

令和 6 年 10 月 3 日現在

機関番号：82108

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2023

課題番号：17KK0122

研究課題名（和文）植物・微生物由来ヘミンからの免疫活性化ヘムポリマーの合成

研究課題名（英文）synthesis of a hemin-containing copolymer as a novel immunostimulator

研究代表者

山崎 智彦（YAMAZAKI, Tomohiko）

国立研究開発法人物質・材料研究機構・高分子・バイオ材料研究センター・主幹研究員

研究者番号：50419264

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 6,400,000円

渡航期間： 5ヶ月

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫は、ヘモグロビンの代謝産物としてヘモゾインを生産している。ヘモゾインは、免疫細胞を活性化する効果があることから、ワクチンにおける免疫賦活剤（アジュバント）として応用が期待されている。ウイルス感染の危険性に加えて宗教上理由から、動物由来の成分を医薬品として応用することは困難である。本研究では、動物由来の成分を用いることなく、ヘモゾインを生産することを実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヘモゾインを酵素を用いて合成する方法を確立し、また合成したヘモゾインがワクチンの免疫賦活剤（アジュバント）として機能することを明らかとした。ワクチンの必要性やその生産が急務である状況下において、新たなワクチンアジュバントは、既存ワクチンの効果増強すること、また抗原との組合せで今までワクチンが無かった感染症の予防が可能とすることから、人々のQOL(クオリティ オブ ライフ)を高めることに貢献する。

研究成果の概要（英文）：Plasmodium falciparum malariae produces haemozoin as a metabolite of haemoglobin. As haemozoin has the effect of activating immune cells, it is expected to be used as an immunostimulant (adjuvant) in vaccines. Due to the risk of viral infection and for religious reasons, it is difficult to use components of animal origin as medicines. In this study, the production of haemozoin was achieved without the use of animal components.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：ヘモゾイン アジュバント マラリア ヘム無毒化蛋白質 ヘミン ヘム蛋白質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ワクチンには抗原性を増強する免疫賦活剤(アジュバント)が添加されており、その効果として大量の抗体が産生される。アジュバントとして広く使用される水酸化アルミニウムはワクチン接種部位の腫れや痛みなどの副作用を誘引した事例の報告があり、安全かつ免疫賦活能の高いアジュバントの開発が望まれている。マラリア原虫が生産する疎水性ヘムダイマーであるヘモゾインがアジュバント効果を示すことが報告された(Cell Host & Microbe 7, 50-61, 2010)。

我々は、ヘモゾインのヘム集合構造と免疫賦活能に着目し、ヘム構造を有するポリマーの開発を進めてきた。ヘミンと N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)とのラジカル重合によりヘミン含有ポリマーである NIPAM-Hemin を開発し、その免疫活性化能を評価した結果、ヒト末梢血単核細胞において免疫活性のトリガーとなる蛋白質であるインターフェロン (IFN- γ)とインターロイキン 6 の発現を誘導できることを示した。またマウス皮下にオブアルブミン抗原と混合して皮下注射したところ、抗オブアルブミン抗体産出が誘導された。このことから、ヘムを含む高分子化合物は、アジュバントの候補分子としてワクチン開発への応用が期待されることが示された。

しかしながら、原料として用いたヘミンは動物血液から調製されたものであり、ウイルス感染の危険性や動物由来成分の摂取に制限がある宗教上理由から、臨床応用には課題が残る。また、ポリマー自身も人工成分であるため、医薬品応用に高いハードルがある。

2. 研究の目的

本研究では、ヘモゾインを模倣したヘモゾインアナログ分子を、非動物由来の原料を用いて、また生体内での代謝反応を模倣して合成することを目的とする。ヘモゾインアナログ分子を、アジュバント分子として体内に投与する医薬品として実用化を目指す上では、動物由来の成分ならびに非天然物を用いることは、実用化には大きなハードルとなる。非動物由来の天然物ならびに生体内で行われている酵素反応を用いて、ヘモゾインアナログ分子を生産することは、アジュバントとしての実用化にとっては利点である。

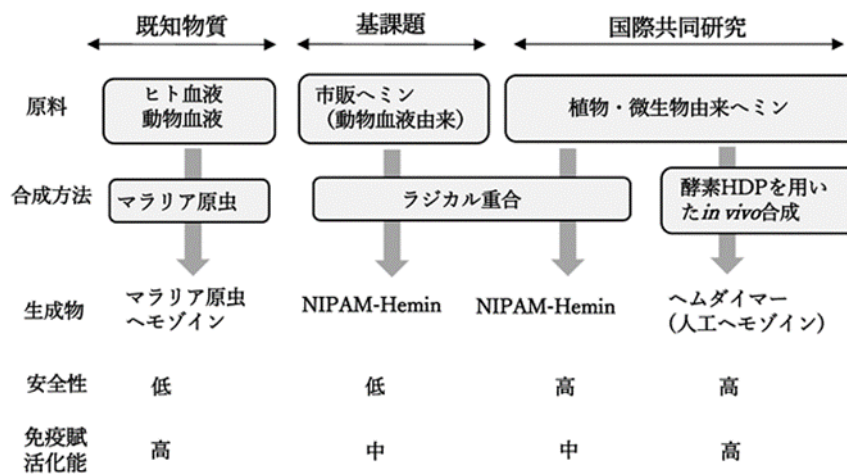


図 基課題をもとにした国際共同研究への発展と、開発物の利点

3. 研究の方法

(1) ヘム蛋白質からのヘミンの調製

動物の血液から精製したヘモグロビンからヘミンは調製されているが、非動物由来のヘム蛋白質からヘミンを調製する方法を開発した。具体的には、植物や大腸菌を用いて精算したヘム蛋白質を複数のプロテアーゼにより処理することで、ヘミンを調整する方法を開発した。

(2) 酵素を用いたヘモゾインアナログの調製

ヘミン単独では、免疫賦活化の効果は示されない。我々の研究において、ヘムを含むポリマーが動物細胞において免疫賦活化の効果を示すことがわかった。また人工的な成分を除外するために、マラリア原虫体内でヘムからヘモゾインの代謝経路を模倣した、ヘム結晶であるヘモゾインの合成方法を開発した。

4. 研究成果

(1) ヘム蛋白質からのヘミンの調製

ルンド大学のLeif Bülow教授の研究において開発した植物由来ならびに大腸菌内で組換え生産したヘモグロビン、さらには微生物が生産するヘム蛋白質を、市販のセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼを用いて加水分解し、反応後の分解物を逆相クロマトグラフィーならびにヘミン由来の400nmのソレレ帯のピークを指標、またFT-IRを用いてヘミンの存在を調べた。その結果、複数のプロテアーゼを組み合わせることにより、効果的にヘミンを分離できることが示された。

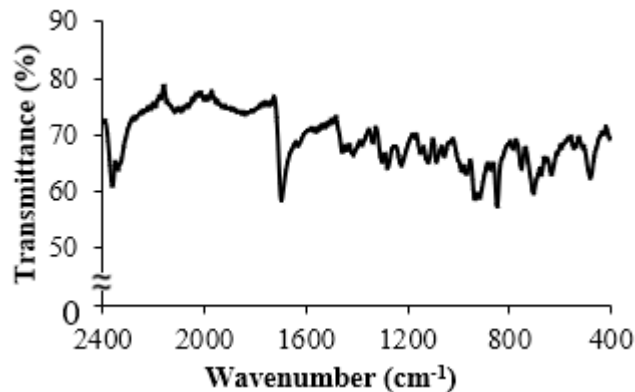


図 ヘム蛋白質から調製したヘミンのFT-IRスペクトル

(2) 酵素を用いたヘモジンアナログの調製

ヘム無毒化蛋白質 (Heme detoxification protein (HDP)) の調製

C末端にヘキサヒスチジンタグを持つヘム無毒化蛋白質 (Heme detoxification protein (HDP)) を発現させるために、*Plasmodium falciparum* 由来のHDP (PfHDP, GenBank Acc# NP_702335) のアミノ酸配列に対する遺伝子配列を大腸菌用にコドン最適化された全長の合成DNAを委託合成した。このHDP遺伝子断片をpCold IVベクターのHind III/Nde I部位に挿入し、pCold IV-PfHDPを作製した。このpCold IV-PfHDPを大腸菌pG-Tf2/BL21コンピテントセルに形質転換した。大腸菌pG-Tf2/BL21はテトラサイクリン誘導性プロモーター(Pzt-1)下でGroEL、GroES、トリガーファクター(Tf)を発現する。pCold IVベクターとpG-Tf2ベクターとの共発現により、HDPの可溶性発現を促進できた。可溶性画分を、HisTrap HPカラム、HiTrap Qカラムを用いて精製することで、精製HDPを調製することができた。

HDPを用いたヘモジンの合成

HDP (0.13mg, 5 μ M) をヘミン (0.39mg, 600 μ M) と共に0.5M酢酸ナトリウム (pH4.8) 中、37℃で1時間、500rpmのオービタルシェーカーで攪拌した。HDPの陰性対照タンパク質としてリゾチーム (0.13 mg) を用いて同じ反応を行った。0.1%(w/v)のSDSを反応液に加えて反応を停止させた。15,000 \times g、10分間の遠心分離で酵素合成ヘモジンを含む沈殿物を回収し、2.5%(w/v)SDSと0.1M重炭酸ナトリウム (pH9.1) で3回洗浄した。その後、ミリQ水で3回洗浄し、沈殿物を凍結乾燥した。

HDPによって合成されたヘモジンの定量は、ヘモジンを0.1 M NaOHに添加することで、ヘミンに分解し、385 nmの吸光度の値とヘミンのモル吸光係数から、ヘモジン量を算出した。その結果、HDPによってヘミンから酵素合成ヘモジンを得ることができた。ヘミンからヘモジンへの変換率は、34%であった。また、平均粒径は350 nm \pm 160 nmであった。

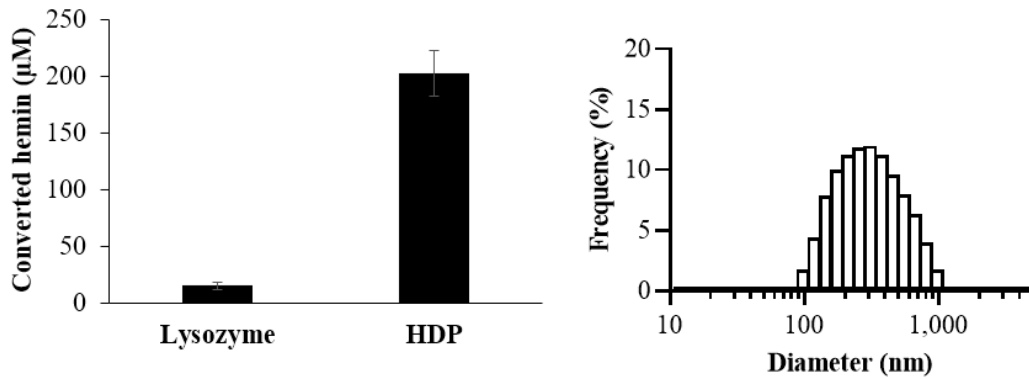


図 HDP を用いた酵素合成ヘモゾインの収率率と酵素合成ヘモゾインの粒子径

(3) 成果の位置づけと今後の展望

新型コロナウイルス感染症の流行以降、世界中においてワクチン開発が活発化している中で、新しいワクチンアジュバントが求められている。新たなワクチンアジュバントの開発は、既存ワクチンの効果増強すること、また抗原との組合せで今までワクチンが無かった感染症の予防が可能とすることから、人々のQOL(クオリティ オブ ライフ)を高めることに貢献する。

その中で、本申請ではアジュバントとして効果が認められているヘモゾインを動物由来成分を用いずに酵素合成することを達成した。今後、新しいワクチンが開発される中、アジュバントと抗原分子との組合せを最適化することが求められ、アジュバントのラインナップの1つとしてヘモゾインは着目されている。

酵素反応は、化学反応と比較して穏やかな条件下で反応を進めることができること、また温度や酵素量を変化させることで、反応を制御することができる。今後は、酵素反応条件を改変することによるヘモゾイン粒子の物性への影響を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hoshi Kazuaki, Yamazaki Tomohiko, Yoshikawa Chiaki, Tsugawa Wakako, Ikebukuro Kazunori, Sode Koji	4. 巻 Volume 13
2. 論文標題 Synthesis of a hemin-containing copolymer as a novel immunostimulator that induces IFN-gamma production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 4461 ~ 4472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/IJN.S166259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Iswanti Febriana Catur, Putri Qarina Hasyala, Prijanti Ani Retno, Djauzi Samsuridjal, Sadikin Mohamad, Witarto Arief Budi, Yamazaki Tomohiko	4. 巻 11
2. 論文標題 The Use of Chitosan Nanoparticles for Delivery of CpG ODN in Treatment of Allergic Balb/C Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reports of Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 599 ~ 613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.52547/rbmb.11.4.599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 智彦
2. 発表標題 ヘム含有ポリマーのワクチンアジュバントとしての商品化
3. 学会等名 「つくばイノベーション・エコシステムの構築（医療・先端技術シーズを用いた超スマート社会の創成事業）」成果報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 4.山崎 智彦, 星 和明, ツチトラム アン, 吉川 千晶, 菅井 和久, 袴田 陽二
2. 発表標題 水溶性ヘムポリマーのアジュバント効果
3. 学会等名 第15回ナノ・バイオメディカル学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 智彦
2. 発表標題 マラリア原虫のヘム結晶を模倣したワクチン効果を増強する高分子
3. 学会等名 SATテクノロジー・ショーケース
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 智彦、星 和明、ツチトラム アン、吉川千晶、津川若子、早出広司、池袋一典
2. 発表標題 水溶性ヘム含有ポリマーの合成と免疫活性化能の検討
3. 学会等名 第13回次世代アジュバント研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星 和明、ツチトラム アン、吉川 千晶、津川若子、早出広司、池袋一典、山崎 智彦
2. 発表標題 免疫活性化能を有するヘミン含有共重合体の開発
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 智彦, LE Bui Thao Nguyen, Tu, Thi Tram Anh
2. 発表標題 グアニン四重鎖構造形成によるCpG オリゴデオキシヌクレオチド担持DOTAPの機能向上
3. 学会等名 第18回ナノ・バイオメディカル学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 PATHAK Soumitra, 山崎 智彦
2. 発表標題 Effects of guanine-quadruplex topology on stability, cellular uptake, and immunostimulatory activities of CpG ODNs
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第8回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 LE Bui Thao Nguyen, 山崎 智彦
2. 発表標題 The ratio of guanine-quadruplex structure-based CpG oligodeoxynucleotides / cationic liposome regulates bifurcated cytokine profiles in immune cells
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第8回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 PATHAK Soumitra, 山崎 智彦
2. 発表標題 Effects of different topologies of G-quadruplex structures used as scaffolds for CpG oligodeoxynucleotides on their stability, cellular uptake and immunostimulatory effects
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2024
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者総覧SAMURAI https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko 北海道大学フロンティア生命材料科学研究室 研究室ホームページ https://life.sci.hokudai.ac.jp/tl/lab/frontier-biomaterials-science 研究者総覧SAMURAI https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko 北海道大学フロンティア生命材料科学研究室 研究室ホームページ https://life.sci.hokudai.ac.jp/tl/lab/frontier-biomaterials-science 研究者総覧SAMURAI https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko 北海道大学フロンティア生命材料科学研究室 研究室ホームページ https://life.sci.hokudai.ac.jp/tl/lab/frontier-biomaterials-science 物質・材料研究機構 研究者紹介 https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko 北海道大学フロンティア生命材料科学研究室 ホームページ https://life.sci.hokudai.ac.jp/tl/lab/frontier-biomaterials-science 研究者紹介 https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ビュロー レイフ (Bulow Leif)	Lund university・Pure and Applied Biochemistry・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	イ レイ (Ye Lei)	Lund university・Pure and Applied Biochemistry・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	早出 広司 (Sode Koji)	The university of North Carolina・joint Department of Biomedical Engineering・Distinguished Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

スウェーデン	Lund university			
米国	The university of North Carolina			