

- PROS1 gene in a deep vein thrombosis patient with protein S deficiency. *Thromb Haemost.* 2007;98(4):783-9. 2007
11. Takahashi S, Ushida M, Komine R, Shimodaira A, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Ikeda Y, Murata M: Platelet responsiveness to in vitro aspirin is independent of COX-1 and COX-2 protein levels and polymorphisms. *Thrombosis Research*. 2008;121(4):509-17. Epub 2007 Jul 13.
 12. Matsubara Y, Murata M, Watanabe G, Ikeda Y: Enhancing effect of the (145)Met-allele of GPIb alpha on platelet sensitivity to aspirin under high-shear conditions. *Thrombosis Research*. 2008;123(2):331-5. Epub 2008 Apr 16.
 13. Ishikawa J, Okada H, Kato H, Takeshita S, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y, Kokubo Y, Okamura T, Tomoike H, Miyata T: Association of Asn221Ser mutation in tissue factor pathway inhibitor beta with plasma total TFPI level. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2008
 14. Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, Okada H, Takeshita S, Sakata T, Kokame K, Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y: Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thrombosis Research*. 2008
 15. Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y. Polymorphisms of platelet membrane glycoproteins. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis*, 277-289, 2008
 16. Yabe M, Matsubara Y, Takahashi S, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Murata M, Ikeda Y. Alpha 2A adrenergic receptor polymorphism is associated with plasma von Willebrand factor levels in a general population. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 19: 395-399, 2008
 17. Matsubara Y, Murata M, Watanabe G, Ikeda Y: Enhancing effect of the (145)Met-allele of GPIb alpha on platelet sensitivity to aspirin under high-shear conditions. *Thromb Res*. 2008;123(2):331-5. Epub 2008 Apr 16.
 18. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, George JN: Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: a series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br J Haematol*. 2009 Mar;144(5):742-54. Epub 2008 Nov 26.
 19. Matsubara Y, Saito E, Suzuki H, Watanabe N, Murata M, Ikeda Y. Generation of megakaryocytes and platelets from human subcutaneous adipose tissues. 2009 Jan 23;378(4):716-20. Epub 2008 Dec 6.

2. 学会発表

1. Murata M, Ikeda Y: JPPP:the Large-Scale Randomized Controlled Trial of Primary Prevention of Atherothrombotic Diseases By Enteric-Coated Low-Dose Aspirin in Japan. **The 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis and Hemostasis**. Suzhou China, 2006
2. Homma K, Ogata T, Fukami M, Murata M, Hasegawa T: Diagnosis of P450 oxidoreductase deficiency using urine steroid profile by gas chromatography/mass spectrometry. **The 9th International Congress of the Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine**. Kobe Japan October 2006
3. 79.Isobe K, Matsubara Y, Takahashi S, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ishikawa M, Matsushita K, Iwanaga S, Ogawa S, Watanabe G, Ikeda Y, and Murata M :The genotype combination of the P2Y12 gene might confer greater risk for coronary artery disease. **48th Annual Meeting and Exposition**, Orlando, Florida December2006
4. M, Matsubara Y, Takahashi S, Ishihara H, Shibano T, Miyaki K, Omae K, Watanabe G, Murata M, Ikeda Y: Identification of ADRA2A polymorphisms related to shear-mediated platelet function by the PFA-100[®] system. **The 12th Meeting on Thrombosis & Rheology**. Tokyo, Japan March2007
5. Mitsuhashi T, Murata M: Study on precision control of blood morphology tests using virtual slides. **20th The International Society for Laboratory Hematology**, Maiami, Florida May 2007
6. Mariko Y, Matsubara Y, Takahashi S, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Murata M, Ikeda Y: Genetic factors for determination of plasma VWF levels in a general population. **21th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**. July 2007 Geneva
7. Matsubara Y, Murata M, Yabe M, Ikeda Y: Effect OF hTERT transfection on gene expression profiling in normal human coronary artery endothelial cells. **21th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**. July 2007 Geneva
8. Moriki T, Maruyama I, Yamaguchi Y, Igari A, Yasuo I, Murata M: Identification of ADAMTS13 Epitopes Required for Binding to von Willbrand Factor using lambda phage surface display. **49th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology**, Atolanta, GA. USA, December, 2007
9. Wada H, Itsuo T, Sugino M, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, Matsumoto M, Fujimura Y: Investigation of thrombotic thrombocytopenic purpura(TTP)/ thrombotic microangiopathy(TMA)in Japan. **49th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology**, Atolanta, GA. USA, December, 2007
10. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Isonishi A, Matsuyama T, Kato S,

- Ishizashi H, Shida Y, Nishio K, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuraishi Y, Imamura Y, Inomue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Sugimoto M, Wada H, Murata M, Miyata T, Ikeda Y: Natural history of 33 patients with Upshaw-Schulman syndrome has revealed that all the gravida develop thrombocytopenia, often followed by thrombotic microangiopathy with stillbirth. **49th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology, Atolanta, GA. USA, December, 2007**
11. Emi S, Matsubara Y, Suzuki H, Ikeda Y, Murata M: Megakaryocytes and functional platelets obtained from human subcutaneous adipocytes in an in vitro differentiation system. **49th Annual Meeting and Exposition, The American Society of Hematology, Atolanta, GA. USA, December, 2007**
 12. Korenaga M, Umemura A, Tagawa T, Iwao T, Chiba M, Noda M, Miyano K, Taniguchi T, Kannami A, Hattori S, Suzuki H, Okamura Y, Takeoka S, Murata M, Kajimura M, Suematsu M, Handa M, Ikeda Y: High Shear responsive thrombus-targeting nanoparticles. **9th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Maui, Hawaii, December, 2007**
 13. Yo K, Suzuki M, Kurihara T, Kobayasi Y, Murata M, Aikawa N: Derivation of the risk stratification system of the blood stream infection for severely burned patients. **The 14th Congress of the International Society for Burn Injuries** Canada Montreal Sep 2008
 14. Yokoyama K, Tsukada Y, Matsubara Y, Kawai T, Oikawa Y, Shimada A, Shibano T, Itoh H, Murata M, Ikeda Y: ANALYSIS OF PLATELET FUNCTION OF JAPANESE TYPE 2 DIABETIC PATIENTS. 5th conference of the Asian-pacific society on Thrombosis&Hemostasis. 2008Sep Singapore
 15. Mitsuhashi T, Murata M: Development and evaluation of usefulness of a virtual slide database. 21th The International Society for Laboratory Hematology. April-May2008 Sydney Australia
 16. Murata M: Inter-individual Variation of Platelet function and anti-platelet drug resistance - is monitoring necessary? 21th The International Society for Laboratory Hematology. April-May2008 Sydney Australia
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
なし

平成 18-20 年度「政策創薬総合研究事業総合研究事業」
『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』

分担研究報告書

＜H12 結合微粒子の止血メカニズム＞

H12-リボソームの凝集促進作用に関する形態学的検討

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)が結合したリボソーム(H12-リボソーム)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。18-19 年度はこの凝集促進作用の機構を解明するために、H12-リボソームとトロンビン刺激血小板との相互反応をフローサイトメトリーおよび電子顕微鏡を使う形態学的検討を行い、本リボソームはトロンビン刺激血小板に経時的に増加して結合し、結合したリボソームは活性化血小板の開放小管系中および血小板間に分布することによって凝集を増大させることを明らかにした。20 年度は H12-リボソームの凝集促進作用をより強いものにするためにリボソームに ADP を内包し、その凝集惹起作用の効果が出やすいリボソームの膜流動性および被覆層数について検討した。その結果、ADP 内包した流動性の大きいリボソームは、ヒト PRP の ADP 凝集において促進的な効果を示し、これらは凝集塊の血小板間に存在した。しかし、流動性の小さいリボソームは凝集促進効果を示さず、血小板間の分布はまばらであった。被覆層数2層の ADP 内包リボソームは単層のものに比較すると、ADP 凝集がわずかに低下したが、凝集塊の血小板間における分布は単層のものと同様であった。すなわち、ADP 内包 H12-リボソームは流動性が大きく単層のものが、人工血小板としての止血効果を示すであろうと考えられた。

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)を結合させたリボソーム (H12-リボソーム)は、血小板凝集を促進させることが判明し、生体内で止血作用を発揮するための人工血小板のひとつの候補としてこれまで検討してきた。平成 18-19 年度は、本リボソームの血小板凝集促進作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、20 年度は H12-リボソームの凝集促進作用をより強いものにするために ADP を内包したリボソームを作製し、凝集惹起剤としての ADP の効果が出やすいリボソームの流動性および被覆層数について検討した。これらの結果から in vivo で最も効果的に止血する人工血小板としての H12 結合微粒子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-リボソーム結合の解析

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、 1.0×10^6 個/ μ l に調整した。この洗浄血小板 50 μ l に carboxyfluorescein (CF)を標識した H12-(CF)リボソーム(最終濃度 3 mg/ml)または同濃度のコントロール(CF)リボソームを 10 μ l 加え、さらにヒトトロンビン(最終濃度 0.1 U/ml)を加えて凝集が生じないように混合後、37°C で 30 秒、1分、5分および 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(FACS Calibur)で測定し、トロンビン刺激血小板に対する H12-(CF)リボソームの結合を解析した。

2) H12-リボソームの超微形態とトロンビン刺激血小板との相互反応の形態的解析

まず最初に、H12-リボソームを凍結超薄切片法で観察した。すなわち、H12-リボソームに0.2%グルタルアルデヒドを等量加え、4°Cで10分間固定した。遠心して得たペレットをPBSで洗浄、1Mショ糖液中で1時間、さらに2.3Mショ糖液中に一昼夜浸漬した。この試料を凍結用試料ピンに載せて液体窒素中で凍結後、超ミクロ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。一部の試料は、H12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抗体でインキュベートし、さらに直径15 nmのコロイド金標識ヤギ抗ウサギ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。

次いで、本リボソームとトロンビン活性化血小板との反応は以下のように行った。すなわち、1)と同様の洗浄血小板を 4.0×10^8 個/ μl に調整した。この洗浄血小板1 mlにH12-リボソームまたはコントロールのリボソーム(最終濃度2 mg/ml)を加え、さらにヒトトロンビン(最終濃度0.1 U/ml)を加えて37°Cで10、30秒および5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。遠心してペレットを作製後、常法に従って四酸化オスマウム後固定、脱水、Epon包埋、超薄切、電子染色して透過型電顕で観察した。固定試料の一部は上記と同様に凍結し、超薄切片を得てH12の免疫染色、酢酸ウランで電子染色して観察した。

3) ADPを内包した膜流動性または被覆層数の異なるH12-リボソームの作製とネガティブ染色法または凍結超薄切片法による観察

膜流動性の異なる3種類のH12-リボソームを作製し、DMPC(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine)、DPPC(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine)、DSPC(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine)とした。膜流動性はDMPC > DPPC > DSPCの順を示す。またDPPCは室温または60°Cで造粒し、一重、二重の膜を持つリボソームを調整、さらにADPを内包してH12-(ADP)

リボソームとした。これらをネガティブ染色法と凍結超薄切片法で観察した。

ネガティブ染色法は蒸留水で100倍に希釈したH12-リボソームを予めフォルムバーム膜を張った電顕用グリッドメッシュに5 μl 載せ、5分間静置した。濾紙で過剰液を吸い取り、さらに2%酢酸ウランを5 μl 載せ、1分後に過剰液を吸い取り乾燥させた後、透過型電顕で観察した。一部のグリッドメッシュに載ったH12-リボソームは水洗、さらにPBSで洗浄、BSAでのブロッキング後、H12の免疫染色し、同様に酢酸ウラン染色後、観察した。

凍結超薄切片法は2)と同様に試料を調整し、酢酸ウランのみで電子染色、またはH12の免疫染色、さらにウラン染色して観察した。

4) 膜流動性のまたは被覆層数の異なるADP内包H12-リボソームのヒトPRPのADP凝集に対する効果の検討

1)のように得た健康成人のPRPを貧血小板血漿(PPP)で血小板数を 2×10^8 個/ μl に希釈した。これに上記で作製した膜流動性の異なる3種類のH12-(ADP)リボソーム(2 mg/ml)、さらにADP(80 μM)を加え、凝集を測定した。同様に、被覆層数の異なるH12-(ADP)リボソーム(DPPC)のADP凝集に対する効果も検討した。

5) 凝集塊の電顕観察

4)と同様の凝集させた5分後のPRP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。遠心してペレットを作製後、これをPBSで洗浄し、以下2)と同様に凍結し、超薄切片を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-リボソームの分布を同定するために、2)と同様にH12の免疫染色をして観察した。

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-リボソーム結合の解析

トロンビン添加前、添加後30秒、1、5、10分後に試料を採取して測定した(図1)。H12-リボソームのトロンビン刺激血小板への結合は、30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、コントロールリボソームはほとん

ど結合しなかった。

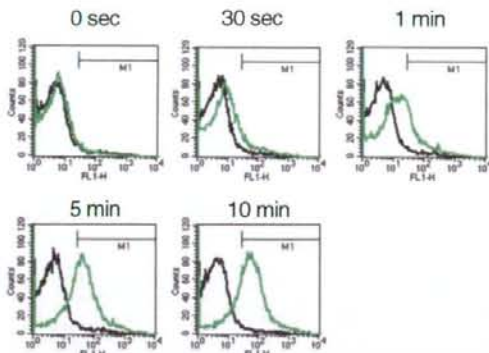


図1. H12-(CF)リボソームのトロンビン刺激血小板への経時的結合増加を示すフローサイトメリー

H12-リボソーム(緑線)はトロンビン刺激時間依存性に血小板に対する結合が増加し、ほぼ5分で平衡に達している。

2) H12-リボソームの超微形態とトロンビン刺激血小板との相互反応の形態的解析

H12-リボソームを凍結超薄切片法で観察すると、直径 100~400 nm 前後の粒子状を示し、リボソームに特徴的な二重膜も観察された(図 2A)。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、金粒子はリボソーム上に特異的に分布した(図 2B)。

洗浄した血小板浮遊液にコントロールまたはH12-リボソームのみを添加した時、血小板は基石状の形態を示し、また顆粒、開放小管系などの細胞内小器官にも変化はなかった。さらに、トロンビンを添加後 10 秒、30 秒では血小板中央部に顆粒の中心化、顆粒の放出像が観察されたが、やはりコントロールまたは H12-リボソームの血小板に対する添加の差は見られなかった。しかし、超薄切片法では両リボソームは電顕下に可視化されなかった。コントロールと H12-リボソームの違いが見られたのはトロンビン刺激5分後であった。すなわち、H12-リボソームの5分のは開放小管系が著しく拡張していた(図 3)。開放小管系の中には、顆粒成分とは思われない物質が存在した。これらの形態は球状に観察されたことから、リボソームの残骸と考えられた。

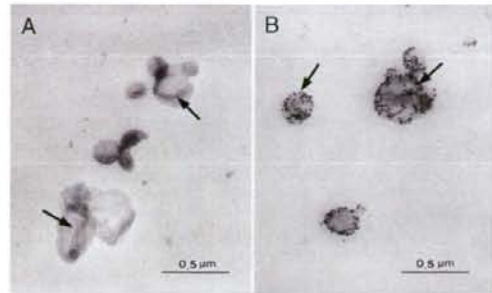


図2. 凍結超薄切片法によるH12小胞体の電顕像と抗H12抗体を使った免疫電顕像

H12-リボソームは直径 200~500nm で、つぶれた球状のように観察されるが、二重膜構造も見られる(A、矢印)。抗H12抗体を使う免疫電顕法では、表面にはH12の存在を示す金粒子が分布している(B、矢印)。

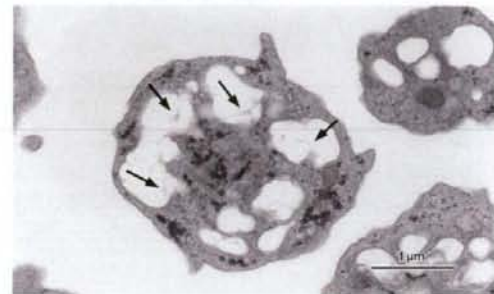


図3. H12-リボソームさらにトロンビン添加5分の血小板。血小板顆粒は消失している。超薄切片法ではリボソームは溶けてしまったために観察されないが、拡張している開放小管系(OCS)中には顆粒成分以外のものが見られ(矢印)、これらはリボソームの残骸と思われる。

次いで、H12-リボソーム、さらにトロンビンを加えた5分後の血小板の凍結超薄切片を抗 H12 抗体、さらに直径 15 nm の金粒子標識二次抗体で孵置して電顕観察すると、H12 の存在を示す金粒子が血小板外側の表面膜および拡張している開放小管系の内部に分布していた(図4)。これらの部位を拡大して観察すると、リボソームの外形がうっすらと識別され、金粒子はこれらのリボソームの外側に沿って円状に分布した。また、開放小管系内のH12-リボソームは開放小管系の膜上に結合していることが判明した。

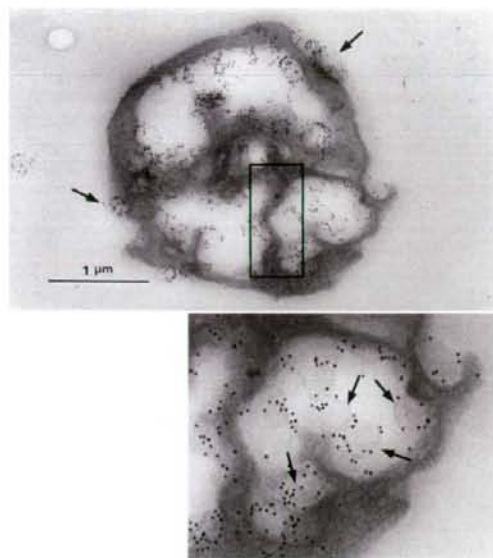


図4. 抗H12抗体によるH12-リボソーム+トロンビン添加5分の免疫電顕像

H12-リボソームの金粒子は、血小板表面(矢印)と拡張した開放小管系中に分布している。(拡大図)OCSに球状で二重膜をもつリボソームが確認され、この表面に金粒子が結合している(矢印)

H12-リボソームを加え、さらにトロンビンを添加して攪拌すると、大きな凝集塊が形成された。この時、この凝集を凍結超薄切片法で観察すると、凝集している血小板の間には大きな隙間が観察され、隙間の表面には H12-リボソーム存在していた(図5)。

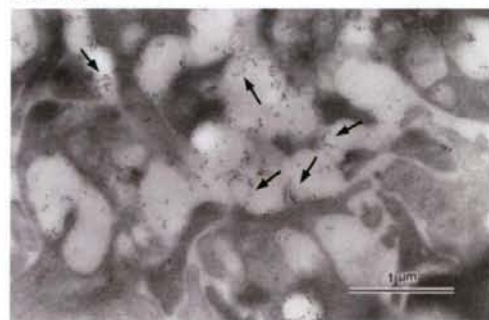


図5. トロンビン凝集5分時のH12-リボソームの分布

金粒子が結合している H12-リボソーム(矢印)の存在部位は、血小板が複雑に凝集しているために必ずしも明瞭ではないが、血小板と血小板の間または開放小管系中に分布している。

3) 膜流動性または被覆層数の異なる H12-(ADP)リボソームの作製とネガティブ染色法または凍結超薄切片法による観察

DMPC、DPPCおよびDSPCをネガティブ染色で観察すると、それぞれのリボソームは直径 200 nm 前後の粒子として観察された(図6)。しかし、流動性が最も高い DMPC は突起状のものが観察された。DPPC または DSPC には突起様構造が見られず、丸い形状を示した。

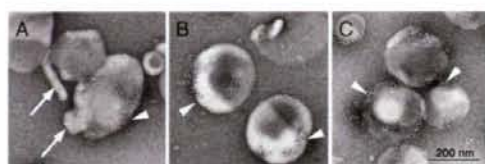


図6. H12-リボソームのネガティブ染色像

A) DMPC はリボソーム本体から出現した突起が見られる(矢印)。B) DPPC は丸い形状を示す。C) DSPC も球状に観察される。リボソーム表面には H12 の存在を示すコロイド金が分布する(矢印)。

凍結超薄切片法ではそれぞれのリボソームは、ネガティブ染色像よりやや小さめに観察された(図7)。しかし、DMPC では突起様構造は観察されず、球状を示した。リボソームの断面像では、リボソーム特有の脂質二重層が観察された。H12 の存在を示すコロイド金も表面に分布した。一方、60°C で像粒された DPPC は膜構造が複雑で、一部では2層に観察された(図8、矢印)

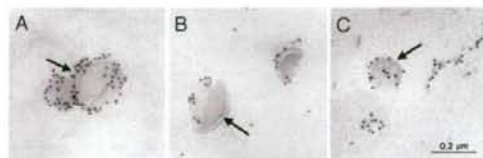


図7. H12リボソームの凍結超薄切片像

DMPC (A)、DPPC (B)および DSPC (C)は直径 200 nm 前後の球状を示し、断面には脂質二重層が観察される(矢印)。表面には H12 の存在を示すコロイド金が分布する。

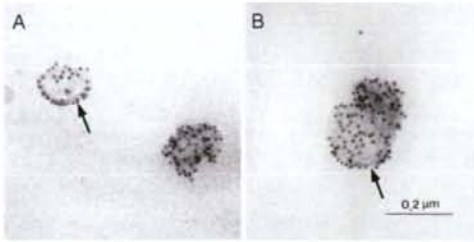


図8. 室温または 60°C で造粒した DPPC の凍結超薄切片像

(A) 室温で造粒した DPPC は膜構造が単層を示す(矢印)。(B) 一方、60°C のものは膜構造が複雑で、一部では2層に観察される(矢印)

4) 膜流動性または被覆層数の異なる ADP 内包 H12-リポソームのヒト PRP の ADP 凝集に対する効果の検討

ヒト PRP にコントロールの H12-リポソーム(DPPC) または ADP を内包した DMPC, DPPC, DSPC を加え (2 mg/ml)、さらに ADP (80 μM) を加えた(図9)。コントロールの H12-リポソームでは、ADP 凝集に特有な二次凝集が強く惹起されず、凝集が解離する傾向を示した。DMPC および DPPC の添加では強い二次凝集が見られ、凝集がさらに促進された。一方、DSPC ではコントロールとほぼ同様な凝集を示し、二次凝集が解離した。

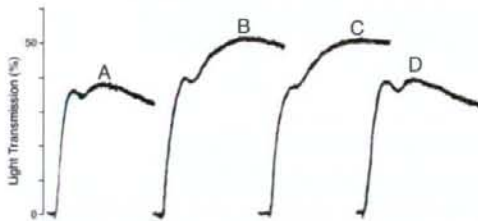


図9. コントロール H12-リポソーム、ADP を内包する DMPC, DPPC, DSPC の ADP 凝集に対する効果

PRP にそれぞれのリポソームを加え、さらに ADP を添加した。コントロール (A) に比べて、DMPC (B) と DPPC (C) はヒト PRP の ADP 凝集を促進させる。しかし、DSPC (D) は促進させない。

一方、被覆層数の異なるように調製したリポソームは、室温で造粒したコントロールの ADP 内包リポソームが 1.0 ± 0.3 枚膜であった。同様に室温で造粒した H12-(ADP)リポソームは 1.1 ± 0.2 枚膜であった。他方、60°C で造粒した H12-(ADP)リポソームは 1.8 ± 0.3 枚膜であった。これらリポソ-

ームのヒト PRP に対する ADP 凝集では(図 10)、コントロールの 1.0 ± 0.3 枚膜をもつ ADP 内包リポソームでは、約 35% の透光度の上昇を示して凝集した後、解離した。室温で造粒し、 1.1 ± 0.2 枚膜をもつ H12-(ADP)リポソームでは 50% 以上の透光度の上昇を示し、凝集は促進されて解離は示さなかった。一方、60°C で造粒した 1.8 ± 0.3 枚膜をもつ H12-(ADP)リポソームでは凝集が室温で造粒したものよりわずかに減弱していた。

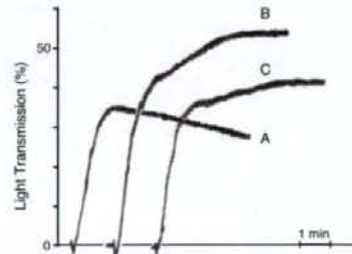


図10. 被覆層数の異なる H12-(ADP)リポソーム(DPPC) の ADP 凝集に対する効果

(A) 室温で造粒し 1.0 ± 0.3 枚膜を持つコントロールの ADP 内包リポソームは解離性の凝集が起こる。(B) 室温で造粒し 1.1 ± 0.2 枚膜をもつ H12-(ADP)リポソームは強い凝集を示し、非解離性である。(C) 60°C で造粒し 1.8 ± 0.3 枚膜をもつ H12-(ADP)リポソームでは室温の1枚膜のものより凝集が低下している。(PRP: 2.0×10^6 /μL、リポソーム: 1×10^8 個、ADP: 4 μM)

5) 凝集塊の電顕観察

ウサギ抗 H12 抗体、さらにコロイド金標識ヤギ抗ウサギ抗体による免疫染色を行い、ヒト PRP の ADP 凝集5分時の DMPC, DPPC および DSPC の分布を観察した。

凝集能の測定で DMPC と DPPC による ADP 凝集は非解離性の強い凝集を示したが、電顕下でもこれらの血小板は著しく変形し、大きな凝集塊の形成が観察された(図 11)。DMPC による ADP 凝集では、変形した血小板間に H12 の存在を示すコロイド金をもつリポソームが多く分布していた(図 11A、矢印)。同様に、DPPC による ADP 凝集でも、凝集塊中に多くのリポソームが分布していた(図 11B、矢印)。しかし、DSPC による凝集では血小板相互の接着が弱く、観察されるリポソームは少なかった(図 11C)。

被覆層数の異なるように調製したリポソームによる ADP 凝集では凝集能と同様に大きな違いは観

察されなかった(図 12)。室温で造粒し 1.1 ± 0.2 枚膜の H12-(ADP)リボソームは血小板間に数多く分布した(図 12A)。また、 60°C で造粒し 1.8 ± 0.3 枚膜をもつ H12-(ADP)リボソームも大きな凝集塊中に分布した(図 12B)。

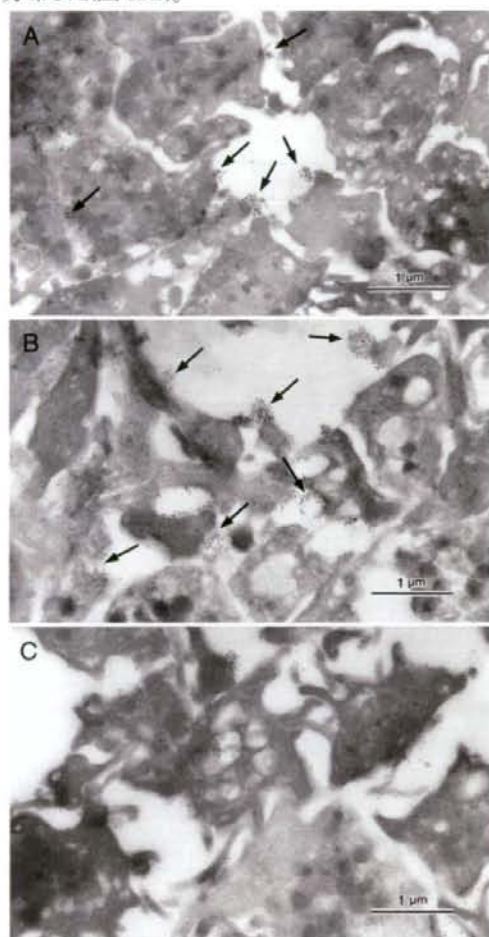


図 11. ヒト PRP の ADP 凝集における流動性の異なる ADP 内包 H12-リボソームの分布

(A) DMPC による ADP 凝集では、変形した血小板間に H12 の存在を示すコロイド金をもつリボソームが多く分布している(矢印)。(B) DPPC による ADP 凝集では、DMPC と同様に凝集塊中に多くのリボソームが分布している(矢印)。(C) しかし、DSPC による凝集では血小板相互の接着が弱く、観察されるリボソームは少ない。

D. 考察

H12 を結合させたリボソーム(H12-リボソーム)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。本リボソームは H12 を介して活性化血小板の

GPIIb/IIIa に結合し、さらに凝集に伴って血小板間に多く存在することによって凝集を促進させると想定された。そこで、平成 18-19 年度は H12-リボソームとトロンビン刺激血小板の反応をフローサイトメトリーおよび形態学的に観察し、本リボソームと活性化血小板および凝集血小板の相互関係について検討した。その結果、以下のことが明らかになった。

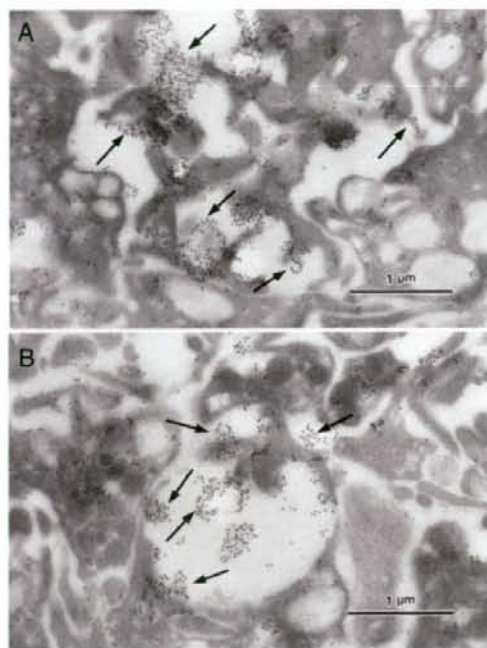


図 12. ヒト PRP の ADP 凝集における被覆層数の異なる ADP 内包 H12-リボソームの分布

(A) 1.1 ± 0.2 枚膜の H12-(ADP)リボソームによる ADP 凝集では、変形した血小板間に H12 の存在を示すコロイド金をもつリボソームが多く分布している(矢印)。(B) 1.8 ± 0.3 枚膜をもつ H12-(ADP)リボソームによる ADP 凝集では、DMPC と同様に凝集塊中に多くのリボソームが分布している(矢印)。

フローサイトメトリーによって、H12-リボソーム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した。電顕による形態学的検討でも、本リボソーム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、さらに H12-リボソームは拡張した開放小管系中に存在するという興味深い所見を得た。フローサイトメトリーの結果からは本リボソーム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、本リボソームの一部またはさらに多くの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 とリボソーム上の H12 が結合するためと考えられる。すでに、H12-リボソーム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られる。いずれにしても、H12-リボソームによる凝集促進作用は、トロンピン刺激血小板において本リボソームが血小板表面および開放小管系内に特異的に結合し、さらに血小板間にも分布するようになり、最終的に凝集塊を増大させる機構であることが形態学的に明らかになった。

20 年度は、H12-リボソームに ADP を内包させた。ADP は血小板濃染顆粒に存在し、血小板活性化時に血小板外に放出され、凝集の促進作用をもつ。すなわち、ADP が内包された H12-リボソームの凝集促進作用は単なる H12-リボソームより強くなると考えられた。また、流動性または被覆層数の異なるリボソームも作製した。内包した ADP がその効果を発揮するためには、H12-リボソームが血小板に結合した後、リボソームから漏れ出なければならない。そこで、流動性または被覆層の異なるリボソームを作製し、どの条件の H12-リボソームが内包した ADP の効果が出やすいかを把握するために、まずそれぞれのリボソームの形態観察を行い、さらに血小板凝集で検討した。

流動性が DMPC > DPPC > DSPC となるこれらのリボソームをネガティブ染色法または凍結超薄切片法で観察すると、それぞれは大差なく直径 200 nm 前後の粒子として観察された。凍結超薄切片法ではこれらの断面に単層の脂質二重層が観察された。ただし、DMPC はネガティブ染色法で本体から突起状のものが出現していた。この所見は凍結超薄切片法では見られなかった。すなわち、ネガティブ染色法は試料を固定等の処理をせず、生のままで風乾して観察するが、これらの操作が特に柔らかいリボソームの DMPC に影響したと考えられた。

一方、60°C で造粒した ADP 内包 H12-リボソームは、 1.8 ± 0.3 枚膜になるが、電顕下でもその断面に 2 層の脂質層を形成していることが確認された。

ヒト PRP を使った ADP 凝集においては、DMPC と DPPC が二次凝集を強く促進したが、流動性の低い DSPC はコントロールと同じように二次凝集を促進させなかった。すなわち、DSPC は流動性が低い、換言すれば堅いため、血小板に接触しても内部の ADP を漏れ出さないことが考えられた。凍結超薄切片法による形態学的検討では、血小板相互の接触が DMPC または DPPC によるものに比較して弱く、凝集塊も大きくなかった。さらに血小板に接触または凝集塊中に存在している DSPC が少なかった。これらの所見は上記の推測のように、ADP が漏れ出てこないことを反映した結果と考えられた。

リボソームの被覆層数 1 枚またはほぼ 2 枚の ADP 内包 H12-リボソーム(DPPC)の ADP 凝集に対する効果も明らかになった。すなわち、被覆層数 2 枚のリボソームでは 1 枚のものに比較して、凝集はわずかではあるが低下していた。この結果は、被覆層数の多いリボソームは流動性の低いリボソームと同様に、ADP が漏れ出にくいことを示していると考えられた。しかし、リボソームの分布を検討した形態学的観察では、それぞれの違いはほとんど識別出来なかった。その理由として、凝集能の違いがわずかであったことに起因していると思われる。

E. 結論

H12-リボソームの凝集促進作用を明らかにするために、フローサイトメトリーと形態学的検討を行い、本リボソームはトロンピン刺激血小板に経時的に増加して結合し、結合したリボソームは活性化血小板の開放小管系中および血小板間に分布するようになって凝集を増大させることが明らかになった。さらに H12-リボソームの凝集促進作用の効果を上げるために、ADP を内包し、この ADP の効果を発揮するリボソームの膜流動性と被覆層数について検討した。その結果、流動性の大きい DMPC、DPPC リボソームは、ヒト PRP の ADP 凝集において促進的な効果を示した。これらは凝集塊の血小板間に存在した。しかし、流動性の小さい DSPC は凝集促進効果を示さず、血小板間の分布はまばらであった。被覆層数 2 層の DPPC は単層のものに比較すると、

ヒト PRP の ADP 凝集が低下したが、凝集塊の血小板間における分布は単層のものと同様であった。すなわち、ADP を内包した H12-リボソームは流動性が高く、被覆層数が低いものほど、内部の ADP が漏れ出し、これは凝集に促進的に作用すると考えられた。ただ、DMPC と DPPC リボソームの凝集能についてはほとんど差がなかったが、ネガティブ染色法で DMPC に変形が見られたことから、DMPC は変形し易く、また ADP が自然に漏れ出すことも考えられる。すなわち、人工血小板としての ADP を内包した H12 リボソームは DPPC によるものが有望と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:なし

2. 学会発表:

- 1) 鈴木英紀, 岡村陽介, 武岡真司, 池田康夫, 半田誠:トロンピン刺激による H12 結合リボソームと血小板との相互反応に関する電顕的検討. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007, 11, 15-17, 志摩市.
- 2) 岡村陽介, 武岡真司, 鈴木英紀, 前川一平, 藤枝俊宣, 江藤薫子, 池田康夫, 半田 誠:ドデカペプチド結合(アデノシン 5'-二リン酸)内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果. 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 2007, 11, 15-17, 志摩市

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18-20年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラ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
— α IIb β 3 インテグリンと H12 担持人工粒子の結合解析—

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

血小板は様々なアゴニストによって活性化した時にのみフィブリノーゲンと結合して血栓を形成する。これは血小板膜表面の α IIb β 3 インテグリンが活性化に伴って立体構造をかえ、リガンドとの結合親和性を高めるためである。これまでの研究から、 α IIb β 3 インテグリンが **inside-out signaling** によって活性化し、リガンドであるフィブリノーゲンと結合するためには、インテグリン細胞内 tail の解離に始まる構造変化が細胞外に伝達し、その結果細胞外ドメインの立体構造が低親和型の **bent conformer** から高親和型の **extended conformer** へ変化する必要があることが明らかになった。しかしこの構造変化伝達のメカニズムは全く解っていない。また、フィブリノーゲンに由来する H12 ペプチドを担持したリポソーム粒子 (H12-vesicle) が、有効かつ安全に生体内で機能するためには、活性化血小板のみと高い親和性をもって結合し、非活性化血小板とは結合しないことが要求される。すなわち H12-vesicle は H12 ペプチドではなく、フィブリノーゲンに近い性格を持っていなければならない。

本研究では、まず α IIb β 3 活性化機序を解明する基礎実験として、1) 機能の異なる抗インテグリン抗体のエピトープを同定することによってその作用機序を解明し、2) **inside-out signaling** における、細胞内から細胞外へのインテグリン構造変化伝達のメカニズムの解明を試みた。次に、これらで得られた知見を元にして、H12-vesicle と α IIb β 3 の結合解析を行い、フィブリノーゲンとの比較を行った。その結果、1) インテグリン活性化抗体と阻害抗体が α 鎖の **genu** に存在する同一のエピトープを認識することから、インテグリンの活性が **genu** を中心とした **tail** の屈曲/伸展によって制御されること、2) α IIb β 3 は α -tail と β -tail の間の結合が解離することで活性化し、この活性化はインテグリンを **bent form** に保っている β -tail と β -head の間の結合の解離に依存することが明らかになった。すなわち、**inside-out signaling** では α -tail/ β -tail 間の解離が **trigger** となり **bent** から **extended** へ構造変化おこると考えられる。また、3) H12-vesicle は α IIb β 3 発現細胞と濃度依存性に、特異的に結合し、その結合親和性は α IIb β 3 の活性化によって10倍以上上昇すること、4) H12-vesicle とフィブリノーゲンは、全く同じ α IIb β 3 の **conformer** と結合し、高濃度でも α IIb β 3 の構造変化を誘発しないことがわかった。以上の結果から、H12-vesicle はフィブリノーゲンと同じメカニズムで α IIb β 3 と結合し、活性化血小板と特異的に結合すると考えられる。また、H12 担持人工粒子は、フィブリノーゲンと同様に非活性化 α IIb β 3 とほとんど結合せず、 α IIb β 3 の構造変化を誘発することも無いため、安全性の高い血液代替製剤となりうるだろう。

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。この過程では、1) 血小板膜タンパク質の GPIb-IX-V と内皮下組織のコラーゲンに結合したフォン・ビルブランド因子 (vWF) の結合による血小板の血管壁への rolling/tethering、2) 血小板膜タンパク質の GPVI/FcRγ とコラーゲンの結合による血小板の活性化、3) 活性化した血小板膜タンパク質 GPIIb-IIIa (α IIb β 3 インテグリン) と vWF との結合による血小板の血管壁への接着、4) ADP/トロンビンの放出・生成による局所的な血小板の活性化と、GPIIb-IIIa とフィブリノーゲンの結合による血小板凝集塊の形成と成長が行われている。これらのステップは安定な血栓形成に不可欠であり、どのステップに異常も止血機能の異常の原因となる。血栓形成に関与する分子の中でも、 α IIb β 3 インテグリン (以下 α IIb β 3) は血小板凝集塊の形成に不可欠であり、 α IIb β 3 無くして安定な血栓形成はありえない。

血小板 α IIb β 3 は全てのインテグリンと同様に、 α 鎖と β 鎖の二つの異なる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 鎖と β 鎖の球状ドメインは互いに会合し、 α 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みえる。頭部を形成する球状ドメインはリガンドと結合するが、脚部の機能は解明されていない。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立体構造をもつことが判明

した。一つは頭部を上に向けた extended conformer、もう一つは tail が途中で 135° 折れ曲がり、頭部を下に向けた bent conformer である (図 1)。

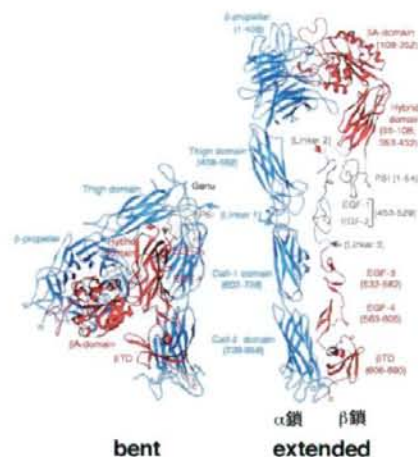


図 1. インテグリンの三次元構造

インテグリン活性化作用をもつ Mn^{2+} あるいはリガンドペプチドである 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 が低活性型であり、extended conformer は高活性型と考えられた。これらのことからインテグリンは活性化に伴って bent conformer から extended conformer へ構造変化をおこし、リガンド親和性を増すというパラダイムが作られた。われわれの研究でも bent conformer、extended conformer に立体構造が固定された α 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 IIb β 3 と共通の β 3 鎖をもつ 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おり、インテグリンの屈曲/伸展が活

性制御に関わっているか否かについては未だ最終的な結論に至っていない。

一方、インテグリンの短い細胞内 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などを含んでいる。近年、talin が細胞内 $\beta 3$ tail と結合することにより $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 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 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ のトロンビンによる活性化が阻害されたことから、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。NMR を用いた $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 細胞内 tail の構造解析から αIIb 鎖と $\beta 3$ 鎖の細胞内 tail は互いに会合しており、talin が $\beta 3$ の tail と結合することにより tail 同士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が bent から extended conformer へと、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明らかにされていない。

$\alpha \text{IIb}\beta 3$ は血漿中のフィブリノーゲンや vWF と結合することによって、血小板同士を架橋し、血小板凝集塊を形成する。ここで重要なのは、 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ は血小板が活性化しない限り、フィブリノーゲンと結合しないことである。 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ は vWF に存在する RGD 配列、あるいはフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端の 12 アミノ残基で構成される H12 配列と結合する。これらの配列に由来した RGD ペプチド、H12 ペプチドは $\alpha \text{IIb}\beta 3$ と結合するが、vWF、フィブリノーゲンなどの高分子リガンドと大きく異なる点は、こ

れらの低分子リガンドは活性化に依存せず $\alpha \text{IIb}\beta 3$ と結合することである。すなわち、RGD・H12 ペプチドは非活性化血小板とも結合しうる。また、これらの低分子リガンドは $\alpha \text{IIb}\beta 3$ と結合し、立体構造の変化をおこすことが知られている。この構造変化に伴い、通常分子内部に隠れている $\alpha \text{IIb}\beta 3$ のエピトープが表出されるため、これをターゲットにした免疫反応が惹起される可能性がある。実際に、抗血栓薬として開発され、 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ と強固に結合して $\alpha \text{IIb}\beta 3$ と vWF/フィブリノーゲンとの結合を阻害する低分子 ligand-mimetic の投与を受けた患者が、抗 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 自己抗体を形成したことが報告されている。止血機能を有する人工粒子が生体内で有効かつ安全に機能するためには、1) 活性化血小板のみと結合し、非活性化血小板とは結合しないこと、2) 高濃度のフィブリノーゲン存在下でも結合しうる高い結合親和性を持つこと、3) たとえ高濃度でも、 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の構造変化をひき起こさないことが重要である。

そこで本研究では 1) リガンド結合阻害作用を有する抗インテグリン抗体のエピトープ・マッピングを行うことによって、 $\beta 3$ インテグリン活性化に必要な構造条件の決定、2) inside-out signaling による $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 活性化における、細胞外 tail の役割の解明を行い、ここで得られた知見をもとに、3) H12 担持人工粒子と $\alpha \text{IIb}\beta 3$ の結合機構の解析を行った。これらの結果から H12 担持人工粒子の有効性・安全性の検討を行い、今後の課題に関して考察を行った。

B. 研究方法

I. $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 、 $\alpha \text{V}\beta 3$ 変異体 cDNA の作成

$\alpha \text{IIb}\beta 3$ 、 $\alpha \text{V}\beta 3$ インテグリンの αIIb 鎖、 αV 鎖、 $\beta 3$ 鎖の cDNA は Joseph C. Loftus 博士 (Mayo Clinic, AZ) から供与された。これらを哺乳類発現ベクター pBJ-1

(Mark Davis 博士 University of California, San Francisco) から供与) にクローニングして使用した。αIIb 変異体 cDNA M660XRT、Q595XTT、M660NRT/F755C、Q595NTT/F755C、F755C、E749A、R751A、E785A、H787A、A318C、D319C、β3 変異体 cDNA S367C/S551C、G382C/T564C、V332C/S674C、G382NLT、G382QLT、T564N、T564Q、G382NLT/D606C、T564N/D606C、S357A、R404A、V359C、Y594A、T603A、D606C、D552C、S77C/S147C、human-to-mouse αV 変異体である I441V、T460ICP、T460I、S462P、V486T、N492H、E496DV、Y515HN、S520V、N524T、I527VF、I527V、S528F、L532Q、I539V、Y565Q、T571A、I586V と Q589NAT の cDNA は、全て部位指定変異法を用いて作成した。エピトープ・マッピングに用いたキメラ V/B、B/V、T、C1、C2、VT、VC1、VC2 は overlap extension PCR 法によって作成した。各キメラ作成に用いたドメイン境界部は図2に示す。

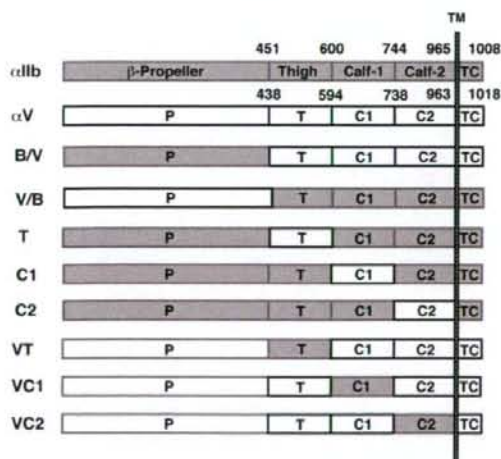


図2. キメラのドメイン構成

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 μg の αV、αIIb cDNA は 50 μg の β3 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。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 Ca²⁺/1mM Mg²⁺加 HEPES-Tyrode buffer (HTB) に再浮遊させ、各モノクローナル抗体 10μg/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 Ca²⁺/1mM Mg²⁺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。

IV. フィブリンノーゲン結合実験

フィブリンノーゲン (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αIIb 抗体 PL98DF6 または抗β3 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抗体と反応させる前に、10 mM DTT と 37°C、15 分間反応させた。細胞を 1 μM の FITC 標識 Fbg と共に 10 μg/ml の control IgG、PT25-2、または 1 mM の GRGDS ペプチドを含んだ 1 mM CaCl₂/1 mM MgCl₂加 HTB または 1 mM MnCl₂加 HTB に再浮遊し 2 時間反応させた。細胞に結合した Fbg 量は FACSCalibur を用いて測定した。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

(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。control IgG、PT25-2 存在下の Fbg 結合から GRGDS ペプチド存在下の Fbg 結合を非特異的結合として差し引き、特異的結合を算出した。

抗 α V β 3 抗体による Fbg 結合阻害実験では、 α V β 3 発現細胞を 1 μ M の FITC 標識 Fbg、100 μ g/ml の control IgG、抗 α V β 3 抗体、または 1 mM の GRGDS ペプチドを含む 1 mM MnCl₂ 加 HTB に再浮遊し 2 時間反応させた。各抗体存在下での特異的結合から抗体非存在下での結合で除し、Relative FITC-Fbg binding を算出した。

V. H12 担持リボソーム粒子結合実験

細胞を 10 μ g/ml の control IgG または抗 α IIb 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 と反応させた。細胞を異なる濃度の DiOC18 標識リボソーム粒子 (control vesicle)、または DiOC18 標識 H12 担持リボソーム粒子 (H12-vesicle) を、10 μ g/ml のマウス IgG、PT25-2、あるいは 1 mM の GRGDS ペプチドを含んだ 1 mM CaCl₂/1 mM MgCl₂ 加 HTB と氷上で 2 時間反応させた。細胞を 1 mM Ca²⁺/1 mM Mg²⁺ 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非特異的結合として差し引き、特異的結合を算出した。

VI. SZ22 結合実験

フィブリノーゲン結合実験と同様に、まず始めに細胞を PL98DF6 と RPE 標識抗マウス IgG で染色した。次に、細胞を FITC 標識 IgG1 または FITC 標識 SZ22 と、1 mM の GRGDS ペプチドまたは異なる濃度のフィブリノーゲン、control vesicle、H12-vesicle の存在下、氷上で 1 時間反応

させた。細胞を 1 mM Ca²⁺/1 mM Mg²⁺ 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。

C. 研究結果

I. エピトープ・マッピングによるインテグリン活性化機構の解明

抗 α V モノクローナル抗体のキメラ分子への結合性の解析—この実験では 9 種類の

抗 α V 抗体 10C4、23C6、LM609、272-17E6、69.6.5、P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 と 2 種類の抗 β 3 抗体 SZ21、VNR5-2、陰性対照としてマウス IgG (mIgG) を用いた。表 1 に野生型 α V β 3、 α IIb β 3 と tail を交換したキメラを発現した細胞での各抗体の陽性率を示した。10C4 と 23C6 と LM609 が α IIb β 3 を発現している細胞に対して部分的な反応性を示したのを除き、すべて野生型の α V β 3 を発現している細胞に結合し、 α IIb β 3 を発現している細胞や CHO 細胞には結合しなかった。10C4、23C6、LM609 と α IIb β 3 発現細胞から得られた蛍光強度は、これら 3 つと α V β 3 発現細胞から得られた蛍光強度よりも有意に低かった (データ掲載せず)。加えて、これら 3 つの抗体は野生型の β 3 のみを発現している細胞にも結合した。CHO 細胞は内在性の α V を有することが知られているため、これら 3 つの抗体はハムスターの α V とヒトの β 3 の複合体に結合したと考えられる。 α V と α IIb の tail を入れ替えた tail-swapping キメラを用いた実験では、272-17E6、69.6.5 は V/B を発現している細胞とは結合した (青) が、B/V を発現している細胞とは結合しなかった (赤)。反対に、P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の 4 種類の抗体は B/V を発現している細胞とは結合した (青) が、V/B を発現している細胞とは結合しなかった (赤) (表 1)。

	mIgG	10C4	23C6	LM609	272-17E6	69.6.5	AMF-7	NKI-M9	P2W7	P3G8	SZ21	VNR5-2
CHO	5.26	4.77	4.34	4.48	4.94	5.23	3.57	3.15	18.99	4.25	3.63	4.04
$\beta 3$	2.72	55.83	70.09	61.93	3.64	4.66	2.92	3.93	4.08	5.84	49.89	66.06
$\alpha V\beta 3$	3.47	61.09	77.73	68.92	67.32	64.4	64.17	71.05	57.59	63.15	54.52	78.98
$\alpha IIb\beta 3$	3.92	57.69	58.25	65.47	3.66	4.25	3.07	4.08	4.61	5.56	51.73	73.22
V/B	4.18	58.73	69.11	61.9	53.13	45.19	3.08	3.78	6.00	6.36	52.16	74.33
B/V	4.24	51.6	63.63	57.3	7.11	6.44	58.39	63.47	49.97	55.63	49.16	74.27

表 1. αV tail-swapping キメラに対する抗体の結合 (%陽性率)

	mIgG	AMF-7	NKI-M9	P2W7	P3G8	272-17E6	SZ21
CHO	7.83	5.86	5.72	15.51	5.78	5.91	4.8
$\alpha V\beta 3$	5.6	68.11	78.41	63.75	67.97	76.32	59.23
VT	4.72	3.37	4.09	6.91	6.44	74.37	68.6
VC1	10.88	82.45	90.34	71.17	76.44	90.39	83.9
VC2	4.7	64.82	81.14	69.67	69.52	78.53	74.97
T	6.4	49.93	62.12	45.45	44.62	4.45	62.75
C1	5.87	3.8	4.03	5.82	6.37	4.05	61.79
C2	5.36	5.53	5.16	6.57	8.25	6.8	71.52

表 2. αV domain-swapping キメラに対する抗体の結合 (%陽性率)

10C4、23C6、LM609 は B/V を発現している細胞とも V/B を発現している細胞とも結合した。しかし、B/V を発現した細胞から得られた蛍光強度は、 $\beta 3$ だけを発現しているものと同等で、V/B を発現している細胞から得られたものよりも有意に低かった (データ掲載せず)。これらの結果は、10C4、23C6、LM609、272-17E6、69.6.5 の結合部位は、N 末端側の β -propeller ドメイン (インテグリンの head に相当する部分) にあると考えられる。また、P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の 4 種類の抗体の結合部位は C 末端側の tail 部分 (インテグリンの thigh、calf-1、calf-2 ドメイン (図 1 参照) に相当する部分) にあることが予想される。これらの 4 つの抗体の結合部位が、tail 部分の 3 つのドメインのうちどこにあるかを同定するため、それぞれのドメインを入れ替えた domain-swapping キメラ分子を発現した細胞を作製し抗体の結合を調べた。

表 2 に各キメラを発現した細胞での各抗体の陽性率を示した。 αV の thigh ドメインを αIIb の対応部と入れ替えたキメラ分子を発現した細胞 (VT) に対するこれらの 4 種類の抗体の反応性は完全に消失した (赤)。しかし αV の calf-1 ドメイン、calf-2 ドメインを αIIb の対応部と入れ替えても (それぞれ VC1、VC2) 抗体の結合に大きな影響はみられなかった。一方、 αIIb の thigh ドメインを αV の対応部と入れ替えたキメラ分子を発現した細胞 (T) にこれら 4 種類の抗体は結合した (青)。しかし、 αIIb の calf-1 ドメイン、calf-2 ドメインを αV の対応部と入れ替えた場合 (それぞれ C1、C2) は抗体の結合は全くみられなかった。これらの結果から、P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の結合部位は tail を構成する thigh ドメインのみに限局して存在し、他の calf-1、calf-2 ドメインには存在しないと考えられる。

human aV 441 ITVNAGLEVPYPSILNQDNKTC~~CS~~LPGTALKVSCFNVRFLKADGKGVLP~~PKL~~NFQV~~ELL~~LD 500
mouse aV 441 VTVNAGLEVPYPSILNQDNKICPLPGTALKVSCFNVRFLKADGKGTLP~~PKL~~H~~LF~~QV~~DV~~LLD 500

human aV 501 KLKQKGAIRRALFLY~~SR~~SPSHSK~~NMT~~IS~~RG~~GLMQCEELIAYLRDESEFRDKLTPITIFME 560
mouse aV 501 KLKQKGAIRRALFLHN~~RS~~SPVH~~SK~~TMTVFRGGQMQCEELVAYLRDESEFRDKLTPITIFME 560

human aV 561 YRLDYRTAADTTGLQPILNQFTTPANISRQA~~HIL~~ 593
mouse aV 561 YRLDQRTAADATGLQPILNQFTTPANVSRQA~~HIL~~ 593

図3. ヒトとマウス α V thigh ドメインのアミノ酸配列の比較

ヒトとマウスの α Vのアミノ酸配列比較による抗体結合部位の同定—キメラを用いた実験から P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9 の結合部位が thigh ドメインに限局することが明らかになった。図3に表示した通り、ヒトとマウスの α V のアミノ酸配列を比較すると、thigh ドメインを構成する 153 残基のうち 18 残基 (赤) が異なることがわかる。このことを利用し、ヒト α V のアミノ酸配列をマウス α V の配列に置換することによって、これら 4 種類の抗体

の結合部位のさらなる同定を行った。まず始めに表3に示した 15 種類の human-to-mouse キメラを作成して野生型の β 3 とともに CHO 細胞に発現させ、これらの抗体の結合を調べた。この結果、AMF-7、P2W7、NKI-M9 は T460ICP を発現している細胞には結合せず、P3G8 は I527VF を発現している細胞には結合しなかった (赤)。

	mIgG	AMF-7	NKI-M9	P2W7	P3G8	272-17E6	SZ21
CHO	3.62	2.56	2.95	13.3	3.2	4.07	1.16
WT	6.8	74.11	85.85	78.21	83.47	87.07	71.41
I441V	4.15	76.76	70.66	72.64	77.61	79.97	70.78
T460ICP	5.15	5.84	3.26	7.01	70.72	77.52	65.15
T460I	5.88	62.11	63.27	54.8	56.43	70.81	64.01
S462P	5.52	14.66	3.75	17.17	66.41	76.18	66.88
V486T	11.93	72.65	78.35	71.75	64.14	82.23	71.1
N492H	10.04	70.78	79	70.14	72.01	82.49	73.56
E496DV	14.9	73.25	76.95	67.31	75.08	75.01	58.72
Y515HN	8.47	59.79	67.31	59.04	65.69	66.81	50.75
S520V	8.33	65.13	72.76	61.29	73.55	71.38	60.68
N524T	12.98	60.75	69.31	58.6	65.03	66.37	57.98
I527VF	9.55	74.93	78.94	59.25	9.26	84.31	81.13
I527V	3.12	75.57	78.3	64.88	77.78	83.6	67.47
S528F	5.32	80.94	82.19	76.5	10.59	85.83	78.1
L532Q	26.68	62.2	77.22	58.2	62.38	76.84	71.26
I539V	13.13	73.98	67.01	57.12	68.84	76.24	64.92
Y565Q	11.64	70.1	77.22	64.52	71.32	80.13	72.63
T571A	27.84	68.76	69.91	54.89	59.55	75.22	75.28
I586V	9.99	70.96	78.21	61.16	70.96	68.54	76.34

表3. Human-to-mouse aV 変異体に対する抗体の結合 (%陽性率)

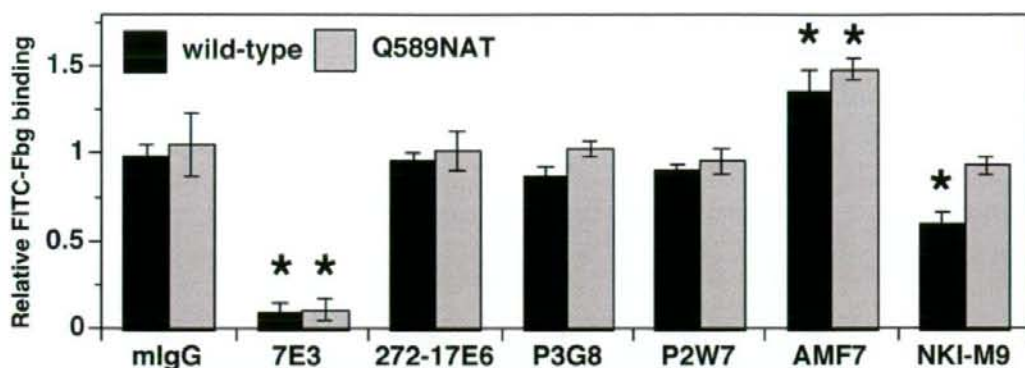


図4. 抗 $\alpha V\beta 3$ 抗体存在下での $\alpha V\beta 3$ -フィブリノーゲン結合

次にさらにどのアミノ酸残基が抗体の結合に不可欠であるのかを調べるために、460-463と527-528のアミノ酸残基を一つずつマウスの対応部分の配列と入れ替えた。この結果 AMF-7、P2W7、NKI-M9 は T460I とは結合するが S462P との結合は著明に低下すること、P3G8 は I527V とは結合するが S528F との結合は著明に低下することがわかった(赤)。以上の結果から AMF-7、P2W7、NKI-M9 のエピトープは αV のアミノ酸残基 Ser-462 に存在し、P3G8 のエピトープは Ser-528 に存在することが判明した。

抗 αV モノクローナル抗体が $\alpha V\beta 3$ -リガンド結合に与える影響の解析— αV のtailに結合する P3G8、AMF-7、P2W7、NKI-M9のうち、AMF-7とNKI-M9は細胞のピトロネクチンへの接着を阻害することが報告されている。これらの抗体が $\alpha V\beta 3$ とリガンドとの結合にどう影響するのかを調べるため、 $\alpha V\beta 3$ 発現細胞とフィブリノーゲンとの結合を抗 $\alpha V\beta 3$ 抗体存在下で測定した(図4)。機能阻害抗 $\beta 3$ 抗体(インテグリンとフィブリノーゲンの結合を阻害する)である7E3は、1mMの Mn^{2+} の存在下で野生型 $\alpha V\beta 3$ を発現している細胞へのフィブリノーゲン結合を有意に阻害した。抗 αV 抗体である272-17E6とP3G8は結

合に全く影響を及ぼさなかった。これに対してNKI-M9は結合を約40%低下させ、反対にAMF-7は結合を約30%上昇させた(図4黒のカラム)。AMF-7とNKI-M9の影響は統計学的に有意であった(* $P < 0.01$)。

同様の実験を立体構造がまっすぐな状態に固定された $\alpha V\beta 3$ を発現しているCHO細胞で行うために、 αV のgenu直下に存在するQ589にN-糖鎖結合部位を導入した変異 $\alpha V\beta 3$ を作成した。このQ589NAT変異体はgenu直下に大きなN-糖鎖が結合するため $\alpha V\beta 3$ が曲がった状態になるのを阻害すると考えられる。これを用いて実験した結果、7E3は野生株と同様に有意な阻害効果を示したが、NKI-M9を含むすべての抗 αV 抗体は結合性阻害効果を示さなかった。AMF-7は結合を約40%増加させた(図4グレーのカラム)。

II. $\alpha IIb\beta 3$ 活性化機構の構造解析

インテグリン α -tail/ β -tailの解離は活性化を誘導する— $\alpha V\beta 3$ 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。

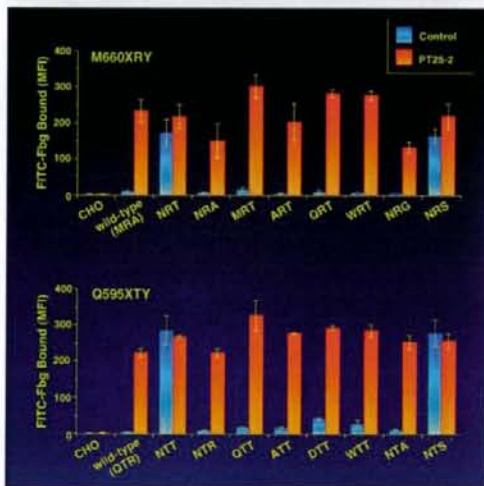
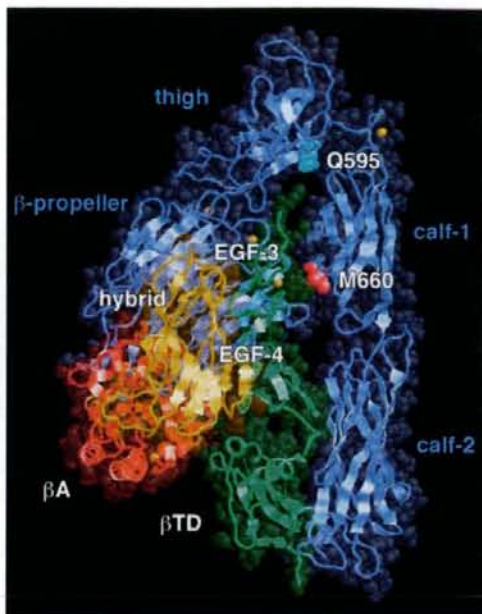


図 5.

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5)。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(図5)。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起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。

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6)。

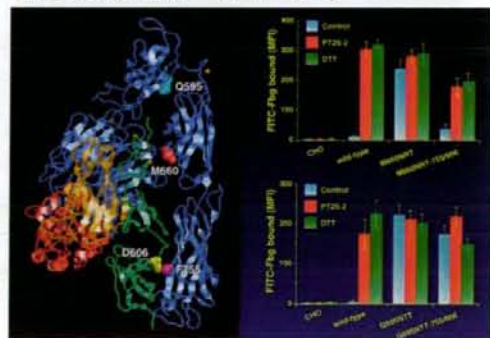


図 6.