

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23659088
 研究課題名（和文） 分子進化工学手法を駆使した毒素中和型アルブミンによるハイブリッド血液浄化法の開発
 研究課題名（英文） Development of effective blood purification treatment method using HSA bound toxic compounds designed by phase display technology
 研究代表者
 小田切 優樹 (OTAGIRI MASAKI)
 崇城大学・薬学部・教授
 研究者番号：80120145

研究成果の概要（和文）：本研究では標的分子を BR に絞り込み、BR 捕獲型 HSA ドメインの設計と新規 BR 除去療法としての有用性を評価するため、以下の検討を行った。得られた知見を要約する。

①進化工学的手法であるファージディスプレイ法を駆使して BR の詳細な結合部位の同定を可能にし、さらに 1.6×10^5 個の変異体の中から BR 高親和性 HSA ドメイン II 変異体を拾い上げることに成功した。

②今回作製した新規 BR 尿中排泄促進剤 pan3_3-13 は、抗体製剤よりも製造コストが低く、従来の血液浄化法の基盤を成す血液透析に替わり、侵襲性の低い新たな血液浄化法の道を拓くことが大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was undertaken to design and evaluate recombinant albumin mutant(specially, domain II mutant)with high bilirubin (BR) binding affinity via phage display technology.

The results obtained here identified the amino acid residues that interact carboxylates of BR in HSA, and also produces HSA domain II mutants with high BR binding affinity. To our knowledge, this is the first finding on HSA mutant with enhanced binding affinity to BR. This approach could be applied to other HSA bound toxic compounds that responsible for the progression of disease and thereby it will pave the way for the development of minimally invasive and low cost blood clarification method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：薬物動態学、DDS

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：アルブミン・血液浄化法・分子進化工学・毒素中和・ハイブリッド

1. 研究開始当初の背景

血液浄化療法の発展・普及により、従来は致命的と考えられた疾患も病態の著名な改善や救命が可能となったが、その反面、重篤な臓器障害を伴う病態や複合障害を呈する症状の改善は十分ではない。例えば、血液透析患者では、尿毒症物質の体外排除法として血液浄

化療法が繁用されているが、HSAと堅固に結合するものに対しては除去できないものも多い。また、アミロイドのように分子サイズが大きい毒素は既存の浄化方法の適応範囲外である。つまり、現行の血液浄化療法の改善は、ヘルスケア対策において緊急かつ最重要課題の一つであり、そのためには①病原毒素の除去効

率の向上、②標的毒素の適応拡大が必須である。

2. 研究の目的

本研究は、安全、安価かつ有効な革新的血液浄化療法を開発するために、病原毒素に対して高い親和性を有する毒素中和型HSA変異体の創製と臨床応用である。特に、本研究では標的分子をBRに絞り込み、BR捕獲型HSAドメインの設計と新規BR除去療法としての有用性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 我々がHSA変異体作製用に改良したファージ表面提示法を用い、毒素に対してより高い親和性を有するHSA変異体を作製する。すなわち、ファージ表面上に提示された膨大かつ多様なHSA変異体ライブラリーの中から特定のターゲットに親和性を持つHSA変異体を結合力に基づいて検索する網羅的変異体を作製する。具体的には、BRの場合、ドメインIIの14残基(211Phe、214Trp、218Arg、222Arg、234Leu、238Leu、242His、257Arg、260Leu、264Ile、284Leu、287Ser、290Ile、292Glu)を、あるいはFAPの発症因子である異型TTRでは、ドメインIIIの8残基を20種のアミノ酸残基へランダムに変異させファージライブラリーを作製する。これを用い、毒素に対して特異的に結合するファージの回収・増幅を行う。このサイクルを数回行うことにより、結合性のより強いファージをスクリーニングした後、回収したファージの提示するHSA変異体の配列をシーケンス解析により同定する。

(2) 作成したHSA変異体と各種標的毒素との結合性をBiacoreにより評価し、結合パラメータ(結合サイト数、結合定数)を算出した。

(3) 高BR血症マウスを作製し、saline、

HSA、ドメインII、およびドメインII変異体を静注して、血中BR量と尿中BR量を測定した。

4. 研究成果

(1) 進化工学的手法であるファージディスプレイ法によるランダムスクリーニングにより、HSA分子上におけるBR結合に関わる残基が¹⁹⁵Lysおよび¹⁹⁹Lysであること、特に¹⁹⁹LysはBR結合における立体選択性に関与していることを初めて明らかにした。

(2) 4残基変異ドメインIIファージライブラリーを用いたバイオパンニングにより、BR高親和性ドメインII変異体をスクリーニングした。ラウンド3で得られたpan3_3-13およびラウンド6で得られたpan6_4は、WTドメインIIと比べてBR結合活性が有意に高かった。中でもpan3_3-13は、WTドメインIIと比較し約7倍高いBR結合活性を有していることがBiacore®による評価にて明らかになった。

(3) BR結合活性が有意に高かったドメインII変異体であるpan3_3-13を用い、胆管結紮による高BR血症マウスにてBR除去効果を評価した。Saline、WTドメインII、pan3_3-13投与群の3群間で、血中BR減少効果を比較したところ、pan3_3-13>WTドメインII>saline投与群の順であった。他方、BRの尿中排泄量は、saline<WTドメインII<pan3_3-13投与群の順に増加していたことから、pan3_3-13がBRの尿中排泄促進剤として機能していることが実証された。

これらの知見から、新たなバイオパンニングで設計されたpan3_3-13は、*in vitro*、*in vivo*両系において、WTドメインIIよりも高いBR結合能を示したことから、優れたBR除去治療薬として適用できる可能性が示された。

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 16 件)

- (1) Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression., Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka K, Mizushima T, Otagiri M, Maruyama T., J Pharmacol Exp Ther., 査読有, 2013, vol.345, 271-83., doi: 10.1124/jpet.112.201814.
- (2) UW solution improved with high anti-apoptotic activity by S-nitrosated human serum albumin., Ishima Y, Shinagawa T, Yoneshige S, Kragh-Hansen U, Ohya Y, Inomata Y, Kai T, Otagiri M, Maruyama T., Nitric Oxide., 査読有, 2013, vol. 30, 36-42, doi: 10.1016/j.niox.2013.01.004.
- (3) Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment., Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, Otagiri M., Biochim Biophys Acta. , 査読有, 2013, vol.1830, 2917-23., doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.006.
- (4) p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase., Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T., Kidney Int., 査読有, 2013, vol.83, 582-92., doi: 1.1038/ki.2012.448.

- (5) Pharmacokinetic alteration of (99m)Tc-MAG3 using serum protein binding displacement method., Nishi K, Kobayashi M, Nishii R, Shikano N, Takamura N, Kuga N, Yamasaki K, Nagamachi S, Tamura S, Otagiri M, Kawai K., Nucl Med Biol., 査読有, 2013, vol.40, 366-70., doi: 10.1016/j.nucmedbio.2012.12.002.
- (6) A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy., Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VT, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama T., Kidney Int., 査読有, 2013, vol.83, 446-54., doi: 10.1038/ki.2012.429.
- (7) Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome P450 impairment in hemorrhagic-shock rats., Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T., Drug Metab Dispos., 査読有, 2013, vol.41, 141-8., doi: 10.1124/dmd.112.048744.
- (8) Effect of acetaminophen on the progression of renal damage in adenine induced renal failure model rats., Kadowaki D, Sumikawa S, Arimizu K, Taguchi K, Kitamura K, Ishitsuka Y, Narita Y, Irie T, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M, Hirata S., Life Sci., 査読有, 2012, Dec vol.91, 1304-8., doi: 10.1016/j.lfs.2012.09.018.
- (9) Elucidation of the therapeutic enhancer mechanism of poly-S-nitrosated human serum albumin against multidrug-resistant tumor in animal models., Ishima Y, Hara M, Kragh-Hansen U, Inoue A, Suenaga A, Kai T, Watanabe H,

Otagiri M, Maruyama T., J Control Release., 査読有, 2012, vol.164, 1-7, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.10.003.

(10) S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis., Watanabe K, Ishima Y, Akaike T, Sawa T, Kuroda T, Ogawa W, Watanabe H, Suenaga A, Kai T, Otagiri M, Maruyama T., FASEB J., 査読有, 2013, vol.27, 391-8., doi: 10.1096/fj.12-217794.

(11) Liposome-encapsulated hemoglobin (hemoglobin-vesicle) is not transferred from mother to fetus at the late stage of pregnancy in the rat model., Kaga M, Li H, Ohta H, Taguchi K, Ogaki S, Izumi H, Inagaki M, Tsuchiya S, Okamura K, Otagiri M, Sakai H, Yaegashi N., Life Sci., 査読有, 2012, vol.91, 420-8., doi: 10.1016/j.lfs.2012.08.021.

(12) A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate., Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Chuang VT, Sato K, Otagiri M, Maruyama T., Biochem Pharmacol., 査読有, 2012, vol.84, 1207-14., doi: 10.1016/j.bcp.2012.07.033.

(13) α (1)-Acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 protein pathway: possible protection against hemolysis-induced oxidative stress., Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kodama A, Maeda H, Watanabe K, Kai H, Otagiri M, Maruyama T., J Biol Chem., 査読有, 2012,

vol.287, 30688-700., doi: 10.1074/jbc.M112.353771.

(14) Pharmaceutical aspects of the recombinant human serum albumin dimer: structural characteristics, biological properties, and medical applications., Taguchi K, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M., J Pharm Sci., 査読有, 2012 vol.101, 3033-46., doi: 10.1002/jps.23181.

(15) Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin., Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Miyamura S, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T., Drug Metab Dispos., 査読有, 2012, vol.40, 1423-8. doi: 10.1124/dmd.112.045617.

(16) S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents., Ishima Y, Hoshino H, Shinagawa T, Watanabe K, Akaike T, Sawa T, Kragh-Hansen U, Kai T, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M., J Pharm Sci., 査読有, 2012, vol.101, 3222-9., doi: 10.1002/jps.23143.

[学会発表] (計 32 件)

(1) 小田切 優樹、ブレオマイシン誘発肺線維症に対するアルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の有用性評価、日本薬学会第 133 年会、2013/3/28、パシフィコ横浜

(2) 異島 優、S-ニトロソ化により獲得する α 1-酸性等タンパク質 (AGP) の抗菌活性、日本薬学会第 133 年会、2013/3/28、パシフィコ横浜

(3) 丸山 徹、エリスロポエチン骨髄デリバリーシステムの構築と腎性貧血治療への応

用、日本薬学会第 133 年会、2013/3/28、パシフィコ横浜

(4) 田中 遼大、ヒト血清アルブミン-チオレドキシニン融合タンパク質の持続的な抗酸化・抗炎症作用によるブレオマイシン誘発肺線維症に対する治療効果、日本薬物動態学会第 27 回年会、2012/11/20-22、タワーホール船堀

(5) 渡邊 博志、尿毒症物質 p-クレジル硫酸は OATs を介して近位尿細管上皮、血管内皮及び血管平滑筋細胞に取り込まれ酸化ストレス障害を誘発する、日本薬物動態学会第 27 回年会、2012/11/20-22、タワーホール船堀

(6) 異島 優、高分子抗癌剤の腫瘍移行制御特性を有する SNO-Albumin Dimer の設計、日本薬物動態学会第 27 回年会、2012/11/20-22、タワーホール船堀

(7) 末永 綾香、高分子抗癌剤の腫瘍移行制御特性を有する SNO-Albumin Dimer の設計、日本薬物動態学会第 27 回年会、2012/11/20-22、タワーホール船堀

(8) 永尾 紗理、一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体は抗炎症・抗酸化作用を介してブレオマイシン誘発肺線維症を抑制する、日本薬物動態学会第 27 回年会、2012/11/20-22、タワーホール船堀

(9) 小玉 あずさ、ヒト血清アルブミン-チオレドキシニン融合タンパク質は抗酸化作用によりシスプラチン誘発腎障害を抑制する、日本薬物動態学会第 27 回年会、2012/11/20-22、タワーホール船堀

(10) 丸山 徹、ヒト $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質バリアント A 体と F1*S 体に対する薬物結合選択性の分子機序解明日本薬物動態学会第 27 回年会、2012/11/20-22、タワーホール船堀

(11) 大柿 滋、一酸化炭素付加赤血球によるクッパー細胞の不活化は輸血誘発肝チトクローム P450 機能障害を保護する、第 34 回生

体膜と薬物の相互作用シンポジウム、

2012/11/15-16、京都大学薬学部

(12) 宮本 洋平、尿毒症物質 p-クレジル硫酸のレドックス特性と腎障害、心血管疾患発症機序解明、第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012/11/15-16、京都大学薬学部

(13) 渡辺 佳織、S-ニトロソ化に伴う $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質 (AGP) の抗菌機能獲得と感染症治療への応用、第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012/11/15-16、京都大学薬学部

(14) 太田 英伸、ラット妊娠母体におけるヘモグロビン小胞体の胎盤通過性、第 19 回日本血液代替物学会年次大会、2012/10/25-26、旭川大雪クリスタルホール

(15) 丸山 徹、血小板代替物 H12 (ADP) リポソームの体内動態に及ぼす血小板減少症の影響、第 19 回日本血液代替物学会年次大会、2012/10/25-26、旭川大雪クリスタルホール

(16) 田口 和明、細胞型人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体のカニクイザルへの大量投与の結果からみた実効性、第 19 回日本血液代替物学会年次大会、2012/10/25-26、旭川大雪クリスタルホール

(17) 南雲 恒平、ESI-TOF/MS を用いたシステイン付加型ヒト血清アルブミンの検出と機能相関一慢性肝疾患の影響一、第 19 回日本血液代替物学会年次大会、2012/10/25-26、旭川大雪クリスタルホール

(18) 大柿 滋、出血性ショックも出るラットにおける一酸化炭素付加型赤血球の肝地とクローム P450 保護効果、第 19 回日本血液代替物学会年次大会、2012/10/25-26、旭川大雪クリスタルホール

(19) Otagiri M、The potential of albumin for use as a nanomedicine carrier、Montreal

2012 international forum on environment and medicine.、2012/7/24-25、Montreal, Quebec (Canada)

(20) 小田切 優樹、ヒト血清アルブミンドメイン II によるビリルビン尿中排泄促進作用、第 28 回日本 DDS 学会学術集会、2012/7/4-5、札幌コンベンションセンター

(21) 異島 優、高分子抗癌剤の腫瘍集積性を高める S- ニトロソ化アルブミンダイマーの EPR 効果増強作用、第 28 回日本 DDS 学会学術集会、2012/7/4-5、札幌コンベンションセンター

(22) 異島 優、S-ニトロソ化アルブミンにより抗アポトーシス効果を付与した改良型臓器保存液の開発、第 12 回日本 NO 学会学術集会、2012/6/29-30、神戸国際会議場

(23) 渡辺 佳織、S-ニトロソ化に伴う α 1-酸性糖タンパク質 (AGP) の抗菌機能獲得と感染症治療への応用、第 12 回日本 NO 学会学術集会、2012/6/29-30、神戸国際会議場

(24) Otagiri M、Human serum albumin as a nanomedicine carrier、Nanoformulation 2012.、2012/5/28-6/1、Fira Palace, Barcelona (Spain)

(25) Hiroshi Watanabe、p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the activation of NADPH oxidase、49th ERA-EDTA Congress, Paris 2012, 2012/5/24-27, Paris (France)

(26) Yohei Miyamoto, A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate accumulates in proximal tubular cells and induces cell damage through increasing oxidative stress, 49th ERA-EDTA Congress, Paris 2012 2012/5/24-27, Paris (France)

(27) 異島 優、新規翻訳後修飾体である S-グアニル化アルブミンは抗菌効果を発揮する、日本薬剤学会第 27 年会、2012/5/24-26、神戸国際会議場

(28) 井上 亜希、S-ニトロソ化アルブミンダイマーは EPR 効果を増強する、日本薬剤学会第 27 年会、2012/5/24-26、神戸国際会議場

(29) 田中 遼大、ブレオマイシン誘発肺線維症に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の有用性評価、日本薬剤学会第 27 年会、2012/5/24-26、神戸国際会議場

(30) 宮崎 裕理、骨髄指向性を有する新規エリスロポエチン製剤の開発、日本薬剤学会第 27 年会、2012/5/24-26、神戸国際会議場

(31) 濱崎 慶輔、アルギニンペプチドを利用した細胞膜透過型アルブミンの設計と評価、日本薬剤学会第 27 年会、2012/5/24-26、神戸国際会議場

(32) 弥永 直樹、In vivo フェージディスプレイ法を用いた新規腎送達ペプチドの探索、日本薬剤学会第 27 年会、2012/5/24-26、神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田切 優樹 (OTAGIRI MASAKI)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号：80120145

(2) 研究分担者

丸山 徹 (MARUYAMA TORU)
熊本大学・薬学部・教授
研究者番号：90423657

渡邊 博志 (WATANABE HIROSHI)
熊本大学・薬学部・准教授
研究者番号：70398220