

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

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

無し

Saturation curves of 125I-vWF binding to rGPIIb α fragment

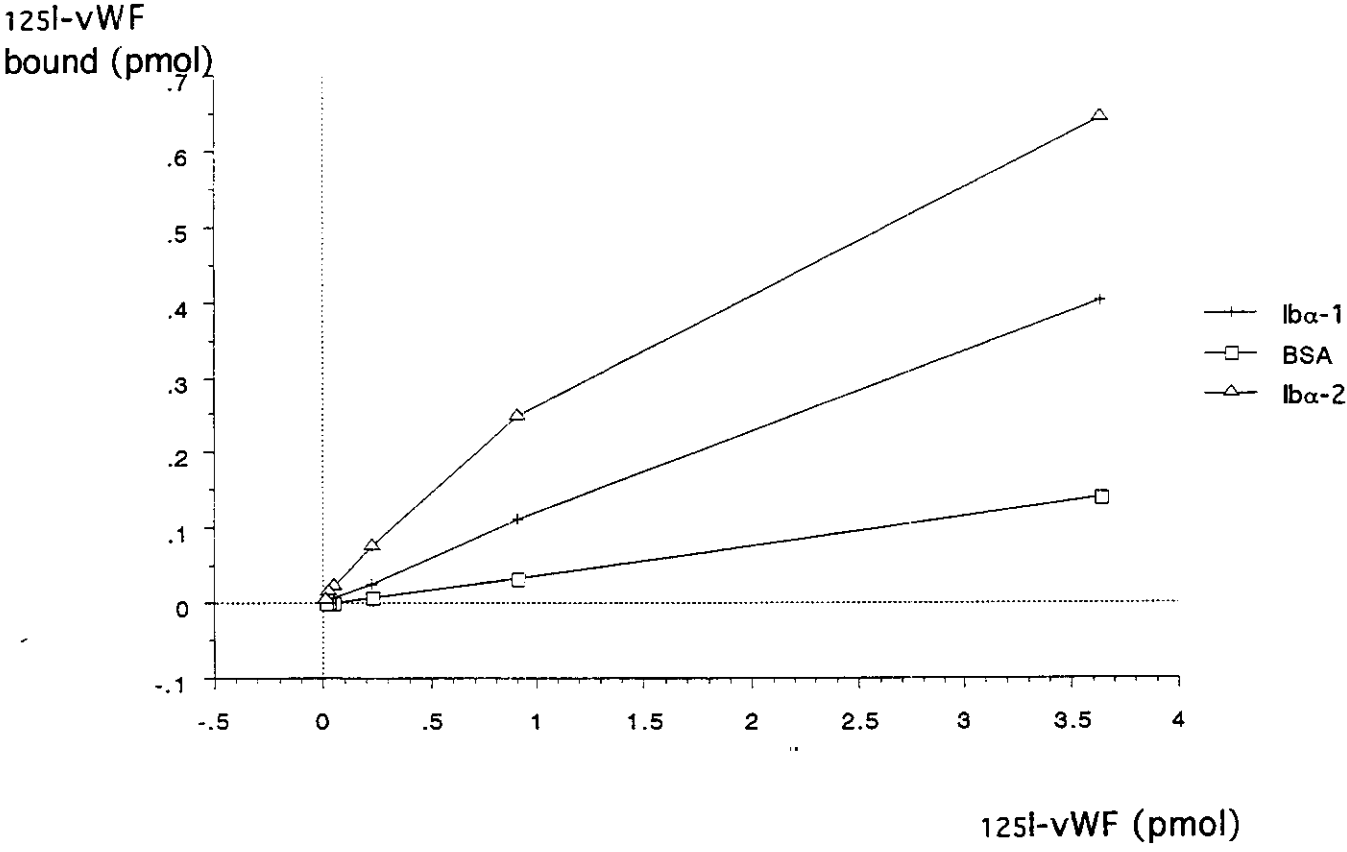
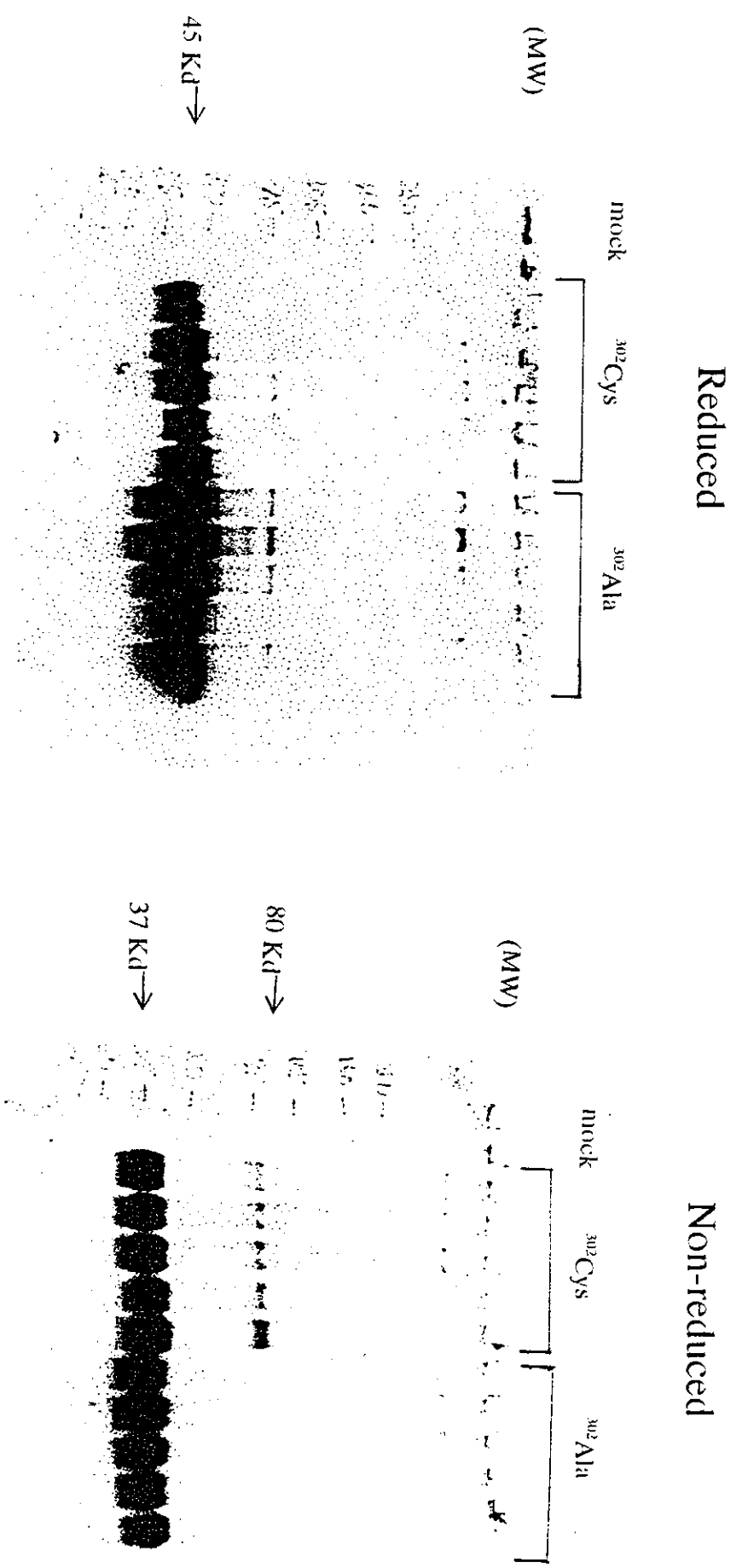


图1

Western blot analysis for rGPIIb α fragment under reduced or non-reduced conditions



Monoclonal antibody: LJ-1b α 1

「流動状態下での血小板血栓形成における P-selectin の役割」

止血能を有する蛋白質高分子量体の *in vitro* の機能解析

-流動状態下での血小板凝集機序の解析-

分担研究者 半田 誠（慶應義塾大学輸血センター 助教授）

研究協力者 岡村陽介（慶應義塾大学輸血センター、早稲田大学理工学部）

研究要旨

止血機構において破綻した血管内皮下組織局所への血小板粘着に引き続き、血小板同士が次々と凝集(血小板-血小板接着)して血小板血栓が形成される。そこで今回 *in vitro* 血液還流系を用いて流動条件下における血小板血栓形成のメカニズムを検討するために、血小板固定化基板(平成 12 年度報告)上での流動血小板の接着挙動を観察、解析した。その結果、血小板血栓形成には、全血流条件下($600\text{s}^{-1}\sim 2400\text{s}^{-1}$)において流動血小板の GPIIb/IX が必須であり、活性化血小板上に発現するその標的分子は vWf と P-selectin(PS)であり、特に低血流条件下では PS が関与するということが、さらに両者は GPIIb/IX のリガンドとして可逆的接着(tethering→rolling)を仲介することで相補的に役割を担い、その後の GPIIb/IIIa を介した不可逆的接着を誘導する可能性が示唆された。人工代替物の不可欠な機能として、残存している患者血小板をいかに止血局所に有効に誘導させ、血小板凝集塊を形成させるかである。この血小板人工代替物を設計するにあたり、全血流条件下で GPIIb/IX は不可欠であることが明らかとなった。

A. 目的

止血機構において破綻した血管内皮下組織局所への血小板粘着に引き続き、血小板同士が次々と凝集(血小板-血小板接着)して血小板血栓が形成される。平成 12 年度において、流動条件下で血小板凝集を測定する系を確立すると共に、粘着血小板を標的とした流動血小板の接着現象には、血小板表面に存在する vWf をリガンドとした流動血小板上の GPIIb/IX が tethering に、そして GPIIb/IIIa がそれに引き続いた膠着に関与することを明らかにした。しかし、低血流条件下では vWf と共に GPIIb/IX のリガンドとして粘着血小板表面に表出した PS も関与する可能性が指摘できた。

そこで本研究では、血小板固定化基板を用いて血小板血栓形成のメカニズムを検討し、特に、抗 PS 抗体を用いて固定化血小板に発現する PS の関与を検討することを目的とした。

B. 方法

1. ADP 凝集

全血(1/10(v/v) 3.8%クエン酸ナトリウム)を遠心分離(600rpm, 15min)し、得られた platelet-rich plasma(PRP, $20\times 10^4/\mu\text{L}$)に抗 PS 抗体を添加し、ADP($3\mu\text{M}$)にて刺激した。

2. 流動状態下血小板接着評価法

2.1 循環血液の調製法

全血(PPACK, f.c. $40\mu\text{M}$)5mL に 3,3'-dihexyloxycarbocyanine(DiOC₆, f.c. $1\mu\text{M}$)を添加し、血小板を蛍光標識した(37°C, 10min)。また各抗体も同様に添加した。

2.2 再構成血液の調製法

全血(1/10(v/v) 3.8%クエン酸ナトリウム)を遠心分離(600rpm, 15min)し、PRP を除去後、同量の acid-citrate-dextrose(ACD)混合生理食塩水(10g/dL, ACD-saline)に分散させた。同操作を再度行った後、2 回遠心分離(2500rpm, 10min)してパフィーコート完全に除去した。最後に HEPES-Tyrode buffer(H-T buffer, pH7.4)にて再分散させ Hct.40%に調製した。

2.3 血小板固定化基板の調製法

PRP に ACD 溶液を混合し、prostaglandin E₁(PGE₁, f.c. $1\mu\text{M}$)を添加後、遠心分離(2500rpm, 7min)し、上清除去後、ringer-citrate-dextrose(RCD)溶液(PGE₁ $1\mu\text{M}$)で再分散させた。同条件で再度遠心分離した後、H-T buffer にて再分散させ洗浄血小板溶液($20\times 10^4/\mu\text{L}$)を調製した。さらに、コラーゲン固定化基板(ウシ腱, TypeI-A, f.c. $30\mu\text{g}/\text{mL}$, 4°C overnight で固相化)上に洗浄血小板分散液を展開し、

37°C、1時間静置し、H-T buffer で洗浄後使用した。

2.4 PS 固定化基板の調製法

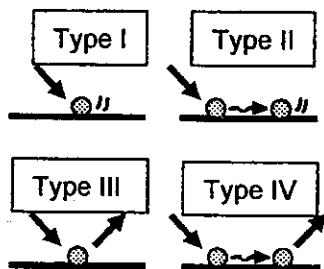
精製ヒトPS(久留米大 諸井将明博士より供与)をPBS(pH7.4, 4°C)に溶解させ、PS溶液(10 μ g/mL)を調製し、ガラス板(直径25mm)上に浸漬させた(4°C, 8h)。さらにBSA溶液(20mg/mL)にてブロッキングし、PBSで洗浄後使用した。

2.5 流動下での蛍光顕微鏡観察

37°Cの恒温槽内のフローチャンバー灌流部に蛍光顕微鏡(TE300, Nikon)を組み込んだ装置に、2.1で示した循環血液をポンプを用いて種々のずり速度にて流動させ、CCDカメラを通じて連続測定し、画像解析装置(Argus 50, 浜松ホトニクス)にて解析した。

粘着面積抑制率とは、非機能性抗体(S84F)の粘着面積を基準としたときの各抗体の抑制効果の割合を示す。

Type別接着挙動とは、流動開始から10秒間の血小板固定化基板に対する接着挙動を下図に示す4種類に分類し計測する。



3. 抗体

流動状態下での血小板血栓形成に関与する接着受容体を同定するために、以下のマウスモノクローナル抗体を使用した。

- ・抗ラット PS 抗体; S789G[機能性], S84F[非機能性] (JT 医薬探索研究所より供与)
- ・抗ヒト PS 抗体; WGA-1
- ・抗 vWf 抗体; NMC-4 (奈良医大 藤村吉博博士より供与)
- ・抗 GPIb/IX 抗体; GUR83-35
- ・抗 GPIIb/IIIa 抗体; YM207 (山之内製薬より供与)
- ・抗 PSGL-1 抗体; PL1 (Immunotech)

C. 結果

1. 血小板凝集に及ぼす抗 PS 抗体の影響

非機能性抗 PS 抗体(S84F)存在下と比較して、機能性抗 PS 抗体(S789G)存在下では2次凝集が明らかに抑制された(図1)。このことから、活性化血小板同士の接着にはPSが関与しているとのMertenら¹⁾の報告を確認すると共に、S789GがPSのこの機能を抑制することが分かった。

1) Merten et.al, *Circulation*, 102, 1931-6(2000)

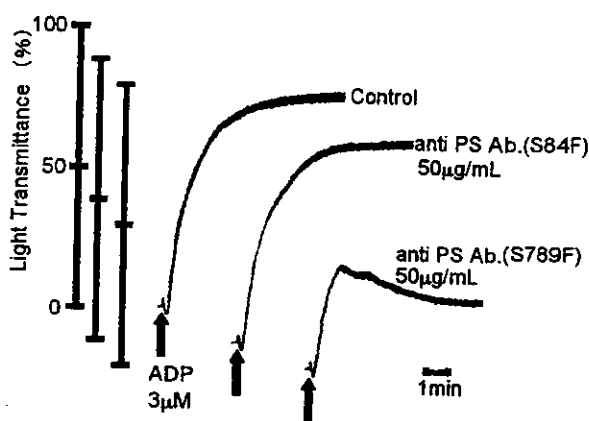


図1 抗 PS 抗体(S789G)の凝集抑制効果

2. 血小板固定化基板上における流動血小板の接着挙動に及ぼす抗 PS 抗体の影響

B-2.1で調製した血小板固定化基板にFITC標識された抗PS抗体を添加することで、基板表面に一樣なPSの発現が確認できた(図2)。

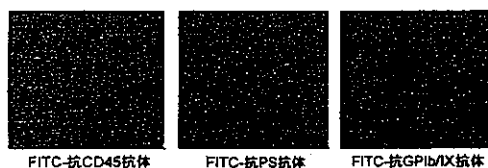


図2 血小板固定化基板上に発現したPS

そこで、血小板固定化基板上にずり速度 600s⁻¹にて全血を流動させたところ、機能性抗PS抗体(S789G)20 μ g/mL存在下では、非機能性抗PS抗体(S84F)と比較して、流動血小板の粘着が部分的ではあるが明らかに抑制された(図3)。

また、ずり速度の低下と共に、機能性抗PS抗体による血小板粘着抑制効果が増大した。しかし、高ずり速度条件下ではむしろ血小板粘着を増強させる結果が

得られた(図4)。

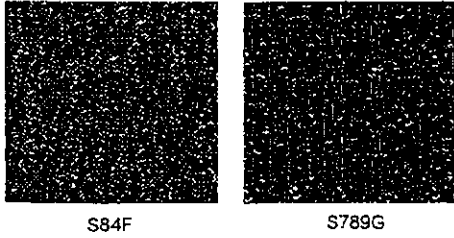


図3 流動状態下における抗PS抗体の粘着抑制効果(ずり速度 $600s^{-1}$, 80秒)

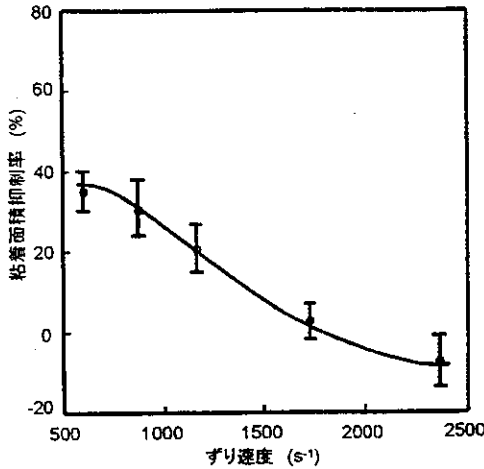


図4 ずり速度と抗PS抗体の粘着抑制効果(80秒, n=3)

次に、血小板固定化基板上に発現するPSのカウンター受容体として白血球膜上に多く存在するP-selectin glycoprotein ligand 1(PSGL-1)が知られているが、血小板膜上にも少量(白血球の1/25~1/100)ではあるが存在することが報告されている。そこで、抗PSGL-1抗体 $60\mu g/mL$ 存在下で低ずり速度($600s^{-1}$)にて全血を流動させたところ、血小板粘着は、Controlとほぼ変わらない結果が得られた(図5)。このことから、血小板膜上に存在するPSGL-1は血小板血栓形成には関与しない可能性が示唆された。

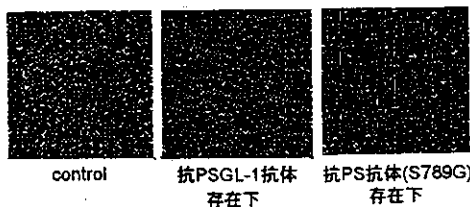


図5 血小板血栓形成におけるPSGL-1の影響(ずり速度 $600s^{-1}$, 80秒)

血小板固定化基板上のPSのカウンター受容体の候補として挙げられるGPIb/IXとPS、vWfとの3者の関係を知るために各抗体を用いて流動(ずり速度 $600s^{-1}$)させたところ、Controlと比較して、抗PS抗体、抗vWf抗体存在下では、血小板粘着が部分的に抑制され、抗GPIb/IX抗体はほぼ完全に粘着抑制することが確認できた(図6)。一方、高ずり速度条件下($2400s^{-1}$)では抗vWf抗体存在下では、抗GPIb/IX抗体存在下と同様に、ほぼ完全な粘着抑制が見られた(図7)。

また、各抗体添加時における粘着抑制率は、抗PS抗体、抗vWf抗体存在下では、それぞれ $36.7\pm 3.6\%$ 、 $50.3\pm 1.7\%$ であり、両者の存在下では $84.5\pm 2.2\%$ となり抑制効果は相加的となった。さらにその効果は、抗GPIb/IX抗体存在下での粘着抑制率 $90.5\pm 3.4\%$ に匹敵する結果が得られた(図8)。

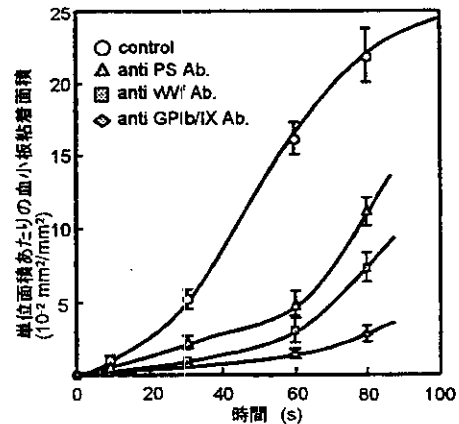


図6 血小板血栓形成におけるPS, vWf, GPIb/IXの関与(ずり速度 $600s^{-1}$, n=3)

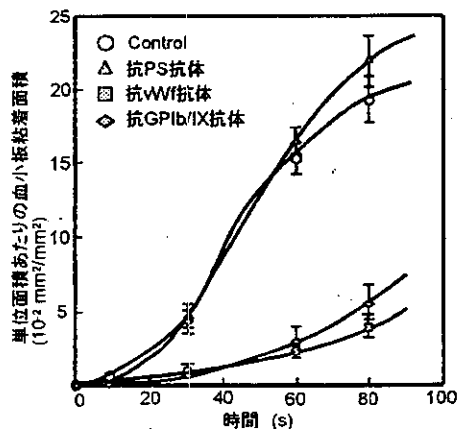


図7 血小板血栓形成におけるPS, vWf, GPIb/IXの関与(ずり速度 $2400s^{-1}$, n=3)

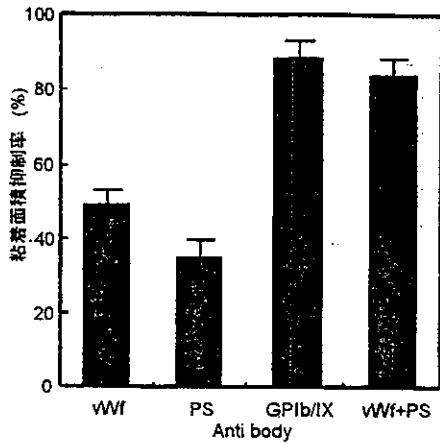


図8 抗PS, vWf, GPIb/IX抗体による粘着面積抑制率 (ずり速度 $600s^{-1}$, 80秒, $n=3$)

さらに、流動開始から10秒間の流動血小板の接着挙動をType別に分類しControlと比較したところ、抗PS抗体存在時では、基板に対して粘着するType I, IIが減少し、さらに基板に対し転がるType III, IVも減少した(図9左)。

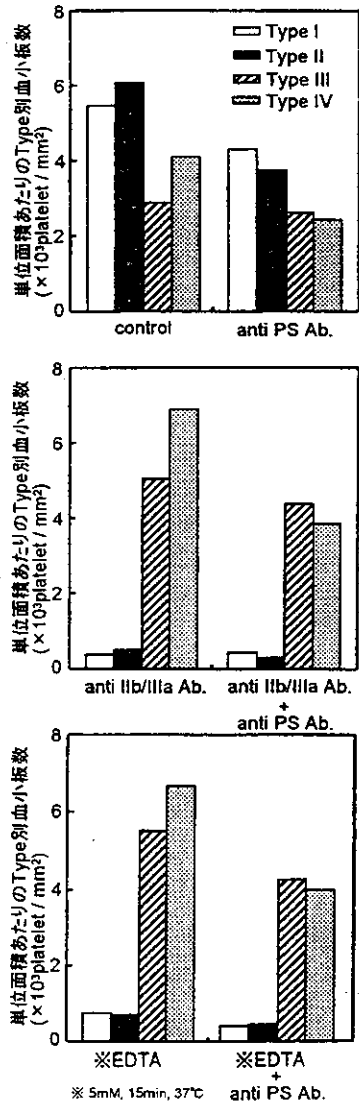


図9 流動血小板のType別接着挙動

また、抗GPIIb/IIIa抗体存在させた系、即ち基板に対する不可逆的接着を抑制した系に対し、抗PS抗体存在時では、Type III, IVの減少が見られた(図9中央)。さらに、EDTA存在時でも抗PS抗体によりType III, IVが減少した(図9右)。このことから、流動血小板側のGPIb/IXと基板側のPSとの相互作用は、可逆的接着である可能性が示唆される結果が得られた。

3. PS固定化基板における流動血小板、rGPIb α -latex beadの接着挙動

PS固定化基板上にずり速度 $600s^{-1}$ にて全血を流動させたところ、流動血小板は基板に対して可逆的接着(tethering, rolling)をし、抗GPIb/IX抗体存在時、あるいは抗PS抗体存在時ではこの接着は完全に抑制された(図10)。

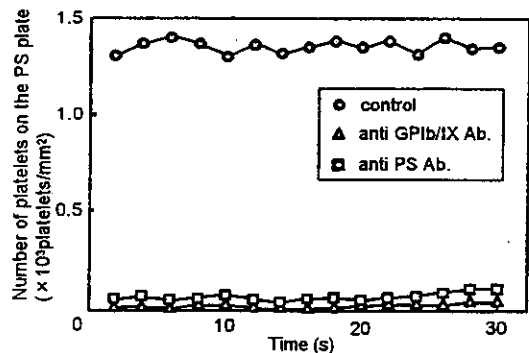
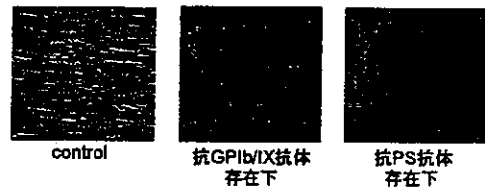


図10 PS基板上における流動血小板の接着挙動

さらにrGPIb α -latex beadを流動させたところ、PS基板に不可逆的接着(adhesion)し、流動血小板と同様に抗GPIb/IX抗体存在時、抗PS抗体存在時ではこの接着はほぼ完全に抑制された。

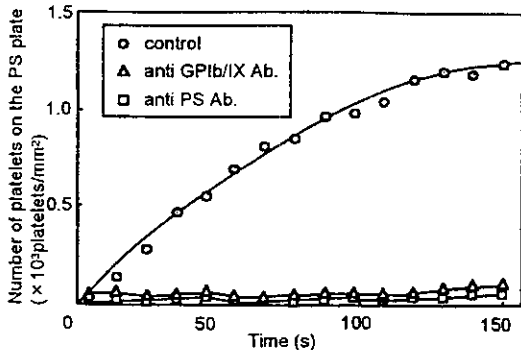


図 11 PS 基板上における rGPIIb/IIIa-latex bead の接着挙動(ずり速度 600s⁻¹)

D. 考察

実際の生体内での血小板血栓形成は、粘着して固相化した血小板を標的とした凝集現象が基本と考えられる。そこでこのような生体内環境をシュミレートした血小板固定化基板を作成し、固相化血小板(活性化血小板)に対する流動血小板の接着、即ち凝集を解析する系を確立してきた。そこで今回、この系を用いて活性化血小板に発現した PS と流動血小板の GPIIb/IIIa との相互作用を明らかにした。

PS は、血小板のα顆粒や血管内皮細胞の Weibel-Palade 小体の膜上に存在し、活性化に伴い細胞表面に表出する接着分子の1つである。vWf も活性化に伴って同膜上に発現し、血漿中にも存在する。ゆえに血小板固定化基板上には PS、vWf が発現しており、GPIIb/IIIa が活性化した状態であるといえる(データは示さず)。その結果、血小板血栓形成には、全血流条件下(600s⁻¹~2400s⁻¹)において流動血小板の GPIIb/IIIa が必須であり、活性化血小板上に発現するその標的分子は vWf と PS であり、特に高血流条件下では vWf が関与するという、さらに両者は GPIIb/IIIa のリガンドとして可逆的接着(tethering→rolling)を仲介することで相補的に役割を担う可能性が今回明らかとなった。

それでは、PS の血小板血栓形成における生物学的意義、即ち PS が血小板に多く存在し、血小板の活性化に伴い発現する理由を考える。

PS は

①血小板血栓形成に伴い、止血部位に凹凸が存在し始め、乱流が生じる。すなわち血栓部位の上流部分と下流部分によどみができ、極度な低ずり速度部位が生じる。一方、血栓横側部分では極度な高ずり速度部位が生じる(図 12)。このとき血栓上には vWf、PS が発現しており、流動血小板は GPIIb/IIIa と vWf との相互作用では補えない低ずり速度部位において、GPIIb/IIIa のリガンドとして PS が代替しているのではないのか？

②また、活性化した血小板同士の結合、すなわち血小板凝集の安定化の役割として活性化血小板上に発現した sulfatide と PS とが結合する (fbg を介した結合の補助)²⁾との Merten らの一連の報告があるが、今回の結果からはこの報告を支持する証拠は得られなかった。

2) Merten et al., *Circulation*, 104, 2955-60 (2001)

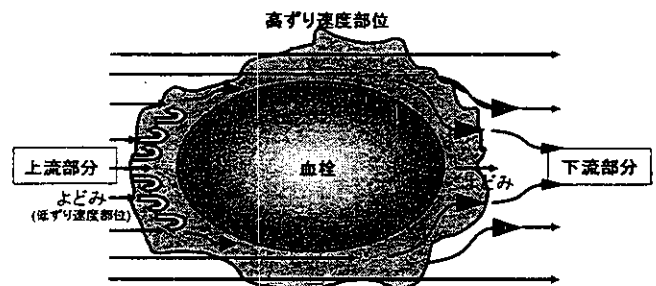


図 12 血栓形成に伴う血流の変化

E. 結論

1) 抗 PS 抗体により血小板固定化基板への血小板粘着が抑制されたことから、低血流状態下での血小板血栓形成における PS の関与が示唆された。

2) PS が活性化血小板上の標的分子となって、流動血小板が GPIIb/IIIa を介して可逆的接着をすることが明らかとなった。

3) 人工代替物の不可欠な機能として、残存している患者血小板をいかに止血局所に有効に誘導させ、血小板凝集塊を形成させるかである。この血小板人工代替物を設計するにあたり、全血流条件下で GPIb/IX は不可欠であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Oda A., Handa M. et al, CrkL is an adaptor for Wiskott-Aldrich syndrome protein and Syk. *Blood*, 97(9), 2633-2639 (2001)

2) Takeoka S., Handa M. et al, Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules*, 2(4), 1192-1197 (2001)

2. 学会発表

1)「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」、岡村陽介,半田 誠 他、第 8 回日本血液代替物学会、2001 年 9 月 4 日(東京)

2)「流動条件下での血小板血栓形成における P-selectin の役割」、岡村陽介,半田 誠 他、第 10 回 Vascular Biology Conference、2001 年 11 月 9 日(東京)

3)「流動状態下での血小板血栓形成における P-selectin の関与」、岡村陽介,半田 誠 他、第 24 回日本血栓止血学会学術集会、2001 年 11 月 21、22 日(京都)

G. 知的所有権の取得状況

なし

「止血能を有する蛋白質高分子量体の開発」

分担研究者 武岡 真司（早稲田大学 理工学部）

研究要旨

止血能を有する蛋白質高分子量体の候補である rGPIb α -アルブミン重合体は、流動下にて基板上に固定したフォンビルブランド因子(vWf)を認識後直ちに粘着した。この粘着は抗 rGPIb α モノクローナル抗体により抑制されたことから、rGPIb α -vWf 間の特異的相互作用による粘着であることを確認した。また、rGPIb α -ラテックスビーズや OsO₄ 固定化血小板でも同様に vWf 基板上へ粘着した。他方 rGPIb α -小胞体では、血小板と同様に vWf 基板へ粘着後流動方向に沿って基板上を転がり脱着する挙動が観察された。基板上での転がり速度は小胞体の膜流動性の増加に伴って低下し、vWf 基板上を移動している rGPIb α -小胞体の脱着は小胞体表面からの rGPIb α 結合脂質の脱離によることを確認した。

A. 目的

出血部位を認識する血小板膜糖蛋白質のリコンビナント体をリン脂質二分子膜小胞体あるいはアルブミン重合体(polyAlb)に結合させ、血小板代替物としての機能評価を進めている。本研究では、出血部位に粘着したフォンビルブランド因子(vWf)を認識する rGPIb α をこれらの担体に結合させ、流動下にて vWf 固定化基板との相互作用を解析し、血小板代替物としての機能評価を目的とした。

B. 方法

1. 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、三菱ウエルファーマ社製)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 μ L 加えて、pH10.65(23 $^{\circ}$ C)とした。80 $^{\circ}$ C にて 10 分間加熱して重合開始状態とし、23 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C)とした後、40 $^{\circ}$ 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。

2. rGPIb α -polyAlb の調製

polyAlb 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)にて未反応 SPDP と副生成物を除去して、PD-polyAlb([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、10.9mMSPDP 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-polyAlb 溶液([HSA]=9.0mg/mL)11mL と混合し、4 $^{\circ}$ C で振とう後 rGPIb α -polyAlb を得た。

3. rGPIb α -小胞体の調製

1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylchlorine(POPC)/1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DPPE)(10/1、モル比)、POPC/cholesterol /DPPE(5/5/1、モル比)、dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylchlorine(DPPC)/cholesterol/ DPPE(5/5/1、モル比)から構成される小胞体をそれぞれ小胞体 I、II

あるいは III とした。クロロホルム/メタノール混合溶液(8/1、体積比)中にて、DPPE (1.3×10^{-5} mol)と SPDP (2.0×10^{-5} mol)を室温にて 2 時間反応させた後、上述の脂質類を混合して乾燥薄膜とし、純水にて水和させた。押し出し法にて孔径 $1 \mu\text{m}$ のフィルターを透過させて、PD-小胞体 I、II、III (夫々 $1140 \pm 210 \text{nm}$ 、 $1120 \pm 250 \text{nm}$ 、 $1160 \pm 120 \text{nm}$) を得た。PD-小胞体分散液 (2mL、[lipid]= 74mM) に SH-rGPIb α を混合し、4°C、12 時間振とう後、遠心分離(12000g、10 分)にて未反応の rGPIb α を分離して rGPIb α -小胞体を調製した。

4. rGPIb α -ラテックスビーズの調製

FITC 標識ラテックスビーズ(粒径 $1 \mu\text{m}$ 、polyscience 社)を $5.0 \times 10^5/\mu\text{L}$ になるように PBS(pH7.4)に分散させ、終濃度で 0.5、5、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の rGPIb α と混合し、4°C で 12 時間静置した。12000g、10min (4°C) にて上清を洗浄後、50mg/mL BSA 溶液を混合した (23°C、1hr)。同条件にて遠心分離を行い、Hepes-Tyrode buffer (pH7.4、50mg/mL BSA)に再分散させた。

5. 四酸化オスミウム固定血小板の調製

PRP と ACD 溶液を混合し、血小板活性化抑制剤 prostaglandin E $_1$ (PGE $_1$ 、終濃度 1mM)を添加後、2200g で 7 分間遠心し、上清を除去後、RCD 溶液(1mM PGE $_1$)に再分散させた。同操作を繰り返した後、Hepes-Tyrode buffer で再分散し血小板数 $2.0 \times 10^5/\text{mL}$ の洗浄血小板溶液を調製した。1.5%四酸化オスミウム(OsO $_4$)を混合し、室温で 10 分間振とう後、遠心分離にて上清を洗浄、メバクリンを添加して流動下での測定を行なった。

6. rGPIb α の定量

polyAlb あるいは小胞体に結合している rGPIb α の定量は、GUR20-5 と HRP 結合 GUR83-35 を用いてサンドイッチ型 ELISA 法により行なった。

7. 再構成血液の調製方法

血液を ACD 溶液と体積比 10:1 で混合、

100g で 15 分間遠心分離して、PRP を除去し、同量の ACD 混合生理食塩水(10g/dL、ACD-saline)に分散させた。同操作を再度行なった後、2200g で 10 分間遠心し、ACD-saline に再分散後、同操作を行ないパフイーコート完全に除去した。Hct70.7%、血小板数 $1.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ の再構成血液を調製した。循環用再構成血液は Hct40%に調整して使用した。

8. vWf 基板の調製方法

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vWf 溶液 (PBS、pH7.3) にガラス基板を 5°C、8 時間浸漬させた後、2.0g/dLBSA 溶液に 2 時間浸漬させ、PBS で洗浄してから使用した。

9. 流動下での蛍光顕微鏡観察

FITC 標識した試料を再構成血液 5mL と混合後、37°C にて 10 分間静置し、CCD カメラを設置した蛍光顕微鏡を用いて観察した。

C. 結果及び考察

本実験では血小板の大きさに近づけた $1025 \pm 250 \text{nm}$ の polyAlb を調製した。SPDP を用いて、polyAlb に rGPIb α を結合させた。他方、同様に SPDP を用いて rGPIb α -小胞体を得た。polyAlb あるいは小胞体に対する rGPIb α 結合量は、血小板表面の GPIb α 結合密度とほぼ等しく、1 粒子当たり 6.0×10^3 分子であった。

また、polyAlb、小胞体ラテックスビーズ、血小板の濃度を $1.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ に統一した。rGPIb α -polyAlb は、ずり速度 2400 s^{-1} の流動下において vWf 基板へ粘着し、粘着後は解離することなく vWf 基板上に集積した(Fig. 1)。抗 GPIb α モノクローナル抗体(GUR83-35)の添加により、rGPIb α -polyAlb の粘着が抑制されたことから、GPIb α -vWf 間の特異的相互作用による粘着であることを確認した。また、polyAlb 自体の vWf 基板への粘着は認められなかった。

ずり速度の増加($800 \text{ s}^{-1} \rightarrow 2400 \text{ s}^{-1}$)と共に、vWf 基板への GPIb α -polyAlb 粘着数が増大したことから、ずり応力による vWf 高次構造変化に起因した強固な粘着

であることを確認した(Fig. 2)。

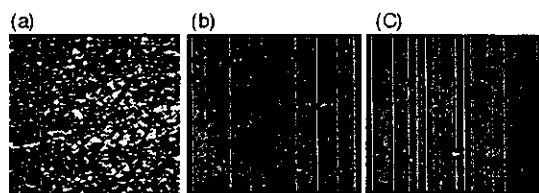


Figure 1. The observation of the attachment of (a) rGPIb α -polyAlb, (b) rGPIb α -polyAlb + GUR83-35, (c) polyAlb to the vWf surface at the shear rate of 2400 s $^{-1}$ with fluorescence microscopy.

rGPIb α -ラテックスビーズ、あるいは OsO $_4$ により細胞膜を固定した血小板も rGPIb α -polyAlb と同様に、vWf 基板への粘着する挙動が観察された。vWf 基板への粘着数は、rGPIb α -polyAlb、rGPIb α -ラテックスビーズあるいは OsO $_4$ 処理血小板では、それぞれ 85、20、14 粒子 \cdot mm $^{-2}$ \cdot s $^{-1}$ であった(Fig. 3)。粘着数の相違は、担体の形状や粘弾性、あるいは血小板膜上に存在する GPIb α とリコンビナント体の vWf との親和性の相違によるものと考察される。

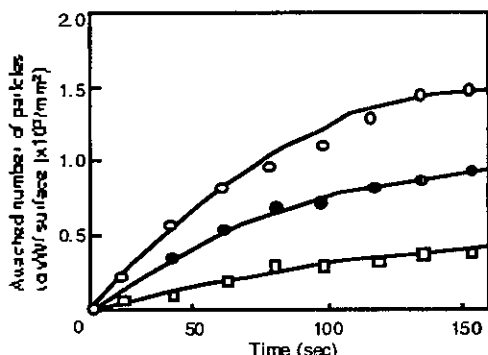


Figure 2. The number of rGPIb α -polyAlb attached to the vWf surface at various shear rates. (○) 2400 s $^{-1}$, (●) 1600 s $^{-1}$, and (□) 800 s $^{-1}$.

他方 rGPIb α -小胞体では、vWf 基板へ粘着後、流動方向に沿って基板上を転がる挙動が観察された(Fig. 4)。これは、固定化していない通常の血小板と類似の挙動であった。

疎水性蛍光プローブである 1、6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH) から膜流動性を反映する蛍光異方性を求めたところ、小胞体 I、II、III ではそれぞれ 0.08、0.19、0.25 であり、小胞体 III > 小胞体

II > 小胞体 I の順に膜流動性が低下した。

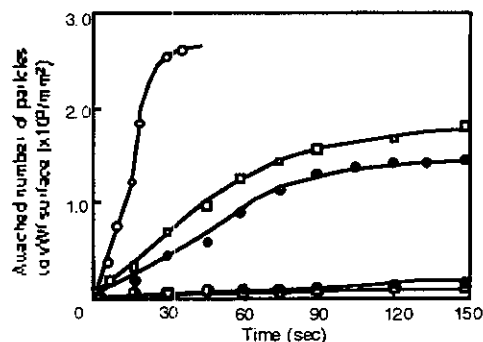


Figure 3. The attached number of rGPIb α conjugates to vWf surface under shear rate of 2400 s $^{-1}$. ○ : OsO $_4$ -treated platelet, □ : rGPIb α -latex bead, ● : rGPIb α -polyAlb, ○ : polyAlb, ○ : rGPIb α -polyAlb + GUR83-35.

ところが、予測に反して移動速度はこの順に増加した (Table 1)。小胞体膜流動性の低下により移動速度は上昇した理由として、膜流動性が高い小胞体は基板へ粘着した際の変形が起こり易く扁平につぶれたまま移動するため接触面積も大きく移動速度は小さいが、膜流動

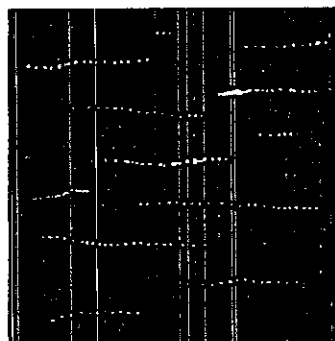


Figure 4. The observation of the attachment of rGPIb α -vesicle II to the vWf surface at the shear rate of 2400 s $^{-1}$ with fluorescence microscopy. This picture was taken after 300 s, and (b) was superimposed of pictures for 3 s taken at every 1/6 s.

性の低い小胞体は球形のまま移動するので、移動速度は大きいものと考えられる。

Table 1. Rolling properties of rGPIb α -vesicles on the vWf surface.

Vesicle ^a	Diameter (nm)	Rolling velocity (μ m/sec)	Rolling length (μ m)	Release ratio of rGPIb α -lipid (%)
I	1140 + 210	15 + 2.2	25 + 7.5	41
II	1120 + 250	28 + 3.8	39 + 14	25
III	1160 + 120	65 + 2.2	210 + 67	6

^aI:POPC/DPPE=10/1, II:POPC/cholesterol/DPPE=5/5/1, III:DPPE/cholesterol/DPPE=5/5/1 (by mol)

また Table 1 に示すように、rGPIb α -小胞体 I、II、あるいは III では、vWf 基板上に粘着し、それぞれ 25 \pm 7.5、39 \pm 14、210 \pm 67 μ m の平均距離を移動した後、基板から脱着する挙動が観察された。血小板は vWf 基板上に粘着すると解離することなく転がる。rGPIb α -小胞体 I、II、あるいは III を vWf 基板上に 30 分間流動させた後、小胞体に結合している rGPIb α を定量して流動前と比較すると、結合量がそれぞれ 45、35、10%減少していた。BSA 固相化基板に対して、rGPIb α -小胞体を流動させた系では、13、11、4%減少していたことから、vWf 基板への粘着の際に脱離した rGPIb α 結合脂質は、それぞれ 32、24、6%の計算となる。また、流動後の vWf 基板に対して FITC 標識した GUR83-35 を添加し蛍光顕微鏡で観察すると、基板が FITC 染色されていることを確認した。これは、小胞体から脱離した rGPIb α 結合脂質の vWf 基板上への存在を示す証拠である。また、小胞体 I、II あるいは III からの rGPIb α 結合脂質の脱離率は、小胞体の疎水性相互作用の増加に伴い (小胞体 I<II<III) 低下していることから、基板からの小胞体の解離は、小胞体から rGPIb α 結合脂質の脱離に起因することを支持している。

D. 結論

流動下において、rGPIb α -polyAlb は vWf 基板を認識して粘着するが、rGPIb α -小胞体は基板上を転がる。従って、rGPIb α を認識蛋白質として利用した場合、polyAlb では生体内における出血部位への集積が可能となり血小板の止血補助が期待できる。小胞体の利用系では、rGPIb α の他に GPIIb/IIIa などとの併用が必要と思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) "Fibrinogen-conjugated Albumin Polymers and their Interaction with Platelet under Flow Conditions. *Biomacromolecules*, 2, 1192-1197, (2001)

2. 学会発表

1) 「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).

2) 「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).

3) 「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)

4) 「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)

5) 「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)

6) 「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)

7) "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 日 (東京).

8) "Comparison between Albumin Polymers and Phospholipid Vesicles as Carriers for GPIb α ", The 7th Meeting on Thrombosis and Rheology, 2002 年 3 月 16 日 (東京).

G. 知的所有権の取得状況
特に無し

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 —止血過程における人工血小板の超微構造解析—

分担研究者 東京都臨床医学総合研究所 鈴木英紀 研究員

研究要旨：人工血小板の担体として実用性が高いと思われるアルブミン重合体(AMS)の表面に GPIa/IIa を標識した人工血小板を使い、これの固相化コラーゲンに対する粘着時の挙動を電子顕微鏡（電顕）で観察した。対照には電顕的に識別が容易なラテックスを使用した。本 AMS は GPIa/IIa 標識ラテックスと同様に、単独でもカバースリップ上に固相化した繊維性コラーゲンに接着した。また、本 AMS と低濃度 (1×10^4 個)の血小板混合時でも、血小板と AMS はそれぞれコラーゲン繊維に粘着した。しかし、両者が混在する凝集はむしろ少なかった。すなわち、GPIa/IIa 標識 AMS はコラーゲン繊維に対して血小板と同様に粘着するという挙動を示すことから、血小板の代潜物として有効であることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、人工血小板の担体として最も実用性が高いと思われるアルブミン重合体(AMS)に GPIa/IIa を標識し、これの *in vitro* の実験系、特に固相化コラーゲンに対する粘着時の挙動を電子顕微鏡（電顕）的に把握し、最適な人工血小板作成の理論的根拠を得ることを目的とする。

B. 研究方法

1) GPIa/IIa 標識ラテックスまたは AMS のコラーゲンに対する粘着

カバースリップに固相化したコラーゲンは前もって準備した。すなわち、Holm 社コラーゲン (Type I) を 10 mM 酢酸で $5 \mu\text{g/ml}$ に希釈し、これをシャーレに並べたカバースリップ上に重層し、 4°C で一昼夜静置した。カバースリップを PBS で洗浄後、1% BSA で 2 時間ブロッキングし、コラーゲン固相化カバースリップを得た。

このカバースリップにコントロールラテックス (5×10^4 個/ μl) または AMS ($50 \mu\text{g/ml}$)、GPIa/IIa 標識ラテックス (コントロールと同数) または AMS (コントロールと同量) を $100 \mu\text{l}$ 載せ、 37°C で 60 分間インキュベイトした。コラーゲンに未反応のラテックスまたは AMS を PBS で 3 回洗浄後、0.1M リン酸緩衝の 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。

四酸化オスミウムによる後固定はすることなしに、エタノールで脱水、*t*-ブチルアルコールに置換、凍結乾燥、金属コーティングして走査型電顕 (日立 S4500) で観察した。

2) 血小板との混在時の GPIa/IIa 標識ラテックスまたは AMS のコラーゲンに対する粘着

健康成人ボランティアから採血した血液を遠心して得た多血小板血漿を PGE₁ を含む HEPES-Tyrode 液で 2 回遠心、洗浄し、最終的に PGE₁ を含まない同液に血小板数を 1×10^4 個/ μl に調整して浮遊させた。この血小板浮遊液にコントロールラテックス (5×10^4 個/ μl) または AMS ($50 \mu\text{g/ml}$)、GPIa/IIa 標識ラテックス (コントロールと同数) または AMS (コントロールと同量) を添加、混合し、1) と同様にコラーゲン固相化カバースリップに載せ、 37°C で 60 分間インキュベイトした。以下、同様に試料を作製し、走査型電顕で観察した。

3) GPIb 標識 AMS の免疫電顕法による観察

GPIb 標識 AMS (0.7mg/ml) $100 \mu\text{l}$ に PBS で希釈したマウス抗 GPIb モノクローナル抗体 (SZ2, $2 \mu\text{g/ml}$) 1ml を加え、室温で 60 分間インキュベイトした。これを PBS で洗浄後、さらに金粒子 (15nm) 標識抗マウス IgG で同様に 60 分間インキュベイトした。次いで、4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定後、蒸留水で水洗、または未固定のまま水洗し

た後、0.22 μm の孔をもつミリポアフィルターを通して AMS をフィルターにトラップさせた。フィルターから余分な水分を吸い取って秤量瓶に入れ、液体窒素で凍結し、 -80°C で 30 分間保存後、 -50°C で 30 分から 1 時間凍結乾燥した。以下、1) と同様に金属コーティングして走査型電顕で観察した。

C. 研究結果

1) GPIIb/IIIa 標識ラテックスまたは AMS のコラーゲンに対する粘着

ラテックス粒子は直径 $1\mu\text{m}$ の球形として走査型電顕下で観察され、識別は容易であった。コントロールの GPIIb/IIIa 未標識ラテックスは、コラーゲン繊維にはほとんど接着することなく、繊維以外の場所に存在した (図1)。一方、GPIIb/IIIa 標識ラテックスはコラーゲン繊維に粘着し、繊維に沿って並ぶ所見も観察された (図2)。

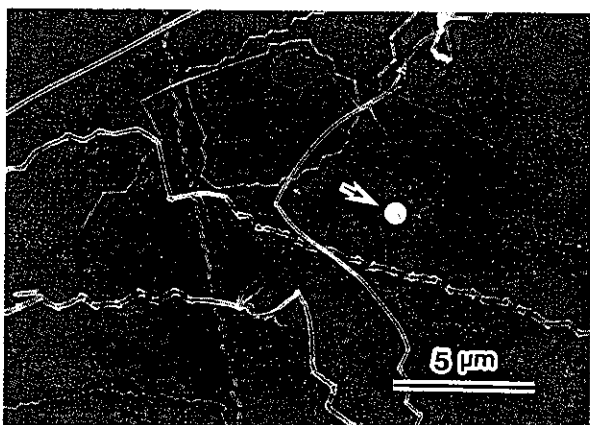


図1. コントロールラテックスのコラーゲンへの接着
ラテックス粒子 (矢印) は、ほとんどコラーゲン繊維に粘着しない。

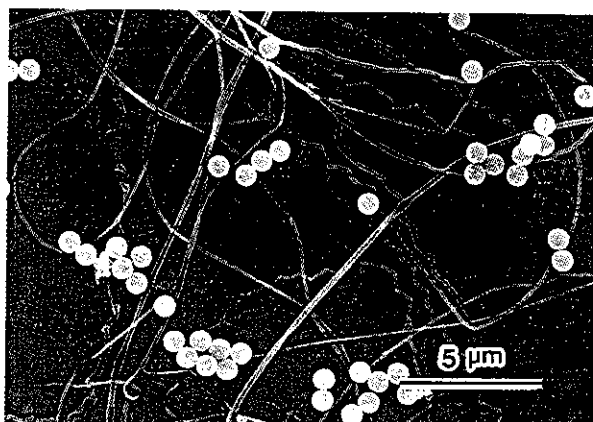


図2. GPIIb/IIIa ラテックスのコラーゲンへの接着
コラーゲン繊維上に多数のラテックス粒子が粘着している。

他方、AMS はパラホルムアルデヒドで固定すると単独の粒子状には観察されず、不定型な微粒子の集合体様に観察された。コントロールの GPIIb/IIIa 未標識 AMS は直径 $2\sim 3\mu\text{m}$ またはそれ以上の微粒子の集合体として観察され、コントロールラテックスと同様にコラーゲン繊維には associate せず、繊維以外の場所に存在した (図3)。GPIIb/IIIa 標識 AMS はコントロールのものに比べて大きな微粒子の集合体として観察され、コラーゲン繊維に絡まるように粘着していた。

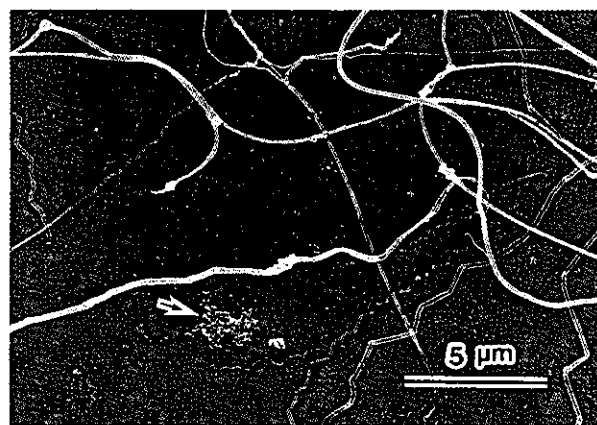


図3. コントロールAMSのコラーゲンへの接着
AMS (矢印) は、ほとんどコラーゲン繊維に粘着しない。

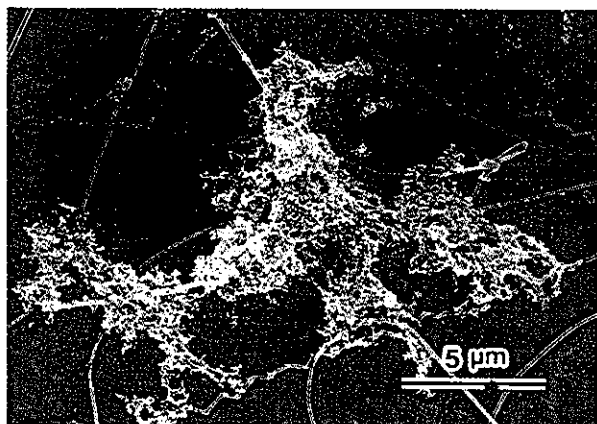


図4. GPIIb/IIIa 標識AMSのコラーゲンへの接着
コラーゲン繊維上に多数の微粒子上のAMSが粘着している。

2) 血小板との混在時の GPIIb/IIIa 標識ラテックスまたはAMSのコラーゲンに対する粘着

1×10^4 個/ μl の血小板と GPIIb/IIIa 標識ラテックスを混合し、固相化コラーゲンに重層して 37°C で 60 分間インキュベートした時、血小板はコラーゲン繊維の上で扁平に変形し、伸展している所見を示した (図5)。しかし、ラテックス粒子は血小板と異なる

場所でコラーゲン繊維状に粘着しており、血小板とラテックス粒子の凝集はむしろ少なかった。同様に血小板と GPIa/IIa 標識 AMS を混合し、これを固相化コラーゲンとインキュベートした時、扁平に変形した血小板のコラーゲンへの粘着と AMS のそれは相互に別々な場所で観察され、血小板と AMS の凝集は非常にまれであった (図6)。

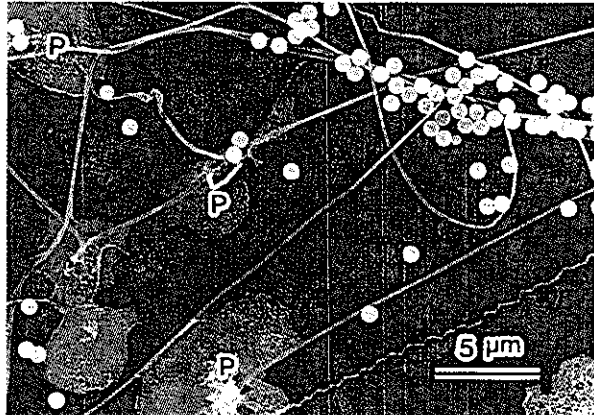


図 5. 混在している血小板と GPIa/IIa 標識ラテックスのコラーゲンへの粘着

血小板(P)はコラーゲン繊維状で扁平に伸展している。ラテックス粒子は血小板が粘着している場所から離れて粘着している。

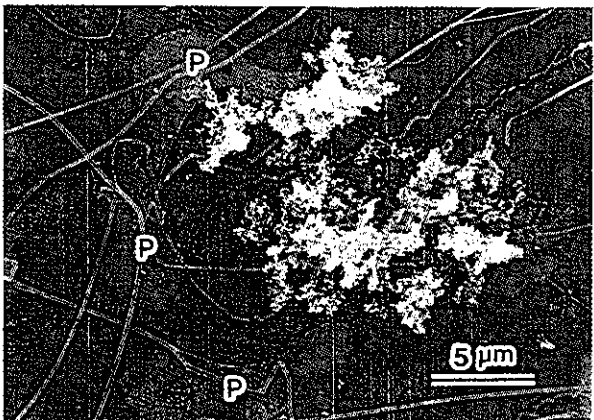


図 6. 混在している血小板と GPIa/IIa 標識 AMS のコラーゲンへの粘着

血小板(P)と AMS は別々にコラーゲンに粘着し、相互の凝集はほとんど見られない。

3) GPIIb 標識 AMS の免疫電顕法による観察

本 AMS を抗 GPIIb 抗体および金粒子標識二次抗体でインキュベートし、固定することなしにミリポアフィルターにトラップさせた後、凍結乾燥して走査型電顕で観察すると、フィルター突起との識別は難しいものの、直径2μm 前後の粒子が2~3個またはそれ以上の塊状として観察された (図 7)。本粒子表面上には GPIIb の存在を示す金粒子が分布した。一方、

免疫反応後にパラホルムアルデヒドで固定し、以下同様に処理して観察した GPIIb 標識 AMS は、粒子状を示さずシート状に観察された (図 8)。本構造の表面上にも GPIIb が検出された。

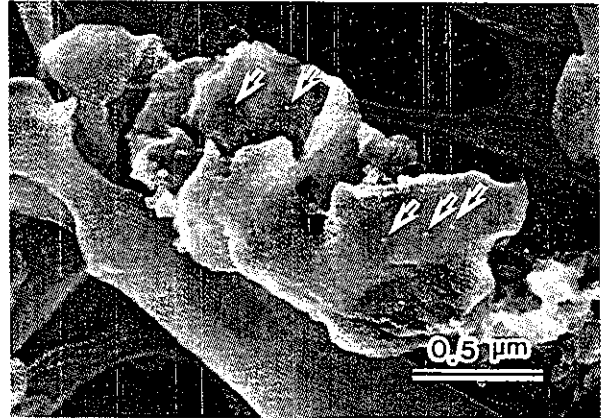


図 7. 未固定 GPIIb 標識 AMS における GPIIb の分布
AMS はフィルター上で2~3個の粒子から成る塊を形成している。粒子の表面上には金粒子が存在する (矢印)。

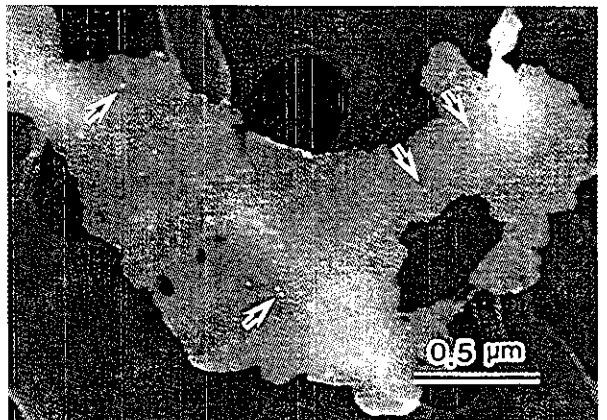


図 8. 固定 GPIIb 標識 AMS における GPIIb の分布
金粒子 (矢印) が存在する AMS は、粒子状ではなくシート状に観察される。

D. 考察

固相化コラーゲンに対する in vitro の粘着実験系で、GPIa/IIa 標識ラテックスおよび AMS はほぼ同じ挙動を示し、コラーゲン繊維上に接着した。この反応はラテックスおよび AMS 上に標識されている GPIa/IIa とコラーゲンとの結合に起因しており、担体としてのラテックスおよび AMS 表面への GPIa/IIa の標識が上手くいっていることを示唆している。さらに、GPIa/IIa 標識ラテックスおよび AMS のコラーゲンに対する粘着形態は、血小板のものと極めて良く相似していることから、人工血小板としての GPIa/IIa 標識ラテックスおよび AMS は非常に有望と考えられる。しかし、血小板と GPIa/IIa 標識ラテ

ックスまたは AMS を混ぜ、固相化コラーゲンに反応させた時、コラーゲン繊維上で血小板とこれらの人工血小板の凝集が観察されることはまれであった。昨年度報告した GPIb および GPIa/IIa 標識リポソームを使った流動下における粘着実験、またはコラーゲン刺激の凝集実験では、血小板とリポソームとの凝集が観察された。これらの実験系では、流動による shear stress または攪拌下のコラーゲンによって十分に活性化した血小板の α 顆粒から von Willebrand 因子が放出され、これが血小板およびリポソーム上に発現している GPIb を架橋することによって相互に凝集したと考えられた。今回使用したラテックスおよび AMS は、GPIa/IIa のみが標識されていることから、血小板とこれらの凝集は起こらないと理解される。

AMS を電顕用の固定することなしに、凍結乾燥して観察すると、AMS は 2～3 個またはそれ以上の塊を形成していたが、粒状に観察された。この結果はすでに武岡らが報告している AMS の形態にほぼ一致した。しかし、パラホルムアルデヒドで固定すると、シート状に変形した。すなわち、AMS は固定によってその形態が影響されることが判明した。しかしながら、血小板を使った検討または今後実施予定の生体を使った in vivo での電顕的検討では、固定は不可欠であることから、固定による AMS の変形を理解した上で、検討を進めざる得ないとする。

E. 結論

人工血小板として最も有望とされる担体の AMS は、その表面に GPIa/IIa を標識された時、カバースリップ上に固相化した繊維性コラーゲンに接着した。また、本 AMS と低濃度 (1×10^4 個) の血小板混合時でも、血小板と AMS はそれぞれコラーゲン繊維に粘着した。しかし、両者が混在する凝集はむしろ少なかった。すなわち、GPIa/IIa 標識 AMS はコラーゲン繊維に対して血小板と同様に挙動することから、血小板の代潜物として有効であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の「出願・登録状況」 なし

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

人工血液開発研究分野

「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」

— 止血能を有するリポソームの流動状態下での機能解析 —

分担研究者：後藤信哉 東海大学医学部循環器内科 講師

研究要旨：生体内に投与した人工血小板は、血管損傷部位に集積して自ら止血を助ける機能を有するとともに、人工血小板自体が、本来の血小板血栓の形成を抑制しない性質を有する必要がある。われわれは、実際の血管損傷部位での血小板血栓形成のモデルとして、損傷血管壁で血流に暴露される血栓性成分であるコラーゲンを固相化した表面上に血液を灌流し、形成される人工血小板による、血小板による血栓の3次元成長過程を描出するシステムを開発した。本システムを用いてアルブミン重合体による人工血小板が、血小板血栓の3次元成長過程に全く影響を与えないこと、血小板膜糖蛋白であるGP Ibaを発現したアルブミン重合体は、血管損傷壁表面に結合して血栓形成を惹起しやすいことを示した

A. 研究目的

人工血小板開発研究において、血小板表面上に存在する接着蛋白受容体であるGP Iba, GP Ia/IIa、アルブミン重合体、リポソームなどの表面に発現させることにより、血流条件下で血管壁の損傷部位に集積する性質を有する粒子を開発できることが示された。現実的に人工血小板として人体に投与するためには、1) これらの人工血小板が、血小板の血栓形成を抑制しないこと、2) 人工血小板が単に血管壁に接着するのみならず、3次元

的に十分な大きさに成長して止血に関与し得ることを、示す必要がある。われわれは、高速レーザー共焦点顕微鏡を用いた血栓評価システムにより、人工血小板による血小板血栓への影響、人工血小板自体による3次元血栓成長の可能性の評価を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

健康成人より血液を採取し、選択的抗トロンビン薬であるアルガトロバンにより抗凝固処理を行った。倫

理上の問題を惹起しないため、供血者から書面によるインフォームドコンセントを行った。

採取した血液から多血小板血漿を分離した。血小板を分離した血漿を戻して、血小板が減少した再構成血液を作成した。再構成液中に、蛍光標識した各種アルブミン重合体を添加してコラーゲン表面、von Willebrand 因子表面上を灌流し、血栓の 3 次元成長をレーザー共焦点顕微鏡システムで検討した。

血小板数を減少させない血液を用いて、蛍光標識した血小板の作る血小板血栓に対する各種アルブミン重合体の抑制効果の有無を検討した。

C. 研究結果

蛍光標識したアルブミン重合体は、コラーゲン上、von Willebrand 因子上に強固に結合した。結合したアルブミン重合体は血流方向に進展した。von Willebrand 因子表面上では、GP Iba α を発現したアルブミン重合体は相対的に多く結合した。Fibrinogen を発現した人工血小板は、表面上には結合しなかったものの、表面に結合した血小板周囲に固着した。

アルブミン重合体は、発現している蛋白の種類、有無にかかわらず血小板血栓の形成に対する抑制効果を有さなかった。

D. 考察

アルブミン重合体による人工血小板は、血管壁の損傷部位を認識し、速やかに結合する性質を有した。血管壁が損傷された時に血流に暴露される成分であるコラーゲンへの結合よりも、コラーゲンなどの蛋白に吸着する血漿蛋白である von Willebrand 因子との結合が、発現した蛋白の影響を強く受けた。血管損傷部位への集積効率を上昇させるためには GP Iba α を発現されることの意義が大きいと考えた。

いずれの膜蛋白を結合させた状態でもアルブミン重合体は血小板の血栓形成を全く抑制しなかった。フィブリノーゲンを結合させたアルブミン重合体は、血小板周囲に集積する傾向を有したため、血小板血栓を増幅する効果が期待できる。

E. 結論

- 1) アルブミン重合体を用いた人工血小板は、血管壁の損傷部位に集積する性質を有した。
- 2) アルブミン重合体による人工血小板は、血小板による血栓形成を抑制しなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表。

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

2. 学会発表

- 1) 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

- 2) 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

- 3) 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

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

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）