ヘモグロビンの生理活性ガス運搬能を利用した創薬戦略

田口和明,^{*,a,b} 松元一明,^a 丸山 徹,^c 小田切優樹^{b,d}

Strategy of Drug Development Based on the Bioactive Gas-carrying Capacity of Hemoglobin

Kazuaki Taguchi,^{*,a,b} Kazuaki Matsumoto,^a Toru Maruyama,^c and Masaki Otagiri^{b,d}

^aFaculty of Pharmacy, Keio University; 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan; ^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University; 4-22-1 Ikeda, Nishi-ku, Kumamoto 860-0082, Japan; ^cGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University; 5-1 Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto 862-0973, Japan; and ^dDDS Research Institute, Sojo University; 4-22-1 Ikeda, Nishi-ku, Kumamoto 860-0082, Japan.

(Received July 29, 2019)

Bioactive gas molecules, including oxygen, nitric oxide and carbon monoxide (CO), exhibit a variety of physiological activities, and are associated with the onset and progress of some disorders. These facts have led researchers to the development of bioactive gas donors for the treatment of intractable disorders. Hemoglobin is likely an ideal carrier of bioactive gases, since hemoglobin in red blood cells innately carries oxygen in the form of oxyhemoglobin, nitric oxide in the form of S-nitrosohemoglobin, and CO in the form of carboxylhemoglobin. In this study, we attempted to develop a biomimetic CO delivery system using a preparation of hemoglobin. Our strategy for the preparation of this hemoglobin-based CO carrier involves CO being exogenously bound to red blood cells or hemoglobin-encapsulated liposomes, called hemoglobin-vesicles (HbV), which mimic the structure and function of red blood cells. We accumulated evidence that the CO donors—CO-bound red blood cells and CO-bound HbV—showed therapeutic efficacy against intractable disorders in animal models. Here, we describe the potential of hemoglobin-based CO donors, especially CO-bound red blood cells and CO-bound HbV, for the treatment of certain disorders. Hemoglobin-based strategies for the delivery of other bioactive gases for novel drug development are also discussed.

Key words—hemoglobin; red blood cell; liposome; carbon monoxide; heme

1. はじめに

ヘモグロビンは2つの α サブユニットと2つの β サブユニットから構成される四量体構造を有しており、各サブユニットにはヘムを1つずつ有している。通常、生体内のほとんどのヘモグロビンは赤血球 (red blood cell; RBC) 中に存在し、主に酸素運搬の役割を担っている。そのため、ヘモグロビン製剤であるRBCは大量出血などの重篤な貧血状態時に、全身の酸素供給不足の是正を目的に臨床現場で用いられている。また、ヘモグロビンは生体内で一酸化炭素 (carbon monoxide; CO) の内因性のリザー

バーでありキャリアとしての役割も担っている。¹⁾つまり、生体内でヘムが代謝される過程において産生された内因性のCOは、RBC中のヘモグロビンと可逆的な結合を示すカルボニルヘモグロビンを形成し体内を循環した後に、ガス分圧に依存して放出される (Fig. 1)。この放出されたCOは抗酸化・抗炎症・シグナル伝達などの多彩な生理活性を示し、²⁾生理活性ガスとして病態生理学上で重要なガス状メディエーターとして機能している。近年、このCOの多岐に渡る生理活性が注目され、COを医療ガスとして疾患の予防又は治療に臨床応用するために、世界中でCO供与体の開発が積極的行われている。³⁾

われわれは、COの創薬を目指したCO供与体開発戦略として内因性のCOとヘモグロビンが相互作用する事実を利用したCOデリバリーシステムの構築を行っている。具体的には、外因的にCOを結合させたCO結合型RBC (CO-RBC) 又はヘモグロ

^a慶應義塾大学薬学部 (〒105-8512 東京都港区芝公園1-5-30), ^b崇城大学薬学部 (〒860-0082 熊本市西区池田4-22-1), ^c熊本大学大学院生命科学研究部 (〒862-0973 熊本市中央区大江本町5-1), ^d崇城大学DDS研究所 (〒860-0082 熊本市西区池田4-22-1)

*e-mail: taguchi-kz@pha.keio.ac.jp

本総説は、日本薬学会第139年会シンポジウムS08で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Systemic Circulation of Endogenous Carbon Monoxide (CO) by Red Blood Cells (RBC)

(a) Endogenous CO, which is produced in the process of heme metabolism by heme oxygenase (HO-1), binds to hemoglobin in RBC and circulates in the body in the form of CO-bound RBC (CO-RBC). (b) CO-RBC releases CO depending on the local partial pressures of both CO and oxygen.

Fig. 2. Schematic Representation of (a) Carbon Monoxide-bound Red Blood Cell (CO-RBC) and (b) Carbon Monoxide-bound Hemoglobin-vesicle (CO-HbV)

ピンを高濃度に内封したりボソーム製剤であるヘモグロビン小胞体 (hemoglobin-vesicle; HbV) に CO を結合させた CO 結合型 HbV (CO-HbV) を CO 供与体として用い、疾患治療薬としての可能性を探求している (Fig. 2). 本稿では、われわれがこれまでに難治性疾患モデル動物を用いて明らかにしてきた CO-RBC 及び CO-HbV の CO 供与体としての有用性とヘモグロビンを基盤とした生理活性ガスの創薬戦略について紹介する.

2. CO-RBC の新規蘇生剤としての有用性評価⁴⁾

外傷、外科的手術時、消化管出血などが原因で引き起こされる大量出血時には、循環血液量の著しい減少に伴い、全身性の低酸素組織障害である出血性ショックが誘発され、その対症療法として RBC 輸血が施行される。RBC 輸血は優れた蘇生効果を発揮する一方で、虚血組織へ大量の酸素を急激に供給する結果、活性酸素種の産生を亢進し、虚血再灌流傷害を助長することが問題視されている。⁵⁾ われわれは、臓器移植に伴う虚血再灌流傷害を CO が抑制する報告に着目し、⁶⁾ 大量出血時に CO を担持した

CO-RBC で輸血することで、大量出血に伴う虚血再灌流傷害が軽減されることが考えられた。好都合なことに、CO-RBC は CO 放出後に通常の RBC 製剤と同様に酸素を運搬するため、出血性ショック状態からの蘇生効果も期待できる。

まず、40%出血性ショックモデルラットを RBC 又は CO-RBC で蘇生して、出血性ショック状態からの蘇生効果を評価した。その結果、非蘇生群では脱血開始後 1 時間以内に全例死亡したのに対し、CO-RBC 蘇生群では RBC 蘇生群と同様に、蘇生 24 時間後 (エンドポイント) まで全例が生存した。また、脱血後には乳酸アシドーシスによる血液 pH の低下、Base Excess の低下、乳酸値の上昇が認められたが、いずれのパラメータも RBC あるいは CO-RBC 投与 1 時間後には脱血前の値に回復した。このことは、CO-RBC は CO 放出後に酸素を運搬し、組織の低酸素状態を改善していることを裏付けている。次に、大量出血後の RBC 又は CO-RBC 蘇生後の虚血再灌流傷害を、大量出血後の蘇生剤投与により最も傷害を受け易い臓器の 1 つであ

る肝臓に焦点を絞って検討した。その結果、肝機能を反映するアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase; AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase; ALT) は、RBC 蘇生群で顕著な上昇がみられたのに対して、CO-RBC 蘇生群では、これら肝機能パラメータの上昇は認められなかった。これらの結果から、CO-RBC は大量出血に対する蘇生効果と輸血後の虚血再灌流傷害を抑制する効果を兼ね備えた新たな蘇生液としての可能性を提示できた。

肝虚血再灌流時には肝臓中遊離ヘム鉄濃度が上昇することが報告されている。⁷⁾ 遊離ヘム鉄は過酸化水素と反応し、3 価鉄になる結果、強力なヒドロキシラジカルを生成 (フェントン反応) し、血管壁や細胞の脂質膜の酸化障害を引き起こす。⁸⁾ また、輸血に伴う肝虚血再灌流時にはチトクローム P450 (CYP) の発現量が低下することが報告されており、⁹⁾ 遊離ヘム鉄の産生源と目される。一方、移植後の再灌流時において CO 処理することで CYP 含量の変動が抑制されること、¹⁰⁾ が報告されている。これらの事実より、われわれは CO-RBC 輸血は肝 CYP を保護することで遊離ヘム鉄濃度の上昇を抑制し、肝臓の酸化障害を抑制していると仮説を立てた。この仮説を実証すべく、蘇生後 1 時間における肝組織中の酸化ストレスマーカー (ヒドロペルオキシド, マロンジアルデヒド) の産生量を比較した。その結果、RBC 蘇生群と比較して CO-RBC 蘇生群で有意にこれらの酸化ストレスマーカーの産生を抑制していた。そこで活性酸素の根源と目される肝臓中遊離ヘム鉄量と肝 CYP 発現量を測定したところ、RBC 蘇生時には既報と同様に肝臓中遊離ヘム鉄の増加と肝 CYP 含量が低下していたが、CO-RBC 蘇生時はこれらの変動を有意に抑制していた。さらに、肝遊離ヘム鉄量と ALT, マロンジアルデヒド及び肝 CYP 量との関係性を調べたところ、遊離ヘム鉄濃度は ALT ($r = 0.97$), マロンジアルデヒド ($r = 0.89$) は有意な正の相関性を示し、逆に、総 CYP 量 ($r = 0.73$) とは負の相関性を示した。以上の結果より、大量出血後の CO-RBC 蘇生は肝 CYP の分解を抑制することで遊離ヘム鉄濃度の上昇を抑え、肝虚血再灌流傷害を抑制している可能性が示唆された。また、年会発表では紹介しなかったが、CO-RBC 蘇生時には Kupffer 細胞の活性化が抑制さ

れ、Kupffer 細胞由来の活性酸素産生量や TLR-4 シグナルを介した炎症性サイトカインの産生量が減少していた。¹¹⁾ これらの事実を総合的に判断すると、CO-RBC 輸血は CYP の安定化や Kupffer 細胞の活性化を抑制による抗酸化・抗炎症作用を示し、包括的に肝虚血再灌流傷害を抑制していると考えられた。この CO-RBC の CYP 保護効果は、虚血再灌流傷害を軽減するだけでなく、輸血時に併用使用される CYP 代謝型薬物 (麻酔薬や鎮痛剤など) の体内動態や薬理効果の維持にも貢献するため、¹²⁾ 大量出血時における CO-RBC 蘇生は併用薬の安定かつ適切な治療も期待でき、RBC に替わる蘇生剤としての優位性も備えていると考えている。

3. CO-HbV の特発性肺線維症に対する治療効果¹³⁾

CO-RBC は理想的な CO 供与体である一方で、現代の輸血システムでは、RBC へのウイルス混入の可能性などの安全性の面で不安が残される。また、日本赤十字社のシミュレーションによると日本の将来人口の減少と少子高齢化社会により今後、献血可能人口が減少し、2027 年には 85 万人以上の献血者分の血液量が不足すると推定されている。そこでわれわれは、バイオミメティクスの概念の下、人工赤血球製剤として開発が進められている HbV を RBC に替わる新たな CO キャリアとして利用する着想に至った。HbV は、ヒト RBC 由来の精製ヘモグロビンをリン脂質二重膜で内包した直径約 280 nm の均一なリポソーム製剤であり、その構造と機能は RBC と同等である。¹⁴⁾ HbV に内封されているヘモグロビンは、ヒト RBC からヘモグロビンを精製する段階においてウイルスを完全に除去しているため高い安全性が担保されている上に、¹⁴⁾ ポリエチレングリコールを粒子表面へ導入することにより、HbV 粒子間の凝集抑制と分散安定性を向上させ、溶液状態で 2 年以上の室温保存が可能である。¹⁵⁾ RBC と同様の機能を備えた HbV は、CO と可逆的な結合性を示すとともに、HbV に CO を外因的に担持させた CO-HbV を大量投与した場合においても、CO に由来する毒性を示さないことも実証しており、¹⁶⁾ CO-HbV は CO 供与体として疾患治療への応用使用が期待できる。

CO-HbV の CO 供与体としての可能性を探究すべく、われわれは CO-HbV の治療対象疾患候補と

Fig. 3. Potential Applications of Hemoglobin as (a) an Oxygen (O₂) Carrier, (b) a CO Carrier, and (c) a Nitric Oxide (NO) Carrier

して特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) に着目した。IPF は、原因不明の肺線維症であり、慢性かつ進行性の経過をたどり、最終的には死に至る予後不良な難治疾患である。その発症機序の詳細は明らかになっていないが、IPF 患者において還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸オキシダーゼ 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4; NOX4) の発現が上昇していること、¹⁷⁾ NOX4 欠損マウスにおいて IPF の進行が抑制されることが報告されており、¹⁸⁾ NOX4 が IPF の発症と進展に関与していると考えられている。NOX4 の活性中心に位置するヘム鉄を介して産生される活性酸素は諸種の疾患の発症・進展に寄与するため、われわれはヘム鉄と高い親和性を有する CO は NOX4 からの活性酸素の産生を抑制することで IPF の発症と進展を抑制すると考えた。そこで、IPF モデルとして汎用されているブレオマイシン誘発 IPF モデルマウスを用いて CO-HbV の IPF に対する治療効果について検討を行った。まず、CO-HbV の肺の線維化に対する影響を線維化評価として汎用されている肺組織の Masson's trichrome 染色と肺ヒドロキシプロリン含量により評価した。その結果、HbV 投与群と比較して CO-HbV 投与群は顕著に肺線維化を抑制していた。さらに、高性能呼吸機能解析システムを用い肺機能についても検討

したところ、HbV 投与群では線維化の進行に伴い努力肺活量 (forced vital capacity; FVC) の低下が確認されたが、CO-HbV 投与群では FVC が維持されており、CO-HbV は IPF に対して治療効果を有することが明らかとなった。

続いて、CO-HbV の IPF 治療メカニズムについて、上述した NOX4 の活性酸素の産生に着目して評価した。NOX4 が活性化すると、それに比例してスーパーオキシドアニオンの産生量が増大するため、スーパーオキシドアニオンに特異的なプローブであるジヒドロエチジウムを用いて肺組織中のスーパーオキシドアニオン産生量を評価した。その結果、生理食塩水投与群と HbV 投与群では顕著なジヒドロエチジウムの蛍光が観察されたが、CO-HbV 投与群では蛍光強度が低下していた。この CO-HbV による NOX4 由来のスーパーオキシドアニオン産生量の低下は、(i) 肺における NOX4 発現量の低下、又は (ii) NOX4 活性の抑制、のいずれかに起因すると考えられる。そこで、NOX4 の発現量を Western blotting で比較したところ、生理食塩水投与群、HbV 投与群、CO-HbV 投与群の間で NOX4 発現量の違いはなかった。また、NOX4 の活性機構として、近年、p22phox と Poldip2 が NOX4 と複合体を形成することで NOX4 の活性化を制御する重要なレギュレーターであることが明らかとなっ

ており,¹⁹⁾ これらの2つのレギュレーターの発現量を検討した。その結果、生理食塩水投与群、HbV投与群、CO-HbV投与群の間でp22phox及びPol-dip2の発現量の変動が認められなかった。つまり、CO-HbV由来のCOは、NOX4、p22phox、Pol-dip2のいずれのタンパク発現量には影響を及ぼさず、スーパーオキシドアニオンの産生を抑制していた。これらの結果は、CO-HbVがNOX4のヘム鉄に直接作用することでNOX4からスーパーオキシドアニオンの産生を軽減し、IPFの発症と進展を抑制していると考えられた。

4. ヘモグロビンを基盤とした創薬の現状と今後の展望

過去半世紀において、HbVを始めとしたヘモグロビンを修飾又は加工した人工酸素運搬体（人工血液）の研究開発が世界中で展開され、²⁰⁻²²⁾ 南アフリカの一部の地域に限られるが実際に人工血液（hemoglobin-based oxygen carrier-201; HBOC-201）がの臨床使用されている。²³⁾ また、これらの人工血液は、本来の開発目的である赤血球代替物としての使用（貧血の改善）に留まらず、粒子径の小ささから赤血球では酸素運搬が困難な心筋梗塞や脳梗塞などの虚血性部位^{24,25)} やがん放射線療法増強剤、²⁶⁾ 妊娠高血圧時の胎児の低酸素症改善²⁷⁾ などの酸素送達剤としての応用使用も期待されている [Fig. 3 (a)]。さらに、本誌で紹介したようにヘモグロビンを基盤としたCO供与体開発も行われている [Fig. 3 (b)]。われわれは、特発性肺線維症のほかにもCO-HbVが潰瘍性大腸炎、²⁸⁾ 急性膵炎、²⁹⁾ 多臓器不全³⁰⁾ の治療薬候補になることも見出ししている。近年では、ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビンにCOを結合させたSANGUINATE™の臨床試験が行われている。^{31,32)} また、一酸化窒素がヘモグロビンのグロビンタンパク部位 (β Cys93) に結合したS-ニトロシル化ヘモグロビンが生体内で検出されている。³³⁾ 今後、S-ニトロシル化ヘモグロビンも生体システムを模倣した生理活性ガスデリバリーシステムとして期待できるかもしれない [Fig. 3 (c)]。このように、ヘモグロビンは、酸素、CO、一酸化窒素などのガス状メディエーターの放出制御担体の優れた創薬素材であり、今後、更なる研究成果の蓄積によりヘモグロビンと医療ガスを融合した革新的な製剤が開発されることを期待したい。

謝辞 本研究は、熊本大学薬学部薬剤学研究室及び崇城大学薬学部薬物動態学研究室で行われたものであり、本研究に携わった学生諸君に深く感謝します。また、本研究は科学研究費補助金により実施しました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Thom S. R., *Compr. Physiol.*, **1**, 421-446 (2011).
- 2) Verma A., Hirsch D. J., Glatt C. E., Ronnett G. V., Snyder S. H., *Science*, **259**, 381-384 (1993).
- 3) Taguchi K., Maruyama T., Otagiri M., *Curr. Med. Chem.*, doi: 10.2174/0929867325666181113122340 (2018).
- 4) Ogaki S., Taguchi K., Watanabe H., Ishima Y., Otagiri M., Maruyama T., *J. Pharm. Sci.*, **103**, 2199-2206 (2014).
- 5) Allan P. F., Bloom B. B., Wanek S., *Mil. Med.*, **176**, 332-335 (2011).
- 6) Ozaki K. S., Kimura S., Murase N., *Transplant. Rev. (Orlando)*, **26**, 125-139 (2012).
- 7) Origassa C. S. T., Câmara N. O. S., *World J. Hepatol.*, **5**, 541 (2013).
- 8) Belcher J. D., Beckman J. D., Balla G., Balla J., Vercellotti G., *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 233-248 (2010).
- 9) Izuishi K., Wakabayashi H., Maeba T., Ryu M., Maeta H., *World J. Surg.*, **24**, 49-52; discussion 53 (2000).
- 10) Nakao A., Faleo G., Shimizu H., Nakahira K., Kohmoto J., Sugimoto R., Choi A. M. K., McCurry K. R., Takahashi T., Murase N., *Kidney Int.*, **74**, 1009-1016 (2008).
- 11) Ogaki S., Taguchi K., Maeda H., Watanabe H., Ishima Y., Otagiri M., Maruyama T., *Biochem. Pharmacol.*, **97**, 310-319 (2015).
- 12) Ogaki S., Taguchi K., Watanabe H., Otagiri M., Maruyama T., *Drug Metab. Dispos.*, **41**, 141-148 (2013).
- 13) Nagao S., Taguchi K., Sakai H., Tanaka R., Horinouchi H., Watanabe H., Kobayashi K., Otagiri M., Maruyama T., *Biomaterials*, **35**, 6553-6562 (2014).
- 14) Sakai H., *J. Funct. Biomater.*, **8**, 10 (2017).

- 15) Sakai H., Sou K., Horinouchi H., Kobayashi K., Tsuchida E., *Artif. Organs*, **33**, 139–145 (2009).
- 16) Taguchi K., Yamasaki K., Sakai H., Maruyama T., Otagiri M., *J. Pharm. Sci.*, **106**, 2392–2400 (2017).
- 17) Amara N., Goven D., Prost F., Muloway R., Crestani B., Boczkowski J., *Thorax*, **65**, 733–738 (2010).
- 18) Hecker L., Vittal R., Jones T., Jagirdar R., Luckhardt T. R., Horowitz J. C., Pennathur S., Martinez F. J., Thannickal V. J., *Nat. Med.*, **15**, 1077–1081 (2009).
- 19) Lyle A. N., Deshpande N. N., Taniyama Y., Seidel-Rogol B., Pounkova L., Du P., Papa-haralambus C., Lassègue B., Griendling K. K., *Circ. Res.*, **105**, 249–259 (2009).
- 20) Taguchi K., Yamasaki K., Maruyama T., Otagiri M., *J. Funct. Biomater.*, **8**, 11 (2017).
- 21) Keipert P. E., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **977**, 343–350 (2017).
- 22) Haruki R., Kimura T., Iwasaki H., Yamada K., Kamiyama I., Kohno M., Taguchi K., Nagao S., Maruyama T., Otagiri M., Komatsu T., *Sci. Rep.*, **5**, 12778 (2015).
- 23) Lok C., *Nature*, **410**, 855 (2001).
- 24) Gekka M., Abumiya T., Komatsu T., Funaki R., Kurisu K., Shimbo D., Kawabori M., Osanai T., Nakayama N., Kazumata K., Houkin K., *Stroke*, **49**, 1960–1968 (2018).
- 25) García-Ruiz J. M., Galán-Arriola C., Fernández-Jiménez R., Agüero J., Sánchez-González J., García-Alvarez A., Nuno-Ayala M., Dubé G. P., Zafirelis Z., López-Martín G. J., Bernal J. A., Lara-Pezzi E., Fuster V., Ibáñez B., *Basic Res. Cardiol.*, **112**, 17 (2017).
- 26) Gundersen S. I., Palmer A. F., *Biotechnol. Prog.*, **24**, 1353–1364 (2008).
- 27) Li H., Ohta H., Tahara Y., Nakamura S., Taguchi K., Nakagawa M., Oishi Y., Goto Y., Wada K., Kaga M., Inagaki M., Otagiri M., Yokota H., Shibata S., Sakai H., Okamura K., Yaegashi N., *Sci. Rep.*, **5**, 15271 (2015).
- 28) Nagao S., Taguchi K., Miyazaki Y., Wakayama T., Chuang V. T. G., Yamasaki K., Watanabe H., Sakai H., Otagiri M., Maruyama T., *J. Control. Release*, **234**, 49–58 (2016).
- 29) Taguchi K., Nagao S., Maeda H., Yanagisawa H., Sakai H., Yamasaki K., Wakayama T., Watanabe H., Otagiri M., Maruyama T., *Drug Deliv.*, **25**, 1266–1274 (2018).
- 30) Nagao S., Taguchi K., Sakai H., Yamasaki K., Watanabe H., Otagiri M., Maruyama T., *Int. J. Nanomedicine*, **11**, 5611–5620 (2016).
- 31) Brotman I., Kocher M., McHugh S., *A&A Pract.*, **12**, 243–245 (2019).
- 32) Abu Jawdeh B. G., Woodle E. S., Leino A. D., Brailey P., Tremblay S., Dorst T., Abdallah M. H., Govil A., Byczkowski D., Misra H., Abuchowski A., Alloway R. R., *Clin. Transplant.*, **32**, e13155 (2018).
- 33) Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J. S., *Nature*, **380**, 221–226 (1996).