

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07974

研究課題名(和文) 中枢作用性ペプチド製剤の開発と経鼻投与による臨床応用に向けた薬理学的基盤研究

研究課題名(英文) Pharmacological and translational studies of centrally-acting peptide derivatives specialized in the delivery to the brain by the intranasal administration

研究代表者

岡 淳一郎 (Oka, Jun-ichiro)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：40134613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、神経ペプチドGLP-2が抗うつ作用を示すこと、GLP-1やNeuromedin Uが認知症改善作用を示すことを報告し、臨床応用を目指して経鼻投与で中枢移行する誘導体化法を開発して国内外の特許出願を行っている。合成した経鼻投与用GLP-2誘導体は治療抵抗性うつ病モデルマウスでも抗うつ作用を示し、GLP-1、Neuromedin U及びoxytocin誘導体は認知症モデルマウスで学習記憶改善作用を示した。ヒトの鼻粘膜の約98%は三叉神経支配の呼吸上皮であり、三叉神経を介して中枢移行が可能な本誘導体は、経鼻投与により臨床でも精神神経疾患に対して充分効果を発揮する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The intranasally administered GLP-2 derivative containing cell-penetrating peptides and a penetration-accelerating sequence induced antidepressant-like effects in refractory depression model mice. Similarly, intranasally administered GLP-1, neuromedin U or oxytocin derivatives induced memory improving effects in amnesia model mice. These derivatives are probably delivered to the brain through the trigeminal nerve from the respiratory epithelium in the nasal mucosa. These results indicate that the derivatives may be useful in the clinical treatment of psychiatric and neurological disorders by the intranasal administration.

研究分野：神経薬理学

キーワード：経鼻投与 中枢移行性 GLP-2 GLP-1 Neuromedin U Oxytocin うつ病 認知症

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究では、対象疾患として「うつ病」と「認知症」をとりあげる。研究代表者や連携研究者らは、種々の神経ペプチド関連化合物が脳機能障害を改善することを報告してきた^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}。Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) は、プログルカゴンからGLP-1と同時に産生される33個のアミノ酸からなるペプチドホルモンである。小腸、大腸では、クリプト細胞の増殖やアポトーシスの抑制を介して粘膜上皮細胞の増殖を促進し^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}、欧米で短腸症候群の治療薬として用いられている。我々は脳での機能について研究を続けており、GLP-2がマウスで抗うつ様作用を示すことを報告した^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}。また、マウスに強制水泳法でストレスを負荷した際に、ストレス反応で上昇する血中糖質コルチコイド量をGLP-2が抑えることも見出し、さらにGLP-2は室傍核でのCRH産生を抑制してHPA系の亢進を抑える作用と海馬歯状回神経新生を回復させる作用を有していることを報告している^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}。

(2) 一方、認知症に関しても、研究代表者らは、GLP-1やGLP-2、neuromedin Uなどの神経ペプチドが予防及び改善作用を示すことを報告している^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}。以上の研究成果は、

アミロイドタンパク質、炎症性サイトカインやリポポリサッカライド (LPS) 誘発学習障害モデル動物、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発学習障害モデル動物、及びアルツハイマー病の危険リスク因子である糖尿病性学習障害動物等を用いた行動薬理学的実験と、培養細胞や海馬スライス標本を用いた実験から得られたものであり、学習障害の初期過程に炎症症状が深く係っていること、及びこれらのペプチドがこの過程を抑制することを示唆している^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}。

(3) これらの動物実験では、脳室内投与により中枢作用を発現させたが、今後ヒトで医薬

品として利用するためには末梢投与で分解されずに中枢移行させる必要がある。本研究の前段階のプロジェクトでは、GLP-2に界面活性剤等を添加した3剤混合溶液をラットに経鼻投与した結果、前頭葉から後頭葉にかけて広範囲に分布して抗うつ様作用を示すことを報告した^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}。しかし、この方法では粘膜傷害等の危険性が考えられるため、経鼻投与に特化した付加体を用いてGLP-2を誘導体化する方法を考案し、経鼻投与で中枢に移行して抗うつ様作用を示すことが確認された。この誘導体化法に関して国内特許を出願している^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}。

2. 研究の目的

本研究で対象とした神経ペプチドは、我々の研究から既存薬にはない新しい作用機序により精神神経疾患を改善する作用を有するもので、医薬品となれば単一選択薬や併用薬として有用性の高い治療薬となり得る物である。しかし、ペプチドを医薬品として利用するには、末梢投与での中枢移行性と酵素による分解の課題を克服する必要がある。本研究は、DDS製剤学の専門家を研究分担者に加えてこの課題にチャレンジし、既に抗うつ作用や認知障害改善作用を有することを明らかにしているペプチド類を、近年注目されつつあるペプチド医薬品として経鼻投与により効力を発揮させようとする新しい試みである。本研究では、前段階で国内特許出願を行ったペプチド誘導体化法が他の多くのペプチドに応用出来ること、その中枢移行経路の同定、及びうつ病バイオマーカーを用いて臨床有効性を動物実験から評価することを主な目的とした^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}。

3. 研究の方法

(1) GLP-1、GLP-2、neuromedin U (NmU)、oxytocinのN末側に、エンドソーム脱出部分 (PAS) と膜透過配列部分 (CPP) 及び蛍光色素を付加した誘導体を合成した^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}。

(2) 蛍光標識 GLP-2 誘導体をマウスに経鼻投与し、3 分後から経時的に脳内各部位の蛍光強度の測定と強制水泳試験または尾懸垂試験で抗うつ様作用を評価した。また、誘導体と単体を脳室内投与することで、作用発現時間と用量反応関係に違いがあるか比較検討した。

(3) 視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系亢進状態を維持させるため、マウスに副腎皮質刺激ホルモンを 14 日間投与して治療抵抗性うつ病マウスとした。強制水泳試験後にホルマリン灌流固定して凍結脳切片標本を作製し、ペプチド誘導体に付加した蛍光色素の脳内分布を検出した。

(4) マウスに LPS を側脳室内投与(i.c.v.)し、3 日後に Y-maze 試験を行った。蛍光標識ペプチド誘導体は LPS 投与の 15 分前または Y-maze 試験の 30 分前に経鼻投与し、認知症初期段階で生じる炎症由来学習障害に対する予防または改善作用を評価した。また、 β -amyloid protein (25-35)と $AlCl_3$ を 35 で 4 日間インキュベートし、i.c.v 後 7 日目に蛍光標識ペプチド誘導体を経鼻投与し、20 分後に Y-maze 試験を行った。各々、蛍光の脳内分布を凍結切片を用いて検出した。

(5) 治療抵抗性うつ病マウスに GLP-2 誘導体経鼻投与後、血漿及び脳内各部位を摘出し、メタボローム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 経鼻投与用 GLP-2 誘導体の付加部分の配列を、一部変更した誘導体や一部削除した誘導体による脳内移行性を調べた結果、PAS と CPP の両方を備えた誘導体のみ抗うつ様作用に重要と考えられる視床下部と海馬に有意な局在が認められた。強制水泳試験および尾懸垂試験において、経鼻投与後に抗うつ様作用がみられ、治療抵抗性うつ病モデルマウス

でも抗うつ様作用がみられた。さらに、GLP-2 誘導体を脳室内投与した場合の作用発現時間と用量反応関係を GLP-2 単体と比較した結果、誘導体化は経鼻投与での中枢移行性に寄与するが作用自体には影響しないことを見出した。

(2) 同様の付加体を付けた GLP-1 誘導体と NmU 誘導体は、いずれも経鼻投与により認知症初期段階で生じる炎症由来学習障害を予防及び改善した。また、oxytocin 誘導体を経鼻投与することにより、LPS 及び β -amyloid protein (25-35)誘発学習記憶障害を改善した。

(3) 蛍光標識 GLP-2 誘導体を経鼻投与し、経時的に脳内各部位の蛍光強度の測定と強制水泳試験を行った結果、経鼻投与された GLP-2 誘導体は、嗅神経および三叉神経を介して中枢へと効率良く速やかに移行している可能性が示された。ヒトの鼻粘膜の約 98% は三叉神経支配の呼吸上皮であり、三叉神経を介して中枢移行が可能な本誘導体は、ヒトでも効率良く中枢移行することが推測される。

(4) ヒト大うつ病で報告されているバイオマーカーが治療抵抗性うつ病モデルマウスでも同様の变化を示し、経鼻投与した GLP-2 誘導体がこれを回復させることを見出した。

(5) この付加体は、GLP-2 に限定せず他の中枢作用性ペプチドにも適用可能なことから、経鼻投与により臨床でも精神神経疾患に対して充分効果を発揮する可能性が示された。現在、PCT 出願から米国と EU に特許出願移行中である。今後は、上記化合物の溶媒の適正化を行い、臨床研究実施体制の構築を考えている。

<引用文献>

Oka, J-I., et al. (2000). Endogenous GLP-1 is involved in β -amyloid protein-induced memory impairment and hippocampal neuronal death in rats. *Brain Res.* 878, 194-198.

Iwai, T., et al. (2006). Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1 β production in cultured rat astrocytes. *Neurosci. Res.* 55, 352-360.

Iwai, T., et al. (2008). Neuromedin U inhibits inflammation-mediated memory impairment and neuronal cell-death in rodents. *Neurosci. Res.* 61, 113-119.

Drucker, DJ., et al. (1996). Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 7911-7916.

Tsai, CH., et al. (1997). Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am. J. Physiol.* 273, 77-84.

Iwai, T., et al. (2009). Antidepressant-like effects of glucagon-like peptide-2 in mice occur via monoamine pathways. *Behav. Brain Res.* 204, 235-240.

Iwai, T., et al. (2013). Glucagon-like peptide-2 but not imipramine exhibits antidepressant-like effects in ACTH-treated mice. *Behav. Brain Res.* 243, 153-157.

Sasaki-Hamada, S., et al. (2015). Immunohistochemical determination of the site of antidepressant-like effects of glucagon-like peptide-2 in ACTH-treated mice. *Neuroscience* 294, 156-165.

Kobayashi, K., et al. (2013). Exendin (5-39), an antagonist of GLP-1 receptor, modulates synaptic transmission via glutamate uptake in the dentate gyrus.

Brain Res. 1505, 1-10.

Iwai, T., et al. (2014). Glucagon-like peptide-1 protects synaptic and learning functions from neuroinflammation in rodents. *Journal of Neurosci. Res.* 92(4), 446-454.

Iwai, T., et al. (2015). Glucagon-like peptide-2-induced memory improvement and anxiolytic effects in mice. *Neuropeptides* 49(1), 7-14.

中村龍治、他(2014)。GLP-2 経鼻投与用製剤の中枢作用。第 130 回日本薬理学会関東部会、星薬科大学百年記念館(東京)平成 26 年 7 月 5 日。

山下 親正、岡 淳一郎、堀口 道子、濱田 幸恵 (2014)。中枢作用性ペプチド誘導体、点鼻剤、抗うつ剤、及び認知障害改善剤。特願 2014-184436。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

Sachie Sasaki-Hamada, Koji Narusawa, Ryuji Nakamura, Hitoshi Ishibashi, Jun-Ichiro Oka (2018). Effects of centrally administered glucagon-like peptide-2 on blood pressure and barosensitive neurons in spontaneously hypertensive rats. *Neuropeptides*, in press. 査読有。

DOI: 10.1016/j.npep.2018.04.007

Sachie Sasaki-Hamada, Taichi Funane, Yusuke Nakao, Rie Sasaki, Mio Nagai, Yudai Ueta, Kazumi Yoshizawa, Michiko Horiguchi, Chikamasa Yamashita, Jun-Ichiro Oka (2018). Intranasal administration of neuromedin U derivatives containing cell-penetrating peptides and a penetration-accelerating sequence induced memory improvements in mice. *Peptides* 99, 241-246. 査読有。

DOI: 10.1016/j.peptides.2017.10.010

Sachie Sasaki-Hamada, Azusa Suzuki, Emi Sanai, Kinzo Matsumoto, Jun-Ichiro Oka (2017). Neuroprotection by *chotosan*, a Kampo formula, against glutamate excitotoxicity involves the inhibition of GluN2B-, but not GluN2A-containing NMDA receptor-mediated responses in primary cultured cortical neurons. *Journal of Pharmacological Sciences* 135(3), 134-137. 査読有.

DOI: 10.1016/j.jphs.2017.10.009

Sachie Sasaki-Hamada, Azusa Suzuki, Yudai Ueda, Kinzo Matsumoto, Jun-Ichiro Oka (2017). Serotonergic and dopaminergic systems are implicated in the antidepressant-like effects of *chotosan*, a Kampo formula, in mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 133(2), 110-113. 査読有. DOI: 10.1016/j.jphs.2017.01.002

Sachie Sasaki-Hamada, Ryuji Nakamura, Yusuke Nakao, Toshiki Akimoto, Emi Sanai, Mio Nagai, Michiko Horiguchi, Chikamasa Yamashita, Jun-Ichiro Oka (2017).

Antidepressant-like effects exerted by the intranasal administration of a glucagon-like peptide-2 derivative containing cell-penetrating peptides and a penetration-accelerating sequence in mice. *Peptides* 87, 64-70. 査読有.

DOI: 10.1016/j.peptides.2016.11.013

Yusuke Nakao, Michiko Horiguchi, Ryuji Nakamura, Sachie Sasaki-Hamada, Chihiro Ozawa, Taichi Funane, Ryo Ozawa, Jun-Ichiro Oka, Chikamasa Yamashita (2016). LARETH-25 and β -CD improve central transitivity and central pharmacological effect of the GLP-2 peptide. *International Journal of*

Pharmaceutics 515(1-2), 37-45. 査読有.

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.054

Sachie Sasaki-Hamada, Maho Hoshi, Yuuki Niwa, Yudai Ueda, Aya Kokaji, Shinji Kamisuki, Kouji Kuramochi, Fumio Sugawara, Jun-Ichiro Oka (2016). Neoechinulin A induced memory improvements and antidepressant-like effects in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 71, 155-161. 査読有. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2016.08.002

Sachie Sasaki-Hamada, Yuki Hojo, Hajime Koyama, Hayuma Otsuka, Jun-Ichiro Oka (2015). Changes in hippocampal synaptic functions and protein expression in monosodium glutamate-treated obese mice during development of glucose intolerance. *European Journal of Neuroscience* 41, 1393-1401. 査読有.

DOI: 10.1111/ejn.12891

〔学会発表〕(計62件)

岡淳一郎、濱田幸恵、恒岡弥生、堀口道子、秋田智后、山下親正(2018)。経鼻投与用ペプチド誘導体の中枢作用：基礎研究からTRへ。トランスレーショナルリサーチ(TR)センター第8回シンポジウム、東京理科大学神楽坂キャンパス富士見校舎(東京)平成30年1月20日。

植田雄大、濱田幸恵、秋田智后、山下親正、岡淳一郎(2017)。認知症モデルマウスにおける oxytocin の学習・記憶改善作用。第137回日本薬理学会関東部会、日本医科大学 教育棟・橘桜会館(東京)平成29年10月28日。

小梶安榔、濱田幸恵、秋田智后、Douglas Osei-Hyiaman、大橋由明、山下親正、岡淳一郎(2017)。モデル動物を用いたうつ病バイオマーカーの定量とGLP-2誘導体の影響。脳学際第1回シンポジウム、東京理科大学葛飾キ

キャンパス大村ホール・ホワイエ (東京)平成 29 年 10 月 21 日。

岡淳一郎(2017)。認知・情動行動における神経ペプチドの機能解明とペプチド医薬品の創出。脳学際第 1 回シンポジウム、東京理科大学葛飾キャンパス大村ホール (東京)平成 29 年 10 月 21 日。

岡淳一郎、濱田幸恵、堀口道子、山下親正 (2016)。経鼻投与用 GLP-2 誘導体の開発と抗うつ様作用。第 3 回日本医科大学・東京理科大学合同シンポジウム、日本医科大学橋桜会館 (東京)平成 28 年 12 月 17 日。

中村龍治、濱田幸恵、堀口道子、恒岡弥生、中尾優介、山下親正、岡淳一郎(2016)。経鼻投与用 GLP-2 誘導体の中枢薬理作用。トランスレーショナルリサーチ(TR)センター第 3 回シンポジウム、東京理科大学葛飾キャンパス図書館大ホール (東京)平成 28 年 1 月 23 日。

舟根太地、濱田幸恵、堀口道子、中尾優介、佐々木梨衣、山下親正、岡淳一郎(2016)。ニューロメジン U 経鼻投与用誘導体の学習記憶改善作用。第 89 回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜(神奈川)平成 28 年 3 月 11 日。

岡淳一郎、濱田幸恵、堀口道子、中村龍治、中尾優介、山下親正(2016)。経鼻投与用 GLP-2 誘導体のペプチド性抗うつ薬としての可能性。第 89 回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜(神奈川)平成 28 年 3 月 10 日。

濱田幸恵、堀口道子、中村龍治、中尾優介、山下親正、岡淳一郎(2015)。中枢作用性 glucagon-like peptide-2 点鼻製剤の開発。第 133 回日本薬理学会関東部会部会、柏の葉カンファレンスセンター(千葉)平成 27 年 10 月 10 日。

岡淳一郎、濱田幸恵、堀口道子、恒岡弥生、中村龍治、中尾優介、山下親正 (2015)。経鼻投与用中枢作用性ペプチド誘導体の作製と作用解析。トランスレーショナルリサーチ(TR)センター第 2 回シンポジウム、東京理

科大学葛飾キャンパス図書館大ホール (東京)平成 27 年 8 月 29 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称 : Centrally-acting peptide derivative, and pharmaceutical composition

発明者 : 山下親正、岡淳一郎、堀口道子、濱田幸恵

権利者 : 学校法人東京理科大学

種類 : 特許権

番号 : PCT/JP2015/074962

出願年月日 : 2015 年 9 月 2 日

国際公開日 : 2016 年 3 月 10 日

国際公開番号 : WO 2016/035820 A1

国内外の別 : 国外

〔その他〕

ホームページ

http://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/index.php?371d

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡淳一郎 (OKA, Jun-Ichiro)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号 : 40134613

(2) 研究分担者

山下親正 (YAMASHITA, Chikamasa)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号 : 30622188

(3) 連携研究者

濱田幸恵 (SASAKI-HAMADA, Sachie)
東京理科大学・薬学部・ポスドクトラル
研究員
研究者番号 : 00399320