

論文の内容の要旨

氏名：藏 野 匠

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：*N*-アセチル-L-システインの経鼻投与に細胞透過性ペプチド修飾ナノキャリアを併用した鼻から脊髄への薬物送達に関する研究

【背景および目的】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの選択的な変性により筋力低下をきたし、呼吸筋麻痺のため死に至る神経変性疾患である。このうち家族性 ALS の一部は、銅/亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ（SOD1）遺伝子の変異を伴うことが知られている。この変異型 SOD1 を過剰発現させたマウス（G93A マウス）は ALS 様症状を示すことから、ALS 研究に汎用されている。水溶性化合物である *N*-アセチル-L-システイン（NAC）は、抗酸化作用を有する。そのため、NAC は変異型 SOD1 を導入したヒト神経芽細胞腫で生じる活性酸素種の増加を低減させることから、ALS の有望な候補薬になりえる。しかしながら、G93A マウスに対して NAC を皮下投与しても、その生存期間を延長させるほどの効果は得られない。この理由として、NAC のような水溶性化合物は、血液脳関門（BBB）や血液脳脊髄液関門により循環血液中から脳や脊髄への薬物移行が制限されるからである。実際、健常マウスに NAC を静脈内投与しても脳や脊髄には移行しない。そのため、ALS の病変部位である脊髄に NAC を送達できれば、ALS に対する有効な薬物治療になることが期待できる。

経鼻投与には、BBB を回避して鼻から脳へ薬物を直接移行可能な経路が存在する。鼻から脳への効率的な薬物送達戦略の 1 つとして、経鼻投与にナノキャリアを利用する研究が行われている。代表的なナノキャリアであるリポソームは、脂質二重層を持つ球形の小胞であり、その表面特性を自由に改変可能である。また、生分解性および生体適合性ポリマーを利用したナノキャリアである高分子ミセルは、細胞透過性ペプチド（cell-penetrating peptide: CPP）を修飾することで鼻粘膜上皮細胞の透過が可能である。これらナノキャリアを利用した研究は、アルツハイマー病やパーキンソン病のような脳を標的とした中枢神経系疾患に対する治療効果を検討したものが多く、脊髄への薬物送達を目的としたナノキャリアや脊髄疾患治療を標的とした薬物送達に関する研究は極めて少ない。

本研究では、鼻から脊髄への薬物送達に適したナノキャリアの表面特性を探索することから、NAC にナノキャリアを併用した経鼻投与が ALS の病勢進展に対して抑制を示す有用な薬物送達法になるかを明らかにすることを目的とした。

1. 鼻から脊髄への薬物送達に適したナノキャリアの表面特性の探索

ナノキャリアを利用した経鼻投与において、鼻から脊髄への効率的な送達はナノキャリアの特性に依存すると考えられるが、どのような表面特性を持つナノキャリアがその送達に適しているか明らかではない。そこで、リポソームをモデルキャリアとして用いて、表面電荷やポリエチレングリコール（PEG）修飾が鼻から脊髄へのナノキャリアの分布に及ぼす影響を評価した。

【方法】

リポソームは常法に従い、薄膜水和法により調製した。PEG 脂質を含む中性脂質 DOPC とコレステロールを基本構成とし、蛍光色素 ATTO-DOPE を加えた。さらに、正電荷脂質 DOTAP または負電荷脂質 DOPS を加えることで、蛍光標識した PEG 修飾正電荷、中性電荷および負電荷リポソームをそれぞれ調製した。また、同様の方法で蛍光標識した PEG を含まない PEG 未修飾中性電荷リポソームを調製した。リポソームの鼻から脊髄への移行は食道逆挿管鼻腔内投与法を用いて評価した。リポソームを 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 5 分間投与し、投与 120 分後の脳および脊髄について、*ex vivo* イメージングにより観察した。

【結果および考察】

PEG 修飾正電荷リポソームおよび PEG 修飾負電荷リポソーム (PEG-Positive および PEG-Negative) は、脳および脊髄全体にほぼ均一した弱い蛍光が観察された (Fig. 1)。これに対して、PEG 修飾中性電荷リポソーム (PEG-Neutral) は、正および負に帯電したリポソームと比較して脳と脊髄で強い蛍光が広く分布していた。一方、PEG 未修飾中性電荷リポソーム (Non-PEG-Neutral) では、脳前方にのみ強い蛍光の局在が観察された。脊髄における広範囲へのリポソームの分布には、血管周囲腔が関与していると考えられる。血管周囲腔には間質液の流れが存在し、脳脊髄液 (CSF) が絶えず流入しているため、CSF 中で安定なナノキャリアは、間質液においても同様に安定であると推察される。PEG-Neutral は組織との電気的な相互作用を受けず、かつ PEG がその表面を修飾しているためキャリア同士の凝集がなく安定であることから正または負に帯電したリポソームよりも脊髄への拡散に適していることが示唆された。これらのことから、ナノキャリアの電荷を中性電荷にすることに加え、その表面に PEG を修飾することが、脊髄に薬物を効率的に送達するために必要な特性であることが明らかとなった。

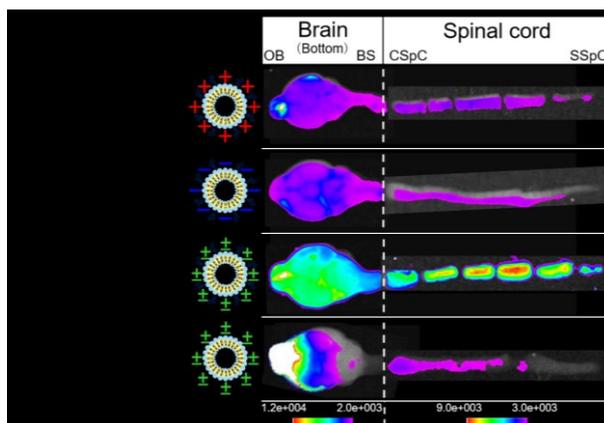


Figure 1. Fluorescence imaging of brain and spinal cord after intranasal administration of fluorescently labeled liposome.

2. NAC にナノキャリアを併用した経鼻投与による鼻から脊髄への薬物送達

リポソームは、NAC のような水溶性化合物を脂質二重層の内水相に取り込むことが可能であるが、一般に薄膜水相法では内水相の体積よりも外水相の体積の方が大きいため、水溶性化合物では低い封入率が懸念される。ポリエチレングリコール-ポリカプロラクトン (PEG-PCL) は、水中で自己会合することにより疎水基 (PCL) 同士が集合し、親水基 (PEG) が外側に配位することで高分子ナノミセルを形成する。CPP の 1 つである Tat は、塩基性アミノ酸であるアルギニンに富む構造を特徴とする。PEG-PCL に Tat を結合した細胞透過性ペプチド修飾ナノキャリア (PEG-PCL-Tat: PPT) は、その表面に水溶性化合物を搭載したまま、鼻から脳へ効率的な送達が可能である。そこで、高分子ナノミセル (PPT) の表面に、NAC を搭載することが可能であるかをその物性から評価した。また、NAC を搭載した PPT の経鼻投与が、ALS の病勢進展に対して抑制を示す有用な薬物送達法になるかを明らかにするため、G93A マウスの生存期間について検討した。

【方法】

NAC 溶液と PPT 溶液を等量混合し、30 分間静置することで、NAC/PPT (重量比 1 : 4) を調製した。高分子ナノミセルの物性は、平均粒子径、多分散指数 (PDI) およびゼータ電位を Zetasizer Ultra により測定した。G93A マウスに、NAC/PPT 溶液または NAC 単独溶液をそれぞれマイクロピペットで 20 μ L (NAC の総投与量として 1 mg) 経鼻投与した。生存期間を評価するために、ALS 発症直後である 105 日齢から薬物の投与を開始し、エンドポイントまで繰り返し (平日 5 日間) 投与した。エンドポイントは G93A マウスを横に倒したときに 30 秒以内に起き上がることができない場合と定義し、エンドポイントに到達するまでの日数を記録した。生存期間中央値は、G93A マウスが 50%死亡するまでの期間であり、 Kaplan-Meier 法による生存曲線から算出した。生存曲線の比較は、ログランク検定を用いて行った。その差が $p < 0.05$ の場合には統計的に有意であると判断した。

【結果および考察】

NAC/PPT のゼータ電位は、PPT と比較して有意に減少した (Table 1)。このことは、正電荷の Tat と負電荷の NAC の間で生じた静電的相互作用により、NAC の一部が PPT の表面に搭載されたこと、および電荷が中和されたことに起因するものと示唆された。一般に、ナノキャリアはゼータ電位の絶対値が 10 mV 以内では中性電荷、10 mV を超えると正または負電荷であるとみなすことができる。このことから、PPT は正電荷を示し、NAC を搭載した PPT (NAC/PPT) は中性電荷を示すことが明らかとなった。NAC/PPT の平均粒子径および PDI 値は、PPT と比較して有意な変化は認められなかった。したがって、NAC/PPT は表面特性として中性電荷と PEG 修飾の両者を有することから、鼻から脊髄への NAC の送達を促進する可能性が示唆された。

Table 1. Particle diameter, PDI, and zeta potential of PPT and NAC/PPT

Nanocarrier	particle size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
PPT	285 ± 6.1	0.496 ± 0.016	+14.1 ± 0.12
NAC/PPT	294 ± 7.2	0.541 ± 0.106	+9.29 ± 0.52*

Mean ± SD ($n = 3$), * $p < 0.05$ (Student's t -test)

NAC/PPT を繰り返し経鼻投与した G93A マウスの生存曲線を Fig. 2 に示す。NAC/PPT 群の生存期間中央値は 137.5 日であり、未処置群 (126.0 日) と比較して生存期間を 11.5 日間、有意に延長した ($p = 0.0069$)。NAC 単独群の生存期間中央値 (133.5 日) は、未処置群と比較して、有意な差は認められなかった。このことから、NAC を高分子ナノミセル (PPT) に搭載し、繰り返し経鼻投与することで、G93A マウスの生存期間が延長することを明らかにした。

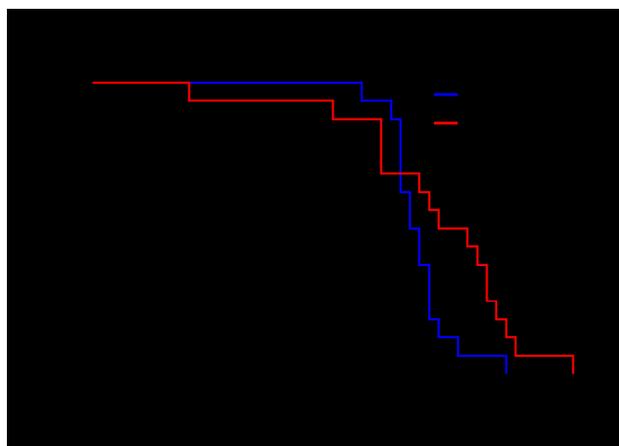


Figure 2. Lifespan of G93A mice treated with intranasal administration of NAC/PPT.

【結論】

本研究では、鼻から脊髄への薬物送達に適したナノキャリアの表面特性を探索することから、NAC にナノキャリアを併用した経鼻投与が ALS の病勢進展に対して抑制を示す有用な薬物送達法になりえるかを検討した。ナノキャリアの電荷を中性電荷にすることに加え、その表面に PEG を修飾することが、脊髄へ薬物を効率的に送達するために必要なナノキャリアの表面特性であることを明らかにした。また、NAC を搭載した細胞透過性ペプチド修飾ナノキャリアは、表面特性として中性電荷と PEG 修飾の両者を有する高分子ナノミセルであることを明らかにした。さらに、その繰り返し経鼻投与は、ALS 様症状を示す G93A マウスの生存期間を延長できる有用な薬物送達法であることを明らかにした。以上のことから、今後、細胞透過性ペプチド修飾ナノキャリアの最適化を図り、薬物の経鼻投与による鼻から脊髄への移行を高めることで、脊髄疾患治療を標的とする有用な薬物送達戦略となることが期待できる。

【学術雑誌掲載論文目録】

1. Kurano T, Kanazawa T, Ooba A, Masuyama Y, Maruhana N, Yamada M, Iioka S, Ibaraki H, Kosuge Y, Kondo H, Suzuki T. Nose-to-brain/spinal cord delivery kinetics of liposomes with different surface properties. *J Control Release*. 2022; **344**:225-234.
2. Kurano T, Kanazawa T, Iioka S, Kondo H, Kosuge Y, Suzuki T. Intranasal administration of *N*-acetyl-L-cysteine combined with cell-penetrating peptide-modified polymer nanomicelles as a potential therapeutic approach for amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmaceutics*. 2022; **14**:2590.