

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19908

研究課題名(和文)細胞外小胞を利用した経鼻脳デリバリー法の開発

研究課題名(英文)Development of nose to brain delivery method using extracellular vesicles.

研究代表者

高倉 喜信(Takakura, Yoshinobu)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30171432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞外小胞(EV)を利用した経鼻脳デリバリー方法の開発について検討を行った。検討に際して、粒子径100nm前後のEV、Small extracellular vesicle (sEV)、および粒子径30nm程度のEV、Extremely small EV (esEV)を対象のEVとした。sEVならびにesEVを経鼻投与したあとは肺、胃へ移行せず、脳に高効率に移行した。また、sEVとesEVの脳移行率には差はなかった。そこで、sEVを選択して脳内分布を観察したところ、脳の広範囲に移行し、主にミクログリアに取り込まれた。以上EVは経鼻脳デリバリーに有用であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞外小胞(EV)を利用した経鼻脳デリバリー方法の開発について検討を行った。脳は重要臓器であることからこれへの薬物の送達による種々の疾患の治療法が期待されるが、脳と血管の間には脳血管関門と呼ばれる障壁があるために、薬物の送達は困難である。経鼻投与は、脳血管関門を介することなく脳へ薬物輸送が可能と期待できる。そこで、細胞から放出される膜小胞である細胞外小胞(EV)を利用した経鼻投与による脳デリバリーについて検証した。その結果、EVは経鼻脳デリバリーに有用であることを見出した。以上の成果は、EVを利用した中枢疾患治療薬の開発に有用な知見である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the development of an intranasal brain delivery method using extracellular vesicles (EVs). The sEVs and esEVs were selected as EV of interest. EVs labeled with *Gaussia luciferase* (gLuc) was intranasally administered to mice. It was revealed that after intranasal administration of sEV and esEV, the EVs hardly migrated to the lungs and stomach, but migrated to the brain with high efficiency. There was no difference in the brain distribution rate between sEV and esEV. sEV was selected as target EV and the distribution of sEV in brain was evaluated. It was found that sEV migrated to a wide area of the brain, and was mainly taken up by microglia. These results indicate that EV is useful for nose to brain delivery,

研究分野：生物薬剤学

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命科学の進展により、従来では治療が困難であった難病の治療が可能となってきた。その一方で、中枢神経系疾患の多くは未だ効果的な治療法が確立されていない。病因が未解明であることなど様々な原因が考えられるが、大きな要因の一つとして中枢への効率的な薬物の送達法が確立されていないことが挙げられる。従って、脳をはじめとした中枢系への薬物送達を可能とするデリバリーキャリアの開発が望まれている。

細胞外小胞 (EVs) は、細胞から分泌される膜小胞であり、核酸やタンパク質などの生理活性物質を内包し、細胞間コミュニケーションに重要な役割を担っている。その内因性デリバリーキャリアとしての性質から、EV は送達効率が高くかつ生体適合性の高いドラッグデリバリーキャリアになりえると期待されている。一方で、EV を利用したデリバリーキャリアの実現のためには EV への薬物搭載法の確立や、EV 産生細胞の選択と細胞からその培養上清中へと放出された EV の回収方法の確立、EV の体内動態の把握と制御など、解決すべき課題が多く存在する。このような背景より、我々は EV を利用したデリバリーキャリアの開発を目的として、これらの課題の解決に向けて取り組んできた。

EV を利用したデリバリーの応用例の一つとして、近年、中枢疾患に対する EV の経鼻投与による治療効果が報告されている。経鼻投与は、血液脳関門 (BBB) を迂回して鼻腔から脳へ薬物を送達する非侵襲かつ有効なアプローチであるが、これらの報告の多くは治療効果のみに着目しており、経鼻投与後の EV 自身の薬物動態は検討されていない。

一方で、細胞からは粒子径や表面電荷、構成物質の異なる、様々な EV が放出されることが知られている。特に、粒子径や表面電荷といった、粒子の物理化学的な性質は、その粒子の体内動態を決定づける重要な因子であることから、経鼻投与後に特に高い脳移行性を示す EV 画分も存在する可能性が考えられた。また、経鼻投与された EV が脳へ移行する可能性は示されてはいたものの、どのような EV が経鼻投与後に脳移行しやすい等の情報については一切存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究では、EV を利用した経鼻脳デリバリー方法の開発を目的として経鼻投与後の EV の動態の解析と、EV の種類の違いが経鼻投与後の体内動態に及ぼす影響を評価した。解析対象の EV としては、粒子径 100nm 前後の EV である Small extracellular vesicle (sEV) および粒子径 30nm 程度の EV である Extremely small EV (esEV) を対象の EV として、これらをレポータータンパク質である *Gussia luciferase* (gLuc) で標識した後、これを経鼻投与後の動態を解析した。また、検討の結果、いずれの EV も高い脳移行性を示すことが明らかとなったことから、esEV と比較して生産性が高く、薬物の搭載効率の高い sEV を対象の EV として選択し、引き続きの検討としてさらに脳内での挙動を解析した。また、経鼻投与された sEV の脳内における細胞取込みに関わる細胞を同定した。

3. 研究の方法

細胞培養

マウスメラノーマ B16BL6 細胞は、理研バイオリソースセンターから入手した。培地として、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に、グルコース 1g、ウシ胎児血清 (FBS) 0.2% NaHCO₃、ペニシリン/ストレプトマイシン/L-グルタミン (PSG) を添加したものを使用し、5% の CO₂ を含む加湿空気中で、37°C で培養した。

プラスミド DNA

EV 移行性タンパク質である Gag と gLuc の融合タンパク質である Gag-gLuc を用いて EV を標識することとし、これを発現するプラスミド DNA である pCMV-gag-gLuc は、既報と同様に調製した。

gLuc および PKH67 で標識した EV の単離

150mm ディッシュあたり 2.5×10^6 個の細胞数で播種し、24 時間培養した後、培養液に pCMV-Gag-gLuc と PEI MAX をトランスフェクトし、24 時間培養後、細胞培養液を除去して細胞をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で 2 度洗浄した。次に、FBS を除去した DMEM をディッシュに加え、さらに 24 時間培養した。培養液を回収し、上清に含まれる sEV ならびに esEV を、以下に述べた方法に従って遠心分離により精製した。上清を EV 収集培地として回収し、0.2 μ m シリンジフィルターで濾過した。この培地を 100,000 \times g で 1 時間超遠心し、ペレットを sEV として回収し上清は esEV 回収用画分とした。sEV の沈殿は PBS で 2 回洗浄した後、PKH67 green fluorescent cell linker kit を用いて sEV を蛍光染色した。sEV ペレットは PBS に再懸濁し、-80°C で保存した。esEV は、サイズ排除クロマトグラフィーにより回収した。回収した esEV を、PKH67 green fluorescent cell linker kit を用いて蛍光標識した後、サイズ排除クロマトグラフィーにより洗浄した。蛍光標識したサンプルを蛍光顕微鏡 (BioZero BZ-X710) により観察した。

ウェスタンブロッティング

細胞を RIPA 緩衝液 (H₂O 中 : 1 % NP-40, 0.5 % デオキシコール酸ナトリウム, 0.1 % SDS, 0.1 % Triton X-100, 1 % Protease Inhibitor Cocktail, 50mM Tris-HCl, and 150 mM NaCl) 中で溶解し、16000 × g, 20 min で遠心することで細胞片を除去した。EV サンプルと細胞溶解液は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を通じて 10 % ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルで分離し、ポリフッ化ビニリデン膜に転写した。膜は以下の一次抗体と 4°C で一晩インキュベートした : マウス抗 CD81 抗体 (1 : 200)、マウス抗 Alix 抗体 (1 : 500) およびウサギ抗カルネキシン抗体 (1 : 500)。次に、膜を以下の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体と室温で 1 時間インキュベートした : ウサギ抗マウス IgG-HRP (1 : 2000) およびマウス抗ウサギ IgG-HRP (1 : 5000)。膜を Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate と反応させ、WSE-6100H LuminoGraph I を用いて化学発光を検出した。

EV の形態観察

EV の回収を確認するため、EV の懸濁液をカーボン/フォルムバーフィルムコート TEM グリッドに塗布し、室温で 20 分間インキュベートした。その後、1 % 酢酸ウラニルによる 3 分間のインキュベーションを行った。これを TEM (Hitachi H-7650) で観察した。

EVs の組織分布

4 週齢の雄性 ICR マウスを清水ラボトリーサブライから購入した。すべての動物実験のプロトコルは、京都大学大学院薬学研究科の動物実験委員会の承認を得ている。鼻腔内投与のため、マウスを麻酔下で仰臥位で 10° の角度にした。その後、7 μL (タンパク質 11.5 μg) の標識した各 EV をピペットを用いて片側の鼻孔にゆっくりと滴下投与した。指示された時点で、脳、胃、肺、および血液を採取した。血清は、凝固した全血を 8,000 × g で 20 分間、4°C で遠心分離することにより得た。臓器を 5 ml/g の溶解バッファー (0.1 M Tris, 0.05 % Triton-X-100) でホモジナイズし、ホモジネートを 14,000 × g, 10 min, at 4°C で遠心分離した。その後、血清と上清を既述のようにルシフェラーゼ活性を測定して評価した。サンプル中の EV 量は、ルシフェラーゼ活性に基づいて投与量に対して正規化し、投与量/ml または組織の用量/g に対する割合 (% of dose/ml または % of dose/g organ) として表した。

蛍光標識した sEVs の組織内分布

マウスには、上記のように sEVs を 10 μL (タンパク質として 16.4 μg) 経鼻投与した。投与 6 時間後にマウスを安楽死させ、脳を採取して Tissue-Tek OCT compound に包埋した。さらに、臓器を -80°C で凍結し、凍結ミクロトーム (Leica CM3050 S) を用いて 10 μm 厚に薄片化し、蛍光顕微鏡 (BioZero BZ-X710) を用いて観察した。

免疫蛍光染色のために、切片を 4 % パラホルムアルデヒドで固定した。次に、切片を PBS で洗浄し、PBS 中の 20 % FBS と 37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、切片をウサギ抗 NeuN Ab (1 : 500 希釈)、ウサギ抗 GFAP Ab (1 : 250 希釈) またはウサギ抗 Iba1 Ab (1 : 1,000 希釈) で一晩処理して、それぞれニューロン、アストロサイト、ミクログリアが染色されるように処理した。次に、Alexa Fluor 594 標識マウス抗ウサギ IgG (1:200 希釈、Abcam) で切片を染色し、蛍光顕微鏡 (BioZero BZ-X710) で観察した。

4. 研究成果

各 EV の単離と標識の確認

B16BL6 細胞からの sEV の単離に成功したことを、sEV マーカー (Alix と CD81) の存在をウェスタンブロッティングによって確認した。esEV の単離については、マーカータンパク質として Lamp が含有されていることをウェスタンブロッティングにより確認した。小胞体マーカーであるカルネキシンは esEV サンプル、sEV サンプルいずれにも含まれていなかったことから、細胞残渣が混入していないことが示唆された。TEM 観察では、sEV の大きさは直径約 100nm、esEV の大きさは約 30nm であった。蛍光顕微鏡観察により、PKH67 で標識した esEV、ならびに sEV 由来の緑色の蛍光ドットが確認されたことから、それぞれの EV を PKH67 により標識可能であることを確認した。

経鼻投与後の臓器分布

経鼻投与した EV の臓器分布を明らかにするため、標識した各 EV を経鼻投与した後、採取した血清および採取した臓器のホモジネートにおけるルシフェラーゼ活性を測定した。いずれの EV を投与した場合においても、脳で高いルシフェラーゼ活性が検出された。この活性は 1 時間で最も高く、時間の経過とともに減少した。一方、胃、肺、血清では、ルシフェラーゼ活性はほとんど検出されなかった。これらの結果から、経鼻投与された esEV ならびに sEV は脳内に特異的に移行することが示唆された。esEV ならびに sEV は、経鼻投与後に同程度の脳内移行性を示すことが明らかとなったが、生産性ならびに薬物搭載効率の観点からは、esEV より sEV の方が利用価値が高いものと考えられたことから、以降の検討においては sEV を対象として検討を行うこととした。

sEV の脳内の分布

蛍光標識した sEV を経鼻投与したマウスより脳を回収したのち、その凍結組織切片を作成し、脳内における標識 sEV の局在を調査した。その結果、脳内の広範な部位において、蛍光標識した sEV に由来する緑色の蛍光ドットが観察された。また、嗅球や大脳皮質などの脳吻部では、線条体や小脳などの脳尾部よりも蛍光ドットの数が多かったことから、投与部位である鼻腔内に近いところから sEV が順次脳内を移動していたものと推察された。

次に、どの細胞が sEV を取り込んだかを特定するために、脳切片の免疫染色を実施した。神経細胞、アストロサイト、ミクログリアはそれぞれ NeuN、GFAP、Iba1 特異抗体で染色した。sEVs の緑色シグナルは、NeuN や GFAP の赤色シグナルと共局在しなかった。一方、sEVs と Iba1 の共局在が観察された。

以上の結果から、経鼻投与された EV は効率よく脳へと移行することを明らかとした。また、EV は脳の広範囲に分布するとともに、おもにグリア細胞に取り込まれることを明らかとした。以上の結果から、EV の経鼻投与によって中枢へのデリバリーが可能となることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大嶽 幾、高橋 有己、高倉 喜信
2. 発表標題 細胞外小胞の経鼻投与後の脳内挙動の解析
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高倉喜信
2. 発表標題 細胞外小胞エクソソーム：新たなDDS開発のプラットフォームとなり得るか？
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------