

定等の処理をせず、生のままで風乾して観察するが、これらの操作が特に柔らかいリポソームの DMPC に影響したと考えられた。一方、60°C で造粒した ADP 内包 H12-リポソームは、1.8 ± 0.3 枚膜になるが、電顕下でもその断面に 2 層の脂質層を形成していることが確認された。

ヒト PRP を使った ADP 凝集においては、DMPC と DPPC が二次凝集を強く促進したが、流動性の低い DSPC はコントロールと同じように二次凝集を促進させなかった。すなわち、DSPC は流動性が低い、換言すれば堅いため、血小板に接触しても内部の ADP を漏れ出さないことが考えられた。凍結超薄切片法による形態学的検討では、血小板相互の接触が DMPC または DPPC によるものに比較して弱く、凝集塊も大きくなかった。さらに血小板に接触または凝集塊中に存在している DSPC が少なかった。これらの所見は上記の推測のように、ADP が漏れ出てこないことを反映した結果と考えられた。

リポソームの被覆層数 1 枚またはほぼ 2 枚の ADP 内包 H12-リポソーム(DPPC)の ADP 凝集に対する効果も明らかになった。すなわち、被覆層数 2 枚のリポソームでは 1 枚のものと同様に、凝集はわずかではあるが低下していた。この結果は、被覆層数の多いリポソームは流動性の低いリポソームと同様に、ADP が漏れ出にくいことを示していると考えられた。しかし、リポソームの分布を検討した形態的観察では、それぞれの違いはほとんど識別出来なかった。その理由として、凝集能の違いがわずかであったことに起因していると思われる。

E. 結論

今回、膜流動性に異なる H12 結合リポソーム(膜流動性：DMPC>DPPC>DSPC)を調製し、さらにこれらに ADP を内包した。DPPC については被覆層数の異なるものを作製した。これらのリポソームをネガティブ染色法、凍結超薄切片法で観察するとともに、ADP 凝集に対する効果と凝集塊におけるこれらのリポソームの分布を検討した。その結果、流動性の大きい DMPC、DPPC リポソームは、ヒト PRP の ADP 凝集において促進的な効果を示した。これらは凝集塊

の血小板間に存在した。しかし、流動性の小さい DSPC は凝集促進効果を示さず、血小板間の分布はまばらであった。被覆層数 2 層の DPPC は単層のものに比較すると、ヒト PRP の ADP 凝集が低下したが、凝集塊の血小板間における分布は単層のものと同様であった。すなわち、ADP を内包した H12-リポソームは流動性が高く、被覆層数が低いものほど、内部の ADP が漏れ出し、これは凝集に促進的に作用すると考えられた。ただ、DMPC と DPPC リポソームの凝集能についてはほとんど差がなかったが、ネガティブ染色法で DMPC に変形が見られたことから、DMPC は変形し易く、また ADP が自然に漏れ出すことも考えられる。すなわち、人工血小板としての ADP を内包した H12 リポソームは DPPC によるものが有望と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

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20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

αIIbβ3 インテグリン活性化機構の解明に関する研究
—αIIbβ3 インテグリンと H12 担持人工粒子の結合解析—

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のみフィブリノーゲンと結合して血栓を形成する。これは血小板膜表面のαIIbβ3 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。これまでの研究から、αIIbβ3 インテグリンが *inside-out signaling* によって活性化し、リガンドであるフィブリノーゲンと結合するためには、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必要があることが明らかになった。

本年度の研究では、実際の H12 担持人工粒子と、αIIbβ3 の結合解析を行うために以下の実験を行った。1) H12 担持人工粒子とαIIbβ3 発現細胞との結合動態の測定を行い、2) H12 担持人工粒子と立体構造が一定の *conformer* に固定された変異αIIbβ3 発現細胞との結合を調べ、人工粒子結合に必要な構造条件の解析を行った。また H12 担持人工粒子の安全性の必要条件として、非活性化αIIbβ3 とは結合せず、αIIbβ3 の構造変化も誘導しないことが挙げられる。そこで、3) 抗 LIBS 抗体とαIIbβ3 発現細胞との結合を調べ、H12 担持人工粒子がαIIbβ3 の構造変化も誘導しうるか否かの検討を行った。その結果、H12 担持人工粒子はαIIbβ3 発現細胞と濃度依存性に、特異的に結合し、その結合解離定数は、非活性化状態のαIIbβ3 では $K_d=2.23\pm 1.40$ mg/ml であった。活性化抗体によって活性化したαIIbβ3 では $K_d=0.40\pm 0.07$ mg/ml と結合親和性が 5 倍以上に上昇した。この H12 担持人工粒子は、立体構造が *bent* に固定されたαIIbβ3 とは全く結合せず、*extended* に固定され、高度に活性化したαIIbβ3 と非常に強く結合した ($K_d=0.26\pm 0.04$ mg/ml)。この結合には、β-hybrid domain の *swing-out* が不可欠であった。一方、高濃度の H12 担持人工粒子は、フィブリノーゲンと同様に、抗 LIBS 抗体とαIIbβ3 発現細胞の結合を増加させなかった。

以上の結果から、H12 担持人工粒子はフィブリノーゲンと同じメカニズムでαIIbβ3 と結合し、活性化血小板と特異的に結合すると考えられる。また、H12 担持人工粒子は、フィブリノーゲンと同様に非活性化αIIbβ3 とほとんど結合せず、αIIbβ3 の構造変化を誘発することも無いため、安全性の高い血液代替製剤となりうるだろう。

A. 研究目的

血小板は、血管壁損傷時に露出した内皮下組織に接着し、さらにフィブリノーゲンを架橋分子として互いに結合することによって止血血栓を形成する。この過程では、1) 血小板膜タンパク質の GPIIb-IX-V と内皮下組織のコラーゲンに結合したフォン・ビルブランド因子 (vWF) の結合による血小板の血管壁への rolling/tethering、2) 血小板膜タンパク質の GPVI/FcR γ とコラーゲンの結合による血小板の活性化、3) 活性化した血小板膜タンパク質 GPIIb-IIIa (α IIB β 3 インテグリン) と vWF との結合による血小板の血管壁への接着、4) ADP/トロンビンの放出・生成による局所的な血小板の活性化と、GPIIb-IIIa とフィブリノーゲンの結合による血小板凝集塊の形成と成長、が行われている。これらのステップは安定な血栓形成に不可欠であり、どのステップに異常も、止血機能の異常の原因となる。

血栓形成に関与する分子の中でも、 α IIB β 3 インテグリンは血小板凝集塊の形成に不可欠であり、 α IIB β 3 無くして安定な血栓形成はありえない。その証拠として、 α IIB β 3 インテグリンの遺伝的欠損によっておこる疾患である Glanzmann 血小板無力症では、患者は重篤な出血傾向を呈することが知られている。 α IIB β 3 インテグリンは血漿中のフィブリノーゲンと結合することによって、血小板同士を架橋し、血小板凝集塊を形成する。ここで重要なのは、 α IIB β 3 インテグリンは血小板が活性化しない限り、フィブリノーゲンと結合しないことである。

α IIB β 3 は全てのインテグリン分子と同様に、 α 鎖と β 鎖から構成されるヘテロダイマーである。これまでの研究によって、 α IIB β 3 インテグリンには立体構造の異なる複数の conformer が存在することが明らか

かになった。われわれは、これら複数の conformer のうち、いわゆる bent form が低活性型であり、反対に extended form が高活性型であることを示した。このことから、 α IIB β 3 は血小板膜上で血小板の活性化に伴い、bent form から extended form に立体構造を変化させることによって、リガンドとの結合親和性を高めると想像される。では、血小板の活性化と α IIB β 3 の構造変化を結びつけるメカニズム (inside-out signaling) は何であろうか? α IIB β 3 は膜貫通タンパク質であり、 α 鎖と β 鎖の C 末端には、それぞれ短い細胞内ドメインが存在する。この部位には、シグナル分子を含んだ多くの細胞内タンパク質が結合する。中でも、talin は β 鎖に結合し、インテグリン α 鎖と β 鎖の間の結合を解離させる結果、インテグリンを活性化させることが明らかとなった。これとは別に、われわれは α 鎖と β 鎖の細胞外 tail 同士の内因性結合が解離することで、 α IIB β 3 の活性化がおこることを明らかにした。以上の結果を総合すると、inside-out signaling では、シグナル分子とインテグリン細胞内 tail の結合によって、細胞外 tail 同士の結合解離がおこり、その結果、bent form から extended form への構造変化がおこり、インテグリンとリガンドの結合親和性が高まると考えられる。

α IIB β 3 インテグリンは vWF に存在する RGD 配列、あるいはフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端の 12 アミノ残基で構成される H12 配列と結合する。これらの配列に由来した RGD ペプチド、H12 ペプチドは α IIB β 3 と結合するが、vWF、フィブリノーゲンなどの高分子リガンドと大きく異なる点は、これらの低分子リガンドは活性化に依存せず α IIB β 3 と結合することである。すなわち、RGD・H12 ペプチドは非活性化血小板とも結合しうる。また、これらの低分子リガンドは α IIB β 3 と結合し、立体構造の変化を

誘発することが知られている。この構造変化に伴い、通常隠れている α IIb β 3のエピトープが表出されるため、免疫反応が惹起される可能性がある。実際に、抗血栓薬として開発され、 α IIb β 3 と強固に結合して α IIb β 3 と vWF/フィブリノーゲンとの結合を阻害する低分子 ligand-mimetic の投与を受けた患者が、抗 α IIb β 3 自己抗体を形成したことが報告されている。

われわれが開発した止血機能を有する人工粒子は、H12 ペプチドをその表面に担持している。この人工粒子が生体内で有効かつ安全に機能するためには、1) 活性化血小板のみと結合し、非活性化血小板とは結合しないこと、2) 高濃度のフィブリノーゲン存在下でも結合しうる、高い結合親和性を持つこと、3) たとえ高濃度でも、 α IIb β 3 の構造変化をひき起こさないこと、が重要である。今年度の研究では、H12 担持人工粒子がこれらの条件を満たしているか否かを、 α IIb β 3 を発現した動物細胞を用いて検討した。

B. 研究方法

I. α IIb β 3 変異体の作成

α IIb 鎖、 β 3 鎖の cDNA は Joseph C. Loftus 博士 (Mayor 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。 α IIb 変異体である A318C、D319C、Q589NAT と β 3 変異体である V332C、S674C、D552C、V359C、S77C、S147C、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 μ g の α V 又は α IIb cDNA は 50 μ g の β 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 Ca²⁺/1mM Mg²⁺加 Hepes-Tyrode buffer (HTB) に再浮遊させ、各モノクローナル抗体 10 μ 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 Ca²⁺/1mM Mg²⁺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、H12 担持リポソーム粒子結合実験

野生型あるいは変異を有する α IIb cDNA 50 μ g と野生型 β 3 cDNA 50 μ 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 10 μ g/ml の抗 α IIb モノクローナル抗体 PL98DF6 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。フィブリノーゲンと α IIb β 3 発現 CHO 細胞 (α IIb β 3-CHO) との結合は、細胞を洗浄後 1 μ M の FITC 標識フィブリノーゲン (FITC-Fbg)、10 μ g/ml のマウス IgG、活性化作用をもつ抗 α IIb β 3 抗体 PT25-2、あるいは 1mM の GRGDS ペプチドを含んだ HTB と氷上で 2 時間反応させ行った。H12 担持リポソーム粒子と α IIb β 3-CHO との結合は、FITC-Fbg の代わりに異なる濃度の DiOC18 標識リポソーム粒子 (control vesicle)、または DiOC18 標識 H12 担持リ

ポゾーム粒子 (H12-vesicle) を、10 $\mu\text{g/ml}$ のマウス IgG、PT25-2、あるいは 1mM の GRGDS ペプチドを含んだ HTB と氷上で 2 時間反応させを行った。細胞を 1mM Ca^{2+} /1mM Mg^{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。各抗体存在下での結合から GRGDS ペプチド存在下での結合をバックグラウンドとして差し引き、特異的結合を算出した。

V. SZ22 結合実験

フィブリノーゲン結合実験と同様に、まず始めに細胞を PL98DF6/RPE 標識抗マウス IgG で染色した。次に、細胞を FITC 標識 IgG1 または FITC 標識 SZ22 と、1 mM の GRGDS ペプチドまたは異なる濃度のフィブリノーゲン、control vesicle、H12-vesicle の存在下、氷上で 1 時間反応させた。細胞を 1mM Ca^{2+} /1mM Mg^{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。

C. 研究結果

I. H12-vesicle と $\alpha\text{IIb}\beta\text{3-CHO}$ の結合動態解析

まず始めに、野生型 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ を発現した CHO 細胞と H12-vesicle の結合を調べた。図 1 に示したように、H12-vesicle は濃度依存性に $\alpha\text{IIb}\beta\text{3-CHO}$ と結合した。拮抗阻害剤である RGD ペプチド 1 mM 存在下でのバックグラウンド結合と比較すると明らかかなように、特異的結合はごくわずかであり、結合解離定数 $K_d=2.23\pm 1.40$ mg/ml であった。しかし、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 活性化モノクローナル抗体である PT25-2 存在下では、結合の著明な増加がみられ、 $K_d=0.40\pm 0.07$ mg/ml と結合親和性が 5 倍以上に上昇した。また、立体構造が extended form に固定され、高度に活性化された $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ の変異体

Q595NTT を発現した CHO 細胞では、さらに $K_d=0.26\pm 0.04$ mg/ml であった。尚、データには示さないが、H12 ペプチドを保持しない control vesicle は、これらの細胞と全く結合しなかった。これらの結果から、H12-vesicle はフィブリノーゲンと同様に、活性化した $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ と特異的に結合するこ

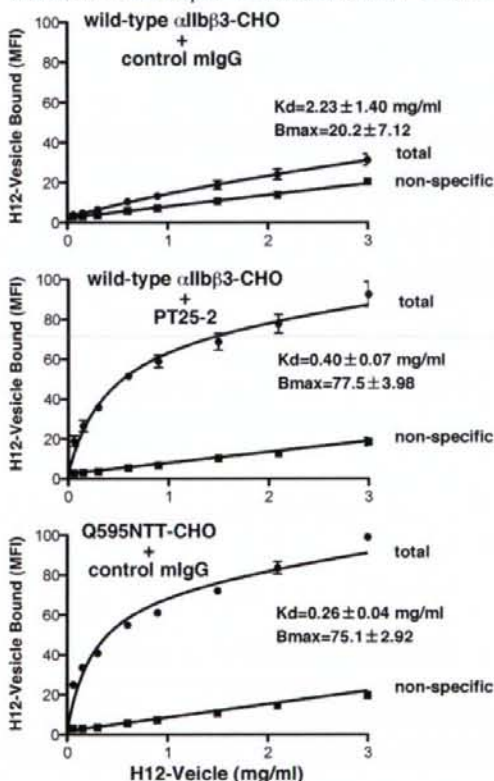


図 1. H12-vesicle と $\alpha\text{IIb}\beta\text{3-CHO}$ の結合動態

とが明らかになった。

II. H12-vesicle とフィブリノーゲンの競合試験

H12-vesicle は血管内で活性化血小板と結合することによって、止血作用を発揮すると考えられる。このためには、H12-vesicle は血液中に存在するフィブリノーゲンとの競合に打ち勝つ十分な親和性を持って、血小板と結合しなければならない。このことを検証するため、フィブリノ

ーゲン存在下での H12-vesicle と α IIb β 3-CHO の結合を調べた (図 2)。H12-vesicle と野生型 α IIb β 3 を発現した細胞との結合は、活性化抗体 PT25-2 の有無

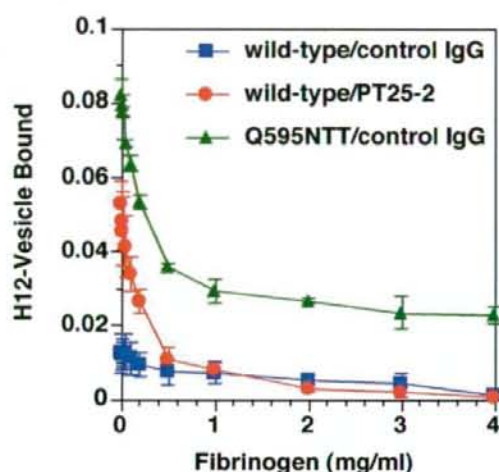


図2. フィブリンノーゲンによる H12-vesicle 結合阻害試験

する H12-vesicle の結合もフィブリンノーゲンによる阻害を受けた。しかし、野生型 α IIb β 3 と異なり、生理的濃度のフィブリンノーゲン存在下でも結合は完全には抑制されず、約 30% の結合が残存した。以上の結果から、H12-vesicle は高度に活性化された α IIb β 3 とは高い親和性を持つため、フィブリンノーゲンに富む血液中でも活性化血小板と十分に結合しうると考えられる。これに対して、非活性化 α IIb β 3 と H12-vesicle の親和性は低く、フィブリンノーゲンと容易に置換されてしまうため、血液中には

にかかわらず、生理的濃度 (2~4 mg/ml) のフィブリンノーゲンによってほぼ完全に阻害された。一方、Q595NTT 発現細胞に対

H12-vesicle は非活性化血小板と全く結合しないと考えられる。

III. H12-vesicle と α IIb β 3 conformer との結合実験

これまでの研究結果から、 α IIb β 3 とフィブリンノーゲンの高親和性結合がおこるためには、 α IIb β 3 の立体構造がいわゆる extended form をとり、かつ α IIb β 3 の頭部を形成する β -hybrid domain が swing-out している (extended with open head) 必要があることが判明した。図 3 はわれわれが作製した α IIb β 3 変異体を示したものである。これらの変異体は、分子内の異なる場所に Cys 残基、あるいは Asn-X-Ser/Thr からなる N-糖鎖結合部位が導入されており、立体構造が特定の conformer に固定されるようにデザインされている。 β 3-V332C/S674C (V332C-S674C)、 α IIb-A318C/ β 3-D552C (A318C/D552C) は bent form、 α IIb-D319C/ β 3-V359C (D319C/V359C) は β -hybrid domain が swing-in した closed head、 β 3-S77C/S147C (S77C-S147C) は β -hybrid domain が swing-out した open head、 α IIb-Q595NTT (Q595NTT) は extended form に構造が固定されるようにデザインされた変異体であり、595-319/359 は α IIb-Q595NTT と α IIb-D319C/ β 3-V359C の両変異の組み合

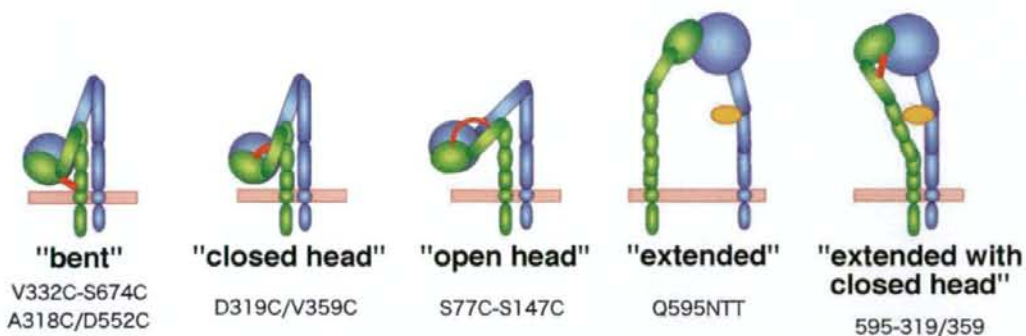


図3. 立体構造の異なる α IIb β 3 conformer の作成

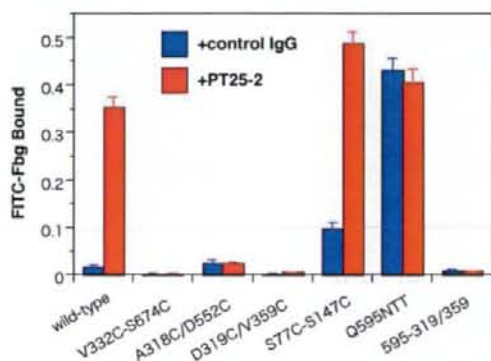


図4. α IIb β 3 conformer とフィブリノーゲンとの結合

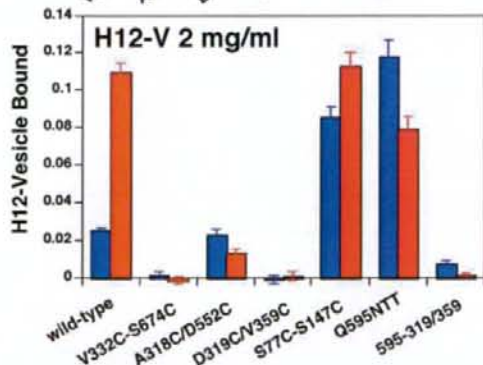
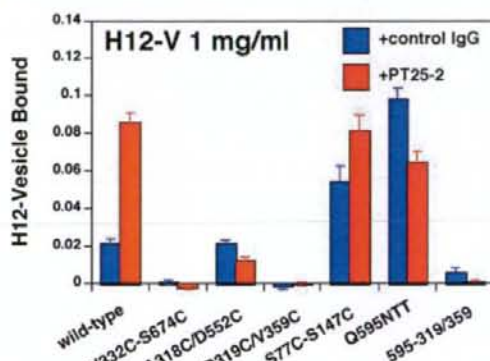


図5. α IIb β 3 conformer とH12-vesicle との結合

わせで、extended with closed head となるようにデザインされたものである。まず始めに、これらの変異体を CHO 細胞に発現し、これらの細胞とフィブリノーゲンの結合を測定して比較した(図4)。bent form あるいは closed head に固定された変異体は、活性化抗体 PT25-2 の存在下でもフィブリノーゲンと結合しなかった。これに対

し、open head を有する変異体は活性化抗体なしでもフィブリノーゲン結合が観察され、extended form では、非常に強い結合が観察された。しかし、同じ extended form でも、頭部が closed head に固定されている 595-319/359 は、フィブリノーゲンと全く結合しなかった。図 5 は H12-vesicle とこれらの変異体を発現した CHO 細胞との結合を調べたものである。H12-vesicle 濃度 1 mg/ml と 2 mg/ml での結合を別々に示した。フィブリノーゲンと同様に、H12-vesicle は PT25-2 存在下でも V332C-S674CD319C/V359C と全く結合しなかった。A318C/D552C は野生型 α IIb β 3 と同程度の結合を示したが、活性化抗体による結合増加は全く観察されなかった。これとは反対に、H12-vesicle は S77C-S147C、Q595NTT と活性化抗体な

しでも強く結合した。しかし、活性化抗体の有無にかかわらず、595-319/359 とは全く結合しなかった。これらの結果から、H12-vesicle は bent form、closed head とは全く結合せず、extended form かつ open head を有する conformer と結合することが明らかになった。

IV. 抗 LIBS 抗体結合。

インテグリンはリガンドの結合によって、構造変化をおこすことが知られている。この構造変化は、抗 LIBS 抗体と呼ばれる一連のモノクローナル抗体によって検出可能である。以前、われわれは抗 α IIb 抗体の SZ22 が抗 LIBS 抗体であることを見いだした。図 6 は SZ22 と α IIb β 3-CHO との結合を調べたものである。リガンドが存在しない状態 (NA) でも SZ22 は α IIb β 3-CHO と結合するが、リガンドペプチドである

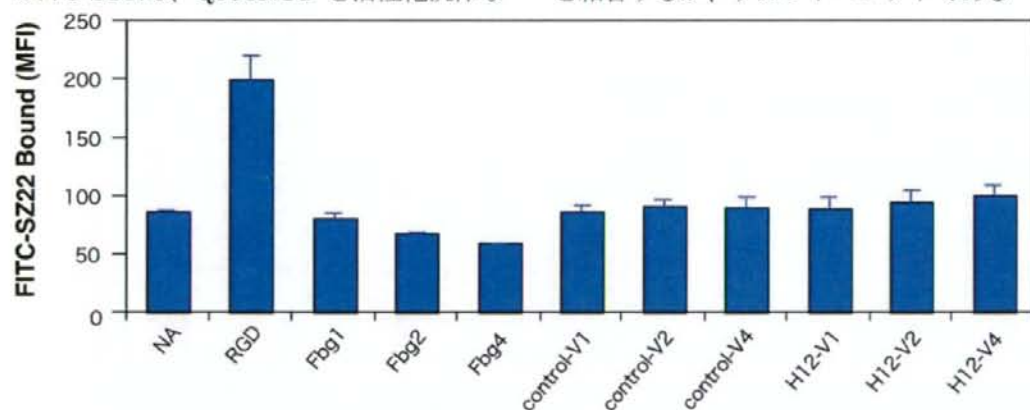


図 6. SZ22 と α IIb β 3-CHO の結合

RGD ペプチド 1 mM を加えることによって、結合が 2 倍以上に増加した (RGD)。これに対して、1~4 mg/ml のフィブリノーゲンは SZ22 の結合を全く増加させなかった (Fbg1~4)。一方、H12 ペプチドを担持しない control vesicle 1~4 mg/ml の存在下 (control-V1~4) では、SZ22 の結合は全く変化しなかった。同様に、H12-vesicle 1~4 mg/ml の存在下 (H12-V1~4) での

SZ22 結合は、control vesicle 存在下と比べて変化無く、リガンドが存在しない状態 (NA) と比べても、有意差を認めなかった。以上の結果から、H12-vesicle は α IIb β 3 の構造変化を引き起こさないことが示唆された。

D. 考察

本研究では、今までの研究で作成した一

連の α IIb β 3 変異体と H12-vesicle の結合を解析することにより、H12-vesicle 結合メカニズムの解明を試みた。その結果、1) H12-vesicle と α IIb β 3 の結合親和性は、 α IIb β 3 を活性化することにより 5~10 倍増加すること、2) H12-vesicle と活性化 α IIb β 3 の結合親和性は非常に強く、フィブリノーゲンと競合しうること、3) α IIb β 3 が H12-vesicle と結合するために必要な立体構造上の条件は、extended form であり、かつ open head を有すること、4) H12-vesicle は高濃度でも、 α IIb β 3 の構造変化を誘発しないこと、が明らかになった。以上の結果は、H12-vesicle はフィブリノーゲンと同じメカニズムで α IIb β 3 と結合することを示唆しており、安全性の高い代替血液であると考えられる。

H12-vesicle は、リポソーム膜にフィブリノーゲンに由来する α IIb β 3 結合部位である H12 ペプチドを、結合させたものである。前述した通り、H12 ペプチドはフィブリノーゲンと異なり、活性化非依存性に α IIb β 3 と結合する。もし H12-vesicle が H12 ペプチドと同じように α IIb β 3 と結合するのであれば、非活性化血小板とも結合することが予想され、臨床応用には不適當である。そこで本研究では、血小板の代わりに、 α IIb β 3 を発現した CHO 細胞と H12-vesicle を調べた。CHO 細胞膜表面に発現した α IIb β 3 インテグリンは、血小板膜表面に発現したものと同様に、結合活性は非常に低く、そのままではほとんどリガンドと結合することはない。図 1 に示したように H12-vesicle と α IIb β 3-CHO の結合は非常に弱く、Kd、Bmax とともに低値であった。しかし、活性化抗体 PT25-2 を添加することによって、H12-vesicle の結合は著明に増加した。また、立体構造が extended form に固定するようにデザインされ、高度に活性化した α IIb β 3 の変異体 Q595NTT (図 3) とは、活性化抗体なしでも非常に

強く結合した。これらの結果は、H12-vesicle が高度に活性化された α IIb β 3 と選択的に結合することを示しており、活性化血小板とは非活性化血小板の 10 倍以上の親和性をもって結合すると考えられる。また、H12-vesicle と活性化 α IIb β 3 との結合親和性は非常に高く、生理的濃度のフィブリノーゲン存在下でも完全に阻害されず、十分な結合が観察された(図 2)。これに対して、H12-vesicle と非活性化 α IIb β 3 との結合は高濃度のフィブリノーゲンによって完全に阻害された。これらの結果から、H12-vesicle は血管内において活性化血小板のみと結合し、非活性化血小板とは全く結合しないことが予測される。実際に H12-vesicle は *in vitro* において ADP・トロンビンなどのアゴニストで活性化した血小板のみと結合し、*in vivo* においても血栓形成部位にのみ集積することが確認されており、われわれの結果と一致する。

α IIb β 3 conformer と H12-vesicle の結合解析では、H12-vesicle はフィブリノーゲンとほとんど同じ結合態度を示した(図 4・図 5)。すなわち、H12-vesicle は、 α IIb β 3 がフィブリノーゲン結合に必要な構造条件を満たした時に、結合することが判明した。わずかな違いとしては、H12-vesicle がフィブリノーゲンよりも、より強く S77C-S147C と結合することが挙げられる。S77C-S147C は β -hybrid domain が swing-out した状態で固定された、いわゆる open head を持つようにデザインされているが、extended form に固定されている訳ではない。このことは、H12-vesicle がフィブリノーゲンよりも低い活性状態の α IIb β 3 と結合しうことを示唆している。事実、ごく僅かではあるが、H12-vesicle は α IIb β 3-CHO と活性化なしでも結合する(図 1・図 5)。この H12-vesicle とフィブリノーゲンの違いは、surface plasmon resonance を用いた無細

胞系を確立し、さらに詳しく検討する必要がある。また、*surface plasmon resonance* はリアルタイムでの結合が測定可能なため、*off rate* が低くより強固に $\alpha\text{IIb}\beta 3$ と結合する人工粒子のスクリーニングにも使用できる。

一般的にインテグリンは、リガンドと結合することによって立体構造を変化させる。 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ もリガンドペプチドである RGD・H12 ペプチドなどの低分子リガンドと結合すると立体構造を変化させ、それまで分子の内側にあった部位が分子表面に露出される。これらの部位は、*ligand-induced binding site* とよばれ、抗 LIBS 抗体の *epitope* となる。臨床的には、これらの cryptic な *epitope* は自己抗体形成のターゲットとなる可能性があるため、H12-vesicle が LIBS *epitope* の表出を誘導するか否かは重要な問題である。SZ22 は αIIb の tail に結合する抗体であり、図7に示したように RGD ペプチドによってその結合が増加することから、抗 LIBS 抗体と考えられる。高分子リガンドのフィブリノーゲンを添加した場合、SZ22 結合は全く増加せず、統計的に有意ではないが、逆に濃度依存性に減少する傾向がみられた。同様に、H12-vesicle 添加しても SZ22 結合の有意な増加は見られなかった。しかし、僅かではあるが、濃度依存性に増加する傾向がみられた。恐らくこれは、H12-vesicle が活性化なしでも $\alpha\text{IIb}\beta 3$ とある程度結合することに起因すると考えられる。実際の血管内では、高濃度のフィブリノーゲンが存在するため、H12-vesicle 結合による SZ22 結合増加は無視できるであろう。抗 LIBS 抗体は認識する *epitope* の部位によって、活性状態の異なる $\alpha\text{IIb}\beta 3$ と結合すると考えられる。今後の課題として、より多くの抗 LIBS 抗体の結合を調べ、H12-vesicle が $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 構造に与える影響を、さらに詳しく検討する必要がある。

今回の研究で得られた結果を総合すると、H12-vesicle はフィブリノーゲンとほぼ同じ挙動を示していることが判る。すなわち、H12-vesicle は活性化血小板と結合して、血栓形成を促進すると考えられる。しかし、その止血機序は、単にフィブリノーゲンと同じように血小板を架橋するだけでない。可能性の1つとして、血小板活性化の増強作用が考えられる。 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ インテグリンは *clustering* をおこすことによって、細胞内シグナルを伝達することが知られている (*outside-in signaling*)。フィブリノーゲンは H12 配列を2カ所にもつ2価のリガンドであるため、たとえ $\alpha\text{IIb}\beta 3$ と結合しても複数の $\alpha\text{IIb}\beta 3$ の *clustering* をおこすことはない。これに対して、H12-vesicle は、複数の H12 ペプチドを結合した多価のリガンドであるため、結合によって血小板表面の複数の $\alpha\text{IIb}\beta 3$ の *clustering* をおこすことができる。今後の予定として、H12-vesicle の血小板活性化作用を、細胞内シグナル分子のリン酸化、細胞内 Ca^{2+} の上昇などによって調べる。これは、H12-vesicle に内包する物質の最適化のためにも、検討を要する課題であろう。

E. 結論

H12-vesicle は活性化依存性に $\alpha\text{IIb}\beta 3$ と結合する、安全性に優れた血液代替製剤である。

G. 研究発表

1 論文発表: 1) 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.

2 学会発表: 無し。

H. 知的財産権の出願・登録：無し。

Ⅲ. 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, <u>Takeoka S</u> , Eto, K, Maekawa, I, Fujie, T, Maruyama H, Ikeda Y, <u>Handa M</u>	Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen g-chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits	<i>J Thromb Haemost</i>	7 巻	470 - 477	2009
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>	18 巻	158 - 166	2008
<u>半田 誠</u> , 岡村陽介, <u>武岡真司</u> , <u>池田 康夫</u> ,	「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 巻 6 号	774 - 778	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>	Part A	233 - 241	2008
Matsumoto A, <u>Kamata T</u> , Takagi T, Iwasaki K, Yura K	Key interactions in integrin ectodomain responsible for global conformational change detected by elastic network normal-mode analysis	<i>Biophys J</i>	95 巻 6 号	2895 - 2908	2008
Shintani T, Iwabuchi T, Sakuragawa, S, <u>Kajimura M</u> , Suematsu M, 他11名	Cystathionine β -synthase as a CO-sensitive regulator of bile excretion,	<i>Hepatology</i>	49 巻	141 - 150	2009
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>	2 巻	8 - 12	2008
Tamura N, Kitajima I, <u>Goto S</u> , 他3名	Important regulatory role of activated platelet-derived procoagulant activity in the propagation of thrombi formed under arterial blood flow conditions	<i>Circ J</i>	73 巻	540 - 548	2009

その他

半田誠 : 人工血液をつくる (9) 平成 20 年度公開発表会、講演ハンドアウト

IV. 研究成果の刊行物・別冊

ORIGINAL ARTICLE

Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute

Y. OKAMURA,*† S. TAKEOKA,* K. ETO,* I. MAEKAWA,* T. FUJIE,* H. MARUYAMA,† Y. IKEDA† and M. HANDA†

*Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Tokyo;

†Department of Transfusion Medicine & Cell Therapy; and ‡Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

To cite this article: Okamura Y, Takeoka S, Eto K, Maekawa I, Fujie T, Maruyama H, Ikeda Y, Handa M. Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 470–7.

Summary. *Background:* The dodecapeptide HHLGGAK-QAGDV (H12), corresponding to the fibrinogen γ -chain carboxy-terminal sequence (γ 400–411), is a specific binding site of the ligand for platelet GPIIb/IIIa complex. We have evaluated H12-coated nanoparticles (polymerized albumin or liposome) as platelet function-supporting synthetic products. *Objectives:* To strengthen the hemostatic ability of H12-coated particles as a platelet substitute, we exploited installation of a drug delivery function by encapsulating adenosine diphosphate (ADP) into liposomes [H12-(ADP)-liposomes]. *Methods and results:* Via selective interaction with activated platelets through GPIIb/IIIa, H12-(ADP)-liposomes were capable of augmenting agonist-induced platelet aggregation by releasing ADP in an aggregation-dependent manner. When intravenously injected into rats, liposomes were readily targeted to sites of vascular injury as analyzed on computed tomography. In fact, comparable to fresh platelets, liposomes exhibited considerable hemostatic ability for correcting prolonged bleeding time in a busulphan-induced thrombocytopenic rabbit model. In addition, the liposomes showed no activating or aggregating effects on circulating platelets in normal rabbits. *Conclusion:* H12-(ADP)-liposome may thus offer a promising platelet substitute, being made with only synthetic materials and exerting hemostatic functions *in vivo* via reinforcement of primary thrombus formation by residual platelets in thrombocytopenia at sites of vascular injury, but not in circulation.

Keywords: ADP, fibrinogen γ -chain peptide, liposomes, platelet substitutes, thrombocytopenic rats and rabbits.

Correspondence: Makoto Handa, Department of Transfusion Medicine & Cell Therapy, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.
Tel.: +81 3 3353 1211 (ext. 62123); fax: +81 3 3353 9706.
E-mail: mhanda@sc.itc.keio.ac.jp

Received 24 September 2008, accepted 5 December 2008

Introduction

To overcome the limitations and drawbacks inherent in standard platelet products, a number of rigorous attempts have been made to develop alternative substitutes to fresh platelets, including the use of materials derived from outdated platelets such as fixed or lyophilized whole cells or cell membranes, and platelet function-supporting synthetic products such as ligand-coated albumin particles or liposomes [1,2].

In 1992, Agam and Livine reported fibrinogen-coated erythrocytes with the capacity to enhance agonist-induced platelet aggregation *in vitro* [3]. These were in fact hemostatically effective in a rat model of immune thrombocytopenia. In the same year, Coller *et al.* conducted an extensive *in vitro* study of fibrinogen-derived synthetic peptide, arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-coated erythrocytes (thromboerythrocytes) as a possible platelet substitute [4]. In the circulation, platelet aggregation is mediated by fibrinogen by bridging adjacent platelets through integrin α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) in an activation-dependent manner. Several sequences in fibrinogen have been designated as GPIIb/IIIa recognition sites: the RGD-based sequences ⁹⁵RGDF⁹⁸ and ⁵⁷²RGDS⁵⁷⁵ in the A α chains; and ⁴⁰⁰HHLGGAKQAGDV⁴¹¹ (H12, the fibrinogen γ -chain dodecapeptide) in the carboxyl-terminal of the γ -chain [5]. In fact, both erythrocyte preparations have been shown to form mixed aggregates *in vitro* with platelets via preferential interaction with GPIIb/IIIa on activated platelets suitable for a prototype platelet substitute. The next generation of platelet substitutes was then developed using human albumin particles as carriers of fibrinogen or fibrinogen peptides. In 1995, Yen *et al.* produced fibrinogen-coated albumin microspheres (thrombospheres; mean diameter, 1.2 μ m), which were shown to be hemostatically active in thrombocytopenic rabbits [1]. In 1999, Levi *et al.* extensively tested their fibrinogen-coated albumin microcapsules (synthocytes; mean diameter, 3.5–4.5 μ m) as a platelet substitute, showing hemostatic efficacy *in vivo* in severely thrombocytopenic rabbit models [6].

In 2003, we started to develop synthetic platelet substitutes based on a strategy of using polymerized albumin or liposomes (mean diameter, 0.22–0.26 μm for each) as a carrier vehicle and synthetic H12 peptides as a surface-coating ligand to target activated platelets [7]. Selection of H12 peptide was derived from general observations that the property of H12 interaction with integrin is highly specific to GPIIb/IIIa, whereas RGD-related peptides are promiscuous to many integrins from various cell types [8]. In fact, H12-coated polymerized albumin and liposomes with polyethyleneglycol-surface modifications show specific interaction with activated platelets and augmented effects on platelet thrombus formation onto collagen-immobilized surfaces under flow conditions *in vitro*, and prolonged hemostatic ability *in vivo* to correct bleeding time in a dose-dependent manner in a thrombocytopenic rat model [9–11].

To strengthen the hemostatic ability of H12-coated particles as a platelet substitute, we exploited installation of a drug delivery function by encapsulating potent platelet agonists into liposomes. To this end, we selected adenosine diphosphate (ADP) as a drug to be carried by liposomes, because this physiologically relevant platelet agonist is stored in dense granules and released upon cellular activation, then functions to reinforce or maintain platelet aggregation through corresponding platelet nucleotide receptors P2Y₁ and P2Y₁₂.

In this communication, we report the successful development of a novel synthetic platelet substitute, H12-coated, ADP-encapsulated liposome [H12-(ADP)-liposome], which behaves like fibrinogen and platelets to exert hemostatic functions at sites of vascular injury, but not in circulation.

Materials and methods

Reagents

Cholesterol and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) were purchased from Nippon Fine Chemical (Osaka, Japan), and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-[monomethoxypoly(ethyleneglycol)] (PEG-DSPE, 5.1 kDa) was from NOF (Tokyo, Japan), while 1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) and H12-PEG-Glu2C18, where fibrinogen γ -chain dodecapeptide (C-HHLGGAKQAGDV, Cys-H12) was conjugated to the end of the PEG-lipids, were synthesized [11]. Adenosine 5'-diphosphate (ADP) and carboxyfluorescein (CF) were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and Acros Organics (Geel, Belgium), respectively. *N*-bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-[(2*S*)-2-hydroxypropanoylamino]-2,4,6-triiodoisophthalamide (Iopamidol) was obtained from Fuji Pharma (Tokyo, Japan). Busulphan and poly(ethyleneglycol) (400 Da) were from Sigma-Aldrich.

Preparation of H12-(ADP)-liposomes

DPPC (1000 mg, 1.36 mmol), cholesterol (527 mg, 1.36 mmol), DHSG (189 mg, 272 μmol), PEG-DSPE

(52 mg, 9.0 μmol) and H12-PEG-Glu2C18 (47 mg, 9.0 μmol) were dissolved in benzene and then freeze-dried. The resulting mixed lipids were hydrated with phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) containing ADP (0.1–10 mmol L⁻¹) and extruded with membrane filters (pore size, 0.45, 0.22 μm ; Durapore[®]; Millipore, Tokyo, Japan). Liposomes were washed with PBS by centrifugation (100 000 $\times g$, 30 min, 4 °C), and the remaining ADP was eliminated by sephadexG25. We also prepared H12-liposome encapsulating 1 mmol L⁻¹ of CF as a model fluorescent dye [H12-(CF)-liposomes], and H12-liposome encapsulating 80 mmol L⁻¹ of iopamidol for CT measurement [H12-(iopamidol)-liposomes]. Particle diameter was analyzed using a dynamic light-scattering method (N4 PLUS; Beckman-Coulter, Fullerton, FL, USA).

Platelet aggregation studies and CF release measurements

Blood drawn from healthy volunteers was mixed with 10% volume of 3.8% (w/v) sodium citrate. Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation (100 $\times g$, 15 min, 22 °C) of blood, and the platelet count was adjusted to $2.0 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$ using platelet-poor plasma (PPP) prepared by centrifugation (2200 $\times g$, 10 min, 22 °C). ADP solution [final concentration (fc), 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$] or collagen solution (fc, 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was added to the PRP containing H12-(CF)-, (CF)-, H12-(ADP)- or (ADP)-liposomes (fc, 0.05–0.20 mg mL⁻¹), and light transmittance was measured using an aggregometer (Hema Tracer T-638; Nico Bioscience, Tokyo, Japan). Samples were fixed with formaldehyde [fc, 1.5% (v/v)] after measurement.

Percentage CF release from liposomes was measured as follows: PRP containing H12-(CF)-liposomes was centrifuged (2200 $\times g$, 10 min, 22 °C) before ADP stimulation. The resulting supernatant was dissolved with 1% deca(oxyethylene) dodecylether (C₁₂E₁₀) and then fluorescent intensity (A) was measured ($E_{\lambda} = 485 \text{ nm}$; $E_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$) using a spectrofluorometer (FP-750; Jasco, Tokyo, Japan). After platelet aggregation measurements, the suspension was centrifuged (2200 $\times g$, 10 min, 4 °C) to obtain the supernatant, which was then divided into two tubes. One tube was mixed with 1% C₁₂E₁₀ and the fluorescent intensity (B) was measured. The other tube was centrifuged (100 000 $\times g$, 30 min, 4 °C) to separate the remaining liposomes, and fluorescent intensity of the supernatant (C) was measured. We defined 'co-sediment ratio of liposomes with platelet aggregation (%)' and 'CF release from liposomes (%)' using the following equations:

$$\text{Co-sediment ratio of liposomes with platelet aggregation (\%)} = (A - B + C) \times 100/A$$

$$\text{CF release from liposomes (\%)} = C \times 100/(A - B + C)$$

Measurement of tail bleeding time of busulphan-induced thrombocytopenic rats

Busulphan-induced thrombocytopenic rats were prepared as described previously [9,10]. Briefly, male Wistar rats (230–

250 g; CLEA Japan, Tokyo, Japan) were anesthetized with diethyl ether and injected on day 0 and day 3 with 10 mg kg^{-1} , for a total dosage of 20 mg kg^{-1} of busulphan. On day 10, thrombocytopenic rats were anesthetized with sevofrane, and the sample suspension at a dose of 4 mL kg^{-1} was infused into the tail vein. After 5 min, a 2.5 mm (length) \times 1.0 mm (depth) template-guided incision (QuikheelTM; Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) was made 1 cm from the tip of the tail. The tail was immersed in a 50-mL cylinder of saline, and the time required for bleeding to stop was measured.

Computed tomography

Normal rats were anesthetized with sodium pentobarbital at a dose of 50 mg kg^{-1} , and H12-(iopamidol)-liposomes at a lipid dose of 130 mg kg^{-1} (iodine dose, 60 mg kg^{-1}) were infused into the tail vein. After 5 min, a 1-cm incision (No. 11 scalpel blade; Asone, Osaka, Japan) was made in the tail vein, and the tail was immersed in a saline bath until cessation of bleeding. The clot and saline at the tail incision site were wiped on a towel after sacrifice, and the site was observed using an eXplore Locus CT system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As controls, (iopamidol)-liposomes, iopamidol solution or saline were used.

Measurement of ear bleeding time of busulphan-induced thrombocytopenic rabbits

Experiments were performed using male New Zealand white rabbits (approximately 2.5 kg, 11 weeks old; Sankyo Lab, Tokyo, Japan). Busulphan-induced thrombocytopenic rabbits were prepared as described previously [12]. Briefly, rabbits received subcutaneous injection of busulphan at a dose of 15 mg kg^{-1} on day 0 and day 3, for a total dose of 30 mg kg^{-1} . Anesthetized rabbits with thrombocytopenia were cannulated on day 15 using a 23-gauge scalp vein infusion set, and the sample suspension at a dose of 4 mL kg^{-1} was infused into the ear vein by an infusion pump at a rate of 0.5 mL min^{-1} . Platelet concentrate was prepared as described previously [13]. The various amounts of platelet concentrate (0.1 to $1 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) were also transfused into the ear vein at the same conditions. After 30 min, a 6-mm-long standardized incision (No. 11 scalpel blade) was made at a site where no vessels were visible. The ear was immersed in a saline bath and the time required for bleeding to stop was measured. In cases with bleeding exceeding 30 min, bleeding time was considered to be 30 min.

Statistical analyses

Statistical significance of data for the H12-(ADP)-liposome group compared with (ADP)-liposome and saline groups was tested using Tukey-Kramer tests (Fig. 4). *P*-values < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using StatView software (Hulinks, Tokyo, Japan).

Results

Augmentation of agonist-induced platelet aggregation by H12-(ADP)-liposomes

With ADP encapsulation into the inner space of liposomes (DPPC/cholesterol/DHSG = 5/5/1, by molar ratio), H12-(ADP)-liposomes were successfully prepared in homogeneity with a mean (\pm standard deviation) diameter of $250 \pm 80 \text{ nm}$.

First, we tested effects of liposomes on agonist-induced platelet aggregation. Encapsulated ADP concentration was 1 mmol L^{-1} . When (ADP)-liposomes were added to PRP, maximum light transmittance of platelet aggregation induced by $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ of collagen was $42 \pm 5\%$ ($n = 3$) (Fig. 1Aii). For H12-liposomes, maximum platelet aggregation was slightly increased to $49 \pm 6\%$ ($n = 3$) (Fig. 1Aiii). When H12-(ADP)-liposomes were added instead, maximum platelet

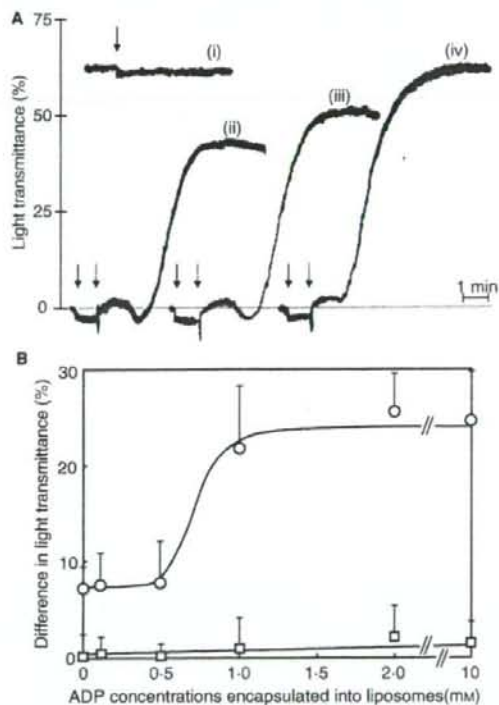


Fig. 1. Augmentation of agonist-induced platelet aggregation by H12-(ADP)-liposomes. (A) Aggregation measurement in PRP (platelet = $2.0 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$) obtained from a healthy volunteer in the presence of (i) H12-(ADP)-liposomes alone, or in response to collagen in the presence of (ii) (ADP)-liposomes, (iii) H12-liposomes or (iv) H12-(ADP)-liposomes. Traces are representative of data obtained from at least three independent experiments. Solid and dot arrows indicate the time of liposome (lipid concentration, 0.20 mg mL^{-1}) and collagen ($0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$) administration, respectively. (B) Effects of (O) H12-(ADP)-liposomes and (□) (ADP)-liposomes on collagen-induced platelet aggregation as a function of ADP concentrations encapsulated into liposomes.

aggregation readily increased to $65 \pm 6\%$ ($n = 3$) with an apparent shortening of lag time compared with that of H12-liposomes (Fig. 1Aiv). However, H12-(ADP)-liposomes themselves did not cause platelet aggregation (Fig. 1Ai). Similar augmented effects of H12-(ADP)-liposomes on agonist-induced platelet aggregation were also seen with stimulation by suboptimal concentrations of ADP ($1\text{--}3 \mu\text{mol L}^{-1}$, not shown). These results indicate that ADP encapsulation could augment enhancing effects of H12-liposomes on agonist-induced platelet aggregation.

Next, we prepared H12-(ADP)-liposomes with varying ADP concentrations, and measured the augmented effects of these liposomes on platelet aggregation response to $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ collagen. Differences in light transmittance of aggregation curve after 5 min between H12-(ADP)-liposomes and (ADP)-liposomes were demonstrated as a function of ADP concentration (Fig. 1B). At ADP concentrations of $0.1\text{--}0.5 \text{ mmol L}^{-1}$, augmented effects of H12-(ADP)-liposomes on platelet aggregation were minimal. With increasing ADP concentrations from 1 to 10 mmol L^{-1} , values increased significantly and plateaued at $22 \pm 6\%$ – $24 \pm 5\%$. In contrast, no significant changes were seen in values when experiments were performed with (ADP)-liposomes. We therefore selected 1 mmol L^{-1} of ADP as the optimal encapsulation concentration.

Aggregation-dependent release of CF from H12-(CF)-liposomes

To study whether the observed aggregation-augmented effect of H12-(ADP)-liposomes was due to aggregation-dependent controlled release of ADP from liposomes or merely the result of leakage by lipid membrane perturbation under stirring conditions, we analyzed the release (or leakage) of CF from CF-encapsulated liposomes on an aggregometer. H12-(CF)-liposomes showed an augmented effect on platelet aggregation induced by a suboptimal concentration of ADP ($3 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Fig. 2A). In the case of (CF)-liposomes as a control, maximum light transmittance of platelet aggregation (lack of secondary response) induced by a suboptimal concentration of ADP ($3 \mu\text{mol L}^{-1}$) was $36 \pm 5\%$ (Fig. 2Ai). When H12-(CF)-liposomes were added to PRP, full platelet aggregation was achieved with maximum light transmittance up to $47 \pm 6\%$ (Fig. 2Aii).

Based on these aggregation studies using the equation shown in the Materials and methods, we calculated the co-sedimentation ratio of H12-(CF)-liposomes with activated platelets or platelet aggregates and CF release ratio from H12-(CF)-liposomes into supernatant (Fig. 2B). Compared with (CF)-liposomes as a control, significant amounts ($17 \pm 5\%$ vs. $3 \pm 1\%$) of H12-(CF)-liposomes became associated with activated platelets or platelet aggregates, and CF was readily ($10 \pm 1\%$ vs. $0.6 \pm 0.5\%$) released into supernatant. These results indicate that the release of encapsulated substances (CF or ADP) from H12-liposomes occurs in an aggregation-dependent manner.

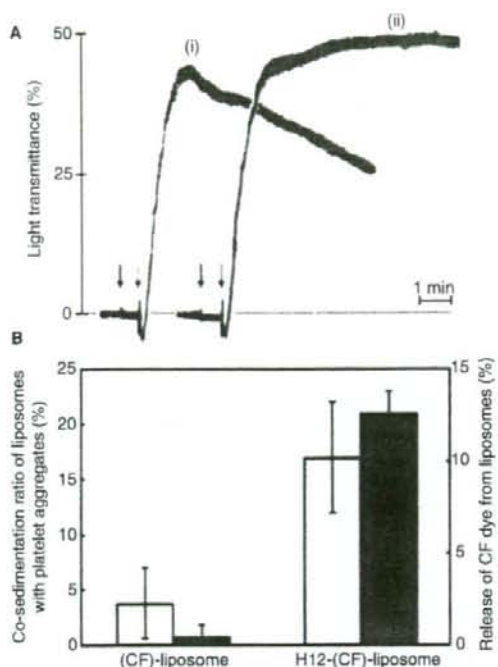


Fig. 2. Aggregation-dependent release of CF from H12-(CF) liposomes. (A) Aggregation measurement in PRP obtained from a healthy volunteer in response to ADP in the presence of (i) (CF)-liposomes and (ii) H12-(CF)-liposomes. Traces are representative of data obtained from at least three independent experiments. Solid and dotted arrows indicate the times of liposome (lipid concentration, fc , 0.05 mg mL^{-1}) and ADP (fc , $3 \mu\text{mol L}^{-1}$) administration, respectively. (B) Parallel measurement of the ratio of (CF)-liposomes or H12-(CF)-liposomes tightly associated with activated platelets or platelet aggregates (white column) and that of CF released from these liposomes into supernatant after platelet aggregation (black column). Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments.

Specific accumulation of H12-liposomes at sites of vascular injury

To elucidate *in vivo* behavior of liposomes, we prepared H12-liposomes containing a contrast dye, iopamidol, and performed CT analysis to detect accumulation of iopamidol-encapsulated liposomes at sites of vascular injury in normal rats. In control experiments using uncoated liposomes, no accumulation was detected at the incision site in the tail (Fig. 3B,C). Infused iopamidol solution was also rapidly excreted into the urinary tract and did not stain the tail incision site (Fig. 3D,E). In contrast, infused H12-liposomes clearly showed specific accumulation at the 1-cm-long incision site in the tail vein (Fig. 3F). Cross-sectional CT (Fig. 3G) and three-dimensional CT (Fig. 3H) confirmed the above results. These findings suggest H12-(ADP)-liposomes as an ideal hemostatic agent specifically recruited to and exerting functions at sites of vascular injury.

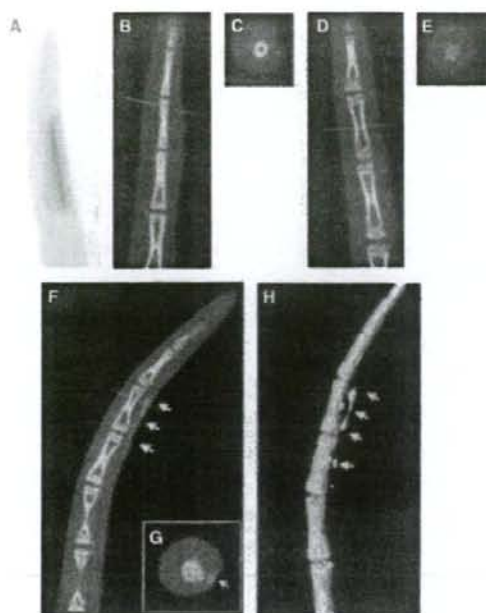


Fig. 3. Specific accumulation of H12-(iopamidol)-liposomes at the injury site in the tail vein as visualized by an eXplore Locus CT system. (A) Photo of rat tail with a 1-cm-long incision including the tail vein. (B) CT image of (iopamidol)-liposome infusion. (C) Cross-sectional CT image of (B). (D) CT image of iopamidol solution infusion. (E) Cross-sectional CT image of (D). (F) CT image of H12-(iopamidol)-liposome accumulation. (G) Cross-sectional CT image of (F). (H) Three-dimensional CT image of (F). Arrows indicate accumulation points of H12-(iopamidol)-liposomes.

Hemostatic effects of H12-(ADP)-liposomes on bleeding time in thrombocytopenic rats

To explore the *in vivo* hemostatic ability of H12-(ADP)-liposomes, a rat model with busulphan-induced thrombocytopenia was used. Tail bleeding times of normal (platelet count, $8.1 \pm 0.8 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$) and thrombocytopenic rats ($1.9 \pm 0.2 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$) at 5 min after intravenous infusion of saline were 178 ± 56 and 682 ± 198 s ($n = 6$), respectively (Fig. 4A). Bleeding times of thrombocytopenic rats after H12-liposome infusion at doses of 10 and 40 mg kg^{-1} were 573 ± 127 and 335 ± 96 s ($n = 8$), respectively, confirming our previous finding of dose-dependent hemostatic effects of H12-liposomes in a rat model [11]. Infusion of H12-(ADP)-liposomes at 1 mg kg^{-1} slightly reduced bleeding time to 543 ± 134 s ($n = 10$). Increasing doses of 4 and 10 mg kg^{-1} resulted in dose-dependent reductions in bleeding time with 521 ± 88 and 349 ± 49 s ($n = 10$), respectively. In contrast, bleeding times of (ADP)-liposome groups at doses of 1, 4 and 10 mg kg^{-1} were 606 ± 135 , 610 ± 115 and 642 ± 195 s ($n = 10$), respectively, comparable to results in saline groups. The shortening of bleeding times by H12-(ADP)-liposomes at a dose of 10 mg kg^{-1} nearly corresponded to that by H12-

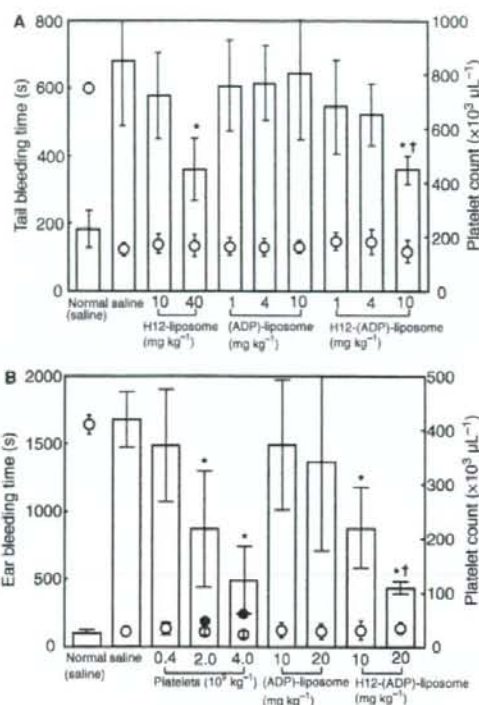


Fig. 4. Hemostatic effects of H12-(ADP)-liposomes on bleeding time in thrombocytopenic animal models. (A) Effects of administration of H12-(ADP)-liposomes on rat tail bleeding time (white column). (○) Platelet count in rats ($n = 6-10$). * $P < 0.05$ for H12-(ADP)-liposome or H12-liposome group vs. saline group. † $P < 0.05$ for H12-(ADP)-liposome vs. (ADP)-liposome group. (B) Effects of administration of platelet concentrates and H12-(ADP)-liposomes on rabbit ear bleeding time (white column). (○) Platelet count in rabbits; (●) platelet count 30 min after administration of platelet concentrate ($n = 5-7$). * $P < 0.05$ vs. saline group. † $P < 0.05$ vs. (ADP)-liposome group.

liposomes at a dose of 40 mg kg^{-1} . These results indicate that ADP encapsulation into H12-liposomes successfully augments hemostatic effects in the thrombocytopenic rat model.

Hemostatic effects of H12-(ADP)-liposomes on bleeding time in thrombocytopenic rabbits: comparison with platelet products

Severely thrombocytopenic rabbits were used to compare the hemostatic effects of H12-(ADP)-liposomes with platelet products. Ear bleeding times of normal (platelet count, $3.7 \pm 0.8 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$, $n = 6$) and thrombocytopenic rabbits ($2.4 \pm 1.3 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$, $n = 5$) 30 min after saline infusion were 112 ± 24 and 1695 ± 197 s, respectively (Fig. 4B). When PRP from donor rabbits containing total platelet counts of 0.4×10^9 , 2.0×10^9 and $4.0 \times 10^9 \text{ kg}^{-1}$ (corresponding to 1.0×10^5 , 5.0×10^5 and $1.0 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ at a dose of 4 mL kg^{-1} , respectively) were transfused into thrombocytopenic

nic rabbits ($2.1 \pm 0.5 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$, $n = 7$), platelet counts gradually increased with time, reaching a maximum at 30 min after transfusion of $2.2 \pm 1.1 \times 10^4$, $4.0 \pm 1.1 \times 10^4$ and $6.1 \pm 0.8 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$, respectively. At doses of 0.4×10^9 , 2.0×10^9 and $4.0 \times 10^9 \text{ kg}^{-1}$, dose-dependent reductions in bleeding time of 1505 ± 410 , 867 ± 440 and 505 ± 257 s, respectively, were seen (Fig. 4B, $n = 7$). We also confirmed that bleeding time 30 min after PPP transfusion was 1473 ± 442 s (not shown, $n = 7$), almost comparable to that obtained with thrombocytopenic rabbits infused with saline (1695 ± 197 s, $n = 7$).

Recovery rates of H12-(ADP)-liposomes 30 min after infusion into normal rabbits was estimated to be $28 \pm 7\%$ ($n = 3$) and $T_{\beta 1/2}$ was 522 ± 30 min ($n = 3$) (not shown). Indeed, when H12-(ADP)-liposomes at doses of 10 and 20 mg kg^{-1} were infused into thrombocytopenic rabbits, a dose-dependent reduction in bleeding time was identified (Fig. 4B), with bleeding times significantly reduced to 881 ± 303 and 428 ± 44 s, respectively ($n = 6$). In contrast, bleeding times of (ADP)-liposome groups at doses of 10 and 20 mg kg^{-1} were 1429 ± 643 and 1375 ± 663 s, respectively ($n = 6$). These results strongly indicate that H12-(ADP)-liposomes exhibit *in vivo* hemostatic ability as efficient as platelet transfusion.

Changes in coagulation and platelet activation parameters after H12-(ADP)-liposome infusion

Blood coagulation parameters (PT, APTT and fibrinogen antigen levels) in thrombocytopenic rat and rabbit plasma at approximately 60 min after measurement of bleeding time were measured. No significant differences among groups were noted with saline, (ADP)- and H12-(ADP)-liposomes, suggesting that *in vivo* perturbation of coagulation pathway by these liposomes was unlikely (Table S2).

Next, we studied whether H12-(ADP)-liposomes infusion caused platelet activation in circulation (Table 1, Supporting information). When H12-(ADP)-liposomes were infused, platelets obtained at 10- to 60-min intervals showed minimal P-selectin expression that was just comparable to values obtained with saline infusion. Of note, infusion of 1 mmol L^{-1} of ADP solution also failed to activate circulating platelets.

Furthermore, platelet counts were unchanged after infusion of H12-(ADP)-liposomes and ADP solution.

These results indicate that our H12-(ADP)-liposomes may be safe as a prototype platelet substitute that exerts platelet aggregation-augmenting effects at sites of bleeding but not in circulation.

Discussion

This communication reported a novel synthetic product composed of lipid nanovesicles (H12-(ADP)-liposomes) designed for targeting activated platelets at sites of vascular injury to help reinforce primary hemostasis by residual platelets in thrombocytopenia.

A notable observation was that H12-mediated interaction of liposome with activated platelets induces release of aqueous contents (CF dye) from the liposome in an aggregation-dependent manner (Fig. 2B). ADP is a weak agonist, but synergizes the effects of other aggregating agents even at suboptimal concentrations [13]. ADP also stabilizes aggregates formed by strong agonists such as thrombin [14]. In fact, by ADP encapsulation, H12-liposome could gain function to further augment platelet aggregation response triggered by a suboptimal concentration ($0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$) of collagen (Fig. 1A). As the extent of aggregation response to low-dose collagen depends upon costimulation with agonists such as ADP released from secretory granules, aggregation response enhancement is probably attributable to ADP released from liposomes. The mechanism of aggregation-dependent ADP release from H12 liposome is currently unknown. A previous study with a different preparation of H12-coated liposomes showed that an encapsulated substance was released upon interaction with platelets activated on the collagen surface, and content release was dependent on ligand (H12) density and inhibited by either anti-H12 or anti-GPIIb/IIIa antibody [15]. The phenomenon can thus be postulated to possibly represent the result of liposome membrane perturbation or mixing rendered by physical force due to multivalent ligand-receptor coupling with activated platelets.

Our working hypothesis in developing an efficient platelet substitute was that H12-coated liposome is specifically and

Table 1 Flow cytometric analyses of P-selectin expression before and after infusion of H12-(ADP)-liposomes into rabbits

Time after infusion (min)	0	10	20	60
Platelet counts ($\times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$)				
Saline	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.5	3.4 ± 0.3	3.4 ± 0.2
H12-(ADP)-liposome	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.5	3.4 ± 0.4
ADP solution (1 mmol L^{-1})	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.3
P-selectin expression (%)				
Saline	0.62 ± 0.10	0.59 ± 0.17	0.60 ± 0.07	0.58 ± 0.12
H12-(ADP)-liposome	0.56 ± 0.20	0.60 ± 0.19	0.58 ± 0.10	0.60 ± 0.16
ADP solution (1 mmol L^{-1})	0.55 ± 0.24	0.58 ± 0.07	0.56 ± 0.14	0.60 ± 0.10
Positive control	26.6 ± 8.2			

Positive controls showed P-selectin expression of platelet-rich plasma by stimulation with $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ADP. Data are the mean \pm SD of three independent experiments.