

肝クッパー細胞を標的とした抗酸化 DDS 戦略の構築と包括的肝疾患治療への展開  
医療薬学専攻 医療薬科学コース (薬剤学分野) 前田 仁志

活性化した肝クッパー細胞より産生される活性酸素種 (ROS) は、種々の肝障害に共通する病態進展因子であることが明らかになってきた。本研究では、クッパー細胞由来 ROS を治療標的とした抗酸化 DDS 戦略として、当研究室で作製したクッパー細胞選択的な DDS 担体の高マンノース付加アルブミン (Man-HSA) に、ROS 消去能に優れたチオール (SH) 基を複数導入した SH 基修飾 Man-HSA (SH-Man-HSA) を開発し、各種急性及び慢性肝疾患に対する有用性を評価した。以下に今回得られた知見を要約する。

### 1. SH-Man-HSA の立体構造解析、体内動態特性及び抗酸化能の評価

イミノチオランを用いて平均7.5個のSH基をMan-HSAに導入したSH-Man-HSAを作製した。その際、SH基の導入によるMan-HSAの立体構造変化は認められなかった。また、それを反映して、SH-Man-HSAの体内動態特性はMan-HSAのものと良く類似しており、血中から素早く消失し、大部分が肝臓へ分布していた。SH-Man-HSAの肝臓内局在を明らかにすべく、蛍光イメージング解析を行ったところ、投与1時間後において、SH-Man-HSAはCD68<sup>+</sup>クッパー細胞に発現する1型マンノース受容体 (MRC1) を介して細胞内にSH基を送達している可能性が示された。EPRによりSH-Man-HSAの抗酸化能を評価した結果、ヒドロキシラジカル (*in vitro*) 及び脂質ラジカル (LOO<sup>•</sup>; *in vivo*) の産生を抑制した。これらの結果はAcetaminophen肝障害モデルマウスの各種酸化ストレスマーカーの解析からも裏付けられた。さらに、このSH-Man-HSAの抗酸化能を反映して、抗アポトーシス作用が認められた。従って、SH-Man-HSAはMRC1を介してCD68<sup>+</sup>クッパー細胞選択的にSH基を送達し、肝臓中酸化ストレスを効率良く抑制することが明らかとなり、当初の狙いであるクッパー細胞由来ROSを治療標的とした抗酸化DDS戦略としての条件を満たしていることが実証された。

### 2. 急性肝障害に対する SH-Man-HSA の有用性評価

ウイルス性及び自己免疫性肝炎モデルであるConcanavalin-A (Con-A) 誘導急性肝障害モデルマウスを用いてSH-Man-HSAの肝保護効果を検証したところ、20.0 µmol SH/kgの投与量でほぼ完全にCon-A誘導急性肝障害を抑制した。その際、ConA処理により大幅に低下した肝臓中SH基含量は、SH-Man-HSA投与により、正常マウスレベルまで回復した。この結果を反映して、Con-A処理により亢進したクッパー細胞由来ROS、肝臓中LOO<sup>•</sup>、過酸化物の蓄積は顕著に抑制された。一方、急性肝障害治療薬であるN-アセチルシステイン (NAC) を比較対照群として用いたところ、肝保護効果は認められたが、その程度はSH-Man-HSAに比べて大きく劣っていた。これは、SH-Man-HSAとNACの肝臓へのSH基供給度の差異を反映した結果であることが示された。また、SH-Man-HSAによる酸化ストレス抑制効果は、クッパー細胞の表現型や炎症性サイトカインの産生と

は独立した機序であることが確認された。臨床応用を想定し、SH-Man-HSAの肝障害発症後の後投与による治療効果と、肝障害の劇症化に対する救命作用について検討した。その結果、SH-Man-HSAはNACと比較して優れた救命作用と後投与での治療効果を発揮し、病態発症後の治療開始時間を延長する可能性が示された。加えて、SH-Man-HSAは繰り返し投与しても、抗酸化活性ひいては肝保護効果が耐性化しなかった。これらの結果から、SH-Man-HSAは、自身のマンノース及びSH基を介した迅速かつ強力な抗酸化効果によって優れた肝保護効果を発揮する結果、現行の急性肝障害治療薬の課題である治療開始時間の延長、救命効果の向上を克服できる可能性を秘めており、各種の急性肝障害に対する治療薬としての応用が期待される。

### 3. 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に対するSH-Man-HSAの有用性評価

メチオニン・コリン欠損食餌 (MCD) 及び高脂肪食 (HFD) 給餌で誘発した2つのNASHモデルマウスを用いて、SH-Man-HSAのNASH病態改善効果を検討した。予想に反し、SH-Man-HSAはNASHモデルマウスに対して肝保護作用を発揮しなかった。NASHの病態形成に伴う病理学的・機能的変化を検討した結果、NASH時には、肝内血行動態の破綻とMRC1の発現低下により、SH-Man-HSAのクッパー細胞移行性が低下しており、これらが抵抗性の原因であると推察された。そこで、上記2つの治療障壁を克服する手段として、NOが有する血管拡張効果と低酸素誘導因子 (HIF)  $-1\alpha$ の安定化を介した2型マンノース受容体 (MRC2) の発現誘導能に着目し、NOドナーとSH-Man-HSAの併用療法を考案した。まず、RAW 264.7細胞を用いた検討において、NOドナーであるNONOateはHIF- $1\alpha$ の発現上昇に伴うMRC2の誘導により、Man-HSAの取り込みを増加させた。さらに、2週間のMCD給餌NASHモデルマウスに対して、NOドナーであるニトロダーム-TTS (NO-TTS) とSH-Man-HSAを併用したところ、肝内血行動態の改善及びMRC2の発現上昇を介して、SH-Man-HSAのクッパー細胞内移行量を増加させるとともに、それを反映してROS除去能を回復させた。そこで、MCD給餌を4週間まで延長したNASHマウスに対して、NO-TTS+SH-Man-HSA (5.0  $\mu\text{mol SH/kg}$ ) 併用療法を実施したところ、肝内酸化ストレスを抑制する結果、肝保護効果、脂質蓄積及び線維化抑制効果が認められた。さらにNO-TTS+SH-Man-HSA併用療法は、HFD誘導NASHモデルマウスに対してもクッパー細胞由来ROSを抑制することで肝保護効果を発揮した。臨床応用を想定し、NOとSHを逐次的に供給可能なハイブリッド体としてSNO-Man-HSAを新たに開発したところ、NASHモデルマウスに対してNO-TTS+SH-Man-HSA併用療法に匹敵する肝保護効果を発揮した。

以上、本研究はSH-Man-HSAを基軸とした抗酸化DDS戦略が、各種急性及び慢性肝疾患に対して有用であることを実証した。今回得られた知見は、治療標的臓器の形態学的及び機能学的病態特性を基盤とした疾患応答DDS戦略の重要性を実証した初めての研究成果であり、今後のDDS製剤開発における有用な基礎資料になるものと思われる。