

平成24年度 厚生労働科学研究費補助金「創薬基盤推進研究事業」
『人工血小板/H12(ADP)リポソーム：臨床研究への移行を
目指した品質管理と薬物試験 (H24-創薬総合-一般-008)』

分担研究報告書

血小板凝集に巻き込まれたH12-(ADP)リポソームの形態解析
-急速凍結切断エッチングレプリカ法による未固定試料の検討-

分担研究者 鈴木 英紀 (日本医科大学・形態解析共同研究施設・准教授)

研究要旨：フィブリノゲン鎖C末端のドデカペプチド(H12)を結合させ、さらにADPを内包させたH12(ADP)リポソームは、ヒト血小板浮遊液のコラーゲンおよびADPにより惹起される血小板凝集を促進させることを電顕的に報告してきた。H12-(ADP)リポソームは凝集塊に巻き込まれ、そこで内包されたADPがリポソームから漏れ出ることによって、凝集を促進すると考えられる。しかし、血小板凝集塊に巻き込まれたH12-(ADP)リポソームからADPがどのような機構で漏れ出ることについては明らかではない。そこで昨年度は、凝集塊に巻き込まれたリポソームの形態をより把握するために、急速凍結切断レプリカ法で検討した。洗浄血小板にH12-(ADP)リポソームを混ぜ、さらにトロンビンを加えて攪拌すると、血小板は凝集し、この時リポソームは血小板相互間にも多量に存在した。そのほとんどが楕円体を示し、その一部の表面には、小孔様の穴も観察された。この小孔からADPが放出されることが考えられたが、この小孔は固定によるアーティファクトの可能性も否定できなかった。そこで、今年度は未固定試料を急速凍結切断エッチングレプリカ法で観察した。血小板凝集に巻き込まれたリポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示し、表面には固定試料の結果と同様に小孔が見られた。すなわち、リポソーム表面の小孔は必ずしも固定に起因しているとは考えられなかった。

A. 研究目的

H12を表面に結合させ、ADPを内包させたH12-(ADP)リポソームは、ヒト血小板浮遊液へのコラーゲンまたはADP添加により惹起される血小板凝集を促進させる。すなわち、リポソームはその表面のH12によって血小板のフィブリノゲン受容体(GPIIb/IIIa)に結合し、血小板相互を架橋する。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促進させると考えられている。

ところで、これまでH12-リポソームまたはH12-(ADP)リポソームの形態を作製した直後のものから、血小板凝集塊に巻き込まれるものま

で電顕的に観察してきた。ネガティブ染色法では、作製直後のリポソームは立体的ではなく、つぶれた多角形に見えた。さらに凍結超薄切片法では、その切り口の断面は球状を想像させるきれいな円形ではないものの、その二重膜によりリポソームと判断できた。すなわち、これらの方法は必ずしもリポソームの正確な形態を反映していないと考えられた。さらに、凝集塊中のリポソームはコントラストが不十分なために、通常のエッチング法では十分に可視化できなかった。しかし、抗H12抗体を使い、凍結超薄切片法による免疫電顕法を採用することによって、リポソームは球状ではなくても凝集塊中の

それらを可視化してきた。それでも、凍結超薄切片を使う限りにおいては、リポソームの凝集塊中にあるの正確な形態を把握できていない。換言すれば、血小板凝集塊中に巻き込まれた H12-(ADP) リポソームから ADP が漏れ出るとすると、その形態に何らかの変化があると考えられるが、従来の方法ではその変化を捉えられていない。そこで昨年度、急速凍結切断レプリカ法の採用し、非凝集または凝集させた固定試料を液体ヘリウム温度で急速に凍結、レプリカ作製器内で試料面を切断、その切断面に対して白金およびカーボン蒸着してレプリカ膜を作製し、それを電顕観察した。トロンビン刺激で血小板は凝集し、この時リポソームは血小板相互間にも多量に存在した。そのほとんどが楕円体を示し、その一部の表面には、小孔様の穴も観察された。この小孔から ADP が放出されることが考えられたが、この小孔は固定によるアーティファクトの可能性も否定できなかった。そこで、今年度は未固定試料を急速凍結切断エッチングレプリカ法で観察した。

B. 研究方法

1) ヒト血小板と H12-(ADP) リポソーム混合液のトロンビン刺激と凍結

① 洗浄血小板の調整: 健康成人から 3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として血液を採血し、これを遠心して多血小板血漿 (PRP) を得た。PRP に PGE₁ (最終濃度 1 μM) を加えて遠心し、ペレットを 0.35% BSA と 1 μM PGE₁ を含む HEPES-Tyrode 液に浮遊した。37°C で 15 分間静置後、遠心し、ペレットを 0.35% BSA を含む HEPES-Tyrode 液に再浮遊し、血小板数を 2.0 × 10⁵/μl に調整した。

② 血小板と H12-(ADP) リポソームの相互反応: 洗浄血小板浮遊液 (0.8 ml) に 0.5 mg/ml の H12-(ADP) リポソームを 0.1 ml 加えて混合し、さらに 1 分後に 1U/ml トロンビンを 0.1 ml 添加し、攪拌して凝集させた。1,000 rpm で 1 分間遠心後、上清を捨て、血小板凝集ペレットを試薬用スパーテルでかき取り、凍結用キャリアーに載せ、余分な水分を吸い取った上で、氷晶の発生や成長を抑えるために高圧凍結装置

(Balzer's 社, EM HPM-010) で急速凍結した。凍結試料は液体窒素中に保存した。

2) 凍結切断エッチングレプリカ膜の作製

凍結試料が載っているキャリアーをあらかじめ真空排気と -110°C に温度設定したレプリカ試料作製装置 (日本電子 EM-19500 JFD II) の中に試料を導入し、排気した。試料の表面をナイフで面出し、切断後、切断面から氷の昇華を促すために -90°C に温度を上げてエッチングした。その面に白金を 40 度の角度から 2 nm の厚さに蒸着し、次いでカーボンを 90 度の角度から 10 nm の厚さで蒸着した。試料を装置から取り出し、室温に戻ってから試料を次亜塩素酸のハイターで溶かし、蒸着膜 (レプリカ膜) を遊離させ、これを 2 回蒸留水で洗浄した。レプリカ膜をグリッドメッシュに回収し、透過型電顕 JEM1010 (日本電子) で観察した。

C. 研究結果

1) 固定試料によるヒト血小板と H12-(ADP) リポソームのトロンビン刺激後の相互関係の検討

洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを加えたトロンビン添加前の固定血小板は円盤状の形態を維持した (図 1)。この時、H12-(ADP) リポソームは全く観察されなかった。

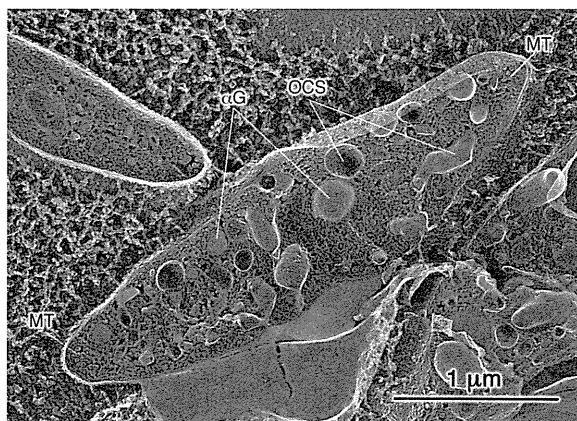


図 1. トロンビン添加前の固定血小板のレプリカ像

洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームのみを加え、グルタルアルデヒドで固定後、レプリカ試料を作製した。中央の血小板はほぼ赤道面で切断されている。円盤状血小板の両端部に微小管 (MT)、中央部に α 顆粒 (αG)、開放小管系 (OCS) が観察される。リポソームは観察されない。

洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを加えた、さらにトロンビン添加して攪拌した5分後に固定した試料では、血小板は相互に接着して凝集塊を形成した(図2)。この時、リポソームは開放小管系中に存在するばかりでなく、接着している血小板相互間に多量に観察された。このような部分を拡大して観察すると、ほとんどのリポソームは楕円体を示した(図3)。また、それらの一部には表面が裂けた小孔が見られた。

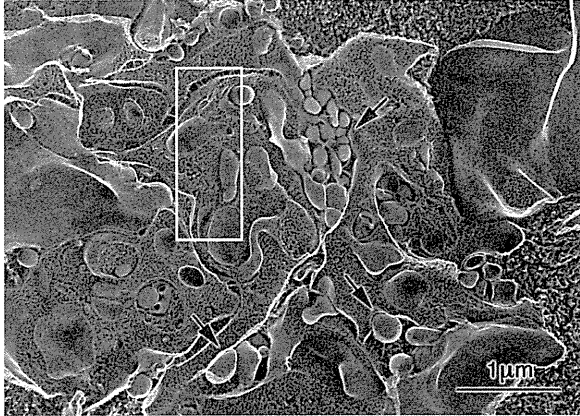


図2. トロンビン添加、攪拌下5分に固定した血小板凝集のレプリカ像

数個以上の血小板が凝集している。血小板相互間にリポソームが存在し、複数個以上のリポソームが存在する部分も観察される(矢印)。

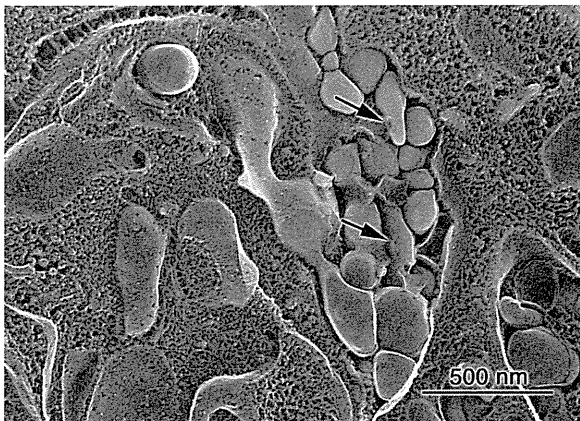


図3. 図2口部の拡大図

血小板相互間に存在しているリポソームは、そのほとんどが楕円体を示している。リポソームの一部の表面には小孔様の陥没も観察される(矢印)。

2) 未固定試料によるヒト血小板と H12-(ADP) リポソームのトロンビン刺激後の相互関係の検討

一方、未固定の試料を得るために、洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを加え、さらにトロン

ビンを加えて攪拌し、固定試料と同様に凝集させた。その後、軽度に遠心し、ペレットをかき取り、凍結キャリアーに載せて高圧凍結した。しかし、これらの時間に手間取り、固定試料のようにトロンビン添加5分というような経時的な試料採取はできなかった。このようにトロンビン添加5分以降に採取、凍結し、調製した未固定凝集塊のレプリカ像では、血小板は識別できない程に複雑な形態を示した(図4)。リポソームは血小板中または血小板間と思われる部位に、多数見られた。拡大像ではリポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示した(図5)。これらのリポソーム表面には、固定したものと同様な小孔が観察された。

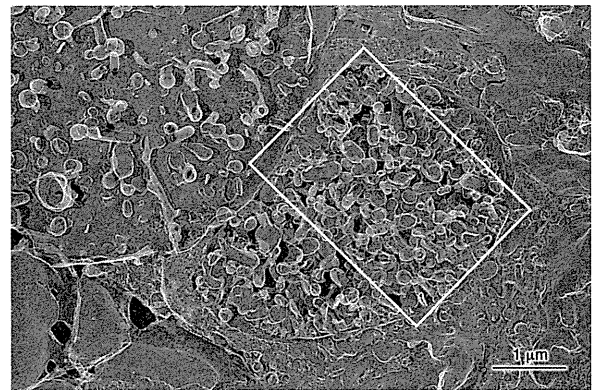


図4. 未固定凝集塊のレプリカ像

トロンビン刺激、攪拌5分後に遠心、凝集塊を集めて凍結した。凍結までの時間がかかり、トロンビンの反応は強くなっている。凝集血小板の断面に多数のリポソームが見られる。

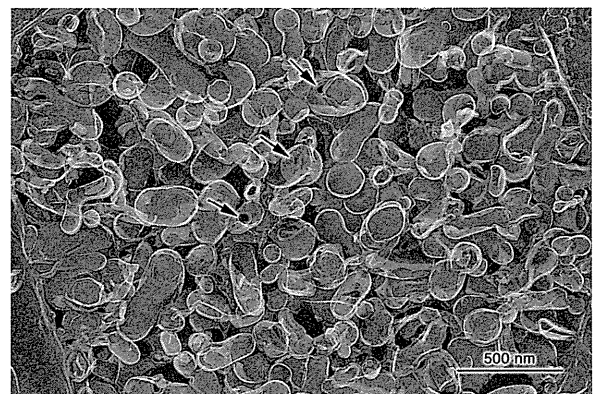


図5. 図4口部の拡大図

リポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示している。リポソーム表面には、固定したものと同様な小孔が観察される(矢印)。

D. 考察

前年度から急速凍結レプリカ法を実施して来た。本法で H12-(ADP) リポソームのみを観察した時、直径 100~250 nm の断面の凸部と凹部が観察され、リポソームは元々直径 100~250 nm の球形であることを確認できた。

次いで、洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを加え、さらにトロンビンを加えた後、経時的にグルタルアルデヒドで固定した。この固定試料を急速凍結割断レプリカ法の試料とした。その結果、洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームのみを加えた固定試料では、血小板は他の方法と同様に円盤状を示し、 α 顆粒、開放小管系、微小管などが識別された。しかし、血小板に結合するリポソームは全く観察されなかった。この結果は H12-(ADP) リポソームは無刺激血小板に結合しないことを示しており、既報の H12-リポソームの分布と同じであった。血小板に H12-(ADP) リポソームとトロンビンを加え、攪拌した 5 分後の固定試料では、血小板は相互に接着し凝集を形成していた。この時、H12-(ADP) リポソームは開放小管系中に存在するばかりでなく、接着している血小板相互間に多量に観察された。このような部分を拡大して観察すると、ほとんどのリポソームは楕円体を示した。また、それらの一部には表面が裂けた小孔が存在することを見出した。すなわち、凝集は血小板相互の接着であるが、この接着力が強くなるに従って、リポソームは球体から楕円体に変形すると考えた。さらに、リポソーム上の小孔は ADP の通路となると考えた。

しかし、この小孔は固定によるアーティファクトの可能性も否定できなかった。そこで今年度は、未固定試料を急速凍結割断エッチングレプリカ法で観察した。未固定の試料を得るために、洗浄血小板に H12-(ADP) リポソームを加え、さらにトロンビンを加えて攪拌し、固定試料と同様に凝集させた。この後、軽度に遠心し、ペレットをかき取り、凍結キャリアーに載せて高圧凍結した。しかし、これらの時間に手間取り、固定試料のようにトロンビン添加 5 分というような経時的な試料採取はできなかった。このようにトロンビン添加 5 分以降に採取、凍結し、調製した未固定凝集

塊のレプリカ像では、血小板は識別できない程に複雑な形態を示した。リポソームは血小板中または血小板間と思われる部位に、多数見られた。拡大像ではリポソームは球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示した。これらリポソーム形態の多様性は、固定試料では見られなかった。未固定試料ではトロンビン刺激から凍結までに手間取ったために、トロンビン刺激がより強くなってリポソームの形態にも影響したと考えられる。一方、未固定試料でもリポソーム表面には、固定したものと同様な小孔が観察された。従って、小孔の形成は固定によるアーティファクトではないと考えられた。

E. 結論

血小板浮遊液に H12-(ADP) リポソームを混ぜ、さらにトロンビンを加え、形成された凝集塊を固定なしに急速凍結、割断、エッチング後、レプリカ膜を作製して電顕観察した。凍結までの時間がかかり、経時的な試料採取は困難であった。また、トロンビンの反応が強く出たためか、固定したものに比べて血小板の識別性は良くなかった。血小板凝集塊に巻き込まれたリポソームは多数観察され、球体、楕円体、鉄アレイ状と多様な形態を示した。表面の一部には固定したものと同様に小孔が観察された。以上の結果により、小孔の形成は固定によるアーティファクトではないと考えられた。また、固定することによって血小板の経時変化が見られること、試料として扱い易いことなど、固定の利点も再認識した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 :

なし

2. 学会発表 :

- 1) 鈴木英紀, 諸根信弘: ヒト血小板と人工血小板粒子の相互作用の解析 -急速凍結割断レプリカ法による検討-. 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会. 2012. 5. 14-16, つくば.

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

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業)
分担研究報告書

α IIb β 3 インテグリンと H12V 担持リポソームの結合解析

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

H12V 担持リポソーム (H12V) は、活性化血小板と選択的に結合することにより、その止血機能を増強する。したがって、H12V と血小板の結合を正確に測定することは、その止血作用を予測する上で不可欠であるばかりでなく、製剤の品質をチェックする上でも重要である。本研究では再現性が高く、実施可能な H12V 機能の評価系を確立することが目的である。

これまでの研究から、血小板を用いた測定法は不確定要素が多く、再現性に欠くことが明らかになった。一方、血小板の代わりに α IIb β 3一過性発現細胞を用い、FACSにて蛍光標識H12Vの結合を測定する系では、結合のKd値やBmax値などのパラメーターを測定することが可能であり、有用な測定法であることがわかった。しかしながら、実験ごとに使用する細胞の α IIb β 3発現量が異なる、H12Vを化学標識しなくてはならないなどの欠点も多いため、新たな測定法の確立が必要である。本研究では新たに、1) LigandTracerを用いた α IIb β 3安定発現細胞株と蛍光標識H12Vの結合測定法と、2) Biacoreを用いて精製 α IIb β 3と非標識H12Vの直接結合を測定する無細胞系の測定法を試験的に行い、実施可能性を検討した。FACSと異なり、LigandTracerによる測定法では、常に一定量の α IIb β 3発現量を有する細胞株を使用すること可能であり、蛍光標識したリガンドの結合と解離を経時的に測定することができた。Biacoreを用いた測定法ではチップへの α IIb β 3の固定化が困難であったが、 α IIb β 3安定発現細胞株からアフィニティー精製した α IIb β 3を用いることにより、十分な量の固定化に成功した。

現時点では未だ試験的な域を出ないが、これら二つの測定法の実施に伴う障害の大部分はクリアされており、十分に実施可能であると考えられる。従来の FACS を用いた測定法と組み合わせることにより、 α IIb β 3 と H12V の結合をより詳細に検討できると期待される。

A. 研究目的

血小板は、血管壁損傷時に露出した内皮下組織に接着し、さらにフィブリンノーゲンを架橋分子として互いに結合することによって止血血栓を形成する。人工粒子 H12V は、フィブリンノーゲンと同様に血小板同士を架橋することによって血栓形成を促進すると考えられる。フィブリンノーゲンと異な

り、H12V は α IIb β 3 インテグリンの結合部位を複数もつために結合の avidity は高く、高濃度のフィブリンノーゲンの共存在下でも血小板と結合することが可能である。実際に経静脈投与により血小板減少症マウスの出血時間の短縮が認められているが、臨床応用を考慮した場合、製剤の機能の安定性が確保されていなければならない。そのた

めには、H12V の機能を評価する測定系の確立が不可欠である。

H12V の止血機能は、血小板 α IIb β 3 インテグリンとの結合に依存していると考えられる。したがって、H12V と α IIb β 3 インテグリンの結合親和性、結合動態を測定することは、H12V の止血機能の予測に役立つばかりでなく、製剤の安定性を評価する上でも重要である。これまでの研究で示したように、H12V と α IIb β 3 インテグリン結合の測定法には幾つかの方法が考えられる。

1) 血小板と H12V の結合を測定：この場合、H12V 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 H12V 量を FACS あるいは放射線測定機器で測定する。平成 23 年度の報告で述べたように、この方法は血小板をヒトから採取する段階から様々な不確定要因を抱えている。このため、再現性のある結果を得るのは非常に困難であり測定系として妥当ではない。2) α IIb β 3 発現細胞と H12V の結合を測定 (図 1 A)：この方法は、血小板の代わりにヒト遺伝子組み換え α IIb β 3 を大量発現した動物細胞を用いる。このため、血小板のように個人差や採取の過程で生じる影響を無視できる。しかし、CHO 細胞に発現した α IIb β 3 は不活性であるため、H12V 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 IIb 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になる。また、一過性発現系では、 α IIb 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 IIb β 3 の発現量を測定し、補正を加えなくてはならない。ここでも、何らかの方法で H12V を標識する必要がある。3) α IIb β 3 発現細胞株と H12V の結合を測定 (図 1 B)：測定系は 2) と基本的には同じであるが、細胞は α IIb β 3 を安定発現した細胞株を用いるため、測定ごとに α IIb β 3 の発現を調

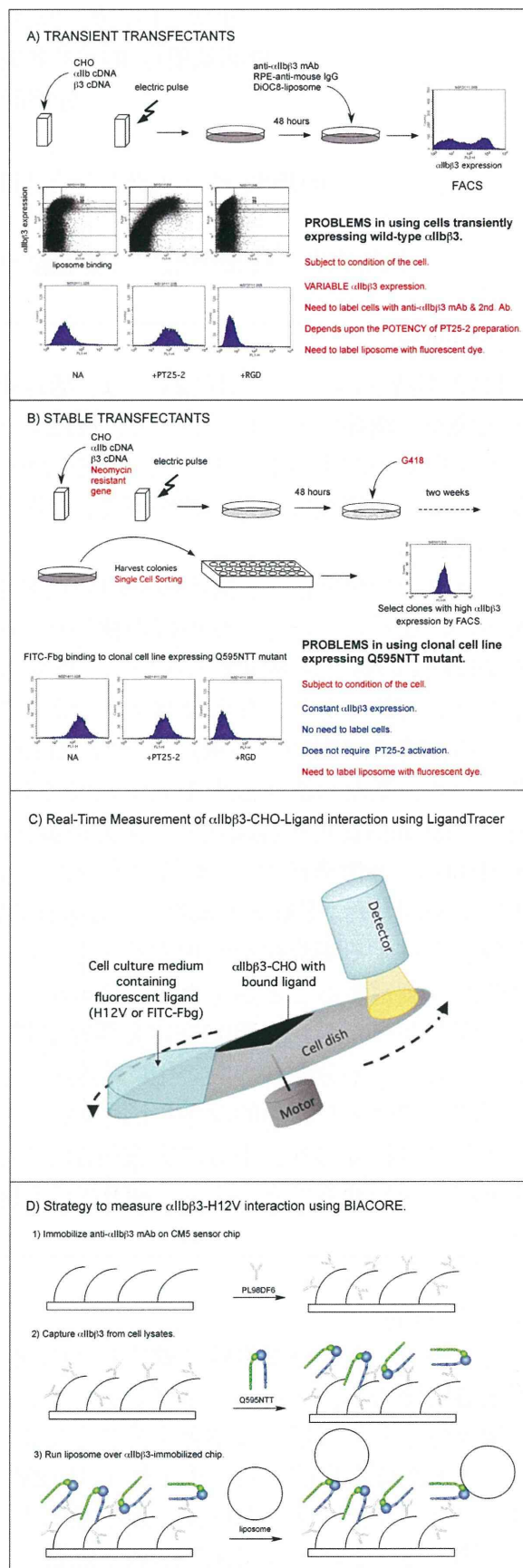


図 1. H12V の機能測定系

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、 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 extended 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。この測定系の最大の問題点は、 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) Ligand Tracer による α I**Ib** β 3 発現細胞と H12V の結合測定 (図 1 C : この方法は、蛍光標識した H12V と α I**Ib** β 3 発現細胞の結合を測定する。この測定法では、FACS と異なりディッシュに接着した細胞と蛍光標識したリガンドの結合を経時的に測定する。このため結合親和性の他に結合速度定数の測定も可能である。5) 表面プラスモン共鳴による α I**Ib** β 3 と H12V の直接結合の測定 (図 1 D) : 表面プラスモンセンサー側に α I**Ib** β 3 を固定化し、その上に H12V 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、H12V 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。

本年度の研究では、H12V の機能の機能評価系として最も有用性の高い 4) 5) を試験的に行い、その問題点の検討を行った。

B. 研究方法

I. α I**Ib** β 3 変異体の作成

α I**Ib** 鎖、 β 3 鎖の cDNA は Joseph C. Loftus 博士 (Mayor 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。高活性型 α I**Ib** 変異体である Q595NTT 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 μ g の α V 又は α I**Ib** cDNA は 50 μ g の β 3 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。一過性発現細胞を用いた実験では、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 Ca^{2+} /1mM Mg^{2+} 加 HEPES-Tyrode buffer (HTB) に再浮遊させ、各モノクローナル抗体 10 μ g/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 Ca^{2+} /1mM Mg^{2+} 加 HEPES-buffered saline (HBS) に再浮遊させ、FACS Calibur 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. α I**Ib** β 3 を安定発現したクローン細胞の作成

50 μ g の α I**Ib** cDNA、50 μ g の β 3 cDNA と共に 5 μ g の Neomycin resistant gene pFneo をトランスフェクトして 48 時間培養した後、700 μ 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 α I**Ib** β 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 α I**Ib** β 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 μ 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、 α I**Ib** β 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。

V. FACS を用いた H12V 結合実験

野生型あるいは変異を有する α I**Ib** cDNA

50 μg と野生型 $\beta 3$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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。

VI. LigandTracer を用いた FITC 標識 Fbg と $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -CHO の結合測定

方法 IV で作成した高活性型 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 変異体 Q595NTT を発現した細胞株を細胞培養ディッシュの一部に接着させる。細胞培養液 2ml に異なる濃度の FITC 標識 Fbg を添加し、LigandTracer にて結合を経時的に測定する。

VII. Biacore による H12V と $\alpha\text{IIb}\beta 3$ の結合測定

まず、Sensor Chip CM5 に抗 αIIb モノクローナル抗体 PL98DF6 を固定化した。 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ の精製は RGD カラムを使用して行った。NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) に GRGDS ペプチドを固定化した。Q595NTT 発現細胞株を T150 フラスコ 4 個分培養した後剥離し、n-octylglucopyranoside を含む細胞溶解液 4ml で細胞を溶解した。遠心した後、可溶性画分を RGD-sepharose と 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。RGD-sepharose を洗浄・円心したのち、結合した $\alpha\text{IIb}\beta 3$ を 5mM EDTA

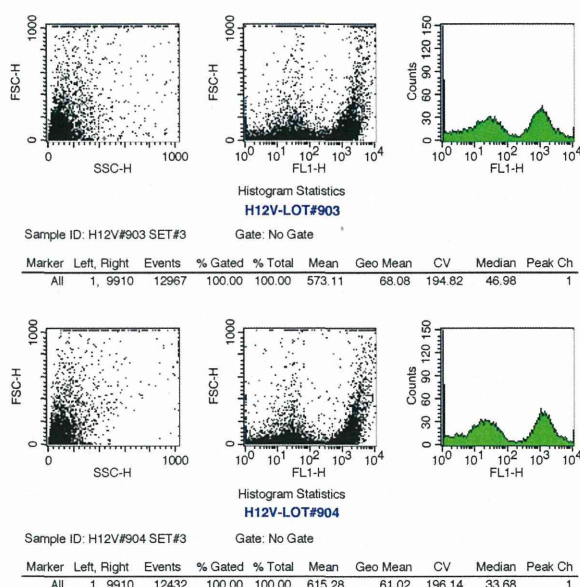


図 2. DiOC18 標識 H12V の FACS 解析

を含むバッファーにて溶出した。精製した $\alpha\text{IIb}\beta 3$ は SDS-PAGE にて展開し、イムノブロット法にて分子量の確認を行った。また、 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ の定量は BCA 法により行った。精製した $\alpha\text{IIb}\beta 3$ は PL98DF6 を固定化した Sensor Chip CM5 上に流し、チップに補足させた。代替策として、精製 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ を直接 Sensor Chip CM5 に固定化することも行った。

C. 研究結果

I. DiOC18 標識 H12V の FACS 解析

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 2 は H12V 製剤 DiOC18 標識し、FACS でその蛍光強度を比較したものである (平成 23 年度結果)。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

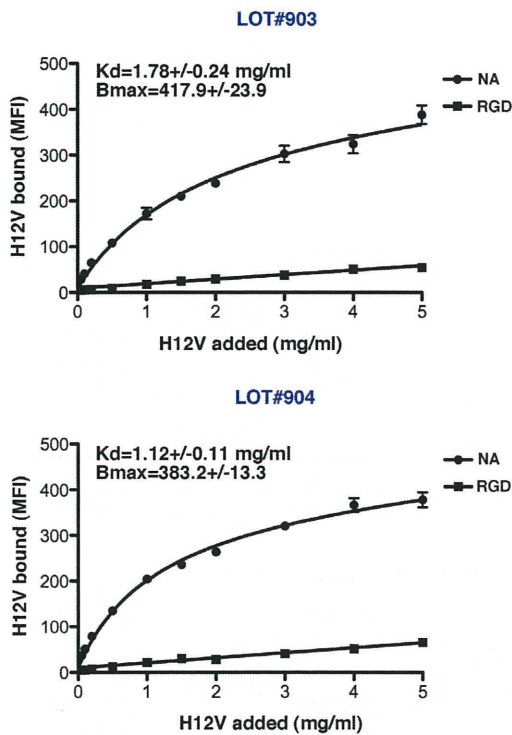


図3. 高活性型 α IIb β 3 (Q595NTT)-CHOとH12-vesicleの結合

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、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。この場合、蛍光標識がH12V機能に及ぼす影響が大きな問題となる。

II. 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

高活性型のQ595NTT変異体を発現した細胞を用いて測定を行った。H12Vは製造日時の異なるLot#903と#904を使用した(平成23年度結果)。図3は蛍光色素DiOC18で標識したH12V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H12V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

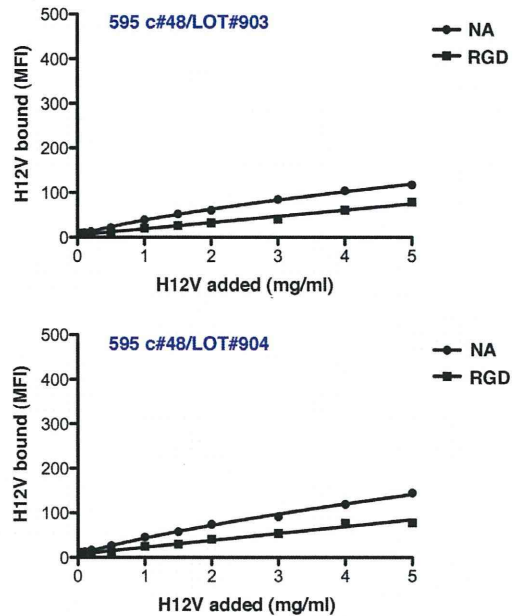


図4. α IIb β 3安定発現細胞株とH12-vesicleの結合

結合を示した。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。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。

III. 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。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クローンの発現は一部を除き、 $MFI < 200$ であった。図4はQ595NTT#48とH12V Lot#903、Lot#904の結合を調べたものである(平成23年度結果)。Q595NTT#48への結合は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

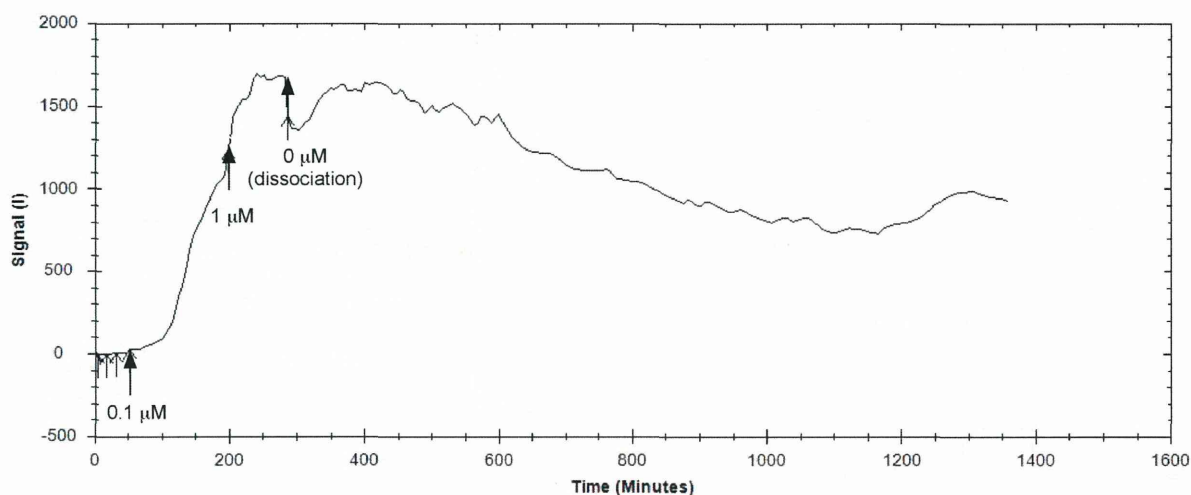


図5. LigandTracer による α IIb β 3-CHO と FITC 標識 Fbg の結合

った (データ記載せず)。

IV. LigandTracer を用いた α IIb β 3-CHO と FITC 標識フィブリノーゲンの結合測定

α IIb β 3-CHO とリガンドの結合を測定する第二の方法として、LigandTracer を用いた測定法を検討した。この方法は、蛍光標識したリガンドと α IIb β 3 発現細胞の結合を測定する点では、前述した FACS と同じである。しかし、FACS では同一の細胞で単一濃度のリガンドの結合しか測定できないのに対し、LigandTracer では複数の異なった濃度のリガンドの結合の測定が経時的に行える。すなわち、結合の親和性だけでなく、結合・解離の速度定数も測定可能である。今回はリガンドとして H12V ではなく FITC 標識フィブリノーゲンを使用し、この測定法の基礎的検討を行った。使用した細胞は、Q595NTT 変異体を安定発現したクローン#48 である。図 1 C に示したように細胞培養ディッシュの一部に細胞を接着させ、2ml の細胞培養液に異なる濃度の FITC 標識フィブリノーゲンを加えて室温にてその結合を測定した。図 5 に示したように、フィブリノーゲンの結合は濃度依存性、時間依存性に増加し、リガンド濃度を 0 としてからは、結合の解離が観察

された。

V. Biacore による結合測定

この方法は細胞の影響を全て排除した唯一の測定系であり、測定に影響を与える不確定要素が最も少ない方法であると言える。実験方法は図 1 D に示したように、1) Biacore チップに抗インテグリン抗体を固定化する。2) α IIb β 3-CHO の細胞溶解液を流して、 α IIb β 3 を Biacore チップに捕捉する。3) H12V を流しチップに捕捉した α IIb β 3 との結合を測定する、の 3 段階で構成される。まず、Biacore チップに抗インテグリン抗体 PL98DF6 の固定化を行った。その後、細胞溶解液からの α IIb β 3 の捕捉を試みたが、全く捕捉されなかった (データ掲載せず)。これは細胞溶解液中の α IIb β 3 濃度が極端に低いことに起因すると考えられた。そこで one step での補足を諦め、細胞溶解液から α IIb β 3 をアフィニティー精製することにした。この目的のため、 α IIb β 3 結合配列である RGD ペプチドを担体に固定化した RGD カラムを作成した。細胞溶解液を一旦この RGD カラムを通して α IIb β 3 を結合させ、洗浄した後に結合画分を 5mM EDTA にて溶出した。図 6 は、溶出液 20 μ l を SDS-PAGE にて泳動し、イ

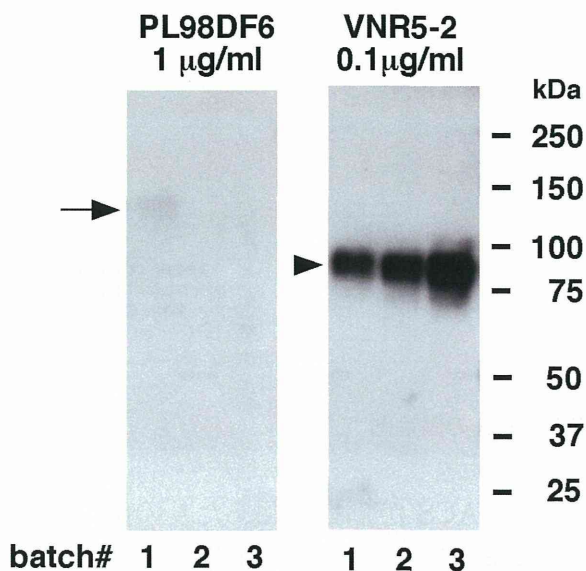


図6. 精製 α IIb β 3 のイムノブロット解析

ムノブロットにて α IIb β 3 を検出したものである。抗 β 3 モノクローナル抗体であるVNR5-2を用いたところ、回収量が異なるものの、各バッチから β 3 に相当する約85kDaのバンド (arrow head) が検出された。一方、同じ検体を抗 α IIb モノクローナル抗体であるPL98DF6を用いて発色させたところ、一部から α IIb に相当する約145kDaのバンド (arrow) が検出されたものの、その検出量は β 3 比べると非常に少なかった。BCA法によるたんぱく質定量では、 α IIb β 3 濃度 11.41~38.66 μ g/ml であり、チップへの固定化に十分な濃度であった。次に、PL98DF6 を固定化したチップに精製した α IIb β 3 を流し、チップへの補足を試みた。われわれの予想に反し、精製 α IIb β 3 は全く補足されなかった(データ掲載せず)。そこでPL98DF6 を介してチップに補足することを諦め、精製 α IIb β 3 を直接Biacore チップに固定化することにした。図7に示したように、15000RU 以上の α IIb β 3 がチップに固定化された。

D. 考察

本研究は、H12V 製剤の機能を予測する上で、信頼性の高い評価法を確立すること

である。前述した通り、H12V は血小板に結合してその止血能を高めると考えられる。従って、H12V 製剤と血小板の結合を正確に測定することができれば、製剤の安定性・機能を客観的に評価することが可能と考えられる。しかしながら、前述した通り血小板そのものを測定に用いるのには様々な障害があり、信頼性・再現性の高い測定を行うことができない。そこで代替案として、血小板に替わる細胞を使用することが考えられる。そもそもH12Vは、フィブリノーゲンのガンマ鎖C末端のペプチド部分をリポゾーム膜に固定したものである。このペプチドは血小板膜表面の α IIb β 3 インテグリンに結合することがわかっている。すなわち、血小板そのものでは無く、 α IIb β 3 インテグリンを発現する細胞を用いればよい。ところが、生理的に存在する細胞で α IIb β 3 インテグリンを発現するのは血小板と骨髄巨核球のみである。また、 α IIb β 3 を発現する巨核球系の培養細胞株の数は少なく、 α IIb β 3 発現量も高くないため、測定に用いるには適さない。これらの理由から、ヒト α IIb β 3 を人工的に強制発現させた細胞を作成し、測定に使用することにした。方法に示したように、一過性発現系では非常に高い α IIb β 3 発現量をもった細胞を得ることが可能である。この細胞とDiOC18 標識したH12Vとの結合をFACSにて測定したところ、結合のKd値やBmax値などのパラメーターの測定が可能であった。これらの値は α IIb β 3 の活性に依存する。 α IIb β 3 を活性化する方法として、活性化抗体であるPT25-2を使用する方法があるが、結果がPT25-2の活性に依存するため、PT25-2製剤のバッチによっては異なる結果が生じうる。そこでPT25-2に依存しない方法として、はじめから高活性を有する α IIb β 3 の変異体Q595NTTを使用した。図3に示したように、PT25-2を使用しなくても再現性の高い結合が測定された。以上のように、

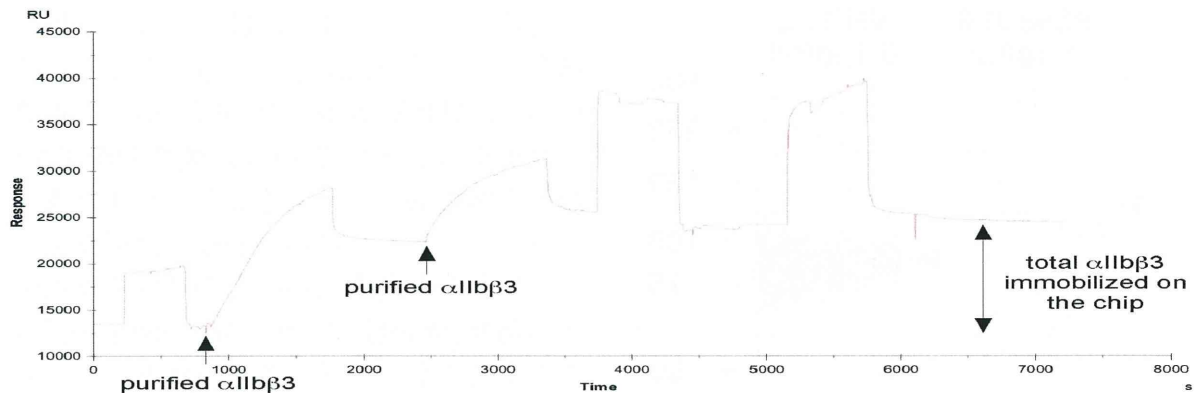


図7. Biacore chip への精製 α IIb β 3 の固定化

Q595NTT 変異体の一過性発現細胞を使用した測定法は信頼性の高い測定法と言える。しかし、この細胞の発現は一過性であるため、測定毎に新たに細胞に α IIb β 3 遺伝子を導入しなければならない。また、 α IIb β 3 の発現量は毎回異なるため、一定の発現量を持った細胞との結合を調べるためには、毎回 α IIb β 3 の発現量を測定し、その値で結合量を補正するなどの手間が必要である。一方、安定発現細胞は作成するためにある程度時間が必要であるが、一旦作成してしまえば、毎回同一の α IIb β 3 発現量を持った細胞と H12-vesicle の結合を調べることができるため再現性に優れる。しかし、外来性の遺伝子を多量に発現した細胞は増殖速度が遅いため、実際には α IIb β 3 を多量に発現した細胞の作成は困難であることが予想される。実際にわれわれは Q595NTT 変異体を安定発現した細胞株を作成し、DiOC18 標識 H12V との結合を FACS にて測定したが、一過性発現細胞に比べて α IIb β 3 発現量が 1/4~1/5 であるため H12V の結合量が低く、信頼性のあるパラメーターを算出することができなかった (図4)。

α IIb β 3 安定発現細胞株を測定に使用する方法は無いのであろうか？われわれは FACS の代わりに LigandTracer を用いた測定法を検討した。方法に示したように、この方法では FACS と同様に蛍光標識したリガンドと細胞の結合を測定する。異なる

のは、FACS が細胞一個あたりの個別の結合量を測定できるのに対して、LigandTracer はディッシュに接着した細胞集団へのリガンドの結合を測定する。よって細胞株の α IIb β 3 発現量が問題となるが、図5に示したように、Q595NTT 安定発現細胞株と FITC 標識フィブリンノーゲンの結合は十分に検出可能であった。LigandTracer の大きな利点はリガンドの結合を経時的に測定することができることであり、結合の親和性だけでなく速度定数の算出が可能であることである。この方法がうまく稼働すれば、FACS 以上の結合情報を得ることができるため、H12V の機能測定に大きく貢献できるだろう。しかし、この方法ではディッシュ自体にリガンドが吸着されないことが大前提である。また測定時間が長く、細胞の viability が問題となるなど、まだ検討すべき点が多い。

α IIb β 3 発現細胞を用いた測定系では、細胞の viability が常に問題となる。また、H12V を標識する必要があるため、この化学標識が H12V に与える影響が問題となる。図2に示したように、H12V の蛍光標識は均一に行われず二峰性を呈している。特に二つの蛍光強度のピーク値が 100 倍近く異なることを考慮すると、蛍光標識が H12V の機能に与える影響は無視できない。よって、理想的には細胞を使用せず、H12V の化学標識も必要としない測定系の開発が求

められる。現時点では Biacore を用いて α I**Ib** β 3 と H12V の結合を直接測定するのが最善であろう。方法に示したように原理的には単純であるが、実施には多くの問題を伴う。当初は抗 α I**Ib**モノクローナル抗体である PL98DF6 をチップに固定化し、その上に α I**Ib** β 3 発現細胞の溶解液を流して α I**Ib** β 3 を補足する計画であったが、全く機能しなかった。原因は細胞溶解液中の α I**Ib** β 3 濃度が低いことに起因すると考えられたため、RGD カラムを用いて細胞溶解液の α I**Ib** β 3 を濃縮精製することにした。図6に示したように、この方法により、 α I**Ib** β 3 濃度を使用可能域まで上げることができた。この方法のもう一つの利点は、RGD カラムに結合する機能的に保たれた α I**Ib** β 3 のみを精製することができる点である。 α I**Ib** β 3 のソースとしては活性型の Q595NTT 変異体を発現した安定細胞株を使用した。これによって α I**Ib** β 3 を活性化する必要を排除できる。しかしながら、この方法で濃縮精製した Q595NTT は PL98DF6 を固定化したチップに補足されなかった。図6に示したように、イムノブロット上で PL98DF6 と Q595NTT の反応は非常に弱く、このことが補足に影響を与えていることが考えられた。そこで PL98DF6 を介さず、直接精製した Q595NTT をチップに固定化したところ、測定に十分な量の Q595NTT が固定化された (図7)。

これまでの研究結果および今回の試験的な結果から、現実的に実行可能な測定法は以下の3つに集約される。1) FACS にて蛍光標識 H12V と Q595NTT 一過性発現細胞の結合を測定する。2) LigandTracer にて蛍光標識 H12V と Q595NTT 安定発現細胞株の結合を測定する。3) Biacore にて H12V と Q595NTT の結合を測定する。1) は既に実行可能であることは証明されているが、結合の親和性以上の kinetics を

測定するのは困難であり、得られる情報は限られている。これに対し2) は結合の kinetics の測定も可能である。1) と2) の測定法を比較することにより、それぞれの測定精度の比較を行うことができるだろう。この二つの方法が化学標識した H12V と生きた細胞を用いる必要があるのに対して、3) は精製した H12V と α I**Ib** β 3 (Q595NTT) の結合を測定する。この方法は H12V の標識による影響や、細胞の状態など、測定に影響を与える不確定要因が最も少ないため、再現性に最も優れた測定法と考えられる。しかし、精製した α I**Ib** β 3 と細胞膜上の α I**Ib** β 3 が同じ挙動を示す保証はなく、測定法1)、2) で得られた結果と比較する必要があるであろう。

結論

測定法1)、2)、3) は、それぞれに特徴的な長所・短所を持ち合わせており、互いに相補する関係にある。これら複数の測定法を組み合わせることにより、H12V 製剤をより正確に評価することが可能になると考えられる。

G. 研究発表

1 論文発表：無し。

2 学会発表: [Kamata T](#), Handa M, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Divalent cations define the structural requirement for activation in α I**Ib** β 3 integrin. The 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012

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
岡村陽介、半田誠	ナノ粒子と血小板の相互作用／完全人工系血小板代替物への応用を目指して	<i>Int Rev Thromb</i>	8 (1)	34-41	2013
Nishikawa K, Hagisawa K, <u>Kinoshita M</u> , Shono S, Katsuno S, Doi M, Yanagawa R, <u>Suzuki H</u> , Iwaya K, Saitoh D, Sakamoto T, Seki S, <u>Takeoka S</u> , <u>Handa M</u>	Fibrinogen γ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage	<i>J Thromb Haemost</i>	10 (10)	2137-2148	2012
Tokutomi, K, Tagawa, K, Korenaga, M, Chiba, M, Asai, T, Watanabe, N, <u>Takeoka, S</u> , <u>Handa, M</u> , <u>Ikeda, Y</u> , Oku, N	Ability of fibrinogen γ -derived dodecapeptides with different sequences to bind to rat platelets	<i>Int J Pharm</i>	438 (1-2)	296-301	2012
Taguchi K, Ujihira H, Katsuno S, <u>Takeoka S</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Handa M</u> , Otagiri M, <u>Maruyama T</u> .	Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute	<i>Drug Metab Dispos</i>			in press
<u>Kamata T</u> , <u>Handa M</u> , Takakuwa S, <u>Sato Y</u> , Kawai Y, <u>Ikeda Y</u> , Aiso S	Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for $\alpha V\beta 3$ integrin	<i>Plos One</i>			in press

IV. 研究成果の刊行物・別冊

ナノ粒子と血小板の相互作用 —完全人工系血小板代替物への応用を目指して—

岡村陽介^{1*} 半田 誠²

¹ 東海大学創造科学技術研究機構 ナノ生体材料学研究室 講師

² 慶應義塾大学医学部 輸血細胞療法センター 教授

Yosuke Okamura^{1*}, MD

Assistant Professor, Nanobiomaterials Laboratory, Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, Hiratsuka, Japan

Makoto Handa², MD

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

* 第一著者連絡先:

〒259-1292 神奈川県平塚市北金目4-1-1 17号館401

Tel: 0463-58-1211 (Ex. 4877), Fax: 0463-50-2478, E-mail: y.okamura@tokai-u.jp

ABSTRACT

血小板は、血液凝固系と連動した巧妙かつ複雑な止血機構を有しており、これら全ての機能を人工系で模倣することは不可能といっても過言ではない。わが国では、厚生労働科学研究費の補助を受け [研究代表者：池田康夫教授 (慶應義塾大学/現・早稲田大学)]、感染の危険性がなく長期間保存可能な完全人工系の血小板代替物の創製を目指し、世界に先駆けて開発してきた。具体的には、生体投与可能なナノ粒子に活性化血小板を認識できる分子 (フィブリノーゲン γ 鎖C末端ドデカペプチド, HHLGGAKQAGDV:H12) を担持させれば、それが損傷部位へ特異的に集積して血栓形成を誘導する起点となり、集積したナノ粒子によって出血部位を充填し止血能を補助できるとの発想に基づいて、極めて単純な血小板代替物を設計した。

はじめに

血小板は止血機構の中心的役割を果たす。現在、血小板の量的・質的異常により惹起される出血に対して信頼できる治療法は血小板輸血である。その供給量はここ5年間で急増しており¹、先進医療に必須な血小板輸血の需要は将来も減少することはないと予想される。しかし、高齢化に伴う献血者数の低下や人口減少によって確保できる血小板製剤の絶対数の減少が予想されること、保存期間が日本では4日間と短く厳密な保存条件が必須であることから、緊急時等の供給体制が完全に整備されていないのが現状である。核酸増幅検査の導入により血液製剤の安全性は著しく向上したものの、未だにウイルス感染などのリスクは払拭され

てはない。さらに赤血球輸血とは異なり自己血輸血の推進が図れないため、今後の先進医療において、安定供給可能な血小板代替物の開発は当然目指すべき方向である²。

血小板の止血機構

血小板は通常血管内を流動しているが、血管損傷部位に露出した内皮下組織、特にコラーゲンを認識すると直ちに接着する。血小板の膜表面には、コラーゲンやそれに結合したフォンビレブランド因子 (VWF) を認識する受容体が存在する。高血流条件下では、血小板膜糖蛋白質Ib (GPIb) がVWFを介したコラーゲンとの相互作用によって血小板が接着し、ローリング速度が緩やかになる³。次いで、コラーゲ

ン受容体であるGPIa/IIaやGPVIがコラーゲンと直接結合して強固に粘着する^{4,5}。さらに、接着や粘着の刺激が細胞内に伝わり、複雑なシグナル伝達経路を経てGPIIb/IIIaの高次構造が変化し(活性化)、血漿蛋白質であるフィブリノーゲンやVWFが結合し、それらを介した血小板凝集(一次凝集と呼ぶ)が起こる⁶。同時に、血小板が偽足を出して伸展するとともに、濃染顆粒が開放小管系と膜融合して血小板活性化因子であるアデノシン5'-二リン酸(ADP)やセロトニン等が放出され、ポジティブフィードバックによって血小板の活性化が亢進する。α顆粒からはVWFやフィブリノーゲン等が放出されるとともに、P-セレクトインが血小板膜表面に移行し、血小板や白血球を巻き込んだネットワークを形成して血小板凝集(二次凝集と呼ぶ)を促す⁷。最終的にトロンボキサンA₂の放出や血小板膜表面に血液凝固系の活性化に必要な足場となるホスファチジルセリンが提供され、フィブリン塊を形成して止血が完了する。このように血小板の止血機構は、接着・粘着・凝集・形態変化・顆粒の放出・血液凝固系の活性化等、巧妙かつ複雑に制御された多段階の反応が動的に連動しているため、これらの機能を全て模倣した人工系の構築は非現実的と考えられる。

海外における血小板代替物の開発動向

血小板代替物は、血小板自体を修飾あるいは加工した血小板由来産物と血小板以外の成分から構築した人工物に分類される。前者の開発の歴史は古く、1950年代から米国にて報告された。例えば、ヒト血小板を凍結融解にて破壊後加熱処理した粉末製剤(Infusible Platelet Membrane, IPM)⁸や、ホルマリンで固定した後に凍結乾燥させた血小板粉末(StasixTM)⁹がこれに相当する。膜表面のGPIbの機能は保持されるため、VWFとの相互作用によって出血部位へ特異的に集積し、その表面上で血液凝固因子を活性化させてトロンビン生成を手助けする機能があるとされている。IPMは他の血小板代替物に先駆けて臨床試験を実施しており、フェーズII試験では、 $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ 以下の血小板減少患者40例のうち27例で出血症状を改善させた¹⁰。しかしながら、その後の開発は、理由は公表されないまま中断されている。後者の血小板代替物(人工物)の研究は、Collerら¹¹が

1980年に報告したことに始まる。具体的には、フィブリノーゲンを吸着させたポリスチレンビーズがADP刺激させた活性化血小板と迅速に反応する機構を報告した。これを機に、赤血球表面にフィブリノーゲン¹²やその一部の結合サイトであるRGD¹³を固相化した例が相次いで報告され、血小板凝集反応に必須なリガンドを担体に固相化させると残存血小板の凝集能を増強させる機序を提案した。さらに、1999年にLeviらはフィブリノーゲンを吸着させた粒子径約3 μmのアルブミンマイクロカプセル(SynthocyteTM)を開発し、血小板減少ウサギの出血時間を顕著に短縮させる効果を詳細に報告した¹⁴。しかし上述の研究例は、ヒト血液由来成分の全てあるいは一部で構成された血小板代替物であり、ウイルス感染等のリスクは払拭されていない。そのような背景の下、ごく最近になって、完全人工系の血小板代替物の開発が目ざされ始めてきている。例えば、2009年にBertramらは、RGDペプチドを結合させた乳酸-グリコール酸共重合体から成るナノ粒子(粒子径約350 nm)を開発した¹⁵。このRGDナノ粒子を大腿動脈出血モデルに投与したところ、未投与系と比較して止血時間を大幅に短縮させることを実証した。さらにRavikumarらは、VWFやコラーゲンを認識する合成ペプチドあるいはRGDペプチド等、数種類のペプチドをリポソーム1粒子に結合させた血小板代替物を提案し、静脈や動脈に相当する全血流条件下においても*in vitro*出血部位モデル基板上を特異的に認識できるリン脂質小胞体(リポソーム)であることを明らかにした^{16,17}。

わが国における血小板代替物の開発戦略

わが国では、厚生労働科学研究費の補助を受け[研究代表者：池田康夫(慶應義塾大学/現・早稲田大学)]、感染の危険性がなく長期間保存可能な完全人工系の血小板代替物の創製を目指し、世界に先駆けて開発してきた^{18,20}。具体的には、血小板が凝集する分子機序に着目し、活性化血小板表面のみを認識できる分子をナノ粒子表面に担持させれば、出血部位に特異的に集積して血栓形成を誘導する起点となり、集積したナノ粒子自身が出血部位を充填できるとの発想から、極めて単純な血小板代替物を設計した(図1A)。特にわれわれは、2003年以降、活性化血小

板に対する認識部位としてフィブリノーゲン γ 鎖C末端に存在するドデカペプチド(HHLGGAKQAGDV:H12)を担持させた生体投与可能なナノ粒子の開発に絞り込み、その止血効果に関する知見を集積してきた(図1A)。次節以降、認識部位としてH12を選定した経緯とナノ粒子の製造法をまとめ、それらの最新の止血能評価の結果を紹介する。

(1) ナノ粒子を出血部位に集積させる仕組み(H12を選定した経緯)

標的とする患部(臓器や組織, 細胞)のみに薬剤を選択的かつ効率的に送達させる技術, ドラッグデリバリーシステムの概念が提唱されている²¹。まずは, 目的に応じた薬剤を生体適合性・生分解性を有する血中投与可能なナノ粒子, 例えばリポソーム, ミセル, エマルジョンやナノカプセル等に封入させる。次いでこれらナノ粒子を患部に集積させる方法として, ナノ粒子の粒子径を100 nm以下に制御して腫瘍周囲の不完全な新生血管の隙間に入り込む Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果を利用したパッシブターゲティング法や, ナノ粒子表面に標的患部に対する抗体やリガンドを担持させて指向性を付与したアクティブターゲティング法が提案されている。われわれは, 後者の概念に基づいて出血部位のみに集積するナノ粒子を設計し, 血小板代替物としての応用を図ってきた。これに加えて, 集積したナノ粒子自身が出血部位を充填する効果や血小板凝集を促進する薬剤を放出する効果も期待している。

まず, ナノ粒子を出血部位のみに集積させる仕組みを付与するために, 血小板凝集に関与する分子機構に着目した。血漿蛋白質であるフィブリノーゲンは, 粘着して活性化した血小板間を繋ぐ架橋剤の役割を担う。上述したように, フィブリノーゲンを結合させた赤血球やマイクロ粒子は血小板凝集を補助する効果が期待できる^{11, 12, 14}。実際, 血小板数を正常値の1/5程度に調整した血小板減少モデル血液にフィブリノーゲンを化学結合させたアルブミンナノ粒子(製造法の詳細は後述)を添加し, 出血部位を模倣したコラーゲン固相化基板上を流動させたところ, ナノ粒子の添加濃度の増大とともに流動血小板の粘着数が増大したことから, アルブミンナノ粒子は血小板凝集増強効果を発現することを再現できた²²。しかしながら, フィブリノーゲン自体はヒトの血液

から精製する必要があり, 4℃で保存すると凝集しやすくハンドリングが難しい蛋白質であるとともに²³, 水溶液中では速やかに失活することも判明し²², 製剤としての保存安定性が担保できないと判断した。

活性化GPIIb/IIIaに対するフィブリノーゲンの結合領域は, γ 鎖C末端のドデカペプチド(H12), α 鎖のテトラペプチド(RGDS, RGDF)の計3カ所である^{24, 25}。そこで, H12とRGDをナノ粒子の認識部位の候補とし, モデル担体としてポリスチレンビーズを用いて両者の機能を比較した²⁶。血小板数を正常の1/10に調整した血小板減少モデル血液中にH12あるいはRGD結合ビーズを添加し, 流動状態でコラーゲン基板に対する血小板の凝集挙動を観察したところ, ペプチド未結合系と比較して, 両者とも血小板凝集を約2倍程度増大させた。さらに, 実験後の基板を走査電子顕微鏡にて観察したところ, コラーゲン基板上の粘着血小板にH12結合ビーズあるいはRGD結合ビーズが結合し, これを巻き込むようにして他の流動血小板が凝集している様子が確認できた。これは, 認識部位としてフィブリノーゲンの代わりにその機能ペプチドを用いても, 血小板凝集を促進させる能力を保持できることを意味する。

血小板代替物には, 出血部位のみで機能を発揮し, 血流中のインタクトの血小板とは決して反応しないことが必須条件である。また, 他の血球や細胞種と反応しないこともとても重要である。実際, H12は血小板のGPIIb/IIIaに特異的であるが, RGDはすべてのインテグリン分子の認識部位である。そこで, 両ペプチド結合体と未活性化血小板と混合し, フローサイトメトリーにて評価した。RGD結合体では僅かではあるが未活性化血小板に非特異的に吸着することが判明した²⁶。これは, 血流中で病的血栓を惹起させる可能性を示唆している。しかし, H12結合体では未活性化血小板とは一切反応しなかった²⁶。さらに, H12結合体と未活性化血小板を混合しても血小板の活性化(GPIIb/IIIa活性化やP-セレクチンの発現)を惹起させないことも確認できている²⁶。したがって, ナノ粒子にH12を結合させれば, 出血部位に粘着した活性化血小板のみに特異的に集積する能力を付与できると判断し, 血小板代替物の認識部位としてH12を選定するに至った。