

氏 名 (生年月日) <sup>さかい</sup>堺 <sup>こう</sup>香 <sup>すけ</sup>輔 (1991 年 2 月 27 日)

学 位 の 種 類 博 士 ( 薬 学 )

学 位 記 番 号 博 薬 第 180 号

学位授与の日付 2019 年 3 月 16 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 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

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 山 本 昌

(副査) 教 授 北 出 達 也

(副査) 教 授 村 木 優 一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序章

近年、硫化水素は生体内で合成酵素により産生されることが明らかとなり、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。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報告されていることから、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。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が、既存の硫化水素プロドラッグの多くは低分子であり、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が治療上の大きな障壁となっている。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、標的部位へ十分量の硫化水素を供給する高分子型硫化水素プロドラッグを開発する必要があると考えられる。

そこで第一章では、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、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（スルフォアルブミン）を開発し、その物性ならびにマウス静脈内投与後の体内動態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。さらに第二章では、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。

### 第 1 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

硫化水素プロドラッグの体内動態を制御するには、標的化素子などの機能性分子を修飾可能な官能基を多数有する高分子キャリアの利用が適当であると考えられる。本章では、高分子キャリアとして、ウシ血清アルブミン (BSA) を選択し、BSA のアミノ基に、硫化水素放出部である sulfide 基を結合させたスルフォアルブミンを開発した。反応比率を調整することで、BSA1 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 を合成した。Sulfo (5)-BSA、Sulfo (10)-BSA、Sulfo (30)-BSA のマウス静脈内投与後の体内動態について <sup>111</sup>In 標識体を用いて評価したところ、それぞれ投与量の約 20%、50%、及び 80% が肝臓へ移行した。修飾数が最も多い Sulfo (30)-BSA の肝臓移行が最も高かったことから、Sulfo (30)-BSA は肝臓の酸化ストレス疾患治療へ応用できる可

能性が示された。そこで次に、Sulfo (30)-BSA からの硫化水素の放出性についてメチレンブルー法あるいはHSip-1を用いた蛍光プローブ法を用いて評価したところ、Sulfo (30)-BSA は既存の低分子型硫化水素プロドラッグと同様に、細胞内環境を想定した 5 mM グルタチオン存在下で硫化水素を放出することが確認された。さらに、Sulfo (30)-BSA からの硫化水素放出は、血漿中では認められず、細胞懸濁液中、マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞中で観察された。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、肝臓に移行した後に硫化水素を放出することが示唆された。最後に Sulfo (30)-BSA の肝臓選択的な体内動態を活かして、肝臓の酸化ストレス疾患（四塩化炭素誘発肝臓障害）治療への応用を試みた。その結果、四塩化炭素処置により上昇した肝臓障害のマーカーの血漿中 AST、ALT 活性は、Sulfo (30)-BSA 投与により有意に抑制された。

以上の結果から、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は、酸化ストレス疾患治療に対しきわめて有用であることが認められた。

## 第2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

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。肝臓においては、実質細胞が有するアシアロ糖タンパク質レセプターをはじめとする糖鎖認識機構や、非実質細胞（Kupffer 細胞、血管内皮細胞等）が有するスカベンジャーレセプターを介した負電荷高分子の認識機構が知られており、本機構を利用することによるスルフォアルブミンの細胞選択的ターゲティングが期待される。

そこで本章では、アシアロ糖タンパク質レセプターへの認識機構を利用した肝臓実質細胞ターゲティング型プロドラッグとして、ガラクトース (Gal) 及び分子の安定性を向上させるポリエチレングリコール (PEG) を Sulfo (5)-BSA に修飾した PEG-Sulfo-BSA-Gal を合成した。また、スカベンジャーレセプターへの認識機構を利用した肝臓非実質細胞ターゲティング型プロドラッグとして、コハク酸 (Suc) を Sulfo (5)-BSA に修飾した Sulfo-BSA-Suc を合成した。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 <sup>111</sup>In 標識体により評価したところ、投与量の約 80% 以上が急速に肝臓中へ移行した。また、コラゲナーゼ灌流法で肝臓を実質細胞、非実質細胞に分離することで、肝臓内分布を評価したところ、PEG-Sulfo-BSA-Gal は肝臓実質細胞、Sulfo-BSA-Suc は肝臓非実質細胞へ選択的に送達されることが示された。一方で、PEG-Sulfo-BSA-Gal 及び Sulfo-BSA-Suc の肝臓への取り込みは、それぞれレセプターの基質である Gal-BSA 及び Suc-BSA の併用投与により有意に抑制された。さらに、PEG-Sulfo-BSA-Gal 及び Sulfo-BSA-Suc は、それぞれ肝実質細胞モデルの HepG2 細胞、非実質細胞モデルの RAW264.7 細胞へ取り込まれた後、硫化水素を放出した。これらの結果から、PEG-Sulfo-BSA-Gal 及び Sulfo-BSA-Suc はそれぞれ、アシアロ糖タンパク質レセプター及びスカベンジャーレセプターを介して、選択的に肝臓実質細胞、非実質細胞へ取り込まれた後、硫化水素を放出することが示唆された。

以上のように、標的化素子を利用した高分子型硫化水素プロドラッグは、肝臓における細胞選択的ターゲティングに有用であることが明らかとなった。

## 総括

本研究では、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（スルフォアルブミン）の開発に成功し、その体内動態特性ならびに酸化ストレス疾患治療における有用性を明らかにした。さらに、標的化素子（ガラクトースやコハク酸）を利用することで高分子型硫化水素プロドラッグの細胞選択的肝臓ターゲティングが可能であることを示した。本研究で開発した高分子型硫化水素プロドラッグは、特定の標的化素子を用いることで、様々な標的部位、細胞を対象とした硫化水素のターゲティングへ応用できる可能性が高いと考えられる。

本研究により得られた知見は、硫化水素の DDS ならびに硫化水素を用いた新規疾患治療法の開発に対して有用な基礎的情報を提供するものであると思われる。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、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報告されていることから、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。そこで本研究では、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、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（スルフォアルブミン）を開発し、その物性ならびにマウス静脈内投与後の体内動態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。

### 第1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

高分子キャリアとして、ウシ血清アルブミン(BSA) を選択し、BSA のアミノ基に、硫化水素放出部である sulfide 基を結合させたスルフォアルブミンを開発した。反応比率を調整することで、BSA1 分子あたり sulfide 基が 5、10、30 分子結合した Sulfo (5)-BSA、Sulfo (10)-BSA、Sulfo (30)-BSA を合成した。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について <sup>111</sup>In 標識体を用いて評価したところ、sulfide 基の修飾数に依存的して肝臓への移行量が増大した。特に修飾数が最も多い Sulfo (30)-BSA は投与量の約 80 %が急速に肝臓中へ移行した。

次に、Sulfo (30)-BSA からの硫化水素の放出性についてメチレンブルー法あるいは HSip-1 を用いた蛍光プローブ法を用いて評価したところ、Sulfo (30)-BSA は、細胞内環境を想定した 5 mM グルタチオン存在下で硫化水素を放出することが確認された。さらに、Sulfo (30)-BSA からの硫化水素放出は、血漿中では認められず、細胞懸濁液中、マウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞中で観察された。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、肝臓に移行した後に硫化水素を放出することが示唆された。

さらに Sulfo (30)-BSA の肝臓選択的な体内動態を活かして、肝臓の酸化ストレス疾患（四塩化炭素誘発肝臓障害）治療への応用を試みた。その結果、四塩化炭素処置により上昇した肝臓障害のマーカーの血漿中 AST、ALT 活性は、Sulfo (30)-BSA 投与により有意に抑制された。

### 第2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

次に、肝臓実質細胞ターゲティング型プロドラッグとして、アシアロ糖タンパク質レセプターに認識されるガラクトース及びポリエチレングリコール (PEG) を Sulfo (5)-BSA に修飾した PEG-Sulfo-BSA-Gal を合成した。また、肝臓非実質細胞ターゲティング型プロドラッグとして、スカベンジャーレセプターに認識されるコハク酸を Sulfo (5)-BSA に修飾した Sulfo-BSA-Suc を合成した。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 <sup>111</sup>In 標識体により評価したところ、投与量の約 80%以上が急速に肝臓中へ移行した。また、コラゲナーゼ灌流法で肝臓を実質細胞、非実質細胞に分離することで、肝臓内分布を評価したところ、PEG-Sulfo-BSA-Gal は肝臓実質細胞、

Sulfo-BSA-Gal は肝臓非実質細胞へ選択的に送達されることが示された。一方、PEG-Sulfo-BSA-Gal 及び Sulfo-BSA-Suc の肝臓への取り込みは、それぞれレセプターの基質である BSA-Gal 及び BSA-Suc の併用投与により有意に抑制された。

さらに、PEG-Sulfo-BSA-Gal 及び Sulfo-BSA-Suc は、それぞれ肝実質細胞モデルの HepG2 細胞、非実質細胞モデルの RAW264.7 細胞へ取り込まれた後、硫化水素を放出した。これらの結果から、PEG-Sulfo-BSA-Gal 及び Sulfo-BSA-Suc はそれぞれ、アシアロ糖タンパク質レセプター及びスカベンジャーレセプターを介して、選択的に肝臓実質細胞、非実質細胞へ取り込まれた後、硫化水素を放出することが示唆された。

以上のように、標的化素子を利用した高分子型硫化水素プロドラッグは、肝臓における細胞選択的ターゲティングに有用であることが明らかとなった。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。