

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22953

研究課題名(和文)脳内において持続的に機能する酵素反応場の構築による脳神経系疾患治療への展開

研究課題名(英文)Fabrication of enzyme reaction fields in the brain for treatment of central nerve system disease

研究代表者

安楽 泰孝 (Anraku, Yasutaka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任准教授

研究者番号：60581585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：酵素補充療法(ERT)は、体内に足りない酵素を補充することで症状の改善を計る治療法で、疾患部位まで酵素を送り届け代謝を促すシステムを組み込んだ薬剤送達システム(DDS)は、とりわけ副作用の低い革新的治療法として期待されている。本課題では、生体内で酵素の反応場として最適な機能を具備するDDSに酵素を封入し、BBB通過用のリガンド分子を搭載することで、脳内に酵素の反応場を創出し、脳神経系(CNS)疾患の革新的治療技術開発を目的とした。DDSを形成する高分子合成、酵素を封入したDDSの構築とその基礎物性評価、in vivo試験を通して、構築したDDSが脳内でERTとして機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、有効な治療法が未確立である中枢神経系(CNS)疾患に対して、薬剤送達に基づく分子治療という抜本的解決策を提供するものであり極めて大きな意義を有している。様々な機能分子を中枢系に送達する方法論確立は、CNS疾患に留まらず、脳腫瘍やアミノ酸代謝異常など広範な疾患治療に大きく貢献することが確信される。また高分子/材料設計の観点からは、生体適合性・標的指向性・環境応答性という異なる機能を空間的に制御された形で構造内部に配置する仕掛けを創り込むなど、独創性に秀でた生体材料設計プロセスを当該分野にもたらす意義を有していると確信する。

研究成果の概要(英文)：Enzyme Replacement Therapy (ERT) is a treatment that aims to improve symptoms by replenishing the body's lacking enzymes. Drug delivery systems (DDS), which incorporate a system that delivers enzymes to the disease site and promotes metabolism, are expected to be an innovative therapy with low side effects. The objective of this project was to develop innovative therapeutic technologies for central nervous system (CNS) diseases by creating a "reaction field of enzymes in the brain. We will demonstrate these proposals by encapsulating the enzyme in DDS, equipped with optimal functions as a reaction field for the enzyme in vivo, and installing a ligand molecule for passing through the BBB on the surface layer. Through the synthesis of polymers to form DDS, construction of DDS encapsulating enzymes and evaluation of their fundamental physical properties, and in vitro and in vivo tests, it was demonstrated that the DDS constructed in this project could work as ERT in the brain.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：高分子 DDS 脳 酵素補充療法

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性は、酵素が精密制御された反応場を構築することで維持されており、とりわけ多くの神経回路が集積している脳においてその役割は極めて重要であり、機能欠損はアルツハイマー病(AD)などの脳神経系(CNS)疾患の要因となる。そこで欠損した酵素を補充し、症状改善を計る酵素補充療法(ERT)が注目されており、疾患部位に『酵素の反応場』を創生する薬物送達システム(DDS)は、副作用の低い革新的治療法として期待されている。ここで ERT を効果的に達成する為には、①酵素を失活することなく封入でき、②疾患部位に的確に運搬し、③標的物質がキャリアを透過し酵素と反応するといった一連の機能を具備する『酵素の反応場』を構築することが必要不可欠である。これまでに両親媒性分子から形成される Liposome をキャリアとする試みはあるが、膜の疎水性が高すぎる為に透過性が低く、生体内で機能する報告例は皆無であった。一方、我々が開発したポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸由来の荷電性セグメントからなる荷電性高分子の自己組織化(PIC)を利用した PICsome は、酵素を失活することなく封入でき、PIC 膜に特徴的な物質透過性を示す。実際に内水相に酵素を封入した PICsome が、固形がんや血流中で標的物質のみを「分解する」ことに成功しており、材料科学的視点から考えても生体内において『酵素の反応場』として最適であることは想像に難くない。一方で、脳内に酵素の反応場を構築する技術開発に関しては未だに挑戦的な課題である。脳は血液脳関門(BBB)と呼ばれる物質輸送を制御するバリア機構によって薬剤送達を制限している。AD 治療薬である Donepezil の脳集積量は投与量のわずか 0.01%、BBB 通過を指向したナノ粒子も 0.9%と集積量は極めて低い。

2. 研究の目的

我々のグループは、グルコースを表層に搭載した高分子集合体を構築し、グルコーストランスポーター1を介し血糖値を精密制御することで臨床薬の約600倍(6.22%)を脳へ集積させる革新的な方法論を見出した。そこで本課題では、①生体内で酵素の反応場として最適な機能を具備する PICsome に酵素を封入し、②表層に BBB 通過用のリガンド分子を搭載することで、既存技術では不可能であった『脳内に酵素の反応場』を創出し、CNS 疾患の革新的治療技術に展開することを目的とする。具体的には、脳内のアリアルサルファターゼ A(ASA)の欠損によりスルファチドが蓄積し、中枢神経障害を来すライソゾーム病(LSD)の治療へと展開するために『脳内のスルファチドを持続的に分解し続ける酵素反応場を構築』することを目的とした。ASA を脳内投与する臨床試験が実施されているが、酵素の脳内への反復投与は患者にとって治療的負担を課す。そこで『血中投与により脳内で高効率に酵素反応を誘起するような反応場を構築』し、脳内という厳しい環境において、有害物質を「分解」し続けるといった革新的なシステムを創出し、既存技術に対する物質変換効率等の高い優位性を有することを実証することを目的とした。

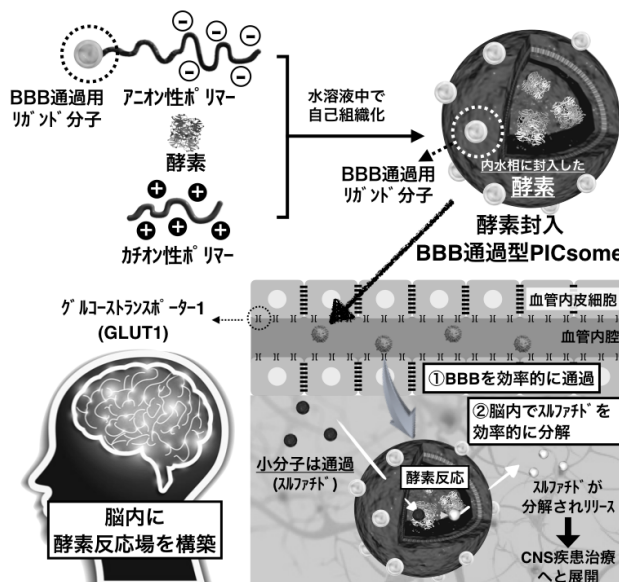


図 1. 本研究課題の概念図

3. 研究の方法

生体への安全性が担保されたポリエチレングリコール(PEG)-ポリアミノ酸をセグメントとする荷電性のブロック共重合体を基盤高分子とし、合目的々に「標的指向性」、「ASA 封入性」といった各種機能を導入し、ASA を封入した多機能型高分子集合体(ASA@PICsome)を構築する。サイズや形状、ASA 封入性、封入個数といった基礎物性評価に加え、試験官レベルで酵素活性評価を実施した。上記の機能評価後、マウスに静脈投与を行い、体内動態(血中循環性、BBB 通過能)を評価した。最後に脳内における酵素反応について in vivo 共焦点顕微鏡(IVRCLSM)で評価した。

4. 研究成果

(1) ASA@PICsome を形成する種々のブロック共重合体の合成: PICsome を構築する高分子として

ポリエチレングリコールを親水性セグメントに有するブロックポリアニオン(PEG-PAsp)とホモポリカチオン(Homo-DAP)を既存の方法に則って合成した。また BBB 通過用に PEG の α 末端にグルコースを有する Gluc-PEG-PAsp も併せて合成した。合成した高分子は、核磁気共鳴、高速液体クロマトグラフィーで測定し、所望の重合度、単峰性の分子量分布を有する高分子であることを確認した。

(2) ASA@PICsome の構築と基礎物性評価: 上記で合成した高分子と ASA を任意の割合で混合し、ASA@PICsome の調製を検討した。動的光散乱(DLS)測定より直径が 110 nm で単分散性の高いナノ粒子(PICsome)であることを確認し、透過型電子顕微鏡(TEM)観察よりベシクル状であることを確認した。また蛍光標識した ASA を用いて、同様に PICsome を調製し、蛍光相関分光法(FCS)測定を行ったところ、当初の目的通り PICsome の内水相に ASA が封入されていることを確認した。ここで添加する ASA の濃度を変えて ASA@PICsome を調製し FCS 測定を行ったところ、粒子径は同一で添加濃度によって 1 粒子あたりに封入される ASA の個数を 1~3 個まで制御可能であることが明らかになった。

(3) 基質変換効率の最適化: 上記で得られた ASA の封入個数の異なる ASA@PICsome の基質変換効率(酵素活性パラメタ(Km, Vmax など))について高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)を用いて評価・算出した。その結果、封入個数が多いほど高い値を示すことが明らかになった。そこで以後の動物を用いた試験には 1 粒子あたり 3 個の ASA が封入されたシステムを用いて評価を行った。

(4) 体内動態評価および BBB 通過試験: 蛍光色素で標識した Cy5-ASA を封入した Gluc-PICsome (Cy5-ASA@Gluc-PICsome)をマウスに尾静脈投与し、IVRTCLSM を用いて血中循環性を評価したところ、ASA を封入していない空の PICsome(高分子を蛍光標識)同様に、高い血中循環性を示した($t_{1/2}$ =18 時間)。また過去の報告にならって血糖制御を行い脳内観察を行ったところ、Cy5-ASA@Gluc-PICsome が BBB を通過して脳内へ移行する様子が確認できた。ここで興味深いことに既存の報告(直径 30 nm)では BBB を通過して脳内に拡散するのにに対し、本課題で調製した 100 nm のナノ粒子の多くは脳血管近傍に留まる様子が確認された。これはおそらくグリア細胞のエンドフットで形成されるグリア限界膜を粒径の大きな PICsome が通過することができずに脳脊髄液中に留まっているためではないかと考えられる。これらの結果は、粒径を変えることで、脳内、脳脊髄液といった脳内の異なる部位に薬剤を送り届けることが可能であることを支持している。続いて脳集積量を評価したところ、ASA 単体では約 0.01%dose/g-brain だったのに対し、表層のグルコース密度が 25%の PICsome では約 3.2%dose/g-brain と酵素単体と比較して 300 倍高く脳へ集積させることに成功した(図 2 (a))。

(5) 脳内における酵素反応評価: 脳内で酵素反応場が機能することを可視化するために、脳へ ASA@Gluc-Cy5-PICsome を集積させた後に、(3)の検討で用いた蛍光基質を脳室内投与(基質は BBB 通過しないため)し、基質由来の蛍光団が生成されることを IVRTCLSM で確認した。その結果、基質投与直後には酵素反応に伴う蛍光団は確認されなかったが、投与 10 分後以降から反応物由来の高い蛍光が確認された(図 2b, c)。これは脳内で酵素反応が生じていること、脳内で物質を分解することに成功したことを支持する結果である[2]。

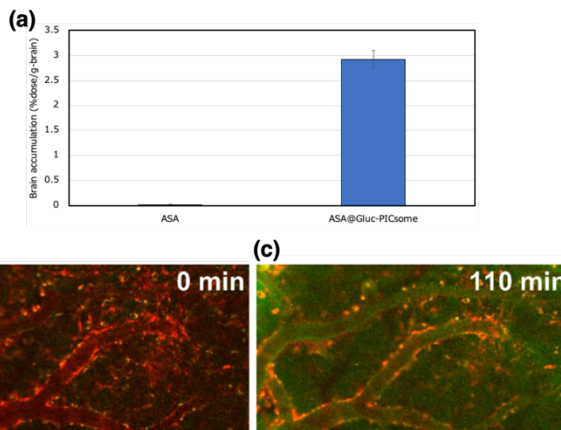


図 2. 脳集積性評価および脳内における酵素反応評価. (a) 脳集積量 (b, c) IVRTCLSM を用いて脳内観察. (b) 基質投与前, (c) 基質投与 110 分後. 赤色: ASA@Gluc-PICsome, 緑色: ASA と反応して生成した化合物

<引用文献>

[1] Anraku Y. et al, Crossing the BBB: Glycemic control boosts glucosylated nanocarrier transport into brain. *Nature Communications* 8, 1001 (2017).

[2] 特願 2020-083201, 名称: 十分な血中滞留性を有し、かつ、グリア限界膜への透過性が改善されたポリイオンコンプレックス型ポリマーソーム, 発明人: 安楽泰孝, 宝地戸秀和, 中村乃理子, オラシオカブラル 出願日: 2020 年 5 月 11 日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 脳神経系疾患の革新的治療技術開発
3. 学会等名 次世代医療技術研究会 第4回情報講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 十分な血中滞留性を有し、かつ、グリア限界膜への透過性が改善されたポリイオンコンプレックス型ポリマーソーム	発明者 安楽泰孝, 宝地戸秀和, 中村乃理子, オラシオカブラル	権利者 東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-083201	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京大学大学院バイオエンジニアリング専攻 カブラル研 http://www.bmc.t.u-tokyo.ac.jp 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻カブラル研究室 http://www.bmc.t.u-tokyo.ac.jp/index.html

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
---------	---------