

セリン修飾を利用した
腎臓標的型 dendriマーの創製に関する研究

2018

博士学位論文

松浦 悟

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、論文の転載については出版社の規約より許可されている。

- 1) Satoru Matsuura, Hidemasa Katsumi, Hiroe Suzuki, Natsuko Hirai, Hidetaka Hayashi, Kazuhiro Koshino, Takahiro Higuchi, Yusuke Yagi, Hiroyuki Kimura, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. L-Serine-modified polyamidoamine dendrimer as a highly potent renal targeting drug carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115, 10511-10516. [第1章、第2章・第1節]

- 2) Satoru Matsuura, Hidemasa Katsumi, Hiroe Suzuki, Natsuko Hirai, Rie Takashima, Masaki Morishita, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. L-Cysteine and L-serine modified dendrimer with multiple reduced thiols as a kidney-targeting reactive oxygen species scavenger to prevent renal ischemia/reperfusion injury. *Pharmaceutics* **2018**, 10, 251. [第2章・第2節]

目次

略語一覧

序論	1
第1章 セリン修飾を利用した高分子キャリアの腎臓標的化	4
第1節 各種アミノ酸修飾 dendrimer の物性の評価	6
第2節 各種アミノ酸修飾 dendrimer の腎臓移行性の評価	8
第3節 セリン修飾 dendrimer の腎臓内分布の評価	13
第4節 セリン修飾 dendrimer の腎臓移行経路の評価	14
第5節 近位尿細管上皮細胞株 LLC-PK1 細胞を用いた細胞内取込機構の評価	15
第6節 セリン修飾 dendrimer の <i>in vivo</i> における安全性の評価	18
第7節 考察	19
第2章 セリン修飾高分子を利用した薬物の腎臓標的化	23
第1節 セリン修飾 dendrimer を利用したカプトプリルの腎臓への薬物送達	24
1-1 カプトプリル結合セリン修飾 dendrimer の物性の評価	24
1-2 カプトプリル結合セリン修飾 dendrimer の体内動態評価	25
1-3 カプトプリル結合セリン修飾 dendrimer による薬理効果	27
第2節 セリン-システイン修飾 dendrimer による還元型チオール <small>の</small> 腎臓への送達	28
2-1 セリン-システイン修飾 dendrimer の物性の評価	28
2-2 セリン-システイン修飾 dendrimer の抗酸化能の評価	30
2-3 セリン-システイン修飾 dendrimer の体内動態の評価	31
2-4 セリン-システイン修飾 dendrimer による腎虚血再灌流障害の抑制効果	33
第3節 考察	36

結論	39
実験の部	40
第 1 章	40
第 2 章	45
謝辞	50
引用文献	51

略語一覽

$^1\text{H-NMR}$	Proton nuclear magnetic resonance
ACE	Angiotensin converting enzyme inhibitor
ARF	Acute renal failure
AUC	Area under the curve
Boc	t-Butoxycarbonyl
BUN	Blood urea nitrogen
CAP	Captopril
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CL	Clearance
CPZ	Chlorpromazine
Cys	L-Cysteine
D_2O	Deuterated water
DDS	Drug delivery system
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine
DMF	N,N-Dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTPA	Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EIPA	5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride
EPR	Enhanced permeability and retention
Et_2O	Diethyl ether
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluoresce inisothiocyanate
G	Generation
GEN	Genistein
GFR	Glomerular filtration rate
H&E	Hematoxylin and eosin
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HBTU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate
HHL	Hippuryl-histidyl-leucine
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography

ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL-18	Interleukin-18
MALDI-TOFMS	Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry
MBB	Monobromobimane
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
ODS	Octadecylsilyl
PAMAM	Polyamidoamine
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PFA	Paraformaldehyde
QOL	Quality of life
RNA	Ribonucleic acid
SE	Standard error
Ser	L-Serine
SPDP	Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate
SPECT/CT	Single photon emission computed tomography/computed tomography
tBu	Tertiary butyl
TFA	Trifluoroacetic acid
Thr	L-Threonine
TIS	Triisopropylsilane
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tyr	L-Tyrosine
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

序論

腎臓は血液をろ過して老廃物を尿として排泄する機能だけでなく、水分・イオンのバランス調節や様々なホルモンを放出し、全身をコントロールする臓器であり、生命維持を担う上で欠かせない臓器の一つである¹⁻⁸。腎疾患は急性腎不全などの一過性の症状であったとしても、健康寿命に影響を及ぼすことが知られており、晩年の QOL を低下させる要因となっていることから、迅速かつ確実な腎臓疾患治療システムを構築することは極めて重要である⁹⁻¹²。これまでに、腎疾患の治療を目的として、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、ステロイド、免疫抑制剤や抗癌剤などの様々な薬物が臨床で使用されている¹³⁻¹⁷。しかしながら、これらの薬物は、標的部位である腎臓以外の臓器や組織にも分布するため、治療に必要な量が送達されないことによる治療効率の低下や副作用による投与制限が懸念される。例えば、ステロイドや免疫抑制剤は微小変化型ネフローゼに有効な治療薬として知られているが、副作用が強く治療が制限される¹⁸⁻²¹。同様に抗癌剤においても、分子標的薬や抗体医薬などが上市されているが、癌組織以外の部位へも分布することによる副作用が治療上問題となっている²²。したがって、有効かつ安全な腎臓疾患治療の実現には、標的部位である腎臓へ効率よく薬物を送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が必要不可欠である (Figure 1)。

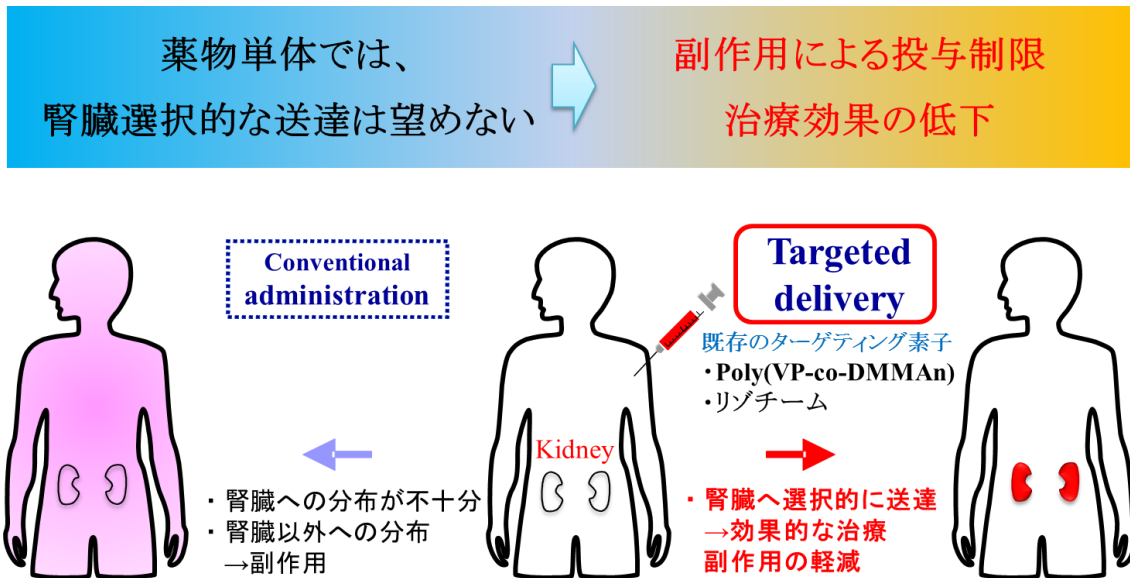


Figure 1 Concept of renal drug targeting.

薬物を標的部位でのみ作用させること、つまり薬物ターゲティングの意義は、既に 1909 年に Ehrlich により抗生物質の例で報告されている²³。生体は複雑な仕組みで構成されているため、狙った臓器のみを標的化することは容易ではないが、肝臓は、細網内皮系による高分子の取り込み機能や特異的に発現する受容体を有することから、高分子や微粒子を利用した肝臓への標的化 DDS の開発には比較的成功例が多い²⁴⁻²⁶。また、癌細胞は細胞周辺の環境や発現している膜タンパク質が正常細胞と異なるため、その違いを利用した腫瘍への標的化 DDS が開発されている。すなわち、pH 応答的な薬物放出型 DDS、EPR 効果(腫瘍における血管透過性や物質の滞留亢進に関する現象)や腫瘍で高発現する分子に対する抗体を利用した DDS などの腫瘍への効率的な薬物送達を試みられている²⁷⁻³¹。

このように一部の臓器・組織では臓器標的化 DDS 製剤の開発は進んでいる一方で、腎臓標的化 DDS の開発は困難な状況にある。その原因の一つとして、細網内皮系の関与が考えられる^{32,33}。一般に薬物キャリアは、細網内皮系により非特異的に肝臓や脾臓へ分布することが知られており、腎臓選択性が乏しい³⁴。細網内皮系を回避する DDS 技術として、薬物キャリアに PEG 修飾する方法があり、細網内皮系からの認識を低下させることが可能である。しかし、薬物キャリアへの PEG 導入は、細網内皮系を回避するだけでなく、標的臓器との親和性も減少させ、それに伴う薬物キャリアの標的臓器への移行性が低下するため、単に PEG 化を用いるだけでは腎臓標的化は達成されない。さらに、肝臓や腫瘍組織の様に、腎臓で発現する標的分子はほとんど知られていないことから、腎臓は能動的に薬物キャリアを標的化しにくい臓器である。したがって、現状では、腎臓選択性の高い薬物キャリアの開発は困難であり、有効性と安全性に優れる腎臓標的化 DDS の開発成功例はほとんどみられない。

こうした状況の中で、わずかながら報告されている腎臓標的化に成功した例として、低分子タンパク質であるリゾチームやポリビニルピロリドン系高分子がある³⁵⁻³⁷。Haas らは、リゾチームに NASIDs の一種であるナプロキセンを結合させた薬物キャリアが近位尿細管上皮細胞に取り込まれることを報告している³⁵。リゾチームは分子量が小さいために糸球体ろ過されやすく、また肝臓に異物として認識されにくいことから、投与された大部分が腎臓に選択的に移行すると考えられている³⁸⁻⁴⁰。しかしながら、リゾチームは外来タンパク質であることから、免疫原性などが問題となり、臨床応用は難しい。また、Kamada らは、ラジカル重合高分子であるポリビニルピロリドン系高分子が静脈内投与後、腎臓へ選択的に集積することを見出し、ポリビニルピロリドン系高分子を利用したスーパーオキシドジェイスムターゼの腎臓標的化に成功している³⁷。ポリビニルピロリドン系高分子は免疫原性の問題を克服しており、腎臓選択的に集積する高分子として過去に注目を集めたが、薬物を結合可能な官能基が少ないことによる投与量の増大ひいては毒性が懸念されるため、実用化は難しい状況にある。

一方、著者は近年、樹状高分子で薬物キャリアとして汎用されるポリアミドアミン dendrimer (PAMAM) にアミノ酸の一種である L-セリンを修飾したセリン修飾 dendrimer (Ser-PAMAM) がマウス静脈内投与後、腎臓選択的に高い移行性を示すことを見出した。そこで本研究では、セリン修飾を用いた有効かつ安全な腎臓標的化 DDS を構築することを目的として、Ser-PAMAM の物性、体内動態について系統的に評価するとともに新規腎臓標的化素子としてのセリンの有用性について検討した。すなわち、Ser-PAMAM の物性、マウスにおける体内動態や腎臓内分布を評価するとともに、腎臓集積機構の詳細を検討した。さらに、Ser-PAMAM による薬物の腎臓標的化の応用例として、カプトプリル (アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤) の腎臓への標的化、ならびに抗酸化剤である L-システインの腎臓送達による酸化ストレス疾患治療を試みた。以下、これらの結果について 2 章にわたり論述する。

第1章 セリン修飾を利用した高分子キャリアの腎臓標的化

腎臓標的化 DDS に関する試みはいくつか報告されているが、化学修飾された薬物キャリアは一般に肝臓や脾臓などの腎臓以外の臓器へも分布するため、腎臓選択的に移行する薬物キャリアの開発は困難な状況にある。これまでも、腎臓での発現が高いとされているコハク酸受容体やスカベンジャー受容体を利用した腎臓標的化が報告されているが、腎臓選択性が高いとは言い難い^{41, 42}。すなわち、これらの受容体を標的として、コハク酸やアコニット酸修飾の利用により高分子薬物または薬物キャリアを腎臓へ効率よく送達可能であるが、肝臓にも同様にスカベンジャー受容体が発現しているため、これらの修飾を施した高分子は肝臓への非特異的な移行も示す⁴³。また、過剰なコハク酸修飾では逆に高分子の腎臓への親和性が低下し、その多くが数時間以内に尿中へ排泄される⁴⁴。さらに、Kobayashi らもカチオン性高分子の腎臓標的化を試みているが、非特異的な肝臓移行も認められ、腎臓選択的送達は達成されていない⁴⁵。したがって、新しい概念に基づく腎臓標的化 DDS 技術の開発が切望される。

一方、アミノ酸修飾は薬物キャリアに様々な機能を与えることが可能であり、またアミノ酸は天然由来成分で物性もよく知られていることから、DDS 技術として有用性が高いと考えられる^{43, 46-48}。例えば、塩基性アミノ酸を修飾した dendrimer は正電荷を示すため、負電荷である核酸と複合体を形成することで、核酸の細胞内取り込みを促進する。また、酸性アミノ酸を修飾した dendrimer は骨への高い親和性を示し、骨へ選択的に送達される。そこで本章では、腎臓選択性の高い DDS 技術を開発することを目的として、アミノ酸修飾による樹状高分子キャリア PAMAM の腎臓標的化を試みた。PAMAM は、免疫原性が低く、動物での安全性も明らかとなっている⁴⁹。さらに、樹状高分子の特性上その末端は数多く枝分かれしており化学修飾可能な官能が多数存在することから機能を持たせやすく、薬物を結合させやすい構造を有しているため、本研究では PAMAM を薬物キャリアとして選択した (Figure 2)⁵⁰⁻⁵²。

具体的には、L-セリンを新規腎臓標的化素子として PAMAM に結合させた Ser-PAMAM を合成し、高分子キャリア PAMAM の腎臓標的化について分子特性と体内動態の観点から系統的に評価した。また、セリンと同様に水酸基を側鎖に持ったアミノ酸である L-スレオニンや L-チロシンを修飾した PAMAM も対照として作製し、同様に検討した。さらに、高い腎臓移行性を示すセリン修飾 PAMAM の腎臓内における分布の詳細や腎臓への集積機構を明らかにすることで、高分子キャリアの腎臓標的化におけるセリン修飾の有用性を評価した (Figure 3)。

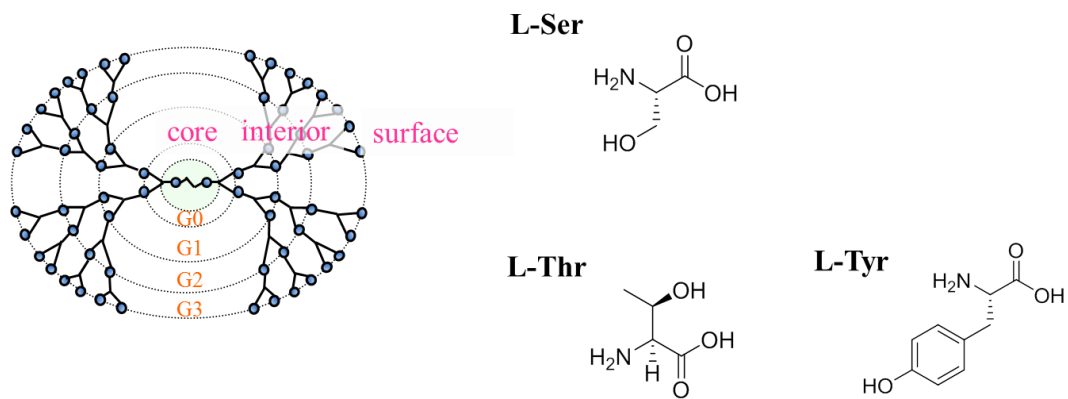


Figure 2 Structure of third generation PAMAM and amino acids containing a hydroxyl side chain.

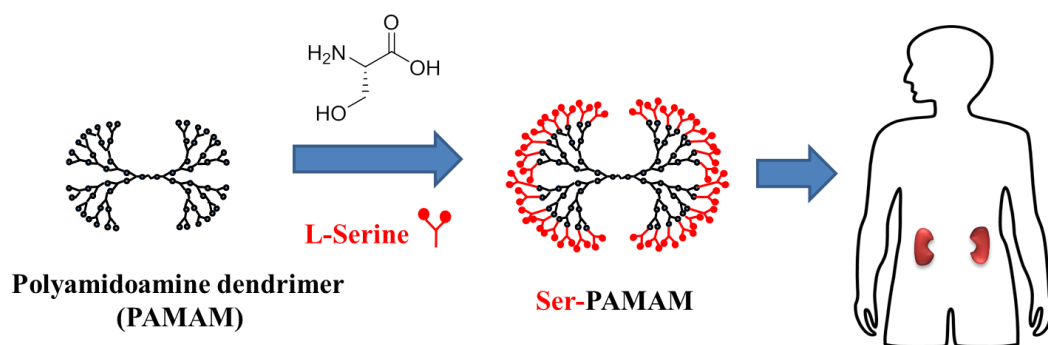


Figure 3 Development of L-serine modified PAMAM as a renal targeting drug carrier.

第1節 各種アミノ酸修飾 dendriマーの物性の評価

1. アミノ酸修飾 dendriマーの合成

第3世代の PAMAM に L-セリンを修飾した dendriマー誘導体 (Ser-PAMAM (G3)) は、アミノ基および側鎖の水酸基が保護された L-セリン (Boc-Ser(tBu)-OH) をポリアミドアミン dendriマーのアミノ基と縮合反応させた後に脱保護を行うことで合成した (Figure 4)。また、第2世代もしくは第4世代の PAMAM に L-セリンを修飾した dendriマー誘導体 (Ser-PAMAM (G2), Ser-PAMAM (G4))、L-セリンと同様に側鎖に水酸基を有するアミノ酸である L-スレオニンまたは L-チロシンを第3世代の PAMAM に修飾した dendriマー誘導体 (Thr-PAMAM (G3), Tyr-PAMAM (G3)) も対照として上記と同様の方法にて合成した。

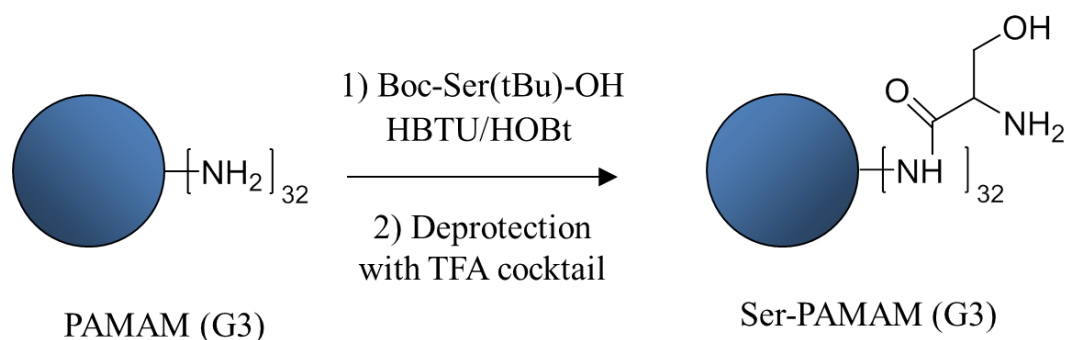


Figure 4 Synthesis and structures of L-serine modified third generation PAMAM [Ser-PAMAM (G3)]. (Fig. 8 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

2. セリン修飾デンドリマーの合成および物性評価

合成した Ser-PAMAM (G3) について、MALDI-TOFMS および $^1\text{H-NMR}$ により、それぞれ分子量および末端に L-セリンが修飾されていることを定量的に確認した。質量分析により得られた第 3 世代の PAMAM の分子量 6960 Da がセリン修飾を施したことで 9684 Da に増大していることが示された (Figure 5)。また、 $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルやシグナルの積分値の比率から目的とする Ser-PAMAM (G3) が合成されていることが確認された (Figure 6)。

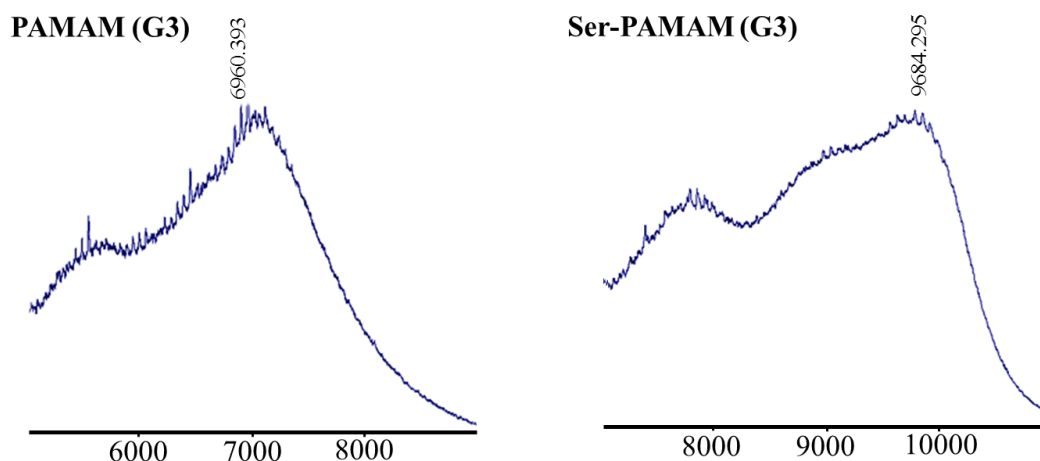


Figure 5 MALDI-TOFMS spectra of third generation PAMAM [PAMAM (G3)] and L-serine modified third generation PAMAM [Ser-PAMAM (G3)] with a trans-indole-3-acrylic acid as a matrix. (Fig. S1 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

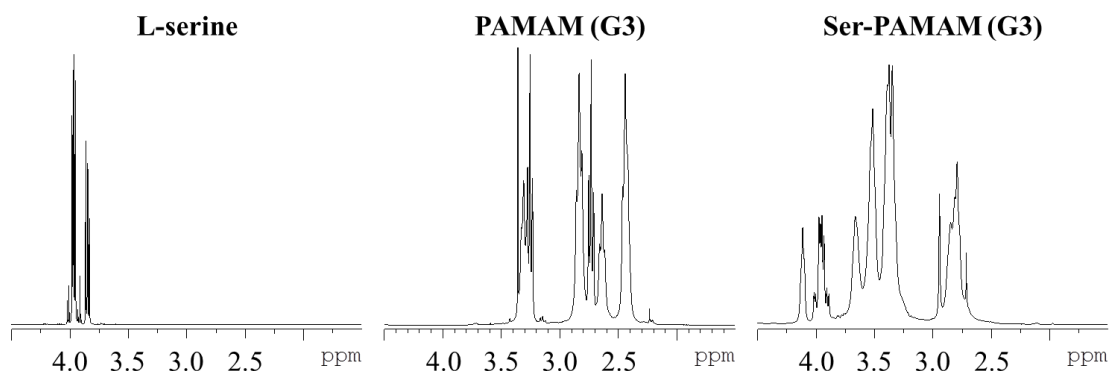


Figure 6 $^1\text{H-NMR}$ spectra of L-serine, third generation PAMAM [PAMAM (G3)] and L-serine modified third generation PAMAM [Ser-PAMAM (G3)] in D_2O . (Fig. S1 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

3. セリン修飾 dendriマーの物理化学的特性

合成した dendriマー誘導体の粒子径およびゼータ電位を Zetasizer (Malvern Instruments) を用いて測定した。Dendriマーにアミノ酸を修飾することにより末端の枝分かれが 2 倍になるため、Dendriマーとしての世代は 1 つ増加する。Dendriマーの性質はその末端の枝分かれ数に大きく性質が依存することから、対照の未修飾の dendriマーには、Ser-PAMAM (G3) (Ser を含めると第 4 世代) と世代数が同等の第 4 世代の PAMAM (PAMAM (G4)) を用いた。各種アミノ酸修飾 dendriマーの粒子径は 2~5 nm を示し、ゼータ電位は 2.58~24.77 mV の正電荷を示した (Table 1)。

Table 1 Physicochemical characteristics of amino acid-modified PAMAMs

Compound	Diameter (nm)	Zeta-potential (mV)
PAMAM (G4)	4.20 ± 0.09	4.56 ± 0.81
Ser-PAMAM (G2)	2.50 ± 0.12	6.04 ± 0.31
Ser-PAMAM (G3)	4.03 ± 0.29	4.76 ± 0.70
Ser-PAMAM (G4)	4.39 ± 0.26	24.77 ± 0.67
Thr-PAMAM (G3)	4.15 ± 0.35	2.58 ± 1.36
Tyr-PAMAM (G3)	3.17 ± 0.35	5.26 ± 3.00

Results are expressed as the mean ± SE of three experiments.

(Table 1 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

第 2 節 各種アミノ酸修飾 dendriマーの腎臓移行性の評価

1. アミノ酸修飾 dendriマーの体内動態

¹¹¹In 標識を施した各種 dendriマー誘導体をマウス尾静脈内投与し、経時的な臓器分布を評価した。PAMAM (G4) および Tyr-PAMAM (G3) は主に肝臓または腎臓に移行した。Thr-PAMAM (G3) は血中からの消失が比較的緩やかで、投与後 180 分で投与量の 34.9% が腎臓へ移行した (Figure 7A、B & C)。一方、Ser-PAMAM は血中から速やかに消失し、腎臓へ選択的に移行した。特に Ser-PAMAM (G3) は、投与後 180 分で投与量の 81.7% が腎臓に集積した (Figure 7D、E & F)。Ser-PAMAM (G4) は肝臓にも若干移行したものの、Ser-PAMAM (G3) および Ser-PAMAM (G2) は腎臓以外の臓器へはほとんど移行せず高い腎臓選択性を示した。また、各種アミノ酸修飾 dendriマー誘導体のマウス尾静脈内投与 30 分後の尿中排泄は、Tyr-PAMAM (G3) と PAMAM (G4) ではほとんど認められなかったのに対して、Ser-PAMAM (G3) および Thr-PAMAM (G3) ではそれぞれ、投与量の 3.9%、14.5% であった (Figure 8)。

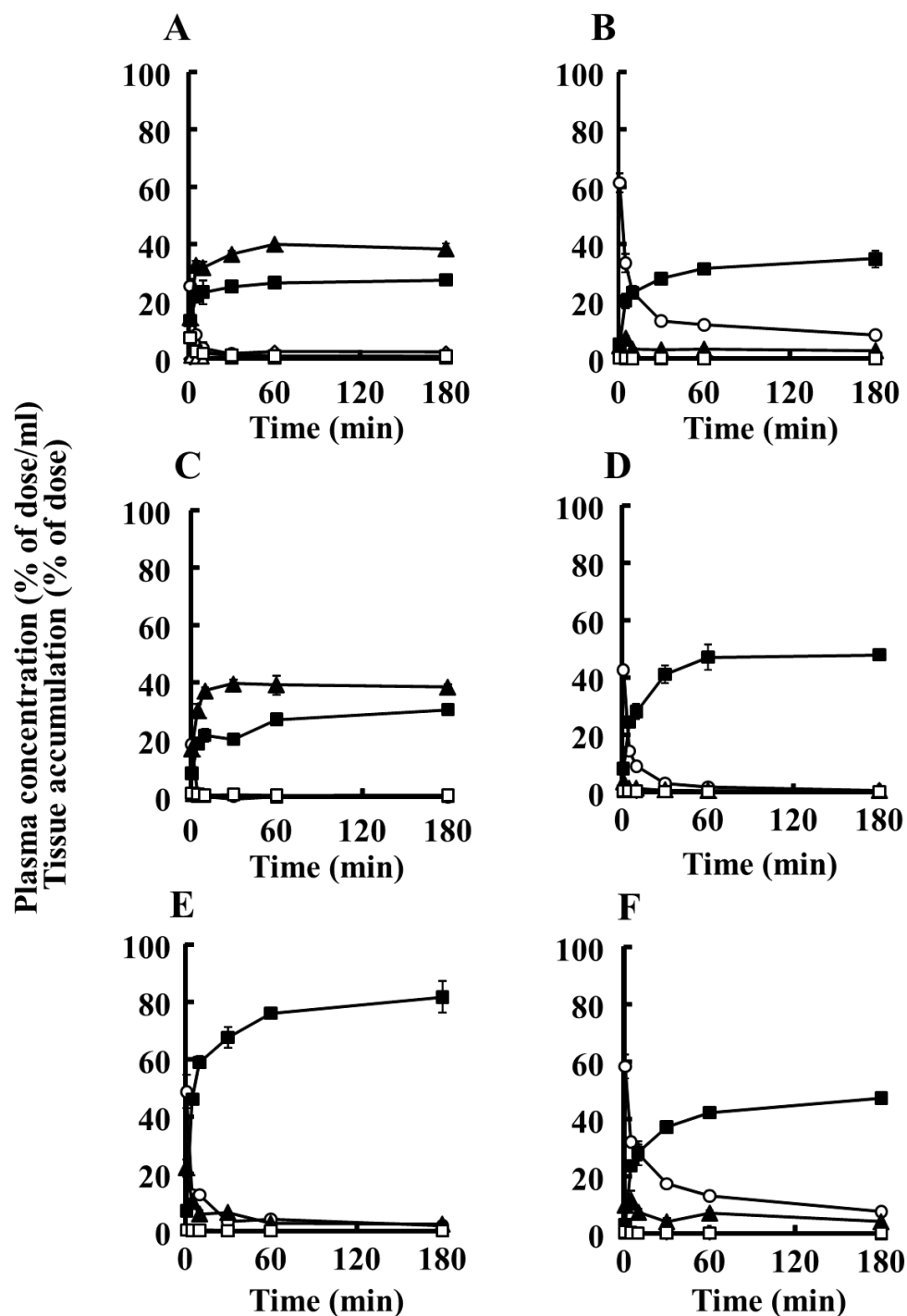


Figure 7 Time courses of plasma concentration and tissue accumulation of various amino acid-modified dendrimers in mice after intravenous injection at a dose of 1 mg/kg. (A) ^{111}In -labeled PAMAM (G4), (B) Thr-PAMAM (G3), (C) Tyr-PAMAM (G3), (D) Ser-PAMAM (G2), (E) Ser-PAMAM (G3) and (F) Ser-PAMAM (G4). Results are expressed as the mean \pm SE of three mice. ○, plasma; ▲, liver; ■, kidney; ◇, spleen; △, heart; □, lung. (Fig. 1 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

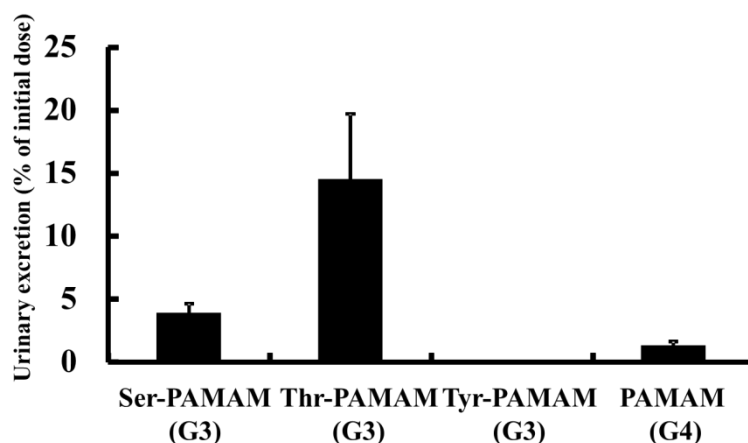


Figure 8 Urinary excretion of ^{111}In -labeled amino acid-modified dendrimers 30 min after intravenous injection in mice. Results are expressed as the mean \pm SE of three mice.

(Fig. S3 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

2. アミノ酸修飾 dendリマーの薬物動態学的パラメーター

前項 1. で得られた体内動態に基づき、薬物動態学的パラメーターを算出した結果を Table 2 に示した。Tyr-PAMAM (G3) および PAMAM (G4) の肝臓取り込みクリアランスは、それぞれ 33.44 mL/h、8.21 mL/h を示し、比較的高い値を示した。一方、Ser-PAMAM (G3) および Thr-PAMAM (G3) の肝臓取り込みクリアランスは、それぞれ 0.10 mL/h、0.05 mL/h であった。また、Ser-PAMAM (G3) の腎臓取り込みクリアランスは 4.87 mL/h であり、全身クリアランスの 78.1% を示したことから、Ser-PAMAM(G3) の高い腎臓標的化効率が明らかとなった。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of PAMAM derivatives

Compound	Dose (mg/kg)	AUC (% of dose \cdot h/mL)	Clearance (mL/h)		
			Total	Liver	Kidney
Ser-PAMAM (G3)	1	16.25	6.16	0.10	4.87
Thr-PAMAM (G3)	1	80.98	1.23	0.05	0.55
Tyr-PAMAM (G3)	1	1.17	85.25	33.44	25.19
PAMAM (G4)	1	4.72	21.19	8.21	5.37

(Table 2 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

3. セリン修飾デンドリマーの組織分布イメージング

最も腎臓選択性に優れた Ser-PAMAM (G3) の腎臓への分布の詳細を明らかにするために、近赤外蛍光および ^{111}In 標識を用いて Ser-PAMAM (G3) の臓器分布のイメージングを行った。近赤外蛍光標識を用いた IVIS で得られた画像より、PAMAM (G4) 投与群では肝臓および腎臓から蛍光が観察された一方で、Ser-PAMAM (G3) 投与群では腎臓のみから強い蛍光が観察された (Figure 9)。また、 ^{111}In 標識を用いた SPECT/CT の画像より、Ser-PAMAM (G3) は一部尿中排泄された Ser-PAMAM (G3) が膀胱で検出されが、腎臓への高い集積性が認められ、腎臓の皮質の部分に特に移行していることが示された (Figure 10)。

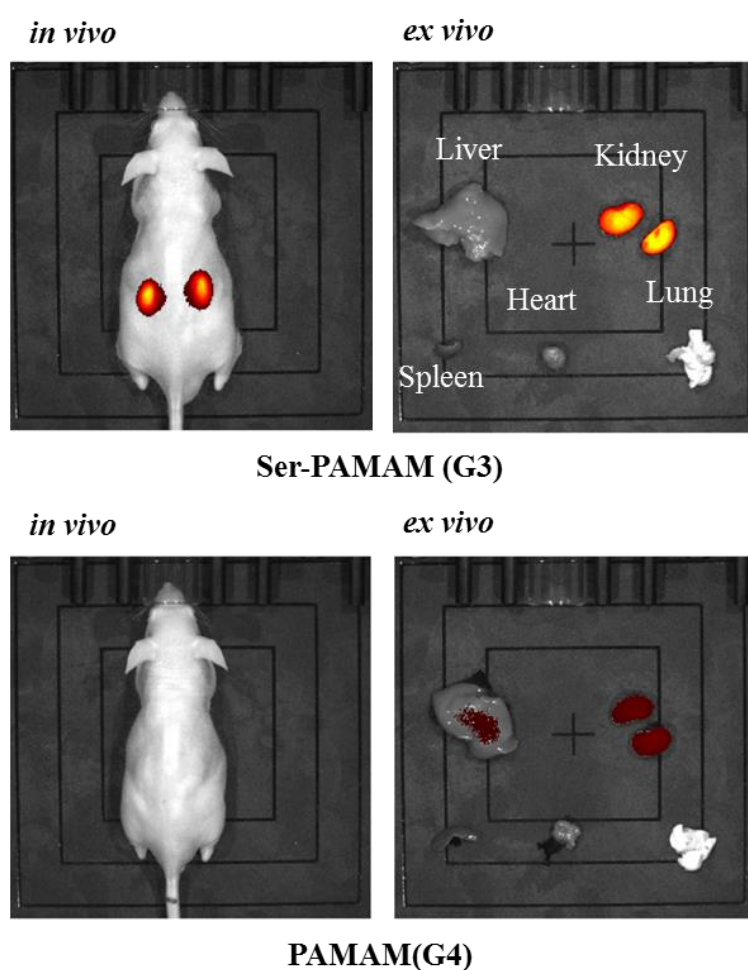


Figure 9 *In vivo* and *ex vivo* imaging of NIR fluorescence dye-labeled Ser-PAMAM (G3) and PAMAM (G4) 60 min after intravenous injection in mice. The fluorescence intensities were measured in (left) whole mice and (right) tissues (liver, kidney, spleen, heart, and lung). (Fig. 2 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

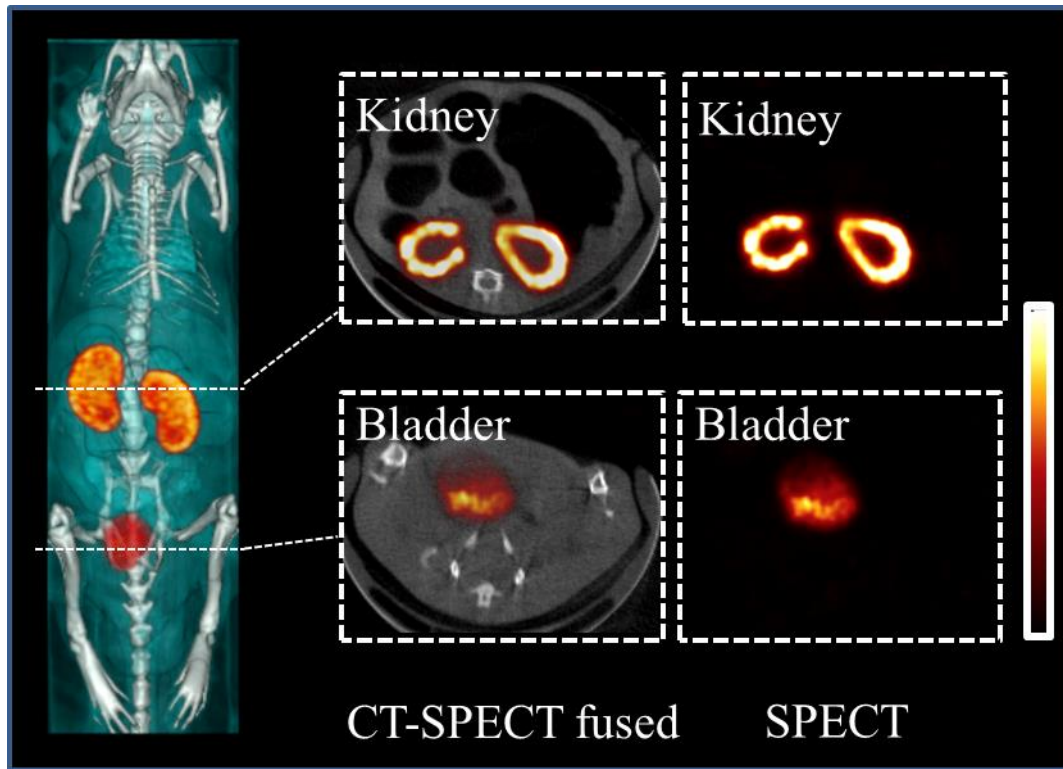


Figure 10 SPECT/CT imaging of ^{111}In -labeled Ser-PAMAM (G3) 180 min after intravenous injection in a mouse. (Fig. 2 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

第3節 セリン修飾 dendriマーの腎臓内分布の評価

前節 3. の結果から Ser-PAMAM (G3) は腎臓の皮質の部分に選択的に集積していることが明らかとなった。そこで Ser-PAMAM (G3) の腎臓内分布をさらに詳細に評価するために、FITC 標識 Ser-PAMAM (G3) 静脈内投与後の腎臓の切片を観察した。その結果、低倍率の蛍光顕微鏡像において皮質部分で強い蛍光が観察された (Figure 11A & B)。その蛍光が観察される部位を拡大した蛍光顕微鏡像において、近位尿細管部分から強い蛍光が観察されたことから、Ser-PAMAM (G3) は腎皮質の中でも近位尿細管上皮細胞に選択的に集積することが示された (Figure 11C)。

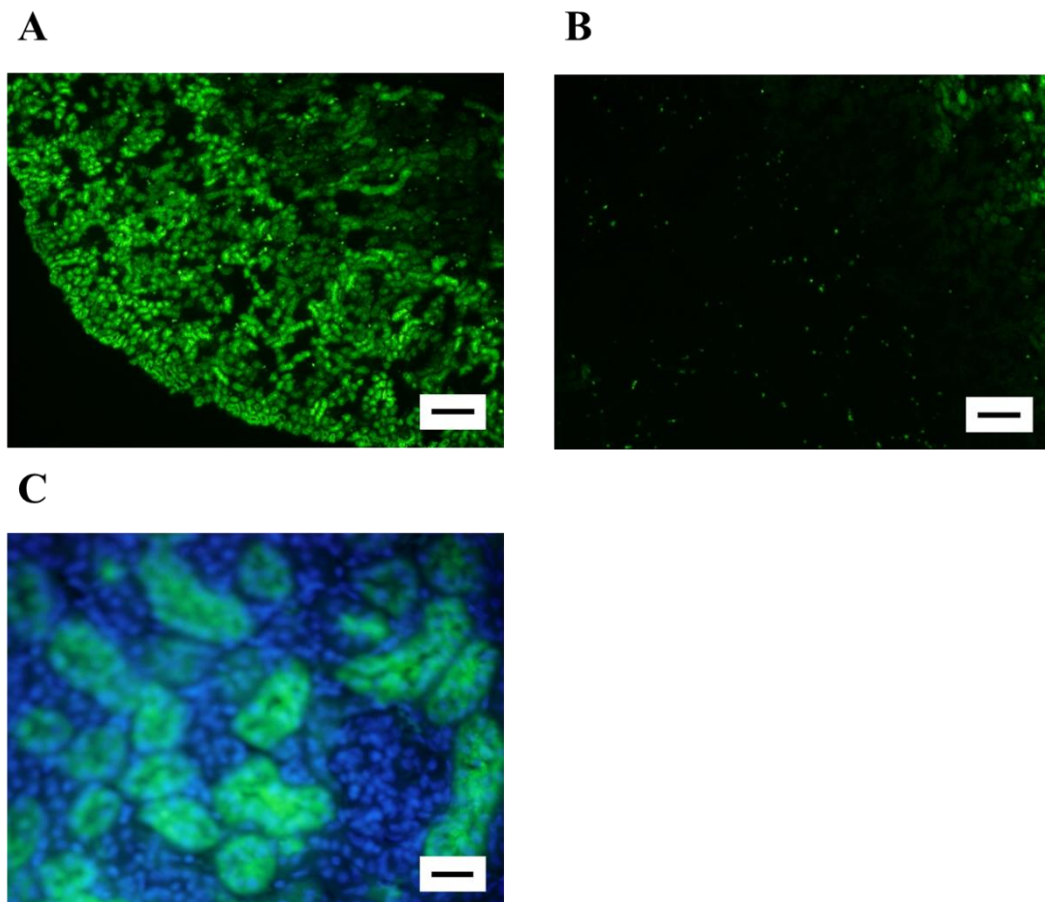


Figure 11 Intra-renal distribution of FITC-labeled Ser-PAMAM (G3) in renal tissue sections at 60 min after intravenous injection in a mouse. (A) Cortex (Scale bar: 200 μm .), (B) Medulla (Scale bar: 200 μm .), (C) Magnified image of the cortex (Scale bar: 25 μm .). Fluorescence intensity was observed using a fluorescence microscope.

(Fig. 3 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

第4節 セリン修飾デンドリマーの腎臓移行経路の評価

前節において Ser-PAMAM (G3) は近位尿細管上皮細胞に選択的に集積することが明らかとなった。近位尿細管上皮細胞へ移行する経路として、糸球体ろ過された後に近位尿細管管腔側より近位尿細管上皮細胞に取り込まれる経路と糸球体ろ過されずに腎輸出細動脈に流れた後に近位尿細管上皮細胞の基底膜側より取り込まれる経路が知られている^{53, 54}。そこで Ser-PAMAM (G3) がいずれの経路から近位尿細管上皮細胞へ取り込まれているかを検討した。糸球体ろ過量を低下させた急性腎不全モデル (ARF) マウスを作製し、Ser-PAMAM (G3) の腎臓クリアランスの変化を評価した。Ser-PAMAM (G3) 静脈内投与後の血漿中濃度推移は、正常マウスおよび急性腎不全モデル (ARF) で大きな差は見られなかったが、腎臓への移行量は ARF マウスで有意に低下した (Figure 12A & B)。そこで次に、糸球体ろ過のみを受け、尿細管での分泌などの関与がないインスリンの全身クリアランス値に基づき糸球体ろ過量を算出した。また、経時的な体内動態評価の結果より、Ser-PAMAM (G3) の腎臓クリアランス値を算出した。その結果、糸球体ろ過量の低下に伴い、Ser-PAMAM (G3) の腎臓クリアランスが減少することが示された (Figure 13)。このことから、Ser-PAMAM (G3) の腎臓移行には糸球体ろ過が関与することが明らかとなった。

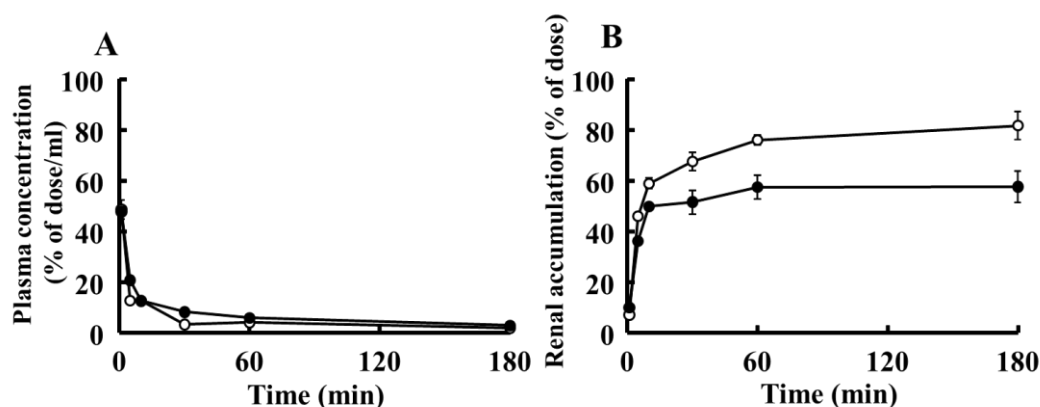


Figure 12 Plasma concentration and renal accumulation of ¹¹¹In-labeled Ser-PAMAM (G3) after intravenous injection at a dose of 1 mg/kg in normal mice and mice with HgCl₂-induced acute renal failure (ARF). Time course of (A) plasma concentration and (B) renal accumulation. ○, normal mice; ●, HgCl₂-induced ARF mice. Results are expressed as the mean ± SE of three mice. (Fig. 4 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

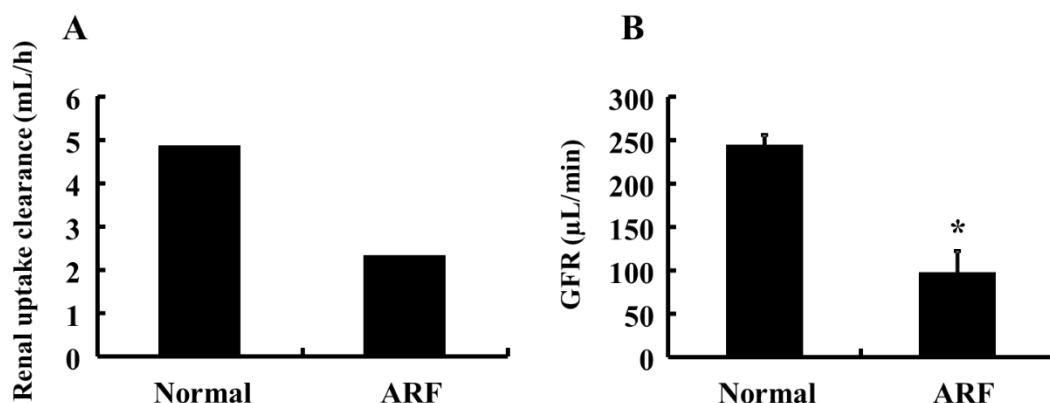


Figure 13 Renal clearance and glomerular filtration rate (GFR) after intravenous injection at a dose of 1 mg/kg in normal mice and mice with HgCl₂-induced acute renal failure (ARF). (C) Renal clearance and (D) GFR in normal mice (normal) and mice with HgCl₂-induced ARF (ARF). Results are expressed as the mean ± SE of three mice.

(Fig. 4 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

第5節 近位尿細管上皮細胞株 LLC-PK1 細胞を用いた細胞内取込機構の評価

前節までに Ser-PAMAM (G3) が腎臓選択的な体内動態を示すこと、なかでも腎臓皮質の近位尿細管細胞へ選択的に集積することを明らかにした。そこで、近位尿細管上皮細胞株である LLC-PK1 細胞を用いて近位尿細管上皮細胞での Ser-PAMAM (G3) の取り込み機構について評価した。

1. 近位尿細管上皮細胞単層膜での透過の方向性

Transwell[®] を用いて近位尿細管上皮細胞単層膜を作製し、FITC 標識を施した Ser-PAMAM (G3) または PAMAM (G4) を刷子縁膜 (Apical) 側または側底膜 (Basal) 側に添加後の透過量を測定することにより、Ser-PAMAM (G3) および PAMAM (G4) の透過の方向性を検討した。PAMAM (G4) の透過は、吸収方向 (Apical-to-Basal) の透過性と分泌の方向 (Basal-to-Apical) の透過性に有意な変化は見られなかった (Figure 14B)。一方で、Ser-PAMAM (G3) の吸収方向の透過性は、分泌方向の透過性に比較して有意に高かった (Figure 14A)。

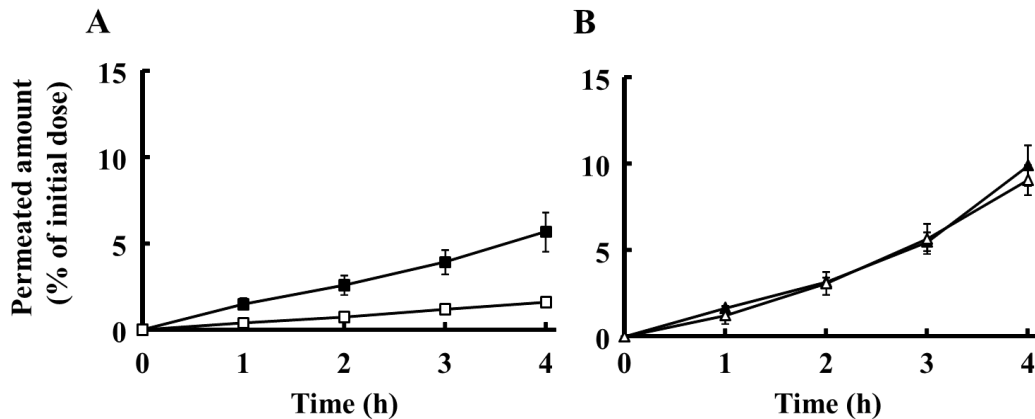


Figure 14 Time course of transport of (A) FITC-labeled Ser-PAMAM (G3) and (B) PAMAM (G4) across LLC-PK1 cell monolayers in the absorptive directions and secretory directions. ■,▲, absorptive directions; □, △, secretory directions. Results are expressed as mean \pm SE of three experiments. (Fig. 5 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

2. 近位尿細管上皮細胞への取り込み機構

上述のように Ser-PAMAM (G3) が吸収方向優位に取り込まれることが明らかとなった。そこで次に、その取り込み機構を明らかにするため、各種エンドサイトーシス阻害剤を用いて、Ser-PAMAM (G3) の細胞内取り込み阻害実験を行った。一般に高分子の細胞内への取り込みはトランスサイトーシスによって取り込まれていることが知られており、クラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシスやマクロピノサイトーシスなどの機構で細胞内に取り込まれている⁵⁵。そこでクラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤であるクロルプロマジン (CPZ)、カベオラ依存性エンドサイトーシスであるゲニステイン (GEN) とマクロピノサイトーシス阻害剤である N-エチル-N-イソプロピルアミロライド (EIPA) をエンドサイトーシス阻害剤として用いた。また、糸球体ろ過で尿細管にろ過されたタンパク質の再吸収を近位尿細管上皮細胞刷子縁膜で担っている受容体にメガリンがある⁵⁶。⁵⁷。メガリンによる取り込みの影響を確認するため、メガリンの基質として知られるリゾチームをメガリンによる細胞内取り込み阻害剤として用いた^{58, 59}。また、非標識 Ser-PAMAM (G3) の過剰添加による阻害検討も行った。その結果、過剰添加群では Ser-PAMAM(G3) の細胞内への取り込みがほぼ完全に阻害された (Figure 15)。さらに、GENとEIPAによる細胞内取り込み阻害群で、細胞内への取り込みが有意に低下したことから、Ser-PAMAM (G3) はカベオラ依存性エンドサイトーシスとマクロピノサイトーシスにより取り込まれていることが示された。さらに、リゾチームの添加でも Ser-PAMAM (G3)

の細胞内取り込みが低下したことから、一部リゾチームと同じ取り込み機構を介して細胞内に取り込まれていることが示唆された。しかし、メガリンを介した取り込み機構とされるクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤である CPZ 添加群では、有意な減少はみられなかった。

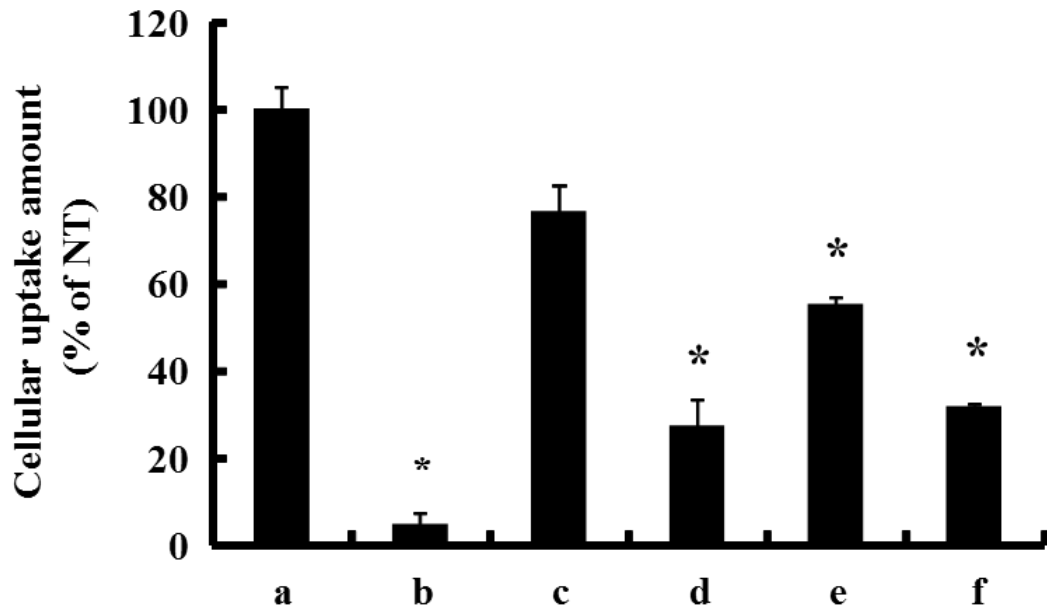


Figure 15 Cellular uptake study of ^{111}In -labeled Ser-PAMAM in LLC-PK1 cells in the presence of various endocytic inhibitors. a, ^{111}In -labeled Ser-PAMAM (G3). b, ^{111}In -labeled Ser-PAMAM (G3) + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ unlabeled Ser-PAMAM (G3). c, ^{111}In -labeled Ser-PAMAM (G3) + 100 μM chlorpromazine. d, ^{111}In -labeled Ser-PAMAM (G3) + 370 μM genistein. e, ^{111}In -labeled Ser-PAMAM (G3) + 100 μM 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride. f, ^{111}In -labeled Ser-PAMAM (G3) + 1 mM lysozyme. Results are expressed as mean \pm SE of three experiments. * $p < 0.05$, significantly different from the ^{111}In -labeled Ser-PAMAM (G3) (group a).

(Fig. 5 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

第6節 セリン修飾 dendriマーの *in vivo* における安全性の評価

Ser-PAMAM (G3) が腎臓標的型高分子キャリアとして有用であることが示されたことから、反復投与後の急性毒性の評価を試みた。すなわち、Ser-PAMAM (G3) を5日間連続で投与し、その最終投与後24時間に血中の腎障害マーカーであるクレアチニンおよび血中尿素窒素 (BUN) を測定するとともにH&E染色された腎切片を観察することで反復投与後の急性毒性を評価した (Figure 16 & 17)。その結果、Ser-PAMAM (G3) の反復投与によるクレアチニン、BUNの上昇は認められなかった。腎切片の組織学的評価においても、Ser-PAMAM (G3) の反復投与による腎臓の形態変化は認められなかった。

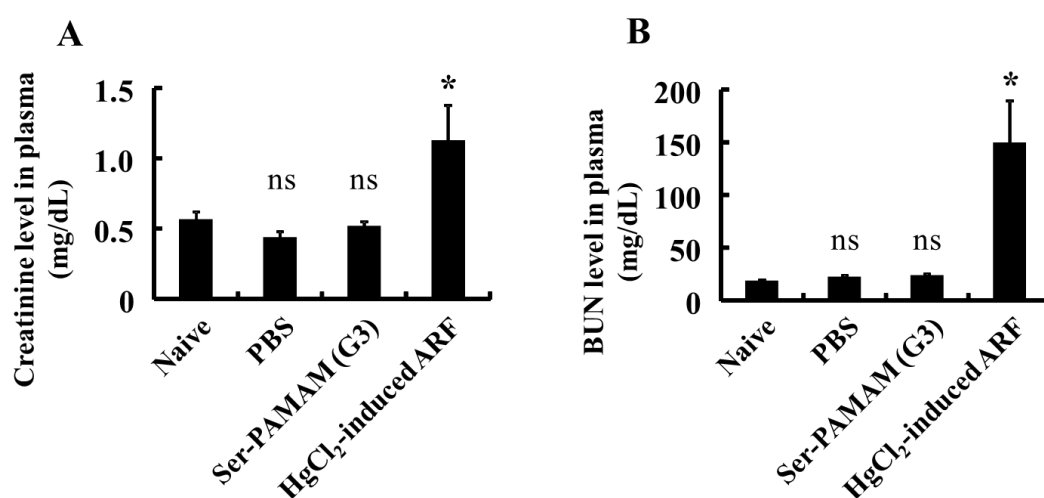


Figure 16 Plasma creatinine (A) and BUN (B) levels after intravenous injection of PBS or Ser-PAMAM (G3) once a day for 5 d. Naive, PBS, Ser-PAMAM (G3), HgCl₂-induced ARF (positive control). Results are expressed as mean \pm SE of five mice. * $p < 0.05$, significantly different from the naive group. ns, not significant.

(Fig. 7 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

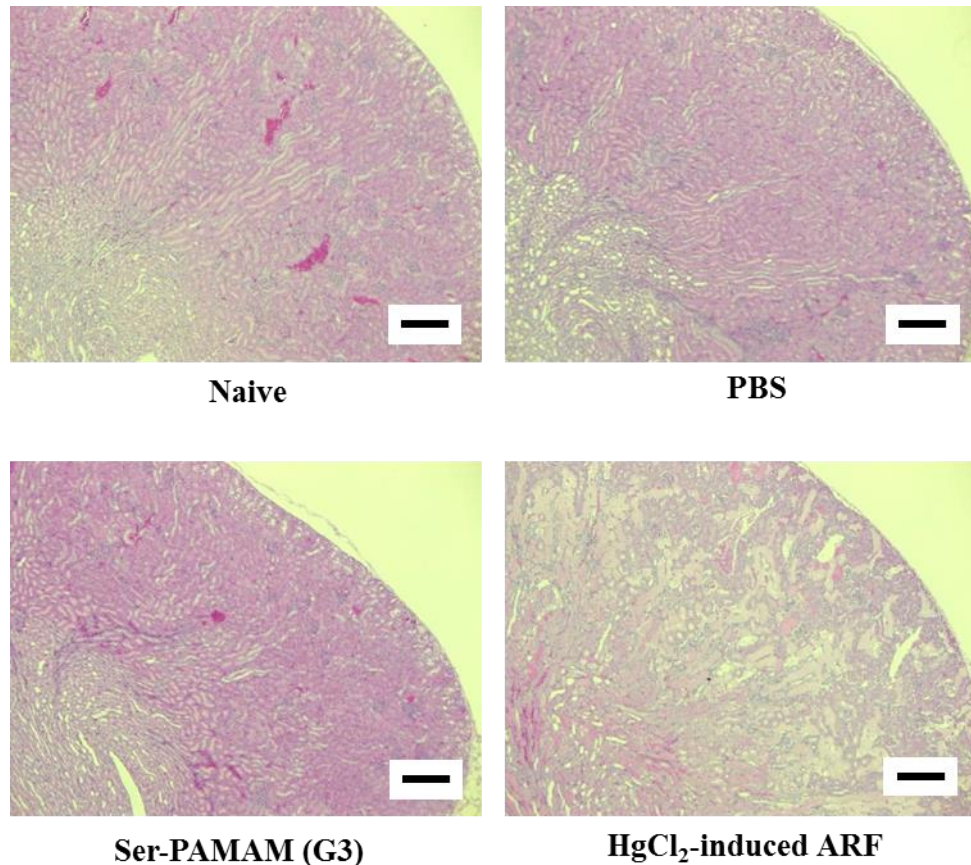


Figure 17 Histological micrographs of the kidney (Scale bar: 200 μm .) after intravenous injection of PBS or Ser-PAMAM (G3) once a day for 5 d. Naive, PBS, Ser-PAMAM (G3), HgCl₂-induced ARF (positive control).

(Fig. 7 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

第7節 考察

本章では、セリン修飾を用いた腎臓標的化 DDS を構築することを目的として、腎臓への高い選択性および移行性を示したセリン修飾 dendrimer の物性ならびにマウスにおける体内動態を系統的に評価するとともに、セリン修飾 dendrimer の腎臓内分布、腎臓集積機構の詳細や反復投与時の安全性を検討することで、腎臓標的化におけるセリン修飾の有用性を評価した。これらの一連の検討により、セリン修飾 dendrimer は有用かつ安全な腎臓標的型高分子キャリアであることを明らかにした。

蛍光顕微鏡による腎臓内分布や SPECT/CT による臓器分布の結果より、Ser-PAMAM (G3) は腎皮質の部分に選択的に移行していることが示された。さらに蛍光顕微鏡による拡大画像から、

Ser-PAMAM は皮質の中でも特に近位尿細管部分に集積していることが明らかとなった^{34, 60, 61}。近位尿細管は急性腎不全などで障害を受けやすい部位であり、また腎細胞癌の発生部位として知られる⁶²⁻⁶⁶。したがって、近位尿細管上皮細胞へ選択的に集積する Ser-PAMAM (G3) は、腎疾患治療に利用可能な腎臓標的型高分子キャリアであると考えられる。一般に、分子量 50,000 より大きい高分子は糸球体ろ過をほとんど受けないことが報告されている⁶⁷。また、粒子径が 5.5 nm 以下のナノ粒子は糸球体ろ過されやすく、尿中へ排泄されることが示されている⁶⁸。本研究で作製した Ser-PAMAM (G3) の分子量は約 10,000 で、粒子径は約 4 nm であったことから糸球体ろ過を受けやすい高分子キャリアであると考えられる。急性腎不全モデルマウスにおいて、糸球体ろ過量の減少に伴い、Ser-PAMAM (G3) の腎臓への取り込みを示す腎クリアランス値が減少したことから、Ser-PAMAM (G3) の腎臓移行には糸球体ろ過の経路が関与することが明らかとなった。さらに、近位尿細管上皮細胞株 LLC-PK1 細胞の単層膜における透過実験において、Ser-PAMAM (G3) は尿細管管腔側からの取り込みが顕著であった。これらの結果より、Ser-PAMAM (G3) は糸球体ろ過を受けた後に近位尿細管上皮細胞の刷子縁側より再吸収され、近位尿細管上皮細胞に集積することが示された。加えて、近位尿細管上皮細胞株 LLC-PK1 細胞での *in vitro* 細胞内取り込み実験の結果は、Ser-PAMAM (G3) がカベオラ依存性エンドサイトーシスまたはマクロピノサイトーシスが関与する能動的な取り込み機構により近位尿細管上皮細胞に取り込まれている可能性を示した。また、Ser-PAMAM (G3) の LLC-PK1 細胞への取り込みは、メガリン受容体の基質であるリゾチームによっても阻害されたが、Ser-PAMAM (G3) の細胞内取り込みは、メガリン受容体による取り込み機構とされるクラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤である CPZ により有意に阻害されなかった⁶⁹。これらのことから、リゾチームが Ser-PAMAM (G3) の細胞内取り込みを阻害したのは、リゾチームがメガリン受容体以外の細胞内取り込み機構を阻害したことによるものと考えられる。したがって、Ser-PAMAM (G3) の近位尿細管への取り込み機構として、メガリン受容体の寄与は小さいと考えられる。

以上のように、Ser-PAMAM が糸球体ろ過を受けた後に近位尿細管上皮細胞の刷子縁側でエンドサイトーシスなどにより能動的に取り込まれ、近位尿細管に選択的に分布することを明らかにした。しかし一般に、高分子キャリアの血中からの消失は、特異的な認識を持つ取り込み機構が介在しない場合、主に肝臓における非特異的な取り込みと腎臓での糸球体ろ過により決定されるため、セリン修飾による肝臓移行の回避も腎臓標的化に大きく関与するものと考えられる^{70, 71}。セリンと同様に側鎖に水酸基を持つアミノ酸であるスレオニンとチロシンを修飾した dendrimer の体内動態評価において、Thr-PAMAM (G3) は Ser-PAMAM (G3) と比較して、腎臓移行率は低かったものの、Ser-PAMAM (G3) と同様に腎臓選択的な体内動態を示した。一方で、Tyr-PAMAM (G3) では未修飾の dendrimer である PAMAM (G4) の体内動態と同様に腎臓選択性は示さず、肝臓にも高い

移行が見られた。したがって、肝臓への取り込み回避には、チロシンのようなフェノール性水酸基ではなく、セリンやスレオニンのようなアルコール性水酸基が寄与することが示唆された。従来の高分子薬物キャリアの開発では、高分子キャリアの物理化学的性質がその体内動態の主要因子であり、中でも分子サイズと電荷が特に重要であるとされてきた^{67, 72, 73}。こうした概念に基づけば、PAMAM (G4), Ser-PAMAM (G3), Thr-PAMAM (G3) および Tyr-PAMAM (G3) はいずれも類似した粒子径や電荷を示していることから、同様の体内動態を示すことが予想されたが、大きく異なる結果となった。このように巨視的な物理化学特性では差がないものでも、ナノ粒子表面の微小構造の違いによりナノ粒子の特性が大きく変化することも報告されていることから、本研究での粒子表面へのアルコール性水酸基導入による肝臓取り込み回避には、ナノ粒子表面の微細構造による特性変化が寄与するものと考えられる^{74, 75}。すなわち、Ser-PAMAM (G3) および Thr-PAMAM (G3) 側鎖のアルコール性水酸基は、電離しない官能基であるのに対して、Tyr-PAMAM (G3) 側鎖のフェノール性水酸基は電離する官能基であり、この違いが肝臓取り込み回避の有無に大きく影響したものと推察される。一方、肝臓への取り込みが回避された Ser-PAMAM (G3) および Thr-PAMAM (G3) のうち、Thr-PAMAM (G3) の腎臓への移行性は低かった。その理由として、スレオニンはセリンに比べて側鎖構造にメチル基が一つ多い構造を有するため、セリンに比べて dendrimer 表面にメチル基による立体障害が生じ、近位尿細管上皮細胞との親和性が低下したことが考えられる。このことは Thr-PAMAM (G3) の尿中排泄が Ser-PAMAM (G3) と比べて増大したと相関する。

また本研究では、Ser-PAMAM の腎臓移行性に及ぼす粒子サイズおよびセリン修飾数の影響についても明らかにした。すなわち、第2世代、第3世代と第4世代の PAMAM のいずれの dendrimer にセリン修飾を施しても、腎臓選択的な体内動態を示したが、なかでも中間的なサイズである Ser-PAMAM (G3) が最も高い腎臓移行性を示した。世代および分子量が小さい PAMAM (G2) は、糸球体ろ過には有利であるが、その腎臓移行性は低かった。この理由として、dendrimer は一つ世代が増加すると末端の枝分かれが2倍になる高分子であり、Ser-PAMAM (G2) には Ser-PAMAM (G3) の半分のセリンしか修飾されておらず、その結果、近位尿細管上皮細胞との親和性が低くなってしまい、腎臓移行性が低下したと考えられる。一方、世代および分子量が大きい Ser-PAMAM (G4) は糸球体ろ過されにくいいため、腎臓への移行性が低下したと考えられる。したがって、Ser-PAMAM (G3) がサイズおよび近位尿細管への親和性のバランスが最も優れていたと考えられる。

また、Ser-PAMAM (G3) の投与は、血漿中の腎障害マーカーであるクレアチニンと BUN および腎臓の形態にほとんど影響なかったことから、Ser-PAMAM (G3) は反復投与による急性毒性を示さないことが明らかとなった。Roberts らは、マウスに PAMAM を連続投与した後の長期安全性につい

て報告している。すなわち、初めの 6 週間に週 1 回 PAMAM を静脈内投与した後、6 ヶ月間のマウスの動き、飲食の挙動や体重増加に変化は見られなかったことから、PAMAM は比較的安全性の高い薬物キャリアであると考えられる⁴⁹。こうしたことから、生体適合性に優れるセリンと PAMAM を結合した Ser-PAMAM (G3) は急性毒性を示さなかったものと推察される。また、Boyd らは、デンドリマーの末端にリジンを結合させたデンドリマーを合成し、天然の L 体では生体内で分解され、非天然の D 体では分解が起こらないことを示している⁷⁶。したがって、L 体の Ser 修飾のように分解後も安全性が高い分子で機能化することにより、有効性かつ安全性の高い腎臓標的化が可能になるものと考えられる。これらのことから、Ser-PAMAM (G3) は比較的安全性の高い腎臓標的型キャリアであると考えられる。

以上の結果より、セリン修飾を用いることで、高分子キャリアである PAMAM の腎臓標的化に成功した。その中でも第 3 世代の PAMAM を用いた Ser-PAMAM (G3) が優れた腎臓移行性を示し、その腎臓移行機構の一端および反復投与の安全性を示し、腎臓標的型高分子キャリアとして期待できるキャリアの創製に成功した。

第2章 セリン修飾高分子を利用した薬物の腎臓標的化

第1章ではセリン修飾を施すことにより高分子キャリアを腎臓へ選択的に送達可能であることを明らかにした。そこで、Ser-PAMAM (G3) を利用した腎臓への薬物送達を目的として、ACE 阻害剤であるカプトプリルを利用した腎 ACE 阻害効果または抗酸化剤である L-システインを利用した腎虚血再灌流障害の抑制効果の検討を試みた。

ACE 阻害剤は降圧剤として臨床で汎用されている医薬品である。高血圧治療の中でも腎保護作用を有することから、慢性腎臓病、糖尿病や心疾患を合併する病態では極めて有用な降圧剤として認知されている^{13, 77, 78}。末梢血管抵抗を減弱させる働きが強く、腎臓においては糸球体付近の圧力を減弱させることで腎保護効果を示すだけでなく、タンパク質の漏出を抑えることも可能であり、尿タンパク質症状を改善する^{79, 80}。このように臨床上重要な効果を示す一方で、副作用も問題となっている。すなわち、ACE はアンジオテンシン I をアンジオテンシン II に変換することにより血圧を上昇させるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系を支配する酵素であるだけでなく、炎症性物質であるブラジキニンを不活性化させるキニナーゼとしての側面も存在し、ACE を阻害することは炎症性物質の体内への蓄積も高めることから空咳や血管性浮腫などの副作用を誘発する⁸¹⁻⁸⁴。特に血管性浮腫に関しては、気道の浮腫による呼吸困難から死亡に至った例もある重大な副作用であることから、Ser-PAMAM (G3) の利用により ACE 阻害剤を腎臓標的化することで副作用の軽減、治療効果の増強が期待できる⁸⁵。

また、L-システインは分子内に還元型チオールを有するため、ラジカルや活性酸素種を消去可能であり、様々な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、低分子の還元型チオールは血中から急速に消失し、肝代謝や尿中への排泄を受けるため、還元型チオール単独で効果を得るには高用量の投与が必要になる⁸⁶⁻⁸⁸。したがって、L-システインを用いて酸化ストレス疾患を治療するには、L-システインを標的部位へ効率よく送達する必要がある。一方、腎臓での酸化ストレス疾患の一つとして、腎虚血再灌流障害がある。腎虚血再灌流障害は心不全による心拍出量の低下、血栓による血行不良や臓器移植時などにおいて、臓器への血液供給が一時的に遮断されることで臓器が虚血状態に陥り、血流を再開することで臓器中に過剰な活性酸素種が発生し、障害が惹起される疾患である⁸⁹⁻⁹²。さらに、活性酸素種は直接的に組織に障害を与えるだけでなく、細胞内シグナルとして、炎症細胞の遊走を亢進させる作用もあり、二重に臓器障害を引き起こすため、致死性を高める^{10, 93}。そこで、Ser-PAMAM (G3) の利用により L-システインを腎臓標的化することによる効率的な腎臓虚血再灌流障害の抑制を試みた。すなわち、PAMAM (G3) の表面を L-セリンと L-システインで修飾したセリン-システイン修飾 dendrimer (Ser-PAMAM-Cys) を合成し、還元型チオール

である L-システインの腎臓標的化による腎虚血再灌流障害の抑制を試みた。

第 1 節 セリン修飾 dendrimer を利用したカプトプリルの腎臓への薬物送達

1-1 カプトプリル結合セリン修飾 dendrimer の物性の評価

1. カプトプリル結合セリン酸修飾 dendrimer の合成および修飾量の定量

Ser-PAMAM (G3) は、前章と同様に合成し、そのアミノ基末端にスパーサーの SPDP を介してカプトプリルを結合させた (Figure 18)。またカプトプリル修飾量は、Ser-PAMAM (G3) 1 分子あたり約 6 分子であった。

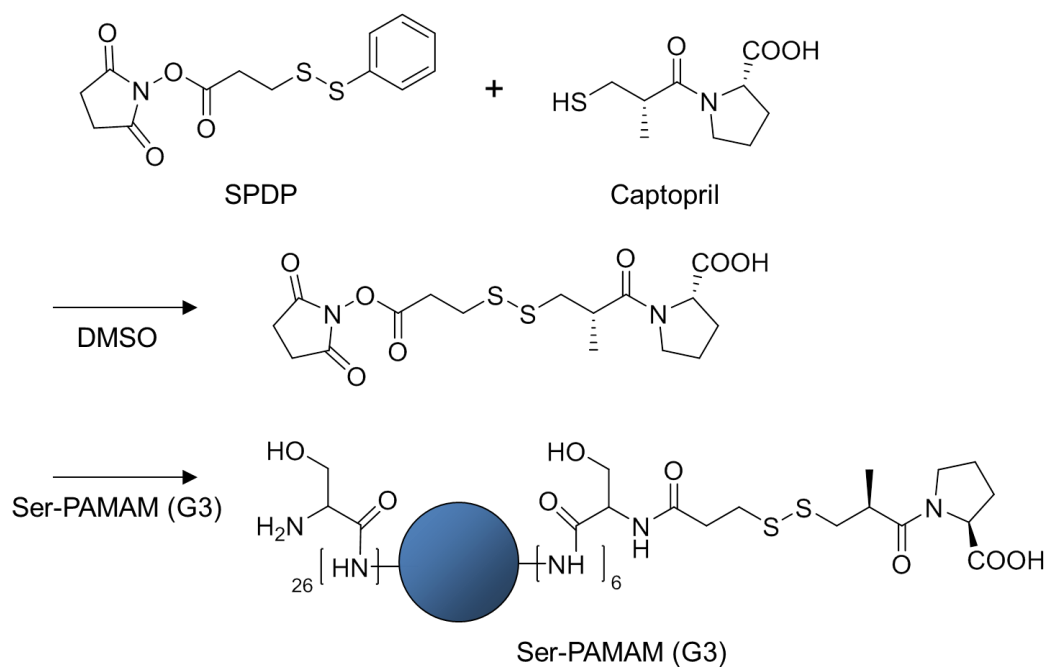


Figure 18 Synthesis and structures of Ser-PAMAM-CAP

(Fig. 8 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

2. カプトプリル結合セリン修飾 dendriマ-の物理化学的特性

カプトプリル結合 Ser-PAMAM (G3) (Ser-PAMAM-CAP) の粒子径およびゼータ電位はそれぞれ、4.75 nm、3.43 mV を示し、カプトプリル未修飾 Ser-PAMAM (G3) と類似の物理化学的特性を示した (Table 3)。

Table 3 Physicochemical characteristics of Ser-PAMAM-CAP

Compound	Diameter (nm)	Zeta-potential (mV)
Ser-PAMAM (G3)	4.03 ± 0.29	4.76 ± 0.70
Ser-PAMAM-CAP	4.75 ± 0.27	3.43 ± 0.61

Results are expressed as the mean ± SE of three experiments.

(Table 1 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

1-2 カプトプリル結合セリン修飾 dendriマ-の体内動態評価

1. カプトプリル結合セリン修飾 dendriマ-のキャリアとしての体内動態

前章と同様に、Ser-PAMAM-CAP に ^{111}In 標識を施し、キャリア部分の体内動態を評価した。Ser-PAMAM (G3) と比較して血中滞留性がやや増大したものの、腎臓への移行量は 80.9% を示し、Ser-PAMAM (G3) と同等の腎臓移行性を示した (Figure 19)。

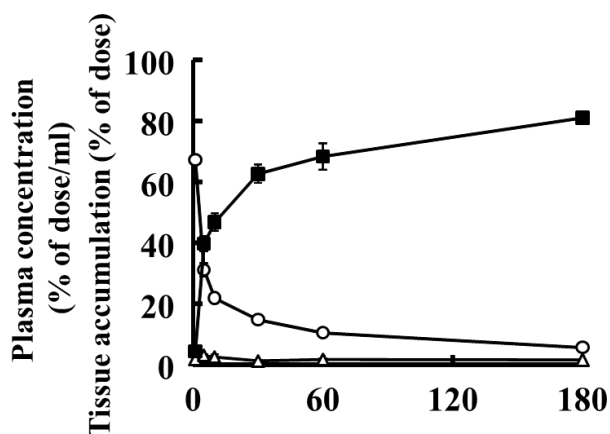


Figure 19 Time courses of plasma concentration and tissue accumulation of ^{111}In -labeled Ser-PAMAM-CAP after intravenous injection in mice at a dose of 1 mg/kg. ○, plasma; △, liver; ■, kidney. Results are expressed as the mean ± SE of three mice.

(Fig. 6 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

2. カプトプリル結合セリン酸修飾 dendriマーによるカプトプリルの体内動態変化

カプトプリル単独または Ser-PAMAM-CAP マウス尾静脈内投与後の血漿中カプトプリル濃度および腎臓内カプトプリル量を HPLC にて定量した。Ser-PAMAM-CAP 投与後の血漿中カプトプリルは、カプトプリル単独投与に比較してわずかに高かった (Figure 20A)。Ser-PAMAM-CAP 投与後の腎臓中カプトプリル濃度は、カプトプリル単独投与に比べて顕著に高かった (Figure 20B)。

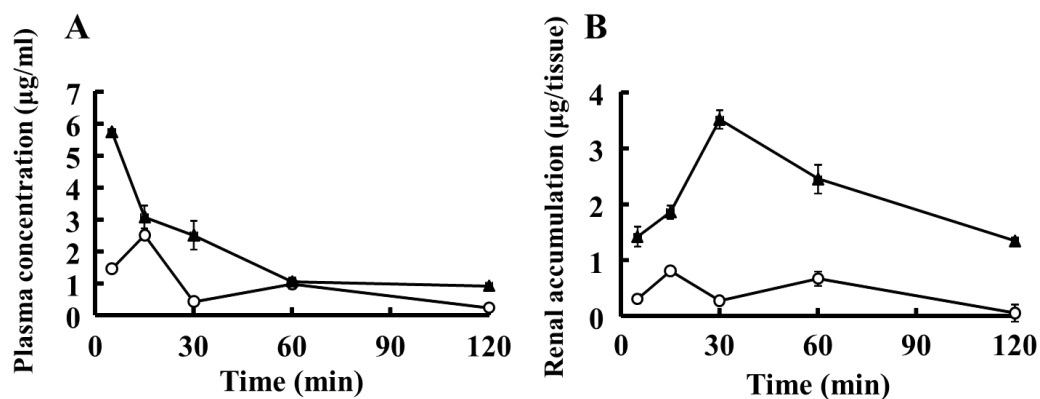


Figure 20 Plasma concentration (A) and renal accumulation (B) of captopril after intravenous injection of captopril alone and Ser-PAMAM-CAP in mice at a dose of 2 mg captopril/kg. ○, captopril alone; ▲, Ser-PAMAM-CAP.

(Fig. 6 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

3. カプトプリル結合セリン酸修飾 dendriマーの血漿中安定性

Ser-PAMAM-CAP は、ジスルフィド結合を介してカプトプリルを Ser-PAMAM (G3) に結合させている。標的部位に効率よくカプトプリルを送達するためには、腎臓に到達するまでの過程、すなわち血中での放出は望まれない。そこで、静脈内投与後の Ser-PAMAM-CAP の安定性を評価するために *in vitro* における血漿中安定性を検討した。Ser-PAMAM-CAP を血漿中で 4 時間インキュベートした後の血漿中遊離カプトプリルの量は HPLC の検出限界以下であった。

1-3 カプトプリル結合セリン修飾デンドリマーによる薬理効果

前項 1-2 において、Ser-PAMAM (G3) の利用により腎臓へのカプトプリルの移行量を高めることに成功した。そこで次に Ser-PAMAM-CAP の薬理効果を評価することを目的として、カプトプリル単独または Ser-PAMAM-CAP のマウス尾静脈内投与後の腎臓中 ACE 活性を測定した。投与後 30 分では両群で ACE 活性が顕著に阻害されたが、カプトプリル単独投与群では投与後 120 分で ACE 活性の回復が見られた。一方、Ser-PAMAM-CAP は、投与後 30 分から 120 分にかけて ACE 活性を顕著に阻害し、持続的な阻害効果を示した (Figure 21)。

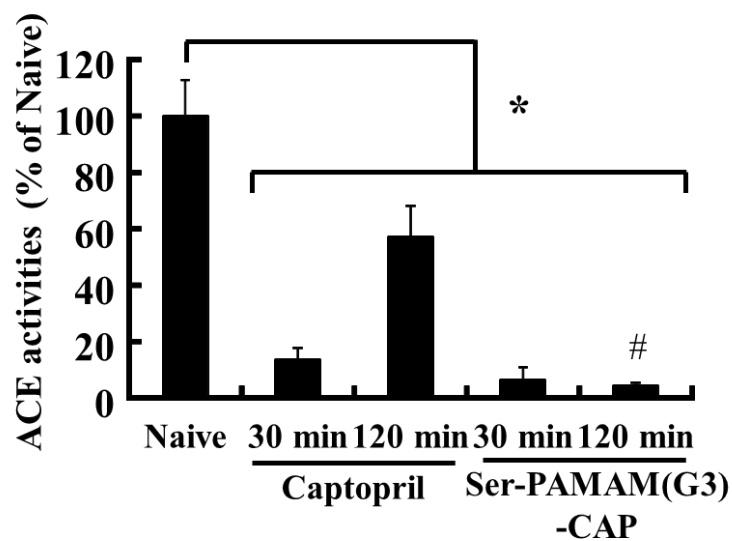


Figure 21 Effect of captopril alone and Ser-PAMAM-CAP on ACE activity in kidney 30 min or 120 min after intravenous injection in mice at a dose of 0.5 mg captopril/kg. Results are expressed as mean \pm SE of three mice. * $p < 0.05$, significantly different from the naive group. # $p < 0.05$, significantly different from the captopril and Ser-PAMAM-CAP groups at the same time.

(Fig. 6 in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115 (41), 10511-10516)

第2節 セリン-システイン修飾 dendriマーによる還元型チオール腎臓への送達

2-1 セリン-システイン修飾 dendriマーの物性の評価

1. セリン-システイン修飾 dendriマーの合成および修飾量の定量

Ser-PAMAM-Cys は、前章と同様の方法にて、セリンおよびシステインを PAMAM の末端アミノ基に結合させることにより作製した。

2. セリン-システイン修飾 dendriマーの物理化学的特性

Ser-PAMAM-Cys の粒子径およびゼータ電位はそれぞれ、4.44 nm、13.40 mV であった。Ser-PAMAM-Cys の粒子径は Ser-PAMAM (G3) と同様であったが、ゼータ電位はやや正電荷へ変化した (Table 4)。

Table 4 Physicochemical characteristics of Ser-PAMAM-Cys

Compound	Diameter (nm)	Zeta-potential (mV)
Ser-PAMAM (G3)	4.03 ± 0.29	4.76 ± 0.70
Ser-PAMAM-Cys	4.44 ± 0.23	13.40 ± 0.89

Results are expressed as the mean ± SE of three experiments.

(Result's statement in *Pharmaceutics* **2018**, 10 (4), 251)

3. セリン-システイン修飾 dendrimer の合成および物性評価

合成した Ser-PAMAM-Cys の分子量は、MALDI-TOFMS により評価した。その結果、Ser-PAMAM-Cys の分子量は、10207 Da であることが示された (Figure 22)。

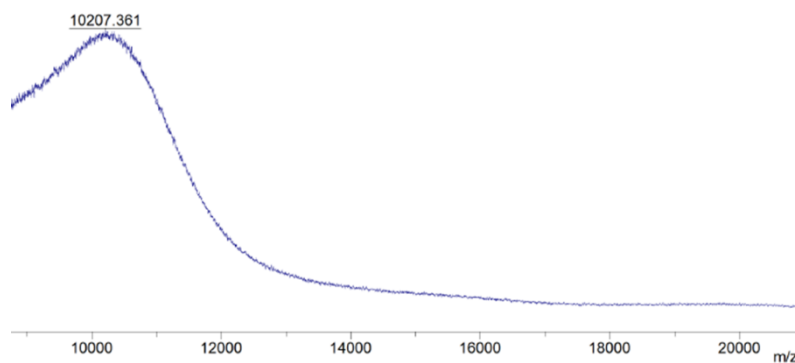


Figure 22 MALDI-TOF spectra of L-cysteine and L-serine-modified third-generation polyamidoamine dendrimer [Ser-PAMAM-Cys] with a trans-indole-3-acrylic acid as a matrix. (Figure S1 in *Pharmaceutics* **2018**, 10 (4), 251)

2-2 セリン-システイン修飾 dendriマーの抗酸化能の評価

Ser-PAMAM-Cys の抗酸化能を評価するため、ラジカルおよび活性酸素種消去能を検討した。Ser-PAMAM-Cys は、L-システイン単独に比べて、PBS 溶液中の DPPH ラジカル、過酸化水素およびヒドロキシルラジカルを顕著に消去した (Figure 23)。

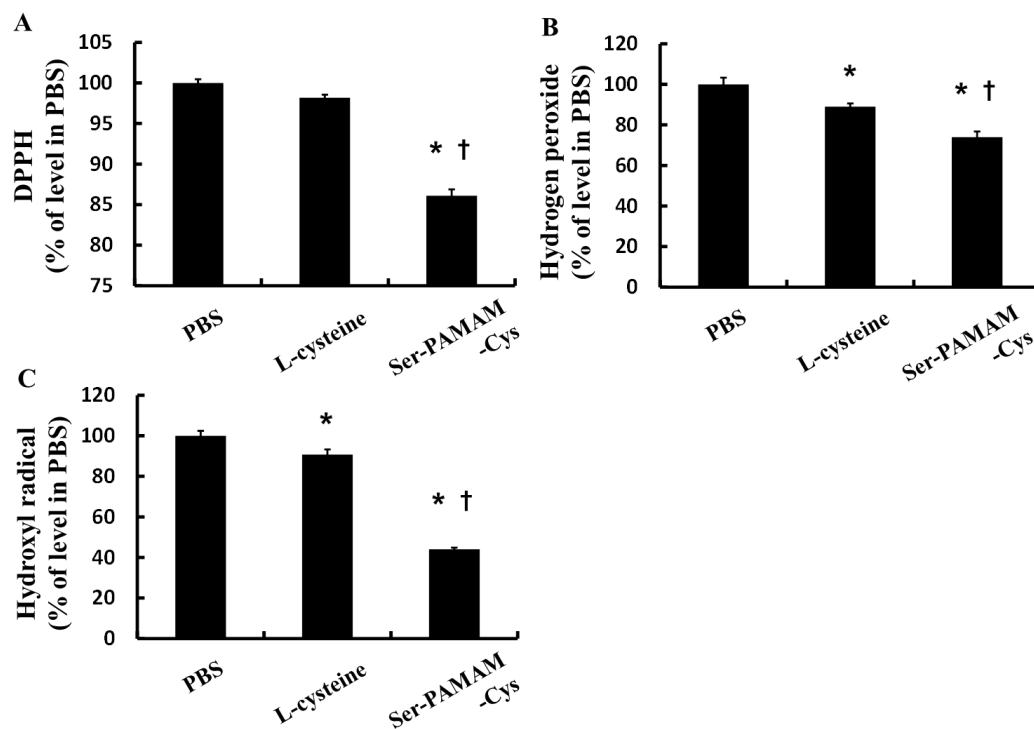


Figure 23 Relative abilities of L-cysteine and Ser-PAMAM-Cys to scavenge (A) DPPH, (B) hydrogen peroxide, and (C) hydroxyl radical. Results are expressed as the means \pm SE of five experiments. * $p < 0.05$: significantly different from the PBS group. † $p < 0.05$: significantly different from the L-cysteine group. (Figure 1 in *Pharmaceutics* **2018**, 10 (4), 251)

2-3 セリン-システイン修飾 dendriマーの体内動態の評価

1. セリン-システイン修飾 dendriマーの *ex vivo* イメージング

近赤外蛍光標識 Ser-PAMAM-Cys の静脈内投与後 60 分において、腎臓から強い蛍光が観察された。またその他の臓器中から蛍光は観察されなかった (Figure 24)。

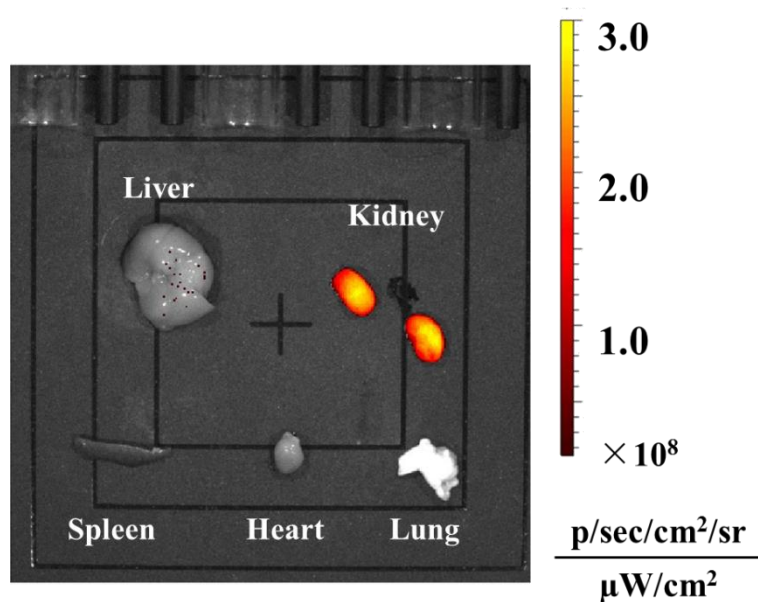


Figure 24 *Ex vivo* imaging of NIR-labeled Ser-PAMAM-Cys 60 min after intravenous injection. Fluorescence intensities were determined for the liver, kidney, spleen, heart, and lung. (Figure 2 in *Pharmaceutics* **2018**, 10 (4), 251)

2. セリン-システイン修飾 dendriマーの体内動態

^{111}In 標識 Ser-PAMAM-Cys は静脈内投与後、速やかに血中から消失し、投与後 180 分までに投与量の 64.2% が腎臓へ移行した (Figure 25)。体内動態の結果に基づき算出した Ser-PAMAM-Cys の肝臓および腎臓クリアランスはそれぞれ、0.09、2.86 mL/h であった (Table 5)。Ser-PAMAM-Cys の腎臓クリアランスは、全身クリアランスの 81.2% を示し、高い腎臓標的化効率を示した。

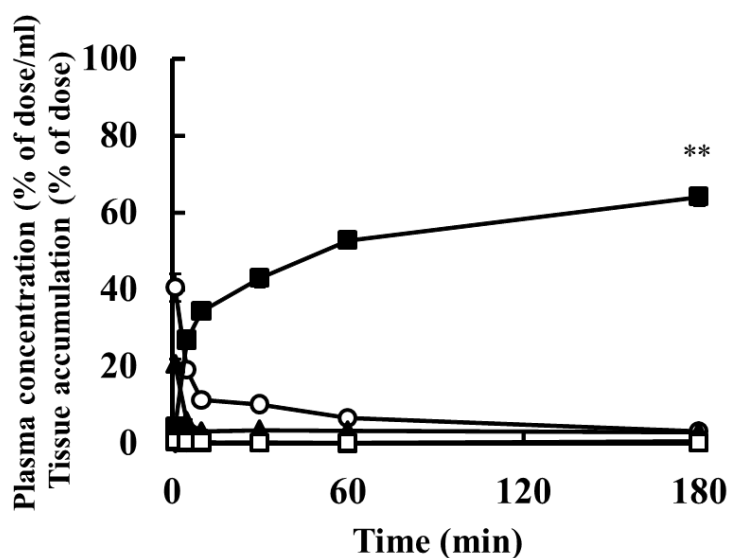


Figure 25 Time courses of plasma concentration and tissue accumulation after intravenous administration of 1 mg/kg of ^{111}In -labeled Ser-PAMAM-Cys. Results are expressed as the means \pm SE of three mice. \circ , plasma; \blacktriangle , liver; \blacksquare , kidney; \diamond , spleen; \triangle , heart; \square , lung. $**p < 0.01$, significantly different from other tissues. (Figure 2 in *Pharmaceutics* 2018, 10 (4), 251)

Table 5 Pharmacokinetic parameters of Ser-PAMAM-Cys

Compound	Dose (mg/kg)	AUC (% of dose \cdot h/mL)	Clearance (mL/h)		
			Total	Liver	Kidney
Ser-PAMAM-Cys	1.0	28.4	3.52	0.09	2.86

(Table 1 in *Pharmaceutics* 2018, 10 (4), 251)

2-4 セリン-システイン修飾 dendriマーによる腎虚血再灌流障害の抑制効果

1. セリン-システイン修飾 dendriマー投与による腎虚血再灌流障害治療効果の評価

虚血再灌流障害モデルマウスを作製し、Ser-PAMAM-Cys の虚血再灌流障害抑制効果を評価した。まずはじめに再灌流後 24 時間の血漿中の腎障害マーカーであるクレアチニンおよび BUN を指標に抑制効果を評価した。虚血再灌流処置のみを行い、薬物を投与しなかった群では、クレアチニンおよび BUN はそれぞれ、0.92 mg/dL、110.8 mg/dL へ上昇した (Figure 26)。L-システイン単独投与群では、クレアチニンおよび BUN の上昇は有意に抑制されなかった。一方、Ser-PAMAM-Cys はクレアチニンおよび BUN の上昇を有意に抑制した。さらに、再灌流後 24 時間の腎切片を作製し、H&E 染色を施した後、腎臓の障害の程度を観察した。無処置のマウス群では、腎皮質において、厚みがあり整った配列の尿細管が観察された (Figure 27)。しかし、虚血再灌流群では、尿細管が細くなり、配列にすき間が生じた組織学的形態を示した。虚血再灌流による腎臓の形態変化はシステイン単独投与により若干改善された。一方、その腎臓の形態変化は Ser-PAMAM-Cys の投与により顕著に抑制された。

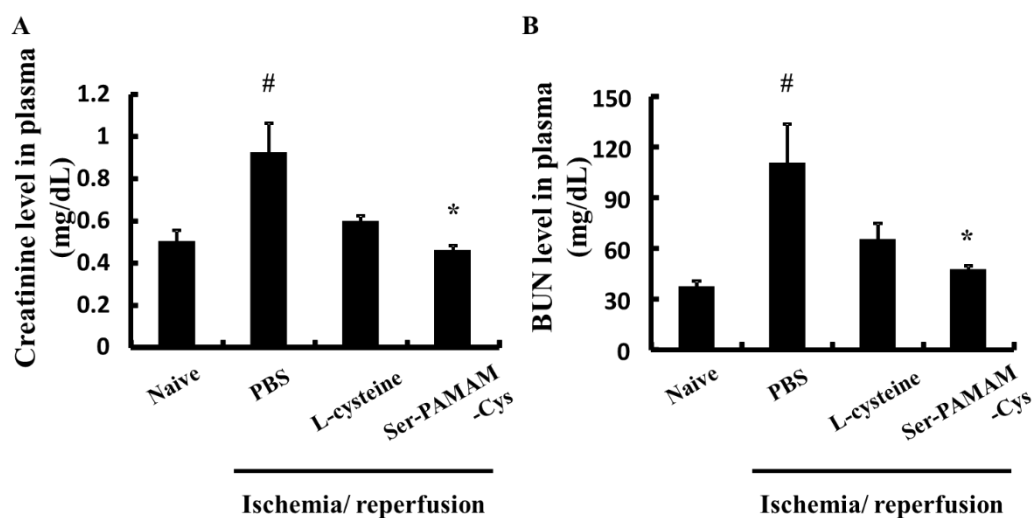


Figure 26 Effect of L-cysteine and Ser-PAMAM-Cys on plasma levels of (A) creatinine and (B) BUN 24 h after ischemia/reperfusion. Results are expressed as the means \pm SE of five mice. # $p < 0.05$, significantly different from the naive group. * $p < 0.05$, significantly different from the ischemia/reperfusion + PBS group. (Figure 3 in *Pharmaceutics* **2018**, 10 (4), 251)

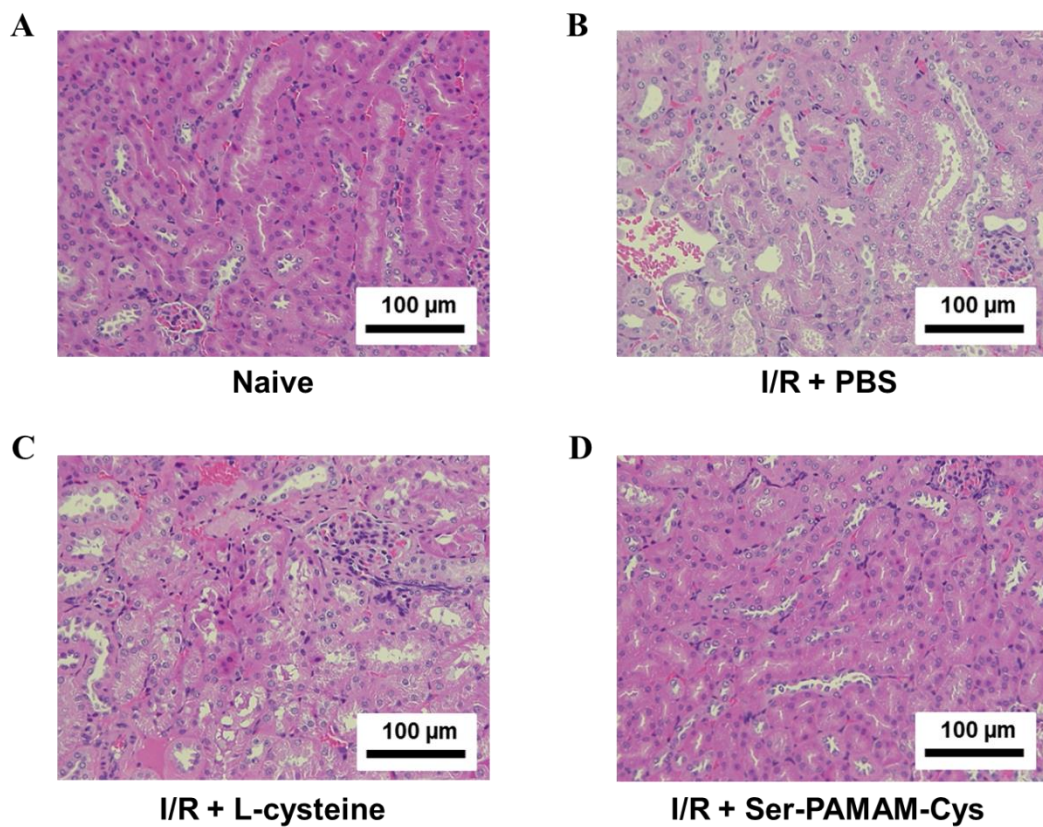


Figure 27 Effect of L-cysteine and Ser-PAMAM-Cys on changes in renal histology. Histological micrographs of sections from (A) naive and ischemia/reperfusion (I/R) mouse model kidneys after intravenous injection of (B) PBS, (C) L-cysteine, and (D) Ser-PAMAM-Cys. Scale bar: 100 μm. (Figure 4 in *Pharmaceutics* **2018**, 10 (4), 251)

2. セリン-システイン修飾デンドリマーによる腎虚血再灌流障害の抑制機構

前項 1.では、血漿中の腎障害マーカーや組織切片評価において、Ser-PAMAM-Cys が腎臓虚血再灌流障害を顕著に抑制可能であることを明らかにした。そこで次に、腎障害時に上昇するマーカー遺伝子や炎症系細胞の遊走を惹起する接着因子の発現への影響について評価した。すなわち、再灌流後 24 時間での腎臓中炎症関連遺伝子の発現レベルをリアルタイム PCR 法にて評価した。その結果、虚血再灌流により上昇した NGAL, IL-18, ICAM-1 と VCAM-1 の発現が、Ser-PAMAM-Cys 投与により有意に抑制された (Figure 28)。

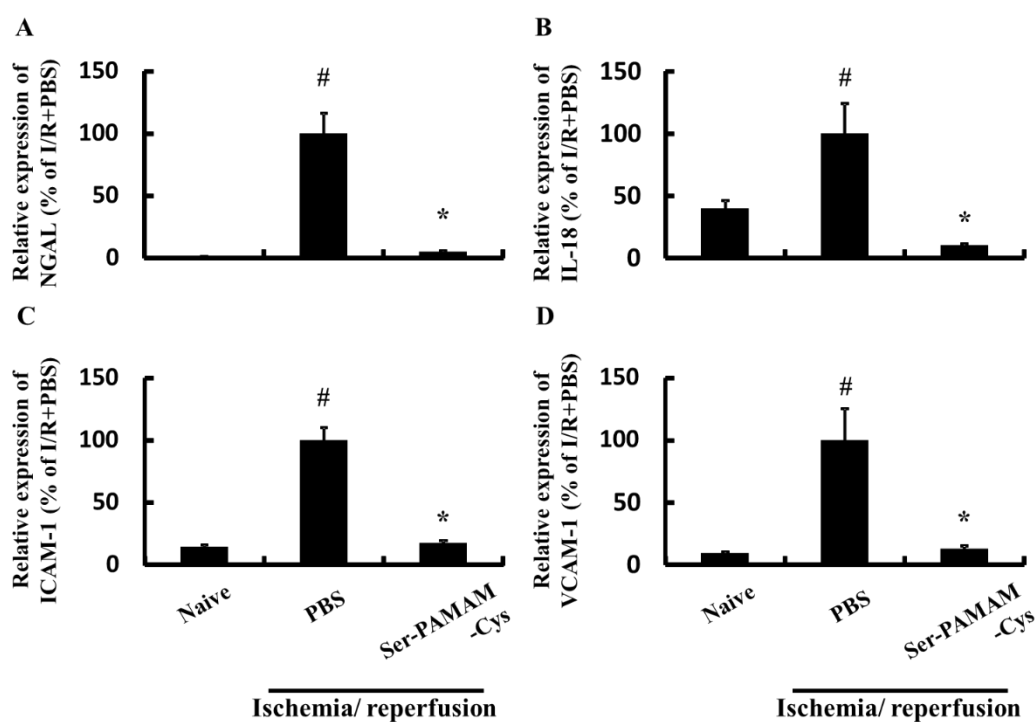


Figure 28 Effect of Ser-PAMAM-Cys on expression levels of (A) NGAL, (B) IL-18, (C) ICAM-1, and (D) VCAM-1 in mouse ischemia/reperfusion model kidneys. Results are expressed as the means \pm SE of five mice. # $p < 0.05$, significantly different from the naive group. * $p < 0.05$, significantly different from the ischemia/reperfusion (I/R) + PBS group. (Figure 5 in *Pharmaceutics* 2018, 10 (4), 251)

第3節 考察

本章では、第1章で腎臓標的型高分子キャリアとしての有用性が明らかとなった Ser-PAMAM (G3) を利用した薬物の腎臓標的化を試みた。はじめに、ACE 阻害剤であるカプトプリルを修飾した Ser-PAMAM-CAP を合成し、効率的な腎臓への薬物送達による腎 ACE 活性の抑制の持続化に成功した。さらに、腎臓標的型高分子である Ser-PAMAM (G3) に抗酸化剤であるシステインを導入した新規腎臓標的型還元型チオール (Ser-PAMAM-Cys) も合成した。Ser-PAMAM-Cys は効果的にラジカルおよび活性酸素種を消去し、酸化ストレス疾患の一種である腎虚血再灌流障害を効率的に抑制した。これらの結果から、薬物の腎臓標的化におけるセリン修飾高分子キャリアの有用性が示された。

Ser-PAMAM-CAP のキャリア部分は Ser-PAMAM (G3) と同様の高い腎臓移行性を示したが、これはカプトプリルの修飾がセリン修飾 dendrimer の物理化学的特性にはほとんど影響しなかったことによるものと考えられる。また、Ser-PAMAM-CAP 投与により、腎臓中カプトプリル量は顕著に増大し、¹¹¹In 標識を用いた Ser-PAMAM-CAP のキャリア部分の腎臓移行性の結果と相関した。このことから、Ser-PAMAM の利用によりカプトプリルが効率よく腎臓へ送達されることが明らかとなった。カプトプリルはクロスリンカーである SPDP を介して dendrimer に結合しており、その結合はジスルフィド結合である。一般に血漿中には生体の還元物質であるグルタチオンは少ないため、ジスルフィド結合は血漿中では還元的切断を受けにくく安定であることが示されている⁹⁴⁻⁹⁷。したがって、血中での Ser-PAMAM-CAP からのカプトプリルの放出は緩やかであると考えられる。これは血漿中での Ser-PAMAM-CAP の安定性試験で遊離したカプトプリルが検出されなかった事実とも一致する。また、カプトプリルの薬理効果の活性中心はチオール基であるため、ACE 阻害効果を示すにはカプトプリルがキャリアと結合しているジスルフィド結合から切り出される必要がある⁹⁸。一般に、細胞質は生体内還元物質であるグルタチオンを多く含み還元環境に保たれている^{94, 99}。また、ジスルフィド結合で薬物を結合させた薬物キャリアは、細胞内へ取り込まれた後、細胞質のグルタチオンなどによりジスルフィド結合が還元され、薬物キャリアから細胞質に薬物を放出することが報告されている^{95, 100}。さらに、Ser-PAMAM-CAP が ACE 活性阻害効果を示したことから、Ser-PAMAM-CAP は腎臓に移行した後に、細胞質中でカプトプリルを放出したと考えられる。また、腎臓の中でも近位尿細管上皮細胞は ACE の発現が高い部位であることから、近位尿細管上皮細胞を標的とする Ser-PAMAM (G3) を利用することで、カプトプリルにより腎臓 ACE 活性が効率的に抑制され、また ACE 活性阻害効果の持続化が得られたと考えられる^{101, 102}。

次に Ser-PAMAM (G3) による L-システインの腎臓標的化に関する研究では、Ser-PAMAM (G3) による腎臓標的化には薬物の修飾率が影響すると考えられることから、修飾率の異なる

Ser-PAMAM-Cys を合成し、腎臓標的化に及ぼす修飾率の影響を評価した。システインの修飾率が全体の 20%である Ser-PAMAM-Cys (Ser:Cys = 80:20) はややゼータ電位が変化したものの、腎臓選択性に大きな影響を与えることなく、効率的に腎臓へ移行した。一方、システインの修飾率が 40%である Ser-PAMAM-Cys (Ser:Cys = 60:40) は、腎臓標的性は維持されたが、システインの修飾率が 20%の Ser-PAMAM-Cys と比較して腎臓移行性がやや低下することが確認された。したがって、高効率の腎臓標的化を行うためのセリン修飾率は、第 3 世代の dendrimer を用いる場合、dendrimer の末端官能基数全体の 80% 以上にすることが示された。

Ser-PAMAM-Cys のラジカル消去能はシステイン単独と比べて高かった。システインやグルタチオンなどの低分子チオールは容易に自己酸化され、分子間でジスルフィド結合を形成するために、活性酸素種やラジカルの消去能が消失しやすいと考えられる^{103, 104}。それに対して Ser-PAMAM-Cys では、表面のチオール基に立体的な間隔が存在し、自己酸化によるチオール分子間のジスルフィド結合の形成が起こりにくいため、チオール基の安定性は高く、活性酸素種やラジカル消去に効果的に働いたものと考えられる。既に報告されている還元剤修飾 dendrimer も、還元型チオール単体と比べて、活性酸素種やラジカルを効率的に消去することが示されていることから、抗酸化剤を樹状に結合させることは、抗酸化剤の活性を高める方法として有用な方法の一つと考えられる⁴⁶。

腎虚血再灌流で特に障害を受ける部位は近位尿細管であることから知られている¹⁰⁵。腎臓虚血再灌流障害は、虚血再灌流により近位尿細管が障害されることで、上皮細胞の脱落などから尿細管が閉塞され、糸球体ろ過量の減弱の症状を呈し、急激にネフロン機能が低下することから致死率の極めて高い疾患である¹⁰⁶⁻¹⁰⁹。腎虚血再灌流障害を引き起こす初期段階では、近位尿細管部位において過剰な活性酸素種が発生され、この活性酸素種が活性ラジカルとしての様々な反応を引き起こし、腎臓組織へ直接的に障害を与える。セリン修飾を用いた dendrimer は特に近位尿細管に集積することから、Ser-PAMAM-Cys は過剰な活性酸素種が発生している近位尿細管部位へ還元型チオールを効率よく送達することで腎虚血再灌流障害を顕著に抑制したと考えられる。また、虚血再灌流障害では、活性酸素種は直接的に組織に障害を与えるだけでなく、細胞内シグナルのメッセンジャーとして働き、様々な炎症関連遺伝子の発現を促進することが知られている^{93, 110}。活性酸素種による直接的な障害が引き起こされた部位で、活性酸素種は、好中球などの炎症細胞を活性化する因子の発現を促進することで虚血再灌流障害の予後を悪化させることが報告されている¹¹¹。そこで、腎虚血再灌流における炎症関連遺伝子群の発現を評価したところ、Ser-PAMAM-Cys の投与により、虚血再灌流処置により亢進した炎症関連遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった。炎症細胞の浸潤を促進する接着因子である ICAM-1 と VCAM-1 の発現や近位尿細管や遠位尿細管が障害を受けた場合に、亢進する IL-18 や NGAL (好中球の活性化の指標としても知られる) の発現は

Ser-PAMAM-Cys の投与により抑制されたことから Ser-PAMAM-Cys は直接的な活性酸素種を消去するだけでなく、炎症関連遺伝子群の発現も効率的に抑制することで腎臓虚血再灌流障害を抑制することが示された。

以上のように、本章では、セリン修飾高分子の利用により薬物の腎臓標的化ならびに薬理効果の増強に成功した。さらに酸化ストレス疾患治療における本標的化技術の有用性も明らかにした。また、高効率な腎臓標的化が可能な薬物修飾率およびセリン修飾率を明らかにした。

結論

著者は2章にわたり、有効かつ安全な腎臓標的化 DDS の構築を目的として、高分子キャリアの腎臓標的化におけるセリン修飾の有用性、セリン修飾高分子キャリアに薬物を結合させることによる薬物の腎臓標的化および腎疾患治療におけるその有用性に関して検討を行い、以下の結論を得た。

第1章 セリン修飾を利用した高分子キャリアの腎臓標的化

高分子キャリアの腎臓標的化における Ser 修飾の有用性を明らかにした。すなわち、Ser 修飾を施すことで、高分子キャリアである PAMAM (G3) が静脈内投与後、腎臓へ選択的に集積することを見出した。また、Ser-PAMAM (G3) は、糸球体ろ過された後に近位尿細管の管腔側よりカベオラ依存性エンドサイトーシスもしくはマクロピノサイトーシスを介するトランスサイトーシスで近位尿細管上皮細胞に選択的に取り込まれることを示した。さらに、反復投与後の急性毒性試験を実施し、Ser-PAMAM (G3) の安全性を明らかにした。

第2章 セリン修飾高分子を利用した薬物の腎臓標的化

Ser-PAMAM (G3) の利用により、ACE 阻害剤であるカプトプリルを効率的に腎臓へ送達可能であること、腎臓中 ACE 活性を持続的に阻害可能であることを明らかにした。また、Ser-PAMAM(G3) の利用により、抗酸化剤であるシステインの腎臓標的化が可能であること、腎虚血再灌流障害が抑制できることを示した。

以上、著者はセリン修飾による腎臓標的化 DDS の構築に成功した。Ser-PAMAM (G3) は様々な腎疾患の発症に関わる近位尿細管に選択的に集積する薬物キャリアであることから、Ser-PAMAM (G3) は腎疾患治療に有望な腎臓標的型高分子キャリアであることが示された。これらの知見は、腎疾患治療を目的とした DDS 製剤の開発に対して有用な情報を提供するものと考えられる。

実験の部

第 1 章 実験の部

【1】 試薬等

第 2 世代、第 3 世代と第 4 世代の PAMAM と FITC isomer I は Sigma-Aldrich 社から購入した。Boc-Ser(tBu)-OH、Boc-Thr(tBu)-OH、Boc-Tyr(tBu)-OH と HOBt は渡辺化学工業から購入した。HBTU は Merk-Millipore 社から購入した。DMSO、DMF、Et₂O、DIPEA、TFA と TIS は和光純薬工業から購入した。SPDP は東京化成工業から購入した。Vivotag 800 は PerkinElmer 社から購入した。DTPA anhydride は同仁化学から購入した。¹⁴C-イヌリンは American Radiolabeled Chemicals 社から購入した。¹¹¹InCl₃ は日本メジフィジックスより供与されたものを用いた。その他の試薬については一般に入手可能な特級試薬に相当する試薬を用いた。

【2】 動物および細胞

ddY 系雄性マウス (5 週齢、25 g) は日本 SLC から購入した。Hos:HR-1 系雄性マウス (6 週齢、25 g) は星野試験動物飼育所から購入した。全ての動物実験は全て「京都薬科大学動物実験実施規定」、および ”the National Institutes of Health’s Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” に則って実施した^{112, 113}。ブタ近位尿細管細胞株 LLC-PK1 細胞は大日本住友から購入し、10% FBS を含む Medium 199 培地で 37℃、5% CO₂ 雰囲気下で培養した。

【3】 アミノ酸修飾高分子キャリアの合成

Ser-PAMAM (G3)、Thr-PAMAM (G3) および Tyr-PAMAM (G3) は、HBTU/HOBt 法を用いてそれぞれのアミノ酸をデンドリマー末端に縮合反応させることで合成した^{46, 48}。以下 Ser-PAMAM (G3) の合成例を示す。DMSO/DMF (1:1 (v/v)) 中で PAMAM (G3) の末端のアミノ基に対して、35.2 eq (32 個の末端アミノ基の 1.1 倍量) の Boc-Ser(tBu)-OH、HBTU と HOBt を反応させ、触媒として 70.4 eq の DIPEA を添加した。室温で反応させ、反応物を TLC で展開し、ニンヒドリン反応が陰性となった場合、末端のアミノ基に全ての Boc-Ser(tBu)-OH が修飾されたと判断し、反応完了とした。反応溶媒に過剰量の Et₂O を加えることを 3 回繰り返すことで沈殿精製を行い、真空デシケーター中で乾燥させた。沈殿物に TFA カクテル (TFA:TIS:水 = 95:2.5:2.5) を加えて 90 分間室温で反応させることで、Boc 基および tBu 基の脱保護を行った。この反応溶媒に過剰量の Et₂O を加えることを 3 回繰り返す。

返すことで沈殿精製を行い、真空デシケーター中で乾燥させた。粗生成物を超純水で溶解させ、PD-10を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより必要な高分子分画を回収し、凍結乾燥することでSer-PAMAM (G3) を得た。

【4】 ^{111}In 標識体の合成

dendリマー誘導体への ^{111}In の導入は Hnатовich らの方法に準じて実施した¹⁴。すなわち、50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) 中で DTPA anhydride と 60 分間室温で反応させることで Ser-PAMAM (G3) に、キレート試薬である DTPA を導入した。PD-10 を用いて未反応の DTPA を除去し、凍結乾燥により DTPA 標識 Ser-PAMAM (G3) を得た。0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) 中で、 $^{111}\text{InCl}_3$ と DTPA 標識 Ser-PAMAM (G3) を室温で放置することにより ^{111}In を DTPA にキレートさせた。キレートされなかった ^{111}In は PD-10 および限外ろ過により除去した。TEC-CONTROL™ (Model#150-771, Biodex medical systems) を用いたペーパークロマトグラフィーにより、 dendリマー誘導体に ^{111}In が標識されていることを確認した。

【5】 高分子キャリアの物理化学的特性の評価

dendリマー誘導体の粒子径およびゼータ電位は、それぞれの dendリマー誘導体が 1 mg/mL とするように PBS で溶解させ、キャピラリーセル (DTS1070, Malvern 社) を測定セルとして使用し、粒子径・ゼータ電位測定装置 (Zetasizer, Malvern 社) を用いて測定した。

【6】 高分子キャリアの体内動態の評価

(1) 近赤外蛍光標識を利用した *ex vivo* および *in vivo* イメージング

Vivotag 800 を用いて、 dendリマー誘導体に近赤外蛍光標識を導入した。*In vivo* イメージングを実施するために、Vivotag 800 標識 Ser-PAMAM (G3) または Vivotag 800 標識 PAMAM (G4) を Hos:HR-1 マウスに尾静脈内投与し、投与後 60 分に直ちに *in vivo* イメージングシステム (IVIS Lumina XRMS Serise III, Perkin-Elmer 社) で臓器分布をイメージングした。その後、イソフルラン麻酔下において右心耳に切り込みを入れ、左心室に 10 mL のヘパリンを含んだ生理食塩水を灌流させ、血中にある臓器に分布していない dendリマー誘導体を除去した。肝臓、腎臓、脾臓、心臓と肺を摘出し、同様に *ex vivo* イメージングを行った。

(2) SPECT/CT による組織分布評価

【4】で得た ^{111}In 標識 Ser-PAMAM (G3) を 1 匹あたり 8.7 MBq となるように、ddY マウスへ静脈内投与した。投与後 3 時間に、SPECT/CT イメージング装置 (NanoSPECT/CT、Bioscan 社) で 45 分間の累積 SPECT 画像を取得し、併せて CT 画像も取得した。得られた SPECT/CT 画像は HiSPECT ソフトウェアにより処理した。

(3) 静脈内投与後の体内動態

【4】で得た ^{111}In 標識 Ser-PAMAM (G3) を dendrimer 誘導体として 1 mg/kg の投与量で、ddY マウスへ静脈内投与した。イソフルラン麻酔下、投与後 1、5、10、30、60 と 180 分に採血を行い、遠心することで血漿を得た。マウスを安楽死させた後、肝臓、腎臓、脾臓、心臓と肺を摘出し、それぞれをガンマカウンター (1480WizardTM3TM、Perkin-Elmer 社) で放射活性を測定し、血漿中濃度および各臓器への移行量を求めた。

(4) 薬物動態学的パラメーターの算出

体内動態の結果から、非線形最小二乗法プログラムソフトウェアである MULTI を使用して、2-コンパートメントモデルとして解析した¹¹⁵。高分子キャリアの組織移行性は、組織取り込みクリアランス値を算出することで評価した¹¹⁶⁻¹¹⁸。組織取り込みクリアランス値 CL_{tissue} は以下に示す式にて表される。また、 X_t は時間 t における組織移行量、 C_t は時間 t における血中濃度、そして AUC_{0-t} は時間 0 から時間 t までの曲線下面積を示している。 X_t/C_t 対 AUC_{0-t}/C_t プロットの傾きを求めることで、 CL_{tissue} を算出した。

$$X_t = C_{\text{tissue}} \times AUC_{0-t}/C_t$$

【7】 腎臓内局在の評価

FITC を用いて、dendrimer 誘導体に蛍光標識を導入した。FITC 標識 Ser-PAMAM (G3) を ddY マウスに尾静脈内投与後 60 分に安楽死させ、腎臓を摘出した。30% スクロース溶液にて腎臓を置換させ、臓器が溶液に完全に沈んだ段階でスクロースによる置換が完了と見なした。腎臓を O.C.T コンパウンド中で凍結させ、その凍結サンプルを凍結切片作製器 (Leica CM1950、LEICA 社) を用いて、10 μm の切片を作製した。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の DAPI で処理することで核染色を行った。作製した腎切片は、蛍光顕微鏡 (Biozero、KEYENCE) で観察した。

【8】 糸球体ろ過量の測定

(1) ARF モデルマウスの作製

糸球体ろ過量を低下させたマウスを作製するために、ddY マウスに 8 mg/kg の HgCl₂ を皮下注射し、48 時間飼育することで作製した³⁷。

(2) 糸球体ろ過量の測定

正常または ARF を発症させた ddY マウスに、4 mg/kg の ¹⁴C-イヌリン (74 MBq/g) を静脈内投与後 1、3、5、10、15、30 と 60 分に、ヘマトクリット管を用いて同一個体の尾静脈より採血した¹¹⁹。ヘマトクリット管を遠心することで得た血漿 5 μL を液体シンチレーションカクテル (クリアゾル I、ナカライテスク) 2 mL を加えて、放射活性を液体シンチレーションカウンター (LSC-6100、Aloka 社) で測定した。イヌリンの全身クリアランスを算出し、その値を糸球体ろ過量とした¹²⁰。

【9】 細胞層透過実験

LLC-PK1 細胞を 2.5×10^5 cells/insert の細胞数で 12-mm Transwell[®] に播種し、1 週間培養した。透過実験を始める前に、刷子縁膜側と側底膜側を HBSS 溶液 (pH 7.4) で満たし、1 時間 37°C でプレインキュベートした。その後、刷子縁膜側または側底膜側を 0.1 mg/mL の FITC 標識 Ser-PAMAM (G3) または PAMAM (G4) を含む HBSS 溶液に置換し、投与の逆側から 1、2、3 と 4 時間に溶液を 100 μL 採取し、等量の新しい HBSS を戻した。そして、マイクロプレートリーダー (PowerScan HT、BioTek 社) にて 485 nm の励起波長により 528 nm の蛍光強度を読み取り、透過した dendrimer 誘導体を定量した。

【10】 細胞内取り込み阻害実験

LLC-PK1 細胞を 2.5×10^5 cells/well の細胞数で 24-well plate に播種し、1 週間培養した。透過実験を始める前に、HBSS 溶液 (pH 7.4) で 1 時間 37°C プレインキュベートした。その後、5 μg/mL の ¹¹¹In 標識 Ser-PAMAM (G3) に阻害条件として、100 μM CPZ、370 μM GEN、100 μM EIPA、1 mM リゾチームまたは 100 μg/mL の標識していない Ser-PAMAM (G3) を含む HBSS 溶液に置換することで阻害実験を開始した¹²¹⁻¹²³。37°C の条件で 4 時間放置した後、溶液を除去し新しい HBSS 溶液で洗浄した。その後、細胞溶解液 (100 mM Tris/HCl、2 mM EDTA、0.05% Triton X-100、pH 7.8) で細胞を溶解させ、ライセート中の放射活性をガンマカウンターにて測定した。

【11】 マウスへの高分子キャリア反復投与による安全性評価

(1) Ser-PAMAM (G3) のマウスへの反復投与

1 mg/kg の Ser-PAMAM (G3) もしくは PBS を ddY マウスに 1 日 1 回静脈内投与を 5 日間行った。最終投与後 24 時間にイソフルラン麻酔下で大静脈から採血を行い、遠心することで血漿を得た。また、マウスを安楽死後に腎臓を摘出した。また、腎障害のポジティブコントロールとして、【8】(1) と同様に塩化水銀誘発性 ARF マウスを作製し、同様に評価した。

(2) クレアチニンおよび血中尿素窒素の測定

クレアチニンは市販の測定キットを (LabAssay、和光純薬工業) 使用して測定した。また、血中尿素窒素は市販の測定キット (DIUR-100、BioAssay System 社) を使用して測定した。

(3) 腎臓の H&E 染色による組織学的評価

摘出した腎臓を 4% PFA に浸漬させた。5 μm のパラフィン切片を作製した後、H&E 染色を施し顕微鏡 (Biozero、KEYENCE) で観察した。

【12】 統計学的解析

多群間比較には、Tukey-Kramer 多重比較法で検定し、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

第2章 実験の部

【1】 試薬

第1章と共通する試薬は第1章【1】に準ずる。Boc-Cys(Trt)-OHはMerk-Millipore社から購入した。DPPHは和光純薬工業から購入した。カプトプリルは東京化成工業から購入した。HHLはSigma-Aldrich社から購入した。その他の試薬については一般に入手可能な特級試薬に相当する試薬を用いた。

【2】 動物

ddY系雄性マウス(5週齢、25g)とC57BL/6J系雄性マウス(6週齢、20-25g)は日本SLCから購入した。全ての動物実験は全て「京都薬科大学動物実験実施規定」、および「the National Institutes of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」に則って実施した^{112, 113}。

【3】 薬物結合セリン修飾高分子キャリアの合成

(1) カプトプリル結合セリン修飾 dendrimer の合成

本章で用いる Ser-PAMAM (G3) は第1章【3】の方法に準じて作製したが、最後の粗生成物は、末端アミノ基数の5倍量にあたる水酸化ナトリウムを含む溶液で溶解させ、PD-10により精製した。DMSO中でSPDPと1.1倍量のカプトプリルを10分間室温で反応させた。この反応溶媒に Ser-PAMAM (G3) を添加し TEA を加えて塩基性条件で一夜室温にて反応させた。反応溶液を超純水で平衡化した PD-10 で精製し、凍結乾燥することにより Ser-PAMAM-CAP を得た。

(2) セリン-システイン修飾 dendrimer の合成

Ser-PAMAM-Cys は第1章【3】の方法に準じて作製した。つまり、PAMAM (G3) に対して 28.2 eq Boc-Ser(tBu)-OH と 7.0 eq Boc-Cys(Trt)-OH を反応させることで合成した。

【4】 ¹¹¹In 標識体の合成

第1章【4】と同様の方法で実施した。

【5】 高分子キャリアの物理化学的特性の評価

第1章【5】と同様の方法で実施した。

【6】 カプトプリルの定量法

カプトプリルの定量法はKokらの方法を一部改変して用いた¹²⁴。すなわち、ジスルフィド結合しているカプトプリルも含めて全てのカプトプリルを測定するために、測定サンプル 100 μL に水素化ホウ素ナトリウムを溶かした 50 mM 水酸化ナトリウム溶液 20 μL を加えて、5 分間 60°C で加熱することで遊離のカプトプリルとした。未反応の水素化ホウ素ナトリウムは、飽和塩化アンモニウム溶液 20 μL を加え、5 分間 60°C で加熱することで失活させた。また、結合型のカプトプリルを定量しない場合は、この過程を省略した。次に、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 100 μL と 4 mg/mL MBB アセトニトリル溶液 20 μL を加えて、5 分間室温で反応させた。除タンパクが必要なサンプルは、アセトニトリルを 200 μL 加え、遠心することでタンパク質を除いた。得られた溶液 10 μL を HPLC システム (Prominence、島津製作所) に注入することでカプトプリルを定量した。0.1% TFA:アセトニトリル (80:20) の移動相を 1.0 mL/min で流し、40°C で ODS カラム (AR-II, ナカライテクス) を用いて分離した。検出は蛍光検出器を用い、励起波長 400 nm と蛍光波長 480 nm で検出した。

【7】 高分子キャリアまたはカプトプリルの体内動態の評価

(1) 高分子キャリアの体内動態評価

第1章【6】と同様の方法で実施した。

(2) カプトプリルの体内動態評価

Ser-PAMAM-CAP をカプトプリルして 2 mg/kg の投与量で、ddY マウスへ静脈内投与した。イソフルラン麻酔下、投与後 5、15、30、60 と 120 分に採血を行い、遠心することで血漿を得た。マウスを安楽死させた後、腎臓を摘出し、リン酸緩衝液中にて腎臓ホモジネートを作製した。血漿および腎臓ホモジネートを測定サンプルとして、【6】の方法に従いカプトプリルの量を定量した。

【8】 カプトプリル結合セリン修飾 dendriマーの血漿中安定性評価

0.5 mg/mL Ser-PAMAM-CAP の PBS 溶液 100 μL に、マウスのブランク血漿 100 μL を加えて、4 時間 37°C で放置した。【6】の遊離型のカプトプリルを測定する方法に従いカプトプリルの量を定量した。

【9】 アンジオテンシン変換酵素の腎臓内活性の測定

ACE 活性の測定法は Koiter らの方法に準じて行った¹²⁵。Ser-PAMAM-CAP をカプトプリルして 0.5 mg/kg の投与量で、ddY マウスへ静脈内投与した。投与 30 分後または 120 分後に、マウスを安楽死させた後、腎臓を摘出し、リン酸緩衝液中にて腎臓ホモジネートを作製した。腎臓ホモジネートと HHL ペプチド(ACE が基質認識する配列であり、活性がある場合には N 末端の馬尿酸が切り出されるペプチド) を混合し、単位時間あたりに HHL ペプチドから切り出された馬尿酸の量に基づき、腎臓の重量あたりの ACE 活性値を算出した。

【10】 活性酸素種およびラジカルの消去効果の測定

(1) 過酸化水素消去能

過酸化水素消去能の測定は Katsumi らの方法を一部改変して用いた⁴⁶。すなわち、チオール基として 250 μM となるように PBS 中に溶解した抗酸化剤 100 μL を、1 mM の過酸化水素 150 μL と反応させ、遮光条件下 1 時間 37°C で放置した。この反応液 20 μL と 5 μM BES- H_2O_2 の PBS 溶液 150 μL を室温 30 分で反応させ、その蛍光強度をマイクロプレートリーダー (PowerScan HT、BioTek 社) にて 485 nm の励起波長により 535 nm の蛍光強度を読み取り、過酸化水素消去の程度を評価した。

(2) ヒドロキシラジカル消去能

ヒドロキシラジカル消去能の測定は Hirayama らの方法を一部改変して用いた¹²⁶。すなわち、1 mM ルミノールが含まれる 5 mM 水酸化ナトリウム溶液 50 μL に、チオール基として 50 μM となるように PBS 中に溶解した抗酸化剤 50 μL 、2 mM 過酸化水素 50 μL と 1 mM 硫酸鉄 (II) 水溶液 50 μL を順次加えることで反応させ、直ちにその発光強度をルミノメーター (Lumat LB9507、Berthold 社) にて読み取り、ヒドロキシラジカル消去の程度を評価した。

(3) DPPH ラジカル消去能

DPPH ラジカル消去能の測定は Brand-Williamas らの方法を改変して用いた¹²⁷。すなわち、625 μM DPPH のエタノール溶液 100 μL とチオール基として 50 μM となるように PBS 中に溶解した抗酸化剤 20 μL を室温 1 時間で反応させ、マイクロプレートリーダー (PowerScan HT、BioTek 社) にて、540 nm における吸光度を測定し、DPPH を含まないエタノール溶液を用いて同様に処理したサンプルをブランクとして吸光度を求め、その差分より DPPH ラジカル消去の程度を評価した。

【11】 腎虚血再灌流障害の治療効果評価

(1) 虚血再灌流障害モデルマウスへの治療

虚血再灌流障害モデルマウスの作製は Skrypnik らおよび Wei らの方法に準じた^{128, 129}。すなわち、イソフルラン麻酔下にて背部より右側の腎臓を切除し、左側の腎臓の腎動静脈をクレンメにて 30 分間血流を遮断させた。チオール基として 0.27 $\mu\text{mol/kg}$ となるように抗酸化剤を投与した後、直ちにクレンメを除去することにより血流を再開させた。食事および飲水自由の状態にて 24 時間飼育し、イソフルラン麻酔下で採血を行い、遠心することで血漿を得た。マウスを安楽死させた後、腎臓を摘出した。そして、ただちに腎臓の上半分を 4% PFA 溶液で組織を固定し、下半分は RNAlater に浸漬させた。

(2) 血中腎障害マーカー測定による腎障害の評価

第 1 章【11】(2) と同様の方法で実施した。

(3) 腎臓切片による腎障害の評価

第 1 章【11】(3) と同様の方法で実施した。

【12】 腎虚血再灌流障害の抑制機構

組織からの核酸の抽出には RNA 抽出試薬 (Sepasol[®]-RNA I super G、ナカライテスク) を用い、抽出した RNA からの cDNA への逆転写には逆転写キット (ReverTra[®] Ace qPCR RT Master Mix with g DNA Remover) を用いて、その手順は製品説明書に従った。定量的 PCR は、SYBR Green (TB Green[™] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus), タカラバイオ) を用いた方法により、リアルタイム PCR 用サーマルサイクラー (LightCycler[®] Nano System, Roche Diagnostics 社) を使用することで行った。そのデータ解析は付属の LightCycler[®] Nano SW 1.1 を用いた。遺伝子解析に用いたプライマーの配列は Table 6 に記載した¹³⁰⁻¹³⁴。

Table 6 Sequence of primer used in qPCR

遺伝子		配列
NGAL	Forward:	5'-CACAGGTATCCTCAGAGCT-3'
	Reverse:	5'-TGTAGTCCGTGGTGGCCAC-3'
IL-18	Forward:	5'-AGGCCTGACATCTTCTGCAA-3'
	Reverse:	5'-TCTGACATGGCAGCCATTGT-3'
ICAM-1	Forward:	5'-GGACCACGGAGCCAATTC-3'

	Reverse:	5'-CTCGGAGACATTAGAGAACAATGC-3'
VCAM-1	Forward:	5'-ACAAAACGATTGCTCAAATCGG-3'
	Reverse:	5'-CGCGTTTAGTGGGCTGTCTATC-3'
Actb	Forward:	5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGC-3'
	Reverse:	5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'

【13】 統計学的解析

第1章【12】と同様の方法で実施した。

謝辞

本稿を終えるにあたり、始終御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学薬剤学分野・山本昌教授に深甚なる敬意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、直接の御指導、御助言を賜りました京都薬科大学薬剤学分野・勝見英正准教授に謹んで感謝いたします。

さらに、種々の貴重な御指導ならびに御助言を賜りました、神戸薬科大学薬剤学分野・坂根稔康教授、東京理科大学薬学部生物薬剤学研究室・草森浩輔助教、京都薬科大学薬剤学分野・森下将輝助教に心から感謝の意を表します。さらに、実験機器に関する御助言と御協力を頂きました国立循環器病研究センター画像診断医学部・樋口隆弘部長、越野一博室長、京都薬科大学代謝分析学分野・木村寛之准教授、屋木祐亮博士研究員に厚く御礼申し上げます。

そして、実験に御協力を頂きました、鈴木宏枝学士、平井菜都子学士、林英誉学士、高島梨恵氏、北田翔氏、安岡慎太郎氏をはじめとする京都薬科大学薬剤学分野の諸氏に心より御礼申し上げます。

末筆ながら、私のような若輩者に研究に専念できるよう、時間や自由を与えてくださると共に始終暖かいサポートや多くの助言をいただいた母 里美、祖母 和江に心から感謝の意を捧げます。

引用文献

- (1) Guyton, Arthur C., Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science* **1991**, 252 (5014), 1813-1816.
- (2) Cannon, Walter B., Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.* **1929**, 9 (3), 399-431.
- (3) Verbalis, Joseph G., Disorders of body water homeostasis. *Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, 17 (4), 471-503.
- (4) Kuro-o, Makoto, Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2006**, 15 (4), 437-441.
- (5) Wagner, Charlotte; Kurtz, Armin, Regulation of renal renin release. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **1998**, 7 (4), 437-441.
- (6) Sasaki, Ryuzo, Pleiotropic functions of erythropoietin. *Intern. Med.* **2003**, 42 (2), 142-149.
- (7) DeLuca, Hector F., Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 80 (6), 1689S-1696S.
- (8) Kurt, Birgül; Kurtz, Armin, Plasticity of renal endocrine function. *Am. J. Physiol.* **2015**, 308 (6), R455-R466.
- (9) Levy, Elliott M.; Viscoli, Catherine M.; Horwitz, Ralph I., The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis. *J. Am. Med. Assoc.* **1996**, 275 (19), 1489-1494.
- (10) Chertow, Glenn M.; Levy, Elliott M.; Hammermeister, Karl E.; Grover, Frederick; Daley, Jennifer, Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. *Am. J. Med.* **1998**, 104 (4), 343-348.
- (11) Fukuhara, Shunichi; Lopes, Antonio Alberto; Bragg-Gresham, Jennifer L.; Kurokawa, Kiyoshi; Mapes, Donna L.; Akizawa, Tadao; Bommer, Jürgen; Canaud, Bernard J.; Port, Friedrich K.; Held, Philip J., Health-related quality of life among dialysis patients on three continents: the dialysis outcomes and practice patterns study. *Kidney Int.* **2003**, 64 (5), 1903-1910.
- (12) Avramovic, Marina; Stefanovic, Vladislav, Health-related quality of life in different stages of renal failure. *Artif. Organs* **2012**, 36 (7), 581-589.
- (13) Xia, H.; He, R.; Chen, J., Protective effect of angiotensin converting enzyme inhibitor on renal function in normotensive non-insulin dependent diabetes mellitus patients with early diabetic nephropathy and microalbuminuria. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* **1996**, 35 (8), 533-536.

- (14) Zhao, Lingfei; Cheng, Jun; Zhou, Jingyi; Wu, Congcong; Chen, Jianghua, Enhanced steroid therapy in adult minimal change nephrotic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Intern. Med. J.* **2015**, *54* (17), 2101-2108.
- (15) Yu, Xiaojuan; Ruan, Lin; Qu, Zhen; Cui, Zhao; Zhang, Yimiao; Wang, Xin; Meng, Liqiang; Liu, Xiaojing; Wang, Fang; Zhang, Ying; Liu, Gang; Yang, Li, Low-dose cyclosporine in treatment of membranous nephropathy with nephrotic syndrome: effectiveness and renal safety. *Ren. Fail.* **2017**, *39* (1), 688-697.
- (16) Randrup Hansen, Caroline; Grimm, Daniela; Bauer, Johann; Wehland, Markus; Magnusson, E. Nils, Effects and side effects of using sorafenib and sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (2), 461.
- (17) Vogelzang, Nicholas J.; Pal, Sumanta K.; Ghate, Sameer R.; Swallow, Elyse; Li, Nanxin; Peeples, Miranda; Zichlin, Miriam L.; Meiselbach, Mark K.; Perez, Jose Ricardo; Agarwal, Neeraj, Clinical and economic outcomes in elderly advanced renal cell carcinoma patients starting pazopanib or sunitinib treatment: a retrospective medicare claims analysis. *Adv. Ther.* **2017**, *34* (11), 2452-2465.
- (18) King, Tracy; Faiman, Beth, Steroid-Associated Side Effects: A Symptom Management Update on Multiple Myeloma Treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* **2017**, *21* (2), 240-249.
- (19) Min, David I.; Monaco, Anthony P., Complications Associated with Immunosuppressive Therapy and Their Management. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **1991**, *11* (5), 119S-125S.
- (20) Shinzawa, Maki; Yamamoto, Ryohei; Nagasawa, Yasuyuki; Oseto, Susumu; Mori, Daisuke; Tomida, Kodo; Hayashi, Terumasa; Izumi, Masaaki; Fukunaga, Megumu; Yamauchi, Atsushi; Tsubakihara, Yoshiharu; Isaka, Yoshitaka, Comparison of Methylprednisolone Plus Prednisolone with Prednisolone Alone as Initial Treatment in Adult-Onset Minimal Change Disease: A Retrospective Cohort Study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2014**, *9* (6), 1040.
- (21) Fujinaga, Shuichiro; Hirano, Daishi; Nishizaki, Naoto, Early identification of steroid dependency in Japanese children with steroid-sensitive nephrotic syndrome undergoing short-term initial steroid therapy. *Pediatr. Nephrol.* **2011**, *26* (3), 485-486.
- (22) Wood, Laura S., Managing the side effects of sorafenib and sunitinib. *Community Oncol.* **2006**, *3* (9), 558-562.
- (23) Ehrlich, Paul, Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte der deutschen chemischen*

- Gesellschaft* **1909**, 42 (1), 17-47.
- (24) Zern, Mark A.; Kresina, Thomas F., Hepatic drug delivery and gene therapy. *Hepatology* **1997**, 25 (2), 484-491.
- (25) Katsumi, Hidemasa; Nishikawa, Makiya; Yamashita, Fumiyoshi; Hashida, Mitsuru, Development of Polyethylene Glycol-Conjugated Poly-S-Nitrosated Serum Albumin, a Novel S-Nitrosothiol for Prolonged Delivery of Nitric Oxide in the Blood Circulation in Vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 314 (3), 1117.
- (26) D'Souza, Anisha A.; Devarajan, Padma V., Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting — Strategies and applications. *J. Control. Release* **2015**, 203, 126-139.
- (27) Liu, Juan; Huang, Yuran; Kumar, Anil; Tan, Aaron; Jin, Shubin; Mozhi, Anbu; Liang, Xing-Jie, pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnol. Adv.* **2014**, 32 (4), 693-710.
- (28) Maeda, Hiroshi, The tumor blood vessel as an ideal target for macromolecular anticancer agents. *J. Control. Release* **1992**, 19 (1), 315-324.
- (29) Matsumura, Yasuhiro; Maeda, Hiroshi, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **1986**, 46 (12 Pt 1), 6387-92.
- (30) Brooks, Peter C., Role of integrins in angiogenesis. *Eur. J. Cancer* **1996**, 32a (14), 2423-9.
- (31) Zhu, Yaqin; Zhang, Jian; Meng, Fenghua; Deng, Chao; Cheng, Ru; Feijen, Jan; Zhong, Zhiyuan, cRGD-functionalized reduction-sensitive shell-sheddable biodegradable micelles mediate enhanced doxorubicin delivery to human glioma xenografts in vivo. *J. Control. Release* **2016**, 233, 29-38.
- (32) Fabian, Eric; Landsiedel, Robert; Ma-Hock, Lan; Wiench, Karin; Wohlleben, Wendel; Van Ravenzwaay, Ben, Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.* **2008**, 82 (3), 151-157.
- (33) Ma, Hui Li; Xu, Yu Feng; Qi, Xian Rong; Maitani, Yoshie; Nagai, Tsuneji, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers. *Int. J. Pharm.* **2008**, 354 (1-2), 217-226.
- (34) Blanco, Elvin; Shen, Haifa; Ferrari, Mauro, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, 33 (9), 941-951.
- (35) Haas, Marijke; Kluppel, Alex C. A.; Wartna, Ellen S.; Moolenaar, Frits; Meijer, Dirk K. F.; De

- Jong, Paul E.; De Zeeuw, Dick, Drug-targeting to the kidney: Renal delivery and degradation of a naproxen-lysozyme conjugate in vivo. *Kidney Int.* **1997**, *52* (6), 1693-1699.
- (36) Kok, R. J.; Haverdings, R. F.; Grijpstra, F.; Koiter, J.; Moolenaar, F.; de Zeeuw, D.; Meijer, D. K., Targeting of captopril to the kidney reduces renal angiotensin-converting enzyme activity without affecting systemic blood pressure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *301* (3), 1139-1143.
- (37) Kamada, Haruhiko; Tsutsumi, Yasuo; Sato-Kamada, Keiko; Yamamoto, Yoko; Yoshioka, Yasuo; Okamoto, Takayuki; Nakagawa, Shinsaku; Nagata, Satoshi; Mayumi, Tadanori, Synthesis of a poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride) co-polymer and its application for renal drug targeting. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (4), 399-404.
- (38) Maack, Thomas, Renal handling of low molecular weight proteins. *Am. J. Med.* **1975**, *58* (1), 57-64.
- (39) Maack, Thomas; Johnson, Valerie; Kau, Sen T.; Figueiredo, Jone; Sigulem, Daniel, Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. *Kidney Int.* **1979**, *16* (3), 251-270.
- (40) Yuan, Zhi-xiang; He, Xia-kai; Wu, Xiao-juan; Gao, Yuan; Fan, Mei; Song, Lian-qiang; Xu, Chao-qun, Peptide fragments of human serum albumin as novel renal targeting carriers. *Int. J. Pharm.* **2014**, *460* (1), 196-204.
- (41) Toma, Ildikó; Kang, Jung Julie; Sipos, Arnold; Vargas, Sarah; Bansal, Eric; Hanner, Fiona; Meer, Elliott; Peti-Peterdi, János, Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118* (7), 2526-2534.
- (42) Sawai, Kenzo; Mahato, Ram I.; Oka, Yoshikazu; Takakura, Yoshinobu; Hashida, Mitsuru, Disposition of oligonucleotides in isolated perfused rat kidney: involvement of scavenger receptors in their renal uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279* (1), 284-290.
- (43) Yamashita, Shugo; Katsumi, Hidemasa; Hibino, Nozomi; Isobe, Yugo; Yagi, Yumiko; Kusamori, Kosuke; Sakane, Toshiyasu; Yamamoto, Akira, Development of PEGylated carboxylic acid-modified polyamidoamine dendrimers as bone-targeting carriers for the treatment of bone diseases. *J. Control. Release* **2017**, *262*, 10-17.
- (44) Kaminskis, Lisa M.; Boyd, Ben J.; Karellas, Peter; Henderson, Scott A.; Giannis, Michael P.; Krippner, Guy Y.; Porter, Christopher J. H., Impact of surface derivatization of poly-L-lysine dendrimers with anionic arylsulfonate or succinate groups on intravenous pharmacokinetics

- and disposition. *Mol. Pharm.* **2007**, *4* (6), 949-961.
- (45) Kobayashi, Hisataka; Kawamoto, Satomi; Jo, Sang-Kyung; Bryant, Henry L.; Brechbiel, Martin W.; Star, Robert A., Macromolecular MRI contrast agents with small dendrimers: pharmacokinetic differences between sizes and cores. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (2), 388-394.
- (46) Katsumi, Hidemasa; Nishikawa, Makiya; Hirosaki, Rikiya; Okuda, Tatsuya; Kawakami, Shigeru; Yamashita, Fumiyoshi; Hashida, Mitsuru; Sakane, Toshiyasu; Yamamoto, Akira, Development of PEGylated cysteine-modified lysine dendrimers with multiple reduced thiols to prevent hepatic ischemia/reperfusion injury. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (8), 2867-2873.
- (47) Okuda, Tatsuya; Sugiyama, Akiko; Niidome, Takuro; Aoyagi, Haruhiko, Characters of dendritic poly(L-lysine) analogues with the terminal lysines replaced with arginines and histidines as gene carriers *in vitro*. *Biomaterials* **2004**, *25* (3), 537-544.
- (48) Liu, Cheng; Liu, Xiaoxuan; Rocchi, Palma; Qu, Fanqi; Iovanna, Juan L.; Peng, Ling, Arginine-terminated generation 4 PAMAM dendrimer as an effective nanovector for functional siRNA delivery *in vitro* and *in vivo*. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (3), 521-532.
- (49) Roberts, Jeanette C.; Bhalgat, Mahesh K.; Zera, Richard T., Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30* (1), 53-65.
- (50) Kim, Yejin; Park, Eun Ji; Na, Dong Hee, Recent progress in dendrimer-based nanomedicine development. *Arch. Pharm. Res.* **2018**, *41* (6), 571-582.
- (51) Sharma, Ashok Kumar; Gothwal, Avinash; Kesharwani, Prashant; Alsaab, Hashem; Iyer, Arun K.; Gupta, Umesh, Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery. *Drug Discovery Today* **2017**, *22* (2), 314-326.
- (52) Kang, Lin; Gao, Zhonggao; Huang, Wei; Jin, Mingji; Wang, Qiming, Nanocarrier-mediated co-delivery of chemotherapeutic drugs and gene agents for cancer treatment. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5* (3), 169-175.
- (53) Mihara, K.; Hojo, T.; Fujikawa, M.; Takakura, Y.; Sezaki, H.; Hashida, M., Disposition characteristics of protein drugs in the perfused rat kidney. *Pharm. Res.* **1993**, *10* (6), 823-827.
- (54) Mihara, K.; Mori, M.; Hojo, T.; Takakura, Y.; Sezaki, H.; Hashida, M., Disposition characteristics of model macromolecules in the perfused rat kidney. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16* (2), 158-162.
- (55) Doherty, Gary J.; McMahon, Harvey T., Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*

- 2009, 78 (1), 857-902.
- (56) Leheste, Jörg-Robert; Rolinski, Boris; Vorum, Henrik; Hilpert, Jan; Nykjaer, Anders; Jacobsen, Christian; Aucouturier, Pierre; Moskaug, Jan Øivind; Otto, Albrecht; Christensen, Erik Ilsø; Willnow, Thomas E., Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am. J. Physiol.* **1999**, 155 (4), 1361-1370.
- (57) Nielsen, Rikke; Birn, Henrik; Moestrup, Søren K.; Nielsen, Moestrup; Verroust, Pierre; Christensen, Erik Ilsø, Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1998**, 9 (10), 1767-1776.
- (58) Nagai, Junya; Saito, Masaki; Adachi, Yoshinori; Yumoto, Ryoko; Takano, Mikiyoshi, Inhibition of gentamicin binding to rat renal brush-border membrane by megalin ligands and basic peptides. *J. Control. Release* **2006**, 112 (1), 43-50.
- (59) Marinó, Michele; Andrews, David; Brown, Dennis; McCluskey, Robert T., Transcytosis of retinol-binding protein across renal proximal tubule cells after megalin (gp 330)-mediated endocytosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2001**, 12 (4), 637-648.
- (60) Mo, Di; Ihrke, Gudrun; Costa, Simone A.; Brilli, Lauren; Labilloy, Anatólia; Halfter, Willi; Cianciolo Cosentino, Chiara; Hukriede, Neil A.; Weisz, Ora A., Apical targeting and endocytosis of the sialomucin endolyn are essential for establishment of zebrafish pronephric kidney function. *J. Cell Sci.* **2012**, 125 (22), 5546-5554.
- (61) Torres, Richard; Velazquez, Heino; Chang, John J.; Levene, Michael J.; Moeckel, Gilbert; Desir, Gary V.; Safirstein, Robert, Three-dimensional morphology by multiphoton microscopy with clearing in a model of cisplatin-induced CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, 27 (4), 1102-1112.
- (62) Nakatani, Shinya; Nakatani, Ayumi; Ishimura, Eiji; Toi, Norikazu; Tsuda, Akihiro; Mori, Katsuhito; Emoto, Masanori; Hirayama, Yoshiaki; Saito, Akihiko; Inaba, Masaaki, Urinary iron excretion is associated with urinary full-length megalin and renal oxidative stress in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press. Res.* **2018**, 43 (2), 458-470.
- (63) Yu, Samuel Mon-Wei; Bonventre, Joseph V., Acute kidney injury and progression of diabetic kidney disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **2018**, 25 (2), 166-180.
- (64) Tsushida, Keigo; Tanabe, Katsuyuki; Masuda, Kana; Tanimura, Satoshi; Miyake, Hiromasa; Arata, Yuka; Sugiyama, Hitoshi; Wada, Jun, Estrogen-related receptor alpha is essential for maintaining mitochondrial integrity in cisplatin-induced acute kidney injury. *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.* **2018**, 498 (4), 918-924.
- (65) Schaub, Thomas P.; Kartenbeck, JÜRgen; KÖNig, JÖRg; Spring, Herbert; DÖRsam, Joachim; Staehler, Gerd; StÖRkel, Stephan; Thon, Walter F.; Keppler, Dietrich, Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1999**, 10 (6), 1159-1169.
- (66) Feng, Ai-ping; Zhang, Qian; Li, Min; Jiang, Xin-nong; Zhang, Zong-yong; Zhu, Peng; Wang, Ming-wei; Wei, Shao-zhong; Su, Li, High SIPA-1 expression in proximal tubules of human kidneys under pathological conditions. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* **2015**, 35 (1), 64-70.
- (67) Takakura, Yoshinobu; Hashida, Mitsuru, Macromolecular carrier systems for targeted drug delivery: pharmacokinetic considerations on biodistribution. *Pharm. Res.* **1996**, 13 (6), 820-831.
- (68) Liang, Xiaowen; Wang, Haolu; Zhu, Yian; Zhang, Run; Cogger, Victoria C.; Liu, Xin; Xu, Zhi Ping; Grice, Jeffrey E.; Roberts, Michael S., Short- and long-term tracking of anionic ultrasmall nanoparticles in kidney. *ACS Nano* **2016**, 10 (1), 387-395.
- (69) Seliverstova, E. V.; Prutskova, N. P., Receptor-mediated endocytosis of lysozyme in renal proximal tubules of the frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Histochem.* **2015**, 59 (2), 2482-2482.
- (70) Takakura, Yoshinobu; Fujita, Takuya; Furitsu, Hisao; Nishikawa, Makiya; Sezaki, Hitoshi; Hashida, Mitsuru, 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 (1), 19-29.
- (71) Furitsu, Hisao; Ogawara, Ken-ichi; Fujita, Takuya; Yamashita, Fumiyoshi; Takakura, Yoshinobu; Sezaki, Hitoshi; Hashida, Mitsuru, Pharmacokinetic analysis of scavenger receptor-mediated uptake of anionized proteins in the isolated perfused rat liver. *Int. J. Pharm.* **1997**, 151 (1), 15-26.
- (72) Li, Shyh-Dar; Huang, Leaf, Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, 5 (4), 496-504.
- (73) Kuipers, M. E.; Swart, P. J.; Schutten, M.; Smit, C.; Proost, J. H.; Osterhaus, A. D.; Meijer, D. K., Pharmacokinetics and anti-HIV-1 efficacy of negatively charged human serum albumins in mice. *Antiviral Res.* **1997**, 33 (2), 99-108.
- (74) Tomalia, Donald A., Dendritic effects: dependency of dendritic nano-periodic property patterns

- on critical nanoscale design parameters (CNDPs). *New J. Chem.* **2012**, *36* (2), 264-281.
- (75) Kannan, R. M.; Nance, E.; Kannan, S.; Tomalia, D. A., Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. *J. Intern. Med.* **2014**, *276* (6), 579-617.
- (76) Boyd, Ben J.; Kaminskis, Lisa M.; Karellas, Peter; Krippner, Guy; Lessene, Romina; Porter, Christopher J. H., Cationic poly-L-lysine dendrimers: pharmacokinetics, biodistribution, and evidence for metabolism and bioresorption after intravenous administration to rats. *Mol. Pharm.* **2006**, *3* (5), 614-627.
- (77) Sinha, Arjun D.; Agarwal, Rajiv, Clinical pharmacology of antihypertensive therapy for the treatment of hypertension in chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, CJN.04330418.
- (78) Sayer, Gabriel; Bhat, Geetha, The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiol. Clin.* **2014**, *32* (1), 21-32.
- (79) Anders, Hans-Joachim; Davis, John M.; Thureau, Klaus, Nephron protection in diabetic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375* (21), 2096-2098.
- (80) Hsu, Feng-Yi; Lin, Fang-Ju; Ou, Huang-Tz; Huang, Shih-Hui; Wang, Chi-Chuan, Renoprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers in diabetic patients with proteinuria. *Kidney Blood Press. Res.* **2017**, *42* (2), 358-368.
- (81) Deddish, Peter A.; Wang, Liu-Xiu; Jackman, Herbert L.; Michel, Bruno; Wang, Julia; Skidgel, Randal A.; Erdos, Ervin G., Single-domain angiotensin I converting enzyme (kininase II): characterization and properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279* (3), 1582-1589.
- (82) Yang, H. Y.; Erdos, E. G.; Levin, Y., A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *214* (2), 374-376.
- (83) Sesoko, Shoji; Kaneko, Yoshihiro, Cough associated with the use of captopril. *Arch. Intern. Med.* **1985**, *145* (8), 1524.
- (84) Messerli, Franz H.; Nussberger, Jürg, Vasopeptidase inhibition and angio-oedema. *Lancet* **2000**, *356* (9230), 608-609.
- (85) Oike, Yuichi; Ogata, Yasuhiro; Higashi, Daisuke; Matsumura, Toshiyuki; Numata, Yuichi, Fatal angioedema associated with enalapril. *Intern. Med.* **1993**, *32* (4), 308-310.
- (86) Borgström, L.; Kågedal, B.; Paulsen, O., Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1986**, *31* (2), 217-222.

- (87) Olsson, B.; Johansson, M.; Gabrielsson, J.; Bolme, P., Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1988**, *34* (1), 77-82.
- (88) Conesa, Erica López; Valero, Fernando; Nadal, José Carlos; Fenoy, Francisco J.; López, Bernardo; Arregui, Begoña; Salom, Miguel García, N-acetyl-l-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am. J. Physiol.* **2001**, *281* (3), R730-R737.
- (89) Perico, Norberto; Cattaneo, Dario; Sayegh, Mohamed H.; Remuzzi, Giuseppe, Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* **2004**, *364* (9447), 1814-1827.
- (90) Kosieradzki, Maciej; Rowinski, Wojciech, Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant. Proc.* **2008**, *40* (10), 3279-3288.
- (91) Moreira, Miriam Aparecida; Irigoyen, Maria Claudia; Saad, Karen Ruggeri; Saad, Paulo Fernandes; Koike, Marcia Kiyomi; Montero, Edna Frasson de Souza; Martins, José Luiz, N-acetylcysteine reduces the renal oxidative stress and apoptosis induced by hemorrhagic shock. *J. Surg. Res.* **2016**, *203* (1), 113-120.
- (92) Moonen, Lies; D'Haese, C. Patrick; Vervaeet, A. Benjamin, Epithelial cell cycle behaviour in the injured kidney. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (7), 2038.
- (93) Hashmp, Syed F.; Sattar, Munavvar Z.A.; Rathore, Hassaan A.; Ahmadi, Ashfaq; Johns, Edward J., A critical review on pharmacological significance of hydrogen sulfide (H₂S) on NF-kappaB concentration and ICAM-1 expression in renal ischemia reperfusion injury. *Acta Pol. Pharm.* **2017**, *74* (3), 747-752.
- (94) Wu, Guoyao; Fang, Yun-Zhong; Yang, Sheng; Lupton, Joanne R.; Turner, Nancy D., Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition* **2004**, *134* (3), 489-492.
- (95) Wen, Hui-Yun; Dong, Hai-Qing; Xie, Wen-juan; Li, Yong-Yong; Wang, Kang; Pauletti, Giovanni M.; Shi, Dong-Lu, Rapidly disassembling nanomicelles with disulfide-linked PEG shells for glutathione-mediated intracellular drug delivery. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (12), 3550-2.
- (96) Gilbert, Hiram F., Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfidebond stability. *Methods Enzymol.* **1995**, *251*, 8-28.
- (97) Raina, S.; Missiakas, D., Making and breaking disulfide bonds. *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51* (1), 179-202.
- (98) Ondetti, Miguel A.; Rubin, Bernard; Cushman, David W., Design of specific inhibitors of

- angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* **1977**, *196* (4288), 441-444.
- (99) Go, Young-Mi; Jones, Dean P., Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780* (11), 1273-1290.
- (100) Sun, Jingjing; Liu, Yanhua; Chen, Yichao; Zhao, Wenchen; Zhai, Qianyu; Rathod, Sanjay; Huang, Yixian; Tang, Suoqin; Kwon, Yong Tae; Fernandez, Christian; Venkataramanan, Raman; Li, Song, Doxorubicin delivered by a redox-responsive dasatinib-containing polymeric prodrug carrier for combination therapy. *J. Control. Release* **2017**, *258*, 43-55.
- (101) Sibony, Mathilde; Gasc, Jean-Marie; Soubrier, Florent; Alhenc-Gelas, Francois; Corvol, Pierre, Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* **1993**, *21* (6), 827-835.
- (102) Vio, Carlos P.; Jeanneret, Valerie A., Local induction of angiotensin-converting enzyme in the kidney as a mechanism of progressive renal diseases. *Kidney Int. Suppl.* **2003**, *86*, S57-63.
- (103) Bagiyani, G. A.; Koroleva, I. K.; Soroka, N. V.; Ufimtsev, A. V., Oxidation of thiol compounds by molecular oxygen in aqueous solutions. *Russ. Chem. Bull.* **2003**, *52* (5), 1135-1141.
- (104) Sokolowska, Izabela; Ngounou Wetie, Armand G.; Woods, Alisa G.; Darie, Costel C., Automatic determination of disulfide bridges in proteins. *J. Lab. Autom.* **2012**, *17* (6), 408-416.
- (105) Arai, Satoko; Kitada, Kento; Yamazaki, Tomoko; Takai, Ryosuke; Zhang, Xizhong; Tsugawa, Yoji; Sugisawa, Ryoichi; Matsumoto, Ayaka; Mori, Mayumi; Yoshihara, Yasunori; Doi, Kent; Maehara, Natsumi; Kusunoki, Shunsuke; Takahata, Akiko; Noiri, Eisei; Suzuki, Yusuke; Yahagi, Naoki; Nishiyama, Akira; Gunaratnam, Lakshman; Takano, Tomoko; Miyazaki, Toru, Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice. *Nat. Med.* **2016**, *22* (2), 183-193.
- (106) Molitoris, Bruce A., New insights into the cell biology of ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1991**, *1* (12), 1263-1270.
- (107) Goligorsky, Michael S.; Lieberthal, Wilfred; Racusen, Lorraine; Simon, Eric E., Integrin receptors in renal tubular epithelium: new insights into pathophysiology of acute renal failure. *Am. J. Physiol.* **1993**, *264* (1), F1-F8.
- (108) Thurau, Klaus; Boylan, John W., Acute renal success: The unexpected logic of oliguria in acute renal failure. *Am. J. Med.* **1976**, *61* (3), 308-315.
- (109) Hoste, Eric A. J.; Clermont, Gilles; Kersten, Alexander; Venkataraman, Ramesh; Angus, Derek

- C.; De Bacquer, Dirk; Kellum, John A., RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit. Care* **2006**, *10* (3), R73.
- (110) Bonventre, Joseph V.; Zuk, Anna, Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? *Kidney Int.* **2004**, *66* (2), 480-485.
- (111) Jang, Hye Ryoung; Rabb, Hamid, The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin. Immunol.* **2009**, *130* (1), 41-50.
- (112) 京 都 薬 科 大 学 動 物 実 験 実 施 規 程 .
https://www.kyoto-phu.ac.jp/education_research/animal/pdf/023.pdf (accessed 2019/1/6).
- (113) Council, National Research, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2011.
- (114) Hnatowich, Donald J.; Layne, Warren W.; Childs, R. L., The preparation and labeling of DTPA-coupled albumin. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1982**, *33* (5), 327-332.
- (115) Yamaoka, Kiyoshi; Tanigawara, Yusuke; Nakagawa, Terumichi; Uno, Toyozo, A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.* **1981**, *4* (11), 879-885.
- (116) Hashida, Mitsuru; Takakura, Yoshinobu, Pharmacokinetics in design of polymeric drug delivery systems. *J. Control. Release* **1994**, *31* (2), 163-171.
- (117) Takakura, Yoshinobu; Takagi, Akira; Hashida, Mitsuru; Sezaki, Hitoshi, Disposition and tumor localization of mitomycin C-dextran conjugates in mice. *Pharm. Res.* **1987**, *4* (4), 293-300.
- (118) Takakura, Yoshinobu; Hashida, Mitsuru, Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1995**, *18* (3), 207-31.
- (119) Rieg, Timo, A High-throughput method for measurement of glomerular filtration rate in conscious mice. *J. Visualized Exp.* **2013**, (75), e50330.
- (120) Smith, Homer W.; Goldring, William; Chasis, Herbert, The measurement of the tubular excretory mass, effective blood flow and filtration rate in the normal human kidney. *J. Clin. Invest.* **1938**, *17* (3), 263-78.
- (121) Margarucci, Luigi; Monti, Maria Chiara; Fontanella, Bianca; Riccio, Raffaele; Casapullo, Agostino, Chemical proteomics reveals bolinaquinone as a clathrin-mediated endocytosis inhibitor. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7* (2), 480-485.
- (122) Liu, Pingsheng; Ying, Yun-shu; Anderson, Richard G. W., Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (25), 13666-13670.

- (123) Shugrue, Christine A.; Obermüller, Nicholas; Bachmann, Sebastian; Slayman, Carolyn W.; Reilly, Robert F., Molecular cloning of NHE3 from LLC-PK1 cells and localization in pig kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1999**, *10* (8), 1649-57.
- (124) Kok, Robbert J.; Visser, Jan; Moolenaar, Frits; Zeeuw, Dick de; Meijer, Dirk K., Bioanalysis of captopril: two sensitive high-performance liquid chromatographic methods with pre- or postcolumn fluorescent labeling. *J. Chromatogr. B* **1997**, *693* (1), 181-189.
- (125) Koiter, Jaco; Navis, Gerjan; de Jong, Paul E.; Van Gilst, Wiek H.; de Zeeuw, Dick, Sample dilution: a methodological pitfall in the measurement of tissue but not serum ace-activity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **1998**, *39* (1), 45-49.
- (126) Hirayama, Osamu; Yida, Masakatsu, Evaluation of hydroxyl radical-scavenging ability by chemiluminescence. *Anal. Biochem.* **1997**, *251* (2), 297-299.
- (127) Brand-Williams, Wendy; Cuvelier, Marie-Elisabeth; Berset, Claudette, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **1995**, *28* (1), 25-30.
- (128) Skrypnik, Nataliya I.; Harris, Raymond C.; de Caestecker, Mark P., Ischemia-reperfusion model of acute kidney injury and post injury fibrosis in mice. *J. Visualized Exp.* **2013**, (78), e50495.
- (129) Wei, Qingqing; Dong, Zheng, Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *Am. J. Physiol.* **2012**, *303* (11), F1487-F1494.
- (130) Weizer-Stern, Orly; Adamsky, Konstantin; Amariglio, Ninette; Rachmilewitz, Eliezer; Breda, Laura; Rivella, Stefano; Rechavi, Gideon, mRNA expression of iron regulatory genes in β -thalassemia intermedia and β -thalassemia major mouse models. *Am. J. Hematol.* **2006**, *81* (7), 479-483.
- (131) Overbergh, L.; Giulietti, A.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C., The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J. Biomol. Tech.* **2003**, *14* (1), 33-43.
- (132) Engel, David; Beckers, Linda; Wijnands, Erwin; Seijkens, Tom; Lievens, Dirk; Drechsler, Maik; Gerdes, Norbert; Soehnlein, Oliver; Daemen, Mat J. A. P.; Stan, Radu V.; Biessen, Erik A. L.; Lutgens, Esther, Caveolin-1 deficiency decreases atherosclerosis by hampering leukocyte influx into the arterial wall and generating a regulatory T-cell response. *FASEB J.* **2011**, *25* (11), 3838-3848.

- (133) Van Eck, Miranda; Twisk, Jaap; Hoekstra, Menno; Van Rij, Brechje T.; Van der Lans, Christian A. C.; Bos, I. Sophie T.; Kruijt, J. Kar; Kuipers, Folkert; Van Berkel, Theo J. C., Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (26), 23699-23705.
- (134) Miyakawa, Noriko; Nishikawa, Makiya; Takahashi, Yuki; Ando, Mitsuru; Misaka, Masayuki; Watanabe, Yoshihiko; Takakura, Yoshinobu, Gene delivery of albumin binding peptide-interferon-gamma fusion protein with improved pharmacokinetic properties and sustained biological activity. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102* (9), 3110-3118.