

Table 5 Enhancement of platelet aggregation of H12-PEG(PEG)vesicles under flow conditions.

Samples	SC of platelets (%)
PEG小胞体	9.6±0.9
H12-PEG小胞体	15.0±5.0
H12-PEG(PEG)小胞体	17.3±1.9

そこで、H12-PEG の修飾率の異なる H12-PEG(PEG)小胞体を同条件にて基板上を流動させた(Fig. 6)。H12-PEG 脂質修飾率 0.1mol%以下では血小板粘着占有率が PEG 小胞体とほぼ同等であり、修飾率 0.3mol%以上でその効果が顕著であった。これは、コラーゲンにて活性化した血小板への H12-PEG(PEG)小胞体の粘着数が H12-PEG 脂質の修飾量に伴って増加したためと考えられた。以上より、出血部位において H12-PEG(PEG)小胞体は血小板凝集を補強する効果があると考えられた。

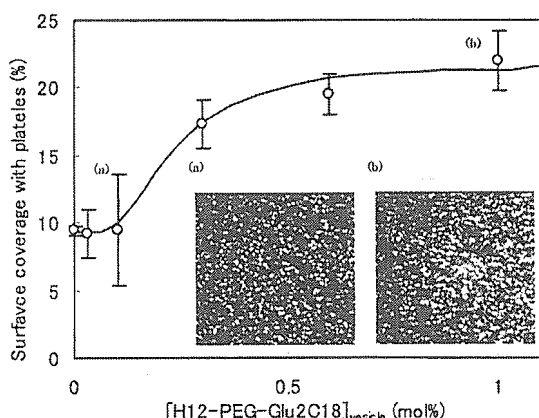


Fig. 6 Surface coverage of platelets vesicles in the thrombocytopenic-imitated blood containing H12-PEG(PEG)vesicles. (a) [H12-PEG-Glu2C18]=0.1 mol%, (b) 1.0mol%.

現在 in vivo での止血効果を検討中であり、H12-polyAlb との比較により担体の相違による止血効果を検討する予定である。

D. 結論

1) H12-polyAlb は、血小板凝集を促進させる微粒子であることを流動下にて確認した。さらに、血小板減少症モデルラットに投与したところ、尾先端切断部位からの出血時間を短縮させることを明らかにした。

2) H12-PEG(PEG)小胞体は血小板凝集を補

強させることを流動下にて確認した。また、H12-PEG 脂質修飾量の増大と共にその効果は顕著に増大し、0.3 mol%以上で充分であった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Teramura, Y., Okamura, Y., Takeoka, S., Kainoh, M., Tsuchiyama, H., Narumi, H., Handa, M., Ikeda, Y. and Tsuchida, E. Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 256-260 (2003).

2) Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y., Watanabe, N., Suzuki, H., Tsuchida, E., Handa, M., and Ikeda, Y. Function of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 773-779 (2003).

3) Okamura, Y., Teramura, Y., Takeoka, S., Tsuchida, E., Suzuki, H., Watanabe, N., Handa, M., and Ikeda, Y. Development of fibrinogen γ chain dodecapeptide-conjugated particles, *Artificial Blood* **11**, 205-210 (2003).

4) 武岡真司, 岡村陽介, 土田英俊, 池田康夫 「血小板代替物の担体設計から Drug Local Delivery の可能性」, *血栓止血誌*, **15** (1), 21-26 (2004).

5) 武岡真司, 岡村陽介 「止血機能を有する微粒子系の設計と機能評価」, *日本心臓血管麻酔学会誌*, 印刷中 (2004).

2. 学会発表

(1) 「活性化血小板認識オリゴペプチド微粒子の機能評価」, 第 52 回高分子学会年次大会, 2003 年 5 月 30 日 (名古屋).

(2) "Recognition properties of polymerized albumin particles and phospholipids vesicles bearing recognition proteins", 7th International Symposium on Polymer for Advanced Technologies, 2003.9.23.

(Florida).

(3) 「血小板代替物の研究展開:2 ずり速度の違いに対応できる微粒子系の設計」, 第 52 回高分子討論会, 2003 年 9 月 26 日 (山口).

(4) 「血小板代替物の研究展開:1 分子集合系と重合系の粒子による機能の相違」, 第 52 回高分子討論会, 2003 年 9 月 26 日 (山口).

(5) 「止血能を有する微粒子系の設計と機能評価」, 第 8 回日本心臓血管麻酔学会学術集会, 2003 年 9 月 27 日 (奈良).

(6) 「活性化血小板認識オリゴペプチド微粒子の機能評価」, 第 41 回日本人工臓器学会大会, 2003 年 10 月 31 日 (仙台).

(7) 「ドデカペプチド担持リン脂質小胞体の血小板認識能評価」, 第 41 回日本人工臓器学会大会, 2003 年 10 月 31 日 (仙台).

(8) 「血小板代替物の設計と *in vitro*, *in vivo* 評価」, 第 41 回日本人工臓器学会大会, 2003 年 11 月 1 日 (仙台).

(9) 「活性化血小板認識オリゴペプチド微粒子の機能評価」, 第 26 回日本血栓止血学会学術集会, 2003 年 11 月 29 日 (東京).

(10) 「高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果」, 第 84 回日本化学会春季年会, 2004 年 3 月 27 日 (神戸).

(11) 「ドデカペプチド(H12)結合小胞体による血小板凝集作用」, 第 84 回日本化学会春季年会, 2004 年 3 月 27 日 (神戸).

H. 知的所有権の出願・登録

ペプチド結合体 特願 2003-029847.

認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の超微構造的解析

-凝集系における効果と挙動に関する形態学的検討-

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：本研究では、人工血小板としての認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体作成の最適な理論的根拠を得るための一環として、電子顕微鏡（電顕）を使った超微形態学的検討を行った。今回、rGPIIb α またはフィブリノゲン γ 鎖C末端のドデカペプチド(H12)を結合したPEG化リポソーム、同じくH12を結合させたアルブミン重合体の超微形態を観察するとともに、凝集系における挙動について検討した。GPIIb結合リポソーム、H12結合リポソームおよびH12結合アルブミンはいずれも0.2-0.4 μ mの粒子として観察され、特にリポソームは脂質二重層の構造が識別された。ヒト多血小板血漿（PRP）にH12結合リポソームまたはH12結合アルブミンを添加し、ADPで刺激すると、コントロールに比較すると両者ともに凝集を促進させた。電顕観察では、血小板相互の接着が強固になり、放出反応まで惹起する所見を示した。すなわち、今回の凝集実験系において、H12結合リポソームおよびH12結合アルブミンは人工血小板として有効に機能す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認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の電子顕微鏡（電顕）レベルの形態を明らかにするとともに、これらの凝集系に対する効果および挙動を微細形態的に把握し、最適な人工血小板作製の理論的根拠を得ることを目的とする。

B. 研究方法

1) GPIIbまたはH12結合PEG化リポソーム、H12結合アルブミン重合体の電顕観察

rGPIIb α 結合PEG化リポソーム（以下GPIIb-リポソーム、総脂質重量10mg/ml）、H12結合PEG化リポソーム（以下H12-リポソーム、同10mg/ml）またはH12結合アルブミン重合体（以下H12-アルブミン、rHSA重量10mg/ml）を約30℃に暖めた10%ゼラチンと等量に混合し、これらをパラフィン板上に滴下し、4℃で冷却した。リポソームまたはアルブミンを含む凝固したゼラチン塊をパラフィン板上から回収し、以下4℃でPBSで洗浄、1Mショ糖液中で1時間、さらに2.3Mショ糖中に一昼夜浸漬

した。これらの試料を液体窒素中で凍結、超ミクロトームで凍結超薄切片を作製し、ウラン染色して透過型電顕で観察した。GPIIb-リポソームの一部の超薄切片については、マウス抗GPIIb抗体（SZ2, 1 μ g/ml）で4℃、16時間インキュベートし、PBSで洗浄後、さらに金粒子（10nm）標識ヤギ抗マウスIgGでインキュベートし、ウラン染色して観察した。一方、H12-リポソームおよびH12-アルブミンについては、その希釈液をフィルターで吸引濾過し、フィルターにトラップされた粒子を凍結乾燥して走査型電顕で観察した。

2) GPIIbまたはH12-リポソーム、H12-アルブミン重合体の凝集に対する効果と挙動の検討

3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として健常人の肘静脈から採血し、これを遠心して多血小板血漿（PRP）を得た。13 $\times 10^4$ 個/ μ lまたはその半数の6.5 $\times 10^4$ 個/ μ lに調製したPRPにGPIIbまたはH12-リポソーム、H12-アルブミン重合体を1mg/ml（総脂質重量）を加えて混合し、凝集計にセットした。リストセチン（1~1.5mg/ml）またはADP（1~

10 μ M) を添加して凝集曲線を観察した。一部の試料については8%パラホルムアルデヒドを加えて固定し、電頭の検体とした。

C. 研究結果

1) GPIb-またはH12-リポソーム、H12-アルブミン重合体の電顕観察

凍結超薄切片法で観察した GPIb-リポソームの大部分は直径 0.2~0.4 μ m の球状として観察された。GPIb を検出した試料では、脂質二重層が観察されるとともに、GPIb の存在を示す金粒子が膜の外側に沿って分布した (図1)。H12-リポソームも同様な形態を示した。フィルターにトラップされた H12-リポソームは球状の形態がより明瞭であった (図2)。

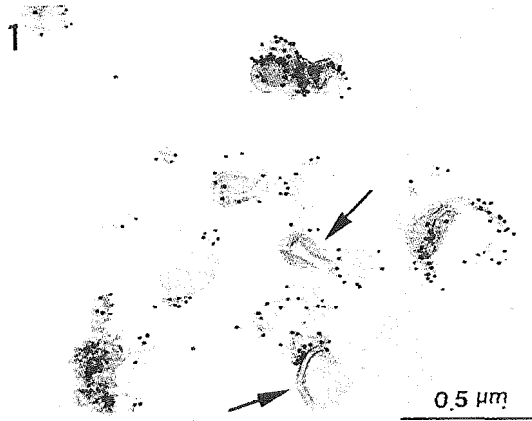


図1. GPIb-リポソームの超薄切片像

リポソームは直径 0.2~0.4 μ m の球状を示す。二重膜構造も観察される (矢印)。表面には GPIb の存在を示す金粒子が分布する。

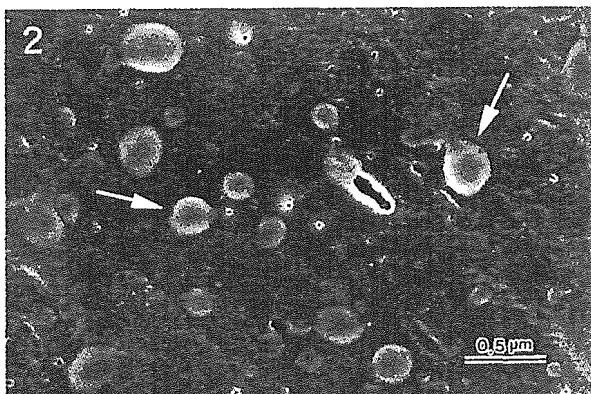


図2. H12-リポソームの走査型電顕像

リポソームは直径 0.2~0.4 μ m の球状を示す (矢印)。表面は滑らかである。

一方、H12-アルブミンは凍結超薄切片法で観察す

ると小繊維の塊状に観察され、一定の形態を示さなかった。しかし、フィルター濾過の走査型電顕像では、直径 1 μ m 以下の扁平な基石状の形態を示し、表面には小孔が観察された (図3)。

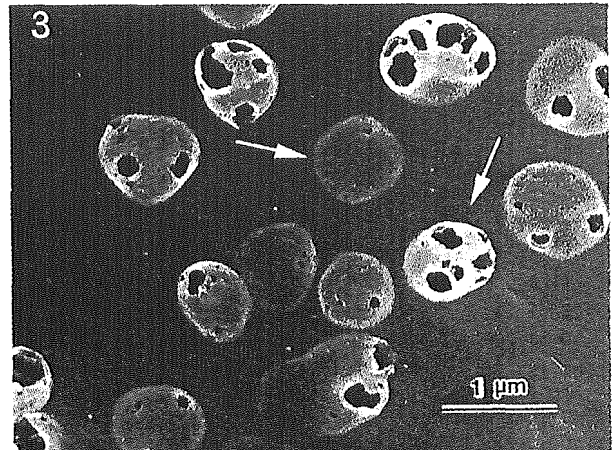


図3. H12-アルブミンの走査型電顕像

アルブミンは直径 1 μ m 以下の扁平な基石状を示す (矢印)。表面には小孔が観察される。

2) GPIb-またはH12-リポソーム、H12-アルブミン重合体の凝集に対する効果と挙動の検討

まず PRP の ADP に対する感度をチェックするために、10 μ M ADP から添加して凝集が惹起されるのを確認した。次いで、ADP 濃度を下げていき、2 μ M までは二次凝集までの反応が見られた。しかし、1 μ M では一次凝集のみであった。そこで、1.5 μ M ADP を使って検討した。PRP とコントロールのリポソームまたはアルブミンを混合し、さらに ADP を添加すると、一次凝集のみが惹起された。一方、H12-リポソームまたはアルブミンでは、決して強くはないが二次凝集まで惹起された (図4)。

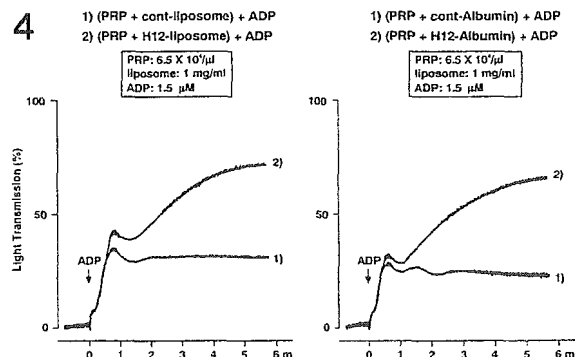


図4. PRP の ADP 凝集に対する H12-リポソームまたはアルブミンの効果

コントロールのリポソームまたはアルブミンでは一次凝集しか惹起されないが、H12-リポソームまたはアルブミンでは二次凝集まで惹起される。

ADP を添加後 5 分にそれぞれに固定液を加え、電顕試料とした。コントロールのリポソームまたはアルブミンを加えたものでは、血小板は変形しているものの、血小板相互の接着は粗で小凝集塊が形成されているに過ぎなかった。また、これらの血小板のほとんどの細胞質には顆粒が残存していた (図 5)。

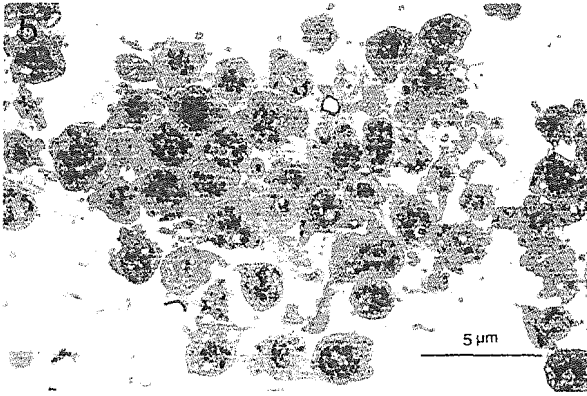


図 5. コントロールアルブミン添加時の ADP 凝集像
PRP にコントロールのアルブミンを加え、混和後 1.5μM ADP を添加し、5 分後に固定した。血小板相互の接着は粗で、血小板顆粒が残存している。

一方、H12-リポソームまたはアルブミンを加えたものでは、大きな凝集塊を形成するとともに、血小板は強く変形し、相互に強く接着していた。細胞質では大部分の血小板で顆粒が減少していた (図 6)。

6



図 6. H12-アルブミン添加時の ADP 凝集像
PRP に H12-アルブミンを加え、混和後 1.5μM ADP を添加し、5 分後に固定した。大きな凝集塊が形成され、血小板相互の変形、接着度は強く、顆粒の残存は少ない。

D. 考察

GPIb-または H12-リポソーム、H12-アルブミンを凍結超薄切片法、走査型電顕法で観察した。走査型電顕像のリポソームは、直径 0.2-0.4μm の球

状の形態を示し、表面は非常に滑らかであった。凍結超薄切片法では、リポソームは細胞膜と同様に二重膜に囲まれていることが明らかになった。また、rGPIbα はリポソームの表面に標識されていることも証明した。一方、H12 の結合については、識別するツールがないために、形態学的にどのようにリポソームに標識されているかは同定できなかった。また、H12-アルブミンは走査型電顕下で直径 1μm 以下であり、基石状の扁平な球体として観察された。このように、本アルブミン重合体は 0.2μm 前後に調製されたにもかかわらず、やや大きく観察される理由として、元々球状のものが走査型電顕の試料調製時、特に乾燥時に扁平に変形したためと考えられる。しかし、これまでアルブミン重合体は球状に観察されず、むしろ板状ないしは小繊維の塊状にしか観察されなかっただけに、扁平とはいえ本重合体の試料作製法が進歩したと考えられる。ただ、表面には小孔が観察された。これは凍結時に生じる氷晶に起因するアーティファクトとも考えられる。

今回の ADP 凝集実験では、ヒト多血小板血漿 (PRP) 中の血小板数を 6.5×10^4 個/μl に設定した。これは血小板減少状態にあつて、使用した H12-リポソームまたはアルブミンが血小板の代潜物として機能するかを検討するためである。コントロールのリポソームまたはアルブミンが放出反応を伴わない小凝集塊のみ形成しないのに対して、H12-リポソームおよびアルブミンは、大きな凝集塊を形成するとともに、血小板相互を強固に接着させ、さらに血小板の放出反応まで惹起させた。すなわち、H12-リポソームおよびアルブミンは、血小板減少状態において、血小板の代潜物として有効に機能することが示唆された。

E. 結論

GPIb-、H12-リポソーム、および H12-アルブミンはいずれも約 0.2~0.4 μm の粒子として観察され、特にリポソームは脂質二重層の構造が識別された。ヒト多血小板血漿 (PRP) に H12-リポソームまたは H12-アルブミンを添加し、ADP で刺激すると、コントロールに比較すると両者ともに凝集を促進させた。電顕観察では、血小板相互の接着が強固になり、放出反応まで惹起する所見を示した。すなわち、今回の凝集実験系において、H12-リポソームおよび

H12-アルブミンは人工血小板として有効に機能することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Takeoka, S., Okamura, Y., Teramura, Y., Watanabe, N., Suzuki, H., Tsuchida, E., Handa, M., Ikeda, Y.: Function of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312: 773-779, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担報告書

「高速レーザー共焦点顕微鏡による 3次元イメージングシステムを用いた *ex vivo*, *in vivo* の血栓評価系における H12 結合リポソームの止血増強効果」に関する研究

分担研究者 後藤信哉（東海大学医学部内科学系）
研究協力者 石田英之（東海大学医学部基礎医学系）
田村典子（東海大学医学部内科学系）

《研究要旨》生体内に投与する人工血小板は、血管が損傷し出血が起こっている部位でのみ効率的に止血血栓の形成に関与する必要がある。すなわち、正常血管内では血栓形成に作動してはならない。血管損傷部位で選択的に止血補助効果を発揮する物質として、活性化血小板表面上の活性化 GP IIb/IIIa に選択的に結合する H12 というペプチドと結合した小胞体に注目した。本小胞体は、血管壁の損傷に粘着して活性化した血小板のみを認識して結合する性質を有する。小胞体上に複数の H12 分子を結合させることにより、H12 結合小胞体を核とした血小板血栓の成長が期待できる。われわれは高速レーザー共焦点イメージングシステムを用いた血栓の 3次元形態評価法を用いて、H12 結合小胞体の、血小板血栓の 3次元成長におよぼす効果を、動脈血流に相当する血流条件下で検討した。H12 は高さ方向を含む、血小板血栓の 3次元成長を血管壁損傷部位で特異的に促進させ、止血を補助する効果を有することを示した。

A. 研究目的

血管損傷部位における止血のメカニズムと、血管内腔を閉塞して臓器の虚血を惹起する血栓形成のメカニズムは極めて類似している。生体内に投与して止血血栓の形成を補助する人工血小板は、止血の必要な部位における血栓形成を促進するものの、

血管内など正常の循環系において血栓を形成する性質を有してはならない。Native 血小板では、GP IIb/IIIa という膜蛋白が、血液の流動性の維持と止血のバランスを保持する上で重要な役割を果たしている。すなわち、正常の、非活性型の血小板表面上の GP IIb/IIIa は血漿蛋白に結合する性質

を有さず血栓の形成を促さない。一方、血管壁の損傷部位に結合し活性化血小板上では GP IIb/IIIa の高次構造が変化してフィブリノーゲンなどの血漿蛋白と結合できるようになる。血漿蛋白は GP IIb/IIIa の結合部位を複数保有しているため、血小板同士が活性化 GP IIb/IIIa を介して結合し合って血栓を成長させることになる。

そこで、活性化 GP IIb/IIIa を認識して結合するペプチドを小胞体に結合させて人工血小板を作成した。このようなペプチドとして生理的なりガンドであるフィブリノーゲンの GP IIb/IIIa 結合部位、H12 を用いた。小胞体上に H12 を複数結合させることにより、血管損傷部位に粘着し、活性化した血小板周囲における血栓の 3 次元成長補助効果を検討した。

B. 研究方法。

健常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。再構成血液中の血小板数は 10,000/ μ l 以下となるように調

整した。

再構成血液中の血小板をメパクリンにて蛍光標識した。赤血球の存在下でも血栓の蛍光イメージングを可能とした。H12 結合小胞体の止血増強効果を検討するために、1) 再構成血液のみ、2) H12 結合小胞体加再構成血液、3) 特異蛋白を結合させない小胞体加再構成血液、をコラーゲンを固相化したガラス表面上に 100 s⁻¹ および 1,500 s⁻¹ のずり速度の条件で 6 分間灌流した。コラーゲン上の血小板血栓の 2 次元成長を蛍光顕微鏡により評価した。また、血栓の 3 次元成長を、高速レーザー共焦点顕微鏡を用いた 3 次元イメージング法により検討した。3 次元イメージング法の原理を図 1 に示した。

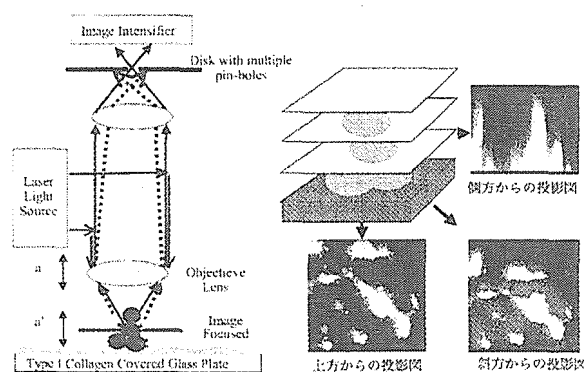


図 1. レーザー共焦点顕微鏡による血小板血栓の 3 次元イメージング

接眼レンズに相当するイメージンシファイアの直前に、20,000 の pin hole を有する円盤を高速で回

転させることにより、共焦点画像の高速撮像を可能とした。piezo-motor control unit を用いて、対物レンズを一定速度で上下させることにより、血栓など 3 次元的構造物の断層像を、上端から下端までスキャンできる。上下方向のスキャンを一定速度で行っているため、撮像時間を構造物の高さ情報に変換することが可能となる。Shareware である ImageJ を用いて、スキャンイングイメージを 3 次元投影像に変換して評価の対象とした (図 1)。

(倫理面への配慮)

本研究では、健常人より採取した血液サンプルを実験に利用する。倫理的問題を惹起させないために、採血対象者には、採血に伴う合併症の可能性を含めて、事前に十分な説明を行い書面によるインフォームドコンセントを取得した。本研究への参加を拒絶しても何らの不利益を被らないこと、一度、研究参加に同視しても、その後いつでも同意の取り消しが可能であること、なども含めて説明し倫理面に配慮した。

C. 研究結果

比較的高い壁すり速度の条件 ($1,500 \text{ s}^{-1}$)、比較的高い壁すり速度の条件 (100 s^{-1}) でおのおの 6 分間灌流したのちの血小板血栓の 2 次元

的成長を図 2、図 3 に示した。

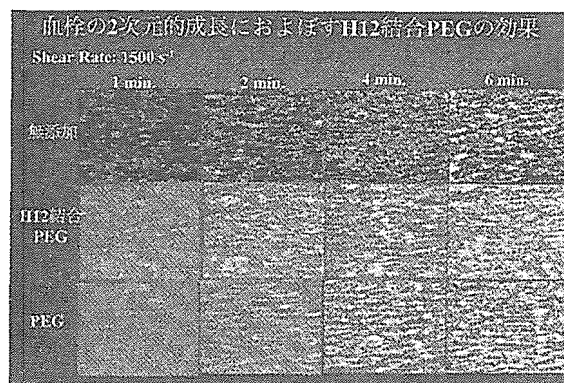


図 2. HI2 結合小胞体による血栓の 2 次元成長促進効果 ($1,500 \text{ s}^{-1}$)

いずれの条件においても、HI2 結合小胞体は血小板血栓の 2 次元成長を促進する効果を有した。

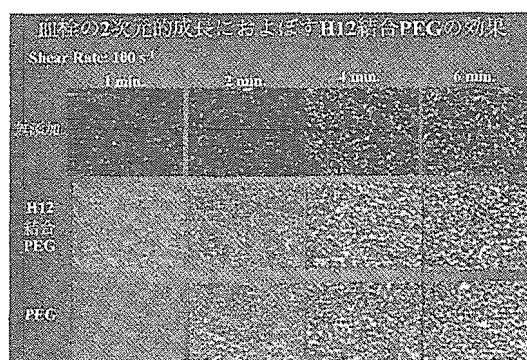


図 3. HI2 結合小胞体による血栓の 2 次元成長促進効果 (100 s^{-1})

高速レーザー共焦点顕微鏡を用いたイメージング法により、native 血小板と相互作用する人工血小板の様子を撮像することができた。小胞体は糸状に引き延ばされ、2つの血小板同士をつなぐように作用していた。

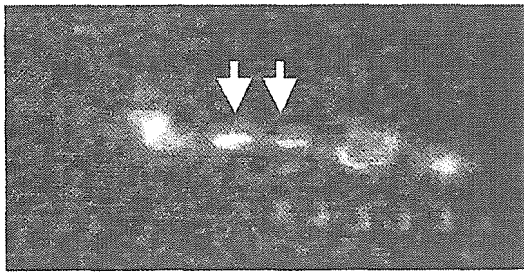


図 4. H12 結合小胞体と native 血小板の相互作用

これらの個別の人工血小板と native 血小板の相互作用の結果、コラーゲン上の血小板血栓の 3 次元成長が促進されることとなる。その結果を図 5 に示した。

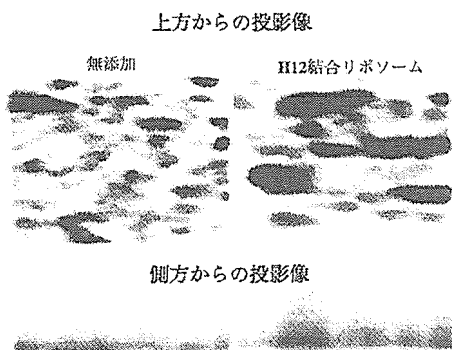


図 5. 血栓の 3 次元成長におよぼす H12 結合小胞体の効果

D. 考察

人工血小板の開発に当たって、血管壁の損傷部位を認識して止血を助けるとの観点から GP Ia/IIa, GP Ibalpha など血管内皮下のマトリックス蛋白に結合する物質を担体に結合させる方法が模索された。健常循環過程で

の血栓形成を最小限としつつ、血管の損傷部位で最も効率的に止血機能を発揮させる人工物を作成するために、本研究では活性化血小板を認識する能力を有する H12 結合小胞体の止血機能を評価した。

本質的に血小板同士の結合を補助する性質を有している H12 結合小胞体は、血流条件下でも血小板血栓の 3 次元成長を補助する効果を有することを確認した。さらに、血小板同士の結合の動的解析により小胞体は血流条件下では伸張してより血栓の形成を補助する効果を効率的に発揮することを示した。

E. 結論

- 1) H12 結合小胞体は血小板数が減少した状態において、血管壁損傷部位における血栓形成を 2 次元的にも 3 次元的にも促進させる効果を有した。
- 2) H12 結合小胞体は、流動状態下で非活性化血小板への結合を惹起しなかった。
- 3) 止血の必要な部位での選択的な止血機能の発揮において H12 結合小胞体は理想的な人工血小板の備えるべき性質に近い性質を有する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表。

- 1) Hagiwara M, Higuchi A, Tamura N, Ueda Y, Hirabayashi K, Ikeda Y, Kato S, Sakamoto S, Hotta T, Handa S, and Goto S. Platelets after Exposure to a High Shear Stress Induce IL-10 Producing Mature Dendritic Cells in Vitro. *Journal of Immunology, in press*
- 2) Goto S, Tamura N, and Ishida H. Ability of Anti-GP IIb/IIIa Agents to Dissolve Platelet Thrombi Formed on a Collagen Surface under Blood Flow Conditions. *J Am Coll Cardiol, in press*
- 3) Sadiq A, Tamura N, Yoshida M, Hoshiya Y, Kumagai A, Tanabe T, Handa S, Ikeda Y, and Goto S. Possible Contribution of Acetylamrinone and Its Enhancing Effects on Platelet Aggregation Under Shear Stress Conditions in the Onset of Thrombocytopenia in Patients Treated with Amrinone. *Thromb Res, 111 (2003) 357-361*
- 4) Goto S. Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effect of new antiplatelet agents. *Current Vascular Pharmacology 2003;2:23-32*
- 5) Goto S: Role of von Willebrand

Factor for the Onset of Arterial Thrombosis. *Clinical Laboratory 47: 327-334, 2001*

2. 学会発表

- 1) Goto S, Tamura N, Ishida H, Takeoka S, and Ikeda Y. Real time visualization of artificial platelet interacting with immobilized matrix and native platelet bound on the matrix surface under controlled blood flow conditions. Forum I of the 9th International Symposium on Blood Substitute. Tokyo, March 4, 2003

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

1. 特願 2003-39230：発明人：後藤信哉、石田英之（70%: 30%）、出願人：東海大学：題名：血栓生成過程観測装置及び血栓生成過程観測方法。2003年2月20日出願

厚生労働科学研究費補助金
(医薬安全総合研究事業)

分担研究報告書

レーザーアブレーションを用いた血小板血栓形成モデルによる
リポソームの微小循環系内挙動

分担研究者 末松 誠 (慶應義塾大学・医学部・医化学教室教授)
研究協力者 梶村 真弓 (慶應義塾大学・医学部・医化学教室助手)

研究要旨

本研究班で作製されたポリエチレングリコール鎖修飾型リポソーム(表面負電荷型)の担体としての生体適合性及び有用性を検証した。特に、血管損傷部位での本粒子の挙動を解析するため、窒素色素レーザーを用いた障害モデルを構築した。この系を用いラット腸間膜微小血管に血小板血栓を形成し、その周辺での rhodamine 標識-リポソーム及び carboxyfluorescein diacetate succinimyl ester (CFSE)で生体染色したラット血小板の挙動を confocal microscopy によりリアルタイムで撮像した。これらの蛍光像を 8-bit digital 化し解析した結果、血小板血栓内にはラット血小板のみの集積が認められ、一方リポソームは基底膜の部分と思われる血管壁の内皮下腔非常に高濃度に充填され、しかも長軸方向には障害部位から左右 50 μ m 以内で収束していることが判明した。つまりこれらのリポソームは、活性化したラット血小板に集積することなく、ラット血小板の分布とは完全に分離して振る舞い、かつ障害血管部位に選択的に集積し、正常血管壁と相互作用しないことが確認された。

A. 研究目的

リポソームは、生体膜の構成成分であるリン脂質を水中に比較的低濃度で分散させた時に形成されるナノサイズの閉鎖小胞体である。本粒子の生体膜類似性ゆえ血液適合性が高く、粒子表面に血小板凝集関連蛋白質を担持させた人工血小板の構築、及び drug delivery system としての利用を目指した研究が盛んに行われている。しかしながら、本粒子自体の微小循環系内の挙動については不明な点が多い。そこで、部位特異的しかも障害サイズを制御可能な実験系として窒素色素レーザーを用いた障害モデルを構築した。カラーゲン露出型の微小血管障害を惹起した際に形成される血小板血栓近傍でのポリエチレングリコール鎖修飾型リポソーム(表面負電荷型)の挙動を *in vivo* で解析することを試みた。

B. 研究方法

B-1. 生体顕微鏡システムと微小循環観察記録システム

Suematsu らの方法に従い (Suematsu M, et al. Lab Invest 1994)、Wistar 系雄性ラット (200 - 250 g) を pentobarbital sodium 50mg/kg 筋肉注射で麻酔し、大腿静脈にカテーテルを挿入し、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) を 1 mg/kg 投与し、体内の血小板を生体染色した。図 1 にシステムの概要を示す。回盲部腸間膜を腹腔外に展開し、微小循環系を正立型レーザー共焦点顕微鏡で観察した。対物レンズは 60 倍を使用した。顕微鏡光路には CFSE 蛍光を画像化する 488nm のアルゴンレーザー、お

よび rhodamine B を画像化する 568 nm のレーザー出力が可能であり、前者の緑色蛍光のみ、あるいは後者の赤色蛍光のみ、さらには両者を同時に撮像し、merge を画像化するフィルターを実装し、自由に切り替えを行った。フィルターなしの状態でも透過光線像の取得も可能とした。また、出力を自由に定量的に制御できる窒素色素レーザー (Micropoint laser ablation) が実装され、微小血管の任意の場所を顕微鏡画面中央に設置することにより、

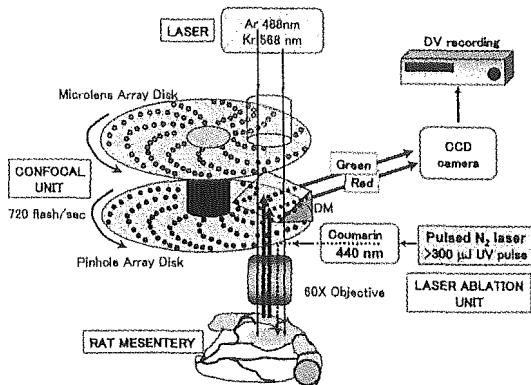


図 1. 生体顕微鏡システム

1- μm の光束で細胞障害を起こすことを可能にした。出力エネルギーを可変することにより、破綻出血を伴う(すなわち基底膜損傷を伴う)出血の作成から、数個の赤血球漏出のみで、血小板の一次凝集塊形成を伴わない、junctional leakage のみの血管内皮細胞障害までを作成することができた。

血小板の画像および rhodamine B をコートしたリポソームの画像を取得するために顕微鏡光路に高感度 CCD カメラ (C5810 浜松ホトニクス製) を装着し、画像はすべて DV 画像として 8-bit のカラーデジタル保存を行った。リポソームは既報の方法で作成された平均径 263 nm のものを用い、コントロールの微小循環像を記録したのち、リポソーム サスペンションを 250 μl / 100 g rat (volume ratio of liposome in the dispersion = 35 %, \therefore サンプル中のリポソーム数(推定) = 4.8×10^{12} 個 ml^{-1}) を注入し、レーザーアブレーション施行前、および施行後 30 分にわたり解析した。

B-2. 画像解析法

記録した蛍光画像をもとに血管から漏出した Rh-lipo の分布と量の半定量的解析を行った。血管壁上の窒素レーザー照射部位 (point of injury) を中心とし、血管の長軸方向あるいは法線方向に軸を設定し、内皮下腔に漏出した蛍光の強度を 8-bit gray level (0-255) で測定した。測定には画像解析ソフト (MetaMorph 6.1, Universal Imaging Corporation) を用い、図 3 に示すように血管の長軸に沿って 2 μm ごと、あるいは法線に沿って 5 μm ごとにグレーレベルを測定した。グレーレベルの測定は各単位 μm 内で 10 箇所程度の測定値の平均値を代表値とし、4 匹の異なる動物、異なる細動脈、細静脈において測定した平均値 (標準誤差) でデータを表現した。

C. 研究結果及び考察

C-1. 正常微小循環におけるリポソーム挙動

本実験で用いた CFSE 標識プロトコールは過去の申請者らの報告にあるように、循環血液中の約 80% の血小板を染色した。これらの血小板は画面上で緑色の破線状に撮像された。Rhodamine B 標識リポソーム (以下 Rh-lipo) を注入すると一過性に蛍光が観察視野を通過し、その一部はわずかに細静脈内皮細胞の junction と思われる部位を染色するものの、大部分は血液空間に分布した。この際、CFSE で染色された血小板の色調に変化はなく、緑色に認識できるため、投与した Rh-lipo は血小板内に取り込まれたりする可能性は低いものと考えられた。また Rh-lipo 投与後に血小板の血管内皮細胞への一過性接着反応に大きな変化は認めなかった。これらの成績はリポソームの投与が血小板の挙動に影響を与えないことを示す証左となった。

C-2. Micropoint laser ablation に伴うリポソームの挙動

一定のレーザーエネルギー (4-nsec energy

pulse の laser を 5 Hz で約5秒間照射)によりレーザーアブレーションを細動脈、細静脈血管(径 20-40 μ m)において施行した。

図 2 は細静脈における ablation 後の Rh-lipo と CFSE-血小板の挙動を示す。Ablation 後数秒のうちにリポソームの血管内からの漏出が確認され、同時に数個の血小板集塊が形成された。図 2A で示される Rhodamine 標識蛍光像で明らかに示されるように、リポソームは障害近傍の血管内皮の junction から漏出し、拡散せずに基底膜と内皮細胞の境界(内皮下

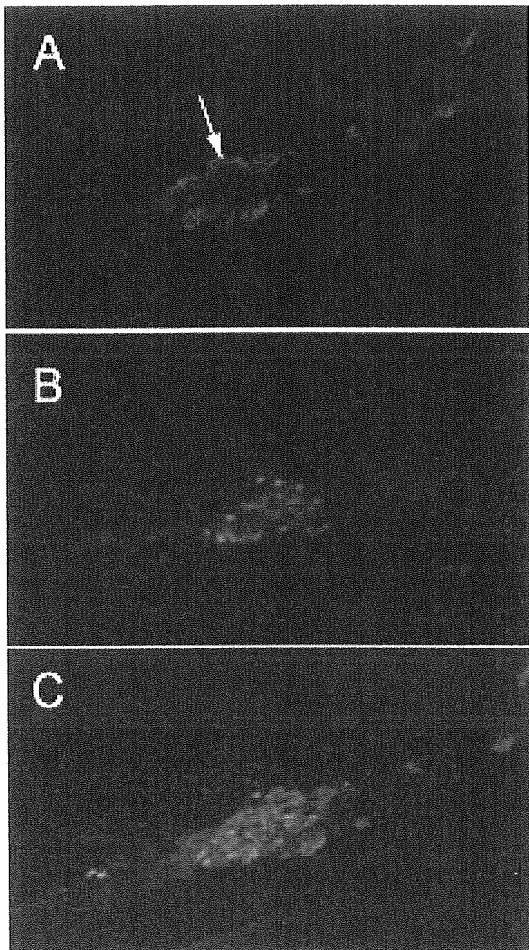


図2. レーザーアブレーション後の細静脈内・近傍でのリポソーム・血小板の挙動 A. リポソーム B. 血小板 C. Merge、矢印:レーザー照射部位

腔)にとどまり、しかも血管長軸方向に拡散せずに局所に充満し、限局性の蓄積を見せた。これらの所見は本研究で用いたリポソームが血管内皮細胞障害部位において特異的に集積し、内皮下腔を充填することを証明している。

一方血小板は障害点を基点として小凝集塊を形成したが、merge 像に示すようにリポソームとのオーバーラップはわずかであり、双方の蛍光の重なりはわずかであった。これは本実験で用いた陰性荷電リポソームが血小板との相互作用に依存せずに障害局所に集積したことを示している。同様の Rh-lipo の挙動は、細静脈における血管内皮細胞を障害した場合にも同様であった。ただし、細静脈では血管壁近傍をローリングする白血球に血小板が接着している場合、あるいはリポソームが白血球を巻き込んだ血小板凝集塊のなかに一部取り込まれるなどの所見を散見した。

C-3. Rh-lipo の血管内皮下腔への集積

細動脈における障害部位でのリポソーム集積の解析を施行した。解析はリポソームの漏出と集積が定常状態に達する ablation 後 5 分後以降に行った。これらのデータの平均値をグラフ化したものが図 3B であり、Point-of-injury を中心として約 30 μ m 内外に集中してリポソームが集積することが確認された。また法線方向での解析でも point-of-injury を中心として限局した集積を示し、障害部位反対側への粒子の移行はわずかであった。

一方細静脈においては障害部位を中心として約 40 μ m の幅をもって集積が起こった。法線方向の分布も細動脈の際とほぼ同様であったが、時に障害部位と反対側の血管壁へのリポソームの移行が見られる場合があった。

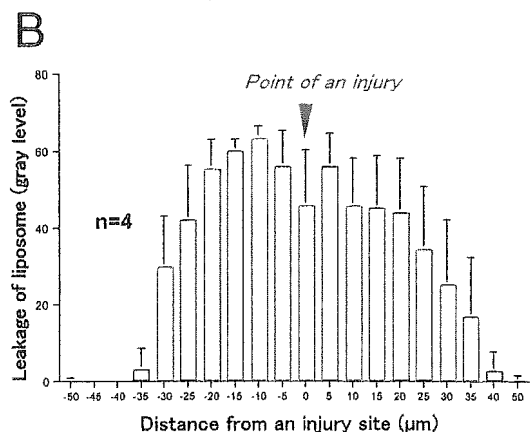
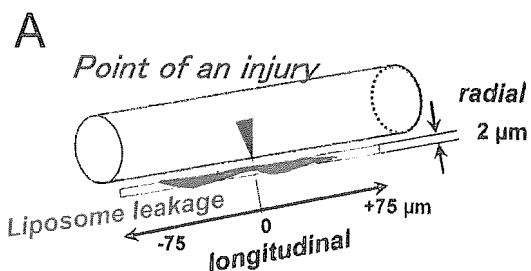


図 3. 細動脈・血管障害部位でのリポソームの集積パターン A. 解析模式図 B. リポソームの漏出と集積、矢印:レーザー照射部位

D. 結論

いずれの血管種においても、本実験で使用したリポソームには血管内皮細胞障害部位へ集積、漏出する作用があり、血管内皮下腔に集積し障害部位を充填する可能性があること、その作用は血小板との相互作用に依存していないことが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 関連特許取得

リポソーム安定化剤

(発明代表者 特願 2003-63803)

An assay system for examining function or ability of cells, tissues or organs.

(発明代表者 出願番号 60/506,506)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kudo A, Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y, Uchida K, Arii S, and Suematsu M. Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver *Hepatology*. In press, 2004.
2. Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematsu M, Yamashina S, Murata T, Narumiya S, Kakita A, and Majima M. Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology*. 39: 139-150, 2004.
3. Nagano S, Shimada H, Tarumi A, Hishiki T, Kimata-Arigo Y, Egawa T, Suematsu M, Park SY, Adachi S, Shiro Y, and Ishimura Y. Infrared spectroscopic and mutational studies on putidaredoxin-induced conformational changes in ferrous CO-P450cam. *Biochemistry*. 42:14507-14514, 2003.
4. Suematsu M, Sukanuma K, Kashiwagi S. Mechanistic probing of gaseous signal transduction in microcirculation. *Antioxid Redox Signal*. 5: 485-492, 2003.
5. Schaefer S, Kajimura M, Tsuyama S, Uchida K, Sato E, Inoue M, Suematsu M, and Watanabe K. Aberrant utilization of nitric oxide and regulation of soluble guanylate cyclase in rat diabetic retinopathy. *Antioxid Redox Signal*. 5: 457-565, 2003.

6. Norimizu S, Kudo A, Kajimura M, Ishikawa K, Taniai H, Yamaguchi T, Fujii K, Arai S, Nimura Y, and Suematsu M. Carbon monoxide stimulates mrp2-dependent excretion of bilirubin-IXalpha into bile in the perfused rat liver. *Antioxid Redox Signal*.5:449-456, 2003.
7. Suematsu M. Quartet signal transducers in gas biology. *Antioxid Redox Signal*.5: 435-437, 2003.
8. Egawa T, Yoshioka S, Takahashi S, Hori H, Nagano S, Shimada H, Ishimori K, Morishima I, Suematsu M, and Ishimura Y. Kinetic and spectroscopic characterization of a hydroperoxy compound in the reaction of native myoglobin with hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 278: 41597-41606, 2003.

研究要旨

血小板凝集反応を媒介する血小板膜表面蛋白質 α IIb β 3 インテグリンには、bent conformer と extended conformer の立体構造の異なる二つの conformer が存在することが明らかとなった。そこで本研究ではこれらの conformer とリガンド結合活性の相関につき検討を行った。 α IIb β 3 分子内に人工的にジスルフィド結合を導入して bent conformer に固定した変異 α IIb β 3 を動物細胞に発現させ、フィブリノーゲンとの結合を調べた。その結果、この変異 α IIb β 3 は低親和性で、還元剤で処理して分子内ジスルフィド結合を切断しない限り、いかなる活性化刺激にも応じないことがわかった。活性化依存性抗体を用いた検討では、この分子は通常 α IIb β 3 活性化時に出現する抗体エピトープの発現が wild-type に比べ非常に低いことがわかった。これらの結果から bent conformer は low-affinity form であること、extended conformer は high-affinity conformer である可能性が示唆された。人工血小板上に α IIb β 3 を発現させるにあたり、止血部位において何らかの方法で bent conformer から extended conformer に変換させるメカニズムをもたせることができれば、凝集能を有する非常に効果的な人工血小板を開発することが可能と考えられる。

A. 研究目的

一次止血血栓形成の過程では、まず血小板が破綻した血管内皮下組織へ粘着し、これに引き続いて血小板同士が結合して血小板凝集塊を形成する。この血小板凝集形成のためには α IIb β 3 インテグリンの存在が不可欠である。血小板膜上の α IIb β 3 インテグリンは通常リガンドに対する親和性が低く、血小板凝集を引き起こすことは無い。しかし、いったん血小板が活性化すると α IIb β 3 はその立体構造を変えて高親和性となり、フィブリノーゲンと結合して血小板凝集をひき起こすと考えられている。最近インテグリンには立体構造の異なる bent conformer と extended conformer の二つの conformer が存在することが明らかになった。本研究ではこれらの conformer とリガンド結合活性の相関を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. モノクローナル抗体

本研究では以下のモノクローナル抗体を使用した。

- PL98DF6 ; 抗 α IIb 抗体
- SZ22 ; 抗 α IIb 抗体
- SZ21 ; 抗 β 3 抗体
- VNR5-2 ; 抗 β 3 抗体
- OP-G2 ; 抗 α IIb β 3 ligand-mimetic 抗体
- PT25-2 ; 抗 α IIb β 3 活性化抗体
- anti-LIBS-1 ; 抗 β 3 活性化依存性抗体
- anti-LIBS-2 ; 抗 β 3 活性化依存性抗体
- anti-LIBS-6 ; 抗 β 3 活性化依存性抗体

2. 変異 α IIb β 3 の作成

変異 β 3cDNA はともに site-directed mutagenesis 法を用いて作成した。 α IIb, β 3cDNA は哺乳動物発現ベクター pBJ-1 に挿入して用いた。変異 β 3V332C, β 3S674C とともに unique restriction enzyme site elimination 法により作成した。

3. トランスフェクション

Chinese hamster ovary (CHO) cell は 10%FCS 加 Dulbecco's modified Eagle medium で培養した。Wild-type α IIb-pBJ1 50 μ g とともに変異 β 3-pBJ1 50 μ g を電気穿孔法を用いて CHO 細胞にトランスフェクトした。細胞は 48 時間後各種実験に使用

した。

4. FACS

細胞は 3.5mM EDTA 加 PBS にて剥離し, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ 加 Tyrode-HEPES buffer にて洗浄後一次抗体と 4 °C にて 30 分反応させた。洗浄後, 二次抗体として RPE-標識ヤギ抗マウス IgG と 4 °C にて 30 分反応させた後洗浄し, FACS にて細胞表面上への抗体の結合を測定した。ある実験では 1 mM GRGDS ペプチド添加前後での抗体の結合を測定した。

5. フィブリノーゲン結合実験

フィブリノーゲンは FITC で標識した。まず α IIb β 3 を発現した CHO 細胞を PL98DF6 と反応させた後, RPE-標識ヤギ抗マウス IgG と反応させた。細胞を 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ 加 Tyrode-HEPES buffer に resuspend したのち 200 μ g/ml の FITC 標識フィブリノーゲンと反応させ, 細胞に結合したフィブリノーゲン量を FACS で測定した。この際 α IIb β 3 の発現の高い細胞集団 (FL2 > 500) の領域にゲートをかけ, この領域における FL1 の MFI を測定した。

C. 結果

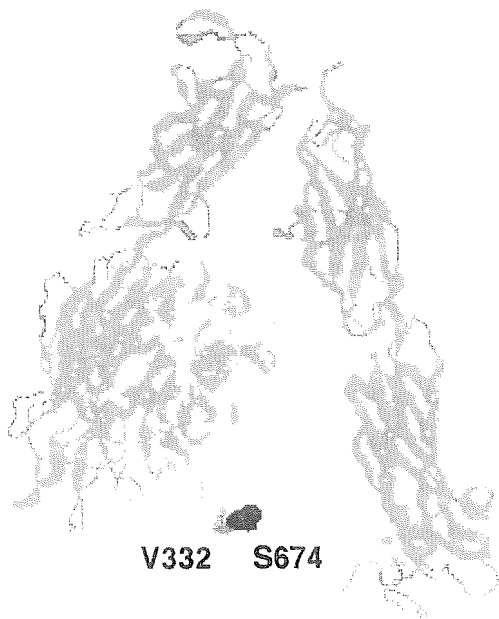


図 1. α V β 3 結晶構造

α V β 3 結晶構造 (図 1) では β 3 (yellow) β A

domain の Val332 (orange) と β TD の Ser674 の距離は 3 Å 以下であり, これらのアミノ酸残基を Cys に置換することによってこれらの domain 間にジスルフィド結合を導入することができる。

CHO 細胞表面に発現した α IIb β 3 を FACS で調べたところ, α IIb, β 3 の発現量は V332C, S674C, V332C/S674C とともに wild-type と同等であった (図 2)。すなわち, これらの変異は α IIb β 3 全体の構造に悪影響を与えることなく安定に発現できることがわかった。

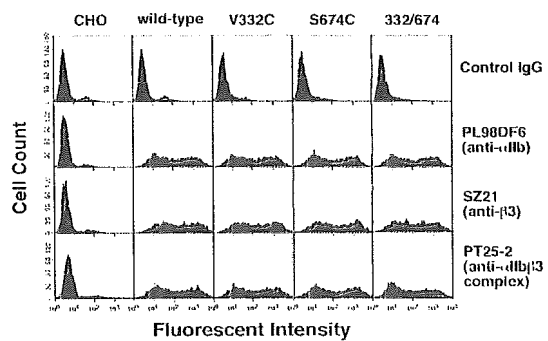


図 2. 変異 α IIb β 3 の発現パターン

次にこれらの α IIb β 3 を発現した細胞へのフィブリノーゲン結合を FACS にて測定した。通常, CHO 細胞上に発現した α IIb β 3 は低親和性で, そのままではフィブリノーゲンに結合することはできない。したがってフィブリノーゲン結合を測定するためには何らかの方法で α IIb β 3 を活性化する必要がある。図 3 は活性化モノクローナル抗体である PT25-2 存在下での wild-type α IIb β 3 発現細胞へのフィブリノーゲン結合をみたものである。縦軸 (FL2) に α IIb β 3 発現量, 横軸 (FL1) に FITC 標識フィブリノーゲン結合量をプロットした。PT25-2 非存在下ではパネル A のようにフィブリノーゲン結合はほとんどみられない。しかし, PT25-2 存在下 (パネル C) では FL1 右方へのシフトが認められる。パネル B, D はそれぞれにおける FL2 > 500 以上の細胞集団 (R2 region) へのフィブリノーゲン結合を histogram で表したものである。以下の実験ではこの histogram の MFI をフィブリノーゲン結合量として使用した。

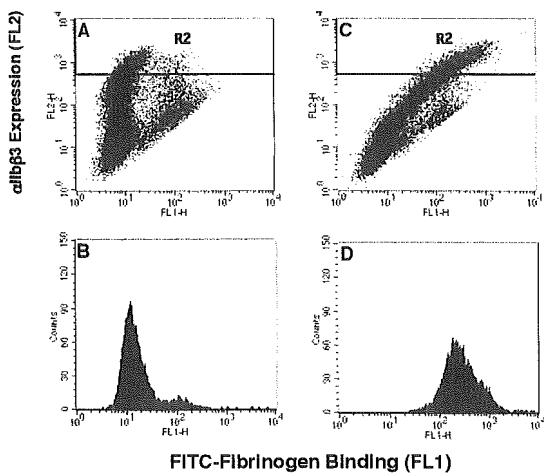


図3. α IIb β 3 発現 CHO 細胞への
フィブリノーゲン結合

インテグリンはさまざまな細胞内シグナルによって活性化されることが知られている (inside-out signalling)。この inside-out signalling による活性化を mimic するため、細胞内ドメインを欠失した β 3 に各変異を導入した。これらの変異 α IIb β 3 を CHO に発現し、フィブリノーゲン結合を調べた (solid bar)。Hatchet bar は結合阻害剤である RGD ペプチド存在下でのフィブリノーゲン結合である (図4)。 α IIb β 3 を発現しない CHO はフィブリノーゲンを結合しないが、wild-type α IIb β 3 を発現した細胞では結合がみられた。V332C、S674C 単独の変異はフィブリノーゲン結合に大きな影響を与えないことがわかる。これに対して V332C/S674C double mutation は、 α IIb β 3 のフィブリノーゲン結合を完全に阻害した。

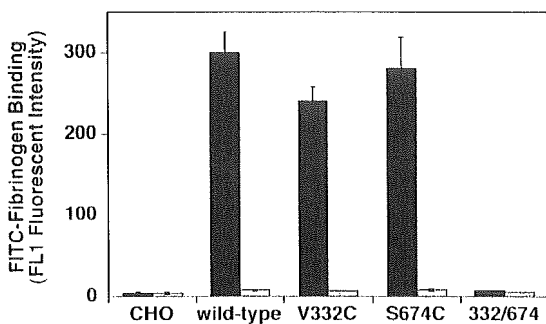


図4. 細胞内ドメイン欠失 α IIb β 3 への
フィブリノーゲン結合

α IIb β 3 は細胞外ドメインの構造を直接変化させる活性化抗体によっても活性化させることができる (図5)。前述したように、細胞内ドメインの intact な α IIb β 3 は不活性であり、そのままではフィブリノーゲンを結合しない (open bar)。活性化抗体 PT25-2 の存在下では wild-type、V332C、S674C はほぼ同等の結合を示したが、V332C/S674C では結合が全く見られなかった (solid bar)。しかし、還元剤である DTT で細胞を処置後、V332C/S674C も wild-type と同等の結合を示した (hatchet bar)。これらの結合は全て RGD ペプチドで阻害された。

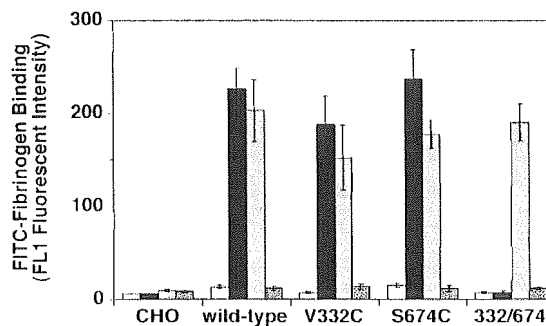


図5. 変異 α IIb β 3 発現 CHO 細胞への
フィブリノーゲン結合

インテグリンは活性化に伴ってその構造を変化させ、分子上に新たな epitope を発現することが知られている。抗 LIBS (ligand-induced binding site) 抗体はこれらの epitope に結合する抗体であり、インテグリンとリガンドの結合によってその結合を増す性質がある。図5に示したように、Non-LIBS 抗体である VNR5-2 の結合は各変異によって全く影響を受けなかった。これに対して抗 LIBS 抗体 (LIBS-2、LIBS-6) の結合は V332C/S674C で有意に低く (solid bar)、低分子リガンドである RGD ペプチド存在下でもその結合はほとんど変化しなかった (hatchet bar)。これらの結果は V332C/S674C は不活性型の conformation をもっており、低分子リガンド結合後もその構造を変化させることがないことを示している。あるいは、V332C/S674C は低分子リガンドへの結合もできな

いため構造変化がおこらない可能性も考えられる。

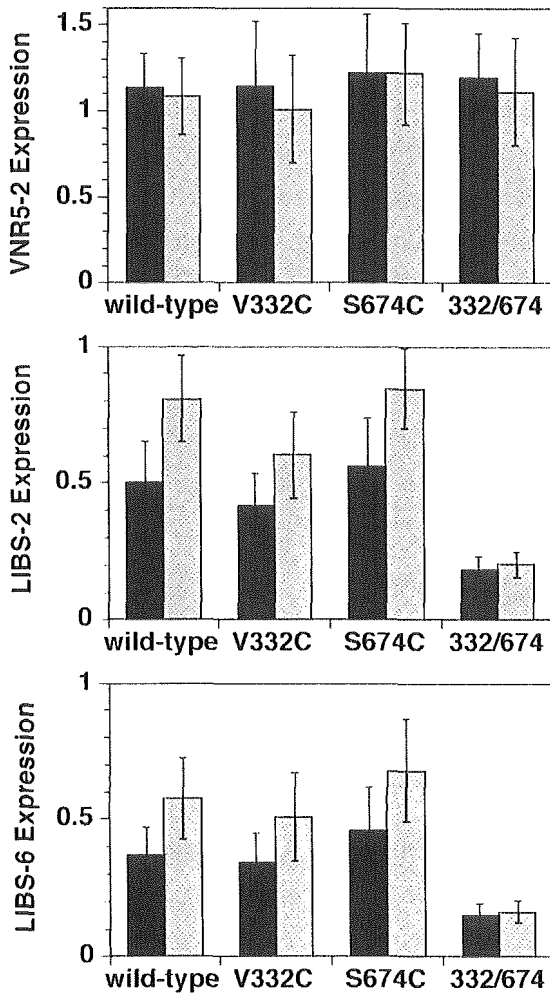


図5. 抗 LIBS 抗体の結合

D. 考察

本研究により、結晶構造および電子顕微鏡像によって同定されている二つの conformer のうち、bent conformer は low-affinity form であることが明らかとなった。これに対し、extended conformer が high-affinity form であるか否かは未だ確定していない。しかし、インテグリンには二つの活性状態があることを考えると、extended conformer が high-affinity form であると考えるのが妥当であろう。Preliminary ではあるが、 βA domain と βTD の間に spacer を設けることによって $\alpha IIb\beta 3$ の活性が高まる結果が得られている。これらの結果は、インテグリンの活性化はインテグリンの立体構造

が bent conformer から extended conformer へ変換することによって引き起こされことを示唆している。それでは inside-out signaling では細胞内 domain の変化がどのようにして細胞外 domain の構造変化を引き起こすのであろうか？このメカニズムを解明するには、インテグリン分子内の domain 間 interaction が活性に与える影響を詳細に解析する必要があると考えられる。また、bent conformer から extended conformer への conversion を止血部位で人工的に再現することができれば、人工血小板開発の大きな助けとなるであろう。

E. 結論

インテグリン分子内にジスルフィド結合を導入することにより、特定の立体構造に固定された組み替え分子を作成することに成功した。

インテグリンの二つの conformer のうち、bent conformer は low-affinity form であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし。
2. 学会発表：なし

G. 知的所有権の取得状況

なし。