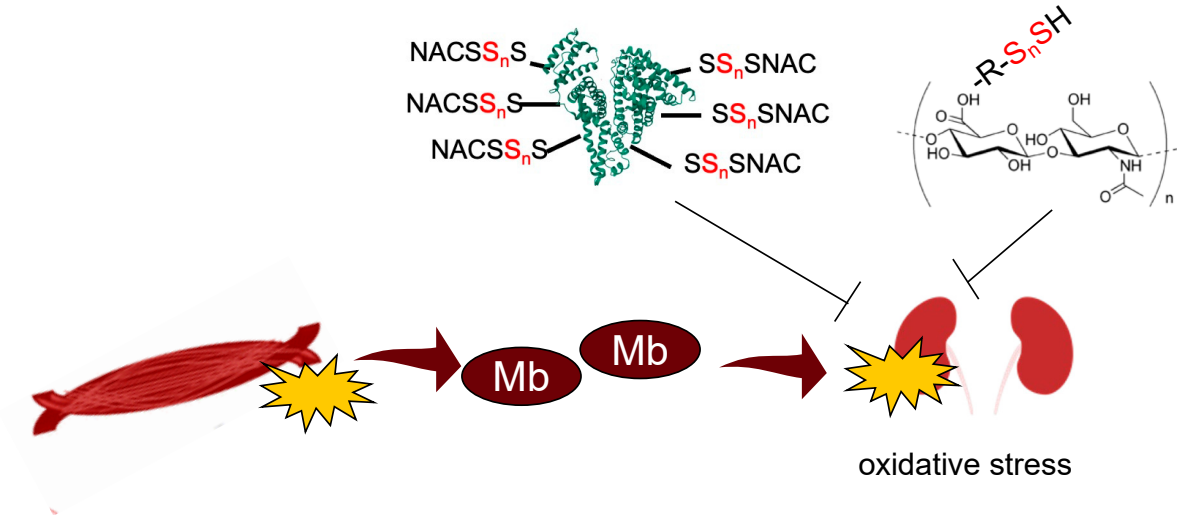
166　腎肝線維化治療に向けた超硫黄分子デリバリー	池田　真由美

【目的】酸化ストレス状態では、体内の抗酸化物質が不足し、腎臓や肝臓などの臓器の病気が進行する。最近、超硫黄分子と呼ばれる化合物が注目されており、効率的に酸化ストレスを緩和することが示されている。しかし超硫黄分子は反応性が高く、血中で速く分解されるため、効率的な治療には適切な薬物送達システムが必要である。本研究では、ヒト血清アルブミンやヒアルロン酸を担体として超硫黄分子を送達させることにより、腎臓や肝臓の疾患を治療する新しい薬剤を合成し、評価することを目的とする。

【方法】血清アルブミンにはチオール基を導入し、超硫黄ドナーと反応させることで超硫黄の付加を試みた。ヒアルロン酸は架橋剤を用いてチオール基を導入後、一酸化窒素により酸化させてさらにスルフィドと反応させることにより超硫黄の付加を試みた。

【結果】アルブミンおよびヒアルロン酸に超硫黄を付加することに成功した。細胞内に超硫黄を供給し、酸化ストレス消去活性を有することが示された。横紋筋融解症誘発の急性腎障害モデルにおいて、合成した超硫黄ドナーが治療効果を有することを明らかにした。

超硫黄ドナーの抗酸化活性による横紋筋融解症誘発急性腎障害の抑制



166. 腎肝線維化治療に向けた超硫黄分子デリバリー

池田　真由美

和歌山県立医科大学 薬学部 薬剤学

Key words：超硫黄，酸化ストレス，ヒアルロン酸，血清アルブミン，Drug delivery system

緒　言

酸化ストレスは酸化と還元のバランスが破綻して酸化に傾いた状態をいい、このような環境下では生体内の抗酸化物質が枯渇し、腎障害や肝障害などの臓器疾患が発症・進展する。最近、生体内の抗酸化物質として、パースルフィド（R-SSH）やポリスルフィド（R-SS_nH、n＞1）を有する化合物である超硫黄分子が着目されている［1］。超硫黄分子は生体内の主要な抗酸化物質の一つであるチオール（SH）化合物よりも高効率に酸化ストレスを消去することが報告されており、超硫黄分子を線維化組織部位へ送達し、枯渇した抗酸化物質を補充することが、酸化ストレス関連疾患の新しい治療戦略となり得ることが期待されている。我々はこれまでに超硫黄分子の新規定量法の開発や、生体液における測定を行い、さらに慢性腎臓病モデルラットおよび慢性腎不全患者において血清中超硫黄分子が減少することを報告しており、酸化ストレス関連疾患において超硫黄分子を供給する有用性を証明している［2，3］。

しかし、超硫黄分子は反応性が高く、かつ血中半減期が短いことから、超硫黄分子を安定な状態で効率よく疾患部位へ送達し、治療へ応用するにはドラッグデリバリーシステム（DDS）が必要である。そこで本研究では、ヒト血清アルブミン（HSA）やヒアルロン酸（HA）を担体に超硫黄分子を送達させ、腎・肝疾患を治療する新規薬剤を合成及び評価することを目的とした。

方　法

1. HSA をキャリアとした超硫黄ドナーの合成

超硫黄付加 HSA として、過去の報告に従い多硫化ナトリウム（Na_2S_n）を反応させて精製した S_n-HSA を合成した［4］。さらに新たな超硫黄 HSA 担体として、低分子超硫黄ドナーである N-acetyl-L-cysteine polysulfides（NACSn）をアルブミンへ結合することを試みた。具体的には、HSA のアミノ基を標的にイミノチオランを用いてチオール（SH）基を導入し、SH-SS 交換反応により NACSn（n＝0～2）を HSA に結合させた。

2. HA をキャリアとした超硫黄ドナーの合成

HA に超硫黄を付加させるために、まず HA のカルボン酸を標的として SH 基の導入を試みた。SH 化合物を、架橋剤を用いて HA へ結合させた。次に、S-ニトロソ（SNO）化合物を用いて HA へ結合させた SH を酸化した。酸化の程度は SNO の定量法である Griess 法を用いて評価した。その後、Na_2S_n を反応させることにより超硫黄の付加を試みた。各工程にて透析および凍結乾燥を行い、精製した。

3. 腎尿細管上皮細胞における活性酸素種の消去活性評価

ブタ腎臓上皮細胞 LLC-PK1 を 96 well plate に播種後、上清を除去し、DPBS（+）中の CM-H2DCF-DA（最終濃度：5 μM）を添加した。30 分間インキュベート後、CM-H2DCF-DA 溶液を除去し、試料およびミオグロビン（Mb）を 2 時間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダーで 485 nm の蛍光励起と 535 nm の蛍光

発光を測定することで細胞内の酸化ストレスレベルを評価した。

4. グリセロール誘発急性腎障害（AKI）モデルマウスの作製

6 週齢の ICR 雄性マウスにイソフルラン吸入麻酔下で 10 mg/kg の 50%グリセロールを半量ずつ両側大腿部に筋肉内投与した。超硫黄ドナーはグリセロールの投与直前に尾静脈内より投与した。24 時間後、イソフルラン吸入麻酔下でマウスの膀胱より尿を、下大静脈より血液を回収してヘパリン血清とした。腎障害の程度は血清中のクレアチニン濃度（SCre）や尿素窒素濃度（BUN）に加え、腎重量や腎組織切片の観察により評価した。

5. 腎尿細管上皮細胞における超硫黄の取り込み活性評価

LLC-PK1 細胞を 96 well plate に播種後、上清を除去し、試料を添加した。2 時間インキュベート後、試料溶液を除去し、PBS で 2 回洗浄した。5 mM SSP4／1 mM hexadecyltrimethylammonium bromide と室温で 10 分反応させた後、マイクロプレートリーダーで 485 nm の蛍光励起と 535 nm の蛍光発光を測定することで細胞内の超硫黄レベルを評価した。

結　果

1. HSA をキャリアとした超硫黄ドナーの AKI 治療効果

Zhang により酸化型の超硫黄を持つ低分子である NACSn が開発されている［5］。そこで NACSn を用いて、HSA 中のポリスルフィドが酸化された新しい超硫黄ドナーの開発を試みた。反応スキームを図 1a に示す。まず Traut 試薬を使用して SH 基を HSA に導入してチオール付加 HSA (poly-SH-HSA) を合成した。これを NACSn と SH／SS 交換反応によって poly-SH-HSA に結合させた。NACSn として、ジスルフィド結合にそれぞれ 1 個と 2 個のスルファン硫黄を含む NACS1 と NACS2 が用いられた。比較対象として、NAC ジスルフィド(NACox)を用いた。以下、NACSn と反応させて合成した超硫黄付加 HSA を poly-NACSn-HSA と表記する。まず DTNB 法を用いてチオールのレベルを測定したところ、HSA あたり約 5 個のチオールが検出され、そのうち 3～4 個は NAC ポリスルフィドまたは NAC ジスルフィドとの反応によって酸化された（図 1b)。次に超硫黄数を測定したところ、poly-NACS1-HSA と poly-NACS2-HSA は、HSA よりも約 4 個と 5 個多いポリスルフィドを有しており、NACSn から超硫黄が HSA に供給されたことが示唆された（図 1c)。横紋筋融解症誘発の酸化ストレス障害では、筋肉から血中に遊離する Mb が酸化ストレスを発生させ腎障害の発症や進展に寄与することが知られている。そこで次に、ブタ近位尿細管上皮細胞における Mb 誘発酸化ストレスに対する消去活性を評価したところ、poly-NACSn-HSA は HSA や NACSn と比較してより高い抗酸化活性を示した（図 1d)。

2. HSA をキャリアとした超硫黄ドナーの AKI 治療効果

グリセロール誘発の AKI モデルマウスにおいて、合成した HSA ベースの超硫黄ドナーの治療効果を評価した。図 2a に示すように、超硫黄ドナーはグリセロールの筋注投与と同時に尾静脈内より投与し、24 時間後に各種評価を行なった。投与後 24 時間後に採取した血漿を用いて BUN および SCre を測定したところ、病態の投与による増加が超硫黄ドナーの投与によりそれぞれ有意に低下していた（図 2b，c)。本モデルにおいては、腎障害の進行に伴い腎重量が増加することが報告されている［6］。そこで右腎臓の重量を秤量したところ、saline 群において sham 群よりも腎重量が増加しており、さらに poly-NACS2-HSA の投与により有意に低下していることが示された（図 2d)。また、腎組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なったところ、病態誘導によって形成された円柱のような形態異常は超硫黄ドナーの投与に抑制される傾向が観察された（図 2e)。

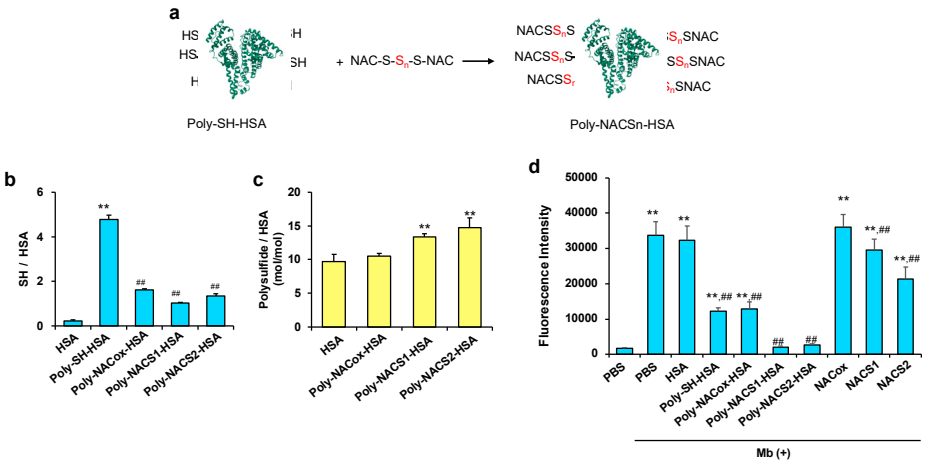


図 1. Poly-NACSn-HSA の合成と *in vitro* における細胞内活性酸素種の消去活性評価

a） 合成スキーム。

b） HSA1 分子あたりの SH 数（mol/mol）。値は mean±S.D.（n＝3）。**p＜0.01 vs HSA、##p＜0.01 vs poly-SH-HSA（one-way ANOVA）。

c） HSA1 分子あたりの超硫黄量（mol/mol）。値は mean±S.D.（n＝3）。**p＜0.01 vs HSA（one-way ANOVA）。

d） LLC-PK1 細胞における酸化ストレス消去活性。値は mean±S.D.（n = 3）。**p＜0.01 vs PBS（Mb(-)）、##p＜0.01 vs PBS（Mb(+)）（one-way ANOVA）。

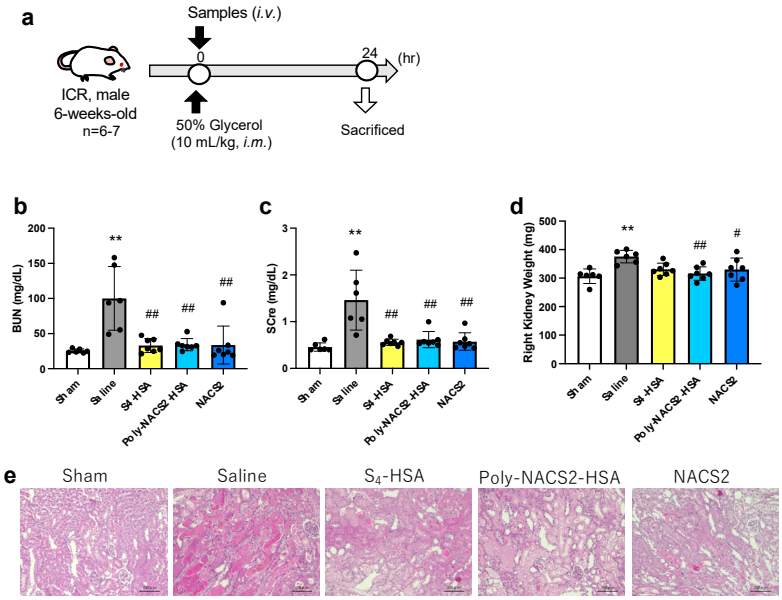


図 2. AKI モデルにおける HSA 超硫黄ドナーの治療効果

a） 投与および評価スケジュール。

b～d） 投与後 24 時間後の BUN 濃度（b）、SCre 濃度（c）、右腎臓重量（d）。値は mean±S.D.（n＝6～7）。**p＜0.01 vs sham、#p＜0.05、##p＜0.01 vs saline（one-way ANOVA）。

e） 組織のヘマトキシリン・エオジン染色（スケールバー：100 μm）。

3. HA をキャリアとした超硫黄ドナーの合成と物性評価

次に、HA を基盤とした超硫黄ドナーの合成に着手した。研究開始当初は HA にシスチンを導入し、その後 Na_2S_n と反応させることにより超硫黄の付加を試みたものの反応効率が低かったため、検討を重ねた結果、最終的に図 3a に示す合成方法に変更した。HA にチオール基を導入し、S-ニトロソ化化合物との反応により酸化させたのち、スルフィドと反応させることで超硫黄を導入した。各ステップにおいて、SH 基の導入を Ellman 試薬で、SNO の導入を Griess 法で確認した（data not shown）。スルフィドとの反応時にギ酸を 0.1%反応させることにより、超硫黄化効率が上昇することが示された（図 3b)。ギ酸濃度を 0.2%以上にすると沈殿物が観察されたため、以降の評価では反応時のギ酸濃度を 0.1%とした。HA と比較しても有意な超硫黄の付加を観察した（図 3c)。合成した超硫黄付加 HA（S_n-HA）の抗酸化活性について評価したところ、HA ではラジカル消去活性が見られなかった一方で S_n-HA は高いラジカル消去活性を示した（図 3d)。

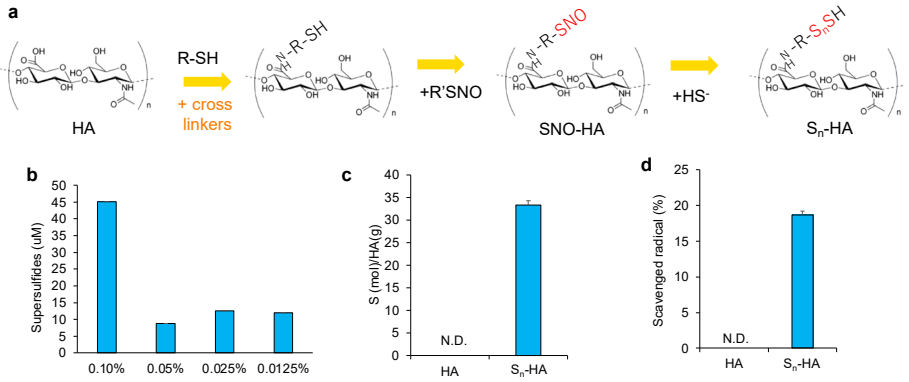


図 3. HA をベースとした超硫黄ドナーの合成と物性評価

a) S_n-HA の合成スキーム。

b) ギ酸添加時の超硫黄濃度。

c) HA 1 g あたりの超硫黄量。

d) HA および S_n-HA の抗酸化活性。

4. S_n-HA の細胞内取り込み活性評価

ブタ近位尿細管上皮細胞である LLC-PK1 細胞を用いて、S_n-HA の細胞内取り込み活性を評価した。細胞に S_n-HA を添加してインキュベートして洗浄したのち、超硫黄の蛍光プローブである SSP4 を用いて細胞内の超硫黄を観察した。その結果、ポジティブコントロールとして用いた Na_2S_n よりもより高活性に S_n-HA は細胞内へ超硫黄を供給することが示された（図 4)。

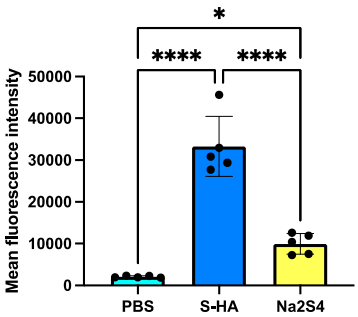


図 4. S_n-HA による腎細胞への超硫黄の供給

S-HA（2 mM）および Na_2S_4（20 mM）添加後の細胞内超硫黄レベル。値は mean±S.D.（n=5）。*p<0.05、****p<0.0001（one-way ANOVA）。

考　察

HSA や HA をキャリアとした超硫黄の導入および抗酸化活性の獲得に成功した。さらに、HSA を基盤とした超硫黄の送達により AKI の治療効果が示された。低分子の超硫黄ドナーのわずか 100 分の 1 モル量で治療効果を示したことから、図 1b に示すような細胞内取り込み活性の向上や HSA による血中半減期の向上により S4-HSA や poly-NACS2-HSA は効率良く腎組織へ超硫黄を供給できた可能性がある。一部解析途中でありデータは示していないが、S_n-HA においてもグリセロール誘発の AKI モデルにおいて治療効果を有する傾向が観察されている。以上のように、超硫黄ドナーにより腎障害が軽減されることが示された。HA の分子量を変えることにより肝臓への移行性が向上することから、現在、四塩化炭素肝繊維化モデルにおける S_n-HA の治療効果について評価を進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都薬科大学医療薬科学系薬剤学分野の異島優先生および熊本大学医学部微生物学講座の澤智裕先生であり、この場を借りて感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際しクライオスタットをお貸しくださった和歌山県立医科大学薬学部生体機能解析学の那波宏之先生および木口倫一先生にお礼申し上げます。さらに、本研究に助成いただいた公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1) Akaike T, Ida T, Wei FY, Nishida M, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, Fujii S, Watanabe Y, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto JM, Motohashi H. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. Nat Commun. 2017 Oct 27;8(1):1177. DOI: 10.1038/s41467-017-01311-y. PMID: 29079736.

2) Ikeda M, Ishima Y, Chuang VTG, Sakai M, Osafune H, Ando H, Shimizu T, Okuhira K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M, Akaike T, Ishida T. Distribution of Polysulfide in Human Biological Fluids and Their Association with Amylase and Sperm Activities. Molecules. 2019 Apr 30;24(9):1689. DOI: 10.3390/molecules24091689. PMID: 31052207.

3) Ikeda M, Ishima Y, Shibata A, Chuang VTG, Sawa T, Ihara H, Watanabe H, Xian M, Ouchi Y, Shimizu T, Ando H, Ukawa M, Ishida T, Akaike T, Otagiri M, Maruyama T. Quantitative determination of polysulfide in albumins, plasma proteins and biological fluid samples using a novel combined assays approach. Anal Chim Acta. 2017 May 29;969:18-25. DOI: 10.1016/j.aca.2017.03.027. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28411626.

4) Ikeda M, Ishima Y, Kinoshita R, Chuang VTG, Tasaka N, Matsuo N, Watanabe H, Shimizu T, Ishida T, Otagiri M, Maruyama T. A novel S-sulfhydrated human serum albumin preparation suppresses melanin synthesis. Redox Biol. 2018 Apr;14:354-360. doi: 10.1016/j.redox.2017.10.007. Epub 2017 Oct 11. PMID: 29040960.

5) Zhang T, Ono K, Tsutsuki H, Ihara H, Islam W, Akaike T, Sawa T. Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock. Cell Chem Biol. 2019 May 16;26(5):686-698.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2019.02.003. Epub 2019 Mar 7. PMID: 30853417.

6) Yin M, Jiang N, Guo L, Ni Z, Al-Brakati AY, Othman MS, Abdel Moneim AE, Kassab RB. Oleuropein suppresses oxidative, inflammatory, and apoptotic responses following glycerol-induced acute kidney injury in rats. Life Sci. 2019 Sep 1;232:116634. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116634. Epub 2019 Jul 4. PMID: 31279782.