

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790402  
 研究課題名(和文) NO 除去機能を賦与した活性酸素消去酵素の DDS 開発と敗血症性ショック治療への応用  
 研究課題名(英文) Development of PEGylated thiol modified protein drugs for the treatment of sepsis  
 研究代表者  
 勝見 英正 (KATSUMI HIDEMASA)  
 京都薬科大学・薬学部・助教  
 研究者番号：30434666

研究成果の概要(和文)：敗血症の新たな治療薬の開発を目的として、敗血症の病態において重要な役割を果たす一酸化窒素(NO)を消去する機能を賦与した新たなタンパク質医薬品の開発とその体内動態制御を試みた。血清アルブミンにNO消去能を有する還元型チオールと水溶性ポリマーであるPEGを結合させたPEG-BSA-SHは、マウスあるいはラットに静脈内投与後、高い血中滞留性を示し、敗血症による血圧低下と肝臓障害を顕著に抑制した。

研究成果の概要(英文)：To prevent septic shock and hepatitis, prolonged delivery of reduced thiols to the blood circulation was performed in animals by a bolus intravenous injection of polyethylene glycol (PEG)-conjugated thiols modified serum albumin (PEG-BSA-SH). PEG-BSA-SH exhibited a prolonged retention in the plasma after intravenous injection into mice. PEG-BSA-SH also effectively suppressed the septic shock and hepatitis in the sepsis mouse or rat model. These findings indicate that PEG-BSA-SH is a promising compound for the treatment of septic shock and hepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症性ショックは、敗血症(細菌によって引き起こされる全身性炎症反応症候群)に続いて発症する血圧低下および循環系の均衡破綻による急性循環不全に起因する多臓器不全をきたす致死率の非常に高い疾患

であり、集中治療室(ICU)における主な死亡原因にも挙げられている。米国では年間の死亡者が21万人にも及んでいると推察され、National Center for Health Statisticsによれば、年齢調整死亡率が過去20年間に78%も増加していることから、医学が進歩

した今日においても治療が極めて困難な疾患の一つとされている。敗血症時、体内において増殖したグラム陰性菌が死滅した際、その細胞壁の構成成分であるリポ多糖 (LPS) やペプチドグリカンなどが血中に放出される。これら LPS やペプチドグリカンが炎症性細胞に存在する Toll 様受容体 (TLR) 4 に認識されることで炎症性サイトカイン、プロスタグランジン、トロンボキサン、一酸化窒素 (NO)、活性酸素種 (ROS) といった種々の炎症性メディエーターが過剰に産生され、血管拡張、ショック、多臓器不全、ひいては死亡に至る (Merx MW and Weber C. Sepsis and the heart. *Circulation*. 14:116 (7):793-802 (2007).)。

現在、本疾患の治療においては、昇圧剤、利尿薬、活性化プロテイン C、BPI ならびにステロイドが治療に用いられているが顕著な救命効果は得られてはおらず、同疾患患者に有効な治療薬がないのが現状であることから、救命効果が期待できる新たな治療薬の開発が切望されている。これまで、TNF- $\alpha$  抗体、IL-1 受容体阻害剤といった抗サイトカイン製剤や炎症性細胞の接着因子などの分子を標的とした治療薬が開発され、本疾患に対する治療が試みられてきたが、これらはいずれも多数存在するメディエーターの一部のみを阻害するものであり、患者の状態に大きく左右されることから、一般的治療法とは成り難く、臨床治験では顕著な効果が得られていない。(舟田 久: 敗血症の解明と治療戦略. 医薬ジャーナル社 (2006))。したがって、本疾患治療においては、複合的にメディエーターを阻害する戦略が有望であると考えられるが、こうした試みはこれまで全く報告がない。そこで研究代表者は、複合的にメディエーターを阻害することによる新たな敗血症性ショック治療戦略の構築を目的に、血管拡張によるショックや細胞障害に大きく関与している NO ならびに各種サイトカインの誘導や炎症性細胞の接着因子など多数のメディエーターの発現に関与する ROS に着目し、本疾患時に過剰産生される NO と ROS を同時に効率よく消去するハイブリッド型治療薬の創製を目指す。

## 2. 研究の目的

上述のように、本研究は、複合的にメディエーターを阻害することによる新たな敗血症性ショック治療戦略の構築を目的に、血管拡張によるショックや細胞障害に大きく関与している NO ならびに各種サイトカインの誘導や炎症性細胞の接着因子の発現に関与する ROS に着目し、本疾患時に過剰産生される NO と ROS を同時に効率よく消去するハイブリッド型治療薬の創製を目指すものである。

研究代表者はこれまでに、高分子キャリアに種々の機能性分子を導入することで静脈内投与後の体内動態制御が可能な高分子型 NO 供与体の開発に成功していることから、こうした経験・合成技術を活かして、NO 消去機能を賦与した活性酸素消去酵素を新たに設計・開発し、その体内動態を制御することにより治療の最適化を行う。すなわち、生体内に存在するタンパク質の遊離チオール基は NO と反応し、S-nitrosothiol を生成することで、NO のリザーバーとして機能している報告があることから (Stamler JS et al., Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:7674-7677 (1992)), superoxide dismutase (SOD) や catalase などの活性酸素消去酵素に還元型チオールを化学的に多数導入することにより NO 消去機能を賦与した活性酸素消去酵素を新たに作製する。さらに作製した結合体の血中滞留性の向上を目的に結合体に水溶性ポリマーであるポリエチレングリコール (PEG) を導入し、体内動態と薬効に優れた新規ハイブリッド型敗血症性ショック治療薬の創製を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 平成 20 年度では、まず、還元型チオールをタンパク質に導入する合成法の確立と NO を効率よく消去することによる治療効果を検証することを目的として、モデルタンパク質として、牛血清アルブミン (BSA) を選択し、多数の還元型チオール基と PEG を導入した NO 消去タンパク質、PEG-BSA-SH の作製を試みた。

### ① PEG-BSA-SH の合成

血中滞留性の向上とチオール基導入による分子間架橋形成の抑制を目的として、BSA に PEG (Mw. 5000) 修飾を施した。得られた PEG-BSA に N-succinimidyl S-acetylthioacetate (SATA) を導入した後、脱アセチル化を行うことにより PEG-BSA-SH を得た (図 1)。

### ② NO 消去能評価

PEG-BSA-SH の NO 消去能を評価することを目的として、緩衝液中で、NO 供与体である NOC7 から放出される NO との反応性について検証した。

### ③ ROS 消去能評価

血清アルブミンは抗酸化効果を有することが報告されていることから、PEG-BSA-SH の ROS 消去能を評価することを目的として、緩衝液中で、各種 ROS との反応性について検証した。

#### ④ 体内動態評価

##### 二官能性キレート試薬

Diethylenetriamine-N, N, N', N'', N'''-pentaacetic acid, dianhydride (DTPA) を用いて PEG-BSA-SH の前駆体である PEG-BSA-SATA に <sup>111</sup>In 標識を施した放射標識体を用いた。 [<sup>111</sup>In]-PEG-BSA-SATA をマウスに尾静脈内投与後、経時的に屠殺し、血漿中、尿中および各臓器中の放射活性を測定した。

#### ⑤ 敗血症モデルの作製

敗血症による臓器不全モデルは、敗血症様の症状を引き起こすリポポリサッカライド (LPS) をマウスに腹腔内投与することにより作製した。

(2) 平成 21 年度では、敗血症性ショックならびに敗血症時に誘発される劇症肝炎における PEG-BSA-SH の有効性を系統的に評価した。

##### ① 敗血症性ショック治療

LPS を腹腔内投与して作製した敗血症モデルラットに PEG-BSA-SH を静脈内投与し、大腿動脈圧を指標に血圧低下抑制効果を評価した。

##### ② 敗血症時の劇症肝炎治療

LPS を腹腔内投与して作製した敗血症モデルマウスに PEG-BSA-SH を静脈内投与し、血漿中 AST・ALT 活性を指標に肝臓障害抑制効果を評価した。

##### ③ 劇症肝炎治療機構 1

上記の敗血症モデルマウスにおける肝臓障害抑制機構の一端を明らかにすることを目的として、レーザードップラー法を用いて LPS 腹腔内投与による肝臓血流量の低下に及ぼす PEG-BSA-SH の影響を評価した。

##### ④ 劇症肝炎治療機構 2

敗血症時に上昇する NO に対する消去能を評価することを目的として、グリース法を用いて LPS 腹腔内投与による血漿中 NO 酸化物濃度の上昇に及ぼす PEG-BSA-SH の影響を検証した。

動物実験を行う際、所属機関である京都薬科大学で策定された動物実験倫理規定に則ってプロトコルを作成し、倫理委員会によって承認を受けると共に、実験遂行時にはプロトコルを遵守した。

#### 4. 研究成果

BSA 1 分子当たり 18 個の還元型チオールと 25 個の PEG が結合した NO 消去タンパク質、PEG-BSA-SH の作製に成功した。PEG-BSA-SH

の前駆体である PEG-BSA-SATA は、静脈内投与後、高い血中滞留性を示し、設計通りに PEG 化による血中滞留性の向上が達成された。また、PEG-BSA-SH は、既存の還元型チオールであるシステイン、グルタチオンと比較して、速やかに NO と反応したことから、NO を効率よく消去可能であることが確認された。また、PEG-BSA-SH は、ROS に対してもある程度消去能を示したことから、PEG-BSA-SH は NO と ROS を消去可能であることが明らかとなった。



図 1 PEG-BSA-SH の構造

そこで、LPS を腹腔内投与して作製した敗血症モデルラットにおける治療効果について検討したところ、既存の還元型チオールであるグルタチオンやチオール基未導入の PEG-BSA 投与群では、生理食塩水投与群と同様に急激な血圧低下が認められ、敗血症によるショック状態が観察された。一方、PEG-BSA-SH 投与群では、その血圧低下が顕著に抑制されたことから、PEG-BSA-SH 投与により、敗血症性ショックが抑制可能であることが明らかとなった。

さらに、敗血症モデルマウスを用いて、敗血症時に誘発される劇症肝炎に対する治療効果を評価した。その結果、PEG-BSA-SH は、既存の還元型チオールと比較して、肝臓障害の指標である血漿中 AST、ALT 活性の上昇を顕著に抑制した (図 2)。

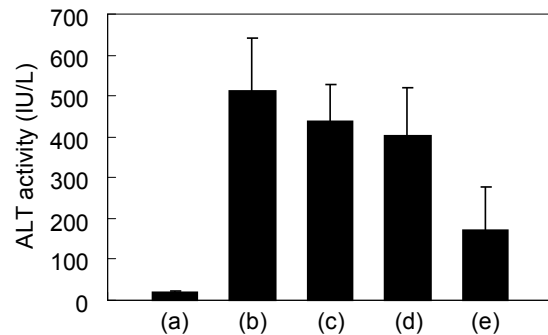


図 2 血漿中 ALT 活性に及ぼす各種還元型チオールの影響 (a) 未処置, (b) LPS + 生理食塩水, (c) LPS + グルタチオン, (d) LPS + PEG-BSA, (e) LPS + PEG-BSA-SH.

また、レーザードップラー法を用いた評価により、PEG-BSA-SH は、LPS 腹腔内投与による肝臓血流量の低下を顕著に抑制可能であることが明らかとなった (図 3)。さらに、LPS による血漿中 NO 酸化物濃度の上昇が PEG-BSA-SH 投与により抑制されたことから、PEG-BSA-SH は生体内の NO レベルを制御することにより肝臓障害を抑制していることが明らかとなった。これらのことから

PEG-BSA-SH は、敗血症によるショックと肝障害を効率よく抑制可能であることが示された。

以上、敗血症によるショックならびに肝臓障害における PEG-BSA-SH の有効性が示された。NO 消去機能を賦与したタンパク質を作製し、その体内動態を制御することによる敗血症治療は、これまで全く報告がないことから、本研究の治療アプローチは、極めて独創的であり、敗血症の予防・治療を目的とした医薬品の開発に対して有用な情報が提供できるものと考えられる。また、タンパク質に還元型チオールを結合させる本合成方法は、血清アルブミンに限らず他のタンパク質医薬品にも応用可能な合成方法であることから、活性酸素消去酵素である SOD や catalase などにも応用可能であり、SOD に NO 消去機能を賦与した PEG-SOD-SH の試作にも成功している。今後、NO 消去能を有する還元型チオールを結合させるタンパク質医薬品として、SOD や catalase などの活性酸素消去酵素を選択することにより活性酸素消去酵素と NO 消去能の相乗効果が期待できるハイブリッド型治療薬の開発ひいてはより有効性に優れた治療薬の開発が可能になるものと考えられる。

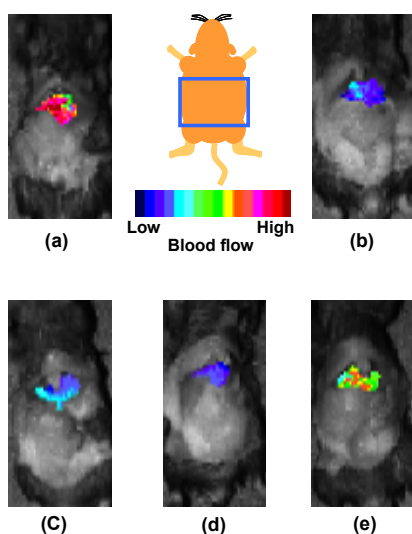


図 3 肝血流量に及ぼす各種還元型チオールの影響 (a) 未処置, (b) LPS + 生理食塩水, (c) LPS + システイン, (d) LPS + グルタチオン, (e) LPS + PEG-BSA-SH.

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

① 西山和志、勝見英正、水口寛規、岡本陽香、西川元也、山本 昌 劇症肝炎治療を目的とした新規還元型高分子チオールの開発 日本薬剤学会第 23 年会 平成 20 年 5 月 20 日 札幌

② 勝見英正、西山和志、岡本陽香、水口寛規、廣崎力也、水山朋美、西川元也、山本 昌 劇症肝炎治療を目的とした新規多価還元型チオールの開発 第 61 回日本酸化ストレス学会 平成 20 年 6 月 20 日 京都

③ 勝見英正、西山和志、岡本陽香、廣崎力也、坂根稔康、西川元也、山本 昌 還元型高分子チオールによる劇症肝炎抑制機構の解明 日本薬学会第 129 年会 平成 21 年 3 月 27 日 京都

④ 長嶋賢太、吉川 豊、岡本陽香、勝見英正、山本 昌、安井裕之 抗酸化療法を旨とした新規高分子ポリチオールの開発と反応機構の評価 日本薬学会第 130 年会 平成 22 年 3 月 29 日 岡山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

勝見 英正 (KATSUMI HIDEMASA)  
京都薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：30434666

### (2) 研究協力者

山本 昌 (YAMAMOTO AKIRA)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：00166779