

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：32723

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860116

研究課題名(和文)敗血症性多臓器不全の治療におけるアルギン酸の有効性

研究課題名(英文)Efficacy of alginic acid for the treatment of multiple organ failure in sepsis

## 研究代表者

磯部 隆史 (ISOBE, Takashi)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30440530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症における多臓器不全の原因物質の1つとして、体内に存在するヒストンが注目されており、ヒストンをターゲットとした敗血症性多臓器不全の治療におけるアルギン酸の有効性を評価するために、アルギン酸など天然高分子のヒストン吸着能を調べ、アルギン酸が他の天然高分子よりもヒストンを強く吸着することを明らかにしました。また、血漿中の代表的なタンパク質とアルギン酸の反応性について検討し、アルギン酸が他の血漿中タンパク質に比べ選択的にヒストンを強く吸着することを確認しました。

研究成果の概要(英文)：The extracellular release of histones in response to bacterial challenges has been reported to function as a mediator for endothelial dysfunction, organ failure, and death during sepsis. In the present study, the adsorption of histones as well as plasma proteins on alginic acid, pectin, dextran, and chitosan was examined in order to evaluate the potential of natural polysaccharides as therapeutic agents for multiple organ failure in sepsis. The results of this study demonstrate that alginic acid strongly adsorbs histones, but not plasma proteins, and suggest that it is a promising candidate drug for the treatment of multiple organ failure in sepsis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アルギン酸 ヒストン 敗血症 多臓器不全

### 1. 研究開始当初の背景

敗血症は感染を基盤とする全身性炎症反応症候群であり、ショックや多臓器不全に移行する重篤な病態です。敗血症が重症化した場合の死亡率は非常に高く、集中治療領域での死因の第1位の病態です。近年、敗血症における多臓器不全の原因物質の1つとしてヒストンが注目されています。ヒストンは、DNAの核内収納や遺伝子の調節に関与するタンパク質ですが、敗血症時には好中球細胞外トラップとしてDNAと共に細胞外へ放出され細菌などの捕捉及び処理に関与していると考えられています。好中球細胞外トラップに使用されたヒストン及び傷害された細胞から血液中へ放出されたヒストンは、血管の内皮細胞を傷害し、多臓器不全を惹起することが報告されています。敗血症による多臓器不全の治療薬として主に海外で使用されてきた活性化プロテインCの作用メカニズムは長らく不明でしたが、最近、ヒストンの分解に関与していることが明らかとなりました。しかしながら、ヒストンを標的とした敗血症性多臓器不全の治療薬は、現在のところ活性化プロテインCしか存在しておらず、ヒストンをターゲットとした新たな治療薬の開発が期待されています。

### 2. 研究の目的

本課題では、アルギン酸が有するカチオン性金属イオンを吸着する能力に着目しました。アルギン酸は昆布などの褐藻類に含まれる安全性の高い高分子で、医療の分野では胃潰瘍などの治療薬として、食品の分野では増粘剤として広く利用されています。一方、敗血症性多臓器不全の新たなターゲットであるヒストンは、塩基性アミノ酸に富むカチオン性のタンパク質であるため、条件によってはアルギン酸による吸着除去が可能と推測しました。敗血症性多臓器不全の治療におけるアルギン酸の有用性を示し、ヒストンをターゲットとした治療の新たなアプローチの1つとして、その臨床応用に展開するための基礎的なデータの取得を本課題の目的としました。この目的を達成するために、まず、アルギン酸など天然高分子のヒストン吸着能、次に、血漿中の代表的なタンパク質との反応性、さらに、血液浄化療法への応用を目指したアルギン酸ゲルビーズのヒストン及び血漿中タンパク質の吸着能について検討しました。

### 3. 研究の方法

#### (1) 天然高分子によるヒストン吸着能の測定

医療あるいは食品の分野で使用されており安全性が確立されている4種類の天然高分子、アルギン酸、ペクチン、デキストラン、及びキトサン(図1)の水溶液を0.1 mg/mLヒストンに添加し、37℃で振とうさせました。1時間後、溶液中に残存するヒストン量をBCA

法により測定し、高分子水溶液を添加していない溶液中のヒストン量と比較することで、高分子によるヒストン吸着量を算出しました。

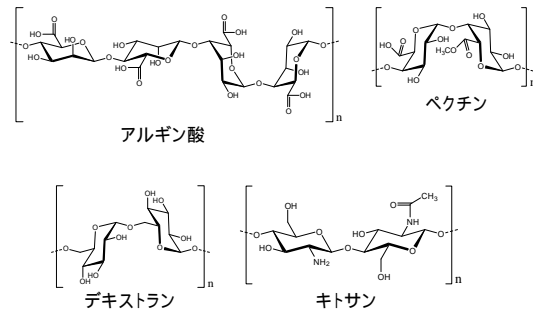


図1 天然高分子の構造

#### (2) 血漿中タンパク質と高分子の反応性の分析

薬物との結合性が知られる代表的な血漿中タンパク質である1-酸性糖タンパク質、アルブミン及びγ-グロブリンの溶液(0.1 mg/mL)に高分子量が0.4 mgとなるように各種高分子水溶液を添加し、37℃で振とうさせました。1時間後、溶液中に残存するタンパク量を測定し、高分子水溶液を添加していない溶液中のタンパク質量と比較することで、高分子による各種血漿中タンパク質の吸着量を求めました。

#### (3) アルギン酸ゲルビーズのヒストン及び血漿中タンパク質に対する吸着能の解析

1%アルギン酸水溶液を0.4 M塩化カルシウム水溶液に20 mg滴下し、1時間の静置後、ゲル化したアルギン酸を取り出し、精製水で洗浄しました。このようにして調製したアルギン酸ゲルビーズをヒストン、1-酸性糖タンパク質、アルブミン及びγ-グロブリンの溶液(0.2 mg/mL)に添加し、37℃で振とうさせました。24時間後、溶液中に残存するタンパク量を測定し、アルギン酸ゲルビーズを添加していない溶液中のタンパク質量と比較することで、アルギン酸ゲルビーズによる各種タンパク質の吸着量を算出しました。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種天然高分子によるヒストン吸着能の差

アルギン酸とペクチンでは添加量依存的なヒストン吸着量の増加が観察されました(図2)。これらの吸着は、塩基性タンパク質であるヒストンのアミノ基とアルギン酸及びペクチンのカルボキシ基との静電相互作用によると考えられます。ヒストンの吸着量はアルギン酸>ペクチンであり、ペクチンはカルボキシ基の一部がメチルエステル化されているため、アルギン酸よりもヒストンに対する吸着性が低いと推測されました。また、カルボキシ基を有しないデキストラン及びキトサンではヒストンの吸着がほとんど

観られませんでした。

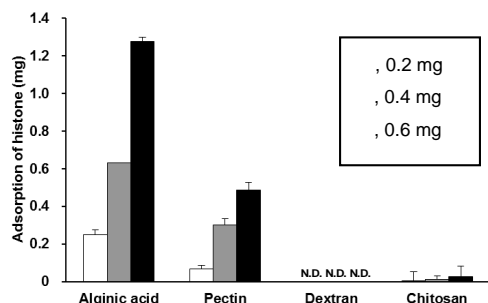


図2 各種高分子によるヒストン吸着能

(2) 血漿中タンパク質と高分子の反応性ならびに選択性

血漿中タンパク質に対する天然高分子の結合性を調べたところ、アルギン酸は全ての血漿中タンパク質に対して吸着性を示しませんでした(図3)。それに対して、ペクチンは $\gamma$ -グロブリンを吸着し、キトサンは1-酸性糖タンパク質を吸着しました。デキストランは全ての血漿中タンパク質に対して吸着性を示しましたが、非常に微量でした。これらのことより、アルギン酸を血管内に投与した場合、血漿中タンパク質と結合することなく、選択的にヒストンを吸着する可能性が期待されます。

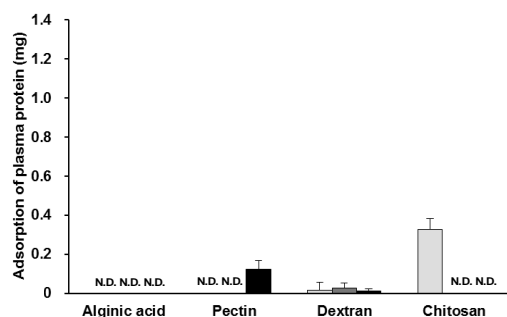


図3 血漿中タンパク質の高分子との反応性

(3) アルギン酸ゲルビーズのヒストン及び血漿中タンパク質に対する吸着能

血液浄化療法への応用も視野に入れアルギン酸ゲルビーズのヒストン及び血漿中タンパク質の吸着能を解析したところ、アルギン酸はカルシウムイオンでゲル化した後もヒストン吸着能を維持していることが明らかとなりました(図4)。1-酸性糖タンパク質、アルブミン及び $\gamma$ -グロブリンについてもアルギン酸ゲルビーズによる吸着が観察されましたが、それらの吸着量はヒストンの吸着量に比べ僅かであり、アルギン酸ゲルビーズがヒストンを選択的に強く吸着していることが明らかとなりました。

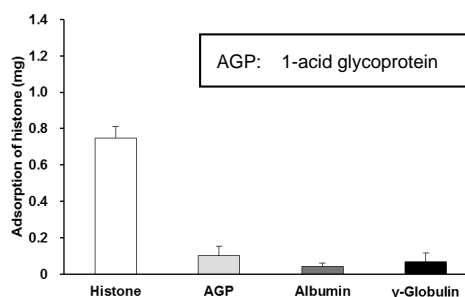


図4 アルギン酸ゲルビーズのタンパク質吸着能

## 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1件)

Isobe T., Kofuji K., Okada K., Fujimori J., Murata M., Shigeyama M., Hanioka N., Murata Y. Adsorption of histones on natural polysaccharides: The potential as agent for multiple organ failure in sepsis. International Journal of Biological Macromolecules, 査読有, Vol. 84, 2016, pp. 54-57  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.029>

[学会発表](計4件)

磯部隆史, 比知屋寛之, 岡田賢二, 村田実希郎, 津田泰之, 埴岡伸光, 小藤恭子, 重山昌人, 村田慶史: 食品由来高分子の敗血症性多臓器不全に対する新規機能性素材としての可能性. 第12回日本機能性食品医学会総会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2014年12月13-14日

磯部隆史, 岡田賢二, 村田実希郎, 津田泰之, 埴岡伸光, 小藤恭子, 重山昌人, 村田慶史: 敗血症性多臓器不全に対する予防製剤への天然多糖類の利用に関する検討. 日本薬学会第135年会, 神戸サンボーホール(兵庫県神戸市), 2015年3月26日.

磯部隆史, 埴岡伸光, 小藤恭子, 村田慶史: 天然高分子の敗血症性多臓器不全予防への応用. 第24回ポリマー材料フォーラム, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 2015年11月27日.

磯部隆史, 小藤恭子, 村田慶史, 埴岡伸光: アルギン酸ゲルビーズの敗血症性多臓器不全予防への利用に関する検討. 日本薬学会第136年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016年3月27日.

[図書](計0件)

[産業財産権]  
 出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

横浜薬科大学ホームページ お知らせ  
<http://www.hamayaku.jp/news/index.html?id=40269&pid=16121>

6．研究組織

(1)研究代表者

磯部 隆史（ISOBE, Takashi）  
横浜薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：30440530

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし