

高分子型硫化水素プロドラッグの開発と
その体内動態制御に関する研究

2018

博士学位論文

堺 香輔

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Kosuke Sakai, Hidemasa Katsumi, Mayu Sugiura, Ayaka Tamba, Kentaro Kamano, Kiyoko Yamauchi, Yosui Tamura, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. Pharmacokinetics and preventive effects of Sulfo-albumin as a novel macromolecular hydrogen sulfide prodrug on carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *J. Pharm. Sci.* **2018**, *107*, 2686-2693. [第 1 章]
- 2) Kosuke Sakai, Hidemasa Katsumi, Kentaro Kamano, Kiyoko Yamauchi, Ayuko Hajima, Masaki Morishita, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. Hepatic and intrahepatic targeting of hydrogen sulfide prodrug by bioconjugation. *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 273-279. [第 2 章]

目次

略語一覧.....	1
総論の部.....	3
緒言.....	3
第 I 章 アルブミンを利用した高分子型硫化水素プロドラッグ (スルフォアルブミン) の開発	5
I-1 スルフォアルブミンの合成と物理化学的性質の評価.....	6
1-a スルフォアルブミンの合成.....	6
1-b スルフォアルブミンの物理化学的性質.....	7
I-2 スルフォアルブミンの体内動態.....	8
2-a 各種スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態.....	8
2-b Sulfo (30)-BSA の肝臓内分布.....	11
2-c Sulfo (30)-BSA の肝移行阻害実験.....	12
I-3 スルフォアルブミンの硫化水素放出能の評価.....	13
3-a GSH 中における硫化水素放出能の評価.....	13
3-b 細胞懸濁液、血漿中における硫化水素放出能の評価.....	15
I-4 スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価.....	16
4-a スルフォアルブミンの細胞内取り込み能の評価.....	16
4-b スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価.....	17
I-5 スルフォアルブミンの肝障害抑制効果.....	18
5-a 四塩化炭素誘発性肝障害モデルマウスにおける血漿中トランスアミナーゼ活性の評価	18
5-b 四塩化炭素誘発性肝障害モデルマウスにおける肝臓の組織学的観察.....	20
I-6 考察.....	21

第 II 章 標的化素子を利用したスルフォアルブミンの細胞選択的ターゲティング	23
II-1 化学修飾スルフォアルブミンの合成と物理化学的性質の評価	24
1-a Sulfo-BSA-Suc の合成	24
1-b PEG-Sulfo-BSA-Gal の合成	25
1-c 化学修飾スルフォアルブミンの物理化学的性質	26
II-2 化学修飾スルフォアルブミンの体内動態	28
2-a 化学修飾スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態.....	28
2-b 化学修飾スルフォアルブミンの肝臓内分布.....	29
2-c 化学修飾スルフォアルブミンの肝移行阻害実験	30
II-3 化学修飾スルフォアルブミンの硫化水素放出能の評価.....	34
II-4 化学修飾スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価	35
4-a 化学修飾スルフォアルブミンの細胞内取り込み能の評価.....	35
4-b 化学修飾スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価	37
II-5 考察.....	38
結論.....	40
実験の部.....	42
第 I 章	42
第 II 章	47
引用文献.....	52
謝辞.....	60

略語一覽

ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
BSA	Bovine serum albumin
CBS	Cystathionine β -synthase
CSE	Cystathionine γ -lyase
DDS	Drug delivery system
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTPA	Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl) -3-ethylcarbodiimide
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Gal	Galactose
GSH	Glutathione
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry
Man	Mannose
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
MPO	Myeloperoxidase
3-MST	3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PEG	Polyethylene glycol
PEG-NHS	α - Succinimidylsuccinyl- ω -methoxy polyoxyethylene
PFA	Paraformaldehyde
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxide dismutase
SPDP	N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate

Suc	Succinic acid
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid
Trx	Thioredoxin

総論の部

緒言

硫化水素は、生体内で合成酵素であるシスタチオンβ-シンターゼ (CBS)、シスタチオンγ-リアーゼ (CSE)、3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素 (3-MST) により産生されることが最近明らかとなった¹⁴⁾。硫化水素は生体内で、抗酸化、抗炎症、細胞保護効果等の多彩な生理活性を有することが知られている。すなわち、硫化水素はグルタチオン (GSH) やチオレドキシン (Trx) といった抗酸化物質の濃度上昇⁵⁾、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性の増大⁶⁾ により酸化ストレスを軽減することが報告されている。また、nuclear factor-kappa B (NF-κB) の活性化抑制や intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) といった接着分子の発現を抑制し、白血球の遊走やミエロパーオキシダーゼ (MPO) 活性を抑制することによる抗炎症効果が報告されている⁷⁾。さらに、心筋虚血モデルマウスにおけるミトコンドリアの呼吸調節による心筋の保護作用や⁸⁾、肝臓の酸化ストレス時における細胞内のカルシウム濃度上昇を抑制することで、肝臓の線維化抑制効果⁹⁾が報告されている。これらのことから、硫化水素は一酸化炭素、一酸化窒素に次ぐ第三のガス状シグナル分子として注目を集めている¹⁰⁻¹²⁾。したがって、硫化水素を体外から投与することによる炎症や虚血再灌流障害などの酸化ストレス疾患治療への応用が期待される。しかしながら、硫化水素はガス状分子であるため取り扱いが難しく、投与に際しては、生体内で硫化水素を放出するプロドラッグの利用が必要である¹³⁾。これまでに、様々な硫化水素プロドラッグが開発されており、疾患治療への応用が試みられてきた (Fig. 1)。

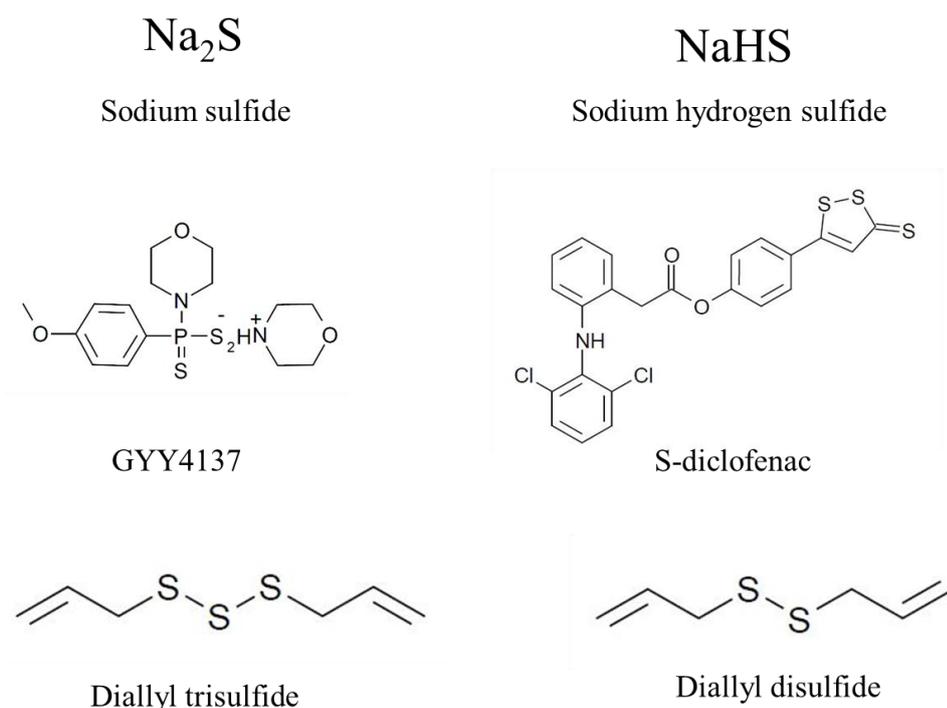


Fig. 1 Existing H₂S prodrugs.

すなわち、水溶液中で速やかに硫化水素を放出する sodium sulfide や sodium hydrogen sulfide といった無機硫化物が広く研究で利用されている^{5,6,14)}。また、加水分解により持続的に硫化水素を放出する GYY4137¹⁵⁾ や、チオールと反応し硫化水素を放出する diallyl trisulfide や diallyl disulfide¹⁶⁾ などの有機硫黄化合物が開発されている。さらに、硫化水素の抗炎症作用を利用し、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の抗炎症作用の増大、消化管毒性軽減を目的として、diclofenac に硫化水素プロドラッグを結合させた S-diclofenac が開発されている¹⁷⁾。

しかしながら、既存の硫化水素プロドラッグの多くは低分子であることから、血中からの消失が速く様々な臓器へ分布するため、標的部位に十分量の硫化水素が供給されないことや、標的部以外で硫化水素を放出することが治療上の大きな障壁となっている¹⁸⁾。したがって、硫化水素による効率的な治療効果を得るためには、硫化水素の放出や体内動態を精密に制御し、標的部へ十分量の硫化水素を供給する DDS 製剤の開発が必要であると考えられる (Fig. 2)。

硫化水素の DDS 製剤を開発するには、薬物の腎排泄や全身への分布による体内からの速やかな消失の抑制、ならびに標的部への選択的送達を目的とした標的化素子などの機能性分子の修飾が可能な高分子キャリアの利用が有用であると考えられる。

そこで著者らは、硫化水素の放出制御及び体内動態制御による効率的な疾患治療法を開発することを目的として、標的とする細胞内で選択的に硫化水素を放出する高分子型硫化水素プロドラッグの開発を試みた。硫化水素プロドラッグの高分子キャリアとして、生体由来のタンパク質であり安全性や生体適合性に優れるアルブミンを選択し、その表面に硫化水素放出部位を結合させることで高分子型硫化水素プロドラッグを開発した。その物理化学的性質ならびにマウス静脈内投与後の体内動態、硫化水素放出能を系統的に評価するとともに、酸化ストレス疾患治療におけるその有用性を評価した。さらに硫化水素の細胞選択的ターゲティングシステムの構築を目指して、標的化素子の利用によるスルフォアルブミンの標的細胞への能動的ターゲティングを試みた。

以下、これらの結果について2章にわたり論述する。

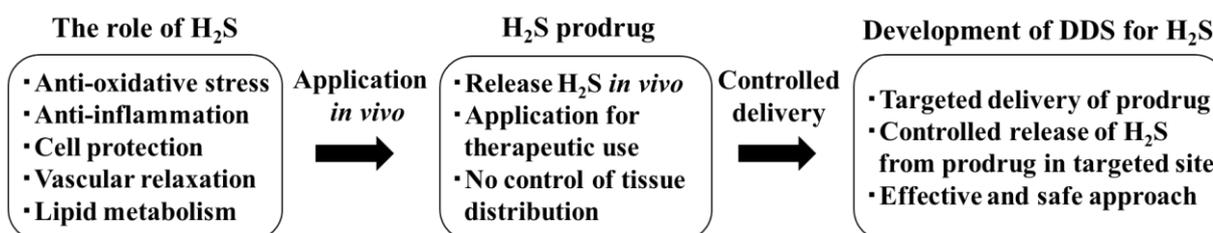


Fig. 2 The biological roles and targeted delivery of H₂S prodrug.

第I章 アルブミンを利用した高分子型硫化水素プロドラッグ (スルフォアルブミン) の開発

過酸化水素やスーパーオキシドアニオンなどの活性酸素種は、生体内で異物の分解などに関与し¹⁹⁻²¹⁾、産生と抗酸化酵素などによる消去のバランスが保たれている²²⁻²⁵⁾。しかし、このバランスが崩壊し過剰量の活性酸素種が産生されると、炎症や虚血再灌流障害といった酸化ストレス疾患が惹起される^{26, 27)}。硫化水素は酸化ストレス疾患に対し、抗酸化物質の発現量増大⁵⁾、炎症性メディエーターの遊離抑制²⁸⁾、細胞保護効果^{8, 29)}といった複合的な薬理効果を発揮することが知られており、医薬品としての応用が期待されている。ガス状分子である硫化水素を用いた効率的な疾患治療を実現するためには、硫化水素の体内動態、放出制御により、標的部位へ十分量の硫化水素を供給可能な硫化水素プロドラッグの開発が必要であると考えられる。しかしながら、既存の低分子型硫化水素プロドラッグは血中からの消失が速いこと、標的部位以外で硫化水素を放出することなどの問題点があり、これら欠点が疾患治療への応用の障壁となっている¹⁸⁾。硫化水素プロドラッグの体内動態、放出制御を実現するためには、硫化水素プロドラッグや機能性分子を修飾可能な高分子型硫化水素プロドラッグの開発が有用であると考えられる。しかしながら、高分子型硫化水素プロドラッグの開発し、その体内動態評価及び疾患治療へ応用した報告例はない。

血清アルブミンは、血中に豊富に存在するタンパク質であり、表面に化学修飾が可能なアミノ基やカルボキシ基を多数有している^{30, 31)}。さらに、生体由来のタンパク質であるため安全性が高く、血中滞留性が良いなどの利点から、DDSにおける高分子キャリアとして広く応用されている³²⁻³⁴⁾。そこで著者らは血清アルブミンを高分子キャリアとして選択し、硫化水素プロドラッグの体内動態制御ならびに硫化水素放出制御が可能な高分子型硫化水素プロドラッグ(スルフォアルブミン)を開発した(Fig. 3)。

本章では、合成したスルフォアルブミンの物理化学的性質、体内動態特性、硫化水素放出能を評価した。さらに得られた結果に基づき、スルフォアルブミンの酸化ストレス疾患治療における有用性を評価した。

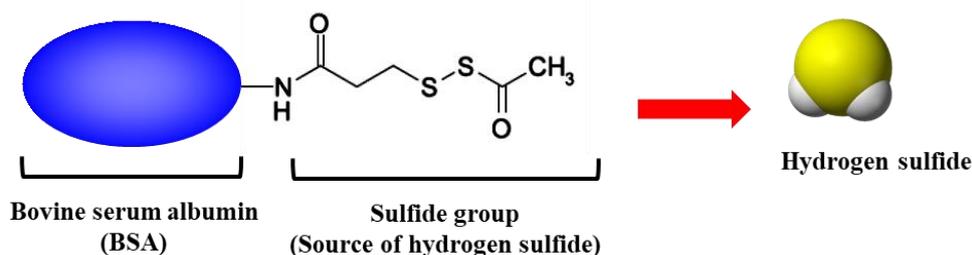


Fig. 3 Structure of Sulfo-albumin.

I-1 スルフォアルブミンの合成と物理化学的性質の評価

I-1-a スルフォアルブミンの合成

スルフォアルブミンは、ウシ血清アルブミン (BSA) に硫化水素放出部位である sulfide 基を修飾することで合成した。すなわち、BSA のアミノ基にジスルフィド導入試薬である N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) を修飾した後、thioacetic acid を反応させることで sulfide 基に変換した³⁵⁾ (Fig. 4)。BSA と SPDP の反応比率を調整することで、sulfide 基の修飾数が異なる 3 種のスルフォアルブミンを合成した。合成したスルフォアルブミンの分子量は MALDI TOF-MS で測定した (Fig. 5)。BSA とスルフォアルブミンの分子量の差から、BSA 1 分子あたりの sulfide 基の修飾数を算出した。その結果、反応比率の増大に伴い分子量が増大し、BSA 1 分子あたり、sulfide 基が約 5、10、30 分子結合した Sulfo (5)-BSA、Sulfo (10)-BSA、Sulfo (30)-BSA が得られた (Table 1)。

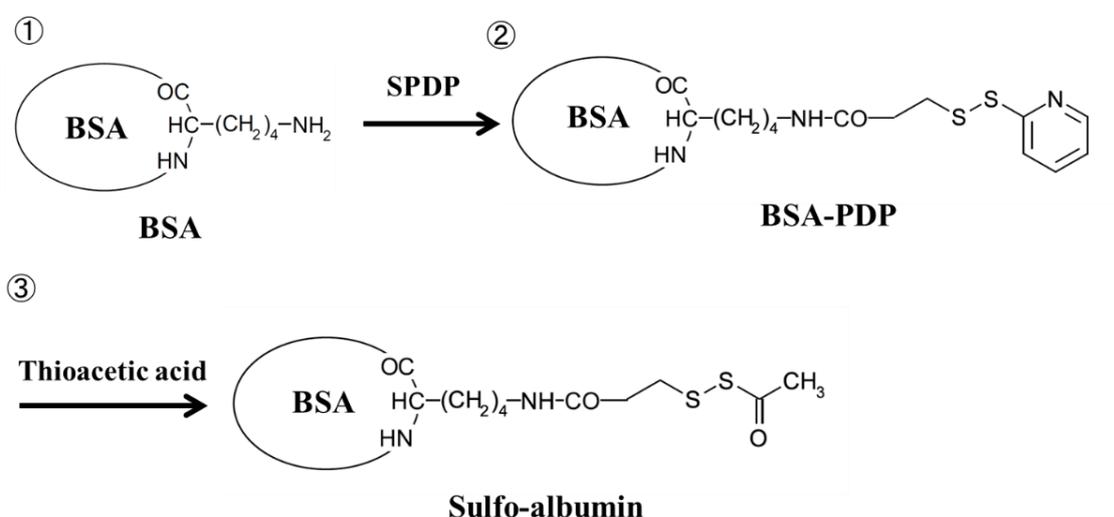


Fig. 4 Synthetic routes of Sulfo-albumin.
(Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 1)

I-1-b スルフォアルブミンの物理化学的性質

各種スルフォアルブミンの直径、ゼータ電位をそれぞれ動的光散乱法、レーザードップラー法で測定した。Table 1 から、各種スルフォアルブミンの直径は約 8 nm であり、sulfide 基の修飾による大きな変化は見られなかった。一方、ゼータ電位は sulfide 基修飾数の増大に伴い負に帯電した。これは BSA のアミノ基に sulfide 基を修飾したことで、表面の正電荷が弱まったためであると考えられる。

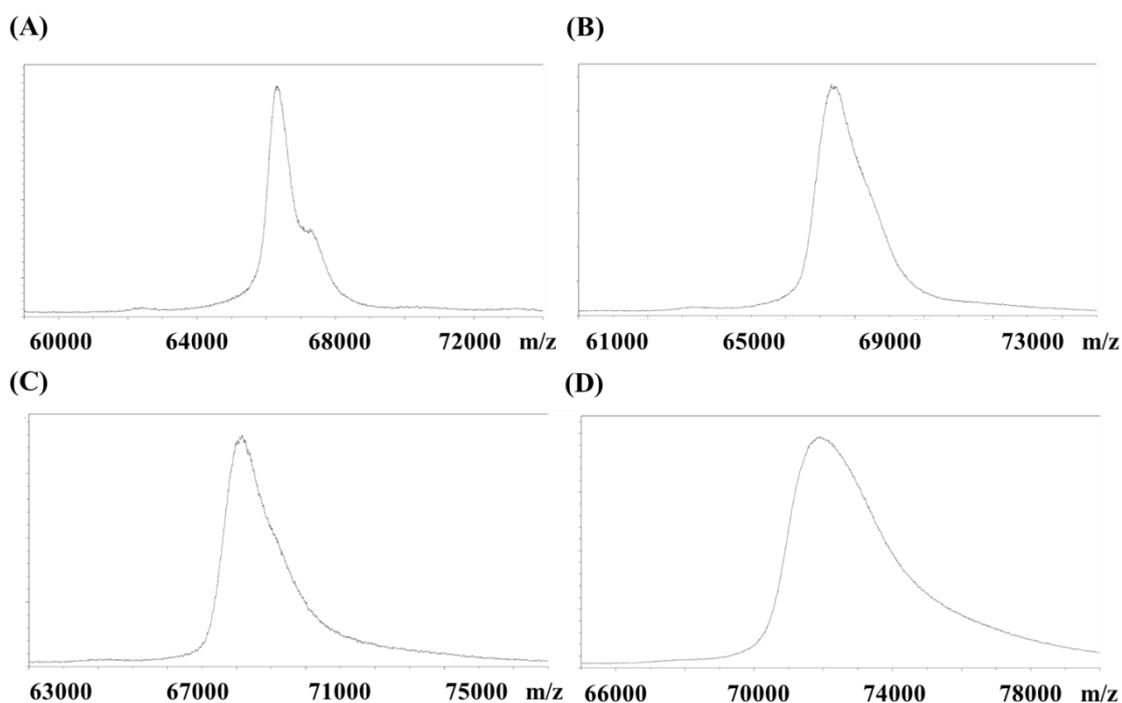


Fig. 5 MALDI-TOF MS spectra of (A) BSA, (B) Sulfo (5)-BSA, (C) Sulfo (10)-BSA, and (D) Sulfo (30)-BSA.

(Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. S1)

Table 1 Physicochemical properties of Sulfo-albumin

Compound	Molecular weight ^a	Number of sulfide groups ^b (mol/mol)	Diameter (nm)	Zeta potential (mV)
BSA	66,300	0	7.29±0.42	-12.57±0.12
Sulfo (5)-BSA	67,300	4.83	9.20±0.06	-19.47±0.78
Sulfo (10)-BSA	68,100	9.72	8.24±0.68	-22.23±1.37
Sulfo (30)-BSA	71,900	30.9	7.21±0.70	-30.87±0.75

^a Molecular weight was measured via MALDI TOF-MS.

^b The average number of sulfide groups was estimated by measuring the molecular weight via MALDI TOF-MS. Results are expressed as the mean ± S.D. of 3 experiments.

(Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Table 1)

I-2 スルフォアルブミンの体内動態

前節までに、スルフォアルブミンの物理化学的性質を評価した。続いて、各種スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態について評価した。

I-2-a 各種スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態

スルフォアルブミンに ^{111}In 標識を施し、血漿中濃度及び臓器中への移行量を測定した³⁶⁾。その結果、比較対照である未修飾 BSA は従来の報告通り、高い血中滞留性を示し、臓器中へはほとんど蓄積しなかった³⁷⁾ (Fig. 6)。一方、スルフォアルブミンは sulfide 基の修飾数増大に伴い、血中からの消失が速くなり肝臓への移行量が増大した。特に、sulfide 基の修飾数が最も多い Sulfo (30)-BSA は静脈内投与後、速やかに血中から消失し、投与 30 分後には投与量の約 80% が肝臓へ移行した。続いて、Sulfo (30)-BSA に近赤外線蛍光プローブである VivoTag 800 を標識し、マウス静脈内投与後の *Ex vivo* 蛍光イメージング画像を観察した³⁸⁾。この観察からも、肝臓から強い蛍光が観察されたことから、Sulfo (30)-BSA は肝臓に移行していることが確認された (Fig. 7)。Sulfo (30)-BSA の肝臓選択的な体内動態は、肝臓の酸化ストレス疾患治療に応用できる可能性があることから、以降の実験は Sulfo (30)-BSA を用いた。

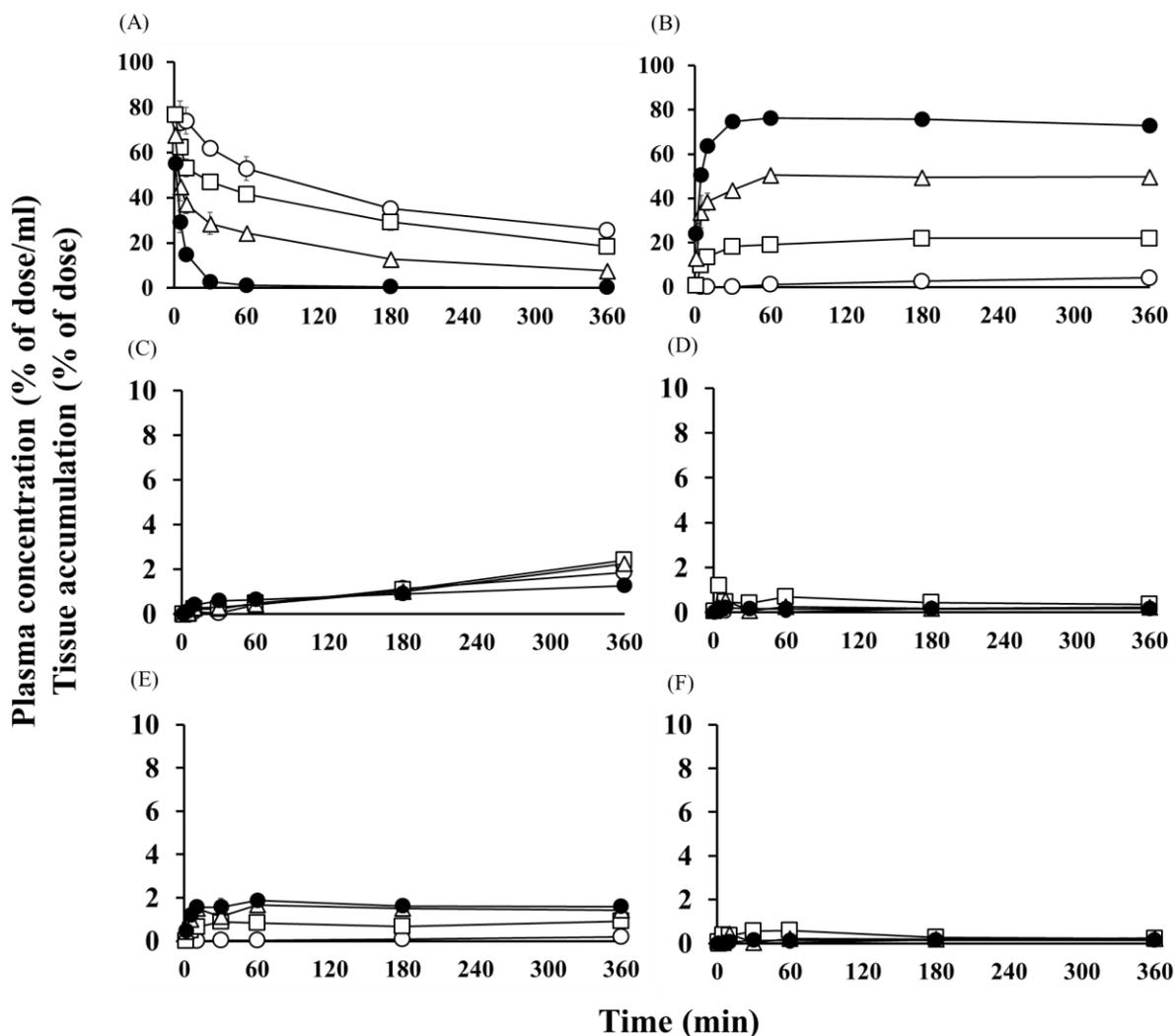


Fig. 6 Plasma concentration and tissue accumulation of ^{111}In -BSA and Sulfo-albumins after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg (A) Plasma, (B) Liver, (C) Kidney, (D) Lung, (E) Spleen and (F) Heart. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 mice. ○, BSA; □, Sulfo (5)-BSA; △, Sulfo (10)-BSA; ●, Sulfo (30)-BSA. (Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 2)

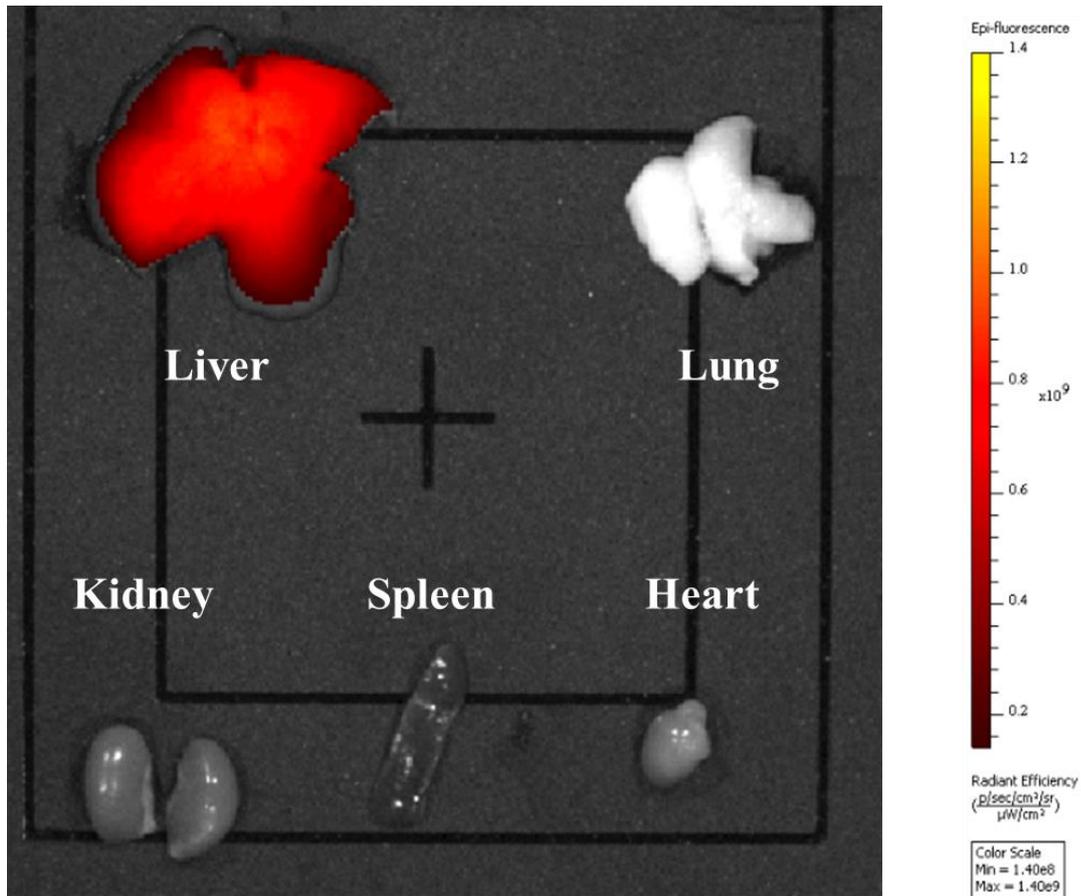


Fig. 7 *Ex vivo* fluorescence image of VivoTag-Sulfo (30)-BSA. Liver, lung, kidney, spleen and heart were excised 180 min after intravenously injection in mice. Fluorescence image was acquired by IVIS imaging system.

I-2-b Sulfo (30)-BSA の肝臓内分布

肝臓は主に、肝細胞からなる実質細胞と、血管内皮細胞や Kupffer 細胞（肝マクロファージ）などからなる非実質細胞から構成されていることが知られている^{39, 40}。そこで、¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA をマウスに静脈内投与後、肝臓にコラゲナーゼ灌流を施し、肝実質細胞、非実質細胞を分離し、各移行量を測定した^{41, 42}。その結果、Sulfo (30)-BSA は肝臓の非実質細胞に選択的に分布していることが明らかとなった (Fig. 8)。一般に、負に帯電した高分子やタンパク質は、肝臓の Kupffer 細胞などに発現するスカベンジャー受容体を介して、肝臓非実質細胞へ分布することが知られている^{43, 44}。このことから、負に帯電する Sulfo (30)-BSA は、同様の機構により非実質細胞へ分布したと考えられる。

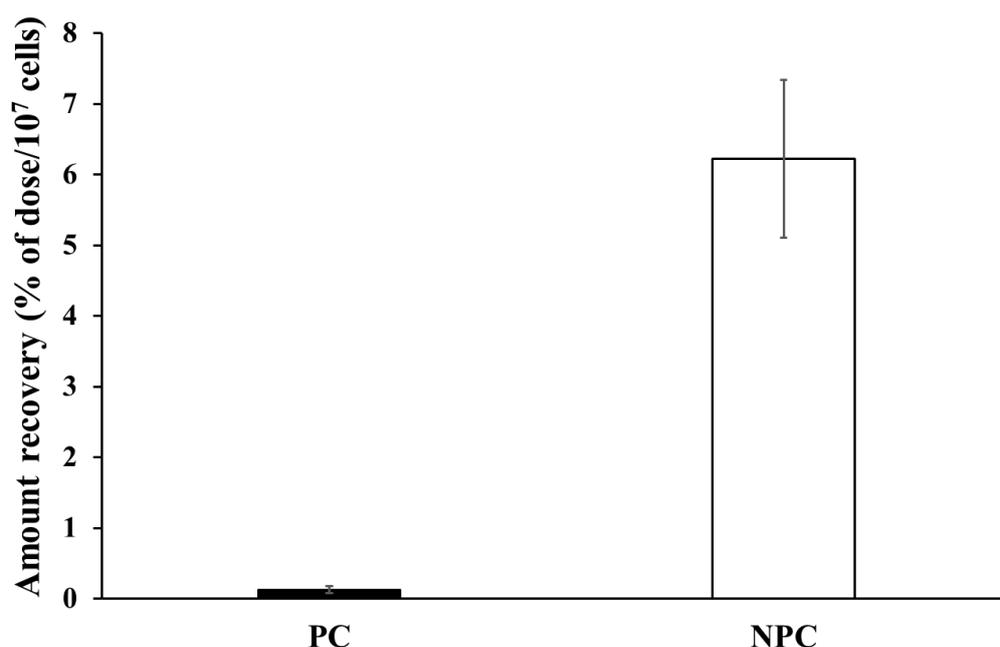


Fig. 8 Intrahepatic distribution of ¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA 30 min after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 mice. PC, parenchymal cells; NPC, nonparenchymal cells (Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 3)

I-2-c Sulfo (30)-BSA の肝移行阻害実験

前述のように、Sulfo (30)-BSA は負に帯電しているため、スカベンジャー受容体を介し肝臓の非実質細胞へ移行したと考えられる。そこで、スカベンジャー受容体の基質であるコハク酸修飾BSA (Suc-BSA) をマウスに前処置することで受容体を飽和させた後、¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA を投与し、肝移行性が低下するかを評価した⁴⁴⁾。その結果、Suc-BSA 未処置群と比較し、Suc-BSA 処置群における¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA の肝臓への移行量は顕著に低下し、血漿中濃度が増大した (Fig. 9)。以上の結果から、Sulfo (30)-BSA はマウス静脈内投与後、スカベンジャー受容体を介して肝臓の非実質細胞へ分布することが示唆された。

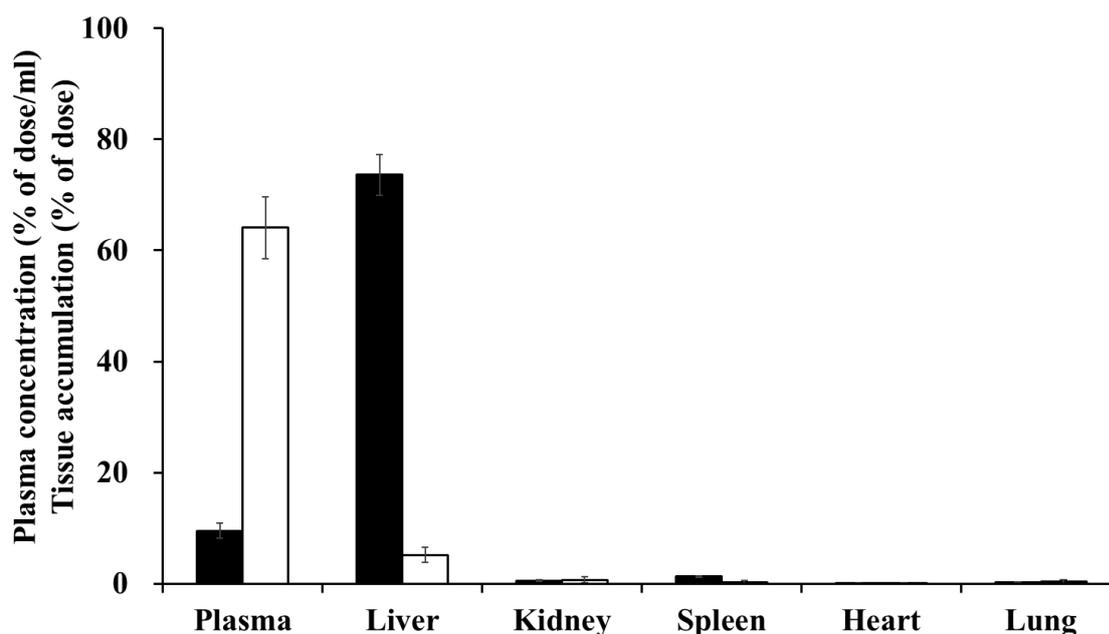


Fig. 9 Biodistribution of ¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA (1 mg/kg) 30 min after intravenous administration in mice. Just before ¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA, 20 mg/kg of unlabeled Suc-BSA was intravenously injected into mice. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 mice. Closed bar, without unlabeled Suc-BSA; Open bar, with unlabeled Suc-BSA.

I-3 スルフォアルブミンの硫化水素放出能の評価

前節では各種スルフォアルブミンの体内動態を評価し、Sulfo (30)-BSA が肝移行性に優れており、肝障害治療へ応用可能である可能性が示唆された。続いて、スルフォアルブミンの硫化水素放出能について評価した。

I-3-a GSH 中における硫化水素放出能の評価

合成したスルフォアルブミンは Fig. 10 のように、GSH やシステインといったチオールと反応し硫化水素を放出すると考えられる³⁵⁾。そこでスルフォアルブミンを、細胞内環境を想定した 5 mM GSH 中で反応させ、経時的に放出された硫化水素をメチレンブルー法で定量した⁴⁵⁻⁴⁷⁾。既存の低分子型硫化水素プロドラッグである H₂S Prodrug 81 (Fig. 11) は、これまでの報告の通り GSH と反応し硫化水素を放出した³⁵⁾ (Fig. 12)。また、Sulfo (30)-BSA は GSH を含まない PBS 中では硫化水素を放出せず、GSH を含む PBS 中で硫化水素を放出した。

以上の結果から、合成したスルフォアルブミンは細胞内環境下を想定した 5 mM GSH 中で硫化水素を放出することが示された。

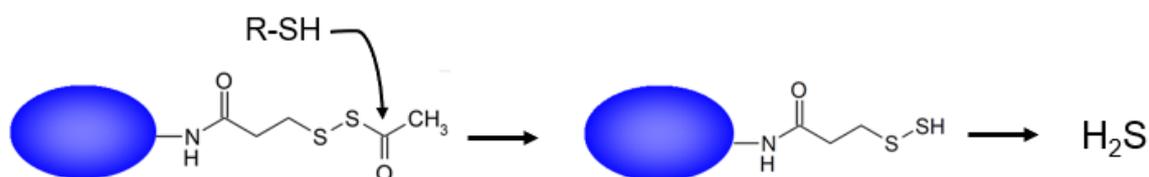


Fig. 10 Mechanism of H₂S release from Sulfo-albumin

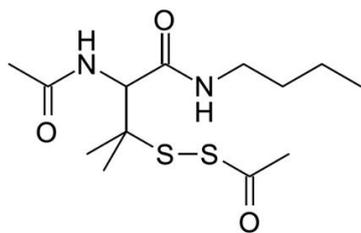


Fig. 11 Structure of H₂S prodrug 81.
(Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 1)

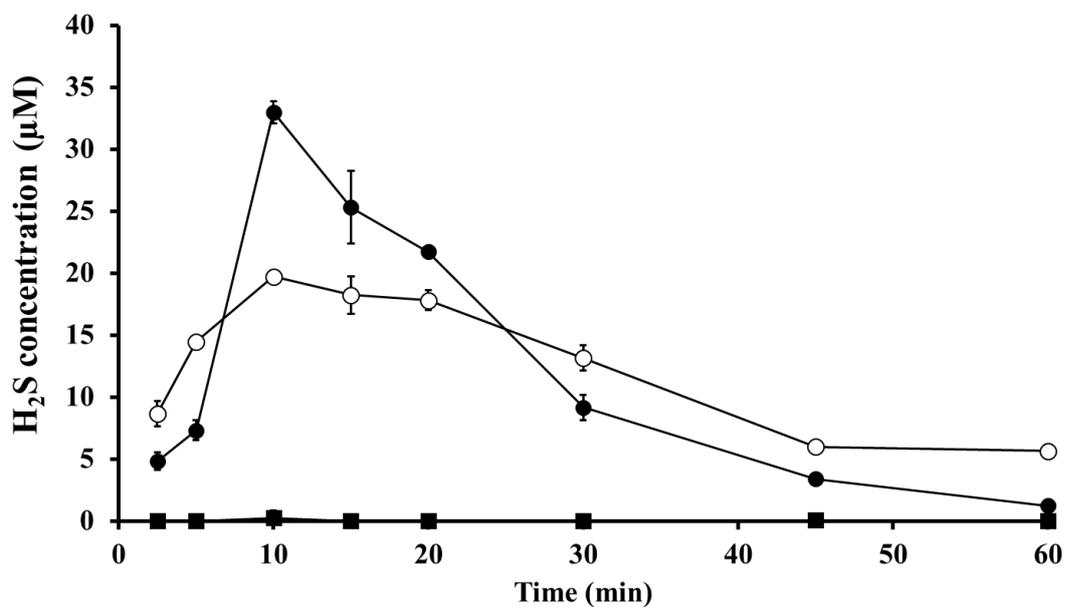


Fig. 12 H₂S release from Sulfo (30)-BSA or H₂S prodrug 81 in PBS and PBS containing 5 mM GSH. H₂S concentration in the solution was measured by a methylene blue method. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 experiments. \circ , Sulfo (30)-BSA + GSH; \bullet , H₂S prodrug 81 + GSH; \blacksquare , Sulfo (30)-BSA without GSH

(Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 4)

I-3-b 細胞懸濁液、血漿中における硫化水素放出能の評価

前述のように、スルフォアルブミンは GSH と反応し硫化水素を放出することが示された。生体内において、還元型 GSH は細胞内に豊富に存在していることが知られている⁴⁸⁾。そこで生体内における硫化水素放出能を評価するため、細胞懸濁液及び 10% マウス血漿中における硫化水素放出を測定した。その結果、Sulfo (30)-BSA からの硫化水素放出は、細胞懸濁液中では見られたものの、10% マウス血漿中では見られなかった (Fig. 13)。また、陰性対照である未修飾 BSA でも同様の実験を行ったが、硫化水素の放出は見られなかった。

以上の結果から、スルフォアルブミンは生体内において、血中では硫化水素を放出せず、細胞内環境下でのみ硫化水素を放出することが示唆された。

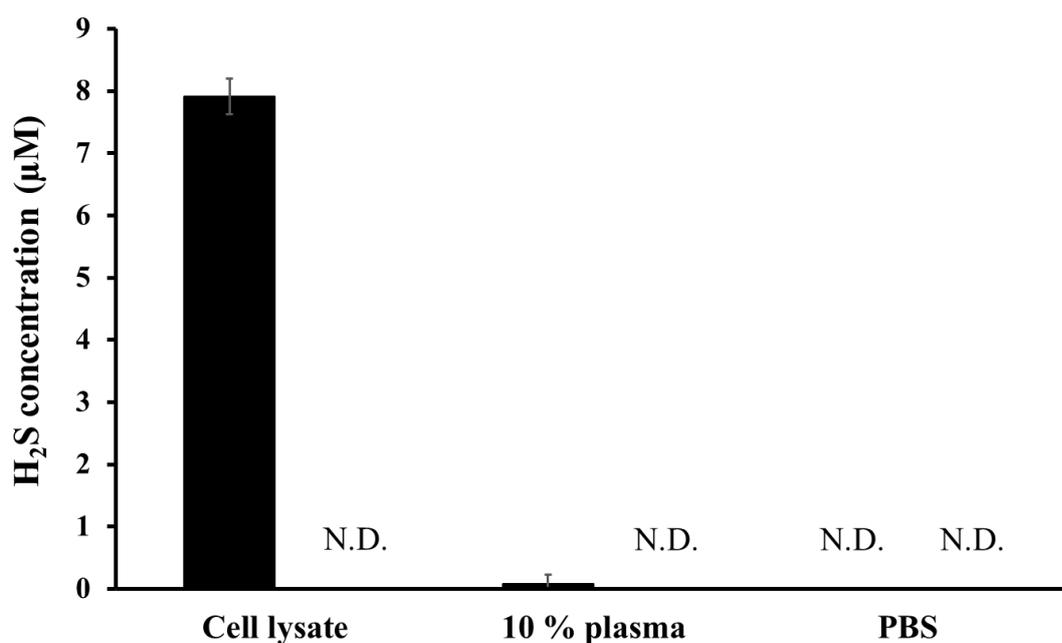


Fig. 13 H₂S release from Sulfo (30)-BSA (closed bar) and BSA (open bar) in cell lysate and 10% plasma. H₂S concentrations in samples were measured 20 min after incubation. The results are expressed as the mean ± S.D. of 3 experiments. N.D., not-detected (Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 5)

I-4 スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価

前節から、スルフォアルブミンが GSH と反応し、細胞内環境下で硫化水素を放出することが明らかとなった。続いて、生細胞中におけるスルフォアルブミンの硫化水素放出能を評価した。

I-4-a スルフォアルブミンの細胞内取り込み能の評価

まず、スルフォアルブミンが細胞内へ取り込まれるか否かを、蛍光色素である fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識体を用いて評価した。マウスマクロファージ様細胞株である、RAW 264.7 細胞に FITC-Sulfo (30)-BSA を処置し、経時的に蛍光顕微鏡で観察した。その結果、細胞内からの蛍光が時間依存的に増大したことから、Sulfo (30)-BSA が RAW 264.7 細胞へ取り込まれたことが確認された (Fig. 14)。

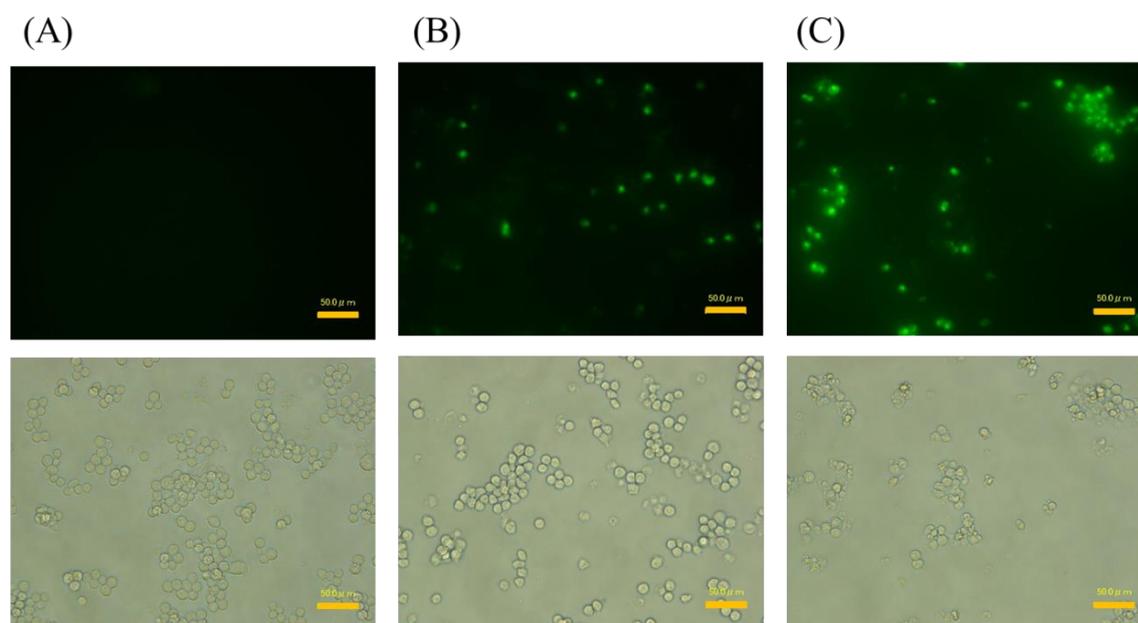


Fig. 14 Fluorescence image of FITC-labeled Sulfo (30)-BSA in RAW 264.7 cells. Cells were incubated with FITC-labeled Sulfo (30)-BSA (1 mg/ml) for (A) 0 h, (B) 2 h, and (C) 4 h. Upper panel and lower panel show fluorescence and bright field image, respectively. Scale bar = 50 μm (Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 6)

I-4-b スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価

続いて、RAW 264.7 細胞内におけるスルフォアルブミンの硫化水素放出能を評価した。硫化水素の蛍光プローブである HSip-1⁴⁹⁾ を用いて、細胞から放出された硫化水素を経時的に検出した。その結果、Sulfo (30)-BSA 処置群における HSip-1 由来の蛍光強度が経時的に増大した (Fig. 15)。

以上の結果から、Sulfo (30)-BSA はマクロファージ細胞に取り込まれた後、硫化水素を放出することが明らかとなった。

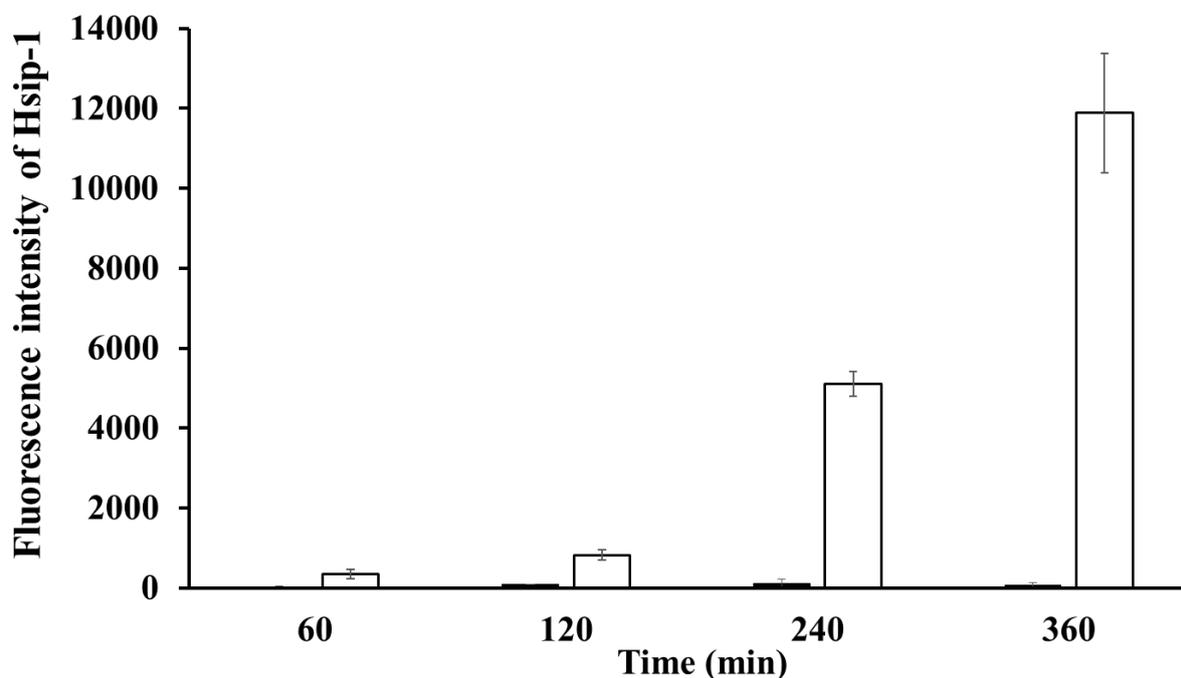


Fig. 15 H₂S release from Sulfo (30)-BSA in RAW 264.7 cells. Cells were incubated with HSip-1, a H₂S fluorescence probe, in the presence (open bar) and absence (closed bar) of Sulfo (30)-BSA. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 experiments. (Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 7)

I-5 スルフォアルブミンの肝障害抑制効果

これまでの結果から、Sulfo (30)-BSA は静脈内投与後肝臓へ移行し、肝臓のマクロファージ内で硫化水素を放出することが示唆された。そこで Sulfo (30)-BSA の肝移行性を利用し、肝臓の酸化ストレス疾患治療への応用を試みた。四塩化炭素は肝臓の CYP2E1 で代謝され、トリクロロメチルラジカルを産生することが知られている^{50,51)}。さらに、活性酸素種の増大⁵²⁾、脂質の酸化^{50,53)}、組織の線維化⁵²⁾などを惹起するため、肝臓の酸化ストレス疾患モデルとして用いられている。そこで四塩化炭素誘発性肝障害モデルマウスを作成し、Sulfo (30)-BSA による肝障害抑制効果を評価した。

I-5-a 四塩化炭素誘発性肝障害モデルマウスにおける血漿中トランスアミナーゼ活性の評価

肝障害モデルマウスは、四塩化炭素をマウスに腹腔内投与することで作成した。同時に PBS、H₂S prodrug 8I、Sulfo (30)-BSA を静脈内投与した。肝障害の指標として血漿中 aspartic aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT) 活性の測定を行った。その結果、四塩化炭素の処置後 24 時間において血漿中 AST、ALT 活性が顕著に増大したことから、肝障害が惹起されたことが確認された (Fig. 16)。H₂S prodrug 8I は AST、ALT 活性の増大を抑制しなかったが、Sulfo (30)-BSA は AST、ALT 活性の増大を有意に抑制した。

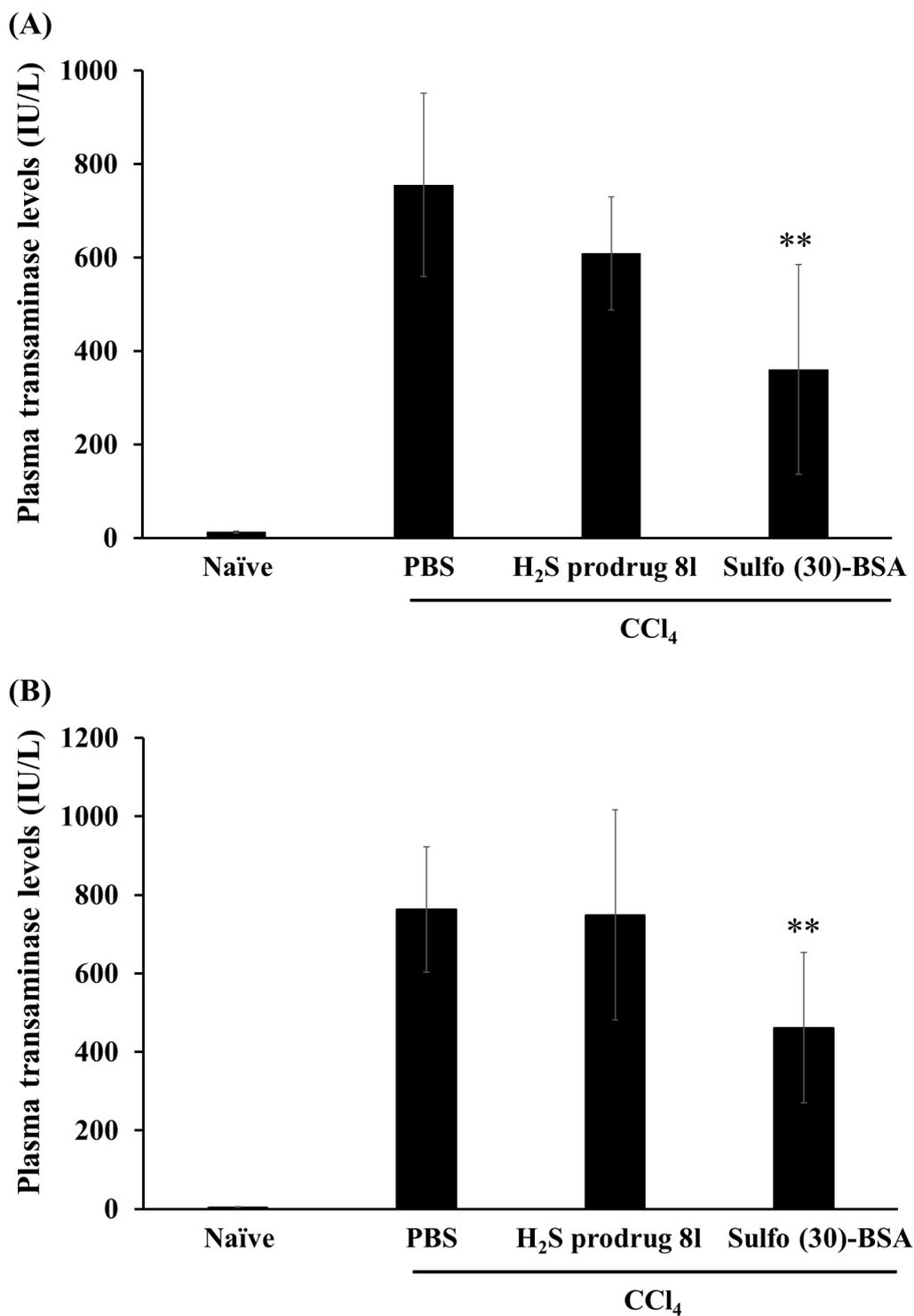


Fig. 16 Effect of Sulfo (30)-BSA on plasma (A) AST and (B) ALT activities 24 h after intraperitoneal injection of CCl₄ in mice. Sulfo (30)-BSA or H₂S prodrug 8I (3.5 μmol H₂S/kg) was intravenously injected to the mice just after administration of CCl₄. The results are expressed as the mean ± S.D. of at least 5 mice. ***p* < 0.01, significantly different from PBS group. (Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 8, revised.)

I-5-b 四塩化炭素誘発性肝障害モデルマウスにおける肝臓の組織学的観察

実験終了後の肝臓を摘出し、肝切片を HE 染色した後、組織学的観察を行った。四塩化炭素は肝臓において、血管周辺の実質細胞に障害を引き起こすことが知られている⁵⁴⁾。実際に、四塩化炭素処置により、血管周囲の細胞の変形、ネクローシス、炎症性細胞の遊走が観察された (Fig. 17)。一方、Sulfo (30)-BSA 処置群はこれらの障害を抑制していることが確認された。

以上の結果から、Sulfo (30)-BSA は肝臓の酸化ストレス疾患治療において有用であることが明らかとなった。

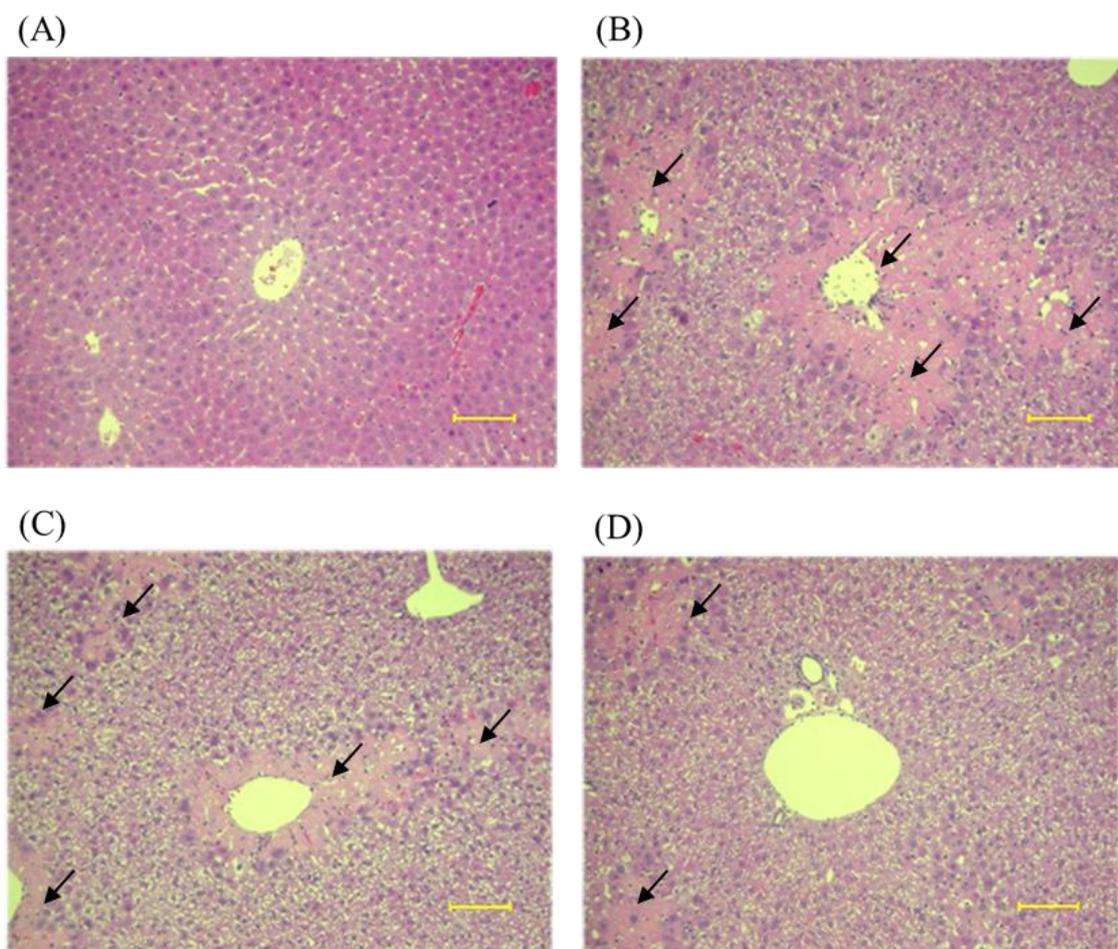


Fig. 17 Histological micrographs of the liver in CCl_4 -induced hepatitis mouse model after intravenous injection of various solutions. (A) Naive, (B) CCl_4 +PBS, (C) CCl_4 + H_2S prodrug 8I and (D) CCl_4 +Sulfo (30)-BSA. Black arrows indicate damaged area. Scale bar: 100 μm . (Sakai et al., *J. Pharm. Sci.*, 2018, 107, 2686-2693. Fig. 9)

I-6 考察

本章では、硫化水素プロドラッグの体内動態制御、及び硫化水素の放出制御を目指し、高分子型硫化水素プロドラッグであるスルフォアルブミンを開発し、その物理化学的性質、体内動態、硫化水素放出能及び酸化ストレス疾患治療への有用性を評価した。

各種スルフォアルブミンの物理化学的性質を評価したところ、未修飾 BSA と比較してスルフォアルブミンは、sulfide 基の修飾数の増大に伴い負に帯電した。一般にタンパク質の表面電荷は、正電荷を有するリジン、アルギニン、負電荷を有するアスパラギン酸、グルタミン酸の数により支配される^{55, 56)}。スルフォアルブミンの sulfide 基は、BSA のリジンのアミノ基に結合しているため、未修飾 BSA と比較して負電荷が増大したと考えられる。

各種スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態を、¹¹¹In 標識体を用いて評価したところ、主に肝臓へ移行することが明らかとなった。また、肝臓への移行量は sulfide 基の修飾数と強く相関し、特に Sulfo (30)-BSA は静脈内投与後、投与量の約 80% が肝臓へ移行した。高分子キャリアの体内動態は、主にサイズと表面電荷に影響される。肝臓の非実質細胞にはスカベンジャー受容体が発現しており、負電荷を有する高分子を認識する機構が存在する^{43, 44)}。また、高分子キャリアにコハク酸 (Suc) やアコニット酸などのカルボキシ基を化学修飾することで負電荷が増大し、肝臓への移行が促進されることが知られている^{44, 57)}。したがって、Sulfo (30)-BSA は強い負電荷を有することから、同様の機構で肝臓へ移行したと考えられる。

続いて、Sulfo (30)-BSA の肝移行メカニズムを評価した。Sulfo (30)-BSA の肝臓内分布を評価したところ、実際に肝臓の非実質細胞に選択的に分布していることが確認された。また、マウスにスカベンジャー受容体の基質である Suc-BSA (20 mg/kg) を静脈内投与し、スカベンジャー受容体を飽和させた後、¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA (1 mg/kg) の体内動態を評価したところ、¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA の肝臓への移行が顕著に抑制された。以上の結果から、Sulfo (30)-BSA は静脈内投与後、負電荷を認識するスカベンジャー受容体を介して肝臓の非実質細胞へ移行することが示唆された。

スルフォアルブミンからの硫化水素放出は、sulfide 基のカルボニル炭素にシステインや GSH などのチオールが求核反応することで促進されることが考えられる。実際にスルフォアルブミンは PBS 中では硫化水素を放出せず、低分子型硫化水素プロドラッグである H₂S prodrug 81 と同様に、細胞内環境を想定した 5 mM GSH 存在下で硫化水素を放出した。このことから、sulfide 基を高分子キャリアである BSA に化学修飾した後も、硫化水素放出能を保持していることが確認された。生体内において、GSH は細胞内に豊富しており、細胞内濃度 (1-10 mM) は血漿中濃度 (2 μM) に対し数百から数千倍高濃度であることが知られている⁵⁸⁾。したがって、スルフォアルブミンは生体内において、細胞内環境下で硫化水素を放出すると考えられる。実際に、スルフォアルブミンは細胞懸濁液中で硫化水素を放出したが、マウス血漿中では硫化水素を放出しなかった。これ

らの結果から、スルフォアルブミンは生体内において、血中では硫化水素を放出せず、細胞内に移行した後に硫化水素を放出することが示唆された。既存の硫化水素プロドラッグを疾患治療に応用する際の欠点として、血中などの標的部位以外で硫化水素を放出することが挙げられる。一方、スルフォアルブミンは細胞内選択的な硫化水素放出を示したことから、体内動態を制御することで標的部位特異的な硫化水素の放出が可能になるものと考えられる。

Sulfo (30)-BSA は肝臓の非実質細胞へ移行したことから、スカベンジャー受容体を発現する RAW 264.7 細胞^{59, 60)} を非実質細胞のモデルとして用い、細胞内における硫化水素放出を評価した。硫化水素は不安定なガス状分子であることから、細胞内で徐々に放出された硫化水素は同時に分解も受けるため、細胞内の低濃度の硫化水素をメチレンブルー法で検出することは困難である。一方で、硫化水素は細胞膜を透過することから、本評価には細胞外へ放出された硫化水素を、より低濃度の硫化水素を検出可能な蛍光プローブである HSip-1⁴⁹⁾ で検出した。Sulfo (30)-BSA は RAW 264.7 細胞へ時間依存的に取り込まれ、硫化水素を放出していることが明らかとなった。したがって、Sulfo (30)-BSA は静脈内投与後、速やかに肝臓の非実質細胞へ取り込まれた後、細胞内で硫化水素を放出するものと考えられる。

酸化ストレス疾患は、過剰量の活性酸素種が産生されることにより、組織の酸化、炎症性細胞の集積、炎症性サイトカインの過剰放出などから引き起こされる⁶¹⁻⁶⁵⁾。硫化水素は、GSH、Trx などの抗酸化物質の濃度上昇、炎症性サイトカインの放出抑制などの多彩な生理活性により酸化ストレス障害を抑制する^{5, 66, 67)}。したがって、Sulfo (30)-BSA の肝臓選択的な体内動態特性、細胞内選択的な硫化水素放出特性は、肝臓の酸化ストレス疾患治療において有用であると考えられる。そこで活性酸素が病態に関与する四塩化炭素誘発性肝障害に対する Sulfo (30)-BSA の有用性を評価した。H₂S prodrug 81 は、四塩化炭素処置による血漿中 AST、ALT 活性の増大を抑制しなかった。一方で、Sulfo (30)-BSA は血漿中 AST、ALT 活性の増大を顕著に抑制し、肝臓の組織学的評価においても肝障害を抑制した。この要因として、低分子である H₂S prodrug 81 は静脈内投与後、全身へ分布するため、標的である肝臓へ十分量の硫化水素を供給できなかったが、Sulfo (30)-BSA は肝臓へ選択的に移行し硫化水素を放出することで、肝臓へ十分量の硫化水素を供給したと考えられる。四塩化炭素は肝臓の実質細胞で代謝され、主に肝臓の実質細胞に障害を惹起するが、Sulfo (30)-BSA は肝臓の非実質細胞で硫化水素を放出すると考えられる。硫化水素は細胞膜を自由に透過するため⁶⁸⁾、非実質細胞で産生された硫化水素が拡散し、近傍の実質細胞へ移行し薬理効果を発揮したと考えられる。

以上、本章では、BSA に sulfide 基を結合させた高分子型硫化水素プロドラッグであるスルフォアルブミンの開発に成功した。続いて、その物理化学的性質、基本的な体内動態、細胞内環境下で硫化水素を放出することを明らかとした。さらに、Sulfo (30)-BSA が肝臓選択的な体内動態を示し、肝臓の酸化ストレス疾患治療における有用性を明らかにした。

第 II 章 標的化素子を利用したスルフォアルブミンの細胞選択的 ターゲティング

第 1 章では、細胞内で選択的に硫化水素を放出する高分子型硫化水素プロドラッグであるスルフォアルブミンを開発した。スルフォアルブミンは sulfide 基の修飾数に依存して静脈内投与後肝臓へ移行したが、これは BSA に化学修飾することによる BSA の物性変化により、肝臓へ非特異的に移行したと考えられる。しかしながら、硫化水素プロドラッグを医薬品として用いる際、効果の増強及び副作用の軽減という観点から、標的細胞に特異的に送達させるアプローチが有用であるとされる。標的細胞への選択的送達には、受容体を介したエンドサイトーシス機構の利用が有効であるとされる。そこで、スルフォアルブミンに標的化素子を修飾することで、標的細胞への能動的ターゲティングシステムの構築を試みた。

肝臓は主に、肝細胞からなる実質細胞と、血管内皮細胞や Kupffer 細胞などからなる非実質細胞から構成されている^{39,40}。疾患によりそれぞれの細胞は異なった病態を示すため、薬物を肝臓の実質細胞、または非実質細胞に選択的に送達することで治療効果を増大させることが知られている。カタラーゼや SOD などの抗酸化酵素に、マンノース (Man) や Suc を化学修飾し非実質細胞へ送達することで、虚血再灌流障害を効率良く抑制可能であることが報告されている^{42,69}。また、プロスタグランジン E₁ にガラクトース (Gal) を化学修飾し、実質細胞へ送達することで、劇症肝炎を効率良く抑制したことが報告されている⁷⁰。肝臓の実質細胞、または非実質細胞へのターゲティングシステムの開発において、両細胞に発現する受容体の違いを利用した標的化素子の化学修飾が有効である。非実質細胞には、Man 修飾された高分子を認識する Man 受容体や、負電荷高分子を認識スカベンジャー受容体が発現している^{71,72}。そこで高分子キャリアに Man や Suc を化学修飾することで、薬物を肝臓非実質細胞へ送達することが可能であることが報告されている^{42,73}。また、肝臓実質細胞には Gal 修飾された高分子を認識するアシアロ糖タンパク質受容体が発現しているため、高分子キャリアに Gal を化学修飾することで、薬物の肝臓実質細胞へ送達可能であることが報告されている^{74,75}。そこで、本機構を利用したスルフォアルブミンの細胞選択的ターゲティングにより、硫化水素プロドラッグを用いた効率的な肝障害治療が可能になると考えられる。

本章では、化学修飾スルフォアルブミンによる硫化水素の細胞選択的ターゲティングを試みた。標的化素子を利用して薬物のターゲティングを行う際、薬物のターゲティング効率は全身クリアランスと標的化素子の受容体への親和性のバランスに左右される^{76,77}。第 I 章の体内動態試験の結果から、最も全身クリアランスが小さく、高い血中滞留性を示した Sulfo (5)-BSA に、Suc を修飾した Sulfo-BSA-Suc を開発することで、硫化水素の肝臓非実質細胞への能動的ターゲティングを、Gal を修飾した PEG-Sulfo-BSA-Gal を開発することで、硫化水素の肝臓実質細胞への能動的ターゲティングを試みた (Fig. 18)。

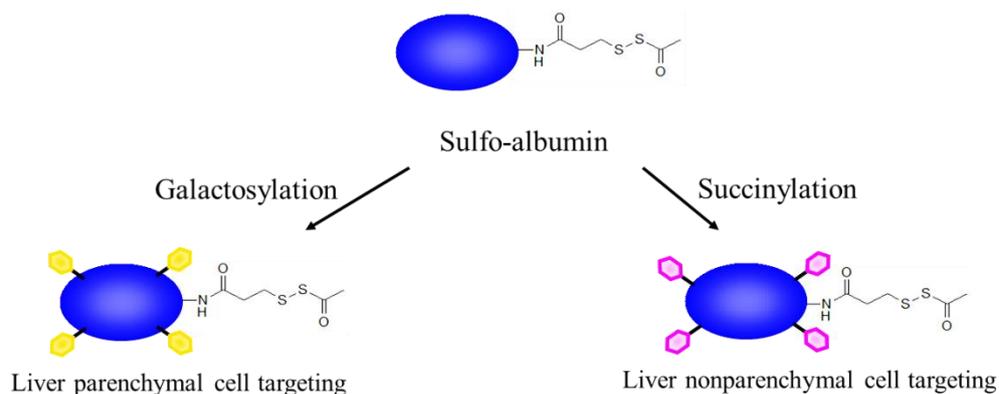


Fig. 18 Targeted delivery of Sulfo-albumin to liver parenchymal cells and nonparenchymal cells.

II-1 化学修飾スルフォアルブミンの合成と物理化学的性質の評価

II-1-a Sulfo-BSA-Suc の合成

Sulfo-BSA-Suc は、Sulfo (5)-BSA に Suc を修飾することで合成した。まず、BSA に SPDP を修飾した BSA-PDP に、無水コハク酸を反応させた PDP-BSA-Suc を合成した。その後 thioacetic acid を反応させ、Sulfo-BSA-Suc を合成した (Fig. 19)。TNBS 法⁷⁸⁾ で Suc の修飾数を算出したところ、BSA 1 分子あたり Suc は約 20.7 分子結合した (Table 2)。比較対照として、Suc 修飾を施していない Sulfo-BSA を合成した。

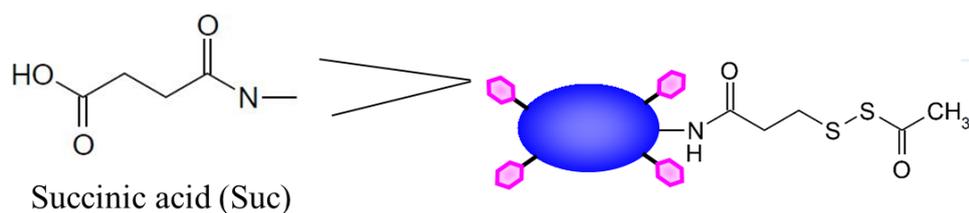


Fig. 19 Structure of Sulfo-BSA-Suc.

II-1-b PEG-Sulfo-BSA-Gal の合成

PEG-Sulfo-BSA-Gal は、Sulfo (5)-BSA に Gal を修飾することで合成した。また、Gal 修飾後の安定性、溶解性向上のため、ポリエチレングリコール (PEG) を修飾した。まず、BSA に PEG を修飾した PEG-BSA に、SPDP を反応させた PEG-BSA-PDP を合成した。続いて、アミノ基を有する Gal 誘導体を縮合させた PEG-PDP-BSA-Gal に、thioacetic acid を反応させ PEG-Sulfo-BSA-Gal を合成した (Fig. 20)。MALDI TOF-MS で分子量を測定した結果、BSA 1 分子あたり PEG は約 6.9 分子結合した。Gal 修飾数をアンスロン法⁷⁹⁾ で測定したところ、BSA 1 分子あたり Gal は約 19.1 分子結合した (Table 2)。比較対照として、Gal 修飾を施していない PEG-Sulfo-BSA を合成した。

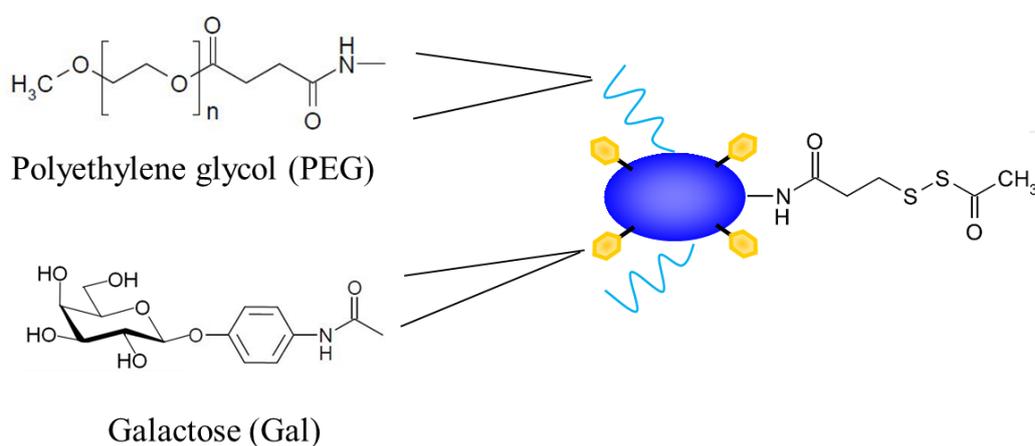


Fig. 20 Structure of PEG-Sulfo-BSA-Gal.

II-1-c 化学修飾スルフォアルブミンの物理化学的性質

各種スルフォアルブミンの直径、ゼータ電位をそれぞれ動的光散乱法、レーザードップラー法で測定した。その結果、各種スルフォアルブミンの直径は7.3-10.7 nmであった (Table 2)。MALDI TOF-MS で分子量を測定した結果、Sulfo-BSA-Suc の分子量は約 70100、PEG-Sulfo-BSA-Gal の分子量は約 87200 であった (Fig 21)。また各種スルフォアルブミンは負電荷を有しており、Sulfo-BSA-Suc は -38.6 mV と最も負に帯電した。

Table 2 Physicochemical characteristics of various Sulfo-BSAs

Compound	Molecular weight ^a	Modification degree (mol/mol)				Diameter (nm)	Zeta Potential (mV)
		Sulfide groups ^b	Suc ^c	Gal ^d	PEG ^e		
BSA	66,900	-	-	-	-	5.7±0.5	-9.5±1.5
Sulfo-BSA	67,100	5.7	-	-	-	7.3±0.3	-16.6±0.3
Sulfo-BSA-Suc	70,100	6.1	20.7	-	-	8.4±1.9	-38.6±1.5
PEG-Sulfo-BSA	79,900	5.3	-	-	6.0	10.3±0.9	-18.4±0.7
PEG-Sulfo-BSA-Gal	87,200	6.3	-	19.1	6.9	10.7±1.3	-11.5±0.5

^a Molecular weight was measured via MALDI TOF-MS.

^b The number of sulfide groups was determined by measuring PDP concentration.

^c The number of Suc was determined by the TNBS method.

^d The number of Gal was determined by the anthrone method.

^e The number of PEG was determined by measuring the molecular weight via MALDI TOF-MS.

BSA, bovine serum albumin; Suc, succinylated; Gal, galactosylated; PEG, polyethylene glycol
Results are expressed as the mean ± S.D. of 3 experiments.

(Sakai et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 2019, 42, 273-279. Table 1)

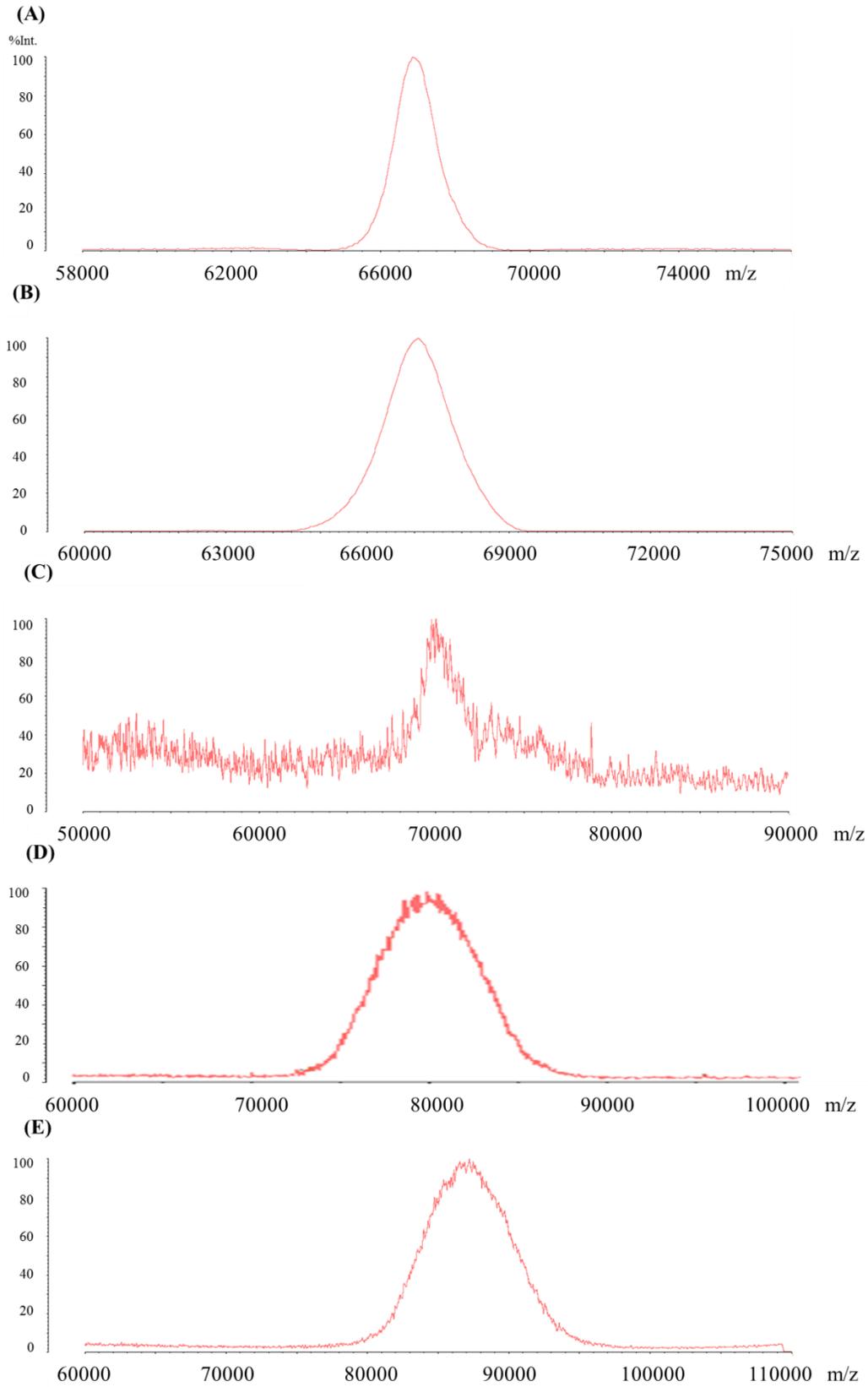


Fig. 21 MALDI-TOF MS spectra of (A) BSA, (B) Sulfo-BSA, (C) Sulfo-BSA-Suc and (D) PEG-Sulfo-BSA, and (E) PEG-Sulfo-BSA-Gal.

II-2 化学修飾スルフォアルブミンの体内動態

II-2-a 化学修飾スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態

化学修飾スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態を、 ^{111}In 標識体を用いて評価した。Sulfo-BSA は静脈内投与後、血中滞留性を保持しており、肝臓への移行量は約 20% であった (Fig. 22)。一方、Suc を修飾した Sulfo-BSA-Suc は投与後速やかに血中から消失し、30 分後には投与量の約 80% が肝臓へ移行した。また、PEG-Sulfo-BSA は Sulfo-BSA とほぼ同様の体内動態を示した。一方で、Gal を修飾した PEG-Sulfo-BSA-Gal は投与後速やかに血中から消失し、30 分後には投与量の約 90% が肝臓へ移行した。

以上の結果から、スルフォアルブミンに Suc 及び Gal を修飾することで、肝臓へのターゲティングに成功した。

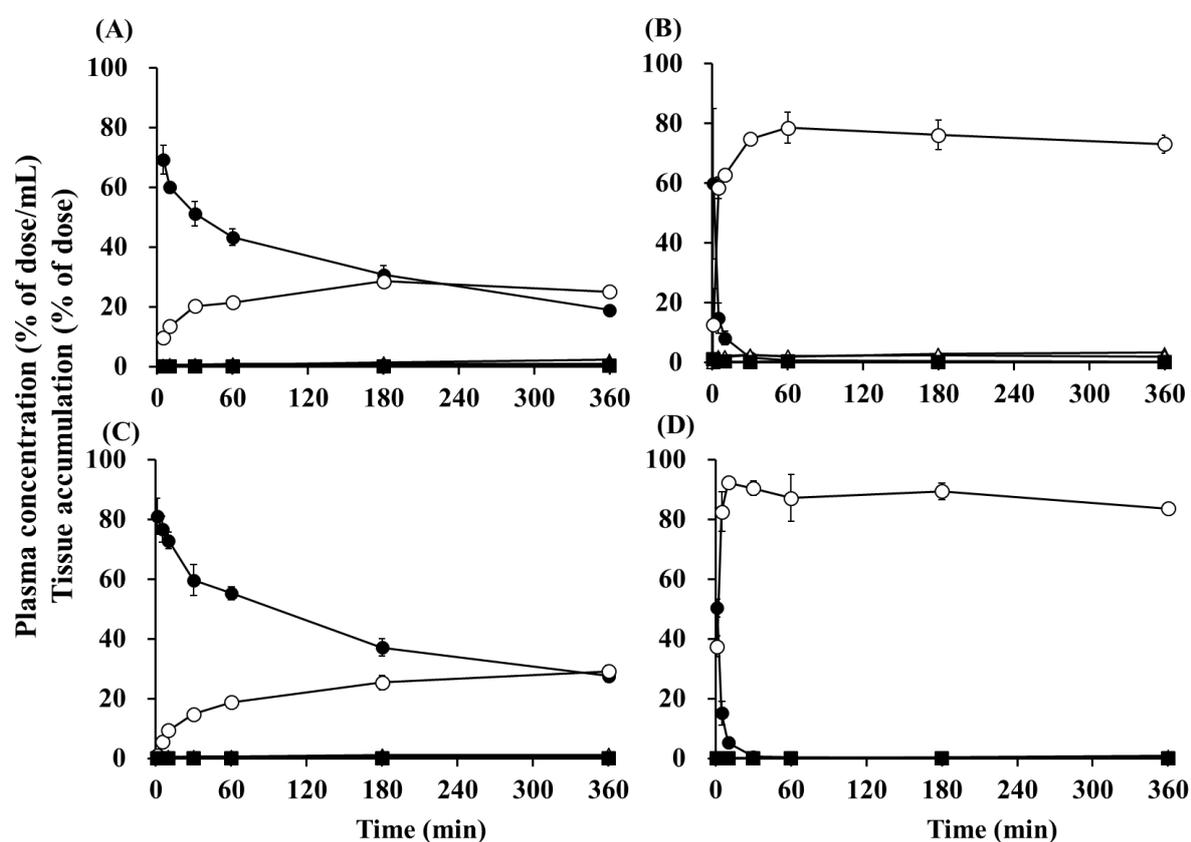


Fig. 22 Biodistribution of (A) ^{111}In -Sulfo-BSA, (B) ^{111}In -Sulfo-BSA-Suc, (C) ^{111}In -PEG-Sulfo-BSA and (D) ^{111}In -PEG-Sulfo-BSA-Gal (1 mg/kg) after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 mice. ●, plasma; ○, liver; ▲, kidney; △, spleen; ■, heart; □, and lung. (Sakai et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 2019, 42, 273-279. Fig. 1)

II-2-b 化学修飾スルフォアルブミンの肝臓内分布

Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は静脈内投与後肝臓へ移行したことから、第1章と同様に、肝臓にコラゲナーゼ灌流を施し、肝実質細胞、非実質細胞を分離し、各細胞への移行量を測定した。その結果、Sulfo-BSA-Suc は非実質細胞へ、PEG-Sulfo-BSA-Gal は実質細胞選択的に分布した (Fig. 23)。

以上の結果、スルフォアルブミンに Gal 又は Suc を修飾することで、それぞれ標的とする肝臓の実質細胞及び非実質細胞への細胞選択的ターゲティングに成功した。

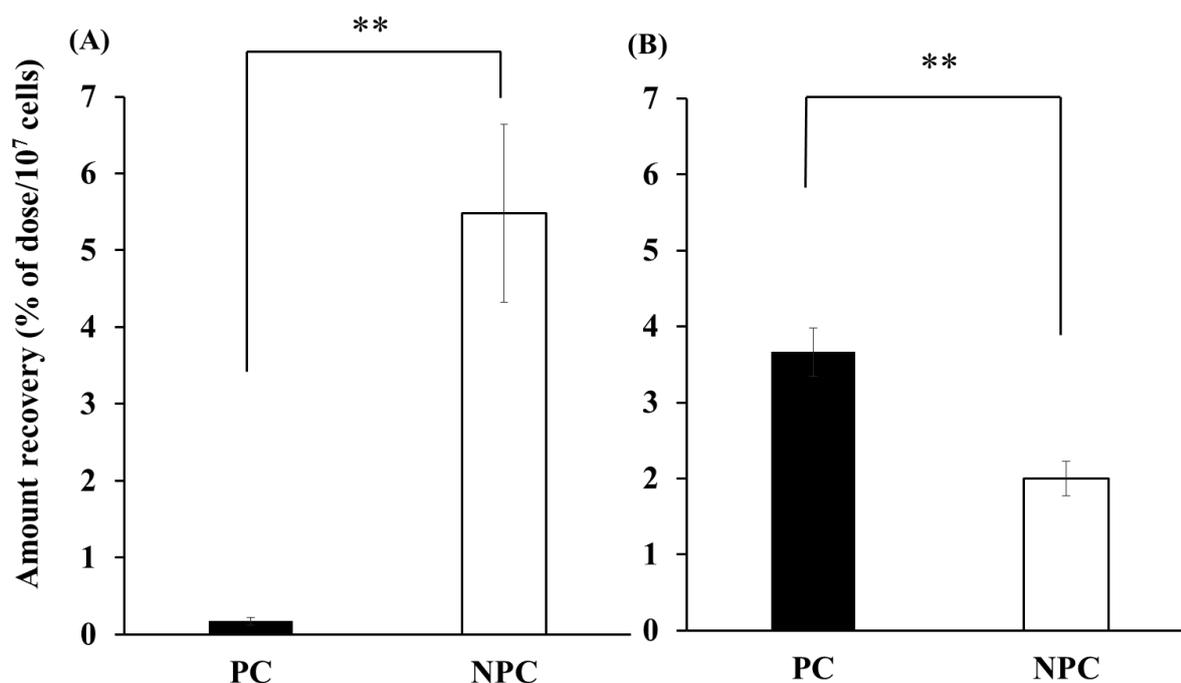


Fig. 23 Intrahepatic distribution of (A) ¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc and (B) ¹¹¹In-Sulfo-BSA-Gal 30 min after intravenous injection in mice at dose of 1 mg/kg. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 mice. PC, parenchymal cells; NPC, nonparenchymal cells. ** $p < 0.01$ (Sakai et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 2019, 42, 273-279. Fig. 3)

II-2-c 化学修飾スルフォアルブミンの肝移行阻害実験

前述のように、化学修飾スルフォアルブミンの細胞選択的ターゲティングに成功した。そこで、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal がそれぞれスカベンジャー受容体、またはアジアロ糖タンパク質受容体を介して肝臓へ移行しているかを評価した。¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc、¹¹¹In-PEG-Sulfo-BSA-Gal を1、4、10、20 mg/kgの投与量でマウスへ静脈内投与したところ、投与量依存的に肝臓への移行量が低下した (Fig. 24)。このことから、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は共に、受容体を介して肝臓へ移行していることが示唆された。¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc 投与の直前に、スカベンジャー受容体の基質である Suc-BSA を処置し受容体を飽和させることで⁴⁴)、¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc の肝臓への移行が顕著に抑制された (Fig. 25)。また、¹¹¹In-PEG-Sulfo-BSA-Gal 投与の直前に、アジアロ糖タンパク質受容体の基質である Gal-BSA を処置し受容体を飽和させることで⁸⁰)、¹¹¹In-PEG-Sulfo-BSA-Gal の肝臓への移行が顕著に抑制された。一方で、¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc 投与の直前に Gal-BSA を前処置、及び¹¹¹In-PEG-Sulfo-BSA-Gal 投与の直前に Suc-BSA を前処置しても、¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc 及び¹¹¹In-PEG-Sulfo-BSA-Gal の肝臓への移行量は顕著に低下しなかった (Fig. 26)。

以上の結果、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は、それぞれスカベンジャー受容体、及びアジアロ糖タンパク質受容体を介し肝臓へ移行していることが明らかとなった。

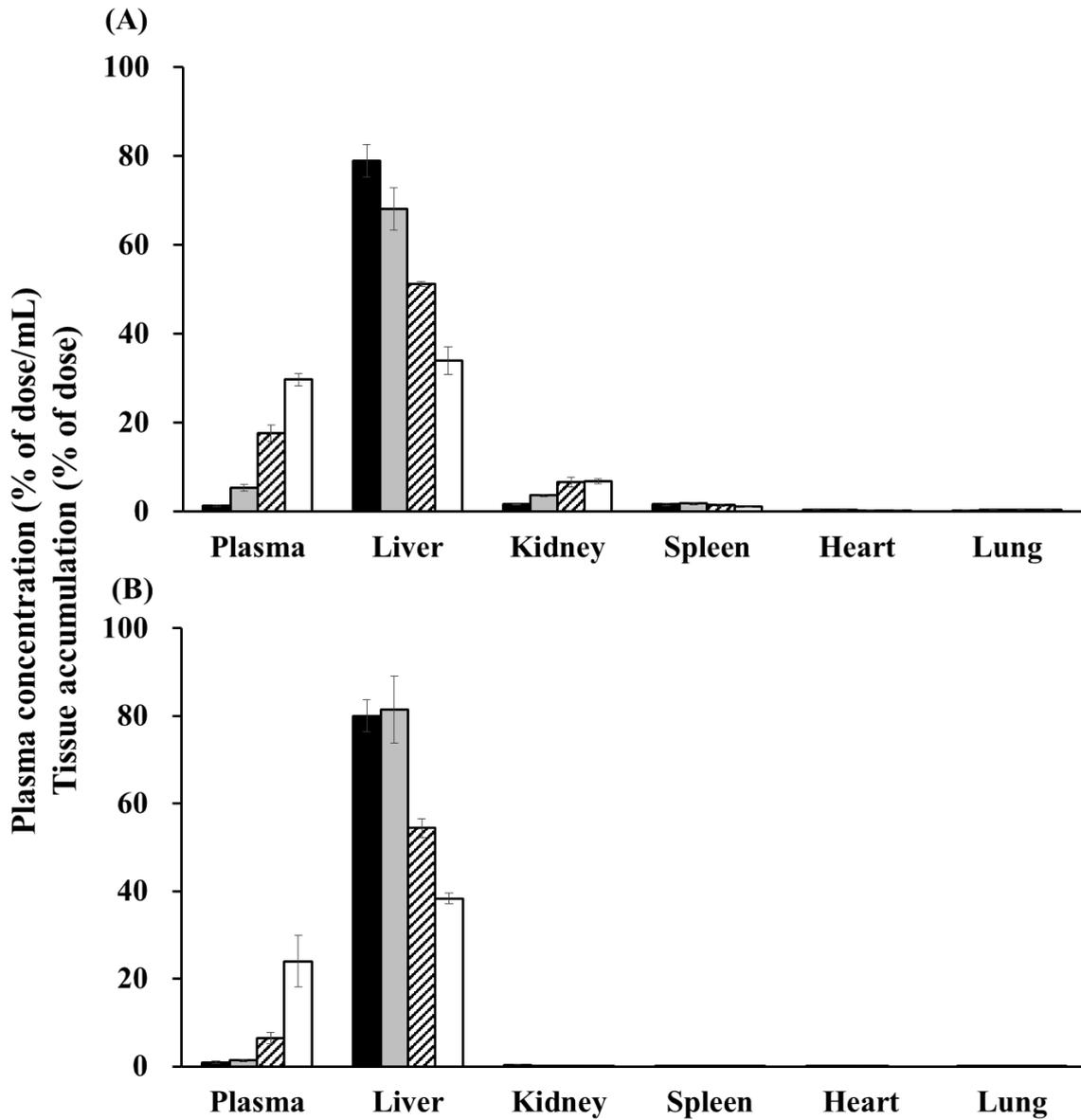


Fig. 24 Biodistribution of (A) ¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc and (B) ¹¹¹In-PEG-Sulfo-BSA-Gal 30 min after intravenous injection in mice. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 mice. Closed bar, at a dose of 1 mg/kg; Gray bar, 4 mg/kg; hatched bar, 10 mg/kg; Open bar; 20 mg/kg.

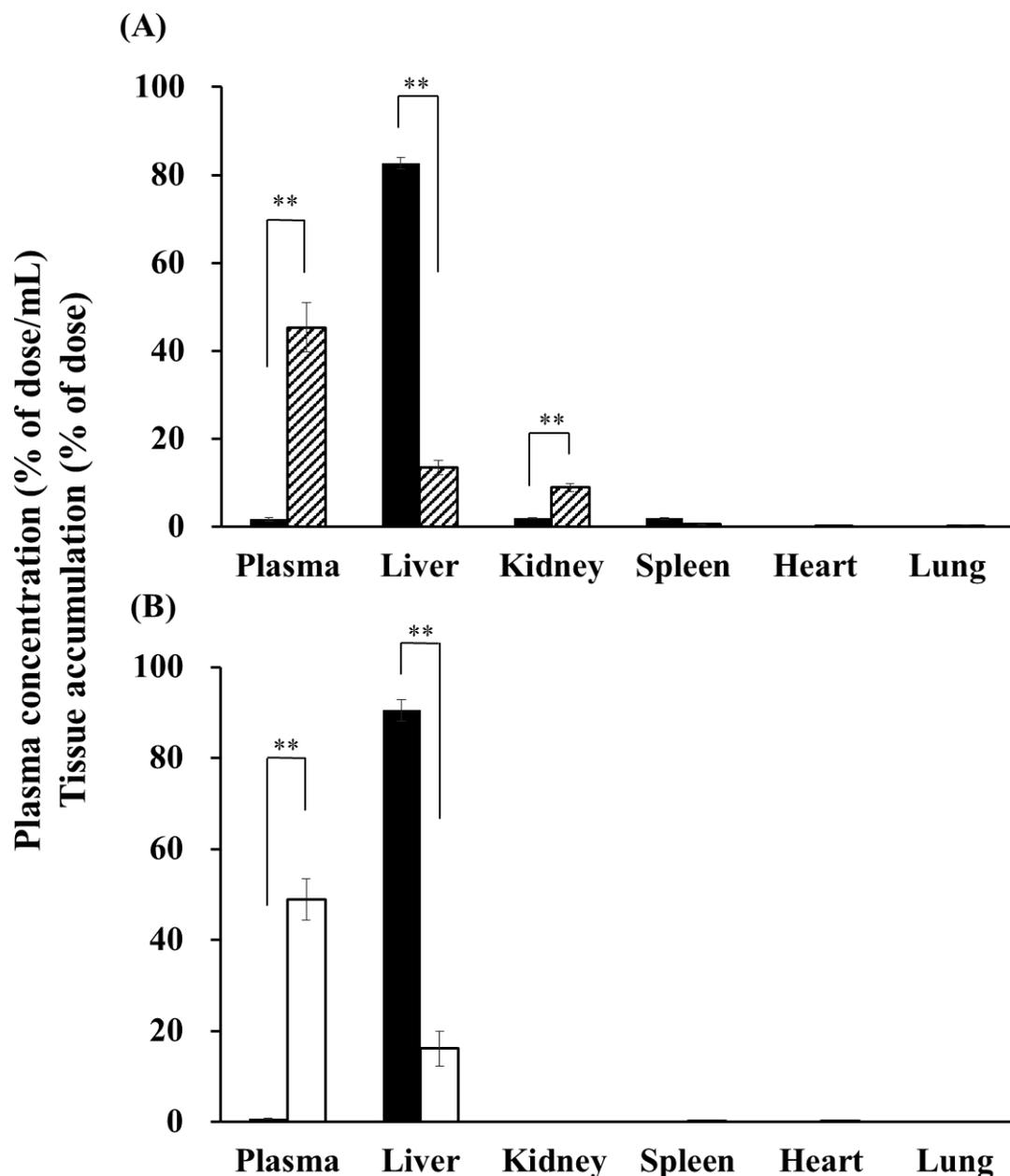


Fig. 25 Biodistribution of (A) ¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc and (B) ¹¹¹In-PEG-Sulfo-BSA-Gal (1 mg/kg) 30 min after intravenous administration in mice. Just before ¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc and ¹¹¹In-PEG-Sulfo-BSA-Gal injection, 20 mg/kg of unlabeled Suc-BSA or Gal-BSA were intravenously injected into mice, respectively. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 mice. Closed bar, without unlabeled Suc-BSA or Gal-BSA; Hatched bar, with unlabeled Suc-BSA; Open bar, with unlabeled Gal-BSA. ** $p < 0.01$

(Sakai et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 2019, 42, 273-279. Fig. 2)

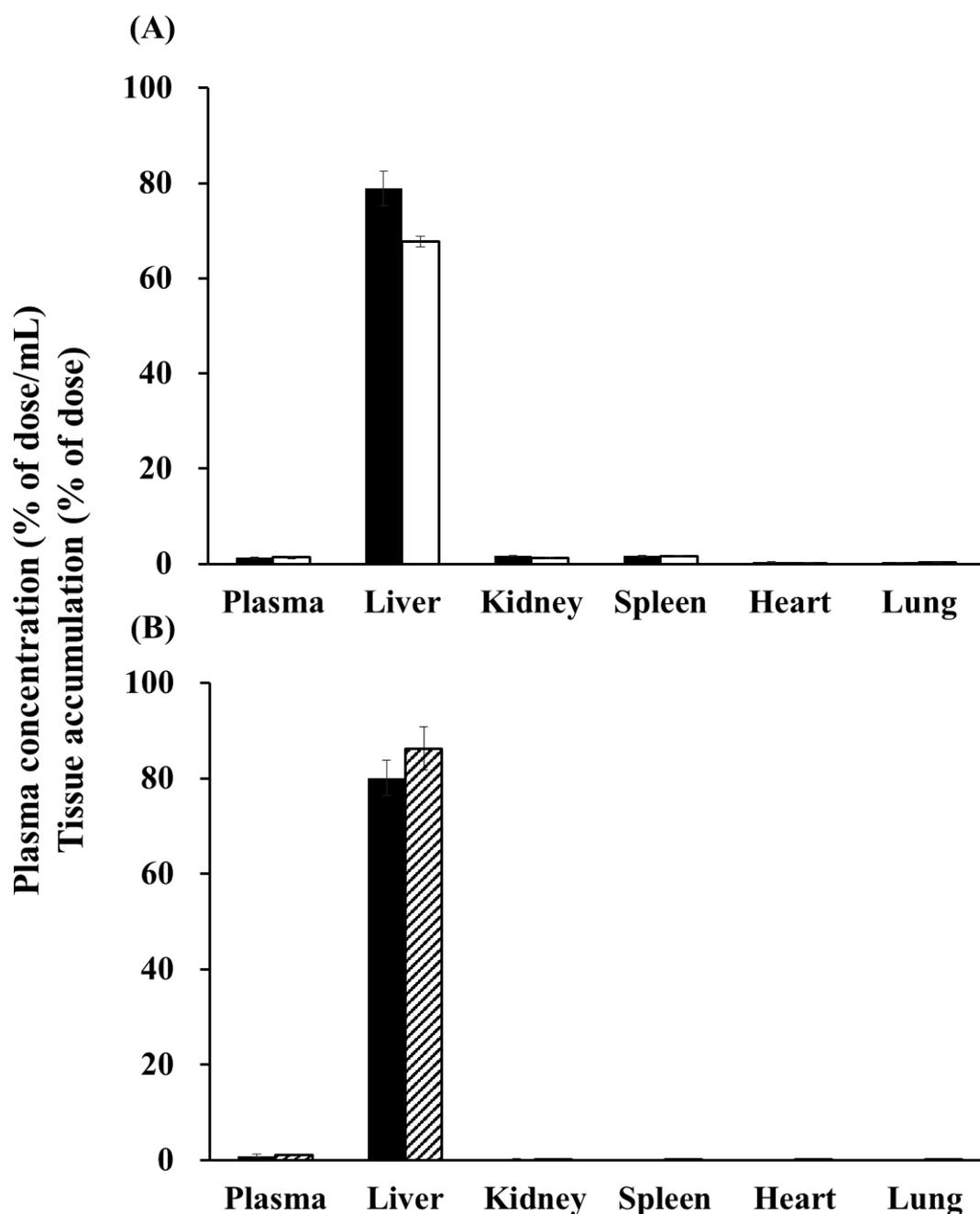


Fig. 26 Plasma concentration and tissue accumulation of (A) ¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc and (B) ¹¹¹In-PEG-Sulfo-BSA-Gal 30 min after intravenous injection in mice (1 mg/kg). Just before ¹¹¹In-Sulfo-BSA-Suc and ¹¹¹In-Sulfo-BSA-Gal injection, 20 mg/kg of unlabeled Gal-BSA or Suc-BSA were intravenously injected into mice, respectively. The results are expressed as the mean ± S.D. of 3 mice. Closed bar, without unlabeled Suc-BSA or Gal-BSA; Open bar, with unlabeled Gal-BSA; Hatched bar, with unlabeled Suc-BSA.

(Sakai et al., *Biol.Pharm. Bull.*, 2019, 42, 273-279. Fig. S1)

II-3 化学修飾スルフォアルブミンの硫化水素放出能の評価

続いて、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal の硫化水素放出能について評価した。Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal を PBS、10% マウス血漿、5 mM GSH 中で反応させ、放出された硫化水素濃度をメチレンブルー法で測定した。その結果、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は PBS、10% マウス血漿中では硫化水素を放出しなかったが、5 mM GSH 中で硫化水素を放出した (Fig. 27)。続いて、5mM GSH 中における硫化水素放出を経時的に測定した。その結果、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は GSH と反応し、速やかに硫化水素を放出した (Fig. 28)。

以上の結果から、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は第 1 章のスルフォアルブミンと同様に硫化水素放出能を保持しており、細胞内環境下を想定した 5 mM GSH 中で硫化水素を放出することが示された。

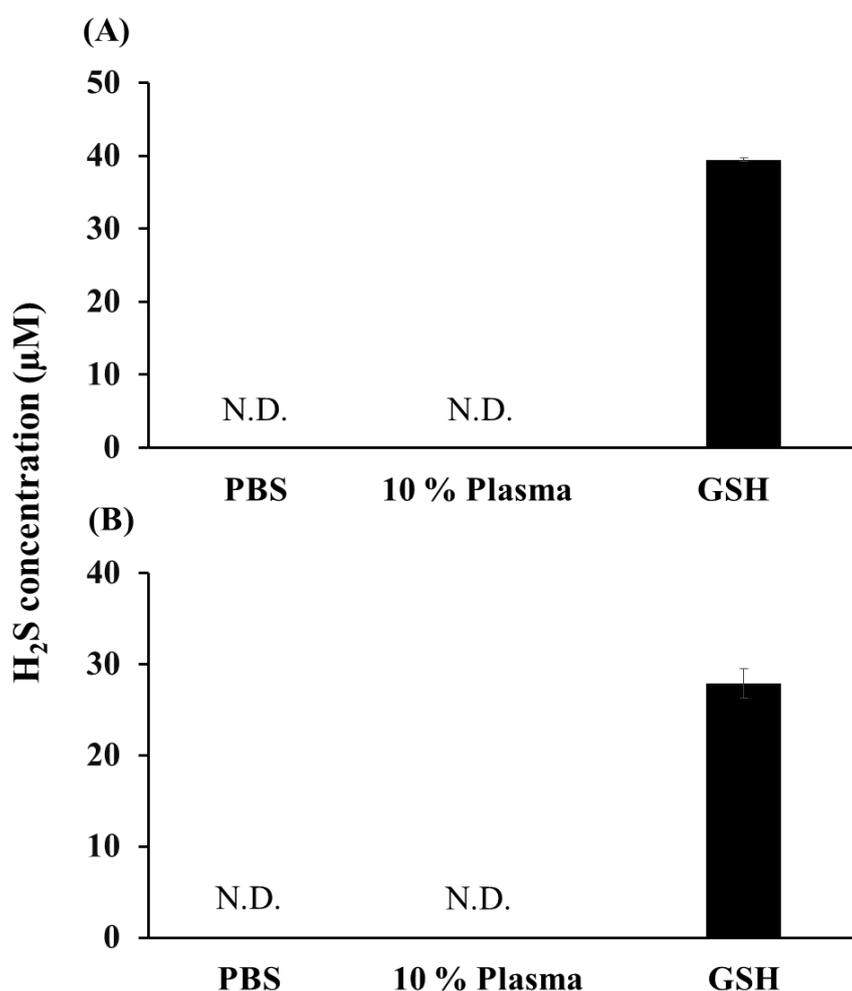


Fig. 27 H₂S release ability of (A) Sulfo-BSA-Suc and (B) PEG-Sulfo-BSA-Gal in PBS, PBS containing 10% mouse plasma and phosphate buffer containing 5 mM GSH after 20 min-incubation. The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 experiments. N.D., not-detected. (Sakai et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 2019, 42, 273-279. Fig. 4)

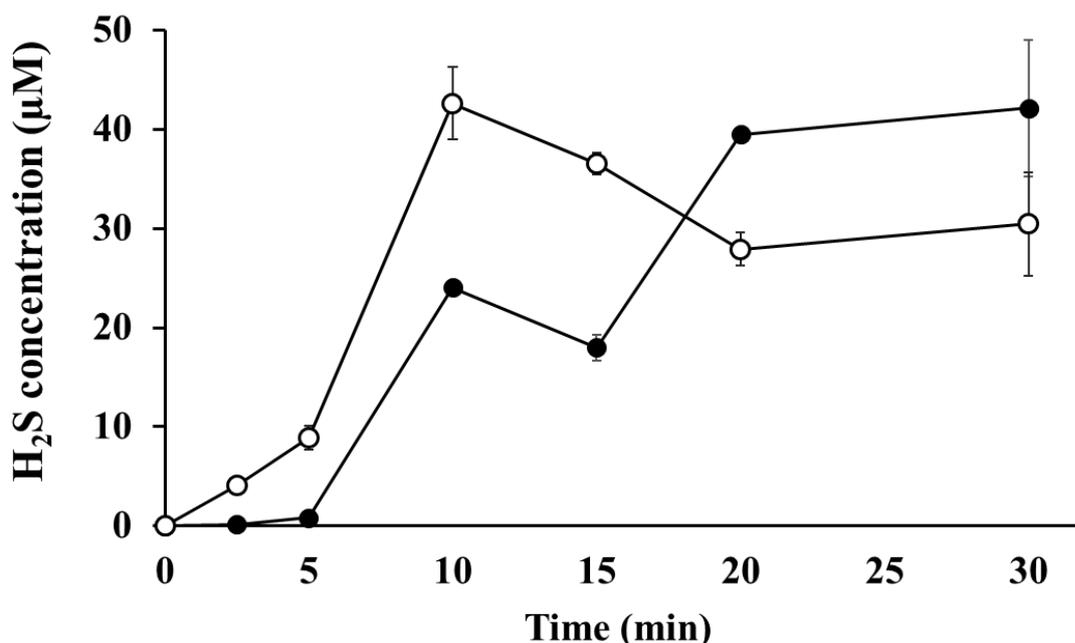


Fig. 28 H₂S release rate from Sulfo-BSA-Suc and PEG-Sulfo-BSA-Gal in phosphate buffer containing 5 mM GSH. ●, Sulfo-BSA-Suc; ○, PEG-Sulfo-BSA-Gal. The results are expressed as the mean ± S.D. of 3 experiments. (Sakai et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 2019, 42, 273-279. Fig. 5)

II-4 化学修飾スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価

前節では、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal が硫化水素放出能を保持しており、細胞内環境下で硫化水素を放出することが明らかとなった。続いて、生細胞中における Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal の硫化水素放出能を評価した。

II-4-a 化学修飾スルフォアルブミンの細胞内取り込み能の評価

まず、スルフォアルブミンが細胞内へ取り込まれるか否かを、蛍光色素である FITC 標識体を用いて評価した。マウスマクロファージ様細胞株である RAW 264.7 細胞（スカベンジャー受容体発現細胞）^{59,60)} に FITC-Sulfo-BSA-Suc を処置し、蛍光顕微鏡で経時的に観察した。その結果、細胞内からの蛍光が時間依存的に増大したことから、Sulfo-BSA-Suc が RAW 264.7 細胞へ取り込まれたことが確認された (Fig. 29)。また、ヒト肝癌由来細胞株である Hep G2 細胞（アシアロ糖タンパク質受容体発現細胞）⁸¹⁾ に FITC-PEG-Sulfo-BSA-Gal を処置し、蛍光顕微鏡で経時的に観察した。その結果、細胞内からの蛍光が時間依存的に増大したことから、PEG-Sulfo-BSA-Gal が Hep G2 細胞へ取り込まれたことが確認された。

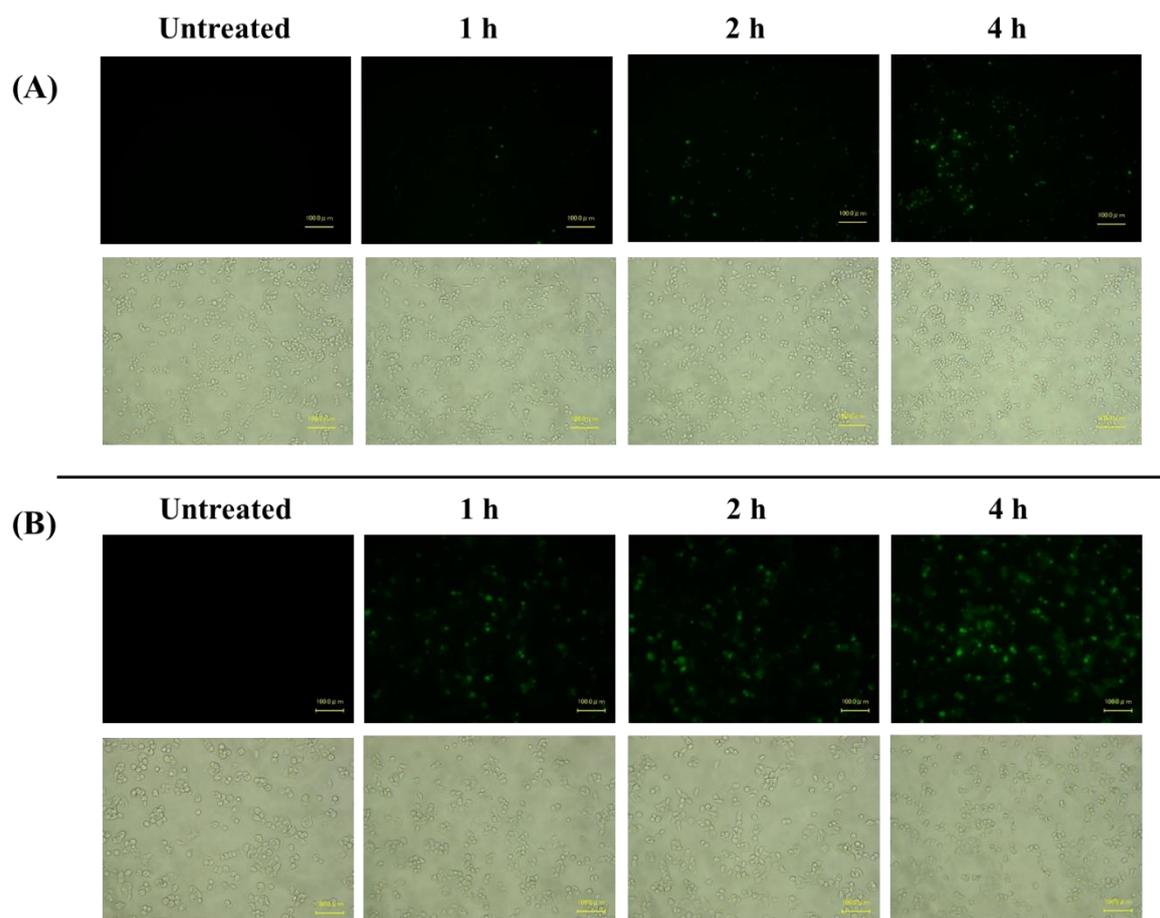


Fig. 29 Fluorescence images of (A) FITC-labeled Sulfo-BSA-Suc in RAW 264.7 cells and (B) PEG-Sulfo-BSA-Gal in Hep G2 cells. Cells were treated with FITC-labeled Sulfo-BSA-Suc and PEG-Sulfo-BSA-Gal (0.5 mg/ml) for 4 h. Upper panels, fluorescence image; Lower panels, bright field image. Scale bar indicate 100 μm . (Sakai et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 2019. 42, 273-279. Fig. 6)

II-4-b 化学修飾スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価

続いて第1章と同様に、細胞内における Sulfo-BSA-Suc 及び PEG-Sulfo-BSA-Gal からの硫化水素放出を、蛍光プローブである HSip-1 を用いて評価した。RAW 264.7 細胞に Sulfo-BSA-Suc を処置、及び Hep G2 細胞に PEG-Sulfo-BSA-Gal を処置することで、HSip-1 由来の蛍光強度が経時的に増大した (Fig. 30)。

以上の結果から、Sulfo-BSA-Suc 及び PEG-Sulfo-BSA-Gal はそれぞれ RAW 264.7、Hep G2 細胞に取り込まれた後、硫化水素を放出することが明らかとなった。

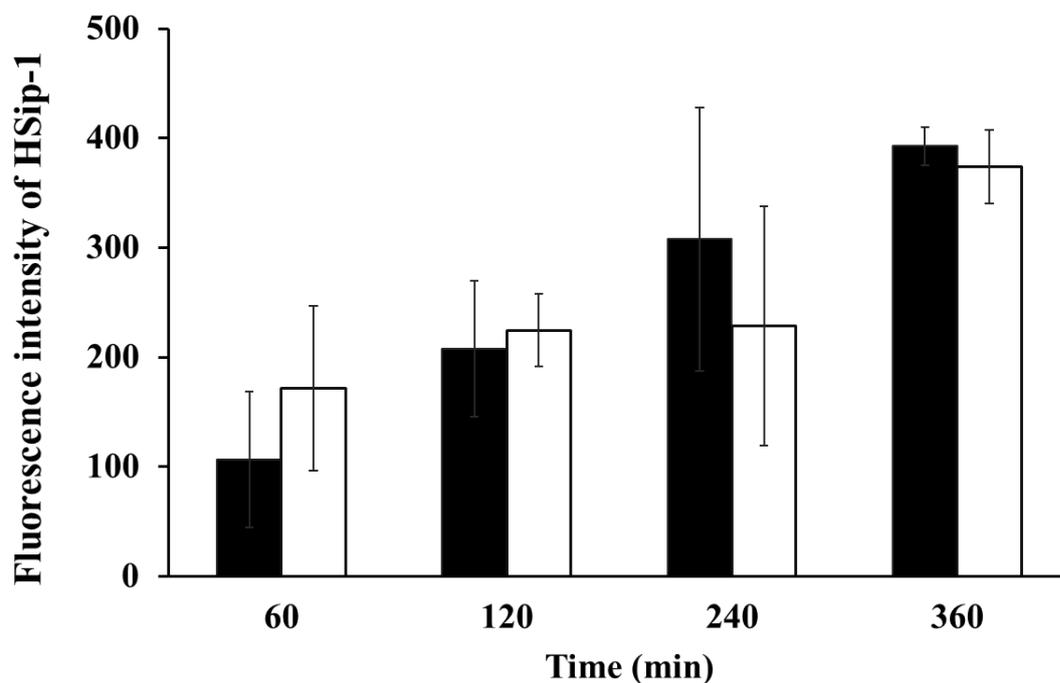


Fig. 30 H₂S release ability of Sulfo-BSA-Suc and PEG-Sulfo-BSA-Gal in RAW 264.7 cells and Hep G2 cells, respectively (100 μ M sulfide group). Cells were treated with HSip-1 (50 μ M) and Sulfo-BSA-Suc (closed bar) or PEG-Sulfo-BSA-Gal (open bar). The results are expressed as the mean \pm S.D. of 3 experiments.

(Sakai et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 2019, 42, 273-279. Fig. 7)

II-5 考察

本章では、硫化水素を用いた効果的な疾患治療法の実現ならびに様々な臓器を対象とした疾患治療への応用を可能にするため、硫化水素プロドラッグの細胞選択的送達法の開発を試みた。すなわち、スルフォアルブミンに標的とする細胞に特異的に認識される標的化素子を化学修飾することで、標的細胞への硫化水素の能動的ターゲティングシステムの開発を目指した。

肝臓の非実質細胞へのターゲティングとして、スカベンジャー受容体による負電荷高分子の認識機構を利用し、スルフォアルブミンに Suc を化学修飾した Sulfo-BSA-Suc を開発した。

また、肝臓の実質細胞へのターゲティングとして、アジアロ糖タンパク質受容体による Gal 修飾高分子の認識機構を利用し、スルフォアルブミンに Gal を化学修飾した PEG-Sulfo-BSA-Gal を開発した。BSA に Gal 及び sulfide 基を修飾した際、溶液中での安定性が低下したが、PEG を修飾することで安定性が向上した。これは、PEG 修飾による水溶性の向上、立体障害により BSA 同士の凝集が抑制されたことによるものと考えられる^{82,83)}。

Yamasaki、Nishikawa らはこれまでに、Gal または Suc を BSA 1 分子あたりそれぞれ約 10、20 分子修飾することで、肝臓への効率的なターゲティングが可能であることを明らかにしている^{44,84)}。そこで Sulfo-BSA-Suc 及び PEG-Sulfo-BSA-Gal の Suc、Gal の修飾数を約 20 分子となるように設計した。各種スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態を評価したところ、Sulfo-BSA、PEG-Sulfo-BSA は血中滞留性が高く、肝臓への移行量は約 20% 程度であった。一方で、標的化素子を修飾した Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は、速やかに血中から消失し、投与量の大半が速やかに肝臓へ移行していることが確認された。一般に、PEG 修飾タンパク質は血中滞留性が増大し、臓器への移行が抑制されることが知られている^{85,86)}。しかし、Sulfo-BSA と PEG-Sulfo-BSA が同様の体内動態を示したことから、PEG-Sulfo-BSA-Gal が速やかに血中から消失したことから、本実験で用いた PEG 修飾数では、スルフォアルブミンの体内動態へはほとんど影響しなかったと考えられる。Sulfo-BSA-Suc、及び PEG-Sulfo-BSA-Gal が肝臓へ移行したことから、その細胞内分布を検討したところ、Sulfo-BSA-Suc は非実質細胞へ、PEG-Sulfo-BSA-Gal は実質細胞選択的に分布した。このことから設計通り、Suc、Gal 修飾によりスルフォアルブミンの標的細胞への選択的ターゲティングに成功した。さらに、スカベンジャー受容体の基質である Suc-BSA 前処置により、Sulfo-BSA-Suc の肝臓への移行量は顕著に低下したが、Gal-BSA 前処置では顕著な変化は見られなかった。また、アジアロ糖タンパク質受容体の基質である Gal-BSA 前処置により PEG-Sulfo-BSA-Gal の肝臓への移行量は顕著に低下したが、Suc-BSA 前処置では顕著な変化は見られなかった。これらの結果から、Sulfo-BSA-Suc は Suc 修飾による負電荷増大により、スカベンジャー受容体を介して肝臓非実質細胞へ取り込まれること、PEG-Sulfo-BSA-Gal は、Gal 修飾によりアジアロ糖タンパク質受容体を介して肝臓実質細胞へ取り込まれることが示唆された。

Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は、第 I 章のスルフォアルブミンと同様に GSH と反応し硫

化水素を放出したが、血漿中では硫化水素を放出しなかった。このことから、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は化学修飾後も硫化水素放出能を保持しており、細胞内で硫化水素を放出することが示唆された。また、肝臓の非実質細胞のモデルとして、スカベンジャー受容体を発現する RAW 264.7 細胞^{59,60)} において、Sulfo-BSA-Suc は経時的に細胞内へ取り込まれ、硫化水素を放出した。同様に肝臓の実質細胞のモデルとして、アジアロ糖タンパク質受容体を発現する Hep G2 細胞⁸¹⁾ において、PEG-Sulfo-BSA-Gal は経時的に細胞内へ取り込まれ、硫化水素を放出した。これらの結果から、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は静脈内投与後、それぞれ標的とした肝臓の非実質細胞及び実質細胞へ移行した後、硫化水素を放出するものであると推察される。

以上、本章では Suc を利用した肝臓非実質細胞ターゲティング型スルフォアルブミンとして Sulfo-BSA-Suc を、Gal を利用した肝臓実質細胞ターゲティング型スルフォアルブミンとして PEG-Sulfo-BSA-Gal の開発に成功した。さらに、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal は標的とする細胞内で硫化水素を放出することが示唆された。以上のように、スルフォアルブミンに標的化素子を修飾することで標的細胞への能動的ターゲティングシステムの開発に成功した。今後、対象とする疾患に合わせた標的化素子を利用することで、様々な臓器を対象とした硫化水素の選択的送達や疾患治療が可能になるものと考えられる。これらの知見は、硫化水素の細胞選択的なターゲティングによる酸化ストレス疾患治療法の開発に有用な情報を提供するものと考えられる。

結論

以上、著者らは2章にわたり、硫化水素プロドラッグの体内動態制御による新規疾患療法の開発を目指して、硫化水素プロドラッグの体内動態制御、放出制御が可能な高分子型硫化水素プロドラッグの開発を行い、以下の結論を得た。

I. アルブミンを利用した高分子型硫化水素プロドラッグ（スルフォアルブミン）の開発

ウシ血清アルブミン (BSA) に硫化水素放出部である sulfide 基を修飾することで、高分子型硫化水素プロドラッグ（スルフォアルブミン）を開発した。スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態を評価したところ、sulfide 基の修飾数に依存して肝臓への移行量が増大した。特に BSA 1 分子あたり、sulfide 基が 30 分子結合した Sulfo (30)-BSA は肝臓選択的な体内動態を示した。Sulfo (30)-BSA の硫化水素放出能を評価したところ、細胞内環境を想定した 5 mM GSH、細胞懸濁液中で硫化水素を放出したが、血漿中では放出しなかった。また、Sulfo (30)-BSA は RAW 264.7 細胞に取り込まれ、細胞内で硫化水素を放出した。これらの結果から、Sulfo (30)-BSA は静脈内投与後、血中では硫化水素を放出せず、肝臓で硫化水素を放出することが示唆された。そこで、四塩化炭素による肝臓の酸化ストレス疾患治療への有用性を評価したところ、既存の低分子型プロドラッグと比較して血漿中 AST、ALT 活性の上昇を顕著に抑制可能であった。

II. 標的化素子を利用したスルフォアルブミンの細胞選択的ターゲティング

硫化水素プロドラッグを疾患治療に用いる際に、有効性や安全性を向上させるため、硫化水素を標的細胞選択的に供給する DDS の開発が有用であると考えられる。そこで、スルフォアルブミンに標的化素子を化学修飾することで、標的細胞への選択的ターゲティングシステムの構築を試みた。肝臓の実質細胞及び非実質細胞には、それぞれ Gal 修飾高分子を認識するアシアロ糖タンパク質受容体が、負電荷の高分子を認識するスカベンジャー受容体を認識するスカベンジャー受容体が発現する。そこで、前章により得られた知見に基づき、血中滞留性を保持している Sulfo (5)-BSA に化学修飾を施すことで、スルフォアルブミンの肝臓内分布の制御を試みた。肝臓非実質細胞へのターゲティングとして Suc を修飾した Sulfo-BSA-Suc を、実質細胞へのターゲティングとして Gal を修飾した PEG-Sulfo-BSA-Gal を合成した。Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal はマウス静脈内投与後、いずれも速やかに投与量の約 80% 以上が肝臓に移行した。また、Sulfo-BSA-Suc はスカベンジャー受容体を介して肝臓の非実質細胞へ、PEG-Sulfo-BSA-Gal はアシアロ糖タンパク質受容体を介して肝臓の実質細胞へ移行していることが明らかとなった。また、Sulfo-BSA-Suc 及び PEG-Sulfo-BSA-Gal はそれぞれ、肝非実質細胞モデルである RAW 264.7 細胞に、実質細胞モデルである Hep G2 細胞に取り込まれ硫化水素を放出することが確認された。これらの結果から、Sulfo-BSA-Suc は肝臓の非実質細胞で、PEG-Sulfo-BSA-Gal は肝臓の実質細胞で

硫化水素を放出することが示唆された。

以上、体内動態制御、硫化水素の放出制御が可能な高分子型硫化水素プロドラッグとして、スルフォアルブミンの開発に成功した。スルフォアルブミンの肝臓移行性を利用して、肝臓の酸化ストレス疾患治療への有用性を明らかにした。さらに、スルフォアルブミンに標的化素子を化学修飾することで標的細胞への能動的ターゲティングが可能であることを明らかとした。これらの知見は、硫化水素プロドラッグの体内動態制御による新規疾患治療法の開発において、有用な情報を提供するものであると考えられる。

実験の部

第 I 章 実験の部

1-a スルフォアルブミンの合成

【試薬】

BSA は Sigma Aldrich 社から購入した。SPDP は同仁化学研究所から購入した。Thioacetic acid、dimethyl sulfoxide (DMSO) は和光純薬工業から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【スルフォアルブミンの合成】

Sulfo (5)-BSA、Sulfo (10)-BSA、Sulfo (30)-BSA は、BSA に SPDP 及び thioacetic acid を、異なる比率で反応させて合成した。Sulfo (30)-BSA の合成に関しては、BSA (30 mg) を 5 mL の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。続いて SPDP (8.48 mg) を 50 μ L の DMSO に溶解し、BSA 溶液へ添加し室温で 2 時間攪拌した。次に 9.57 μ L の thioacetic acid を添加し、さらに 1.5 時間攪拌した³⁵⁾。反応液を 15,000 MWCO の RC 透析膜 (Spectrum Laboratories, Inc., Dominguez, CA) にて蒸留水中で透析した後、超純水で限外濾過 (vivaspin molecular weight cutoff: 10,000, Sartorius, Göttingen, Germany) を 5 回行うことで未反応物を除去した。

1-b スルフォアルブミンの物理化学的性質

【試薬】

3-Indoleacrylic acid は和光純薬工業株式会社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

各種スルフォアルブミン、BSA の分子量は、各種サンプルと 3-indoleacrylic acid を混和し、MALDI TOF-MS (Microflex; Bruker Daltonics, Billerica, MA) で測定した⁸⁷⁾。BSA 1 分子あたりの sulfide 基修飾数は、BSA とスルフォアルブミンの分子量の差から算出した。各種サンプルの直径及びゼータ電位は Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) を用いて、それぞれ動的光散乱法、及びレーザードップラー法で測定した。

2-a 各種スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態

【試薬】

Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid (DTPA), dianhydride は同仁化学研究所から購入

した。VivoTag 800 は PerkinElmer 社から購入した。 $^{111}\text{In-Cl}_3$ は日本メジフィクス社から供与されたものを用いた。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【動物】

以降のすべての動物実験は、清水実験材料株式会社から購入した ddY 雄性マウス (25g) を使用した。また、動物実験は京都薬科大学動物実験実施規定に従った⁸⁸⁾。

【実験方法】

各種スルフォアルブミン及び BSA は、Hnatowich らの方法で ^{111}In 標識した³⁶⁾。 ^{111}In -スルフォアルブミン及び ^{111}In -BSA をマウスへ静脈内投与した (1 mg/kg)。麻酔下で経時的に下大静脈から採血し、10,000 g で5分間遠心することで血漿を採取した。また、マウスを安楽死させた後、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺を摘出した。各臓器中及び血漿中の放射活性をガンマカウンター (1480 Wizard; PerkinElmer, Boston, MA) で測定した。また、BSA を VivoTag 800 と反応させることで、VivoTag-BSA を合成し、第 I 章 1-a と同様の方法で VivoTag-Sulfo (30)-BSA を合成した。VivoTag-Sulfo (30)-BSA をマウスに静脈内投与して180分後、右心室から脱血還流を行った。その後各臓器を摘出し、IVIS Lumina XRMS Series III (PerkinElmer, Boston, MA) で *Ex vivo* 蛍光イメージング画像を取得した。

2-b Sulfo (30)-BSA の肝臓内分布

【試薬】

Collagenase Type I, trypsin inhibitor, from soybean は、和光純薬工業株式会社から購入した。Hank's balanced salts は Sigma Aldrich 社から購入した。4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) は同仁化学研究所から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

Sulfo (30)-BSA の肝臓内分布は、肝臓にコラゲナーゼを灌流することで、実質細胞と非実質細胞を分画後、放射活性から測定した^{41,42)}。マウスに ^{111}In -Sulfo (30)-BSA (1 mg/kg) を静脈内投与した。30分後、マウスを麻酔下で開腹し、下大静脈から前灌流液 (10 mM Ca^{2+} - Mg^{2+} -free HEPES buffer, pH 7.2) を 2 mL/min の速度で約 10 分間灌流した。また、灌流開始直後に下大静脈を切断した。続いて、10 mM HEPES buffer (5 mM CaCl_2 , 0.05% collagenase, 0.005% trypsin inhibitor 含有, pH 7.5) を 2 mL/min の速度で約 10 分間灌流した。その後、肝臓を摘出し、Hanks-HEPES 緩衝液 (pH 7.2) 中でハサミとピペッティングにより細胞を分離した。細胞懸濁液を綿で濾過し、濾液を 50×g で1分間遠心した。沈殿した細胞を、さらに4回 50×g で1分間遠心することで、実質細胞を回収した。また、最初の遠心後の上清に含まれる細胞を、さらに4回 50×g で1分間遠心して上清を回

収した。続いて3回200×gで2分間遠心し、沈殿した非実質細胞を回収した。得られた実質細胞及び非実質細胞を2.0 mLのHanks-HEPES緩衝液で懸濁し、細胞数をヌクレオカウンター(NC-100; Chemometec, Allerød, Denmark)で測定した。また、放射活性をガンマカウンターで測定した。各細胞への移行量は、% of dose/10⁷ cellsで計算した。

2-c Sulfo (30)-BSA の肝移行阻害実験

【試薬】

Succinic anhydride は和光純薬工業株式会社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

Suc-BSA は、BSA と succinic anhydride を0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で反応させた後、vivaspin (molecular weight cutoff: 10,000) で限外濾過を行うことで合成した⁸⁹⁾。Suc-BSA (20 mg/kg) をマウスに静脈内投与した直後に、¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA (1 mg/kg) を静脈内投与した。30分後、¹¹¹In-Sulfo (30)-BSA の血漿中濃度及び臓器移行量を、第I章-2-aと同様の方法で測定した。

3-a GSH 中における硫化水素放出能の評価

【試薬】

N,N-dimethyl-*p*-phenylenediamine、zinc acetate、Iron(III) chloride は和光純薬工業から購入した。Sodium sulfide、H₂S prodrug 8I は同仁化学研究所から購入した。GSH はMP Biomedicals社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

Sulfo (30)-BSA をPBS、または5 mMのGSH含有PBSでsulfide基が150 μMとなるように溶解した。経時的に、硫化水素濃度を以下のメチレンブルー法で測定した⁴⁵⁻⁴⁷⁾。サンプル100 μL、1% zinc acetate 120 μL、20 mM N,N-dimethyl-*p*-phenylenediamine (7.2 M HCl) 20 μL、30 mM Iron(III) chloride (1.2 M HCl) 20 μLをサンプリングチューブで混和した。30分間インキュベートした後、200 μLを96-well plateに加え、670 nmの波長における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した (Powerscan® HT; DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan)。サンプル中の硫化水素の濃度は、sodium sulfideを用いた検量線から計算した。

3-b 細胞懸濁液、血漿中における硫化水素放出能の評価

【試薬】

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、antibiotic-antimycotic mixed stock solution はナカラ

イテスク株式会社から購入した。Fetal bovine serum (FBS) は、Biosera 社から購入した。

【細胞】

RAW 264.7 細胞は、DMEM (10% FBS、1% antibiotic-antimycotic mixed stock solution (10,000 IU/mL penicillin、10 mg/mL streptomycin、25 mg/mL amphotericin B)) 中で、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

【実験方法】

RAW 264.7 細胞をセルスクレーパーで剥がし、PBS で3回洗浄した。細胞数が 2×10^7 cells/ml となるように PBS で懸濁し、液体窒素及び 37 °C の恒温槽で3回凍結融解した。その後、遠心により凝集物を除去することで、細胞懸濁液を調製した。また、マウスの血漿を PBS で希釈することで、10% マウス血漿を調製した。Sulfo (30)-BSA 及び未修飾 BSA を、PBS、細胞懸濁液、10% マウス血漿中で sulfide 基が 400 μ M となるように溶解した。20 分後、硫化水素濃度を第 I 章 3-a と同様メチレンブルー法で測定した。

4-a スルフォアルブミンの細胞内取り込み能の評価

【試薬】

FITC isomer I は Sigma Aldrich 社から購入した。

【実験方法】

BSA と FITC isomer I を反応させ、FITC-BSA を合成した⁹⁰⁾。その後、第 I 章 1-a と同様の方法で FITC-Sulfo (30)-BSA を合成した。24-well plate に、RAW 264.7 細胞を 1.5×10^5 cells/well で播種し、DMEM 中で一晩培養した。DMEM を除去し、FITC-Sulfo (30)-BSA (1 mg/mL) を含む DMEM を処置した。2-4 時間後、DMEM を除去し、PBS で3回洗浄した。その後、蛍光顕微鏡で蛍光画像を観察した (BZ-8000; Keyence Japan, Osaka, Japan)。

4-b スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価

【試薬】

HSip-1 は同仁化学研究所から購入した。Hanks' balanced salt solution (HBSS) はナカライテスク社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

RAW 264.7 細胞を 96-well plate に 1.0×10^5 cells/well で播種し、DMEM 中で一晩培養した。DMEM を除去し、Sulfo (30)-BSA (Sulfide 基として 200 μ M)、及び HSip-1 (50 μ M) を含む HBSS を処置した。経時的に、HBSS 中の蛍光強度を、励起波長 485 nm、蛍光波長 528 nm の条件でマ

マイクロプレートリーダーを用いて測定した (Powerscan® HT; DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan)。

5-a 四塩化炭素誘発性肝障害モデルマウスにおける血漿中トランスアミナーゼ活性の評価

【試薬】

Carbon tetrachloride、トランスアミナーゼ CII テストワコーは和光純薬工業株式会社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

ゴマ油で希釈した carbon tetrachloride (0.9 % v/v) 150 μ L をマウスに腹腔内投与することで、肝障害モデルマウスを作成した⁵³⁾。同時に、PBS、H₂S prodrug 8l、Sulfo (30)-BSA を静脈内投与した (3.5 μ mol sulfide group/kg)。24 時間後、麻酔下で下大静脈から採血し、遠心分離することで血漿を回収した。血漿中 AST、ALT 活性をトランスアミナーゼ CII テストワコーで測定した。

5-b 四塩化炭素誘発性肝障害モデルマウスにおける肝臓の組織学的観察

【実験方法】

実験終了後のマウスの肝臓を摘出し、4% パラホルムアルデヒド (PFA) 中で臓器を固定した。その後、厚さ 3 μ m の肝切片を作成し、HE 染色を行った後、顕微鏡で観察した (BZ-8000; Keyence Japan, Osaka, Japan)。

第 II 章 実験の部

1-a Sulfo-BSA-Suc の合成

【試薬】

BSA は Sigma Aldrich 社から購入した。Thioacetic acid、DMSO、succinic anhydride は、和光純薬工業から購入した。SPDP は東京化成工業株式会社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

BSA (30 mg) を 6.0 mL の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。SPDP 1.0 mg を 60 μ L の DMSO に溶解し、BSA 溶液に添加して室温で 2 時間攪拌した。反応液を超純水で 5 回限外濾過し (vivaspen MWCO:10,000Da, Sartorius, Göttingen, Germany) 凍結乾燥した (BSA-PDP)。BSA-PDP (30mg) を 3 mL の 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH8.5) に溶解した。Succinic anhydride (3.1 mg) を 30 μ L の DMSO に溶解し、BSA-PDP 溶液へ添加し、室温で 1 時間攪拌した⁸⁹⁾。その後、反応溶液を超純水で 5 回限外濾過し、凍結乾燥した (PDP-BSA-Suc)。PDP-BSA-Suc (30 mg) を 6.0 mL の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、1.1 μ L の thioacetic acid を添加し 1.5 時間攪拌した。続いて、反応溶液を超純水で 5 回限外濾過し、凍結乾燥して Sulfo-BSA-Suc を得た。比較対照として、Suc を修飾していない Sulfo-BSA も同様に合成した。分子量は MALDI TOF-MS (AXIMA performance, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) で、第 I 章 1-b と同様の方法で測定した。

1-b PEG-Sulfo-BSA-Gal の合成

【試薬】

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC)、2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) は同仁化学研究所から購入した。4-aminophenyl β -D-galactopyranoside は東京化成工業株式会社から購入した。 α -Succinimidylsuccinyl- ω -methoxy-polyoxyethylene (PEG₂₀₀₀-NHS, average molecular mass, 2000 Da) は日油株式会社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

BSA (30 mg) を 3.0 mL の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。PEG₂₀₀₀-NHS (10.6 mg) を BSA 溶液に添加し、室温で 2 時間攪拌した。その後、反応溶液を超純水で 5 回限外濾過し、凍結乾燥した (PEG-BSA)。次に、PEG-BSA (30 mg) を 3mL の 0.1 M の MES 緩衝液 (pH 5.0) に溶解し、EDC (14.1 mg)、4-aminophenyl β -D-galactopyranoside (19.9 mg) を加え、室温で 2 時間攪拌した。その後、反応溶液を超純水で 5 回限外濾過し、凍結乾燥した (PEG-BSA-Gal)。次に、

PEG-BSA-Gal (30 mg) を 6.0 mL の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。SPDP (1.1 mg) を 60 μ L の DMSO に溶解して反応溶液に加え、室温で 2 時間攪拌した。続いて、反応溶液を超純水で 5 回限外濾過し、凍結乾燥した (PEG-PDP-BSA-Gal)。次に、PEG-PDP-BSA-Gal (30 mg) を 6.0 mL の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、1.2 μ L の thioacetic acid を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。その後、反応溶液を超純水で 5 回限外濾過し、凍結乾燥して PEG-Sulfo-BSA-Gal を得た。比較対照として、Gal 修飾を行っていない PEG-Sulfo-BSA を同様の方法で合成した。分子量は第 II 章 1-a と同様の方法で測定した。

1-c 化学修飾スルフォアルブミンの物理化学的性質

【試薬】

Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)、dithiothreitol (DTT)、anthrone、は、和光純薬工業株式会社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

Sulfo-BSA-Suc 1 分子あたりの Suc 修飾数は、以下の TNBS 法で算出した⁷⁸⁾。超純水に溶解したサンプル 100 μ L を、4% NaHCO₃ (pH 8.5) 100 μ L、0.1% TNBS 100 μ L と混和した。40 °C で 2 時間インキュベートし、10% sodium lauryl sulfate (SDS) 100 μ L、1N HCl 50 μ L を加えた。その後、マイクロプレートリーダーで 335 nm の波長における吸光度を測定した。未修飾 BSA でも同様の実験を行い、アミノ基の残存数から Suc の修飾数を算出した。また、sulfide 基修飾数は以下の通り、BSA-PDP と DTT を反応させ、343 nm における吸光度から算出した⁹¹⁾。BSA-PDP を超純水で溶解し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した DTT と混和した。343 nm における吸光度から、遊離した 2-mercaptopyridine を定量することで PDP 修飾数を算出した。PEG-Sulfo-BSA-Gal の PEG 修飾数は、BSA と PEG-BSA の分子量の差から算出した。Gal 修飾数は以下の anthrone 法で算出した⁷⁹⁾。超純水に溶解したサンプル 40 μ L を、0.2% anthrone (H₂SO₄) 80 μ L と混和した。90 °C で 16 分間加熱後、氷上で急冷した。100 μ L を 96-well plate に移し、625 nm における吸光度から Gal 濃度を測定した。Sulfide 基修飾数は、PEG-PDP-BSA-Gal と DTT を上述の通り反応させることで算出した。各種サンプルの直径及びゼータ電位は Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) を用いて、それぞれ動的光散乱法、及びレーザードップラー法で測定した。

2-a 化学修飾スルフォアルブミンのマウス静脈内投与後の体内動態

【試薬】

DTPA, dianhydride は同仁化学研究所から購入した。¹¹¹In-Cl₃ は日本メジフィクス社から供与されたものを用いた。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

Sulfo-BSA、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA、PEG-Sulfo-BSA-Gal は、第 I 章 2-a と同様の方法で ^{111}In 標識した。各サンプルの血漿中濃度、各種臓器移行量の測定は、第 I 章 2-a と同様の方法で行った。

2-b 化学修飾スルフォアルブミンの肝臓内分布

【試薬】

Collagenase Type I, trypsin inhibitor, from soybean は、和光純薬工業株式会社から購入した。Hank's balanced salts は Sigma Aldrich 社から購入した。4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) は同仁化学研究所から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

^{111}In -Sulfo-BSA-Suc、 ^{111}In -PEG-Sulfo-BSA-Gal をマウスに 1 mg/kg の投与量で静脈内投与した。以後の実験は、第 I 章 2-b の実験と同様に行った。

2-c 化学修飾スルフォアルブミンの肝移行阻害実験

【実験方法】

^{111}In -Sulfo-BSA-Suc 及び ^{111}In -PEG-Sulfo-BSA-Suc を 1、4、10、20 mg/kg の投与量でマウスに尾静脈内投与した。30 分後、血漿中濃度、各種臓器移行量の測定を、第 I 章 2-a と同様の方法で行った。Suc-BSA は、第 I 章 2-c と同様の方法で合成した。Gal-BSA は BSA を 0.1 M の MES 緩衝液 (pH 5.0) 中で、EDC、4-aminophenyl β -D-galactopyranoside と室温で 2 時間攪拌し、超純水で 5 回限外濾過することで合成した。Gal-BSA (20 mg/kg) をマウスに静脈内投与し⁸⁰⁾、直後に ^{111}In -Sulfo-BSA-Suc または ^{111}In -PEG-Sulfo-BSA-Gal (1mg/kg) を投与した。同様に Suc-BSA (20 mg/kg) をマウスに静脈内投与し⁴⁴⁾、直後に ^{111}In -Sulfo-BSA-Suc または ^{111}In -PEG-Sulfo-BSA-Gal (1mg/kg) を投与した。30 分後、 ^{111}In -Sulfo-BSA-Suc、 ^{111}In -PEG-Sulfo-BSA-Gal の血漿中濃度、各種臓器移行量の測定を上述の方法で測定した。

3 化学修飾スルフォアルブミンの硫化水素放出能の評価

【試薬】

N,N-dimethyl-*p*-phenylenediamine、zinc acetate、Iron(III) chloride は和光純薬工業から購入した。Sodium sulfide は同仁化学研究所から購入した。GSH は MP Biomedicals 社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal を PBS、5 mM の GSH 含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4)、10% マウス血漿中 (PBS) に、sulfide 基が 150 μ M となるようにサンプリングチューブ内に溶解した。20 分後、硫化水素濃度を第 I 章 3-a と同様にメチレンブルー法で測定した。また、Sulfo-BSA-Suc、PEG-Sulfo-BSA-Gal を 5 mM の GSH 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に、sulfide 基が 150 μ M となるように溶解した。経時的に、硫化水素濃度を上述の方法で測定した。また、サンプル、1% zinc acetate、20 mM N,N-dimethyl-p-phenylenediamine、30 mM Iron(III) chloride を混和後、凝集物は遠心にて除去して吸光度を測定した。

4-a 化学修飾スルフォアルブミンの細胞内取り込み能の評価

【試薬】

DMEM、HBSS、antibiotic-antimycotic mixed stock solution はナカライテスク株式会社から購入した。Fetal bovine serum (FBS) は、Biosera 社から購入した。FITC isomer I は Sigma Aldrich 社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

RAW 264.7 細胞、Hep G2 細胞は第 I 章 3-b と同様の方法で培養した。

【試薬】

BSA と FITC isomer I を反応させ、FITC-BSA を合成した後、第 II 章 1-a と同様の方法で FITC-Sulfo-BSA-Suc を合成した。FITC-PEG-Sulfo-BSA-Gal は、PEG-Sulfo-BSA-Gal と FITC isomer I を反応させることで合成した。48-well plate に、RAW 264.7 細胞及び Hep G2 細胞を 1.0×10^5 cells/well で播種し、DMEM 中で一晩培養した。DMEM を除去し、RAW 264.7 細胞に FITC-Sulfo-BSA-Suc (0.5mg/mL) を含む DMEM を、Hep G2 細胞に FITC-PEG-Sulfo-BSA-Gal (0.5mg/mL) を含む HBSS を処置した。以降の実験は、第 I 章 4-a と同様の方法で行った。

4-b 化学修飾スルフォアルブミンの細胞内における硫化水素放出能の評価

【試薬】

HSip-1 は同仁化学研究所から購入した。HBSS はナカライテスク社から購入した。その他の試薬に関しては特級試薬を用いた。

【実験方法】

96-well plate に、RAW 264.7 細胞、Hep G2 細胞を 1.0×10^5 cells/well で播種し、DMEM 中で一

晩培養した。DMEM を除去し、RAW 26F4.7 細胞に Sulfo-BSA-Suc (Sulfide 基として 100 μ M)、及び HSip-1 (50 μ M) を含む HBSS を処置した。また、Hep G2 細胞に PEG-Sulfo-BSA-Gal (Sulfide 基として 100 μ M)、及び HSip-1 (50 μ M) を含む HBSS を処置した。以降の実験は、第 I 章 4-b と同様の方法で行った。

引用文献

- 1) Abe, K.; Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 1066-1071.
- 2) Untereiner, A. A.; Fu, M.; Módos, K.; Wang, R.; Ju, Y. J.; Wu, L. Stimulatory effect of CSE-generated H₂S on hepatic mitochondrial biogenesis and the underlying mechanisms. *Nitric Oxide.* **2016**, *58*, 67-76.
- 3) Shibuya, N.; Mikami, Y.; Kimura, Y.; Nagahara, N.; Kimura, H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J. Biochem.* **2009**, *146*, 623-626.
- 4) Ahmad, A.; Gerö, D.; Olah, G.; Szabo, C. Effect of endotoxemia in mice genetically deficient in cystathionine- γ -lyase, cystathionine- β -synthase or 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *38*, 1683-1692.
- 5) Jha, S.; Calvert, J. W.; Duranski, M. R.; Ramachandran, A.; Lefer, D. J. Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Am. J. Physiol. Hert. Circ. Physiol.* **2008**, *295*, H801-H806.
- 6) Benetti, L. R.; Campos, D.; Gurgueira, S. A.; Vercesi, A. E.; Guedes, C. E. V.; Santos, K. L.; Wallace, J. L.; Teixeira, S. A.; Florenzano, J.; Costa, S. K.; Muscará, M.N.; Ferreira, H. H. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *698*, 463-469.
- 7) Sivarajah, A.; Collino, M.; Yasin, M.; Benetti, E.; Gallicchio, M.; Mazzon, E.; Cuzzocrea, S.; Fantozzi, R.; Thiemermann, C. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock* **2009**, *31*, 267-274.
- 8) Elrod, J. W.; Calvert, J. W.; Morrison, J.; Doeller, J. E.; Kraus, D. W.; Tao, L.; Jiao, X.; Scalia, R.; Kiss, L.; Szabo, C.; Kimura, H.; Chow, C. W.; Lefer, D. J. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 15560-15565.
- 9) Fan, H. N.; Wang, H. J.; Yang-Dan, C. R.; Ren, L.; Wang, C.; Li, Y. F.; Deng, Y. Protective effects of hydrogen sulfide on oxidative stress and fibrosis in hepatic stellate cells. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *7*, 247-253.
- 10) Leffler, C. W.; Parfenova, H.; Jaggar, J. H.; Wang, R. Carbon monoxide and hydrogen sulfide: gaseous messengers in cerebrovascular circulation. *J. Appl. Physiol.* **2006**, *100*, 1065-1076.
- 11) Chen, C. Q.; Xin, H.; Zhu, Y. Z. Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great

- pharmacological potential. *Acta Pharmacol. Sin.* **2007**, *28*, 1709-1716.
- 12) Wagner, F.; Asfar, P.; Calzia, E.; Radermacher, P.; Szabó, C. Bench-to-bedside review: hydrogen sulfide-the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Crit. Care* **2009**, *13*, 213.
 - 13) Powell, C. R.; Dillon, K. M.; Matson, J. B. A Review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *149*, 110-123.
 - 14) Calvert, J. W.; Jha, S.; Gundewar, S.; Elrod, J. W.; Ramachandran, A.; Pattillo, C. B.; Kevil, C. G.; Lefer, D. J. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 365-374.
 - 15) Li, L.; Whiteman, M.; Guan, Y. Y.; Neo, K. L.; Cheng, Y.; Lee, S. W.; Zhao, Y.; Baskar, R.; Tan, C. H.; Moore, P. K. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* **2008**, *117*, 2351-2360.
 - 16) Liang, D.; Wu, H.; Wong, M. W.; Huang, D. Diallyl trisulfide is a fast H₂S donor, but diallyl disulfide is a slow one: the reaction pathways and intermediates of glutathione with polysulfides. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4196-4199.
 - 17) Li, L.; Rossoni, G.; Sparatore, A.; Lee, L. C.; Del Soldato, P.; Moore, P. K. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 706-719.
 - 18) Predmore, B. L.; Lefer, D. J. Development of hydrogen sulfide-based therapeutics for cardiovascular disease. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2010**, *3*, 487-498.
 - 19) Bardaweel, S. K.; Gul, M.; Alzweiri, M.; Ishaqat, A.; AL Salamat, H. A.; Bashatwah, R. M. Reactive oxygen species: the dual role in physiological and pathological conditions of the human body. *Eurasian J. Med.* **2018**, *50*, 193-201.
 - 20) Nguyen, G. T.; Green, E. R.; Mecsas, J. Neutrophils to the ROScues: mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*:373
 - 21) Billings, E. A.; Lee, C. S.; Owen, K. A.; D'Souza, R. S.; Ravichandran, K. S.; Casanova, J. E. The adhesion GPCR BAI1 mediates macrophage ROS production and microbicidal activity against Gram-negative bacteria. *Sci. Signal.* **2016**, *9*(413):ra14.
 - 22) Townsend, D. M.; Tew, K. D.; Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 145-155.
 - 23) Rietjens, I. M.; Boersma, M. G.; Haan, L. D.; Spenkeliink, B.; Awad, H. M.; Cnubben, N. H.; Van Zanden, J. J.; Van der Woude, H.; Alink, G. M.; Koeman, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *11*, 321-333.
 - 24) Poljsak, B.; Šuput, D.; Milisav, I.; Achieving the balance between ros and antioxidants : when to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 2013:956792.

- 25) Mao, G. D.; Thomas, P. D.; Lopaschuks, G. D.; Poznanskyq, M. J.; Tg, C. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the fenton reaction in SOD toxicity. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 416-420.
- 26) Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 231-255.
- 27) Sies, H. Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes. *Klin. Wochenschr.* **1991**, *69*, 965-968.
- 28) Shimada, S.; Fukai, M.; Wakayama, K.; Ishikawa, T.; Kobayashi, N.; Kimura, T.; Yamashita, K.; Kamiyama, T.; Shimamura, T.; Taketomi, A.; Todo, S. Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver. *Surg. Today* **2015**, *45*, 892-903.
- 29) Wei, W.; Wang, C.; Li, D.; The content of hydrogen sulfide in plasma of cirrhosis rats combined with portal hypertension and the correlation with indexes of liver function and liver fibrosis. *Exp. Ther. Med.* **2017**, *14*, 5022-5026.
- 30) Steel, L. F.; Trotter, M. G.; Nakajima, P. B.; Mattu, T. S.; Gonye, G.; Block, T. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 262–270.
- 31) Filoti, D. I.; Shire, S. J.; Yadav, S.; Laue, T. M. Comparative study of analytical techniques for determining protein charge. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 2123-2131.
- 32) Kinoshita, R.; Ishima, Y.; Ikeda, M.; Kragh-Hansen, U.; Fang, J.; Nakamura, H.; Chuang, V. T.; Tanaka, R.; Maeda, H.; Kodama, A.; Watanabe, H.; Maeda, H.; Otagiri, M.; Maruyama, T. S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano-EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes. *J. Control. Release* **2015**, *217*, 1-9.
- 33) Lin, T.; Zhao, P.; Jiang, Y.; Tang, Y.; Jin, H.; Pan, Z.; He, H.; Yang, V. C.; Huang, Y. Blood-brain-barrier-penetrating albumin nanoparticles for biomimetic drug delivery via albumin-binding protein pathways for anti-glioma therapy. *ACS Nano* **2016**, *10*, 9999-10012.
- 34) Lu, W.; Zhang, Y.; Tan, Y. Z.; Hu, K. L.; Jiang, X. G.; Fu, S. K. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery. *J. Control. Release* **2005**, *107*, 428-448.
- 35) Zhao, Y.; Bhushan, S.; Yang, C.; Otsuka, H.; Stein, J. D.; Pacheco, A.; Peng, B.; Devarie-baez, N. O.; Aguilar, H. C.; Lefer, D. J.; Xian, M. Controllable hydrogen sulfide donors and their activity against myocardial ischemia-reperfusion injury. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1283-1290.
- 36) Hnatowich, D.J.; Layne, W.W.; Childs, R.L. The preparation and labeling of DTPA-coupled albumin. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1982**, *33*, 327-332.
- 37) Ma, S. F.; Nishikawa, M.; Katsumi, H.; Yamashita, F.; Hashida, M. Cationic charge-dependent hepatic delivery of amidated serum albumin. *J. Control. Release* **2005**, *102*, 583–594.

- 38) Petersen, L. K.; Huntimer, L.; Walz, K.; Ramer-Tait, A.; Wannemuehler, M. J.; Narasimhan, B. Combinatorial evaluation of *in vivo* distribution of polyanhydride particle-based platforms for vaccine delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 2213-2225.
- 39) Blouin, A.; Bolender, R. P.; Weibel, E. R. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell. Biol.* **1977**, *72*, 441-455.
- 40) Tanaka, T.; Fujishima, Y.; Hanano, S.; Kaneo, Y. Intracellular disposition of polysaccharides in rat liver parenchymal and nonparenchymal cells. *Int. J. Pharm.* **2004**, *286*, 9-17.
- 41) Yamada, M.; Nishikawa, M.; Kawakami, S.; Hattori, Y.; Nakano, T.; Yamashita, F.; Hashida, M. Tissue and intrahepatic distribution and subcellular localization of a mannosylated lipoplex after intravenous administration in mice. *J. Control. Release* **2004**, *98*, 157-167.
- 42) Yabe, Y.; Nishikawa, M.; Tamada, A.; Takakura, Y.; Hashida, M. Targeted delivery and improved therapeutic potential of catalase by chemical modification: combination with superoxide dismutase derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1176-1184.
- 43) Kawabata, K.; Takakura, Y.; Hashida, M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 825-830.
- 44) Yamasaki, Y.; Sumimoto, K.; Nishikawa, M.; Yamashita, F.; Yamaoka, K.; Hashida, M.; Takakura, Y. Pharmacokinetic analysis of *in vivo* disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for *in vivo* recognition by receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301*, 467-477.
- 45) Huang, S.; Chua, J. H.; Yew, W. S.; Sivaraman, J.; Moore, P. K.; Tan, C. H.; Deng, L. W. Site-directed mutagenesis on human cystathionine- γ -lyase reveals insights into the modulation of H₂S production. *J. Mol. Biol.* **2010**, *396*, 708-718.
- 46) Kang, J.; Li, Z.; Organ, C. L.; Park, C. M.; Yang, C. T.; Pacheco, A.; Wang, D.; Lefer, D. J.; Xian, M. pH-controlled hydrogen sulfide release for myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6336-6339.
- 47) Lawrence, N. S.; Davis, J.; Compton, R. G. Analytical strategies for the detection of sulfide: a review. *Talanta*. **2000**, *52*, 771-784.
- 48) Schafer, F. Q.; Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191-1212.
- 49) Sasakura, K.; Hanaoka, K.; Shibuya, N.; Mikami, Y.; Kimura, Y.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Kimura, H.; Nagano, T. Development of a highly selective fluorescence probe for hydrogen sulfide. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18003-18005.
- 50) Basu, S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation

- by antioxidant nutrients. *Toxicology* **2003**, *189*, 113-127.
- 51) Jeong, H. G.; Park, H. Y. The prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice by α -hederin: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1998**, *45*, 163-170.
- 52) Wu, Y.; Li, L.; Wen, T.; Li, Y. Q. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology* **2007**, *232*, 50-56.
- 53) Ma, S. F.; Nishikawa, M.; Katsumi, H.; Yamashita, F.; Hashida, M. Liver targeting of catalase by cationization for prevention of acute liver failure in mice. *J. Control. Release* **2006**, *110*, 273-282.
- 54) Adebayo, A. H.; Yakubu, O. F.; Balogun, T. M. Protective properties of *Citrullus lanatus* on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *European J. Med. Plants* **2014**, *4*, 979-989.
- 55) Andersson, H.; Bakker, E.; Von Heijne, G. Different positively charged amino acids have similar effects on the topology of a polytopic transmembrane protein in *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1491-1495.
- 56) Baud, F.; Karlin, S. Measures of residue density in protein structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1999**, *96*, 12494-12499.
- 57) Yamasaki, Y.; Hisazumi, J.; Yamaoka, K.; Takakura, Y. Efficient scavenger receptor-mediated hepatic targeting of proteins by introduction of negative charges on the proteins by aconylation: the influence of charge density and size of the proteins molecules. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *18*, 305-312.
- 58) Hong, R.; Han, G.; Fernández, J. M.; Kim, B. J.; Forbes, N. S.; Rotello, V. M. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1078-1079.
- 59) Xu, W. Y.; Wang, L.; Wang, H. M.; Wang, Y. Q.; Liang, Y. F.; Zhao, T. T.; Wu, Y. Z. TLR2 and TLR4 agonists synergistically up-regulate SR-A in RAW264.7 through P38. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 2315-2323.
- 60) Zhu, X. D.; Zhuang, Y.; Ben, J. J.; Qian, L. L.; Huang, H. P.; Bai, H.; Sha, J. H.; He, Z. G.; Chen, Q. Caveolae-dependent endocytosis is required for class a macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 8231-8239.
- 61) Sinha, K.; Chaudhary, G.; Gupta, Y. K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci.* **2002**, *71*, 655-665.
- 62) Shurtz-Swirski, R.; Sela, S.; Herskovits, A. T.; Shasha, S. M.; Shapiro, G.; Nasser, L.; Kristal, B. Involvement of peripheral polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **2001**, *24*, 104-110.
- 63) Chandel, N. S.; Trzyna, W. C.; McClintock, D. S.; Schumacker, P. T. Role of oxidants in NF- κ B

- activation and TNF- α gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 1013-1021.
- 64) Pizzimenti, S.; Toaldo, C.; Pettazzoni, P.; Dianzani, M. U.; Barrera, G. The “Two-Faced” effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the hallmarks of cancer. *Cancers (Basel)*. **2010**, *2*, 338-363.
- 65) Cruz, C. M.; Rinna, A.; Forman, H. J.; Ventura, A. L. M.; Persechini, P. M.; Ojcius, D. M. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2871-2879.
- 66) Kimura, Y.; Kimura, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* **2011**, *18*, 1165-1167.
- 67) Chen, X.; Liu, X. S. Hydrogen sulfide from a NaHS source attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced inflammation via inhibiting nuclear factor- κ B. *J. Zhejiang Univ. B* **2016**, *17*, 209-217.
- 68) Mathai, J. C.; Missner, A.; Kügler, P.; Saparov, S. M.; Zeidel, M. L.; Lee, J. K.; Pohl, P. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2009**, *106*, 16633-16638.
- 69) Yabe, Y.; Kobayashi, N.; Nishihashi, T.; Takahashi, R.; Nishikawa, M.; Takakura, Y.; Hashida, M. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 894-899.
- 70) Hashida, M.; Akamatsu, K.; Nishikawa, M.; Yamashita, F.; Takakura, Y. Design of polymeric prodrugs of prostaglandin E₁ having galactose residue for hepatocyte targeting. *J. Control. Release* **1999**, *62*, 253-262.
- 71) Willekens, F. L.; Werre, J. M.; Kruijt, J. K.; Roerdinkholder-Stoelwinder, B.; Groenen-Döpp, Y. A.; Van Den Bos, A. G.; Bosman, G. J.; Van Berkel, T. J. Liver kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* **2005**, *105*, 2141-2145.
- 72) Malovic, I.; Sørensen, K. K.; Elvevold, K. H.; Nedredal, G. I.; Paulsen, S.; Erofeev, A. V.; Smedsrød, B. H.; McCourt, P. A. The mannose receptor on murine liver sinusoidal endothelial cells is the main denatured collagen clearance receptor. *Hepatology* **2007**, *45*, 1454-1461.
- 73) Opanasopit, P.; Sakai, M.; Nishikawa, M.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. Inhibition of liver metastasis by targeting of immunomodulators using mannosylated liposome carriers. *J. Control. Release* **2002**, *80*, 283-294.
- 74) D'Souza, A. A.; Devarajan, P. V. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting - strategies and applications. *J. Control. Release* **2015**, *203*, 126-139.
- 75) Hattori, Y.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. Controlled biodistribution of galactosylated

- liposomes and incorporated probucol in hepatocyte-selective drug targeting. *J. Control. Release* **2000**, *69*, 369-377.
- 76) Yamashita, F.; Hashida, M. Pharmacokinetic considerations for targeted drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 139-147.
- 77) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283-318.
- 78) Habeeb, A. F. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **1966**, *14*, 328-336.
- 79) Scott, T. A. Jr.; Melvin E. H.; Determination of dextran with anthrone. *Anal. Chem* **1953**, *25*, 1656-1661.
- 80) Murao, A.; Nishikawa, M.; Managit, C.; Wong, J.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. Targeting efficiency of galactosylated liposomes to hepatocytes *in vivo*: effect of lipid composition. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1808-1814.
- 81) Fallon, R. J.; Danaher, M.; Saxena, A. The asialoglycoprotein receptor is associated with a tyrosine kinase in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26626-26629.
- 82) Veronese, F. M.; Pasut, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1451-1458.
- 83) Veronese, F. M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* **2001**, *22*, 405-417.
- 84) Nishikawa, M.; Miyazaki, C.; Yamashita, F.; Takakura, Y.; Hashida, M. Galactosylated proteins are recognized by the liver according to the surface density of galactose moieties. *Am. J. Physiol.* **1995**, *268*, G849-856.
- 85) Bailon, P.; Palleroni, A.; Schaffer, C. A.; Spence, C. L.; Fung, W. J.; Porter, J. E.; Ehrlich, G. K.; Pan, W.; Xu, Z. X.; Modi, M. W.; Farid, A.; Berthold, W.; Graves, M. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 KDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon α -2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 195-202.
- 86) Nishikawa, M.; Tamada, A.; Kumai, H.; Yamashita, F.; Hashida, M. Inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice. *Int. J. Cancer* **2002**, *99*, 474-479.
- 87) Rivas, D.; Ginebreda, A.; Elosegí, A.; Pozo, J.; Pérez, S.; Quero, C.; Barceló, D. Using a polymer probe characterized by MALDI-TOF/MS to assess river ecosystem functioning: From polymer selection to field tests. *Sci. Total Environ.* **2016**, *573*, 532-540.
- 88) https://www.kyoto-phu.ac.jp/education_research/animal/pdf/023.pdf
- 89) Takakura, Y.; Fujita, T.; Furitsu, H.; Nishikawa, M.; Sezaki, H.; Hashida, M. Pharmacokinetics of

succinylated proteins and dextran sulfate in mice: Implications for hepatic targeting of protein drugs by direct succinylation via scavenger receptors. *Int. J. Pharm.* **1994**, *105*, 19-29.

- 90) Lombry, C.; Bosquillon, C.; Pr at, V.; Vanbever, R. Confocal imaging of rat lungs following intratracheal delivery of dry powders or solutions of fluorescent probes. *J. Control. Release* **2002**, *83*, 331-341.
- 91) Ming, X.; Carver, K.; Wu, L. Albumin-based nanoconjugates for targeted delivery of therapeutic oligonucleotides. *Biomaterials* **2013**, *34*, 7939-7949.

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 山本 昌教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、直接の懇切丁寧な御指導、御教導並びに激励を賜りました、京都薬科大学 勝見英正准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに、終始御懇切なる御助言と御指導を賜りました、京都薬科大学 坂根稔康准教授（現神戸薬科大学 教授）、東京理科大学薬学部生物薬剤学研究室 草森浩輔助教、京都薬科大学 森下将輝助教に謹んで深く感謝の意を表します。

また、京都薬科大学薬学分野教室員一同、特に実験に御協力頂いた杉浦真優学士、釜野健太郎氏、丹波綾香氏、山内基誉氏、田村陽水氏、羽嶋亜由子氏、鬼頭由里香氏に深く感謝致します。

最後に、研究に専念できる環境を下さった家族に心から感謝致します。