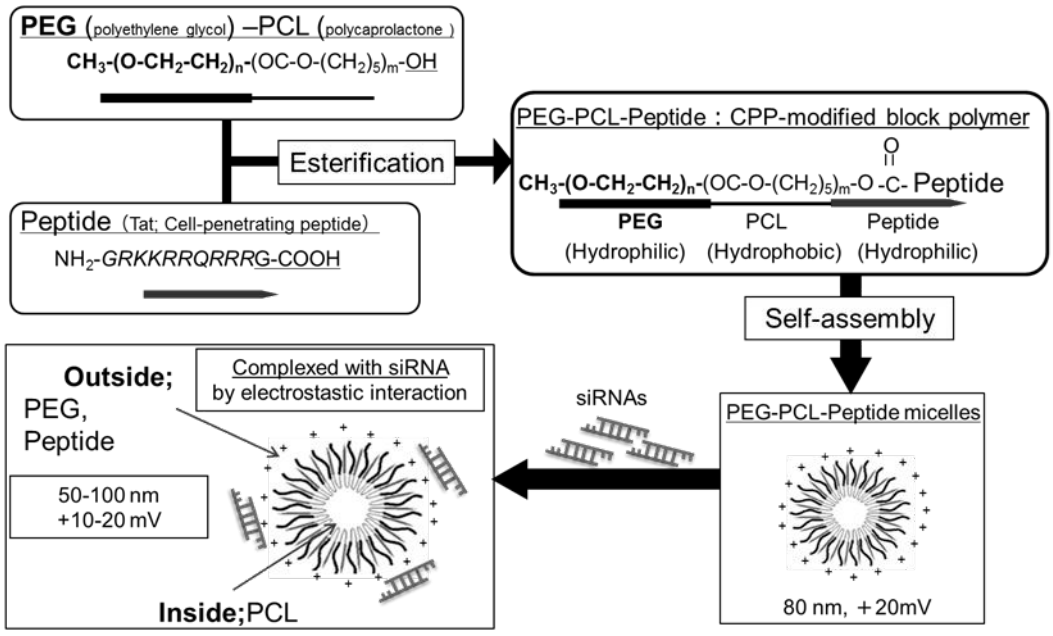
79　特定の中枢部位標的次世代型Nose-to-Brain核酸DDS開発	金沢　貴憲

【目的】近年、新たな中枢輸送経路として、経鼻投与によって、全身循環血液への分布を伴わずに直接中枢に届く『Nose-to-Brain 経路』が期待されている。一方、核酸医薬の本経路を介した中枢への分布動態に関しては、これまで報告はほとんどない。これは、鼻腔内から中枢までの Nose-to-Brain 動態を再現良く、定量的に解析する技術がなかったためである。また、Nose-to-Brain 経路を利用した中枢への DDS 研究の大部分は、中枢全体を標的としたものであるが、一方で、中枢全体への薬物送達は正常な脳機能に影響を与えてしまう危険性が高い。そこで、本研究では、上記課題を解決することを目的とし、Nose-to-Brain 動態の解析手法の確立とモデル核酸を用いた Nose-to-Brain 動態の解析および特定の中枢部位として脊髄を標的とする Nose-to-Brain 核酸 DDS の確立を行った。

【方法】はじめに、Nose-to-Brain 動態の解析手法の確立を目的に、実験動物への負担の少ない吸入麻酔下で、安定に経鼻投与する方法を二つ構築し、これら経鼻投与法を用いて、モデル核酸として膜透過性の低い［^{14}C］- 水溶性高分子を投与した際の脳・脊髄を含む体内分布を定量的に解析した。次に、鼻粘膜や中枢組織内における安定性の向上を期待して、生体安定性に優れたナノミセルを形成する Methoxy PEG-PCL（MPEG-PCL）に着目し、これと膜透過ペプチドである Tat を結合させた MPEG-PCL-Tat（下図）を設計し、その核酸の Nose-to-Brain 動態ならびに筋萎縮性側索硬化症（G93A-SOD1）モデルマウスにおける中枢部位での標的遺伝子発現を解析した。

【結果】いずれの経鼻投与法においても静脈内投与（iv）に比べて高い脳および脊髄への分布を示した。また、蛍光標識モデル核酸を用いて脳矢状断面を光イメージング観察したところ、嗅神経からつながる嗅球、ならびに大脳の前方領域および脳幹に特に強い蛍光が見られた。次に、PEG-PCL-Tat 併用によるモデル核酸の Nose-to-Brain 動態を解析した結果、嗅球、脳、脊髄のいずれの部位における移行性は、単独投与と比べて有意に向上した。またこのとき、単独投与に対する PEG-PCL-Tat 併用投与の分布効率の相対値から各組織における PEG-PCL-Tat 併用による向上効率を比較した結果、脊髄内分布の向上効率が、嗅球や脳内分布よりも有意に高く、最大で単独投与の 3 倍以上向上した。そこで、MPEG-PCL-Tat に SOD1 標的 siRNA を搭載して G93A-SOD1 モデルマウスへ経鼻投与した結果、naked siRNA に比べて、脊髄における SOD1 mRNA の発現を有意に抑制することを実証した。

膜透過性ペプチド修飾高分子ミセル型ナノキャリア（PEG-PCL-Peptide）の概要



79. 特定の中枢部位標的次世代型 Nose-to-Brain 核酸 DDS 開発

金沢　貴憲

日本大学 薬学部 薬剤学研究室

Key words：Nose-to-Brain，脊髄標的 DDS，核酸デリバリー，ナノキャリア，筋委縮性側索硬化症

緒　言

難治性の中枢疾患に対して、遺伝子発現を制御する核酸医薬は次世代の創薬モダリティとして期待されている。しかしながら、これら核酸医薬の血液循環を介した中枢への移行は、血液脳関門や血液脳脊髄液関門により著しく制限されている。近年、新たな中枢輸送経路として、経鼻投与によって、全身循環血液への分布を伴わずに直接中枢に届く『Nose-to-Brain 経路』が期待されている。一方、核酸医薬の本経路を介した中枢への分布動態に関しては、これまで報告はほとんどない。これは、鼻腔内から中枢までの Nose-to-Brain 動態を再現良く、定量的に解析する技術がなかったためである。また、Nose-to-Brain 経路を利用した中枢への DDS 研究の大部分は、中枢全体を標的としたものであるが、一方で、中枢全体への薬物送達は正常な脳機能に影響を与えてしまう危険性が高い。そこで、本研究では、上記課題を解決することを目的とし、1. Nose-to-Brain 動態の解析手法の確立とモデル核酸を用いた Nose-to-Brain 動態の解析、2. 特定の中枢部位として脊髄を標的とする Nose-to-Brain 核酸 DDS の確立を行った。

方法および結果

1. Nose-to-Brain 動態の解析手法の確立とモデル核酸を用いた Nose-to-Brain 動態解析

はじめに、Nose-to-Brain 動態の解析手法の確立を目的に、実験動物への負担の少ない吸入麻酔下で、安定に経鼻投与する方法を 2 つ構築した。1 つ目は、吸入麻酔した状態で経鼻投与ができるように、上部にシリコン栓で開閉部できる投与口を設けた吸入マスク（シナノ製作所、SN-487-70-09）を開発した。これにより、実験動物を固定した状態で、投与タイミングに応じてシリコン栓を抜いた開口部を介してマイクロピペット法により容易に経鼻投与することが可能となった。2 つ目は、鼻腔内へのより確実な薬液の送達性と滞留性の向上を目的とし、外科的手術によって、食道から鼻腔内へカニューレを通し、そこにシリンジポンプをつなげることで、吸入麻酔下でマイクロシリンジポンプにより投与速度や液量を様々な条件下で精密に制御して食道側から薬液を直接鼻腔内へ送り込むことを可能とした食道逆挿管鼻腔内投与法を確立した。これにより、食道への薬物の流出が懸念される MCC の影響や実験者による投与の個体間変動を極限まで減少させることが期待できる。そこで、これら経鼻投与法を用いて、モデル核酸として膜透過性の低い水溶性分子の［^{14}C］- inulin（Mw：5,000）を投与し、脳・脊髄を含む体内分布を定量的に評価した［1］。

図 1 に、マイクロピペット法（MP）および食道逆挿管鼻腔内投与法（Reverse）を用いて［^{14}C］-inulin をマウスへ投与し 60 分後における体内分布を示す（図 1）。いずれの経鼻投与法においても静脈内投与（iv）に比べて高い脳および脊髄への分布を示した。特に、脳および嗅球への分布は顕著に高く、なかでも Reverse は、iv の数十倍以上、MP の 2 倍以上の値を示した（図 1A、B）。一方、経鼻投与による血中への分布 iv よりも低かった。（図 1C）。また、三叉神経と脊髄における［^{14}C］-inulin の分布量は iv よりも高い傾向を示し、Reverse と MP との間でほぼ同等であった（図 1D、E）。さらに、CSF 中［^{14}C］-inulin 濃度についても、経鼻投与が iv よりも高かった（図 1F）。

次に、経鼻投与後の脳内の局在を明らかとするため、分子量 3,000 の蛍光標識デキストラン（AD-3K）を用いて、Reverse による投与後の脳矢状断面を *ex vivo* イメージング観察したところ、嗅神経からつながる嗅球、ならびに大脳の前方領域および脳幹に特に強い蛍光が見られた（図 2）。

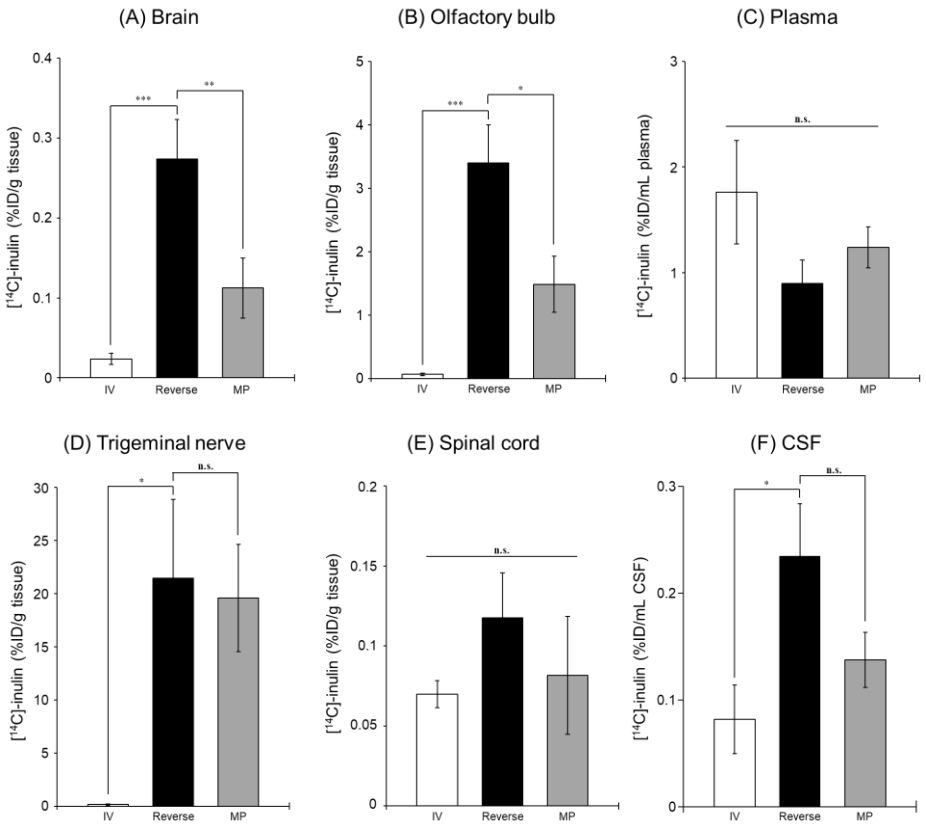


図 1. 各投与方法による[^{14}C]-inulin の中枢および血中分布

（A）脳、（B）嗅球、（C）血中、（D）三叉神経、（E）脊髄、（F）CSF 中の［^{14}C］-inulin 分布。

$^{***}P<0.001$、$^{**}P<0.01$，$^{*}P<0.05$，$^{n.s.}P>0.05$（ANOVA followed by Dunnett's test）。

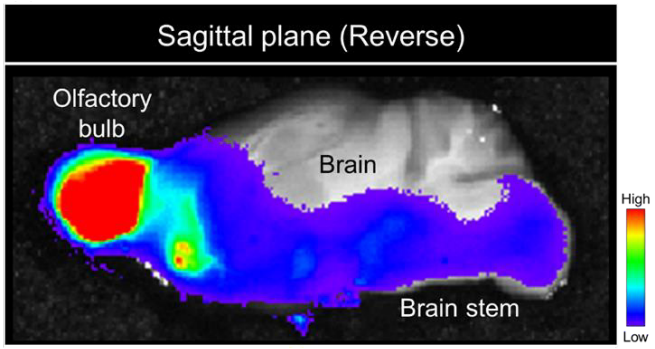


図 2. 食道逆挿管鼻腔内投与法による AD-3K の脳内局在の蛍光イメージング観察

AD-3K の鼻腔内投与 60 分後の脳矢状断面を観察（Olfactory bulb：嗅球、Brain：脳、Brain stem：脳幹）。

2. 脊髄を標的とする Nose-to-Brain 核酸 DDS の確立

経鼻投与による脊髄への薬物送達効率を高める DDS キャリアの開発において、①鼻粘膜上皮層の透過性向上ならびに②粘膜内での消失機構に対する安定性向上は重要な課題である。そこで、①鼻粘膜上皮層の透過性向上を期待して、細胞膜透過ペプチドである Tat に着目した。Tat は、HIV-Tat タンパク質のアルギニンとリジンに富む領域に存在する塩基性ペプチド（YGRKKRRQRRR）で、負電荷の細胞膜表面と相互作用しやすいため、高い細胞膜透過性を示すこと

が知られている。近年、これら細胞膜透過ペプチドの併用によってペプチド・タンパク性薬物の Nose-to-Brain デリバリーを向上させる報告も増えている。次に、鼻粘膜における安定性の向上を期待して、水中で自己会合することで、安定性に優れたナノサイズのミセルを形成する Methoxy PEG-PCL（MPEG-PCL）に着目し、これと Tat を結合させた MPEG-PCL-Tat（図 3）を開発した。

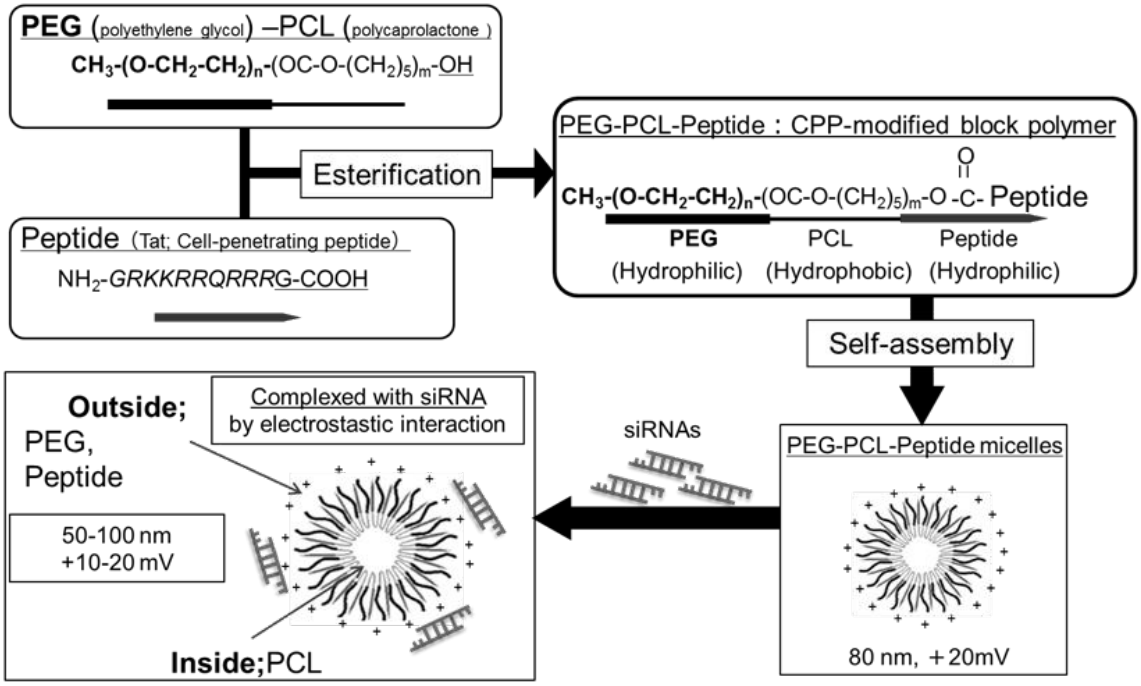


図 3. 膜透過性ペプチド修飾高分子ミセル（PEG-PCL-Peptide）の概要
PEG-PCL-Tat: PEG-PCLとTatペプチドのエステル結合により合成。水中で自己会合により高分子ミセルを形成。

はじめに脳・脊髄内分布効率について検討するため、モデル核酸として［^{14}C］-デキストラン（分子量 10,000）を用いて単独および PEG-PCL-Tat と混合してマウスへ経鼻投与し、一定時間後に摘出した嗅球、脳、脊髄の放射活性から組織内分布を定量的に算出した。その結果、嗅球、脳、脊髄のいずれの部位においても、MPEG-PCL-Tat の併用により有意に向上した。またこのとき、単独投与に対する PEG-PCL-Tat 併用投与の分布効率の相対値から各組織における PEG-PCL-Tat 併用による向上効率を比較した結果、脊髄内分布の向上効率が、嗅球や脳内分布よりも有意に高く、最大で単独投与の 3 倍以上向上した。また、大槽から CSF を採取し同様の方法で CSF 中濃度を算出した結果、PEG-PCL-Tat 併用経鼻投与群は単独経鼻投与群に比べて顕著に高い濃度推移を示した。よって、PEG-PCL-Tat 併用経鼻投与は、薬物送達困難な脊髄を標的とした有用な核酸 DDS キャリアとなる可能性が示された。

そこで、PEG-PCL-Tat 併用経鼻投与による siRNA の脊髄デリバリーの可能性を明らかとするため、ALS モデルマウスに対する siRNA の脊髄中標的 mRNA のノックダウン（KD）効果について検討した。ALS の原因遺伝子である hSOD1 を標的とした siRNA および Control siRNA との PEG-PCL-Tat 複合体を経鼻投与し、脊髄における hSOD1 mRNA KD 効果を RT-qPCR 法により測定した。その結果、hSOD1 標的 siRNA/MPEG-PCL-Tat 複合体を経鼻投与した ALS モデルマウス脊髄中 hSOD1 mRNA は、未処置ならびに Control siRNA/MPEG-PCL-Tat 複合体と比べ有意に抑制した。

考　察

本研究では、Nose-to-Brain 動態を再現良く定量的に解析する技術を確立し、モデル核酸および新規ナノキャリアの経鼻投与後の中枢内分布動態を明らかにすることができた。また、これら分布動態の情報をもとに、中枢の特定部位である脊髄を標的とする Nose-to-Brain 核酸 DDS ナノキャリアを確立し、ALS モデルマウス脊髄における標的遺伝子発現を経鼻投与によって効率よく抑制できることを実証した。以上、本研究において我々は、Nose-to-Brain 動態に基づいた特定の中枢部位標的核酸 DDS ナノキャリアを確立するための技術基盤ができたと考えている。今後、この技術基盤を応用し、様々な中枢の特定疾患領域を標的とする核酸 DDS の確立をすすめていきたいと考えている。

文　献

1）Fukuda M, Kanazawa T, Iioka S, Oguma T, Iwasa R, Masuoka S, Suzuki N, Kosuge Y, Suzuki T. Quantitative analysis of inulin distribution in the brain focused on nose-to-brain route via olfactory epithelium by reverse esophageal cannulation. J Control Release. 2021 Apr 10;332:493-501. Epub 2021 Feb 26. PMID: 33647429 DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.02.024.