

Figure 3 (Movie 1). Developing thrombus upon laser ablation on a venule. Two dimensional images were acquired between 20 seconds and 40 seconds after the start of laser ablation. Towards the end of this movie, the whole thrombus embolized.



Figure 4 (Movie 2). Three-dimensional reconstruction of a thrombus induced by laser ablation on a venule. Spatial distribution of platelets in the thrombus was evaluated by this scanning. Scans were made on the x-z plane (vertical) traversing the longitudinal axis of the microvessels. Note that single platelets in the thrombus were visualized.



Figure 5 (Movie 3). Three-dimensional reconstruction of a thrombus induced by laser ablation on a venule. Spatial distribution of platelets in the thrombus was evaluated by this scanning. Scans were made radially on the x-y plane (horizontal) from the top surface to the approximately the centerline of this venule.

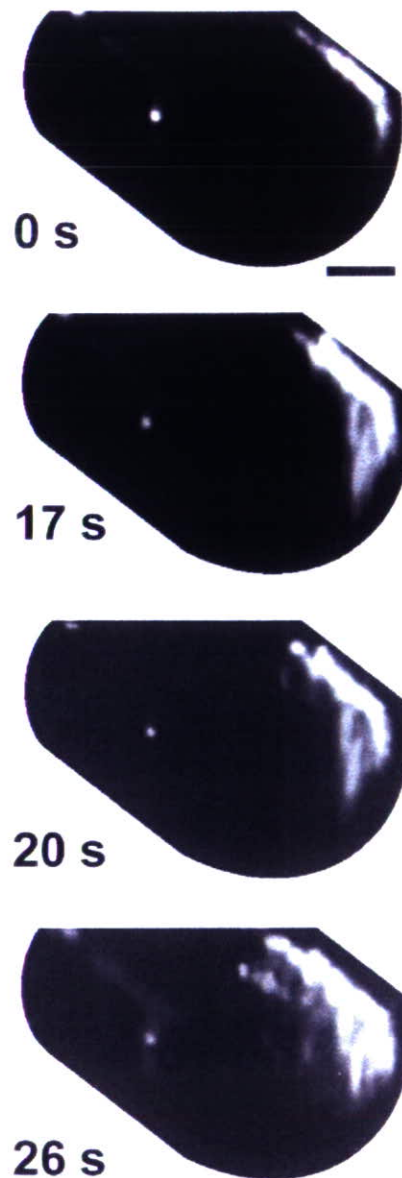


Figure 6. Three-dimensional reconstruction of a growing thrombus showing temporal changes in shape and volume. At each x - y confocal plane, a 2D image was obtained and these images were stacked in sequential order with an imaging-software to yield a 3D image. Representative images of different x - y planes covered 28- μ m depth of the tissue, and each images were 1- μ m apart. Bar=10 μ m.

厚生労働省科学研究費補助金

「政策創薬総合研究事業」

『臨床応用可能な人工血小板としてのH12結合微粒子の in vivo 評価』

2007 年度分担研究報告書

「ADP を含む H12 結合人工血小板の血小板血栓形成におよぼす影響」

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

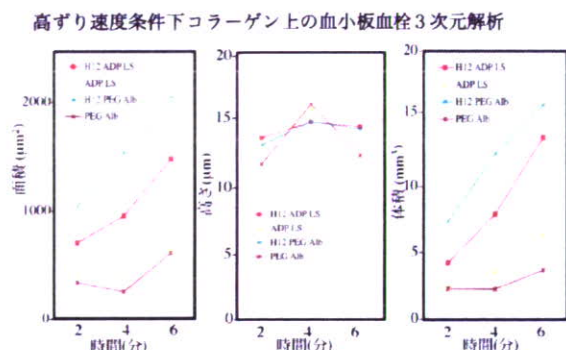
《研究要旨》感染性を有するヒト血液輸血は肝炎、HIV など重篤な健康被害を惹起する可能性がある。一時的に出血性が亢進する手術時などに局所の止血を補助する人工血小板に期待が集まる。血小板特異的膜蛋白 GPIIb/IIIa への結合部位であるドデカペプチドを含むアルブミン重合体(H12-結合リポソーム)が止血補助機能を有する血小板代替物となり得ることを示してきた。さらに H12 結合アルブミン重合体の生体適合性を高めるために、血小板活性化効果を有する ADP を局所放出する能力を H12 結合アルブミンに実装した。ADP は生体に対して多面的な作用を有するため、臨床応用する H12 アルブミン重合体に ADP 局所放出能力を実装すべきか否かにはさらに詳しい検証が必要である。われわれは ADP の添加による血液中の ATP 濃度の変化を検証した。また、血栓形成における酸素および酸素依存性エネルギー供給の意義を解明するため、ラットの血液を用いて血液中の酸素分圧の異なる動脈血と静脈血の血小板血栓形成におよぼす効果の差異を検証した。

A. 研究目的

昨年までの研究により H12 結合アルブミン重合体、ADP 局所放出機能を実装した H12-結合リポソームの血栓形成におよぼす効果に関する研究を終了している。これらの研究により H12 結合アルブミン重合体、(図1) ADP 局所放出機能

を実装した H12-結合リポソームはいずれも人工的な血管損傷モデルにおける血小板血栓の成長を促進する効果を有することを示した。血小板の止血機能との観点から見れば、血栓成長促進効果は止血機能の亢進につながる。一方、血小板代替物投与時の最大の副作用と想

定される血栓性合併症は血栓性の亢進により増加することが危惧される。



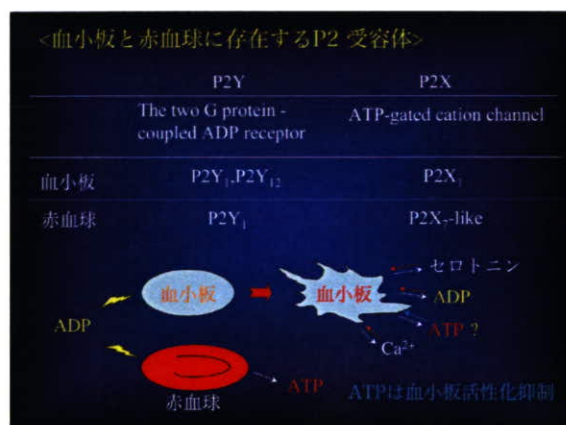
高ずり速度ではH12 PEG AlbuminとH12 ADP liposomeの添加時にそれぞれ血小板血栓の3次元成長が増強された。

図1. 血管壁損傷部位に曝露されるコラーゲンを固相化したガラス板上に全血を灌流し形成される血小板血栓の3次元成長を定量化した

ADP は血小板活性物質であるため、ADP を局所放出する機能を実装したアルブミン重合体は止血機能をより増強することが期待された。しかし、予備実験では ADP 放出機能を実装したアルブミン重合体の効果にはばらつきが大きかった。実際、ADP 自体は血小板に対する活性化促進効果を有するものの、ADP を原料として産生される ATP はむしろ血小板の活性化を抑制する効果を有する。血管内での ADP, ATP 間の平衡は、外部からの ADP 添付によりむしろ ATP 産生増加に作用する可能性もある。さらに、全血中に存在する赤血球は ADP の局所濃度が増加した時に外部に ATP を供給するソースとなることも知られている。

図2. 血小板と赤血球に存在する ADP 受容体

ヒト血液中には多面的な作用を有する可能性のある ADP の効果を、血小板のみの条件のみならず赤血球の存在下でも



検討した。

ADP, ATP のエネルギーの代謝には酸素の影響が大きいことから、ラットの血液を用いて動脈血と静脈血を用い、血小板血栓過程の差異を比較した。ADP 局所放出機能を有する血小板代替物の効果を動脈血、静脈血の条件にて比較検討した。

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。

Flow chamber システムを用いて、メパクリンにて蛍光染色をした全血をコラーゲン上に 1500 s^{-1} のずり速度にて灌流し、血

血小板血栓の成長を蛍光顕微鏡にて経時的に観察した。またこの時の血中の ATP 濃度をルシフェラーゼ assay により測定した。

赤血球の存在下における ADP の効果を検討するため、洗浄血小板を調製し、全血、赤血球+洗浄血小板、洗浄血小板の3条件でフローサイトメトリーによる単一血小板 10,000 個中の活性化 GPIIb/IIIa 特異的抗体 PAC-1 の結合と P-セレクトインの発現を検討した。また赤血球が血小板の活性化におよぼす影響を考慮し、PRP と全血時の血小板のミトコンドリアの膜電位の変化についても rhodamine123 を用いて検討した。

ラットより腹大動脈、下大静脈からそれぞれ動脈血、静脈血を採血し、抗トロンビン薬ヒルログにて抗凝固処理後、動脈血、静脈血の条件下、コラーゲン上の血小板血栓の成長を flow chamber にて検討した。

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

全血中に ADP を終濃度 $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 作用させた時の血小板数を計測し、ADP が血小板を凝集させていないことを確認した。ADP を $1\mu\text{M}$ 添加しても血小板数には大きな影響を与えなかった。一方、 $10\mu\text{M}$ の ADP を添加すると、血小板凝集によると想定される血小板数の減少を認めた。

コラーゲン上の血栓形成におよぼす効果を検討すると、終濃度 $1\mu\text{M}$ の ADP の存在下では血小板血栓の形成は抑制された。前述の通り、この結果は、血小板凝集による血小板数減少の影響ではない。試みに、 $0.2\mu\text{M}$ の ADP を添加して同様の実験を行った。 $0.2\mu\text{M}$ の低濃度でも、当初想定された血小板血栓の成長促進効果は確認できなかった(図3)。直接血小板を活性化する効果を有する ADP を添加しても、コラーゲン上の血小板血栓の形成が促進されなかった理由として、ADP 添加時に起こる抗血小板性物質の産生が想定された。

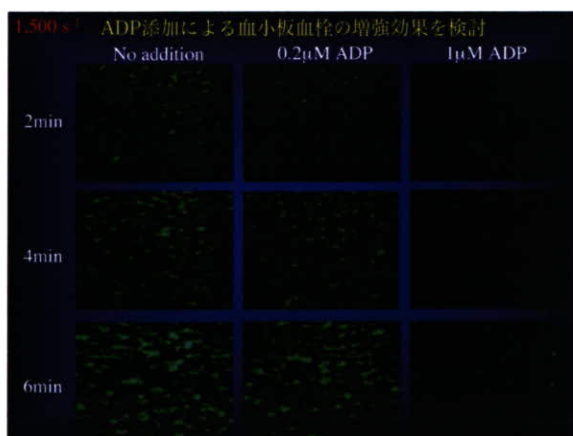
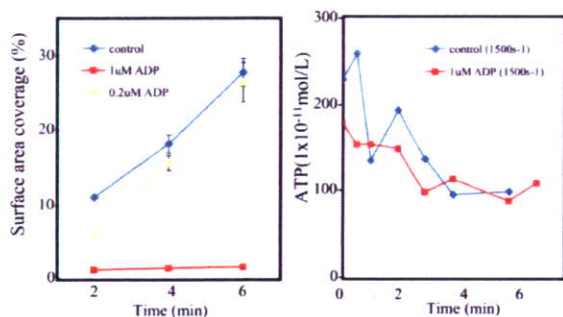


図3. 各種濃度の ADP 存在下のコラーゲン上の血小板血栓(1500 s^{-1})

ADP から誘導される既知の抗血小板物質である ATP の濃度を計測した。ATP 濃度は外部から添加した ADP の有無にかかわらず血栓の成長とともに減少した。血栓形成の過程における ATP の消費が想定された(図4)。

Collagen 上の血小板血栓の成長に伴う血中の ATP 産生量



(500 s⁻¹) の条件下では collagen 上の血小板血栓の成長にともない、血中の ATP 量は減少傾向にあった。また 1µM ADP 添加時には ATP の濃度は control よりも低値を示した。

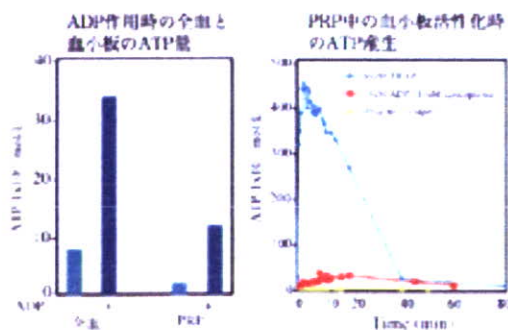
図4. 血小板血栓の成長にともなう血中の ATP 量の変化

外部から ADP を添加すると、赤血球の存在下において非存在下よりも大量の ATP が検出された。また、ADP による刺激時に比較してトロンビン受容体刺激時にはより大量の ATP が検出された(図5)。

図5. 血小板を ADP 刺激した時の ATP 産生におよぼす赤血球の影響

血小板アゴニストによる ATP 産生

全血、赤血球+洗浄血小板、洗浄血小板に ADP を作用した時の血小板の活性化を PAC-1 の結合、P-セレクトリン結合にて検討した。1µM ADP を作用させた時の PAC-1 による GPIIb/IIIa の活性化は

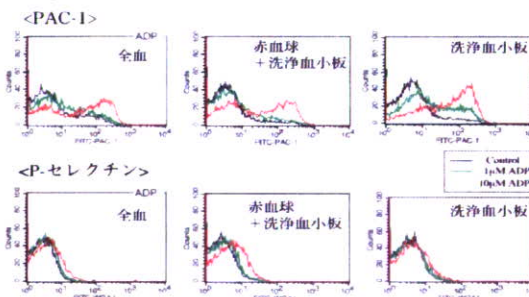


内質よりも全血ではADP作用時のATP濃度が高かった。

TRAP刺激による赤血球由来のATP産生が亢進することで、ADP刺激ではATPが放出はじまってしまう。

赤血球の存在下では洗浄血小板よりも弱かった。一方 P-セレクトリンの発現には有意差を認めなかった(図6)。

Flow cytometryによる単一血小板の検討 単一血小板10,000



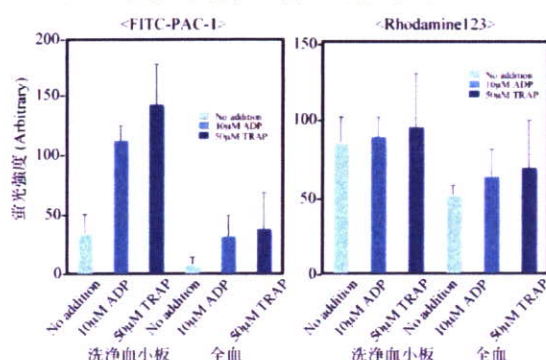
赤血球の存在下では、血小板は1µMのADPではGPIIb/IIIaの活性化が十分にされない。

図6. FACSによる赤血球存在下 GPIIb/IIIa の活性化と P-セレクトリンの発現

ADP, トロンビン受容体刺激ペプチド (TRAP) にて血小板を活性化させた時の GPIIb/IIIa の活性化とミトコンドリアの膜電位計測した。GPIIb/IIIa の活性化は赤血球の存在下では非存在下に比較して弱かった。ミトコンドリアの膜電位の変化におよぼす効果も同様であった(図7)。本実験では赤血球の存在が ADP/ATP バランスに影響を与える可能性とともに、血小板周囲の酸素濃度にも影響をおよ

ぼしていることが研究の限界と理解された。すなわち、赤血球非存在下の多血小板血漿の酸素濃度は検体準備の過程で動脈血並の 100 mmHg に達するのに対して、赤血球存在下の静脈採血では実験期間を通じて血小板は 50 mmHg 程度の低濃度の酸素に曝露されることとなった。われわれの実験は、従来広く使用されてきた静脈血を用いた実験が、酸素濃度の低い環境であるからして十分に血小板を活性化できない環境であることを示したことになった(図 7)

ADP or TRAP で刺激した時の血小板を GPIIb/IIIa の活性化とミトコンドリアの膜電位の変化 (FACS; 単一血小板 10,000)



全血(静脈血)では血中の酸素量は少ない。血小板の活性化に酸素は重要。

図 7. 赤血球存在下 ADP, TRAP を作用させた時の血小板 GPIIb/IIIa とミトコンドリアの膜電位の変化

ラットの動脈血、静脈血を用いた時のコラーゲン上の血小板血栓の成長では、 1500 s^{-1} のずり速度では動脈血の時に顕著な血栓の成長が認められた(図 8)。

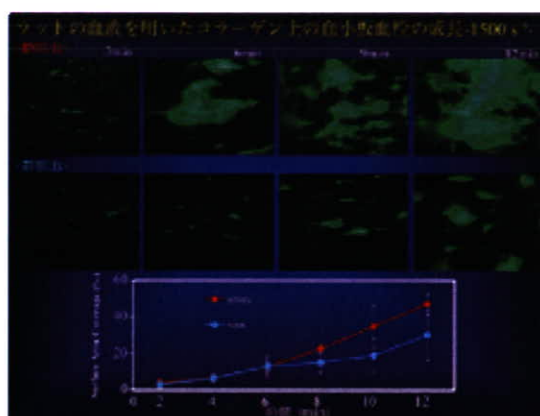


図 8. ラットの動脈血、静脈血を用いた時のコラーゲン上の血栓の成長

D. 考察

血管の損傷部位に集積した血小板は強力な活性化刺激を受け活性化し、変形する。その過程でエネルギーが消費される。実際、われわれの研究では静脈血をコラーゲン上に灌流すると血液中の ATP 濃度が血栓形成とともに減少することを示した。従来の研究では血小板血栓の形成における酸素代謝、エネルギー供給の重要性が全く考慮されていなかった。われわれは血小板代替物の臨床効果の予測において、特に ADP を局所放出する機能を実装した血小板代替物の効果については周囲の酸素濃度の関与を十分に配慮する必要があることを示した。

さらに、ADP は単独の血小板に添加した時には血小板を活性化させる作用を有するものの、その効果は赤血球の存在下では減弱することが示された。減弱の原因として ADP が抗血栓性を有する ATP に変換される可能性とともに、赤血球が

存在する時には静脈血の低酸素条件が実験期間中継続するため血小板の機能を十分に発揮できない可能性も示唆された。

実際、ラットを用いて静脈血と動脈血のコラーゲン上の血栓性を比較するとその差は著しかった。酸素濃度の高い条件では native 血小板の止血機能がより強く発現することが理解された。

E. 結論

- 1) ヒトに使用する血小板代替物として ADP 局所放出機能を有する H12 結合アルブミン重合体を使用する場合には、周囲の酸素濃度により局所放出された ADP が ATP に変換され血栓性が抑制される可能性について十分に考慮する必要があることが解明された。
- 2) 血小板代替物の必要性は血液中の酸素濃度により影響を受けることから、静脈からの出血と動脈からの出血では最適の血小板代替物が異なる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Origasa H, Goto S, Uchiyama S, Shimada K, Ikeda Y, and J-TRACE Investigators. The Japan Thrombosis Registry for Atrial fibrillation, Coronary

or Cerebrovascular Events (J-TRACE): A nation-wide, prospective large cohort study; The study design. *Circulation Journal*, *in press*

2. Roether J, Alberts MJ, Touzéc E, Mas JL, Hill MD, Michele P, Bhatt DL, Aichner FT, Goto S, Matsumoto M, Ohman EM, Okada Y, Uchiyama S, D'Agostino R, Hirsch AT, Wilson PWF, Steg PG, on behalf of the REACH Registry Investigators. Risk Factor Profile and Management of Cerebrovascular Patients in the REACH Registry. *Cerebrovascular Disease*, *in press*

3. Liu CL, Xie LX, Duralajan SSK, Li M, Goto S, Huang JD, Salvianolic acid B inhibit hydrogen peroxide-induced endothelial cell apoptosis through regulating PI3K/Akt signaling. *Plos One* 2 (12), e1321

4. Li M, Zhao MQ, Kumar SS, Xie LX, Zhang HX, Kum WF, Goto S, and Liao FL. Protective effect of tetramethylpyrazine and salvianolic acid B on apoptosis of rat cerebral microvascular endothelial cell under high shear stress. *Clin Hemorl Microcirc* 38:177-187, 2008

5. Goto S. Are Japanese patients more prone to gastro-duodenal mucosal injury and bleeding with the use of antiplatelet agents? *Thromb Res*. 2007;120(4):463-4.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 出願人：東海大学／慶應義塾大学、
発明人：後藤信哉／末松誠. 血管内に
ステントを配置する際のステントの形状を
最適化させるためのシミュレータ. 特許
出願 2008

平成 19 年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

血小板減少ウサギを用いた H12-(ADP)小胞体の安全性評価

分担研究者 村田 満 (慶応義塾大学 医学部 臨床検査医学, 教授)
研究協力者 森木 隆典 (慶応義塾大学 保健管理センター, 講師)

研究要旨

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(HHLGGAKQAGDV: H12)をポリエチレングリコール(PEG)鎖末端に担持させたリン脂質小胞体は、活性化血小板表面に活性化状態にある GPIIb/IIIa を認識し、血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少症モデルラットの出血時間を短縮させることを既に報告してきた。平成 18 年度には、止血能の更なる向上を目的とし、アデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内包させた。これは、血小板凝集塊でのみ特異的に ADP を放出することで止血能を増幅させ、血小板輸血群に匹敵する効果の発現に成功した(分担研究者: 池田康夫報告書)。

平成 19 年度は、血小板減少モデルウサギを用いた H12-(ADP)小胞体の安全性評価を目的とし、H12-(ADP)小胞体あるいは ADP 水溶液の投与前後の血小板活性化の有無を抗ウサギ P-セレクトリン抗体を用いたフローサイトメトリー測定にて検討した。その結果、動物に H12-(ADP)小胞体を静脈投与しても未活性化血小板の活性化を引き起こすことはなく、血液適合性の観点から H12-(ADP)小胞体の安全性に関する初期の要件は満足するものと考えられる。

A. 研究目的

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(HHLGGAKQAGDV: H12)をポリエチレングリコール(PEG)鎖末端に担持させたリン脂質小胞体は、活性化血小板表面に活性化状態にある GPIIb/IIIa を認識し、血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少症モデルラットの出血時間を短縮させることを既に報告してきた。平成 18 年度には、止血能の更なる向上を目的とし、アデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内

包させた。これは、血小板凝集塊でのみ特異的に ADP を放出することで止血能を増幅させ、血小板輸血群に匹敵する効果の発現に成功した(分担研究者: 池田康夫報告書)。

平成 19 年度は、血小板減少モデルウサギを用いた H12-(ADP)小胞体の安全性評価を目的とし、H12-(ADP)小胞体あるいは ADP 水溶液の投与前後の血小板活性化の有無を抗ウサギ P-セレクトリン抗体を用いたフローサイトメトリー測定にて検討した。

B. 研究方法

1. 血小板減少症モデルウサギの作製方法

ニュージーランドホワイトウサギ(雄性, 11週齢, 2.5 kg)は、三協ラボサービス(株)より購入した。ケタミン(60 mg/mL)とセラクタール(2%)の混合溶液(ケタミン/セラクタール = 3/1 (v/v), 2 mL)にて麻酔後、ブスルファン ポリエチレングリコール溶液(10 mg/mL)を 0, 3 日目に下腹部皮下投与した(全投与量 30 mg/kg)。投与開始後 15 日目を血小板減少症モデルウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4/\mu\text{L}$)とした。

2. フローサイトメトリーを用いた安全性試験

血小板減少症モデルウサギにケタミン/セラクタール麻酔後、23G 翼状針を装着したシリンジポンプにて試料(H12-(ADP)小胞体([lipid] = 20 mg/kg)、生理食塩水、ADP 水溶液(100 μM)を耳静脈から投与した(4 mL/kg, 0.5 mL/min)。投与開始から 10, 20, 60 分経過後、耳静脈から採血した。

全血(1/10 (v/v) 3.8% クエン酸ナトリウム)を遠心分離し(600 rpm, 15 min, r.t.)、多血小板血漿(PRP)を得た。PRP([PLT]= $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$, 50 μL)に PE-標識マウス由来抗ウサギ P-セレクトリン抗体あるいは PE-標識マウス由来抗ウサギ IgG (約 0.5 μg)を添加し、振とうさせた(37 °C, 10 min)。ホルムアルデヒド(f.c. 1%)にて固定後、PE 標識血小板の割合をフローサイトメトリーにて計測した。

予め調整しておいた PRP に ADP 刺激した群を陽性対照、ADP 未刺激群を陰性対照とした。

C. 研究結果及び考察

予め調製した PRP に血小板活性化マーカーである PE 標識抗ウサギ P-セレクトリン抗体を添加、ADP 刺激(100 μM)したところ、平均蛍光強度は 78.9 ± 12.2 となり、血小板の活性化に伴う P-セレクトリンの発現した(Fig. 1 (a))。他方、ADP 未刺激時は、PE 標識抗ウサギ IgG 添加時とほぼ同等で血小板の活性化は生じないことを確認した(Fig. 1 (a))。

そこで、H12-(ADP)小胞体分散液を血小板減少モデルウサギに投与後、経時的に採血して得られた PRP は P-セレクトリンの発現は認められなかった(Fig. 1(c), Fig. 1(e)○)。これは、生理食塩水投与群と同等の結果であり(Fig. 1(b), Fig. 1(e)□)、H12-(ADP)小胞体を投与しても血小板の活性化は引き起こさないことを明らかにした。

続いて、ADP 水溶液(100 μM)を投与した。経時的に採血して得たウサギ PRP に、PE 標識抗ウサギ P-セレクトリン抗体を添加したところ、ADP を投与しても全く P-セレクトリンは発現しない、即ち、血小板の活性化は起こらないことが明らかとなった(Fig. 1(d), Fig. 1(e)△)。これは、赤血球膜上に ADP 受容体(P_2Y_{13})が存在し、ATP に変換される機構が既に報告されており⁽¹⁾、この機構によって、ADP による血小板の活性化が赤血球によって抑制されたためと考えられる。さらに血管内皮細胞上には ecto-NTPase(CD39)が産生されており、血小板から放出される ADP,ATP を分解し血小板凝集を抑制する機構も報告されており⁽²⁾、生体内には ADP 消去能が数多く存在し、ADP を投与しても血小板の活性化を引き起こさないことを明らかにできた。

(1) Wang, L. et al. *Circulation Res.* 96, 189-196 (2005).

(2) Enyoji, K. *et al. Nat Med*, 5, 1010-1017 (1999).

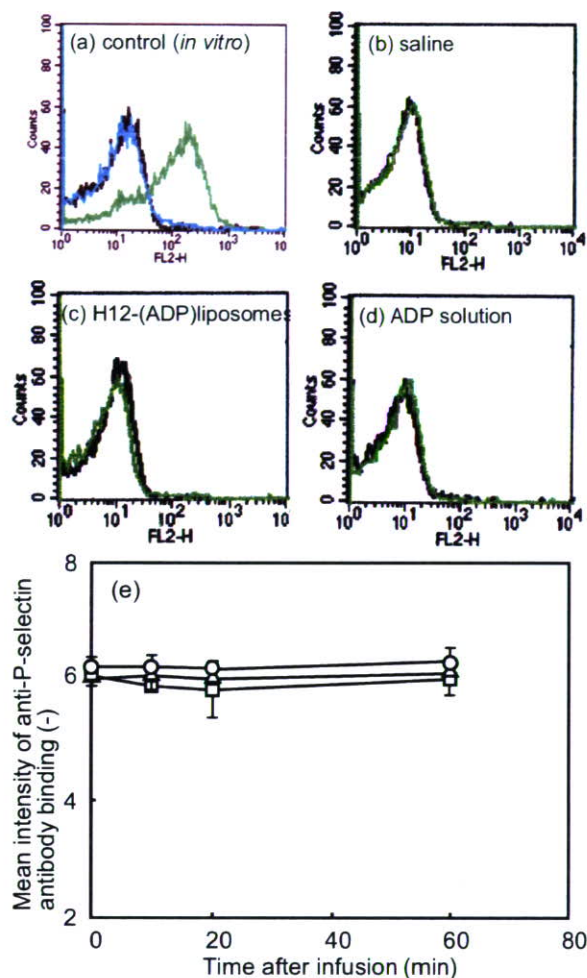


Fig. 1 Flow cytometric analyses of P-selectin expression before and after infusion of the H12-(ADP)liposomes into the thrombocytopenic rabbits. (b)-(d) showed representative data at 60 min after infusion of H12-(ADP)liposomes, ADP solution, and saline, respectively (black line: control IgG, green line: anti P-selectin antibody). (a) showed representative data of control groups (black line: control IgG in the presence of 100 μ M ADP, blue line: anti P-selectin antibody in the absence of 100 μ M ADP, green line: anti P-selectin antibody in the presence of 100 μ M ADP). (e) Time course studies of P-selectin expression in case of (○) H12-(ADP)liposomes, (□) ADP solution, and (△) saline.

D. 結論

H12-(ADP)小胞体あるいは ADP 水溶液を投与しても血小板の活性化を引き起こさないことを明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

(1) Moriki, T., Maruyama, I.N., Yamaguchi, Y., Igari, A., Ikeda, Y., Murata, M. Identification of ADAMTS13 epitopes required for binding to von Willebrand Factor using lambda phage surface display. The American Society of Hematology, the 49th ASH annual meeting and exposition (2007.12., Atlanta).

(2) 森木 隆典, 丸山 一郎, 池田 康夫, 村田 満. ADAMTS13 分子内におけるフォンビルブランド因子結合エピトープ配列. 第30回日本血栓止血学会学術集会. (2007.11., 三重)

G. 知的財産権の出願・登録状況

平成 19 年 6 月 8 日特許願提出 (整理番号 K0070378)

平成19年度「政策創薬総合研究事業総合研究事業」
『臨床応用可能な人工血小板としてのH12結合微粒子の in vivo 評価』

分担研究報告書

＜H12結合微粒子の止血メカニズム＞ 形態的観察
- トロンビン刺激によるH12-リポソームと血小板との相互反応に関する電顕的検討 -

分担研究者 鈴木 英紀 (東京都臨床医学総合研究所・研究員)

研究要旨：フィブリノゲン γ 鎖C末端のドデカペプチド(H12)が結合したリポソーム(H12-リポソーム)は血小板凝集を促進させることをこれまで報告してきた。今回、前もって本リポソームとヒト洗浄血小板を混合し、さらにトロンビンを添加して惹起される血小板と本リポソームとの相互反応をフローサイトメトリーで測定するとともに、本リポソームの動態を抗H12抗体を使う免疫電顕法で検討した。その結果、フローサイトメトリーによってH12-リポソームはトロンビン刺激血小板に経時的に増加して結合することを明らかにした。また、形態学的にも本リポソームがトロンビン刺激血小板へ結合し、さらに一部のリポソームが開放小管系内に移動することを明らかにした。

A. 研究目的

フィブリノゲン γ 鎖C末端のドデカペプチド(H12)を結合させたリポソーム(H12リポソーム)は、血小板凝集を促進させることで、in vivo止血作用を発揮すると考えられている。今回、トロンビンを添加して惹起される本リポソームと血小板との相互反応をフローサイトメトリーと電顕で検討し、その効果を形態学的に把握することによって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した。

B. 研究方法

1) フローサイトメトリーによるトロンビン刺激血小板に対するH12-リポソーム結合の解析

3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として健常人ボランティア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。PRPを遠心し、ペレットをHEPES-Tyrode液で洗浄し、 $1.0 \times 10^5/\mu\text{l}$ に調整した。この洗浄血小板 $50 \mu\text{l}$ にcarboxyfluorescein(CF)を標識したH12-(CF)リポソーム(最終濃度3 mg/ml)または同濃度のコントロール(CF)リポソームを $10 \mu\text{l}$ 加え、さらにヒト・トロンビン(最終濃度0.1 U/ml)

を加えて凝集が生じないように混合後、 37°C で30秒、1分、5分および10分間静置した。以下、常法に従ってフローサイトメーター(FACS Calibur)で測定し、トロンビン刺激血小板に対するH12-(CF)リポソームの結合を解析した。

2) トロンビン刺激血小板とH12-リポソームの相互反応の形態的解析

1)と同様の洗浄血小板を $4.0 \times 10^5/\mu\text{l}$ に調整した。この洗浄血小板1 mlにH12-リポソームまたはコントロールのリポソーム(最終濃度2 mg/ml)を加え、さらにヒト・トロンビン(最終濃度0.1 U/ml)を加えて 37°C で10、30秒および5分間静置した。以下、経時的に0.2%グルタルアルデヒドを等量加え、 4°C で30分間固定した。一部の洗浄血小板にはあらかじめEDTA(5 mM)、リポソーム未結合のH12(0.5 mM)、RGD(1 mM)、マウス抗GPIIb/IIIaモノクロナル抗体(PAC-1またはP2、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)を加えて1分間インキュベートし、以下同様にリポソーム、トロンビンを加えて5分後に固定した。遠心してペレットを作製後、常法に従って四酸化オスミウム後固定、脱水、Epon包埋、超薄切、電子染色して透過型電顕で観察した。固定試料の一部は凍結し、免疫染色を

行った。すなわち、遠心した血小板ペレットを PBS で洗浄し、1 M ショ糖液中で1時間、さらに 2.3M ショ糖液中に一昼夜浸漬した。この試料を凍結用試料ピンに載せて液体窒素中で凍結後、超ミクロトームで凍結超薄切片を作製した。切片は酢酸ウランで染色して透過型電顕で観察した。切片の一部は H12 およびフィブリノゲンの分布を検出するために、0.5% BSA を含む PBS でブロッキング後、ウサギ抗 H12 抗体またはウサギ抗フィブリノゲン抗体でインキュベートし、さらに直径 15 nm のコロイド金標識ヤギ抗ウサギ IgG でインキュベートした。以下、同様に酢酸ウランで電子染色し、透過型電顕で観察した。

C. 研究結果

1) フローサイトメトリーによるトロンビン刺激血小板に対する H12-リポソーム結合の解析

トロンビン添加前、添加後 30 秒、1、5、10 分後に試料を採取して測定した(図 1)。H12-リポソームのトロンビン刺激血小板への結合は、30 秒後から観察され、その後経時的に増加して 5 分でほぼ平衡に達した。一方、コントロールリポソームはほとんど結合しなかった。

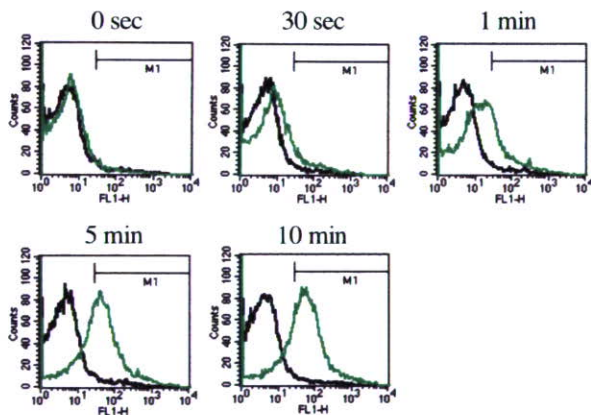


図 1. H12-(CF) リポソームのトロンビン刺激血小板への経時的結合増加を示すフローサイトメトリー

H12-リポソーム(緑線)はトロンビン刺激時間依存的に血小板に対する結合が増加し、ほぼ5分で平衡に達している。

2) トロンビン刺激血小板と H12-リポソームの相互反応の形態的解析

洗浄した血小板浮遊液にコントロールまたは H12-リポソームのみを添加した時、血小板は基石状の形態を示し、また顆粒、開放小管系などの

細胞内小器官にも変化はなかった(図 2A、2B)。さらに、トロンビンを添加後 10 秒では血小板中央部に顆粒の中心化が観察されたが、やはりコントロールまたは H12-リポソームの血小板に対する添加の差は見られなかった。しかし、超薄切片法では両リポソームは電顕下に可視化されなかった。

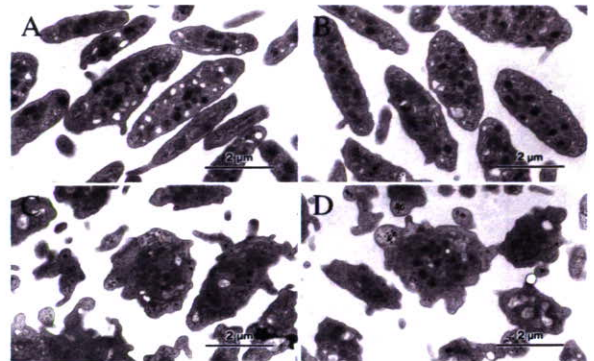


図 2. 超薄切片法による control または H12-リポソーム添加時、トロンビン添加 10 秒の血小板の形態 control (A) または H12-リポソーム (B) を加えたのみでは血小板に変形は見られない。トロンビン添加 10 秒後、血小板は形態変化するが、control (C) と H12-リポソーム (D) 添加の差はない。

コントロールリポソームを加え、さらにトロンビン添加 30 秒では顆粒は消失し、顆粒内容物が開放小管系中に存在する放出形態を示した(図 3A)。5 分後でも同様な所見を示した(図 3C)。一方、H12-リポソーム添加の血小板はトロンビン添加 30 秒では、コントロールとの差はほとんどなかったが(図 3B)、5 分では開放小管系の拡張が著明に観察された(図 3D)。

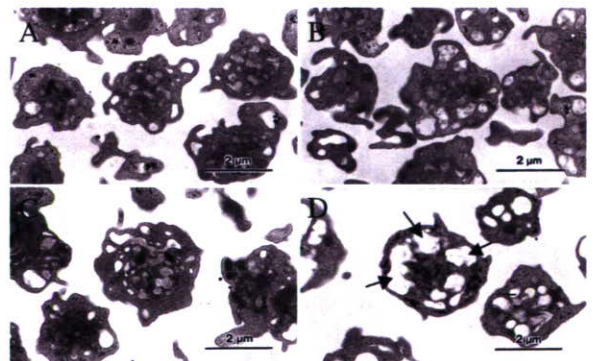


図 3. control または H12-リポソームさらにトロンビン添加 30 秒、5 分の血小板の形態

control リポソームとトロンビンを加えた 30 秒 (A) と 5 分 (C) の血小板には大差ない。H12-リポソームのものは、30 秒 (B) から 5 分 (D) にかけて開放小管系 (OCS) が拡張している(矢印)。

H12-リポソームを添加した5分の血小板を詳細に観察すると、開放小管系の中に顆粒成分とは思われぬ物質が存在した(図4)。これらは球状の形態が捕捉されることから、リポソームの残骸と考えられた。

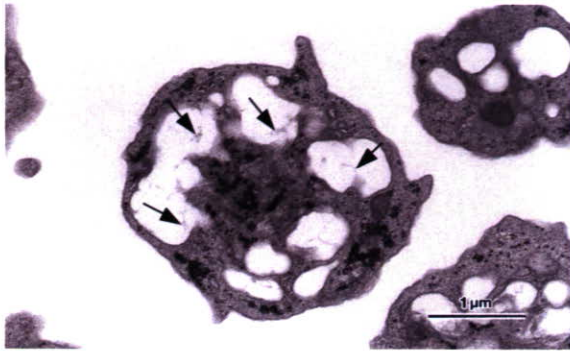


図4. H12-リポソームさらにトロンビン添加5分の血小板(図3Dの拡大像)

血小板顆粒は消失している。超薄切片法では、リポソームは溶けてしまうために観察されないが、拡張している開放小管系(OCS)中には顆粒成分以外のものが見られ(矢印)、リポソームの残骸と思われる。

H12-リポソームは開放小管系中に内在するかを検討するために、凍結超薄切片法で観察した。まず最初に、本法でH12-リポソームを観察すると、直径100~400 nm前後の粒子状を示し、リポソームに特徴的な二重膜も観察された(図5A)。ウサギ抗H12抗体、さらにコロイド金標識二次抗体で免疫染色すると、金粒子はリポソーム上に特異的に分布した(図5B)。

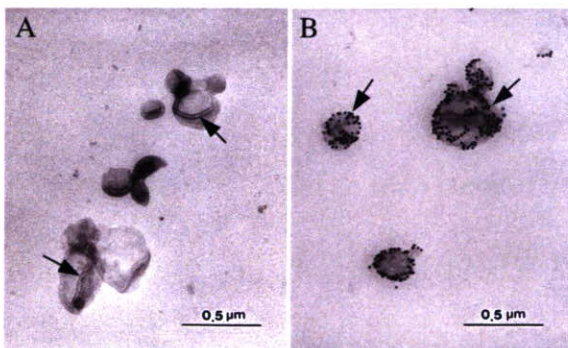


図5. 凍結超薄切片法によるH12小胞体の電顕像と抗H12抗体を使った免疫電顕像

H12-リポソームは直径200~500nmで、つぶれた球状のように観察されるが、二重膜構造も見られる(A, 矢印)。抗H12抗体を使う免疫電顕法では、表面にはH12の存在を示す金粒子が分布している(B, 矢印)。

次いで、H12-リポソーム、さらにトロンビンを

加えた5分後の血小板の凍結超薄切片を抗H12抗体、さらに直径15nmの金粒子標識二次抗体で孵置して電顕観察すると、H12の存在を示す金粒子が血小板外側の表面膜および拡張している開放小管系の内部に分布していた(図6)。これらの部位を拡大して観察すると、リポソームの外形がうっすらと識別され、金粒子はこれらのリポソームの外側に沿って円状に分布した。また、開放小管系内のH12結合リポソームは開放小管系の膜上に結合していることが判明した。

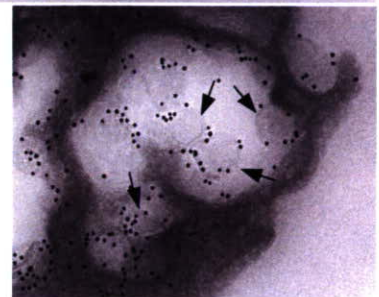
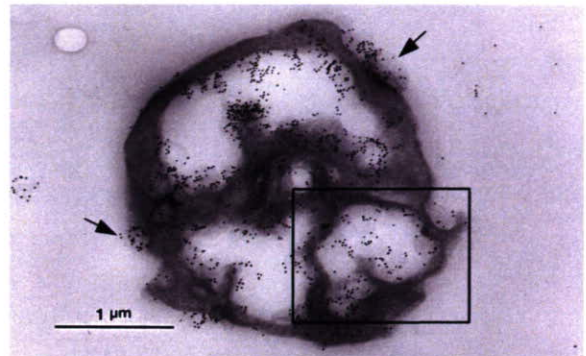


図6. 抗H12抗体によるH12小胞体+トロンビン添加5分の免疫電顕像

H12-リポソームの金粒子は、血小板表面(矢印)と拡張した開放小管系中に分布している。(拡大図)OCSに球状で二重膜をもつリポソームが確認され、この表面に金粒子が結合している(矢印)。

抗H12抗体を使う免疫電顕法により、トロンビン刺激された血小板では、一部のH12-リポソームが開放小管系中へ移動することが明らかになった。このリポソームの開放小管系中への内在化のメカニズムを解明するために、血小板浮遊液にH12-リポソームを加える前に、あらかじめCa²⁺キレート剤のEDTA(図7B)、リポソーム未結合のH12(図7C)、マウス抗GPIIb/IIIaモノクローナル抗体(図10)を加えて37°Cで1分間前処理した。これらの血小板では、トロンビン添加後5分後でも、顆粒の放出像は見られるものの、開放

小管系の拡張はほとんど観察されなかった。

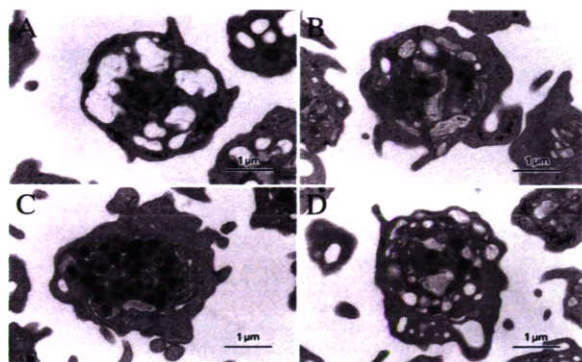


図 7. H12-リポソーム+トロンビン添加5分後の開放小管系拡張への EDTA、H12、抗 GPIIb/IIIa 抗体の効果

H12 小胞体、さらにトロンビン添加5分で起こる血小板開放小管系の拡張(A)は、EDTA (B)、H12 (C)、マウス抗 GPIIb/IIIa 抗体 PAC-1 (D)で抑制された。

H12-リポソームを加え、さらにトロンビンを添加して攪拌すると、大きな凝集塊が形成された。この時、この凝集を凍結超薄切片法で観察すると、凝集している血小板の間には大きな隙間が観察された(図8)。隙間の表面には H12-リポソームと思われる構造が多数存在した(図8挿入図)。

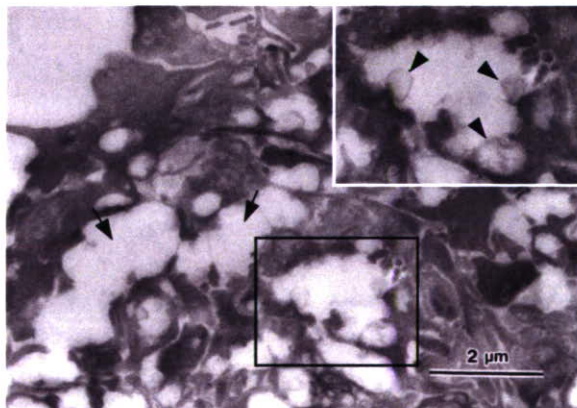


図 8. H12-リポソームおよびトロンビンを添加し、攪拌、5分後の血小板凝集

血小板に H12-リポソーム、さらにトロンビンを加えて攪拌すると凝集が起こる。血小板間には大きな隙間が生じている(矢印)。(挿入図) 隙間にはリポソームが分布している(矢尻)。

凝集塊における H12-リポソームの分布を確かめるために、抗 H12 抗体を使う免疫電顕法で検討すると、H12 の存在を示すコロイド金は凝集塊の隙間の部分に存在するリポソーム上に分布していた(図9)。

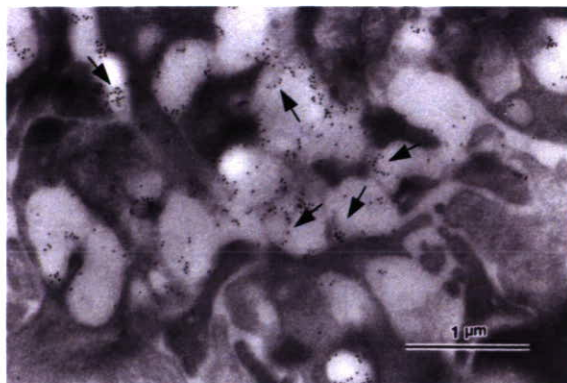


図 9. トロンビン凝集5分時の H12-リポソームの分布

金粒子が結合している H12-リポソーム(矢印)の存在部位は、血小板が複雑に凝集しているために必ずしも明瞭ではないが、血小板と血小板の間または開放小管系中に分布していると推察される。

抗 H12 抗体で同定される H12-リポソームの分布は血小板凝集塊においてかなり特異的であった。すなわち、血小板活性化、凝集によってα顆粒から放出されるフィブリノゲンの免疫染色では、本蛋白が血小板中心部の granulomere に存在し、その周囲の開放小管系中にはほとんど存在しなかった(図10)。

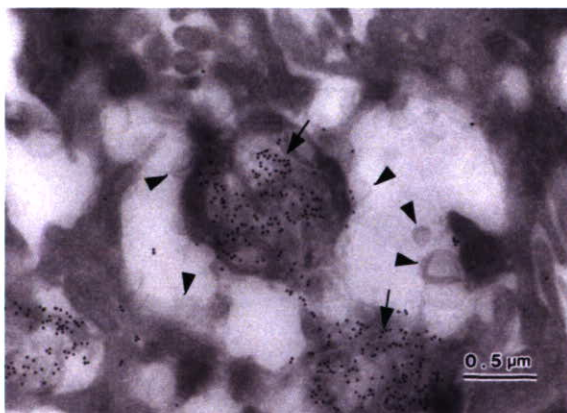


図 10. トロンビン凝集5分時のフィブリノゲンの分布

フィブリノゲンの金粒子は、凝集血小板の中央部で局所的に分布している。これらは血小板間または開放小管系中の H12-リポソーム(矢印)とは関連していない。

D. 考察

H12-リポソームとトロンビン刺激血小板の反応をフローサイトメトリーおよび形態学的に観察した結果、以下のことが明らかになった。

昨年までの検討で、3-5 U/ml とやや高濃度の

ヒトまたはウシトロンビンで刺激した洗浄血小板には、H12-リポソームが5から10分までに経時的に増加して結合することが示唆された。今年度はまず、凝集測定に使われているトロンビン濃度での検討を行った。すなわち、洗浄血小板浮遊液に、H12-リポソーム(最終濃度3 mg/ml)、さらに最終濃度0.1U/mlのヒト・トロンビンを添加して30秒、1、5、10分間静置したものを試料とした。その結果、H12-リポソームはトロンビン刺激血小板に経時的に増加して結合するようになり、ほぼ5分で平衡に達することが明らかになった。この結果は、昨年度の高濃度トロンビンを使ったものとほぼ同じ所見を示した。すなわち、H12-リポソームは比較的low濃度のトロンビンによって活性化された血小板にも結合することを示している。

次いで、H12-リポソームはトロンビン刺激血小板に如何に結合するかを超薄切片法で形態学的に検討した。血小板浮遊液にH12-リポソームを加え、さらに0.1U/mlのトロンビンを添加した時、血小板は形態変化を示し、30秒以降に開放小管系の拡張像が著明になった。ただ、超薄切片の試料作製過程において、脱水のためにエチルアルコールが使われるために、リポソームはこれによって溶解されてしまい、本法によってはリポソームが可視化されないと想像されたが、やはりリポソームは同定されなかった。しかし、拡張した開放小管系中を注意深く観察すると、顆粒の内容物ではなく、形態的に丸く捕捉される物質が存在した。これがリポソームではないかと考え、リポソームが開放小管系に入り込むために開放小管系が拡張するのではないかと考えられた。

そこで、同様にトロンビン刺激された血小板の凍結超薄切片をウサギ抗H12抗体で免疫染色する免疫電顕法で検討を続けた。まず、H12-リポソームを本法で観察すると、H12の存在を示す金粒子はリポソームの表面に検出され、H12は表面に結合していることが確かめられた。次いで、開放小管系が拡張しているトロンビン刺激5分の血小板で検討したところ、H12-リポソームは血小板表面に分布するばかりでなく、開放小管系中に内在化することを確認した。すな

わち、超薄切片法の結果より予想されたように、開放小管系の拡張はH12-リポソームの内在化に起因するとの確証が得られた。

H12-リポソームの内在化による開放小管系の拡張の機構を明らかにするために、EDTA、H12または抗GPIIb/IIIa抗体で前処理した血小板で検討したところ、いずれの前処理でも開放小管系の拡張像は観察されなかった。すなわち、H12-リポソームの内在化はGPIIb/IIIa依存性の血小板活性化で惹起されると推察された。

H12-リポソームの分布は0.1U/mlトロンビン惹起凝集塊でも検討した。H12-リポソーム+トロンビンによって形成される血小板凝集は、一見大きな隙間のある凝集であった。しかし、詳細に観察すると、その隙間にはH12-リポソームが存在することが観察され、免疫電顕法でも確認した。この大きな隙間は前述の結果より血小板と血小板の間または開放小管系と考えられた。

以上の結果より、まずフローサイトメトリーによって、H12-リポソームがトロンビン刺激血小板に特異的に結合し、その結合は経時的に増加することを明らかにした。電顕による形態学的検討でも、本リポソームがトロンビン刺激血小板の表面に結合することを確認し、さらにH12-リポソームは拡張した開放小管系中に存在するという興味深い所見を得た。フローサイトメトリーの結果からは本リポソームは表面に結合した後、凝集に伴って血小板間に多く存在するものと想定していたが、それだけではなく、本リポソームの一部またはさらに多い部分が開放小管系内に移動、取り込まれると考えられた。開放小管系の膜上では、そこに分布しているGPIIb/IIIaとリポソーム上のH12が結合するためと考えられる。すでに、H12-リポソームは血小板凝集を促進させることを報告してきたが、凝集促進とこの開放小管系内に分布の関連については不明である。しかし、拡張している開放小管系と血小板と血小板の間の領域との識別が必ずしも簡単でないことから、むしろ拡張している開放小管系の一部は血小板間の領域が含まれていると考えるのが自然であろう。

E. 結論

前もって H12-リポソームとヒト洗浄血小板を混合し、さらに比較的濃度のトロンビンを添加して活性化される血小板と本リポソームとの相互反応をフローサイトメトリーで測定するとともに、本リポソームの動態を電顕で検討した。その結果、フローサイトメトリーによって H12-リポソームはトロンビン刺激血小板に結合し、その結合は経時的に増加することを明らかにした。また、形態学的にも本リポソームがトロンビン刺激血小板へ結合し、さらにその一部は開放小管系内に移動することを明らかにした。すなわち、H12-リポソームはコントロールのリポソームに比べてトロンビン刺激血小板においても、血小板表面および開放小管系内に特異的に結合し、大きな凝集塊を形成させることから、人工血小板として有望と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chung, J., Suzuki, H., Tabuchi, N., Sato, K., Shibamiya, A., Koyama, T.: Identification of tissue factor and platelet-derived particles on leukocytes during cardiopulmonary bypass by flow cytometry and immunoelectron microscopy. *Thromb. Haemost.* 98: 368-74, 2007.
- 2) Kozuma, Y., Kojima, H., Yuki, S., Suzuki, H., Nagasawa, T.: Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin-mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL. *J. Thromb. Haemost.* 5: 1274-82, 2007.

2. 学会発表

- 1) 鈴木英紀, 岡村陽介, 武岡真司, 池田康夫, 半田誠: トロンビン刺激による H12 結合リポソームと血小板との相互反応に関する電顕的検討. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007, 11, 15-17, 志摩市.
- 2) 岡村陽介, 武岡真司, 鈴木英紀, 前川一平, 藤枝俊宣, 江藤薫子, 池田康夫, 半田誠: ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-二リン酸)内包リン脂質小胞体の

血小板代替物としての止血能増幅効果. 第30回日本血栓止血学会学術集会, 2007, 11, 15-17, 志摩市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

平成19年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業)
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に関する研究

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

血小板は様々なアゴニストによって活性化した時にのみフィブリノーゲンと結合し血栓を形成する。これは血小板膜表面の α IIb β 3 インテグリンが活性化に伴って立体構造をかえ、リガンドとの結合親和性を高めるためである。同様に H12 担持人工粒子も活性化血小板のみと結合することが要求される。従って α IIb β 3 の活性化メカニズムを解明することは、H12 担持人工粒子の生体内での挙動を予測する上でも重要である。これまでの研究から、 α IIb β 3 には少なくとも二つの異なる conformer が存在し、 α IIb β 3 は血小板細胞内シグナルの活性化により低親和型の bent conformer から高親和型の extended conformer へ立体構造を変化させることによってフィブリノーゲンと結合することが明らかになった。しかし、この結果は人工的に一定の構造に固定された変異 α IIb β 3 を用いて導き出したものあり、これらの変異体が必ずしも生理的な構造変化を反映していない可能性が残る。また α IIb β 3 と類似した構造をもつ α V β 3 インテグリンの構造解析では、 α V β 3 が bent のままでリガンドと結合することなど、われわれの結果と反する報告もなされている。そこで本研究では α V β 3 とリガンドの結合に影響を与える抗 α V モノクローナル抗体のエピトープを同定することにより、インテグリンの立体構造変化による活性調節機構のさらなる解明を試みた。 α V/ α IIb キメラ分子、ヒト/マウス α V キメラ分子を作成し、哺乳動物細胞に発現させて抗体との結合を調べたところ、異なる3つの抗体 P2W7、AMF7、NKI-M9 が同一のアミノ酸残基 Ser-462 を認識することがわかった。このアミノ酸残基は α V β 3 の立体構造上で tail が折れ曲がる場所である genu に局在していた。これらの抗体が α V β 3 とフィブリノーゲンとの結合に与える影響を調べたところ、P2W7 は全く影響を及ぼさなかったが、AMF7 は有意に結合を増加させ、反対に NKI-M9 は有意に結合を阻害した。同様に立体構造が extended に固定された α V β 3 とフィブリノーゲンの結合に対する影響を調べたところ、AMF7 による促進作用はみられたものの NKI-M9 による阻害効果は全くみられなかった。これらの結果は α V β 3 のリガンド結合活性がアロステリックに調節されることを意味しており、 α V β 3 でもわれわれの仮説通り、インテグリンの屈曲/伸展によって不活性/活性が制御されていることを示唆している。以上の結果から、H12 担持人工粒子も extended conformer と選択的に結合することが予想される。

A. 研究目的

インテグリンはあらゆる細胞の表面に存在し、他の細胞の表面や細胞外基質に存在する分子(リガンド)と結合することによ

って、細胞-細胞間や細胞-細胞外基質間の結合に関与する分子である。個々のインテグリン分子は互いに異なる α 鎖と β 鎖から構成されるヘテロダイマーである。現在

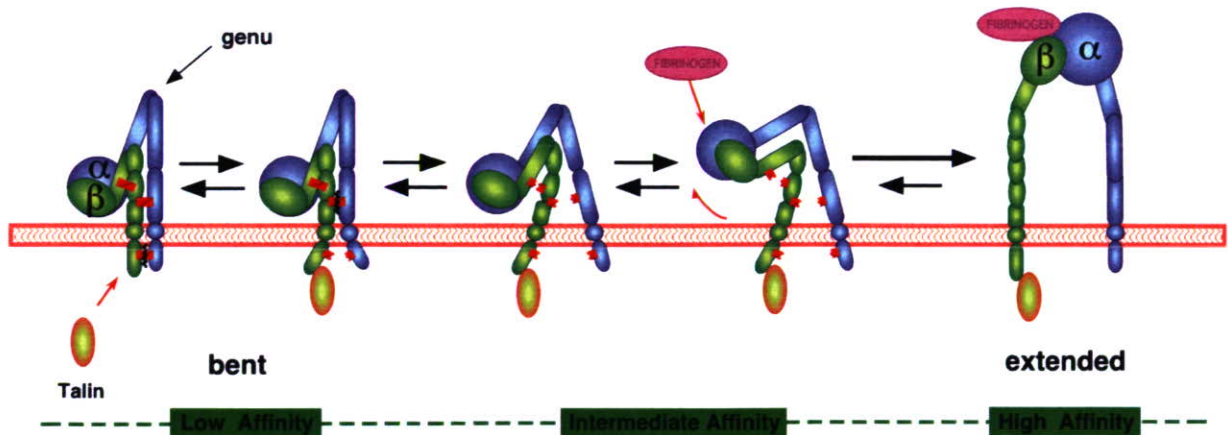


図1. インテグリンの活性化モデル

までに 24 個の異なるヘテロダイマーが同定されているが、それぞれ異なる組織に分布し結合するリガンドも異なる。インテグリンとリガンドの結合は細胞内シグナル経路を活性化させることが知られている (outside-in signaling)。反対にインテグリンとリガンドの結合は細胞内シグナルの影響を強く受ける (inside-out signaling) が、その構造メカニズムは不明であった。最近の構造解析の進歩により、インテグリンの短い細胞内ドメインは互いに結合していることがわかった。inside-out signaling では細胞内タンパクである talin が β 鎖に結合するために、この α 鎖と β 鎖の間の結合が解離してインテグリンが活性化すると考えられている。一方細胞外ドメインの立体構造は、結晶構造、電子顕微鏡像の解析から α 鎖と β 鎖はともに頭部 (head) を形成する球状ドメインと脚部 (tail) を形成する棒状のドメインから構成されることがわかった (図1)。結晶構造では α 鎖と β 鎖の head は会合して大きなリガンド結合部位を形成し、tail は genu で 137 度折れ曲がり head を下に向けている像 (bent conformer) が得られた。しかし電子顕微鏡解析では head を上に向け tail が真っ直ぐな像 (extended conformer) も観察されているため、インテグリンには bent と

extended の少なくとも二つの立体構造が存在することになる。その後の研究から bent が不活性型で extended が活性型とする説が有力である。以上を総合するとインテグリン細胞内ドメインが解離する結果、細胞外ドメインの立体構造が bent から extended へと大きく変化することによってインテグリンは活性化すると考えられる (図1)。しかし $\alpha V\beta 3$ インテグリンが bent の状態でもリガンドと結合することが示されるなど、インテグリンの屈曲/伸展が活性制御に関わっているか否かについては未だ最終的な結論に至っていない。

そこで本研究は $\alpha V\beta 3$ と $\alpha IIb\beta 3$ の二つのインテグリンの免疫学的な違いを利用して活性制御に重要な部位を同定することにより、インテグリンの活性制御機構の解明を試みた。 $\alpha V\beta 3$ は血管内皮細胞など様々な場所に存在し細胞外基質との接着などに関わることが知られている。一方 $\alpha IIb\beta 3$ は $\alpha V\beta 3$ と共通の β 鎖をもつが、血小板・巨核球に特異的に存在し、血漿中のフィブリノーゲンと結合することにより血小板凝集に関わる。 αIIb と αV は一次構造上の相同性も高く、立体構造上の相同性も高いと予想されるが、免疫学的には一方を認識するモノクローナル抗体が他方も認識することはない。本研究ではこのことを利用し、