

分担研究報告書

人工血小板の開発に関する研究

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部 講師

研究要旨 血管内皮下組織中に存在するコラーゲン、フォン・ビルブランド因子（vWF）を標的として、それぞれに粘着し得る2種類のリポソームを作成し、そのin vitroならびにin vivoの評価を行った。コラーゲンに粘着するGPIaIIa導入リポソームは、蛍光顕微鏡と連動した連続画像解析装置を用いて観察すると流動状態下でコラーゲン表面と接触すると直ちに粘着し、quartz crystal microbalance (QCM)法による振動数変化（ ΔF ）として捕らえることが可能であった。この反応は抗GPIa抗体（Gi9）で抑制される特異的な反応であった。また抗コラーゲン抗体を導入したリポソームも同様にコラーゲンに特異的に粘着した。一方、vWFを標的としたリポソームに関しては昨年度の研究でvWF結合部位を含む遺伝子組み換えGPIb α を組み込んだリポソーム（GPIb α -リポソーム）はリポソーム同志の凝集がみられるばかりではなく、ヒト血小板ともvWFを介して凝集し得ることを示したが、本年度の研究ではさらに（1）in vitroの静止系でvWFが固相化されたmicrotiter well表面への³H-GPIb α リポソームの粘着は添加リポソーム濃度に依存して増加すること、流動状態下でvWF固相化表面にrGPIb α リポソームを還流すると ΔF の増加を伴わない一過性の粘着が観察され、その粘着量は固相化vWF濃度に強く依存すること、（2）in vivoで血管傷害や血栓形成部位への集積性を放射ラベルしたrGPIb α リポソームを用いて検討すると、ラット頸動脈シャントモデルにおいてはrGPIb α リポソームはコントロールに比較して有意に血栓への集積性が高いことが示された。また標識rGPIb α リポソームは動物血管壁ブロックに特異的に粘着した。すなわち両リポソームは血栓形成に必須な凝集や粘着機能を明らかに有しており、人工血小板のプロトタイプとして開発の今後に明解な方向性を示したといえる。

A. 研究目的

悪性腫瘍に対する化学療法、骨髄移植や外科手術の際に血小板輸血は欠くことのない重要な補助治療法である。しかし、血小板輸血には解決すべき幾つかの大きな問題点がある。一つは供給不足・緊急時供給体制の不備であり、もう一つは血小板製剤による輸血後のウィルス感染症をはじめとする輸血副作用発現の危険性である。血

小板輸血は頻回に行われることが多く、また、ドナー数が多いことから感染症のリスクも大きい。本研究は十分な止血能を有する血小板代替物の開発を目的としている。血小板代替物作成のためには血小板機能の中で最も基本的かつ重要な機能を担う因子を取り上げ、これを効率良く担体に導入しなければならない。平成9年度までの検討で我々は組換えGPIb/IXをCHO細胞で発

現することに成功し、発現された蛋白は血小板上の受容体蛋白と同等の機能を持つことを見だし、このヒト組換え型受容体蛋白の大量培養法と純化法、ならびに GPIIb/IIIa のリポソームへの導入法について検討し、基礎的データの集積と rGPIIb α 導入リポソームの安定供給を達成した。平成 10 年度は血管損傷部位に特異的に集積し、ヒト血小板とも反応して血栓を形成する 2 種類の粒子を作成した。すなわち (1) 遺伝子組み換え血小板膜糖蛋白 GPIIb α を固相化したリポソーム、(2) 遺伝子組み換え血小板膜糖蛋白 GPIIIa を固相化したリポソーム、である。この 2 者につき、(1) *in vitro* でリポソームの内皮下組織の構成成分 (コラーゲンやフォンビルブランド因子 (vWF)) への粘着を、静止系ならびに流動状態下で観察し、(2) *in vivo* 動物モデルでの血栓への集積性につき検討した。

B. 研究方法

(1) リポソームの作成

前年度と同様の方法で作製した。すなわち、活性化された NGPE に組み換え GPIIb α または GPIIIa を結合させたあと、界面活性化剤存在下でコレステロール、レシチン、フォスファチジルエタノールアミンから成る脂質と混合し、ゲルろ過にて界面活性化剤を除去し、リポソームをえた。同様の方法で、抗コラーゲン抗体を導入したりポソームも作製した。

(2) *in vitro* のリポソーム粘着の検討

静止系および流動状態下で検討した。前者では、vWF が固相化された microtiter well に ^3H -で放射標識した rGPIIb α リポソームを一定時間静置し、洗浄後、残存する放射活性を測定した。後者は Tanaka らの方法に準じ、quartz crystal microbalance 法またはビデオ蛍光カメラを用いた画像解析法にて rGPIIb α リポソームまたは GPIIIa リポソームの vWF またはコラーゲン表面への粘着につき検討した。

(3) GPIIb α リポソームの *ex vivo* 血管壁への結合

まず、組み換え GPIIb α 蛋白自体が血管壁に結合するかを検討するため、組み換え GPIIb α を ^{125}I で標識した。対照として ^{125}I で標識したヒト血清アルブミン (HSA) を用いた。これらのラットないしモルモットの血管壁ブロックへの結合性を測定した。リポソームの結合実験には、脂質を ^3H -で放射標識したりポソームを用い、同様の方法でラットないしモルモットの血管壁との反応を測定した。

(4) *in vivo* での rGPIIb α リポソームの検討 リポソームの血管傷害や血栓形成部位への集積性検討には、ヒト GPIIb α と交叉反応があるラットを用い、頸動静脈シャントモデルにて血栓形成部位にリポソームが集積するかを検討した。すなわち、脂質を ^3H -で放射標識したりポソームを、あらかじめ頸動静脈にシャントが作成されたラットに注入し、経時的に血液中、およびシャント部位での放射活性を定量した。結果は、血栓/血液の放射活性比で記載した。

C. 研究結果

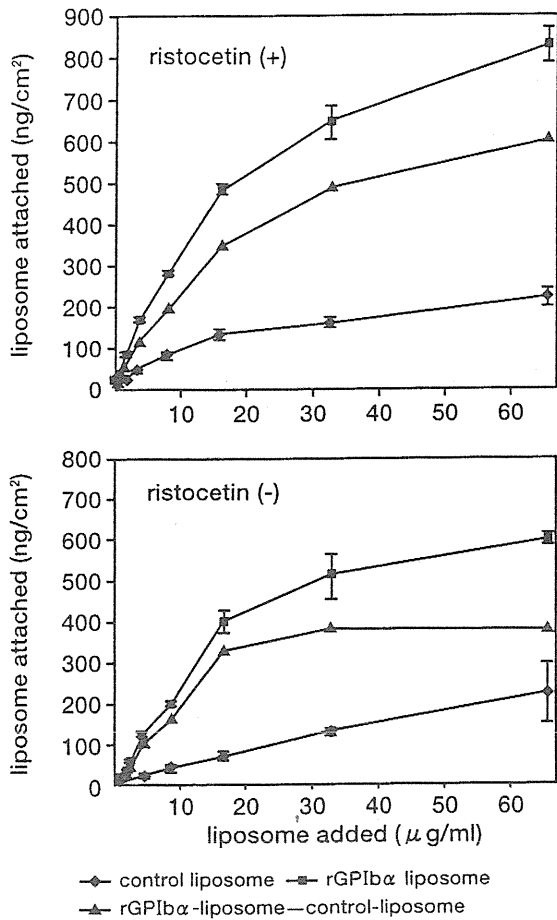
(1) *in vitro* のリポソーム粘着の検討

(a) GPIIb α リポソーム

静止系で microtiter well に固相化された vWF surface への ^3H -GPIIb α リポソームの粘着は、添加リポソーム濃度に依存して増加し、その程度は ristocetin 存在下でより顕著であった。また粘着飽和に達する濃度が ristocetin 存在下では非存在下に比べ高くなる傾向が見られた (図 1)。流動状態下でコラーゲン固相化表面に rGPIIb α リポソームを可溶性 vWF 存在下一定速度で還流すると、リポソームは表面に結合したが、その結合は一過性で短時間で解離した。 ΔF の増加は見られなかった。一方、流動状態下で vWF 固相化表面に rGPIIb α リポソームを還流すると、rGPIIb α リポソームは vWF 表面に粘着することなく移

図 1

Adhesion of rGPIIb α -liposomes onto surface-immobilized vWF



動し、やはり ΔF の増加は見られなかった。この現象は固相化する vWF 濃度に強く依存性していた。

(b) GPIIaIIa リポソーム

GPIIaIIa リポソームは流動状態下でコラーゲン表面と接触すると直ちに粘着し、 ΔF もリポソーム表面の GPIIaIIa 濃度に比例して時間とともに増加し、この粘着は抗 GPIIaIIa 抗体で抑制される特異的な反応であった(図 2)。また抗コラーゲン抗体導入リポソームも時間とともに粘着がみられた(図 3)。

(2) GPIIb α リポソームの ex vivo 血管壁への結合

組み換え GPIIb α 蛋白自体が血管壁に結合するかを検討するため、¹²⁵I で標識 GPIIb α のラット血管壁への結合を調べた結果が図 4 である。コントロール (HSA) では全く結合が見られないのに対し、GPIIb α は飽和的に血管壁に結合した。これは可溶性 vWF の有無に関係がなかった。またこの結合は、可溶性 GPIIb α の存在により競合的に阻害されること(図 5) から特異的であると考えられた。

次にリポソームの血管壁への結合実験を行った。脂質を ³H- で放射標識した GPIIb α リポソームは、モルモット血管壁に結合し、この結合は可溶性 GPIIb α の存在により競合的に抑制される特異的なものであった(図 6)。この結合はリストセチンにより増強した。一方、コントロールである

図 2

Adhesion of rGPIIa-IIa-Liposomes to Collagen Surface

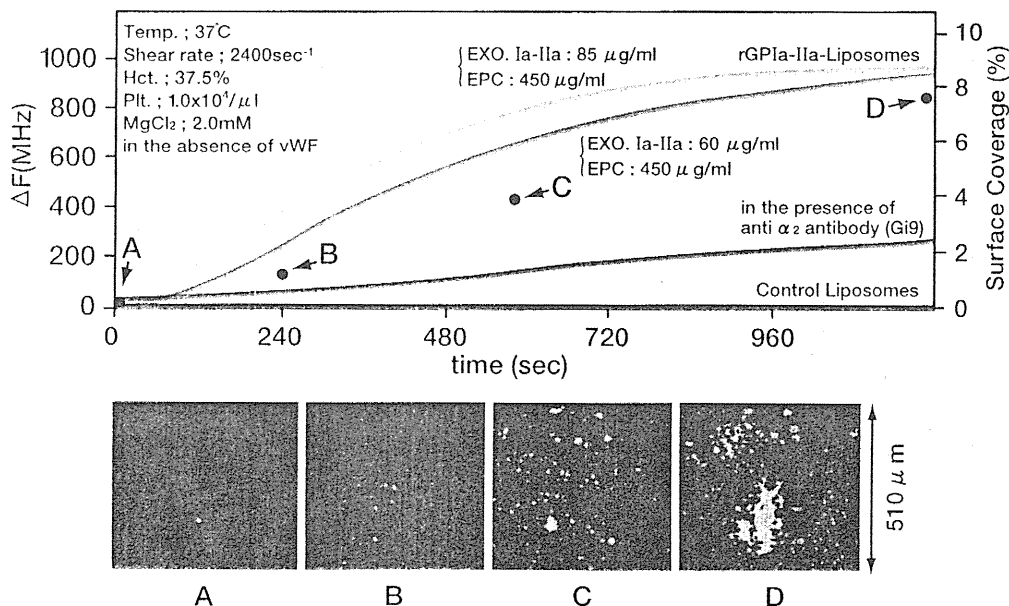
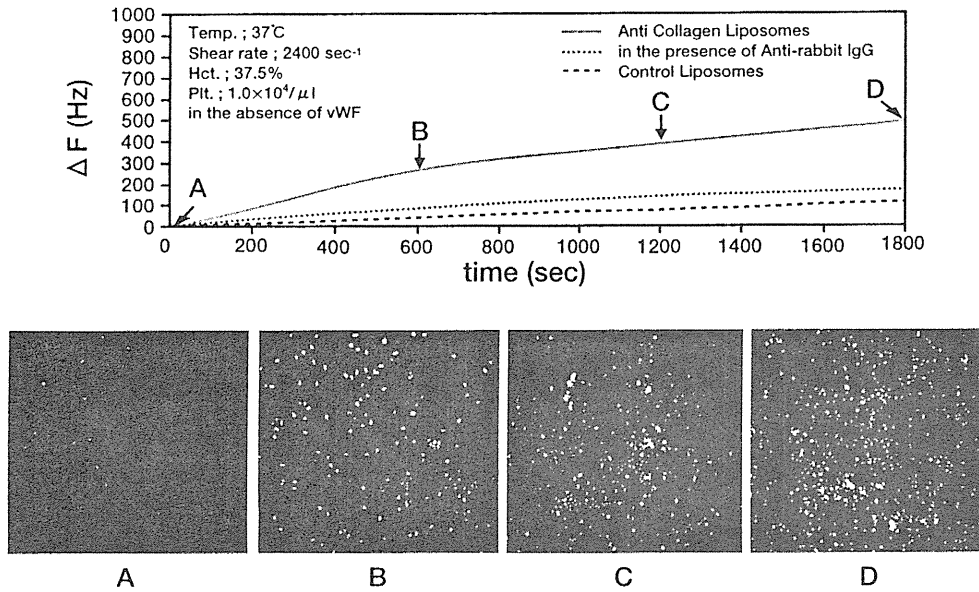


図3

Adhesion of Anti Collagen-Liposomes to Collagen Surface



HSAリポソームにこのような結合は見られなかった。

(3) *in vivo*でのrGPIb α リポソームの検討 リポソームの血管傷害や血栓形成部位への集積性を、放射ラベルしたrGPIb α リ

ポソームを用いて検討した。ラット頸動脈シャントモデルにおいて血栓単位重量あたりの放射活性集積率はGPIb α でコントロールより高く(表1)、血中放射活性は低かった。血栓/血液の放射活性比はGPIb

図4

¹²⁵I-rGPIb、¹²⁵I-HSAのラット血管壁ブロックへの結合

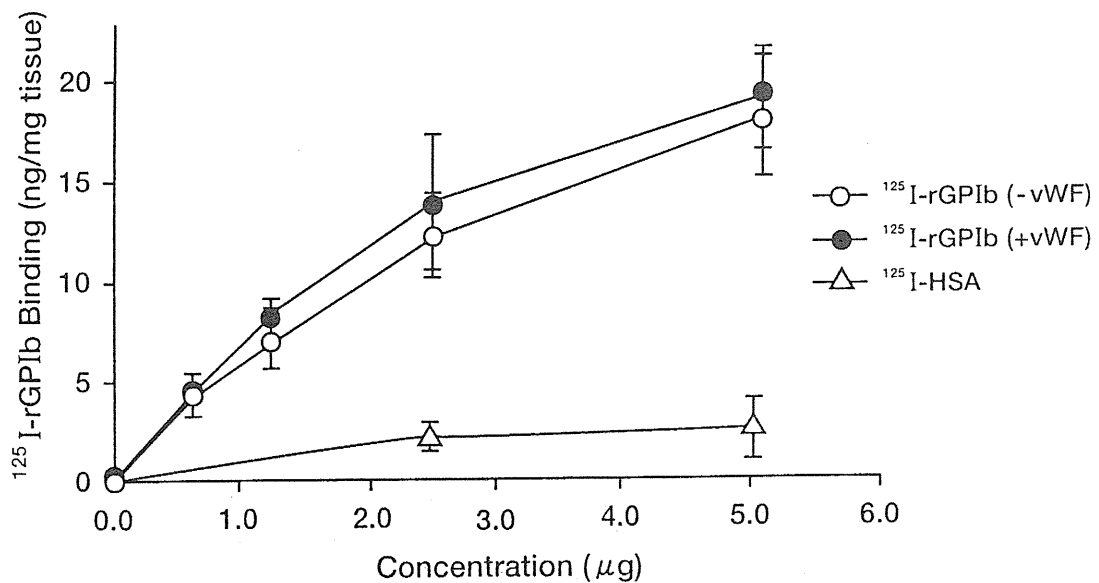
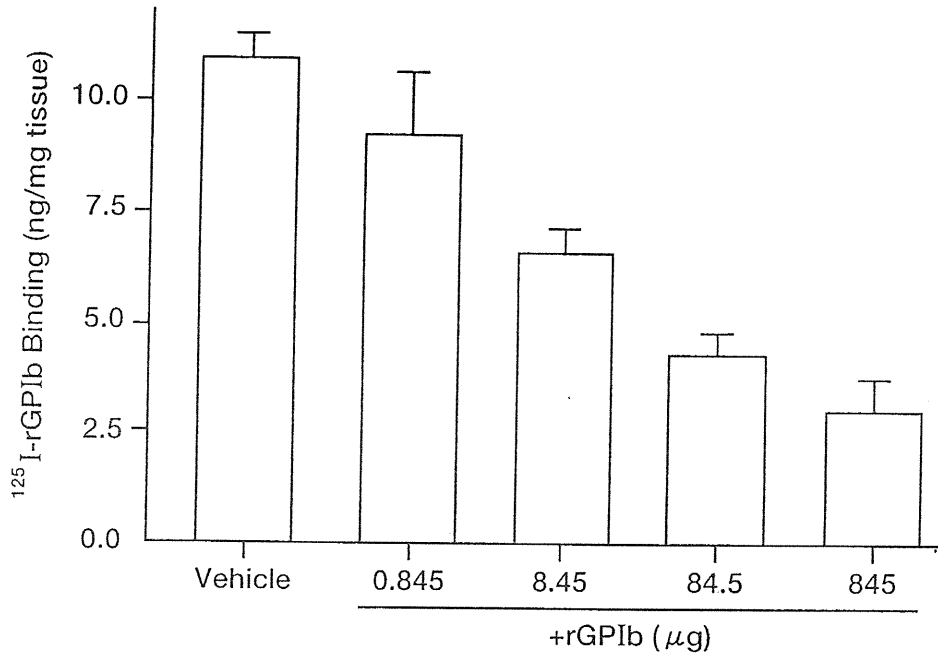


図5

¹²⁵I-rGPIIbのラット血管壁ブロックへの結合---
非標識rGPIIbの影響

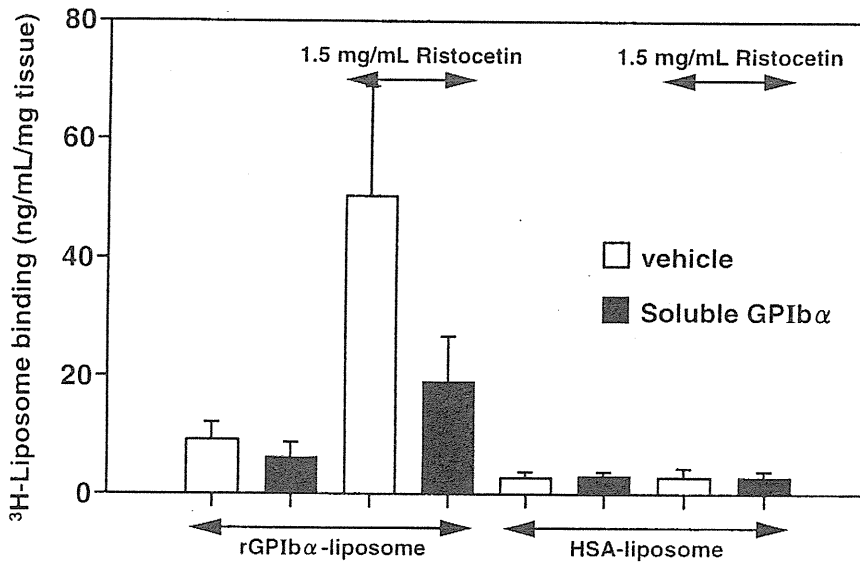


αリポソームがコントロールに比較し有意に高かった。これはrGPIIbαリポソームが血栓に特異的に集積したことを示している。

D. 考案と結論
昨年度までの研究によりGPIIbαリポソームが作成されたが、今年度は、血小板粘着

図6

rGPIIbα-³H-リポソームのブロックへの結合の特異性



rGPIIbα-³H-リポソーム、HSA-³H-リポソームのブロックへの結合

54.3 mg/mL rGPIIbα-³H-リポソーム、34.0 mg/mL HSA-³H-リポソームをモルモット血管壁ブロックと室温下で1時間保温後、PBSで洗浄し、ブロックへの結合量を測定した。n=4

表 1

ラット動静脈シャントモデルにおける rGPIIb α -リポソームの血栓への集積性

	³ H-Liposome	rGPIIb α - ³ H-liposome 0.28 mg/kg (rGPIIb α)
血栓単位重量当たりの放射活性集積率 ¹⁾	11.5 \pm 0.5	16.3 \pm 1.0 *
血中放射活性 (dpm/20 μ L)	2022 \pm 33	650 \pm 46 **
放射活性比 (血栓/血液) ²⁾	2.3 \pm 0.1	11.3 \pm 1.4 **

mean \pm S.E., n=3 * p<0.05, ** p<0.01 vs. ³H-Liposome

¹⁾ 血栓単位重量当たりの放射活性集積率；

血栓単位重量当たりの放射活性 (dpm/g) \div 投与総放射活性 (dpm) \times 100

²⁾ 放射活性比 (血栓/血液)；

血栓単位重量当たりの放射活性 (dpm/g) \div 血液単位容量当たりの放射活性 (dpm/mL)

に必要なもう一つの接着分子GPIIb/IIIa (インテグリン α 2 β 1) が導入されたGPIIb/IIIaリポソームが創製され、いずれもヒト血小板の重要な機能である凝集能や粘着能を有することが示された。これらは、組み換え蛋白を用いているため、血漿由来のウイルス感染のリスクがなく、大量供給が可能である。現在、両蛋白とも量産体制が確立しており、月に数十～数百mgの組み換え蛋白が供給されている。すなわち、人工血小板のプロトタイプが2つ作成され、それらの評価を行うに十分な体制が確立されたといえる。出血のみられる血管損傷部位では、vWFとコラゲンが血小板粘着の標的になっていることから我々の作成したリポソームはin vivoにおいても血管損傷部位に集積し、止血機能を示すことが十分に予想される。

full-length mouse platelet glycoprotein IX.

Blood Coagulation and Fibrinolysis 9(4) 381-385, 1998

2. 学会発表

Nishiya T, Murata M et al: Adhesion of liposomes carrying a recombinant fragment of platelet glycoprotein Iba or anti-collagen antibody to collagen surface under flow conditions- approach to platelet substitutes.

Blood 92 (suppl) (abstract) 1998

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) 村田 満：人工血小板 組織培養工学24(13), 13-15, 1998

(2) Kitaguchi T, Murata M et al: Characterization of cDNA encoding

止血能を有する蛋白質重合体の開発

分担研究者 武岡 真司 早稲田大学理工学部 助教授

研究要旨 本研究では、生体適合性の高いアルブミン高分子量体に血小板のレセプター蛋白質を効率高く結合させ、止血機能を有する粒子系の構築を目的としている。今年度はアルブミンを多糖支持体に結合させる方法、あるいはアルブミン間を重合させてマイクロスフェアを形成する方法にてアルブミン高分子量体を合成、この形態や大きさを解析すると共に、血液凝固因子(vWF)のレセプター蛋白質のリコンビナント体(rGPIb α)を結合させてvWFとの複合体形成能を評価した。また、rGPIb α 自体のvWF複合体形成能についても、分子量分画成分を用いて解析した。

A. 研究目的

本研究では、高分子量の多糖にアルブミンを結合させる方法、あるいはアルブミン自体を重合させてマイクロスフェアとする方法にて形態や粒子径の異なるアルブミン高分子量体を合成、これにrGPIb α をPEGを介して結合させて止血能を有する蛋白質重合体を構築することを目的としている。また、rGPIb α 自体もオリゴマー化していることが前年度明らかとなったので、これを分画しvWFとの複合体形成能を検討する。

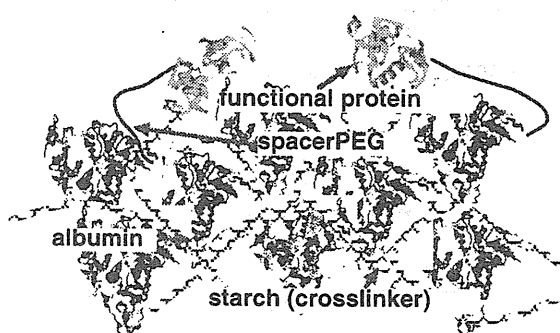


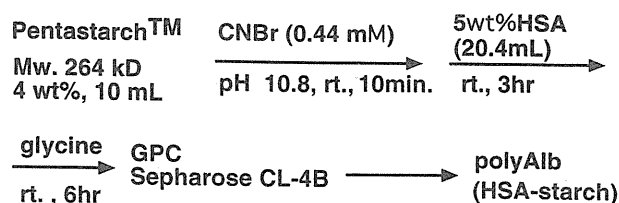
図 1 多糖架橋アルブミン高分子量体の模式図

B. 研究方法

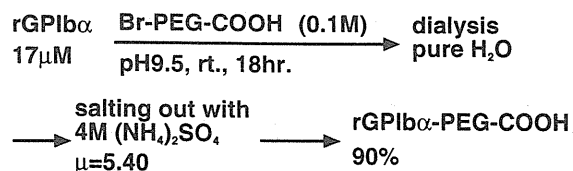
1. 多糖架橋アルブミン高分子量体系 (図 1)

高分子量のスターチ; PentastarchTM ($M_n=7,000$, $M_w=264,000$) に臭化シアンを pH10.8 で作用させてスターチの水酸基を活性化させ、5wt%のヒト血清アルブミンを結合させた。過剰量のグリシンを添加して、未反応の活性基を不活化させた後透析、ゲル濾過によりアルブミン高分子量体を得た (スキーム 1)。

次に片末端がカルボン酸、もう片末端がプロモの平均分子量 954 のポリエチレングリコール (97 年度報告書) を合成、末端プロモ基を GPIb α の SH 基と結合 (スキーム 2)、もう片末端のカルボン酸を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) と N-



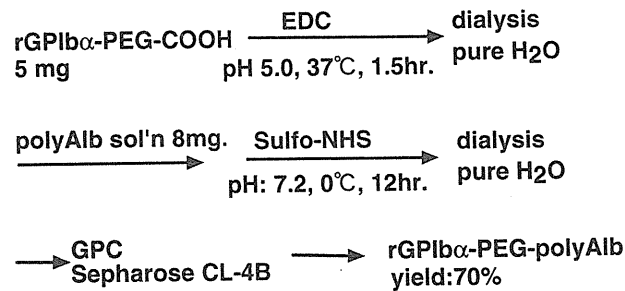
スキーム 1 多糖結合アルブミン高分子量体の合成



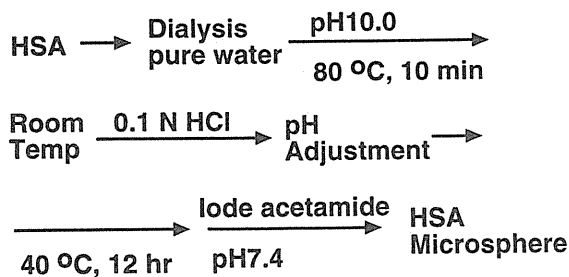
スキーム 2 rGPIb α へのPEG誘導体の結合

hydroxysulfo succinimide (Sulfo-NHS) を用いて活性化させ、アルブミン高分子量体のアミノ残基と結合させた(スキーム 3)。

リストセチン (0.5mg/ml) 共存下におけるアルブミン高分子量体 (0.34mg/ml) と vWF (100 μg/ml) との複合体形成を濁度測定 (700nm) により解析した。



スキーム3 rGPIb α -PEG-アルブミン高分子量体の合成



スキーム4 アルブミンマイクロスフェアの合成

2. アルブミンマイクロスフェア系

ヒト血清アルブミン (5g/dL) を透析後、pH10.8 の水溶液中にて B 体に変化させ、これを 80°C で 10 分間静置させてアルブミンのオリゴマー体を得た。次に pH を低下させてオリゴマー間を凝集させてアルブミンマイクロスフェアを得、更に 40°C で 12 時間静置させてジスルフィド架橋によって安定化させた (スキーム 4)。

アルブミン高分子量体はコロジオン膜上で乾燥させて分子間力顕微鏡観測あるいはポリカーボネートメンブランフィルター (孔径 0.2 μm) 上に捕捉して凍結乾燥、白金スパッタリング後走査型顕微鏡にて観測した。

3. rGPIb α の解析

rGPIb α (lotH010) 2.2mM の Tris-HCl 緩衝液 (20mM, pH8.0) 溶液に 640mM のメルカプトエタノールにて充分還元 (120°C, 40 分) した後 SDS-PAGE 測定を行った。

rGPIb α の HEPES 緩衝液 (20mM, pH7.4) をゲルカラム (Sephacryl S-200) にて約 0.5ml ずつ 50 分画を分取し、Native-PAGE によって各分画成分を分析した。

vWF は遠心ろ過チューブ (ウルトラフリー CL, 分画分子量 5kD) によって濃縮して HEPES 緩衝液 (20mM, pH7.4) に交換、0.2mg/ml に調節、更にリストセチンを同緩衝液に溶解させて 14.5mg/ml とした。

分画 rGPIb α と vWF との複合体形成は、0.8mg/ml の vWF 溶液に 0.2mg/ml 分画 rGPIb α を滴下して微小熱量分析により解析した。

C. 研究結果及び考察

1. 多糖架橋アルブミン高分子量体系

ポリエチレングリコール (PEG) の片末端 OH 基に 1-ブロモ酢酸エチルを結合させ、アルカリ水溶液中にて加水分解して収率 64% でカルボン酸を得た。もう片末端の OH 基はプロモアセチルクロライドにてブロモ化をおこなった (収率 98%)。PEG 誘導体の構造は ¹H-NMR にて確認した。

ヒドロキシエチルスターチを臭化シアンにて活性化させた後、ヒト血清アルブミンを結合、ゲル濾過 (Sephacryl S-200) 精製し収率 50% で多糖架橋アルブミン高分子量体を得た (スキーム 1)。rGPIb α の-SH 基は 1 個であり、PEG の結合数も 1.1 個が得られたことから、定量的な結合が確認された (スキーム 2)。蛋白質収率は 90% であった。

GPIb α 結合 PEG 末端カルボン酸を polyHSA に結合させる反応はカルボン酸活性化試薬を用いて定法通り行なった。蛋白質-蛋白質高分子量体間の結合であるので、0°C での反応時間を長め (12 時間) に行なったところ、70% の収率にて目的物が得られた (スキーム 3)。

本結合操作により、GPIb α 結合前のアルブミン高分子量体の粒子径 103~117nm は結合後に 150~180nm 程度まで増大した。動的光散乱により粒径分布を測定したところ、GPC の高分子量分画成分でも、10, 90, 700nm に中心を持つ3つの分布となった(図2)。このことは、球形以外の形態を示唆している。本アルブミン高分子量体をコロジオン膜上で乾燥させて形態を直接観測したところ、厚さ 11nm 程度、幅 70~200nm 程度、長さ 500~数千 nm 程度のリボン状の形態が観測された(図3)。

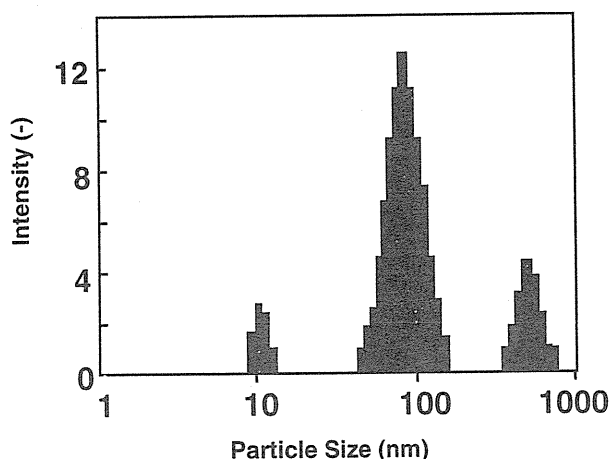


図2 動的光散乱測定によるrGPIb α -PEG-PolyAlbの粒径分布

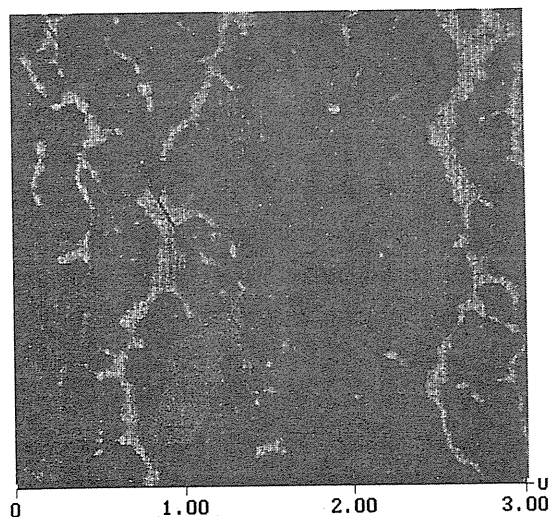


図3 rGPIb α -PEG-polyAlbのAFM観測

厚さはアルブミンの2分子相当であった。更に、アルブミン高分子量体 9.7mg/ml 中 2.8mg/ml の GPIb α が検出されたこと、後述するように GPIb α は2量体が主であることを考慮すると、ヒドロキシエチルスターチ1分子あたりにアルブミン約7分子が二分子膜を形成する様に配列し、これに GPIb α 2量体がポリエチレングリコールを介して結合している構造を1単位として、これが60単位連なった構造が推定された(図4)。

リストセチン存在下 vWF との複合体形成能の評価では、rGPIb α を担持させた系の濁度が最も高くなり、polyHSA に担持した rGPIb α が機能することを確認した(表1)。

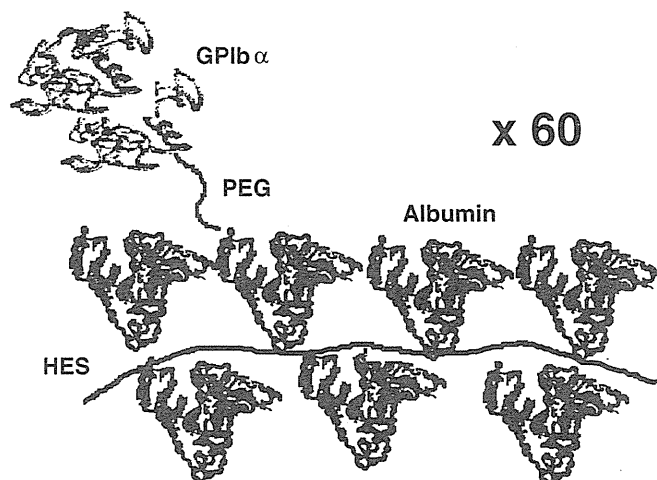


図4 rGPIb α -PEG-PolyAlb の推定構造

表1 rGPIb α -PEG-polyAlb系の複合体形成測定

Sample	Δ O.D. ($\times 10^{-3}$) ^a
rGPIb α -PEG-polyAlb+vWF	0.4
rGPIb α -PEG-polyAlb+ristocetin	7.1
vWF+ristocetin	22.3
rGPIb α -PEG-polyAlb+vWF+ristocetin ^b	35.0 ^c

a. The difference of absorbance value after 10min. at 37 $^{\circ}$ C

b. [albumin] is 0.34mg/mL; [vWF] 100 μ g/mL; [ristocetin] 0.5mg/mL.

c. The only Δ O.D. of GPIb α -albumin-starch+vWF+ristocetin should be $35.0-22.3-7.1=5.6\times 10^{-3}$

2. アルブミンマイクロスフェア系

アルブミンを高 pH にて加熱処理した後、pH を低下させると、表面電荷の減少により凝集度を制御できる。表 2 に示した様に、pH 7.4 まで低下させた段階では粒径約 30nm、5.4 では粒径約 9800nm であった(表 2)。再加熱により任意の粒子径に安定させることができた。

図 5 にアルブミンマイクロスフェアの AFM 及び SEM 像を示す。直径 500nm から 3 μ m 程度の球状構造が観測された。SEM からは扁平の球状構造が推測された。

表2 アルブミンマイクロスフェアの粒径制御

pH	mean diameter (nm)
7.40	32 \pm 16
6.35	345 \pm 180
5.73	1200 \pm 350
5.40	9780 \pm 850

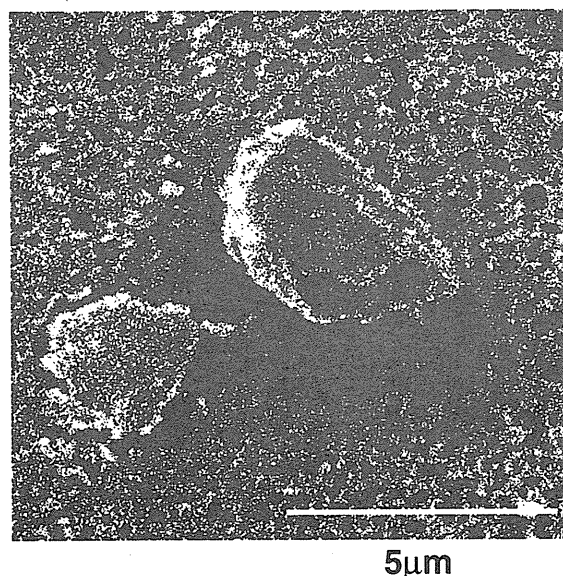


図5 アルブミンマイクロスフェアのSEM写真

3. rGPIb α の解析

Native-PAGE により提供 rGPIb α を詳しく観測すると、図 6 に示した様に 45kD(A 体とする)、66kD(B 体とする)、132 k D(BB)、222 k D(AABB)、354 k D (AABBBB)と推定されるバンドより構成されていた。また、メルカプトエタノールにて還元したところ、45kD(A 体)、66kD(B 体)が主となった。これは、45kD と 66kD を単量体とする rGPIb α のフリー-SH 基 (rGPIb α では 7 個あるシステイン基の内 4 個はジスルフィド体、2 個はその可能性が高いものと考えられているので、3 個あるいは 1 個がフリー) 間の酸素酸化による分子間ジスルフィド体架橋にてオリゴマー体となったものと思われる。そして、2 量体が主であった。

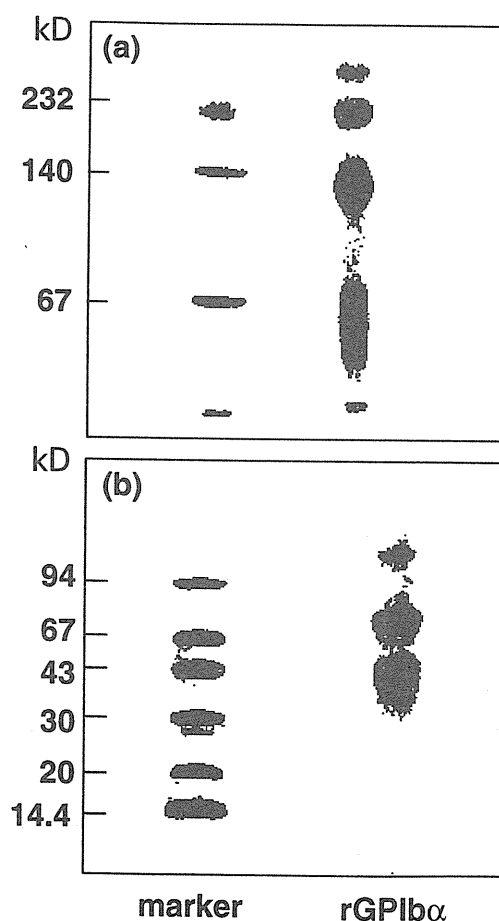


図6 rGPIb α のNative-PAGEによる分析 (a) 30-300kD, (b) 10-250kD

ゲル濾過による rGPIb α オリゴマー体の各分画を図 7 に示し, native-PAGE の結果を図 8 に示した. 更に, 各分画の定量分析及び滴定型微小熱量分析結果を表 3 に示した. ゲルカラムにて単離された rGPIb α の単量体の収率は 7.8%であった. Fr. 13 は, 132, 222, 354 kD から構成されており, Fr. 14 も同じ構成であるが, 132kD の成分が主となっている. Fr. 17 と 18 は 45kD, 66kD の単量体の分画であった.

興味深いことに, vWF との複合体形成反応 (表 3) は Fr. 14 が最も大きく, Fr. 17&18 と Fr. 13 はその半分程度であった. Fr. 13 と Fr. 14 の相違は 132 kD 成分の相違と思われる, より高分子量の 354 kD あるいは 222 kD と vWF との反応性は低いものと思われる. 更に, 単量体である 45kD や 66kD よりも 2 量体である 132 kD の方が反応性は高いものと思われた.

D. 結論

ポリエチレングリコールを介して GPIb α を結合させたアルブミン高分子量体は, リストセチン存在下 vWF と複合体を形成することを確認した. また, アルブミンをジスルフィド架橋にて重合させて粒径の異なるマイクロスフェアを調製できた. 今後, ポリエチレングリコールの結合数および rGPIb α の結合数を制御する方法論の確立, および最適な結合数の設定を行う. rGPIb α 自体もジスルフィド架橋により重合し, 2 量体を主成分としたオリゴマー体が形成することを明らかにした. vWF との複合体形成能は 2 量体をもっとも高いことから, 今後 2 量体に焦点を当てた精製およびその有効利用を検討する.

E. 研究発表

学会発表

“Molecular Assembling System Using Polyprotein (IIPf064)”, 第 47 回高分子討論会, 平成 10 年 10 月 1 日, 名古屋

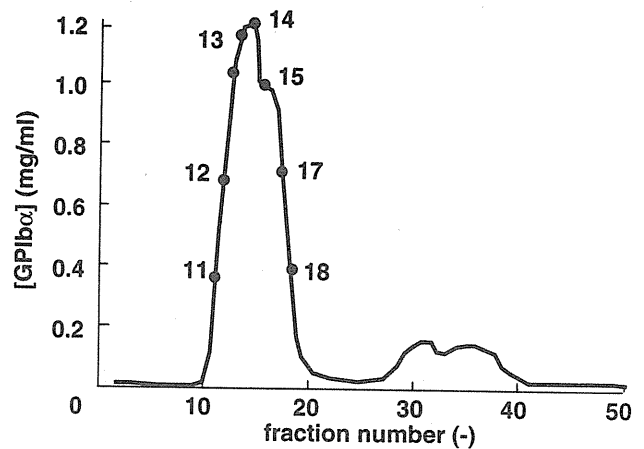


図 7 ゲル濾過による rGPIb α 重合体の分離

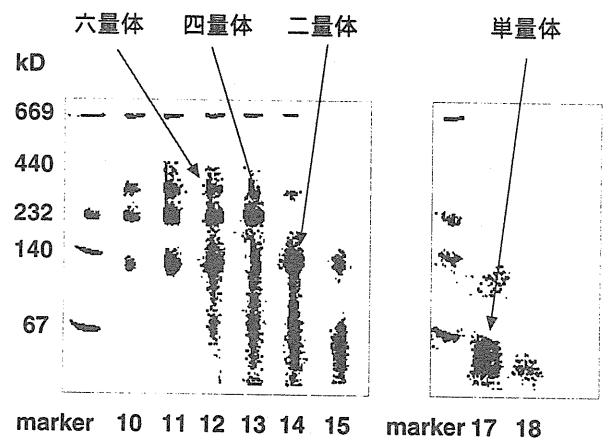


図 8 Negative-PAGE 法による各 GPC 分画の rGPIb α 重合体の構成

表 3 rGPIb α 分画の定量及び vWF との複合体形成解析

Fr. No.	[GPIb α] (mg/ml)	volume (ml)	amount (mg)	ΔQ (μ cal)	ΔH (kcal/mol)
13	1.12	658	0.737	-7.69	-28.8
14	1.19	405	0.482	-18.7	-70.1
17	0.70	600	0.420	-9.32	-34.9
18	0.40	936	0.374		

人工血小板の開発に関する研究

分担研究者 半田 誠 慶應義塾大学医学部輸血センター専任講師

研究要旨 微量質量センサーを組み込んだ流動条件下血小板粘着連続測定法ならびに蛍光顕微鏡と連動した連続画像解析装置を用いて、血管内皮下組織の主成分コラーゲン（CL、type 1）への流動条件下での血小板粘着にはどのような膜受容体と細胞内刺激伝達系が必須であるかを検討した。その結果、この粘着には、GPIIb-III複合体が tethering 分子として、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンが CL へ直接結合する細胞活性化非依存性の接着分子として、共存すればそれで十分であることが明かとなった。また、アクチン再重合などの細胞変形能に関連した細胞内刺激伝達系もこの粘着には必要である可能性が示された。以上の条件を具備すれば、血小板機能を代替する人工物の創製が可能となる可能性が示唆された。

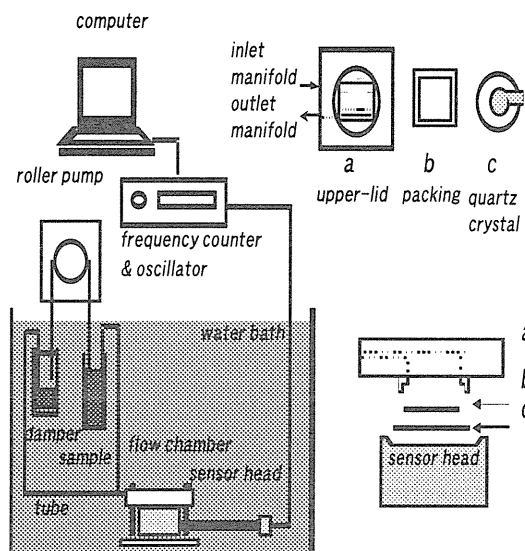
A. 研究目的

平成10年度の研究で、血小板の粘着とそれに続く血小板血栓（凝集）の形成など血小板機能を代替する人工物の機能解析には、in vitro の流動システムが必須であること、我々が独自に開発した微量質量センサーである水晶振動子を組み込んだ流動系（QCM法）がそれに対応して有用であること、を明らかにしてきた。そこで今回、血管内皮下組織の主成分コラーゲンに血小板が粘着するためにはどのような細胞表面膜受容体あるいは細胞内刺激伝達系が必須であるかを検討した。

B. 研究方法

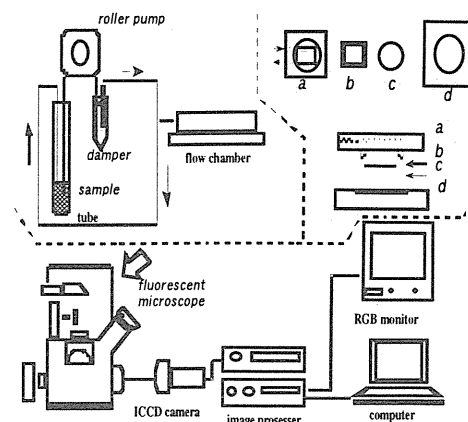
1) QCM法：ポリカーボネートで表面スピンコーティングした5MHzの水晶振動子にコラーゲン（子ウシ腱タイプ1）を固相化し、37℃の恒温槽内のフローチェンバー灌流部に組み込んだ。3.5mlの抗凝固剤PACK加全血を種々の速度で循環させ、水晶振動子への血小板粘着量(Δf :表面粘着占有率)を連続測定した(図1)。

図1. QCM法



2) 蛍光顕微鏡を使用した流動条件下血小板粘着・凝集連続解析法：メパクリン標識した血小板の粘着を倒立顕微鏡（TE300-2、ニコン）下QCM法と同様の灌流系を用いて連続観察し、それを画像解析装置（ARUGUS-50/ICCD、浜松フォト）で検討した（図2）。

図2. 蛍光画像解析法



3) 血小板接着分子機能を抑制するプローブには抗インテグリン $\alpha 2$ サブユニット抗体:Gi9;抗 $\beta 1$ 抗体:Li a 1/2、4G4;抗GPIb α 抗体:GUR20-5、GUR83-35;抗 $\alpha 1$ Ib $\beta 3$ 作用剤:PGE1、RGDペプチドなどを使用した。

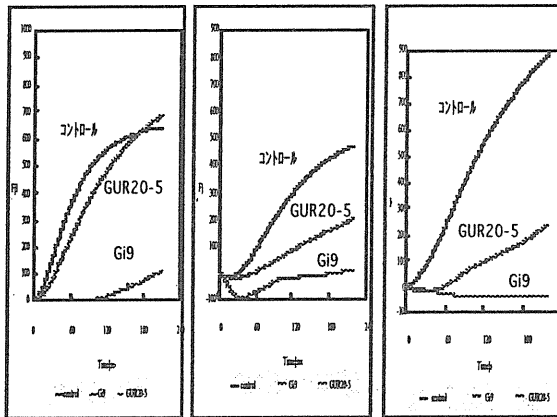
C. 研究結果

QCM法の観察で、血流速度に関係なく抗GPIa/I Ia複合体（インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ ）抗体Gi9（終濃度 $10 \mu / m l$ ）とLi a 1/2（終濃度 $10 \mu / m l$ ）は粘着（ Δf : 表面粘着占有率）を強く抑制し（図3: 図右から左へそれぞれズリ速度2、400、3、600、4、800/sでの流動条件下での結果）、後者の抑制効果は完全であった（図4）。一方、抗GPIb/I X複合体抗体GUR2

0-5 (図3)、GUR 83-35 (データ未掲載) (ともに終濃度 $10 \mu\text{m l}$) は血流速度に依存して抑制効果が著明に増加した。

図3.

コラーゲンへの血小板粘着に及ぼす抗膜受容体抗体の影響



さらに、それぞれ GPIIb/IIIa 複合体 (インテグリン $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) を競合阻害するかその活性化を抑制する RGD ペプチド ($100 \mu\text{M}$) や PGE_1 ($1 \mu\text{M}$) はむしろ血小板粘着の増強効果を示すことが明らかとなった (図4、5)。画像解析から (図5)、血小板粘着量が増加したのは、それに続く凝集がこれらのアゴニストで抑制されたため (立体障害の軽減) と考えられた。

図4. RGDペプチドと抗膜受容体抗体の影響

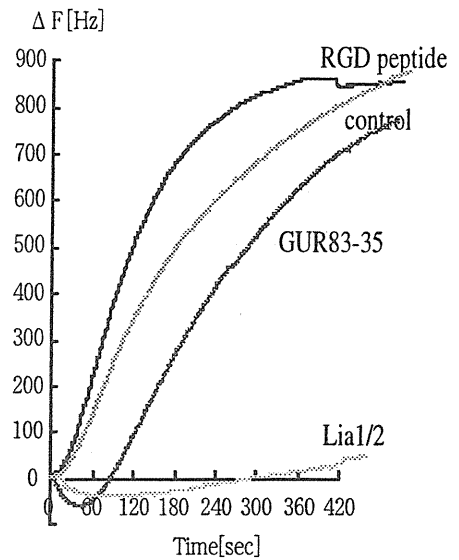
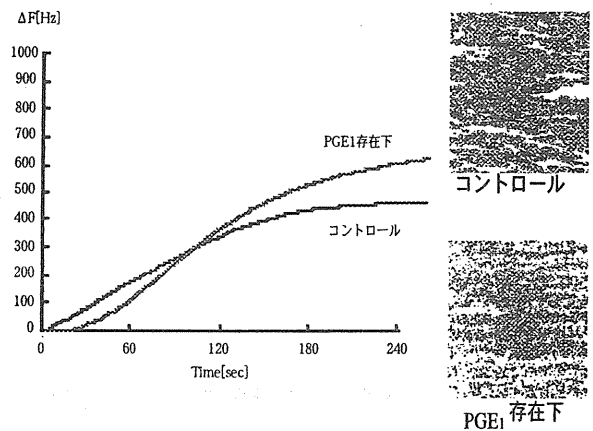
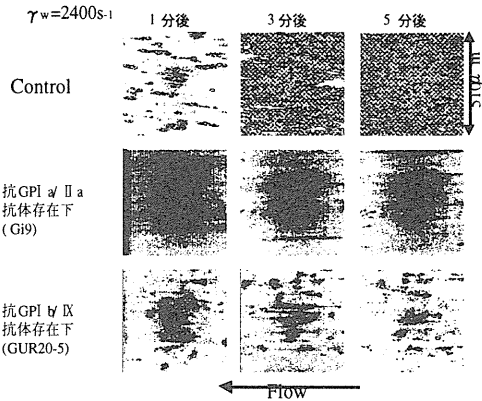


図5. コラーゲンへの血小板粘着における PGE_1 の影響



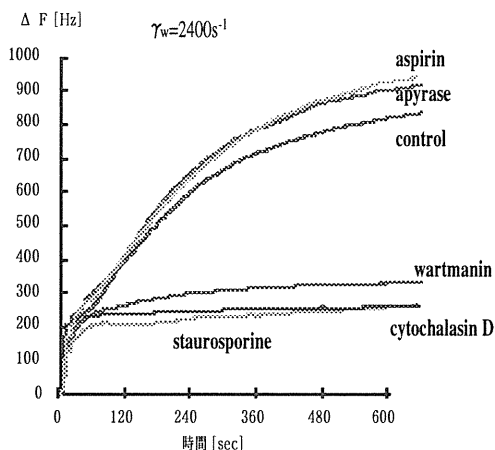
画像解析法で血小板の動きを観察すると、抗 $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ 抗体、 Gi9 存在下で血小板は可逆性の粘着すなわち tethering を示したが粘着は起こらなかった。一方、抗 GPIIb/IIIa 複合体抗体、 GUR 83-35 存在下では tethering なしで血小板は流れに抵抗して瞬間的に不可逆的に粘着した (図6、 PGE_1 存在下、ズリ速度 $2,400/\text{s}$)。

図5. 高血流条件下でのコラーゲンへの血小板粘着：蛍光顕微鏡での画像解析



またQCM法の観察で、GUR 83-35の有無に関係なくスタウロスポリン(50 μM)、ワルトマニン(50 μM)、サイトカラシンD(0.1 mM)は、粘着を強く抑制した。一方、アスピリン(1 mM)、アピラーゼ(0.2 u/ml)、シロスタゾール(0.1 mM、データ未掲載)はこの粘着に影響を及ぼさなかった(図7、GUR 83-35存在下)。

図7. 各種血小板アンタゴニストの影響



D. 考察

血小板膜受容体として少なくともGPIIb/IX複合体と $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンが存在すれば血小板は流

動条件下で粘着機能(不可逆的粘着)を十分発揮できること可能性が示唆された。その際、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンは細胞活性化に無関係にその機能を行行使することがわかった。一方、それと対照的に細胞活性化依存性のインテグリンである $\alpha 1 \text{ I b } \beta 3$ 複合体は血小板粘着に必須ではなかった。cAMPの濃度変化やcostimulatoryな刺激の共存は粘着それ自体にに影響を及ぼさず、一方、蛋白リン酸化や細胞骨格系の再重合あるいはPI-3キナーゼなど細胞伸展と関連した細胞内刺激伝達系の存在が粘着に不可欠である可能性が示唆された。

E. 結論

GPIIb/IX複合体と $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンの働きが備われば、血小板機能を代替する人工物の創製が可能となる可能性が示唆された。しかし、細胞内刺激伝達系の関与による細胞変形能の保持は流れに抵抗して粘着しなければならない細胞が具備すべき特性かも知れない。

F. 研究発表

<論文>

1) Hironobu Ambo, Tetuji Kamata, Makoto Handa, et al: Novel point mutations in the $\alpha 1 \text{ I b } \beta 3$ subunit (Phe289- \rightarrow Ser, Glu324- \rightarrow Lys and Gln747-

>Pro) causing thrombasthenic phenotypes in four Japanese patients. Brit J Haematol 102: 829-840, 1998

2) Hironobu Ambo, Tetuji Kamata, Makoto Handa, et al: Three novel $\beta 3$ subunit missense mutations (H280P, C560F and G579S) in thrombasthenia, including one (H280P) prevalent in Japanese patients. Biochem Biophys Res Commun 251: 763-768, 1998

3) Atsushi Oda, Hans D Ochs, Makoto Handa, et al: Collagen induces tyrosine phosphorylation of Wiskott-Aldrich syndrome protein in human platelets. Blood 92: 1199-1207, 1998

<学会発表>

山県伯彦、半田誠、他：流動状態下での血小板のコラーゲンへの粘着— $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンの関与—第2報
第21回日本血栓止血学会総会、1998年9月18日

人工血小板の微小循環動力学的特性の生体内解析

分担研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学

研究要旨 前年度に確立した血小板の体内動態解析系を高速度高感度ビデオ蛍光顕微鏡システムを用いてラット微小循環における血小板動態を解析した。流血中の血小板は細動脈と細静脈において異なった管内分布を示し、細動脈では管壁近傍、細静脈では軸流周辺で密度が高いこと、細動脈での管壁近傍での密度は局所の shear rate と正の相関を示すことが明らかとなった。vWFのGP1b結合部位を認識しその機能を阻害する単クローン抗体の投与により細動脈の管壁近傍の血小板密度は著しく低下したことから、GP1bを介した shear-dependent platelet activation が細動脈での血小板の傍内皮領域での局所密度を規定する決定的な機構であると考えられた。

A. 研究目的

平成10年度の本分担研究では、血小板と血管内皮細胞との相互反応に関与しうる接着分子としての von Willebrand factor (vWF)の役割を解明することを目的として実験計画を遂行した。

B. 研究方法

(1)(2)を達成する目的で従来より開発を進めていたミリ秒分解能を持つ高感度撮像管による carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester 蛍光標識血小板の生体観察、評価系をラット腸間膜微小循環を用いて行った。anti-vWF monoclonal antibody は味の素中央研究所より供与された抗体 (AJvW-2)を用い、静脈カテーテルから1mg/kgを投与前、投与後30分で血管内血小板分布を観察した。血小板像は落射蛍光下にIntensifierを用いて高速度撮像し、次に同一視野において透過光線法により赤血球像を撮像した。実験終了後ビデオを frame-by-frame analysis で解析し、赤血球の軸流速度、傍内皮速度を求め、血小板速度は対赤血球速度として表現し比較を行った。また単位時間あたりに特定の部位を通過する蛍光標識血小板の出現頻度を血管の軸中心から傍内皮境界までを短軸方向に4等分し各位置において計測した。

C. 研究結果

すでにラットの腸間膜微小循環系を用いた生体観察系において蛍光色素 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)の静脈内投与により単一血小板の蛍光染色を可能にしている (Suematsu, et al. J. Clin. Invest. 96, 1995)。この蛍光像の挙動は赤血球速度とほぼ同等であるため通常のビデオ解析 (30 frame/sec) では困難であった。本研究で用いた超高速超高感度ビデオ撮像システム (文献5)を用いて観察し微小血管の短軸方向で血小板密度、対赤血球速度に heterogeneity が存在し、shear rate の高い細動脈側では細静脈に比して内皮近傍の血小板密度が高く、内皮周辺では血小板が rolling や transient adhesion をおこして一過性の接着現象を起こしていることが示された。図1は frame-by-frame analysis により解析した血管内の赤血球速度分布の典型的な成績である。x軸に50 msec毎の時間変化、y軸に軸中心から内皮表面までの位置、z軸方向に最大赤血球速度を100とした際の相対赤血球速度をプロットした。血流速度分布は細動脈、細静脈で特徴的な違いが見い出された。すなわち細動脈では軸中心で脈流変化は3-4回/secの周波数で認められたのに対し、細静脈では脈流が現われなかった。この周期はラット

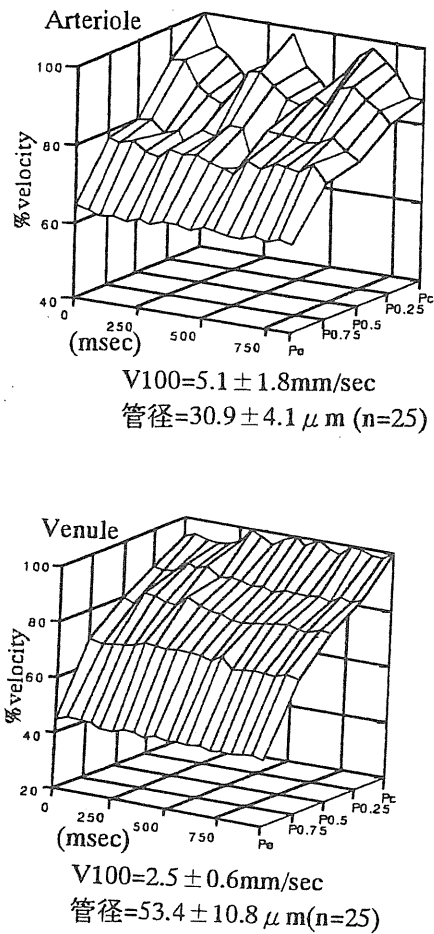


図1 微小血管における赤血球速度分布の heterogeneity. Pc:軸中心、Pe:血管内皮近傍。Pcでの最大赤血球速度を100とした相対速度を示した。グラフは典型的な解析データを示した。欄外の値はn=25の実験におけるPcでの赤血球速度 (V100)の絶対値と、観察した血管径 (D; mean + SD)を示した。

の心拍数に一致した。細動脈の軸中心で見られたこの脈流性変化は同じ微小血管の内皮近傍ではほぼ消失した。また細動静脈ともに軸流赤血球速度に比して30%程度傍内皮領域での赤血球速度が低い値を示した。以上の成績からもし傍内皮領域で蛍光標識血小板が一定速度で下流へ移動しない場合、なんらかの理由で血管内皮細胞と血小板の間に adhesive interactionが起きたものと考えることが可能となった。図2に血管内の各座標における蛍光

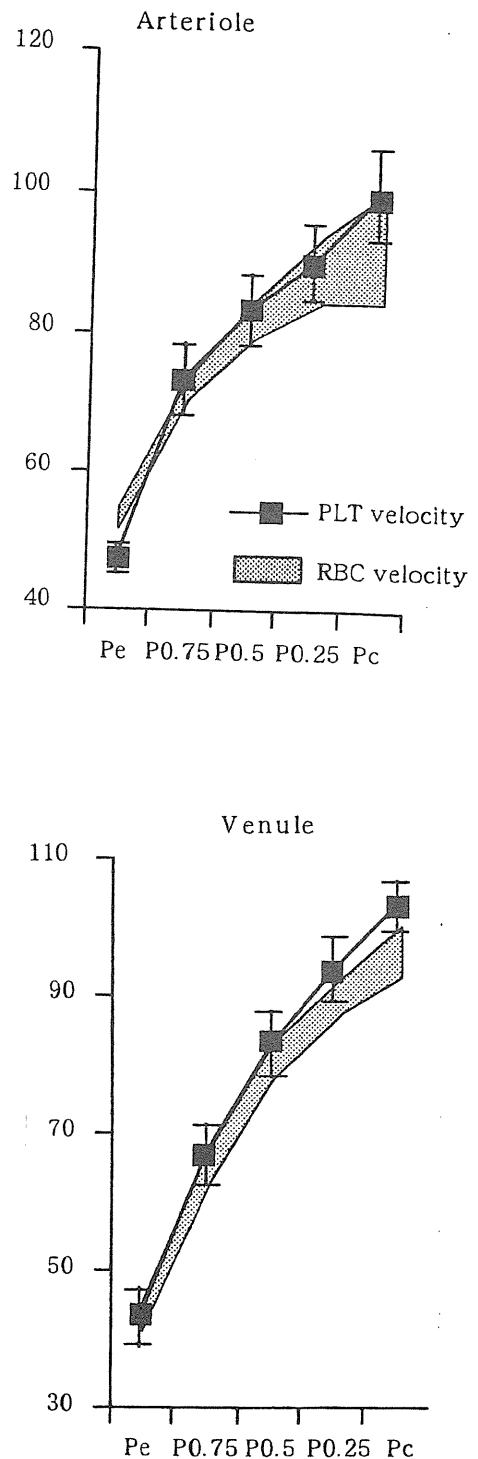


図2 微小血管における赤血球速度 (V_r)と血小板速度 (V_p)の関係。図1と同じくPcでの最大赤血球速度を100とした相対速度を示した。Closed squares: mean V_p (mean + SD, 単一血小板30-50個の解析による)。網かけの部分は赤血球速度の変動範囲を示す (n=18)。

標識血小板の速度分布を示した。ここでは軸中心における最大赤血球速度を100として各点での赤血球速度(最大、最小)の平均値と血小板速度との関係を示した。細動静脈ともに血小板速度は最大赤血球速度によく一致して流れていた。また傍内皮領域では局所の赤血球速度の平均値に比して血小板速度は低値を示した。速度の分散は一見小さいように見えるが、傍内皮領域での個々の血小板速度をヒストグラム解析すると、細動脈では、特に wall shear rate が 1000 /sec を超えるような部位では対赤血球速度の 50-70% 程度で流れる遅い血小板群があることが明らかになった(図3)。

図4に細動静脈における血小板密度分布を示した。密度分布の profile は細動脈と細静脈でまったく様相を異にした。すなわち細動脈では傍内皮領域とその近傍で比較的高密度で血小板が現われるのに対し、細静脈では軸中心から遠ざかるに従い密度が減少することが明らかになった。そこで個々の実験における局所の wall shear rates の値と傍内皮領域の血小板密度の相関関係を解析したところ(図5)、両者の間に強い正の相関が認められた。さらに shear rates の高い細動脈においては血管壁を血小板の小凝集塊が通過するのが観測された。その出現頻度も細動脈では細静脈に比べ有意に高値を示した。また傍内皮領域における個々の血小板の移動速度は赤血球のように一定ではなく millisecond level で時折内皮上に停止しては断続的に移動することも明らかになった。すなわち血小板の挙動は細動脈と細静脈でまったく異なっており、細動脈では血小板が管壁に片寄って分布し、血管内皮細胞表面とミリ秒オーダーの接着反応を繰り返し示すこと、このような偏在分布が wall shear 依存性に起きていることが示された。

興味深いことに anti-vWF monoclonal antibody である AJvW-2 を投与すると 10 分後には細静脈での内皮近傍血小板密度が低下し、30 分後には軸流血小板密度が内皮近傍での密度を大きく上回る細静脈型の密度分布を示した。また抗体投与前後で細静脈における密度分布には大きな変化が認められなかった(図6)。また細動脈ではコ

ントロールの状態においても蛍光標識血小板の小凝集塊がミリ秒オーダーで touch and go を繰り返しているが、AJvW-2 投与後にはこのような現象の頻度が著明に低下した。抗体投与によるこれらの変化は抗体の F(ab) fragment でも同様に再現できた。以上のことから細動脈における血小板の偏在分布には vWF と GP1b との相互作用が関与することが示唆された。

D. 考察

血小板は高い shear stress の下では vWF の

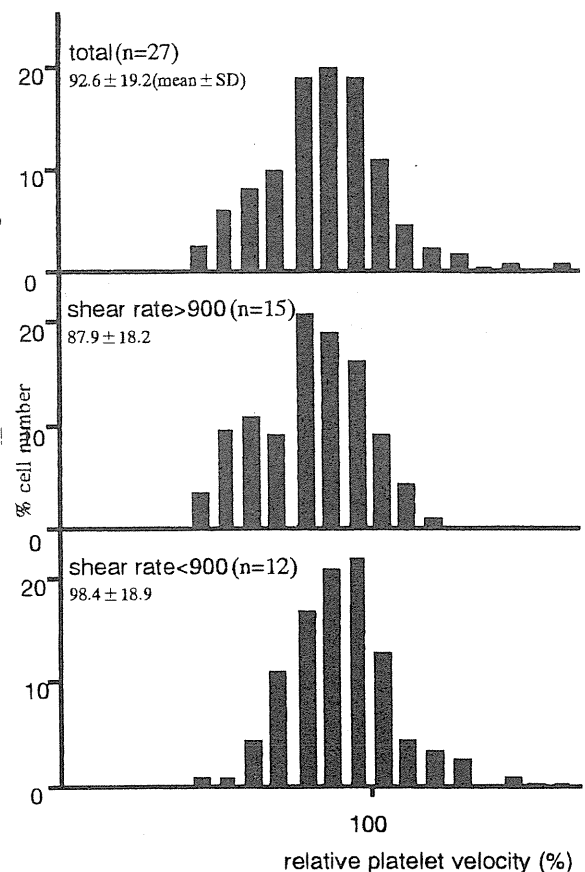


図3 細動脈における傍内皮細胞領域における血小板相対速度分布のヒストグラム。100は局所における平均赤血球速度を示す。上段：細動脈全測定データ (n = 27) 中段：shear rate が 900 以上の細動脈。下段：shear rate が 900 以下の細動脈。各ヒストグラム内の数値は平均血小板速度 (mean + SD) を示す。