

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32624

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20725

研究課題名（和文）脳疾患を標的とする "Nose-to-Brain" 経路に適した粘膜透過型薬物キャリアの開発

研究課題名（英文）Development of a Mucosal Permeable Drug Carrier for the Nose to Brain Pathway to Target Brain Diseases

研究代表者

萩原 芙美子（Hagiwara, Fumiko）

昭和薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：00963993

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：ファージディスプレイライブラリー法を用いてマウスに作用可能な変異型Adタンパク質を創製するため、まずヒトAdのhCAR結合可能領域を目的遺伝子としてファージプラスミドに組み込み、ファージ粒子を作製した。作製した組み換えファージ粒子とhCAR発現細胞の特異的な結合性をフローサイトメトリーで評価したところ特異的な結合性は示さず、野生型と組み換え型ファージ粒子を用いた結合性評価においても両者に差は見られなかった。このことから、ファージに目的タンパク質が提示されていない、もしくは提示されているがファージに結合した状態ではCARに結合できない可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、ファージディスプレイ法を用いてマウスに作用可能な変異型Adタンパク質の創製に向けて、ファージに結合した状態の目的タンパク質をCARへ結合させるため、新たにプラスミドを設計しなおす予定である。Adタンパク質キャリアの慢性脳疾患への応用の可能性を検討するために、疾患モデルマウスを用いた治療実験は不可欠であることから、本研究での変異型Adタンパク質の創製には意義があると考えられる。Adタンパク質キャリアの治療用キャリアとしての有用性を検討することで、DDS研究への貢献につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To create a mutant Ad protein capable of acting in mice using a phage display library method, the hCAR-binding region of human Ad was first incorporated into a phage plasmid as the target gene, and phage particles were generated. The specific binding of the recombinant phage particles to hCAR-expressing cells was evaluated by flow cytometry, and no difference was observed between the wild-type and recombinant phage particles. This indicates that the target protein may not be presented on the phage, or may be presented but unable to bind to CAR in the phage-bound state.

研究分野：DDS

キーワード：DDS Nose-to-Brain アデノウイルス CAR BBB

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

DDS とは、患者 QOL の向上を達成すべく最適な場所・時・量の薬物を送達させる技術である。また患者および医療従事者への負担が大きい注射による投与から、経口・経皮・経粘膜投与など比較的負担の小さい非侵襲的経路から薬物吸収を可能とする技術も含まれる。脳への DDS 技術の発展は、BBB に存在するトランスポーターを介して脳組織に薬物を輸送し、その後、脳内にて活性を発現するようなプロドラッグにより達成されてきた。しかしながら、化学的な修飾は多くの薬物で制限されており脳疾患への脈管内投与による薬物治療は、血液脳関門 (BBB) が障壁となっている。これまでに申請者は、超音波造影剤であるマイクロバブルと超音波による脳への薬物送達法の開発を行ってきたが、さらなる効率的な脳への薬物送達のため、BBB を介さない鼻腔内投与における “Nose-to-Brain” 経路での脳内薬物移行に着目した。本経路においてインスリンやナノ粒子が脳内へ移行することも報告されている一方で、鼻腔内投与後の薬物が脳深部に十分に拡散しないことが新たな課題であり、これら問題点を克服する DDS 技術が求められている。申請者グループはこれまでの研究で、粘膜透過能および組織浸潤拡散能を有する新たなタンパク質キャリアを開発しており、“Nose-to-Brain” 経路をさらに発展できると考えられる。脳疾患動物モデルを用いた治療実験を検討することで、本キャリアタンパク質が物質キャリアではなく、治療用キャリアとして DDS 研究に貢献できることを明らかとしたい。

2. 研究の目的

近年、BBB を介さずに脳内へ高分子薬物をデリバリー可能な “Nose-to-Brain” 経路が注目されており、特に膜透過ペプチドを用いることで鼻粘膜上皮細胞の細胞内および細胞間隙経路を介したインスリンやナノキャリアの透過が報告されている。これらの報告は、鼻腔に理的に近い脳組織へのデリバリー効率が高く、脳深部へのデリバリーには改善が必要であると考えられた。そこで、現所属研究室にて開発された粘膜上皮細胞を透過し、さらに組織中への拡散能を併せ持つ透過キャリアを用いることで、鼻腔粘膜からの脳組織への透過および脳組織深部への拡散が達成できると考えられる。物申請者グループは、アデノウイルスのカプシドタンパク質から同定した粘膜透過タンパク質を用いて、治療用タンパク質の粘膜透過改善が可能な新たな DDS キャリアを開発している。本キャリアタンパク質は粘膜上皮細胞を透過するだけでなく、組織深部への拡散機能も有しており、鼻腔粘膜投与後の脳組織深部への分布も期待できる。本研究の目的は、新たに開発したキャリアタンパク質を用いた DDS 技術を用い、“Nose-to-Brain” 経路を利用した脳深部への治療用タンパク質の送達技術の確立、および疾患モデルマウスに適したキャリアの創製および脳疾患治療への応用により DDS 研究に貢献することである。

3. 研究の方法

Ad タンパク質を利用した粘膜透過キャリアは、ヒト Ad 由来のタンパク質であり、ウイルスの種特異性の高さからマウスを用いたデリバリー研究には十分なキャリア能を示すことができない。そこで、Ad キャリアタンパク質の膜透過性に必須の相互作用分子であるヒト Cocksackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) との結合性を、マウス CAR との結合性へと変換した変異型キャリアタンパク質をファージディスプレイライブラリー法にて創製する。さらに創製したキャリアタンパク質と BDNF の融合体を用いて、マウス鼻腔内投与による脳内デリバリー技術の確立および治療実験へとつなげる。

ヒト Ad 由来キャリアタンパク質の CAR との結合部位は立体構造解析によりすでに明らかとなっている。そこで、CAR との結合アミノ酸をランダムにて変異させファージ上に提示し、変異型キャリアタンパク質のファージディスプレイライブラリー (5,000 万通り以上) を作製する。このライブラリーとマウス CAR 発現細胞を用いたバイオパニングを繰り返すことで、マウス CAR に結合するキャリア分子を創生する。その後、マウス粘膜上皮細胞モデルを用いた透過実験を行うことで、マウス CAR を標的とした粘膜透過キャリアの評価を行う。

4. 研究成果

本研究ではマウスの Cocksackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) に結合可能な変異型アデノウイルス (Ad) タンパク質を創製するため、ファージディスプレイライブラリー法を用いることとした。ファージディスプレイ法を用いるため、ヒト Ad の CAR 結合可能領域を目的遺伝子として Ad プラスミドから切り出し、ファージプラスミドのタンパク質をコードする部位に目的遺伝子を組み込んだ。その後、得られた組み換えファージミドベクターを用いてファージ粒子を作製した。まず、ファージディスプレイ法を用いるには、hCAR への結合が前提条件である。そこで hCAR を発現させた SF295 細胞 (SF295-CAR) に Ad5knob 発現ファージを作用させ、フローサイトメトリーを用いて結合性を評価したところ、

Ad5knob 発現ファージの hCAR への結合性は見られなかった。そこで、SF295-CAR の hCAR の発現量を評価するため、SF295 および SF295-CAR への Ad5knob の結合性をフローサイトメトリーで評価したところ SF295-CAR の方が蛍光強度が高くなったことから、CAR は問題なく発現していると考えられた。続いて、Ad5knob 発現ファージと hCAR の特異的な結合性を明らかにするために、野生型ファージの hCAR への結合性を評価した。CAR への特異的な結合をフローサイトメトリーにて検討したところ、野生型と組み換え型に大きな差は見られなかったことから、特異的な結合はしていないと考えられた。以上より、作製した組み換えファージミドベクターに原因があると考え、組み換えファージミドベクターの配列を再考する必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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