

200808008A

厚生労働科学研究費補助金
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

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法部 教授

平成21(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金
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

(H18—医薬—一般—026)

平成20年度
総括・分担研究報告書

平成21年3月

..... 研究組織

(研究代表者)

半田誠 慶應義塾大学医学部 教授

(研究分担者)

池田康夫 慶應義塾大学医学部 教授
武岡真司 早稲田大学理工学術院 教授
梶村真弓 慶應義塾大学医学部 講師
後藤信哉 東海大学医学部 教授
村田満 慶應義塾大学医学部 教授
鈴木英紀 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 研究員
鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

目 次

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

平成 20 年度研究報告

I. 総括研究報告書

半田 誠	-----	1
------	-------	---

II. 分担研究報告

1. 放射性同位元素標識 H12-(ADP)小胞体の調製とその血中動態、臓器分布

池田 康夫	-----	15
-------	-------	----

2. H12-(ADP)小胞体の膜物性と ADP 放出特性の相関

武岡 真司	-----	23
-------	-------	----

3. 人工血小板投与による臓器代謝変動の評価

梶村 真弓	-----	33
-------	-------	----

4. H12 結合リポソームによる止血増強効果と ADP

後藤 信哉	-----	42
-------	-------	----

5. H12-(ADP)小胞体の安全性評価 (血液凝固系、生化学検査)

村田 満	-----	47
------	-------	----

6. <H12 結合微粒子の止血メカニズム> 形態的観察 - 膜流動性または被覆層数の異なるリポソームの形態とそれらの血小板凝集に対する検討 -

鈴木 英紀	-----	55
-------	-------	----

7. α IIb β 3 インテグリン活性化機構の解明に関する研究 - α IIb β 3 インテグリンと H12 担持人工粒子の結合解析-

鎌田 徹治	-----	60
-------	-------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

V. その他

I. 総括研究報告

平成 20 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)
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
総括研究報告書

主任研究者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

研究要旨

【研究目的】人工血小板/血小板代替物のプロトタイプである H12(ADP)小胞体(フィブリノーゲンの γ 鎖 C 末端アミノ酸配列(HHLGGAKQAGDV: H12)をその表面に担持させ、アデノシン 5' -二リン酸(ADP)を内包させたリポソーム)の機能と安全性について、前(平成 18、19)年度に引き続き、*in vivo* 実験系を中心に検討を加え、人工微粒子の体内動態や物性などを解析した。

【研究方法】 ^{14}C (ADP) と ^3H (cholesterol) で 2 重標識した H12(ADP)小胞体を調製し、ラットでの体内動態を検討した。膜の物性(流動性と被覆層数)を変化させた小胞体を調整し、その機能を *in vitro* (形態的観察を含む)、*in vivo* で解析した。小胞体投与の影響について、酸化ストレスの鋭敏な指標の heme oxygenase-1 を用いて網内系(肝臓/脾臓)への負荷を解析した(ラット)。また、凝固/血液生化学検査への影響について血小板減少モデル動物(ラット/ウサギ)で検討した。*in vitro* 流動系を用いて動脈血栓形成への影響を、また小胞体とその標的となる $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の結合動態(発現細胞を用い)を、解析した。

【研究結果】小胞体(至適投与量、40mg/kg)の血中濃度は経時的に減少したが、ADP の内包化は H12 の有無にかかわらず安定的に保持され、脾臓/肝臓に集積され、ADP は尿へ、小胞体は糞へ排泄され、網内系の飽和はみられなかった。同様の投与量では、網内系への酸化ストレスも一過性で、臨床検査値への影響も観察されなかった。小胞体の機能(ADP 放出能)は膜流動性と被覆層数に影響され、最適な物性を有することが確認された。また、小胞体は動脈血栓形成を増強しないこと、活性化 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (活性化血小板)に特異的に結合することが確認された。

【考察・結論】本研究により絞り込まれた H12(ADP)小胞体が、その機能と安全性について、人工血小板の候補微粒子としての要件を十分満たす性能を有することが確認された。多方面からの安全性評価とともに微粒子の止血機能の最適化を行い、人工血小板の実用化を目指してゆく。

(分担研究者)

池田康夫	慶應義塾大学医学部	教授
武岡真司	早稲田大学理工学部	教授
梶村真弓	慶應義塾大学医学部	講師
後藤信哉	東海大学医学部	教授
村田満	慶應義塾大学医学部	教授
鈴木英紀	(財) 東京都医学研究機構	東京都臨床医学総合研究所 研究員
鎌田徹治	慶應義塾大学医学部	講師

A. 研究目的

本研究（3カ年）の最終目的は、血小板の機能を代替し、血小板減少時の止血治療や予防に十分な効果を発揮し得る人工産物（人工血小板／血小板代替物）のプロトタイプとして絞り込まれた人工微粒子（H12担持アルブミン重合体とリポソーム）の有用性（止血機能、適応法）と安全性を *in vivo* 評価することで、近い将来の創薬化への基礎データを提示することにある。

本年度（最終年度）は、前2年度（平成18、19年度）の成果から、最も有望な将来の人工産物として絞り込まれた H12 担持リポソーム（以下 H12(ADP)小胞体）について、その止血効果、適応法、安全性についてさらに解析した。具体的には、動物モデルを用いた *in vivo* 評価を中心に、この人工微粒子の体内動態や物性、網内系や臨床検査値への影響などを検討した。

周知の如く、急速な高齢化社会への移行を背景として、悪性腫瘍などの適応患者の増加や医療の高度化に伴い、そして現在表面化している献血人口の急速な減少により、我が国における血小板製剤の使用量将来予測では、払底化への危惧が強く指摘されている。また、我が国では血小板製剤の医療機関への供給は予約制をひいており、短い保存期間（4日間）と厳密な保存条件を必要とし、緊急時の供給体制が全く整っていない。さらに、ウイルス感染症などの輸血副作用発現の危険性を排除できず、その危険性を有する同種血輸血を可及的に回避し得る人工血小板の開発ならびに臨床応用は、21世紀の医療において当然目指すべき方向である。常時使用可能な人工血液の開発促進は平成15年度に施行された血液法（安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律）にも明記され、血液事業の効率化のみならず、緊急災害時の備えの観点からも血液行政の最重点課題の一つとされている。

一方、世界に目を向けると、人工血小板／血小板代替物の研究は、軍事的な使用目的からすでに1970年代から米国で始まった。しかしながら、検討対象は期限切れの血小板を使用した産物（固定血小板、冷凍血小板など）が主体で、1995年には凍結乾燥させた血小板膜断片（infusible platelet membrane: Cypflex™）が初期臨床試験（フェーズ2）の段階まで検討されたが、何らかの理由で開発は中止された。人工血小板としてはアルブミンのマイクロカプセル微粒子にヒトフィブリノーゲンを結合させた産物（Synthocyte™）が1999年に報告されたが、同様に臨床試験（フェーズ1）が中止された（Blajchman MA: Substitutes and alternatives to platelet transfusions in

thrombocytopenic patients. J Thromb Haemost 1:1637-41, 2003)。現在、欧米において開発されている人工血小板/血小板代替物は、アルブミン微粒子（マイクロスフェア）にフィブリノーゲンと強力な親和性を有する合成ペプチドをその表面に結合させた人工産物（Haemoplax™）のみ（前臨床の段階）であり、世界的にみても人工血小板の実用化への期待は高いといえる。

実際、我々は平成9年度より厚生科学研究費補助金（当時）の支援を受け、血小板の止血機能を代替した人工産物の創製に向けた基礎研究を開始し、すべてが人工物で構成されたハイブリッド型人工微粒子を着想して、開発するに至った。すなわち、出血部位においてのみ粘着・凝集などの血小板が有する止血機能が発揮される人工代替物（人工血小板）の創製である。微粒子としては生体適合性に優れ、形状変化や表面修飾が可能なりコンビナントのヒトアルブミンを変性させて作成したアルブミン重合体（polyAlb）と脂質小胞体（リポソーム）を、その表面に結合させて止血部位への特異性を規定する認識分子として接着分子受容体（GPIb α 、GPIa/IIa）とそのリガンド分子（リコンビナント蛋白や人工ペプチド：フィブリノーゲン）を選択した。

平成12年度～17年度厚生労働科学研究補助金（医薬安全総合研究事業、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）の支援を受けた研究により、血管障害部位において生体内に残存する血小板をリクルートしてヒト血小板と凝集塊を形成し、これを促進させ得る機能（止血機能）を有する人工微粒子（フィブリノーゲンの γ 鎖C末端アミノ酸配列に相当する合成ペプチド（HHLGGAKQAGDV：H12）を担持させたH12結合微粒子）が人工血小板のプロトタイプとして最も有望であることが示された。

平成18年度（医薬安全総合研究事業、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）から始まった本研究（平成19年度より、創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業へ移行）では、いくつかの候補微粒子の中から人工血小板のプロトタイプとして絞り込まれた2種類のH12結合微粒子（H12結合アルブミン重合体：H12-polyAlbと生理的な血小板刺激物質のADPを内包させたH12結合リポソーム：H12(ADP)小胞体）の止血機能と安全性をin vivo評価した。そして、前2カ年の研究成果から、人工血小板の最終候補をH12(ADP)小胞体に絞り込み、その有用性と安全性をについてさらなる検討を加えた。

B. 研究方法

1. **放射性同位元素標識 H12 (ADP) 小胞体による体内動態の解析 (池田)**: 放射性同位元素 (RI, $[8-^{14}\text{C}]$ ADP, $[1, 2-^3\text{H}]$ cholesterol) を用いて、内水相の ADP と小胞体膜構成成分の cholesterol の一部を 2 重標識した H12 (ADP) 小胞体 (粒径 250 ± 80 nm) を、従前の方法を用い、無菌的 (エンドトキシンフリー) に製造した。血中濃度パラメータや臓器分布は、RI 標識 H12-(ADP) 小胞体をラットの尾静脈に投与し、経時的に採血した検体の RI 活性を液体シンチレーションカウンターで測定して求めた。臓器分布は、投与 24 時間まで、経時的に犠牲死させたラットの臓器や糞尿を用いて、検討した。

2. **H12 (ADP) 小胞体膜の物性-効力連関の解析 (武岡、鈴木)**: 膜の主成分であるリン脂質 (PC) にそれぞれ DMPC、DPPC (従来より用いているもの)、DSPC (膜流動性 $\text{DMPC} > \text{DPPC} > \text{DSPC}$ の順に低下する) を使用して、膜流動性の異なる 3 種類の小胞体を調整した。また、小胞体の被覆層数 (lamellarity) の制御は、造粒時の温度条件 (4°C 、室温、 60°C) を変えることで達成した。小胞体の効力 (ADP 放出能、ADP 惹起血小板凝集増強作用、*in vivo* 止血能) は、ヒトの血液を使用した血小板集計と抗がん剤惹起血小板減少ラットの尾切法による出血時間で解析した。また、小胞体の血小板凝集への取り込みや結合の様式を、ネガティブ染色法または凍結超薄切片法により電子顕微鏡下で観察した。

3. **H12 (ADP) 小胞体による網内系負荷の解析 (梶村)**: ラットをジエチルエーテルで麻酔後、小胞体 ($40\text{mg}/\text{kg}$) を尾静脈に投与して、経時的に肝臓や脾臓を採取し、組織の heme oxygenase-1 (HO-1) の発現 (酸化ストレスの鋭敏な指標) を、ウエスタンブロット法や免疫組織化学法で解析した。また、採取した肝臓や脾臓を用いて、組織の代謝変動をメタボローム・質量分析 (capillary electrophoresis mass spectrometer にて) にて解析した。

4. **その他の *in vitro*/*ex vivo* 実験系**: ①フローチェンバーを用いた流動条件下血小板血栓形成 (後藤)、②血小板減少動物 (ラット、ウサギ) を用いた血小板数や血液凝固検査、血液生化学検査の測定 (村田)、③CHO 細胞発現系を用い、H12 の結合標的となる血小板 GPIIb/IIIa 複合体 (α IIb β 3 インテグリン) と小胞体の結合動態の構造分子学的な解析、を行った (鎌田)。

C. 研究結果及び考察

1. H12(ADP)小胞体の体内動態 (池田)

1) H12(ADP)小胞体の体内動態はH12の有無に影響されず、ADPの内包化も安定的に保持されていた：H12-(ADP)小胞体を40 mg/kgの至適用量で投与したところ、 ^3H (小胞体膜)、 ^{14}C (内包化ADP)共に投与6時間(血中残存率はおおよそ20%)までは、ほぼ同等の血中動態挙動を示し、その後徐々に両者の乖離が見られた(池田 H20 分担報告書、図2、3)。このことは、少なくとも止血効果を及ぼす血中濃度の範囲内(投与後6時間まで)では、ADPの内包化が流血中で安定的に保持されていることを示唆するものであった。さらに、H12-(ADP)小胞体と比較して、(ADP)小胞体でもほぼ同等の動態パラメータの推移を示し、H12の有無は小胞体の動態に影響しないことが明らかとなった。

2) H12(ADP)小胞体は脾臓(主)や肝臓で異化され、ADPは尿へ、小胞体(cholesterol)は糞へ排泄された：投与後24時間までの経時的解析で、RI標識小胞体の集積臓器は脾臓(主)と肝臓で、小胞体(膜cholesterol)は脾臓から肝臓を経て糞へ、ADPは脾臓を経て尿へ排泄された(図4、5)。

以上のことから、健常小動物(ラット)においては、静脈投与されたH12(ADP)小胞体は、通常の脂質小胞体(リポソーム)と同様、脾臓を主体とした網内系で処理され、H12による表面修飾やADP内包化は、その異化動態になら影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、少なくとも至適投与量(40 mg/kg、単回投与)のレベルでは網内系の飽和は起こらないことが示唆され、小胞体の有効性や安全性に資する基礎データが得られた。今後は、体内動態に及ぼす過剰あるいは持続投与の影響を解析する必要がある。

2. H12(ADP)小胞体膜の物性と機能 (武岡、鈴木)

H12(ADP)小胞体膜の物性と機能の連関を、膜流動性(DMPC、DPPC、DSPC含有微粒子：膜流動性はDMPC>DPPC>DSPCの順に低下、膜被覆層数はおおよそ1、DPPC含有微粒子が現行のH12(ADP)小胞体)と膜被覆層数(DMPC、DPPC含有微粒子で膜被覆層数はおおよそ2)の観点から解析した。膜流動性や膜被覆層数が異なっても、H12(ADP)小胞体の活性化血小板との結合動態に変りはなかった(武岡 H20 分担報告書、図2)。一方、ADPによる血小板凝集増強作用は、流動性の最も低いDSPC含有微粒子では認められず、膜被覆層数が多い微粒子では通常の微粒子と比較して弱かった(図3)。上記知見は電子顕微鏡下での形態的観察でも支持

された（鈴木 H20 分担報告書、図 6、7）。RI 標識 ADP 含有微粒子を用い、血小板凝集に伴う ADP の放出率を測定したところ、膜流動性や膜被覆層数に依存して内包化 ADP の膜からの放出が大きく影響を受けることがわかった（すなわち、膜が固く、あるいは厚くなると ADP の放出が起こりにくくなる）（表 3）。さらに、膜流動性に影響する温度（4°C、37°C、60°C）での保存条件下、内包 ADP の安定性を検討したところ、膜流動性を高めた状態では振とうによる機械的刺激で内包 ADP の安定性は保持できなくなることがわかった（図 5）。ADP 未内包 H12 小胞体に比較して、H12(ADP)小胞体による血小板減少ラットの出血時間短縮作用は、DMPC ならびに DSPC 含有微粒子で認められなかった（図 6）。DMPC 含有微粒子は膜流動性が高く、流血中で非特異的に内包 ADP を漏出してしまうため、その止血効果が発揮できなかった可能性が考えられた。一方、膜流動性が低い DSPC 含有微粒子は止血部位で内包 ADP を放出できないため、止血増強機能が発揮できなかったと考えられる。DPPC 含有した現行の H12(ADP)小胞体が、膜流動性と膜被覆層数の膜物性の観点から、効力最適化がなされていることが、改めて証明された。

3. H12(ADP)小胞体による網内系負荷（梶村）

H12(ADP)小胞体投与による、酸化ストレスマーカーHO-1 の、ラット網内系臓器（肝臓と脾臓）での発現を経時的に 24 時間まで解析したところ、肝臓に比較して、脾臓では 6 時間をピークとして明らかな発現増強が認められた（梶村 H20 分担報告書、図 1、2）。この作用は、小胞体自体に起因しており、H12 や ADP の有無で変化がなかった（図 3、4、5）。H12(ADP)小胞体の至適用量（40mg/kg）の投与刺激で、6 時間後、肝臓における低分子代謝産物（解糖系、ペントースリン酸系、クエン酸回路系）の増加が認められた。以上から、RI 標識小胞体の体内動態に一致した網内系への一過性の負荷が、分子レベルでも示唆されたことになり、少なくとも至適用量での当該小胞体の安全性を示すものと考えられた。

4. H12(ADP)小胞体の *in vitro* 流動条件下での血小板血栓形成への影響について（後藤）

固相化したコラーゲン表面に $1,500 \text{ s}^{-1}$ の高ずり血流条件にて蛍光標識した血小板を含むヒト血液を灌流して、血小板血栓形成をリアルタイムで画像解析した。H12(ADP)小胞体は、陰性対照の(ADP)小胞体に比較して、血小板血栓の二次元方向への形成を増強させたが、三次元方向への増強作用は示さなかった（後藤 H20 分担研究報告書、図 1）。このことは、H12(ADP)小胞体が、低ずり血流条

件下で止血機能を発揮するが、動脈系（高ずり応力条件）での血小板血栓（病的血栓）の促進作用は有していないこと指示する知見と考えられる。

5. H12(ADP)小胞体の血液化学検査への影響（村田）

H12-(ADP)小胞体を血小板減少症ラット、ウサギに投与（40 mg/kg）しても、TC値のわずかな上昇以外は、血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値（ALB、TC、TG、HDL、LDL、ALT、Crの7項目）に異常は見られなかった（村田 H20 分担研究報告書、図1、2、表3、4、5）。

6. H12(ADP)小胞体と α IIb β 3インテグリンの結合動態の解析（鎌田）

α IIb β 3 インテグリンは、血小板の活性化で惹起された屈曲型（bent conformer）から伸展型（extended conformer）への変換に伴いフィブリノーゲン（H12ドメインを介して）の低親和性受容体から高親和性受容体に転換することが知られている（鎌田 H20 分担研究報告書、図3）。そして、フィブリノーゲンは活性化した α IIb β 3 インテグリンに結合することで血小板同士を架橋して、血小板凝集をもたらす（普段の流血中ではフィブリノーゲンと血小板は結合しない）。一方、H12などの低分子ペプチドは、活性化していない α IIb β 3 インテグリン（流血注の血小板）に結合して、受容体の立体構造を変化させ（ligand-induced binding sites: LIBS）、活性化に導く。従って、H12(ADP)小胞体の α IIb β 3 インテグリンとの分子レベルでの結合動態は、安全性の観点から重要なポイントであった。実際、CHO細胞発現系を用いた結合実験の結果、H12小胞体の結合親和性は α IIb β 3 インテグリンの活性化構造変化（bent conformer から extended conformer へ）に依存して著しく増加し（図4、5）、LIBSへの構造変化も誘導しなかった（図6）。以上から、H12(ADP)小胞体は流血中のフィブリノーゲンと全く同様に、活性化血小板に特異的に結合して、血小板凝集を増強することが作用を発揮することが示唆された。

D. 結論

本研究により絞り込まれた H12(ADP)小胞体が、その機能と安全性について、人工血小板の候補微粒子としての次の要件を十分満たす性能を有することが確認された。すなわち、1) 血小板を代替する止血機能を有する、2) 流血中で血栓を誘発しない、3) 止血部位でのみ作用する、4) 十分な血中濃度を保ち、血液適合性を維持できる、ことなどである。多方面からの安全性評価とともに微粒子の止血機能の最適化を行い、人工血小板の実用化を目指してゆく。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

(原著)

(1) Okamura, Y., Takeoka, S., Eto, K., Maekawa, I., Fujie, T., Maruyama, H., Ikeda, Y., and Handa, M. Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate- encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 470-477 (2009).

(2) Okamura, Y., Goto, T., Niwa, D., Fukui, Y., Otsuka, M., Motohashi, N., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of free-standing albumin-nanosheets having hetero-surface. *J. Biomed. Mater. Res. A* **89A**, 233-241 (2009).

(3) Shintani T., Iwabuchi T., Soga T., Kato Y., Yamamoto T., Takano N., Hishiki T., Ueno Y., Ikeda S., Sakuragawa T., Ishikawa K., Goda N., Kitagawa Y., Kajimura M., Matsumoto K., and Suematsu M. Cystathionine b-synthase as a CO-sensitive regulator of bile excretion, *Hepatology*, **49**, 141-150, 2009.

(4) Tamura N, Kitajima I, Kawamura Y, Goto S. Important regulatory role of activated platelet-derived procoagulant activity in the propagation of thrombi formed under arterial blood flow conditions. *Circ J* 2009;**73**:540-8.

(5) Okamura, Y., Fujie, T., Nogawa, M., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits. *Transf. Med.* **18**, 158-166 (2008).

(6) Okamura, Y., Utsunomiya, S., Suzuki, H., Niwa, D., Osaka, T., and Takeoka, S. Fabrication of freestanding nanoparticle-fused sheets and their hetero-modification using sacrificial film. *Colloids and Surf A: Physicochemical and Engineering Aspects* **318**, 184-190 (2008).

(7) Morikawa T., Kajimura M., Ichikawa M., and Suematsu M. Three-dimensional imaging of growing thrombus *in vivo*. *Microvascular Reviews and Communications*, **2**, 8-12, 2008

- (8) Atsushi Matsumoto, Tetsuji Kamata, Junichi Takagi, Kenji Iwasaki, Kei Yura: Key interactions in integrin ectodomain responsible for global conformational change detected by elastic network normal-mode analysis. *Biophys J.* ; 95(6):2895-908, 2008.
- (9) Morikawa T., Hattori K., Kajimura M., and Suematsu M. The effects of cilostazol on tissue oxygenation upon an ischemic-reperfusion injury in the mouse cerebrum, *Advances in Experimental Medicine and Biology* (in press)
- (10) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Specific accumulation of iopamidol-encapsulated phospholipid vesicles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide to vascular injury using computed tomography. *Nanomedicine* (2009) submitted.
- (11) Okamura, Y., Fukui, Y., Suzuki, H., Kabata, K., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Disk-shaped biodegradable nanosheets carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide and their enhanced effects of platelet aggregation as a novel platelet substitute. *Bioconjugate Chem.* (2009) to be submitted.
- (12) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Controlled Release of adenosine diphosphate encapsulated liposomes carrying fibrinogen γ -chain peptide in platelet aggregation-dependent manner. *J. Controlled Release* (2009) to be submitted.
- (13) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Biodistribution of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes. *Nanomedicine* (2009) to be submitted.

(総説)

- (1) 半田 誠, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 「特集: 血小板をつくろう -血小板代替物-」 *日本血栓止血学会誌* **19** (6), 774-778 (2008).
- (2) 岡村 陽介, 武岡 真司, 半田 誠, 池田 康夫, 「人工血小板の開発」 *Medical Science Digest* **34** (4), 138-140 (2008).

2. 学会発表

- (1) Handa M., Okamura Y, Takeoka S., Ikeda, Y.: Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide on the surface and adenosine 5'-diphosphate inside as a platelet substitute. 6th Current Issues on Blood Substitute Research, Tokyo,

October, 2008.11.).

(2) Handa, M., Okamura, Y., Takeoka, S., and Ikeda, Y. Fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-incorporated liposomes as a synthetic platelet substitute. American Association of Blood Banks annual meeting & Txpo. at Montreal, Canada (2008.10.).

(3) Okamura, Y., Eto, K., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Development of liposome- based platelet substitutes having an excellent hemostatic ability amplified by releasing adenosine 5'-diphosphate in the platelet aggregates. 11th Liposome Research Days Conference at Yokohama, Japan (2008.7.).

(4) Okamura, Y., Takeoka, S., Maekawa, I., Eto, K., Ikeda, Y., and Handa, M. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide on the surface and adenosine 5'-diphosphate inside as a platelet substitute. The 13th Meeting on Thrombosis and Rheology at Tokyo, Japan (2008.3.).

(5) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「ドデカペプチド結合リポソームの血管損傷部位に対する特異的集積性評価」 第31回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11., 大阪).

(6) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠. 「止血能を増幅する人工血小板: 血小板凝集をトリガーとしてADPを放出するリポソームの止血能評価」 第31回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11., 大阪).

(7) 岡村 陽介, 江藤 薫子, 池田 康夫, 半田 誠, 武岡 真司. 「血小板凝集をトリガーとしてADPを放出するリポソームの血小板代替物としての止血能評価」 第14回日本血液代替物学会 (2008.10., 東京).

(8) 武岡 真司, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣. 「表裏面の機能が異なるナノシートの構築」 第57回高分子討論会 (2008.9., 大阪).

(9) 福井 慶仁, 岡村 陽介, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ポリ乳酸ナノシートによる活性血小板の認識能評価」 第57回高分子学会年次大会 (2008.5., 横浜).

(10) 江藤 薫子, 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司. 「ドデカペプチド結合ADP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57回高分子学会年次大会 (2008.5., 横浜).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告

平成 20 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

放射性同位元素標識 H12-(ADP)小胞体の調製と
その血中動態、臓器分布

分担研究者 池田 康夫 (慶応義塾大学 医学部 血液内科, 教授)
研究協力者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
岡村 陽介 (早稲田大学 理工学術院 理工学研究所, ヒューマンサ
イエンス振興財団研究員)
江藤 薫子 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
丸山 仁美 (慶応義塾大学 医学部 血液内科, 研究員)

研究要旨

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させたリン脂質小胞体は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集形成を促進させながら内包物質(モデルとして水溶性蛍光物質(カルボキシフルオロセイン)を利用)を放出し、特に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させれば(H12-(ADP)小胞体)、その止血能は顕著に向上することを *in vivo* にて実証してきた。

平成 20 年度は、放射性同位元素(RI, [$8\text{-}^{14}\text{C}$]ADP, [$1,2\text{-}^3\text{H}$]cholesterol)を用いて、内水相の ADP と小胞体膜構成成分の cholesterol の一部を 2 重標識した H12-(ADP)小胞体を調製し、H12-(ADP)小胞体の体内動態(血中濃度推移、臓器分布)を明らかにすることを目的とした。H12-(ADP)小胞体は、投与 6 時間までは内水相の ADP とほぼ同様の 2 相性の血中濃度推移を示し、その後徐々に両者の乖離が見られた($T_{\alpha 1/2}$: ^3H : 1.8 hr, ^{14}C : 2.2 hr, $T_{\beta 1/2}$: ^3H : 30.1 hr, ^{14}C : 12.4 hr)。H12 の有無に関わらず血中濃度推移は同等であった。投与 H12-(ADP)小胞体は主に脾臓に集積していた。最高血中濃度(C_{\max})と血中濃度-時間曲線下面積($AUC_{24\text{hr}}$)は投与量に比例し、消失速度(CL)は投与量によらずほぼ一定であることから、止血効果を発現する投与量(40 mg/kg)で H12-(ADP)小胞体を投与しても、脾臓、肝臓を中心とする細網内皮系は飽和に達していないと判断した。さらに、H12-(ADP)小胞体の ADP 成分は尿、コレステロール成分は肝臓を介して糞として排泄された。

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(H12)を結合させたリン脂質小胞体は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集形成

を促進させながら内包物質(モデルとして水溶性蛍光物質(カルボキシフルオロセイン)を利用)を放出し、特に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包さ

せれば(H12-(ADP)小胞体)、その止血能は顕著に向上することを *in vivo* にて証明してきた^{1),2)}。

平成 20 年度は、放射性同位元素(RI, [8-¹⁴C]ADP, [1,2-³H]cholesterol, Fig. 1)を用いて、内水相の ADP と小胞体膜構成成分の cholesterol の一部を 2 重標識した H12-(ADP) 小胞体を調製し、H12-(ADP)小胞体の体内動態(血中濃度推移、臓器分布)を明らかにすることを目的とした。

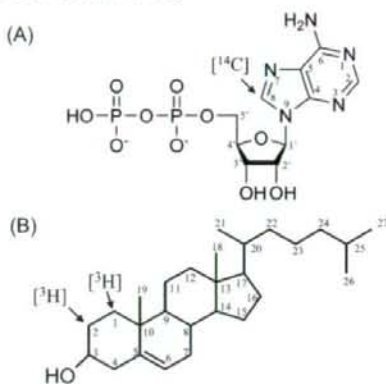


Fig. 1 Structure of [8-¹⁴C]ADP (A) and [1,2-³H]cholesterol (B).

- 1) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).
- 2) 平成 18, 19 年度 政策創薬総合研究事業 研究報告書

B. 研究方法

1. H12 結合 PEG 脂質 (H12-PEG-Glu2C18) の合成

1.1. Glu2C18 の合成

グルタミン酸 (2.96 g, 20 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物 (4.56 g, 24 mmol) をベンゼン 150 mL に溶解させ、Dean-Stark 装置を用いて沸点還流させた (105°C, 1 hr)。この系にステアリルアルコール (11.9 mg, 44 mmol) を添加して沸点還流させた (105°C, 14 hr)。溶媒を減圧除去後、残分を

クロロホルム 150 mL に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 150 mL で 2 回、水 150 mL で 2 回分液洗浄した。クロロホルム層を回収し、硫酸ナトリウムにて脱水後、溶媒を減圧除去した。メタノール再結晶、濾過後、乾燥させて白色粉末 Glu2C18 (13.3 g, 収率 85%) を得た。

1.2. マレイミド基導入 PEG 結合 Glu2C18 (MALPEG-Glu2C18) の合成

クロロホルム 10 mL 中に Glu2C18 (575.5 mg, 880 μmol)、TEA (122.5 μL, 880 μmol) を添加後、MALPEG-NHS (Mw:3400, 1.5 g, 279 μmol) を溶解、攪拌した (r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製した後、ベンゼン中に溶解し凍結乾燥後、白色粉末 MALPEG-Glu2C18 (1448.1 mg, 収率 70%) を得た。

1.3. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18) の合成

MAL-PEG-Glu2C18 (1000 mg, 253.7 μmol) と C 末端にシステインを結合させた H12 (328 mg, 253.7 μmol) を DMF 10 mL に溶解、攪拌した (r.t., 72 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製後、メタノールにて抽出し、シリカゲルカラムにて精製した (展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水=65/25/4, v/v/v)。真空乾燥後、ベンゼンに溶解させて凍結乾燥し、淡黄色粉末 H12-PEG-Glu2C18 (427.6 mg, 収率 32%) を得た。

2. RI 標識 H12-(ADP)小胞体の調製法

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) (100 mg, 136 μmol)、cholesterol (52.7 mg, 136 μmol)、

1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) (19.0 mg, 13.6 μ mol)、PEG-DSPE (4.7 mg, 0.82 μ mol)、H12-PEG-Glu2C18 (4.3 mg, 0.82 μ mol)をベンゼンに溶解させ、凍結乾燥させた (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.03/0.03, モル比)。[8-¹⁴C]ADP (1.9 mM, 0.25 mL; 1.85 MBq)を含む ADP 水溶液 (1 mM, 2.25 mL)にて水和後(3 hr, r.t.)、エクストルージョン法にて粒径制御し、遠心分離にて精製した (100,000g, 30 min, 4°C)。次いで、[1,2-³H]cholesterol (20 μ M, 25 μ L; 1.85MBq in ethanol)を各小胞体分散液に添加・振とう後 (10min, r.t.)、ゲル濾過精製を経て(Sephadex G-25)、RI 標識 H12-(ADP)小胞体を得た。

3. 血中濃度推移測定

Wistar 系雄性ラット(三協ラボサービス, 8 週齢、250-300 g)に RI 標識 H12-(ADP)小胞体あるいは(ADP)小胞体を尾静脈投与した ([lipid] = 10, 20, 40 mg/kg)。投与開始 5, 10, 15, 30 min, 1, 3, 6, 9, 24 hr 後に採血し (50 μ L)、Solvable[®] (2 mL, PerkinElmer 社製)を加えて可溶化し、過酸化水素 (400 μ L)にて脱色した (r.t., 1 hr)。その後、Hionic Fluor[®] (15 mL, PerkinElmer 社製)を添加し液体シンチレーションカウンター (LSC)にて測定した。他方、ADP 水溶液 (1 mM, PBS(pH 7.4))と [8-¹⁴C]ADP 水溶液 (3.7 MBq/mL)の混合液を尾静脈投与し (4 mL/kg)、同様の測定を行った。

各薬物動態パラメータ(血中半減期 ($T_{0.5}$), $T_{0.5}$), 最高血中濃度 (C_{max}), 薬物消失速度 (CL), 血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{24hr}) は、WinNonlin professional version5.2.1[®] (Pharsight 社)を用いて解析し

た。

4. 臓器分布測定

3.で投与したラットを 24 時間後に犠牲死させた。脳、心臓、肺、胃、消化管、腎臓、膀胱を摘出し、ホモジナイズした。また、肝臓、脾臓、尿、糞は投与開始 3、6、9、24 時間後に経時的に採取しそれぞれ均一な状態にした。各臓器を 50-100 mg 秤量し、Solvable[®] (2 mL)を加えて可溶化し(60°C, 1 hr)、過酸化水素 (400 μ L)にて脱色した(r.t., 1 hr)。その後、Hionic Fluor[®] (15 mL)を添加し LSCにて測定した。他方、ADP 水溶液(1 mM, PBS(pH 7.4))と [8-¹⁴C]ADP 水溶液 (3.7 MBq/mL)の混合液を尾静脈投与し(4 mL/kg)、同様の測定を行った。

C. 研究結果及び考察

1. H12-(ADP)小胞体の血中濃度推移

Wister 雄性ラットに RI 標識 H12-(ADP)小胞体を 40 mg/kg にて投与後、経時的に採血し LSC 測定 (³H、¹⁴C の同時測定)したところ、³H、¹⁴C 共に投与 6 時間まではほぼ同等の 2 相性の血中動態挙動を示し、その後徐々に両者の乖離が見られた(Fig. 2 (a))。他方、(ADP)小胞体群でもほぼ同等の結果が得られ、H12-PEG-Glu2C18 の有無に関わらず同等の血中動態を示すことを確認した(Fig. 2 (b))。得られた血中濃度推移曲線から算出した ADP と cholesterol の血中動態パラメータ($T_{0.5}$, $T_{0.5}$, C_{max} , CL, AUC_{24hr})を以下に示す(Table 1)。

他方、ADP 水溶液投与では投与直後から速やかに血中から消失されたことから(Fig. 2 (c))、H12-(ADP)小胞体投与群の ¹⁴C の挙動は(投与 6 時間まで)、小胞体に内包

されている ADP を反映しており、ADP は小胞体に安定に内包された状態で血中を滞留していると判断された。

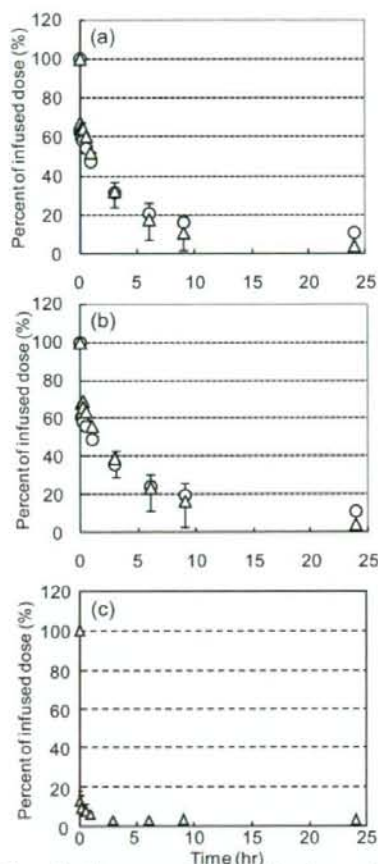


Fig. 2 Percent of infused dose of (a) H12-(ADP)vesicles, (b) (ADP)vesicles at a dose of 40 mg/kg and (c) ADP solution administered into rats (N = 5). ○: ^3H (Cholesterol), △: ^{14}C (ADP).

次いで、RI 標識 H12-(ADP)小胞体、あるいは(ADP)小胞体を 10, 20 mg/kg にて投与後、経時的に採血し LSC 測定 (^3H 、 ^{14}C の同時測定)したところ、**Fig. 2 (a), (b)**と同様の挙動が得られた。各投与量における ADP と cholesterol の血中動態パラメータ (C_{\max} 、CL、 $\text{AUC}_{24\text{hr}}$)を以下に示す(**Fig. 3 (a), (b)**)。 C_{\max} と $\text{AUC}_{24\text{hr}}$ は投与量に比例し、CL は投与量

によらずほぼ一定であることから、40 mg/kg の H12-(ADP)小胞体を投与しても、小胞体の集積臓器として知られる脾臓、肝臓を中心とする細網内皮系は飽和に達していないと判断された。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of H12-(ADP)vesicles and (ADP)vesicles at a dose of 40 mg/kg (N=5).

	H12-(ADP)vesicles	
	^3H	^{14}C
$T_{0.5}$ (hr)	1.8	2.2
$T_{\beta 0.5}$ (hr)	30.1	12.4
$\text{AUC}_{24\text{hr}}$ (hr x nM)	19.2	434.5
C_{\max} (nM)	13.4	710
CL (L/hr)	1.4×10^{-3}	3.1×10^{-3}

	(ADP)vesicles	
	^3H	^{14}C
$T_{0.5}$ (hr)	2.1	2.2
$T_{\beta 0.5}$ (hr)	30.3	12.4
$\text{AUC}_{24\text{hr}}$ (hr x nM)	15.1	380.8
C_{\max} (nM)	10.0	600
CL (L/hr)	1.3×10^{-3}	3.0×10^{-3}

