

ALA-Porphyrin Science

機能性抗酸化剤としての Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の調製
朝山章一郎・早川なつみ・川上浩良

首都大学東京 大学院都市環境科学研究科 分子応用化学域

要約

本研究では、機能性の抗酸化剤として、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性と ONOO⁻ 分解活性を有するカチオン性 Mn ポルフィリンと、軟骨の機能維持に重要な役割を果たしているヒアルロン酸との静電的相互作用による複合体を形成させた。Mn ポルフィリンのカチオンとヒアルロン酸のアニオンの電荷比 ([+]/[-]) が、0.08 と 0.17 の水溶性の複合体の調製に成功した。得られた複合体は、生理イオン強度 (150 mM NaCl) 条件下において、解離することなく安定に存在した。また、複合体の SOD 活性と ONOO⁻ 分解活性は、Mn ポルフィリン単独よりも減少したが、有意な活性を示した。さらに、複合体中の Mn ポルフィリン錯体は、 $\cdot\text{OH}$ ラジカルによる分解から保護された。以上の結果は、種々の活性酸素種の誘因する関節リウマチにおける軟骨破壊部位において、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体は、長期安定に存在し、持続的な抗酸化治療効果を発揮可能なことを示唆している。

Keyword: Mn ポルフィリン、ヒアルロン酸、抗酸化剤、活性酸素種

はじめに

ヒアルロン酸は、生体内では、関節、硝子体、皮膚、脳など広く生体内の細胞外マトリックスに見られる。とりわけ関節軟骨では、アグリカン、リンクタンパク質と非共有結合し超高分子複合体を作って、軟骨の機能維持に極めて重要な役割を果たしている [1]。関節リウマチにおいては、慢性の炎症や軟骨破壊に活性酸素種 (ROS) の関与が考えられており、ROS による軟骨破壊やヒアルロン酸の低分子化が認められている [2]。特に、ROS による NF- κ B の活性化は、炎症性サイトカインの産生や、さらなる ROS を産生し、また、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ と NO の反応により生じた ONOO⁻ は、マトリックスメタロプロテアーゼを刺激し、軟骨破壊に関与していると考えられている [3]。我々は、これまで ROS イニシエータである $\text{O}_2^{\cdot-}$ に着目し、その消去酵素スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) を模倣したカチオン性 Mn ポルフィリンを合成してきた。合成した Mn ポルフィリンは、生体内で高い抗酸化効果を示すことを明らかにしてきた [4-6]。

本研究では、軟骨破壊や炎症などを引き起こす $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、ONOO⁻ に対して抗酸化効果を有する Mn ポルフィリンと、関節軟骨や滑膜細胞に対して親和性のあるヒアルロン酸の静電的相互作用による複合体を検討した。調製した複合体のイオン強度安定性、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、ONOO⁻ に対する抗酸化効果の検討を行った。さらに、より反応性の高い活性酸素種の $\cdot\text{OH}$ ラジカルに対する安定性評価も行った。

実験

(I) Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の調製

Mn ポルフィリン (MnM4Py₄P) のカチオン性とヒアルロン酸のアニオン性を利用した静電相互作用により複合体を形成させた (図 1)。まず、カチオン/アニオン比を種々の割合 ([+]/[-] = 0.1、0.25、0.5、1.0) で調製し、MnM4Py₄P とヒアルロン酸をそれぞれ PBS に溶解させた。その後、MnM4Py₄P 溶液とヒアルロン酸溶液を混合し、室温下で 3 時間攪拌した。透析 (MWC0 = 8000) により、複合体を形成していない MnM4Py₄P を取り除き、凍結乾燥により、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体を回収した。得られた複合体を、蒸留水に再溶解させ紫外可視分光光度計を用いて、測定波長 700 nm における濁度散乱から、複合体の水溶性を評価した。

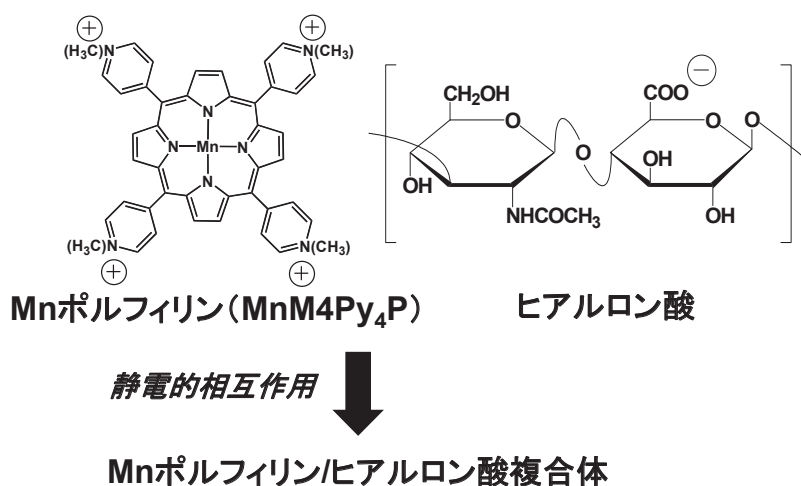


図 1 Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の化学構造式

(II) Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の調製

生体内においても Mn ポルフィリンが Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体から放出されることなく安定に存在するかを評価した。まず、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体 ([+]/[-] = 0.08, 0.17) を蒸留水に溶解させた。次いで、5 M NaCl を段階的に加え、ピペティングにより混和させた後、紫外可視分光光度計を用いて 700 nm の吸光度を複合体由来の散乱の指標として測定した。

(III) Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の SOD 活性および ONOO⁻分解活性評価

Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の抗酸化効果を、ストップフロー法を用いて、下記の通り評価した。

[SOD 活性評価] 0.25 mL のシリンジに脱水 DMSO へ飽和させた KO₂ を、2.5 mL シリンジに 60 mM HEPES/HEPES-Na 緩衝液へ溶解させた Mn ポルフィリンまたは Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体 ([+]/[-] = 0.08, 0.17) をセットした。36 °C で迅速に混合後、発生した O₂⁻ が Mn ポルフィリンにより分解される挙動を、O₂⁻ の極大吸収波長 245 nm ($\epsilon = 1640$

M¹cm⁻¹) により追跡し、二次反応速度定数を算出した。

[ONOO⁻分解活性評価] アスコルビン酸非存在下とアスコルビン酸存在下で評価した。Mn(III)からMn(II)への還元を防ぐため、測定60秒前に各濃度のMnポルフィリンまたはMnポルフィリン/ヒアルロン酸複合体 ([+]/[-] = 0.08, 0.17) と、4 mM アスコルビン酸を1:1で混和し、それをさらに2 mM ONOO⁻と1:1で混合して測定した。ONOO⁻濃度はONOO⁻の極大吸収波長302 nm (ε = 1670 M¹cm⁻¹) を用いて決定した。

(IV) Mnポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の \cdot OHラジカル安定性評価

炎症が生じている関節腔では、 \cdot OHが存在していることが考えられる。このような条件下では、Mnポルフィリンは \cdot OHにより分解され、抗酸化効果を示さなくなる。そこで、Mnポルフィリンをヒアルロン酸と複合化すれば、 \cdot OHによるMnポルフィリンの消失を防ぎ、長期間の抗酸化効果が期待できる。そこで、 \cdot OHによるMnポルフィリン/ヒアルロン酸複合体中のMnポルフィリンの分解安定性を評価した。

まず、MnポルフィリンおよびMnポルフィリン/ヒアルロン酸複合体 ([+]/[-] = 0.08, 0.17) 水溶液に、フェントン溶液 (H₂O₂ = 0.1 mM, FeSO₄ = 1.0 mM (最終濃度)) を加え、室温下で反応させた。次いで、1~30分間反応させたサンプルを回収し、急速冷凍を行い、フェントン反応を停止させた。凍結乾燥によりサンプルを回収後、蒸留水に溶解させ、紫外可視分光光度計を用いてMnポルフィリンの463 nmの吸光度を測定した。

結果・考察

(I) Mnポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の調製

透析後のMnポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の[+]/[-]比の結果を表1に示す。目視より、[+]/[-] = 0.5, 1.0の仕込み比において複合体の沈殿形成が確認されたため(図2)、水溶性を維持した[+]/[-] = 0.1, 0.25の仕込み比(In feed)と、沈殿を生じた[+]/[-] = 0.5 (In feed)の仕込み比に対して、透析後の複合体の[+]/[-]比(In complex)の結果を表1に示す。透析を行ったことにより、仕込み比よりも[+]/[-]比が低下した。これは、Mnポルフィリンとヒアルロン酸を静電的相互作用により結合させているため、結合しきれなかったMnポルフィリンが取り除かれた結果、複合体中の[+]/[-]比が減少したためだと考えられる。以後、透析後の[+]/[-]比(In complex)を用いて、複合体を表記する。

表1 Mnポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の調製

MnM4Py ₄ P (M)	In feed		In complex
	Hyaluronic acid (M)	[+]/[-]	[+]/[-]
2.7 × 10 ⁻⁴	1.1 × 10 ⁻²	0.10	0.08 ± 0.01
2.7 × 10 ⁻⁴	4.4 × 10 ⁻³	0.25	0.17 ± 0.01
2.7 × 10 ⁻⁴	2.2 × 10 ⁻³	0.50	0.32 ± 0.09

複合体の水溶性評価の結果を図2に示す。上記の通り、[+]/[-]比 (In feed) の増大に伴い沈殿形成が認められたので、複合体中の Mn ポルフィリンが増加するに従い、水溶性が低下することが示された。この結果は、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体複合体が形成されたことを支持している。

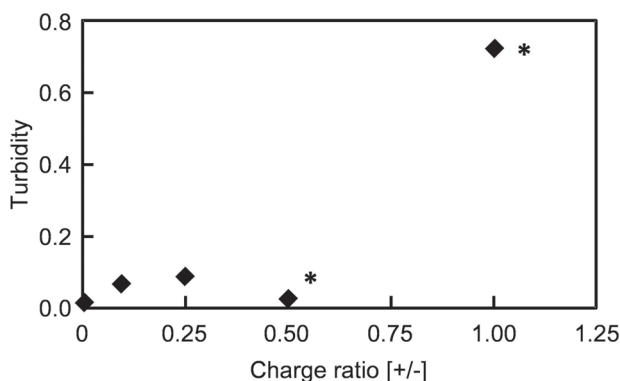


図2 Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の水溶性評価：濁度（縦軸）は 700 nm の吸光度として評価。横軸は仕込み比 (In feed) を示す。*は沈殿形成を示す。

(II) Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の調製

複合体の結合安定性評価の結果を図3に示す。複合体から Mn ポルフィリンが放出されれば、濁度の減少、一方、複合体の凝集が生じれば濁度の上昇が生じると考えられる。[+]/[-] = 0.08, 0.17 (In complex) では、濁度（散乱）がほぼ一定であったことから、生理塩濃度 (150 mM) においても複合体の解離や凝集は認められなかった。この結果から、生理塩強度において、複合体は安定に存在することが示唆された。

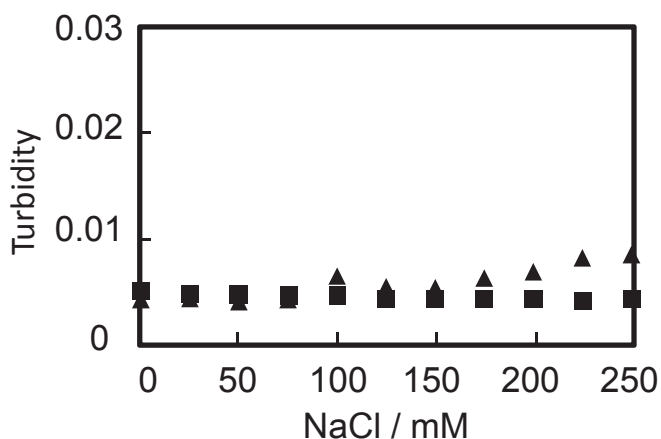


図3 Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の結合安定性：(■), [+]/[-] = 0.08; (▲), [+]/[-] = 0.17。濁度（縦軸）は 700 nm の吸光度として評価。

(III) Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の SOD 活性および ONOO⁻分解活性評価

Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の SOD 活性および ONOO⁻消去能評価の結果を表 2 に示す。Mn ポルフィリンと比較し、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の SOD 活性は低下していた。この時、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体中の Mn ポルフィリンの結合量が増加すると、SOD 活性が増加する傾向を示した。

表 2 Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の SOD 活性および ONOO⁻分解活性

Compound	$k_{O_2^{\cdot-}}$ ($\times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)	$k_{ONOO^{\cdot-}}$ ($\times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)	$k_{ONOO^{\cdot-}}$ ($\times 10^6 M^{-1} s^{-1}$)
Ascorbic acid (1mM)	-	-	+
MnM4Py ₄ P	10	0.06	5.0
Hyaluronic acid	-	-	-
[+]/[-] = 0.08	2.5	0.03	5.0
[+]/[-] = 0.17	5.7	0.04	5.0

この結果は、SOD 活性に重要な役割を示す Mn ポルフィリンのカチオン部位とヒアルロン酸のアニオン部位との静電相互作用により、複合体が形成されたことを示唆している。すなわち、O₂^{·-}との親和性に関わる Mn ポルフィリンのカチオンがヒアルロン酸のアニオンにより相殺され、SOD 活性が低下したと考えられる。しかし、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の SOD 活性は O₂^{·-}自己不均化速度よりも高いことから、Mn ポルフィリンがヒアルロン酸と複合体を形成していても、有意な抗酸化効果を示すことが示唆された。

また、表 2 より、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体は、アスコルビン酸非存在下では、有意な ONOO⁻分解活性を示さなかったが、アスコルビン酸存在下においては、有意な ONOO⁻分解活性を示した。この結果から、生体内においては、ONOO⁻を分解することが可能であると考えられる。

(IV) Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の[·]OH ラジカル安定性評価

Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の[·]OH 安定性評価の結果を図 4 に示す。Mn ポルフィリン単独と比べると、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体中の Mn ポルフィリンは、[·]OH による分解から保護されていることが示された。この結果から、炎症部位において、Mn ポルフィリンは、長期間存在することが可能になると考えられる。すなわち、Mn ポルフィリンを、関節軟骨や滑膜組織に対する親和性の高いヒアルロン酸との複合化させることにより、Mn ポルフィリンの長期関節腔滞留が可能になると考えられる。

そして、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体が、O₂^{·-}、ONOO⁻消去活性を示したことにより、関節内の炎症・軟骨破壊を抑制すると共に、活性酸素による NF-κB の発現誘導を抑

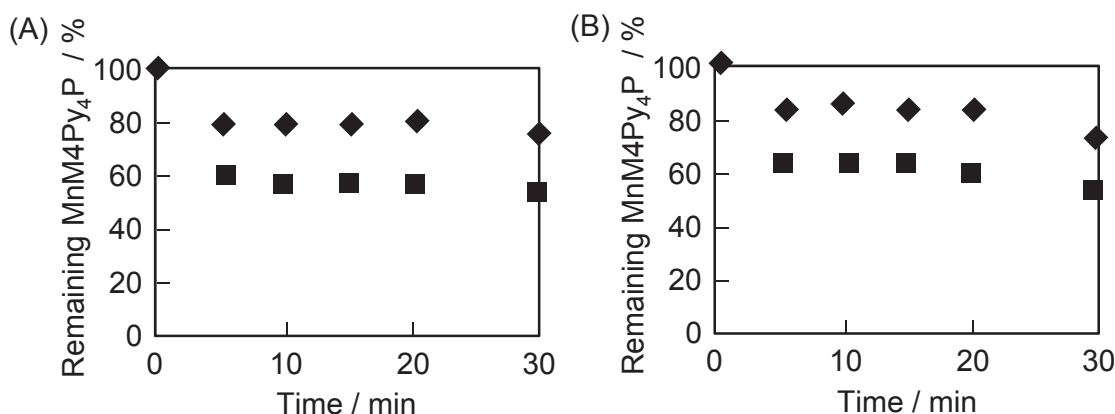


図4 Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体の $\cdot\text{OH}$ ラジカル安定性：
 (A), $[+]/[-] = 0.08$; (B), $[+]/[-] = 0.17$: (◆), 複合体; (■)
 Mn ポルフィリン単独。

制することが考えられる。さらに、複合体中の Mn ポルフィリンは、 $\cdot\text{OH}$ による分解から保護されたことから、炎症部位での Mn ポルフィリンの長期安定化による持続的な抗酸化治療が可能になると考えられる。

結論

静電的相互作用により Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体を調製し、生理塩強度下でも解離せず存在したことから、生体内において、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体は安定に存在することが示唆された。得られた複合体は有意な抗酸化効果を示したことから、生体内においても、炎症や軟骨破壊を引き起こす O_2^- 、 ONOO^- を十分に消去することが考えられる。さらに、Mn ポルフィリンをヒアルロン酸と複合化することで $\cdot\text{OH}$ に対する安定性が増大したことから、Mn ポルフィリン/ヒアルロン酸複合体を用いた持続的な抗酸化治療が期待できる。

文献

- 1 S. Al-Assaf, S. Navaratnam, B. J. Parsons and G. O. Phillips, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **411**, 73.
- 2 G. T. Balogh, J. Illés, Z. Székely, E. Forrai and A. Gere, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **410**, 76.
- 3 H. Lemarechal, Y. Allanore, C. Chenevier-Gobeaux, A. Kahan, O. G. Ekindjian and D. Borderie, *Clin. Chim. Acta.*, 2006, **372**, 147.
- 4 S. Asayama, T. Nakajima and H. Kawakami, *Metallomics*, 2011, **3**, 744.
- 5 T. Haruyama, S. Asayama and H. Kawakami, *J. Biochem.*, 2010, **147**, 153.
- 6 T. Hanawa, S. Asayama, T. Watanabe, S. Owada and H. Kawakami, *J. Control. Release*, 2009, **135**, 60.

Design of Mn-Porphyrin/Hyaluronic Acid Complexes for a Functional Antioxidant

Shoichiro Asayama, Natsumi Hayakawa and Hiroyoshi Kawakami

**Department of Applied Chemistry, Tokyo Metropolitan University,
1-1 Minami-Osawa, Hachioji, Tokyo 192-0397, Japan**

Received 30th November 2011, Accepted 8th December 2011

Summary.

In this study, the polyion complexes between cationic Mn-porphyrin and anionic hyaluronic acid (HA) have been designed for a functional antioxidant. The Mn-porphyrin exhibits superoxide dismutase (SOD) activity and ONOO⁻ decomposition activity. The HA plays an important role in the biological function of articular cartilage. The Mn-porphyrin/HA complexes at +/- charge ratio of 0.08 and 0.17 have been formed. The resulting water-soluble complexes are stable under physiological ionic strength conditions (150 mM NaCl) and exhibit significant SOD and ONOO⁻ decomposition activity in spite of the complex formation. Furthermore, the Mn-porphyrin antioxidants in the complex are protected against the degradation by most reactive ·OH radicals. These results suggest that the Mn-porphyrin/HA complexes is useful for sustainable antioxidative therapy such as a treatment for rheumatoid arthritis concerning articular dysfunction by reactive oxygen species.

Keyword: Mn-porphyrin, Hyaluronic acid, Antioxidant, Reactive oxygen species