

図 2. liposome にコートした rhodamine の蛍光強度を指標とした血管障害部位の三次元構築。Gray level 60 を閾値とし、それ以上の蛍光強度の point を緑でハイライトした (Panel 1-17, optical section の厚さは 2.5 micron)。これらを積算し、total injury area,  $6600 \mu\text{m}^2$  を算定した。Scale, 30 micron.

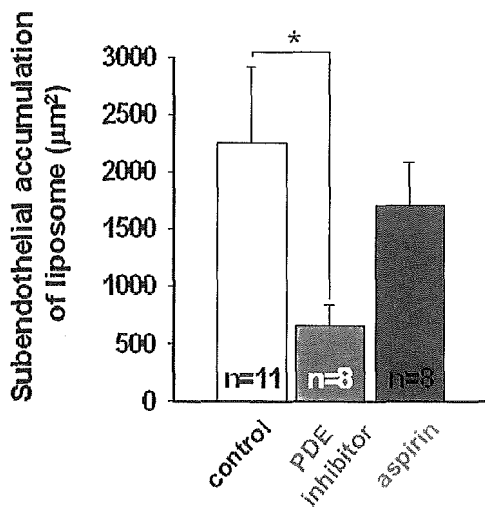


図 3. liposome にコートした rhodamine の蛍光強度を指標とした血管障害サイズの比較

Liposome の血管内皮下腔への集積を障害の指標とした解析により、phosphodiesterase 阻害剤投与群で血管障害面積の減少が認められた (図 3)。このような作用は aspirin 投与群では認められなかった。これらの結果から phosphodiesterase 阻害剤が破綻性出血後の endothelial barrier をより tight に保持し制御する作用をもつことが示唆された。

実験を行った細静脈の laser ablation 前の血流動態の parameter を図 4 に示した。実験を行った 3 群間で shear rate や center flow velocity に差異は認められなかった。

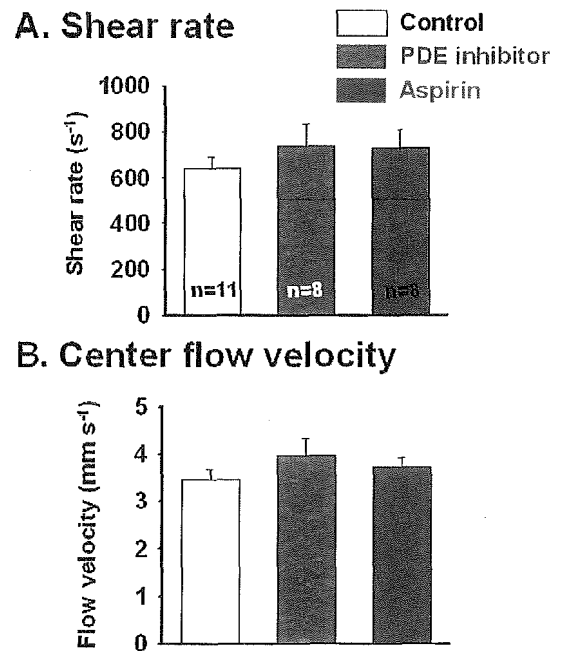


図 4. 血流動態のパラメータ。\* Shear rate は Newtonian definition の仮定下、 $\gamma = 4 u_{\text{mean}}/\Gamma$  に基づき算定。

## C-2. 血流速度と血栓サイズ・形状の経時的変化

図5に、これらの細静脈で行った laser ablation 後の血栓サイズ・形状の経時的変化を示した。測定した血栓の面積(area)、かさ高さ(height)、血管壁に密着する基底部の長さ(length)の平均値をplotした。

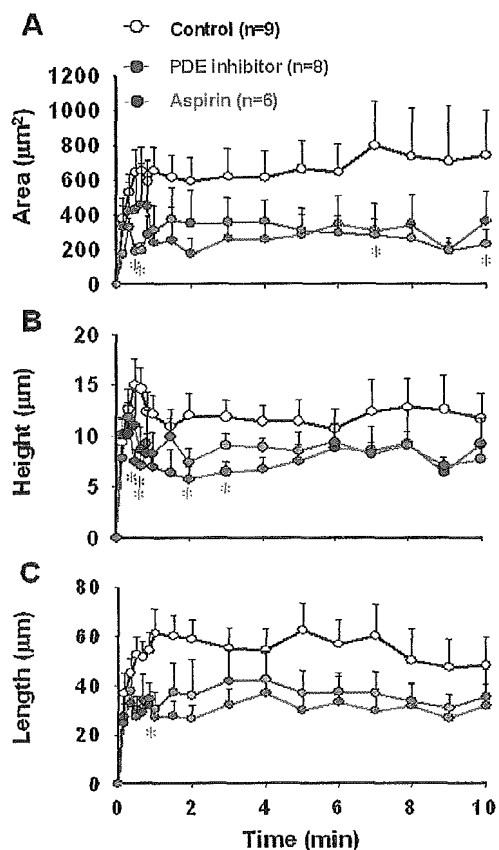
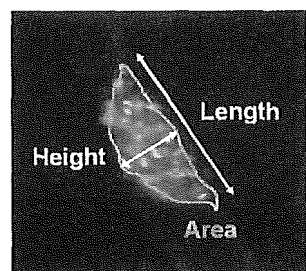


図5. 血栓の形状の経時的変化。血栓の面積(A)、血管壁からの最大高 (B)、基底幅最大高 (C)。

Phosphodiesterase 阻害剤は破綻性出血惹起後約 30 秒以内という非常に早い time point で形成される initial plug の形成速度には影響を与えないが、その後の血栓形成は抑制することが判明した。area,

height, length の三つの parameter とともに、phosphodiesterase 阻害剤、aspirin 投与両群のいくつかの time point で control 群に比べて有意な減少が認められた (ANOVA, Fisher's multiple comparison,  $p < 0.05$ )。Control 群において血栓のかさ高さが時間とともに増すのに対し、phosphodiesterase 阻害剤投与群ではかさ高さの低い血栓が形成される傾向がみられた。Aspirin でも同様の傾向が認められた。

## C-3. 血栓と血流中の血小板との相互作用に及ぼす血小板機能抑制剤の影響

図6に、形成された一次血栓と血流中の血小板との相互作用を解析した結果を示した。一分間毎に剥離した血小板 (flying thrombus) の個数を凝集塊のサイズ別に方法に記したように5つのグループに分け、10分間で剥離した血小板の総個数として示した。

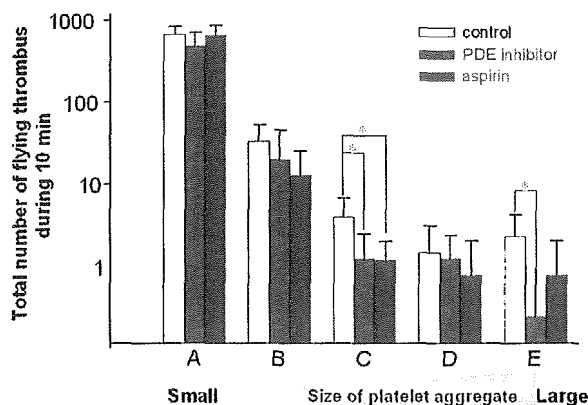


図6. Laser ablation により形成された一次血栓と血流中の血小板との相互作用に及ぼす血小板機能抑制剤の影響。10分間に剥離した血小板 (flying thrombus) の個数を剥離した凝集塊のサイズ別に示した。単一血小板 (A)、2-5 個でなる小凝集塊 (B)、6-10 個でなる中凝集塊 (C)、11-15 個でなる中凝集塊 (D)、15 個以上の大凝集塊 (E)。\*,  $p < 0.05$  by Mann-Whitney U test.

血流中の単一血小板の血栓への“touch-and-go”には、3群間で差を認めなかった。しかし、図6のCに示すような血小板6から10個で形成される比較的大きな凝集塊の剥離する回数は、phosphodiesterase 阻害剤、aspirin 投与によって有意に減少した。この結果より、これらの阻害剤には、梗塞や狭窄の原因となる大きなサイズの血栓が障害部位下流に飛しょうする確率を減少させるような効果があることが示唆された。

#### C-4. 血小板機能抑制剤の止血プロセスに及ぼす効果

破綻性出血惹起後の微小血管における止血プロセスを評価するため、以下のような解析を行った。図7に示すように、記録した透過光画像をもとに ablation 部位から血管外に漏出した赤血球が占める面積を laser ablation 直後と10分後で測定し、その差を bleeding index として算定した。

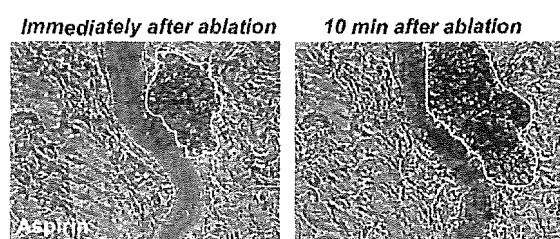


図7. Laser ablation 直後（左）および10分後の細静脈周辺の透過光画像。線で囲んだ部分が赤血球の漏出部位。

図8に、control, phosphodiesterase 阻害剤、および aspirin 投与群での laser ablation 後10分の画像を示した。Control と aspirin 群では、顕著な赤血球の血管外漏出が認められるのに対し、phosphodiesterase 阻害剤投与後は、ablation 後も、ほとんど赤血球の漏出が認められず、明らかにこの

群で bleeding index が減少していることが判明した。この結果より、phosphodiesterase 阻害剤が、不必要な血栓形成を抑制する効果を持ちながらも、生体内で起こるべき止血効果を阻害せずむしろ止血作用を増強させる効果を有することが示唆された。

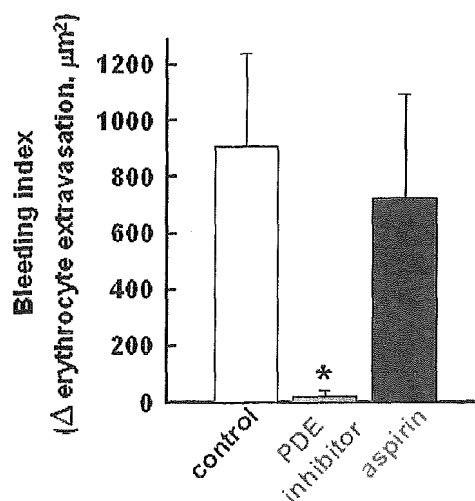
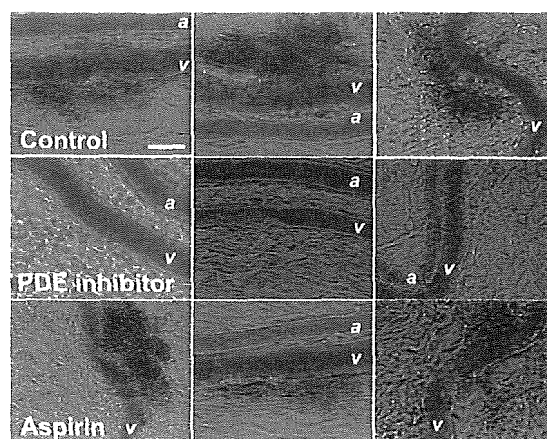


図8. 止血プロセスに及ぼす血小板機能抑制剤の効果。

#### D. 結論

Laser ablation により微小血管に破綻性出血を作製し、障害部位で形成される血小板血栓周辺での rhodamine 標識-liposome 及び CFSE 標識-血小板の挙動を confocal microscopy によりリアルタイムで撮像する imaging 技術を構築した。

この新規実験系により、これまで詳細が不明であった血栓形成部位での血小板の接着現象や局所での hemodynamics の変動をリアルタイムで追跡することが可能となった。この系を用い、異なる作用機序を有する抗血小板薬であるアスピリン（cyclooxygenase 阻害剤）および phosphodiesterase 阻害剤の抗血栓効果を評価したところ、二つの血小板機能抑制剤の効果を区別化することが可能であることが判明した。人工血小板の実用化に必須のプロセスである人工血小板粒子の生体内挙動を評価する観点より、この実験系が有用であることが示唆された。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### G. 研究発表

##### [論文発表]

1. Hattan, N., Kawaguchi, H., Ando, K., Kuwabara, E., Fujita, J., Murata, M., Suematsu, M., Mori, H., Fukuda, K. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc. Res.* 65(2), 334-344, 2005.
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.* 7(5-6), 788-794, 2005.
3. Suematsu, M., Tsukada, K., Tajima, T., Yamamoto, T., Ochiai, D., Watanabe, H., Yoshimura, Y., Goda, N. Carbon monoxide as a guardian against hepatobiliary dysfunction. *Alcohol Clin Exp Res* 29(11), 134S-139S, 2005.

4. Cameron-Schaefer, S., Kondo, K., Ishige, A., Tsuyama, S., Uchida, K., Hanawa, T., Suematsu, M., Watanabe, K. Maintaining the redox-balance intact: Gosha-jinki-gan but not insulin activates retinal soluble guanylate cyclase in diabetic rats. *Ophthalm. Res.* 38(2), 95-104, 2005.

10. Ishikawa, M., Kajimura, M., Adachi, T., Maruyama, K., Makino, N., Goda, N., Yamaguchi, T., Sekizuka, E., Suematsu, M. Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against nitric oxide-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation. *Circ. Res.* 97(12), e104-e114, 2005.

5. Suganuma, K., Tsukada, K., Tsuneshige, A., Kashiba, M., Yonetani, T., Suematsu, M. T-state stabilization of hemoglobin allostery by nitric oxide: a protection against post-ischemic hepatobiliary dysfunction. *Antioxid. Redox Signaling* (in press).

6. Yamashita, T., Shoge, M., Oda, E., Yamamoto, Y., Giddings, J.C., Kashiwagi, S., Suematsu, M., Yamamoto, J. The free radical scavenger, edaravone, augments NO release from vascular cells and platelets after laser-induced acute endothelial injury in vivo. *Platelets* (in press).

##### [邦文原著 著書]

1. 末松 誠、梶村 真弓、足立 健。ヘムオキシゲナーゼ-CO 系ニヨル血管機能制御機構とNOシステムとの相互作用 細胞工学 25 161-165, 2006.

##### [学会発表]

1. Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against nitric oxide-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation, The 4<sup>th</sup> international conference for heme oxygenase, Kajimura M., Ishikawa M., Goda N., Suematsu M. 2005年10月3日 (Boston, USA)

2. Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against nitric oxide-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation、梶村 真弓、第 78 回日本生化学会、2005 年 11 月 23 日（神戸）

3. Carbon monoxide suppresses NO generation in cultured porcine aortic endothelial cells、梶村 真弓、第 31 回日本微小循環学会、2006 年 2 月 10 日（東京）

#### 備考

本報告書における phosphodiesterase 阻害剤の表記に関しては、知的所有権確保のため名称を削除した。

本実験を施行するにあたっての 3 次元血栓撮像装置は、文部科学省 21 世紀リーディングプロジェクト生体・細胞機能シミュレーションプロジェクト「網羅的代謝計測技術に基づく細胞シミュレーションの構築とその応用並びに支援・基盤領域の研究開発」の助成金で導入したものである。本厚生科研費では血栓止血の定量的評価にこれを利用し、文部科学省 21 世紀リーディングプロジェクトでは血小板血栓止血シミュレーションの仮想実験の実証に利用しており、双方の実験内容に重複がないことを記す。

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

$\alpha$  IIb  $\beta$  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 専任講師

### 研究要旨

インテグリンには bent と extended の少なくとも二つの conformer があり、血小板  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 インテグリンは血小板の活性化に伴って bent conformer から extended conformer に大きく立体構造を変えると考えられている。すなわち、bent conformer は low-affinity form であり、extended conformer は high-affinity form であると想定されている。平成 15 年度の研究で bent conformer が実際に low-affinity form であることを証明したが、extended conformer の機能に関してはいまだに詳しく解析していない。また、平成 16 年度の研究から、われわれは  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の inside-out signaling による活性化は、 $\alpha$  IIb 鎖と  $\beta$  3 鎖の stalk 間の相互作用が解離することによって引き起こされるとする仮説 “relay-switch model” を提唱した。そこで本年度の研究では、 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 分子内に N-glycan 結合部位を導入した変異  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を CHO 細胞膜上に発現させることにより、1)  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 extended conformer は high-affinity conformer か? 2)  $\alpha$  IIb 鎖と  $\beta$  3 鎖の細胞膜近傍ドメインの解離が実際に  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 活性化を引き起こすか? についての検証を行った。その結果、 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の extended conformer は high-affinity form であり、 $\alpha$  IIb と  $\beta$  3 stalk 間の解離が  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 活性化を誘導することがわかった。これらの結果を応用し、人工的に活性制御可能な  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の開発が可能であることが示唆された。

### 研究目的

従来の電子顕微鏡を用いた  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の構造解析では、インテグリン N 末端側が球状のリガンド結合部位を形成し、C 末端は  $\alpha$  鎖・ $\beta$  鎖ともに棒状の stalk (tail) を形成することが観察されていた。ところが 2001 年の結晶構造解析で、 $\alpha$  V  $\beta$  3 は  $\alpha/\beta$  stalk の途中で折れ曲がり、球状ドメインを下に向けた、いわゆる bent conformer を呈していた。その後の  $\alpha$  V  $\beta$  3 の高解像度電

子顕微鏡解析でも、インテグリンには従来の電子顕微鏡像でみられた extended conformer と結晶構造でみられた bent conformer が存在し、 $Mn^{2+}$  あるいは RGD ペプチドの存在下で extended conformer が有意に増加することが示された (図 1)。以上の結果から、インテグリンは活性化に伴って low-affinity form である bent conformer から high-affinity form である extended conformer へ構造変化をおこすという

パラダイムが形成された。われわれの平成15年度の研究でも、 $\beta 3$ の head と stalk の間に人工的にジスルフィド結合を導入することによって bent conformer に固定された  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  は、フィブリノーゲンに対し低親和性であることが示された。しかし、最近  $\alpha \text{V} \beta 3$  インテグリンの bent conformer がフィブロネクチンと結合することが電子顕微鏡で示されるなど、このパラダイムを疑問視する結果も報告されている。

平成16年度の研究では  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  と  $\alpha \text{V} \beta 3$  の  $\text{Mn}^{2+}$  による活性化の違いから、インテグリン  $\alpha$  鎖の calf-2 ドメインと  $\beta$  鎖の EGF4、 $\beta$  TD 間の結合がインテグリンの活性調節に大きく影響することを示し、また calf-2 ドメインと  $\beta$  鎖の EGF4- $\beta$  TD 間にジスルフィド結合を導入することによって、inside-out signaling による  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  の活性化が完全に阻害されることを報告した。これらの結果から、inside-out signaling による  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  の活性化では、 $\alpha / \beta$  細胞内ドメイン結合の解離に引き続き、 $\alpha / \beta$  stalk 間結合が解離することによって  $\beta$  head/ $\beta$  stalk 間の結合が不安定となり、bent conformer から extended conformer への構造変化がおこる“relay-switch model”を提唱した。この仮説では  $\alpha$  と  $\beta$  の stalk が開くことがインテグリン活性化を誘導する。

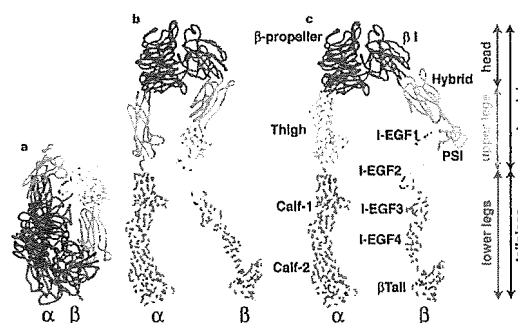


図 1

本年度の研究では、1) インテグリン bent conformer が低親和性であり extended conformer が高親和性であること、2)  $\alpha / \beta$  stalk の解離が  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  を活性化することをそれぞれの conformer に固定された分子を作成し証明した。これらの研究結果は平成15、16年度に得られた研究結果を補完するものであり、 $\alpha \text{IIb} \beta 3$  の活性化メカニズムの解明に大きく寄与するものである。また、これらの過程で得られた低親和性・高親和性  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  は、人工的に活性制御可能な  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  分子開発に応用可能であり、その応用法について考察した。

## 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  $\alpha \text{IIb}$  抗体

SZ22 ; 抗  $\alpha \text{IIb}$  抗体

VNR5-2 ; 抗  $\beta 3$  抗体

PT25-2 ; 抗  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  活性化抗体

## II) 変異 $\alpha$ IIb、 $\beta$ 3cDNA の作成。

変異  $\alpha$  IIb cDNA Q595XTT、D583NTT、T478NKT、D319C、M660XRT、F755C、変異  $\beta$  3 cDNA V332N、S674NGT、V332C/S674C、S367C/S551C、G382C/T564C、G388C/R636C、V359C、Y594A、T603A、D606C はともに site-directed mutagenesis 法を用いて作成した。 $\alpha$  IIb、 $\beta$  3cDNA 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  $\alpha$  IIb-pBJ1 50  $\mu$ g とともに変異  $\beta$  3-pBJ1 50  $\mu$ 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  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgCl}_2$  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) フィブリンノーゲン結合実験

フィブリンノーゲン (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  $\beta$  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  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgCl}_2$  または 1 mM  $\text{MnCl}_2$  を含む Tyrode-HEPES buffer に resuspend したのち 200  $\mu$ 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。一部の実験では、Fbg とともに活性化抗体である PT25-2 を 10  $\mu$ 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。

## 研究結果

I)  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 bent conformer は low affinity conformer である。——インテグリン  $\alpha$  鎖の細胞外ドメインは、N 末端側から  $\beta$ -propeller、thigh、calf-1、calf-2 ドメイン、 $\beta$  鎖は  $\beta$  A、hybrid、PSI、EGF1~4、 $\beta$  TD で構成される (図 1)。 $\alpha$  V  $\beta$  3 結晶構造では  $\beta$  head ( $\beta$  A、hybrid) と  $\beta$  stalk (tail) (EGF3、EGF4、 $\beta$  TD) の間に広い結合面が形成されており、この間の結合がインテグリンを bent conformer に保っていると考えられる。まず始めに、bent conformer に



固定された分子を作成するため、平成15年度に報告した V332C/S674C の他に S367C/T551C、G382C/T564C、G388C/R636C を作成した。これらの変異  $\beta 3$  は、 $\beta A/\beta TD$ 、hybrid/EGF3、hybrid/EGF4、hybrid/ $\beta TD$  の間にジスルフィド結合を形成するように設計されており、いずれの分子も extended conformer にはなり得ないと考えられる (図2)。これらの変異  $\beta 3$  を野生型  $\alpha IIb$  とともに CHO 細胞膜上に強制発現させ、Fbg との結合を調べたところ、全ての変異  $\alpha IIb \beta 3$  は活性化抗体 PT25-2 の存在下でも Fbg を結合せず、DTT 処理でジスルフィド結合を還元することによってはじめて Fbg を結合した。同様に、 $\alpha IIb$  thigh ドメインと calf-1 ドメインの間にジスルフィド結合を導入し、bent conformer に固定された  $\alpha IIb \beta 3$  分子も Fbg に対し低親和性であり、DTT 処理をしてジスルフィド結合を還元しない限り、Fbg と結合しなかった (データ掲載せず)。

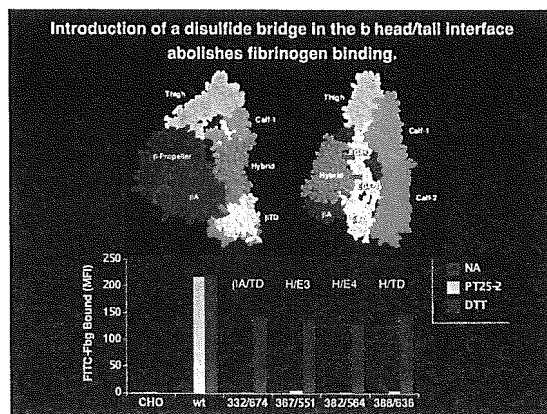


図2

これらの結果は、ジスルフィド結合を導入する場所にかかわらず、bent conformer に固定された  $\alpha IIb \beta 3$  は低親和性であることを示している。

II)  $\alpha IIb \beta 3$  extended conformer は high affinity conformer である。——インテグリン extension のリガンド結合活性に与える影響を調べるため、extended conformer に固定した分子を作成した。これらの分子には  $\alpha IIb$  genu の直下、genu のやや外側、genu の反対側に N-glycan 結合配列 (N-X-S/T) が導入されている (それぞれ Q595NTT、D538NTT、T478NKT) (図3)。立体構造から、genu の直下にある Q595 に糖鎖が結合した場合 (Q595NTT)、最も強く  $\alpha IIb \beta 3$  の extension を誘導すると考えられる。

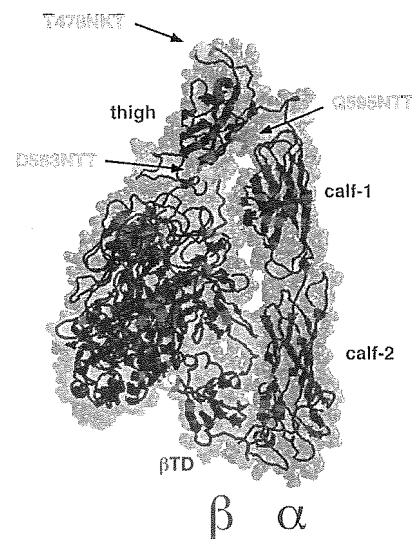


図3

Genu からやや離れた D538 に糖鎖が結

合した場合 (D538NTT)、誘導される extension の程度は Q595NTT よりも弱いと予想される。また、*genu* の反対側に糖鎖が結合した場合 (T478NKT) は、インテグリン extension を誘導する作用はほとんど無いと考えられる。野生型  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を発現した CHO 細胞に比べ、Q595NTT、D538NTT を発現した細胞は PT25-2 による活性化なしに Fbg を結合した。活性化の程度は Q595NTT > D538NTT であった。一方 T478NKT は野生型  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 と同様、PT25-2 で活性化されない限り Fbg を結合しなかった (図4)。また、 $\beta$  A/ $\beta$  TD 間に N-glycan 結合部位を導入した場合 ( V332N、S674NGT、V332N/S674NGT) も、野生型  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 に比べ有意な活性化がみられたものの、その作用はごく軽度 (<D538NTT) であった (データ掲載せず)。

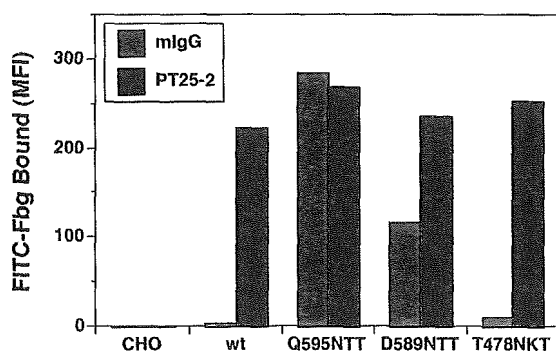


図4

これらの結果は  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の extended conformer は高親和性レセプターであり、活性化の度合いは extension の度合いに依存する傾向があることを示

唆している。

III) Q595NTT の活性化作用は糖鎖結合に依存する。——  $\alpha$  IIb Q595NTT 変異の活性化作用が糖鎖結合によるものか単なる変異によるものかを鑑別するため、Q595 に異なる変異を導入し、その Fbg 結合に与える影響を調べた (図5)。Q595NTT 以外に Q595NTS が同等の活性化作用を持つ他、ATT、DTT、WTT は有意な活性化作用を持たなかった。また、Q595、R597 をそれぞれ単独で N (Q595NTR)、T (Q595QTT) に置換しても活性化は得られなかった。これらの結果は、N-glycan 結合配列である N-X-T/S 以外の配列は  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 活性化作用を持たないことを示している。すなわち、Q595NTT の  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 活性化作用は変異による構造への直接作用ではなく、N-glycan 結合によるものであると考えられる。

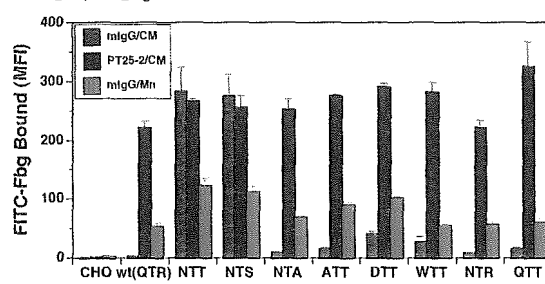


図5

IV)  $\alpha$  IIb/ $\beta$  3 stalk の解離は活性化を誘導する。——Relay-switch model を検証するため、 $\alpha$  IIb M660 に N-glycan 結合部位を導入した。図6にみられるように、M660 (黄色) は  $\alpha$  IIb calf-1

と  $\beta 3$  EGF3 の間に位置しており、この部位に糖鎖結合部位を導入することにより  $\alpha$  IIb と  $\beta 3$  stalk の解離をおこす事が理解できるだろう。 $\alpha$  IIb Q595 (紫) と異なり、M660に糖鎖を結合させてもインテグリンを直接 extend させる作用は無いと考えられる。

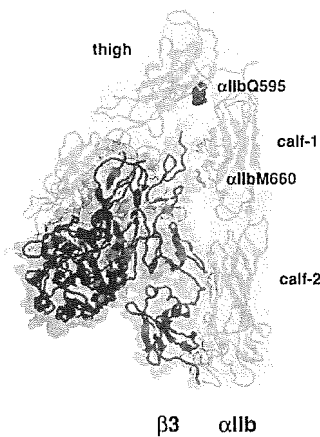


図 6

Q595NTT と同様に、M660NRT、M660NRS は  $\alpha$  IIb  $\beta 3$  活性化を誘導したものの、その他の変異では活性化抗体 PT25-2 非存在下では Fbg 結合がみられなかった (図 7)。

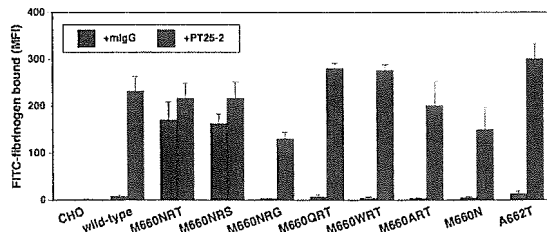


図 7

これらの結果は、 $\alpha$  IIb calf-1 と  $\beta 3$  EGF3 の間が糖鎖の存在によって大きく離れることが  $\alpha$  IIb  $\beta 3$  の活性化を誘

導することを示唆している。

結晶構造から (図 6)、 $\alpha$  IIb calf-1 と  $\beta 3$  EGF3 の距離が開く事によって、 $\alpha$  IIb calf-2 と  $\beta 3$  EGF4- $\beta$  TD の距離も開くことが予想される。平成 15 年度の研究結果では、 $\alpha$  IIb calf-2 と  $\beta 3$  EGF4- $\beta$  TD 間の解離がおこることは inside-out signaling による  $\alpha$  IIb  $\beta 3$  の活性化に必須であった。そこで、 $\alpha$  IIb calf-2 と  $\beta 3$  EGF4/ $\beta$  TD 間の結合をジスルフィド結合によって固定化し、 $\alpha$  IIb Q595NTT、M660NRT 変異導入による  $\alpha$  IIb  $\beta 3$  活性化への影響を調べた (図 8)。Q595NTT では calf-2/ $\beta 3$  EGF4- $\beta$  TD 間にジスルフィド結合を導入することによって、活性化に大きな影響は見られなかった。これに対し、M660NRT ではジスルフィド結合導入によって活性化が著しく抑制された。

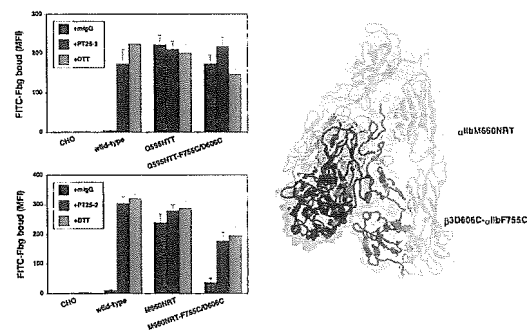


図 8

これらの結果は、 $\alpha$  IIb  $\beta 3$  は extended conformer である限り high-affinity form であり、 $\alpha/\beta$  stalk 間相互作用の影響は受けないが、 $\alpha/\beta$  stalk 解離によっ

て誘導される活性化は細胞膜近傍の  $\alpha/\beta$  ドメイン間相互作用が解離する必要があることを示している。また、M660NRT による活性化は、thigh/calf-1 間あるいは  $\beta$ -head/ $\beta$ -stalk 間にジスルフィド結合を導入してインテグリンの extension を阻害する事によって、完全に抑制された（データ記載せず）。これらの結果から、 $\alpha/\beta$  stalk 解離は bent $\rightarrow$ extended conformer への構造変化を誘導し、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を活性化すると考えられる。

#### 考案

本研究では CHO 細胞膜上に発現した遺伝子組換え  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を用い、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化メカニズムの検討を行った。 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 分子のドメイン間にジスルフィド結合が存在することによって bent conformer に立体構造が固定化され、extended conformer になることが不能な  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 は、導入されたジスルフィド結合の場所にかかわらず、全て低親和性を示した。反対に、分子内に N-glycan 結合部位を導入することにより立体構造が extended conformer に固定化された  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 は、Fbg に対し非常に高い親和性を示した。興味あることに、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化の程度は extension の程度と相関がみられた。これらの結果から、インテグリンが活性化に伴い bent $\rightarrow$ extended conformer に

立体構造を変化させるという仮説は正しいと考えられる。しかし、われわれの結果からは bent-extended の中間の conformer も、リガンドに対するある程度の親和性をもつことが予想される。したがって実験条件によっては、bent conformer と高分子リガンドの結合を観察することも可能であろう。

現在のところ inside-out signaling がどのようなメカニズムでインテグリン細胞外ドメインの構造変化を引き起こすのか明らかにされていない。インテグリン細胞内ドメインは約30~50アミノ酸残基で構成される。 $\alpha$ IIb 鎖と  $\beta$ 3 鎖の細胞内ドメインは互いに会合しているが、最近、細胞内蛋白質である talin が  $\beta$ 3 の細胞内ドメインに結合すると、この会合が解離して  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の活性化がおこることがわかった。われわれは平成16年の研究で、細胞外の  $\alpha/\beta$  stalk の解離を阻害すると、inside-out signaling による  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の活性化が完全に抑制されることを報告した。これらの結果は、inside-out signaling によるインテグリン活性化のためには、細胞内  $\alpha/\beta$  ドメイン間の結合が解離するだけではなく、細胞外の  $\alpha/\beta$  stalk 間の結合が解離する必要があることを意味している。すなわち、inside-out signaling では  $\alpha/\beta$  stalk の解離がインテグリン活性化をおこすことを示唆している。今回の研究では、

実際に  $\alpha/\beta$  stalk 間に N-glycan を挿入し、 $\alpha/\beta$  stalk の解離を誘導することによって  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の活性化が見られた。また、 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を bent conformer に保つことで、 $\alpha/\beta$  stalk 解離によって誘導される活性化が完全に抑制されたことから、 $\alpha/\beta$  stalk 解離は bent  $\rightarrow$  extended conformer への構造変化を誘導すると考えられる。これらの結果は  $\beta$ -head/ $\beta$ -stalk 間の相互作用と  $\alpha/\beta$  stalk 間の相互作用が互いに影響を及ぼすことによって inside-out、outside-in signaling を細胞内外に伝達するとする仮説 “relay-switch model” と非常に良く合致する。

血小板  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 は通常不活性であるが、出血部位などで血小板が活性化された時に inside-out signaling による活性化を受け、Fbg と結合することが知られている。したがって、人工血小板に  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を応用する際にも、その活性が調節可能でない限り、安全かつ有効な人工血小板とは言えない。われわれは本研究によって得られた知識をもとに、その可能性について検討した。 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の活性化は、 $\beta$  3 の head/stalk 間にジスルフィド結合を導入して  $\beta$  3 の extension を阻害することによって完全に抑制された。この抑制作用は DTT 処理によってジスルフィド結合を還元することで中和することができた (図 2)。このことを利用し、

$\alpha$  IIb  $\beta$  3 に  $\alpha$  IIb-Q595NTT 変異と  $\beta$  3-V332C/S674C 変異を同時に導入した。さらに、トロンビン存在下で  $\beta$  3 head/stalk 間の抑制を解除するため、 $\beta$  3-S674 の前後にトロンビン切断部位を導入した (図 V332C/S674Cthr)。S674 は比較的大きな C-D loop に位置しており、この前後に大幅な変異を導入しても、 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 全体の構造には大きな影響を及ぼさないと予想される。

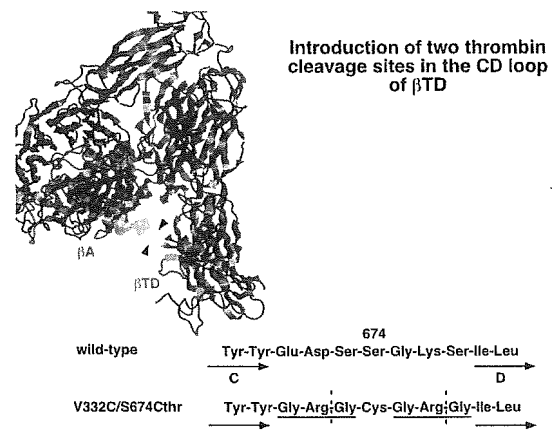


図 9

試験的ではあるが、この変異  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を CHO 細胞に発現させたところ、良好な発現が得られた。Fbg の結合を調べたところ、Q595NTT による活性化は  $\beta$  3-V332C/S674Cthr (332/674thr) によって完全に抑制された。この抑制効果は DTT 処理によって消失した (図 10)。このように活性調節機能を持った変異  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を安定に発現させることが可能であることがわかった。今後の課題としては、非常に効率よく切断される配列を C-D loop 内に導入すること。人工血小板粒子内にトロンビ

ン、PDI などの酵素を内包させ、血栓形成部位で放出させる機能を持たせるなどの検討が必要である。

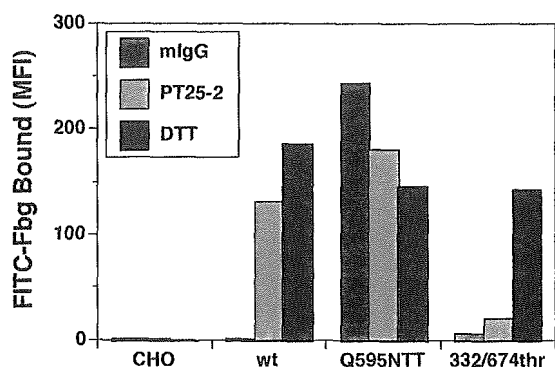


図 1 0

### 結論

$\alpha$  IIb  $\beta$  3 インテグリン bent conformer が low-affinity form であり、extended conformer が high-affinity form であることが証明された。 $\alpha$  /  $\beta$  stalk 間を開くことによって  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 が活性化されることから、inside-out signaling では  $\alpha$  /  $\beta$  細胞内ドメイン解離に引き続いて  $\alpha$  /  $\beta$  stalk の解離がおこることにより、bent  $\rightarrow$  extended conformer への構造変化が誘導されると考えられる。 $\alpha$  IIb 鎖の活性化変異 (Q595NTT) と  $\beta$  3 鎖の不活性化変異 (V332C/S674C) を組み合わせることにより、活性制御可能な  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を作り出すことが可能と考えられる。

健康危険情報：無し

### 研究発表

1 論文発表：Kamata T, Handa M, Sato Y, Ikeda Y, Aiso S: Membrane-proximal

alpha/beta stalk interactions differentially regulate integrin activation. J Biol Chem 280: 24775-83, 2005

2 学会発表：Kamata T, Handa M, Ikeda Y, Aiso S: Platelet  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin constrained in the extended conformer represents a highly activated form. The XXth Congress of the International Society on Thrombosis & Haemostasis, Sydney, Australia, August 6-12, 2005

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

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
Takeoka S	Design and modification of nanoparticles for Blood substitutes			35-41	2005
Okamura Y, Takeoka S, teramura Y, Maruyama H, Tsuchida E, Handa M & Ikeda Y	Hemostatic effects of fibrinogen $\gamma$ -chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles in vitro and in vivo	Transfusion	45	1221-1228	2005
Okamura Y, Maekawa I, TERamura Y, Maruyama H, Handa M, Ikeda & TAKEoka S	Hemostatic effects of phospholipids vesicles carrying fibrinogen $\gamma$ chain dodecapeptide in vitro and in vivo	Bioconjugate Chem	16	1589-1596	2005
Kamata T, Handa M, Sato Y, Ikeda Y and Aiso S	Membrane-proximal $\alpha$ / $\beta$ stalk interactions differentially regulate integrin activation	J Biol Chem	280(26)	24775-24783	2005
Okamura Y, Handa M, Suzuki H, Ikeda Y & Takeoka S	New strategy of platelet substitutes for enhancing platelet aggregation at high shear rates: cooperative effects of a mixed system of fibrinogen $\gamma$ chain dodecapeptide- or glycoprotein Ib $\alpha$ -conjugated latex beads under flow conditions	J of artificial organs	In press		2006
Goto S, Tamura N, Ishida H, Zaverio M, Ruggeri	Dependence of platelet thrombus stability on sustained glycoprotein IIb/IIIa activation through adenosine 5'-diphosphate receptor stimulation and cyclic calcium signaling	J of Am Colledge Cardiol	47(1)	155-162	2006
武岡真司	人工赤血球・人工血小板の開発の現状	臨床麻酔	29 (4)	721-726	2005



## 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

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 10g/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

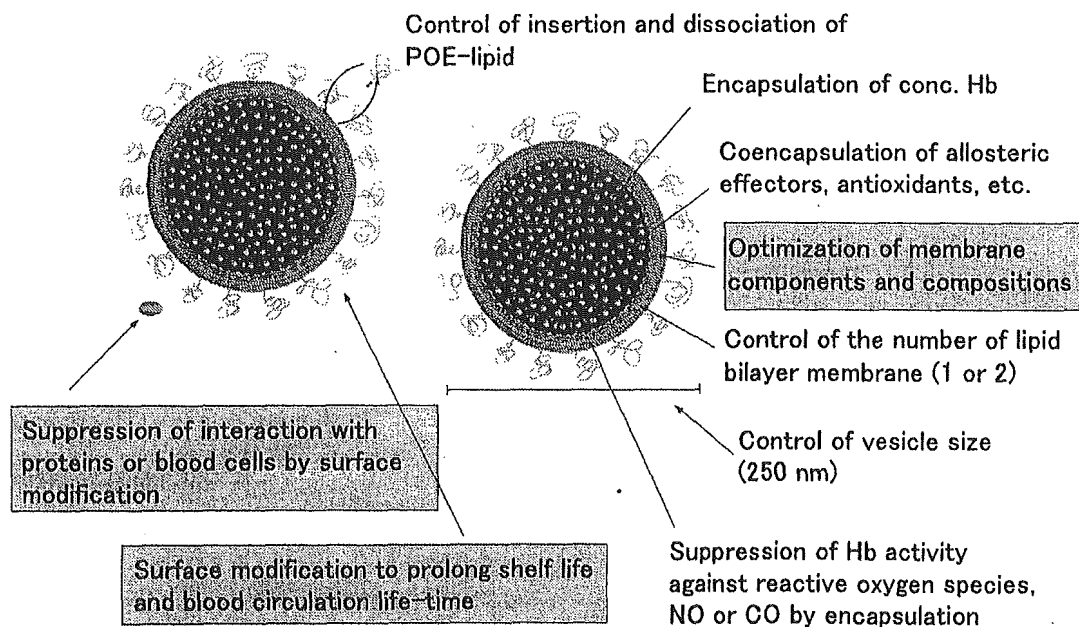


FIG. 1. Design of POE-modified hemoglobin vesicles (Hb-vesicles) as red-blood-cell

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