

厚生科学研究費補助金  
高度先端医療研究事業（人工血液開発分野）

# 人工血小板開発研究

（研究課題番号：H12-血液-001）

平成 12 年度  
総括・分担研究報告書

平成 13 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 助教授  
武岡真司 早稲田大学理工学部 助教授  
鈴木英紀 (財) 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 研究員  
末松誠 慶應義塾大学医学部 助教授  
長澤俊郎 筑波大学臨床医学系 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

（研究協力者）

西谷孝子 慶應義塾大学医学部特別研究教員 助教授

## 目 次

### 人工血小板開発研究

I.	総括研究報告書	池田 康夫
II.	分担研究報告	
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.	止血能を有するリポソームの <i>in vitro</i> の機能解析	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 その応用に関する研究	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.	止血過程における人工血小板の超微構造的解析	鈴木 英紀
6.	Liposome-Glycoprotein Ib $\alpha$ 粒子の微少循環における 挙動解析と生体適合性	末松 誠
7.	血小板減少モデル動物の作成と 人工血小板の <i>in vivo</i> での機能解析	長澤 俊郎
8.	人工血小板開発研究の動向調査と その臨床応用に関する研究	池淵 研二
9.	細胞近傍の微少流動及び微粒子運動の計測と解析	谷下 一夫
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	
IV.	研究成果の刊行物・別冊	
V.	その他	
	資料1 (財)ヒューマンサイエンス振興財団 主催 公開シンポジウムポスター	
	資料2 新聞記事 (公開シンポジウム取材記事)	
	資料3 雑誌取材記事	

別添 4

## 総括研究報告書

平成12年度厚生科学研究費補助金  
(高度先端医療研究事業) 人工血液開発分野

総括研究報告書

人工血小板開発研究

主任研究者 池田 康夫 慶應義塾大学医学部 内科 教授

研究要旨

血小板輸血は、現代医療において欠くことの出来ない補助療法であるが、同時に安全でかつ緊急時にも実施可能な血小板輸血体制の確立が望まれている。これらを背景に人工血小板/血小板代替物の開発研究が平成9年より開始された。これまでに血管傷害部位に特異的に集積する人工粒子の作成が行われた。リポソームまたはアルブミンマイクロスフェア(AMS)を人工担体として選択し、血小板膜上のvWF受容体、GPIb $\alpha$ 、コラゲン受容体 GPIa/IIaを遺伝子組換えとして大量に精製してこれら担体に固相化したものを作成し、その機能解析を行った。

rGPIb $\alpha$ -rGPIa/IIa リポソームは、高ずり速度下で効率よく特異的にコラゲンに粘着するとともに、ヒト血小板との共存下でコラゲンを添加すると凝集塊中に巻き込まれることが電顕で観察されたが、これを血小板減少ラットに投与すると出血時間の延長が認められた。一方、フィブリノゲンを固相化したfbg-AMSは、低ずり速度の流動状態で粘着し、活性化したヒト血小板上へ効率よく集積し、この集積は抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体で著明に抑制された。

これらの in vitro、in vivo の実験結果を合わせ、確実な止血能を発揮する人工血小板/血小板代替物の候補として GPIb $\alpha$ 、GPIa/IIa、フィブリノゲンの三者を固相化したリポソームまたは、AMSを作成することが重要であると強く示唆された。

分担研究者

長澤 俊郎 筑波大学臨床医学系  
血液内科 教授

末松 誠 慶應義塾大学医学部  
医化学 助教授

武岡 真司 早稲田大学理工学部  
医工学 助教授

半田 誠 慶應義塾大学医学部  
輸血センター 助教授

村田 満 慶應義塾大学医学部  
内科学 講師

鈴木 英紀 (財)東京都医学研究機構  
東京都臨床医学総合研究所医薬研究開発  
センター 研究員

谷下 一夫 慶應義塾大学工学部  
システムデザイン工学 教授

池淵 研二 北海道赤十字 血液センター  
副所長

## 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、輸血後のウイ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、その意味でウイ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。

平成9年度から開始した本研究班の研究成果は、人工血小板創製への具体的な方向を明示したことである。即ち、ハイブリッド型の人工細胞の作成を目標に生体適合性に優れるリポソームまたは、蛋白質高分子量体を担体を選び、止血に重要な役割を演じている血小板膜糖蛋白、あるいは粘着性蛋白をこれに固相化する方法である。止血血栓形成の分子機構に関する基礎研究の成果をもとに、流動状態下における血管傷害部位への血小板粘着に必須の血小板膜糖蛋白(GP)として、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 を、それぞれの担体に結合し、in vitro, in vivo における機能評価を行った。GPIb $\alpha$ -リポソームは、vWF 固相化表面にずり速度依存性に結合するが、一過性である。一方、GPIa/IIa は、コラゲン表面に低ずり速度下で不可逆的に結合するものの、高ずり速度下での結合は著しく少ない。GPIb $\alpha$ -GPIa/IIa は、高ずり速度下でも不可逆的に効率よくコラゲンに粘着した。

過去3年間のこれらの研究成果をふまえて、リポソーム、アルブミンマクロスフェア(AMS)を人工担体として GPIb $\alpha$ 、GPIa/IIa の他、血小板凝集塊を増強させる目的でフィブリノゲンなどを固相化させることにより人工血小板/血小板代替

物の開発を具体化してゆくことが本研究の目的である。

## B. 研究方法

### 1. 血小板膜糖蛋白 (GPIb $\alpha$ 、GPIa/IIa)、 フィブリノゲン固相化リポソームの 作成とその機能解析

CHO 細胞を用い遺伝子導入により、vWF 受容体蛋白(GPIb  $\alpha$ )、コラゲン受容体蛋白 (GPIa/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 n-octyl B-D-glucopyranoside を用いてリポソームに固相化する。リポソーム表面の各膜糖蛋白、フィブリノゲンの結合量は、ELISA 法で測定した。その機能解析は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 vWF、I 型コラゲン表面への粘着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。測定は全て洗浄赤血球を Hct37.5%とし、血小板濃度  $1.25 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、 $37^\circ$  で行った。実験過程でリポソームの二重リン脂質の破壊など認められていないことが確かめられる。

### 2. アルブミンマイクロスフェア (AMS) の調整と GPIa/IIa、フィ ブリノゲンの結合

遺伝子組換えヒトアルブミン(rHSA、ウエルファイド社製)10mg/ml に 0.1M NaOH を加え、PH10.65 とした後、 $81^\circ\text{C}$  にて10分間加熱後、 $3^\circ\text{C}$  で冷却、これに 0.1M HCl を滴下し、pH6.02 とした後、 $40^\circ\text{C}$  で攪拌、過剰のヨードアセトアミドを加え、PBS、PH7.4 で透析を行い、AMS を調整した。N-succinimidyl 3-

pyridyldithio) propionate (SPDP) を用いてピリジルジスルフィド-アルブミン重合体を得た。GPIa/IIa またはフィブリノゲン (fbg) に SPDP、DTT を加え、チオール基を導入し、これを前記のアルブミン重合体と混合し、それぞれ GPIa/IIa-AMS, fbg-AMS を得た。

### 3. 人工血小板の止血能評価

F344 近交系雄ラットに  $\gamma$ 線  $7\text{Gy}$  を照射し、種々の程度の血小板減少ラットを作成し、尾浸水状態でシンプレート出血時間を測定した。血小板  $7.6 \times 10^4 / \mu\text{l}$  以上において血小板数と出血時間は一次相関関係を示し、ラット血小板輸注により出血時間は短縮した。

### 4. リポソームの生体内挙動に関する超 高速高感度ビデオ観察

Wistar 系雄性ラット腸間膜微少循環においてローダミン標識リポソーム粒子の生体内撮像を試みた。20~30ミクロン径の細動脈、細静脈を任意に選択し、蛍光粒子の挙動をビデオレコーダーで記録した。

(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. 遺伝子組換え血小板膜糖蛋白 (GPIb $\alpha$ 、GPIa/IIa) 固相化リポソームの 作成とその機能評価

rGPIa/IIa-Ib  $\alpha$  -liposomes のコラゲン表面

への粘着は、可溶性 vWF 存在下では、ずり速度が高くなるのに伴って増加したが、可溶性 vWF が無いときには、ずり速度の増加に伴って著しく減少した。rGPIa/IIa または rGPIb $\alpha$  の表面密度をそれぞれ 50% 減少すると rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラゲン表面への粘着は減少した。このリポソームは、コラゲン添加時にヒト血小板と共に凝集塊を形成し、また流動状態下でコラゲンに血小板とともに粘着することが電顕下で観察された。rGPIa/IIa のみを固定化したリポソーム、rGPIa/IIa-liposomes, のコラゲン表面への粘着は、可溶性 vWF 存在下において、ずり速度の増加にともなって著しく減少した。

### 2. アルブミンマイクロスフェア (AMS) の調整と AMS への rGPIa/IIa、フィブリノゲンの結合

PH と温度の変化によりリコンビナントヒトアルブミンから種々の粒子径を持つ AMS が調整可能となった。rGPIa/IIa、フィブリノゲン (fbg) を結合させた AMS の流動状態下での機能評価を行った。rGPIa/IIa-AMS は、コラゲンを特異的に認識し、低ずり速度下で効率良くこれに粘着した。一方、fbg-AMS はコラゲンに粘着した血小板膜上に発現した活性型 GPIIb/IIIa を認識し、これに結合すると同時に、残存する血小板を巻き込んだ凝集塊を形成した。Fbg-AMS は、ヒト血小板と混じた時、ADP 添加により血小板凝集塊中に巻き込まれ、血小板と相互接着することが超微形態学的に証明された。

### 3. rGPIb $\alpha$ -リポソーム、rGPIb $\alpha$ -

GPIa/IIa リポソームの止血能の検討  
rGPIb $\alpha$ -リポソームの投与により、中等度の血小板減少ラットにおいて尾水浸状態でのシンプレート出血時間が短縮されることが観察されたが、rGPIb $\alpha$ -GPIa/IIa リポソームでは、逆に出血時間を延長させた。

### 4. その他

リポソーム構成脂質として DPPG と DPEA の 2 種類で調整されたリポソームの補体への影響を検討した所、C5b-9 複合体形成が見られ、補体の活性化が見られた。また、基礎的研究として、人工血小板粒子の弾性係数と粘着力を原子間力顕微鏡によって測定する系が確立され、人工血小板粒子の最適の変形能、粘着力を考慮することが可能となった。

### D. 考察

平成 9 年に開始された研究は、平成 12 年度までに以下の結果を得ている。血管障害部位に特異的に集積する候補人工物としてリポソーム、AMS を担体として vWF 受容体 GbIb $\alpha$ 、コラゲンの受容体 GPIa/IIa を固相化したものを作成し、in vitro の実験系でその作用が確認された。また、これまで欧米で試みられてきた血小板代替物と同様、生体内に残存する血小板と相互に凝集塊を形成し得るフィブリノゲン固相化高分子アルブミン重合体 (fbg-AMS) の作成も試みた。AMS については、我が国で開発されたりコンビナントヒトアルブミンを用いて種々の粒子径を持つ AMS の調整が可能となった。すなわち rGPIb $\alpha$ -リポソーム、rGPIa/IIa

リポソーム、rGPIb $\alpha$ -GPIa/IIa リポソーム、fbg-AMS、rGPIb $\alpha$ -AMS、rGPIa/IIa-AMSなどが作成され、それぞれまず in vitro の系においてその機能が確認された後、生体内投与での止血能の評価、有害事象の評価へと進んでいる。残念ながらこれまでの血小板減少ラットモデル実験において rGPIb $\alpha$ -GPIa/IIa リポソームは著明な止血効果を示しておらず、かえって出血時間を延長させる結果となった。これは生体内においては残存する血小板と競合して血管壁に特異的に結合し、その機能を阻害した為と考えられ、これのみでは血小板代替物としては機能し得ないことを示唆する。しかし同時に、生体内においても血管障害部位に特異的に集積し得ることを示しており、rGPIb $\alpha$ 、rGPIa/IIa リポソームまたは AMS は血管障害部位に特異的に集積する人工物として確認された。人工血小板/血小板代替物に必須の止血能が発揮される為には、rGPIb $\alpha$ -GPIa/IIa-リポソームに fbg を更に固相化することによって残存する血小板を効率よく血管障害部位へリクルートし、止血能を発揮する人工担体に改変することが今後の課題と考えられ、その意味では当該研究申請時の研究計画に沿った流れになっていると思われる。止血の為の血小板の役割を分子レベルで明らかにする基礎研究も人工血小板の創製と同時に進行中であるが、その過程で流動状態下での血小板・血小板の接着に vWF と GPIb $\alpha$  の役割が明らかになったことは、我々の試みている人工血小板開発のアプローチの妥当性を示していると思われる。rGPIb $\alpha$ -、GPIa/IIa-、fbg-リポ

ソーム、または AMS の生体内投与の止血効果の確認が急がれている。

## E. 結論

リポソーム、AMS を人工担体として遺伝子組換え血小板膜糖蛋白 GPIb $\alpha$ 、GPIa/IIa を固相化した候補人工血小板粒子を作成した。rGPIb $\alpha$ -GPIa/IIa リポソームは、流動状態下 in vitro 実験系においてコラゲン表面に特異的に粘着した。また、ヒト血小板と混ぜ、コラゲンを添加するとリポソームは血小板凝集塊に巻き込まれることが、電顕で確認された。しかし、血小板減少ラットに投与した時、尾浸水条件下でのシンプレート出血時間は延長し、これのみでは止血能を示さなかった。

フィブリノゲンを固相化した AMS (fbg-AMS)は、粘着し、活性化したヒト血小板上に流動状態下でリクルートされることから候補人工血小板粒子として rGPIb $\alpha$ 、rGPIa/IIa のみならず、フィブリノゲンも固相化する必要があると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

半田 誠 Bernard-Soulier 症候群と GPIb/IX 複合体の解析：最近の進歩  
「Annual Review 2001 血液」編集：高久文麿、溝口秀明、小宮山淳、中外医学社 165-171 2001

池田康夫 人工血小板・血液代替物 血液・免疫・腫瘍 Vol.5 (2), 92(196)-98(202), 2000

T Nishiya, M Murata, M Handa and Y



Ikeda: Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib  $\alpha$  to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochemical and biophysical research communications*. 270, 755-760, 2000

Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Tamatani T, Sakamoto S, Ito M, Ishimura Y and Suematsu M: Immunoneutralization of glycoprotein Ib  $\alpha$  attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circulation Research*, 86, 1031-1037, 2000

Kyokane T., Norimitsu S., Tani H., Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Mimura Y, Ishimura Y, Suematsu M: Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology*, 120, 1227-1240, 2001

Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, Ikeda Y, Tsuchida E: Conjugation of von Willebrand Factor binding domain of platelet glycoprotein Ib  $\alpha$  to size-controlled albumin microspheres, *Biomacromolecules*, (1)290-295, 2000

Ohkawa H, Teramura Y, Takeoka S, Tsuchida E: Synthesis of multiacyl poly(ethylene glycol) for the conjugation of cytochrome c to phospholipid vesicle : *Bioconjugate chem* (11)815-821, 2000

寺村裕治、武岡真司、土田英俊、池田康夫: 粒子径を制御したアルブミン重

合体の合成と GPIb  $\alpha$  結合体の評価: *人工血液* (8) 90-95, 2000

武岡真司、寺村裕治、土田英俊、池田康夫: 止血能を有するアルブミン重合体の開発, *血液・免疫・腫瘍* (6) 46-50, 2001

村田満: 人工血小板 (血小板代替物) ①開発の歴史, *血液・免疫・腫瘍* (6) 35-39, 2001

半田誠: GPIIb/IIIa 複合体の構造と機能, *血栓と循環* 6(4), 11-16, 2000

## 2. 学会発表

西谷孝子、戒能美枝、村田満、半田誠、池田康夫: rGPIa/IIa-IB  $\alpha$ -liposomes のコラゲン表面への粘着に対する rGPIa/IIa と rGPIb  $\alpha$  の表面密度の影響、第7回日本血液代替物学会総会 2000

西谷孝子、半田誠、池田康夫: フィブリノゲンを表面に固相化したリポソーム、Fgn-liposome、第7回日本血液代替物学会総会 2000

西谷孝子、戒能美枝、上出佳永子、村田満、半田誠、池田康夫: コラゲン表面における rGPIa/IIa-Ib  $\alpha$ - liposomes と血小板との相互作用、第23回日本血栓止血学会総会 2000

Nishiya T, Suematsu M, Ikeda Y: Adhesive properties of liposomes carrying recombinant GPIa/IIa a/or GPIb  $\alpha$  under flow conditions. The 8<sup>th</sup> Int'l Symposium on Blood Substitutes, San Diego, USA 2000

Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M, Ikeda Y: Adhesive properties of liposomes

carrying both recombinant GPIa/IIa and GPIb  $\alpha$  under flow conditions. Specific synergy of receptor-ligand interactions. The 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, USA

武岡真司：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(2) (V-11)、第7回日本血液代替物学会総会 2000

武岡真司：人工血小板として機能する微粒子の設計と機能評価(IIU04)、第49回高分子討論会 2000

Takeoka S: Characterization of albumin microspheres conjugated with von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib arufa (PO-38) the 8<sup>th</sup> Int'l Symposium on Blood Substitutes 2000

武岡真司：フィブリノゲンの結合アルブミン重合体の血小板代替物としての機能評価(IIPb158) 第50回高分子学会年次大会 2001.3.31

武岡真司：アルブミン重合体とリン脂質小胞体を担体とした血小板膜糖蛋白質 rGPIb  $\alpha$  結合体の機能比較、第50回高分子学会年次大会 2001

藤原収子、池淵研二 他： リポソームがヒト末梢血白血球に及ぼす影響—TNF- $\alpha$ の生産と SOD 内包化による抑制効果— 第7回日本血液代替物学会総会 2000

池淵研二 他： 血液事業の立場から 第7回日本血液代替物学会総会 2000

出口隆明、辻徹也、西谷孝子、池田康夫、谷下一夫：人工血小板の運動計測、第12回バイオエンジニアリング講演会、2000

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

血小板 GPIb  $\alpha$  の機能抑制物質を有効成分とする抗炎症剤 (特願 2000-136496)

アルブミン重合体、その製造法及び血小板代替物 (特願 2000-274508)

Albumin Polymer Composition, Production Process Therefor and Use Thereof (09/641,217)

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

無し

別添 5

## 分担研究報告書

厚生省科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

平成12年度分担研究報告書

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内科教授

研究協力者 西谷孝子 慶應義塾大学医学部内科助教授

研究要旨

遺伝子組み換え GPIa/IIa と GPIb $\alpha$  (rGPIa/IIa と rGPIb $\alpha$ )を固定化したリポソーム、rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes, を創り、流動状態下における rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着に対する可溶性 von Willebrand factor (vWf), 及び rGPIa/IIa と rGPIb $\alpha$ の表面密度の影響を検討した。rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着は、可溶性 vWf 存在下では、ずり速度が高くなるのに伴って増加したが、可溶性 vWf が無いときには、ずり速度の増加に伴って著しく減少した。rGPIa/IIa 又はrGPIb $\alpha$ の表面密度をそれぞれ50% 減少すると、rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着は減少した。rGPIa/IIa のみを固定化したリポソーム、rGPIa/IIa-liposomes, のコラーゲン表面への粘着は、可溶性 vWf 存在下においても、ずり速度の増加にともなって著しく減少した。

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作り、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、血小板代替物と成り得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コラーゲン表面への粘着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。

C. 研究結果

1. rGPIa/IIa-liposomes

rGPIa/IIa のみを固定化したリポソーム、rGPIa/IIa-liposomes (rGPIa/IIa の表面密度： $2.22 \times 10^3$  molecules/particles), はコラーゲン表面に接触後直ちに静止して粘着し、可溶性 vWf の有無に拘らず、ずり速度が増加するのに伴って粘着は著しく減少した(図1)。この粘着は抗 GPIa 抗体 (Gi9) 及びフリーの rGPIa/IIa によって抑制された(図2)。rGPIa/IIa-liposomes は BSA や vWf 表面とは相互作用しなかった。以上のことから、rGPIa/IIa はリポソーム表面上で、コラーゲン受容体としての機能を保持していることが明らかである。

## 2. rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes

rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes は、可溶性 vWf 存在下、コラーゲン表面に強固に粘着し、ずり速度が高くなるに従って、その粘着は増加した。しかし、可溶性 vWf が無い時には、rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着は rGPIa/IIa-liposomes と同様に、ずり速度の増加に伴って著しく減少した。図 3 に示したように、rGPIa/IIa と rGPIb $\alpha$  の表面密度がそれぞれ  $2.17 \times 10^3$ ,  $1.00 \times 10^4$  molecules/particles であるリポソームのコラーゲン表面への粘着においては、可溶性 vWf 存在下では、ずり速度が  $600 \text{ s}^{-1}$  から  $2400 \text{ s}^{-1}$  へと高くなるに従って surface coverage は  $33.1 \pm 2.3\%$  から  $43.2 \pm 3.8\%$  に増加した。しかし、可溶性 vWf が無いときには、surface coverage は  $23.1 \pm 0.8\%$  から  $3.8 \pm 0.7\%$  に減少した。rGPIb $\alpha$  の表面密度が約 50%減少したリポソームでは、ずり速度が  $600 \text{ s}^{-1}$  から  $2400 \text{ s}^{-1}$  に増加すると、surface coverage は  $33.8 \pm 0.9\%$  から  $19.2 \pm 0.8\%$  に減少した (図 3)。rGPIa/IIa の表面密度が約 50%減少したリポソームでは、ずり速度が  $600 \text{ s}^{-1}$  から  $2400 \text{ s}^{-1}$  に増加すると surface coverage は  $16.2 \pm 2.2\%$  から  $3.1 \pm 0.9\%$  に減少した (図 3)。また、可溶性 vWf が無いときの surface coverage は、可溶性 vWf があるときに比べ常に低い値を示した (図 3)。

## 3. rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着に対する抗 GPIa 抗体と抗 GPIb $\alpha$ 抗体の影響

rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着に対する抗 GPIa 抗体 (Gi9) と抗 GPIb $\alpha$ 抗体 (GUR83-35)の阻害効果を、抗体が無いときの surface

coverage に対する抗体存在下での surface coverage の割合 (relative surface coverage) として図 4 に示した。GUR83-35 で rGPIb $\alpha$ -vWf 相互作用を阻害すると、ずり速度が  $600 \text{ s}^{-1}$  から  $2400 \text{ s}^{-1}$  へと高くなるに従って relative surface coverage は  $66.2 \pm 3.9\%$  から  $6.5 \pm 2.6\%$  に減少した。Gi9 存在下での relative surface coverage は GUR83-35 存在下のそれよりも常に小さく、その傾向はずり速度の高いときに著しかった。

## D. 結論

rGPIa/IIa と rGPIb $\alpha$  をリポソームに固定化することにより、血小板のコラーゲン表面への粘着を人工的に再現することができた。即ち、可溶性 vWf 存在下での rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着においては、rGPIa/IIa-collagen 相互作用と rGPIb $\alpha$ -vWf 相互作用が協同的に寄与していることが明らかとなった。平成十三年度には、粘着によりリポソーム膜の物質透過性が高まり、リポソームに内包された物質を放出できる機能を持った系の構築を行う予定である。

## E. 発表業績

### 1. 論文発表

1. Nishiya T., Murata M., Handa M., Ikeda Y. (2000)

Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet glycoprotein Ib $\alpha$  to immobilized von Willebrand factor under flow conditions.

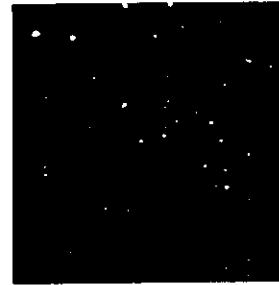
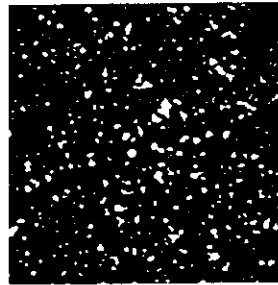
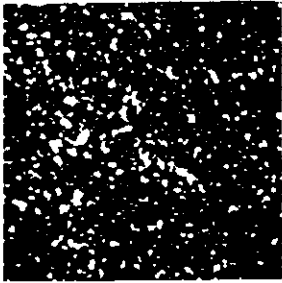
Biochem Biophys. Res. Commun. 270,

- 755-760.
2. Nishiya T., Kainoh M., Murata M., Handa M., Ikeda Y. (2001)  
Reconstitution of adhesive properties of platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins GPIa/IIa and Ib $\alpha$  under flow conditions. Specific synergy of receptor-ligand interactions.  
Submitted to Blood.
  3. 西谷孝子 (2000)  
リポソームを用いた人工血小板へのアプローチ  
人工血液 8、6-12.
  4. 西谷孝子、池田康夫 (2000)  
血小板代替物  
血液、腫瘍科 41、47-54.
  5. 西谷孝子 (2001)  
止血能を有するリポソームの開発  
血液、免疫、腫瘍、6、41-45.
  6. 西谷孝子 (2001)  
血小板代替物の開発  
メディカルレビュー社  
血小板生物学、印刷中
  - 第7回血液代替物学会、札幌
  3. 西谷孝子、半田誠、池田康夫 (2000)  
フィブリノーゲンを表面に固定化したリポソーム、Fgn-liposomes.  
第7回血液代替物学会、札幌
  4. 西谷孝子、戒能美枝、上出佳永子、村田満、半田誠、池田康夫 (2000)  
コラーゲン表面における rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes と血小板との相互作用  
第23回日本血栓止血学会、名古屋
  5. Nishiya T., Suematsu M., Ikeda Y. (2000)  
Adhesive properties of liposomes carrying recombinant GPIa/IIa and/or GPIb $\alpha$  under flow conditions.  
8<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes. San Diego, U.S.A.
  6. Nishiya T., Kainoh M., Murata M., Handa M., Ikeda Y., (2000)  
Adhesive properties of liposomes carrying both recombinant GPIa/IIa and GPIb $\alpha$  under flow conditions. Specific synergy of receptor-ligand interactions.  
42<sup>nd</sup> annual meeting of the American Society of Hematology.  
San Francisco, U.S.A.

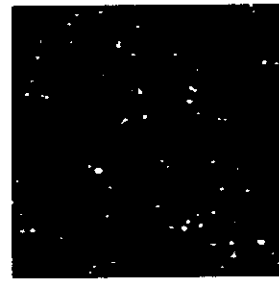
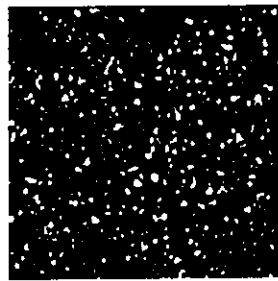
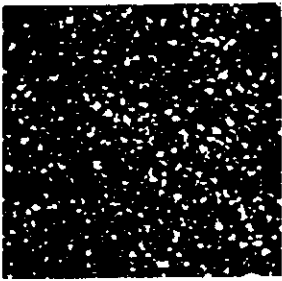
## 2. 学会発表

1. 西谷孝子 (2000)  
血小板代替物  
会長シンポジウム “血液代替物開発研究 Update 2000”  
第7回日本血液代替物学会、札幌
  2. 西谷孝子、戒能美枝、村田満、半田誠、池田康夫 (2000)  
rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着に対する rGPIa/IIa と rGPIb $\alpha$ の表面密度の影響
- F. 知的所有権の所得状況
1. 特許所得 無し
  2. 実用新案登録 無し
  3. その他 無し

vWf (+)



vWf (-)



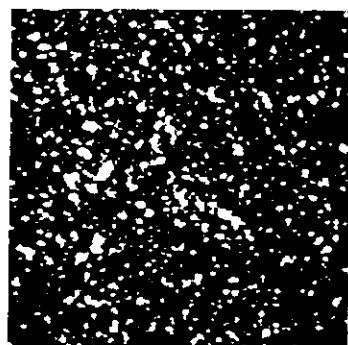
600

1200

2400

Shear rate ( $s^{-1}$ )

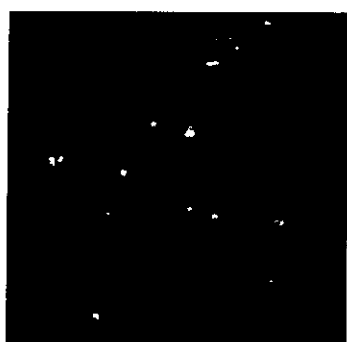
図1. rGPIa/IIa-liposomes のコラーゲン表面への粘着



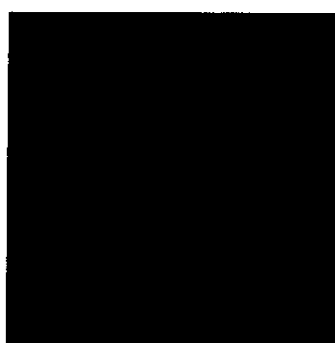
control



anti GPIa



free rGPIa/IIa  
(0.1 μg/ml)



free rGPIa/IIa  
(1 μg/ml)

図2. 抗GPIa抗体とフリーのrGPIa/IIaによる  
rGPIa/IIa-liposomes のコラーゲン表面  
への粘着の抑制



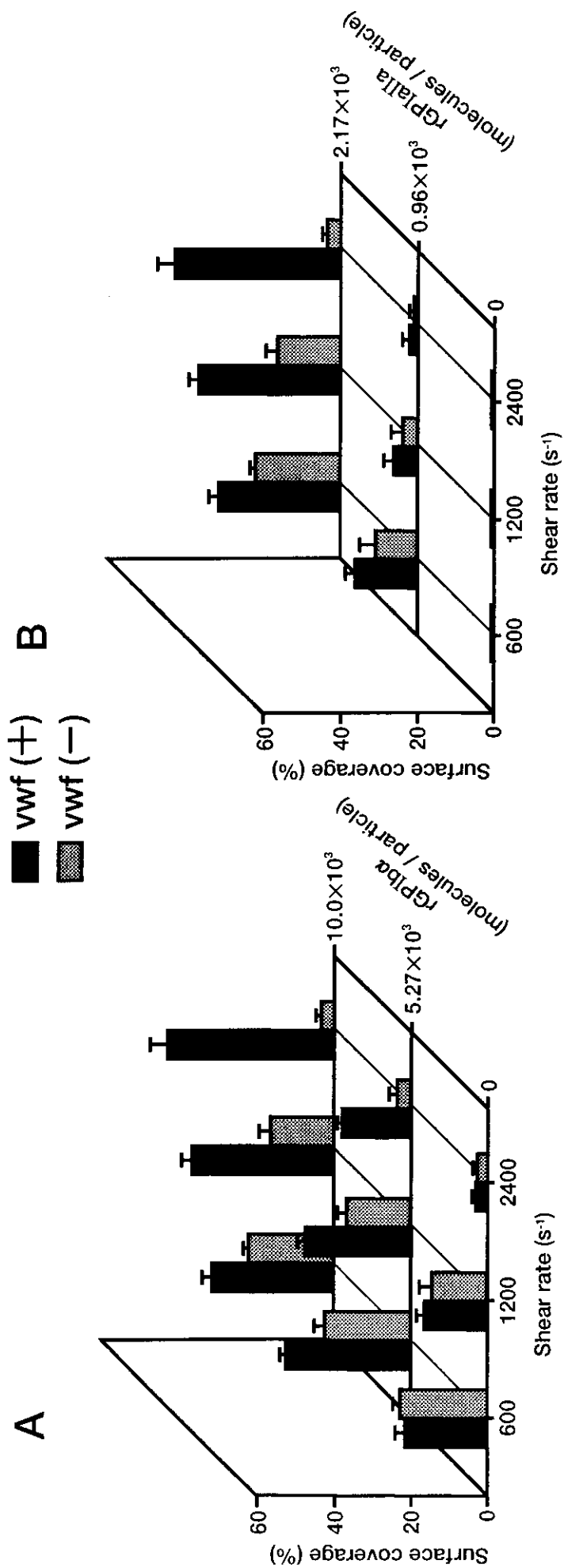


図3. rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着に対する  
rGPIa/IIaとrGPIIb $\alpha$ の表面密度の影響

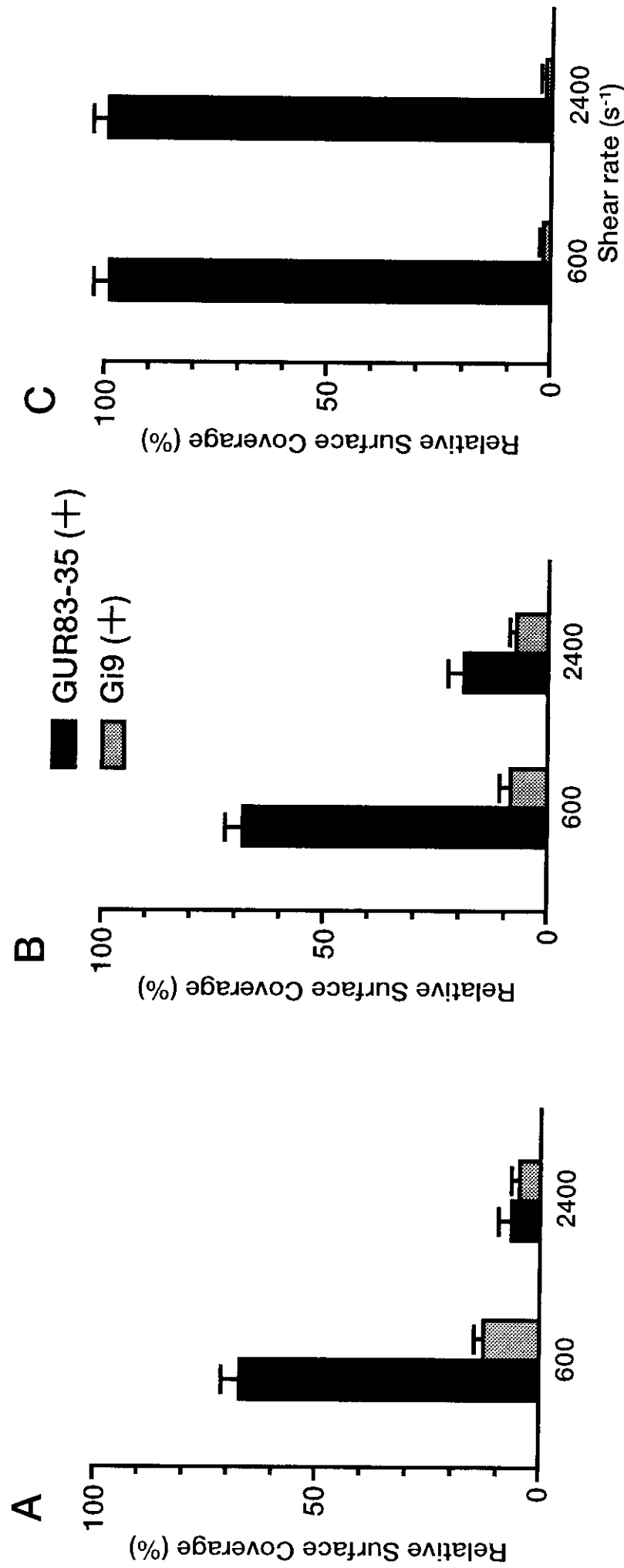


図4. rGPIa/IIa-Ib $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着に対する GUR83-35 と Gi9 の阻害効果

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

止血能を有するリポソームの *in vitro* の機能解析

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部 講師

研究要旨 平成9年度～平成11年度の研究で我々は rGPIb  $\alpha$ -liposome、rGPIaIIa-liposome を作成し、*in vitro* ならびに *in vivo* での機能評価を行ってきた。今年度は使用する rGPIb  $\alpha$  分子の最適化の為の実験を行った。すなわち、pCDM8neo ベクターを pcDNA3.1 に変更した。産生された rGPIb  $\alpha$  蛋白は、Western blotting 上、45KDa の monomer であり、dot blotting では4種類の抗 GPIb  $\alpha$  モノクローナル抗体と反応することが示された。また ligand blotting にて、この rGPIb  $\alpha$  蛋白がリストセチン存在下で vWF と反応することが確認された。新株 rGPIb  $\alpha$  蛋白の機能：未純化の状態、新株 rGPIb  $\alpha$  蛋白をメンブレンに固相化し、ブロックのあと 125I-vWF の結合を観察すると、リストセチン存在下、ボトロセチン存在下ともに vWF の結合が見られた。これは抗 vWF で抑制されたことから、特異的な反応であると思われる。しかし、新株 rGPIb  $\alpha$  蛋白は旧株に比較し、同じ量の rGPIb  $\alpha$  を固相化したにもかかわらず vWF 結合量が少なかった。等量 (500ng) の rGPIb  $\alpha$  蛋白をメンブレンに固相化し、新株と旧株を比較すると、新株ではリストセチンによる 125I-vWF 結合が殆ど見られなかった。pcDNA3.1 で発現された rGPIb  $\alpha$  蛋白は vWF 結合機能を有するが、その活性は pCDM8neo で発現された蛋白のそれと比較して弱いと思われる。さらに純化過程での活性喪失が示唆された。よって天然配列のままの rGPIb  $\alpha$  (1-302) を作成しこの C 末端に Cys 導入するか、既知の生体蛋白との融合蛋白として発現し、この既知の生体蛋白の部分で dimerization を起こさせるような設計を今後の課題としたい。

A. 研究目的

輸血療法の中でも血小板輸血はこれらの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加率を示しており、これは諸外国でも同様に、特に AIDS、肝炎の発症の可能性がある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%の増えている。輸血療法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

ポゾームなどが考えられる。

平成9年度～平成11年度の研究で我々はrGPIb $\alpha$ -liposome、rGPIaIIa-liposomeを作成し、in vitroの研究成果を挙げてきた。また前者についてはpreliminaryではあるがin vivoの成績を得ている。これらを総括して考案し、大きな問題点を整理すると、(1)現状のliposomeには凝集機能がない、(2)in vivoでの半減期が短い、の2点に集約されると思われる。(1)に関しては、in vitroでの粘着やin vivo止血能の発揮にはrGPIb $\alpha$ とrGPIaIIaの両者が必要でと思われるが、両方が導入されたrGPIb $\alpha$ -rGPIaIIa-liposomeですら、vWFやコラーゲン上での凝集は観察されない(これまで血小板とのco (hetero)-aggregationが観察されたのは、リストセチン存在下のみである)。co-aggregationが起きれば、血小板凝集塊が増大することが実験的に示されているので、恐らく止血には有利に働くであろう。また(2)については現在PEG化liposomeの研究が続けられているが、in vitroのデータが十分に揃っていない。

mRNA sequence of rGPIb $\alpha$  fragment secreted from rGPIb $\alpha$ /pCDM8 or pcDNA3.1 transfected CHO-cells

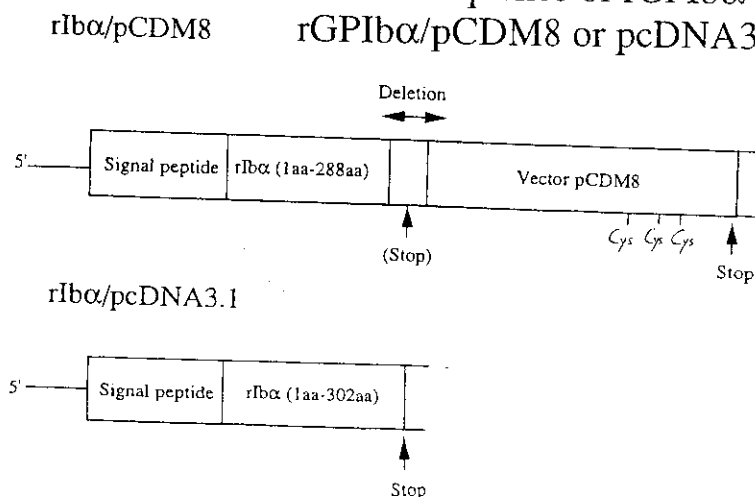


図 1