

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19049

研究課題名（和文）CAGリピート結合分子の経鼻投与後における脳内動態解明及びリピート短縮効果の検証

研究課題名（英文）Elucidation of intracerebral distribution of CAG repeat binding molecules after intranasal administration and verification of effect on repeat contraction.

研究代表者

柴田 知範（Shibata, Tomonori）

大阪大学・産業科学研究所・招へい教員

研究者番号：80711960

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）：ハンチントン病は、CAGリピートの異常伸長により脳線条体の神経細胞が欠落する難治性疾患である。申請者の所属する研究室ではCAGリピート結合低分子(NA)をハンチントン病モデルマウスの脳線条体へ直接投与することによりCAGリピートが短縮することを見出した。NAは、血中からの脳内移行が制限されているため、NAの投与は脳線条体への直接投与という侵襲的な投与方法に限られている。本研究では、組織透明化3次元イメージングによりNA誘導体の脳内動態を解析する技術を活用し、NA誘導体を非侵襲的に脳内へと送達する経鼻投与の薬物送達経路を調べることで、経鼻投与後の脳内動態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAは、ハンチントン病のマウスモデルにおいて異常に伸長したCAGリピートを短縮する画期的な低分子である。将来のハンチントン病治療においては、NAを脳内へと送達すること重要な課題であり、本研究により明らかとなった経鼻投与後のNAの脳内動態はNAの治療効果を検証していく上で重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Huntington's disease is an incurable disorder in which neurons in the brain striatum are degenerated due to aberrant expansion of CAG repeats. We have found that direct administration of a CAG repeat-binding small molecule (NA) into the brain striatum of a mouse model of Huntington's disease resulted in the contraction of aberrantly expanded CAG repeats. Because of the limited transfer of NA from the blood to the brain, NA administration is limited to the invasive method of direct administration to the brain striatum. In this study, we analyzed the drug delivery pathway and the intracerebral distribution of an NA derivative after noninvasive intranasal administration by three-dimensional whole-brain imaging using a combination of tissue clearing and light sheet fluorescence microscopy.

研究分野：核酸化学

キーワード：経鼻投与 CAGリピート ハンチントン病 全脳イメージング CAGリピート結合分子 組織透明化

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

ハンチントン病は、CAG から成る 3 塩基の反復配列 (CAG リピート) の異常伸長により線条体の神経細胞が変性し発症する難治性疾患である。研究代表者の所属する研究室では、ハンチントン病モデルマウス (R6/2) の脳線条体に CAG リピート結合分子である「ナフチリジン - アザキノロン (NA)」を直接投与することで CAG リピートが短縮誘導されることを報告した (*Nat. Genet.* 2020, 52, 146)。NA によるリピート短縮効果は、週 1 回の継続的な直接投与により 3 リピート短縮/4 週間ほどであり、さらなるリピート短縮効果を得るには、長期的な投与が必要である。しかしながら脳内への NA 送達には、血液脳関門 (BBB) により血中から脳内への移行が制限されているため、外科手術を伴う侵襲的な直接投与に限定されており、長期的な継続投与や R6/2 マウスの表現型解析を困難にしている。また NA の脳内への送達効率や脳内動態がリピート短縮誘導や R6/2 マウスの表現型に及ぼす影響も不明であり、効果的な治療法の確立には、NA の脳内送達及び脳内動態を考慮した治療戦略が必要である。研究代表者は、NA の脳内動態を解析する技術として組織透明化/3D イメージング (*Cell*, 2014, 159, 911) を活用し、脳内における NA の局在を解析する手法を確立した (図 1)。脳内でホルムアルデヒド固定可能な 1 級アミンと Alexa594 を導入した NA 誘導体 (NA-Alexa594-NH<sub>2</sub>) をマウス脳内に直接投与、ホルムアルデヒド固定後、CUBIC による全脳イメージングを行い、高解像 3D イメージング画像を得ることに成功している。

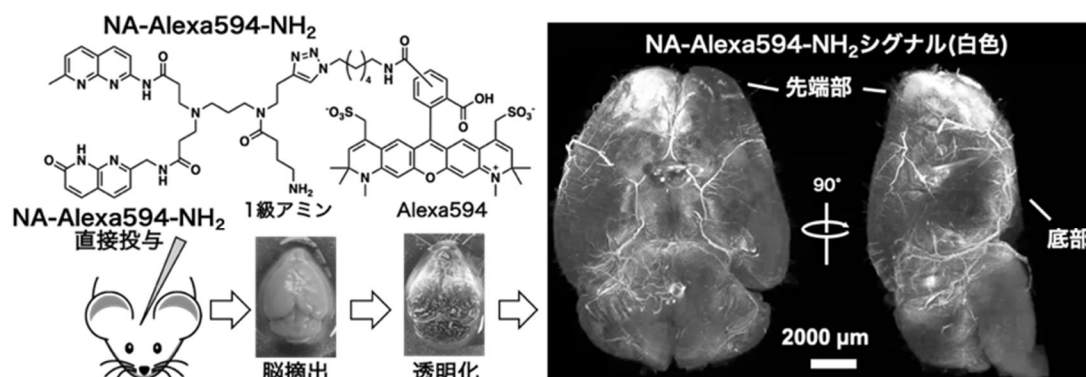


図1. NA-Alexa594-NH<sub>2</sub>を用いたマウス全脳3次元イメージングによる脳内局在解析

### 2. 研究の目的

本研究では血液脳関門を介さず脳内送達可能で非侵襲的な経鼻投与に着目した。組織透明化 3 次元イメージングにより経鼻投与後の NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の動態を解析することで、将来のハンチントン病治療法確立に資する CAG リピート結合分子の脳内動態に関する知見を得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

脳実質や脳室への投与は、中枢神経系に直接薬物を投与できる反面、侵襲性が高いという欠点がある。そこで研究代表者は、血液脳関門を介さず脳内送達可能で非侵襲的な経鼻投与を実施した。経鼻投与は、鼻から脳への複数の経路を経て、鼻粘膜から脳へと薬物が送達される。NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の鼻から脳への薬物送達経路を調べるため、イソフルラン吸入麻酔下においてマウスに対してマイクロピペットを用いて左鼻孔に NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> を経鼻投与を行った。経鼻投与直後、0.5, 1, 3, 6, 24 時間後にマウスを灌流固定し、マウス脳を摘出した後、組織透明化試薬を用いてマウス脳の透明化を実施した。その後、ライトシート型蛍光顕微鏡を用いた全脳イメージングにより投与した NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の蛍光を観察した (図 2)。

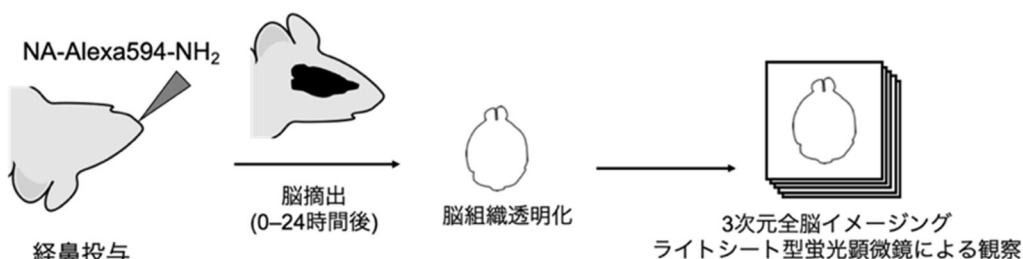


図2. 経鼻投与後の3次元全脳イメージングの概要

#### 4. 研究成果

NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> を経鼻投与した 0 時間（投与直後の灌流固定）、0.5 時間、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間後の 3 次元全脳イメージング画像をライトシート型蛍光顕微鏡により取得した結果を図 3 に示す。経鼻投与後 0 時間では、NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の蛍光シグナルが左右の嗅球と脳血管で観察され、投与後 1 時間以内にシグナルが減少した（図 3A）。経鼻投与 0 時間後のサンプルの脳矢状面画像では、尾側脳幹および吻側嗅球領域に蛍光シグナルの分布が認められた（図 3B）。観測された NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の経鼻投与後の脳内分布は、ラットおよびカニクイザルを用いた放射性標識タンパク質の経鼻投与に関する研究で報告されたものと同様であった。また NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の蛍光シグナルが脳血管の外側には観測されなかったことから、NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> は BBB を透過しないことが示唆された。また経鼻投与後 1 時間ほどで嗅球付近の蛍光シグナルが消失したが、投与後 3~6 時間経過した後、左側の嗅球において蛍光シグナルが観察され、そのシグナルは、24 時間経過した後でも観察された。

嗅球における NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の分布をさらに調べるため、経鼻投与後 0 時間および 6 時間のサンプルの脳切片を作成し、嗅球全体に広く発現し、系球体層、分裂細胞層、顆粒細胞層に特異的に集積する secretagogin について免疫染色した後、蛍光顕微鏡で観察した（図 3C）。NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> 由来の蛍光シグナルは両方の脳切片で検出されたが、経鼻投与 0 時間後と 6 時間後の脳切片では NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の局在に差がみられた。経鼻投与 0 時間後の脳切片では、系球体層の系球体周囲細胞に NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の蛍光が検出された。一方、経鼻投与 6 時間後の脳切片では、系球体に NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の蛍光が検出された。経鼻投与 0 時間後と 6 時間後の NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の局在が異なることから、鼻から嗅球に到達する経路が複数あることが示唆された。

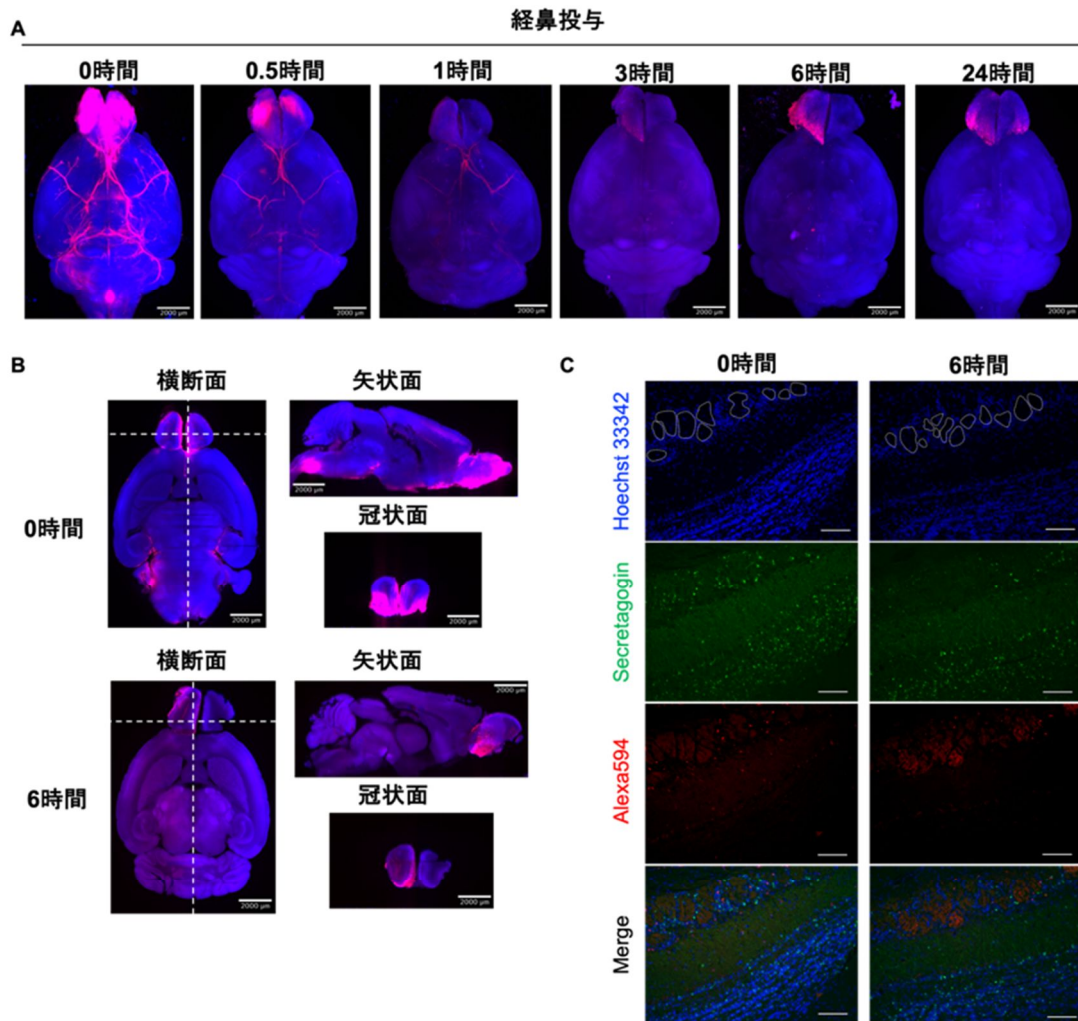


図3. 左鼻腔へのNA-Alexa594-NH<sub>2</sub>経鼻投与後の脳内分布. (A) 経鼻投与0-24時間後の3次元全脳イメージング画像、(B)経鼻投与0, 6時間後の横断面、矢状面、冠状面画像、(C)マウス脳切片における嗅球の蛍光免疫染色画像

経鼻投与における薬物送達の経路は、細胞内と細胞外輸送経路があると考えられている。細胞外輸送経路は嗅覚経路と三叉神経経路に分けられ、経鼻投与された物質は嗅上皮と呼吸上皮の前膜からそれぞれ嗅球と脳幹に迅速に輸送される。本研究で実施した左鼻孔からの投与では、投与直後から NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の蛍光シグナルが左右の嗅球に集積したことから、NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> は細胞間隙や神経周囲腔を通過する細胞外経路を経て両嗅球に到達すると考えられる。細胞内輸送は、経鼻投与された物質が嗅上皮の末梢嗅神経細胞から嗅球へ輸送される軸索輸送経路である。タンパク質を経鼻投与した先行研究では、嗅上皮から嗅球への細胞内輸送には6時間かかることが報告されている。NA-Alexa594-NH<sub>2</sub> の蛍光シグナルが投与3~6時間後に観察されたことから細胞内経路を経て嗅球に到達することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件(うち査読付論文 1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 Shibata Tomonori、Nakatani Kazuhiko	4. 巻 79
2. 論文標題 A small molecule binding to TGGAA pentanucleotide repeats that cause spinocerebellar ataxia type 31	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 129082 ~ 129082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.129082	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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yusuke Fujiwara, Tomonori Shibata, Chikara Dohno, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Control of RNA Foci Formation by Photo-Switchable Ligands
3. 学会等名 The 49th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Luyan Zhang, Tomonori Shibata, Asako Murata, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Evaluation of APOBEC-catalyzed cytosine deamination for the repeat DNAs
3. 学会等名 The 49th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomonori Shibata, Konami Nagano, Morio Ueyama, Kensuke Ninomiya, Tetsuro Hirose, Yoshitaka Nagai, Kinya Ishikawa, Gota Kawai, Kazuhiko Nakatani
2. 発表標題 Alleviation of RNA toxicity by a small molecule targeting UGGAA repeat in spinocerebellar ataxia type 31
3. 学会等名 NEURO2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原 侑亮、柴田 知範、堂野 主税、中谷 和彦
2. 発表標題 RNA反復配列を標的とした光応答性リガンドによる細胞内RNA fociの形成制御
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上英太郎、柴田知範、中森雅之、田井中一貴、中谷和彦
2. 発表標題 全脳イメージングを用いたCAGリピート結合分子の脳内分布解析
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上英太郎、柴田知範、中森雅之、田井中一貴、中谷和彦
2. 発表標題 全脳イメージングを用いたCAGリピート結合分子の薬物動態解析
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021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
---------	---------