

博士論文概要

論文題目

Construction of Platelet Substitutes Using
Molecular Assembly and Evaluation of Their
Hemostatic Effects *in vitro* and *in vivo*

分子集合を利用した血小板代替物の構築と *in vitro*,
in vivo 止血能評価

氏 名	申 請 者	
	岡村	陽介
	Yosuke	Okamura

専攻・研究指導
(課程内のみ)

応用化学専攻 高分子化学研究

両親媒性分子間の分子集合やリガンドとレセプター間の特異的な分子認識を利用して構築されたナノ粒子は、その表面に様々な機能性分子を担持させることによって、高度な機能を持つ分子素子の創製となるため、活発な研究が行われている。所属研究室では、両親媒性分子(リン脂質、糖脂質、アミノ酸脂質など)や蛋白質の分子集合現象を利用して、血中投与可能なナノ粒子を提案している。他方、悪性腫瘍に対する化学療法・放射線治療の普及に伴い、その副作用である急性血小板減少症患者に対する血小板製剤の需要が増加している。しかし、血小板製剤の保存期間は3日間と短く、ウィルス等の感染リスクがあるため、これらが解決できる血小板代替物の実現が焦眉の急となっている。しかし、血小板の止血機構は、厳密かつ巧妙に制御されたりガンド-レセプター反応、分子内シグナル伝達、アクチン重合に伴う形態変化、膜融合を伴う顆粒放出、さらには血液凝固系のカスケード反応から構成されており、これらを全て具備した人工系の実現は最先端のナノテクノロジーを駆使しても不可能である。その様な背景の下、申請者は、血小板が出血部位を認識して粘着・凝集する分子機構に着目し、血管損傷部位や血小板表面を認識できる分子をナノ粒子表面に担持できれば、出血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、出血部位での集積粒子の充填効果が期待できるとの発想から、極めて単純な構造の血小板代替物の設計に結びつけた。本論文は、このように設計された血小板代替物を、最先端の *in vitro*、*in vivo* 評価系によってその認識能や止血能評価をフィードバックさせながら、より効果的な血小板代替物への改良を重ねた成果や、ナノテクノロジーにて構築した形態変化による機能発現、制御された放出反応による機能増幅のアイデアを実践しながら、より普遍的な薬物運搬用担体の設計までを視野に入れた内容をまとめたものである。

本論文は、九章から構成されている。第一章は、両親媒性分子の分子間相互作用と分子集合現象に関する従来知見を用いて構築された生体投与可能なナノ粒子に関する総論である。従来報告された薬物運搬系やナノテクノロジーで得られた物質系の研究動向をまとめ、その分子及び粒子の構造設計、物理化学的性質や生体投与のための要件並びにそれらの問題点について概説した。

第二章では、血小板膜表面上に構成される膜蛋白質の分子レベルでの理解を基に、幾つかの血小板代替物の候補を設計するにあたり、その要件と根拠を概説した。具体的には、血管損傷部位への血小板認識と血小板凝集(一次、二次)、膜蛋白質の構造変化、活性化に伴う細胞内外のシグナル伝達に関する最先端の研究動向を参考にしながら、第一章の知見を基に血小板代替物の設計を行った。

第三章では、生体投与可能なナノ粒子として、遺伝子組換えヒト血清アルブミンを単量体と見なし、その分子集合とジスルフィド縮合重合反応にて構築したアルブミン重合体の新規合成法を考案した内容、並びにアルブミン重合体やリン脂質小胞体表面に認識蛋白質を結合させる調製方法について記載した。pH と温度の

制御により、アルブミン高次構造の変化が生じて ^{34}Cys が露出し、チオール・ジスルフィド交換反応が生起するためにアルブミン分子間での重合が進行する。その粒径を 50nm から 5 μm 程度まで制御するための条件を設定した。更に、ヘテロ架橋剤 *N*-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオプロピオネート)、あるいは両末端に官能基を有するポリエチレングリコール(PEG)を用いた最小限の化学修飾により、機能を保持させたまま認識蛋白質を担体の表面に結合させることに成功した。

第四、五章では、血小板代替物の認識部位の選定結果である。まず、第四章は、第三章で確立した作製法にて血小板膜蛋白質の遺伝子組換え体(rGPIb α , rGPIa/IIa)を粒子表面に担持させ、流動状態下 *in vitro* にて機能評価した実験結果である。rGPIb α を担持させた小胞体(rGPIb α -小胞体)は、血小板と同様に VWF 基板上を流動方向に沿って転がる挙動が認められた。他方、rGPIb α -アルブミン重合体では基板上を転がることなく直ちに粘着して集積する挙動が観測できた。細胞膜を四酸化オスミウムにて固定化した血小板やラテックスビーズでも同様の粘着挙動が確認できたことから、重合系の微粒子に共通の現象であることを証明した。rGPIb α 結合体のこれらの挙動は、粒子間の相互作用、膜流動や膜変形に相関して変化することも明らかにできた。同様の方法にて、rGPIa/IIa 受容体であるコラーゲン基板への低ずり速度の流速下での担体の特異的な接着挙動を蛍光顕微鏡観察と画像処理から定量解析し、rGPIa/IIa の機能を再現できた。しかし、これらの出血部位を認識して集積する微粒子の系と共に、残存血小板を誘導し、凝集を促進させる機能を持つ微粒子系の構築が次の課題となった。

第五章は、活性化血小板膜上で機能発現される蛋白質(GPIIb/IIIa)を認識して血小板凝集を担う血漿蛋白質フィブリノーゲン(Fbg)、あるいはその認識アミノ酸配列(ドデカペプチド(H12))に着目し、それらを担持させたアルブミン重合体の流動下における機能評価の結果である。Fbg 結合体ではその血小板凝集促進能は確認できたものの、Fbg は構造的に不安定な蛋白質であることが免疫学的手法により判明した。そこで、Fbg 作用部位(H12)を検討した。正常値の約 1/10 程度まで減少させた血小板数の血液中に、H12 結合体を添加して血小板粘着率を比較したところ、未添加系と比較して粘着率は約 2 倍増大し、H12 結合体による血小板粘着増強効果を確認した。この様子は流動後のコラーゲン基板の走査電顕観察によっても支持された。さらに、H12 結合体は未活性血小板と相互作用しないことをフローサイトメトリーから明らかにし、H12 の血小板代替物への有用性を立証した。

第六章は、H12 を担持させたアルブミン重合体について、血小板減少症モデル動物を用いた止血能の評価、さらにその血中滞留時間の延長を目的として、PEG を介して H12 を担持させた H12-PEG-アルブミン重合体を新規に構築して *in vivo* 評価した内容である。抗癌剤(ブスルファン)の副作用を利用して、血小板数を正常値の約 1/5 まで減少させた血小板減少ラットの調製法と出血時間の測定法を確立した。H12-アルブミン重合体の投与により出血時間を 1/2 程度まで短縮させる

ことに成功した。さらに、H12-PEG-アルブミン重合体表面上の PEG 鎖の分子量を 5 kDa に統一し、1 粒子あたりに最大約 7.2×10^4 分子まで結合させることで、血中半減期は PEG 未修飾体に比べて約 20 倍延長でき、活性化血小板に対する H12 の特異的認識能は PEG 鎖の修飾後も維持され、投与後 3 時間経過しても止血能が保持されていた。

第七章では、リン脂質小胞体への認識部位の結合法と得られた試料の血小板代替物としての *in vitro*、*in vivo* 評価をまとめた。グルタミン酸骨格を持つポリエチレングリコール(PEG)結合型脂質と H12 を PEG 鎖末端に結合させた H12-PEG 脂質を用いて表面修飾した小胞体の調製を試みた。小胞体表面上における H12 の認識能は、血中滞留性の向上のために共修飾されている PEG 鎖排除体積によって阻害されたが、PEG 脂質の分子量と表面修飾率の制御により回避できた。H12-PEG 小胞体は、*in vitro* の流動試験において活性化血小板と特異的に結合し、血小板減少状態下でも血小板凝集を増幅させ、0.3mol% の H12 導入率で充分であった。また、血小板減少症モデル動物を用いた *in vivo* 試験においても、投与量依存的に出血時間を短縮させることも確認できた。

第八章では、形態変化を利用した機能発現や放出反応のダイナミクスを制御した新規な分子集合体の構築に関する試みを記載した。親水部 (SiO_2) と疎水部 (ODMS) からなる親-疎水マイクロパターンを基板上に作製し、疎水部にアルブミンを吸着、ジスルフィド架橋させたナノシートを構築し、共焦点レーザー顕微鏡にて 3 次元観察した。このナノシートはラウリルエーテルにて簡便に剥離でき、表裏に異なる認識部位を結合できることから、全くの独創的な血小板代替物の構築と展開が期待される。また、血小板凝集惹起物質内包 H12 結合小胞体では、コラーゲンによって血小板の凝集が惹起された際、直ちに小胞体から惹起物質が放出されて血小板凝集が効果的に促進する現象を初めて示すことができた。さらに、PEG 脂質の親-疎水バランスを制御したり、希釈によって PEG 脂質導入の平衡状態を移動させることによって、PEG 脂質の遊離を意図的に促進させて、PEG 鎖に埋没していた H12 の機能発現を遅延させることを実現した。

第九章では、血小板の止血機構を緻密に制御された多段階の分子認識反応が連動したカスケード反応と化学増幅系が複合されたものとみなし、それらを人工系で構築する目標に対する将来展望である。コンピューターシミュレーションを用いた次世代型担体の可能性についても言及し、血小板代替物や薬物運搬系に関する新しい提案を記述した。

以上、本論文は、分子集合技術を駆使して構築したナノ粒子に分子認識反応を高度に制御させた表面を付与した系が、血小板代替物としての候補となることを具体的に示したものである。

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
1. 論文 (報文)	
1.	“Prolongation effects of hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen- γ chain dodecapeptide, <i>Transfusion</i> (投稿中), <u>Yosuke Okamura</u> , Toshinori Fujie, Hitomi Maruyama, Makoto Handa, Yasuo Ikeda, and Shinji Takeoka.
2.	“Cooperative effects of platelets aggregation of platelet substitutes at a high shear rate; mixed system of fibrinogen γ -chain dodecapeptide- or glycoprotein Ib α -conjugated latex beads under flow conditions”, <i>J.Artif. Organs</i> (印刷中), <u>Yosuke Okamura</u> , Makoto Handa, Hidenori Suzuki, Yasuo Ikeda, and Shinji Takeoka.
3.	“Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen- γ chain dodecapeptide <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> ”, <i>Bioconjugate Chem.</i> 16 , 1589-1596 (2005), <u>Yosuke Okamura</u> , Ippei Maekawa, Yuji Teramura, Hitomi Maruyama, Makoto Handa, Yasuo Ikeda, and Shinji Takeoka.
4.	“Hemostatic effects of fibrinogen- γ chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> ”, <i>Transfusion</i> 45 , 1221-1228 (2005), <u>Yosuke Okamura</u> , Shinji Takeoka, Yuji Teramura, Hitomi Maruyama, Eishun Tsuchida, Makoto Handa, and Yasuo Ikeda.
5.	“Platelet glycoprotein Ib α polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions”, <i>Br. J. Haematol.</i> 128 , 533-539 (2005), Yumiko Matsubara, Mitsuru Murata, Tomohiro Hayashi, Keijiro Suzuki, <u>Yosuke Okamura</u> , Makoto Handa, Hiroaki Ishihara, Toshiro Shibano and Yasuo Ikeda.
6.	“Development of fibrinogen γ chain dodecapeptide-conjugated particles”, <i>Artificial Blood</i> , 11 , 205-210 (2003), <u>Yosuke Okamura</u> , Yuji Teramura, Shinji Takeoka, Eishun Tsuchida, Hidenori Suzuki, Naohide Watanabe, Makoto Handa, and Yasuo Ikeda.
7.	“Function of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow”, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 312 , 773-779 (2003), Shinji Takeoka, <u>Yosuke Okamura</u> , Yuji Teramura, Naohide Watanabe, Hidenori Suzuki, Eishun Tsuchida, Makoto Handa, and Yasuo Ikeda.
8.	“Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice” <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 306 , 256-260 (2003), Yuji Teramura, <u>Yosuke Okamura</u> , Shinji Takeoka, Mie Kainoh, Hideki Narumi, Hiromi Tsuchiyama, Makoto Handa, Yasuo Ikeda, and Eishun Tsuchida.
9.	“Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibility on the vWf surface under flow conditions”, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 296 , 765-770 (2002), Shinji Takeoka, Yuji Teramura, <u>Yosuke Okamura</u> , Makoto Handa, Yasuo Ikeda, and Eishun Tsuchida.

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
10.	“Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions”, <i>Biomacromolecules</i> 2 , 1192-1197 (2001), Shinji Takeoka, Yuji Teramura, <u>Yosuke Okamura</u> , Makoto Handa, Yasuo Ikeda, and Eishun Tsuchida.
2. 総説	
1.	「血小板代替物の展開」, <i>Molecular Medicine</i> , 41 (12), 1494-1500 (2004), 武岡真司, <u>岡村陽介</u> .
2.	「止血機能を有する微粒子系の設計と機能評価」, <i>日本心臓血管麻酔学会誌</i> , 8 (1), 35-41 (2004), 武岡真司, <u>岡村陽介</u> .
3.	「血小板代替物の担体設計から Drug Local Delivery の可能性」, <i>血栓止血誌</i> , 15 (1), 21-26 (2004), 武岡真司, <u>岡村陽介</u> , 土田英俊, 池田康夫.
3. その他 (特許)	
1.	「薬物運搬体」 特願 2005-75663 武岡真司, <u>岡村陽介</u> , 金澤秀雄, 久本秀治, 久保田恒平, 小幡洋輔.
2.	「薄膜状高分子構造体とその調製方法」 特願 2004-252207 武岡真司, <u>岡村陽介</u> , 大塚正宣.
(業績)	
1.	日本化学会 第 84 春季年会 学生講演賞 (2004).
(講演発表)	A. 国際会議での講演発表
1.	“Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen-γ chain dodecapeptide as platelet substitutes <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> ” Particles 2005 Surface Modification in Particle Technology (2005.8., San Francisco), <u>Yosuke Okamura</u> , Shinji Takeoka, Makoto Handa, and Yasuo Ikeda.
2.	“Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen-γ chain dodecapeptide as platelet substitutes <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> ”, The International Society of Thrombosis & Haemostasis XXth Congress (2005.8., Sydney), <u>Yosuke Okamura</u> , Shinji Takeoka, Hidenori Suzuki, Mitsuru Murata, Makoto Handa, and Yasuo Ikeda.
3.	“Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen-γ chain dodecapeptide as platelet substitutes <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> ”, Xth International Symposium on Blood Substitutes (2005.6., Providence), <u>Yosuke Okamura</u> , Shinji Takeoka, Eishun Tsuchida, Makoto Handa, and Yasuo Ikeda.

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
4.	“Hemostatic effects of fibrinogen- γ chain dodecapeptide-conjugates <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> ”, Incorporating the 6th UK Platelet Meeting and the 2nd UK/Japanese Platelet Conference (2004. 9., Oxford), <u>Yosuke Okamura</u> , Shinji Takeoka, Hidenori Suzuki, Makoto Handa, and Yasuo Ikeda.
5.	“Evaluation of secondly hemostasis for oligopeptide-conjugated latex beads as a model of platelet substitutes”, IX International Symposium on Blood Substitutes (2003.3., Tokyo), <u>Yosuke Okamura</u> , Yuji Teramura, Shinji Takeoka, Makoto Handa, Eishun Tsuchida, and Yasuo Ikeda.
6	“Role for P-selectin in platelet thrombus formation under flow”, The 44th American Society of Hematology Annual Meeting (2002.12., Philadelphia), <u>Yosuke Okamura</u> , Naohide Watanabe, Shinji Takeoka, Yasuo Ikeda, and Makoto Handa. その他連名で 13 件、計 19 件発表.
	B. 学会関連での講演発表
1.	「ドデカペプチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体の血小板代替物としての評価」第 43 回日本人工臓器学会大会 (2005 年 11 月, 東京), <u>岡村陽介</u> , 藤枝俊宣, 半田誠, 池田康夫, 武岡真司.
2.	「接着分子を標的とした血小板代替物の創製」第 28 回日本血栓止血学会学術集会 (2005 年 11 月, 福岡), <u>岡村陽介</u> , 半田誠, 武岡真司, 鈴木英紀, 村田満, 池田康夫.
3.	「フィブリノーゲン由来ドデカペプチド結合アルブミン重合体の血小板代替物としての止血効果」(2005 年 9 月, 山形), <u>岡村陽介</u> , 藤枝俊宣, 半田誠, 池田康夫, 武岡真司.
4.	「フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド結合担体の止血効果」第 12 回日本血液代替物学会年次大会 (2005 年 6 月, 東京), <u>岡村陽介</u> , 前川一平, 藤枝俊宣, 武岡真司, 土田英俊, 半田誠, 池田康夫.
5.	「フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の止血効果」日本膜学会第 27 年会, (2005 年 5 月, 東京), <u>岡村陽介</u> , 前川一平, 武岡真司, 半田誠, 池田康夫.
6.	「フィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド結合担体の止血効果」第 54 回高分子学会年次大会, (2005 年 5 月, 横浜), <u>岡村陽介</u> , 前川一平, 藤枝俊宣, 武岡真司, 土田英俊, 半田誠, 池田康夫.
7.	「血小板代替物用認識部位としての H12 ペプチドと担体の選定」第 85 回日本化学会春季年会, (2005 年 3 月, 横浜), <u>岡村陽介</u> , 前川一平, 藤枝俊宣, 武岡真司, 土田英俊, 半田誠, 池田康夫.
8.	「フィブリノーゲン γ 鎖ドデカペプチド結合体の <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 評価」, 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, (2004 年 11 月, 奈良), <u>岡村陽介</u> , 武岡真司, 土田英俊, 半田誠, 池田康夫.
9	「ドデカペプチド結合アルブミン重合体の血小板凝集促進効果」, 第 53 回高分子討論会, (2004 年 11 月, 札幌), <u>岡村陽介</u> , 武岡真司, 土田英俊, 半田誠, 池田康夫. その他 16 件と、連名で 23 件、計 48 件発表.