

機関番号：32676

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 年～2010 年

課題番号：20590042

研究課題名（和文）デリバリーキャリアを利用したバイオ医薬の次世代型・非侵襲的 DDS の開発研究

研究課題名（英文）Development research of next generation type of non-invasive DDS using delivery carrier

研究代表者

森下 まり子 (Morishita Mariko)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70257096

研究成果の概要（和文）：本研究は、バイオ医薬の経口および経鼻投与時のバイオアベイラビリティを改善するための新しい素子となる機能性ペプチドの安全性と有用性、およびその作用機構を検討した。また、この機能性ペプチドを処方最適化条件に基づき新規デリバリーキャリア（スマートハイドロゲルおよび逆ミセル型高分子ナノ粒子）に組み込み、その有用性を *in vivo* で明らかにした。その結果、機能性ペプチドの安全性および有効性は著しく高く、またデリバリーキャリアとの適合性も良好であり、様々なバイオ医薬に応用可能な非侵襲的デリバリーシステムの構築の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the safety and usefulness of functional peptides, which are expected as new tools to improve the bioavailability of oral and nasal administration of biologics, and was to clarify the mechanism of their absorption enhancement action. In addition, these functional peptides were incorporated to new carriers, such as smart hydrogels and the reverse-type micelle nanoparticles, and their usefulness were investigated in the *in vivo* study. As a result, we found that safety and efficacy of the functional peptide is significantly high, and good compatibility with the delivery carrier was shown. Therefore, this study demonstrated that high possibility of developing a non-invasive delivery system using functional peptides, and the delivery system can be applied to various biologics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：薬物送達システム、インスリン、バイオ医薬、細胞膜透過ペプチド、バイオアベイラビリティ、機能性ペプチド、吸収改善、Caco-2 細胞

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

ペプチド、タンパク質や核酸などのバイオ医薬は、メタボリックシンドローム、感染症や癌など様々な疾患治療薬として世界的にその需要が急増している。これらバイオ医薬の投与形態は現在、注射剤が主流となっているが、患者 QOL 向上、医療費削減のためには、これらの薬物の注射回数の低減や非注射剤化が極めて重要かつ急務である。しかしながら、バイオ医薬は生体内での安定性が低く、また粘膜透過性も著しく低いため、注射投与以外での製剤化は極めて困難であり、経口製剤として実用化されているものは皆無である。

2. 研究の目的

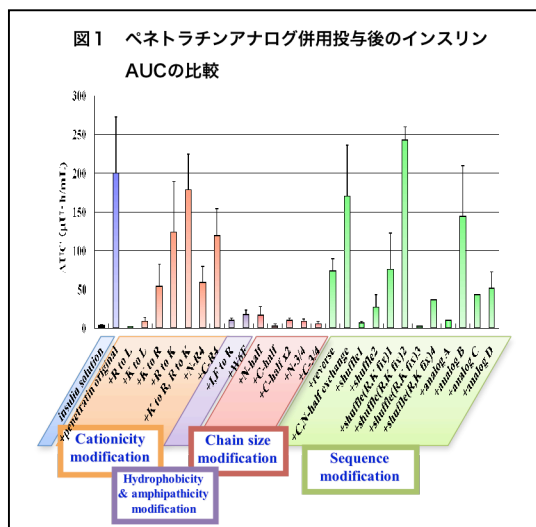
本研究は、現在の社会的ニーズも鑑み、高いバイオアベイラビリティ (BA) を備えた、バイオ医薬のための非侵襲的デリバリーシステムを創製し、臨床での早期実用化を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 機能性ペプチドと各種バイオ薬物との結合親和性の評価—各種機能性ペプチドをビオチンラベル化し BIAcore の反応プレートに結合させ、各種バイオ薬物の濃度を変えて反応させることにより、結合定数を求める。

(2) ラットを用いた吸収実験により機能性ペプチドによる各種バイオ薬物の BA 評価を行う。

(3) Caco-2 細胞を用いた細胞透過実験により機能性ペプチドの消化管粘膜透過機構および毒性評価を行う。



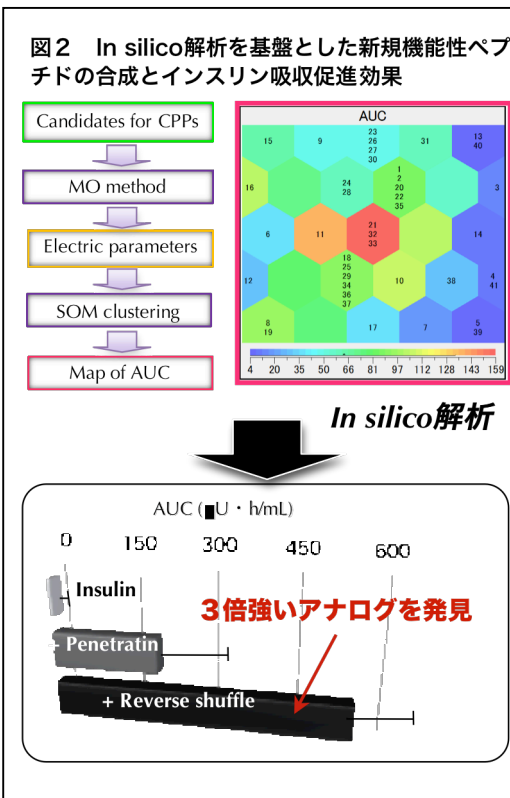
(4) *In silico* 手法により各種バイオ薬物の BA を最大にする機能性ペプチドの構造を決定する。

(5) Hella 細胞を用いて逆ミセル型高分子ナノ粒子の細胞内取り込みへの機能性ペプチドの有効性を検討する。

(6) スマートハイドロゲルと機能性ペプチド、バイオ薬物との親和性を *in vitro* および *in vivo* で検討する。

4. 研究成果

(1) これまでの研究により明らかとなった最も効果の高い機能性ペプチド：ペネトラチンについて、ペプチド鎖長、構成アミノ酸の種類およびアミノ酸配列を変えた構造改変体 20 種を合成し、各種構造改変体のインスリン吸収促進効果をラット *in situ* 吸収実験法を用いて比較検討した。その結果を図 1 に示す。機能性ペプチドの構造の特徴については以下の傾向が示唆された。①ペプチドの長さを短くしない方が良い、②構成するアミノ酸の種類は変えない方が良い、③塩基性アミノ酸の位置は保持した方が良いが R と K の位置は逆でも良い。また、これらの構造の特徴を考慮し、R および K の位置を固定し他のアミノ酸をランダム配列にした改変体の中で、ペネトラチンより強い効果を示すものを新たに



見出すことが出来た。

また、構造改変体 20 種の特徴から、より優れた効果を有する機能性ペプチドの構造を推定した。具体的には、フロンティア分子軌道法論により各アナログの HOMO や LUMO などのパラメータを求め、これらとインスリン AUC との関係性をコホーネンの自己組織化マップにより解析をし、オリジナルのペネトラチンよりも数倍強いアナログ体を見出す事が出来た (図 2)。このペプチドはペネトラチンと比較してインスリンの腸管吸収性を 3 倍、鼻粘膜吸収性を 10 倍上げることが示された。

(2) Caco-2 細胞を用いて、機能性ペプチド自身およびペプチド薬物の吸収促進メカニズムについて詳細な検討を行った。その結果、D-R8 によるインスリン透過促進作用は apical 側から basal 側方向のみの透過に認められ、D-R8 の作用は方向性を有する可能性が示唆された (図 3)。さらに、図 4 に示すように、D-R8 は、インスリン 1 分子に対して約 1.5 分子が結合したときに、顕著な透過促進作用を示した。これらのことから、ある分子数以上の D-R8 の結合がインスリン透過促進作用には必要である可能性が強く示唆され、また、Caco-2 単層膜透過実験は *in vivo* における D-R8 の吸収促進効果を反映する良好なモデルとなることが示唆された。

図 3 Caco-2 単層細胞におけるインスリンの見かけの透過係数

Conditions	P_{app} of insulin ($\times 10^{-6}$ cm/s)
A to B	
Insulin solution	2.16 ± 0.19
+ D-R8	4.03 ± 0.61*
B to A	
Insulin solution	1.67 ± 0.15
+ D-R8	2.04 ± 0.11

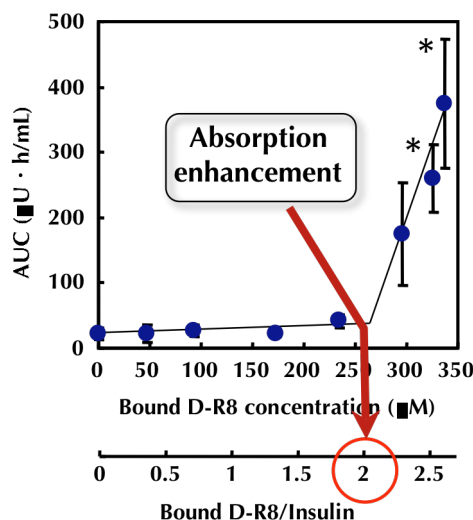
* $p < 0.05$, significant difference compared with the corresponding "Insulin solution (A to B)".

(3) Caco-2 および Hella 細胞を用いて、機能性ペプチド自身の透過メカニズムおよびペプチド薬物の吸収促進メカニズムを詳細に検討した。この結果、ペプチドの膜透過促進作用は方向性があること、エネルギー非在であること、また複数のエンドサイトーシス経路が関与していることが示された。

(4) Hela 細胞および Caco-2 細胞を用いて、機能性ペプチド自身の透過メカニズムおよびペプチド薬物の吸収促進メカニズムを詳

細に検討した。ペネトラチン存在下、Hela 細胞は 200nm の逆ミセル型高分子ナノ粒子を温度依存的に取り込み促進することが明らかとなった。また、Caco-2 細胞を用いた透過および取り込み挙動の検討においては、機能性ペプチドによるインスリン透過性促進作用は、非飽和性・エネルギー非在性の細胞内取り込み経路を介して生じる可能性が示唆された。

図 4 インスリン吸収促進効果とインスリンに結合した D-R8 濃度との関係



(5) インフルエンザ A 型抗原をモデル抗原として選択し、D-penetratin と共に経鼻投与して *in vivo* における抗体価の変動を検討した結果、IgG ならびに IgA 抗体価の顕著な上昇が認められた。penetratin を利用することで、ワクチン抗原およびナノ粒子を用いた新規経鼻粘膜ワクチンデリバリーシステムの開発の可能性が示唆された。

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 11 件)

① N. Kamei, M. Morishita, 他 7 名, Molecular imaging analysis of intestinal insulin absorption boosted by cell-penetrating peptides by using positron emission tomography, 査読あり, J. Control. Release, 146 巻, 16-22 頁, 2010 年

② E. S. Khafagy, M. Morishita, K. Takayama, The role of intermolecular interactions with penetratin and its analogue on the

enhancement of absorption of nasal therapeutic peptides, 査読あり, Int. J. Pharm., 388 巻, 209-212 頁, 2010 年

③E. S. Khafagy, M. Morishita, K. Takayama, Structural requirements of penetratin absorption enhancement efficiency for insulin delivery, 査読あり, J. Control. Release, 143 巻, 302-310 頁, 2010 年

④N. Kamei, M. Morishita, K. Takayama, Importance of intermolecular interaction on the improvement of intestinal therapeutic peptide/protein absorption using cell-penetrating peptides, 査読あり, J. Control. Release, 136 巻, 179-186 頁, 2009 年

⑤E. S. Khafagy, M. Morishita, K. Takayama, Efficiency of cell-penetrating peptides on the absorption of therapeutic peptides, proteins and hydrophilic macromolecules, 査読あり, Int. J. Pharm., 381 巻, 49-55 頁, 2009 年

⑥ N. Kamei, M. Morishita, 他 4 名, Complexation hydrogels for oral delivery of insulin, interferon β and calcitonin, J. Control. Release, 査読あり, J. Control. Release, 134 巻, 98-102 頁, 2009 年

⑦E. S. Khafagy, M. Morishita, 他 3 名, Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin, 査読あり, J. Control. Release, 133 巻, 103-108 頁, 2009 年

⑧K. Nakamura, M. Morishita, 他 6 名, Key functions in polymer carriers for intestinal absorption of insulin 査読あり, Int. J. Pharm., 354 巻, 135-142 頁, 2008 年

⑨A. Tunesca, K. Nakamura, M. Morishita, 他 3 名, Complexation Hydrogels for Oral Insulin Delivery: Effects of Polymer Dosing on In Vivo Efficacy, 査読あり, J. Pharm. Sci., 97 巻, 2607-2618 頁, 2008 年

⑩ N. Kamei, M. Morishita, 他 4 名, Usefulness of cell-penetrating peptides to improve intestinal insulin absorption, 査読あり, J. Control. Release, 132 巻, 21-25 頁, 2008 年

⑪N. Kamei, M. Morishita, J. Ehara, K. Takayama, Permeation characteristics of

oligoarginine through intestinal epithelium and its usefulness for intestinal peptide drug delivery, 査読あり, J. Control. Release, 131 巻, 94-99 頁, 2008 年

[学会発表] (計 21 件)

① M. Morishita, Oral Insulin Delivery Systems: Development of carrier systems and molecular imaging analysis of intestinal insulin absorption using PET. the 1st Novo Nordisk Oral Protein Delivery, December 2-3, 2010, Denmark

② M. Morishita, Novel technology using cell-penetrating peptides for oral delivery of therapeutic peptides and proteins. IPTS 2010, September 13-15, Antalya, Turkey

③ M. Morishita, Noninvasive delivery systems for therapeutic peptides and proteins, Japan-Egypt workshop, July 21-22, 2010, Japan

④ 森下真莉子, 基礎薬学における糖尿病薬の研究-インスリン非注射製剤開発への試み、日本医療薬学会第 20 年会、11 月 13-14 日、2010 年、千葉

⑤ 森下真莉子, バイオ医薬の経粘膜送達法：非侵襲的バイオ医薬製剤の開発と治療の最前線、日本薬剤学会第 25 年会、5 月 12-14 日、2010 年、徳島

⑥ 森下真莉子, 機能性ペプチドをキャリアとするバイオ薬物の経粘膜デリバリー、第 12 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ、1 月 19-20 日、2010 年、東京

⑦ M. Morishita, Use of Cell-Penetrating Peptides in Enhancing Mucosal Absorption of Therapeutic Peptides and Proteins Asian Federation for Pharmaceutical Sciences, 11 月 15-18 日, 2009 年, Fukuoka, Japan

⑧ 森下真莉子, 消化管膜の多彩な機能を活かした創薬、創剤研究の最前線、日本薬学会第 129 年会、3 月 26-28 日、2009 年、京都

⑨E. S. Khafagy, M. Morishita, 他 4 名, Structure-activity relationship of penetratin analogues for peptides delivery、日本薬物動態学会第 24 回年会、12 月 27-29 日、2009 年、京都

⑩E. S. Khafagy, M. Morishita, 他 4 名、Efficiency of penetratin analogues on the nasal peptides delivery、第 25 回日本 DDS 学会、7 月 3-4 日、2009 年、東京

⑪寺澤義明、森下真莉子、他 3 名、バイオ薬物の経口吸収促進ツールとなる細胞膜透過ペプチドの In silico 解析に基づく開発研究、第 25 回日本 DDS 学会、7 月 3-4 日、2009 年、東京

⑫山本修一、森下真莉子、他 2 名、細胞膜透過ペプチドによるインスリン Caco-2 単層膜透過促進機構の解明、第 25 回日本 DDS 学会、7 月 3-4 日、2009 年、東京

⑬E. S. Khafagy, M. Morishita、他 3 名、Structural requirement of penetratin efficiency for insulin delivery、日本薬剤学会第 24 年会、5 月 21-23 日、2009 年、静岡

⑭寺澤義明、森下真莉子、他 3 名、バイオ薬物の効率的消化管吸収を目指した新規細胞膜透過ペプチドの開発、日本薬剤学会第 24 年会、5 月 21-23 日、2009 年、静岡

⑮山本修一、森下真莉子、亀井敬泰、高山幸三、細胞膜透過ペプチドによるインスリン吸収促進作用の Caco-2 単層膜における評価、日本薬剤学会第 24 年会、5 月 21-23 日、2009 年、静岡

⑯亀井敬泰、森下真莉子、高山幸三、機能性ペプチドによるバイオ薬物の消化管吸収改善とそのメカニズムの検討、日本薬学会第 129 年会、3 月 26-28 日、2009 年、京都

⑰森下真莉子、デリバリーキャリアを利用した次世代型経口糖尿病治療システムの構築、第 24 回日本 DDS 学会、6 月 29-30 日、2008 年、東京

⑱亀井敬泰、森下真莉子、高山幸三、細胞膜透過ペプチドの消化管バイオ薬物吸収促進機構における分子間相互作用の寄与、日本薬剤学会第 23 年会、5 月 20-22 日、2008 年、札幌

⑲E. S. Khafagy, M. Morishita, K. Takayama, Effect of cell-penetrating peptides (CPPs) on the nasal absorption of insulin、日本薬剤学会第 23 年会、5 月 20-22 日、2008 年、札幌

⑳池野洋平、森下真莉子、亀井敬泰、高山幸

三、バイオ薬物の消化管吸収における細胞膜透過性ペプチドの有効性の評価、日本薬学会第 128 年会、3 月 26-28 日、2008 年、横浜

㉑枝佳美、El-Sayed Kafagy、森下真莉子、高山幸三、バイオ医薬の経鼻吸収における細胞膜透過性ペプチドの有用性評価、日本薬学会第 128 年会、3 月 26-28 日、2008 年、横浜

〔図書〕(計 5 件)

森下真莉子 (編集および共著)、メディカルドゥ、薬物の消化管吸収予測研究の最前線、2010 年、総頁数 130

M. Morishita and K. Park (編集および共著)、Informa Healthcare、Biodrug Delivery Systems: Fundamentals, Applications and Clinical Development、2009 年、総頁数 471

森下真莉子 (共著)、南山堂、ドラッグデリバリーシステム：標的指向化 (ターゲティング) の定量的解析、304-318 頁、『分子薬物動態学』、2008 年

森下真莉子 (共著)、化学同人、薬物送達システム (DDS) の必要性、放出制御型製剤、171-194 頁、『薬剤学』、2008 年

森下真莉子 (共著)、シーエムシー、機能性 DDS キャリアの応用・実用化研究、細胞膜透過性ペプチドによるバイオ薬物の消化管吸収促進、199-207 頁、『機能性 DDS キャリアの製剤設計』、2008 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：細胞膜透過性ペプチド

発明者：森下真莉子他

権利者：東レ株式会社

種類：特許

番号：2009-122096

出願年月日：2009/05/20

国内外の別：国内

名称：経鼻投与用医薬組成物

発明者：森下真莉子他

権利者：東レ株式会社

種類：特許

番号：Case No. 660M04041、Case No. 08122

出願年月日：2008/02/28

国内外の別：国内および国外

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森下まり子 (MORISHITA MARIKO)
星薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：70257096

(2) 研究分担者

高山幸三 (TAKAYAMA KOZO)
星薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00130758