

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 1 月 29 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500547

研究課題名(和文) 実用化を目指した血液脳関門透過型高分子医薬デリバリーシステムの開発

研究課題名(英文) Development of non-invasive protein drug delivery system across the blood-brain barrier

研究代表者

近藤 哲朗 (KONDO, Tetsuro)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：30344229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系を標的とする高分子タンパク医薬の開発が求められている。本研究では、血液脳関門(BBB)上の膜タンパク・受容体の分子認識機構を介して脳へ非侵襲的に送達可能な高分子タンパク医薬を創出するための技術開発を行った。In vitro BBBモデルを作成し、指向性進化工学的手法を用いてBBB上の膜タンパク・受容体に結合親和性・機能制御性を示すアミノ酸配列モチーフを探索した。現在までに機能モチーフの一つとして脳毛細血管内皮細胞の細胞膜に特徴的に作用する機能を示す配列候補を得た。現在さらに機能モチーフの創出を進めており、医薬候補タンパクへの応用および生体投与の準備を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have developed new technologies of directed evolution to engineer functional peptide motifs that interact with membrane proteins expressed on the blood-brain barrier (BBB), aiming at establishing non-invasive protein drug delivery to the central nervous system. Using an in vitro BBB model, we performed repetitive selection and amplification of random peptide libraries and obtained peptide motif candidates that characteristically interact with the plasma membranes of brain-derived microvascular endothelial cells.

研究分野：総合領域

キーワード：抗体医薬 タンパク医薬 中枢神経系 血液脳関門 脳毛細血管内皮細胞 アストロサイト 指向性進  
化学 フェージディスプレイ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、抗体医薬や核酸などの高分子医薬が種々の疾患の標的分子に対して創出され、リポソームや高分子ミセルといった DDS キャリアー・デバイスの発展と共に、高分子特性を利用した薬物送達技術が急速に進歩してきた。これらの高分子医薬はその劇的な治療効果から世界の医薬市場で需要が急増し今後ますます巨大なマーケットを占めると予想されるが、その多くは末梢組織のがん（血液がん、大腸がん、乳がん）や関節リウマチ等の自己免疫疾患を対象としている。

中枢疾患に対して従来から実用化されている薬剤は、うつ病、統合失調症や、不眠症などを対象とした脂溶性小分子薬剤が多い。一方アルツハイマー病や脳腫瘍など高齢社会が抱える深刻な中枢疾患に対しては、責任分子を標的として根本的な治療につながるような特異性の高い薬剤が極めて少なく、特異抗体や組換え機能タンパクなどをデザインした高分子・タンパク医薬の開発が次世代型の治療薬として期待されている。実際、これらの中枢疾患を標的として設計された高分子・機能タンパクは、培養神経細胞を用いた実験や、動物の脳室・脳実質への直接注入実験において高い特異性と顕著な効果が数多く報告されているが、生体に薬剤として投与する場合、そのほとんどが血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) を通過できないため、実用化が遅れている。

したがって、高い薬効が期待される高分子・タンパク医薬を設計しても、脳に投与するためには現状ではほとんどの場合が穿頭・開頭などの外科手術が必要で、投与が複数回に及ぶ場合はとくに患者にかかるストレスは心理的なものを含めて少なくない。すなわち、末梢組織や血液の癌などの高分子・タンパク医薬の開発と比べ、中枢疾患タンパク医薬の開発・実用化を難しくしている要因の一つは、BBB をいかに非浸襲的に通過させて

脳へ投与可能にするかという課題である。

この BBB 透過性の問題に対して、様々な試みが行われている。(1) BBB のタイトジャンクション構成分子やトランスポーターに対する機能修飾を行って BBB の透過性を増大させる方法や、(2) 細胞表面のポリアニオンを標的としたカチオン性タンパクや細胞膜透過ペプチド (CPPs) を用いた吸着性トランスサイトーシスを利用する方法、(3) BBB の毛細血管内皮細胞上に発現しているインスリン受容体やトランスフェリン受容体などに対するリガンドや抗体との融合タンパクを作成し、受容体を介したトランスサイトーシスを利用する方法等、様々な手法が試みられている。

本研究計画では、指向性分子進化工学的手法を応用し、BBB 上の膜タンパク・受容体の分子認識機構を介して脳へ非浸襲的に送達可能な高分子タンパク医薬を創出するための技術開発を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、穿頭・開頭などの外科手術を介さずに脳へ非浸襲的に投与できる新しい中枢標的の高分子・タンパク医薬を創出するための技術開発を目的としている。血液脳関門 (BBB) に発現している膜タンパクや受容体に対して結合親和性や機能制御性を示すアミノ酸配列モチーフを指向性進化工学的手法を用いて創出し、その機能モチーフを医薬候補となる高分子・タンパク質に応用することによって、BBB を非浸襲的に通過させて脳へ送達できる新しい高分子医薬の開発へ貢献することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) バクテリア・ディスプレイ法を応用した BBB 膜タンパク・受容体に対する結合親和性を示すペプチドの探索

(2) 脳毛細血管内皮細胞およびアストロサイト等を用いた *in vitro* BBB モデルの作製

(3) ファージ・ディスプレイ法を用いた BBB 膜タンパク・受容体に対する結合親和性・機能制御性を示す機能モチーフの探索

(4) 培養脳毛細血管内皮細胞を用いた免疫組織化学的方法によるモチーフの機能解析

#### 4. 研究成果

本研究計画では、脳へ非侵襲的に送達可能な高分子タンパク医薬を創出するための技術開発を行った。血液脳関門 (BBB) 上の膜タンパク・受容体に結合親和性・機能制御性を示すアミノ酸配列モチーフを指向性進化工学的手法を用いて創出し、その機能モチーフを医薬候補となる高分子・タンパク質に应用することによって、BBB 上の膜タンパク・受容体を介して脳へ送達できる新しい高分子医薬の開発へ貢献することを目指した。2011 年度からバクテリアディスプレイ法を応用して BBB 上の既知の受容体に特異的に結合するペプチドアミノ酸配列の探索を進めた。一方で、2012 年度からは、*in vitro* 血液脳関門モデルを独自に作成し、これを透過する機能を有するペプチドアミノ酸配列の探索を T7 を用いたファージディスプレイ法を応用して行った。多孔質膜を挟んでマウス脳毛細血管内皮細胞とアストロサイトの共培養を行い、高い経上皮電気抵抗値 (TEER) を示す *in vitro* BBB モデルを作成した。高次構造に一定の束縛条件を付与したランダムペプチドファージライブラリーを作成して、上記 *in vitro* BBB モデルを用いて目的のアミノ酸配列モチーフの探索を行った。2013 年度は *in vitro* BBB モデルの改良および選択増幅法の改良を行って引き続き進め、現在までに機能モチーフの一つとして脳毛細血管内皮細胞の細胞膜に特徴的に作用する機能を示す配

列候補を得た。現在さらに機能モチーフの創出を進めており、これらを用いて医薬候補となる機能タンパクへの応用および生体投与の準備を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

1) Kubo T, Ono S, Kimura T, Kobayashi S, Kondo T, Fukuda E, Haga T, Kameyama T “Random peptide library based on a spider neurotoxin, and utilization of the library in *in-vitro* evolution directed to GPCR ligands” 17th World Congress of IST International Society on Toxinology 2012 年 7 月 12 日, Honolulu, USA

2) Kubo T, Ono S, Kimura T, Kobayashi S, Kondo T, Fukuda E, Haga T, Kameyama T “Development of the PERISS method to generate GPCR ligands/binders from a random peptide library with a spider neurotoxin scaffold” Biophysical Society 56th Annual Meeting. 2012 年 2 月 29 日 San Diego Convention Center, San Diego, USA

3) Kubo T, Ono S, Kimura T, Kobayashi S, Kondo T, Fukuda E, Haga T, Kameyama T “*In vitro* evolution of peptide neurotoxins directed to receptor ligands (2): Application of a newly developed PERISS method to generate m2 muscarinic receptor ligands from a random peptides with an ICK motif.” 9th Australian Peptide Conference, 2011 年 10 月 17 日 Conference Centre, Hamilton Isl., Australia

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤哲朗 (KONDO, Tetsuro)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ  
メディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：30344229

### (2) 連携研究者

久保泰 (KUBO, Tai)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ  
メディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：10178030