

機関番号：37401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590049

研究課題名 (和文) 抗ラジカル型炎症剤 XO 阻害剤 AHPP の新しい SMA-ミセル化剤の研究

研究課題名 (英文) New micellar agent for antioxidation therapy based on XO inhibition using AHPP

研究代表者

前田 浩 (MAEDA HIROSHI)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：90004613

研究成果の概要 (和文) : 我々は既に AHPP が XO の強力な阻害剤を見出しているが、水難溶性であること、低分子であるために体外排泄が急速で、EPR 効果を示さないことが医薬品化のバリエーションであった。そこで本研究ではこれらの問題を解決するため、AHPP の PEG (ポリエチレングリコール) 共有結合体 (PEG-AHPP) あるいはスチレンマレイン酸コポリマー (SMA) を用いた SMA の非共有結合抱合ミセル体 (SMA-AHPP) を作成した。その結果 (1) In vitro での XO 阻害活性は free の AHPP に比べ、PEG-AHPP および SMA-AHPP は 80% 程度であった。(2) In vivo の XO 阻害活性はラット肝の虚血再環流 (I/R) モデルを用いて行ったところ、薬物非投与群に比べ、十分な細胞傷害作用の抑制をみた。(3) また、本態性高血圧ラット (SHR) を用いた試験では静脈内および経口投与の何れにおいても、平均正常血圧への降下作用を示した。(4) 経口投与の場合でも、1 回の投与でもその作用は 24 時間以上持続した。

研究成果の概要 (英文) : We had previously discovered that AHPP exhibited a potent inhibitory effect against xanthine oxidase (XO). The difficulty to make AHPP as pharmaceutical agent resides in poor water solubility and low MW that has short in vivo $t_{1/2}$ and no targeting capacity to the diseased site.

To solve these problems we synthesized PEG-conjugate of AHPP and SMA (styrene-co-maleic acid) micelles containing AHPP. As the results, we found (1) XO inhibitory activity in vitro of both polymeric AHPP showed about 80% of that of free AHPP, and satisfactory. (2) In vivo evaluation of ischemia-reperfusion (I/R) model of liver, the polymeric AHPP showed significant effect preventing I/R induced tissue (liver) toxicity. (3) Oral administration of PEG-AHPP in lipid formation in the spontaneously hypertensive rats resulted in lowering of blood pressure to normal range. (4) The antihypertensive effect lasted even more than 24 hr after one oral administration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

<XO 阻害剤の AHPP の特長>

スーパーオキシドの生成亢進は各種病態を増悪する。また、血管内に付着した XO により生ずるスーパーオキシドは血中の NO と直ちに反応し (ONOO⁻ となり)、NO を消費し、NO のレベルの低下 (すなわち高血圧) をもたらすことを我々は報告している [K. Morikawa et al. JCI, 112, 1871-1879 (2003) 他]。つまり、スーパーオキシドは生体にとって普遍的な有害物質である。AHPP (4-アミノ-6-ヒドロキシピラゾロ [3, 4-d] ピリミジン) はスーパーオキシド生成酵素である XO の強力な阻害剤である (上記 Y. Miyamoto et al (1996))。この XO 阻害剤の AHPP は水に不溶で医薬用薬剤にはならなかったが、上記の SMA ミセル化により水溶化に成功したので、このミセル剤を用いて経口投与でも病巣集積性と持続性が高いことを *in vivo* の実験で示したい。

<研究の特長>

感染、炎症、臓器移植などで普遍的に生ずるスーパーオキシドはマクロファージなどの NADPH オキシダーゼの他に、実はキサンチンオキシダーゼ (XO) 活性の著しい亢進があり、それにより大過剰のスーパーオキシドの生成が起っていることを我々は見出した。そこで、本研究では亢進した XO の活性を抑え、炎症を抑えようとするものである。炎症には COX-II、kinin、TNF- α 、ILs など無数のメディエーターが関与するが炎症において直接活性酸素 (ROS) を産生する酵素の中心はこの XO である。最近、我々は SMA を用いたアドリアマイシン、ピラルビシンなどのミセル化物の作成に成功したが (K. Greish, et al, J. Cont. Release, 97, 219-230 (2004); K. Greish, et al, Bioconj. Chem., 16, 230-236 (2005); A. Iyer, et al, Drug Discovery Today, 11, 812-818 (2006))、その研究過程でこの SMA ミセルは、上記アントラサイクリン類以外の多くの水不溶性薬物を 20%~50% も包含することが可能となり、高性能のミセル基材となることがわかってきた。一方、高分子制癌剤の研究途上に見出された高分子薬固有の病巣集積メカニズムである EPR 効果 [enhanced permeability and retention effect] (Y. Matsumura and H. Maeda, Cancer Res., 46, 6387-6392 (1986); H. Maeda, et al. J. Control Release 74, 47-61 (2001)) は、癌局所にだ

けでなく炎症局所への薬物の選択的デリバリーにおいて極めて重要であることを我々は発見している。さらに、薬剤の高分子化は病巣指向性のみならず、薬物の血中 $t_{1/2}$ の大幅な延長、副作用の低減、投与回数減少、それに加えて薬効の向上をもたらす。

2. 研究の目的

我々が見出したキサンチンオキシダーゼ (XO) の新規阻害剤 AHPP [4-アミノ-6-ヒドロキシピラゾロ [3, 4-d] ピリミジン (AHPP) は、これまで知られているアロプリノールに比べ、酵素阻害特性の上から明らかに優れた薬効を示したが、水に難溶性であったため、そのままでは注射投与が困難で、正確なファーマコキネティック上のデータの取得が困難であった。今回、その薬理的な諸問題を DDS の手法で解決しようとするものである。また、溶解度の問題をシンプルな両親媒性のポリマー結合体、あるいは SMA ミセル包合体などの高分子型薬剤を作成し、上記の問題を解決しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) AHPP の SMA ミセルの化学的、物理化学的性状の検討: ①水に可溶化した SMA-AHPP ミセルセファデックス G-50、セファクリル HR200 又は GPC による分子サイズプロファイルの検討、②動的光散乱による分子量分布測定 (大塚電子 Photal)、③ AHPP の放出速度 (*in vitro*) の検討は主として、アミコン社限外濾過装置と cut off 10kDa の分子ふるい膜を用い、経時的に濾過外液の紫外吸収 (260nm) によって行なう。
(2) PEG 化 AHPP の合成: 縮合反応のための活性化エステル合成は、まず 5.0g の PEG (MW. 300, 和光純薬) と、3.0g の p-ニトロフェノール・クロロフォルメイトを 50mL のテトラヒドロフラン (THF) に溶かし、さらにトリエチルアミンを 0.29g 添加し、24~30 時間室温で攪拌下に反応させる。次に、トリエチルアミンの塩酸塩が析出する。これをろ過して除く。この濾液に対し、300 mL のエチルエーテルを加え、沈殿物を生じさせ、分取し、それを冷エチルエーテルにて洗浄する。この沈殿物を約 50mL の THF にとかし、この THF 溶液にエチルエーテルを加え、両親媒の混液より活性化 PEG-p-ニトロクロロフォルメイト化物の析出標品を得る。この活性化 PEG を 1.0g とり、20mL の THF にとかし、これに AHPP の 0.1M NaOH 溶液 (0.5g/25mL 0.1M NaOH) を攪拌下に滴下しながら加え、さらに 30~40 時間反応させ、THF 可溶化物を得る。これが PEG 化 AHPP である。

(3) SMA-AHPP ミセルの作成：微粒パウダーとした 100mg の AHPP を pH 10.5 の 0.05 M NaOH/Na₂CO₃ 20 ml に溶解し、ついで、SMA の無水マレイン酸物(平均 MW1.2kDa) 200mg の微粉末を少量ずつ攪拌下に数時間にわたり添加、数時間後に全体が可溶化し、3~4 時間反応し、ついで、0.1M HCl をゆっくり攪拌下に加え、pH を 4.5 まで下げると、沈殿が生ずる。これを pH 2 の 0.01M HCl で洗浄し、ついで、0.1M NaOH を少量ずつくわえ、可溶化し、200 ml とする。このものをアミコンメンブレン (cut off; MW100kDa) 透析路濾過器で 1/10 容まで濃縮、再洗浄をくり返し(計 3 回)、凍結乾燥する。即ち AHPP ミセル標品を得る。

(4) 肝虚血再灌流モデルを用いた肝障害予防：ラットを用いて肝動脈の結紮による虚血後、その血流再開通による再灌流(10~30 分)後に誘発される肝障害は、主としてキサンチンデヒドロゲナーゼ(XD)の活性化により生じる XO が産生する ROS (特にスーパーオキシド)によると考えられている。我々は血流再開通の前に PEG-AHPP または SMA-AHPP ミセルを投与し、ついで血流再開通後、経時的に採血し、肝機能酵素を中心にこのミセル剤の有効性を調べる。

(5) 先天性高血圧ラット (SHR) を用いた降圧効果の検討：高血圧ラット(14-18 週齢、重さ 250-300g)を用いて、非観血的にラット血圧測定装置により、in vivo 降血圧効果を解析する。PEG-AHPP または SMA-AHPP を経静脈、または経口投与し、経時的に SHR ラットから血圧を 3 日間にわたり測定する。

また、PEG-と SMA-のどちらの剤型がよいかも検討する。大腸炎の病理組織を常法により HE 染色後検討する。また、各種炎症性メディエーターの発現の差異を免疫染色などの手法により検討する。

(6) AHPP の SMA ミセルの毒性評価 (p. o, i. v. 投与)：LD₅₀、MTD、肝・腎機能、CRP、アルブミン、グロブリンなど、さらに血液像一般に関し、急性、亜急性の両時間範囲で検討する。

4. 研究成果

図 1 A-1, A-2 に示すように PEG-AHPP 結合物は AHPP に固有の UV 吸収を示し(図 1A-1)、その蛍光はミセル状態で消失している(図 1A-2)。セファデックス G-100 PBS 中では bis(AHPP)₂-PEG と nano AHPP-PEG は図 1B のように夫々、分子量 138 kDa と 104kDa 中心分子量を示した。また、動的光散乱法によると mono AHPP は平均分子サイズとして 104nm (蒸留水中) ±70nm を示した(図 1C)。また、両者とも XO に対し、もとの AHPP の 80% の活性を示した(図 1A~C)。この PEG ミセルにお

いては、AHPP の蛍光 (λ_{ex} 270nm) 照射時の蛍光は消失しているが、pH を 9 以上にするとミセルの崩壊がみられた(図 2)。この PEG-AHPP より AHPP の放出を各 pH において検討したところ、1 時間に約 3% の放出がみられた。pH が高いほうが放出が早い傾向がみられた。AHPP-PEG 化合物の経口投与においても本態性高血圧ラットモデルに対しても有効であった(not shown)。

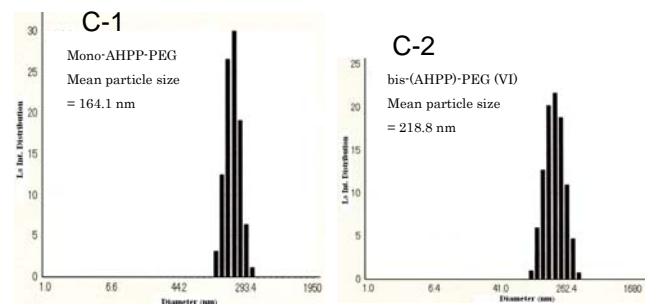
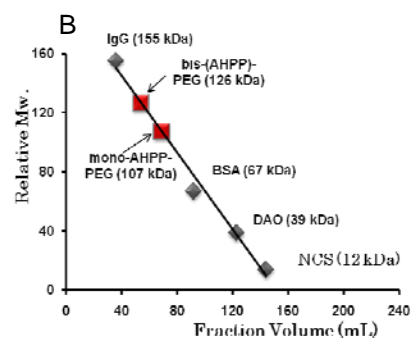
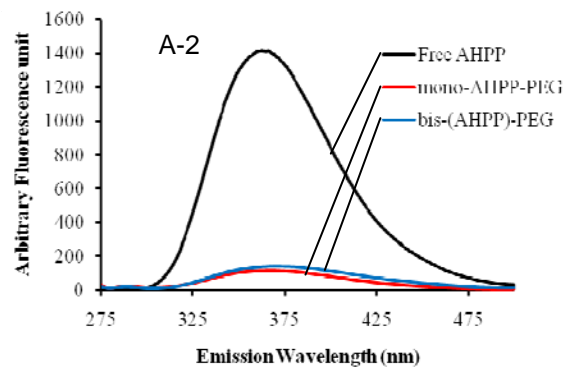
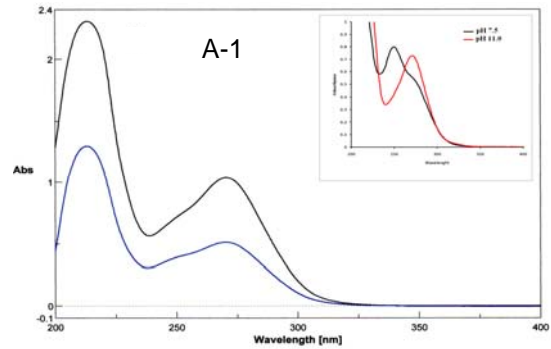


図 1. A-1, 2. AHPP とその PEG 結合体の UV 吸収 (A-1) および蛍光スペクトル (A-2)。B. Mono-

AHPP-PEG および bis-(AHPP)-PEG のセファデックス G-100 によるみかけ上の分子量解析。C. Mono-AHPP-PEG (C-1) および bis-AHPP-PEG (C-2) の溶液中での分子サイズの分布。

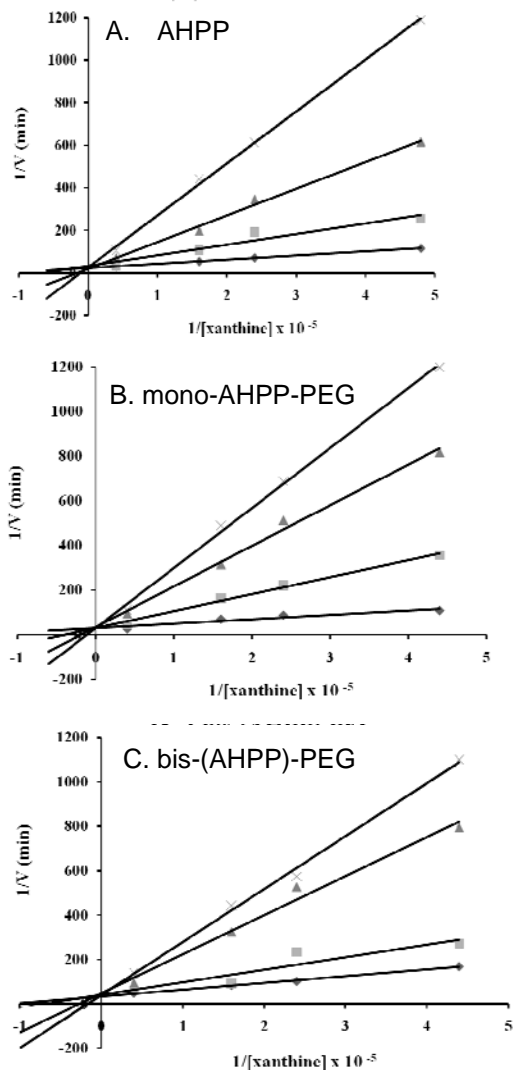


図 2. AHPP とその誘導体の XO 阻害活性。A. free AHPP, B. mono-AHPP-PEG, C. bis-AHPP-PEG

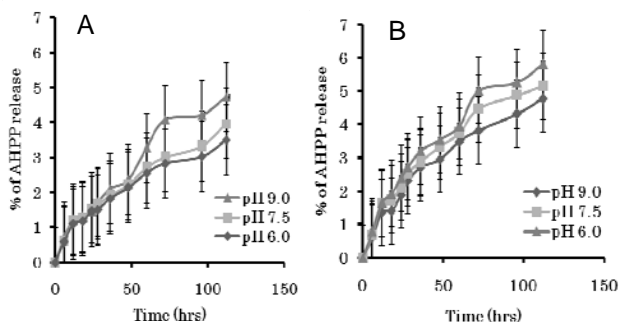


図 3. PEG-AHPP からの AHPP の遊離。A. mono-AHPP-PEG, B. bis-(AHPP)-PEG

[結論]

AHPP の PEG 化合物がほぼ純粋な形を得られ、そのものは経口投与物においても高血圧ラットにおける十分な降圧作用を確認した。また持続した。この PEG 化合物は EPR 効果により高い病巣指向性がみられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. H. Maeda, Y. Matsumura, History and impact of EPR effect for the nanomedicine drug developments in cancer chemotherapy, *Adv. Drug Delivery Reviews* (available online, 2011)
2. H. Nakamura, J. Fang, B. Gahininath, K. Tsukigawa, H. Maeda, Intracellular uptake and behavior of two types zinc protoporphyrin (ZnPP) micelles, SMA-ZnPP and PEG-ZnPP as anticancer agents; Unique intracellular disintegration of SMA micelles, *J. Controlled Release* (accepted, 2011)
3. G. Y. Bharate, J. Fang, H. Nakamura, K. Nakahara, T. Yamaguchi, S. Shinkai, H. Maeda, Polymeric xanthine oxidase inhibitor with antiinflammatory and antihypertensive properties: PEG-conjugated micelle of 4-amino-6-hydroxypyrazolo [3,4-d] pyrimidine (AHPP), *J. Drug Targeting* (in preparation)
4. N. Larson, K. Greish, H. Bauer, H. Maeda, and H. Ghandehari, Synthesis and evaluation of poly(styrene-co-maleic acid) micellar nanocarriers for the delivery of tanespimycin, *Bioconjugate Chemistry* (in preparation)
5. J. Fang, T. Seki, H. Qin, G. Y. Bharate, A. K. Iyer and H. Maeda: Tissue protective effect of xanthine oxidase inhibitor, polymer conjugate SMA-AHPP, on hepatic ischemia-reperfusion injury, *Exp. Biol. Medicine*, 235, 487-496 (2010)
6. H. Maeda, G. Y. Bharate, J. Daruwalla, Polymeric drugs and nanomedicines for efficient tumor targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 409-419 (2009)
7. J. Fang, A. K. Iyer, H. Nakamura, T. Seki, K. Greish, H. Maeda SMA-copolymer conjugate of AHPP: a polymeric inhibitor of xanthine

oxidase with potential antihypertensive effect, *J. Cont. Release* 135, 211-217 (2009)

8. H. Maeda Controlling oxidative stress: therapeutic and delivery strategies. *Adv. Drug Delivery Reviews* 61, 285-286 (2009)

[学会発表] (計 13 件)

1. H. Maeda, H. Nakamura, G. Y. Bharate, K. Tsukigawa, H. Qin, J. Fang, Nanoparticles of styrene-co-maleic acid (SMA) telomer containing anthracycline and zinc-protoporphyrin (ZnPP) as new micellar anticancer agents, and SMA conjugate of AHPP, a xanthine oxidase inhibitor for oxystress diseases <Review>, International Conference on Biomaterials Science 2011, 2011年3月17日, 茨城県 (つくば市)
2. G. Y. Bharate, H. Nakamura, J. Fang, B. Klumperman, S. Shinkai and H. Maeda, Evaluation of (styrene-co-maleic acid) telomer micelles encapsulated-zinc protoporphyrin (SMA-ZnPP): A stability study for three different types of SMA micelles, International Conference on Biomaterials Science 2011, 2011年3月17日, 茨城県 (つくば市)
3. Hiroshi Maeda, The enhanced permeability and retention effect in cancer and inflammation for more selective drug delivery: Past, present and future outlook, 37th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, 2010年7月13日, 米国 (ポートランド, OR)
4. H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, Limitations and augmentations of the EPR effect in solid tumor, 2010年5月26日, スペイン (バレンシア)
5. 前田 浩. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect of Solid Tumor-The Universal Mechanism for Tumor Selective Delivery Using Macromolecular Therapeutics and Beyond, USC-AAPS Moving Targets Symposium, 2009年11月7日, The University of Southern California, LA, USA
6. 方 軍. SMA-copolymer conjugates of AHPP: a polymeric inhibitor of xanthine oxidase with therapeutic potentials against hypertension, 36th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2009年7

- 月18日, デンマーク (コペンハーゲン)
7. 前田 浩. Therapeutic potentials of SMA-copolymer conjugates of AHPP against hypertension via inhibiting xanthine oxidase, The 8th Int'l Symposium on Frontiers in Biomed. Polymer, 2009年5月22日, 静岡県三島市

[図書] (計 3 件)

1. T. Seki, J. Fang, H. Maeda: Tumor targeted macromolecular drug delivery based on the enhanced permeability and retention effect in solid tumor. *In Pharm. Perspective of Cancers Therapeutics* (eds. Y. Lu and R. I. Mahato), AAPS Springer Press, New York, 93-120 (2009)
2. H. Maeda, Recollections of 45 years in research: From protein chemistry to polymeric drugs to the EPR effect in cancer therapy, *Nova Science Book Chapter*, (in press, 2011)
3. H. Maeda: The EPR-effect in Relation to Tumor Targeting, *Cancer Drug Delivery* (ed. Kratz), Wiley-VCH, in press, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗炎症剤

発明者: 前田 浩、方 軍、関 孝弘、バラテ ガ
ヒナシ

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2008-176397

出願年月日: 2008-07-05

国内外の別: 国内/国際

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 浩 (MAEDA HIROSHI)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号: 90004613

(2) 研究分担者

方 軍 (FAN JUN)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号: 20412736

中村 秀明 (NAKAMURA HIDEAKI)

崇城大学・薬学部・助手

研究者番号: 30435151