

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390043

研究課題名(和文)多臓器不全治療を目的とする次世代型アルブミン チオレドキシ融合体の設計と評価

研究課題名(英文) Design and Evaluation of Next Generation Albumin-thioredoxin Fusion Protein for Multiple Organ Failure Treatment

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) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多臓器不全モデルでのアルブミン - チオレドキシ(HSA-Trx)の治療効果を調べるため、原発臓器になりうる肺、肝、腎障害モデルのマウスを作製して以下の知見を得た。

1)ブレオマイシン誘発肺線維症およびインフルエンザ誘発肺障害に対するHSA - Trxの効果を調べたところ、有効な治療効果が確認された。2)アセトアミノフェン誘発肝障害に対する効果を調べたところ、用量依存的な肝障害抑制効果が認められた。3)シスプラチン腎症に対する融合体の有用性について評価したところ、融合体投与はScr、BUNおよびNAG活性の上昇を抑制するとともに、CLcrの低下を抑制することが判明した。

研究成果の概要(英文)：This research investigated the therapeutic effect of albumin-thioredoxin (HSA-Trx) on multiple organ failure model using mouse models of primary organ failure such as lungs, liver and kidney.

1) HSA-Trx was found to produce effective therapeutic effect in Bleomycin induced pulmonary fibrosis. 2) The inhibitory effect of fusion protein on acetaminophen induced liver disorder was found to occur in a concentration dependent manner. 3) Effectiveness of the fusion protein in cisplatin nephropathy was evaluated. The fusion protein was found to inhibit increases in Scr, BUN and NAG activity, as well as reduction in CLcr.

研究分野：薬物動態学、DDS

キーワード：アルブミン ナノメディスン レドックス 多臓器不全治療 病態モデル 肺障害 肝障害 腎障害

1. 研究開始当初の背景

従来、多臓器不全に対しては、障害臓器をピンポイントで治療ターゲットとしてきた。ところが近年、多臓器不全の死因の多くが、原発臓器以外の臓器障害に起因することが明らかとなり、原発臓器と遠隔臓器間の障害クロストークが病態の進行に大きな役割を果たすという新たな疾患概念が提唱され、この悪循環を断つことが臓器間の障害連鎖を防ぐ上で重要であると考えられるようになってきた。臓器間の障害クロストークに関するメカニズムは明らかにされていないが、臓器間を連結している血液ルートに含まれる何らかの液性因子、中でも酸化ストレスあるいは炎症関連因子の関与が高いと考えられている。そこで我々は、従来のピンポイントな臓器保護療法の限界を克服すべく、複数臓器を網羅的かつ持続的に保護する新たな治療戦略の構築を企図した。病態増悪を惹起する臓器間コミュニケーションの持続的遮断薬としては、血中滞留性に富み、抗酸化・抗炎症を兼ね備えた薬剤の開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、抗ストレスタンパク質として多様な生物活性を有し生体の恒常性維持に重要な役割を果たしているチオレドキシン (Thioredoxin; Trx) に着目した。Trx は細胞内外において優れた抗酸化・抗炎症作用を発揮するため虚血再灌流障害、心筋炎、肺線維症、脳卒中、肝疾患、敗血症など様々な病態に対して臓器保護効果を示すことが明らかにされている。Trx は容易に糸球体ろ過を受けるために、体内からの消失半減期が約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。最近、我々はアルブミン融合技術を活用し、この課題を初めて克服することに成功した。すなわち、本研究では、

HSA-Trx 誘導体を設計・作製し、()物理化学的特性、()生物活性(抗酸化・抗炎症作用)、()体内動態特性、()変異原性等の有害性、を多角的に解析する。

3. 研究の方法

病態モデル動物の作成: BLM 肺線維モデルマウスは BLM を生理食塩水に溶解し、1 mL/kg の投与量で経気道投与を行うことで作成した。インフルエンザ誘発モデルマウスはインフルエンザウイルスを経気道投与して作成した。APAP 誘発肝障害モデルマウスは APAP を腹腔内単回投与して作成した。HE 染色及び Massons trichrome 染色: 還流後に組織を摘出して、固定化し、スライスして切片を作製した。免疫染色は作成した切片を洗浄後、可溶化、ブロッキングを行い、一次抗体、二次抗体反応を行った。活性型 TGF-1, IL-6, TNF- は ELISA kit を用いて定量した。細胞内 ROS 及び NO の産生は MFI ratio を算出して評価した。

4. 研究成果

本研究では、HSA-Trx の生物活性と体内動態特性を鑑み、酸化ストレス関連疾患に対する新規治療薬としての可能性を検証した。具体的には、慢性肺障害としてプレオマイシン誘発肺線維症、急性肺障害としてインフルエンザ誘発肺障害、急性肝障害としてアセトアミノフェン誘発肝障害、腎障害としてシスプラチン腎症モデルを選択し、臨床応用を考慮して、これらの病態モデルマウスに対する治療効果を HSA-Trx の前投与及び後投与で検討した。以下に得られた知見を要約する。

(1) 未だ有用性の高い治療薬が存在しない特発性肺線維症に対する治療薬としての可能性を検証すべく、BLM 誘発肺線維症に対する HSA-Trx の有用性を評価した。その結果、週1回投与で有意な肺線維化抑制効果が確認された。またこの効果は、Trx 単独の2日に1回の腹腔内繰り返し投与とほぼ同程度

であった。対照的に、同条件下の HSA 及び Trx 単独投与では、線維化に対する抑制効果は認められなかった。また、HSA-Trx 投与により、BLM 処置 7 日後における肺組織中活性型 TGF- β 1 の発現量が抑制された。そこで、Trx の抗酸化・抗炎症効果に着目して、病態形成の初期段階における気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中炎症性細胞 (好中球、肺胞マクロファージ、リンパ球)、肺線維中炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) とケモカイン (MIF) および酸化ストレス (8-OH-dG, NO₂-Tyr, MDA) を評価したところ、いずれも BLM 処置により誘導されたが、その変動は HSA-Trx の投与により顕著に抑制された。さらに、病態化における HSA-Trx の体内動態を検討したところ、HSA-Trx は健常マウスとほぼ同等の能動プロファイルを示し、Trx 単独と比較して、血中滞留性の上昇及び投与後 2 時間における肺組織移行性の亢進が認められた。

(2) インフルエンザウイルス感染誘発の急性肺障害モデルマウスを作製し、HSA-Trx の肺障害抑制効果を検証した。BALF 中の好中球数が上昇し始める感染 4 日後で、HSA-Trx あるいは Trx を投与したところ、HSA-Trx 投与群でのみ有意な障害抑制効果及び生存率の改善が確認された。また、HSA-Trx は、インフルエンザ誘発の BALM 中好中球数の上昇および酸化ストレス (肺組織 8-OH-dG, NO₂-Tyr, 血中ヒドロペルオキシド量) の誘導を抑制したものの、BALF 中肺胞マクロファージ数の上昇及び IFN- γ 産生、肺組織 iNOS の発現には影響を与えなかった。

(3) APAP 誘発肝障害においても病態形成に酸化ストレスが重要な役割を果たしていることから、本モデルを用いて HSA-Trx の有用性を評価した。その結果、HSA-Trx では、用量依存性の肝障害抑制効果が認められ、APAP 誘発致死モデルの生存率を有意に改善した。他方、HSA 群では有用性が認められず、

Trx 群では抑制効果はみられたものの、その効果は、HSA-Trx 群よりも劣っていた。次に、酸化ストレスに関する評価を行ったところ、HSA-Trx は APAP 誘発の肝組織における 8-OH-dG、NO₂-Tyr の蓄積及び GSH/GSSG 比の低下を顕著に抑制した。加えて、HepG2 を使用した *in vitro* における検討で、HSA-Trx は SIN-1 誘導の ROS 及び NO を濃度依存的に抑制した。また炎症性サイトカイン及びケモカインに関する評価を行ったところ、HSA-Trx は TNF- α 、IFN- γ 及び MIF の発現上昇を抑制した。

(4) シスプラチン腎症マウスを作成し HSA-Trx の腎保護効果を評価したところ、CIN に対する効果と同様の結果が得られたことに加え、腎組織中 TNF- α 、IL-1 β 及び IL-6 の上昇を抑制した。FITC-HSA-Trx の腎臓内動態について検討した結果、尿細管上皮細胞に FITC 由来の傾向が観察された。FITC の分布は皮質において強く認められ、一部は皮随境界領域まで達していた。抗 HSA 抗体及び抗 megalin 抗体を用いた免疫染色の結果、抗 HSA 抗体で検出された領域は FITC 由来の蛍光とよく一致しており、この領域は megalin の発現部位と一部オーバーラップしていた。したがって、HSA-Trx の一部は megalin/cubilin を介したエンドサイトーシスにより尿細管上皮細胞へ移行することが示唆された。

以上、本研究では HSA-Trx は酸化ストレスが病態形成に関与する慢性肺障害、急性肺障害、急性肝障害及び腎障害に対して優れた効果を発揮することが明らかになった。また、その作用には、Trx のラジカル消去能、好中球の炎症部位への遊走阻害作用、MIF の発現抑制を介した炎症性サイトカインの阻害効果が関与していた。

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 49 件)

Taguchi K, Chuang VTG, Yamasaki K, Urata Y, Tanaka R, Anraku M, Seo H, Kawai K, Maruyama T, Komatsu T, Otagiri M. Cross-linked human serum albumin dimer HSA the potential for use as a plasma retaining-agent for the fatty acid-conjugated antidiabetic drugs. *J Pharm Pharmacol*. 67:255-63. (2015), 査読有, doi: 10.1111/jphp.12338

Tanaka R, Ishima Y, Enoki Y, Kimachi K, Shirai T, Watanabe H, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Therapeutic Impact of Human Serum Albumin-Thioredoxin Fusion Protein on Influenza Virus-Induced Lung Injury Mice. *Front Immunol*. 5:561. (2014) , 査読有 , doi: 10.3389/fimmu.2014.00561.

Ishima Y, Fang J, Kragh-Hansen U, Yin H, Liao L, Katayama N, Watanabe H, Kai T, Suenaga A, Maeda H, Otagiri M, Maruyama T. Tuning of poly-S-nitrosated human serum albumin as superior antitumor nanomedicine. *J Pharm Sci*. 103:2184-2188. (2014), 査読有 , doi: 10.1002/jps.24020.

Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Tanaka R, Horinouchi H, Watanabe H, Kobayashi K, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials*. 35:6553-6562. (2014) , 査読有 , doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.049

Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Ishima Y, Maruyama T, Kragh-Hansen U,

Hirayama F, Otagiri M. 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. *Biochim Biophys Acta*. 1840:2806-2812. (2014), 査読有 , doi: 10.1016/j.bbagen.2014.04.014

Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, Kodama A, Nagao S, Watanabe H, Chuang VT, Otagiri M, Maruyama T. Albumin fusion prolongs the antioxidant and anti-inflammatory activities of thioredoxin in mice with acetaminophen-induced hepatitis. *Mol Pharm*. 11:1228-1238. (2014) , 査読有 , doi: 10.1021/mp400690v

Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Kondo M, Chuang VT, Wu Q, Endo M, Ishima Y, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 1840:1152-1162. (2014) , 査読有 , doi: 10.1016/j.bbagen.2013.12.007

Ishima Y, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Otagiri M. Poly-s-nitrosated albumin as a safe and effective multifunctional antitumor agent: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Biomed Res Int*. 2013:353892. (2013) , 査読有 , doi: 10.1155/2013/353892

Anraku M, Chuang VT, Maruyama T, and Otagiri M. Redox properties of

serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 1830:5465-5472. (2013) ,査読有, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.036

Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, and Otagiri M. Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity HSA a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim Biophys Acta*. 1830:2917-2923. (2013) , 査読有 , doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.006.

Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka K, Mizushima T, Otagiri M, and Maruyama T. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther*. 345:271-283. (2013) , 査読有 , doi: 10.1124/jpet.112.201814

Ishima Y, Hoshino H, Shinagawa T, Watanabe K, Akaike T, Sawa T, Kragh-Hansen U, Kai T, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M. S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J Pharm Sci*. 101: 3222-3229. (2012) ,査読有, doi: 10.1002/jps.23143.

Taguchi K, Giam Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Pharmaceutical aspects of the recombinant human serum albumin dimer: Structural characteristics, biological properties, and medical applications. *J Pharm Sci*. 101:

3033-3046. (2012) , 査読有 , doi: 10.1002/jps.23181

Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. *IUBMB Life*. 64: 450-454. (2012) ,査読有, doi: 10.1002/iub.567

[学会発表](計88件)

Masaki Otagiri, Therapeutic Applications of Albumin-Thioredoxin Fusion Protein, 10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses in collaboration with ACS Lille, 2014/9/7-10, Lille(France)

M.Otagiri. Pharmacokinetics of serum albumin variants, Innovation workshop on Albumin: The next generation protein therapeutics 2014, 2014/7/12, Chicago(USA)

異島優、インフルエンザ肺炎モデルマウスに対するヒト血清アルブミン-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134年会、2014/3/27-30、熊本大学(熊本県熊本市)

Masaki Otagiri , Albumin-Thioredoxin Fusion Protein is Effective in Suppressing Lung Injury, 9th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference , 2013/5/11-14, Orlando (USA)

Masaki Otagiri , Development of recombinant serum albumin, The International Liver Congress 2013 48th annual meeting of the European

association for the study of the liver,
2013/4/24-28, Amsterdam (Holland)

Otagiri M, The potential of albumin for use
as a nanomedicine carrier, Montreal 2012
international forum on environment and
medicine, 2012/7/24-25,
Montreal,Quebec(Canada)

Otagiri M, Human serum albumin as a
nanomedicine carrir, Nanoformulation 2012,
2012/5/28-6/1, Barcelona(Spain)

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