

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19H04468
研究課題名(和文) 低分子・高分子・ナノ医薬品の脳部位特異的送達システムの開発

研究課題名(英文) Development of drug delivery system to the brain

研究代表者

近藤 昌夫 (Kondoh, Masuo)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：50309697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化に伴い中枢神経疾患(CNS)の発症率が指数関数的に増加することから、国内外を問わず製薬企業はCNS薬開発に鎧を削っていますが、未だCNS薬の治験成功率は最低です。この理由の一つに、そもそも脳に薬が届かないことがあります。この研究では、脳の中に薬を送達する方法の開発を試み、これまで注目されていなかった新しい方法で脳の中に薬を運べる可能性を見出しました。今後、この可能性を深く調べていく予定です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発した方法は、将来的に色々な薬を脳内に運ぶために利用できます。例えば、低分子、抗体などの高分子に加え、粒子も脳内に運ぶことができるかもしれません。粒子を運ぶことができれば、粒子中の薬をかえることでCNS疾患治療に大きく貢献できると期待されます。65歳を過ぎるとCNS疾患の発症率が急激に増加することから、健康寿命を延ばすにはCNS薬の開発が重要です。この研究成果をさらに磨くことで健康社会に実現に貢献したいと思っています。

研究成果の概要(英文)：The population is aging in the world, and the elderly population is expected to exceed 1.4 billion by 2050. Patients with central nervous system (CNS) diseases is expected to increase exponentially in the aging society. Although pharmaceutical companies have been making strenuous efforts to develop CNS drugs, the success rate of CNS drug is still the lowest among diseases. One of the reasons is that blood-brain barrier (BBB) prevents drug delivery to the brain. In this study, we attempted to develop a method to deliver drugs to the brain across the BBB, and we proved a novel concept for drug delivery to the brain. We will investigate safety and efficacy of the developed method.

研究分野：規制科学、薬物送達学

キーワード：脳内薬物送達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

周知のように世界規模で高齢化が進み、2050年には高齢者人口が14億人を超えると予想されている。このうち認知症患者は1億3500万人に達すると試算されており、メグファーマが認知症治療薬の開発に鎭を削っているものの、依然として認知症に対する薬剤貢献度(約20%)および治療満足度(約10%)は全疾患中最低の値を示している。

さて、脳の毛細血管は隣接する細胞間隙を密着結合によってシールすることで血液脳関門(BBB)を構築し、血液・脳間の物質交換を厳密に制御しており、多くの薬剤は単に投与しただけではBBBを透過することはない。一般的に脂溶性が高い薬剤はBBBを透過し得るが、薬効発現には透過量が不十分な場合が多く、治療候補薬物の選択幅を著しく制限する要因となっており、ここに中枢神経薬創製の難しさがある。

このボトルネックを解消するため、これまでに脳毛細血管のBBB通過技術が開発されているものの、現在のところ実用化されているのはポドパのみにすぎない。

申請者は、教科書、文献等の調査を行い、膜タンパク質Aに着目した。

膜タンパク質Aに着目は海馬、小脳等に高発現している。海馬や小脳は認知症の発症に関与していることを考慮すると、この報告は膜タンパク質Aを標的とすることで低分子、中分子、抗体、ナノ粒子等を海馬・小脳特異的に送達する技術開発につながる可能性を示唆しているものの、未だ膜タンパク質Aを標的とした脳部位特異的薬物送達に係る報告は見当たらない。

これまでに申請者は、別の創薬研究において膜タンパク質Aを利用した薬物吸収促進技術の開発を試み、膜タンパク質Aの細胞外領域認識技術(技術A)を創製していた。

2. 研究の目的

本研究は、独自の技術Aを有効活用することで、膜タンパク質Aを標的とした次世代脳内薬物送達技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

技術Aの脳内分布を解析し、膜タンパク質Aを標的とした脳部位特異的薬物送達活性解析に向けた基本情報を取得するために、以下の項目について検討した。

(1) Caco-2細胞の単層膜培養系における活性解析

ヒト腸管上皮由来Caco-2細胞の単層膜培養系を用いて、技術Aによるタイトジャンクションバリア制御活性(TER測定)を検討した。具体的には、Caco-2細胞を 6×10^4 cells/wellになるようにセルカルチャーインサートに播種した後に、技術Aをbasal側またはapical側から添加した。その際、膜タンパク質Aには結合しないC2を陰性対照として用いた。

次に、TEERの低下が観察されない条件にて、蛍光標識(DyLight 633)した技術Aを用い、トランスサイトーシス誘導条件を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。具体的には、CaCo-2細胞にDyLight 633 蛍光標識技術Aを終濃度 $3 \mu\text{g/mL}$ でbasal側、または終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ でapical側から処理し、 37°C で1, 2, 4時間反応させた後に4% PFAで固定化し、核染色及び細胞膜染色を行なった。

(2) 技術Aの組織分布解析

蛍光標識した技術Aを用いて、技術A尾静脈投与後の組織分布(肝臓、腎臓、肺、脳、心臓、脾臓、胃、小腸、大腸)を解析するとともに、HE染色による組織障害性に係る情報を併

せて取得することとした。蛍光分子としては、食餌等による自家蛍光を回避するために 750 nm の長波長の近赤外光を持つ Vivo Tag-S 750 (パーキンエルマー社)を用いることとした。なお、Vivo Tag-S 750 単体 (Genhance 750) の生体に投与した際の血中半減期は、0.5 時間とのことであり、本蛍光試薬が血中半減期に及ぼす影響は少ないものと考えられた。

(3) 技術 A の脳部位分布解析

全脳イメージングにより、技術 A の脳部位分布を定性的に解析することとした。なお、予備検討より、灌流液にヘパリンを添加することで、灌流中の血液凝固等を回避し、血管染色試薬 (DyLight488-Lectin) による染色が良好になることが確認できたため、本条件にて実施することとした。

具体的には、蛍光標識 (DyLight550) 技術 A を 5 mg/kg の用量で 8 週齢雄性 C57BL6N マウスに尾静脈投与後、1 時間及び 4 時間後にヘパリンを含む生理食塩水、及び DyLight488 Tomato Lectin を含む生理食塩水で灌流後、4% PFA で固定し、脳を摘出した。摘出した脳を FAST システムにより全脳解析を行った。

(4) 技術 A の安全性の評価

技術 A の脳への分布が認められた 5 mg/kg の用量で投与した時の毒性を、体重、主要臓器重量、生化学的パラメータ (AST, ALT, CPK, BUN, CRP) 及び、病理組織学的検査により評価した。具体的には、技術 A を 5 mg/kg の用量で 8 週齢雄性 C57BL6N マウスに尾静脈投与し、24 時間後に体重を測定後、採血及び組織を採材した。なお、コントロールとして、生理食塩水を同容量投与したものをを用いた。

4. 研究の成果

(1) Caco-2 細胞の単層膜培養系における活性解析

技術 A を basal 側に添加した場合、10 µg/mL 以上で TEER の有意な低下が認められた。一方、apical 側に添加した場合、30 µg/mL までの濃度では TEER の低下は認められなかった。

また、トランスサイトーシスの有無を解析したところ、basal 側添加した場合には反応時間と共に細胞表面上 (apical 側) に蛍光が移動する様子が観察された。なお、apical 側から添加した場合には、観察される蛍光が少なかった

以上より、in vitro モデル系において、技術 A は apical 側から basal 側に輸送されるものと考えられた。

(2) 技術 A の組織分布解析

雄性 8 週齢 C57BL/6N マウスに VivoTag-S 750 標識した技術 A を 5 mg/kg で尾静脈投与し、投与 1、4、8、24、48 時間後に各臓器 (脳、腎、肝、心、肺、脾、胃、小腸、大腸) を摘出後、Maestro EX にて蛍光を観察・定量した。その結果、技術 A はいずれの臓器にも分布したが、脳では 1~4 時間後に多く存在した。

(3) 技術 A の脳部位分布解析

上述したように、5 mg/kg の用量で脳への分布が認められたため、蛍光標識 (DyLight550) 技術 A を 5 mg/kg の用量で 8 週齢雄性 C57BL6N マウスに尾静脈投与した。

全脳解析では特に嗅球の血管周辺に強い蛍光が認められた。また、大脳皮質、視床下部、小脳の血管周辺にも弱いながら蛍光が観察された。

一般的に、嗅球においては自家蛍光が認められることがある。そこで、より長波長の蛍光を発する DyLight633 で標識した技術 A を 5 mg/kg の用量で 8 週齢雄性 C57BL6N マウスに尾静脈投与した後に脳を採材し、共焦点顕微鏡による観察を行った。その結果、技術 A の蛍光は嗅球の血管に沿って観察された。

技術 A の受容体である膜タンパク質 A は、海馬、小脳、視床下部に発現していることが報告されている。また、視床下部、嗅球、網膜に発現しているとの報告もなされている。これらのことから、技術 A は脳に一様に分布するのではなく、膜タンパク質 A の発現部位に分布している可能性が示唆された。

(4) 技術 A の安全性の評価

技術 A の脳への分布が認められた 5 mg/kg の用量で技術 A の安全性評価を試みたところ、技術 A 投与群において、脾臓重量が約 1.5 倍増加していたが、その他の臓器重量及び体重には差が認められなかった。また、血液生化学的検査において、技術 A 投与群の 1 匹において、ALT 及び AST が共に高い個体が認められたもののいずれも 100 を超えない値であり、偶発性である可能性は否定できなかった。なお、BUN、CPK は両群間に差はなく、CRP は検出限界以下であった。

さらに、採取した組織のヘマトキシリン・エオジン染色標本を基に組織学的検査を実施した。その結果、コントロール群において、脳の側脳室の軽度拡張、腎盂拡張、また技術 A 投与群において肺の気管支周囲への好中球浸潤が認められたが、まれではあるが自然発生性に観察され、今回も 1 例のみでの変化であることから偶発性と考えられた。

また、AST および ALT の高値が認められた技術 A 投与群の 1 例に、単核細胞集簇巣が認められた。当該個体の AST および ALT の値は高値であったがいずれも 100 を超えない値であり、この数値では形態学的な変化に及ぼす影響については不明である。さらに、コントロール群の全例において単核細胞集簇巣が認められ、特にコントロール投与群の 2 例で強く観察されたことから、単核細胞集簇巣が認められたことについては、飼育環境による影響が大きいと推察された。なお、両群の全例とも肝細胞の細胞質が抜けて観察され、グリコーゲン貯留が顕著であったが、その状態には個体差がないことから、飼料による影響が考えられた。以上より、技術 A 投与による肝毒性への影響は否定できないが、1 例のみであり、群単位で考慮すると偶発性の変化である可能性が考えられた。

技術 A 投与群の 1 例に白脾腫大が認められたが、他の所見は認められていないことから個体差であり、毒性変化によるものではない可能性が高いと考えられた。また、技術 A 投与群において脾臓重量が増加していたが、組織学的には変化は認められず、血液生化学的検査による CRP 値も検出限界以下であり、炎症反応は起こっていないと考えられるが、当該脾臓の変化は毒性によるものか否かは現時点では判断できなかった。

これらのことから、技術 A 5 mg 投与に起因する重篤な毒性変化はないと考えられた。

以上より、技術 A は、脳における部位特異的な薬物送達のツールになると考えられ、本研究成果は、次世代脳内送達プラットフォーム構築に繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tachibana, K.; Hashimoto, Y.; Shirakura, K.; Okada, Y.; Hirayama, R.; Iwashita, Y.; Nishino, I.; Ago, Y.; Takeda, H.; Kuniyasu, H.; Kondoh, M.	4. 巻 336
2. 論文標題 Safety and efficacy of an anti-claudin-5 monoclonal antibody to increase blood-brain barrier permeability for drug delivery to the brain in a non-human primate.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Control Release	6. 最初と最後の頁 105-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2021.06.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto, Y.; Campbell, M.; Tachibana, K.; Okada, Y.; Kondoh, M.	4. 巻 44
2. 論文標題 A Pharmacological Target to Modify the Permeability of the Blood-Brain Barrier.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 1380-1390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tachibana, K.; Kondoh, M.	4. 巻 2367
2. 論文標題 A method to prepare a bioprobe for regulatory science of drug delivery system to the brain: an angulin binder to modulate tricellular tight junction-seal.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 291-304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tachibana Keisuke, Iwashita Yumi, Wakayama Erika, Nishino Itsuki, Nishikaji Taiki, Kondoh Masuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Tight Junction Modulating Bioprobes for Drug Delivery System to the Brain: A Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1236 ~ 1236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics12121236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Yoshimi, Isoda Katsuhiko, Taira Yuichiro, Taira Ikuko, Kondoh Masuo, Ishida Isao	4. 巻 887
2. 論文標題 Anti-tumor effect of a recombinant Bifidobacterium strain secreting a claudin-targeting molecule in a mouse breast cancer model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173596 ~ 173596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173596	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Yosuke, Tachibana Keisuke, Kondoh Masuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Tight junction modulators for drug delivery to the central nervous system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Discovery Today	6. 最初と最後の頁 1477 ~ 1486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.drudis.2020.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Yosuke, Okada Yoshiaki, Shirakura Keisuke, Tachibana Keisuke, Sawada Makoto, Yagi Kiyohito, Doi Takefumi, Kondoh Masuo	4. 巻 368
2. 論文標題 Anti-Claudin Antibodies as a Concept for Development of Claudin-Directed Drugs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 179 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.118.252361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Yosuke, Tachibana Keisuke, Krug Susanne M., Kunisawa Jun, Fromm Michael, Kondoh Masuo	4. 巻 20
2. 論文標題 Potential for Tight Junction Protein-Directed Drug Development Using Claudin Binders and Angubindin-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4016 ~ 4016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20164016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tachibana Keisuke, Kondoh Masuo	4. 巻 2109
2. 論文標題 A Method to Prepare Claudin-Modulating Recombinant Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 251 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2019_258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤昌夫、竹田浩之	4. 巻 37
2. 論文標題 本邦の上皮バリアの生物学に育まれた創薬を目指して	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1793-1796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橘 敬祐、近藤 昌夫	4. 巻 55
2. 論文標題 上皮を標的とした創薬イノベーションとレギュラトリーサイエンス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 522 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.55.6_522	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Yosuke, Kondoh Masuo, Takeda Hiroyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Development of drug delivery system for treatment of central nervous system diseases targeting tight junctions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 374 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2745/dds.34.374	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondoh Masuo	4. 巻 34
2. 論文標題 [FOREWORD] Interpenetration of innovation and regulation for drug development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 333 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2745/dds.34.333	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Masuo Kondoh
2. 発表標題 Claudin-5 binder is a promising candidate for drug delivery to the brain by modulation of blood-brain barrier
3. 学会等名 4th International Tight Junction Conference in Berlin (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 Claudin-5を標的とした脳内薬物送達技術のイノベーション・レギュレーション
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 上皮バリアの分子基盤に立脚したDDSイノベーション・レギュレーション
3. 学会等名 創薬薬理フォーラム第29回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西野樹、岩下有美、橘敬祐、近藤昌夫
2. 発表標題 リバースレギュラトリーサイエンス研究～中枢神経系作用薬の創薬基盤技術開発に向けた承認事例等の論点整理～
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西鍛冶大樹、若山英里香、橘敬祐、近藤昌夫
2. 発表標題 リバースレギュラトリーサイエンス研究～認知症治療薬の現状及び臨床開発上の課題～
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 上皮バリアを標的とした粘膜吸収促進技術の螺旋的発展
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 上皮バリアの生物学に立脚した創薬基盤技術の開発
3. 学会等名 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業2019年度BINDS公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 上皮バリアの生物学を基盤としたDDS研究
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 イノベーション・レギュレーション・コミュニケーション
3. 学会等名 第56回薬剤学懇談会研究討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Hashimoto, Tomoyuki Hata, Minoru Tada, Manami Iida, Akihiro Watari, Yoshiaki Okada, Takefumi Doi, Hiroki Kuniyasu, Kiyohito Yagi, Keisuke Tachibana, Masuo Kondoh
2. 発表標題 Proof of concept for Claudin-2-directed cancer therapy by using a monoclonal antibody that recognizes the extracellular loop domain of Claudin-2
3. 学会等名 CRS Annual meeting & Exposition 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Hashimoto, Keisuke Shirakura, Yoshiaki Okada, Hiroyuki Takeda, Akihiro Watari, Tatsuya Sawasaki, Keisuke Tachibana, Takefumi Doi, Kiyohito Yagi, Masuo Kondoh
2. 発表標題 Claudin-5 binder is a promising candidate for drug delivery to the brain by modulation of blood-brain barrier
3. 学会等名 AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Hashimoto, Keisuke Shirakura, Yoshiaki Okada, Hiroyuki Takeda, Kohki Endo, Maki Tamura, Akihiro Watari, Yoshifusa Sadamura, Tatsuya Sawasaki, Keisuke Tachibana, Takefumi Doi, Kiyohito Yagi, Masuo Kondoh
2. 発表標題 Claudin-5 as a target for drug delivery to the brain by modulation blood-brain barrier
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Hashimoto, Tomoyuki Hata, Minoru Tada, Manami Iida, Akihiro Watari, Yoshiaki Okada, Takefumi Doi, Hiroki Kuniyasu, Kiyohito Yagi, Keisuke Tachibana, Masuo Kondoh
2. 発表標題 Efficacy and safety evaluation of claudin-2 as a target for cancer therapy by using anti-claudin-2 monoclonal antibodies
3. 学会等名 2019 Antibody Engineering & Therapeutics (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------