

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18980

研究課題名（和文）脳内デリバリーを促進する細胞膜融合性ナノ集合体を用いたタンパク質点鼻型製剤の開発

研究課題名（英文）Development of S/O/W emulsion formulations for nose to brain protein delivery

研究代表者

通阪 栄一（Toorisaka, Eiichi）

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号：40363543

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の経鼻投与は、脳内への速やかな薬物送達、全身性副作用の回避ができ、非侵襲的なため理想的な脳内デリバリーの経路といえる。しかし、タンパク質を鼻腔へそのまま投与しても、粘液での洗浄作用、粘膜中プロテアーゼによる分解、さらに粘膜組織の透過性の低さが問題でほとんど脳へ到達することはない。本研究では、これらの問題を克服するために、固体のSolid-in-Oil-in-Water（S/O/W）エマルジョンをタンパク質性薬物のキャリアとして用いた。結果として、粘膜近傍でエマルジョン油相を酵素分解することで、放出した界面活性剤-タンパク質複合体が脳内タンパク質デリバリーを促進することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜親和性の高い脂溶性集合体による膜透過促進技術が、鼻腔からのタンパク質脳内デリバリーに応用できることが確認された。今後、この技術で脳内へのタンパク質デリバリーが確立できれば、アルツハイマー病やパーキンソン病などの脳疾患を悩んでいる患者に対するQOLが向上し、社会への貢献は非常に大きい。また、投与技術がなく臨床試験が滞っている多くのバイオ医薬品の製剤化も進むことが予想され、産業界への波及効果も大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to develop a nose to brain protein delivery system using emulsions. Intranasal administration of protein has a few problems such as mucosa clearance, low absorption from the epithelial cell layers and protease degradation. To overcome these problems, the S/O/W emulsions using solid fat were examined as protein carriers. This study demonstrated that the proteins/surfactant complexes released by the emulsion collapse promote nose to brain protein delivery.

研究分野：医用化学工学

キーワード：タンパク質デリバリー Nose-to-brain エマルジョン 界面活性剤集合体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が進む中、アルツハイマー病など今後益々増加が予測される脳疾患に対し、バイオ医薬品(タンパク質)が有望な治療薬として注目されており、それらの脳への送達技術の開発が望まれている。しかし、効果的な脳への薬物送達手段がまだない。そのため、脳疾患に関しては外科的手術など極めて侵襲的治療がなされているのが現状である。薬物脳内デリバリーのため、血中からのルートが長年検討されてきたが、脳への異物侵入防御機構である血液脳関門を突破できていない<sup>1)</sup>。そこで近年、新しい経路として、経鼻投与が注目されている。鼻腔嗅上皮と脳の中樞神経系にはこれらを連結する独自のルートが存在するためである。

経鼻投与は、脳内への速やかな薬物送達、全身性副作用の回避ができ、非侵襲的なため理想的な薬物脳内デリバリーの経路といえる。しかし、親水性高分子であるタンパク質を鼻腔へそのまま投与しても、(1)粘液での洗浄作用、(2)粘膜中プロテアーゼによる分解、さらに(3)粘膜組織の透過性の低さが問題でほとんど脳へ到達することはない。現在、膜透過促進剤や微粒子キャリアの利用が検討されているが、大幅な促進には至っていない<sup>2)</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究では、Solid-in-Oil-in-Water (S/O/W) エマルジョンをタンパク質性薬物キャリアとして用いた。S/O/W エマルジョンは、親水性高分子であるタンパク質を界面活性剤で被覆し表面改質を行った脂溶性集合体を Oil-in-Water (O/W) エマルジョンの油滴中に分散させたものである。

脂溶性集合体がもつ細胞膜親和性による透過促進作用を鼻粘膜に応用し、鼻腔内最上部に位置する嗅上皮細胞近傍まで送達できれば脳への移行が進むと考えられる。そこで、エマルジョンへの粘膜附着性付与による粘膜滞留性の向上、微細化による粘膜深部への送達により、脂溶性集合体を上皮細胞層表面へ集積するキャリアの開発を目指した。また従来の S/O/W エマルジョンは安定性が低いため、油相に固体脂を用いた固体の S/O/W エマルジョンキャリアを開発し、Nose-to-Brain デリバリーキャリアとしての利用を試みた。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 固体 S/O/W エマルジョンの調製

FITC 修飾 BSA (FITC-BSA) 水溶液とシヨ糖エルカ酸エステル (ER290) 含有シクロヘキサンをホモジナイザーで高速攪拌 (21,600 rpm) し、凍結乾燥することで、脂溶性集合体を得た。これをトリリスチン含有ジクロロメタン中に分散させた Solid-in-Oil (S/O) サスペンションと水溶性界面活性剤水溶液をホモジナイザーで高速攪拌し、Solid-in-Oil-in-Water (S/O/W) エマルジョンを調製した。続いて、SPG 膜に圧入し粒子径制御を行い、恒温槽内で振盪 (100rpm, 2h, 40°C) させ、ジクロロメタンを除去し固体 S/O/W エマルジョンを得た。粘膜附着性修飾エマルジョンの調製には、0.01wt%キトサン溶液と混合した。

### 3-2. タンパク質の細胞内導入評価

細胞培養ディッシュに粘膜上皮細胞モデルの Caco-2 細胞を播種し、静置培養した後、固体 S/O/W エマルジョンを添加した。PBS で洗浄後、パラホルムアルデヒド溶液で固定し、フローサイトメーターによりタンパク質の細胞内導入効率を評価した。

### 3-3. 脳移行性評価

上記と同様の方法でモデルタンパク質としてインスリンを封入した固体 S/O/W エマルジョンを調製した。また、油脂として大豆油を用いた液体の S/O/W エマルジョンも用意した。

マウス (ddY) に三種混合麻酔薬を腹腔内注射した後に、仰臥位の体勢にし、マイクロピペットを用いて各鼻腔 10  $\mu$ L ずつ計 20  $\mu$ L のエマルジョン製剤を投与した。その後、リパーゼ溶液を各鼻腔に 5  $\mu$ L ずつ投与した。所定の時間で脳を摘出し、PBS 中で粉砕することでインスリンの抽出を行った。遠心分離後の上澄みに含まれるインスリンを ELISA 法で定量した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 固体 S/O/W エマルジョンの調製条件の検討

本研究では、固体脂を有機溶媒に溶解してエマルジョンを調製後に、溶媒を除去することで、固体脂微粒子の水中懸濁液(固体エマルジョン)を形成させる方法で、固体 S/O/W エマルジョンの調製を試みた。エマルジョン形成にあたり、様々な親水性界面活性剤を検討したが、溶媒除去後に分散性の良い球状粒子の形成が可能なポリビニルアルコール (PVA) を選択した。

粒子径制御には膜乳化法を用いた。SPG 膜細孔径の大きいものから順に通していくことで SPG 膜の細孔径にあわせて微細化できることが確認された(図1)。0.6  $\mu$ m の SPG 膜を通すことで平均粒子径は 0.46  $\mu$ m まで微細化できることが分かった。

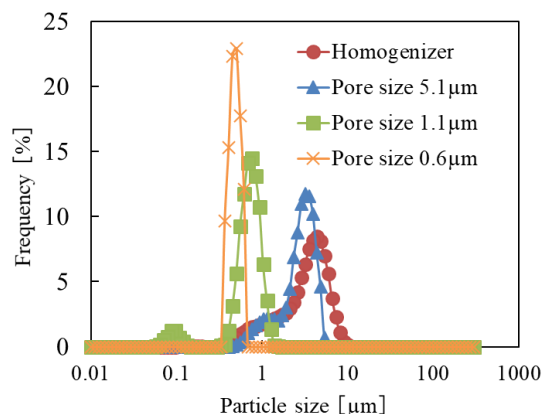


図1 固体 S/O/W エマルジョンの粒子径分布

0.5  $\mu\text{m}$  よりも小さい粒子は粘膜深部に送達できるとの報告があることから、目的にあった粒子径制御が可能となった。

この中で、ホモジナイザーと膜孔径 0.6  $\mu\text{m}$  の SPG 膜を用いて調製した固体粒子の SEM 画像を図 2 に示す。どちらの場合も得られた粒子表面形態が滑らかではなかったが球形であることが確認された。

次に、静電的相互作用を利用しエマルション表面に粘膜付着性高分子であるカチオン性のキトサンの表面修飾を試みた。図 3 に粒子表面電位を示す。エマルションのみでは表面が負に帯電しているのに対し、キトサンの添加により表面電位が正に変化した。このことから粘膜付着性を有するキトサンの修飾が確認された。

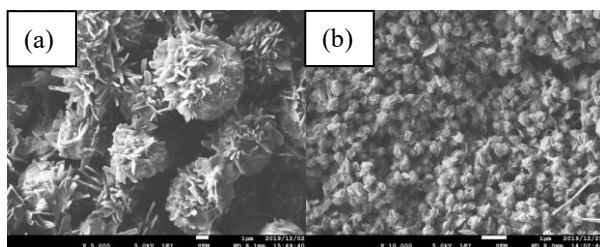


図 2 固体脂粒子の SEM 画像  
(a)ホモジナイザー, (b)SPG 膜孔径 0.6  $\mu\text{m}$

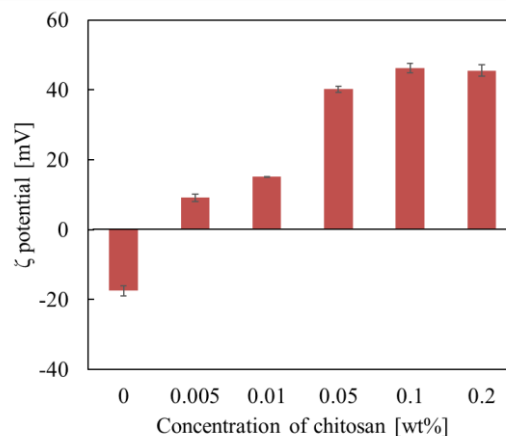


図 3 エマルション油滴表面のゼータ電位

#### 4-2. タンパク質の細胞内導入評価

図 4 に 0.6  $\mu\text{m}$  の SPG 膜で調製された固体 S/O/W エマルションの細胞導入効率を示す。利用した Caco-2 細胞は粘膜上皮細胞モデルとして使用される細胞である。導入量の比較から水溶液よりもキャリアを用いた方が細胞内に導入されやすいことが分かった。キャリアの中でもキトサン修飾が行われたエマルションにおいて導入効率が増加し、油分解酵素であるリパーゼを添加したときにさらに導入が進んだ。これは、キトサンが細胞表面への付着性を有すること、及び細胞周辺での油相の分解が脂溶性集合体の細胞への接触、融合を促進したためだと考えられる。このことから、エマルションが細胞近傍に送達されることはタンパク質導入には有利となることが示唆された。

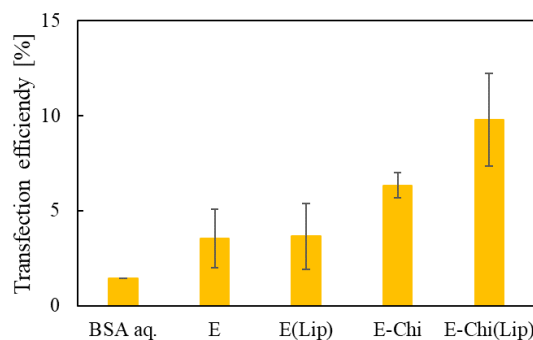


図 4 タンパク質の細胞導入効率  
E:エマルション, E-Chi:キトサン修飾エマルション, Lip:リパーゼ処理

#### 4-3. タンパク質の脳移行性評価

S/O/W エマルションをキャリアとしてタンパク質の Nose-to-Brain デリバリーが可能であるかをマウスを用いて評価した。しかし、キャリアとして固体 S/O/W エマルションを用いた場合、ほとんどインスリンは脳へ移行しなかった。固体脂を用いて調製したエマルションが阻害に働いている可能性があると考え、液体 S/O/W エマルションでも評価を行った。結果として、液体 S/O/W エマルションをそのまま鼻腔に投与しても脳への移行性は促進されなかったが、リパーゼを用いた油脂の分解処理を併用すると脳への移行性が大きく向上することが判明した。油の分解により脂溶性集合体の膜透過性効果を十分に活かすことができたためだと考えられる。

これらの結果から、脂溶性集合体が嗅上皮細胞を透過する可能性は示唆されたが、固体 S/O/W エマルションでは脂溶性集合体の特性を活かすことができないことが判明した。エマルション特性から粒子設計を見直し、改良することが必要である。また、鼻腔から脳への輸送メカニズムが定かでないため、今後、粘膜面の直接観察などにより解析する予定である。

#### <引用文献>

- 1) S. Md, et al., Nano-carrier enabled drug delivery systems for nose to brain targeting for the treatment of neurodegenerative disorders. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 43, 295-310 (2018)
- 2) P. Picone, et al., Nose-to-brain delivery of insulin enhanced by a nanogel carrier. *J. Control. Release*, 270, 23-36 (2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉高京華, 通阪栄一
2. 発表標題 タンパク質の粘膜透過性促進のためのエマルジョン製剤の開発
3. 学会等名 膜シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉高京華, 通阪栄一
2. 発表標題 タンパク質の鼻粘膜透過性促進のための固体エマルジョンキャリアの開発
3. 学会等名 化学工学会中国四国支部・関西支部合同徳島大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉高京華, 通阪栄一
2. 発表標題 タンパク質の吸収促進のための粘膜滞留性エマルジョンの開発
3. 学会等名 膜シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----