

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 18 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282136

研究課題名(和文)人工赤血球の酸素運搬機能時間を体内電子供与系の活用により飛躍的に延長させる

研究課題名(英文) Prolonged functional lifespan of artificial red cells by using the electron energies produced by erythrocyte glycolysis

研究代表者

酒井 宏水 (SAKAI, HIROMI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70318830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：人工赤血球(ヘモグロビンベシクル, Hb-V)は、輸血代替として体内における酸素運搬機能と安全性が実証されている。Hb-VはmetHb還元酵素系を持たないため、投与後metHbが漸増する。電子伝達物質メチレンブルー(MB)を投与すると、赤血球解糖系で産生される還元型NAD(P)Hの電子エネルギーがMBを介してHb-Vに移動し、metHbを還元することが解った。さらに、電子伝達系として作動しうる分子14種について検討したところ、幾つかの有効な分子が見つかった。脂質膜への親和性、酸化還元電位、NAD(P)Hとの反応性、還元型分子の酸素との反応性などが、重要な因子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In vivo safety and efficacy of artificial red cells (Hb-vesicles, Hb-V) as a transfusion alternative have been clarified extensively. Gradual autoxidation of ferrous Hb in Hb-V to form ferric metHb is inevitable and results in decreased oxygen carrying capacity. We found that metHb in Hb-V can be reduced to ferrous Hb by using the electron energies produced by erythrocyte glycolysis, via methylene blue as a transmembrane electron mediator. We tested other 14 candidate mediators, and found some other potential molecules that can reduce metHb effectively, as did methylene blue. The requisite chemical properties as a potential electron mediator are clarified. We established an indirect enzymatic metHb reducing system for Hb-V using unlimited endogenous electrons created in RBCs in combination with an effective electron mediator that prolongs the functional lifespan of HbV in blood circulation.

研究分野：人工赤血球

キーワード：人工酸素運搬体 人工赤血球 リポソーム ヘモグロビン 電子伝達物質 メトヘモグロビン 輸血代替

1. 研究開始当初の背景

人工赤血球(ヘモグロビン-ベシクル, Hb-V)は、酸素を結合する蛋白質Hb約3万個を脂質膜で包んだ小球粒子(直径:約250 nm)である【図1】。その濃厚分散系(占有体積40%, [Hb]=10 g/dL)の特徴は、(a) 血液型が無い、(b) ウィルスなど感染源を排除、(c) 室温で2年以上の備蓄が可能、(d) 大量投与しても代謝系を経て分解排泄される、(e) 血漿中に均一分散し、赤血球が到達し得ない末梢組織にも酸素を供給する、更に(f) 出血性ショック蘇生液として、赤血球と同等の酸素運搬効果と安全性を有する(Sakai et al., *J Intern Med* 2008; *Crit Care Med* 2004; *Shock* 2012)。北米で展開された修飾Hb(分子内架橋, 重合体)は、血管内皮由来弛緩因子: NOを捕捉し、血管収縮や血管損傷などを引き起こすが(Natanson et al, *JAMA* 2008)、(g) 対してHb-Vは、本来毒性を有するHb分子を脂質膜で覆うことで、副作用を回避できる(Sakai et al., *J Biol Chem* 2008ほか)。日本の献血-輸血システムの安全性は世界最高水準にあるが、新興ウィルスなど感染の脅威や、保存期限が短く緊急時や大規模災害時の危機管理に不安も残る。Hb-Vの実用化されれば、これら輸血の問題点を一挙に解決できる。一方で課題の一つとしてmetHb還元酵素系を排除したHb-VはHbの自動酸化($\text{HbO}_2[\text{Fe}^{2+}] \rightarrow \text{metHb}[\text{Fe}^{3+}] + \text{O}_2$)のため、機能寿命に限界がある。血漿中に常在するアスコルビン酸(AsA)など水溶性還元剤は、脂質膜を透過できずmetHbを還元できない。申請者らは様々な非酵素的還元系の構築を試みたが(Sakai et al., *Biochemistry* 2000; *Bioconj Chem.* 1997, 2003, 2004, 2006, 2009)、実用的な効果を得る迄には至らなかった。

2. 研究の目的

人工赤血球「ヘモグロビン-ベシクル, Hb-V」は、静脈内投与後、 HbO_2 は次第に酸化してmetHbとなり、酸素運搬機能が漸減する。最近、Phenothiazine系色素(メチレンブルー: MB^+)の投与によって、Hb-V中のmetHbが速やかに還元されることが予備的検討から明らかになった。細胞内の解糖系で産生されるNADH, NADPHなど、還元型ニコチン酸アミドの電子エネルギーは、細胞膜を介した電子伝達経路によって細胞外にも供与されることが知られており、Hb-VのmetHb還元はこの電子供与系に関与しているのでは?と考えた。本研究では、生体細胞の電子伝達・供与機能を活用し、metHbを還元して人工赤血球の血中機能寿命を飛躍的に延長させ人工赤血球の適用範囲を拡大させること、またその作用経路の分子科学的解明を目的とする。

3. 研究の方法

人工赤血球(Hb-V)投与後に MB^+ を投与し、metHb還元効果を定量的に計測する。臨床的状況を想定し血液交換率が50-60%に到達した状態で効果を最大限に引き出せる条件を見出す。反応機序の解明に関しては、赤血球/Hb小胞体/ MB^+ の混合比を換えた*in vitro*実験、電子供給源の推定、NAD(P)H内包小胞体/Hb小胞体/ MB^+ 混合系におけるmetHb還元の効果を検討する。

1) 単回投与試験(ラット)、出血性ショック蘇生モデル(ラット)を用いる酸素運搬機能持続性の検証

2) 電子供与体の推定、赤血球膜を介した MB^+ 拡散による電子移動の推定

3) Phenothiazine系色素ほか電子伝達系物質の検討: Hb小胞体中のmetHbへの電子伝達媒体として、 MB^+ 以外にも候補物質が存在する可能性がある。そこで、Toluidine blueのほか類似体(Azure, Thionine, Methylene greenなど)の反応性を計測し MB^+ と比較する。

4. 研究成果

1) *in vivo*試験による MB^+ 同時投与の効果の検証

Wistar系ラット(雄性, n = 3)に対し、Isoflurane吸入麻酔、大腿動静脈より、メト化率が約50%の人工赤血球(Hb-V)を静脈内投与(10 mL/kg)し、次いで5分後に MB^+ を投与したところ、 MB^+ の投与量が多くなるにつれ、明らかなmetHb還元効果が得られた(Fig. 1)。したがって、 MB^+ が血管内で還元され、Leukomethylene blue (MBH)になり、これがHb-Vに到達してmetHbを還元していることが推察された。

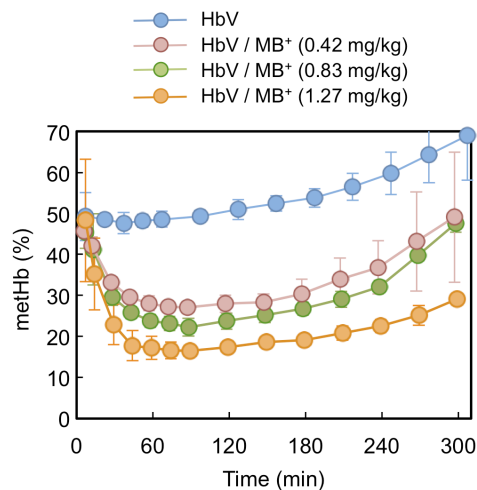


Fig. 1. Hb-V (メト化率50%)を投与したあとに MB^+ を投与したときのmetHb還元効果

2) *in vitro*試験による電子供与体、電子伝達経路の推定

メト化率が50%のHb-Vについて、ラット血液成分と混合し、これにMB⁺を添加したあとのメト化率の推移を検討した。全血および洗浄赤血球にはmetHb還元効果が見られたが、血漿分画には効果が見られなかった(Fig. 2)。したがって、電子供与体は赤血球内に存在することが推定された。

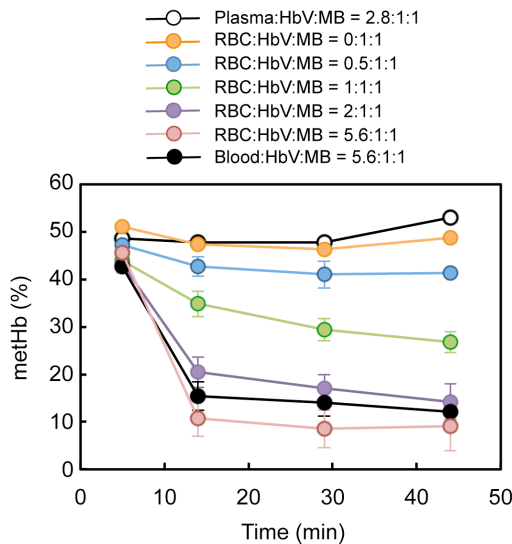


Fig. 2. Hb-V (メト化率50%)に血液成分を混合したあとにMB⁺を添加したときのmetHb還元効果

次に、赤血球内の何が電子供与体になっているかを推定するため、可能性のある物質としてNADH, NADPHを定量したところ、Hb-V内のmetHbを還元した後に急激に低下していることが明らかになった (Fig. 3)。また、赤血球分散液にグルコースを添加すると、還元効果が増強されたことから、解糖系が関与していることが明らかになった。

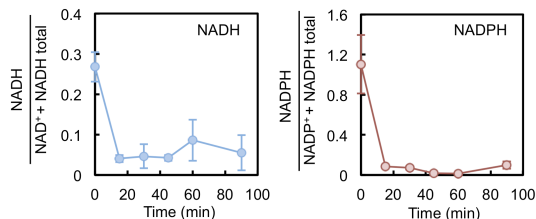


Fig. 3. 赤血球内のNADH, NADPHの消費

そこで、NAD(P)Hが電子供与体であることを更に実証するため、NAD(P)Hのみを内包したリポソームを調製し赤血球モデルとし、これとHb-Vを混合させ、MB⁺を添加したところ、metHb還元効果が見られた。これらのことから、電子供与体は、解糖系により繰り返し還元体に還元されるNAD(P)Hであることが断定された。

3) *in vivo*試験によるMB⁺の投与効果の検証

メト化率が5%以下のHb-Vをラット大腿動脈から投与(10 mL/kg)する実験において、MB⁺を5分後に投与する場合と、ある程度メト化率が上昇してから投与する場合について検討した (Fig. 4)。5分後に投与した場合は、メト化速度が低減することが確認された。また、メト化率が30%程度に到達した300分後にMB⁺を投与した場合、メト化率が瞬時に10%にまで低下した。したがって、実際にHb-Vを投与した場合には、メト化率が上昇した時点でMB⁺を投与することにより、Hb-Vの酸素運搬機能を延長させることができることが明らかとなった。

また、出血性ショック蘇生試験(Wistar系ラット, isoflurane麻酔)において、麻酔下、ラットの循環血液量の50%を脱血して出血性ショック状態とし、アルブミン溶液に分散させたHb-Vを投与した。メト化率が50%程度にまで上昇した時点でMB⁺を投与したところ、メト化率は瞬時に10%程度にまで低下した。その後約20時間後にメト化率が50%に低下した時点で、再度MB⁺を投与したところ、メト化率は瞬時に低下した。更に約25時間後にメト化率が50%程度に上昇した時点でMB⁺を投与したところ、メト化率の低下がみられた。このように、繰り返しMB⁺の投与によってHb-V中のmetHbを効率よく還元できることが実証された。したがって、メト化率が上昇しても、MB⁺の投与によって酸素運搬機能を回復できるので、機能的血中半減期は大幅に延長できることが明らかになった。

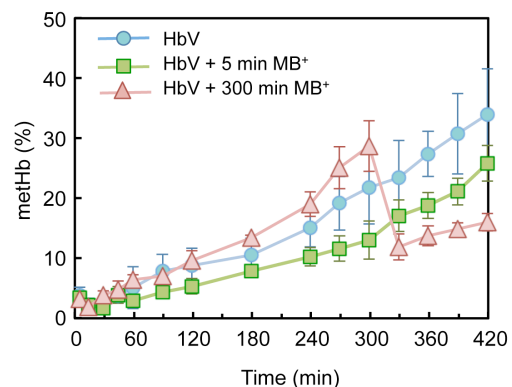


Fig. 4. Hb-V投与後5分または300分後にMB⁺を投与する場合のメト化率の推移

以上のことから、MB⁺による還元システムは、Fig. 5のようになると考えられる。つまり、血管内投与したMB⁺は、赤血球膜を透過して赤血球内に存在するNAD(P)Hによって還元され、leukomethyleneblue (MBH)に還元される。この反応によって酸化されたNAD⁺は、解糖系のGAPDHによってNADHに繰り返し還元される。また

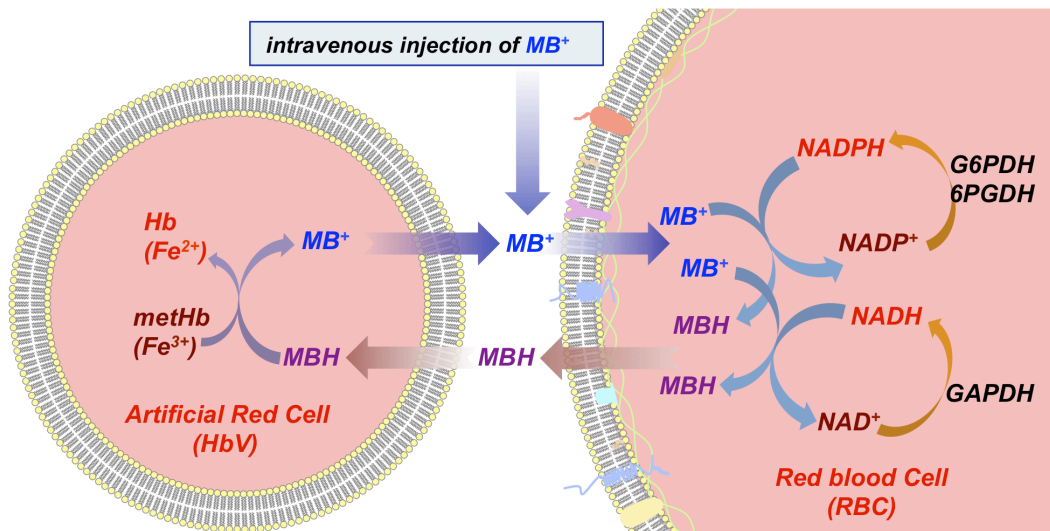


Fig. 5. メチレンブルー(MB⁺)の併用投与による、人工赤血球(Hb-V)の中のmetHbを還元する方法。赤血球内のNAD(P)Hが電子供与体、MBが電子伝達体として作動する。酸化型NAD(P)⁺は、解糖系酵素によって繰り返し還元体NAD(P)Hに還元される。

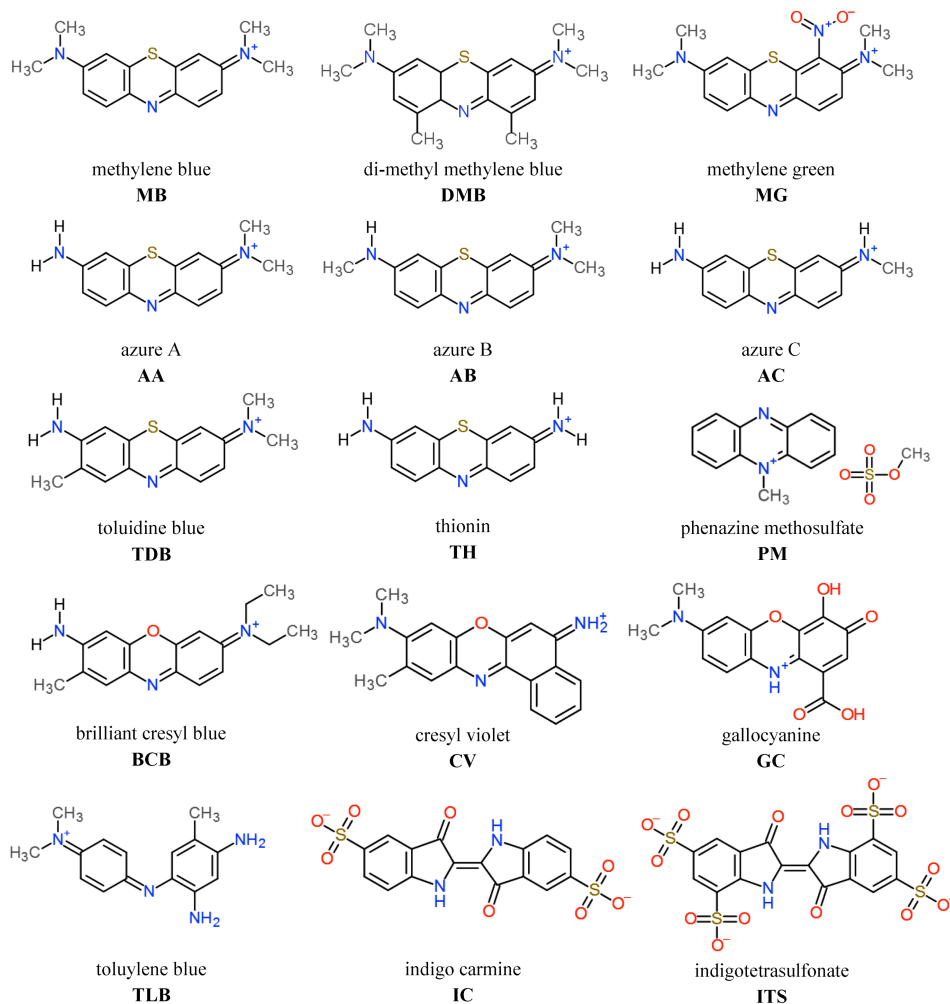


Fig. 6. 本研究で検討した電子伝達系物質の一覧。このうち、MBと同等の効果がDMBおよびTDBで確認された。

NADP⁺は、解糖系のG6PDH, 6PDGHによってNADPHに繰り返し還元される。MBHは脂溶性を増しており、容易に赤血球膜を透過し、水相に移行し、Hb-Vと接触して脂質膜を透過し、Hb-V内のmetHbに電子を伝達

する。酸化体となったMB⁺は再度、水相に移行し、赤血球に取り込まれ、同様の反応が繰り返し生起するものと考えられる。

赤血球にグルコースが供給され、赤血球

内の解糖系が温存される限り、解糖系から産生される電子エネルギーは無尽蔵である。この電子エネルギーを使用することで人工赤血球Hb-VのmetHbを還元して機能寿命を大幅に延長できることが明らかになった。本研究は、次の論文で発表された。Sakai et al., Red blood cells donate electrons to methylene blue mediated chemical reduction of methemoglobin compartmentalized in liposome in blood. *Bioconjugate Chem.* 25, 1301-1310 (2014)

4) メチレンブルーに代わる電子伝達物質の検討

MB⁺の投与によりHb-V中のmetHbを効率よく還元することができた。MB⁺は臨床的にも使用されており、安全性も十分に実証されている。しかし、MB⁺と類似の構造の色素分子や、様々な電子伝達系物質が知られているので、MB⁺を上回る効果を示す物質系もありうる。そこで、酸化還元電位、水に対する溶解度、再酸化速度などの観点から、14種類の新たな物質系について、有効性を検討した。その物質名は、dimethyl methylene blue (DMB), methylene green, azure A, azure B, azure C, toluidine blue (TDB), thionin acetate, phenazine methosulfate, brilliant cresyl blue, cresyl violet, galloxyanin, toluylene blue, indigo carmine, indigotetrasulfonate, そして、MB⁺である(**Fig. 6**)。このうち、6種については、脂質膜を透過しないこと、水に対する溶解度が低いこと、実質的に反応が生起しない、あるいは反応が早すぎる(活性が高すぎる)ことなどのため、不適であった。しかし、9種については、metHbの還元効果をしめした。その中でも、Phenothiazine であるDMBと、TDBがMBと同等の還元効果を示した。MB⁺と比較して、DMBとTDBはNAD(P)Hにより速やかに還元されるものの、酸素による再酸化速度が遅いことが特徴であった。

したがって、今後、DMBとTDBについては、*in vivo*試験により効果を調べる必要がある。本研究の成果については、次の論文で発表された。Kettisen et al., Potential electron mediators to extract electron energies of RBC glycolysis for prolonged *in vivo* functional lifetime of hemoglobin-vesicles. *Bioconjugate Chem.* 26, 746-754 (2015)

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4件)

1. H. Sakai, B. Li, W. Lim, Y. Iga. Red blood cells donate electrons to methylene blue

mediated chemical reduction of methemoglobin compartmentalized in liposome in blood. *Bioconjugate Chem.* 25, 1301-1310 (2014)

2. K. Kettisen, L. Bulow, H. Sakai. Potential electron mediators to extract electron energies of RBC glycolysis for prolonged *in vivo* functional lifetime of hemoglobin-vesicles. *Bioconjugate Chem.* 26, 746-754 (2015)

3. 酒井宏水, 久禮智子. 人工赤血球(ヘモグロビンベシクル)の実現に向けて. *医学のあゆみ* 253, 1180-1181 (2015)

4. 酒井宏水. 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)微粒子分散液の特徴. *粉体工学* 6, 909-914 (2014)

[学会発表] (計7件)

1. 酒井宏水, Li Bing, Lim Wei Lee / 体内電子供与系の活用による人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の機能復元 / 日本化学会第94春季年会 / 名古屋大学 東山キャンパス / 2014.3.27
2. Hiromi Sakai / Prolonged functional life span of artificial red cells (Hb-vesicles) by coexistence of an electron mediator in blood stream / Experimental Biology 2014 / San Diego Convention Center / April 26-30, 2014
3. 酒井宏水, Karin Kettisen, 伊賀弓佳 / 赤血球解糖系が産生する電子エネルギーの活用による人工赤血球(ヘモグロビンベシクル)の機能持続効果 / 日本化学会第95春季年会 / 日本大学船橋キャンパス (薬学部) / 2015.3.26-29
4. H. Sakai / Translational research of hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative / International Society on Blood Substitutes (ISBS) / Lund University, Lund, Sweden / 21-24 June 2015
5. H. Sakai / Prolonged *in vivo* functional lifespan of an artificial oxygen carrier (hemoglobin vesicles) using a transmembrane electron mediator and electron energies of red blood cells glycolysis / ICMAT2015 & IUMRS-ICA2015 / June 28 – July 2, 2015 / Suntec, Singapore
6. H. Sakai / Transmembrane electron

mediators to extract electron energies of RBC glycolysis for prolonged in vivo functional lifespan of an artificial oxygen carrier (Hb-vesicles) / The 10th World Congress for Microcirculation / Kyoto International Conference Center / Sept. 25-27, 2015

7. 酒井宏水 / Hb-vesicles (赤血球代替物) の有用性と開発の状況 / 第39回日本血液事業学会総会 / 大阪国際会議場 / 2015.10.5.

[図書] (計1件)

1. 酒井宏水. 人工赤血球による生体組織への酸素輸送. 「全人力・科学力・透析力に基づく透析医学」第6章: 腎性貧血. pp.369-373 平方秀樹 監修、医薬ジャーナル社. 大阪 (2014)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ヘモグロビンのメト化抑制能を有する人工赤血球

発明者: 酒井宏水、山田孫平

権利者: 公立大学法人奈良県立医科大学

種類:

番号: 特願2016-040494

出願年月日: 平成28年3月2日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.narmed-u.ac.jp/~chem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井宏水 (SAKAI, Hiromi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70318830