



Title	リポソームを用いた中枢神経への低侵襲薬物輸送システムの開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	福井, 隆史
Description	配架番号 : 2712
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14976号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85852
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	FUKUI_Takafumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 福井 隆史

学位論文題名

リポソームを用いた中枢神経への低侵襲薬物輸送システムの開発
(Development of a minimally invasive drug delivery system
for central nervous system using liposomes)

【背景と目的】

近年の神経科学の発展により、難治性の中枢神経疾患の病因や標的分子が明らかになり、これらの疾患に対する治療薬剤が開発されつつある。しかし、中枢神経の特殊性から、薬剤を標的組織、および細胞に到達させるのが容易でない事が、これら薬剤の臨床応用の阻害要因の1つとなっている。そこで、低侵襲、細胞特異的で、複数回投与可能な、中枢神経疾患に対する DDS (Drug Delivery System) の開発が求められている。我々は、軸索逆行性輸送用の新規 DDS として、リポソームに着目した。リポソームは、親水性と疎水性を持つ分子から作られる複合体で、封入した核酸、蛋白質、化合物などを細胞内に効率的に導入可能である。また、脂質組成、表面修飾を調節することで、リポソームの細胞取り込み効率、細胞内挙動を操作することが可能である。我々は、最適化されたリポソームは、軸索内へと取り込まれ、軸索逆行性輸送システムに載って、末梢組織から脊髄運動神経細胞や DRG (Dorsal Root Ganglia) 神経細胞に効率的に輸送されると仮説を立てた。本研究の目的は、リポソームの脂質組成と表面修飾を最適化することにより、末梢組織から中枢神経へ軸索逆行性に輸送されるリポソームを開発することである。

【材料と方法】

(1) リポソーム構成脂質と軸索輸送の関係

DSPC、POPC を主な構成要素とし、DSPC と POPC の組成割合を変えた、3 種類のリポソーム、すなわち DSPC-Lip, POPC-Lip, DSPC/POPC-Lip を作製し、蛍光マーカーである DiD で標識した。これらのリポソームを野生型 LEWIS ラットの左坐骨神経及び、前脛骨筋に投与し、3 日後に灌流固定した。腰髄と DRG の組織切片を作成し、DiD が集積した腰髄運動神経細胞及び、DRG 神経細胞を観察した。

(2) リポソームの表面修飾と軸索輸送の関係

DSPC を主な構成脂質としたリポソームに CTB (Cholera Toxin B Subunit)、R8 (Octa-arginine) で表面修飾を行った。これらの表面修飾リポソームを野生型 LEWIS ラットの左坐骨神経及び、前脛骨筋に投与し、3 日後に灌流固定した。腰髄と DRG の組織切片を作成し、DiD が集積した腰髄運動神経細胞及び、DRG 神経細胞を観察した。

【結果】

(1) リポソーム構成脂質と軸索輸送の関係

(a) 坐骨神経投与後 3 日

DiD で標識された腰髄運動神経細胞や DRG 神経細胞の割合を、高効率の神経トレーサーである CTB や Fluoro-Gold 投与時に標識される細胞数と比較する事で輸送効率を算出した。腰髄での結果は、DSPC-Lip が最も高く 4.5%、DSPC/POPC-Lip で 3.2%、POPC-Lip で 0.96% の輸送効率であった。DRG 神経細胞への輸送効率も、腰髄運動神経細胞と同様に、DSPC-Lip が最も高く 3.9%、DSPC/POPC-Lip で 2.6%、POPC-Lip で 0.8% であった。

(b) 前脛骨筋投与後 3 日

DSPC-Lip のみ腰髄運動神経細胞への輸送を認め、輸送効率は 2.6%であったが、POPC-Lip、DSPC/POPC-Lip、DiD では、全く輸送を認めなかった。DRG 神経細胞を評価すると、脊髄運動神経細胞と同様に、DSPC-Lip のみ DRG 神経細胞への輸送を認め、DiD で標識された DRG 神経細胞の割合は 2.3%であったが、POPC-Lip、DSPC/POPC-Lip、DiD は、全く輸送を認めなかった。

(2) リポソームの表面修飾と軸索輸送の関係

(a) 坐骨神経投与後 3 日

投与後 3 日での腰髄運動神経細胞への輸送効率は、CTB 修飾群が最も高く 17.3%、次に CTB-R8 修飾群で 13.0%、R8 修飾群で 9.6%、修飾無し群で 4.4%の順であった。DRG も評価すると、CTB 修飾群で 14.3%、CTB-R8 修飾群で 10.6%、R8 修飾群で 7.3%、修飾無し群で 3.7%の順であり、腰髄と同様の結果であった。

(b) 前脛骨筋投与後 3 日

投与後 3 日での腰髄運動神経細胞を評価すると、修飾無しリポソームと CTB 修飾リポソームのみ軸索輸送されており、輸送効率はそれぞれ、2.6%、4.8%であった。DRG 神経細胞を評価すると、同様に修飾無しリポソームと CTB 修飾リポソームのみ軸索輸送されており、輸送効率はそれぞれ、2.3%、4.6%であった。R8 修飾リポソーム、CTB-R8 修飾リポソームは、全く脊髄運動神経細胞及び DRG 神経細胞に輸送されていない。

【考察】

本研究によって、特定の脂質組成から構成されるリポソームが、末梢組織から腰髄運動神経細胞や DRG 神経細胞へ輸送される事が初めて明らかとなった。さらに、リポソームの脂質組成を最適化し、CTB で修飾することにより、効率的な軸索輸送が達成できることが示された。軸索輸送タンパクであるダイニンは能動的カーゴとして、基本構造がリポソームと似ている vesicle や endosome を細胞体へ能動的に軸索逆行性に輸送する事が知られている。神経内、筋肉内に投与したリポソームが神経細胞の細胞体に輸送されるには、軸索内への取り込み、ダイニンへの積載、ダイニンによる細胞体への輸送という 3 つの過程を経る必要がある。さらに、細胞体への輸送には数日以上の間を要するため、リポソームが軸索内で分解や膜融合せずに形状や物性を保つ能力、すなわち biostability も重要な要素となる。本研究では、リポソームの投与方法、脂質組成、表面修飾によって、末梢組織から神経細胞体への輸送効率が大きく異なっていたが、これは、それぞれのリポソームによって、軸索内への取り込み効率、ダイニンへの積載効率、軸索内およびダイニン上での安定性が異なる事に起因したと考える。DSPC を主な構成脂質とするリポソームの輸送効率が高かった理由としては、DSPC の割合が多いほど、軸索や神経終末での取り込み効率が上昇した、あるいは、軸索内での biostability が高くなり、軸索内での分解が抑制された可能性が考えられる。CTB 修飾が、軸索逆行性輸送効率を上昇させたが、CTB は GM1 受容体を介して軸索内に高効率に取り込まれる事が広く知られており、CTB 修飾リポソームも CTB 単体と同様のメカニズムを介して、細胞内に取り込まれる事が明らかとなっている。よって、今回の神経内投与や筋肉投与でも、同様の機序によって軸索内への取り込みが向上したと考えられる。さらに、CTB 修飾は、リポソームのダイニンへの積載性も高めた可能性も高く、これらの複合的要因によって、CTB 修飾がリポソームの輸送効率を向上させたと考える。

【結論】

本研究では、末梢組織に投与したリポソームが、運動神経細胞、DRG 神経細胞に輸送される事を初めて示した。さらに、リポソームの軸索逆行性輸送には、最適な脂質組成があり、CTB による修飾によって、リポソームの軸索輸送効率が飛躍的に高められる事が示された。本研究結果は、末梢組織から中枢神経を標的とした DDS 開発の基盤となる。