2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

学　校　名	**東　京　薬　科　大　学**	研究所名等	
研 究 課 題	ヒト生体模倣血液脳関門モデルによる新たな薬物脳送達技術開発　－ニューモダリティ時代における脳疾患治療の革新を目指して－	研 究 分 野	医　　学
キーワード	①生体模倣システム　②血液脳関門　③ドラッグデリバリーシステム　④脳疾患　⑤ヒト予測 ⑥創薬基盤技術　⑦ニューモダリティ		

○研究代表者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
降　幡　知　巳	東京薬科大学 薬学部・ 創薬基盤科学教室	教　　授	研究代表者　総括 データ統合解析、論文作成、知財出願

○研究分担者

氏　　名	所　　属	職　　名	役　割　分　担
林　　良　　雄	東京薬科大学 生命科学部・ 創薬化学研究室	教　　授	研究分担者 ペプチドデザインと有機化学実験
森　尾　花　恵	東京薬科大学 薬学部・ 個別化薬物治療学教室	助　　教	研究分担者 脳移行性評価実験 データ整理
伊　藤　慎　悟	熊本大学大学院 生命科学研究部 （薬学系）微生物	准　教　授	研究分担者 DDSデザインとin vivo実験

ヒト生体模倣血液脳関門モデルによる新たな薬物脳送達技術開発
－ニューモダリティ時代における脳疾患治療の革新を目指して－

1. 研究の目的

脳疾患に対する治療薬開発は非常に困難である。この主要因の一つは、脳には脳毛細血管内皮細胞（Brain Microvascular Endothelial Cells, BMEC）を実体とする血液脳関門（Blood-Brain Barrier, BBB）が存在し、ニューモダリティを含め様々な薬物の脳移行を制限しているためである。そのため、薬物を脳に届ける薬物脳送達技術（脳ドラッグデリバリーシステム、脳DDS）が必要とされている。

脳DDSキャリアには、トランスサイトーシスによりBBBを透過する抗体・核酸・ペプチド・ウイルスなどの中／高分子が用いられる。このような脳DDSキャリアの開発を促進するには、効率的・的確に脳DDSキャリアのヒト脳移行性を検証できる評価系が、さらにはこれを組み込んだ新たな創薬体系を立ち上げる必要がある。 そこで本研究は、ヒト生体模倣システムを導入したBBBモデルを開発し、それを用いた新たな脳DDSキャリア開発体系の確立を目的とする。なお、生体模倣システムは生体環境を再現することで細胞本来の機能を最大限引き出す最先端細胞培養法であり、細胞を用いた試験結果のヒト予測性を大きく向上させると期待されている。

2. 研究の計画

本研究では目的達成に向け、以下２つの目標を設定した：（１）ヒト生体模倣 BBB モデルを用いた脳 DDS キャリア評価系の確立、（２）本評価系を活用した新たな脳 DDS キャリアの創成の実証、である。2025 年度では主に（１）に取り組み、さらに（１）の成果を用いて（２）に向けた取り組みを実施した。

（１）ヒト生体模倣BBBモデルの開発とその評価能の実証

ヒト生体模倣システムを導入したBBBモデルとして、研究代表者は独自のヒト不死化BBB細胞を用いた階層スフェロイド型BBBモデル（human multicellular spheroidal-BBBモデル、hMCS-BBBモデル）の開発を進めてきた。そこで本研究においては、脳移行性抗体に対する本モデルの評価能およびその結果の生体外挿性を検証した。ヒト不死化BBB細胞の培養およびhMCS-BBBモデルの構築は、既報（Kitamura et al. Mol Pharmaceut 2022;19(8):2754-2764）に基づき行った。対象とする抗体は、サル*in vivo*脳移行性が明らかな４種の抗ヒトトランスフェリン受容体抗体（hTfRMab1-4）を用い、陰性対照として正常IgGを用いた。また、これら抗体のBBB透過がTfRに依存していることを検証するため、CRISPR/Cas9システムを用いてTfR欠損BMECを作製し、hMCS-BBBモデルを構築した。さらに、異なるタンパク質を標的とする脳移行性ペプチド融合抗HER2抗体も評価対象とした。これに対する陰性対照は抗HER2抗体とした。これら抗体は蛍光色素で標識した。BBB透過性試験では、スフェロイドと抗体を２時間反応させた後、スフェロイド内部に移行した抗体由来の蛍光を検出した。脳移行性は37℃および4℃条件下における蛍光強度の比で算出した。

（２）新たな脳DDSキャリアの創出の実証

新たな脳DDSキャリアのモダリティとして、環状ペプチドに着目した。まず、未発表の脳移行性環状ペプチドを基に、そのアミノ酸配列を改変したペプチドを合成することで、さらに脳移行性を高めた環状ペプチドの開発に取り組んだ。知財出願の予定があるため、具体的な配列情報は記載できないが、特定アミノ酸のアラニンへの変換やＤ体への変換等の手法を用いた。合成したペプチドはFAMを用いて蛍光標識し、精製した。その後、抗体と同様の方法を用いてBBB透過性を評価した。

3. 研究の成果

（１）ヒト生体模倣BBBモデルの開発とその評価能の実証

hMCS-BBBモデルのhTfRMAbに対するBBB透過性評価能を明らかとするため、TfRへの親和性が異なる4種 hTfRMAb（hTfRMAb-1、-2、-3、-4)および陰性対照としてコントロールIgGを用いて透過性試験を実施した。その結果、3種（hTfRMAb-1、-3、-4）のBBB透過活性は、それぞれ3.4±0.2、2.6±0.3、3.7±0.3倍であり、明らかなBBB透過性が認められた。一方、hTfRMAb-2のBBB透過活性はコントロールIgGの値と同程度であった(それぞれ1.4±0.2倍、1.2±0.2倍)。

次に、hTfRMAbのBBB透過におけるTfRの役割を明らかにするため、TfR欠損BMECを用いたhMCS-BBBモデルを構築し、同様の透過性試験を実施した。その結果、TfR欠損hMCS-BBBモデルにおけるhTfRMAb-1、-3、-4のBBB透過活性は消失し、hTfRMAb-2およびコントロールIgGで観察された値と同程度となった(IgG、hTfRMAb-1、-2、-3、-4について、それぞれ1.0±0.1、1.2±0.1、0.9±0.1、0.8±0.1、1.2±0.2倍)。したがって、hTfRMAb-1、-3および-4のBBB透過活性はTfRに依存したトランスサイトーシス経路を介するものと考えられた。

上記のとおり４種hTfRMAbのBBB透過性に違いが認められたことから、続いてサル*in vivo*データとの照合(*in vitro-in vivo* correlation, IVIVC) を行った。その結果、*in vitro*実験結果は、*in vivo*実験より得られた知見と良好な相関を示すことが明らかとなった。すなわち、*in vivo*サル試験において、hTfRMAb-1、-3、-4の静脈内投与後の脳内濃度はhTfRMAb-2と比較して有意に高い値を示し、また、免疫組織化学染色においても同様の結果が認められた。これら結果は*in vitro*実験より得られた結果（hTfRMAb-1、-3、-4はBBB透過性であるのに対し、hTfRMAb-2は非透過性）であることとよく一致している。

hTfRMAb間でのBBB透過性の違いは、BMECにおけるエンドサイトーシス、細胞内小胞輸送、エキソサイトーシスのいずれかの段階における違いに起因する可能性がある。これまでに、BBB透過性のhTfRMAbは、非BBB透過性hTfRMAbと比べ、エンドサイトーシス後にリソソームを介した分解経路を回避しやすいことが知られている。そこで、hMCS-BBBモデルを用い、hTfRMAb-1またはhTfRMAb-2とリソソームとの共局在解析を実施した。その結果、BBB非透過性のhTfRMAb-2ではリソソームとの共局在が多く観察されたのに対し、BBB透過性のhTfRMAb-1では少なかった。これらを定量的に解析した結果、hTfRMAb-1のリソソーム共局在率(37.4±2.7%; Pearson’s correlation coefficient (R) = 0.32±0.01) は、hTfRMAb-2 (63.8±4.3%; R=0.45±0.01) よりも有意に低いことが明らかになった。したがって、hTfRMAb-1はリソソーム分解経路を回避する傾向にあり、これが効率的な脳移行を示す一因となっている可能性があると考えられた。

以上の知見を総合すると、hMCS-BBBモデルはhTfRMAbのTfRを介したBBB透過性の違いを識別することができること、さらにその評価結果は*in vivo*における脳移行性を反映し得ることが明らかとなった。さらに、hTfRMabのBBB透過過程には、リソソームへの移行を回避する経路が関与すると考えられた。

本内容について、論文としてまとめ年度内に受理された。また、同時にプレスリリースも行い、日刊工業新聞オンライン版など複数のメディアで紹介された。

次に、脳移行性ペプチド融合抗HER2抗体を対象として同様にBBB透過阻害試験を行った。その結果、脳移行性ペプチド融合抗HER2抗体のBBB透過活性は2.0±0.3であり、抗HER2抗体(1.2±0.1)と比較して高い値を示した。本結果は、脳移行性ペプチド融合抗HER2抗体がトランスサイトーシス経路を介してBBBを透過することを示しており、hTfRMab以外の抗体についても、hMCS-BBBモデルがその脳移行性評価に有用であると考えられる。さらに、脳移行性ペプチド融合抗HER2抗体のBBB透過における時間および濃度依存性を解析した。時間依存性解析の結果、本抗体の取り込みは、40分まで直線性が認められることが明らかとなった。続いて、このBBB透過時間で濃度依存性解析を行った結果、本抗体の取り込みには低濃度域から明瞭な飽和性が認められた。したがって、脳移行性ペプチド融合抗HER2抗体のBBB透過は高親和性の能動輸送経路が関与すると考えられた。

本内容については、日本薬剤学会学術年会にて発表を行った。現在論文としてまとめているところであり、2026年度中の投稿を予定している。

（２）ペプチド型脳DDSキャリアの同定

（１）の結果により、hMCS-BBBモデルが脳移行性抗体の評価系として有用であることが明らかとなったことから、本評価系を用いて、新たな脳DDSキャリアの創出に取り組んだ。対象として、環状ペプチドに着目し、既知の脳移行性ペプチドとは配列の異なる7種の新たな環状ペプチドを合成した。また、この対照として線状化したペプチドも合成した。hMCS-BBBモデルを用いてこれらのBBB透過性を解析したところ、複数の環状ペプチドにおいて、基準とする環状ペプチドよりも高い脳移行性が認められた。一方、線状化したペプチドでは脳移行性はほとんど認められなかった。したがって、これらBBB透過活性を持つ環状ペプチドは、新たな脳移行性DDSキャリアとなる可能性がある。現在、本ペプチドの抗体融合体を作成しており、これを用いたBBB透過性試験を実施予定である。また、本ペプチドの更なる改変体を合成し、より優れた活性を持つペプチドの同定も試みる予定である。

4. 研究の反省・考察

2025 年度の研究では、目標とした（１）評価系の確立について論文発表を行うまでに至り、本目標については概ね目標を達成できたと考えている。hMCS-BBB モデルを用いた脳 DDS キャリア開発体系が確立し、広く創薬研究に用いられるようになれば、ヒトに投与する前に、脳 DDS キャリアがヒト脳に届くか的確に評価・予測することができるようになると期待される。これにより、開発早期の Go/No-go の意思決定や臨床試験における成功率の向上につながると期待され、ひいては画期的な治療につながる脳 DDS キャリアの創出が期待される。

一方、目標（２）新たな脳 DDS キャリア開発については、新たな脳移行性ペプチドシーズを見出し、現在、アプタマーについても同様に検討を進めている。しかしながら、いずれも脳 DDS キャリアとしての有用性を実証するまでに至らなかった。アミノ酸改変を Step-by-step で実施したことや、探索に試行錯誤を要したこと、シーズ候補であったもう一つのペプチドの合成がうまく進まなかったことなど、複数の要因が考えられる。しかしながら、見出した分子はいずれも新規配列やユニークな BBB 透過特性を有しており、知財出願を検討するに足る成果であると考えられる。これらは新たな脳 DDS キャリア開発における前向きな知見であり、2026 年度以降、引き続き精力的に開発を進めていきたい。

5. 研究発表

(1)学会誌等

Ohki S, Fukatsu T, Morimoto H, Kinoshita M, Imakiire A, Yamamoto R, Morio H, Sonoda H, Furihata T. Translational applicability of human blood-brain barrier spheroid models for the development of brain-penetrant therapeutic antibodies. Fluids Barriers CNS. 2026;23(1):30.

(2)口頭発表

① 大木 聖矢、深津 智樹、森尾 花恵、薗田 啓之、降幡 知巳. 階層スフェロイド型ヒト血液脳関門モデルは*in vivo*外挿性ある脳移行性抗体の評価が可能である. 日本薬物動態学会第40回年会（2025年10月20日、京都）
② 降幡 知巳. ヒト生体模倣血液脳関門モデルの開発とその脳疾患治療薬開発研究への実装に向けた取り組み. 第15回CSJ化学フェスタ2025（2025年10月24日、東京）
③ 降幡 知巳. ヒト生体模倣血液脳関門モデルを用いた脳移行性抗体評価法の開発. 日本薬学会第146年会（2026年3月26日、大阪）