

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	バイオミメティックDDSを基盤とした新規一酸化炭素ナノデリバリーシステムの構築と難治性炎症疾患治療への応用
Author(s)	永尾, 紗理
Citation	
Issue date	2017-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/37122">http://hdl.handle.net/2298/37122</a>
Right	

# バイオミメティック DDS を基盤とした新規一酸化炭素ナノデリバリーシステムの構築と難治性炎症疾患治療への応用

医療薬学専攻 薬剤学分野 永尾 紗理

一酸化炭素 (CO) は、致死性の毒ガスとして広く認識されてきたが、近年になり、内因的に産生され、シグナル伝達分子として機能すること、また抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス効果などの多面的な生理活性を有することから、新規創薬シーズとして注目を集めている。実際に、国内外で高圧酸素療法を基盤とした CO 吸入療法の臨床応用が試みられており、CO の臨床応用の動きは加速化している。しかしながら、CO 吸入療法は専用の設備や人材が必須であるなどの数多くの問題点が挙げられており、CO の臨床応用における大きな障壁となっている。私は、これらの問題点を克服すべく、リン脂質膜にヘモグロビンを高濃度に封入したヘモグロビン小胞体 (HbV) を新規 CO 供与体として利用する着想に至った。そこで本研究では、創薬シーズとして高いポテンシャルを秘めている CO の放出制御担体として HbV を活用し、CO 結合型 HbV (CO-HbV) の実用化の可能性を追求すべく、安全性に関する検討と、未だに有効な治療法が確立していない難治性疾患に対する新規治療薬としての可能性を検証した。具体的には、健常マウスを用いた安全性評価と、難治性疾患として特発性肺線維症 (IPF)、潰瘍性大腸炎および急性膵炎を選択し、これらの病態モデルマウスに対する有用性評価およびその作用機序について検討を行った。以下に得られた知見を総括する。

## 1. CO-HbV の安全性評価

健常マウスに CO-HbV を投与量依存的に (100, 250, 500, 1000, 1400 mg Hb/kg) 静脈内投与し、投与後 28 日目まで経時的に、(i) 血圧および心拍数、(ii) 体重、(iii) 生化学パラメータ、(iv) 各臓器 (肝臓、脾臓、心臓、膵臓、腎臓、肺) の組織学的評価 (HE 染色及びベルリンブルー染色)、(v) 造血細胞への影響、を評価した。その結果、全ての検討項目において、対照群である生理食塩水投与群と CO-HbV 投与群に明らかな違いは確認されなかった。加えて、CO の動態学的解析により、CO-HbV は *in vitro* 及び *in vivo* において十分な CO 放出特性を有することが確認できた。以上のことから、CO-HbV は、生体内で安全かつ安定に CO を送達できることが明らかとなり、臨床応用可能な新規 CO 製剤としての有用性が期待できる。

## 2. ブレオマイシン (BLM) 誘発肺線維症に対する CO-HbV の有用性評価

BLM 誘発肺線維症モデルマウスに対する CO-HbV の有効性評価を行った結果、線維化段階 (BLM 投与 14 日後) において、線維化部位の特異的染色法である Masson's trichrome 染色と、線維化の指標である肺組織中ヒドロキシプロリン量の測定から、CO-HbV は投与量依存的に線維化を抑制し、1000 mg Hb/kg の投与量において最も抑制効果を示した。さらに、臨床で IPF の指標として用いられる肺機能検査 (努力肺活量、肺組織の硬さ) を評価したところ、CO-HbV 投与群でのみ肺機能を維持させた。また、CO-HbV は、炎症段階初期 (BLM 投与 3~7 日後) における肺組織中の炎症性サイトカイン産生を有意に減少させ、好中球浸潤に起因する酸化障害及び Nox4 由来の活性酸素種 (ROS) の産生を顕著に抑制していた。加え

て、CO-HbVは、線維化因子の一つであるTGF- $\beta$ の発現も有意に抑制していた。これらの知見から、CO-HbVは抗炎症及び抗酸化作用によりBLM誘発の肺線維化に対して優れた治療効果を発揮することが明らかとなった。

### 3. デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発潰瘍性大腸炎に対するCO-HbVの有用性評価

潰瘍性大腸炎治療薬としてのCO-HbVの可能性を検証すべく、DSS誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを用い、有用性を評価した。大腸炎の症状が現れ始めたDSS飲水開始3日後にCO-HbVを単回静脈内投与すると、「体重減少」、「便の硬さ」、「血便の状態」により評価するDisease Activity Index (DAI)スコアは有意に減少し、大腸組織の障害も抑制された。また、CO-HbVは、潰瘍性大腸炎発症時の代表的な合併症である貧血の指標である血中の赤血球数およびヘモグロビン値の減少を抑制した。加えて、CO-HbVによる大腸炎の抑制機序として、大腸組織への好中球の浸潤、酸化障害、およびアポトーシスの抑制が認められた。興味深いことに、CO-HbVは炎症性サイトカインの産生を抑制するだけでなく、抗炎症性サイトカインの産生を亢進しており、病態の進行に影響を与える炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインの不均衡を是正する優れた抗炎症作用を発揮していた。これらの知見から、CO-HbVは潰瘍性大腸炎の新規治療薬になりうる可能性が示された。

### 4. 急性膵炎に対するCO-HbVの有用性評価

急性膵炎に対するCO-HbVの新規治療薬としての可能性を調査すべく、2つの膵炎モデルマウスを用い、有用性を評価した。その結果、致死性のコリン欠乏エチオニン添加食誘発重症膵炎モデルマウスにおいて、CO-HbVは膵組織の障害抑制効果を発揮するだけでなく、生存期間を有意に延長した。さらに、膵臓局所のみならず、炎症性サイトカイン産生を抑制する結果、遠隔臓器（肝臓、腎臓、肺）障害に対しても保護効果を有することが明らかとなった。また、セルレイン誘発急性膵炎モデルマウスにおいて、CO-HbVはCOによる抗炎症・抗酸化作用を発揮することで急性膵炎の進行を抑制した。加えて、CO-HbVはHMGB1の産生を抑制したことから、COによる抗炎症効果は、一部TLR4-NF- $\kappa$ B経路のシグナル抑制に起因する可能性が示唆された。さらに、*in vitro*において、マウス由来マクロファージ様細胞株にCO-HbVを添加すると、マクロファージの極性をM2様に変化させた。このマクロファージの可塑性変動に起因してCO-HbVによるサイトカイン種産生変動が誘導されている可能性が推察された。これらの知見から、CO-HbVは膵臓の増悪に関連する複数の因子を多面的に抑制することで重症急性膵炎に対して治療効果を示し、新規治療薬として期待できる。

以上の結果より、CO-HbVは安全性の高い新規CO供与体であり、炎症や酸化ストレスが病態形成に関与する難治性疾患である特発性肺線維症、潰瘍性大腸炎および重症急性膵炎に対して優れた効能を発揮することが明らかとなった。また、これら疾患に対する治療効果は、COの抗炎症作用、抗酸化作用、抗アポトーシス作用に起因していた。本研究で得られた成果は、新規CO供与体であるCO-HbVの難治性炎症性疾患に対する臨床応用を考える上で、有用な基礎資料になるものと思われる。