

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24249086

研究課題名(和文)人工酸素運搬体及び類縁体を用いた酸素代謝障害の革新的治療法の研究

研究課題名(英文) Innovative Approaches for Oxygen Metabolism Disorder with Artificial Oxygen Carriers and Related Compounds

研究代表者

川口 章 (KAWAGUCHI, Akira)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30195052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 26,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の血液循環はポンプとしての心臓、回路としての血管、循環液としての血液からなり、何れを欠いても循環不全となる。本研究では血液の側からの治療として、人工酸素運搬体を用いた動物実験において、1) 気管支、胃、脳、内耳、皮膚、骨格筋などの虚血・再灌流における保護作用、2) 大量投与後も網内系の抗原認識機能に競合的障害を来さず、3) 担癌マウスに併用することで放射線療法を増感し、化学療法での遠隔転移を抑制した。作用機序として、酸素による「好氣的代謝」という従来の考えから、HIF-1aを介したシグナル伝達系の抑制による「抗炎症作用」が実験結果をより妥当に説明すると考えられる。

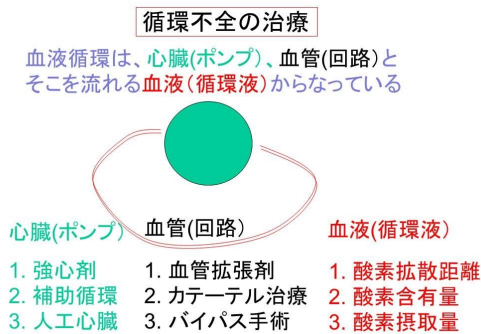
研究成果の概要(英文)：Blood circulation consists of heart(pump), vasculature(circuit)and blood(fluid). While derangement of any of them results in circulatory failure, approaches through the third component have been scarce except for transfusion. Whereas artificial oxygen carriers (AOC) remain short of red cells in health, their physical characteristics may work better in disease. In the current study, we tested various AOC and related compounds in animal models to show, 1)protection of ischemia and/or reperfusion injury in bronchus, stomach, brain, inner-ear, skin and skeletal muscle, 2)absence of competitive inhibition on antigen recognition by reticuloendothelial system after a large-dose administration, 3)enhanced radiotherapy and reduction on metastasis after chemotherapy. The results prompted us to change the hypothetical mechanism from aerobic energy synthesis to anti-inflammatory action through suppressed HIF-1a-mediated signal transduction, which better explains the current observations.

研究分野：循環不全

キーワード：人工酸素運搬体 虚血 再灌流障害 ヘモグロビン 酸素代謝障害 一酸化炭素中毒 シアン中毒 水素

1. 研究開始当初の背景

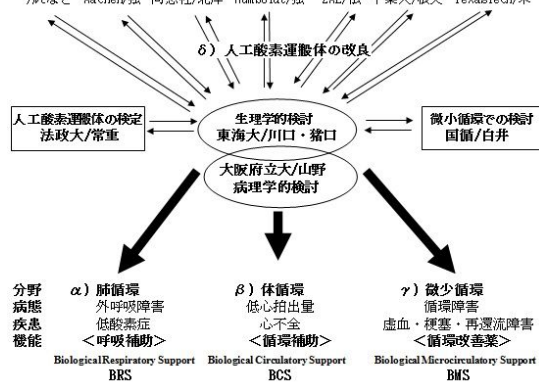
生体内の血液循環はポンプとしての心臓、回路としての血管系、そこを流れる循環液としての血液からなる。これら3つの要素のどれを欠いても循環不全に陥り、組織、臓器および個体の生命さえ危機に陥る。従来、ポンプ不全=心不全に対しては、強心剤、心移植や人工心臓が研究され、回路破綻=血管狭窄や閉塞に対してはバイパス術やステント治療が発達してきた。3番目の循環液=血液については、出血に対する血液補充として輸血は行われるが、血液の主要な機能の一つとして酸素運搬を果たす人工臓器=人工酸素運搬体の開発が遅れている。



2. 研究の目的

本研究では、様々な人工酸素運搬体を開発・改良・応用することで、上に述べた様々な循環不全への今までにない対策、すなわち血液の側からの新たな治療体系を構築することを目指す。その一環として、末梢循環不全に対して、()虚血・梗塞・再灌流障害を研究してきた。本研究では、引き続き、()微小循環障害の実験的治療を検討しつつ、()呼吸不全=酸素摂取補助、()心不全=低心拍出量補助としての効果も実験的に検討する。

① tLEH ② cLEH ③ HemCD ④ New-HbV ⑤ HemozLife ⑥ ColMb ⑦ HemoTech ⑧ Aachen/独 ⑨ 同志社/北岸 ⑩ HumboIst/独 ZAL/仏 ⑪ 千葉大/根矢 ⑫ TexasTech/米



3. 研究の方法

(1) 対象疾患の拡大と選定

()呼吸不全、()心不全、()循環不全の動物モデルにおいて、それぞれの人工酸素運搬体の有用性を検討する。

(2) 作用点・作用機序の解析

現在までに効果の見られた疾患モデルにおいて、微小血管造影法、電気生理学的方法、生理活性物質モニター、免疫組織化

学染色を含む形態学的検査、免疫学的手法により、人工酸素運搬体投与前後および長期的効果を検討する。また、拮抗物質を前投与することなどで作用機序の検索も行う。

(3) 人工酸素運搬体の最適化

共同研究・連携関係にある研究者・企業と協力して、それぞれの人工酸素運搬体について、サイズ・表面処理・素材・酸素親和性などについて、対象とする病態モデルに最適となるように調整して、疾病毎に酸素親和性を最適化したものとする。

4. 研究成果

発表論文番号を右肩数字に示す
リポソーム封入ヒトヘモグロビン (LEH テルモ社) を用いて、気管支⁴、胃⁵、脳^{8,17,49}、内耳^{14,45}、皮膚¹⁴、骨格筋⁴⁷、などの虚血・再灌流障害における有用性を示した。代謝は網内系で行われるが、大量投与した際も抗原認識機能に競合的障害がかからないことも示した⁴⁶。また腫瘍には血管の未熟・未発達に起因する低酸素症があり、治療抵抗性=悪性度を増悪させている。LEH はこうした腫瘍を移植した担癌マウスで放射線療法を増感し⁴⁸、化学療法における遠隔転移を抑制する⁶ことを実験的に示した。

これらに共通する機序として、従来は運搬された酸素によるエネルギー効率の高い好氣的代謝の促進⁵⁰に依存するものと考えていたが、効果発現が早すぎることで、また抗炎症作用が前面に出ていることから、細胞質にある HIF-1 を介したシグナル伝達系の抑制に基づくものと考案した(下図)³。即ち極少量の酸素が HIF-1 を細胞質で分解することで、HIF-1 が核内に取り込まれて発生する広汎で多様な炎症性サイトカインの発生を来す低酸素反応カスケード(図 A)を未然に抑制することで抗炎症作用を発揮する(図 B)というもので、様々な酸素運搬体に共通する広範な抗炎症作用を説明できる³。

図 A 無酸素状態

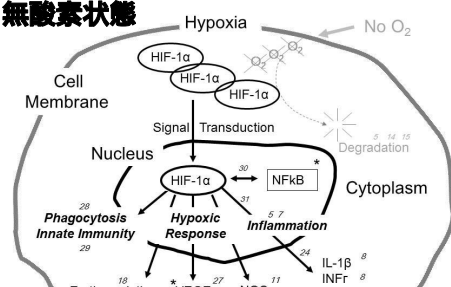
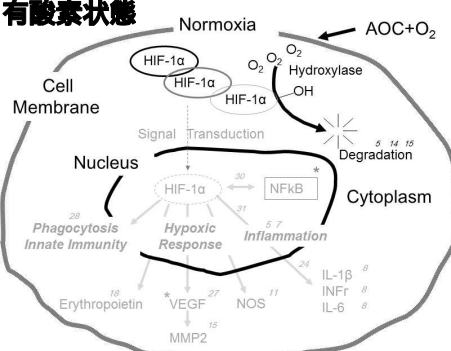


図 B 有酸素状態



一方、血液の過剰酸素化は炎症を惹起し³³、水素吸入は抗炎症性に働く²¹ことも体循環・肺循環の調整が酸化還元バランス²⁸に基づいていることを示唆している。新たな人工酸素運搬体として、コバルト・ミオグロビン (CoMb)^{9-12,18,35-39,44}、HemoCD⁴⁰⁻⁴²、また ImCD^{2,19}などの類縁体を用いて2原子分子(O₂、CO、CN、H₂、NOなど)の研究も進めている。ことに、CNについてはImCD²¹、COにはHemoCDなど、体内酸素代謝系の拮抗物質=有毒ガスに拮抗する特異的な解毒剤としての有用性が見込まれる。これら2原子分子は、酸素代謝系に関わる微量ガスとして強力な微小循環調整機能を有しており、それらのバランス¹²⁻¹³が微小環境を調整していると考えられる。

本研究では、こうした酸素代謝のみならず、自律神経系³¹、薬剤^{24,26,32}の効果を、冠循環^{20,22,29,30,34}、肺循環²⁵および脳循環^{7,15,27}において、NMR⁴⁷、PET¹⁷、NIRS⁴³や放射光²²などの最新・特殊技術を用いて観察を行ってきた。人工酸素運搬体と類縁体()は、酸素を含む2原子分子の循環調節機能を観察する非常に有力な手段・薬剤として、酸素摂取・運搬・代謝の解明に有効であると見込まれ、こうした理解に基づいた、循環障害()に対する人工臓器^{1,16}や新たな薬剤の開発が進行中であり、早期の実用化が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計50件)

1. Kawaguchi AT(1番目),他5名。Ventricular conduction defects after transcatheter aortic valve implantation. *Artif Organs* 2015;39(5): 409-415. 査読あり DOI:10.1111/aor.12393.
2. Yamagiwa T(1番目),Kawaguchi AT(2番目), Kano K(8番目),Inokuchi S(9番目),他5名。Supramolecular ferric porphyrins and a cyclodextrin dimer as an antidote for cyanide poisoning. *Hum Exp Toxicol* 2014;33(4):360-368. 査読あり DOI:10.1177/0960327113499041.
3. Kawaguchi AT. Artificial oxygen carrier to regulate hypoxic signal transduction. *Artif Organs* 2014;38(8): 617-20. 査読あり DOI:10.1111/aor.12372.
4. Takeichi H(1番目),Kawaguchi AT(2番目),Murayama C(3番目),他2名。Liposome-encapsulated hemoglobin accelerates bronchial healing after pneumectomy in the rat without or with preoperative radiotherapy. *Artif Organs* 2014;38(8): 634-640. 査読あり DOI:10.1111/aor.12278.
5. Kawaguchi AT(1番目),Murayama C(5番目),他4名。Effects of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Gastric Wound Healing in the Rat. *Artif Organs* 2014;38(8): 641-649. 査読あり DOI:10.1111/aor.12339.
6. Murayama C(1番目),Kawaguchi AT(2番目),他6名。Liposome-encapsulated hemoglobin enhances chemotherapy to suppress metastasis in mice. *Artif Organs* 2014;38(8):656-661. 査読あり DOI:10.1111/aor.12354
7. Fukuta T(1番目),Kawaguchi AT(13番目),Oku N(14番目),他11名。Real-time trafficking of PEGylated liposomes in the rodent focal brain ischemia analyzed by positron-emission tomography. *Artif Organs* 2014;38(8): 662-666. 査読あり DOI:10.1111/aor.12350.
8. Kawaguchi AT(1番目),Yamano M(4番目),Haida M(6番目),他4名。Effects of Liposome-Encapsulated Hemoglobin on Learning Ability in Tokai High-Avoider Rat After Total Brain Ischemia and Reperfusion. *Artif Organs* 2014;38(8): 667-674. 査読あり DOI:10.1111/aor.12352.
9. Neya S(1番目),Kawaguchi AT(3番目),他1名。Usefulness of Myoglobin Containing Cobalt Heme Cofactor in Designing a Myoglobin-Based Artificial Oxygen Carrier. *Artif Organs* 2014;38(8):715-719. 査読あり DOI:10.1111/aor.12327.
10. Nagai M(1番目),Neya S(4番目),他2名。Circular dichroism of hemoglobin and myoglobin. *Chirality*. 2014;26(9):438-42. 査読あり DOI:10.1002/chir.22273.
11. Qi F(1番目),Neya S(3番目),他2名。A Cluster Analysis on the Structural Diversity of Protein Crystals, Exemplified by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2014;62(6):568-77. 査読あり https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/62/6/62_c14-00095/_pdf
12. Nishimura R(1番目),Neya S(12番目),他12名。Electronic control of discrimination between O₂ and CO in myoglobin lacking the distal histidine residue. *Inorg Chem*. 2014;53(2):1091-9. 査読あり DOI:10.1021/ic402625s.
13. Suzuki M(1番目),Neya S(3番目),他1名。Skeletal recombination reaction of N-fused pentaphyrin(1.1.1.1.1) via bromination. *Org Lett*. 2014;16(2):327-9. 査読あり DOI:10.1021/ol403242z.
14. Okada M(1番目),Kawaguchi AT(2番目),

- 他 3 名。Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia: An experimental study in the gerbil. *Neurosci Lett* 2013;553:176-180. 査読あり
DOI:10.1016/j.neulet.2013.08.043.
15. Ishii T(1 番目),Kawaguchi AT(7 番目), Oku N(9 番目), 他 6 名。Nanoparticles accumulate in ischemic core and penumbra region even when cerebral perfusion is reduced. *Biochem Bioph Res Co* 2013;430:1201-1205. 査読あり
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.12.080.
 16. Kato N(1 番目),Kawaguchi AT(2 番目), 他 2 名。Static cardiomyoplasty with synthetic elastic net suppresses myocardial dysfunction and dilatation after acute myocardial infarction in the rat. *Artif Organs* 2013;37:593-599. 査読あり DOI:10.1111/aor.12059.
 17. Kawaguchi AT(1 番目),Haida M(2 番目),Yamano M(4 番目), 他 3 名。Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates ischemic stroke in nonhuman primates: longitudinal observation. *Artif Organs* 2013;37:904-912. 査読あり
DOI:10.1111/aor.12091.
 18. Neya S(1 番目),Kawaguchi AT(4 番目), 他 2 名。Relaxation analysis of ligand binding to the myoglobin reconstituted with cobaltic heme. *Inorg Chem* 2013;52:7387-93. 査読あり
DOI:10.1021/ic400078w.
 19. Yamagiwa T(1 番目),Inokuchi S(2 番目),Kawaguchi AT(6 番目), 他 3 名。A stable in vitro method for assessing the toxicity of potassium cyanide and its antidote. *Tokai J of Exp Clin Med* 2013;38:114-122. 査読あり
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=da8tokai/2013/003804/001&name=0114-0122e&Use rID=150.7.168.248>
 20. Sonobe T(1 番目),Shirai M(5 番目), 他 3 名。Contribution of serotonin uptake and degradation to myocardial interstitial serotonin levels during ischaemia-reperfusion in rabbits. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013 Feb;207(2):260-8. 査読あり
DOI:10.1111/j.1748-1716.2012.02461.x.
 21. Fujii Y(1 番目),Shirai M(2 番目), 他 8 名。Insufflation of hydrogen gas restrains the inflammatory response of cardiopulmonary bypass in a rat model. *Artif Organs* 2013;37(2):136-41. 査読あり
DOI:10.1111/j.1525-1594.2012.01535.x.
 22. Shirai M(1 番目), 他 5 名。Synchrotron radiation imaging for advancing our understanding of cardiovascular function. *Circ Res*. 2013;112(1):209-21. 査読あり
DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.300096.
 23. Jenkins MJ(1 番目),Shirai M(10 番目), 他 8 名。Myosin heads are displaced from actin filaments in the in situ beating rat heart in early diabetes. *Biophys J*. 2013;104(5):1065-72. 査読あり
DOI:10.1016/j.bpj.2013.01.037.
 24. Zhan DY(1 番目),Shirai M(8 番目), 他 6 名。In vivo monitoring of acetylcholine release from cardiac vagal nerve endings in anesthetized mice. *Auton Neurosci*. 2013;176(1-2):91-4. 査読あり
DOI:10.1016/j.autneu.2013.02.014.
 25. Shirai M(1 番目), 他 8 名。Impaired pulmonary blood flow distribution in congestive heart failure assessed using synchrotron radiation microangiography. *J Synchrotron Radiat*. 2013;20(Pt 3):441-8. 査読あり
DOI:10.1107/S0909049513007413.
 26. Komaki F(1 番目),Shirai M(6 番目), 他 4 名。Effects of intravenous magnesium infusion on in vivo release of acetylcholine and catecholamine in rat adrenal medulla. *Auton Neurosci*. 2013;177(2):123-8. 査読あり
DOI:10.1016/j.autneu.2013.03.004.
 27. Inamori S(1 番目),Shirai M(2 番目), 他 8 名。A comparative study of cerebral microcirculation during pulsatile and nonpulsatile selective cerebral perfusion: assessment by synchrotron radiation microangiography. *ASAIO J*. 2013;59(4):374-9. 査読あり
DOI:10.1097/MAT.0b013e3182976939.
 28. Ogura S(1 番目),Shirai M(9 番目), 他 8 名。Oxidative stress augments pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice overexpressing the oxidized LDL receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(2):H155-62. 査読あり
DOI:10.1152/ajpheart.00169.2012.
 29. Maeda H(1 番目),Shirai M(8 番目), 他 8 名。Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(8):1159-66. 査読あり
DOI:10.1016/j.bbadis.2013.02.014.

30. Pearson JT(1 番目), Shirai M(13 番目), 他 11 名。Acute Rho-kinase inhibition improves coronary dysfunction in vivo, in the early diabetic microcirculation. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:111. 査読あり DOI:10.1186/1475-2840-12-111.
31. Kawada T(1 番目), Shirai M(7 番目), 他 6 名。Sympathetic afferent stimulation inhibits central vagal activation induced by intravenous medetomidine in rats. *Acta Physiol (Oxf).* 2013;209(1):55-61. 査読あり DOI:10.1111/apha.12123.
32. Gray EA(1 番目), Shirai M(8 番目), 他 6 名。Schwenke DO. Assessment of the serotonin pathway as a therapeutic target for pulmonary hypertension. *J Synchrotron Radiat.* 2013;20(Pt 5):756-64. 査読あり DOI:10.1107/S0909049513021213.
33. Fujii Y(1 番目), Shirai M(2 番目), 他 5 名。Hyperoxic condition promotes an inflammatory response during cardiopulmonary bypass in a rat model. *Artif Organs.* 2013;37(12):1034-40. 査読あり DOI:10.1111/aor.12125.
34. Nakaoka H(1 番目), Shirai M(12 番目), 他 12 名。Establishment of a novel murine model of ischemic cardiomyopathy with multiple diffuse coronary lesions. *PLoS One.* 2013;8(8):70755. 査読あり DOI:10.1371/journal.pone.0070755.
35. Nishimura R(1 番目), Neya S(10 番目), 他 10 名。Relationship between the electron density of the heme Fe atom and the vibrational frequencies of the Fe-bound carbon monoxide in myoglobin. *Inorg Chem.* 2013;52(6):3349-55. 査読あり DOI:10.1021/ic3028447.
36. Mahmood I(1 番目), Neya S(3 番目), 他 2 名。Influence of lipid composition on the structural stability of G-protein coupled receptor. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2013;61(4):426-37. 査読あり https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/61/4/61_c12-01059/_pdf
37. Neya S. Dynamic motion and rearranged molecular shape of heme in myoglobin: structural and functional consequences. *Molecules.* 2013;18(3):3168-82. 査読あり DOI:10.3390/molecules18033168.
38. Ohgo Y(1 番目), Neya S(3 番目), 他 7 名。A less common spin-crossover process observed in the six-coordinated model heme complexes. *Polyhedron* 2013;66:60-64. 査読あり DOI:10.1016/j.poly.2013.02.015
39. Shinagawa H(1 番目), Yamano M(2 番目), 他 2 名。Protective Activity of Antioxidants in the Hypothalamic Paraventricular Nuclei of Chronic Restraint-Stressed Mice. *Journal of Life Science Research* 2013;11:1-20. 査読あり http://www2.rehab.osakafu-u.ac.jp/kiyoh/pdf_data/jlsr11/jlsr_011_2013_01.pdf
40. Watanabe K(1 番目), Kano K(3 番目), 他 1 名。Supramolecular iron porphyrin/cyclodextrin dimer complex that mimics the functions of hemoglobin and methemoglobin. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013;52(27):6894-7. 査読あり DOI:10.1002/anie.201302470.10.1002/anie.201302470.
41. Ueda T(1 番目), Kano K(4 番目), 他 2 名。Intramolecular Oxidative O-Demethylation in a Per-O-methylated -Cyclodextrin-Iron Porphyrin Inclusion Complex in Aqueous Solution. *Chemistry Letters* 2013,42: 1366-1368. 査読あり DOI:10.1246/cl.130678
42. Ueda T(1 番目), Kano K(3 番目), 他 1 名。Intramolecular direct oxygen transfer from oxoferryl porphyrin to a sulfide bond. *Inorg Chem.* 2014;53(1):543-51. 査読あり DOI:10.1021/ic4026393.
43. 栗田太作(1 番目), 灰田宗孝(5 番目), 他 5 名。低酸素運動における前頭部多チャンネル NIRS と前額部パルスオキシメータの同時測定を試み NIRS 信号の拍動成分の意味, 東海大学スポーツ医科学雑誌 2013 25:79-82. 査読あり http://www.sms.u-tokai.ac.jp/activitylog/doc/ttj_of_sms_25/09_kurita.pdf
44. Neya S, Kawaguchi AT. Inherently distorted heme as a novel tool for myoglobin-based oxygen carrier. *Artif Organs* 2012;36: 220-3. 査読あり DOI:10.1111/j.1525-1594.2011.01238.x.
45. Okada M(1 番目), Kawaguchi AT(2 番目), 他 5 名。Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia and reperfusion in the gerbil. *Artif Organs* 2012;36: 178-184. 査読あり DOI:10.1111/j.1525-1594.2011.01306.x.
46. Kawaguchi AT, 他 5 名。Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on antigen-presenting cells in mice. *Artif Organs* 2012;36: 194-201. 査読あり DOI:10.1111/j.1525-1594.2011.01269.

- x.
47. Kurita D(1 番目), Kawaguchi AT(2 番目), Yamano M(4 番目), Haida M(6 番目), 他 2 名。Liposome-encapsulated hemoglobin improves energy metabolism in skeletal muscle ischemia and reperfusion in the rat. *Artif Organs* 2012;36:185-193. 査読あり
DOI:10.1111/j.1525-1594.2011.01419.x.
48. Murayama C(1 番目), Kawaguchi AT(2 番目), Haida M(5 番目), 他 4 名。Liposome-Encapsulated Hemoglobin ameliorates tumor hypoxia and enhances radiation therapy to suppress tumor growth in mice. *Artif Organs* 2012;36:170-177. 査読あり
DOI:110.1111/j.1525-1594.2011.01418.x.
49. Fukui T(1 番目), Kawaguchi AT(2 番目), 他 3 名。Liposome-encapsulated hemoglobin skin wound healing in mice. *Artif Organs* 2012;36:161-169. 査読あり
DOI:10.1111/j.1525-1594.2011.01371.x.
50. Kawaguchi AT. Artificial oxygen carriers the clinical point of view. *Artif Organs* 2012;36:127-129. 査読あり
DOI:110.1111/j.1525-1594.

【図書】(計 1 件)

1. Kawaguchi AT, et al, springer, Hemoglobin-Based Oxygen Carriers as Red Cell Substitutes and Oxygen Therapeutics, 2013, 746, 369-383

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 章 (KAWAGUCHI, Akira)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：30195052

(2) 研究分担者

猪口 貞樹 (INOKUCHI, Sadaki)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：60160008

灰田 宗孝 (HAIDA, Munetaka)
東海大学医療技術短期大学・看護学部・教授
研究者番号：20208408

白井 幹康 (SHIRAI, Mikiyasu)
独立行政法人国立循環器病研究センター・心機能生理部・部長
研究者番号：70162758

根矢 三郎 (NEYA, Saburo)
千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10156169

山野 真利子 (YAMANO, Mariko)
大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・准教授
研究者番号：80192409

今井 清博 (IMAI, Kiyohiro)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号：50028528
(H26 以降：連携研究者)

加納 航治 (KANO, Koji)
同志社大学・工学部・教授
研究者番号：60038031

村山 千恵子 (MURAYAMA, Chieko)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：50307295
(H27)

玉木 哲朗 (TAMAKI, Tetsuro)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：10217177
(H27)

遠藤 整 (ENDO, Hitoshi)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：10550551
(H27)

常重 アントニオ (TSUNESHIGE, Antonio)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号：30409346
(H27)

奥 直人 (OKU, Naoto)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号：10167322
(H27)

(3) 連携研究者

今井 清博 (IMAI, Kiyohiro)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号：50028528
(H26 以降)