

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究B

研究期間：2009～2011

課題番号：21390177

研究課題名（和文） アルブミン融合技術を基盤としたレドックス制御ナノメディスンの開発

研究課題名（英文） Development of Redox Controlling Nanomedicine Based on Albumin Fusion

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

研究成果の概要（和文）：

アルブミン融合技術を活用した新規レドックス制御ナノメディスンを設計し、臨床応用するため種々の検討を行った結果、HSA-チオレドキシン融合体が炎症性・酸化ストレス性難治性疾患に有用であることを明らかにした。加えて、SNO-HSA ダイマーの EPR 効果に基づく顕著な抗腫瘍活性を確認した。

今後は、本データを基に医師主導型臨床試験に向けた基盤整備を行う。

研究成果の概要（英文）：

Using albumin fusion technology, a novel redox controlling nanomedicine was designed and evaluated for applications in clinical settings. The results from various studies suggested that HSA-thioredoxin fusion protein has great potential as a therapeutic agent for treating oxidative stress and inflammation related diseases. In addition, a significant tumor metastasis activity from the EPR effect of SNO-HSA dimer has been confirmed. Based on the results of the current studies, preparations for a clinical trial led by a clinician are now in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ドラッグデリバリー・ヒト血清アルブミン・Thioredoxin 1・Pichia 酵母・肺障害・抗酸化能・酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩により、生命体の恒常性維持に様々なレドックス反応が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、

このバランスの崩壊が引き金となって、癌、生活習慣病、心疾患等の疾患を引き起こしている可能性が強く指摘されてきた。我が国では、これら患者やその予備軍が1千数百万人

以上存在するため、新たな治療法としてレドックス制御医薬品の創製が切望されている。

生体内のレドックス反応を制御する分子としては、チオレドキシシン (Trx)、スーパーオキシドジスミターゼ (SOD)、カタラーゼ (Cat)、一酸化炭素 (NO) などが知られており、これら機能分子の医薬品開発を目指した検討が活発に行われている。しかしながら、Trx の消失半減期は約 1 時間と短く、血中濃度を維持して治療効果を得るには定速静脈内投与や頻回の繰り返し投与を余儀なくされる。

シグナル分子である NO は生体の病態生理学上の様々な現象で中心的な役割を担っているため、ユニークで高い生物活性を有している。現在、癌治療戦略としては、化学療法、放射線療法、外科療法が主流であるが、化学療法の場合、抗癌剤の腫瘍組織への選択的移行性の低さによる正常細胞への傷害性や薬剤耐性が克服すべき課題である。つまり、上述した 2 つのレドックス制御分子の創薬には体内動態を的確に制御することができる上、ラジカルなどの外的ストレスに対する保護効果を有するキャリアが必要不可欠である。

2. 研究の目的

我々は、上記の課題を解決する方法として、遺伝子組換え技術を活用し、HSA と機能タンパク性医薬品を遺伝子レベルで融合して結合体のままで発現することができるアルブミン融合技術を確立している。本研究は、この技術を活用して HSA を担体としたレドックス制御ナノ医薬品の開発と難治性疾患治療への応用を目的として企図された。

具体的には、HSA とレドックス分子のヘテロ融合体を作製し、活性酸素が関与する疾患のうち、未だ有効な治療法が確立していない予後不良な病態への応用を検討する。

加えて、NO のキャリアとして、HSA 分子

内の 6 個の Lys 残基を Cys に置換した変異体を鋳型として HSA ダイマー (ホモ融合体) を作製する。本キャリアは分子サイズの増加に伴い、より Enhanced permeation and retention (EPR) 効果を受けるため、高い腫瘍選択的性の獲得が期待できる (表 1)。

レドックス制御ナノメディスン	特徴と期待される応用
HSA-Trx	・Trx の血中滞留性向上 ・協調的抗酸化作用 ⇒ 難治性の炎症・酸化ストレス疾患
(NO) ₆ -HSA-HSA-(NO) ₆	・癌組織での NO の持続的放出 ⇒ 癌治療に対するマルチな応用

3. 研究の方法

本研究では、アルブミン融合技術を活用した新規レドックス制御ナノメディスンを開発し、臨床応用するために、1)HSA-レドックス制御タンパク質のヘテロ融合体 (HSA-Trx、SOD-HSA-Cat) の作製と構造・機能評価、2)SNO-HSA ダイマーの設計と NO 導入効率の評価、3) SNO-HSA ダイマーの構造・機能評価、4) 上述したレドックス制御ナノタンパク質の体内動態特性の評価を行い、これらの結果を基盤として、5) 各種 HSA 融合体の生物効果を *in vitro* 実験により評価し、さらに 6) 各種病態モデル動物での薬理効果を検討した後、最終的にこれらの知見に基づき炎症性・酸化ストレス性難治性疾患の医師主導型臨床試験に向けた基盤整備を行う。

4. 研究成果

得られた研究成果を以下に要約する。

(1) アルブミンとの融合体化により、Trx の血中滞留性は著しく改善し、HSA-Trx の優れた血中滞留性が確認された。次いで、エンドトキシン、肺炎症、肺線維症などの病態モデルマウスを作成して HSA-Trx あるいは Trx、HSA 単独を静脈内投与、腹腔内投与、経気道投与して HSA-Trx の治療効果を評価した。その結果、いずれのモデルにおいても Trx 単

独群に比べ、HSA-Trx 融合体の優れた薬理効果が観察された。

(2) SNO-HSA ダイマーを LY-80 および C26 細胞に対して、傷害性を評価したところ、アポトシス誘導が NO に腫瘍細胞内の酸化ストレス亢進に依存していることが判明した。次いで、C26 細胞を移植した担癌マウスに対して、SNO-HSA を投与して調べたところ、腫瘍の顕著な減少が認められた。興味深いことに、これらの効果が SNO-HSA ダイマーの EPR 効果に基づくことが示された。加えて、SNO-HSA ダイマー投与後の血中動態や血清血化学的データ、血圧を調べたところ、腫瘍マーカーのみ顕著に減少したものの、ほかの血清学的パラメータは単独群と変わらず、SNO-HSA ダイマーの有効性と安全性が裏付けられた。

以上のように、HSA-Trx を用いた酸化ストレス関連疾患への治療応用の可能性が示唆された。目下、Trx だけでなく、スーパーオキサイドスカベンジ能を有する SOD といった他の抗酸化タンパク質との融合化についても鋭意検討中である。

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 48 件)

1. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M, Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles prevents Escherichia coli growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model.、J Pharmacol Exp Ther.、査読有、vol.337、2011、201-8
2. Nishi K, Ono T, Nakamura T, Fukunaga N, Izumi M, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Yamagata Y, Curry S, Otagiri M、 Structural insights into differences in drug-binding selectivity between two forms of human alpha1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms.、J Biol Chem.、査読有、vol.286、2011、14427-34
3. Furukawa M, Tanaka R, Chuang VT, Ishima Y, Taguchi K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M、 Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury.、J Control Release.、査読有、vol.154、2011、189-95
4. Minomo A, Ishima Y, Kragh-Hansen U, Chuang VT, Uchida M, Taguchi K, Watanabe H, Maruyama T, Morioka H, Otagiri M、 Biological characteristics of two lysines on human serum albumin in the high-affinity binding of 4Z,15Z-bilirubin-IX α revealed by phage display.、FEBS J.、査読有、vol.278、2011、4100-11
5. Ishima Y, Chen D, Fang J, Maeda H, Minomo A, Kragh-Hansen U, Kai T, Maruyama T, Otagiri M、 S-Nitrosated Human Serum Albumin Dimer is not only a Novel Anti-Tumor Drug but also a Potentiator for Anti-Tumor Drugs with Augmented EPR Effects.、Bioconjug Chem.、査読有、vol.23、2011、264-71
6. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kawai K, Komatsu T, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri M、 Superior plasma retention of a cross-linked human serum albumin dimer in nephrotic rats as a new type of plasma expander.、Drug Metab Dispos.、査読有、Vol.38、2010、2124-9
7. Ikuta S, Chuang VT, Ishima Y, Nakajou K, Furukawa M, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M、 Albumin fusion of thioredoxin-the production and evaluation of its biological activity for potential therapeutic applications.、J Control Release.、査読有、Vol.147、2010、17-23
8. Ishima Y, Hiroyama S, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Sawa T, Akaike T, Kai T, Otagiri M、 One-step preparation of S-nitrosated human serum albumin with high biological activities.、Nitric Oxide.、査読有、Vol.23、2010、121-7
9. Hirata K, Maruyama T, Watanabe H, Maeda H, Nakajou K, Iwao Y, Ishima Y, Katsumi H, Hashida M, Otagiri M、

Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics., J Control Release., 査読有、Vol.145、2010、9-16

10. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier. Drug Metab Dispos. vol. 37、2009、1456-63.
11. Iwao Y, Hiraike M, Kragh-Hansen U, Kawai K, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Altered chain-length and glycosylation modify the pharmacokinetics of human serum albumin. Biochim Biophys Acta. vol. 1794、2009、634-41.

〔学会発表〕(計 94 件)

1. Maruyama T, Otagiri M, et al., Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics, 2011 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2011/10/14-18, Chicago
2. Anraku M, Otagiri M, et al., Quantitative Analysis of Cysteine-34 on the Antioxidative Properties of Human Serum Albumin and its Physiological Significance in Hemodialysis Patients, Helsinki Drug Research 2011 Congress, 2011/9/18-20, Helsinki, Finland
3. Otagiri M, Albumin Fusion of Thiorodoxin: Evaluation of Its Biological Activity for Potential Therapeutic Applications, 8th Retro metabolism Based Drug Design and Targeting Conference, 2011/6/3-4, Graz, Austria
4. Ishima Y, Otagiri M, et al., Effect of genetically mannosylated-human serum albumin with nitric oxide on hepatic ischemia reperfusion injury, 4th Asia Pacific Regional ISSX Meeting, 2011/4/22-4/25, Tainan, Taiwan
5. 田口 和明, 渡邊 博志, 丸山 徹, 小田切 優樹, 他、ヘモグロビン小胞体の出血性ショックモデルラットにおける大腸菌増殖抑制効果、第 17 回日本血液代替物学会、2010、10/18-19、熊本
6. 渡邊博志, 丸山徹, 小田切優樹, 他、

Poly-SNO-アルブミンによる抗癌剤耐性克服効果、日本薬学会年会第 131 年会、平成 23 年 3 月 28-31 日、静岡

7. 蓑毛藍、小田切優樹、他、ファージディスプレイ法を用いたHSA分子上のBR結合部位の探索、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 27 日、岡山コンベンションセンター
8. 丸山徹、小田切優樹、他、肺障害モデルマウスに対するアルブミンチオレドキシ融合タンパク質の有用性評価、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 27 日、岡山コンベンションセンター
9. 平田憲史朗、小田切優樹、他、糖鎖付加アルブミンを用いたクッパー細胞へのNOターゲティング、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 27 日、岡山コンベンションセンター

〔図書〕(計 1 件)

- ① Masaki Otagiri (Ed)、Sojo University Publishing Center、HUMAN SERUM ALBUMIN、2011、300 頁

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：S-ニトロソ化 α 1-酸性糖タンパク質を含有する抗菌剤

発明者：渡辺 佳織、異島 優、末永 綾香、渡邊 博志、甲斐 俊哉、丸山 徹、小田切 優樹

権利者：ニプロ株式会社

種類：公開特許公報 (A)

番号：特願 P111N21023

出願年月日：2011. 7. 2

国内外の別：国内

名称：抗癌剤増感剤

発明者：小田切 優樹、異島 優、渡邊 博志、丸山 徹

権利者：ニプロ株式会社

種類：公開特許公報 (A)

番号：特願 P111N21063

出願年月日：2011. 8. 12

国内外の別：国内

○取得状況 (計 6 件)

名称：高リガンド親和性アルブミン変異体の製造方法

発明者：蓑毛 藍、異島 優、丸山 徹、森岡 弘志、小田切 優樹

権利者：ニプロ株式会社

種類：公開特許公報 (A)

番号：特開 2010-172277

取得年月日：2010. 8. 12
国内外の別：国内

名称：S-ニトロソ基含有アルブミン及びその製造方法ならびに抗がん剤
発明者：小田切 優樹、中城 圭介、片山 直久、甲斐 俊哉
権利者：ニプロ株式会社
種類：公開特許公報 (A)
番号：特開 2009-057318
取得年月日：2009. 3. 19
国内外の別：国内

名称：融合タンパク質、該融合タンパク質に関連する遺伝子、ベクター、形質転換体及び抗炎症性医薬組成物
発明者：小田切 優樹、生田 祥太郎
権利者：ニプロ株式会社
種類：公開特許公報 (A)
番号：特開 2009-055838
取得年月日：2009. 3. 19
国内外の別：国内

名称：脂肪酸を含有するS-ニトロソタンパク質とその製法
発明者：異島 優、赤池 孝章、小田切 優樹
権利者：ニプロ株式会社
種類：公開特許公報 (A)
番号：特開 2008-050294
取得年月日：2008. 3. 6
国内外の別：国内

名称：糖鎖含有アルブミン、その製造方法およびその用途
発明者：中城 圭介、片山 直久、甲斐 俊哉、小田切 優樹
権利者：ニプロ株式会社
種類：公開特許公報 (A)
番号：特開 2008-043285
取得年月日：2008. 2. 28
国内外の別：国内

名称：ピキア酵母を用いた組換えヒトヘモグロビンの製造
発明者：中城 圭介、帆足 洋平、甲斐 俊哉、宇野 公之、小田切 優樹
権利者：ニプロ株式会社
種類：公開特許公報 (A)
番号：特開 2008-017774
取得年月日：2008. 1. 31
国内外の別：国内

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

丸山 徹 (MARUYAMA TORU)
熊本大学・薬学部・教授

研究者番号：90423657

渡邊 博志 (WATANABE HIROSHI)
熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70398220