

「認知症患者の記憶改善に寄与するペプチド医薬の脳内送達法の開発」

神戸学院大学薬学部

亀井 敬泰

1 研究の背景と目的

認知症高齢者が益々増加し大きな社会問題となっている現在、その家族や医療介護従事者の精神的・社会的負担は計り知れないものとなっている。製薬各社においても、認知症に対する治療薬を開発すべく基礎および臨床研究が進められてきたが、有効な薬剤は依然として確立されていない。アルツハイマー病をはじめとする認知症の発症メカニズムは未だ不明確であり、これが真に有効な認知症治療標的を見出だせない大きな要因のひとつである。

近年、アルツハイマー病の原因物質として広く認識されているアミロイドβ (Aβ) が、脳内の神経細胞膜上に発現するインスリン受容体を減少させることが報告されている (図 1)。脳内インスリンシグナル伝達が記憶形成に関与していることが示唆されていることから、この経路を標的とした新たな認知症治療の可能性が高まっている。特に、脳内インスリン濃度を高めることにより膜上受容体の Aβ の結合領域が減少するとともに、インスリン自身が受容体を刺激し記憶形成を促すことが期待される (図 1)。さらに、脳内のグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体刺激がインスリンシグナル伝達の下流分子を活性化させることも示唆されていることから、Exendin-4 等の GLP-1 受容体作動薬 (インクレチン関連薬) が相乗的に認知症治療に寄与することが期待される (図 1)。このようにインスリンシグナル伝達経路を作用標的とすることにより、認知症に対する新たな治療戦略を構築できると考えられる。

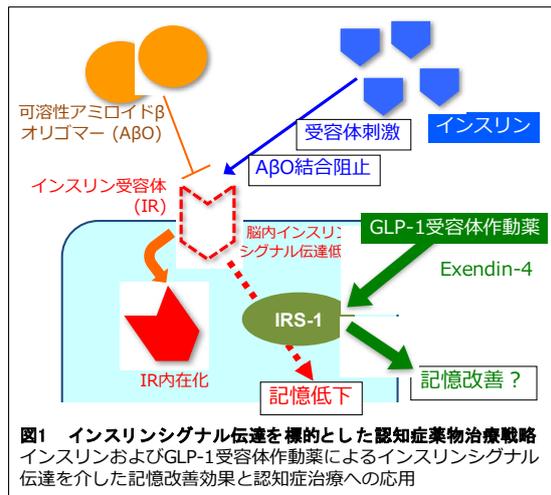


図1 インスリンシグナル伝達を標的とした認知症薬物治療戦略  
インスリンおよびGLP-1受容体作動薬によるインスリンシグナル伝達を介した記憶改善効果と認知症治療への応用

一方、認知症治療薬の開発を妨げるもうひとつの根幹的な原因として、病巣である脳への薬物移行性の低さが大きく関係している。血液および脳実質間の薬物輸送は、血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) により厳密に制御されている。そのため、たとえ有望な認知症治療薬のシーズが見出されたとしても、その多くは脳内で治療効果を発揮できずに開発途中で脱落してしまう。この問題を解決する手段として、血中を経由せずに薬物を直接脳へと送達可能な「Nose-to-Brain (鼻腔-脳) 送達法」の有用性が見出されてきた (図 2)。本手法は、①投与部位である鼻から脳への輸送距離の短さ、②全身性薬物曝露のリスク低減という 2 つの利点を有していることから、認知症等の中枢疾患治療薬の効果を高める最も理想的なアプローチであると考えられる。従って、上述のインスリンや GLP-1 受容体作動薬についても、この直接的移行経路を介して効率的な脳移行が

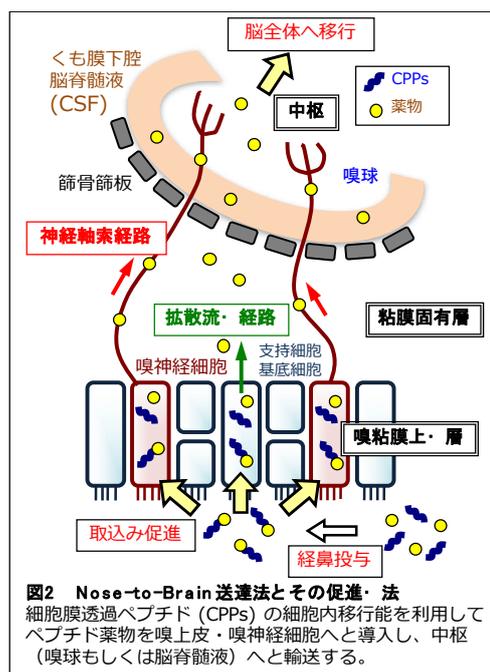


図2 Nose-to-Brain 送達法とその促進・法  
細胞膜透過ペプチド (CPPs) の細胞内移行能を利用してペプチド薬物を嗅上皮・嗅神経細胞へと導入し、中枢 (嗅球もしくは脳脊髄液) へと輸送する。

達成されるものと期待される。しかし、これらのペプチド薬物は鼻粘膜上皮細胞（嗅神経細胞や支持細胞）への取込み効率が低く、単独で経鼻投与するだけでは脳まで到達できない。そのため、ペプチド薬物の **Nose-to-Brain** 送達法を基盤とした認知症治療戦略を構築するためには、膜透過促進技術を組合せることが必須である。

筆者はこれまでに、生体膜透過促進ツールである「細胞膜透過ペプチド (Cell-penetrating peptides: CPPs)」をペプチド・タンパク質医薬品と混合することにより、それら薬物の粘膜透過性が顕著に亢進され、経口および経鼻吸収性が安全かつ効率的に増大することを明らかにした。これらの成果を基に、本研究では CPPs 物理混合法を **Nose-to-Brain** 送達戦略に組合せることにより、ペプチド薬物の脳内濃度を飛躍的に増大し、認知症治療効果が向上すると仮説を立てた。本仮説を実証するため、まず、強力な両親媒性 CPP である **penetratin** を併用することにより、鼻腔から脳へのインスリンおよび **Exendin-4** の移行効率や脳深部への分布効率を向上できるかをマウスおよびラットを用いて定量解析した。さらに、CPPs 併用 **Nose-to-Brain** 送達法を介して脳内に集積したペプチド薬物が認知症治療を発揮しうるかについて、老化促進マウス (**Senescence-accelerated mouse: SAM**) を用いて検証した。

## 2 研究方法・研究内容

**In vivo** 経鼻投与実験: マウス (ddY, SAMP8 および SAMR1) もしくはラット (Sprague-Dawley) 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、<sup>64</sup>Cu 標識インスリン、あるいは **Exendin-4**) および CPPs (**penetratin**) の混合溶液を投与した (5-10  $\mu$  L/マウス、25-50  $\mu$  L/ラット)。ラットを用いた実験では、薬液投与前に気道確保、食道および鼻口蓋の閉鎖手術を施した (Hirai 法)。一定時間経過した後、頸静脈より血液を採取した。さらに左心室より氷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**: 摘出した脳を氷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、各々に氷冷緩衝液 (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インスリンあるいは **Exendin-4** 濃度は Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により測定した。

**ペプチド薬物脳内分布解析**: Sprague-Dawley ラットに <sup>64</sup>Cu-NODAGA 標識インスリンおよび **penetratin** の混合溶液を経鼻投与した後、下大静脈より採血および放血した。脳を摘出した後、ブレインスライサを用いて 12 分割した厚さ 2 mm の冠状切片を作成し、各切片中に分布した放射能をオートラジオグラフィにより画像化した。

**脳脊髄液 (CSF) 中ペプチド薬物濃度の定量解析**: *In vivo* 経鼻投与実験方法に従い、Sprague-Dawley ラットにインスリンおよび **penetratin** の混合溶液を投与し一定時間経過した後、ラットを臥位にし CSF を採取した。

**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、インスリンもしくは **Exendin-4** および **penetratin** を長期間繰返し経鼻投与した (1 日 1 回、8 週間もしくは 5 週間)。投与終了翌日より、前訓練 (1 日) および訓練 (7 日間もしくは 4 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氷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 $\beta$  抗体を用いて染色した後、NeuN 陽性細胞数および A $\beta$  陽性面積を算出した。

### 3 研究成果

CPPs 混合投与によるインスリンおよびExendin-4のNose-to-Brain送達効率の向上: ddYマウスおよびSprague-Dawleyラットを用いて、鼻腔から脳へのペプチド薬物の移行性に及ぼすCPPs併用投与の影響について評価した。まず、インスリンおよびpenetratin併用経鼻投与後15分および30分におけるマウスおよびラット脳各部位のホモジネート中インスリン濃度をELISA法により測定した結果、鼻腔に近い嗅球のみならず海馬や小脳においてもインスリン単独投与群と比較して顕著に増大することが明らかになった。Exendin-4にpenetratinを併用投与した場合も同様に、その脳移行性が顕著に増大した。また、 $^{64}\text{Cu}$ 標識インスリンを用いたオートラジオグラフィの結果においても、脳全体におけるインスリン濃度がpenetratin併用により増大することが確認された(図3)。

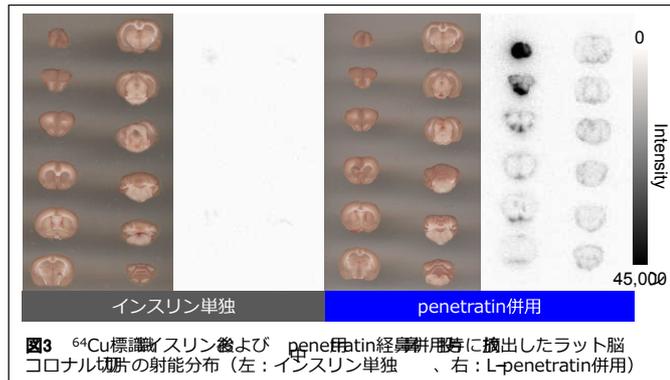


図3  $^{64}\text{Cu}$ 標識インスリンおよびpenetratin併用時に抽出したラット脳 coronal切片の射能分布(左:インスリン単独、右:L-penetratin併用)

CPPs 併用 Nose-to-Brain 送達法における直接輸送経路の寄与の評価: penetratin 混合投与によりインスリンが鼻腔から血中を経由せず直接脳に到達したことを確認するため、ラットCSF中インスリン濃度を定量解析した。その結果、penetratin 混合投与により脳前方由来のCSF中のインスリン濃度は上昇したのに対し、脳後方由来のCSF中ではインスリンは検出されなかった。すなわち、鼻腔から直接嗅球もしくはCSFへの直接輸送の増大が脳全体のインスリン濃度の上昇に寄与していることが示唆された。

CPPs 併用経鼻投与を介したインスリン脳送達による軽度認知症治療効果の解析: CPPs 併用 Nose-to-Brain 送達戦略の認知症治療への有効性をさらに検証するため、脳に到達したインスリンが記憶形成を促進し、認知症治療に寄与するかを評価した。まず、軽度認知障害を発症した老化促進マウス(SAMP8)にインスリンを長期連続経鼻投与した結果、penetratin 併用時にのみ認知機能低下が抑制され、正常対照マウス(SAMR1)と同程度の記憶を保持していることが観察された(図4A)。つまり、効率的に脳内へとインスリンを送達することにより、軽度な認知症に対する治療効果や進行抑制効果が得られることが示唆された。

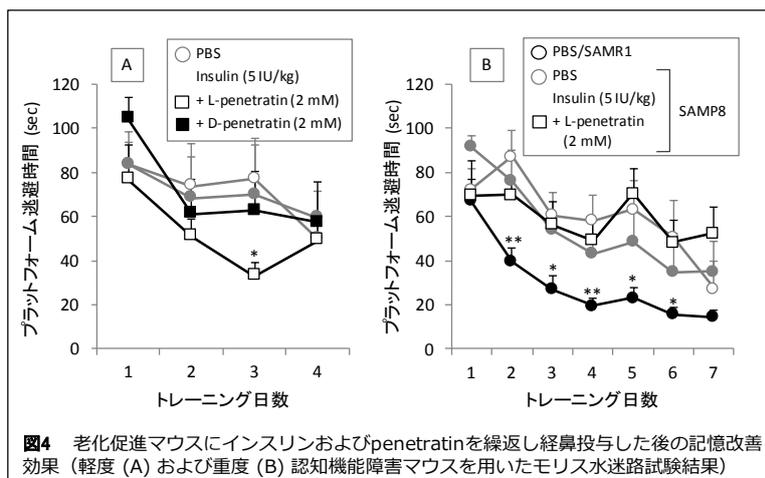


図4 老化促進マウスにインスリンおよびpenetratinを繰返し経鼻投与した後の記憶改善効果(軽度(A)および重度(B)認知機能障害マウスを用いたモリス水迷路試験結果)

CPPs 併用経鼻投与を介したインスリン脳送達による重度認知症治療効果の解析: 認知機能障害が進行したSAMP8マウスにpenetratin併用インスリン長期連続経鼻投与を実施した結果、記憶の改善は認められなかった(図4B)。一方、連続投与後の海馬における神

神経細胞数を解析した結果、インスリン単独経鼻投与後において神経細胞数減少が抑制されたのに対し、penetratin 併用時にはその効果が減弱していた。さらに A $\beta$  沈着面積を解析した結果、予想に反してインスリン脳内濃度の増大に伴い A $\beta$  沈着が増大することが明らかになった。認知症の進行度に応じて、インスリン脳送達効率と治療効果の関係が変動する可能性が示唆された。

CPPs 併用経鼻投与を介した Exendin-4 脳送達による重度認知症治療効果の解析: 重度認知機能障害を呈する SAMP8 マウスに penetratin 併用 Exendin-4 経鼻投与を繰り返した結果、インスリンの場合と同様に記憶の改善は認められなかったが、Exendin-4 と penetratin に加えて、インスリンを同時併用することにより重度認知機能障害マウスの記憶学習能力が飛躍的に向上することが明らかになった。

実験結果についての考察: 本研究の結果、CPPs 混合投与を介してインスリンや Exendin-4 等のペプチド薬物の Nose-to-Brain 送達効率を飛躍的に増大可能であることが明らかになった。また、血中を経由せず鼻腔から脳への直接輸送の増大が寄与していたことから、薬物の全身曝露による副作用リスクを低減させる安全な脳内薬物送達法であることも示唆された。一方で、インスリンの脳送達効率を高めることにより軽度認知機能障害の進行抑制効果は認められたものの、重度の脳機能低下を回復させるには至らなかった。これには認知症の進行度と脳内インスリンの作用バランスが関係していると推察される。つまり、A $\beta$  沈着を伴わない軽度な症状に対しては、インスリンの脳内移行量を高めるほどインスリンシグナル伝達が活性化することが可能である。それに対し、A $\beta$  依存性の重度認知機能障害時に脳内インスリン濃度が増加すると、A $\beta$  を分解するインスリン分解酵素 (IDE) が競合され、その結果 A $\beta$  が脳内に蓄積する可能性が考えられる。このようにインスリンを用いた認知症治療戦略には、病態の進行度を把握しインスリンの脳送達効率をコントロールすることが重要である。

一方、GLP-1 受容体作動薬である Exendin-4 は、A $\beta$  の分解に影響せずに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形成に寄与することが示唆されていることから、A $\beta$  依存性のアルツハイマー病の治療に適した薬剤になりうることを期待される (図 1)。検討の結果、CPPs 混合投与を介した Exendin-4 に CPPs を併用して Exendin-4 の脳内濃度を高めただけでは、記憶の改善は認められなかったが、インスリンを追加混合することにより重度記憶障害の改善効果が得られることが明らかになった。つまり、Exendin-4 を介した GLP-1 受容体刺激がインスリンシグナル伝達を促進するためには、同時にインスリン脳内濃度も部分的に上昇させインスリン受容体刺激を介したシグナル伝達を開始しておく必要があることが示唆された。今後はインスリンとインクレチン薬を組み合わせた効率的な Nose-to-Brain 送達法が、あらゆる進行度の認知症を治癒する有効な手法となることを薬理学的手法に基づき証明することにより、未だ確立しない認知症薬物治療の発展へとつなげたい。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

世界に先駆けて超高齢社会を迎えたわが国では、認知症患者数が今後益々増加すると予想される。認知症の発症は、高齢者自身の生活の質の低下に加えて、その家族や医療介護従事者の精神的・身体的負担も増大することから、「健康寿命」の延伸がわが国最大の課題であると言える。本研究を通して、直接的脳内ペプチド送達を基盤とした万能な認知症治療法が完成した暁には、認知症患者やその家族の生活が飛躍的に改善し、「健康長寿社会」の基盤形成につながるものと考えている。