

論文の内容の要旨

日本の献血・輸血システムは世界最高レベルにあるが、少子高齢化に伴う献血者層人口の減少や大規模震災時における輸血液不足への懸念から、長期保存可能な人工酸素運搬体(赤血球代替物)の実現に大きな期待が寄せられている。これまでもヘモグロビン(Hb)を用いた製剤がいくつか開発されてきたが、血圧上昇などの副作用があり、未だ実用化には至っていない。一方、小松らはウシ Hb(HbBv)の分子表面に3個のヒト血清アルブミン(HSA)を結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(HbBv-HSA₃)を開発し、それが安全な人工酸素運搬体として機能することを明らかにしている。本研究は、HbBv-HSA₃の実用化に向けた試験を実施するため、まず HbBv-HSA₃の効率高い調製法の確立を第一の目的とした。また、遺伝子組換えヒト HbA(rHbA(wt))の産生、rHbA(wt)と組換え HSA(rHSA)からなる完全合成型組換え(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(rHbA(wt)-rHSA₃)の調製、さらには変異導入による酸素親和性の制御を第二の目的とした。

第1章は、序論である。Hbの構造と酸素結合能、人工酸素運搬体の歴史、代表的な製剤の特徴や臨床試験の状況、課題について概説している。

第2章の前半では、HbBvを用いた HbBv-HSA₃の合成、精製の改良について述べ、効率高い調製法を確立している。後半では、クラスターの構造、酸素結合能、エンドトキシン(LPS)の除去法についてまとめている。また、非還元性二糖類をクラスターに添加した凍結乾燥粉末が、酸素結合能を保ったまま2年間安定に保存できることを見出している。

第3章では、*Pichia*酵母を宿主として産生したrHbA(wt)とrHSAからなるrHbA(wt)-rHSA₃の合成について述べている。前半は、rHbA(wt)の産生、精製法、構造、酸素結合能について記述している。後半は、rHbA(wt)-rHSA₃の調製、構造、酸素結合能についてまとめており、従来のHbA-HSA₃と同じ酸素結合パラメーターを持つことを確認している。

第4章では、ヘムポケット内アミノ酸残基を置換した4種類のrHbA(X)を調製し、それらの酸素親和性が赤血球由来のHbAよりも低いことを明らかにしている。また、これらHbA(X)をコアとして合成したrHbA(X)-rHSA₃は適度に低い酸素親和性を有することを見出している。

第5章では、HbBv-HSA₃の安全性評価についてまとめている。血液適合性試験および動物実験より、HbBv-HSA₃に副作用がないことを明らかにし、蛍光色素を用いた血中滞留時間の測定結果についても記述している。

第6章では、本論文の総括と将来展望である。

以上のように本論文では、HbBv-HSA₃の大規模スケール合成につながる効率高い調製法、完全合成型rHbA(X)-rHSA₃の合成と酸素親和性の制御に関する多くの成果が詳細にまとめられている。これらは、(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターを赤血球代替物や酸素治療剤として実現するための重要な基盤技術となる。

論文審査の結果の要旨

1. 論文の主題

Synthesis of Hemoglobin–Albumin Clusters as an Artificial O₂-Carrier

人工酸素運搬体としての(ヘモグロビン–アルブミン)クラスターの合成

2. 当該研究分野における位置付け

赤血球代替物としての人工酸素運搬体の開発は、生体適合性、酸素運搬能に優れたヘモグロビン(Hb)を原料とするアプローチが主流となっている。しかし、Hb 単体を投与しただけでは、直ちに腎臓から排泄されてしまうため、重合または高分子修飾により分子量を上げ、血中滞留性を延ばす必要がある。これまで欧米を中心に様々な製剤が開発されてきたが、一酸化窒素(血管内皮由来弛緩因子)の捕捉による副作用(血管収縮と血圧上昇)を起こす場合もあり、実用化には至っていない。一方、ウシ Hb(HbBv)に血漿蛋白質であるヒト血清アルブミン(HSA)を結合させたコア–シェル構造の(ヘモグロビン–アルブミン)クラスター(HbBv–HSA₃)は、分子表面が負に帯電しているため、血管内壁への拡散が抑えられ、血圧上昇は見られない。HbBv–HSA₃ は実用化に最も近い人工酸素運搬体の一つと言われている。本研究では、①HbBv–HSA₃ の効率高い調製法を確立するとともに、②ヒト血液に一切依存しない完全合成型の組換え(ヒトヘモグロビン–アルブミン)クラスター(rHbA–rHSA₃)を合成し、変異導入による酸素親和性の制御を可能にした。これらの成果は、赤血球代替物のみならず酸素治療薬として具体化するための重要な基盤技術となる。

3. 論文の構成

本論文は、以下の 6 章で構成されている。

第 1 章 序論

第 2 章 (ヘモグロビン–アルブミン)クラスターの合成

第 3 章 組換えヒトヘモグロビン A (wt) の産生および組換え(ヘモグロビン–アルブミン)クラスターの合成

第 4 章 遺伝子工学的に改変したヘムポケットを有する組換え(ヘモグロビン–アルブミン)クラスターの合成

第 5 章 動物実験による(ヘモグロビン–アルブミン)クラスターの評価

第 6 章 結論と将来展望

4. 論文の独自性や成果

人工酸素運搬体の実現は、先端医療はもちろん、人類の健康・福祉に大きな貢献をもたらすものと期待されている。本論文は、HbBv–HSA₃ の効率高い調製法を示すとともに、完全合成型の rHbA–rHSA₃ を合成し、変異導入による酸素親和性の制御を実現した成果のまとめである。業績の詳細は、以下の 4 点に要約される。

- 1) 架橋剤の変更および陰イオン交換クロマトグラフィー(AEC)を用いる精製により、効率高い HbBv-HSA₃ の調製法を確立した。これにより数 10 L スケールでの合成にも目途が立った。得られた HbBv-HSA₃ の各成分を単離し、酸素結合能が HSA 結合数に依らず一定であることを明らかにした。さらに、クラスターの製剤化に向けた取り組みとして、溶液中の LPS の除去条件および測定法を確立した。また、非還元性二糖類であるスクロースを添加した Hb-HSA₃ 製剤の凍結乾燥粉末が、蛋白質の構造と機能を保ったまま 2 年間安定に保存できることを見出した。
- 2) *Pichia* 酵母を宿主とした rHbA(wt)発現系を構築し、得られた rHbA(wt)が赤血球由来の HbA と全く同じアミノ酸配列、立体構造を有することを明らかにした。*Pichia* 酵母による rHbA(wt)の産生および X 線結晶構造解析は世界初の報告例である。さらに rHbA(wt)と遺伝子組換え HSA(rHSA)を用いて rHbA(wt)-rHSA₃を合成した。この製剤はヒト血液に一切依存しない安定供給可能な完全合成型の人工酸素運搬体となる。
- 3) rHbA(wt)のヘムポケット内アミノ酸残基である Leu-β28 を嵩高いアミノ酸 (Phe、Trp、Tyr) に置換することで、低酸素親和性を有する rHbA(X)を調製した。rHbA(X)をコアとして合成した rHbA(X)-rHSA₃は適度に低い酸素親和性を有する。興味深いことに rHbA(X)およびそのクラスターの酸素親和性は、改変した β28 位置のアミノ酸側鎖体積と負の相関関係にあった。最も嵩高い Trp に置換した rHbA(βL28W)-rHSA₃は、赤血球と同じ酸素親和性を有することを明らかにした。
- 4) 動物実験により HbBv-HSA₃ の安全性を評価した。ラット 20%血液交換試験では、投与 6 時間後まで循環パラメーターおよび血液ガスパラメーターに変化は見られず、血圧上昇などの副作用も起こさないことを明らかにした。さらに、蛍光ラベル体を用いて血中滞留時間の測定ができることも見出した。

5. 論文の課題

著者は HbBv-HSA₃ の効率高い調製法を確立した。今後、数 10 L スケールの生産に向けて、流体力学や反応工学の知見も必要となろう。また、*Pichia* 酵母による rHbA(wt)の発現量は約 200 mg/と高いが、産業利用するためにはさらなる向上が望ましい。今回構築した発現系は過剰発現が制限される細胞内発現型である。細胞外分泌型として再構築すれば、収量の改善が見込まれる。プラスミドベクターのプロモーターやコドン配列の最適化によっても発現量の向上が期待できる。

6. 論文の評価

本論文は、人工酸素運搬体 HbBv-HSA₃ の実用化に向けた開発研究、ならびに遺伝子組換え技術を用いた rHbA(wt)-rHSA₃ に関する基礎研究の両面において、大きな一歩となる成果のまとめといえる。当該分野における学術的貢献度はきわめて高く、本論文が博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。また、2020年2月13日、論文内容とそれに関連した事項についての諮問を行った結果、合格と認定した。