

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21475

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群モデル動物における遺伝子組換え降圧ペプチダーゼの効果と体内動態

研究課題名(英文) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of human recombinant aminopeptidases in model animals for hypertensive disorders of pregnancy

研究代表者

加藤 将夫 (Kato, Yukio)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30251440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群患者の血漿では、昇圧ペプチドangiotensin II (Ang II)の加水分解を担うaminopeptidase A (APA)活性が低い。本研究は、遺伝子組換えヒトAPAタンパク質を作製し、その体内動態と薬理活性の解明を目的とした。ヒトAPAをコードする遺伝子を哺乳類細胞に導入し、培養上清から組換えタンパク質を精製した。精製したrhAPAはAng IIを加水分解しAng IIIが生成されたことから、酵素活性を有する組換えタンパク質を作製することができた。APAを種々のリンカー配列を介してFcタンパク質と融合させることで、酵素活性とマウスにおける体内動態特性が改善された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠時には多くの高血圧治療薬が禁忌であるため、妊娠高血圧症候群に対する治療薬は極めて限られる。低分子薬は胎盤を通過する可能性があるため胎児に対する影響の可能性を排除できない。一方、遺伝子組換えタンパク質であれば分子サイズが大きく胎盤透過性は低いと予想されるため、安全性の高いモダリティとして妊娠高血圧症候群の降圧治療に応用できる可能性があり、社会的意義は大きい。本研究においては、リンカー配列を介してFcタンパク質と融合させることでAPAの酵素活性と体内動態特性が改善されることが示された。本研究は生体内に存在する酵素を遺伝子組換えタンパク質として応用する上で有益な方策を示した点で学術的意義がある。

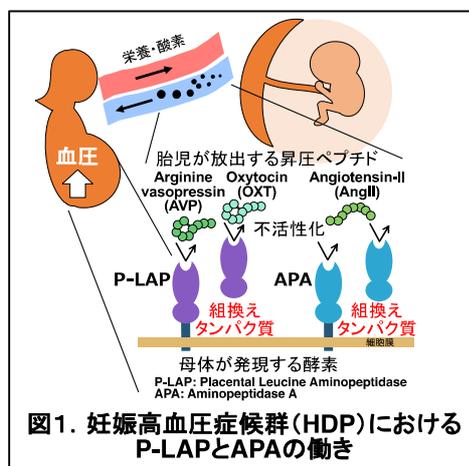
研究成果の概要(英文)：Patients with hypertensive disorders of pregnancy exhibit lower plasma concentration of aminopeptidase A (APA) activity which hydrolyzes the hypertensive peptide angiotensin II (Ang II). Therefore, recombinant protein for APA may rescue the hypertension in those patients with limited distribution to fetus due to its high molecular size. The purpose of the present study was to generate recombinant protein for human APA to elucidate its pharmacokinetics and pharmacological activity. A gene encoding the extracellular domain of human APA was transfected in mammalian cells, and the recombinant protein was purified from the culture medium by affinity chromatography. Purified rhAPA hydrolyzed Ang II to produce Ang III, demonstrating the production of an enzymatically active recombinant APA protein. The rhAPA was then fused to the Fc protein via different linker sequences, and the obtained fusion proteins exhibited improved enzymatic activity and pharmacokinetic properties of APA in mice.

研究分野：薬物動態学

キーワード：妊娠高血圧症候群 薬 動物モデル 遺伝子組換えタンパク質 質量分析装置 アミノペプチダーゼ アンジオテンシン 薬物動態 降

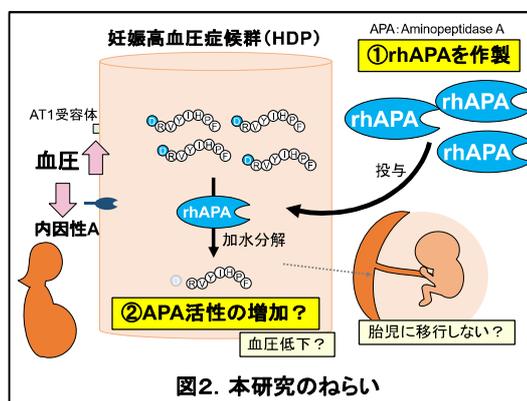
1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群(**hypertensive disorders of pregnancy, HDP**)は緊急性の高い疾患であり、多くは早期分娩で対処される。しかし、早期分娩は母体の高血圧、糖尿病、高コレステロール血症などのリスクの増加(1)や、胎児側においても出産後青年期の心血管疾患リスクを増やすこと(2)などが報告されている。また、胎盤透過による副作用リスクから降圧薬の多くは妊婦に禁忌であり、**HDP**に有効な治療薬はない。よって母体血圧を正常化し安全な分娩をはかる治療薬の開発が望まれる。**Placental leucine aminopeptidase (P-LAP)**と **aminopeptidase A (APA)**はともに母体内に存在し、それぞれ胎児が分泌する昇圧ペプチドである **arginine vasopressin (AVP)**、**angiotensin II (AngII)**を分解することで母体の高血圧を防ぐ働きがある(図1)。**P-LAP**は子宮収縮ペプチド **oxytocin (OXT)**も分解する(図1)。しかし**HDP**においては**P-LAP**、**APA**ともに血中濃度が低下し(3,4)、これが**HDP**の原因の一つとされる(図1)(5,6)。よって、**P-LAP**と**APA**の組換えタンパク質を投与してこれらの不足を補うことで、高分子であるが故に胎盤を透過せず、母体のみでの治療効果が期待される。



2. 研究の目的

HDP患者血液では**Ang II**の加水分解を担う**APA**の活性が低く、血中に**Ang II**が蓄積することが、**HDP**発症要因の1つである。よって、**APA**の組換えタンパク質(**rhAPA**)は、高分子であるが故に、胎盤移行性が低い降圧モダリティとして期待できる。抗体やサイトカインなど多くのタンパク質がバイオ医薬品として開発される中、生体内の酵素を医薬品として応用する例は未だ限られている。本研究は、妊婦体内に存在するものの**HDP**において低下する酵素である**APA**の**HDP**治療薬としての**potential**を解明するため、**APA**組換えタンパク質を作製し、その体内動態と高血圧モデル動物に及ぼす効果の解明を目的とした。



3. 研究の方法

3-1. ヒトAPA組換えタンパク質の合成

ヒト**APA**配列を**pCAGGS**ベクターに組み込み、**pCAGGS/rhAPA**プラスミドを作製した。**APA**配列をヒト免疫グロブリン**Fc**領域配列を含む**pCAGGS**に組み込み、**pCAGGS/rhAPA-Fc**プラスミドを作製した。**Expi293F**を含む細胞培養液に対し、**ExpiFectamine 293 Transfection Kit**を用いてプラスミドDNAを導入した。**37°C**、**8% CO₂**環境下で、**5**日間振とう培養後、細胞懸濁液を遠心し、上清をフィルターを通した。**rhAPA**精製においては**HisTrap-HP**を、**rhAPA-Fc**については**Bio-Scale Mini UNOsphere SUPRA affinity chromatography cartridges**を用いたクロマトグラフィーにより精製した。

3-2. Glu-MCAに対する加水分解活性

rhAPA標品を、**25 mM Tris-HCl**、**1 mM CaCl₂**、**0.01% BSA**を含む緩衝液(**pH 7.5**)で希釈後、**APA**基質である**Glu-MCA**を添加し、**37°C**でインキュベーションした。加水分解で生じた**AMC**に由来する蛍光(**Ex 370 nm/Em 460 nm**)をプレートリーダーで測定した。

3-3. AngIIに対する加水分解活性の評価

rhAPA標品を**25 mM Tris-HCl (pH7.5)**、**1 mM CaCl₂**、**0.01% BSA**を含む緩衝液中で**10 μM**の**AngII**と**37°C**でインキュベーションした。反応は、内標準物質を含む**2**倍量の**MeOH**を加えることで停止した。遠心後、上清を**LC-MS/MS**での測定に供した。

3-4. マウスへのrhAPA投与

ICRマウスに対し、イソフルラン麻酔下で、**0.1% BSA**含有**PBS**に溶解した**rhAPA**を頸静脈より単回静脈内投与した。投与量は、物質量が同等になるよう設定した(分子量をそれぞれ**130**および**180 kDa**と仮定した)。経時的に採血した血液を遠心して血漿を得た。血漿を**Glu-MCA**とインキュベーションし、加水分解で生じた**AMC**を蛍光プレートリーダーで測定することで**APA**活性を評価した。**Glu-MCA**の加水分解活性をもとに算出した**rhAPA**および**rhAPA-Fc**の血漿中濃度を用い、モーメント解析により薬物動態パラメータを算出した。

3-5. ¹²⁵I 標識

0.05 Mリン酸緩衝液(**pH 7.5**)中で**rhAPA**を**Na¹²⁵I**と混合後、最終濃度**50 μg/mL**のクロラ

ミン T を添加して反応を開始した。室温 2 分間反応後、システインを添加して反応を停止した。PD MidiTrap G-25 に反応液を添加し、放射活性の高いフラクションをマウスへの投与に供した。得られた¹²⁵I]rhAPA および¹²⁵I]rhAPA-Fc の比活性はそれぞれ 4.66×10⁵ および 4.98×10⁵ dpm/pmol であった。

3-6 . 妊娠マウスにおける¹²⁵I]rhAPA の体内動態

妊娠 18 日齢の ICR マウスに、イソフルラン麻酔下で¹²⁵I]rhAPA を頸静脈より単回静脈内投与した。投与後に経時的に尾静脈から血液を採取し、遠心により血漿を得た。血漿に、BSA およびトリクロロ酢酸 (TCA) を添加後遠心し、上清と沈殿を分離し、それぞれについてγ カウンターで放射活性を測定した。投与 1, 5, 120 分後に臓器を採取し総放射活性をγ カウンターで測定した。肝臓、腎臓、胎盤、胎児については、氷冷 PBS を 25% w/v になるように加え homogenize の後、血漿と同様に TCA 沈殿を行った。

3-7 . AngII 誘発高血圧マウスに対する降圧作用

イソフルラン麻酔下で 37°C に加温したプレート上に、7 週齢の ICR 雌性マウスを固定し、非観血式血圧計を用いて、tail-cuff 法によって経時的に収縮期血圧を測定した。rhAPA を投与 20 分後に AngII を投与し、経時的に血圧を測定することで、AngII による血圧上昇に対する rhAPA の降圧作用を評価した。

4 . 研究成果

4-1 . rhAPA の作製

ヒト APA 組換えタンパク質(rhAPA)を得るため、ほ乳類由来の浮遊細胞である Expi293F 細胞に rhAPA を発現させ、その精製方法を確立した。150 mL の培養上清から rhAPA が 1.85 ~ 3.06 mg 得られた。精製の各段階のフラクションについて非還元下で SDS-PAGE 後、CBB 染色で純度を確認したところ、130 ないし 180 kDa 付近のバンドを濃縮的に単離できていた (図 3)。また、精製されたタンパク質を還元下で SDS-PAGE 後、抗 His タグ抗体による western blot で検出したところ、130 kDa 付近にバンドが検出され、His タグを含むタンパク質の精製が確認できた。rhAPA ないし rhAPA-Fc を APA 基質である Glu-MCA とインキュベーションすると、時間依存的に酵素反応産物 AMC に由来する蛍光強度が増加した (図 3) ことから、精製された rhAPA は APA 酵素活性を有することが示された。

4-2 . rhAPA の酵素活性の特徴づけ

作製した rhAPA の酵素活性を特徴づけるべく、rhAPA による AngII の加水分解活性を評価した。rhAPA を AngII とインキュベーションし、生成する AngIII 濃度を経時的に測定した。rhAPA 非存在下のバッファ中では、いずれの時間でも AngIII は定量限界以下であったのに対し、rhAPA-Fc

の添加で AngIII は時間依存的に増加した (図 4)。さらに、APA と Fc との間に 6 種類のリンカー配列 (L1~L6) を入れることにより、反応の Kcat/Km 値は最大で約 8 倍上昇した (図 4)。APA は、AngII の N 末端の D-R 間を切断するが、AngI の N 末端も同様に D-R である。そこで APA による AngI の加水分解活性を評価したところ、rhAPA は、AngI を ang2-10 に加水分解した。Ang(2-10)は、AngIII と同様、AngII よりも血圧上昇作用が低いことから、rhAPA 融合タンパク質は、AngII の加水分解に加えて、その前駆体である AngI も加水分解することで、血圧上昇の抑制に協調的に働くことが示唆された。

4-3 . マウスにおける rhAPA の体内動態

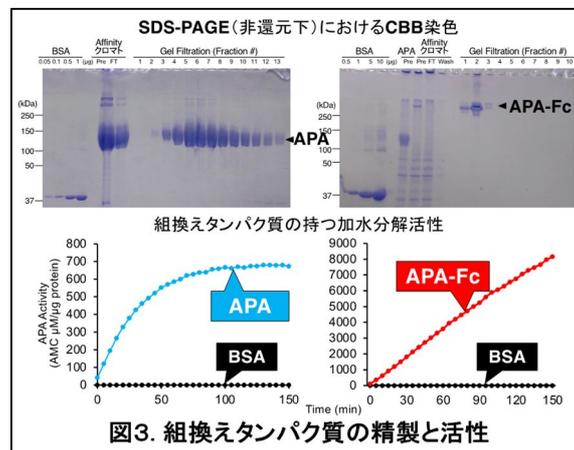


図3. 組換えタンパク質の精製と活性

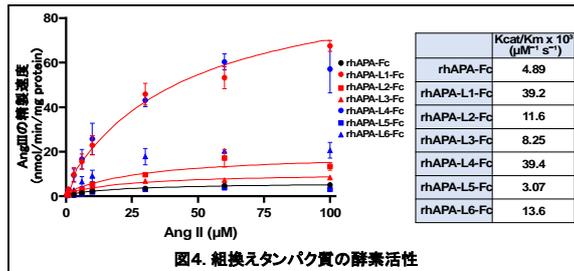


図4. 組換えタンパク質の酵素活性

マウスに **rhAPA** を単回静脈内投与後の血漿中濃度推移を、**Glu-MCA** 加水分解活性に基づいたバイオアッセイを用いて測定したところ、血漿中 **rhAPA** 活性は、**rhAPA** および **rhAPA-Fc** を投与後、**vehicle** のみの投与に比べ有意に上昇した。その後、**rhAPA** の血漿中濃度は、速やかに減少した一方、**rhAPA-Fc** では比較的持続的な血中濃度推移が見られた。モーメント解析の結果、**rhAPA-Fc** は **rhAPA** に比べ、終末相の半減期の延長が認められ、その原因は主に分布容積の増加による一方、全身クリアランスの低下は顕著ではなかった(表 1)。以上の体内動態評価はバイオアッセイを用いた結果であり、内因性 **APA** 活性の影響を受ける可能性を否定できないことから、今後より精密な分析法を用いた体内動態評価が必要である。

	rhAPA		rhAPA-Fc	
	0.9 mg/kg	5 mg/kg	1.25 mg/kg	6.92 mg/kg
AUC _(0-∞) (mg/mL・hr)	34.2	347	69.2	389
CL _{tot} (mL/hr/kg) ^{a)}	101	52.2	80.6	64.5
V ₀ (mL/kg) ^{b)}	52.9	71.0	270	258
V _{dss} (mL/kg) ^{c)}	57.9	135	535	705
t _{1/2z} (hr) ^{d)}	0.436	2.89	5.20	9.68

a) Total clearance
b) Distribution volume for central compartment
c) Steady-state distribution volume
d) Half-life in terminal phase

4-4 . rhAPA-Fc の組織および胎児移行性

¹²⁵I]rhAPA-Fc を妊娠マウスに静脈内投与後、血漿中 **TCA-precipitable** 画分の放射活性は、緩やかに減少した一方で、血漿中 **TCA-soluble** 画分の割合は、15 分程度の **lag-time** の後に経時的に増加した。各組織における組織-血漿中放射活性比は、肝でのみ 1 以上となり(図 5)、肝に特に移行することが示唆された。一方で、脳は、他の臓器よりも特に低い値であった(図 5)。いずれの臓器分布も経時的に増大した(図 5)。各臓器で検出された放射活性が、体内で形成された¹²⁵I]rhAPA-Fc の分解物に由来する可能性があるため、高い放射活性が検出された肝および腎と、胎児移行性の評価のため胎盤および胎児では、**TCA-precipitable** と **-soluble** 画分を分けて放射活性を評価した。その結果、**TCA-precipitable** な放射活性は、いずれの時間においても肝で最も高く、胎児 10~14 匹の総和として胎児への **TCA-precipitable** な放射活性の分布は、経時的に増加するものの、投与 120 分後でも投与量の 0.490 ± 0.057% であり、¹²⁵I]rhAPA-Fc の胎児移行はわずかであった。**TCA** 沈殿法を用いても分解物を見ている可能性を否定できないため、今後より精密な分析法を用い胎児移行を評価する必要がある。

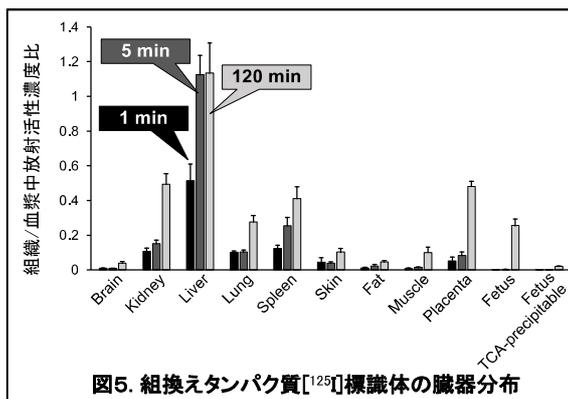


図 5. 組換えタンパク質¹²⁵I]標識体の臓器分布

4-5 . rhAPA-Fc の降圧作用

rhAPA-Fc が、生体内で **AngII** を加水分解し、降圧作用を有するかを評価すべく、**AngII** を投与して作製した高血圧モデルマウスに **rhAPA-Fc** を投与して、収縮期血圧を測定した。**AngII** の投与によって、収縮期血圧が上昇したことから(図 6)、高血圧モデルマウスが作出できた。リンカーを挿入した **rhAPA-Fc** の投与により、**vehicle** 投与に比べ、収縮期血圧が低下した(図 6)ことから、**rhAPA-Fc** は生体内で降圧作用を示すことが示唆された。

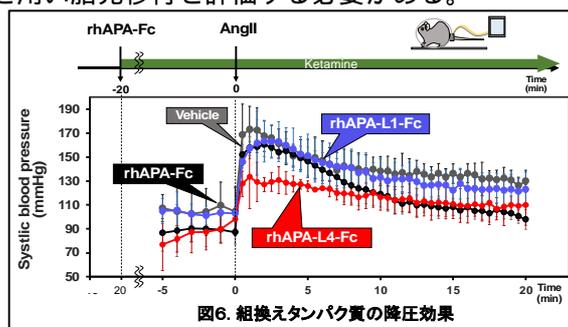


図 6. 組換えタンパク質の降圧効果

【引用】

- 1) Tanz L. J. et al. *J Womens Health* 2019, 28(5): 677-685.
- 2) Bonamy A-K. E. et al. *Pediatr Res* 2005, 58(5): 845-849.
- 3) Mizutani S. et al. *Arch Gynecol* 1985, 236(3): 165-172.
- 4) Mizutani S. et al. *Arch Gynecol* 1987, 240(1): 27-31.
- 5) Mizutani S. et al. *J Biomed Biotechnol* 2011: 286947.
- 6) Mizutani S. et al. *Life Sci* 2011, 88(1-2): 17-23.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsukawa Tetsuya, Mizutani Shigehiko, Matsumoto Kunio, Kato Yukio, Yoshihara Masato, Kajiyama Hiroaki, Shibata Kiyosumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Placental Leucine Aminopeptidase as a Potential Specific Urine Biomarker for Invasive Ovarian Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 222 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11010222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara Masato, Mizutani Shigehiko, Kato Yukio, Matsumoto Kunio, Mizutani Eita, Mizutani Hidesuke, Fujimoto Hiroki, Osuka Satoko, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Recent Insights into Human Endometrial Peptidases in Blastocyst Implantation via Shedding of Microvesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13479 ~ 13479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222413479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara M, Mizutani S, Matsumoto K, Kato Y, Masuo Y, Tano S, Mizutani H, Kotani T, Mizutani E, Shibata K, Kajiyama H.	4. 巻 121
2. 論文標題 Crosstalk between foetal vasoactive peptide hormones and placental aminopeptidases regulates placental blood flow: Its significance in preeclampsia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 32-39,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.placenta.2022.02.016	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津本彩乃、増尾友佑、近藤友美、今村龍、水谷栄彦、松本邦夫、加藤将夫
2. 発表標題 ヒトaminopeptidase A組換えタンパク質の臓器分布および胎児移行の解析
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津本彩乃、増尾友佑、山口有紀子、酒井克也、今村龍、水谷栄介、牛田貴文、小谷友美、梶山広明、松本邦夫、水谷栄彦、加藤将夫
2. 発表標題 Aminopeptidase A組換えタンパク質による妊娠高血圧症治療薬の開発
3. 学会等名 第42回日本妊娠高血圧学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口有紀子、増尾友佑、津本彩乃、酒井克也、今村 龍、水谷栄介、牛田貴文、小谷友美、梶山広明、松本邦夫、水谷栄彦、加藤将夫
2. 発表標題 Aminopeptidase A-Fc融合タンパク質のリンカー配列最適化
3. 学会等名 日本薬剤学会第38年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子薬物治療学研究室 https://bunyaku.w3.kanazawa-u.ac.jp

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
研究協力者	松本 邦夫 (Matsumoto Kunio)		

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	水谷 栄彦 (Mizutani Shigehiko)		

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