

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750149

研究課題名(和文) 配置を精密に制御した高分子量ヘモグロビン集合体(人工酸素運搬体)の創製

研究課題名(英文) Synthesis of aligned megadalton hemoglobin assembly as artificial oxygen carrier

研究代表者

松平 崇 (Matsuhira, Takashi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20570998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新しい分子構造を持つ人工酸素運搬体の創製を目指し、赤血球から単離したヘモグロビン(Hb)を四分岐PEGの末端に結合させ、複数のHbが精密に配置、分子間架橋された高分子量Hb集合体(aligned megadalton Hb; AM-Hb)を合成した。人工酸素運搬体としての性質を各種物性測定により評価したところ、合成されたAM-Hbは架橋剤の鎖長に依存した分子サイズを持つことが確認され、赤血球、Hb溶液、Hbベシクルに比べて高い粘度と高い酸素親和性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：There have been many attempts to make artificial oxygen carriers based on the modification of isolated hemoglobin (Hb). In these attempts, artificial oxygen carrier realizes improved characteristics, avoiding infection, no blood type, and longer shelf life than red blood cells (RBC). In this work, novel large-sized Hb assembly (aligned megadalton Hb; AM-Hb) was synthesized by intermolecular crosslinking of Hbs with 4-armed polyethylene glycol (PEG) to prevent extravasation.

The physicochemical properties as oxygen carrier was evaluated for AM-Hb. The molecular size of AM-Hb depends on the molecular weight of PEG linker. AM-Hb has larger viscosity and larger oxygen affinity than those of RBC, Hb, and Hb vesicles.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：人工臓器学 血液代替物 高分子 ヘモグロビン

1. 研究開始当初の背景

輸血用赤血球の保存期間が3週間と短いことは、現行の献血 - 輸血システムにおける最重要課題の一つである。この問題の解決のため、ヘモグロビン(Hb)を原料とした人工酸素運搬体が研究されているが、遊離したHbは内因性のNOやCOを捕捉して、血管収縮などの重篤な副作用を示す。報告者のグループは、Hbをリポソームに封入したHbベシクルの研究において「粒子径」が血管活性の有無を決定する極めて重要な因子であることを明らかにしている。そこで、架橋により分子サイズを精密に制御することができれば副作用を回避できると考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、新しい分子構造を持った人工酸素運搬体の創製を目的とし、Hbの配置を精密に制御した高分子量Hb集合体(aligned megadalton Hb; AM-Hb)を合成した。AM-Hbについて物理化学的性質の測定を行い、人工酸素運搬体としての性能を評価した。

3. 研究の方法

Hbと結合する活性基を末端に導入した、四分岐ポリエチレングリコール(PEG)を用いてHb同士を架橋し、数種類のAM-Hbを得た。得られたAM-Hbについて物性測定を行い、分子量、粒子径、粘度、酸素親和性、協同性などの情報を、Hb溶液、Hbベシクル、血液と比較した。

4. 研究成果

(1) AM-Hbの合成および精製方法の確立

本研究は研究協力者である酒井宏水(奈良県立医科大学、医学部教授)より、専門的知識の提供を受けて遂行した。加熱処理とナノフィльтраクションにより感染源を排除した高純度Hbを原料として用いた。末端にHbと結合する活性基を持つ四分岐PEGと過剰量のHbを、温和な条件下で反応させることで、配置を制御しつつ、Hbの劣化を最小限に抑えな

がら架橋反応を進行させることに成功した。また、残留した原料などの不純物を、塩析、透析、濃縮により除去し、AM-Hbの精製方法を確立した。

化学修飾された部位(架橋部位)を確認するために電気泳動法による分析を行ったところ、Hb四量体構造のうち、β鎖と呼ばれるサブユニットが選択的に化学修飾されていることが確認された。

(2) サイズ排除クロマトグラフィー

鎖長が異なる2種類のPEGを用いて合成されたAM-Hbのサイズ排除クロマトグラフィー(size exclusion chromatography; SEC)の結果を図1に示す。合成されたAM-Hbは原料Hbが除去されていることが確認された。またAM-Hb-1とAM-Hb-2は、それぞれが極めて狭い分子量分布を持ち、かつPEGの鎖長に依存して分子サイズが異なることが明らかになった。

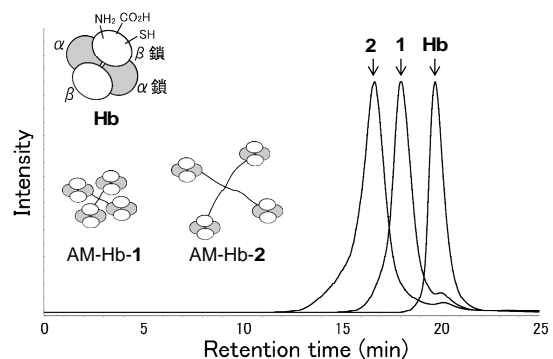


図 1. 鎖長が異なる架橋剤を用いて合成された、AM-Hb-1 と AM-Hb-2、および原料 Hb のサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)の比較。

(3) 人工酸素運搬体としての性質の評価

酸素親和性を評価するため、AM-Hb-1の酸素結合解離曲線(oxygen equilibrium curve; OEC)を測定した。その結果、AM-Hb-1の50%飽和酸素分圧(P_{50})は、原料Hb、Hbベシクル、血液(赤血球)と比べて小さい値であり、酸素親和性が増大していることが明らかになった。一方で、OECにおけるヒル係数の値から、AM-Hb-1ではサブユニット間の協同性が低

下していることが明らかになった。

また、粘度測定の結果、AM-Hb-1の粘度はHb、Hbベシクル、血液(赤血球)に比べて、著しく高い値を示した。

(4) まとめ

Hb の配置を精密に制御しつつ分子間架橋された構造を持つ、高分子量 Hb 集合体 (AM-Hb)の合成及び精製方法を確立し、人工酸素運搬体としての性質を評価した。得られた AM-Hb は、架橋剤の鎖長に依存した分子サイズと、極めて狭い分子量分布を持ち、Hb、Hb ベシクル、血液に比べて高い酸素親和性と粘度を示すことが明らかとなった。この結果より、AM-Hb は、赤血球とは異なる特性を持つ酸素運搬体として利用できると考えられる。

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 2 件)

Shigeyoshi Osaki, Keizo Yamamoto, Takashi Matsuhira and Hiromi Sakai, The effects of seasonal changes on the molecular weight of *Nephila clavata* spider silk, *Polymer Journal*, **48**, 659-663, 2016.

査読有り

DOI: 10.1038/pj.2015.138

Takashi Matsuhira and Shigeyoshi Osaki, Molecular weight of *Nephila clavata* spider silk, *Polymer Journal*, **47**, 456-459, 2015.

査読有り

DOI: 10.1038/pj.2015.10

[学会発表](計 6 件)

松平崇, 山田孫平, 久禮智子, 山本恵三, 酒井宏水, 四分岐PEG鎖で分子間架橋されたヘモグロビン集合体の合成と性質,

日本化学会 第97春季年会, 2017年, 横浜.

山田孫平, 久禮智子, 松平崇, 山本恵三, 酒井宏水, 抗酸化機能を向上したヘモグロビンを有する人工赤血球, 日本化学会 第97春季年会, 2017年, 横浜.

山田孫平, 久禮智子, 松平崇, 山本恵三, 酒井宏水, ヘモグロビンの自動酸化を抑制させた人工赤血球, 日本薬学会 第137年会 (仙台), 2017年, 仙台.

Takashi Matsuhira, Shigeyoshi Osaki, Effects of UV Rays upon Spider Silk, The 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC2014), 2014, Tsukuba.

松平崇, 大崎茂芳, 紫外線はクモの糸にどのような影響を与えるのか?, 第63回高分子討論会, 2014年, 長崎.

松平崇, 山本恵三, 大崎茂芳, クモの糸の分子量の季節依存性, 第60回高分子研究発表会 (神戸), 2014年, 神戸.

[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]

ホームページ等

http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/profile_matsuhira.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松平 崇 (Takashi MATSUHIRA)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20570998

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
酒井 宏水 (Hiromi SAKAI)