

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461410

研究課題名(和文)ヘパリン親和性を獲得した新規エリスロポエチンの生物学的特性と臨床応用のための検討

研究課題名(英文)Biological characteristics of the novel erythropoietin designed to bind to Heparin-like Substances

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エリスロポエチン(EPO)は、赤血球系の造血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的に働くことも明らかとなっている。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獲得していた。本新規EPO誘導体(rhHEPO)は、造血促進効果および組織保護効果を維持しており、さらに抗腫瘍効果(腫瘍増殖阻害)が付加されていることで、臨床への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Erythropoietin (EPO) has been used as an erythropoietic stimulant, and it also shows tissue-protective effects. We synthesized a hybrid molecule of EPO; heparin-binding EPO (HEPO), and studied the 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 an advantage to inhibit tumor growth while preserving hematopoietic and tissue-protective effects.

研究分野：生物系 医師薬学 内科系臨床医学 血液内科学

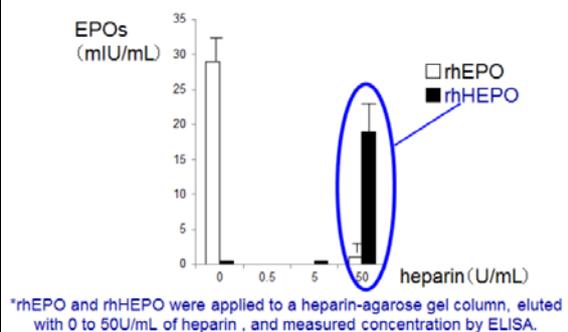
キーワード：エリスロポエチン ヘパリン親和性 サイトカイン 造血活性 血管増殖阻害

1. 研究開始当初の背景

- (1) サイトカインには造血因子のように血流を介して遠隔臓器に作用するものと、血小板由来成長因子 (PDGF) 家系分子などの細胞増殖因子やケモカインのように、ヘパリン親和性モチーフを介して分泌局所に濃度勾配を形成して作用するものがある。エリスロポエチン (EPO) は赤血球系の造血因子として発見されたが、その後の研究で血管内皮・心筋・中枢神経などにも作用し、細胞保護的に働くことが明らかとなってきた (J Clin Invest 2010, Blood 2011, Brain Res 2011, Stroke 2012, Proc Nac Acad Sci 2012)
- (2) 哺乳類では低酸素および貧血に際し腎から EPO がサージ分泌され、血流を介して骨髄の赤血球造血を刺激する (エンドクリン)。これに対し虚血に弱い臓器・組織である中枢神経や心・血管系では、虚血や炎症などの組織傷害に際して臓器内での EPO 産生分泌の亢進と EPO 受容体 (EPOR) の発現亢進が誘導され、EPO/EPOR システムを介した臓器保護作用が起動される (パラクリン)。このように EPO は造血作用に加え、脳・心血管保護作用とその臨床応用が期待できる。実際に我々は急性心筋梗塞患者に対し、標準的治療法である冠動脈インターベンション後に rhEPO 製剤を投与し、梗塞巣の縮小と慢性期心不全の改善を観察し報告した (Circ J 2010, 2010 年度日本循環器学会 TR 事業採択課題)
- (3) そこで申請者は、EPO にヘパリン親和性モチーフを導入することでヘパリン親和性 EPO (HEPO) の合成を試みた。ヒト腎由来 EPO は 165 アミノ酸残基からなる糖タンパクで、3つの N-型糖鎖と1つの O-型糖鎖をもつ。このヒト EPO 糖タンパク分子にヒト胎盤増殖因子 (PLGF) のヘパリン親和性モチーフを導入することで HEPO の合成を行った。HEPO は組織外マトリックスおよび血管内皮への特異的結合性をもち、長期作用型の EPO 徐放製剤として利用できる可能性がある。また血管内皮親和性により、EPO の血管・細胞保護作用に有用な特性が付加されることを期待した。

- (4) 下図のごとく精製したヒト HEPO (rhHEPO) はヘパリン親和性を示した (Drug Deliv 2012)。またヘパリンに結合した状態でも EPO 活性を保持しており、EPO 依存性細胞株 (AS-E2 細胞株) を用いた in vitro の造血活性は rhEPO とほぼ同等であった。正常マウスに投与して造血作用を観察したところ、rhEPO では投与開始後 7 日目にヘモグロビン (Hb) 値のピークを迎え、14 日目には低下していたが、rhHEPO では投与開始後 14 日目でも Hb の増加傾向がみられた (長期作用性)。

Heparin affinity of EPO derivatives



2. 研究の目的

- (1) rhHEPO の長期造血活性作用の機序を評価し、より有効な投与方法の検討を行う。
- (2) rhHEPO の組織・血管内皮親和性および血管増殖抑制作用の詳細な解析を行う。
- (3) rhHEPO の安定発現株 (Stable Transfectant) を樹立し、恒久的な rhHEPO の収穫を図る。

3. 研究の方法

- (1) 安定発現株 (Stable Transfectant) の作成と大量培養系および蛋白精製系の確立
 - ・ヒト特有の糖鎖構造の重要性を踏まえ、現在のバキュロウイルス・昆虫細胞系からヒト細胞株による発現系を作成する。
 - ・Tet-On/Tet-Off Advanced Systemを利用して安定発現株 (Stable Transfectant) を樹立する。
 - ・オービタルシェイカーフラスコを用いた浮遊細胞培養系を確立し、大量培養を行う。
 - ・ヘパリンカラムによる精製手法を確立し本新薬の安定生産を開始する
- (2) In vitroにおける生物学的特性の解析

・ In vitro造血活性の検討にはAS-E2 (EPO依存性白血病細胞株) を用いる。

・ In vitro血管内皮作用の検討では血管新生キットを用いる。

(3) In vivo動物治療モデル実験

・造血活性および血管内皮保護作用の検討は、マウス下肢虚血治療モデルを用いる。

・さらに、微小血管障害の治療モデル作成のための基礎検討を行う。

・モノクローリン誘発ラット肺血管障害モデルは既に作成しているが、新たなマウス肺血管障害モデルの開発や安定した作成のための基礎検討を行う。

4. 研究成果

(1) rhHEPOのEPO活性の検討

(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)
ヘパリンアガロースゲルを十分に洗浄したのちPBSに浮遊させた。EPOおよび各種EPO誘導体を含む溶液に上記のゲル浮遊液を加え、一夜静置した。それぞれ十分に洗浄し、培養液に浮遊させたのち、AS-E2細胞を加えて5日間培養し、細胞数を測定した。

EPOおよび各種EPO誘導体のAS-E2増殖活性を検討した。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) rhHEPOのin vitro造血活性の検討

rhHEPOのin vitro造血活性力価を比較するため、AS-E2細胞にrhEPOまたはrhHEPOを添加し、4日間培養して細胞数を測定した。

その結果、rhEPOと同様にrhHEPO添加においても、AS-E2細胞は濃度依存性の増殖を示した。

(3) rhHEPOのin vivo造血活性の検討

健常マウスの左下肢大腿部に、rhEPOまたはrhHEPOをdays 0, 2, 4に筋注し、day 7に採血を行った群とday 14に採血を行った群で検血データの比較を行った。
rhEPO投与群では7日目に赤血球造血のピークがあり、14日目には既に低下していた。

一方、rhHEPO投与群では14日目でもさらに赤血球造血活性の上昇がみられた。
この結果から、rhHEPOは長期作用型のEPO

徐放製剤となる可能性が示唆され、今後さらに投与方法や評価日数の検討を行う予定である。

(4) rhHEPOのin vivo血管新生阻害活性の検討

マウスに麻酔を施行したのち、左下肢の中間部に皮膚切開を加え、血管を露出。大腿動脈起始部を結紮したのち、その末梢の伏在動脈を結紮し、その他の側枝を剥離して本管とともに切除。

rhEPOまたはrhHEPOを虚血下肢筋肉内に投与し、レーザードップラで下肢血流測定を行った。

rhEPO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た。

今回の研究期間中に、使用してきた血管新生キットが製造中止となり、in vitroにおける血管新生阻害の作用機序を評価、検討することができなくなった。

今後、新たな測定系を確立し、さらなる検討を加えることで、rhHEPOの血管新生阻害剤 (抗腫瘍剤) としての臨床応用を推進する。

(5) rhHEPO糖鎖のヒト化および安定発現株 (Stable Transfectant) の樹立

rhHEPOのヒト細胞株の発現系への移行は可能であったが、蛋白の収量が低下してしまう。

その点を補うために安定発現株 (Stable Transfectant) の樹立を試みたが、残念ながら今回の研究期間には実現できなかった。

今後引き続き手法を変えて検討していく予定である。

(6) rhHEPOの臨床応用

rhHEPOは特許化されている。

今後は基礎検討を行いつつ、他施設やパートナー企業との連携を含め、研究の拡大を推進していく必要がある。

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 16 件)

1. Moriyama M (8 番目、他 15 名) Relationship between HMGB1 and PAI-1 after allogenic hematopoietic stem cell

- transplantation.** J Blood Med 2016;7:1-4. 査読有
2. Moriyama M (1 番目、他 11 名) Possible involvement of lung cells harboring an abnormal karyotype in the **pathogenesis** of secondary pulmonary alveolar proteinosis. Annals ATS. 2015;8:1251-3. 査読有
 3. Moriyama M (1 番目、他 11 名) A case of pancreatic neuroendocrine **tumors**. Int Canc Conf J. 2015;7:1-4. 査読有
 4. Moriyama M (11 番目、他 17 名) The association of level of reduction of Wilms' **tumor gene 1** mRNA transcript in **bone marrow** and outcome in acute myeloid **leukemia** patients. Leuk Res. 2015;39:667-71. 査読有
 5. Moriyama M (3 番目、他 16 名) Late onset post-transfusion hepatitis E developing during **chemotherapy** for acute promyelocytic **leukemia**. Intern Med. 2015;54:657-61. 査読有
 6. Moriyama M (6 番目、他 8 名) A case of severe **thrombocytopaenia** associated with acute HIV-1 infection. Int J STD AIDS. 2015;3:209-11. 査読有
 7. Moriyama M (7 番目、他 11 名) Manifestations of fulminant CD8 T-cell post-**transplant** lymphoproliferative disorder following the administration of rituximab for lymphadenopathy with a high level of Epstein-Barr Virus (EBV) replication after allogeneic **hematopoietic stem cell transplantation**. Intern Med. 2014;18:2115-9. 査読有
 8. Moriyama M (5 番目、他 7 名) Differentiation of mouse induced pluripotent **stem cells** into alveolar epithelial cells in vitro for use in vivo. Stem Cells Transl Med. 2014;6:675-85. 査読有
 9. 森山雅人 **血栓形成**の最初期段階における病態機序の解明と von Willebrand 因子 (VWF) 関連検査の有用性の検討. 新潟県医師会報. 2014 年 11 月 (Vol. 776, No. 11) 8-10. 査読無
 10. 森山雅人 (1 番目、他 1 名) **肺がん**に対する**抗体療法**. 最新医学社・最新医学. 2014 年 3 月 (Vol. 69, No. 3) 83-92. 査読無
 11. 小澤拓也 体外増幅自己**赤芽球移植**を用いた重症下肢虚血に対する**血管再生治療**新潟医学会雑誌 2014;128:574-6. 査読無
 12. Moriyama M (10 番目、他 13 名) Successful treatment of severe newly diagnosed immune **thrombocytopenia** involving an alveolar **hemorrhage** with combination therapy consisting of **romiplostim, rituximab** and **vincristine**. Intern Med. 2013;52:1239-42. 査読有
 13. Ozawa T (4 番目、他 7 名) **Erythropoietin** induces **angiogenesis** in a manner dependent on the intrinsic auto/paracrine production of interleukin-6 in vitro. Int J Cardiol. 2013;168:2941-3. 査読有
 14. Ozawa T (7 番目、他 12 名) **Asialoerythropoietin** exerts stronger **angiogenic** activity than **erythropoietin** via its binding affinity to tissue. Cardiovasc Drugs Ther. 2013;27:117-24. 査読有
 15. Ozawa T (4 番目、他 7 名) . Effects of **erythropoietin** administration on iron status in patients with ST-elevation myocardial **infarction** who underwent successful percutaneous coronary intervention. Int J Cardiol. 2013;167:1644-5. 査読有
 16. Ozawa T (4 番目、他 10 名). Serum ferritin levels adversely affect cardiac function in patients with ST-elevation **myocardial infarction** who underwent successful percutaneous coronary intervention. Int J Cardiol. 2013;167:286-8. 査読有
- [学会発表] (計 6 件)
1. 森山雅人 (1 番目、他 8 名) Efficacy of **interferon-alpha** treatment for Erdheim-Chester disease. 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2015 年 7 月 16 日. 札幌市教育文化会館 (北海道・札幌市)
 2. 森山雅人 (1 番目、他 19 名) 妊娠を契機

に診断された **Upshaw-Schulman 症候群** 症例における第二子妊娠の周産期管理. 第 37 回日本血栓止血学会学術集会. 2015 年 5 月 22 日. 甲府市総合市民会館 (山梨県・甲府市)

3. 森山雅人 (2 番目、他 13 名) **同種造血幹細胞移植**における血清蛋白と**発熱・炎症反応**との関連性の検討. 第 37 回日本造血幹細胞移植学会総会. 2015 年 3 月 7 日. 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
4. 森山雅人 (2 番目、他 8 名) Effect of TPO receptor agonist for **impairment of hematopoiesis** after cord blood transplantation. 第 74 回日本血液学会学術集会. 2014 年 11 月 1 日. 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
5. 森山雅人 (1 番目、他 13 名) **同種造血幹細胞移植**における血清蛋白と**発熱・炎症反応**との関連性の検討. 第 36 回日本造血幹細胞移植学会総会. 2014 年 3 月 8 日. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)
6. 森山雅人 (1 番目、他 8 名) Extensive prolongation of **APTT** in a patient with **malignant** fibrous histiocytoma (MFH). 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 23 日. ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

小澤 拓也 (OZAWA, Takuya)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号 : 70467075

(3) 連携研究者

該当者なし