

2022年度（第47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タンパク質 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酸素結合能 ⑦酵素 ⑧血中半減期		

○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)、ストロマフリーヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP)の合成と血中滞留性評価、有効性評価、安全性評価、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微細構造の量子化学計算
加 藤 遼	中央大学理工学部	助 教	安定酸素錯体のメカニズム解析
木 平 清 人	宇宙航空研究開発機構 (JAXA)	研 究 員	rHbのX線結晶構造解析
岩 崎 正 之	東海大学医学部	教 授	SFHbNPの安全性評価
河 野 光 智	埼玉医科大学 総合医療センター	教 授	SFHbNPの有効性評価、安全性評価

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、それが安全性と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、粒径はもう少し大きいほうが好ましい。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-シェル型のヘモグロビンナノ粒子(HbNP、粒径90nmまたは30nm)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た。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

第3年次である2022年度は以下の4項目を実施した。

- (1) 2021年度に確立した手法に従い、赤血球から赤血球膜のみを除去して得たストロマフリーHb(SFHb)を用いてSFHbナノ粒子(SFHbNP)を合成する。粒子内に残存する酵素の活性を定量し、SFHbNPの高い酸素錯体安定性のメカニズムを解明する。
- (2) シアニン色素(Cy5.5)で蛍光ラベル標識したSFHbNPをラットに静脈内投与し、血中半減期(t_{50})を算出する。
- (3) ラット50%脱血ショックモデルを作成し、SFHbNP溶液を静脈内投与することにより蘇生する。2時間後までの呼吸循環器系パラメーター、血液ガスパラメーターなどの観測から、SFHbNPの有効性を明らかにする。実験終了後、血液生化学検査を行う。
- (4) 上記(3)のラット50%脱血ショックモデルにおいて、投与7日後に血液生化学検査、臓器(心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓)の病理検査を行い、SFHbNPの安全性を明らかにする。

3. 研究の成果

(1) 高い酸素錯体安定性のメカニズム解明

SFHbには微量のカタラーゼ(Cat、過酸化水素の不均化酵素)が残存するため、SFHbNPは安定な酸素錯体を形成する(2022年度成果)。SFHbNPのカタラーゼ活性は200units/mgであり、原料SFHb(198units/mg)と同等であった。一方、SFHbにはスーパーオキシドディスム

ターゼ(SOD、スーパーオキシドアニオンラジカルの不均化酵素)も微量残存する。SFHbNPのSOD活性は0.06units/mgであり、原料SFHbの8%まで低下していた。SFHbNPの抗酸化能はCat活性に由来することが明らかとなった。

(2) 血中半減期の測定

麻酔下のラットにCy5.5ラベル化SFHbNPを投与し、経時的に採血を行った。得られた血清の蛍光強度の減衰から算出したSFHbNPの t_{50} は20.7時間であり、Hb(0.7時間)の約30倍に延長していることがわかった。実験終了後、血液生化学検査を行ったところ、肝機能の指標[ALT(Alanine transaminase)、AST(Aspartate Aminotransferase)]が高値であることが判明した。粒径と肝臓への取り込みに着目し、粒径30nmのSFHbNPを同様な手法で合成した。酸素親和性($P_{50}=8\text{Torr}$)、酸素錯体安定性、酵素活性、血液適合性が粒径90nmのSFHbNPと変わらないことを確認した後、血中半減期測定を行った。 t_{50} は17.3時間と長く、実験後のALT、ASTは正常値を示した。これ以降、粒径30nmのSFHbNPを用いて動物実験を進めることとした。

(3) 有効性評価

SFHbNP溶液を用いて蘇生したラットは全例が2時間後まで生存した。一方、乳酸リンゲル液投与群(対照群)では、2時間以内に60%が死亡した。50%脱血後に低下した平均動脈圧(MAP)、心拍数(HR)、動脈血二酸化炭素分圧(PaCO_2)、pHは、SFHbNPの投与により脱血前値(基準値)まで回復し、その効果は返血群と同等であった。しかし、乳酸リンゲル液投与群では、各パラメーターの十分な回復は見られなかった。実験後のALT、ASTは、乳酸リンゲル液投与群では高値となったのに対し、SFHbNP群では脱血前値と変わらなかった。

(4) 安全性評価

SFHbNP溶液投与7日後におけるALT、ASTに変化はなかった。SFHbNP溶液は血球成分を含まないため、蘇生直後に赤血球数やヘマトクリット値は低下するが、7日後には基準値に回復していた。7日後の心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓の病理検査に異常は認められなかった。

4. 研究の反省・考察

- (1) SFHbNPの高い酸素錯体安定性はCatの抗酸化能によることが明らかとなった。さらにSFHbNPのCat活性は6ヶ月間変化しないこともわかった(4°C保存)。SODは分子量が32kDaと小さいため、重合時の化学修飾、または精製(限外ろ過)時の濃度減少により活性が低下したものと考えられる。残存するCatの抗酸化能だけで十分に安定な酸素錯体が得られることがわかった。
- (2) SFHbNP(90nm)は血中滞留性に優れた人工酸素運搬体であることが明らかとなった。しかし、実験後にALT、ASTが上昇することもわかった。血中濃度推移において、初期分布相が多かったことから、SFHbNP(90nm)の多くは臓器の食細胞により代謝されていると考えられる。肝臓においても組織マクロファージ(クッパー細胞)にSFHbNPが捕捉され、負荷がかかったものと推察される。そこで、粒径を30nmに小さくしたSFHbNP(30nm)を合成し、同実験を行ったところ、長い血中半減期は保たれたまま、ALT、ASTは正常値を維持した。SFHbNPの粒径を適切に制御することにより、肝臓への負荷を抑制できることが明らかとなった。
- (3) SFHbNP溶液がラット50%脱血ショックモデルの蘇生にきわめて有効であることが実証された。今後、末梢組織の酸素分圧測定、血流中におけるSFHbNPの自動酸化速度の測定なども必要と考えられる。
- (4) 投与7日後の血液生化学検査から、肝機能に異常はなく、赤血球数やヘマトクリット値が基準値に戻っていたことから、造血機能にも問題ないことが示された。SFHbNPが安全性と有効性を兼ね備えた人工酸素運搬体として機能することが明らかとなった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Zinc Substituted Myoglobin-Albumin Fusion Protein: A Photosensitizer for Cancer Therapy, T. Yamada, Y. Morita, R. Takada, M. Funamoto, W. Okamoto, M. Kohno, T. Komatsu, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202203952:1-7.
- ② Core-Shell Structured Hemoglobin Nanoparticles as Artificial O_2 Carriers, W.

Okamoto, M. Hasegawa, N. Kohyama, T. Kobayashi, T. Usui, H. Onozawa, R. Hashimoto, M. Iwazaki, M. Kohno, R. Georgieva, H. Bäumlér, T. Komatsu, *ACS Appl. Bio Mater.* **2022**, *5*, 5844-5853. (イメージ図が当該号の表紙として掲載)

- ③ (ヘモグロビン-アルブミン)クラスター型人工酸素運搬体の開発, 小松晃之, *膜* **2022**, *47*, 252-256.
- ④ Catalase-Albumin Cluster Incorporating Protoporphyrin IX: O₂ Generating Photosensitizer for Enhanced Photodynamic Therapy, T. Yamada, M. Katsumi, Y. Yagisawa, M. Ichihara, T. Komatsu, *Mater. Adv.* **2022**, *3*, 6451-6457.
- ⑤ Hemoglobin-Albumin Clusters as an Artificial O₂ Carrier: Physicochemical Properties and Resuscitation from Hemorrhagic Shock in Rats, W. Okamoto, M. Hasegawa, T. Usui, T. Kashima, S. Sakata, T. Hamano, H. Onozawa, R. Hashimoto, M. Iwazaki, M. Kohno, T. Komatsu, *J. Biomed. Mater. Res.* **2022**, *110*, 1827-1838.

(2) 口頭発表

- ① 高峯晃生、岡本 航、高山夏実、小松晃之、コア-シェル型構造のストロマフリー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103春季年会
- ② 藤澤隼矢、臼井朝音、岡本 航、小松晃之、ポリ(2-エチル-2-オキサゾリン)結合アルブミンの合成と構造、日本化学会第103春季年会
- ③ 藤田真悠花、岡本 航、吉田瑠佳、小松晃之、表面にポリオキサゾリンを結合した赤血球の合成、日本化学会第103春季年会
- ④ 臼井朝音、岡本 航、橋本 諒、小野沢博登、岩崎正之、河野光智、田口和明、小松晃之、動物用人工血漿増量剤“Aloxa”の安全性および有効性評価、第29回日本血液代替物学会年次大会
- ⑤ 小林樹広、岡本 航、加藤 遼、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン“Hemoxa”の合成と酸素結合能、第29回日本血液代替物学会年次大会
- ⑥ 高山夏実、岡本 航、小松晃之、抗酸化能を有する人工酸素運搬体“ストロマフリーヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP)”の開発、第29回日本血液代替物学会年次大会【**学生講演賞受賞**】
- ⑦ 吉田瑠佳、岡本 航、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾赤血球の開発、第29回日本血液代替物学会年次大会【**学生講演賞受賞**】
- ⑧ 岡本 航、臼井朝音、橋本 諒、小野沢博登、岩崎正之、河野光智、小松晃之、ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン“Hemoxa”の有効性評価(50%出血性ショックラットの蘇生試験)、第29回日本血液代替物学会年次大会 (**依頼講演**)
- ⑨ 山田大雅、勝見真帆、小松晃之、プロトポルフィリン結合HemoAct製剤の合成と光線力学療法への応用、第29回日本血液代替物学会年次大会 (**依頼講演**)【**最優秀学生講演賞受賞**】
- ⑩ 小松晃之、ヘモアクト型人工酸素運搬体制剤の最新動向、第29回日本血液代替物学会年次大会 (**依頼講演**)
- ⑪ T. Komatsu, Hemoglobin-Based O₂ Carriers as Red Blood Cell Substitutes Prepared using Maleimide-Thiol Conjugates, 10th Asia Biological Inorganic Chemistry (AsBIC10) (**招待講演**)
- ⑫ 臼井朝音、岡本 航、河野光智、田口和明、小松晃之、動物用人工血漿増量剤“ポリオキサゾリン修飾アルブミン”の合成と有効性、第12回CSJ化学フェスタ2022
- ⑬ 石井幸太、勝見真帆、山田大雅、小松晃之、(亜鉛置換ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成、第12回CSJ化学フェスタ2022
- ⑭ 山田大雅、勝見真帆、小松晃之、がん治療光増感剤としての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、錯体化学会第72回討論会
- ⑮ 勝見真帆、山田大雅、小松晃之、(亜鉛ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成と光線力学活性、錯体化学会第72回討論会
- ⑯ 小松晃之、(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター型人工酸素運搬体の開発、日本膜学会第44年会 (**招待講演**)
- ⑰ 山田大雅、勝見真帆、小松晃之、プロトポルフィリン結合(カタラーゼ-アルブミン)クラスターの光線力学活性、第71回高分子学会年次大会

(3) 出版物

- ① ヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体(赤血球代替物)の開発、小松晃之、ヘムタンパク質の科学、生理機能の理解とその展開に向けて、監修：城 宜嗣、青野重利、齋藤正男、p. 407-413、エヌ・ティー・エス出版