

革新的吸収促進技術を搭載したバイオ医薬の経口および脳送達システムの創製

神戸学院大学 薬学部 武田(森下) 真莉子

研究の背景と目的

ペプチド、タンパク質や核酸などのバイオ医薬は、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。実際、新規医薬品の中に占めるバイオ薬物の比率は飛躍的に高まっており、2025年までには新薬の7割がバイオ医薬で占められると推測されている。一方で、これらバイオ医薬の投与形態は現在も変わらず注射剤が主流であり、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。一方、バイオ薬物の非注射剤化を可能にするためには、生体膜透過性を強力に改善できる新たな機能素子の開発が必要不可欠である。そこで我々は、生体膜透過能を有する細胞膜透過性ペプチド cell-penetrating peptides (CPPs)に着目し、バイオ薬物の非侵襲的投与におけるバイオアベイラビリティを上げるブースターとしてCPPsを用いることを提案し、これまでにその有用性、安全性を主に *in vitro* および *in situ* 実験で明らかにし、さらに最強の新規CPPsを人口ニューラルネットなどの *in silico* 解析で見いだしてきた。また一連の検討の中で、本ストラテジーを用いることにより、経鼻投与を介した嗅神経輸送制御による中枢活性バイオ薬物脳送達の可能性も見いだしてきた。アルツハイマー病や老人性痴呆に代表される中枢疾患の多くは、依然として薬剤の貢献度が著しく低く十分な治療満足度が得られていない難治性中枢神経系疾患に分類され、この分野の創薬・創剤開発は現代人の悲願でもある。

本研究では、以上のような我々の基礎的知見に基づき、バイオ医薬の革新的な新規剤形開発に利用される基盤技術の確立、それと同時に未だにアンメットメディカルニーズ領域である中枢神経系疾患に対する画期的な創薬・創剤の創製を行い、これらの有用性・有効性を *in vivo* で証明することを目的とする。

研究方法・研究内容

I バイオ医薬の革新的な新規剤形開発に利用される基盤技術の確立

1) 実施可能な非侵襲的デリバリーシステムの創製

まず始めに、新規 DDS 製剤開発の際にコントロールとなる混合溶液を用いた経口投与実験を実施した。東京実験動物株式会社から購入した ddY 系雄性マウス (6 週齢、体重 30-40g) を 24 時間絶食とした後、マウス用経口ゾンデ (株式会社夏目製作所) を用いて無麻酔下でインスリン (30IU/mL) および L-または D-ペネトラチン (1, 2 および 5 mM) 混合溶液を投与した。投与液量は 100 μ L/30g とし、インスリンの投与量を 10 IU/kg とした。投与前および投与後経時的に尾静脈から採血した。血糖値は、ワンタッチウルトラビュー (Johnson & Johnson K.K.) を使用して測定した。また、血漿中インスリン濃度は ELISA キット (Merckodia 社) を用いて測定した。

2) 毒性試験：新規製剤を単回および繰り返し経鼻投与後 (30 日) の毒性試験

本研究ではラットを用いて CPP を単回および慢性経鼻投与後の粘膜の組織学的評価および炎症性のバイオマーカーを指標とする毒性試験を行った。24 時間絶食した体重約 180-220 g の SD 系雄性ラットに、1 日 2 回、計 10 μ L (5 μ L/回)、インスリン (1 IU/kg) 溶液、CPP (L-Penetratin, PenetraMax) 溶液 (0.5、2mM)、インスリン (1 IU/kg) と CPP

(L-Penetratin、PenetraMax) の混合液(0.5、2mM)を、背位で 15°の角度から、1 日間、7 日間連続、30 日間連続投与群の 3 グループに分けて、経鼻投与した。すべてのグループの最初の投与後と、7 および 30 日間連続投与の 2 グループの最終投与後に血漿中インスリン濃度の測定を ELISA キット (Mercodia 社) を用いて行った。また、すべてのグループの最終投与後、鼻腔からマイクロシリンジポンプ (KD Scientific 社) を用いて、2mL/分で、37°C の PBS を灌流し鼻洗浄液を行い、洗浄液中の乳酸脱水素酵素 (LDH)、IL-1 α および TNF- α の濃度測定を行った。また、5%(w/v)タウロデオキシコール酸ナトリウムをポジティブコントロールとした。7 および 30 日間連続投与の 2 グループは、投与初日と最終投与後に、血漿中の IL-1 α および TNF- α の濃度を測定した。さらに、鼻組織を摘出し常法に従い組織切片を作成し、光学顕微鏡 (NIKON ECLIPSE E600 : 株式会社ニコン) で観察を行った。

II 嗅神経輸送制御による中枢活性バイオ薬物脳送達

1) 経鼻投与を介したインスリン脳移行特性と CPPs によるブースティング作用の評価

CPPs の経鼻併用投与によりバイオ薬物が効率的に脳内へと送達され、尚且つ、全身血中に対する脳内への集積比率が向上するか否かを、マウスを用いて検討した。本研究では、近年アルツハイマー病に対する治療効果が注目されているインスリンをモデルバイオ薬物として用い、また、我々がこれまでの研究において強力な粘膜吸収促進作用を有することを示してきたペネトラチンを代表的 CPP として用いた。

さらに、ペネトラチンを併用することにより、鼻から脳への移行過程のどの部位 (嗅球、脳脊髄液、および脳実質等) にインスリンが効率的に送達されるのかを明らかにするため、分布特性についてマウスを用いて詳細に検討した。マウスにインスリンとペネトラチンを経鼻投与後、摘出した各脳部位におけるインスリン濃度を定量評価すると同時に、過去に CPP 存在下における消化管インスリン吸収および体内動態を定量解析した実績のある PET イメージングを活用し、薬物到達効率を非侵襲的かつリアルタイムに評価した。

2) 種々のバイオ薬物脳送達における CPP 経鼻併用投与法の有用性評価

中枢疾患の治療に貢献しうる様々なバイオ薬物の脳内送達に対する CPP 経鼻投与の応用性について評価した。インスリンの他、オキシトシン、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) および血管作動性腸ペプチド (VIP) の効率的な脳送達の可能性を試みることを目的として、ペネトラチンと共にマウスに経鼻投与し、その後の各薬物の血中濃度推移を検討した。

研究成果

I-1) *In vivo* 経口吸収実験の結果より、インスリン単独ではほとんど吸収されないのに対し、ペネトラチン併用下では有意な血糖値の低下が認められた(Fig. 1)。特に D-ペネトラチン併用下では濃度依存的に有意な血糖値の低下作用が認められた。混合溶液投与による薬理学的利用率は約 20%となり、期待以上に高いインスリン吸収率が得られた。また、同時に血中インスリン濃度の著明な上昇も認められた。この成果はすでに Journal of Controlled Release に投稿しており (In vivo proof of concept of oral insulin delivery based on a co-administration strategy with the cell-penetrating peptide, penetratin) 現在審査中である。

本研究の結果から、複雑なデリバリーシステムを利用しなくても、混合溶液というシンプルな投与方法でも十分にペネトラチンによるバイオアベイラビリティ促進効果が得られることが期待される。今後は、取り扱いのしやすい粉末化製剤化および胃内での分解を避けるために腸溶解性カプセルの併用により、さらに効果の増強が得られることが期待され

るが、最終的にはより精密な製剤最適化を図ることも必要であろう。

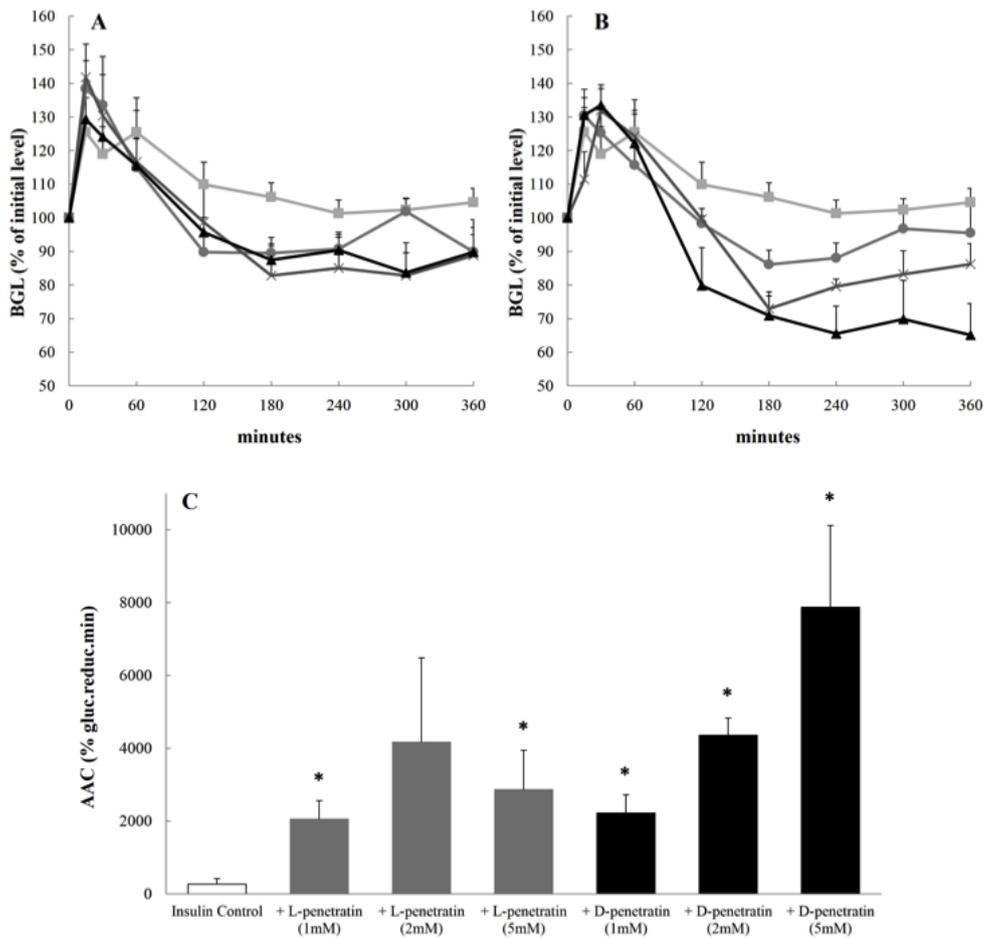


Figure 1: Dose dependent reduction of BGLs in mice following oral administration of insulin (10IU/kg) plus L- or D-penetratin. A: ■ Insulin control, ● +L-penetratin (1mM), × +L-penetratin (2mM), ▲ +L-penetratin (5mM). B: ■ Insulin control, ● +D-penetratin (1mM), × +D-penetratin (2mM), ▲ +D-penetratin (5mM). C: +L-penetratin and +D-penetratin AAC. Each point represents the mean ± S.E.M. (n = 4-5), * denotes $p < 0.05$, significant difference from insulin control.

I-2) ラットに30日間連続して各種CPPとインスリンを経鼻投与した結果をTable 1ならびにFig. 2に示した。Table 1に示すように、いずれの群においても鼻洗浄液へのIL-1 α およびTNF- α の漏出はまったく認められなかった。7および30日間連続投与の2グループは、投与初日と最終投与後に、血漿中のIL-1 α ならびにTNF- α の濃度を測定したが、これについても変化は認められなかった。さらに、LDHの漏出についても認められなかった。鼻組織の組織切片標本の写真をFig. 2に示したが、ポジティブコントロール5%(w/v)であるタウロデオキシコール酸ナトリウムを投与した群では鼻粘膜の著しい傷害が認められたが、CPPs併用群では、粘膜への刺激性はまったく認められなかった。これらの結果は、CPPsの生体への極めて高い安全性を示唆するものである。

Table 1 Interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α release in nasal lavage fluid following multiple nasal administration of L-penetratin or PenetraMax with or without insulin

	Interleukin -1 α (pg/uL)			Tumor necrosis factor- α (pg/mL)		
	First day	Seventh day	Thirtieth day	First day	Seventh day	Thirtieth day
0.5mM L-penetratin	20.1 \pm 0.3	18.1 \pm 0.2	19.4 \pm 0.6	77.1 \pm 0.8	76.2 \pm 0.6	74.1 \pm 0.0
2mM L-penetratin	21.4 \pm 0.6	18.3 \pm 0.1	18.9 \pm 0.3	75.6 \pm 0.3	76.5 \pm 0.5	74.4 \pm 0.3
0.5mM PenetraMax	21.2 \pm 1.1	21.7 \pm 0.8	18.9 \pm 0.2	72.9 \pm 0.8	76.2 \pm 0.6	75.6 \pm 0.3
2mM PenetraMax	20.7 \pm 0.5	20.3 \pm 1.0	19.9 \pm 0.6	73.5 \pm 0.8	75.3 \pm 0.5	75.6 \pm 0.3
Insulin solution (1IU/kg)	19.7 \pm 0.6	18.3 \pm 0.4	22.6 \pm 3.7	75.9 \pm 1.4	77.1 \pm 1.4	75.3 \pm 0.8
+0.5mM L-penetratin	20.2 \pm 0.2	18.1 \pm 0.3	25.8 \pm 1.1	75.9 \pm 0.8	75.0 \pm 0.3	74.1 \pm 0.0
+2mM L-penetratin	22.2 \pm 1.7	19.7 \pm 0.7	23.2 \pm 2.4	75.9 \pm 1.1	75.3 \pm 0.0	74.9 \pm 0.4
+0.5mM PenetraMax	21.2 \pm 0.9	20.6 \pm 1.0	20.7 \pm 0.6	74.1 \pm 1.1	74.4 \pm 0.3	75.6 \pm 0.3
+2mM PenetraMax	19.4 \pm 1.4	20.6 \pm 0.9	21.9 \pm 1.2	74.4 \pm 0.7	74.4 \pm 0.3	76.5 \pm 0.0

Each value represents the mean \pm SEM (n=3-4).

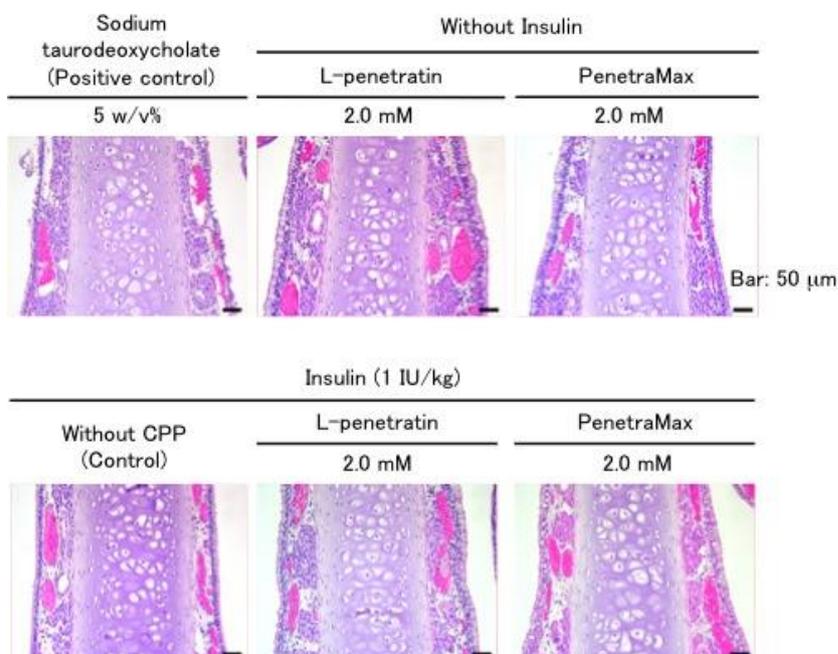


Fig. 2. Photomicrographs of the nasal respiratory mucosal membranes of vertical sections through the anterior rat nasal cavity following nasal administration of L-penetratin or PenetraMax (2.0mM) with or without insulin for 30 consecutive days. Sodium taurodeoxycholate (5 w/v%) was used as positive control. The bars indicate 50 μ m. Tissues were decalcified and stained with hematoxylin and eosin after fixation in 20% formalin neutral buffer solution.

II-1) Fig. 3 に示すように、L-ペネトラチン、D-ペネトラチンおよびD-R8の併用により、経鼻投与後のインスリン脳移行性を高める可能性が示唆された。また、用いたCPPsの種類により鼻から脳へのインスリン送達経路が異なる可能性が示された(血中経由、嗅球経由、血中・嗅球非経由)。さらに、脳内分布を詳細に解析した結果、CPPsの種類によって薬物が脳において集積する部位が異なり、このことから、部位選択的な脳内薬物デリバリーの可能性が示された (Fig. 3)。また、PETを用いた検討を行った結果、ペネトラチンによるインスリン脳移行性促進効果は、経鼻投与後速やかに起こることが示された。この研究については、今後さらに薬物とCPPを経鼻投与後、超短時間および長時間での脳集積性を評価することにより、CPPsの有用性がより明確になるものと期待される。

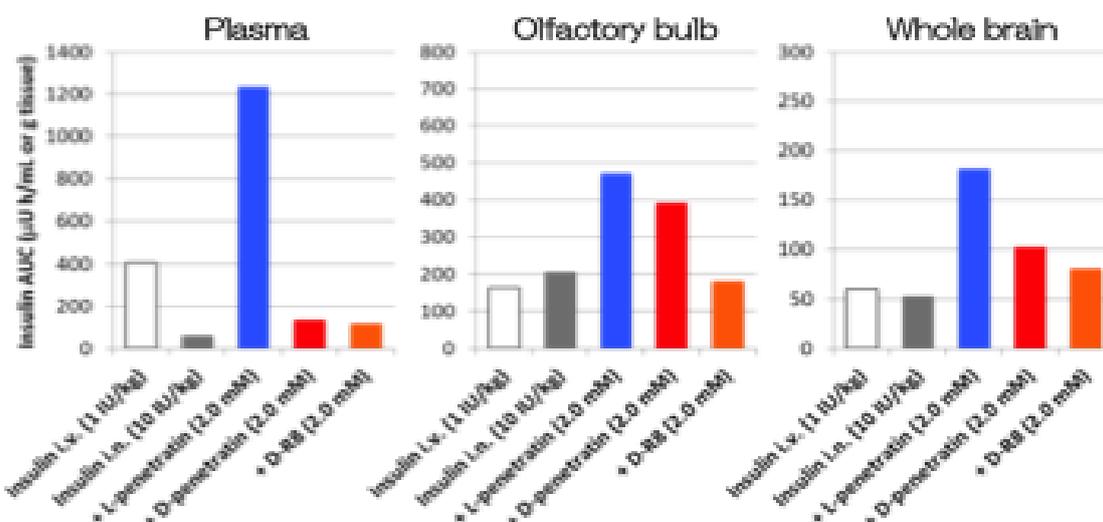


Figure 3: AUC calculated from a series of averaged insulin concentrations in plasma, olfactory bulb, or whole brain following intranasal (i.n.) administration of insulin with or without L- or D-penetratin (2.0 mM) or D-R8 (2.0 mM) to mice.

II-2) モデルペプチド薬物(オキシトシン、GLP-1 およびVIP)の鼻腔から血中への吸収性は、いずれもペネトラチン併用下において顕著に促進された。一方、脳移行性に及ぼすペネトラチンの影響はペプチド薬物により異なり、GLP-1 およびVIP 経鼻投与後の脳への移行効率はペネトラチン併用による増大傾向が認められたが、オキシトシンについては脳内濃度の増大は認められなかった。このように CPPs 併用経鼻投与を介した脳内デリバリー効率はペプチドの種類によって異なり、血中への吸収性と脳への移行性は必ずしも相関しないことが明らかになった。この研究については、今後、さらに例数を重ねると共に、ペネトラチンと各種ペプチド薬物の分子間相互作用を定量的に検討することが必要である。また、オレキシン(睡眠障害)、グレリン(拒食症)、レプチン(肥満)、コレシストキニン(抑うつ)などの薬物についても検討し、*in vitro* および *in vivo* の結果から総合的にCPPsの有用性を評価したい。

研究がもたらす効果及び波及効果

CPPs はバイオ薬物の経口バイオアベイラビリティを著しく上昇させる新規デリバリーツールとしてこれまでも盛んに研究されてきたが、インスリンを用いた本 *in vivo* 実験でその proof of concept が実証された。さらに、30日間の連続投与でも、粘膜局所ならびに全

身性の副作用はまったく認められず、極めて安全性の高いデリバリーツールであると考えられる。今後は、インターフェロン β や、GLP-1など、さまざまなバイオ薬物への応用性が強く期待され、社会的にもその貢献が期待されることと確信している。

また、本研究により、CPPsがバイオ薬物の脳内デリバリーに有用性が高いこと、さらに複数のバイオ薬物に対して有効であることが示された。これらの基礎的知見は、未だにアンメットメディカルニーズ領域である中枢神経系疾患における画期的な創薬・創剤の開発に貢献すると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に際しご援助を賜りました公益財団法人ひょうご科学技術協会に深く感謝申し上げます。