

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19716

研究課題名(和文) 予防医学に貢献する疾患横断的な未病マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of onset prediction markers that contribute to preventive medical science

研究代表者

異島 優 (ISHIMA, Yu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・准教授

研究者番号：00457590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症疾患や癌、動脈硬化などの多くの疾患は、酸化ストレスと密接に関わっており、酸化ストレスに対する生体恒常性維持機構の破綻がこれら酸化ストレス関連疾患の発症に繋がる。そのため、この恒常性維持機構の定量化(未病マーカー)ができれば、これら疾患の発症予防や早期発見に繋がるが、これまでにそのような報告は皆無である。本研究では、未病マーカーとしてのアルブミン結合型超硫黄分子に着目した。その結果、アルブミン結合型超硫黄分子は、健康人では高い濃度に維持されており、病態発症に応じ、低値を示すことを明らかにした。また、このアルブミン結合型超硫黄分子の簡便な測定法も確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康科学の領域において、あらゆる疾患に対する予防医学の発展は極めて重要な課題であり、本研究成果は、ある程度の疾患横断性を兼ね備えた未病マーカーの候補としてアルブミン結合型超硫黄分子を同定した。このことにより、酸化ストレスを伴う疾患の発症や早期発見が可能になり、炎症疾患や癌、動脈硬化での死者数を減少することが可能になるとともに、昨今の医療経済的問題解決にも繋がる画期的な研究成果であり、社会的意義は極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Many diseases such as inflammatory diseases, cancer, and arteriosclerosis are closely related to oxidative stress, and disruption of homeostatic mechanisms against oxidative stress leads to the development of these oxidative stress-related diseases. Therefore, if this homeostatic mechanism can be quantified (pre-disease marker), it will lead to the prevention and early detection of these diseases, but no such reports have been reported so far. In this study, we focused on albumin-bound supersulfides as pre-symptomatic markers. As a result, it was clarified that albumin-bound supersulfides are maintained at a high concentration in healthy subjects, and show a low level according to the onset of disease. We also established a simple assay for this albumin-bound supersulfides.

研究分野：薬剤学

キーワード：アルブミン 未病マーカー 超硫黄分子 酸化ストレス 腎疾患 肝疾患

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、ヒト血清アルブミン(HSA)の生理機能、特に抗酸化作用機序の解明を研究してきた。すでに、唯一の遊離型 Cys-34 のシステイン残基(Cys-SH)や6つのメチオニン残基が抗酸化作用に寄与しており、酸化ストレス疾患時に Cys-34 の酸化修飾が引き起こされることなどを報告してきた。その一方で、Cys-34 の遊離型システイン残基と6つのメチオニンを全てアラニンに置換しても、HSA の抗酸化能が完全には消失しないことを発見した。ちょうど時を同じくして、以前から共同研究をしていた東北大学教授の赤池らは、細胞内の抗酸化機構に超硫黄分子が関与することを報告した。この超硫黄分子とは、硫黄が過剰に直列で連結した分子の総称である。例えば、システイン残基を例にとると、還元型(Cys-SH)もしくは酸化型(Cys-S-S-Cys)の2パターンしかないと考えられていた。しかしながら、超硫黄分子の発見により、還元型でも Cys-SH 以外に Cys-SSH、Cys-SSSH などが存在すること、酸化型でも Cys-S-S-Cys 以外に Cys-S-S-S-Cys や Cys-S-S-S-S-Cys などが存在することが明らかとなった。加えて、反応性の観点からは、Cys-SSH では、Cys-SH よりも pKa の低下に起因する求核剤との反応性の増大が引き起こされ、Cys-S-S-S-Cys の中央の S はサルフェンサルファと呼ばれ、新たに酸化剤や還元剤との反応性を獲得することが知られている。

そこで研究代表者は、この超硫黄分子の報告を受け、HSA の 17 対の Cys-S-S-Cys が、実際はポリスルフィド(Cys-S-S(n)-S-Cys)ではないのではという大胆な仮説を立て、HSA 結合型超硫黄分子の研究に着手した。その結果、タンパク質結合型超硫黄分子の測定法を開発し、驚くべきことに健康人から精製した HSA1 分子から約 15 分子の超硫黄分子を検出することに世界で初めて成功した。この量はヒト血清中濃度に換算すると実に 8 mM という高濃度である。これだけの濃度がヒト血清中に存在しながら、これまで発見されなかった理由として、(1)HSA 結合型超硫黄分子の還元剤に対する安定性が低いため、MS 解析前処理に還元剤が使用できないこと、(2)HSA に存在する 17 対の架橋構造により、非還元状態での MS 解析時の消化効率の低さとペプチド断片物の複雑さが挙げられる。従って、MS を使用せず、アルカリ加水分解を利用した研究代表者の測定法は、HSA 結合型超硫黄分子の測定に最適であったと考えられる。その後、化学的に HSA 結合型超硫黄分子を部分的に除去する方法を用いて、この HSA 結合型超硫黄分子が、抗酸化能や構造安定性(凝集化)、薬物結合能に寄与していることを突き止めた。

このような研究背景から、HSA の抗酸化に寄与する結合型超硫黄分子を未病マーカーとして利用する本研究構想に至った。従来の病態に伴い増加する『病態マーカー』とは異なり、発病する可能性が高まるにつれて減少していく『未病マーカー』に焦点を当てており、これまでにない革新的な予防・治療法の確立に向けた取り組みに大きく貢献する極めて挑戦的な研究である。また、『超硫黄分子』は研究分野としては芽生え期であるものの、アルブミンに限らず、多くのタンパク質にも波及すること、加えて、従来のシステイン残基の酸化・還元型の概念を大きく変革させるものであり、まさに挑戦的研究そのものである。現在臨床では、栄養状態の指標として HSA 濃度(量的変動)は活用されており、本研究が提唱する質的変動として HSA 結合型超硫黄分子を同時定量すれば、栄養状態+酸化ストレス疾患の発症予測や重症度、治療効果を評価できる多機能マーカーとして確立でき、臨床への貢献度は極めて大きいと考えられる。

## 2. 研究の目的

炎症疾患や癌、動脈硬化、自己免疫疾患、白内障、虚血性疾患などの種々の疾患は、酸化ストレスと密接に関わっており、酸化ストレスに対する生体の恒常性維持機構とのバランスの破綻がこれら酸化ストレス関連疾患の発症に繋がる。すなわち、この生体の恒常性維持機構の抗酸化防御力(=未病マーカー)が簡便に測定できれば、酸化ストレス関連疾患の発症予防や早期発見に繋がることが考えられるが、これまでにそのような疾患横断的な未病マーカーは同定されていない。そこで本研究の目的は、酸化ストレスに対するヒト血中恒常性維持の指標となる『未病マーカー』を同定し、予防医学に広く貢献することである。

理想的な『未病マーカー』は、健常時は豊富に存在しているものの、生体ホメオスタシスの破綻の程度によりその濃度が減少する分子であり未病段階から変動するため、予防医療の観点から極めて魅力的である。特に、肝疾患や腎疾患のような炎症性疾患や癌、動脈硬化、自己免疫疾患、白内障、虚血性疾患など数多くの病態に共通して関わりのある『酸化ストレスに対する未病マーカー』の探索は、我が国のほとんどの死因を網羅する極めて有用かつ波及効果の高い研究に繋がると考

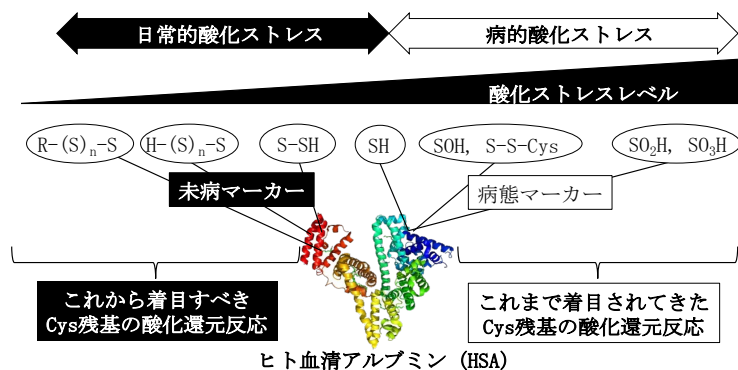


図1 これから着目すべきアルブミン結合型超硫黄分子

えられる。これまでに研究代表者は、循環血中に多く存在するヒト血清アルブミン(HSA)が、酸化ストレス疾患の進行・ステージとともにシステイン付加体をはじめとする酸化修飾が増加することを明らかにしてきた。このシステイン付加体は、病態時の過度な酸化ストレスに応答するもの、つまり『病態マーカー』であり、病態のごく早期あるいは発症段階には応答しない(図1)。その一方で、研究代表者はHSAのシステイン残基に『超硫黄分子』が結合していることを世界で初めて突き止めた。細胞内ではすでに、グルタチオン(GSH)にSが結合した『GSSH』はα効果によるチオール基のpKa低下に伴い、GSHの100倍以上の抗酸化力を発揮することから、超硫黄分子は酸化ストレスに対する生体の巧みな恒常性維持機構として急速に注目を集めている。そこで、『HSA結合型超硫黄分子』が疾患横断的な『未病マーカー』なり得るのではと、本研究を着想した。

### 3. 研究の方法

研究対象は健康診断受診者及び早期肝障害・腎障害患者とし、研究代表者が報告したHSA結合型超硫黄分子測定系であるElimination Method of Sulfide from Polysulfide(EMSP)法に加え、MS解析や蛍光プローブ法(Sulfane Sulfur Probe: SSP)によりHSA結合型超硫黄分子の定量を多面的に行った。さらに、還元型の超硫黄分子の測定には、Dithiothreitol (DTT)による還元法を利用したDTT-メチレンブルー (DTT-MB)法によって測定した。健康人の血液検体は、人間ドック受診者の余剰分を熊本大学の猿渡博士より提供いただき、『未病マーカー』としての妥当性、病態予防・早期発見の可能性を追求した。また、早期肝障害・腎障害患者検体は、病態ステージごとにHSA結合型超硫黄分子定量を行い、病態早期から減少していること、あるいは病態の進行との相関性に関して、多角的評価を行った。必要に応じて、血中抗酸化力をBAPテストにて測定した。いずれの臨床検体を用いたサンプル、倫理委員会の承認を得て行った。

### 4. 研究成果

まず、健康診断受診者の臨床検体50名分の結果を示す。本研究はコホート研究になるため、将来的な一定時間の経過観察が伴うため、引き続き追跡調査を実施している最中であり、HSA結合型超硫黄分子と酸化ストレス病態発症との関連は追って報告する。一方で、今回の臨床検体50名分の詳細な背景を調べたところ、非喫煙者及び喫煙者の集団であったことから、喫煙が与えるHSA結合型超硫黄分子への影響を評価してみることにした。喫煙は、酸化ストレス疾患ほどではないが、ある程度の血中酸化ストレスの増大が報告されている。従って、喫煙による酸化ストレスがHSA結合型超硫黄分子へ影響を及ぼすかを検討することは、今後『未病マーカー』としてHSA結合型超硫黄分子の妥当性を評価する上でも重要であると考えられる。まずは、健康診断受診者の非喫煙者及び喫煙者の背景は以下の通りである(表1)。

表1 健康診断者(非喫煙者と喫煙者)のパラメーター

	非喫煙者		喫煙者	
年齢	74.8 ± 7.9		68.1 ± 5.0	
身長	154.5 ± 7.8		162.1 ± 6.2	
体重	57.3 ± 9.4		68.0 ± 9.5	
BMI	23.9 ± 2.5		25.8 ± 2.6	
アルブミン酸化度	41.6 ± 5.1		37.9 ± 4.6	
T-Bil	0.6 ± 0.2		0.7 ± 0.2	
AST	25.7 ± 5.1		25.9 ± 7.0	
ALT	20.6 ± 10.3		22.4 ± 9.9	
γ-GTP	21.4 ± 9.8		35.2 ± 18.7	
ALP	226.7 ± 39.7		196.3 ± 46.5	
LDH	189.7 ± 32.5		183.1 ± 26.1	
TG	132.9 ± 59.7		137.4 ± 69.7	
Cr	1.2 ± 0.5		1.1 ± 0.2	
eGFR	46.8 ± 14.5		56.0 ± 13.0	
血糖	160.4 ± 43.0		195.5 ± 61.5	

次に血中抗酸化力を測定すべく、BAPテストを用いて評価した。その結果、喫煙者の血中抗酸化力は、非喫煙者と比較して、有意に低値(P=0.00518)であった(図2A)。すでに、BAPテストによる喫煙者の血中抗酸化力測定において、非喫煙者よりも低値であることが報告されており、今回の臨床検体においてもその再現性を取ることができた。次に、この血清検体から、HSAを精製したのち、その精製したHSAに含まれる結合型超硫黄分子量を測定した。その結果、

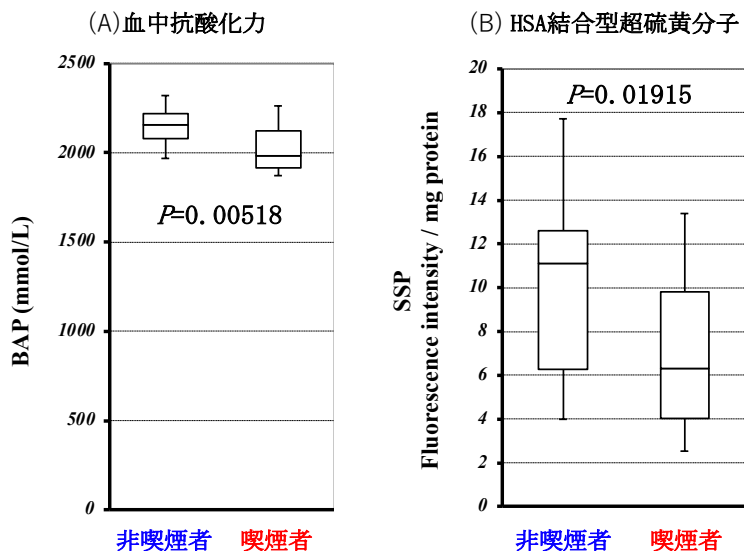


図2 非喫煙者及び喫煙者における血中抗酸化力とHSA結合型超硫黄分子の定量評価  
非喫煙者33名及び喫煙者17名の血清を用い、BAPテストにて血中抗酸化力値  
(A)、SSP4蛍光プローブにてHSA結合型超硫黄分子(B)を評価した。

喫煙者のHSA結合型超硫黄分子は、非喫煙者と比較して、有意に低値 ( $P=0.01915$ ) であった (図2B)。研究代表者は、血中に存在する超硫黄分子は、その大部分がHSAに結合した形で存在していることを確認している。この結果は、喫煙により惹起した酸化ストレスが、HSA結合型超硫黄分子を一部分解した可能性を示唆するものであると考えられる。本知見は、喫煙による酸化ストレスによるHSA結合型超硫黄分子への影響を確認した最初の報告である。

次に、早期肝障害・腎障害患者の臨床検体を用いて、HSA結合型超硫黄分子をEMSP及びDTT-MB法にて定量した。腎障害のステージが1-4の糖尿病性腎症(DN)患者およびステージ5の透析導入慢性腎不全患者(CKD)血清の超硫黄分子量を健常血清と比較した。その結果、酸化型超硫黄分子量は、各病態において有意に少なかった(図3A)。また、糖尿病性腎症においては、腎障害のステージが進行するにつれ、超硫黄分子は少ない傾向が見られた(図3B)。同様にDTT-MBにて還元型超硫黄分子濃度を求めたところ、興味深いことに、腎障害の重症度ごとに評価すると、病態にてステージ1より還元型超硫黄分子は減少するものの、ステージ1-3にて還元型超硫黄分子は病態進行に伴い上昇し、さらにステージが進行すると再び減少するという傾向が得られた(図3C)。

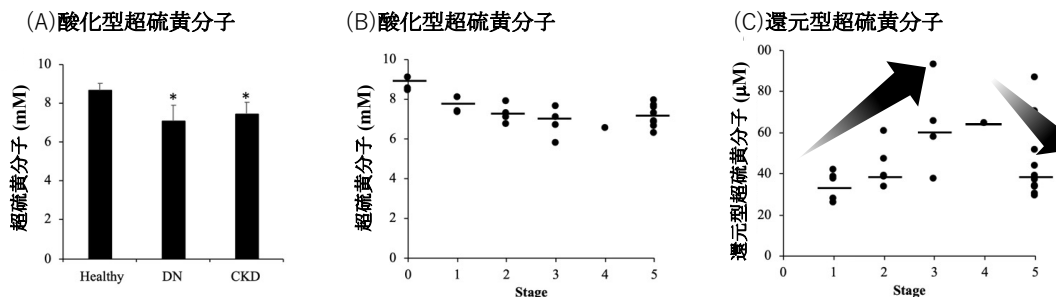


図3 早期肝障害・腎障害患者におけるHSA結合型超硫黄分子の定量評価  
各種疾患患者におけるEMSP法による酸化型超硫黄分子の定量 (A)、腎疾患ステージ別におけるEMSP法による酸化型超硫黄分子の定量 (B) 及びDTT-MB法による還元型超硫黄分子の定量 (C)

上記のような知見から、ヒト血清中ポリスルフィドの酸化ストレス応答性に関して、以下のように考察している。

- (1) ヒト血清中ポリスルフィドは健常時は『酸化型』ポリスルフィドで豊富に存在している。
- (2) 酸化ストレスに応じてこの『酸化型』から『還元型』ポリスルフィドに変化し、ユニークな抗酸化システムを発動し、生体恒常性維持に働いている。
- (3) さらなる酸化ストレスが生じた際には、この生体恒常性維持機構が破綻し、『酸化型』及び『還元型』ポリスルフィドともに低下する。

このような見解から、当初の『酸化型』ポリスルフィドの減少を『未病マーカー』とすることも十分考えられるが、酸化ストレスが高まった際に一過的に上昇する『還元型』ポリスルフィドを捉える技術が開発できれば、この『還元型』ポリスルフィドを『未病マーカー』とすることが、より酸化ストレス応答性の『未病マーカー』となり得ることが考えられる。今後、この『還元型』ポリスルフィドを選択的かつ高感度で捉える技術開発を行うことで、革新的な予防・治療法の確立が可能になると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirakawa Naoki, Ishima Yu, Kinoshita Ryo, Nakano Ryuto, Chuang Victor Tuan Giam, Ando Hidenori, Shimizu Taro, Okuhira Keiichiro, Maruyama Toru, Otagiri Masaki, Ishida Tatsuhiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Reduction-Responsive and Multidrug Deliverable Albumin Nanoparticles: An Antitumor Drug to Abraxane against Human Pancreatic Tumor-Bearing Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 4302 ~ 4309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.1c00110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hama Maichi, Ishima Yu, Chuang Victor Tuan Giam, Ando Hidenori, Shimizu Taro, Ishida Tatsuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Evidence for Delivery of Abraxane via a Denatured-Albumin Transport System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 19736 ~ 19744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.1c03065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kinoshita Ryo, Ishima Yu, Chuang Victor T. G., Watanabe Hiroshi, Shimizu Taro, Ando Hidenori, Okuhira Keiichiro, Otagiri Masaki, Ishida Tatsuhiko, Maruyama Toru	4. 巻 13
2. 論文標題 The Therapeutic Effect of Human Serum Albumin Dimer-Doxorubicin Complex against Human Pancreatic Tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1209 ~ 1209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics13081209	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田悠花、中島崇樹、異島優、安藤英紀、清水太郎、長野一也、柴田寛子、石田竜弘
2. 発表標題 PEG修飾タンパクの凝集体形成が及ぼす抗PEG抗体産生・血中滞留性への影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本怜奈、異島優、安藤英紀、清水太郎、石田竜弘
2. 発表標題 紫外線による皮膚角質中に含まれる活性イオウ分子種の変動
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井愛菜、異島優、安藤英紀、清水太郎、石田竜弘
2. 発表標題 致死性エンドトキシンショックに対するヒト血清アルブミンの治療効果の機序解明
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾菜々、異島優、安藤英紀、清水太郎、石田竜弘
2. 発表標題 活性イオウ付加型ヒト血清アルブミンの腫瘍への送達は小疱形成を介した細胞死を誘導する
3. 学会等名 第29回DDSカンファランス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾菜々、異島優、安藤英紀、清水太郎、石田竜弘
2. 発表標題 Sulfane sulfur付加型HSAを用いた還元ストレス誘導を介するがん治療戦略
3. 学会等名 第60回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 異島優
2. 発表標題 活性硫黄化が織りなすタンパク質の新たな生体防御機構
3. 学会等名 第28回日本血液代替物学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学薬学部 薬物動態制御学ホームページ  
<https://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/ykz/>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストラリア	Curtin University		
マレーシア	Monash University Malaysia	International Medical University	