

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34311

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23812

研究課題名(和文)骨標的化高分子ミセルを利用したFGF23発現制御法の確立と腎線維症治療への展開

研究課題名(英文) Development of bone-targeting, thermal-sensitive micelles for treatment of CKD-MBD

研究代表者

山下 修吾 (Yamashita, Shugo)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：30845730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はPPAR アゴニストであるGW0742を封入した骨選択性に優れた高分子ミセル(GW-DDF)を創製し、慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常(CKD-MBD)を起因とした腎線維化症の治療戦略の構築を目指した。DDFを用いることでGW0742の骨移行率を3.5倍改善することに成功した。またCKDモデルマウスにGW-DDFを尾静脈内投与することで、CKD-MBD進行要因の1種である線維芽細胞成長因子23の分泌を未処置群と比較して最大1/7まで抑制することに成功した。本研究で得られた成果はCKD-MBDなど骨関連疾患治療を目的とした医薬品の開発に対して有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、新たな国民病と言われる慢性腎臓病を起因としたCKD-MBDなどの骨関連疾患治療を目的とした医薬品開発に対して、手がかりとなる基礎的情報を提供できると考える。特に(1)ヒトの体を形作るアミノ酸のみで構成された骨指向性薬物キャリア(DDF)開発に成功したこと(2)DDFが熱応答性を有しており骨組織での薬物放出を外部から制御できる可能性を見出したこと(3)線維芽細胞成長因子23などの骨から分泌される病態因子の分泌抑制方法を見出したことにより、骨関連疾患の治療戦略の幅を広げることで、将来的な健康寿命の延伸に貢献する一助となり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：Kidney fibrosis initiated by chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) is induced by fibrosis growth factor 23 (FGF23) secreted from the bone. However, inhibition methods of kidney fibrosis correlated CKD-MBD have not been established. In this study, we developed the kidney fibrosis therapy method by using the diblock copolypeptide between poly aspartic acid and aspartic acid/phenylalanine irregular polymer (DDF). Accumulation rate of GW0742 which is FGF23 inhibitor, encapsulated DDF (GW-DDF) was 3.5-fold higher than GW0742 only after intravenous injection in mice. In addition, FGF23 blood level was suppressed approximately 1/7 compared with untreated CKD model mice by intravenous injection of GW-DDF. These findings indicate that DDF is a promising bone-targeting polypeptide micelle for the delivery of GW0742 and suppressing of FGF23 secretion in bone.

研究分野：薬剤学

キーワード：DDS ポリペプチドミセル 熱応答性 CKD-MBD FGF23

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病に伴う骨・ミネラル代謝異常 (CKD-MBD) は腎臓の線維化に関与しており、その不可逆的な線維化は機能不全を誘発し、予後を著しく低下させることからその対策は急務である。近年、CKD-MBD の病態に骨細胞から分泌される線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) が関与することが明らかとなった。腎機能の低下により、血中リン濃度や FGF23 分泌、ネフロン数のバランスが崩壊し、過剰なリン排泄を起因とした腎線維化が惹起される。FGF23 は、リン排泄輸送体のプロモーターであることから、リン濃度のコントロールに先駆けて FGF23 分泌を制御することは、腎機能保護の観点から有用であると考えられる。そこで報告者は骨細胞へ薬物を送達可能なドラッグデリバリーシステムを活用した、直接的に骨細胞からの FGF23 分泌を抑制する方法論の開発を試みた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、PPAR δ アゴニストの GW0742 を治療薬物として、効率的な FGF23 発現制御を可能とする新規骨ターゲティングシステムを開発することで、CKD-MBD に起因する腎線維化に対する新規治療法を構築することを目的とした。

(2) 代表的な骨標的素子としてアスパラギン酸オリゴマーが挙げられるが、アスパラギン酸ポリペプチドは熱応答性を有することが報告されている。そこで本研究では骨指向性ならびに熱応答性が期待できるポリアスパラギン酸を被覆殻とした、多機能性ポリペプチドミセルを開発することで「本研究の目的-(1)」の達成を試みた。

3. 研究の方法

(1) GW0742 の骨送達キャリアとして、親水性ポリマーに骨指向性を有するポリアスパラギン酸を、疎水性ポリマーにアスパラギン酸とフェニルアラニンの不規則性ポリペプチドを重合した、骨標的型アスパラギン酸-フェニルアラニンコポリペプチドミセル (DDF) を設計した。この DDF へ GW0742 を溶媒希釈法にて封入し GW0742 封入 DDF (GW-DDF) を作製した。GW-DDF の温度依存的な GW0742 放出性を評価するとともに、GW-DDF をマウス尾静脈から投与した後の GW0742 の体内動態を LC/MS/MS にて評価した。

(2) リン-アデニン給餌にて作製した CKD モデルマウスに、最適化された GW-DDF を尾静脈内投与した後の血中 FGF23 濃度を ELISA にて定量することで、血中 FGF23 濃度の時間的変化を算出した。

4. 研究成果

(1) 合成で得られた DDF 1 長鎖あたりの分子量を示唆屈折率検出器にて測定したところ約 12,000 を示した。ピレンを用いた蛍光プローブ法および原子間力顕微鏡を用いた携帯観察の結果、DDF は 1 $\mu\text{g/mL}$ の臨界ミセル濃度を有し、球状の自己集合体を形成した。動的光散乱法の結果よりミセル 1 粒子あたりの見かけの分子量は 1×10^7 を示し、分散溶媒温度を変化させた際の DDF の粒子径を同じく動的光散乱法にて評価したところ、DDF の温度依存的な粒子径の変動が観察された。また、その変動は可逆性を示した。

(2) DDF に GW0742 を封入した GW-DDF の粒子径は 40 nm、GW0742 の封入効率は 70% を示した。GW-DDF からの熱応答的な GW0742 の薬物放出性を観察したところ、昇温時に GW0742 の放出速度が増大し、降温時に GW0742 の更なる放出速度の増大が観察された。GW-DDF の GW0742 放出機構について明らかにするため、温度変化時の DDF の CD スペクトルを取得したところ、臨海ミセル濃度以上の存在下において、室温条件でターン型を示した DDF が昇温時にランダムコイル型へ変化することが明らかとなった。以上のことから、DDF は熱応答的に高次構造を変化させることで、封入薬物を放出可能であることが示唆された。

(3) 立体配置の異なるアミノ酸で構成された GW-DDF のマウス尾静脈内投与後 24 時間における血中・右下肢骨・肝臓の濃度-時間推移を評価した。全ての GW-DDF 類似体は投与後 60 分ほどで投与量の半分が血中から消失し、肝臓への移行は立体配置の違いに関わらず 30 分から 60 分でピークを迎えた。一方、右下肢骨への移行について GW-DDF 類似体の骨濃度 (C_{max}) は 70 ng/g tissue を示したものの、D 体で構成された GW-DDF (GW-D-DDF) の骨移行時間 (t_{max}) が 10 分であったのに対し、L 体で構成された GW-DDF (GW-L-DDF) は 60 分に t_{max} を示したことから DDF を構成するアミノ酸の立体配置の違いによる t_{max} の変化が観察された。得られたデータを基に GW-DDF の PK パラメータを算出した。GW-DDF の骨移行速度の指標である骨取り込みクリアランス値 (CL_{bone}) は GW-D-DDF が高値を示し、GW-L-DDF の CL_{bone} は GW-D-DDF のそれと比較して 1/4 の低値であったものの、右下肢

骨における **GW0742** 滞留性の指標である骨中 **AUC** は **GW-L-DDF** が高値を示した。以上の結果より、**GW0742** の **C_{max}** ならびに骨中 **AUC** を改善可能な **GW-L-DDF** は **GW0742** の骨送達による **FGF23** 分泌抑制の達成が期待できるポリペプチドミセルと考えられる。

(4) 下肢骨へ分布した **GW-DDF** が骨細胞へ分布しているか評価するため、**FITC** 標識を施した **GW-DDF** をマウスに投与し作製した下肢骨切片内の骨細胞を蛍光免疫染色し、**GW-DDF** と骨細胞の局在性を評価した。画像は骨基質に包埋された骨細胞を **Texas Red-X phalloidin** にて染色した結果を示した (図 1)。観察の結果、**FITC** 由来の緑色蛍光ならびに **Texas Red** 由来の赤色蛍光から突起状の蛍光シグナルが観察された。骨細胞は樹状突起の発達した細胞構造を有しており、骨細管と呼ばれる骨基質内の微細トンネル構造を介して骨細胞同士が細胞間ネットワークを形成している。矢印で示すような、緑色蛍光と赤色蛍光が共局在した突起状のシグナルは **GW-DDF** の骨細管への分布を示唆しており、**DDF** は骨細管ネットワークを介して骨基質深部の骨細胞まで運搬可能であることが示唆された。

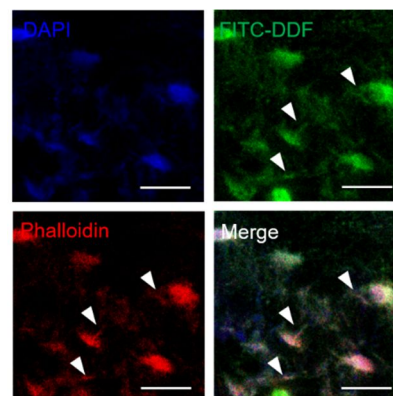


図 1 **GW-DDF** の骨内分布
Scale bar, 20 μ m

(5) 最後に **GW-DDF** の有用性を評価するべく、**CKD** モデルマウスを用いて血中 **FGF** 濃度を指標に評価致した。**CKD** モデルマウスは **C57BL/6** マウスに **0.2%** アデニンならびに **0.8%** 無機リンを含有する飼料を与え、**2** 週間以上飼育することで作製した。作製した **CKD** モデルマウスに **GW-DDF** を尾静脈より投与し、投与後 **30** 分で **45** の温浴にてマウス下肢骨を **10** 分間温めた。その後、経時的に尾静脈より採血し、血中 **FGF23** 濃度を **ELISA** にて定量することで、血中 **FGF** 濃度の時間的変化を算出した。**GW-DDF** 加温併用群において、投与後 **6** 時間で **FGF** 濃度は **600 pg/mL** を示し、投与前と比較して **FGF23** の分泌を **1/5** まで抑制した。また、この有意な分泌抑制は投与後 **24** 時間目まで確認された (図 2)。しかしながら **GW-DDF** を **2** 回/週で **4** 週間投与した場合、すべての群において有意な差は認められず、**GW-DDF** 加温処置による長期的な **FGF23** 分泌抑制効果は確認されなかった。またマッソントリクローム染色にて腎組織中の膠原繊維量を評価したが、こちらもすべての群において有意な差は認められなかった。一方で **4** 週間の血中リン濃度を評価したところ、**GW-DDF** 加温処置群のみ **1** 週目と比較した **4** 週目における血中リン濃度の上昇が認められた。すなわち、**GW-DDF** 加温処置により骨細胞からの **FGF23** 分泌抑制が達成されたものの、期待していた過剰リン排泄を是正することによる腎機能保護は認められず、リン排泄を遅延することによる血中リン濃度の上昇が引き起こされたと考えられる。以上、本研究では **DDF** を用いた **GW0742** の骨細胞送達により **FGF23** 分泌を制御することに成功したが、腎線維化の抑制は達成できなかった。しかしながら、**FGF23** 分泌制御だけでなく、リン摂取を制御することで腎線維化の抑制が期待できる示唆に富んだ知見が得られたと考えられる。

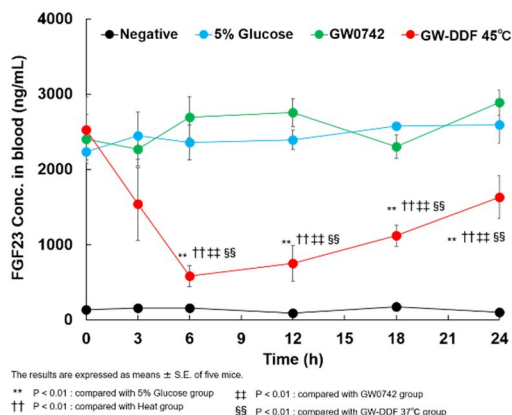


図 2 血中 **FGF23** 濃度-時間推移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shugo Yamashita, Hidemasa Katsumi, Erika Shimizu, Yuto Nakao, Ayane Yoshioka, Minako Fukui, Hiroyuki Kimura, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto	4. 巻 157
2. 論文標題 Dendrimer-based micelles with highly potent targeting to sites of active bone turnover for the treatment of bone metastasis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	6. 最初と最後の頁 85-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejpb.2020.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下修吾、勝見英正、木村峻輔、喜里山暁子
2. 発表標題 慢性腎臓病に伴う-骨ミネラル代謝異常治療を目的とした温熱感受性骨ターゲティング型ミセルの開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------