

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800004

研究課題名（和文） 酸化ストレス障害のイメージングと治療を可能とするラジカル含有ナノ粒子の創製

研究課題名（英文） Development of radical-containing nanoparticle for therapy and imaging of oxidative stress injuries

研究代表者

吉富 徹 (YOSHITOMI TORU)

筑波大学・数理物質系・研究員

研究者番号：20585799

研究成果の概要（和文）：

pH応答型抗酸化ニトロキシドラジカル含有ナノ粒子を用いた腎臓虚血再灌流障害の治療は、粒子形成により低分子薬の副作用・毒性を低減するだけでなく、虚血部位のpH低下に反応して粒子崩壊することで活性酸素種を消去し、高い治療効果を示すことが明らかとなった。このように疾病環境で特異的に崩壊するインテリジェントナノ粒子は、新しい酸化ストレス疾患に対する治療薬として期待される。

研究成果の概要（英文）：

We have developed pH-sensitive nitroxide radical-containing nanoparticles (RNP^N) prepared by a self-assembling amphiphilic block copolymers (PEG-*b*-PMNT; poly(ethylene glycol)-*b*-poly[4-(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl)aminomethylstyrene]). This self-assembled RNP^N disintegrates at pH below 7.0 because of a protonation of amino groups in the hydrophobic segment of the PEG-*b*-PMNT, thereby resulting in an improvement in ROS scavenging activity. Using a renal ischemia-reperfusion induced acute kidney injury model in mice, the protective effect of RNP^N was evaluated. The formation of polymeric micelle in bloodstream and disintegration of RNP^N in injured kidney area were confirmed by electron spin resonance spectra. Due to these characters, the RNP^N showed extremely high ROS scavenging activity and renal protective effect, compared to low molecular weight nitroxide radical derivatives. It is interesting to note that the side effect of nitroxide radicals was markedly suppressed due to the compartmentalization of nitroxide radicals in the core of RNP^N in untargeted area. On the basis of these results, this system is expected as a new medication for therapy of various oxidative stress injuries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：酸化ストレス障害、ドラッグデリバリーシステム、高分子ミセル

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレス障害は、動脈硬化や糖尿病、虚血再灌流障害だけでなく、パーキンソン病やアルツハイマー病などの要因の一つとして考えられている。そこで近年、この酸化ストレス障害を画像化するためのイメージングプローブや治療薬に大きな注目が集まっている。特に、活性酸素と反応することで蛍光シグナルが ON となる蛍光色素が開発され注目を集めているが、実際に大動物やヒトの深部まで非侵襲的にイメージングすることは、自家蛍光や光の透過性の問題があるため困難である。また治療薬として、これまでに水溶性抗酸化剤のアスコルビン酸(ビタミン C)・グルタチオンや脂溶性抗酸化剤のトコフェノール(ビタミン E)、また活性酸素消去作用をもつ薬剤としてセレン含有化合物であるエブセレンなど様々な化合物について検討されてきたが、水溶性抗酸化剤の場合、腎からの急速な排泄が問題となり、また脂溶性抗酸化剤の場合、水溶液に対する溶解性が低く、実際に血液中への投与が困難である。2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド(TEMPO)などのニトロキシラジカルは、ROS と効率的に反応し消去するだけでなく、電子磁気共鳴イメージング(EPR)や磁気共鳴イメージング(MRI)の造影剤としても機能する。しかしながら、従来用いられてきた低分子ニトロキシラジカルは、腎臓での濾過作用により、ほとんどのプローブが体外に急速に排泄されてしまうだけでなく、投与後急激な血圧低下が生じるといった問題点を有している。そこで、我々は、このニトロキシラジカルをナノ粒子に封入することによって、この低分子ニトロキシラジカルプローブの問題点を解決し、さらに生体内の酸性環境で崩壊するナノ粒子の設計・開発を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究は、酸化ストレス障害の診断と治療を行うナノデバイスの開発を目的として行った。我々は、ニトロキシラジカル含有コア-シェル型ナノ粒子(RNP)を設計し、生体内で発生する ROS を非侵襲的にイメージングし、さらに脳・心臓や腎臓等の虚血再灌流疾患やアルツハイマー病などの酸化ストレス障害に対する新しい治療薬の創製を目指した。

3. 研究の方法

1) ニトロキシラジカル含有ナノ粒子(RNP)の合成

RNPは、我々独自のルートで作製したPEG

とポリクロロメチルスチレンブロック共重合体 に 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl(amino-TEMPO)を導入することにより得られるブロック共重合体 (PEG-b-PCTEMPO) を水中で自己組織化することで作製した。

2) 虚血性腎臓疾患のための治療薬の開発
ICR マウス(麻酔下)の一方の腎臓を摘出し、もう一方の腎動脈・静脈をクリップで留めることにより虚血を行い、一定時間後クリップを解除することで再灌流を行った。再灌流から5分後、低分子の TEMPO 誘導体と RNP を投与した。腎臓の機能障害は、血漿中クレアチニンと血漿中尿素窒素を測定し、腎臓保護効果の評価を行った。さらに酸化ストレスマーカーの評価を行った。

4. 研究成果

親水性で生体適合性の高いポリエチレングリコール(PEG)とポリクロロメチルスチレン誘導体のブロック共重合体を博士後期課程在学中に新規に合成し、疎水性セグメント側鎖に 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド(TEMPO)残基をエーテルおよびアミノ基を介して結合させた二つのレドックスポリマーを合成した(図1参照)。

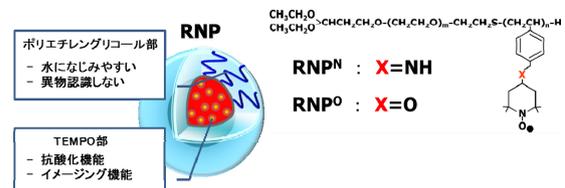


図1 ラジカル含有ナノ粒子(RNP)の構造

このブロック共重合体は水中で自己組織化して40nm程度のコア-シェル型ナノ粒子を形成する。特にアミノ基を介してニトロキシドラジカルを導入したニトロキシドラジカル含有ナノ粒子(RNP^Nと略記)はpH低下にともなうアミノ基のプロトン化により粒子が崩壊することを確認した。一方、エーテル結合型(RNP^Oと略記)ではpHに関わらず粒子の形状を保持することが確認された。この2種類のRNPはニトロキシドラジカルをナノ粒子コア内に封入しているため、安全で、特にニトロキシドラジカル特有のアポトーシスの誘導や血圧低下を誘引しない(図2参照)。またその毒性は極めて低いことも細胞毒性試験、ICRマウスを用いた急性毒性試験を用いて確認している。

さらに、このRNPはESRやMRのプローブとして機能するため、体内動態を標識化す

ることなく測定することができる。図 3 に、RNP 静脈投与後採血を行い、ESR 法により RNP 薬物濃度を測定した結果を示す。低分子 TEMPO 誘導体は、静脈投与後急速に腎排泄されてしまうので、血中半減期が短い (hydroxy-TEMPO の血中半減期; 15 秒)。一方、RNP^N と RNP^O は、血中半減期が 15 分、60 分であり、低分子の TEMPO 誘導体に比べて、60 倍、240 倍血中滞留性を向上した。また RNP の疎水性コアに存在する TEMPO ラジカルは、T1 緩和能を有しており、MRI による非侵襲的生体内の画像化が可能である。RNP^N を担癌マウスの尾静脈から投与して、MRI 画像を撮像したところ、癌組織周辺に RNP が EPR 効果 (Enhanced Permeation and Retention Effect) により集積することが確認された (図 4)。

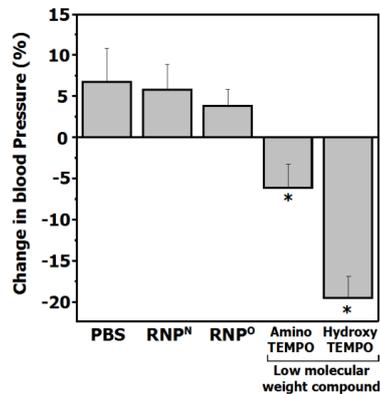


図 2. RNP^N および RNP^O を投与した後の血圧変動

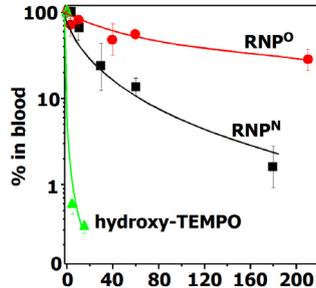


図 3. RNP^N と RNP^O の血中滞留性

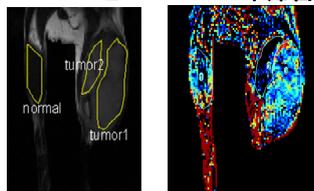


図 4 RNP^N を静脈注射後の担癌マウスの T1 強調画像:左足腫瘍部位に強い MR 信号が確認される。

虚血再灌流障害に対する RNP の効果

脳梗塞や心筋梗塞など血流が停止した後に再灌流を行うと、大量の ROS が発生し、これが再灌流後にダメージを広げることが知られている。高齢化に伴い腎臓は移植や腎炎、ネフローゼなどにおいて頻繁に虚血-再灌流障害の影響を受ける。申請者は、博士取得後、

腎虚血-再灌流モデルマウスを作製し、RNP の治療効果を評価した(研究業績論文 6)。

まず RNP のニトロキシドラジカルを ESR により解析した。図 5 に示すように RNP^N および RNP^O とともに血中においては幅広い一本のシグナルがみられ、これは固体中に閉じ込められて運動性の低下したニトロキシドラジカルのスペクトルを示している。このスペクトルは血中での粒子の形成を意味している。一方で虚血-再灌流後の腎臓内における ESR スペクトルは RNP^O では血中と同様ブロードなスペクトルを示すのに対し、RNP^N では鋭い三本線を示している。これは虚血-再灌流に伴う解糖系の亢進により pH が低下し、RNP^N の崩壊がおり、ニトロキシドラジカルが露出したことを示す結果である。このように pH 低下に伴い崩壊するナノ粒子 RNP^N のスイッチングが、実際の虚血-再灌流腎において起こっていることが証明された。さらに、図 5e に腎臓-虚血再灌流モデルに対する RNP の効果を示す。虚血再灌流後 RNP を投与することにより、マウス血漿中のクレアチニン(Cr)や血漿中尿素窒素(BUN)は、優位に低下し、低分子アミノ-TEMPO やヒドロキシ-TEMPO に比べても高い治療効果を示すことが明らかとなった。特に pH 崩壊型の RNP^N は RNP^O に比較しても高い効果を示すことが確認された。このように梗塞-再灌流障害に対する RNP のきわめて

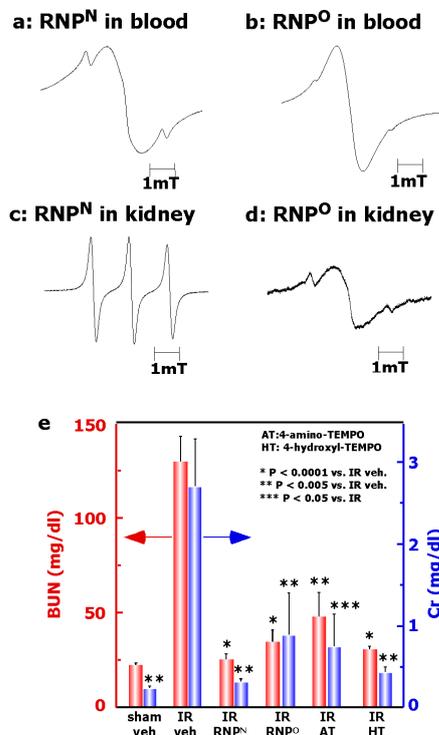


図 5. 腎供血再灌流マウス血中および腎臓中の RNP^N および RNP^O の ESR スペクトル(a~d) および BUN およびクレアチン量(e)AT: アミノ-TMEPO. HT: ヒドロキシ-TEMPO

高い効果を有するだけでなく、他には潰瘍性大腸炎やアルツハイマー、脳出血など様々な酸化ストレス疾患に対して治療効果を示すことが明らかとなっており、これまでになかった革新的治療薬として期待される。

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 11 件)

- 1) Pennapa Chonpathompikunlert, Ching-Hsiang Fan, Yuki Ozaki, Toru Yoshitomi, Chih-Kuang Yeh, Yukio Nagasaki: Redox Nanoparticle Treatment Protects Against Neurological Deficit in Focused Ultrasound-Induced Intracerebral Hemorrhage, *Nanomedicine*, 査読有, in press (2012). doi: 10.2217/nnm.12.2
- 2) Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki: Design and preparation of a nanoprobe for imaging inflammation sites, *Biointerphase*, 査読有, 7,7 (2012) doi: 10.1007/s13758-011-0007-5
- 3) Toru Yoshitomi, Yu Yamaguchi, Akihiko Kikuchi, Yukio Nagasaki: Creation of a blood-compatible surface: a novel strategy for suppressing blood activation and coagulation using nitroxide radical-containing polymer with reactive oxygen species scavenging activity, *Acta Biomaterialia*, 査読有, 8, pp1323-1329 (2012)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.029>
- 4) Kazuko Toh, Toru Yoshitomi, Yutaka Ikeda, and Yukio Nagasaki: Novel redox nanomedicine improves gene expression of polyion complex vector, *Science and Technology of Advanced Materials*, 査読有, 12, pp065001-1-065001-5 (2011) doi:10.1088/1468-6996/12/6/065001
- 5) Chonpathompikunlert Pennapa, Toru Yoshitomi, Han Junkyu, Hiroko Isoda, Yukio Nagasaki: The Use of Nitroxide Radical-containing Nanoparticles Coupled with Piperine to Protect Neuroblastoma SH-SY5Y cells from A β -Induced Oxidative Stress, *Biomaterials*, 査読有, 32, pp8605-8612 (2011)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.024>
- 6) Toru Yoshitomi, Aki Hirayama, Yukio Nagasaki: The ROS scavenging and renal protective effects of pH-responsive nitroxide radical-containing nanoparticles, *Biomaterials*, 査読有, 32, pp8021-8028 (2011)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.014>
- 7) Pennapa Chonpathompikunlert, Toru Yoshitomi, Junkyu Han, Kazuko Toh, Hiroko Isoda, Yukio Nagasaki: Chemical Nanotherapy-Nitroxyl Radical-containing Nanoparticle (RNP) Protects Neuroblastoma SH-SY5Y cells from A β -induced Oxidative Stress, *Therapeutic Delivery*, 査読有, 2, pp585-597 (2011) doi:10.4155/tde.11.27
- 8) Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki: Nitroxyl radical-containing nanoparticles for novel nanomedicine against oxidative stress injury, *Nanomedicine*, 査読有, 6, pp509-518 (2011) doi:10.2217/nnm.11.13
- 9) Aiki Marushima, Kensuke Suzuki, Yukio Nagasaki, Toru Yoshitomi, Kazuko Toh, Hideo Tsurushima, Aki Hirayama, Akira Matsumura: Newly Synthesized Radical-containing Nanoparticles (RNP) Enhance Neuroprotection after Cerebral Ischemia-reperfusion Injury, *Neurosurgery*, 査読有, 68, pp1418-1426 (2011) doi: 10.1227/NEU.0b013e31820c02d9
- 10) 丸島 愛樹, 鈴木 謙介, 長崎 幸夫, 吉富 徹, 藤 加珠子, 鶴嶋 英夫, 平山 暁, 松村 明: 脳虚血再灌流における酸化ストレス障害と脳保護療法-pH 応答性ラジカル含有ナノ粒子 (radical-containing nanoparticle: RNP)の可能性, 脳卒中, 査読有, 32, pp552-558 (2010)
<http://dx.doi.org/10.3995/jstroke.32.552>
- 11) Yutaka Ikeda, Rie Suzuki, Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki: Novel Oligonucleotide Carrier as Scavenger for Reactive Oxygen Species, *Macromol. Biosci*. 査読有, 11, pp344-351 (2011) DOI: 10.1002/mabi.201000305

[学会発表] (計 69 件)

- ① Toru Yoshitomi, Aki Hirayama, Yukio Nagasaki: Nanotherapy of Renal Ischemia-reperfusion Injury by pH-Sensitive Redox Nanoparticle, The 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society 2011, Gaylord National Hotel and Convention Center, Maryland, U.S.A. 2011年8月3日
- ② 吉富徹, 平山暁, 長崎幸夫: レドックス反応性ナノ粒子による腎虚血再灌流障害の治療, 第64回日本酸化ストレス学会, 北海道ルスツリゾートホテル&コンベンション, 2011年7月2日

[図書] (計 2 件)

- ① 吉富徹、長崎幸夫: Design of pH-Triggered Nanotherapy for Ischemia-Reperfusion Injury、

『高分子』Hot Topics、高分子学会、60 巻
7月号、pp63, 2011

- ② 吉富徹、長崎幸夫：ニトロキシラジカル含有コアシェル型ナノ粒子の作製と機能、コアシェル微粒子の設計・合成技術・応用の展開、シーエムシー出版、総ページ数 10 ページ、pp237-246、2010

[その他]

ホームページ等

http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_lab/index.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉富 徹 (YOSHITOMI TORU)

筑波大学・数理物質系・研究員

研究者番号：20585799