

201009008A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

H12(ADP)リポソームの人工血小板としての
前臨床評価(効力と安全性)

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成23(2011)年3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

H12 (ADP) リポソームの人工血小板としての前臨床
評価 (効力と安全性)

(H21—政策創薬—一般—005)

平成22年度
総括・分担研究報告書

平成23年3月

..... 研究組織

(研究代表者)

半田誠 慶應義塾大学医学部 教授

(研究分担者)

池田康夫 早稲田大学理工学術院 教授

武岡真司 早稲田大学理工学術院 教授

木下学 防衛医科大学校 准教授

丸山徹 熊本大学薬学部 教授

鈴木克彦 早稲田大学スポーツ科学術院 准教授

後藤信哉 東海大学医学部 教授

村田満 慶應義塾大学医学部 教授

鈴木英紀 東京都医学総合研究所 主任研究員

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

目 次

H12 (ADP) リポソームの人工血小板としての前臨床評価 (効力と安全性)

平成 22 年度研究報告

I. 総括研究報告書

半田 誠1

II. 分担研究報告

1. 代替原料を用いた H12-PEG-Glu2C18 の合成

池田 康夫 15

2. 膜組成の異なるリポソームの調製と機能評価

武岡 真司 19

3. 外傷性大量出血時の急性易出血性病態に対する H12 (ADP) リポソームの止血制御 効果

木下 学 23

4. H12 (ADP) リポソームの体内動態の解析に関する検討

丸山 徹 39

5. 好中球機能を用いた血小板減少・外傷性出血における人工血小板投与の *in vivo* 評価

鈴木 克彦 49

6. マウス精巣動脈血栓モデルを用いた血栓性評価

後藤 伸哉 56

7. H12-(ADP)小胞体の安全性評価 (血液凝固系、生化学検査): 血中濃度測定法の検討

村田 満 61

8. 止血血栓への関与の超微細形態学的解析

鈴木 英紀 66

9. α IIb β 3 インテグリンと H12 の結合機序に関する研究: 脂質膜組成がリポソームと α IIb β 3 インテグリンの結合に与える影響の解析

鎌田 徹治 72

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

V. その他

I. 総括研究報告

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業)

H12 (ADP)リポソームの人工血小板としての前臨床評価(効力と安全性)
総括研究報告書

研究代表者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

研究要旨

【研究目的】 H12 (ADP) リポソーム(フィブリノゲン γ 鎖 C 末端アミノ酸配列由来合成ペプチド(H12)表面修飾、アデノシン 5' -二リン酸(ADP)内包化ナノ微粒子)の効力と安全性について検討を加え、人工血小板としての適格性を評価する。

【研究方法】 外傷性臓器損傷ウサギモデルを用いて大量輸血に伴う急性血小板減少症への適応を評価し、組織学的検討を加えた。同時に、炎症系への作用を好中球の活性化酸素産生能(ルミノール反応)を指標に *ex vivo* で評価した。アイソトープ標識物の体内動態を健常マウスとラットを用い解析した。血栓症誘発作用を止血血栓と対比してマウス精巣動脈血栓症モデルで評価した。血中脂質の代理マーカーとしての可能性を健常ラットで検討した。リポソームの品質と性能に及ぼす脂質膜組成(荷電)の影響を血小板凝集計等の *in vitro* 評価系で検討した。CHO 細胞発現系を用いて、 α IIb β 3 インテグリンとの結合 kinetics やネオ抗原誘発作用を *in vitro* 解析した。

【研究結果】 当該リポソーム投与により、血小板輸血と同様、肝臓損傷部位からの出血が強力に阻害され、モデル動物の救命が達成された。リポソームは出血部位に特異的に集積し、異物反応は惹起しなかった。リポソームは薬剤として十分な血液滞留性と体外排泄性を示した。リポソームの集積は動脈血栓と比較して止血血栓により選択的であった。血中リン脂質測定がリポソームの代理検査となる可能性が指摘できた。リポソームの表面陰性荷電を増加させることで、活性化血小板への結合性や血小板凝集補助機能を増強させた。 α IIb β 3 インテグリンへのネオ抗原誘発作用は認めなかった。

【考察・結論】 種々の *in vitro*、*in vivo* 評価系を用いて、H12(ADP)リポソームの人工血小板としての適格性を、効力と安全性の面から評価することができた。とくに、緊急性があり血小板輸血が利用できないニーズの高い対象(外傷に伴う大量出血/輸血による急性血小板減少症)への適応の妥当性が初めて明らかとなった。

(研究分担者)

池田康夫	早稲田大学理工学術院 教授
武岡真司	早稲田大学理工学術院 教授
木下学	防衛医科大学校 准教授
丸山徹	熊本大学薬学部 教授
鈴木克彦	早稲田大学スポーツ科学術院 准教授
後藤信哉	東海大学医学部 教授
村田満	慶應義塾大学医学部 教授
鈴木英紀	東京都総合医学研究所 主任研究員
鎌田徹治	慶應義塾大学医学部 講師

A. 研究目的

輸血用血液のうち、保存期間が短く、緊急使用が困難な血小板製剤を代替する人工血小板の開発は、欧米では50年以上の歴史があるにもかかわらず、いまだ実用化に至っていない。一方、我が国では、平成9年度より厚生労働科学研究費の補助を得て、独自の人工物の開発研究が開始され、多くの候補微粒子の中から、すべての構成成分が人工的に合成された H12(ADP) リポソームが人工血小板の最終候補薬剤として絞り込まれた (V その他：参考資料を参照)。

ポリエチレングリコール(PEG)鎖で表面修飾された本微粒子は、ヒトフィブリノゲン γ 鎖のカルボキシ末端を構成する12個のアミノ酸配列(400HHLGGAKQAGDV411:H12)の人工ペプチドを、PEG 鎖を介してその表面に結合させ、血小板のアルファ顆粒に存在する生理的な血小板刺激物質のアデノシン2リン酸(ADP)を内包化させた平均粒径250ナノメートルのリン脂質小胞体である。H12(ADP)リポソームは H12 を介して活性化した血小板に高親和性結合することで、出血部位に特異的に集積し、血小板凝集を増強するとともに、内包化された ADP を凝集依存性に放出することで、血小板輸血に匹敵する止血補助効果を発揮することが抗がん剤(ブスルファン)惹起血小板減少症動物モデルを用いて示された (Okamura Y, *et al*: Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine diphosphate- encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J Thromb Haemost* 7: 470-477, 2009)。

本研究(3カ年計画の2年目)は、創薬化への前臨床開発ステップとして、H12(ADP)リポソームの効力と安全性について、従来の輸血/血栓止血学的アプローチに加え、侵襲防御学、薬物動態学、免疫学等の見地から、1) ニーズのある病態モデルでの薬効と、2) 炎症や病的血栓の誘発等の安全性について集学的なマイクロ/マクロ評価を行い、3) 性能の最適化を平行して押し進めながら、人工血小板として十分な安全域(薬効/毒性のマージン)が確保できる試験物であるかを検討した。

B. 研究方法

1. H12(ADP) リポソームの調整:

DPPE、cholesterol、DHSG、polyethylen glycol (PEG) -DSPE、H12-PEG-Glu2C18 を、モル比 5/5/1/0.033/0.033 でベンゼンに溶解後、凍結乾燥させ、ADP 水溶液 (1 mM) と水和させ、押出造粒法を用いて H12(ADP) リポソームを製造し (粒径 250 ± 80 nm)、超遠心分離後 PBS に分散させ、ゲルろ過してリポソーム分散液を調整した。陰性荷電脂質である DHSG の含量を増やしたリポソームは、上記構成成分のモル比を 5/5/5/0.045/0.045 に変えて製造した。

2. H12(ADP) リポソームの *in vivo* 効力評価: 外傷に伴う大量出血/輸血による急性血小板減少症のウサギモデルでの検討 (木下)

麻酔したウサギの大腿動・静脈から 25 ml の脱血と自己洗浄赤血球/アルブミン溶液の輸血を 8 回繰返すことで最終的に総循環血液量相当の用量交換を行って、大量出血/輸血に合併する希釈性血小板減少症モデルを作成した。続いて、乏血小板血漿 (PPP) に浮遊させた H12(ADP) リポソームやその対照物: PPP に浮遊させた (ADP) リポソーム、多血小板血漿 (PRP)、PPP 単独を投与後、動物を開腹して肝臓に Derma punch で直径 5mm の損傷を作成し、組織欠損箇所からの持続的な出血を定量的に解析した後、循環容量補正なしにそのまま閉腹して飲水のみで予後を観察した。血算や血液凝固パラメータ、耳介出血時間、Sonoclot を用いた全血凝固能を脱血前、血液交換後、薬剤投与後に適宜測定した。

3. H12(ADP) リポソームの *in vivo* 安全性評価:

1) リポソームの体内動態 (丸山): 脂質膜及び包含 ADP をそれぞれ ^3H と ^{14}C で標識したリポソームを健常マウスとラットに投与して解析した。2) 血栓症誘発作用の評価 (後藤): 蛍光標識リポソームの集積を、マウスを用いて塩化鉄惹起精巣動脈血栓と尾切部位の止血血栓で比較した。

4. その他の *in vitro/ex vivo* 実験系:

1) 血小板凝集計による血小板凝集能の測定、フローサイトメータによる結合解析、透過型電子顕微鏡解析 (武岡、鈴木英)、2) 好中球の接着・遊走能とルミノメータによる活性酸素産生能を、ハイドロゲル法を用いて行った (鈴木克)、3) 健常ラットの総コレステロールとリン脂質濃度の経時変化を測定した (村田)、4) 種々の条件下での $\alpha\text{IIb}\beta 3$ インテグリン発現 CHO 細胞と蛍光標識リポソームの結合をフローサイトメータで解析した (鎌田)。

C. 研究結果及び考察

1. H12(ADP)リポソームの効力評価 (木下、武岡、鈴木英)

1) H12(ADP)リポソームの投与により、比較した多血小板血漿の輸血と同様に肝臓損傷部位からの出血が強力に阻害され、大量出血／輸血に伴う急性血小板減少症モデル動物の出血死（死亡率80%以上）が100%回避された：トータルで循環血液量に相当する血液交換（脱血と自己洗浄赤血球輸血を8回繰返す）を行うことで、ヘモグロビン値や白血球数の大きな変動なしで安定的に血小板数は $200 \times 10^3 / \mu\text{l}$ から $50 \times 10^3 / \mu\text{l}$ に減少した（木下 H22 分担研究報告書、図4）。また、同時に凝固因子も前値の30%程度に減少し、希釈性血小板減少症／凝固因子欠乏症が再現できた（表1）。実際、一次止血能に相当する耳介出血時間と二次止血能に相当する Sonoclot 全血凝固時間は血液交換前後でそれぞれ 230 ± 7 秒から 1193 ± 48 秒と 123 ± 6 秒から 382 ± 41 秒に著しく延長し、20 mg/kg の H12(ADP) リポソーム／PPP 浮遊液の投与によりそれぞれの測定値は、 605 ± 32 秒と 250 ± 28 秒に短縮した（図7、12A）。同様に、陽性対照である PRP（血小板と PPP:凝固因子の同時投与に相当）投与により血小板数は、 $50 \pm 6 \times 10^3 / \mu\text{l}$ から $108 \pm 12 \times 10^3 / \mu\text{l}$ に増加し（表3）、それとともに出血時間と全血凝固時間はそれぞれ 605 ± 34 秒と 250 ± 46 秒に短縮した（図7、12A）。一方、陰性対照である PPP 単独ならびに H12 未結合(ADP)リポソームの投与後のそれら測定値は、それぞれ 1193 ± 56 秒と 1193 ± 87 秒、 520 ± 44 秒と 567 ± 76 秒であった（図7、12A）。実際、薬剤投与15分後に損傷を与えられた肝臓からの出血量を比較すると、最初の5分間は、陰性対照（PPP と(ADP)リポソーム）に比較して PRP は有意な減少を示したが、H12(ADP)リポソームの効果は明らかでなかった（図10）。しかし、それに続く5分間では、むしろ PRP より強力に H12(ADP)リポソームは出血量を減少させた。そして結果的には、H12(ADP)リポソームは PRP と比べて全く遜色なく、肝臓からの出血の持続時間を陰性対照の半分以下に短縮させた（図11）。肝臓損傷後72時間までの観察で、PPP と(ADP)リポソームを投与された動物の生存率はそれぞれ10%と20%であった（図8）。一方、H12(ADP)リポソームと PRP 投与群では100%が生存した。

以上は、血小板輸血が利用できず、外傷などに起因した大量出血／輸血に伴う急性血小板減少症の救命に、H12(ADP)リポソームが効果的である証拠を示した。制御不能の外傷性出血の予防には、希釈性血小板減少症／凝固因子欠乏症の発現を抑えるために、赤血球ばかりでなく血漿と血小板を同時に輸血することが

標準となっている。今回の我々の報告は、この急性病態動物モデルにおいてこの薬剤が人工血小板として利用できる可能性を初めて示した。この薬剤の効果発現は血小板に比べて遅れる傾向にあることが示された。その理由として作用機序が残存した血小板を介して血小板血栓を増強する二次的なもののためではないかと推測される。薬剤の投与量や投与法を検討することで、より実践的な事後投与の可能性について検討してゆく必要がある。

2) H12(ADP)リポソームはウサギの肝臓損傷部位に集積して止血血栓の形成に寄与した：PRP 投与後のウサギ肝臓損傷部位には血小板凝集塊とフィブリン網で構成された止血（赤色：赤血球が豊富）血栓が光顕・電顕による形態的解析で認められた（鈴木英 H22 分担研究報告書、図 5、6）。H12(ADP)リポソーム投与後の切片では、血小板凝集塊とフィブリン網は減少しているものの、赤血球の周囲にリポソームと思われる 500nm 以下の小顆粒の集積が観察された（図 7、8、9）。抗 H12 抗体による免疫電顕法でこれらの小顆粒がリポソームである可能性が高いことが確認された（図 10）。一方、H12 未結合(ADP)リポソームの投与後では、リポソームの集積は観察されなかった（データ未提示）。

以上より、この薬剤が H12 を介して止血局所に特異的に集積して、残存血小板による止血血栓を強化することで、その作用を発揮するとの従来の見解（*J Thromb Haemost* 7: 470-477, 2009）をあらためて実際の病態モデルで確認した。人工血小板として欧米で開発が試みられている凍結乾燥ヒト血小板（Stasix、Hawthorn JS, et al.: *J Thromb Haemost* 7:1663-71, 2009）や RGD 配列結合ポリリン酸・グリコール酸重合体微粒子（Bertram JP, et al.: *Sci Transl Med* 1:1-8, 2009）は、動物モデルでの急性外傷性出血に対して止血効果を発揮することが報告されている（V その他：参考資料を参照）。しかしながら、これらの薬剤はあくまでも止血剤として検討され、血小板輸血を代替する血小板減少症での検討はなされていなかった。

2. 安全性の評価（丸山、鈴木克、後藤、村田、鎌田）

1) H12(ADP)リポソームおよびその構成成分は網内系(肝臓と脾臓)で分解・代謝され、血中および臓器蓄積性は低い：³H-コレステロールおよび ¹⁴C-ADP で標識されたリポソームの体内動態をマウスおよびラットで検討した。マウスへの 10mg/kg の投与量で、その血中半減期 ($T_{1/2\alpha}$ および $T_{1/2\beta}$) はおよそ 1 時間と 1 日で、³H に比して ¹⁴C で短い傾向であった（丸山 H22 分担研究報告書、図1、表 1）。投与後 1 時間で肝臓と脾臓にほぼ均等にに取り込まれるが、ほぼ 7 日で体外に排泄され

た(図2、図3)。コレステロールは胆汁への移行を経て便中にほぼ100%排泄され、ADPは便中および尿中にそれぞれ30%と60%排泄された(図4)。ほぼ同様の体内動態をラットでも示したが、 $T_{1/2\alpha}$ および $T_{1/2\beta}$ は異なりおよそ2時間と10-20時間であった(図5、表2)。臓器への取り込みは、コレステロールは肝臓、ADPは脾臓優位であったが、40mg/kgの大量投与でも7日でほぼすべてが排泄された(図7)。

以上より、H12(ADP)リポソームは、実験動物として使用されるラットで十分な血中濃度を2-3時間維持して、通常の代謝経路で体外に排泄され、体内蓄積性の低い安全な薬剤であることが明らかとなった。血小板減少症などの病態に加えて、より大型の動物(ウサギやサル)での検討およびもう一つの構成成分であるH12ペプチドの動態を検討してゆく必要がある。

2) H12(ADP)リポソームは急性血小板減少ウサギモデルにおいて明らかな炎症や酸化ストレス反応を惹起しなかった：末梢血好中球の接着・遊走能は血液交換後に増加したが、リポソーム投与で減少した(鈴木克 H22 分担研究報告書、図4)。一方、好中球の活性化酸素の産生は血液交換と薬剤投与により全く変動しなかった(図5)。対照実験とくに陽性対照の検討により、薬剤の安全性をさらに追求する必要性が示された。

3) H12(ADP)リポソームの集積は動脈血栓と比較して止血血栓により選択的であった：10mg/kg以上の高用量でマウスに異常行動が観察された(後藤 H22 分担研究報告書、図2)。しかし、脳組織へのリポソームの取込みは明らかでなかった。精巣動脈血栓に比較して尾静脈止血血栓への選択的な集積がみられた(図3)。用量依存性の検討と対照実験を行うことで、観察された現象の科学的解釈の信頼性を高める必要が指摘できた。

4) リン脂質血中濃度がリポソームの代理マーカとなる可能性が指摘できた：平成21年度の検討でリポソームの構成成分である脂質の血中濃度は薬剤の投与依存性に増加することが指摘されていた。そこで、総コレステロールとリン脂質について、用量依存性を経時的にラットで検討したところ後者でリポソームの血中濃度を反映する測定値の変動が観察された(村田 H22 分担研究報告書、図2、3)。しかしその感度は低かった。そこで、測定検体中のリポソームの可溶性に問題があると考え、加熱と可溶化剤を加えることで、測定値の感度は著しく改善することが明らかとなった(図4)。検体の処理を含め測定の標準化を進めてゆく必要がある。

5) H12(ADP)リポソームは血小板受容体 α IIb β 3 インテグリンのネオ抗原を誘導しなかった：フィブリノゲンやその関連ペプチドリガンド (RGD) は受容体である α IIb β 3 インテグリンに自己抗体対応のネオ抗原 (ligand induced binding site:LIBS) を誘導することが知られ、薬剤性血小板減少症の原因となる。しかしながら、RGD で著しく誘導される発現細胞上の α IIb β 3 インテグリンへの抗 LIBS 抗体の結合は、リポソームでは誘発されなかったことから、この薬剤がネオ抗原を誘導する可能性は RGD に比較してきわめて低いことが示された (鎌田 H22 分担研究報告書、図 7、8)。

3. H12(ADP)リポソームの性能最適化 (池田、武岡、鈴木英、鎌田)

H12(ADP)リポソームの膜組成成分である陰性荷電リン脂質 DHSG の含量を従来品 (5/5/1) (池田 H22 分担研究報告書)の5倍に増加させた標品 (5/5/5) の活性化血小板結合能 (フローサイトメータ) およびアゴニスト (ADP) 惹起血小板凝集補助作用 (血小板凝集計) は、従来品に比較して著明な増加を示した (武岡 H22 分担研究報告書、図 1、2)。興味あることに、H12 未結合の 5/5/5 標品でも活性化血小板結合能と血小板凝集補助作用は、H12 が結合した従来品より上回った。血小板凝集の電顕解析でも、5/5/5 標品はもちろんのこと、H12 未結合の 5/5/5 標品でも、リポソームの密着した凝集塊への取り込みが観察された (鈴木英 H22 分担研究報告書、図 1~4)。 α IIb β 3 インテグリン強制発現 CHO 細胞との結合実験でも、5/5/5 標品は従来品と同様に活性化した受容体に高親和性を示し、その結合定数は両者で変らなかったが、5/5/5 標品の結合部位数は 5/5/1 標品の 2-3 倍であった (鎌田 H22 分担研究報告書、図 2、3)。また、両者はフィブリノゲンの結合を阻害しなかった (図 5)。活性化 α IIb β 3 インテグリンへのフィブリノゲンの親和性は H12 リポソームより高いことと矛盾しない結果であった。以上より、H12(ADP)リポソームの性能は微粒子表面の荷電が大きく係っていることが明らかとなった。従来品 (5/5/1) を用いた急性血小板減少症動物モデルの ex vivo 評価で、全血凝固活性が有意に改善したのは残存血小板の凝固活性の増加によるものと推測される (木下 H22 分担研究報告書、図 4)。リポソーム膜の陰性荷電脂質が血小板に代わって凝固因子活性化の足場として働いた可能性を検討する必要がある。

D. 結論

種々の *in vitro*、*in vivo* 評価系を用いて、H12(ADP)リポソームの人工血小

板としての適格性を、効力と安全性の面から確認することができた。とくに、緊急性があり血小板輸血が利用できないニーズの高い対象（外傷に伴う大量出血／輸血による急性血小板減少症）への適応の可能性が初めて明らかとなった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(原著)

(1) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y. and Takeoka, S. Release abilities of adenosine diphosphate from phospholipid vesicles with different membrane properties and their hemostatic effects as a platelet substitute. *J. Controlled Release*, 148, 373-379 (2010)

(2) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Visualization of Liposomes Carrying Fibrinogen γ -Chain Dodecapeptide Accumulated to Sites of Vascular Injury Using Computed Tomography *Nanomedicine*, 6, 391-396 (2010)

(3) Kamata T., Handa M., Ito S, Sato Y, Ohtani T, Kawai Y, Ikeda Y., Aiso S. Structural requirements for activation in α IIb β 3 integrin. *J Biol Chem* 285(49):38428-38437 (2010)

(4) Nogami, Y., Takase, B., Kinoshita, M., Shono, S., Kaneda, S., Ishihara, M., Kikuchi, M., Maehara, T. Characteristic changes in heart rate variability induces during hemorrhagic shock, and effect of liposome-encapsulated hemoglobin in rats. *J Arrhythmia* 26: 189-198 (2010)

(5) Kinoshita, M., Uchida, T., Sato, A., Nakashima, M., Nakashima H., Shono S., Habu, Y., Miyazaki, H., Hiroi, S., and Seki, S. Characteriation of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J Hepatol* 53: 903-910 (2010)

(6) Yoshida H, Okamura Y, Watanabe N, Ikeda Y., Handa M. Shear-dependent suppression of platelet thrombus formation by phosphodiesterase 3 inhibition requires low levels of concomitant Gs-coupled receptor stimulation. *Thromb Haemost* 105(3):487-495 (2011)

(7) 1. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K,

Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Fluid Resuscitation with Hemoglobin Vesicles Prevents Escherichia coli Growth via Complement Activation in a Hemorrhagic Shock Rat Model. *J Pharmacol Exp Ther* 337: 201-208 (2011)

(8) Taguchi K, Iwao Y, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Repeated injection of high doses of hemoglobin-encapsulated liposomes (hemoglobin vesicles) induces accelerated blood clearance in a hemorrhagic shock rat model. *Drug Metab Dispos* 39:484-489 (2011)

(9) Taguchi K, Miyasato M, Watanabe H, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. Alteration in the pharmacokinetics of hemoglobin-vesicles in a rat model of chronic liver cirrhosis is associated with Kupffer cell phagocyte activity. *J Pharm Sci* 100:775-783 (2011)

(総説)

(1) 半田 誠:人工血小板、日本小児血液学会雑誌 24(3):125-130、2010

2. 学会発表

(1) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 鈴木 英紀, 渡邊 直英, 池田 康夫, 武岡 真司, 半田 誠. 「膜流動性の異なるドデカペプチド結合(ADP内包)リポソームのADP放出特性とその止血能評価」第33回日本血栓止血学会学術集会 (2010.4., 鹿児島).

(2) 武岡 真司. 「アミノ酸型脂質からなるpH応答性リポソームとナノ医療としての可能性開」第17回日本血液代替物学会年次大会(2010.10., 熊本)

(3) 半田 誠:人工血小板の開発状況、シンポジウム「人工血小板の現状と将来」第17回日本血液代替物学会(2010.10., 熊本)

(4) 西川可穂子, 木下学, 萩沢康介, 庄野聡, 勝野俊介, 宮崎裕美, 小野聡, 齋藤大蔵, 関修司, 阪本敏久:外傷性大量出血時の大量輸血に伴う血小板減少に対して人工血小板H12(ADP)liposomeを用いた止血制御効果. 第17回日本血液代替物学会2010, 熊本.

(5) 新井 愛美, 岡村陽介, 勝野峻介, 渡邊直英, 半田誠, 池田康夫, 武岡真司. 「止血能を有する血小板代替物としてのリポソーム組成の検討」第32回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11., 広島).

(6) 西川可穂子, 木下学, 萩沢康介, 庄野聡, 勝野俊介, 宮崎裕美, 小野聡, 阪本敏久, 齋藤大蔵, 関修司:人工血小板 H12(ADP)リポソームを用いた外傷性大量出血に伴う血小板減少時の止血制御に関する研究. 第25回日本 shock 学会総会 (2010, 東京)

(7) 萩沢康介、松下芳太郎、勝野俊介、西川可穂子、庄野聡、木下学、齋藤大蔵：人工血小板による止血制御. 第 56 回防衛衛生学会 (2011, 東京)

(8) 庄野聡：外傷性大量出血時の大量輸血に伴う血小板減少に対して人工血小板 H12(ADP)liposome を用いた止血制御効果. 第 16 回日本集団災害学会 (2011, 大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No.7,887,837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”

Ⅱ. 分担研究報告

代替原料を用いた H12-PEG-Glu2C18 の合成

分担研究者 池田 康夫 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
研究協力者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
勝野 峻介 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
新井 愛美 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)

研究要旨

フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させた H12-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る機能を有する。内水相に血小板凝集惹起物質、adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた H12-(ADP)小胞体は、血小板凝集塊中で ADP を放出するので、更に血小板を活性化させて止血能が顕著に向上できることを *in vivo* にて証明してきた。

H12-(ADP) 小胞体の構成成分の一つである H12-PEG-Glu2C18 の原料である α -(3-[3-Maleimido-1-oxopropyl]amino)propyl- ω -succinimidyl carboxypentyloxy, polyoxyethylene (SUN BRIGHT MA-034HS, 日油株式会社製)の製造が平成 21 年度に中止された。

平成 22 年度は、その代替品である α -N-[(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl- ω -(succinimidyl)oxy carboxy], polyoxyethylene (SUN BRIGHT MA-034TS, 日油株式会社製)を原料とし、品質の標準化を図った。この代替品を原料として合成した H12-PEG-Glu2C18 は従来のものと比較して、収率は約 20%、TLC (固定相: シリカゲル, クロロホルム/メタノール/水=65/25/4(v/v/v))における Rf 値は約 0.20 と同程度になり、また $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、H12 が MAL-PEG-Glu2C18 に結合したことを示す MAL-PEG-Glu2C18 のマレイミド基由来のピーク($\gamma=6.70$ ppm)の消失も確認できた。

A. 研究目的

リン脂ニ分子膜小胞体の表面の PEG 鎖末端にフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させ、その内水相に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP) を内包させた H12-(ADP)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を放出する機能を有する。従って、血

小板数を減少させた実験動物に静脈投与して出血時間を測定したところ、顕著な止血能が認められている^{1),2)}。現在、H12-(ADP)小胞体の構成成分の一つである H12-PEG-Glu2C18 は当研究室で合成しているが、その原料である α -(3-[3-Maleimido-1-oxopropyl]amino)propyl- ω -succinimidyl carboxypentyloxy, polyoxyethylene (SUN BRIGHT MA-034HS, 日油株式

会社製)の生産が中止されている。

平成 22 年度は、その代替品である α -N-[(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl- ω -(succinimidyl)oxy carboxy), polyoxyethylene (SUN BRIGHT MA-034TS, 日油株式会社製) を原料とし、品質の標準化を図った。

- 1) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).
- 2) 平成 18, 19 年度 政策創薬総合研究事業 研究報告書

B. 研究方法

1. H12 結合 PEG 脂質(H12-PEG-Glu2C18)の合成法(Scheme 1)

1.1. Glu2C18 の合成法

グルタミン酸 (2.96 g, 20 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物 (4.56 g, 24 mmol) をベンゼン 150 mL に溶解させ、Dean-Stark 装置を用いて沸点還流させた (105 °C, 1 hr)。この系にステアリルアルコール (11.9 mg, 44 mmol) を添加して沸点還流させた (105°C, 14 hr)。溶媒を減圧留去後、残渣をクロロホルム 150 mL に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 150 mL で 2 回、水 150 mL で 2 回分液洗浄した。クロロホルム層を回収し、硫酸ナトリウムにて脱水後、溶媒を減圧留去した。これをメタノールから再結晶し濾過回収後、乾燥させて白色粉末 Glu2C18 (13.3 g, 収率 85%) を得た。

1.2. マレイミド基導入 PEG 結合 Glu2C18 (MAL-PEG-Glu2C18)の合成法

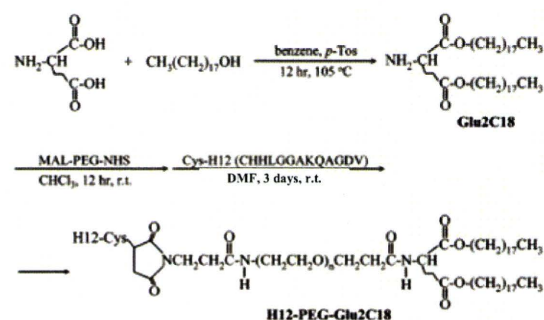
クロロホルム 10 mL 中に得られた Glu2C18 (194.9 mg, 298 μ mol) を溶解させ、**(a)** α -(3-[3-Maleimido-1-oxopropyl]amino)propyl- ω -succinimidyl carboxypentyloxy, polyoxyethylene (SUN BRIGHT MA-034HS(日油株式会社製); Mw: 3363, 500 mg, 149 μ mol)、ある

いは**(b)** α -N-[(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl- ω -(succinimidyl)oxy carboxy), polyoxyethylene (SUN BRIGHT MA-034TS(日油株式会社製); Mw: 3350, 500 mg, 149 μ mol) を溶解させて、攪拌した (r.t., 12 hr)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製した後、*t*-ブチルアルコール中から凍結乾燥した。

1.3. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18)の合成法

1.2. 節で合成した MAL-PEG-Glu2C18 (450 mg, 114.2 μ mol) と C 末端にシステインを結合させた H12 (147.6 mg, 114.2 μ mol) を DMF 10 mL に溶解、攪拌した (r.t., 72 hr, N₂)。ジエチルエーテルにて再沈殿精製後、メタノール抽出し、シリカゲルカラムにて精製した (展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水=65/25/4, v/v/v)。真空乾燥後、*t*-ブチルアルコールに溶解させて凍結乾燥した。

Scheme 1 Syntheses of H12-PEG-Glu2C18 (PEG 3.1 kDa, H12 1.3 kDa)



C. 研究結果及び考察

1. マレイミド基導入 PEG 結合 Glu2C18 (MAL-PEG-Glu2C18)の合成

再沈殿精製後に *t*-ブチルアルコール中から凍結乾燥して得られた白色粉末 MAL-PEG-Glu2C18**(a)** は収量 486.4 mg (収率 70 %)、**(b)** は収量 479.5 mg (収率 69 %) となり、

ほぼ同程度であった。また、TLC (固定相: シリカゲル, 展開溶媒: クロロホルム/メタノール=4/1(v/v))を行ったところ、Rf 値は**(a)**では 0.63、**(b)**では 0.65 となり、共にモノスポットとして検出された。

2. H12 結合 PEG-Glu2C18 (H12-PEG-Glu2C18)の合成法

シリカゲルカラムにて精製し真空乾燥後、*t*-ブチルアルコール中から凍結乾燥して得られた淡黄色粉末 H12-PEG-Glu2C18**(a)**は収量 181.6 mg(収率 30.4 %)、**(b)**は収量 178.5 mg(収率 29.4 %)となり、ほぼ同程度であった。TLC (固定相: シリカゲル, クロロホルム/メタノール/水=65/25/4(v/v/v))を行ったところ、Rf 値は**(a)**では 0.17、**(b)**では 0.20 となり、共にモノスポットとして検出された。また、**(a)**、**(b)**の H12-PEG-Glu2C18 の¹H-NMR スペクトルにおいて、MAL-PEG-Glu2C18 のマレイミド基由来のピーク($\gamma=6.70$ ppm)が消失していた。このことは、C 末端にシステインを結合させた H12 のチオール基が MAL-PEG-Glu2C18 のマレイミド基と結合していることを示すことから、従来の原料 α -(3-[3-Maleimido-1-oxopropyl]amino)propyl- ω -succinimidyl carboxypentyl, polyoxyethylene と同様に、その代替品である α -N-[(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl- ω -(succinimidyl)oxy carboxy), polyoxyethylene から従来のスキームに従って H12-PEG-Glu2C18 の合成が可能であることを明らかにした。現在、この H12-PEG-Glu2C18**(b)**を用いて調製した H12-(ADP)小胞体の機能評価を行っており、今後はこの H12-PEG-Glu2C18**(b)**を用いて実験を行っていく。

D. 結論

α -(3-[3-Maleimido-1-oxopropyl]amino)propyl- ω -succinimidyl carboxypentyl, polyoxyethylene の代替品として用いた α -N-[(3-Maleimido-1-oxopropyl)aminopropyl- ω -(succinimidyl)oxy carboxy), polyoxyethylene から合成した H12-PEG-Glu2C18 は従来のものと比較して、収率は約 20%、TLC (固定相: シリカゲル, クロロホルム/メタノール/水=65/25/4(v/v/v))における Rf 値は約 0.20 と同程度になり、また¹H-NMR スペクトルにおいて、H12 が MAL-PEG-Glu2C18 に結合したことを示す MAL-PEG-Glu2C18 のマレイミド基由来のピーク($\gamma=6.70$ ppm)の消失も確認できた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Okamura, Y., Katsuno, S., Suzuki, H., Ikeda, Y., Handa, M., and Takeoka, S. Controlled Release of adenosine diphosphate encapsulated liposomes carrying fibrinogen γ -chain peptide in platelet aggregation- dependent manner. *J. Controlled Release*, 148, 373-379 (2010).

(2) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., and Takeoka, S. Visualization of Liposomes Carrying Fibrinogen γ -Chain Dodecapeptide Accumulated to Sites of Vascular Injury Using Computed Tomography *Nanomedicine*, 6, 391-396 (2010).

2. 学会発表

(1) 勝野 峻介, 岡村 陽介, 鈴木 英紀, 渡邊 直英, 池田 康夫, 武岡 真司, 半田 誠.
「膜流動性の異なるドデカペプチド結合 (ADP内包)リポソームのADP放出特性とその止血能評価」第33回日本血栓止血学会学術集会 (2010.4., 鹿児島).

(2) 新井 愛美, 岡村 陽介, 勝野 峻介, 渡邊 直英, 半田 誠, 池田 康夫, 武岡 真司.
「止血能を有する血小板代替物としてのリポソーム組成の検討」第32回日本バイオマテリアル学会大会(2010.11., 広島).

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No.7,887,837

“DRUG DELIVERY MATERIAL”