

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300166

研究課題名（和文）マルチ酵素機能抗酸化キャリアによるミトコンドリア標的治療

研究課題名（英文）Mitochondria Treatment by Antioxidant with Multi-enzyme Activity

研究代表者

川上 浩良（KAWAKAMI HIROYOSHI）

首都大学東京・都市環境科学研究科・教授

研究者番号：10221897

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞内活性酸素の消去、特にミトコンドリア内で発生する活性酸素に効率的に作用する新規抗酸化機能物質を合成した。さらに、ミトコンドリアが関与する疾患の中で拡張型心筋症に焦点を絞り、その予防と治療に関わる『ミトコンドリア標的治療』の創成を目指し、マルチ酵素活性を有する新規抗酸化機能物質の合成とMn-SOD欠損マウスを用いた新規抗酸化剤のin vivo評価を行った。

研究成果の概要（英文）：

In this research, we have prepared the Mn-porphyrin-dimer-loaded liposomes for the rescue of H₂O₂-damaged cells. Furthermore, the antioxidative effect of the Mn-porphyrin dimer on the SOD-deficient cells and mice was examined. Moreover, we have synthesized a new Mn-porphyrin dimer to switch the enzyme activity by biological stimuli.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：酵素、抗酸化、キャリア、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアはこれまで電子伝達系に関連したオルガネラと理解されてきたが、細胞の生死の決定や、神経疾患、老化病など様々な疾患に関与することが明らかとなり、多彩な機能を持つミトコンドリアが多様な生命現象における中心的役割を果たしていることが解ってきた。一方で、電子伝達系に関与する

ミトコンドリアは常に活性酸素の漏洩による危険性に曝されており、これがミトコンドリア障害を引き起こす原因と考えられている。つまり、先ず酸素の一部が活性酸素であるスーパーオキシドラジカルアニオン(O₂⁻)として生成され、その後生体内でSODやグルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼなどの酵素バランスが崩れると、ミトコンドリアがこ

れら活性酸素種から酸化障害を受け、その蓄積が生理機能の劣化をもたらす疾患を誘起すると考えられている (Nature Med., 13, 688-697 (2007) など多数)。

老化は多くの因子が複雑に関与して進行するため、そのメカニズムの解明は容易ではないが、細胞内において活性酸素産生に関与するミトコンドリアがその主因子であるとの考えが老化研究では主流となりつつある。例えば、ミトコンドリアに局在する Mn-SOD 欠損マウスにおいては老化現象が認められ、拡張性心筋症、代謝性、アシドーシス、変性性神経疾患を発症した (Science, 297, 811-816 (2001) など)。東京都健康長寿医療センターの清水らも Mn-SOD 欠損マウスを用い、ミトコンドリア障害による拡張性心筋症、骨格筋障害、骨粗鬆症等、多くの症例についてミトコンドリアとの相関を見出している (Biochem. Biophys. Res. Commun. 382, 457-61 (2009) など多数)。また、アポトーシス (主原因は H_2O_2) を要因とするミトコンドリアとアルツハイマー病、パーキンソン病、あるいは脳虚血障害との関連性もこれまでに多数報告されてきており、脳神経疾患の治療においてもミトコンドリア障害の抑制が最も重要な課題であるとされている (Nature, 441:1157-1161 (2006), Nature, 441:1162-1166 (2006) など)。さらに、活性酸素障害により引き起される mtDNA 変異による癌化、および癌転移、糖尿病などの生活習慣病治療 (詳細は割愛) においても、ミトコンドリアで起こる酸化障害の抑制が必要不可欠であるということが示されている (Science, 320, 661-664 (2008) など多数)。申請者らは、活性酸素障害の主原因となる O_2^- を特異的に消去できる SOD ミメティックな抗酸化剤を合成、in vivo 肝虚血再灌流実験において極めて有効に作用することを報告してきた (J. Controlled Release, 135, 60-64 (2009))。例えば、ビタミン C, E に比べその酸素消去速度は約 10^2 - 10^3 倍高く、優れた抗酸化速度を有し、さらに、その化学構造を精密に制御することにより、多様な活性酸素種 (O_2^- に加え ONOO $^-$ など) も消去でき、生体内に存在する酵素にはないマルチ酵素機能を有する抗酸化剤の合成に成功している。さらにその抗酸化剤をイオン結合でリポソーム表面に固定化することにより、リポソームの安定性を飛躍的に向上させた抗酸化機能を有するナノキャリアの合成にも成功した。

2. 研究の目的

申請者らは、活性酸素障害の主原因となる O_2^- を特異的に消去できる SOD ミメティックな抗酸化剤を合成、in vivo 肝虚血再灌流実験において極めて有効に作用することを

報告してきた (J. Controlled Release, 135, 60-64 (2009))。例えば、ビタミン C, E に比べその酸素消去速度は約 10^2 - 10^3 倍高く、優れた抗酸化速度を有し、さらに、その化学構造を精密に制御することにより、多様な活性酸素種 (O_2^- に加え ONOO $^-$ など) も消去でき、生体内に存在する酵素にはないマルチ酵素機能を有する抗酸化剤の合成に成功している。さらにその抗酸化剤をイオン結合でリポソーム表面に固定化することにより、リポソームの安定性を飛躍的に向上させた抗酸化機能を有するナノキャリアの合成にも成功した。以上の結果は、本研究課題の実現に充分寄与する成果と考えられる。

本研究では、細胞内活性酸素の消去、特にミトコンドリア内で発生する活性酸素に効率的に作用する新規抗酸化機能物質を合成した。さらに、ミトコンドリアが関与する疾患の中で老化と脳神経疾患に焦点を絞り、その予防と治療に関わる『ミトコンドリア標的治療』の創成を目指した。次に研究内容を示す。

(1) ミトコンドリア外膜あるいは内膜まで選択的に輸送でき、 O_2^- を無害な水まで3電子還元できる SOD・カタラーゼ活性と活性酸素種 (ONOO $^-$) も消去できる新規抗酸化機能物質を合成した。

(2) Mn-SOD 欠損マウスを用い、新規抗酸化剤の in vivo 評価を詳細した。

3. 研究の方法

本研究では、先述した目標を実現するため、以下の実験を行った。

(1) ミトコンドリアへのターゲティング機能、マルチラジカル消去能、代謝能を有するマルチ酵素機能抗酸化物質 (Mn ポルフィリン錯体) を合成した。

(2) Mn-SOD 欠損マウスを用い、マルチ酵素機能抗酸化キャリアの in vivo 評価 (特に拡張型心筋症に注目)

具体的には、ミトコンドリア指向性を有するモノカチオン性 MnP (MnMImP $_3$ P) は Ailder-Longo 法により合成し、細胞膜透過性向上と生体分解性を期待した trans 型 M (*trans*-MnM2Py $_2$ P) は 2+2 合成法により合成した。得られたポルフィリン錯体はカラム精製後、メチル化、Mn 酢酸法による Mn 導入を行い、目的の MnP を合成した。MnMImP $_3$ P と *trans*-MnM2Py $_2$ P の SOD 活性と ONOO $^-$ 消去能はストップフロー法を用い評価した。

MnP の抗酸化効果による拡張型心筋症抑制は、拡張型心筋症が発症する前の 5 週齢から、3 週間連日腹腔内投与し評価した。MnP の効果はマウス体重の増加率、自発活動量から評価した。解剖後は心臓/体重比から心筋の拡張抑制効果を評価した。MnP の取り込み量は、

心臓を回収し原子吸光法により測定した。さらに、フリーラジカル自動分析装置を用いて血中のヒドロペルオキシド量を評価した。

細胞質における MnP の細胞生存率・抗酸化効果は SOD-1 欠損 fibroblast 細胞を用いて評価した。評価法は MnP を SOD-1 欠損 fibroblast 細胞に添加し、酸素 20% 下の過酷な条件下で培養しその時の細胞生存率から行った。MnP の抗酸化効果は SOD-1 欠損 fibroblast 細胞に MnP を添加後、酸素 20% 下で培養後 DHE 染色により $O_2 \cdot^-$ 量を同定し、 $O_2 \cdot^-$ 量/細胞数から評価した。

さらに、新規マルチラジカル消去能を有する人工酵素 (MnPD-N3) の合成はスキームに従い合成し、合成の確認は 1H -NMR、FAB-MS、UV-VIS 分光光度計により行った。SOD 活性、ONOO $^-$ 消去活性はストップフロー装置を用いて測定し、それぞれの速度定数を算出した。

4. 研究成果

合成した MnP の構造は 1H -NMR により確認した。MnMImP $_3$ P、*trans*-MnM2Py $_2$ P は、高い SOD 活性、ONOO $^-$ 消去能を有していた。

生理食塩水を投与した SOD 欠損マウスでは心臓/体重比の増加が認められたことから、拡張型心筋症が確認できた。一方 MnM4Py $_4$ P、*trans*-MnM2Py $_2$ P を投与したそれぞれの心臓/体重比は生理食塩水投与群と比較し有意に低下していたことから、拡張型心筋症発症を抑制できることを示唆した。しかし、MnMImP $_3$ P を投与した SOD 欠損マウスの心臓/体重比は増加しており、拡張型心筋症が見られた (図 1)。次に、心臓の MnP 取り込み量を評価した。MnM4Py $_4$ P は多く取り込まれていたが、*trans*-MnM2Py $_2$ P の取り込み量は少なかった (図 2)。

しかし、SOD-1 欠損 fibroblast 細胞に MnP を添加すると、細胞内の $O_2 \cdot^-$ 量は減少しており、MnP は細胞内に取り込まれて、SOD 活性を示していることは示された (図 3)。

in vivo, *in vitro* 評価より、*trans*-MnM2Py $_2$ P は拡張型心筋症を抑制しているにも関わらず、心臓内に取り込まれた量が少ないことから、生体内代謝系により速やかに代謝された可能性が示唆された。今回の実験では、MnM4Py $_4$ P、*trans*-MnM2Py $_2$ P が拡張型心筋症に対して効果を示すことが認められた。しかし、実験条件の最適化はまだ不十分であり、さらに検討が必要である。

trans-MnM2Py $_2$ P は優れた SOD 活性及び ONOO $^-$ 消去能を有し、*in vitro* において低い細胞毒性と抗酸化効果を示した。また、*in vivo* でも優れた抗酸化効果を示した。

MnPD-N3 の合成は (図 4)、Soret 帯の長波長シフト、Q 帯の減少から確認した。MnPD-N3 の SOD 活性、ONOO $^-$ 消去活性は、モノ MnP と同

程度であった。また、モデル化合物である ZnPD-N3 は、 Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} イオン存在下で蛍光の消光を示し、ZnPD-N3 の金属キレート能が示唆された。従って、MnPD-N3 も同様に金属キレート能を有すると考えられる

MnPD-N3 は金属イオン非存在下ではカタラーゼ活性を示さなかったのに対し、 Mn^{2+} キレート後の MnPD-N3 はカタラーゼ活性 ($126s^{-1}$) を示した。これは、 Mn^{2+} キレート後にポルフィリン環が対面構造をとり、2 つの Mn を介した H_2O_2 不均化機構が形成されるためであると考えられる (表 1)。

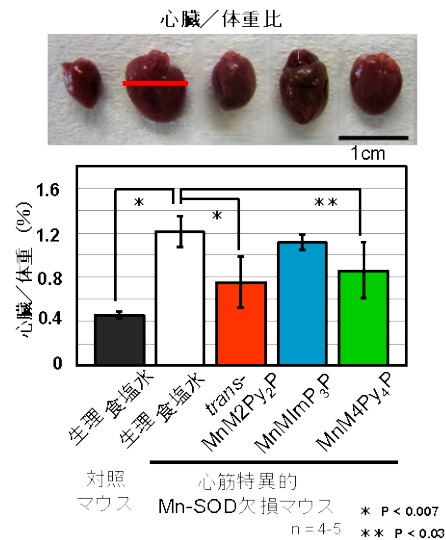


図 1 Mn ポルフィリン錯体投与による拡張型心筋症の抑制

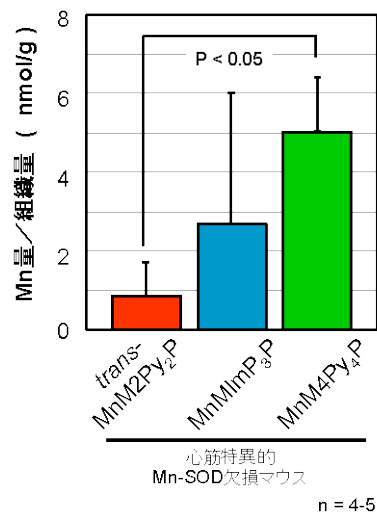


図 2 心臓への Mn ポルフィリン錯体蓄積量

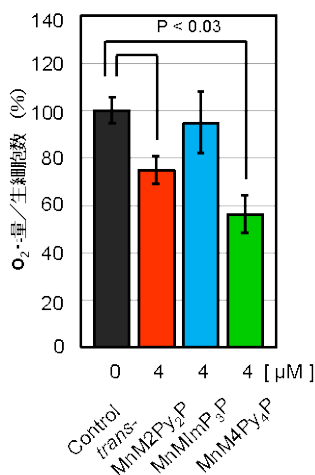


図3 細胞内Mnポルフィリン錯体の抗酸化能

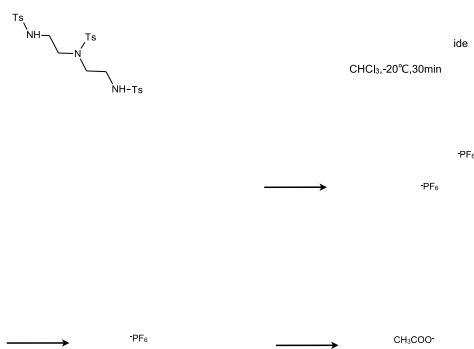


図4 MnPD-N3の合成スキーム

表1 36°C下におけるMnPD-N3のラジカル消去活性評価

Compounds	SOD activity (10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹)	ONOO ⁻ dec activity (10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹) ^a	Catalase activity (s ⁻¹)
MnPD-N3	6.7	0.42	38
MnPD-N3 + Mn ²⁺	-	-	126

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計3件)

(1) N. Hayakawa, S. Asayama, Y. Noda, T.

Shimizu, H. Kawakami, Pharmaceutical Effect of Manganese Porphyrins on Manganese Superoxide Dismutase Deficient Mice, *Mol. Pharmaceutics* **9**, 2956-2959 (2012).

DOI:10.1021/ mp300147v

(2) K. Hazama, S. Asayama, H. Kawakami, Up-regulation of Gene Expression by Transfection to Hepetocyte Spheroids, *Mol. Pharmaceutics* **9**, 3602-3605 (2012).

DOI:10.1021/mp300519v

(3) S. Asayama, T. Nakajima, H. Kawakami, New water-soluble Mn-porphyrin with catalytic activity for superoxide dismutation and peroxyxynitrite decomposition, *Metallomics*, **3**, 744-748 (2011).

DOI: 10.1039/ c1mt00005e

〔学会発表〕(計3件)

(1) 窪田陸, 朝山章一郎, 川上浩良, 人工カタラーゼとしてのイミダゾール基含有高分子/Mn-ポルフィリン複合体の分子設計, 日本薬学会第133年会, 2013年3月29日, パシフィコ横浜.

(2) 米田祥浩, 山口翔平, 清水孝彦, 朝山章一郎, 川上浩良, Mn-SOD欠損細胞及びマウスに対するMnポルフィリンダイマー含有リポソームの抗酸化活性評価, 第61回高分子学会年次大会, 2012年5月31日, パシフィコ横浜.

(3) 窪田陸, 田端久志, 清水孝彦(都健康長寿医療センター研), 朝山章一郎, 川上浩良, Mnポルフィリンダイマーを用いたSOD欠損細胞に対する抗酸化評価, 日本薬学会第131年会, 2011年3月28日-31日, 静岡県立大学・静岡県コンベンションアーツセンター・ツインメッセ静岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 浩良 (KAWAKAMI HIROYOSHI)
首都大学東京・都市環境科学研究科・教授
研究者番号: 10221897

(2) 研究分担者

朝山 章一郎 (ASAYAMA SHOICHIRO)
首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授
研究者番号: 90315755
清水 孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)
千葉大学・医学研究科・客員准教授
研究者番号: 40301791

(3) 連携研究者

なし