

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790058

研究課題名(和文) 標的化リポソームによる肝レドックスの非侵襲的測定法の開発

研究課題名(英文) The development of the non-invasive redox measurement technique with liver-targeting liposomes.

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の酸化還元(レドックス)変化は様々な疾患との関係が示唆されており、生体計測用ESRを用いた生体内レドックスのより正確な測定法の開発は重要である。そこで、レドックス測定用プローブの組織標的化および体内貯留性を高めるために、プローブのリポソーム化を目指してレドックス測定用プローブで標識したリン脂質を合成した。このリン脂質を用いてレドックスプローブで標識されたリポソームを作成し、本リポソームが活性酸素に反応することを示した。

研究成果の概要(英文)：In vivo redox status are involved in the various diseases. In vivo electron spin resonance (ESR) spectroscopy is a very useful technique for the measurement of in vivo redox status. The extension of half-life in the body and the tissue targeting of redox probes for in vivo ESR are important for developing the more precise in vivo redox measurement. Therefore, the purpose of this study is to make the liver-targeting liposomes labeled by redox probes.

The redox probe-conjugated phospholipids (DMPE-PROXYL) were synthesized. The liposome including the DMPE-PROXYL gave the ESR signal in vitro. The ESR signal of this liposome decreased by the reaction with hydroxyl radical, but did not decreased by ascorbic acid or liver homogenate. This suggests that the oxidative stress can be detected by the liposome including the DMPE-PROXYL.

研究分野：生物物理

キーワード：ニトロキシルラジカル リポソーム 電子スピン共鳴 酸化ストレス レドックス

1. 研究開始当初の背景

生体内の酸化還元(レドックス)バランスの変化は様々な疾患との関連が示唆されている。それらの報告の多くは、過酸化した脂質や蛋白質の増加などを測定することで生体内における活性酸素の過剰生成によるレドックスバランスの変化を評価している。しかし、それらは活性酸素が反応した結果であると推測されるにすぎず、それだけで酸化ストレスと病態との因果関係を断定することは難しい。

生きている動物体内でのレドックスバランスの変化を測定する方法として、生体計測用電子スピン共鳴(ESR)法がある。生体計測用 ESR 法によるレドックス測定ではプローブとしてニトロキシラジカルが用いられる。ニトロキシラジカルの生体内におけるレドックス平衡は生体内で産生される活性酸素による酸化やアスコルビン酸や還元酵素群による還元依存している。動物へのニトロキシラジカルの投与後に非侵襲的に測定されたニトロキシラジカルの ESR シグナル強度変化から、生体内におけるニトロキシラジカルのレドックス平衡が酸化と還元のどちらに傾いているのかを知ることができるため、これを指標に生体内のレドックスバランスの評価を行う。このように、生体計測 ESR 法は生きている動物における体内のレドックスバランスの変化をリアルタイムで測定でき、疾患との関係の解明に非常に有用な測定法である。従来の生体計測用 ESR 法で汎用されているニトロキシラジカルは分子量が小さく、迅速に尿中に排泄されるため、動物への投与後の体内半減期が短い。このため、腎機能が変化するような疾患では健康な動物と病態モデル動物で体内のプローブ量に大きな差がでてしまい、正確なレドックス測定は困難である。また、全身に分布するため、特定の臓器におけるレドックス変化を測定するためには目的の臓器を体外に露出させるなどの外科的な処置が必要になる。従って、プローブの体内貯留時間を延長させることや、特定臓器への標的化を行うことは、生体計測 ESR 法の適用範囲を広げ、より詳細かつ正確なレドックス評価を達成するために重要であると考えられる。

リポソームの特定臓器への標的化の代表例として、肝指向性リポソームが知られている。肝実質細胞表面にはアシアロ糖蛋白質受容体が存在し、ガラクトースで修飾されたリポソームはこの受容体に認識され、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。これを利用することで、リポソームを肝実質細胞に集積させることができる。

2. 研究の目的

肝臓におけるレドックスバランス変化と肝障害との関係解明を目指して、肝レドックスの非侵襲的な測定のために、ニトロキシラ

ジカル標識化肝実質細胞指向性リポソームを開発する。

3. 研究の方法

(1) DMPE-PROXYL の合成

クロロホルム中でジメチルアミノピリジン存在下ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を用いて 3-Carboxy-PROXYL (CXP) とジミリストイルホスファチジルエタノールアミン(DMPE)をアミド結合により結合させた。その後カラムクロマトグラフィーにより精製し、DMPE に CXP が結合した DMPE-PROXYL を得た。

(2) リポソーム懸濁液の調製

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留去し脂質膜を作成した。デシケーター中で1晩乾燥後 HEPES 緩衝液を加えて 37 °C で加温し、リポソーム懸濁液を調製した。

4. 研究成果

リポソーム中にニトロキシラジカルを封入する方法でリポソームを標識すると、ニトロキシラジカル間のスピン-スピン相互作用により ESR シグナル強度が減弱し、測定が困難になることが予想されたため、リン脂質をニトロキシラジカルで標識することを考えた。研究開始当初は Hydroxymethyl-PROXYL とジミリストイルホスファチジン酸を 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonylchloride 存在下で結合させる方法や CXP を N-hydroxysuccinimide により活性化後に DMPE と結合させる方法を試みたが、どちらの反応もほとんど進行せず、リポソーム調製に必要な量のニトロキシラジカル標識化リン脂質を得るには至らなかった。そこで、DCC を用いて CXP と DMPE を直接反応させる方法により CXP と DMPE を結合させた DMPE-PROXYL を得た。

DMPE-PROXYL と未反応の DMPE をカラムクロマトグラフィーで分離することが困難だったため、カラム精製後に得られた生成物中のリン含有量とニトロキシラジカル含有量を測定し、DMPE と CXP の結合率を算出したところ、DMPE の 89.5% に CXP が結合しており、得られた生成物のほとんどが DMPE-PROXYL であることがわかった。得られた DMPE-PROXYL のクロロホルム/メタノール溶液は CXP と同様に 3 本に分裂した ESR スペクトルを与えた。そこで、DMPE-PROXYL を含むリポソームを調製し、その ESR スペクトルを測定したところ、クロロホルム/メタノール溶液中に比べて線幅がやや広がり、高磁場側のシグナルが顕著に小さくなったスペクトルが得られた。これはニトロキシラジカルの分子サイズが大きくなり回転運動が制限された際に見られ

る特徴的な形であることから、DMPE-PROXYL がリポソーム膜によって回転が制限されていることがわかった。

ニトロキシルラジカルは MRI の造影剤としても機能することが知られている。そこで、DMPE-PROXYL リポソームの懸濁液と、CXP と未標識リポソームの懸濁液について MRI 撮像を行ったところ、Hepes 緩衝液に比べて懸濁液全体の輝度が高くなった。この懸濁液を遠心し、リポソームを沈殿させると CXP と未標識リポソームの懸濁液はマイクロチューブ全体の輝度が高いままであったが、DMPE-PROXYL リポソームは沈殿の輝度が顕著に高くなり、DMPE-PROXYL がリポソームと共に沈殿していることがわかった。また、遠心後の上清の ESR 測定を行い、遠心前のシグナル強度に対する遠心後のシグナル強度の割合から上清中のニトロキシルラジカル残存率を算出した。CXP と未標識リポソームの懸濁液の場合は遠心後も上清中に 98% の CXP が残っていたのに対して DMPE-PROXYL リポソームの懸濁液の場合は上清中の残存率は 48% だった。さらに、上清中の DMPE-PROXYL の ESR スペクトルの形状が膜によって回転が制限された際の特徴的なスペクトルだったことから、上清に残っていた DMPE-PROXYL もリポソームから遊離したわけではなく、リポソームの粒子径が小さいために遠心で沈殿せずに残ったものであることが示唆された。以上のことから、DMPE-PROXYL は CXP と同様に MRI 造影剤として機能すること、リポソームが DMPE-PROXYL によって標識されていることが示された。

DMPE-PROXYL の合成に使用した PROXYL 型のニトロキシルラジカルはアスコルビン酸などによる還元反応にはある程度耐性を持つ。一方でヒドロキシルラジカルによって酸化されて ESR シグナルを失うため、酸化ストレスを検出することができる。DMPE-PROXYL がリポソームの状態、この能力を保持していることを調べるため、DMPE-PROXYL リポソームの還元反応あるいは酸化反応に対する応答性を検討した。その結果、アスコルビン酸やマウス肝ホモジネートと混和しても DMPE-PROXYL リポソームの ESR シグナルはほとんど変化しなかったのに対して、ヒドロキシルラジカルとの反応では ESR シグナルが減弱した。このことから、DMPE-PROXYL リポソームが酸化ストレス評価に利用できることが示唆された。今後、ガラクトース修飾脂質と DMPE-PROXYL を含むリポソームを作成することで肝レドックスの非侵襲的な測定につながるものと期待される。

本リポソームの病態モデルへの応用には敗血症モデルを想定している。また、レドックスバランスを評価するためにはプローブにアシル保護を施すなどの工夫が必要となる。そこで、従来の低分子量のプローブにア

シル保護を施したプローブ前駆体を利用した敗血症モデルマウスのレドックス評価について検討し、論文として発表した。また、ラジカル反応がリポソーム膜に及ぼす影響を検討し、学会発表を行った。

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 1 件)

Shoko Okazaki, Yoko Tachibana, Yukari Koga-Ogawa and Keizo Takeshita, Redox evaluation in sepsis model mice by the *in vivo* ESR technique using acyl-protected hydroxylamine, *Free Radical Biology and Medicine*, 68 (2014), 72~79, 査読あり、DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.011

[学会発表](計 11 件)

岡崎祥子、ケトプロフェンが紫外線照射により惹起するリポソーム膜内のラジカル反応と膜の崩壊現象、第31回日本薬学会九州支部大会、2014年12月6日~2014年12月7日、第一薬科大学(福岡県・福岡市)

Shoko Okazaki, Radical reaction induced by UV-irradiated ketopropofen in liposomal membranes, APES-IES-SEST2014, 2014年11月12日~2014年11月16日、東大寺文化センター・奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

岡崎祥子、紫外線照射により抗炎症剤ケトプロフェンが引き起こすリポソーム膜内のラジカル反応と膜に及ぼす影響、第67回日本薬学会九州支部大会酸化ストレス学会学術集会、2014年9月4日~2014年9月5日、同志社大学今出川キャンパス(京都府・京都市)

岡崎祥子、抗炎症剤ケトプロフェンへの紫外線照射により引き起こされるラジカル反応のリポソーム膜における検討、第30回日本薬学会九州支部大会、2013年12月7日~2013年12月8日、長崎国際大学(長崎県・佐世保市)

岡崎祥子、非ステロイド性抗炎症剤ケトプロフェンが紫外線照射により引き起こすリポソーム膜内のラジカル反応と膜に及ぼす影響、第52回電子スピンスイエンズ学会、2013年10月24日~2013年10月26日、大宮ソニックシティ(埼玉県・大宮市)

岡崎祥子、アシル保護ヒドロキシルアミンを用いた *in vivo* ESR法による生体内レドックス測定-敗血症モデルマウスにおける検討、フォーラム2013衛生薬学・環境トキシコロジー、2013年9月13日~2013

年9月14日、九州大学医学部百年講堂（福岡県・福岡市）

岡崎祥子、紫外線照射によりケトプロフェンが引き起こすリポソーム膜内のラジカル反応と膜への影響、第17回ESRフォーラム研究会、2013年7月19日、九州大学医学部百年講堂（福岡県・福岡市）

岡崎祥子、非ステロイド性抗炎症剤ケトプロフェンが紫外線照射により引き起こすリポソーム膜内のラジカル反応、第66回酸化ストレス学会学術集会、2013年6月13日~2013年6月14日、名古屋市ウインクあいち（愛知県・名古屋市）

岡崎祥子、紫外線照射によりケトプロフェンが引き起こすリポソーム膜内のラジカル反応、日本薬学会第133年会、2013年3月28日~2013年3月30日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

岡崎祥子、非ステロイド性抗炎症剤ケトプロフェンへのUV照射によるリポソーム膜内でのラジカル反応の惹起、第51回電子スピンサイエンス学会、2012年11月1日~2012年11月3日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

岡崎祥子、アシル保護ESRプローブを用いた*in vivo* ESR法による生体内レドックス測定-敗血症モデルマウスにおける検討、第25回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2012年8月8日~2012年8月10日、慶応義塾大学芝共立キャンパス（東京都・港区）

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