

2021年度（第46回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	中 央 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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－		研究分野 工 学
キ ー ワ ー ド	①蛋白質 ②コア-シェル型ナノ粒子 ③人工酸素運搬体 ④赤血球代替物 ⑤輸血治療 ⑥遺伝子組換え蛋白質 ⑦酸素結合能 ⑧X線結晶構造解析		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 松 晃 之	中央大学理工学部	教 授	研究代表者(総括)、ヘモグロビンナノ粒子(HbNP)およびSFヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP)の合成と酸素結合能の解明、有効性評価、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
森 寛 敏	中央大学理工学部	教 授	Hb微細構造の分子軌道計算
森 田 能 次	中央大学理工学部	助 教	HbNPの酸素、一酸化炭素結合能の解析
加 藤 遼	中央大学理工学部	助 教	HbNPの保存安定性評価、溶液物性測定
木 平 清 人	宇宙航空研究開発機構 (JAXA)	研 究 員	HbのX線結晶構造解析
河 野 光 智	東海大学医学部	准 教 授	HbNPの有効性評価

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、2025年には“年間約65万人分の血液が不足する”と予測されている(献血推進2025、厚生労働省)。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。これまでに人工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) 赤血球から赤血球膜を除去しただけのストロマフリーHb(SFHb)を用いて SFHb ナノ粒子(SFHbNP)を合成し、その酸素結合能を明らかにする。SFHbには微量の酵素が残存するため、酸素錯体の安定性が向上する。
- (2) SFHbNPの酸素結合パラメーターを精密に測定し、粒子構造との相関を解明する。また得られたSFHbNP溶液の保存安定性を評価する。
- (3) SFHbNP溶液([Hb]=5g/dL)のコロイド浸透圧を測定し、溶液物性を明らかにする。さらに、SFHbNPとヒト全血を混合した溶液の赤血球数、白血球数、血小板数の変化を6時間後まで計測することにより、SFHbNPの血液適合性を評価する。

3. 研究の成果

(1) ストロマフリーHbを用いたSFHbNPの合成

ヒト赤血球から得たSFHbを用いてSFHbNPを合成した。最適調製条件はHbNPと同様で(収率80%)、粒径90nmの均一な球状構造が形成されていることを明らかにした。SFHbには微量のカタラーゼ(Cat、過酸化水素不均化酵素)が残存するため、酸素錯体の安定性は格段に向上した。驚いたことに20 μ M過酸化水素水溶液中でもヘム鉄の酸化が抑制され、Hbの酸化速度は1/10に低減した。そこで、今後の実験は全てSFHbNPを用いて行うこととした。

(2) SFHbNP の酸素結合能の解明と保存安定性評価

SFHbNP の P_{50} は 7Torr、Hill 係数 (n) は 1.4 であり、酸素結合速度定数も HbNP と同等であった。SFHbNP 溶液 ([Hb]=5g/dL) は 4°C 冷蔵下においてきわめて安定で、6 ヶ月間、粒径、酸素結合能、コア Hb の酸化率 (5%以下) に変化は見られなかった。1 年以上の保存安定性を実証するため、測定を継続している。

(3) コロイド浸透圧、血液適合性の測定

SFHbNP の濃度とコロイド浸透圧の相関を解明した。コロイド浸透圧を生理条件に揃えるための添加 HSA 濃度は 4g/dL が最適であった。また、SFHbNP とヒト全血を SFHbNP/血液 =10、20、40vol% の割合で混合した溶液の赤血球数、白血球数、血小板数は、6 時間後まで変化せず、SFHbNP の高い血液適合性が明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

- (1) 赤血球内には酸素運搬の役割を担う Hb のほかに、抗酸化能を有する Cat やスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) などの酵素が共存しているため、SFHb を用いて合成した SFHbNP は安定な酸素錯体を形成した。SFHbNP の Cat 活性、SOD 活性を評価し、どちらの酵素が中心 Hb の抗酸化能に寄与しているかを検証した。SFHb と SFHbNP の Cat 活性は同等であったのに対し SFHbNP の SOD 活性は SFHb の 1/13 に低下することがわかった。SFHbNP の抗酸化能は Cat 活性に由来すると考えられる。
- (2) 赤血球製剤の保存期間は 4°C 冷蔵下において 3 週間と定められている。長期保存可能な SFHbNP 溶液 ([Hb]=5g/dL) は理想的な人工酸素運搬体制剤である。
- (3) SFHbNP 溶液はタンパク質粒子の分散液であるため、コロイド浸透圧がない。それは必ずしも欠点ではなく、HSA を添加することにより、自由にコロイド浸透圧を調整できることを意味している。SFHbNP とヒト全血を混合しても、血球数に変化はなく、血小板の凝集も全く認められなかった。今後、動物実験による安全性評価、有効性評価に研究を進めていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Protein Triad Comprising Genetically Fused Hemoglobin and Human Serum Albumins as an Artificial O₂ Carrier Resistant to Haptoglobin Binding, Y. Morita, Y. Shindo, T. Komatsu, *Chem. Lett.* **2021**, *50*, 2011-2014. (2021.12.1)
- ② Genetically and Chemically Tuned Haemoglobin-Albumin Trimers with Superior O₂ Transport Efficiency, Y. Morita, R. Takada, A. Saito, T. Komatsu, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 9144-9147. (2021.9.16)
- ③ Methemoglobin-Albumin Cluster Incorporating Protoporphyrin IX: Dual Functional Protein Drug for Photodynamic Therapy”, T. Yamada, T. Komatsu, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 2526-2529. (2020.8.3)

(2) 口頭発表

- ① 高山夏実、岡本 航、長谷川 舞、小松晃之、人工酸素運搬体としてのストロマフリーヘモグロビンナノ粒子の合成と抗酸化能評価、日本化学会第102春季年会 (2022.3.23)
- ② 船本瑞稀、高田諒也、森田能次、小松晃之、光線力学療法のためのアルブミン-ミオグロビン融合タンパク質の合成、日本化学会第102春季年会 (2022.3.25)
- ③ 勝見真帆、山田大雅、小松晃之、プロトポルフィリンIX結合(カタラーゼ-アルブミン)クラスターの合成と光線力学活性、日本化学会第102春季年会 (2022.3.25)
- ④ 岡本 航、長谷川舞、臼井朝音、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、小松晃之、HemoAct™の安全性・有効性評価 (50%出血性ショックラットの蘇生試験)、第28回日本血液代替物学会年次大会 (2021.10.14) (**優秀発表賞受賞**)
- ⑤ 長谷川舞、岡本 航、小松晃之、抗酸化能を有するストロマフリーヘモグロビンナノ粒子 (SFHbN) の合成、第28回日本血液代替物学会年次大会 (2021.10.14) (**最優秀発表賞受賞**)
- ⑥ 臼井朝音、岡本 航、橋本 諒、小野沢博登、河野光智、岩崎正之、小松晃之、動物用人工血漿増量剤としてのポリオキサソリン修飾血清アルブミン (Aloxa™) の合成、第28回日本血液代替物学会年次大会 (2021.10.15)

- ⑦ 高田諒也、森田能次、小松晃之、アルブミン-ミオグロビン融合タンパク質の合成、第11回CSJ化学フェスタ2021 (2021. 10. 20) (**優秀ポスター賞受賞**)
- ⑧ 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超構造体の合成と形態制御、錯体化学会第71回討論会 (2021. 9. 16)
- ⑨ 吉田瑠佳、森田能次、小松晃之、酸素吸脱着により構造変化する組換えヘモグロビン集合体の合成、錯体化学会第71回討論会 (2021. 9. 16)
- ⑩ 小林樹広、岡本 航、長谷川舞、森田能次、小松晃之、組換えヘモグロビンナノ粒子の合成と酸素結合能、第15回バイオ関連化学シンポジウム (2021. 9. 8)
- ⑪ 石丸真里花、山田大雅、小松晃之、抗酸化剤を結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成、第15回バイオ関連化学シンポジウム (2021. 9. 8)
- ⑫ 森田能次、小松晃之、協同効果を有する人工酸素運搬体(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの合成と酸素親和性制御、第70回高分子討論会 (2021. 9. 6) (**依頼講演**)
- ⑬ 澤口玲実、森田能次、小松晃之、金属配位結合で連結した組換えヘモグロビンナノファイバーの合成、第33回生物無機化学夏季セミナー (2021. 7. 17)
- ⑭ 高田諒也、森田能次、小松晃之、協同性を保持した(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの合成と酸素親和性制御、第33回生物無機化学夏季セミナー (2021. 7. 17)
- ⑮ 石丸真里花、山田大雅、小松晃之、抗酸化能を有する(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成、第33回生物無機化学夏季セミナー (2021. 7. 17)
- ⑯ 吉田瑠佳、森田能次、小松晃之、 α 99 位置アミノ酸置換ヘモグロビンの合成と酸素親和性、第33回生物無機化学夏季セミナー (2021. 7. 17)
- ⑰ 岡本 航、臼井朝音、河野光智、田口和明、小松晃之、動物用血漿増量剤としてのポリオキサゾリン修飾アルブミンの合成、第70回高分子学会年次大会 (2021. 5. 27) (**優秀ポスター賞受賞**)
- ⑱ 山田大雅、小松晃之、がん治療用光増感剤としてのプロトポルフィリンIX結合(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成、第70回高分子学会年次大会 (2021. 5. 27) (**優秀ポスター賞受賞**)

(3) 出版物

なし