

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07019

研究課題名(和文)オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸を用いたタンパク質医薬の経粘膜吸収促進

研究課題名(英文) Enhancement of mucosal absorption of protein drugs using hyaluronic acid modified with oligoarginines

研究代表者

佐久間 信至 (Sakuma, Shinji)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：80388644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質医薬の経粘膜吸収促進剤としてのテトラグリシン-L-オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸の有用性を検討した。分子量約4.2 kDaのエキセンジン-4は、同ヒアルロン酸誘導体と肺に共投与したとき、完全に吸収された。同ヒアルロン酸誘導体の吸収促進能はタンパク質医薬の分子量に影響されなかったものの、肺からのタンパク質医薬の吸収性が分子量の増加とともに低下したため、分子量約22.1 kDaのソマトロピンのバイオアベイラビリティ(BA)は、同ヒアルロン酸誘導体の肺への共投与下、平均で46%であった。BAの目標値を50%とした本研究を通して、臨床応用に向けた同ヒアルロン酸誘導体の有用性は実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子量のタンパク質医薬は、粘膜を透過できず、ほとんどが注射剤として開発される。医師による注射剤の投薬管理は、薬物療法の確実性で利点がある一方、タンパク質医薬自体の高コストと相まって医療費を引き上げる要因となる。注射器の進歩による痛みの軽減等、注射剤に対する患者のコンプライアンスは改善されているが、注射剤だけでは、継続的な治療に対する患者のアドヒアランスは低下し、新型コロナウイルス感染症で顕在化したパンデミック時の治療提供のスピードと範囲に限界が生じる。その解決策は、患者による投薬管理が可能な製剤の開発であり、タンパク質医薬の経粘膜デリバリー技術の開発は喫緊の課題である。

研究成果の概要(英文)：We investigated a potential of hyaluronic acid modified with tetraglycine-L-octaarginine as an absorption enhancer, which delivers protein drugs applied on the mucosa into systemic circulation. Exendin-4, whose molecular weight (Mw) is about 4.2 kDa, was completely absorbed when coadministered intrapulmonary with the hyaluronic acid derivative. Absorption-enhancing abilities of the hyaluronic acid derivative was independent of Mw of protein drugs; however, since absorption of protein drugs decreased with an increase in Mw, mean bioavailability (BA) of somatropin with a Mw of about 22.1 kDa was 46.1% under intrapulmonary coadministration with the hyaluronic acid derivative. The current research with a BA target of 50% indicated that there was a reasonable likelihood for the clinical use of the hyaluronic acid derivative.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 吸収促進 経粘膜吸収促進 バイオ医薬 タンパク質医薬 膜透過ペプチド 膜透過ペプチド固定化高分子 ヒアルロン酸

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、研究者個人に帰属します。

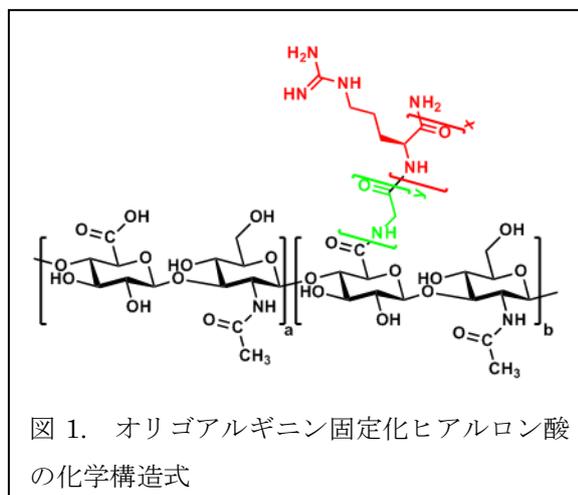
1. 研究開始当初の背景

ペプチドやタンパク質、抗体、核酸などのバイオ医薬は、標的分子に対する特異性が極めて高い次世代医薬として注目されている。バイオ医薬は膜透過性が低く、粘膜などの投与部位からの吸収性が極めて悪いため、ほとんどのバイオ医薬は注射剤として開発されている。しかし、注射剤は医師による投薬管理を必要とし、製造コストも高いことから、バイオ医薬自体の高コストと相まって医療費高騰の一因となっている。

投与部位における低膜透過性分子の膜透過性を促進し、血中や作用部位へ効率的に送達させる吸収促進の戦略は、①プロドラッグ、②吸収促進剤の利用などによる吸収障壁能の緩和、③投与経路の変更、に大別される。低分子有機化合物ではプロドラッグを中心に成功例が見られるが、バイオ医薬では鼻や肺などの吸収障壁能が相対的に低い部位にインタクトのタンパク質医薬を投与する経鼻・経肺製剤が数例あるだけで、プロドラッグや吸収促進剤など、創薬・創剤を基盤とするバイオ医薬の吸収促進技術の臨床的成功例はなかった。そのような中、研究開始時点の2019年、ノボノルディスクファーマが第3相臨床試験を実施していたGLP-1アナログのセマグルチドの経口剤が米国FDAにより承認された。中鎖脂肪酸誘導体のN-(8-(2-ヒドロキシベンゾイル)アミノ)カプリル酸ナトリウム (SNAC) を吸収促進剤として含有する錠剤であり、ヒトにおけるバイオアベイラビリティ (BA) は約0.5%である。

研究代表者は、膜透過ペプチドに着目した研究をこれまで行ってきた。膜透過ペプチドとは、HIV ウイルスの研究に見出された細胞膜を効率的に透過するタンパク質の一次構造をもとに設計された、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸に富む10残基程度のカチオン性ペプチドである。同ペプチドは、マクロピノサイトーシス (細胞が本来備えている食作用の一つであり、負電荷を有する細胞膜表面に静電的相互作用により濃縮された正電荷の分子が細胞内に取り込まれる現象) により細胞内へ取り込まれる。研究代表者は、「細胞膜上に滞留することによりマクロピノサイトーシスを繰り返し誘導し、共存する低膜透過性分子の細胞内取り込み/経粘膜吸収を飛躍的に促進する」という独自のコンセプトに基づき、代表的な膜透過ペプチドのオリゴアルギニンを高分子に固定化した新規の膜透過促進剤を創製した。支持体として合成高分子のN-ビニルアセトアミドとアクリル酸の共重合体 (PNVA-co-AA) を用いた非分解性のオリゴアルギニン固定化PNVA-co-AAを最初に開発した。マウス経鼻投与でのバイオアベイラビリティ (BA) が1%に満たないタンパク質医薬のエキセンジン-4 (GLP-1アナログ) の吸収性は、同高分子 (具体的にはD-オクタアルギニン固定化PNVA-co-AA) と共投与することにより約25倍に改善されることを明らかにした。

研究代表者は、本技術の臨床応用を目指して、生体成分のヒアルロン酸を支持体とする生分解性のオリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸 (図1) を開発した。テトラグリシンをスペーサーとしてL-オクタアルギニンを固定化したヒアルロン酸誘導体 (テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸) は、D-オクタアルギニン固定化PNVA-co-AAよりも安全性に優れ、分子量数~数十kDaの酸性及び塩基性タンパク質医薬のマウス経鼻投与におけるBAを10~15%まで改善する有望な吸収促進剤であることを明らかにした。さらに、SNACとの比較検討を実施し、SNACの経鼻吸収促進効果は分子量数kDaのタンパク質に限定されるのに対して、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は、分子量や等電点などのタンパク質医薬の物性に影響されない安定した吸収促進効果を示すことを実証した。



2. 研究の目的

上述のテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の吸収促進効果は、研究として画期的である。しかし、投与されたタンパク質医薬の80%以上が依然として有効利用されていないことは事実である。脱注射剤化により製剤としてのコストは低減されるものの、タンパク質医薬自体のコストを鑑みると、BAのさらなる改善が本技術の臨床応用に向けた研究を加速すること明らかである。

本研究の目的は、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸をシーズとして用いて、その投与ルートや化学構造の最適化を通してタンパク質医薬の経粘膜投与時のBAを50%以上に改善するとともに、最適化されたオリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸によるタンパク質医薬の吸収促進機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸によるタンパク質医薬の BA>50%を実現する投与ルートの開発

ヒアルロン酸の側鎖のカルボキシル基にテトラグリシン-L-オクタアルギニンを固定化した。タンパク質医薬のモデルとして、分子量が約 22.1 kDa のソマトロピンと分子量が約 4.2 kDa のエキセンジン-4 を用いた。投与部位として、肺、口腔、胃及び直腸を選択した。麻酔下のマウスに、タンパク質医薬とテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の混合液をそれぞれのルートから投与した後、経時的に採血し、血漿中薬物濃度を ELISA 法により測定した。

(2) オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸の化学構造の最適化

側鎖としてジグリシン-L-テトラアルギニンあるいはジグリシン-L-ジアルギニンを持つヒアルロン酸誘導体を合成した。(1)と同じ方法(投与部位として鼻を追加)で動物実験を実施した。

(3) オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸によるタンパク質医薬の吸収促進機構の解明

西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) をモデルタンパク質に用いて、各種エンドサイトーシス阻害剤存在下、培養した気道上皮細胞の HRP 透過性に及ぼすテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の透過促進効果を評価した。

4. 研究成果

(1) オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸によるタンパク質医薬の BA>50%を実現する投与ルートの開発

タンパク質医薬の経粘膜吸収は受動拡散であることから、肺や消化管など膜表面積が広い部位が吸収に有利である。オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸は生分解性であることから、未吸収物質の回収が困難な肺でも投与可能である。まず、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸によるソマトロピン及びエキセンジン-4 の経肺吸収促進効果を検討した。その結果、図 2 に示すように、肺からの吸収性は高く、薬物のみの投与下における平均の BA は、ソマトロピンで 18.8%、エキセンジン-4 で 69.4%であった。テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸を共投与することにより、平均の BA はソマトロピンで 46.1%、エキセンジン-4 で 116.7%と改善され、分子量の小さいエキセンジン-4 は 100%吸収された。一方、胃内投与では吸収促進効果は得られず、タンパク質医薬の消化管内での分解が原因と考えられた。口腔内及び直腸内ではテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸による吸収促進効果は確認されたものの、分子量の小さいエキセンジン-4 の口腔内投与で平均の BA が 1%を超えた程度であった(他はヒアルロン酸誘導体の有無に関わらず BA<1%)。以上のことから、目標の BA>50%を実現する投与ルートは経肺であることが明らかとなった。

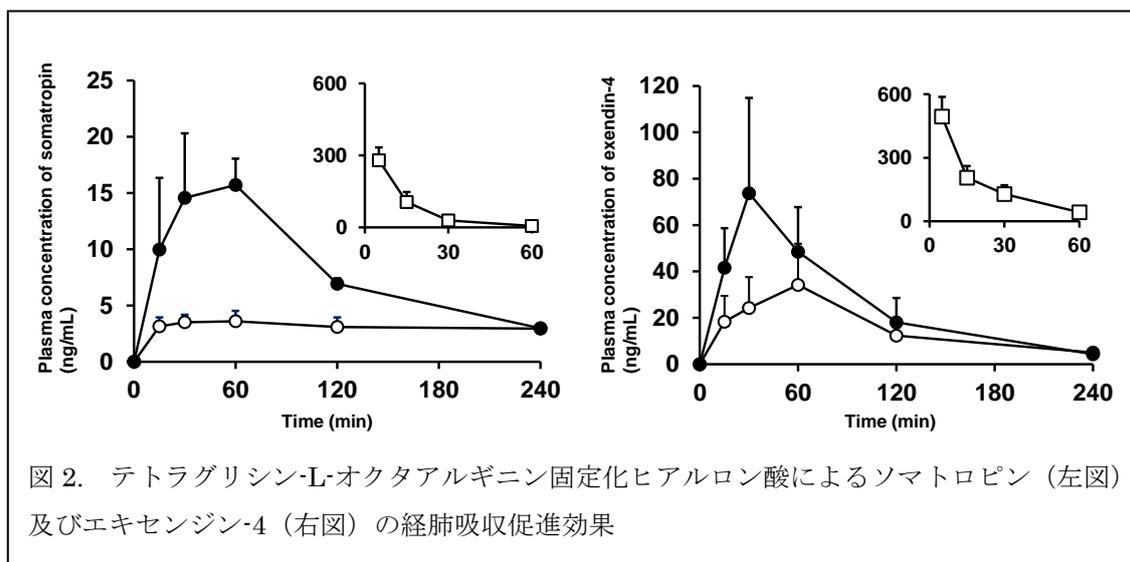


図 2. テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸によるソマトロピン (左図) 及びエキセンジン-4 (右図) の経肺吸収促進効果

(2) オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸の化学構造の最適化

検討事例が最も多い経鼻ルートを用いて、タンパク質医薬の吸収性に及ぼすオリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸の化学構造の影響を検討した。ジグリシン-L-テトラアルギニン固定化ヒアルロン酸は、ソマトロピン及びエキセンジン-4 に対して、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸と同等の吸収促進効果を示した。一方、ジグリシン-L-ジアルギニン固定化ヒアルロン酸は、ソマトロピンの経鼻吸収をまったく促進しなかった。分子量の小さいエキセンジン-4 の経鼻吸収性は促進したものの、アルギニン鎖が長い他のヒアルロン酸誘導体よりも吸収促進効果が弱くなる傾向が認められた。

一方、研究の進捗に伴い、BAを改善する技術的なブレイクスルーとともに、患者の利便性の高い投与ルートを開発することの重要性を臨床医から指摘された。投与部位として胃及び口腔を選択したときのテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の吸収促進効果は前述の通りであるが、ジグリシン-L-テトラアルギニン固定化ヒアルロン酸は、ソマトロピン単独投与時の約15倍の3.1%まで口腔内投与時のBAを改善することが確認された（テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸は単独投与時の約6倍の吸収改善効果）。今後、アルギニン鎖長の異なるヒアルロン酸誘導体間で口腔内投与時の吸収促進効果に差がある理由を解明し、利便性の高い投与ルートとしての口腔内投与の実現可能性を検証していきたい。

(3) オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸によるタンパク質医薬の吸収促進機構の解明

テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸によるHRPの透過促進は、クラスリンエンドサイトーシス阻害剤により有意に阻害され、マクロピノサイトーシス及びカベオラエンドサイトーシス阻害剤では阻害されなかった。以上のことから、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸によるタンパク質医薬の吸収促進機構にクラスリンエンドサイトーシスが関与することが示唆された。

以上、分子量が数kDaのタンパク質医薬については、テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸と肺に共投与することにより、BA>50%が達成された。タンパク質医薬に対するテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の吸収促進能（ヒアルロン酸誘導体の共投与時/非投与時のBA比）はタンパク質医薬の分子量の影響を受けなかったものの、肺からのタンパク質医薬の吸収性が分子量の増加とともに低下したため、分子量が数十kDaのタンパク質医薬の平均のBAは目標（BA>50%）に未達であった。しかし、目標をわずかに下回った程度であり（BA:46.1%）、本研究を通して、臨床応用に向けたオリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸の有用性は実証された。将来的に、患者による投薬管理が可能で患者にやさしいタンパク質医薬の非侵襲的投与製剤の開発を目指して、今後も研究を精力的に続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takumi Tomono, Haruya Yagi, Saki Kanemoto, Masami Ukawa, Kohei Miyata, Koichi Shigeno, Shinji Sakuma	4. 巻 616
2. 論文標題 Acquisition of absorption-enhancing abilities of cationic oligopeptides with short chain arginine residues through conjugation to hyaluronic acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Pharm.	6. 最初と最後の頁 121519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2022.121519	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八木晴也, 齋藤夏紀, 伴野拓巳, 鶴川真実, 宮田康平, 滋野浩一, 佐久間信至
2. 発表標題 テトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の経直腸吸収促進剤としての有用性評価
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八木晴也, 半田悠真, 伴野拓巳, 鶴川真実, 宮田康平, 滋野浩一, 佐久間信至
2. 発表標題 オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸を用いたバイオ医薬の口腔粘膜吸収促進
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴野拓巳, 八木晴也, 金本紗季, 鶴川真実, 宮田康平, 滋野浩一, 佐久間信至
2. 発表標題 バイオ医薬の経鼻吸収促進剤としての短鎖オリゴアルギニン固定化ヒアルロン酸の有用性評価
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八木晴也, 伴野拓巳, 鶴川真実, 宮田康平, 滋野浩一, 佐久間信至
2. 発表標題 タンパク医薬の経肺吸収促進を可能にするテトラグリシン-L-オクタアルギニン固定化ヒアルロン酸の特性解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八木晴也, 伴野拓巳, 鶴川真実, 宮田康平, 飛田悦男, 佐久間信至
2. 発表標題 膜透過ペプチドを側鎖に持つヒアルロン酸誘導体を用いたバイオ医薬の経肺 デリバリー
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020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
研究分担者	伴野 拓巳 (Tomono Takumi) (30824685)	摂南大学・薬学部・助教 (34428)	
研究分担者	鶴川 真実 (Ukawa Masami) (50735511)	摂南大学・薬学部・助教 (34428)	

	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
研究協力者	八木 晴也 (Yagi Haruya)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	滋野 浩一 (Shigeno Koichi)		

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