

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15008

研究課題名(和文) 血中滞留/骨髄指向型抗酸化アルブミンの創製と包括的放射線防護療法への応用

研究課題名(英文) Development of novel hybrid anti-oxidant based on albumin fusion technology and its therapeutic application on acute radiation syndrome

研究代表者

小田切 優樹 (OTAGIRI, Masaki)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80120145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、未だ有効な治療法が確立していない急性放射線症候群に対する新規抗酸化剤の開発を目的として、アルブミン創薬技術を駆使して、血中滞留型と細胞透過性を兼ね備えたハイブリッド型抗酸化アルブミンの設計に成功した。本抗酸化剤は急性放射線障害マウスに対し、優れた抗酸化・抗炎症効果を発揮する結果、臓器障害の抑制、引いては生存率を改善した。従って、今回作製したハイブリッド型抗酸化アルブミンは急性放射線障害に対する新規治療薬としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have been constructed a albumin fusion technology that is able to create albumin derivatives with multiple functions. In the present study, we attempted to develop a novel anti-oxidant that combined both blood retention property and cell penetrating activity based on albumin fusion technology. This hybrid type of anti-oxidant exhibited superior radical scavenging activity both in vitro and in vivo. In addition, this anti-oxidant showed similar blood retention property comparable to wild type albumin. Poly-sulfated glutathiones that released from hybrid albumin efficiently transferred into the cells. Moreover, hybrid albumin inhibited radiation injury effectively and hence, significantly recovered the survival rate against model mice of acute radiation syndrome via anti-oxidative and anti-inflammatory action. Thus, a hybrid type of anti-oxidant albumin that developed in this study has a potential as a novel therapeutics against acute radiation syndrome.

研究分野：薬物動態学

キーワード：組織指向性機能性アルブミン 包括的放射線防護療法 ハイブリッド型抗酸化アルブミン 体内動態特性

### 1. 研究開始当初の背景

現在、世界で運転、建築あるいは計画中の原子力発電所は約 600 基存在しており、核戦争や核テロの危機を鑑みると、常に放射線汚染の脅威と背中合わせの状態に置かれている。1986 年のチェルノブイリ原発事故や、2011 年の福島原発事故による放射能汚染は記憶に新しいところである。放射能障害のうち、急性放射線症候群は酸化ストレスによる骨髄障害と各種臓器不全(消化管、神経、心臓、肺)を引き起こし、重篤化すると死に至るため、放射線被ばくを低減化する放射線防護剤の開発が切望されているものの、未だ有効な薬剤は存在しない。申請者は遺伝子組換え法を基盤とすることで独自にアルブミン融合技術を確立し、様々な体内動態特性や生物活性を有するヒト血清アルブミン誘導体を作製することができる体制を構築している。

### 2. 研究の目的

急性放射線症候群に対する予防や治療戦としては、酸化ストレス障害から臓器を保護するための放射線防護剤が必要となる。理想的な放射線防護剤としては、強力なラジカル消去能を有する化合物の開発に加えて、それを血中に滞留して全身循環における酸化ストレスの上昇を持続的に抑制しつつ、他方で細胞内に移行して損傷臓器の酸化障害を軽減することを両立できるデリバリーシステムの構築が必要となる。本研究では、上述したアルブミン融合技術を駆使して、血清滞留性と細胞透過性を兼ね備えたハイブリッド型抗酸化アルブミンを作製し、急性放射線障害に対する治療薬の開発を試みた。

### 3. 研究の方法

これまで我々が構築してきた培養・精製方法を用いて組換え型 HSA ダイマーを調製し、それをイムノチオランで処理して中間体の poly-チオール HSA ダイマーを作製する。次いで、poly-チオール HSA ダイマーと細胞透過型のグルタチオンパーサルファイドをジスルフィド結合により融合することでハイブリッド型抗酸化アルブミン)を調製する。その後、このハイブリッド型抗酸化アルブミンの構造特性や多量体化の有無を、電気泳動、各種スペクトル法、抗体反応により評価する。また、ハイブリッド型抗酸化アルブミンのラジカル消去活性と抗アポトーシス効果を多面的に評価する。作製したハイブリッド型抗酸化アルブミンの体内動態特性を健常及び X 線照射(8Gy) マウスで解析する。最後に、X 線照射マウスに対するハイブリッド型抗酸化アルブミンの臓器保護効果と血液障害に対する影響を組織学的、形態学的評価、生化学、血液学的検査、免疫染色法により多角的に解析する。また、60 日後の生存率に対するハイブリッド型抗酸化アルブミンの改善効果を検証する。

### 4. 研究成果

本研究では、我々が独自に構築したアルブミン融合技術を駆使して、血中滞留型に富んだポリチオール HSA ダイマーと細胞透過型のグルタチオンパーサルファイドをジスルフィド結合により融合し、細胞内外で持続的に機能するハイブリッド型抗酸化アルブミンの作製に初めて成功した。ハイブリッド型抗酸化アルブミンは、アルブミンと類似した立体構造を保持している上、チオール基をグルタチオンパーサルフィドでマスクしているため、チオールの酸化修飾を防ぐことができることから、HSA と同等かつポリチオール HSA よりも安定性に優れていた。また、培養細胞系を用いた検討により、アルブミンやグルタチオンよりも高い抗酸化効果や抗アポトーシス作用を発揮した。さらに、健常及び放射線照射マウスを用いた体内動態の検討から、HSA ダイマーに匹敵する優れた血中滞留性とグルタチオンパーサルフィドの臓器移行性を確認した。加えて、放射線照射による血管透過性亢進状態でもハイブリッド型抗酸化アルブミンの血中滞留性の低下は認められなかった。最後に、放射線照射マウスにハイブリッド型抗酸化アルブミンを投与して、治療効果を検討したところ、優れた臓器保護効果を発揮し、生存率を有意に改善した。また、血液障害も軽減化していた。これらの結果から、今回作製したハイブリッド型抗酸化アルブミンは急性放射線症候群に対する新規治療薬としての応用が期待される。

### 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 18 件)

Taguchi K, Yamasaki K, Maruyama T, Otagiri M. Comparison of the Pharmacokinetic Properties of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers. J Funct Biomater. 8: E11. 2017, 査読有, doi: 10.3390/jfb8010011.

Watanabe H, Imafuku T, Otagiri M, Maruyama T. Clinical Implications Associated With the Posttranslational Modification-Induced Functional Impairment of Albumin in Oxidative Stress-Related Diseases. J Pharm Sci., 査読有, in press doi: 10.1016/j.xphs.2017.03.002.

Yamasaki K, Sato H, Minagoshi S, Kyubun K, Anraku M, Miyamura S, Watanabe H, Taguchi K, Seo H, Maruyama T, Otagiri M. The Binding of Silibinin, the Main Constituent of Silymarin, to Site I on Human Serum Albumin. Biol Pharm Bull. 40:310-317. 2017, 査

読有,

doi: 10.1248/bpb.b16-00790.

Setoyama H, Tanaka M, Nagumo K, Naoe H, Watanabe T, Yoshimaru Y, Tateyama M, Sasaki M, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T, Sasaki Y. Oral branched-chain amino acid granules improve structure and function of human serum albumin in cirrhotic patients.

J Gastroenterol. 2016, 査読有,  
doi: 10.1007/s00535-016-1281-2

Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Yamasaki K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound hemoglobin vesicles ameliorate multiorgan injuries induced by severe acute pancreatitis in mice by their anti-inflammatory and antioxidant properties.

Int J Nanomedicine. 11:5611-5620. 2016, 査読有,  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S118185>

Shibata A, Ishima Y, Ikeda M, Sato H, Imafuku T, Chuang VT, 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. 479:578-583. 2016, 査読有,  
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.113.

Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Nakamura H, Maruyama T, Hirayama F, Kragh-Hansen U, Otagiri M. N-acetyl-L-methionine is a superior protectant of human serum albumin against post-translational oxidation as compared to N-acetyl-L-tryptophan. Biochemistry and Biophysics Reports 6:266-274. 2016, 査読有,  
doi:10.1016/j.bbrep.2016.04.011

Kragh-Hansen U, Minchiotti L, Coletta A, Bienk K, Galliano M, Schiøtt B, Iwao Y, Ishima Y, Otagiri M. Mutants and molecular dockings reveal that the primary L-thyroxine binding site in human serum albumin is not the one which can cause familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. Biochim Biophys Acta. 1860:648-660. 2016, 査読有,  
doi: 10.1016/j.bbagen.2016.01.001.

Nishida K, Watanabe H, Ogaki S, Kodama A, Tanaka R, Imafuku T, Ishima Y, Chuang VT, Toyoda M, Kondoh M, Wu Q, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. Renoprotective effect of long acting thioredoxin by modulating oxidative stress and macrophage migration inhibitory factor against rhabdomyolysis-associated acute kidney injury.

Sci Rep.5:14471. 2015, 査読有,  
doi: 10.1038/srep14471.

Haruki R, Kimura T, Iwasaki H, Yamada K, Kamiyama I, Kohno M, Taguchi K, Nagao S, Maruyama T, Otagiri M, Komatsu T. Safety Evaluation of Hemoglobin-Albumin Cluster "HemoAct" as a Red Blood Cell Substitute. Sci Rep. 5:12778. 2015, 査読有,  
doi: 10.1038/srep12778.

Anraku M, Shintomo R, Taguchi K, Kragh-Hansen U, Kai T, Maruyama T, Otagiri M. Amino acids of importance for the antioxidant activity of human serum albumin as revealed by recombinant mutants and genetic variants. Life Sci. 134:36-41. 2015, 査読有,  
doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.010.

Kadowaki D, Anraku M, Sakaya M, Hirata S, Maruyama T, Otagiri M. Olmesartan protects endothelial cells against oxidative stress-mediated cellular injury.

Clin Exp Nephrol. 19:1007-14. 2015, 査読有,  
doi: 10.1007/s10157-015-1111-5.

[学会発表](計25件)

Kazuaki Taguchi, Therapeutic application of bone marrow-targeted liposome ~ Encapsulation of erythropoietin for renal anemia treatment ~, International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History (ISDDPS), 2017/3/9-10, 京都リサーチパーク(京都府・京都市)

丸山徹、クラッシュ症候群モデルラットに対する一酸化炭素付加赤血球の有用性評価、第23回日本血液代替物学会年次大会、2016/11/24-25、早稲田大学西早稲田キャンパス(東京都・新宿区)

前田 仁志、NASH病態におけるDDS戦略

の限界と一酸化窒素による治療抵抗性の克服、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）

池田真由美、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、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）

Masaki Otagiri, Albumin as Nitric Oxide-Traffic Protein : Novel Anticancer Agent, International Conference On Nanomedicine And Nanobiotechnology - ICONAN 2016, 2016/9/28-30 Paris (France)

皆吉 勇紀、組換え型高マンノース付加アルブミンを担体とした肝クッパー細胞指向性インターフェロン 2b の設計と肝保護効果、第 32 回日本 DDS 学会学術集会、2016/6/30-7/1、グランシップ静岡コンベンションアーツセンター（静岡県・静岡市）

永尾 紗理、バイオミメティックな一酸化炭素デリバリーによる炎症性腸疾患の治療効果、第 32 回日本 DDS 学会学術集会、2016/6/30-7/1、グランシップ静岡コンベンションアーツセンター（静岡県・静岡市）

Hitoshi Maeda, Therapeutic Impact of Liver-Targeted Nitric Oxide Releasing Nano-Antioxidant on NASH, 第 1 回日韓若手薬剤学研究者ワークショップ (The 1st Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceuticals)、2016/6/24-25、京都教育文化センター（京都府・京都市）

小田切優樹、ヒト血清アルブミン - オクタナ酸ナトリウム - N-アセチル-L-メチオニン三元複合体の X 線結晶構造解析、日本薬剤学会第 31 年会、2016/5/19-21、長良川国際会議場および岐阜都ホテル（岐阜県・岐阜市）

木村 虎太郎、抗がん剤封入ヒト血清アルブミンナノ粒子の設計・評価、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）

岡本 侑子、アルブミンとリポソームを融合した新規 DDS キャリアの創製、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）

Kouno Yousuke, N-acetyl-L-methionine is a superior protectant of human serum albumin against photo-oxidation and reactive oxygen species compared to N-acetyl-L-tryptophan, Asian Federation for Pharmaceutical Sciences (AFPS) Conference 2015, 2015/11/25-27, Bangkok(Thailand)

小田切優樹、人工赤血球製剤へモグロビン小胞体の体内動態、臨床応用化を目指した人工赤血球関連セミナー、2015/11/19、旭川医科大学（北海道・旭川市）

Masaki Otagiri, DESIGN AND EVALUATION OF RECOMBINANT ALBUMIN DOMAIN WITH HIGH BILIRUBIN BINDING AFFINITY VIA PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY, International Bioanalytical Formulation Congress 2015, 2015/9/15-16, Berlin(Germany)

Masaki Otagiri, CLINICAL APPLICABILITY OF THIOREDOXIN-ALBUMIN FUSION PROTEIN AGAINST OXIDATIVE STRESS RELATED DISEASES, 15th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants, 2015/6/22-24, Paris(France)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田切 優樹 (OTAGIRI Masaki)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80120145

### (2) 研究分担者

異島 優 (ISHIMA Yu)

徳島大学・薬学部・准教授

研究者番号：00457590

田口 和明 (TAGUCHI Kazuaki)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：90621912