

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25年 5月 8日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790162

研究課題名（和文）革新的虚血性疾患治療薬の開発を目指した
一酸化窒素運搬タンパク質の創製

研究課題名（英文）Development of Nitric oxide traffic protein as a novel drug against
ischemic diseases.

研究代表者

異島 優 (ISHIMA YU)

熊本大学・薬学部・助教

研究者番号：00457590

研究成果の概要（和文）：

現在、臓器保存液として University of Wisconsin (UW)液が広く使用されているが、この UW 液は、保存臓器に対して、抗ネクロシスの作用により、保護的に作用するが、冷阻血時に引き起こされるアポトーシス細胞死には、ほとんど有効ではない。そこで、当研究室が開発した抗アポトーシス作用を有する NO を付加したアルブミン (SNO-HSA) を UW 液に添加し検討したところ、ラットの肝臓やヒトの肝臓を用いた検討において、SNO-HSA 添加 UW 液は、抗ネクロシス&抗アポトーシス作用により長時間にわたり、保護作用を示した。

研究成果の概要（英文）：

S-Nitrosated human serum albumin (SNO-HSA) is useful in preventing liver ischemia/reperfusion injury, and SNO-HSA should thus be able to prevent cell injury during liver transplantation. However, the potential protective effect of SNO-HSA on a combination of cold and warm ischemia, which is obligatory when performing liver transplantation, has not been examined. Our results indicate that a combination of SNO-HSA and UW solution can be used to prevent the two types of ischemia. Therefore, SNO-HSA-added UW solution could be very useful in transplantation, because the previously imposed constraints on preservation time can be removed. This is a great advantage in a situation as the present one with increased utilization of scarce donor organs for more recipients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態学・ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

NOは細胞保護、生存、血管新生など関わる大変重要な生理活性シグナル分子である。近年、ヒト血清アルブミン (HSA) などの血清タンパク質が、NOの生体内輸送システム (NOトラフィック) を構築していることが報告されている。その分子機構は、タンパク質のCys残基のNO抱合化を介する(化

学的には、S-ニトロソチオール, SNOを形成) NOの生体内運搬である。従来、NOは半減期が短く、オートクリン、パラクリン的にしか作用することが出来ないと考えられてきたが、このNO抱合化により安定化され、生体内運搬を可能にしていると考えられている。しかしながら、虚血再灌流障害時において、内因性NOの産生低下とともにNOトラフィ

ックによる NO 運搬異常が発生する。この虚血再灌流障害という病態は、臨床的には各種臓器の閉塞巣における血流開通の際に惹起される。肝臓外科における血流遮断法や心筋梗塞に対する経皮的冠動脈形成術、動脈血栓溶解法などの治療手段、さらに臓器移植の際に観察され、虚血の範囲が広範囲であれば虚血臓器そのものに留まらず、そこから離れた遠隔臓器にもおよび患者の予後にも重篤な影響をもたらす。それゆえに、虚血再灌流障害の病態を解明し、その対策を練ることは臨床の現場において極めて重要なことである。虚血再灌流障害を伴う虚血性心疾患や血管閉塞性疾患の治療法には、抗サイトカイン療法やアラキドン酸代謝阻害薬、エンドセリン阻害薬など、病態に即した様々なものが考案されてきたが、未だに決定的な治療法ではないのが現状である。そこで我々は、「NO トラフィック改善療法」という全く新規なコンセプトを提唱する。このコンセプトは極めてシンプルであり、NO トラフィック異常を NO トラフィック製剤投与により改善するという方法である。しかしながら、NO トラフィック製剤と呼ばれる薬剤は未だ存在しない。そこで我々は、HSA による内因的 NO トラフィックメカニズムの解明を行う過程で、すでに以下の知見を得ている。新規 NO トラフィックである HSA の 410 位の Arg が Cys に変異した HSA R410C の NO 付加体 (SNO-HSA R410C) が、動物モデルの虚血・再灌流障害に対して極めて高い臓器保護活性を有すること (JPET, 320(3), 969-977 (2007))、さらに、血中に存在する内因性物質が血清タンパク質への NO 付加や NO 放出の制御を行っているという内因的 NO トラフィックメカニズムの解明に繋がる発見を突き止めた (BBRC, 364(4), 790-795 (2007) JBC, 283(50), 34966-34975 (2008))。これら知見は、超一流雑誌 Nature Reviews にも引用され、その注目度を物語っている (Benhar M. et. al. Nat Rev Mol Cell Biol. 10(10), 721-732 (2009))。

2. 研究の目的

新規 NO トラフィック製剤を作製し、その有効性・安全性を評価し、医薬品開発に繋げることを本研究の最終目的とする。

3. 研究の方法

血清タンパク質の Cys 残基を NO 抱合化することによる NO トラフィックタンパク質を構築するという新規コンセプトを用いた医薬品開発への基礎研究を行う。研究概略は以下の通りである。

(1) 新規 NO トラフィックタンパク質の創

製を行う。例：SNO 組換え HSA、Cys 残基付加型組換え SNO 組換え HSA など。

(2) 生体内 NO トラフィックの制御機構の解明を行う。

(3) 各種 NO トラフィック製剤の *in vitro* での抗アポトーシスなどの生物活性評価を行う。

(4) 各種 NO トラフィック製剤を用い、虚血性疾患や臓器移植時の拒絶反応の治療に応用する。

(5) NO トラフィック製剤による新規移植臓器保存液を開発する。

(6) NO トラフィック製剤を血管新生療法へ応用する。

(7) 様々な生体親和性高分子ポリマー (PEG など) による蛋白化学修飾やナノ粒子化等による新たな DDS の開発を目指す。

これらの研究を通し、新規 NO-ドラッグデリバリーシステムを構築する。

4. 研究成果

本研究は、NO トラフィック製剤の創製と虚血性疾患、臓器移植への臨床応用のための有効性・実用性評価を最終目標とする。本年度は、臓器保存液への NO トラフィック製剤の応用を目指し、様々な NO 付加型アルブミンを作製した。具体的には、内因的 S-ニトロソ化アルブミンを基本骨格とし、化学的架橋剤を用いて高付加型 NO アルブミンやマンノース受容体ターゲティング型であるマンノース付加 NO アルブミン、さらにはアルブミン二量体に NO を付加した NO アルブミンダイマーを作製し、その臓器保存液への有用性を評価した。方法は、冷阻血 2 4 時間後の温阻血 1 2 時間において、NO 付加型アルブミン添加群と現在の U 臓器保存液の第一選択剤である University of Wisconsin 液群で比較検討した。その結果、University of Wisconsin 液と比較し、最も効果が高かったのは、内因的 S-ニトロソ化アルブミンであった。これは、臓器保存中の NO 補充量として、輸送効率が至適であったためだと考えられる。つまり、他の NO トラフィック製剤は、細胞内への NO 供給量が過剰過ぎて、NO の二面性の一つであるアポトーシス作用が強く発揮されたために、臓器保護効果が減弱したと考えられる。今回の結果は、内因的な S-ニトロソ化アルブミンの絶妙な NO の放出能を示すだけでなく、様々な NO 付加型アルブミンの作製にあたり、十分にその特性を検討し、様々な臨床応用に対して、使い分ける必要があることが示唆された。しかしながら、University of Wisconsin 液と比較しても有意に臓器保護効果が高い S-ニトロソ化アルブミンの有用性は、今後脳死移植の増加に伴い、臓器保存時間の延長が望まれることが予想されるため、益々高まってくるものと考えられ、極めて重要な知見で

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 20 件)

1. UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin. Nitric Oxide. 2013, 30, 36-42 Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, Otagiri M, Maruyama T. (1 番目) (査読有)
2. Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. Biochim Biophys Acta. 2013, 1830, 2917-23. Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, Otagiri M. (2 番目) (査読有)
3. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. Kidney Int. 2013, 83, 582-92. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. (9 番目) (査読有)
4. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. Kidney Int. 2013, 83, 446-54. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. (10 番目) (査読有)
5. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. FASEB J. 2013, 27, 391-8. Watanabe K, Ishima Y, Akaike T, Sawa T, Kuroda T, Ogawa W, Watanabe H, Suenaga A, Kai T, Otagiri M, Maruyama T. (1 番目) (査読有)
6. Elucidation of the therapeutic enhancer mechanism of poly-S-nitrosated human serum albumin against multidrug-resistant tumor in animal models. J Control Release. 2012, 164, 1-7. Ishima Y, Hara M, Kragh-Hansen U, Inoue A, Suenaga A, Kai T, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. (1 番目) (査読有)
7. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan propionate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate. Biochem Pharmacol. 2012, 84, 1207-1214 Miyamoto Y, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. (6 番目) (査読有)
8. Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. Drug Metab Dispos. 2012, 40, 1423-1428. Watanabe H, Miyamoto Y, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. (8 番目) (査読有)
9. S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. J Pharm Sci. 2012, 101, 3222-3229. Ishima Y, Akaike T, Maruyama T, Otagiri M. (1 番目) (査読有)
10. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. IUBMB Life. 2012, 64, 450-454. Ishima Y, Maruyama T, Otagiri M. (1 番目) (査読有)
11. 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. 2012, 23, 264-271. Ishima Y, Maeda H, Maruyama T, Otagiri M. (1 番目) (査読有)
12. 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. 2011, 278, 4100-4111. Minomo A, Ishima Y, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Otagiri M. (2番目) (査読有)
13. Cellular uptake mechanisms and responses to NO transferred from mono- and poly-S-nitrosated human serum albumin. Free Radic Res. 2011, 45, 1196-1206. Ishima Y, Yoshida F, Akaike T, Maruyama T, Otagiri M. (1番目) (査読有)
14. Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury. J Control Release. 2011, 154, 189-195. Furukawa M, Chuang VT, Ishima Y, Maruyama T, Otagiri M. (4番目) (査読有)
15. Albumin fusion of thioredoxin--the production and evaluation of its biological activity for potential therapeutic applications. J Control Release. 2010, 147, 17-23. Ikuta S, Chuang VT, Ishima Y, Maruyama T, Otagiri M. (3番目) (査読有)
16. The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. J Biol Chem. 2010, 285, 23970-23984. Fujii S, Okamoto T, Ahtesham AK, Ishima Y, Motohashi H, Yamamoto M, Akaike T. (8番目) (査読有)
17. One-step preparation of S-nitrosated human serum albumin with high biological activities. Nitric Oxide. 2010, 23, 121-127. Ishima Y, Hiroyama S, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Sawa T, Akaike T, Kai T, Otagiri M. (1番目) (査読有)
18. The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions. FEBS Lett. 2010, 584, 2816-2820. Miyamoto Y, Ishima Y, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M. (5番目) (査読有)
19. Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics. J Control Release. 2010, 145, 9-16. Hirata K, Maruyama T, Watanabe H, Ishima Y, Hashida M, Otagiri M. (7番目) (査読有)
20. Nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) induces apoptosis in tumor cells. Nitric Oxide. 2010, 22, 259-265. Katayama N, Nakajou K, Ishima Y, Ikuta S, Yokoe JI, Yoshida F, Suenaga A, Maruyama T, Kai T, Otagiri M. (3番目) (査読有)
- [学会発表] (計 25 件)
1. ヒト血清アルブミンドメイン II によるビリルビン尿中排泄促進作用
小田切 優樹 1,2,3)、異島 優 3)、成底 徹 3)、諏訪 喜昭 3)、渡邊 博志 3)、森岡 弘志 3)、丸山 徹 3)
1) 崇城大学 薬学部、2) 崇城大学 DDS 研究所、3) 熊本大学大学院 生命科学研究部、第 28 回日本 DDS 学会学術集会 (2012/7/4-5、札幌コンベンションセンター (北海道))
2. 高分子抗癌剤の腫瘍集積性を高める S-ニトロソ化アルブミンダイマーの EPR 効果増強作用
異島 優 1,2)、井上 亜希 1)、方 軍 3)、前田 浩 4)、渡邊 博志 1,2)、小田切 優樹 1,3,4)、丸山 徹 1,2)
熊本大学大学院 生命科学研究部 医療薬剤学講座、2) 熊本大学薬学部 育薬フロンティアセンター、3) 崇城大学 薬学部、4) 崇城大学 DDS 研究所、第 28 回日本 DDS 学会学術集会 (2012/7/4-5、札幌コンベンションセンター (北海道))
3. S-ニトロソ化に伴う α 1-酸性糖タンパク質 (AGP) の抗菌機能獲得と感染症治療への応用
渡辺佳織 1, 異島 優 1, 2, 赤池孝章 3, 澤 智裕 3, 黒田照夫 4, 小川和加野 4, 渡邊博志 1, 2, 甲斐俊哉 1, 5, 小田切 優樹 1, 6, 7, 丸山徹 1, 2
(1) 熊本大・院・薬 2) 熊本大・薬・育薬フロンティアセンター 3) 熊本大・医・微生物学 4) 岡山大・医歯薬・分子微生物学 5) 東北ニプロ製薬 6) 崇城大・薬 7) 崇城大・DDS 研究所) 第 12 回日本 NO 学会学術集会 (2012/6/29-30、

神戸国際会議場(兵庫県))

4. S-ニトロソ化アルブミンにより抗アポトーシス効果を付与した改良型臓器保存液の開発
異島 優 1,2、品川 拓也 1、米重 梓二 1、甲斐 俊哉 1、赤池 孝章 3、小田切 優樹 1,4,5、丸山 徹 1,2
(1 熊本大学 薬学部 医療薬剤学、2 熊本大学 薬学部 育薬フロンティアセンター、3 熊本大学 医学部 微生物学、3 崇城大学 薬学部、4 崇城大学 DDS 研究所、) 第 12 回日本 NO 学会学術集会 (2012/6/29-30、神戸国際会議場(兵庫県))
5. S-ニトロソ化アルブミンダイマーは EPR 効果を増強する
井上 亜希 1、異島 優 1,2、方 軍 3、前田 浩 4、小田切 優樹 1,3,4、渡邊 博志 1,2、丸山 徹 1,2
(1 熊本大学 薬学部 医療薬剤学研究室、2 熊本大薬・育薬フロンティアセンター、3 崇城大学 薬学部、4 崇城大学 DDS 研究所)、日本薬剤学会第 27 年会 (2012/5/24-26、神戸国際会議場(兵庫県))
6. ブレオマイシン誘発肺線維症に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の有用性評価
田中 遼大 1、小玉 あずさ 1、異島 優 1,2、田中 健一郎 1、水島 徹 1、渡邊 博志 1,2、小田切 優樹 1,3,4、丸山 徹 1,2
(1 熊本大学大学院 薬学教育部、2 熊本大学 薬学部 育薬フロンティアセンター、3 崇城大学 薬学部、4 崇城大学 DDS 研究所)、日本薬剤学会第 27 年会 (2012/5/24-26、神戸国際会議場(兵庫県))
7. 新規翻訳後修飾体である S-グアニル化アルブミンは抗菌効果を発揮する
異島 優 1,2、星野 瞳 1、品川 拓也 1、小田切 優樹 1,3,4、渡邊 博志 1,2、丸山 徹 1,2
(1 熊本大学 薬学部 医療薬剤学、2 熊本大学 薬学部 育薬フロンティアセンター、3 崇城大学 薬学部、4 崇城大学 DDS 研究所)、日本薬剤学会第 27 年会 (2012/5/24-26、神戸国際会議場(兵庫県))
8. アルギニンペプチドを利用した細胞膜透過型アルブミンの設計と評価
濱崎 慶輔 1、渡邊 博志 1,2、弥永 直樹 1、國安 明彦 3、異島 優 1,2、小田切 優樹 1,3,4、丸山 徹 1,2
(1 熊本大薬、2 熊本大薬・育薬フロンティアセンター、3 崇城大薬、4 崇城大 DDS 研)、日本薬剤学会第 27 年会 (2012/5/24-26、神戸国際会議場(兵庫県))
9. フェージディスプレイ法を用いた尿毒症物質 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan (CMPF) 高親和性アルブミン変異体の設計
西村 知晃 1、蓑毛 藍 1、異島 優 1,2、末永 綾香 1、渡邊 博志 1,2、森岡 弘志 1、小田切 優樹 1,3,4、丸山 徹 1,2
(1 熊本大薬、2 熊本大薬・育薬フロンティアセンター、3 崇城大薬、4 崇城大 DDS 研)、日本薬剤学会第 27 年会 (2012/5/24-26、神戸国際会議場(兵庫県))
10. In vivo フェージディスプレイ法を用いた新規腎送達ペプチドの探索
弥永 直樹 1、渡邊 博志 1,2、濱崎 慶輔 1、國安 明彦 3、異島 優 1,2、小田切 優樹 1,3,4、丸山 徹 1,2
(1 熊本大薬、2 熊本大薬・育薬フロンティアセンター、3 崇城大薬、4 崇城大 DDS 研)、日本薬剤学会第 27 年会 (2012/5/24-26、神戸国際会議場(兵庫県))
11. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the activation of NADPH oxidase
Hiroshi Watanabe^{1,2}, Daisuke Honda¹, Yohei Miyamoto¹, Tsuyoshi Noguchi¹, Daisuke Kadowaki^{1,2}, Yu Ishima^{1,2}, Motoko Tanaka³, Hisae Tanaka⁴, Masafumi Fukagawa⁴, Masaki Otagiri^{1,5} and Toru Maruyama^{1,2}
(1Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, 2Center for Clinical Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, 3Department of Nephrology, Akebono Clinic, Kumamoto, Japan, 4Division of Nephrology, Endocrinology and Metabolism, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan, 5Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University, Kumamoto, Japan), 49th

ERA-EDTA Congress, Paris 2012
(2012/5/24-27, Paris(France))

12. A uremic toxin,
3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-fur
anpropionate accumulates in
proximal tubular cells and induces
cell damage through increasing
oxidative stress
Yohei Miyamoto¹, Yasunori Iwao²,
Katsumi Meral, Hiroshi Watanabe^{1,3},
Daisuke Kadowaki^{1,3}, Yu Ishima¹,
Victor Tuan Giam Chuang⁴, Keizo
Sato⁵, Masaki Otagiri^{1,6} and Toru
Maruyama^{1,3*}

(¹Department of Biopharmaceutics,
Graduate School of Pharmaceutical
Sciences, Kumamoto University, 5-1,
Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973,
Japan, ²School of Pharmaceutical
Sciences, University of Shizuoka,
52-1, Yada Suruga-ku, Shizuoka
422-8526, Japan, ³Center for
Clinical Pharmaceutical Sciences,
School of Pharmacy, Kumamoto
University, 5-1, Oe-honmachi,
Kumamoto 862-0973, Japan, ⁴School
of Pharmacy, Faculty of Health
Sciences, Curtin Health Innovation
Research Institute, Curtin
University, GPO Box U1987, Perth
6845, Western Australia, Australia,
⁵School of Pharmacy, Kyushu
University of Health and Welfare,
1714-1, Yoshino Nobeoka, Miyazaki
882-8508, Japan, ⁶Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Sojo
University, 4-22-1, Ikeda, Kumamoto
860-0822, Japan) 49th ERA-EDTA
Congress, Paris 2012 (2012/5/24-27,
Paris(France))

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

- ①名称：腎臓集積性を示すペプチド、薬物
担体、製剤、医薬組成物
発明者：渡邊博志
権利者：ニプロ株式会社
種類：特許
番号：特願 2012-097763
出願年月日：2012 年 04 月 23 日
国内外の別：国内

- ②名称：細胞膜透過性を有する製剤、細胞
膜透過性組成

物及び薬物輸送方法

発明者：渡邊博志

権利者：ニプロ株式会社

種類：特許

番号：特願 2012-097762

出願年月日：2012 年 04 月 23 日

国内外の別：国内

- ③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：異島 優

権利者：ニプロ株式会社

種類：特許

番号：P 1 1 1 N 2 1 0 2 3

出願年月日：2011 年 5 月 23 日

国内外の別：国内

- ④名称：抗癌剤増感剤

発明者：異島 優

権利者：ニプロ株式会社

種類：特許

番号：P 1 1 1 N 2 1 0 2 2

出願年月日：2011 年 3 月 29 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

- ①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：異島 優

権利者：ニプロ株式会社

種類：特許

番号：特開 2 0 1 0 - 1 7 2 2 7 7

取得年月日：2010 年 8 月 12 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

[http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/
Yakuzai/](http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

異島 優 (ISHIMA YU)

熊本大学・薬学部・助教

研究者番号：00457590