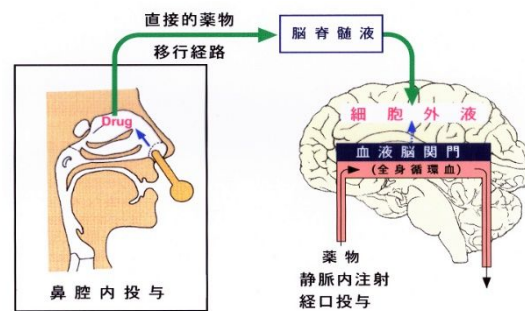
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本人男性の平均寿命は 80.2 歳、日本人女性の平均寿命は 86.6 歳で、日本は世界一の長寿命国である。厚生労働省の調査・推計によると、2012 年時点の認知症老人数は推計で 462 万人、老人人口の約 15% に相当する。今後、老人人口はさらに増え続け、2025 年には介護を要する認知症老人数は 470 万人に及ぶと推計されている。現在、老人保健施設入居者の 75% が認知症を発症しており、保険財政に対する認知症のウエイトは非常に大きい。また、認知症老人の約 50% が自宅で生活しているが、家族が介護している場合、家族の負担はあまりにも大きく、社会問題となりつつある。このような事情を背景に、認知症に対する治療法や治療薬の開発が精力的に行われている。その結果、以前に比べて、かなりの進展が認められ、塩酸ドネペジル(アリセプト®)、リバスチグミン(イクセロン®)など、有効な治療薬も開発されている。しかしながら、これらの治療薬はアセチルコリン分解酵素の阻害薬である。間接的に脳内アセチルコリンの量を増やすことで、認知症の症状を改善する医薬品であり、対症療法にすぎない。神経細胞が死滅するというアルツハイマー型認知症に対する根本治療は、神経細胞の死滅を防止すると同時に、神経細胞数を増やすことであると考えられる。このような作用を有する医薬品の候補物質としては、脳内で発見されている神経成長因子、脳由来栄養因子、インスリン様成長因子などのペプチドが有望である。ところが、このようなペプチドを静脈内投与などの通常の投与方法で投与しても、血液-脳関門が脳への移行性を極端に制限しているため、治療効果を期待することはできない。これらのペプチドを認知症の根本治療薬として臨床応用するためには、何らかの方法で治療に有効な量を脳内へ送達する必要がある。

一方、鼻粘膜は現在、ペプチド性医薬品の投与部位として注目を集めているが、脳組織を取り巻いて存在する脳脊髄液と鼻腔との直接的なつながりを示唆する実験事実が数多く報告されている。研究代表者はすでに、これらの実験事実注目し、低分子医薬品に焦点を絞って、鼻腔から脳脊髄液への直接的な薬物移行経路が存在することを示し、鼻腔から脳脊髄液への薬物移行性について種々の情報を得ている。血液と脳組織の間には血液-脳関門が存在するが、組織と脳脊髄液の間にはこのような薬物移行障壁は存在しない。したがって、鼻腔は脳脊髄液だけでなく、脳組織への薬物送達を可能にする新規投与部位としての可能性を秘めている。

当初、研究代表者は、膜透過性や生体内安定性などの種々の観点から、鼻腔内投与によるペプチド性医薬品の脳内送達は非常に困難と予想していた。ところが、その後、静脈内投与では全く中枢作用を示さないペプチドを鼻腔内投与すると、ヒトにおいて、顕著な中枢作用が観察されるという報告が相次いだ。これらは、ペプチドであっても、鼻腔内投与することにより、脳内へ送達できることを示す現象と考えられる。ペプチドの鼻腔内投与はすでに、実用化されている。鼻腔内投与することで、ペプチドの脳内送達が可能であれば、非常に簡便で、実用性が高い変性性認知症に対する治療システムの開発が可能で、画期的な治療法となる可能性が高いと考えられる。



### 2. 研究の目的

ニューロメジン U はブタ脊髄より単離された神経ペプチドである。ニューロメジン U 受容体には 2 種類のサブタイプが存在する。Type 2 受容体 (NMUR2) は、脳の視床下部のみに発現し、摂食抑制やエネルギー代謝亢進作用を示す。東京薬科大学の林、高山らは、構造活性相関に基づいて、NMUR2 選択的アゴニスト活性を示す生理活性ペプチド CPN を創製した。本研究では、新規肥満治療薬としてニューロメジン誘導体 CPN に着目し、鼻腔内投与による脳への送達を目指した。

### 3. 研究の方法

#### 1) CPN の血清中及び脳脊髄液中での安定性

Wistar 系雄性ラットより血液を採取し、血清を調製した。大槽穿刺法により脳脊髄液を採取した。37 °C で、血清および脳脊髄液に CPN を添加し、経時的に各試料を採取した。

#### 2) CPN の体内動態と鼻腔内投与後の吸収

麻酔下、Wistar 系雄性ラットの大腿動脈に採血用のカニューレを施した。CPN を急速静脈内投与あるいは鼻腔内投与した後、経時的に採血を行った。採取した血液を遠心分離し、得られた血漿に対して、アセトニトリルを添加し、タンパクを沈殿させた。遠心して得られた一定量の上清について、減圧下、溶媒を留去した。

#### 3) 鼻腔内投与後の脳移行性

麻酔下、ddY 系雄性マウスに CPN を急速静脈内投与、腹腔内投与または鼻腔内投与した。投与 5 分後、採血を行うと同時に、心臓より脳の脱血灌流を行い、脳組織を採取し、嗅球、脳前半部、脳後半部に部位分けを行った。脳組織をホモジナイズし、血漿と同様の方法で除タンパク処理を行った。

4) 薬理効果による評価

ddY 系雄性マウスに、CPN を急速静脈内投与、腹腔内投与、鼻腔内投与した。その後、経時的に体重変化と摂餌量を測定した。なお、CPN は初日と 4 日目の計 2 回投与した。

5) CPN の薬理効果の確認

ddY 系雄性マウスに、CPN を腹腔内投与あるいは鼻腔内投与した。コルチコステロン、CPN の血中濃度を測定するために、投与 5 分後に採血を行い、体内動態の検討と同様の方法で、除タンパク処理を行った。

6) CPN およびコルチコステロンの定量

CPN、コルチコステロンは、いずれも逆相系高速液体クロマトグラフィーによる分離を行い、質量分析装置により検出した。

4. 研究成果

1) CPN の血清中及び脳脊髄液中での安定性

CPN の血清及び脳脊髄液中での安定性を評価した (図 1)。CPN は血清及び脳脊髄液で不安定であることが明らかとなった。血清中では半減期 10 分程度で速やかに分解されるが、脳脊髄液中における分解は緩やかであった。これらの知見は、血液を介さずに、鼻腔から脳への直接移行経路を介した脳移行が CPN の脳内送達に対して有利であることを示す知見と考えられる。

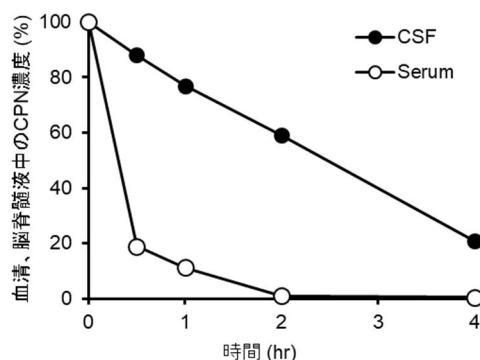


図 1 CPN の血清 (○) 及び脳脊髄液 (●) 中での安定性

2) CPN の体内動態と鼻腔内投与後の吸収

CPN の静脈内投与後の体内動態及び鼻腔内投与後の吸収動態を解析した (図 2, 表 1)。静脈内投与後の薬物動態は 2-コンパートメントモデルで表されることが明らかとなった。血液からの消失は速く、平均滞留時間は 3.5 分と短く、図 1 で示された血清中での低い安定性に起因すると考えられた。鼻腔内投与後の吸収率は約 24% であり、膜透過性が良好であることが明らかとなった。

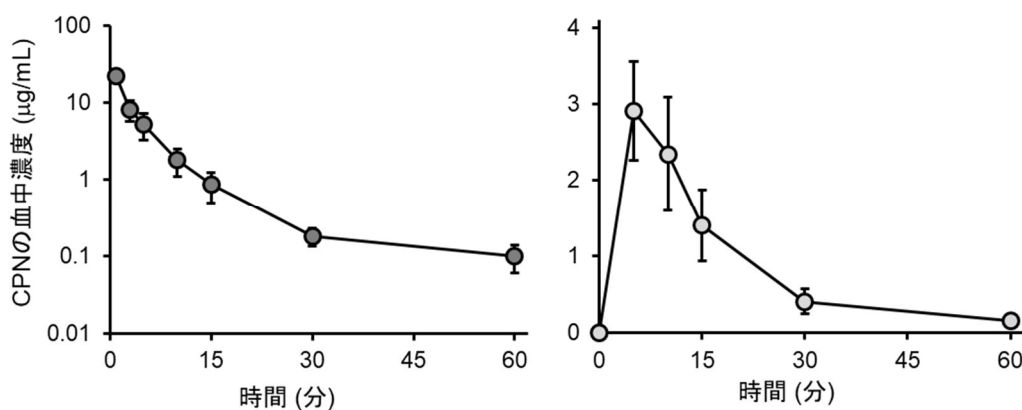


図 2 静脈内投与後(左) および鼻腔内投与後(右)の CPN の血漿中濃度の経時変化

表 1 CPN の薬物動態学的パラメータ

	静脈内投与	鼻腔内投与
血中濃度時間曲線下面積 (min · µg/mL)	115.2 ± 27.7	55.8 ± 12.9
平均体内滞留時間 (min)	3.47 ± 0.68	20.8 ± 4.3
全身クリアランス (mL/min)	5.04 ± 1.48	-
分布容積 (mL)	15.5 ± 0.94	-
吸収率 (%)	-	24.2 ± 5.6

### 3) 鼻腔内投与後の脳移行性

CPN をマウス鼻腔内に投与し、5 分後の血漿中薬物濃度および脳内濃度を評価した。対照投与経路としては静脈内投与、腹腔内投与を選択した。脳は嗅球、前脳、後脳の 3 部位に分けて、濃度を測定した。図 4(左)は投与 5 分後の血漿中濃度、図 4(右)は脳内濃度を示す。静脈内、腹腔内投与後に比べて、鼻腔内投与後の血漿中 CPN 濃度は低かったが、鼻腔内投与後には、高い脳内濃度が観察された。部位別の脳内濃度に関しては、前脳および後脳に比べて、嗅球が高値を示した。嗅球は鼻腔に最も近く位置することから、鼻腔内投与された CPN が脳に直接、移行する可能性が示唆された。

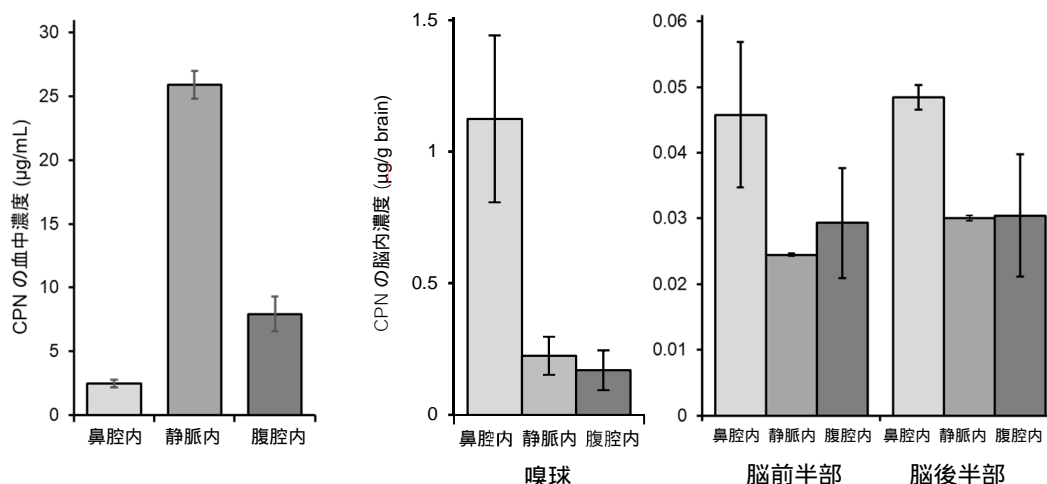


図 4 CPN を種々投与経路で投与した 5 分後における血中濃度 (左) 脳内濃度 (右)

次に、CPN の脳内移行に対する鼻腔からの直接移行の寄与を定量的に評価した。鼻腔内投与された薬物が脳へ移行する経路として、直接的な移行経路の他に、血液に吸収された後、血液-脳関門を介して脳へ移行する経路が考えられる。腹腔内投与の場合は血液-脳関門を介した移行のみである。血液-脳関門を介した脳移行量が血漿中薬物濃度の時間積分値  $AUC$  (area under the concentration-time curve) に比例すると仮定すると、鼻腔内投与後、血液-脳関門を介して移行した量は腹腔内投与時の脳内濃度 ( $C_{\text{brain, i.p.}}$ ) と腹腔内投与時および鼻腔内投与時の  $AUC$  ( $AUC_{\text{blood, i.p.}}$ ,  $AUC_{\text{blood, i.n.}}$ ) を用いて次の式で表される。これを鼻腔内投与後の脳内濃度から引き算することにより、血液-脳関門を介した移行量を補正できる。鼻腔内投与後の脳内移行に対する直接移行の寄与率を示す DTP (Direct Transport Percentage) は下記の式で求めることができる。

$$DTP (\%) = \frac{C_{\text{brain, i.n.}} - C_{\text{brain, i.p.}} \cdot \frac{AUC_{\text{blood, i.n.}}}{AUC_{\text{blood, i.p.}}}}{C_{\text{brain, i.n.}}} \times 100$$

表 2 に CPN 投与後の DTP を示す。脳内各部位の DTP は 70% 以上であった。鼻腔内投与後、脳内に存在する CPN の 3/4 以上が鼻腔から脳に直接移行していること、さらに、鼻腔に近い部位の DTP が高値を示すことが明らかとなった。

表 2 脳内各部位における直接移行の寄与率 (DTP)

	嗅球	前脳	後脳
DTP (%)	96.08 ± 0.96	84.11 ± 2.45	74.76 ± 1.29

### 4) 薬理効果による評価

CPN を 2 回 (1 日目と 4 日目) マウス鼻腔内に投与し、経日的に体重及び摂餌量を測定した。対照投与経路としては、静脈内投与、腹腔内投与を選択し、鼻腔内投与については、3 種類の投与量を設定した。体重の経日変化を図 5 (左) マウス 1 匹 1 日あたりの平均摂餌量を図 5 (右) に示す。CPN の鼻腔内投与により、マウスの体重増加が有意に抑制され、抑制の程度は CPN の投与量に依存していることが示された。さらに、摂餌量も体重変化を裏付ける結果で、CPN 鼻腔内投与群で抑制傾向が観察された。



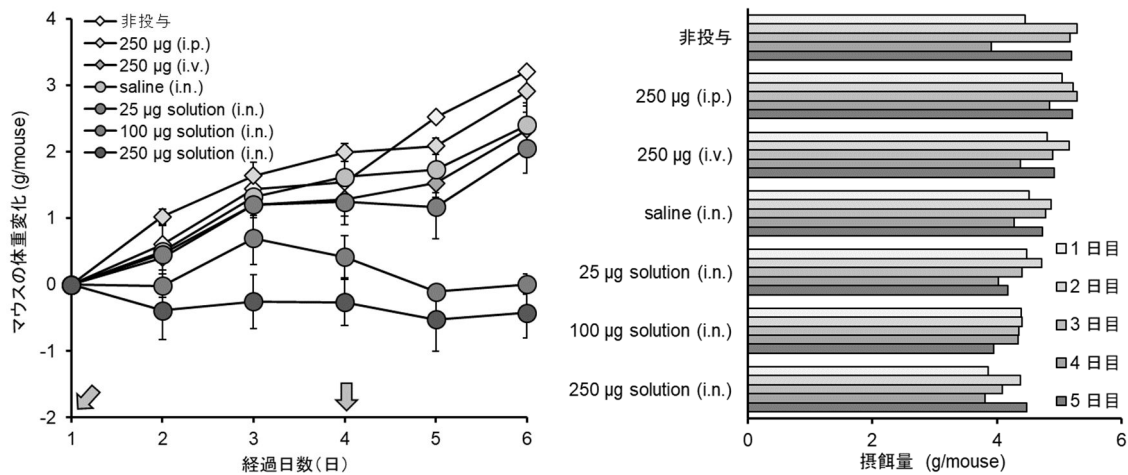


図 5. CPN 投与後のマウス体重の経日変化 (左)と摂餌量 (右)

### 5) CPN の中枢作用

CPN が視床下部の NMUR2 に結合すると、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンが放出され、これを刺激に副腎皮質刺激ホルモンが脳下垂体から放出される。さらに、この副腎皮質刺激ホルモンが副腎に作用することで、コルチコステロン (CCS) が血中に放出される。つまり、薬理効果が視床下部 NMUR2 を介した薬理効果である場合、血中 CCS 濃度は増大するはずである。そこで、CPN をマウス鼻腔内に投与した 5 分後の CPN (図 6(左)) 及び CCS の血漿中濃度 (図 6(右)) を測定した。血漿中 CPN 濃度は鼻腔内投与群と腹腔内投与群で、大きな相違は観察されなかった。一方、腹腔内投与後の血漿中 CCS 濃度は生理食塩水投与群と CPN 投与群で同程度であったのに対して、鼻腔内投与後の CCS 濃度は、生理食塩水投与群より CPN 投与群が有意に高い値を示した。以上のデータより、マウスで観察された体重変化は CPN の中枢作用に基づくことが明らかとなった。

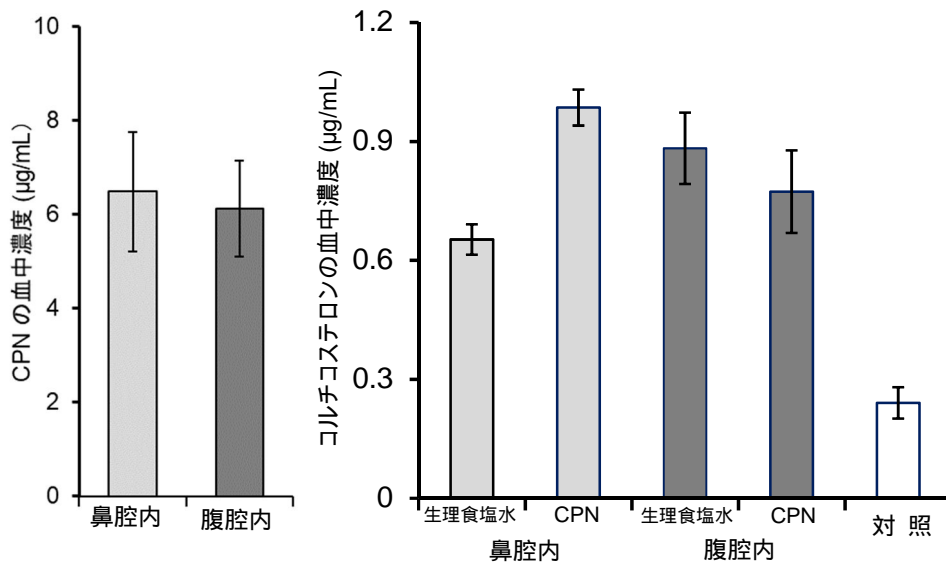


図 6 鼻腔内投与・腹腔内投与後の血漿中 CPN 濃度 (左) および血漿中コルチコステロン濃度 (右)

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 13 件)

田中晶子、井上大輔、勝見 英正、山本 昌、湯谷玲子、古林呂之、坂根稔康; 生理活性ペプチドの鼻腔内投与による脳への送達と中枢疾患治療への応用; 日本薬学会第 139 年会, 2019 年 3 月

田中晶子、高山健太郎、井上大輔、古林呂之、勝見英正、山本 昌、湯谷玲子、林 良雄、坂

**根根稔康**; 生理活性ペプチドの鼻腔内投与による脳への送達と中枢疾患治療への応用; 第 27 回 DDS カンファランス, 2018 年 9 月

**坂根稔康**、**田中晶子**、湯谷玲子、井上大輔、古林呂之、勝見英正、山本 昌; 鼻腔内投与による生理活性ペプチドの脳内送達; 第 34 回日本 DDS 学会学術集会, 2018 年 6 月

天野真弓、**田中晶子**、武田康嗣、**高山健太郎**、井上大輔、古林呂之、草森浩輔、勝見英正、**坂根稔康**、林 良雄、山本 昌; 鼻腔内投与によるニューロメジン誘導体の脳内送達: 新規肥満治療法の開発; 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 2017 年 7 月

**Akiko Tanaka**, Daisuke Inoue, Tomoyuki Furubayashi, **Kentaro Takayama**, Yoshio Hayashi, Hidemasa Katsumi, **Toshiyasu Sakane**, Akira Yamamoto; Transnasal delivery of peptide agonist specific to neuromedin U receptor 2 to the brain for the treatment of obesity; 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月

**Akiko Tanaka**, Daisuke Inoue, Tomoyuki Furubayashi, **Kentaro Takayama**, Yoshio Hayashi, Hidemasa Katsumi, **Toshiyasu Sakane**, Akira Yamamoto; Transnasal delivery of peptide agonist specific to neuromedin U receptor 2 to the brain for the treatment of obesity; 第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2017 年 10 月

**田中晶子**、竹村有希、武田康嗣、**高山健太郎**、井上大輔、古林呂之、勝見英正、**坂根稔康**、山本 昌; 鼻腔内投与による生理活性ペプチド CPN-116 の脳内送達; 医療薬学フォーラム 2017, 2017 年 7 月

**坂根稔康**、湯谷玲子、寺岡麗子、前田千晶、**田中晶子**、武田康嗣、**高山健太郎**、井上大輔、古林呂之、草森浩輔、勝見英正、林 良雄、山本 昌; 鼻腔内投与による CPN-116 の脳内送達; 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月

**Toshiyasu Sakane**, Reiko Yutani, Reiko Teraoka, **Akiko Tanaka**, Yuki Takemura, Koji Taketa, **Kentaro Takayama**, Yoshio Hayashi, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto; Transnasal delivery of the peptide to the brain. International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences, 2017 年 3 月

**田中晶子**、竹村有希、武田康嗣、**高山健太郎**、古林呂之、草森浩輔、勝見英正、**坂根稔康**、林 良雄、山本 昌; ニューロメジン誘導体 CPN-116 の鼻腔内投与の有用性の評価; 日本薬劑学会第 31 年会, 2017 年 5 月

前田千晶、**田中晶子**、武田康嗣、**高山健太郎**、井上大輔、古林呂之、草森浩輔、勝見英正、**坂根稔康**、林 良雄、山本 昌; 鼻腔内投与による CPN-116 (ニューロメジン U アゴニストペプチド) の脳内送達; 第 22 回創剤フォーラム若手研究会, 2016 年 11 月

**田中晶子**、竹村有希、天野真弓、前田千晶、武田康嗣、**高山健太郎**、井上大輔、古林呂之、草森浩輔、勝見英正、**坂根稔康**、林 良雄、山本 昌; 第 25 回 DDS カンファランス, 2016 年 9 月

**Akiko Tanaka**, Yuki Takemura, Daisuke Inoue, Tomoyuki Furubayashi, Koji Taketa, **Kentaro Takayama**, Yoshio Hayashi, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, **Toshiyasu Sakane**, Akira Yamamoto; Transnasal delivery of peptide agonist specific to neuromedin U receptor 2 to the brain for the treatment of obesity; 2016 Controlled Release Society Annual Meeting and Exposition, 2016 年 6 月

#### [ 図書 ] (計 1 件)

ペプチド創薬の最前線 (木曾 良明 編)

第 3 編: 製剤化・デリバリー技術, 25 章 「肥満症に対する新規治療システムの開発: 鼻腔内投与による生理活性ペプチドの脳内送達」

田中晶子, 坂根稔康, CMC 出版, 2019 年 5 月

#### [ 産業財産権 ]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### 研究協力者

研究協力者氏名 : 高山健太郎

ローマ字氏名 : Takayama Kentaro

研究協力者氏名 : 田中晶子

ローマ字氏名 : Tanaka Akiko

研究協力者氏名 : 木村駿輔

ローマ字氏名 : Kimura Shunsuke

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。