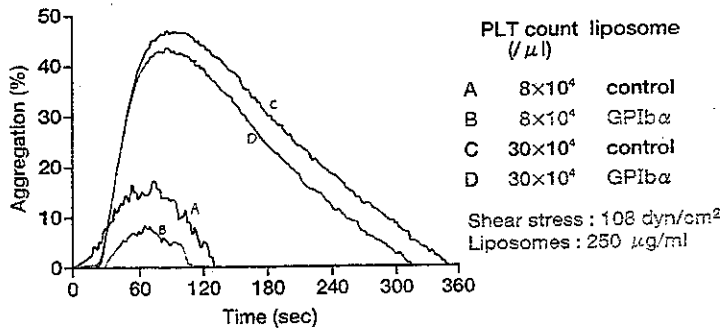


図 1

Effect of rGPIb α -Liposome on Shear-Induced Platelet Aggregation

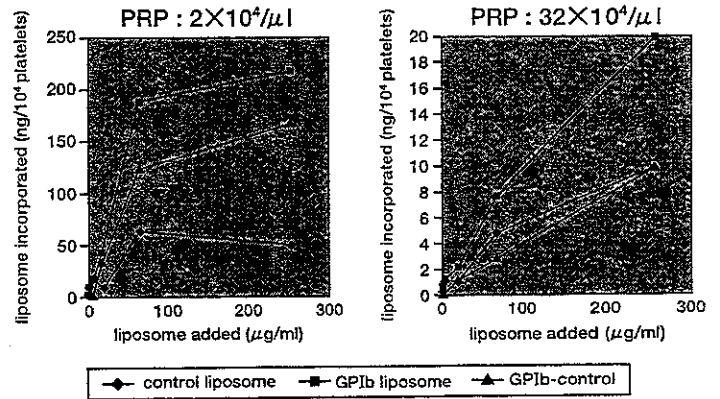


めrGPIb α -liposomeを添加しても増強が認められなかった。一般に高ずり応力下血小板凝集はGPIb/IX/VとGPIb/IIIaの2つのreceptorを介しておこるとされる。従ってrGPIb α -liposomeは単独ではずり応力下では凝集しないと思われる。またずり応力下ではvWFと血小板GPIbの結合-解離が繰り返され、この刺激がGPIb/IIIaを活性化すると思われる。従ってvWF、rGPIb α -liposome、血小板の3者が同時に存在する場合、ずり応力下ではvWFはrGPIb α -liposomeと血小板の両者に対しての結合-解離を繰り返すため、liposomeそのものの凝集を引き起こさず、血小板凝集に対して一部競合抑制効果を示すことが予想される。図1の実験事実はこの理論を裏付けるものと思われる。またrGPIb α -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血栓症、特に動脈血栓を助長しないという点で有利な情報を与えるものである。

(2) rGPIb α -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

図 2

Quantitative Analysis rGPIb α -Liposome Incorporated into Platelet Aggregation Induced by Ristocetin



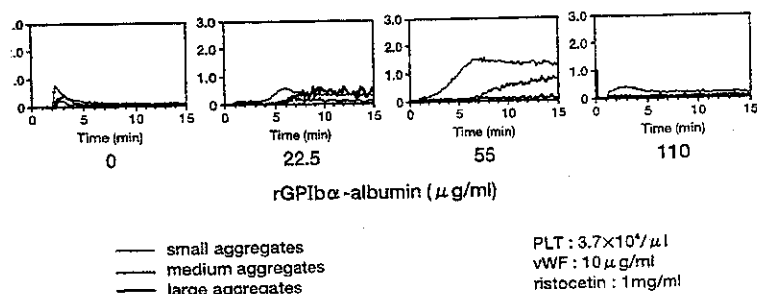
である。ここではrGPIb α -liposome濃度と血小板凝集塊に巻き込まれるrGPIb α -liposome量の関係を知るため、血小板数正常または増加時と、血小板減少時の両者の場合におけるrGPIb α -liposomeの凝集塊への巻き込み量を³HラベルしたrGPIb α -liposomeを用いて検討した。図2に示すごとく、PRP中血小板数 2×10^4 ではrGPIb α -liposome濃度 64μ g/mlで凝集塊に巻き込まれる量がほぼプラトーに達しており、この実験からは、これ以上rGPIb α -liposome血中濃度を上昇させても凝集については効果が上がらないことが予想される。一方、PRP中血小板数 32×10^4 ではrGPIb α -liposome濃度 256μ g/mlでもまだ凝集塊に巻き込まれる量が増加しつつあり、血中濃度を上昇させることによる更なる巻き込み量の増加が予想させる。しかし実際にはこの血小板数では血小板機能異常症でないかぎり人工血小板の適応とはならない。また、図2に示すごとく、血小板濃度が高くなると単位血小板数あたりに巻き込まれるrGPIb α -liposome量は減少する。この $100 \sim 200 \mu$ g/mlというrGPIb α -liposome濃度は、実際にこのliposomeが血小板リストセチン凝集を増強させた濃度

である (Kitaguchi T et al 論文発表(1) 参照)。

(3) 次に静止系で microtiter well に固相化された vWF surface への ^3H -GPIb α liposome の粘着を検討した。粘着量は添加 liposome 濃度に依存して増加し、その程度は リストセチン存在下でより顕著であった。また粘着が飽和に達する濃度が リストセチン存在下では非存在下に比べ高くなる傾向が見られた。これは リストセチン存在下では liposome が凝集するため、粘着以外に凝集も観察しているためと思われる。

図 3

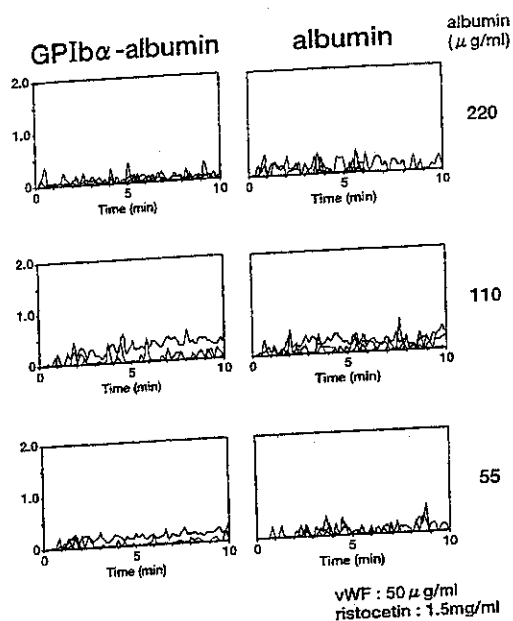
Enhancement of Ristocetin-Induced Platelet Aggregation by rGPIb α -albumin



(4) 人工血小板デザインにおいて、機能分子を運ぶ担体の選定は極めて重要である。アルブミン重合体は、すでに臨床に應用されており、その生体内での安全性について一定の情報が得られている。我々はアルブミン重合体が人工血小板の担体となりうるかを検討するため、アルブミン重合体に既に *in vitro* での機能が十分に解明された rGPIb α を結合させた rGPIb α -albumin を

図 4

Aggregation of rGPIb α -albumin



作成し、その *in vitro* 機能評価を行った。早稲田大学工学部武岡真司助教授より供与された rGPIb α -albumin が、PRP 中での血小板 ristocetin 凝集能に与える影響を検討したものが図 3 である。rGPIb α -albumin は、用量依存的に血小板凝集を増強させた。しかし albumin 濃度 55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でピークに達しており、これ以上ではその効果は減弱した。同様の結果は rGPIb α -liposome による血小板 ristocetin 凝集の増強でも観察されており (Kitaguchi T et al)、rGPIb α -albumin においても、止血補助のための至適濃度が存在することを示唆している。

一方、rGPIb α -albumin 自身が vWF と ristocetin 存在下で凝集するかを検討したものが図 4 であるが、少なくともこの散光凝集計 (PA-100) で同定しうる凝集塊は形成しないと思われた。これが rGPIb α -albumin の粒子サイズや粒子形によるものか、rGPIb α -albumin の性質上凝集が起こりにくいのか今後の検討を要する。

D. 考案と結論

平成10年度までの研究によりGPIb α リポソームが作成されたが、平成11年度は、その機能解析がさらに詳細なものとなった。すなわちrGPIb α -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血栓症、特に動脈血栓を助長しないという点で有用な情報であり、また血小板凝集を補助するために必要なin vivoへの投与量（至適血中濃度）の大まかな値が予測できたことは特筆に値する。さらに新たな担体による代替物作成のよび実験が開始された。

今後GPIaIIa-liposomeならびにrGPIb α -GPIaIIa-liposomeについても同様な検討を加える。また機能分子の改良（例えば抗コラーゲン抗体や、より機能の強いmutant型rGPIb α ; Moriki T et al. Blood 1997)の使用や、血液凝固促進物質など機能物質の内包につき検討することが必要である。これらにより血小板代替物の止血における作用機序の基礎的データの蓄積を行いたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kitaguchi T, Murata M, Iijima K et al. Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α -A potential substitute for platelet transfusion Biochem Biophys Res Commun 261:784-788, 1999

(2) 村田 満：厚生省高度先端医療研究事業：人工血液開発研究分野：公開シンポジウムに参加して 人工血液 7(2):53, 1999

2. 学会発表

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 東京

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

平成11年度分担研究報告書

人工血小板の開発に関する研究

3. フローシステムでの血小板粘着測定法の確立とその応用に関する研究

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 in vitro 血液還流系を用いて、血管内皮下組織の主成分のコラーゲン（CL、type 1）への流動条件下での血小板血栓形成初期反応に、GPIIb-IIIa複合体がCLへ結合したフォンヴィルブランド因子（vWf）を標的とする tethering 分子として、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンがCLへ細胞活性化非依存性に直接非可逆的に結合する接着分子として、重要であることを明かにしてきた。今回、この初期反応にどのような細胞内刺激伝達機構が重要であるかを種々の阻害剤や画像解析装置を使用して検討した。その結果、PI-3キナーゼ、蛋白リン酸化反応、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が重要で、これらの細胞内反応が血流の中で血小板血栓の安定性を保持するのに必須である可能性が示された。以上の結果は、血小板機能を代替する人工物の創製に重要な情報を与えるものである。

A. 研究目的

平成9、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、1) in vitro の流動システムが必須であること、2) 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、3) 血小板膜受容体のGPIIb-IIIa複合体がフォンヴィルブランド因

子への結合を介した tethering 分子としていかなる血流条件下でも止血局所に血小板を誘導し、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンがコラーゲン受容体としてその後の血小板の非可逆的接着（粘着）を有効に仲介すること、4) $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンが必ずしも細胞の活性化に依存しなくても十分その機能を発揮すること、5) したがって、最低限これら2種類の血小板膜受容体の機能を組み込んだシステムがあれば血小板人工創製物の作製が可能であること、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血栓が有効に形成されるためにはどのような細胞内刺激伝達系が必要であるかを種々の細胞内刺激伝達系阻害剤や画像解析装置を使用して検討した。

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 I）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 PPACK 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。

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。

3) 細胞内刺激伝達系阻害剤：PGE₁、aprase、アスピリン、staurosporine、cytochalasine D、E、wortmannin、LY294002、(以上すべて米国シグマ社より購入); Y-27632 (吉富製薬より供与)。

C. 研究結果

全血を用いた流動条件下 (2、400 / s) コラーゲンへの血小板粘着 (QCM 法、粘着占有率) に及ぼす各種血小板阻害薬の影響を観察した結果 (表 1)、蛋白リン酸化反応あるいはミオシン再重合反応を強力に抑制するそれぞれ staurosporine (1 μ M) cytochalasin D、E (10 μ M) は、この粘着反応も強力に抑制することが明かとなった。また、種々の細胞内反応に関与するとされる PI-3 キナーゼ (PI-3K) の特異的阻害剤である wortmannin (0.1-1 μ M) と LY294002 (1-10 μ M) がこの粘着を完全ではないが明らかに阻害することがわかった (図 1)。一方、細胞内 cAMP を上昇させる PGE₁、シクロオキシゲナーゼ阻害によりトロンボキサン A₂ の生成を抑制するアスピリン、あるいはアクチン重合反応を介した血小板放出反応に関与する Rho キナーゼの強力な阻害剤である Y-27632 (10 μ M) はこの粘着自体に影響を及ぼさなかった。

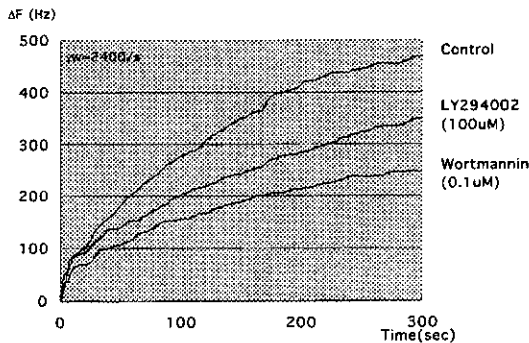
表 1

全血を用いた流動条件下コラーゲンへの血小板粘着に及ぼす血小板阻害剤の影響, QCM法での検討

cAMP上昇	PGE1	増強 (効果ナシ)
COX阻害	ASA	増強 (効果ナシ)
PI-3 キナーゼ阻害	LY294002 wortmannin	阻害 (部分)
アクチン再重合阻害	cytochalasin D/E	阻害 (強力)
蛋白キナーゼ阻害 (非特異的)	staurosporine	阻害 (強力)
Rhoキナーゼ阻害	Y-27632	効果ナシ

図 1

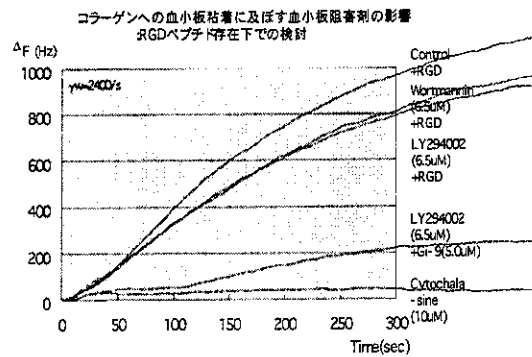
コラーゲンへの血小板粘着に及ぼすPI-3キナーゼ阻害剤の影響



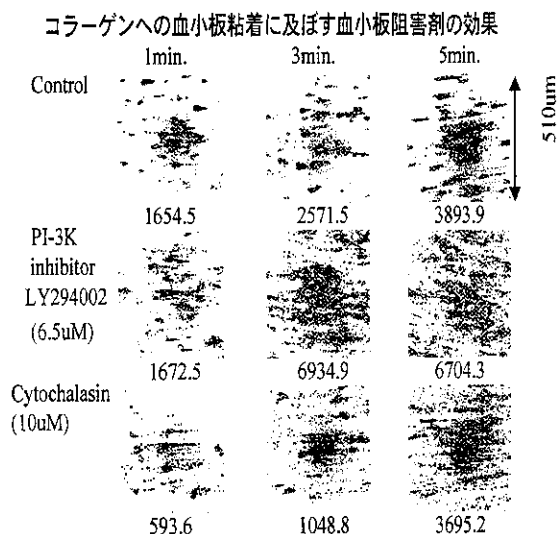
この条件下でのコラーゲンへの血小板粘着には コラーゲンに結合した v W f を標的とした G P I b - I X さらに G P I I b / I I I a を介した粘着反応と コラーゲンと直接結合する G P I a / I I a を介した粘着反応が共存する。そこで、R G D ペプチド (5 0 μ M) 存在

下で前者の系をシャットダウンさせて、P I - 3 K 阻害剤の影響を見たところ、その抑制効果は軽度であった。一方、R G D ペプチド非存在下では L Y 2 9 4 0 0 2 と抗 G P I a / I I a 抗体、G i 9 の両者によりこの粘着反応はほぼ完全に阻害された (図 2) 。

図 2

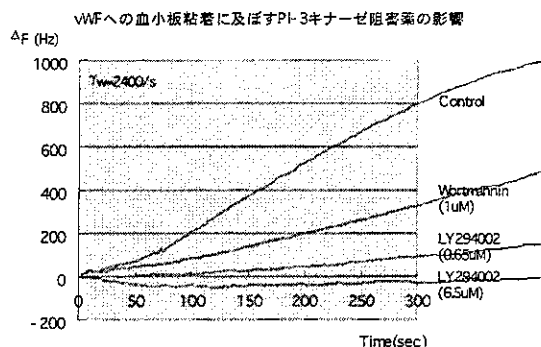


そこで、各種阻害剤の影響を蛍光顕微鏡下で観察した。LY294002、LY294002 と G i 9 そして cytochalasin D により非可逆性の血小板粘着が減少するものの、むしろ血小板の可逆的粘着は対照に比して変化ないかむしろ増強することが観察された (図 3) 。

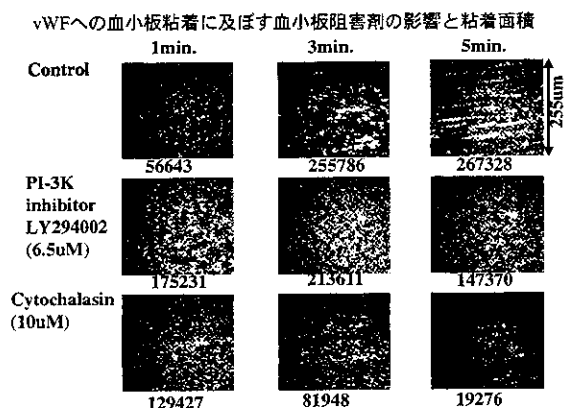


以上のことから、前者の系がよりPI-3Kに依存性に作動していることが示唆された。そして、GPIb-IXを介したテザリングは細胞内反応に依存せず起きていること、また、血小板のアクチン再重合などを介した細胞変形能が血小板の粘着に重要であること、が示唆された。

次に、固相下したvWFへの血小板粘着に及ぼすPI-3K阻害剤の影響を見たところ、LY294002はより強力にこの粘着反応を抑制し、この系がPI-3K依存性であるとの上記の考え方を指示する結果が得られた(図4)。

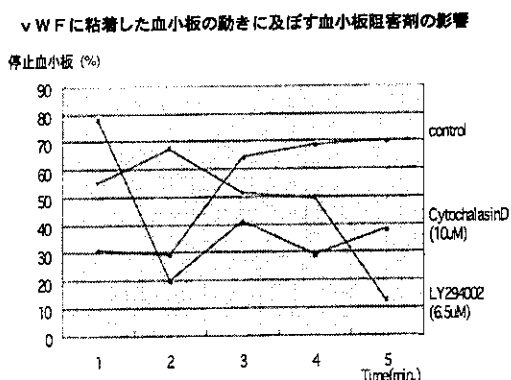


そして、図3と同様に、蛍光顕微鏡下での観察でも阻害剤の効果は明らかで、対照では血小板が粘着したあとの集積像がみられるが、LY294002処理では血小板が個々に分離して集積像を示さなかった。興味あることに時間の経過とともに一度粘着した血小板(血栓)が剥離し、結果的に血栓形成が低下することが観察できた(図5)。この現象はサイトカラシンでより著明に惹起された。



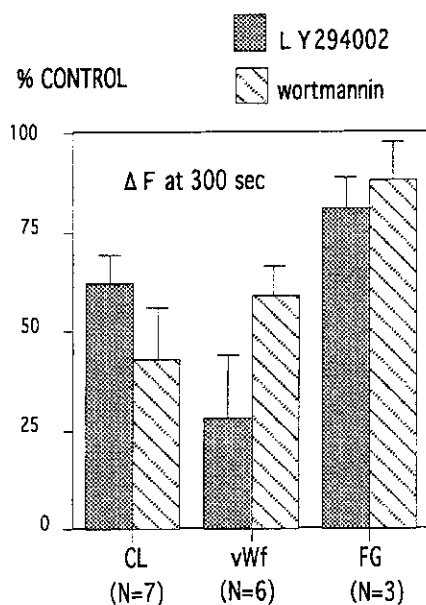
そこで表面に10秒間静止した血小板数の割合を解析したところ、対照で

は時間の経過とともに静止血小板数が増加したのとは対照的に、LY 294 002 処理ではその数は著しく減少し、サイトカラシンでその傾向は著しかった (図 6)。



一方、コラゲンや vWf への粘着と異り、GPIIb-IIIa 複合体の関与するフィブリノゲンへの血小板粘着は PI-3K 阻害剤にあまり影響されなかつた (図 7)。

図 7 PI3-K 阻害剤による高血流条件下血小板粘着の阻害効果



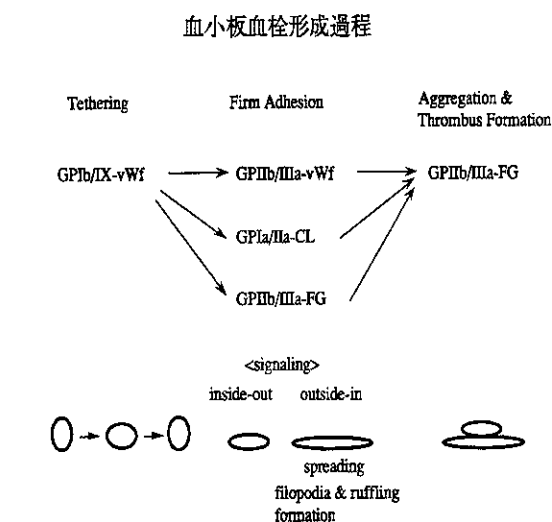
血流条件下で、PI-3K 依存性のシグナリングが血小板の非可逆性の粘着に關与していることが判明した。

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ていた。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 $\alpha 1 \text{Ib} \beta 3$ 複合体は血小板粘着に必須ではなかつた。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。

人工血小板創製において血管傷害部位へのターゲティングは個々の標的マトリックス成分に対する受容体蛋白を使用することで達成される。その際、tethering 分子として GPIb-IX 複合体は必須であり、その下流においてのみ、活性化非依存性に GPIa/IIa ならびに GPIIb/IIIa はそれぞれの対応表面（コラゲンとフィブリン/フィブリノゲン）に対して非可逆的粘着を仲介することができる可能性がある（図8）。ただしその条件として、創製物が血小板の様に偽足形成や伸展反応などの細胞変形能を有



することがあげられる。

E. 結論

1. 血流条件下での血小板の非可逆性粘着には、アクチン再重合などが関与した細胞の形態変化が必要である、
2. GPIb/IX受容体のテザリングには細胞内活性化反応は必要ない、
3. GPIb/IX受容体を介したvWfへの非可逆性粘着には inside-out あるいは outside-in シグナリングを介してPI3-Kが重要な役割を担っている、
4. 一方、GPIa/IIaを介したコラゲンへの、あるいはGPIIb/IIIaを介した固相化フィブリノゲンへの非可逆性粘着にはPI3-Kを介した inside-out シグナリングは必ずしも重要でない、可能性が示唆された。

F. 研究発表

<論文>

- 1) Kashiwagi H, Tomiyama Y, Tadokoro S, Honda S, Shiraga M, Mizutani H, Handa M, Kurata Y, Matsuzawa Y and Shattil SJ: 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
- 2) Oda A, Ikeda Y, Ochs HD, Druker BJ, Ozaki K, Handa M, Ariga T, Sakiyama Y, Witte ON and Wahl MI:

Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Btk/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD23 crosslinking. Blood 95(5) :1663-1670, 2000

研究要旨

リコンビナントヒト血清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、 $240\pm 10\text{nm}$ アルブミンマイクロスフェア (AMS) を調製した。N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロパネート (SPDP) を用いて血小板膜糖蛋白質 rGPIb α を AMS に担持させた。rGPIb α -AMS は特異的 vWf と結合して凝集塊を形成し、血小板代替物としての必要条件の 1 つが確認できた。一方、小胞体に血小板膜蛋白質をポリエチレングリコール(PEG)を介して固定化させるために、4 本のアシル鎖と活性基を有する血小板膜蛋白質 PEG 脂質誘導体を合成し、標識蛋白質 cytochrome c と結合させた。

A. 目的

本研究では、蛋白質重合体として粒径制御可能なアルブミンマイクロスフェア (AMS) の調製、並びに血小板膜糖蛋白質を最小限の修飾にて担持させる方法を確立し、得られた血小板膜糖蛋白質担持 AMS の血小板代替物としての機能評価を行なうことを目的としている。

また、小胞体分散安定度の向上を目的としたポリエチレングリコール(PEG)表面修飾と、表面結合レセプター蛋白質の機能発現は相反するので、PEG 鎖を介し血小板膜糖蛋白質の表面固定のために PEG 脂質の開発も目的とした。

B. 方法

1. AMS 調製

250mg/mL リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA、吉富製薬提供)を純水に対して 24 時間透析し、保存剤を除去した。生食にて希釈した 10mg/mL rHSA 溶液 25mL に対して 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液を 800 μ L 加えて、20 分間攪拌して pH10.65(23 $^{\circ}$ C)とした。80 $^{\circ}$ C にて 20 分間加熱後、3 $^{\circ}$ C の氷浴中にて 10 分間冷却した。これに 0.1M 塩酸水溶液 900 μ L を滴下して pH6.04 (23 $^{\circ}$ C)とした後、37 $^{\circ}$ C で 90 分間攪拌した。過剰のヨードアセトアミドを 20mg 加えリン酸緩衝液(PBS, pH7.4)に対して透析を行い、粒径 $240\pm 10\text{nm}$ の AMS を得た。

2. rGPIb α -AMS の合成

2-1. AMS の PD 基導入と rGPIb α の SH 基導入

AMS 分散液 ([HSA]=16mg/mL, pH7.4)

5.0mL に対して 10.9mM N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) エタノール溶液を 50 μ L 加え、22 $^{\circ}$ C で 30 分間攪拌した。ゲルろ過 (Sephadex G-25, 10mm ϕ x 700mmh) にて未反応 SPDP と副生成物を除去して、11mL のピリジルジスルフィド AMS (PD-AMS, [HSA]=9.0mg/mL) を得た。

PD-AMS 溶液 ([HSA]=4.9mg/mL) 500 μ L に対して 1M ジチオトレイトール (DTT) 溶液を 10 μ L 加えて 22 $^{\circ}$ C で 15 分間攪拌した。サイズ排除 HPLC (TSK-GEL G3000SW_{XL}, 7.8mm ϕ x 300mmh, 1mL/min, PBS) により、遊離の 2-チオピリドン (2TP) を定量、導入 PD 基を算出した。

rGPIb α (74mg/mL) 100 μ L を 400 μ L の PBS (pH7.4) に溶解させ、10.9mM SPDP エタノール溶液を 20 μ L 加え、22 $^{\circ}$ C で 30 分間振とうした。続けて 1M DTT 溶液 10 μ L を加えて 22 $^{\circ}$ C で 10 分間振とう後、ゲルろ過にて 2.2mg/mL SH-rGPIb α を 2.3mL 得た。

2-2. rGPIb α -AMS の合成

PD-AMS 溶液 ([HSA]=9.0mg/mL) 11mL に 2.2mg/mL SH-rGPIb α を 2.3mL 加え、25 $^{\circ}$ C にて振とうを行なって rGPIb α -AMS を合成した。rGPIb α の結合量は、遊離の 2TP より定量した。

2-3. rGPIb α -AMS の機能評価

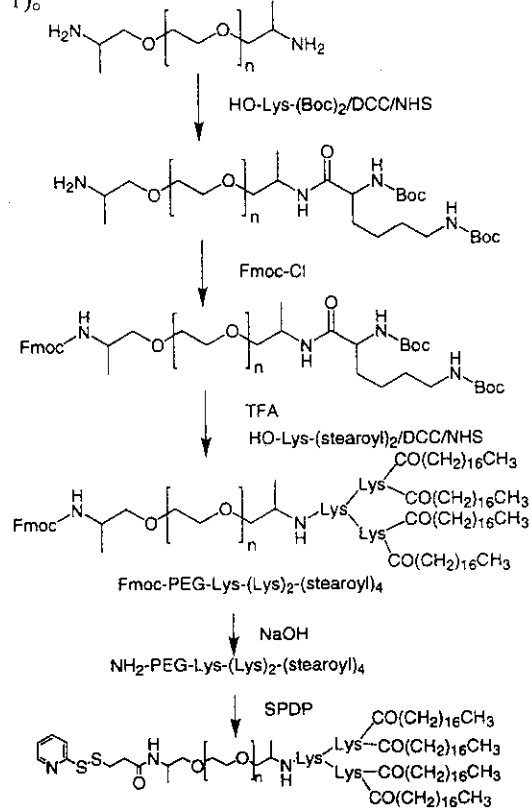
rGPIb α -AMS ([rGPIb α]=4.0 μ g/mL, [HSA]=1.0mg/mL) に vWf (50 μ g/mL) を加え、リストセチン (1.0mg/mL) 添加により誘発される凝集をアグリゴメーターにより観察した。また、rGPIb α -AMS の水溶液に rGPIb α 抗体である GUR20-5 (20 μ g/mL) を加え、30

分後に vWf(50 μ g/mL)を添加、最後にリストセチン(1.0mg/mL)を添加してアグリゴメーターにより凝集を観察した。

血小板数(4.0 $\times 10^4/\mu$ L)の少ない血しょう中で rGPIb α -AMS 結合体が血小板と凝集塊を形成することを確認するために、rGPIb α -AMS 結合体([rGPIb α]=0.27 μ g/mL, [HSA]=150 μ g/mL)を混合した系にリストセチン(1.5mg/mL)を添加し、アグリゴメーターにより凝集塊形成を観察した。

3. 小胞体表面修飾剤の合成と標識蛋白質との結合

両末端にアミノ基を有する PEG を出発物質として、片末端のアミノ基を tert-butoxy carbonyl(Boc)基で保護したリジンを結合させた後、残りの PEG アミノ基を fluorenyloxy carbonyl (Fmoc) 基で保護した。Boc 基のみを酸により除去後 α, ϵ -distearoyl lysine を対称酸無水物法により結合させ 4 本鎖 PEG 脂質を合成した。Fmoc 基を塩基性雰囲気中除去後、アミノ基に SPDP を反応させ活性 PEG 脂質(PD-PEG 脂質)を合成した(scheme 1)。



スキーム 1. PD-PEG脂質の合成法

PD-PEG 導入小胞体は Presome™ (DPPC/cholesterol/DPPG:5/5/1 by mol) と 2.5mol%の PD-PEG 脂質をベンゼン中で混合、凍結乾燥、水和、extrusion によって調製した。PD-PEG 脂質の導入率は ¹H-NMR によって PD 基、PEG 主鎖のプロトンと小胞体のコリンメチルプロトンの積分比から算出した。標識蛋白質(cytochrome c)との結合は SPDP/DTT によって cytochrome c 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い、反応の進行は交換時に遊離する 2TP を HPLC で測定して求めた。

C. 結果

1. AMS 調製

37 $^{\circ}$ C における rHSA 溶液(pH6.04, 23 $^{\circ}$ C)の攪拌時間により AMS 粒径制御が可能となった。攪拌時間と平均粒子径との関係を図 1 に示す。

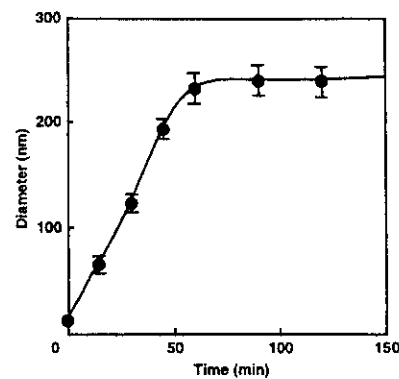
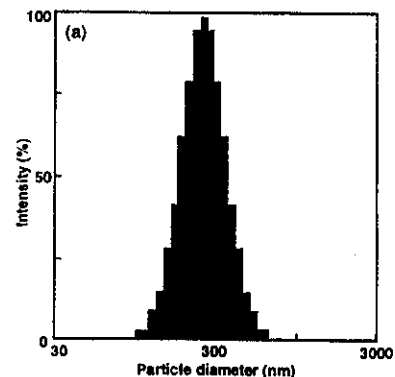


図1 37 $^{\circ}$ Cでの攪拌時間によるAMSの粒径制御

攪拌時間 15, 30, 45, 60 分後には 65 \pm 1.3, 126 \pm 3, 194 \pm 7, 240 \pm 8nm と徐々に大きくなり、90分後には 240 \pm 10nm の AMS が得られた(図 2(a),(b))。収率はほぼ 100% であった。



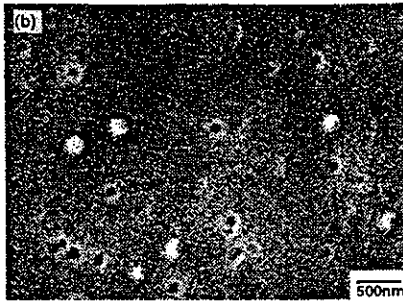


図2 (a) 動的光散乱法により求めたAMSの粒径分布
(b) 走査型電顕により観測したAMS粒子(孔径0.1 μ mに捕捉)

2. AMSのPD基導入とrGPIb α のSH基導入
仕込SPDPと、AMSに結合したPD基の導入率との関係は直線関係であった(図3)。

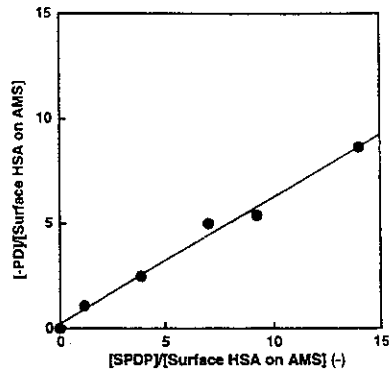


図3 AMS表面構成HSAに対する仕込SPDPと表面に結合したPD基との関係(反応時間30分後に測定)

直線の傾きからAMSとSPDPとの反応収率は72%であった。PD-AMSをDTT還元後サイズ排除HPLCにて遊離の2TPを定量すると、AMS表面を構成するアルブミン1分子当たり5.5個のPD基が導入された計算となった。同様にしてPD基導入rGPIb α をDTT還元後、サイズ排除HPLCにより定量すると、rGPIb α 1分子当たり1.3個のPD基が導入された計算となった。

3. rGPIb α -AMSの合成

PD-AMS溶液にSH-rGPIb α を加えて、rGPIb α -AMSを合成した。この反応溶液を37 $^{\circ}$ Cにて振とうし、終濃度[-PD(AMS)]=40 μ M, [-SH(rGPIb α)]=8.6 μ Mであった。0.5, 2, 6, 15時間反応後のHPLC流出曲線を示す(図4)。

各時間でのrGPIb α の結合率は、9, 26, 36, 40%であった(図5)。反応時間が15時間以上では、遊離2TPの濃度がほとんど変化し

なかったため、この時点でrGPIb α の結合は飽和に達したものと考えられる。

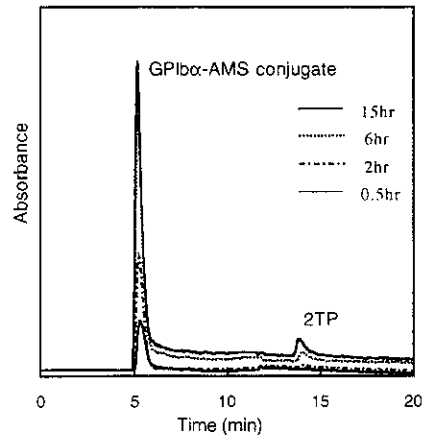


図4 PD-AMSとSH-rGPIb α の各反応時間後に測定したHPLC流出曲線(流出速度1.0mL/min)

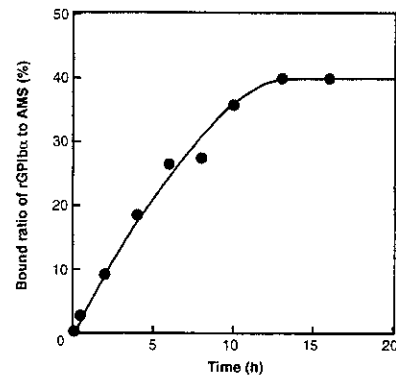


図5 反応時間とAMS粒子に結合したrGPIb α の結合率

4. rGPIb α -AMSの機能評価

rGPIb α -AMS ([rGPIb α]=4.0 μ g/mL, [HSA]=1.0mg/mL)は、vWf(50 μ g/mL)と混合しただけでは凝集せず、vWf存在下リストセチン(1.0mg/mL)の添加により凝集が誘発された(図6(a))。さらにこの凝集は、GUR20-5(20 μ g/mL)の添加により抑制されており、rGPIb α とvWfの特異的結合による凝集であった(図6(b))。また、rGPIb α -AMS結合体([rGPIb α]=0.27 μ g/mL, [HSA]=150 μ g/mL)が血小板数減少(4.0 $\times 10^4/\mu$ L)血しょう中では凝集せず、リストセチン(1.5mg/mL)添加により凝集塊の形成が誘発され、rGPIb α -AMS結合体が血小板と協同的に凝集塊を形成していることが確認できた(図6(c),(d))。更に予備的

はあるが、vWF 固定基板上に流動させた rGPIb α -AMS をビデオに録画して観察すると、リストセチンを添加しなくても基板上を rGPIb α -AMS は転がって停止した。これは AMS のみでは認められないことから、rGPIb α と vWF との相互作用であることが示唆された。

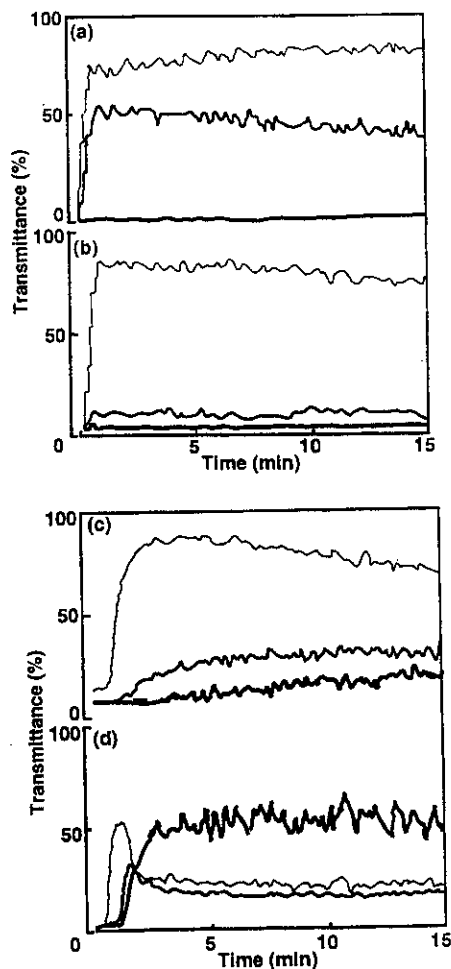


図6 AMS-rGPIb α のリストセチン凝集によるアグリゴメーター観察 (a) [GPIb α]=4.0 μ g/mL, [HSA]=1.0mg/mL, [vWF]=50 μ g/mL, [リストセチン]=1.0mg/mL (b) (a)にGUR20-5 添加 (10 μ g/mL), 血小板減少血しょう中での凝集観察 (c) control AMS ([HSA]=150 μ g/mL), (d) [GPIb α]=0.27 μ g/mL, [HSA]=150 μ g/mL, [リストセチン]=1.0mg/mL, [血小板]=4.0 $\times 10^4$ / μ L

5. 小胞体表面修飾剤の合成

小胞体表面修飾剤に求められる条件は、親水部に対して充分大きな疎水部を有し、一旦小胞体に導入されたら脱離せずに小胞体の分散安定度を保持することである。疎水部を効率良く増加させるために多分岐構造を用いて、世代数から結合アシル鎖本数を制御する設計を行った。また生体適合性

の観点から、リジンの多分岐構造部を有する多アシル鎖型 PEG 脂質を設計した。

まずベンジルエステルによる保護、DCC 反応によるアミド形成によって α, ϵ -distearoyl lysine を合成した。続いて、Boc 基、Fmoc 基を用いてリジン多分岐構造を構築、4 本のアシル鎖と末端 PD 基を有する PEG 脂質を合成した。4 本のアシル鎖の導入は低磁場側の Fmoc 基とアシル鎖末端メチルのプロトン比(図 7(a))から確認した。また PD 基の結合は $^1\text{H-NMR}$ より確認し、アシル鎖の末端メチル基との積分比からほぼ定量的に PD 基が導入されたことを確認した(図 7(b))。

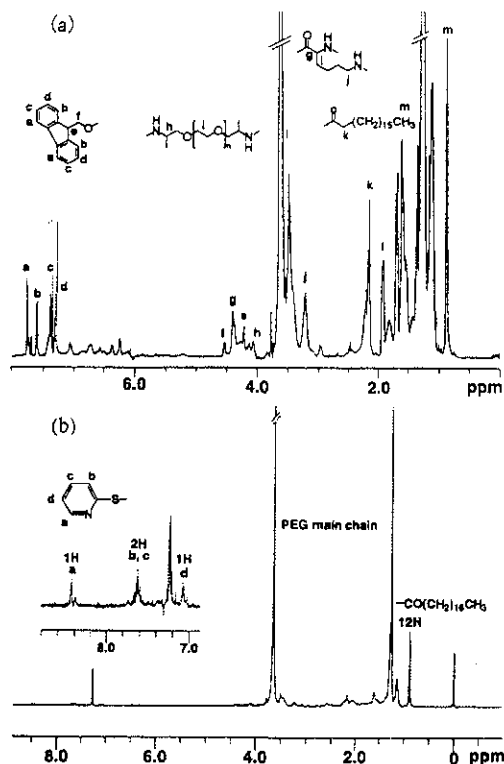


図7 (a) Fmoc-PEG脂質 (b) PD-PEG脂質の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

6. PD-PEG 導入小胞体の調製と蛋白質との結合

PD-PEG 導入小胞体は、PresomeTM (DPPC/cholesterol/DPPG:5/5/1 by mol)と 2.5mol%の PD-PEG 脂質を混合し、高圧押出法によって調製した。小胞体の粒径は表 1 にまとめた。

表1 PD-PEG脂質を導入した小胞体の特徴

Diameter ¹ (nm)	290 ± 45
Diameter ² (nm)	302 ± 51
Incorporation ratio ³ (%)	61
Molar ratio of PEG (mol%)	1.5
Exposed PEG ⁴ (mol%)	0.38

- 1: Measured after extrusion
 2: Measured two months after
 3: Quantitated by ¹H-NMR spectra (500MHz, in CDCl₃)
 4: Calculated as the vesicle with two bilayer membranes

PD 基、PEG 主鎖のプロトンと小胞体のコリンメチルプロトン由来のシグナルが ¹H-NMR により認められ、PD-PEG の導入を確認した。2 ヶ月以上粒径変化を認めないことから、PEG 脂質導入は小胞体の分散安定度の向上に寄与していることが示唆された。PEG 脂質の小胞体への導入率はコリンメチルプロトンと PEG 主鎖のプロトン比から算出され、61%導入された。

さらに血小板膜蛋白質のモデル蛋白質として cytochrome c を小胞体に結合させた。この結果、反応は 3 時間程度で飽和に達した。HPLC の溶出時間は小胞体、cytochrome c、2TP はそれぞれ 5、10、14 分であり、2TP の溶出曲線の積分値から反応した PD-PEG 脂質を定量した結果、表面露出の PEG 脂質 0.4mol% のうち 26% が反応した(表 2)。

表2 HPLC分析により得られたPD基の小胞体導入結果

A: consumed PDP after 3h mixing	2.54 × 10 ⁻⁸ mol
B: consumed PDP by DTT	7.10 × 10 ⁻⁸ mol
Yield: [A/(A+B)] × 100%	26.3
Diameter after conjugation(nm)	304 ± 66

D. 考察

1. rGPIbα-AMS

ヒト血清アルブミンは 17 対のジスルフィド結合と 1 個のチオール基を持つ分子量 66.5kDa 蛋白質である。アルカリ側の pH では N-B 転移に基づきチオール基やジスルフィド結合が分子表面へ露出し、分子内及び分子間にてチオール・ジスルフィド交換反応を引起す。負電荷反発により安定分散しているアルブミン B 体は、pH を下げることによりその反発力が低下して凝集し、さらに 37°C での攪拌により分子間ジスルフィド結合が生起して重合体が成長を進行したものであると思われる。攪拌時間の制御により AMS

の粒径を制御できた(図 1)。得られた AMS は均一径の球状粒子であった(図 2(a), (b))。

仕込 SPDP 濃度と AMS に導入された PD 基濃度との関係は比例関係であり、測定濃度範囲内では全て反応が 30 分以内で完了していることを示している(図 3)。この関係から SPDP の AMS 結合収率は 60% であった。しかし、SPDP のスクシンイミジル基は使用前に既に 15% が失活しているため、補正後の結合収率は 72% となった。従って、SPDP の仕込濃度から図 3 の関係を用いて AMS に結合する PD 基の数を制御できる。

チオール基結合 rGPIbα と PD-AMS 間の結合反応は、反応の完了に 15 時間を要した(図 4,5)。SPDP と AMS の結合反応と比較すると、かなり遅い反応である。これは AMS 粒子数が少なく拡散速度も小さいことに起因する、反応の頻度因子の差と思われる。遊離 2TP の定量から AMS 1 粒子当たり rGPIbα が約 2500 個が結合した計算となった。これは、AMS 表面構成の HSA1 分子当たり 5.5 個導入されている PD 基のうち、0.4 個が rGPIbα と結合した計算となった。HSA の分子量は 66.5kDa であり、rGPIbα の分子量は 45kDa から 135kDa であるため、AMS 表面への rGPIbα 結合はほぼ飽和状態と思われる。

rGPIbα-AMS 結合体は、リストセチン添加により vWf との特異的結合による凝集が生じた。従って rGPIbα が AMS 表面上で機能を持ち、血小板上での機能と同様の働きをしているものと考えられる。さらに血小板数の少ない血しょう中でもリストセチン誘発により血小板と協同的に凝集塊を形成することから、血小板の凝集能を促進する効果が期待された。

2. 蛋白質結合 PEG 脂質

各反応段階における収率は、最初の PEG 片末端に対する α, ε-diBoclysine 結合反応(収率 50%)を除いて概して高収率(70-90%)であった。最初の低収率の原因は電荷をもつ PEG によってカラムのバンドがブロード化したために目的物回収が困難であったと思われる。最終生成物である片末端に PD 基を有する 4 本鎖 PEG 脂質は NMR より PD 基由来のプロトン 4H に対して脂質末端メチルプロトン 12H であったことからほぼ定量的に PD 基が結合した。この 4 本鎖 PEG

脂質は小胞体に前導入されるが、その導入率は61%であり低かった(表1)。これはこのPEG脂質の分子内水素結合、強固な分子間疎水性相互作用のためにそれ自身安定な集合体の形成が原因であると思われる。逆にこのことは小胞体の脂質と共集合させると強固な疎水性相互作用を形成し脱離し難くなるものと考えられる。また、PEG脂質導入小胞体の粒径は2ヶ月経過時点でも調製時と変わらないことからPEG導入による小胞体の分散安定性が示された。Cytochrome cとの表面露出PD-PEG脂質の26%が反応したことが明らかとなった(表2)。反応が3時間でほぼ完結し、結合cytochrome c自身の立体障害によりこれ以上反応が進行しなかったものと考えられる。

E. 結論

pH変化と熱変性により、rHSA溶液から粒径制御されたAMSを調製した。収率はほぼ100%であり、簡便であることから量調製が期待できる。水溶液中での調製によりAMS表面上に官能基を保持できるので様々な血小板膜糖蛋白質や血液凝固関連蛋白質を結合させることが可能である。また、架橋剤SPDPの使用により、AMSとrGPIb α の結合反応を定量的に追跡でき、結合量の制御を可能とした。rGPIb α -AMS結合体はvWfとの特異的結合を形成し、血小板を凝集塊に巻込む挙動が認められたことから、血小板代替物として有効であると考えられた。

大きい疎水部を有するPEG脂質を合成した。このPEG脂質は小胞体に導入可能であり、分散安定度向上に寄与した。またPD基をPEG鎖末端に導入することにより水溶性蛋白質をPEG鎖を介して小胞体に固定化できることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) "Synthesis of Multi-Acyl Polyethyleneglycol for the Conjugation of Cytochrome c to Phospholipid Vesicles", *Bioconjugate Chem.*, **11** (2000) submitted.

2) "Conjugation of von Willebrand Factor-Binding Domain of Platelet Glycoprotein to Size-Controlled Albumin - Microspheres", *Biomacromolecules*, **1** (2000) submitted.

2. 学会発表

1) "Albumin Microspheres Conjugating Receptor Proteins as Platelet Substitutes(PL-35b)", 5th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies, 1999年9月4日(東京)

2) 「アルブミンマイクロスフェア利用の血小板代替物モデル(V-1)」, 第6回日本血液代替物学会年次大会, 1999年9月11日(東京)

3) 「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(IIPf102)」, 第48回高分子討論会, 1999年10月7日(新潟)

4) 「ジスルフィド結合を利用した機能性蛋白質担持アルブミンマイクロスフェア(3D415)」, 日本化学会第78春季年会, 2000年3月30日(千葉)

5) 「認識蛋白質結合アルブミンマイクロスフェア(IIJ18)」, 第49回高分子学会年次大会, 2000年5月30日(名古屋)

6) 「ポリオキシエチレン脂質による蛋白質の小胞体への固定化(IIJ28)」, 第49回高分子学会年次大会, 2000年5月30日(名古屋)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

「血小板代替物」、平11-255878、平成11年9月9日

人工血小板（liposome-rIb）の *in vivo* 止血効果に関する研究

分担研究者 長澤俊郎 筑波大学臨床医学系教授
長谷川雄一 筑波大学臨床医学系講師

研究要旨 人工血小板（liposome-rIb）の *in vivo* 止血効果を評価したところ、血小板数 10 万以上に於いて出血時間の短縮と出血量の減少を認めた。血小板数 10 万未満に於いては本実験系では評価し得なかった。

A. 研究目的

人工血小板（liposome-rIb）をラットに輸注したときの止血効果を解析する。

B. 研究方法

1) 実験系

F344 近交系雄ラット（8 週齢以上 12 週齢未満）に γ 線 7Gy を照射し、種々の程度の血小板減少ラットを作製し、liposome-rIb 輸注前後での出血時間、出血量を測定した。

2) 出血時間の測定

出血時間の測定は、シンプレート(オルガノンテクニカ)を用い、尻尾を切開し、37℃生理食塩水中で止血までの時間を測定した。出血時間が 600 秒を越える場合止血困難として、出血時間の測定を中止した。

3) 出血量の測定

出血量は、生理食塩水中 50ml 中への出血で呈されるヘモグロビンの色調を OD₅₅₀ で測定し評価した。

4) liposome-rIb の輸注

liposome-rIb は、rIb として 57.7 μ g

(300×10^{10} 個血小板相当) を 1 回量とし、尾静脈より静注した。

尚、ラットについては筑波大学実験動物取り扱い規定に従って、十分な倫理的配慮のもとに実施した。

C. 研究結果

1) 血小板数と出血時間：

血小板数と出血時間は血小板数 7.6 万以上に於いて $r = 0.73$ の相関を示した(図 1)。しかし、血小板数 7.6 万未満ではいずれも 600 秒以上と止血不能であった。

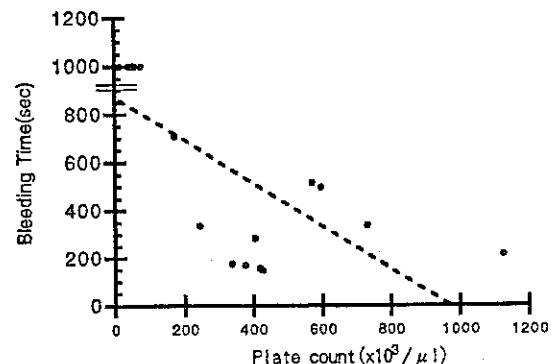


図1 血小板数によるシンプレート出血時間の変化

2) liposome-rIb の止血効果評価

出血時間は血小板数 7.6 万未満の場合に rIb の投与後も短縮が認められなかった。血小板数 7.6 万以上の血小板数では、出血時間の短縮が認められた場合（黒い矢印）（評価可能 6/8）と、逆に出血時間が延長した場合（白い矢印）（評価可能 2/8）とがあった（図 2）。出血時間が逆に延長した際の血小板数は 59.4 万と 33.7 万であった。

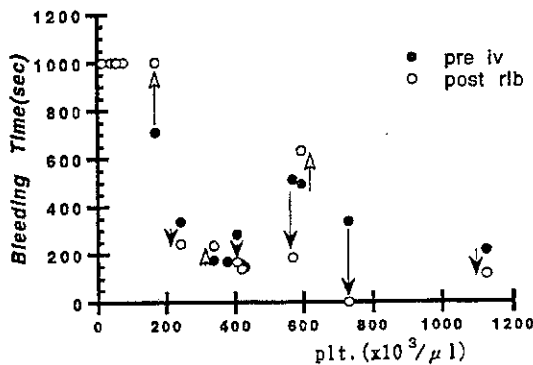


図2 liposome-rIb 投与による出血時間の変化

出血量は、rIb 投与前後の出血量を OD₅₅₀ で評価し、投与前後の OD の比（pre/post）を算定し、出血量が減少（pre/post が 1 未満）したものは（黒い矢印）（評価可能試行の）5/8 であった（図 3）。

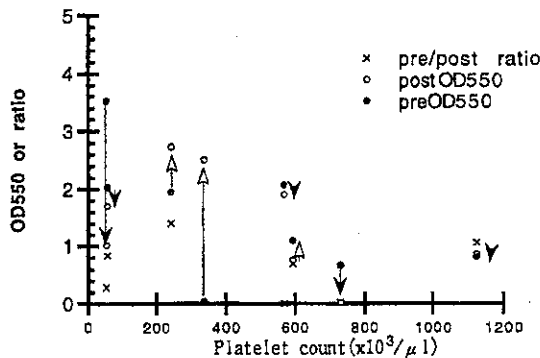


図3 liposome-rIb 投与による出血量の変化

対照とした rIb を結合していない

liposome の投与では出血時間の短縮は見られなかった。また、ラット血小板の投与では、いずれのラットも出血時間の短縮を認めた。

D. 考察

血小板輸注は血液疾患、化学療法後の支持療法として不可欠である。血小板は供血者から採取されるが、寿命が短く、有効期間も 3 日程度と長期保存は出来ない。止血能を有する血小板代替物 (platelet substitute) が開発されれば、災害時など大量の血小板が必要時、血小板の確保が困難な時などでも血小板輸血の代用になると期待される。

血小板代替物に止血効果を発揮させるには、止血に重要な血小板糖蛋白 Ib、IIb/IIIa、フィブリノーゲンなどを効率よく出血部位に集積させることが重要であり、血小板糖蛋白 Ib、IIb/IIIa¹⁾、フィブリノーゲン²⁾ を運搬する担体の開発が重要である。担体の候補物質としてはアルブミン、リポゾームがあり、本研究班でもリポゾームあるいはアルブミンに血小板糖蛋白 Ib を装着した人工血小板が開発されつつある。血小板糖蛋白 Ib は、出血部位で von Willebrand 因子を介してコラーゲン線維と結合し、一次止血の中心的役割を果たしている。

今回、本研究班が開発したリポゾームに血小板糖蛋白 Ib を装着した liposome-rIb をラットに輸注し、*in vivo* での止血効果を検討した。ラット実験モデルには放射線照射による血小板減少ラットを用い、出血時間の測定、出血量の測定により止血効果を評価した。図 1 に示したように

血小板数と出血時間との間には負の相関がみられ、実験モデルとして有用と考えられた。いろいろな程度 of 血小板数で liposome-rIb 輸注前後の出血時間、出血量を比較すると、血小板数 10 万程度以上では輸注後の出血時間の短縮、出血量の減少がみられたのに対して、血小板数 5 万前後では出血時間の短縮、出血量の減少は観察されず、liposome-rIb 輸注の止血効果を証明できなかった。この理由は明らかではないが、多量の liposome-rIb が出血部位に集積すると、血小板が少ないため続いて起こる血小板凝集が惹起されず、また集積した liposome-rIb が長期に保持されないためと推測された。これに対して、血小板がある程度存在する時には、liposome-rIb は血小板の凝集を助けている可能性が推察されるが、今後さらに輸注量を変化させ検討したいと考えている。

今回の liposome-rIb 輸注が *in vivo* でも止血効果を示す可能性が示唆されたため、血小板糖蛋白 Ib 以外の IIb/IIIa、フィブリノーゲンを装着した血小板代替物の開発も考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

放射線照射ラットを用いて血小板減少時の出血時間を評価する本法では、血小板数が 10 万程度までは相関関係が認められ、*in vivo* での止血機能評価に有効である。

人工血小板 (liposome-rIb) の *in vivo* での止血効果は、血小板数 10 万未満の試験に於いては、本実験系では明らかにし得なかった。それ以上の血小板数の場合、出血時間の短縮と出血量の減少を認めた。

文献

- 1) Thorpe DS, et al. Combinatorial chemistry reveals a new motif that binds the platelet fibrinogen receptor, gpIIb/IIIa. *Biochem Biophys Res Commun* 256:537-541,1999
- 2) Levi M, et al. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 5:107-111,1999

微小血管における血小板分布決定機構としての Glycoprotein Iba の役割

分担研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学

研究要旨 血小板膜上に発現する接着分子である GPIIb/IIIa は微小血管において血小板が内皮細胞近傍を通過するために必要なメカニズムを担っていることが明らかになった。細動脈のような wall shear rate の高い微小環境では血小板は GPIIb/IIIa と vWF の結合により microaggregate を形成し、periendothelial space を通過しつつ、内皮細胞表面ともミリ秒単位の接着反応を常に繰り返していることが示された。また血管内皮が刺激を受けると内皮細胞上の P-selectin が表出する結果、内皮近傍を通過し接着反応を示す血小板の population が増加することも示された。一方ヒト血小板の GPIIb/IIIa を介した接着反応を生体内で観察する評価系としてラットが使用できることが見い出された。

A 研究目的

人工素材から成る vehicle の表面にヒト組み換え型の接着分子を表出させてその生体内機能評価を行う系を確立することは人工血小板の実用化に必須のプロセスである。本研究では GPIIb/IIIa を表出させたりポソームがそのような candidate として作成されてきたが、生体における GPIIb/IIIa を介した血小板接着の機序は未だ十分に解明されておらず、またどのような動物系でヒト GPIIb/IIIa の機能評価が可能かについても十分な検討がなされていなかった。本研究ではそのような評価系として使用可能な系を確立することを目的とした。一連の研究の結果ラットがヒト GPIIb/IIIa の機能評価に使用できること、GPIIb/IIIa が流血下で血小板がずり応力に抗して血管内皮細胞に接着するために必須の分子であることを解明したので報告する。

B 研究方法

1 蛍光色素 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) による血小板生体染色法の確立

CFSE は細胞内に取り込まれ esterase で水解されて蛍光色素となり蛋白質のリジン残基と反応して細胞から漏出しにくい複合体を形成する。CFSE 15mM 溶液を male Wistar rat (280 g) に 0.2 ml 血管内投与することにより血小板と白血球の一部が生体染色され生体ビデオ顕微鏡で観察できることをこれまで報告してきたが、今回は生体染色された血小板の機能変化についてレーザー散乱式凝集計を用いて詳細に検討した。

2 微小血小板粒子の超高速高感度ビデオ観察法

既報の方法を用いてラット腸間膜微小循環において CFSE で染色された血小板の高速度撮像を行った。一方でラット末梢血から platelet rich plasma を調整し plasma 成分を除去して、ex vivo で CFSE によりラベルしたのち、再びラットの循環血液中に戻してその挙動を解析した。同様の実験をヒト末梢血から分離採取した washed platelet にも CFSE ラベルを行い、これを循環血液中に戻して挙動を解析した。これらの解析には通常ビデオ記録速度 (30 frame/sec) ではあるものの検出感度の高い撮像法である