

令和元年5月29日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15440

研究課題名(和文) 認知症を治癒する革新的創薬に向けたペプチド薬物脳内送達法の開発

研究課題名(英文) Nose-to-Brain Delivery of Peptide Drugs for Effective Pharmacotherapy of Dementia

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)：経鼻投与は、血液脳関門を回避して薬物を直接脳に送達することのできるルートとして注目されている。本研究では、ペプチド薬物であるGLP-1受容体作動薬(Exendin-4)を新たな認知症治療候補薬物として用い、経鼻投与を介してそれら薬物を脳内に送達することを試みた。細胞膜透過ペプチド(Cell-Penetrating Peptides: CPPs)をExendin-4と混合投与することにより、鼻腔から脳への薬物輸送効率を飛躍的に増大させることができることを見出した。また、CPPs混合経鼻投与を介して脳に移行したExendin-4が、老化促進マウスの認知機能障害を改善させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いたExendin-4は、認知機能障害が進行しインスリン受容体が減少した場合でも、その下流シグナルを促し記憶を高めることが示唆されている。すなわち、認知症の発症や進行を抑えるだけでなく、病態進行後の脳機能回復にも有効な万能な薬剤となり得ると期待される。一方、経鼻投与された薬物は全身循環を経由せずに直接脳実質へと薬物を移行することができるため、薬物の全身曝露による副作用発現リスクを最小限に抑えることが可能である。本研究で考案した直接的脳内ペプチド送達法は、認知症のみならず多くの精神神経疾患領域の創薬研究が直面する難題を突破するブレークスルーとなる可能性を有している。

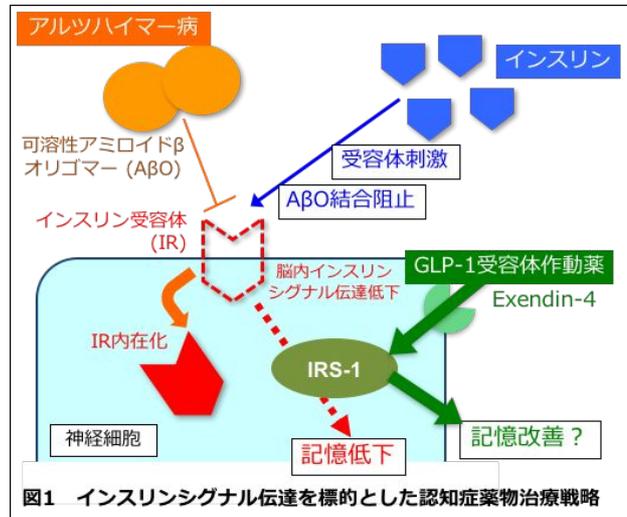
研究成果の概要(英文)：The present study aimed to overcome the difficulty in treating severe cognitive dysfunction using insulin by delivering the potential alternatives, GLP-1 receptor agonist (exendin-4) to the brain via the nose-to-brain delivery system by coadministration with penetratin. The distribution of exendin-4 throughout the brain was dramatically increased by intranasal coadministration with the L-penetratin. Furthermore, spatial learning ability after daily administration of exendin-4 with L-penetratin and supplemental insulin for 4 weeks suggested therapeutic efficacy against severe cognitive dysfunction in aged SAMP8. The present study suggests that nose-to-brain delivery of exendin-4 with supplemental insulin, mediated by CPP coadministration, shows promise for the treatment of dementia with progressive cognitive dysfunction.

研究分野：薬剤学

キーワード：経鼻投与 脳内デリバリー 細胞膜透過ペプチド ペプチド薬物 認知症 GLP-1受容体作動薬

1. 研究開始当初の背景

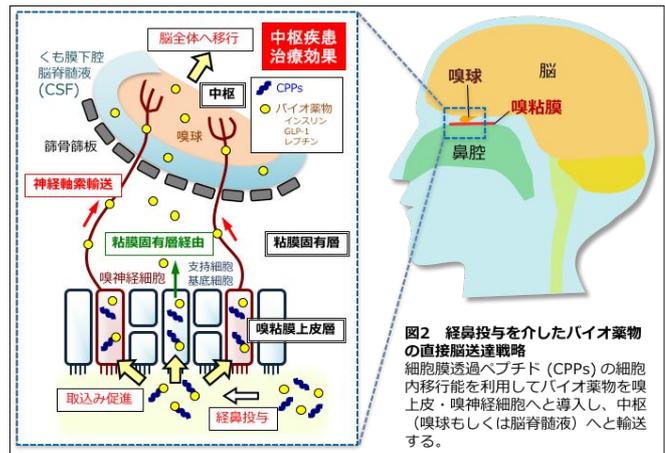
アルツハイマー病に対する薬物治療は、現状ではドネペジル等の低分子医薬品を使った対症療法しかなく、根本的な原因を解決する手段は依然として確立されていない。近年では、原因分子であるアミロイド (A β) に特異的に結合する抗体薬の開発も進められてきたが、第相臨床試験で相次いで中止となる等、製薬業界にとっては大きな痛手となっている。一方、様々なペプチドホルモンや神経栄養因子を中枢疾患治療薬として活用する新たな創薬の可能性が高まっている。特に、ペプチド薬物であるインスリンやGLP-1 受容体作動薬が脳内の神経細胞上の受容体を刺激し、記憶の形成に寄与しているという有力な知見が得られている(図1)。しかし、これらの医薬シーズを中枢疾患治療薬として結実させるためには、末梢から中枢への薬物輸送を支配する血液脳関門 (BBB) を突破するための戦略を構築することが必要である。



リガンド修飾や細胞間隙開口作用に基づく従来の BBB 透過促進法では、薬物は静脈内注射等を介して一旦全身に投与される。そのため不要な薬物の全身曝露による副作用発現リスクが高まる可能性が危惧される。それに対し、血中を經由せず薬物を直接脳に送達する手段として、経鼻投与ルートの有用性が示唆されてきた。本手法には、投与部位である鼻から治療標的となる脳への到達距離が短い、薬物の全身曝露のリスクを低減できる、という重要な2つのメリットがある。ただし、単に経鼻投与しただけでは生体膜透過性の低いペプチド薬物の脳移行効率が飛躍的に向上するとは限らない。経鼻投与法の利点を最大限に活用し、安全性の高い有用な脳内薬物デリバリーを達成するためには、鼻腔から脳実質への移行効率を高める戦略を組み合わせることが重要である。

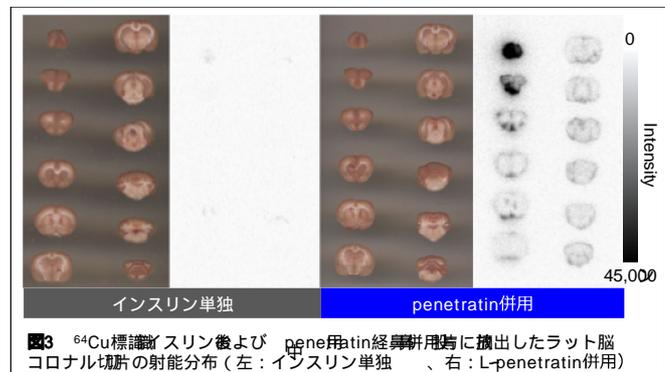
経鼻投与された薬物の脳移行ルートとして、鼻粘膜上の嗅神経細胞の軸索を辿り、脳先端部の嗅球に到達する経路が広く知られている。また、三叉神経の軸索を經由して脳幹(橋)に分布する経路も報告されている。一方、鼻粘膜上の支持細胞や基底細胞等の上皮細胞に薬物を取り込まれた場合には、粘膜固有層を經由して脳脊髄液 (Cerebrospinal fluid: CSF) や嗅球に流入することも示唆されている。すなわち、上述したペプチド薬物単独での脳移行性の低さは、分子量の大きさや親水性の高さに起因した嗅神経・三叉神経細胞および上皮細胞への取込み効率の低さによるものと考えられる。

これまでに申請者は、細胞膜透過ペプチド (CPPs) をバイオ医薬品と併用することにより、消化管や鼻粘膜からの薬物吸収性を飛躍的に高めることに成功した。粘膜組織に対する傷害や炎症作用を一切示すことなく、本来全く吸収されないインスリンのバイオアベイラビリティを35% (消化管) または100% (経鼻) にまで上昇させることを可能にした。従って、安全かつ強力な膜透過エンハンサーである CPPs を、ペプチド薬物の鼻粘膜上皮取込み促進ツールとして利用することにより、薬物の鼻腔から脳への移行性が飛躍的に向上すると考えた(図2)。



2. 研究の目的

これまでの検討において、記憶改善効果を発揮することが期待されるインスリンと代表的 CPP である penetratin を併用することにより、マウスおよびラット経鼻投与後のインスリン脳内濃度が顕著に上昇することを ELISA 法およびオートラジオグラフィにより明らかにした(図3)。さらに記憶学習試験の結果、インスリン脳内濃度の上昇に伴い軽度認知症マウスの病態進行が抑制されることを明らかにした。一方、インスリンの脳移行効率を向上させた



けでは、進行した記憶低下を回復させるには至らず、この結果は認知症の進行に伴う脳神経細胞上インスリン受容体の減少を示唆する報告と一致する。

そこで本研究では、インスリンシグナル伝達の下流分子の活性化を介して記憶・学習に寄与することが示唆されている GLP-1 受容体作動薬 Exendin-4 を penetratin と併用し、経鼻投与を介した効率的な脳内デリバリーを試みた。さらに、Exendin-4 の効率的な脳送達戦略が、重度に進行した認知機能障害をも治癒し得る革新的認知症創薬の実現につながることを薬物動態学および中枢薬理学的解析に基づき実証することを目的とした。

3. 研究の方法

In vivo 経鼻投与実験：マウス (ddY、SAMP8 および SAMR1) に麻酔した後、仰向けにして左鼻腔内にペプチド薬物 (インスリン、Exendin-4) および CPPs (penetratin) の混合溶液を投与した (5-10 μ L/マウス)。一定時間経過した後、頸静脈より血液を採取した。さらに左心室より冰冷緩衝液を還流して脱血した後、迅速に脳を摘出した。

血漿中および脳内ペプチド薬物濃度の定量解析：摘出した脳を冰冷緩衝液で洗浄した後、嗅球、視床下部、海馬、大脳皮質、小脳、脳幹に分離し、各々に冰冷緩衝液 (プロテアーゼ阻害剤含有) を添加しホモジナイズした。血液および脳ホモジネートを遠心処理し、上清をそれぞれ血漿および脳抽出液として回収した。血漿中および脳抽出液中のペプチド薬物濃度は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。

モリス水迷路試験：SAMP8 (認知症モデル) および SAMR1 (正常対照) マウスに、インスリンおよび penetratin を長期間繰返し経鼻投与した (1日1回、5週間)。投与終了翌日より、前訓練 (1日) および訓練 (7日間) から構成されるモリス水迷路試験を実施した。プラットフォームへの到達時間を記憶学習能力の指標とした。

脳組織の免疫染色：SAMP8 および SAMR1 マウスの左心室より冰冷緩衝液を還流し脱血した後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を還流し組織を固定した。脳を摘出した後、冠状断のパラフィン切片を抗 NeuN 抗体もしくは抗 A 抗体を用いて染色した後、NeuN 陽性細胞数および A 陽性面積を算出した。

4. 研究成果

初年度は、重度に進行した記憶障害を元の状態に治癒する新たな治療法を確立するため、CPPs 経鼻併用投与方法を介して GLP-1 受容体作動薬 (Exendin-4) を脳に送達することを目指した。

まず、ddY マウスを用いて経鼻投与後の Exendin-4 の脳内移行性を評価した結果、CPPs の一種である penetratin を併用することにより、嗅球、視床下部、海馬、大脳皮質、小脳および脳幹のすべての部位において Exendin-4 濃度が顕著に増大することが明らかになった (図4)。次に、認知機能障害の進行した老化促進マウス (SAMP8 マウス) に Exendin-4、L-penetratin およびインスリンの3種を同時併用し経鼻投与を5週間続けた結果、認知機能低下が回復することが明らかになった (図4)。これらの結果より、細胞膜透過ペプチド併用経鼻投与方法が、Exendin-4 脳送達効率の向上および重度の認知機能障害を治癒する有効な戦略となりうることが示唆された。さらに、Exendin-4、L-penetratin およびインスリンを同時に経鼻投与した ddY マウスの脳ホモジネートサンプルをウェスタンブロット法により解析した結果、脳内インスリンシグナル伝達経路の活性化作用が認められた。すなわち、CPPs 併用経鼻投与方法を介して脳に効率的に移行した Exendin-4 が、インスリン刺激によって開始された記憶形成シグナル伝達を活性化することにより、SAMP8 マウスの重度記憶障害を回復させることが示唆された。本研究の結果より、経鼻投与を基盤とした GLP-1 作動薬の効率的な脳送達法が、軽度のみならず重度の認知機能障害の治療にも有効となる可能性が示唆された。

初年度の結果に基づき、2年目は penetratin 併用経鼻投与後に脳内へと集積した Exendin-4 が鼻腔から直接脳に送達されたのか、あるいは、全身から BBB を経由して脳に移行したのかを解明することを試みた。マウスを用いた検討の結果、L-penetratin 併用経鼻投与によって得られる Exendin-4 脳移行性増大効果は、全身循環への吸収促進作用を介したのではなく、鼻腔から脳への直接送達ルートを通じて達成されたもので

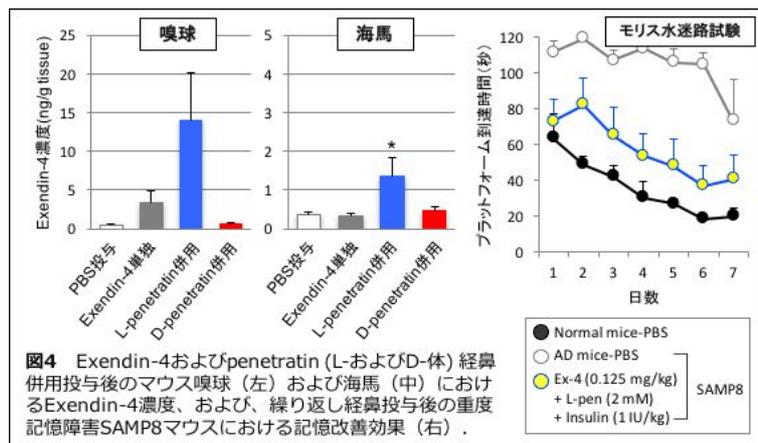


図4 Exendin-4およびpenetratin (L-およびD-体) 経鼻併用投与後のマウス嗅球 (左) および海馬 (中) におけるExendin-4濃度、および、繰返し経鼻投与後の重度記憶障害SAMP8マウスにおける記憶改善効果 (右)。

あることが示唆された。一方、鼻粘膜から血中への吸収性を増大させたとしても、脳内濃度の増加には寄与し得ないことが示唆された。認知症治療効果を発揮するためには、Exendin-4 とともにインスリンの脳内濃度を同時に高めることが必要である。しかし、Exendin-4 および penetratin 間の相互作用がインスリンにより競合的に妨げられる可能性が懸念されることから、penetratin 併用経鼻投与を介した Exendin-4 脳送達効率に及ぼすインスリン同時併用の影響をマウスを用いて評価した。その結果、インスリンは penetratin による Exendin-4 脳送達効率を変動させないことが示唆された。

これらの検討結果より、CPPs 物理混合法は、鼻腔から脳へのペプチド薬物の移行効率を高め、中枢疾患治療を向上させる 有用な基盤技術となることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(欧文)

1. Kamei N, Okada N, Ikeda T, Choi H, Fujiwara Y, Okumura H, Takeda-Morishita M, Effective nose-to-brain delivery of exendin-4 via coadministration with cell-penetrating peptides for improving progressive cognitive dysfunction, *Sci. Rep.* 8 (2018) 17641

(和文)

2. 亀井敬泰, 田中未紗, 岡田展幸, 池田尚正, 崔八ヨン, 武田真莉子, ペプチド医薬の効率的 Nose-to-Brain 送達法の開発と認知症治療への応用, *Progress in Drug Delivery System*, 26 (2017) 36-41.
3. 亀井敬泰, 細胞膜透過ペプチドを基盤とするペプチド医薬の Nose-to-Brain 送達法の開発と認知症治療への応用, *YAKUGAKU ZASSHI*, 137 (2017) 1247-1253.
4. 亀井敬泰, バイオ医薬の非侵襲 DDS 基盤となる膜透過促進戦略の確立, *Drug Delivery System*, 32 (2017) 330-339.

〔学会発表〕(計 14 件)

(招待講演・シンポジウム等)

5. 亀井敬泰, 武田真莉子, 中枢疾患治療に寄与するバイオ医薬の鼻腔-脳移行促進法の開発, 日本薬学会第 139 年会シンポジウム, 2019 年 3 月, 千葉.
6. 亀井敬泰, 中枢疾患治療を目指した Nose-to-Brain バイオ薬物送達法の開発, 日本薬剤学会・経肺経鼻フォーカスグループ研究会, 2019 年 1 月, 静岡.
7. 亀井敬泰, 認知症治療に寄与する Nose-to-Brain ペプチド薬物送達戦略, 第 24 回創剤フォーラム若手研究会, 2018 年 9 月, 神戸.
8. 亀井敬泰, 武田真莉子, バイオ医薬の効率的 Nose-to-Brain 送達法の開発と中枢疾患治療への応用, 第 34 回日本 DDS 学会学術集会, 2018 年 6 月, 長崎.
9. 亀井敬泰, 細胞膜透過ペプチドを基盤とするペプチド医薬の Nose-to-Brain 送達法の開発と認知症治療への応用, 平成 28 年度近畿支部奨励賞受賞者講演, 第 67 回日本薬学会近畿支部大会, 2017 年 10 月, 神戸.
10. 亀井敬泰, バイオ医薬の非侵襲 DDS 基盤となる膜透過促進戦略の確立, 第 9 回日本 DDS 学会奨励賞受賞講演, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 2017 年 7 月, 京都.

(一般発表)

11. 亀井敬泰, 岡田展幸, 池田尚正, 藤原由衣, 奥村遥, 崔八ヨン, 武田真莉子, Nose-to-Brain 経路を介したペプチド薬物脳送達による認知症治療効果の評価, 第 37 回日本認知症学会学術集会, 2018 年 10 月, 札幌.
12. Kamei N, Tanaka M, Okada N, Ikeda T, Choi H, Takeda-Morishita M, Establishment of the effective nose-to-brain delivery of peptide drugs and its potential for pharmacotherapy of dementia, The 2nd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceuticals, July 2018, Seoul, Korea.
13. 奥村遥, 岡田展幸, 池田尚正, 藤原由衣, 亀井敬泰, 武田真莉子, GLP-1 受容体作動薬の効率的脳送達に基づく認知症治療法の開発, 第 6 回日本くすりと糖尿病学術集会, 2017 年 9 月, 東京.
14. 亀井敬泰, 田中未紗, 岡田展幸, 池田尚正, 崔八ヨン, 武田真莉子, ペプチド医薬の効率的 Nose-to-Brain 送達法の開発と認知症治療への応用, 第 26 回 DDS カンファレンス, 2017 年 9 月, 静岡.
15. Kamei N, Tanaka M, Choi H, Okada N, Ikeda T, Takeda-Morishita M, Therapeutic effect of the enhanced nose-to-brain delivery of insulin on mild and progressive cognitive dysfunction, The 44th Annual Meeting and Exposition, the Controlled Release Society, July 2017, Boston, USA.
16. 亀井敬泰, 岡田展幸, 池田尚正, 奥村遥, 藤原由衣, 崔八ヨン, 武田真莉子, 効率的 Nose-to-Brain 送達戦略に基づく認知症治療法の開発, 第 33 回日本 DDS 学会学術集会, 2017 年 7 月, 京都.
17. Kamei N, Tanaka M, Choi H, Okada N, Ikeda T, Takeda-Morishita M, Effect of an enhanced

nose-to-brain delivery of insulin on mild and progressive memory loss in the senescence-accelerated mouse, FIP 6th Pharmaceutical Sciences World Congress, May 2017, Stockholm, Sweden.

18. 岡田展幸, 池田尚正, 奥村遥, 藤原由衣, 崔ハヨン, 亀井敬泰, 武田真莉子, 重度記憶障害マウスにおける Exendin-4 脳送達と治療効果の解析, 日本薬学会第 32 年会, 2017 年 5 月, 埼玉.

〔図書〕(計 2 件)

19. 亀井敬泰, 武田真莉子, 細胞膜透過ペプチドを利用したバイオ医薬の粘膜透過促進戦略, ドラッグデリバリーシステム バイオ医薬品創成に向けた組織、細胞内、核内送達技術の開発-, 杉林堅次監修, シーエムシー出版 (2018) pp. 33-42.
20. 亀井敬泰, 武田真莉子, バイオ医薬における血液脳関門の透過と非侵襲技術, 最新 DDS 技術の先端バイオ医薬品への応用開発, 技術情報協会 (2017) pp. 345-351.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 武田 真莉子

ローマ字氏名: Mariko Takeda-Morishita

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、研究者個人に帰属されます。