

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870767

研究課題名(和文) 経鼻投与型機能性ペプチド修飾神経指向性ナノキャリアの開発と脳神経疾患治療への応用

研究課題名(英文) Development of the neuron targeting functional peptide-modified nanocarriers for CNS diseases therapy

研究代表者

金沢 貴憲 (Takanori, Kanazawa)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60434015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、機能性ペプチド修飾ナノキャリアと経鼻投与を基盤とした脳への薬物・核酸送達システムの開発と脳神経疾患治療への応用を目的とし、新規機能性ペプチド修飾ナノキャリアの設計とその神経細胞ならびに鼻から脳への核酸送達性、および神経疾患モデル動物を用いた治療効果の検討を行った。新たに設計した機能性ペプチド修飾ナノキャリアはいずれも神経細胞および鼻から脳への核酸送達性を増強した。また、脳虚血再灌流障害モデル動物に本ナノキャリアを用いて薬物を経鼻投与することで、優れた治療効果が示された。以上より、本研究で設計した新規ナノキャリアと経鼻投与の併用は脳神経疾患に対する有効な薬物投与方法となると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, to develop the drug/siRNA delivery system to the brain using nasal administration and multifunctional peptide-modified nanocarriers, we designed the novel functional peptide-modified nanocarriers and estimated them about the intracellular siRNA uptake in neuron cells and nose-to-brain delivery of siRNA in rats. The functional peptide-modified nanocarriers strongly increased the intracellular siRNA uptake and siRNA delivery to the brain from nasal cavity. Combination of the functional peptide-modified nanocarriers and nose-to-brain delivery showed the therapeutic effects in t-MCAO (Transient-Middle Cerebral Artery Occlusion) rats. In conclusion, combination of the functional peptide-modified nanocarriers and nose-to-brain delivery can be expected as an useful drug delivery system for CNS diseases.

研究分野：医療系薬学

キーワード：脳デリバリー Nose-to-Brain 機能性ペプチド 高分子ミセル ナノキャリア 核酸デリバリー

1. 研究開始当初の背景

現在、アルツハイマーやパーキンソン病などの神経変性疾患に代表される脳・中枢神経系 (CNS) 疾患に対する根本的な治療薬・治療法はない。そのため、画期的なメカニズムを有する新規の低分子治療薬のみならず、バイオ医薬による CNS 疾患の治療戦略に大きな期待が寄せられている。CNS 疾患の効果的な治療を達成するためには、新規治療薬の開発と同時に、疾患部位である CNS へこれら治療薬を効率的に送り届ける薬物送達技術 (Drug delivery system : DDS) を開発することが必要不可欠である。しかしながら、全身循環血流を介した脳への薬物送達は、血液脳関門 (Blood-brain barrier:BBB) により極めて制限されるため、BBB の存在は CNS 疾患治療の大きな障壁となっている。

近年、BBB を介さずに薬物を脳へ送り込む新たな手段として、鼻腔より鼻粘膜層を介して脳へ移行する “Nose-to-Brain (NTB)” 経路が報告されている。この “NTB” 経路は、非侵襲的かつ直接的に脳内に薬物を送達可能であることから、様々な薬物に対して研究されているが、物理的障壁として鼻粘膜層に存在するタイトジャンクションや粘液層が脳への薬物送達をより一層困難にしている。

我々は、これまで “Nose-to-Brain” と細胞透過性ペプチド修飾ナノキャリアを併用することで、Nose-to-Brain を利用した脳組織への薬物送達効率が著しく向上することを示し、この併用が “Nose-to-Brain” の限界を打破する新しい戦略となりうる可能性を報告している (kanazawa et al., *Pharm. Res.* (2011))。

2. 研究の目的

本研究では、脳、さらには脳の神経細胞への効率的な核酸送達システムの構築と脳神経疾患治療への応用を目的としている。具体的には、神経細胞への高い核酸導入能と鼻から脳への核酸送達能を著しく向上させる機能性ペプチド修飾ナノキャリアの開発、ならびに最適ナノキャリアの脳神経疾患モデル動物に対する治療効果について検討する。

3. 研究の方法

(1) 種々の機能性ペプチド修飾ナノキャリアの設計と神経細胞への核酸送達能評価

本研究では、機能性ペプチドには、代表的な細胞透過性ペプチドおよび新たに設計したアルギニン、ヒスチジン、システインからなる多機能性ペプチドを用い、高分子ミセルおよびステアリン酸を修飾した、3 種の機能性ペプチド修飾ナノキャリアを設計した。

それぞれの機能性ペプチド修飾ナノキャリアと蛍光標識 siRNA との複合体をラット神経細胞へトランスフェクションし 4 時間後の siRNA の細胞内取り込み効率についてフローサイトメトリーを用いて検討した。

(2) 種々の機能性ペプチド修飾ナノキャリア

アの経鼻投与後の鼻粘膜および脳内分布

麻酔したラットに蛍光標識モデル核酸をそれぞれの機能性ペプチド修飾ナノキャリアと共に経鼻投与し、一定時間後鼻粘膜、三叉神経、脳を摘出し、PBS により洗浄した。次に、摘出した鼻粘膜、三叉神経、脳の全体像およびブレインスライサーで 2 mm ごとにスライスした脳切片を蛍光イメージング装置により観察した。

(3) 脳神経疾患モデル動物へのモデル薬物封入ナノキャリア経鼻投与後の治療効果

脳神経疾患には脳虚血再灌流障害を選択し、栓系法により一過性中大脳動脈閉塞 (t-MCAO) ラットを作製した。ナノキャリアには脳内への薬物移行効率が最も高かった細胞透過性ペプチド修飾高分子ミセルを用いた。薬物には脳神経保護作用が期待されるシクロスポリン A (CsA) を用いた。再灌流前の t-MCAO ラットに、CsA 溶液および CsA 封入細胞透過性ペプチド修飾高分子ミセルを経鼻投与 (CsA 量として 1 mg/kg) し、再灌流 22 時間後における脳の梗塞巣割合、浮腫による脳湿重量の変化率、脳組織内の TNF- α 産生量および神経学的スコアを評価した。このとき、ポジティブコントロール群として CsA 溶液の腹腔内投与群 (CsA 量として 10 mg/kg) についても検討した。

4. 研究成果

(1) 種々の機能性ペプチド修飾ナノキャリアによる神経細胞への核酸送達能評価

いずれの機能性ペプチド修飾ナノキャリアも核酸の細胞取り込み効率を向上した。このとき、キャリア間に大きな差はなく、神経細胞への送達性に優れたナノキャリアであることが示された。

(2) 種々の機能性ペプチド修飾ナノキャリアの経鼻投与後の鼻粘膜および脳内分布

いずれの機能性ペプチド修飾ナノキャリアもキャリアを用いない場合と比べて、鼻粘膜、三叉神経、脳への移行を向上させた。ステアリン酸を修飾した多機能性ペプチドでは鼻粘膜および脳先端の嗅球に顕著に高い分布が観察された。高分子ミセルを修飾した機能性ペプチドでは三叉神経および脳幹にも高い分布が見られ、特に細胞透過性ペプチド修飾高分子ミセルで脳全体に高い分布が見られた。よって、本研究で開発したナノキャリアはいずれも Nose-to-Brain デリバリーを増強させる優れたキャリアであることが示された。

(3) 一過性脳虚血再灌流障害モデル動物へのモデル薬物封入細胞透過性ペプチド修飾高分子ミセル経鼻投与後の治療効果

未処置群に比べ、いずれの CsA 投与群においても梗塞巣、TNF- α 産生量、浮腫および神経学的スコアの著明な改善が認められた。特に、細胞透過性ペプチド修飾高分子ミセルの経鼻投与群において、脳の梗塞巣が 20% 縮小し、脳浮腫率や行動薬理学的指標である神経

学的スコアの顕著な改善が認められ、ポジティブコントロール群であるの CsA 溶液 10 倍量を腹腔内投与した群と同等の改善が見られた。

以上より、本研究で構築した細胞透過性ペプチド修飾高分子ミセルと経鼻投与を用いた脳内薬物デリバリー法は脳内へ高濃度に薬物や核酸を送り込むことで、脳神経疾患モデル動物に対して優れた治療効果を発揮することが示唆された。本デリバリー法は脳神経疾患に対する有効な薬物治療法となると期待される。

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)

[雑誌論文](計 6 件)

Kanazawa T, Akiyama F, Kakizaki S, Takashima Y, Seta Y, Delivery of siRNA to the brain using a combination of nose-to-brain delivery and cell-penetrating peptide-modified nano-micelles. *Biomaterials*, **34**, 9220-9226 (2013)

Kanazawa T, Morisaki K, Suzuki S, Takashima Y, Prolongation of life in rats with malignant glioma by intranasal siRNA/drug co-delivery to the brain with cell-penetrating peptide-modified micelles. *Mol. Pharm.*, **11**, 1471-1478 (2014)

金沢貴憲, 高島由季, 高分子ミセルをキャリアとする経鼻投与による脳への薬物・核酸デリバリー, *Drug Delivery System*, **28**, 318-327 (2013)

金沢貴憲, 高島由季, 細胞透過性ペプチド修飾ナノキャリアと経鼻投与を用いた非侵襲的な脳への核酸送達技術, *Pharm Tech Japan*, **30**, 1113-1118 (2014)

Okada H, Tanaka K, Ogawa T, Kanazawa T, Takashima Y, Cytoplasm-responsive delivery systems for siRNA using cell-penetrating peptide nanomicelles, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **24**, 3-11 (2014)

Kanazawa T, Brain delivery of small interfering ribonucleic acid and drugs through intranasal administration with nano-sized polymer micelles. *Med Devices (Auckl)*, **6**, 57-64 (2015)

[学会発表](計 16 件)

金沢貴憲, 鈴木翔平、森崎一貴、高島由季、瀬田康生、経鼻投与と細胞透過性ペプチド修飾高分子ミセルを利用した治療核酸デリバリー、第 13 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム、東京 (2013 年 5 月)

柿崎詩野、金沢貴憲、秋山史成、高橋源、金子真未、高島由季、瀬田康生、モデル

核酸/MPEG-PCL-Tat 複合体経鼻投与後の脳への核酸送達促進機構、第 13 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム、東京 (2013 年 5 月)

柿崎詩野、金沢貴憲、高橋源、金子真未、高島由季、瀬田康生、蛍光イメージングを用いた高分子ナノミセル経鼻投与後の脳内ならびに体内分布評価、第 29 回日本 DDS 学会、京都 (2013 年 7 月)

Kanazawa T, Akiyama F, Kakizaki S, Takashima Y, and Seta Y, Intranasal brain delivery of siRNA with cell-penetrating peptide-modified MPEG-PCL nanomicelles, 40th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, HA, USA (2013 年 7 月)

金沢貴憲、高島由季、瀬田康生、経鼻投与と細胞透過性ペプチド高分子ミセルを用いた脳への核酸デリバリーと脳腫瘍治療、第 23 回アンチセンスシンポジウム、徳島 (2013 年 11 月)

金子真未、金沢貴憲、柿崎詩野、高橋源、高島由季、瀬田康生、蛍光イメージング装置を用いた細胞透過性ナノミセル投与後の脳内ならびに体内分布評価、第 19 回創剤フォーラム若手研究会、千葉 (2013 年 12 月)

金子真未、金沢貴憲、高島由季、瀬田康生、細胞透過性ナノキャリアと経鼻投与を利用した脳への核酸デリバリー、日本薬剤学会 第 29 年会 学生主催シンポジウム (SNPEE2014)「ADME ~異分野が織りなす薬剤学~」、埼玉 (2014 年 5 月)

金子真未、金沢貴憲、新出隆樹、酒巻良江、高島由季、瀬田康生、多機能性ペプチドによる鼻から脳への薬物移行性の向上、第 30 回日本 DDS 学会、東京 (2014 年 7 月)

金成将英、金沢貴憲、金子真未、茨木ひさ子、高島由季、瀬田康生、経鼻投与と細胞透過性ペプチド修飾高分子ミセルによる脳への核酸送達と脳腫瘍治療効果、第 20 回創剤フォーラム若手研究会、東京 (2014 年 11 月)

岩谷景子、金沢貴憲、新出隆樹、金子真未、酒巻良江、茨木ひさ子、高島由季、瀬田康生、新規機能性オリゴペプチドによる核酸の細胞内取り込みおよび鼻から脳への移行性の向上、第 20 回創剤フォーラム若手研究会、東京 (2014 年 11 月)

(招待講演)高島由季、金沢貴憲、瀬田康生、後眼部及び脳内への低侵襲的な薬物・核酸送達、日本薬学会 第 135 年会、神戸 (2015 年 3 月)

新出隆樹、金沢貴憲、金子真未、酒巻良江、茨木ひさ子、高島由季、瀬田康生、第 15 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム、京都 (2015 年 5 月)

新出隆樹、金沢貴憲、金成将英、茨木ひ

さ子、高島由季、鈴木豊史、伴野和夫、
瀬田康生、シクロスポリン A 封入細胞透
過性ペプチド修飾高分子ミセルの経鼻投
与による虚血性脳障害治療効果、第 31 回
日本 DDS 学会学術集会、東京 (2015 年 7
月)

樋口舞人、金沢貴憲、新出隆樹、金成将
英、高島由季、鈴木豊史、伴野和夫、瀬
田康生、シクロスポリン封入細胞透過性
高分子ミセルの調製と経鼻投与後の虚血
再灌流障害治療効果、第 59 回日本薬学会
関東支部大会、千葉 (2015 年 9 月)

(招待講演) 金沢貴憲、経鼻投与を利用
した非侵襲的な脳への薬物・バイオ医薬
デリバリー、第 57 回先天代謝異常学会総
会、大阪 (2015 年 11 月)

(招待講演) Kanazawa T, Nose-to-brain
delivery of drug/siRNA with
nanocarriers, APSTJ Global Education
Seminar 2015-3, Shizuoka (2016 年 2 月)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/seizaisek
kei/](http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/seizaisek
kei/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢 貴憲 (Takanori, Kanazawa)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60434015

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし