

図4. 各種リポソームおよび低濃度コラーゲン (0.2 $\mu\text{g/ml}$) 添加後に生じる凝集の電顕像
 A) の生食、B) のコントロールリポソーム、C) のH12リポソームではコラーゲン添加後に形成される凝集塊は小さいが、D) のH12(ADP)リポソームのものは凝集塊が大きい。

H12(ADP)リポソーム、さらに0.2 $\mu\text{g/ml}$ コラーゲン添加時に形成された凝集塊の一部を拡大して観察すると、凝集した血小板の周囲にはリポソーム様の構造が観察された(図5)。しかし、超薄切片法では、リポソームは試料調製時に使う脱水剤のアルコールによって溶けてしまうために、これらの構造がリポソームかどうかは不明である。

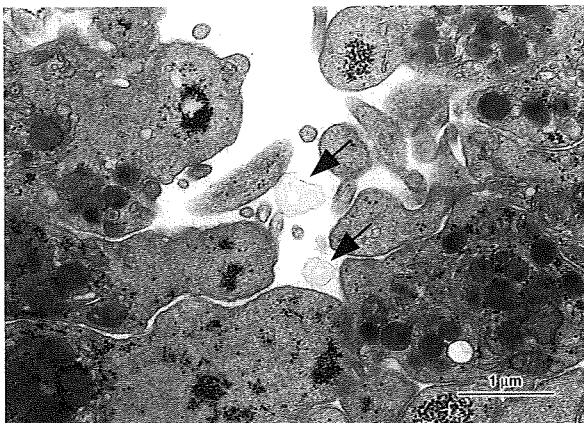


図5. 図4Dの□部の拡大像
 凝集塊中にリポソーム様の構造が観察されるが(矢印)、リポソームであるかどうかは不明である。

3) 低濃度コラーゲン血小板凝集時におけるH12(ADP)リポソームの分布 (免疫電顕法)

抗H12抗体を使う免疫電顕法でコラーゲン添加後に形成された凝集塊を観察すると、凝集し密着している血小板間にコロイド金で標識されたリポソームが存在した(図6)。

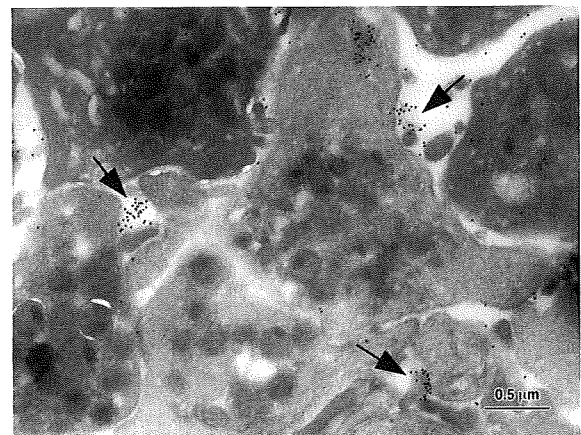


図6. 低濃度コラーゲン添加で生じる凝集塊中におけるH12(ADP)リポソームの分布
 凝集している血小板相互の間にH12の存在を示すコロイド金粒子が付着したリポソームが分布している(矢印)。

D. 考察

H12 を結合させたリポソーム (H12-リポソーム)は血小板凝集を促進させることをこれまで報告してきた。ところで、血小板の濃染顆粒には ADP が存在し、これは血小板活性化時に血小板外に放出され、凝集の促進作用をもつ。そこで、H12-リポソームに ADP を内包させれば、その凝集促進作用は単なる H12-リポソームより強くなると考えられることから、ADP 内包 H12 リポソームの検討を昨年度から実施してきた。すなわち、流動性または被覆層数の異なるリポソームを作製し、どの条件の ADP 内包リポソームがその ADP の効果が出やすいかを把握するために、ADP 刺激による血小板凝集で検討した。その結果、ADP を内包した H12-リポソームは流動性が高く、被覆層数が少ないものほど凝集を促進させたことから、この条件のリポソームは内部の ADP が漏れ出し易いと考えられた。

しかし、上記の条件において H12 または H12(ADP)リポソームの凝集促進作用の差はわずかであった。そこで、内包する ADP の凝集に対する関与をさらに明らかにするために、今回低濃度コラーゲンによる凝集実験を行った。凝集がほとんど惹起されない低濃度の ADP またはコラーゲンを添加された血小板に、最初に添加した逆の低濃度コラーゲンまたは ADP を追加して添加すると、その相乗効果が出現してある程度の凝集を示すことが知られている。予備実験において、この低濃度コラーゲンおよび ADP の相乗効果が得られた(図 1 B)。次いで、ヒト PRP に生食、H12 未結合のコントロールリポソーム、H12 または H12(ADP)リポソームをあらかじめ加え、さらに低濃度コラーゲン (0.2 µg/ml)を添加し、惹起される凝集を凝集計で比較、検討した。その結果、H12(ADP)リポソームは他のものより大きな凝集能を示した(図 2)。同時に行った電顕観察でも、H12(ADP)リポソームは大きな凝集塊を形成させた(図 4 D)。また、本リポソームの分布を免疫電顕で検討したところ、凝集し密着している血小板間に分布した(図 6)。これらの結果は、低濃度コラーゲンによって形成された凝集局所に H12(ADP)リポ

ソームが巻き込まれ、その部位でリポソーム内に内包されていた ADP が漏れ出ることによって、凝集をさらに促進することを示している。すなわち、今回の実験では、内包された ADP の有効性がより明瞭に示されたと考えられる。

E. 結論

内包 ADP の凝集に対する効果を明らかにするために、PRP に生食、コントロールリポソーム、H12 または H12(ADP)リポソームを添加し、さらに低濃度コラーゲンを加え、惹起される血小板凝集に対する各リポソームの効果を比較検討した。同時に、凝集形態およびリポソームの分布についても電子顕微鏡で観察した。その結果、生食、コントロールまたは H12 リポソームを加えた PRP では、低濃度コラーゲン (0.2 µg/ml)添加後、15~25%の透過度の上昇を示すに過ぎなかったが、H12(ADP)リポソーム添加 PRP のそれは約 40%の透過度の上昇が観察された。電顕観察では、H12(ADP)リポソーム添加 PRP のコラーゲン凝集は他のものに比べて大きな凝集塊が形成され、さらに抗 H12 抗体を使う免疫電顕法では、H12(ADP)リポソームは凝集塊の血小板間に存在した。これらの結果から、本リポソームはその表面に標識された H12 によって血小板のフィブリンゲン受容体 (GPIIb/IIIa)に結合し、血小板相互を架橋することによって凝集をまず促進させる。次いで、内包する ADP が凝集塊中で漏れ出ることによって凝集をさらに増強させると考えられ、内包 ADP の有効性がより明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

- 1) Okamura Y, Fukui Y, Kabata K, Suzuki H, Handa M, Ikeda Y, Takeoka S: Novel platelet substitutes: disk-shaped biodegradable nanosheets and their enhanced effects on platelet aggregation. *Bioconjug Chem.* 20: 1958-1965, 2009

2. 学会発表：

- 1) 鈴木英紀, 岡村陽介, 武岡真司, 池田康夫, 半田誠: 血小板代替物の開発 -H12 結合リポソームの微細構造とヒト血小板との相互反応の検討-.日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会, 2009.5.29, 仙台
- 2) 鈴木英紀, 岡村陽介, 武岡真司, 池田康夫, 半田誠: 血小板代替物 H12 結合リポソームの超微形態と血小板との相互反応の検討. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会, 2009.6.6. 小倉

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

αIIbβ3 インテグリンと H12 の結合機序に関する研究

分担研究者 鎌田徹治（慶應義塾大学医学部 解剖学教室 専任講師）

研究要旨

血小板αIIbβ3 インテグリンは活性化したときのみ、H12 配列を有するフィブリノーゲンや H12 担持人工粒子と結合する。この活性化の経路には大きく分けて2つが存在する。一つはアゴニストと血小板細胞膜表面に存在するその受容体との結合による細胞内シグナル経路の活性化であり、もう一つは2価イオンによる活性化である。前者は最終的にインテグリン細胞内ドメインの解離を促す結果、細胞外ドメインの構造変化をおこすことがこれまでの研究により明らかになってきた。一方、インテグリンの細胞外ドメインには複数の2価イオン結合部位があり、これらの部位に2価イオンが結合する結果、インテグリンのリガンド結合活性が変化することが解っている。しかしながら、2価イオンがどのようにしてインテグリン全体の構造を変え、活性に影響を与えるのか明らかにされていない。本研究では、1) 異なる2価イオン条件下でαIIbβ3 発現細胞とフィブリノーゲンの結合を調べることによってαIIbβ3 活性化に必要な構造条件を解析し、2) β3 鎖の2価イオン結合部位に変異を導入し、そのフィブリノーゲン結合に与える影響を調べることによって、2価イオンがインテグリン活性を調節するメカニズムを検討した。その結果、1) Ca²⁺/Mg²⁺存在下では、インテグリンの起き上がりとは hybrid ドメインの swing-out の両方がαIIbβ3 活性化に必要なのに対し、Mn²⁺存在下ではインテグリンの起き上がりのみが必要で hybrid ドメインの swing-out は必要ないこと、2) ADMIDAS に配位するアミノ酸残基に変異を導入することにより、Ca²⁺/Mg²⁺存在下でも hybrid ドメインの swing-out に依存せず活性化が行われることが解った。

以上の結果から、αIIbβ3 活性化は最終的に ADMIDAS イオンのシフトに伴い、周辺のリガンド結合部位の再構成が行われることによって達成されるのであり、これにいたるために必要なインテグリン全体の構造変化は、2価イオン条件の違いによって異なると考えられる。これらの結果は、従来の報告にない全く新しい発見であり、H12 担持人工粒子の作用機序を解明するうえでも重要と考えられる。

A. 研究目的

インテグリンとリガンドの結合は細胞内シグナル (inside-out signaling) と2価イオンの影響を強く受けるが、その構造メカニズムは不明であった。最近の構造解析の進歩により、inside-out signaling では talin などの細胞内タンパクがβ鎖の細胞内ドメインに結合するために、α鎖とβ鎖の細胞内

ドメイン間の結合が解離してインテグリンが活性化すると考えられている。一方、細胞外ドメインの立体構造は、結晶構造、電子顕微鏡像の解析からα鎖とβ鎖はともに頭部 (head) を形成する球状ドメインと脚部 (tail) を形成する棒状のドメインから構成されることがわかった (図1)。結晶

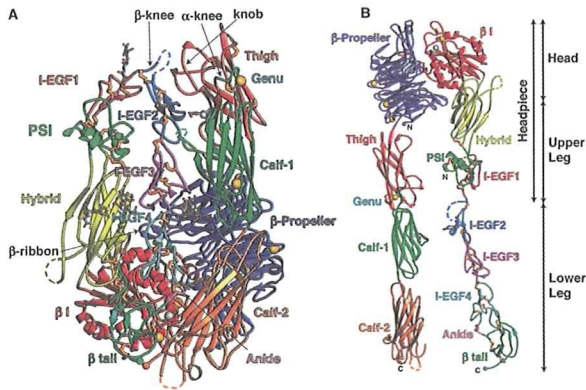


図1 α IIb β 3 インテグリンの結晶構造。

構造では α 鎖と β 鎖の head は会合して大きなリガンド結合部位を形成し、tail は genu で 137 度折れ曲がり head を下に向けている像 (bent conformer) が得られた。しかし電子顕微鏡解析では head を上に向け tail がまっすぐな像 (extended conformer) も観察されているため、インテグリンには bent と extended の少なくとも二つの立体構造が存在することになる。その後の研究から bent が不活性型で extended が活性型とする説が有力だが、bent form が活性型であるとする報告もあり、未だに解決していない。

インテグリンのリガンド結合部位を形成する head は、 α 鎖の β -propeller ドメインと β 鎖の β A、hybrid ドメインで構成される。リガンド結合状態では β A ドメインと hybrid ドメインの相対的位置が変化し、 β A ドメインと hybrid ドメインの長軸の角度が増す (図2)。この hybrid ドメインの

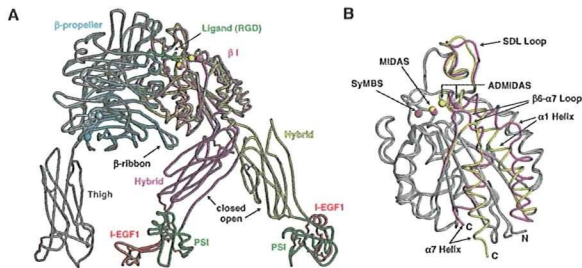


図2 α IIb β 3 インテグリン頭部の結晶構造。

swing-out によって β A ドメインに存在する 3 個の 2 価イオン結合部位の再構成がおき、その結果 β A ドメインのリガンド結合ループが移動することによってリガンドの結合親和性が増すと考えられている。すなわち、hybrid ドメインの swing-out こそがインテグリン活性化に必須の構造変化であり、インテグリンの起き上がり (extension) には依存しないことが報告されている。

今回の研究で、われわれは異なる 2 価イオン条件下において α IIb β 3 活性化に必要な構造変化の解析を行った。その結果、活性化は 1mM Ca^{2+} /1mM Mg^{2+} (以下 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) 存在下では hybrid ドメインの swing-out に依存するものの、1mM Mn^{2+} (以下 Mn^{2+}) 存在下ではこれに依存せず、むしろ起き上がり (extension) のみに依存することが明らかになった。次に、 β 3 鎖の 2 価イオン結合部位に変異を導入することにより、何故イオンの違いによって活性化に必要な構造変化が異なるのか、そのメカニズムについて検討を行った。これらの結果は、従来の報告にない全く新しい発見であり、H12 担持人工粒子の作用機序を解明するうえでも重要と考えられる。

B. 研究方法

I. α IIb β 3 変異体の作成

α IIb 鎖、 β 3 鎖の cDNA は Joseph C. Loftus 博士 (Mayo Clinic, AZ) から供与された。これらを哺乳類発現ベクターである pBJ-1 (Mark Davis 博士 University of California, San Francisco) から供与) にクローニングした。 α IIb 変異体である A318C、D319C、Q595NTT と β 3 変異体である V332C、S674C、D552C、V359C、S77C、S147C、D119A、S121A、Y122A、S123A、D126A、D127A、D158A、R214A、N215A、D217A、P219A、D220A、M335del の cDNA は site-directed mutagenesis 法

を用いて作成した。

II. 細胞培養とトランスフェクション

Chinese hamster ovary (CHO-K1) 細胞は 10% fetal calf serum、1% penicillin and streptomycin、1% non-essential amino acids 添加 Dulbecco's modified Eagles medium を用い 37 °C、CO₂ 濃度 5% の incubator で行った。50 µg の αIIB cDNA は 50 µg の β3 cDNA と一緒に CHO-K1 細胞へ electroporation 法を用いてトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞は 48 時間後に培養皿から剥離し解析に用いた。

III. Flow Cytometry

細胞を剥離した後 1mM Ca²⁺/1mM Mg²⁺加 HEPES-Tyrode buffer (HTB) に再浮遊させ、各モノクローナル抗体 10µg/ml と混和し氷上で 30 分間反応させた。遠心洗浄した後、二次抗体として RPE 標識抗マウス IgG と氷上で 30 分間反応させた。遠心洗浄の後細胞を 1mM Ca²⁺/1mM Mg²⁺加 HEPES-buffered saline (HBS) に再浮遊させ、FACSCalibur を用いて細胞の各モノクローナル抗体による陽性率と蛍光強度を測定した。

IV. フィブリノーゲン結合実験

野生型あるいは変異を有する αIIB cDNA 50 µg と野生型 β3 cDNA 50 µg を CHO 細胞にトランスフェクトした。48 時間後細胞を剥離して 10 µg/ml の抗 αIIB モノクロー

ナル抗体 PL98DF6 を含有する HTB に再浮遊して氷上で 30 分間反応させた後細胞を遠心洗浄し、RPE 標識抗マウス IgG と氷上で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後 1µM の FITC 標識フィブリノーゲン (FITC-Fbg)、10 µg/ml の各種モノクローナル抗体あるいは 1mM の GRGDS ペプチドを含んだ HTB と氷上で 2 時間反応させた。細胞を 1mM Ca²⁺/1mM Mg²⁺加または 1mM Mn²⁺加 HBS に再浮遊させ、FACSCalibur を用いて FL2>500 の領域の細胞集団の平均蛍光強度 (FL1) を測定した。

C. 研究結果

I. フィブリノーゲンと αIIBβ3 conformer との結合実験。

前年度の研究結果で、αIIBβ3 とフィブリノーゲンの高親和性結合がおこるためには、αIIBβ3 の立体構造がいわゆる extended form をとり、かつ αIIBβ3 の頭部を形成する β-hybrid domain が swing-out している (extended with open head) 必要があることを報告した。図 3 はこの時の実験に用いた、特定の conformer に固定された αIIBβ3 変異体のデザインを示したものである。β3-V332C/S674C (V332C-S674C)、αIIB-A318C/β3-D552C (A318C/D552C) はそれぞれ β 鎖の頭部と脚部、α 鎖の頭部と β 鎖の脚部の間に disulfide 結合を挿入

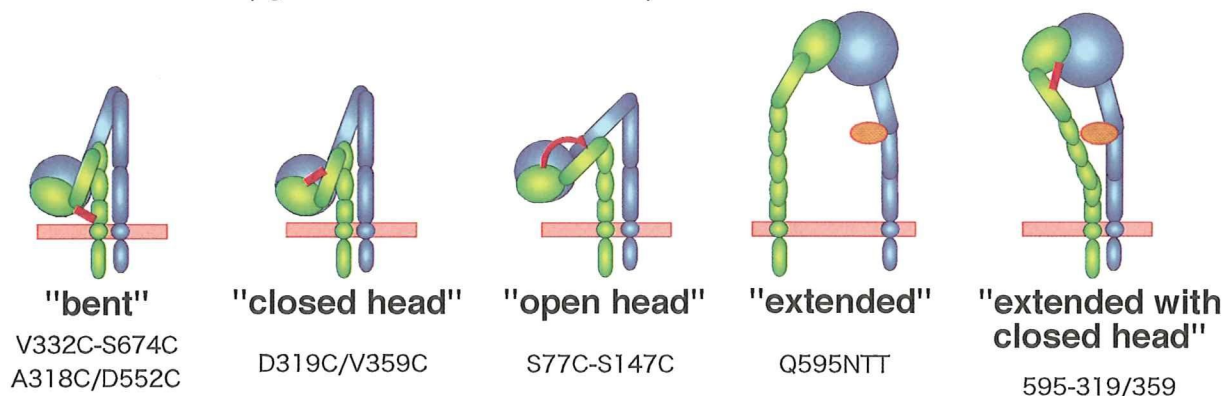


図3 今回の実験で使用した αIIBβ3 変異体のデザイン。

し bent form に固定された変異体、 α IIb-D319C/ β 3-V359C (D319C/V359C) は α 鎖の頭部と β 鎖の hybrid ドメインの間に disulfide 結合を挿入し、hybrid ドメインが swing-out できない closed head の状態に固定された変異体、反対に β 3-S77C/S147C (S77C-S147C) は hybrid ドメインが常に swing-out した open head の状態に固定された変異体、 α IIb-Q595NTT (Q595NTT) は α 鎖脚部の *genu* に N-glycan 結合部位を挿入することによって 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 となるようにデザインされたものである。これらの変異体を CHO 細胞に発現し、これらの細胞とフィブリノーゲンの結合を測定して比較した。図 4 A に示したように、bent form に固定された変異体 V332C-S674C、A318C/D552C、あるいは closed head に固定された D319C/V359 は活性化抗体 PT25-2 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 S77C-S147C 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 に固定された Q595NTT では、活性化抗体なしで 100%に近い活性化が観察された。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。これらの結果から、フィブリノーゲンは bent form、closed head とは全く結合せず、extended with open head のみと選択的に結合することが明らかになった。

以上の結果は全て $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下で得られたものである。次に我々は Mn^{2+} 存在下で同じ実験を行った (図 4 B)。

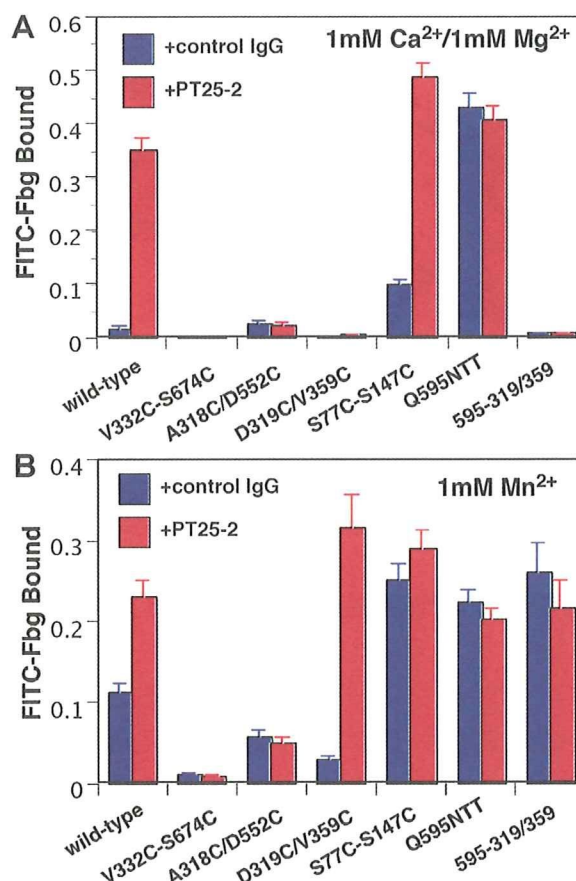


図 4 異なる 2 価イオン存在下における、 α IIb β 3 変異体とフィブリノーゲンの結合

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下と同様に、フィブリノーゲンと bent form との結合は非常に弱く、open head を有する conformer とは活性化抗体なしでも強く結合した。しかしながら $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下と異なり、活性化抗体存在下では closed head を有する conformer とも結合がみられ、extended with closed head とは活性化抗体なしでも強い結合が観察された。これらの結果は、 Mn^{2+} 存在下では α IIb β 3 の活性化は起き上がりに依存し、hybrid ドメインの swing-out には依存しないことを示唆している。

II. 2 価イオン結合部位の α IIb β 3-フィブリノーゲン結合に与える影響

使用する 2 価イオン条件の違いによって、何故 α IIb β 3 活性化に必要な構造が異なるのであろうか？この問いに答えるため、次

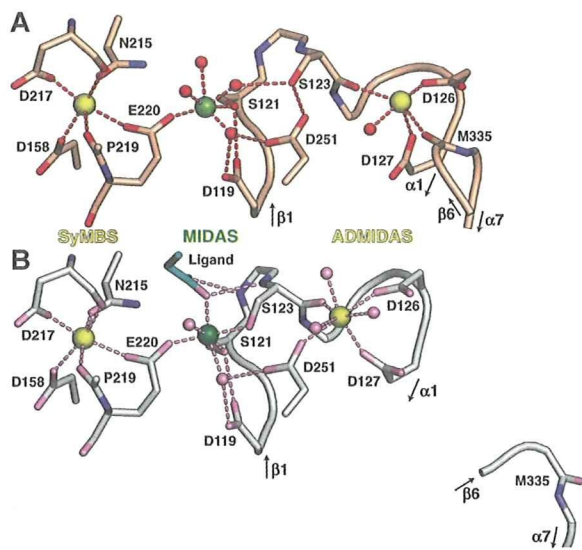


図5 α IIb β 3 結晶構造における2価イオン結合部位

にインテグリン分子内に存在する2価イオン結合部位がリガンド結合に与える影響を調べた。 α IIbには4個、 β 3には3個の2価イオン結合部位が存在することが、結晶構造から明らかにされている。この内、 β 3の3個の2価イオン結合部位は、それぞれMIDAS、ADMIDAS、LIMBS (SyMBS)とよばれ、リガンド結合の調節に関与することがわかっている。図5は $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下におけるリガンド非存在下(A)、リガンド存在下(B)での各イオンの α IIb β 3結晶構造における結合部位を示したものである。リガンドの有無にかかわらず、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下ではMIDASは Mg^{2+} (緑)で占められており、ADMIDAS、SyMBSには Ca^{2+} (黄)が結合している。MIDASはS121、E220から直接の配位と、D119、S123、D251からの水分子を介した間接的な配位を受ける。リガンド存在下では2価イオン結合部位の再構成がおこり、MIDASはリガンドとS121、E220の他にS123から直接の配位と、D119、D251からの水分子を介した間接的な配位を受けるようになる。リガンド結合前後でSyMBSに大きな変化は無いが、ADMIDASはリガ

ンド結合後に大きくMIDAS側にシフトする。リガンド非存在下では、ADMIDASは β 1- α 1 loopのS123、D126、D127と β 6- α 7 loopのM335主鎖のカルボニル酸素から直接の配位をうける。しかし、リガンド存在下ではhybridドメインのswing-outに伴いM335からの配位がはずれ、代わりにD251からの配位を受ける。この結果、ADMIDASとともに β 1- α 1 loopは全体的にMIDAS側にシフトすることになる。

これらの2価イオン結合部位を構成するアミノ酸残基をAlanineに置換し、フィブリノーゲン結合を調べたところ、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下ではすべての変異で著明な結合低下がみられたが、D126A、D127A、M335のdeletion mutantであるM335delで、PT25-2存在下でわずかな結合が観察された(図6A)。 Mn^{2+} 存在下でも同様にすべての変異で結合低下がみられたものの、SyMBSを構成する各アミノ酸残基、特にD217の変異では、PT25-2存在下で有意な

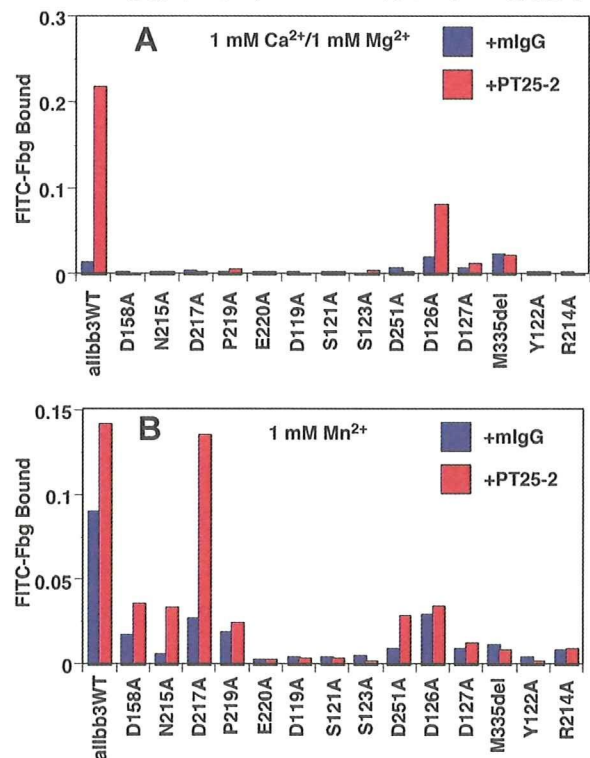


図6 2価イオン結合部位の変異が α IIb β 3-フィブリノーゲン結合に与える影響。

結合がみられた。また、ADMIDAS を構成する D251、D126 の変異でも PT25-2 存在下でごくわずかではあるが結合が観察された (図 6 B)。

III. α IIb β 3 extended form における 2 価イオン結合部位の役割

活性化抗体 PT25-2 は α IIb 鎖 β -propeller domain の下面に結合することがわかっており、インテグリンの起き上がりを誘導することで活性化をおこすと推測される。よって上記の結果から、インテグリンが起き上がった状態では、2 価イオン結合部位に異常があってもある程度のリガンド結合が起こりうる可能性が示唆された。しかし、PT25-2 による詳細な活性化メカニズムは明らかではない。そこで、インテグリン構造への影響がもっと明確な Q595NTT 変異を同時に導入することにより、2 価イオン結合部位がリガンド結合に与える影響を調べた。すでに述べたように、 α IIb の Q595NTT 変異は脚部の折れ曲がり部位に大きな糖鎖を結合するため、 α IIb 鎖を常に起き上がった状態に固定する変異である。図 7 に $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下と Mn^{2+} 存在下におけるこれらの変異体へのフィブリノーゲン結合を示した。全体的に、図 6 で示した結果がより誇張された結果が得られた。注目すべきことに、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下で D126A と D127A において有意なフィブリノーゲン結合が観察された。

D. 考察

本研究では、 α IIb β 3 と H12 ペプチドとの結合メカニズムを明らかにすることを目的とする。本年度は、 α IIb β 3 活性化における 2 価イオンの作用機序についての検討を行った。これまでの研究で、インテグリンがリガンドと高親和性結合をするためには、インテグリンが起き上がり、かつ頭部の hybrid ドメインが swing-out した状態

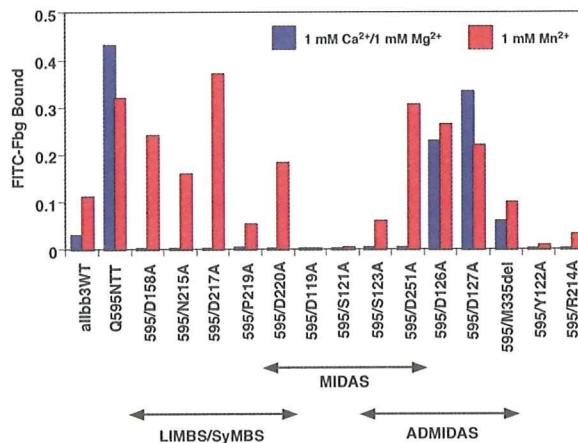


図 7 Extended form に固定された α IIb β 3 変異体における 2 価イオン結合部位の役割。

(extended with open head) であることが必要であることを報告した。今回の報告では、活性化に必要な構造条件が、共存する 2 価イオンの違いによって異なることを示した。この結果は、インテグリン活性化のためにはインテグリンの起き上がりが必要とする説と、必要ではないという説の双方を説明しうる発見であり非常に重要である。

インテグリンのリガンド結合活性は 2 価イオンによる調節をうけることは当初から知られていた。リガンド結合には 2 価イオンの存在が必須だけでなく、2 価イオンの種類によって結合活性が変化する。例えば、 Ca^{2+} は低濃度では活性化作用をもつが、高濃度ではインテグリンによっては阻害作用を及ぼす。一方、 Mg^{2+} は弱い活性化作用をもち、 Mn^{2+} は強力な活性化作用を有する。これらの作用は、 β 鎖に存在する 3 個の 2 価イオン結合部位の機能に起因すると考えられている。このうち MIDAS に結合したイオンは直接リガンドの一部と結合するため、インテグリン機能に必須である。LIMBS/SyMBS に結合したイオンはリガンドと直接結合しないものの、MIDAS を維持するために必要であり、 Ca^{2+} による positive regulatory site と考えられている。

一方、ADMIDAS はその変異がリガンド結合を促進することから、Ca²⁺による negative regulatory site と考えられている。リガンド結合前とリガンド結合後の α IIb β 3 の 2 価イオン結合部位の結晶構造を比較すると、ADMIDAS に最も大きな変化が起きていることがわかる (図 5)。リガンド結合前には β 6- α 7 loop の M335 のカルボニル酸素が ADMIDAS イオンに配位しているが、リガンド結合後には hybrid domain の swing-out に伴って β 6- α 7 loop が大きく変位するためにこれがはずれ、代わりに D251 のカルボキシル基が配位するようになる。また、S123 が MIDAS に直接配位することにより、ADMIDAS は MIDAS 側に大きくシフトし、これに伴って β 1- α 1 loop の構造も変化する。この 2 価イオン結合部位周辺の構造変化がインテグリンの活性化をおこすと考えられる。

われわれの結果では、hybrid ドメインの swing-out を阻害しても、Mn²⁺存在下ではインテグリンが起き上がってればフィブリノーゲンを結合した。このことは Mn²⁺ はリガンド存在下では β 6- α 7 loop の変位がなくても M335 の配位からはずれ、図 5 B に近い状態になりうることを示唆している。実際に α V β 3 の bent form の結晶内で、RGD ペプチド存在下で ADMIDAS の Mn²⁺が M335 からはずれ、代わりに D251 が配位することが観察されている。これは Mn²⁺が Ca²⁺と異なり、カルボニル酸素との親和性が低いことがその理由と考えられる。しかし、一步進んで ADMIDAS イオンに配位するアミノ酸残基にかわり、D251 が配位することがイオンのシフトをおこし、活性化につながると仮定した場合、D126、D127 の変異は 2 価イオンの D251 への配位を促し、Ca²⁺/Mg²⁺存在下でも活性化を誘導するはずである。実際に D126A、D127A はインテグリンが起き上がった状

態であれば Ca²⁺/Mg²⁺存在下でもフィブリノーゲンを結合した (図 7)。試験的な実験では、この結合は hybrid ドメインの swing-out を阻害しても影響をうけなかった (データ掲載せず)。通常 Ca²⁺/Mg²⁺存在下では swing-out を阻害することによってフィブリノーゲン結合は完全に阻害される。これらの結果は D126A、D127A 変異が“リガンド結合部位の活性化”を起こしていることを示唆している。D126A、D127A 変異はすでに報告されており、リガンド結合を促進することが示されている。しかし、これは negative regulatory site である ADMIDAS 自体が壊れ、2 価イオンが結合できなくなるためと考えられている。今後は D126A、D127A によって 2 価イオン結合が妨げられるか否か、 β 3 鎖の遺伝子組み換え断片を作成して調べる必要がある。

前述したように、インテグリンの活性化にはインテグリンの起き上がりが必要であるとする報告と、必要ではないとする二つの相反する報告がある。起き上がりが必要ではないとする説の根拠は、1) α V β 3 インテグリンが bent form のままで RGD ペプチドと結合することが結晶構造で観察された、2) 電子顕微鏡で α V β 3 インテグリンが bent form のままでフィブロネクチン断片と結合することが示されたことによる。一方、起き上がりが必要であるとする説の根拠は、1) 電子顕微鏡で α V β 3 インテグリンの extended form が RGD ペプチド存在下で有意に増加すること、2) 本研究でも示した通り、変異体作成実験により、extended form に固定された分子は高活性を示し、bent form に固定された分子は低活性を示すことによる。しかし、低分子リガンドとインテグリンの結合に活性化は元来必要ではなく、現在までにインテグリンと高分子リガンドが結合した複合体の結晶構造は得られていないため、この論争はい

まだに決着していない。今回のわれわれの結果では、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下では起き上がりとは hybrid ドメインの swing-out の両方がおきない限り、活性化はおこらなかった。しかし、 Mn^{2+} 存在下では hybrid ドメインの swing-out は必要なく、起き上がりのみが必要であった。これらの結果は、 Mn^{2+} 存在下ではインテグリンのリガンド結合部位そのものは活性化状態にあるものの、頭部を細胞膜側に向けているためにリガンドのアクセスが障害され、結合しない可能性が考えられる。これまでに結晶構造あるいは、電子顕微鏡によって観察されたインテグリン-リガンド複合体の多くは $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ではなく Mn^{2+} 存在下で行われている。また、インテグリン側も膜貫通ドメイン以下をもたない遺伝子組み替え断片が用いられており、もともとリガンドのアクセス障害はおこりえない。すなわち、これらの実験条件下ではインテグリンは bent form のまま高分子リガンドと結合することが可能であったと考えられる。われわれの仮説を証明するためには、SPR 測定などの無細胞測定系を用いて、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 変異体とフィブリノーゲンの結合を調べる必要がある。

これまでの実験で、H12 担持人工粒子はフィブリノーゲンとほぼ同じ結合動態を示すことが判明している。よって H12 担持人工粒子を用いても、今回のフィブリノーゲンと同様の結果が得られると推測される。しかし、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 存在下では hybrid ドメインが swing-out した open head をもつ

$\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 変異体と非常に強く結合するなど、フィブリノーゲンと異なる点もみられる。次年度の研究では、H12 担持人工粒子を用いて実験を行い、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -H12 担持人工粒子結合における 2 価イオンの役割について解析を行いたい。また、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -リガンド結合の測定系については、従来の細胞を用いた系ではない無細胞測定系を確立し、解析を発展させていくつもりである。最後に、H12 担持人工粒子の安全性を確認する手段として、H12 担持人工粒子が血小板刺激作用を有するかどうかを、細胞内シグナル経路の活性化を調べることで遂行していきたい。

E. 結論

$\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 活性化に必要なインテグリン全体の構造変化は、2 価イオン条件の違いによって異なる。これは ADMIDAS における 2 価イオンの挙動によると考えられ、ADMIDAS のシフトに伴って周辺のリガンド結合部位の再構成が行われることが活性化を起こすと想定される。

F. 健康危険情報：無し。

G. 研究発表

- 1 論文発表：無し。
- 2 学会発表：無し。

H. 知的財産権の出願・登録：無し。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., <u>Handa, M.</u> , <u>Ikeda, Y.</u> , and <u>Takeoka, S.</u>	Visualization of Liposomes Carrying Fibrinogen γ -Chain Dodecapeptide Accumulated to Sites of Vascular Injury Using Computed Tomography	<i>Nanomedicine</i>	6 巻	391 - 396	2010
Okamura Y, Fukui Y, Kabata K, Suzuki H, Handa M, Ikeda Y, and <u>Takeoka S.</u>	Novel Platelet Substitutes: Disk-Shaped Biodegradable Nanosheets and their Enhanced Effects on Platelet Aggregation	<i>Bioconju. Chem.</i>	20 巻	1958 - 1965	2009
Okamura Y, Goto T, Niwa D, Fukui Y, Osaka T., and <u>Takeoka, S.</u>	Fabrication of free-standing albumin nanosheets having heterosurfaces.	<i>J. Biomed. Mater. Res. A.</i>	89A 巻	233 - 241	2009
Tsuji T, <u>Takeoka S.</u> , Okamura Y, Sudo R, Ikeda Y, Tanishita K.	Motion of polymerized albumin particles in a model arteriole in the presence of red blood cells	<i>J Biorheol.</i>	1 巻	29 - 34	2009
Wada T, Okamura Y, <u>Takeoka S.</u> , Sudo R, Ikeda Y, Tanishita K.	Deformability and adhesive force of artificial platelets measured by atomicforce microscopy	<i>J Biorheol.</i>	1 巻	35 - 40	2009
Fujie, T., Matsutani, N., <u>Kinoshita, M.</u> , Okamura, Y., Saito, A., and <u>Takeoka, S.</u>	Adhesive, flexible, and robust polysaccharide nanosheets integrate for tissue-defect repair	<i>Adv. Funct. Mater.</i>	19 巻	2560 - 2568	2009
Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, <u>Maruyama T.</u> , Otagiri M.	Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG)ylated liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce the accelerated blood clearance phenomenon in mice	<i>Drug Metab Dispos.</i>	37(11) 巻	2197 - 2203	2009

IV. 研究成果の刊行物・別冊



Visualization of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide accumulated to sites of vascular injury using computed tomography

Yosuke Okamura, PhD^{a,b}, Kaoruko Eto, MS^a, Hitomi Maruyama, BS^b,
Makoto Handa, MD, PhD^b, Yasuo Ikeda, MD, PhD^a, Shinji Takeoka, PhD^{a,*}

^aDepartment of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, TWIns, Tokyo, Japan

^bDepartment of Transfusion Medicine and Cell Therapy, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

Received 29 November 2008; accepted 13 July 2009

Abstract

We have constructed liposomes with hemostatic activity as a platelet substitute using moderately thrombocytopenic rats. The liposomes were conjugated with the dodecapeptide (HHLGGAKQAGDV: H12), which is a fibrinogen γ -chain C-terminal sequence (γ 400–411). To visualize liposome accumulation at the site of vascular injury by *in vivo* computed tomography, a water-soluble contrast dye, *N,N'*-bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-[(2*S*)-2-hydroxypropanoylamino]-2,4,6-triiodoisophthalamide (iopamidol), was encapsulated into the H12-conjugated liposomes. We achieved direct visualization of specific accumulation of the H12-(iopamidol)liposomes at the jugular vein injured by ferric chloride and succeeded in semiquantitative analyses of the accumulated amount of H12-liposomes in the injured site. We therefore propose that H12-liposomes that are specifically recruited to, and exert their hemostatic activity at the site of vascular injury, have a significant potential as a carrier and/or as an ideal platelet substitute. Furthermore, the H12-(iopamidol)liposomes would also be clinically useful as diagnostic agents for pathological thrombus detection and as contrast dyes for hepatosplenography.

From the Clinical Editor: The authors have constructed liposomes with hemostatic activity as a platelet substitute using moderately thrombocytopenic rats. They propose that H12-liposomes that are specifically recruited to, and exert their hemostatic activity at the site of vascular injury, have a significant potential as a carrier and/or as an ideal platelet substitute. Furthermore, the H12-(iopamidol) liposomes would also be clinically useful as diagnostic agents for thrombus detection and as contrast dyes for hepatosplenography.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Platelet substitute; Dodecapeptide; Liposome; Iopamidol; Computed tomography

Platelet transfusion has an important function in supportive therapy for patients with thrombocytopenia caused by hematological malignancies, or as a result of intensive chemotherapy and radiation therapy for cancer. However, the shortage of platelet concentrates has always been a serious issue because of short shelf-life (4 days in Japan), insufficient donation, the risk of viral and bacterial infections, as well as alloimmunization associated with transfusion. For these reasons several trials have

been conducted to develop platelet substitutes (artificial platelets) reproducing platelet functions such as infusible platelet membranes,¹ solubilized platelet membrane protein-conjugated liposomes (plateletsomes),² fibrinogen-bonded red blood cells,³ fibrinogen-bearing liposomes,⁴ fibrinogen-coated albumin microcapsules (synthocytes),⁵ and arginine-glycine-asparaginic acid (RGD) peptide-bound red blood cells (thromboerythrocytes).⁶ These platelet substitutes consist of materials derived from blood components.

Glycoprotein (GP) IIb/IIIa, which exists on the platelet membrane, changes from an inactive to an active form when platelets adhere to collagen exposed on sites of vascular injury.^{7,8} The activated GPIIb/IIIa acts as a receptor for fibrinogen and von Willebrand factor,^{9,10} which leads to platelet aggregation.¹¹ A dodecapeptide HHLGGAKQAGDV (H12), corresponding to the fibrinogen γ -chain C-terminal sequence (γ 400–411), is a specific binding site of the ligand for activated GPIIb/IIIa.¹²

This work was supported by Health and Labor Sciences Research Grants (Research on Pharmaceutical and Medical Safety, M.H., Y.I., and S.T.), Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan. Y.O. was the recipient of Japan Health Sciences Foundation.

*Corresponding author. Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, TWIns, Tokyo, Japan.

E-mail address: takeoka@waseda.jp (S. Takeoka).

1549-9634/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.nano.2009.07.004

Our strategy for development of platelet substitutes is straightforward; biocompatible and biodegradable carriers such as phospholipid vesicles (liposomes)^{13–16} and polymerized albumin particles^{17–19} are specifically accumulated at sites of vascular injury by virtue of their own mass. To construct a carrier having an accumulation ability specific to the activated GPIIb/IIIa, we conjugated an H12 sequence instead of fibrinogen to these carriers,^{12,20–22} because isolated human fibrinogen is not stable.¹⁷ We recently reported that the H12-conjugated liposomes dose-dependently reduced the bleeding time in rats with moderate thrombocytopenia *in vivo*.¹⁴ However, we have not previously confirmed by *in vivo* studies whether the H12-liposomes are specifically accumulated at sites of vascular injury.

N,N'-bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-[(2*S*)-2-hydroxypropanoylamino]-2,4,6-triiodoisophthalamide (iopamidol) is a nonionic contrast dye and is used clinically for ureterography and angiography.²³ Furthermore, it is quite easy to encapsulate iopamidol into the liposome, because iopamidol is a water-soluble contrast dye.

The purpose of this study was to visualize specific accumulation of the H12-liposomes as platelet substitutes at the sites of vascular injury. In this study we prepared H12-liposomes encapsulating iopamidol (H12-(iopamidol)liposomes), intravenously infused the H12-(iopamidol)liposomes into rats, and observed accumulation of the liposomes at jugular vein injured by ferric chloride (FeCl₃) and organ distribution using an eXplore Locus computed tomography (CT) system (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, England).

Methods

Materials and reagents

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) and cholesterol were purchased from Nippon Fine Chemical (Osaka, Japan). 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-[monomethoxy poly(ethyleneglycol) (5000) (PEG-DSPE, Mn 5.1 kDa) was purchased from NOF (Tokyo, Japan). 1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG),²⁴ and H12-PEG-lipid,¹⁴ in which the fibrinogen γ -chain dodecapeptide (C-HHLGGAKQAGDV, Cys-H12) was conjugated to the malimide group at the end of the PEG-lipids, were synthesized in our laboratory. *N,N'*-bis[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl]-5-[(2*S*)-2-hydroxypropanoylamino]-2,4,6-triiodoisophthalamide (iopamidol) as a contrast dye was purchased from Fuji Pharma (Tokyo, Japan). Sephadex G25 for gel permeation chromatography was purchased from GE Healthcare UK. FeCl₃ was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri).

Preparation of iopamidol-encapsulated liposomes carrying H12

We prepared iopamidol-encapsulated liposomes carrying H12 (H12-(iopamidol)liposomes) as follows. DPPC (100 mg, 136 μ mol), cholesterol (52.7 mg, 136 μ mol), DHSG (18.9 mg, 27.2 μ mol), PEG-DSPE (5.2 mg, 0.90 μ mol), and H12-PEG-lipid (4.7 mg, 0.90 μ mol) were dissolved in benzene and then freeze-dried. The resulting mixed lipids were hydrated with

phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) with an iopamidol adjusted to an iodine concentration of 185 mg/mL, and the resulting liposome dispersion was extruded with membrane filters (pore size: 0.80, 0.45, and then 0.22 μ m, Durapore; Millipore, Tokyo, Japan). The liposomes were then washed with PBS by centrifugation (100,000g, 30 minutes, 4°C). The residual iopamidol was removed on Sephadex G25 (GE Healthcare UK), and the H12-(iopamidol)liposome fraction was collected. The particle diameter was analyzed by a dynamic light scattering method (N4 PLUS; Beckman-Coulter, Fullerton, Florida). Alternatively, we also prepared (iopamidol)liposomes using mixed lipids in the absence of H12-PEG-lipid.

Stability of the H12-(iopamidol) liposomes

The H12-(iopamidol)liposomes at a lipid concentration of 10 mg/mL were incubated at 4°C and collected over time. After separation on Sephadex G25 (GE Healthcare UK), the H12-(iopamidol)liposome fraction was collected. The liposomes were dissolved by adding 2% (vol/vol) deca(oxyethylene) dodecyl ether (final concentration: 1% vol/vol), and the solution was heated at 42°C for 2 minutes to measure the amount of iopamidol encapsulated. Iopamidol was quantified by high-pressure liquid chromatography on a TSK-GEL ODS-100V column (TOSOH, Tokyo, Japan) with 4.6 mm outer diameter \times 250 mm height using a mobile phase of 97% (vol/vol) phosphoric acid (pH 7.0) and 3% (vol/vol) methanol containing 30 mM triethylamine at 1 mL/min by the detection wavelength of 240 nm. In parallel, the lipid concentration was quantified using a commercial kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).

CT imaging

All animal studies were approved by the Animal Subject Committee of Keio University, School of Medicine. Male Wistar rats (250–300 g; CLEA Japan, Tokyo, Japan) were anesthetized with sodium pentobarbital at a dose of 30 mg/kg, and the H12-(iopamidol)liposomes were infused into the tail vein at a lipid dose of 130 mg/kg ([iodine] = 60 mg/kg) before induction of thrombi with FeCl₃. For induction of thrombus formation with FeCl₃, a 0.5 \times 1 cm² rectangle of Whatman filter paper (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, United Kingdom) was saturated with a 35% (wt/vol) solution of FeCl₃ and applied beneath the jugular vein for 30 minutes. After killing the animal the injured site was observed using an eXplore Locus computed tomography (CT) system (GE Healthcare UK). (Iopamidol) liposomes prepared without H12 ([lipid] = 130 mg/kg, [iodine] = 60 mg/kg) or iopamidol solution alone ([iodine] = 60 mg/kg) were used as control groups. We also observed the various organs 1 hour after infusion of the H12-(iopamidol)liposomes using the CT system. Each experiment was performed at least three times.

We calculated the amount of lipids accumulated at the thrombus induced with FeCl₃ as follows: 1 mL of the H12-(iopamidol)liposome dispersion at a range of lipid concentrations (0.25–10 mg/mL) was added to 1.5-mL tubes. After observation of the tubes by CT, the region of interest (ROI) was outlined in the tube, and the outlined volume (mm³) and total

number of voxels (arbitrary unit) were calculated. From the outlined volume and a known lipid concentration in the tube, the amount of lipid in the ROI was estimated; the amount of lipid per voxel was then calculated from the amount of lipid in the ROI divided by the total number of voxels. Alternatively, the CT value per voxel was calculated from the average CT value in the ROI divided by the total number of voxels. We obtained a calibration curve of the CT value per voxel vs. the amount of lipid per voxel (ng). Finally, the amount of lipid accumulated at the injured jugular vein was calculated by extrapolation from the calibration curve of the average CT value for the total accumulation volume, from the three-dimensional (3D) image (see later discussion of Figure 3, D).

Statistical analysis

Comparisons for the H12-(iopamidol)liposome group at the injury site vs. the (iopamidol)liposome group at the injury site or the H12-(iopamidol)liposome group at the noninjury site (see later discussion of Figure 4, B) were carried out using Tukey-Kramer tests. A *P* value of less than .05 was considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using Stat View software (Hulink, Tokyo, Japan).

Results

Iopamidol, which is a water-soluble and nonionic contrast dye used for ureterography, was encapsulated into the inner aqueous phase of the liposome (the molar ratio of DPPC/cholesterol/DHSG = 5:5:1), and the liposome surface was modified with PEG-DSPE (0.3 mol%) and H12-PEG-lipids (0.3 mol%). Indeed, the H12-(iopamidol)liposomes were successfully prepared to homogeneity with a mean diameter of 250 ± 80 nm. The encapsulation ratios of iopamidol into the liposomes were maintained when the H12-(iopamidol)liposomes were kept at 4°C on days 0, 1, and 4. The ratios were calculated to be 100.0, 105.4, and 99.8%, respectively. Furthermore, endotoxin contamination in the liposome dispersion at a lipid concentration of 10 mg/mL was below 0.25 EU/mL, which was regarded as acceptable for an *in vivo* study.

First, iopamidol alone at an iodine dose of 60 mg/kg was infused into rats, and its organ distribution was observed using the eXplore Locus CT system (GE Healthcare UK). Iopamidol was rapidly excreted into the bladder via the kidney and ureter, because iopamidol is a water-soluble low-molecular-weight compound (Figure 1). It was also obvious that iopamidol did not stain blood vessels. In the case of the H12-(iopamidol)liposomes at a lipid dose of 130 mg/kg ([iodine] = 60 mg/kg) 1 hour after infusion, blood vessels and urinary organs such as kidney, ureter, and bladder showed no evidence of staining. However, liver and spleen were clearly stained (Figure 2, A–C), as well as (iopamidol)liposomes without H12 (data not shown). Furthermore, we confirmed that cardiac tissue was also clearly stained, suggesting that the iopamidol was stably encapsulated into the liposome, and the H12-(iopamidol)liposomes were stably circulating in blood. It was noted that encapsulation of iopamidol into the liposome changed the organ distribution from ureter and bladder to liver and spleen.

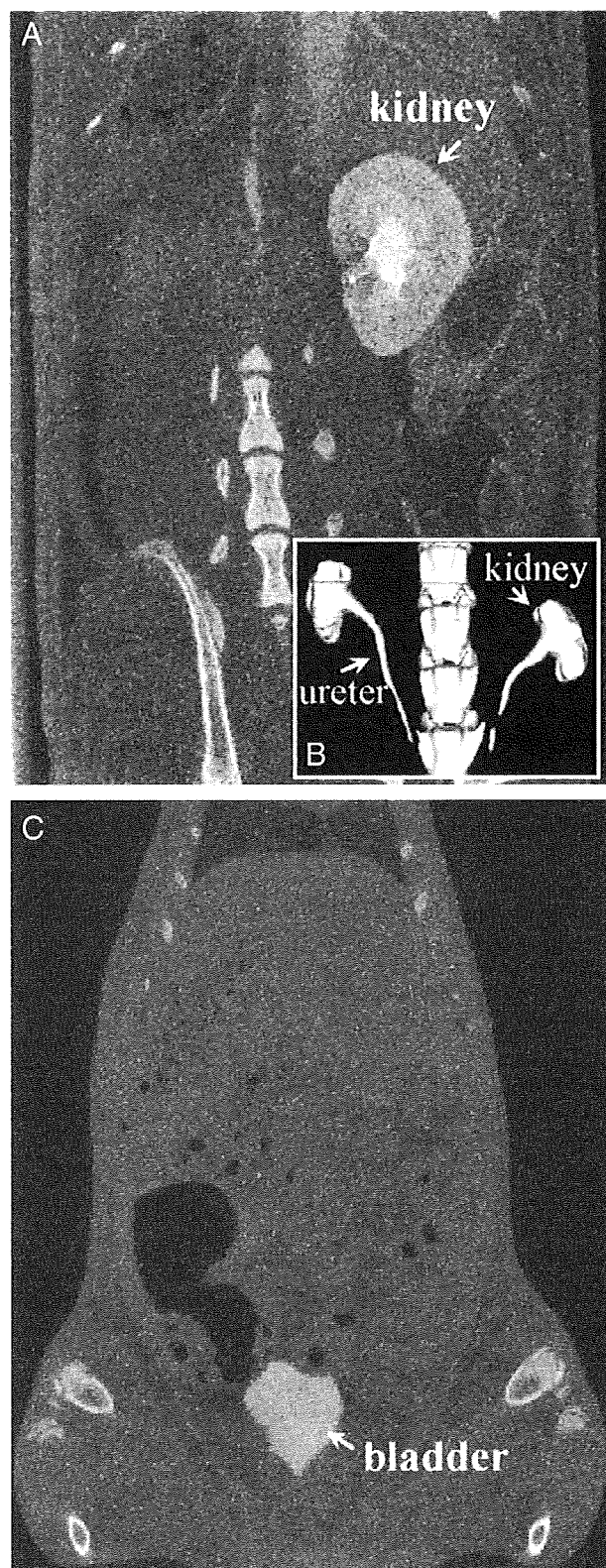


Figure 1. Abdominal CT images 5 minutes after infusion of an iopamidol solution into the rat. (A) Two-dimensional (2D) CT image of kidney. (B) 3D CT image of the kidney and ureter. (C) 2D CT image of the bladder. The administered amount of iopamidol was 60 mg/kg equivalent of iodine.

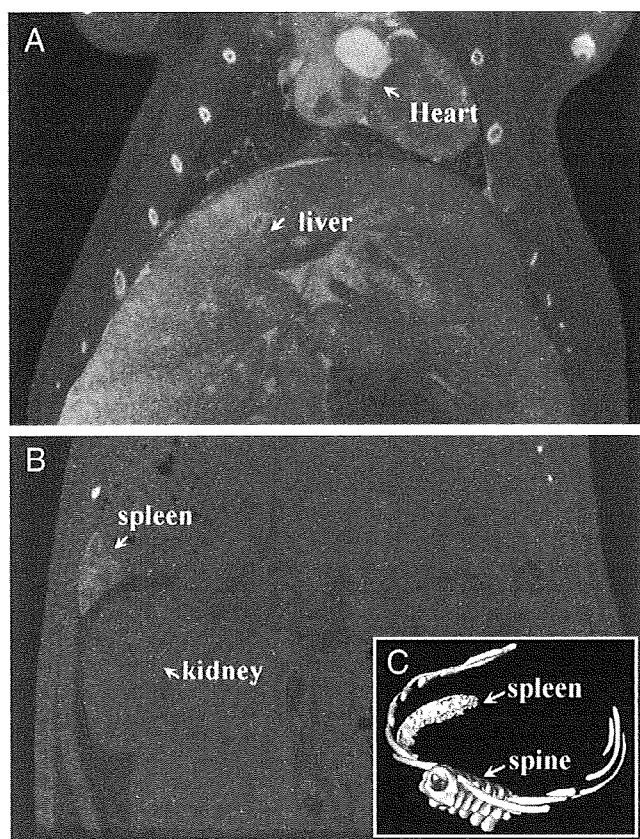


Figure 2. Abdominal CT images 60 minutes after infusion of the H12-(iopamidol)liposomes into the rat. (A) 2D image of the liver and heart stained with the liposomes. (B) 2D and (C) 3D CT images of the spleen stained with the liposomes. The administered amount of the H12-(iopamidol)liposomes was 130 mg/kg equivalent of lipid ([iodine] = 60 mg/kg).

Next, we tried to visualize the accumulation of the H12-(iopamidol)liposomes at the injured sites of jugular vein. The H12-(iopamidol)liposomes at a lipid dose of 130 mg/kg ([iodine] = 60 mg/kg) were infused into the tail vein. Five minutes after infusion, a rectangle of Whatman filter paper ($0.5 \times 1 \text{ cm}^2$) saturated with a 35% solution of FeCl_3 was applied beneath the jugular vein for 30 minutes. The jugular vein turned black as shown in Figure 3, A, indicating that the injured jugular vein was occluded with thrombus and blood clot. It was clearly shown by the CT system that the H12-(iopamidol)liposomes accumulated at the 0.5-cm segment of jugular vein exposed to FeCl_3 , whereas the other parts of the jugular vein were not stained (background level) as shown in Figure 3, B. The 3D CT image (Figure 3, C) also clearly shows the accumulation of the H12-(iopamidol)liposomes in the injured jugular vein. When the (iopamidol)liposomes without H12 were used there was no accumulation at the injured site (Figure 3, D and E). Furthermore, it was also clearly shown that the H12-liposomes infused intravenously were specifically accumulated to a postcaval vein exposed by FeCl_3 and a 1-cm length incision site of tail vein made by a no. 11 scalpel blade (data not shown). The iopamidol solution did not stain the injury site (Figure 3, F and G), because there was no

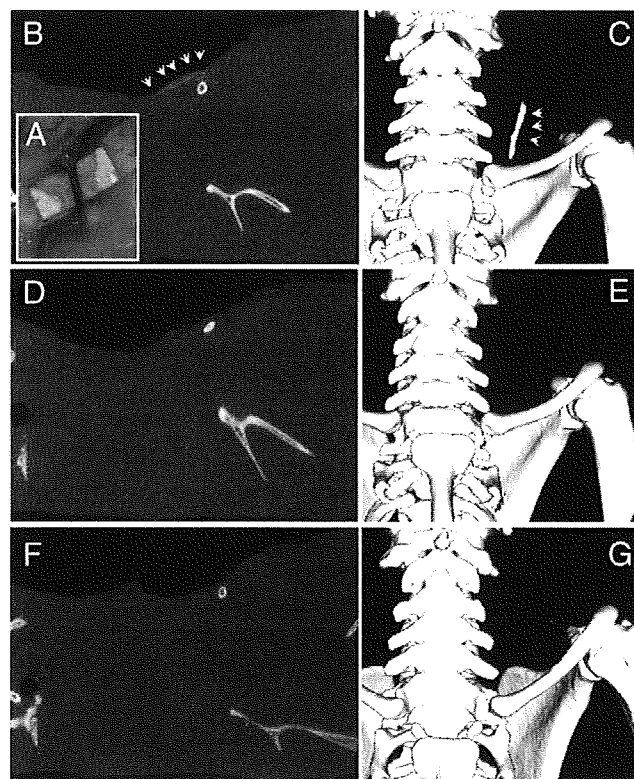


Figure 3. Specific accumulation of H12-(iopamidol)liposomes at the injury site of rat jugular vein using an eXplore Locus CT system (GE Healthcare UK). (A) Photograph of jugular vein on a $0.5 \times 1 \text{ cm}$ rectangle of Whatman filter paper saturated with a 35% (wt/vol) solution of FeCl_3 after 30 minutes. (B) A cross-sectional CT image of the side view of rat infused with H12-(iopamidol)liposomes. (C) a 3D CT image of B. Arrowheads indicate the accumulation points of the H12-(iopamidol)liposomes. (D) A cross-sectional CT image of the side view of rat infused with (iopamidol)liposomes. (E) A 3D CT image of D. (F) A cross-sectional CT image of the side view of rat infused with iopamidol solution. (G) A 3D CT image of F.

mechanism for specific accumulation and iopamidol itself localized rapidly to the bladder as shown in Figure 1. Consequently, we succeeded in specific visualization of the accumulation of the H12-liposomes at the injury site using iopamidol encapsulation.

Finally, we sought to calculate the amount of lipids accumulated at the site of vascular injury. CT images of the H12-(iopamidol)liposome dispersion showed the gradation contrast images of the lipid concentration as shown in the inset of Figure 4, A. As indicated in the Methods section, we obtained a calibration curve with a high correlation coefficient as shown in Figure 4, A (the CT value per voxel vs. the amount of lipid per voxel, in nanograms). When the (iopamidol)liposomes without H12 were infused into rats the average CT value per voxel at the injury site, as shown in Figure 3, E, was calculated to be 163 ± 20 (Figure 4, B). This background level was equal to that obtained for the noninjury site (147 ± 6), suggesting that the (iopamidol)liposomes did not accumulate at the injury site. In the case of the H12-(iopamidol)liposomes as shown in Figure 3, C, the average CT values per voxel at the injury site were

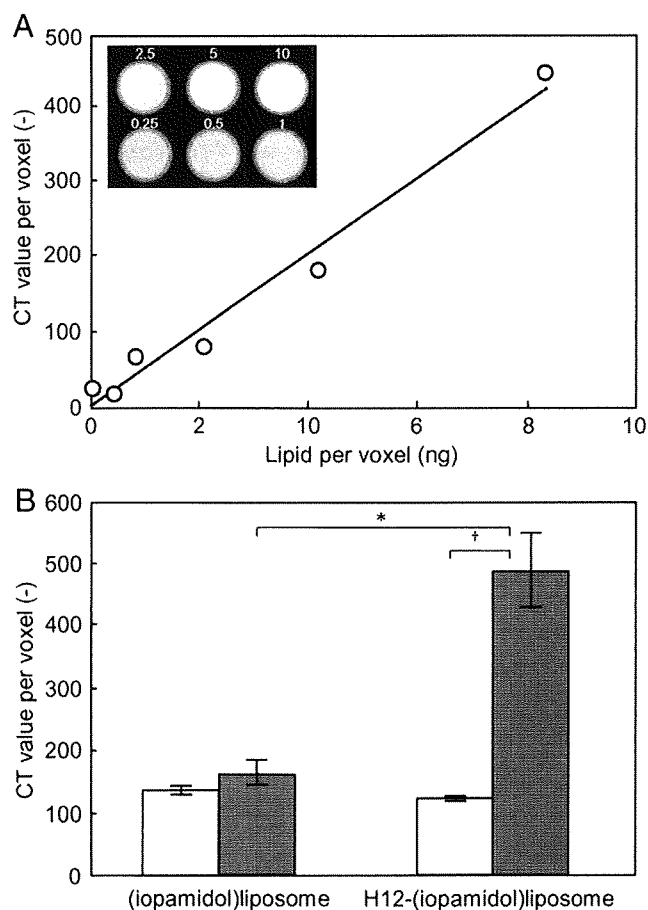


Figure 4. (A) Correlation of average CT values per voxel with the amount of lipid per voxel. Inset shows the CT images of the H12-(iopamidol)liposome dispersion at a lipid concentration of 0.25 to 10 mg/mL. (B) Average CT values per voxel at the injured jugular vein (gray columns) or noninjury site (white columns) after infusion of H12-(iopamidol)liposomes or (iopamidol) liposomes into the rats. * $P < 0.05$ vs. (iopamidol)liposome group at the injury site; † $P < 0.05$ vs. H12-(iopamidol)liposome group at the noninjury site.

significantly increased to 489 ± 61 over that at the noninjury site (135 ± 1) (Figure 4, B). After extrapolation from the calibration curve of the values at the injury and noninjury sites, the amount of lipids of the H12-(iopamidol)liposomes accumulated at the injury site was estimated to be $127 \pm 27 \mu\text{g}$.

Discussion

We confirmed elsewhere that fibrinogen γ -chain dodecapeptide (H12)-conjugated liposomes maintained the ability to specifically bind GPIIb/IIIa on the activated platelet, and that the H12-liposomes dose-dependently shortened the bleeding time of rats with moderate thrombocytopenia as a platelet substitute.¹⁴ Our purpose in this study was to visualize the specific accumulation of the H12-liposomes at the site of vascular injury by iopamidol as a clinically used contrast dye.

We confirmed that the iopamidol was stably encapsulated into the inner aqueous phase of the H12-liposome, because of

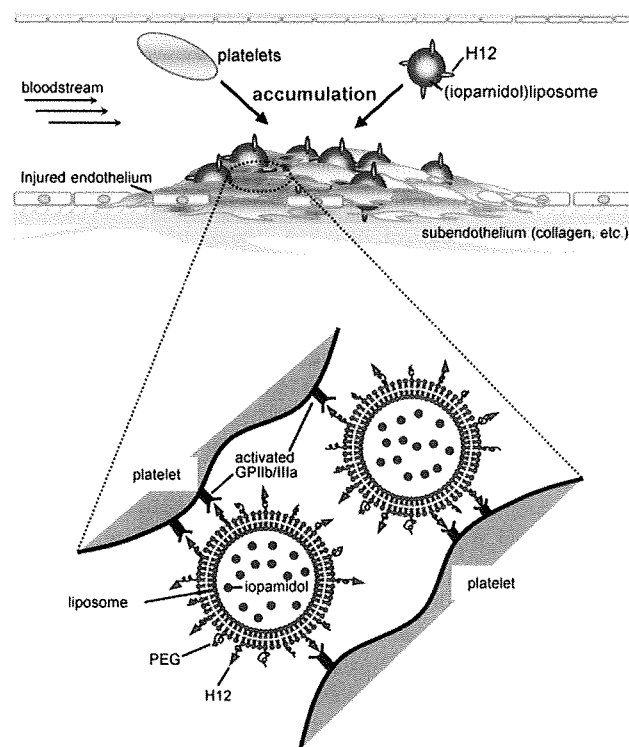


Figure 5. Schematic images of accumulation mechanism of H12-(iopamidol) liposomes at site of endothelial injury. PEG, poly(ethyleneglycol) (5000).

the stable membrane formation by DPPC and cholesterol, the electrostatic repulsion of negatively charged DHSG, and the excluding volume effect of the PEG chains on iopamidol encapsulation. By infusion of the H12-(iopamidol)liposomes into the rats, liver and spleen were shown to be clearly stained, whereas blood vessels and urinary organs such as kidney, ureter, and bladder showed no evidence of staining (Figure 2). We have already shown using a radioisotope technique that liposomes encapsulating hemoglobin as well as empty liposomes are mainly distributed in liver and spleen, and the liposomes containing hemoglobin and phospholipids readily disappeared from Kupffer cells in liver and macrophages in spleen within a week of administration to rats.²⁵ These are regarded as normal physiological pathways for the removal of aged erythrocytes and would also be reasonable pathways for the elimination of liposomes.²⁶ On the other hand, the iopamidol solution was rapidly excreted into the bladder via the kidney and ureter (Figure 1), because iopamidol is a water-soluble low-molecular-weight compound. Our experimental protocol reproduced the clinical use of iopamidol for ureterography. It was noted that encapsulation of iopamidol into the liposome changed the organ distribution from ureter and bladder to liver and spleen.

We succeeded in specific visualization of the accumulation of the H12-liposomes at the injured site using iopamidol encapsulation, based on no accumulation of the (iopamidol)liposomes without H12 and the iopamidol solution at the injured site as shown in Figure 3. This indicated that H12 on the surface of the liposome reproduced the ability to bind GPIIb/IIIa on the

activated platelet, leading to adhesion and aggregation at the site of vascular injury (Figure 5). In other words, we succeeded in detection of the platelet thrombus formation by the H12-(iopamidol)liposomes. This result provided the first direct evidence that the H12-liposomes, which dose-dependently reduced the bleeding time in thrombocytopenic rats,¹⁴ participated in hemostasis by specific accumulation in platelet aggregates at the site of bleeding. Based on the calibration curve of the values at the injury and noninjury sites, the amount of lipids accumulated at the injury site was estimated to be $127 \pm 27 \mu\text{g}$ as shown in Figure 4, corresponding to approximately 0.4% of the total amount of lipid infused into the rats (33 mg). Considering the relatively long blood circulation time (β -phase half-life of H12-liposome: 200 ± 23 minutes) and the accumulation behavior of the H12-(iopamidol)liposomes in liver and spleen as shown above, this amount of lipid accumulation at the injury site seems to be reasonable.

In conclusion, we have succeeded in visualization of the specific accumulation of H12-liposomes at a site of vascular injury using iopamidol encapsulation and CT observation, and in semiquantitative analyses of the H12-liposomes accumulated into the injured site. These results constitute direct evidence that the H12-liposomes participated in hemostasis by specific accumulation in platelet aggregates at the site of bleeding. Thus, the H12-liposomes would be promising carriers as an ideal synthetic platelet substitute that is specifically recruited to and exerts a hemostatic activity at sites of vascular injury. In another respect, it is interesting to note that the organ distribution of iopamidol itself changes from ureter and bladder to liver and spleen on encapsulation of iopamidol into the liposome. We anticipate that H12-(iopamidol)liposomes will be used clinically as diagnostic products for pathological thrombus detection and as contrast dyes for hepatosplenography, and H12-liposomes encapsulating antithrombotic drugs would be useful clinically as therapeutic agents.

References

- Graham SS, Gonchoroff NJ, Miller JL. Infusible platelet membranes retain partial functionality of the platelet GPIIb/IX/V receptor complex. *Am J Clin Pathol* 2001;115:144-7.
- Rybak M, Renzulli LA. A liposome based platelet substitute, the plateletsome, with hemostatic efficacy. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1993;21:108-18.
- Agam G, Livine AA. Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 1992;22:105-12.
- Casals E, Verdager A, Tonda R, Galan A, Escolar G, Estelrich J. Atomic force microscopy of liposomes bearing fibrinogen. *Bioconjug Chem* 2003;14:593-600.
- Levi M, Friedrich PW, Middleton S, De Groot PG, Wu YP, Harris R, et al. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999;5:107-11.
- Coller BS, Springer KT, Beer JH, Mohandas N, Scudder LE, Norton KJ, et al. Thromboerythrocytes: in vitro studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusion. *J Clin Invest* 1992;89:546-55.
- Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002;110:599-611.
- Xiao T, Takagi J, Coller BS, Wang JH, Springer TA. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 2004;432:59-67.
- Mustard JF, Packham MA, Kinlough-Rathbone RL. Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood* 1978;52:453-66.
- Ruggeri ZM, De Marco L, Gatti L. Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *J Clin Invest* 1983;72:1-12.
- De Marco L, Girolami A, Zimmerman TS. Von Willebrand factor interaction with the glycoprotein IIb/IIIa complex. *J Clin Invest* 1986;77:1272-7.
- Kloczewiak M, Timmons S, Hawiger J. Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen γ -chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107:181-7.
- Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y. Rolling properties of rGPIIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWF surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:765-70.
- Okamura Y, Maekawa I, Teramura Y, Maruyama H, Handa H, Ikeda Y, et al. Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen- γ chain dodecapeptide in vitro and in vivo. *Bioconjug Chem* 2005;16:1589-96.
- Kitaguchi T, Murata M, Iijima K, Kamide K, Imagawa T, Ikeda Y. Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ibb α : A potential substitute for platelet transfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:784-9.
- Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ibb α under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 2002;100:136-42.
- Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E. Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules* 2001;2:1192-7.
- Okamura Y, Takeoka S, Teramura Y, Maruyama H, Tsuchida E, Handa M, et al. Hemostatic effects of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles in vitro and in vivo. *Transfusion* 2005;45:1221-8.
- Okamura Y, Fujie T, Maruyama H, Handa M, Ikeda Y, Takeoka S. Prolonged hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide. *Transfusion* 2007;47:1254-62.
- Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen: synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the γ chain. *Biochemistry* 1984;23:1767-74.
- Kloczewiak M, Timmons S, Bednarek MA, Sakon M, Hawiger J. Platelet receptor recognition domain on the γ chain of human fibrinogen and its synthetic peptide analogues. *Biochemistry* 1989;28:2915-9.
- Lam SC, Plow EF, Smith MA, Andrieux A, Ryckwaert JJ, Marguerie G, et al. Evidence that arginyl-glycyl-aspartate peptides and γ chain peptides share a common binding site on platelets. *J Biol Chem* 1987;262:110-5.
- Langheinrich AC, Ritman EL. Quantitative imaging of microvascular permeability in a rat model of lipopolysaccharide-induced sepsis. *Invest Radiol* 2006;41:645-50.
- Takeoka S, Mori K, Ohkawa H, Sou K, Tsuchida E. Synthesis and assembly of poly(ethylene glycol)-lipids with mono-, di-, tetraacyl chains and a poly(ethylene glycol) chain of various molecular weights. *J Am Chem Soc* 2000;122:7927-35.
- Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:702-9.
- Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, et al. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 2001;159:1079-88.