

氏名（本籍）	亀井敬泰	（群馬県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第129号	
学位授与年月日	平成21年3月16日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Novel approach using cell-penetrating peptides for efficient intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins	

論文審査委員	主査	教授	高山幸三
	副査	教授	上田晴久
	副査	教授	米谷芳枝

論文内容の要旨

1. はじめに

近年の分子生物学および遺伝子工学技術の進展により、生理活性を有するバイオ薬物の疾病治療における寄与が大きくなってきている。しかし、このようなバイオ薬物は生体内において非常に不安定であり、また物理的特性により粘膜透過性が著しく制限されるため、経口投与などの経粘膜投与製剤としての開発は極めて困難である。従って、現在これらバイオ薬物の主たる投与剤形は静脈内注射や皮下注射といった非経口製剤に限定されている。しかし、これらの剤形は薬剤の服用を繰り返す患者にとって肉体的かつ精神的な苦痛を伴うため、Quality of Lifeの向上を可能とする簡便な投与剤形の開発が期待される。そのためには、前述のようなタンパクおよびペプチド薬物の欠点を克服する必要がある。これまでも分解酵素阻害剤やリポソーム、ハイドロゲルなどの薬物送達キャリアを利用した試みが行われてきたが、現状として実用化には至っていない。この理由として、これらの試みは主として生体内でのバイオ薬物の安定性を高めることを目的としており、粘膜透過性については依然として改善されていないことが挙げられる。粘膜透過性を改善させるための手段としては吸収促進剤の利用について検討されてきたが、粘膜への刺激性を誘発するなど安全性を考慮すると実用化は困難である。従って、これら薬物の生体膜透過性を安全かつ効率的に向上するための新たな機能性素子の開発が必須である。

HIV-1 Tat ペプチドやオリゴアルギニンなどの cell-penetrating peptides (CPPs) と総称されるカチオン性ペプチドが、高分子量かつ親水性であるにもかかわらず

ず細胞内に容易に取り込まれることが近年報告されている。さらに、タンパクや核酸などと架橋させることにより、これらの生理活性を保持したまま効率的な細胞内導入が可能となることが明らかとされており、薬物送達ツールとしての期待が集まっている。従って本研究では、先に述べたようなバイオ薬物の粘膜透過性を改善するための機能性素子としてこの CPPs の性質に着目し、バイオ薬物の効率的な消化管粘膜吸収を可能とするツールとしての有用性を検討した。

2. 細胞膜透過ペプチドによるバイオ薬物の消化管吸収性の改善

従来、CPPs を用いた薬物の細胞内導入はそれら分子間に化学的な架橋を施すことにより達成される。一方、本研究ではより簡便であると同時に薬物の活性も損なわない手法として、バイオ薬物と CPPs を混合し同時投与方法を試み、バイオ薬物の消化管吸収に及ぼす CPPs の影響を検討した。まず、CPPs として塩基性アミノ酸であるアルギニン 6 個から構成されるオリゴアルギニン (R6) を用い、ペプチド薬物であるインスリンの消化管吸収に及ぼす R6 同時投与の影響についてラット回腸を用いた *in situ loop* 吸収実験法により検討した結果、血漿中インスリン濃度の顕著な上昇、さらに血糖降下作用の増大が認められた。さらに、L-体アルギニンから構成される L-R6 と比較し D-体アルギニンから構成される D-R6 を同時投与した場合にその吸収促進作用は大きくなることが明らかとなった。また、D-R6、D-R8、D-R10 を用いオリゴアルギニンを構成するアルギニン残基数とインスリン吸収促進効率の関係を検討した結果、D-R8 同時投与によって最も強い吸収促進作用が認められたため、オリゴアルギニンが消化管インスリン吸収促進作用を示すための最適なアミノ酸残基数が存在する可能性が示唆された。一方、薬物としてタンパク薬物であるインターフェロン β および水溶性高分子化合物であるデキストランを用いた場合においては、それらの消化管吸収性は R6 同時投与によって影響を受けなかった。生理的環境下においてインスリンは負電荷、インターフェロン β およびデキストランはそれぞれ正電荷および無電荷を示すことより、正電荷を有するオリゴアルギニンが薬物の消化管吸収性を促進するためには薬物およびオリゴアルギニン間における静電的相互作用が必要となる可能性が示唆された。このように、オリゴアルギニンを利用することによりバイオ薬物の消化管吸収性が改善されることが明らかとなったが、有効性および安全性を考慮すると低用量でより強い消化管薬物吸収促進作用を示す CPPs を見出すことが必要となる。従って、候

補と考えられる数種の CPPs (R8、penetratin、pVEC および RRL helix) を用い、インスリンの消化管吸収に対する各 CPP の促進効率を比較検討した。その結果、L-penetratin が最も強いインスリン吸収促進作用を示すことが明らかとなった。さらに、CPPs 適用に伴う消化管粘膜上皮に対する刺激性を評価するために、適用後の粘膜上皮細胞からの乳酸脱水素酵素 (LDH) の漏出量を測定した結果、R6 および penetratin のいずれを用いても LDH の漏出は認められなかった。また、R6 を適用後の消化管粘膜上皮の状態を光学顕微鏡により観察した結果、いずれの部位においても刺激性を示唆する変化は認められなかったため、これら CPPs が安全かつ有効な消化管高分子薬物吸収促進ツールとなる可能性が示唆された。

3. 細胞膜透過ペプチドによる消化管薬物吸収促進機構の解明

上述の結果より、CPPs を利用することによりバイオ薬物の消化管吸収性を顕著に改善できることが明らかとなった。さらに、本吸収促進作用は薬物および CPP 間を化学的に架橋させる従来の細胞内送達技術と異なり、薬物および CPP を物理的混合液としての投与のみで達成された。一方で、CPPs による消化管薬物吸収促進機構については未だ明らかにされていない。これまでに CPPs の細胞内取り込みがエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスを介していることが報告されているが、実際に消化管などの生体組織を用いて CPPs の取り込みもしくは透過機構を解明した例はない。従って、本検討ではまず CPP 自身の消化管上皮粘膜透過機構を明らかとするために、ラット摘出回腸を用いた *in vitro* 透過実験によりフルオレセイン標識 D-R6 (FL-D-R6) の回腸粘膜透過挙動を評価した。その結果、生理的条件下 (37°C) での透過と比較して、低温条件下 (4°C) において回腸組織への集積が大きく変化しなかったのに対し、その漿膜側への透過は減少した。このことより、FL-D-R6 の回腸粘膜透過が主にエネルギー介在的に起こっている可能性が示唆された。また、負電荷を有するヘパリン共存下において、組織への集積および漿膜側への透過がいずれも顕著に低下した。これは細胞表面プロテオグリカンに対する FL-D-R6 の静電的な付着がヘパリンにより妨げられたためであると考えられる。これらの結果、オリゴアルギニンの消化管上皮における取り込みおよび透過は、細胞表面への付着およびそれに伴うエンドサイトーシス経路を介して引き起こされる可能性が示唆された。

一方、ペプチド薬物であるリュープロライドに D-R6 を架橋させたコンジュ

ゲートの消化管吸収性についても *in situ loop* 吸収実験により評価した。その結果、リユープロライド自身と比較してコンジュゲートの吸収性が低下することが明らかとなった。これは、D-R6 と架橋することにより細胞内への取り込み効率が上昇したものの、リユープロライドの分子量および極性が上昇することにより細胞内から血中へのリユープロライドの放出が制限されたためと推測される。このため、CPPs を用いた消化管吸収促進作用を可能とするためには、上述したように静電的な分子間相互作用により形成された薬物-CPP 複合体が細胞内に取り込まれ、細胞内で複合体から解離した薬物が血中に放出される必要があることが示唆された。

さらに、この仮説を検証するために薬物-CPP 間の分子間相互作用および CPP による消化管薬物吸収促進効率の関連性を表面プラズモン共鳴 (SPR) 結合実験および *in situ loop* 吸収実験により検討した。まず、CPP として D-R8 を用い 16 種の異なる等電点を有するペプチド薬物との結合特性を評価した結果、ガストリン、インスリンおよびグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) のみが D-R8 に結合した。また、結合が認められた 3 種のペプチド薬物の消化管吸収はいずれも D-R8 同時投与により増大することが明らかとなった。一方、D-R8 への結合を示さなかった他の薬物については D-R8 同時投与による消化管吸収性への影響は認められなかった。さらに、薬物としてインスリンを用いインスリンに対する D-R8 の結合濃度を算出し、結合 D-R8 濃度とインスリン吸収促進効率の関連性を検討した結果、D-R8 がインスリンの消化管吸収性を改善するためにはインスリン 1 分子に対し 2 分子以上の D-R8 の結合を必要とすることが明らかとなった。これらの結果より、バイオ薬物および CPP 間の分子間相互作用、さらにはそれら分子間の結合比が CPP 同時投与による消化管薬物吸収促進作用の重要な支配因子として寄与している可能性が示唆された。

4. まとめ

本研究の結果、バイオ薬物の消化管吸収性は CPPs を利用することにより顕著に改善されることが明らかとなった。また、CPPs による吸収促進作用は分子間の架橋を必要とせず、物理的混合による簡便な手法により達成された。以上の結果より、CPPs はバイオ薬物の経口投与製剤の開発を実現するための有用なツールとなる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

タンパク質やペプチドなどのバイオ薬物は生体内で不安定であり、さらに粘膜透過性が著しく制限されるため、経口投与可能な剤形の開発は困難である。このようなことから、バイオ薬物の粘膜吸収性を改善する様々な手法が検討されているが、多くは生体内での安定性の向上を目的としたものであり、経粘膜吸収を実現する有効な方法は未だ開発されていない。本研究は、細胞膜透過能を有する HIV-1 Tat やオリゴアルギニンなどの cell-penetrating peptides (CPPs) に着目し、バイオ薬物の効率的な消化管粘膜吸収改善ツールとしての可能性を検討したものである。従来、タンパク質や遺伝子などの細胞内送達法として、CPPs を化学的に架橋させる手法が広く検討されてきた。しかし、本研究では、CPPs と単に混合して投与することでバイオ薬物の消化管粘膜吸収が著しく改善されることを見出しており独創性に優れる研究成果が得られた。以下に本研究の概要を述べる。

CPPsとして塩基性アミノ酸であるアルギニンから構成されるオリゴアルギニン (R6、R8 および R10) を用い、ラット回腸を用いた *in situ* loop 吸収実験を評価手法として、ペプチド薬物であるインスリンの消化管吸収への影響を検討した。その結果、血漿中インスリン濃度の顕著な上昇と血糖降下作用の増強が認められた。さらに、L-体アルギニンと比較してD-体アルギニンから構成されるオリゴアルギニンを同時投与した場合にその作用は強くなり、またオリゴアルギニンを構成するアルギニン残基数がインスリン吸収促進効率に影響することが明らかとなった。さらに、10種類のCPPs (R8、penetratin、pVEC および RRL helix など) を用い、インスリンの消化管吸収に対する各CPPsの促進効率を比較検討した結果、L-penetratinが最も強いインスリン吸収促進作用を示すことが明らかとなった。また、これらCPPを適用することによる消化管粘膜への傷害性は認められず、これらCPPsが安全かつ有効な消化管高分子薬物吸収促進ツールとなる可能性が示唆された。

次にCPPsによる消化管薬物吸収促進メカニズムの解明を目的として、D-R8を用い消化管組織におけるCPP自身の取り込みおよび透過挙動を検討した。ラット摘出回腸を用いた *in vitro* 透過実験の結果、消化管粘膜透過性の低い水溶性高分子化合物である fluorescein isothiocyanate-labeled dextran 4,400 (FD-4) と比較してD-R8は粘膜透過性が著しく低く腸管組織に集積する傾向が認められた。さらに低温条件下 (4℃) もしくはヘパリン共存下において、組織への集積および漿膜

側への透過が低下したことから、D-R8自身の消化管上皮における取り込みが細胞表面への付着およびそれに伴う能動輸送を介して引き起こされ、それらのメカニズムを介して消化管薬物吸収促進作用を発現する可能性が示唆された。CPPsによる消化管薬物吸収促進作用の発現における薬物-CPP間の分子間相互作用の関与を検討するために、表面プラズモン共鳴 (SPR) 結合実験および in situ loop 吸収実験により D-R8 に対する 16 種の異なる等電点を有するペプチド薬物の結合特性および吸収性への影響を評価した。その結果、ガストリン、インスリンおよびグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) のみが D-R8 に結合し、これら 3 種のペプチド薬物の消化管吸収はいずれも D-R8 同時投与により増大することが明らかとなった。CPP 同時投与による消化管薬物吸収促進作用の重要な支配因子として、それらの分子間相互作用の寄与が示唆された。

本論文は、膨大な実験結果に基づいて CPPs によるバイオ薬物の消化管吸収の改善作用を明らかにしたものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしい内容である。