

令和 5 年 3 月 30 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08461

研究課題名(和文)台湾ハブ毒由来血栓溶解剤の開発

研究課題名(英文)Development of Tiwan Habu-derived clot-busting agent

研究代表者

石田 功 (ISHIDA, Isao)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：00415556

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)：ガラガラヘビ毒由来メタロプロテアーゼ断片(Alfimeprase)は、強力なフィブリン塊分解活性をもつが出血活性はもたず、且つrtPA(組換え組織型プラスミノゲンアクティベータ)のような副作用が予想されないため、米国で血栓溶解剤として臨床開発された。しかし、生理的条件下において、Alfimepraseは血清中の $\alpha$ -2-macroglobulin ( $\alpha$ -2M)により不可逆的、且つ迅速に不活性化されるため、期待された血栓溶解効果は見られなかった。本研究では、Alfimepraseのホモログである台湾ハブ毒由来タンパク質TM3(Fibrinlysin)に着目し、研究を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血栓症は、我が国においても欧米と同様に、罹患率・死因率の高さはトップクラスであり、その予防、治療に関する研究の注目度は非常に高い。血管の梗塞部位の解除には、組換え組織プラスミノゲン活性化因子(rtPA)の静脈注射は効果的であるが、血中プラスミン産生による補体の活性化、血小板凝集促進による副作用が問題となる。フィブリン塊分解活性を持ち、なおかつ血中で不活性化されず、出血活性を持たないヘビ毒由来タンパク質断片の創製は、有用な血栓溶解剤となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： The rattlesnake-derived metalloprotease-fragment which is referred to as the alfimeprase has strong fibrinolysis activity without hemorrhagic activity and does not show any adverse effect like the rtPA. The alfimeprase went in clinical development, but it was rapidly degraded by the  $\alpha$ -2 macroglobulin in the blood vein, that resulted in no good efficacy. We have focused on the Taiwan habu-derived toxin TM3(fibrinlysin) and developed the research on the clot-dissolving agent.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヘビ毒 フィブリン 血栓溶解剤

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

血栓症は、我が国においても欧米と同様に、その罹患率・死因率の高さはトップクラスであり、その予防、治療に関する研究の注目度は非常に高い。血管の梗塞部位の解除には、組換え組織プラスミノゲン活性化因子（rtPA）の静脈注射は効果的である。また、再狭窄については GPIIb/IIIa 血小板受容体阻害剤により回避が可能とされる。しかしその一方で、この手法は血中プラスミン生成による補体の活性化、血小板凝集促進による副作用が問題となる。

ガラガラヘビ毒由来メタロプロテアーゼ断片（Alfimeprase）は、強力なフィブリン塊分解活性をもつが出血活性はもたず、且つ rtPA のような副作用が予想されないため、米国で血栓溶解剤として臨床開発された。しかしながら、Alfimeprase は、生理的条件下において、血清中の  $\alpha 2$ -macroglobulin（ $\alpha 2M$ ）により、不可逆的に且つ迅速に不活性化されるため、期待された血栓溶解効果が見られず、第2相臨床試験でドロップアウトした。

### 2. 研究の目的

本研究では、Alfimeprase のホモログである台湾ハブ毒由来タンパク質 TM3(Fibrinlysin) に着目した。Fibrinlysin は、フィブリン塊分解活性をもち、 $\alpha 2M$  により不活性化されないが、出血活性をもつという欠点がある。体内における出血活性の発現は、毒タンパク質の活性部位周辺に配置される塩基性アミノ酸残基が、基底膜と結合することにより生じると考えられている。そこで、Fibrinlysin の出血活性を欠損させた変異体タンパク質の作製を行った。実現できれば、新規血栓溶解剤として臨床で利用でき、血栓治療の幅が広がるだけでなく、大きな経済効果を及ぼすと期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) Fibrinlysin 変異体の作製

Fibrinlysin とそのホモログ（Alfimeprase, HR2a など）のアミノ酸配列のマルチプルアラインメントを行い、その結果から、出血活性に関わるアミノ酸残基を推定した。さらに出血活性に関与すると予想されたアミノ酸残基を置換した変異体を設計し、分子モデリングを行い立体構造の変化を評価した。

#### (2) 野生型および変異体 Fibrinlysin 組換えタンパク質の発現

人工合成した変異体遺伝子は、バキュロウイルス発現系 Bac-to-Bac System を用いて、それぞれ組換えタンパク質を発現させ、SDS-PAGE および western blotting により発現確認を行った。

#### (3) N 末端にメリチンシグナルペプチドを付加した Fibrinlysin 組換えタンパク質の作製・発現

組換えタンパク質を分泌タンパク質として得るために、Fibrinlysin 遺伝子の N 末端側に

ミツバチ毒メリチンのシグナルペプチドを付加した遺伝子を設計した (図 1)。



図1 メリチンシグナルペプチドをN末に付加した Fibrinlysin 遺伝子

人工合成遺伝子は、バキュロウイルス発現系 Bac-to-Bac System を用いて Sf9 細胞に形質転換し、それぞれ組換えタンパク質を発現させ、SDS-PAGE および western blotting により発現確認を行った。さらに、カラムクロマトグラフィーにより粗精製した組換えタンパク質は、ヒト正常血液を用いてフィブリン分解活性の確認を行った。

#### (4) Fibrinlysin 前駆体組換えタンパク質の作製・発現

Fibrinlysin 前駆体遺伝子を人工合成し、バキュロウイルス発現系 Bac-to-Bac System を用いて、それぞれ組換えタンパク質を発現させた。(3) と同様に、粗精製した組換えタンパク質は、ヒト正常血液を用いてフィブリン分解活性の確認を行った。

#### 4. 研究成果

Fibrinlysin とそのホモログ (Alfimeprase, HR2a, PMMP-2, PMMP-3) のアミノ酸配列を比較した結果、Fibrinlysin に特徴的である 4 カ所の塩基性アミノ酸残基、R85、R106、R116、K133 を見出した。これら 4 カ所の塩基性アミノ酸残基は、Fibrinlysin の出血活性に関与すると予想された (図 2)。

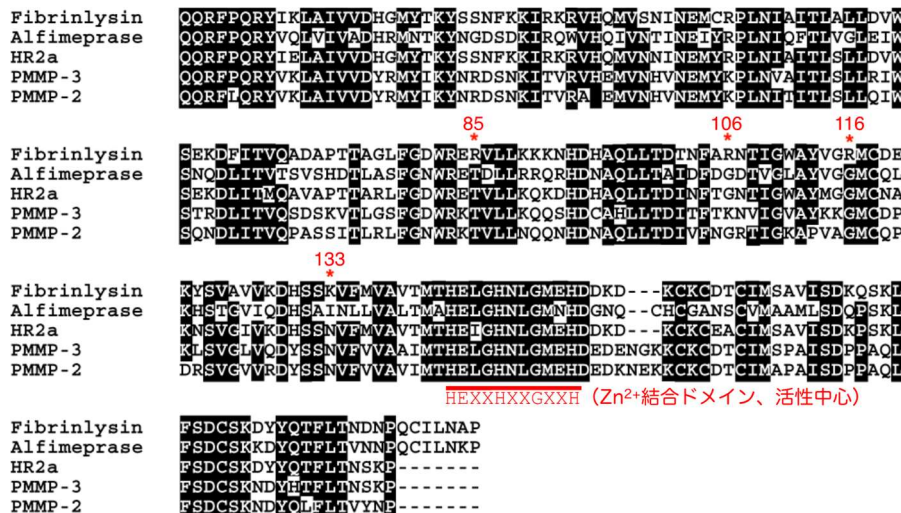


図2 Fibrinlysinと類似タンパク質との比較  
\*は出血活性に関与すると予想される塩基性アミノ酸残基を、赤線はZn<sup>2+</sup>結合モチーフを示している。

その中でも、R106はFibrinlysinの活性中心近傍に配置されていることから、R106のアミノ酸置換は、出血活性だけでなく酵素活性にも影響を及ぼすことが考えられた。そのため、2種類のFibrinlysin変異体、三重変異体 (Mutant1: R85T/R116G/K133N)、および四重変異体 (Mutant2: R85T/R106G/R116G/K133N) を設計した。野生型Fibrinlysinと2種類の変異体の立体構造を分子モデリングにより比較した結果、どちらも野生型との大きな構造の変化、さらに活性中心構造の変化は見られなかった (図 3)。

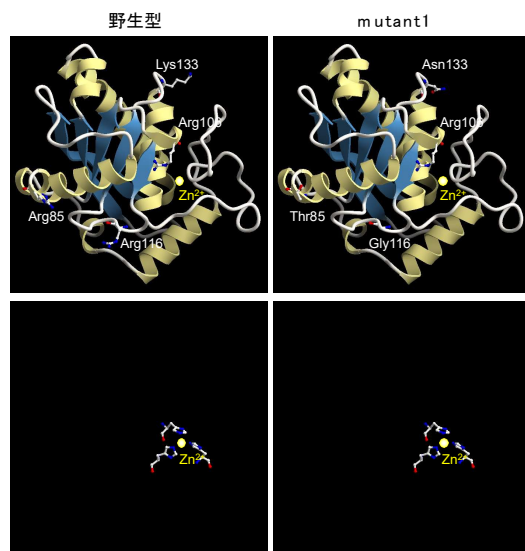


図3 アミノ酸置換によるFibrinlysinの立体構造への影響  
野生型と三重変異体(R85T, R116G, K133N)の立体構造、および活性中心の構造を比較した。

以上のことから、Mutant1、Mutant2 は酵素活性自体に影響を及ぼす可能性は低いと判断し、野生型 (Original)、Mutant1、および Mutant2 の遺伝子を人工合成した。

人工合成した各遺伝子は、バキュロウイルス発現系 Bac-to-Bac System を用いて形質転換し、それぞれ組換えタンパク質を発現させた。しかし、3種類の組換えタンパク質は、膜タンパク質予測プログラム SOSUI により可溶性タンパク質と予想されたにも関わらず、ほとんどが不溶性タンパク質として発現し、Triton X-100 など界面活性剤による可溶化が必要であった (図4)。

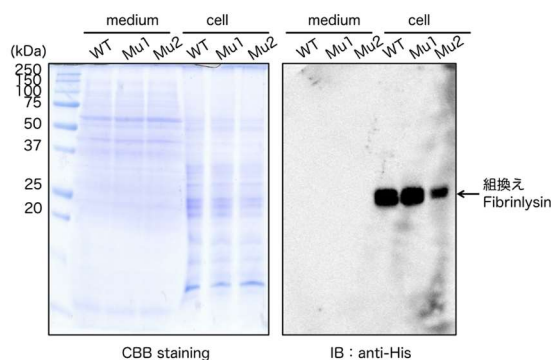


図4 組換えFibrinlysinタンパク質の発現

加えて、これら不溶性タンパク質は、CHAPS、グアニジン塩酸、尿素などでは可溶化できず、1% Triton X-100 で可溶化したサンプルも、透析の段階で目的タンパク質は凝集するなど、透析による界面活性剤、変性剤の除去は難しく、発現タンパク質の Refolding 操作は困難であることが分かった (表1)。

表1 変成剤、界面活性剤を用いた組換えタンパク質の可溶化

変成剤、界面活性剤	溶解
2% SDS	△ (熱処理が必要)
1% TritonX-100	△
1% Tween-20	×
1% CHAPS	×
5% CHAPS	×
6M グアニジン塩酸	×
8M 尿酸	×

目的タンパク質を分泌タンパク質として発現させるために、N末端にミツバチ毒メリチンのシグナルペプチドを付加した遺伝子を設計・人工合成し、バキュロウイルス発現系で組換えタンパク質の発現を行った。その結果、シグナルペプチドを付加した野生型、Mutant1、Mutant2は、可溶性タンパク質として培地中へ分泌されることが確認できた(図5)。しかしながら、一部は不溶性タンパク質として発現していた。可溶性画分は、TALON、DEAE Sepharoseを用いたカラムクロマトグラフィーにより精製を進めた。しかしながら、精製を進めるに伴って、目的タンパク質は不溶化、さらに凝集し精製が困難となった。

一方、粗精製標品ではあるが、ヒト正常血液を用いて3種類の組換えタンパク質のフィブリン分解活性を調べた結果、コントロールと比較して、全てにおいてフィブリン塊の減少が見られた(図6)。

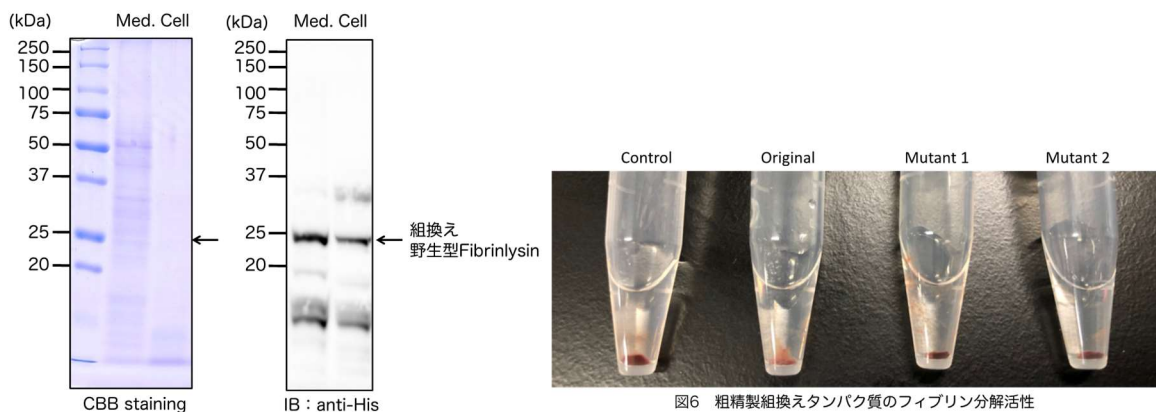


図5 シグナルペプチドを付加した組換えタンパク質の発現

図6 粗精製組換えタンパク質のフィブリン分解活性

Fibrinlysinを含むAlfimepraseホモログタンパク質は、ヘビ体内で前駆体として合成され、翻訳後プロセッシングを受け、分泌タンパク質として機能することが分かっている。Fibrinlysinの遺伝子全長を確認した結果、前駆体のC末端側にFibrinlysinはコードされていることから、前駆体のC末端側にHisタグを付加した遺伝子を人工合成し、バキュロウイルス発現系に導入して各組換えタンパク質の発現を行った。しかしながら、昆虫細胞では前駆体がうまくプロセッシングされず、成熟タンパク質の発現量は微量(約50~100 ng/mL)であった。

また、粗精製標品ではあるが、3種類の組換えタンパク質のフィブリン分解活性を調べた結果、全てにおいてフィブリン分解活性が確認できた。

#### 考察と今後の展開

顕微鏡で目的タンパク質を発現させた宿主細胞を観察すると、多核体は確認できたが、ウイルス感染後期に確認できる宿主細胞の浮遊が見られなかった。Fibrinlysinは毒タンパク質であるため、発現された目的タンパク質が宿主細胞に悪影響を与えることにより、発現効率を低下させている可能性も考えられた。今後、小麦胚芽やウサギ網状赤血球などを用いた無細胞 *in vitro* タンパク質発現系にて、Fibrinlysin変異体タンパク質の発現・精製を試みる。さらに、目的タンパク質の最適な発現条件、精製条件を検討しつつ、Fibrinlysin変異体タンパク質のフィブリン分解活性、出血活性の有無を調べていく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7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 Masafumi Tsujimoto, Kazuma Aoki, Yoshikuni Goto, Atsushi Ohnishi	4. 巻 169
2. 論文標題 Molecular and functional diversity of the oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 409-420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab009.	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 Ohnishi, A, Watanabe, J, Tsujimoto, M	4. 巻 469
2. 論文標題 Importance of Tyr409 and Tyr 414 in constructing the substrate pocket of human aminopeptidase B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecu. Cell. Biochem.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/J.bbe.2019.03.004	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 Shimizu, Y, Isoda, K, Taira, Y, Taira, I, Kondoh, M and Ishida, I	4. 巻 887
2. 論文標題 Anti-tumor effect of a recombinant Bifidobacterium strain secreting claudin-targeting molecule in mouse breast cancer model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur. J. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 173596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j-ejphar.2020.173596	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 Ohno, MK, Kirikae, T, Yohihara, E, Kirikae, E, Ishida, I	4. 巻 -
2. 論文標題 Addition of L-cysteine to the N- or C-terminus of the all-d-enantiomer [D(KLAKLAK)2] increases antimicrobial activities against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii and Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peer J.	6. 最初と最後の頁 10176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.10176	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 山本雅信、大西敦、松本正吾	4. 巻 88
2. 論文標題 ボンピコール産生系におけるフェロモン腺の脂肪滴-その役割と動態制御-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 蚕糸・昆虫バイオテック	6. 最初と最後の頁 109 - 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11416/konchubiotec.88.	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 Tsujimoto Masafumi, Aoki Kazuma, Ohnishi Atsushi, Goto Yoshikuni	4. 巻 43
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 beyond antigenic peptide-processing enzyme in the endoplasmic reticulum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin.	6. 最初と最後の頁 207-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00857	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 I. Taira, Y. Taira, M. Kato, Y. Shimizu, K. Isoda, H. Saitou, I. Ishida	4. 巻 12
2. 論文標題 Reviving previous therapeutics by recombinant anaerobic bifidobacteria. Mini-review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed J Sci & Tech Res	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26717/BJSTR.2019.12.002324	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 Y. Taira, I. Taira, T. Nishikawa, I. Ishida	4. 巻 138
2. 論文標題 Development of an anticancer therapy using recombinant bifidobacterium as a new drug delivery system (DDS).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Yakugaku-Zasshi	6. 最初と最後の頁 923-930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 辻本雅文、青木一真、大西敦、後藤芳邦	4. 巻 91
2. 論文標題 多機能性酵素としての小胞体アミノペプチダーゼERAP研究の20年	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 666-680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大野まき、切替照雄、良原栄策、切替富美子、大西敦、石田功
2. 発表標題 N末端またはC末端にシステインを付加したD-ペプチドの抗菌効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (広島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水芳実、島岡真理亜、中山未希、磯田勝広、平裕一郎、平郁子、斎藤浩美、石田功
2. 発表標題 乳がんに対する組換えピフィズ菌の腫瘍集積性と抗腫瘍効果の評価
3. 学会等名 日本DDS学会学術集会 第36回 (神戸)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 建部卓也、石田功
2. 発表標題 BCG抗原発現がん細胞による抗腫瘍免疫誘導
3. 学会等名 日本薬学会関東支部大会 第64回 (東京)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 建部卓也、石田功
2. 発表標題 BCG抗原とIL-2共発現がん細胞による抗腫瘍免疫の誘導
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水芳実、中山未希、篠原華穂、磯田勝広、平裕一郎、平郁子、斎藤浩美、石田功
2. 発表標題 偏性嫌気性細菌を用いたトリプルネガティブ乳がん治療薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉金正樹、小林綾夏、若菜一成、大西敦、辻本雅文
2. 発表標題 RNPEPL1組換えタンパク質の基質特異性解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水芳実、島岡真理亜、藤岡野々花、磯田勝広、平裕一郎、平郁子、斎藤浩美、石田功
2. 発表標題 組換えピフィズ菌を用いた乳がん治療薬開発に向けた検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋英絵、田上孝平、松田久美、渡部瞭、大西敦、辻本雅文
2. 発表標題 アミノペプチダーゼB変異体の酵素活性及び基質特異性の解析
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋英絵、田上孝平、松田久美、渡部瞭、大西敦、辻本雅文
2. 発表標題 アミノペプチダーゼBの基質特異性の解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西敦、辻本雅文
2. 発表標題 アミノペプチダーゼBの基質特異性解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木下 結賀、佐藤 梨花子、平 裕一郎、平 郁子、清水 芳実、石田 功、磯田 勝広
2. 発表標題 銀ナノワイヤーの薬物相互作用に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 迫田凌太、平裕一郎、平郁子、清水芳実、磯田勝広、斎藤浩美、石田功
2. 発表標題 EPR効果増強剤がピフィズス菌の抗腫瘍効果に与える影響
3. 学会等名 第63回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤雅和、平裕一郎、平郁子、川口愛夏、矢部貴美恵、大野華、小倉祐太、後藤凧、清水芳実、磯田勝広、斎藤浩美、石田功
2. 発表標題 EPR効果増強剤によるピフィズス菌腫瘍内集積数の増大
3. 学会等名 第139回日本薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越後谷美幸、磯田勝広、田中杏樹、藤盛千咲、木下結賀、佐藤梨花子、平裕一郎、平郁子、清水芳実、石田 功
2. 発表標題 金ナノ粒子の薬物相互作用による傷害性の検討
3. 学会等名 第139回日本薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川毅、藤園友里、小出圭悟、平郁子、平裕一郎、石田功
2. 発表標題 がん細胞死誘導活性をもつTRAIL-R1を標的とした新規3価VHH抗体分泌ピフィズス菌の安全性
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本健太、清水芳実、山内友梨奈、平裕一郎、平郁子、磯田勝広、斎藤浩美、石田功
2. 発表標題 CL4指向性抗腫瘍蛋白質を分泌する組換えピフィズス菌の作製
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野まき、良原栄策、切替照雄、西川毅、石田功
2. 発表標題 多剤耐性緑膿菌に対するD-ペプチドと抗菌薬の併用効果
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田功（オーガナイザー）
2. 発表標題 シンポジウムD「DDS研究からの創薬イノベーション」
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西敦、稲生雪菜、瀬田章敏、矢作知佳、辻本雅文
2. 発表標題 RNPEPL1の酵素的性状解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濃沼政美、大野賢一、河野弥生、山元健太、大西敦、渡邊丈夫、高松智
2. 発表標題 全身作用型GHK-Cu製剤開発に向けたパイロットスタディー（1）製剤学的安定性評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平裕一郎、平郁子、石田功他	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 265
3. 書名 バイオ医薬品の開発と市場2019	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>帝京平成大学薬学部薬学科ユニット紹介 細胞生化学ユニット  <a href="https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/puroteorisisu.html">https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/puroteorisisu.html</a></p> <p>帝京平成大学薬学部薬学科ユニット紹介 抗体・DDSユニット  <a href="https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/dds.html">https://pharm.thu.ac.jp/research/unit/dds.html</a></p> <p>研究活動  <a href="http://pharm.thu.ac.jp/research/grant.html">http://pharm.thu.ac.jp/research/grant.html</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	大西 敦  (OHNISHI Atsushi)  (50342762)	帝京平成大学・薬学部・教授   (32511)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	盛根 信也  (MORINE Shinya)		

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