

<平成26年度助成>

## アルツハイマー病治療に有用な脳移行性クルクミン含有脂質 ナノカプセルの開発技術に関する基盤研究

田上 辰 秋

(名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物送達学分野)

### 1. はじめに

超高齢化社会の到来に伴い、今後日本を含む先進国諸国において、アルツハイマー病を含むメンタルヘルス関連疾患の患者数の増加が予想されている。現在アルツハイマー病に対する根本的治療は存在しないことから、アルツハイマー病のメカニズムの解明および治療・予防方法について、活発に研究が行われている。

ウコンの抽出成分であるクルクミンは健康食品として広く知られている。クルクミンは、抗炎症作用・抗酸化作用に基づく様々な薬理活性を有する化合物としても知られており<sup>1)</sup>、炎症性疾患のみならず、がん・心臓病・脳疾患に対して治療効果が報告されている。クルクミンは、アルツハイマー病に対しても有効であるとの研究報告がある<sup>2)</sup>。クルクミンは有用な性質を示す化合物として、数多くの顕著な薬理効果が *in vitro* 条件において報告されている一方で、*in vivo* および実際の患者に対して、顕著な治療効果を示している報告は、ほとんどない。この原因として、クルクミンの体内動態の問題が挙げられる。クルクミンは消化管吸収が著しく低く<sup>3)</sup>、さらにアルツハイマー病のように脳に薬物を送達する場合、脳を外部から保護する血液脳関門が存在するため、脳内に効果的に送達する手段がまだ存在していないのが課題として挙げられる。

リポソームは、リン脂質二重膜から構成された小胞である<sup>4)</sup>(図1)。リン脂質は、細胞二重膜の構成成分であるため、リポソームは生体適合性の

面で優れている。リポソーム内水相には水溶性の化合物をリン脂質膜には脂溶性の化合物を封入することができるため、リポソームは、いわゆる脂質ナノカプセルとすることができる。さらにリポソーム表面には、化学修飾が可能である。特定の細胞や組織に集積するように、リガンドを結合させる工夫がなされている。また、血中にリポソームが投与された後も、リポソームが異物認識されないように、ポリエチレングリコール(PEG)でリポソームを被覆する工夫がなされている<sup>5)</sup>。

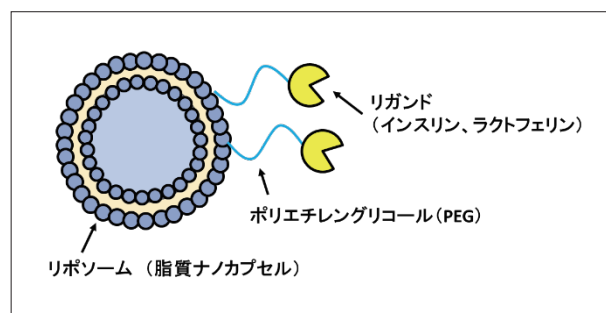


図1. リポソームの模式図

以上の背景より、本研究は脳組織にクルクミンを効率的に送達するためのリポソーム技術に関する基礎的検討を行った。血液脳関門には様々な受容体が発現していることから、それらのリガンドをリポソーム表面に化学修飾することにより、脳組織移行率が向上するのではないかと考えた。今回は、ポリペプチドであるインスリン、ラクトフェリンをリガンドとしてリポソームに修飾し、基礎的な検討を行った。

### 2. 方 法

リポソームの作成：リポソームは、薄膜水和法

により調製を行った。まず、リン脂質(DSPC/Cholesterol)を有機溶媒に溶解し、ガラス試験管内で脂質溶液を蒸発させることにより、脂質薄膜フィルムを調製した。次に等張付近濃度のクエン酸を加え、振とうすることにより、リポソームを調製した。その後、エクストリューダーを用いることにより、リポソームの粒子径を100 nm程度に調整した。次に、透析カセットを用いてリポソーム溶液を透析し、リポソーム外水相をHEPES緩衝液で置換した。次にクルクミン包接官能基導入シクロデキストリンを添加し、インキュベーションを行うことにより、クルクミンをリポソームに導入した。リポソーム膜表面に修飾されるPEG脂質とポリペプチドを結合させるために、DSPE-PEG-NHSによるアミド結合を介した修飾によりリガンド修飾を行った。

**リポソームの生体内分布の評価：**マウスに、トリチウムラベルしたリポソームを投与した。その24時間後、マウスを安楽死させ、各臓器を摘出した。臓器を細切もしくはホモジナイスした後、液体シンチレーションカウンターで測定を行った。

### 3. 結果・考察

まず、はじめに、クルクミンをリポソーム内に効率的に含有させるための封入技術の検討を行った。リポソーム内に薬物を封入する場合、クルクミンは難水溶性薬物であるため、通常はリポソームの膜の部分に含有させる方法をとる。この場合、リポソームに含有される薬物含有量は制限される。リポソームに含有させる薬物量を改善するため、筆者は、シクロデキストリンという環状オリゴ糖のなかにクルクミンを包接し、その後、リポソームの内水相に移行させる方法を用いた(図2)。この方法を用いることにより、クルクミンをリポソーム内部に高含量で封入できることを見出した。次に、リポソームに修飾されたインスリンおよびラクトフェリン量をタンパク定量法

により定量し、リポソーム表面にインスリンおよびラクトフェリンが修飾されていることを確認した。

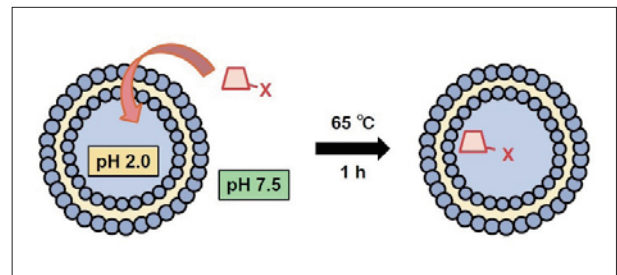


図2. クルクミン包接CDを用いたリポソーム封入法

インスリン修飾リポソームおよびラクトフェリン修飾リポソームの生体内分布については、インスリン修飾およびラクトフェリン修飾リポソームを放射性物質であるトリチウムでラベルし、トリチウムラベルしたリポソームをマウスに投与し、24時間後のマウスの生体内分布および脳内移行量について比較検討を行った(図3)。その結果、投与されたりポソームの多くは、肝臓および脾臓に蓄積していることがわかった。これは、マクロファージをはじめとする貪食細胞によりリポソームが非特異的に貪食されたことによるものであると推察される。また、インスリン修飾リポソームおよびラクトフェリン修飾リポソームの方がそれらを修飾していない単なるPEG修飾リポソームよりも多く肝臓や脾臓に蓄積していた。これは、それらのタンパクに対する受容体がそれらの部位に発現しており、各臓器に蓄積したのではないかと考察される。脳への移行量を測定した結果、PEG

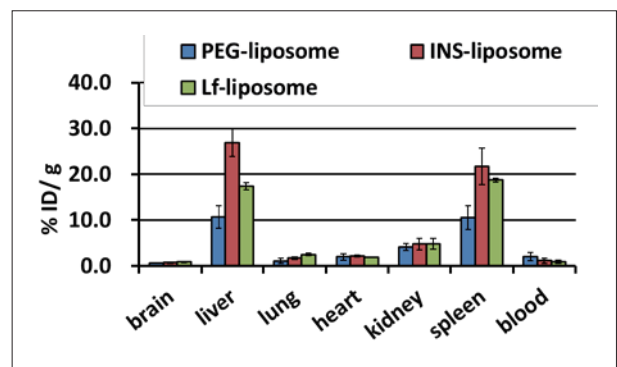


図3. インスリン修飾リポソームおよびラクトフェリン修飾リポソームの生体内分布

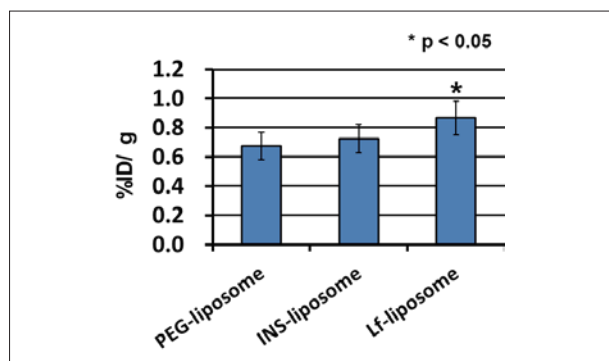


図4. インスリン修飾リポソームおよびラクトフェリン修飾リポソームの脳移行量

修飾リポソームよりもインスリン修飾リポソームの方がわずかに蓄積している傾向を示し、さらにラクトフェリン修飾リポソームは、PEG修飾リポソームよりも有意に脳組織に蓄積しているという結果が得られた(図4)。血液脳関門にもそれらの受容体が発現しているため、脳内により多く蓄積する可能性が示唆された。他の研究者によってもラクトフェリン修飾ナノ粒子の報告がなされている<sup>6,7)</sup>。それらの報告は、今回得られた結果を裏づけていると言える。

#### 4. 結 論

今回、クルクミンを大量に包含するリポソームとして、クルクミン包接シクロデキストリンを利用したリポソームの調製を行った。今後さらなる検討が必要であるが、リポソーム内への封入率を高める技術として本研究は有用な知見であると言える。この手法はクルクミン以外の化合物にも応用できるため、応用性が高い方法になると考えられる。

また、ラクトフェリン修飾リポソームは、ラクトフェリンを修飾していないPEG修飾リポソームよりも多く脳内に移行していることが明らかとなった。これらの知見は、将来アルツハイマー病だけでなく、他の神経疾患に対するドラッグデリバリーシステムの開発において有用であると考えられる。

今後は、加齢マウスを使用し、検討を重ねていく予定である。加齢もしくはアルツハイマー病を発症した患者において、各受容体が健常に発現しているか否かの問題もあるため、加齢および疾患動物モデルの影響が今回提案したドラッグデリバリーシステムにどのように影響を与えるか検討する必要があると思われる。

#### 謝 辞

最後になりましたが、本研究計画遂行について助成をして頂きました、公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に深く感謝を申し上げます。また、本研究の遂行にあたり協力いただいた、大学院生の太根将史くんに深く感謝を申し上げます。

#### 文 献

- 1) Menon VP, Sudheer AR (2007) Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* **595**, 105-125.
- 2) Chin D, Huebbe P, Pallauf K, Rimbach G (2013) Neuroprotective properties of curcumin in Alzheimer's disease--merits and limitations. *Curr Med Chem* **20**, 3955-3985.
- 3) Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Newman, R.A., Aggarwal, B.B., 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* **4**, 807-818.
- 4) Safinya CR, Ewert KK (2012) Materials chemistry: Liposomes derived from molecular vases. *Nature*, **489**, 372-374.
- 5) Barenholz Y (2012) Doxil(R)-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **160** (2):117-134.
- 6) Pang Z, Feng L, Hua R, Chen J, Gao H, Pan S, Jiang X, Zhang P (2010) Lactoferrin-conjugated biodegradable polymersome holding doxorubicin and tetrandrine for chemotherapy of glioma rats. *Molecular pharmaceutics* **7** (6):1995-2005.
- 7) Yu Y, Pang Z, Lu W, Yin Q, Gao H, Jiang X (2012) Self-assembled polymersomes conjugated with lactoferrin as novel drug carrier for brain delivery. *Pharmaceutical research* **29** (1):83-96.

## Development of curcumin-loaded lipid nano-capsules against brain tissues for Alzheimer's disease

**Tatsuaki Tagami**

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences  
Nagoya City University*

The number of patients suffered from Alzheimer's disease is increasing in developed countries by the arrival of super aging society. The elucidation of mechanism and the effective treatment are studying now. It is reported that curcumin, which is an extract from turmeric has many kinds of pharmacological effect derived from anti-oxidant and anti-inflammatory effect. According to articles, curcumin is effective against inflammatory bowel diseases, cancers, heart diseases and mental health diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's diseases. While curcumin has pharmacological effects in vitro, this compound does not show therapeutics effect in vivo and in clinical. The major reason is that the absorption of curcumin is poor and it is unstable in serum. If Alzheimer's disease is treated with curcumin, the development of delivery system of curcumin against brain tissue is important. In this present study, we tried to develop the efficient technology to incorporate curcumin into liposome by using cyclodextrin. Then polypeptide, insulin and lactoferrin was conjugated with the surface of liposome to deliver the liposome in brain tissue. The biodistribution of insulin- and lactoferrin-conjugated PEGylated liposome was investigated by using mice. Additionally, the accumulation of these liposomes in brain tissue was also investigated. We found that lactoferrin-conjugated PEGylated liposome was remarkably accumulated in brain tissue compared with PEGylated liposome. These results suggest that lactoferrin-conjugated PEGylated liposome has possibility to deliver the curcumin against brain tissue, although further study is necessary.