

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08076

研究課題名(和文) HSAを基盤としたNOやH2Sの輸送システムの解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Development of transport system of NO and H2S based on Human serum albumin

研究代表者

異島 優 (ISHIMA, Yu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・准教授

研究者番号：00457590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、『HSAによる生理活性ガスの内因的な輸送システムの全容解明とその臨床応用』を二大柱とし、NOによる修飾(Cys-SNO)やH2Sによる修飾(Cys-SSH)の生成メカニズムの解明を行ってきた。その結果、NOとH2Sの間に、生理活性ガス分子間のクロストークが存在することが推察された。また、Cys-SSHを測定する中で、新規に開発した測定方法により、HSAには多量にCys-SSS-Cysが存在すること、さらには、このCys-SSS-Cysは酸化ストレスに鋭敏に反応し、病態初期から変動することも明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：This research is based on "the complete elucidation of the endogenous transport system of physiologically active gases by HSA and its clinical application", and the generation mechanism of modifications with NO or H2S have been clarified. As a result, it was inferred that crosstalk between NO and H2S. Also, in the measurement of Cysteine persulfide, it was confirmed that an oxidized form of polysulfide was abundantly present in HSA by the newly developed measurement method, and this oxidized form of polysulfide reacts sensitively to oxidative stress. It was also possible to clarify that it changes from the early stage of the disease state.

研究分野：薬剤学

キーワード：ヒト血清アルブミン 活性イオウ 一酸化窒素 酸化ストレス疾 美白作用

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) は、生理活性ガス分子としてすでに同定されている昨今、これに続く第3のガス分子として、硫化水素 (H_2S) が注目を浴びている。これら生理活性ガス分子には、循環血中を安定に輸送する内因的なシステムが構築されており、ヒト血清中の HSA や赤血球中のヘモグロビンが NO や CO のそれにあたる。ただ、 H_2S の輸送システムに関しては、不明な点が多い。その H_2S 研究を複雑化する要因の1つに、硫黄の酸化度由来する遊離硫化水素や酸揮発性硫化物の多様性が挙げられる。これに関し、2014年に赤池らによって cystathionine- β -synthase (CBE) や cystathionine- γ -lyase (CSE) といった硫化水素合成酵素とされていたものが、実は、システインパースルフィド (Cys-SSH) やグルタチオンパースルフィド (G-SSH) を直接的に産生することが見出され、これらパースルフィド化合物は強力な抗酸化作用を有するという興味深い報告がなされた。加えて、Snyder らにより、2013年にタンパク質のパースルフィド (SSH-Protein) の存在とそのパースルフィド修飾による活性制御が明らかにされた。これらの知見は、 H_2S の研究の上で、極めて重要なブレイクスルーとなった。

こうした背景のもと、我々はまず、NO のデリバリーシステムを構築し臨床応用すべく、NO を付加させた HSA (SNO-HSA) の研究を通して、『ガス分子を循環血中において安定かつ適材適所に供給するには、1 から担体を作るのではなく、内因的な輸送システムを利用・活用するほうが効率的である』ことや『NO などの多機能性ガス分子は、非常に広域な疾患への応用が期待できる』ことを実証してきた。次に、 H_2S のデリバリーシステムの構築に着手し、NO と同様に、HSA をまずキャリアとして利用したところ、HSA には、非常に多くの過イオウ化が内因的に起こっている事実を突き止めた。このことは、NO のみならず、 H_2S もまた HSA の輸送タンパクとして機能している可能性を示唆するものであった。

2. 研究の目的

以上の研究結果ならびに研究背景から、『HSA を基盤とした NO や H_2S の輸送システムの解明とその臨床応用』を本研究の目的として、『NO 運搬型 HSA 研究』の基盤を用いて、まずは、『 H_2S 運搬型 HSA 研究』へ展開させて行くものである。具体的には、①生理活性ガスの内因的な輸送システムの全容解明と②それら輸送システムを生かした酸化ストレス疾患治療法の開発を二大柱とし、唯一の遊離型システイン ^{34}Cys への NO による修飾 (Cys-SNO) から、 H_2S による修飾 (Cys-SSH) の生成メカニズムの解明、 ^{34}Cys -SSH の定量法の開発ならびに病態と

の関連性、 ^{34}Cys -SSH 化作製を行い、生物活性の解析や酸化ストレス疾患への応用やさらに薬物を結合させたポリサルファイドリンカー型 DDS キャリアの開発を3年間の研究期間で明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遊離型システイン ^{34}Cys への NO や H_2S による修飾の生成メカニズムの解明

まず、HSA に存在する遊離システイン ^{34}Cys を NO 供与剤 (NOC7 や GSNO) ならびに H_2S 供与剤 (NaHS や Na 2 Sx) を用いて、*in vitro* で修飾する。その際、 ^{34}Cys が還元や酸化状態である条件で検討し、どのような条件下で効率的にそれぞれの修飾を受けるかを検討する。その際、生成した SNO 基の定量は、既設してある Griess 試薬を用いた Flow-reactor system の HPLC 解析法を使用する。一方、SSH 基の定量は、Dr. Xian が開発した SSH 検出蛍光プローブを用いた検討に加え、すでに当研究室で HSA の SSH 基の検出系として確立させた図2に示す蛍光検出法、さらには、同仁化学との共同研究で行っている DDT を用いた変法メチレンブルー法の3種の検出系によって、総合的に SSH 基の定量を行っていく。これらの結果から、HSA への NO ならびに H_2S の反応特性を探る。

(2) 酸化ストレス病態時の生体サンプルにおける ^{34}Cys -SSH の定量

まずは、動物モデルにおける慢性腎不全ラットモデルや肝炎モデル、大腸癌モデルマウスなどにおいて、血清中の ^{34}Cys -SSH の定量を試みる。これらモデルに関しては、すでに当研究室にておいて構築可能な体制である。 ^{34}Cys -SSH の定量は、1. で述べた評価系を使用する予定である。動物実験におけるデータが蓄積した後に、慢性腎臓病患者や肝炎患者、糖尿病の患者等の血清サンプルや唾液サンプルを使用し、 ^{34}Cys -SSH の定量ができればと考えている。

(3) ^{34}Cys -SSH 化 HSA や Poly-SSH 化 HSA の作製とその生物活性の解析

^{34}Cys -SSH 化 HSA の作製に関しては、1. のデータに基づいて行う。Poly-SSH 化 HSA の作製に関しては、これまでに報告してきた Poly-SNO-HSA の作製方法 (HSA に、Lys 残基のアミノ基に SH を導入する目的でイミノチオランを添加し、その後亜硝酸イソペンチルにて SNO 化を行うもの) に H_2S 供与剤を加える方法が使用できると考えている。また、これらの生物活性解析は、HSA の元来有するリガンド結合能や抗酸化活性、エステラーゼ様活性における ^{34}Cys -SSH 化の影響などから着手し、酸化ストレス疾患 (慢性腎臓病や慢性肝疾患、敗血症など) モデルマウスへの ^{34}Cys -SSH 化 HSA や Poly-SSH 化 HSA 投与実験にて、その有用性を評価する。評価項目は、血清 LDH 評価をはじめ、肝臓や腎臓の機能評価 (AST、ALT、BUN など)、細胞死 (アポトーシス、ネクローシス) の形態や各種抗体による免疫染

色やウェスタンブロット等の評価を行い、関連するシグナル分子を同定する予定である。加えて近年、癌幹様細胞において、多選択性アミノ酸トランスポーター(xCT)が高発現し、シスチン (Cys-SS-Cys) の取り込みにより、抗酸化能を高めていることが明らかにされた。Poly-SSH 化 HSA は、このシスチンを補足することで、このシグナルを止めることが予想されるため、癌幹様細胞系の動物モデルも検討に含めている。それらの結果、どのような疾患に対し有効性があるかを精査し、治療薬としての開発を目指す。

(4) ポリサルファイドリンカー型 DDS キャリアの開発

この計画は、上記研究における発展的な部分ではあるが、今後のポリサルファイド研究への大きな架け橋となる可能性が高く、上記計画に目処が付き次第、着手する予定である。例えば、Poly-SSH 化 HSA に対して、SH-SS 交換反応を利用し、シスチン (Cys-SS-Cys) を反応させる。その生成物には、多分子の Cys が HSA にトリスルフィド (S-S-S) を介して結合しており、トリスルフィドの開裂に伴い放出される Cys-SH が細胞内の抗酸化剤として働き、一方の Cys-SH 放出後の Poly-SSH 化 HSA は、循環血中の抗酸化剤として働く。このようなそれぞれの環境に応じた抗酸化剤を必要な部位で開裂・放出させることが可能となる。また、シスチンを抗癌剤などの薬物に置き換えれば、トリスルフィドによるコントロール・リリースが可能になる。S-S 結合を介したコントロール・リリースと比較し、還元反応のみならず酸化反応によっても開裂可能であることが大きな違いとなる。つまり、酸化ストレスが高まった部位にて容易に開裂することができるリンカーである。

4. 研究成果

まず、遊離型システイン ^{34}Cys への NO による修飾 (Cys-SNO) から、 H_2S による修飾 (Cys-SSH) の生成メカニズムの解明、 ^{34}Cys -SSH の定量法の開発ならびに酸化ストレス病態との関連性を *in vitro* や生体サンプルを用いた解析を行ってきた。その結果、Cys-SSH の修飾には、一部 Cys-SNO から生成することが示唆されたことから、NO と H_2S の間に、生理活性ガス分子間のクロストークが存在することが推察された。つまり、NO もしくは H_2S によって、SH 基に修飾が入り、反応性が向上することで、さらなる修飾を引き起こすといった正のスパイラルが生まれることを示唆している。また、Cys-SSH を測定する中で、新規に開発した測定方法である Elimination Method for Sulfide from Polysulfide (EMSP) により、HSA には多量に Cys-SSS-Cys が非常に多く存在することを明らかにすることができた (図1)。本発見は、血清中イオウのリザーバーとして HSA が機能しているという新しい知見である。興味深いことに、ヒトにおいて、この Cys-SSS-Cys は

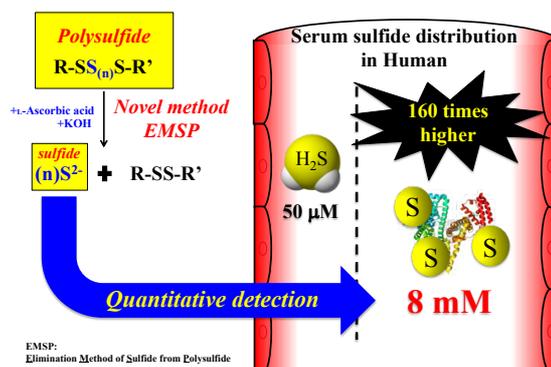


図1 ヒト血清における活性イオウ分布

酸化ストレスに鋭敏に反応し、病態初期から変動することも明らかにすることができた。その一方で、 ^{34}Cys -SSH 化 HSA や Poly-SSH 化 HSA の作製を行い、生物活性の解析や酸化ストレス疾患への治療薬としての応用を病態モデルにて検討した。まず取り組んだこととして、 ^{34}Cys -SSH 化 HSA の美白作用に関して、メラノーマ細胞を用いてその美白効果を実証した。具体的には、UV 由来の活性酸素種や一酸化窒素の産生に対して、 ^{34}Cys -SSH 化 HSA は強力に抑制すること、加えて、メラニンの生成に寄与しているチロシナーゼの活性を抑制することが明らかになった (図2)。本知見は、すでに論文化並びに特許として公表するに至っている。

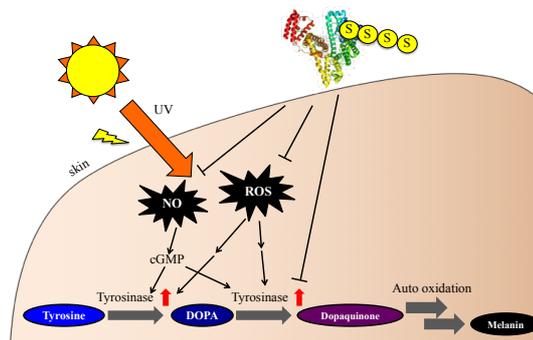


図2 SSH化HSAの美白作用メカニズム

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)

[雑誌論文] (計 31 件)

- Oshiro S, Ishima Y, Maeda H, Honda N, Bi J, Kinoshita R, Ikeda M, Iwao Y, Imafuku T, Nishida K, Miyamura S, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. Dual Therapeutic Effects of an Albumin-Based Nitric Oxide Donor on 2 Experimental Models of Chronic Kidney Disease. *J Pharm Sci*. 2018 (査読有) 107(3):848-855. doi: 10.1016/j.xphs.2017.10.023.
- Ikeda M, Ishima Y, Kinoshita R, Chuang VTG, Tasaka N, Matsuo N, Watanabe H, Shimizu T, Ishida T, Otagiri M, Maruyama T. A novel S-sulphydrated human serum albumin preparation suppresses melanin synthesis. *Redox Biol*. 2018 (査読有)

- 14:354-360. doi: 10.1016/j.redox.2017.10.007.
- 3) Kinoshita R, Ishima Y, Chuang VTG, Nakamura H, Fang J, Watanabe H, Shimizu T, Okuhira K, Ishida T, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. Improved anticancer effects of albumin-bound paclitaxel nanoparticle via augmentation of EPR effect and albumin-protein interactions using S-nitrosated human serum albumin dimer. *Biomaterials*. 2017 (査読有)140:162-169. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.06.021.
 - 4) Ikeda M, Ishima Y, Chuang VTG, Ikeda T, Kinoshita R, Watanabe H, Ishida T, Otagiri M, Maruyama T. Apoptosis induction of poly-S-nitrosated human serum albumin in resistant solid tumor under hypoxia can be restored by phosphodiesterase 5 inhibition. *Nitric Oxide*. 2017 (査読有) 69:28-34. doi: 10.1016/j.niox.2017.04.005.
 - 5) Ikeda M, Ishima Y, Shibata A, Chuang VTG, Sawa T, Ihara H, Watanabe H, Xian M, Ouchi Y, Shimizu T, Ando H, Ukawa M, Ishida T, Akaike T, Otagiri M, Maruyama T. Quantitative determination of polysulfide in albumins, plasma proteins and biological fluid samples using a novel combined assays approach. *Anal Chim Acta*. 2017 (査読有) 969:18-25. doi: 10.1016/j.aca.2017.03.027.
 - 6) Ishima Y. Albumin-Based Nitric Oxide Traffic System for the Treatment of Intractable Cancers. *Biol Pharm Bull*. 2017 (査読有) 40(2):128-134. doi:10.1248/bpb.b16-00867.
 - 7) Shibata A, Ishima Y, Ikeda M, Sato H, Imafuku T, Chuang VTG, Ouchi Y, Abe T, Watanabe H, Ishida T, Otagiri M, Maruyama T. Human serum albumin hydropersulfide is a potent reactive oxygen species scavenger in oxidative stress conditions such as chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 (査読有) 479(3):578-583. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.113.
 - 8) Kinoshita R, Ishima Y, Ikeda M, Kragh-Hansen U, Fang J, Nakamura H, Chuang VT, Tanaka R, Maeda H, Kodama A, Watanabe H, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano-EPR enhancer applied to macromolecular anti-tumor drugs such as micelles and liposomes. *J Control Release*. 2015 (査読有) 217:1-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.036.
- [学会発表] (計 38 件)
- 1) ポリスルフィド運搬体としてのヒト血清アルブミン、池田真由美、異島 優、清水太郎、居原秀、赤池孝章、丸山 徹、石田竜弘、日本薬学会第 138 年会「大原学園金沢校 (石川県金沢市)」、2018/3/26-28
 - 2) 新規抗がん剤としての活性イオウ付加アルブミンの設計、松尾菜々、池田真由美、清水太郎、異島 優、石田竜弘、第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会「徳島大学 (徳島県徳島市)」、2017/10/22-23
 - 3) 酸化ストレスに応答するポリスルフィド化血清タンパク質の同定、池田真由美、異島 優、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹、石田 竜弘、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会「つくば国際会議場 (茨城県つくば市)」、2017/6/29-30
 - 4) ヒト血清アルブミンにおける活性イオウの検出と機能解明、池田真由美、異島 優、田坂菜々美、清水太郎、渡邊博志、小田切優樹、丸山 徹、石田竜弘、第 17 回日本 NO 学会学術集会「阿波観光ホテル (徳島県徳島市)」、2017/5/19-20
 - 5) 活性イオウトラフィックタンパク質としてのヒト血清アルブミンの役割、池田真由美、異島 優、田坂菜々美、清水太郎、渡邊博志、小田切優樹、丸山 徹、石田竜弘、日本薬剤学会第 32 年会「大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)」、2017/5/11-12
 - 6) 新規酸化ストレス早期発見に向けた血清パースルフィド定量の有用性評価、池田真由美、異島 優、渡邊博志、石田竜弘、小田切優樹、丸山 徹、第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2016/11/17-18「名古屋市立大学大学院薬学研究科・薬学部 (愛知県名古屋市)」
 - 7) PEG リポソームへのアルブミン修飾は、抗 PEG 抗体の産生を抑制する、山崎 仁王、異島 優、清水 太郎、石田 竜弘、日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 2016/11/6-7「就実大学 (岡山県岡山市)」
 - 8) ナノ EPR 増強剤である NO 付加アルブミンダイマーは Abraxane® の腫瘍移行を促進することで治療効果並びに安全性を向上させる、木下 遼、異島 優、池田 真由美、中村 秀明、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹、第 31 回日本薬物動態学会 2016/10/13-15「キッセイ文化ホール 松本市総合体育館 (長野県松本市)」
 - 9) S-Nitrosated human serum albumin dimer as a novel nano EPR enhancer applied to nanotechnology based anticancer drugs, Ryo Kinoshita, Yu Ishima, Mayumi Ikeda, Jun Fang, Hiroshi Maeda, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, 2016 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition 2016/7/17-20「Seattle, (USA)」
 - 10) Therapeutic potential of S-nitrosated α 1-acid glycoprotein as a novel antibacterial

- agent, Kotaro Matsusaka, Yu Ishima, Kaori Watanabe, Hiroshi Watanabe, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, 第9回国際NO学会(The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide) 2016/5/20-22 「仙台国際センター (宮城県仙台市)」
- 11) Sulfide Anti-Oxidant Buffer Enables Polysulfur to Be Detected by Methylene Blue Assay, Mayumi Ikeda, Yu Ishima, Motonori Shibata, Hiroshi Watanabe, Ming Xian, Yuya Ouchi, Takaaki Akaike, Toru Maruyama, 第9回国際NO学会(The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide) 2016/5/20-22 「仙台国際センター (宮城県仙台市)」
 - 12) UW SOLUTION IMPROVED WITH HIGH ANTI-APOPTOTIC ACTIVITY BY S-NITROSATED HUMAN SERUM ALBUMIN, Yu Ishima, Takuya Shinagawa, Shinji Yoneshige, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, 第9回国際NO学会(The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide) 2016/5/20-22 「仙台国際センター (宮城県仙台市)」
 - 13) S-ニトロソ化 α 1-酸性糖タンパク質による癌治療への応用、松坂幸太朗、異島 優、木下 遼、渡邊博志、小田切優樹、丸山 徹、日本薬学会 第31回年会 2016/5/19-21 「長良川国際会議場、岐阜都ホテル (岐阜県岐阜市)」
 - 14) ナノEPR増強剤であるNO付加アルブミンダイマーは 難治性癌における高分子抗癌剤抵抗性を改善する、木下 遼、異島 優、池田真由美、中村 秀明、方 軍、前田 浩、小田切優樹、丸山 徹、日本薬学会 第31回年会 2016/5/19-21 「長良川国際会議場、岐阜都ホテル (岐阜県岐阜市)」
 - 15) ヒト血清アルブミンにおける活性イオウ分子種の検出と構造・機能への影響、池田 真由美、異島 優、渡邊 博志、大内 雄也、Ming Xian、赤池 孝章、丸山 徹、日本薬学会 第136年会 2016/3/26-29 「パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)」
 - 16) 血清アルブミンによる一酸化窒素トランスフィクションシステムの解明と難治性癌治療への展開、異島 優、日本薬学会 第136年会 2016/3/26-29 「パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)」
 - 17) S-Nitrosated human serum albumin dimer as novel nano EPR enhancer applied to nano-anticancer drugs, Ryo Kinoshita, Yu Ishima, Mayumi Ikeda, Jun Fang, Hiroshi Maeda, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2015 2015/11/25-27 「Bangkok (Thailand)」
 - 18) Anti-tumor effect of Poly-S-nitrosated Human Serum Albumin is enhanced by phosphodiesterase 5 inhibitors, Mayumi Ikeda, Yu Ishima, Ryo Kinoshita, Hiroshi Watanabe, Tsuyoshi Ikeda, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2015 2015/11/25-27 「Bangkok (Thailand)」
 - 19) 新規ナノ EPR 増強剤の一酸化窒素付加アルブミンダイマーによる腫瘍内環境改善作用、木下 遼、異島 優、池田 真由美、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹、第31回日本DDS学会学術集会 2015/7/2-3 「京王プラザホテル (東京都新宿区)」
 - 20) Poly-S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの HIF-1 α 抑制効果、異島 優、井上 亜希、小田切 優樹、渡邊 博志、丸山 徹、第31回日本DDS学会学術集会 2015/7/2-3 「京王プラザホテル (東京都新宿区)」
 - 21) 高分子抗癌剤治療における新規ナノEPR 増強剤としての一酸化窒素付加アルブミン二量体の有用性評価、異島 優、木下 遼、池田 真由美、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹、第15回日本NO学会学術集会 2015/6/27-28 「千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)」
 - 22) 組換え型高マンノース 付加アルブミンを担体とした 肝指向性インターフェロン α 2b の設計と肝保護効果、皆吉 勇紀、前田 仁志、異島 優、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹、日本薬学会 第30年会 2015/5/21-23 「長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール (長崎県長崎市)」
 - 23) NO 付加ヒト血清アルブミンの抗腫瘍活性における PDE 阻害剤の増強効果、池田 真由美、異島 優、木下 遼、渡邊 博志、池田 剛、小田切 優樹、丸山 徹、日本薬学会 第30年会 2015/5/21-23 「長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール (長崎県長崎市)」
 - 24) ドラッグデリバリーシステム担体としてのヒト血清アルブミン、異島 優、日本薬学会第135年会 2015/3/25-28 「神戸学院大学 (兵庫県神戸市)」
- 〔図書〕 (計 0件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 1件)
- 名称：美白化粧品、及びそれに含まれるアルブミン系化合物の製造方法
 発明者：丸山徹、池田真由美、異島優、水田夕稀
 権利者：丸山徹、池田真由美、異島優、水田夕稀
 種類：特許

番号：国際特許出願 2017JP019852
出願年月日：2017年12月20日
国内外の別： 国外

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
徳島大学大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野
<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/ykz/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

異島 優 (ISHIMA Yu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号：00457590

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

丸山 徹 (MARUYAMA Toru)
熊本大学・薬学部・教授

研究者番号：90423657

(4)研究協力者

なし