

モデル（精巣動脈血栓症）での血栓症誘発・促進作用を認めず、3) 種々の薬効モデル（マウス、ラット、ウサギ）で血栓症を示唆する副作用（組織学的検討を含む）を認めなかった。さらに、前年度には、4) 血栓準備状態であるラット DIC モデル（組織因子誘発性、出血優位型も出る）において、血栓症マーカーを用いた詳細な検討を行い、当該試験物による血栓症（静脈系）誘発・促進作用を明らかに示唆する知見は得られなかった。しかし、過量投与（80mg/kg、常用量：10-20mg/kg）では、D-ダイマーの一過性の上昇作用（推計学的に有意ではない）が認められ、かつその作用は陰性対照として用いた mock リポソーム（H12 未修飾、ADP 未内包）でも同等に認められた。リポソーム自体に大量投与では線溶促進作用を有する可能性が示唆された。そこで、今回は、血栓優位型のエンドトキシン（LPS）誘発性 DIC モデルを用いて、薬剤の過量投与（80mg/kg）による血栓マーカー（血小板、PAI-1、TAT）及び臓器障害マーカー（肝機能、腎機能）を指標に、血栓症の誘発性についてさらに検討を加えた。

## B. 研究方法

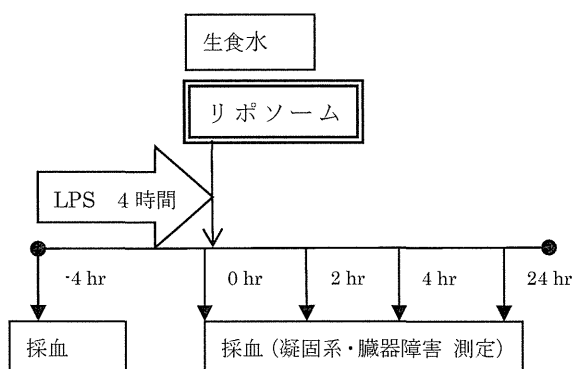
Wistar 系雄性ラット（三共ラボ、7 週齢、200-220g）は、一晚（最低 16 時間）絶食した後、以下の実験に用いた。ラットは、拘束衣にて固定し尾静脈より LPS (E.coli 055:B5) を投与し、その後、腹部大動脈より 3.13% クエン酸ナトリウム入真空採血管・凝固促進フィルム入真空採血管を用いて採血し

た。この血液検体を、遠心分離（2,200g, 10 min）し、血液凝固検査用血漿と臓器障害検査用血清を回収した。血液凝固検査は、トロンビンアンチトロンビンⅢ複合体（TAT）、PAI-1 は測定キットを使用し測定した。フィブリノゲン抗原量（Fng）、アンチトロンビン活性（ATIII）、D-ダイマー、の 3 項目と臓器障害検査は血中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、血中クレアチニン（Cr）の 2 項目を測定（三菱化学メディエンスに委託）した。また血球数は、自動血球計算計（K-4500, Sysmex）にて測定した。

### <LPS 誘発 DIC モデルラットの作製>

ラットは拘束衣にて固定し尾静脈に留置針を設置した。LPS (E.coli 055:B5, SIGMA) 30mg/kg を 4 時間かけて、留置針よりシリンジポンプ（テルフュージョン 35 型, テルモ）を用いて持続投与した。そして、終了直後に H12(ADP) 小胞体 (80mg/kg 相当量を 1mL の PBS に懸濁) を投与した。生理食塩水および mock 小胞体 (80mg/kg) を陰性対照とした。LPS 投与終了直後、2 時間後、4 時間後、24 時間後に採血を行い、血小板数、凝固検査、血栓症マーカー、臓器障害マーカーの測定を行った (Fig. 1)。

Fig1



### C. 結果及び考察

H12-(ADP)小胞体過量(80mg/kg、常用量は10-20 mg/kg)投与群及び対照であるmock小胞体と生理食塩水投与群において、投与直後(0時間)、2時間後、4時間後、及び24時間後の、各種血栓症マーカー(血小板数:PLT、フィブリノゲン:Fbg、アンチトロンビン:AT、TAT、PAI-1、D-ダイマー)及び臓器障害マーカー(肝機能:ALT、腎機能:クレアチニン)を測定した(Fig. 2)。LPSの4時間持続投与によって、PAI-1濃度の著明な増加が誘発され、血小板やフィブリノゲンは減少し、その他のマーカーはDICを示唆する変動をきたした。一方、血栓症による肝臓及び腎臓の障害が出現し、少なくとも24時間後まで持続した。いずれのマーカーにおいても、またいずれの時点においても、その変動は、3群間で有意な差(t検定)は認めなかった。血栓優位型のDICモデルにおいても血栓増強効果を示唆するマーカーの変動は認められなかったことから、少なくとも常用量の4-8倍の投与量(80 mg/kg)の範囲内では、H12-(ADP)小胞体の血栓症誘発作用への危惧は払拭できた可能性が高まった。しかしながら、前年度の

検討では、投与後30分にて、小胞体それ自体の過量投与(80 mg/kg)による一過性のD-ダイマー上昇が認められた。したがって、今回のモデルでも、投与後30分のデータを早急に取得すべきである。また、安全性試験として、投与量も100倍量までエスカレーションして、その影響をみる必要がある。

### D. 結論

血栓優位型のLPS誘発性DICラットモデルにおいて、陰性対照(生食、mock小胞体)と比較して、H12-(ADP小胞体(-80mg/kg)の投与で、有意な血栓症マーカー及び臓器障害マーカーの変動(投与後24時間)は認めなかった。当該試験物の血栓誘発・増強作用は認められなかった。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

総説

1) 半田誠:人工血小板開発の現状と今後の展望. 日病薬誌. (2013) 49(9):949-53.

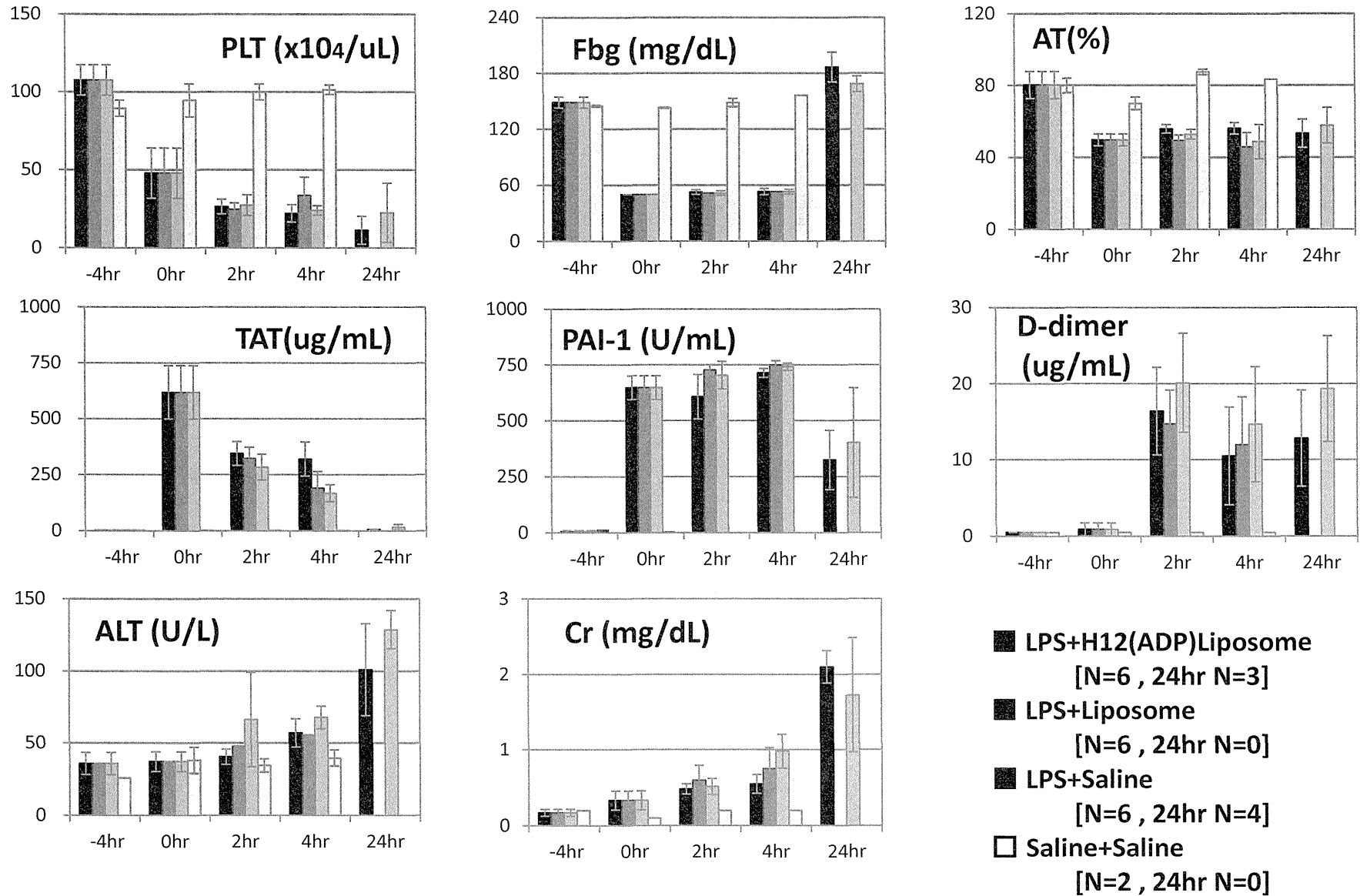
#### 2. 学会発表

なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig 2. LPS 惹起DICラットにおける各種マーカの変動



平成 25 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

超微細形態解析

ーウサギ肝出血時に投与した人工血小板リポソーム分布の電顕的検討ー

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 $\gamma$ 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。すなわち、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、凝集をさらに促進すると考えられる。実際 *in vitro* の検討では、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することを観察してきた。しかし、動物を使った *in vivo* の実験では、血小板血栓に巻き込まれたリポソームを確認されていない。そこで、今回ウサギ低血小板肝臓出血モデルを使い、肝臓欠損孔からの出血と止血を観察しつつ、止血後にその部位を電顕検体として観察し、これまでにない血小板凝集塊が観察され、その中には *in vitro* の実験のように人工血小板リポソームが巻き込まれている所見を得た。この結果はH12-(ADP)リポソームが、血小板減少状態の生体の止血に関与することを示唆する結果と考えられる。

#### 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。

実際 *in vitro* の検討では、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することを凍結超薄切片法および凍結切断エッチングレプリカ法で観察してきた。また、血小板間および開放小管系中に侵入したリポソ

ームは血小板の収縮力で本来の球状から楕円状に変形し、この変形により内包されたADPを放出することが示唆された。

一方、H12-(ADP)リポソームの動物を使った *in vivo* における実験においても、本リポソームはラットの止血時間を短縮させる効果を得ている。また、前もって急性的に血小板減少状態を生起したウサギに、リポソームを投与し、さらに肝出血させた低血小板肝臓出血モデルにおいても、止血時間を短縮する結果を得ている。しかし、この検体を電顕で観察した時、出血部にリポソームは観察されるものの、その数は決して多くはなく、さらに血小板血栓に巻き込まれるという *in vitro* の実験で得られたような結果は得られていない。

ところで、上記のウサギ低血小板肝臓出血モデルに対するH12-(ADP)リポソームの効果の検

討は、これまでリポソームの前投与であった。しかし、救急救命の現場での人工血小板使用の前提としては、出血後の投与が实际的である。そこで、最近のウサギ低血小板肝臓出血モデルでは、人工血小板リポソームの同時投与を行っている。今回、本モデルの肝臓欠損孔からの出血と止血を観察しつつ、止血後にその部位を電顕観察し、これまでにない血小板凝集塊が観察され、その中には *in vitro* の実験のようにリポソームが巻き込まれている結果を得た。

## B. 研究方法

### 1) 急性血小板減少症ウサギの作製法

ニュージーランドホワイトウサギの右大腿動脈および左大腿静脈にカニューレーションを行い、動脈は脱血と動脈圧測定用、静脈は輸液および輸血用とした。血小板を減少させるために、25ml の脱血を行い、同時に低分子デキストラン液を 25ml 輸液した。この脱血と低分子デキストラン液の輸液は、さらにもう 1 回行った。3 回目の脱血後、1 回目の脱血で得られた洗浄赤血球を生理食塩水で 25ml に希釈して輸血した。次いで、4 回目の脱血を行い、2 回目の脱血で得られた洗浄赤血球を同様に輸血した。以下、1 回 25ml の脱血を計 10 回（合計平均 250 ml）を行い、最後の 10 回目の脱血で採取した洗浄赤血球は生理食塩水で 25ml にして投与した。このようにしてウサギの血小板数を  $19.5 \pm 5.8 \times 10^4/\text{ml}$  から  $5 \pm 0.6 \times 10^4/\text{ml}$  に減少させた。

### 2) 肝臓出血法と人工血小板の投与法

ウサギを開腹し、肝臓の一葉に Derma punch（直径 5 mm）を刺して貫通、損傷させ、oozing 出血を持続させた。バルーンカテによる圧迫止血を行いながら、直ちに H12-(ADP) リポソームを体重当たり 20 mg/kg 投与した。同時に、損傷 0 分から 5 分経過後、および 5 分から 10 分経過後の出血量を測定し、止血を確認できたものは閉腹し、臓器出血量と 24 時間の生命予後について比較した。

### 3) 電顕的検索

肝臓の欠損孔を含む部位を細切し、これを 2% グルタルアルデヒド液（pH7.4）中に浸漬して約 2 時間固定した。次いで、0.1M リン酸

緩液で洗浄後、1% 四酸化オスミウム後固定、エタノール系列で脱水、Epon 812 に包埋し、熱重合した。試料のブロックから超マイクロトームを使って光顕用切片を作製し、これをトルイジンブルーで染色、観察した。その後、電顕観察部位をトリミングし、超薄切片を調製、グリッドメッシュに回収した。これを酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色後、透過型電顕（日本電子 JEM-1010）で観察した。

## C. 研究結果

### 1) 急性血小板減少症ウサギの肝出血に対する H12-(ADP) リポソームの効果

実験前のウサギにおけるヘモグロビン量と血小板数はそれぞれ 11.8 g/dL、 $21.0 \times 10^4$  個/mL であった。脱血完了後のそれらは 6.6 g/dL、 $3.3 \times 10^4$  個/mL に低下、減少していた。さらに H12-(ADP) リポソーム投与後では、ヘモグロビン量 4.3 g/dL、血小板数  $2.5 \times 10^4$  個/mL であった。出血量は 0-5 分後は 14.5 g、5-10 分後は 15.2 g であった。しかし、1 時間経過しても止血できなかったが、そのまま解剖し、電顕検体とした。

### 2) 肝損傷部の電顕的検索

電顕観察前に、光顕用のトルイジンブルー染色切片を観察した（図 1）。

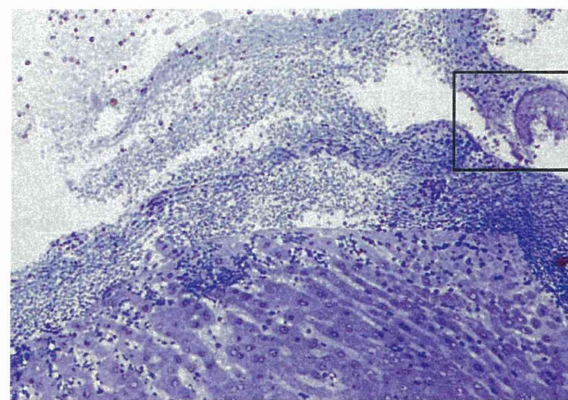


図 1. 肝損傷部のトルイジンブルー染色像

肝臓損傷部の境界面には多数の赤血球が見られ、白血球は多くはない。図右上に血小板凝集塊が見られる（□部）。

肝損傷部では血管または毛細血管にあたる類洞からの出血のために多くの赤血球が見られた。損傷部の赤血球の周囲では白血球も見られたが、多くはなかった。損傷部からやや遠い部位に血

血小板凝集塊が観察された。この部を拡大すると、少数の赤血球と白血球を巻き込んだ混合血栓のように観察された（図 2）。中央部はフィブリン層に囲まれているような血栓像を示した。

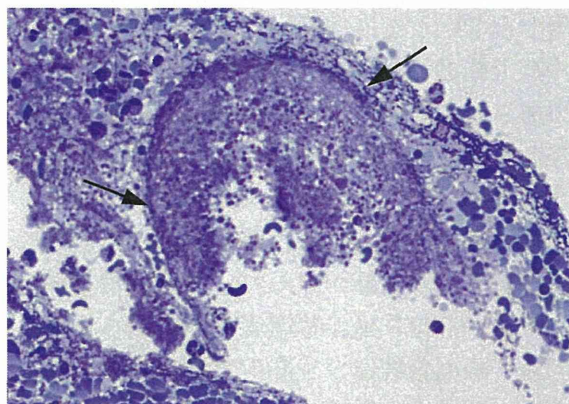


図2. 肝損傷部のトルイジンブルー染色像

図1の□部を拡大した。赤血球、白血球を含む血小板凝集塊が見られ、中央部の血小板凝集塊はフィブリンの帯(矢印)に囲まれている。

トルイジンブルー染色で見られた血小板凝集を電顕で観察した（図 3）。黒染しているフィブリン層の外側には脱顆粒した血小板が見られ、さらに赤血球、白血球が見られた。フィブリン層の内側では主に血小板が観察されたが、血小板相互の間には電子密度がない隙間が目立って見られた。



図3. 肝損傷部の血小板血栓の電顕像

フィブリン(矢印)により外側と内側に分けられているのが分かる。外側では血小板は脱顆粒し、赤血球と白血球も観察される。一方、内側では大部分が血小板による凝集塊として観察される。血小板相互には隙間が多く観察される。

血小板凝集塊をさらに拡大して観察すると、血小板が存在しない隙間が明瞭になった（図

4）。この部分にはやや形態が不整形であるが、直径 500 nm 程で二重膜をもつリポソームが存在していた（図 5A, B）。他の血小板間の明るく見える部位にも、このようなリポソームが多く観察された。

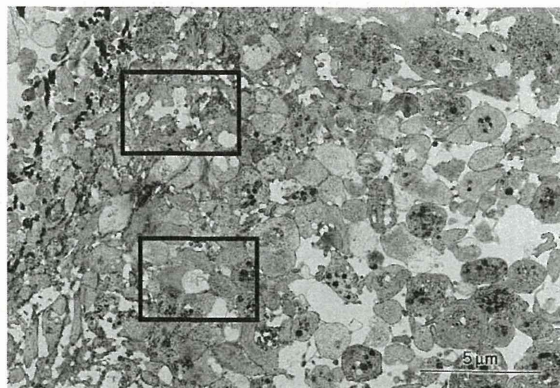


図4. 肝損傷部における血小板凝集像

凝集塊中の血小板は形態変化を起し、少数の血小板では顆粒は残存しているが、多くの血小板では放出像が多く観察される。また、血小板相互間に隙間が多く観察される(□部)。

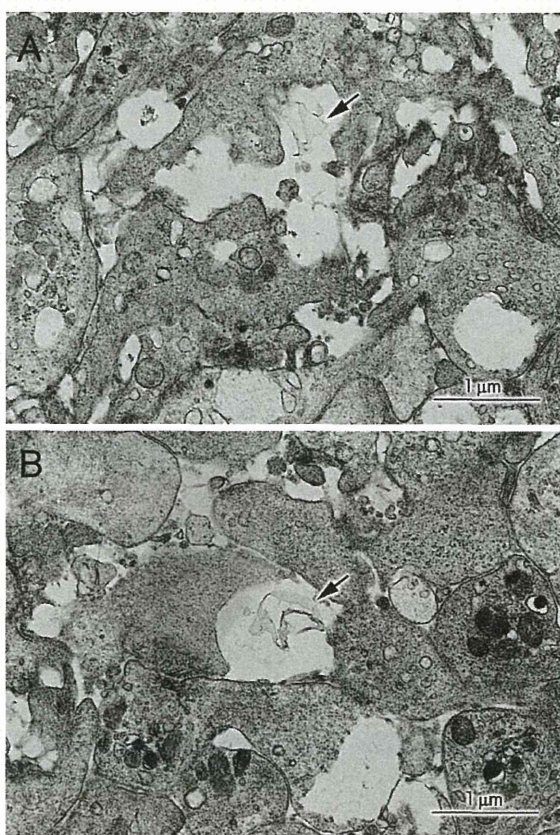


図5. 図4□部の拡大像

□部を拡大して観察すると、やや形態が不整形ではあるが、二重膜をもつリポソームが見られる (A, B, 矢印)。また、リポソームの崩壊物も見られる。

#### D. 考察

これまでウサギ低血小板肝臓出血モデルを用いて、出血後に自己の血小板、血漿、H12-(ADP)リポソームを投与し、止血時間と24時間の生命予後を検討してきた。肝損傷部からの出血は自己血漿投与群では、止血不能で、全例が数時間で出血死した。自己の血小板とH12-(ADP)リポソーム投与群は、平均25分で止血され、約半数例を救命できた。すなわち、低血小板状態で進行する出血に対して、H12-(ADP)リポソーム投与が血小板輸血と同等の止血ならびに救命効果を発揮し、血小板代替物として機能することが示唆されている。

H12-(ADP)リポソームは通常の超薄切片法で観察した時、試料作製過程においてアルコール脱水をするために、リポソームを構成している脂質成分を溶出させる。このため、リポソームは破壊され、必ずしも明瞭に識別されなかった。そこで、これまでアルコールを使わない凍結超薄切片法を採用し、*in vitro*における活性化血小板とリポソームとの相互関係を電顕観察してきた。本法ではリポソームは破壊されないものの、電子密度が無いために識別には困難であったが、凝集時には凝集塊の血小板間に電子密度のない隙間が見られ、高倍で観察すると、この隙間にリポソームが確認された。また、平成23年度から急速凍結エッチングレプリカ法を採用、実施して来た。本法では3次元的な像に見えるために、H12-(ADP)リポソームのみを観察した時、直径100~250 nmの完全球形であることを確認できた。次いで、本法で洗浄血小板にH12-(ADP)リポソームを加え、さらにトロンビンを加え攪拌し、経時的にグルタルアルデヒドで固定した試料を電顕観察した。血小板は相互に接着し凝集を形成し、H12-(ADP)リポソームは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観察すると、大部分のリポソームは楕円体を示した。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思った。次いで、リポソームが押し潰されるように楕円体に変形することにより、内包されたADPが放出すると考えられた。

今回は低血小板肝臓出血モデルウサギを使用した *in vivo* の実験であり、出血部を含めた肝組織は大きくならざるを得ない。このために、これまでの凍結超薄切片法またはレプリカ法は適用できないことになる。そこで、通常の超薄切片法で観察した。実験に使用したウサギは、肝出血させたと同時にH12-(ADP)リポソームを投与したにもかかわらず、1時間経過しても止血されなかった。しかし、このウサギを屠殺して光顕で観察すると、肝損傷部では出血のために主に多くの赤血球が見られ、さらに損傷部からやや遠い部位に血小板凝集塊が観察された。この血小板凝集塊は、少数の赤血球と白血球を巻き込んだ混合血栓のように観察された。中央部はフィブリン層に囲まれているような血栓像を示した。また、この血栓を電顕で観察すると、黒染しているフィブリン層、赤血球、白血球が見られ、さらにフィブリン層の内側では主に血小板による凝集塊が観察された。凝集塊の血小板相互の間には、電子密度がない隙間が目立って見られ、この中にやや形態は不整形なものの、直径500 nm以下で一部で二重膜をもつリポソームが存在することが観察された。この結果は、これまでの凍結超薄切片法およびレプリカ法の *in vitro* の実験により得られた血小板とH12-(ADP)リポソームの相互関係と良く似ていた。すなわち、今回 *in vivo* の実験で使用したウサギの止血時間は平均時間の25分よりも延長したにもかかわらず、H12-(ADP)リポソームが血小板血栓中に巻き込まれている所見は、生体中で減少状態にある血小板と混合することで、より大きな血小板血栓を形成し、止血に関与すると思われる。

#### E. 結論

これまでのウサギ低血小板肝臓出血モデルでは、投与した人工血小板リポソームは出血部において観察されるものの、その数は決して多くはなかった。さらに、リポソームが血小板血栓に巻き込まれる像も観察できていなかった。今回、電顕観察に使用したウサギでは、これまでになく血小板凝集塊が観察され、その中には *in vitro* の実験のように血小板凝集塊中にリポソームが巻き

込まれている所見を得た。従って、ウサギ肝損傷部の止血時間は延長していたものの、H12-(ADP)リポソームは血小板血栓中に巻き込まれて、より大きな血小板血栓を形成することにより、止血に関与することを示唆する結果と考えられる。

#### 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, 武岡真司, 池田康夫, 半田 誠： ヒト血小板と人工血小板 (H12-(ADP)リポソーム)の相互作用の形態解析. 第 35 回日本血栓止血学会学術集会. 2013. 5. 30-6. 1, 山形市.

#### 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25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

$\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3 インテグリンと H12 担持リポソームの結合解析  
—表面プラズモン共鳴法による無細胞測定系の検討—

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

H12 担持リポソーム (H12V) は、活性化血小板と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、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による H12V と精製 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3 の結合測定法の検討を行った。

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 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3一過性発現細胞を用い、FACSにて蛍光標識H12Vの結合を測定する方法では、結合パラメータ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、1) 実験結果が使用する細胞の状態に大きく依存する、2) 実験ごとに使用する細胞の $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3発現量が異なる、3) 化学標識したH12Vを使用しなくてはならない、などの問題点も多いため、新たな測定法の確立が求められる。前年度の研究では、1) LigandTracerを用いた測定法、2) SPR法を用いた無細胞系の測定法を検討した。LigandTracerによる測定法は、リガンドの結合と解離の経時的な測定が可能なもの、培養細胞を用いる点、蛍光標識H12Vを必要とする点ではFACSによる測定法と何ら変わらない。そこで、本年度はSPR法を用いた測定法に集中して検討を行った。 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3安定発現細胞株からアフィニティー精製した $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3を用いることにより、十分な量の $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3をセンサーチップに固定化することができた。しかし、 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3を固定化したチップへのH12Vの結合は全く測定されなかった。そこで、 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3が本当に固定化されているか否かを確認するため、抗 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3モノクローナル抗体の結合を調べたところ、これらの抗体の結合も測定されなかった。固定化に用いた $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3はアフィニティー精製したものであり、 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3以外の夾雑物が固定化された可能性は低い。よって精製された $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3の質に問題がある可能性が高いと考えられた。

現時点では、固定化に用いた $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3 が質的異常をきたした原因は明らかではない。抗 $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3モノクローナル抗体の反応性が著しく低下している事を考慮すると、精製の過程で $\alpha$ I**IIb** $\beta$ 3の構造自体が変容したと考えるのが妥当であろう。今後は、精製の過程で構造に影響を与える界面活性剤を使用しない方法を用いるなどの、対策が必要である。

### 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。フィブリノーゲンと異なり、H12Vは $\alpha$ IIb $\beta$ 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 $\alpha$ IIb $\beta$ 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 $\alpha$ IIb $\beta$ 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 $\alpha$ IIb $\beta$ 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。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)  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 発現細胞とH12Vの結合を測定(図1A)：この方法は、血小板の代わりにヒト遺伝子組み換え $\alpha$ IIb $\beta$ 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 $\alpha$ IIb $\beta$ 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、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3そのものを活性化させる必要がある。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、

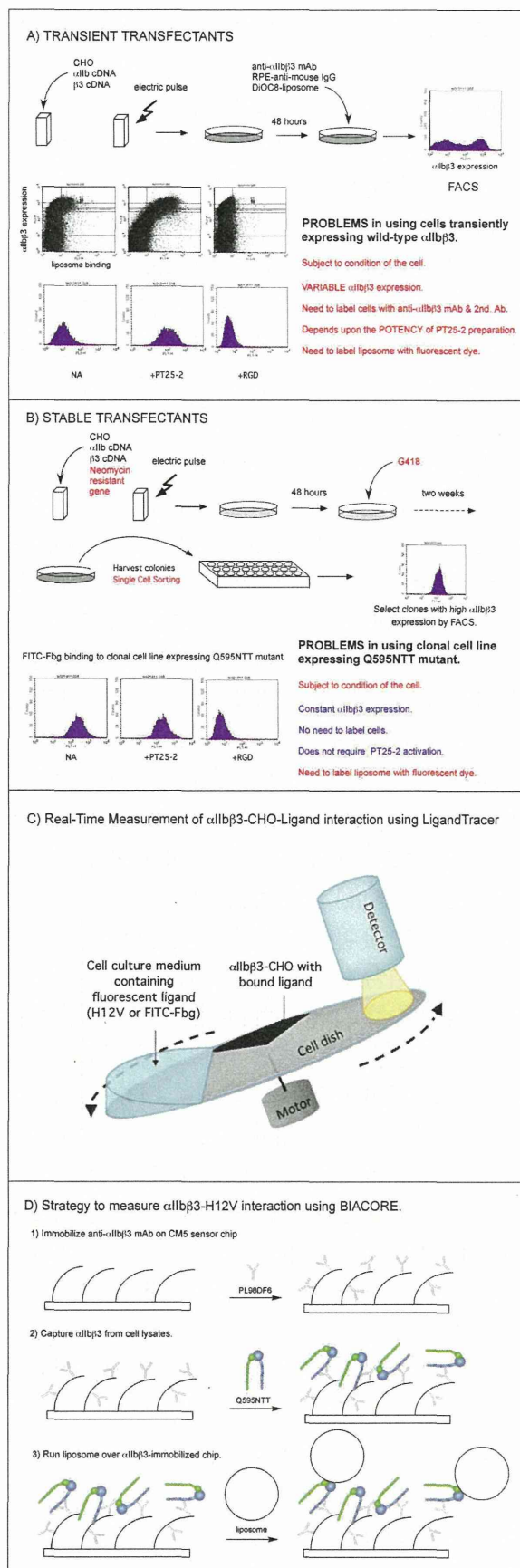


図1. H12Vの機能測定系

一過性発現系では、 $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 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  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 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)  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 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  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 を安定発現した細胞株を用いるため、測定ごとに  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 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、 $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 の Q595NTT 変異体の使用が考えられる。これは、 $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 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、 $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 を多量に発現した細胞株の作成が困難なことである。4) Ligand Tracer による  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 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  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 発現細胞の結合を測定する。この測定法は 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) SPR 法による  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 と H12V の直接結合の測定 (図 1 D) : センサーチップ側に  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 を固定化し、その上に H12V を注入すること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 5) SPR 法に集中して検討を行った。

## B. 研究方法

### I. $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 変異体の作成

$\alpha$ I**Ib** 鎖、 $\beta$ 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  $\alpha$ 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、CO<sub>2</sub> 濃度 5% の incubator で行った。50  $\mu$ g の  $\alpha$ V 又は  $\alpha$ I**Ib** cDNA は 50  $\mu$ g の  $\beta$ 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。

### III. $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 を安定発現したクローン細胞の作成

50  $\mu$ g の  $\alpha$ I**Ib** cDNA、50  $\mu$ g の  $\beta$ 3 cDNA と共に 5  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 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  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 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  $\mu$ 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、 $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 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。

### IV. Flow Cytometry

細胞を剥離した後 1mM Ca<sup>2+</sup>/1mM Mg<sup>2+</sup>加 HEPES-Tyrode buffer (HTB) に再浮遊させ、各モノクローナル抗体 10 $\mu$ 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<sup>2+</sup>/1mM

Mg<sup>2+</sup>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。

#### V. $\alpha$ IIB $\beta$ 3 のアフィニティー精製

$\alpha$ 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#48 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°C で一晩反応させた。RGD-sepharose を洗浄・円心したのち、結合した  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 を 5mM EDTA を含むバッファーにて溶出した。精製した  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 は SDS-PAGE にて展開し、免疫ブロット法にて分子量の確認を行った。また、 $\alpha$ IIB $\beta$ 3 の定量は BCA 法により行った。

#### VI. SPR 法による H12V と $\alpha$ IIB $\beta$ 3 の結合測定

SPR 法による測定は、Biacore 2000 を用いて行った。まず、Sensor Chip CM5 に抗  $\alpha$ IIB モノクローナル抗体 PL98DF6、抗  $\beta$ 3 モノクローナル抗体 VNR5-2 を固定化した。次に、Q595NTT 発現細胞株#48 を n-octylglucopyranoside を含む細胞溶解液で溶解した後遠心し、可溶性画分を得た。これを抗体を固定化した CM5 に注入し、 $\alpha$ IIB $\beta$ 3 の捕捉を試みた。他の実験では、方法 V で精製した  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 を直接、あるいは抗  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 抗体を固定化した Sensor Chip CM5 上に流し、固定化させた。

H12V を、1mM Ca<sup>2+</sup>/1mM Mg<sup>2+</sup>加 HBS に希釈し、 $\alpha$ IIB $\beta$ 3 を固定化した CM5 上に注入して結合を測定した。同様に、抗  $\beta$ 3 モノクローナル抗体 VNR5-2、抗  $\alpha$ IIB モノクローナル抗体 PL98DF6 を希釈し、 $\alpha$ IIB $\beta$ 3 固定化 CM5 上に流して結合を測定した。

### C. 研究結果

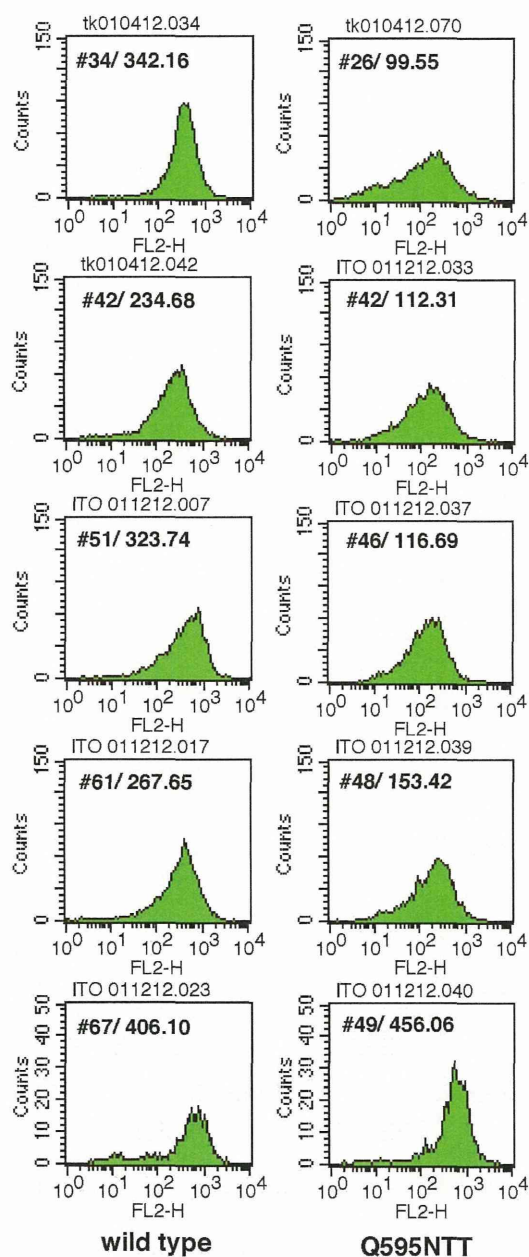


図2.  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 安定発現細胞株の FACS 解析

#### I. $\alpha$ IIB $\beta$ 3 安定発現細胞株の作成

野生型  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 と Q595NTT 変異体の安定発現細胞を single cell sorting して培養した結果、幾つかの細胞株を得ることができた (平成 23 年度研究結果より)。図 2 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。しかし、Q595NTT クローンの発現量は野生型に比べて有意に低く、#49 を除き MFI < 200 であった。

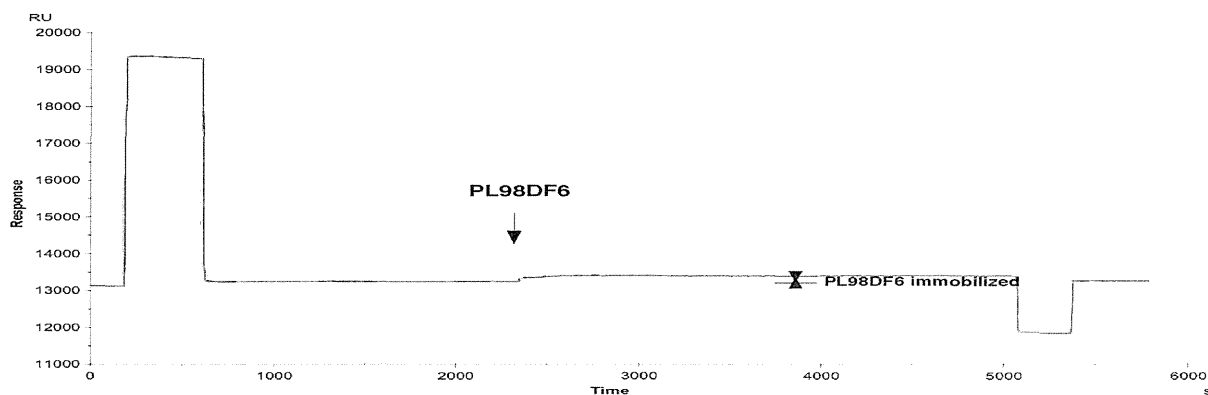


図3. 抗 $\alpha$ IIb抗体 PL98DF6 の固定化

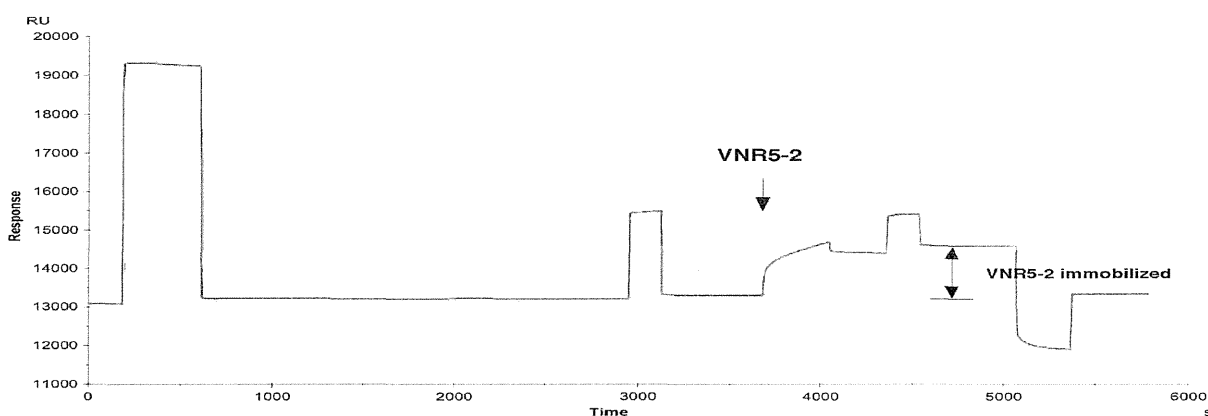


図4. 抗 $\beta$ 3抗体 VNR5-2 の固定化

Q595NTT#49 の発現量は 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。本研究の $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のソースとして、Q595NTT#48 を使用した。

## II. SPR 法による結合測定— $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の固定化

まず始めに、抗 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 抗体を介して $\alpha$ IIb $\beta$ 3 をセンサーチップ CM5 に固定化する方法を試みた。すなわち、1) Biacore チップ (CM5) に抗 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 抗体を固定化する、2)  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-CHO の細胞溶解液を流して、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を CM5 チップに捕捉する、の2段階で構成される。この方法の利点は、細胞溶解液から比較的容易に直接 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を捕捉することが可能であること。また、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 がチップ上に補足される向きが一定になるため、適当な抗 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 抗体を用いることで、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のリガンド結合部位の向

きを揃えることができる点である。本実験では、 $\alpha$ IIb の脚部 (calf-1 domain) に結合し、リガンド結合は阻害しない PL98DF6 と、 $\beta$ 3 に結合する VNR5-2 を使用した。まず、PL98DF6 の固定化を試みた。図3に示したように、PL98DF6 を注入しても sensorgram 上 SPR シグナルの増加がほとんど見られなかった。続いて VNR5-2 の固定化を行った。PL98DF6 と異なり、SPR シグナルの増加が観察された (図4)。そこで VNR5-2 を固定化したチップを用い、細胞溶解液からの $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の捕捉を試みた (図5)。図4と同様に、VNR5-2 の固定化は観察されたが、細胞溶解液を注入しても SPR シグナルの増加はほとんど認められなかった。原因は、元々 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のソースとして使用した Q595NTT クローン#48 の発現量は

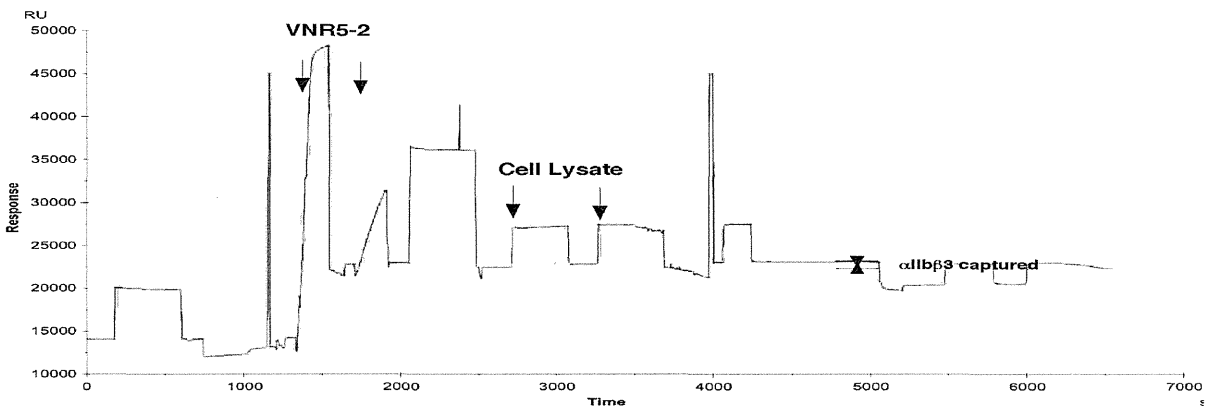


図5. 細胞溶解液からの $\alpha$ IIb $\beta$ 3の捕捉

低く、細胞溶解液中の $\alpha$ IIb $\beta$ 3濃度が十分ではないことが考えられた。そこでone stepでの補足を諦め、細胞溶解液から $\alpha$ IIb $\beta$ 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、 $\alpha$ IIb $\beta$ 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カラムに通して溶解液中の $\alpha$ IIb $\beta$ 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、細胞溶出液20 $\mu$ lをSDS-PAGEにて泳動し、イムノブロットにて $\alpha$ IIb $\beta$ 3を検出したものである(平成24年度研究結果より)。抗 $\beta$ 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 $\beta$ 3に相当する約85kDaのバンドが検出された。一方、同じ検体を抗 $\alpha$ 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 $\alpha$ IIbに相当する約145kDaのバンドが検出されたものの、その検出量は $\beta$ 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、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3濃度11.41~38.66 $\mu$ g/mlであり、チップへの固定化に十分な濃度であった(平成24年度研究結果より)。次に、VNR5-2を固定化したチップに精製した $\alpha$ IIb $\beta$ 3を流し、チップへの補足を試みた。我々の予想に反し、精製 $\alpha$ IIb $\beta$ 3は全く補足されなかった(図7)。そこで抗体を介してチップに補足すること

を諦め、精製 $\alpha$ IIb $\beta$ 3を直接CM5チップに固定化することにした。

図8に示したように、精製 $\alpha$ IIb $\beta$ 3の固定化はpHの影響を大きく受けた。中性条件下ではカップリング率は低く、pHが低くなるにつれてカップリング率が上がり、SPRシグナルが増加した。pH 4.5で5000RU以上の $\alpha$ IIb $\beta$ 3がチップに固定化された。

### III. SPR法による結合測定—固定化 $\alpha$ IIb $\beta$ 3とH12Vの結合

次に、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3が固定化されたチップに、異なる濃度のH12Vを注入し、結合を観察した。図9に示したように、シグナルの増

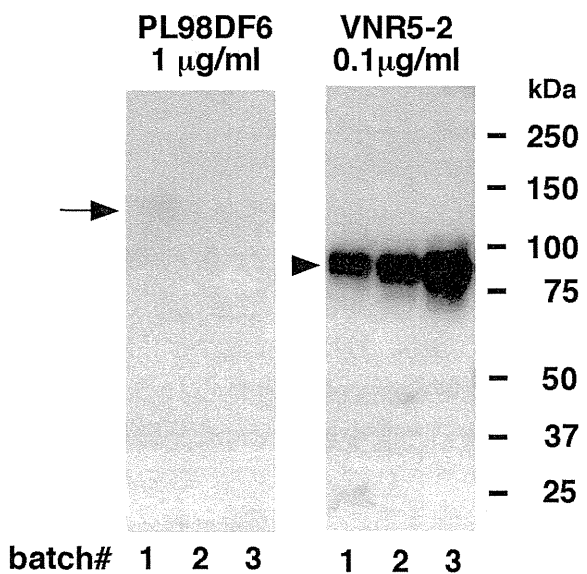


図6. 精製 $\alpha$ IIb $\beta$ 3のイムノブロット解析

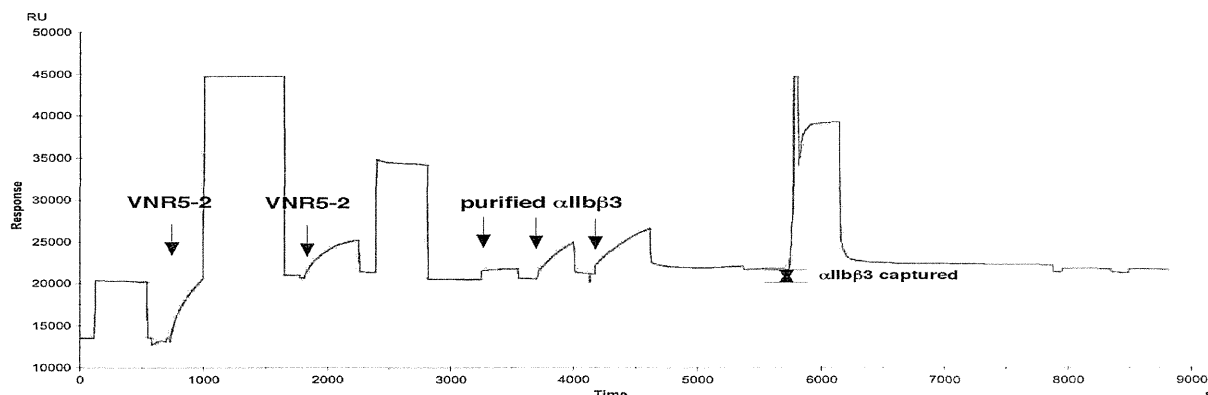


図7. 抗β3抗体 VNR5-2 を介した精製αIIbβ3 の捕捉

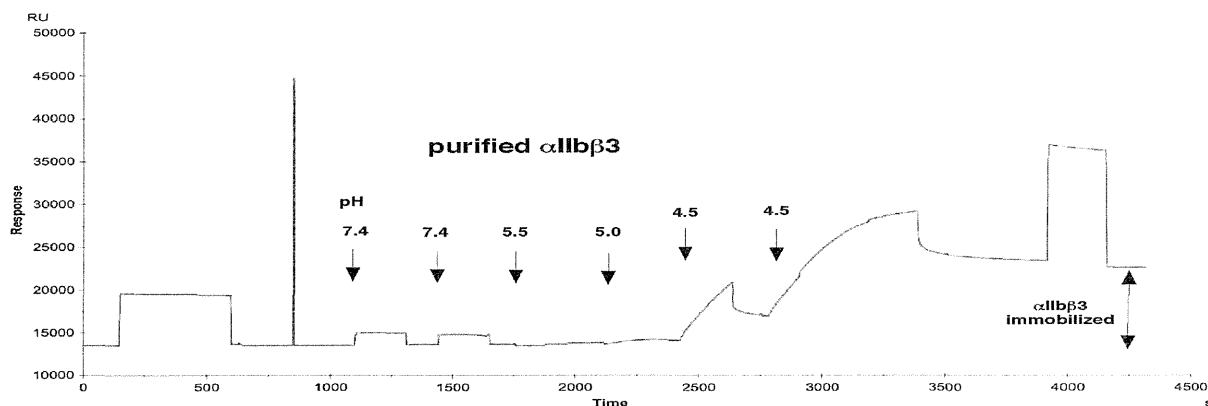


図8. 精製αIIbβ3 の固定化

加は全く観察されなかった。そこでαIIbβ3 がチップ上に本当に固定化されているか否かを確認するため、H12V の代わりに抗αIIbβ3 モノクローナル抗体を注入した。精製αIIbβ3 を固定化したチップに PL98DF6 (図10)、VNR5-2 (図11) を注入しても、SPR シグナルの増加はほとんど観察されなかった。

#### D. 考察

本研究の目的は、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。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。よって、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。これまでの研究で示したように、血小板あるいはそれに替わる培養細胞を用いた測定

法では、測定結果が細胞の状態に大きく依存するため、再現性の高い方法とは言えない。これらの問題をクリアするため、今回われわれは無細胞系の測定法を開発し、その検討を行った。

H12V は、フィブリンノーゲンのガンマ鎖 C 末端のペプチド部分をリポソ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αIIbβ3 インテグリンに結合する。よって血小板そのものではなく、αIIbβ3 インテグリンと H12V の直接結合を測定すれば、再現性の高い結果を得る事ができる。今年度の研究では、SPR 法による、H12V とαIIbβ3 の直接結合の測定を行った。この方法では、αIIbβ3 を CM5 sensor chip に固定化し、その上に H12V を注入して結合する際に生じる質量変化 (SPR の変化) を経時的に測定する。これにより、結合速度定数、解離速度定数の算出が可能となる。

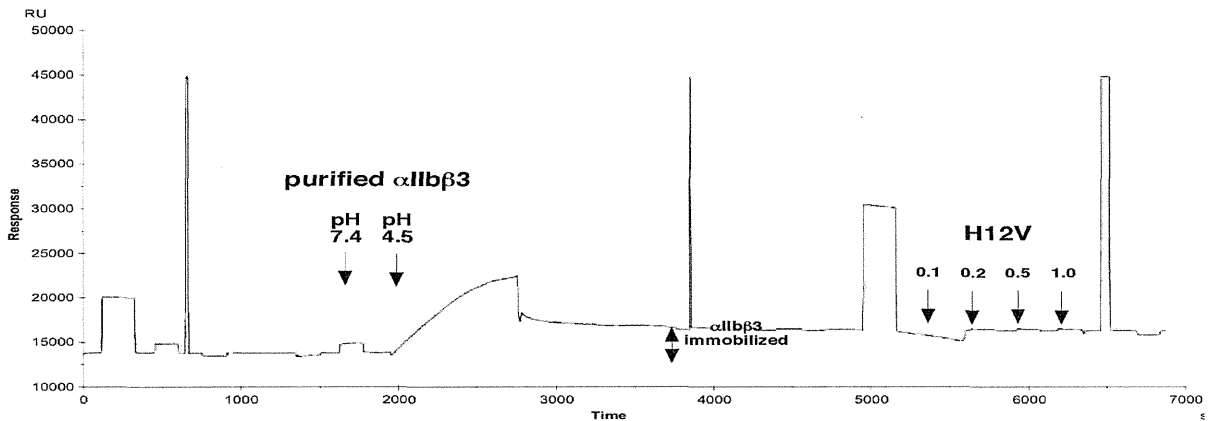


図9. 固定化した $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と H12V の結合

この方法で最も問題となるのが、高純度の $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンをセンサーチップに固定化することである。 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 発現細胞株から $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を抽出するためには、界面活性剤で細胞膜を可溶化し、そこから $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のみを精製しなければならない。細胞溶解液には $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の他に、多くの膜タンパク質が混入しているためである。はじめに、細胞溶解液から直接 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 をセンサーチップに固定化することを試みた。方法は、センサーチップに精製した抗 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 モノクローナル抗体を固定化し、このセンサーチップ上に $\alpha$ IIb $\beta$ 3 発現細胞の細胞溶解液を注入することによって、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のみを選択的にチップ上に捕捉する。この方法では、細胞溶解液から $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を精製する煩雑な過程を回避することができるため、有用と考えられた。しかし、センサーチップへの抗 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 モノクローナル抗体 (VNR5-2) の固定化は成功したものの、細胞溶解液からの $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の補足は全く観察されなかった。原因として、細胞溶解液中の $\alpha$ IIb $\beta$ 3 濃度が低いことが考えられた。そこで $\alpha$ IIb $\beta$ 3 発現細胞から $\alpha$ IIb $\beta$ 3 をアフィニティー精製し、濃縮することにした。まず、GRGDS ペプチドを Sepharose 4 beads に固定化した。 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 発現細胞 (Q595NTT#48) を界面活性剤で可溶化して遠心し、可溶性画

分と作製した beads を混和した。Beads を緩衝液で洗浄した後、5 mM EDTA を含む緩衝液と混和して、結合した $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を抽出した。図6は、この方法で精製した $\alpha$ IIb $\beta$ 3 をイムノブロット法で解析したものである。 $\alpha$ IIb、 $\beta$ 3 とともに目的の分子量をもつことが確認された。しかし、抗 $\beta$ 3 抗体 VNR5-2 に比べ、抗 $\alpha$ IIb 抗体 PL98DF6 と精製 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の反応性が極めて悪かった。この精製 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の濃度を BCA 法で測定したところ、固定化に必要な十分な濃度であった。次に、VNR5-2 を固定化したセンサーチップ上に精製 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を注入し、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の補足を試みた。われわれの予想に反し、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の補足は全く観察されなかった。そこで VNR5-2 を介さず、精製 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 をセンサーチップに直接固定化することにした。図8に示したように、十分な量の $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が固定化された。次に、濃度 0.1、0.2、0.5、1.0 mg/ml の H12V を注入し、固定化した $\alpha$ IIb $\beta$ 3 との結合を観察した。しかし、SPR シグナルの変化は全く認められなかった。過去の FACS による結合解析における Q595NTT 発現細胞と H12V の解離定数は 1~2 mg/ml であり、H12V 濃度 1 mg/ml は結合に十分であると考えられる。では、何故結合が観察されなかったのであろうか？原因は $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が精製の過程で変性し



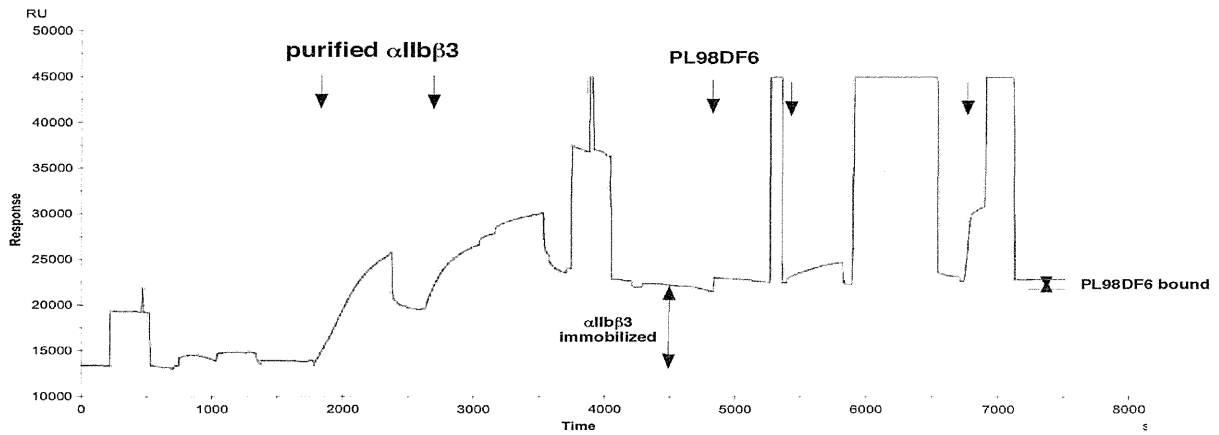


図 1 0. 固定化した $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と抗 $\alpha$ IIb 抗体 PL98DF6 の結合

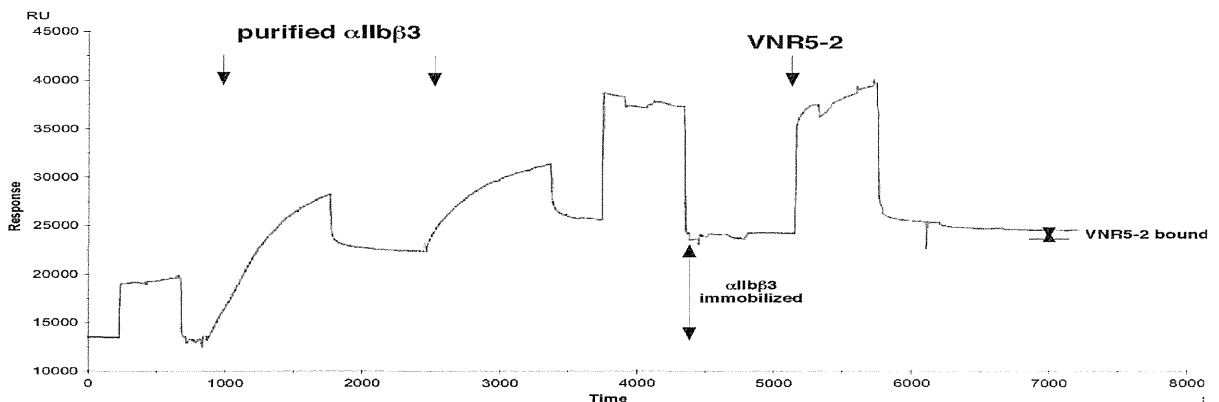


図 1 1. 固定化した $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と抗 $\beta$ 3 抗体 VNR5-2 の結合

た可能性が考えられる。元来、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 インテグリンは膜タンパクであり、精製の過程で界面活性剤を使用しなければならない。本研究で用いた界面活性剤は *n*-octylglucopyranoside であり、インテグリン精製に標準的に用いられている。また、本研究ではアフィニティーカラムを用いて、機能的に intact な $\alpha$ IIb $\beta$ 3 のみを精製しているため、変性した $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が多量に混入している可能性は低いと考えられる。しかし、変性条件下 (イムノブロット)、非変性条件下で抗 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 抗体の結合が低下していることを考慮すると、 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の溶出～センサーチップへの固定化の段階で変性したと考えるのが妥当であろう。このステップでは 1)  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の溶出に 5 mM EDTA を使用している、2)  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 固定化に低 pH を必要とする、の 2 点が大きな問題と考える。EDTA

存在下では、37°C 以上で $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の解離が進行することが知られている。常温での解離は知られていないが、溶出に RGD ペプチドを用いるなど他の方法を検討すべきかもしれない。本実験では $\alpha$ IIb $\beta$ 3 をセンサーチップに固定化する際、中性条件下では固定化がされず、余儀なく酸性条件下での固定化を行った。この条件はタンパク質の変性に大きく寄与するものであり、本研究で $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が変性した大きな原因の一つと考えられる。

これまでもインテグリンとリガンドの結合を、SPR 法で測定した報告はなされている。これらの報告の全てにおいて使用されているのは、膜貫通ドメインから C 末端を人工的に欠損した可溶性インテグリンであり、細胞溶解液から精製したインテグリンを用いた例はない。また、他の膜タンパ

クでは、界面活性剤の使用でタンパクの高次構造が影響を受けることが知られている。よって、本研究でも $\alpha$ IIb $\beta$ 3 発現細胞株から界面活性剤を用いて $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を精製するのではなく、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを欠損した可溶性 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 を発現する細胞を作製し、培養液中に分泌された $\alpha$ IIb $\beta$ 3 をアフィニティー精製して用いるのが好ましいと考えられる。

#### E. 結論

SPR 法にて H12V と高活性型 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Q595NTT) の結合を測定する方法は、測定に伴う不確定要因が最も少なく、再現性に優れた方法と考えられる。しかし、今回の研究により実施にあたっては、幾つかの問題点があることが明らかになった。使用する $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の変性を、極力抑えるなどの対策が必要である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表: Kamata T, Handa M, Takakuwa S, Sato Y, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin. PLoS One 8(6):e66096, 2013
2. 学会発表: 無し。

G. 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
半田誠	人工血小板開発の現状と今後の展望	日病薬誌	49 (9)	949-53	2013
<u>Kamata T</u> , <u>Handa M</u> , <u>Takakuwa S</u> , <u>Sato Y</u> , <u>Kawai Y</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Aiso</u> <u>S</u>	Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for $\alpha V\beta 3$ integrin	<i>Plos One</i>	8 (6)	e66096	2013
Taguchi K, Ujihira H, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T.	Pharmacokinetic study of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen $\gamma$ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model	<i>J Pharm Sci</i>	102 (10)	3852-9	2013
Taguchi K, Ujihira H, Katsuno S, <u>Takeoka S</u> , <u>Ikeda Y</u> , <u>Handa</u> <u>M</u> , <u>Otagiri M</u> , <u>Maruyama</u> <u>T</u> .	Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen $\gamma$ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute	<i>Drug Metab Dispos</i>	41 (8)	1584-91	2013