

## 招 待 講 演

Absorptive-mediated transcytosis 機構に基づいた  
オリゴペプチドの脳へのデリバリー

寺崎哲也 （東北大院・薬・薬物送達）

# Absorptive-mediated transcytosis 機構に基づいた オリゴペプチドの脳へのデリバリー

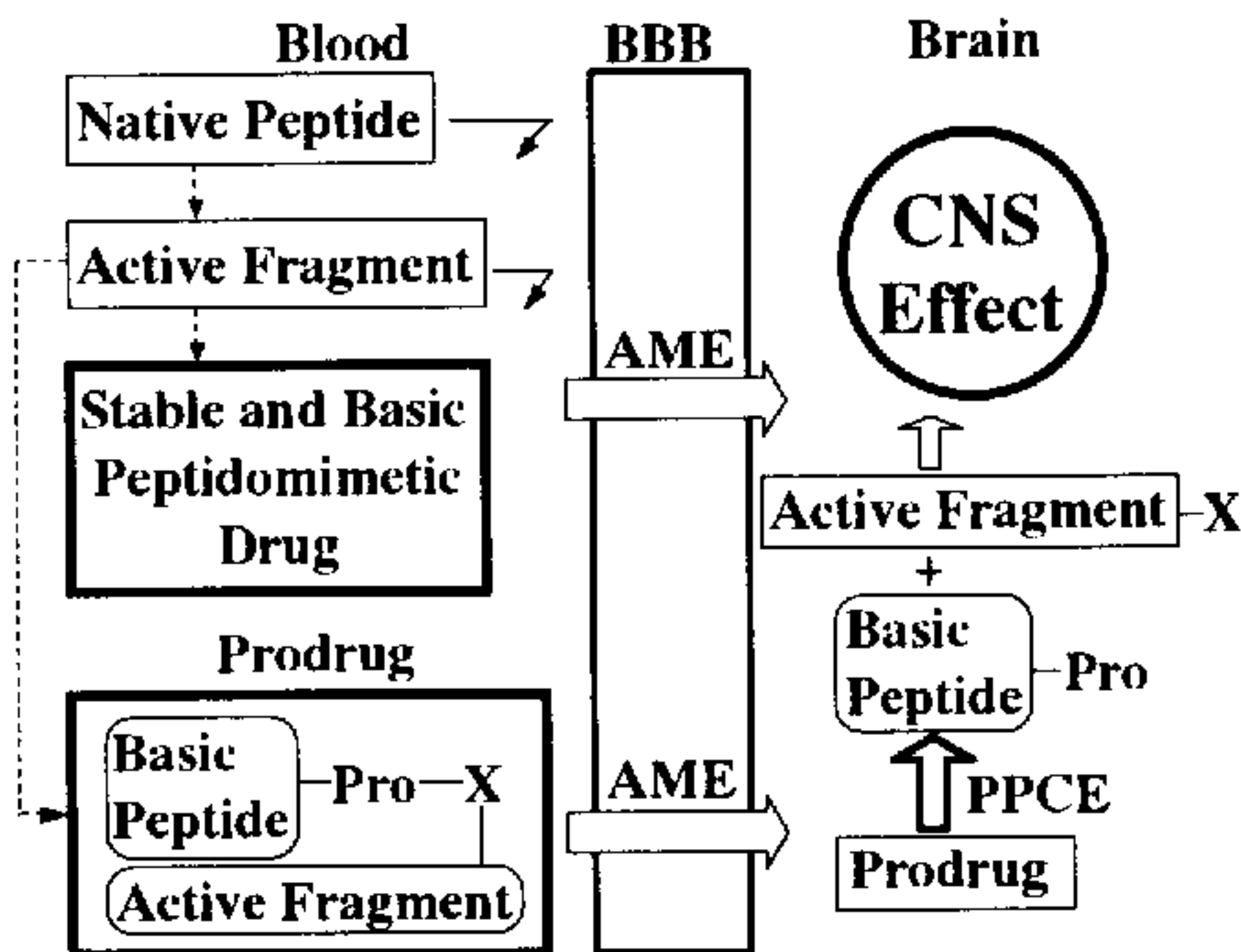
寺崎 哲也

東北大・未来科学技術・バイオ、  
東北大院・薬・薬物送達、CREST

## 【脳支援・防御システムとしての血液脳関門】

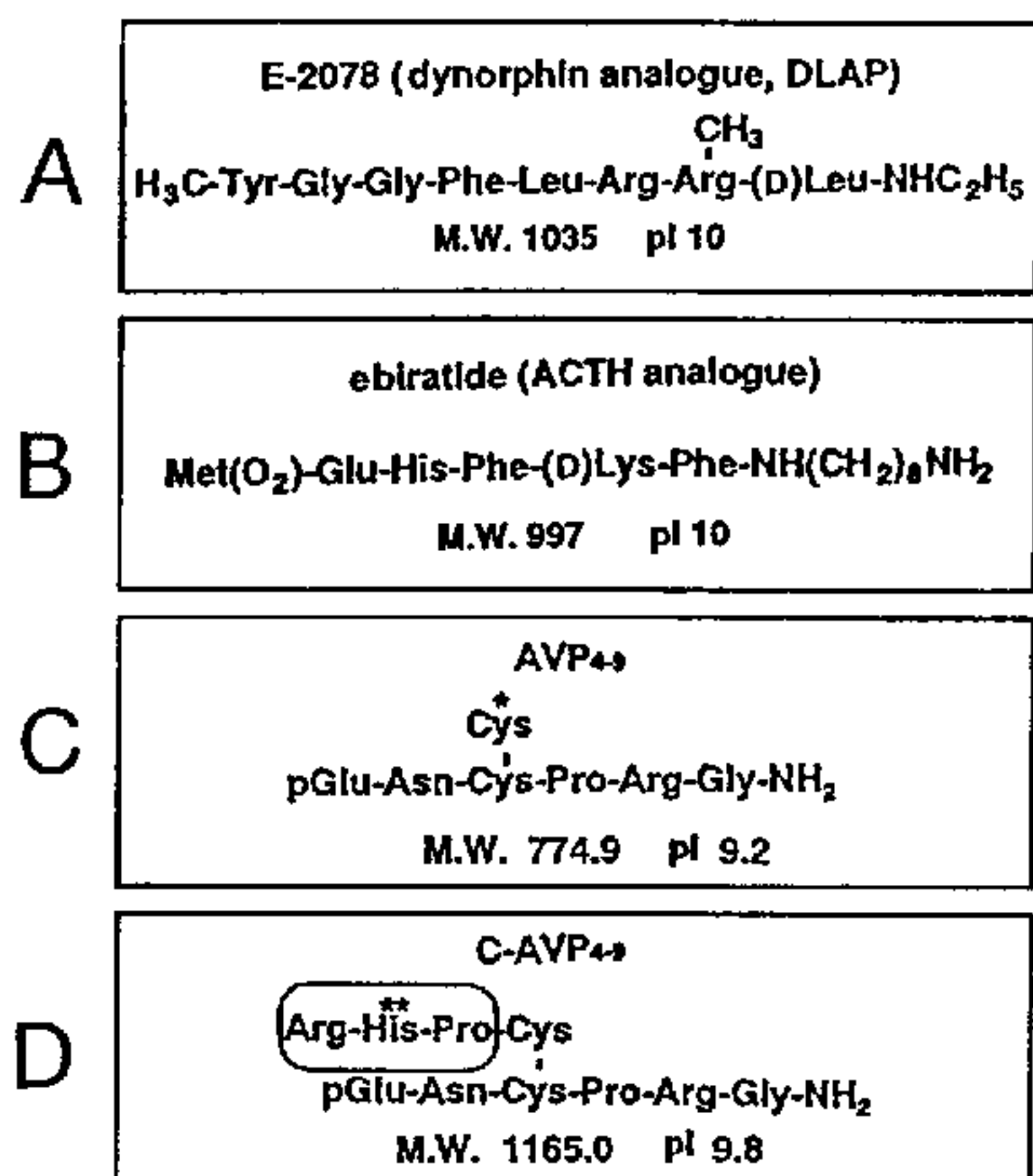
中枢作用型薬物の脳へのデリバリー研究において最も困難な課題は、血液脳関門(BBB)透過性を増加させることである。BBBの実体である脳毛細血管内皮細胞は、密着結合で連結している為に、細胞間隙を介した移行はほとんどなく、経細胞的透過性を増加させる必要がある。BBBには、ヘキソース輸送系を始めとする種々の輸送系が循環血液中の栄養物質を脳内へ供給する「脳支援システム」として働いている。これらの輸送系の基質を mimic した薬物分子は、BBB 透過が十分に期待できる。一方、サイクロスポリン A などの分子量が 500 以上の薬物が脳へ移行しにくいことから BBB には「分子ふるい」があるのではないかと考えられてきた。しかし、BBB に存在する P-糖蛋白が、ATP を直接消費して脳から循環血液中への異物の侵入を排除する「脳防御システム」として働いていることが明らかになった<sup>1)</sup>。つまり、脳への移行性が低いのは P-糖蛋白の基質であることが原因であることが明らかになった。さらに、アジドチミジンやバルプロ酸などのいくつかの薬物は P-糖蛋白以外の排出輸送系の働きによって脳への移行性が制限されていることが明らかになった<sup>2)</sup>。これらのことから、脂溶性を高くして受動拡散で BBB を透過させる構造修飾を行う場合、分子量の制限がないが、「脳防御システム」としての BBB 排出輸送系の基質になりにくい構造であることが重要である。その為には、BBB 排出輸送系の機能解析を急ぐ必要がある<sup>2)</sup>。

## 【エンドサイトーシス輸送機構とペプチドデリバリー】



インスリンやトランスフェリンは receptor-mediated endocytosis (RME) によって BBB を透過することが知られる。これらの受容体に対するモノクローナル抗体と生理活性ペプチドを結合させる chimeric peptide

**Fig.1 Strategy of Peptide Drug Delivery to the Brain** の手法によって脳内へペプチドを移行させることに成功したという報告があり、有用な手法である。一方、カチオン化したアルブミンやヒストンなど血液中で正に荷電する分子量数万のペプチドは、BBB を透過することが知られている。



**Fig. 2 Structure of Blood-Brain Barrier Permeable Peptide Drug**

脳内には多くの生理活性ペプチドが発見されているが、その活性中心を有した fragment に構造修飾を加えて脳内及び血液中での安定性を増加させることが試みられている。しかし、循環血液中に投与可能な形にするには BBB 透過性がある程度得られることが必要である。そこで、Fig. 1 に示したように、生理活性と安定性を保持した分子量 1000 程度の塩基性合成ペプチドが、BBB を本当に透過するのかを in vivo 実験系を用いて明らかにすると共

に、*in vitro* 実験系を用いて透過機構を解析した。

Fig.2A の E-2078 は、ダイノルフィンに化学修飾を施した比較的安定な塩基性ペプチドで、マウスに皮下投与した後にモルヒネと同程度の鎮痛効果が報告されていた。E-2078 をラットに脳灌流し、同時に脳微小透析法を行ったところ、透析液中に未変化体の E-2078 が検出された。この時、脳脊髄液中にはほとんど検出されなかったことから、脳脊髄液関門(BCSFB)の寄与はほとんど無視でき、BBB を介した脳への移行が主たる経路であることが明らかになった<sup>3,4)</sup>。さらに、単離脳毛細血管を用いた輸送実験の結果、E-2078 はエンドサイトーシス阻害剤で細胞内への内在化が阻害され、poly-L-lysine などの塩基性ペプチドで内在化が阻害された。したがって、E-2078 は absorptive-mediated endocytosis (AME)によって BBB を透過することが示唆された<sup>5)</sup>。

Fig.2B に示した ACTH 構造類似体の ebiratide は、腹腔内投与後に中枢効果が報告されていた。そこで、E-2078 と同様に *in vivo* 及び *in vitro* 実験系を用いて検討したところ、ほぼ同様の結果が得られた。したがって ebiratide も AME 機構で BBB を透過し、脳細胞間液中へ移行し、学習改善効果を表すことが示唆された<sup>6-8)</sup>。

### 【Postproline cleaving enzyme を利用したプロドラッグ化】

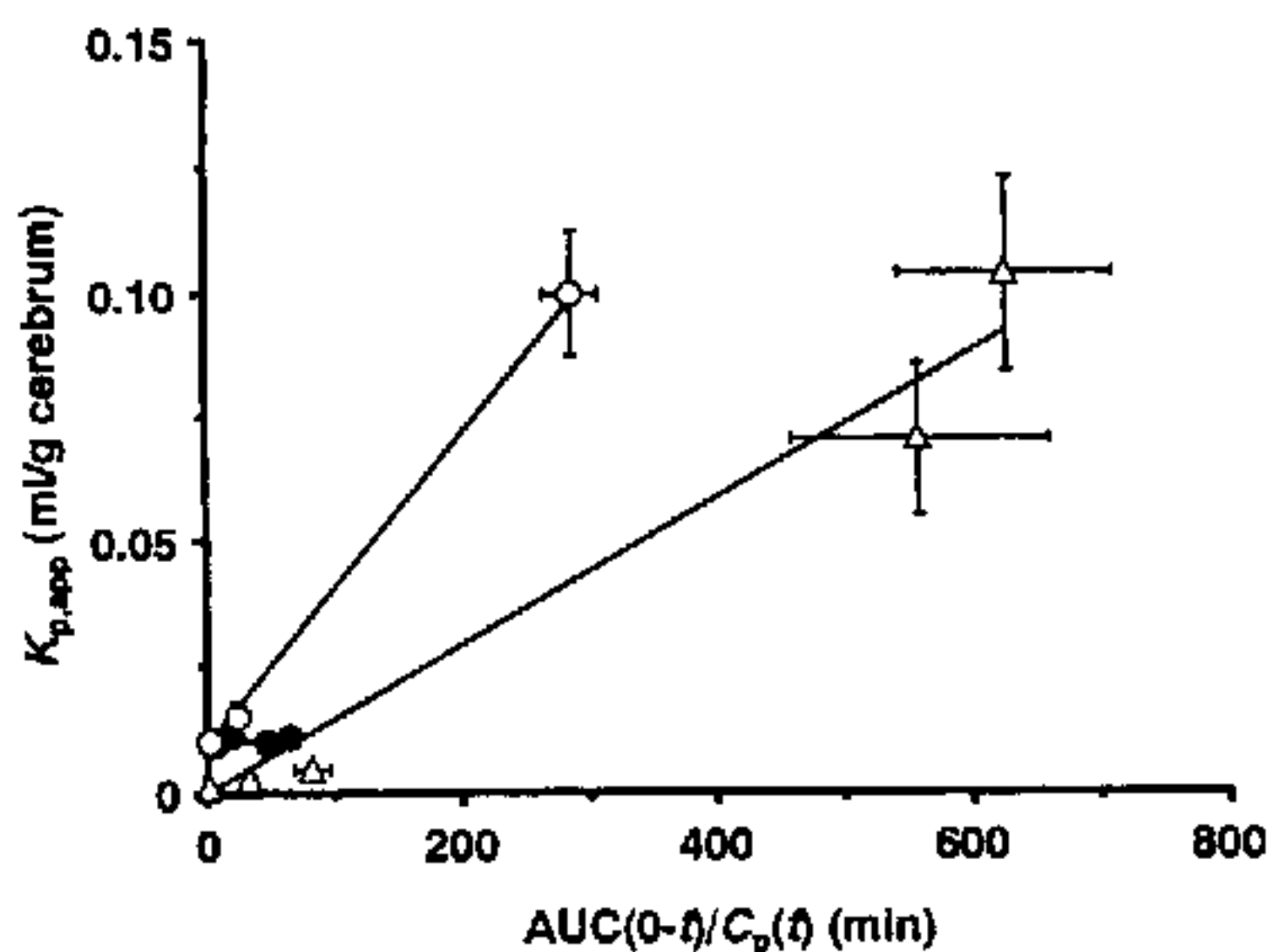
Postproline cleaving enzyme (PPCE)は血液中で活性が低く中枢で高い活性を有することが知られる。したがって、Fig. 1 に示したように、PPCE を還元酵素として利用するプロドラッグ化は、脳へのドラッグデリバリーの新しい戦略として可能性がある<sup>9)</sup>。

Fig. 2C に示した AVP<sub>4-9</sub> は、アルギニン・バソプレシン AVP の主代謝物で比較的安定で学習改善効果を示すことが報告されている。そこで、Fig.2D に示したように、Arg-His-Pro を AVP<sub>4-9</sub> の Cys に結合させ、塩基性を高めて BBB 透過性を増加させることを狙った。さらに、脳内へ移行した C-AVP<sub>4-9</sub> は PPCE によって AVP<sub>4-9</sub> を生成し中枢効果が生じることを期待した。なお、C-AVP<sub>4-9</sub> の等電点は 9.8 であり、E-2078 や ebiratide とほぼ同じであった。

[<sup>125</sup>I]C-AVP、 [<sup>35</sup>S]AVP<sub>4-9</sub>、及び [<sup>125</sup>I]BSA を各々、マウスに静脈

内投与し、血漿中及び脳内濃度の経時変化から BBB 透過速度を求めたところ、Fig. 3 に示したように、各々、 $3.10 \times 10^{-4} \pm 0.35 \times 10^{-4}$  mL/min/g brain、 $1.47 \times 10^{-4} \pm 0.09 \times 10^{-4}$  mL/min/g brain、 $6.26 \times 10^{-5} \pm 1.26 \times 10^{-5}$  mL/min/g brain、が得られ、見かけ上 C-AVP<sub>4,9</sub>の方が AVP<sub>4,9</sub>より高い BBB 透過性を示すことが明らかになった。さらに、BBB 非透過性マーカーとしての [<sup>125</sup>I]C-AVP<sub>4,9</sub> を静脈内投与 30 分後の脳を capillary depletion 法を用いて分画したところ、未変化体の K<sub>p</sub> (組織対血漿中薬物濃度比) 値として実質組織中、毛細血管中に各々、 $4.06 \times 10^{-1} \pm 0.36 \times 10^{-1}$ 、 $1.86 \times 10^{-2} \pm 0.67 \times 10^{-2}$  となった。さらに、[<sup>125</sup>I]BSA について同様に検討したところ、実質組織中、毛細血管中に各々、 $1.04 \times 10^{-2} \pm 0.13 \times 10^{-2}$ 、 $2.98 \times 10^{-4} \pm 0.17 \times 10^{-4}$  となった。従って、C-AVP<sub>4,9</sub> は BBB を透過して脳実質組織中へ移行していることが示唆された<sup>9)</sup>。

さらに、培養マウス脳毛細血管内皮細胞(MBEC4)を用いて取り込み実験を行い、BBB 透過機構を解析した。[<sup>35</sup>S]AVP<sub>4,9</sub>、及び [<sup>125</sup>I]C-AVP<sub>4,9</sub> の MBEC4 に対する細胞内在化量を示す acid resistant binding の経時変化を測定したところ、[<sup>14</sup>C]inulin に比べて両化合物の acid resistant binding は有意に高く、細胞内に内在化されていることが示唆された<sup>9)</sup>。この時、[<sup>125</sup>I]C-AVP<sub>4,9</sub>の方が取り込み量が多く、この結果は in vivo の BBB 透過速度の違いを反映していることが



**Fig. 3** Integration plot of [<sup>125</sup>I]C-AVP<sub>4,9</sub> (○), [<sup>35</sup>S] AVP<sub>4,9</sub> (△) and [<sup>125</sup>I] BSA (●) after I.V. injection to mice. (n=3-4)

示された。さらに、[<sup>125</sup>I]C-AVP<sub>4,9</sub>の 60 分後における acid resistant binding は MBEC4 を低温処理、高張処理、dancylcadaverine 処理、2,4-dinitrophenol 処理、phenylarsine oxide 処理した時、いずれの場合も有意に低い値を示したことからエンドサイトーシスで内在化されていることが示唆された<sup>9)</sup>。さ



らに、 $V_1$  antagonist や  $V_2$  antagonist ではこの値は変化しなかったが、poly(L-lysine)や protamine では有意に低下し、poly(L-glutamic acid)では有意差が見られなかった。これらの結果は、E-2078 や ebitratide で得られたものと同様であり、C-AVP<sub>4-9</sub>は予想した様に AME 機構で BBB を透過することが示された<sup>9)</sup>。

さらに、C-AVP<sub>4-9</sub>は PPCE によって代謝され、AVP<sub>4-9</sub>と Arg-His-Pro を生成し、PPCE 特異的阻害剤の N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal (ZPP)の共存下ではC-AVP<sub>4-9</sub>はPPCEによって代謝されなかった。また、脳ホモジネート中でC-AVP<sub>4-9</sub>はAVP<sub>4-9</sub>を生成し、ZPP 共存下では少なくとも一部は代謝が阻害された。したがって、C-AVP<sub>4-9</sub>は脳内のPPCEによって代謝されたAVP<sub>4-9</sub>を遊離していることが示唆された<sup>9)</sup>。

以上の結果から、Fig. 1 に示した様に PPCE を利用するプロドラッグ化の手法は、構造修飾に限界のある活性な peptide fragment を BBB 易透過型に変換する有用な脳へのドラッグデリバリーの新しい戦略であることが示された。

**【謝辞】** E-2078, ebitratide に関する成果は辻彰教授（金沢大・薬）との、C-AVP<sub>4-9</sub>に関する成果は田辺修一氏（ヤクルト・中研）との共同研究によって得られたものであり、心から感謝いたします。

### 【引用文献】

1. T. Terasaki, K. Hosoya, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **36**, 195-209 (1999).
2. T. Terasaki, "An Introduction to the Blood-Brain Barrier: Methodology and Biology" ed. by W. M. Pardridge, Cambridge Univ. Press, (1998) Chap 3, 24-31.
3. T. Terasaki, *et al.*, *Pharm. Res.*, **8**, 815-820 (1991).
4. T. Terasaki, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **81**, 143-152 (1992).
5. T. Terasaki, *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 351-357 (1989).
6. T. Shimura, *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258**, 459-465 (1991).
7. T. Terasaki, *et al.*, *Pharm. Res.*, **9**, 529-534 (1992).
8. T. Shimura, *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 583-588 (1992).
9. S. Tanabe, *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, in press (1999).