

観察された。また図 1 のパネル B,C,D の矢頭で示したように、血小板に粘着した後、血流によって血栓から乖離し下流に押し流される様子も観察された。このような血小板との相互作用は、fibrinogen γ 鎖 C 末端のアミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12) の代わりに cysteine を担持させたコントロール粒子である L-cys PEG-polyAlbumin では認められなかった (図 2)。

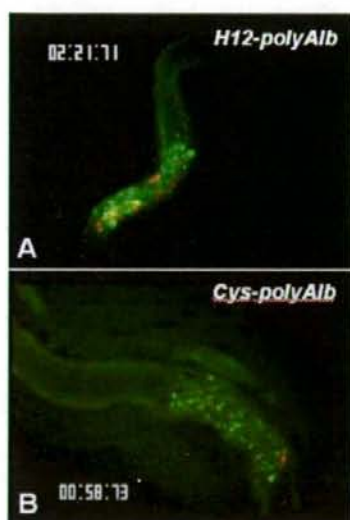


図 2. 血小板血栓近傍での H12-PEGpolyAlb 粒

図 3 には、shear rate が 1500 s^{-1} と高い時の本粒子の挙動をラットのネイティブの血小板のそれと比較して示した。ラットネイティブ血小板は、血栓表面の活性化血小板と“touch-and-go”を繰り返した。同様の挙動は、H12-PEGpolyAlb でも認められたことから、本粒子がネイティブ血小板と酷似した挙動をとりうることの証左を得た。

C-2. H12-PEG polyAlb と白血球の相互作用

平成 18 年度の研究により、H12-PEG

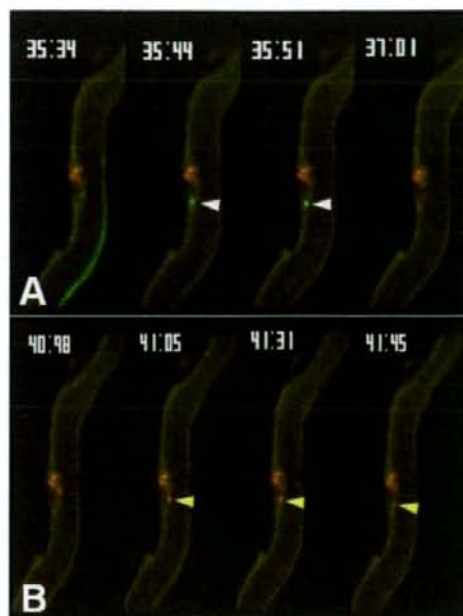


図 3. Laser ablation により形成された止血血栓と人工血小板粒子 H12-PEGpolyAlb との相互作用。Rat native 血小板(白矢頭)の挙動 (A)、人工血小板粒子(黄色矢頭)の挙動 (B)。

polyAlb は、炎症や障害のない正常微小循環においては、血小板、白血球、及び血管内皮細胞を不必要に活性化しないことを確認した。しかしながら、laser ablation 後の微小血管内の活性化したと思われる白血球に本粒子が接着して流れる様子が頻繁に観察された (図 4)。図 4A に示されるように、ネイティブ血小板でもこのような非特異的な接着が認

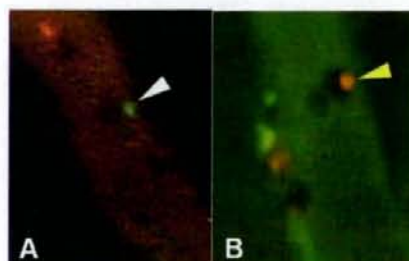


図 4. 白血球と人工血小板粒子 H12-PEG polyAlb との相互作用。Native rat 血小板(白矢頭)の挙動 (A)、人工血小板粒子(黄色矢頭)の挙動 (B)。

められた。

C-3. H12-(ADP) liposome 投与による Heme oxygenase 1 の発現変動

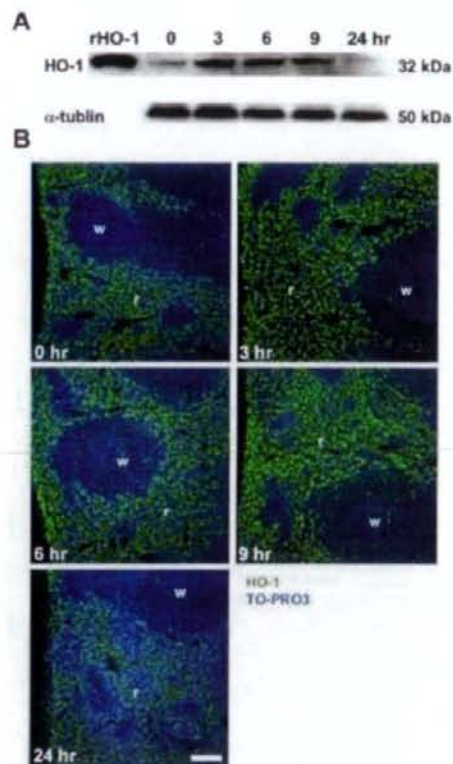


図 5. 脾臓における H12-(ADP)-liposome 投与による HO-1 発現レベルの経時的変化 (A), Western blot analysis (B) Immunohistochemistry. Scale bar: 100 μ m.

H12-(ADP)-liposome(40 mg/kg)投与後 3, 6, 9, 24 時間後の肝臓及び脾臓の HO-1 の発現レベルを western blot と免疫組織化学で解析した結果、図 5 に示すように、肝臓では顕著な HO-1 の upregulation は確認できなかった。脾臓においては、投与後 3 時間から HO-1 の発現量は上昇しはじめ、6 時間をピークとして 24 時間後には baseline level まで減少した。脾臓では、red pulp の macrophage に恒常的に HO-1 が発現している。今回の染色の結

果では、western blot で認められた、HO-1 の upregulation がどの細胞に特異的に惹起されたものかを検出することはできなかった。しかしながら、この結果をもとに、その後の実験の試料採取条件を 6 時間と 24 時間の 2 ポイントに絞った。

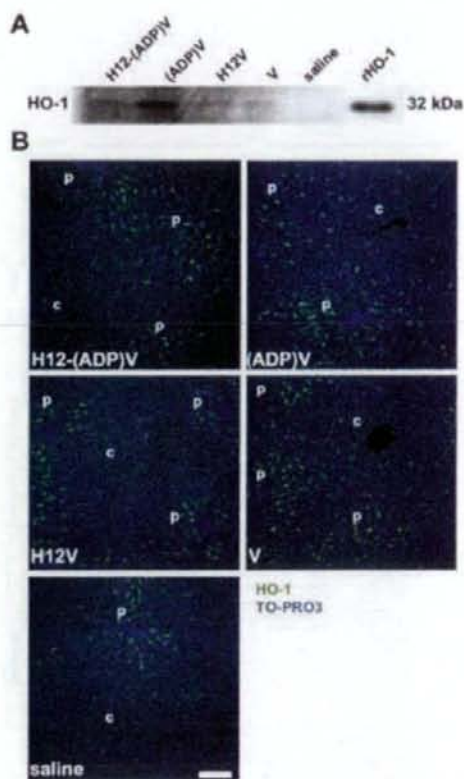


図 6. 肝臓における各 liposome 投与 6 時間後の HO-1 発現 Scale bar: 100 μ m.

次にこれらの HO-1 expression の upregulation が H12、内包された ADP、または liposome 自体のいずれに起因して誘導されたかを確認するため、H12-(ADP) liposome、(ADP) liposome、H12-liposome、liposome 単独および vehicle である saline を投与し、これら 5 群での比較検討を行った。肝臓 6 時間の試料では、saline 以外のすべての群に

においてHO1のupregulationが認められた(図6)。また脾臓6時間の試料では、saline投与群においてもHO1が検出された。肝臓脾臓の両組織のmacrophageにはHO1が恒常的に発現していることは免疫染色から明らかであるが、western blotでは必ずしも検出できなかった(図7A)。

脾臓でのHO1発現量はwestern blot densitometryの結果(n=3)、H12-(ADP) liposome、(ADP) liposome、H12-liposome、

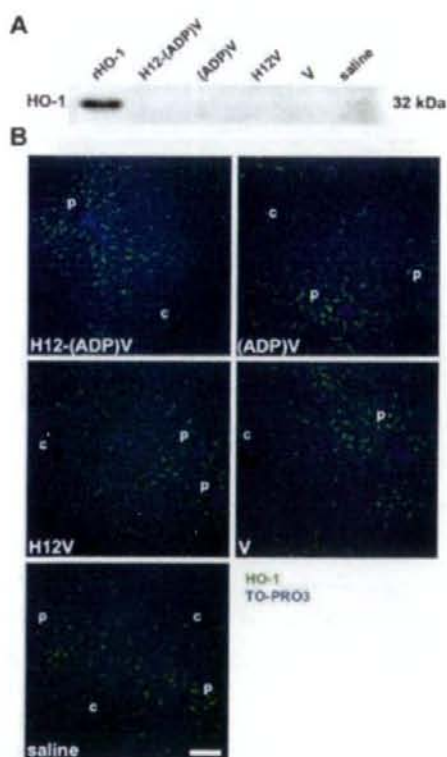


図7. 肝臓における各 liposome 投与 24 時間後の HO-1 発現 Scale bar: 100 μm。

liposome の 4 群間で統計学的有意差はなかったが、これら 4 群は vehicle 群に比べ有意な発現量の上昇が認められた(図8)。脾臓 24 時間の試料では、発現量は減少し、群間の差も消失した(図9)。

C-4. H12-(ADP) liposome 投与による血漿 GOT、GPT の変動

H12-(ADP)小胞体投与後の血漿 GOT と GPT 値は、vehicle 投与群と差が認められなかったことから、40 mg/kg という高濃度の投与でありながらも、肝機能マーカーに変化は及ぼさず、本粒子投与の安全性の証左となった(図7)。

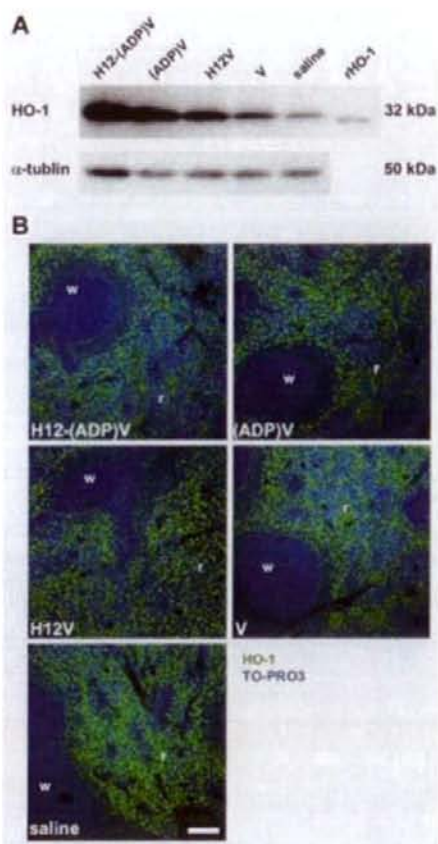


図8. 脾臓における各 liposome 投与 6 時間後の HO-1 発現 Scale bar: 100 μm。

C-5. H12-(ADP) liposome 投与による肝臓の代謝変動 -metabolome 解析-

前述した実験結果より、機能的変化のおこる time point と予想された投与 6 時間後の肝臓組織を用い、分子量 1,000 以下の生体構成成分の代謝変動を

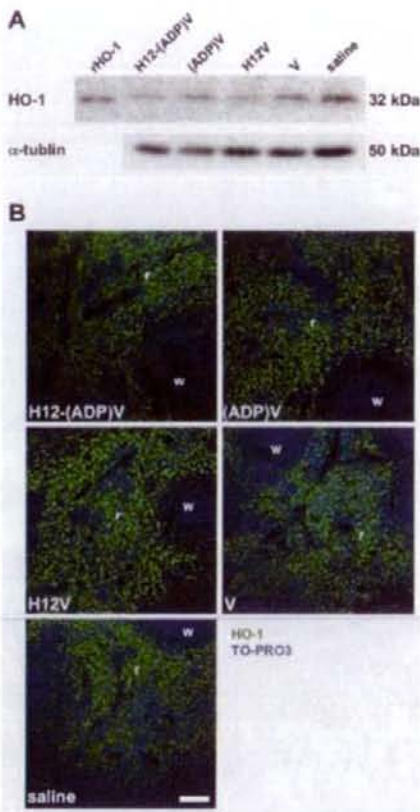


図9. 脾臓における各 liposome 投与 24 時間後の HO-1 発現。Scale bar: 100 μ m。

No apparent changes in plasma GOT and GPT

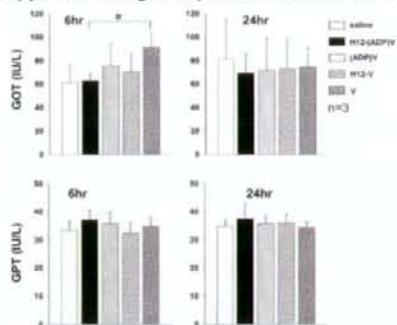


図10. 血漿 GOT、GPT の変化

capillary electrophoresis (CE)-MS によるメタボローム・質量分析技術を駆使して予備的な検討を試みた。対照群としては、vehicle 投与群を用いた(各群 n=2)。解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸経路の低分子代謝物の変動を図 11-13 に示した。H12-(ADP) liposome を負荷すると解糖系、ペントースリン酸経路の構成分子の多くが増加する傾向があることが明らかになった。今後、これらの代謝変動が H12、ADP、あるいは liposome の負荷のいずれに起因するものかを検討する必要がある。

Glycolysis

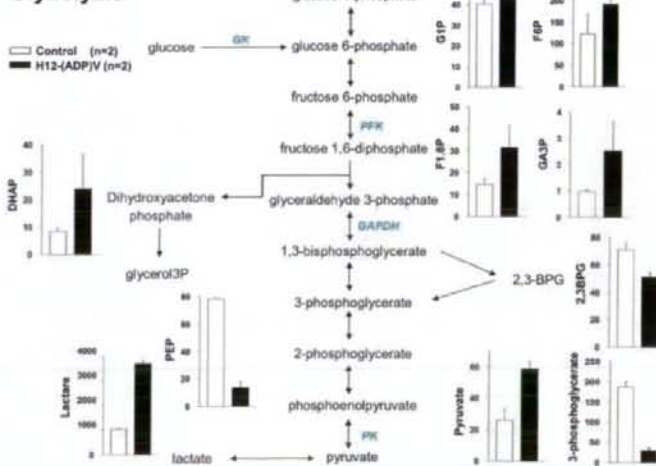


図11. 解糖系代謝物の変化

Pentose phosphate pathway

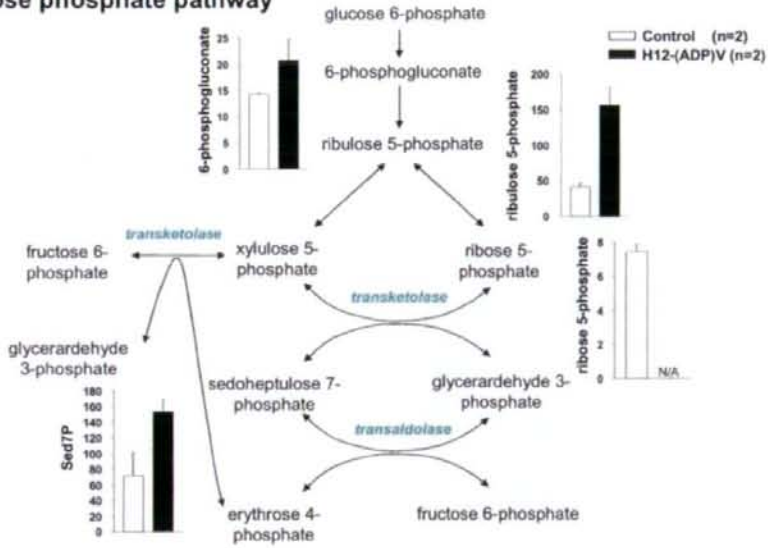


図 12. ペントースリン酸経路代謝物の変化

TCA cycle

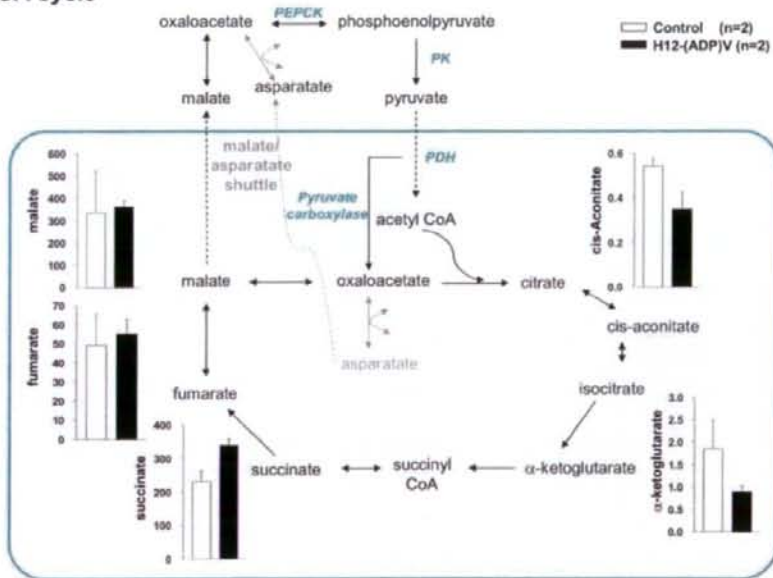


図 13. クエン酸回路代謝物の変化

D. 結論

H12-PEG polyAlb 粒子は、血小板膜上の活性化したインテグリン α IIb β 3のリガンドであるフィブリノーゲンのC末端アミノ酸配列に相当する合成ペプチドを担持した人工血小板粒子であるが、これまでこの粒子が微小循環内でどのような挙動をとるのか、また止血効果を発揮するメカニズムが活性化した血小板との相互作用に依存するか否かは不明であった。

これまでの実験で用いた H12-PEGpolyAlb 粒子径は 250 nm であったが、これを約 4 倍の 1 micron まで大きくしたことにより、この人工血小板粒子の可視化を容易にした。ただし、粒子径を増大させることによって血中半減期が著しく減少する *disadvantage* を補うため、予め血栓を作製しその微小循環床へ H12-PEGpolyAlb 粒子を短時間で導入すべく頸動脈経路で *small-train-bolus* を注入する手法を選択した。その結果、血小板血栓周辺での本粒子と CFSE 標識-血小板の相互作用をリアルタイムで捉えることに初めて成功した。コントロール粒子である *L-cys-PEGpolyAlb* の活性化血小板との相互作用はほとんど認められなかったのに対して、期待したように H12-PEGpolyAlb 粒子が活性化血小板と特異的に接着する様子が捉えられた。これらの成績は H12-PEGpolyAlb の投与がえないことを示す証左となった。

本研究班で作製した血小板代替物ナノ粒子である H12-PEGpolyAlb を、*in vivo* 微小循環実験モデルを用いその生体内挙動を評価した結果、本粒子が活性化した血小板を特異的に認識し接着能を有することの証左が得られた。

最終研究年度には、H12-(ADP)小胞体粒

子単回投与による網内系負荷による臓器の代謝変動を検討した。その結果、

① H12-(ADP) liposome の投与後 6 時間では、肝臓及び脾臓のの発現レベルの上昇が認められた。② この上昇は一過性で、24 時間までに *baseline* レベルまで減少した。また肝臓及び脾臓で認められた *heme oxygenase-1* の発現レベルの上昇は、ADP-liposome、H12-liposome、liposome 単独投与によっても惹起された。③ H12-ADP liposome 投与による plasma 中の *asparatate aminotransferase (GOT)* および *alanine aminotransferase (GPT)* の変動は認められなかったことから、今回の投与プロトコール下では肝機能は正常に保持されていることの証左となった。④ 質量分析技術(CE-MS)を用い、肝臓の低分子代謝物を測定したところ、H12-ADP liposome 投与により解糖系、ペントースリン酸経路の構成分子の多くが増加する傾向にあることが明らかになった。これらの代謝変動あるいは人工血小板粒子投与に起因する *metabolic adaptation* が惹起される機構に関して今後さらなる検討が必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

関連特許取得

なし

G. 研究発表

G-I. 論文発表

- 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, *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 292: H1876-1882, 2007.
 - 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.
 - 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 β -synthase as a CO-sensitive regulator of bile excretion, *Hepatology*, 49, 141-150, 2009.
 - 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)
- G-II. 邦文原著 著書
- 末松 誠、梶村 眞弓、足立 健。ヘムオキシゲナーゼ-CO系による血管機能制御機構とNOシステムとの相互作用 **細胞工学** 25 161-165, 2006.
 - 山本 雄広、高野 直治、梶村 眞弓、足立 健、末松 誠。一酸化炭素とシグナル伝達 吉川 敏一監修 **酸化ストレスの医学 診断と治療社** 131-137, 2008.
- G-III. 学会発表
- Sep 2006 The 24th European Microcirculation Society, Amsterdam, Netherlands. Kajimura M., Ishikawa M., Adachi T., Maruyama K., Goda N., and Suematsu M., Cross-interactions between CO and NO signaling in microvascular endothelium (invited speaker)
 - Aug 2007 The 8th World Congress for Microcirculation, Milwaukee, Wisconsin. Kajimura M., Interactions of multiple-gas transducing systems in the brain microcirculation (invited speaker)
 - Aug 2008 International Society on Oxygen Transport to Tissue, Sapporo, Japan. Kajimura M., Hattori K., Morikawa K., Ishikawa M., and Suematsu M., Regulation of vascular tone by gaseous mediators; Interactions of multiple gas-transducing systems utilizing molecular oxygen (invited speaker)
 - June 2006 The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, Japan. Kajimura M., Ishikawa M., Goda N., Suematsu M. CO is a tonic regulator against NO-dependent vasodilation in the rat cerebral circulation.
 - Aug 2007 The 8th World Congress for Microcirculation, Wisconsin, USA. Mandai S. Kajimura M., Morikawa T. Tsukada K., Mochizuki Y., Takeoka S., Nakajou K., and Suematsu M. Effects of polyethylene-glycol-modified human recombinant albumin on hemostasis.
 - Dec 2007 The 80th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama, Japan. Morikawa T. Kajimura M., Ichikawa M., Hoshino R., Suematsu M. Distinct effects of cilostazol and aspirin on thromboembolic reation and microvascular permeability.
 - Aug 2008 International Society on Oxygen Transport to Tissue, Sapporo, Japan. 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.

8. 平成 18 年 10 月 第 5 回日本コンピュータ外科学会教育講演、(東京)。梶村 眞弓、末松 誠。実証的データで強化された血小板接着シミュレーションによる抗血小板薬の差別化予測と実証。
9. 平成 19 年 2 月 第 32 回日本微小循環学会、(京都)。Takayuki Morikawa, Mayumi Kajimura, Mio Kimura, Ritsuko Hoshino, and Makoto Suematsu Differing effects of cilostazol and aspirin on thrombus formation and microvascular permeability.
10. 平成 19 年 7 月 第 32 回日本炎症再生学会、(東京)。森川 隆之、梶村 眞弓、木村 美緒、星野 利津子、末松 誠。止血血栓形成プロセス及び血管透過性に及ぼす cilostazol の効果- aspirin との比較 -。
11. 平成 20 年 6 月 第 31 回日本バイオレオロジー学会、(東京)。(シンポジスト) 梶村 眞弓、石川 眞実、末松 誠。低分子ガスを介した情報伝達系による脳微小循環機能制御機構。
12. 平成 21 年 2 月 第 34 回日本微小循環学会、(東京)。Takayuki Morikawa, Katsuji Hattori, Mayumi Kajimura, and Makoto Suematsu Carbon monoxide as a tonic modulator against hydrogen sulfide-dependent vasodilatation in the murine cerebellar microcirculation.

備考

本実験を施行するにあたっての 3 次元血栓撮像装置は、文部科学省 21 世紀リーディングプロジェクト生体・細胞機能シミュレーションプロジェクト「網羅的代謝計測技術に基づく細胞シミュレーションの構築とその応用並びに支援・基盤領域の研究開発」の助成金で導入したものである。本厚生科研費では血栓止血の定量的評価にこれを利用し、文部科学省 21 世紀リーディングプロジェクトでは血小板血栓止血シミュレーションの仮想実験の実証及び人工血小板粒子投与による代謝変動の解析評価に利用しており、双方の実験内容に重複がないことを記す。

厚生労働省科学研究費補助金

「政策創薬総合研究事業」

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

平成18-20年度分担研究報告書

H18 年度:「H12 結合微粒子の in vivo 流動条件下における止血、血栓能の評価」

H19 年度:「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」

H20 年度:「H12 結合リポソームによる止血増強効果と ADP」

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

《研究要旨》高齢化の進行とともに心筋梗塞、脳梗塞などの有病率の増加と、アスピリン、チエノピリジンなどの抗血小板薬の使用の拡大が起こっている。抗血小板薬の使用中の手術、頭蓋内出血などに対する局所的、一時的な止血機能の増強における人工血小板への期待が高まっている。過去の研究において止血機能の増強効果の確認された機能蛋白である H12 の担体として、アルブミン重合体とリポソームの得失を比較検討した。さらに、局所的な血栓性の亢進を図るためにリポソーム内に血小板活性化物質である ADP を導入し、血栓の形成される局所における急速な血栓性の亢進を目指した。H12 結合 ADP 放出リポソームの止血機能増強効果、血栓性亢進効果を、生理的血小板数の条件および人工的な血小板減少症の条件にて比較検討した。

A. 研究目的

人口の急速な高齢化の進む本邦では、心筋梗塞、脳梗塞に代表される、血管の動脈硬化性変化を基盤とした血栓性疾患であるアテローム血栓症の有病率が増加している(1)。アテローム血栓性疾患は、心臓、脳などの重要臓器を灌流する血管内の動脈硬化巣破綻部位への血

小板の集積により惹起されるので、動脈硬化巣の破綻が起こっても血小板の集積、活性化が起こらないように抗血小板薬による予防介入が本邦でも広く行われている(2)。抗血小板薬服用中の症例であつても手術時、頭蓋内出血に代表される重篤な出血性イベントの発症時には出血部位局所において急速に止血能を亢

進させる必要が生じる。そのような場合に人工血小板は極めて有用であろう。

われわれは前段階までの研究において、ヒト血小板膜糖蛋白、ないしその血漿リガンドを担体に結合させることにより止血機能を増強させ得ることを確認した。各種の機能蛋白の中でも、比較的容易に大量を産生できる H12 に着目して研究を行った。H12 を人工血小板として使用する場合、担体としてアルブミン重合体、リポソームいずれが好ましいのか？、さらにはリポソーム内に血小板活性化促進物質を注入し、血栓形成部位の局所においてこれらの物質を局所放出させるのがよいのか？、あるいはそのような機能は不要であるのかをヒト血液を用いた *in vitro* 血栓モデルを用いて検討した。

B. 研究方法。

健康成人より血液を採取し、選択的抗トロンビン薬であるアルガトロバンにより抗凝固処理を行った。倫理上の問題を惹起しないため、供血者からインフォームドコンセントを得た。

人工血小板の候補として、H12 結合アルブミン重合体、H12 結合リポソーム、さらには血小板活性物質である ADP を局所放出する能力を有する H12 結合リポソームを用いた。人工血小板を使用する場合の最大の臨床的合併症は、止血機能の過剰亢進による血栓性イベント発症リス

クの増加であるため、血小板数が生理的条件である場合の血栓性の亢進と血小板数の減少した条件における止血機能の増強効果を分けて評価した。止血、血栓機能の評価に当ってはコラーゲン、von Willebrand 因子 (VWF) などの内皮下血栓性マトリックスを固相化したガラス板上に血液を灌流し、マトリックス上に形成された血栓の評価を行った(3)。血小板の活性化動態の評価に当っては、予めヒト血小板を fluo-3 により蛍光標識し、血小板内のカルシウムイオン濃度を蛍光強度の変化により定量化する方法を用いた(4)。

本研究では、健康人より採取した血液サンプルを実験に利用する。倫理的問題を惹起させないために、採血対象者には、採血に伴う合併症の可能性を含めて、事前に十分な説明ののちインフォームドコンセントを取得した。本研究への参加を拒絶しても何らの不利益を被らないこと、一度、研究参加に同視しても、その後いつでも同意の取り消しが可能であること、なども含めて説明し倫理面に配慮した。

C. 研究結果

止血機能の増強を目指す人工血小板において最大の問題は血栓性合併症発症率の増加である。

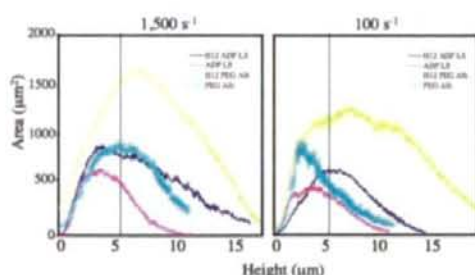


図 1. 各種リポソームの存在下にて、 1500 s^{-1} 6 分間の血液灌流によりコラーゲン上に形成された血栓のサイズ

そこで、心筋梗塞、脳梗塞などアテローム血栓症のモデルとなる血管内皮下マトリックス上への血小板の集積を動脈血流条件下にて評価する実験を行った。H12 のキャリアとしてアルブミン重合体を使用すると、血栓の血管内腔方向への成長の促進を認めた。リポソームでは、血栓の 3 次元的成長促進効果は少なかった。

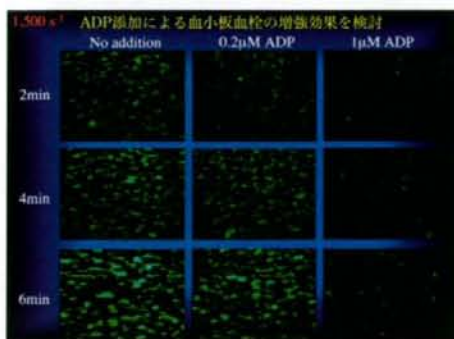


図 2. 外部から添加した ADP の血栓形成におよぼす効果

リポソームはアルブミン重合体に比較し

て血小板血栓の 3 次元的成長におよぼす効果は少なかった。一方、止血にかかわる血栓の 2 次元的広がりに対する促進効果も強くはなかった。そこで、リポソーム中に血小板活性化作用を有する ADP を含有させ、ADP を局所放出することにより人工血小板の効率化を目指した。血液全体に ADP を添加した時には血栓の成長は必ずしも促進されなかった。極小放出された ADP の作用を局所的に評価する必要が示唆された。

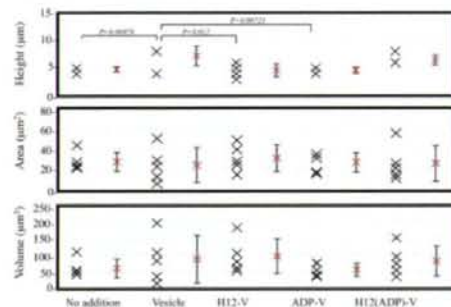


図 3. 各種リポソームの存在下にて、 1500 s^{-1} 6 分間の血液灌流によりコラーゲン上に形成された血栓のサイズ(血小板数を $2 \text{ 万} / \mu\text{l}$ に減少させた条件)

ADP を局所放出させる能力を有するリポソームであっても、血小板の減少した条件では血栓の成長におよぼす効果を確認できなかった(図 3)。一方、ヒト血小板にカルシウムイオン濃度感受性の蛍光色素 Fluo-3 を導入して血栓を形成する血小板内のカルシウムイオン濃度の変化を計測したところ、リポソーム近傍の血小板の活性化は局所放出された ADP よ

りむしろリポソームに結合したH12の存在の有無により大きな影響を受けた(図4)。

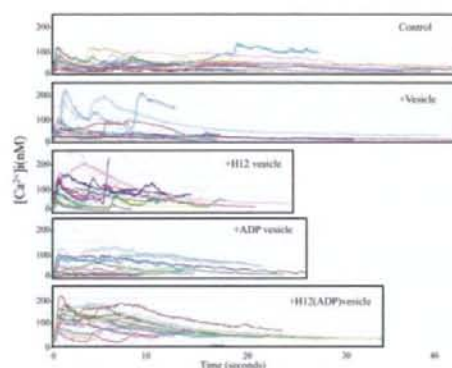


図4. 血栓を形成する血小板内のカルシウムイオン濃度変化におよぼすH12およびADPの関与の検討

D. 考察

止血機能の損なわれた症例における局所的な出血イベントに対する対応策として、ヒトに対して局所投与可能な人工血小板の開発を目指して研究を行った。過去の研究により減少した、ないし機能喪失した血小板の止血機能を助ける機能蛋白としてはフィブリノーゲンの血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受容体結合部位であるH12が好ましいことが示された。今回の研究では、H12の運搬体としてアルブミン重合体とリポソームの差異を検討した。アルブミン重合体は止血機能の指標となる血栓の2次元方向の進展を効率的に促進させたが、血管内腔方向に向かう血栓の3次元的成長促進効果も見られた。臨床現場では、心筋梗塞、脳梗塞などの血栓

性疾患の発症予防を目的として抗血小板療法を施行している症例の出血性合併症に対して人工血小板が使用される場合が多い。人工血小板の投与により心筋梗塞、脳梗塞の発症が増加すれば本末転倒となってしまう。その意味では、アルブミン重合体よりも、血栓の3次元的成長促進効果の少ないリポソームが好ましい。

リポソームの止血効果をより効率的にするために、リポソーム内にADPを含有させ、血小板血栓内にてリポソームからADPが局所放出されるシステムを作成した。このH12結合ADP含有リポソームを人工血小板として使用した場合には、血小板数2万/ μ l以下の条件では、H12結合ADP含有リポソームによるコラーゲン上の血小板血栓形成促進効果は認められなかった。血小板減少症例における一時的止血機能の増強にはH12結合ADP含有リポソームは有用である可能性が示唆された。

われわれは、血小板活性化過程における細胞内カルシウムイオン濃度の周期的変動は主にADP受容体P2Y₁₂の刺激により調節されていることを示した(4)。リポソームの、ヒト血小板活性化におよぼす効果もまたADP含有の有無により主に影響を受けると推論した。しかし、予想に反してADP含有リポソームの存在下でもカルシウムイオン濃度の周期的変動は大きく影響を受けることはなかった。むしろH12の有無がカルシウムイオン濃度の周期的

変動におよぼす効果が大きくなった。本実験は血小板数の少ない条件にて施行したため血小板数の多い条件での既報(4)との差異を呈したと想定された。H12 が周囲の血小板の持続的活性化を促すことにより血栓の安定性に寄与することは人工血小板としては有利な性質となり得ることが示唆された。

E. 結論

- 1) 止血機能を増強する機能蛋白である H12 を運搬する担体としてアルブミン重合体とリポソームを比較すると、血栓の3次元的成長促進効果が弱いとの点においてリポソームはアルブミン重合体に優った
- 2) 生理的な血小板数では H12 結合 ADP 含有リポソームには血栓の3次元的成長を促進させる効果を認めた。この効果は血小板減少症のモデルでは明らかではなかった。
- 3) リポソームと結合する血小板の活性化動態はリポソームから局所放出される ADP よりもリポソームに結合した H12 により影響を受けた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 後藤信哉、浅田祐士郎. 血栓症
ー やさしく、くわしく、わか

りやすく. 東京：南江堂，
2006.

2. Yamazaki T, Goto S, Shigematsu H, et al. Prevalence, awareness and treatment of cardiovascular risk factors in patients at high risk of atherothrombosis in Japan. *Circ J* 2007;71:995-1003.
3. Tamura N, Kitajima I, Kawamura Y, et al. 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.
4. Goto S, Tamura N, Ishida H, Ruggeri ZM. Dependence of platelet thrombus stability on sustained glycoprotein IIb/IIIa activation through adenosine 5'-diphosphate receptor stimulation and cyclic calcium signaling. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:155-62.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1.特願 2005-270387: 発明人：広渡祐史、岡本奈美、後藤信哉、出願人：東ソー株式会社、東海大学、題名：心不全症候群の識別方法、2005年9月16日出願、公開番号 2007-786376、公開日

2007年3月15日

2.特願 2008-059457 出願人：東海大学
／慶應義塾大学、発明人：後藤信哉／
末松誠. 血管内にステントを配置する際
のステントの形状を最適化させるための
シミュレータ. 特許出願 2008

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)
平成 18~20 年度総合研究報告書

H12-(ADP)小胞体の安全性評価

分担研究者 村田 満 (慶應義塾大学 医学部 臨床検査医学, 教授)
研究協力者 森木 隆典 (慶應義塾大学 保健管理センター, 講師)
研究協力者 小峰 梨沙 (慶應義塾大学医学部内科)

研究要旨

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(HHLGGAKQAGDV: H12)をポリエチレングリコール(PEG)鎖末端に担持させたリン脂質小胞体は、活性化血小板表面に活性化状態にある GPIIb/IIIa を認識し、血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少症モデルラットの出血時間を短縮させることを既に報告してきた。平成 18 年度には、止血能の更なる向上を目的とし、アデノシン 5'-二リン酸(ADP)を内包させた。これは、血小板凝集塊でのみ特異的に ADP を放出することで止血能を増幅させ、血小板輸血群に匹敵する効果の発現に成功した(分担研究者: 池田康夫報告書)。またラビット血液を用いた全血血小板機能測定装置 PFA-100 による人工血小板評価系の可能性について 2 つの基礎検討を行った。平成 19 年度は、血小板減少モデルウサギを用いた H12-(ADP)小胞体の安全性評価を目的とし、H12-(ADP)小胞体あるいは ADP 水溶液の投与前後の血小板活性化の有無を抗ウサギ P-セレクトリン抗体を用いたフローサイトメトリー測定にて検討した。その結果、動物に H12-(ADP)小胞体を静脈投与しても未活性化血小板の活性化を引き起こすことはなく、血液適合性の観点から H12-(ADP)小胞体の安全性に関する初期の要件は満足するものと考えられる。平成 20 年度は、血液適合性の観点から H12-(ADP)小胞体の安全性評価を行うことを目的とした。H12-(ADP)小胞体を血小板減少症ラット、ウサギに投与しても、血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値に異常は見られなかったことから、血液学適合性の観点から安全性の高いナノ粒子であることを明らかにした。

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。平成 19 年度は、血小板減少モデルウサギを用いた H12-(ADP)小胞体の安全性評価を目的とし、H12-(ADP)小胞体あるいは ADP 水溶液の投与前後の血小板活性化の有無を抗ウサギ P-セレクチン抗体を用いたフローサイトメトリー測定にて検討したところ、H12-(ADP)小胞体を静脈投与しても未活性化血小板の活性化を引き起こすことはなく、H12-(ADP)小胞体の安全性に関する初期の要件は満足すると結論付けた。

平成 20 年度は、血液適合性の観点から H12-(ADP)小胞体の安全性評価を行うことを目的とし、H12-(ADP)小胞体の投与前後の血球数変動、血液凝固検査、血液生化学的検査を実施した。

B. 研究方法

1. 血小板減少ラットの血球数変動、血液凝固検査、血液生化学的検査方法

Wister 系雄性ラット(三協ラボ, 8 週齢, 230-280 g)にブスルファン ポリエチレングリコール溶液(5 mg/mL)を 0, 3 日目に尾静脈投与し(全投与量 20 mg/kg)、投与開始後 10 日目を血小板減少ラット([PLT] = $19.6 \pm 2.6 \times 10^4$ / μ L)とした。セボフラン麻酔後、H12-(ADP)小胞体(早大 武岡真司先生より供与)を尾静脈から投与した(4 mL/kg)。対照群として生理食塩水を投与した。投与 30 分後に採血し、血球測定装置(K-4500, Sysmex)にて各血球を測定した。

3.8%クエン酸ナトリウム真真空採血管を用いて心臓採血後、遠心分離(2,200g, 10 min)にて血液凝固検査用の血漿を回収し、ジエチルエーテルにて犠牲死させた。プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、フィブリノーゲン抗原

量(Fbg)、第Ⅷ因子様抗原量(VWF Ag)、VWF 活性の 5 項目を測定した(SRL に委託)。

他方、血清分離剤入採血管を用いて心臓採血後、遠心分離(2,200g, 10 min)にて血液生化学的検査用の血漿を回収した。アルブミン(ALB)、総コレステロール(TC)、トリグリセリド(TG)、高密度リポ蛋白質(HDL)、低密度リポ蛋白質(LDL)、アラニン・アミノトランスフェラーゼ(ALT)、クレアチニン(Cr)の 6 項目を測定した(SRL に委託)。

2. フローサイトメトリーを用いた安全性試験

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

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

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

3. 血小板減少ウサギを用いた止血能評価

ニュージーランドホワイトウサギ(雄性, 三協ラボ, 11 週齢, 2.5 kg)にケタミン(60

mg/mL)とセラクタル(2%)の混合溶液(ケタミン/セラクタル = 3/1 (v/v), 2 mL)にて麻酔を施した。ブスルファン ポリエチレングリコール溶液(10 mg/mL)を0, 3日目に下腹部皮下投与した(全投与量 30 mg/kg)。投与開始後 15 日目を血小板減少ウサギ([PLT] = $2.6 \pm 0.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$)とした。ケタミン/セラクタル麻酔後、23G 翼状針を装着したシリンジポンプにて検体(H12-(ADP)小胞体、生理食塩水、PRP([PLT] = 10, 50, 100 $\times 10^4 / \mu\text{L}$))を耳静脈から投与した(4 mL/kg, 0.5 mL/min)。投与 60 分後に採血し、血球測定装置(K-4500)にて各血球を測定した。

1.と同様に、3.8%クエン酸ナトリウム入真空採血管を用いて心臓採血後、遠心分離(2,200g, 10 min)にて血液凝固検査用の血漿を回収し、ネプタールにて犠牲死させた。PT, APTT, Fbg の 3 項目を測定した(SRL に委託)。

C. 研究結果及び考察

1. H12-(ADP)小胞体の物性

H12-(ADP)小胞体は、早大 武岡真司先生より提供された。以下にその物性を示す (Table 1, 2)。

Table 1 Lipid components of H12-(ADP)vesicles.

components	Molar ratio
DPPC ¹⁾	5
Cholesterol	5
DHSG ²⁾	1
PEG-DSPE ³⁾	0.03
H12-PEG-Glu2C18	0.03

1) 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine
 2) 1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate
 3) 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-[monomethoxy]poly(ethylene glycol) (5000)

Table 2 Characterization of H12-(ADP)vesicles.

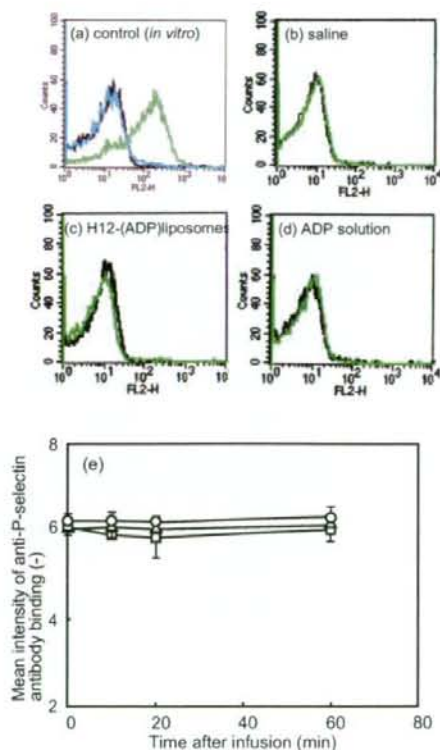
sample name	H12-(ADP)vesicles
diameter (nm)	280 ± 70
lipid concentration (mg/mL)	10
Encapsulated ADP (mM)	1
LPS (EU/mL)	<0.2

2. H12-(ADP)小胞体による血小板活性化

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

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

Figure 1



続いて、ADP 水溶液(100 μ M)を投与した。経時的に採血して得たウサギ PRP に、PE 標識抗ウサギ P-セレクチン抗体を添加したところ、ADP を投与しても全く P-セレクチンは発現しない、即ち、血小板の活性化は起こらないことが明らかとなった(Fig. 1(d), Fig. 1(e) Δ)。これは、赤血球膜上に ADP 受容体(P₂Y₁₃)が存在し、ATP に変換される機構が既に報告されており⁽¹⁾、この機構によって、ADP による血小板の活性化が赤血球によって抑制されたためと考えられる。さらに血管内皮細胞上には ecto-NTPase(CD39)が産生されており、血小板から放出される ADP,ATP を分解し血小板凝集を抑制する機構も報告されており⁽²⁾、生体内には ADP 消去能が数多く存在し、ADP を投与しても血小板の活性化を引き起さないことを明らかにできた。

3. 血球数測定

血小板減少ラットに生理食塩水あるいは H12-(ADP)小胞体(1, 4, 10 mg/kg)を投与しても、投与 30 分後の各血球には何ら変動せず、溶血や活性化、凝集を引き起さないことを確認した。特に、血小板数変動を以下に示す(Fig. 2)。

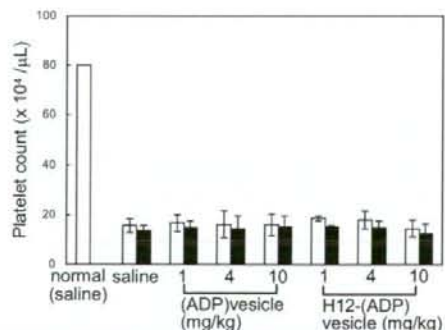


Fig. 2 Platelet counts 30 min before (white column) and after (black column) H12-(ADP)vesicles injection into the thrombocytopenic rats (N = 8-12).

血小板減少ウサギでも同様の試験を行ったが、何ら変動しないことを確認した(Fig. 3)。

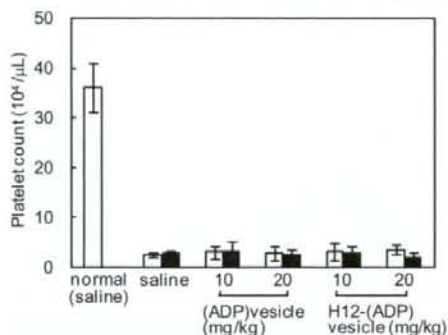


Fig. 3 Platelet counts 60 min before (white column) and after (black column) H12-(ADP)vesicles injection into the thrombocytopenic rabbits (N = 8).

4. 血液凝固検査

血小板減少ラットに H12-(ADP)小胞体を投与し、それぞれ 30 分後、24 時間後の血液凝固検査(PT, APTT, Fbg, VWF Ag, VWF 活性の 5 項目)を行った(Table 3)。H12-(ADP)小胞体を投与しても、血液凝固系に何ら影響を与えないナノ粒子であることが確認できた。血小板減少ウサギでも同様の試験を行い(投与 60 分後)、何ら変動しないことを確認した(PT, APTT, Fbg の 3 項目, VWF Ag, VWF 活性は測定不能)(Table 4)。

5. 血液生化学的検査

血小板減少ラットに H12-(ADP)小胞体を投与し、それぞれ 30 分後、24 時間後の血液生化学的検査(ALB, TC, TG, HDL, LDL, ALT, Cr の 7 項目)を行った(Table 5)。まず、H12-(ADP)小胞体を投与しても ALB は変動せず、血漿は等張を維持していることを確認した。投与 30 分後、TC は投与量依存的にわずかに上昇する傾向が見られたものの、24 時間後には生理食塩水群と同等となった。これは、投与後、血中に滞留している

H12-(ADP)小胞体構成成分のコレステロールに起因するものと判断できる。また TG、HDL、LDL は変動しなかった。さらに、ALT、Cr も変動せず、H12-(ADP)小胞体投を投与しても腎臓、肝臓障害を引き起こさないことを確認した。

D. 結論

H12-(ADP)小胞体をラット、ウサギに投与しても、血球数、血液凝固検査値、血液生化学的検査値に異常は見られなかったことから、血液学適合性の観点から安全性の高いナノ粒子であることを明らかにした。

Table 3 Blood coagulation parameters on normal and thrombocytopenic rats before and after infusion of the H12-(ADP)vesicles (N = 10-16).

30 min after injection	normal rats		thrombocytopenic rats	
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			20 mg/kg	40 mg/kg
PT (s)	31.1 ± 0.4	32.2 ± 2.3	30.8 ± 2.2	30.8 ± 2.7
APTT (s)	28.8 ± 0.9	29.8 ± 7.4	30.3 ± 9.6	31.6 ± 11.0
Fbg (g/dL)	256.8 ± 23.9	262.2 ± 65.3	224.8 ± 33.2	234.2 ± 23.2
VWF Ag (%)	11.3 ± 4.1	14.2 ± 6.1	16.0 ± 5.4	13.0 ± 5.0
VWF activity (%)	62.5 ± 4.4	66.7 ± 7.0	60.1 ± 13.4	63.0 ± 7.8

24 hr after injection	normal rats		thrombocytopenic rats	
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			20 mg/kg	40 mg/kg
PT (s)	30.2 ± 0.3	28.5 ± 3.1	31.1 ± 3.2	27.0 ± 6.6
APTT (s)	29.3 ± 1.2	29.5 ± 5.5	33.1 ± 6.1	34.1 ± 4.7
Fbg (g/dL)	242.5 ± 26.9	222.0 ± 36.4	243.7 ± 31.3	228.8 ± 24.8
VWF Ag (%)	11.9 ± 3.2	19.2 ± 7.3	20.4 ± 1.7	18.4 ± 6.1
VWF activity (%)	64.3 ± 4.3	60.8 ± 24.6	69.6 ± 4.0	61.4 ± 10.1

Table 4 Blood coagulation parameters on normal and thrombocytopenic rabbits before and after infusion of the H12-(ADP)vesicles (N = 6).

1 hr after injection	normal rabbits		thrombocytopenic rabbits	
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			10 mg/kg	20 mg/kg
PT (s)	9.0 ± 0.1	8.7 ± 0.0	9.3 ± 0.6	9.1 ± 0.4
APTT (s)	27.2 ± 2.2	27.2 ± 3.3	27.3 ± 1.8	26.5 ± 3.1
Fbg (g/dL)	234.1 ± 25.2	241.5 ± 24.9	225.0 ± 40.5	257.2 ± 32.7

Table 5 Biochemical blood parameters on normal and thrombocytopenic rats before and after infusion of the H12-(ADP)vesicles (N = 5-7).

30 min after injection	normal rats		thrombocytopenic rats	
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			20 mg/kg	40 mg/kg
ALB (g/dL)	3.8 ± 0.1	3.2 ± 0.3	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1
TG (mg/dL)	62.0 ± 5.0	64.4 ± 7.7	68.4 ± 6.6	79.0 ± 7.4
TG (mg/dL)	49.7 ± 3.2	25.3 ± 12.2	25.0 ± 9.7	26.4 ± 9.1
HDL (mg/dL)	24.3 ± 1.2	23.0 ± 2.1	22.2 ± 2.4	23.4 ± 2.9
LDL (mg/dL)	8.3 ± 1.5	6.9 ± 1.8	6.9 ± 1.0	9.1 ± 1.2
ALT (IU/L)	50.3 ± 7.5	42.9 ± 4.3	42.4 ± 7.1	44.8 ± 5.7
Cr (mg/dL)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0

24 hr after injection	normal rats		thrombocytopenic rats	
	saline	saline	H12-(ADP)vesicles	
			20 mg/kg	40 mg/kg
ALB (g/dL)		3.5 ± 0.7	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.3
TG (mg/dL)		69.8 ± 14.4	66.1 ± 5.8	73.0 ± 6.4
TG (mg/dL)		32.0 ± 14.7	31.3 ± 18.5	28.6 ± 7.4
HDL (mg/dL)		23.0 ± 6.6	25.1 ± 2.5	24.8 ± 4.1
LDL (mg/dL)		7.3 ± 2.7	7.0 ± 0.8	8.8 ± 3.3
ALT (IU/L)		44.0 ± 5.3	45.9 ± 4.6	47.2 ± 9.6
Cr (mg/dL)		0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsubara Y, Murata M, Yoshida T, Watanabe K, Saito I, Miyaki K, Omae K, Ikeda Y. Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341: 128-31, 2006
2. Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokudo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T. Protein S - K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis. *BLOOD* 107(4): 1737-8, 2006
3. Nishida H, Murata M, Miyaki K, Omae K, Watanabe K, Ikeda Y. Gorog Thrombosis Test: analysis of factors influencing occlusive thrombus formation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 17(3): 203-7, 2006.
4. Matsubara Y, Murata M, Watanabe K, Saito I, Miyaki K, Omae K, Ishikawa M, Matsushita K, Iwanaga S, Ogawa S, Ikeda Y: Coronary artery disease and a functional polymorphism of hTERT. *Biochem Biophys Res Commun.* 348(2): 669-72, 2006
5. Yabe M, Matsubara Y, Takahashi S, Ishihara H, Shibano T, Miyaki K, Omae K, Watanabe G, Murata M, Ikeda Y: Identification of ADRA2A polymorphisms related to shear-mediated platelet function. *Biochem Biophys Res Commun.* 347(4): 1001-5, 2006
6. Hattori H, Sonoda A, Sato H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, Watanabe K, Suzuki N: G501C polymorphism of oxidized LDL receptor gene (OLR1) and ischemic stroke. *Brain Res.* 1121(1): 246-9, 2006
7. Hattori H, Sato H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, Watanabe K, Suzuki N: A561C polymorphism of E-selectin is associated with ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population without diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Brain Res.* 1108(1): 221-3, 2006
8. Takahashi S, Ushida M, Komine R, Shimizu A, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Ikeda Y, Murata M. Increased basal platelet activity, plasma adiponectin levels, and diabetes mellitus are associated with poor platelet responsiveness to in vitro effect of aspirin. *Thromb Res.* 119(4): 517-24, 2006
9. Yada H, Murata M, Shimoda K, Yuasa S, Kawaguchi H, Ieda M, Adachi T, Murata M, Ogawa S, Fukuda K. Dominant negative suppression of Rad leads to QT prolongation and causes ventricular arrhythmias via modulation of L-type Ca²⁺ channels in the heart. *Circulation Research* 6:101(1): 69-77, 2007
10. Yin T, Takeshita S, Sato Y, Sakata T, Shin Y, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Kojima T, Madoiwa S, Sakata Y, Murata M, Ikeda Y, Miyata T: A large deletion of the