

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19157

研究課題名（和文）天然PIECE抱合法による生理活性ペプチドの消化管吸収への挑戦

研究課題名（英文）Gastrointestinal absorption of bioactive peptides by natural PIECE conjugation method

研究代表者

濱野 吉十（Hamano, Yoshimitsu）

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：50372834

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ペプチド医薬は、標的分子への特異性が高く比較的安価に合成できるため、次世代型のペプチド医薬が注目を集めている。しかし、タンパク質分解酵素によって分解されるため、その投与方法は静脈注射または皮下注射である。ペプチド医薬の有効な経口投与方法が可能になれば、患者の生活の質（QOL）を改善することができる。本研究では、高い細胞膜透過性機能を示す  $\alpha$ -ポリ-L-リジン（ $\alpha$ -P L）とポリアニオン化合物を用い、ヒトインスリン（HI）のポリイオンコンプレックスを調製した（HI/PPP-complex）。興味深いことに、HI/PPP-complexをマウスに経口投与したところ、優れた血糖値下降作用を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチド医薬の有効な経口投与方法が可能になれば、患者の生活の質（QOL）を改善することができる。ペプチド医薬の消化管吸収を達成するには、胃内部の酸性条件下で非水溶性を示し、腸管内の中性または弱アルカリ性条件下で溶解する製剤が望ましい。本研究では、腸管吸収促進剤として微生物由来の細胞膜透過性ポリカチオン性イソペプチド（PIECE）である  $\alpha$ -P Lを用いて、ペプチド医薬の経口投与方法を可能にするpH応答溶解性ポリイオンコンプレックスを開発した。本法は既に食品添加物として利用されている物質のみを使用した混合製剤であるため、安全性試験を大幅に回避できる新しいペプチド医薬の経口投与方法として期待できる。

研究成果の概要（英文）：Next-generation peptide drugs are attracting attention because they are highly specific to target molecules and can be synthesized relatively inexpensively. However, because they are degraded by proteolytic enzymes, their administration is generally by intravenous or subcutaneous injection. If an effective oral administration method of peptide drugs becomes available, it will improve the quality of life (QOL) of patients. In this study, we used  $\alpha$ -poly-L-lysine ( $\alpha$ -P L), which exhibits high cell membrane permeability function and polyanionic compounds were used to prepare a polyionic complex of human insulin (HI) (HI/PPP-complex). Interestingly, when HI/PPP-complex was orally administered to mice, it showed excellent hypoglycemic activity.

研究分野：応用微生物学

キーワード：インスリン バイオ医薬品 経口投与 ポリリジン 細胞膜透過性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬、タンパク質医薬、ペプチド医薬は、標的分子への特異性が高いため現代医療において重要不可欠な医薬品である。しかし、これらバイオ医薬は各種タンパク質分解酵素によって分解され、また、分子量も大きく消化管では吸収されないため、その投与法は一般的に注射投与に限られる<sup>1</sup>。投与期間が長期にわたる場合、患者への負担は大きく、タンパク質/ペプチド医薬の有効な経口投与が可能になれば、患者の生活の質 (QOL) を改善することができる。

インスリン製剤は、バイオ医薬の代表例である<sup>2</sup>。糖尿病はインスリン作用不足により高血糖状態を主徴とする慢性の疾患であり、これまでに数多くの糖尿病治療薬が生み出されてきた。中でもインスリン製剤は糖尿病治療において欠かせない医薬品である。インスリン欠乏による I 型糖尿病にはインスリン製剤のみが治療薬として有効である。インスリン抵抗性、インスリン分泌能低下が主体となる II 型糖尿病においても高血糖を示す場合や経口糖尿病薬で血糖コントロールが困難な場合にはインスリン製剤が用いられる。インスリン製剤は作用時間で分類されており、超速攻型、速攻型、中間型、持続型、混合型に分けられ、基礎分泌や追加分泌を促すなど、患者の容体に応じて多様な使い分けがされる。一方で、開発から半世紀近くが経過してもなおインスリン製剤は全て非経口投与薬に制限されている<sup>3</sup>。インスリン製剤の経口投与製剤を開発す

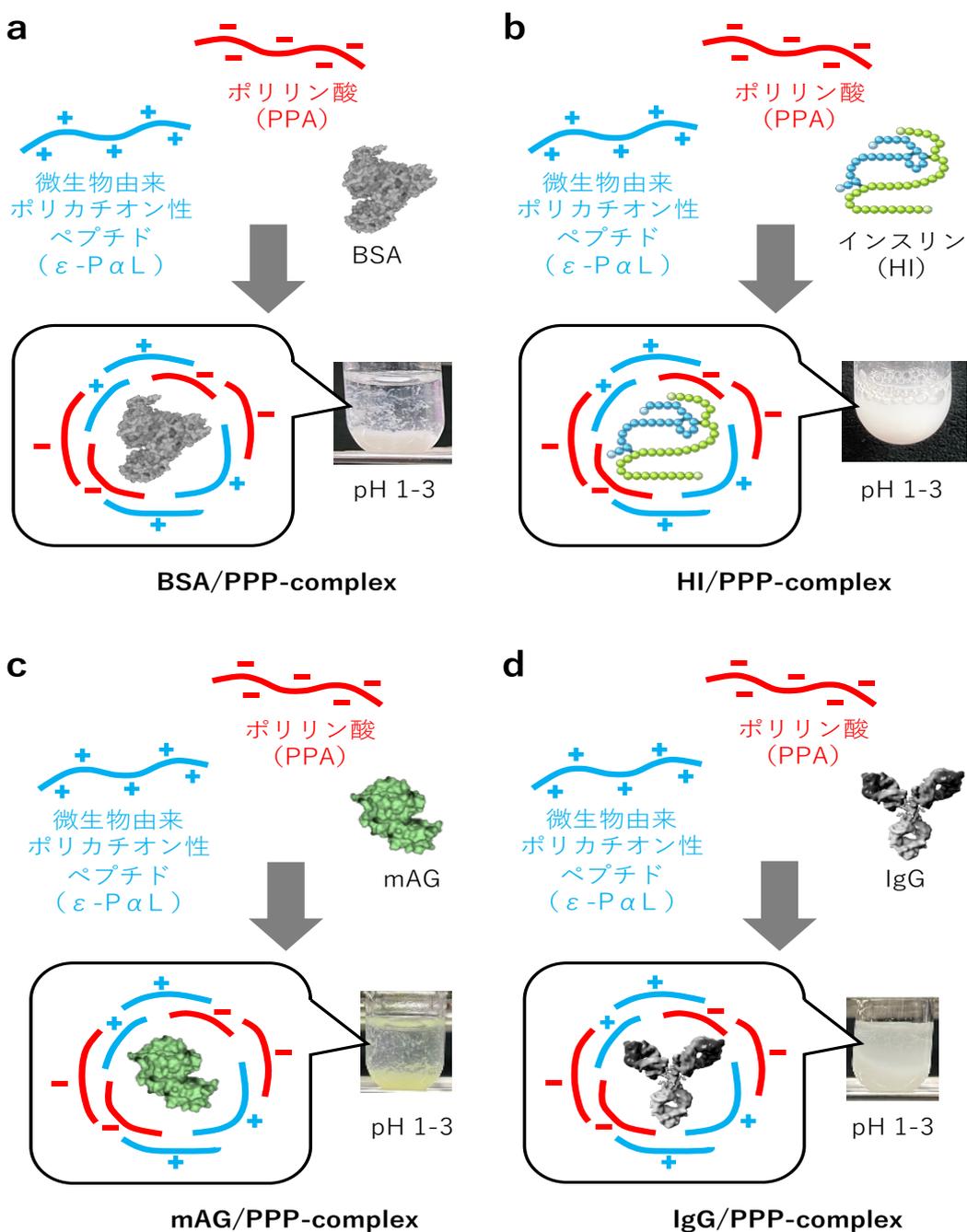


図 1

ることができれば、患者の QOL を向上できるため、消化酵素の阻害剤、腸溶性カプセル剤、ナノ粒子（ミセル）などが開発されているが、未だ実用化には至っていない。

近年、バイオ医薬の消化管上皮細胞吸収性を改善させる手法として cell-penetrating peptide (CPP) の利用が注目を集めている<sup>4,5</sup>。一般的に CPP は短鎖ペプチド (5-30 残基) であり、物理化学的性質に基づいて、カチオン性、両親媒性、疎水性の 3 つに分類される<sup>6</sup>。CPP はターゲット分子に共有結合させる、あるいは、非共有結合的に作用することでエンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスなどエネルギー依存的にターゲット分子を細胞内へ送達させることが可能であり、また、エネルギー非依存的にターゲット分子が細胞膜を透過し細胞内に送達することも知られている。さらに、CPP を用いてペプチドホルモンであるインスリンの消化管上皮細胞吸収性を向上させた事例も報告されている<sup>6</sup>。CPP は一般的に化学合成で供給され、近年では、タンパク質/ペプチド分解酵素に耐性を示す CPP も報告されているが、その高い合成コストの問題は解決されていない。また、新規化合物である CPP を用いた創薬においては、その臨床開発において安全性を評価する必要がある。

## 2. 研究の目的

$\epsilon$ -ポリ-L- $\alpha$ -リジン ( $\epsilon$ -P $\alpha$ L) は、放線菌によって生産されるポリカチオン性イソペプチドである。最近我々は、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L が高い細胞膜透過性を示す CPP として機能することを明らかにしている<sup>7</sup>。 $\epsilon$ -P $\alpha$ L は、微生物培養によって極めて安価に生産することが可能であるため、従来型 CPP の高い合成コストの問題を解決できる新しい CPP として期待されている。また、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L は、食品添加物 (食品防腐剤) として利用されており、ヒトへの安全性も確認されている CPP である。

タンパク質/ペプチド医薬の消化管吸収を達成するには、胃内部の酸性条件下で非水溶性を示し、腸管内の中性または弱アルカリ性条件下で溶解する製剤が望ましい。さらに、腸管内にて生体高分子化合物であるタンパク質やペプチドの吸収を促進する腸管吸収促進剤の併用が望ましい。そこで本研究では、腸管吸収促進剤として  $\epsilon$ -P $\alpha$ L を使い、タンパク質/ペプチドを含有する pH 応答溶解性ポリイオンコンプレックス (PPP-complex) の開発を試みた。

## 3. 研究の方法

生体高分子化合物であるタンパク質のモデルとして牛血清アルブミン (BSA)、ペプチド化合物のモデルとしてヒトインスリン (HI) を使い、pH 応答溶解性の PPP-complex を得る諸条件を検討するとともに、PPP-complex を調整するための最適なポリアニオンを探した。さらに、蛍光タンパク質と抗体を用いて PPP-complex 調製法の汎用性を評価し、PPP-complex 内のタンパク質/ペプチドの生化学的安定性について消化酵素ペプシンを用いて検証した。そして、実際にタンパク質/ペプチド医薬の pH 応答溶解性 PPP-complex が経口投与によって薬効示すか評価するために、HI の pH 応答溶解性ポリイオンコンプレックスである HI/PPP-complex を健康マウスおよび糖尿病モデルマウスに経口投与し、HI が腸管吸収され血糖値降下作用を示すか検証した。

## 4. 研究成果

### pH 応答溶解性の PPP-complex

PIECE として  $\epsilon$ -ポリ-L- $\alpha$ -リジン ( $\epsilon$ -P $\alpha$ L)、生体高分子化合物のモデルとして牛血清アルブミン (BSA)、ペプチド化合物のモデルとしてヒトインスリン (HI) を使い、pH 応答溶解性のタンパク質/ペプチド含有ポリイオンコンプレックス (PPP-complex) を形成する諸条件を検討した。

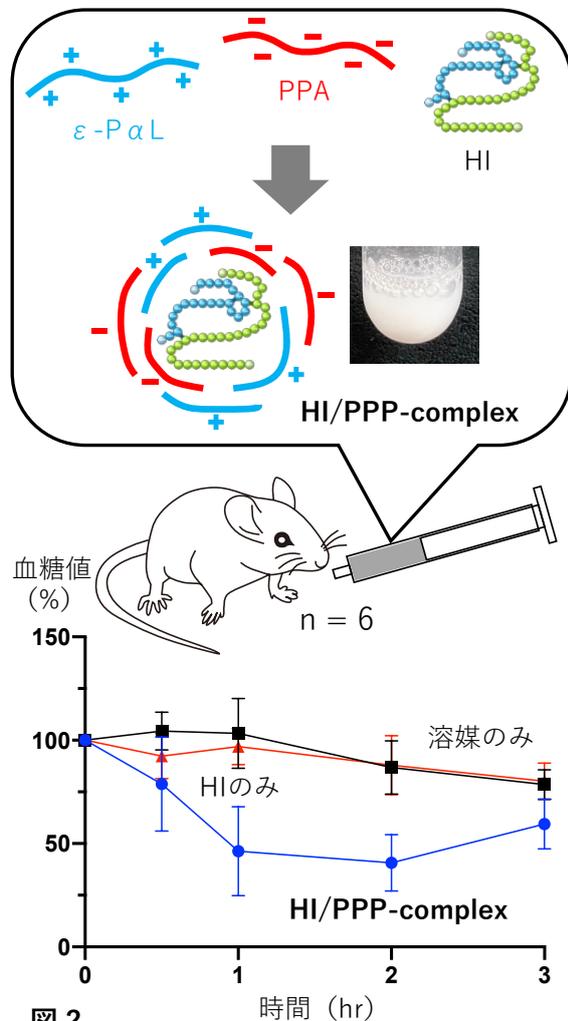


図 2

その結果、アニオン性ポリマーとしてポリリン酸 (PPA) を用いて PPP-complex を調製したところ、酸性条件下 (pH 1.0~2.0) で非水溶性かつ結晶性の高い良好な沈殿物 (BSA/PPP-complex および HI/PPP-complex) を生成した (図 1a, 1b)。さらに、BSA/PPP-complex および HI/PPP-complex を含む懸濁液の pH を 7~9 に調製したところ、沈殿物は速やかに溶解し透明な溶液を与えた。この pH 応答溶解性 PPP-complex の調製法は、蛍光タンパク質 (mAG) と抗体 (IgG) にも適用でき (図 1c, 1d)、得られた mAG/PPP-complex と IgG/PPP-complex は同様の pH 応答溶解性を示した。さらに酸性環境下にある不溶性の BSA/PPP-complex と HI/PPP-complex に消化酵素ペプシンを添加しても BSA と HI は分解されることなく、高い生化学安定性を示した。また、mAG の蛍光比活性は、mAG/PPP-complex 生成前と比較し、生成後に再溶解にて遊離した mAG の比活性は 7 割程度保持された。したがって、PPP-complex 形成時の酸性環境においてもタンパク質/ペプチドは活性が維持され、中性・弱アルカリ性条件下での PPP-complex 崩壊に伴い、活性を保ったタンパク質/ペプチドが再溶解されることを見出した。以上のことから、PPP-complex は、酸性条件下である胃内環境においてペプシンによる分解を受けることなく通過し、中性・弱アルカリ性条件である小腸・十二指腸において、その PPP-complex は崩壊すると期待された。

### HI/PPP-complex の経口投与による血糖値低下効果

PPP-complex の消化管吸収について、HI/PPP-complex を用いて検証した。マウスに HI/PPP-complex を経口投与したところ、HI 投与量 300 IU/kg で有意に血糖値下降作用を確認した (図 2)。これは我々が期待した通り、HI/PPP-complex が酸性条件の胃内で消化酵素ペプシンに分解されず中性・弱アルカリ性環境である腸管で崩壊し、PIECE である  $\epsilon$ -P $\alpha$ L によって HI が腸管吸収されたことを示唆した (図 3)。PPP-complex の調製に用いた  $\epsilon$ -P $\alpha$ L とポリリン酸は、既に食品添加物として利用されており、ヒトへの安全性は確認されている。また、PPP-complex は非共有結合的に作用した混合製剤であるため、新規化合物としての安全性試験を回避できる新しい抗体医薬、タンパク質医薬、ペプチド医薬の経口投与技術として期待できる。

これまでに、細胞膜透過性ペプチド (CPP) と抗体医薬、タンパク質医薬、ペプチド医薬を共存させた経口投与法の成功例が数例報告されている。しかし、CPP の多くは高度な有機合成に頼るしかなく、その高い製造コストに関する課題は解決されていない。他方、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L は微生物が生産する天然の CPP であり、有機合成 CPP と比較すると、その製造コストは究極的に安価である。また、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L の化学構造はイソペプチド構造であるため各種タンパク質分解酵素にも耐性であり、経口投与を促進する CPP としては理想的な CPP であることが期待された。本研究成果は、実際に  $\epsilon$ -P $\alpha$ L が腸管内で CPP として機能し HI の腸管吸収を促進することを実験的に初めて示しており、また、PPA との PPP-complex は pH 応答溶解性を示し、HI の経口投与を可能にした。本研究成果は、 $\epsilon$ -P $\alpha$ L と PPA を用いてタンパク質/ペプチド医薬を経口投与できる画期的な技術を提供するものであり、その進歩性と優位性は極めて高い。

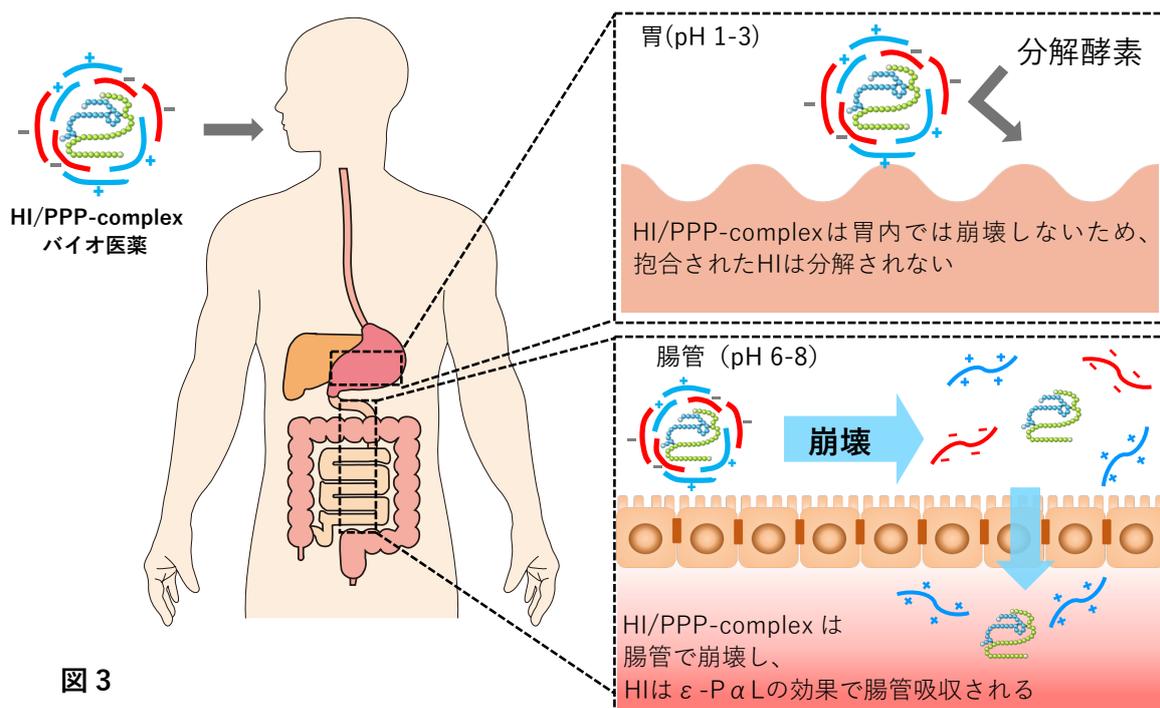


図 3

#### 【参考文献】

1. Mitragotri S, Burke PA, Langer R. Overcoming the challenges in administering

- biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 655-672 (2014).
2. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes* **6**, 850-867 (2015).
  3. Khafagy el S, Morishita M, Onuki Y, Takayama K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. *Adv Drug Deliv Rev* **59**, 1521-1546 (2007).
  4. Drucker DJ. Advances in oral peptide therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **19**, 277-289 (2020).
  5. Artursson P, Lundquist P. A new opening for orally taken peptide drugs. *Nature Biomedical Engineering* **4**, 12-13 (2020).
  6. Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 406-424 (2017).
  7. Takeuchi Y, *et al.* First direct evidence for direct cell-membrane penetrations of polycationic homopoly(amino acid)s produced by bacteria. *Commun Biol* **5**, 1132 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeuchi Yamato, Ushimaru Kazunori, Kaneda Kohei, Maruyama Chitose, Ito Takashi, Yamanaka Kazuya, Ogasawara Yasushi, Katano Hajime, Kato Yasuo, Dairi Tohru, Hamano Yoshimitsu	4. 巻 5
2. 論文標題 First direct evidence for direct cell-membrane penetrations of polycationic homopoly(amino acid)s produced by bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04110-4	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 Hasebe Fumihito, Adachi Kazuya, Yamanaka Kazuya, Oikawa Tadao, Maruyama Chitose, Hamano Yoshimitsu	4. 巻 76
2. 論文標題 Constitutive and high gene expression in the diaminopimelate pathway accelerates -poly-l-lysine production in Streptomyces albulus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 522 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-023-00636-9	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 Sakae Hiroki, Takeuchi Yamato, Maruyama Chitose, Hamano Yoshimitsu, Nagatani Hirohisa	4. 巻 462
2. 論文標題 Phase transfer mechanisms of fluorophore-labeled cell-penetrating peptide -poly-l-lysine at liquid liquid interfaces	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Electrochimica Acta	6. 最初と最後の頁 142769 ~ 142769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.electacta.2023.142769	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木海渡、伊藤崇志、片野肇、長谷部文人、丸山千登勢、濱野吉十
2. 発表標題 PIECEを利用した タンパク質/ペプチド医薬の経口投与ドラッグデリバリー
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞膜透過性ポリカチオンイソペプチドを含む経口医薬組成物、ポリイオンコンプレックス複合体、その製造方法及び経口インスリン製剤	発明者 濱野吉十	権利者 福井県立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-025687	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	坂江 広基  (Sakae Hiroki)  (00779895)	金沢大学・物質化学系・助教    (13301)	

	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	丸山 千登勢  (Maruyama Chitose)  (20452120)	福井県立大学・生物資源学部・准教授   (23401)	
研究協力者	長谷部 文人  (Hasebe Fumihito)  (30781801)	福井県立大学・生物資源学部・助教   (23401)	

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