

COPD や中枢神経系疾患治療に 貢献する DDS 研究

東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科 講師 あきた ともみ 秋田 智后

1. はじめに

ドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; DDS) は、薬物を必要な時に、必要な量を、必要な部位に、選択的に送達することを目指した製剤技術です。薬物の体内における時間的、量的、空間的な制御によって、医薬品の有効性や安全性が向上し、副作用も軽減することが可能となるため、患者のクオリティ・オブ・ライフ (QOL) を向上させることができます。筆者の研究室 (物理薬剤学・製剤学) は、2024 年度より発足しましたが、2011 年に本学薬学部 DDS・製剤設計学の山下親正教授の研究室に一期生として配属されて以来、一貫してご指導を頂き、DDS に関する研究を行ってきました。

本稿では、主な研究内容として、肺胞再生を目指した分化誘導を基盤とする COPD 根治治療薬の DDS の開発と、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 事業に採択され、研究代表者である山下教授の下、筆者が研究分担者として研究を行っている中枢神経系疾患治療を目指した神経回路を活かした Nose-to-Brain システムの開発に関する研究について紹介します。

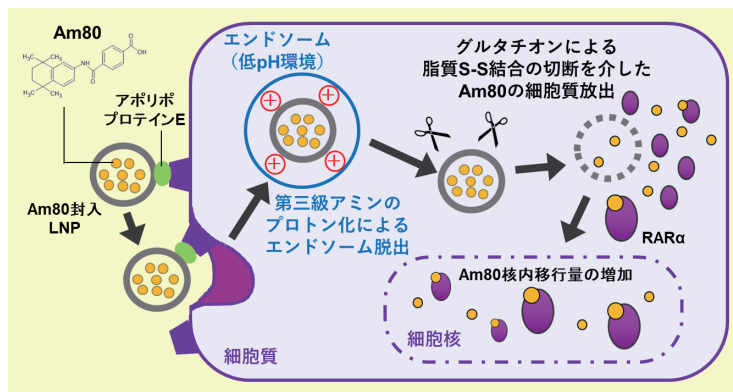
2. 肺胞再生を目指した分化誘導を基盤とする COPD 根治治療薬の DDS の開発

慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD) は、2019 年における世界の死亡原因の第 3 位を占める疾患ですが、有効な薬物療法は未だに対症療法しかありません。有毒ガスや喫煙などの長期吸入曝露を主な発症原因とし、末梢気道病変と気腫性病変が様々な割合で複合的に関与して気流閉塞を示します。特に日本では、肺胞領域で弾性線維が破壊される気腫型が多いと考えられています。

肺胞の再構築には肺胞を構成する I 型及び II 型肺胞上皮細胞への前駆細胞分化が重要です。筆者らの研究グループでは、近年ヒトにおいて

同定された肺胞上皮前駆細胞に対し、合成レチノイド Am80 が分化誘導効果を有すること、さらに、エラストアーゼ誘発性 COPD モデルマウスに 1.0 mg/kg の用量で経肺投与することで、有意な肺気腫改善効果が得られ、Am80 が COPD の根治治療薬になり得る可能性を示してきました^{1,2)}。しかし、そこから推定される Am80 のヒト臨床用量は 5.0 mg/60 kg であり、Am80 を吸入粉末剤化するためには薬効量の低下が必要でした。そこで、Am80 の肺気腫改善効果を高めるための DDS の構築を行いました。

具体的には、Am80 の作用点である核内への移行量を向上させるために、細胞内環境応答性脂質を用いた脂質ナノ粒子 (Lipid Nanoparticle; LNP) による細胞質デリバリーと、レチノイン酸結合タンパク質 RAR α の核局在化シグナルを利用した DDS 戦略を用いました。その結果、Am80 封入 LNP が、炎症により増加したアポリポプロテイン E を介してエンドサイトーシスを経て細胞内に取り込まれ、2 種の細胞内環境応答ユニットである「第三級アミン」と「ジスルフィド結合」を搭載した細胞内環境応答性脂質の機能による LNP の効率的なエンドソーム脱出と LNP から細胞質への薬物放出を経て、RAR α の関与により Am80 の核内移行量が有意に増加することを示しました³⁾ 【図 1】。第三級アミンは、エンドソーム内の低 pH 環境に



【図 1】 Am80 封入 LNP の細胞内移行プロセス

質中への脱出を可能にします。ジスルフィド結合は、細胞質中のグルタチオンによる還元反応を受け、その結合が開裂することでナノ粒子の不安定化を引き起こし、封入した薬物の細胞質中への放出を可能にしています。細胞での評価に加え、マウスにおける薬理効果を評価した結果、0.01 mg/kg の Am80 を封入した LNP を経肺投与することにより、LNP 未封入時の 100 分の 1 の投与量で肺胞修復効果及び呼吸機能改善効果が得られました⁴⁾。

以上の結果より推定された Am80 臨床用量は 0.05 mg/60 kg となりました。そこで、臨床応用を目指して、Am80 封入 LNP を最大限活かす吸入製剤を開発するため、患者吸気の空気衝撃で多孔質な凍結乾燥ケーキが瞬時に崩壊し、微粒子を生成する凍結乾燥を用いた LDPI (Lyophilizate Dry Powder Inhalation) システム⁵⁾に着目し製剤設計を行いました。製剤の添加剤としてフェニルアラニンとロイシンを選択し、改良した空気力学的粒度分布装置⁵⁾を用いて応答曲面法により最適添加剤量を決定しました【図 2】。その添加剤量はフェニルアラニン 1.25 mg/vial, ロイシン 0.65 mg/vial となり、決定した最適処方を用いた吸入特性試験の結果、臨床用量 0.05 mg/vial を満たす吸入粉末製剤化に成功しました。また、LNP の機能、Am80 の分化誘導効果において、凍結乾燥による影響はみられないことを確認しています。

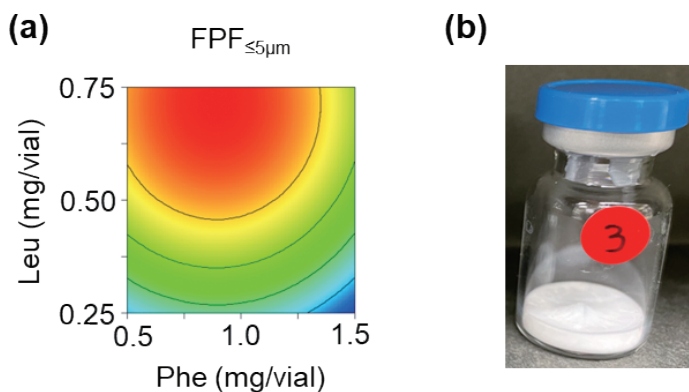
3. 神経回路を活かした Nose-to-Brain システムの開発

うつ病やアルツハイマー病などの中枢神経系疾患は、中枢への薬物送達ที่難しいことから、薬剤貢献度や治療満足度が低い、アンメット・メディカル・ニーズが高い疾患です。近年、生体に存在する神経ペプチドである Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) は、マウスへの側脳室内投与により抗うつ様作用を示し、治療抵抗性うつ病のモデル動物に対しても有効であることから、うつ病の新規治療薬候補として期待されています。しかし、脳内に薬物を直接注入する側脳室内投与は侵襲性が高いため、山下教授発案の下、筆者らは神経ペプチドを非侵襲的に脳内へ送り届ける DDS 技術の確立を目指しました。

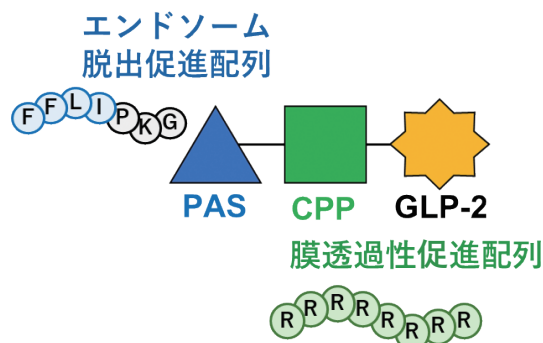
経鼻投与後の中枢移行経路は、まず鼻粘膜の嗅上皮と呼吸上皮を介した経路に大別され、それぞれの上皮からは細胞間隙または神経を介する経路の、合計 4 つの経路が存在します。細胞間隙を介した経路では薬

物が脳脊髄液へ拡散や全身吸収されるため、経鼻投与後の薬物は、細胞内へ取り込ませ神経へと移行させる必要がありました。また、神経科学の常識として、神経細胞の軸索輸送は非常に遅いことが知られていました。そこで、神経細胞への取り込みを促進させるための膜透過性促進配列である Cell-penetrating Peptide (CPP) と、エンドソーム脱出促進配列である Penetration Accelerating Sequence (PAS) を神経ペプチドに付加し、軸索輸送が速くなるような誘導体 (PAS-CPP-GLP-2) を創製しました【図 3】。

まず、PAS-CPP-GLP-2 の CPP によりマクロピノサイトーシスが誘起され、誘導体が効率よく神経細胞に取り込まれた後、PAS の作用でエンドソーム脱出して細胞質に移行し、さらに細胞外に移行して次の神経細

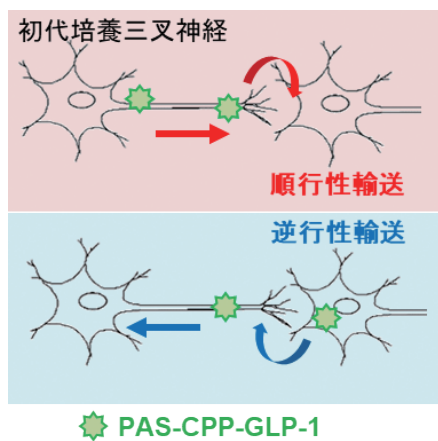


【図 2】 (a) 応答曲面の一例と (b) 最適添加剤量により作製された凍結乾燥ケーキ



【図 3】 GLP-2 誘導体における PAS-CPP のアミノ酸配列

胞へ乗り継いで移行していくという仮説を立て、*in vitro* の実験系を用いて検証しました。その結果、仮説通りにマクロピノサイトーシスによる細胞内取り込みと PAS によるエンドソーム脱出、その後の細胞外移行がみられ、この PAS-CPP-GLP-2 をマウスに経鼻投与したところ、側脳室内投与と同用量で、かつ単回投与後 20 分という時間で薬効を示し、驚くほど効率的に中枢へ移行していることが明らかになりました⁶⁾。また、GLP-2 と同じく生体内の神経ペプチドであり、



【図4】 初代培養した三叉神経における順行性・逆行性輸送のイメージ

アルツハイマー病の新規治療薬候補として期待される Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) を誘導体化 (PAS-CPP-GLP-1) したところ、仮説通りの細胞動態を示し、加えて三叉神経の初代培養細胞を用いたことで神経細胞を順行性輸送（細胞体から軸索末端に向かう輸送）・逆行性輸送（軸索末端から細胞体に向かう輸送）【図4】することを世界で初めて実証することができました⁷⁾。

次に、PAS-CPP-GLP-2 が側脳室内投与と経鼻投与で同じ薬効量を示した理由を解明するため、両者における中枢移行経路を比較することとしました。側脳室内投与では投与された薬物は速やかに脳脊髄液 (CSF) へと拡散し、CSF で満たされた血管周囲腔を透過して薬物作用部位の脳実質細胞へと移行します。ELISA と免疫染色法を用いた検討の結果、側脳室内投与後の PAS-CPP-GLP-2 は CSF 中には移行したものの、血管周囲腔に多くが留まり、実質細胞にほとんど移行していないことが分かりました⁸⁾。一方、経鼻投与では CSF と血管周囲腔のどちらにも検出・観察されず、呼吸上皮の三叉神経から三叉神経節、神経投射経路上の三叉神経毛帯、そして作用部位である海馬や視床下部に誘導体が検出され、これら一連の神経経路を移行したことが分かりました⁸⁾。以上より、PAS-CPP-GLP-2 は側脳室内投与と経鼻投与で異なる経路で中枢移行することを明らかにしました。さらに、現在では、PAS-CPP-GLP-1 および PAS-CPP-GLP-2 の薬効面でも新たな有用性が得られる新規誘導体の開発にも成功しています。

4. おわりに

COPD 根治治療薬の開発を目指した DDS 研究では、細胞内環境応答性脂質を用いた LNP に Am80 を封入

することで低用量化に成功し、その細胞内移行プロセスを明らかにして、臨床用量を満たす吸入粉末製剤の開発に成功しました。今後は、機能性脂質を用いた LNP の経肺投与が、他の難治性肺疾患に対しても有用であるか、その可能性を検討していきたいと思います。

Nose-to-Brain システムの開発では、機能性配列 PAS-CPP を神経ペプチドに付加することで、細胞内を移行し、神経細胞を乗り継いで効率的に中枢移行することを、その移行メカニズムと共に明らかにすることができました。本システムは神経細胞の内側から薬物を作用させることが可能となるため、現在、山下教授を研究代表者として AMED 事業に採択され、筆者はアルツハイマー病の治療薬の実用化に向けて、研究分担者として研究を推進しているところです。

謝辞

本研究成果は、本学薬学部の山下研究室在籍中のものであり、学生時代から引き続き現在まで、多大なるご指導とご支援を頂いている山下親正教授に深く感謝申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、共同研究者としてご協力頂きました多くの先生方に対し、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。そして、昼夜を問わず多くの実験を行い、素晴らしい研究成果に繋げてくれた研究室の皆様に、感謝の意を表します。

【参考文献】

- 1) H. Sakai, M. Horiguchi, C. Ozawa, T. Akita, K. Hirota, K. Shudo, H. Terada, K. Makino, H. Kubo, C. Yamashita, *J. Control. Release.*, 196, 154-160 (2014)
- 2) H. Sakai, M. Horiguchi, T. Akita, C. Ozawa, M. Hirokawa, Y. Oiso, H. Kumagai, Y. Takeda, I. Tachibana, N. Maeda, C. Yamashita, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 361, 501-505 (2017)
- 3) T. Akita, K. Oda, S. Narukawa, Y. Morita, K. Tange, Y. Nakai, C. Yamashita, *Pharmaceuticals*, 16, 838 (2023)
- 4) T. Akita, Y. Morita, T. Kawai, K. Oda, K. Tange, Y. Nakai, C. Yamashita, *Pharmaceutics*, 15, 37 (2023)
- 5) K. Miyamoto, H. Taga, T. Akita, C. Yamashita, *Pharmaceutics*, 12, 976 (2020)
- 6) T. Akita, R. Kimura, S. Akaguma, M. Nagai, Y. Nakao, M. Tsugane, H. Suzuki, J. Oka, C. Yamashita, *J. Control. Release*, 335, 575-583 (2021)
- 7) T. Akita, M. Shimamura, A. Tezuka, M. Takagi, C. Yamashita, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 195, 114176 (2024)
- 8) T. Akita, Y. Oda, R. Kimura, M. Nagai, A. Tezuka, M. Shimamura, K. Washizu, J. Oka, C. Yamashita, *J. Control. Release*, 351, 573-580 (2022)