

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12103
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591018
 研究課題名（和文）レドックスセンサー機能と腎保護効果を併せ持つナノ粒子抗酸化剤の開発
 研究課題名（英文）Development of an antioxidative nano-particle for redox sensing and reno-protection
 研究代表者
 平山 暁 (HIRAYAMA AKI)
 筑波技術大学・保健科学部・教授
 研究者番号：20323298

研究成果の概要（和文）：

抗酸化物質含有ナノ粒子(RNP)を開発し、急性腎障害モデルの治療に応用した。RNP は抗酸化物質として TEMPO を含有させ、酸性領域で自己崩壊し含有 TEMPO による抗酸化能を発揮させるよう設計した。既存の抗酸化物質に比べ、長時間の生体内安定性と虚血再灌流腎など酸化ストレス亢進部位への選択的集積(レドックスセンサー機能)が認められ、これにより急性腎障害に対しすぐれた腎保護効果を有することが示された。

研究成果の概要（英文）：

A TEMPO radical containing nano-particle (RNP) which possessed high in vivo stability and antioxidative effects was synthesized and applied to a treatment of acute kidney injury (AKI) model. RNP was synthesized as a micelle containing TEMPO in the core and poly(ethelenglycol)-poly(chloromethylstyrene) as its outer shell (PEG-PCTEMPO). Controlling the amino group of the repeating units of PCTEMPO, we synthesized pH-sensitive RNP (N-RNP) which release the inner TEMPO in acidic circumstance. RNP showed significant reno-protection through its high in vivo stability and target-specificity against tissue with high oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：急性腎障害、ナノ粒子、酸化ストレス、ドラッグデリバリーシステム、腎保護薬、電子スピン共鳴

1. 研究開始当初の背景

近年慢性腎臓病の心血管系疾患や全死亡に対する相対危険率の高さが明らかになり、慢性腎疾患進展制御の重要性が高まると

もに、酸化ストレスがこの進展要因として高い注目を集めている。

酸化ストレス研究では、細胞内情報伝達機構の解明など分子生物学的に著しい進歩が見

られる反面、反応の上流部に関する研究、即ち発生するラジカル種自身、またその連鎖反応としてもたらされる多くの活性酸素種(ROS)の特定や制御といった報告は少ない。これは ROS が極めて反応性に富み、半減期が短く検出が困難であるという化学的特性に起因するが、この状態では多種の体内物質と非特異的な反応を体内各所で惹起しうる「酸化ストレス」反応全体を評価することは難しい。このことは、近年の抗酸化効果を有する薬剤による、心血管障害や発癌抑制などを目的とした大規模トリアルの失敗の一因とされていた。すなわち、酸化ストレス関連反応が抑も生体全域で恒常的に発生しうるため、一般的な抗酸化剤では標的臓器以外での作用を制御しきれず、想定外の副作用が相次いでいた。この克服のためには、新技術を応用し、酸化ストレス病変に対する部位特異性が高く、かつラジカル種に対する反応特異性の高い抗酸化剤の開発が望まれていた。

TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidine-1-oxyl)などのニトロキシラジカルは定常状態で不対電子を含む安定ラジカルであり、ラジカル消去による抗酸化効果やこれに関連する降圧効果、虚血再灌流障害保護、放射線被曝防護、神経変性疾患などに対する薬理効果が知られている。しかしながら TEMPOL の最大の欠点はその生体内半減期の短さにある。TEMPOL は持続注射や飲用水中負荷などにより投与されているが、このような状況では臨床応用を志した安定的な製剤化は困難であった。これを克服するため、研究代表者および分担者は Drug Delivering System (DDS)を応用しブロック共重合体の水溶性高分子末端に官能基を導入することによって表層にリガンド導入部位を有する数十 nm のコアシェル型ナノ粒子に TEMPO を導入し、コアに安定なラジカルを有する新しいナノ粒子 (Radical-containing nanoparticle: RNP)を開発していた。

2. 研究の目的

本研究は腎疾患における酸化ストレス保護に DDS(Drug Delivering System)技術を応用し、抗酸化剤や降圧剤などの薬理効果が期待される RNP をレドックスセンサー機能を有する腎疾患保護薬としての可能性を探った。具体的には①安定的なラジカル消去活性を有する抗酸化剤、②生体内レドックスセンサーとして使用可能なニトロキシラジカルおよびその誘導体を含有するナノ粒子、を開発し薬理効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は以下の各ステップからなる。

- step1. 薬理効果の高いニトロキシラジカル・誘導体の選定
- step2. この化合物のナノ粒子合成
- step3. 動物実験による生体内安定性・安全性の確認
- step4. 疾患モデルにおけるレドックスセンサー機能効果検討
- step5. 疾患モデルにおける抗酸化薬理効果検討

Step 1. ニトロキシラジカルの選定

ニトロキシラジカル体の抗酸化反応過程はラジカル種および員環・側鎖構造に特異的であることから、ニトロキシラジカル・誘導体は6員環(TEMPO系)を主に、安定性を増大させる場合は5員環(PROXYL系)をし検討を行った。

Step 2. ナノ粒子の合成

ニトロキシラジカル含有ナノ粒子

(Radical-containing Nanoparticle: RNP)は研究代表者・分担者により出願中の特許(特願2008-120626号・研究業績1)に基づき行った。合成は以下の過程により行った。

過程① 末端にアセタール基を有するポリエチレングリコール-b-ポリクロメチルスチレン(アセタール-PEG-b-PCMS)の合成

過程② TEMPOを有するブロックポリマー(アセタール-PEG-b-PCMS(TEMPO))の合成

過程③ アセタール-PEG-b-PCMS(TEMPO)によるナノ粒子(RNP)の合成

得られたナノ粒子は動的光散乱(DLS)測定により平均粒子径を求め、またX-band ESRによりESR信号特性を確認した。

さらにブロック共重合体の親水性セグメント末端に官能基を導入し、疎水性セグメントがpHに応答して親-疎水性を変化させる設計とし、炎症反応などの酸性領域で粒子の自己崩壊により内部の抗酸化物質が露出するpH応答型ナノ粒子とpH非応答型ナノ粒子を合成した。

Step3. 動物実験による生体内安定性・安全性の確認

この過程以降は主として研究代表者が研究分担者及び所属大学院生吉富徹氏(前述特許共同出願者)他1-2名とともに施行した。動物実験はマウスを用いた。生体内安定性の検討は、ex vivo及びin vivoにて行った。

合成されたナノ粒子を実験動物に投与し、一定時間後にと殺、臓器及び血液を採取した。これにより動物への安全性を検討した。さらに、生体内分布を以下の方法で検討した：ニトロキシラジカルは定常状態で不対電子を含有するためESR信号陽性であり、還元により信号を消失する。この還元体は適切な酸化剤により再度ラジカル体に戻るため、各臓器や血液中のESR信号(残存しているラジカ

ル受容作用のある活性化体)と酸化後の ESR 信号 (ラジカル消去後の代謝体)を比較検討することによりそのラジカル消去能と各臓器への分布, 臓器中および血中・尿中の安定性評価を評価した.

Step4.5 疾患モデルにおけるレドックスセンサー・抗酸化機能効果検討

レドックスセンサー機能・薬理効果はマウスを用い, 虚血再灌流による急性腎障害虚血再還流障害を用いた. RNP を再灌流直後に投与し, その腎保護効果を血清クレアチニン, BUN, 腎組織病変により評価した. 上記3と同様の手法で, 血中・腎におけるラジカル消去活性および標的臓器への分布状態 (ラジカルセンサー機能) の評価を行った.

4. 研究成果

(1) 薬理効果の高いニトロキシルラジカル・誘導体の選定

最終的な検討の結果では, TEMPO が幅広く抗酸化能を示し取り扱いに容易であることから選択された.

(2) RNP 合成と in vitro における特性

上記の方法に基づき, RNP を合成した. RNP は pH 応答型および pH 非応答型の両者を合成した. In vitro における RNP 特性評価では, pH 応答型 RNP は pH<6 の酸性領域にて粒子径の増大とともに ESR スペクトルがブロードな 1 本線から鋭い 3 本線に変化し, 内包する TEMPO が露出することが確認された. 一方, 10mM グルタチオンを標準対象として還元耐性を検討したところ, 粒子状態の RNP は非粒子化 TEMPO に比べ強い還元耐性を示し, 生体内抗酸化物質などの影響を受けにくいと考えられた. 更にスーパーオキシド (O_2^-) に対する消去活性を検討した. pH 非応答型 RNP は pH 変動により消去活性は変化がなかったが, pH 応答型 RNP は pH6.0 では pH7.4 に比べ有意に強い O_2^- 消去活性を示し, pH 応答型 RNP では内包するニトロキシルラジカルが効果的に活性酸素を消去しうることが認められた.

(3) 生体内安定性・安全性

上記の ESR シグナル特性を生かし, RNP の生体内動態を検討した. RNP3mg/kg(TEMPOL2.5microM/L 相当)および同相当量の TEMPOL を ICR マウス尾静脈から投与した. 非粒子化 TEMPOL の生体内半減期は約 10 秒程度と報告されており, 我々の測定でも投与2分以降血中に ESR シグナルを観察できなかった. 一方 RNP は持続的に血中で ESR シグナルが観察され, pH 応答型 RNP の血中半減期は約 15 分, pH 非応答型 RNP は約 2 時間であり, 非粒子型 TEMPOL に比べすぐれた生体内安定性が確

認された.

細胞系を用いた毒性検討では, 非粒子化 TEMPO では IC50 が 8.3mM, amino-TEMPO 4.8mM と報告されているのに対し, RNP は 8mmol(TEMPO 相当量)/L でも細胞生存に影響を与えなかった. マウスを用いた検討では 300mg/kg の投与で生存率に全く影響を与えず, 600mg/kg で約 60%の生存率と優れた低毒性が認められた.

TEMPO は降圧作用を有することが知られており, 投与後の血圧低下が懸念される. 非粒子型 TEMPO(4-amino-TEMPO, 4-hydroxy-TEMPO)では投与 15 分以内に投与前と比べ 5-20%の収縮期血圧低下がみられたが, RNP では pH 応答型・非応答型いずれも有意な血圧低下を認めなかった.

(4) 腎保護効果

ICR マウスを用い, 片腎摘出/片腎 50 分虚血の虚血再灌流急性腎障害モデルを作成し, RNP の薬理効果を検討した. 薬理効果は 350 μ L の pH 応答型 RNP(3mg/kg), pH 非応答型 RNP(1.5 mg/kg), 4-amino-TEMPO (0.4 mg/kg), 4-hydroxy-TEMPO (0.4 mg/kg)を再灌流 5 分後に尾静脈より投与し検討した. 虚血再灌流 24 時間後において薬物非投与群では有意に血清クレアチニン(cre), 血中尿素窒素(BUN)の上昇を認め, 急性腎障害を呈した. pH 応答型 RNP は pH 非応答型 RNP, 4-amino-TEMPO, 4-hydroxy-TEMPO に比べ有意に腎障害を改善した. 組織学的検討においても pH 応答型 RNP は尿細管における虚血再灌流性病変を有意に改善させた. また酸化ストレスマーカーTBARS や炎症性サイトカイン IL-6 についても pH 応答型 RNP はすぐれた保護効果を呈した.

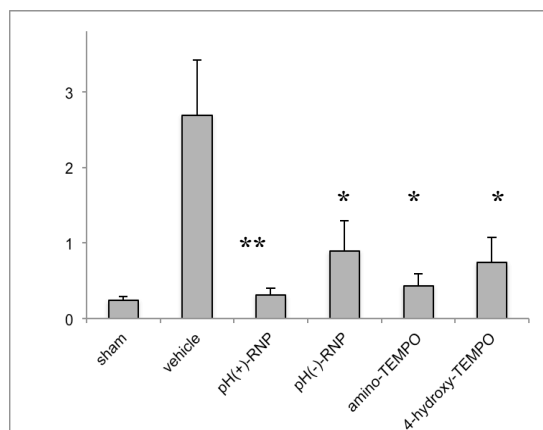
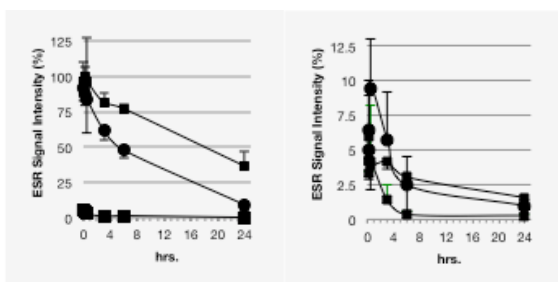


図: 急性腎障害に対する腎保護効果. sham:偽手術, vehicle:薬剤非含有ナノ粒子, pH(+)-RNP: pH 応答型 RNP, pH(-)-RNP: pH 非応答型 RNP をそれぞれ表す. *: p<0.05, **: p<0.01 vs. vehicle

(5) ナノ粒子の体内動態

ナノ粒子の体内動態は臓器・血中の ESR シグナル測定により行った。粒子状態の RNP はブロードな ESR シグナルが観察されるが、pH 変化により外殻が崩壊し内部の TEMPO が露出すると、非粒子化 TEMPO と同様なシャープな 3 本線の ESR シグナルが観察される。In vitro では pH 応答型 RNP は酸性域への pH 変化により 3 本線シグナルへ変化した。非応答型ではこの変化は観察されなかった。

前述の急性腎障害モデルに投与したところ、血中では RNP は pH 応答型・非応答型ともにブロードなシグナルが観察された。虚血再灌流腎では、pH 応答型は投与後約 1 時間をピークとするシャープな 3 本線シグナルが観察されたが、非応答型ではブロードなシグナルのままであり、シグナル強度も応答型に比べ弱いものであった。これらのことから、pH 応答型 RNP は、酸化ストレスの亢進する虚血再灌流腎においてのみ選択的に崩壊し内部の TEMPO を露出させることにより、部位特異的に抗酸化作用をもたらすことが確認された。



図：血中（左）および虚血再灌流腎（右）における ESR シグナルの変化。○：pH 応答型 RNP，□：pH 非応答型 RNP。最下段は非粒子型 amino-TEMPO を示す。

今回の研究により、pH 応答性を利用することにより、部位特異的な抗酸化療法が急性腎障害に有効であることが示された。この治療法は腎疾患に限らず応用可能であり、今後多種の酸化ストレス関連疾患での治療法拡大に貢献するものである。すでに他領域への応用研究が行われつつあり、今後の進展が期待できる。

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 4 件)

以下の雑誌論文は全て査読のあるものである。

- ① Yoshitomi T, Hirayama A, Nagasaki Y. The ROS scavenging and renal protective effects of pH-responsive nitroxide radical containing nanoparticles. *Biomaterials*. 2011

Nov;32(31):8021-8.

10.1016/j.biomaterials.2011.07.014

- ② Marushima A, Suzuki K, Nagasaki Y, Yoshitomi T, Tou K, Tsurushima H, Hirayama A, Matsumura A. Newly synthesized radical-containing nanoparticles (rnp) enhance neuroprotection after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurosurgery* 2011 May;68(5): 1418-26. 10.1227/NEU.0b013e31820c02d9
- ③ Owada S, Maeba T, Sugano Y, Hirayama A, Ueda A, Nagase S, Goto S, Nishijima F, Bannai K, Yamato H. Spherical carbon adsorbent (AST-120) protects deterioration of renal function in chronic kidney disease rats through inhibition of reactive oxygen species production from mitochondria and reduction of serum lipid peroxidation. *Nephron Exp Nephrol*. 2010;115(4): e101-11. Epub 2010 Apr 28.
- ④ Yoshitomi T, Suzuki R, Mamiya T, Matsui H, Hirayama A, Nagasaki Y. pH-Sensitive Radical-Containing-Nanoparticle (RNP) for the L-Band-EPR Imaging of Low pH Circumstances. *Bioconjugate Chem*. 20, 1792-1798, 2009.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Hirayama A, Ueda A, Nagase S, Aoyagi K, Owada S. Application of ESR and Spin Technologies for the Control of Kidney Diseases. International Workshop "Advanced ESR Studies for New Frontiers in Biofunctional Spin Science and Technology"(AEBST 2011) AEBST2011 2011.11.13 Kobe
- ② 吉富 徹, 平山 暁, 長崎幸夫, レドックス反応性ナノ粒子による腎虚血再灌流障害の治療 第 64 回日本酸化ストレス学会学術集会 2011.7 北海道, ルスツ
- ③ 平山 暁, 吉富 徹, 長崎幸夫. 急性腎障害に対するナノ粒子治療の開発 シンポジウム Japan Kidney Week 2011, 第 55 回(社)日本透析医学会学術集会・総会 2011.6 横浜
- ④ Nagasaki Y, Yoshitomi T, Hirayama A. Novel redox nanotherapy for renal ischemia reperfusion injury. XLVIII ERA-EDTA Congress 2011.6 Prague, Czech Rep
- ⑤ Hirayama A, Yoshitomi T, Owada S, Ueda A, Matsui H, Aoyagi K, Nagasaki

- Y. Development of a pH – Sensitive Reno – Protective Nano – Particle for Relief of Ischemia–Reperfusion Acute Kidney Injury. 43rd Annual meeting of the American Society of Nephrology (Renal Week 2010) 2010.11.18-21 Denver (abstract in J Am Soc Nephrol 21: 2010, 106A)
- ⑥ Yoshitomi T, Mamiya T, Matsui H, Hirayama A, Nagasaki Y: Design of redox imaging nanoprobe using nitroxyl radical containing nanoparticle, SFRBM 2010 - 17th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Orlando, Florida (2010). 2010.11.17-21.
- ⑦ Yoshitomi T, Matsumoto S, Krishna MC, Matsumoto K, Anzai K, Matsui H, Hirayama A, Nagasaki Y. Design of nitroxyl radicals containing nanoparticle for MR imaging of tumor, The 37th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Oregon Convention Center, Portland, Oregon, USA. (2010). 2010.07.10-14.
- ⑧ 吉富 徹、間宮 孝、松井 裕史、平山 暁、長崎 幸夫：反応性イメージングを目指したニトロキシルラジカル含有ナノ粒子の設計と評価、第 26 回日本 DDS 学会学術集会、大阪国際交流センター (2010) 2010.06.17-18.
- ⑨ Yoshitomi T, Mamiya T, Matsui H, Hirayama A, Nagasaki Y. Design of pH-sensitive polymeric micelle possessing reduced forms of TEMPO for imaging of ROS. 2010.3.17-20. 2010 Oxygen Club California World Congress, Santa Barbara, CA, USA. (*Young Investigator's Award winning presentation*)
- ⑩ 吉富 徹、平山 暁、間宮 孝、松井裕史、長崎幸夫. TEMPO 含有ナノ粒子の開発と生体内動態 第 48 回電子スピンスイエンス学会年会(SEST2009) 2009.11.12 神戸
- ⑪ Hirayama A, Yoshitomi T, Ueda A, Matsui H, Owada S, Aoyagi K, Nagasaki Y. Development of TEMPOL-Containing Nano-Particle for Continuous Superoxide Scavenging and Antihypertension. 42nd Annual meeting of the American Society of Nephrology (Renal Week 2009) 2009.11 San Diego (abstract in J Am Soc Nephrol 20: 2009, 225A)
- ⑫ Yoshitomi T, Toh K, Marushima A, Suzuki K, Tsurushima H, Hirayama A, Matsumura A, Nagasaki Y. Healing of Oxidative Stress in Brain on the Occasion of Cerebral Ischemia-Reperfusion. 2009 Gordon Research Conference on Biomaterials: Biocompatibility and Tissue Engineering 2009.7.19-24 Plymouth (USA)
- ⑬ 吉富 徹、間宮 孝、松井裕史、平山 暁、長崎幸夫. 生体内 ROS の可視化を目指した EPR ナノプローブの創製 第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会 2009.6.11 福岡
- ⑭ 藤 加珠子、吉富 徹、丸島愛樹、鈴木謙介、鶴嶋英夫、平山 暁、松村 明、長崎幸夫. ラジカル含有ナノ粒子を用いた脳虚血-再灌流モデルラットにおける脳梗塞の抑制第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会 2009.6.11-12 福岡 ポスターアワード (優秀演題賞) 受賞演題
- ⑮ 平山 暁、吉富 徹、植田敦志、青柳一正、長崎幸夫. 安定した抗酸化・降圧効果を発揮するナノ粒子化 TEMPO の開発 第 52 回日本腎臓学会学術総会 2009.6.3 横浜
- ⑯
- 〔産業財産権〕
○出願状況 (計 2 件)
名称：高分子環状ニトロキシドラジカル化合物とシリカの有機—無機ハイブリッド複合体
発明者：長崎幸夫、吉富 徹、池田 豊、植田敦志、平山 暁、矢口達也、山下真代
権利者：長崎幸夫、吉富 徹、池田 豊、植田敦志、平山 暁、矢口達也、山下真代、国立大学法人筑波大学、国立大学法人筑波技術大学
種類：特許
番号：特願 2012-024460
出願年月日：H24.2.7
国内外の別：国内
- 名称：Polymerized cyclic nitroxide radical compound, and use thereof
発明者：NAGASAKI Yukio, YOSHITOMI Toru, MATSUI Hirofumi, HIRAYAMA Aki, MAMIYA Takashi, MATSUMURA Akira, SUZUKI Kensuke, TSURUSHIMA Hideo, MARUSHIMA Aiki, TOH Kazuko, MIYAMOTO Daisuke
権利者：NAGASAKI Yukio, YOSHITOMI Toru, MATSUI Hirofumi, HIRAYAMA Aki, MAMIYA Takashi, MATSUMURA Akira, SUZUKI Kensuke, TSURUSHIMA Hideo, MARUSHIMA Aiki, TOH Kazuko,

MIYAMOTO Daisuke, University of
Tsukuba

種類：特許(PCT 出願)

番号：WO/2009/133647,

PCT/JP2008/072467

出願年月日：2009.5.11, 2010.11 指定国移行(日
本, 米国, カナダ)

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 暁 (HIRAYAMA AKI)

筑波技術大学・保健科学部・教授

研究者番号：20323298

(2)研究分担者

長崎 幸夫 (NAGASAKI YUKIO)

筑波大学・数理物質科学研究科・教授

研究者番号：90198309