

学位プログラム名	応用理工学学位プログラム
サブプログラム名	物性・分子工学サブプログラム
学籍番号	202030067
学生氏名	鳥海 拓都
学位名	博士（工学）
指導教員	長崎 幸夫

博士論文題目     Design and Evaluation of Nanoparticle Antioxidants to Achieve Improvement of Exercise Performance  
(運動能力向上を達成するナノ粒子型抗酸化剤の設計と評価)

## 背景

医療技術や化学の発展に伴い、平均寿命は年々伸びている。健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間を示す健康寿命も同様に伸びているものの、その差は約 10 年存在し、長らく縮小していない。

健康寿命を妨げる原因の一つとして、運動能力の低下が考えられる。運動能力や健康の維持や向上のために運動が行われるものの、過度や不慣れな運動はかえって自身の身体にダメージを与え、運動能力の低下や健康の悪化を引き起こす。例えば、マラソンのような長時間の運動は赤血球の破壊を促し、貧血を引き起こすだけでなく、消化管の機能を低下し、運動誘発性胃腸症候群などを引き起こすことが報告されている。このような運動による悪影響の原因の一つとして活性酸素種 (ROS) が考えられる。ROS はエネルギー産生や免疫として生体内で産出される反応性に富んだ酸素化合物であり、ROS と生体内の抗酸化能による酸化還元を一定レベルに制御することで、細胞や組織の恒常性が保たれている。一方で、運動時はエネルギーをより多く産生するため、ROS が大量に産出される。過剰量の ROS は、生体内の抗酸化能を上回り、健康な組織や細胞と反応し、変性や機能障害 (酸化ストレス) を誘発し、運動能力の低下や健康の悪化を引き起こす。そのため、ROS による運動能力の低下を抑制するためには、エネルギー産生に必要な一定レベルの ROS は残しつつも、酸化ストレスを引き起こす過剰量の ROS を取り除くことが重要である。

ROS による悪影響を制御するために、アスコルビン酸やコエンザイム Q10 などの抗酸化剤がよく用いられる。そのため、抗酸化剤による運動能力向上を目的とした研究が広く行われている。しかし、多くの抗酸化剤は期待されるほどの有効性を示せずにいるばかりか、かえって副作用が生じることが報告されている。筆者は、このような結果を引き起こす原因として、一般的な抗酸化剤が低分子であるがためではないかと考えた。低分子薬は、生体内を非特異的かつ瞬間的に拡散する。そのため、低分子抗酸化剤は運動中に発生する ROS を取り除くことができない。また、低分子薬はその小ささから、正常細胞に容易に取り込まれる。そのため、低分子抗酸化剤は細胞内のエネルギー産生に使用される ROS までも取り除いてしまい、ミトコンドリア機能障害を引き起こす。し

たがって、大量の低分子抗酸化剤を用いなければ、有効量の低分子抗酸化剤を運動中に維持できないが、その分ミトコンドリア機能障害のリスクが大きくなるため、作用よりも副作用が上回るオーバードーズ症候群が引き起こされ、低分子抗酸化剤は期待されるような運動能力向上効果を示せずにいる。

低分子抗酸化剤の問題を解決し、運動能力の向上を実現するためには、抗酸化剤の作用を時間的・空間的に制御する事で、長時間かつ標的部位特異的な抗酸化作用の発揮とミトコンドリアへの副作用の抑制を実現する事が重要であると考えた。そこで、長崎研究室で以前から開発してきたナノ粒子型抗酸化剤 (RNP)に着目した。RNP は、生体適合性を有する親水性のポリエチレングリコール (PEG)と抗酸化能を持つ 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド (TEMPO)が結合した疎水性セグメントからなる両親媒性ポリマーが、自己組織化により形成された約 25 ナノメートルサイズのナノ粒子である。TEMPO は最も強い抗酸化剤の一つであるニトロキンドラジカルを有し、ROS の代表例でもあるスーパーオキシドだけでなく、ヒドロキシラジカルなどの多くの種類の ROS の除去が可能である。PEG の外殻は、その生体適合性により免疫標識を抑制し、長時間の滞留を実現する。また、RNP の数十ナノメートルの大きさは、正常な細胞への侵入を抑制し、細胞内の酸化還元バランスの不安定化を防ぐ。そのため、RNP は低分子抗酸化剤と比べて、生体内にて抗酸化作用を長時間発揮するだけでなく、ミトコンドリアへの副作用の抑制まで実現している。より組織特異的な滞留性を実現するために、長崎研究室では以前より、二種類の RNP を開発してきた (図 1)。疎水性セグメントにアミノ基の共有結合にて TEMPO が導入されている RNP<sup>N</sup> は、胃液などの低 pH にてアミノ基のプロトン化により親水性になるため、自己集合が崩れる。そのため、RNP<sup>N</sup> は経口投与後、血中に滞留する。一方、疎水性セグメントにエーテル基の共有結合にて TEMPO が導入されている RNP<sup>O</sup> は、低 pH でも自己組織化を維持する。そのため、RNP<sup>O</sup> は経口投与により消化管に特異的に滞留する。

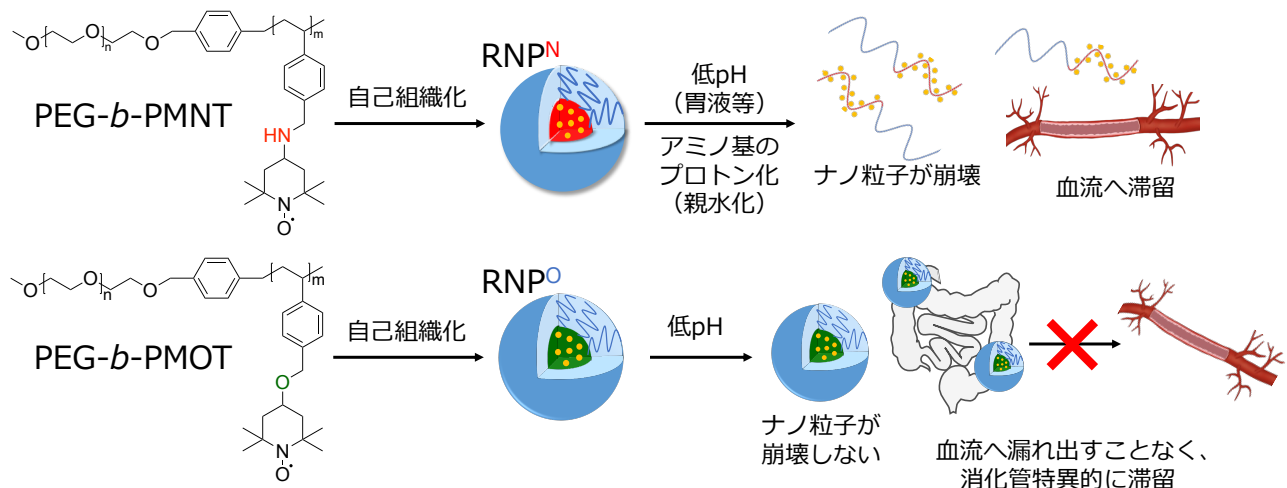


図 1: 血液に滞留するナノ粒子型抗酸化剤 (RNP<sup>N</sup>)と消化管に滞留するナノ粒子型抗酸化剤 (RNP<sup>O</sup>)の設計と特徴

上記に記す RNP の特徴は低分子抗酸化剤の問題を解決し、運動能力向上に有効であると考えられるが、運動と ROS が及ぼす身体への機能障害の機序と RNP の特徴が合致していなければ真に有効性を示すことができない。そこで、運動誘発性 ROS が引き起こす機能障害のメカニズムについて

て調べた。マラソンのような長時間の運動では、骨格筋や血液の収縮、足裏の機械的刺激などが原因となり、赤血球の破壊を示す溶血の亢進や赤血球数の減少が確認される。赤血球の破壊は、ヘモグロビンが有する鉄イオンの放出を促す。鉄イオンはフェントン反応により、ROS を産出することが報告されているため、結果として、赤血球の破壊は ROS の増加を誘発する。そこで、本研究では、血液に滞留する RNP<sup>N</sup>を用いて血流中の ROS を除去が運動能力向上に有効ではないかと考え、RNP<sup>N</sup>を皮下投与し、効果を検証した（第一章）。その結果、RNP<sup>N</sup>は運動による赤血球数の減少を抑制し、運動能力を向上させることが確認された。また、より簡便な方法である経口投与における効果も合わせて検証したところ、RNP<sup>N</sup>は経口投与においても運動能力向上効果を示した。この結果は、経口投与により、RNP<sup>N</sup>は血流に滞留するため、皮下投与同様に赤血球の保護によるものと考察した。一方で、経口投与後の RNP<sup>N</sup>は血液中に数%しか滞留しないことが長崎研究室の以前の研究にて確認している。この数%の RNP<sup>N</sup>が皮下投与時と同様の効果を発揮するとは理解し難い。経口投与後の RNP<sup>N</sup>は消化管に90%以上も滞留することが確認されているため、消化管に滞留する RNP<sup>N</sup>が何か運動能力向上に効果を発揮しているのではないかと考えた。現に、長時間の運動は、体温の上昇や酸化ストレスにより、運動誘発性胃腸症候群と呼ばれる、消化管の損傷や機能障害が生じることが報告されている。そのため、消化管に滞留する RNP<sup>N</sup>は運動誘発性胃腸症候群を改善することで運動能力向上効果を発揮しているのではと着想に至った。そこで、血液に漏れ出すことなく、消化管特異的に滞留する RNP<sup>O</sup>を用いて運動能力への効果を検証した（第二章）。その結果、RNP<sup>O</sup>は運動による消化管の損傷を抑制し、運動能力向上効果を発揮した。

## 第一章

### 血液に滞留するナノ粒子型抗酸化剤 (RNP<sup>N</sup>)による運動誘発性溶血の抑制と運動能力向上効果

#### 方法

生体適合性を有する親水性の PEG と抗酸化能を持つ 4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル (NH<sub>2</sub>-TEMPO)が結合した疎水性セグメントからなる両親媒性ポリマー (PEG-*b*-PMNT)を水中でミセル化することで RNP<sup>N</sup>を作製した。作成された RNP<sup>N</sup>は、動的光散乱法 (DLS)と電子スピン共鳴法 (ESR)を用いて RNP<sup>N</sup>の粒径および、ニトロキシドラジカルの含有量を評価した。ラット (F344、雄、11 週齢)に、低分子抗酸化剤である 4-ヒドロキシ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル (TEMPOL)、RNP<sup>N</sup>をそれぞれ様々な投与量で皮下投与し、トレッドミルを用いて高強度走行 (40m/min)を走行不能になるまで行い、オールアウトタイム (走行不能に至るまでの走行時間)を評価した。比較対照として溶媒を投与した Control+オールアウト群を採用した。また、走行時間を 10, 30, 50 分にした別群を用いて溶血、遊離鉄、赤血球数、酸化ストレスを評価し、運動誘発性の溶血への効果を検証した。比較対照として溶媒を投与し、高強度走行を行わず安静にした安静群 (SED)を採用した。また、TEMPOL と RNP<sup>N</sup>を経口投与した際のオールアウトタイムも評価した。

#### 結果と考察

作製した RNP<sup>N</sup>は DLS の結果から単峰性のピークを持つ粒径平均 23 nm の粒子であることが確認された。また、ESR の結果から、抗酸化能を持つニトロキシドラジカルがミセルに内包されていることが確認された。皮下投与後のオールアウトテストの結果から、高投与量の TEMPOL 群は

Control 群と比較して有意に走行時間が短縮した (図 2)。一方、RNP<sup>N</sup> 群は、RNP<sup>N</sup> の投与量依存的に走行時間が延長し、TEMPOL 群が走行時間を短縮した投与量では 50%もの大幅な走行時間延長を確認した。10, 30, 50 分の高強度走行後、Control 群では走行時間依存的に溶血が有意に増加することが確認され、TEMPOL 投与群でも同様の結果を示した。一方、RNP<sup>N</sup> の投与では、走行による溶血を有意に抑制した。その結果、50 分走行後、Control 群の赤血球数は安静群と比べて有意に減少し、TEMPOL の投与は赤血球数の減少を抑制できなかった (図 3)。一方、RNP<sup>N</sup> の投与は、安静群と同様のレベルで赤血球数を維持した。これらの結果は、運動に伴い赤血球が破壊されていることを意味している。赤血球の破壊に伴い鉄イオンが、Control 群、TEMPOL 群ともに走行時間依存的に増加していたが、RNP<sup>N</sup> 群では鉄イオンの遊離を有意に抑制していた。血中に鉄イオンが遊離した結果、フェントン反応等による ROS の発生が懸念される。実際、酸化ストレスの指標である赤血球内のタンパク質のカルボニル化は、Control 群で安静群と比較して有意に増加した。TEMPOL 群では同様の傾向を示したものの、RNP<sup>N</sup> 群では Control 群と比較して有意に酸化ストレスを抑制し、安静群と同等であった。以上の結果から、図 4 で示すように運動により赤血球が破壊され、溶血に伴い酸化ストレスが上昇する。これがさらに赤血球の破壊につながるという負のスパイラルにより、身体にダメージを受けた結果、運動能力が低下し、走行の継続を妨げるものと結論づけられる。TEMPOL は低分子抗酸化剤であるがために、運動中に発生する ROS を除去できないだけでなく、ミトコンドリア機能障害を誘発するため、運動能力を向上するばかりか、むしろ運動能力を低下する副作用を示したと考えられる。一方、RNP<sup>N</sup> は血中に長時間滞留し、抗酸化能を発揮することにより、図 4 に示す負のスパイラルの進行を抑制するため、投与量依存的な運動能力の向上を実現したものと考察する。

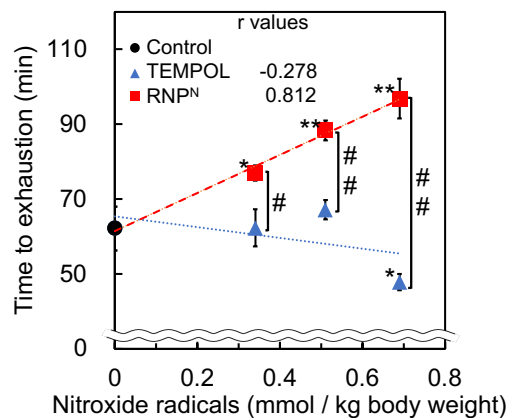


図 2: 皮下投与後のラットのオールアウトテスト結果 (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  versus Control, # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  versus within same concentration between the TEMPOL and the RNP<sup>N</sup>. Pearson's correlation coefficient: r values.)

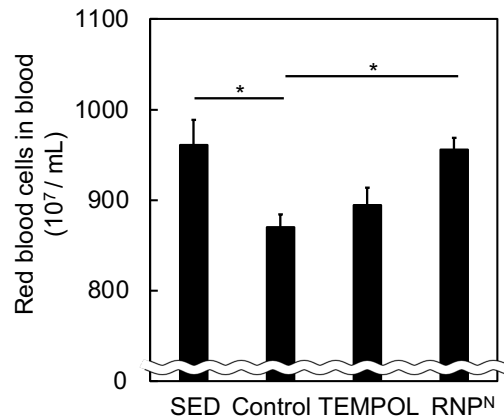


図 3: ラット赤血球数の結果 (\* $p < 0.05$ )

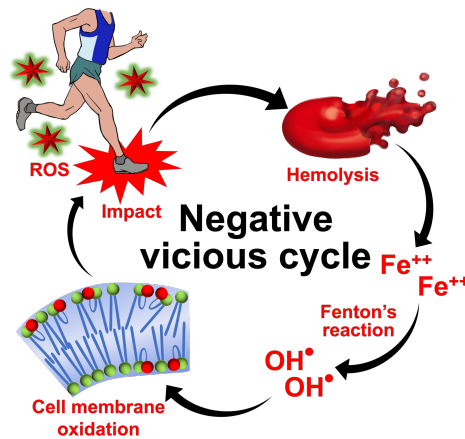


図 4: 運動性溶血が引き起こす負のスパイラル

皮下投与よりも簡便な方法である経口投与による RNP<sup>N</sup>の効果を検証したところ、オールアウトタイムの結果から、RNP<sup>N</sup>は有意な走行時間の延長効果を発揮した。この結果は、RNP<sup>N</sup>が経口投与後に血液に滞留するため、皮下投与同様に赤血球を保護し、運動能力を向上したと考察する。

## 第二章

### 消化管に滞留するナノ粒子型抗酸化剤 (RNP<sup>O</sup>)による運動誘発性胃腸症候群の改善と運動能力向上効果

#### 方法

生体適合性を有する親水性 PEG と抗酸化能を持つ TEMPOL が結合した疎水性セグメントからなる両親媒性ポリマー (PEG-*b*-PMOT)を水中でミセル化することで、RNP<sup>O</sup>を作製した。作製した RNP<sup>O</sup>は、DLS と ESR を用いて RNP<sup>O</sup>の粒径および、ニトロキシドラジカルの含有量を評価した。マウス (C57BL/6J、雄、9 週齢)に、低分子抗酸化剤である TEMPOL、RNP<sup>O</sup>をそれぞれ様々な投与量で経口投与し、高強度走行におけるオールアウトタイムを評価し、運動能力への効果を検証した。比較対照として溶媒を投与した Control+オールアウト群を採用した。また、走行時間を 80 分にし

た別群および、溶媒を投与し、高強度走行を行わず安静にした安静群 (SED)により、小腸、赤血球、肝臓、骨格筋の酸化ストレスや損傷等を評価し、RNP<sup>0</sup>の運動誘発性胃腸症候群への保護効果を検証した。

## 結果と考察

作製した RNP<sup>0</sup>は DLS の結果から単峰性のピークを持つ粒径平均 27 nm の粒子であることが確認された。ESR より、抗酸化能を持つニトロキシドラジカルがミセルに内包されていることが確認された。オールアウトテストの結果から、TEMPOL 群は投与量を増加するにつれて、Control 群と比較して走行時間が短縮する傾向を示した。一方、RNP<sup>0</sup>群は、投与量依存的に走行時間の有意な延長を示した。

80 分の高強度走行後、小腸において明らかな酸化ストレスの指標を示すタンパク質のカルボニル化レベルの増加と損傷が確認され、TEMPOL 群も同様であった。一方、RNP<sup>0</sup>群は、走行による酸化ストレスと損傷を有意に抑制した結果を示した。高強度走行後のマウスの赤血球において、有意な酸化ストレスの増加と赤血球数の減少が確認され、TEMPOL 群も同様であった。しかし、RNP<sup>0</sup>群では、RNP<sup>0</sup>が消化管内に局在するにもかかわらず、赤血球の酸化ストレス障害と赤血球数の減少を有意に抑制した結果を示した。これは肝臓と骨格筋においても同様な傾向であった。消化管に滞留する RNP<sup>0</sup>が赤血球や肝臓、骨格筋への保護効果を示すメカニズムを明らかにするべく、腸管壁浸漏に着目した。腸管壁浸漏は、消化管の損傷や酸化ストレスなどにより、腸管のバリア機能が破壊され、腸管内に封じ込められていた毒素や炎症性サイトカインが血液に流出することであり、現に、運動により腸管壁浸漏が生じることが報告されている。腸管壁浸漏の指標であり、ROS を誘発するリポ多糖 (LPS)の血漿中濃度は、Control 群と TEMPOL 群にて有意に増加したのに対し、RNP<sup>0</sup>群は有意に抑制し、安静群と同等のレベルを維持した。

これらの結果より、運動は消化管に酸化ストレスや損傷を引き起こし、腸管壁浸漏を誘発する。腸管壁浸漏により LPS が血液を介して全身に拡散するため、赤血球や肝臓、骨格筋などの臓器に酸化ストレスや損傷を誘発し、その結果、健康の悪化や運動能力低下を招く機構を想定した。低分子抗酸化剤は、その速やかな代謝とオーバードーズ症候群より、期待される効果を発揮することができなかった。一方、RNP<sup>0</sup>は血中には入らないが、消化管に生じる ROS を効果的に取り除くことで、連鎖的に生じる腸管壁浸漏などを通して全身に惹起する赤血球を含む臓器障害や運動能力低下を抑制し、結果として運動能力を投与量依存的に大幅に向上させたものと考察する。

## 結論

皮下投与や経口投与により、血中に滞留するナノ粒子型抗酸化剤 (RNP<sup>N</sup>)は、血流での ROS を取り除くことで、運動による赤血球の破壊を抑制する。そのため、RNP<sup>N</sup>は運動誘発性の赤血球数の減少を抑制し、運動能力を向上する。また、経口投与により、消化管に滞留するナノ粒子型抗酸化剤 (RNP<sup>0</sup>)は、消化管の ROS を取り除くことで、運動による消化管の酸化ストレスや損傷を抑制し、腸管壁浸漏による肝臓や赤血球、骨格筋などへの全身の機能障害を抑制する。そのため、RNP<sup>0</sup>は運動誘発性胃腸症候群を抑制し、運動能力を向上させる。これらの結果から、RNP による副作用の抑制と組織特異的な抗酸化作用の発揮は、低分子抗酸化剤では成し得なかった運動能力の向上に有効であることが示唆された。私が調べた限りでは、本研究は、ナノ粒子型の抗酸

化剤が ROS による運動障害を軽減し、副作用の軽減と体内動態の延長によって運動能力を大幅に向上させることを示した初めて知見である。このような組織特異的に抗酸化作用を発揮できる RNP を用いることで、運動が生体に及ぼす影響を明らかにすることができるため、化学のみならず、医学や体育学など幅広い学術領域の発展に貢献できると考えられ、老化やリハビリテーションなどへの応用により、広く社会に貢献可能だと考えられる。