

令和元年6月20日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14519

研究課題名(和文)尿毒症症状改善に向けたインドール吸着合成ナノ粒子の開発

研究課題名(英文) Design of Synthetic Polymer Nanoparticles Specifically Capturing Indole for improvement of uremia symptom

研究代表者

小出 裕之(Koide, Hiroyuki)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：60729177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：インドールを吸着するために、2%架橋したpoly N-isopropylacrylamide (pNIPAm)に疎水性モノマーを組み合わせてナノ粒子を合成した。合成したナノ粒子は、組み込む疎水性モノマーの構造と配合比によって大きく変化した。ナノ粒子のインドール類似低分子化合物吸着量は、インドール吸着量と比較して有意に低かった。NPsによるインドールの消化管吸収抑制効果をin vivoで評価したところ、ナノ粒子はインドールの体内蓄積率を有意に減少させることが明らかとなった。以上より、NPsは消化管でインドールを選択的に吸着し、体外への排泄を促すことで、CKDの進行を抑制し得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、尿毒症症状の悪化を抑制するために、消化管でインドールを選択的に吸着するナノ粒子の開発を行った。その結果、ナノ粒子とインドールをマウスに経口投与することで、インドールの体内蓄積率を有意に減少させることに成功した。

現在臨床で用いられている消化管での標的分子吸着材は、標的分子以外も吸着してしまうため、他の薬剤を服用してから数時間間隔をあける必要がある。さらに、栄養素も吸着してしまうため、食後数時間間隔をあける必要がある。本研究で開発したナノ粒子はこれら問題点を克服することが可能となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Synthetic polymer hydrogel nanoparticles (NPs) capable of capturing and/or releasing target biomacromolecules are of interest as alternative bio-affinity ligands. In the present study, we focused on the developing NPs that adsorb indole in the intestine for chronic kidney disease (CKD) therapy.

NPs were prepared by an aqueous dispersion copolymerization of NIPAm, various hydrophobic monomers, and a cross-linker. Indole adsorption rates were significantly changed by varying the structure and percentage of the hydrophobic monomers in the NPs. However, NPs did not adsorb the indole analogs. NP inhibited intestinal absorption of indole not only in vitro but also in the biological milieu. These results suggest that usability of NPs as an epoch-making oral absorbent.

研究分野：高分子、薬物送達

キーワード：ナノ粒子 分子認識 低分子 インドール 経口投与 尿毒症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

タンパク質間相互作用は生命の維持に必須の現象で、この相互作用を人工的に制御することは創薬において有用な戦略となり得る。現在、タンパク質間相互作用を制御する物質として最も汎用されているのは抗体やそのフラグメントである。しかしながら、抗体製剤はタンパク質であるが故、精製過程の複雑さ、安定性の低さからなる価格の高騰などといった、解決すべき多くの課題を有するため、より安価で安定な代替品の創出が希求されている。そもそも、タンパク質間の強固な結合は、それらを構成するアミノ酸の性質により、水素結合、疎水性相互作用、静電的相互作用などの多種多様な結合が、広範囲に渡って組み合わさることで成し遂げられている。したがって、上述の相互作用を模倣することにより、標的タンパク質やペプチドに親和性のある材料が人工的に設計可能であると考えられている。我々はこれら相互作用を生み出す機能性のプラスチック原材を用いてプラスチックナノ粒子を合成することで、抗体のように標的分子に多点で、強力に、特異的に結合する“プラスチック抗体”の創出を試みてきた。これまでに、(*N,N'*-Methylenebis(acrylamide)、Bis)にて2%架橋した*N*-isopropylacrylamide (NIPAm)を基盤とした合成高分子ナノ粒子 (NPa) に、最適な量の負電荷モノマーや疎水性モノマーを組み込むことで、26 アミノ酸からなる比較的単純な構造をもつミツバチ毒素 (メリチンペプチド) や、がんの増殖に関与する血管内皮細胞増殖因子 (VEGF₁₆₅) に結合し、機能を中和するナノ粒子開発に成功してきた。しかし、プラスチック原料から合成されるプラスチックナノ粒子は、安全性の観点から静脈内投与には適さない。

そこで本研究では、消化管内に存在する毒素、またはその前駆体を吸着し排泄を促す、新たな経口投与型の NPs 開発を試みた。NPs の経口吸着剤としての有用性評価に際し、本研究では、標的モデルとして近年、慢性腎臓病 (CKD) の進行に最も重要な働きをすると注目されているインドールを選択した。インドールは、食物中に含まれるトリプトファンから腸内細菌により合成される芳香族低分子である。合成されたインドールは腸管吸収を受け、肝臓にて代謝されることで、尿毒素のひとつであるインドキシル硫酸 (indoxyl sulfate, IS) を生じる。通常 IS は、体循環に入った後速やかに腎臓より排泄されるが、CKD 患者においては、腎クリアランスの低下に伴い体内に高濃度に蓄積し、尿毒症症状を引き起こす。つまり、CKD 患者においてインドールの吸収を阻害し血中 IS 濃度を低下させることは、尿毒症症状の改善のみならず CKD の進行抑制につながるといえる。

2. 研究の目的

本研究では、消化管内で特異的にインドールを吸着し吸収を阻害する NPs を開発し、CKD の進行抑制への応用を目的としている。

3. 研究の方法

【NPs の合成】

NPs は NIPAm を基盤とし、架橋剤として Bis、疎水性モノマーとしては *N*-tert-butylacrylamide (TBAm)、*N*-Phenyacrylamide (PAA)、もしくは 2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl acrylamide (5FPAA) を用いた。負電荷モノマーとしては Acrylic acid (AAc)、正電荷モノマーとしては、*N*-(3-Aminopropyl) methacrylamide (APM) を用いた。NIPAm、Bis、AAc、APM は超純水、TBAm はエタノール、PAA、5FPAA はアセトンに溶解した。総モノマー濃度が 65 mM となるように調製後、SDS 溶液 (2 mg/mL) を添加し窒素置換した。その後、Ammonium per sulfate (APS、最終濃度; 200 µg/mL) を添加し、窒素暴露下 65°C で 3 時間反応させた。また、APM を加えた場合は、SDS の代わりに Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)、APS の代わりに α,α' -Azobisisobutyronitrile (AIBN) を用いた。未反応のモノマーやオリゴマーは、透析 (Spectra/Por 4, MWCO 12-14kD) により除去した (1 日 2 回、4 日以上)。

【NPs の物性評価】

粒子径は動的光散乱法 (dynamic light scattering, DLS)、表面電荷は電気泳動光散乱測定により求めた。透析後のポリマー懸濁液 20 µL を超純水 980 µL で希釈し、ZetaSizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) を用いて、粒子径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) および表面電荷を 25 ± 0.1°C にて測定した。

【NPs とインドール及びその誘導体との親和性評価】

25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中にてインドールと NPs を 10 秒室温で混合した (インドール ; 85 μ M, NPs ; 5 mg/ml)。その後、超遠心処理により NPs と NPs とインドールの複合体を沈降させた。上清に残った NPs に結合していないフリーのインドール濃度は、紫外可視吸光度計を用いて 279 nm の吸光度を測定し、求めた。また、NPs のインドールに対する特異性は、インドール類似化合物としてトリプトファン (親水性分子)、トリプタミン (塩基性分子、pKa=10.2)、インドール酢酸 (酸性分子、pKa = 4.75)、シアノコバラミン (分子量の大きな分子; vitamin B12, VB12) を使用した。

【インビトロにおける NPs のインドール吸収阻害効果】

Caco-2 細胞をコラーゲンコートしたインサートに 2×10^3 cells/insert となるように播種した。24 時間後に培地を吸引除去し、腸上皮分化培地をインサートとウェルに加え、さらに 48 時間培養。経上皮電気抵抗を評価することで、単層膜形成を確認した。その後、 $[^{14}\text{C}]$ 標識インドールと NPs をそれぞれ最終濃度として 43 μ M (370 Bq) と 5.0 mg/mL となるように添加した。6 時間後、 $[^{14}\text{C}]$ 標識インドール由来の放射活性を、液体シンチレーションカウンター (LSC-7400) を用いて測定した。Vehicle としては NPs を添加しない群を用意した。

【インビボにおける NPs のインドール吸収阻害効果】

$[^{14}\text{C}]$ 標識インドール (43 nmol/400 μ L 50 kBq/400 μ L) と TF-NP5、TF-NP5-n あるいは TF-NP5-p (最終濃度 5 mg/400 μ L) をマウスに経口投与し、1 時間後に血液、肝臓、腎臓中の放射活性を測定した。

4. 研究成果

【インドールに親和性のある NPs のスクリーニング】

NIPAm、Bis に加えてそれぞれの疎水性モノマーの割合が 20、40、60、もしくは 80% となるように計 12 種類 NPs を合成し、Control NPs (NP0) は、NIPAm 98%、Bis 2% を用いた。合成した NPs の粒子径、PDI、表面電荷を **Table 1** に示した。どの組成においても、極めて均一な NPs の懸濁溶液が得られた。それぞれの NPs の粒子径は Control NPs、T-NPs、P-NPs、F-NPs の順に小さくなり、同じ疎水性モノマーを用いた NPs 間では、疎水性モノマーの割合を増やすほど粒子径が減少した。

NPs によるインドール吸着能を検討したところ、疎水性モノマーの割合を増加させることでインドール吸着率が増加した (**Figure 1**)。Control NPs (NP0) のインドール吸着率は 10% 以下と低く、NIPAm はインドールとの相互作用に重要でないことが明らかになった。疎水性モノマーを 80% 組み込んだ NPs に関しては、F-NP4 が T-NP4、若しくは P-NP4 と比較して最も高いインドール吸着率を示した。しかし、疎水性モノマーを 20% 組み込んだ NPs 間で比較すると、T-NP1 が P-NP1 若しくは F-NP1 と比較してより高いインドール吸着能を示した。

【NPs へ疎水性モノマーを多種類組み合わせることによるインドール吸着能の向上】

Table 1. ナノ粒子を構成するモノマー組成、粒子径、PDI、表面電荷

	Hydrophobic monomer feed (mol%)			Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	ζ -potential (mV)	Yield (%)
	TBAm	PAA	SFPAA				
NP0				171.7 \pm 18.4	0.030	-12.6 \pm 5.3	92
T-NP1	20			151.8 \pm 17.8	0.009	-24.1 \pm 9.4	82
T-NP2	40			137.0 \pm 16.7	0.033	-32.3 \pm 3.9	80
T-NP3	60			122.4 \pm 27.4	0.033	-36.6 \pm 6.0	92
T-NP4	80			102.0 \pm 10.8	0.022	-34.2 \pm 5.8	85
P-NP1		20		114.7 \pm 17.1	0.066	-26.0 \pm 1.4	89
P-NP2		40		100.2 \pm 24.2	0.056	-32.1 \pm 2.8	89
P-NP3		60		88.3 \pm 9.1	0.053	-36.2 \pm 7.4	96
P-NP4		80		96.3 \pm 10.3	0.064	-44.1 \pm 11.6	94
F-NP1			20	101.8 \pm 6.6	0.078	-24.5 \pm 5.6	76
F-NP2			40	89.2 \pm 3.6	0.062	-35.0 \pm 5.0	77
F-NP3			60	83.4 \pm 5.6	0.019	-44.7 \pm 5.9	81
F-NP4			80	63.5 \pm 3.0	0.021	-36.9 \pm 3.2	87

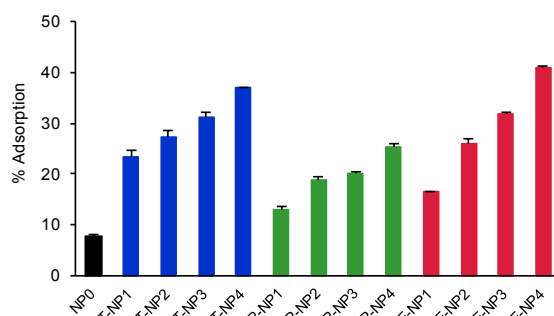


Figure 1. ナノ粒子によるインドール吸着

本研究で用いている疎水性モノマー、TBAm と 5FPAA は異なる結合様式でインドールと相互作用しているため、この2つの相互作用を組み合わせることでインドールに対する親和性が向上するのではないかと推察した。そこで、この仮説を検証するため、TBAm と 5FPAA の両方を組み込んだ粒子を合成し、インドールとの親和性を検討した。

合成した NPs の粒子径、PdI、表面電荷、収率、モノマー組み込み率は **Table 2** に示した。TBAm と 5FPAA を両方組み込んだ NPs の粒子径及び表面電荷は、TBAm、5FPAA どちらか一方だけを組み込んだ NPs と大差なかった。2種類の疎水性モノマーを組み込んだ NPs (TF-NPs) も、TB-NPs や FP-NPs と同様に、疎水性モノマーの総組み込み率が増えるほどインドール吸着率が増加した(**Figure 2**)。また、疎水性モノマーの総組み込み率で比較すると、疎水性モノマーを1種のみ組み込んだ NPs (TB-NPs, FP-NPs) よりも高いインドール吸着能を示した。

これまでで、TBAm を 40 mol%、5FPAA を 40 mol%組み込んだ NPs (TF-NP5) がインドールに対して最も高い親和性を有することが明らかになった。

【NPs の特異性に関する検討】

T-NP4, TF-NP5, TF-NP6 はインドール類似化合物の吸着率が 10%以下であり、それらはインドールの吸着率よりも有意に低かった (**Figure 2**)。このことから、NPs はインドールを特異的に吸着し得ることが明らかになった。また、F-NP4 はトリプタミンに対して僅かながら親和性を示したが、TF-NP5, TF-NP6 のトリプタミン吸着率は F-NP4 と比較して有意に低かった。これ以降の検討は、インドールに対して最も高い親和性を有し、インドール類似化合物に対する親和性が比較的 low だった TF-NP5 を用いて行った。

【NPs への荷電モノマーの組み込みがインドールへの親和性、特異性へ与える効果】

次に、インドールに対する親和性の最も高かった TF-NP5 に荷電モノマーを組み込むことで、インドールへの親和性と特異性の向上を目指した。荷電モノマーとしては、正電荷を有する APM、若しくは負電荷を有する AAc を用いた。合成した NPs の物理的性質を **Table 3** に示した。APM や AAc の組み込みや、界面活性剤若しくはラジカル重合開始剤の違いが粒子径に大きな影響を与えることはなかった。

TF-NP5 のインドールに対する親和性は、APM 組み込みによる影響は受けず、AAc 組み込みにより僅かに上昇した (**Figure 3**)。一方、インドール類似化合物に対する親和性は、荷電モノマーの組み込みにより大きく変化した (**Figure 3**)。TF-NP5-n はトリプタミンに対して高い親和性を示したのに対し、TF-NP5-p はインドール酢酸に対して親和性を示さなかった。尚、以降の検討では TF-NP5, TF-NP5-p, TF-NP5-n を使用している。

Table 2. ナノ粒子を構成するモノマー組成、粒子径、PDI、表面電荷

	Hydrophobic monomer feed (mol%)		Hydrodynamic diameter (nm)	Pdi	ζ-potential (mV)	Yield (%)
	TBAm	5FPAA				
TF-NP1	20	20	75.2 ± 9.6	0.105	-39.3 ± 1.4	91
TF-NP2	20	40	80.1 ± 16.9	0.046	-32.7 ± 10.1	93
TF-NP3	20	60	79.1 ± 14.1	0.033	-40.0 ± 4.4	79
TF-NP4	40	20	78.2 ± 16.0	0.071	-38.3 ± 3.7	87
TF-NP5	40	40	76.5 ± 10.0	0.087	-39.8 ± 1.7	81
TF-NP6	60	20	71.6 ± 4.1	0.037	-40.3 ± 4.4	85

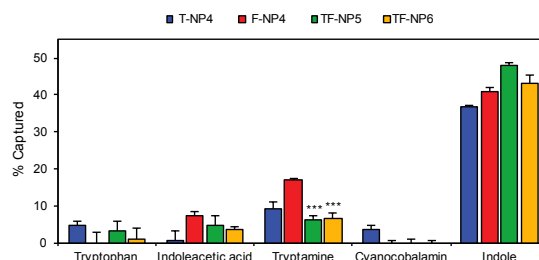


Figure 2. ナノ粒子によるインドール及びその誘導体の吸着能

Table 3. ナノ粒子を構成するモノマー組成、粒子径、PDI、表面電荷

	Monomer feed ratio (mol%)				Hydrodynamic diameter (nm)	Pdi	ζ-potential (mV)	Yield (%)
	TBAm	5FPAA	APM	AAc				
TF-NP5	40	40			76.5 ± 10.0	0.087	-39.8 ± 1.7	81
TF-NP5p	40	40	5		80.5 ± 16.6	0.11	49.3 ± 2.3	75
TF-NP5n	40	40		5	83.1 ± 4.1	0.017	-38.6 ± 1.1	70

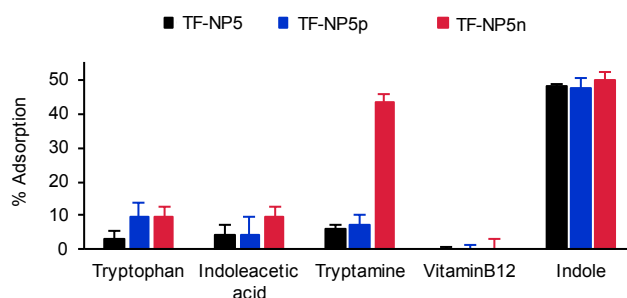


Figure 3. ナノ粒子によるインドール及びインドール誘導体の吸着能

【NPsによるインドールの腸管膜透過阻害効果】

単層膜を形成させたCaco-2細胞に、¹⁴C標識インドールとTF-NP5、TF-NP5-pもしくはTF-NP5-nを

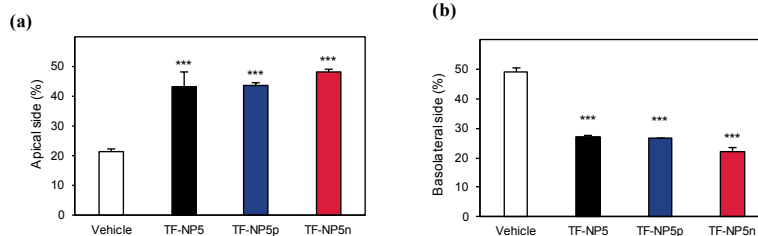


Figure 4. インビトロにおける消化管吸収試験 (a)基底外側及び(b)管腔側に存在する¹⁴C標識インドール量 Significant differences; *** (P < 0.001, Dunnett's test subsequent to ANOVA).

添加した結果、Vehicleの投与では、単層膜に添加したインドールの約20%が頂端膜側に残存しており (Figure 4b)、約50%が側底膜側から検出された (Figure 4c)。一方、NPsを投与した群では測底膜側に移行したインドールが約半分、頂端膜側に残存したインドールが約2倍に増加していた。また、NPs投与群の中ではTF-NP5-n投与群で最もその程度が高かった。以上より、ナノ粒子は、腸管からのインドール吸収を抑制できる可能性が示された。

【NPsによるインドールの吸収阻害効果】

血漿、肝臓、腎臓中の¹⁴C標識インドールの量はNPsの投与により優位に減少した。また、NPs投与群間で比較するとTF-NP5-n投与群が、僅かに¹⁴C標識インドールの蓄積率が低かった (Figure 5)。以上より、ナノ粒子はインドールを吸着することでその腸管吸収を抑制可能であることが示された。

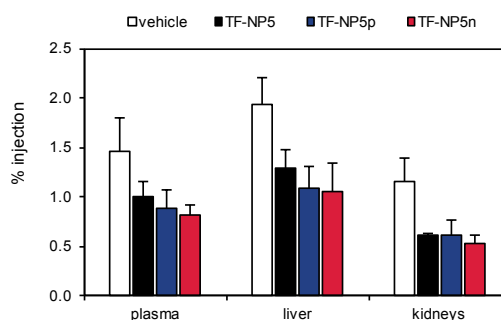


Figure 5. 放射標識インドールとナノ粒子を経口投与した後のインドールの分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1. Okishima A, **Koide H***, Hoshino Y, Egami H, Hamashima Y, Oku N, Asai T., Design of Synthetic Polymer Nanoparticles Specifically Capturing Indole, a Small Toxic Molecule. **Biomacromolecules**. 4, 1644-1654.

2. 小出裕之、奥 直人、星野 友、三浦佳子:生体内で標的高分子を吸着してその機能を中和するプラスチック抗体、月刊プラスチック、5月号、59-63 (2018)

3. 小出裕之: 標的分子を吸着してその機能を無毒化するプラスチック抗体開発、化学工業、Vol.69、42-47 (2018)

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. 沖島杏奈、小出裕之、星野 友、江上寛通、濱島義隆、奥 直人: 消化管内でインドールを吸着するポリマーナノ粒子の開発、第66回高分子討論会 (愛媛)、3Pd102、2017年9月20日

2. Anna Okishima, Hiroyuki Koide, Yu Hoshino, Hiromichi Egami, Yoshitaka Hamashima, Naoto Oku: Development of synthetic polymer nanoparticles to adsorb indole for the treatment of renal failure、2017 AAPS Annual Meeting and Exposition (サンディエゴ)、T2091、2017年11月13日

3. 沖嶋杏奈、小出裕之、星野 友、江上寛通、濱島義隆、浅井知浩、奥 直人：慢性腎臓病の進行抑制を指向したインドール吸着ポリマーナノ粒子の創製、日本薬学会第 138 年会（金沢）、28X-am07S、2018 年 3 月 28 日

4. 沖嶋杏奈、小出裕之、星野 友、江上寛通、濱島義隆、奥 直人、浅井知浩：慢性腎臓病の進行抑制に向けたインドール吸着ポリマーナノ粒子の創製、日本薬剤学会第 33 年会（静岡）、講演要旨集 p.257、2018 年 5 月 13 日

5. Anna Okishima, Hiroyuki Koide, Yu Hoshino, Naoto Oku, Tomohiro Asai: Rational design of synthetic polymer nanoparticles that specifically adsorb a toxic molecule、NANODDS 2018（ポートルランド）、p69、2018 年 9 月 22 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

出願番号：PCT/JP2018/13871

名称：インドール及びその誘導体吸着剤

発明者：小出裕之、沖嶋杏奈、星野 友、奥 直人

権利者：静岡県公立大学法人、九州大学

番号：PCT/JP2018/13871

出願年：平成 30 年 3 月 30 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~radiobio/>

6. 研究組織

研究代表者

研究分担者氏名：小出 裕之

ローマ字氏名：KOIDE HIROYUKI

所属研究機関名：静岡県立大学・

部局名：薬学部 医薬生命化学教室

職名：講師

研究者番号（8 桁）：60729177

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。