

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08556

研究課題名(和文) グルタチオン産生促進物質の経鼻投与による神経変性疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy for neurodegenerative diseases by intranasal administration of antimicroRNA.

研究代表者

青山 晃治 (Aoyama, Koji)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00420943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経グルタチオン(GSH)産生を抑制するmicroRNAに対し、その阻害薬(antimicroRNA)をマウスに経鼻投与することにより脳内GSH産生を促進させ、酸化ストレスによる神経変性に対して抑制効果を発揮するかどうかを明らかにすることが目的であった。脳内GSH産生を抑制するmicroRNA-96-5pを標的としたantimicroRNAの高用量経鼻投与実験では、海馬へのantimicroRNAの移行性と海馬神経細胞内GSH量の増加が確認された。一方で、antimicroRNAを用いた経鼻投与法による治療戦略においては、効果増強と用量減量のために新たな薬物送達システムの改良が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体においては多くの物質が血液脳関門を通過しにくいいため、静脈内投与以外の投与方法による薬物送達の可能性を探ることが重要である。近年、経鼻投与方法による薬物の脳内への移行性が示唆されており、血液脳関門に影響されない新たな薬物投与方法としての可能性が期待されている。本研究結果から、経鼻投与方法は脳内へantimicroRNAを移行させ神経細胞内GSH量を増加させたことから将来的に神経変性疾患治療薬への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify whether intranasal administration of an inhibitor (antimicroRNA) to microRNA-96-5p, which suppresses neuronal glutathione (GSH) production, can increase GSH levels against neurodegeneration due to oxidative stress in the mouse brain. Although the neuroprotective effect is still inconclusive under oxidative stress, a high-dose intranasal administration of antimicroRNA to microRNA-96-5p confirmed the central migration and increased neuronal GSH levels in the hippocampus. Additional drug delivery strategy to the intranasal administration would be needed for both enhancing the efficacy and reducing the dose of antimicroRNA in vivo.

研究分野：薬理学

キーワード：グルタチオン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患患者の脳内においては酸化ストレスが亢進していると同時に抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) の減少が認められる。しかし、生体においては多くの物質が血液脳関門を通過しにくいことから、GSH を含む抗酸化物質の静脈内投与方法による臨床効果は期待できないため、治療戦略上、有効性のあるドラッグ・デリバリー・システムの構築が必要である。近年、経鼻投与方法によるペプチドや microRNA の脳内への移行性が確認されており、血液脳関門に影響されない新たな薬物投与方法としての可能性が期待されている。GSH は、システイン、グルタミン酸、およびグリシンから成るトリペプチドであり、GSH 産生の律速段階は神経細胞内へのシステインの取り込みであることがわかっている (Aoyama K et al, *Molecules*, 2015、図 1)。これまでに我々は神経細胞における GSH 産生に重要な役割を果たしているシステイン・グルタミン酸トランスポーターである EAAC1 の蛋白発現を抑制する microRNA (miR-96-5p) を発見し、miR-96-5p 阻害薬 (antimiR-96-5p) の脳室内投与が脳内 GSH 量を増加させ、酸化ストレスに対し抵抗性をもたらすことを報告した (Kinoshita C, Aoyama K et al, *Nature Communications*, 2014)。しかし、静脈からの末梢投与では antimiR-96-5p は脳内へ移行しないため神経保護効果は期待できず、新たな投与方法による検討が必要であった。これまで、microRNA を標的分子とした阻害薬 antimiR-96-5p の経鼻投与による神経保護効果を確認した研究はなく、また神経変性疾患治療薬開発において抗酸化物質である GSH 産生を神経細胞選択的に促進する治療戦略もない。

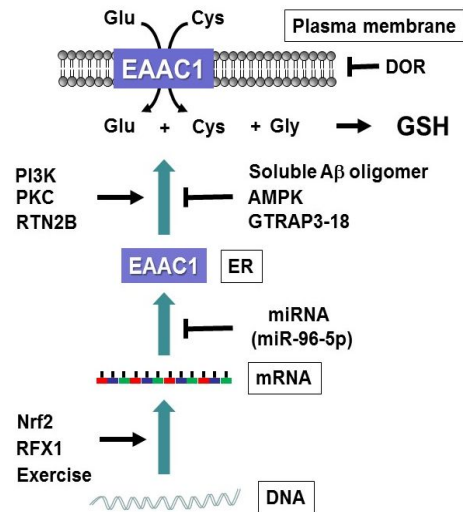


図 1. 神経細胞における GSH 産生調節

## 2. 研究の目的

神経変性疾患に対する治療戦略においては、脳内で減少した GSH 量を増加させる治療薬は有効であると考えられる。神経細胞においてシステイン・グルタミン酸トランスポーター EAAC1 の発現を促進させる antimiR-96-5p は細胞内 GSH 量を増加させ酸化ストレスによる神経変性に対して抵抗性を示すと考えられる。本研究においては、antimiR-96-5p の経鼻投与方法による有効性についてマウスを用いた動物実験で確認することが目的である。

## 3. 研究の方法

初めに、脳への輸送経路として経鼻投与方法の有用性を評価するために、蛍光標識した miR-96-5p antimiR (Exiqon) を C57BL/6J マウス (生後 2 ヶ月、オス) に経鼻投与し、脳への移行性を生化学的、免疫組織学的手法により検討した。次に、脳内における GSH 量について経時的に経鼻投与後の脳組織抽出液を用いた GSH 標識試薬 4-fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan (Dojindo) 処理後のサンプルを HPLC 法にて測定し対照 (スクランブル antimiR もしくは生理食塩水投与) 群と比較検討した。さらに、経鼻投与後の C57BL/6J マウス (生後 1 ヶ月、オス) 脳スライスカルチャー組織切片を用いた chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) による GSH 蛍光染色でも同様に GSH 量の変化について比較検討した。

## 4. 研究成果

これまでの我々の結果では、HEK293 細胞を用いた in vitro 実験で 30 pmol 程度の antimiR-96-5p の投与で、またマウス側脳室内への in vivo 投与実験においても 3 nmol の antimiR-96-5p 投与で有意な EAAC1 発現増加と細胞内 GSH 量増加が認められた (Kinoshita C, Aoyama K et al, *Nature Communications*, 2014) が、今回の antimiR 経鼻投与実験では 5 nmol の antimiR-96-5p 単回投与で僅かながら海馬において antimiR 蛍光シグナルが確認され、同部位での GSH 量の増加が確認された (図 2)。これらの結果は、経鼻投与 3 日後の海馬組織サンプルで明らかであったが、投与 5 日および 7 日後においては明らかな結論には至らなかった。また同一個体におけるその他の脳部位では明らかな変化は認められなかった。本研究において用いた試薬の一回使用量が高額となったため、予算上、5 nmol 以上の投与

量の増量もしくは反復投与による検討を行うことはできなかった。これらの結果から、antimiR-96-5p の経鼻投与法は、神経細胞の GSH を増加させる有効な手段と考えられたが、より低用量で神経保護効果を発揮させるためには、今後更なる薬物送達方法の改良、および実験条件の検討が必要であると考えられた。

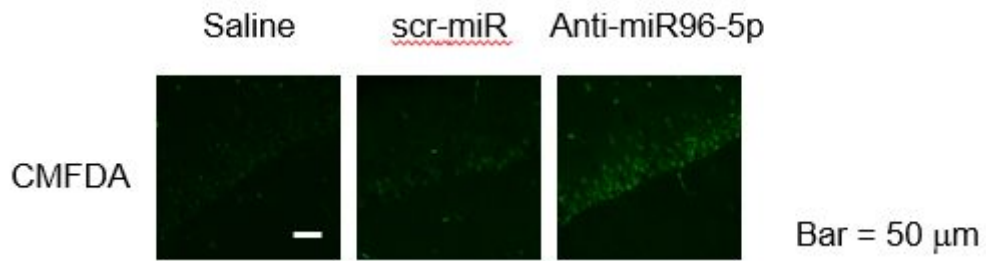


図 2. 経鼻投与 3 日後の海馬 CA1 領域における GSH 標識 (CMFDA) 蛍光染色. 生理食塩水 (左), スクランブル miR (中), antimiR-96-5p (右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 青山晃治	4. 巻 41
2. 論文標題 グルタチオンの神経保護作用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 帝京医学雑誌	6. 最初と最後の頁 211-220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chisato Kinoshita, Koji Aoyama, Toshio Nakaki	4. 巻 119
2. 論文標題 Neuroprotection afforded by circadian regulation of intracellular glutathione levels: A key role for miRNAs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radical Biology & Medicine	6. 最初と最後の頁 17-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koji Aoyama
2. 発表標題 Measurement of neuronal glutathione levels in the brain.
3. 学会等名 35th International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青山晃治
2. 発表標題 グルタチオンと神経変性
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青山 晃治
2. 発表標題 亜鉛毒性とグルタチオンの神経保護効果
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 青山晃治、木下千智、中木敏夫	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 Clinical Neuroscience	

〔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