

令和元年6月27日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09823

研究課題名(和文)ヘパリン親和性エリスロポエチンの組織保護・再生効果の検討

研究課題名(英文) Examination of tissue protection and regeneration effect of heparin affinity erythropoietin

研究代表者

森山 雅人 (MORIYAMA, MASATO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30598131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エリスロポエチン(EPO)は、赤血球系の増殖因子として発見され使用されてきたが、その後の研究で組織保護・再生にも有用であることが示された。研究代表者らは、EPO誘導体であるヘパリン親和性EPO(HEPO)の合成に成功し、この新規EPO誘導体の生物学的特性を検討した。ヒトHEPO(rhHEPO)は長時間作用型の赤血球造血作用を示しつつ、新たに血管新生阻害作用も付加されていた。今回の研究でHEPOは組織保護と抗腫瘍効果に加え、止血血栓への作用も期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HEPOは赤血球造血作用を保ちつつ、ヘパリン親和性が付与されたことにより、長時間造血作用を示すとともに、抗腫瘍性も獲得している。rhHEPOは特許化されており、近年ではがんと血栓塞栓症の関連性が注目されていることから、その機序や治療を研究する上で重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Erythropoietin (EPO) has been used as an erythropoietic stimulant, and it is also shows tissue-protective and regenerative effects. We synthesized a hybrid molecule of EPO ; heparin affinity erythropoietin (HEPO), and studied the biological characteristics of this novel EPO derivative. Human HEPO (rhHEPO) shows not only long-acting erythropoietic activity, but also antiangiogenic effect. This novel EPO derivative (HEPO) may have advantages to act on thrombosis and hemostasis, in addition to tissue-protective and anti-tumor effects.

研究分野：血液内科、腫瘍内科

キーワード：エリスロポエチン ヘパリン親和性 ヘパリン結合ドメイン 血栓 組織保護 血管障害 細胞外マトリックス サイトカイン

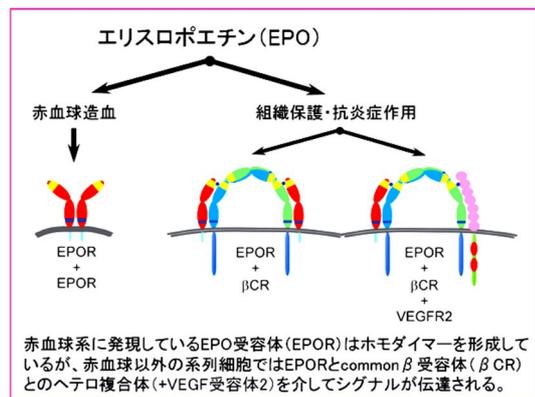
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者らは、EPO/赤血球造血系の再生医療への応用を目指して臨床研究を行い成果を挙げてきた。

- ・平成 13 年より重症下肢虚血に対する EPO 併用骨髄単核細胞移植 (BMI) を開始し、21 例の症例 (BMI 全体で 39 例) に対して治療を行った。
- ・平成 17 年より急性心筋梗塞 (AMI) に対する EPO 投与による心機能改善効果の多施設共同研究 (EPO/AMI study) を展開。本研究は平成 22 年度日本循環器学会 TR 事業採択課題に採択され、現在 EPO-AMI-2 へ発展し、継続中。
- ・平成 19 年より重症下肢虚血に対する体外増幅自己赤芽球移植による血管新生治療の臨床試験 (EVEETA study) を開始し (小澤、森山ら 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 15K09117) 現在までに 14 例に適用し、80%以上の奏効率を得ている (平成 24 年 厚生労働省 ヒト幹細胞臨床研究承認 (承認番号 90)、平成 27 年 再生医療新法申請)。

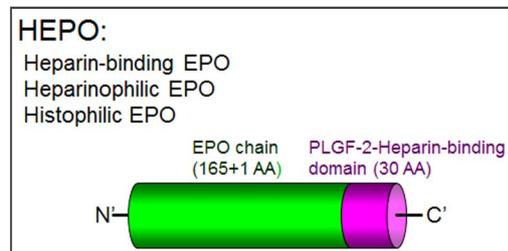
(2) ところが、EPO のシグナル伝達系は組織によって異なっている (右図)。赤血球系に発現している受容体 (EPOR) はホモダイマーを形成し、EPO の結合により細胞内ドメインの相互作用が誘導され、JAK2 を活性化し下流にシグナルが伝達される。一方、神経や心筋などでは EPOR と β -common receptor (CR) とのヘテロ複合体を介してシグナル伝達経路が活性化される。この受容体の違いが、赤血球系では高く、その他の系列細胞では低いという、EPO の結合親和性に影響している。



(3) また I 型サイトカインである EPO は局所投与しても血流を介して遠隔臓器である骨髄に到達し赤血球造血活性を示す。この特性は造血においては有益だが、局所治療で使用するには不利な点となる。そこで EPO の分子構造を改変する試みがなされ、EPO のリジン残基をカルバミル化 (アミノ基にイソシアン酸を付加) したカルバミル化 EPO (CEPO) や、EPO のシアル酸を全て取り去ったアシアロ EPO (AEPO) などの EPO 誘導体が合成され、申請者らはその生物学的特性の基礎検討も行ってきた (科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 21590887、Clin Exp Hypertens 2012)。

(4) 一方、同じサイトカインでも、血管内皮増殖因子 (VEGF) や胎盤増殖因子 (PLGF) などの増殖因子は、いずれも C 末端に 20 から 40 残基のヘパリン結合ドメイン (HBD) を有し、細胞外マトリクスのグリコサミノグリカン (GAG) のスルホニル基に結合することで強力な組織親和性を示し、サイトカインの濃度勾配を形成する。特に PLGF の HBD は、他の増殖因子の HBD と比べてアルギニン (R) の繰り返し配列 (-RRR-) が多く、更に多数のアルギニン (R) とリシン (K) の繰り返し配列 (R/K) が存在しているため、最もヘパリン親和性が強く、かつ結合できるグリコサミノグリカンのスペクトルも広いことが推測された。

(5) そこで申請者らは、ヒト EPO 糖タンパク分子にヒト PLGF の HBD を導入し、ヘパリン親和性 (組織親和性) EPO (HEPO) の合成に成功した (申請者ら Drug Deliv 2012) (右図)。ヒト EPO cDNA の 3' -末端にヒト PLGF の HBD cDNA を追加し、バキュロウイルスベクターに組み込んだ。無血清培養によりヒト HEPO (rhHEPO) を含む培養上清を収穫した。それを限外濾過により濃縮しヘパリンセファロースカラムを用いて精製した。



* なお、これまでの基礎検討における、rhHEPO の生物学的特性と、期待される臨床応用の方向性は以下の通りである (Drug Deliv 2012)。

- ・ヘパリン親和性の獲得と EPO 作用の保持 臓器・血管内皮保護剤
- ・赤血球造血能の延長 長期持続性造血剤
- ・血管再生抑制の可能性 抗腫瘍剤 (血管増殖阻害剤)

2. 研究の目的

* 本申請課題では、rhHEPO の生物学的特性の中で、最も有用かつ臨床応用に近いと考えられる血管内皮・組織保護、再生作用を中心に、必要な基礎検討とデータ収集を行う。

- (1) 対象となる疾患の病態を解明すべく、造血幹細胞移植施行患者やがん薬物療法施行患者などの血液検体を用いて、血管内皮・凝固線溶系マーカーを測定し解析を行う。
- (2) 併行してバキュロウイルス・昆虫細胞発現系による rhHEPO の大量生産を進める。
- (3) 播種性血管内凝固症候群 (DIC) や褥瘡などの疾患マウスを用いて、rhHEPO による血栓・血管内皮障害抑制作用、組織保護・再生作用の検討を行う。

* これらの結果を元に、対象疾患患者における凝固線溶系異常を明らかにし、マウス疾患モデルで得られた rhHEPO の効果から、ヒト生体における血管内皮および組織の保護、再生効果を推定し、臨床応用の基礎データとなるかを明らかにする。

3. 研究の方法

臨床検体における各種マーカーの解析：次の順序で解析を行う

- (1) 下記疾患の患者に口頭および文書で説明し同意を得た後に血液を採取し保存する。
(対象疾患) 悪性腫瘍、造血器腫瘍、骨髄不全症、凝固線溶系検査異常症例
- (2) 保存した検体を元に、血算や凝固線溶系検査の解析、検討を行う
(検査項目) 血算、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、プロトロンビン時間 (PT)、フィブリノーゲン、線溶系 (FDP, D-dimer) など。

バキュロウイルス・昆虫細胞発現系による rhHEPO の生産を図る

In vitro 血栓・血管障害抑制作用を評価する

ヒト血漿凝固時間測定、フィブリン形成阻害活性、血小板凝集阻害活性、凝固線溶系酵素阻害活性、血管内皮細胞増殖活性

In vivo 動物治療モデル実験を行う

- (1) DIC モデル (ラット)
- (2) 微小血管障害モデル (ラット)
- (3) 褥瘡モデル (ラット)

4. 研究成果

- (1) ヘパリンアガロースゲルを用いた EPO 依存性細胞株 AS-E2 増殖活性の検討では、rhHEPO のみが洗浄後もゲルに吸着したまま残留し、その状態でも EPO 活性が保存されることが示された。
- (2) EPO と同様に HEPO 添加においても、AS-E2 は濃度依存性の増殖を示した。
- (3) 健常マウスに対する in vivo 造血活性実験において、rhHEPO 投与では 7 日目に Hb のピークがあり 14 日目には低下していたが、rhHEPO では 14 日目でもさらに Hb の上昇がみられていた。この結果から rhHEPO は長期作用型 EPO 徐放製剤となる可能性が示唆された。
- (4) マウスの下肢虚血自然回復モデルに対する介入実験では、rhHEPO 群およびコントロール群では強い血流の回復が観察されたが、rhHEPO 投与群では有意な血流回復抑制効果が観察されていた。今回の研究期間中に更なる in vitro における作用機序の評価が行えなかったが、今後更なる検討を加えることで、血管新生阻害剤 (抗腫瘍剤) としての臨床応用が期待される。
- (5) rhHEPO のヒト細胞株の発現系への移行と安定発現株 (Stable Transfectant) の樹立は困難であった。そのため、必要な実験が実施できず、十分なデータを確保することができなかった。
- (6) 近年、がん患者では血栓塞栓症による死亡が多く、がん関連血栓塞栓症 (Cancer-associated thromboembolism; CAT) は患者の生命予後に大きな影響を及ぼすことが示された。がん患者では静脈血栓塞栓症 (Venous thromboembolism; VTE) 発症リスク、再発リスクとも非がん患者に比べて高いことが示されている。また本邦の VTE 患者の 3 割にがんの既往があること、特発性、再発性の深部静脈血栓症患者ではがんの発症率が高く、がんと血栓症との関連性を示す報告は多い。この観点からも HEPO の抗腫瘍効果と血栓止血に及ぼす影響は今後ますます

す重要になると期待される。

- (7) rhHEPOは既に特許化されている。今後の研究の進展のためには、他施設やパートナー企業との連携を推進していくことが不可欠である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Cancers among adolescents and young adults at one institution in Japan. Kamimura K, Matsumoto Y, Zhou Q, Moriyama M, Saijo Y. *Oncol Lett.* 16(6) 7212-7222 2018年 doi:10.3892/ol.2018.9535、査読有
2. The Prognostic Nutrition Index Predicts the Development of Hematological Toxicities in and the Prognosis of Esophageal Cancer Patients Treated with Cisplatin Plus 5-Fluorouracil Chemotherapy. Matsumoto Y, Zhou Q, Kamimura K, Moriyama M, Saijo Y. *Nutrition and cancer.* 70(3) 447-452 2018年 doi:10.1080/01635581.2018.1445765、査読有
3. Myelodysplastic syndrome with refractory hemorrhage due to reduced platelet aggregation activity. Tanaka T, Kozakai T, Kitajima T, Fuse K, Kobayashi H, Ushiki T, Shibasaki Y, Moriyama M, Takizawa J, Sone H, Fuse I, Masuko M. *Rinsho ketsueki The Japanese journal of clinical hematology* 58(12) 2402-2405 2017年 doi:10.11406/rinketsu.58.2402、査読有
4. Relationship between HMGB1 and PAI-1 after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Nomura S, Maeda Y, Ishii K, Katayama Y, Yagi H, Fujishima N, Ota S, Moriyama M, Ikezoe T, Miyazaki Y, Hayashi K, Fujita S, Satake A, Ito T, Kyo T, Tanimoto M. *Journal of blood medicine* 7 1-4 2016年 doi:10.2147/JBM.S93008、査読有

[学会発表](計 9 件)

1. 森山雅人. がん関連血栓塞栓症：機序・診断・治療. 日本血液学会学術集会 2018年
2. Masato Moriyama, Masato Matsuda, Takeshi Suzuki, Yutaka Komiyama, Tsukasa Suetake, Kazuya Fukuda, Chihaya Imai, Takayuki Matsuto, Yasuo Saijo. Diagnostic and prognostic value of a novel ELISA system for detection of factor VIII inhibitory antibodies in hemophilias. APSTH 2018
3. Qiliang Zhou, Kenta Sasaki, Yoshifumi Matsumoto, Masato Moriyama, Yasuo Saijo. Experience of Lenvatinib treatment for thyroid cancer at Niigata University. 中国臨床腫瘍学会 2018年
4. Takeshi Suzuki, Masato Matsuda, Yutaka Komiyama, Tsukasa Suetake, Kazuya Fukuda, Yasuo Saijo, Yoshiki Hoshiyama, Takayuki Matsuto, Masato Moriyama. Effect of centrifugation and microparticle-derived coagulation activity on routine coagulation tests. ISLH 2018
5. K.kamimura, Y.Matsumoto, Q.Zhou, M. Moriyama, Y.Saijo. Cancers among Adolescents and Young Adults in Japan. ESMO Asia 2017
6. 周啓亮、松本吉史、森山雅人、西條康夫. 当科におけるレンバチニブ治療を施行した進行期甲状腺がん 5 例の検討. 日本臨床腫瘍学会 2017年
7. 松本吉史、周啓亮、森山雅人、西條康夫. 当院における局所進行膵臓癌に対する S-1 併用化学放射線療法の検討. 日本臨床腫瘍学会 2017年
8. 森山雅人、松田将門、鈴木健史、小宮山豊、末武司、井藤ヒロミ、高野操、西條康夫、松戸隆之、曾根博仁. 凝固検査の標準化における遠心条件の重要性 高速遠心による凝固活性化の可能性 . 日本検査血液学会 2017年
9. 松田将門、森山雅人、鈴木健史、小宮山豊、末武司、松戸隆之、高野操、曾根博仁. 血漿中マイクロパーティクルの凝固活性を指標としたクロスミキシングテスト用正常血漿の評価. 日本検査血液学会 2016年

6 . 研究組織

・研究分担者

小澤 拓也 (OZAWA, Takuya)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：70467075

西條 康夫 (SAIJO, Yasuo)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10270828