

分担研究報告書

トロンビン刺激血小板と H12-vesicle の相互反応に関する形態学的研究

分担研究者 鈴木 英紀 (東京都臨床医学総合研究所・研究員)

研究要旨：フィブリノゲン γ 鎖C末端のドデカペプチド(H12)が結合した小胞体(H12-vesicle)は血小板凝集を促進させることをこれまで報告してきた。今回、前もって本 vesicle とヒト洗浄血小板を混合し、さらにトロンビンを添加して惹起される血小板と本 vesicle との相互反応をフローサイトメトリーで測定するとともに、本 vesicle の動態を電顕で検討した。その結果、フローサイトメトリーによって H12-vesicle はトロンビン刺激血小板に結合し、その結合は経時的に増加することを明らかにした。また、形態学的にも本 vesicle がトロンビン刺激血小板へ結合し、さらに多くの vesicle が開放小管内に移動することを明らかにした。

A. 研究目的

フィブリノゲン γ 鎖C末端のドデカペプチド(H12)結合小胞体(H12-vesicle)は血小板凝集を促進させることから、これまでその粒子の形態をネガティブ染色法、レプリカ法で確認してきた。今回、H12-vesicle の止血効果を知る一環として、本 vesicle を前もってヒト洗浄血小板に混合し、さらにトロンビンを添加して惹起される血小板と本 vesicle との相互反応をフローサイトメトリーおよび電顕で観察し、その効果を形態学的に把握することによって最適な人工血小板作製の理論的根拠を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1) フローサイトメトリーによるトロンビン刺激血小板に対する H12-vesicle の結合の解析

3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として健康人ボランティアの肘静脈から採血し、これを遠心して多血小板血漿 (PRP) を得た。PRP を遠心し、ペレットを HEPES-Tyrode 液で洗浄し、 $1.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$ に調整した。この洗浄血小板 $50 \mu\text{l}$ に carboxyfluorescein (CF) を標識した H12-(CF) vesicle (最終濃度 3 mg/ml) または同濃度のコントロール(CF) vesicle を $10 \mu\text{l}$ 加え、さらにヒト・トロンビン(最終濃度 3 U/ml) を加

えて凝集が起こらないように混合後、 37°C で 10 秒から 10 分間静置した。以下、常法に従ってフローサイトメーターで測定し、トロンビン刺激血小板に対する H12-(CF) vesicle の結合を解析した。

2) トロンビン刺激血小板と H12-vesicle の相互反応の形態的解析

1) と同様の洗浄血小板を $4.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$ に調整した。この洗浄血小板 1 ml に H12-vesicle またはコントロールの vesicle (最終濃度 2 mg/ml) を加え、さらにウシ・トロンビン (最終濃度 5 U/ml) を加えて 37°C で 30 秒、5 および 10 分間静置した。以下、経時的に 0.2% グルタルアルデヒドを等量加え、 4°C で 30 分間固定した。遠心後、ペレットを PBS で洗浄し、1 M ショ糖液中で 1 時間、さらに 2.3 M ショ糖液中に一昼夜浸漬した。この試料を凍結用試料ビンに載せて液体窒素中で凍結後、超ミクロトームで凍結超薄切片を作製した。切片は酢酸ウランで染色して透過型電顕で観察した。切片の一部は H12、GPIIb/IIIa およびフィブリノゲンの分布を検出するために、0.5% BSA を含む PBS でブロッキング後、ウサギ抗 H12 抗体、マウス抗 GPIIb/IIIa 抗体 (P2) またはウサギ抗フィブリノゲン抗体でインキュベートし、さらにコロイド金 (10、15 nm) 標識ヤギ抗マウスまたはウ

サギ IgG でインキュベートした。以下、同様に酢酸ウランで電子染色し、透過型電顕で観察した。

C. 研究結果

1) フローサイトメトリーによるトロンビン刺激血小板に対する H12-vesicle の結合の解析

トロンビン添加前、添加後 10、30、60 秒、5、10 分後に試料を採取して測定した(図 1)。H12-vesicle のトロンビン刺激血小板への結合は、10 秒後から観察され、その後経時的に増加して 5 分でほぼ平衡に達した。一方、コントロール vesicle はほとんど結合しなかった。

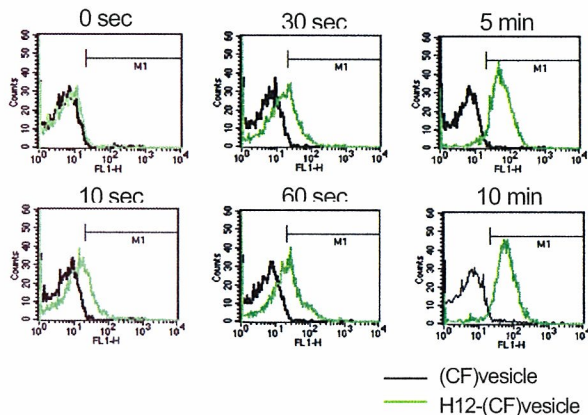


図1. H12-(CF)vesicle のトロンビン刺激血小板への経時的結合増加を示すフローサイトメトリー

2) トロンビン刺激血小板と H12-vesicle の相互反応の形態的解析

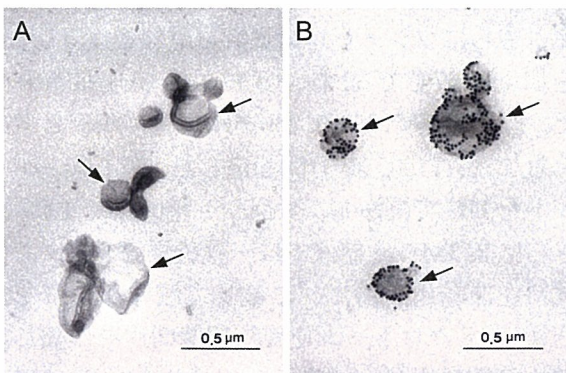


図2. 凍結超薄切片法による H12-vesicle の形態
本 vesicle は二重膜をもつ直径 100~400 nm の粒子状を示し(A, 矢印)、表面には H12 が結合していることが免疫電顕的に明らかである(B, 矢印)。

凍結超薄切片法で観察した H12-vesicle は直径 100~400 nm 前後の粒子状を示し、リポソーム粒子に特徴的な二重膜も観察された(図 2A)。

切片中の vesicle をウサギ抗 H12 抗体、さらにコロイド金標識二次抗体で免疫染色すると、金粒子は vesicle 上に特異的に分布した(図 2B)。

血小板浮遊液にコントロールまたは H12-vesicle を添加した時、血小板は円盤形を維持し、これらの vesicle の血小板への影響は見られなかった(図 3)。また、これらが血小板に結合している像は観察されなかった。

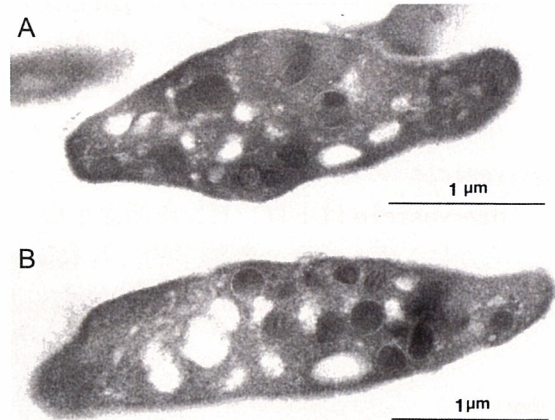


図3. コントロール、H12-vesicle を添加した血小板
コントロール(A)または H12-vesicle を添加した血小板(B)はともに円盤状を示し、表面には vesicle が結合していない。

血小板浮遊液にコントロールの vesicle、さらにトロンビンを添加した 30 秒の血小板は、偽足を形成し、さらに球状に変形した(図 4)。顆粒は消失し、中央部には granulomere、その周囲に開放小管系が存在し、内部には顆粒成分と思われるやや電子密度のある物質が観察された。しかし、vesicle は観察されなかった。

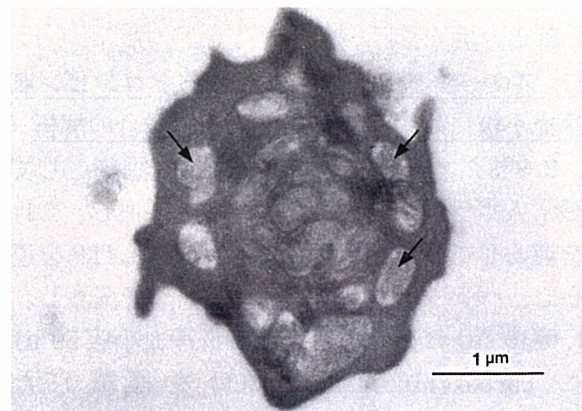


図4. control vesicle+トロンビン加30秒の血小板
血小板は偽足を出して球状に変形し、中央部には granulomere が見られる。辺縁部の開放小管系はやや拡張し、顆粒内物質が充満している(矢印)。

一方、H12-vesicle を加え、さらにトロンピンを添加した 30 秒の血小板は、同様に偽足形成が伴う形態変化を示しているが、開放小管系はさらに拡張し明るい像を示した(図5)。血小板の表面には二重膜を持つ vesicle が結合していた。これらの vesicle はコントラストがないものの、よく観察すると開放小管系内にも存在した。



図5. H12-vesicle+トロンピン添加 30 秒の血小板
血小板はコントロールと同様に球状に変形しているが、開放小管系はさらに拡張している。コントラストのない vesicle が血小板表面に結合し(矢印)、さらに開放小管系内にも存在する(矢尻)。

H12-vesicle を加え、さらにトロンピンを添加した 30 秒の血小板を抗 H12 抗体で免疫染色すると、H12 の存在を示すコロイド金は表面膜上および開放小管系内の vesicle を認識し、かなりの数の vesicle が開放小管系内に存在することが示唆された(図6)。これらの vesicle は管腔内に存在するというよりも、むしろ開放小管系の膜上に分布した。



図6. H12-vesicle+トロンピン添加 30 秒の血小板 (H12 の免疫染色)
H12 の存在を示す金粒子は表面膜(矢印)および開放小管系(矢尻)の vesicle を認識し、多くの vesicle が血小板の内外に結合しているのが分かる。

コントロールの vesicle、さらにトロンピンを添加した 5 分の血小板は、相互の偽足が絡み合い、小凝集塊を形成した(図7)。しかし、血小板表面および開放小管系中には vesicle が確認されなかった。

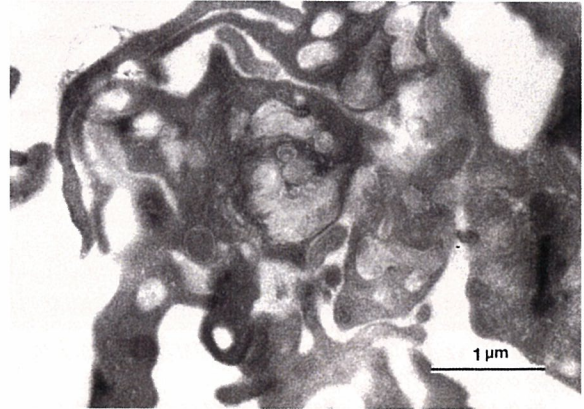


図7. control vesicle+トロンピン加 5 分の血小板
血小板は相互の偽足が絡み合い、小凝集塊を形成している。血小板表面および開放小管系中には vesicle が存在しない。

一方、H12-vesicle を加え、さらにトロンピンを添加した 5 分の試料では、コントロールの vesicle のものに比べて大きな凝集塊が形成された。さらに凝集塊中のそれぞれの血小板の開放小管系は 30 秒のものと同様に拡張し、その管腔上には vesicle が多数存在した(図8)。

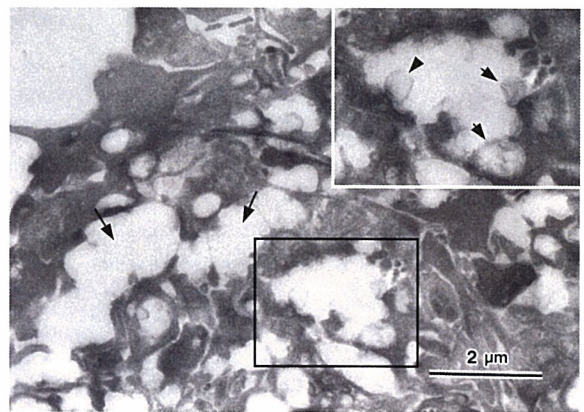


図8. H12-vesicle+トロンピン添加 5 分の血小板
コントロールの vesicle のものに比べて大きな凝集塊が形成される。凝集塊中の血小板の開放小管系は拡張している(矢印)。一部の開放小管系を拡大すると、小管系の膜上には vesicle が多数結合している(挿入図、矢尻)。

H12-vesicle を加え、さらにトロンピンを添加した 5 分の血小板を抗 H12 抗体で免疫染色す

ると、H12の存在を示すコロイド金は30秒のものと同様に開放小管系の膜上に結合している vesicle 上に検出され、本小管系における多くの vesicle の存在が明らかになった(図9)。

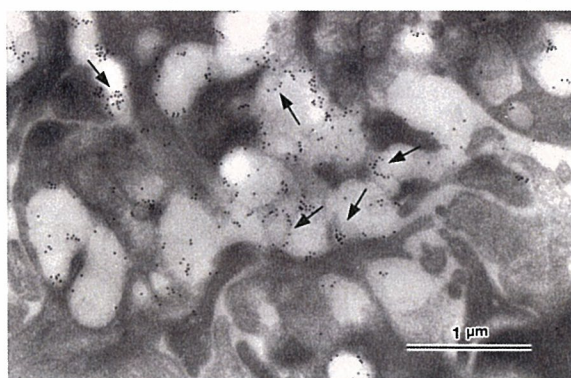


図9. H12-vesicle+トロンビン添加5分の血小板 (H12の免疫染色)

凝集塊中血小板の拡張した開放小管系の膜上にはコロイド金で標識された vesicle が多数存在している(矢印)。

抗H12抗体で同定されるH12-vesicleの分布は血小板凝集塊においてかなり特異的であった。すなわち、血小板活性化、凝集によって α 顆粒から放出されるフィブリノゲンの免疫染色では、本蛋白が血小板中心部の granulomere に存在し、その周囲の開放小管系中にはほとんど存在しなかった(図10)。

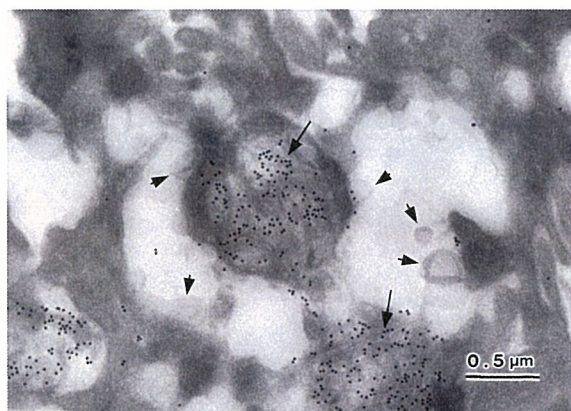


図10. H12-vesicle+トロンビン添加10分の血小板 (フィブリノゲンの免疫染色)

フィブリノゲンの金粒子は主に血小板中心部の granulomere に存在し(矢印)、その周囲の開放小管系中にはほとんど存在しない。ここには vesicle が多数存在する(矢尻)。

D. 考察

今回の検討では、まずフローサイトメトリー

によって、H12-vesicle がトロンビン刺激血小板に特異的に結合し、その結合は経時的に増加することを明らかにした。一方、コントロールのH12を標識していない vesicle はトロンビン刺激血小板に結合しなかった。電顕による形態学的検討でも、本 vesicle がトロンビン刺激血小板の表面に結合することを確認し、コントロールの vesicle は血小板に結合しなかった。さらにH12-vesicleは拡張した開放小管系の膜上に多数存在するという興味深い所見を得た。この開放小管系膜上の vesicle は血小板が凝集した後も多数存在した。フローサイトメトリーの結果からは本 vesicle は表面に結合した後、凝集に伴って血小板間に多く存在するものと想定していたが、それだけではなく、本 vesicle の一部またはさらに多い部分が開放小管系内に移動、取り込まれると考えられた。開放小管系の膜上では、そこに分布している GPIIb/IIIa と vesicle 上のH12が結合するためと考えられる。すでに、H12-vesicle は血小板凝集を促進させることを報告してきたが、凝集促進とこの開放小管系内に分布の関連については不明である。しかし、拡張している開放小管系と血小板と血小板の間の領域との識別が必ずしも簡単でないことから、むしろ拡張している開放小管系の一部は血小板間の領域が含まれていると考えるのが自然であろう。今後、H12-vesicle の凝集促進作用と分布の関係の詳細な検討が必要と思われる。

E. 結論

前もって H12-vesicle とヒト洗浄血小板を混合し、さらにトロンビンを添加して惹起される血小板と本 vesicle との相互反応をフローサイトメトリーで測定するとともに、本 vesicle の動態を電顕で検討した。その結果、フローサイトメトリーによって H12-vesicle はトロンビン刺激血小板に結合し、その結合は経時的に増加することを明らかにした。また、形態学的にも本 vesicle がトロンビン刺激血小板へ結合し、さらに多くの vesicle が開放小管系内に移動することを明らかにした。すなわち、H12-vesicle はコントロールの vesicle に比べてトロンビン

刺激血小板においても、血小板表面および開放小管系内に特異的に結合し、大きな凝集塊を形成させることから、人工血小板として有望と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okamura Y, Handa M, Suzuki H, Ikeda Y, Takeoka S: New strategy of platelet substitutes for enhancing platelet aggregation at high shear rates: cooperative effects of a mixed system of fibrinogen g-chain dodecapeptide- or glycoprotein Iba-conjugated latex beads under flow conditions. J Artif Organs 9: 251-258, 2006

2. 学会発表

なし

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

厚生労働省科学研究費補助金
臨床応用可能な人工血小板としての H12 結合微粒子の
in vivo 評価
2006 年度分担研究報告書

「H12 結合微粒子の in vivo 流動条件下における止血、血栓能の評価」

分担研究者 後藤信哉（東海大学医学部内科学系助教授）
研究協力者 石田英之（東海大学医学部基礎医学系助教授）
田村典子（東海大学医学部内科学系特定研究員）

《研究要旨》高齢化にともない、アスピリン、チクロピジン、クロピドグレルなどの抗血小板薬を、心筋梗塞、脳梗塞の再発予防目的にて使用している症例が増加している。これらの症例において胃がんなどの疾病が発見された場合には、非可逆的作用を有する抗血小板薬を 2 週間程度中止するか、あるいは出血性合併症リスクを覚悟して内視鏡手術などの出血手技を施行する必要がある。後者の選択をした場合に、状況によっては内視鏡手術などにより惹起された出血性合併症をコントロールできず、感染リスクのある血小板輸血などが必要となる場合がある。人工血小板は、抗血小板薬併用中の症例が出血性合併症を発症した時の一時的止血に役立つことが期待される。H12 アルブミン重合体、H12 結合 ADP 含有リポソームはいずれも in vitro の評価系において止血増強効果を呈した。これらの人工物の生体内への投与においては抗原性が問題となる。代表的な抗原提示細胞である樹状細胞の成熟分化におよぼす効果を指標として、人工血小板の抗原性のスクリーニングを試みた。リポソームは抗原性の問題を惹起しないことを示唆された。

1. 研究目的

人工血小板の臨床応用にあたって、適応疾患を選択する必要がある。抗血小板薬により、心筋梗塞、脳梗塞予防を行っている症例は元々血栓リスクが高い。これらの症例が内視鏡手術などの出血手技を必要としたときに人

工血小板はもっとも効率的である。これらの症例を適応と考える限り、止血機能の増強効果は短期間持続すれば十分である。

H12 結合アルブミン重合体、リポソームの止血増強効果およびヒトへの使用における抗原性の問題の有無を

検証した。

2. 研究方法。

健常成人より血液を採取し、選択的抗トロンビン薬であるアルガトロバンにより抗凝固処理を行った。H12 結合アルブミン重合体、ADP 含有リポソームによる止血機能の増強の有無を各々、アルブミン重合体、ADP 含有リポソームと比較した。

これらの粒子の抗原性を検証するために、これらの粒子を未成熟樹状細胞と共培養し、成熟におよぼす効果の有無を検証した。

3. 研究結果

H12 結合アルブミン重合体、ADP 含有リポソームはいずれも native 血小板に結合し止血機能を増強させた(図1)。特に、H12 結合アルブミン重合体、リポソームは血栓の底面に集積する性質を有するため、血栓の3次元的生长による血栓性合併症の発症を増加させることなく、止血機能のみを選択的に改善する可能性が示唆された。

今回のproductはH12含有の有無による底面カパーにははっきりと差があります。 2006.11.14

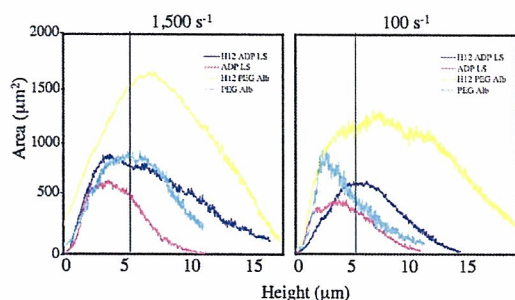


図1. H12 結合アルブミン、リポソームはいずれも底面近くの血栓をより濃密にして止血を増強させる。

さらに、これらの粒子の抗原性を検証したところ、H12 結合アルブミン重合体の存在下における樹状細胞の成熟分化が認められた。

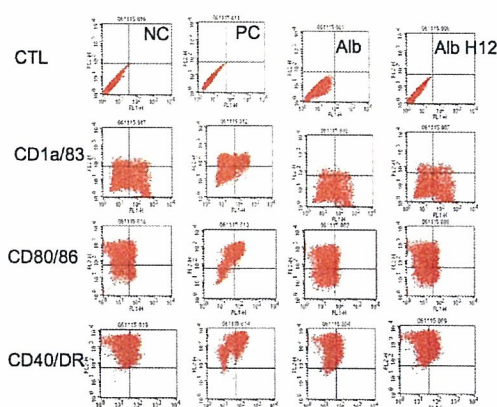


図2. H12 結合アルブミンは若干抗原性を有する

4. 考察

短期間の止血機能の増強との目的ではH12 結合アルブミン、リポソームの有効性がin vivoの検討により示唆された。樹状細胞を指標とした抗原性の検討において短期間の抗原性も少ないことが示唆された。

投与期間の短い、抗血小板薬服用中の内視鏡治療時などを適応とした臨床応用を真剣に考える段階に達したと考察する。

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
分担研究報告書

動物モデルにおける血小板代替物の機能評価法の確立
- ラビット血液を用いた PFA-100 の基礎的検討 -

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 教授
研究協力者 小峰 梨沙 慶應義塾大学医学部内科

研究要旨

今年度はラビット血液を用いた全血血小板機能測定装置 PFA-100 による人工血小板評価系の可能性について 2 つの基礎検討を行った。まず、(1) ラビット血液は PFA-100 で測定可能か検討した。ラビット耳動脈より採血後、collagen/ADP カートリッジ、collagen/Epinephrine カートリッジに血液を分注し PFA-100 にて血小板血栓形成による閉塞時間を測定した。すると、collagen/ADP カートリッジで測定した場合、ヒトと同様な閉塞時間を示したのに対して collagen/Epinephrine カートリッジでは閉塞せず、測定不可能であった。この結果を踏まえて (2) 抗がん剤（ブスルファン）を投与し、血小板減少過程にあるラビットより経時的に採血した血液を collagen/ADP カートリッジにて閉塞時間を測定した。血小板数が低下するとともに閉塞時間は延長し、10 万/ μ l 以下では投与前に比べて約 2 倍以上延長した。しかし、抗がん剤の副作用によりヘマトクリット値も低下したため測定限界である 300 秒までは測定不能であった。今後、血小板減少を起こし、かつヘマトクリット値が変動しない抗がん剤投与量を再検討する必要があると思われた。

A. 研究目的

血小板代替物の機能評価、安全性評価はこれまで in vivo, in vitro ともに様々な検討がなされている。特に in vivo 評価ではラットからラビットへ大型の動物での血小板代替物止血評価が行われている（平成 17 年度分担研究報告書 半田誠報告分）。そこで今年度はラビットの血液を用いた簡便な in vitro 評価系の確立を目的とし、全血血小板機能検査装置 PFA-100（Platelet Function Analyzer）による基礎検討を行った。まず、ラビット血液で PFA-100 測定が可能か二種

のカートリッジを用いて確認した。次に抗がん剤（ブスルファン）を投与し血小板減少過程にあるラビットより経時的に採血した血液を PFA-100 で閉塞時間を測定した。血小板数による閉塞時間の変動を観察した。

B. 研究方法

1. ラビット血液による PFA-100 測定

1.1 .PFA-100 原理

全血血小板機能検査装置である PFA-100 はカートリッジ内にあるキャピラリーで 3.8% クエン酸ナトリウム入り全血（800 μ l）を吸

引させた際に血小板が collagen/ADP、または collagen/Epinephrine が固相化された膜により活性化され血小板血栓を形成し、血流が閉塞するまでの時間を測定する。血小板機能にはほぼ依存しており、凝固系の影響は受けない。抗血小板薬服用時や血小板機能異常では閉塞時間は延長し、血小板が活性化されていると短縮する。測定限界は 300 秒でヒト正常範囲は collagen/ADP は 71~118 秒、collagen/Epinephrine では 94~193 秒である (PFA-100 説明書参考)。

1.2. ラビット血液の採取方法

ニュージーランドホワイトラビット (雄性、11 週齢、2.5kg) は、三協ラボより購入した。ケタミン (60mg/ml)・セラクター (2%) 溶液 (ケタミン/セラクター=3/1(v/v), 2ml) にて麻酔後、23G 注射針にて耳動脈より 3.8% クエン酸ナトリウム入り採血管を用いて採血 (3.8% クエン酸ナトリウム/血液=1/9(v/v)) した。

1.3. PFA-100 測定条件

血液分注量は 800 μ l でそれぞれ collagen/ADP カートリッジ、collagen/Epinephrine カートリッジともに 3 回測定を行った。

2. 血小板減少過程ラビットの PFA-100 測定

2.1. 血小板減少ラビットの作成方法

ケタミン (60mg/ml)・セラクター (2%) 溶液 (ケタミン/セラクター=3/1(v/v), 2ml) にて麻酔後、ブスルファンポリエチレングリコール溶液 (10mg/ml) を 0, 3 日目に下腹部皮下投与 (全投与量 30mg/kg) した。耳静脈より 23G 注射針で経時的に採血し、血小板数、

ヘマトクリット値を測定した (KX-4500、Sysmex)。使用したラビットは実験 1 ヶ月前、既にブスルファン投与により血小板減少状態であった。本実験開始時には血小板数が回復していると見込んで実験を行った。

2.2. PFA-100 測定条件

ラビット採血方法は 1.2. と同様である。ブスルファン 1 回目投与前 (0 日目)、投与後 7、10、13、14、15 日目の 3.8% クエン酸ナトリウム入り採血液 (800 μ l) を collagen/ADP カートリッジにて 3 回測定した。

C. 結果及び考察

1. ラビット血液による PFA-100 測定 (Table 1)

ラビット血液 (血小板数 $23.1 \times 10^4/\mu$ l、ヘマトクリット 41.1%) を用いて PFA-100 測定を行った結果、collagen/ADP カートリッジにおいては平均閉塞時間 116 ± 11 秒でヒト正常範囲と同等であった。ラビットの血小板は ADP によって活性化し血小板血栓を形成したことが明らかとなった。一方、collagen/Epinephrine カートリッジではラビット血液では閉塞しなかった。この原因として Epinephrine とラビットの血小板は反応性がないことが考えられる。また約 220 秒以上過ぎたところで測定エラーとなり測定限界の 300 秒までも測定できない状態となってしまった。エラーのコメントは Maximum syringe travel reached と表示されていた。このエラーはカートリッジ内のキャピラリーが分注した血液サンプルを吸引しきってしまった際に表示されるもので、約 220 秒までで全て血液を吸引してしまったことがわかった。以上の結果より今

後ラビット血液で PFA-100 測定を行う際は collagen/ADP カートリッジを採用し検討することとした。

Table 1 ラビット血液 PFA-100 測定結果

col/ADP(秒)	col/EPI(秒)
108	>220E
128	>238E
112	>232E

Ave. 116±11	—

E:測定エラー(Maximum syringe travel reached)

2. 血小板減少過程ラビットの PFA-100 測定

今回使用した 2 匹のラビットは 1 ヶ月前にブスルファンによって血小板減少状態となっていた。そのため実験開始時のブスルファン投与前の血小板数は $17.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、 $13.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ と正常ラビットより血小板数が低下傾向にあった。ブスルファン投与後 7 日目より血小板数は急激に低下し、13 日目で 2 匹ともに血小板数 $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ を切っていた (Fig 1)。そのときの血小板数に対する PFA-100 測定結果を Fig 3 に示す。血小板数に依存して閉塞時間が延長しているのがわかる。血小板数 $10 \times 10^4/\mu\text{l}$ 以下で閉塞時間は著しく延長し、ブスルファン投与前の血小板数時と比べると 2 倍以上の閉塞時間の差が見られた。血小板数 $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ 以下になると測定限界である 300 秒までにキャピラリーが血液サンプルを吸引し終わってしまいそれ以上閉塞時間を測定ができない状態となってしまった。この原因として考えられることは、ヘマトクリットの低下による血液粘度の低下である。血小板数 $5 \times 10^4/\mu\text{l}$ 以下すなわちブスルファン投与後 13 日目以

降でヘマトクリットの低下が起こり、15 日目では 2 匹のラビットともに投与前に比べて約 4%の低下が見られた。ヘマトクリットが低下することで血液の粘度も低下しキャピラリーの血液吸引速度が上がり、測定限界である 300 秒に到達する前に血液を吸い終えてしまうことが考えられた。

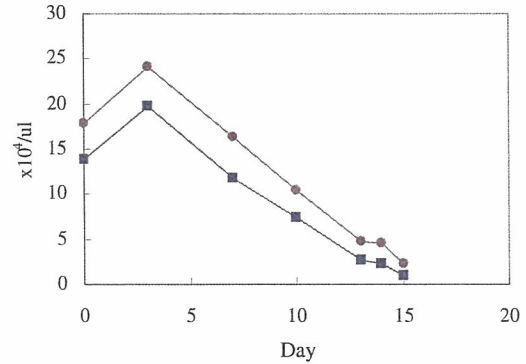


Fig.1 PLT (●Rabbit 1, ■Rabbit 2)

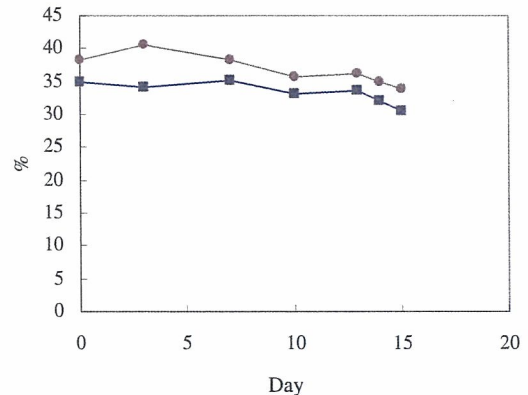


Fig.2 HCT (●Rabbit 1, ■Rabbit 2)

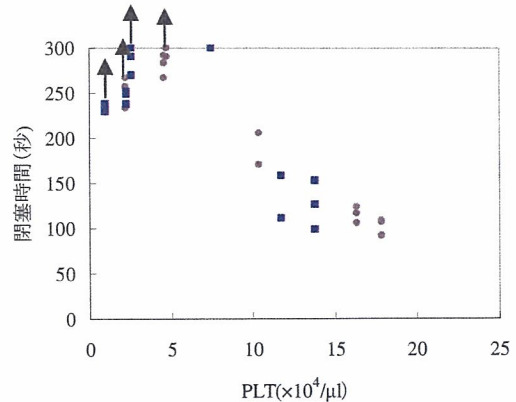


Fig.3 PFA-100 測定結果 (●Rabbit 1, ■Rabbit 2)

↑ は 300 秒以内で血液サンプルをキャピラリーで吸引し終わってしまったことを示す。

D. 結論

ラビット血液を用いて PFA-100 測定を行った結果、collagen/ADP カートリッジ使用時ではヒトと同等な閉塞時間を示したため、測定可能であった。また、血小板数が低下すると閉塞時間の顕著な延長傾向が見られ、血小板数依存的に閉塞時間は変動することが明らかとなった。しかし、ブスルファンの作用により血小板数が低下すると同時にヘマトクリットも低下してしまうため、PFA-100 の測定限界である 300 秒まで閉塞時間 s を測ることができなかった。今後、血小板減少を起こし、かつヘマトクリット値が変動しない抗がん剤投与量を再検討する必要があると思われる。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成18年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュレトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

α IIb β 3 インテグリン活性化機構の解明に関する研究

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

α IIb β 3 インテグリンは血小板の細胞内シグナル経路の活性化 (inside-out signaling) に伴い、その立体構造を bent conformer から extended conformer へ大きく変え、親和性を高めることによってリガンドであるフィブリノーゲンと結合すると考えられている。しかし細胞内でおこった変化がどのようにして細胞外に伝達されるのかそのメカニズムについては全く解っていない。平成17年度の研究で、われわれは inside-out signaling による α IIb β 3 の活性化は α IIb 鎖と β 3 鎖の細胞外 tail 間の結合が解離することによって引き起こされるとする仮説 “relay-switch model” の検証を行った。この結果、実際に α IIb tail と β 3 tail を人工的に解離させることで α IIb β 3 が活性化することがわかった。本年度はさらに研究を進め、この2つの細胞外 tail の解離がどのようにして bent conformer から extended conformer への構造変化を誘導するのか? に関する検討を行った。その結果 α -tail/ β -tail 間の結合解離はインテグリンを bent に保っている β -head/ β -tail 間の結合を不安定にすることで活性化しやすくすることがわかった。すなわち、inside-out signaling による α IIb β 3 活性化では——Step 1) talin 結合によって細胞内 tail の解離がおこる。Step 2) 細胞外 α -tail/ β -tail 結合が不安定となり解離がおこる。Step 3) β -head/ β -tail 結合が不安定となりリガンドとの結合親和性が増す。Step 4) リガンドとの結合によって bent から extended conformer への変換が完成する。——の順番で構造変化が進行し活性化がおこると考えられる。

A. 研究目的

血小板 α IIb β 3 インテグリンは α と β の異なる二つの分子から構成されるヘテロ 2 量体分子である。その構造は

いずれも N 末端側が球状のドメインを形成し、これに続く C 末端側は脚状の tail を形成する。それぞれの tail は細胞膜を 1 回貫通し、短い細胞内 tail

となる。 α と β の球状ドメインは互いに会合し、 α I**IIb** β 3分子は全体として球状の頭部から脚が2本伸びているように見える(図1)。頭部を形成する球状ドメインはリガンドと結合することが解明されているが、脚部の機能は解っていない。

近年の結晶構造解析・電子顕微鏡による単粒子解析の結果、インテグリンは少なくとも二つの異なる3次元構造をもつことが解った。一つは頭部を上に向けた extended conformer、もう一つは tail の途中で 135° 折れ曲がり頭部を下に向けた bent conformer である。 Mn^{2+} あるいは RGD ペプチドの存在下で extended conformer が有意に増加することから、bent conformer がリガンドに対する親和性の低い low affinity form であり、extended conformer はリガンドに対する親和性が高い high-affinity form と考えられた。これらのことからインテグリンは活性化に伴って low-affinity form である bent conformer から high-affinity form である extended conformer へ構造変化をおこすというパラダイムが形成された。われわれの平成15年度および平成17年度の研究でも bent conformer、extended conformer に立体構造が固定された α I**IIb** β 3 はそれぞれフィブリノーゲンに対して低親和性、高親和性を示すことが証明されており、このパラ

ダイムは基本的に正しいと考えられる。しかし α V β 3 インテグリンが bent conformer のままでフィブロネクチンと結合することが電子顕微鏡で示されるなど、このパラダイムを疑問視する結果も報告されている。

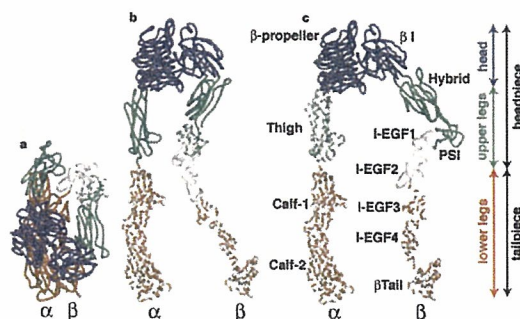


図1

一方、短い細胞内 tail はシグナル分子を含む様々な細胞内タンパク質と結合し、インテグリンが focal adhesion に局在するための情報を含んでいる。近年、talin が細胞内 β 3 tail と結合することにより α I**IIb** β 3 インテグリンを活性化することが報告された。この talin を knock down することで実際にマウス血小板 α I**IIb** β 3 インテグリンのトロンビンによる活性化が抑制されたことから、talin とインテグリン細胞内 tail との結合が inside-out signaling によるインテグリン活性化の最終ステップであると考えられる。一方 NMR を用いた α I**IIb** β 3 細胞内 tail の構造解析から α I**IIb**と β 3の細胞内 tail は互いに会合しており、talin が β 3 tail と結合することにより tail 相互の結合が解離すること

が解った。

以上を総合すると、inside-out signaling では talin が細胞内 tail 間結合を解離することによって、インテグリン細胞外ドメインの bent から extended conformer への大きな構造変化を起こすことになる。しかしながら、このインテグリン細胞内 tail の構造変化がどのようなメカニズムによって細胞外ドメインに伝達されるのか全く解っていない。平成16年度の研究でわれわれは、インテグリン細胞外 tail の解離を阻害することによって inside-out signaling による α IIb β 3 の活性化を完全に抑制できることを報告した。また平成17年度の研究では細胞外 tail を反対に解離させることによって α IIb β 3 の活性化を惹起できることが解った。これらの結果は細胞内 tail の解離に引き続いておこる細胞外 tail の解離がインテグリン細胞外の構造変化を惹起することを示唆している。 α V β 3 の3次元構造では β -tail は α -tail の他に β -head の間で広い結合面を形成している。これらの結果から inside-out signaling による α IIb β 3 の活性化では、 α / β 細胞内ドメイン結合の解離に引き続いて α / β tail 間結合が解離することによって β -head/ β -tail 間の結合が不安定となり、bent conformer から extended conformer への構造変化がおこるとする“relay-switch model”を提唱した。

本年度の研究ではこの仮説のさらなる検証を行い、1) α / β tail の解離によって α IIb β 3 が活性化するためには、 β -head/ β -tail の解離がおこらなくてはならないこと、2) β -head/ β -tail を完全に解離させることで α IIb β 3 の活性化が惹起されるが、これには α / β tail の解離は必要ないこと、3) β -head/ β -tail 間、 α / β tail 間結合をそれぞれ部分的に解離させることで非常に弱い活性化がおこるが、これらを組み合わせることで非常に強い活性化が惹起されることを見いだした。これらの結果は α -tail/ β -tail 間の結合が β -head/ β -tail 間の結合に影響を与えるとする仮説に矛盾しない結果であり、“relay-switch model”でよく説明できる。また、これらの過程で得られた低親和性・高親和性 α IIb β 3 は人工的に活性制御可能な α IIb β 3 分子開発に応用可能であり、その応用法について考察した。

B. 研究方法

I) モノクローナル抗体

本研究では以下のモノクローナル抗体を使用した。

PL98DF6；抗 α IIb 抗体

VNR5-2；抗 β 3抗体

PT25-2；抗 α IIb β 3 活性化抗体

II) 変異 α IIb、 β 3 cDNA の作成。

変異 α IIb cDNA M660XRT、Q595XTT、

M660NRT-F755C、Q595NTT-F755C、F755C、E749A、R751A、E785A、H787A、変異 $\beta 3$ cDNA S367C/S551C、G382C/T564C、V332C/S674C、G382NLT、G382QLT、T564N、T564Q、G382NLT-D606C、T564N-D606C、S357A、R404A、V359C、Y594A、T603A、D606C はともに部位指定変異法を用いて作成した。 α IIB、 $\beta 3$ cDNA は哺乳動物発現ベクター pBJ-1 に挿入して用いた。

III) トランスフェクション

Chinese hamster ovary (CHO) cell は 10%FCS 加 Dulbecco's modified Eagle medium で培養した。Wild-type α IIB-pBJ1 50 μ g とともに変異 $\beta 3$ -pBJ1 50 μ g を電気穿孔法を用いて CHO 細胞にトランスフェクトした。細胞は 48 時間後各種実験に使用した。

IV) FACS

細胞は 3.5mM EDTA 加 PBS にて剥離し、1 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 加 Tyrode-HEPES buffer にて洗浄後一次抗体と 4 $^{\circ}\text{C}$ にて 30 分反応させた。洗浄後、二次抗体として RPE-標識ヤギ抗マウス IgG と 4 $^{\circ}\text{C}$ にて 30 分反応させた後洗浄し、FACS にて細胞表面上への抗体の結合を測定した。ある実験では 1 mM GRGDS ペプチド添加前後での抗体の結合を測定した。

V) フィブリノーゲン結合実験

フィブリノーゲン (Fbg) は FITC で

標識した。まず変異インテグリンを発現した CHO 細胞を抗 $\beta 3$ 抗体 VNR5-2 と反応させた後、RPE-標識ヤギ抗マウス IgG と反応させた。一部の実験では細胞を剥離した後 VNR5-2 と反応させる前に 10 mM DTT と 37 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間反応させた。細胞を 1 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 または 1 mM MnCl_2 を含む Tyrode-HEPES buffer に resuspend したのち 200 μ g/ml の FITC 標識 Fbg と反応させ、細胞に結合した Fbg 量を FACS で測定した。一部の実験では、Fbg とともに活性化抗体である PT25-2 を 10 μ g/ml 添加して行った。この際インテグリンの発現の高い細胞集団 (FL2>500) の領域にゲートを設定し、この領域における FL1 の median fluorescence intensity (MFI) を測定した。

C. 研究結果

インテグリン α -tail/ β -tail の解離は活性化を誘導する。—— α V $\beta 3$ インテグリンの結晶構造 (bent conformer) では、 α -tail と β -tail は広い結合面を形成している。我々はこの結合面に大きな N-糖鎖を挿入することによりこの結合面を解離させることを試みた。このために α -tail を形成する calf-1 ドメインの α -tail/ β -tail 結合面に存在するアミノ酸残基 Met-660 に続く配列を、部位指定変異法を用いて N-糖鎖結合配列である N-X-T/S に置換した (M660NRT)。

この変異 α IIB β 3 を CHO 細胞に発現させ、この細胞と FITC 標識フィブリノーゲン (FITC-Fbg) の結合を FACS で測定した (図 2)。

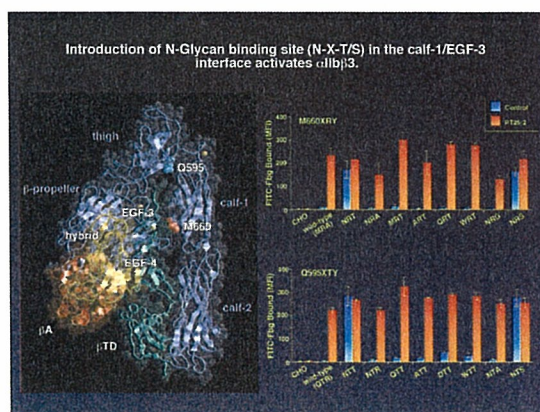


図 2

また対照として α -tail の屈曲部 (genu) に存在する Gln-595 に同様の変異を導入し extended conformer に固定された変異 α IIB β 3 を作成した。通常 CHO 細胞に発現した α IIB β 3 は低親和性であり、そのままでは Fbg と結合することではなく活性化抗体 PT25-2 存在下ではじめて Fbg と結合する。しかし M660NRT、Q595NTT を発現した CHO 細胞は活性化抗体非存在下でも Fbg と結合した。この活性化は N-X-T/S 配列に依存しており、これ以外の配列を導入しても活性化は全く観察されなかった。つまりこの活性化は大きな糖鎖がこれらの部位に実際に結合することによっておこることを意味しており、 α -tail と β -tail が大きく解離することによって α IIB β 3 の活性化がおこると考えられる。

II) α -tail/ β -tail の解離による活性化では細胞膜近傍の解離が特に重要である。——平成 16 年度の研究でわれわれは細胞膜近傍の α IIB 鎖の calf-2 ドメイン (F755) と β 3 鎖の EGF-4/ β T ドメイン (D606) の間に人工的なジスルフィド結合を導入することにより inside-out signaling による α IIB β 3 活性化が完全に抑制されることを報告した。そこでこのジスルフィド結合を M660NRT、Q595NTT に導入 (各々 M660NRT-F755C/D606C、Q595NTT-F755C/D606C) し Fbg 結合に与える影響を調べた (図 3)。この結果 M660NRT による活性化は細胞膜近傍の tail 間にジスルフィド結合を導入することにより強く抑制されることがわかった。

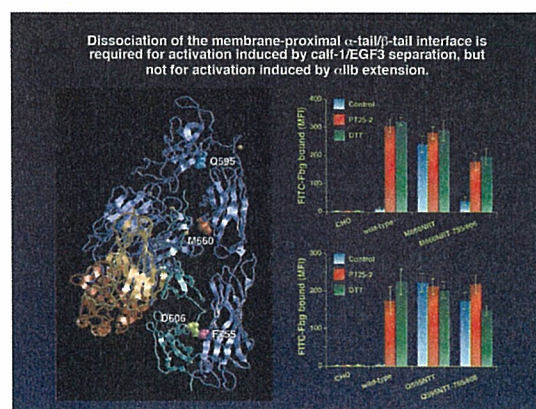


図 3

この結果は α -tail/ β -tail の解離によって誘導される活性化では細胞膜から離れた calf-1/EGF-3 ドメイン間の解離は重要ではなく、細胞膜近傍の calf-2 と EGF-4/ β T ドメインの間の結合解離が

おこることが重要であることを示唆している。実際に細胞膜近傍の calf-2/ β T ドメイン間に N-糖鎖結合部位を導入 (V760NVT) したところ強い活性化が観察された (図 4)。これに対して Q595NTT による活性化は細胞膜近傍にジスルフィド結合を導入してもほとんど影響を受けなかった。これらの結果から α IIb β 3 は extended conformer である限り tail 間結合の有無にかかわらず高活性を示すことがわかった。また活性化の過程において α IIb β 3 の extension は α -tail/ β -tail 解離の後におこると考えられる。

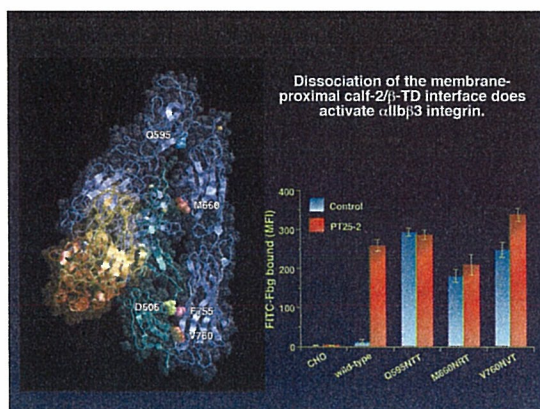


図 4

III) β -head/ β -tail 間結合の解離は α IIb β 3 活性化に必須である。—では α -tail/ β -tail の解離はどのようにして extension を誘導するのであろうか? α V β 3 インテグリンの結晶構造を観察すると bent conformer で β -tail は α -tail だけでなく β -head と広い結合面を形成していることがわかる。この β -head/ β -tail 間の結合はインテグリン

を bent conformer に保つ上で主要な役割を果たしていると考えられる。一方 α -tail/ β -tail 間の結合はインテグリンを bent conformer に保つ直接的な働きは無いと推測される。これらのことから、われわれは α -tail/ β -tail 間結合の解離が extension を誘導するためには β -head/ β -tail 間の結合に影響を与え不安定化させるという仮説を立てた。

この仮説を検証するため、 β -head/ β -tail 間にジスルフィド結合を導入して解離を阻害し、tail の解離あるいは α 鎖 extension によって誘導される活性化に与える影響を調べた (図 5)。 β -head/ β -tail 結合面を形成する hybrid/EGF-3 間 (S367C/S551C)、hybrid/EGF-4 間 (G382C/T564C)、 β A/ β T 間 (V332C/S674C) にジスルフィド結合を導入すると、いずれの場合も DTT 処理によってジスルフィド結合を還元化しない限り、M660NRT、Q595NTT 変異による活性化をほぼ完全に抑制した。

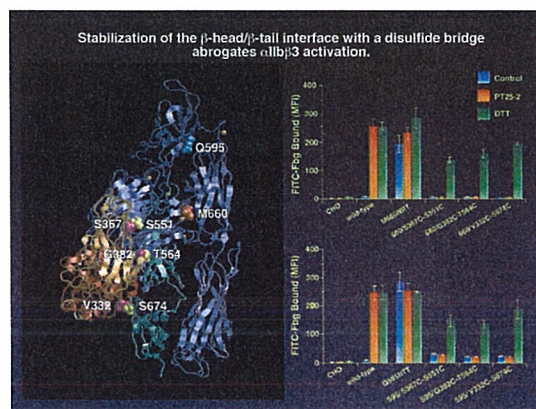


図 5

これらの結果は tail の解離による活性化がおこるためには β -head/ β -tail の解離がおこらなくてはならないことを意味している。また、たとえ α 鎖が extended form であっても β 鎖の β -head/ β -tail 結合が解離しない限り α IIb β 3 の活性化は誘導されないことが判った。

IV) β -head/ β -tail 間結合の解離は活性化を誘導する。— β -head/ β -tail の解離を阻害することによって α IIb β 3 活性化が完全に阻害された。それでは反対に β -head/ β -tail の解離を誘導することによって α IIb β 3 は活性化するであろうか？この疑問に答えるため β -head/ β -tail 間に N-糖鎖を挿入し完全に β -head/ β -tail 間結合が解離した状態の変異 α IIb β 3 を作成し、Fbg 結合に与える影響を調べた (図 6)。

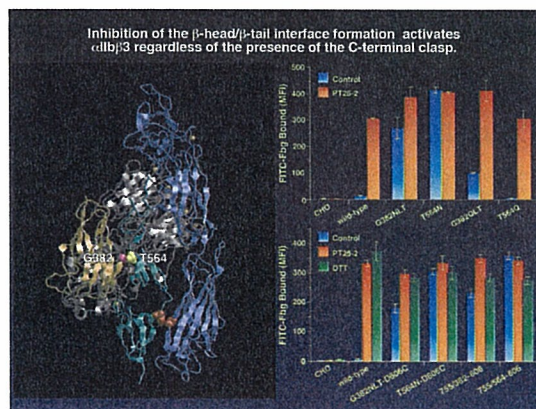


図 6

Hybrid ドメインに N-糖鎖結合部位を導入した G382NLT、EGF-4 ドメインに N-糖鎖結合部位を導入した T564N はともに活性化抗体非存在下でも Fbg を

結合した。これらの変異に類似した G382QLT、T564Q 変異を持った α IIb β 3 と Fbg の結合は減弱していた。これらの結果は G382NLT、T564N 変異によって誘導される活性化は実際に N 糖鎖結合に依存することを示唆している。次に α -tail/ β -tail 間結合がこの活性化に与える影響を調べた。 β 3 鎖の G382NLT、T564N 変異とともに D606C 変異を導入しても活性化に大きな影響を与えなかった。これに α IIb 鎖の F755C 変異を加え、 β 3 鎖 D606C との間にジスルフィド結合が形成されるようにしても、活性化に大きな変化は見られなかった。これらの結果は α -tail/ β -tail 間の結合に関係なく、 β -head/ β -tail 間が完全に解離すれば強い活性化が誘導されることを意味している。つまり α IIb β 3 の活性化の過程において β -head/ β -tail の解離は α -tail/ β -tail 解離の後におこると考えられる。

V) β -head/ β -tail 間結合の解離と α -tail/ β -tail 間結合の解離は α IIb β 3 活性化誘導において相乗的に作用する。—N-糖鎖結合によって誘導される α -tail/ β -tail 間、 β -head/ β -tail 間の解離はいずれも非常に強い活性化を誘導するため、一方の結合解離が他方に与える影響を調べることは不可能である。 α V β 3 インテグリンの結晶構造を観察すると β -head/ β -tail 境界面、 α -tail/ β -tail

境界面に存在する幾つかのアミノ酸残基は互いに接触しており、特にβ-head/β-tail 境界面の Ser-367、Arg-404 と Ser-551、Asp-550 やα-tail/β-tail 境界面のβ3 残基 Tyr-594、Thr-603 とαIIb 残基 Glu-785 は水素結合で結合している (図7)。

そこでこれらのアミノ酸残基を Ala 残基に置換して内因性のβ-head/β-tail 間結合、α-tail/β-tail 間結合を部分的に切断しすることで、これらの結合がαIIbβ3 活性化に及ぼす影響を調べた。

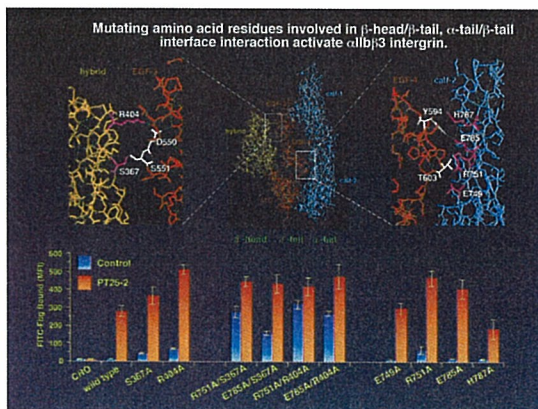


図7

N-糖鎖を挿入した場合と異なり、β3 鎖の S367A、R404A 変異は非常に弱い活性化を誘導するだけであった。同様にαIIb 鎖の E749A、R751A、E785A、H787A 変異は強い活性化を誘導することは無く、R751A、E785A がごくわずかな活性化作用を有するのみであった。しかし、β3 鎖の S367A、R404A とαIIb 鎖の R751A、E785A を組み合わせることによって著明な活性化がみられた。これらの結果はαIIbβ3 活性化

においてβ-head/β-tail 間結合の解離とα-tail/β-tail 間結合の解離が相乗的に作用することを意味しており、α-tail/β-tail 間結合が減弱することによって実際にβ-head/β-tail 間結合の解離が促進されると解釈できる。

D. 考察

αIIbβ3 インテグリンは血小板活性化に伴いその立体構造を変化させてリガンドとの結合親和性を高めることによって機能する分子である。この結合親和性が細胞内のシグナル経路の活性化によって著明に変化することから、αIIbβ3 はインテグリン活性化シグナルの研究対象となり、細胞内 tail とシグナル分子の結合が活性変化を惹起することが解ってきた。一方、αIIbβ3 と Fbg 結合メカニズムについても古くから研究されており、多少の異論があるものの、最近では細胞外ドメインの立体構造が bent conformer から extended conformer に変化することによって活性化がおこると考えられている。しかしながら、なぜ短い細胞内 tail の構造変化が細胞外ドメインの大きな構造変化を惹起するのかそのメカニズムは解っていない。われわれは本研究で 1) インテグリンα-tail とβ-tail を完全に解離させることにより強い活性化が誘導できること、2) この活性化はβ-head とβ-tail の解離に依

存すること、3) β -head/ β -tail を完全に解離させることにより強い活性化が誘導されるが、この活性化は α -tailと β -tailの解離に依存しないこと、4) β -head/ β -tail 間結合を減弱させることで弱い活性化が誘導されるが、同時に α -tail/ β -tail間結合を弱めることによって非常に強い活性化が誘導されることを見いだした。これらを総合するとわれわれが提唱した“relay-switch model”は基本的には正しく、 β -head/ β -tail 間結合の解離は α -tail/ β -tail間結合の解離の後におこり、 α -tailと β -tailが開くことによって β -headと β -tailの間の結合が弱まり、bentからextendedへの構造変化が促進されると推測される。すなわちinside-out signalingによる α I**IIb** β 3活性化では——Step 1) talin 結合によって細胞内 tail の解離がおこる。Step 2) 細胞外 α -tail/ β -tail間結合が不安定となり解離がおこる。Step 3) β -head/ β -tail間結合が不安定となりリガンドとの結合親和性が増す。Step 4) リガンドとの結合によって bent から extended conformer への変換が完成する。——の順番で構造変化が進行すると考えられる(図8)。これまでの研究から完全に bent conformer に固定されたインテグリンは不活性で、extended conformer に固定されたインテグリンは非常に高い活性を持つことが解っ

ている。しかし本研究からわかるように完全な extended conformer とならなくても β -head/ β -tail 間結合がある程度緩むことにより、インテグリンはリガンドとの親和性を増し結合することが可能になると考えられる。これらの結果は実験条件によってはインテグリンが bent conformer のままでリガンドと結合することが可能であることを示唆しているが、extended は bent conformer よりも高い活性をもつとする基本的な結果は変わらない。

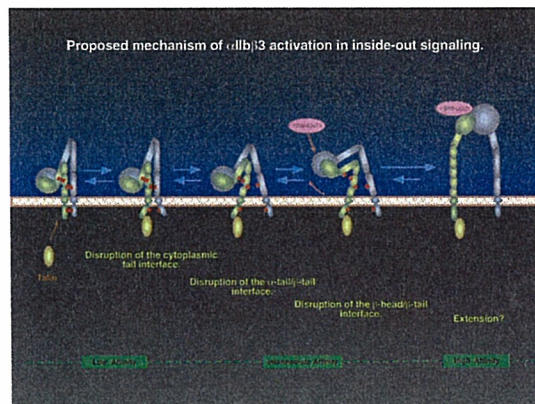


図 8

われわれは本研究の過程で様々な conformer に固定され、その結果異なる活性を有する多くの α I**IIb** β 3を開発・作成してきた。これらの遺伝子組み換え分子は以下のように様々な方法で人工血小板の開発に応用することができる。1) 人工粒子上に変異 α I**IIb** β 3を結合させることにより、将来的に活性制御可能な凝集能を有する人工粒子を開発する上で利用できる。2) 高活性を有する変異 α I**IIb** β 3