

学位論文題名

Vascular-targeted nanotherapy with a dual-targeting strategy to obesity control

(肥満治療を指向した血管を標的とするナノ医療戦略)

学位論文内容の要旨

Antiangiogenesis has been the focus of a new strategy for the management of obesity. We herein describe a novel concept of vascular-targeted nanotherapy to obesity control. The surface of nanoparticulate system was first modified with an adipose tissue-specific linear peptide ligand (KGGRAKD) via a short polyethylene glycol (PEG) spacer. To evaluate the specificity of the carrier, we purified primary endothelial cells from adipose tissue (pcEC-IWAT). The nanoparticulate system (Pep-PEG_{2kDa}-NP) bound only to pcEC-IWAT and not to other endothelial cell lines, such as MBEC-4 and MFLM-4. The mechanism for the intracellular uptake of Pep-PEG_{2kDa}-NPs into pcEC-IWAT was mediated via prohibitin-mediated endocytosis, as evidenced by three independent experiments, saturation of receptor binding sites by excess free peptide, the blocking of receptors by an anti-prohibitin antibody and low temperature (4°C) experiments. *In vivo* evaluation of targeting activity of nanoparticles to white fat vessels (WV) indicated that the targeted accumulation of NPs modified with this prohibitin-homing peptide via a long PEG_{5kDa}-linker in WV of mice were significantly increased by co-modification with a hydrophilic PEG_{2kDa} polymer, whereas the undesired accumulation of PEGylated targeted NPs in the liver was considerably reduced. These results demonstrate that the PEGylation of targeted NPs is a critical factor in maximizing the *in vivo* targeted delivery of NPs, a process that can be attributed to a significant decrease in recognition by the reticuloendothelial system. Thus, we denoted this *in vivo* optimized PEGylated targeted NPs as prohibitin targeted nanoparticles (PTNP). In addition, the co-localization of double labeled-PTNP [an integrated lipid membrane (NBD-DOPE) and aqueous core (rhodamine) in the same nanoparticle] to WV indicates that PTNP remains intact inside the circulation and therefore show promise for the successful delivery of an aqueous phase marker to a target using a system that mimics the delivery of small-molecule drugs, proteins, peptides and nucleic acids.

Cytochrome C (CytC), a proapoptotic protein which is rapidly cleared from the circulation (t_{1/2}: 4 min), is loaded in PTNP using a strategy that permitted it to be shielded from external inactivating effects, thus permitting its delivery to the site of action. The functional activity of CytC-loaded PTNP was confirmed *in vitro* and *in vivo* by the observations that CytC-loaded PTNP could cause endothelial cell apoptosis, resulting in the destruction of the vascular architecture in adipose tissue. Treatment with CytC-loaded PTNP resulted in a significant weight loss in a dose-dependent manner in high-fat diet fed *wt* mice, as evidenced by the decrease in fat mass and serum leptin levels. We also confirmed that no detectable hepatotoxicity accompanied the

observation. Thus, this finding may unveil a promising potential of CytC as a novel anti-obesity drug for the prevention of diet-induced obesity.

Furthermore, to extend the applicability of the PTNP system in terms of treating obesity, a proapoptotic peptide, $[_D(KLAKLAK)_2, KLA]$ was encapsulated, as denoted by KLA-PTNP and then the advantages of the KLA-PTNP over the conjugate system (Adipotide) composed of the same targeting peptide and proapoptotic domain was investigated. Compared to the use of Adipotide, KLA-PTNP caused a significant reduction in body weight, adipocyte hypertrophy, adipose tissue hyperplasia, ectopic fat deposition in liver and muscle as well as infiltrated macrophage contents in DIO mice. Surprisingly, we found that PTNP had the attractive potential to passively accumulate around the angiogenic regions that particularly appeared in obese white fat. Therefore, the targeted nanotherapy is mechanistically superior vis-à-vis peptidomimetic for obesity treatment, in that the targeted delivery of nanoscaled carriers into the angiogenic region of obese adipose tissue could be passively promoted via a physical property (enhanced permeability) of a discontinuous architecture in angiogenic vessels. Taken together, this work may, in the near future, offer a paradigm shift in the discovery and development of anti-obesity drugs for the management of obesity.

学位論文審査の要旨

主査	教授	原島	秀吉
副査	教授	武田	宏司
副査	准教授	秋田	英万
副査	特任准教授	梶本	和昭

学位論文題名

Vascular-targeted nanotherapy with a dual-targeting strategy to obesity control

(肥満治療を指向した血管を標的とするナノ医療戦略)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

近年、動脈硬化や糖尿病といった生活習慣病の罹患者数は増加の一途を辿っており、未だ有効な治療法は確立されていない。これらの生活習慣病の多くは肥満、特に内臓脂肪型肥満を基盤として発症することが明らかにされており、肥満を早期に治療あるいは予防することが生活習慣病の進展を予防する最も有効な方法と考えられている。しかしながら、現在までに臨床応用されている抗肥満薬の多くは、中枢神経系に作用して食欲を抑制する、もしくは消化管における脂肪吸収を阻害するといった戦略に基づいており、いずれも有効性・安全性の面で問題を抱えている。従って、安全で効果的な肥満治療のための新たな戦略とそれを実現するための新たな技術開発は、極めて重要な研究課題と言える。

本論文は、肥満の本体である脂肪組織に栄養と酸素を供給する血管の重要性に着目し、脂肪組織の血管が有する他の臓器の血管とは異なる性質を利用して選択的な薬物送達を可能にする薬物送達システムの開発と血管を標的とする肥満治療戦略の創出を目的としたもので、学術的にも極めて独創性の高い研究である。特に、薬物送達システムの開発研究という観点からは、標的細胞に対して高い親和性を示すペプチドをリガンドとして搭載したリポソーム型薬物キャリアーの開発に成功した。その際、*in vivo*における能動的な薬物送達において、単に標的化リガンドを搭載するだけでは不十分であり、PEG修飾の併用によってリポソームの立体的安定性を高めることが極めて重要であることを見出した。これらは未だ十分な成功例のない能動的ターゲティングに基づく選択的薬物送達システムの製剤設計において極めて有益な知見である。これに加え、著者は「脂肪組織の血管を標的とする肥満治療」という新たな戦略の実現可能性を検証するため、細胞内に取り込まれることでアポトーシスを誘導する2種類の分子(D(KLAKLAK)₂ペプチド、cytochrome c)を用い、これらを封入した脂肪血管標的型リポソームを肥満モデルマウスに尾静脈より投与し、高脂肪食を任意に摂取させた状態でも顕著な抗肥満効果を発揮できることを実証した。さらに、肥満の予防にも有効であることを示しただけでなく、正常な体重増加には影響を及ぼさないことを明らかにしており、臨床応用上も極めて有用性の高い知見と言える。更に、腫瘍への薬物送達においては、粒子径100nm程度の血中滞留性ナノ粒子が受動的に集積しやすい性質(enhanced permeability and retention (EPR)効果)を利用するのが一般的であるが、肥満動物の脂肪組織においても同様の現象が認められることを見出した。これは、薬剤学的な観点からも極めて意外な発見であると同時に、今後の肥満治療を目的とした創薬・製剤開発におけるgold standardとなり得る極めて有益な知見と言える。

これを要するに、著者は、脂肪組織の血管を標的とする薬物送達キャリアーが、肥満という特殊な疾患組織の構造的特徴によって受動的な集積と能動的な標的認識の双方の機序を併せ持つこととなり、高い選択性と有効性を兼ね備えたナノ医療システムとして応用可能であるとの新知見を得たものであり、安全かつ効果的な肥満治療法の確立、更には、全世界が直面しているメタボリックシンドロームの脅威を克服する次世代医薬の創出に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(生命科学)の学位を授与される資格あるものと認める。