

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07912

研究課題名(和文) 肝障害の診断と治療を目的としたレドックス感受性リポソームの開発

研究課題名(英文) Development of a redox sensitive liposome for diagnosis and treatment for liver damages

研究代表者

岡崎 祥子 (OKAZAKI, Shoko)

崇城大学・薬学部・講師

研究者番号：40435152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではレドックス反応に応答するニトロキシルラジカルで修飾したリン脂質を合成し、レドックス感受性リポソームを作成した。ニトロキシルラジカル単独では生体内半減期が短く、腎障害などを有する疾患モデルでは生体内レドックスを測定することが困難であったが、リポソームにしたことで体内滞留性を高めることに成功した。これにより、健康動物と病態モデル動物の間でのプローブ濃度の差を軽減することができ、生体内レドックスの非侵襲的測定の対象となる疾患の拡大が期待される。

研究成果の概要(英文)：We synthesized a nitroxyl radical-binding phospholipid and prepared a redox sensitive liposome. It is difficult to measure the in vivo redox by an in vivo ESR technique using a nitroxyl radical in a disease model having renal impairment, because the half-life of a nitroxyl radical is short. However, we achieved increase of retention in the body of the nitroxyl radical by producing a redox sensitive liposome. This would lead to increase of target diseases of non-invasive redox measurement by ESR and MRI, because difference of probe concentration in a body between healthy and disease model animals would decrease.

研究分野：生物物理

キーワード：レドックス 酸化ストレス ニトロキシルラジカル リポソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 酸化ストレスと疾患について

活性酸素(ROS)過剰生成による生体内のレドックスバランスの変化と様々な疾患との関連は障害を受けた組織等における過酸化脂質などの増加により評価することが一般的である。しかし、このような方法は病気の進行とレドックス変化の関連を同一動物で経時的に追うことはできない。しかし、病態のメカニズム解明や新規治療法の開発には、同一個体で病態の進行に伴ってどのようにレドックスバランスが変化していくのかを知ることは非常に重要である。

(2) *In vivo* ESR法について

In vivo ESR法ではニトロキシルラジカルをプローブとして、そのレドックス反応を利用して、生きている動物における体内のレドックス変化をリアルタイムで測定するのが一般的である。プローブのレドックスの平衡関係は ROS により酸化方向へ、あるいは生体内の抗酸化物質や還元酵素により還元方向へシフトする。しかし、従来のニトロキシルラジカルをプローブとする方法では酸化と還元どちらの反応も ESR シグナルの減少として測定されるため、レドックスバランスの変化を評価する際に注意を要する。そこで、我々はこれまでに、ROS との反応性を残したまま酵素的還元に対して抵抗性を持たせたプローブの開発や、還元型の状態での安定な投与を可能にしたプローブを用いた敗血症モデルマウスにおけるレドックス測定などを行ってきた。特に還元型(ヒドロキシルアミン体)の状態での投与は従来のニトロキシルラジカルをプローブとする場合と異なり、プローブ(ヒドロキシルアミン)のレドックス平衡が生体内レドックスを反映するだけでなく、酸化によりシグナルが増強され、還元によりシグナルが減少するというようにレドックス平衡を ESR シグナルの消長として直接評価できるという利点がある。しかしこれらのプローブは低分子量であるため、投与後速やかに尿中に排泄されてしまい、腎機能が変化するような病態では体内のプローブ量に健常群との間で大きな差が生じてしまう。これにより健常群と病態群の測定値の比較が困難となるので、適用できる病態に制限がある。また、全身に分布するため、体外からの非侵襲的測定ではレドックス変化が起きている部位(血中と臓器中どちらで起きているのか等)の特定は難しく、特定臓器のレドックス変化は切開により臓器を露出させる方法で測定されている。しかし、この方法では同一動物でレドックス変化を経時的に測定することはできないなどの問題がある。

2. 研究の目的

レドックスプローブであるニトロキシルラジカルで修飾したリポソームを作成し、体

内滞留性を向上させることで、*in vivo* ESR法による生体内レドックス測定法の適用拡大を図る。また、リポソームに肝指向性を持たせ、特定臓器におけるレドックス変化の非侵襲的測定を達成する。

3. 研究の方法

(1) DMPE-PROXYL の合成

クロロホルム中、ジメチルアミノピリジン及びジシクロヘキシルカルボジイミド存在下 3-Carboxy-PROXYL とジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(DMPE)を 37 °C で 1 晩反応させた。その後クロロホルム/メタノールを溶離液として用いたカラムクロマトグラフィーにより分離精製した。

(2) ニトロキシルラジカル修飾リポソームの調製と安定性の評価

卵黄レシチンとジセチルリン酸のクロロホルム溶液に DMPE-PROXYL のクロロホルム/メタノール溶液を加えて攪拌後、エバポレーターで溶媒を除去し脂質膜を作成し、デシケーター中で 1 晩乾燥させた。リン酸緩衝液(PBS)を加えて懸濁後、凍結融解させ、エクストルーダーを用いて粒径を 0.1 μm に揃えた。

調製したリポソーム懸濁液を PBS あるいはマウス血漿で希釈し、粒径、ESR シグナル、MRI 輝度の経日的変化を測定した。

(3) ニトロキシルラジカル修飾リポソームの体内動態の検討

ニトロキシルラジカル修飾リポソームを ddY マウス(4 週齢、雄性)の尾静脈より投与し、体内動態を MRI により測定した。また、各臓器を摘出し、ホモジナイズ後にフェリシアン化カリウムを添加してプローブの再酸化を行い、X-band ESR を用いて各臓器中の総ニトロキシルラジカル量を測定した。

4. 研究成果

これまでに行った DMPE-PROXYL の合成は室温で反応させており、収率が 10% ほどであったが、反応温度を 37 °C にすることで DMPE のほぼ全てが反応し、精製後の収率が約 50% と顕著に増加させることができた。また、精製物中のリン濃度に対するニトロキシルラジカル濃度の割合を算出したところ、85-95% と高い割合でニトロキシルラジカルとしてリン脂質と結合しており、ニトロキシル修飾リポソームの調製に充分利用できることがわかった。

これまでの検討から、DMPE-PROXYL はクロロホルム中では明瞭な 3 本線の ESR シグナルを示すが、リポソームにすると幅広く高磁場側のシグナルが顕著に小さくなったシグナルを示すことがわかっている。これは回転運動が制限された際の特徴的なシグナル変化であり、想定通りにリポソーム膜にニトロキシルラジカルが結合している状態であるこ

とを示している。しかしながら、シグナルが変形しているため、X-band ESR では測定ができて、感度が著しく低下する *in vivo* ESR による検出は困難となる可能性が高い。一方で、ニトロキシルラジカルはその常磁性から MRI 造影剤としても機能する。そこで、レドックス測定を *in vivo* ESR ではなく MRI で行うことを前提として検討を行うことにした。膜中に DMPE-PROXYL を異なる濃度 (0.16 mmol/L から 5 mmol/L まで) で含むニトロキシルラジカル修飾リポソームを調製し、MRI で撮像したところ、DMPE-PROXYL 濃度依存的に輝度が増加した(図 1)。また、未修飾のリポソーム懸濁液に 3-Carboxy-PROXYL を混和した場合よりもわずかではあるが輝度の増加率が大きかった。ニトロキシルラジカルはレドックス反応により常磁性を失い、造影剤として機能しなくなることから、本リポソームで MRI により生体内のレドックス評価ができることが示唆された。

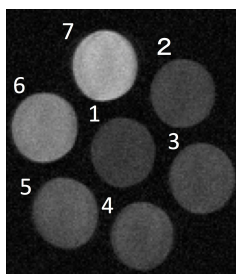


図 1 ニトロキシルラジカル修飾リポソーム懸濁液の MRI 画像

DMPE-PROXYL 濃度：
 (1) 0 mmol/L, (2) 0.16 mmol/L, (3) 0.31 mmol/L, (4) 0.63 mmol/L, (5) 1.25 mmol/L, (6) 2.5 mmol/L, (7) 5 mmol/L

動物に投与するにあたり、緩衝液中、血漿中での安定性は重要である。未修飾のリポソームのゼータ電位が 0.64 mV だったのに対して、2.4 mmol/L の DMPE-PROXYL を含むニトロキシルラジカル修飾リポソームのゼータ電位は -12 mV と著しく低下しており、本リポソームは凝集しづらいことが示唆された。実際に、ニトロキシルラジカル修飾リポソームの粒子径を測定したところ、少なくとも 1 週間は粒子径に変化はなかった。MRI の輝度にも変化はなく、DMPE-PROXYL の濃度依存的な輝度上昇にも変化はなかった。また、ESR シグナルの形状にも変化がなかったことから、保存中に PROXYL 部分の脱離などが起こらないこともわかった。以上のことから、ニトロキシルラジカル修飾リポソームは緩衝液中や血漿中で安定に存在しており、調製後使用するまで保存がある程度可能であり、生体内でレドックス反応が起こらない限りは安定に存在できる可能性が高いことがわかった。

マウスの尾静脈よりニトロキシルラジカル修飾リポソームを投与し、MRI で輝度変化を測定したところ、上腹部で輝度の増加が認められた。そこで、リポソームの集積が予想される肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、各臓器中の総ニトロキシルラジカル量(酸化型+還元型)を測定した。その結果、特に肝臓と脾臓において、3-Carboxy-PROXYL を投与した

場合の 15-30 倍高かった。おそらくリポソームにしたことで、細網内皮系に貪食されたものと考えられる。また、尿中への排泄量は 3-Carboxy-PROXYL の 1/6 程度に低下しており、血中濃度は 20 倍以上に増加していた。これらの結果から、ニトロキシルラジカル修飾リポソームは 3-Carboxy-PROXYL よりも体内滞留性が高く、排泄されにくくなっていることが示された。

肝指向性を持たせるためのガラクトース修飾リン脂質の合成では中間産物の安定性が悪く、最終的な合成に至らなかったため、ニトロキシル修飾リポソームへの肝指向性付与は実現できなかったが、ニトロキシルラジカルをリポソームとすることで体内滞留性を著しく増加させることに成功した。細網内皮系による貪食はリポソームの PEG 修飾によるステルス化で回避できる。今後、PEG 修飾と組み合わせたリポソームを作成し、健康マウスと病態モデルとの輝度変化の比較からレドックス測定を行う予定である。ニトロキシルラジカル修飾リポソームによるレドックス測定が可能になれば、これまで測定対象になり難かった病態にまで測定対象を拡大できるようになり、病態とレドックスについてより詳細な検討が可能になると期待される。

<引用文献>

- Okazaki *et al.*
Free Rad. Res., 41, pp.1069-1077, 2007
 Okazaki *et al.*
Free Radic. Biol. Med., 68, pp.72-79, 2014
 Inoguchi *et al.*
Biochem. Biophys. Res. Com., 330, pp.415-422, 2005

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)

Shoko Okazaki, Keizo Takeshita
 Irradiation of phenolic compounds with ultraviolet light causes release of hydrated electrons, *Applied Magnetic Resonance*, in press, pp.1-12, 2018 査読あり DOI: 10.1007/s00723-018-0999-9

Ryo Tabuchi, Makoto Anraku, Daisuke Iohara, Takako Ishiguro, Shinsuke Ifuku, Tomone Nagae, Kaneto Uekama, Shoko Okazaki, Keizo Takeshita, Masaki Otagiri, Fumitoshi Hirayama
 Surface-deacetylated chitin nanofibers reinforced with a sulfobutyl ether -cyclodextrin gel loaded with prednisolone as potential therapy for inflammatory bowel disease, *Carbohydrate*

Polymers, 174, pp.1087-1094, 2017 査読あり
DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.07.028

Keizo Takeshita, Shoko Okazaki, Kyosuke Shinada, Yuma Shibamoto
Application of a compact magnetic resonance imaging system with 1.5T permanent magnets to visualize release from and the disintegration of capsule formulations in vitro and in vivo, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40, pp.1268-1274, 2017 査読あり
DOI: 10.1248/bpb.b17-00154

Keizo Takeshita, Shoko Okazaki, Yuriko Hirose
Pharmacokinetics of lipophilically different 3-substituted 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl radicals frequently used as redox probes in in vivo magnetic resonance studies, *Free Radical Biology and Medicine*, 97, pp.263-273, 2016 査読あり
DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.008.

〔学会発表〕(計 3 件)

岡崎祥子、北富章子、佐藤みづき、福田悞、竹下啓蔵
敗血症モデルマウスにおける生体内レドックスの経時的変化と病態指標
第 69 回酸化ストレス学会学術集会, 2016

岡崎祥子、佐藤みづき、福田悞、北富章子、竹下啓蔵
敗血症モデルマウスにおける生体内レドックスの非侵襲的測定と病態変化
第 32 回日本薬学会九州支部大会, 2015

岡崎祥子、廣瀬友吏子、竹下啓蔵
生体内レドックス測定に用いられる五員環ニトロキシルスピンプローブの薬物動態解析
第 54 回電子スピンスイエンズ学会, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 祥子 (OKAZAKI, Shoko)
崇城大学・薬学部・講師
研究者番号: 40435152

(2) 連携研究者

竹下 啓蔵 (TAKESHITA, Keizo)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号: 70175438