

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21641

研究課題名（和文）超音波併用脳内局所広範囲薬剤投与方法を用いた画期的なアルツハイマー病新規治療法開発

研究課題名（英文）Development of innovative treatment for Alzheimer's disease using local interstitial drug administration in the brain.

研究代表者

齋藤 竜太（Saito, Ryuta）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10400243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病モデルマウス5xFADを用いて開発した超音波併用脳内局所広範囲薬剤投与方法を用いた薬剤投与方法による新規治療開発を目指した。マウス脳内では、パラフィン切片を免疫抗体染色で染めることにより安定してアミロイド蓄積を評価する系を確立した。その上で、ネプリライシン、クルクミンは上記投薬で有効な薬剤分布が得られることを確認した。さらに、これらの薬剤を用いてアミロイド蓄積を解消することを試みた。結果としてネプリライシンが最も安定してアミロイド斑を低減させることを確認した。その上で、5xFADマウスを用いて、海馬への投薬技術を安定化させて、海馬へ投薬を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は、認知症を起こす代表的な病気の一つであり、日本での認知症患者数は、2012年現在462万人といわれ、2025年には700万人にまで増加すると予測されている。本疾患は、脳の中に「アミロイド（ベータ）タンパク」が蓄積し、このタンパク質の毒性により神経細胞が破壊されて神経細胞数が減ることで発症する。通常本疾患では脳の萎縮は、海馬のあたりから始まって脳全体へと広がる。つまり病初期には、アミロイド蛋白の局所的な集積がある。これはアミロイドPET検査などで同定されている。従って本研究で確認したように脳局所薬剤投与方法によるアミロイド蛋白の低減は、新規治療開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Aim of this study was to develop novel therapeutic strategy by drug administration using ultrasound facilitated local interstitial drug delivery method that we developed using Alzheimer's disease model mouse 5xFAD (B6.Cg-Tg (APP SwF1Lon, PSEN1 *M146L*L286V) 6799Vas/ Mmjax). In the model mouse brain, we established a system for stably evaluating amyloid accumulation by staining paraffin sections with immunoantibody staining. In addition, it was confirmed that neprilysin and curcumin provided effective drug distribution with the above drug delivery method. Furthermore, an attempt was made to decrease amyloid accumulation using these agents. As a result, it was confirmed that neprilysin most stably reduced amyloid plaques. Then, using 5xFAD mice, hippocampal administration techniques were stabilized and hippocampal administration was carried out.

研究分野：神経外科学分野

キーワード：アルツハイマー病 CED

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は脳実質内局所広範囲に高濃度薬剤送達を可能とする新規薬物送達法 Convection-enhanced delivery (CED) を用いた中枢神経系疾患の新規治療法の開発を進め(基盤 A 2009-11, 基盤 B 2014-16)、AMED 資金援助下に 2018 年より小児脳幹部神経膠腫(悪性脳腫瘍)を対象とした化学療法剤局所投与の医師主導治験を実施した。こちらに関しては現在、薬事承認申請に向け関係機関と協議を重ねている。一方で、超音波併用薬剤投与技術を確立し、CED を超える広範囲薬剤投与を可能とした(基盤 B, 2017-19)。本技術は、脳内薬剤注入局所での超音波併用を可能とする点で独自の技術である。この技術は複雑な組織構築へも均一な薬剤分布を可能とする(特許第 5995127 号(P5995127)、特許第 7057585 号)。次世代 CED として期待される超音波併用薬剤投与技術は、様々な中枢神経疾患に対する新たな治療可能性を創出する。本研究ではアルツハイマー病治療に向けた基礎的基盤の構築を目指す。

2. 研究の目的

アルツハイマー病は、蛋白の異常な沈着により、脳のいたるところにアミロイド斑とタウ蛋白からなる神経原線維変化が生じ、もともとは健康であったニューロンが、効率よく機能しなくなっていくことが原因と考えられている。この分野は近年、精力的に研究が進められており、当院老年科でも、アミロイド蛋白の蓄積を可視化する研究が進められている。この研究で、早期におけるアミロイド蛋白の蓄積は全般性ではなく、脳のある部位に特に蓄積が多くなる傾向があることが判明している。このことは、アミロイド蓄積部位の局所治療が功を奏する可能性を示唆する。本研究では、我々が開発した脳内広範囲薬剤送達技術を用いて、脳局所のアミロイド沈着を解除する新規治療法開発を目的とする。

3. 研究の方法

3-1 アルツハイマー病モデルマウス

アルツハイマー病モデルマウス 5xFAD (B6.Cg-Tg (APP SwFlon, PSEN1 *M146L*L286V) 6799Vas/Mmjax): アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 遺伝子を染色体上の不特定部位に挿入、マウス脳内で APP を過剰に発現させることで、結果的にアミロイドを蓄積するようになった遺伝子改変マウスを用いた。

3-2 投与薬剤

治療薬としてクルクミン(富士フイルム和光純薬(株))、ネプリライシン(R&D Systems, Inc.)を検討した。治療薬候補としては他にも bapineuzumab、solanezumab、ponezumab、gantenerumab などのようなアミロイドを認識する抗体薬も検討したが、超音波を用いた薬剤送達による薬剤そのものの変性などを考慮し、前記 2 薬剤を用いた。

3-3 脳内局所投与

従来型 CED (convection-enhanced delivery; 局所広範囲薬剤投与技術)、我々が開発した超音波併用薬剤送達技術 UFD (ultrasound facilitated delivery; 超音波印加薬剤送達)を用いた。投与プロトコールは、いずれも以下の方法で 10 μ l の投与を行った。投与計画: 0.2 μ l/min 15min 0.5 μ l/min 10min 0.8 μ l/min 2.5min 静置 5min。定位脳手術装置を用いてモデルマウスの線条体と海馬への投与を実施した。

3-4 薬剤分布

薬剤分布は上記投与直後にマウスを安楽死させ、凍結標本作成の方法で脳切片を作成して検討した。

3-5 アミロイド染色

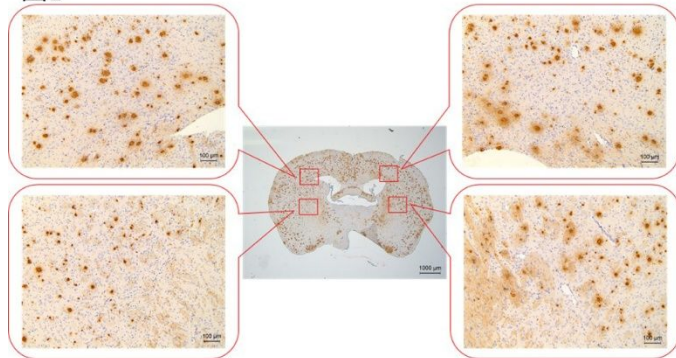
投与後、3 日後、7 日後のマウスを安楽死させ、脳を摘出した。脳をホルマリン固定し、パラフィン切片(5 μ m)を作成した。抗アミロイド抗体を用いた免疫染色を行い、アミロイド蛋白の蓄積を評価した。具体的には一次抗体に Anti-beta Amyloid, Mouse-Mono (MOAB-2)(Novus Biologicals, Centennial, CO)、二次抗体 BIOTINYLATED ANTI-MOUSE IgG (H+L)(VECTOR Laboratories Inc., Newark, CA)を使用した。

4 . 研究成果

4-1 アルツハイマー病モデルマウス

アルツハイマー病モデルマウス 5xFAD に関しては、ジェノタイピングにより系統維持を進めつつ研究に使用した。12 週齢で以下のアミロイド染色結果が得られることを確認した。

図1



4-2 アミロイド染色

凍結切片、パラフィン切片を用いた Congo-red 染色、抗アミロイド抗体を用いた免疫化学染色を検討し、パラフィン切片を用いた免疫化学染色が最も安定にアミロイド蓄積を評価できることを確認した。

モデルマウス脳では、脳全体にアミロイドが安定的に蓄積することが確認された(図1)。

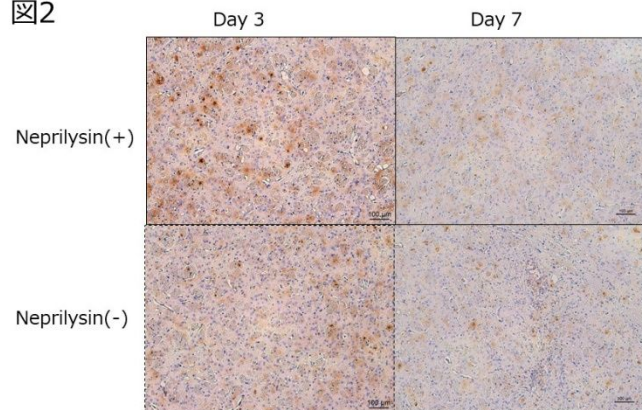
4-3 使用薬剤の選択

クルクミン、ネプリライシンは局所投与後の脳内分布は良好であった。この2薬剤を用いて、モデルマウス線条体への薬剤投与によるアミロイド蓄積低減を検討することとした。

ここで、線条体はこれまでの脳腫瘍治療開発で標準的に使用した薬剤投与部位であり、上記アミロイド染色でも安定的にアミロイド蓄積が認められる部位であることから、本研究において線条体で薬剤投与によるアミロイド蓄積低減を検討することとした。

結果としてネプリライシン 10 μ l (Neprilysin 量 : 10 μ g) の投与後、3 日後、7 日後にアミロイド蓄積の低減が確認された(図2)。

図2



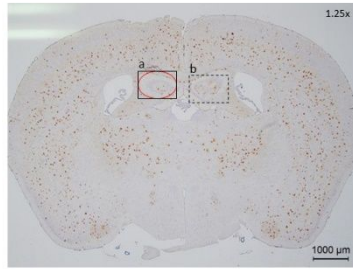
4-4 使用薬剤の局所毒性

ネプリライシン投与後の毒性を評価した。局所投与後 10 日間の観察において、マウスに明らかな異常は認めなかった。また 10 日後の脳切片においても明らかな局所障害は認めず、安全な投与が可能であることを確認した。

4-5 海馬への投薬

アルツハイマー病においては海馬を中心にアミロイドの蓄積が始まることが示唆されている。そのため、海馬への薬剤送達技術を確立した。線条体と同様にネプリライシン $10\mu\text{l}$ (Neprilysin 量 : $10\mu\text{g}$) を局所投与した後、3日後、7日後のアミロイド蓄積を評価したところ、アミロイド蓄積の低減が確認された。代表的な画像を図3, 4に示す。

図3
Neprilysin投与から3日後



○ : Neprilysin投与位置

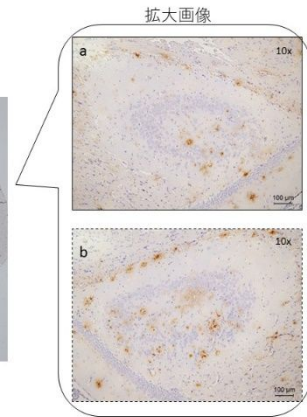
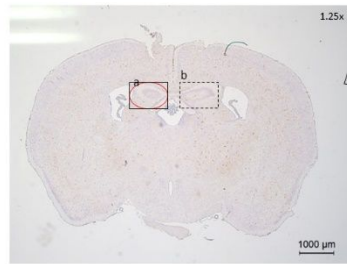
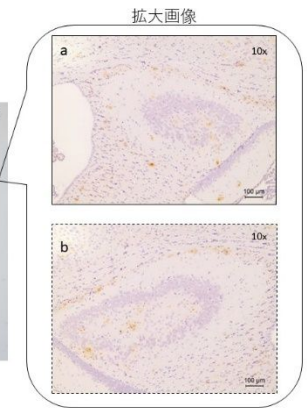


図4
Neprilysin投与から7日後



○ : Neprilysin投与位置



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 齋藤 竜太	4. 巻 50
2. 論文標題 特集 Precision Medicine-個別化医療を目指した遺伝子診断と新治療の知見 悪性脳腫瘍 Diffuse midline glioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 29~38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204529	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 齋藤 竜太	4. 巻 49
2. 論文標題 特集 グリオーマ-現在の常識と近未来のスタンダード グリオーマ治療法update 化学療法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 588~596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204432	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 Saito Hidehisa, Hidema Shizu, Otsuka Ayano, Suzuki Jun, Kumagai Michio, Kanaya Akihiro, Murakami Toru, Takei Yusuke, Saito Kazutomo, Sugino Shigekazu, Toyama Hiroaki, Saito Ryuta, Tominaga Teiji, Nishimori Katsuhiko, Yamauchi Masanori	4. 巻 574
2. 論文標題 Effects of oxytocin on responses to nociceptive and non-nociceptive stimulation in the upper central nervous system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 8~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.08.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Osada Yoshinari, Saito Ryuta, Shibahara Ichiyo, Sasaki Keisuke, Shoji Takuhiro, Kanamori Masayuki, Sonoda Yukihiko, Kumabe Toshihiro, Watanabe Mika, Tominaga Teiji	4. 巻 3
2. 論文標題 H3K27M and TERT promoter mutations are poor prognostic factors in surgical cases of adult thalamic high-grade glioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 vdab038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/oaajnl/vdab038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 前澤 聡、石崎 友崇、齋藤 竜太	4. 巻 51
2. 論文標題 特集 脳神経外科医が知っておきたい-てんかんのすべて 脳神経外科医が知っておきたいてんかんの診断と検査 てんかん発作症候学と大脳皮質の機能解剖	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 17~28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204711	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 Maki Y., Natsume J., Ito Y., Okai Y., Bagarinao E., Yamamoto H., Ogaya S., Takeuchi T., Fukasawa T., Sawamura F., Mitsumatsu T., Maesawa S., Saito R., Takahashi Y., Kidokoro H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Involvement of the Thalamus, Hippocampus, and Brainstem in Hypsarrhythmia of West Syndrome: Simultaneous Recordings of Electroencephalography and fMRI Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Neuroradiology	6. 最初と最後の頁 1502~1507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3174/ajnr.A7646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Sachiko, Maesawa Satoshi, Bagarinao Epifanio, Nakatsubo Daisuke, Tsugawa Takahiko, Mizuno Satomi, Kawabata Kazuya, Tsuboi Takashi, Suzuki Masashi, Shibata Masashi, Takai Sou, Ishizaki Tomotaka, Torii Jun, Mutoh Manabu, Saito Ryuta, Wakabayashi Toshihiko, Katsuno Masahisa, Ozaki Norio, Watanabe Hirohisa, Sobue Gen	4. 巻 138
2. 論文標題 Magnetic resonance-guided focused ultrasound thalamotomy restored distinctive resting-state networks in patients with essential tremor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 306~317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2022.5.JNS22411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 齋藤 竜太
2. 発表標題 脳腫瘍治療成績向上を目指して
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuta Saito
2. 発表標題 Visualization of drug delivery in local convection-enhanced delivery against brain tumors
3. 学会等名 AIMS Neuro Imaging 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuta Saito
2. 発表標題 EFFICACY OF LOCAL ADMINISTRATION OF ALKYLATING AGENT AGAINST BRAINSTEM GLIOMAS
3. 学会等名 International Conference on Brain Tumor Research and Therapy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 竜太
2. 発表標題 びまん性内在性橋グリオーマに対するACNU局所投与による多施設共同第II相医師主導臨床試験
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryuta Saito
2. 発表標題 Phase II single-arm, multi-center, Physician-Initiated Clinical Trial of Convection-enhanced Delivery of Nimustine Hydrochloride (ACNU) against Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 竜太
2. 発表標題 最大限摘出を目指すグリオーマの手術：「不易」=手術の安全、「流行」=機器の進歩に応じた術式の変化
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryuta Saito
2. 発表標題 Phase II single-arm, multi-center, Physician-Initiated Clinical Trial of Convection-enhanced Delivery of Nimustine Hydrochloride (ACNU) against Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas
3. 学会等名 American Society of Clinical Oncolog (国際学会)
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
研究 分 担 者	下田 由輝 (Shimoda Yoshiteru) (30815444)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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
---------	---------