

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15619

研究課題名(和文) 神経幹細胞を標的とした逆行性吻側移動経路を介した鼻腔内薬剤投与の有効性の検証

研究課題名(英文) Investigation of the effectiveness of intranasal drug administration through the retrograde rostral migration pathway targeting neural stem cells

研究代表者

西崎 和則 (NISHIZAKI, Kazunori)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90180603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：鼻腔内薬剤投与の有効性を検討するため神経幹細胞が存在する傍側脳室領域における細胞分裂数と傍側脳室領域で生まれた新生神経細胞が吻側移動経路によって分布する嗅球における新生神経細胞数をそれぞれKi67およびDCXを用いて免疫学的な検討を行った。プロラクチンもしくはGDF11の点鼻投与は傍側脳室領域における細胞分裂の有意の増加および嗅球における新生神経細胞の有意の増加を統計学的な解析で示したが、経鼻投与による脳内薬剤移行ルートとしては鼻腔から直接脳組織に移行する積極的な証拠は得られなかった。鼻腔内薬剤の脳組織移行ルートの解明には血液中の点鼻投与された薬剤濃度の分析などさらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effectiveness of intranasal drug administration, the numbers of mitosis in the subventricular region where neural stem cells are present and of new neurons in the olfactory bulb where new neurons born in the subventricular region distribute through the rostral migration pathway were evaluated immunologically using Ki 67 (a marker of cell division) and DCX (a marker of new neurons), respectively. The nasal administration of prolactin or GDF (growth differentiation factor) 11 showed significant increases in cell division in the subventricular region and in neonatal neurons in the olfactory bulb by statistical analysis, respectively. However, as a transfer route of the nasal administration drug, the active evidence of direct transfer from the nasal cavity to brain tissue was not obtained. To elucidate brain tissue migration routes of intranasal medicine, further research such as analysis of the blood concentration of drug administered nasally should be necessary.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：プロラクチン GDF11 点鼻 嗅球 傍側脳室領域 吻側移動経路 神経細胞再生

1. 研究開始当初の背景

先進国の高齢人口の急増に伴う認知症高齢者の増加に対して、我が国だけではなく世界的に緊急な対応策が求められている。認知症の多くを占めるアルツハイマー病の病因は不明であるが、アミロイド やタウの増加によって神経細胞死を生じているという説が有力である。高齢者では神経幹細胞の減少や細胞分裂能低下によってニューロン産生が減少し、アルツハイマー病の初期症状である記憶低下の一因となっている。嗅球において新生ニューロンを増加させる因子として、プロラクチンや GDF (growth and differentiation factor)¹¹ が知られている (Shingo, et al, Katsimpardi, et al). これらの薬剤は全身投与後血行性に傍側脳室領域の神経幹細胞へ作用し、傍側脳室領域で産生された未熟なニューロンは吻側移動経路 (rostral migratory stream : RMS) に沿って嗅球へ移動し、成熟ニューロンに分化すると考えられている。我々は現在までに行った嗅覚障害に対する再生医療の一連の研究から (Tsujigiwa, et al, Orita et al, Nishizaki et al, Noda et al), 現時点では幹細胞を体内に移植する細胞補充療法よりも外因性因子 (プロラクチンなど) を投与して体内の幹細胞を賦活化させる分化誘導療法に将来性を見出している。薬剤の脳組織への血行性移行は血液脳関門から制限があり、効率よく神経幹細胞を賦活化させるには新たな投与経路の開発が必要である。オキシトシンによる自閉症治療に鼻腔内投与が有効と報告されている。鼻腔内投与による薬剤の脳内移行が嗅神経経由で吻側移動経路を逆行性に移行することで他の脳組織より選択的に傍側脳室領域に浸透するならば、この領域にある神経幹細胞に標的を絞った侵襲の少ないより効率的な薬剤投与の可能性が
ある。

2. 研究の目的

自閉症改善を目指してオキシトシン点鼻剤による大規模臨床治験が 2014 年から開始され、脳組織への薬剤投与ルートとして、鼻腔内投与が注目されている。鼻腔内から脳内への薬剤の移行経路は未解明であるが、血行性および血液脳関門の影響を受けにくい脳脊髄易性、三叉神経、嗅神経を介する経路が考えられる。鼻腔内投与は経口投与に対しては消化器での代謝を受けないこと、組織内への薬剤投与などの非経口投与に対しては侵襲が少ないことなどの優越性を示す。傍側脳室領域にある神経幹細胞の細胞分裂により産生された新生ニューロンは吻側移動経路を伝って嗅球に分布する。薬剤が吻側移動経路を逆行性に、選択的に他の脳組織より傍側脳室領域へ浸透できれば、神経幹細胞を標的にした薬物治療を行える可能性がある。

本研究では薬剤の鼻腔内投与による脳疾患の治療の可能性を追求するために、プロラクチンおよび GDF11 を点鼻し、嗅球における新生神経細胞の増加の有無と薬剤の脳内移行の経路を検討した。

3. 研究の方法

1) 鼻腔内薬剤投与による神経幹細胞の細胞分裂能に与える影響

プロラクチン (Recombinant Mouse Prolactin, R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN) もしくは GDF11 (Recombinant Human/Mouse/Rat, R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN) の 4 日間連続鼻腔内投与後、傍側脳室領域の神経細胞の細胞分裂数と嗅球における新生ニューロン数を免疫組織学的手法 (Ki67 (細胞分裂のマーカー), Rabbit anti-Ki-67 affinity purified polyclonal antibody, Merck, Kenilworth, NJ と DCX (神経前駆細胞および新生神経細胞のマーカー), Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) で観察し、薬剤の鼻腔内投与に

よる神経幹細胞に及ぼす効果発現を統計学的に検討し(統計解析ソフトとして IBM SPSS Statistics 25), 鼻腔内投与 嗅神経 嗅球 吻側移動経路 傍側脳室のルートによる薬剤移行の可能性を検証する.

2) 鼻腔投与によるプロラクチンの脳内組織への移行ルートを調べるため Alexa Fluor 488 Microscale Protein Labeling kit(Molecular Probes)を用いて蛍光標識した Mouse Prolactin 50 µg(R&D systems)を 5 µg/日×4 日間点鼻投与し, マウスの鼻腔を含む頭部矢状断で蛍光発色を蛍光顕微鏡で観察した. コントロールとして, PBS および蛍光物質(Alexa 488)を同様の条件で点鼻投与し, また点鼻を行っていないマウスで自然蛍光を観察した.

4. 研究成果

1) 点鼻薬剤の至適濃度の決定

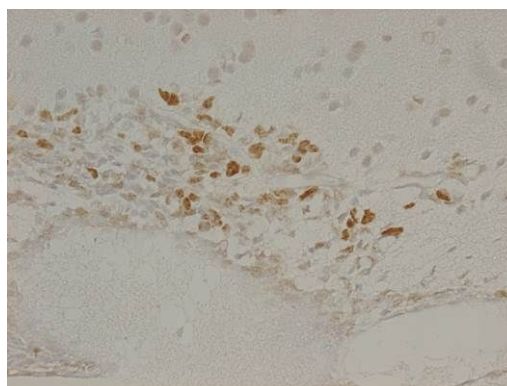
プロラクチンの点鼻の至適濃度はすでに行った実験結果から 250 µg/ml とした. 使用する GDF11 の濃度を決定するために 40ng/ml, 400ng/ml, 4 µg/ml の濃度を用いて鼻腔内投与を行い, 各濃度における傍側脳室領域の染色性を観察し, 400ng/ml を投与する濃度とした.

2) 脳組織における免疫染色

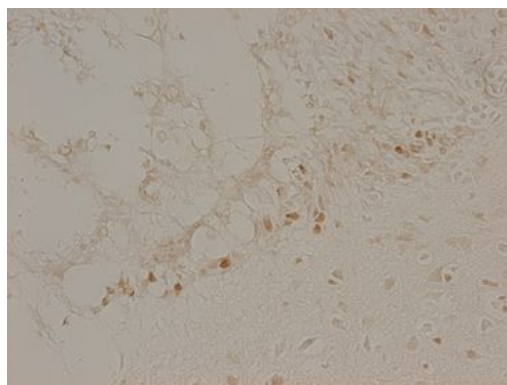
両薬剤の4日間連続鼻腔内投与による脳組織における効果発現を免疫組織学的手法で検討した.

a) Ki67 による免疫染色

プロラクチン投与群(図1), GDF11 投与群(図2), それぞれの対照群(プロラクチン対照群として溶剤として使用した PBS のみ, GDF11 の対照群として溶剤として使用した HCl のみ)のいずれの群においても Ki67 陽性細胞が, 神経幹細胞が存在する傍側脳室領域から吻側移動経路に沿って多く観察された.

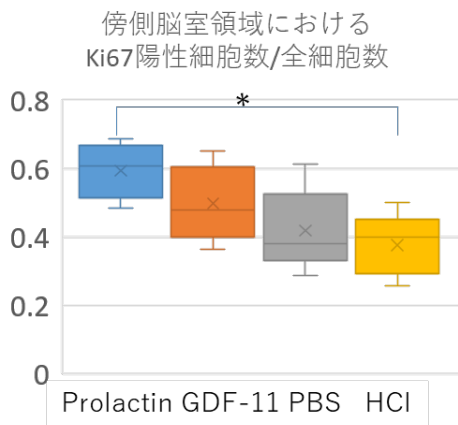


(図1. プロラクチン投与群における傍側脳室領域の Ki67 陽性細胞. 陽性細胞率が中央値の切片)



(図2. GDF11 投与群における傍側脳室領域の Ki67 陽性細胞. 陽性細胞率が中央値の切片)

傍側脳室領域における Ki67 陽性細胞の全細胞数におけるパーセントは, プロラクチン経鼻腔投与群では平均 59.3% (対照群 41.7%) で, Welch's t-test は $P=0.03$ で有意差を認めた. 一方, GDF11 経鼻腔投与群では平均 49.7% (対照群 37.6%) で, Welch's t-test は $P=0.10$ であった. また, one way ANOVA post hoc with Scheffé's 検定では $P=0.019$ で, 群間比較ではプロラクチン投与群と HCl 投与群で有意差 $P=0.032$ を認めた. プロラクチン経鼻腔投与が傍側脳室領域での細胞分裂を促進している可能性が示唆された.

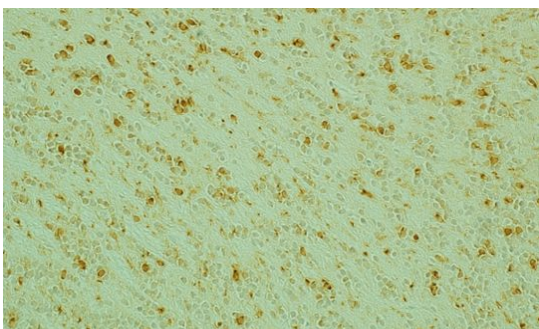


b) DCX による免疫染色

プロラクチン投与群 (図 3), GDF11 投与群 (図 4), それぞれの対照群対照を含めるいずれの群においても, DCX 陽性細胞は傍側脳室領域から吻側移動経路さらには嗅球に観察された。



(図 3. プロラクチン投与群における嗅球の DCX 陽性細胞 . 陽性細胞率が中央値の切片)



(図 4. GDF11 投与群における嗅球の DCX 陽性細胞 . 陽性細胞率が中央値の切片)

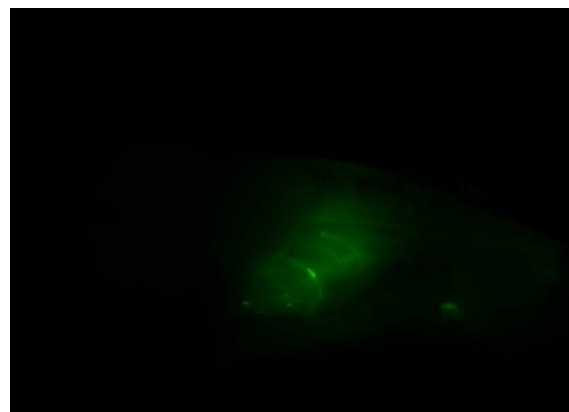
プロラクチンもしくは GDF11 経鼻腔投与群 (各 N=5) と対照群 (プロラクチンは PBS を GDF11 は塩化水素を使用) (各 N=5) との間で

嗅球での全細胞数における DCX 陽性細胞数のパーセントを算出し, 統計学的な解析を行った. Welch 's t-test では, プロラクチン投与群と対照群は $P=0.11$, GDF11 投与群と対照群の間で有意差 ($P=0.04$) を認め, また, one way ANOVA post hoc with Scheffé 's 検定は $P=0.022$ で, 群間比較ではプロラクチン投与群と HCl 投与群の間で有意差 ($P=0.028$) を認めた。

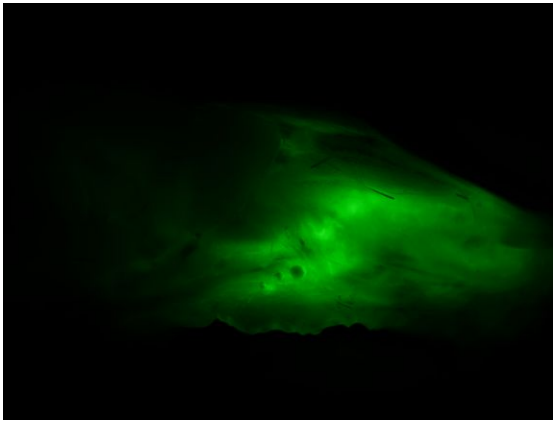
これらの結果はプロラクチンと GDF11 鼻腔内投与は嗅球における新生神経細胞の増加を誘導する可能性を示している。

3) 蛍光ラベルしたプロラクチンの鼻腔投与後の蛍光観察

次にプロラクチン経鼻投与の脳への移行ルートを探るため蛍光色素をラベルしたプロラクチンを点鼻投与し, マウスの鼻腔を含む頭部矢状断で蛍光発色を観察したが, 嗅球や傍側脳室領域での明確な蛍光は観察されなかったが (図 5), 蛍光標識のみの点鼻投与においても脳組織の蛍光はほとんどなく (図 6), 脳組織内における蛍光標識の感度の問題などについてさらに検討を要すると思われた。



(図 5. 蛍光標識プロラクチン点鼻鼻腔内のみが蛍光を発色している)



(図 6. 蛍光標識点鼻 鼻腔内のみが蛍光を発色している)

4) 結論

プロラクチンの点鼻投与は傍側脳室領域における細胞分裂の有意の増加, プロラクチンもしくはGDF11の点鼻投与は嗅球における新生神経細胞の増加を有意に高めることが示唆されたが, 経鼻投与による脳内薬剤移行ルートとしては少なくともプロラクチンやGDF11のように分子量の大きなタンパクが鼻腔投与により鼻腔から直接脳組織に移行する積極的な証拠は得られなかった. ELISA法などを使用した血液および組織中の薬剤濃度の解析などさらなる研究が必要である.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(2件)

Nishizaki K, Junko Yoshinobu, Aya Murai, Intranasal administration of prolactin or growth differentiating factor 11 may affect the olfactory bulb, The 14th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2017年12月2日, 高雄, 台湾

Nishizaki K, Junko Yoshinobu, Aya Murai, Intranasal medication may improve olfactory function, 27th Congress of the European Rhinologic Society (ERS), The 27th Congress of the European Rhinologic Society (ERS), London, 2018年4月26日, 英国

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
耳鼻咽喉・頭頸部外科学のホームページに研究内容を掲載.

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/jibika-1/kenkyu-naiyou.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西崎和則 (NISHIZAKI, Kazunori)
岡山大学 医歯薬学総合研究科 教授
研究者番号: 90180603

(2) 研究分担者

前田幸英 (MAEDA Yukihide)
岡山大学 大学病院 講師
研究者番号: 00423327

折田頼尚 (ORITA Yori-hisa)
岡山大学 大学病院・講師
研究者番号: 90362970

高原 (旧姓吉延) 潤子 (TAKAHARA, Junko)
岡山大学 医学部 技術専門職員
研究者番号: 80448224

村井 綾 (MURAI, Aya)
岡山大学 大学病院 医員
研究者番号: 00780834