

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15628

研究課題名(和文)一酸化窒素リリース型インジェクタブルゲルの設計と虚血疾患への展開

研究課題名(英文)Design of injectable gel with NO releasing properties and its application

研究代表者

長崎 幸夫 (NAGASAKI, Yukio)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：90198309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体環境下でゲル化するナノ粒子にNO発生能を創り込み、心筋梗塞領域へ投与し、心筋内でのゲル化により長期滞留性を向上させるとともにNOを発生させて血流の上昇と新生血管増殖効果を目指した。また、発生したNOを消費する活性酸素種を消去する機能を材料に創り込み、効果的なNOによる血管新生と心筋梗塞治療法を目指した。これらの材料設計及び心筋梗塞モデルに対する評価により、NO発生及びROS消去単独材料に比べ、両者を併せ持つ材料は極めて高い効果を発揮することが確認された。

研究成果の概要(英文)：NO generation ability was installed in nanoparticles which forms gel under the physiological conditions. The obtained NO-release injectable gel was administered to the myocardial infarction region and the formed gel in myocardium improves long-term retention and continuous generation of NO and increases blood flow and new blood vessels. The objective of this work was to improve angiogenesis of myocardial infarction using our NO-releasing injectable gel. In addition, an ROS elimination function was added to the NO-releasing injectable gel, which avoided consumption of the generated NO and improved therapeutic efficacy.

研究分野：生体機能材料

キーワード：一酸化窒素 インジェクタブルゲル 心筋梗塞 虚血性疾患 アルギニン 誘導型一酸化窒素合成酵素
ブロック共重合体 フラワーミセル

1. 研究開始当初の背景

有機合成を基盤とする合成医薬はこれまで多くの人々を救ってきた。しかしながら「作用」と「副作用」は表裏一体で、しばしばその副作用が患者の QOL を低下させる。近年、「夢の薬」といわれた分子標的薬が実現し、効果が飛躍的に向上したものの、その不十分な集積性や個人差など、限界も分かりつつある。一方で、ナノテクノロジーを基盤とし、高い血中滞留性と腫瘍集積性を併せ持つナノ粒子に既存薬物を封じ込め、高度な化学治療を行う薬物送達システムは分子標的治療と双璧をなす創薬技術として近年急速に発展を続けているものの、その腫瘍への集積性は高くても投与量の 10% 程度にすぎず、90% 以上は標的部以外に拡散あるいは代謝され、副作用や長期毒性が十分に解決されたとは言いがたい。このような現状を鑑み、きわめて副作用の小さい薬物治療の創出がこれからの重要な課題である。

2. 研究の目的

一酸化窒素(NO)は生体内で血管新生やアポトーシス誘導など、様々な生理機能を有することが知られている。申請者らはこれまで、生体内で時間・空間的に NO を発生させ、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導せしめる新しい抗腫瘍ナノメディシンの設計を行ってきた。本研究では生体環境下でゲル化するナノ粒子に NO 発生能を創り込み、心筋梗塞領域へ投与し、心筋内でのゲル化により長期滞留性を向上させるとともに NO を発生させて血流の上昇と新生血管増殖効果を目指す。心筋梗塞

に対するタンパク質送達や遺伝子治療はひろく行われているものの、NO 発生型インジェクタブルナノ粒子を適用する例はなく、全く新しいタイプのナノメディシンとして期待される。

3. 研究の方法

一酸化窒素(NO)は、生体内ではアルギニンを経質とし、一酸化窒素合成酵素(NOS)によって産生される。しかしながら水溶性のアミノ酸であるアルギニンは代謝や酵素分解により速やかに代謝され、バイオアベイラビリティが低く、ターゲット部位に集積しない。

我々はこれまで、このような問題を解決するため、水溶性で生体適合性の高いポリエチレングリコール(PEG)とポリアルギニンのブロック共重合体(PEG-b-PArg)をベースにポリアクリル酸(PAAc)などのポリカチオンとの複合によりポリイオンコンプレックス型ナノ粒子を作成し、ナノ粒子が炎症部位のマクロファージに貪食され、ペプチド分解酵素で分解されてアルギニンを産生し、NOS によって NO を発生させるというナノ材料を開発してきた(図 1, *Macromol. Rapid Commun.*, 36, 1916(2015))。実際、胆がんマウスにこのナノ粒子を尾静脈投与すると、図 2 に示すように投与量依存的に腫瘍成長速度が増加から抑制に変化することが確認されている(*J. Controll. Rel.*, 217, 256(2015))。これらの結果から本研究では、PArg をベースに生体環境下でゲル化するインジェクタブルゲルを設計し、心筋梗塞のような局所虚血環境に対する新しいナノメディシンを祖出することとした。すなわち上

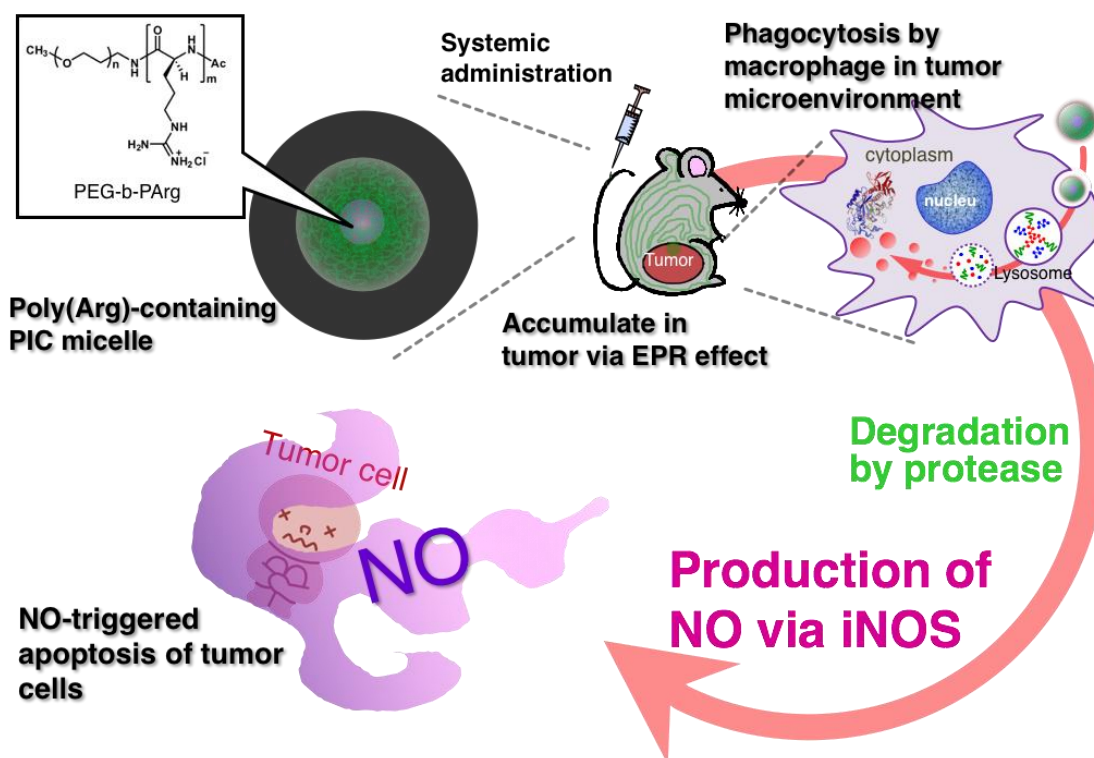


図 1. 炎症部位に集積し NO を発生するナノ粒子の設計と新しい抗がん治療への展開

述した PEG-b-PArg の代わりに Prg-b-PEG-b-PArg トリブロック共重合体を合成し、PAAc とのポリイオンコンプレックスにより生体環境下でゲル可能を有するフラワーミセルを作製し、心筋注射による心筋梗塞モデルマウスに対する NO 放出用なメディシンとしての評価を行う。さらに我々が別途進めてきた活性酸素種(ROS)を消去するインジェクタブルゲル(RIG)を併用することでその硬貨を検討していく。

4. 研究成果

4.1 材料設計

NO を発生する材料としてポリアルギニン(PArg)を一成分とした材料を設計した。図 3a に示すように PArg-b-PEG-b-PArg はポリカチオン-b-PEG-b-ポリカチオントリブロック共重合体としてポリアクリル酸(PAAc)とフラワー型のポリイオンコンプレックスミセルを形成する(NO-IG)。一方、我々がこれまで合成してきた ROS を消去するフラワーミセルはポリカチオン部位にニトロキシ化合物である TEMPO を導入している(PMNT-b-PEG-b-PMNT)。この両トリブロック共重合体を PAAc と複合化させることで NO を放出し、ROS を消去するインジェクタブルゲル(NO-RIG)を作製した。得られた PIC ミセル(NO-RIG)は溶液中で 25°C以下で透明であり、生理的条件下で 37°Cでゲル化した(図 1a)。従って、この PIC システムを注射可能なヒドロゲルとして利用することができる。粒径は 80-90nm(図 3b)で完全に透明である。この溶液の温度を上昇させると 30°C を超えたあたりから粘度が 4 桁にも及ぶ上昇を示した(図 3c)。また、30°C 付近で貯蔵弾性率(G')を損失弾性率(G'')が越え、ゲル化する(図 3d)。このゲルは温度低下でも弾性率は変化せず、不可逆である。これは温度上昇に伴い表層の PEG ループが疎水化するとともに、PIC コアが緩み、一部ほぐれた結果、ミセル間での静電的架橋が生じるためと考えられ、温度応答性可逆的ゲルを形成する疎水性 A セグメントおよび親水性 B セグメントを有する従来の A-B-A 型トリブロックコポリマーとは対照的である。

このインジェクタブルゲルを蛍光ラベル(Hylite)化し、マウス心筋に投与したところ、2 週間程度にわたって観測された(図 3e)。これはポリマー自身の投与では 2 日程度で抄出することと対照的であった(図 3f)。心臓切片解析から組織内に均一に広がっている様子が確認された(図 3g,h)。

次に、RAW264.7 マウスマクロファージ細胞系を用いてインビトロでの PIC の細胞傷害性を評価した。図 4 に示すように、NO-IG は、PIC の形成のために、PArg-PEG-PArg ポリマーのみと比較して、RAW264.7 マクロファージ細

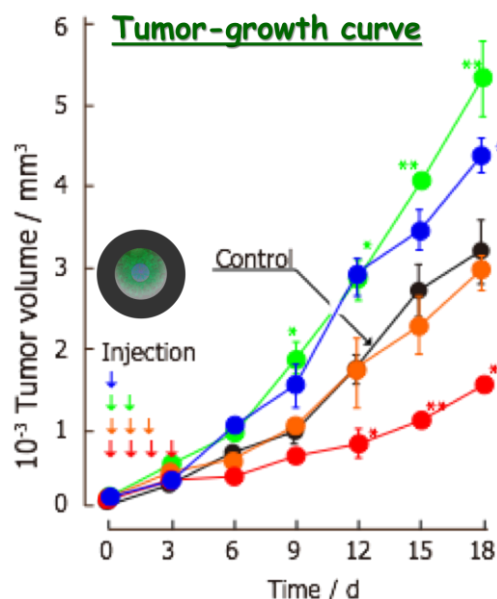


図 2.皮下移植担がんマウスに対するポリアルギニンナノ粒子(IANP)の効果、(腫瘍サイズの経時変化). IANP(16 mg/kg)一回投与(0d, 青)、2回投与(0,1d, 緑)、3回投与(0,1,2d, 橙色)、4回投与(0,1,2,3d, 赤色)、コントロール(黒色) (n= 4, expressed as mean \pm S.E., *p b 0.05). (n= 3, mean \pm S.D., *p b 0.05). 1,2回投与では腫瘍増殖がコントロールよりむしろ早くなるのに対し、4回投与では優位に抑制される。

胞に対して有意に低い毒性を示した。PArg-PEG-PArg および PMNT-PEG-PMNT (NO-RIG) からなる PIC は、おそらく ROS 捕捉能に起因するため、RAW264.7 細胞の毒性はるかに低いのは興味深い。

4.2.2 心筋梗塞モデルマウスに対する効果

上述のように心筋内に投与したゲルは 2 週間にわたり滞留することが確認されたため、左前下行枝(LAD)結紮による心筋梗塞モデルマウスを作製(図 5a*)し、その効果を評価した。図 5b に示すサンプル群を投与し、エコーによるイメージング(図 5c)から、LAD 結紮 1 ヶ月後において、左心室拡張が確認され、心筋梗塞モデルマウスでは心室中隔の膜厚が減少していた(図 5d)。さらに、心機能の重要なパラメータである駆出率(EF)および短縮率(FS)も、大きく低下し、心機能が極端に低下していることがわかる(図 5e)。これに対し、

NO 放出能や ROS 消去能の無いゲル(Sham)、NO 放出ゲル(NO-IG)及び ROS 消去ゲル(RIG)では LAD 結紮モデルに対して上昇する傾向はあったが、統計的有意差は得られなかった。NO を発生し、ROS を消去する NO-RIG は図に見られるように優位にその機能回復が認められた。

これらの検討後、心臓の肉眼的観察の結果、すべての治療群において左心室に大きな梗塞

* 図 5 以降は下記のリンクを参照されたい。

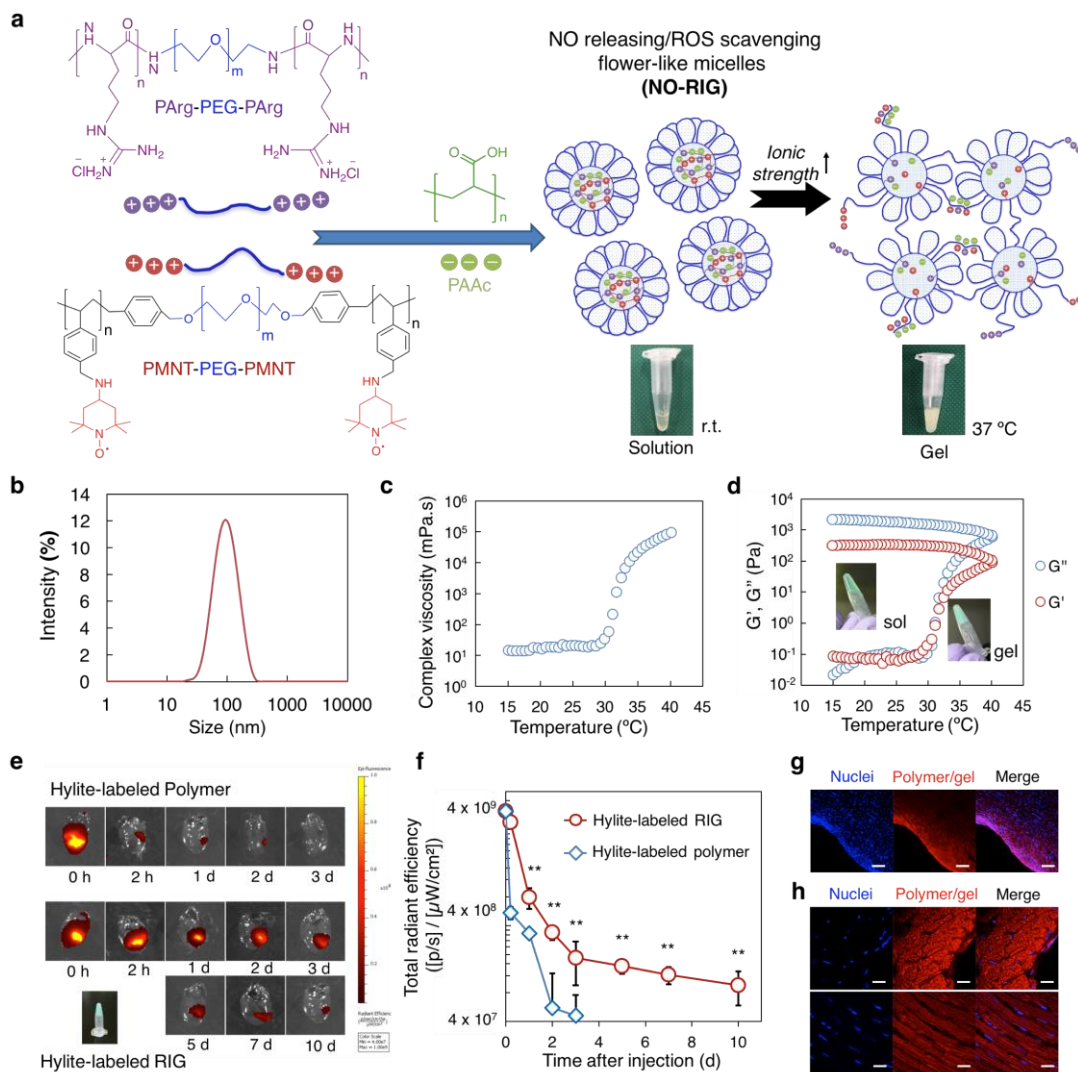


図3. NO を発生し、ROS を消去するインジェクタブルゲル(NO-RIG)の設計とその特性 a.設計した高分子とポリイオンコンプレックスミセル、ゲル化；b. PIC フラワーミセルの粒径・分布(5mg/mL, PBS, 25°C)；c. PIC フラワーミセルの昇温における粘度上昇(45mg/mL)；d. 貯蔵弾性率(G')及び損失弾性率(G'')の温度依存性(45mg/mL)；e. 蛍光ラベル NO-RIG の心筋投与後の残存性(上から 5mm の所の切片の蛍光撮影。10 日間にわたって徐々に減衰している様子が確認された)；f. 蛍光強度の定量結果(水溶性高分子が 2 日程度で消失するのにに対し、NO-RIG では 10 日間にわたり徐々に減衰した)；f.低倍率(スケールバー=100um)、g:高倍率(スケールバー=20um)心臓切片 (5um) の蛍光画像。

を呈することがわかった(図 5a)。したがって、Masson Trichrome 染色により梗塞サイズをさらに測定した。図 6b および c に示すように、このモデルの梗塞サイズの重症度が高いために梗塞サイズはまだ比較的大きかったものの、NO-RIG で処置したマウスの梗塞サイズは、他の処置群よりも有意に減少した(約 40%)。

左前下行枝の結紮位置を調整し、適度な心筋梗塞サイズモデルマウスに対する効果を再検討したところ、図 7 に示すように高度な治療効果を示すことを確認できた。これらの得られた結果は、NO-RIG 処理が他の対照注射用ヒドロゲルと比較してマウスを心筋梗塞から効果的に保護できることを示している。

4.3 NO 発生評価

心筋梗塞後に NO-RIG が心臓機能を保護する治療機構を調べるために、マウスの腹部皮膚における NO-RIG 処理による血管新生の誘

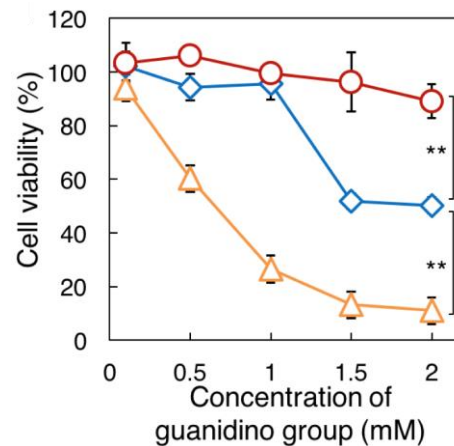


図 4. マウスマクロファージ(RAW264.7)に対する細胞毒性(Δ : PArg-b-PEG-b-PArg; \diamond : NO-IG; \circ : NO-RIG)

導を評価した。NO-RIG および他の対照ゲルをマウス皮膚を剥がし、内側に注射し、血管新生を注射後7日目に確認した(図8a)。心筋梗塞の状態を模倣し、マクロファージなどの免疫細胞を活性化するために、注射用ゲルにリポ多糖(LPS)を封入し、使用した。shamゲルおよびPArg-PIC(NO-IG)処置は、LPS負荷対照ゲル(図8b、c)で処置したマウスにも関わらず、殆ど血管新生が観察されなかった。一方興味深いことに、LPS処理を行ったNO-RIGはマウスは、他の他の投与群に比べて有意に高かった(図8b、c)。図9ではNO-RIGおよびLPSで処理したマウスは、DAF-FM DAで蛍光染色することによってNOの産生を有意に増加させることが確認された(a、b)。これらの結果は、NO-RIGでの処置が疾患組織の局所領域で所望のレベルまでNO生成を効果的に上昇させ、血管新生を誘導することができることを明確に示している。

4.4 結論

我々の設計したNO-RIGは、NO発生とROS除去の2つの生体機能性トリブロックポリマーで構成され、NOの放出を維持し、その心筋梗塞病態に対する血管新生を優位に向上させ、梗塞サイズの抑制に高い効果を発揮した。LPSによる炎症誘導が大きな引き金となる事から、心筋梗塞に伴う炎症の惹起によりマクロファージの浸潤が起こり、アルギニンを基質としたiNOSによるNOの産生と、発生したNOがスーパーオキシドのようなROSによって消費されることを抑制することが大きく機能する事が結論づけられる。NO-RIGは注射可能なヒドロゲル系であるため、汎用性のある薬物および生体分子、さらには細胞もNO-RIGに閉じ込めることができ、これは治療に対する高い治療効能を有することが期待される。

5. 主な発表論文等(詳細な論文リストはhttp://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_1ab/data/kakenhi/nagasakiG.pdfを参照)

[雑誌論文] (計26件)

1. Keisuke Motone, Toshiyuki Takagi, Shunsuke Aburaya, Wataru Aoki, Natsuko Miura, Hiroyoshi Minakuchi, Haruko Takeyama, Yukio Nagasaki, Chuya Shinzato, Mitsuyoshi Ueda, Redox nanoparticle prevents coral larvae from heat stress mortality as a potential use for coral reef protection, *Marine Biotechnology*, in press (10.1007/s1012).
2. Yutaka Ikeda, Yukio Nagasaki, Antioxidative biointerface: Biocompatible materials scavenging reactive oxygen species, *Biomedical Materials*, (Review), Vol.13, No.4, 044103(2018) (doi.org/10.1088/1748-605X/aab720).
3. Yukio Nagasaki, Design and Application of Redox Polymers for Nanomedicine, *Polymer*

- Journal*, (Review) in press. (10.1038/s41428-018-0054-6) (高分子学会賞受賞論文)
4. Long Binh Vong, Thang Q Bui, Tsutomu Tomita, Hiroki Sakamoto, Yuji Hiramatsu, Yukio Nagasaki, Novel Angiogenesis Therapeutics by Redox Injectable Hydrogel - Regulation of Local Nitric Oxide Generation for Effective Cardiovascular Therapy, *Biomaterials*, Vol. 167, 143-152(2018) (doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.023)
 5. Yutaka Ikeda, Kazuhiro Shoji, Chitho Feliciano, Shinji Saito, Yukio Nagasaki, Antioxidative nanoparticles significantly enhance therapeutic efficacy of an antibacterial therapy against *Listeria monocytogenes* infection, *Molecular Pharmaceutics*, 15 (3), pp 1126-1132(2018) (doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00995).
 6. Chitho P. Feliciano, Yukio Nagasaki, Oral Nanotherapeutics: Redox Nanoparticles Attenuate Ultraviolet B Radiation-Induced Skin Inflammatory Disorders in *Kd: Hr-Hairless Mice*, *Biomaterials*, Volume 142, 162-170(2017), (doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.07.01).
 7. Long Binh Vong, Shinya Kimura, Yukio Nagasaki, Newly designed silica-containing redox nanoparticles for oral delivery of novel TOP2 catalytic inhibitor for treating colon cancer, *Advanced Healthcare Materials*, Vol.6, 1700428(2017) (0.1002/adhm.201700428)
 8. Hisayuki Hosoo, Aiki Marushima, Yukio Nagasaki, Aki Hirayama, Hiromu Ito, Sandra Puentes, Arnela Mujagic, Hideo Tsurushima, Wataro Tsuruta, Kensuke Suzuki, Hirofumi Matsui, Yuji Matsumaru, Tetsuya Yamamoto, Akira Matsumura, Neurovascular unit protection from cerebral ischemia-reperfusion injury by radical-containing nanoparticles in mice, *Stroke*, Vol. 48, 2238-2247(2017) (doi:10.1161/STROKEAHA.116.016356).
 9. Phetcharat Boonruamkaew, Pennapa Chonpathompikunlert, Long Binh Vong, Sho Sakaue, Yasushi Tomidokoro, Kazuhiro Ishii, Akira Tamaoka, Yukio Nagasaki, Chronic treatment with a smart antioxidative nanoparticle for inhibition of amyloid plaque propagation in Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease, *Scientific Reports*, Volume 7, Article Number 3785, pp.1-13 (2017) (10.1038/s41598-017-03411-7)
 10. Yukio Nagasaki, Yutaro Mizukoshi, Zhenyu Gao, Chitho P. Feliciano, Kyungho Chang, Hiroshi Sekiyama, Hiroyuki Kimura, Development of a Local Anesthetic Lidocaine-loaded Redox-active Injectable Gel for Postoperative Pain Management, *Acta Biomaterialia*, Volume 57, 127-135(2017) (10.1016/j.actbio.2017.04.031).
 11. Babita Shashni, Yukichi Horiguchi, Kosuke Kurosu, Hitoshi Furusho, Yukio Nagasaki,

- Application of Surface Enhanced Raman Spectroscopy as a Diagnostic System for Hypersialylated Metastatic Cancers, *Biomaterials*, Volume 134, 143-153 (2017) (10.1016/j.biomaterials.2017.04.038).
12. Kanako Shiota, Susumu Hama, Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki, Kentaro Kogure, Prevention of UV-induced Melanin Production by Accumulation of Redox Nanoparticles in the Epidermal Layer via Iontophoresis, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Note, Volume 40, 941-944(2017) (doi: 10.1248/bpb.b17-00155)
 13. Chitho P. Feliciano, Koji Tsuboi, Kenshi Suzuki, Hiroyuki Kimura, Yukio Nagasaki, Long-term bioavailability of redox nanoparticles effectively reduces organ dysfunctions, *Biomaterials*, Volume 129, pp.68-82. (10.1016/j.biomaterials.2017.03.011)
 14. Babita Shashni, Abdulaziz Alshwimi, Kentaro Minami, Tatsuhiko Furukawa, Yukio Nagasaki, Nitroxide radical-containing nanoparticles as potential candidates for overcoming drug resistance in epidermoid cancers, *Polymer*, Volume 116, pp.429-438(10.1016/j.polymer.2017.02.052).
 15. Long Binh Vong, Makoto Kobayashi, Yukio Nagasaki, Evaluation of the Toxicity and Antioxidant Activity of Redox Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos, *Molecular Pharmaceutics*, Volume 13, No. 9, pp 3091-3097(2016) (doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00225)
 16. Sindhu Thangavel, Toru Yoshitomi, Meena Kishore Sakharkar, Yukio Nagasaki, Redox nanoparticle increases the chemotherapeutic efficiency of pioglitazone and suppresses its toxic side effects, *Biomaterials*, Volume 99, page 109-123(2016). (doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.05.001)
 17. Phetcharat Boonruamkaew, Pennapa Chonpathompikunlert, Yukio Nagasaki, Redox nanoparticle therapeutics for acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice, *Special issue of "Harmful and Beneficial Role of ROS", Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2016, ID 4984597(2016) (doi:10.1155/2016/4984597)
 18. Long Binh Vong, Yukio Nagasaki, Combination treatment of murine colon cancer with doxorubicin and redox nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, 13 (2), pp 449-455(2016). (doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00676)
 19. Shiro Ishii, Junya Kaneko, Yukio Nagasaki, Development of a long-acting, protein-loaded, redox-active, injectable gel formed by a polyion complex for local protein therapeutics, *Biomaterials*, Volume 84, page 210-218(2016) (doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.029)
 20. Makiko Saita, Junya Kaneko, Takenori Sato, Shun-suke Takahashi, Satoko Wada-Takahashi, Ryota Kawamata, Takashi Sakura, Masaichi-Chang-il Lee, Nobushiro Hamada, Katsuhiko Kimoto, Yukio Nagasaki, Novel antioxidative nanotherapeutics in a rat periodontitis model: Reactive oxygen species scavenging by redox injectable gel suppresses alveolar bone resorption, *Biomaterials*, Volume 76, Pages 292-301(2016) (doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.077).
- [学会発表] (計 183 件)
- 2018.3.1 長崎幸夫、機能性 PEG の設計と展開、高分子学会医用高分子研究会第 68 回医用高分子研究会「DDS・バイオコンジュゲーションのための水溶性高分子の新展開」(東京工業大学キャンパス・イノベーションセンター(CIC)、芝浦)
- [図書] (計 3 件)
- 長崎幸夫、酸化ストレスを制御するポリマードラッグの設計、CSJ カレントレビュー、日本化学会編、化学同人、17 章、169-174(2017) 他
- [産業財産権]
- 出願状況 (国内 5 件、PCT 1 件、計 6 件)
非公開に付き、公表を差し控えます。
 - 取得状況 (計 0 件)
本研究に関わる内容で、本研究期間に取得した特許はありません。(本研究が始まる前に出願した特許取得が数件有り)
- [その他]
- ホームページ等
http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_lab/index.htm
6. 研究組織
- (1)研究代表者
長崎幸夫 (Yukio Nagasaki)
筑波大学・数理物質系・教授
研究者番号：90198309