

この結果 M660NRT による活性化は細胞膜近傍の tail 間にジスルフィド結合を導入することにより強く抑制されることがわかった。この結果は α -tail/ β -tail の解離によって誘導される活性化では細胞膜から離れた calf-1/EGF-3 ドメイン間の解離は重要ではなく、細胞膜近傍の calf-2 と EGF-4/ β T ドメインの間の結合解離がおこることが重要であることを示唆している。実際に細胞膜近傍の calf-2/ β T ドメイン間に N-糖鎖結合部位を導入 (V760NVT) したところ強い活性化が観察された (図7)。

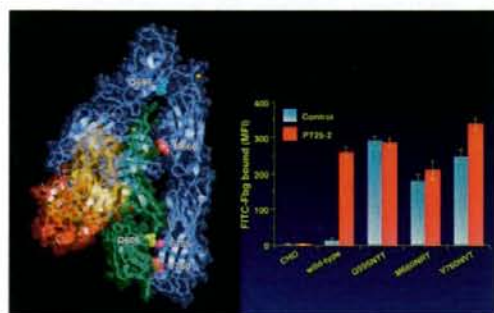


図7.

これに対して Q595NTT による活性化は細胞膜近傍にジスルフィド結合を導入してもほとんど影響を受けなかった。これらの結果から α IIb β 3 は extended conformer である限り tail 間結合の有無にかかわらず高活性を示すことがわかった。また活性化の過程において α IIb β 3 の extension は α -tail/ β -tail 解離の後におこると考えられる。

β -head/ β -tail 間結合の解離は α IIb β 3 活性化に必須である—では α -tail/ β -tail の解離はどのようにして extension を誘導するのであろうか? α V β 3 インテグリンの結晶構造を観察すると bent conformer で β -tail は α -tail だけでなく β -head と広い結合面を形成していることがわかる。この β -head/ β -tail 間の結合はインテグリンを bent conformer に保つ上で主要な役割を

果たしていると考えられる。一方 α -tail/ β -tail 間の結合はインテグリンを bent conformer に保つ直接的な働きは無いと推測される。これらのことから、われわれは α -tail/ β -tail 間結合の解離が extension を誘導するためには β -head/ β -tail 間の結合に影響を与え不安定化させるという仮説を立てた。この仮説を検証するため、 β -head/ β -tail 間にジスルフィド結合を導入して解離を阻害し、tail の解離あるいは α 鎖 extension によって誘導される活性化に与える影響を調べた(図8)。

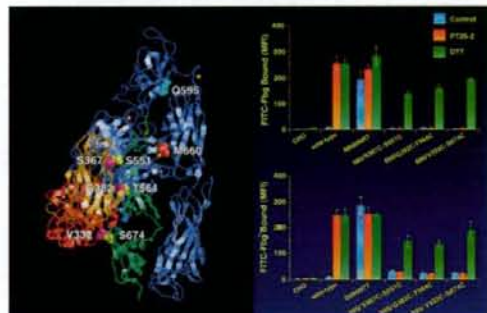


図8.

β -head/ β -tail 結合面を形成する hybrid/EGF-3 間 (S367C/S551C)、 hybrid/EGF-4 間 (G382C/T564C)、 β A/ β T 間 (V332C/S674C) にジスルフィド結合を導入すると、いずれの場合も DTT 処理によってジスルフィド結合を還元しない限り、M660NRT、Q595NTT 変異による活性化をほぼ完全に抑制した。これらの結果は tail の解離による活性化がおこらなくてはならないことを意味している。また、たとえ α 鎖が extended form であっても β 鎖の β -head/ β -tail 結合が解離しない限り α IIb β 3 の活性化は誘導されないことが判った。

β -head/ β -tail 間結合の解離は活性化を誘導する— β -head/ β -tail の解離を阻害することによって α IIb β 3 活性化が完全に阻害さ

れた。それでは反対に β -head/ β -tail の解離を誘導することによって α IIb β 3 は活性化されるであろうか？ この疑問に答えるため β -head/ β -tail 間に N-糖鎖を挿入し完全に β -head/ β -tail 間結合が解離した状態の変異 α IIb β 3 を作成し、Fbg 結合に与える影響を調べた (図 9)。

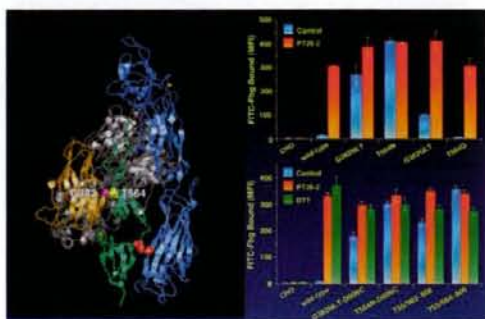


図 9.

Hybrid ドメインに N-糖鎖結合部位を導入した G382NLT、EGF-4 ドメインに N-糖鎖結合部位を導入した T564N はともに活性化抗体非存在下でも Fbg を結合した。これらの変異に類似した、G382QLT、T564Q 変異を持った α IIb β 3 と Fbg の結合は減弱していた。これらの結果は G382NLT、T564N 変異によって誘導される活性化は実際に N 糖鎖結合に依存することを示唆している。次に α -tail/ β -tail 間結合がこの活性化に与える影響を調べた β 3 鎖の G382NLT、T564N 変異とともに D606C 変異を導入しても活性化に大きな影響を与えなかった。これに α IIb 鎖の F755C 変異を加え、 β 3 鎖 D606C との間にジスルフィド結合が形成されるようにしても、活性化に大きな変化は見られなかった。

これらの結果は α -tail/ β -tail 間の結合に関係なく、 β -head/ β -tail 間が完全に解離すれば強い活性化が誘導されることを意味している。つまり α IIb β 3 の活性化の過程において β -head/ β -tail の解離は α -tail/ β -tail 解離の後におこると考えられる。

β -head/ β -tail 間結合の解離と α -tail/ β -tail 間結合の解離は α IIb β 3 活性化誘導において相乗的に作用する—N-糖鎖結合によって誘導される α -tail/ β -tail 間、 β -head/ β -tail 間の解離はいずれも非常に強い活性化を誘導するため、一方の結合解離が他方に与える影響を調べることは不可能である。 α V β 3 インテグリンの結晶構造を観察すると β -head/ β -tail 境界面、 α -tail/ β -tail 境界面に存在する幾つかのアミノ酸残基は互いに接触しており、特に β -head/ β -tail 境界面の Ser-367、Arg-404 と Ser-551、Asp-550 や α -tail/ β -tail 境界面の β 3 残基 Tyr-594、Thr-603 と α IIb 残基 Glu-785 は水素結合で結合している (図 10)。

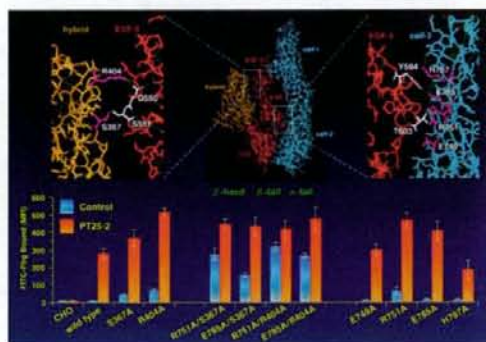


図 10.

そこでこれらのアミノ酸残基を Ala 残基に置換して内因性の β -head/ β -tail 間結合、 α -tail/ β -tail 間結合を部分的に切断することで、これらの結合が α IIb β 3 活性化に及ぼす影響を調べた。N-糖鎖を挿入した場合と異なり、 β 3 鎖の S367A、R404A 変異は非常に弱い活性化を誘導するだけであった。同様に α IIb 鎖の E749A、R751A、E785A、H787A 変異は強い活性化を誘導することは無く、R751A、E785A がごくわずかな活性化作用を有するのみであった。しかし、 β 3 鎖の S367A、R404A と α IIb 鎖の R751A、E785A を組み合わせることによって著明

な活性化がみられた。

これらの結果は α IIb β 3 活性化において β -head/ β -tail 間結合の解離と α -tail/ β -tail 間結合の解離が相乗的に作用することを意味しており、 α -tail/ β -tail 間結合が減弱することによって実際に β -head/ β -tail 間結合の解離が促進されると解釈できる。

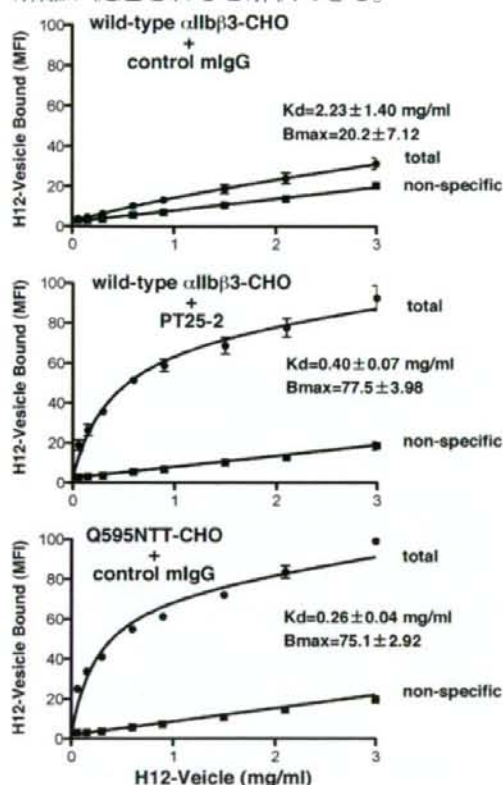


図 11. H12-vesicle と α IIb β 3-CHO の結合動態

III. α IIb β 3 と H12 担持人工粒子の結合解析

I. H12-vesicle と α IIb β 3-CHO の結合動態解析

まず始めに、野生型 α IIb β 3 を発現した CHO 細胞と H12-vesicle の結合を調べた。図 11 に示したように、H12-vesicle は濃度依存性に α IIb β 3-CHO と結合した。拮抗阻害剤である RGD ペプチド 1 mM 存在下での非特異的結合と比較すると明らかなよ

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、 α IIb β 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 α IIb β 3 の変異体 Q595NTT を発現した CHO 細胞では、 $K_d = 0.26 \pm 0.04$ mg/ml であった。尚、データには示さないが、H12 ペプチドを担持しない 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 α IIb β 3 と特異的に結合するこ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 12)。

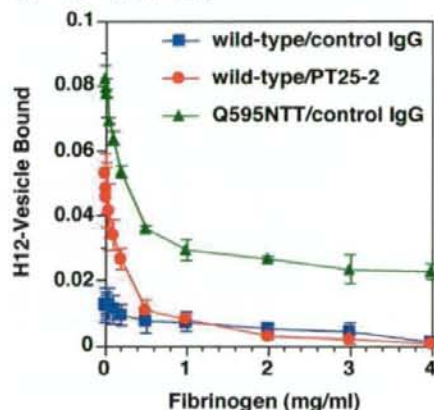


図 12. フィブリノーゲンによる H12-vesicle 結合阻害試験

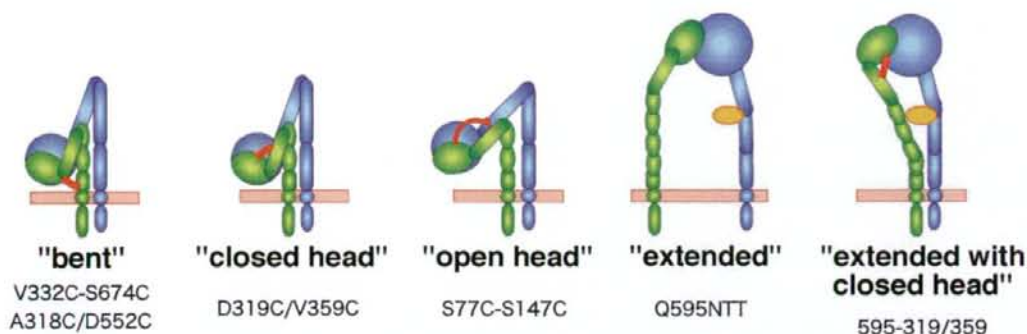


図 13. 立体構造の異なる α IIb β 3 conformer の作成

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 の有無にかかわらず、生理的濃度 (2~4 mg/ml) のフィブリノーゲンによってほぼ完全に阻害された。一方、Q595NTT 発現細胞に対する H12-vesicle の結合もフィブリ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。これに対して、非活性化 α IIb β 3 と H12-vesicle の親和性は低く、フィブリノーゲンと容易に置換されてしまうため、血液中には 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 13 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設計されている。 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 の両変異の組み合わせで、extended with closed head となるように設計されたものである。

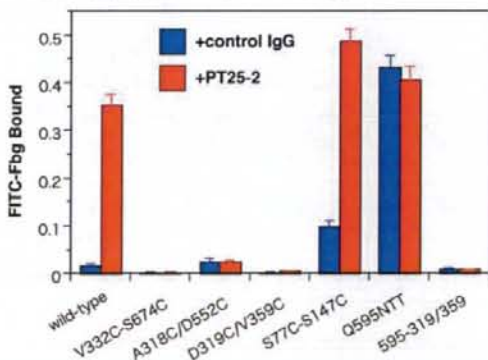


図 14. α IIb β 3 conformer とフィブリノーゲンとの結合

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 1 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。

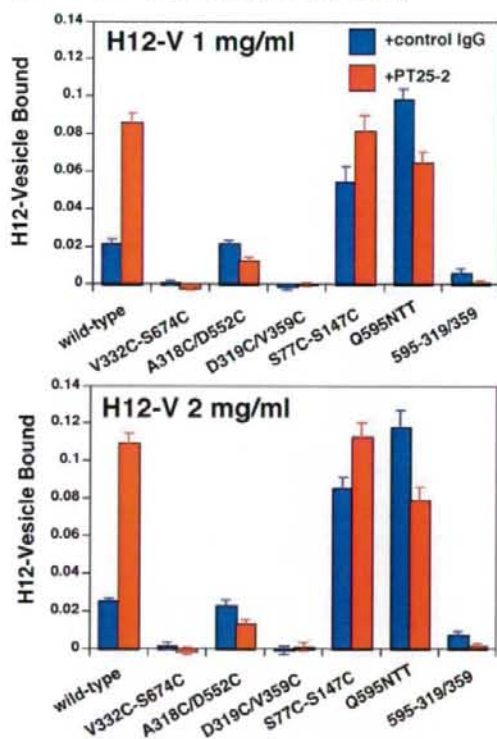


図 15. α IIb β 3 conformer と H12-vesicle との結合
図 1 5 は H12-vesicle とこれらの変異体を発現した CHO 細胞との結合を調べたものである。H12-vesicle 濃度 1 mg/ml と 2 mg/ml での結合を別々に示した。フィブリノーゲンと同様に、H12-vesicle は PT25-2 存在下でも V332C-S674C、D319C/V359C

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 1 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 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。

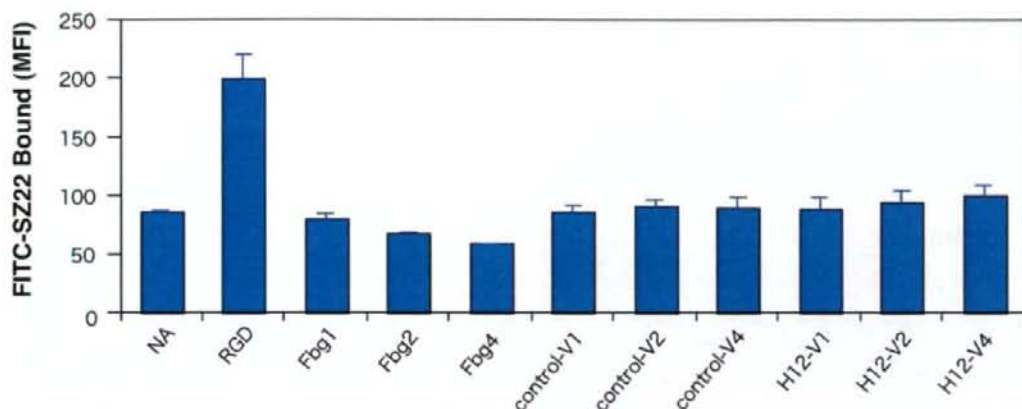


図 16. SZ22 と α IIb β 3-CHO の結合

D. 考察

本研究では 1) リガンド結合阻害作用を有する抗インテグリン抗体のエピトープ・マッピングを行うことによって、 β 3 インテグリン活性化に必要な構造条件の決定、2) inside-out signaling による α IIb β 3 活性化における、細胞外 tail の役割の解明を行い、ここで得られた知見をもとに、3) H12 担持人工粒子と α IIb β 3 の結合機構の解析を行った。これらの結果から H12 担持人工粒子の有効性・安全性の検討を行った。

I. エピトープ・マッピング

α V と α IIb の domain-swapping キメラを作成して CHO 細胞に発現させることにより、1) 抗 α V モノクローナル抗体 P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 が α V の tail を構成する thigh ドメインに特異的に結合すること、2) α V の human-to-mouse キメラを用いることにより P3G8 のエピトープが α V のアミノ酸残基 Ser-528 に存在し、AMF-7、P2W7、NKI-M9 のエピトープが共通のアミノ酸残基 Ser-462 に存在すること、3) 野生型 α V β 3 を発現した CHO 細胞とフィブリノーゲンの Mn²⁺存在下での結合に与える影響を調べることにより、P3G8、P2W7 が結合に全く影響を与えないが AMF-7 は結合促進作用を有し、反対

に NKI-M9 は結合阻害作用を持つことを明らかにした。

インテグリンのリガンド結合部位は N 末端側の head に存在することが既に解明されている。本研究で α V の head を構成する β -propeller ドメインに結合することが明らかとなった 10C4、23C6、LM609、69.6.5 は α V β 3 とリガンドの結合を阻害する抗体である。また本研究で用いた 7E3 は β 3 の head を構成する β A ドメインに結合することが知られており、これらの抗体はリガンドと競合することで阻害作用もつと考えられる。一方 P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の 4 抗体はリガンド結合には直接関与しない thigh ドメインと結合する抗体であった。図 17 に示すように α V β 3 の結晶構造で P3G8 のエピトープである Ser-528 は genu から離れた β -propeller 側の側面に位置しており (マゼンタ)、P3G8 がリガンド結合に全く影響しないことも理解できるだろう。一方 AMF-7、P2W7、NKI-M9 の共通のエピトープである Ser-462 は genu の直上に局在している (シアン)。注目すべきことは、AMF-7、P2W7、NKI-M9 はこの共通のアミノ酸残基を認識するにも拘らず、これらの抗体が α V β 3 とリガンドの結合に与える影響が全く異なることである。

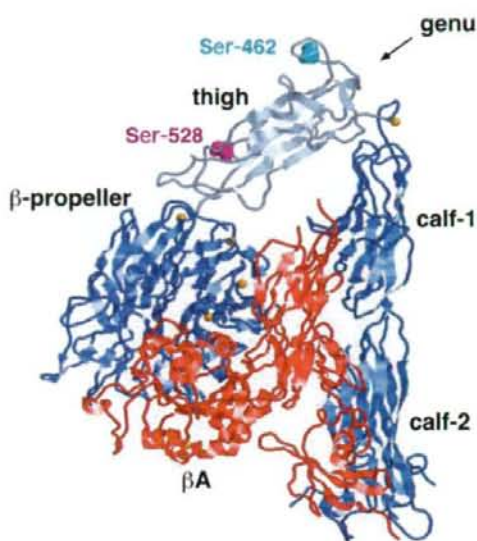


図 17. $\alpha V\beta 3$ 結晶構造におけるエピトープの局在

われわれの実験では P3G8 は全く機能を持たず、AMF-7 は活性化作用を、NKI-M9 は阻害作用を有していた (図 4)。genu がインテグリンの tail の屈曲部位であることを考慮すると、これらの 3 抗体は αV の genu に結合し tail の屈曲をコントロールすることでアロステリックにインテグリンの活性を制御していると想像される。事実 extended に構造が固定された Q589NAT 変異体を用いた実験では、P3G8 はリガンド結合に影響を与えず、AMF-7 は活性化作用を維持していたが、NKI-M9 による阻害効果のみが全く失われていた。これらの結果は NKI-M9 は $\alpha V\beta 3$ を屈曲させ bent conformer に保つことによって活性を低下させる抗体であることを示唆している。対照的に、拮抗阻害作用を有する 7E3 は野生型、Q589NAT 変異体に対し同等の強い阻害効果を有していた。われわれの結果はインテグリンの bent conformer が低活性型であり extended conformer

が高活性型とする従来の仮説に一致しており、 $\alpha V\beta 3$ においても同様の活性制御機構が存在すると考えられる。しかし $\alpha V\beta 3$ がどの程度屈曲あるいは伸展したところで活性の変化がみられるかについては全くわかっていない。2 価イオンなどの条件の違いによっては $\alpha V\beta 3$ がある程度屈曲していてもリガンドと結合する余地は残されているであろう。

II. $\alpha IIb\beta 3$ 活性化における細胞外 tail の役割

$\alpha IIb\beta 3$ インテグリンは血小板活性化に伴いその立体構造を変化させてリガンドとの結合親和性を高めることによって機能する分子である。この結合親和性が細胞内のシグナル経路の活性化によって著明に変化することから、 $\alpha IIb\beta 3$ はインテグリン活性化シグナルの研究対象となり、細胞内 tail とシグナル分子の結合が活性変化を惹起することが解ってきた。一方、 $\alpha IIb\beta 3$ と Fbg 結合メカニズムに関しても古くから研究されており、多少の異論があるものの、前述したように細胞外ドメインの立体構造が bent conformer から extended conformer に変化することによって活性化がおこると考えられている。しかしながら、なぜ短い細胞内 tail の構造変化が細胞外ドメインの大きな構造変化を惹起するのかそのメカニズムは解っていない。本研究でわれわれは 1) インテグリン α -tail と β -tail を完全に解離させることにより強い活性化が誘導できること、2) この活性化は β -head と β -tail の解離に依存すること、3) β -head/ β -tail を完全に解離させることにより強い活性化が誘導されるが、この活性化は α -tail と β -tail の解離に依存しないこと、4) β -head/ β -tail 間結合を減弱させることで弱い活性化が誘導され

るが、同時に α -tail/ β -tail 間結合を弱めることによって非常に強い活性化が誘導されることを見いだした。これらを総合するとわれわれが提唱した“relay-switch model”は基本的には正しく、 β -head/ β -tail 間結合の解離は α -tail/ β -tail 間結合の解離の後におこり、 α -tail と β -tail が開くことによって β -head と β -tail の間の結合が弱まり、bent から extended への構造変化が促進されると推測される。すなわち inside-out signaling による α IIb β 3 活性化では—Step 1) talin 結合によって細胞内 tail の解離がおこる。Step 2) 細胞外 α -tail/ β -tail 間結合が不安定となり解離がおこる。Step 3) β -head/ β -tail 間結合が不安定となりリガンドとの結合親和性が増す。Step 4) リガンドとの結合によって bent から extended conformer への変換が完成する。—の順番で構造変化が進行すると考えられる (図 18)。

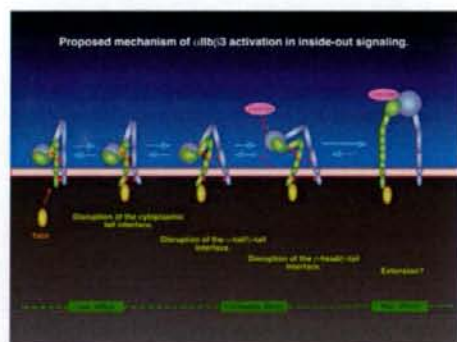


図 18. α IIb β 3 の活性化機序 (仮説)

これまでの研究から完全に bent conformer に固定されたインテグリンは不活性で、extended conformer に固定されたインテグリンは非常に高い活性を持つことが解っている。しかし本研究からわかるように完全な extended conformer とならなくても β -head/ β -tail

間結合がある程度緩むことにより、インテグリンはリガンドとの親和性を増し結合することが可能になると考えられる。これらの結果は実験条件によってはインテグリンが bent conformer のままでリガンドと結合することが可能であることを示唆しているが、extended は bent conformer よりも高い活性をもつとする基本的な結果は変わらない。

III. H12-vesicle と α IIb β 3 の結合解析

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 の結合を解析した結果、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、臨床応用には不相当である。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 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 1 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 1 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 1 4・図 1 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 と結合しうる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 1・図 1 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 α IIb β 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。 α IIb β 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 α IIb の tail に結合する抗体であり、図 1 6 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 α IIb β 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 α IIb β 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 α IIb β 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。 α IIb β 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 α IIb β 3 と結合しても複数の α IIb β 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 α IIb β 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

1) inside-out signaling による α IIb β 3 インテグリンの活性化では、細胞内 tail の解離に続いておこる細胞外 tail の解離がトリガーとなって、細胞外ドメインの bent から extended conformer への構造変化がおこる。

2) H12-vesicle は活性化依存性に α IIb β 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: 1) Kamata T, Handa M, Ikeda Y, Aiso S: Dissociation of the extracellular α -tail/ β -tail interface interaction activates α IIb β 3 integrin. The 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, Florida, USA, December 9-12, 2006

2) Kamata T, Handa M, Ikeda Y, Aiso S: Separation of the Extracellular Tails Activates α IIb β 3 Integrin. 第59回日本

細胞生物学会大会、福岡県福岡市、2007
年5月28～30日

3) 松本 淳、鎌田徹治、高木淳一、岩
崎憲治、 由良 敬：Elastic Network
modelの基準振動解析によるインテグリン
の構造変化の解析。第45回に本生物
物理学会年会、神奈川県横浜市、2007
年12月21～23日

H. 知的財産権の出願・登録：無し。

Ⅱ. 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, <u>Ikeda Y</u> , <u>Handa M</u>	Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute	<i>J Thromb Haemost</i>	7 巻	470 - 477	2009
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
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
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
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 heterosurfaces	<i>J Biomed Mater Res</i>	Part A	233 - 241	2008
Morikawa T, <u>Kajimura M</u> , Ichikawa M, Suematsu M	Three-dimensional imaging of growing thrombus <i>in vivo</i>	<i>Microvascular Reviews and Communications</i>	2 巻	8 - 12	2008
Okamura Y, Utsunomiya S, Suzuki H, Niwa D, Osaka T, <u>Takeoka S</u>	Fabrication of free-standing nanoparticle-fused sheets and their hetero-modification using sacrificial film	<i>Colloids and Surface A: Physicochemic al and Engineering Aspects</i>	318 巻	184 - 190	2008

Matsumoto A, <u>Kamata T</u> , Takagi J, Iwasaki K, Yura K	Key Interactions in Integrin Ectodomain Responsible for Global Conformational Change Detected by Elastic Network Normal-Mode Analysis	<i>Biophysical Journal</i>	95 卷 6 号	2895 - 2908	2008
<u>半田 誠</u> , 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 卷 6 号	774 - 778	2008
岡村陽介, 武岡真司, <u>半田 誠</u> , 池田 康夫	人工血小板の開発	<i>Medical Science Digest</i>	34 卷 4 号	138 - 140	2008
Okamura Y, Fujie T, Maruyama H, <u>Handa M</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Takeoka S</u>	Prolonged hemostatic ability of polyethylene glycol-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide	<i>Transfusion</i>	47 卷 7 月号	1254 - 1262	2007
Fujie T, Okamura Y, <u>Takeoka S</u>	Ubiquitous transference of a free-standing polysaccharide nanosheet with the development of a nano-adhesive plaster	<i>Adv Mater</i>	19 卷 4 号	3549 - 3553	2007
Okamura Y, <u>Handa M</u> , <u>Suzuki H</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Takeoka S</u>	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 Ibalph-conjugated latex beads under flow conditions	<i>J Artif Organs</i>	9 卷 4 号	251 - 258	2006
岡村 陽介, 藤枝 俊宣, <u>半田 誠</u> , 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 卷 4 号	155 - 160	2006
<u>武岡 真司</u> , 岡村 陽介	血小板代替物の開発	月刊『 <i>BIO INDUSTRY</i> 』	23 卷 7 号	65 - 71	2006

Ⅲ. 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(ethylene glycol)] (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-[(2S)-2-hydroxypropanoylamino]-2,4,6-triiodoisophthalamide (Iopamidol) was obtained from Fuji Pharma (Tokyo, Japan). Busulphan and poly(ethylene glycol) (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 ($E_s = 485 \text{ nm}$; $E_m = 500 \text{ nm}$) 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

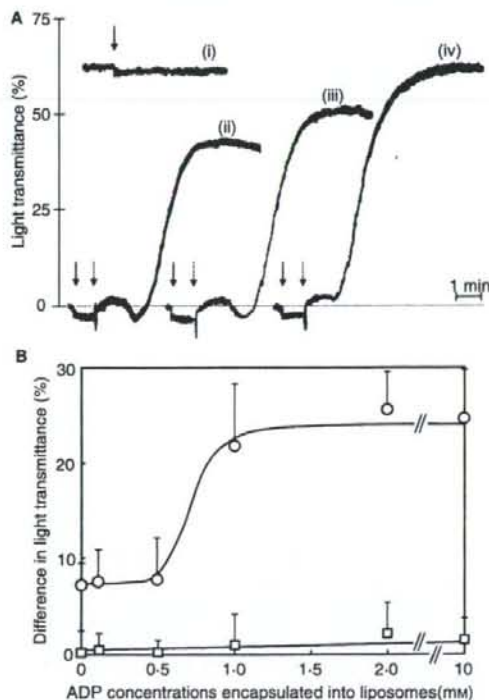


Fig. 1. Augmentation of agonist-induced platelet aggregation by H12-(ADP)-liposomes. (A) Aggregation measurement in PRP (platelet = $2.0 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$) obtained from a healthy volunteer in the presence of (i) H12-(ADP)-liposomes alone, or in response to collagen in the presence of (ii) (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 (fc, $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$) administration, respectively. (B) Effects of (○) 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 ($1-3 \mu\text{mol L}^{-1}$, 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 $0.1-0.5 \text{ mmol L}^{-1}$, 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.

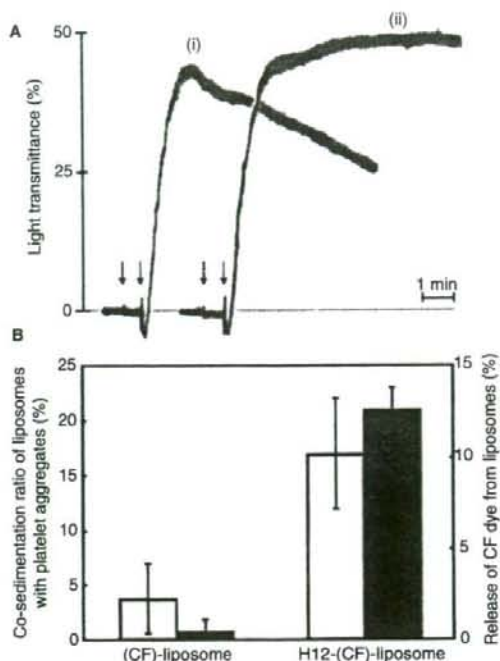


Fig. 2. Aggregation-dependent release of CF from H12-(CF) liposomes. (A) Aggregation measurement in PRP obtained from a healthy volunteer in response to ADP in the presence of (i) (CF)-liposomes and (ii) H12-(CF)-liposomes. Traces are representative of data obtained from at least three independent experiments. Solid and dotted arrows indicate the times of liposome (lipid concentration, 1c , 0.05 mg mL^{-1}) and ADP (1c , $3 \mu\text{mol L}^{-1}$) 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.

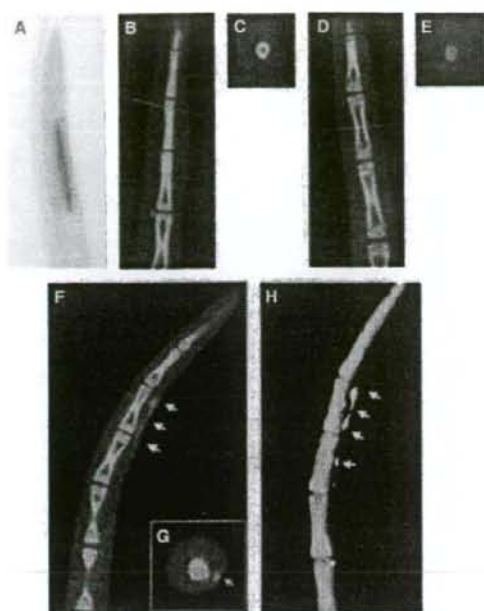


Fig. 3. Specific accumulation of H12-(iopamidol)-liposomes at the injury site in the tail vein as visualized by an eXplore Locus CT system. (A) Photo of rat tail with a 1-cm-long incision including the tail vein. (B) CT image of (iopamidol)-liposome infusion. (C) Cross-sectional CT image of (B). (D)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

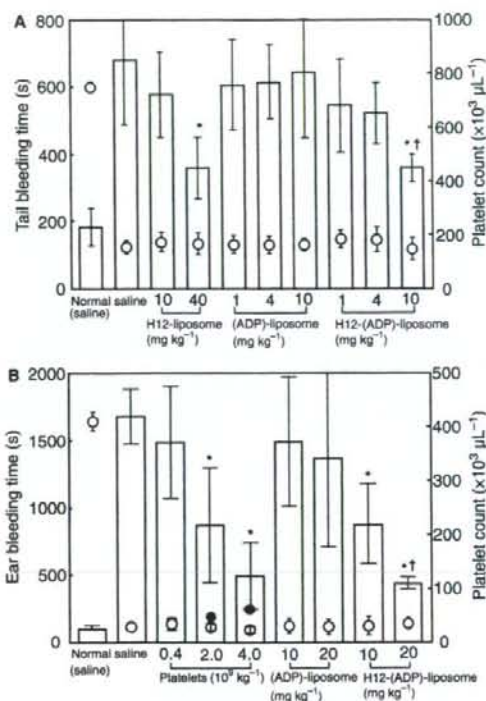


Fig. 4. Hemostatic effects of H12-(ADP)-liposomes on bleeding time in thrombocytopenic animal models. (A) Effects of administration of H12-(ADP)-liposomes on rat tail bleeding time (white column). (○) Platelet count in rats ($n = 6-10$). * $P < 0.05$ for H12-(ADP)-liposome or H12-liposome group vs. saline 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-