

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19790130

研究課題名（和文） レドックス反応を利用した血中貯留型多量化アルブミンの分子設計

研究課題名（英文） Development of polymeric albumin preparation with prolonged half-life by redox reaction

研究代表者

岩尾 康範（IWAO YASUNORI）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30433022

研究成果の概要（和文）：

本研究は、遺伝子組換え技術を基に、血中滞留型多量化アルブミン製剤を開発することを目的として企図された。まず、アルブミンの体内寿命に影響を及ぼすアミノ酸残基の基礎的情報を得るために、26種類の異形アルブミンバリエーション及び種々の酸化・糖化修飾アルブミンを用いて、体内動態及び抗酸化能などを詳細に解析した。その結果、ドメインⅢに位置する570番目のグルタミン酸残基や573番目のリジン残基を変異させること、N末端に一つアルギニン残基を付加させること、さらにドメインⅡに糖鎖を付加させることで、血中滞留性に優れたアルブミンが作製できる可能性が示唆された。そこで、これらアミノ酸残基を多重変異させ、さらに重合化した多量体化アルブミンを作製した。多量体化アルブミン変異体はその二次構造や三次構造などに変化はなく、動態特性はモノマーのものと比較し、極めて長い血中半減期を示すことが明らかとなった。加えて、ラットに対し浮腫を惹起させ、多量体化アルブミンによる改善効果を調べたが、多量化に伴う分子量の増大によって、高い浮腫改善効果も認められた。今回の結果は、血中滞留型多量化アルブミンプロドラッグとしての可能性を示唆するものであるが、今後より安全性など詳細な検討が必要であろう。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we aim to develop a novel polymeric albumin preparation with prolonged half-life by using site-directed mutagenesis and redox reaction. First, to obtain fundamental information regarding which amino acid residues in albumin are involved in its elimination, the pharmacokinetics and antioxidant activity of 26 genetic variants of albumin, as well as oxidized and glycosylated albumins were examined. As a result, we found that when two amino acid residues, namely, Glu 570 and Lys 573, in domain III were mutated to Arg, one Arg was added to the N-terminal and domain II were glycosylated, the half-life of albumin was increased. On the basis of these results, we performed multiple mutations to albumin and the mutant was further polymerized. The polymeric recombinant albumin mutant was correctly folded, as evidenced by the similarity of the patterns in the far- and near-UV circular dichroism spectra of mutant and native albumin. In addition, the plasma levels of the polymeric albumin mutant after intravenous bolus injection to rats exhibited two-phase profiles, and the half-life was longer than that of native albumin. Furthermore, the polymeric albumin showed a reduction in edema against paw edema mouse models because of its high molecular weight. These results indicate the potential for development of the new polymeric recombinant albumin preparation with prolonged half-life, but further investigation is needed to ensure the safety of the albumin preparation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態学

1. 研究開始当初の背景

アルブミン製剤は出血性や外傷性ショック時の循環血漿量の是正、また熱傷やネフローゼ症候群などのアルブミン漏失亢進及び肝硬変症などのアルブミン合成能低下に伴う低アルブミン血症時の膠質浸透圧の改善をはじめとする種々の疾患に繁用されており、近代医療にとって欠かせない医薬品となっている。しかし、血液を原料とするため、HIV やクロイツフェルト・ヤコブ病病原物質をはじめとする未知の有害なウィルスや夾雑蛋白質の混入する可能性がつきまとう。そのため、2008 年に遺伝子組換えによるアルブミン製剤が上市されたが、これは野生型に限られており、むしろ高医療コストという側面を否定することはできず、安全性、有効性かつ経済性に優れたアルブミン製剤の開発が切望されている。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子組換え技術を基に、血中滞留型多量化アルブミン製剤を開発することを目的として企図された。まず一残基置換ミュータントを作製し、その抗酸化能や動態特性を詳細に検討する。同時に、アルブミン異形バリエーションや種々の化学修飾アルブミンの体内動態解析及び抗酸化能も検討する。それらの結果から、アルブミンの体内寿命に影響を及ぼすアミノ酸残基をピックアップし、そのダブルあるいはトリプルといった、多重変異をかけた優れたアルブミンモノマーを作製する。次いで、このアルブミンモノマーをジスルフィド架橋化後、重合化して、多量体化アルブミンを作製する。次いで、その体内動態特性や変異原性の有無を調べ、未修飾アルブミンと比較検討し、血中滞留型多量化アルブミンプロドラッグとしての可能性を追求する。

3. 研究の方法

1) Yeast-E.coli のシャトルベクター-pPIC9 上で AOX1 のプロモーター下流にシグナル配列とポリ A 配列を含む HSAdNA を挿入し、QuikChange® XL site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE) を用いて部位特異的に（機能に重要なアミノ酸残基に対して）変異させる。その後、*Pichia pastoris* (GS115 株) を形質転換し、アルブミンミュータントを精製する。

2) アルブミンミュータントの抗酸化能及び体内動態特性を検討する。また、アルブミン異形バリエーションや種々の化学修飾アルブミンについても同様の検討を行う。この中で、抗酸化能が上昇し、さらに体内寿命が延長した変異体をピックアップし、それらの変異体をすべて網羅するような、ダブル、トリプルあるいはポリメリックミュータントを作製する。作製後、再度、抗酸化能及び体内動態特性を検討する。

3) メルカプトアルキルイミデートまたは 2-イミノチオランを用いることによって HSA 分子上のアミノ基をチオール基に変換し、その後-SH と-SS-の交換反応を行い、ジスルフィド架橋を形成させる。次に、反応混合物をセファデックス G-150 にてゲル濾過し、SDS-PAGE を用いて重合度のチェックをするとともに各多量体を分離精製する。また、UV 吸収、蛍光、CD 及び NMR スペクトルなどの各種スペクトル法を駆使して、立体構造を調べる。

4) 常法により、¹²⁵I あるいは ¹¹¹I により多量体化 HSA をラベル化し、これらラベル化多量体化 HSA をラットおよびマウスに静脈内投与して血中濃度を調べ、native HSA と比較検

討する。

5) 多量体化 HSA 及び native HSA の肝取り込み速度を調べるとともに、肝レセプター（スカベンジャー受容体）への関与を比較検討する。

6) ラットに対し浮腫を惹起させ、多量体化 HSA による改善効果を調べ、native HSA と比較検討する。

7) 免疫学的、動態学的性質に加え、機能性面で優れた多量体化 HSA に対し、カプリル酸や N-アセチル-L-トリプトファンなどを添加して、安定性の向上を試みる。

4. 研究成果

1) ヒト血清アルブミンバリエーションの構造・体内動態解析

現在、60 種類以上のアルブミンバリエーションが存在するが、その構造・動態特性の詳細を把握できれば、網羅的に個々のアミノ酸残基の役割を考察することができ、優れた機能性アルブミンを設計する上で非常に重要な基礎的情報となる。そこで、17 種類の一残基置換バリエーション及び3種のC末端欠損体、3種の糖鎖付加体及び3種のN末端プロペプチド付加体の構造・動態特性を検討し、その関連性を検討した。その結果、二次構造の指標である α -ヘリックスを増大させることがアルブミンの血中滞留性を上昇させることが明らかとなり、特にドメインⅢへの変異が有用であることが示唆された。加えて、C末端が欠損することでアルブミンの半減期が有意に減少すること、逆にN末端に一つアミノ酸が付加されると半減期が上昇すること、さらにドメインⅡに糖鎖を付加すると血中滞留性が上昇することが示唆された。

2) 糖化・酸化修飾アルブミンの体内動態解析と近位尿管上皮細胞に対する影響

血中における翻訳後修飾はアルブミンの体内動態に影響を与える重要な因子の一つであり、翻訳後修飾の中でも酸化・糖化はアルブミンの生体内からの消失を促進させる。そこで、軽度・過度の糖化修飾を施したアルブミンの構造特性や、マウスにおける動態解析及び種々のレセプターの強制発現細胞での取り込み実験などを詳細に検討したが、修飾の程度の違いによりその動態特性・取り込み活性が大きく変化すること、またドメインⅢのリジン、アルギニンなどの塩基性アミノ酸残基が糖化修飾を受けやすく、その特異的構造体 (AGEs) が種々の病態の発症・進展に関与する可能性が示唆された。また、慢性腎臓病時を反映する過度の酸化修飾アルブミ

ンに着目し、その構造・機能・動態解析を行った結果、酸化修飾アルブミンは、含硫黄アミノ酸残基や塩基性アミノ酸残基が有意に酸化修飾を受けること、さらにその修飾体は近位尿管上皮細胞上のスカベンジャー受容体 CD36 を介して、尿管間質障害を引き起こすことが明らかとなった。

3) 遺伝子組換えマンノース付加アルブミンの肝ターゲティングへの応用

ヒト血清アルブミンは通常糖鎖を持たない単純蛋白質であるが、Asn-X-Thr/Ser という N 型糖鎖修飾のコンセンサス配列を遺伝子組換えにより導入することで、高マンノース付加アルブミンの作製が可能となる。そこで、この高マンノース付加アルブミンを作製し、肝臓へのターゲティングを試みたが、本変異体は肝クッパー細胞へ選択的に取り込まれること、さらに NO 付加高マンノースアルブミン変異体が、肝虚血再還流障害に対し、有益な作用を示すことが初めて明らかとなった。

4) 血中滞留性多量体化アルブミン変異体の基礎的な構造・機能・体内動態特性

上記 1~3) の検討により、ドメインⅢに位置する 570 番目のグルタミン酸残基や 573 番目のリジン残基を変異させること、N 末端に一つアルギニン残基を付加させること、さらにドメインⅡに糖鎖を付加させることで、酸化や糖化などの翻訳後修飾にも抵抗性を示し、血中滞留性に優れたアルブミンが作製できる可能性が示唆された。そこで、これらアミノ酸残基を多重変異させ (図 1)、さらに 2-イミノチオランにより重合化した多量体化アルブミンを作製した。

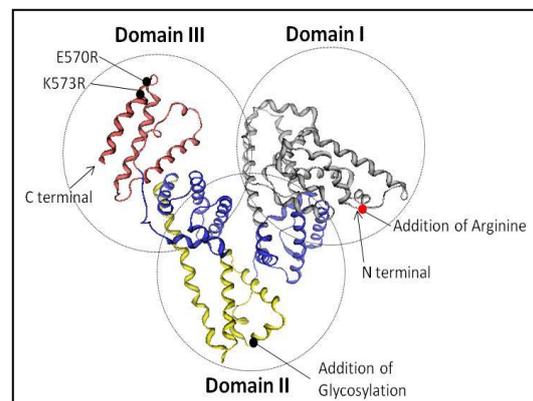


図 1. アルブミン変異部位

その結果、多量体化アルブミン変異体の二次構造や三次構造など構造特性に変化はなく、その動態特性はモノマーのものと比較し、極

めて長い血中半減期を示すことが、またそれに伴い、肝臓・腎臓への移行性が極めて抑制されることが明らかとなった。加えて、ラットに対し浮腫を惹起させ、多量体化アルブミンによる改善効果を調べたが、多量化に伴う分子量の増大によって、高い浮腫改善効果も認められた。

今後、臨床応用に際し、安定性の向上など更なる検討を加えることで、血中貯留型多量体化アルブミンプロドラッグとしての可能性を追求できるものと思われる。

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 7 件)

1. Zsila F and Iwao Y. The drug binding site of human alpha1-acid glycoprotein: Insight from induced circular dichroism and electronic absorption spectra. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1770**, 797-809 (2007)

2. Nagai R, Mera K, Nakajou K, Fujiwara Y, Iwao Y, Imai H, Murata T and Otagiri M. The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1772**, 1192-1198 (2007)

3. Iwao Y, Hiraike M, Kragh-Hansen U, Mera K, Noguchi T, Anraku M, Kawai K, Maruyama T and Otagiri M. Changes of net charge and α -helical content affect the pharmacokinetic properties of human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1774**, 1582-1590 (2007)

4. Nagai R, Fujiwara Y, Mera K, Motomura K, Iwao Y, Tsurushima K, Nagai M, Takeo K, Yoshitomi M, Otagiri M and Ikeda T. Usefulness of antibodies for evaluating the biological significance of AGEs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1126**, 38-41 (2008)

5. Iwao Y, Nakajou K, Nagai R, Kitamura K, Anraku M, Maruyama T and Otagiri M. CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **295**, F1871-1880 (2008)

6. Iwao Y, Hiraike M, Kragh-Hansen U, Kawai K, Suenaga A, Maruyama T and Otagiri M. Altered chain-length and glycosylation modify the pharmacokinetics of human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1794**, 634-641

(2009)

7. Hirata K, Maruyama T, Watanabe H, Maeda H, Nakajou K, Iwao Y, Ishima Y, Katsumi H, Hashida M and Otagiri M. Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics. *Journal of Control Release*, in press (2010)

[学会発表] (計 31 件)

1. 田口 和明, 浦田 由紀乃, 安楽 誠, 甲斐 俊哉, 岩尾 康範, 土田 英俊, 小林 紘一, 小田切 優樹. 出血性ショック時におけるヘモグロビン小胞体の体内動態特性. 第14回日本血液代替物学会年次大会. 東京. 06/14-15, 2007

2. 丸山 徹, 岩尾 康範, 平池美香子, 安楽 誠, 小田切 優樹. 酸化修飾アルブミンによる尿細管間質障害とその機序解明. 第1回日本腎と薬剤研究会学術大会. 大阪. 11/25, 2007

3. 田口 和明, 岩尾 康範, 丸山 徹, 甲斐 俊哉, 土田 英俊, 小林 紘一, 小田切 優樹. 人工酸素運搬体 ヘモグロビン小胞体の出血時における体内動態特性評価. 第24回日本薬学会九州支部会. 福岡. 12/8-9, 2007

4. 生田祥太郎, 異島 優, 中城圭介, 岩尾 康範, 丸山 徹, 小田切優樹. チオレドキシン-アルブミン融合タンパク質の設計と機能評価. 第24回日本薬学会九州支部会. 福岡. 12/8-9, 2007

5. 田口 和明, 丸山 徹, 岩尾 康範, 小林 紘一, 土田 英俊, 小田切 優樹. 出血性ショック時におけるヘモグロビン小胞体の体内動態特性. 第1回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 東京. 12/15, 2007

6. 岩尾 康範, 田先 由佳, 佐藤 圭創, 丸山 徹, 小田切 優樹. 尿毒症物質インドキシル硫酸のレドックス特性. 第1回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 東京. 12/16, 2007

7. 平田憲志郎, 異島 優, 中城圭介, 岩尾 康範, 丸山 徹, 小田切優樹. ネオグリコアルブミンの肝ターゲティング素材としての有用性について. 日本薬学会第128年会. 横浜. 03/26-28, 2008

8. 田口 和明, 丸山 徹, 岩尾 康範, 坂井 宏水, 土田 英俊, 小林 紘一, 甲斐 俊哉, 小田切 優樹. 出血性ショック時におけるヘ

モグロビン小胞体の体内動態解析. 日本薬学会第 128 年会. 横浜. 03/26-28, 2008

9. 中城圭介, 生田 祥太郎, 異島 優, **岩尾 康範**, 丸山 徹, 小田切優樹. アルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の体内動態と生理作用について. 日本薬学会第 128 年会. 横浜. 03/26-28, 2008

10. **岩尾 康範**, 田先 由佳, 佐藤 圭創, 丸山 徹, 小田切 優樹. 尿毒症物質インドキシル硫酸の酸化ストレスへの影響. 日本薬学会第 128 年会. 横浜. 03/26-28, 2008

11. **岩尾 康範**, 永井 竜児, 中城 圭介, 丸山 徹, 小田切 優樹. 酸化修飾アルブミン (AOPPs-HSA) の尿細管間質障害に及ぼす影響. 第 20 回腎とフリーラジカル研究会. 大阪. 09/20. 2008

12. 小野 知実, 西 弘二, 福永 直子, **岩尾 康範**, 丸山 徹, 小田切 優樹. ヒト α 1-酸性糖タンパク質のリガンド結合特性におけるペプチド部分の重要性. 第 23 回日本薬物動態学会年会. 熊本. 10/30-11/1, 2008

13. 山田 純嗣, **岩尾 康範**, 野口 大之, 米良 克美, 異島 優, 末永 綾香, 丸山 徹, 小田切 優樹. ヒト血清アルブミンの抗酸化活性に関するアミノ酸残基の探索. 第 23 回日本薬物動態学会年会. 熊本. 10/30-11/1, 2008

14. 山田 純嗣, **岩尾 康範**, 野口 大之, 米良 克美, 異島 優, 末永 綾香, 丸山 徹, 小田切 優樹. ヒト血清アルブミンの抗酸化活性に関するアミノ酸残基の探索. 第 25 回日本薬学会九州支部大会. 宮崎. 12/06-07, 2008

15. 藤木 定弘, 佐塚 泰之, **岩尾 康範**, 宮城島 惇夫, 豊岡 達志, 伊吹 裕子, 板井 茂. Doxorubicin の抗腫瘍効果に対する cucurbitacin I の影響. 日本薬学会第 129 年会. 京都. 03/ 28, 2009

16. 木村 晋一郎, 宮城島 惇夫, **岩尾 康範**, 森上 佳奈, 板井 茂. 遠心転動流動造粒法による微小球形粒子の調製~製造条件の顆粒物性に及ぼす影響~. 日本薬学会第 129 年会. 京都. 03/ 28, 2009

17. 内本 武亮, 宮城島 惇夫, **岩尾 康範**, 板井 茂. グリセリン脂肪酸エステル of 滑沢メカニズムに関する研究. 日本薬学会第 129 年会. 京都. 03/ 28, 2009

18. 藤木 定弘, 佐塚 泰之, **岩尾 康範**, 豊岡 達志, 伊吹 裕子, 宮城島 惇夫, 板井 茂. Cucurbitacin I による doxorubicin の抗腫瘍効果増強作用とそのメカニズムについての検討. 日本薬剤学会第 24 年会. 静岡. 05/21, 2009

19. 椎野 甲斐, **岩尾 康範**, 宮城島 惇夫, 藤木 定弘, 板井 茂. 苦味マスキングを目的としたワックスマトリックス製剤の設計と評価. 日本薬剤学会第 24 年会. 静岡. 05/21, 2009

20. 宮城島 惇夫, 神山 晋太郎, 栗田 拓朗, **岩尾 康範**, 板井 茂. 糖アルコール isomalt の錠剤特性改善効果の評価. 日本薬剤学会第 24 年会. 静岡. 05/21, 2009

21. 内本 武亮, 宮城島 惇夫, **岩尾 康範**, 板井 茂. グリセリン脂肪酸エステルの滑沢特性に関する研究. 日本薬剤学会第 24 年会. 静岡. 05/23, 2009

22. **岩尾 康範**, 大島 寛之, 栗田 拓朗, 牧野 悠二, 宮城島 惇夫, 板井 茂. 凍結乾燥脂質ナノ粒子製剤の調製と溶出特性に関する研究. 日本薬剤学会第 24 年会. 静岡. 05/23, 2009

23. 木村 晋一郎, 宮城島 惇夫, **岩尾 康範**, 森上 佳奈, 板井 茂. 遠心転動流動造粒法による微小球形粒子の調製における製造条件の及ぼす影響. 日本薬剤学会第 24 年会. 静岡. 05/23, 2009

24. 宮本 洋平, **岩尾 康範**, 佐藤 圭創, 小田切 優樹, 丸山 徹. 尿毒症物質 CMPF のレドックス特性. 日本薬剤学会第 24 年会. 静岡. 05/23, 2009

25. 宮本 洋平, **岩尾 康範**, 佐藤 圭創, 小田切 優樹, 丸山 徹. 尿毒症物質 CMPF のレドックス特性. 第 62 回日本酸化ストレス学会. 福岡. 06/11, 2009

26. 阿形 泰義, **岩尾 康範**, 宮城島 惇夫, 板井 茂. Non-sink 条件における球形粒子の溶解挙動. 第 18 回 DDS カンファレンス. 静岡. 09/12, 2009

27. 藤木 定弘, 佐塚 泰之, **岩尾 康範**, 豊岡 達志, 伊吹 裕子, 宮城島 惇夫, 板井 茂. ウリ科苦味成分による doxorubicin の抗腫瘍効果増強メカニズムの検討. 第 11 回応用薬理シンポジウム. 静岡. 09/19, 2009

28. 宮本 洋平, **岩尾 康範**, 渡邊 博志, 佐

藤 圭創, 小田切 優樹, 丸山 徹. 尿毒症物質フラン化合物CMPFのレドックス特性. 第3回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 福岡. 11/14, 2009

29. 梅木 伸夫, 佐藤 貴幸, 原田 真宏, 武田 順子, 斎藤 秀次, **岩尾 康範**, 板井 茂. 新規生分解性高分子を用いた製剤設計—マイクロスフェアの調製条件と in vitro, in vivo 放出特性—. 第 26 回製剤と粒子設計シンポジウム. 広島. 11/27, 2009

30. Yohei Miyamoto, **Yasunori Iwao**, Hiroshi Watanabe, Keizo Sato, Masaki Otagiri, Toru Maruyama. 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan propionate, an uremic toxin, increase oxidative stress through over-generation of super-oxide anion radical. 第 31 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 大阪. 12/01, 2009

31. 宮本 洋平, **岩尾 康範**, 渡邊 博志, 佐藤 圭創, 小田切 優樹, 丸山 徹. 尿毒症物質フラン化合物CMPFのレドックス特性. 第3回日本薬学会九州支部大会. 福岡. 12/12, 2009

〔図書〕(計 1 件)

①米良 克美, 藤原 章雄, 竹尾 和寛, **岩尾 康範**, 永井 竜児, 腎疾患における AGEs 生成経路の検討とその臨床マーカーとしての応用, 腎とフリーラジカル, 第 9 集, p101-108, 2008

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~pharmeng/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩尾 康範 (IWAO YASUNORI)
静岡県立大学・薬学部・助教
研究者番号 : 30433022

(2)研究分担者

なし