

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590199

研究課題名(和文) 血栓標的ドメインとヘビ毒由来フィブリン分解酵素融合体による血栓溶解剤の開発

研究課題名(英文) Modification of rattlesnake venom derived blood clot dissolver, Alfimeprase, by fusion with C-terminal domain of habu-HR1a and fibrin-targeting peptide

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： Alfimeprase(A)は血中の α -2マクログロブリン(α -2M)と速やかに複合体を形成して活性が阻害されるため、臨床第2相でドロップした。Aにハブ毒HR1aのC末ドメインを結合させた融合体(AH)遺伝子に、フィブリンへの標的化ヒトプラスミノゲンのクリングルドメイン1を融合させたAHP遺伝子を化学合成して大腸菌ベクター(pE-SUMO)で発現させた。これによって、Aのフィブリノゲン切断活性、ヒト血餅溶解活性の α -2Mによる阻害を回避することはできなかった。それはN末のSUMOペプチドの有無とは関係なかった。

研究成果の概要(英文)： Alfimeprase(A) can digest fibrin directly, and do not produce any plasmin in different from tPA (Activase). Because A can be rapidly trapped by α -2 macroglobulin (α -2M) and inactivated in the blood vein, the clinical effect of A in the phase 2 has not been so good to advance its development. We designed the gene in which the C-terminal side of the A was fused with the C-terminal domain (collagen-binding domain) of the HR1a. Considering targeting to fibrin clots, the C-terminal side of the AH gene was fused with the gene for the human plasminogen-derived kringle domain 1 region, which fusion protein is called AHP. The A, AH and AHP genes were inserted into the pE-SUMO vectors and were expressed in the E.coli BL21(DE3)star. Fusion of the HR1a C-terminal domain with A did not have any effect in terms of avoiding of inactivation by α -2M regardless of the presence or absence of the N-terminal SUMO-peptide.

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：バイオテクノロジー タンパク質 酵素

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血栓症の罹患率、死因率の高さは欧米同様、日本においてもトップクラスに位置しており、血栓症の予防や治療の研究に対する注目度は非常に高い。血管の梗塞部位解除に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り、再狭窄については GPIIb/IIIa 血小板受容体阻害剤により回避可能となっているが、活性化された血中プラスミンによる補体活性化、血小板凝集促進による副作用が問題となっている。ガラガラヘビ毒由来メタロプロテアーゼ断片 (Alfimeprase) は出血活性を持たず強力なフィブリン塊分解活性を持ち、rtPA のような副作用が予想されないために、米国で血栓溶解剤として臨床開発された。Alfimeprase は、血清中の α -2 マクログロブリン (α -2M) によって生理的条件では不可逆的に速やかに不活性化されてしまい、期待された効果が見られず、第 2 相臨床試験でドロップした (BioCentury Extra, Mar17, 2008)。

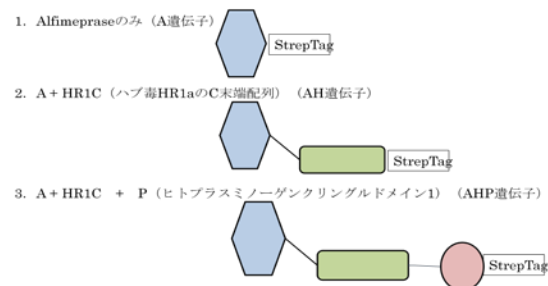
2. 研究の目的

ハブ毒由来メタロプロテアーゼ HR1a の N 末端ドメイン、HR2a は、Alfimeprase と同じメタロプロテアーゼに属しており、立体構造が似ている。私たちは、HR2 は α -2M と結合するが、HR1a は α 2M と結合しないことを見出した。そこで、私たちは Alfimeprase が欠失している HR1a の C 末ドメイン (コラーゲン結合部位) を Alfimeprase に融合することにより α 2M によって不活性化されないものを作製することを考えた。また、rtPA のようにフィブリンに対する特異的な結合性を持たせるために、上記融合体にフィブリン標的化ドメイン (ヒトプラスミノゲン First Kringle Domain) (Blood, 116, 2201-2202, 2010) をつなげた融合体を作ること考えた。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌発現コンストラクト作製

Alfimeprase (A) にハブ毒 HR1a の C 末端ドメイン (H)、ヒトプラスミノゲンクリングドメイン 1 (P) を融合させた遺伝子を化学合成した。本遺伝子を鋳型にして、pE-SUMO ベクター (Life Sensors 社) に挿入できるような PCR プライマーセットを用いて PCR 増幅し、pE-SUMO-A、pE-SUMO-AH、pE-SUMO-AHP プラスミドを構築した。これらの遺伝子産物は、目的タンパク質の N 末に SUMO (100 アミノ酸) +HisTag (His6) 配列を持ち、C 末端には StrepTag (8 アミノ酸) が付加される。これらのプラスミドを使って、タンパク質発現用の大腸菌株 BL21 (DE3) star (Invitrogen 社) を形質転換した。



(2) 大腸菌発現タンパク質の発現、抽出、精製

本 Alfimeprase は Zn^{2+} 要求性メタロプロテアーゼであるため、IPTG による発現誘導時に 0.5mM $ZnCl_2$ を添加して 37°C、3 時間培養した。集菌してトリス系バッファーに懸濁した後、超音波処理で菌体破碎して発現タンパク質を抽出した。目的タンパク質は沈殿画分に集まるため、8M ウレア+DTT で可溶化して HisTrap カラムを用いて精製した。精製サンプルを Tris バッファー系で①4M ウレア、②4M ウレア+グルタチオン、③0.5M アルギニン (pH8.5) +0.1mM $ZnCl_2$ 、0.5M アルギニン (pH8.5) に順次透析してリフォールディングした。組換えタンパク質から SUMO 断片除去は、SUMO-protease1 (Life Sensor 社) で消化する。消化後反応液中で SUMO 切断タンパク質は沈殿する、消化された SUMO 断片は沈殿せず、遠心によって目的タンパク質と分離した。沈殿したタンパク質は再度 8M ウレア+グルタチオンで可溶化後 1 晩 4°C に置いた後、上記と同様の方法で再度リフォールディングした。

(3) フィブリン分解活性の測定

下記の反応系で、37°C、2 時間反応させ、反応液の 7.5 μ l を SDS-PAGE にて解析し、Fibrinogen の切断の有無を調べた。

2mg/ml Fibrinogen	
(in 10mM Na-citrate pH7.4)	12.5 μ l (25 μ g)
10xTrisbufferedsaline(TBS)	5
精製タンパク質	1~2 μ l*
滅菌水	適量
Total	50 μ l

*基質 (Fibrinogen, MW=330kDa) : 精製タンパク質 = 1 : 1~2 (モル比)

(4) 血栓溶解活性の測定

クエン酸処理ヒト全血液を生理食塩水で 2 倍希釈して、1.5ml チューブの底に 5 μ l 加え、等量の 0.025M $CaCl_2$ を加えて混和した後、37°C に 15~20 分置いて血餅を作る。血餅に 0.5ml TBS で 2 回洗浄する。洗浄した血餅に 50 μ l 反応液 (48 μ l + 2 μ l 精製タンパク質) を加え、37°C で 1 時間反応する。15 分置きに反応液を穏やかに混和する。1 時間反応後に 0.5ml TBS を加えて反応を止め、

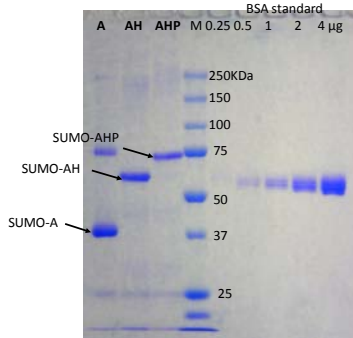
5000rpm、1分遠心して、残った血餅をチューブの底に落として、血餅量の減少を見る。

4. 研究成果

(1) 大腸菌発現タンパク質の精製

SUMO-A、SUMO-AH、SUMO-AHP は、200ml の菌培養液からそれぞれ、3.9mg、1.5mg、1mg 量を精製できた。

HisTrapカラム精製&透析SUMO-A、-AH、-AHP SDS-PAGE



2014/5/25

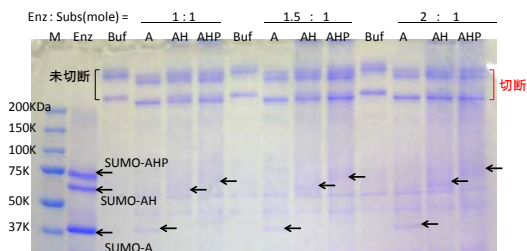
平瀬研究室

11

(2) SUMO-A、SUMO-AH、SUMO-AHP のフィブリノゲン分解活性

本実験系ではフィブリノゲン分子はサブユニットに分かれず、200kDa 以上の分子量に見られたが、切断分子は未切断分子よりも小さくなった。

Refolded SUMO-A, AH, AHPによるフィブリノゲンアッセイ



*FibrinogenのMW=330kDa

2014/5/25

CONFIDENTIAL

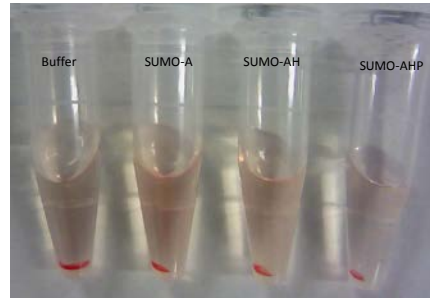
4

基質フィブリノゲン (分子量 330kDa) に対して、37°C、2 時間の反応においてモル比で 2 倍量の精製タンパク質で完全に分解できた。

(3) SUMO-A、SUMO-AH、SUMO-AHP の血栓溶解活性

精製したタンパク質が、実際に血栓を溶解する活性があるかどうかを、ヒト血餅の溶解活性で調べた。

SUMO-A、-AH、-AHPの血栓溶解活性
2倍希釈血液、37°C、1時間



2014/5/25

CONFIDENTIAL

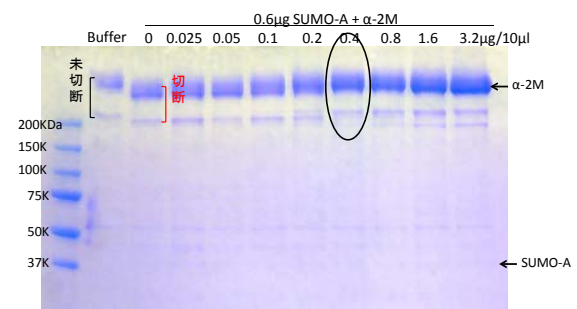
6

37°C、1 時間の加温で、Buffer コントロールに比べて、明らかに血餅量の減少が見られた。特に、フィブリン標的ドメインを持つ SUMO-AHP の活性が高かった。

(4) 精製タンパク質のフィブリノゲン分解活性に対する α -2M の阻害活性

0.6 μ g の精製タンパク質 SUMO-A のフィブリノゲン消化に対する α -2M の阻害活性を見た。

α -2M+SUMO-Aのフィブリノゲンアッセイ



2014/5/25

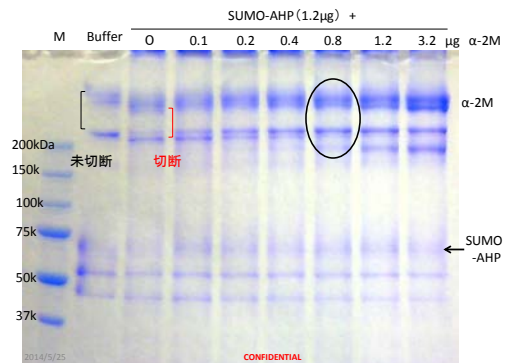
CONFIDENTIAL

7

0.6 μ g の SUMO-A (MW=約 35kDa) の活性は、0.4 μ g の α -2M (MW=725kDa) で完全に阻害された。プロテアーゼと α -2M の阻害はモル比で 1 : 1 で起こる。SUMO-A よりも、 α -2M は分子量が 20 倍大きいことから、SUMO-A の活性体は 3.3%程度であることが分かる。

次に、1.2 μ g の SUMO-AHP のフィブリノゲン消化に対する α -2M の阻害活性を見た。

α -2M+SUMO-AHPのフィブリノゲンアッセイ



2014/5/25

CONFIDENTIAL

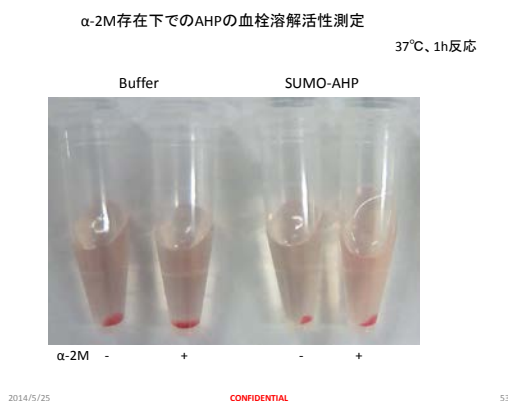
8

Alfimeprase (A) にハブ毒 C 末端ドメイン

を融合させた SUMO-AHP タンパク質でも、 α -2M で阻害された。完全に SUMO-AHP (MW=約 70 k Da) の活性体を阻害する α -2M 量から、SUMO-AHP の活性体は 6.6%であった。

(5) 精製タンパク質 SUMO-AHP の血栓溶解に対する α -2M の阻害活性

1.2 μ g の精製 SUMO-AHP に 0.8 μ g の α -2M を添加した反応液で血栓溶解アッセイを行い、 α -2M を添加しないものと比較した。



血栓溶解活性において、Alfimeprase (A) にハブ毒 C 末端ドメインを融合させた SUMO-AHP タンパク質でも、 α -2M で阻害された。

(6) SUMO 断片除去

SUMO-protease1 で SUMO-A、SUMO-AHP タンパク質を切断すると沈殿するため、再リフォルディングを行った。SUMO 断片を除去した A、AHP はフィブリノゲン分解活性を保持していた。A、AHP のフィブリノゲン分解は、 α -2M により阻害されることを確認した。N 末端の SUMO 断片の有無は、 α -2M の結合には関係ないことが分かった。

(7) 結論まとめ

①フィブリン分解活性 (Fibrolase) を持つ Alfimeprase (A) にハブ毒 HR1a の C 末タンパク質 (H) + プラスミノゲン由来フィブリン結合ドメイン (P) を結合させた組換えタンパク質 (AHP) の生産に成功した。フィブリノゲン消化活性を持っていた。

②N 末端に SUMO ペプチドを付加した SUMO-AHP は特に血栓溶解活性が強かった。フィブリンにターゲティングするためと考えられた。

③ハブ毒由来 HR1a の C 末タンパク質を融合させた SUMO-AHP においても、 α -2M による阻害活性を回避することはできなかった。この結果は、SUMO ペプチドを切断した場合でも同様であった。最初の仮説が間違っていたと結論される。

④ α -2M と結合しないで、出血活性のない Alfimeprase、ハブ HR2a 様毒を探す必要がある。

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 9 件)

- 1) Inoue, H, Suganami, A, Ishida, I, Tamura, Y and Meada, Y. Affinity maturation of a protein that binds specific epitope using *in silico* analysis. J. Biochem., 154(4), 325-332, 2013. 査読有
- 2) Shimizu, Y, Isoda, K, Tezuka, E, Yufu, T, Nagai, Y, Ishida, I, Tezuka M. Influence of 50-nm polystyrene particles in inducing cytotoxicity in mice co-injected with carbon tetrachloride, cisplatin, or paraquat. Pharmazie, Aug67(8), 712-714, 2012. 査読有
- 3) 石田功、研究開発ステージの違いによる人材評価の実際、研究開発リーダー、8 巻、No. 11(2 月)、12-14、2012. 査読無
- 4) Shibata, Y, Okano, S, Shiroza, T, Tahara, T, Nakazawa, K, Katoka, S, Ishida, I, Kobayashi, T, Yoshie, H and Abiko, Y. Characterization of human type monoclonal antibodies against the reduced form of hemin binding protein 35 (HBP35) from *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodontal Res., 46(6), 673-681, 2011. 査読有
- 5) 石田功、製薬業界では新しい創薬技術が求められている、研究開発リーダー、8 巻、No. 5 (8 月)、35-37、2011. 査読無
- 6) Inoue, H, Ihara, A, Takahashi, H, Shimada, I, Ishida, I and Maeda, Y. Affinity transfer to human protein by CD3 grafting of camelid VHH. Protein Science, 20, 1971-1981, 2011. 査読有
- 7) Miyoshi-Akiyama, T, Ishida, I, Fukushi, M, Yamaguchi, K, Matsuoka, Y, Ishihara, T, Tsukahara, M, Hatakeyama, S, Kurosu, H, Itoh, N, Morisawa, A, Yoshinaka, Y, Yamamoto, N, Lianfeng, Z, Chuan, Q, Kirikae, T and Sasazuki, T. Fully human monoclonal antibody directed to proteolytic cleavage site in SARS coronavirus S protein neutralizes virus in Rhesus macaque SARS model. J Infectious Diseases, 203, June 1, 1574-1581, 2011. 査読有
- 8) Kunisato, A, Wakatsuki, M, Shimba, H, Ohta, T, Ishida, I and Nagao, K. Direct generation of induced pluripotent stem cells from human non-mobilized blood. Stem Cells and Development, 20(1), 159-168, Jan, 2011. 査読有
- 9) Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Lin Z, Obata T, Ishida, I, Kishi H and Muraguchi A. Generation of TRAIL-receptor 1-specific human monoclonal antibodies by a combination of immunospot array assay on a chip and human Ab-producing mice. Eur. J. Immunol., 40, 3591-3593, Dec, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1) 石田功「遺伝子組換え嫌気性菌による固形がん治療」アカデミックフォーラム、東京、2014年5月14-16日。
- 2) 平裕一郎、平郁子、大野まき、西川毅、磯田勝広、池本守、斎藤浩美、石田功「嫌気性菌をDDSに用いた固形がんに対する新規治療法の開発」日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月27-30日。
- 3) 平裕一郎、平郁子、大野まき、磯田勝広、西川毅、池本守、斎藤浩美、石田功「嫌気性菌をドラッグデリバリー担体に用いた固形がんに対する新規治療法の開発—in vivo レベルでの解析」第57回日本薬学会関東支部大会、東京、2013年10月26日。
- 4) 西川毅、平裕一郎、平郁子、大野まき、磯田勝広、池本守、斎藤浩美、石田功「嫌気性菌をドラッグデリバリー担体に用いた固形がんに対する新規治療法の開発—細胞・分子レベルでの解析」第57回日本薬学会関東支部大会、東京、2013年10月26日。
- 5) 吉江唯菜、山崎竜人、小島唯、建部卓也、前田優平、西川毅、石田功「乳がん細胞におけるカタラーゼの過剰発現がTRAILによる細胞死誘導に与える影響」第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月11-13日。
- 6) 高石明那、長谷井智也、神谷力嗣、前田恭央子、下枝里佳子、杉田真美、吉江唯菜、西川毅、石田功「昆虫培養細胞における無血清培地を用いた組換え蛋白質発現細胞の作製」第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月11-13日。
- 7) 石田功「抗体医薬開発、ヒト抗体作製技術から製品開発へ」平成24年度慶応大学薬学研究所がんプロフェッショナルセミナー、慶応大学芝共立キャンパス、2013年2月1日。(招待講演)
- 8) 石田功「抗体医薬の現状と未来」創薬を指向したタンパク質科学、日本化学会関東支部講演会、東京、2011年10月21日。(招待講演)
- 9) 石田功「こんな考え方で研究をしてきました」キリンHDフロンティア技術研(旧基盤研)25周年シンポジウム、横浜、2011年5月14日。(招待講演)

〔図書〕(計 8 件)

- 1) 石田功、「ゴールが見えているのに遅れが生じたテーマ評価とGo/Stop判断」、pp123-125、第2章遅れが生じた研究開発テーマの評価と軌道修正、Go/Stop判断、遅れを出さない研究開発組織・プロジェクトのつくり方、技術情報協会2013年12月刊。
- 2) 石田功、「ヒト抗体医薬品の開発における潜在ニーズの探索」第5章潜在ニーズ具現化

テーマの成功事例、pp539-541、失敗事例、顧客も気づいていない将来ニーズの発掘と新製品開発への活用、技術情報協会2013年8月刊。

- 3) 石田功、「抗体医薬開発、ヒト抗体作製技術から製品開発へ」、pp159-162、文科省「がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン」採択事業、高度がん医療開発を先導する専門家の養成、平成24年度活動報告書、慶応大学大学院薬学研究所2013年3月発行。
- 4) 石田功、第2章4節大量調製-動植物利用、pp31-35、新機能抗体開発ハンドブック、2012年8月刊(NTS出版)
- 5) 石田功、抗体医薬の開発動向、pp1-10、抗体医薬品の開発と市場、2012年7月刊(シーエムシー出版)
- 6) 石田功、「未だ実用に使われていない過去の発見、要素技術の掘り起こし」、pp329-331、2022年を見据えた研究テーマ発掘の実践ノウハウ集、技術情報協会2012年7月刊。
- 7) 石田功、「研究開発ステージの違いによる人材評価の実際」、pp158-161、新しい研究開発者の評価と処遇、技術情報協会2011年3月刊。
- 8) 石田功、「ベンチャー企業との提携」、pp71-74、「本社技術開発戦略に基づいた画期的な技術の創出」、研究開発「失敗」の実集、技術情報協会2011年2月刊。

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

本テーマに関する特許出願はありませんでした。

〔その他〕

ホームページ等

ホームページ：<http://www.thu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

池本 守 (IKEMOTO, Mamoru)
帝京平成大学・薬学部・准教授
研究者番号：90311331