

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860686

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の進展を抑制する新規『尿細管・間質領域指向性リポソーム』の創出

研究課題名(英文) Construction of novel liposome with directional quality to kidney tubule and tubulointerstitial region to control the development of diabetic nephropathy

研究代表者

米澤 正(YONEZAWA, SEI)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50469988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000 円

研究成果の概要(和文)：糖尿病モデルラットにおいてファージディスプレイペプチドライブラリー法により、腎尿細管・間質領域に特異性を持つペプチドの候補を得た。また糖尿病性腎症尿細管部位で発現が増加するRAGEに対して特異的に結合するペプチドも数候補得た。さらに線維化部位への指向性を持つペプチドにより表面修飾を施したリポソームを作製し、その体内動態を調べた結果、リポソームの線維化部位への指向性が認められた。

リポソーム内にステロイドを内封する系の確立にも成功し、今後糖尿病モデルラットにおいて腎尿細管・間質領域に特異性を持つリポソームにステロイドを内封し、その動態解析・治療効果について検討するだけの成果を得た。

研究成果の概要(英文)： To obtain specific peptide for kidney tubule and tubulointerstitial region, phage-displayed peptide library was injected into Zucker diabetic fatty rats. Then phage specifically accumulated in tubule and tubulointerstitial region were isolated. And some phage specifically accumulated in RAGE protein expressed in tubule of diabetic nephropathy were isolated. Moreover, we prepared liposome with directional quality to fibrotic area and examined its bio-distribution in crescentic glomerulonephritis. Results showed that liposome had directional quality to fibrotic area.

We have already succeeded in preparing liposome-encapsulated steroid drug. Next we will examine the bio-distribution and therapeutic effect of liposome-encapsulated steroid drug with directional quality to kidney tubule and tubulointerstitial region in Zucker diabetic fatty rats.

研究分野：生化学・薬物送達学・腎臓学

キーワード：糖尿病性腎症 リポソーム DDS

1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全の原因としては、慢性糸球体腎炎が一番多くて50%、次いで糖尿病性腎症で15%と言われているが、透析療法新規導入患者において糖尿病性腎症の割合は増加傾向をたどっている。一般的に、腎機能の低下は糸球体から始まり、尿細管間質病変の惹起・進展による慢性炎症や線維化により引き起こされると考えられている。初期の糸球体障害について考えると、免疫学的機序や代謝性要因(糖尿病性腎症など)というように、その原因は様々である上に、病態判明時には進行が進んでいるという症例が多い。そして腎機能においては多少の変動があっても、一度悪くなった腎は良くなることはないと考えられており、その治療目的はその進行を遅らせ、少しでも透析療法への移行を遅らせることにある。

DDS (drug delivery system) とは薬物の体内動態を精密に制御し、選択的かつ最適に作用部位に送り込むことによって、薬物治療の最適化を達成することを目的とする、薬物の投与形態の総称である。目的によって吸収改善や標的指向化(ターゲティング)などに分類され、癌などの治療を最適化することを目指して製剤化されており、今後の医療を支える基盤となる技術として注目されている(Jain KK, *Methods Mol Biol.* 2008)。申請者はこれまで DDS 技術を用い腎への効率的な薬物送達の実現を試みており、生体膜様の脂質二重膜によって形成される粒子系 100 nm のリポソームを材料として、その表面をポリエチレングリコール(PEG)で修飾することにより、疾患腎糸球体のみならず、尿細管・間質に対して高い集積が見られることを見いだしている(下図)。これは PEG で修飾することによってリポソーム表面に水層を形成し、血中での滞留性を向上させることで、炎症により透過性が上昇した血管からしみ出したいわば受動的な(パッシブ)ターゲティングと考えられる。これらを踏まえ、本研究ではさらに『腎尿細管・間質領域』への積極的な(アクティブ)ターゲティングを加えることによって、効率よく薬物を『腎尿細管・間質領域』に送り込み、病態の進展を効率よく抑えてやることを目指すという着想に至った。すなわちパッシブとアクティブな指向性を兼ね備え、疾患腎の『尿細管・間質領域』に特異的な集積を示すリポソームを創出し、そこへの薬物送達を成し遂げようと考えた。

2. 研究の目的

毎年、末期腎不全治療すなわち透析療法の新規導入患者は増加傾向をたどっている。その原疾患とされるものの中では、慢性糸球体腎炎と糖尿病性腎症が大部分を占めている。本研究では、原疾患の中でも、その数が増え続けている糖尿病性腎症において、DDS 技術を活かすことによって『腎尿細管・間質領域』

に対する薬物送達を目指す。原因の根治・除去が困難な病態において、その進展速度を効率的に抑制することで、患者 QOL の向上に寄与することを最終的な目的としている。

3. 研究の方法

『尿細管・間質領域』特異的に集積するペプチドの決定

具体的には糖尿病性腎症モデルラットに対して、ファージディスプレイペプチドライブラリー法による *in vivo* バイオパニングをおこなった。アクティブな指向性として『尿細管・間質領域』特異的に集積するペプチドを回収するために、腎からファージを回収する際には、腎をふるい上で濾し、糸球体との分離操作を実施した。これにより回収ファージの『尿細管・間質領域』に対する特異性を向上させることを試みた。

糖尿病性腎症尿細管部位で発現が増加する RAGE に対して、特異的に結合するペプチドの決定

RAGE は糖尿病性腎における発現を抑制することにより、腎障害が修復されるという報告もあり(Myint et. al. *Diabetes* 2006)、糖尿病性腎症の進展に非常に関わりが強い。その RAGE に対して、親和性の高いペプチドを決定し、実際の RAGE に対する結合親和性を細胞レベルで検討する。具体的には 96 ウェルプレートに RAGE タンパクをコートし、ペプチドライブラリーによるインビトロバイオパニングをおこなった。その後 RAGE の発現が知られている血管内皮細胞に対して各ペプチドを添加し、受容体を介する細胞応答の結果である形質変化を観察し、最適なペプチドを決定することを試みた。

各種腎尿細管・間質領域指向性リポソームの作製と指向性の評価

においてアクティブターゲティングを実現するペプチドの検討を進めている段階であったため、初期検討として肺線維化部位へ指向性が認められたペプチドの腎への応用を試みた。リン脂質(ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン)に PEG を結合させ、さらにその先に線維化部位指向性ペプチドを結合させた。この脂質をジステアロイルホスファチジルコリン、コレステロールといった脂質と混合し、パンガム法によって脂質二重膜からなるリポソームを調製した。粒子系は 100 nm に調整した。3種類の組成の異なるリポソームを調製した。またそれぞれには蛍光脂質(DiIc₁₈)によるラベルを施し、半月体性糸球体腎炎モデルラットに対して尾静脈内投与した後、3時間で腎を摘出し、凍結切片を作成して免疫染色をおこなった。共焦点レーザースキャン顕微鏡で観察し、線維化部位、腎尿細管・間質領域への集積を評価した。

・ステロイド剤内封腎尿管・間質領域指向性リポソームの作製とその治療効果の評価

リポソームへのステロイド剤（ヒドロコルチゾン）の内封は、リポソーム脂質二重膜内に溶かし込むことによりおこなった。ステロイド内封リポソームの作用をラット腎尿管上皮細胞へ炎症性刺激を加えたところに添加し、確認することとした。

4. 研究成果

・『尿管・間質領域』特異的に集積するペプチドの決定

月齢の異なる3匹の糖尿病モデルラットにおいて、ファージディスプレイペプチドライブラリー法によるインビトロパニングを実施した。腎内の『系球体』と『尿管・間質領域』を分離することにより、それぞれの月齢において特異的に集積したと考えられるペプチドを数候補見出した。現在はパニングの2回目を完了しており、投与したファージに対して『尿管・間質領域』に集積したファージの収率はまだ $10^{-6}\%$ あたりであるため、今後これらのファージによるバイオパニングを2、3度行うことにより、特異性を持ったペプチド配列を決定する予定である。月齢による違いが見られたことより、時期によって標的が変わっている可能性が考えられるため、病態に応じた薬物送達を検討することの有用性が示唆された。

・糖尿病性腎症尿管部位で発現が増加する RAGE に対して、特異的に結合するペプチドの決定

当初計画していたコンピューターシュミレートによる検索では候補が大量な上に、その後の絞り込みが困難であった。そこでリコンビナント RAGE たんぱくとペプチドライブラリーによるパニングを行い、RAGE に特異的に結合すると思われるペプチド配列候補を得ようと考え実行した。インビトロパニングを2回おこなった状況で、候補が未だに数が多いため今後さらなるパニングによる絞り込みが必要であると考えている。

・各種尿管・間質領域指向性リポソームの作製と指向性の評価

線維化部位指向性ペプチドによる修飾を施したリポソームを作製し、半月体性系球体腎炎における体内動態の解析をおこなった。リポソームが赤。線維化領域は smooth muscle actin (SMA) による免疫染色を施し緑の擬似カラーで示した。両者が局在を共にすると黄色が観察される。

・control liposome

リポソームの局在はほとんどが系球体内に限られ、『尿管・間質領域』にはほとんど認められない(図1a)。

・PEG liposome

リポソームは系球体内に主に存在していたが、一部尿管や間質領域、他にも血管内に見られた(図1b)。

・Peptide-modified liposome

動態としては PEG liposome と似ている。系球体内への存在が見られるが、それ以外の『尿管・間質領域』にも存在が認められた。一方、半月体と呼ばれる線維化部位への集積した唯一認められたことから、ペプチドによって特異性がもたらされたものと考えられる(図1c)。

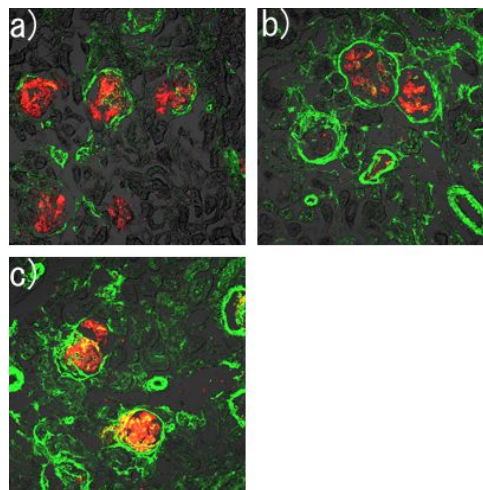


図1 各リポソームの動態解析

a) control liposome、b) PEG liposome、

c) Peptide-modified liposome.

赤はリポソーム (DiIc₁₈)

緑は SMA 免疫染色。

集積した量の定量を行った結果、control > PEG > Peptide-modified liposome となった。control は静脈内投与後恐らく肝臓や脾臓といった細網内皮系と呼ばれる臓器に非特異的にトラップを受けつつ、そこを抜けたりリポソームが系球体に詰まった状態であると考えられる。PEG と Peptide-modified に関しては、両者の表面にある PEG による水和効果により、細網内皮系を抜け、全身を循環しているために定量結果は低かったと考えられる。また PEG 修飾は、炎症を起こした部位における血管透過性向上により、受動的に集まることが期待され、実際『尿管・間質領域』への漏出が観察された。線維化部位とリポソームの定量において相関が見られたことも非常に興味深く、今後あらたな展開が期待される。

以上より、c) においてのみ半月体（線維化部位）にもリポソームが見られることから、指向性ペプチドの腎における有用性が示され、間質領域への薬物送達に向けた初期検討

を行うことが出来た。今後この Peptide-modified liposome に実際に薬物を内封して、治療効果に関する検討を行う予定である。

・ステロイド剤内封腎尿細管・間質領域指向性リポソームの作製とその治療効果の評価

ヒドロコルチゾン（DEX）をリポソーム膜内に封入し、その封入率の算出を HPLC または吸光度測定によって可能とする系を確立した。このリポソームを、あらかじめ炎症性反応を惹起したラット近位尿細管上皮細胞（NRK52E 細胞）に添加した。その後 mRNA を抽出し、単球マクロファージに対する遊走活性をもつ MCP-1 の発現を遺伝子レベル（リアルタイム PCR）で調べたところ、濃度依存的に発現が抑えられることを確認した（図 2）。

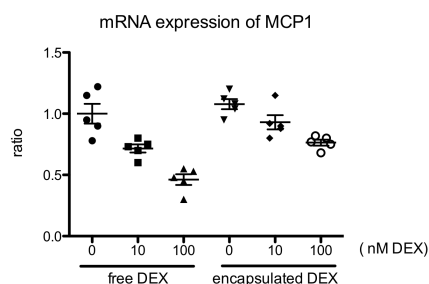


図 2 MCP-1 の発現変化

NRK52E 細胞に対して IL-1（最終濃度 5 ng/mL）を添加し、デキサメタゾン DMSO 溶液（free DEX）またはリポソーム封入デキサメタゾン（encapsulated DEX）を添加した。

縦軸は、free DEX の 0 nM DEX における発現量を『1』として、相対値で発現量を示している。

今後 1. のバイオパニングを繰り返すことで収率を上げ、集積ペプチドの選別が完了次第、そのペプチドによる表面修飾を施したリポソームにステロイドを内封し、動態解析、治療効果の検討へと迅速に進めるだけの成果を得ることが出来た。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計 1 件）

佐藤博規、米澤正、Komatsu Masanobu、畠山祐実、川崎靖、杉山晶規、名取泰博

『腎線維化組織指向性リポソームの作製と動態解析』

第 53 回日本薬学会東北支部会 2014 年 10 月 5 日いわき明星大学（福島）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 正（YONEZAWA SEI）

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50469988