

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592085

研究課題名(和文) 環境応答性ナノ粒子を用いた脳虚血治療の研究

研究課題名(英文) Newly synthesized radical-containing nanoparticles (RNP) enhance neuroprotection after cerebral ischemia-reperfusion injury

研究代表者

鶴嶋 英夫 (Tsurushima, Hideo)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50315470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：強力な活性酸素消去作用があるが、体内半減期が非常に短く、副作用(血圧低下)のある薬剤をナノミセル粒子に包埋する事で副作用を予防し、半減期を延長した新規な活性酸素消去薬剤を開発した。この粒子を脳梗塞ラットに治療に用いると脳梗塞の縮小作用が観察され、しかも脳虚血部位の活性酸素が消去されている事が証明された。ナノ粒子によるDDSは薬物の薬物力学的性質を改良し、副作用を減じたりできる可能性がある事を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Antioxidant nitroxyl radicals such as 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) have been investigated for their ability to scavenge free radicals produced by ischemia-reperfusion injury. However, the short in vivo half-life and toxicity of TEMPO was reported. We developed a core-shell-type nanoparticle, termed a radical-containing nanoparticle (RNP). We evaluated the ability of RNP to deliver TEMPO radicals to the ischemic brain and scavenge free radicals in cerebral ischemia-reperfusion injury. RNPs were detected for 6 h after intravenous administration in the ischemic brain, and significantly reduced the production of superoxide anion in neuronal cells. The infarction volumes of rats treated by RNPs were significantly lower than those of rats treated by saline, micelles, and TEMPOL. RNP treatment suppressed lipid peroxidation and protein oxidation, and limited the adverse effects of TEMPO radicals such as hypotension. RNPs could be a promising neuroprotective agent.

研究分野：DDS, Nano-medicine

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：drug delivery system ナノ粒子 脳梗塞 活性酸素消去 治療 ナノメディスン

様式C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血栓溶解療法や血管内治療による急性期動脈閉塞に対する再開通療法は、虚血性脳卒中や心疾患において主要な治療法である。虚血再灌流に伴う様々な活性酸素種の発生は、虚血半影帯(ischemic penumbra)における組織の障害を増強させることが知られており、血再灌流障害と呼ばれている。活性酸素消去作用のある脳保護薬の進歩は、t-PAや血管内手技による再開通療法の普及に伴い、虚血再灌流障害に伴う脳障害を抑制するために重要である。

2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl

(TEMPO)などのニトロキシラジカルや

-phenyl-N-tert butyl nitron (PBN)などのスピントラッピング剤は、フリーラジカル消去作用により虚血再灌流障害による脳梗塞の拡大を抑制し、機能予後を改善させることが知られている。また、日本国内では2001年よりラジカル供与型のフリーラジカル消去剤であるエダラボンが承認されている。しかしながら、世界的にみると脳梗塞急性期に広く利用できるフリーラジカル消去剤は未だなく、rt-PAやMerciリトリーパーなど再開通を目的とした治療法がますます普及する中でフリーラジカル消去剤による脳保護療法は、therapeutic time windowの延長と虚血再灌流障害の抑制のために更なる発展が期待される。

TEMPOなどのニトロキシラジカルは、ピペリジン環構造をした安定なフリーラジカルであり、それ自身の酸化還元反応により触媒のように抗酸化作用をもつことが知られている。しかし、ニトロキシラジカルは生体内ではカタラーゼ、グルタチオンなどの抗酸化システムにより急速に還元されてしまうため、半減期が短いこと、また毒性が臨床応用への問題点であった。また、TEMPOのもつ降圧作用は、

脳梗塞急性期の治療にとっては副作用である。よって、生体内半減期が延長して、毒性、副作用が軽減されれば、ニトロキシラジカルはフリーラジカル消去剤として高い可能性をもつと考えられる。

2. 研究の目的

我々が開発した脳保護薬である

radical-containing nanoparticle (RNP)の特徴と脳虚血再灌流に伴う酸化ストレス障害に対する効果について検討するとともに、ニトロキシラジカルのミセル化による虚血脳組織への治療の可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) RNP の作製

ラジカル含有ナノ粒子は、内部に安定ラジカルであるニトロキシラジカル(Amino-TEMPO)を有するコア-シェルタイプのミセルである。その構造は、親水性のポリエチレングリコール(PEG)と、4-amino-TEMPOを側鎖に有する疎水性のポリスチレンを結合させた両親媒性のブロック共重合体からなる。得られた両親媒性のブロック共重合体は、水溶液中で自己組織化させることでコア-シェルタイプのミセル粒子(RNP)に形成される。RNPの平均粒径は、動的光散乱測定法により光散乱光度計を用いて測定し、低濃度溶液では40 nmで高濃度溶液では60 nmであった。

(2) RNP 活性酸素消去作用と脳梗塞抑制効果

ラット一過性脳虚血モデルにRNPを投与して、経時的に脳組織を摘出し、TTC染色によって生存している脳組織と壊死に陥った脳組織(脳梗塞)を識別した。各脳スライスの脳梗塞面積の総和をとり脳梗塞体積を計算した。神経細胞におけるフリーラジカルの評価には、ジハイドロエチジウムを使用した。

ジハイドロエチジウムはスーパーオキシドアニオンと反応するとエチジウムブロマイドとなり、核内で赤色の蛍光を発する。これにより組織内の活性酸素量を測定した。ラット一過性脳虚血モデルに生理食塩水、TEMPOL、RNP のいずれかを経静脈投与して、3 時間後に摘出した脳を 8- μm の冠状切片にして、10 $\mu\text{mol/L}$ のジハイドロエチジウム溶液内で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間浸透させた。スーパーオキシドの発生を示唆する赤色の蛍光を観察した。それらの細胞を神経系のマーカーである anti-NeuN 抗体と緑色蛍光をもつ Alexa Fluor 488 で処理して、細胞の同定を行った。酸化損傷生成物の産生は、カルボニル蛋白の測定で行った。

4. 研究成果

(1) RNP の体内動態

RNP をラット一過性脳虚血モデルに静脈内投与すると、血中では TEMPO ラジカルは RNP 粒子内に封入された状態で循環しているのに対し、虚血脳組織中では RNP は崩壊して、フリーラジカル消去作用により還元された状態になって集積していた。

(2) RNP の脳梗塞治療効果

脳梗塞抑制効果についての検証では、各薬剤投与 24 時間後に比較したところ、RNP 投与群では生理食塩水、TEMPOL 投与群に比べて、有意に脳梗塞が抑制された。

スーパーオキシドの発生を示唆する赤色の蛍光を発する細胞は RNP 投与群で減少することがわかり、それらの細胞の多くは神経細胞であった。すなわち、RNP は神経細胞におけるスーパーオキシドアニオンの産生を抑制することが示唆された。酸化損傷生成物の産生である虚血脳組織中のカルボニル化蛋白を測定したところ、RNP 投与群は生理食塩水投与群より有意にカルボニル蛋白の産生が低かった。

(3) RNP による副作用の抑制

副作用の評価として各薬剤投与後 5 分間の平均大腿動脈圧を測定したところ、TEMPOL は生理食塩水や RNP と比べて有意に血圧低下を認め、RNP では TEMPO による急速な血圧低下は抑制された。

(4) 考察

RNP は内部に amino-TEMPO を封入した pH 応答性をもつコア-シェルタイプのミセルからなり、TEMPO ラジカルを内部に封入して、周囲の PEG 構造により細網内皮系による貪食防ぐことにより、生体内において TEMPO 単独投与に比べて 60 倍の血中半減期をもつことができた。また、pH 応答性を有することにより、RNP は虚血により酸性環境になった脳組織において pH 応答性に粒子が崩壊することで、TEMPO ラジカルが露出してフリーラジカルを消去するため、環境応答性のドラッグデリバリーシステムであるといえる。TEMPO radicals をミセル化することで、経静脈投与後の急速な血圧低下という副作用を軽減できたことも、安全な治療システムを構築する上で重要である。RNP による脳保護作用の分子メカニズムとしては、静脈中に投与された RNP は、血中では PEG 構造によるステルス効果により形状を保つことで内部の TEMPO ラジカルの血中滞留性を高め、粒径が 40-60 nm と小さい RNP は虚血により破綻した血液脳関門より虚血脳組織内へ移行して、虚血による低 pH 環境下において粒子の崩壊が起こり、露出された TEMPO ラジカルが虚血組織内のフリーラジカルを消去することで脳保護効果を示すものと考えられた。脳虚血によるフリーラジカルの産生経路は、細胞膜上の NADPH オキシダーゼ (Nox)、キサンチンオキシダーゼ、アラキドン酸代謝、あるいは細胞内ミトコンドリア電子伝達系を介するものなど

があげられる。破綻した血液脳関門を越えて、虚血脳組織内で露出された TEMPO ラジカルは、特に細胞膜における脂質酸化や蛋白酸化をフリーラジカル消去作用によって抑制すると考えられる。RNP は薬剤のミセル化により血中滞留性を高めて副作用を軽減させ、pH 応答性により標的組織において薬剤の効果を発揮させた新たなフリーラジカル消去剤であり、虚血性脳卒中に対する効果に加えて、今後、虚血性心疾患や全身の動脈閉塞性疾患に対する応用についてもさらなる研究の蓄積が期待される薬剤であると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- . Oyane A, Tsurushima H, et al. Spontaneous assembly of DNA-amorphous calcium phosphate nanocomposite spheres for surface-mediated genetransfer. *Cryst Eng Comm* 15(25): 2013, 4994-4997. 査読有
- . Zaboronok A, Tsurushima H, et al. Size-dependent radiosensitization effects of gold nanoparticles on human U251 malignant glioma cells. *Nanosci Nanotech Lett* 5: 2013, 990-994. 査読有
- . Ito Y, Tsurushima H, et al. Angiogenesis therapy for brain infarction using a slow-releasing drug delivery system for fibroblast growth factor 2. *Biochem Biophys Res Commun* 432(1): 2013, 182-187. 査読有
- . Sato M, Tsurushima H, et al. Risk factors of ischemic lesions related to cerebral angiography and neuro-interventional procedures. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 53(6): 2013, 381-387. 査読有
- . Wang X, Tsurushima H, et al. DNA-lipid-apatite composite layers enhance gene expression of mesenchymal stem cells. *Mat Sci Eng C* 33: 2013, 512-518. 査読有
- . Yazaki Y, Tsurushima H, et al. Fabrication of DNA-antibody-apatite composite layers for cell-targeted gene transfer. *Sci Technol Adv Mater* 13: 2012, on line published 064204(8pp). 査読有
- . Oyane A, Tsurushima H, et al. Fabrication of a DNA-lipid-apatite composite layer for efficient and area-specific gene transfer. *J Mater Sci Mater Med* 23(4): 2012, 1011-1019. 査読有
- . Nakamura K, Tsurushima H, et al. A subpopulation of endothelial progenitor cells with low aldehyde dehydrogenase activity attenuates acute ischemic brain injury in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 418(1): 2012, 87-92. 査読有
- . Takigawa T, Tsurushima H, et al. Cilostazol suppression of arterial intimal hyperplasia is associated with decreased expression of sialyl Lewis X homing receptors on mononuclear cells and E-selectin in endothelial cells. *J Vascular Surgery* 55(2): 2012, 506-516. 査読有
- . Zhang W, Tsurushima H, et al. BMP-2 gene-fibronectin-apatite composite layer enhances bone formation. *J Biomed Sci* 18: 2011, 62. 査読有

- . Wang X, Tsurushima H, et al. BMP-2 and ALP gene expression induced by a BMP-2 gene-fibronectin-apatite composite layer. Biomed Mater 6: 2011, on line published DOI 10.1088/1748-6041/6/4/045004. 査読有
- . Yazaki Y, Tsurushima H, et al. Control of gene transfer on a DNA-fibronectin-apatite composite layer by the incorporation of carbonate and fluoride ions. Biomaterials 32: 2011, 4896-4902. 査読有
- . Zhang W, Tsurushima H, et al. Osteoblast differentiation and disinfection induced by nitrogen plasma-treated surfaces. Biomed Mater Eng 21(2): 2011, 75-82. 査読有
- . Marushima A, Tsurushima H, et al. Time-course analysis of brain perfusion single-photon emission computed tomography using a three-dimensional stereotactic region-of-interest template in patients with Moyamoya disease. World Neurosurg. 76(3-4): 2011,304-310. 査読有
- . Marushima A, Tsurushima H, et al. Newly synthesized radical-containing nanoparticles (RNP) enhance neuroprotection after cerebral ischemia-reperfusion injury. Neurosurgery 68(5): 2011,1418-1426. 査読有

[学会発表](計4件)

- . 鶴嶋英夫(代表) et al. 血管内皮前駆細胞を用いた脳虚血治療に関する基礎的検討、第72回日本脳神経外科学術総会、2013, 10, 16-18 横浜.
- . 鶴嶋英夫(代表) et al. 脳組織保護作用、血管・骨再生作用をもたらすFGF-2徐放性Drug Delivery System、第71回日本脳神経外科学術総会、2012, 10, 17-19 大阪.
- . 鶴嶋英夫(代表) et al. 虚血性脳血管障害におけるDrug Delivery System ナノ粒子治療 -ナノ粒子の臨床応用の可能性-第70回日本脳神経外科学術総会、2011, 10, 12-14 (シンポジウム) 横浜
- . 鶴嶋英夫(代表) et al. 虚血性脳血管障害におけるDrug Delivery System ナノ粒子治療 (シンポジウム) 第70回日本脳神経外科学術総会 2011,10,12~14(横浜).

[図書](計1件)

1. Tsurushima H, 他 Springer Malignant Brain Tumors, Tumors of the Central Nervous system 2011 vol.3: Role of Radioresponsive Gene Therapy: 382 (287-292).

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴嶋 英夫 (TSURUSHIMA, HIDEO)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号: 50315470

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし