

令和元年6月4日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11180

研究課題名(和文) 修飾ナノキャリアを用いた内耳薬物送達機構の解明と開発

研究課題名(英文) Investigation into unraveling the mechanism of drug delivery system to the inner ear

研究代表者

喜多 知子(嶋知子)(Kita, Tomoko)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：20362519

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)：本研究は内耳蝸牛への効率的な薬物送達を達成することを目標とし、血液内耳関門初代培養系の確立、血液内耳関門輸送体の部位別発現確認、モデル薬物の動物実験に向けて、様々な検討を進めたものである。期間内での完了には至らなかったが、次の研究に繋がる課題が発見できた。血管系以外の組織からの血管内皮細胞および周皮細胞の単離培養は困難であり、in vivo動物実験での輸送体阻害剤による内耳移行性への影響は有意に認められなかったため、論文調査ならびに考察を行った。また、成体内耳の血管部位での薬物輸送体の発現解析については、レーザーマイクロダイセクションによる良好なcDNAライブラリ作成法を確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内耳を標的とした創薬開発において、薬物の内耳への効率的な移行性は効果につながることから非常に重要である。本研究での成果はまだ序章にすぎないが、幾つかの改善点ならびに注意点が明らかになったことは、意義が高い。

研究成果の概要(英文)：The final aim of this study was to achieve the effective drug delivery systems to the inner ear. First, we tried to establish the culture system of blood-labyrinth barrier but unfortunately failed. And second, to clarify the contribution of each drug transporter expressed in this inner ear barrier, we have established the preparation protocols of cDNA library from samples obtained by laser capture micro dissection. Third, using several model drugs for each drug transporter and their inhibitors, it was shown that several tissue type specific transporters are localized in the inner ear barrier, but there was no significant change in the distribution of each model drug.

研究分野：内耳基礎

キーワード：内耳蝸牛 薬物送達 血液内耳関門

1. 研究開始当初の背景

古くから、*in vitro* 内耳由来細胞株ならびに *ex vivo* 蝸牛器官などの培養実験系で内耳毒性に対する保護作用を示す薬物として、抗酸化剤、抗アポトーシス剤など多数のものの有効性が報告されてきた。にもかかわらず、受診した難聴患者が処方されるものは、ステロイド剤、循環改善剤、代謝改善剤、ビタミン剤などの全身性への作用を期待するものであり、ターゲット細胞（コルチ器や蝸牛神経節）に直接働きかけるものではない。その理由の一つとして、内耳ターゲット細胞への薬物送達性が非常に悪いことが挙げられ、難聴創薬の開発が遅れている原因とも考えられる。培養実験系で顕著な効果を示す薬物が、*in vivo* 動物実験系で予想に反し有意な効果を示さないことが珍しくない。

薬物が全身投与されてからこの内耳ターゲット細胞に到達するのに、主に2つのルートがあると考えられている (Li H et al., Sci Rep.2011;1:159)。

・内リンパ腔を介する経路：血管条の毛細血管から血液-内耳関門および辺縁細胞を経て内リンパ腔内に拡散し、コルチ器のアピカル側から到達

・外リンパ腔を介する経路：ラセン靭帯と基底板の毛細血管から血液-内耳関門等を経て外リンパ腔内に拡散し、基底板を経てコルチ器の基底側から到達

血管条の血液-内耳関門については2013年に単離構成細胞の初代培養法が確立された (Neng L et al., Nat Protoc. 2013;8:709) が、ラセン靭帯の関門については、血管条の関門と異なる構成細胞からなるということ以外に殆ど分かっていない。ここで、直接投与や局所投与では薬が外リンパ腔内に拡散することから、我々は内耳への送達には、外リンパ腔を介するラセン靭帯の血液-内耳関門の役割も重要であると考え、本研究において、この関門構成細胞のキャラクタリゼーションと培養細胞株の樹立を目指す。

2. 研究の目的

内耳への薬物投与方法には、全身投与、局所投与、直接投与の3通りがあり、一般的な治療法で最もポピュラーなのは全身投与(点滴または内服)である。しかしながら内耳という組織は、脳組織と同様、血管の占める割合が極端に少なく、かつ関門とよばれる密着結合で連結しているバリアが存在するため、全身投与により血流を介して内耳ターゲット部位(コルチ器および蝸牛神経節)に送達される割合は非常に低いと考えられている。また局所投与方法として、鼓室内注入および正円窓膜留置、直接投与方法として浸透圧ポンプ等がある。局所投与も直接投与も、血流を介さず直接ターゲットに到達できる手法であるため効果が期待される反面、投与ごとに受診を要し侵襲をとまなうこと、そして内耳内腔での薬物濃度のコントロールが難しいことから、一般診療における普及性は期待しにくい。

そこで本研究では、内耳蝸牛への薬物送達機構を包括的に解明し、全身投与による薬物療法の実現に有用な知見を提供することを目的とする。循環血液と内耳の物質輸送を厳密に制御する「血液-内耳関門」に着目し、構成細胞のキャラクタリゼーションと各細胞株による薬剤透過性試験系の確立、そして送達性の高いデバイス(ナノキャリア)の探索および構築を行い、効率的な内耳への薬物送達システム(DDS)を開発する。本研究は、耳科学と薬剤学の融合研究であり、効率的な内耳送達を達成するための新知見を創出する。臨床試用されず埋もれていた薬物にチャンスを与え、難聴治療の新薬開発の礎となる研究を遂行したい。

3. 研究の方法

本研究は内耳蝸牛への効率的な薬物送達を達成することを目標とし、血液内耳関門初代培養系の確立、血液内耳関門輸送体の部位別発現確認、モデル薬物の動物実験に向けて、様々に検討を進めたものである。

まず蛍光標識されたナノキャリアを用いて、樹立した関門構成細胞をよく透過するもの、そして内耳ターゲット細胞(コルチ器や蝸牛神経節)への取り込みの高いものを探索する。次にラセン靭帯に存在する血液-内耳関門を構成する細胞の初代培養系の樹立を目指す。さらに関門に発現する薬物輸送分子のキャラクタリゼーションを行う。

1) 蛍光標識ナノキャリアの細胞移行実験

In vitro 器官培養により、内耳ターゲット細胞(コルチ器や蝸牛神経節)への取り込みを見る。異なる材料で作製された複数の蛍光標識ナノキャリアを培地に加え、一定時間後にPBS洗浄操作を行ってからPFA固定して顕微鏡し、最も取り込みの高いものを見つける。

2) ラセン靭帯の血液-内耳関門関連細胞の単離培養

血管条の関門細胞での報告 (Neng L et al., Nat Protoc. 2013;8:709) を参考に、成体マウスからラセン靭帯を摘出し、構成する細胞の単離培養を試みる。培地成分を周皮細胞または血管内皮細胞専用に変更することにより単一細胞の培養条件を見つける。単一性の評価は免疫染

色で、各細胞特異マーカー（血管内皮細胞：vWF、周皮細胞：PDGFbeta（および nestin）マクロファージ様細胞：（未同定ではあるがマクロファージのマーカー）F4/80, CD68, CD11b）を調べる。

3) 血液-内耳関門に発現する薬物輸送体の発現解析

成体マウス蝸牛における薬物輸送体の部位別発現比較解析を行うために、サンプル採取に関する検討を行った。先の論文、ラット内耳蝸牛での血管条・コルチ器・神経軸での qPCR による発現比較解析 (Manohar S, et al., Hear Res. 2016;332:46) では、ラセン靭帯に関する報告がなされていなかったため、今回は4箇所でのサンプル採取ならびに RNAseq 解析用サンプルの作製を試みた。サンプル採取法は、2) により得られた単離細胞の FACS ソーティング (CD31 マーカー染色) とレーザーマイクロダイセクションによる2通りとした。

4) *In vivo* 動物実験

本研究が開始されてしばらくして、ラット内耳蝸牛に発現している薬物輸送体に関する報告がなされた (Manohar S, et al., Hear Res. 2016;332:46)。そこで我々は、輸送体の基質として知られている薬物を複数選び、マウスに全身投与 (皮下注) を行い、内耳蝸牛への薬物移行性について検討した。また基質阻害剤を直前投与 (尾静注) することにより、内耳移行性に变化があるかについて調べた。

4. 研究成果

血管条以外の組織からの血管内皮細胞および周皮細胞の単離培養は困難であり、*in vivo* 動物実験での輸送体阻害剤による内耳移行性への影響は有意に認められなかったため、論文調査ならびに考察を行った。また、成体内耳の血管部位での薬物輸送体の発現解析については、レーザーマイクロダイセクションによる良好な cDNA ライブラリ作成法を確立できた。期間内での完了には至らなかったが、次の研究に繋がる課題が発見できた。

1) 蛍光標識ナノキャリアの細胞移行実験

ナノキャリアリポソームとして、作製材料の異なる4種類のナノキャリアを用いた。その結果、生後2日目の CD-1 野生型マウスの蝸牛感覚上皮には殆ど移行がみられなかったが、ポジコンとして用いた HeLa 細胞ではほぼ全ての細胞内への移行が確認された (図1)。本研究では、ナノキャリア添加培地での1時間とその後無添加培地での30分の培養後の観察であり、条件変更の検討はしなかった。HeLa 細胞に比べて蝸牛感覚上皮への移行性が低かった理由として、上皮特有の細胞間接着ならびにタイトジャンクション形成、器官培養の intact に比べて細胞の viability の低下による膜組成の変化などが挙げられる。

様々なキャリア in HeLa細胞

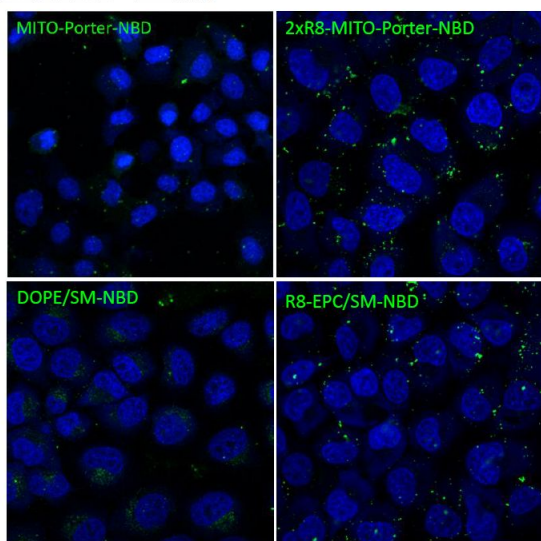


図1. HeLa 細胞への NBD (ニトロベンゾオキサジアゾール)ラベルナノキャリアの取り込み。従来型 (MITO-Porter-NBD) に比べ改良型、特にオクタアルギニンペプチド付加型での移行率の改善が認められた。

2) ラセン靭帯の血液-内耳関門関連細胞の単離培養

まず細胞単離条件については、既報に従い3種類の酵素液、Accutase (Innova) + TrypLE select (ThermoFischer)、Pronase (Roche # 10 165 921 001)または Collagenase IV (Sigma, #C5138)を用い、反応条件を室温または 37 で 10-60 分、として検討した。その結果、酵素の強さは Pronase > Accutase + TrypLE select > Collagenase IV の順であり、が最も至適であると考えられた。そこで次に、この条件により単離した細胞の培養を試みた。図2に示すとおり、周皮細胞専用の培地を使用することにより、紡錘形の nestin 陽性細胞 (幼若な周皮細胞)

を7日間維持培養することができた。しかしながら継代に伴う細胞数が大幅に減少すること、7日間の培養では PDGFbeta 陽性細胞が観察されなかったことから、サンプル数やマウス年齢などを変更して検討を進めたが、大きな改善は見られなかった。更にその他の細胞に関する専用培地では、殆どの細胞が死滅し維持が困難であった。以上から、今後検討する際には、温度感受性 tsA58 SV40 large T antigen TG マウスを用いた血液-内耳関門細胞の不死化細胞株での樹立が望ましいと思われた。

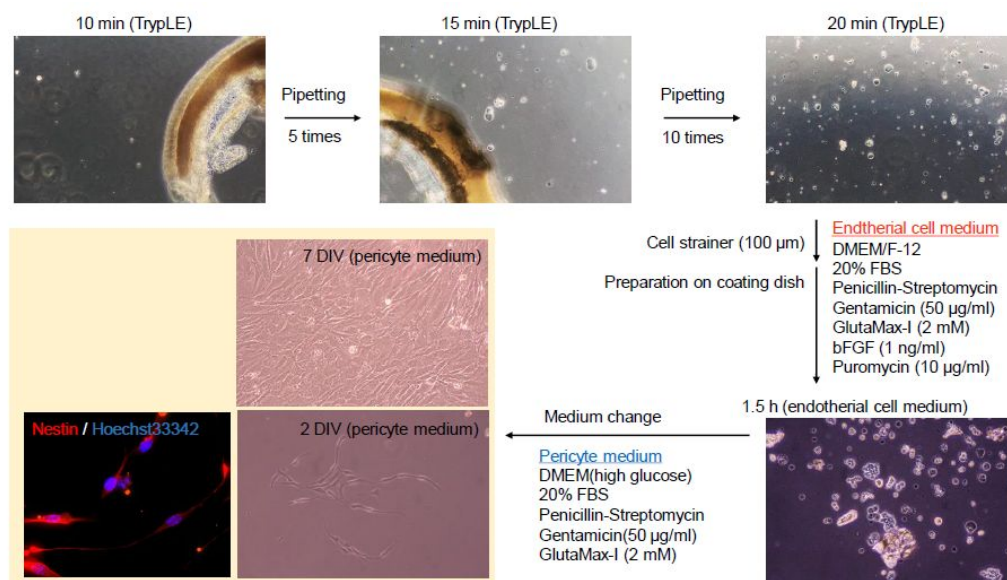


図2. ラセン靭帯からの細胞単離および専用培地での培養結果
周皮細胞専用培地での培養2日目で Nestin 陽性(幼若な周皮細胞マーカー)の細胞が認められた。

3) 血液-内耳関門に発現する薬物輸送体の発現解析

成体マウス蝸牛における薬物輸送体の部位別発現比較解析を行うために、サンプル採取に関する検討を行った。まず2)により得られた単離細胞のFACSソーティング(CD31マーカー染色)を試みたが、細胞のviabilityを保ったままの細胞単離法が完全には確立できず、CD31染色によるソーティングで解析用の細胞数を得ようとすると、膨大なマウスが必要となり現実的に困難であると考えられた。よって次に、レーザーマイクロダイセクションによる解析用サンプル取得を試みた。最初に常法に従いトルイジン染色によるキャプチャーを試みたが、血管内皮細胞の同定が不明瞭であったため、滋賀医大・動物生命科学研究センター・依馬教授より分与された Flk1-GFP; Flt1-tdsRed BAC Tg マウスを用いることとした。このマウス内耳は Flt1-1 (tdsRed) と Flk-1 (GFP) とともに CD31 の染色像と同局在しており、キャプチャーの際に十分検知できる強い蛍光を示し本研究に有用であった(図3)。

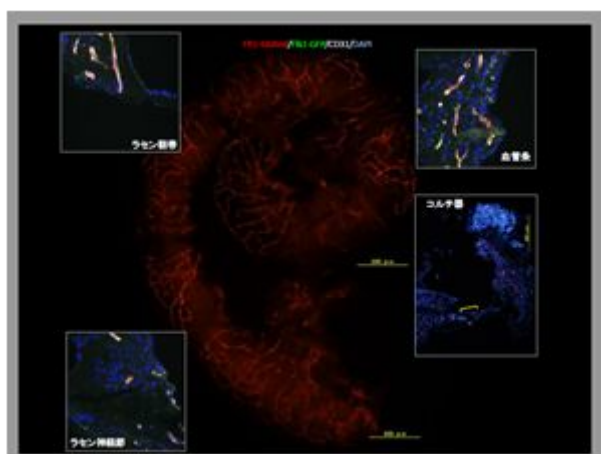


図3. Flk1-GFP; Flt1-tdsRed BAC Tg マウスの内耳蝸牛像。ホールマウントと切片

レーザーマイクロダイセクション用内耳サンプルの調製法ならびにキャプチャーサンプルからのRNA抽出ならびにcDNAライブラリ作製法については、信州大学・人工聴覚器学・西尾講師から詳細にご指導いただいた。本番までに、レーザーマイクロダイセクションのサンプルにて試行錯誤しつつ条件検討を重ねることにより、改善点の抽出ならびに煩雑な手技の習得ができた。最終的に、RNAseq解析に使用可能なcDNAライブラリを得ることができた(図4)。

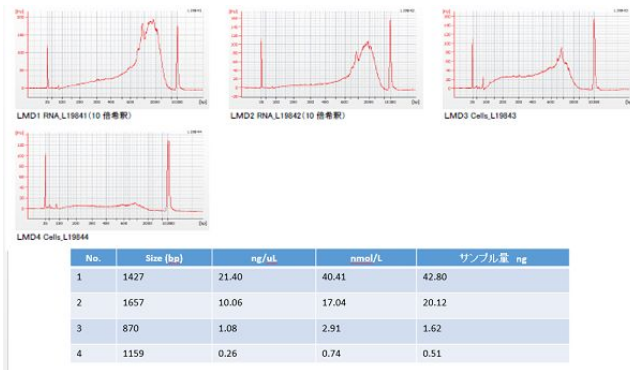


図4 .マイクロダイセクションキャプチャー
サンプルから作製した cDNA ライブラリ

4) *In vivo* 動物実験

ラット内耳蝸牛での発現が報告された薬物輸送体 (Manohar S, et al., Hear Res. 2016;332:46) の中から、OCT2 と MDR1 について基質モデル薬物を複数選び、マウスに全身投与 (皮下注) を行い、内耳蝸牛への薬物移行性を組織中濃度にて調べた。その結果、OCT2 の輸送基質は内耳移行性が高く、一方 MDR1 の輸送基質は内耳移行性が低かった。また、阻害剤を基質投与前に投与 (尾静注) したが、内耳移行性には変化がみられなかった (論文作成中)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

- 1: Nishiyama N, Yamaguchi T, Yoneyama M, Onaka Y, Ogita K. Disruption of Gap Junction-Mediated Intercellular Communication in the Spiral Ligament Causes Hearing and Outer Hair Cell Loss in the Cochlea of Mice. Biol Pharm Bull. 査読有 2019;42(1):73-80. doi: 10.1248/bpb.b18-00559.
- 2: Kada S, Hamaguchi K, Ito J, Omori K, Nakagawa T. Bone Marrow Stromal Cells Accelerate Hearing Recovery via Regeneration or Maintenance of Cochlear Fibrocytes in Mouse Spiral Ligaments. Anat Rec (Hoboken). 査読有 2019 Jan 11. doi:10.1002/ar.24063.
- 3: Yamahara K, Nishimura K, Ogita H, Ito J, Nakagawa T, Furuta I, Kita T, Omori K, Yamamoto N. Hearing preservation at low frequencies by insulin-like growth factor 1 in a guinea pig model of cochlear implantation. Hear Res. 査読有 2018 Oct;368:92-108. doi: 10.1016/j.heares.2018.07.004.
- 4: Iki T, Tanaka M, Kitajiri SI, Kita T, Kawasaki Y, Mizukoshi A, Fujibuchi W, Nakagawa T, Nakahata T, Ito J, Omori K, Saito MK. Microarray analyses of otospheres derived from the cochlea in the inner ear identify putative transcription factors that regulate the characteristics of otospheres. PLoS One. 査読有 2017 Jun 29;12(6):e0179901. doi: 10.1371/journal.pone.0179901.
- 5: Sato Y, Sakurai Y, Kajimoto K, Nakamura T, Yamada Y, Akita H, Harashima H. Innovative Technologies in Nanomedicines: From Passive Targeting to Active Targeting/From Controlled Pharmacokinetics to Controlled Intracellular Pharmacokinetics. Macromol Biosci. 査読有 2017 Jan;17(1). doi: 10.1002/mabi.201600179.

[学会発表](計0件)

[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〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中川隆之

ローマ字氏名：NAKAGAWA, takayuki

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：50335270

研究分担者氏名：山田勇磨

ローマ字氏名：YAMADA, yuma

所属研究機関名：北海道大学

部局名：薬学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60451431

研究分担者氏名：山口太郎

ローマ字氏名：YAMAGUCHI, taro

所属研究機関名：摂南大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：30710701

研究分担者氏名：北尻真一郎

ローマ字氏名：KITAJIRI, shinichiro

所属研究機関名：信州大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：00532970

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。