

氏 名 (生年月日) まつ うら さとる  
松 浦 悟 (1989 年 10 月 8 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 薬 第 183 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 セリン修飾を利用した腎臓標的型デンドリマーの創製に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 山 本 昌

(副査) 教 授 栄 田 敏 之

(副査) 教 授 西 口 工 司

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序章

腎臓は血液を濾過して老廃物や塩分を尿として排泄する機能を有し、生命維持を担う上で欠かせない臓器の一つである。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。

一方、腎臓疾患を有効かつ安全に治療するためには、標的部位である腎臓へ薬物を効率良く送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術の開発が必要不可欠である。しかしながら、これまでの DDS 技術を利用した腎臓標的化のアプローチでは、腎臓選択性の高い薬物担体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。例えば、低分子タンパク質であるリゾチームは、比較的腎臓に集積しやすいことから腎臓標的型キャリアとして知られているが、低分子タンパク質は免疫原性などに問題があるため投与が制限される。また、ポリビニルピロリドン系化合物は、腎臓選択的に集積するポリマーとして過去に注目されたが、薬物を結合可能な官能基数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、腎臓標的型キャリアとしての臨床応用は困難な状況にある。

そこで本研究では、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、アミノ酸の一種である L-セリン (Ser) を新規腎臓標的化素子としてポリアミドアミンデンドリマー (PAMAM; 樹状高分子) に 32 分子結合させた腎臓標的型高分子キャリア (Ser-PAMAM) を創製するとともに、高分子キャリアの腎臓標的化における Ser 修飾の有用性を評価した。すなわち、第 1 章では、Ser-PAMAM の物性ならびにマウスにおける体内動態の評価を系統的に評価するとともに、腎臓集積機構の詳細を検討した。さらに、第 2 章では、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 L-システイン (Cys) の腎臓送達による酸化ストレス疾患治療を試みた。

### 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

マウスにおける Ser-PAMAM の体内動態を詳細に検討することで Ser-PAMAM の腎臓標的型キャリアとしての有用性を評価した。また、対照として、Ser と同様に側鎖に水酸基を有するアミノ酸で、アルコール性水酸基を持つ L-スレオニン (Thr) とフェノール性の水酸基を有する L-チロシン (Tyr)

を PAMAM に結合させた Thr-PAMAM と Tyr-PAMAM も同時に作製し、体内動態について同様に評価した。<sup>111</sup>In 標識を施した Ser-PAMAM、Thr-PAMAM、Tyr-PAMAM および未修飾 PAMAM のマウス静脈内投与後の体内動態を評価したところ、Tyr-PAMAM は未修飾 PAMAM と同様に、肝臓及び腎臓へ集積し、腎臓選択性が低い結果となった。また Thr-PAMAM は選択的に腎臓へ移行したものの、その移行性は 34.9%であり、Ser-PAMAM に比べて低かった。一方、Ser-PAMAM の腎臓移行率は 81.7%を示し、最も高い腎臓移行性および選択性を示した。*In vivo* 微弱光イメージングシステムや SPECT/CT を用いた Ser-PAMAM の臓器分布の評価においても、腎臓選択的な体内動態が観察された。そこで次に、Ser-PAMAM の腎臓内分布、腎臓への移行経路、細胞内取り込み機構及び毒性を検討した。すなわち、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識を施した Ser-PAMAM をマウスに静脈内投与した後の腎臓切片を蛍光顕微鏡で観察することにより、Ser-PAMAM は近位尿細管上皮細胞に選択的に集積されることを確認した。近位尿細管は腎細胞がんや慢性腎不全などの腎臓疾患の発症部位であることから Ser-PAMAM は腎臓疾患治療に有利な腎臓分布を示すことが明らかとなった。また、Ser-PAMAM の腎臓取り込みクリアランスは、糸球体ろ過量の減少に伴い低下したことから、Ser-PAMAM は糸球体ろ過をされた後に管腔側から近位尿細管上皮細胞へ移行していることが示された。さらに、近位尿細管上皮細胞株 LLC-PK1 細胞を用いて、Ser-PAMAM の細胞内取り込みに対する各種エンドサイトーシス阻害剤の影響を評価したところ、Ser-PAMAM の上皮細胞への取り込みには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可能性が示された。また、Ser-PAMAM の一週間連続投与による腎障害は認められなかった。

以上より、Ser 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。また、腎臓標的型高分子キャリア (Ser-PAMAM) の腎臓移行機構の一端や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 を用いた薬物の腎臓標的化を目的として、ACE 阻害剤であるカプトプリル (CAP) を Ser-PAMAM へ約 6 分子結合させた Ser-PAMAM-CAP を合成し、静脈内投与後の腎臓中 CAP 濃度及び ACE 活性を評価したところ、Ser-PAMAM を用いることで CAP が効率よく腎臓へ送達されること、また ACE 活性抑制効果が持続化されることが明らかとなった。

また、抗酸化剤である Cys の腎臓標的化による腎虚血再灌流障害の治療を目的として、約 6 分子の Cys と約 26 分子の Ser を PAMAM のアミノ基末端へ結合させた Ser-PAMAM-Cys も合成した。腎臓虚血再灌流時においては、近位尿細管で発生する活性酸素種 (ROS) が腎臓障害を惹起・悪化させることから、Ser-PAMAM を利用して Cys を近位尿細管へ選択的に送達させることによる効率的な障害抑制が期待される。合成した Ser-PAMAM-Cys は 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) ラジカル及び様々な ROS を消去可能であり、なかでも組織障害性が強いとされるヒドロキシラジカルを効率的に消去した。腎臓虚血再灌流障害モデルマウスにおいて、腎機能マーカーである血漿中クレアチニンと血中尿素窒素の上昇は、Ser-PAMAM-Cys の投与により有意に抑制された。また、その効果は Cys と比較して顕著であった。腎臓の組織学的評価においても、虚血再灌流による腎臓の形態変化が Ser-PAMAM-Cys の投与により抑制されることが確認された。さらに、Ser-PAMAM-Cys の投与により腎臓中の炎症マーカー遺伝子発現の上昇が抑制されることが明らかとなった。

以上より、Ser-PAMAM を利用することにより、薬物の腎臓標的化が可能であること、Ser-PAMAM を用いた薬物の腎臓標的化により効率的な腎臓疾患治療が可能であることを明らかにした。

## 結論

本研究により、Ser 修飾が高分子キャリア及び薬物の腎臓標的化に有用であることを明らかにした。

さらに、Ser-PAMAM の体内動態を系統的に評価することにより、Ser-PAMAM の腎臓内局在や移行機構の詳細も明らかにした。Ser-PAMAM が集積する近位尿細管は様々な腎臓疾患の発症部位であることから、Ser-PAMAM は腎臓疾患治療に有望な腎臓標的型高分子キャリアであると考えられる。本研究で得られた知見は、腎臓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。

## 審査の結果の要旨

一般に、腎臓疾患を有効かつ安全に治療するためには、標的部位である腎臓へ薬物を効率良く送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術の開発が必要不可欠である。しかしながら、これまでの DDS 技術を利用した腎臓標的化のアプローチでは、腎臓選択性の高い薬物担体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。そこで本研究では、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、アミノ酸の一種である L-セリン (Ser) を腎臓標的化素子としてポリアミドアミンデンドリマー (PAMAM; 樹状高分子) に結合させた腎臓標的型高分子キャリア (Ser-PAMAM) を創製した。すなわち、本研究では Ser-PAMAM の物性ならびにマウスにおける体内動態の評価を系統的に評価するとともに、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 (Cys) の腎臓送達による酸化ストレス疾患治療を試みた。

### 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

マウスにおける Ser-PAMAM の体内動態を詳細に検討することで Ser-PAMAM の腎臓標的型キャリアとしての有用性を評価した。また、対照として、Ser と同様に側鎖に水酸基を有するアミノ酸で、アルコール性水酸基を持つ L-スレオニン (Thr) とフェノール性の水酸基を有する L-チロシン (Tyr) を PAMAM に結合させた Thr-PAMAM と Tyr-PAMAM も同時に作製し、体内動態について同様に評価した。<sup>111</sup>In 標識を施した Ser-PAMAM、Thr-PAMAM、Tyr-PAMAM 及び未修飾 PAMAM のマウス静脈内投与後の体内動態を評価したところ、Tyr-PAMAM は未修飾 PAMAM と同様に、肝臓及び腎臓へ集積し、腎臓選択性が低い結果となった。また Thr-PAMAM は選択的に腎臓へ移行したものの、その移行性は 34.9% であり、Ser-PAMAM に比べて低かった。一方、Ser-PAMAM の腎臓移行率は 81.7% を示し、最も高い腎臓移行性及び選択性を示した。In vivo 微弱光イメージングシステムや SPECT/CT を用いた Ser-PAMAM の臓器分布の評価においても、Ser-PAMAM の腎臓選択的な体内動態が観察された。

次に、Ser-PAMAM の腎臓内分布、腎臓への移行経路及び細胞内取り込み機構について検討した。すなわち、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識を施した Ser-PAMAM をマウスに静脈内投与した後の腎臓切片を蛍光顕微鏡で観察したところ、Ser-PAMAM は近位尿細管上皮細胞に選択的に集積されることを確認した。また、Ser-PAMAM の腎臓取り込みクリアランスは、糸球体ろ過量の減少に伴い低下したことから、Ser-PAMAM は糸球体ろ過をされた後に管腔側から近位尿細管上皮細胞へ移行していることが示された。さらに、近位尿細管上皮細胞株 LLC-PK1 細胞を用いて、Ser-PAMAM の細胞内取り込みに及ぼす各種エンドサイトーシス阻害剤の影響を評価したところ、Ser-PAMAM の上皮細胞への取り込みには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可能性が示された。

## 第2章 セリン修飾高分子を利用した薬物の腎臓標的化

次に、Ser-PAMAM を用いた2種類の薬物の腎臓標的化を試みた。まず、ACE 阻害剤であるカプトプリル (CAP) を Ser-PAMAM へ搭載した Ser-PAMAM-CAP を合成し、静脈内投与後の腎臓中 CAP 濃度及び ACE 活性を評価したところ、Ser-PAMAM を用いることで CAP が効率よく腎臓へ送達されること、ACE 活性抑制効果が持続化されることが明らかとなった。

また、抗酸化剤である Cys の腎臓標的化による腎虚血再灌流障害の治療を目的として、Cys と Ser を PAMAM のアミノ基末端へ結合させた Ser-PAMAM-Cys を合成した。その結果、Ser-PAMAM-Cys は 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) ラジカル及び様々な活性酸素を消去できることが明らかとなった。また、腎臓虚血再灌流障害モデルマウスにおいて、腎臓機能マーカーである血漿中クレアチニンと血中尿素窒素の上昇が、Ser-PAMAM-Cys の投与により有意に抑制された。さらに、Ser-PAMAM-Cys の投与により腎臓中の炎症マーカー遺伝子発現の上昇が抑制されることが明らかとなった。

以上より、Ser-PAMAM を利用することにより、薬物の腎臓標的化が可能であること、Ser-PAMAM を用いた薬物の腎臓標的化により効率的な腎臓疾患治療が可能であることを明らかにした。

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。