

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750155

研究課題名(和文)脳組織標的指向化超分子プロドラッグによる革新的ライソゾーム病治療アプローチ

研究課題名(英文)Therapeutic approach to lysosomal storage disorders by brain-targetable supramolecular prodrugs

研究代表者

田村 篤志(Tamura, Atsushi)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：80631150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではライソゾーム病の一つであるニーマンピック病C型(NPC病)の治療を目的に、 $\beta$ -シクロデキストリン( $\beta$ -CD)を含有した細胞内分解性ポリロタキサンを設計し、NPC病モデルマウスに対する治療効果を評価した。細胞内分解性ポリロタキサンは現在臨床試験がすすめられている $\beta$ -CD誘導体と比較して約10分の1の低濃度で治療効果を示すことが明らかになった。以上より、ポリロタキサンは $\beta$ -CDの輸送担体として有効であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, stimuli-labile polyrotaxanes containing  $\beta$ -cyclodextrins were developed for the treatment of Niemann-Pick type C (NPC) disease. The administration of the polyrotaxane significantly prolonged the life span of the mouse model of NPC disease at lower dose than clinically tested  $\beta$ -cyclodextrin derivatives. Accordingly, the polyrotaxanes are promising candidate for the treatment of NPC disease.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ポリロタキサン シクロデキストリン コレステロール ライソゾーム病 ニーマンピック病C型 オー  
トファジー

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病の一つであるニーマンピック病C型(NPC病)は、リソゾームから小胞体へのコレステロール輸送を担う膜貫通タンパク質 NPC1 が変異することにより、リソゾームにコレステロールの蓄積を生じる先天性疾患である。NPC 病は進行性神経後退、肝脾腫、運動失調といった重篤な症状を示す致死性疾患である。しかしながら、現在有効な治療法が確立されていない難治性疾患である。近年、コレステロールと包接錯体を形成するヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HP-β-CD) が、NPC 病細胞中に蓄積したコレステロールの排泄を促し、その結果 NPC 病モデルマウスの生存期間を著しく延長することが見いだされた。本結果を受けて、NPC 病に対する HP-β-CD の臨床試験が世界中で進められている。しかしながら、高濃度の HP-β-CD による急性毒性、聴力低下、組織障害性といった副作用に関する指摘もあり、投与量や投与形態の改善が求められる。

研究代表者は、NPC 病治療における HP-β-CD の問題点を改善するために β-CD 空洞部にポリマー鎖が貫通したインターロック構造の超分子ポリロタキサン (PRX) の利用を提唱している (図1)。PRX 中の β-CD は疎水性空洞部がポリマー鎖で占められた構造であるため、空洞部に由来する障害性や非特異的包接を回避できる。また、PRX は β-CD 誘導体と比較すると高分子量であるため、血中投与後の腎排泄が遅延されると期待される。

このような仮説のもと、NPC 病に対する PRX の有効性を明らかにすることを目的に、β-CD を含有した分解性 PRX の設計、ならびに培養細胞系でのコレステロール除去作用について検討をすすめてきた。これまでの研究で、PRX は、細胞内特異的な β-CD の放出

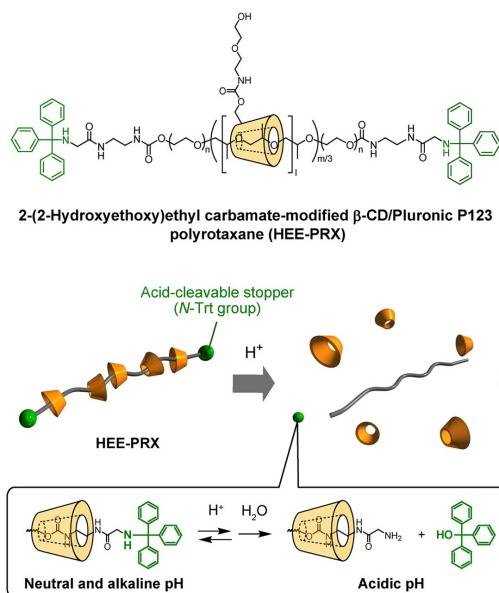


図1. 酸分解性ポリロタキサンの化学構造式

により HP-β-CD の 100 分の 1 の濃度でコレステロール蓄積の改善が可能であることを報告している (A. Tamura, N. Yui *Sci. Rep.* 4, 4356, (2016)). よって PRX は効果的かつ低侵襲的な NPC 治療が可能になると期待される。

2. 研究の目的

PRX は培養細胞系において HP-β-CD よりも低濃度でコレステロール除去が行えることを明らかにしているが、NPC 治療薬としての PRX の有効性を示すためには、NPC 病モデル動物に対する治療効果を明らかにする必要がある。また、分解性 PRX の分子設計に関しても生態環境下で作用し得る設計が必要である。本研究課題では、血液中での安定性とリソゾーム酸性環境下での分解特性を示す酸分解性 PRX を新たに設計するとともに、培養細胞系での評価、ならびにモデル動物に対する治療効果の評価を行った。NPC 病の病態改善には脳への β-CD 輸送が必須であるが、脳への標的指向性を有する PRX の分子設計についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 酸分解性ポリロタキサンの分子設計

一級アミノ基を両末端に有する Pluronic P123 (PPG:  $M_n = 4,200$ , PEG:  $M_n = 1,100 \times 2$ ) と β-CD を用いて擬ポリロタキサンを調製し、N-(triphenylmethyl)glycine で両末端を封鎖することにより PRX を調製した。PRX を水溶化するため、β-CD の水酸基をカルボニルジイミダゾール (CDI) で活性化後、2-ヒドロキシエトキシエチルアミン (HEEA) を反応させ、2-ヒドロキシエトキシエチル (HEE) 基が修飾された水溶性 PRX を得た (HEE-PRX)。各 pH における HEE-PRX の安定性・分解応答性の評価は HPLC 測定、SEC 測定により評価した。各 pH の緩衝溶液に HEE-PRX を溶解し、所定時間経過ごとに SEC 測定による β-CD 放出、ならびに HPLC で脱離した N-(triphenylmethyl) (Trt) 基を定量した。

(2) NPC 病由来細胞に対するコレステロール除去作用、オートファジー機能の評価

NPC 病患者由来皮膚繊維芽細胞 (NPC1 細胞) におけるコレステロール低下作用の評価は、細胞を HP-β-CD または HEE-PRX により 24 時間作用させた後に、コレステロールを Filipin 染色し、蛍光顕微鏡により評価した。また、NPC1 細胞におけるオートファジー機能は、オートファゴソームのマーカータンパク質である LC3、オートファジー選択的に分解を受けるタンパク質である p62 の免疫染色、ならびに western blot による発現量より評価した。また、mRFP-GFP-LC3 を発現した NPC1 細胞を用いてオートファゴソーム数、オートリソソーム数の計測を行った。

(3) NPC 病モデルマウスに対する治療効果の評価

動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て実施した（動物実験番号：0150234A, 0160207C）。NPC 病モデルマウスとして BALB/cNctr-Npc1<sup>m1N</sup>/J を使用した。生後 3 週齢より週 1 回 HEE-PRX、または比較対象である HP-β-CD を背部皮下に投与し、体重変化、運動機能スコア、生存期間を観察した。また、生後 3 週から 7 週まで週 1 回皮下投与を行った後に、各臓器を摘出し組織中のコレステロール類含量を GC-MS により定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 酸分解性ポリロタキサンの設計と pH 分解応答性

PRX に対し HEE 基の修飾を行った結果、反応仕込み時の[CDI]/[β-CD]のモル比に応じて HEE 基の修飾数を制御することが可能であった。β-CD あたりの HEE 基修飾数が 4 以上のときに HEE-PRX は水溶性を示し、水への溶解度は 150 mg/mL 以上であった。HEE-PRX の pH に対する分解応答機能を明らかにするために、各 pH の緩衝溶液に HEE-PRX を溶解し、末端の Trt 基の加水分解速度を評価した（図 2）。中性～弱アルカリ性条件（pH 7.4～9）では、48 時間静置後でも Trt 基の解離率は 5%以下であり、十分に安定であることが明らかになった。しかしながら、pH の低下に伴い加水分解が進行し、pH 5.0 では 24 時間でほぼ完全に Trt が解離した。また、SEC 測定を行った結果、Trt 基の解離に伴いポリロタキサン骨格が分解し、貫通していた β-CD が放出されることを確認した。また、HEE 基修飾数の影響を評価した結果、Trt 基の加水分解速度は HEE 基修飾によって変化しないことが明らかとなった。

##### (2) NPC 病由来細胞に対するコレステロール蓄積改善

HP-β-CD、HEE-PRX で NPC1 細胞を 24 時間処理し、Filipin 染色により細胞内のコレステロールを観察した。その結果、10 mM の

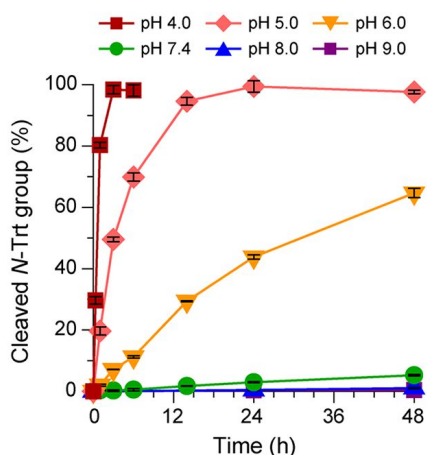


図 2. 各 pH における酸分解性ポリロタキサンの分解挙動

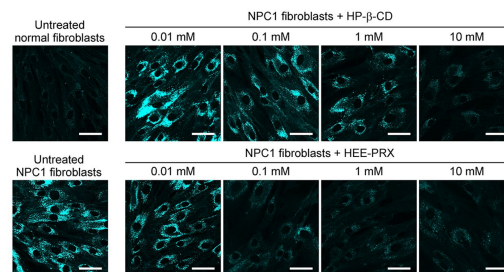


図 3. HEE-PRX で処理した NPC1 細胞中のコレステロール蓄積状態

HP-β-CD で処理した NPC1 細胞では正常細胞と同程度まで蛍光強度が減少し、コレステロールの蓄積が改善されたことが示唆された（図 3）。一方、HEE-PRX で処理した NPC1 細胞では 0.1 mM の濃度でも（PRX 中の β-CD 濃度換算）の正常細胞と同程度まで蛍光強度が減少した。

##### (3) NPC 病由来細胞におけるオートファジー不全の改善

ライソゾーム病ではライソゾームに種々の代謝物が蓄積することで細胞機能やシグナル伝達等に障害を及ぼす。その一つにオートファジーの異常が挙げられ、多くのライソゾーム病ではオートファジーの障害が明らかとなっている。オートファジーは自己のタンパク質を分解することで生命維持活動に重要な役割を担っているため、オートファジーの障害は神経変性疾患等の疾患と関連することが明らかとされている。NPC 病においてもオートファジーの機能障害が報告されており、神経変性との関連が指摘されている。

そこで、NPC 病のオートファジー機能障害に対する PRX の作用を検討した。正常線維芽細胞と NPC1 細胞を用いて LC3 を免疫染色した結果、これまでの報告と同様に NPC1 細胞では基底状態で LC3 陽性の小胞が多数観察され、細胞質中にオートファゴソームが蓄積していることが確認された（図 4A,B）。NPC1 細胞に対し HP-β-CD（10 mM）、PRX（1 mM）を作用させた結果、HP-β-CD では LC3 陽性の小胞がさらに増加したのに対し、PRX では LC3 陽性の小胞の減少が観察された。このとき、HP-β-CD、PRX を作用させた細胞は両者ともコレステロールが正常細胞レベルまで減少していた。すなわち、HP-β-CD と PRX はコレステロールの減少に対しては同様の作用を示すが、オートファジーに対しては正反対の作用を示すことを示唆している。

細胞中の LC3 量を定量した結果、HP-β-CD では LC3 量が増加したが、PRX では正常細胞レベルまで LC3 量が減少した（図 4C）。オートファジーにより分解を受けるタンパク質 p62 の発現量を評価することで、オートファジーによるタンパク質分解の程度を評価した結果、HP-β-CD を作用させた NPC1 病細胞では p62 量の増加が認められた。本結果は、オートファジーによるタンパク質分解機能

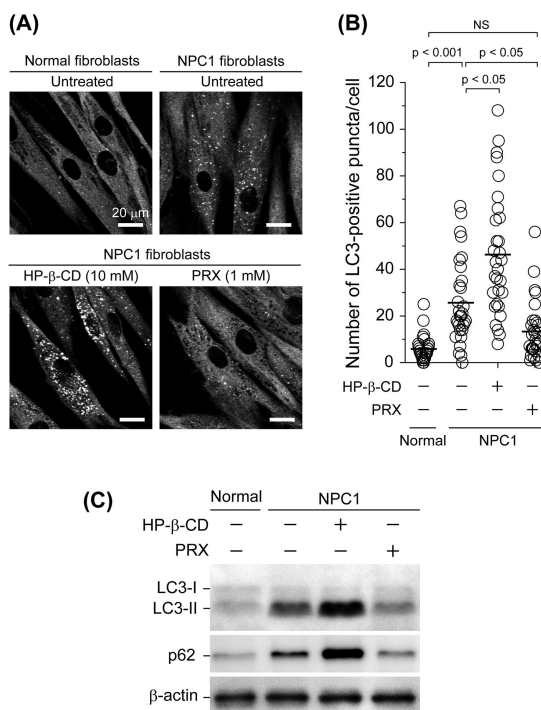


図 4. (A) HP-β-CD (10 mM)、PRX (1 mM) を作用させた NPC 病由来細胞の LC3 免疫染色像、(B) 画像解析より求めたオートファゴソーム数、(C) LC3-II、p62 の発現量変化

が低下していることを示唆している。一方、PRX の場合は LC3 とともに p62 も正常細胞と同程度まで減少しており、オートファジー機能を改善していることが示唆された。同様にコレステロールを減少可能な HP-β-CD では PRX で正反対の作用を示す点について詳細な原因は明らかとなっていないが、HP-β-CD と PRX の細胞に対する作用部位の差異が関連していると考えられる。

#### (4) NPC 病モデルマウスに対する治療効果

NPC 病に対する治療効果の評価として、*Npc1* 欠損マウスをモデルマウスとして使用し、生存期間の観察を行った。その結果、HEE-PRX を 500 mg/kg で週 1 回投与したマウスでは有意な生存期間の延長が確認された (図 5)。比較対象である HP-β-CD を投与したマウスでは 4000 mg/kg の投与量で HEE-PRX と同等の生存期間を示したが、500 mg/kg の投与量では治療効果は認められなかった。また、HEE-PRX を投与したマウスは、HP-β-CD に関する既報と同様に、血中 AST、ALT レベルの低下、組織中コレステロール量の低下、組織の空胞化の抑制、小脳プルキンエ細胞脱落抑制を示した。以上の結果より、HEE-PRX は HP-β-CD より低投与量で同様の治療効果を示すことが明らかとなった。

次に NPC 病モデルマウスの組織におけるコレステロール含量を GC-MS 測定により評価した。8 週齢の NPC モデルマウスでは、肺、肝臓、脾臓で野生型マウスの 10 倍程度

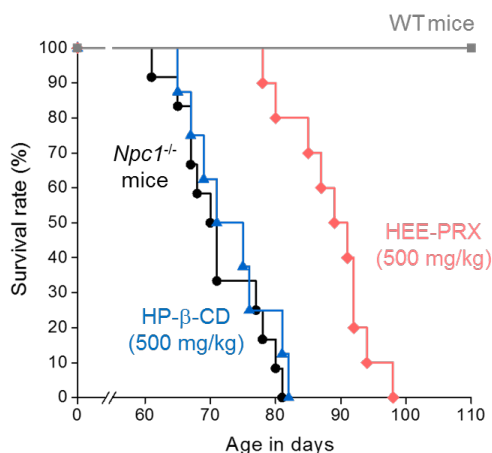


図 5. HP-β-CD、HEE-PRX (500 mg/kg、週 1 回皮下投与) を投与した NPC 病モデルマウスの生存期間

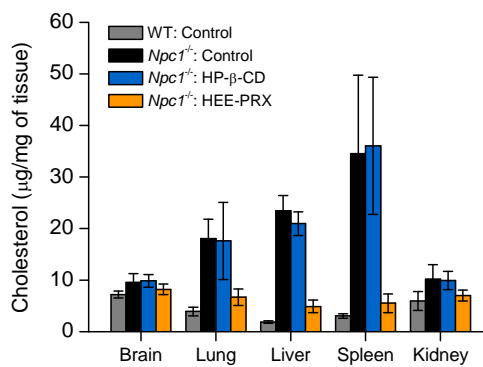


図 6. HP-β-CD、HEE-PRX (500 mg/kg、週 1 回、計 5 回皮下投与) を投与した NPC 病モデルマウス組織中のコレステロール量

のコレステロール含量の増加が認められた (図 6)。HEE-PRX を 500 mg/kg で週 1 回、計 5 回投与したマウスの組織中コレステロール含量は野生型マウスとほぼ同レベルを維持していた。一方、同投与量の HP-β-CD では組織中コレステロール含量の有意な変化は認められなかった。また、他のステロール類 (植物由来コレステロール、コレステロール前駆体、酸化ステロール) に対しても同様の評価を行った。NPC 病モデルマウスではコレステロールだけではなく植物由来コレステロール、コレステロール前駆体、酸化ステロールの組織中含量も増加しており、コレステロールの吸収・生合成が亢進するとともに、酸化ストレスによるコレステロールの酸化も亢進していることが明らかになった。興味深いことに、HEE-PRX を投与することでこれらのステロール類の組織中含量の増加を抑制することが明らかになった。本結果は、HEE-PRX によりコレステロールの吸収・生合成・酸化を正常レベルに維持されることを示唆している。

以上の結果より、HEE-PRX は NPC 病モデルマウス組織中のコレステロール蓄積を効

果的に抑制することが明らかになり、このような作用が低投与量での生存期間延長に結末していると考えられる

#### (5) 脳標的指向化のための分子設計

HP- $\beta$ -CD による NPC 病治療には、脳への HP- $\beta$ -CD の局所投与が効果的であることが報告されており、脳の症状改善が必須だといえる。HEE-PRX は血液脳関門を超えて脳へ到達する効率は非常に低いため、脳へのターゲティングが可能となれば、より低濃度で作用させることが可能になると期待される。脳への薬物送達には様々なレセプターやトランスポーターを介した方法が試みられている。NPC 病モデルマウスの血液成分を評価した結果、代謝物 X の濃度が野生型マウスと比較して有意に低いことが明らかとなった。そこで、代謝物 X に関連する合成リガンド Y を修飾したポリロタキサンを新たに設計した。本ポリロタキサンは脳へのターゲティングが可能になると期待され、現在も評価を継続中である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

A. Tamura, N. Yui. Rational design of stimuli-cleavable polyrotaxanes for therapeutic applications. *Polym. J.* in press (2017). 査読有

DOI: 10.1038/pj.2017.17

A. Tamura, M. Ohashi, N. Yui. Oligo(ethylene glycol)-modified  $\beta$ -cyclodextrin-based polyrotaxanes for simultaneously modulating solubility and cellular internalization efficiency. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* in press (2017). 査読有

DOI: 10.1080/09205063.2017.1304173

田村篤志, 由井伸彦. シクロデキストリンによるコレステロール動態制御と代謝疾患治療への展望. *細胞* 49 (2), 85-90 (2017). 査読無

田村篤志, 由井伸彦. 環状糖類によるコレステロール動態の制御と脂質異常症治療への展開. *BIO Clinica* 31 (13), 1378-1384 (2016). 査読無

K. Nishida, A. Tamura, N. Yui. Tailoring the temperature-induced phase transition and coacervate formation of methylated  $\beta$ -cyclodextrins-threaded polyrotaxanes in aqueous solution. *Macromolecules* 49 (16), 6021-6030 (2016). 査読有

DOI: 10.1021/acs.macromol.6b01493

A. Tamura, K. Nishida, N. Yui. Lysosomal pH-inducible supramolecular dissociation of polyrotaxanes possessing acid-labile *N*-triphenylmethyl end groups and their therapeutic potential for Niemann-Pick type C disease. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 17 (1), 361-374 (2016). 査読有

DOI: 10.1080/14686996.2016.1200948

K. Nishida, A. Tamura, N. Yui. Acid-labile polyrotaxane exerting endolysosomal pH-sensitive supramolecular dissociation for therapeutic applications. *Polym. Chem.* 6 (21), 4040-4047 (2015). 査読有

DOI: 10.1039/C5PY00445D

A. Tamura, G. Ikeda, K. Nishida, N. Yui. Cationic polyrotaxanes as a feasible framework for the intracellular delivery and sustainable activity of anionic enzymes: a comparison study with methacrylate based polycations. *Macromol. Biosci.* 15 (8), 1134-1145 (2015). 査読有

DOI: 10.1002/mabi.201500083

M. Terauchi, G. Ikeda, K. Nishida, A. Tamura, S. Yamaguchi, K. Harada, N. Yui. Supramolecular polyelectrolyte complexes of bone morphogenetic protein-2 with sulfonated polyrotaxanes to induce enhanced osteogenic differentiation. *Macromol. Biosci.* 15 (7), 953-964 (2015). 査読有

DOI: 10.1002/mabi.201500032

A. Tamura, N. Yui.  $\beta$ -Cyclodextrin-threaded biocleavable polyrotaxanes ameliorate impaired autophagic flux in Niemann-Pick type C disease. *J. Biol. Chem.* 290 (15), 9442-9454 (2015). 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M115.636803

A. Tamura, N. Yui. Threaded macromolecules as a versatile framework for biomaterials. *Chem. Commun.* 50 (88), 13433-13446 (2014). 査読有

DOI: 10.1039/C4CC03709J

[学会発表](計 34 件)

田村篤志. 難治疾患に挑むポリロタキサン分子の分子デザイン. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016 年 11 月 21 日, 福岡国際会議場, 福岡

A. Tamura. Development of acid-labile polyrotaxanes for the treatment of Niemann-Pick type C disease. *The 8th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology (IWAMSN 2016)*, November 9th, 2016, Ha Long City, Vietnam

田村篤志. 分解応答型インターロックポリマーによる細胞代謝機能の改善. 新学術領域研究ナノメディシン分子科学 第9回公開シンポジウム細胞内環境の理解と制御, 2015年7月1日, 東京大学本郷キャンパス小柴ホール, 東京

A. Tamura. Polyrotaxane-based intracellular delivery of cyclodextrins for intractable disease therapies. *Joint Conference of 8th Asian Cyclodextrin Conference and 32nd Cyclodextrin*

*Symposium*. May 16th, 2015, Kumamoto Prefectural Community Center PAREA, Kumamoto, Japan.

田村篤志, インターロック高分子による希少難治性代謝疾患治療. 第65回医用高分子研究会, 2015年3月9日, 東京理科大学, 東京

〔図書〕(計 1件)

田村篤志, 由井伸彦. 第3章 細胞内分解性ポリロタキサンを用いた薬物送達と超分子医薬への応用. 丸山一雄監修, DDS キャリア作成プロトコル集, シーエムシー出版, pp 80-88 (2015)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2件)

名称: 内部分解型ポリロタキサンおよびその合成法

発明者: 由井伸彦, 田村篤志, 有坂慶紀, 伏見麻由

権利者: 東京医科歯科大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-92550

出願年月日: 2016年5月2日

国内外の別: 国内出願

名称: メチル化ポリロタキサンおよびその合成法

発明者: 由井伸彦, 田村篤志, 西田慶

権利者: 東京医科歯科大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-90121

出願年月日: 2016年4月28日

国内外の別: 国内出願

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/org/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 篤志 (TAMURA, Atsushi)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号: 80631150

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし