HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14976
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86018
Type	doctoral thesis
File Information	FUKUI_Takafumi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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 the central nervous system using liposomes）

2022 年 3 月

北海道大学

福井隆史
Takafumi Fukui

学位論文

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 the central nervous system using liposomes）

2022 年 3 月

北海道大学

福井隆史
Takafumi Fukui

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 頁

要旨 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁

略語表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6 頁

緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7 頁

方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10 頁

結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15 頁

考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32 頁

総括および結論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38 頁

謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39 頁

利益相反 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 40 頁

引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術雑誌に現在投稿中である。

Takafumi Fukui, Hironao Tateno, Takashi Nakamura, Yuma Yamada,

Yusuke Sato, Norimasa Iwasaki, Hideyoshi Harashima, Ken Kadoya

Retrograde axonal transport of liposomes from peripheral tissue to spinal cord and DRGs by optimized phospholipid and CTB modification

Biomaterials　（2021 年 11 月　投稿済み）

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 福井隆史、角家健、舘野寛直、中村孝司、山田勇磨、佐藤悠介、岩崎倫政、原島秀吉

   リポソームを応用した末梢組織から脊髄への低侵襲薬物輸送システムの開発、第 94 回日本整形外科学会学術総会、東京都、2021 年 5 月 20 日-21 日、東京国際フォーラム・JP タワーホール&カンファレンス.

要旨

【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 Drug delivery System（DDS）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 Dorsal Root Ganglia（DRG）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】

⑴ リポソームの構成脂質と軸索輸送の関係

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine（DSPC）、1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine（POPC）を主な脂質構成要素とし、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 1,1′-dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate（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。

⑵ リポソームの表面修飾と細胞内への取り込み

⑴の結果から DSPC が軸索逆行性輸送に最適な脂質である事が判明したため、DSPC を主な構成脂質としたリポソームに Cholera Toxin B Subunit（CTB）や Octa-arginine（R8）で表面修飾を行った。さらに DiD で標識した。これらのリポソームに NSC-34 motor neuron like cells を 2 時間浸漬させ、細胞内へのリポソームの取り込み効率を評価した。この実験は In vivo での軸索への取り込みを反映するものと考えられる。

⑶ リポソームの表面修飾と軸索輸送の関係

⑵で用いた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】

⑴ 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 単独では、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 単独は、全く輸送を認めなかった。

⑵ リポソームの表面修飾と細胞内への取り込み

R8 修飾群で一番高い細胞内取り込みを認めた。続いて CTB-R8 修飾群、その次に CTB 修飾群と続き、修飾無し群では、細胞内取り込みは全く認めなかった。

⑶ 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、腰髄とほぼ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かった。

【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期間を要するため、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。R8 修飾が、細胞内取り込みでは一番効果的であった一方、坐骨神経投与実験では、CTB 修飾が一番輸送効率を上昇させていた。さらに筋肉投与実験では、R8 修飾群で輸送が完全に消失していた。この事実は in vitro 実験結果が必ずしも in vivo 実験結果を反映しておらず非常に興味深い。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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AAV	Adeno-associated virus
BBSCB	Blood brain spinal cord barrier
CNS	Central Nervous System
CTB	Cholera Toxin B Subunit
DDS	Drug delivery system
DiD	18(5);1,1′-dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate salt
DRG	Dorsal root ganglia
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoCholine
FBS	Fetal bovine serum
PEG	Polyethylene glycol
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphoCholine
R8	Octa arginine
PDI	Polydispersity index

諸言

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(Federici and Boulis, 2007, Houdebine et al., 2019, Kheder and Nair, 2012, Lee-Hotta et al., 2019, Mòdol et al., 2014, Nabizadeh et al., 2021) 。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(Banks, 2016)。例えば、経口投与や経血液投与では、Blood Brain Spinal Cord Barrier（BBSCB）のため、薬剤の多くは、中枢神経組織に移行しない(Montero et al., 2019, Reinhold and Rittner, 2020)。経髄液投与は、組織特異性が低く、投与手技に伴う、感染、血腫などのリスクが少なくないため、汎用性に欠ける(Fowler et al., 2020, Papisov et al., 2013)。手術的に、標的部位に局所投与する方法もあるが、侵襲性が非常に高いこと、投与可能部位が限られること、複数回投与が難しいことなどの欠点がある(Lu et al., 2014)。以上より、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 Drug delivery System（DDS）の開発が求められている。近年、その解決策の１つとして、ウイルスベクターを用いて、末梢組織から、軸索逆行性に脊髄運動神経細胞まで、核酸を送達させる方法が試みられてきた(Jan et al., 2019, Wang and Zhang, 2021, Wang et al., 2002)。主に Adeno Associated Virus（AAV）を用いた送達が数多く報告され、輸送効率を向上させた新しいセロタイプも開発されているが、輸送効率が成体より高くなる幼若個体を使用した報告も少なくない。さらに、我々の渉猟した限り、AAV を成体の筋肉に投与した場合の、脊髄運動神経まで輸送効率は、未だ5%未満であり、さらなる向上が必要である(Hollis Ii et al., 2008, Wang and Zhang, 2021, Zheng et al., 2010)。また、ウイルスが輸送できるのは核酸に限られるため、核酸だけでなく、タンパク、化合物なども軸索逆行性に輸送可能な新規 DDS の開発が強く望まれている(Bloom et al., 2019, Wang and Zhang, 2021)。そこで、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(Nguyen et al., 2016, Ross et al., 2018)。現在、リポソームは悪性腫瘍、感染症に対する治療、ウイルス感染に対するワクチンなど、さまざまな分野の DDS として、すでに臨床応用されており、その高い生体親和性と安全性が確立されている(Abu Lila and Ishida, 2017, Raoufi et al., 2021, Theoharides et al., 2021)。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(Futaki et al., 2001, Gonzalez Porras et al., 2016, Nguyen et al., 2016, Walker et al., 2016)。

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、軸索逆行性輸送にのって、末梢組織から脊髄運動神経細胞に効率的に輸送されると仮説を立てた（図 1)。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、末梢組織から脊髄運動神経細胞へ軸索逆行性に輸送されるリポソームを開発する事である。

本研究の結果、1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine（DSPC） 、Cholesterol（Chol)、polyethylene glycol（PEG）で構成されるリポソームは、神経投与、筋肉投与の両方の軸索逆行性輸送に適している事が明らかとなった。さらに、Cholera Toxin B Subunit（CTB）による表面修飾が、その輸送効率を有意に上昇させ、投与後 3 日での脊髄運動神経細胞への輸送効率は、前脛骨筋投与で 4.8%、坐骨神経投与で 17.3%となった。後根神経節（Dorsal root ganglion, DRG）神経細胞にも、脊髄運動神経細胞とほぼ同様の効率で、リポソームが輸送されていた。これらの結果は、リポソームが末梢組織から脊髄組織、DRG への、低侵襲、細胞特異的 DDS になりうることを示しており、新しい中枢神経組織への DDS 開発の基盤となる。

図 1.

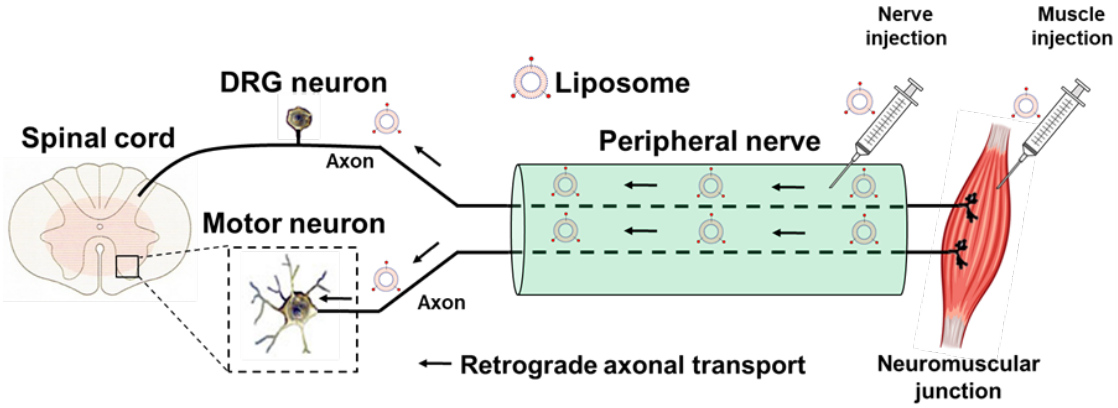

図 1. リポソームの軸索逆行性輸送の概念図

方法

1. 動物

本研究は、北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した（19-0074）。実験には、LEWIS ラット(10–14 weeks old；Wild-type, Charles River Laboratories Japan, Inc.)の雌雄を用いた。体重は 160〜220g で、専用の飼育室で、12 時間明暗サイクルで飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。動物の麻酔には、ケタミン(75–100 mg/kg, KETALAR® , Daiichi Sankyo Propharma Corporation, Tokyo, Japan)とメデトミジン(0.5 mg/kg, DOMITOR® , Orion Corporation, Espoo, Finland)の混合液を腹腔内注射で投与した。

2. リポソームの調製

リポソームを構成する脂質として、1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoCholine（POPC; NOF Corporation, Tokyo, Japan), DSPC（NOF Corporation）, Chol（Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL）and N-（Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000-1,2-distearoyl- sn-glycero- 3-phosphoethanolamine（DSPE-PEG2000；NOF Corporation）を用いた。脂質組成物は、3 種類を使用した。すなわち、POPC/Chol/DSPE-PEG2000 = 70/30/5 (mol ratio); DSPC/POPC/Chol/DSPE-PEG2000 = 30/40/30/5 (mol ratio); DSPC/Chol/DSPE-PEG2000 = 70/30/5 (mol ratio)の 3 種類の脂質組成物である。クロロホルムで溶解した脂質と 1,1′-dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate（DiD）（0.5mol%）(Thermo Fisher Scientifc, Waltham, MA)をガラス管に加え、N2 ガスで有機溶媒を除去して脂質膜を作製した。脂質膜は、5%のグルコースを含む 10mM の HEPES 緩衝液で水和し、脂質濃度を 5mM とした。リポソームの調製は、バス型ソニケーターを用いて行った。リポソームの表面に occta-arginine（R8）を修飾するために、脂質のクロロホルム溶液にステアリル化した(STR-R8) (KURABO, Osaka, Japan)を加えた。リポソーム表面の CTB 修飾には、ビオチン化した DSPE-PEG2000 (NOF Corporation)を 0.1mol%添加した。リポソーム調製後、アビジンとビオチン化 CTB を添加した (biotinylated DSPE-PEG2000/avidin/biotinylated CTB = 1/1/1, mol ratio)。計 6 種類のリポソームを作製し（図 2)、リポソームの特性評価は、A Zetasizer Nano (Malvern Institute Ltd., Malvern, WR, UK)を用いて行った（表 1)。これらのリポソーム作製から特性評価までの一連の過程は、北海道大学薬学部薬剤分子設計学研究室の先生方に依頼し、施行して頂いた。

図 2.

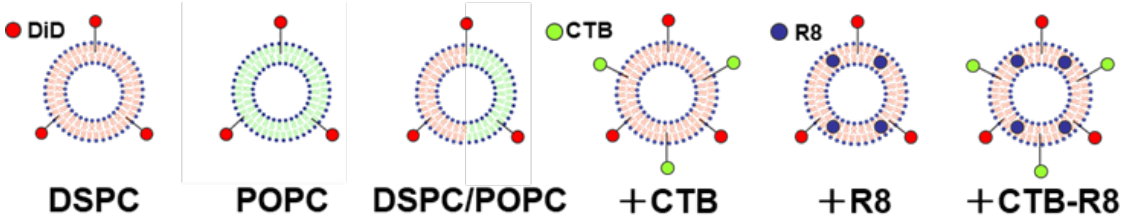

図 2. 作製したリポソーム

表 1.

Liposome	Diameter (nm)	PDI	Zeta-potential (mV)
DSPC	136.00 ± 9.27	0.26 ± 0.01	- 15.77 ± 0.31
POPC	146.67 ± 13.07	0.13 ± 0.01	- 16.10 ± 2.62
DSPC/POPC	154.33 ± 14.52	0.15 ± 0.08	- 16.57 ± 3.69
CTB-DSPC	173.00 ± 20.61	0.23 ± 0.03	- 11.6 ± 2.36
R8-DSPC	116.67 ± 13.07	0.20 ± 0.03	17.9 ± 1.85
CTB-R8-DSPC	125.00 ± 6.16	0.23 ± 0.03	16.3 ± 1.44

Data are the mean ± SD (n=3).

表 1. 作製したリポソームの特性

粒子径、多分散指数、ゼータ電位を示す

3. 手術方法

神経注入のために、麻酔をかけたラットを伏せた状態にし、臀部から大腿部遠位部にかけて縦方向に長さ 4cm の皮膚切開を置き、坐骨神経を露出させた。2.0μL の各リポソームまたは DiD 単独を、ハミルトンシリンジ(30 gauge needle, HAMILTON, Reno, USA)を用いて坐骨神経に注入した。筋肉注射では、前脛骨筋の表層レベルに 0.3cm の皮膚切開を加えた後、前脛骨筋筋膜を露出させ、ハミルトンシリンジを用いて、2.0μL の各リポソームまたは DiD 単独を前脛骨筋の中央部に注入した。使用したラットの数は各 3 匹または 5 匹である。ポジティブコントロールである 1% CTB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、または、10% Fluoro-Gold (Fluorochrome, Denver, USA)投与時にも、それぞれ 2.0μL ずつ坐骨神経または前脛骨筋に注射した。使用したラットの数は各 3 匹または 5 匹である。CTB と Fluoro-Gold は共に優れた軸索逆行性輸送マーカーである。

4. 組織

各リポソーム溶液、0.5％の DiD をラットにそれぞれ注射後、3 日または 10 日後に、0.1M リン酸緩衝液（PB）（pH7.4）で経心的に灌流し、続いて 0.1M PB 中の 4％パラホルムアルデヒド（PFA） (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)を用いて灌流固定した。ポジティブコントロールである 1％CTB、10％の Fluoro-Gold 投与時には、注射後 3 日目で、0.1M リン酸緩衝液（PB）（pH7.4）で経心的に灌流し、続いて 0.1M PB 中の 4％パラホルムアルデヒド（PFA） (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)を用いて灌流固定した。腰椎の脊髄と DRG を取り出し、4％PFA で 4℃で一晩処理した後、0.1M PB 中の 30％スクロースに移して凍結保護した。脊髄はミクロトーム (REM-710; Yamato Kohki Industrial Co., Saitama, Japan)を用い、35 μm 間隔で、水平方向に切片化した。DRG はクライオスタット(Leica Biosystems CM3050, Wetzlar, Germany)を用いて 14μm 間隔で切片化した。ラットでは、坐骨神経は L4，5，6 の神経線維で構成されており、前脛骨筋は主に L4 の神経線維で支配されている(Brink et al., 1979, Peyronnard et al., 1986)ため、神経投与群では L5DRG を、筋肉投与群では L4DRG を評価した。

5. 免疫染色

ChAT での免疫標識のために、切片を 0.1 M TBS 中の 10% ウマ血清 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) でブロッキングした後、一次ヤギ抗 ChAT ポリクローナル抗体(goat, 1:200, AB144P; Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO)を 4℃で一晩反応させた。翌日、切片を Alexa594 に結合させたドンキー抗ヤギ（1:500）（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）を用いて、室温で 2.5 時間インキュベートした。CTB の免疫標識のために、切片を 10%馬血清(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)と 0.1M TBS でブロックした後、一次ヤギ抗 CTB ポリクローナル抗体(goat, 1:5000, 703; List Biological Laboratories, Inc., Campbell, USA)を 4℃で一晩反応させた。翌日、切片を Alexa488 に結合させたドンキー抗ヤギ（1:500）(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)とともに室温で 2.5 時間反応させた。

6. 定量化

腰髄の 6 分割の連続切片をオールインワン蛍光顕微鏡（BZ-X710; Keyence, Osaka, Japan）で観察し、リポソーム輸送の定量化を行った。DiD、CTB、Fluoro-Gold で標識された神経細胞は、核ではなく細胞体側に 668nm，518nm，460nm のシグナルが存在することで識別した。すべてのセクションの標識神経細胞の総数を数えた。輸送効率は，DiD で標識された神経細胞の総数を CTB または Fluoro-Gold で標識された神経細胞の総数で割って算出した。CTB と Fluoro-Gold には、機能的に、ほとんど違いが無い事が知られているが、網膜神経節細胞の標識には、CTB よりも Fluoro-Gold の方がより適しているとの報告もあるため(Yao et al., 2018)、腰髄運動神経細胞の標識及び正規化には CTB を用い、DRG 神経細胞の標識及び正規化には Fluoro-Gold を用いた。DRG の in vivo リポソーム輸送を定量化するために，10 枚のうち 1 枚の切片をオールインワン蛍光顕微鏡（BZ-X710; Keyence, Osaka, Japan）で観察した。腰髄と同様に、DiD、CTB、Fluoro-Gold で標識された神経細胞は、核ではなく細胞体側に 668nm、518nm、460nm のシグナルが存在することで識別した。すべてのセクションの標識神経細胞の総数を数えた。輸送効率は、DiD で標識された神経細胞の総数を CTB または Fluoro-Gold 標識された神経細胞の総数で割って算出した。

7. 細胞培養

NSC-34 motor neuron like cells は，CELLutions Biosystems Inc.から購入し、10%ウシ胎児血清（FBS）および 1%ペニシリン/ストレプトマイシン(PS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を添加したダルベッコイーグル培地(DMEM, Wako, Osaka, Japan)で培養した。細胞は 48 ウェルプレートに 2.0×105 個/cm^2 の密度で播種し、リポソームと 37℃で 2 時間インキュベー

トした後、4% PFA で固定し、DAPI（1:500）と反応させた。リポソームのインキュベーションの間は、細胞培養液から FBS を除いた。細胞の画像は、オールインワン蛍光顕微鏡(BZ-X710; Keyence, Osaka, Japan)で撮影した。100 個以上の細胞をランダムに選択し、DiD 標識された細胞の数をカウントして、全細胞に対する DiD 標識細胞の割合を算出した。

8. 統計解析

統計解析では、one-way ANOVA および Tukey-Kramer 検定を用いて複数グループの比較を行った。すべての解析は，JMP ソフトウェア(SAS, Cary, NC, United States)を用いて、事前に指定した有意水準を 95%として行った。データは平均値±標準偏差（SD）で示した。

結果

1. DSPC、Cholesterol、PEG で構成されるリポソームは末梢神経から脊髄に軸索逆行性に輸送される

リポソームの細胞内取り込み効率や細胞内挙動は、構成するリン脂質組成に依存する事が知られているため(Inoh et al., 2020, Inoh et al., 2017, Sakai-Kato et al., 2020, Suesca et al., 2013)、我々は、リポソームの末梢組織から脊髄への軸索逆行性輸送を可能にする、最適なリン脂質組成があると考えた。そこで、まず、DSPC、POPC、Chol、PEG 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（DSPC-Lip; DSPC/Chol/DSPE-PEG2k=70/30/5, POPC-Lip; POPC/Chol/DSPE-PEG2k=70/30/5, DSPC/POPC-Lip; DSPC/Chol/DSPE-PEG2k=30/40/30/5）を作製し、DiD で標識した。これらのリポソームを、成熟ラットの坐骨神経に 2ul 投与し（図 3a)、3 日後に灌流固定を行った。脊髄切片を観察すると、全てのリポソーム群で、DiD が集積した運動神経細胞を観察した（図 3b)。DiD で標識された運動神経細胞の割合は、高効率の神経トレーサーである CTB と比較して定量すると、DSPC-Lip が最も高く 4.5%、DSPC/POPC-Lip で 3.2%、POPC-Lip で 0.96%であった（図 3c)。重要なことに、DiD のみを注入した場合、DiD で標識された運動神経細胞を全く認めなかった（図 3b,c)。このことは、リポソームから遊離した DiD のみが運動神経細胞に集積した可能性や、DiD 付加によるリポソームの輸送効率上昇の可能性を否定するものである。坐骨神経は、脊髄運動神経細胞と DRG 神経細胞の 2 つの神経細胞の軸索で構成されるため、坐骨神経へのリポソームの投与は、DRG 神経細胞へも移動する可能性がある。そこで、DiD で標識される DRG 神経細胞を評価すると、脊髄運動神経細胞と同様に、全てのリポソーム群で、DiD が集積した神経細胞を観察した（図 3d)。また、DiD で標識された神経細胞の割合も、脊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（図 3e)。以上の結果は、DSPC、POPC、Cholesterol、PEG を主な構成要素とするリポソームは、末梢神経から、脊髄運動神経細胞、DRG 神経細胞に軸索逆行性に輸送されること、DSPC の割合が高いほど、

その輸送効率が高くなること、運動神経細胞と感覚神経細胞の間では、輸送効率に明らかな差がないことを示している。

図 3.

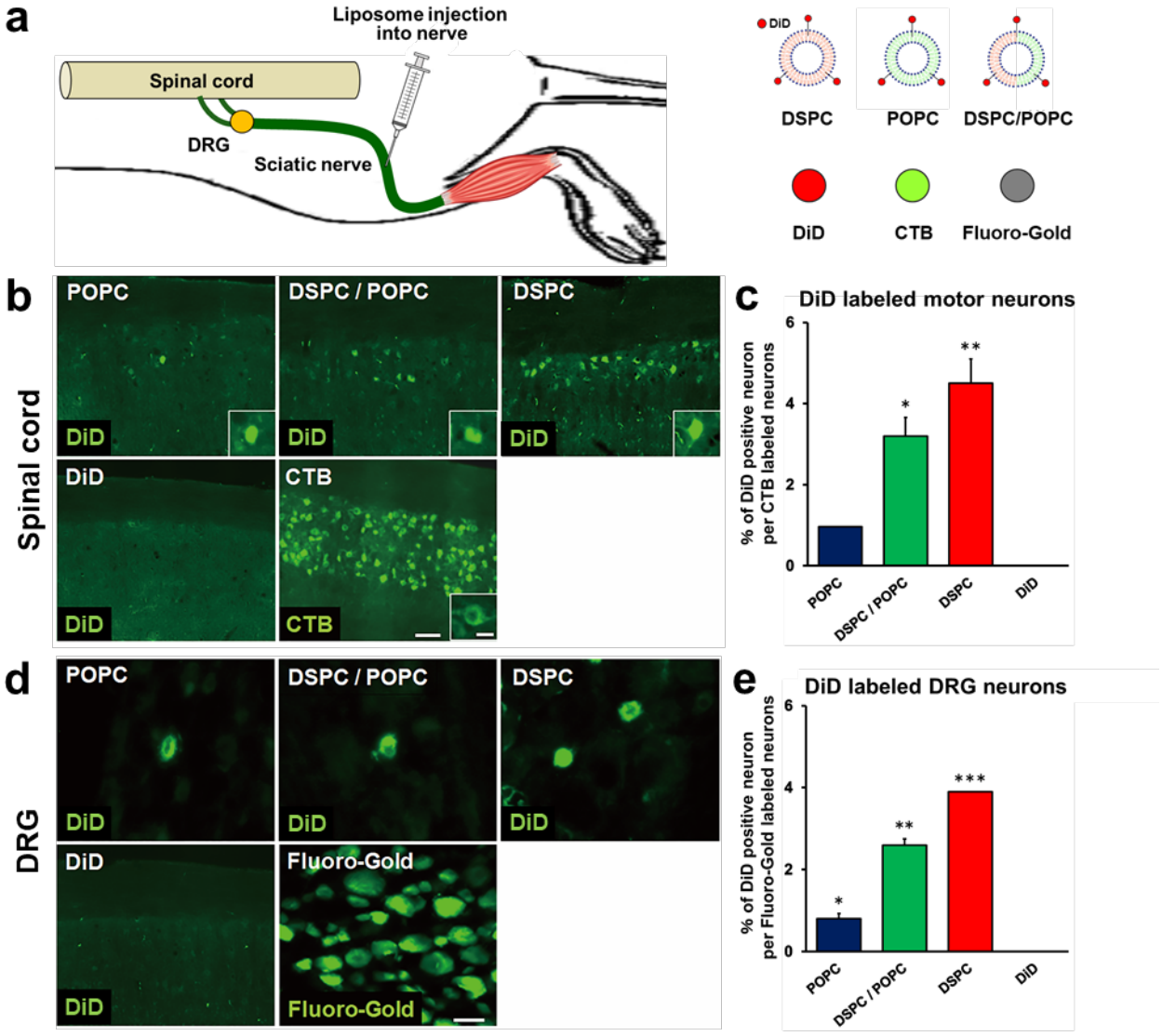
a
Liposome injection into nerve
Spinal cord
DRG
Sciatic nerve
DiD
DSPC
POPC
DSPC/POPC
DiD
CTB
Fluoro-Gold
b
Spinal cord
POPC
DSPC / POPC
DSPC
DiD
CTB
c
DiD labeled motor neurons
% of DiD positive neuron per CTB labeled neurons
d
DRG
Fluoro-Gold
e
DiD labeled DRG neurons
% of DiD positive neuron per Fluoro-Gold labeled neurons

図 3. 坐骨神経注入 3 日後の脊髄運動神経細胞および DRG 神経細胞への異なるリン脂質から構成されるリポソームの軸索逆行性輸送

(a) 坐骨神経投与のシェーマと投与したリポソーム。
(b) 腰部脊髄の水平断面図。POPC 単独、DSPC 単独、POPC と DSPC から構成されるリポソームの軸索逆行性輸送を示す。運動神経細胞への輸送は、リポソームに付加した DiD の蛍光によって確認した。挿入図は、DiD 陽性の運動神経細胞の高倍率図である。DiD のみでは 3 日後には運動神経細胞に移動しなかったが、ほとんどの運動神経細胞は CTB で標識された。スケールバーは、それぞれ 100μm、30μm。
(c) リポソームの軸索逆行性輸送の効率。CTB で標識された運動神経細胞の総数に対する DiD 陽性の運動神経細胞の割合（n=3/グループ）。DSPC リポソームは 4 つのグループの中で最も高い輸送効率を示した。エラーバーは平均±標準偏差（SD）を示す。*p, **p < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.
(d) L5 DRG の切片。DRG 神経細胞へのリポソームの軸索逆行性輸送を示す。DRG 神経細胞への輸送は、リポソームに付加した DiD の蛍光によって確認した。DiD だけでは DRG 神経細胞に輸送されなかったが、ほとんどの神経細胞は Fluoro-Gold で標識されていた。スケールバーは、40μm。
(e) Fluoro-Gold で標識された神経細胞の総数に対する DiD 陽性の DRG 神経細胞の割合を定量した（n=3/グループ）。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p, ***p < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.

2. DSPC、Cholesterol、PEG で構成されるリポソームは筋肉から脊髄に軸索逆行性に輸送される

次に、前述のリポソームが筋肉投与でも、脊髄運動神経や DRG 神経細胞に逆行性輸送されるか検討した。前述と同様のリポソームを成熟ラットの前脛骨筋に 2ul 投与し（図 4a)、3 日後に灌流固定を行った。脊髄運動神経細胞を評価すると、DSPC-Lip のみ運動神経への輸送を認め、DiD で標識された運動神経細胞の割合は 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（図 4b,c)。

次に、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、DSPC/POPC、DiD は、全く輸送を認めなかった（図 4d,e)。

以上の事は、DSPC、Chol、PEG で構成されるリポソームは、筋肉から脊髄運動神経細胞、DRG 神経細胞に軸索逆行性に輸送されること、POPC を組成に含むリポソームは輸送されないこと、末梢神経内投与と同様に、運動神経細胞と感覚神経細胞の間では、輸送効率に明らかな差がないことを示している。

図 4.

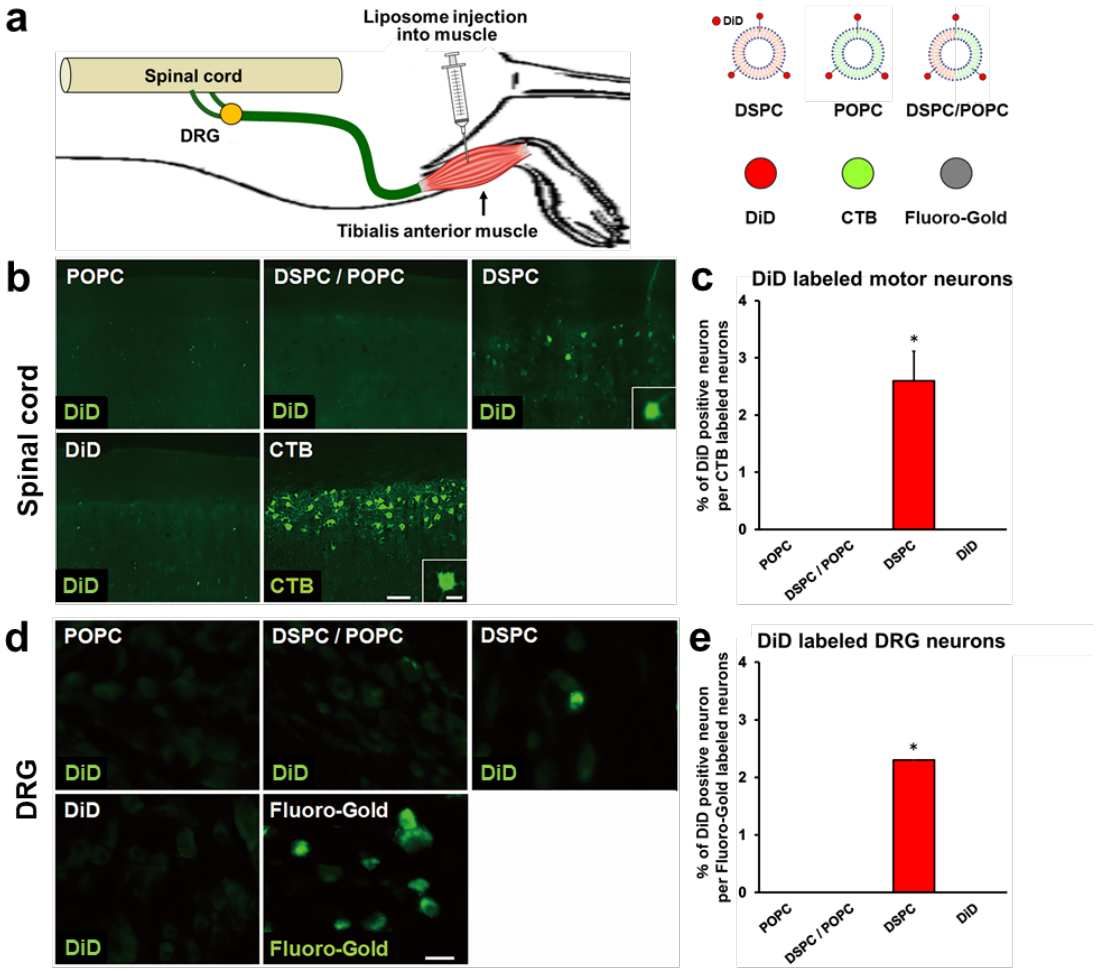
a
Liposome injection into muscle
Spinal cord
DRG
Tibialis anterior muscle
DiD
DSPC
POPC
DSPC/POPC
DiD
CTB
Fluoro-Gold
b
Spinal cord
POPC
DSPC / POPC
DSPC
DiD
CTB
c
DiD labeled motor neurons
% of DiD positive neuron per CTB labeled neurons
POPC
DSPC / POPC
DSPC
DiD
d
DRG
Fluoro-Gold
e
DiD labeled DRG neurons
% of DiD positive neuron per Fluoro-Gold labeled neurons

図 4. 前脛骨筋注入 3 日後の脊髄運動神経細胞および DRG 神経細胞への異なるリン脂質から構成されるリポソームの軸索逆行性輸送

(a) 前脛骨筋投与のシェーマと投与したリポソーム。
(b) 腰部脊髄の水平断面図。POPC 単独、DSPC 単独、POPC と DSPC から構成されるリポソームの軸索逆行性輸送を示す。運動神経細胞への輸送は、リポソームに付加した DiD の蛍光によって確認した。挿入図は、DiD 陽性の運動神経細胞の高倍率図である 3 種類のリポソームのうち、DSPC リポソームのみが運動神経細胞で確認された。スケールバーは、それぞれ 100μm、30μm。
(c) リポソームの軸索逆行性輸送の効率。CTB で標識された運動神経細胞の総数に対する DiD 陽性の運動神経細胞の割合（n=3/グループ）。DSPC リポソームは 4 つのグループの中で最も高い輸送効率を示した。エラーバーは平均±標準偏差（SD）を示す。
*p < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.
(d) L5 DRG の切片。DRG 神経細胞へのリポソームの軸索逆行性輸送を示す。DRG 神経細胞への輸送は、リポソームに付加した DiD の蛍光によって確認した。3 種類のリポソームのうち、DSPC リポソームのみが DRG 神経細胞で同定された。スケールバーは、40μm。
(e) Fluoro-Gold で標識された神経細胞の総数に対する DiD 陽性の DRG 神経細胞の割合を定量した（n=3/グループ）。エラーバーは平均±SD を示す。
*p < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.

3. R8 による修飾はリポソームの培養脊髄運動神経細胞への取り込みを向上させる

リポソームに、表面修飾を加えることにより、細胞への取り込み効率、細胞内での安定性、endosomal escape などの生体内挙動を制御できる(Khalil et al., 2008, Li et al., 2014, Walker et al., 2016, Yamada et al., 2016, Zhao et al., 2017)。そこで、前述の DSPC リポソームに、CTB や R8 で表面修飾を行う事でさらに、末梢組織から脊髄への逆行性輸送効率を向上できると考えた。

CTB はコレラ毒素の一部を構成する 5 量体のタンパク質で、細胞毒性を持たず、神経細胞表面の GM1 受容体を介して細胞内に入り、高効率に軸索逆行性に輸送される(Gonzalez Porras et al., 2016, Zuilhof, 2016)。また、R8 による修飾は、リポソームの細胞内取り込みを大きく促進させる(Yamada et al., 2016 Khalil et al., 2008)。そこで CTB と R8 による修飾の有無の違いによる、4 種類のリポソームに、DiD で標識したものを準備した。

まず、それぞれのリポソームの細胞内取り込み能を、培養脊髄運動神経細胞株である NSC34 motor neuron like cell(Gonzalez Porras et al., 2016, Rusmini et al., 2019)を使用して評価した。培養液に濃度を変えたリポソーム液を添加し、2 時間後に、DiD で標識される細胞の割合を定量した。修飾が無いコントロールリポソームは、いずれの濃度でも、DiD で標識される細胞を全く認めなかった(図 5a,b)。CTB の修飾を施したリポソームは、リン脂質濃度 0.14mM までは、DiD 陽性細胞を認めなかったものの、0.42mM 以上で、DiD 陽性細胞を認めた。一方、R8 または CTB-R8 修飾を施したリポソームは、リン脂質濃度 0.07mM では、DiD 陽性細胞を認めなかったものの、0.14mM 以上で、DiD 陽性細胞を認めた。特に、R8 修飾リポソームは 100%の細胞で取り込まれ、CTB のみ、CTB-R8 修飾のものよりも、統計学的に有意に高かった(図 5a,b)。リン脂質濃度 0.42mM では、R8 修飾と CTB-R8 修飾の両リポソームが、100%の取り込みを示し、CTB のみよりも優れた取り込み効率であった(図 5a,b)。これらの事は、R8 と CTB の修飾がそれぞれ、脊髄運動神経への DSPC リポソームの取り込みに有効であり、特に R8 が効果的であること、R8 と CTB の相加効果はなく、むしろ、CTB の修飾が R8 の効果を阻害する可能性を示唆している。

今回、DSPC リポソームの坐骨神経投与では、修飾なし群でも、脊髄運動神経への取り込みを認めたにも関わらず、この培養細胞では、まったく取り込みを認めなかった。この事は、この in vitro assay が、坐骨神経投与による脊髄運動神経への軸索逆行性輸送を、部分的にのみ模擬していることを示している。

図 5.

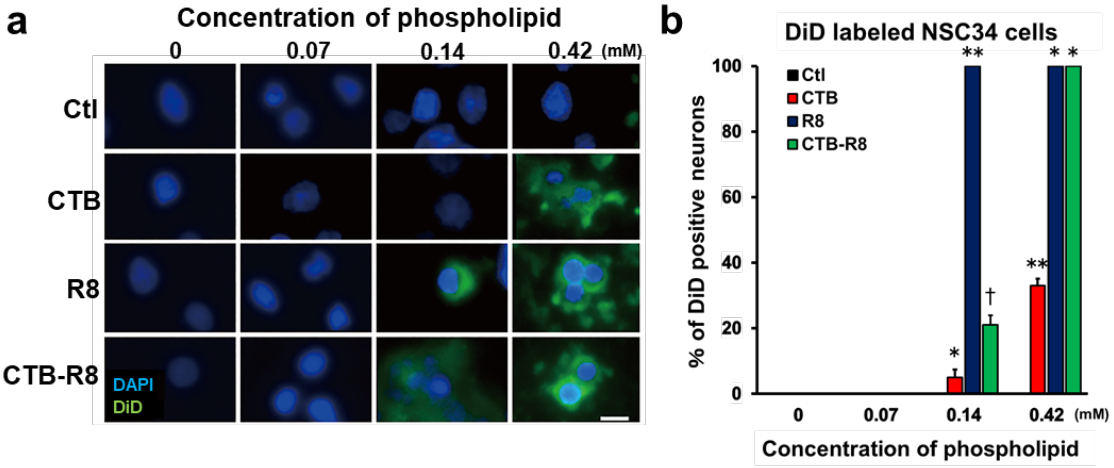

図 5. CTB 及び R8 で修飾したリポソームの NSC34 運動神経細胞様細胞による取込み

(a) CTB と R8 で修飾した DSPC リポソームを用いて培養した NSC34 運動神経細胞様細胞の高倍率画像。リポソームを取り込んだ細胞は DiD 蛍光で識別した。未修飾のリポソームは高濃度でも細胞内に取り込まれなかったが、R8 や CTB で修飾したリポソームは細胞に取り込まれた。スケールバーは、20μm。
(b) DiD 陽性の NSC34 運動神経細胞様細胞の総細胞数に対する割合。サンプルあたり少なくとも 100 個の細胞を定量化した（n=3 サンプル/条件）。R8 修飾リポソームは、リン脂質の濃度が 0.14mM の場合、すべての細胞に取り込まれた。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p, † < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.

4. CTB による修飾はリポソームの末梢神経から脊髄への軸索逆行性輸送を向上させる

次に、前述のリポソーム修飾が、実際の軸索逆行性輸送をどの程度向上させるのか検討した。前述の実験と同様に、4 種類のリポソームを成熟ラットの坐骨神経に投与し、投与後 3 日での脊髄運動神経細胞を評価した。すると、DiD で標識された運動神経細胞の割合は、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(図 6a-d)。修飾に伴う輸送効率の向上率は、CTB 修飾群で 3.9 倍、CTB-R8 修飾群で 3 倍、R8 修飾群で 2.2 倍であった。投与後 10 日後でも評価すると、DiD で標識された運動神経細胞の割合は、3 日後より、約 2 割から 6 割、増加していたが、その傾向は変わらず、CTB 修飾群が一番高く 26.7%で、次に、CTB-R8 修飾群、R8 修飾群、修飾無し群の順であった(図 6e)。

続いて、DRG も評価すると、投与後 3 日目の DiD で標識された DRG 神経細胞の割合は、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、運動神経細胞と同様であった(図 6f,g)。修飾に伴う輸送効率の向上率は、CTB 修飾群で 3.9 倍、R8 修飾群で 2 倍、CTB-R8 修飾群で 2.9 倍であった。また、投与後 10 日での検討でも、DiD で標識された DRG 神経細胞の割合は増加し、CTB 修飾群が 23.4%と一番高く、次に、CTB-R8 修飾群、R8 修飾群、修飾無し群の順であった(図 6h)。

以上のことより、CTB、R8、あるいはその両者の修飾により、リポソームの脊髄運動神経細胞および DRG 神経細胞への軸索逆行性輸送効率が向上する事が明らかとなった。特に、CTB 単独修飾が一番効果的で、R8 と CTB の相乗、相加効果はなく、むしろ、R8 の修飾が CTB 修飾の効果を阻害し、前述の培養実験と逆の結果であった。また、修飾効果に、神経細胞特異性はないこと、少なくとも投与後 10 日目までは、時間依存的に輸送効率が向上することも明らかとなった。

図 6.

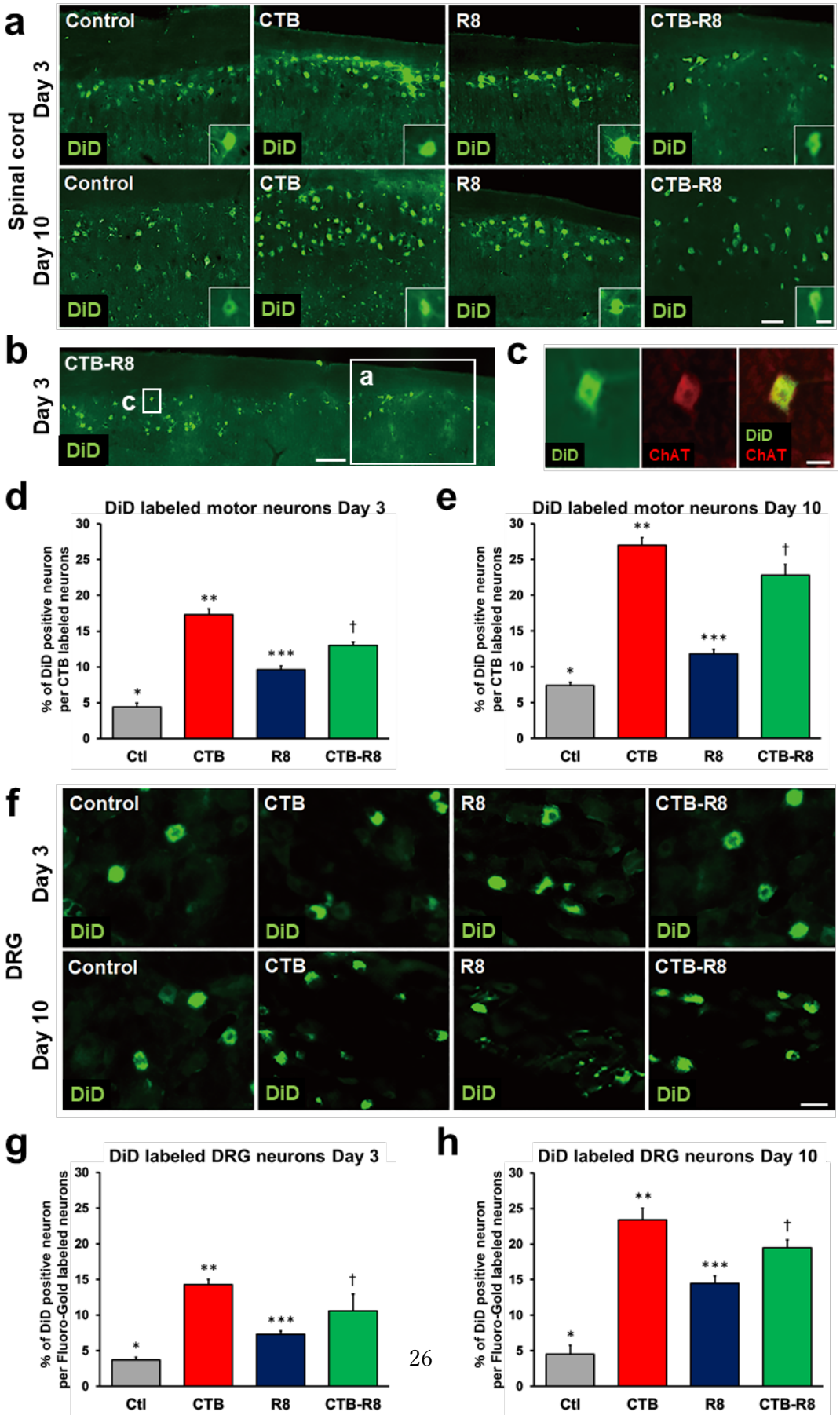
a
Spinal cord
Day 3
Day 10
Control
CTB
R8
CTB-R8
DiD
b
Day 3
CTB-R8
c
a
DiD
c
DiD
ChAT
DiD
ChAT
d
DiD labeled motor neurons Day 3
% of DiD positive neuron per CTB labeled neurons
Ctl
CTB
R8
CTB-R8
e
DiD labeled motor neurons Day 10
% of DiD positive neuron per CTB labeled neurons
f
DRG
Day 3
Day 10
g
DiD labeled DRG neurons Day 3
% of DiD positive neuron per Fluoro-Gold labeled neurons
h
DiD labeled DRG neurons Day 10
% of DiD positive neuron per Fluoro-Gold labeled neurons

図 6. CTB および R8 で修飾したリポソームの坐骨神経注入 3 日後および 10 日後の脊髄運動神経細胞および DRG 神経細胞への逆行性輸送

(a) 坐骨神経注射の 3 日後と 10 日後の腰部脊髄の水平断面図。リポソームが軸索輸送された運動神経細胞は、DiD 蛍光によって識別された。挿入図は DiD 陽性の運動神経細胞の高倍率図。スケールバーは、それぞれ 100μm、30μm。
(b) CTB-R8 修飾リポソームを坐骨神経に注射してから 3 日後の腰部脊髄の低倍率図。枠で囲んだ部分は a および c の位置を示す。スケールバーは、300μm。
(c) (b) の高倍率図。DiD 陽性の神経細胞はコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）陽性であった。スケールバーは、30μm。
(d) 坐骨神経注入 3 日後のリポソームの逆行性輸送の効率。CTB で標識した運動神経細胞の総数に対する DiD 陽性運動神経細胞の割合（n=5/グループ）。CTB を結合させたリポソームは、4 つのグループの中で最も高い輸送効率を示した。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p, ***p, † < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.
(e) 坐骨神経注入 10 日後のリポソームの逆行性輸送の効率。CTB 標識運動神経細胞の総数に対する DiD 標識運動神経細胞の割合（n=5/群）。3 日目に比べて全体的に輸送効率が向上した。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p, ***p, † < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.
(f) L5 DRG の切片。リポソームが輸送された DRG 神経細胞は、DiD 蛍光によって識別された。スケールバーは、40μm。
(g) 坐骨神経注入 3 日後の DRG 神経細胞へのリポソームの逆行輸送の効率。坐骨神経注入 3 日後の DRG 神経細胞の Fluoro-Gold 標識神経細胞総数に対する DiD 標識神経細胞の割合を定量した（n=5/グループ）。CTB で修飾したリポソームは、4 つのグループの中で最も高い輸送効率を示した。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p, ***p, † < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.
(h) 坐骨神経注入 10 日後の DRG 神経細胞へのリポソームの逆行性輸送の効率。坐骨神経注入 10 日後の DRG 神経細胞の Fluoro-Gold 標識神経細胞

総数に対する DiD 標識神経細胞の割合を定量した（n=5/グループ）。3 日目に比べて全体的に輸送効率が向上した。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p, ***p, † < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.

5. CTB による修飾はリポソームの筋肉から脊髄への軸索逆行性輸送を向上させる

続いて、CTB や R8 によるリポソームの修飾が、筋肉からの軸索逆行性輸送も向上効果を持つか検討した。前述と同様の CTB や R8 が付加された、4 種類のリポソームを成熟ラットの前脛骨筋に 2ul 投与し、3 日後に灌流固定した。

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 修飾リポソームは、それぞれ脊髄運動神経細胞に集積していたが、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に集積していなかった(図 7a)。

DiD で標識された運動神経細胞の割合は、CTB 修飾リポソームで 4.8%と、修飾無しリポソームの約 1.8 倍であった(図 7b)。投与後 10 日目であっても、R8 修飾リポソームと CTB-R8 リポソームは、脊髄運動神経に集積しなかったが、修飾無しリポソームは 2.5 倍、CTB 修飾リポソームは 2.9 倍、輸送効率が向上した(図 7c)。

DRG を評価すると、脊髄と同様に、投与後の日数に関わらず、R8 修飾リポソーム、CTB-R8 リポソームは、全く DRG 神経細胞に集積しておらず、修飾なしリポソームと CTB 修飾リポソームが DRG 神経細胞に集積していた (図 7d)。

DiD で標識された神経細胞の割合は、投与後 3 日目と 10 日目で、CTB 修飾リポソームがそれぞれ 4.1%と 7.3%、修飾無しリポソームで 2.3%と 3.2%であった(図 7e,f)。

以上の結果は、CTB の修飾が、リポソームの筋肉から脊髄運動神経細胞や DRG 神経細胞への軸索逆行性輸送を向上させることを示している。

また、神経内投与では有効であった R8 修飾が、筋肉内投与では、逆に阻害する現象が認められ、神経と筋肉では、リポソームの取り込み機序が大きく異なることを示唆している。

図 7.

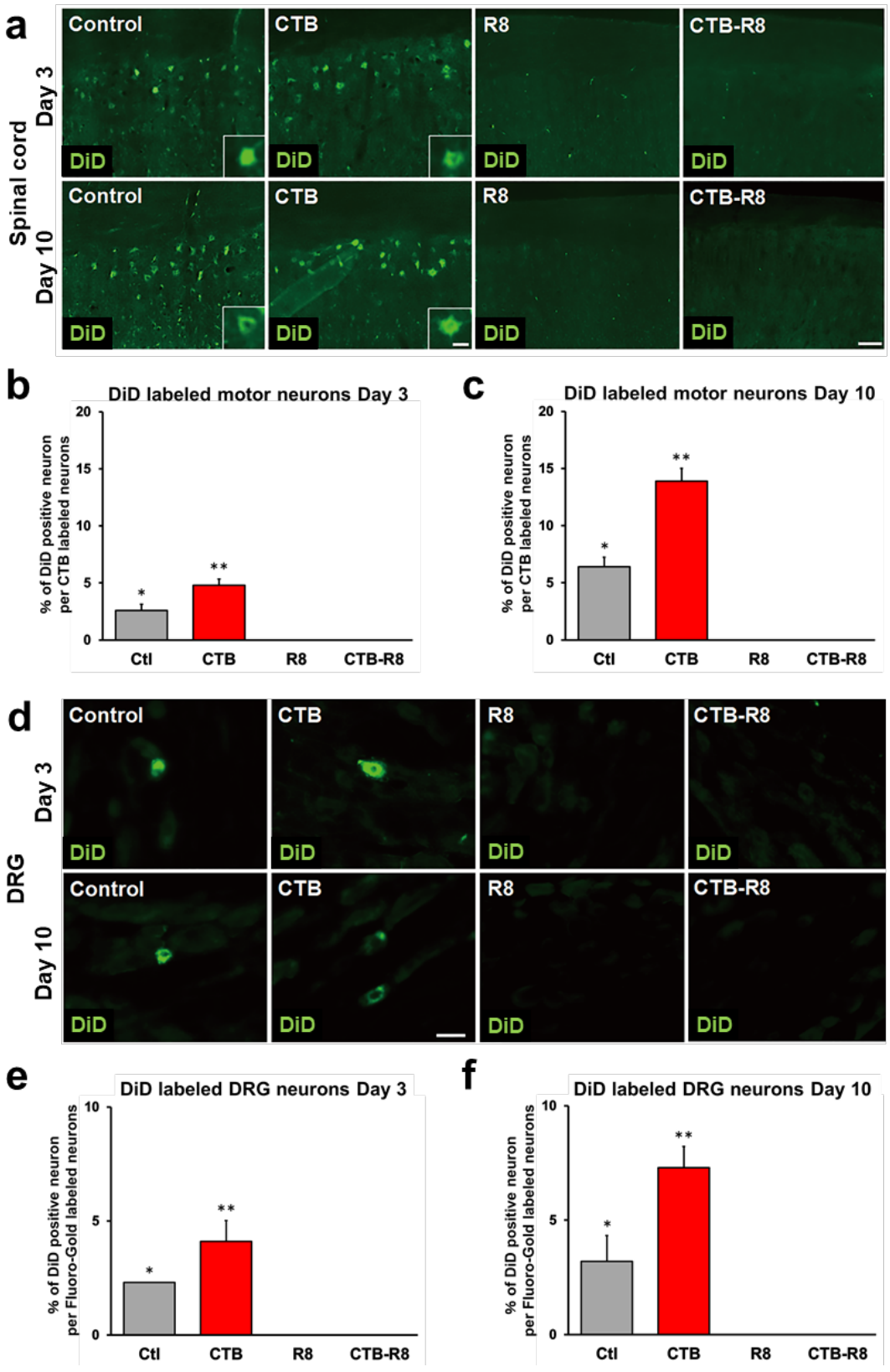
a
Spinal cord
Day 3
Day 10
Control
CTB
R8
CTB-R8
DiD
b
DiD labeled motor neurons Day 3
% of DiD positive neuron per CTB labeled neurons
Ctl
CTB
R8
CTB-R8
c
DiD labeled motor neurons Day 10
d
DRG
e
DiD labeled DRG neurons Day 3
% of DiD positive neuron per Fluoro-Gold labeled neurons
f
DiD labeled DRG neurons Day 10

図 7. CTB および R8 で修飾したリポソームの前脛骨筋注入 3 日後および 10 日後の脊髄運動神経細胞および DRG 神経細胞への逆行性輸送

(a) 腰部脊髄の水平断面図。リポソームが軸索輸送された運動神経細胞は、DiD 蛍光によって識別された。挿入図は DiD 陽性の運動神経細胞の高倍率図。CTB 修飾リポソームは運動神経細胞に輸送されたが、R8 修飾リポソームは輸送されなかった。スケールバーは、それぞれ 100μm、30μm。
(b) 前脛骨筋に注射してから 3 日後のリポソームの逆行性輸送の効率。CTB で標識した運動神経細胞の総数に対する DiD 陽性運動神経細胞の割合（n=5/グループ）。CTB で修飾したリポソームは、4 つのグループの中で最も高い輸送効率を示した。R8 および CTB-R8 修飾リポソームは、運動神経細胞では全くされていなかった。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.
(c) 前脛骨筋注射から 10 日後のリポソームの逆行性輸送の効率を示す。CTB 標識運動神経細胞の総数に対する DiD 陽性運動神経細胞の割合（n=5/群）。3 日目に比べて全体的に輸送効率が向上した。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.
(d) L4 DRG の切片。リポソームが輸送された DRG 神経細胞は、DiD 蛍光によって識別された。スケールバーは、40μm。
(e) 前脛骨筋注射の 3 日後に、Fluoro-Gold 標識神経細胞の総数に対する DiD 陽性の DRG 神経細胞の割合を定量した（n=5/グループ）。CTB で修飾したリポソームは、4 つのグループの中で最も高い輸送効率を示した。R8 および CTB-R8 修飾リポソームは、DRG 神経細胞には全く輸送されなかった。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.
(f) 前脛骨筋注射から 10 日後に DiD 標識された DRG 神経細胞の、Fluoro-Gold 標識神経細胞総数に対する割合を定量した（n=5/グループ）。3 日目と比較して、全体的に輸送効率が向上した。エラーバーは平均±SD を示す。*p, **p < 0.05 to all other groups by one-way ANOVA with Tukey-Kramer test.

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。

1. 軸索逆行性輸送に必要な要件

軸索逆行性輸送にはダイニンを介した速い輸送と、拡散を介した遅い移動がある。齧歯類において、前者は 73 mm / day or more in live rats であり(Abraham et al., 2018)、後者は 0.2～0.6 ㎜/ day とされる(Balice-Gordon et al., 1993, Godement et al., 1987)。これは、成熟ラットの下肢筋肉から脊髄の細胞体への移動に、前者で約 1.4 日、後者は 17 日～50 日かかる事になる。人間の場合はさらに長期間を要するため、DDS としての利用では、リポソームはダイニンを介した速い軸索輸送システムに積載される必要がある。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移動と 3 つの過程を経る必要があり、細胞体を直接の標的とする場合と比べて、DDS に求められる要件は多い。また、細胞体への移動に数日以上の期間を要するため。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 も重要になる。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。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。

2. リポソームの取り込み

リポソームの神経内投与の場合、リポソームは軸索表面で取り込まれる。軸索は分子機能的に細胞体と異なる点もあるが、細胞体と同じく、表面は脂質二重層で構成されている(Muzio and Cascella, 2021)。そして、リポソームが細胞体で取り込まれる際の機序である様々な endocytosis のうち、

少なくとも、macropinocytosis と clathrin dependent endocytosis の機序は有するため(Aravamudhan et al., 2020)、軸索表面のリポソーム取り込み機序は、細胞の取り込み機序と、あまり変わらない可能性が高い。一方、リポソームの筋肉投与の場合、軸索の終末である神経筋接合部や感覚器官での取り込みとなる(Banks et al., 2009, Morrison, 2016)。神経終末では、アセチルコリンなどの神経伝達物質を含む小胞の放出と取り込みが行われるが(Ribeiro et al., 2006, Royle and Lagnado, 2003)、シナプス間隙など、終末特異的な構造があるため(Sudhof, 2004)、リポソームの取り込み効率向上に必要な要件は、細胞体と異なる可能性がある。

3. ダイニンへの積載性

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(Hirokawa et al., 2010, Walsby, 1994)。軸索逆行性輸送を目的とした DDS 開発には、DDS のダイニンへの積載効率を高める必要があるが、未だダイニンに積載される物質や積載機序の詳細は未解明な部分も多く、今後の研究の進展が望まれる。

4. リポソームの脂質組成

今回、DSPC の割合が多くなるに従い、軸索逆行性の輸送効率が上昇した。この理由として、大まかに 2 つの可能性が考えられる。ひとつは、脂質組成の違いによって細胞内への取り込み効率が変化する事が知られている事から(Suesca et al., 2013)、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可能性である。もうひとつは、DSPC の方が POPC よりも膜流動性が低いため(Boggs, 1987)、DSPC の割合が多くなるに従い、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である。

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(DSPE)や 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine(POPE)などの脂質を使用した場合の検討など、脂質組成が軸索逆行性の輸送効率に及ぼす検討をさらに進める事で、軸索逆行性輸送により最適なリポソームを開発することができる。

5. CTB 修飾

今回、CTB 修飾が、軸索逆行性輸送効率を上昇させた。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いる(Jobling et al., 2012, Melkoumov et al., 2019)。CTB で修飾されたリポソームは 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との報告もあり(Gonzalez Porras et al., 2016, Walker et al., 2016)、今回の神経内投与や筋肉投与でも、同様の機序が働いた結果、軸索内への取り込みが向上したと考えられる。また CTB で修飾する事により、endosomal escape が向上するため(Gonzalez Porras et al., 2018, Walker et al., 2016)、軸索内でのリポソーム分解が抑制された可能性もある。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あり(Gonzalez Porras et al., 2016)、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。

6. R8 修飾

R8 は、8 つのアルギニンが結合したペプチドで、細胞透過性に優れるが、タンパク質、核酸、リポソームなどに結合させると、それらの細胞内移行性を向上させる(Futaki et al., 2001, Khalil et al., 2008)。そこで、リポソームの細胞内取り込み向上を目的として、リポソーム修飾に良く使用されてきた(Khalil et al., 2008, Yamada et al., 2016)。本研究でも、R8 修飾はリポソームの培養神経細胞への取り込み効率を向上させていた。これは、R8 修飾によってリポソームのζ電位が上昇するので、プロテオグリカンなどにより負に帯電した細胞表面との相互作用が向上する事が、一因であると考えられる(Futaki, 2017, Sellers et al., 2016)。よって、R8 修飾が末梢神経内投与によるリポソームの軸索逆行性輸送の効率を向上させた理由も、ダイニンへの積載性向上、生体安定性の向上よりも、軸索での取り込み効率向上が理由だと考える。一方、筋肉投与では、R8 修飾はリポソームの軸索逆行性輸送能を消失させた。その原因として、R8 修飾によって、リポソームの筋細胞への取り込み能が向上し、そこで、神経筋接合部で取りこまれる前に、筋細胞へ取り込まれてしまった可能性がある。特に、前述の神経終末の構造上の特殊性から(Sudhof, 2004)、R8 修飾が神経終末での取り込み能

向上に寄与しない場合、あるいは、阻害的になる場合、相対的に筋細胞での取り込みが促進する。今回の知見は、筋肉投与によって、リポソームを軸索逆行性輸送させる場合、単純に汎用性の高い、細胞非特異的な、取り込み効率向上効果のある修飾では、輸送効率を逆に低下させる可能性があることを示唆している。

7. CTB と R8 の同時修飾による相乗効果

本研究では、投与経路に関わらず、CTB と R8 修飾の併用による、輸送効率への相乗、相加効果は認めなかった。CTB と R8 の両者で同時修飾したリポソームに関する過去の報告は、渉猟した範囲では無かったため、今回の結果が、軸索逆行性輸送特異的なものかは不明である。軸索内への取り込み、ダイニンへの積載性、生体安定性のどの過程で、併用が阻害的に機能したかは不明であるが、単純に修飾を増やせば良いわけでないことを示し、軸索逆行性輸送の難しさを示している。

8. 軸索輸送とサイズ

リポソームのサイズは細胞への取り込み効率を決める重要な要因であり、HepG2 cells を用いた取り込み実験では、87～222 nm の大きさのリポソームで良好な細胞取り込みを示し、この範囲のサイズでは取り込み効率にほとんど違いが無かったとの報告がある(Sakai-Kato et al., 2020)。一方で Caco-2 細胞を用いた取り込み実験では、40.6nm～276.6nm までの範囲の大きさのリポソームでは、より小さいリポソームの方が取り込み効率は高くなったと報告されている(Andar et al., 2014)。このような報告はあるものの、細胞の種類によって、適切なリポソームサイズは変わる事も指摘されており(Andar et al., 2014)、運動神経細胞での取り込みにとって適切なリポソームサイズは上記とは少し異なる可能性がある。また、リポソームのサイズはダイニンへの積載性にも関与すると考えられる。ダイニンカーゴとしてアクティブゾーンタンパク質小胞、グリシン受容体、ミトコンドリア、初期エンドソーム、後期エンドソームなどがあり、その大きさについての詳細は不明なものが多い。しかしながら、少なくとも軸索逆行性輸送でダイニンに積載される初期エンドソームのサイズは 400nm 以下であると

の報告がある(Hirokawa et al., 2010, Jovic et al., 2010)。これらの点から、本研究で使用したリポソームのサイズ、径 101nm～200nm は、軸索逆行性輸送に適切なサイズであると思われ、CTB や R8 などの修飾がないものでも、輸送された理由の 1 つと考える。

9. 過去の文献との比較

過去のリポソームの軸索逆行性輸送に関する研究として、CTB 修飾 protocells を胸膜に投与し、24 時間後に横隔神経内の存在を示した研究がある(Gonzalez Porras et al., 2018)。この研究では、脊髄の神経細胞体まで、protocells が輸送されたかは不明であり、軸索への取り込み能のみを示すにとどまっている。このリポソームの組成の詳細な割合は不明であるものの、構成脂質に DSPC や Chol を使用している点、PEG、CTB の使用など、本実験で用いたリポソームと本質的な部分は共通している。一方、silica による表面コーティングを使用している点で異なっている。また、蛍光標識に rhodamine を使用した点、待機期間が 24 時間と短い点、投与モデルが異なる点など、評価方法が異なる点もあり、2 つのリポソームの軸索逆行性輸送能を直接比較することは難しい。

10. リポソームの DDS としての利点と欠点

リポソームは DDS としての大きな 3 つの利点がある。1 つは、タンパク、核酸、化合物など、様々な物質を封入可能であること(Nguyen et al., 2016, Ross et al., 2018)。2 つ目は、色々な修飾を施すことで、DDS としての挙動を操作できること(Futaki et al., 2001, Gonzalez Porras et al., 2016, Nguyen et al., 2016, Walker et al., 2016)。3 つ目は、すでに DDS として使用されてきた実績があり、安全性が保証されていることである(Abu Lila and Ishida, 2017, Raoufi et al., 2021, Theoharides et al., 2021)。一方で、いくつかの課題もある。リポソームへの物質の封入効率が封入物質の大きさや物性に依存するため、それぞれの物質に対して、封入方法や、リポソームデザインの詳細な検討や調整が必要になること、核酸の封入が可能であるが、一過性の発現にとどまり、AAV のように永続的に目的の分子を発現できる訳ではないことなどである。

本研究では、末梢組織に投与したリポソームが脊髄運動神経細胞や DRG 神経細胞に輸送される事を示したが、実際に、治療として使用するためには、封入物質に応じた最適化が必要になる。

11. 適応疾患

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 (Federici and Boulis, 2007, Houdebine et al., 2019, Kheder and Nair, 2012, Lee-Hotta et al., 2019, Mòdol et al., 2014, Nabizadeh et al., 2021)。運動神経細胞、DRG 神経細胞が関与する病態に関わる遺伝子や治療分子も近年、明らかとなってきた。例えば、脊髄損傷に伴う痙性には、脊髄運動神経の KCC2 の down regulation が関与しており(Boulenguez et al., 2010)、KCC2 を upregulation する CLP257、290(Gagnon et al., 2013, Lee-Hotta et al., 2019)などが治療薬の候補である。さらに脊髄運動神経細胞が障害される ALS や SMA の原因遺伝子として、*SOD1*、*C9orf72* や *SMN1* が、それぞれ特定されおり(Cappella et al., 2019, Houdebine et al., 2019)、それらを標的とする治療方法が開発中である。また、慢性疼痛には、DRG 神経細胞の NKCC１の upregulation が関与し、bumetanide や furosemide が NKCC1 の upregulation を抑制し、疼痛を緩和する(Mòdol et al., 2014)。リポソームを応用した軸索逆行性の DDS は、これらの疾患に対する低侵襲、高効率、標的特異的な DDS になる可能性を持っており、輸送効率の向上を目的とした、更なる研究が必要である。また、本研究では、神経細胞体までのリポソームの輸送を、リポソーム表面に結合させた DiD の検出によって決定していたが、封入物質が、細胞体で機能したことを証明しておらず、DDS としての証明は不完全である。そこで、今後の研究課題は、mRNA によるタンパク発現のように、封入物質が神経細胞体で機能することを証明する事となる。

総括および結論

●末梢組織から中枢神経へ軸索輸送されるリポソームの開発を試みた。
●DSPC、Chol、PEG から構成されるリポソームは、神経投与だけでなく、筋肉投与でも、軸索逆行性に腰髄運動神経細胞や DRG 神経細胞に輸送された。
●リポソームを R8 で修飾する事により、神経投与後の輸送効率は向上した一方、筋肉投与後の輸送は消失した。
●リポソームを CTB で修飾する事により、神経投与及び筋肉投与後の輸送効率は、大きく上昇した。

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、リポソームの逆行性輸送には、最適な脂質組成があり、CTB や R8 による表面修飾によって、さらなる輸送効率の向上が可能である事が明らかとなった。今後、リポソームの改良によって、いっそうの輸送効率の向上が期待される。本研究結果は、末梢組織から脊髄運動神経細胞や DRG 神経細胞を標的とした DDS 開発の基盤となる。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野博士課程の在学中に行った研究をまとめたものです。稿を終えるにあたり、研究の機会をくださった北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・岩崎倫政教授に深い謝意を表します。また、本研究全般にわたり、直接のご指導ご鞭撻を賜りました同運動器先端医学分野・角家健特任准教授に心より感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました北海道大学薬学部薬剤分子設計学研究室の教員各位、教室員の皆様そして、北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室の教員各位、教室員の皆様、のすべてのみなさまに、心より感謝を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献　References

Abraham, Z., Hawley, E., Hayosh, D., Webster-Wood, V.A., and Akkus, O. (2018). Kinesin and Dynein Mechanics: Measurement Methods and Research Applications. J Biomech Eng 140, 0208051-02080511.

Abu Lila, A.S., and Ishida, T. (2017). Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. Biol Pharm Bull 40, 1-10.

Andar, A.U., Hood, R.R., Vreeland, W.N., Devoe, D.L., and Swaan, P.W. (2014). Microfluidic preparation of liposomes to determine particle size influence on cellular uptake mechanisms. Pharm Res 31, 401-413.

Aravamudhan, P., Raghunathan, K., Konopka-Anstadt, J., Pathak, A., Sutherland, D.M., Carter, B.D., and Dermody, T.S. (2020). Reovirus uses macropinocytosis-mediated entry and fast axonal transport to infect neurons. PLoS Pathog 16, e1008380.

Balice-Gordon, R.J., Chua, C.K., Nelson, C.C., and Lichtman, J.W. (1993). Gradual loss of synaptic cartels precedes axon withdrawal at developing neuromuscular junctions. Neuron 11, 801-815.

Banks, R.W., Hulliger, M., Saed, H.H., and Stacey, M.J. (2009). A comparative analysis of the encapsulated end-organs of mammalian skeletal muscles and of their sensory nerve endings. J Anat 214, 859-887.

Banks, W.A. (2016). From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. Nat Rev Drug Discov 15, 275-292.

Bloom, D.C., Watson, Z.L., and Neumann, D.M. (2019). Peripheral AAV Injection for Retrograde Transduction of Dorsal Root and Trigeminal Ganglia. Methods Mol Biol 1950, 237-247.

Boggs, J.M. (1987). Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. Biochim Biophys Acta 906, 353-404.

Boulenguez, P., Liabeuf, S., Bos, R., Bras, H., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Stil, A., Darbon, P., Cattaert, D., Delpire, E., Marsala, M., and Vinay, L. (2010). Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. Nat Med 16, 302-307.

Brink, E.E., Morrell, J.I., and Pfaff, D.W. (1979). Localization of lumbar epaxial motoneurons in the rat. Brain Res 170, 23-41.

Cappella, M., Ciotti, C., Cohen-Tannoudji, M., and Biferi, M.G. (2019). Gene Therapy for ALS-A Perspective. Int J Mol Sci 20.

Federici, T., and Boulis, N. (2007). Gene therapy for peripheral nervous system diseases. Curr Gene Ther 7, 239-248.

Fowler, M.J., Cotter, J.D., Knight, B.E., Sevick-Muraca, E.M., Sandberg, D.I., and Sirianni, R.W. (2020). Intrathecal drug delivery in the era of nanomedicine. Adv Drug Deliv Rev 165-166, 77-95.

Futaki, S. (2017). [Membrane translocation of arginine-rich cell-penetrating peptides]. Seikagaku 89, 8-14.

Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. J Biol Chem 276, 5836-5840.

Gagnon, M., Bergeron, M.J., Lavertu, G., Castonguay, A., Tripathy, S., Bonin, R.P., Perez-Sanchez, J., Boudreau, D., Wang, B., Dumas, L., Valade, I., Bachand, K., Jacob-Wagner, M., Tardif, C., Kianicka, I., Isenring, P., Attardo, G., Coull, J.A., and De Koninck, Y. (2013). Chloride extrusion enhancers as novel therapeutics for neurological diseases. Nat Med 19, 1524-1528.

Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., and Bonhoeffer, F. (1987). A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. Development 101, 697-713.

Gonzalez Porras, M.A., Durfee, P., Giambini, S., Sieck, G.C., Brinker, C.J., and Mantilla, C.B. (2018). Uptake and intracellular fate of cholera toxin subunit b-modified mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers (aka protocells) in motoneurons. Nanomedicine 14, 661-672.

Gonzalez Porras, M.A., Durfee, P.N., Gregory, A.M., Sieck, G.C., Brinker, C.J., and Mantilla, C.B. (2016). A novel approach for targeted delivery to motoneurons using cholera toxin-B modified protocells. J Neurosci Methods 273, 160-174.

Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. Neuron 68, 610-638.

Hollis Ii, E.R., Kadoya, K., Hirsch, M., Samulski, R.J., and Tuszynski, M.H. (2008). Efficient Retrograde Neuronal Transduction Utilizing Self-complementary AAV1. Mol Ther 16, 296-301.

Houdebine, L., D'Amico, D., Bastin, J., Chali, F., Desseille, C., Rumeau, V., Soukkari, J., Oudot, C., Rouquet, T., Bariohay, B., Roux, J., Sapaly, D., Weill, L., Lopes, P., Djouadi, F., Bezier, C., Charbonnier, F., and Biondi, O. (2019). Low-Intensity Running and High-Intensity Swimming Exercises Differentially Improve Energy Metabolism in Mice With Mild Spinal Muscular Atrophy. Front Physiol 10, 1258.

Inoh, Y., Hirose, T., Yokoi, A., Yokawa, S., and Furuno, T. (2020). Effects of lipid composition in cationic liposomes on suppression of mast cell activation. Chem Phys Lipids 231, 104948.

Inoh, Y., Nagai, M., Matsushita, K., Nakanishi, M., and Furuno, T. (2017). Gene transfection efficiency into dendritic cells is influenced by the size of cationic liposomes/DNA complexes. Eur J Pharm Sci 102, 230-236.

Jan, A., Richner, M., Vægter, C.B., Nyengaard, J.R., and Jensen, P.H. (2019). Gene Transfer in Rodent Nervous Tissue Following Hindlimb Intramuscular Delivery of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotypes AAV2/6, AAV2/8, and AAV2/9. Neurosci Insights 14, 1179069519889022.

Jobling, M.G., Yang, Z., Kam, W.R., Lencer, W.I., and Holmes, R.K. (2012). A single native ganglioside GM1-binding site is sufficient for cholera toxin to bind to cells and complete the intoxication pathway. mBio 3.

Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J., and Caplan, S. (2010). The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. Histol Histopathol 25, 99-112.

Khalil, I.A., Kogure, K., Futaki, S., and Harashima, H. (2008). Octaarginine-modified liposomes: enhanced cellular uptake and controlled intracellular trafficking. Int J Pharm 354, 39-48.

Kheder, A., and Nair, K.P. (2012). Spasticity: pathophysiology, evaluation and management. Pract Neurol 12, 289-298.

Lee-Hotta, S., Uchiyama, Y., and Kametaka, S. (2019). Role of the BDNF-TrkB pathway in KCC2 regulation and rehabilitation following neuronal injury: A mini review. Neurochem Int 128, 32-38.

Li, Y., Cheng, Q., Jiang, Q., Huang, Y., Liu, H., Zhao, Y., Cao, W., Ma, G., Dai, F., Liang, X., Liang, Z., and Zhang, X. (2014). Enhanced endosomal/lysosomal escape by distearoyl phosphoethanolamine-polycarboxybetaine lipid for systemic delivery of siRNA. J Control Release 176, 104-114.

Lu, C.T., Zhao, Y.Z., Wong, H.L., Cai, J., Peng, L., and Tian, X.Q. (2014). Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. Int J Nanomedicine 9, 2241-2257.

Melkoumov, A., St-Jean, I., Banquy, X., Leclair, G., and Leblond Chain, J. (2019). GM1-Binding Conjugates To Improve Intestinal Permeability. Mol Pharm 16, 60-70.

Mòdol, L., Cobianchi, S., and Navarro, X. (2014). Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. Pain 155, 1577-1590.

Montero, A.S., Bielle, F., Goldwirt, L., Lalot, A., Bouchoux, G., Canney, M., Belin, F., Beccaria, K., Pradat, P.F., Salachas, F., Boillée, S., Lobsiger, C., Lafon, C., Chapelon, J.Y., and Carpentier, A. (2019). Ultrasound-Induced Blood-Spinal Cord Barrier Opening in Rabbits. Ultrasound Med Biol 45, 2417-2426.

Morrison, B.M. (2016). Neuromuscular Diseases. Semin Neurol 36, 409-418.

Muzio, M.R., and Cascella, M. 2021. Histology, Axon. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.

Nabizadeh, F., Balabandian, M., Sharafi, A.M., Ghaderi, A., Rostami, M.R., and Naser Moghadasi, A. (2021). Statins and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. Acta Neurol Belg.

Nguyen, T.X., Huang, L., Gauthier, M., Yang, G., and Wang, Q. (2016). Recent advances in liposome surface modification for oral drug delivery. Nanomedicine (Lond) 11, 1169-1185.

Papisov, M.I., Belov, V.V., and Gannon, K.S. (2013). Physiology of the intrathecal bolus: the leptomeningeal route for macromolecule and particle delivery to CNS. Mol Pharm 10, 1522-1532.

Peyronnard, J.M., Charron, L.F., Lavoie, J., and Messier, J.P. (1986). Motor, sympathetic and sensory innervation of rat skeletal muscles. Brain Res 373, 288-302.

Raoufi, E., Bahramimeimandi, B., Salehi-Shadkami, M., Chaosri, P., and Mozafari, M.R. (2021). Methodical Design of Viral Vaccines Based on Avant-Garde Nanocarriers: A Multi-Domain Narrative Review. Biomedicines 9.

Reinhold, A.K., and Rittner, H.L. (2020). Characteristics of the nerve barrier and the blood dorsal root ganglion barrier in health and disease. Exp Neurol 327, 113244.

Ribeiro, F.M., Black, S.A., Prado, V.F., Rylett, R.J., Ferguson, S.S., and Prado, M.A. (2006). The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. J Neurochem 97, 1-12.

Ross, C., Taylor, M., Fullwood, N., and Allsop, D. (2018). Liposome delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease. Int J Nanomedicine 13, 8507-8522.

Royle, S.J., and Lagnado, L. (2003). Endocytosis at the synaptic terminal. J Physiol 553, 345-355.

Rusmini, P., Cortese, K., Crippa, V., Cristofani, R., Cicardi, M.E., Ferrari, V., Vezzoli, G., Tedesco, B., Meroni, M., Messi, E., Piccolella, M., Galbiati, M., Garrè, M., Morelli, E., Vaccari, T., and Poletti, A. (2019). Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. Autophagy 15, 631-651.

Sakai-Kato, K., Yoshida, K., Takechi-Haraya, Y., and Izutsu, K.I. (2020). Physicochemical Characterization of Liposomes That Mimic the Lipid Composition of Exosomes for Effective Intracellular Trafficking. Langmuir 36, 12735-12744.

Sellers, D.L., Bergen, J.M., Johnson, R.N., Back, H., Ravits, J.M., Horner, P.J., and Pun, S.H. (2016). Targeted axonal import (TAxI) peptide delivers functional proteins into spinal cord motor neurons after peripheral administration. Proc Natl Acad Sci U S A 113, 2514-2519.

Sudhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. Annu Rev Neurosci 27, 509-547.

Suesca, E., Alejo, J.L., Bolaños, N.I., Ocampo, J., Leidy, C., and González, J.M. (2013).

Sulfocerebrosides upregulate liposome uptake in human astrocytes without inducing a proinflammatory response. Cytometry A 83, 627-635.

Theoharides, T.C., Lauritano, D., Ronconi, G., Calvisi, V., and Conti, P. (2021). Antibodies for COVID-19 - which, when and how long? J Biol Regul Homeost Agents 35, 417-422.

Walker, W.A., Tarannum, M., and Vivero-Escoto, J.L. (2016). Cellular Endocytosis and Trafficking of Cholera Toxin B-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles. J Mater Chem B 4, 1254-1262.

Walsby, A.E. (1994). Gas vesicles. Microbiol Rev 58, 94-144.

Wang, J., and Zhang, L. (2021). Retrograde Axonal Transport Property of Adeno-Associated Virus and Its Possible Application in Future. Microbes Infect, 104829.

Wang, L.J., Lu, Y.Y., Muramatsu, S., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Okada, T., Mizukami, H., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nagatsu, T., Ozawa, K., and Nakano, I. (2002). Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci 22, 6920-6928.

Yamada, Y., Furukawa, R., and Harashima, H. (2016). A Dual-Ligand Liposomal System Composed of a Cell-Penetrating Peptide and a Mitochondrial RNA Aptamer Synergistically Facilitates Cellular Uptake and Mitochondrial Targeting. J Pharm Sci 105, 1705-1713.

Yao, F., Zhang, E., Gao, Z., Ji, H., Marmouri, M., and Xia, X. (2018). Did you choose appropriate tracer for retrograde tracing of retinal ganglion cells? The differences between cholera toxin subunit B and Fluorogold. PLoS One 13, e0205133.

Zhao, L., Chen, G., Li, J., Fu, Y., Mavlyutov, T.A., Yao, A., Nickells, R.W., Gong, S., and Guo, L.W. (2017). An intraocular drug delivery system using targeted nanocarriers attenuates retinal ganglion cell degeneration. J Control Release 247, 153-166.

Zheng, H., Qiao, C., Wang, C.H., Li, J., Li, J., Yuan, Z., Zhang, C., and Xiao, X. (2010). Efficient retrograde transport of adeno-associated virus type 8 to spinal cord and dorsal root ganglion after vector delivery in muscle. Hum Gene Ther 21, 87-97.

Zuilhof, H. (2016). Fighting Cholera One-on-One: The Development and Efficacy of Multivalent Cholera-Toxin-Binding Molecules. Acc Chem Res 49, 274-285.