

ヘモグロビンナノ粒子からなる人工酸素運搬体の開発 —臨床利用可能な赤血球代替物の実現に向けて—

1. 研究の目的

(1) 研究背景

現在、日本では輸血用血液製剤の85%が50歳以上の患者に使用されている。少子高齢化が進行し、献血者層人口が減少すると、2027年には“年間約85万人分の血液が不足する”とも予測されている。血液型に関係なく、ウイルス感染の心配もなく、いつでもどこでも誰にでも使用できる人工酸素運搬体(赤血球代替物)の実現が、輸血治療を補完するための医療対策の一環として強く望まれる状況にある。これまでも酸素輸送タンパク質であるヘモグロビン(Hb)を用いた人工酸素運搬体が数多く開発されてきたが、未だ実用化には至っていない。2013年、申請者は Hbを血漿タンパク質であるヒト血清アルブミン(HSA)で包み込んだ新しい人工酸素運搬体“(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター”(Hb-HSA₃クラスター)を合成し、それが安全性・有効性に優れた赤血球代替物として機能することを明らかにした(*Biomacromolecules* 2013, 14, 1816 など。新聞掲載、TV報道多数)。現在、実用化に向けた評価試験を医学チームと共同で推進している。

(2) 研究目的

Hb-HSA₃クラスターは臨床に近い製剤の一つとして国内外から注目を集めているが、さらに理想的な人工酸素運搬体にするためには、2つの改良が必要であることがわかってきた。(i)分子サイズ:Hb-HSA₃クラスターの粒径は15nmと小さいため、肝臓では類洞血管内皮細胞の小孔を通過し、肝実質細胞で代謝される。その際、肝臓に負担をかける可能性がある。つまり、粒径は90nm以上が好ましい。血中滞留性の延長も期待できる。(ii)酸素錯体の安定性:Hb-HSA₃クラスターは中心Hbの自動酸化に伴い、徐々に酸素結合能を失う。生体内で酸素輸送能を長時間発揮するためには、抗酸化能を併せ持つことが望まれる。

本研究は、上記(i)(ii)の条件を完全に満たした新しい人工酸素運搬体として、Hbからなる球状微粒子の表面をHSAで被覆したコア-シェル型ヘモグロビンナノ粒子(HbNP、粒径90nm)を合成し、その構造、酸素結合能、有効性、安全性を明らかにすることを目的としている。Hb-HSA₃クラスターの優れた特性を保ちながら、安全性に優れ、生体内で長時間酸素を輸送できる革新的な人工酸素運搬体の創製を目指す。本研究で得られる成果は、先進医療、人類の健康増進に多大な貢献をもたらすばかりでなく、我々の生活に大きな波及効果を与えると期待される。

2. 研究の計画

以下の3項目を実施した。

- (1) 高純度 Hb を重合したナノ粒子の表面に HSA を結合させる方法によりコア-シェル型の HbNP を合成し、その構造を明らかにする。粒径制御が鍵となるので、反応条件を網羅的に検討し、最適条件を絞り込む。
- (2) HbNP の酸素結合パラメーターを精密に測定し、酸素結合能を明らかにする。
- (3) ピキア酵母を宿主とした遺伝子組換え技術により、組換え Hb (rHb) を産生し、赤血球に近い酸素親和性を持つ rHb ナノ粒子 (rHbNP) を合成する。ヘムポケットの最適構造を予測し、得られた rHb の立体構造は X 線結晶構造解析から解明する。

3. 研究の成果

(1) ヘモグロビンナノ粒子(HbNP)の合成と構造解析

高純度ヒト Hb の分子表面に架橋剤(3-マレイミドプロピオン酸-N-スクシンイミジル、SMP)を反応させマレイミド基を導入後、ジチオトレイトールで重合することにより、Hb からなる微粒子を調製した。そこへ HSA を添加し、目的の HbNP を得た。動的光散乱測定により、粒径約 90nm の粒子形成を確認した。最適調製条件は、Hb 濃度(1mM)、架橋剤(20mol/Hb)、反応時間(72 時間)であり、収率は 80%であった。円偏光二色性スペクトル測定から、粒子表面の 90%が HSA で被覆されていることを明らかにした。走査型電子顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡観察から均一な球状構造(粒径 90nm)を確認した。

(2) HbNP の酸素結合能の解明

HbNP の酸素親和性 (P_{50}) は 8 Torr、Hill 係数 (n : 協同性の指標) は 1.4、自動酸化速度定数 (k_{ox}) は 0.03h^{-1} であり、人工酸素運搬体として十分な機能を有することがわかった。以上の成果について特許出願済。ナノ秒レーザーフラッシュフォトリス分光測定から、酸素結合速度定数を決定し、HSA による被覆がコア Hb 粒子の酸素結合反応に影響しないことを明らかにした。

(3) HbNP の酸素親和性制御

rHb を産生し、組換えヒト血清アルブミン (rHSA) との組み合わせにより rHb ナノ粒子 (rHbNP) を合成した。rHbNP は原料血液を全く必要としない人工酸素運搬体である。rHb の単結晶を国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟内の微小重力下において作成し、X 線結晶構造解析から rHb が Hb と同一構造であることを明らかにした。さらに赤血球と同じ P_{50} 値 (25 Torr) を有する人工酸素運搬体を合成するため、ヘムポケット内 Leu- β 28 を Phe (F) に置換した低酸素親和性の rHb (rHb (F)) を産生し、同様な方法で rHb (F)NP を調製した。しかし、 P_{50} は 12 Torr に留まり (Hill 係数: 1.2)、目標値には及ばなかった。そこで、窒素雰囲気下において HbNP を合成したところ、コア Hb の四次構造が Tense 状態で固定され、低酸素親和性の HbNP (Hb^TNP、 P_{50} 値 56 Torr) が得られた。

4. 研究の反省・考察

- (1) 時間的制約が多かったものの、実験計画の圧縮や順序組替などの工夫を凝らしながら研究計画に従った実験を遂行し、目標を達成することができた。
- (2) 分子設計通り、Hb、HSA、架橋剤のみを原料として HbNP を合成することに成功した。特殊な試薬、製造装置は一切必要ない。調製工程はわずか 2 段階であり、他の修飾 Hb 製剤に比べ合成は簡便で収率も高いことが実証された。今後、量産も視野に入れたスケールアップを進めていく。
- (3) HbNP の酸素親和性は赤血球に比べると高い。これは架橋剤である SMP が Hb の表面リシン残基や Cys- β 93 に結合するため、Hb の四次構造変化が抑制されることに起因する。しかし、高い酸素親和性は出血ショック状態の蘇生液にはむしろ好ましく、人工酸素運搬体としての機能に問題はない。
- (4) rHbNP は血液に依存しない「完全合成型の人工酸素運搬体」である。また、遺伝子組換え技術によりヘムポケット内アミノ酸に変異を加えることで、酸素親和性を制御することも明らかとなった。
- (5) 通常の条件下で調製した HbNP と窒素雰囲気下で調製した低酸素親和性 Hb^TNP を適切な割合で混合することにより、酸素親和性を 8~56 Torr の範囲で自由に調節できることがわかった。HbNP:Hb^TNP (55:45、v:v) の混合液は、赤血球と同じ酸素親和性 (P_{50} =25 Torr) の製剤となった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Supramolecular Linear Coordination Polymers of Human Serum Albumin and Haemoglobin, R. Adachi, S. Suzuki, T. Mitsuda, Y. Morita, T. Komatsu, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 15585–15588. (2020.12.25)
- ② Hemoglobin (β K120C)-Albumin Trimer as Artificial O₂ Carrier with Sufficient Hemoglobin Allosterity, Y. Morita, A. Saito, J. Yamaguchi, T. Komatsu, *RSC Chem. Biol.* **2020**, *1*, 128–136. (2020.8.1) [表紙掲載]
- ③ Lyophilized Hemoglobin-Albumin Cluster with Disaccharides: Long-Term Storable Powder of Artificial O₂ Carrier, R. Funaki, H. Iwasaki, T. Kashima, T. Komatsu, *Polym. Adv. Technol.* **2020**, *31*, 1122–1126. (2020.5.1)

(2) 口頭発表

- ① 小松晃之、蛋白質を用いた機能分子システムの創製と応用、日本化学会第101春季年会 (2021.3.19) (依頼講演)
- ② 吉田瑠佳、齊藤飛鳥、森田能次、小松晃之、Lys- α 99置換ヘモグロビン変異体の合成と

- 酸素親和性、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 19)
- ③ 森田能次、大熊千夏、小松晃之、酸素結合解離に応答して構造が変化するヘモグロビンオリゴマーの合成、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 20)
 - ④ 小林樹広、岡本 航、長谷川舞、森田能次、小松晃之、組換えヒトヘモグロビンナノ粒子の合成と酸素結合能、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 21)
 - ⑤ 臼井朝音、岡本 航、森田能次、河野光智、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾ブタ血清アルブミンの合成、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 21)
 - ⑥ 高田諒也、森田能次、小松晃之、協同的酸素結合能を有する(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの合成、日本化学会第101春季年会 (2021. 3. 21)
 - ⑦ 小松晃之、修飾ヘモグロビンおよび組換えヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体制剤の開発、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 3) (**依頼講演**)
 - ⑧ 岡本 航、鹿島知周、濱野辰彦、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、小松晃之、出血性ショックラットを用いたHemoActの有効性評価、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 3) (**学生講演賞受賞**)
 - ⑨ 森田能次、高田諒也、齊藤飛鳥、小松晃之、アロステリック効果を有する組換えヘモグロビン-アルブミントリマーの合成、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 3)
 - ⑩ 樋渡侑樹、岡本 航、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、森田能次、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン(Hemoxa)の合成と有効性評価、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 4)
 - ⑪ 長谷川舞、岡本 航、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、小松晃之、ヘモグロビンナノ粒子(HbNP)の合成と有効性評価、第27回日本血液代替物学会年次大会 (2020. 12. 4)
 - ⑫ 小松晃之、ヒト用および動物用人工酸素運搬体制剤の開発、JACIライフサイエンス技術部会 (2020. 11. 19) (**招待講演**)
 - ⑬ 小松晃之、人工酸素運搬体(赤血球代替物)の開発、CBI学会2020大会 (2020. 10. 27) (**招待講演**)
 - ⑭ 高田諒也、齊藤飛鳥、森田能次、小松晃之、赤血球と同等の酸素結合能を有する人工酸素運搬体“(ヘモグロビン-アルブミン)トリマー”の合成、第10回CSJ化学フェスタ2020 (2020. 10. 20)
 - ⑮ 岡本 航、樋渡侑樹、森田能次、河野光智、小松晃之、人工酸素運搬体“ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン”の合成と有効性、第10回CSJ化学フェスタ2020 (2020. 10. 21)
 - ⑯ 澤口玲実、森田能次、小松晃之、ビスターピリジン鉄錯体で連結したヘモグロビンナノファイバーの合成、錯体化学会第70回討論会 (2020. 9. 30)
 - ⑰ 齊藤飛鳥、高田諒也、森田能次、小松晃之、赤血球と同じ酸素輸送能を有する(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの合成、錯体化学会第70回討論会 (2020. 9. 30)
 - ⑱ 岡本 航、長谷川舞、森田能次、小松晃之、人工酸素運搬体としてのアルブミン-ヘモグロビンナノ粒子の合成、第69回高分子学会年次大会 (2020. 5. 27)

(3) 出版物

- ① 赤血球代替物となる人工酸素運搬体の開発、森田能次、小松晃之 (錯体化学会フロンティア選書) フロンティア機能高分子金属錯体、編著: 西原 寛、山元公寿、p. 300-323、三共出版 (2020. 6. 20)