

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07032

研究課題名（和文）薬物動態および病態解析に基づく経鼻投与型認知症薬物治療戦略の実証研究

研究課題名（英文）Establishment of Nose-to-Brain Delivery Strategy for Treatment of Dementia Based on Pharmacokinetic and Therapeutic Analyses

研究代表者

亀井 敬泰（Kamei, Noriyasu）

神戸学院大学・薬学部・講師

研究者番号：40637451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、経鼻投与後の脳各部位、血中あるいは脳毛細血管周囲腔における薬物分布特性を評価することにより、CPP併用経鼻投与戦略における鼻腔-脳直接輸送機構の寄与を解明することを目的とした。さらに、CPP併用経鼻投与を介した脳内薬物送達法のさらなる応用性を評価するため、抗A抗体薬の脳送達後のアミロイド前駆体タンパク質（APP）ノックインマウスにおける認知症病態改善効果を検証した。これら研究を通して、本投与戦略の有用性を実証し革新的な認知症薬物治療法の実現に貢献することを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、CPP併用経鼻投与法が高分子量バイオ医薬品の送達効率を飛躍的に向上させる有用な戦略となりうることを実証した。本投与戦略を認知症治療薬の開発研究に導入することにより、認知症治療薬としての実用化が停滞する疾患修飾薬の開発を促進できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify the involvement of direct nose-to-brain transport pathways in the enhanced brain delivery via the intranasal coadministration strategy with cell-penetrating peptides (CPPs). Moreover, we investigated the applicability of our strategy to the delivery of anti-amyloid beta antibody to the brain and improvement of the therapeutic potential of the drugs in amyloid precursor protein (APP) knock-in mice. Through this study, we tried to demonstrate the usefulness of nose-to-brain delivery via intranasal administration with CPPs for treating dementia.

研究分野：薬剤学

キーワード：経鼻投与 脳内デリバリー ペプチド薬物 抗体薬 細胞膜透過ペプチド アルツハイマー病 認知症

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

世界に先駆けて超高齢社会に突入した我が国において、アルツハイマー病に代表される認知症患者数は今後益々増加することが予想される。これまで製薬各社において、アルツハイマー病の原因物質であるアミロイド (A) の脳内濃度を減少させる抗体薬やその産生を抑えるセクレターゼ (BACE1) 阻害薬等の有望な疾患修飾薬の開発が進められてきたが、真に有効な原因治療薬を確立するには至っていない (2021 年にアデカヌマブが世界初の A 抗体薬として米国で承認されたが、その治療効果は未だ疑問視されている)。

認知症治療薬開発が成功しない背景には、認知症の病態が完全に解明されていないことに加えて (薬理的な要因) 病巣である脳への薬物移行性が血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) の存在により著しく制限されていることが原因として関与していると考えられる (薬物動態学的要因)。そのため我々は、新たな認知症治療薬候補として脳神経細胞活性化効果を有するインスリンや GLP-1 受容体作動薬 (Exendin-4) 等の生理活性ペプチド薬物に着目し、「経鼻投与」を介して脳に効率的にそれら薬物を送達する手法の構築に着手してきた。

2. 研究の目的

これまでの研究において、細胞内薬物送達ツールである細胞膜透過ペプチド (Cell-Penetrating Peptides: CPPs) を用いることにより、前述のインスリンや Exendin-4 の経鼻投与後の脳移行効率を飛躍的に向上できることを見出してきた。さらに、CPP 併用による効率的経鼻投与戦略を介して脳に移行したこれらペプチド薬物が老化促進マウス (Senescence-Accelerated Mouse Prone-8: SAMP8) の認知機能障害を顕著に改善できることを明らかにしてきた。しかし現状では、CPPs 併用投与後の鼻腔から脳への薬物移行促進メカニズムや病態治療効果との関係性を詳細に明らかにするには至っていない。そこで本研究では、経鼻投与および全身投与後の脳各部位、血中あるいは脳毛細血管周囲腔における薬物分布特性を評価することにより鼻腔 脳直接輸送機構の寄与を解明することを目的とした。さらに本研究では、CPP 併用経鼻投与を介した脳内薬物送達法のさらなる応用性を評価するため、抗 A 抗体薬を脳に送達することを試みた。本検討では、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) ノックインマウスをアルツハイマー型認知症モデル動物として用い、抗 A 抗体を CPP と併用投与することによる脳移行性促進作用と認知症治療効果への影響を検証した。これら研究を通して、本投与戦略の有用性を実証し革新的な認知症薬物治療法の実現に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス経鼻投与後の血漿中および脳内薬物濃度解析：Exendin-4 および L-penetratin (最も強力な CPPs の一つ) の混合溶液を ddY マウスの左鼻腔に 5 μ L 投与し、経時的な全身循環血中への吸収および嗅球・大脳皮質・視床下部・海馬等の脳内への分布を ELISA 法により定量解析することにより、CPPs 併用時における鼻腔から脳への直接的な薬物移行促進機構の寄与を評価した。比較のため、Exendin-4 溶液を単独で ddY マウスに皮下注射した後、上記と同様に血中および脳内の Exendin-4 濃度を測定した。

In vivo イメージングを利用したラット経鼻投与後の脳内および三叉神経への薬物分布解析：インスリン及び Exendin-4 に Cy7 を標識した後、L-penetratin と混合し投与液とした。鼻腔閉鎖手術 (Hirai 法) を施した Sprague-Dawley ラットの左鼻腔に薬液を投与した。一定時間経過後に、脳および三叉神経を採取し、*in vivo* イメージングシステムを用いて脳断面および三叉神経における蛍光分布を測定した。

マウス経鼻投与後の血管周囲腔および海馬への薬物分布解析：インスリンおよび L-penetratin の混合溶液を ddY マウスの左鼻腔に投与し、30 分後に脳を摘出し凍結切片を作製した。ヒトインスリン抗体 (ウサギ由来) および抗ウサギ IgG-Alexa488 で凍結切片を免疫染色し、さらに脳毛細血管の観察のため DyLight594 標識 Tomato Lectin で染色した後、血管周囲腔および海馬等におけるインスリンの分布を共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。

抗体経鼻投与時のマウス脳移行性評価：C57BL/6J 雄性マウス (10 週齢) の左鼻腔もしくは尾静脈にヒト IgG 抗体および L-penetratin (i.n. のみ) を投与した。投与 30 分後に脳を摘出し、嗅球、脳前方および後方へと分離し、ホモジネート中のヒト IgG 濃度を ELISA 法により測定した。

抗 A 抗体長期経鼻投与後の認知症治療効果の評価：App ノックインマウス (App NL-G-F/NL-G-F) および C57BL/6J 野生型マウス (雄制、12 カ月齢) の左鼻腔に、Alexa594 標識抗 A (1-16) 抗体および penetratin の混合溶液を 14 日おきに計 4 回投与した。記憶学習評価として、新規物体認識試験およびモリス水迷路試験を実施した。投与終了後に摘出した脳を凍結切片およびホモジネートし、A β 42 および Iba1 を測定した。

4 . 研究成果

血漿中 Exendin-4 濃度が同程度に維持されるように、皮下および L-penetratin 併用経鼻投与を介して ddY マウスに Exendin-4 を投与した。その結果、L-penetratin 併用経鼻投与時に脳内 Exendin-4 濃度が飛躍的に増大したのに対し、皮下投与時には Exendin-4 が血中に同程度吸収されたにもかかわらず、脳内濃度の上昇は認められなかった。つまり、L-penetratin 併用経鼻投与による Exendin-4 の脳移行性の増大は、血中への Exendin-4 の吸収増大に起因する間接的な促進効果ではなく、鼻腔から脳への直接輸送経路を介して達成されたことが示唆された。

続いて、Cy7 標識インスリンおよび Cy7 標識 Exendin4 を L-penetratin と併用しラットに経鼻投与した結果、Cy7-インスリン及び Cy7-Exendin4 は三叉神経に高濃度に分布したものの、脳実質において蛍光は検出されず、L-penetratin 併用時においても蛍光強度は増大しなかった。一方、Cy7-インスリンおよび Cy7-Exendin4 単独投与時と比較して、L-penetratin 併用投与後に経時経過とともに三叉神経に対する嗅球の蛍光強度比の上昇が認められたことから、L-penetratin 併用によるペプチド薬物の脳移行促進作用には、三叉神経経路よりも嗅粘膜経路が強く寄与していることが示唆された。

さらに共焦点レーザー走査型顕微鏡によりインスリン経鼻投与後のマウス脳切片を観察した結果、脳中心近くの血管周囲腔においてインスリンの分布が認められたことから、CPP 併用投与後にインスリンが鼻腔から粘膜固有層あるいは嗅球周囲の脳脊髄液を介して血管周囲腔へと移行し、これが脳移行性の増大に寄与している可能性が示唆された。また、L-penetratin 併用投与を介して脳に移行したインスリンは、視床下部あるいは海馬神経細胞の周囲に特異的に局在したことから、認知症病巣部位へのインスリン標的化が可能であることが示唆された。

本研究ではさらに、penetratin 併用経鼻投与法のさらなる応用を目指して、認知症の疾患修飾薬（抗体薬）の効率的な脳送達が可能であるか検証した。まずヒト IgG と L-penetratin を併用投与することにより、巨大な抗体薬を効率的に鼻腔から脳に送達可能であることを明らかにした。続いて、抗 A 抗体を L-penetratin と併用経鼻投与することにより App ノックインマウスの認知機能障害を顕著に改善できることを明らかにした。

本研究を通じて、CPP 併用経鼻投与法が高分子量バイオ医薬品の送達効率を飛躍的に向上させる有用な戦略となりうることを実証した。本投与戦略を認知症治療薬の開発研究に導入することにより、認知症治療薬としての実用化が停滞する疾患修飾薬の開発を促進できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 亀井敬泰	4. 巻 118
2. 論文標題 細胞膜透過ペプチド併用投与によるバイオ医薬のNose-to-Brain送達効率の改善	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ペプチドニュースレター	6. 最初と最後の頁 2-5
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 亀井敬泰	4. 巻 81
2. 論文標題 精神神経疾患治療に寄与するバイオ医薬の脳内送達法の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 薬剤学	6. 最初と最後の頁 69-74
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 Khafagy El-Sayed, Kamei Noriyasu, Fujiwara Yui, Okumura Haruka, Yuasa Teruyo, Kato Masahiro, Arime Kenji, Nonomura Anna, Ogino Hideyuki, Hirano Serena, Sugano Sayaka, Takeda-Morishita Mariko	4. 巻 319
2. 論文標題 Systemic and brain delivery of leptin via intranasal coadministration with cell-penetrating peptides and its therapeutic potential for obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 397 ~ 406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2020.01.016	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 亀井敬泰, 武田真莉子	4. 巻 30
2. 論文標題 Nose-to-Brain薬物送達効率を向上させる粘膜透過促進戦略	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 MEDCHEM NEWS	6. 最初と最後の頁 25-29
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 亀井敬泰	4. 巻 35
2. 論文標題 DDSの「ちょっとした」技術・知識, 経鼻投与	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 78-80
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 亀井敬泰, 武田真莉子	4. 巻 34
2. 論文標題 Nose-to-Brain経路を利用したペプチド薬物送達法: 認知症治療薬の開発に向けて	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 360-367
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 亀井敬泰	4. 巻 34
2. 論文標題 用語解説, 老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse Prone-8, SAMP8)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 397
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 Kamei Noriyasu, Suwabe Susumu, Arime Kenji, Bando Hidemi, Murata Kaho, Yamaguchi Maika, Yokoyama Natsuki, Tanaka Erina, Hashimoto Ayaka, Kanazawa Takanori, Ago Yukio, Takeda-Morishita Mariko	4. 巻 13
2. 論文標題 Investigation of the Transport Pathways Associated with Enhanced Brain Delivery of Peptide Drugs by Intranasal Coadministration with Penetratin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1745 ~ 1745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13111745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamei Noriyasu, Hashimoto Ayaka, Tanaka Erina, Murata Kaho, Yamaguchi Maika, Yokoyama Natsuki, Kato Masahiro, Oki Keisuke, Saito Takashi, Saido Takaomi C., Takeda-Morishita Mariko	4. 巻 In press
2. 論文標題 Therapeutic effects of anti-amyloid antibody after intravenous injection and efficient nose-to-brain delivery in Alzheimer's disease mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Delivery and Translational Research	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13346-022-01117-6	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13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 亀井敬泰
2. 発表標題 細胞膜透過ペプチド併用によるバイオ医薬のNose-to-Brain送達効率の向上
3. 学会等名 トランスポーター研究会関東支部会2020シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀井敬泰
2. 発表標題 オーバービュー・Nose-to-Brain薬物送達戦略の課題
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀井敬泰
2. 発表標題 精神神経疾患治療に寄与するバイオ医薬の脳内送達法の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂東秀美, 松本淳志, 諏訪部晋, 有銘兼史, 亀井敬泰, 金沢貴憲, 武田真莉子
2. 発表標題 細胞膜透過ペプチド併用投与を介したペプチド薬物の鼻腔 脳移行促進機構の解明
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本彩花, 田中恵里奈, 村田加帆, 山口舞佳, 横山夏季, 坂東秀美, 亀井敬泰, 斉藤貴志, 西道隆臣, 武田真莉子
2. 発表標題 アルツハイマー病治療効果を高める抗アミロイド 抗体薬の投与経路の比較評価: APPノックインマウスを用いた検討
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂東秀美, 松本淳志, 諏訪部晋, 有銘兼史, 亀井敬泰, 金沢貴憲, 武田真莉子
2. 発表標題 Penetratin併用経鼻投与を介したExendin-4脳移行促進経路の評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kamei N, Okada N, Ikeda T, Choi H, Fujiwara Y, Okumura H, Takeda-Morishita M
2. 発表標題 Effective nose-to-brain delivery of exendin-4 via coadministration with cell-penetrating peptides for improving progressive cognitive dysfunction
3. 学会等名 The 10th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀井敬泰
2. 発表標題 ペプチド医薬の効率的脳内送達法の開発と認知症治療への応用
3. 学会等名 第19回大学-医療連携講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂東秀美, 諏訪部晋, 有銘兼史, 亀井敬泰, 金沢貴憲, 武田真莉子
2. 発表標題 Penetratin併用経鼻投与を介したExendin-4脳移行促進経路の評価
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部大会(誌上開催)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kamei N, Okada N, Ikeda T, Fujiwara Y, Okumura H, Takeda-Morishita M
2. 発表標題 Improvement of Progressive Cognitive Dysfunction in the Senescence-Accelerated Mouse via Intranasal Administration of Exendin-4 with Cell-Penetrating Peptides
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting and Exposition, the Controlled Release Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 諏訪部晋, 有銘兼史, 亀井敬泰, 武田真莉子
2. 発表標題 Penetratin併用による鼻腔 脳直接輸送経路を介したExendin-4の脳移行促進作用の検証
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有銘兼史, 諏訪部晋, 亀井敬泰, 金沢貴憲, 武田真莉子
2. 発表標題 Penetratin併用経鼻投与によるインスリン脳送達における三叉神経経路の寄与の評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山夏季, 村田加帆, 山口舞佳, 田中恵里奈, 橋本彩花, 亀井敬泰, 武田真莉子
2. 発表標題 Penetratin併用経鼻投与によるインスリン脳送達後の脳内分布特性の評価
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 亀井敬泰, 武田真莉子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 pp.154-164
3. 書名 認知症を治癒する革新的創薬に向けたペプチド薬物脳内送達法の開発, ペプチド創薬の最前線	

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸学院大学薬学部 薬物送達システム学研究室ホームページ https://www.pharm.kobegakuin.ac.jp/~dds/

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	武田 真莉子 (Takeda Mariko) (70257096)	神戸学院大学・薬学部・教授 (34509)	

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