

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20515

研究課題名（和文）短鎖型自己集合性ペプチドを用いた中分子医薬品の次世代型DDSの開発-口腔粘膜への応用

研究課題名（英文）Development of drug delivery vehicles for medium-sized molecule drugs using short self-assembling peptides: application to the oral mucosa

研究代表者

谷口 卓 (Taniguchi, Suguru)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：80964569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、次世代創薬として注目されている中分子医薬品をターゲットとしたDDS担体の開発を目的としている。我々が開発した合成の簡便さや生体適合性などの利点をもつエラスチン由来短鎖型ペプチドは、生理的条件下で高い自己集合能を示した。さらに、従来と比べてより大きな分子量のモデル薬物をペプチド内部に包含するとともに、徐放できることが示された。また、薬物の分解を避ける経路として期待される口腔粘膜上皮細胞を通過したため、この経路を介した投与の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、エラスチン由来短鎖型ペプチドが生理的条件下で強い自己集合能を示すとともに、幅広い分子量のモデル薬物をペプチド内部に包含できることが明らかとなった。さらにこのペプチドが口腔粘膜を透過できることが示唆された。口腔粘膜は吸収性に優れており、薬効の即効性が期待されるだけでなく、胃腸管や肝臓での分解を回避できる経路である。また注射のような痛みもなく、嚥下困難な状況でも安全に投与することが期待できる。本研究により、中分子医薬品をはじめ経皮吸収が困難な美容成分などの幅広い化合物を、口腔粘膜を経由して投与するためのDDS担体としてこの短鎖ペプチドの利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a drug delivery system for medium-sized molecular drugs, which are currently attracting attention as next-generation drugs. The elastin-derived short-chain peptide developed by us exhibited high self-assembly ability under physiological conditions. Furthermore, model drugs with a higher molecular weight than conventional drugs could be encapsulated inside the peptide and released sustainably. Additionally, this peptide can pass through oral mucosal epithelial cells, which is expected to bypass drug degradation. Therefore, the potential for enhanced delivery via this route was suggested.

研究分野：生物化学

キーワード：エラスチンペプチド コアセルベーション 自己集合能 薬物送達システム 中分子 口腔粘膜

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

中分子医薬品は従来の低分子医薬品や抗体医薬品などの高分子医薬品の中に位置付けられており、標的特異性の高さなどから次世代創薬として注目されている。中分子医薬品にはペプチド医薬品や核酸医薬品などがあるが、比較的体内で分解されやすいため、より有効な薬物送達システム (DDS) の開発が求められている。天然タンパク質であるエラスチン由来の自己集合性短鎖型ペプチド (Short-ELP) は合成の簡便さ、生体適合性、薬物包含の可能性などの利点から DDS 担体としての応用が期待されているが、中分子医薬品を包含可能であるかは不明であり、生体への効果的な投与方法についても情報が少ない。そこで、Short-ELP に適応可能な薬物の分子サイズを明らかとし、さらに胃腸管や肝臓での消化・分解を受けにくい経路として知られている口腔粘膜吸収が適用可能かどうかを明らかにすれば、次世代創薬に対応可能な DDS 担体の開発に繋がることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究はエラスチンに由来する温度応答性の自己集合性短鎖型ペプチドである Short-ELP を中分子医薬品の DDS 担体として応用するために、中分子医薬品を想定した幅広い分子量のモデル薬物を用い、Short-ELP が包含することのできる薬物の分子量サイズを明らかにすることを目的としている。そこで、まず包含可能な分子量を検討するために、体温付近 (37°C) で十分な自己集合能を有する Short-ELP; (FPGVG)<sub>5</sub> を化学合成し、Short-ELP に対して分子量の異なる複数のモデル薬物を用いた薬物包含試験を行った。さらに、包含した薬物を一定時間徐放できるかどうかについても検討した。また、投与経路として口腔粘膜吸収が可能かどうかを明らかにするために、口腔粘膜を模倣した三次元培養口腔モデルを用いて、Short-ELP が口腔粘膜を透過できるかどうかを検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) エラスチン由来自己集合性短鎖型ペプチドの合成

天然タンパク質であるエラスチンを模倣したポリペプチド (Elastin-like polypeptide; ELP) は、温度応答性の自己集合能を有する代表的な高分子であり、DDS 担体としての応用が活発に研究されている。我々は ELP のアミノ酸組成を一部変更することで、既存の ELP の 1/30 程度の分子量にもかかわらず、同等の強い自己集合能を有する短鎖型の温度応答性自己集合ペプチド (Short-ELP) を開発した。本研究では、Short-ELP を DDS 担体として用いるために、Fmoc 固相合成法により化学合成した。合成後のペプチドの分子量は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) により確認した。また、合成後のペプチドは Sep-Pak® C18 カートリッジを用いた固相抽出法による粗精製の後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による精製を行い、その後の実験に用いた。

#### (2) Short-ELP の自己集合能の評価

Short-ELP は温度に応答して自己集合する性質があり、自己集合の開始温度はペプチド濃度や使用する溶媒の影響を受けることが知られている。ここでは、Short-ELP を DDS 担体として利用するために、生理的条件下 (37°C、pH7.4) で十分な自己集合を示すための条件を検討した。すなわち、氷中で超純水あるいは PBS (pH7.4) を用いて種々の濃度のペプチド溶液を調製した。温度可変セルチャンバーを接続した分光光度計に調製したペプチド溶液をセットし、温度を低温から高温へと変化させながら溶液の濁度変化を測定することでペプチドの自己集合能を評価した。測定温度範囲は 5°C~65°C の範囲とし、温度変化速度は 0.5°C/min とした。

#### (3) Short-ELP を用いた薬物包含・徐放試験

様々な分子量のモデル薬物を用いて、薬物包含試験を行った。Short-ELP を PBS に溶解させた後に氷中で各モデル薬物を添加し、Short-ELP と薬物の混合溶液を調製した。次に、この混合溶液を 37°C にインキュベートすることで Short-ELP を自己集合させ、内部に薬物を包含させた。37°C で一定時間静置させた後に遠心分離し、上清中に含まれる薬物量を定量することで自己集合した Short-ELP に包含されたモデル薬物の量を調べた (包含試験)。さらに、上清を回収後、沈殿に新たに PBS を添加し、再度 37°C で静置した。一定時間ごとに PBS を回収し、薬物量を定量することで、Short-ELP の内部に包含された薬物の経時的な薬物放出量を評価した (徐放試験)。

#### (4) 口腔粘膜透過試験

ヒト正常口腔上皮細胞が多層化された培養カップを用いて、三次元培養口腔モデルにおける Short-ELP の口腔粘膜透過試験を行った。培養カップの口腔上皮細胞の上層に Short-ELP 溶液を添加し、これが組織を透過して培養カップの下層に接したりザーバー液 (PBS) に到達するかどうかで透過の有無を評価した。すなわち、37°C で種々の濃度に調製した Short-ELP を培養カ

ップの上層に添加し、一定時間ごとに PBS (リザーバー液) を回収した。回収した PBS は MonoSpin® 逆相カラム C18 を用いて塩類を除去したのち、HPLC により溶液中に含まれる Short-ELP を定量することで、Short-ELP が口腔粘膜をどのように透過するかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Short-ELP の合成

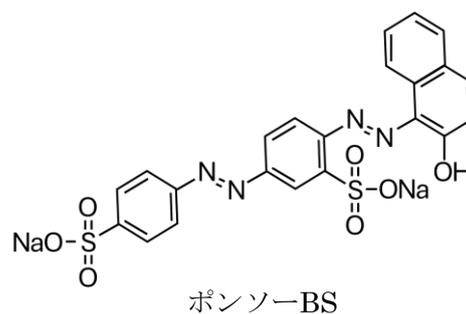
本研究で用いたペプチドは Fmoc 固相合成法により合成した。ELP の自己集合には、天然のエラスチンタンパク質中に含まれる Val-Pro-Gly-Val-Gly (VPGVG) の繰り返し配列が重要であり、VPGVG のアミノ酸組成を 1 部変更した様々な ELP が開発されている。本研究では、1 位の Val を Phe に置換した Phe-Pro-Gly-Val-Gly を 5 回繰り返した 25 残基のペプチドである (FPGVG)<sub>5</sub> を合成した。(FPGVG)<sub>5</sub> の理論分子量は 2,304 であり、MALDI-TOF-MS で観測された分子量 2,305 であったため、合成は成功したと判断できる。合成後のペプチドは、Sep-Pak® C18 カートリッジを用いた固相抽出法による粗精製を行った。その後、得られたペプチドを HPLC によりさらに精製し、本申請で購入した凍結乾燥機を用いてペプチド粉末を得た。以後の実験にはすべて精製後のペプチドを適宜溶液調製し、実験に使用した。

##### (2) Short-ELP の自己集合能の評価

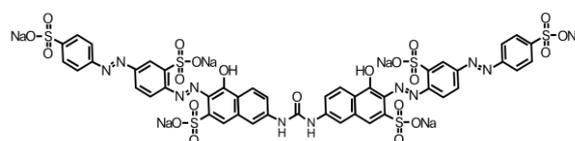
合成した (FPGVG)<sub>5</sub> について、分光光度計を用いた濁度測定によりペプチドの自己集合能を評価した。溶媒には超純水および PBS (pH 7.4) を用いた。(FPGVG)<sub>5</sub> を超純水で濃度 10 mg/mL に調製し濁度を測定すると、測定温度範囲内 (5°C~65°C) において自己集合を示さなかった。一般に、ELP は調製する溶媒の塩濃度の影響をうけることが知られている。そこで、(FPGVG)<sub>5</sub> を PBS で 10 mg/mL に調製した溶液を測定したところ、15°C 付近で自己集合を開始し、体温付近 (37°C) では十分に安定した濁度を示した。また、半分の濃度である 5 mg/mL においても自己集合能を示し、37°C では十分に安定した濁度を示した。しかし、さらに低濃度である 1 mg/mL では、37°C よりも高い温度で自己集合を示した。これらの結果より、(FPGVG)<sub>5</sub> を PBS で濃度 5 あるいは 10 mg/mL に調製すると、体温付近で十分な自己集合を示すことが明らかとなったため、以後の実験では 5 mg/mL のペプチド濃度を用いた。

##### (3) Short-ELP の薬物包含および徐放試験

中分子医薬品の分子量は一般に 500~5,000 程度とされている。本研究では、分子量 500~6,000 程度の様々なモデル薬物を用いて、(FPGVG)<sub>5</sub> の薬物包含および徐放試験を行った。モデル薬物にはデキサメタゾンリン酸エステルナトリウム (分子量 516.4)、ポンソーBS (分子量 556.5)、エバンスブルー (分子量 960.8)、シアノコバラミン (分子量 1,355)、シリウスレッド (分子量 1,373)、バンコマイシン (分子量 1,449)、ポリ (スチレンスルホン酸ナトリウム塩) (分子量約 4,300)、フルオレセインイソチオシアナート-デキストラン (分子量 3,000~5,000)、インスリン (分子量 5,808) を用いた。(FPGVG)<sub>5</sub> およびモデル薬物をそれぞれ PBS に溶解させ、低温で混合させた。その後、37°C に加温することでペプチドを自己集合させ、内部に薬物を包含させた。遠心分離後、上清に含まれる薬物の量を定量することで、ペプチド内部に保持された薬物量を評価した。ポンソーBS (分子量 556.5) を包含させた試験では、包含率は 95% 以上であり、ほとんどの薬物を包含できることが示された。その後、沈殿に新たな PBS を加え、一定時間静置した後に再度上清を回収し薬物量を定量した。この「新たな PBS の添加」と「上清の回収」を 3 週間にわたり行った。回収した上清に含まれる薬物量を定量した結果、ペプチド内部に包含されたポンソーBS は 3 週間にわたり緩やかに放出され続けたことが示された。シリウスレッド (分子量 1373) を用いて同様の包含試験を行ったところ、包含率は 95% 以上であり、また緩やかな徐放を示した。これらの結果から、(FPGVG)<sub>5</sub> は分子量 500 以下である従来の低分子医薬品の 3 倍程度の分子量の薬物を包含できる可能性が示唆された。さらに、(FPGVG)<sub>5</sub> よりも分子量の大きなモデル薬物であるポリ (スチレンスルホン酸ナトリウム塩) (分子量約 4,300) やインスリン (分子量 5,808) を用いて同様の試験を行ったところ、包含率は低下したものの、内部に保持された薬物は一定時間緩やかに放出され続けた。その他の薬物についても一応の包含、徐放が見られた。本研究で得られた結果から、(FPGVG)<sub>5</sub> は様々な分子量のモデル薬物に対する DDS 担体としての利用が期待される。



ポンソーBS



シリウスレッド

#### (4) Short-ELP の口腔粘膜透過性の評価

口腔粘膜は吸収性に優れており、薬効の即効性が期待されるほか、胃腸管や肝臓での消化・分解を回避できる経路としても期待されている。本研究では口腔粘膜を介した投与を見据え、三次元培養口腔モデルを用いた Short-ELP の口腔粘膜透過試験を行った。PBS で種々の濃度に調製した (FPGVG)<sub>5</sub> を培養カップ上層に添加したところ、検討したすべての濃度において 24 時間以内にペプチドが口腔粘膜を透過し、リザーバー溶液に到達していることが確認された。

以上、本研究課題においては、Short-ELP が生理的条件下においても高い自己集合を示し、中分子量のモデル薬物を包含および徐放できることが示された。さらに、Short-ELP がヒト正常口腔上皮細胞を透過することが示された。合成が容易で生体適合性の高い Short-ELP が、標的特異性の高い中分子医薬品をターゲットとした DDS 担体と成りうること、また吸収性に優れ、分解を回避できる経路である口腔粘膜を介した投与を利用できる可能性を本研究により示すことができた。中分子医薬品に向けた DDS 製剤の開発をはじめ、経皮吸収が困難な美容成分など、幅広い化合物をターゲットとした活用が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura Mayuko, Taniguchi Suguru, Tamaoki Sachio, Fujita Tsugumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of compound action potentials in the frog sciatic nerve by inchinkoto, a traditional Japanese medicine used for oral mucositis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2024.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tatsubo Daiki, Suyama Keitaro, Sakamoto Naoki, Tomohara Keisuke, Taniguchi Suguru, Maeda Iori, Nose Takeru	4. 巻 62
2. 論文標題 Determining the Sequence Dependency of Self-Assembly of Elastin-Like Peptides Using Short Peptide Analogues with Shuffled Repetitive Sequences	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2559 ~ 2570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.3c00146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Toma, Sodemoto Nanami, Inoue Asako, Taniguchi Suguru, Maeda Iori, Hikima Tomohiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Suitability of high molecular weight tissue derived elastin polypeptides and their particles as cosmetic biomaterials	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 e3472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/psc.3472	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suguru Taniguchi, Tsugumi Fujita, Iori Maeda	4. 巻 -
2. 論文標題 Drug loading and release behavior of short elastin derived peptides containing phenylalanine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Peptide Science 2023	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口卓、藤田亜美、前田衣織
2. 発表標題 薬物キャリアとしてのフェニルアラニン含有エラスチン由来自己集合性短鎖型ペプチド
3. 学会等名 日本DDS学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Suguru Taniguchi、Tsumumi Fujita、Iori Maeda
2. 発表標題 Drug loading and release behavior of short elastin derived peptides containing phenylalanine
3. 学会等名 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田 衣織、大窪 陸斗、谷口 卓
2. 発表標題 ブタ大動脈由来水溶性エラスチンによる血糖上昇の抑制効果
3. 学会等名 エラスチン・関連分子研究会第7回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中原崇希、谷口 卓、野瀬 健、前田衣織
2. 発表標題 ブタ大動脈由来エラスチン含有物の抽出方法の検討
3. 学会等名 第13回 CSJ化学フェスタ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 立川健人、谷口 卓、野瀬 健、前田衣織
2. 発表標題 マグロ動脈球由来エラスチン含有物の抽出及びその性質
3. 学会等名 第13回 CSJ化学フェスタ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村麻友子、谷口卓、藤田亜美、玉置幸雄
2. 発表標題 茵ちん蒿湯を構成する生薬による蛙坐骨神経の複合活動電位の抑制作用の検討
3. 学会等名 九州矯正歯科学会
4. 発表年 2023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