

分子生物学的手法を用いて  $\alpha V$  と  $\alpha IIb$  の domain-swapping キメラを作成することにより、抗  $\alpha V$  モノクローナル抗体のエピトープマッピングを行った。さらにこれらの抗体が  $\alpha V\beta 3$  とリガンドとの結合に与える影響を調べ、エピトープと機能の相関を検討した。

## B. 研究方法

### I. $\alpha V$ と $\alpha IIb$ のキメラの作成

$\alpha IIb$  鎖、 $\alpha V$  鎖、 $\beta 3$  鎖の cDNA は Joseph C. Loftus 博士 (Mayo Clinic, AZ) から供与された。これらを哺乳類発現ベクターである pBJ-1 (Mark Davis 博士 University of California, San Francisco) から供与) にクローニングした。今回の実験で用いたキメラ V/B、B/V、T、C1、C2 は以前研究室で作成したものである(5)。VT、VC1、VC2 は overlap extension PCR 法によって新たに作成した。各キメラ作成に用いたドメイン境界部は図 2 に示した通りである。human-to-mouse  $\alpha V$  変異体である I441V、T460ICP、T460I、S462P、V486T、N492H、E496DV、Y515HN、S520V、N524T、I527VF、I527V、S528F、L532Q、I539V、Y565Q、T571A、I586V

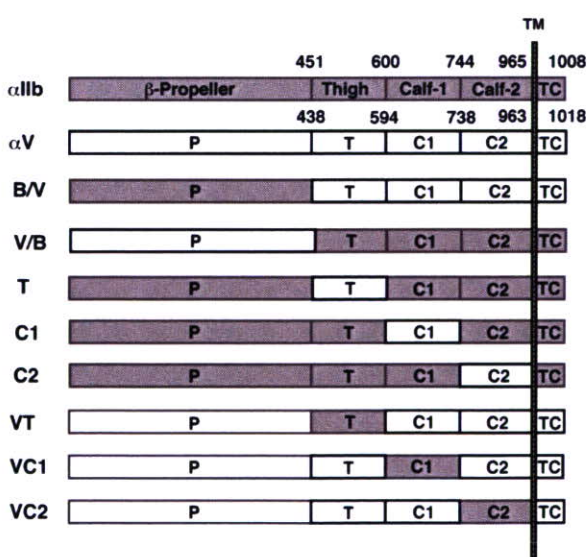


図 2. キメラのドメイン構成

と Q589NAT の cDNA は site-directed mutagenesis 法を用いて作成した。

### II. 細胞培養とトランスフェクション

Chinese hamster ovary (CHO-K1) 細胞は 10% fetal calf serum、1% penicillin and streptomycin、1% non-essential amino acids 添加 Dulbecco's modified Eagles medium を用い 37 °C、CO2 濃度 5% の incubator で行った。50  $\mu g$  の  $\alpha V$  又は  $\alpha IIb$  cDNA は 50  $\mu g$  の  $\beta 3$  cDNA と一緒に CHO-K1 細胞へ electroporation 法を用いてトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞は 48 時間後に培養皿から剥離し解析に用いた。

### III. Flow Cytometry

細胞を剥離した後 1mM  $Ca^{2+}$ /1mM  $Mg^{2+}$  加 HEPES-Tyrode buffer (HTB) に再浮遊させ、各モノクローナル抗体 10 $\mu g/ml$  と混和し氷上で 30 分間反応させた。遠心洗浄した後、二次抗体として RPE 標識抗マウス IgG と氷上で 30 分間反応させた。遠心洗浄の後細胞を 1mM  $Ca^{2+}$ /1mM  $Mg^{2+}$  加 HEPES-buffered saline (HBS) に再浮遊させ、FACSCalibur を用いて細胞の各モノクローナル抗体による陽性率と蛍光強度を測定した。

### IV. フィブリノーゲン結合実験

野生型あるいは Q589NAT 変異を有する  $\alpha V$  cDNA 50  $\mu g$  と野生型  $\beta 3$  cDNA 50  $\mu g$  を CHO 細胞にトランスフェクトした。48 時間後細胞を剥離して 1 $\mu g/ml$  の抗  $\beta 3$  モノクローナル抗体 VNR5-2 を含有する HTB に再浮遊して氷上で 30 分間反応させた後細胞を遠心洗浄し、RPE 標識抗マウス IgG と氷上で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後 1 $\mu M$  の FITC 標識フィブリノーゲン (FITC-Fbg)、1mM  $Mn^{2+}$ 、100 $\mu g/ml$  の各種モノクローナル抗体あるいは 1mM の GRGDS ペプチドを含んだ HTB と氷上で 2 時間反応させた。細胞を 1mM  $Mn^{2+}$

加 HBS に再浮遊させ、FACSCalibur を用いて FL2>500 の領域の細胞集団の平均蛍光強度 (FL1) を測定した。各抗体存在下での FITC-Fbg 結合を抗体非存在下での FITC-Fbg 結合で除し、Relative FITC-Fbg binding を算出した。

### C. 研究結果

#### I. 抗 $\alpha V$ モノクローナル抗体のキメラ分子への結合性の解析。

今回の実験では9種類の抗 $\alpha V$ 抗体 10C4、23C6、LM609、272-17E6、69.6.5、P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 と 2 種類の抗 $\beta 3$  抗体 SZ21、VNR5-2、陰性対照としてマウス IgG (mIgG) を用いた。表 1 に野生型 $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha IIb\beta 3$  と tail を交換したキメラを発現した細胞での各抗体の陽性率を示した。10C4 と 23C6 と LM609 が  $\alpha IIb\beta 3$  を発現している細胞に対して部分的な反応性を示したのを除き、すべて野生型の $\alpha V\beta 3$  を発現している細胞に結合し、 $\alpha IIb\beta 3$  を発現している細胞や CHO 細胞に

は結合しなかった。10C4、23C6、LM609 と  $\alpha IIb\beta 3$  発現細胞から得られた蛍光強度は、これら3つと $\alpha V\beta 3$  発現細胞から得られた蛍光強度よりも有意に低かった (データ掲載せず)。加えて、これら3つの抗体は野生型の $\beta 3$  のみを発現している細胞にも結合した。CHO 細胞は内在性の $\alpha V$  を有することが知られているため、これら3つの抗体はハムスターの $\alpha V$  とヒトの $\beta 3$  の複合体に結合したと考えられる。

$\alpha V$  と  $\alpha IIb$  の tail を入れ替えた tail-swapping キメラを用いた実験では、272-17E6、69.6.5 は V/B を発現している細胞とは結合した (青) が、B/V を発現している細胞とは結合しなかった (赤)。反対に、P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の4種類の抗体は B/V を発現している細胞とは結合した (青) が、V/B を発現している細胞とは結合しなかった (赤) (表 1)。10C4、23C6、LM609 は B/V を発現している細胞とも V/B を発現している細胞とも結合した。しかし、B/V を発現した細胞から得られた

	mIgG	10C4	23C6	LM609	272-17E6	69.6.5	AMF-7	NKI-M9	P2W7	P3G8	SZ21	VNR5-2
CHO	5.26	4.77	4.34	4.48	4.94	5.23	3.57	3.15	18.99	4.25	3.63	4.04
$\beta 3$	2.72	55.83	70.09	61.93	3.64	4.66	2.92	3.93	4.08	5.84	49.89	66.06
$\alpha V\beta 3$	3.47	61.09	77.73	68.92	67.32	64.4	64.17	71.05	57.59	63.15	54.52	78.98
$\alpha IIb\beta 3$	3.92	57.69	58.25	65.47	3.66	4.25	3.07	4.08	4.61	5.56	51.73	73.22
V/B	4.18	58.73	69.11	61.9	53.13	45.19	3.08	3.78	6.00	6.36	52.16	74.33
B/V	4.24	51.6	63.63	57.3	7.11	6.44	58.39	63.47	49.97	55.63	49.16	74.27

表 1.  $\alpha V$  tail-swapping キメラに対する抗体の結合 (%陽性率)

	mIgG	AMF-7	NKI-M9	P2W7	P3G8	272-17E6	SZ21
CHO	7.83	5.86	5.72	15.51	5.78	5.91	4.8
$\alpha V\beta 3$	5.6	68.11	78.41	63.75	67.97	76.32	59.23
VT	4.72	3.37	4.09	6.91	6.44	74.37	68.6
VC1	10.88	82.45	90.34	71.17	76.44	90.39	83.9
VC2	4.7	64.82	81.14	69.67	69.52	78.53	74.97
T	6.4	49.93	62.12	45.45	44.62	4.45	62.75
C1	5.87	3.8	4.03	5.82	6.37	4.05	61.79
C2	5.36	5.53	5.16	6.57	8.25	6.8	71.52

表 2.  $\alpha V$  domain-swapping キメラに対する抗体の結合 (%陽性率)

蛍光強度は、 $\beta 3$  だけを発現しているものと同等で、V/B を発現している細胞から得られたものよりも有意に低かった（データ掲載せず）。これらの結果は、10C4、23C6、LM609、272-17E6、69.6.5 の結合部位は、N 末端側の  $\beta$ -propeller ドメイン（インテグリンの head に相当する部分）にあると考えられる。また、P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の 4 種類の抗体の結合部位は C 末端側の tail 部分（インテグリンの thigh、calf-1、calf-2 ドメインに相当する部分）にあることが予想される。P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の 4 種類の抗体の結合部位が、tail 部分の 3 つのドメインのうちどこにあるかを同定するため、それぞれのドメインを入れ替えた domain-swapping キメラ分子を発現した細胞を作製し抗体の結合を調べた。表 2 に各キメラを発現した細胞での各抗体の陽性率を示した。 $\alpha V$  の thigh ドメインを  $\alpha IIb$  の対応部と入れ替えたキメラ分子を発現した細胞 (VT) に対するこれらの 4 種類の抗体の反応性は完全に消失した (赤)。しかし  $\alpha V$  の calf-1 ドメイン、calf-2 ドメインを  $\alpha IIb$  の対応部と入れ替えても (それぞれ VC1、VC2) 抗体の結合に大きな影響はみられなかった。一方、 $\alpha IIb$  の thigh ドメインを  $\alpha V$  の対応部と入れ替えたキメラ分子を発現した細胞 (T) にこれら 4 種類の抗体は結合した (青)。しかし、 $\alpha IIb$  の calf-1 ドメイン、calf-2 ド

メインを  $\alpha V$  の対応部と入れ替えた場合 (それぞれ C1、C2) は抗体の結合は全くみられなかった。これらの結果から、P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の結合部位は tail を構成する thigh ドメインのみに限局して存在し、他の calf-1、calf-2 ドメインには存在しないと考えられる。

## II. ヒトとマウスの $\alpha V$ のアミノ酸配列比較による抗体結合部位の同定。

キメラを用いた実験から P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の結合部位が thigh ドメインに限局することが明らかになった。図 3 に表示した通り、ヒトとマウスの  $\alpha V$  のアミノ酸配列を比較すると、thigh ドメインを構成する 153 残基のうち 18 残基 (赤) が異なることがわかる。このことを利用し、ヒト  $\alpha V$  のアミノ酸配列をマウス  $\alpha V$  の配列に置換することによって、これら 4 種類の抗体の結合部位のさらなる同定を行った。まず始めに表 3 に示した 15 種類の human-to-mouse キメラを作成して野生型の  $\beta 3$  とともに CHO 細胞に発現させ、これらの抗体の結合を調べた。この結果、AMF-7、P2W7、NKI-M9 は T460ICP を発現している細胞には結合せず、P3G8 は I527VF を発現している細胞には結合しなかった (赤)。次にさらにどのアミノ酸残基が抗体の結合に不可欠であるのかを調べるために、460-463 と 527-528 のアミノ酸残基を一つずつマウスの対応部分の配列と入

human aV	441	<b>I</b> TVNAGLEVYPSILNQDNK <b>TCS</b> LPGTALKVSCFNVRFLKADGKG <b>V</b> LPRKLN <b>FQVEL</b> LLD	500
mouse aV	441	VTVNAGLEVYPSILNQDNK <b>I</b> CPLPGTALKVSCFNVRFLKADGKG <b>T</b> LPRKL <b>H</b> FQVDVLLD	500
human aV	501	<b>KLKQK</b> GAI <b>RRALFLYSRSP</b> SHSKN <b>MTISR</b> GG <b>LMQCEELI</b> AYLRDESEFRDKLTPITIF <b>ME</b>	560
mouse aV	501	<b>KLKQK</b> GAI <b>RRALFLHNRSP</b> VH <b>S</b> KT <b>MTVFR</b> GG <b>QMQCEELV</b> AYLRDESEFRDKLTPITIF <b>ME</b>	560
human aV	561	<b>YRLDY</b> RTAAD <b>TTGL</b> QPILNQ <b>FTPANISR</b> QA <b>HIL</b>	593
mouse aV	561	<b>YRLDQ</b> RTAAD <b>T</b> GLQPILNQ <b>FTPANVSR</b> QA <b>HIL</b>	593

図 3. ヒトとマウス  $\alpha V$  thigh ドメインのアミノ酸配列の比較

	mIgG	AMF-7	NKI-M9	P2W7	P3G8	272-17E6	SZ21
CHO	3.62	2.56	2.95	13.3	3.2	4.07	1.16
WT	6.8	74.11	85.85	78.21	83.47	87.07	71.41
I441V	4.15	76.76	70.66	72.64	77.61	79.97	70.78
T460ICP	5.15	5.84	3.26	7.01	70.72	77.52	65.15
T460I	5.88	62.11	63.27	54.8	56.43	70.81	64.01
S462P	5.52	14.66	3.75	17.17	66.41	76.18	66.88
V486T	11.93	72.65	78.35	71.75	64.14	82.23	71.1
N492H	10.04	70.78	79	70.14	72.01	82.49	73.56
E496DV	14.9	73.25	76.95	67.31	75.08	75.01	58.72
Y515HN	8.47	59.79	67.31	59.04	65.69	66.81	50.75
S520V	8.33	65.13	72.76	61.29	73.55	71.38	60.68
N524T	12.98	60.75	69.31	58.6	65.03	66.37	57.98
I527VF	9.55	74.93	78.94	59.25	9.26	84.31	81.13
I527V	3.12	75.57	78.3	64.88	77.78	83.6	67.47
S528F	5.32	80.94	82.19	76.5	10.59	85.83	78.1
L532Q	26.68	62.2	77.22	58.2	62.38	76.84	71.26
I539V	13.13	73.98	67.01	57.12	68.84	76.24	64.92
Y565Q	11.64	70.1	77.22	64.52	71.32	80.13	72.63
T571A	27.84	68.76	69.91	54.89	59.55	75.22	75.28
I586V	9.99	70.96	78.21	61.16	70.96	68.54	76.34

表 3. Human-to-mouse  $\alpha V$  変異体に対する抗体の結合 (%陽性率)

れ替えた。この結果 AMF-7、P2W7、NKI-M9 は T460I とは結合するが S462P との結合は著明に低下すること、P3G8 は I527V とは結合するが S528F との結合は著明に低下することがわかった (赤)。以上の結果から AMF-7、P2W7、NKI-M9 のエピトープは  $\alpha V$  のアミノ酸残基 Ser-462 に存在し、P3G8 のエピトープは Ser-528 に存在することが判明した。

### III. 抗 $\alpha V$ モノクローナル抗体が $\alpha V\beta 3$ -リガンド結合に与える影響の解析。

$\alpha V$  の tail に結合する P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 のうち、AMF-7 と NKI-M9 は細胞のビトロネクチンへの接着を阻害することが報告されている。これらの抗体が  $\alpha V\beta 3$  とリガンドとの結合にどう影響するのかを調べるため、 $\alpha V\beta 3$  発現細胞とフィブリノーゲンとの結合を抗  $\alpha V\beta 3$  抗体存在下で測定した (図 4)。機能阻害抗  $\beta 3$  抗体 (インテグリンとフィブリ

ノーゲンの結合を阻害する) である 7E3 は、1mM の  $Mn^{2+}$  の存在下で野生型  $\alpha V\beta 3$  を発現している細胞へのフィブリノーゲン結合を有意に阻害した。抗  $\alpha V$  抗体である 272-17E6 と P3G8 は結合に全く影響を及ぼさなかった。これに対して NKI-M9 は結合を約 40%低下させ、反対に AMF-7 は結合を約 30%上昇させた (図 4 黒のカラム)。AMF-7 と NKI-M9 の影響は統計学的に有意であった (\* $P < 0.01$ )。

同様の実験を立体構造がまっすぐな状態に固定された  $\alpha V\beta 3$  を発現している CHO 細胞で行うために、 $\alpha V$  の genu 直下に存在する Q589 に N-糖鎖結合部位を導入した変異  $\alpha V\beta 3$  を作成した。この Q589NAT 変異体は genu 直下に大きな N-糖鎖が結合するため  $\alpha V\beta 3$  が曲がった状態になるのを阻害すると予想される。これを用いて実験した結果、7E3 は野生株と同様に有意な阻害効果を示したが、NKI-M9 を含むすべて

の抗 $\alpha V$ 抗体は結合性阻害効果を示さなかった。AMF-7は結合を約40%増加させた(図4グレーのカラム)。

#### D. 考察

本研究では $\alpha V$ と $\alpha IIb$ のdomain-swappingキメラを作成してCHO細胞に発現させることにより、1)抗 $\alpha V$ モノクローナル抗体P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9が $\alpha V$ のtailを構成するthighドメインに特異的に結合すること、2) $\alpha V$ のhuman-to-mouseキメラを用いることによりP3G8のエピトープが $\alpha V$ のアミノ酸残基Ser-528に存在し、AMF-7、P2W7、NKI-M9のエピトープが共通のアミノ酸残基Ser-462に存在すること、3)野生型 $\alpha V\beta 3$ を発現したCHO細胞とフィブリノーゲンのMn<sup>2+</sup>存在下での結合に与える影響を調べることにより、P3G8、P2W7が結合に全く影響を与えないがAMF-7は結合促進作用を有し、反対にNKI-M9は結合阻害作用を持つことを明らかにした。

インテグリンのリガンド結合部位はN末端側のheadに存在することが既に解明されている。本研究で $\alpha V$ のheadを構成する $\beta$ -propellerドメインに結合することが明らかとなった10C4、23C6、LM609、69.6.5は $\alpha V\beta 3$ とリガンドの結合を阻害す

る抗体である。また本研究で用いた7E3は $\beta 3$ のheadを構成する $\beta A$ ドメインに結合することが知られており、これらの抗体はリガンドと競合することで阻害作用もつと考えられる。一方P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9の4抗体はリガンド結合には直接関与しないthighドメインと結合する抗体であった。図5に示すように $\alpha V\beta 3$ の結晶構造でP3G8のエピトープであるSer-528はgenuから離れた $\beta$ -propeller側の側面に位置しており(マゼンタ)、P3G8がリガンド結合に全く影響しないことも理解できるだろう。一方AMF-7、P2W7、NKI-M9の共通のエピトープであるSer-462はgenuの直上に局在している(シアン)。注目すべきことは、AMF-7、P2W7、NKI-M9はこの共通のアミノ酸残基を認識するにも拘らず、これらの抗体が $\alpha V\beta 3$ とリガンドの結合に与える影響が全く異なることである。われわれの実験ではP3G8は全く機能を持たず、AMF-7は活性化作用を、NKI-M9は阻害作用を有していた(図4)。genuがインテグリンのtailの屈曲部位であることを考慮すると、これらの3抗体は $\alpha V$ のgenuに結合しtailの屈曲をコントロールすることでアロステリックにインテグリンの活性を制御していると想像される。事実extendedに構造が固定されたQ589

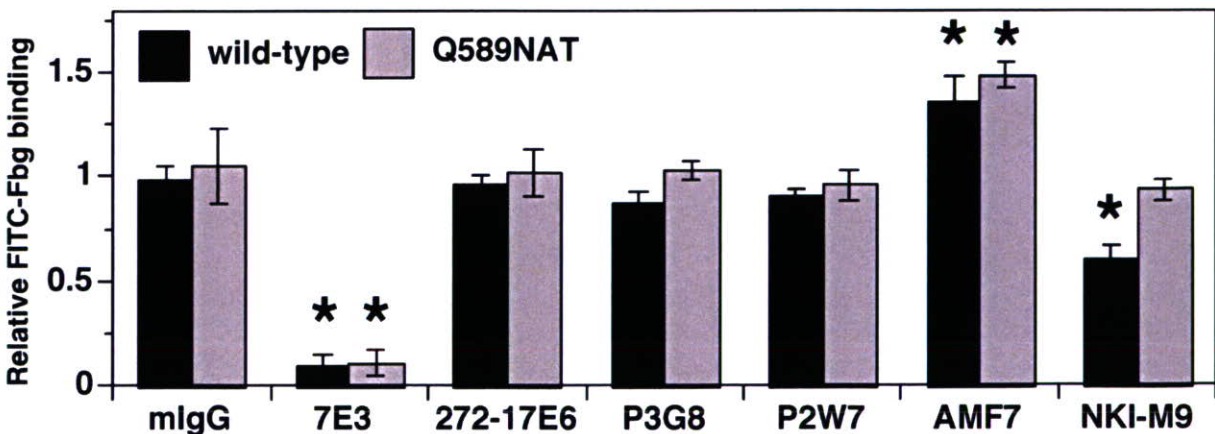


図4. 抗 $\alpha V\beta 3$ 抗体存在下での $\alpha V\beta 3$ -フィブリノーゲン結合

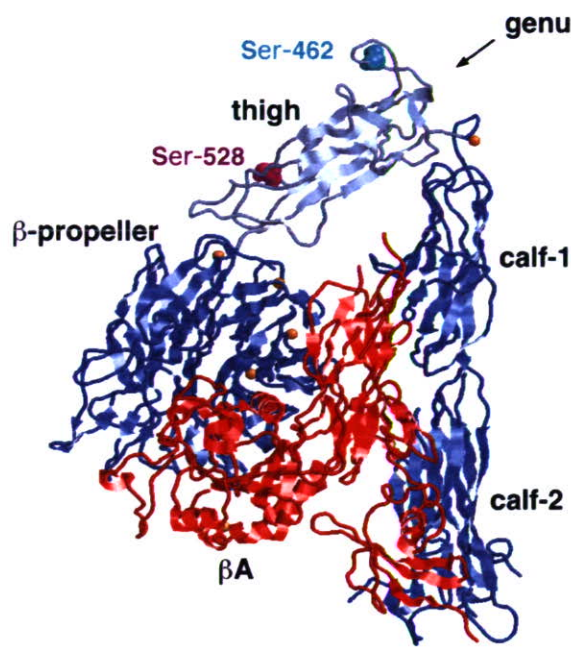


図5.  $\alpha V\beta 3$  結晶構造におけるエピトープの局在

NAT 変異体を用いた実験では、P3G8 はリガンド結合に影響を与えず AMF-7 は活性化作用を維持していたが、NKI-M9 による阻害効果のみが全く失われていた。これらの結果は NKI-M9 は  $\alpha V\beta 3$  を屈曲させ bent conformer に保つことによって活性を低下させる抗体であることを示唆している。対照的に、拮抗阻害作用を有する 7E3 は野生型、Q589NAT 変異体に対し同等の強い阻害効果を有していた。われわれの結果はインテグリンの bent conformer が低活性型であり extended conformer が高活性型とする従来の仮説に一致しており、 $\alpha V\beta 3$  においても同様の活性制御機構が存在すると考えられる。しかし  $\alpha V\beta 3$  がどの程度屈曲あるいは伸展したところで活性の変化がみられるかについては全くわかっていない。2 価イオンなどの条件の違いによっては  $\alpha V\beta 3$  がある程度屈曲していてもリガンドと結合しうる余地は残されているであろう。

前年度および今年度の研究から、 $\alpha IIb\beta 3$

インテグリンは血小板の活性化に伴い立体構造を bent から extended form に変化させることによって高分子リガンドであるフィブリンノーゲンと結合することが解った。人工血小板粒子表面に結合した H12 ペプチドは、フィブリンノーゲンの  $\alpha IIb\beta 3$  結合部位を形成するものの、フィブリンノーゲンと異なり  $\alpha IIb\beta 3$  と活性化非依存性に結合することが知られている。つまり  $\alpha IIb\beta 3$  は構造変化をおこさなくても H12 ペプチドと結合すると考えられる。またこの様な低分子リガンドは  $\alpha IIb\beta 3$  と結合することにより、 $\alpha IIb\beta 3$  の構造変化を惹起することが知られている。このため生体内に低分子リガンドを投与すると、 $\alpha IIb\beta 3$  の隠れたエピトープに対する自己抗体が形成された例が報告されている。これらのことから、H12 担持人工粒子も非活性化血小板に結合し、同様な臨床応用上の問題を起こす可能性が考えられる。次年度の研究では、これまでにわれわれが作成した変異  $\alpha IIb\beta 3$  と H12 担持人工粒子との結合を調べることにより、H12 担持人工粒子がどの conformer と結合するかを調べ、フィブリンノーゲンとの対比を試みたい。また H12 担持人工粒子が  $\alpha IIb\beta 3$  の構造変化を直接惹起する可能性についても検討する。

## E. 結論

細胞膜表面の  $\beta 3$  インテグリンのリガンド結合活性は、 $\alpha$  鎖の genu を中心とした脚部の進展/屈曲によって制御される。

## G. 研究発表

1 論文発表：無し。

2 学会発表：1) Kamata T, Handa M, Ikeda Y, Aiso S: Separation of the Extracellular Tails Activates  $\alpha IIb\beta 3$  Integrin. 第 59 回日本細胞生物学会大会、福岡県福岡市、2007 年 5 月 28-30 日

2) 松本 淳、鎌田徹治、高木淳一、岩崎  
憲治、 由良 敬 : **Elastic Network model**  
の基準振動解析によるインテグリンの構造  
変化の解析。第 45 回に本生物物理学会年  
会、神奈川県横浜市、2007 年 12 月 21～

23 日

H. 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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamura Y, Fujie T, Maruyama H, <u>Handa M</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Takeoka S</u>	Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen g-chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits	<i>Transfusion Med</i>	in press		2008
Okamura Y, Utsunomiya S, Suzuki H, Niwa D, Osaka T, <u>Takeoka S</u>	Fabrication of freestanding nanoparticle-fused sheets and their hetero-modification using sacrificial films	<i>Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects</i>	in press		2008
岡村陽介, <u>武岡真司</u> , <u>半田 誠</u> , <u>池田 康夫</u>	人工血小板の開発	<i>Medical Science Digest</i> ,	34 巻 4 号	138 - 140	2008
Okamura Y, Goto T, Niwa D, Fukui Y, Otsuka M, Motohashi N, Osaka T, <u>Takeoka S</u>	Fabrication of free-standing albumin-nanosheets having hetero-surface	<i>J Biomed Mater Res</i>	in press		2008
Morikawa T, <u>Kajimura M</u> , Ichikawa M, Suematsu M	Three-dimensional imaging of growing thrombus <i>in vivo</i>	<i>Microvascular Reviews and Communications</i>	in press		2008
Okamura Y, Fujie T, Maruyama H, <u>Handa M</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Takeoka S</u>	Prolongation effects of hemostatic ability of polyethylene glycol-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen gamma-chain dodecapeptide	<i>Transfusion</i>	47 巻 7 月号	1254 - 1262	2007
Fujie T, Okamura Y, <u>Takeoka S</u>	Ubiquitous transference of free-standing polysaccharide nanosheet in the development of a nano-adhesive plaster	<i>Adv Mater</i>	19 巻 4 号	3549 - 3553	2007

その他

半田誠：人工血液をつくる（8）平成 19 年度公開発表会、講演ハンドアウト

## 研究成果の刊行物・別冊

## **Hemostatic Effects of Polymerized Albumin Particles Carrying Fibrinogen $\gamma$ -Chain Dodecapeptide as Platelet Substitutes in Severely Thrombocytopenic Rabbits**

Yosuke Okamura<sup>1),4)</sup>, Toshinori Fujie<sup>1)</sup>, Masayuki Nogawa<sup>2)</sup>, Hitomi Maruyama<sup>3)</sup>, Makoto Handa<sup>4)</sup>, Yasuo Ikeda<sup>3)</sup> and Shinji Takeoka<sup>1)\*</sup>

(Received: )

1) Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, 169-8555, Japan, 2) Research and Development Department, Central Blood Institute, Japanese Red Cross Society, Tokyo, 135-8521, Japan. 3) Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, 160-8582, Japan, 4) Department of Transfusion Medicine & Cell Therapy, School of Medicine, Keio University, Tokyo, 160-8582, Japan.

### **RUNNING TITLE**

Hemostasis by Albumin Particles carrying Dodecapeptide (50 characters)

\* To whom correspondence should be addressed.

e-mail : takeoka@waseda.jp, Tel : +813-5286-3217, Fax : +813-5286-3217

## **ABSTRACT**

**Aim** Our purpose was to produce a platelet substitute that could enhance hemostatic ability using rabbits with severe thrombocytopenia.

**Background** We have developed polymerized albumin particles (polyAlb) for treatment of bleeding and focused on a dodecapeptide; HHLGGAKQAGDV (H12) as a useful ligand for activated platelet. This sequence occurs only at the carboxy-terminus of the fibrinogen  $\gamma$ -chain ( $\gamma$  400-411).

**Methods/Materials** H12 was conjugated to the surface of polyAlb modified with poly(ethylene glycol) (PEG) chains to produce blood-compatible particles (H12-PEG-polyAlb) that had prolonged blood residence time and enhanced stability *in vitro* and *in vivo*. The H12-PEG-polyAlb was administered intravenously to rabbits with severe thrombocytopenia, and the ear bleeding time was measured in order to evaluate the hemostatic effect.

**Results** The H12-PEG-polyAlb significantly shortened the ear bleeding time of severely thrombocytopenic rabbits and showed no effect on the inhibition or promotion of endogenous and exogenous coagulation activities. Furthermore, we could assess the hemostatic capacity of the H12-PEG-polyAlb, based on the relationship between transfused platelet count and the bleeding time.

**Conclusions** The H12-PEG-polyAlb may be a suitable candidate for an alternative to human platelet concentrates infused to treat bleeding in patients with severe

thrombocytopenia.

**KEY WORDS:** platelet substitutes, dodecapeptide (H12), polymerized albumin particles, PEG modification, thrombocytopenic rabbits, ear bleeding time

## **INTRODUCTION**

Platelet transfusion plays an important role in supportive therapy for patients with thrombocytopenia caused by hematologic malignancies or resulting from intensive chemotherapy or radiotherapy for cancer. However, the limited supply of platelet concentrates has always been a serious issue because of their short storage life (three days in Japan), an insufficient number of donations, and hence the demand that exceeds the supply. Furthermore, the risk of viral or bacterial infection associated with transfusion is also a serious issue. For these reasons, a number of trials have been conducted to develop platelet substitutes (artificial platelets) that can reproduce platelet functions, such as infusible platelet membranes (IPMs) (Graham *et al.*, 2001), solubilized platelet membrane protein-conjugated liposomes (Plateletsomes) (Rybak *et al.*, 1993), fibrinogen-bonded red blood cells (Agam *et al.*, 1992), liposomes bearing fibrinogen (Casals *et al.*, 2003), fibrinogen-coated albumin microcapsules (Synthocytes) (Levi *et al.*, 1999), and arginine-glycine-asparaginic acid (RGD) peptide-bound red blood cells (Thromboerythrocytes) (Coller *et al.*, 1992). These platelet substitutes consist of materials derived from blood components.

The glycoprotein (GP) IIb/IIIa receptor on the platelet membrane is converted from an inactive to an active form when platelets adhere to collagen at the site of vascular injury (Takagi *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004). The activated GPIIb/IIIa acts as a receptor for fibrinogen and von Willebrand factor (VWF) (Mustard *et al.*, 1978; Ruggeri *et al.*, 1983), and their binding is followed by platelet aggregation (De Marco *et al.*, 1986). This is because fibrinogen contains three putative binding sites for GPIIb/IIIa, namely a tetrapeptide containing an RGD sequence, for example, RGDF and RGDS at  $\alpha$  95-98 and  $\alpha$  572-575, respectively, and a dodecapeptide (HHLGGAKQAGDV, H12) at the  $\gamma$ -chain carboxy-terminal sequence ( $\gamma$  400-411) (Kloczewiak *et al.*, 1982).

In order to construct platelet substitutes having the desired hemostatic effects, we have also conjugated fibrinogen (Takeoka *et al.*, 2001), recombinant platelet membrane glycoprotein (GP) Iba (Takeoka *et al.*, 2000; Takeoka *et al.*, 2002, Kitaguchi *et al.*, 1999; Nishiya *et al.*, 2002), and GPIa/IIa (Teramura *et al.*, 2003) to biocompatible and biodegradable carriers such as polymerized albumin particles (polyAlb) and phospholipid vesicles (liposomes). In particular, the fibrinogen conjugates were shown to facilitate platelet aggregation *in vitro* on an activated platelet-immobilized surface by recruiting flowing platelets into aggregates after their initial attachment (Takeoka *et al.*, 2001). However, the isolated human fibrinogen protein is not stable (Takeoka *et al.*, 2001) and tends to precipitate at 4 °C within a few hours (Wertheimer *et al.*, 1944).

Therefore, we focused on the H12 sequence instead of full-length fibrinogen

(Kloczewiak *et al.*, 1982; Kloczewiak *et al.*, 1984; Kloczewiak *et al.*, 1989; Lam *et al.*, 1987).

The H12-conjugates showed minimal interaction with non-stimulated platelets compared with RGD-conjugates, based on our results obtained from flow cytometric analyses of platelet agglutination (Takeoka *et al.*, 2003; Okamura *et al.*, 2005). Furthermore, the H12-conjugated polyAlb enhanced the *in vitro* thrombus formation on a collagen surface, and it dose-dependently reduced the tail bleeding time of rats with moderately thrombocytopenia (Okamura *et al.*, 2005). Recently, we succeeded in prolonging the *in vivo* residence time of the H12-polyAlb by PEG modification (H12-PEG-polyAlb) and confirmed that the H12-PEG-polyAlb hemostatic effects lasted for at least 6 hours (Okamura *et al.*, 2007).

Our purpose was to produce a platelet substitute that could enhance hemostatic ability using a larger animal with severe thrombocytopenia (thrombocytopenic rabbits). In this study, the H12-PEG-polyAlb particles were administered intravenously to rabbits, and the ear bleeding time was measured to evaluate the hemostatic effect. Furthermore, we estimated the hemostatic capacity of the H12-PEG-polyAlb based on the relationship between the bleeding time and platelet transfusion.

## **MATERIALS & METHODS**

**Reagents** Fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide (C-HHLGGAKQAGDV, H12) was synthesized using a solid-phase synthesizer by BEX (Tokyo). Poly(ethylene glycol), precisely,  $\alpha$ -(3-[3-maleimido-1-oxopropyl]amino) propyl- $\omega$ -succinimidyl carboxypentyloxy

poly(ethylene glycol) (MALPEG-NHS, Mw: 5.0 kDa), and  $\alpha$ -methoxy- $\omega$ -succinimidyl carboxypentyloxy poly(ethylene glycol) (mPEG-NHS, Mw: 5.0 kDa), were purchased from NOF (Tokyo). Busulphan and poly(ethylene glycol) (average molecular weight, 400 Da) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Recombinant human serum albumin (rHSA) was kindly donated by Mitsubishi Pharma (Osaka). Ketamine (60 mg mL<sup>-1</sup>) and Seractal 2% were purchased from Daiichi-Sankyo (Tokyo) and Bayer Medical (Tokyo), respectively. Phycoerythrin-conjugated streptavidin (PE-streptavidin) and *N*-hydroxysuccinimidobiotin (NHS-biotin) were purchased from BD-Pharmingen (San Diego, CA) and Pierce Chemical (Rockford, IL), respectively.

***Preparation of H12-PEG-polyAlb*** A suspension of polyAlb with an average diameter of  $240 \pm 100$  nm was prepared as described previously (Okamura *et al.*, 2007). A solution of MALPEG-NHS in DMSO (10 mM, 7.4 mL) was added to the polyAlb suspension (15 mg mL<sup>-1</sup>, 250 mL), and the suspension was stirred for 20 min at r.t.. A solution of mPEG-NHS in DMSO (25 mM, 8.9 mL) was added to the suspension, and the suspensions were stirred for 20 min at r.t.. The un-reacted reagents and the by-products were separated by repeated centrifugation (30,000g, 20 min, 4 °C, twice) and washing with phosphate-buffered saline (PBS), and MALPEG- and mPEG-modified polyAlb ((MALPEG)(mPEG)polyAlb) were collected. A suspension of (MALPEG)(mPEG)polyAlb (21 mg mL<sup>-1</sup>, 70 mL) was mixed with a solution of H12 (100 mM, 292  $\mu$ L) and allowed to react at r.t. for 12 hrs. A small molar



excess of cysteine over MALPEG was added to the suspension, and the un-reacted reagents were removed by repeated centrifugation (30,000g, 10 min, 4 °C) and washing with PBS to obtain the purified H12-conjugated (MALPEG)(mPEG)polyAlb (H12-PEG-polyAlb, 30 mg mL<sup>-1</sup>, 15 mL).

The concentrations of MALPEG, mPEG, and H12 conjugated to the surface of polyAlb particles were determined by quantifying each un-reacted reagent using high pressure liquid chromatography (HPLC) on a TSK-GEL G3000PW<sub>XL</sub> column (7.8 mm o.d. x 300 mm h using a mobile phase of 36% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid at 1 mL/min). The un-reacted reagents were detected using a reflective index detector (RI).

***Preparation of busulphan-induced thrombocytopenic rabbits*** All animal studies were approved by the Animal Subject Committee of Keio University, School of Medicine and were performed according to NIH guidelines for the care and use of laboratory animals (NIH publication 85-23 Rev. 1985). Experiments were carried out using male New Zealand white rabbits (ca. 2.5 kg, 11 weeks-old, Sankyo Lab, Tokyo). The rabbits were anesthetized by intramuscular injection of a 'cocktail' of Ketamine (1.5 mL) and Seractal 2% (0.5 mL). A busulphan solution was prepared at a concentration of 10 mg mL<sup>-1</sup> in poly(ethylene glycol) (average molecular weight, 400 Da). After shaving the hair around the injection sites, the rabbits received a subcutaneous injection of busulphan at a dosage of 15, 20, or 25 mg kg<sup>-1</sup> on Day 0 and Day 3, to produce a total dosage of 30, 40, or 50 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. Blood

samples for cell counting were withdrawn from anesthetized rabbits by inserting a 23-gauge needle into an ear vein, and the cell counts were determined with an automated hematology analyzer (K-4500, Sysmex, Kobe, Japan). To maintain adequate anesthesia, intramuscular injection of Ketamine was repeated as the need arose.

**Platelet transfusion** Blood withdrawn from donor rabbits, which were anesthetized and then exsanguinated by cardiac puncture, was mixed with a 10% volume of an acid-citrate-dextrose (ACD) solution composed of 2.2% (w/v) sodium citrate, 0.8% (w/v) citric acid, and 2.2% (w/v) glucose. Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation (100g, 15 min, 22 °C), and the resulting PRP was mixed with a 15% volume of ACD solution. The PRP was centrifuged (2200g, 7 min, 22 °C), and the platelet pellet was obtained by removing the supernatant. The pellet was resuspended in platelet-poor plasma (PPP) prepared by centrifugation (2200g, 10 min, 22 °C), and the platelet count was adjusted from  $1.0 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$  to  $1.0 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$  using an automated hematology analyzer (K-4500). The anesthetized rabbits with severe thrombocytopenia were cannulated on Day 15 with a 23-gauge scalp vein infusion set, and the various PRPs with defined platelet counts were transfused into the ear vein by an infusion pump at a rate of  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  and at a dose of  $4 \text{ mL kg}^{-1}$ . Platelet recovery at 30 min was calculated as described previously (Michelson *et al.*, 1996), using an estimated blood volume of  $58 \text{ mL kg}^{-1}$  (Reimers *et al.*, 1973).

We also confirmed that the transfused platelets had a normal half-life period and

survival time (The Panel on Diagnostic Application of Radioisotopes in Hematology, International Committee for Standardization in Hematology, 1977) in the blood circulation as follows: the PRP was mixed with 15% (v/v) of ACD and centrifuged (2200g, 10 min, 22 °C). The plasma supernatants were replaced with a Ringer's-citrate-dextrose solution (RCD solution, composition: 0.76% (w/v) citric acid, 0.090% (w/v) glucose, 0.043% (w/v) MgCl<sub>2</sub>, 0.038% (w/v) KCl, 0.60% (w/v) NaCl, pH 6.5). After resuspension, this mixture was added drop by drop to a 10 mM solution of NHS-Biotin in DMSO (to a final concentration of 10 μM), and was incubated at 37 °C for 30 min. The suspension washed with the RCD solution by centrifugation (2200g, 7 min, 22 °C), and the biotin-labeled PRP was resuspended to 500 x 10<sup>3</sup> μL<sup>-1</sup> in PPP prepared by centrifugation (2200g, 10 min, 22 °C). Using a similar method as before, the resulting PRP was transfused into the ear vein using a 23-gauge scalp vein infusion set, and 200 μL blood was collected from the ear vein at time intervals using a 23-gauge needle. This was then mixed with ACD (final concentration 10% (v/v)), followed by centrifugation (100g, 10 min, 22 °C). To 50 μL platelet suspension was added 10 μL PE-streptavidin (1:20 dilution of 0.5 mg mL<sup>-1</sup> solution in PBS) followed by incubation for 30 min at r.t. before fixing with paraformaldehyde (final concentration 1.0% (w/v)). The platelets were gated to their characteristic forward versus side scatter, and 1.0 x 10<sup>4</sup> platelets were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Nihon Becton Dickinson, Tokyo). The transfused platelets were quantified as a fraction of the PE-positive platelets and the number of labeled platelets was calculated as the percentage of the circulating labeled platelets. Each

experiment was performed at least three times. The platelet survival time was calculated using the 30 min recovery as 100%, as recommended by the Panel on Diagnostic Application of Radioisotopes in Hematology, International Committee for Standardization in Hematology, 1977.

**Measurement of the ear bleeding time** The anesthetized thrombocytopenic rabbits were cannulated on Day 15 with a 23-gauge scalp vein infusion set, and the sample suspension (10, 20, 30 mg mL<sup>-1</sup> equivalent of rHSA) was infused into the ear vein using an infusion pump at a rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>. The samples were the H12-PEG-polyAlb and the PEG-polyAlb at a dose of 4 mL kg<sup>-1</sup>, and saline was used to obtain the control value. Thirty minutes after administration, a 6 mm length standardized incision (No. 11 scalpel blade, San Jose, CA) was made at a site where no vessel was visible. The ear was immersed in a saline bath, and the time until the bleeding stopped was measured. In the case of bleeding over 30 min, we registered the bleeding time as 30 min. In addition, cell counts were determined using an automated hematology analyzer (K-4500) before (-5 min) and after (60 min) injection of samples.

**Measurement of blood coagulation parameters** Blood withdrawn from thrombocytopenic rabbits after injection of the H12-PEG-polyAlb, the PEG-polyAlb or saline was mixed with a 10% volume of 3.8% (w/v) sodium citrate, and the plasma was collected by centrifugation