

200808008B

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18～20年度 総合研究報告書

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18～20年度  
総合研究報告書

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 18 ～ 20 年度総合研究報告

## I. 総合研究報告書

## ・総括研究報告書

半田 誠	-----	1
参考資料	-----	21

## ・分担研究報告

1. H12- (ADP) 小胞体の止血能評価とその血中動態、臓器分布		
池田 康夫	-----	33
2. 血小板減少モデルウサギを用いた止血能評価系の確立と H12- (ADP) 小胞体の膜物性と ADP 放出特性の相関		
武岡 真司	-----	52
3. 人工血小板の微小循環動態解析と安全性評価		
梶村 真弓	-----	73
4. H12 結合微粒子の <i>in vitro</i> 流動条件下における止血・血栓能の評価		
後藤 信哉	-----	86
5. H12- (ADP) 小胞体の安全性評価		
村田 満	-----	92
6. <H12 結合微粒子の止血メカニズム>H12-リボソームの凝集促進作用に関する形態学的検討		
鈴木 英紀	-----	101
7. aIIbb3 インテグリン活性化機構の解明に関する研究- aIIbb3 インテグリンと H12 担持人工粒子の結合解析-		
鎌田 徹治	-----	109

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

## III. 研究成果の刊行物・別冊

## I . 総合研究報告

## 総括研究報告

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  
平成18～平成20年度 総合研究報告書

主任研究者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

**研究要旨**

**【目的】**人工血小板/血小板代替物の候補微粒子として絞り込まれたH12(ADP)小胞体(フィブリノーゲンの $\gamma$ 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)について、*in vivo*実験系を中心に、その機能と安全性を検討した。

**【方法と結果】**H12結合ナノ微粒子(アルブミン重合体、リポソーム:粒径 $250 \pm 80$  nm)を検討し、以下の知見を得て、生理的な血小板刺激物質のADPを内包化したH12(ADP)小胞体を、人工血小板の最終候補として絞り込んだ。1)血小板凝集計などの*in vitro*解析、プスルファン惹起血小板減少症動物モデル(ラット、ウサギ)での*in vivo*解析により、小胞体は、血小板凝集依存性にADPを放出することで、血小板輸血に匹敵する止血機能(出血時間の短縮、出血量の軽減)を発揮した。2)静注された小胞体は、流血中の血小板を活性化することなく、CTスキャン解析(ラット)で、出血部位に特異的に集積した。3)RI標識小胞体の体内動態解析(ラット)で、小胞体は有効な血中濃度を数時間維持し、脾臓や肝臓で異化された。至適投与量での網内系(ラット)の酸化ストレス負荷は些少でかつ一過性であった。4)超微細形態的観察、発現細胞を使用した分子結合解析、*in vitro*、*in vivo*(ラット)流動系での画像解析等での基礎的検討結果は、いずれも小胞体の活性化血小板特異性を支持した。5)小胞体のADP放出能やADP内包安定性は、小胞体膜の物性(流動性、被覆層数)に依存し、機能至適化が現行試験物で十分達成されてい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(血小板に匹敵する止血機能を有し、流血中で血栓を起こさずに、保存期間が長くかつ厳密な保存条件を要せずに、血液適合性に優れて、有効な血中濃度を長く維持できる)を十分満たす可能性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継続的に行い、人工血小板の実用化を目指してゆく。

## A. 研究目的

本研究（3カ年）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 結合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* 評価を中心に検討することで、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。

周知の如く、血小板輸血は、癌などの化学療法、外科手術や移植の支持療法として不可欠で、輸血用血液製剤の約半分(単位)を占めるが、厳密な保存条件を要し、なおかつその短い期限(4日間)により、緊急時の対応は極めて困難な性質を有することから、予測しない事態により潜在的な供給不足が一気に顕在化する恐れもある。更には、細菌感染症などの輸血副作用発現の危険性がとくに高く、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世紀医療において当然目指すべき方向である。実際、安全な血液製剤の安定供給確保のため災害等の緊急時の使用を可能とする人工血液の開発は官民学が取り組むべき重要な課題として H15 年施行の血液法の基本方針の中で謳われている。

人工血小板／血小板代替物の開発は、すでに欧米で 50 年以上の歴史があり、期限切れ製剤を有効利用した血小板由来産物やヒトフィブリノゲンを表面固定したアルブミン微粒子から成る人工血小板を対象としてきた。しかし、前臨床を経て実際にヒトへの臨床試験まで行き着いたものは数少なく、しかも未だにどれも実用化に至っていない。また、そのほとんどがベンチャー企業主導のもとに開発されたもので、そのデータの詳細はほとんど公表されていない。例えば、1999 年に報告された Synthocyte™ は、前臨床データで強力な止血機能を発現する粒径約 2-3 $\mu\text{m}$  のアルブミン・マイクロカプセルであるが、おそらく有効な血中濃度を保てないために、初期臨床試験は中断されたとみられている (Blajchman MA: *J Thromb Haemost* 1:1637, 2003, Levi M, et al: *Nat Med* 5:107, 1999)。現在、臨床試験（フェーズ I-III）に供されているとみられる試験物は、凍結乾燥ヒト血小板 (Stasix™) と粒径 1 $\mu\text{m}$  のアルブミン・マイクロスフェア (Simplat™) である。しかしこれらの製造物はおそらく血中半減期が極めて短く、急性の出血治療への適応が期待されるのみで、血小板輸血の代替として十分とはいえない。

一方、我が国では、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が開始され、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が着想・開発されてきた。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リ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 $\alpha$ 、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）が選択された。

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g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、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について、in vivo評価を中心として、総合的な検討を行った。そして、平成19年度から、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について検討を加えた。



## B. 研究方法

1. **H12 結合人工微粒子の調整**: H12-polyAlb (粒径  $250 \pm 80$  nm) は、リコンビナントヒト血清アルブミンを熱/アルカリ処理することで得た粒径約 250 ~1000 nm 程度の polyAlb に、ポリエチレングリコールの表面処理と H12 ペプチドの付加を加えて無菌的に作成した。H12 (ADP) 小胞体 (粒径  $250 \pm 80$  nm) は、凍結乾燥させた H12 小胞体を 1 mM の ADP 水溶液にて水和させ、押出造粒法を用いて調製した。

血中濃度測定のための標識は蛍光分子の Dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate ( $\text{DiOC}_8$ ) を用い、血管傷害部位への特異的集積性の検討には水溶性造影剤の iopamidol (IOP) を内包化して用いた。また、体内動態の解析には、放射性同位元素 (RI,  $[8\text{-}^{14}\text{C}]\text{ADP}$ ,  $[1, 2\text{-}^3\text{H}]\text{cholesterol}$ ) 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。RI 標識 ADP は H12 (ADP) 小胞体からの ADP 放出の解析にも使用した。

また、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 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 ( $4^\circ\text{C}$ 、室温、 $60^\circ\text{C}$ ) を変えることで達成した。

2. **血小板減少動物モデルの確立**: プスルファン投与により作成された血小板減少動物モデルを確立して、静脈内に投与した人工微粒子の出血時間への影響について検討した。ラットモデルでは、プスルファン投与後 10 日目の Wister 系雄性ラットを用い、尾切法により、ウサギモデルでは、薬剤投与後 15 日目のニュージーランドホワイトウサギを用い、耳切法により、それぞれ、出血時間を測定した。急性出血モデルとして、ウサギの腹部手術モデルを確立した。すなわち、プサルファン惹起血小板減少動物の前腹壁にメスで一定の切傷をつけ、ガーゼで吸収された血液の重量を測定し、出血量を算出した。また、血小板濃厚液をウサギ全血より遠心法にて作成し、それを投与すること (血小板輸血) で、人工微粒子の陽性対照とした。

4. **小胞体体内集積性の検討**: 造影剤 (IOP) 標識小胞体を健常ラットの尾静脈に投与し、5 分経過後、尾先端から 1 cm の部位にメスで一定の切傷を作成し、止血するまで尾先端を生理食塩水中に浸した。犠牲死させた後、小動物用 CT スキャンシステム (eXplore Locus™) にて、尾の止血局所や臓器などへの体内分布

を観察した。詳細な体内動態（血中濃度パラメータや臓器分布）の解析は、RI 標識 H12-(ADP)小胞体を健常ラットの尾静脈に投与し、経時的に採血した検体や臓器などの RI 活性を測定して求めた

**5. 体内循環における動態観察:** レーザーアブレーションによりラット腸間膜の微小血管に破綻性出血を作製し、障害部位で形成される血小板血栓周辺での標識された血小板や人工微粒子の挙動を生体顕微鏡下にリアルタイムで撮像し、imaging 技術による評価システムを用いて解析した。

**6. 網内系負荷の解析:** 小胞体をラット尾静脈に投与して、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、ウェ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解析した。

**7. その他の *in vitro*/*ex vivo* 実験:** ①血小板凝集計やフローサイトメトリーによる非流動条件下での血小板凝集、②フローチェンバーや全血血小板機能測定装置 PFA-100 を用いた動脈系流動条件下血小板血栓（病的動脈血栓）形成、③生化学的検査、凝固学的検査測定値への影響の検討や、④人工微粒子と凝集血小板の相互作用の電子顕微鏡を使った超微形態学的解析を行った。また、⑤新規人工血小板開発に資するために、CHO 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 ( $\alpha$  IIb  $\beta$  3 インテグリン:  $\alpha$  IIb  $\beta$  3) と小胞体の結合動態の構造分子学的な解析、を行った。

#### (倫理面での配慮)

*in vitro* 実験用血液の採血は、健常人ボランティアからの十分なインフォームドコンセントのもと行った。また、実験動物を使用した *in vivo* 解析は、施設内の実験動物に関する取扱規程の遵守のもと行った。

## C. 研究結果及び考察

### 1. H12(ADP)小胞体の止血機能 (池田、武岡)

#### 1) H12(ADP)小胞体への絞り込み：

H12 結合微粒子 (H12-polyAlb と H12 小胞体) はともに、その表面の H12 を介して、活性化した血小板上のフィブリノーゲン受容体 ( $\alpha$  IIb  $\beta$  3) と多点結合して、*in vitro* でアゴニスト惹起血小板凝集を増強し、*in vivo* で血小板減少ラットの出血時間 (延長した) を短縮する効果が、平成 17 年度までの研究で証明されていた。しかし、H12-polyAlb に比して、H12 小胞体の出血時間短縮効果は弱かった。

そこで、血小板の  $\alpha$  顆粒に含まれ、活性化に伴い細胞外へ放出され、血小板の活性化を増強させる生理活性物質の ADP を内包化した H12(ADP)小胞体を作成した。H12(ADP)小胞体の基礎的検討によって、ADP の内包化は安定し、血小板凝集に伴って小胞体より放出され、アゴニスト惹起血小板凝集を増強することが明らかとなった (池田、図 6)。さらに、H12 小胞体に比して、ADP 放出機能により H12(ADP)小胞体は、より効果的 (1/4 の投与量で同等の効果：40mg/kg vs 10mg/kg) に血小板減少ラットの延長した出血時間を短縮した (池田、図 7)。H18 に、ラットと同様にブスルファン投与で惹起される血小板減少症ウサギを新たに確立し、ウサギの血小板を使用した血小板輸血モデルを作成した。(武岡、図 3、4、5)。血小板減少症ウサギでの比較で、80mg/kg 投与量での H12-polyAlb の出血時間短縮効果は投与量を 120mg/kg に上げるとむしろ減弱した (武岡、図 7)。一方、H12(ADP)小胞体では、用量依存性に短縮効果は増加し、その効果は血小板輸血に匹敵するほど (20mg/kg の小胞体と  $4.0 \times 10^9$  個/kg の血小板輸血) 有効であった (池田、図 9)。以上の検討から、H12(ADP)小胞体に絞って、以後の解析を行った。

#### 2) H12(ADP)小胞体の血中濃度と止血機能：

蛍光 (DiOC<sub>18</sub>) 標識した H12-(ADP)小胞体 (40mg/kg) の血中濃度の推移と出血時間短縮効果を検討し、血中半減期 ( $T_{\beta 1/2}$ ) は  $522 \pm 30$  分 (平均  $\pm$  SD) で、血中濃度を約 100  $\mu$ g/mL 以上 (投与後 6 時間まで) に保てば有意な止血機能が維持できると算出された (池田、図 11、12)。

血小板輸血の目的は出血の予防と治療である。小胞体の出血時間短縮効果は前者の適応に合致する。後者のモデルとして、血小板減少ウサギの腹部につけ

た切創からの出血量の軽減効果（ウサギ腹部手術モデル）を確立した（池田、図 2）。実際、H12(ADP)小胞体の止血効果を血小板輸血と比較したところ、その効果は出血時間に対してより弱かった（20mg/kg の小胞体では効果がなく、40mg/kg では  $2.0 \times 10^9$  個/kg の血小板輸血に匹敵する効果しかなかった）（池田、図 13）。

## 2. H12(ADP)小胞体の安全性（池田、武岡、梶村、後藤、村田）

### 1) 向血栓性：

今までの検討から、投与後の血小板、凝固・線溶系マーカーの変動はなく、被験動物（ラット、ウサギ）で急性の死亡例は全くみられなかった（村田、表 3、4）。安全性への最大の危惧は、H12(ADP)小胞体が止血部位ばかりでなく、体循環の中で非特異的に循環血小板を活性化したり、あるいはある種の病態で循環する活性化血小板と相互反応することで、血栓傾向を惹起させないかということである。ラットとウサギでの単回投与実験では急性毒性を示唆する観察は一切なかった。実際、20 mg/kg の至適用量の H12(ADP)小胞体を健常ウサギに投与しても、流血中に活性化血小板（P-セレクチンの表出をフローサイトメトリーで測定）は検出されなかった（村田、図 1）。フローチェンバーを使用した高圧り応力下流動系でのコラーゲン表面への血小板血栓の形成は、動脈系の病的血栓の *in vitro* モデルである。実際、H12(ADP)小胞体は 3 次元方向への血栓形成を増強する効果は観察されなかった（後藤、図 3）。

### 2) 出血部位集積性：

造影剤（IOP）を内包化した H12(IOP)小胞体は、健常ラットに投与後、尾静脈に沿って作成した切創部位や頸静脈の塩化鉄傷害血栓に特異的に集積することが、CT スキャンの解析で明らかとなった（武岡、図 12、15）。また、ラット腸間膜細静脈のレーザーアブレーション部位で、蛍光標識微粒子と血小板が密に結合することが観察され、活性化血小板を標的とした H12 微粒子の出血局所（血管傷害部位）集積性を支持する知見であった（梶村、図 1）。

以上のことから、H12(ADP)小胞体が、流血中ではなく止血部位に特異的に集積して、止血効果を発揮することが強く示唆された。

### 3) 網内系負荷：

H12(ADP)小胞体（40mg/kg）の投与刺激による酸化ストレスマーカーHO-1 の、ラット網内系臓器での発現は、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、図 5、6）。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 (梶村、図 8)。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 (梶村、図 11、12、13)。以上から、H12(ADP)小胞体による網内系への一過性の負荷 (リン脂質小胞体自体の異化) が分子レベルで証明された。

### 3. H12(ADP)小胞体の体内動態 (池田)

RI 二重標識 H12 (ADP)小胞体 ( $^3\text{H}$ : 小胞体膜)、 $^{14}\text{C}$ : 内包化 ADP) 投与 6 時間までは、小胞体と内水相の ADP とほぼ同様の 2 相性の血中濃度推移を示し、その後両者の乖離が徐々に見られた ( $T_{\alpha 1/2}$ ;  $^3\text{H}$ : 1.8 hr,  $^{14}\text{C}$ : 2.2 hr,  $T_{\beta 1/2}$ ;  $^3\text{H}$ : 30.1 hr,  $^{14}\text{C}$ : 12.4 hr)。その挙動は H12 の有無に関わらず血中濃度推移は同等であった (図 16、17、表 1)。H12 (ADP)小胞体は主に脾臓に集積した。また、H12 の有無に関わらず集積性の相違は認められなかった (図 18、19、20)。得られた薬物動態パラメータから、止血効果を発現する投与量(40mg/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された。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 (図 21、22)。

以上のことから、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。

### 4. 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わりなかった (武岡、図 17)。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に比較して弱かった (武岡、図 18)。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、図 11、12)。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) (武岡、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 (武岡、図 5)。ADP 未内包 H12 小胞体と比較して、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 (武岡、図 20)。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 (ADP 放出能) 最適化がなされている**ことが、改めて証明された。

#### 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 (図 2、3、表 3、4、5)。

#### 6. H12 (ADP) 小胞体と $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンの結合動態の解析 (鎌田)

$\alpha$  IIb  $\beta$  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、血小板活性化に伴い複合体分子の細胞膜近傍の細胞外部分の  $\alpha$  /  $\beta$  tail の解離と  $\beta$  head /  $\beta$  tail の解離によって連続的あるいは相乗的に活性型へ変換することが明らかにした。(鎌田、図 8、9、10)。そして、フィブリノーゲンは活性化した  $\alpha$  IIb  $\beta$  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  $\alpha$  IIb  $\beta$  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  $\alpha$  IIb  $\beta$  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  $\alpha$  IIb  $\beta$  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 14、15)、LIBS への構造変化も誘導しなかった (図 16)。H12 (ADP) 小胞体の結合はフィブリノーゲン

と競合するが、生理的血中濃度のフィブリノーゲン存在下でも活性化 $\alpha$ IIb $\beta$ 3インテグリンと十分に結合しうる(図12)。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で、その止血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  $\gamma$ -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.* **73**,540-548(2009).

(5) Okamura, Y., Fujie, T., Nogawa, M., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -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),2895-2908, (2008).

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

(10) Goto S. Are Japanese patients more prone to gastro-duodenal mucosal injury and bleeding with the use of antiplatelet agents? *Thromb Res.* **120**(4),463-464(2007).

(11) Chung, J., Suzuki, H., Tabuchi, N., Sato, K., Shibamiya, A., Koyama, T.: Identification of tissue factor and platelet-derived particles on leukocytes during cardiopulmonary bypass by flow cytometry and immunoelectron microscopy. *Thromb. Haemost.* **98**,368-374( 2007).

(12) Kozuma, Y., Kojima, H., Yuki, S., Suzuki, H., Nagasawa, T.: Continuous expression of Bcl-xL protein during megakaryopoiesis is post-translationally regulated by thrombopoietin-mediated Akt activation, which prevents the cleavage of Bcl-xL. *J. Thromb. Haemost.* **5**,1274-1282( 2007).

(13) Okamura, Y., Fujie, T., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified



- polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. *Transfusion* **47**, 1254-1262 (2007).
- (14) Fujie, T., Okamura, Y., and Takeoka, S. Ubiquitous transference of free-standing polysaccharide nanosheet in the development of a nano-adhesive plaster. *Adv. Mater.* **19**, 3549-3553 (2007).
- (15) Okamura, Y., Handa, H., Suzuki, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. New strategy of platelet substitutes for enhancing platelet aggregation at high shear rates; cooperative effects of a mixed system of fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide- or glycoprotein Ib $\alpha$ -conjugated latex beads under flow conditions *J. Artif. Organs* **9**, 251-258 (2006).
- (16) Nakajima H, Watanabe N, Shibata F, Kitamura T, Ikeda Y, Handa M : N-terminal region of CCAAT/ enhancer binding protein epsilon is critical for cell cycle arrest, apoptosis and functional maturation during myeloid differentiation. *J Biol. Chem.* **281(20)**,14494-14502, (2006).
- (17) Jung SM, Ohnuma M, Watanabe N, Sonoda M, Handa M, Moroi M: Analyzing the mechanism of Rap1 activation in platelets: Rap1 activation is related to the release reaction mediated through the collagen receptor GPVI. *Thromb Res.* **118(4)**,509-21 (2006).
- (18) 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.
- (19) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Specific accumulation of iopamidol-encapsulated phospholipid vesicles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide to vascular injury using computed tomography. *Nanomedicine* (2009), submitted.
- (20) Okamura, Y., Fukui, Y., Suzuki, H., Kabata, K., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Disk-shaped biodegradable nanosheets carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide and their enhanced effects of platelet aggregation as a novel platelet substitute. *Bioconjugate Chem.* (2009), to be submitted.
- (21) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Controlled Release of adenosine diphosphate encapsulated liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide in platelet aggregation- dependent manner. *J. Controlled Release* (2009), to be submitted.
- (22) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S.

Biodistribution of fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes. *Nanomedicine* (2009), *to be submitted*.

(23) Okamura, Y., Fujie, T., Nogawa, M., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits. *Transf. Med.* (2008), *in press*.

(24) 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 films. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2008), *in press*.

(25) 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.* (2008), *in press*.

(26) Okamura, Y., Eto, K., Maekawa, I., Fujie, T., Maruyama, H., Ikeda, Y., Takeoka, S., Handa, M. Development of H12 (fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide)-coated, ADP (adenosine 5'-diphosphate) -incorporated liposomes as a synthetic platelet substitute. , *in submission*.

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

(28) Origasa H, Goto S., Uchiyama S, Shimada K, Ikeda Y., and J-TRACE Investigators. The Japan Thrombosis Registry for Atrial fibrillation, Coronary or Cerebrovascular Events (J-TRACE): A nation-wide, prospective large cohort study; The study design. *Circulation Journal*, *in press*.

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

(30) Okamura, Y., Fujie, T., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen- $\gamma$  chain dodecapeptide. *Transfusion*, *in press*.

(31) Osaka M., Hagita S., Haraguchi M., Kajimura M., Suematsu M., and Yoshida M., Real time imaging of mechanically injured-femoral artery in mouse revealed a biphasic pattern of leukocyte accumulation. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, in press.

(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).

(3) 武岡 真司, 岡村 陽介, 「血液の仕組みと人工血液(血液代替物)へのアプローチ」 *化学と教育 ~ヘッドライン~* (2008).

(4) 岡村 陽介, 藤枝 俊宣, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司, 「血小板代替物の開発の現状」 *人工血液* **13** (4), 155-160 (2006).

(5) 武岡 真司, 岡村 陽介, 「血小板代替物の開発」 *月刊『BIO INDUSTRY』* **23** (7), 65-71 (2006).

(6) 武岡 真司, 岡村 陽介, 阿閉 友保, 「動く臓器としての血液に学ぶ -人工赤血球・人工血小板への挑戦-」 “ファイバー” スーパーバイオイミティクス ~近未来の新技术創成~, *Advanced Biomimetics series 2*, 453-457 (2006).

## 2. 学会発表

(1) Handa M., Okamura Y., Takeoka S., Ikeda, Y.: Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen g-chain dodecapeptide on the surface and adenosine 5'-diphosphate inside as a platelet substitute. 6th Current Issues on Blood Substitute Research (2008.11., Tokyo, Japan).

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

(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 (2008.7., Yokohama, Japan).

(4) Okamura, Y., Takeoka, S., Maekawa, I., Eto, K., Ikeda, Y., and Handa, M.

Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide on the surface and adenosine 5'-diphosphate inside as a platelet substitute. The 13th Meeting on Thrombosis and Rheology (2008.3., Tokyo, Japan).

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

(6) Morikawa T. Kajimura M., Ichikawa M., Hoshino R., Suematsu M. Distinct effects of cilostazol and aspirin on thromboembolic reaction and microvascular permeability. The 80<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (2007.12.12., Yokohama, Japan).

(7) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y.. Hemostatic effects of liposomes bearing fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide amplified by encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitutes. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (2007.10., Japan).

(8) Kajimura M. Ishikawa M., and Suematsu M. (Invited speaker) Interactions of multiple-gas transducing systems in the brain. The 8<sup>th</sup> World Congress for Microcirculation (2007.8.16., Milwaukee, USA).

(9) Fujie, T., Okamura, Y., Takeoka, S. Fabrication of free-standing polysaccharide nanosheet in application of "nano-adhesive plaster". 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes (MMC-12) (2007.8., Fukuoka, Japan).

(10) Takeoka, S., Fujie, T., Okamura, Y. Modification of free-standing polysaccharide nanosheets and their application on a nano-adhesive plaster. American Chemical Society 234<sup>th</sup> National Meeting & Exposition (2007.8., Boston, USA).

(11) Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Hemostatic effects of liposomes carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide and encapsulating adenosine 5'-diphosphate as a platelet substitute. American Chemical Society 234<sup>th</sup> National Meeting & Exposition (2007.8., Boston, USA).

(12) Fujie, T., Okamura, Y., Handa, H., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Prolonged hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen  $\gamma$ -chain dodecapeptide. The International Society of Thrombosis & Haemostasis XIIth Congress (2007.7., Geneva, Switzerland).

(13) Takeoka, S., Okamura, Y., Maekawa, I., Handa, H., and Ikeda, Y. Hemostatic