

令和元年6月21日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08211

研究課題名(和文) 早期臨床開発を目指した革新的生体膜透過ブースティング技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of innovative biomembrane permeation boosting technology aiming for early clinical development

研究代表者

武田 真莉子 (Takeda, Mariko)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：70257096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は難吸収性物質(バイオ薬物・中分子薬)の経口創薬に有効活用できる生体膜透過デリバリー基盤技術を確立することを目的とした。研究の結果、細胞膜透過ペプチド(CPPs)はバイオ医薬のみならず、BCS Class IIIに属する低分子～中分子薬(分子量300～1000)についてもバイオアベイラビリティ(BA)・ブースティング効果を発揮できることが明らかとなった。さらに既に臨床使用されているCPPs構成アミノ酸(アルギニンやトリプトファンなど)についても、バイオ薬物の強力なBAブースターとなり得る革新的知見が得られ、本基盤技術の経口創薬への早期有効活用の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

現在、創薬とそれに続く臨床開発分野では“難吸収性(低膜透過性)の克服”という困難な課題に直面している。本研究は、その課題に対し普遍的な解決法を提案することを究極の目標として、難吸収性物の経口創薬に有効活用できる生体膜透過デリバリー基盤技術を確立することを目的としている。CPPsおよび構成アミノ酸を非架橋型で用いる本BAブースティング技術は、本研究の成果が示すように、低分子、高分子およびナノ粒子などのDDSキャリアにも万能に適用可能な革新的な技術であり、今後、世界の経口製剤開発をリードし、創薬・創製開発に多大な貢献ができるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish an effective biomembrane permeation delivery technology that can be utilized for preparing oral drug formulation of poorly absorbed substances (biopharmaceuticals and medium molecular drugs). As a result of the research, it was clearly demonstrated that cell-penetrating peptides (CPPs) can exert bioavailability (BA) boosting effects not only on biopharmaceuticals but also on low to medium molecular drugs (molecular weight 300 to 1000) belonging to BCS Class III. Furthermore, arginine and tryptophan, those are constituent amino acids of CPPs, showed powerful BA boosting effects for a number of biopharmaceuticals as well as high molecular weight materials. Since they have been clinically used, it could be considered the possibility of early use of this basic technology for oral formulation development of poorly absorbed drugs.

研究分野：薬剤学、薬物送達システム

キーワード：細胞膜透過ペプチド バイオ薬物 バイオアベイラビリティ 生体膜透過 吸収促進 インスリン アルギニン トリプトファン

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

1. 研究開始当初の背景

21世紀に入り、バイオ市場の急速な発展に伴いペプチド・タンパク質・抗体・核酸医薬などの高分子を生体に効率よく吸収させるための革新的な Drug Delivery System (DDS) 技術がより一層求められている。特に、患者にとって最も利便性が高い経口製剤開発が望まれているものの、バイオ薬物のような膜透過性・安定性が極端に低い物質の経口製剤化は最も難しく、99%のバイオ薬物が注射投与に限られているのが現状である。また、ナノテクノロジーを基盤とする DDS キャリア開発も基礎研究は盛んであるが、その低い膜透過性ゆえに経粘膜吸収を狙った実用化は難しい。さらに、近年創出される低分子の医薬品候補化合物の多くは BCS Class III や IV に分類される難膜透過性であり、その理由として P 糖タンパク質(P-gp)などの Efflux transporter 基質であることが挙げられる。製剤添加剤や機能性食品あるいは特異的阻害剤を併用して Efflux transporter 機能を阻害し基質薬物の吸収改善を図る研究が国内外で盛んであるが、いずれも実用化には至っていない¹⁾。

以上のように現在、創薬全体において物質の“難吸収性(低膜透過性)の克服”という大きな難題が立ちだかっており、その普遍的な解決方法 - すなわち高度に有効なバイオアベイラビリティ(BA)ブースター技術開発が世界中の経口製剤市場に強く求められている。

2. 研究の目的

物質の生体膜透過性を強力に改善できる新たな機能素子として、我々は細胞膜透過ペプチド: cell-penetrating peptides (CPPs)に着目し、これを利用した

DDS を構築してきた。CPPs は通常はターゲット分子と化学的に架橋して用いられる細胞内在化促進ツールであるが、我々は非架橋型で強力な粘膜吸収促進効果があることを世界に先駆けて見出した(図1)²⁾。この知見を端緒として、本技術が薬物の化学構造を変えずに、また生体への安全性を損なうことなくバイオ医薬の経口 BA を驚異的に改善できることを *in vitro* で詳細に検討し、*in vivo* で実証を重ねて世界に発信し²⁾、また、理研と共同で PET imaging により世界で初めてインスリンの消化管吸収の可視化にも成功してきた³⁾。一方で、本技術の適用可能な対象薬物(分子量や物性面)、適用条件(CPP と相互作用する条件)および限界(分子から粒子まで)はどこまでなのか? という大きな命題を明らかにする必要も指摘されている。特に、膜透過性の低い低分子を対象とした CPPs の研究は報告がなく、BCS Class III に属する薬物に対する応用性への検討が大変期待される。さらに、申請者らはごく最近、CPPs の吸収促進機構を解明する過程で、代表的 CPPs であるオリゴアルギニン(R8)の構成アミノ酸であるアルギニンモノマー(R)、ダイマー(R2)あるいはテトラマー(R4)が、ある条件下では強い膜透過促進活性を示すことを新たに発見し、特にアルギニンモノマーに従来の CPPs に匹敵する作用を認め⁴⁾。CPPs を添加剤として臨床使用するには大規模安全性試験が必須とされており、認可されるまでには相当な時間がかかることが懸念事項とされていた。しかし、アルギニンはすでに臨床使用されている製剤添加剤であるため、この知見を実証することができれば、ヒトを対象とした proof-of-concept 臨床試験に速やかに着手できるという着想を得た。

先に述べたように、CPPs を幅広く有効活用するために、その応用可能範囲と限界を明らかにする方向に研究を進展させることは意義が高いと考えられる。従って本研究では、バイオ医薬のみならず、BCS Class III に属する低分子薬についても CPPs の BA ブースティング効果を検証する。さらに、CPPs を利用した製剤の臨床開発を加速させる戦略として、製剤添加物として認可されている化合物の中で CPPs 様の物質に着目し、CPP 構成アミノ酸(アルギニンやトリプトファンなど)の BA ブースターとしての有用性を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず1) 早期臨床試験の実施を目指して、CPP の効果発現に重要な構成アミノ酸であると報告されている塩基性アミノ酸アルギニンや疎水性アミノ酸トリプトファンによる膜透過促進技術の確立を目指す。さらに、本技術の適用可能な対象薬物(分子量や物性)、適用条件(CPP と相互作用する条件)および限界(分子から粒子まで)を明らかにすることを目的として、2) 各種難吸収性低分子化合物の経口創薬に対する膜透過促進技術の応用性を検討する。これらの実験結果を総合的に判断し、CPP あるいはアミノ酸を基盤技術とする膜透過デリバリー法の有用性と限界を明確にする。

(1) 塩基性アミノ酸アルギニンによるインスリン経口吸収促進作用の実証

24時間絶食したマウス(ddY系、雄性6週齢、体重30-40g)に経口ゾンデを用いてインスリ

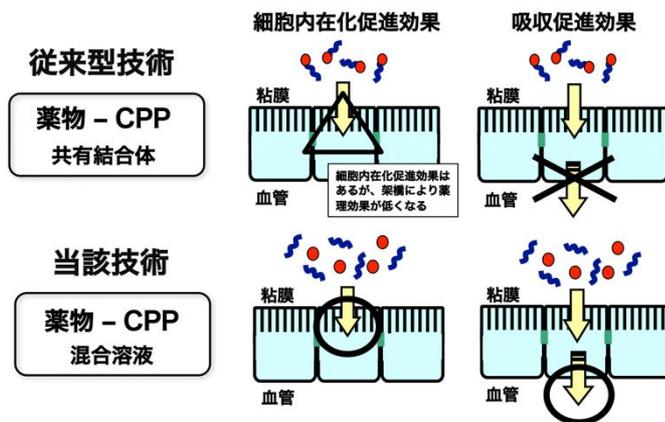


Fig. 1 非架橋型CPPによるバイオ医薬の粘膜吸収促進技術の概略

ン(50IU/kg)およびL-アルギニン(40および200mM)混合溶液を100 μ L/30gの液量で投与した。投与後、経時的に尾静脈から採血し血糖値を測定した。得られた血糖値の時間推移から血糖値-時間曲線上面積(AAC)を算出した。

(2) 疎水性アミノ酸トリプトファンによる消化管吸収促進作用の検証

各種ペプチド薬物および化合物(インスリン、GLP-1、Exendin-4、およびFITC標識高分子デキストラン)とL-およびD-トリプトファン(8、16、および32mM)もしくは他のアミノ酸の混合溶液(0.5mL/200g)をSprague-Dawley系雄性ラット(体重180-220g)の回腸ループに投与した後、経時的に頸静脈から0.25mLの血液を採取した。ペプチド薬物およびデキストランの血漿中濃度はそれぞれELISA法および蛍光測定により定量した。また、吸収促進メカニズムの解明として、表面プラズモン共鳴(SPR)分子間相互作用解析:BiacoreX100を用い、CM5センサーチップにインスリンを固定化した後、各種濃度のL-トリプトファンおよびL-penetratin溶液(2-100 μ M)を適用し、インスリンに対するL-トリプトファンおよびL-penetratinの分子間相互作用を解析した。

(3) 難吸収性低分子化合物を対象とした膜透過促進技術の検証

低中分子薬物として、メトトレキサート(MTX)、メトホルミン(MFM)、リセドロネート(RDN)、ザナミビル(ZNV)、ピンクリスチン(VCR)、およびタクロリムス(TCL)の6種を選択し、両親媒性CPPであるpenetratin(L-およびD-体)存在下および非存在下におけるCaco-2細胞単層膜透過性をTranswellを用いて評価した。経時的に回収したサンプル中の薬物濃度はLC-MS/MSおよびHPLCを用いて測定した。また実験前後に経上皮電気抵抗値(TEER)を測定することにより、薬物およびpenetratin適用によるCaco-2細胞単層膜のintegrityへの影響を評価した。さらに上記薬物のうち、MTXを選択し、Sprague-Dawley系雄性ラット(体重180-220g)を用いた*in situ*腸管吸収実験を実施した。

4. 研究成果

(1) 塩基性アミノ酸アルギニンによるインスリン経口吸収促進作用の実証

*In vivo*経口投与実験の結果、インスリン単独投与と比較して、200mMのアルギニンを併用投与した場合に、投与直後の血糖値の急激な上昇が抑えられ、また、血糖降下作用の増強効果が認められた(Fig. 2)。本研究の結果より、アルギニンはインスリンの経口製剤化を可能にする有用な吸収促進剤になる可能性が示唆された。今後、アルギニンの機能を最大限に発揮できる戦略を構築することにより、インスリンを代表するペプチド薬物の経口デリバリーシステムの実用化につながる可能性が期待される。

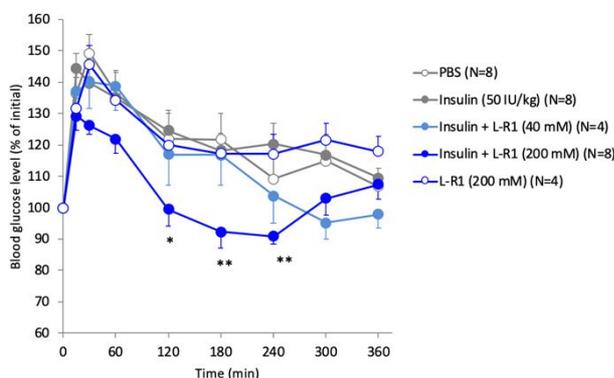


Fig. 2. Blood glucose levels in mice following oral administration of insulin (50 IU/kg) with or without arginine (L-R1). Each data point represents the mean \pm S.E. from n=4-8. * p <0.05, ** p <0.01 vs. Insulin (50 IU/kg)

(2) 疎水性アミノ酸トリプトファンによる消化管吸収促進作用の検証

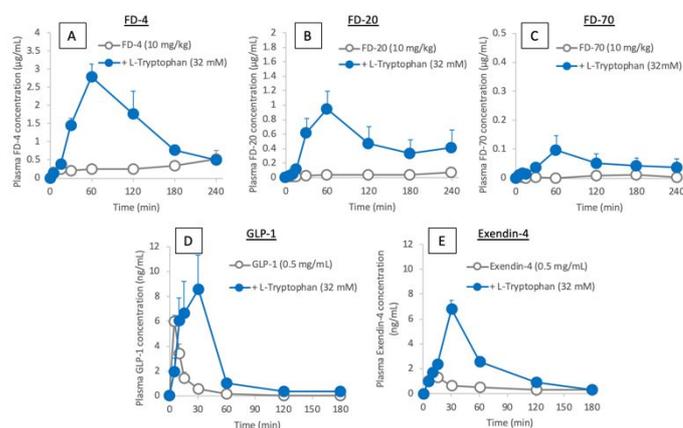


Figure 3. Time profiles of plasma concentrations of model hydrophilic macromolecules (FD-4, FD-20, and FD-70) and peptide drugs (GLP-1 and Exendin-4) after their *in situ* administration with or without L-tryptophan (32 mM) into rat ileal loop. Panels A-C show the absorption of FD-4, FD-20, and FD-70, respectively. Panels D and E show the absorption of GLP-1 and Exendin-4, respectively. Each data point represents the mean \pm SEM of N=3-7.

種々のペプチド薬物および水溶性モデル高分子化合物(デキストラン)の消化管吸収改善におけるL-トリプトワンの応用性を検証した結果、L-トリプトファンはインスリンのみならずGLP-1やExendin-4の吸収性を顕著に増大させることが明らかになった。また、種々の分子量を有するデキストランを用いた吸収実験の結果より、L-トリプトファンは分子量70kDa程度の巨大なタンパク質薬物の消化管吸収改善にも応用できることが示唆された(Fig. 3)。

一方、他の疎水性アミノ酸(イソロイシン、プロリンおよびフェニルアラニン)はいずれも、インスリンの消化管吸収に影響しなかったことから、トリプトファン特有の吸収促進作用であることが示唆された(Fig. 4)。分子間相互作用の解析結果、インスリンおよびL-トリプトファン

間に相互作用が認められなかったことから、バイオ薬物への相互作用を必要とする L-penetratin とは異なり、L-トリプトファンは、薬物との相互作用を介さず消化管粘膜吸収性を向上できることが明らかになった。また、L-トリプトファンによるインスリン吸収促進効果が同時投与した場合に最も大きく、トリプトファンを一旦除去した後にインスリンを投与した場合にはその効果が顕著に減弱することから、その効果は可逆的であることが示唆された。また、L-トリプトファンは消化管上皮の脂質膜や細胞間隙構造に影響しないことが示唆されている。さらに、L-トリプトファンの代謝物であるセロトニンが消化管粘膜からの薬物吸収性を

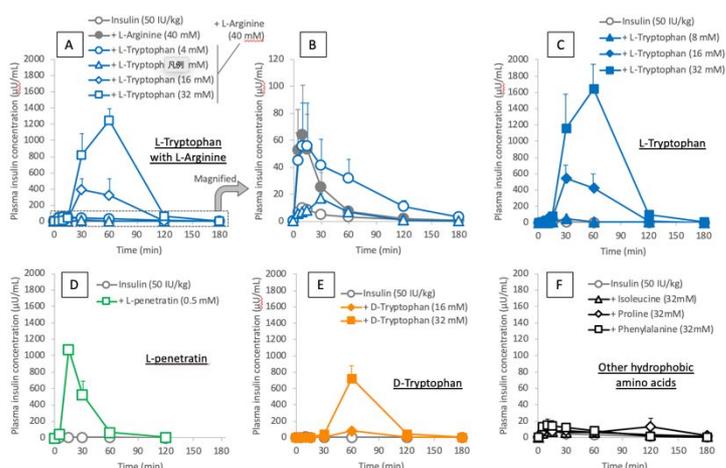


Figure 4. Time profiles of plasma insulin concentration after *in situ* administration of insulin (50 IU/kg) with or without amino acid additives (L- or D-tryptophan, L-arginine, L-isoleucine, L-proline and L-phenylalanine) or L-penetratin into rat ileal loop. Panel A, various concentrations of L-tryptophan (4–32 mM) with L-arginine (40 mM); panel B, magnified graph made from dotted surrounding line in panel A; panel C, various concentrations of L-tryptophan (8–32 mM) without L-arginine; panel D, L-penetratin (0.5 mM); panel E, D-tryptophan (16 or 32 mM); panel F, hydrophobic amino acids (L-isoleucine, proline, and phenylalanine). Each data point represents the mean \pm SEM of N=3–8, except for the group with L-tryptophan (8 mM, N=2) in panel C.

を増大させる活性本体である可能性が考えられたが、セロトニンによるインスリン吸収促進効果はトリプトファンよりも弱く、また作用発現時間が遅延することが確認された。本研究の結果より、トリプトファンは効率的かつ応用性の高い経口吸収促進剤となりうることを示唆されたが、その粘膜透過促進メカニズムを解明するためには、今後さらなる検証が必要である。

(3) 難吸収性低分子化合物を対象とした膜透過促進技術の検証

Caco-2細胞単層膜薬物透過実験より、D-体 penetratin 存在下において、MTX および VCR の透過性が増大することが明らかになった。このとき CPPs の存在による TEER の低下は認められなかったことから、細胞間隙を介した透過促進作用は関与していないことが示唆された。一方、MFM、RDN、ZNV、および TCL の透過性は、L-および D-penetratin のいずれの存在下においても促進されなかった。また、D-penetratin 併用時の各薬物の見かけの透過係数 (P_{app}) の上昇効率は、薬物の分子量および薬物自身の粘膜透過特性と関連し、分子量が比較的大きく、粘膜透過性が低い薬物であるほど高いことが示唆された。しかし脂溶性薬物である TCL は相関性から外れた結果となり、Caco-2細胞単層膜透過実験の結果をもとに CPPs の消化管吸収改善効果を予測することは困難であることが示唆された。また、MTX のように *in vitro* 条件下で D-penetratin 併用の効果が認められた薬物は、*in situ* 腸管吸収実験においてもその効果が再現され、さらに *in vitro* 条件下では効果を示さなかった L-penetratin による消化管粘膜吸収改善効果が認められた。これは Caco-2細胞のみからなる *in vitro* 環境下では *in vivo* の消化管管腔や粘膜の状態・機能を完全に再現できないためであると推察される。本研究の結果より、CPPs は難吸収性薬物にも応用可能な汎用性の高い経口吸収促進ツールとなりうることを示唆された。

以上の研究成果から、CPPs はバイオ医薬のみならず、BCS Class III に属する低分子～中分子薬 (分子量 300～1000) についても BA ブースティング効果を発揮できることが明らかとなった。特に生体膜透過性が低い薬物ほど、吸収改善効率が低いことを示すことができた。また、*in vitro* の結果が *in vivo* でも再現されたことから、これらの知見は、難吸収性低分子～中分子薬の製剤開発に大変有用であると考えられる。さらに、CPPs を利用した製剤の臨床開発を加速させる戦略として、CPP 構成アミノ酸 (アルギニンやトリプトファンなど) の BA ブースターとしての可能性を検討した結果、その効果は予想以上に強力であることが明らかとなった。既に臨床使用されているこれらのアミノ酸がバイオ薬物の新規吸収促進剤になり得る可能性が示唆され、非常に有用な知見が得られたと考えている。

< 引用文献 >

- 1 Thanki K., *et al.*, J Controlled Release, 170(1):15-40, 2013.
- 2 Kamei N., *et al.*, Ther Deliv, 4(3):315-26, 2013.
- 3 Kamei N., *et al.*, J Controlled Release, 146(1):16-22, 2010.
- 4 Kamei N., *et al.*, Int J Pharm, 521(1-2):176-183, 2017.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- 1 Kamei N, Shigei C, Hasegawa R, Takeda-Morishita M. Exploration of the Key Factors for Optimizing the *in Vivo* Oral Delivery of Insulin by Using a Noncovalent Strategy with Cell-Penetrating Peptides, Biol Pharm Bull, 41, 239-246, 2018 (査読あり)
DOI 10.1248/bpb.b17-00798
- 2 Fukuoka Y, Khafagy ES, Goto T, Kamei N, Takayama K, Peppas NA, Takeda-Morishita M. Combination Strategy with Complexation Hydrogels and Cell-Penetrating Peptides for Oral

Delivery of Insulin, Biol Pharm Bull, 41, 811-814, 2018 (査読あり)

DOI 10.1248/bpb.b17-00951

3 Kamei N, Tamiwa H, Miyata M, Haruna Y, Matsumura K, Ogino H, Hirano S, Higashiyama K, Takeda-Morishita M. Hydrophobic Amino Acid Tryptophan Shows Promise as a Potential Absorption Enhancer for Oral Delivery of Biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*, 10, 182-202, 2018 (査読あり) DOI 10.3390/pharmaceutics10040182

4 武田真莉子, 経口 GLP1 製剤と経口インスリン製剤の実用化への展望, *糖尿病* (2018) 61 巻 12 号 pp. 818-821.

5 亀井敬泰, ペプチド医薬の経口・経粘膜吸収製剤の実用化に向けた開発戦略, 最新の薬剤学知見と世界の開発状況をふまえた前臨床/臨床医薬品開発の展望と戦略, *じほう* (2018) pp. 172-187.

6 武田真莉子, 経鼻吸収製剤の現状と将来, *日本薬理学雑誌* (2017) pp. 148-152.

7 亀井敬泰, 武田真莉子, バイオ薬物の経口製剤化に貢献する DDS 技術, 最新 DDS 技術の先端バイオ医薬品への応用開発, *技術情報協会* (2017) pp. 426-435.

8 亀井敬泰, バイオ医薬の非侵襲 DDS 基盤となる膜透過促進戦略の確立, *Drug Delivery System* 32 (2017) pp. 330-339.

9 武田真莉子, インスリン経口デリバリーシステムの基礎と開発動向, *Diabetes Journal* 44 (2016) pp. 59-61.

[学会発表](計 4 件 (国際学会)、計 30 件 (国内学会)、招待講演のみ掲載)

1 亀井敬泰, 武田真莉子, 膜透過促進戦略に基づくバイオ薬物の経口吸収改善, 日本薬学会第 139 年会シンポジウム S39, 2019 年 3 月, 千葉.

2 武田真莉子, 難吸収性薬物の経口 bioavailability を改善する DDS 研究最前線, 新適塾「未来創薬への誘い」第 41 回会合, 2018 年 1 月, 大阪.

3 Takeda-Morishita M, Kamei N, Drug delivery and pharmaceutical technology: Recent advances in DDS research on the key molecule "cell-penetrating peptides" that controls the kinetics of the next-generation drug "biopharmaceuticals", International Conference on Applied Pharmaceutical Sciences 2018, October 2018, Surabaya, Indonesia.

4 亀井敬泰, タンパク質・ペプチド薬物の経口吸収促進戦略, 日本薬剤学会第 33 年会ラウンドテーブルセッション, 2018 年 5-6 月, 静岡.

5 武田真莉子, バイオ医薬の動態を制御するキー分子“細胞膜透過ペプチド”の DDS フロンティア研究, 薬物動態懇話会 4 月例会, 2018 年 4 月, 大阪.

6 武田真莉子, 糖尿病治療薬開発を推進する DDS の最新の話, 第 79 回大阪薬科大学公開教育講座, 2018 年 7 月, 大阪.

7 亀井敬泰, ペプチド薬物の経粘膜投与戦略, 日本薬剤学会前臨床開発・経口吸収フォーカスグループ合同合宿討論会, 2017 年 12 月, 静岡.

8 Takeda-Morishita M, Kamei N, Recent advances in DDS research on the key molecule "cell-penetrating peptides" that controls the kinetics of the next-generation drug "biopharmaceuticals", Thammasat University, Drug Discovery and Develop center, September, 2017, Bangkok, Thailand.

9 武田真莉子, インスリン経口製剤化～臨床開発動向と基礎研究の進展～, 第 27 回 DM Club Meeting, 2017 年 10 月, 仙台.

10 Kamei N, Tamiwa H, Miyata M, Takeda-Morishita M, Potential of hydrophobic amino acid tryptophan as an absorption enhancer for the oral delivery of biopharmaceutics, Oral Delivery Focus Group Scientific Session, The 45th Annual Meeting and Exposition, the Controlled Release Society, July 2017, New York, USA

11 亀井敬泰, 細胞膜透過ペプチドの生体膜透過ブースティング効果を基盤とするバイオ医薬の経粘膜デリバリーシステムの開発, 日本薬学会第 137 年会シンポジウム, 2017 年 3 月, 仙台.

12 亀井敬泰, 細胞膜透過ペプチドを基盤としたバイオ医薬の非侵襲的デリバリー法の開発, 熊本大学拠点形成研究 A 主催特別講演会, 2016 年 12 月, 熊本.

13 武田真莉子, 第 6 回 Hyogo Expert Forum for Diabetic Medicine, インスリンおよび GLP-1 の経口製剤化を推進する創製技術と臨床開発動向, 2016 年 10 月, 神戸.

14 Takeda-Morishita M, Noninvasive delivery systems for biopharmaceuticals based on a noncovalent strategy with cell-penetrating peptides, 30th Anniversary Symposium of The Nagai Foundation Tokyo, July 2016, Tokyo Japan

15 武田真莉子, 糖尿病治療薬の非注射剤化を推進する高度創製技術, 第 5 回日本くすりと糖尿病学会学術集会, 2016 年 10 月, 神戸.

16 武田真莉子, 薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) 研究における最新の話, 神戸西地区薬学研修会, 2016 年 9 月, 神戸.

[図書](計 4 件)

1 武田真莉子, バイオ医薬の創薬・創剤に活用される細胞膜透過ペプチド(CPPs), バイオ医薬品の開発と市場 2019, シーエムシー出版 (2018) pp. 106-115.

- 2 亀井敬泰, 武田真莉子, 細胞膜透過ペプチドを利用したバイオ医薬の粘膜透過促進戦略, ドラッグデリバリーシステム バイオ医薬品創成に向けた組織、細胞内、核内送達技術の開発-, 杉林堅次監修, シーエムシー出版 (2018) pp. 33-42.
- 3 武田真莉子, バイオ医薬の経粘膜デリバリーにおける細胞膜透過ペプチド (CPPs) の有用性, 医療・診断をささえるペプチド科学-再生医療・DDS・診断への応用-, シーエムシー出版 (2017) pp.221-230.
- 4 武田真莉子, 剤形の進歩: GLP-1 およびインスリンの非注射剤の開発動向, *Drug Delivery System* 31 (2016) 440-449.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 低分子医薬化合物の経粘膜吸収促進剤

発明者: 武田真莉子, 亀井敬泰

権利者: 神戸学院大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-023567

出願年: 2017 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

神戸学院大学薬学部 薬物送達システム学研究室

<http://www.pharm.kobegakuin.ac.jp/~dds/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 亀井 敬泰

ローマ字氏名: (KAMEI, noriyasu)

所属研究機関名: 神戸学院大学

部局名: 薬学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 40637451

(2)研究協力者

研究協力者氏名: El-Sayed Khafagy

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。