

20010672

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)

平成13年度 総括・分担研究報告書

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学 教授

平成14(2002)年 3月

厚生科学研究費補助金
高度先端医療研究事業

人工血小板開発研究
(研究課題番号：H12-血液-001)

平成13年度
総括・分担研究報告書

平成14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)

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
後藤信哉 東海大学医学部 講師
末松誠 慶應義塾大学医学部 教授
長澤俊郎 筑波大学臨床医学系 教授
池淵研二 東京医科大学 助教授
谷下一夫 慶應義塾大学理工学部 教授

(研究協力者)

村田満 慶應義塾大学医学部内科 講師
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. | 血小板膜糖蛋白、フィブリノゲン等を固相化したリポソーム、
蛋白質高分子量体の作成とその解析
- リポソームを用いた血小板代替物の開発 - | 池田 康夫
村田 満 |
| 2. | 止血能を有する蛋白質高分子量体の <i>in vitro</i> の機能解析：
流動状態下での血小板凝集機序の解析
- 流動状態下での血小板血栓における P-selectin の役割 - | 半田 誠 |
| 3. | 止血能を有する蛋白質高分子量体の開発 | 武岡 真司 |
| 4. | 止血過程における人工血小板の超微構造的解析
- 止血過程における人工血小板の挙動に関する電顕的検討 - | 鈴木 英紀 |
| 5. | 止血能を有するリポソームの流動状態下での機能解析
- 高速レーザー共焦点顕微鏡を用いた人工血小板の機能評価 - | 後藤 信哉 |
| 6. | 細胞近傍の微小流動及び微粒子運動の計測と解析
- 粘着減少における人工血小板の流体力学的挙動 - | 谷下 一夫 |
| 7. | 人工血小板の微小流動及び微粒子運動の計測と解析
- 人工血小板代替物 Glycoprotein Ib α -liposome の生体内挙動 - | 末松 誠 |
| 8. | 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 |
| 9. | 血小板輸血の動向調査と人口血小板の臨床応用に関する研究
- 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 |
| 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
学会抄録 ・ 新聞記事 | |

総括研究報告書

平成13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

本研究班では、これまで血管損傷部位に特異的に粘着する人工血小板の設計における血小板膜糖蛋白 GPIb α の重要性を明らかにして、遺伝子組み換え GPIb α (rGPIb α) を結合させたリポソーム、アルブミンマイクロスフェア (AMS) を作成し、その機能解析を行ってきたが、流動状態下での粘着のみならず、血小板凝集塊の形成にも GPIb α が重要な役割を演じていることが新たに明らかにされた。rGPIb α を結合させたリポソーム、AMS、ラテックス粒子の流動状態下での vWF 基板への粘着を検討すると、後2者の粒子の粘着は不可逆的であるのに対し、リポソームでは一旦粘着後、流動方向に再び移動し、粘着は可逆的であった。

フィブリノゲン(fbg)を結合させた AMS(fbg-AMS)は、血小板固定基板に低ずり速度下で有意に粘着するが、高ずり速度下での粘着は著しく減少した。また、fbg-AMS はヒト血小板凝集塊に巻き込まれることも確認された。rGPIb α -AMS、rGPIb α -リポソームをラットに投与し、生体内挙動を検討した。ラット腸間膜静脈を用い、光化学反応により傷害された血管内皮細胞部位での血栓形成における AMS の役割を検討したところ、血管閉塞に至るまでの時間が著しく短縮し、rGPIb α -AMS が生体内の血栓形成に重要な役割を果たす事が、明らかとなった。

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

後藤信哉 東海大学医学部 内科 講師

鈴木英紀 (財) 東京都医学研究機構 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 東京医科大学 生化学助教授

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、他の血液製剤同様、血小板製剤においても、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。

平成9年度から開始された本研究班のこれまでの研究成果は、一言で言えば、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たリポソームまたは、蛋白質高分子量を担体を選び、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 α 、コラゲン受容体 GPIa/IIa を、遺伝子組み換え技術により作成し、純化したもの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。rGPIb α -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、rGPIa/IIa-リポソームは、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。rGPIb α -GPIa/IIa-リポソームは、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。rGPIb α -リポソーム、rGPIb α -GPIa/IIa-リポソームの止血能について血小板減少ラットを作成し検討した。rGPIb α -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の短縮が観察されたが、rGPIb α -GPIa/IIa-リポソーム投与では、逆に出血時間が延長する結果を得た。

人工担体としてリポソームの他、アルブミンマイクロスフェア (AMS) を調整し、リコンビナント膜糖蛋白を固相化し、その機能評価を行った。r GPIa/IIa-AMS はコラゲンを特異的に認識し、低速度下で効率よくこれに粘着した。一方、AMS にフィブリノゲン (fbg) を結合させた fbg-AMS はヒト血小板凝集塊に巻き込まれる事が確認された。

過去4年間のこれらの研究を更に推進し、確固たる方向付けを行うと共に、本年度は実用化への一歩を踏み出す目的で、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア(AMS)を人工担体として(特に後者)種々の密度で rGPIb α 、rGPIa/IIa を固相化させ、更にこれに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、人工血小板/血小板代替物開発の具体化に向けて研究を進めることとした。

B. 研究方法

1. 血小板膜糖蛋白 (GPIb α 、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 α)、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り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ー、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°C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た。

2. アルブミン重合体の調製と粒径制御

250mg/mL リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA、三菱ウェルファーマ社製)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 rHSA 溶液(10mg/mL、25mL)に対して 0.1M 水酸化ナトリウム水溶液を 800 μL 加えて、pH10.65(23°C)とした。80°C にて 10 分間加熱して重合開始状態とし、23°Cまで冷却した。これに 0.1M 塩酸水溶液 1mL を滴下して pH6.02(23°C)とした後、40 °C で攪拌し重合体を生長させた。過剰のヨードアセトアミドを加えて重合反応を停止し、リン酸緩衝液(PBS、pH7.4)

に対して透析を行いアルブミン重合体を調製した。

rGPIb α -AMS の調製

AMS 分散液 ([HSA]=16mg/mL、pH7.4) 5.0mL に対して 10.9mM N-succinimidyl3-(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)にて未反応 SPDP と副生成物を除去して、PD-AMS([HSA]=9.0mg/mL)を得た。

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、23 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。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。

この溶液を PD-AMS 溶液([HSA]=9.0mg/mL)11mL と混合し、4 $^{\circ}$ C で振とう後 rGPIb α -AMS を得た。

3. 人工血小板の血栓形成能評価

①出血時間測定

F344 近交系雄ラットに γ 線 7Gy 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 $7.6 \times 10^4 / \mu$ 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。

②光化学反応による血栓形成

1.25% Fluorescent-Na 200 μ l /100gBW をラット静脈内に投与する。直径 40 μ m の腸間膜静脈を選び、600-700nm の波長の光を照射した。Fluorescent -Na は、光化学反応により single molecule oxygen を放出し血管内皮を障害する。これにより形成される血栓を観察し、血流の完全停止までの時間を測定した。

4. 微小血小板粒子の超高速高感度ビデオ観察法

Wistar 系雄性ラット (300g)腸間膜微小循環において蛍光標識リポソーム粒子の生体内撮像を試みた。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 Silicon intensified target (SIT) camera を使い、Gain 8, offset 2 の条件を固定して微小血管の撮像を行った。観察は 20-30ミクロン径の細動脈、細静脈を任意に選択して、蛍光標識粒子の挙動を SVHS video recorder に記録した。リポソーム粒子は 2×10^{10} 個/rat を 1分かけて大腿静脈カテーテルから投与を行い、投与前および投与後 1分、5分、10分以降 10分ごとに 40分までビデオ画像を各 2分間記録した。この記録時間の間、観察領域を励起波長 530 nm で epi-illumination を行い画像を取得し、観察のインターバルには照射を止めて組織の障害を最小限にする工夫を行った。

5. 血小板固定化基板の調整と流動状態下での血小板凝集機序の解析

洗浄血小板浮遊液をコラゲン（ウシ type 1 コラゲン）固定化基板上に添加後、37℃、1時間静置し、Hepes-tyrode バッファーで洗浄後、血小板固定化基板として実験に用いた。基板をチャンバー内に固定し、37℃の恒温槽内でポンプを用いて DiOC₆ で血小板を標識した全血を種々ずり速度で灌流し、蛍光顕微鏡によって標識血小板の血小板固定化基板への粘着を CCD カメラを通じて連続的に観察し、画像解析装置(Argus 50)にて解析した。

（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. 研究結果及び考察

平成12年度までの研究で rGPIb-リポソームの投与は、中等度の血小板減少ラットの出血時間を短縮させる事が確認されたが、一方、予備的な実験ながらも rGPIb-rGPIa/IIa-リポソームが血小板減少ラットの出血時間を延長させる結果となった。更にフィブリノゲンを固相化した AMS (fbg-AMS)がヒト血小板凝集塊に巻き込まれ、血小板と相互接着する

ことが示されたことなどから、平成13年度は集中して残存ヒト血小板と相互反応を起こし得る人工血小板の開発を目指し、班全体の方針として GPIb α 、GPIa/IIa、フィブリノゲンを結合した AMS の機能評価を試みた。

1. 遺伝子組み換え GPIb α の構造と機能に関する検討

人工血小板の設計に rGPIb α は必須であるが、これまで実験に用いてきた rGPIb α はそのC末端に本来のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸が付加されており、しかも s-s 結合による dimer 形成をしていることが研究の過程で明らかになった。そこで今後使用する rGPIb α 分子としてどのような分子が適切なのかについて慎重に検討を加えた。まず GPIb α を dimer 化させた組み換え体と monomer 組み換え体を新たに作成し、その機能比較を行った。更にこれまで使用していた rGPIb α と新たに精製した monomerGPIb α についてリストセチン存在下での ¹²⁵I 標識 vWF 結合能を検討したところ、monomerGPIb α では vWF との反応特異性を示す saturation curve は得られず Kd は計算不能であったが、これまでの rGPIb α の Kd は 6.7×10^{-8} Mであった。GPIb α の N 末 45Kd 領域の形状が dimer であるものはそれが monomer であるものより vWF との結合親和性が高いことが示され、今後、人工血小板の開発に向けて使用する rGPIb

の性状に重要な情報を提供した。

2. 流動状態下での血小板血栓形成機序

血小板固定化基板上への血小板の集積過程を蛍光顕微鏡下 CCD カメラで連続的に観測したところ、 600sec^{-1} ~ 2400sec^{-1} の広い範囲のずり速度下において血小板血栓形成には流血血小板の GPIb/IX が必須であることが証明され、流動状態下での粘着反応のみならず血小板血栓形成においても GPIb/IX が重要な役割を演じていることが確認された。血小板固定化基板上の分子で流血血小板膜上の GPIb/IX と反応する標的となるものとしては抗体による阻害実験の結果から vWF と P-selectin が同定された。特に低ずり速度下では P-selectin の重要性が明らかとなった。この結果は人工血小板を設計する上で全ての範囲の血流状態下で GPIb/IX は不可欠な膜糖蛋白である事が明らかとなった。

3. rGPIb α 、フィブリノゲン結合 AMS の機能

ヒト血小板の大きさに近づけた AMS を調整し、SPDP を用いて rGPIb α を結合させ、3 者の人工担体ともほぼ同密度の rGPIb α を表面に結合した上で、それらの人工粒子の流動状態下における vWF 基板上への集積を解析した。全ての担体の vWF への粘着は抗 GPIb α モノクローナル抗体の添加で完全に抑制され、粘着は GPIb α -vWF 反応特異的に起こってい

ることが確認されたが、AMS、ラテックス、リポソームの挙動には明らかな差異があった。

即ち、AMS、ラテックスでは vWF 基板に直ちに粘着し、その後解離することはなかったが、リポソームではヒト血小板と同様、vWF 基板へ粘着後、流動方向に向かって基板上を転がり、脱着する挙動が観察された。転がる速度はリポソームの膜流動性の増加に伴って低下し、リポソームの脱着はリポソーム表面からの rGPIb α 結合脂質の脱離によることが確認された。この事実から rGPIb α を認識蛋白質として利用した場合、AMS では生体内における出血部位への集積が可能となるが、リポソームの系では rGPIa/IIa などが必要となる事が考えられた。

一方、fbg-AMS は流動状態下で (低ずり速度 350sec^{-1}) 血小板固定化基板上に可逆的に粘着し、この粘着は抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体により完全に抑制された。Fbg-AMS が反応する血小板固定化基板上の標的分子は GPIIb/IIIa 複合体であることが明らかとなった。高ずり速度下では fbg-AMS の血小板固定化基板への集積に起こりにくかった。また fbg-AMS が血小板基板へ粘着・集積するに伴い、ヒト血小板の粘着数も有意に増加した。

4. rGPIb α -リポソームの生体内挙動 - ラット微小循環系での解析 -

これまでに血小板は微小血管系におい

て内皮細胞近傍を流れており、その挙動に血小板膜糖蛋白 GPIb α が重要な役割を演じていることが本研究班末松誠分担研究者らの研究で明らかとなったが、rGPIb α -リポソームの生体内挙動を明らかにする目的でヒト GPIb α と交叉反応性を示すラット微小循環系を用い、超高速感度ビデオ観測法で解析した。

rGPIb α -リポソームはずり速度の速い細動脈において一過性の粘着反応を呈しながら小凝集塊を形成し、血管壁近傍を流れる。このような粘着は、低ずり速度の細静脈でも認められるが、その一部は内皮細胞上をローリングする白血球と塊を形成して流れていることが明らかとなった。これらの挙動は抗 GPIb α モノクローナル抗体、抗 vWF モノクローナル抗体により特異的に抑制されることから、ヒト血小板同様、rGPIb α -リポソームの生体内挙動は GPIb α 、vWF 相互反応により規定されることが確認された。

5. rGPIb α -AMS、rGPIa/IIa-AMS の生体内血栓形成能の評価

ラット腸間膜を用い、光化学反応により傷害された血管内皮細胞部位での血栓形成における AMS の役割について検討した所、コントロール AMS に比べて rGPIb α -AMS、rGPIa/IIa-AMS 投与では、血管閉塞に至るまでの時間が著しく短縮した。この実験系は生体内における血栓形成過程を見る上で、再現性に優れた良い方法ではあるが、その促進は血管

を閉塞し、致死的な臓器障害を惹起する病的血栓の実験モデルとしても用いられており、本年度得られた知見は臨床上、重要な問題を提起しており、今後の重要な研究課題である。

D. 結論

リポソーム、AMS を人工担体として遺伝子組み換え GPIb α 、GPIa/IIa 並びに純化フィブリノゲンを結合させ、その機能解析を in vitro、in vivo で行った。人工血小板の設計に必須の膜糖蛋白としての GPIb α の重要性が単に流動状態下での粘着反応のみならず、血小板血栓形成過程においても証明されたことにより、これまでの本研究班の開発方針の妥当性が改めて確認された。本研究班で初期から用いて来た rGPIb α アミノ酸配列が native な GPIb α と異なっていることが研究の過程で明らかとなったが、本年度の分子生物学的な詳細な検討の結果、GPIb α は dimer を形成していることで（これまで使用してきた rGPIb α ）vWF との結合親和性が増大する事が証明された。

rGPIb α -リポソーム、rGPIb α -AMS ともにラットに投与され、それぞれ実験系は異なるものの止血機能を保持する人工担体としての有利な特徴を有している事が示された。

即ち、rGPIb α -リポソームは細動脈内で内皮細胞近傍を流れていること、rGPIb α -AMS は光化学反応によって作られた

腸間膜血栓モデルにおいて血栓形成を著しく促進することが示されたことである。

人工血小板開発基礎的研究のこれらの成果を踏まえて、より詳細な *in vivo* 研究の計画が今後予定されている。

E. 健康危険情報

無し

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y et al: Platelet interactions with liposomes carrying recombinant platelet membrane glycoproteins or fibrinogen : approach to platelet substitutes. *Artif Cells Blood substit Immobil Biotechnol* 29 453-464 2001

Nishiya T, Kainou M, Murata M, Handa M, Ikeda Y: Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions. Specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* in press, 2002

Kyokane, T., Norimizu, S., Taniai, H., Suematsu M et al. Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 120, 1227-1240, 2001

Tanimoto, A., Oshio, K., Suematsu, M., Pouliquen, D., Stark, D. Relaxation effects of clustered particles. *J. Magnet. Reson. Imag.* 14(1):72-77, 2001.

Morisaki, H., Katayama, T., Kotake, Y., Ito, M., Ishimura, Y., Takeda, J., Suematsu, M. Roles of carbon monoxide in leukocyte and platelet dynamics in rat mesentery during sevoflurane anesthesia.

Suzuki, T., Makino, R., Suematsu, M. Organic phosphates as a new class of soluble guanylate cyclase inhibitors. *FEBS Lett.* 507, 49-53,

Mine, S., Fujisaki, T., Suematsu, M., Tanaka, Y. Activated platelets and endothelial cell interaction with neutrophils under flow conditions. *Intern Med.* 2001, 40, 1085-92.

Uwatoku, R., Suematsu, M., Ezaki, T., Saiki, T., Suganuma, T., Naito, M., Ando, M., Matsuno, K. Kupffer cell-mediated recruitment of rat dendritic cells to the liver: roles of N- acetylgalactosamine receptors. *Gastroenterology* 121, 1460-1472, 2001.

Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E: Fibrinogen-conjugated Albumin Polymers and their Interaction with Platelet under Flow Conditions. *Biomacromolecules*, 2, 1192-1197, (2001)

Oda A, Ochs HD, Lasky LA, Spencer S, Ozaki K, Fujihara M, Handa M, Ikebuchi K, Ikeda H: CrkL is an adaptor for Wiskott-Aldrich syndrome protein and Syk. *Blood* 97, 2633-9, 2001

Goto S, Tamura N, Sakakibara M, Ikeda Y, Handa S. Effects of ticlopidine on von Willebrand factor-mediated shear-induced platelet activation and aggregation. *Platelets*. 2001; 12: 406-414

Eto K, Goto S, Shimazaki T, Yoshida M, Sakakibara M, Isshiki T, and Handa S: Two distinct mechanisms are involved in stent thrombosis under flow conditions. *Platelet* 12: 228-235, 2001

Eto K, Ochiai M, Isshiki T, Takshita S, Terakura M, Sato T, Ikeda Y, Handa S, and Goto S: Platelet aggregability under shear is enhanced in patients with unstable angina pectoris who developed acute myocardial infarction. *Jpn Cir J* 65: 279-282, 2001

後藤信哉、田村典子、榊原守、石田英之、半田俊之介：動脈硬化の発症と進展に關与する血小板と白血球の相互作用の分子機構—血流条件下の検討—第 9 回分子循環器研究会報文集, 2001

Shibuya-Fujiwara N, Ikebuchi K. et al:

Liposome-encapsulated superoxide dismutase suppresses liposome-mediated augmentation of TNF- α production from peripheral blood leukocytes. *Life Science* 69, 2007-2015, 2001

Shibuya-Fujiwara N, Hirayama F, Ikebuchi K, et al: Phagocytosis in vitro of polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin by human peripheral blood monocytes plus macrophages through scavenger receptors. *Life Science*, 70, 291-300, 2001

Wakamoto S, Fujihara M, Abe H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Ikeda H, Ikebuchi K: Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release in vitro. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech*, 29, 191-201, 2001

Abe H, Ikebuchi K, Niwa K, Inanami O, Kuwabara M, Fujihara M, Hirayama J, Ikeda H: Superoxide generation from human polymorphonuclear leukocytes by liposome-encapsulated hemoglobin. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech*, 29, 275-283, 2001

Tanishita, K. et al.: Microscopic velocimetry with scale-up model for a flow field over cultured endothelial cells, *Trans. ASME, J. Biomech. Eng.*, in press 2002

Tanishita, K et al.: Measurement of surface topography of endothelial cell and wall shear stress distribution on the cell, JSME Int. J., 44, 972-981, 2001

谷下一夫 他: 流れ負荷による内皮細胞の形態再構築過程における細胞表面のせん断応力分布, 日本機械学会論文集 (掲載予定) 2002

2. 学会発表

Ikeda Y, Nishiya T, Murata M, Suematsu M: von Willebrand factor-dependent platelet responses under flow conditions. XVIII Int'l Symposium of Thrombosis Hemostasis (ISTH) Paris, 2001

Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M, Ikeda Y: Reconstitution of recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α , or fibrinogen into liposomes. Adhesion / and aggregation of proteoliposomes on the collagen surface under flow conditions. XVIII Int'l Symposium of Thrombosis Hemostasis (ISTH) Paris, 2001

Murata M, Ikeda, SNP relevant to platelet thrombogenicity, O11, UK-Japan Platelet Conference, Japan Feb 2002

Watanabe N, Suzuki H, Ikeda Y, Handa M et al: Analysis of platelet junction in

phosphoinositide 3-kinase P85 α -deficient mice. UK-Japan Platelet Conference, Japan Feb 2002

Suematsu M, Katayama T, Nishiya T, Kashiwai S, Murata M, Handa M, Ikeda Y: Reconstitution of GpIb α -mediated platelet behavior in microcirculation in vivo. O3, UK-Japan Platelet Conference, Japan Feb 2002

武岡真司 他「フィブリノーゲン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(III Pb158)」, 第50回高分子学会年次大会、2001年5月25日(大阪).

武岡真司 他「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 α 結合体の機能比較(III Pa157)」, 第50回高分子学会年次大会、2001年5月25日(大阪).

武岡真司 他「rGPIb α 結合アルブミン重合体と小胞体の機能比較(I-5)」, 第8回日本血液代替物学会年次大会、2001年9月4日(東京)

武岡真司 岡村陽介 半田誠 他「フィブリノーゲン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(I-4)」, 第8回日本血液代替物学会年次大会、2001年9月4日(東京)

武岡真司 他「アルブミン重合体を用いた血小板代替物の開発 (II-2)」、第 8 回日本血液代替物学会年次大会、2001 年 9 月 5 日 (東京)

武岡真司 他「血小板膜タンパク質をアルブミン重合体あるいはリン脂質小胞体に結合させた血小板代替物の評価 (IU20)」、第 50 回高分子討論会、2001 年 9 月 12 日 (東京)

Takeoka S. et al: Comparison between Albumin Polymers and Phospholipid Vesicles as Carriers for Recognition Proteins. (P-21), The International Symposium on Bio-integrated Materials and Tissue Engineering, 2002 年 3 月 7 月 (東京).

Takeoka S. et al: Comparison between Albumin Polymers and Phospholipid Vesicles as Carriers for GPIb, The 7th Meeting on Thrombosis and Rheology, 2002 年 3 月 16 月 (東京).

長澤俊郎 他「培養骨髄巨核から産生された血小板の形態と機能」第 8 回日本血液代替物学会年次大会、2001 年 9 月 4 日 (東京)

Nagasawa T: Morphology and function of in vitro induced-platelets (IVIP) derived from murine hematopoietic stem cells.

United Kingdom - Japan platelet conference Feb 2002 Kyoto

田村典子、後藤信哉、吉田美奈子、池田康夫、半田俊之介. 血流下 von Willebrand 因子依存性血小板活性化過程における P2Y₁₂ ADP 受容体の役割. 第 24 回日本血栓止血学会、2001

後藤信哉、田村典子、石田英之、半田俊之介: GP IIb/IIIa 受容体阻害薬による血小板血栓崩壊効果. 第 49 回日本心臓病学会学術集会 2001

Goto S, Tamura N, Handa S, Ishida H: Three dimensional analysis of platelet thrombus formed on collagen surface under flow conditions and the inhibiting effects of ticlopidine. 第 65 回日本循環器学会学術集会, 2001

Goto S: Role of P2Y₁₂ receptor in platelet thrombus formation under flow conditons. S1, UK-Japan Platelet Conference, Japan Feb 2002

辻徹也、和田透、武岡真司、池田康夫、谷下一夫 矩形管モデルにおける人工血小板粒子の壁近傍における挙動 第 40 回日本 ME 学会、BME 3 9—特別号 P665, 2002

辻徹也、田端隆、武岡真司、池田康夫、

谷下一夫 矩形管モデル流路における人工血小板の粘着の挙動解析 第14回バイオエンジニアリング講演会、講演論文集 135-136, 2002

西谷孝子、戒能美枝、村田満、半田誠、池田康夫：コラーゲン表面における rGPIa/IIa-Ib α -liposomes または、Fbg-liposomes と血小板との相互作用 第8回日本血液代替物学会年次大会 2001

池田康夫：人工血小板／血小板代替物の開発研究の動向・シンポジウム-人工代替物開発の現状と今後の展望- 第8回日本血液代替物学会年次大会 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

血流条件下の血小板血栓を指標とした抗凝固療法の抗血栓効果評価システムの開発（出願準備中・後藤）

分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

血小板膜糖蛋白、フィブリノゲン等を固相化したリポソーム、
蛋白質高分子量体の作成とその解析

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 村田満 慶應義塾大学医学部内科講師

研究要旨

＜目的＞本研究班の平成12年度までの検討で人工血小板に導入する接着分子の受容体として GPIb α が必須であることが明らかにされたが、検討された GPIb α 分子は C 末端に本来のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸が付加され、かつ S-S 結合による dimer を形成しているものであった。そこで本年度は (1) これを天然の GPIb α 配列をもつ monomer GPIb α と比較する、(2) C 末端の 1 アミノ酸 (302 番残基) が異なるだけで他は全く同一である 2 種の GPIb α (302Ala と 302Cys) を新たに作成して、その機能を比較することとした。＜結果＞ (1) 受容体の解離定数 Kd は、天然 GPIb α 配列 monomer GPIb α では vWF との反応特異性を示す saturation curve が得られず計算不能、旧株細胞からの精製組換え GPIb α dimer では $6.7 \times 10^{-8} \text{M}$ と血小板上の受容体とほぼ同様であった。(2) GPIb $\alpha^{302\text{Ala}}$ と GPIb $\alpha^{302\text{Cys}}$ を発現するベクターを新たに作成し、これらを CHO 細胞に導入し、その培養上清をウェスタンブロットで解析したところ、GPIb α^{302} は、全て monomer、GPIb $\alpha^{302\text{Cys}}$ は、一部 dimer、一部 monomer であることが確認された。＜結論＞人工血小板に導入する GPIb α 分子の最適化を目的として異なる組み換え体を作成し、その機能を比較した。dimer 化した分子は monomer に比し、リガンドに対する親和性が高い事を明らかにした。今後は、これらを担体へ導入し、その挙動と機能を in vitro 及び in vivo で検討してゆく必要がある。

A 研究目的

平成12年度までの検討で、人工血小板に導入する接着分子の受容体として GPIb α が必須であることを示した。導入する組み換え GPIb α については、過去に作成された発現ベクターを用いて、この分子は C 末端に本来のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸が付加されたものであり、しかも S-S 結合による dimer を形成している。天然の GPIb/IX/V 受容体の dimer 形成の報告は無いが、受容体複合体は、GPIb α 2 β 2IX $_2$ V $_1$ の構造を形成しており、 α 鎖の dimer 化が受容体機能に影響し

ている可能性が考えられる。昨年度の分担研究者村田は dimer 化により受容体機能が高まる可能性を示した。そこで今年度は GPIb α を dimer 化させた組み換え体と monomer の組み換え体を新たに作成し、その機能比較を行った。両者は C 末端の一アミノ酸が異なるだけで他は全く同一のものである。

B. 研究方法

610 のアミノ酸より成る GPIb α の N 末 45-Kd 領域 (細胞質外領域) には vWF 結合領域 (アミノ酸 1-293) が存在する。その 45-Kd 領域

のみを有する組換え GPIIb α fragment を monomer・dimer の形状でそれぞれ発現させるため、GPIIb α のアミノ酸 1-302 に翻訳される遺伝子配列をベクター、pcDNA3.1zeo にそれぞれ組み入れて GPIIb α monomer 発現ベクター(Ib α -1)、GPIIb α dimer 発現ベクター(Ib α -2)としたものを本研究に用いた。これら発現ベクターを哺乳細胞である Chinese hamster ovary cells(CHO 細胞)にそれぞれ導入後、その培養上清中に組換え GPIIb α が分泌される培養細胞株を樹立した。

C. 研究結果

発現ベクターを導入された細胞からの抽出 mRNA は RT-PCR 法によりアミノ酸翻訳開始から終了の配列を解析された。

まず昨年度予備検討を行った旧株 GPIIb α と新株 GPIIb α について機能を詳細に検討した。これら発現ベクター導入細胞の培養上清中に目的とする組換え GPIIb α が分泌されていること検討するために GPIIb α N 末 45-Kd 領域を認識する抗 GPIIb α モノクローナル抗体、LJ-Ib α 1 を用いて、還元された培養上清を対象に western blot analysis を施行した。新株、旧株共に組換え GPIIb α の存在を示唆する結果を得た。さらに、その 45-Kd 領域内、立体構造依存性に認識部位を有する抗 GPIIb α モノクローナル抗体 5 種類 (LJ-P3、LJ-Ib α 10、GUR20-5、GUR83-35、Hip1)を用いて、LJ-Ib α 1 にて抗原量を合わせた培養上清を対象に dot-blot analysis を施行した。結果、種々の抗体に対する反応性は両培養上清の間で類似していた。これは両培養上清共に vWF と結合しうる構造を持つ組換え GPIIb α を含むことを示唆している。

これら培養上清からトロンピンカラムを用いてそれぞれ精製された組換え GPIIb α は reversed-phase-HPLC により形状が検討された。結果、新株細胞からの培養上清由来の組換え GPIIb α fragment の多くは monomer、旧株細胞からのその多くは dimer で発現していることが認められた。

精製組換え GPIIb α と vWF の結合親和性(Kd の算出)を検討するために精製組換え GPIIb α 500ng をニトロセルロースメンブレンに固相化して、反応惹起物質リストセチン (終濃度 1.0mg/ml) 存在下 ¹²⁵I 標識 vWF を反応させ (終濃度 16-0.06 μ g/ml)、そのメンブレンの放射活性を測定した。結果、Kd は新株細胞からの精製組換え GPIIb α では vWF との反応特異性を示す saturation curve が得られず計算不能、旧株細胞からの精製組換え GPIIb α では 6.7×10^{-8} M であった。(図 1) また、新株あるいは旧株細胞からの培養上清を用いた同様の実験の結果 (Kd) は前者で 33×10^{-8} M、後者で 3.3×10^{-8} M であった。本実験の結果は GPIIb α の N 末 45-Kd 領域の形状が dimer であるものはその monomer のものより vWF との結合親和性が高いことを示している。

次に C 末端—アミノ酸だけが異なる 2 種の組み換え体発現ベクターを新に作成した。GPIIb α ³⁰²Ala と GPIIb α ³⁰²Cys である。これらを CHO 細胞に導入し、その培養上清をウェスタンプロットで解析したところ、GPIIb α ³⁰²Ala は、全て monomer、GPIIb α ³⁰²Cys は、一部 dimer、一部 monomer であった。(図 2)

D. 考察

リガンド結合部位を含む 2 種の組み換え

GPIb α (monomer, dimer) を発現させ、その構造機能を検討したところ、両者はいずれも立体構造依存性のエピトープを認識するモノクローナル抗体と反応したことから、分子構造そのものに大きな差は無いと考えられた。しかし、リガンド結合能は、両者で大きな差があり、dimer の解離定数 (Kd) は、血小板上の GPIb/IX/V 複合体のそれと近いものであることが判明した。

リガンド結合後の受容体の clustering や dimer 化、受容体の長軸方向での回転などが受容体からのシグナル伝達に重要であるという報告がみられる。一方、dimer 化自身がリガンド結合を促進するという報告も散見される。しかし血小板 GPIb/IX/V 複合体についてこのような報告は無く、今回我々の成績が初めてこの可能性を示す物である。

今後、新しく作成した2種の組み換え蛋白を大量に産生、精製し、担体への導入を行い、その挙動と機能を *in vitro* 及び *in vivo* で検討してゆく予定である。

E. 結論

人工血小板に導入する GPIb α 分子の最適化を目的とし、2種の組み換え体を作成し、その機能を比較した。Dimer 化した分子は monomer に比し、リガンドに対する親和性が高い事を明らかにした。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishiya T, Kaino M, Murata M, Handa M, Ikeda

Y: Platelet interactions with liposomes carrying recombinant platelet membrane glycoproteins or fibrinogen : approach to platelet substitutes.

Artif Cells Blood substit Immobil Biotechnol 29 453-464 2001

Nishiya T, Kainou M, Murata M, Handa M, Ikeda Y: Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions. Specific synergy of receptor-ligand interactions. Blood in press.

2. 学会発表

Ikeda Y, Nishiya T, Murata M, Suematsu M: von Willebrand factor-dependent platelet responses under flow conditions. XVIII Int'l Symposium of Thrombosis Hemostasis (ISTH) Paris, 2001

Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M, Ikeda Y: Reconstitution of recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α , or fibrinogen into liposomes. Adhesion / and aggregation of proteoliposomes on the collagen surface under flow conditions. XVIII Int'l Symposium of Thrombosis Hemostasis (ISTH) Paris, 2001

Murata M, Ikeda, SNP relevant to platelet thrombogenicity, O11, UK-Japan Platelet Conference, Japan Feb 2002

Watanabe N, Suzuki H, Ikeda Y, Handa M et al: Analysis of platelet function in phosphoinositide 3-kinase P85 α -deficient mice. UK-Japan Platelet