

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860031

研究課題名(和文)細胞膜透過ペプチド経鼻併用投与に基づくバイオ薬物の革新的脳内デリバリー

研究課題名(英文)Nose-to-Brain Delivery of Biopharmaceuticals via Non-covalent Strategy with Cell-Penetrating Peptides

研究代表者

亀井 敬泰 (Kamei, Noriyasu)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：40637451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：末梢に投与されたバイオ薬物が中枢作用を発揮するためには、極めて緻密な生体バリアである血液脳関門(BBB)を突破し効率的に脳へと到達しなければならない。そこで本研究では、BBBを介さず直接脳に薬物を送達可能な鼻腔-脳経路に着目し、バイオ薬物の効率的な脳内デリバリーを達成するための基盤技術の構築を試みた。細胞膜透過ペプチド(Cell-penetrating peptides: CPPs)の併用により、経鼻投与されたバイオ薬物が効率的に脳へと送達され、さらに、中枢疾患治療効果を発揮することが明らかになった。本研究を通じて、バイオ薬物を用いた新たな中枢疾患治療法構築の可能性が拓けた。

研究成果の概要(英文)：The biopharmaceuticals are required to permeate through blood-brain barrier (BBB) for achieving the efficient therapeutic effect in central nervous system (CNS). In this study, we therefore tried to develop the successful strategy for brain delivery of biopharmaceuticals via the direct nose-to-brain transport, which can bypass the BBB. The biopharmaceuticals coadministered intranasally with cell-penetrating peptides (CPPs) was efficiently delivered to the brain parenchyma including cerebral cortex and hippocampus, and eventually showed the therapeutic actions for CNS disorders. This study opened new avenues for developing a novel CNS pharmacotherapy with biopharmaceuticals.

研究分野：薬剤学、ドラッグデリバリー

キーワード：脳内デリバリー 経鼻投与 バイオ薬物 細胞膜透過ペプチド インスリン インクレチン

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病に代表される中枢疾患の多くは、依然として十分な治療満足度が得られていない難治性疾患である。現在、それら中枢疾患の病態は徐々に解明されつつあり、原因となる生体内分子の補充もしくは制御を目的としたタンパク質・ペプチドなどのバイオ医薬品の創成が期待される。しかし、たとえ脳内において顕著な治療効果を示す候補薬物が見出されたとしても、末梢ルートを通じて血中に供給された薬物が治療部位である脳へ到達するためには、物質輸送を厳密に制御する血液脳関門 (BBB) を突破しなければならない。病態に関わる分子に直接作用しうるバイオ薬物の治療効果は極めて大きいものと期待されるが、BBB による輸送制限は低分子医薬品と比較してはるかに厳しく、バイオ薬物のもつ潜在能力を十分に引き出すことは困難である。一方近年、鼻腔から脳に繋がる直接的な薬物移行経路の存在が示唆されている。経鼻投与を介した脳薬物送達が可能となれば、静脈内もしくは脳内注射といった侵襲的経路を介することなく、治療満足度・薬剤貢献度の著しく低い中枢疾患群の薬物治療向上ならびに新薬開発を果たせるものと強く期待される。

現在のところ鼻腔から脳への薬物移行経路は明確にはされていないが、一部の報告では嗅神経軸索およびそれらを包囲する嗅神経鞘細胞により形成されるチャンネル状経路を介した嗅球への移行と、そこから脳脊髄液への流入、さらに血管周囲腔を介した脳全体への分布が候補メカニズムの中心として考えられている¹⁾。本投与経路は脳への集積性を示すことから、治療標的部位が脳である場合、全身への曝露が抑えられるという利点を有する。しかし、低分子薬物の場合にはチャンネルを経由した瞬時の脳輸送が達成されることが示されているのに対し、タンパク質やペプチドなどの高分子薬物の場合には嗅神経の樹状突起部への取込みが必要となり、輸送速度および効率性は低分子と比較して劣るとされている¹⁾。このことから、単にバイオ薬物を経鼻投与しただけでは、現実的には期待されるほどの脳移行性は達成されず、結果的に全身副作用の出現が懸念される。そのため、経鼻投与を介して全身曝露を抑えたままバイオ薬物を、効率的に脳へと送達させるためには、それら薬物に神経細胞内移行能を付与することが求められる。

2. 研究の目的

前述の通り、タンパク質やペプチドなどの高分子薬物が鼻腔から嗅神経を介して脳へと効率的に移行するには、嗅神経細胞内への取込み効率を向上させることが重要である。当研究室ではこれまでに、細胞膜透過ペプチド (CPPs) と呼ばれる機能性ペプチドを用いることによって、従来注射剤として使用されてきたタンパク質・ペプチド薬物 (バイオ

薬物) の経口・経鼻吸収の実現の可能性を示してきた²⁻⁴⁾。特に、代表的 CPP である penetratin が、インスリンの非注射投与時のバイオアベイラビリティ (BA) を著しく改善することを明らかにした。

そこで本研究では、これまでの研究成果を応用し、各種中枢疾患治療バイオ薬物を CPPs と併用し経鼻投与することによって、鼻腔から中枢へと繋がる嗅神経へのバイオ薬物の取込み、さらには脳内への移行効率を飛躍的に向上させることを試みた (図 1)。これにより、非侵襲的、かつ他の臓器への薬物分布を極力回避した安全な新規中枢疾患薬物治療法を確立することを目的とした。

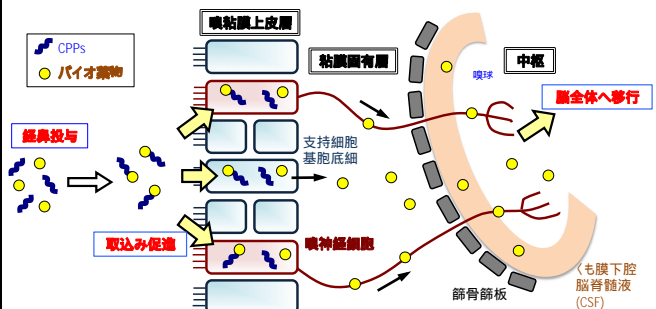


図 1 CPPs 併用経鼻投与を介したバイオ薬物の脳内デリバリーの模式図

3. 研究の方法

(1) バイオ薬物経鼻投与実験法

本研究では、モデルバイオ薬物として、認知症治療への活用が期待されるインスリン、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、Exendin-4、また、自閉症治療に有効とされるオキシトシン、概日リズム等に関わる血管作動性腸ペプチド (VIP) を用いた。一方 CPPs として、代表的かつ効率的な細胞内移行能を有する penetratin を利用した。本戦略は、バイオ薬物および CPPs の共有結合を施さない単純物理混合溶液を調製し、これを投与液とした。

ddY 雄性マウスもしくは Sprague-Dawley 雄性ラットにバイオ薬物および CPPs の混合溶液を経鼻投与し、一定時間経過後に採血および脳摘出を実施した。特に、ラットを用いた実験では、経鼻投与後の鼻腔内での薬液の希釈や咽頭側もしくは口腔内への流出を抑えるため、Hirai らにより確立された手法を用いて食道および鼻口蓋を閉鎖した⁵⁾。脳内分布評価時には、より正確に脳組織内濃度を解析するため、心臓より氷冷緩衝液を還流して脱血した後に脳を摘出し、さらに嗅球、視床下部、海馬、大脳皮質、小脳、脳幹の 6 部位に分割した。血液および脳ホモジネートは遠心分離した後、上清を測定用サンプルとした。血漿中および脳組織中のバイオ薬物の濃度は、ELISA 法により定量した。

(2) オートラジオグラフィおよびガンマカウンタによる脳内分布の高感度解析

高感度な脳内インスリン分布解析を可能にするため、キレート剤として NODAGA を架橋

したインスリンに ^{68}Cu を標識した (^{68}Cu -NODAGA-インスリン)。上述と同様の方法に従い、 ^{68}Cu -NODAGA-インスリンおよび penetratin の混合溶液を Sprague-Dawley ラットに投与し、一定時間経過後に脳を摘出し 12 分割のスライス切片を作成した。スライス切片中の放射能分布をオートラジオグラフィにより画像化するとともに、ガンマカウンタを用いて各スライス切片中の放射能を測定した。

(3) 老化促進モデルマウス (Senescence-accelerated mouse: SAM) を用いた中枢薬理学的評価

脳送達されたバイオ薬物による中枢疾患治療効果を評価するため、モデル薬物インスリンによる記憶学習改善効果をモリス水迷路試験により解析した。16 週齢の SAM マウスに 1 日 1 回 8 週間毎日インスリンおよび penetratin 混合溶液を連続経鼻投与した翌日から、円形プールを用いたモリス水迷路試験を実施しプラットフォーム到達時間を計測することにより、記憶学習能力の指標とした。さらに、アルツハイマー病の原因物質として考えられているアミロイド (A) の血中濃度および脳内濃度を ELISA 法により測定し、A 量変化と治療効果との関連性を評価した。

4. 研究成果

(1) インスリン経鼻投与後の脳移行性に及ぼす CPPs の影響

ELISA 法に基づく評価

マウスおよびラットを用いたインスリン経鼻投与と実験の結果、鼻腔から脳へのインスリンの移行効率が L-もしくは D-penetratin 併用投与によって顕著に増大することが明らかになった。さらに、脳を 6 部位 (嗅球、視床下部、海馬、大脳皮質、小脳および脳幹) に分割し脳内分布特性について解析した結果、投与部位である鼻腔に近い吸収で最も顕著なインスリン濃度の上昇が認められた。また、嗅球のみならずその他の部位においてもインスリン濃度の上昇が認められたことから、penetratin 併用下で鼻腔-脳実質経路を介して先端の嗅球に到達したインスリンが徐々に脳深部へと移行したと推察された。

放射標識インスリンを用いた評価

上述の ELISA 法による定量に加えて、より高感度に画像化および定量解析が可能な放射能標識体を用いたオートラジオグラフィおよびガンマカウンティング法による経鼻投与後のインスリン脳内分布解析を実施した。オートラジオグラフィの結果より、L-および D-penetratin 併用時に放射活性の増強が認められ、特に嗅球で最も強い放射活性が認められた (図 2)。また、脳後部に進むにつれて放射能が減弱していることから、インスリンの脳への移行に鼻腔からの直接的な輸

送が寄与していることが示唆された。この結果は、ガンマカウンタによる放射能測定結果とも相関していることから、バイオ薬物の効率的な脳送達法としての CPPs 併用経鼻投与法の有用性な手段となることが示唆された。

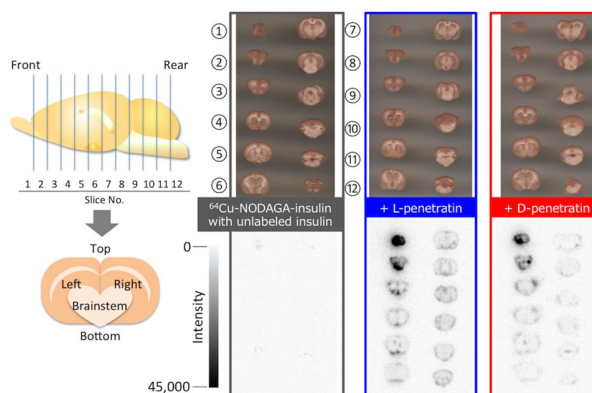


図 2 オートラジオグラフィによるインスリン脳内分布解析

(2) その他のペプチド薬物の鼻腔-脳移行性に及ぼす CPPs の影響

上述の結果より、両親媒性 CPP である penetratin を用いることにより、経鼻投与後のインスリンの脳移行性を顕著に増大させることが明らかになった。従って次に、CPP 併用経鼻投与法の応用性を評価するため、種々のペプチド薬物の経鼻投与後の脳移行性に及ぼす penetratin の影響について評価した。モデルペプチド薬物として、GLP-1、Exendin-4、オキシトシンおよび VIP を用いた。このうち、L-または D-penetratin の併用により経鼻投与後の Exendin-4 の脳移行性が顕著に増大することが明らかになった。一方、GLP-1、オキシトシン、VIP については penetratin 併用によるわずかな脳内濃度の上昇傾向が認められたものの、内因性の各ペプチドによって打ち消されたため、経鼻投与したペプチド薬物の明確な脳移行促進作用は認められなかった。以上の結果より、CPPs は様々なバイオ薬物の鼻腔から脳への移行性を高めることができると期待されるが、今後より詳細に検討することが必要である。

(3) CPPs を介したインスリン脳送達における鼻腔-脳間直接輸送の寄与

カプリン酸ナトリウム併用時の鼻腔-脳移行性との比較

上述の結果より、CPPs を併用することにより、インスリンや Exendin-4 経鼻投与後の脳移行性が増大することが明らかになった。鼻腔から脳実質内へとバイオ薬物が直接移行する場合には、血中を経由しないため、バイオ薬物の全身での副作用発現の可能性を低減することが可能である。しかしながら、前述の結果では、鼻腔からどのような経路を辿り脳に到達したのか厳密な検証には至らなかった。そこで、CPPs 併用経鼻投与時のバイオ薬物の脳移行メカニズムを評価するため、

まずはカプリン酸ナトリウム (C10) を併用しインスリンを経鼻投与した場合における脳内インスリン濃度変化を評価した。C10 は強力な細胞間隙開口作用を有しているため、インスリンの粘膜吸収性は顕著に増大したが、このとき脳内インスリン濃度は変動しなかった。つまり、血漿中薬物濃度の上昇が必ずしも脳内への薬物の移行を促すわけではないことが示唆され、先に得られた CPPs 併用によるバイオ薬物の脳移行性促進作用は、血中を介さず直接脳内に到達したことに起因するものであることが示唆された。

CPPs 併用インスリン経鼻投与後の脳脊髄液中インスリン濃度の解析

CPPs 併用により増大した経鼻投与後のバイオ薬物の脳移行性が、鼻腔から脳への直接輸送の亢進に起因していることをさらに明確にするため、インスリンおよび penetratin 併用経鼻投与後の脳脊髄液 (CSF) 中のインスリン濃度を評価した。その結果、penetratin 併用により脳前方由来の CSF 中のインスリン濃度が上昇したことから、経鼻投与されたインスリンが penetratin の作用を介して嗅神経細胞もしくは鼻粘膜上皮細胞に取込まれ、神経軸索もしくは粘膜固有層を経由して CSF に到達し、脳内濃度の増大に寄与している可能性が示唆された。

(4)CPPs 併用インスリン経鼻投与による認知症治療効果

上述の通り、CPPs 併用経鼻投与法は全身への薬物の曝露を軽減した直接的な脳内送達技術となり得ることが示唆された。本技術を基盤として新たな中枢疾患治療法を確立するためには、直接鼻腔から脳に送達されたバイオ薬物が疾患治療効果を発揮することを証明しなければならない。従って、認知症治療への応用が期待されるインスリンをモデル中枢疾患治療薬として用い、鼻腔から脳へと送達されたインスリンが記憶学習能力の改善効果を有するかを評価した。認知症の発症初期 (16 週齢) から軽度認知機能障害 (24 週齢) が認められる老化促進モデル SAM マウスに、8 週間連続で 1 日 1 回インスリンおよび penetratin を併用し経鼻投与した後、モリス水迷路試験を実施した。その結果、penetratin 併用インスリン経鼻投与群において、認知機能の進行が抑制され正常対照マウスと同程度の記憶学習能力が保持されていた。一方このとき、血漿中および脳内 A 濃度に変化が認められなかったことから、経鼻投与されたインスリンによる認知症の進行抑制効果に寄与するメカニズムについては不明なままである。

本結果より、CPPs 併用投与を介して鼻腔から脳へと移行したバイオ薬物が中枢疾患治療効果を十分に発揮しうることが証明された。今後は、アルツハイマー病のみならず、摂食障害、自閉症、多発性硬化症など様々な

中枢疾患治療に本手法が応用できるかを検証する予定である。

<引用文献>

- 1) Dhuria SV et al, J Pharm Sci 99, 1654-1673, 2010.
- 2) Kamei N et al, J Control Release 132, 21-25, 2008.
- 3) Khafagy El-S et al, Int J Pharm 381, 49-55, 2009.
- 4) Kamei N et al, J Control Release 136, 179-186, 2009.
- 5) Hirai S et al, Int J Pharm 7, 317-325, 1981.

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 5 件)

Kamei N, Shingaki T, Kanayama Y, Tanaka M, Zochi R, Hasegawa K, Watanabe Y, Takeda-Morishita M, Visualization and quantitative analysis of the brain distribution of insulin administered via nose-to-brain delivery based on the cell-penetrating peptide noncovalent strategy, *Mol. Pharm.*, 13, 2016, 1004-1011. (査読有)

亀井敬泰, 武田真莉子, バイオ医薬の経粘膜デリバリーシステム研究の新展開, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 46, 2015, 829-836. (査読無)

Kamei N, Takeda-Morishita M, Brain delivery of insulin boosted by intranasal coadministration with cell-penetrating peptides, *J. Control. Release*, 197, 2015, 105-110. (査読有)

亀井敬泰, 武田真莉子, バイオ医薬品の経鼻送達システムの開発, *くすりと糖尿病* 3, 2014, 43-46. (査読無)

亀井敬泰, 武田真莉子, バイオ薬物脳内デリバリー研究の最新動向, *Drug Delivery System* 28, 2013, 287-299. (査読無)

[学会発表](計 13 件)

亀井敬泰, 崔ハヨン, 田中未紗, 武田真莉子, アルツハイマー病治療効果を高める経鼻投与型ペプチド薬物脳内送達法の開発, 第 65 回日本薬学会近畿支部大会, 2015 年 10 月, 大阪.

Kamei N, Choi H, Tanaka M, Itokazu R,

Shingaki T, Kanayama Y, Watanabe Y, Takeda-Morishita M, Brain delivery of peptide drugs via intranasal administration for Alzheimer's disease treatment, The 42nd Annual Meeting and Exposition, the Controlled Release Society, July 2015, Edinburgh, Scotland.

Kamei N, Choi H, Tanaka M, Takeda-Morishita M, Brain delivery of peptide drugs via intranasal coadministration with cell-penetrating peptides, International Symposium CPP Paris 2015, July 2015, Paris, France.

Takeda-Morishita M, Kamei N, Choi H, Tanaka M, Itokazu R, Shingaki T, Kanayama Y, Watanabe Y, Brain delivery of insulin boosted by intranasal coadministration with cell-penetrating peptides, 12th World Congress, the World Federation of Societies of Biological Psychiatry, June 2015, Athens, Greece.

亀井敬泰, 武田真莉子, ペプチド薬物の中枢疾患治療効果を高める脳内デリバリー法の開発, 日本薬学会第 135 年会シンポジウム, 2015 年 3 月, 神戸.

亀井敬泰, 新垣友隆, 金山洋介, 蔵地理代, 長谷川功紀, 渡辺恭良, 武田真莉子, 細胞膜透過ペプチド併用経鼻投与によるインスリン脳内デリバリー: ⁶⁴Cu-NODAGA 標識インスリンを用いた脳内分布評価, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月, 神戸.

崔ハヨン, 亀井敬泰, 田中未紗, 重井愛子, 系数玲, 武田真莉子, アルツハイマー病治療を標的とした経鼻投与型ペプチド薬物脳内送達法の開発, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月, 神戸.

崔ハヨン, 系数玲, 亀井敬泰, 武田真莉子, 経鼻投与によるバイオ薬物脳送達における細胞膜透過ペプチドの有用性評価, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014 年 7 月, 東京.

Kamei N, Takeda-Morishita M, Enhanced brain delivery of bioactive peptide drugs via intranasal administration with cell-penetrating peptides, FIP 5th Pharmaceutical Sciences World Congress, April 2014, Melbourne, Australia.

亀井敬泰, 細胞膜透過ペプチドを利用したバイオ薬物の非侵襲的デリバリー, 第 30 回関西地区ペプチドセミナー, 2013 年 11 月, 神戸.

亀井敬泰, 崔ハヨン, 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.

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.

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 学会学術集会, 2013 年 7 月, 京都.

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kobegakuin.ac.jp/~dds/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 敬泰 (KAMEI, Noriyasu)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号: 40637451

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

武田 真莉子 (TAKEDA-MORISHITA, Mariko)

渡辺 恭良 (WATANABE, Yasuyoshi)

金山 洋介 (KANAYAMA, Yousuke)