

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790159

研究課題名(和文)一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の特発性肺線維症新規治療薬としての有用性評価

研究課題名(英文) Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles as a potential therapeutic agent for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis

研究代表者

田口 和明 (Taguchi, Kazuaki)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：90621912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素(CO)結合型ヘモグロビン小胞体(CO-HbV)の適応疾患候補として、有効な治療薬が存在しない難治疾患である特発性肺線維症(IPF)への有用性をブレオマイシン(BLM)誘発IPFマウスモデルを用い評価した。その結果、CO-HbVはBLM誘発IPFマウスモデルの肺線維化及び肺機能の低下を有意に抑制した。また、CO-HbV投与により気管支肺胞洗浄液中の白血球浸潤、肺組織中の炎症性サイトカイン産生、活性酸素の産生の抑制、更には線維化因子の一つであるTGF- β の発現を抑制した。以上の結果より、CO-HbVはIPFの新規治療薬になりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Carbon monoxide (CO) has potent anti-inflammatory and anti-oxidant effects. We prepare a CO-bound hemoglobin-vesicles (CO-HbV), and evaluated the therapeutic effect of CO-HbV on idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) that is thought to involve inflammation and the production of reactive oxygen species (ROS). CO-HbV suppressed the progression of pulmonary fibril formation and improved respiratory function compared to saline and HbV in a bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice model. The suppressive effect of CO-HbV on pulmonary fibrosis can be attributed to a decrease in ROS generation by inflammatory cells, cytokines and transforming growth factor-beta in the lung. This is the first demonstration of the inhibitory effect of CO-HbV on the progression of pulmonary fibrosis via the anti-oxidative and anti-inflammatory effects of CO in the bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice model.

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：ヘモグロビン リポソーム 一酸化炭素 特発性肺線維症

1. 研究開始当初の背景

現代の医療現場において、酸素や一酸化炭素のガス分子に加え、一酸化炭素 (CO) が第3の医療ガス分子として注目されている。これまでCOは酸素の約200倍でヘモグロビンに結合する結果、ヘモグロビンによる酸素運搬を阻害し、細胞内窒息を起こす有毒ガスとして認知されてきた。しかしながら、近年、興味深いことに、COは生体内ストレスに過敏に反応するメディエーターとして、抗炎症作用・抗アポトーシス作用・血管弛緩作用・抗酸化作用・抗菌作用等、多様な情報伝達物質として優れた機能を発揮することが明らかとなり、新たな医療ガスとしての臨床応用が世界中で試みられている。既に、高気圧酸素療法やニトログリセリンを基盤としたCO吸入療法や低分子CO供与体 (Carbon monoxide release molecule: CORM) が開発され、免疫異常疾患・感染症モデル動物などの慢性・急性疾患において有効性を発揮することが実証されている。しかしながら、CO吸入療法やCORMを臨床使用した場合、前者は高圧酸素療法時に使用するような高額な設備投資が必要である。さらに、COの強力な有害作用を考慮すると専門技師の常在が必要と考えられるため、簡便性に欠けている。加えて、1日数時間の持続的なCO吸入が連日必要となるため、患者のQuality of life (QOL) の低下が懸念される。また、半減期が1-2分と非常に短いCORMの場合も、CO吸入療法と同様に1日数回の頻回投与が必要であり、QOLの維持は困難である。したがって、COの臨床応用を実現するためには、新規CO運搬体が必要不可欠である。

リン脂質膜にヘモグロビンを高濃度に封入したヘモグロビン小胞体 (HbV) はヘモグロビンとともにアロステリック因子などの共物質を封入することで赤血球と類似した機能を可能としているため、短時間かつ簡便な方法でCO結合型HbV (CO-HbV) を作製することが可能である。また、これまでのHbVの臨床応用に向けた基盤研究において、HbVの安全性に加え、ヒトにおける半減期は約4日間と予測されており、十分な安全性と血中滞留性を有すると考えられる。このように、簡便に作製でき、長い半減期を有したHbVは新規CO運搬体として適していると考えられる。そこで本研究では、新規CO運搬体としてHbVを活用し、CO-HbVの新規治療薬としての可能性を追求する。

2. 研究の目的

本研究では、COのキャリアとして、COに高い親和性を持つHbVに着目し、HbVにCOを付加したCO-HbVを作製し、HbVの新規CO運搬体としての可能性を評価した。具体的には、CO-HbVの安全性・毒性試験を行うと共に、予後不良な慢性の肺線維症である特発性肺線維症 (IPF) の有効な新規治療薬としての可能性を特発性肺線維症モデルマウスを用い

て追隨した。

3. 研究の方法

(1) CO-HbVの安全性評価

健常マウスにCO-HbVを100, 250, 500, 1000, 1400 mg Hb/kgで投与し、1日・3日・7日・14日・28日後に血液サンプルを回収し、生化学パラメータ (クレアチニン・AST・ALT・リパーゼなど) の測定を行った。また、血液をサンプリング後、臓器 (腎臓・肝臓・心臓・肺・脾臓) を回収し、ヘマトキシリン・エオジン染色により組織学的評価を行った。

(2) コロニーアッセイ

コロニーアッセイ用高粘性培地に 5×10^3 cells/mLに調製したヒト骨髄由来CD34⁺細胞にCO-HbVを加え、37°C、5% CO₂条件下で培養した。播種28日後まで、経時的にコロニー数を観察した。

(3) IPFモデルマウスの作成

Sea-ICRマウス (オス、6週齢) に非絶食、抱水クロラール麻酔下において、プレオマイシン (5 mg/kg) を経気道投与することにより作成した。

(4) サンプルの投与

プレオマイシン投与30分前及び1日後に生理食塩水、HbV (1000 mg Hb/kg) またはCO-HbV (1000 mg Hb/kg) を尾静脈より投与した。

(5) 肺線維化及び肺機能評価

IPFモデルマウスにサンプル投与後、3日目に肺胞洗浄液中の細胞数を、14日目に肺線維化の評価 (Masson's trichrome染色及びヒドロキシプロリン定量) 及び努力肺活量の測定を行い、治療効果の評価を行った。

4. 研究成果

健常マウスにCO-HbVを100, 250, 500, 1000, 1400 mg Hb/kgで投与し、1日・3日・7日・14日・28日後に血液サンプルを回収し、生化学パラメータ (クレアチニン・AST・ALT・リパーゼ・電解質など) の測定を行った。その結果、HbV構成成分 (内部ヘモグロビン、脂質膜成分) の代謝産物と考えられるビリルビンや脂質関係パラメータの上昇が確認されたものの、各臓器傷害を反映するパラメータの変化は確認されなかった。また、臓器 (腎臓・肝臓・心臓・肺・脾臓) をヘマトキシリン・エオジン染色により形態を観察した結果、すべての臓器において臓器傷害性は確認されなかった。さらに、ヒト骨髄由来CD34⁺細胞にCO-HbVを最終濃度で1%, 3%になるように添加し、コロニーアッセイ法によりCO-HbVの造血作用への影響を検討した。その結果、CO-HbV添加28日後までコントロール群とCO-HbV添加群でコロニー数および形態に変化は確認されなかった。

そこで、CO-HbV の IPF 治療薬としての可能性を追求するために、BLM 誘発 IPF モデルマウスを作製し、BLM 投与 30 分前及び 1 日後に、生理食塩水、HbV または CO-HbV を尾静脈投与し、肺線維化の評価（マッソントリクローム染色とヒドロキシプロリンの定量）を 3 群間で比較した。マッソントリクローム染色の結果、生理食塩水投与群及び HbV 投与群において顕著な線維化の進行が見られたのに対し、CO-HbV 投与群では、その進行の抑制が確認されていた（図 1A）。また、ヒドロキシプロリンを定量した結果、マッソントリクローム染色の結果と同様に、生理食塩水投与群及び HbV 投与群においては有意な産生の増加が確認されたのに対して、CO-HbV 投与群においてその抑制が確認された（図 1B）。さらに、CO-HbV 投与による肺機能への効果について評価を行った。評価項目としては、肺線維症をはじめとする拘束性障害でその値が低下することから IPF 患者に対する治療効果の指標として用いられている努力肺活量（FVC）により評価を行った。その結果、生理食塩水投与群及び HbV 投与群では線維化に伴う FVC の低下が認められたのに対し、CO-HbV 投与群では、その抑制が確認された（図 2A）。また、肺全体及び肺胞の硬さを測定した結果、FVC と同様に CO-HbV 投与群では、肺機能悪化の抑制が確認された（図 2B, C）。以上の結果より、CO-HbV は IPF に対する治療効果を有することが確認された。

これまでの報告で、IPF の進行には炎症と活性酸素が関与していることが報告されている。そこで続いて、CO-HbV の IPF 進行抑制メカニズムの解明を CO の抗炎症及び抗酸化作用に着目し、検討した。その結果、CO-HbV 投与により気管支肺胞洗浄液中の白血球浸潤と肺組織中の炎症性サイトカイン産生量は有意に減少し、抗炎症効果が認められた。また、肺組織中酸化産物（ニトロチロシン・8-OHdG）の免疫染色及びスーパーオキシドを反映する DHE 染色の結果より、CO-HbV 投与により肺組織中の酸化産物は著明に減少し、抗酸化作用も認められた（図 3）。加えて、CO-HbV 投与により、線維化因子の一つである TGF- β の発現抑制も観察された（図 4）。

最後に、BLM 誘発 IPF マウスモデルにおける、CO-HbV の安全性評価も行った。その結果、CO-HbV 最終投与後 1 日・3 日・7 日・14 日目の生化学パラメータは健常マウスと同様に HbV 構成成分の代謝産物と考えられるビリルビンや脂質関係パラメータの一過性の上昇が確認されたが、クレアチニンやトランスアミナーゼなどの臓器傷害を反映するパラメータの変化は確認されなかった。

以上の結果より、CO-HbV は CO の抗炎症・抗酸化作用を発揮し、また、線維化の中心的な原因となる TGF- β 産生を抑制することで、BLM 誘発の肺線維化に対して抑制効果を発揮することが明らかとなり、CO-HbV の安全性を加味すると、IPF の新規治療法になりうる可

能性が強く示唆された。

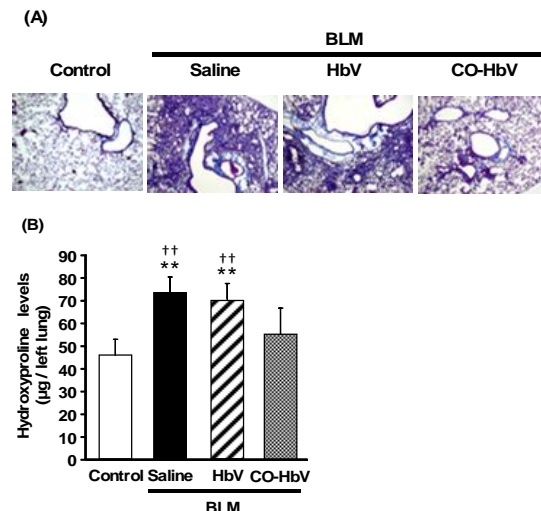


図 1. 肺組織線維化の評価。(A) マッソントリクローム染色、(B) ヒドロキシプロリンの定量

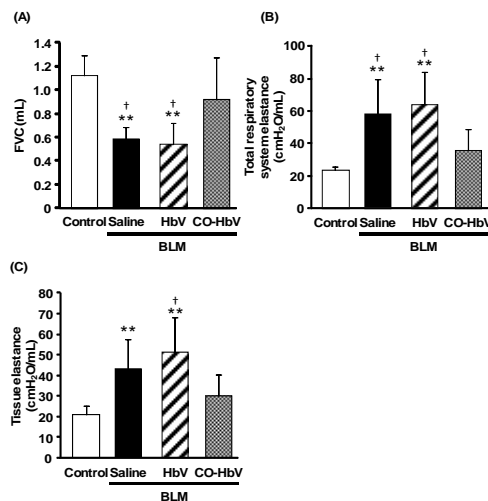


図 2. 肺機能検査。(A) Forced vital capacity, (B) total respiratory system elastance, (C) tissue elastance

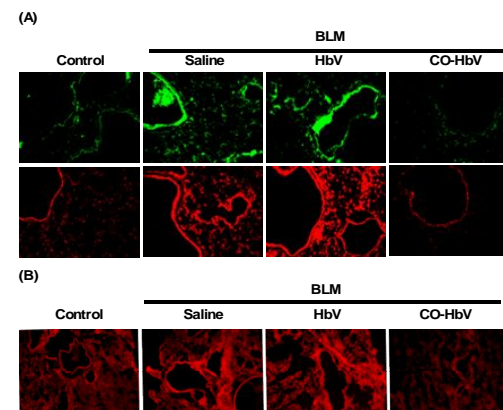
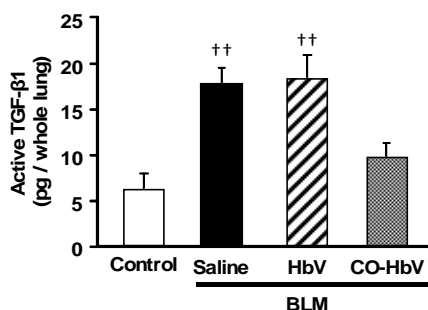


図 3. (A) 肺組織中酸化産物（上：ニトロチロシン、下：8-OHdG）の免疫染色及び (B) スーパーオキシド産生量

図 4.



CO-HbV の肺組織中 TGF-β産生の抑制効果

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 3 件)

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*, 査読有, 2014

doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.049

Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome P450 impairment in hemorrhagic-shock rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 査読有, 2013;41(1):141-8.

doi: 10.1124/dmd.112.048744.

Kaga M, Li H, Ohta H, Taguchi K, Ogaki S, Izumi H, Inagaki M, Tsuchiya S, Okamura K, Otagiri M, Sakai H, Yaegashi N. Liposome-encapsulated hemoglobin (hemoglobin-vesicle) is not transferred from mother to fetus at the late stage of pregnancy in the rat model. *Life Sciences*, 査読有, 2012;91(11-12):420-8.

doi: 10.1016/j.lfs.2012.08.021.

[学会発表](計 3 件)

田口和明、他、一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の特発性肺線維症治療薬としての創製 第 20 回日本血液代替物学会年次大会 2013/12/6-7 (奈良)

Ogaki S, Taguchi K, 他 Carbon monoxide bound red blood cells protect the expression of hepatic cytochrome P450 after resuscitation from hemorrhagic shock via inactivation of Kupffer cells. *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013* 2013/11/21-22 (Jeju, Korea)

Taguchi K 他、 Preclinical studies of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier in non-human primate. 14th International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics

2013/10/18-21 (Chengdu, China)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田口 和明 (TAGUCHI KAZUAKI)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号 : 90621912