

脳への微弱電流処理による BBB 開口・リポソーム動態制御による脳梗塞治療法の開発

福田達也

徳島大学大学院医歯薬学研究部(薬学域) 衛生薬学分野

【研究の背景】

我々はこれまでに、脳梗塞時の特徴的な病態である血液脳関門(BBB)の透過性亢進に着目し、粒子径約 100 nm のリポソーム製剤が患部へ集積し、脳虚血/再灌流障害の治療に有効であることを報告してきた^{1,2)}。しかし、リポソームの患部への移行は、障害進行に伴う脳微小循環不全により虚血/再灌流後の早期に限定されるため³⁾、リポソームによる薬物送達効率を向上させるためには、この時間的制限を克服し、BBB を突破可能な技術が求められる。当研究室ではこれまでに、経皮薬物送達技術であるイオントフォレシスに用いられる微弱電流処理(0.3-0.5 mA/cm²)が、細胞内シグナルの活性化を介して組織細胞間隙の開裂を誘起し、リポソーム等のナノ粒子の組織内浸透を促進することを見出している⁴⁾。他方で近年、頭蓋上からの脳への微弱電流処理(tDCS)が、アストロサイトや神経細胞を活性化することで、うつ病や脳梗塞などの症状を改善することが報告されている⁵⁾。これら知見に基づき、tDCS により BBB を構成する細胞の生理を制御し、微小循環不全の改善と BBB 間隙の開口を誘起することができれば、脳梗塞部位へのリポソーム製剤の集積性を増大できるのではないかと考えた。

【目 的】

本研究では、tDCS による脳微小循環不全の改善と BBB 間隙の開口、それによる脳梗塞部位へのリポソーム製剤の集積性増大と治療効果の向上を最終的な目的とした。はじめに、実験動物の代替として期待されている発育鶏卵を用いた系において、微弱電流処理による血管透過性への影響について検討した。次に、脳虚血/再灌流モデルとして汎用される一過性中大脳動脈閉塞(t-MCAO)ラットに対して蛍光標識リポソームを静脈内投与し、その一定時間後の脳内分布を解析するとともに、tDCS がその分布に及ぼす影響について検討した。

【方 法】

①発育鶏卵を用いた血管透過性の評価:

インキュベーター(37.6°C)内の転卵器に発育鶏卵を配置した日を Day 1 とし、Day 14-16 まで転卵(90 度/h)させながらインキュベートした。その後、発育鶏卵の殻を削ることで静脈内投与用、および Ag/AgCl 電極を貼るための部位を作成し、実験に使用した。微弱電流処理(0.34 mA/cm², 1h)を行った発育鶏卵に対し、モデル蛍光低分子・高分子として、カルセイン(M.W. 622.5)、異なる平均分子量の FITC 標識デキストラン(M.W. 10,000 あるいは 70,000)をそれぞれ静脈内投与し、37.6°Cでインキュベートした。サンプル投与 6、4 時間後において、血管周辺を満たしている漿尿液を回収し、プレートリーダーによってその蛍光強度を測定することで血管透過性の指標とした。微弱電流処理を行わず、各サンプルの静脈内投与のみを行った群をコントロール群とした。

②脳虚血/再灌流モデルラットにおけるリポソームの脳内分布:

脳虚血/再灌流モデル t-MCAO ラットに対し、1 時間の虚血、再灌流直後あるいは 6 時間後に粒子径約 100 nm の蛍光標識ポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームを尾静脈内投与した。リポソーム投与 3 時間後、ラットの脳を摘出し、脳スライスを作製後、in vivo imaging system (IVIS)にてリポソームの脳内分布を蛍光イメージング解析した。蛍光が認められた脳スライスを OCT コンパウンドに浸し凍結後、クライオスタットにて凍結切片(10 μm)を作製した。そして、脳血管内皮細胞マ

カーCD31 に対する蛍光免疫染色を行い、リポソームの詳細な脳内分布を共焦点顕微鏡により観察した。ラット脳に対して tDCS を行う際には、ラット右頭蓋上に陽極、背中に陰極をそれぞれ設置し、インフルラン吸入麻酔下、1 mA の電流値で 60 分処理した。

【結 果】

①発育鶏卵への微弱電流処理によるモデル蛍光物質の血管外漏出の促進:

カルセイン、または異なる分子量の FITC 標識デキストランを静脈内投与した発育鶏卵から回収した漿尿液の蛍光強度を測定したところ、いずれの物質においても微弱電流処理群において対照群と比較して高い蛍光値が認められた。またその蛍光値は投与 6 時間後と比較して 24 時間後において高く、24 時間後ではいずれのサンプルにおいても微弱電流処理群で有意に高い蛍光値、すなわち血管外への低分子・高分子の漏出が認められた。

②t-MCAO ラットにおけるリポソームの脳内分布と tDCS の影響:

虚血/再灌流後各時間に投与した蛍光標識 PEG 修飾リポソームの脳内分布を IVIS にて解析したところ、再灌流直後に投与した場合は、虚血側脳半球の広域にわたって集積が認められ、共焦点画像から、血管外へ漏出し脳実質へ広く拡散している様子が観察された。一方、再灌流 6 時間後に投与した場合ではその集積は減少していた。そこで、tDCS (1 mA, 60 min) のリポソーム集積性への影響を評価したが、本条件では期待された効果を得ることは困難であった。

【考 察】

発育鶏卵を用いた検討において、微弱電流処理により静脈内投与したモデル蛍光低分子・高分子の血管外への漏出が促進されたことから、微弱電流処理が血管透過性の亢進を誘起し、血管外への高分子送達へ応用できることが明らかとなった。本技術を脳虚血/再灌流モデルへと適用し、tDCS による脳梗塞後の脳微小循環不全の改善と BBB 開口によるリポソーム集積性の向上を試みたが、期待していた効果を得ることは困難であった。今後、tDCS の電流値や処理時間などについて詳細な検討を進め、条件を最適化することで、tDCS による脳梗塞部位へのリポソーム集積性の増大を達成したいと考えている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

正常の血管を越えて目的の組織へと薬物を送達することは困難とされている。本研究で新たに見出した、微弱電流処理による血管透過性の亢進とそれによる低分子・高分子の血管外への送達技術は、血管内皮の組織生理を人為的に制御し、目的部位への薬物送達効率を向上し得る新たな DDS の開発に繋がる可能性がある。本研究では、この技術を脳梗塞部位へのリポソーム集積性向上に応用すべく検討を行ったが、現状では期待していた効果を得ることができず、改善を重ねる必要がある。しかし、tDCS による脳梗塞部位の BBB 開口と、それによるリポソームを用いた効率的な薬物送達の実現されれば、要介護に至る原因疾患の上位であり、医療経済を圧迫する脳梗塞に対する治療薬開発において有益な情報を提供できると考えている。

【参考・引用文献】

- 1) Fukuta T, Asai T, Yanagida Y, Namba M, Koide H, Shimizu K, Oku N. Combination therapy with liposomal neuroprotectants and tissue plasminogen activator for treatment of ischemic stroke. *FASEB J*, 31, 1879-1890 (2017).
- 2) Fukuta T, Ishii T, Asai T, Oku N. Application of liposomal drug delivery systems to develop neuroprotective agents for the treatment of ischemic stroke. *Biol Pharm Bull*, 42, 319-326 (2019).
- 3) Ishii T, Asai T, Oyama D, Fukuta T, Yasuda N, Shimizu K, Minamino T, Oku N. Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. *J Control Release*, 160, 81-87 (2012).

- 4) Hama S, Kimura Y, Mikami A, Shiota K, Yoyoda M, Tamura A, Nagasaki Y, Kanamura K, Kajimoto K, Kogure K. Electric stimulus opens intercellular spaces in skin. *J Biol Chem*, 289, 2450–2456 (2014).
- 5) Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiba K, Itohara S, Nakai J, Iwai Y, Hirase H. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. *Nat Commun*, 7, 11100 (2016).