

## 経鼻投与による新しい概念に基づいたペプチドの中枢デリバリー技術の開発

山下親正

東京理科大学 薬学部薬学科

### 【研究の背景】

近年、低分子化合物と異なる作用メカニズムを有する中枢作用性ペプチドが見出され、中枢神経系疾患に対するアンメットメディカルニーズを解決できる薬剤になり得ると期待されている。しかしながら、中枢作用性ペプチドは容易に血液脳関門を透過することができず、その薬効薬理試験は脳室内投与で行われており、仮に有用なペプチドが見出されても臨床適用は困難である。一方、げっ歯類とヒトでは鼻粘膜の解剖学的特徴が大きく異なることが知られている。つまり、鼻粘膜は嗅上皮と呼吸上皮で覆われており、げっ歯類は嗅上皮 50%と呼吸上皮 50%であるのに対して、ヒトでは嗅上皮 2%、呼吸上皮 98%である。このことは、げっ歯類を用いて嗅球を介して中枢へデリバリーさせることができても嗅上皮が殆どないヒトにおいては、中枢へ効率良くデリバリーさせることができないことを意味し、従来の嗅球を介した中枢デリバリー戦略の臨床応用は難しく、実用化できるペプチドの中枢デリバリー技術が望まれている。

### 【目 的】

上記の背景から、呼吸上皮を介した、特に、三叉神経の軸索経路を着目した経鼻投与による非侵襲的な中枢デリバリー技術を構築することができれば、臨床的有用性が得られ、実用化の可能性が高まる。そこで、細胞膜透過性促進配列とエンドソーム膜脱出促進配列を新規抗うつ様作用を示す Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) に付加した GLP-2 ペプチド誘導体を創製し、臨床応用可能な全く新しい概念に基づいたペプチドの非侵襲的な中枢デリバリー技術の構築を目指した。

本研究では、吸収促進剤を用いることなく、実用化できる全く新しい概念に基づいたペプチドの非侵襲的な中枢デリバリー技術を構築すると共に、中枢移行メカニズムの解明を目的とする。

### 【方 法】

#### 1. 細胞内動態

$6 \times 10^3$  cell の A549 細胞を 35mm glass base dish (AGC TECHNO GLASS CO., LTD., Shizuoka, Japan) に播種し、1 日間インキュベートした。その後、薬液を  $300 \mu\text{L}/\text{dish}$  で曝露して 30 分間インキュベーター内に静置した。規定時間後、 $200 \mu\text{L}$  の氷冷した  $20 \text{ U}/\text{mL}$  ヘパリン溶液で 2 回洗浄し、さらに  $300 \mu\text{L}$  の氷冷した  $1 \times \text{PBS}$  で 3 回洗浄した。その後共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光観察を行った。

#### 2. 経時的な脳内分布と抗うつ様作用

FITC 標識した GLP-2 誘導体をマウスに経鼻投与 ( $0.6 \text{ nmol}/\text{mice}$ ) した 3, 5, 10, 20 分後に脳を摘出し、脳組織を嗅球、下辺縁皮質、視床下部室傍核、扁桃体外側基底核、海馬、視床下部背内側核、橋・三叉神経主知覚核 (Pr5)、吻側延髄腹外側部及び延髄・最後野に分画した。各部位の凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡にて観察することで脳内移行部位を検討した。また、同様に投与を行った 3, 5, 10, 20 分後に強制水泳試験を行い、GLP-2 誘導体の抗うつ様作用を評価した。

## 【結 果】

### 1. *In vitro* における GLP-2 誘導体における細胞膜透過性促進配列 (CPP) とエンドソーム脱出促進配列 (PAS) の有用性

GLP-2 誘導体がマクロピノサイトーシスにより細胞へ取り込まれ、効率良くエンドソームを脱出し、細胞外へ排出されることを実証し、*in vitro* において、誘導体化の有用性を示した。

### 2. *In vivo* における GLP-2 誘導体における細胞膜透過性促進配列 (CPP) とエンドソーム脱出促進配列 (PAS) の有用性

GLP-2 誘導体は細胞膜透過促進配列である CPP とエンドソーム脱出促進配列である PAS を GLP-2 に付加している。そこで、PAS-CPP-GLP-2、CPP-GLP-2 及び PAS-GLP-2 を用いて、CPP と PAS の配列の必要性を確認した。その結果、PAS-CPP-GLP-2 のみが薬理効果を示したことから、経鼻投与により効率良く中枢へデリバリーするためには、CPP と PAS の両方の配列が必要であることが判明した。

### 3. GLP-2 誘導体の経鼻投与後における経時的な脳内分布と抗うつ様作用の相関性

経鼻投与後 3 分では、三叉神経主知覚核 (Pr5) で、5 分では嗅球と Pr5 で GLP-2 誘導体が有意な分布が認められたものの、その他の部位では有意な分布が認められず、抗うつ様作用も見られなかった。経鼻投与 10 分後では嗅球と Pr5 のみで有意な分布が認められたものの、抗うつ様作用は見られなかった。更に、経鼻投与 20 分後で初めて脳内全体に GLP-2 誘導体が分布し、抗うつ様作用を発現することが判明した。

## 【考 察】

本研究により、細胞膜透過促進配列である CPP とエンドソーム脱出促進配列である PAS を GLP-2 に付加した GLP-2 誘導体は、マクロピノサイトーシスにより細胞へ効率良く取り込まれ、PAS によりエンドソームを効率良く脱出することが判明した。

更に、経鼻投与された GLP-2 誘導体は三叉神経を介して海馬・視床下部へデリバリーされ、抗うつ様作用を示す可能性が高いことを明らかにすることができた。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、経鼻投与により中枢性ペプチドを中枢へ効率良くデリバリーさせることができ、実用化も期待される中枢デリバリー技術の開発に成功し、臨床応用が期待される。

## 【参考・引用文献】

木村玲良、永井美於、赤熊沙紀、秋田智后、岡淳一郎、山下親正、経鼻投与された新規抗うつ薬 GLP-2 誘導体の中枢移行機構の解明、第 141 回日本薬理学会関東支部会(東京、2019 年 10 月 12 日) 優秀発表賞 受賞