

研究テーマ

低酸素細胞選択的ドラッグデリバリーシステムによる脳梗塞の新規治療法の開発

1. はじめに

脳梗塞を主体とする脳血管疾患は我が国の死因の第3位、寝たきりの第1位の原因であり、新規治療法の開発が急務である。全医療費の実に1割近くが脳卒中診療に費やされており、新たな治療法の開発が医療経済に及ぼす影響は計り知れない。したがって、本申請課題では、脳梗塞巣選択的に薬剤を蓄積させるという、全く新しい発想に基づいた脳梗塞に対する治療介入の試みを提案したい。

2. 方法

融合ナノ材料 PTD-ODD-Halotag-Alexa Fluor660 (POHA) を、脳血管障害モデルマウスへ適用することで、脳虚血巣のイメージングが可能か検討し、その技術を応用した脳虚血巣へのターゲティングや DDS 材料の評価・実用化を検討する。

1. 融合ナノ材料 PTD-ODD-Halotag-Alexa Fluor660 (POHA) の脳虚血巣選択的集積(巨視的観察):

マウスの局所脳虚血モデル(中大脳動脈虚血・再灌流モデル)に、再灌流後3分以内に尾静脈から POHA を全身投与し、POHA 集積の経時的变化を脳を中心に観察する。体表からの観察、皮膚を剥離してからの観察、脳を単離してからの観察を行い、虚血巣選択的な POHA 集積を経時的に観察する。

2. 融合ナノ材料 POHA の脳虚血巣選択的集積(微視的観察) :

虚血側と非虚血側の脳切片に対し、抗 Halotag 抗体を用いた蛍光組織化学法を行い、Halotag(すなわち POHA) の局在について、局在している細胞種、その細胞内分布、さらには、虚血側選択的集積の有無を確認する。

3. カスパーゼ阻害薬を連結した融合ナノ材料の脳虚血巣選択的 DDS の構築:

現在 Halotag によって連結されている蛍光色素は、他の機能分子に置換可能であることから、蛍光色素をカスパーゼ阻害剤(CasS)に置換し、脳虚血巣選択的に CasS を送達できるか検討する。Myc で標識した PTD-CasS、PTD-ODD-CasS の脳内分布を抗 Myc 抗体を用いた免疫組織化学法を用いて確認する。

4. 融合ナノ材料を用いた脳虚血治療:

マウスの局所脳虚血モデルに対して、PTD-CasS もしくは PTD-ODD-CasS 投与を行い、非投与群との比較を行う。

3群の脳血流、脳梗塞面積・体積、神経学的障害スコアの評価を行い、PTD-ODD-CasS の有効性を確認する。

3. 結果 研究成果

1. 融合ナノ材料POHAの脳虚血巣選択的集積(巨視的観察): POHA投与初期には血流量に比例して左脳半球から蛍光シグナルが強く観察されたが、次第に左大脳半球からの蛍光シグナルが減弱する一方で、右大脳半球の蛍光シグナルが増強し(図1左)、投与4日後には右大脳半球(虚血側)からの極めて選択的な蛍光シグナルが観察された。皮膚を剥離してからの観察(図1中)や、脳を単離してからの観察(図1右)でも強い蛍光シグナルが観察され、虚血巣にPOHAが蓄積していることが証明できた。
2. 融合ナノ材料POHAの脳虚血巣選択的集積(微視的観察): 虚血側と非虚血側の脳切片に対する、抗Halotag抗体を用いた蛍光組織化学法では、Halotagが形態学的に神経細胞と考えられる細胞の細胞質内に、虚血側選択的に蓄積していることが証明できた(図2)。
3. カスパーゼ阻害薬を連結した融合ナノ材料の脳虚血巣選択的DDSの構築: Mycで標識されたPTD-CasSは脳内に広く分布する一方で、Mycで標識されたPTD-ODD-CasSは脳虚血巣選択的に集積していることを抗Myc抗体を用いた免疫組織化学法を用いて確認した(図3)。
4. 融合ナノ材料を用いた脳虚血治療: コントロール群、PTD-CasS投与群、PTD-ODD-CasS投与群のいずれの群でも、適切な中大脳動脈虚血・再灌流が得られており、血流変化は、投与内容によらなかった。また脳梗塞面積・体積がPTD-CasS、PTD-ODD-CasS投与にて縮小することが証明された。さらに、神経学的障害スコアにて、PTD-CasSやPTD-ODD-CasSはともに神経脱落症状を改善させることが証明された。

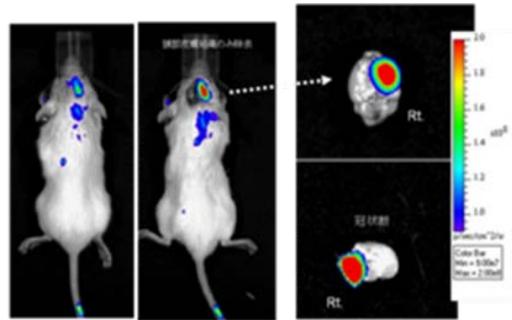


図1.融合ナノ材料の虚血巣選択的な集積

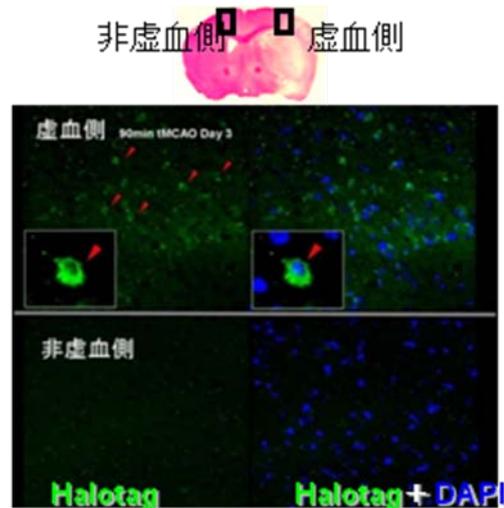


図2.融合ナノ材料の虚血細胞選択的分布

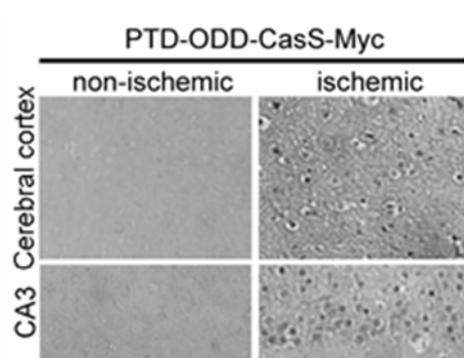


図3.カスパーゼ阻害剤を連結した融合ナノ材料の虚血巣選択的送達

以上のことから、本DDSは、脳虚血巣選択的な薬剤送達に有効なシステムであることが証明された。

4. 考察 まとめ

本研究を通じて、融合ナノ材料によるイメージング・ターゲティングおよびDDS材料の虚血性脳血管障害への実用化の目途が立った。Halotagにはさまざまな機能分子を自由に付け替えることができるという利点がある。そこで、カスパーゼ阻害剤以外にさまざまな機能分子を連結したリコンビナントタンパク質を作成し、虚血・再灌流モデルマウスに投与することで、虚血性脳血管障害に対する保護効果を検討することができる。機能分子の候補としてはアポトーシス阻害剤以外にも、オートファジー誘導剤/阻害剤、SIRT2、神経栄養因子BDNF、エリスロポイエチン、neuroglobinなどがあげられる。細胞死を人為的に、かつ低酸素細胞選択的に操作することで、虚血性脳血管障害治療の新規創出に直結することが期待される。

5. 参考文献

Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res.* 2002 Apr 1;62(7):2013-8.