

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07517

研究課題名（和文）血小板代替リポソームによって炎症を制御して外傷性凝固障害を治療する

研究課題名（英文）Treatment of trauma induced coagulopathy with H12-ADP-liposome

研究代表者

萩沢 康介（Hagisawa, Kohsuke）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生理学・助教

研究者番号：50539244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：血小板代替リポソームであるH12-(ADP)-リポソームは受傷後に血小板が集積している部位への標的性をもっている。そこで放出されたADPは血小板膜上のP2Y12受容体を介して血小板機能を賦活し、ADPの一部はただちに細胞外で代謝されアデノシンとなり抗炎症作用を発揮する複合的な効果を有する。凝固障害の早期にH12-(ADP)-リポソームを投与することで、血小板からの炎症惹起物質の放出を抑え、血管内皮傷害を防止し、血小板機能を回復させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は凝固障害の早期にH12-(ADP)-リポソームを投与して、血小板からの炎症惹起物質の放出を抑え、血管内皮傷害を防止し、血小板機能を回復させ、凝固障害の病態制御の新たな局面を切り開くことにつながると思われる。

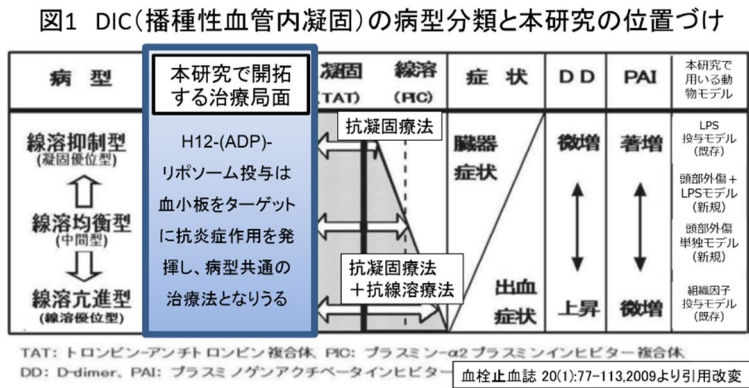
研究成果の概要（英文）：H12-(ADP)-liposomes, which are platelet-replacement liposomes, are targeted to sites of platelet accumulation after injury. The ADP released there stimulates platelet function via P2Y12 receptors on the platelet membrane, and part of the ADP is immediately metabolized extracellularly to adenosine, which has the combined effect of exerting an anti-inflammatory effect. In this study, it is suggested that prompt administration of H12-(ADP)-liposomes in the early stages of coagulopathy inhibits the release of inflammation-inducing substances from platelets and neutrophils, prevents vascular endothelial injury, and restores platelet function.

研究分野：循環器生理

キーワード：凝固障害 免疫血栓 血小板代替物

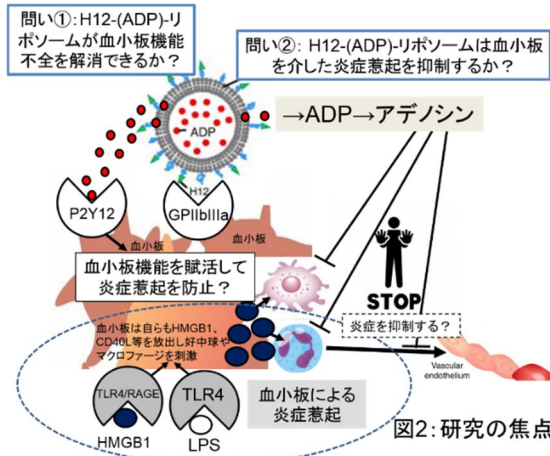
## 1. 研究開始当初の背景

凝固障害の治療については、日本血栓止血学会 DIC 部会を中心として科学的根拠に基づいた治療ガイドラインが示されている（図 1、文献 1）。そこでは凝固と線溶のバランスで病型分類し、抗凝固療法や抗線溶療法を主とした治療が推奨され、血小板補充療法は出血症状が顕在化した場合にのみ使用が考慮されている。上記のように血小板は全身炎症時に炎症惹起性の mediator となりうることから、凝固障害治療では主たる役割を与えられてこなかった。



申請者らは血小板の代替物として H12-(ADP)-リポソームを開発してきた。これはリポソーム表面に活性化血小板の糖タンパク(GP)IIbIIIa に特異的に結合するフィブリノゲン  $\gamma$  鎖の HHLGGAKQAGDV 配列ペプチド(H12)を組み込み、リポソーム内部に ADP を含有させている(文献 2)。これにより、血小板が減少した病態でも、血小板の P2Y12 受容体から ADP 刺激をしながら、H12 による多点結合を介した血小板凝集を引き起こして止血を補助する。本研究課題の焦点は H12-(ADP)-リポソームによって血小板を軸にした炎症を制御することである（図 2）。

本研究では「問い 1: H12-(ADP)-リポソームが血小板機能不全を解消できるのか?」「問い 2: H12-(ADP)-リポソームは血小板による炎症惹起を抑制しうるか?」を明らかにする。



## 2. 研究の目的

外傷にはしばしば凝固障害が合併する。すなわち全身性の炎症反応から血管内皮傷害を生じ、凝固亢進と線溶亢進のいずれかまたは両者の亢進が生じるとされているが、不明な点も多い。これに対して血小板輸血は凝固障害が進展し出血症状が生じた場合に適応となるものの、血小板は2次的にサイトカインや DAMPs を分泌し炎症を拡大させる可能性がある。

我々が開発している血小板代替リポソームである H12-(ADP)-リポソームは受傷後に血小板が集積している部位への標的性をもっている。そこで放出された ADP は血小板膜上の P2Y12 受容体を介して血小板機能を賦活し、ADP の一部はただちに細胞外で代謝されアデノシンとなり抗炎症作用を発揮する複合的な効果を有する(文献 3)。

本研究は凝固障害の早期に H12-(ADP)-リポソームを投与して、血小板からの炎症惹起物質の放出を抑え、血管内皮傷害を防止し、血小板機能を回復させ、凝固障害の病態制御の新たな局面

を切り開こうとするものである。

### 3. 研究の方法

本研究は防衛医科大学校動物実験倫理委員会による承認を受け実施した。ラットに LPS(10mg/kg)を腹腔内投与し、その 4 時間後に尾静脈より H12-(ADP)-リポソーム (40mg/kg)ないし生理食塩水(2ml/kg)を投与した。

- 「急性期予後」: LPS 投与から 18 時間の生存率を比較した。  
これとは別個体で、LPS 投与から 4、6、8、12 時間後に以下の検討を行った。
- 「凝固障害」: 採血を行い、血算測定・Sonoclot による凝固機能評価・生化学検査等を実施した。
- 「臓器障害」: 気管支肺胞洗浄液を採取し、各種サイトカインの測定とともに、肺、腎臓等を採取し病理学的検討を行った。

### 4. 研究成果

LPS 投与 4 時間後に H12-(ADP)-リポソームを投与し、1 時間後に電顕撮影を行ったところ、図 3 に示すように好中球細胞外トラップ( NETs )に H12-(ADP)-リポソームが接着していることを確認した。

生食群では LPS 投与から 8-12 時間後に、血小板数は 50 万から 10-20 万へ低下し、Sonoclot の活性化凝固時間(ACT)が 50 秒から 220 秒強に延長が認められた。一方、H12-(ADP)-リポソーム群では血小板数は同様に減少したものの、活性化凝固時間の延長は 100 秒程度に軽減された。

さらに、図 4 に示すように、Multiplete システムによる評価では、LPS 投与によって血小板凝集能(ADP 刺激下)は正常の百分の一近くにまで低下したが、H12-(ADP)-リポソーム投与で十分の一程度にまで有意に回復した。そして気管支肺胞洗浄液中の好中球エラスターゼ複合体濃度

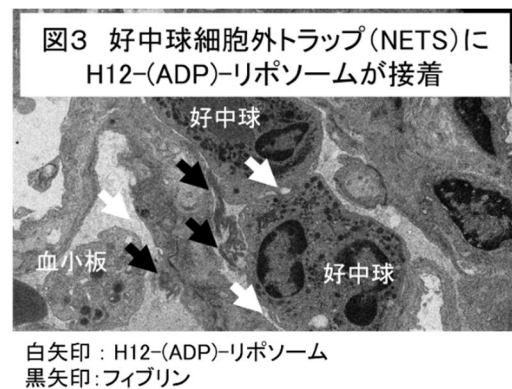
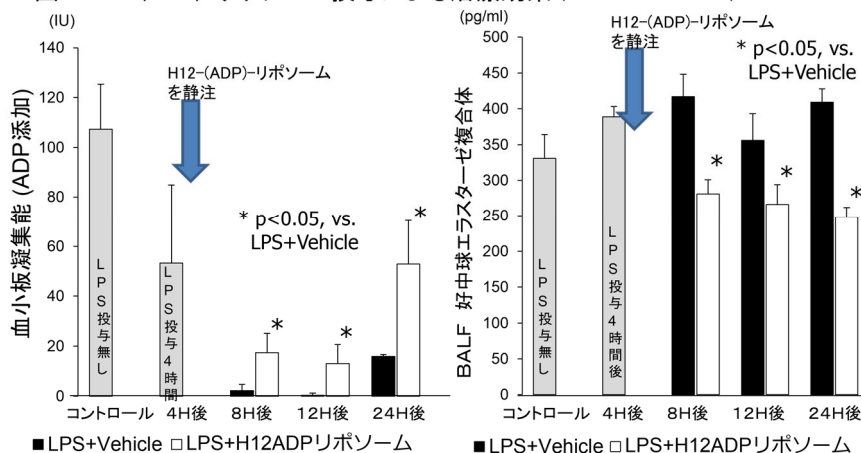


図4 H12-(ADP)-リポソーム投与による治療効果 (n=6~8, mean±SE)



も H12-(ADP)-リポソーム群で生食群に比し有意に低値であった。さらに、American Thoracic society の監修した急性肺傷害動物モデルの定量スコア(文献4)を用いた検討では、H12-

(ADP)-リポソーム群では LPS 投与 6 時間後の急性肺傷害スコアが生食群に比し有意に改善していた(66 vs. 80,  $p < 0.05$ )。

これらがいまって、LPS 投与後の生存率は、H12-(ADP)-リポソーム群で生食群に比し有意に改善した(図 5)。

以上の結果から図 6 に示すように、本研究における LPS 誘導性の凝固障害および臓器傷害モデルにおいて、H12-(ADP)-リポソームは血小板機能不全を回復させ、好中球と血小板の炎症惹起を抑制し、臓器傷害を軽減することが示唆された。

図 5 LPS投与後の生存率は、H12ADPリポソーム群で生食群に比し有意に改善した(79 vs. 38%,  $p < 0.05$ )。

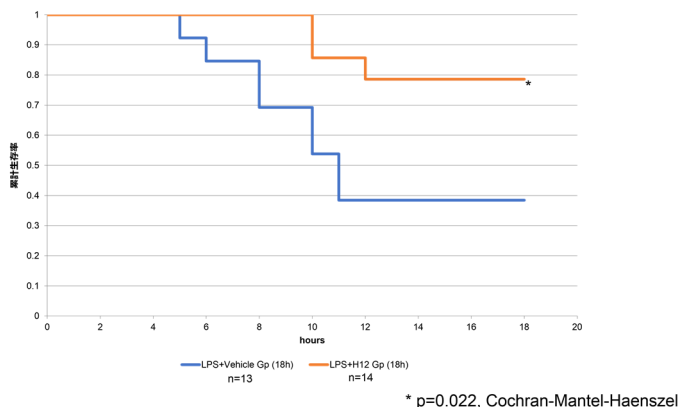
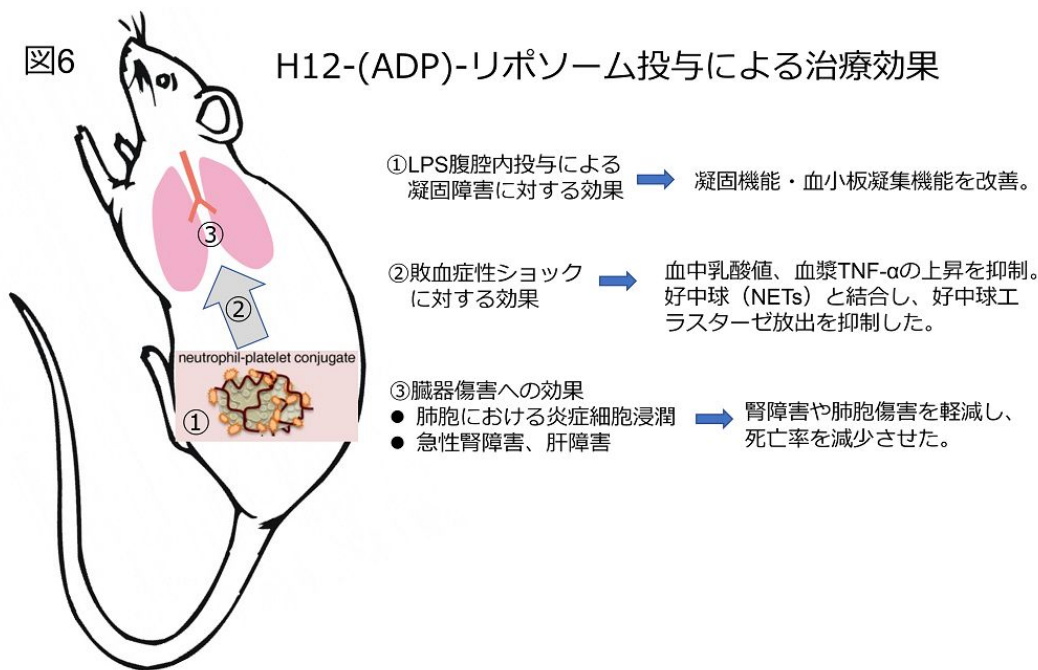


図 6 H12-(ADP)-リポソーム投与による治療効果



<引用文献>

1. 日本血栓止血学会学術標準化委員会DIC部会：科学的根拠に基づいた感染症に伴うDIC治療のエキスパートコンセンサス．血栓止血誌 20: 77-113, 2009.
2. Takeoka S, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 312: 773-9. 2003.
3. Hagsisawa K, et al. *Critical Care Medicine* 44: e827-e837. 2016.
4. Matute-Bello, Gustavo, et al. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 44:725-738. 2011.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hagisawa Kohsuke, Kinoshita Manabu, Takeoka Shinji, Ishida Osamu, Ichiki Yayoi, Saitoh Daizoh, Hotta Morihiro, Takikawa Masato, Torres Filho Ivo P., Morimoto Yuji	4. 巻 6
2. 論文標題 H12 (ADP) liposomes for hemorrhagic shock in thrombocytopenia: Mesenteric artery injury model in rabbits	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 e12659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rth2.12659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hagisawa Kohsuke, Kinoshita Manabu, Takeoka Shinji, Sakai Hiromi	4. 巻 121
2. 論文標題 Artificial blood transfusion: A new chapter in an old story	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiology News	6. 最初と最後の頁 22-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.36866/pn.121.22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 HAGISAWA Kohsuke, KINOSHITA Manabu, TAKEOKA Shinji	4. 巻 31
2. 論文標題 A novel strategy for hemostatic resuscitation using platelet substitute: H12-(ADP)-liposome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 505 ~ 514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.31.505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 萩沢康介、木下学	4. 巻 28
2. 論文標題 外傷性大量出血に対する人工血液と輸血治療の最前線	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 人工血液 (日本血液代替物学会会誌)	6. 最初と最後の頁 40-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Osamu, Hagiwara Kohsuke, Yamanaka Nozomu, Tsutsumi Koji, Suzuki Hidenori, Takikawa Masato, Takeoka Shinji, Kinoshita Manabu	4. 巻 10
2. 論文標題 Therapeutic potential of fibrinogen $\alpha$ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes as a haemostatic adjuvant for post-cardiopulmonary bypass coagulopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11308 (2020)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68307-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 萩沢康介
2. 発表標題 人工血液を用いたショック治療
3. 学会等名 第85回日本循環器学会総会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩沢 康介, 木下 学, 武岡 真司
2. 発表標題 エンドトキシン血症時の凝固障害に対するH12ADPリボソーム投与効果の検討
3. 学会等名 第28回日本血液代替物学会年次大会 シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩沢康介、石田治、木下学、武岡真司
2. 発表標題 腸間膜動脈出血に対するH12-(ADP)-リボソームを用いたDamage control surgery
3. 学会等名 第27回日本血液代替物学会年次大会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武岡 真司  (Takeoka Shinji)  (20222094)	早稲田大学・理工学術院・教授   (32689)	
研究分担者	石田 治  (Ishida Osamu)  (20365266)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院外科・講師   (82406)	
研究分担者	宮崎 裕美  (Miyazaki Hiromi)  (30531636)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 医療工学部門・講師   (82406)	
研究分担者	木下 学  (Kinoshita Manabu)  (70531391)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・免疫・微生物学・教授   (82406)	
研究分担者	佐藤 俊一  (Sato Shunichi)  (90502906)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター 生体情報・治療システム研究部門・教授   (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------