

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 1 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591238

研究課題名(和文)電気透析と人工分子シャペロンを組合せたアルブミン結合毒素除去によるアルブミン再生

研究課題名(英文) Removal of albumin-bound toxin and albumin refolding by electrical dialysis and artificial chaperon

研究代表者

小久保 謙一 (KOKUBO, Kenichi)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：20287965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質結合毒素のタンパク質の毒素の結合を外し、毒素を除去してタンパク質を再生するシステムを開発を目的とした。アルブミン結合毒素をアルブミンから効率よく外すためにタンパク質の変成剤として尿素を用いた。それにより、アルブミンが効率的に除去可能であり、また尿素を除去することで、アルブミンのリフォールディングが起こり、アルブミンが再生されることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to develop a method to effectively remove protein bound toxins by unbinding toxin from protein using denaturant and by refolding the protein. Using urea as a denaturant, protein bound toxins effectively removed. The protein can be refold by rapidly removing urea by the modified apparatus for dialysis.

研究分野：臨床工学

キーワード：アルブミン結合毒素 効率的除去 インドキシル硫酸 リフォールディング

1. 研究開始当初の背景

1990年代より腎不全の進行にインドキシル硫酸などのアルブミン結合毒素が関与していることが報告され(Niwa et.al., J Lab Clin Med. 1994)、これらのタンパク結合毒素は「忘れられていた毒素」(Vanholder et al., Kidney Int, 2001)として注目されるようになった。近年になり、インドキシル硫酸の血漿濃度が高い患者ほど死亡率が高く、動脈硬化が進行していること(Barreto et al., CJASN, 2009)、p-クレチル硫酸濃度が高い患者ほど死亡率が高いこと(Liabeuf et al., Nephrol Dial Transplant, 2010)も明らかになっている。また糖尿病では、AGE化などの糖化や酸化による修飾を受けたアルブミンが体内に蓄積するとともに、それらが腎不全の進行や糖尿病の合併症の発症に関わっていると考えられるようになってきている(Makino et al., Nephrol Dial Transplant, 1996)。急性肝不全の治療においては、アルブミンに結合しているビリルビンの除去が難しく、それが治療の難しさにつながっていることが指摘されている。

血液透析療法は、腎不全患者の生命を維持するために不可欠の治療であるが、分子の大きさに基づいた分離方法であるため、アルブミン結合毒素をほとんど除去することができない。また、急性肝不全の治療などに用いられる急性血液浄化法では、毒素のみを除去するのは難しいため、アルブミン透析や吸着剤による除去、血漿交換などによりアルブミンごと除去して新しい血漿と交換する方法がとられている。しかし、アルブミン透析や吸着剤を用いる場合、毒素の除去速度は不十分であり、また血漿交換では、高価で感染のリスクのある血漿もしくはアルブミン製剤が必要である。また、急性血液浄化において用いられている治療法は、保存期の腎不全患者や糖尿病患者に使用する治療法としては、生体への負荷が大きく、高コストであるため、それを適用することは現実的ではない。

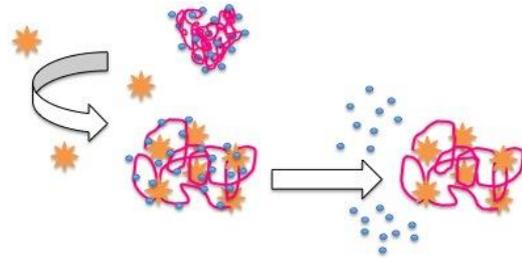
大腸菌の分子シャペロンの一つであるシャペロニン、ATPと共役した構造変化により、変性タンパク質を取り囲み、内部に親水的な雰囲気を作ることで、自発的なタンパク質の折り畳み(フォールディング)を促し、タンパク質を正しい三次元構造にする。近年、変性タンパク質との結合、リフォールディング、放出を動的に制御できる人工的なホスト分子(人工分子シャペロン)として、コレステリル基置換プルランのような人工的に疎水部分を付与した多糖を原料とするナノゲルが開発されている。これらのナノゲルは三次構造の崩れた変性タンパク質をゲル内部に取り込み、タンパク質の凝集を抑制するとともに、リフォールディングを促し、三次構造を再構築したタンパク質を放出させる機能を有することが明らかとなっている(Morimoto et al., Macromol Biosci, 2005)。

2. 研究の目的

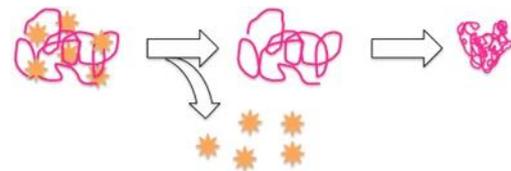
本研究では、「タンパク質をきれいにする」という新しい概念の血液浄化法を確立することを最終目的とした。すなわち、タンパク結合毒素のタンパク質と毒素の結合を外し、毒素を除去してタンパク質を再生する。これにより、血液透析患者、保存期腎不全患者、急性肝不全患者などに適用可能な新たな治療手段を提供することができるようになることを考えた。

本研究では次の2つの技術を確立し、それを組み合わせたシステムを構築することを目的とした。

(1) タンパク変性剤を利用したアルブミン結合毒素の効率的な除去



(2) 変性剤を除去しながらアルブミンの凝集を防ぎ、三次構造を再構築する方法の確立

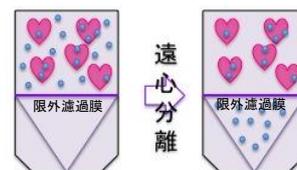


3. 研究の方法

(1) アルブミンとインドキシル硫酸の吸着等温線の作成と吸着形態の検討

まず初めに、アルブミンとインドキシル硫酸の吸着等温線の作成し、Scatchardモデルによりその吸着形態について検討した。

インドキシル硫酸とヒト血清アルブミンをpH7.4のリン酸緩衝液(0.1M)に溶かし、所定の濃度になるように混合し、攪拌した後、37度で静置した。アルブミン濃度は、0.3 mg/mLとし、IS濃度を0~500 mg/mLに変化させた。1, 3, 6, 12, 24時間後に遠心濾過フィルタ(分画分子量3 kDa)を用いて、インドキシル硫酸とアルブミンを分離し、遊離インドキシル硫酸濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定した。



高速液体クロマトグラフィーにおいて、インドキシル硫酸は、電気化学検出器(400mVもし

くは 500 mV)で検出した。設定は以下の通りとした。

流量：500 μL/min  
 使用カラム：EICOMPACT SC-50DS  
 逆相系分離カラム)  
 カラム温度：25°C  
 検出：EDC-700  
 移動相：0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4)

## (2) タンパク変性剤を利用したアルブミン結合毒素の効率的な除去

タンパク質の変性剤を利用して、アルブミン結合毒素の除去効率が変化するかどうかを測定した。変性剤としては尿素を使用した。

アルブミン水溶液は生理食塩水にヒト血清アルブミンを溶解して作成した。アルブミン水溶液に定量のインドキシル硫酸を混合し、24 時間以上 37°Cのインキュベータ内に静置し、毒素結合型アルブミンを作製した。

アルブミンとの結合率は、限外濾過膜を用いた遠心分離によって毒素結合型アルブミンと結合しなかった遊離インドキシル硫酸を分離、遊離インドキシル硫酸濃度を高速液体クロマトグラフィ (ECD 検出) にて測定し、初期混合量と遊離量の差から結合量を求めた。

変性剤を使用することで、平衡吸着量に変化するかどうか、また除去効率が向上するかどうか検討した。また、変性剤の濃度を変化させ、除去効率がどのように変化するかについても検討した。

次に、変性剤を含む透析液を用いて、透析を行い、インドキシル硫酸の除去量を比較した。透析液は、体積変化がないように密閉した一定量のものを循環させた。

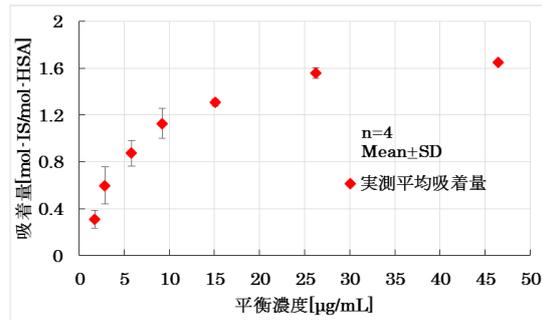
## (3) 変性剤を除去しながらアルブミンの凝集を防ぎ、三次構造を再構築する方法の確立

アルブミン水溶液は生理食塩水にヒト血清アルブミンを溶解して作成した。作成したアルブミン溶液と変性剤をまぜて、アルブミンを変性させた後、透析により、変性剤を除去した。その際、アルブミンの 3 次構造が元に戻らず、アルブミン同士が結合して凝集すると、溶液が白濁する。そこで、アルブミンが凝集したかどうかを、波長 520nm の吸光度を測定することで、判断した。

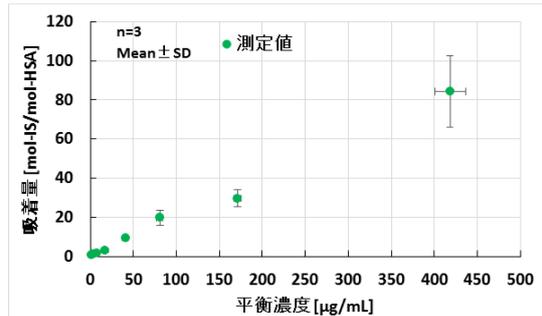
## 4. 研究成果

### (1) アルブミンとインドキシル硫酸の吸着等温線の作成

HSA と IS は混合してから、1 時間程でほぼ一定濃度となった。遊離 IS 濃度から吸着 IS 量を計算し、吸着等温線を作成した。アルブミンとインドキシル硫酸のモル比を 1:2 に固定して測定した。吸着等温線は一見、ラングミュア型のものであり、最大吸着量は、2 mol-IS/ mol-HAS となっていた。

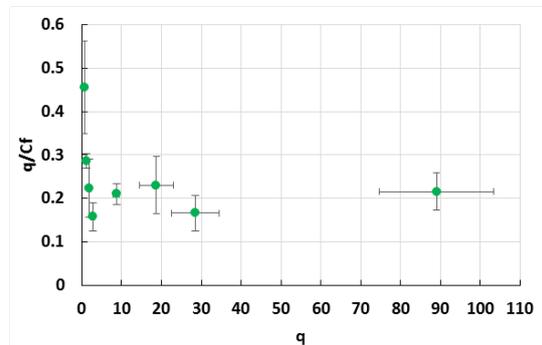


一方、アルブミン濃度を一定として、測定した吸着等温線は、次のようになった。



濃度の高い部分では 1 つのアルブミンに 70 ~100 の IS 分子が吸着していることがわかる。

次にアルブミン濃度一定で作成した吸着等温線を Scatchard モデルで解析した。



その結果、アルブミンとインドキシル硫酸の結合においては、弱い結合と強い結合の少なくとも二つの独立した吸着サイトが存在することが示された。吸着等温線は、

$$q = \frac{0.35C_f}{1 + 0.19C_f} + 0.20C_f$$

となった。強く結合しているサイトへのインドキシル硫酸の最大吸着量は

$$2 \text{ mol-IS/ mol-HSA}$$

であった。

健康人のインドキシル硫酸モル濃度をアルブミンモル濃度で割ると、0.019 となる。したがって、人の体内においては、インドキシル硫酸はそのほとんどが強く結合していると考えられる。

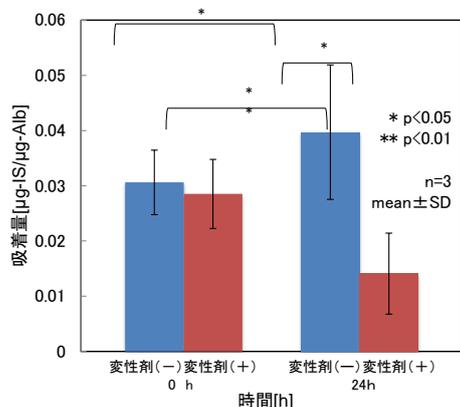
実際健康人、透析患者で報告されているイ

インドキシル硫酸の結合率は、90～98%と非常に高い。本実験結果から、それらは非常に強く結合しており、吸着速度が速く、脱着速度が遅い吸着形態であると考えられた。したがって、希釈法では、十分な脱着速度を得ることができず、除去速度が遅くなってしまうため、現在の血液透析療法では、十分に除去することは難しいことが確認できた。

## (2) タンパク変性剤を利用したアルブミン結合毒素の効率的な除去

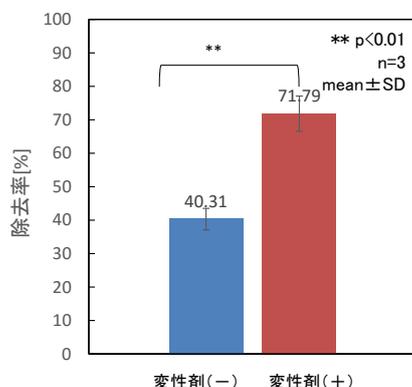
変性剤(+)群においては、インドキシル硫酸の平衡吸着量が減少したことから、変性剤付加によりアルブミンとインドキシル硫酸の平衡を除去しやすい方へ移動させることに成功したと考えられる。

変性剤(-)群においては溶媒の添加による希釈によって平衡吸着量が低下しておらず、単に希釈するだけでは、インドキシル硫酸の除去は難しいことが確認できた。



変性剤によってアルブミンの3次構造がほぐれ、アルブミン内部のインドキシル硫酸との結合部位を露出されたことで、吸着特性が変化し、結合していないインドキシル硫酸が増加したと考えられる。

透析によりインドキシル硫酸の除去を試みたところ、変性剤(-)群に比べて、変性剤(+)群では、インドキシル硫酸の除去率が非常に高くなった。



以上の結果から、変性剤の添加により、インドキシル硫酸が除去しやすい方向に吸着

特性を変化させることができ、それにより除去率の大幅な向上が見られたと考えられた。

## (3) 変性剤を除去しながらアルブミンの凝集を防ぎ、三次構造を再構築する方法の確立

変性剤により水素結合が外れて、伸びた形状をしているアルブミンは、変性剤を取り除くと周りが親水的な雰囲気であれば、自然に3次構造が元に戻ることが知られている。変性剤が除去されたとき、アルブミン同士が結合すると凝集してしまう。

親水的な雰囲気を作るにはいくつかの方法があるが、最も簡単な方法である、水の存在下で変性剤を除去するだけで、アルブミン濃度が血中濃度の標準値の1/10程度の場合、アルブミン同士が結合して凝集することなく、アルブミンを元に戻せることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

- ① 鈴木駿平, 小久保謙一, 栗原佳孝, 塚尾浩, 小林弘祐. インドキシル硫酸のアルブミンへの吸着動態解析. 第29回ハイパフォーマンスメンブレン研究会, 2014. 3. 8-9, 日本消防会館ニッショーホール(東京都港区)
- ② 鈴木駿平, 小林こず恵, 小久保謙一, 栗原佳孝, 塚尾浩, 小林弘祐. インドキシル硫酸のアルブミンへの吸着動態解析. 第59回日本透析医学会学術集会・総会, 2014. 6. 13-15, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市中央区)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: アルブミン結合毒素除去装置  
 発明者: 小久保謙一, 小林弘祐, 小林こず恵  
 権利者: 北里研究所  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2014-91968  
 出願年月日: 平成 26 年 4 月 25 日  
 国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小久保 謙一 (KOKUBO, Kenichi)  
 北里大学・医療衛生部・准教授  
 研究者番号: 20287965

### (2) 研究分担者

小林 弘祐 (KOBAYASHI, Hirotsuke)  
 北里大学・医療衛生部・教授  
 研究者番号: 70153632