

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04758

研究課題名(和文)ハイブリッド化臓器再生因子の腎送達システムの構築と次世代型腎疾患治療薬への応用

研究課題名(英文)Development of renal delivery system for hybridized tissue regenerating factors and its application for kidney disease

研究代表者

丸山 徹 (MARUYAMA, TORU)

熊本大学・薬学部・教授

研究者番号：90423657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、in vivo フェージディスプレイ法により独自に見出した腎特異的認識ペプチドを血中滞留性に富むアルブミンに付加することで、腎送達効率と血中保持能の向上を両立させた革新的なナノキャリアを構築し、これにアルブミン工学を駆使することでハイブリッド型の腎修復/再生因子を結合させたセルフリーな体内誘導型腎臓修復/再生治療剤の創製に初めて成功した。腎病態モデル動物に対する検討から、本ハイブリッド型DDSは、搭載した腎臓修復/再生治療剤を効率良く腎臓に送達する結果、優れた腎保護効果を発揮した。従って、今回作製した革新的なDDS製剤は先制的な腎再生医療に対する治療戦略としての展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we successfully created the innovative nano-sized carrier which possessed both the superior blood circulation and the efficient delivery to kidney by the associations of peptide that specifically recognized kidneys to human albumin (HSA). Then, kidney regeneration and repair factors were loaded to HSA by the albumin engineering technology established by us. This hybrid-albumin DDS showed efficient and sustained delivery of regeneration and repair factors to the kidneys, even though under the chronic renal failures. Consequently, hybrid-albumin DDS showed excellent renoprotective and anti-fibrotic actions against chronic renal failure model animals. Since hybrid-albumin DDS is a cell-free and self-inducing regenerating system, it can be possible to conduct early intervention to the injured kidneys, and substantially lead to repair and regenerate kidneys. Thus, the hybrid system can be expected as a novel pre-emptive Medicine using Self-Repairing potential.

研究分野：薬剤学

キーワード：DDS

1. 研究開始当初の背景

本邦では、高齢化と生活習慣病の普遍化に伴い、慢性腎疾患罹患者が急増化しており (> 1 千万人)、死因の第 8 位を占めるようになった。また、末期腎不全から移行する人工透析患者数が 30 万人を超える結果、その医療費は 1 兆円となり (総医療費の 1/30)、医療費を圧迫していることから、透析導入の抑制が本邦のヘルスケア分野において緊急かつ最重要な課題の一つとして位置付けられるようになってきた。このような状況に関わらず、腎疾患に対する根本的な治療法は未確立のままであり、“アンメットメディカルニーズ”の一つとして位置付けられている。

元来、ヒトは障害を受けた細胞やそれが進行した線維化臓器に対し、内在性細胞が機能して自己再生を促すシステムを有している。このような臓器の線維化解除と実質細胞の保護/再生を強力に高めるタンパク質として、骨形成因子 7(BMP-7)、肝細胞増殖因子(HGF)が同定されており、多くの線維化疾患に対する実用化が期待されている。BMP7 の場合、様々な慢性腎障害モデルで腎保護効果や、線維化を修復/再生することが実証されており、自己腎再生医薬のシーズとして有望視されている。興味深いことに、プロスタサイクリンのアゴニストである ONO-1301 は経口血小板凝集抑制剤として見出されたが、副作用との乖離が狭く開発中止となったものの、血小板凝集抑制作用の 1/10 以下の濃度で、線維芽細胞等に作用し、HGF の産生を強力に促進するため、臓器保護/修復剤として内在的な修復/再生医療への応用が試みられており、難治性循環器疾患や下肢虚血の血管新生療法に対して臨床試験に向けた前臨床試験が進行中である。

ただし、上述した再生/修復因子による腎保護/再生医療を実現化するためには、これらを腎臓へ効率的かつ持続的に供給するシステムが必要とされるが、血中滞留性が乏しい上、腎臓への移行性も低いことから、頻回投与あるいは持続点滴が必要となり、これが医薬品開発におけるボトルネックとなっている。この課題の克服には、再生/修復因子を腎臓に効率良く送達する技術と頻回投与を避けるための血中滞留性を付与できるデリバリーシステムを確立する必要がある。しかしながら、腎臓を標的とした DDS は確立していない。

2. 研究の目的

本研究では、in vivo フェージディスプレイ法により独自に見出した腎特異的認識ペプチドを血中滞留性に富むアルブミンに付加することで、腎送達効率と血中保持能の向上を両立させた革新的ナノキャリアを構築するとともに、これにアルブミン工学を駆使することでハイブリッド型の腎修復/再生因子を結合させたセルフリーな体内誘導型腎臓修復/再生治療剤を創製し、その体内動態特

性、腎保護効果と作用機序を複数の慢性腎不全病態モデル動物で検証する独創的かつ画期的な試みである。これが実現できれば、多様な腎疾患に対する初の抜本的な治療薬となるため、末期腎不全からの透析導入を減少させる結果、ヘルスケアの向上はもとより、

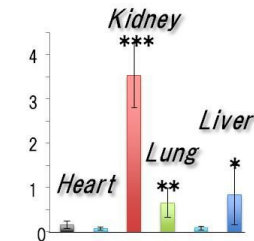


図1 腎認識ペプチド-HSA の臓器分布特性

医療経済的な貢献も大いに期待できる。

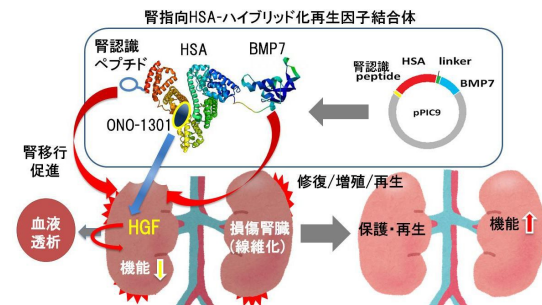


図2 ハイブリット化再生因子の腎ターゲティングによる腎再生治療戦略

3. 研究の方法

本研究の最終的な到達目標は、腎移行性と血中滞留性の時間的な制御を可能とする次世代型腎デリバリーシステムを確立し、損傷・線維化腎の修復/再生治療に応用することであり、今回はその基盤情報の構築が目的となる。

そのためには、1) 組換え型腎認識ペプチド-HSA-BMP7 融合体の設計と作製、2) 1) で作製した融合体の構造・機能特性の評価、3) 1) で作製した融合体と ONO-1301 複合体 (腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体) の調製と安定性評価、4) 腎不全病態モデル動物の確立、5) 3) で調製した融合体の健全及び腎不全病態モデル動物における体内動態解析 ((腎移行性、血中滞留性) 6) 3) で調製した融合体の腎不全病態モデル動物に対する薬理作用 (予防効果と後投与による治療効果) の 6 項目を段階的に検討していく必要がある。

本研究は、アルブミン工学とその体内動態に精通した申請者と腎臓内科医がそれぞれの専門性を有機的に発揮する医薬連携プロジェクトである。

4. 研究成果

本研究では、申請者が構築したアルブミン工学を駆使して、臓器再生因子である BMP7

と ONO-1301 の腎臓デリバリーシステムを構築し、慢性腎疾患モデル動物に対する有用性を評価した。ここで、BMP7 はアルブミン融合技術によりヒト血清アルブミン(HSA)と融合体化し、これに ONO-1301 を混合することで、HSA を担体としたハイブリッド臓器再生因子デリバリーシステムを構築した。

次いで、申請者が *in vivo* フェージディスプレイ法により独自に見出した腎特異的認識ペプチドを HSA に付与することで、腎臓を標的化するハイブリッド臓器再生因子デリバリーシステムの作製に初めて成功した。物理化学的・構造学的特性を評価したところ、HSA の特性は失われていないことが判明した。*In vitro* 系で、ハイブリッド体に搭載した臓器再生因子の生物活性を評価したところ、HSA との融合化や結合により生物活性の低下が若干認められたものの、依然として臓器再生能を保持していた。

マウスを用いた体内動態解析から、HSA-BMP7・ONO-1301 複合体は HSA に匹敵する血中滞留性と臓器分布を示し、BMP7 の消失半減期を 20 倍以上延長した。HSA-BMP7・ONO-1301 複合体に腎認識ペプチドを付与したところ、血中滞留性は低下し、腎臓への分布が数倍増加した。ただし、腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体の血中滞留性は BMP7 よりも優れており、野生型 HSA の 70% 程度であった。類似した結果は、常法に従って作製した 2 つの腎不全モデルマウス(5/6 腎摘慢性腎臓病マウスあるいは片側尿管結さつ処理(UUO)腎線維化マウス)でも観察された。腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体の体内動態に関する目標値は、血中滞留性が野生型 HSA の 50%以上かつ腎移行性が 5 倍以上であったが、今回の結果はこれをクリアしていたことから、腎送達効率と血中保持能の向上を両立させた革新的なナノキャリアとして腎認識ペプチド-HSA を、さらに臓器再生因子を搭載したハイブリッド体として腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体を構築することができたと判断した。

そこで、腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体の腎病態改善効果を 5/6 腎摘による慢性腎臓病(CKD)モデルマウス及び片側尿管結さつ処理(UUO)誘発腎線維化モデルマウスを用いて評価した。その結果、腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体は 5/6 腎摘 CKD マウスの腎機能を有意に改善した。また、UUO マウスにおける腎線維化を顕著に抑制した。なお、本実験条件下では、コントロールとして用いた HSA、BMP7、ONO-1301 による有意な病態改善効果は認められなかった。他方、HSA-BMP7 及び HSA-ONO1301 投与群では病態改善効果は認められたものの、その程度は腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体投与群よりも有意に劣っていた。

本検討の場合、腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体投与群では、臓器修復・再生

因子である HGF の発現が上昇しており、HGF を介した病態改善効果が示唆された。このことを確認すべく、腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体投与群を HGF の中和抗体で前処理したところ、病態改善効果が一部抑制された。加えて、上述した検討は、病態作製時からの投与による予防効果であったため、次に、腎機能低下や線維化が出現した後に、腎認識ペプチド-HSA-BMP7・ONO-1301 複合体の投与を開始して病態改善効果を評価した。その結果、本ハイブリッド薬は病態発症後の後投与であっても腎障害や線維化を有意に抑制することが判明した。

以上示したように、今回作製したハイブリッド化臓器再生因子の腎送達システムは、次世代型の腎疾患治療薬としての可能性を大いに秘めていることが明らかとなった。

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 15 件)

- 1) Kinoshita R, Ishima Y, Ikeda M, Kragh-Hansen U, Fang J, Nakamura H, Chuang VTG, Tanaka R, Maeda H, Kodama A, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T, S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes, *J Control Release*, 217, 1-9 (2015).
- 2) Hashimoto M, Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kinoshita M, Nishikawa K, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T, Pharmacokinetic Properties of Single and Repeated Injection of Liposomal Platelet Substitute in a Rat Model of Red Blood Cell Transfusion-Induced Dilutional Thrombocytopenia, *J Pharm Sci*, 104, 3968-76 (2015).
- 3) Nishida K, Watanabe H, Ogaki S, Kodama A, Tanaka R, Imafuku T, Ishima Y, Chuang VTG, Toyoda M, Kondoh M, Wu Q, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T, Renoprotective effect of long acting thioredoxin by modulating oxidative stress and macrophage migration inhibitory factor against rhabdomyolysis-associated acute kidney injury, *Sci Rep* (2015), 5:14471. doi: 10.1038/srep14471.
- 4) Taguchi K, Hashimoto M, Ogaki S, Watanabe H, Takeoka S, Ikeda Y,

- Handa M, Otagiri M, Maruyama T, Effect of Repeated Injections of Adenosine Diphosphate-Encapsulated Liposomes Coated with a Fibrinogen-Chain Dodecapeptide Developed as a Synthetic Platelet Substitute on Accelerated Blood Clearance in a Healthy and an Anti-cancer Drug-Induced Thrombocytopenia Rat Model, *J Pharm Sci*, 104, 3084-9 (2015).
- 5) Maeda H, Hirata K, Watanabe H, Ishima Y, Chuang VTG, Taguchi K, Inatsu A, Kinoshita M, Tanaka M, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T, Polythiol-containing, recombinant mannosylated-albumin is a superior CD68+/CD206+ Kupffer cell-targeted nanoantioxidant for the treatment of two acute hepatitis models *J Pharm Exp Ther*, 352, 244-57 (2015).
 - 6) Ishima Y, Inoue A, Fang J, Kinoshita R, Ikeda M, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T, Poly-S-nitrosated human albumin enhances the antitumor and antimetastasis effect of bevacizumab, partly by inhibiting autophagy via the generation of nitric oxide, *Cancer Sci*, 106, 194-200 (2015).
 - 7) Enoki Y, Watanabe H, Arake R, Sugimoto R, Imafuku T, Tominaga Y, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Tanaka M, Matsushita K, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T, Indoxyl sulfate potentiates skeletal muscle atrophy by inducing the oxidative stress-mediated expression of myostatin and atrogen-1, *Sci Rep*, (2016) 6:32084. doi: 10.1038/srep32084.
 - 8) Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Yamasaki K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T, Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles ameliorates multi-organ injuries induced by severe acute pancreatitis in mice via their anti-inflammatory and anti-oxidant properties, *Int J Nanomedicine*, 11, 5611-5620 (2016).
 - 9) Shibata A, Ishima Y, Ikeda M, Sato H, Imafuku T, Chuang VTG, Ouchi Y, Abe T, Watanabe H, Ishida T, Otagiri M, Maruyama T, Human Serum Albumin Hydropersulfide is a potent reactive oxygen species scavenger in oxidative stress conditions such as chronic kidney disease, *Biochem Biophys Res Comm*, 479, 578-583 (2016).
 - 10) Sugimoto R, Watanabe H, Ikegami K, Enoki Y, Imafuku T, Sakaguchi Y, Murata M, Nishida K, Miyamura S, Ishima Y, Tanaka M, Matsushita K, Komaba H, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T, The down-regulation of ABCG2, a urate exporter, by parathyroid hormone enhances urate accumulation in secondary hyperparathyroidism, *Kidney Int*, 91, 658-670 (2017).
 - 11) Enoki Y, Watanabe H, Arake R, Fujimura R, Ishiodori K, Imafuku T, Nishida T, Sugimoto R, Nagao S, Miyamura S, Ishima Y, Tanaka M, Matsushita K, Komaba H, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T, Potential therapeutic interventions for chronic kidney disease-associated sarcopenia via indoxyl sulfate-induced mitochondrial dysfunction, *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, (2017) doi: 10.1002/jcsm.12202.
 - 12) Ikeda M, Ishima Y, Shibata A, Chuang VTG, Sawa T, Ihara H, Watanabe H, Xian M, Ouchi Y, Shimizu T, Ando H, Ukawa M, Ishida T, Akaike T, Otagiri M, Maruyama T, Quantitative determination of polysulfide in albumins, plasma proteins and biological fluid samples using a novel combined assays approach, *Anal Chim Acta*, 969, 18-25 (2017).
 - 13) Kinoshita R, Ishima Y, Chuang VTG, Nakamura H, Fang J, Watanabe H, Shimizu T, Okuhira K, Ishida T, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T, Improved anticancer effects of albumin-bound paclitaxel nanoparticle via augmentation of EPR effect and albumin-protein interactions using S-nitrosated human serum albumin dimer, *Biomaterials*, 140, 162-169 (2017).
 - 14) Ikeda M, Ishima Y, Kinoshita R, Chuang VTG, Tasaka N, Matsuo N, Watanabe H, Shimizu T, Ishida T, Otagiri M, Maruyama T, A novel S-sulhydrated human serum albumin preparation suppresses melanin

synthesis, Redox Biology, 14, 354-360 (2018).

- 15) Oshiro S, Ishima Y, Maeda H, Honda N, Bi J, Kinoshita R, Ikeda M, Iwao Y, Imafuku T, Nishida K, Miyamura S, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T, Dual therapeutic effects of an albumin-based nitric oxide donor on two experimental models of chronic kidney disease, J Pharm Sci, 107, 848-855 (2018)

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 戸田翔太、渡邊博志、弥永直樹、濱崎慶輔、國安明彦、長谷川功紀、後藤久美子、異島優、小田切優樹、丸山徹、腎指向型アルブミン-BMP7 ハイブリット体の創製と腎保護効果の検討, 第 32 回日本薬学会九州支部大会, 2015 年 11 月 28 日 ~ 2015 年 11 月 29 日, 宮崎:九州保健福祉大学
- 2) Hiroshi Watanabe, Kento Nishida, Masafumi Fukagawa, Toru Maruyama, Renoprotective effect of long acting thioredoxin by modulating oxidative stress and macrophage migration inhibitory factor against rhabdomyolysis-associated acute kidney injury, 第 48 回米国腎臓学会議 Kidney Week-ASN 2015 (国際学会), 2015 年 11 月 03 日 ~ 2015 年 11 月 08 日, USA: San Diego Convention Center
- 3) 渡邊博志、戸田翔太、異島優、小田切優樹、丸山徹、アルブミン融合技術を利用した血中滞留型 BMP7 の作製と腎線維化抑制作用, 第 30 回日本薬物動態学会, 2015 年 11 月 12 日 ~ 2015 年 11 月 14 日, 東京: タワーホール船堀
- 4) 戸田翔太、渡邊博志、異島優、小田切優樹、丸山徹、遺伝子工学的手法を用いた血中滞留型 BMP7 の設計と持続的腎保護作用の評価, 第 58 回日本腎臓学会学術総会, 2015 年 06 月 05 日 ~ 2015 年 06 月 07 日, 愛知: 名古屋国際会議場
- 5) Kento Nishida, Hiroshi Watanabe, Masafumi Fukagawa and Toru Maruyama, Long-acting albumin-thioredoxin fusion protein prevents AKI-associated acute lung injury, 第 49 回米国腎臓学会議 Kidney Week-ASN 2016 (国際学会), 2016 年 11 月 17 日 ~ 2016 年 11 月 20 日, USA: Chicago McCormick Place

- 6) Hiroshi Watanabe, Ryusei Sugimoto, Motoko Tanaka, Hirotaka Komaba, Masafumi Fukagawa and Toru Maruyama, Downregulation of ABCG2, a Urate Exporter, by Parathyroid Hormone Enhances Urate Accumulation in Secondary Hyperparathyroidism, 第 49 回米国腎臓学会議 Kidney Week-ASN 2016 (国際学会), 2016 年 11 月 17 日 ~ 2016 年 11 月 20 日, USA: Chicago McCormick Place
- 7) Hiroshi Watanabe, Yuki Enoki, Riho Arake, Motoko Tanaka, Kazutaka Matsushita, Masafumi Fukagawa and Toru Maruyama, Molecular mechanism of uremic toxin induced-skeletal muscle atrophy in chronic kidney disease, The 2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia (国際学会), 2016 年 11 月 04 日 ~ 2016 年 11 月 05 日, Japan: Nagoya
- 8) Saori Nagao, Kazuaki Taguchi, Hiromi Sakai, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, Therapeutic application of a new type of nano-sized carbon monoxide donor in colitis model mice, 2016 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (国際学会), 2016 年 07 月 17 日 ~ 2016 年 07 月 20 日, USA: Washington State Convention Center
- 9) Ryo Kinoshita, Yu Ishima, Mayumi Ikeda, Jun Fang, Hiroshi Maeda, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, S-Nitrosated human serum albumin dimer as a novel nano EPR enhancer applied to nanotechnology based anticancer drug, 2016 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (国際学会), 2016 年 07 月 17 日 ~ 2016 年 07 月 20 日, USA: Washington State Convention Center
- 10) 高野芽依、渡邊博志、前田仁志、小田切優樹、丸山徹、持続型 BMP7 誘導体の肝線維化モデルに対する有用性評価, 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017 年 11 月 25 日 ~ 2017 年 11 月 26 日, 熊本: 崇城大学
- 11) Kento Nishida, Hiroshi Watanabe, Fukagawa Masafumi Fukagawa, Toru

Maruyama, Systemic effects of long-acting albumin-thioredoxin fusion protein against distant organ injury following AKI, 米国腎臓学会議 Kidney Week-ASN 2017, 2017年11月2日～2017年11月5日, USA: Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 徹 (MARUYAMA, Toru)
熊本大学・薬学部・教授
研究者番号：90423657

(2) 研究分担者

渡邊 博志 (WATANABE, Hiroshi)
熊本大学・薬学部・准教授
研究者番号：70398220

異島 優 (ISHIMA, Yu)
熊本大学・薬学部・助教
研究者番号：00457590
H27年度のみ

(3) 連携研究者

なし()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし()