

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04525

研究課題名(和文) 脳内に抗体医薬を効率的に送達するスマートベシクルの創製

研究課題名(英文) Development of Antibody Drug Delivery System to the Brain

研究代表者

安楽 泰孝 (Anraku, Yasutaka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任准教授

研究者番号：60581585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：血液脳関門(BBB)を突破して脳実質部に浸透し、さらには脳内環境に応答して抗体医薬を放出することで機能を発現させる薬剤送達システム(DDS)を、生体適合性に優れた高分子材料の自己組織化に基づいて構築し、脳神経系変性疾患の革新的治療法を確立することを目的とした。抗体医薬を内水相に搭載したスマートベシクル(IgG@SV)を新規に開発した。IgG@SVは血液を模倣した環境で構造を維持し、脳内を模倣した環境で構造が解離し、封入したIgGを放出する機能を有する。このIgG@SVをアルツハイマー病マウスモデルマウスに尾静脈投与したところ、IgG単体と比べて25倍効率よく脳内へ送達可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有効な治療法が未確立である脳神経系変性疾患に対して、抗体医薬の脳内送達に基づく分子治療という抜本的解決策を提供するものであり大きな意義を有している。また高分子/材料設計の観点からは、生体適合性・標的指向性・環境応答性という異なる機能を空間的に制御された形で構造内部に配置する仕掛けを創り込むなど、独創性に秀でた生体材料設計プロセスを当該分野にもたらす意義を有している。産業的側面から考えても、細胞レベルでは十分な効果が得られるのに対し、BBB通過できずに治療効果が得られず開発が中断された薬剤が多い中、本システムは開発が中止された薬剤についても再チャレンジの機会が得られる経済的価値は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a drug delivery system (DDS) that can penetrate the blood-brain barrier (BBB), infiltrate the brain parenchyma, and exhibit functionality by responding to the brain's internal environment, with the goal of establishing an innovative therapeutic approach for central nervous system (CNS) disorders. We constructed this system based on the self-assembly of high-performance polymer materials with excellent biocompatibility. We also developed a novel smart vesicle (IgG@SV) loaded with antibody therapeutics in the water phase. IgG@SV maintains its structure stably in an environment mimicking blood and undergoes structural dissociation in an environment mimicking the brain after BBB passage, thereby releasing the encapsulated IgG. When we intravenously administered IgG@SV to an Alzheimer's disease mouse model, we confirmed that it can efficiently deliver the IgG into the brain, achieving a 25-fold higher efficiency compared to the administration of IgG alone.

研究分野：薬剤送達システム

キーワード：薬剤送達システム スマートベシクル 血液脳関門 抗体医薬 高分子

### 1. 研究開始当初の背景

患者数が 20 万人を超えて増加の一途を辿っているアルツハイマー病(AD)等の脳神経系(CNS)疾患の治療において、AD 病態の主体をなすアミロイド  $\beta$ (A $\beta$ )の構造変化を高感度に認識し、その凝集抑制といった翻訳後過程の制御が出来るほか、すでに蓄積した場合それを除去出来るといった利点をもつことから、近年抗体医薬が大きな注目を集めている。しかし、脳においては脳血管内皮細胞(BCEC)間の結合が極めて強固(密着結合)なために、血管内腔から脳実質部への物質輸送が著しく制限されている(血液脳関門: BBB)。実際に、現在臨床において AD 治療薬として最も使用されている Donepezil の脳集積量は投与量のわずか 0.01%、BBB 通過を指向したペプチド搭載ナノ粒子を薬剤送達システム(DDS)として活用しているシステムも 0.05%と低く、十分な治療効果が望めないのが現状である。また現在、臨床試験が行われている抗体医薬に関しても、高々投与量の 0.04%が脳に到達するに過ぎず、未だ AD 治療に十分な量の抗体医薬を全身投与によって脳実質部に送達出来ない事が大きな課題となっている。すなわち、「BBB を越えて、抗体等の高分子医薬を高効率で脳実質部に送達して機能させる方法論を創出」することは、まさに CNS 疾患の抜本的治療が実現できるかどうかの核心であり、これまでも世界各国の研究グループによって様々なアプローチが検討されてきたものの、未だ達成されていない挑戦的な研究課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、BBB を越えて、A $\beta$  抗体を高効率で脳実質部に送達して機能させる高分子集合体を創出する事を目的とした。抗体医薬に関しては、脳実質に局在し神経毒性の高い A $\beta$ (特に A $\beta$ オリゴマー(A $\beta$ O))に対する全長 IgG 抗体(whole antibody)に焦点を定めた。A $\beta$  に対する抗体医薬は、優れた標的タンパク質の除去促進が期待されながら、BBB 通過能が低いために臨床試験で期待された効果が得られていない。そこで、この問題をこれまでに確立したグルコースを表層に修飾した高分子集合体への内包化によって解決することを考えた。ここで一般的に全長 IgG 抗体は、分子量 150kDa (直径 15 nm)と大きく、かつ表面電荷が不均一な高分子医薬であるために、薬剤との相互作用を形成駆動力として集合体を形成し抗体を内包することは困難である。そこで研究者らがこれまでに構築した、ポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸由来の荷電性セグメントからなる荷電性高分子の自己組織化(PIC)を利用した新規高分子ベシクル(PIC 型ベシクル)を活用した。この時の PIC 型ベシクル構造設計上のポイントは、(i) 抗体内包 PIC 型ベシクルの高い血中循環性の達成に基づく脳血管内皮細胞との接触頻度の向上 (血中滞留特性)、(ii) PIC 型ベシクルの表層グルコース密度の制御に基づく BBB 通過能の最大化 (BBB 通過特性)、(iii) BBB 通過後の脳実質内において脳内環境(還元環境)に反応して速やかにベシクル構造が解離し抗体を放出する(環境応答性特性)を創り込むことである。

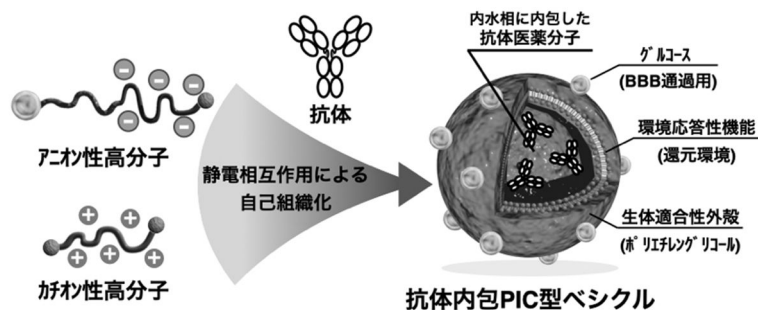


図1. ブロック共重合体の自己組織化に基づく抗体内包PIC型ベシクルの創製

### 3. 研究の方法

生体への安全性が担保された PEG とポリアミノ酸をセグメントとする荷電性ブロック共重合体を基盤高分子とし、合目的々に「血中滞留特性」「標的指向特性」「還元環境応答特性」といった各種機能を導入し、抗体医薬を内包した PIC 型ベシクルを構築する(図 1)。その粒径や形状、抗体内包量といった基礎物性評価に加え、*in vitro* 試験として各種初代培養細胞を用いた標的指向性に関する試験、脳実質環境を模倣した還元環境下における応答性試験を実施する。また *ex vivo* 試験として、AD マウスの脳を用いてより *in vivo* の条件に近い A $\beta$  が沈着した培養脳切片を作成し、PIC 型ベシクルから放出された抗体の A $\beta$  認識能を評価する。上記の各種機能の発現が確認でき次第、AD マウスに尾静脈投与し、体内動態(血中滞留性、BBB 通過能、抗体放出能など)を評価する。

### 4. 研究成果

#### 荷電性高分子の合成

グルコース (Gluc)を表面に有し、脳内還元環境に反応して集合体が解離する機能を併せ持つ PIC 型ベシクルを構築するために、以下の手順で構成高分子を合成した。(i) Gluc を  $\alpha$  末端に導入した PEG-NH<sub>2</sub> (Gluc-PEG-NH<sub>2</sub>: PEG 分子量=2,000)を開始剤として COOH 基が保護されたアスパラギン酸(Protect-Asp)重合 (Gluc-PEG-P(Protect-Asp)-NH<sub>2</sub>)、(ii)  $\omega$  末端の NH<sub>2</sub> 基にエチレング

リコール Spacer (EG) を介し末端に活性エステル基 (NHS) と還元環境で開裂するジスルフィド結合 (SPDP) を有する NHS-EG-SPDP を縮合反応で導入 (Gluc-PEG-P(Protect-Asp)-EG-SPDP)、(iii) 保護基を脱保護しブロックポリアニオン (Gluc-PEG-PA<sub>sp</sub>-EG-SPDP) を合成した。また反対電荷を有するホモポリカチオン (Asp 側鎖にカチオン種導入) についても同様に SPDP を導入した。高分子構造は、核磁気共鳴法、液体クロマトグラフィーを用いて評価・同定し、単分散性が高く、Asp の重合度が 80 であることを確認した。

#### 抗体内包 PIC 型ベシクルの構築と基礎物性評価

上記で調製した種々の高分子を用いて抗体を内包した PIC 型ベシクルの調製を行った。具体的には、抗体を含むポリアニオン溶液とポリカチオン溶液をそれぞれの電荷が等しくなるように混合して調製した (IgG@SV)。なお同様の方法で、還元環境応答性を有さない PIC 型ベシクルも調製した (IgG@V)。動的光散乱測定を行ったところ、IgG@SV が直径 113 nm、多分散指数 0.056、IgG@V が直径 104 nm、多分散指数 0.078 と、いずれも直径 100 nm 前後で単分散な粒子であることを確認した。また透過型電子顕微鏡観察より、いずれの粒子とも中空状のベシクル構造であることを確認した。続いて、蛍光標識した IgG を用いて同様にベシクルを調製し、蛍光相関分光法を用いて 1 粒子あたりの封入数を検討した。その結果、添加する IgG 濃度に依存して、1 粒子あたりの封入数が 0 から 3 個まで制御可能であることが明らかになった。

#### 標的指向性・環境応答性試験

蛍光標識化抗体を内包した IgG@SV 表面の Gluc 分子が GLUT1 を適切に認識するか、GLUT1 を発現する MDA-MB231 細胞を用いて取り込み試験を検討した。まず Gluc を SV 表面に導入することで、IgG 単体、Gluc を担持していない SV と比べ、劇的に細胞取り込み量が増加することが明らかとなった。ここで GLUT1 阻害剤であるフロレチンを加え、Gluc を担持した IgG@SV を細胞に播種したところ、フロレチン無しと比べ取り込み量が減少した。これらの結果は、Gluc を担持した IgG@SV が GLUT1 を介して細胞に取り込まれていることを支持する結果である。続いて、還元環境におけるベシクルの解離挙動および内包した抗体の放出挙動を評価した。具体的には血液中を模倣した環境 (0.1 mM)、脳実質中を模倣した環境 (3 mM) と異なるグルタチオン濃度における挙動を追跡した。まず還元環境応答性を有さない IgG@V は、いずれの環境においてもベシクルの解離、IgG の放出は確認されなかった。一方で、IgG@SV は、血液中を模倣した環境では構造を維持し、脳実質を模倣した環境では時間変化に伴った構造の不安定化、及びそれに伴った IgG の放出が確認された。これらの結果は、当初の計画通り、所望の機能を有しているベシクル構造を構築できていることを支持する結果である。さらに放出された抗体を用いて、*ex vivo* 試験として、AD マウス (APP/PS1 マウス) の脳を用いて、より *in vivo* の条件に近く A $\beta$  が沈着した培養脳切片を作成し、放出された抗体を播種したところ、A $\beta$  (チオフラビン T で染色) と抗体との共局在が確認された。これらの結果は、放出された抗体が活性を維持しており、A $\beta$  に対する標的指向性を有していることが明らかとなった。

#### 体内動態試験

蛍光標識化抗体を内包したベシクルを AD マウスに尾静脈投与し、血中循環性 (血中半減期:  $\tau_{1/2}$ ) を *in vivo* 共焦点顕微鏡を用いて評価した。その結果、IgG@V の  $\tau_{1/2}$  は 23 時間、IgG@SV の  $\tau_{1/2}$  は 20 時間と、環境応答性機能をベシクルに導入することで、血中安定性が低減することが明らかとなった。続いて脳集積性を評価したところ、抗体単体は 0.1%、IgG@V は 3.2%、IgG@SV は 2.5% であった

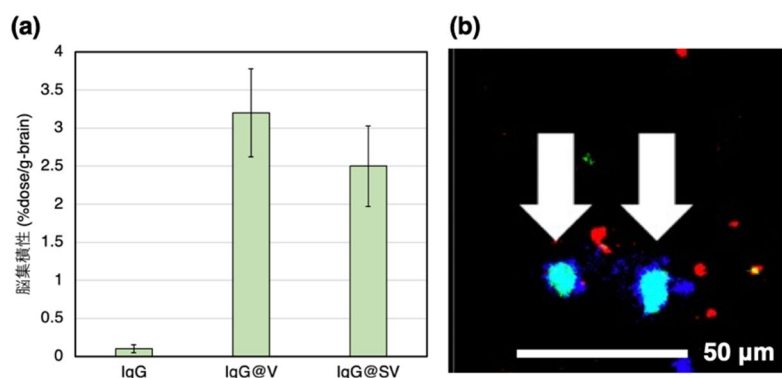


図2. IgG@SVの体内動態評価 (a) 投与後24時間後の脳集積性。 (b) IgG@SV投与後24時間後の脳切片画像 (青: A $\beta$ 由来(チオフラビンT)、緑: 抗体由来、赤: ポリマー由来)。矢印は抗体とA $\beta$ の共局在部位。

(図 2(a))。IgG@SV と比べて IgG@V の脳集積性が高いのは、血中循環性の高さ起因していると考えられる。さらに AD マウスの脳内に分布する A $\beta$  に対する抗体の認識能について、蛍光免疫染色観察を行った。その結果、IgG@SV を投与した群のみ抗体と A (チオフラビン T) との共局在が確認された (図 2(b))。これらの結果は、IgG@SV が当初の計画通り BBB を通過して、脳内環境に应答してベシクル構造が解離し、内水相に封入された IgG が放出され、放出された IgG が脳内の A $\beta$  に結合していることを支持する結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 高分子集合体を用いた脳神経系疾患の革新的治療技術の開発
3. 学会等名 キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 ナノマシンが拓く革新的な脳神経系疾患治療法の開発
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会 (招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 脳内に薬剤を効率的に送達するBBB通過型ナノマシンの基礎と応用
3. 学会等名 第117回日本精神神経学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 脳神経系疾患の革新的治療技術開発
3. 学会等名 次世代医療技術研究会 第4回 情報交換会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 ナノマシンが拓く革新的な脳神経系疾患治療
3. 学会等名 COINS Seminar #53 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Noriko Nakamura, Yasutaka Anraku, Shigeto Fukushima, Kazuko Toh, Horacio Cabral, Kazunori Kataoka
2. 発表標題 Multivalent interaction between target proteins and ligand molecules on polymeric micelle penetrating blood-brain barrier
3. 学会等名 Pacifi Chem 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasutaka Anraku, Takuya Nishizono, Noriko Nakamura, Kazuko Tou, Horacio Cabral
2. 発表標題 Development of polymeric vesicles to build enzyme reaction field in cerebrospinal fluid
3. 学会等名 Pacifi Chem 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidekazu Hochido, Takuya Nishizono, Noriko Nakamura, Horacio Cabral, Yasutaka Anraku
2. 発表標題 Development of nanocarriers to release macromolecular drugs in response to the brain environment
3. 学会等名 Pacifi Chem 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 脳神経系疾患の革新的治療技術開発
3. 学会等名 次世代医療技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西園拓也、中村乃理子、宝地戸秀和、藤加珠子、カブラルオラシオ、安楽泰孝
2. 発表標題 脳脊髄液中に酵素反応場を構築する高分子ベシクルの開発
3. 学会等名 第69回高分子年次会
4. 発表年 2020年

〔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