

養した後、700 $\mu\text{g/ml}$ の G418 を含んだ培養液でさらに 2-3 週間コロニーが形成されるまで培養した。コロニーを剥離した後、抗 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 抗体、二次抗体として RPE 標識抗マウス IgG と反応させ、single cell sorter にて $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 発現量の高い細胞を一個ずつ 96 穴プレートに採取した。700 $\mu\text{g/ml}$ の G418 を含んだ培養液でさらに 2-3 週間培養して細胞を増やした後、 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の発現量を FACS にて測定して発現量の高い細胞を保存した。

VI. H12-vesicle 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 β_3 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 $\mu\text{g/ml}$ 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。H12-vesicle と $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -CHO との結合は、異なる濃度の DiOC18 標識 H12-vesicle (FH12V) を、10 $\mu\text{g/ml}$ のマウス IgG、PT25-2、あるいは 1mM の GRGDS ペプチドを含んだ HTB と氷上で 2 時間反応させ行った。細胞を 1mM Ca^{2+} /1mM Mg^{2+} 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。各抗体存在下での結合から GRGDS ペプチド存在下で

の結合をバックグラウンドとして差し引き、特異的結合を算出した。

VII. SZ22 結合実験

フィブリノーゲン結合実験と同様に、まず始めに細胞を PL98DF6/RPE 標識抗マウス IgG で染色した。次に、細胞を FITC 標識 IgG1 または FITC 標識 SZ22 と、異なる濃度の GRGDS ペプチドまたは H12-vesicle の存在下、氷上で 1 時間反応させた。細胞を 1mM Ca^{2+} /1mM Mg^{2+} 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 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ conformer との結合実験。

これまでの研究結果で、 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ とフィブリノーゲンの高親和性結合がおこるためには、 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の立体構造がいわゆる extended form をとり、かつ $\alpha\text{IIb}\beta_3$ の頭部を形成する β -hybrid domain が swing-out している (extended with open head) 必要があることを報告した。図 1 はその際の実験に用いた、特定の conformer に固定された $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 変異体のデザインを示したものである。 β_3 -V332C/S674C (V332C-S674C)、 αIIb -A318C/ β_3 -D552C (A318C/D552C) はそれぞれ β 鎖の頭部と

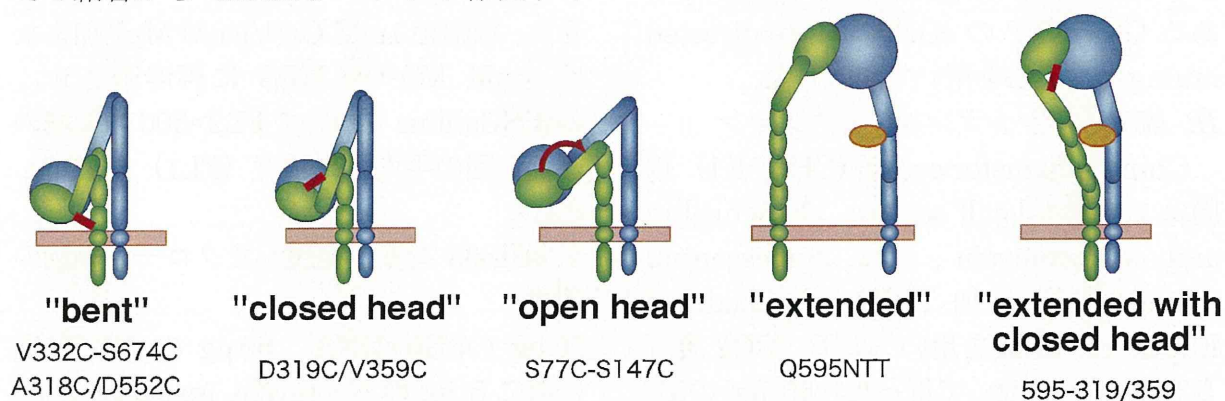


図1 今回の実験で使用した $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 変異体のデザイン。

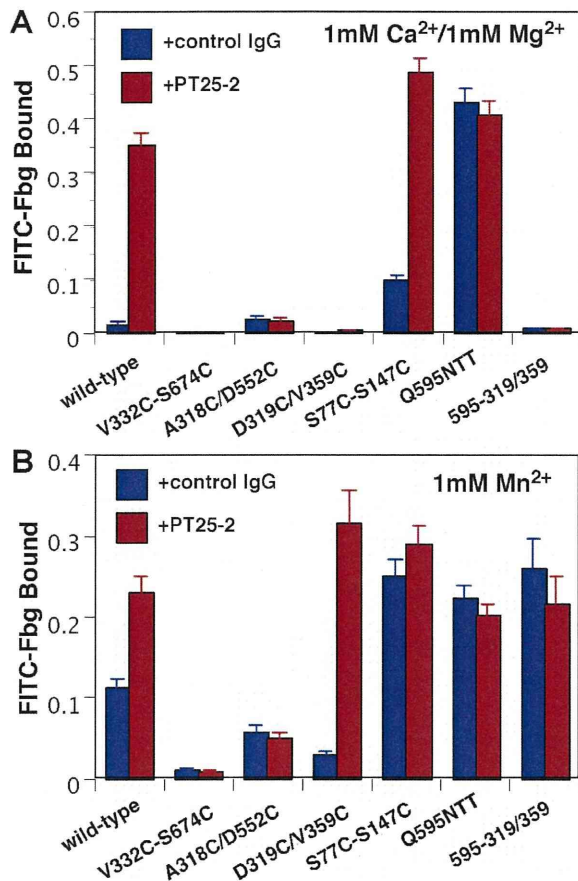


図2 異なる2価イオン存在下における、 α IIb β 3 変異体とフィブリノーゲンの結合

脚部、 α 鎖の頭部と β 鎖の脚部の間に disulfide 結合を挿入し 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

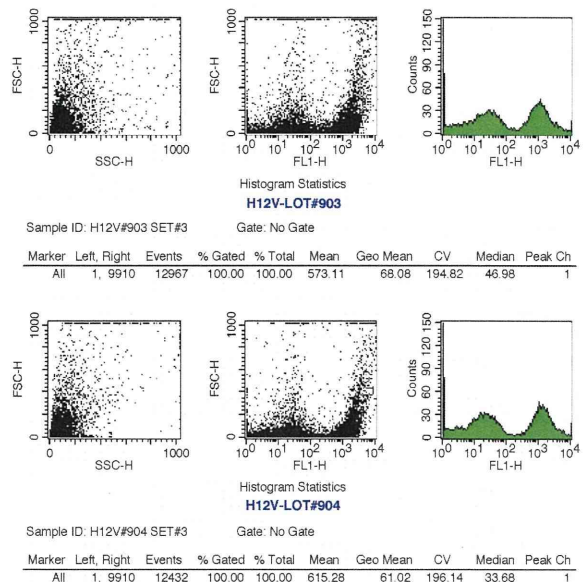


図3. DiOC18 標識 H12-vesicle の FACS 解析

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2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。

II. DiOC18 標識 H12-vesicle の FACS 解析

H12-vesicle の機能を解析する方法の一つの方法として、血小板を含む α IIb β 3 発現細胞との結合を調べる方法が考えられる。このた

めには、H12-vesicle を何らかの方法で標識しなければならない。一般的な標識法として、放射性アイソトープ、蛍光色素による標識法があるが、試料の取り扱いの簡便さから、蛍光色素を用いて標識を行った。DiOC18 はリポソームの脂質膜成分に結合する蛍光色素である。その放出する蛍光は緑色であるため、FACS では FITC と同じチャンネル FL-1 で計測可能である。図 3 は製造日時の異なる H12-vesicle 製剤 Lot#903 と Lot#904 を DiOC18 標識し、FACS でその蛍光強度を比較した結果である。左にドットプロット (FSC/SSC)、中央にドットプロット (FSC/FL1)、右にヒストグラム (FL1) を示す。ドットプロット (FSC/SSC) をみると両粒子の FSC 値はほぼ同じであり、同じ粒子径を有していることがわかる。しかし、ドットプロット (FSC/FL1) をみると、各リポソーム粒子の蛍光強度は均一ではなく、大きく二つの集団に分かれることがわかる。ヒストグラムをみると、両粒子の蛍光強度にはかなりのバラツキがあり、2 峰性になっていることが明らかである。しかし、平均蛍光強度 (Geo Mean) を見ると、Lot#903 で 68.08、Lot#904 で 61.02 であり、ほぼ同じ値を示していた。

III. H12-vesicle と α IIb β 3-CHO の結合解析：一過性発現細胞を用いた解析

まず、野生型 α IIb β 3 を発現した CHO 細胞を用いて測定を行った。H12-vesicle は製造日時の異なる Lot#903 と #904 を使用した。図 4 は蛍光色素 DiOC18 で標識した H12-vesicle と α IIb β 3-CHO 細胞の結合を FACS にて測定したものである。横軸は DiOC18 標識 H12-vesicle 濃度、縦軸は細胞への結合量 (平均蛍光強度 MFI) を示す。それぞれ総結合量と結合阻害剤である RGD ペプチド共存在下での非特異的結合を示した。両 Lot とも活性化抗体である

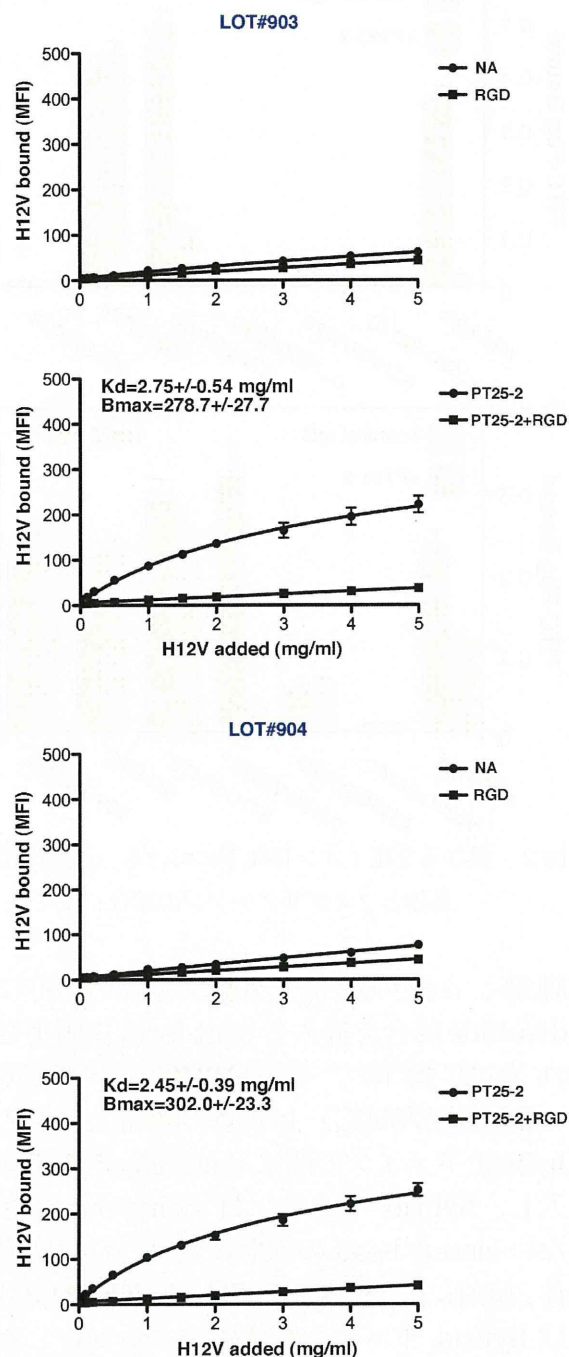


図 4. 野生型 α IIb β 3-CHO と H12-vesicle の結合

PT25-2 非存在下では、 α IIb β 3-CHO と僅かに結合するだけだった。ところが、PT25-2 存在下では容量依存性に結合の増加がみられ、その結合の Kd 値はそれぞれ 2.75 ± 0.54 mg/ml、 2.45 ± 0.39 mg/ml、Bmax 値はそれぞれ 278.7 ± 27.7 、 302.0

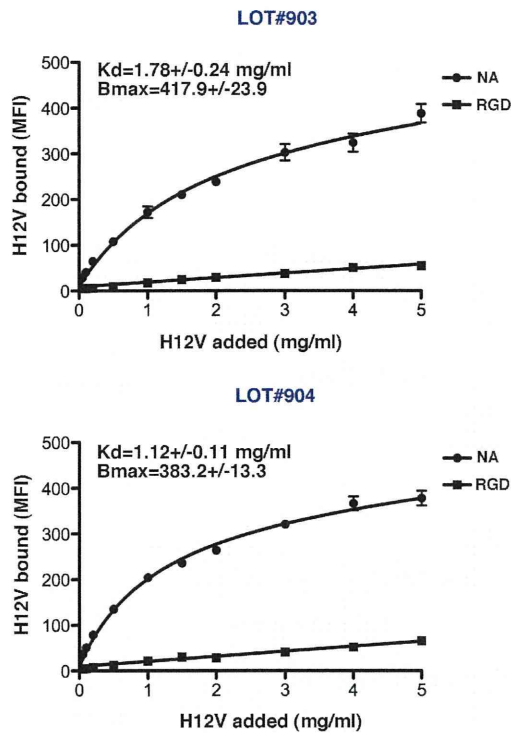


図5. 高活性型 α IIb β 3 (Q595NTT) -CHO と H12-vesicle の結合

± 23.3 であった。次に、Q595NTT 変異体を発現した細胞を用いて同様の結合実験を行った(図5)。Q595NTT 変異体は高活性型の α IIb β 3 を発現した細胞で、活性化抗体なしでもフィブリノーゲンを結合する。同様に、両 Lot とも PT25-2 非存在下で濃度依存性に Q595NTT 変異体発現細胞と結合した。結合の Kd 値はそれぞれ 1.78 ± 0.24 mg/ml、 1.12 ± 0.11 mg/ml、Bmax 値はそれぞれ 417.9 ± 23.9 、 383.2 ± 13.3 であった。次に、H12 ペプチドを担持していないリポソーム粒子についても同様の検討を行った。使用した試料は製造日時の異なる Lot#901 と Lot#902 であり、何れも DiOC18 で標識した。図6に示したように、Lot#901、Lot#902 共に、PT25-2 で活性化した野生型 α IIb β 3-CHO と全く結合せず、高活性型の Q595NTT 変異体を発現した細胞とも全く結合しなかった。

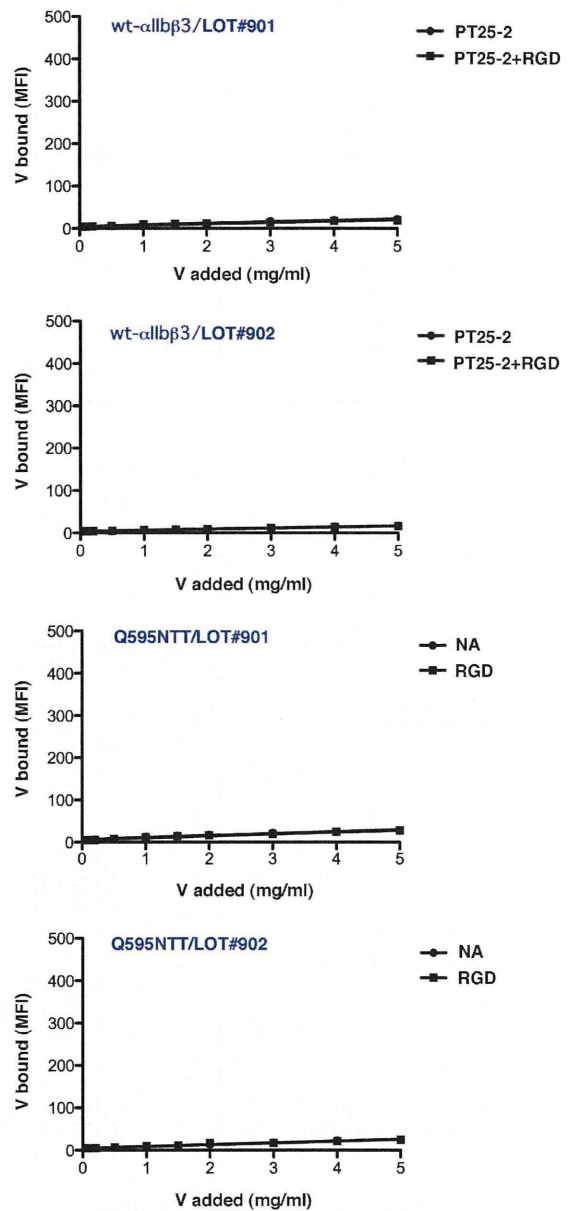


図6. リポソーム vesicle と α IIb β 3-CHO の結合

IV. H12-vesicle と α IIb β 3-CHO の結合: 安定発現細胞を用いた解析

野生型 α IIb β 3 と Q595NTT 変異体の安定発現細胞を single cell sorting した結果、幾つかの細胞株を得ることができた。図7にその発現を示す。何れもシングルピークのクローンが得られたが発現は低く、特に Q595NTT クローンの発現は#49を除き、MFI < 200であった。Wild type #67 と

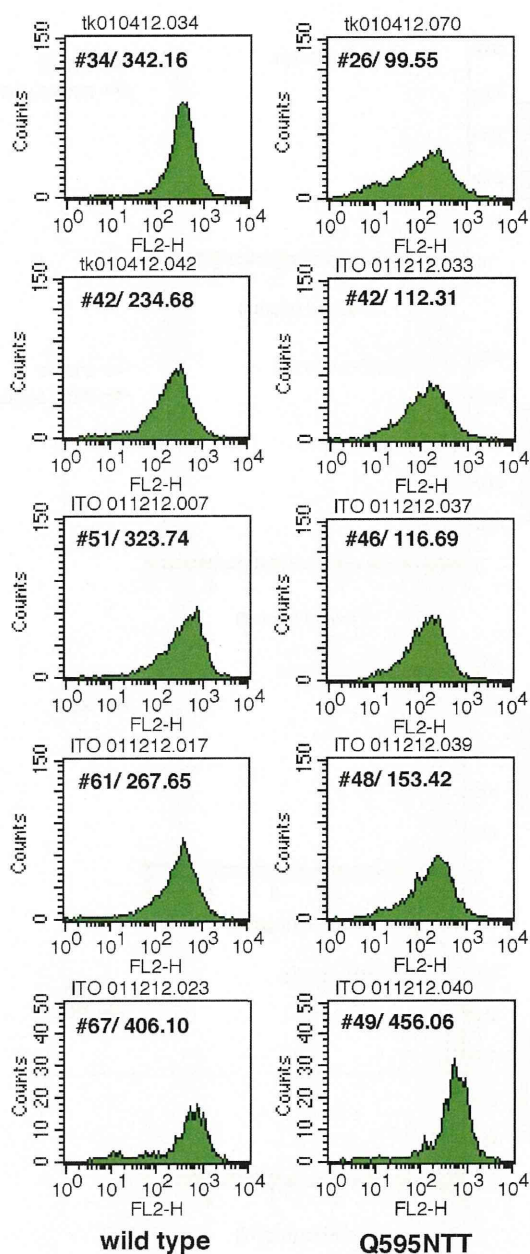


図7. α IIb β 3 安定発現細胞株の FACS 解析

Q595NTT#49 の発現量はいずれも MFI > 400 と高かったが、増殖が非常に遅く実際の使用には適さなかった。図8は wild type#51、Q595NTT#48 と H12-vesicle Lot#903、Lot#904 の結合を調べたものである。wild type #51 は PT25-2 存在下での結合を調べた。容量依存性に結合の増加がみられたものの、一過性発現細胞を用いた時と異なり、5 mg/ml でも結合はプラトー

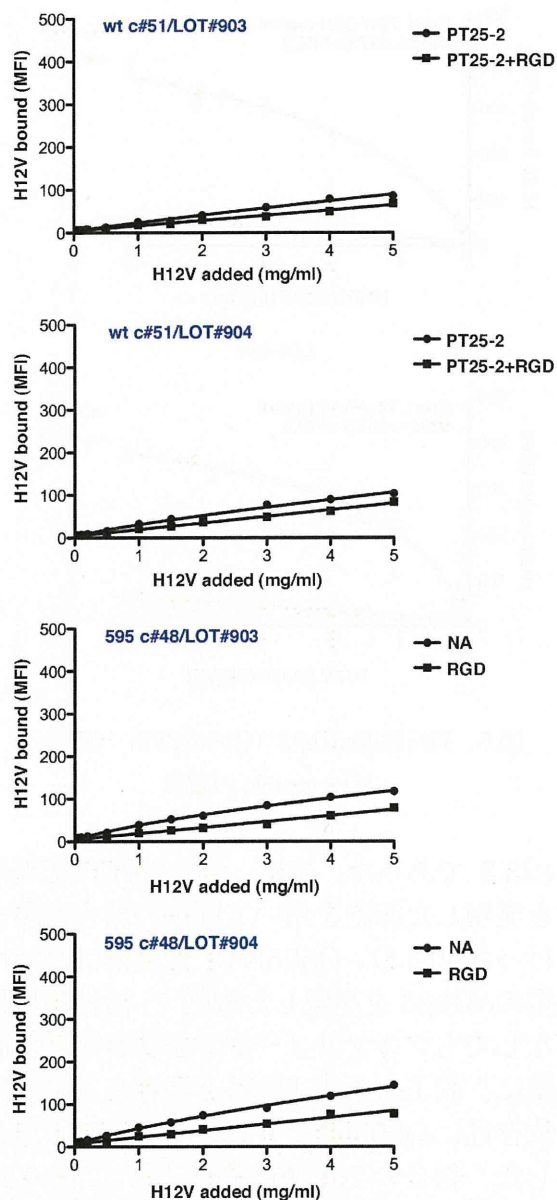


図8. α IIb β 3 安定発現細胞株と H12-vesicle の結合

に達しなかった。同様に、Q595NTT#48 への結合も PT25-2 非存在下で用量依存性に増加したものの、5 mg/ml で飽和傾向を認めず、10 mg/ml の高濃度でも飽和することはなかった (データ記載せず)。

V. H12-vesicle と α IIb β 3-CHO の結合解析-脂質膜組成の影響

従来型の H12-vesicle の脂質構成 (モル

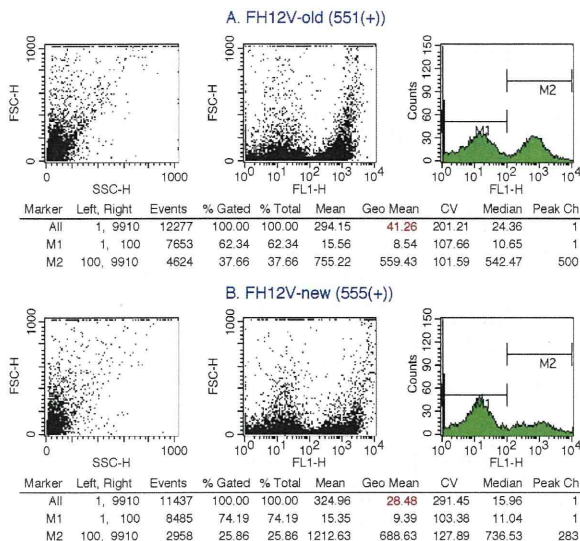


図9. DiOC18 標識 H12-vesicle の FACS 解析

比) は、DPPC:Cholesterol:DHSG=5:5:1 である。一方、新規に開発した H12-vesicle の脂質構成は 5:5:5 であり、従来に比べ負電荷脂質である DHSG が増加している。今回は従来型と新規型のリポソーム粒子に ADP を内包した標品 (それぞれ 551(+), 555(+)) と表記) を用い、 α I**I** β 3-CHO 細胞との結合を調べた。

前項で示した H12-vesicle と α I**I** β 3 発現細胞の結合実験では、蛍光標識した H12-vesicle の結合量を蛍光強度で表している。従って、二つの H12-vesicle、551(+)) と 555(+)) の結合を正しく比較するためには、それぞれの非活性 (一粒子あたりの蛍光強度) が同じであることが大前提となる。そこで、FACS を用いて各 H12-vesicle の蛍光強度を測定した (図9)。ドットプロット (FSC/SSC) をみると両粒子の FCS 値はほぼ同じであり、同じ粒子径を有していることがわかる。しかし、ドットプロット (FSC/FL1) をみると、各リポソーム粒子の蛍光標識は均一ではなく、大きく分けて二つの集団に分かれることがわかる。ヒストグラムをみると、両粒子の蛍光強度にはかなりのバラツキがあることがわかる。全粒子の平均蛍光強度 (赤) をみても、551(+))

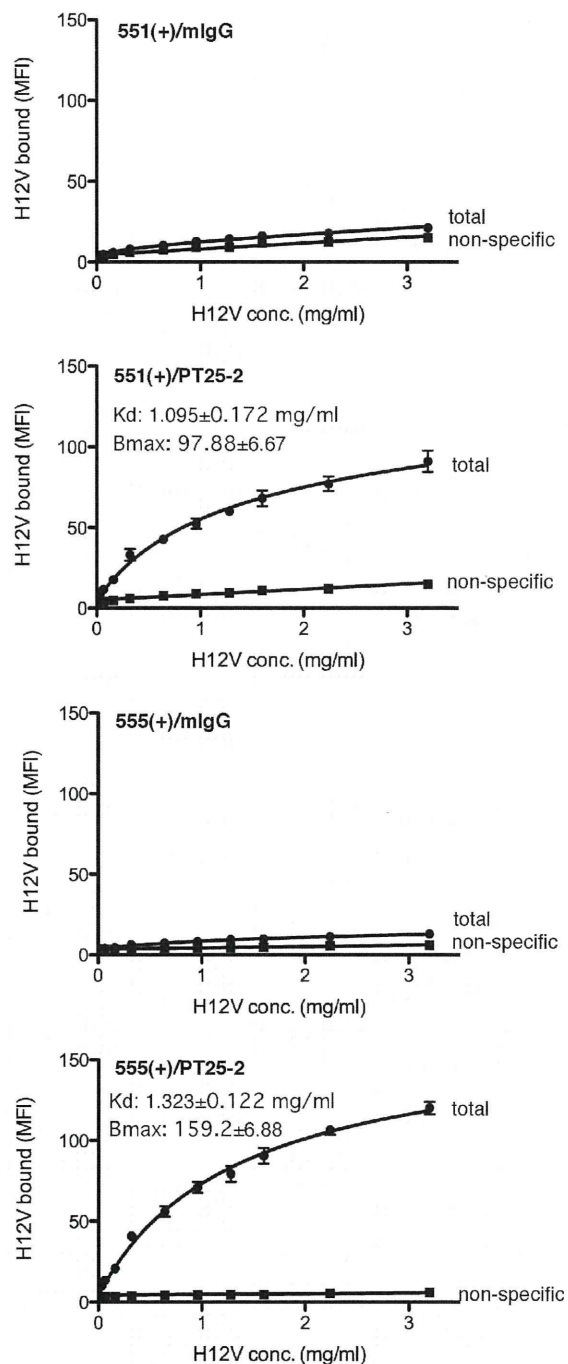


図10. α I**I** β 3-CHO 細胞と脂質膜成分の異なる H12-vesicle の結合の比較

は 41.26、555(+)) は 28.48 と約 1.5 倍の違いがあった。

図10は DiOC18 で標識した H12-vesicle と α I**I** β 3-CHO 細胞の結合を FACS にて測定したものである。横軸は DiOC18 標識

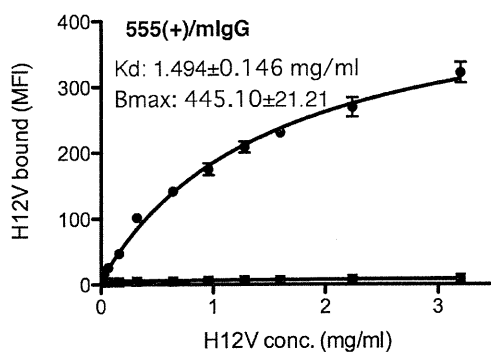
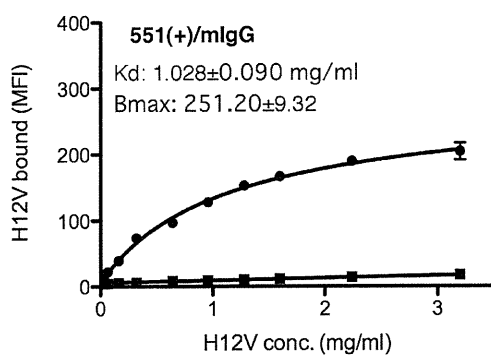


図 11. Q595NTT 変異株と脂質膜成分の異なる H12-vesicle の結合の比較

H12-vesicle 濃度、縦軸は細胞への結合量 (平均蛍光強度 MFI) を示す。Total は総結合量、non-specific は結合阻害剤である RGD ペプチド共存在下での非特異的結合を示す。総結合量をみると、コントロール抗体であるマウス IgG (mIgG) 存在下では 551(+), 555(+))ともに α IIb β 3 とほとんど結合しなかった。しかし、 α IIb β 3 活性化抗体である PT25-2 存在下では、551(+), 555(+))ともに濃度依存性に α IIb β 3-CHO 細胞と結合した。551(+), 555(+))の Kd 値はそれぞれ 1.095 ± 0.172 mg/ml, 1.323 ± 0.122 mg/ml、Bmax 値はそれぞれ 97.88 ± 6.67 、 159.2 ± 6.88 であった。一方、非特異的結合は 555(+))においていずれも低く、551(+))の約 50% であった。次に、Q595NTT 変異株を発現した細胞を用いて同様の結合実験を行った (図 11)。Q595NTT 変異株は高活性型の α IIb β 3 を発現した細胞で、活性化

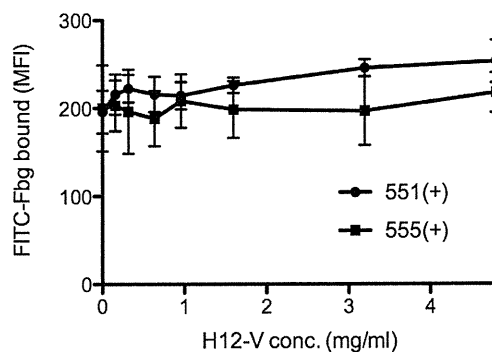


図 12. H12-vesicle によるフィブリノーゲン結合阻害実験

抗体なしでもフィブリノーゲンを結合する。フィブリノーゲンと同様に、551(+), 555(+))はコントロール抗体存在下で濃度依存性に Q595NTT 変異株と結合した。Kd 値はそれぞれ 1.028 ± 0.090 mg/ml, 1.494 ± 0.146 mg/ml、Bmax 値はそれぞれ 251.20 ± 9.32 、 445.10 ± 21.21 であった。

VI. H12-vesicle はフィブリノーゲンの結合を阻害しない。

H12-vesicle は、リポソーム表面にフィブリノーゲンの α IIb β 3 結合配列である γ 鎖ペプチド (H12 ペプチド) 配列を担持したものである。従って、H12-vesicle とフィブリノーゲンは α IIb β 3 の同一部位に結合するため、互いに結合を阻害する拮抗作用があると考えられる。平成 20 年度の報告で、われわれは H12-vesicle が生理的濃度のフィブリノーゲン存在下においても活性化 α IIb β 3 と結合しうることを示した。今回の実験では、H12-vesicle が、フィブリノーゲンと α IIb β 3 の結合を阻害する作用を有するか否かを調べた。図 12 は異なる濃度の H12-vesicle 共存在下における、 1μ M の FITC 標識フィブリノーゲンと高活性型の Q595NTT 変異株発現細胞の結合を調べたものである。縦軸はフィブリノーゲン結合量 (MFI) を示す。551(+), 555(+))とも

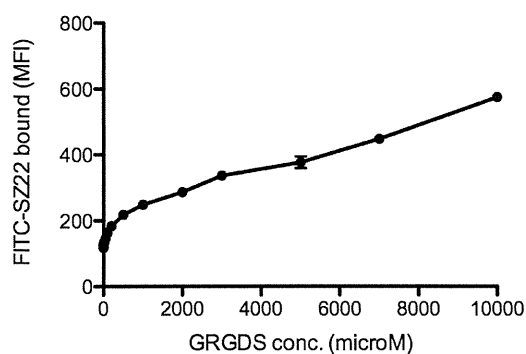


図 13. RGD ペプチドによる LIBS エピトープの誘導

にフィブリノーゲン結合阻害作用は認められず、4.8 mg/ml という高濃度でも有意な阻害作用は認められなかった。

VII. H12-vesicle は α IIb β 3 の構造変化を誘導しない。

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 13 は異なる濃度の RGD ペプチド存在下における FITC 標識 SZ22 と α IIb β 3-CHO 細胞の結合を示したものである。RGD ペプチドは用量依存性に SZ22 の結合を増加させ、RGD ペプチド非存在下に比べ 1mM で約 2 倍、10mM で約 5 倍の結合増加がみられた。これに比べ、H12-vesicle である 551(+)と 555(+)は、3.2 mg/ml まではほとんど結合を増加させず、4.8 mg/ml という極端な高濃度においても、約 15%の結合増加を認めるのみであった (図 14)。

D. 考察

本研究の目的は、1) 複数の測定系を用いて H12-vesicle の機能を評価し、どの測定系が最適であるかを見いだすと共に、2)

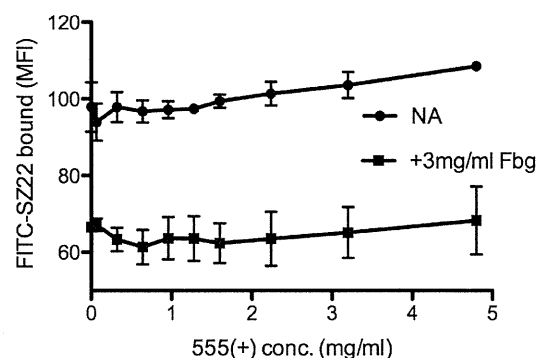
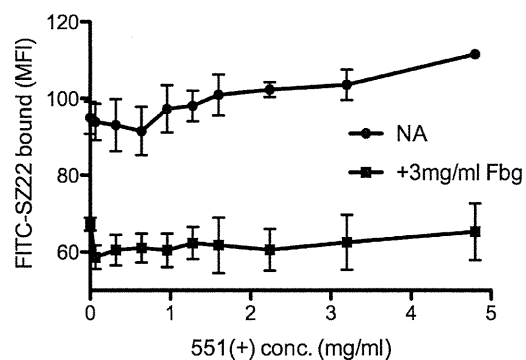


図 14. H12-vesicle による LIBS エピトープの発現

H12-vesicle 製剤の組成や Lot の違いがどのように機能に影響を与えるかを検討することである。

H12-vesicle の機能の測定法には幾つかの方法が考えられるが、それぞれ問題を抱えている。1) 血小板と H12-vesicle の結合を測定：この場合、H12-vesicle を蛍光色素あるいは放射性アイソトープで標識し、血小板と混和した後に、結合した H12-vesicle 量を FACS あるいは放射線測定機器で測定する。この過程で H12-vesicle を化学修飾することになるため、H12-vesicle の機能が影響を受ける可能性がある。しかし DiOC18 などの蛍光色素は脂質膜成分に結合するため、 α IIb β 3 結合部位である H12-ペプチド部分への影響は少ないと考えられる。また、前述したように血小板が H12-vesicle と結合するためには、活性化していなければならない。このためには血小板を ADP、トロンビンなどのアゴ

ニストと反応させる必要がある。ここで最大の問題は、そもそも血小板をヒトから採取する段階で活性化を受ける可能性があることである。また、ADP、トロンビンなどの反応性に個人差があることも大きな問題である。つまり、再現性のある結果を得るためには、特定の個人からの血小板を使い続けなければならない、例えそうでも操作の過程で血小板の機能が影響を受けてしまう危険性が高い。以上から、血小板そのものを用いるのは、測定系として妥当ではないと考えられる。2) α I**Ib** β 3 発現細胞と H12-vesicle の結合を測定 (図 15A) : これまでの研究で、われわれは CHO 細胞膜表面に α I**Ib** β 3 を一過性発現させた細胞を用い、H12-vesicle の機能を検討してきた。ここでも、H12-vesicle を標識する必要があるが、血小板の代わりに α I**Ib** β 3 を発現した動物細胞を用いるため、血小板のように個人差や採取の過程での影響を排除することができる。しかし、CHO 細胞に発現した α I**Ib** β 3 は不活性であるため、H12-vesicle との結合を調べるためには、活性化モノクローナル抗体 PT25-2 を用いて α I**Ib** β 3 そのものを活性化する必要がある。すなわち、実験結果が使用する PT25-2 の活性に依存することとなる。また、一過性発現の系では、 α I**Ib** β 3 の発現量を正確にコントロールできないため、測定ごとに α I**Ib** β 3 の発現量を測定し、補正を加えなくてはならない。

3) α I**Ib** β 3 発現細胞株と H12-vesicle の結合を測定 (図 15B) : 測定系は 2) と同じであるが、細胞は α I**Ib** β 3 を安定発現したクローン細胞を用いるため、測定ごとに α I**Ib** β 3 の発現を調べる必要がなく、複数の測定結果の比較も容易となる。この場合も PT25-2 を使用する必要があるが、これを回避する方法としては、 α I**Ib** β 3 の Q595NTT 変異体の使用が考えられる。これは、 α I**Ib** β 3 の高次構造が常に extended

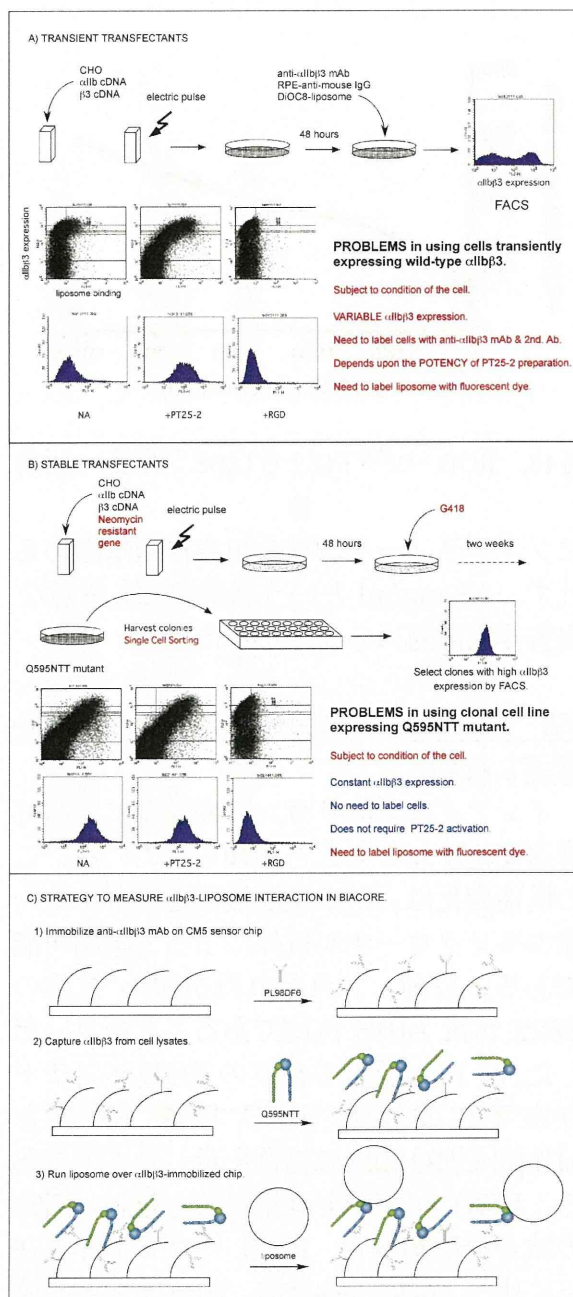


図 15. H12-vesicle の機能測定系

の状態になるようにデザインされたものであり、常に高活性状態にあることが確認されている。この測定系で結果に影響を与える不確定要素は、細胞の状態と H12-vesicle の標識のみであろう。しかし最大の問題は、 α I**Ib** β 3 を多量に発現した細胞株が得られるか否かである。

4) 表面プラスモン共鳴による α I**Ib** β 3 と H12-vesicle の直接結合の測定 (図 15C) :

表面プラスモンセンサー側に α I**Ib** β 3 を固層化し、その上に H12-vesicle を流す事によって結合をリアルタイムで測定する。この場合、生きた細胞を使用せず、H12-vesicle の標識も不要であるため、測定に関わる不確定要素をほぼ排除することができる。

本研究では、このうち、 α I**Ib** β 3 を発現した細胞を用いる 2) と 3) を実施した。使用する細胞は primary cell ではなく、細胞株であることが望ましいが、 α I**Ib** β 3 を多量に発現した細胞株は存在しないため、 α I**Ib** β 3 遺伝子を人工導入した細胞を用いた。この測定法では、H12-vesicle を化学標識する必要がある。この場合、蛍光標識と放射性アイソトープによる標識が考えられるが、利便性を考慮し蛍光標識を選択した。蛍光標識した H12-vesicle と細胞の結合は、FACS や蛍光リーダーを用いて測定可能であるが、特定の細胞集団との結合が解析可能な FACS を選択した。H12-vesicle の蛍光標識は DiOC18 で行った。DiOC18 はリポソーム膜の脂質成分に結合するため、 α I**Ib** β 3 結合部位である H12 への影響は最小限にとどめることができる。しかし、DiOC18 標識 H12-vesicle を FACS で解析した結果では、DiOC18 の取り込みは均一に行われておらず、蛍光の強い集団と弱い集団の二峰性を呈していた。製造日時の異なる Lot#903 と Lot#904 を比較した結果でも、両者とも二峰性の染色パターンを示しており、蛍光標識を均一に行うのが困難であることを示している。今回の結果では、Lot#903 と Lot#904 の平均蛍光強度はそれぞれ 68.08、61.02 であり、大きな違いはなかった。しかし、脂質組成の異なるリポソームを標識した結果では、551(+) と 555(+) の平均蛍光強度はそれぞれ 28.48、41.26 と約 1.5 倍の違いがあった。このようにリポソーム作成後に蛍光標識を行うと、その比活性をコントロールするのは困難と

思われる。今後はリポソーム作成時に脂溶性の蛍光色素を予め一定の割合で含有させるなど、標識を均一に行う必要があると考えられる。

一過性発現細胞を用いた実験では、 α I**Ib** β 3 発現量 (蛍光強度) >500 の細胞集団への H12-vesicle 結合量 (平均蛍光強度 Geo Mean) を測定した。野生型 α I**Ib** β 3 を発現した細胞では、H12-vesicle の結合はごく僅かであった。しかし活性化抗体 PT25-2 の存在下では、用量依存性に特異的結合の増加がみられた。Lot#903 と Lot#904 の比較では、結合の Kd 値はそれぞれ 2.75 ± 0.54 mg/ml、 2.45 ± 0.39 mg/ml であり、Bmax 値はそれぞれ 278.7 ± 27.7 、 302.0 ± 23.3 であった。この結果は、Lot#903 と Lot#904 の α I**Ib** β 3 に対する結合親和性はほぼ同じであることを意味している。また細胞上の H12-vesicle 結合部位数を反映する Bmax 値もほぼ同じ値であった。これらの結果からは、Lot#903 と Lot#904 の機能に大きな違いは無いと判断できる。一方、高活性型の Q595NTT 変異体を発現した細胞では、PT25-2 無しでも強い結合がみられた。Lot#903 と Lot#904 の Kd 値はそれぞれ 1.78 ± 0.24 mg/ml、 1.12 ± 0.11 mg/ml、Bmax 値はそれぞれ 417.9 ± 23.9 、 383.2 ± 13.3 であった。この結果は、Lot#903 と Lot#904 は Q595NTT 発現細胞上でほぼ同じ結合部位数を有するものの、結合親和性は Lot#904 が高いことを意味している。何故、野生型 α I**Ib** β 3 を発現した細胞と Q595NTT 発現細胞で異なる結果が得られたのであろうか？ Kd 値の比較では Q595NTT 発現細胞の方が常に低値であり、Q595NTT の方が PT25-2 で活性化した α I**Ib** β 3 よりも高活性であることを示している。つまり、 α I**Ib** β 3 の活性が高いほど H12-vesicle の親和性の違いが明らかになると考えられる。野生型 α I**Ib** β 3 発現細胞を用いた測定では、PT25-2 の活性が鍵となる

ため、これが結果に影響を与える不確定要因となりうる。以上の結果から、Q595NTT 発現細胞を用いた測定系が推奨される。

一過性発現細胞を用いた測定系では、測定毎に使用する細胞の α I**Ib** β 3 発現量は変化するため、測定日の違うデータを正確に比較するのは困難である。安定発現細胞を用いれば α I**Ib** β 3 発現量は常に一定であるため、この問題は解決される。われわれは野生型 α I**Ib** β 3、Q595NTT を安定発現した細胞株を作成し、H12-vesicle の結合を調べた。期待に反して、これらの細胞に対する H12-vesicle の結合は非常に低く、信頼できるパラメーターを得ることはできなかった。原因は、一過性発現系で H12-vesicle 結合を調べる対象とした細胞群の α I**Ib** β 3 発現量は 800-1000 であるのに対し、安定発現細胞株の発現量は野生型 α I**Ib** β 3#51 で 323.74、Q595NTT#48 で 153.42 と低いことに起因すると考えられる。野生型 α I**Ib** β 3#51 は二倍以上の発現量を有するにも拘わらず、Q595NTT#48 よりも H12-vesicle の結合量が低かった。この原因は、PT25-2 による α I**Ib** β 3 の活性化が Q595NTT よりも低いことによると考えるのが妥当であろう。

一過性発現細胞、特に Q595NTT 変異体を発現した細胞と H12-vesicle の Kd 値は 551(+)で 1.028 ± 0.090 mg/ml と、Lot#904 の Kd 値と非常に近く、この測定系の再現性の高さがうかがえる。反面、野生型 α I**Ib** β 3 を PT25-2 で活性化する方法では 551(+)の Kd 値 1.095 ± 0.172 mg/ml と、本年度の値とは大きく異なり再現性に乏しい。これは使用する PT25-2 の活性に結果が大きく左右されるためであろう。これらの結果を総合すると、Q595NTT 変異体の一過性発現系が最も再現性の高い測定法と考えられる。安定発現系は α I**Ib** β 3 の発現量が低く、H12-vesicle の結合解析には適さなかった。しかし、細胞を用いた測定系は細胞

の状態、 α I**Ib** β 3 の発現量、 α I**Ib** β の活性化、H12-vesicle の標識などの不確定要因が多く、測定系の再現性を確保する上で問題点となる。これらの要因を排除するためにも、無細胞測定系を用いるべきであろう。本年度は実施できなかったが、表面プラスモン共鳴を用いた測定系は最も実現性が高い。図 1 C に示したように、Q595NTT 変異体を固層化したセンサーチップに無標識の H12-vesicle を流すことによって、リアルタイムで結合測定が可能である。この方法では、前述した不確定要因もほとんどない。Q595NTT のソースとして今回樹立した安定細胞株を使用することができることもメリットである。今回、何故 Lot#903 と Lot#904 で異なる結合親和性を示したのかは不明である。しかし、脂質組成の異なる 551(+)と 555(+)の比較では、Q595NTT に対する Kd 値はそれぞれ 1.028 ± 0.090 mg/ml、 1.494 ± 0.146 mg/ml と異なっていた。この結果は脂質組成の変化が H12-vesicle の結合親和性に大きな影響を与えることを示しており、リポソーム作成時の脂質濃度管理が重要であることを示唆している。

H12-vesicle はフィブリノーゲンの α I**Ib** β 3 結合部位である γ 鎖ペプチド (H12 ペプチド) をリポソーム膜表面に担持している。H12-vesicle とフィブリノーゲンは α I**Ib** β 3 の同じ部位に結合するため、互いに結合を阻害する作用を有すると考えられる。実際にフィブリノーゲンは用量依存性に H12-vesicle の結合を妨げることが観察された。逆に H12-vesicle も高濃度ではフィブリノーゲンと α I**Ib** β 3 の結合を妨げる可能性が考えられる。しかし今回使用した濃度範囲内では、551(+)、555(+)ともにフィブリノーゲン結合阻害効果は全く認められなかった。H12-vesicle は大きいいため、細胞上の限られた数の α I**Ib** β 3 と結合することしかできず、たとえ高濃度でもフィブリ

ノーゲンが結合する余地は十分に残されているとためと考えられる。

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する。これらの部位は、ligand-induced binding site (LIBS) とよばれ、いわゆる抗 LIBS 抗体の epitope となる。臨床的には、これらの 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。抗 α IIb モノクローナル抗体である SZ22 が抗 LIBS 抗体であることは、既に報告した。この抗体の epitope は α IIb 鎖の脚部を構成する calf-2 ドメインに局在することがわかっている。図 13 に示したように SZ22 の α IIb β 3 への結合は RGD ペプチドの濃度に依存して増加した。一方、H12-vesicle は 551(+), 555(+)ともに SZ22 結合の有意な増加は起こさなかった。しかし vesicle の濃度が極端に高い場合には、僅かではあるが増加する傾向がみられた。興味あることに、生理的濃度のフィブリノーゲンは SZ22 の結合を著明に減少させた (図 14)。この効果が SZ22 だけにみられるのか、他の抗 LIBS 抗体に共通にみられるのかは明らかではない。低活性型 α IIb β 3 と H12-vesicle の結合がフィブリノーゲンによって阻害されたことを考えると、血管内では α IIb β 3 の構造変化が起こりにくい状況にあると思われる。以上の結果から、555(+)は 551(+)に比べて優れた血小板結合作用をもつと期待されるが、 α IIb β 3 の構造変化を惹起させる効果は観察されず、安全性は保たれていると考えられる。

結論

高活性型 α IIb β 3 発現した一過性発現細

胞を用いることで、H12-vesicle 製剤の結合能を評価することが可能である。しかし、測定の再現性をさらに高めるためには、無細胞測定系の開発が必要であろう。また、H12-vesicle のリポソーム脂質膜組成を調整することにより、止血機能のさらなる最適化が可能であると考えられた。

G. 研究発表

1 論文発表：1) Tetsuji Kamata, Makoto Handa, Sonomi Ito, Yukiko Sato, Toshimitsu Ohtani, Yohko Kawai, Yasuo Ikeda, and Sadakazu Aiso: Structural Requirements for Activation in α IIb β 3 Integrin. *J.Biol.Chem.* ; 285(49):38428-37, 2010.

2 学会発表：1) Tetsuji Kamata, Makoto Handa, Yohko Kawai, Yasuo Ikeda and Sadakazu Aiso: Regulatory Role of the Extracellular α -Tail/ β -Tail Interaction in α IIb β 3 Integrin Activation. The 52nd ASH Annual Meeting and Exposition. Orlando, FL, December 4-7, 2010

2) Tetsuji Kamata, Makoto Handa, Yohko Kawai, Yasuo Ikeda and Sadakazu Aiso: Separation of the two extracellular tails is required to propagate activation signals initiated in the cytoplasmic tails of α IIb β 3 integrin. The 23rd Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan, July 23-28, 2011

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

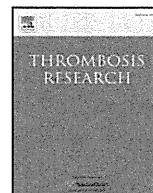
研究成果の刊行に関する一覧表

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
Suzuki, H., Okamura, Y., Ikeda, Y., Takeoka, S., Handa, M.	Ultrastructural analysis of thrombin-induced interaction between human platelets and liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute	<i>Thrombosis Research</i>	1285 (6)	552-559	2011
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	<i>Thromb Haemost</i>	105 (3)	487-495	2011
Tokutomi, K., Tagawa, K., Korenaga, M., Chiba, M., Asai, T., Watanabe, N., Takeoka, S., Handa, M., Ikeda, Y., Oku, N.	Decoration of fibrinogen γ -chain peptide on adenosine diphosphate-encapsulated liposomes enhances binding of the liposomes to activated platelets	<i>International Journal of Pharmaceutics</i>	407 (3)	151-157	2011
Taguchi K, Maruyama T, Otagiri M.	Pharmacokinetic properties of hemoglobin vesicles as a substitute for red blood cells	<i>Drug Metab Rev.</i>	43 (2)	362-373	2011
半田 誠	人工血小板	<i>脈管学</i>	51 (3)	333-378	2011
Shono S, Kinoshita M, Takase B, Nogami Y, Kaneda S, Ishihara M, Saitoh D, Kikuchi M, Seki S.	Intraosseous transfusion with liposome-encapsulated hemoglobin improves mouse survival after hypohemoglobinemic shock without scavenging nitric oxide	<i>Shock.</i>	35 (1)	45-52	2011
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	<i>Drug Metab Dispos.</i>	39 (3)	484-489	2011
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	<i>J. Controlled Release</i>	148 (3)	373-379	2010
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	<i>Nanomedicine</i>	6 (2)	391-396	2010
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	<i>J Arrhythmia</i>	26 (3)	189-198	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻(号)	ページ	出版年
Kamata T, <u>Handa M</u> , Ito S, Sato Y, Ohtani T, Kawai Y, <u>Ikeda Y</u> , Aiso S.	Structural requirements for activation in alphaIIb beta3 integrin	<i>J Biol Chem.</i>	285 (49)	38428 -38437	2010
Wada T, Okamura Y, <u>Takeoka S</u> , Sudo R, <u>Ikeda Y</u> , Tanishita K.	Deformability and adhesive force of artificial platelets measured by atomicforce microscopy	<i>J Biorheol.</i>	1 巻	35 - 40	2009

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別冊



Regular Article

Ultrastructural analysis of thrombin-induced interaction between human platelets and liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute

Hidenori Suzuki ^{a,*}, Yosuke Okamura ^b, Yasuo Ikeda ^b, Shinji Takeoka ^b, Makoto Handa ^c

^a Laboratory of Electron Microscopy, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

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

^c Department of Transfusion Medicine & Cell Therapy, Keio University, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 May 2011

Received in revised form 15 July 2011

Accepted 15 July 2011

Available online 15 August 2011

Keywords:

Platelets

Platelet substitute

Liposomes

Dodecapeptide (H12)

Aggregation

Electron microscopy

ABSTRACT

Background: The dodecapeptide HHLGGAKQAGDV (H12) in the carboxy-terminus of the fibrinogen γ -chain is a specific binding site of the ligand for platelet GPIIb/IIIa complex. We have evaluated liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute.

Objectives: We examined the interaction between human platelets and H12-liposomes during thrombin-induced activation using flow cytometry and electron microscopy (EM).

Methods and results: After thrombin-activation, a remarkable time-dependent increase in binding of the H12-liposomes to platelets was found by flow cytometry. A large-sized swollen open canalicular system (OCS) was observed in the spheroidal platelets from 60 sec to 5 min after thrombin-activation, but intact H12-liposomes were not evident by conventional EM. Cryoultramicrotomy and immunogold staining with anti-H12 antibody were successful in identifying the liposomes; they appeared as small particles with a unit membrane around 0.2 to 0.4 μ m in diameter, and gold labels representing H12 were distributed homogeneously on the surface. Abundant H12-liposomes were localized not only on the surface membrane but also in the lumen of the large-sized swollen OCS in the platelets at 60 sec after thrombin-activation. The formation of the large-sized swollen OCS was inhibited by pre-incubation with unbound H12, EDTA or anti-GPIIb/IIIa antibody. In thrombin-induced platelet aggregates we observed electron-transparent areas between adherent platelets, in which abundant H12-liposomes were distributed.

Conclusions: We demonstrate morphologically that H12-liposomes bind to thrombin-activated platelets and accumulate between adherent platelets like fibrinogen, leading to large-scale aggregation.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Platelet transfusion plays an important role in prophylactic or therapeutic treatment for patients with thrombocytopenia caused by hematologic malignancies or intensive chemotherapy for solid tumors or as a result of surgical procedures and radiotherapy. However, due to the short storage life of platelets (4 days in Japan), the possibility of a shortage of platelets for transfusion has become a serious concern in our aging society. Furthermore, the risk of viral and bacterial infections being transmitted through transfusion is also a serious issue. To solve these problems, various platelet substitutes [1] have been developed, such as solubilized platelet membrane protein-conjugated liposomes (Plateletsome) [2], infusible platelet membranes (IPM) [3], fibrinogen-coated albumin microcapsules (Syntho-

cyte) [4], red blood cells with bound fibrinogen [5], liposomes bearing fibrinogen [6], and arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide-bound red blood cells (Thromboerythrocyte) [7].

We have developed platelet substitutes using polymerized albumin particles [8–11], phospholipid liposomes [12–15] and nanosheets [16] as biocompatible and biodegradable carriers and shown that carriers carrying recombinant fragments of platelet membrane proteins (rGPIIb [17,18] and rGPIa/IIa complex [19,20]) specifically interact with a surface that mimics the site of a bleeding injury, such as von Willebrand factor (VWF) and collagen immobilized on a surface under flow conditions *in vitro*. Moreover, we demonstrated that rGPIa/IIa-conjugated albumin particles reduced the tail bleeding time of thrombocytopenic mice [8]. These carriers have the ability to induce hemostasis; however, they cannot recruit flowing platelets to induce platelet aggregation.

Next we began the development of synthetic platelet substitutes based on a strategy of using polymerized albumin or liposomes (mean diameter, 0.22–0.26 μ m for each) as a carrier vehicle and synthetic H12 peptides as a surface-coating ligand to target activated platelets

* Corresponding author at: Laboratory of Electron Microscopy, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan. Tel.: +81 3 5316 3100x1782; fax: +81 3 5316 3150.

E-mail address: suzuki-hd@igakuken.or.jp (H. Suzuki).

[11,21–23]. It is well established that platelet aggregation is mediated via fibrinogen by bridging adjacent platelets through integrin α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) in an activation-dependent manner [24–26]. 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 carboxy-terminus of the γ -chain [27–29]. Selection of the H12 peptide was derived from general observations that the interaction of H12 is highly specific to GPIIb/IIIa, whereas RGD related peptides are promiscuous with many integrins from various cell types [30]. In fact, H12-coated polymerized albumin and liposomes with polyethyleneglycol (PEG)-surface modifications show specific interactions 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 [11,21–23].

However, we have only indirectly demonstrated the interaction between platelets and H12-particles *in vitro* or *in vivo*. In the present study, we carefully examined ultrastructural interactions between human platelets and H12-liposomes during thrombin-induced activation and aggregation, focusing on liposome localization using cryoultramicrotomy including immunogold staining. Although we failed to detect H12-liposomes using conventional electron microscopy, the application of cryoultramicrotomy has enabled us to identify these liposomes in both activated and aggregated platelets.

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-phosphatidyl-ethanolamine-*N*-[monomethoxypoly(ethylene glycol)] (PEG-DSPE, 5.1 kDa) was from NOF (Tokyo, Japan). 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. Carboxyfluorescein (CF) was obtained from Acros Organics (Geel, Belgium). Polyvinylpyrrolidone, polyvinylalcohol (10 Da), prostaglandin E₁ (PGE₁), human thrombin and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Paraformaldehyde, glutaraldehyde, Epon, and uranyl acetate were obtained from TAAB Laboratories (Aldermaston, West Berkshire, UK). Rabbit antibody to H12 was synthesized by Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan). PAC-1, a mouse anti-GPIIb/IIIa antibody, was purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). Rabbit anti-human fibrinogen antibody and goat anti-rabbit IgG conjugated to 10- or 15-nm colloidal gold were obtained from Cappel Organon Teknika (West Chester, PA, USA) and BioCell Research Laboratories (Cardiff, UK), respectively. 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and other reagents were acquired from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan).

Preparation of H12-liposomes

The preparation was performed exactly as described previously [11,21–23]. Briefly, DPPC (100 mg), cholesterol (52.7 mg), DHSG (18.9 mg), PEG-DSPE (5.2 mg) and H12-PEG-Glu2C18 (4.7 mg) were dissolved in benzene and then freeze-dried (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C18 = 5/5/1/0.033/0.033, by molar ratio). The resulting mixed lipids were hydrated with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4, 5 mL) for 3 h at room temperature (RT) and extruded with membrane filters of pore size of 0.45 μ m first and then with that of 0.22 μ m (Durapore®; Millipore, Tokyo, Japan). For flow cytometric

analysis, we also prepared the liposomes hydrated with a solution of CF in PBS (1 mM, 5 mL). The liposomes were washed with PBS by suspension and centrifugation (100,000 \times g, 30 min, 4 °C, twice), and the H12-liposomes and CF-labeled H12-liposomes were collected. We also prepared control liposomes (CF-labeled and unlabeled) in the absence of H12-PEG-Glu2C18 by the same procedure. The liposome diameter was analyzed using a dynamic light scattering method (N4 PLUS Particle Size Analyzer, Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA). The lipid concentration of liposome was quantified using a phospholipid test kit (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan).

Preparation of human washed platelets

Blood drawn from healthy volunteers was mixed with 10% volume of 3.8% sodium citrate. Blood collection was approved by the Committee of Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science on the Ethics of Research in Human Experimentation. Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation of the blood (100 \times g, 15 min) at room temperature (RT). PRP was mixed with a 15% volume of acid-citrate-dextrose solution composed of 2.2% sodium citrate, 0.8% citric acid, and 2.2% glucose (ACD) containing 1 μ M PGE₁. The suspension was centrifuged (2,200 \times g, 7 min, RT), and the plasma was replaced with a Ringer's-citrate-dextrose solution (RCD solution, composition: 0.76% citric acid, 0.09% glucose, 0.043% MgCl₂, 0.038% KCl, 0.60% NaCl, pH 6.5) containing 1 μ M PGE₁. After the pellets were resuspended in the RCD solution, the suspension was centrifuged (2,200 \times g, 7 min, RT) and the concentrated platelets were resuspended at 1.0 \times 10⁵/ μ l in a HEPES-Tyrode buffer (H-T buffer, pH 7.4) containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.4 mM NaH₂PO₄, 12 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 22 mM NaH₃C₆H₅O₇, 5 mM HEPES, 0.35% BSA and 0.1% glucose. The platelet count was determined using an automated hematology analyzer (K-4500; Sysmex Co., Kobe, Japan).

Flow cytometry

After the addition of human thrombin (final concentration 0.1 U/ml) to mixtures of washed platelets (1.0 \times 10⁵/ μ l) and H12-CF-liposomes or control CF-liposomes (final concentration 3 mg/ml), the mixtures were gently shaken three times and allowed to stand without stirring for 30 sec, 60 sec, 5 min and 10 min at 37 °C. The incubation was terminated by adding an equal volume of 3% formaldehyde in PBS. After centrifugation, the platelets were resuspended in PBS. This washing procedure was repeated three times, after which platelets were gated according to their characteristic forward scatter versus side scatter, and 20,000 platelets were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Nihon Becton Dickinson, Tokyo, Japan). The number of platelets bound to the H12-CF-liposomes or control CF-liposomes was quantified as a fraction of the fluorescent-positive platelets. Each experiment was performed at least three times.

Electron microscopy and immunogold electron microscopy

After the addition of thrombin to mixtures of washed platelets and H12-liposomes or control liposomes similar to flow cytometry, the mixtures were gently shaken three times and allowed to stand without stirring for 30 sec, 60 sec and 5 min at 37 °C, fixed with 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Part of the mixture of platelets and H12-liposomes was stirred for 60 sec after the addition of thrombin and fixed similarly above. To obtain control platelets before the addition of thrombin, washed platelets incubated with H12- or control liposomes alone were fixed in a manner similar to that described above. To block the function of GPIIb/IIIa, on the other hand, human platelets were pre-incubated with liposome-unbound H12 (0.5 mM), EDTA (5 mM) or the anti-GPIIb/IIIa antibody PAC-1 (10 μ g/ml) for 60 sec before the addition of H12-liposomes and

thrombin. After fixation at 4 °C for 30 min, the fixed platelets were centrifuged at 2,200×g for 3 min and the platelet pellets were dissected into blocks of 1-mm cubes and divided into two samples: one for conventional electron microscopy and the other for cryoultramicrotomy including immunogold staining.

For electron microscopy, the samples were re-fixed with 2% glutaraldehyde in the same buffer at 4 °C for 30 min, washed with 0.1 M PB, post-fixed with 1% osmium tetroxide in same buffer at 4 °C for 60 min, dehydrated with a graded ethanol series, and embedded in Epon. After electron staining using uranyl acetate and lead citrate, ultrathin sections were examined with a JEM 1200EX transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 80 kV.

For cryoultramicrotomy and immunogold staining, the samples were processed according to the method of Tokuyasu [31] with minor modifications as previously described [32]. Briefly, the fixed platelets were rinsed with 0.1 M PB and PBS at 4 °C, then infused with 1 M sucrose in PBS for 60 min, 1.84 M sucrose in PBS for 2 h and then 1.84 M sucrose containing 20% polyvinylpyrrolidone in PBS overnight at 4 °C. After freezing in liquid nitrogen, ultrathin frozen sections were cut and were incubated with rabbit anti-H12 (1:5,000 dilution) or anti-human fibrinogen antibody (1:2,000 dilution) in PBS overnight at 4 °C. After rinsing with PBS five times, the sections were then incubated with goat anti-rabbit IgG coupled to 10 or 15-nm colloidal gold at a dilution of 1:100 for 60 min at RT. After rinsing with PBS three times and then distilled water (DW) five times, the sections were stained with 1% uranyl acetate, washed with DW, and then adsorption-stained with a mixture of 3% polyvinylalcohol and 0.3%

uranyl acetate. The stained sections were examined with a JEM 1200EX electron microscope in a manner similar to that described above.

Results

Time-dependent increase in binding of H12-liposomes to thrombin-activated platelets

When thrombin was added to the mixture of human washed platelets and H12-liposomes, a significant time-dependent increase in binding of the liposomes to platelets was found by flow cytometry (Fig. 1). The binding of the liposomes to platelets had already begun by 30 sec and almost reached a plateau by 5 min after the addition of thrombin. The control liposomes, however, did not bind to platelets during the thrombin-induced activation.

Formation of a large-sized swollen open canicular system (OCS) in platelets incubated with H12-liposomes after thrombin-induced activation

To assess the ultrastructural interaction of platelets with H12-liposomes after the addition of thrombin, ultrathin sections from Epon-embedded samples were subjected to transmission electron microscopy (Fig. 2). Before the addition of thrombin to the mixture of platelets and H12-liposomes, platelets had discoid forms, and organelles such as α -granules, dense granules, mitochondria, glycogen, and the open canicular system (OCS) were well preserved in the platelet cytoplasm (Fig. 2A). Thirty seconds after the addition of thrombin, platelets had changed to spheroidal forms with pseudopodia,

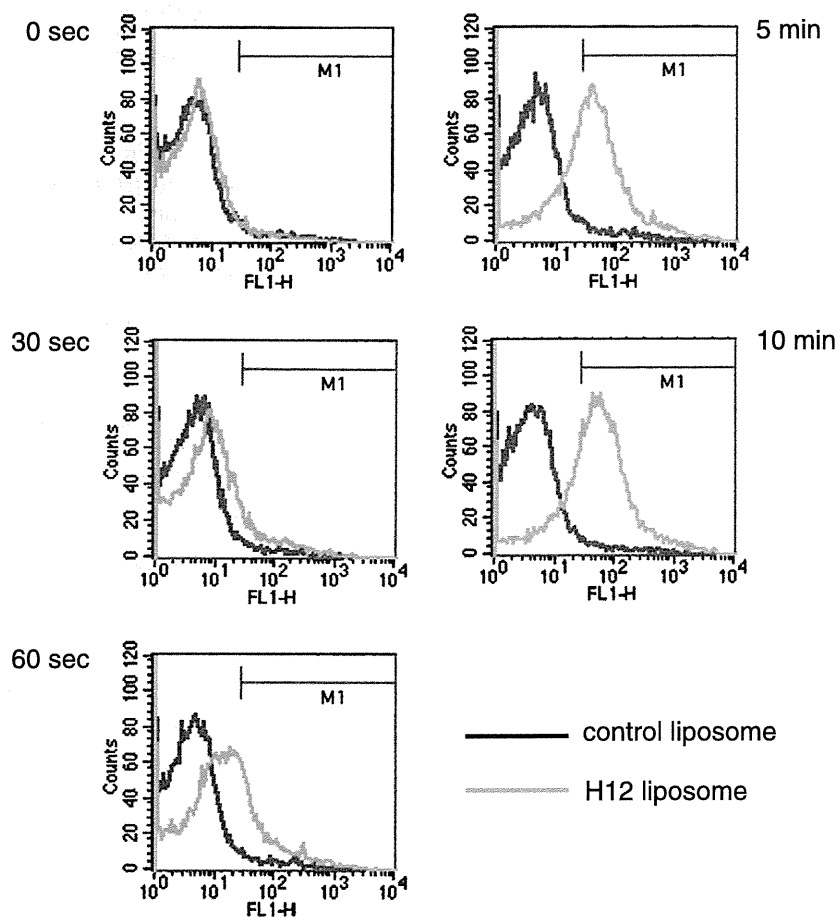


Fig. 1. Binding of H12-liposomes to thrombin-activated platelets by flow cytometry. After the addition of thrombin into mixtures of washed platelets and H12-CF-liposomes or control CF-liposomes, these mixtures were gently shaken three times and allowed to stand without stirring for 30 and 60 sec and 5 and 10 min at 37 °C, fixed with formaldehyde, washed with PBS, and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer. The binding of the H12-CF-liposomes to platelets increased time-dependently, but that of control CF-liposomes did not change.

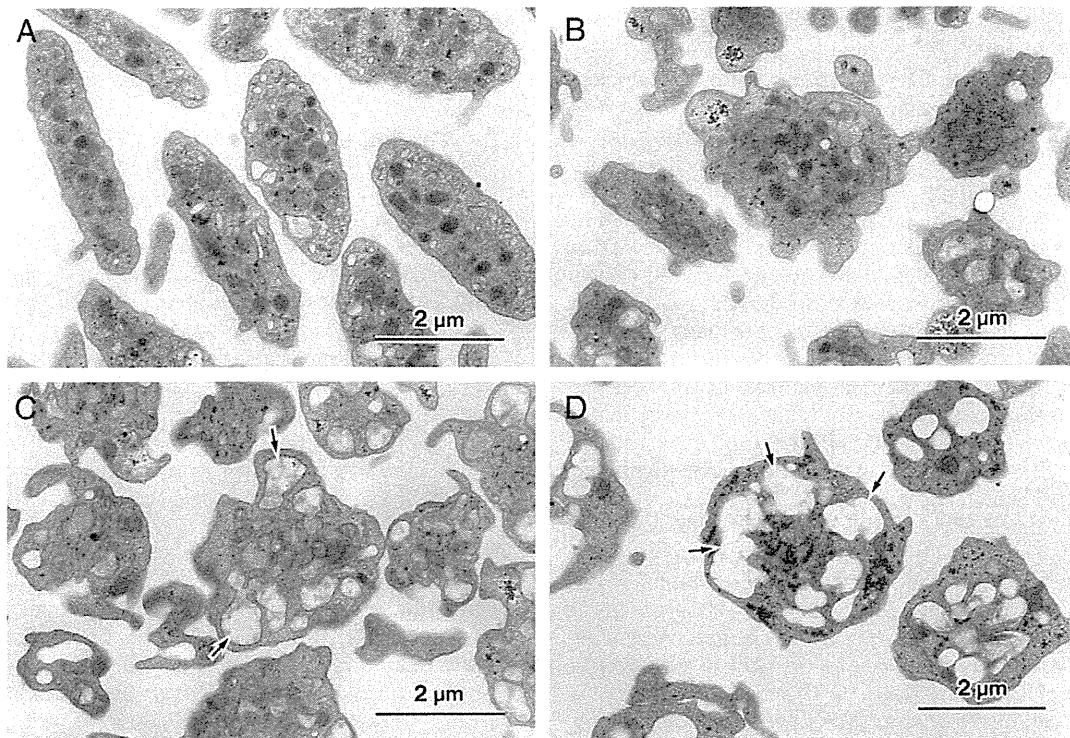


Fig. 2. Interaction of human platelets with H12-liposomes before and after the addition of thrombin. After the addition of thrombin, platelets were gently shaken three times and allowed to stand without stirring for 30 and 60 sec and 5 min at 37 °C, fixed with glutaraldehyde, post-fixed with osmium tetroxide, and embedded in Epon; ultrathin sections were then examined by transmission electron microscopy. (A) Before the addition of thrombin, platelets in the mixture with H12-liposomes have discoid forms containing cytoplasmic organelles such as α -granules, dense granules, mitochondria, glycogen, and the open canalicular system (OCS). (B) Thirty seconds after the addition of thrombin, platelets show spheroid forms with pseudopodia, and the centralization of granules can be seen. (C) At 60 sec, the OCS becomes expanded in the spheroidal platelets (arrows). (D) At 5 min, activated platelets have several large-sized swollen OCS (arrows), in which fuzzy and/or formless contents are present.

and the centralization of granules was observed (Fig. 2B). At 60 sec, the number of intact granules decreased; instead, several swollen OCS were observed in the spheroidal platelets (Fig. 2C). At 5 min, intact granules were no longer observed in the thrombin-activated platelets, indicating a release reaction had already occurred (Fig. 2D). The OCS was expanded to a size much larger than that of platelets at 60 sec after the addition of thrombin. There were several large-sized swollen OCS in the activated platelets whose longer axis was approximately equal to or greater than 1 μ m. H12-liposomes, however, were not observed as intact forms during the activation. By careful inspection, fuzzy and/or formless contents were found to be present in the lumen of the large-sized swollen OCS. In contrast, the formation of large-sized swollen OCS could not be observed in the platelets incubated with control liposomes during the thrombin activation (data not shown).

Identification of H12-liposomes in thrombin-activated and aggregated platelets

To visualize H12-liposomes in the mixture with platelets before and after the addition of thrombin, ultrathin frozen sections from the samples were subjected to electron microscopy (Fig. 3). In the mixture of platelets and H12-liposomes before thrombin-activation, the liposomes were present independently from the platelets and were observed as electron-lucent small particles with unit membranes, around 0.2 to 0.4 μ m in diameter (Fig. 3A). Through a combination of the immunogold method with an anti-H12 antibody, we were able to view H12 distributed homogeneously on the surface of the liposome (Fig. 3B), indicating that the method combining cryoultramicrotomy and immunogold staining was more effective at identifying liposomes than conventional electron microscopy methods.

Accordingly, the same methods were also used to analyze the interaction between platelets and H12-liposomes during thrombin-

induced activation (Fig. 4–6). When thrombin was added into the mixture of platelets and H12-liposomes and the suspension was incubated without stirring from 30 sec to 5 min, the gold-labeled liposomes were identified not only on the exterior surface but also in the lumen of the large-sized swollen OCS in the platelets (Fig. 4). Interestingly, some H12-liposomes were localized along the membrane of the large-sized swollen OCS. In contrast, when the mixture of platelets

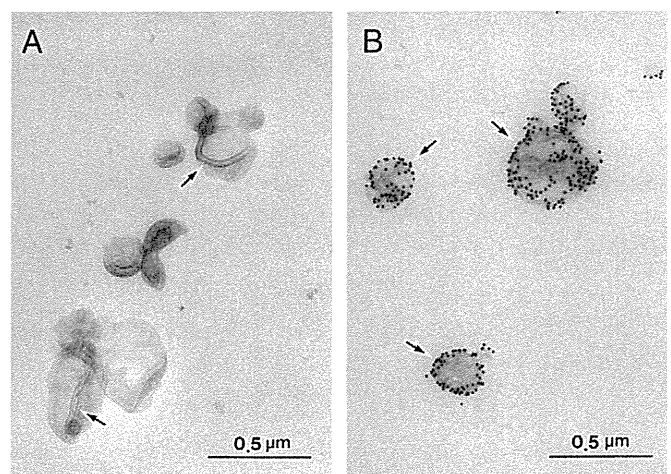


Fig. 3. Visualization of H12-liposomes by cryoultramicrotomy and immunogold staining. H12-liposomes in the mixture with platelets were fixed and frozen in liquid nitrogen, and ultrathin frozen sections were examined by electron microscopy before and after immunostaining with an anti-H12 antibody and gold-conjugated secondary antibody. (A) Liposomes show unilamellar small particles around 0.2 to 0.4 μ m in diameter (arrows). (B) Abundant gold particles representing H12 are distributed homogeneously on the surface of the liposomes (arrows).