

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：34512

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06118・19K21236

研究課題名(和文) 自閉症治療に対する新規DDS開発 -経鼻投与によるoxytocinの脳内送達-

研究課題名(英文) Development of brain drug delivery system for the treatment of autism spectrum disorder -Transnasal delivery of oxytocin to the brain-

研究代表者

田中 晶子(Tanaka, Akiko)

神戸薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：30824320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はオキシトシン(OXT)鼻腔内投与後の脳移行性を向上する新たなDDS製剤の開発を目的とする。OXTの脂溶性増大による脳移行性の改善を目的として、脂肪酸修飾OXTを合成した。脂肪酸修飾によりOXTの脂溶性は増大したが、溶解性がやや低下した。また、マウス鼻腔内投与後のOXTの脳移行性は改善されなかった。これらの結果より、脳移行性の改善には、OXTの溶解性と膜透過性のバランスの最適化が必要であることが示唆された。一方、OXTの粘膜吸収を促進する製剤添加物としてアニオン性界面活性剤のN-アシルタウリン酸塩を併用したところ、OXTは効率的に脳へ移行することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、鼻腔内投与後のOXTの脳移行性を改善するためのDDS開発を目的として、化学修飾または製剤添加物の併用によるOXTの脳移行性改善を試みた。なかでもN-アシルタウリン酸塩は、鼻腔内投与後のOXTの脳移行性を著しく改善した。これらの知見は、N-アシルタウリン酸塩がOXTなどの様々な中分子医薬の脳移行性を改善する可能性を示すものである。したがって、本研究で得られた知見は、ASD治療法の開発にとどまらず、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患などの脳疾患を対象とした中分子医薬による新規治療法の開発に展開できる可能性が高く、社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop brain delivery system of oxytocin (OXT) after intranasal administration. To improve brain delivery efficacy of OXT, OXT was conjugated with fatty acids. However, fatty acid-modification decreased the water-solubility of OXT, and hardly affected the brain delivery efficacy of OXT after intranasal administration in mice. These results indicate that the balance between the solubility and the permeability should be optimized for the efficient brain delivery of OXT after intranasal administration. In contrast, we examined the effects of N-acyl taurates, anionic surfactants, to the brain delivery efficacy of OXT. We demonstrated that the brain delivery efficacy of OXT was significantly improved by co-administration of N-acyl taurates. These results indicate that N-acyl taurates are promising additives for the efficient brain delivery of OXT and the treatment of autism spectrum disorder.

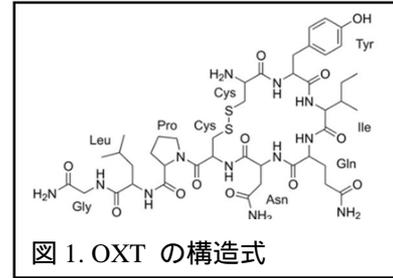
研究分野：生物薬剤学

キーワード：鼻腔内投与 脳内送達 オキシトシン 自閉症治療 自閉症スペクトラム障害 中枢神経系疾患 脳内動態

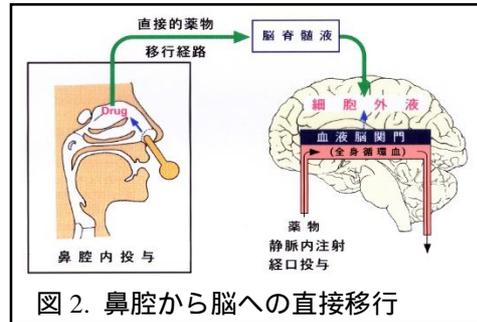
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder, ASD) は社会性の欠如、コミュニケーション障害などを中核とする脳機能障害であり、その患者は良好な対人関係の構築が難しく、通常の世界生活が困難である場合が多い。100 人に約 1 人が本障害を抱えているといわれ、患者数は国内で 100 万人程度と推定されている。これまでの治療では、ASD に起因する不安やうつ、興奮などに対する対症療法が行われているに過ぎず、根本的な治療法は皆無である。このような状況の中で、近年、医師主導臨床試験により、授乳促進の適応で承認されている OXT (図 1) の鼻腔内投与製剤が ASD の症状に対して改善効果を示すことが報告された<sup>1)</sup>。連続投与の必要性や吸収性の観点から、鼻腔内投与が選択されたと考えられるが、現段階では鼻腔内投与された OXT の体内動態、脳への移行、有効性及び安全性などに関する情報は十分とは言いがたい。したがって、OXT を ASD 治療へ応用するには、まず、鼻腔内投与後の OXT の体内動態と脳内移行性を明らかにするとともに、より効率的な OXT の脳内送達を可能とする DDS 開発が必須である。



一方、鼻腔はペプチド性医薬品の投与部位として、注目を集めており、脳組織、脳脊髄液との直接的なつながりを示唆する実験事実が多く報告されている(図 2)。研究代表者はこれまでに、OXT による効率的な ASD 治療の実現を目指して、OXT 溶液を鼻腔内投与した後の脳移行性や体内動態を系統的に評価するとともに、薬理作用との関連を評価し、OXT の脳内送達に対する鼻腔内投与の有用性をすでに明らかにしている<sup>2)</sup>。しかしながら、鼻腔内投与後の OXT 脳内移行量は投与量のわずか 0.01% であり、高投与量による全身副作用という克服すべき課題も明らかとなった。鼻腔から脳移行性が低い要因の 1 つとして、OXT の低い鼻粘膜透過性が考えられる。そこで、本研究では、OXT の嗅上皮細胞の透過性の向上により脳内送達効率を高めた新たな DDS 製剤を開発し、OXT による ASD 治療の量的、質的な向上を目指した。



### 2. 研究の目的

これまでの検討において、OXT の鼻腔内投与が腹腔内投与、静脈内投与と比較して有用であることを明らかにした。しかしながら、この研究を通じて、鼻腔内投与後の OXT 脳内移行量は投与量のわずか 0.01% であることも示された。そこで、本研究では OXT の鼻腔内投与後の脳送達性を向上する新たな DDS を開発することで、OXT 鼻腔内投与による ASD 治療法の構築を目指した。すなわち、OXT の脂溶性増大による吸収促進効果を目的として、脂肪酸修飾を施した OXT 誘導体を合成した。また別途、製剤添加物(N-アシルタウリン酸塩)の併用による OXT の吸収改善ひいては脳移行性の向上を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) OXT 鼻腔内投与後の脳および CSF への移行性

ddY 系雄性マウスの鼻腔内に OXT 溶液を投与し、その後、5, 15, 30 分に採血するとともに、心臓から脳を脱血灌流し、脳を採取した。採取した脳を嗅球、脳前半部、脳後半部の 3 部位に分割し、各部位の OXT 濃度を測定した。また、ラットに OXT 溶液を鼻腔内投与し、経時的に採血するとともに、大槽穿刺法により脳脊髄液 (CSF) をポリエチレンチューブ内に採取した。CSF を含むチューブの長さで、最初に採取された前半部 CSF (位置的に鼻腔より遠位の大槽周辺の CSF) と後で採取された後半部 CSF (位置的に鼻腔に近位の嗅球付近の CSF) に 2 等分し、それぞれの OXT 濃度を測定した。鼻腔内投与後の OXT の脳移行に対する直接移行の寄与を定量化するために、直接移行の寄与を示す direct transport percentage (DTP) を、腹腔内投与時の血漿中濃度、脳内濃度を用いて、下記の式により算出した。

$$\text{DTP} (\%) = \frac{C_{\text{brain, i.n.}} - C_{\text{brain, i.p.}} \cdot \frac{\text{AUC}_{\text{blood, i.n.}}}{\text{AUC}_{\text{blood, i.p.}}}}{C_{\text{brain, i.n.}}} \times 100$$

#### (2) OXT 脂肪酸修飾体の作製

OXT の極性を低下させ、生体膜透過性を改善するために、酪酸、カプリン酸およびオクタン酸の短鎖脂肪酸を N 末端アミノ基に化学結合させた。OXT と脂肪酸無水物を攪拌し反応させた後、精製し OXT 脂肪酸修飾体を得た。また、MALDI-TOF-MS により合成物の分子量を測定

することで、目的とする OXT 脂肪酸修飾体が得られたことを確認した。

### (3) OXT 脂肪酸修飾体および吸収促進剤併用 OXT 溶液の脳内移行性

(1) と同様、ddY 系マウス鼻腔内に脂肪酸修飾 OXT 溶液あるいは吸収促進剤併用 OXT 溶液を投与し、その後、5 分に採血するとともに、心臓から脳を脱血灌流し、脳を採取した。採取した脳を嗅球、脳前半部、脳後半部の 3 部位に分割し、各部位の OXT 濃度を測定し、OXT 単独投与時と比較した。

### (4) 吸収促進剤併用 OXT 溶液鼻腔内投与時の障害性

鼻粘膜障害性は LDH (Lactate dehydrogenase) 活性値を指標として評価した。吸収促進剤を鼻腔内投与し、30 分後、食道にカニューレを施し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で鼻腔内を灌流した。この灌流液の上清を用いて、鼻粘膜より漏出した LDH 活性を測定した。LDH 活性値は、LDH CII-assay Wako を用いて測定した。その後、マイクロプレートリーダー (Multi-Detection Microplate Reader、POWERSCAN<sup>®</sup>HT、HITACHI) を用いて 490 nm の波長にて吸光度を測定することにより算出した。

## 4. 研究成果

### (1) OXT の脳移行性評価

まず、基礎的な検討として、鼻腔内投与時の脳移行性を詳細に検討した。OXT 鼻腔内投与後の嗅球中濃度は時間の経過とともに低下したが、対照的に脳前半部、脳後半部における OXT 濃度は時間の経過とともに増大した (図 3. (A))。これらの結果より、鼻腔から直接移行した OXT は、嗅球から脳前半部、脳後半部へと順次、移行する可能性が示唆された。次に、鼻腔からの直接移行の寄与を定量化するため、鼻腔内投与後、腹腔内投与後の血中濃度、脳内濃度をもとに DTP を算出したところ、嗅球、脳前半部における投与 5 分後の DTP は 80% 以上という高い値を示し、直接移行の寄与が大きいことが示唆された。いずれの部位においても、経時的に DTP が低下することが明らかとなり、時間の経過とともに全身循環血から脳への移行の寄与が相対的に増大する可能性が示唆された。また、脳内濃度に関する知見と同様、鼻腔に近いほど、その部位の DTP が高いこと (嗅球 > 脳前半部 > 脳後半部) が明らかとなった。

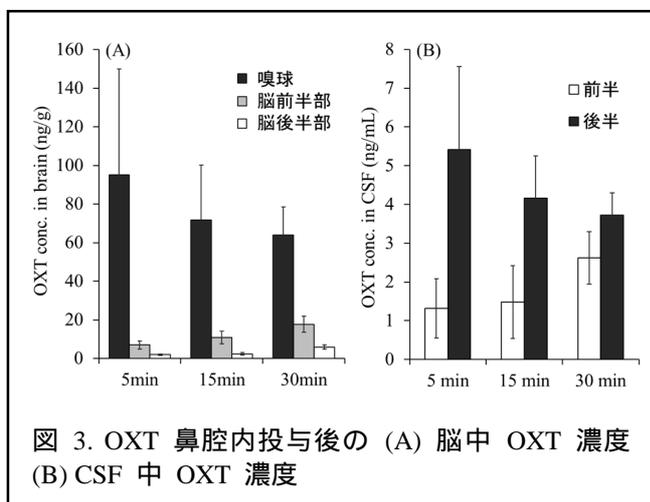


図 3. OXT 鼻腔内投与後の (A) 脳中 OXT 濃度 (B) CSF 中 OXT 濃度

また、投与 5 分後の後半部 CSF 中 OXT 濃度は、前半部と比較して高く、OXT は鼻腔から直接 CSF に移行する可能性が示唆された。一方、経時的に後半部 CSF 中濃度は低下したが、前半部 CSF 中濃度は増大した (図 3. (B))。前半部 CSF には、鼻腔から直接移行した OXT が含まれることから、前半部 CSF における濃度低下は、鼻腔内 OXT 量の低下に伴って生じる鼻腔から脳への直接移行速度の低下を示していると考えられる。一方、後半部 CSF における濃度増大は OXT が全身循環から BBB を介して、脳に移行する可能性を示唆する結果であり、上記の DTP の経時的な低下と同じ現象であることが示唆された。

### (2) OXT 脂肪酸修飾体の脳移行性評価

OXT 脂肪酸修飾体は、MALDI-TOF-MS によりカプリン酸修飾 OXT、オクタン酸 OXT が合成できていることが確認できた。マウスに鼻腔内投与したところ、脂肪酸修飾 OXT の脳移行性は未修飾 OXT 投与時よりも低く、脂肪酸修飾による優位性が観察されなかった。これは、脂肪酸修飾により OXT の溶解性が低下したことが要因と考えられ、溶解性と膜透過性のバランスが重要であることが示唆された。そこで、溶解性を向上させるため、同様の方法で、より短鎖の脂肪酸である酪酸修飾 OXT を合成し、OXT の脳内移行性の向上を試みた。酪酸修飾 OXT の溶解性は、カプロン酸誘導体 OXT と比較して高かったが、酪酸修飾による脳移行性の改善は認められなかった。これは、短鎖である酪酸修飾においても、鼻腔内投与後に OXT が脳へ直接移行する過程で、OXT が脳脊髄液に十分に溶解できなかったことによるものと推察される。

以上の結果より、OXT に対する脂肪酸修飾は溶解性が十分に担保できなかったため、鼻腔内投与による脳への送達において優位な結果とはならなかったが、他のペプチドに関してはまだ議論の余地があると考えられる。

### (3) 吸収促進剤併用時の OXT の脳移行性および鼻粘膜障害性評価

OXT の粘膜吸収を促進する製剤添加物としてアニオン性界面活性剤である N-アシルタウリン酸塩を取り上げ、製剤添加物による OXT の脳移行性の改善を検討した。鼻腔内投与 5 分後の脳移行性を評価したところ、OXT の脳移行性は、N-アシルタウリン酸塩併用により向上する傾向がみられた。さらに、血漿中濃度に対する脳内濃度の比 (Brain/Plasma) を算出したところ、sodium methyl palmitoyl taurate (PMT) および sodium methyl stearoyl taurate (SMT) の併用により OXT が効率的に脳へ移行することが示された。また、鼻粘膜障害性について評価したところ、N-アシルタウリン酸塩は鼻粘膜に対して障害性を示さないことが明らかとなった。したがって、PMT と SMT は OXT の鼻腔内投与による脳内送達に対して有効かつ安全な吸収促進剤であることが示された。

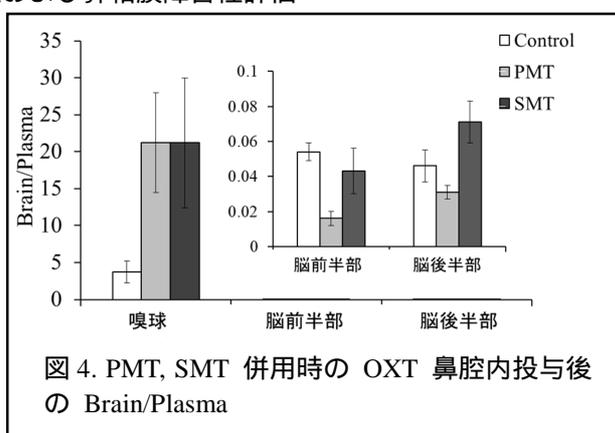


図 4. PMT, SMT 併用時の OXT 鼻腔内投与後の Brain/Plasma

以上のように、本研究では、鼻腔内投与後の OXT の脳移行性を改善するための DDS 開発を目的として、化学修飾または製剤添加物の併用による OXT の脳移行性改善を試みた。なかでも N-アシルタウリン酸塩は、鼻腔内投与後の OXT の脳移行性を著しく改善した。これらの知見は、N-アシルタウリン酸塩が OXT などの様々な中分子医薬の脳移行性を改善する可能性を示すものである。したがって、本研究で得られた知見は、ASD 治療法の開発にとどまらず、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患などの脳疾患を対象とした中分子医薬による新規治療法の開発に展開できる可能性が高く、社会的意義が大きいと考えられる。

#### (引用文献)

1. T. Watanabe et al. *Brain*, **138**, 3400-3412, 2015.
2. A. Tanaka, et al., *Mol. Pharm.*, **15**, 1105-1111, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中晶子、高山健太郎、井上大輔、古林呂之、勝見英正、山本 昌、湯谷玲子、林 良雄、坂根稔康 |
| 2. 発表標題<br>生理活性ペプチドの鼻腔内投与による脳への送達と中枢疾患治療への応用             |
| 3. 学会等名<br>第 27 回 DDS カンファランス                            |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中晶子、井上大輔、勝見英正、山本 昌、湯谷玲子、古林呂之、坂根稔康 |
| 2. 発表標題<br>生理活性ペプチドの鼻腔内投与による脳への送達と中枢疾患治療への応用  |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第 139 年会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松田芳明、田中晶子、田村大樹、井上大輔、勝見英正、山本 昌、湯谷玲子、古林呂之、坂根稔康 |
| 2. 発表標題<br>鼻腔内投与された Oxytocin の脳内移行特性                    |
| 3. 学会等名<br>第35回日本 DDS 学会学術集会                            |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tamura H., Tanaka A., Matsuda Y., Katsumi H., Yamamoto A., Yutani R., Furubayashi T., Sakane T. |
| 2. 発表標題<br>Transnasal delivery of oxytocin to the brain for the treatment of autism spectrum disorder      |
| 3. 学会等名<br>第 3 回日韓若手薬剤学研究者ワークショップ（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中晶子、松田芳明、田村大樹、越路亜莉紗、井上大輔、勝見英正、山本 昌、湯谷玲子、古林呂之、坂根稔康 |
| 2. 発表標題<br>鼻腔内投与された Oxytocin の脳内移行特性                          |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第 139 年会                                      |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中晶子、井上大輔、古林呂之、坂根稔康                    |
| 2. 発表標題<br>鼻腔内投与によるペプチドの脳内送達：鼻腔から脳への移行機構と移行後の脳内動態 |
| 3. 学会等名<br>第 36 回日本 DDS 学会学術集会                    |
| 4. 発表年<br>2020年                                   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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