

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01367

研究課題名(和文) 高分子鎖を介して多重連結されたヘモグロビン集合体の合成と体内酸素運搬機能の評価

研究課題名(英文) Synthesis and in vivo characterization of polymer-multilinked 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：輸血用赤血球の代替となり得る人工酸素運搬体を創製することを目的として、生体適合性高分子を介して多重連結されたヘモグロビン(Hb)集合体(polymer-multilinked Hb assembly; PML-Hbs)を合成し、性質を調べた。Hbの2<sub>2</sub>四量体構造のうち、2つの鎖を鎖状の高分子の両端と結合させて環状モノマーを合成し、続いてHbのサブユニットの交換平衡を介して開環重合させることにより、超分子構造を持つPML-Hbsを得た。架橋剤を用いてPML-Hbsの構造を固定したところ、大きな分子サイズを持ち、可逆的に酸素を結合解離する、赤血球代替物として有望なHbポリマーが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hbを重合することで人工酸素運搬体を作製する試みは過去に多数の報告があり、特に欧米において、ヒトへの投与を目指し研究が進められている。しかし、ランダム重合Hbは重合度が小さい上に分子量分布が広く、低分子量の成分が血管壁を透過して発現する副作用が問題となる。

本研究のように修飾Hbを単量体とみなして超分子重合する方法により得られるPML-Hbsは、決まった長さの高分子によりHb同士が連結されているためHbを規則的に配置でき、重合度の調節も可能であるなど、従来法に比べ多くの長所を有する。本研究で得られた知見は、既存のランダム重合法の副作用の問題を解決する糸口になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Various chemical modifications of hemoglobin (Hb) have been investigated to produce artificial oxygen carriers for use as red blood cells (RBC) substitutes. An Hb molecule has a stable 2<sub>2</sub> tetrameric structure which dissociates reversibly into two dimers. In this work, we developed an efficient procedure to produce polymer-multilinked Hb assembly (PML-Hbs). We first synthesized a cyclic Hb monomer whose two subunits were connected through a polyethylene glycol (PEG) chain. During the inter-molecular exchange of subunits, the cyclic Hb monomer proceeded supramolecular ring-opening polymerization to produce a linear PML-Hbs. Hb units in the PML-Hbs were subsequently fixed covalently by site-specific cross-linking between two subunits. The fixed PML-Hbs is a promising material for use as a RBC substitute, because it has a quite large molecular size (molecular weight of ca. 1,000,000) to prevent the extravasation, with showing reversible oxygen binding.

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 高分子科学 超分子化学 ヘモグロビン 解離平衡 架橋

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在用いられている輸血用赤血球は、異なる血液型を持つ患者への輸血ができない、長期保存ができない、感染源混入の可能性がある等の問題を抱えている。これらを解決するため、赤血球から単離したヘモグロビン(Hb)に重合等の化学修飾を行い、人工的に赤血球代替物(人工酸素運搬体)を作り出す試みが行われてきた。しかしながら、重合Hbを血管内に投与した場合、血管収縮が起こり、血圧の異常亢進や心筋梗塞などの重篤な副作用が引き起こされる(Natanson et al., *JAMA* 2008)。これまでの研究により、修飾Hbの粒子径が副作用を抑制する上で重要な要素であることが、動物投与試験で明らかにされた(Sakai et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000)。赤血球(8,000 nm)に比べて粒子径が非常に小さいHb (7 nm)は、直径約50 nm程度の血管内壁の孔を透過して血管弛緩因子であるNOやCOと結合し、副作用を示す。既存のランダム重合法により得られる重合Hbは原料Hbより大きな粒子径(平均47 nm)を持つが、平均重合度が低く分子量分布も広いいため、低分子量の成分が血管壁を透過して副作用を発現していると考えられる。この副作用を抑制するために、化学構造や重合反応の制御が可能な新しいHb重合法の開発が待望されていた。

### 2. 研究の目的

既存の重合Hbは、Hbの表面に低分子の架橋剤をランダムに反応させることにより合成されている。本研究では、決まった形状の高分子架橋剤を用いてHb同士を部位選択的に多重連結すれば、化学構造が制御されたHb集合体(polymer-multilinked hemoglobin assembly; PML-Hbs)が得られると考えた。一方、最近になって、ポリエチレングリコール(PEG)で修飾されたHbと未修飾Hbとの間で高濃度、生理学的条件下でも $\alpha\beta$ サブユニットの交換反応が容易に進行すること、また、Hbの $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造を固定する架橋剤(bis-(3,5-dibromosalicyl) fumarate; DBBF)がPEG修飾Hbに対しても同様に作用することが、予備的検討から明らかとなった。この知見を基に、本研究ではループ状にPEG修飾されたHbを単量体とみなし、サブユニット交換反応を介した開環重合によりPML-Hbsを合成する方法を見出した。PML-Hbsは濃度依存の解離平衡の状態にあることが明らかとなったため、PML-Hbs中の $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造を固定化(fixing)して得られる重合Hb (fPML-Hbs)について、人工酸素運搬体としての性質を明らかにすることを研究の目的と定めた。

### 3. 研究の方法

#### (1) HbのPEG修飾

活性基を片方の末端に導入したPEGをHbと反応させ、2つの $\beta$ 鎖の決まった部位(Cys-93( $\beta$ ))が選択的にPEG化された修飾Hb (PEG<sub>2</sub>-Hb, Fig. 1)を合成した。同様に、両末端に活性基を持つPEGをHbと反応させ、環状構造を持つHbモノマー(cyclic monomer; cm-Hb, Fig. 3)を合成した。

#### (2) サブユニット交換平衡の定量分析

Hbの $\alpha_2\beta_2$ 四量体は、結合解離平衡を介して $\alpha\beta$ サブユニットを分子間で交換する、平衡状態にある。架橋剤(DBBF)を反応させることで、交換平衡の比率を保持しつつ $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造を固定し、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により定量的な解析を行った。

#### (3) fPML-Hbsの合成と性質

cm-Hbを濃縮すると、分子間で $\alpha\beta$ サブユニットの交換反応が進行し、非共有結合性の相互作用により超分子的にポリマー化した、PML-Hbsを形成する。PML-HbsにDBBFを作用させることで超分子ポリマー構造を固定化し、共有結合でつながった重合Hb (fPML-Hbs)を得た。fPML-Hbsについて、分子量、粒子径、酸素親和性、協同性など人工酸素運搬体としての性質を調べ、Hb溶液と比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 未修飾HbとPEG修飾Hbとの $\alpha\beta$ サブユニット交換反応

生理的条件下において、Hbの結合解離平衡( $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta$ )は98%以上が安定な四量体のほうに偏っており、容易には解離しないと考えられていた。しかしながら、合成したPEG<sub>2</sub>-Hbに

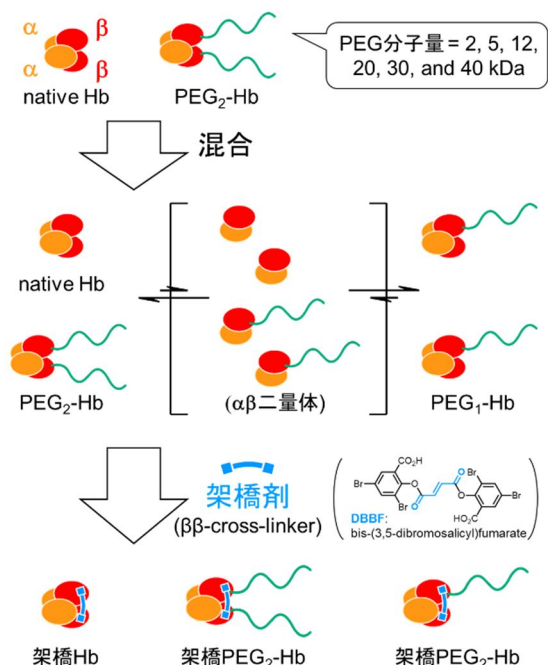


Fig. 1 未修飾 Hb (native Hb)と PEG 修飾 Hb (PEG<sub>2</sub>-Hb)を混合すると、 $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造の解離平衡を経由して交換反応が進行し、PEG<sub>1</sub>-Hb が生成する。本研究では、架橋剤(DBBF)を反応させて生成物の比率を調べること、平衡状態の定量的な解析を行った。

未修飾Hbを混合して架橋剤(DBBF)を反応させ、SECにより生成物を分析した結果、サブユニット交換反応によりPEGが1本だけ結合したPEG<sub>1</sub>-Hbが生成していることが確認された(Fig. 1)。この実験事実は、Hbは安定な四量体構造を保ちながらも、解離平衡を経由してサブユニット交換反応が容易に進行することを意味している。

PEGの分子量と、混合するHb種の濃度比を変えて同様の実験を行い、PEG<sub>1</sub>-Hbの濃度の二乗([PEG<sub>1</sub>-Hb]<sup>2</sup>)を、PEG<sub>2</sub>-Hbと未修飾Hbの濃度の積([PEG<sub>2</sub>-Hb][native Hb])に対してプロットした(Fig. 2)。傾きがサブユニット交換平衡(PEG<sub>2</sub>-Hb + native Hb ⇌ 2 PEG<sub>1</sub>-Hb)の平衡定数(K<sub>eq</sub>)に相当する。PEGの分子量が大きくなるほどK<sub>eq</sub>が増大し、交換反応をしやすくなることが分かった。

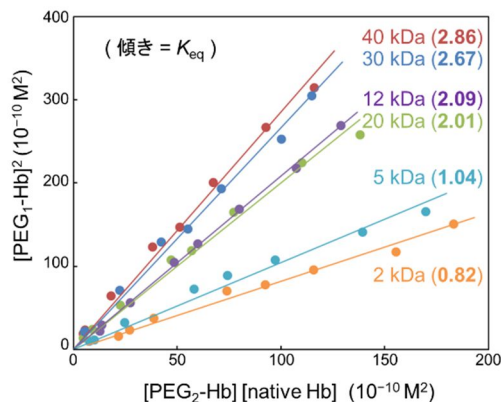


Fig. 2 交換反応により生成したPEG<sub>1</sub>-Hbの濃度の二乗([PEG<sub>1</sub>-Hb]<sup>2</sup>)と、PEG<sub>2</sub>-Hbと未修飾Hbの濃度の積([PEG<sub>2</sub>-Hb][native Hb])の関係。分子量2 kDa ~ 40 kDaまで異なる長さのPEGを用いた結果を比較し、傾きから得られる交換反応の平衡定数(K<sub>eq</sub>)を括弧内に示す。

このように、分子内架橋によりサブユニット交換平衡を固定し、定量的に分析する手法を確立したことは、次のPML-Hbs合成とその固定化を行う手法の開発につながった。本研究の成果は、次の論文として発表された。Matsuhira et al., Analysis of dimeric αβ subunit exchange between PEGylated and native hemoglobins (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub> tetramer) in an equilibrated state by intramolecular ββ-crosslinking. *Biomacromolecules* 19(8), 3412-3420 (2018)

## (2) cm-Hbの開環重合によるPML-Hbsの合成と、架橋による超分子ポリマー構造の固定化

両末端官能性のPEGとHbを1:1で反応させて、環状Hbモノマー(cm-Hb, Fig. 3)を合成した。合成したcm-Hbについて、動的光散乱法(DLS)により得られる粒子径分布の濃度依存性をFig. 4に示す。モノマー濃度の上昇に伴い平均粒子径が増大していることから、cm-Hbは分子間サブユニット交換反応により超分子開環重合し、高分子量のPML-Hbsを形成していることが示唆された。

高濃度で形成されたPML-HbsのHbユニットを架橋剤(DBBF)により固定し、重合Hb (fPML-Hbs)を合成した。カラム精製されたfPML-HbsのSEC分析の結果を、原料のcm-Hbと並べてFig. 5に示す。cm-Hbの分子量が75,000であるのに対し、分子量校正曲線を用いて算出されたfPML-Hbsの平均分子量は約1,000,000と、13量体を超える平均重合度を示した。また、得られたfPML-HbsはHbとPEGが交互に繰り返し結合した配列を持つことが、電気泳動法により確認された。

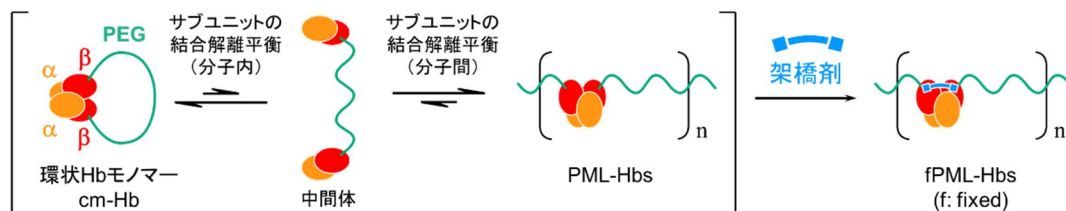


Fig. 3 環状 Hb モノマー(cyclic monomer; cm-Hb)はサブユニット交換平衡を介して超分子開環重合し、高分子により多重連結された Hb 集合体(PML-Hbs)を生成する。低濃度ではモノマー構造が、高濃度ではポリマー構造が支配的になる。架橋剤(DBBF)を用いて PML-Hbs に含まれる Hb ユニットを固定することにより、重合 Hb (fPML-Hbs)が合成される。

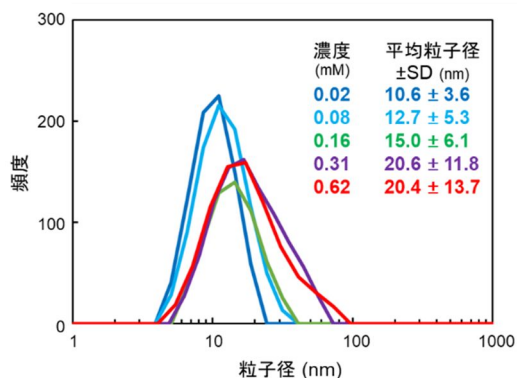


Fig. 4 動的光散乱法(DLS)による cm-Hb の粒子径分布の濃度依存性。濃度増大に伴い平均粒子径が増大している。

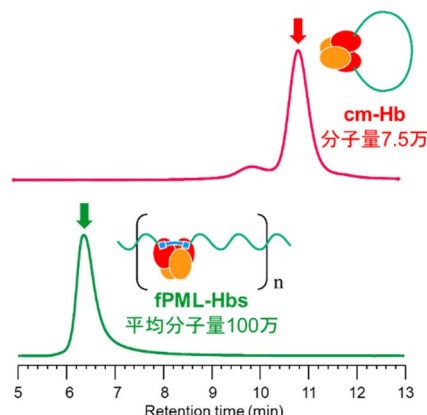


Fig. 5 cm-Hb と fPML-Hbs の SEC 分析。開環重合により平均重合度が>13の重合 Hb が得られる。

### (3) 人工酸素運搬体としての性質

酸素結合解離曲線(oxygen equilibrium curve; OEC)測定により求められる50%飽和酸素分圧( $P_{50}$ )を比較すると、cm-Hb (5.5 Torr)とfPML-Hbs (5.2 Torr)は未修飾Hb (8.2 Torr)と比べて低い値を示したことから、化学修飾が酸素親和性を増大させることが明らかになった。一方、協同性を表すHill係数の値は、Hb (2.2)、cm-Hb (1.5)、fPML-Hb (1.1)の順に小さくなっており、化学修飾する箇所が増えるほどHbのサブユニットの動きが制限され、協同性が低下することが明らかになった。

粒子径は人工酸素運搬体の血管活性を決定づける重要な因子である。DLS測定の結果、fPML-Hbの粒子径は $97\pm 45$  nmであり、高い重合度を反映して従来の重合Hbより大きな粒子径を示した。この値は血管内壁の孔に比べて十分に大きいと評価できる。本研究の成果は、次の論文として発表された。Matsuhira et al., Ring-opening polymerization of hemoglobin. *Biomacromolecules* 20(4), 1592-1602 (2019).

### (4) まとめ

超分子開環重合の手法を用いて、高分子により多重連結されたHb集合体(PML-Hbs)を合成する方法を確立し、続いてHbユニットを架橋して得られるfPML-Hbsについて、人工酸素運搬体としての性質を評価した。fPML-Hbsは、未修飾Hbに比べて高い酸素親和性を示し、従来のランダム重合Hbに比べて大きい粒子径を持つことが明らかとなった。この結果より、fPML-Hbsは赤血球とは異なる酸素親和性を持ち、従来の重合Hbより血管外漏出が起こりにくい人工酸素運搬体として利用できると思われる。

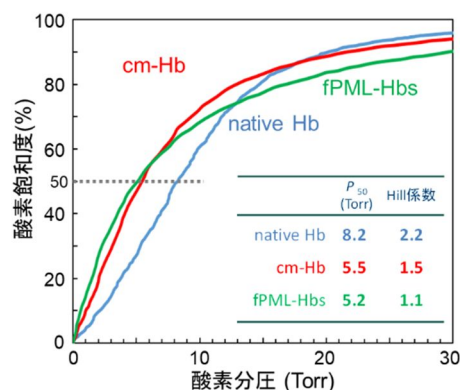


Fig. 6 未修飾 Hb、cm-Hb、fPML-Hb の酸素結合解離曲線。修飾 Hb は未修飾 Hb に比べ、高い酸素親和性を示した。



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 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Matsuhira, Keizo Yamamoto, Hiromi Sakai	4. 巻 20(4)
2. 論文標題 Ring-opening polymerization of hemoglobin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 1592-1602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.8b01789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Matsuhira, T. Kure, K. Yamamoto, H. Sakai	4. 巻 19(8)
2. 論文標題 Analysis of dimeric subunit exchange between PEGylated and native hemoglobins ( 2 2 tetramer) in an equilibrated state by intramolecular -crosslinking.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 3412-3420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.8b00728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Takashi MATSUHIRA, Keizo YAMAMOTO, Hiromi SAKAI
2. 発表標題 Supramolecular Ring-Opening Polymerization of Hemoglobin and Subsequent Fixation Using Site-Specific Cross-Linking within 2 2 Tetramers
3. 学会等名 The 17th International Symposium of Blood Substitutes & Oxygen Therapeutics (XVII-ISBS-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi MATSUHIRA, Keizo YAMAMOTO, Hiromi SAKAI
2. 発表標題 Quantification of Hybrid 2 2 Tetramer Formed by Spontaneous Exchange of Dimeric Subunits between PEGylated and Native Hemoglobins Using Intra-Molecular Cross-Linking
3. 学会等名 The 17th International Symposium of Blood Substitutes & Oxygen Therapeutics (XVII-ISBS-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi MATSUHIRA, Keizo YAMAMOTO, Hiromi SAKAI
2. 発表標題 Covalent Fixing of Supramolecular Hemoglobin Polymer Using Site-Selective Intra-Molecular Subunit Cross-Linking
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松平崇、山本恵三、酒井宏水
2. 発表標題 環状ヘモグロビンモノマーの超分子閉環重合における環サイズの影響
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松平 崇・久禮 智子・山本 恵三・酒井 宏水
2. 発表標題 ヘモグロビンとPEG 修飾ヘモグロビンのサブユニット交換平衡
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会 (2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Matsuhira, Keizo Yamamoto, and Hiromi Sakai
2. 発表標題 Ring-opening polymerization of loop-PEGylated hemoglobin
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Matsuhira, Keizo Yamamoto, and Hiromi Sakai
2. 発表標題 Physicochemical characterization of poly-(PEG-hemoglobin) produced by ring-opening polymerization
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松平 崇、久禮 智子、山本 恵三、酒井 宏水
2. 発表標題 化学修飾ヘモグロビンの サブユニット交換反応
3. 学会等名 日本血液代替物学会 第25回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Matsuhira, Keizo Yamamoto, and Hiromi Sakai
2. 発表標題 Ring-opening Polymerization of Hemoglobin Using its Reversible Association-Dissociation Equilibrium of 2 2 Subunits
3. 学会等名 The International Symposium for Materials Scientists "Inspiration for Innovation by Interaction" (ISMS-III) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松平 崇、山本 恵三、酒井 宏水
2. 発表標題 分子間架橋したヘモグロビン集合体の作製と人工酸素運搬体としての性質
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第12回若手研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Matsuhira, Keizo Yamamoto, Hiromi Sakai
2. 発表標題 Reactivity of Cys beta93 of native and beta-crosslinked Hbs
3. 学会等名 60th Anniversary of Artificial Cell in conjunction with XVI ISBS International Symposium Blood Substitutes & Oxygen Therapeutics V ISNS Nanomedicine Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takashi Matsuhira, Keizo Yamamoto, Hiromi Sakai	4. 発行年 2020年
2. 出版社 World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore	5. 総ページ数 in press
3. 書名 Nanobiotherapeutics Based Blood Substitutes, Eds. T.M.S. Chang, J. Jahr, H, Sakai	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ヘモグロビンの サブユニット交換反応  <a href="http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/invest_modify_Hb.html">http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/invest_modify_Hb.html</a>          奈良県立医科大学 化学教室  <a href="http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/">http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/</a></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
研究分担者	酒井 宏水  (Sakai Hiromi)  (70318830)	奈良県立医科大学・医学部・教授   (24601)	