

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590056

研究課題名(和文) 膜透過技術を搭載したバイオ医薬の非侵襲的デリバリーの創製と臨床開発への橋渡し研究

研究課題名(英文) Development of non-invasive delivery of biopharmaceuticals equipped with novel membrane permeation technology and their translational research

研究代表者

武田 真莉子 (Takeda, Mariko)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：70257096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞膜透過性ペプチド(CPPs)を基盤ツールとするバイオ薬物の非侵襲的送達システムの創製の確立と臨床開発への橋渡し研究を目的とし以下の成果を得た。1) CPPsによる膜透過促進作用の主要機構を解明、2) 人工ニューラルネットワークによるin silico探索研究により天然のCPPsより優れた新規ペプチド配列(PenetraMax)を発見し特許化、3) in vivo毒性試験によりCPPsは局所的にも全身的にも高い安全性を有することを示した。さらにCPPsを用いた臨床製剤の創製に向けた基礎的知見が得られ、これらの結果を踏まえ経口PETイメージング研究を進めるための実験系の確立も達成できた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish non-invasive delivery systems for drugs based on new delivery tool: cell-penetrating peptides (CPPs) and to perform translational research, and the following results were obtained: 1) Elucidation of main mechanism of membrane permeation enhancing effects by CPPs, 2) Novel peptide sequence (PenetraMax) that is superior to natural CPPs was obtained by in silico exploratory research using an artificial neural network, 3) Clarification of CPPs' high safety systemically and locally by in vivo toxicity tests. Furthermore, useful knowledge for development of the clinical formulations of CPPs, and based on the above results, an experimental conditions to perform oral PET imaging studies were established.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー バイオ医薬 非侵襲的投与経路 吸収促進 バイオアベイラビリティ インスリン 細胞膜透過ペプチド ペネトラチン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質や核酸などのバイオ医薬の投与形態は注射剤が主流である。患者 QOL 向上および医療費削減のためには、これらの薬物の注射回数の低減や非注射剤化が極めて重要かつ急務であると叫ばれながらも、経口投与などの非侵襲的投与経路を利用した新規剤形開発はなかなか大きな進展が認められない。これまでの開発戦略の多くは、単に“生体内での安定性の向上を目的とした試み”であり、それだけでは臨床で有効性および安全性が保証できるほどに十分な bioavailability (BA) を得ることは困難である。つまりバイオ薬物の非注射剤化を可能にするためには生体膜透過性を強力に改善できる新たな機能素子の開発が何としても必要不可欠である。このような新たな機能素子として、我々は細胞膜透過性ペプチド：cell-penetrating peptides (CPPs) に着目した。CPPs は、Tat ペプチドに代表される 10 残基程度のカチオン性ペプチドで、近年、安全かつ有用性の高い細胞内導入ベクターとして注目されている。我々は、生体膜透過性を有するこれら CPPs を、バイオ薬物の非侵襲的投与における BA プラスターとして用いることを提案し、その有効性を世界で初めて証明することができている。しかし、臨床開発を行うためには、毒性試験を行う必要があり、ヒト投与の前に安全性を保証しなければならない。また、安全性の保証を強力にサポートするためにも、徹底した吸収促進機構の研究および体内動態研究が必須である。このような基礎研究を固めることにより、安全性の保証されたバイオ薬物の BA enhancer としての CPPs の作用を最大にするデリバリーシステムを構築できると期待される。

2. 研究の目的

本研究はバイオ薬物の生体膜透過性を強力に改善する新規機能素子：細胞膜透過性ペプチド(CPPs)を利用した非侵襲的デリバリーシステムの創製を確立し、臨床開発を早期に実現するための橋渡しとなる研究の遂行を目的とする。具体的には CPPs の透過促進機構の包括的解明、*in vivo* 毒性試験、*in silico* での新規 CPPs の探索並びに非侵襲的デリバリーシステムの創製と PET イメージングを用いた臓器移行性の非侵襲的・速度論的解析を行う。

3. 研究の方法

(1)CPP によるバイオ薬物吸収促進機構解明：Caco-2 細胞実験によりバイオ薬物-CPP の膜透過過程を分離して各素過程への CPP の関与と CPP 自身の細胞内動態を速度論的に明らかにする。

(2)*In vivo* 毒性試験：CPP を単回および慢性投与後の粘膜(鼻および消化管)の組織学的評価および単回および繰り返し投与後(30日)の毒性試験を行い生体への安全性を明ら

かにする。

(3)新規 BA enhancer 素子の探索：数 10 種類の CPPs 構造改変体を合成し、分子軌道法による構造計算、分子間相互作用、吸収促進活性等の情報を *in silico* 解析し、有力な新規素子を見いだす。

(4)非侵襲的デリバリーシステムの創製：粉末製剤、スマートハイドロゲルマイクロ粒子および逆ミセル型高分子ナノ粒子を候補製剤とし、デリバリーキャリアを選択し最適化する。

(5)PET イメージングを用いたバイオ薬物の速度論的解析：デリバリーシステムからの薬物の吸収挙動を PET を利用した分子イメージング手法により画像化し、吸収後の薬物体内動態とそれに及ぼす CPPs の効果について速度論的に解析する。

4. 研究成果

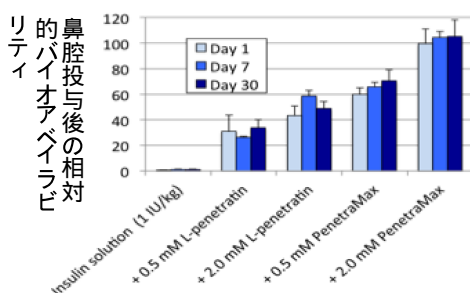
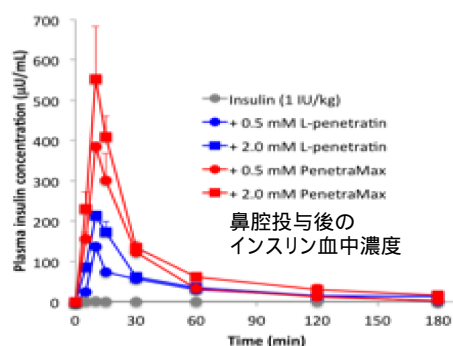
(1)CPP によるバイオ薬物吸収促進機構解明：Caco-2 細胞を用いて様々な条件下詳細な検討を行い、その結果、CPP 自身の生体膜透過はほとんどおこらず、細胞分画に留まること、バイオ薬物への吸収促進作用は漿膜側ではなく粘膜側から優位に起こること、また適用する CPP が低濃度ではエネルギー介在輸送で、高濃度では非エネルギー介在輸送によりバイオ薬物の吸収促進作用が起こっていることを明らかにし、これらの結果を論文化した。

(2)*In vivo* 毒性試験：この研究では、インスリンをモデル薬物とし、3 種類の CPP(L-penetratin, D-penetratin, PenetraMax)を用いて、Wistar 系雄性ラットに単回、ならびに 30 日間 1 日 2 回連続経鼻投与実験を行い、吸収促進効果ならびに毒性を評価した。その結果、PenetraMax は最も著明にインスリンの鼻粘膜からの吸収を促進し、BA はほぼ 100%に達した。30 日間 1 日 2 回連続経鼻投与後の血中濃度-時間曲線は 1 日目および単回投与時と同じであり、安定した吸収促進効果が得られることが明らかとなった(Fig. 1)。また、鼻粘膜組織の形態学的検査ならびに炎症性および免疫原性のバイオマーカーの経日的変動の結果から、局所的にも全身的にも何ら毒性が認められないことを明らかにし、これらの結果を論文化した。これらの結果から、penetratin の非常に高い安全性が示され、臨床試験に向けての準備が進んだ。

(3)新規 BA enhancer 素子の探索：数十種類の penetratin 構造改変体を合成し、分子軌道法による構造計算、分子間相互作用、吸収促進活性等の情報を合わせて人工ニューラルネットワークの一種である自己組織化マップを用いて解析し、CPP の構造記述子と吸収促進効果との関連性を明らかにすることができた(Fig. 2)。この情報をもとに、天然

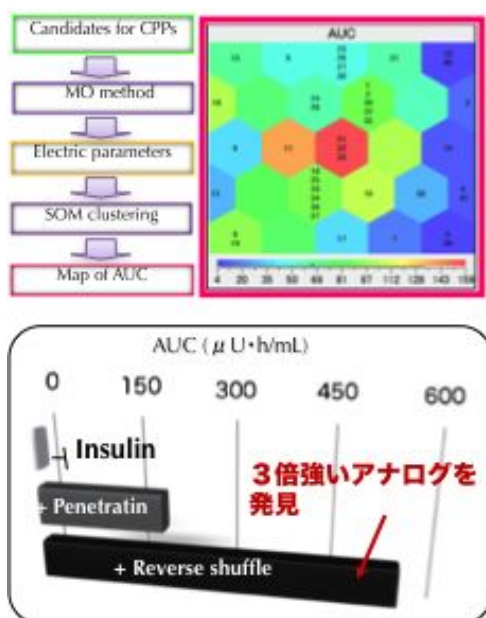
の penetratin より吸収促進作用がより強力なペプチド配列を見出し、それを動物実験により実証し論文ならびに特許を取得した。

Fig. 1 CPPによる著明なBA促進効果



(4)非侵襲的デリバリーシステムの創製：投与経路を経口として、最初は混合溶液としてCPPの機能評価を開始した。その結果、溶液投与でも十分に主薬の薬理効果を発揮できることが明らかとなった。特にインスリンを用いた場合は、約20%の薬理学的利用率を得ることに成功した。今後はこの基礎的知見に基づき、臨床製剤として使用しやすい剤形への開発を続ける。

Fig. 2 *In silico*解析による新規CPPの探索



(5)PET イメージングを用いたバイオ薬物の速度論的解析：経口投与のPETイメージング実験系の確立を試みた。本研究では、従来より用いているペントバルビタールのような簡便な麻酔が使用できないため、プロポフォルなどの消化管蠕動運動に影響をしない麻酔を用いた吸収実験系への変更が必要となった。本研究では数時間にわたり安定した吸収実験が行える大腿静脈への持続注入条件など実験条件を確立した。

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)

〔雑誌論文〕(計7件)

1. One-month subchronic toxicity study of cell-penetrating peptides on insulin nasal delivery in rats: E.S. Khafagy, N. Kamei, E. Nielsen, R. Nishio and M. Takeda-Morishita, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013, 85, 736-743 (査読有り).
2. Mechanistic study on the uptake/permeation of cell-penetrating peptides across Caco-2 monolayer and their stimulatory effect on epithelial insulin transport: N. Kamei, Y. Onuki, K. Takayama, M. Takeda-Morishita, J Pharm Sci, 2013, 102, 3998-4008 (査読有り).
3. Determination of the Optimal Cell-Penetrating Peptide Sequence for Intestinal Insulin Delivery Based on Molecular Orbital Analysis with Self-Organizing Maps: N. Kamei, S. Kikuchi, M. Takeda-Morishita, Y. Terasawa, A. Yasuda, S. Yamamoto, N. Ida, R. Nishio, K. Takayama, J. Pharm. Sci., 2013, 102, 469-479 (DOI 10.1002/jps, 査読有り).
4. Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide: El-S. Khafagy and M. Takeda-Morishita, Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64, 531-539 (10.1016/j.addr.2011.12.014).
5. Non-invasive insulin delivery: the great potential of cell-penetrating peptides: N. Kamei, E. Nielsen, El-S. Khafagy and M. Takeda-Morishita, Therapeutic Delivery, 2013, 4, 315-326(10.4155/TDE.12.164).
6. 武田真莉子, バイオ医薬品の非注射製剤の現状と開発動向 薬剤学, 73 (2013) 56-62.
7. Cell-penetrating Peptide-Biodrug Strategy for Oral and Nasal Delivery: Review of Recent Findings: El-S. Khafagy, N. Kamei, M. Takeda-Morishita, J. Exp. Clin. Med.,

[学会発表](計 26 件)

1. 亀井敬泰, 崔八ヨン, 系数玲, 武田真莉子, 経鼻投与を介したペプチド薬物脳送達における cell-penetrating peptides の有効性評価, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月, 熊本.
2. 武田真莉子, バイオ医薬の次世代型投与システムの研究開発動向と将来展望～経口吸収 FG の立場から～, 日本薬剤学会 2025WG シンポジウム・バイオとナノが拓く医療イノベーション, 2013 年 12 月, 東京.
3. Takeda M, Kamei N, Cell-Penetrating Peptides: Molecular function and usefulness as a novel oral bioavailability enhancer for therapeutic peptides and proteins, Post-Congress of 4th World Congress of Asian Psychiatry 2013, August 2013, Khon Kaen, Thailand.
4. 武田(森下)真莉子, 亀井敬泰, バイオ医薬の経粘膜デリバリーシステムの開発研究, 第 29 回日本 DDS 学会学術集会ワークショップ, 2013 年 7 月, 京都.
5. 武田(森下)真莉子, バイオ医薬の経口デリバリーシステムの開発研究, ドラッグデリバリーシステムと医薬品包装技術に関する国際会議, ファームテックジャパン 2013, 2013 年 4 月, 横浜.
6. 武田(森下)真莉子, シンポジウム趣旨説明, 脳をターゲットとする薬物デリバリー研究の最前線, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜.
7. 大門裕貴, 川上亘作, 井澤浩則, 亀井敬泰, 武田(森下)真莉子, 酒井秀樹, 阿部正彦, Hill JP, 有賀克彦, キトサン誘導体添加によるインスリンの膜透過性及び安定性の向上, 材料技術研究協会討論会, 2013 年 12 月, 千葉.
8. 武田真莉子, 亀井敬泰, Nielsen EJB, Khafagy El-S, Cell-penetrating peptide を用いたインスリンの粘膜吸収増進と安全性評価, 第 2 回日本くすりと糖尿病学会学術集会, 2013 年 11 月, 東京.
9. 亀井敬泰, 志田貴之, 田中智大, 高山幸三, 武田真莉子, 高度不飽和脂肪酸の GLP-1 分泌促進作用を介した新規糖尿病治療法の開発, 第 2 回日本くすりと糖尿病学会学術集会, 2013 年 11 月, 東京.
10. 岩前瑠衣紗, 吉田真也, Nielsen EJB, 亀井敬泰, 高山幸三, 武田(森下)真莉子, 膜透過性ペプチドをキャリアとするインスリン経口デリバリーシステムの開発, 第 63 回日本薬学会近畿支部大会, 2013 年 10 月, 京都.
11. 芝ひかり, 亀井敬泰, 武田(森下)真莉子, 経鼻投与に基づく脳内バイオ薬物デリバリー法の開発, 第 63 回日本薬学会近畿支部大会, 2013 年 10 月, 京都.
12. Kamei N, Khafagy El-S, Hamamoto Y, Shiba H, Iwamae R, Kaiguchi M, Tanaka F, Matsumoto Y, Nielsen EJB, Nishio R, Takeda-Morishita M, Long-term effectiveness and systemic/local safety of novel penetratin analogue for nasal insulin delivery, The 5th Asian Arden Conference, August 2013, Nagoya, Japan.
13. Nielsen EJB, Yoshida S, Kamei N, Rahbek UR, Pedersen BR, Takayama K, Takeda-Morishita M, Cell-penetrating peptides in oral delivery systems for insulin, The 40th Annual Meeting and Exposition, the Controlled Release Society, July 2013, Hawaii, USA.
14. 亀井敬泰, 芝ひかり, 武田(森下)真莉子, 細胞膜透過ペプチドを利用した鼻から脳への効率的バイオ薬物デリバリー, 第 29 回日本 DDS 学会, 2013 年 7 月, 京都.
15. Khafagy El-S, Kamei N, Hamamoto Y, Shiba H, Iwamae R, Kaiguchi M, Tanaka F, Matsumoto Y, Nielsen EJB, Nishio R, Takeda-Morishita M, One-month subchronic toxicity study of cell-penetrating peptides on insulin nasal delivery in rats, 日本薬剤学会第 28 年会, 2013 年 5 月, 名古屋.
16. 亀井敬泰, 芝ひかり, 武田(森下)真莉子, 鼻腔を介した脳内バイオ薬物デリバリーにおける細胞膜透過ペプチドの有用性, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜.
17. Nielsen EJB, Kamei N, Yoshida S, Takayama K, Takeda-Morishita M, Usefulness of cell-penetrating peptides for development of oral insulin delivery systems, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜.
18. 武田(森下)真莉子, バイオエンハンサー:細胞膜透過ペプチドを利用したバイオ薬物経口デリバリーシステムの開発研究, クラスター交流会, 2012 年 9 月, 神戸.
19. 武田(森下)真莉子, バイオ医薬品の非注射剤の現状と開発動向, 日本薬剤学会第 27 年会, 2012 年 5 月, 神戸.
20. Takeda-Morishita M, Kamei N, Cell-penetrating peptides: Molecular function and usefulness in the pharmaceutical development as a novel bioenhancer, 2012 International Advanced Drug Delivery Symposium, April 2012, Hsinchu, Taiwan.
21. 佐藤智美, 森下真莉子, 吉田真也, 高

- 山幸三, 細胞膜透過ペプチド(CPPs)を利用した脳への薬物送達システムの開発研究, 日本薬学会第 27 年会, 2012 年 5 月, 神戸.
22. 吉田真也, 森下真莉子, 佐藤智美, 高山幸三, 細胞膜透過ペプチドを利用した経口インスリン送達システムの開発, 日本薬学会第 27 年会, 2012 年 5 月, 神戸.
23. Morishita M, Kamei N, Takayama K, Noninvasive peptide and protein delivery systems using cell-penetrating peptides, 20th Helsinki Drug Research Congress, September 2011, Helsinki, Finland.
24. Morishita M, Kamei N, Takayama K, N Cell-penetrating peptides as a novel oral bioavailability enhancer for therapeutic peptides and proteins: a mechanistic study of BA enhancement effects using Caco-2 cell monolayers, 日本薬物動態学会第 26 年会, 2011 年, 11 月, 広島.
25. 森下真莉子, Cell-penetrating peptides を用いた生理活性ペプチドの粘膜吸収促進, 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2011 年, 11 月, 岡山
26. 森下真莉子, 細胞膜透過性ペプチドによるバイオ薬物の消化管吸収促進, 第 29 回物性物理化学研究会, 2011 年 5 月, 京都.

〔図書〕(計 4 件)

1. 亀井敬泰, 武田(森下)真莉子(分担執筆), 『ペプチド医薬の最前線』, シーエムシー出版, 東京, pp. 117-121, 2012.
2. 森下真莉子(分担執筆), 『The DDS』, 京都廣川書店, 京都, pp. 117-133, 2012.
3. 亀井敬泰, 森下真莉子(分担執筆), 『ペプチド・タンパク性医薬品の新規 DDS 製剤の開発と応用』, メディカルドウ, 東京, pp. 41-46, 2011.
4. 森下真莉子(監修, 分担執筆), 『次世代バイオ医薬品の処方設計と開発技術』, シーエムシー出版, 東京, pp. 193-201, 2011.

〔産業財産権〕

取得状況(計 3 件)

名称: 経鼻投与用医薬組成物
 発明者: 森下真莉子, 高山幸三, 井田伸夫, 青木孝夫
 権利者: 東レ株式会社
 種類: 特許
 番号: 04711013
 取得年月日: 2011 年 4 月 23 日
 国内外の別: 国内およびメキシコ(登録

2012/07/05), 中国(登録 2012/10/29), ロシア(登録 2012/08/31)

名称: 医薬組成物
 発明者: 森下真莉子, 高山幸三, 井田伸夫, 青木孝夫
 権利者: 東レ株式会社
 種類: 特許
 番号: 05103748
 取得年月日: 2012 年 10 月 12 日
 国内外の別: 国内

名称: 両親媒性ペプチド含有医薬組成物
 発明者: 森下真莉子, 高山幸三, 西尾玲士, 井田伸夫
 権利者: 東レ株式会社
 種類: 特許
 番号: 05076374
 取得年月日: 2012 年 9 月 12 日
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.pharm.kobegakuin.ac.jp/~dds/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 武田 真莉子 (TAKEDA Mariko)
 神戸学院大学・薬学部・教授
 研究者番号: 70257096

(2) 研究分担者

高山 幸三 (TAKAYAMA Kozo)
 星薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号: 00130758