

《若手研究者紹介》



バイオ医薬品の経粘膜デリバリー

亀 井 敬 泰* Noriyasu Kamei
神戸学院大学薬学部薬物送達システム学研究室

1. はじめに

気づけば本稿の執筆時点において、筆者が大学院に進学してから10年となる。節目の折、このような寄稿の機会を与えていただいたことに、「薬剤学」編集委員の先生方に厚く御礼申し上げたい。これを機に自身の10年を振り返り、研究者を志し現在の職に就くまでの経緯や、これまで主に進めてきた「バイオ医薬品の経粘膜デリバリー」の研究内容を紹介させていただきたい。

2. 研究の道に進むきっかけ

筆者が星薬科大学薬学部の学生だった頃、初めて「薬剤学」という学問に触れたのは2年次後期の「物理薬剤学」の講義であった。恩師である高山幸三教授（星薬科大学・薬剤学教室）が担当されていたが、実のところ筆者はあまり良い成績をとれなかったと記憶している。翌年の3年次前期には「製剤学」の講義を受けたが、これもまた同様の成績であった。その理由は単純で、当時の筆者は「薬剤学」に特別関心をもっていなかったからに他ならない。その頃、両親が薬剤師だったこともあり将来は病院薬剤師に

なろうとぼんやり考えていたのだが、その仕事と「薬剤学」という学問の関連性が見出せなかった。一方で、自分のやりたいことは果たして本当に病院薬剤師なのか、他にも選択肢があるのではないかも考え始めていた。それならば3年次後期の教室配属時にそのヒントを掴めるような教室を選択しようと考え、高山教授の主宰する薬剤学教室を希望し、そのまま配属が決定した。薬剤学教室は、星薬科大学の中で最も規模の大きな教室の一つであったため、将来設計に関わる様々なことが経験できるであろうと安易に考えた。理由はどうあれ、ここでようやく本格的に「薬剤学」と向き合うことになった。

薬剤学教室には高山教授、武田（森下）真莉子講師、小幡誉子助手、大貫義則助手（職階は当時）に加えて、外国人留学生を含む大勢の大学院生が在籍しており、病院薬剤師を目指す先輩、企業の研究者を目指す先輩、アカデミアのポジションを狙う先輩など様々で、筆者にとってすべてが新鮮に映った。もちろん研究・学術面でも、教室に配属されて初めてわかったことがたくさんあり、「薬剤学」という学問の幅広さ・奥深さを知ることができた。特に当時、高山教授、武田（森下）講師とテキサス大学オースティン校のNicholas Peppas教授が共同研究していたスマートハイドロゲル（Poly (methacrylic acid) grafted with poly (ethylene glycol) : P (MAA-g-EG)）の発想に、これから研究を始めようとしている筆者は大きな感銘を受けた。消化管内pHに応答した膨潤・収縮挙動を示すこの高分子キャリアは、胃内酸性条件下ではポリマー内部に薬物を保持し、小腸中性条件下で効率的に薬物を放出する。この特性を利用して、特にインスリンのようなペプチド・

*2004年星薬科大学薬学部卒業、2009年同大学大学院薬学研究科博士後期課程修了（薬剤学教室、高山幸三教授）、東京大学大学院薬学系研究科特任研究員（分子薬物動態学教室、杉山雄一教授）、星薬科大学博士研究員（薬剤学教室）、日本赤十字社血漿分画センター技術員を経て、2012年より神戸学院大学薬学部薬物送達システム学研究室講師（レクチャー）（薬物送達システム学研究室、武田真莉子教授）、趣味：テレビでサッカー観戦するのが楽しみ（家族をもってからは徹夜で欧州などのサッカーをなかなか見られないのが残念）、連絡先：〒650-8586 神戸市中央区港島1-1-3
E-mail: noriyasu@pharm.kobegakuin.ac.jp

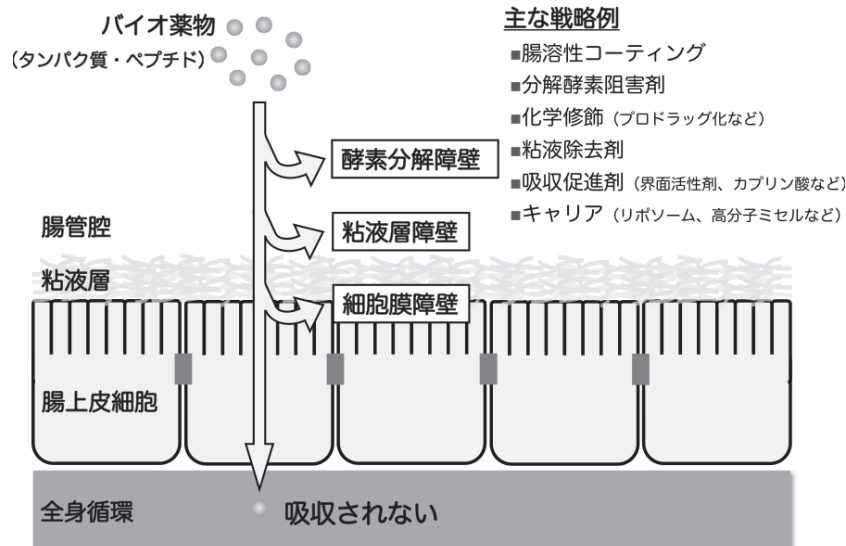


図1 バイオ医薬品の経口吸収に対する種々の障壁

タンパク質性医薬品を飲み薬にしようという発想は、それまで筆者が浅く捉えていた「薬剤学」とは異なるものであった。

学部4年生に進級し、筆者に与えられた研究テーマは「多孔性高分子膜のフラクタル構造と薬物透過性の関連性」というものであった。当時修士課程1年であった柳川史樹博士(現・産業技術総合研究所)によるご指導のもと、自分の手で poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) 多孔性膜を合成し、2-チャンバー型拡散セルを用いた薬物透過実験を行い、走査型電子顕微鏡で膜構造を観察し、そしてその結果を自分なりに考察した気になっていただけでとても楽しかったことを覚えている。また、Fickの拡散式について改めて勉強するなど、今までテストのためだけに勉強してきた理論が初めて研究に結びついたことも新鮮であった。これをきっかけにもっと深く研究に関わってみたいと思い、学部卒業後は星薬科大学大学院修士課程に進学することを決意した。一方で、元々の希望であった病院薬剤師の選択肢をこの時点で捨てる必要もなく、大規模な病院での薬剤師の役割や臨床研究について学んでみたいとも考えていたため、6カ月間の実務実習を含む臨床薬学コースを選択した(所属は薬剤学教室)。

3. 大学院修士課程

かくして薬剤学教室での研究生活をスタートさせ、いよいよ学部生から大学院生へと一段ステージが上がったわけだが、修士課程進学を機に改めてど

のようなことを研究していきたいかを考えてみた。上述のように、教室配属時にはペプチド・タンパク質性医薬品(バイオ医薬品)を飲み薬にするというアイデアが非常に印象的であった。誰だって注射はしたくないし、毎日使う薬であれば飲み薬が使いやすいことは確かである。難解なテーマであるが、注射剤からの開放を目指し患者のQOLやコンプライアンスを第一に考えた研究に関わりたいと思い、インスリンなどのバイオ医薬品の経粘膜吸収改善をメインに研究していた武田(森下)講師(当時)にご指導をいただくことに決めた。

修士課程に進学した2004年4月より「細胞膜透過ペプチドを利用したバイオ医薬品の消化管吸収改善」というテーマのもと、研究を進めていくことになった。メインは動物実験であり、その方法の多く(*in situ* closed loop 吸収実験や Ussing chamber 透過実験など)は、研究生として薬剤学教室に在籍していた青木芳延博士(杏林製薬株式会社)にご教示いただいた。図1に示すように、バイオ医薬品の経口製剤化を実現するためには、投与後の胃や小腸内での安定性や消化管粘膜透過性を向上することが必須である。上述したpH応答性ポリマーの他にも多種多様な高分子もしくは脂質キャリアなどがバイオ薬物の経口送達ツールとして精力的に研究されている。それらキャリア内にバイオ薬物を封入し、吸収部位で効果的に放出したり徐放化させたりと、薬物が消化管内環境から保護されるように製剤設計されている。しかし、キャリアを用いて消化管内におけ

るバイオ薬物の安定性を改善できたとしても、必ずしも封入された薬物なり放出された薬物が効率的に小腸粘膜を透過して血中に吸収されるとは限らない。一方で、消化管粘膜透過性を高める吸収促進剤なども古くから研究されているものの、その多くは上皮細胞膜への傷害性や細胞間隙の開口作用を有するものであるため、安全面を完全に満たすわけではない。そこで、筆者らはバイオ薬物に粘膜透過能を付与し、消化管粘膜つまり上皮細胞層の透過性を安全かつ効率的に向上するためのツールとして、細胞膜透過ペプチド(Cell-Penetrating Peptides: CPPs)に着目した。

CPPsとは、細胞内移行能を有するペプチドの総称であり、塩基性ペプチドや両親媒性ペプチドなどに分類される。代表的なものとして、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1の転写活性化因子由来のTatペプチド、人工的にアルギニンのみから合成されたオリゴアルギニン(R8など)、さらにはショウジョウバエのホメオプロテインであるAntennapedia由来のpenetratinなどが挙げられる。修士課程の間はCPPsのうちオリゴアルギニンに焦点を当て、代表的ペプチド薬物であるインスリンの消化管吸収を改善させることを目的に実験を進めた。特に、オリゴアルギニンをインスリンと物理的に混ぜて小腸内に投与しただけでその吸収性を顕著に増大できること、アルギニン残基数や構成アミノ酸の立体異性がインスリン吸収促進効率に影響すること、さらには、オリゴアルギニンは粘膜傷害性を示さず安全性が高いことなどを明らかにし、CPPsがバイオ医薬品の経口製剤化を可能にするための有用なツールとなる可能性を示すことができた¹⁾。修士課程を修了する時期になると、運良く論文1報もしくは2報分くらいの実験データが蓄積していた。

一方で臨床薬学コースを選択した筆者は、修士課程2年間のうちの6カ月間を実務実習生として慶應義塾大学病院薬剤部で過ごし、病院薬剤師の業務全般を学んだ。臨床研究に関わることはできなかったが、文献セミナーに参加し臨床研究の文献を発表するなど知識を深めることができた。病院実習を終えた頃には、修士課程修了後の進路も決めなければならず、研究者を目指すか病院薬剤師として就職するかを選択に迫られたが、最終的には研究を介して医療に貢献したいという方が優り、博士課程への進学

を決めた。

4. 大学院博士課程

研究の道に進むという意志もようやく固まり、博士課程進学後は一層研究に専念することができた。引き続き武田(森下)准教授(当時)に指導を仰ぎ、修士課程での研究内容をさらに発展させていくことにした。それまではCPPsの中でオリゴアルギニン(R8)のみに焦点を当てインスリン消化管吸収改善を試みていたが、最適な吸収促進効率を有するCPPsを探索するため、各種CPPs併用時の吸収促進効率を*in situ* closed loop実験により比較評価した。その結果(図2)、主要なCPPsのうちpenetratinによる吸収促進効率が最も高く、インスリンのバイオアベイラビリティが最大で35%にまで上昇することを明らかにした²⁾。

一方、新規吸収促進剤としてのCPPsの有用性を確立するためには、その促進メカニズムの解明が必須である。それまで、薬物もしくはキャリアとCPPsを化学的にコンジュゲートする方法が一般的な細胞内薬物送達法であったのに対し、筆者らは両者を物理的混合液として投与するのみで効率的な薬物吸収改善を達成した。コンジュゲートせずに吸収を促進させることが可能であれば、薬理活性部位への影響を懸念する必要がなく、また混ぜて投与するだけという簡便な方法であるため、その利点は極めて大きい。筆者らは物理的混合液を介して吸収改善を達成した要因として、薬物およびCPP間の分子間相互作用が関与しているとの仮説を立て、これについて検証した。表面プラズモン共鳴(SPR)を利用して、等電点の異なる16種のペプチドとR8の分子間相互作用を解析した結果、インスリン、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)およびガストリンのみがR8に対する親和性を示したのに対し、カルシトニンやエキセンディン-4を含むその他の13種のペプチドはR8との相互作用を示さなかった。さらに分子間相互作用の認められたインスリン、GLP-1およびガストリンの吸収のみがR8の併用により促進されたことから、分子間相互作用と吸収促進作用の関連を示すことができた³⁾。また、東京大学大学院の杉山雄一教授(当時)からご助言をいただき、インスリンとR8間の相互作用について詳細に解析した結果、1分子のインスリンの消化管吸収を促進させるためには

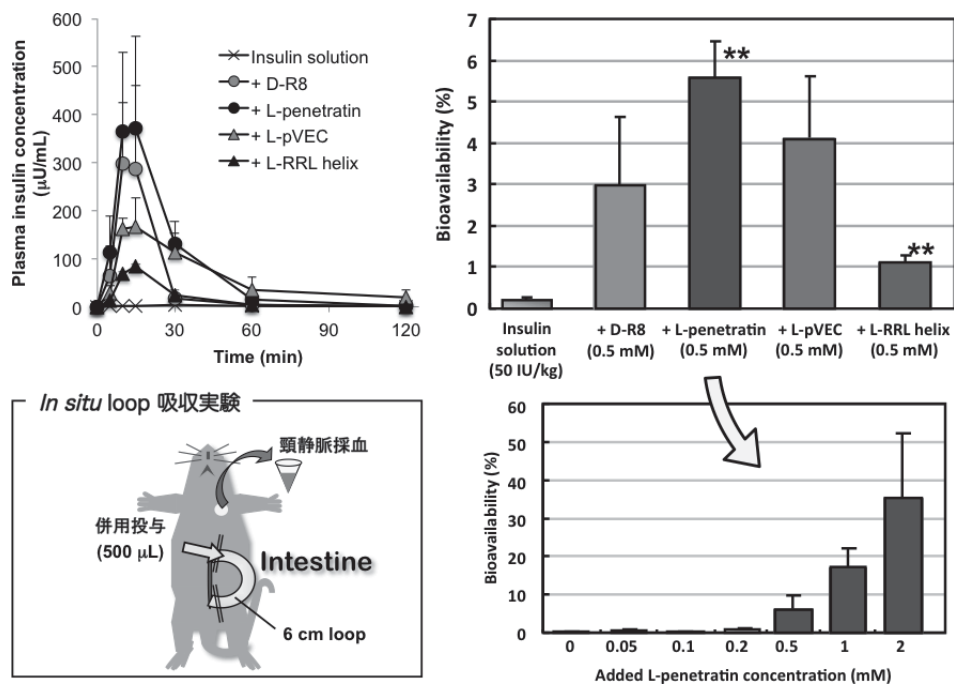


図2 種々の細胞膜透過ペプチドによるインスリン消化管吸収促進作用

2分子以上のR8が結合する必要があることを明らかにした³⁾。

博士課程の後半では、理化学研究所分子イメージング科学研究センター（現・ライフサイエンス技術基盤研究センター）との共同研究にも関与させていただいた。ここでは、渡辺恭良センター長をはじめとする医学、合成化学、放射化学などの様々な分野の先生方にご指導をいただき、CPPs併用投与を介したインスリン消化管吸収促進作用の*in vivo* PETイメージングにも成功することができた⁴⁾。最新の研究装置に触れることができたことも、貴重な経験となった。

大学院での研究を振り返ると、当然、試行錯誤の連続であった。うまくいった実験（つまり論文を出すまでに至った実験）はごく一部であり、大半の実験は実験をするための実験（予備検討）であったし、期待通りの結果が得られなかった実験の方がはるかに多かった。例えば、上述の薬物-CPP間相互作用を解析する際、その測定法を確立するまでに1年以上苦戦が続いた。結合型濃度と非結合型濃度を感度良く分離する必要がある、開始当初は限外ろ過法や平衡透析法を利用して検討を進めていた。しかし、対象がペプチドやタンパク質となるとこれらの方法では測定を妨げる要因が多く、詳細な解析には至らなかった。苦戦の末たどり着いたのが、一方の分子

に結合した他方の分子の結合量をダイレクトに測定することのできる表面プラズモン共鳴（SPR）を利用した手法であり、結合型濃度を感度良く見積もることができた。ついに期待した結合センサーグラムが得られたとき、たまたま近くにいた先輩の1人と立ち上がって喜んだことを覚えている。苦勞して得られた成果であるからこそ、達成感や喜びは大きかった。たくさん論文を書くことももちろん大切であるが、大学院生にとっては試行錯誤した過程を経て実った研究こそ将来の糧となるように思う。

5. ポスドク時代および日本赤十字社 血漿分画センター

2009年3月に星薬科大学大学院博士課程を修了し学位を取得した後は、東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学教室（杉山教授（当時））に特任研究員として在籍させていただいた。トランスポーターに関する研究に従事し薬物動態の考え方を勉強させていただき、加えて新たな研究分野の先生方や学生との出会いは筆者にとって貴重なものであった。その後また、星薬科大学・薬剤学教室（高山教授）において博士研究員として在籍させていただいた際には、大学院時代の研究を続け、オリゴアルギニンによるインスリン吸収促進メカニズムに関する解明研究を進めた。特に、Caco-2細胞を用いた*in*

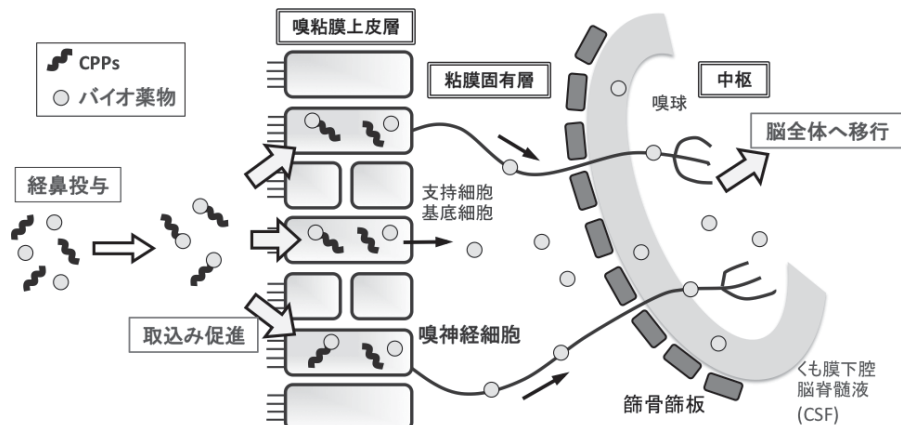


図3 細胞膜透過ペプチドを利用した経鼻投与型バイオ薬物脳内デリバリー

in vitro 評価に基づき、オリゴアルギニンがエネルギー非依存性経路を介してインスリンの消化管上皮細胞の透過性を促進していることを明らかにした⁵⁾。

東京大学と星薬科大学で計2年のポストク生活を過ごした頃には年齢も30代間近になっていたので、そろそろ流動的なポジションではなく安定した研究の仕事に就こうと考え、ポストク終了後の2011年4月に日本赤十字社血漿分画センター（現・血液製剤機構）に入社した。技術開発部という部署に配属となり、そこでは三浦裕也技術開発部長によるご指導のもと血漿タンパク質（特に血液凝固因子およびその補因子）の新たな分離精製技術の開発や体内動態特性評価に従事した。研究に加えて、実際の製造ラインにも関わることができ、さらには患者のニーズをダイレクトに聞くことができたので、製造プロセスの改善点や求められる製剤開発など、目的意識をより明確にして研究する重要性を再認識させられた。

6. 神戸学院大学薬学部に着任して

日本赤十字社血漿分画センターでは正社員としての雇用であったため、入社時には永く勤めようと考えていた。そのような中、星薬科大学から神戸学院大学に教授として移られることが決まっていた武田（森下）准教授（当時）に再びアカデミアの世界に誘っていただき、2012年4月より武田（森下）教授の主宰する神戸学院大学薬学部・薬物送達システム学研究室の講師（レクチャラー）として教育・研究を開始した。

神戸学院大学着任後は、上述のCPPsを用いて鼻腔から脳へとバイオ医薬品を送達する試みに着手し

ている。鼻粘膜上皮中の嗅神経が、篩骨篩板を通過し脳の先端部位である嗅球へと通じていることが古くから知られている。この嗅神経の軸索もしくはその周囲腔を介して薬物が脳内へと直接移行することから、血液脳関門を介さず薬物を効率的に脳へと送達する有効なルートとして注目されている（図3）。投与が非侵襲的であることに加え、全身血中における薬物の不必要な濃度上昇を伴わないことも大きな利点である。従って、経鼻投与は極めて魅力的な脳への薬物送達手法であると期待されるが、分子量の大きいバイオ薬物の場合には鼻腔から脳への移行効率が低下するため、その利点を最大限に活用することが難しい。そこで筆者らは、CPPsの細胞内移行能を利用して効率的に鼻粘膜上皮細胞もしくは嗅神経細胞にバイオ薬物を取り込ませ、その結果効率的な脳移行を可能にすることを試みている。本研究の結果については、今後の成果報告に期待していただきたい。

6年制となった現在の薬学部教育において、特に私立大学では学生の研究意欲を高めるのはなかなか難しい。今年度で研究室が立ち上がって3年目となり、試行錯誤してきた結果もあって、以前よりは研究室らしくなってきたように感じられるが、筆者が学生だった頃のように学生全員（当時は大学院生であったが）が切磋琢磨して研究を進めるといった文化を構築するにはもう少し時間がかかりそうである。思えば、筆者が大学院生として研究をしていた頃には、その楽しさを教えてくれた先輩が何人もいた。修士課程に入りたての頃にポストクとして在籍していた中村宏司博士（現・テルモ株式会社）や、いつも相談にのってくださった大貫助教（現・薬理学教

室講師), 1 学年上の身近なお手本であった山縣哲雄博士 (現・Merck KGaA) の存在は筆者にとって貴重であった。薬物送達システム学研究室には4~6年生の3学年がやっと揃ったばかりであり, 彼らにとって同じ目線で研究の面白さを一緒に体験してくれる大学院生のような存在がない。筆者自身が研究の面白さや意義を学生に最大限伝えることにより, 昨今求められている研究マインドをもった薬剤師を一人でも多く育成・輩出したいと考えている。

7. おわりに

本稿で紹介したように, 筆者はこれまで「バイオ薬物の経粘膜デリバリー」をメインに研究を進めてきた。星薬科大学薬剤学教室に配属されなければこの研究テーマに出会わなかったであろうし, 研究の道を志すこともなかったかもしれない。これが偶然なのか必然なのかはわからないが, 筆者にとって人生最大の岐路であったと実感する。学生にとっては, 一見興味ないものの中に将来のヒントが隠れているかもしれないのだから, 可能性を狭めず多くの経験をしてほしい。もしそれが研究であるとしたら, 喜んでその面白さを伝えていきたい。

今回改めて10年間を振り返り, 多くの先生方や先輩方にお世話になってきたことを再確認すること

ができた。現在に至るまでご指導いただいたすべての方々にここで深く謝意を表すとともに, 今後も精力的に薬剤学研究を進めることで恩返しをしたいと考えている。

引用文献

- 1) M. Morishita, N. Kamei, J. Ehara, K. Isowa, K. Takayama, A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin, *J. Control. Release*, **118**, 177–184 (2007).
- 2) N. Kamei, M. Morishita, Y. Eda, N. Ida, R. Nishio, K. Takayama, Usefulness of cell-penetrating peptides to improve the intestinal insulin absorption, *J. Control. Release*, **132**, 21–25 (2008).
- 3) N. Kamei, M. Morishita, K. Takayama, Importance of intermolecular interaction on the improvement of intestinal therapeutic peptide/protein absorption using cell-penetrating peptides, *J. Control. Release*, **136**, 179–186 (2009).
- 4) N. Kamei, M. Morishita, Y. Kanayama, K. Hasegawa, M. Nishimura, E. Hayashinaka, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Takayama, Molecular imaging analysis of intestinal insulin absorption boosted by cell-penetrating peptides by using positron emission tomography, *J. Control. Release*, **146**, 16–22 (2010).
- 5) N. Kamei, Y. Onuki, K. Takayama, M. Takeda-Morishita, Mechanistic study of the uptake/permeation of cell-penetrating peptides across a Caco-2 monolayer and their stimulatory effect on epithelial insulin transport, *J. Pharm. Sci.*, **102**, 3998–4008 (2013).