

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04540

研究課題名(和文)革新的多段階作用型中枢移行性脳アミロイドーシス治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of innovative drugs having multistep action for treatment of central cerebral amyloidosis

研究代表者

有馬 英俊(Hidetoshi, Arima)

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50260964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルツハイマー病(AD)治療薬として多段階作用型化合物BPL-CDEを開発し、その可能性を評価した。ApoE ϵ 4およびラクトース修飾 β -CDが最も高い血液脳関門(BBB)透過性を示し、PAMAM dendrimer(G3)に β -CDとラクトースを修飾したBPL-CDEを調製した。BPL-CDEとsiRNAの複合体は弱い正電荷を持つナノ粒子を形成した。PL-CDEはA β ペプチドの凝集体形成を抑制する可能性が示唆された。蛍光ラベル化したBPL-CDEは脳に移行することが示唆された。本研究は、BPL-CDEおよびBPL-CDE/siRNA複合体のAD治療薬としての可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、アルツハイマー病(AD)の治療において多段階作用型化合物BPL-CDEの有効性を示した点にある。ApoE ϵ 4およびラクトース修飾 β -CDの高い血液脳関門透過性を明らかにし、PAMAM dendrimerを基にした新規薬剤の開発に成功した。また、BPL-CDEがA β ペプチドの凝集を抑制する可能性を示唆した。社会的意義としては、AD治療薬の進展により、高齢化社会における認知症患者の生活の質向上および介護者の負担軽減が期待される。これにより、医療費の削減や社会福祉の向上に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed and evaluated the potential of a multistep-acting compound, BPL-CDE, as a therapeutic agent for Alzheimer's disease (AD). ApoE ϵ 4 and lactose-modified β -cyclodextrin (β -CD) showed the highest blood brain barrier (BBB) permeability, and BPL-CDE was prepared by modifying PAMAM dendrimer (G3) with β -CD and lactose. siRNA complexes with BPL-CDE were nanosized, weakly positively charged nanoparticles, and the fluorescent-labeled BPL-CDE migrated into the mouse brain after intravenous injection in mice. BPL-CDE interacted with A β peptide (1-42), suggesting that BPL-CDE may interact with A β peptide (1-42) and inhibit A β peptide (1-42) aggregate formation. This study demonstrates the potential of a multi-step-acting therapeutic approach in the treatment of AD and suggests the potential of BPL-CDE and BPL-CDE/siRNA complexes as therapeutic agents for AD.

研究分野：薬剤学

キーワード：アルツハイマー病 多段階作用 血液脳関門 デンドリマー シクロデキストリン 結合体 脳移行性 リガンド siRNA

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

アルツハイマー病 (AD) は、認知症の中で最も一般的であり、高齢化社会の進展に伴いその患者数は増加の一途を辿っている。内閣府の発表によると、日本の認知症患者数は **2012** 年時点で約 **462** 万人、**2025** 年には **730** 万人に達し、**65** 歳以上の高齢者の約 **5** 人に **1** 人が認知症を患うと予測されている。特に **AD** は、その進行性と不可逆性から患者の生活の質を著しく低下させ、介護者に対する負担も非常に大きいため、有効な治療薬の開発が急務である。

現在、市販されている **AD** 治療薬は主にコリンエステラーゼ阻害剤 (**donepezil, rivastigmine, galantamine**) および **NMDA** 受容体拮抗薬 (**memantine**) であり、これらの薬剤は症状の一時的な改善には寄与するものの、病気の進行を止めることはできない。そのため、新たな治療アプローチが求められており、特に病理学的特徴であるアミロイド ($A\beta$) 蓄積、神経原繊維変化、脳内炎症反応、**APO\epsilon4** 遺伝子発現、コレステロール蓄積といった多岐にわたる要因に対して効果を発揮する薬剤の開発が必要である。

これまでの臨床試験では、 $A\beta$ 抗体や $A\beta$ ワクチン、**BACE1** 阻害剤、 γ -セクレターゼ阻害剤などが試みられてきたが、**Phase 3** 試験での失敗例が多く報告されている。その原因として、**AD** の病態が単一の病因ではなく、複数の要因が絡み合って進行する複雑な疾患であることが挙げられる。このような背景から、単一のターゲットに対する治療では限界があり、多段階作用型の治療アプローチが求められている。

私たちの研究グループは、シクロデキストリン (**CD**) とポリアミドアミン (**PAMAM**) デンドリマーを結合させた新規化合物 (**CDE** 結合体) に着目した。**CD** は、 $A\beta$ と直接相互作用しミスフォールディングを抑制する能力や、コレステロール代謝を調整する能力を有する。また、**PAMAM** デンドリマーは $A\beta$ 線維形成抑制やトランスフェリンの輸送能力を高める特性を持っている。これらを組み合わせた **CDE** は、**AD** に対する多段階作用を持つ治療薬として期待される。さらに、**CDE** に血液脳関門 (**BBB**) 透過性を付与するため、**BBB** 透過リガンド (**BPL**) を修飾することにより、脳内への効率的な薬剤送達の実現を試みる。加えて、**APO\epsilon4** 遺伝子発現を特異的に抑制する **siRNA** との複合体を構築し、**AD** の進行を多面的に抑制することを目指す。このような多段階作用型の治療アプローチは、**AD** のみならず、他の神経変性疾患や脳腫瘍などに対しても応用可能であり、今後の医薬品開発において重要な一歩となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規 **AD** 治療薬として、多段階作用型の新規化合物を開発することである。具体的には、**CDE** に、**BPL** を修飾し、**APO\epsilon4** 遺伝子発現、コレステロール蓄積、脳炎症反応、アミロイド線維形成・蓄積、神経原繊維変化という **AD** の **5** つの危険因子を同時に抑制する化合物 (**BPL-CDE**) を構築する。さらに、**APO\epsilon4** 遺伝子発現を特異的に抑制する **siRNA** との複合体を形成し、その化学的・物理的性質、**BBB** 透過性、細胞実験および動物実験における有効性と安全性を評価することを通じて、**AD** 治療のための新しいシーズ薬の開発を目指す (**Fig. 1**)。

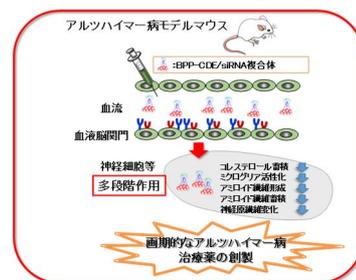


Fig. 1 本研究の目的

3. 研究の方法

(1) BBB 透過性: ヒト脳微小血管内皮細胞である **hCMEC/D3** 細胞への会合性は、蛍光ラベル化ペプチドまたは蛍光ラベル化糖修飾 β -**CD** (**S- β -CD**) を細胞上清液に添加し、インキュベーション後、細胞分散液を調製し、その分散液中の蛍光をフローサイトメータにて定量した。また、**in vitro** **BBB** モデル **hCMEC/D3** 細胞単層膜の透過性は、単層膜の **apical** 側に蛍光ラベル化ペプチドまたは **s- β -CD** を添加し、インキュベーション後、**basolateral** 側の溶液中の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーにて定量した。さらに、マウスに蛍光ラベル化ペプチドを静脈内投与後、脳組織を単離し、脳ホモジネート上清中の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーにて定量、または蛍光顕微鏡を用いて定量した。

(2) BPL-CDE の合成と精製: **PAMAM** デンドリマー (**G3**) にラクトースおよび β -**CD** を結合した **BPL-CDE** の合成を行った。 β -**CD** をトシル化後、**PAMAM** デンドリマー (**G3**) とともに **DMSO** に溶解後、攪拌し、反応物をゲルろ過後、精製した。得られた **CDE** 結合体 (**G3**)、ラクトース 1 水和物とシアノ水素化ホウ素ナトリウムをホウ酸緩衝液に溶解後、室温で攪拌した。得られた反応物をゲルろ過後、精製した。得られた **BPL-CDE** は **NMR** を用いて化学構造を確認した。

(3) BPL-CDE/siRNA 複合体形成: **BPL-CDE** と **siRNA** を溶液中で混合し、インキュベーションすることで複合体を調製した。複合体の形成はアガロース電気泳動により確認した。また複合体の物理化学的性質 (粒子径、多分散性指数、 ζ -電位) は **Zetasizer nano** を用いて測定した。

(4) $A\beta$ ペプチド (1-42**) と **BPP-CDE** との相互作用:** $A\beta$ ペプチド (**1-42**) の溶解液に **BPL-CDE** を添加し、インキュベーション後の β シート構造をチオフラビン **T** 法により評価した。溶液中の

A β ペプチド(1-42)とBPL-CDEとの相互作用をNMR法により検討した。

(5) 培養細胞実験：マウス神経芽細胞腫(N2a細胞)およびA β 過剰発現N2a細胞(SwN2a細胞)を用いて、細胞におけるA β の発現および蓄積に及ぼすBPL-CDEおよびBPL-CDE/siRNA複合体の有効性を評価する。

(6) *In vivo*実験：健常マウスおよびADモデルマウスにBPL-CDE/siRNA複合体を静脈内投与し、その体内動態、脳移行性、安全性を評価する。また、脳内A β 蓄積、APO ϵ 4遺伝子発現、コレステロール蓄積、炎症マーカー、神経原繊維変性などをELISAおよび免疫組織化学染色により測定する。行動学的評価として、Y迷路試験およびモリス水迷路試験を行い、認知機能の改善効果を評価する。

4. 研究成果

(1) BPLスクリーニング：蛍光ラベル化ペプチドのhCMEC/D3細胞への会合は、8種のペプチドの中で、LNP, ApoEdp, Tatが高かった。また、hCMEC/D3細胞単層膜の透過性は、8種のペプチドの中で、Angiopep-2, ApoEdp, CDX, HAI, SynB1, Tatが高かった。さらに、マウスの静脈内投与後の脳移行性は、ApoEdpが最も高く、Angiopep-2, CDX, HAI, SynB1, Tatは同程度だった。これらのことから、今回評価した8種のペプチドの中で、ApoEdpがBBB透過性が最も高いことが示された。一方、S- β -CDの中で、ラクトース修飾 β -CD(L- β -CD)がマンノース修飾 β -CD(M- β -CD)よりも、hCMEC/D3細胞への会合性、hCMEC/D3細胞単層膜の透過性、マウスの静脈内に投与後の脳移行性に優れることが示された。これらのことから、BPL分子として、ApoEdpおよびラクトースが相応しいことが示唆された。

(2) BPL-CDEの合成と精製：BPL-CDEsとして、CDEにApoEdpまたはラクトースを修飾したCDEの合成を試みたところ、ラクトースを修飾したCDEの合成に成功し、その構造をNMRで検討した。その結果、PAMAMデンドリマー(G3)に β -CDが2分子、ラクトースが1分子修飾された結合体であることが示された(Fig. 2, BPL-CDE)。以降の検討では、このBPL-CDEを使用した。

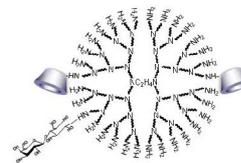


Fig. 2 BPL-CDEの構造(推定)

(3) BPL-CDE/siRNA複合体の物理化学的性質：BPL-CDEとsiRNAの複合体形成をアガロース電気泳動により検討した。siRNAの電気泳動度がBPL-CDEの添加によりチャージ比依存的に低下したことから、BPL-CDEとsiRNAとの複合体形成が確認された。これは、BPL-CDE分子のPAMAMデンドリマーの1級アミノ基の正電荷とsiRNA分子のリン酸ジエステル結合部のリン酸基の負電荷の静電相互作用に起因するものと推定される。また、BPL-CDE/siRNA複合体の粒子径・多分散性指数・ゼータ電位をチャージ比50において測定した結果、それぞれ約30 nm、約0.4、約10 mVであった。このことから、BPL-CDE/siRNA複合体は弱い正電荷を有するナノ粒子であることが示唆された。今後、血清存在下など、生体に近い条件での検討が必要である。

(4) BPL-CDEの脳移行性：今回調製したBPL-CDEを蛍光ラベル化した化合物をマウスに静脈内投与すると、脳内への移行が観察された。今後、定量的評価などより詳細な検討が必要ではあるが、BPL-CDEはL- β -CDより分子サイズが数倍大きいにも関わらず、BBBを透過する可能性が示唆された。

(5) A β ペプチド(1-42)とBPL-CDEとの相互作用：A β ペプチド(1-42)の凝集体形成に対するBPL-CDEの影響をチオフラビンT法により検討したところ、BPL-CDEはA β ペプチド(1-42)の凝集体形成に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。また、NMR法により、A β ペプチド(1-42)とBPL-CDEは溶液中で相互作用する可能性が示唆された。しかしながら、これらの結果は、再現性が得られていないことから、実験条件を考慮しながら、検討を継続する必要がある。一方、*in vitro* BBBモデルを用いたBPL-CDEおよびBPL-CDE/siRNA複合体の細胞透過性、細胞膜からのコレステロール漏出、脂質ラフト抑制効果、抗脳炎症効果、神経原繊維変性抑制効果については、コロナ禍の影響で十分に検討が行えなかった。これらの評価は、今後の重要な課題であり、引き続き研究を進める必要がある。

本研究の意義として、複数のAD関連因子を同時に標的とする多段階作用型治療アプローチの有効性が示された点が挙げられる。BPL-CDEは、AD治療薬としての可能性を持ち、さらなる研究により臨床応用への道が開かれることが期待される。今後の研究では、未検討であった評価項目についての詳細な検討を行い、BPL-CDEの有効性と安全性をさらに明確にすることで、より効果的なAD治療薬の開発を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hidetoshi Arima	4. 巻 13
2. 論文標題 Twenty Years of Research on Cyclodextrin Conjugates with PAMAM Dendrimers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13050697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有馬英俊
2. 発表標題 機械学習を用いたシクロデキストリン複合体自由形成エネルギーの簡易予測
3. 学会等名 第37回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有馬英俊
2. 発表標題 創剤と医療におけるAI活用の概要
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村順也、有馬英俊、香月正明、入倉 充
2. 発表標題 機械学習を用いたシクロデキストリン誘導体の複合体自由形成エネルギーの予測
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	川上 茂 (Kawakami Shigeru) (20322307)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授 (17301)	
研究分担者	北岸 宏亮 (Kitagishi Hiroaki) (60448090)	同志社大学・理工学部・教授 (34310)	
研究分担者	山吉 麻子 (Yamayoshi Asako) (70380532)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授 (17301)	
研究分担者	斉藤 貴志 (Saito Takashi) (90360552)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

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