

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08481

研究課題名(和文)震災特有疾患に対する一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の医薬品としての有用性評価

研究課題名(英文)Therapeutic effects of carbon monoxide-bound Hemoglobin-vesicles against disaster-related syndrome

研究代表者

田口 和明 (Taguchi, Kazuaki)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・講師

研究者番号：90621912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヘモグロビンを基盤とした一酸化炭素(CO) 供与体(CO結合型ヘモグロビン小胞体及びCO結合型赤血球)が震災時に多発するクラッシュ・シンドロームとそれに続発する急性腎傷害に対する治療効果と作用機序を検討した。その結果、CO供与体はクラッシュ・シンドロームに対して高い治療効果(生存期間の延長、腎傷害の抑制)を示した。また、CO供与体はヘムタンパク質(ミオグロビンやチトクロームP450)を介した腎臓の酸化傷害を抑制することで、急性腎傷害に対して保護効果を発揮したと考えられた。以上より、CO供与体はクラッシュ・シンドロームの治療薬として高いポテンシャルを有すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大規模災害時には、家屋の倒壊に伴う身体の高圧長時間圧迫により致死率の高いクラッシュ・シンドローム罹患者が多発する。現在、透析や大量の輸液が本疾患の治療法として推奨されているが、医療機関の倒壊などにより極限状態にある医療現場において、これらの治療を施行することは現実的に困難を極めている。COがクラッシュ・シンドロームの創薬シーズとして高いポテンシャルを有することを学術的に明らかにした本研究は、災害医療において火急の課題であるクラッシュ・シンドローム治療薬の創薬を加速させることが期待でき、社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the therapeutic performance of hemoglobin-based carbon monoxide (CO) donor, CO-bound hemoglobin-vesicles and CO-bound red blood cells, against disaster-related disorders with focus on acute kidney injury (AKI) induced by crush syndrome. A single administration of CO donors was found to effectively suppress the pathogenesis of AKI with the mortality in crush syndrome model rats being improved. In addition, CO donors were found to have renoprotective effects via the suppression of subsequent heme protein (myoglobin and cytochrome P450)-associated renal oxidative injury. These findings suggest that these CO donors have the potential for use as a novel therapy against crush syndrome-induced AKI.

研究分野：医療薬学

キーワード：ヘモグロビン リポソーム 急性腎傷害 赤血球 クラッシュ・シンドローム 一酸化炭素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

身体の一部の長時間圧迫と圧迫解除によって引き起こされる「クラッシュ・シンドローム」は、近年の度重なる大地震時において頻発し、致死性の高い震災特有疾患として広く認識されている。現在のところ、本症に対する治療ガイドラインは存在しないものの、中等症までは乳酸リンゲル液などによる大量輸液やアシドーシスの補正、重症時には血液透析などの血液浄化療法が推奨されている。一方で、これらの治療法は大量の医薬品や水といった莫大な医療資源を要求すること、また、血液透析に至っては専門技師や特殊機器の確保も必要であり、「医療従事者の被災による人手不足」、「道路の閉鎖による医薬品の不足」、「ライフラインの停止」、さらには「医療機関の倒壊」などの医療極限状態にある被災地における施工は現実的には困難である。そのため、災害現場で施行可能なクラッシュ・シンドローム治療法の開発は災害急性期医療の火急の課題の一つと言える。

一酸化炭素 (CO) は強力かつ多彩な生理活性を有する医療ガスとして着目されており、様々な疾患の創薬シーズとしての可能性が見出されている¹⁾。我々は、CO が横紋筋融解症に対して高い治療効果を発揮することを見出し、別名「外傷性横紋筋融解症」とも呼ばれるクラッシュ・シンドロームに対しても CO の治療効果が期待できる。このような背景の基、本研究では、CO のクラッシュ・シンドローム治療薬としての可能性を追求するために、ヘモグロビンを基盤とした CO 供与体 (CO 結合型ヘモグロビン小胞体及び CO 結合型赤血球) を用いて検討を行った。

2. 研究の目的

CO のクラッシュ・シンドロームに対する治療効果とその作用機序を検討し、CO を基盤とした実用性の高いクラッシュ・シンドローム治療薬の開発に向けた基盤情報を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) クラッシュ・シンドロームモデルラットの作製²⁾

クラッシュ・シンドロームモデルは、2.0 kg 荷重下でステンレスパイプに巻き付けたラバーバンドをラット両後肢に適用し、5 時間圧迫後、ラバーバンドを解除してモデルとした。圧迫解除 1 時間後に生理食塩水または CO 供与体を静脈内投与した。

(2) 腎機能、筋傷害パラメーター、遊離ヘム鉄の測定

血漿中腎機能マーカー (尿素窒素、クレアチニン)、筋傷害マーカー (クレアチニンキナーゼ、ミオグロビン) 及び腎臓中遊離ヘム濃度は各々の測定キット (尿素窒素・クレアチニン: 和光純薬工業製、ミオグロビン: Life Diagnostics 社製、クレアチニンキナーゼ・遊離ヘム: Cayman Chemical 社製) を用いて添付のプロトコールに準じて測定した。

(3) 組織学的評価

左腎を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにより固定化後、パラフィン切片を作製した。定法に従い、PAS 染色、TUNEL 染色、免疫染色 (4-hydroxynonenal: 4-HNE) を行った。組織画像は、顕微鏡 (BZ-8000、Keyence 社) にて取得した。

(4) トレッドミル歩行試験

生理食塩水または CO 供与体投与 2 時間後 (圧迫解除 3 時間後) に、トレッドミル歩行試験器 (Model MK-680; Muromachi kikai Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用い、歩行距離・歩行時間を測定した。

(5) 横紋筋融解症モデルラットの作製³⁾

ラットを 24 時間絶水処置を施した後、8 mL/kg の用量で 50%グリセロール/生理食塩水を両側の下腿部筋肉内に投与した。グリセロール投与 3 時間後に生理食塩水または CO 供与体を静脈内投与した。

(6) 腎組織中ミオグロビン酸化体の検出

Moore らの方法に基づき⁴⁾、10 μ m に切り出したラット腎組織片に 10 μ M DTPA を含むリン酸緩衝液 (pH7.4) を添加し、ホモジナイザー (Power Gen 125、Fisher Scientific 社) を用いてホモジナイズを行い、遠心分離 (6,000 rpm、10 min、4 °C) して得られた上清について、350-700 nm の吸光度を測定した。

(7) 肝及び腎ミクロソーム中総チトクローム P450 (CYP) 量の測定

ミクロソーム中の総 CYP 量は Omura らの報告に基づき⁵⁾、吸収差スペクトル法を用いて算出した。遠心分画法により回収したミクロソーム画分を 10%グリセロール含有 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、これに還元剤としてヒドロスルファイトナトリウム約 1 mg を加え、得られた溶液に CO を 1 分間バブリングした。分光光度計にて 450 nm 付近の吸光度と 490 nm の吸光度の差から総 CYP 量 (nmol/mg protein) を算出した。

4. 研究成果

(1) 生存率の評価 (図 1)

圧迫解除 1 時間後に生理食塩水または CO 供与体を投与し、生存率を比較した。その結果、生理食塩水処置群では圧迫開放 6 時間後より急激に死亡例が増加し、解放後 9 時間までに全例が死亡した。一方、CO 供与体処置群では圧迫解放 24 時間まで全例が生存し、CO がクラッシュ・シンドロームの創薬シーズとして有望であることが明らかとなった。

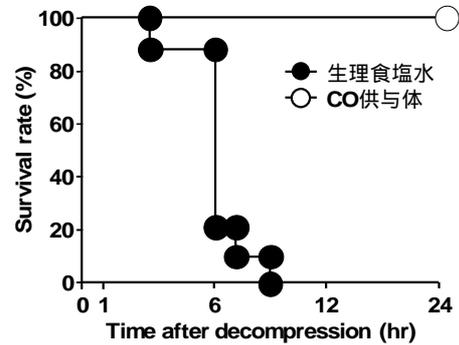


図 1 生存率

(2) CO のクラッシュ・シンドロームに伴う急性腎傷害に与える影響 (図 2)

圧迫開放 6 時間後に腎機能マーカー (尿素窒素、血清クレアチニン) を測定した結果、生理食塩水処置群では尿素窒素・血清クレアチニンが上昇し、明らかな急性腎傷害が確認された。しかしながら、CO 供与体処置群ではこれらの上昇は抑制され、腎保護効果が確認された。加えて、各処置群の腎組織を PAS 染色 (組織形態評価)、TUNEL 染色 (アポトーシス評価) 及び 4-HNE の免疫染色 (酸化傷害の評価) し、組織学的評価を行った。その結果、CO 供与体処置群で組織形態の変化、アポトーシスの誘発、酸化産物の蓄積が抑制されていた (data not shown)。これらの結果より、CO の腎保護効果が確認された。

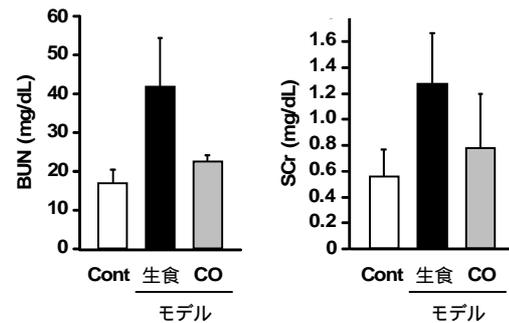


図 2 尿素窒素 (BUN)、血清クレアチニン (SCr)

(3) CO の筋傷害に対する影響 (図 3)

血清中のクレアチンキナーゼとミオグロビン濃度を測定することで筋傷害を評価した。その結果、生理食塩水処置群と比較して CO 供与体処置時において血清中クレアチンキナーゼとミオグロビン濃度は低値を示した。加えて、トレッドミルにより歩行力 (運動性) について評価したところ、生理食塩水処置群では運動性が低下していたものの、CO 供与体処置群は歩行力を維持していた。以上の結果より、CO 供与体処置時には腎傷害だけでなく筋傷害の増悪も抑制する可能性が示唆された。

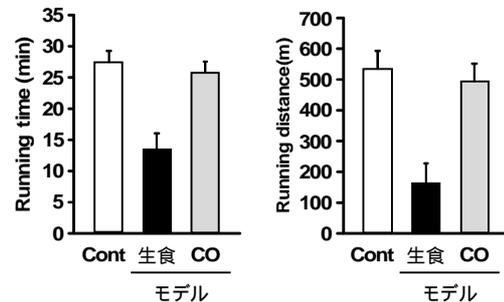


図 3 歩行距離及び歩行時間

(4) CO の腎保護メカニズムの検討

クラッシュ・シンドロームモデルラットの生存時間は 6 時間以内と短く、CO の腎保護メカニズムの検討に不向きであるため、クラッシュ・シンドロームと同様の発症機序で急性腎傷害を併発する横紋筋融解症モデルラットを用いて検討を行った。

まず、横紋筋融解症モデルラットに CO 供与体を投与し、腎保護効果について確認したところ、クラッシュ・シンドロームモデルラットと同様に CO 供与体投与により腎機能マーカー (尿素窒素、血清クレアチニン) の上昇は抑制された (data not shown)。また、免疫染色による検討から、生理食塩水投与群で観察された酸化産物 (4-HNE) の蓄積は CO 供与体処置群で抑制されていた (data not shown)。そこで、CO の抗酸化作用が腎保護メカニズムに関与していると考え、横紋筋融解症に伴う急性腎傷害の発症機序の一部として知られている

ミオグロビン内部ヘム鉄の酸化に起因する組織傷害、腎チトクローム P450 (CYP) 分解に由来する遊離ヘム介在性の酸化傷害、に着目して検討を行った。

ミオグロビン内部ヘム鉄の酸化の評価 (図 4)

ミオグロビン酸化体はより強力な酸化物質として酸化傷害を惹起する。ミオグロビン酸化体は、410 nm 付近に吸収極大を有しているため、横紋筋融解症モデルラットの腎臓中の酸化ミオグロビンの産生を吸収スペクトルにより定性的に評価した。その結果、生理食塩水処置群では、410 nm 付近の吸光度が上昇し、ミオグロビン酸化体の蓄積が認められた。一方、CO 供与体処置群ではその上昇が抑制された。

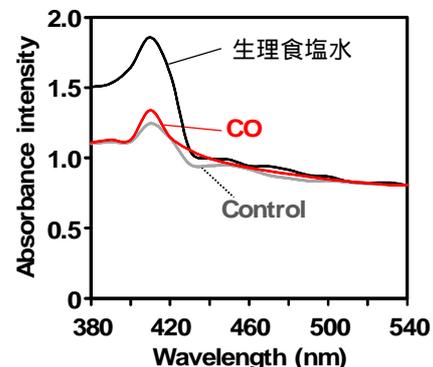


図 4 酸化ミオグロビンの吸収スペクトル

腎組織中 CYP 及び遊離ヘム含量 (図 5)

ヘムタンパク質の分解により生じる遊離ヘムは酸化傷害を誘発する。そこで、主要ヘムタンパク質である腎組織中の CYP 含量を評価したところ、生理食塩水処置群では CYP 総量が減少していたが、CO 供与体処置群では、その低下が抑制されていた。腎臓とは対照的に、肝臓の総 CYP 量はいずれの群でも変化していなかった (data not shown)。また、腎組織中の遊離ヘム濃度を測定したところ、CYP 含量の変化と対応して、生理食塩水処置群では腎組織中の遊離ヘム濃度が増加し、CO 供与体処置群では、この上昇が抑制されていた。これらの結果から、生理食塩水処置群で観察された腎組織中の遊離ヘム濃度の上昇には、腎 CYP の分解が大きく寄与しており、CO 供与体処置はそれを阻害することで、腎臓中の遊離ヘム濃度の上昇を抑制していることが推察された。

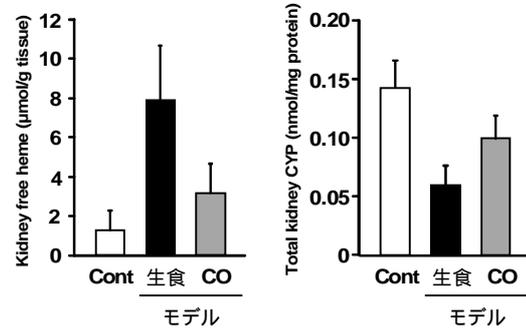


図 5 腎組織中遊離ヘム鉄含量と総 CYP 含量

これらの結果より、CO 供与体はミオグロビンの酸化や CYP 分解を抑制することで遊離ヘムにより産生される活性酸素や酸化ヘムタンパク質を介した腎酸化傷害を抑制することで、クラッシュ・シンドロームによる致死性の急性腎傷害に対して保護効果を示し、結果的に延命効果を発揮したと考えられた。

<引用文献>

- 1) Motterlini R, Otterbein LE. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 728-43 (2010).
- 2) Murata I, Ooi K, Sasaki H, Kimura S, Ohtake K, Ueda H, Uchida H, Yasui N, Tsutsui Y, Yoshizawa N, Hirotsu I, Morimoto Y, Kobayashi J. Characterization of systemic and histologic injury after crush syndrome and intervals of reperfusion in a small animal model. *J. Trauma*, **70**, 1453-63 (2011).
- 3) Nishida K, Watanabe H, Ogaki S, Kodama A, Tanaka R, Imafuku T, Ishima Y, Giam 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).
- 4) Moore KP, Holt SG, Patel RP, Svistunenko DA, Zackert W, Goodier D, Reeder BJ, Clozel M, Anand R, Cooper CE, Morrow JD, Wilson MT, Darley-Usmar V, Roberts LJ. A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31731-7 (1998).
- 5) Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-8 (1964).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Taguchi K, Nagao S, Maeda H, Yanagisawa H, Sakai H, Yamasaki K, Wakayama T, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T	4. 巻 25
2. 論文標題 Biomimetic carbon monoxide delivery based on hemoglobin vesicles ameliorates acute pancreatitis in mice via the regulation of macrophage and neutrophil activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 1266 ~ 1274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10717544.2018.1477860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Taguchi K	4. 巻 138
2. 論文標題 Safety Evaluation of Cellular-type Artificial Blood Based on Pharmacokinetic Analysis and Its Use in Medical Gas Delivery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1381 ~ 1389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.18-00127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Taguchi K, Maruyama T, Otagiri M	4. 巻 in press
2. 論文標題 Use of hemoglobin for delivering exogenous carbon monoxide in medicinal applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/0929867325666181113122340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taguchi K, Yamasaki K, Sakai H, Maruyama T, Otagiri M	4. 巻 106
2. 論文標題 The Use of Hemoglobin Vesicles for Delivering Medicinal Gas for the Treatment of Intractable Disorders.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Pharm Sci.	6. 最初と最後の頁 2392-2400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2017.04.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi K, Yamasaki K, Maruyama T, Otagiri M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Comparison of the Pharmacokinetic Properties of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Funct Biomater.	6. 最初と最後の頁 E11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jfb8010011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi K, Ogaki S, Nagasaki T, Yanagisawa H, Nishida K, Maeda H, Enoki Y, Matsumoto K, Sekijima H, Ooi K, Ishima Y, Watanabe H, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T	4. 巻 372
2. 論文標題 Carbon Monoxide Rescues the Developmental Lethality of Experimental Rat Models of Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Exp Ther.	6. 最初と最後の頁 355 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.119.262485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 田口和明、永尾紗理、前田仁志、酒井宏水、山崎啓之、丸山徹、小田切優樹
2. 発表標題 一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の抗炎症作用機序の解明と急性膵炎治療への応用
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口和明、永尾紗理、酒井宏水、丸山徹、小田切優樹
2. 発表標題 一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の急性膵炎治療への応用
3. 学会等名 第25回日本血液代替物学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口和明、松元一明、丸山徹、小田切優樹
2. 発表標題 ヘモグロビンの生理活性ガス運搬能を利用した創薬戦略
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taguchi K, Yamasaki K, Sakai H, Maruyama T, Otagiri M
2. 発表標題 Biological responsiveness and pharmacokinetic properties of cellular type hemoglobin based oxygen carrier (Hemoglobin-Vesicles) in hyperlipidemia model mice after massive intravenous injection
3. 学会等名 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口和明、永尾紗理、酒井宏水、山崎啓之、丸山徹、小田切優樹
2. 発表標題 急性肺炎に対する一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の有用性評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第32年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口和明、永尾紗理、酒井宏水、山崎啓之、丸山徹、小田切優樹
2. 発表標題 ヘモグロビン小胞体の難治性炎症疾患治療薬としての応用使用
3. 学会等名 第24回日本血液代替物学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口 和明
2. 発表標題 細胞型人工赤血球の動態特性解析に基づく安全性評価と医療ガスデリバリーへの応用
3. 学会等名 第34回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田口 和明、松元 一明、丸山 徹、小田切 優樹
2. 発表標題 生理活性ガス一酸化炭素のバイオミメティックDDS
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taguchi K, Maruyama T, Sakai H, Otagiri M
2. 発表標題 Carbon monoxide bound Hemoglobin-vesicles are effective in treating inflammatory disorders
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----