

厚生科学研究費補助金  
高度先端医療研究事業（人工血液開発研究分野）

平成11年度  
総括・分担研究報告書

人工血小板の開発に関する研究

主任研究者 池田康夫  
慶應義塾大学医学部内科学 教授

厚生科学研究費補助金  
高度先端医療研究事業（人工血液開発研究分野）

# 人工血小板の開発に関する研究

（研究課題番号：H10-血液-006）

平成11年度  
総括・分担研究報告書

平成12年3月

..... 研究組織 .....

（主任研究者）

池田康夫 慶應義塾大学医学部 教授

（分担研究者）

村田満 慶應義塾大学医学部 講師  
半田誠 慶應義塾大学医学部 講師  
武岡真司 早稲田大学理工学部 助教授  
長澤俊郎 筑波大学臨床医学系 教授  
末松誠 慶應義塾大学医学部 助教授  
池淵研二 北海道赤十字血液センター 副所長  
谷下一夫 慶應義塾大学理工学部 教授  
山口隆美 名古屋工業大学生産システム工学専攻 教授

（研究協力者）

西谷孝子 慶應義塾大学医学部 助教授

# 目次

平成11年度

## 人工血小板の開発に関する研究

総括研究報告書	池田 康夫
分担研究報告書	
1. リポソームを用いた血小板代替物の開発	池田 康夫 西谷 孝子
2. GPIb $\alpha$ -liposome,の作成とその性状の解析	村田 満
3. フローシステムでの血小板粘着測定法の確立と人工血小板の機能評価	半田 誠
4. 止血能を有する蛋白質高分子量体の開発	武岡 真司
5. 人工血小板の(liposome-rIb)の in vivo 止血効果に関する研究	長澤 俊郎
6. 微小血管における血小板分布決定機構としての Glycoprotein Ib $\alpha$ の役割	末松 誠
7. PEG-修飾リポソームの貧食機構に関する研究	池淵 研二
8. 人工血小板粒子のモデル細動脈内における 分布及び運動の計測	谷下 一夫
9. 人工血小板の最適設計に関する計算流体力学的研究	山口 隆美

## 研究発表業績

### その他

(財) ヒューマンサイエンス財団 主催

平成12年2月11日開催 厚生科学研究研究成果発表会

- 「人工血液をつくる」ポスター
- 当日配布資料

(財) ヒューマンサイエンス財団 主催

平成12年2月23日開催 厚生科学研究研究成果発表会 (研究者向け)

- 講師依頼状・プログラム

第6回日本血液代替物学会 年次大会

平成11年9月10日・11日 東京開催

- 学会ポスター
- 抄録集 一部抜粋

当研究班主催 公開シンポジウム 報告書

平成11年2月10日開催

日本血液代替物学会雑誌「人工血液」vol.7, No.2. pp53, 1999

# 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

総括研究報告書

主任研究者 池田 康夫 慶應義塾大学医学部 内科学 教授

研究要旨：人工血小板・血小板代替物の開発を目指した本研究班は、これまで2年間の研究成果をふまえ、本年度の研究で止血機能を保持する人工粒子の創製に成功し、実用化に向けた第1歩を踏み出した。

具体的な研究成果としては、リポソームを人工担体とし、遺伝子組み換え技術で精製されたフォンビルブランド因子(vWF)受容体(GPIb $\alpha$ )、コラゲン受容体(GPIa/IIa複合体)を結合させた rGPIb $\alpha$ 、rGPIa/IIa-リポソームが流動状態でコラゲン表面に効率よく粘着することが確認された。rGPIb $\alpha$ を単独で結合させた rGPIb $\alpha$ -リポソームの *in vivo* 止血能が血小板減少ラットを用いて検討され、リポソームの投与後、出血時間が短縮することが証明された。

リポソームに代わり、生体適合性を有する人工担体候補としてアルブミンマイクロスフェア(AMS)の調整法が確立され、rGPIb $\alpha$ -AMS が作製された。In vitro 機能評価としてリストセチン存在下で vWF 依存性凝集が起こることが確認された。そのほか、rGPIb $\alpha$ -リポソームの *in vitro* でのミクロの挙動解析法、ラット腸管膜微小循環を用いた生体内挙動解析システムが確立され、これらのリポソームの動脈内での偏在分布が確認された。

分担研究者

末松誠 慶應義塾大学医学部 助教授  
村田満 慶應義塾大学医学部 講師  
半田誠 慶應義塾大学医学部 講師  
谷下一夫 慶應義塾大学理工学部 教授  
武岡真司 早稲田大学理工学部 助教授  
池淵研二 北海道赤十字血液センター  
副所長  
長澤俊郎 筑波大学臨床医学系 教授  
山口隆美 名古屋工業大学生産システム  
工学 教授

A. 研究目的

血小板輸血は、癌・造血器腫瘍などの治療や、外科手術における欠くことの出来ない補助治療法として非常に重要な位置を占めており、現在その使用量が毎年約10%も増加していることや、21世紀に於ける新たな医療の展開を考えると、その重要性が一層増すことが予想される。しかし、血小板輸血には解決すべき2つの大きな課題がある。一つはその需要の増加と血小板の短い保存期間(72時間)の為に起こる供給不足・緊急時供給

体制の不備であり、他は、血小板製剤においても他の血液製剤同様、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を有していることである。これらの重要な課題を解決するため、学会を中心として血小板輸血の適応に関するガイドライン作成に取り組み、不必要な輸血を減少させるよう、努力しているが、赤血球輸血と異なり、自己血輸血の推進は図れず、その意味でウィルス感染症などの副作用発現の危険性を有する同種血を可及的に回避し得る人工血小板・血小板代替物の開発・臨床応用は、21世紀の医療の当然目指すべき方向といえる。常時使用可能な人工血小板・血小板代替物を開発することは、血液事業の効率化のみならず、緊急災害時の備えという観点からも重要であるが、血液行政の最大の課題である輸血後感染症の回避を解決し得ることから、医療行政にもたらすインパクトは大きい。さらに言えば、この領域の研究は、欧米においても緒についたばかりであり、医療の国際化が呼ばれている現在、わが国でこのような研究を推進し、その成果を上げることの意義は非常に大きいと言える。

## B. 研究方法

### 1. 血小板膜糖蛋白固相化リポソームの作製とその機能解析

CHO細胞を用い、vWF受容体蛋白(GPIIb $\alpha$ )、コラゲン受容体蛋白(GPIIa/IIa)を培養上清中に可溶性蛋白として大量に回収し、その精製蛋白をdetergent dialysis法で調製したリポソームにn-octyl  $\beta$ -D-

glucopyranosideを用いて結合させ、それぞれrGPIIb $\alpha$ -リポソーム、rGPIIa/IIa-リポソーム、rGPIIb $\alpha$ 、rGPIIa/IIa-リポソームを作製した。リポソーム表面の蛋白結合量はELISA法で測定した。その機能解析はrhodamineで標識したリポソームのtype Iコラゲンへの粘着をフローシステムで蛍光顕微鏡を用いて観察し、得られたビデオ画像により、定量的解析を行った。実験過程でリポソームの2重リン脂質膜の破壊など認められていないことが確かめられている。

### 2. rGPIIb $\alpha$ の担持するアルブミン高分子重合体の調製とその機能評価

リコンビナントアルブミン溶液からpHと温度の制御により分子内・分子間チオール・ジスルフィド交換反応を生起させ、 $240 \pm 10$ nmのアルブミンマイクロスフェア(AMS)を調製した。N-サクシニイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)を用いてrGPIIb $\alpha$ をAMSに結合させた。rGPIIb $\alpha$ -AMSの機能は散乱光血小板凝集計を用い、リストセチン存在下でのvWF依存性凝集の有無で評価した。

### 3. 人工血小板・血小板代替物の止血能評価と生体内挙動の検討

#### 1) 止血能評価

F344近交系雄ラットに $\gamma$ 線7Gyを照射し、種々の程度の血小板減少ラットを作製した。ラット尻尾を用いシンプレート法で行った出血時間は血小板数7.6万/ $\mu$ l以上で、血小板数との間に高い負の相関を認めた( $r = -0.73$ )。従って、血小板減少ラットでの出血時間測定が人工血小

板・血小板代替物の止血能評価になり得ることが示唆された。

## 2) 生体内挙動の観察システム

ラット腸管微小循環系を用い、蛍光色素 CFSE(carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester)により生体染色された血小板の高速度高感度撮像が可能となった。rGPIb  $\alpha$ -リポソームについては、rhodamine 標識し、同様に観察した。

## 4. 人工担体の適正化・問題点の評価

### 1) 小胞体のポリエチレングリコール (PEG) 表面修飾と蛋白質の結合

両末端にアミノ基を有する PEG を用い、それぞれのアミノ基を化学修飾した後、 $\alpha$ 、 $\epsilon$ -distearoyl lysine を結合させた 4 本鎖 PEG 脂質を合成し、その後 SPDP を反応させ、活性 PEG 脂質 (PD-PEG 脂質) を合成した。PD-PEG 導入小胞体へのタンパク質の結合は SPDP/DTT により蛋白にメルカプト基を導入後、PD-PEG 脂質とのチオール・ジスルフィド交換反応によって行った。

### 2) PEG 修飾リポソームの貧食機構の解析

ヒト末梢単核球を分離し、蛍光標識した PEG 修飾リポソームと共に 20 時間培養後、フローサイトメーターで単球・マクロファージの蛍光量を測定した。

(倫理面への配慮)

代替物の止血能検討の為の動物実験に際しては、次のそれぞれの施設における規定 (慶應義塾大学: 実験動物委員会倫理規定、筑波大学: 動物実験取り扱い規定)

の承認を得て、動物愛護に十分な配慮を行い、適切な処置を施した。

## C. 研究結果

### 1. 血小板膜糖蛋白固相化リポソームの機能解析

リポソームを担体とした候補血小板代替物として、rGPIb  $\alpha$ -リポソーム、rGPIa/IIa-リポソーム、rGPIb  $\alpha$ , rGPIa/IIa-リポソームの 3 種類を作成し、600、1200、2400sec<sup>-1</sup> の種々のずり速度の流動状態下で type I コラゲンへのリポソームの粘着様式を蛍光顕微鏡下で観察し、ビデオ画像で解析した。rGPIb  $\alpha$ -リポソームは、コラゲンに結合した vWF に可逆的、一過性に粘着し、その粘着量はずり速度依存性であった。一方、rGPIa/IIa-リポソームは、コラゲンに強固に粘着するが、高ずり速度下では、その粘着は著しく減少する。rGPIb  $\alpha$ 、rGPIa/IIa-リポソームは、高ずり速度下でも効率良く強固にコラゲンに粘着した。

血小板減少ラットモデルが作成されたことから、人工血小板・血小板代替物の止血能評価の標準化が可能となり、rGPIb  $\alpha$ -リポソームの止血能が評価された。リポソーム輸注前後の出血時間を測定したところ、中等度の血小板減少ラットでは、輸注後の出血時間の短縮がみられた。他の 2 種類のリポソームの止血能評価については、計画中である。

### 2. rGPIb $\alpha$ 結合アルブミン高分子量体の調整とその機能評価

アルカリ状態での熱変性と凝集挙動を利用した分子内・分子間チオール・ジスル



フィド交換により、ヒトリコンビナントアルブミンからアルブミンマイクロスフェア (AMS) を調整した。AMS の大きさは 2~3 $\mu\text{m}$  まで制御可能であるが、rGPIb  $\alpha$  結合に用いたものは、240 $\pm$ 10nm であった。SPDP を用い、ジスルフィド結合により、rGPIb  $\alpha$  を高効率に導入出来た。rGPIb  $\alpha$ -AMS はリストセチン存在下に vWF 依存性に凝集し、この凝集は GPIb  $\alpha$  に対するモノクローナル抗体で著明に抑制されることが散乱光血小板凝集計を用いて確認された。また、rGPIb  $\alpha$ -AMS はリストセチン惹起ヒト血小板凝集を増強することも明らかとなった。

### 3. その他

ラット腸管膜微小循環を用い rhodamine 標識 rGPIb  $\alpha$ -リポソームの挙動を高速度、高感度ビデオシステムで観察することが可能となった。CFSE で生体染色後、観察したヒト血小板と同様、動脈側での偏在分布が観察された。rGPIb  $\alpha$ -リポソームは、流血中でヒト血小板と相互作用は起こさなかった。PEG 修飾リポソームへの水溶性蛋白質の結合を可能にする、PEG 脂質の設計がなされ、試みにチトクローム C を PEG 修飾リポソームに結合せしめ、血小板膜糖蛋白結合への道を拓いた。

### D. 考察

生体の重要な防御反応である止血機構の分子レベルでの解析が近年大きな進展を見せている。本研究班でも、主任研究者・分担研究者などがそれに取り組んだ結果、止血血栓形成の初期反応として血管損傷

部位で露出する内皮下組織の主成分であるコラゲンを標的にした血小板粘着が重要であり、その反応に血小板膜糖蛋白 GPIb/IX 複合体、GPIa/IIa 複合体が重要な役割を演じることが明らかとなった。そこで人工血小板・血小板代替物開発の第1歩として血管損傷部位のコラゲンに特異的に粘着し、止血機能を発揮し得る人工物を作製することを目的に研究が開始された。人工担体として生体適合性に優れ、機能蛋白を導入し易いものとしてリポソームを選択し、これに遺伝子組み換え技術で大量に精製した vWF 受容体 (rGPIb  $\alpha$ ) コラゲン受容体 (rGPIa/IIa) を結合させた。

候補人工担体としては、この他ヒトリコンビナントアルブミンから調整したアルブミンマイクロスフェア (AMS) を考慮し、本研究班の平成11年度の研究成果としてサイズが制御可能な AMS の調整法が確立され、これに vWF 受容体としての機能を保持したままで rGPIb  $\alpha$  が結合し得ることが示された (特許出願)。作製された rGPIb  $\alpha$ -リポソーム、rGPIa/IIa-リポソーム、rGPIb  $\alpha$ 、rGPIa/IIa-リポソームについて流動状態下でのコラゲンへの粘着を蛍光顕微鏡下で検討した結果、高い速度下において効率良く強固に粘着するものは、rGPIb  $\alpha$ 、rGPIa/IIa-リポソームであった。それぞれの蛋白を単独で導入したリポソームは可逆的、一過性の粘着であったり (rGPIb  $\alpha$ -リポソーム) 高い速度下での粘着が著明に低下する (rGPIa/IIa-リポソーム) などであった。In vitro での解析が進んで、大量に作製が可能で

あった rGPIIb $\alpha$ -リポソームについて血小板減少ラットを用いてその止血能が評価された。In vitro の粘着実験での一過性粘着の結果にも拘わらず、このリポソームの投与により中等度血小板減少ラットにおいて出血時間の短縮がみられ、血管損傷部位にコラーゲンを標的に特異的に集積する人工粒子が人工血小板・血小板代替物として有望であることを世界で初めて示した。この結果から rGPIIb $\alpha$ 、rGPIa/IIa-リポソームの止血能評価の結果が待たれるところであり、実験が計画されている。止血血栓形成過程で、血小板粘着は、初期反応として必須であるが、それに引き続いて起こる血小板凝集もまた止血血栓形成に不可欠であることは、凝集に必須の膜糖蛋白 GPIIb/IIIa を先天的に欠如する血小板無力症では、著明な出血傾向が見られることで明らかである。そこで、平成12年度までに作製された血管損傷部位に特異的に集積するリポソームに凝集機能を附加することが当然求められる。従って、それ自身が、あるいは生体内に残存する患者血小板と人工物が凝集塊を形成し得るようにデザインされた新たな人工血小板・血小板代替物の創製が求められる。血小板凝集に必須の粘着蛋白として GPIIb/IIIa 複合体のリガントとなるフィブリノゲンを遺伝子組み換え体として精製し、rGPIIb $\alpha$ 、rGPIa/IIa-リポソームに固相化することを現在計画中である。それにより血管損傷部位に特異的に集積したリポソームに残存する血小板がリクルートされて凝集塊を形成し、リポソームの止血機能が一層増強されることが期待される。

本年度の研究の成果により、人工血小板・血小板代替物開発をリードする独創的な方向性が明示され、今後の開発研究での課題もより具体的な形で理解されるようになった。人工酸素運搬体の開発研究が20年に近い歴史を有しているのに比べ、人工血小板・血小板代替物の開発研究は、緒に付いたばかりである。人工担体の生体適合性（生体内寿命・安全性も含め）の改良などについては、人工酸素運搬体にも共通している課題でもあるが、一方、人工血小板・血小板代替物では循環血液中で血栓を作ることがないかの観点での、安全性の新たな検討も必要であり、その意味でも本研究班分担研究者によりリポソーム・血小板の生体内挙動を腸間膜微小循環系で観察し得るシステムが構築されたことは特筆に値する。本研究班は、その特徴として高分子化学・流体力学・微小循環学・血栓止血学の基礎理論を重視することで学際的な開発研究を進めて来ており、その成果が平成11年度に得られた。

#### E. 結論

血管損傷部位に特異的に集積し得るリポソームをデザインし、rGPIIb $\alpha$ 、rGPIa/IIa-リポソームが流動状態下においてコラーゲンを標的にして、効率よく集積することが明らかとなった。また、rGPIIb $\alpha$ -リポソームを血小板減少モデルラットに投与すると出血時間の短縮が見られた。

血小板膜糖蛋白を担持するリポソームの創製は、人工血小板開発の有力な手段であることが初めて示され、これを基盤として凝集機能、血液凝固促進活性を附加

させることで、臨床上有用で実用化し得る人工血小板開発が可能であることを強く示唆した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hayashi S, Suematsu M et al: Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress; Role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ. Res.* 85, 663-671, 1999

Iizuka T, Suematsu M et al: Stage-specific expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 during embryogenesis in rats. *J Immunol.* 164, 2463-2471, 2000

Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Suematsu M et al: Immunoneutralization of glycoprotein Iba attenuates endotoxin-induced rolling of platelets and leukocytes on rat venular endothelium in vivo. *Circ Res*, in press, 2000

Yamaguchi T., et al: Computational mechanical model studies on the spontaneous emergent morphogenesis on the cultured endothelial cells. *J Biomech.* 33(1) 115-126, 1999

Miyazaki Yamaguchi et al: simulation of platelet adhesion using a discrete element method, in clinical application of computational mechanics to the cardiovascular system. Ed. Yamatuchi T. Springer-verlag, Tokyo 2000 in press.

Kitaguchi T, Murata M, Iijima K et al:

Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib  $\alpha$ -A potential substitute for platelet transfusion. *Biochem Biophys Res Commun.* 261: 784-788, 1999.

Kashiwagi H, Handa M, et al: A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the  $\beta 3$  subunit activates integrins  $\alpha IIb \beta 3$  and  $\alpha v \beta 3$ . *Blood* 93 (8): 2559-2568, 1999

Haseyama Y, Handa M, Ikeda Y et al: Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. *Blood* 94(5): 1568-1577, 1999

Oda A, Ikeda Y, Handa M et al: Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Btk/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD23 crosslinking. *Blood* 95(5): 1663-1670, 2000

Nishiya, T., Murata, M., Handa, M., Ikeda, Y: Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib  $\alpha$  to immobilized von Willebrand factor under flow conditions.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, in print.

西谷孝子、池田康夫：血小板代替物、「血液、腫瘍科」第40巻第4号 印刷中

西谷孝子：リポソームを用いた人工血小板の開発、人工血液 Vol. 8、No. 1 印刷中

Ikeda Y, Handa M, Murata M, Goto S:

Shear-dependent platelet response. Eibun Press. New Frontier in Vascul Biol. Thromb. Hemost. 189-197, 2000.

S Miura, Ikeda Y et al: Total inhibition of high shear stress induced platelet aggregation by homodimeric von Willebrand factor A1-loop fragments. Br. J Haemost. 105, 1092-1100, 1999

Sonoda A, Murata M, Ikeda Y et al: Association between platelet glycoprotein Ib  $\alpha$  genotype and ischemic cerebrovascular disease

Matsubara Y, Murata M, Handa M, Ikeda Y et al: Association between diabetic retinopathy and genetic variations in  $\alpha 2 \beta$  integrin, a platelet receptor for collagen. Blood 95, 1560-1564, 2000

池田康夫：病的動脈血栓形成の分子機構 第114回日本医学会シンポジウム記録集 53-61、1999

池田康夫：血管内皮障害と血栓形成、医学のあゆみ 191. (5) 518-522

池田康夫：出血傾向 - 症候から診断へ第2集 日本医師会雑誌 121-8、平成11年

池田康夫：病的血栓形成の分子機構、循環器科、47, 87-91, 2000

## 2. 学会発表

片山富博 末松誠 他：超高速生体ビデオ顕微鏡によるラット血小板の微小循環動態の解析、第25回日本微小循環学

会 2000 2月

S. Takeoka: Albumin microspheres conjugating receptor proteins as platelet substitutes (PL- 35b), 5<sup>th</sup> Int. Sym. Polymers for advanced technologies, 1999, Sept.

武岡真司：蛋白質結合デンドロン型脂質による水溶性蛋白質の固定化(11Pf102)、第6回日本血液代替物学会年次大会 1999年 9月

武岡真司：ジスルフィド結合性を利用した性蛋白質担持アルブミンマイクロスフェア(3D415)、日本科学会第78回春季年会 2000年 3月

池淵研二：単球/マクロファージによるリポソーム内包型ヘモグロビンの貧食機構、第61回日本血液学会 1999年

谷下一夫他：人工血小板の運動の計測、日本機械学会第12回バイオエンジニアリング講演会 2000年

Tanishita et al: Motion of artificial platelet in the model small artery. ICTAM 2000

Tanishita K et al: Wall shear stress distribution on the surface of realistic endothelial cell model. Advances in bioengineering, ASME, 39-40 BED- vol43, 1999

Tanishita K et al: Arterial blood flow and transport near the endothelial cells. Special lecture proceedings of the 4<sup>th</sup> Asia Pacific Conf. Med & Biol. Engin., 22-25, 1999

宮崎寿子、山口隆美他：離散要素法を用いた血小板粘着のシミュレーション、日本機械学会第12回バイオエンジニアリン

グ講演会 2000年 1月

西谷孝子、村田満：血小板代替物、第12回日本血液代替物学会会長シンポジウム 平成11年 9月

山県伯彦、半田誠 他：流動状態下での血小板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

Nishiya, T., Shih, G., Murata, M., Handa, M., Kainou, M., Kamide, K., Ikeda, Y.: Adhesion of liposomes with covalently bound recombinant platelet membrane glycoprotein Ia-IIa or Ib  $\alpha$  to subendothelial components under flow conditions. The 4<sup>th</sup> Meeting on Thrombosis & Rheology. March 1999 Tokyo.

Nishiya, T., Shih, G., Murata, M., Handa, M., Kainou, M., Kamide, K., Ikeda, Y.: Adhesion of liposomes with covalently bound recombinant platelet membrane glycoprotein Ia-IIa or Ib  $\alpha$  to subendothelial components under flow conditions — Approach to platelet substitutes. XVIIth congress International Society for Thrombosis & Haemostasis. August, 1999. Washington DC. U. S. A.

西谷孝子、上出佳永子、村田満、半田誠、池田康夫：遺伝子組み換え GPIb/IX/V のフラグメントを導入したリポソームと固定化 vWf との相互作用、第6回日本血液代替物学会年次大会、1999年 9月

西谷孝子、戒能美枝、上出佳永子、村田満、半田誠、池田康夫：遺伝子組み換え GPIaIIa 及び GPIb $\alpha$  のフラグメントを導

入したリポソームの固定化コラーゲンへの粘着、第6回日本血液代替物学会年次大会 1999年9月

西谷孝子、村田満、半田誠、戒能美枝、上出佳永子、池田康夫：リポソームを担体とした血小板代替物の開発、第22回日本血栓止血学会学術集会、1999年12月

Nishiya, T., Kinou, M., Kamide, K., Murata, M., Handa, M., Ikeda, Y.: Adhesion of liposomes carrying both recombinant GPIaIIa and GPIb  $\alpha$  to collagen surface under flow conditions. 41st annual meeting of the American Society of Hematology. December New Orleans. U. S. A.

Nishiya, T., Kinou, M., Kamide, K., Murata, M., Handa, M., Ikeda, Y.: Adhesion of liposomes carrying both recombinant GPIaIIa and GPIb  $\alpha$  to collagen surface under flow conditions. The 5<sup>th</sup> Meeting on Thrombosis & Rheology. March 2000.

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

「血小板代替物」平 11-255878、平成11年9月9日

「GPIb-脂質結合体およびその用途」特願 2000-57449、平成12年3月2日

### 2. 実用新案登録 特筆無し

### 3. その他

「血小板接着分子 GPIb-alpha を標的にした新しい炎症制御法の開発」

慶應義塾大学発明取扱規則第3条につき  
発明提案書を提出予定

(平成12年4月特許出願予定)

# 分 担 研 究 報 告 書

リポソームを用いた血小板代替物の開発

主任研究者 池田康夫 慶應義塾大学医学部 教授

研究協力者 西谷孝子 慶應義塾大学医学部 助教授

**研究要旨** 遺伝子組み換え GPIaIIa または GPIb $\alpha$  を固定化したリポソーム(rGPIaIIa-liposomes, rGPIb $\alpha$ -liposomes), 両方を固定化したリポソーム(rGPIaIIa-Ib $\alpha$ -liposomes), 及び GPIb $\alpha$  変異体(M239V) を固定化したリポソーム(rM239V-liposomes) を創り、それらの流動状態下におけるコラーゲン表面への粘着、可溶性 vWf, または vWf 表面との相互作用を解析した。rGPIaIIa-liposomes は、ずり速度が低いとき効率よくコラーゲン表面に粘着すること、rGPIb $\alpha$ -liposomes と vWf 表面との相互作用は、ずり速度が高いときに強く、rGPIb $\alpha$  と vWf との可逆的結合による“tethering”を特徴とすること、rGPIaIIa-Ib $\alpha$ -liposomes はずり速度に関係なく効率よくコラーゲン表面に粘着することが明らかとなった。rM239V-liposomes は rGPIb $\alpha$ -liposomes より強い vWf 表面との相互作用を示すが、可溶性 vWf と速やかに反応して凝集塊を作ることから、人工血小板としては不適合であることが明らかとなった。

**A. 研究目的**

血小板膜蛋白の遺伝子組み換え体を固定化したリポソームを創り、それらの流動状態下における血管内皮下組織成分との相互作用を検討することにより、血小板代替物となりうるリポソームを構築することを目的とする。

**B. 研究方法**

ローダミンで蛍光標識したリポソームの流動状態下における、固定化コラーゲン、または固定化 vWf 表面上での動的変化を蛍光顕微鏡で連続測定しイメージプロセッサ、ARGUS-20, ARGUS-50, を用いて画像解析を行った。測定はすべて洗浄赤血球中、ヘマトクリット 37.5%, 血小板濃度 1.25

$\times 10^4/\mu\text{l}$ , 37°C で行った。リポソームと可溶性 vWf との相互作用は aggregometer を用いて測定した。

**C. 研究結果**

**1. rGPIaIIa-liposomes**

rGPIaIIa-liposomes は可溶性 vWf とは反応せず、コラーゲン表面との相互作用は非可逆的で、リポソームはコラーゲン表面に接触後直ちに静止して粘着し、ずり速度が 600, 1200, 2400  $\text{s}^{-1}$  と増加するのに伴ってリポソームのコラーゲン表面への粘着は減少した(図1)。

**2. rGPIb $\alpha$ -liposomes**

rGPIb $\alpha$ -liposomes は可溶性 vWf とは反応せず、vWf 表面との相互作用は可逆的、



即ち、リポソームは vWf 表面と接触後直ちに静止して粘着するのではなく、表面を流動方向へ移動し、その移動速度、表面に滞在する時間、および表面と相互作用するリポソームの数は、リポソーム表面の rGPIb $\alpha$  密度と vWf 濃度に依存することが明らかとなった。vWf 表面と相互作用する rGPIb $\alpha$ -liposomes の数は、リポソーム表面の rGPIb $\alpha$  密度と vWf 濃度が高いときは大きく、これらの値が小さくなるに従って減少した(図2)。1.0 と 100  $\mu\text{g/ml}$  の vWf 溶液を用いて作った vWf 表面では、リポソームは表面との接触を保ちながら流動方向へ移動し、その移動速度は、リポソーム表面の rGPIb $\alpha$  密度と vWf 濃度が高いときには小さく、これらの値が小さくなるに従って大きくなった(図3)。0.1  $\mu\text{g/ml}$  の vWf 溶液を用いて作った vWf 表面では、リポソームは短時間表面と接触するのみで、表面に滞在する時間は、rGPIb $\alpha$  密度が高くなるほど長くなった。rGPIb $\alpha$ -liposomes はずり速度が大きくなるのに伴って、vWf 表面と相互作用する数が増加した(図1)。

### 3. rGPIaIIa-Ib $\alpha$ -liposomes

可溶性 vWf が存在しないとき、rGPIaIIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着は rGPIaIIa-liposomes と同様に非可逆的で、ずり速度が大きくなるのに伴って粘着は著しく減少した(図4)。一方、10  $\mu\text{g/ml}$  の可溶性 vWf の存在下では、rGPIaIIa-Ib $\alpha$ -liposomes は可溶性 vWf とは反応せず、コラーゲン表面への粘着は非可逆的で、しかも、ずり速度が 2400  $\text{s}^{-1}$  と高くなっても粘着は減少することなく、むしろ増加した(図4)。これらの結果は、rGPIaIIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面へ

の粘着では、ずり速度が低いときには主に rGPIaIIa とコラーゲンとの相互作用によって起こり、ずり速度が高くなると rGPIaIIa とコラーゲンとの相互作用は減少するが、rGPIb $\alpha$  とコラーゲン表面に吸着している vWf との相互作用がこれを補っており、rGPIb $\alpha$  と rGPIaIIa が協同的に働いていることを示している。このことは、抗 GPIaIIa 抗体(Gi9) と抗 GPIb $\alpha$  抗体(GUR20-5) を用いた実験によっても支持される。

### 4. rM239V-liposomes

rM239V-liposomes は rGPIb $\alpha$ -liposomes と比べると vWf 表面での移動速度が小さく、表面に滞在する時間も長く、vWf 表面との強い相互作用を示すが、可溶性 vWf と速やかに反応して大きな凝集塊をつくるため、血小板代替物としては不適切な物質である。

## D. 考察・結論

GPIaIIa と GPIb $\alpha$  の遺伝子組み換え体をリポソームに固定化することにより蛋白本来の機能を損なうことなく膜表面に再現できることが明らかになった。rGPIaIIa-Ib $\alpha$ -liposomes では2つの蛋白が協同的に働いており、人工血小板として重要な物質である。一方、血小板型 vWD 患者に発見された GPIb $\alpha$  変異体、M239V、を固定化したリポソームは血小板代替物としては不適切である。今後は、固定化する rGPIaIIa と rGPIb $\alpha$  の比率を検討することにより、より有効な粘着を惹起するリポソームの作製を試みると同時に、血小板凝集塊に巻き込まれ、血小板の放出反応を促進する可能性のあるフィブリノーゲン固定化リポソームの作製にも着手する予定である。さらに、

リポソームの正常血管、障害血管における微小循環挙動の解析を容易にするために、R-Phycoerythrin でラベルしたリポソームの作製も行う予定である。

## E. 発表業績

### 1. 論文発表

1. Nishiya, T., Murata, M., Handa, M., Ikeda, Y: Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib<sub>β</sub> to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, in press.

2. 西谷孝子、池田康夫：血小板代替物、「血液、腫瘍科」第40巻第4号 印刷中

3. 西谷孝子：リポソームを用いた人工血小板の開発、人工血液 Vol. 8、No. 1 印刷中

### 2. 学会発表

1. Nishiya, T., Shih, G., Murata, M., Handa, M., kainoh, M., Kamide, K., Ikeda, Y: Adhesion of liposomes with covalently bound recombinant platelet membrane glycoprotein Ia-IIa or Ib<sub>β</sub> to subendothelial components under flow conditions.---- Approach to platelet substitutes. XVIIth congress International Society for Thrombosis & Haemostasis. Aug. 14-21, 1999. Washington DC. U.S.A.

2. 西谷孝子、上出佳永子、村田満、半田誠、池田康夫：遺伝子組み換え GPIb/IX/V のフラグメントを導入したリポソームと固定化 vWf との相互作用、第6回日本血液代替物学会年次大会、1999年9月10, 11日、東京

3. 西谷孝子、戒能美枝、上出佳永子、村田満、半田誠、池田康夫：遺伝子組み換え GPIaIIa 及び GPIb<sub>α</sub> のフラグメントを導入したリポソームの固定化コラーゲンへの粘着、第6回日本血液代替物学会年次大会、1999年9月10, 11日、東京

4. 西谷孝子、村田満、半田誠、戒能美枝、上出佳永子、池田康夫：リポソームを担体とした血小板代替物の開発、第22回日本血栓止血学会学術集会、1999年12月2, 3日、宇都宮

5. Nishiya, T., Kainoh, M., Kamide, K., Murata, M., Handa, M., Ikeda, Y: Adhesion of liposomes carrying both recombinant GPIaIIa and GPIb<sub>α</sub> to collagen surface under flow conditions. 41th annual meeting of the American Society of Hematology. December 3-7, 1999. New Orleans, U.S.A.

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）  
分担研究報告書

GPIIb $\alpha$ -liposome の作成とその性状の解析

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部 講師

研究要旨 遺伝子組み換え血小板膜糖蛋白 GPIIb $\alpha$  を固相化した liposome (rGPIIb $\alpha$ -liposome) は、内皮下組織に存在するフォンビルブランド因子 (vWF) と特異的に結合する。今年度は rGPIIb $\alpha$ -liposome の in vitro で機能をさらに詳細に検討するため (1) rGPIIb $\alpha$ -liposome が、ずり応力惹起血小板凝集に与える影響、(2) 血小板凝集を補助する為に最適な rGPIIb $\alpha$ -liposome 濃度を決定する目的で血小板凝集塊に巻き込まれる liposome 量の定量化、(3) rGPIIb $\alpha$  の担体をアルブミン重合体に変えた場合 (rGPIIb $\alpha$ -albumin) の in vitro 機能評価、を行った。血小板数  $8 \times 10^4/\mu\text{l}$  および  $32 \times 10^4/\mu\text{l}$  の PRP において  $108 \text{ dyn/cm}^2$  のズリ応力を負荷した場合の血小板凝集率は、PRP 中に予め rGPIIb $\alpha$ -liposome を添加しても増強が認められなかった。これは高ズリ応力下での凝集にはもう一つの vWF 受容体である GPIIb/IIIa が必要であるという過去の成績を支持するものであり、rGPIIb $\alpha$ -liposome を血小板代替物として考える場合、ずり応力血小板凝集を増強しないことは動脈血栓を誘発しないという点で有用な情報である。また rGPIIb $\alpha$ -liposome を in vivo に投与する場合、どの程度の血中濃度を達成した場合にその効果が最大になるかを in vitro 実験系で予測するための基礎データは重要である。そこで rGPIIb $\alpha$ -liposome 濃度と血小板凝集塊に巻き込まれる rGPIIb $\alpha$ -liposome 量を検討した。その結果、PRP 中血小板数  $2 \times 10^4$  では rGPIIb $\alpha$ -liposome 濃度  $64 \mu\text{g/ml}$  で凝集塊に巻き込まれる量がほぼプラトーに達することが判明した。一方、代替物における担体の改良は昨年からの課題であったが、今年度において rGPIIb $\alpha$ -albumin 粒子の基礎的検討が開始された。

A. 研究目的

悪性腫瘍や造血器疾患に対する強力な化学療法、細胞移植治療の著しい進歩に伴って、輸血療法の重要性が益々強調されている。一方これに伴う感染症の伝播、特に AIDS、肝炎の発症のの可能性が大きな社会問題となっている。輸血療法の中でも血小板輸血はこれらの先進的治療を支える大きな柱であるとの認識が高まっている。事

実ここ数年、血小板製剤の供給は年 10～20% の増加率を示しており、これは諸外国でも同様で、今後も続くことが予想されている。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。また、血小板製剤の有効期間が 72 時間と短いこともあり、供給が限られ、特に、僻地では入手が困難であるなどの行政上の問題も少なくない。

さらに同種免疫成立によるランダムドナー血小板輸血に対する不応状態が生じ、HLA適合血小板を必要とするなどの問題も抱えている。これらは高額な医療費を消費することにもつながり、早急な解決が求められている。かかる理由から血小板輸血に代わる治療の開発が強く望まれている。本研究で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。

人工血小板作成のためには止血機構に於ける血小板の役割を分子レベルで解析し、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抽出し、これを効率良く担体に導入することが重要である。血小板因子としては血小板の主たる機能である凝集、粘着を司る血小板膜糖蛋白をターゲットとする。担体は生体適合性がよく異物としての認識が少ない物質、例えば赤血球膜、アルブミン粒子などの生体由来物質の他にリポソームなどが考えられる。

平成10年度までの検討で我々は遺伝子組み換え血小板膜糖蛋白GPIb $\alpha$ を固相化したliposome (rGPIb $\alpha$ -liposome)は、リストセチン存在下でフォンビルブランド因子(vWF)を特異的に結合して凝集すること、血小板凝集塊の中に取り込まれ、血小板凝集を増強することを示した。今回の検討ではliposomeのin vitroでの機能評価をさらに拡大する目的で、(1) rGPIb $\alpha$ -liposomeが、ズリ応力惹起血小板凝集に与える影響、(2) 血小板凝集を補助する為に最適なrGPIb $\alpha$ -liposome濃度を決定する目的で血小板凝集塊に巻き込まれるliposome量の定量化、(3) 静止系でのrGPIb $\alpha$ -liposomeの固相化vWFへの粘着の定量化、に加え(4) rGPIb $\alpha$ の担体としてアルブミン重合体を用いた場合(rGPIb $\alpha$ -albumin)のin vitro機能評価を行った。

## B. 研究方法

### (1) リポソームの作成

昨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GPIb $\alpha$ 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リポソームも作製した。

### (2) ズリ応力惹起血小板凝集に対するrGPIb $\alpha$ リポソームの影響

既報の方法でズリ応力惹起血小板凝集を測定した。すなわち、PRP(血小板数 $8 \sim 30 \times 10^4/\mu\text{l}$ )に $108 \text{ dyne}/\text{cm}^2$ のズリ応力を6分間負荷し、凝集を観察した。共存するrGPIb $\alpha$ リポソームの濃度は予備検討の結果から $250 \mu\text{l}/\text{ml}$ とした。

### (3) rGPIb $\alpha$ リポソームの血栓への取り込み

$^3\text{H}$ ラベルしたliposomeをPRPに添加し、リストセチン凝集を惹起したあと、遠心にて血小板凝集塊を分離し、凝集塊中の $^3\text{H}$ 放射活性を測定した。PRP中の血小板濃度は $2 \sim 32 \times 10^4/\mu\text{l}$ とした。

### (4) 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 $^3\text{H}$ -で放射標識したrGPIb $\alpha$ 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rGPIb $\alpha$ リポソームまたはGPIaIIa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。

## C. 研究結果

(1) 図1にrGPIb $\alpha$ -liposomeがズリ応力惹起血小板凝集に与える影響を示した。血小板数 $8 \times 10^4/\mu\text{l}$ および $32 \times 10^4/\mu\text{l}$ のPRPにおいて $108 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ のズリ応力を負荷した場合の血小板凝集率は、PRP中に予