

histamine 表面灌流による functional な障害モデルで、liposome の挙動を検討した。

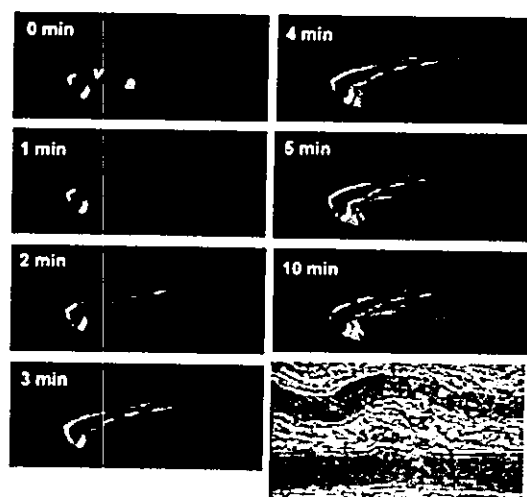


図5. Histamine 表面灌流によるラット腸間膜細静脈壁でのリポソーム集積の経時的変化。

ラット腸間膜に histamine を表面灌流した時の細静脈血管壁透過性の経時的変化は、Kajimura らにより報告されている。Histamine 表面灌流後、water permeability (L_p) は増加し、6分後に最大値に達する。gap の size の評価の指標となる effective oncotic pressure ($\sigma\Delta\pi$) は1分後で大きく減少し、3分後、6分後ではさらなる減少は認められないことから、定常状態では存在しない liposome が透過できるサイズの大きな gap は、比較的早い time point で形成されることが示唆されている。図5には腸間膜細静脈壁への liposome の集積を三次元の image で示した。

表面灌流開始後 1 分後では

leukocyte がある部分に liposome の集積がみられ、2分後には血管壁が竹の節のように顕著な rhodamine の蛍光がみられた。3分後以降ではさらなる集積はみとめられなかった。この変化は、前述した GAP formation の time course と一致していることが判明した。

C-5. マウス脳梗塞モデルでの liposome 前投与の効果

Laser ablation および histamine による 2 種類の血管障害モデルで liposome が障害部位に特異的に集積する性質を有することが判明したことから、脳血流虚血再灌流後に起きる血管内皮障害部位にこの anionic liposome が集積し plasma leakage の増加を抑制する効果をもつ可能性を、マウス脳梗塞モデルを構築し検討した。Blood brain barrier dysfunction の指標となる plasma protein の脳組織への漏出を macroscopic に sham operation、vehicle、および liposome 投与の三群で比較した(図 6A)。Control では Evans blue の leakage はみられないのに対し、虚血再灌流4時間の脳組織では顕著な leakage が認められた。Evans blue (EB) content を測定したところ vehicle 投与群では 7.5 ± 0.5 ng EB/mg brain ($n=10$)、一方 liposome 投与群では 4.8 ± 0.6 ng EB/mg brain ($n=10$) と有意に減少した(図 6B)。

肝臓、腎臓、肺ではこのような差は認められなかった。

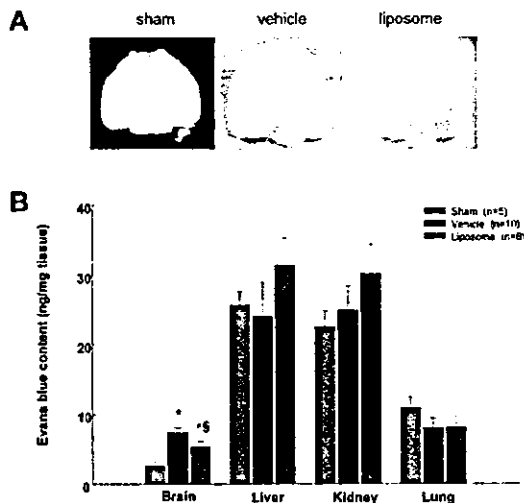


図6. C57black/6 マウス脳梗塞モデルにおける anionic liposome の効果。A. albumin-bound の Evans blue の脳組織への漏出。 B. 各組織における Evans blue の血管外漏出。

D. 結論

liposome 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ことから、本研究ではこの粒子の挙動を *in vivo* で解析することを試みた。その結果、本研究班で作製した PEG modified anionic liposome には血管内皮細胞障害部位へ集積、漏出する性質があり、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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiura, Y., Kashiba, M., Hoshikawa, K., Sasaki, R., Saito, K., Kimura, H., Maruyama, K., Goda, N., Suematsu, M. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxid. Redox Signaling* 2005, in press.

2. Fujii, K., Sakuragawa, T., Kashiba, M., Sugiura, Y., Maruyama, K., Goda, N., Nimura, Y., Suematsu, M. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver. *Antioxid. Redox Signal.* 2005 in press.

3. Tomita, K., Azuma, T., Kitamura, N., Nishida, J., Inokuchi, S., Nishimura, T., Suematsu, M., Ishii, H. Pioglitazone prevents alcohol-induced fatty liver in rats through upregulation of c-Met. *Gastroenterology* 126, 873-885, 2004.

4. 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*.39: 1099-1109, 2004.

5. 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.

2. 学会発表

1. 「メタボローム：網羅的代謝解析技術によるガス分子を解した新しい臓器機能制御機構の解明」、末松 誠、第3回生態機能研究会、2004年7月23日（箱根）

2. 「Erythrocytes as an oxygen-sensing regulator of glycolysis and adenosine metabolism: Evidence from high-throughput metabolome analysis」、末松 誠、The 2nd Japan-United Kingdom Platelet Conference、2004年9月2日（Oxford, United Kingdom）

3. 「網羅的代謝解析法によるCOの新しい標的分子の検索とその病態生理学的意義」、末松 誠、第1回 Heme Oxygenase 研究フォーラム、特別講演、2004年9月4日（京都）

4. 「メタボローム解析からわかる赤血球の低酸素応答とその臨床的意義」、末松 誠、第19回日本救命医療学会総会、2004年9月17日（東京）

5. 「メタボローム解析技術による新規

代謝制御系の探索」、末松 誠、BioJapan 2004、2004年9月30日（東京）

6. 「Roles of hemoglobin allostery in oxygen sensing in erythrocytes: Evidence from metabolome analysis」、末松 誠、The 2nd Kyoto University International symposium “Leading Project for Biosimulation”、2004年9月27日（京都）

7. 「Visualization of gaseous signalings *in vivo*」、梶村真弓、末松 誠、The 9th Keio Medical Award Symposium、2004年11月30日（東京）

8. 「メタボローム解析法による赤血球の新しい生理作用の検索」、末松 誠、第27回日本分子生物学会、2004年11月30日（神戸）

9. 「メタボローム解析法による赤血球の新しい生物作用の検索と医学への応用」、末松 誠、慶應義塾先端科学技術シンポジウム、2005年1月28日（東京）

厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

α IIb β 3 インテグリン活性化機構の解明

分担研究者 鎌田徹治（慶應義塾大学医学部解剖学教室助手）

研究要旨

血小板は出血部位で生成されたトロンビンなどの刺激によって活性化を受け、損傷血管壁あるいは互いに接着することによって止血血栓を形成する。有効かつ安全な人工血小板を開発するためには、血小板と同様に、出血部位のみで凝集する機能を付与することが不可欠である。よって血小板 α IIb β 3 インテグリンの活性化メカニズムを解明することは、この目的を達成するうえで重要なテーマである。前年度研究にて、我々は α IIb β 3 インテグリンには少なくとも二つの conformer があり、bent conformer は low-affinity form であること、extended conformer は high-affinity conformer であることを示した。すなわち、 α IIb β 3 は活性化によって bent から extended conformer に構造を変えると考えられる。本年度の研究では、 α IIb β 3 と構造の近い α V β 3 のキメラを作成し、 α IIb β 3 活性化に与える影響を調べた。その結果、 α IIb 鎖細胞膜近傍の calf-2 ドメインと β 3 鎖の EGF4- β TD ドメイン間の相互作用が、bent conformer から extended conformer への移行、すなわち α IIb β 3 活性化の調節に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。calf-2 と EGF4- β TD ドメイン間に人工的にジスルフィド結合を導入すると inside-out シグナルによる α IIb β 3 活性化が完全に抑制されることから、逆に calf-2 と EGF4- β TD ドメインの解離をおこすことにより α IIb β 3 活性化を惹起することができるかと予想される。この結果を応用し、calf-2 と EGF4- β TD ドメイン間に人工的なトロンビン切断部位を導入することにより、トロンビン存在下のみで活性化しうる α IIb β 3 分子を作成することが可能であると考えられる。

1. 研究目的

二価イオンはインテグリンとリガンドの結合に不可欠であるばかりでなく、インテグリン活性にも大きな影響をあたえることが知られている。中でも Mn^{2+} は強い活性化作用を有する。これらの二価イオンはインテグリン分子中に存在する二価イオン結合部位に結合することによってリガンド結合に関与すると考えられる。結晶構造の解析からインテグリン α 鎖には5箇所、 β 鎖には3箇所の二価イオン結合部位が存在することが

明らかにされたが、最近 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンが β 鎖の3箇所の二価イオン結合部位に結合することによってリガンド結合に影響を与えることが明らかにされた。しかし、 α 鎖の二価イオン結合部位の役割はいまだ不明である。

血小板の主要インテグリンである α IIb β 3 と内皮細胞などに存在する α V β 3 は共通の β 鎖をもち、 α 鎖も一次構造上高い相同性を有する。機能的にもこれらのインテグリンは共にフィブリノーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチンなどと RGD 依

存性に結合することが知られている。このように、 α I**IIb** β 3 と α V β 3 は高い構造的・機能的相同性を有するが、不思議なことに Mn^{2+} に対しては異なった反応を示す。 Mn^{2+} は α V β 3 に対し強いリガンド結合を誘導するが、 α I**IIb** β 3 に対する作用は非常に弱い。本研究では、この Mn^{2+} に対する二つの β 3 インテグリンの反応性の違いを利用し、 α I**IIb** と α V のキメラ分子を作成してその Mn^{2+} 存在下でのリガンド結合を解析することにより、インテグリン α 鎖における機能的に重要な二価イオン結合部位を同定することを目的とする。

2. 研究方法

I) 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 I**IIb** 抗体

SZ22 ; 抗 α I**IIb** 抗体

VNR5-2 ; 抗 β 3 抗体

PT25-2 ; 抗 α I**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

II) α I**IIb**/ α V キメラ, 変異 α I**IIb**, α V, β 3 cDNA の作成

インテグリン α 鎖の細胞外ドメインは N 末端側から β -propeller, thigh, calf-1, calf-2 ドメインで構成される。図 1 A に示すように計 11 個の α I**IIb**/ α V キメラ分子を作成した。各ドメインの境界は α V β 3 インテグリンの結晶構造をもとに設定し、各 α I**IIb**/ α V キメラ cDNA は overlap extension PCR 法により作成した。変異 α I**IIb**, α V, β 3 cDNA はともに site-directed mutagenesis 法を用いて作成した。 α I**IIb**, β 3 cDNA は哺乳動物発現ベクター-pBJ

-1 に挿入して用いた。

III) 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 I**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。

IV) FACS

細胞は 3.5mM EDTA 加 PBS にて剥離し、1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$ 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。

V) フィブリノーゲン結合実験

フィブリノーゲン (Fbg) は FITC で標識した。まず変異インテグリンを発現した CHO 細胞を抗 β 3 抗体 VNR5-2 と反応させた後、RPE-標識ヤギ抗マウス IgG と反応させた。一部の実験では細胞を剥離した後 VNR5-2 と反応させる前に 10 mM DTT と 37°C, 15 分間反応させた。細胞を 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$ または 1 mM $MnCl_2$ を含む Tyrode-HEPES buffer に resuspend したのち 200 μ g/ml の FITC 標識 Fbg と反応させ、細胞に結合した Fbg 量を FACS で測定した。一部の实验では、Fbg とともに活性化抗体である PT25-2 を 10 μ g/ml 添加して行った。この際インテグリンの発現の高い細胞集団 (FL2 > 500) の領域にゲートを設定し、この領域における FL1 の median fluorescence

intensity (MFI) を測定した。

3. 研究結果

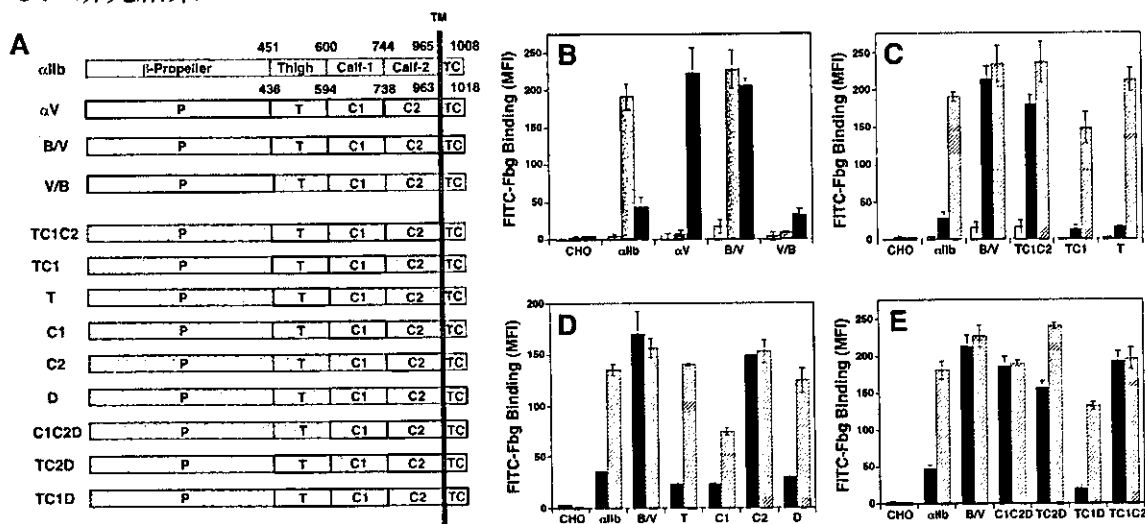


図 1.

I) Mn^{2+} 応答部位はインテグリンの head 領域ではなく stalk 領域に局在する - $\alpha V \beta 3$ 結晶構造では, β -propeller ドメインがインテグリンの head 領域を, thigh, calf-1, calf-2 ドメインが stalk 領域を構成する. 図 1 B に示したように, 野生型 α IIB $\beta 3$ を発現した CHO 細胞 (α IIB) は Mn^{2+} 存在下 (gray bar) では Fbg と強く結合したが, 1 mM Mn^{2+} 存在下 (solid bar) ではわずかな結合しか観察されなかった. これに対し, 野生型 $\alpha V \beta 3$ を発現した CHO 細胞 (αV) は Mn^{2+} 存在下で強く Fbg 結合に結合した. 一方, α IIB と αV の stalk 領域を交換したキメラ分子を発現した CHO 細胞では全く逆の現象が観察された. すなわち, α IIB の β -propeller ドメインと αV の stalk 領域からなるキメラ分子 (B/V) を発現した細胞は Mn^{2+} 存在下で強く Fbg と結合したが, αV の β -propeller ドメインと α IIB の stalk 領域からなる分子 (V/B) を発現

した細胞と Fbg の結合は著しく減弱していた. これらの結果は, インテグリンの Mn^{2+} 応答部位はインテグリンの head 領域ではなく stalk 領域に局在することを示唆している.

II) インテグリンの Mn^{2+} 応答部位は calf-2 ドメインに局在する - 次にこの Mn^{2+} 応答部位をさらに限局するため, 図 1 A に示したような domain-swapping キメラ分子を作成し, これを発現した細胞への Fbg 結合を調べた. まず始めに高い Mn^{2+} 応答性を示した B/V キメラの stalk 領域の C 末端側から α IIB 配列に戻す操作を行った. この結果, TC1C2 は B/V と同様の Mn^{2+} 応答性を有するが, TC1, T では Mn^{2+} 応答性を欠如することがわかった (図 2 C solid bar). このことは Mn^{2+} 応答性には αV calf-2 ドメインが必要であることを示している. 次に Mn^{2+} 応答性が αV calf-2 ドメインだけによるものか否かを確認するため, α IIB のドメイン配列を一つずつ

を αV ドメインの配列に交換する操作を行った。この結果 T, C1, D は Mn^{2+} 応答性を欠如するが, C2 は高い Mn^{2+} 応答性をもつことがわかった (図 2D solid bar)。一方, B/V キメラの stalk 領域ドメインの αV 配列を αIIb 配列に戻してやると, calf-2 ドメイン配列を αIIb に戻した時のみ (TC1D) Mn^{2+} 応答性が失われることがわかった (図 2E solid bar)。これらの結果は, $\beta 3$ インテグリンの Mn^{2+} 応答部位は細胞膜近傍の calf-2 ドメインに存在することを強く示唆している。

III) $\alpha V \beta 3$ インテグリン stalk 領域の二価イオン結合部位は Mn^{2+} 応答性に関与しない——インテグリン α 鎖に存在する 5 個の二価イオン結合部位のうち, 4 個は head 領域の β -propeller ドメインに, 1 個は stalk 領域に局在する。しかしながら, この stalk 領域の二価イオン結合部位は αV の thigh と calf-1 ドメインの間に存在し, calf-2 ドメインには明らかな二価イオン結合部位は見られない。この矛盾を解決するため, stalk 領域の二価イオン結合部位を構成する酸性アミノ酸残基 Asp-599 と Glu-636 をそれぞれ Ala に置換し, Mn^{2+} 存在下での $\alpha V \beta 3$ と Fbg の結合に対する影響を調べた。これらのアミノ酸残基は二価イオン結合のためには必須であり, 変異はこの部位への二価イオン結合を阻害すると考えられる。しかしながら, これらの変異は Mn^{2+} 存在下での $\alpha V \beta 3$ への Fbg 結合に全く影響を与えなかった (図 2 solid bar)。この結果は, $\alpha V \beta 3$ の Mn^{2+} 応答部位が calf-2 ドメインに存在することと矛盾しないことを示している。

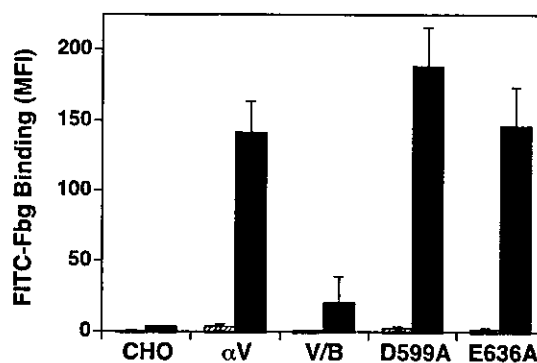


図 2

IV) α calf-2/ β EGF4- β TD ドメイン間相互作用はインテグリン活性を調節する——では, calf-2 ドメインはどのようにして $\alpha V \beta 3$ の Mn^{2+} 応答性に関与しているのだろうか? $\alpha V \beta 3$ 結晶構造 (図 3A) では αV (blue) の calf-2 ドメインと $\beta 3$ (red) の EGF4, β TD とは密接しており, 広い interface を形成していることがわかる。このことは, calf-2/EGF4- β TD ドメイン間 interface の結合の強さの違いが Mn^{2+} 応答性に関与する可能性を示唆している。この仮説を確かめるため, まずこの interface に人工的にジスルフィド結合を導入して calf-2/EGF4- β TD 間の解離がおこらない分子を作成し, Fbg 結合に与える影響を調べた。図 3A に示したように, αV 鎖 calf-2 ドメインのアミノ酸残基 Ser-749 (yellow) と $\beta 3$ 鎖 β TD の Asp-606 (orange) は物理的に近く, これらの残基を同時に Cys 残基に置換することにより, ジスルフィド結合を導入することが可能である。 αV Ser-749 と $\beta 3$ Asp-606 をそれぞれ単独で Cys に置換した場合 ($\alpha V S749C$, $\beta 3 D606C$), Mn^{2+} 存在下 Fbg 結合に大きな影響を与えなかったが, これらの残基を同時に Cys に置換したところ (749/606), Fbg 結合は野生型

$\alpha V \beta 3$ の約 1/3 に抑制された (図 3 B solid bar). この抑制効果は細胞を DTT 処理し, ジスルフィド結合を還元することにより完全に失われた (図 3 B hatchet bar).

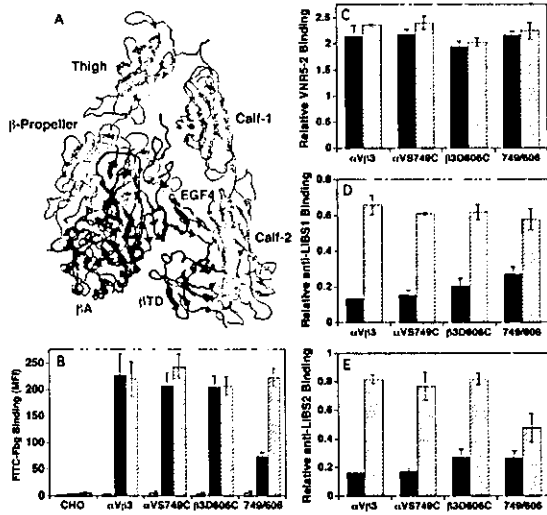


図 3

次にこの α / β 間ジスルフィド結合が $\alpha V \beta 3$ の conformation にあたえる影響を調べた. $\alpha V \beta 3$ の conformation 変化をモニターするために, 各変異 $\alpha V \beta 3$ を発現した CHO 細胞と抗 LIBS 抗体との結合を FACS にて測定した. 抗 LIBS 抗体はリガンドと結合したインテグリンと選択的に結合する抗体である. 図 3 E に抗 LIBS-2 抗体の結合を示す. αV Ser-749 と $\beta 3$ Asp-606 をそれぞれ単独で Cys に置換した場合 ($\alpha VS749C$, $\beta 3D606C$) は抗 LIBS-2 抗体の結合に大きな変化はみられなかったが, これらの残基を同時に Cys に置換した場合 (749/606) には, RGD ペプチド存在下での抗 LIBS-2 抗体の結合 (hatchet bar) に明らかな減少がみられた. 抗 LIBS-2 抗体のエピトープは βTD 内にあることが既に報告されている. これらの結果はインテグリン活性化に伴って calf-2/EGF-4- βTD 間の解

離がおこることを示唆している.

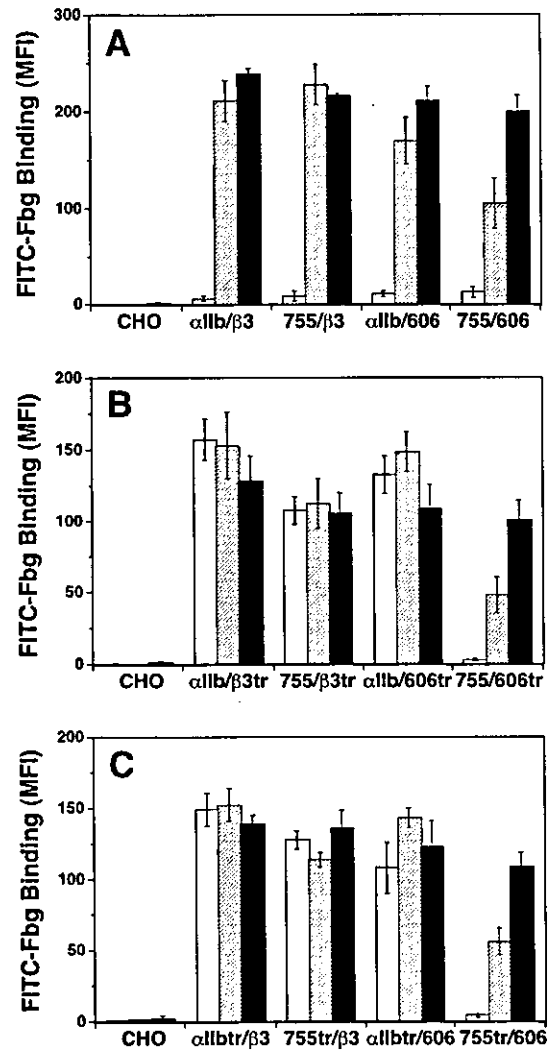


図 4

VI) calf-2/EGF-4- βTD 間ジスルフィド結合は inside-out signaling を完全に抑制する -- calf-2/EGF-4- βTD 間にジスルフィド結合を導入することにより Mn^{2+} による $\alpha V \beta 3$ の活性化が阻害されることがわかった. では, 他の活性化刺激によるリガンド結合への影響はどうであろうか? この問題に答えるために, $\alpha IIb \beta 3$ の calf-2/EGF-4- βTD interface に同様のジスルフィド結合を導入し, 活性化抗体と inside-out signaling による Fbg 結合に対する影響を調べた. αV Ser-749

に相当する α IIb Phe-755 と β 3 Asp-606 をそれぞれ単独で Cys に置換した場合 (755/ β 3, α IIb/606), 活性化抗体 PT25-2 によって誘導される Fbg 結合 (図 4 A hatchet bar) は, 野生型 α IIb β 3 (α IIb/ β 3) に比べ有意な差は認められなかった. しかし, これらの残基を同時に Cys に置換したところ (755/606), PT25-2 による Fbg 結合は約 50% 阻害された. この阻害効果は DTT 処理により完全に失われた. 次に inside-out signaling によるインテグリン活性化を mimic するために, α IIb あるいは β 3 の細胞内ドメインを欠如した α IIb β 3 に対する Fbg 結合を調べた. インテグリンの細胞内ドメインを細胞膜直下で欠失させることにより, インテグリンが活性化することは既に報告されており, inside-out signaling を模倣するものと考えられている. 図 4 B に β 3 細胞内ドメインを欠如した α IIb β 3 に対する Fbg 結合を示す. 完全な細胞内ドメインを有する場合と異なり, β 3 細胞内ドメインを欠如した α IIb β 3 は活性化抗体非存在下でも強く Fbg を結合した (open bar). この分子内にさらに図 4 A と同じ Cys 変異を導入したところ, α 鎖, β 鎖単独の変異 (755/ β 3tr, α IIb/606tr) は大きな影響を与えなかったが, F755C/D606C double mutation (755/606) は Fbg 結合を完全に阻害した. この阻害効果は PT25-2 添加によっても完全に中和されなかったが (hatchet bar), DTT 処理によってはじめて野生型 (α IIb/ β 3tr) と同等の Fbg 結合がみられた (solid bar). α IIb 細胞内ドメインを欠失させた α IIb β 3 でも同様の結果が得られた (図 4 C).

4. 考察

本研究では, α IIb β 3 と α V β 3 の Mn^{2+} に対する反応性の違いを利用して, β 3 インテグリンの Mn^{2+} 応答部位が α 鎖の calf-2 ドメインであることを示した. α V β 3 の結晶構造では, α 鎖の calf-2 ドメインは二価イオン結合部位を持たないものの, β 3 鎖の EGF4- β TD と約 700 Å の広い結合面を形成している. 考えられる機序として, このドメイン間相互作用がインテグリン活性に影響を与えることが考えられる. 実際にこの calf-2/EGF4- β TD interface をジスルフィド結合によって安定化させると Mn^{2+} による活性化が阻害された. しかし, このジスルフィド結合導入による抑制効果は Mn^{2+} に限らず, 活性化抗体, inside-out signaling によるインテグリン活性化をも抑制した. 特に inside-out signaling による活性化への抑制効果は著しく, リガンド結合がほぼ完全に阻害された. これらの結果は, calf-2/EGF4- β TD 間の相互作用の強さによってインテグリン活性が調節されうることを示唆している. 特に inside-out signaling では calf-2/EGF4- β TD interface の解離が必須であると考えられる. Calf-2 ドメインがインテグリン活性に関与することはこれまでにも示唆されている. 抗 α IIb 抗 LIBS 抗体のエピトープが calf-2 ドメインに存在することが報告されている. Preliminary ではあるが, われわれのデータでは, 弱い活性化作用を有する二つの抗 α IIb 抗体のエピトープも calf-2 ドメイン内に存在することがわかっている. また, 興味深いのは白血球 elastase が calf-2 ドメインの一部を切断することにより α IIb β 3

の potentiation をおこすことである。これらの報告は抗体結合あるいは酵素による切断によって calf-2/EGF4- β TD interface が不安定化することにより、インテグリン活性化につながることを示唆している。また、白血球 elastase 切断部位をトロンビン切断部位にかえることによって、トロンビンによって活性化される α IIb β 3 をデザインすることが可能であろう。このような分子は出血部位のみで活性化されることが期待されるため、安全な人工血小板開発の大きな助けとなるであろう。

以上の結果から、われわれはインテグリンの活性化モデルを提唱した。インテグリン β 鎖の stalk 領域は α 鎖の stalk 領域だけでなく、 β 鎖の head 領域と広い interface を形成している。特に β 鎖の head と stalk 領域の間の interface はインテグリンを bent conformer に維持していると考えられる。このモデルでは、 β 鎖の head と stalk 領域の間の相互作用と、 β 鎖の stalk 領域と α 鎖の stalk 領域の間の相互作用は互いに影響しあう。 β head/

β stalk 間の interface の解離がおこると β stalk/ α stalk 間 interface が不安定となる。反対に β stalk/ α stalk 間 interface の解離がおこると β head/ β stalk 間 interface に影響し不安定となる。すなわち、 β stalk を挟んだ二つの interface の変化がリレースイッチのように互いに伝達しあうのである。Inside-out signaling では細胞内ドメインと tailin などの細胞内蛋白質の結合が β stalk/ α stalk interface の解離をひきおこす。これが β head/ β stalk interface を不安定化させるため、extended conformer への構造変化が促進される。Outside-in signaling ではリガンドとの結合が β head/ β stalk interface の解離をおこすため、 β stalk/ α stalk interface が不安定となる。この interface が解離することによって β hybrid ドメインの swing-out が促進され、リガンドとの親和性が高まるとともに、 α / β 細胞内ドメイン interface の解離がおこり、シグナル分子との結合部位を露出させるのである。

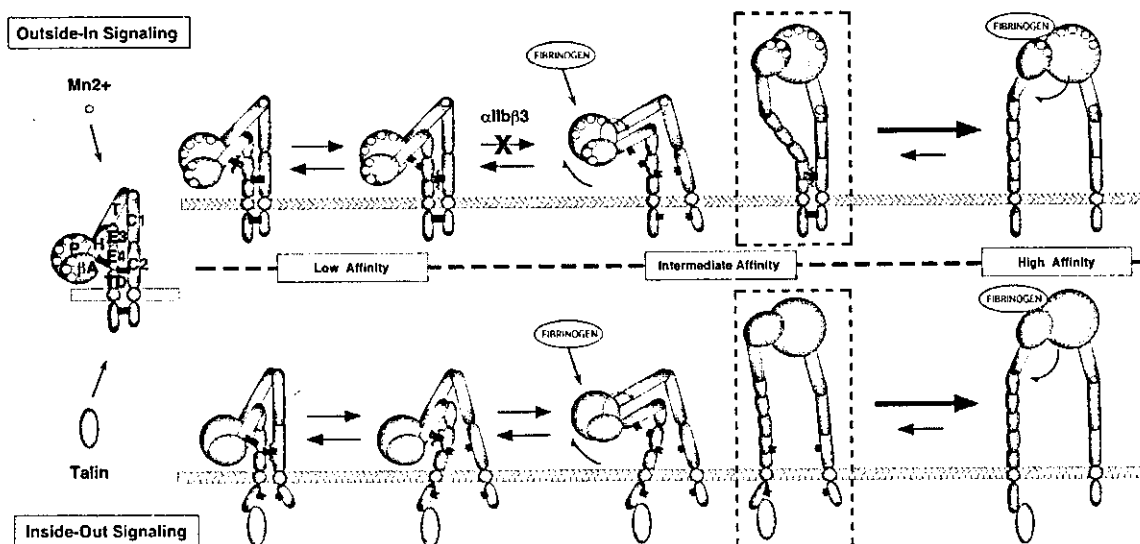


図5. インテグリン活性化のリレースイッチモデル

5. 結論

インテグリン活性の調節には、細胞膜近傍の α/β ドメイン間の相互作用が大きな役割をはたしていることが明らかとなった。このドメイン間の結合・解離を人工的に制御することによって、 $\alpha\text{IIb}\beta3$ 活性をコントロールすることができると考えられる。これを利用して、出血部位のみで活性化する $\alpha\text{IIb}\beta3$ をデザインし、人工血小板に応用することが可能であろう。

6. 健康危険情報：無し

7. 研究発表

1 論文発表：無し。

2 学会発表：

日本血栓止血学会第26回総会

アメリカ血液学会第45回総会

8. 知的財産権の出願・登録：無し

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	編集者名	書籍名	出版社名	出版年	ページ
Takeoka S	Design and modification of nanoparticles for Blood Substitutes	Ishii H, Suematsu M, Tanishita K, Suzuki H	Organ Microcirculation: A gateway to diagnostic and therapeutic interventions	Springer-Verlag Tokyo	2005	35-41
武岡真司	人工血液（赤血球、血小板）の最近の進歩	化学工学会 関東支部編	最近の化学工学 56 先端医療における化学工学	化学工学社	2004	49-57

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Okamura Y, Takeoka S, Teramura Y, Maruyama H, Handa M & Ikeda Y	Hemostatic effects of fibrinogen- γ chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles in vitro and in vivo	Transfusion	In press		2005
武岡真司	機能性分子素子としての人工赤血球・人工血小板の構築	日本顕微鏡学会関東支部	第 29 回講演会予稿集	15-21	2005
武岡真司	人工赤血球・人工血小板の開発の現状	臨床麻酔	Vol29:4	1-6	2005
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	Cardio Anesthesia	8 (1)	35-42	2004
武岡真司・岡村陽介	血小板代替物の展開	Molecular Medicine	41 (12)	1494-1500	2004
武岡真司・岡村陽介・池田康夫	血小板代替物の担体設計から Drug local delivery の可能性	日本血栓止血学会誌	15(1)	21-26	2004
Goto S	Propagation of arterial thrombi: Local & remote contributory factors	ARterioscler Thromb Vasc Biol	24	2207-2208	2004
Hagihara M, Higuchi A, Tamura N, Ueda Y, Hirabayashi K, Ikeda Y, Kato S, Sakamoto S, Hotta T, Handa S & Goto S	Platelets, after exposure to a high shear stress, induce IL10-producing mature dendritic cells in vitro	J of Immunol	172	5297-5303	2004
Goto S, Tamura N, Ishida H	Ability of anti-glycoprotein IIb/IIIa agents to dissolve platelet thrombi formed on a collagen surface under blood flow conditions	J of Am Collodge of Cardiol	44 (2)	316-323	2004
Goto S	Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effects of new antiplatelet agents	Current Vasc Pharmacol	2	23-32	2004
Goto S	Understanding the mechanism and prevention of arterial occlusive thrombus formation by anti-platelet agents	Curr. Med. Chem -	2	149-156	2004

Tomita k, Azuma T, Kitamura N, Suematsu M Ishii H et al:	Pioglitazone prevents alcohol-induced fatty liver in rats through upregulation of c-Met	Gastroenterology	126	873-885	2004
Kudo A, Kashiwagi S, Kjimura M, Yoshimura Y, Suematsu et al:	Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver	Hepatology	39	1099-1109	2004
Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematsu M, Majima M et al:	Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice	Hepatology	39	139-150	2004
Yasu T, Greener Y, Jablonski E, Suematsu M, Too S, et al:	Activated leukocytes and endothelial cells enhance retention of ultrasound contrast microspheres containing perfluoropropane in inflamed vnules	Int'l J of cardiol	98	245-252	2005
Fujii K, Sakuragawa T, Kashiba M, Maruyama K, Suematsu M et al:	Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver	Antioxid. Redox Signal.	In press		2005
Sugiura Y, Kashiba M, Maruyama K, HoshikawaK, Sasaki R, Suematsu M et al:	Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur- donteining amino acids in rat testes	Antioxid Redox Signaling	In press		2005
梶村真弓、柏木哲、市川美緒、末松誠	ガス状メディエーターの生体内挙動	血管医学	5 (3)	45-53	2004

研究成果の刊行物・別冊

Design and Modification of Nanoparticles for Blood Substitutes

SHINJI TAKEOKA

Key words. Liposome, Nanoparticle, Hemoglobin, Red-blood-cell substitute, Platelet substitute

Introduction

We have been developing the technology of stabilized and functionalized nanoparticles such as liposomes for 20 years. When phospholipids and cholesterol are dispersed into an aqueous solution, they spontaneously assemble to form vesicles with a bimolecular (bilayer) membrane. There are many parameters, such as size, size distribution, lamellarity (the number of bilayer membranes), membrane fluidity, surface charge, surface modification, membrane permeability, that characterize liposomes. They can be adjusted as need dictates to allow for changing encapsulation of functional molecules, release triggered by external stimuli, conjugation of functional sites on the surface, rolling or adhesion properties of liposomes, and control of blood circulation time. On the other hand, we have to consider their physical and chemical stability during storage or blood circulation. Surface modification with polyoxyethylene (POE) chains is one of the most effective ways to impart such stabilization.

In this chapter, I introduce two examples of nanoparticle application; one is a liposome encapsulating concentrated hemoglobin (Hb-vesicle) for a red-blood-cell substitute, and the other is a liposome bearing recognition proteins or peptides on the surface and used as a platelet substitute. The microcirculation, pharmacokinetics, and histopathological change were studied in relation to the characteristics of the particles as well as their oxygen-binding and releasing properties. In the case of the platelet substitutes, nanoparticles

Department of Applied Chemistry, School of Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

bearing receptor proteins of the platelet surface recognize the collagen surface under shear rates. The rolling and adhesion properties will be discussed depending on the stiffness or membrane fluidity of the particles.

Present Status of the Development of Red-Blood-Cell Substitutes [1,2]

Hb-vesicles that encapsulate concentrated hemoglobin with a phospholipids bilayer membrane have a similar structure to red blood cells, and are expected to be used soon in clinical tests because the degree of safety and efficacy are considered to be high. Although effective use of the hemoglobin from donated and expired blood should be promoted at the present stage, recombinant human hemoglobin will be used in the future. During hemoglobin purification from red blood cells, stroma including the glycoproteins which determine a blood type, proteins other than hemoglobin, and the viruses are removed by heating or filter processing. By encapsulating hemoglobin with a stabilized phospholipids membrane with POE-lipid, liquid-state preservation for 2 years is guaranteed at room temperature under nitrogen atmosphere [3], and with dry powder, further prolonged preservation is possible. These points are advantages for an artificial oxygen carrier.

The design of the red-blood-cell substitutes (POE-modified hemoglobin vesicles) are summarized in Fig. 1. Hb-vesicles are dispersed into a saline solution and enclosed with the bottle in a state of deoxidization. The hemoglobin concentration is 10 g/dl and is close to that of human blood. Moreover, because hemoglobin molecules are encapsulated, the colloid osmotic pressure of the solution is zero. Therefore, when regulation of colloid osmotic pressure

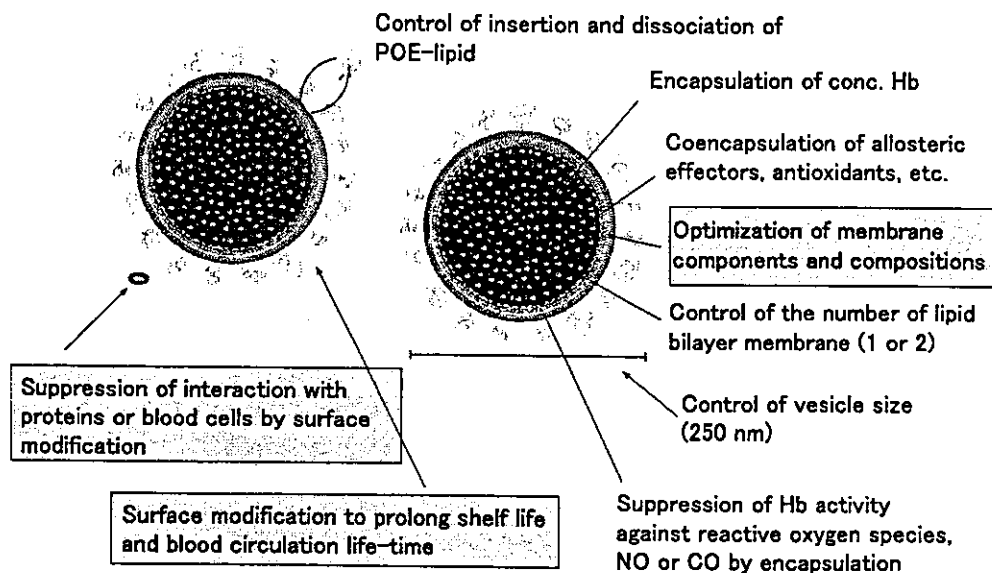


FIG. 1. Design of POE-modified hemoglobin vesicles (Hb-vesicles) as red-blood-cell substitutes

is needed, a solution of colloids such as albumin and polysaccharide will be used with the Hb-vesicle dispersion. The particle diameter is strictly adjusted to 250 nm. The degree of oxygen affinity is adjusted to a suitable value by coencapsulating an allosteric effector such as pyridoxal 5'-phosphate. The optimization of the composition of the lipid components resulted in high encapsulation efficiency of hemoglobin in the Hb-vesicle, a stability of 2 years in a liquid state, the prevention of hemolysis, an appropriate lifetime in blood circulation, and avoidance of platelet and complement activation. Furthermore, large-scale manufacturing has been improved by the introduction of freeze-thawing and freeze-drying operations which can control a molecular assembling state before encapsulating hemoglobin molecules.

Present Results of Safety and Efficacy Tests

Although *in vivo* testing was carried out using rats or hamsters, we confirmed the fundamental safety and oxygen transporting ability. Safety tests using primates is in progress. When 90% of the volume of rat blood was exchanged by the albumin dispersion of the Hb-vesicles, the oxygen partial pressure of the renal cortex was maintained as was blood pressure [4]. On the other hand, when the blood was exchanged by an albumin solution in the same concentration, the fall of blood pressure and oxygen partial pressure of the renal cortex became noticeable at 70% exchange, and all rats died just after 90% exchange.

In the hamster 80% exchange transfusion examination with the albumin dispersion of the Hb-vesicles, the noninvasively measured oxygen partial pressure of the subcutaneous tissue microcirculatory system was maintained at 5 times or more than that of the control albumin group although it fell to 60%–70% before exchange [5]. The contraction of a resistance blood vessel and the rise of blood pressure was not confirmed at all, but it was confirmed with modified hemoglobin products. Because the Hb-vesicle has a size that does not penetrate a blood vessel, there is no influence on the activity of nitrogen oxide as an endothelium-derived relaxation factor [6]. Furthermore, the Hb-vesicles cannot penetrate the sinusoidal vessels of liver (several holes 10–200 nm in size are open in the blood vessels) like old red blood cells, but are metabolized by Kupfer cells of liver and macrophages in reticuloendothelial systems. On the other hand, acellular hemoglobin molecules in the liver influenced liver microcirculation by eliminating carbon monoxide as a gaseous vasodilator, caused overgeneration of bilirubin, and suppressed bile secretion [7,8]. The half-life of Hb-vesicles in human blood circulation was estimated to be about three days on the basis of the results in rats, rabbits, and monkey. Moreover, from details of the blood biochemistry examination and pathology examination in the single and repetitive administration, we confirmed the transitional rise of lipase in connection with lipid decomposition, the transitional rise of a cho-

lesterol value, iron content, and the transitional hypertrophy of a reticuloendothelial system [9]. It was concluded that Hb-vesicles are expected to function adequately in cases of extensive bleeding.

Development of Platelet Substitutes

The history of platelet substitutes is short compared with that of red blood cells, with few examples of research. A platelet has complicated functions, such as adhesion specific to the bleeding site, expansion, aggregation, secretion, and the activation of a blood coagulation system. Needless to say, we cannot make platelet substitutes that have these all. However, a bleeding tendency is strongly apparent in such bleeding diseases as Bernard-Soulier syndrome and thrombasthenia, in which adhesion and aggregation ability are lacking. In these conditions, a hemostatic effect can be expected by the infusion of particles having functions such as adhesion and the aggregation of platelets due to the assistance of the function of the remaining platelets. Although clinical tests were carried out with human red blood cells [10] or albumin microcapsules [11] conjugating fibrinogen, and with the dried powder of human platelets [12], all clinical tests were suspended due to problems of safety and efficacy. Moreover, since the blood components of human origin were used, the risk of infection cannot be avoided completely. The platelet substitutes created by our group use liposomes and recombinant human albumin as biocompatible particles. They also use recombinant proteins of the part of platelet membrane or synthetic oligopeptides by conjugating to those particles for the purpose of accumulation to the bleeding site involving native platelets, expecting to achieve hemostasis.

The mechanisms of platelet adhesion differ between the blood flow of high shear rate and that of low shear rate. As shown in Fig. 2, the hemostasis of the platelets to bleeding in a high shear rate begins from a platelet recognition of the von Willebrand factor (vWf) bound to the collagen in the subcutaneous tissue of a blood vessel exposed to the bleeding site, followed by platelet adhesion and rolling. This recognition ability comes from the GPIb/V/IX complex containing GPIb α on the surface of a platelet [13]. Next, the platelets will progress and a granule will be secreted if GPIaIIa ($\alpha_2\beta_1$ integrin) or GPVI on the surface of the platelet directly interacts with the collagen and is activated. Fibrinogen recognizes the activated GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin), constructs a crosslink between blood platelets, forms an aggregate, and serves as primary hemostasis. Hemostasis is completed by formation (secondary hemostasis) of the fibrin clot by induction of the coagulation system.

The target platelet substitutes bear the water-soluble part of receptor proteins such as GPIb α which recognizes collagen through vWf under the blood

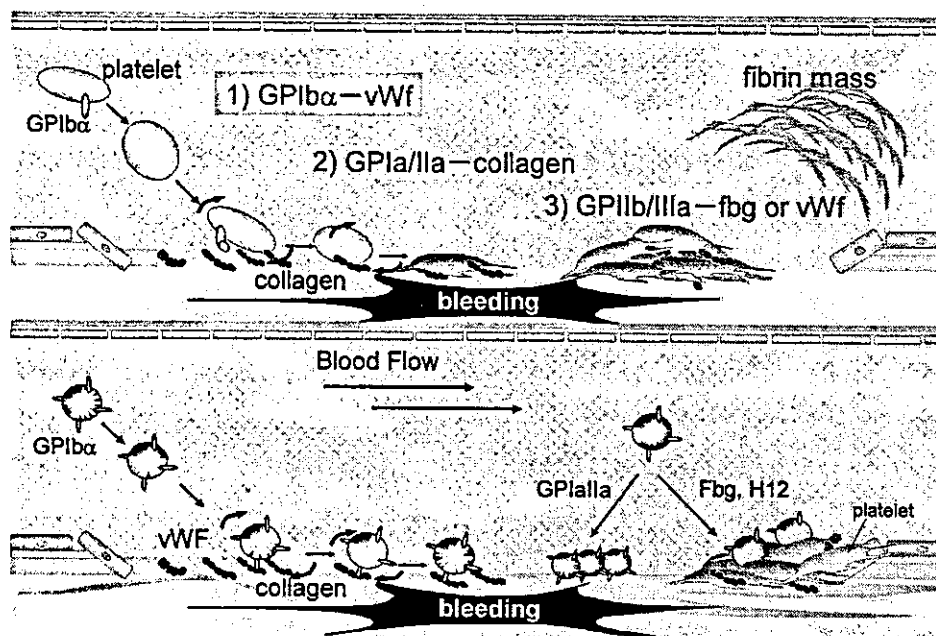


FIG. 2. Design of platelet substitutes studied from functions of natural platelets

flow of high shear rates and GPIIaIIa which recognizes collagen directly at low shear rates. Instead of GPIIb/IIIa on the surface of an activated platelet, they bear the fibrinogen or its oligopeptide to assist the platelet aggregation as ligands of the GPIIb/IIIa.

If an anti-GPIIb/IIIa antibody is added to a platelet dispersion to inhibit GPIIb/IIIa activity, the platelets roll on the vWf-immobilized plate along the flow direction by the interaction of rGPIb α on the platelet and the vWf. Interestingly, phospholipid liposomes conjugating rGPIb α roll on the vWf-immobilized plate as well [14]. The number of the rolling liposomes increased with the shear rate, indicating the characteristic of rGPIb α . Moreover, the rolling speed was correlated with the membrane fluidity of the liposomes. That is, the rolling speed of "soft" liposomes was low, whereas that of the "hard" liposomes was high [15]. However, the rGPIb α -liposomes did not continue rolling but departed from the plate after rolling some length. This was remarkable as the "soft" liposomes. When the amount of rGPIb α on the surface of the liposome after the experiment was measured, it was suggested that rGPIb α -lipid should dissociate from the bilayer membrane during the rolling on the vWf-plate. Now rGPIb α -lipid which cannot dissociate serves as a point of a molecular design.

On the other hand, the rGPIIaIIa-liposomes directly recognize collagen under the blood flow of low shear rates and adhered to (stopped at) the collagen-immobilized plate [16]. In this case, the number of the adhering liposomes decreased as the shear rate rose. However, liposomes conjugating both rGPIb α and GPIIaIIa adhered on the collagen plate under the blood flow from low to high shear rates [17]. If the liposomes having platelet activation factors