

平成 21 年 5 月 1 日現在

| |
|--|
| 研究種目：基盤研究 (C) |
| 研究期間：2007～2008 |
| 課題番号：19590292 |
| 研究課題名 (和文) 血小板のコラーゲン受容体 GPVI の活性構造と活性化機構の解析及びその阻害剤の探索 |
| 研究課題名 (英文) Analysis of the active structure and activation mechanism of platelet collagen receptor GPVI using GPVI-specific inhibitors |
| 研究代表者 諸井 将明 (MOROI MASAOKI) 久留米大学・分子生命科学研究所・教授 研究者番号：00049074 |

研究成果の概要：血小板のコラーゲンレセプターGPVIの特異的な阻害剤の探索及びそれを用いた反応機構の解析を行った。

1. GPVIダイマーと特異的に結合するFabをスクリーニングし、コラーゲンとの結合にはGPVIのダイマー構造が必要なことと、血小板上でGPVIはダイマーとして存在することを示した。
2. GPVIと複合体を形成するFcR γ 鎖の透過性ペプチドを作製した。このペプチドはコラーゲンを介した血小板の活性化を特異的に阻害し、特にSykのリン酸化を阻害した。
3. 変異GPVIの解析から、R38とE40およびR65が結合活性に強く関与していることを示した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：血小板、コラーゲン、GPVI、シグナル伝達、阻害剤、抗体、コラーゲン受容体、血栓症

1. 研究開始当初の背景

GPVIは我々が見出した血小板のコラーゲンレセプターであるが、クローニング及び細胞外部分のX線結晶解析が行われ、構造とその機能の関係が明らかになりつつある段階であった。特にリガンドのコラーゲンとは不溶性のコラーゲン繊維とのみ反応することから、その結合反応が複雑であることが予想さ

れた。またGPVIを介する血小板の活性化機構はBCRやTCRと同様なチロシンリン酸化を介するシグナル伝達系によっておりその機構の解析は研究者の興味を集めている。一方GPVIとコラーゲンの反応は血栓形成の初発反応と考えられGPVIの阻害剤が新しい抗血栓薬となる可能性があることから、GPVIの阻害剤の開発が試みられている。

2. 研究の目的

(1) 我々は以前の研究により、GPVI の細胞外部分の組換え蛋白はそのままではコラーゲンとは結合しないが、IgG の Fc 部分と融合させてダイマーとしたものはコラーゲンと強く結合することを見出していた。この事はダイマーを形成することによりコラーゲンとの結合にかかわる構造が形成されたと考えられる。GPVI がダイマー構造をとっていることは X 線構造解析の結果からも示唆されていた。GPVI ダイマー特異的な構造がコラーゲンとの結合に関与していることを明らかにするためにファージディスプレイ法を用いて GPVI ダイマーとのみ結合する Fab をスクリーニングし、GPVI ダイマー特異的な構造とコラーゲンとの結合活性の関係を明らかにすることを目的としている。

(2) GPVI は血小板上では Fc 受容体 γ 鎖 (FcR γ) と複合体を形成しており、コラーゲンとの結合により FcR γ の細胞内 ITAM 配列にある 2 個のチロシン残基がリン酸化される。このリン酸化 ITAM にチロシンキナーゼ Syk が SH2 ドメインを介して結合し活性化される。活性化 Syk が更に LAT, PLC γ 2 などを活性化し血小板の活性化を引き起こすと考えられている。これらの細胞内シグナル伝達反応を特異的に阻害できれば GPVI を介した活性化反応を特異的に阻害できると考えられる。本研究では ITAM のペプチド配列に脂肪酸を融合させ膜透過性にしたペプチドを合成し、これらのペプチドによる GPVI を介する活性化反応への作用を解析した。

(3) GPVI の組換え蛋白に変異を加えてコラーゲンとの結合部位を特定する報告が出されており、また X 線構造解析の結果からもコラーゲンとの結合部位が推定されている。これらの結果はコラーゲンが GPVI の特定の部位と強く結合しているというより多くの部位を介して結合反応が起こっていることを示唆している。報告されたコラーゲンとの結合に関与するアミノ酸残基はそれ単独の変異による影響は小さい。しかし以前に我々は大きな結合活性の低下を伴う変異を見出しており、今回はこの変異を更に解析することを目指している。

3. 研究の方法

(1) GPVI の細胞外部分の組換え蛋白 (GPVI_{ex}) および融合に使用した Fc 部分を含むヒト IgG には結合せず、GPVI ダイマー (GPVI-Fc2) と結合する Fab をファージディスプレイ法を用いてスクリーニングした。得られた 6 クローンの中で 5 クローンは GPVI ダイマー特異的に結合した。これらの Fab は C 末端にタグとして Myc と His 以外に double helix を挿入しておりこの double

helix を介して Fab は二価となっている (b-Fab)。活性の強い b-Fab の double helix を削除し一価にしたものも作製した (m-Fab)。これらの Fab の血小板凝集反応、GPVI-Fc2 のコラーゲンへの結合反応、血小板への結合反応などを測定した。

(2) FcR γ 鎖 ITAM 部分の 18 個のアミノ酸配列ペプチドの N 末端にパルミチン酸を結合させたペプチドを合成した (p-ITAM-Y)。ITAM にある 2 個の Tyr 残基を Phe に変換したペプチド (p-ITAM-F) 及びリン酸化したペプチド (p-ITAM-YP) を合成した。これら 3 種の ITAM ペプチドの血小板凝集反応、血小板放出反応、細胞内 Ca 遊離反応、及び血小板活性化に伴うチロシンリン酸化反応などに対する作用を解析した。

(3) GPVI と相同性の高い KIR とのキメラ分子を作製し、キメラ分子のコラーゲン及び CRP (collagen related peptide) との結合活性を解析し、コラーゲンとの結合に関与する GPVI 部分を推定する。この GPVI 部分のアミノ酸に変異を加えた GPVI-Fc2 を作製し、コラーゲン及び CRP に対する結合活性を解析した。

4. 研究成果

(1) ファージディスプレイ法を用いてスクリーニングした結果 GPVI ダイマーに特異的に結合する 5 種の Fab を得ることができた。この 5 種の Fab は二価の b-Fab であるが、これらの Fab は血小板を活性化し凝集させた。一方一価にした m-Fab はコラーゲンによる血小板凝集を阻害した。マウスのモノクローナル抗体を用いても二価の IgG によって血小板は凝集し、一価の Fab にするとコラーゲン凝集を阻害することが報告されており、この b-Fab も同様に GPVI を架橋することにより血小板を活性化したと考えられる。b-Fab および m-Fab は GPVI-Fc2 のコラーゲン繊維への結合を阻害した。また m-Fab の血小板への特異的結合がフローサイトメーターにより観察された。これらのことより、GPVI は血小板上で二量体を形成して存在しており、また二量体を形成することにより特有のコンフォメーションが形成され、このコンフォメーションがコラーゲンとの結合に関与していることが示された。抗血栓薬として GPVI の阻害剤に注目が集まっているが、我々の結果は GPVI ダイマー特異的な構造に結合する物質をスクリーニングすることにより効率的に阻害剤が得られることを示唆している。

(2) パルミチン酸を導入して膜透過性にした ITAM ペプチド (p-ITAM-Y)、Tyr 残基を Phe に変換したもの (p-ITAM-F) 及びリン酸化したもの (p-ITAM-YP) の血小板凝集、放出反応、細胞内 Ca 遊離反応に対する作用を解析

すると、p-ITAM-Y および p-ITAM-F は何の作用も示さなかったが、p-ITAM-YP はコラーゲンによる血小板凝集、セロトニン放出及び細胞内 Ca 遊離を阻害するとともに、トロンビンによるこれらの反応には影響を与えなかった。これらのことは p-ITAM-YP が GPVI 特異的な活性化反応を阻害していることを示している。

その作用機作を明らかにするためにコラーゲンによる血小板の活性化にともなうチロシンリン酸化反応を解析した。P-ITAM-YP は CRP による FcR γ 鎖のチロシンリン酸化には影響を与えなかったが、Syk のリン酸化を阻害した。Syk はその SH2 ドメインを介してリン酸化された FcR γ に結合することが示されており、p-ITAM-YP は下に示すように Syk と結合することにより Syk の FcR γ への結合を阻害することにより活性化を阻害していると考えられた。なお他の ITAM ペプチドは影響を与えなかった。

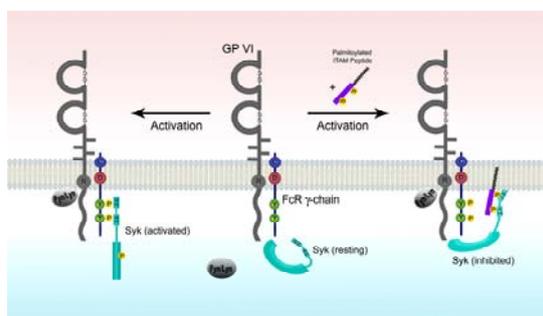


図 ペプチドの反応機構

これらの実験は GPVI を介した血小板のシグナル伝達反応を明らかにするとともに、これらのペプチドが GPVI に対する阻害剤となる可能性を示した。しかしながら上記の実験は全て洗浄血小板を用いたものであり、血液中ではアルブミンによりペプチドが吸着されてしまい阻害活性を示さなかった。現在リポソームなどを用いた投与方法を検討している。

(3) GPVI と相同性の高い KIR とのキメラ分子を作製し、キメラ分子のコラーゲン及び CRP との結合活性を解析した。その結果 GPVI のコラーゲン及び CRP との結合は主に第一免疫グロブリン様ドメイン (D1) に存在すると考えられた。D1 の種々のアミノ酸に変異を加え、その活性を解析した結果、R38 と E40 が結合活性に強く関与していることが示された。また立体構造上 E40 の近くにある R65 の変異もコラーゲン、CRP への結合を強く低下させた。これらの結果から R38, E40 および R65 などの解離性のアミノ酸残基がコラーゲンとの結合に強く関与していることが明らかとなった。

GPVI はコラーゲンの立体構造を認識して結合していると考えられる。そこで異なったタイプのコラーゲン繊維への組換え GPVI の結合反応を解析した。GPVI はタイプ I, II 及び III コラーゲンと結合し、特にタイプ III コラーゲンへの結合が強かった。シート状の繊維を形成するタイプ IV, VI コラーゲン及び細繊維を形成するタイプ V コラーゲンにはほとんど結合せず、GPVI はフィブリルタイプのコラーゲン繊維と強く結合すると考えられた。タイプ I 及びタイプ III コラーゲンへの流血下での血小板の粘着反応を比較すると、タイプ III コラーゲン上で血小板はより大きな凝集塊を形成して粘着していることが明らかになった。タイプ III コラーゲンへの強い結合活性がコラーゲン上での強い血小板の活性化を引き起こし、大きな血小板凝集塊の形成に至ったと考えられ、生理的には血管内皮下に存在するタイプ III コラーゲンが血栓形成に強く関与していると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) Jung SM, Takemura Y, Imamura Y, Hayashi T, Adachi E, Moroi M: Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion. *Platelets* 2008; 19(1): 32-42. 査読有
- 2) Gardiner EE, Al-Tamimi M, Mu FT, Karunakaran D, Thom JY, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC, Baker RI: Compromised ITAM-based platelet receptor function in a patient with immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2008; 6(7): 1175-1182. 査読有
- 3) Teye K, Okamoto K, Tanaka Y, Umata T, Ohnuma M, Moroi M, Kimura H, Tsuneoka M: Expression of the TAF4b gene is induced by MYC through a non-canonical, E-box which contributes to its specific response to MYC. *Int J Oncol* 2008; 33(6):

1271-1280 査読有

4) Moroi M, Jung SM: A mechanism to safeguard platelet adhesion under high shear flow: von Willebrand factor-glycoprotein Ib and integrin alpha2beta1-collagen interactions make complementary, collagen-type-specific contributions to adhesion. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4): 797-803. 査読有

5) Moroi M, Jung SM: A mechanism to safeguard platelet adhesion under high-shear flow: von Willebrand factor-glycoprotein alpha2beta1-collagen interactions make complementary, collagen-type-specific contributions to adhesion: reply to a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2007; 5(6): 1340-1342. 査読有

6) Wijeyewickrema LC, Gardiner EE, Moroi M, Berndt MC, Andrews RK: Snake venom metalloproteinases, crototharagin and alborhagin, induce ectodomain shedding of the platelet collagen receptor, glycoprotein VI. *Thromb Haemost* 2007; 98(6): 1285-1290. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1) Stephanie M. Jung et al.: Cell-permeable peptides that specifically inhibit platelet activation through the collagen receptor Glycoprotein VI. The Third United Kingdom-Japan Platelet Conference, Singapore, September 17, 2008

2) Masaaki Moroi et al.: Recombinant anti-GPVI Fab recognizing a specific conformation of the GPVI dimer. The Third United Kingdom-Japan Platelet

Conference, Singapore, September 17, 2008

3) Kayoko Tsuji et al.: Formation of platelet-like particles by a new method using liquid culture of murine embryonic stem cells. The Third United Kingdom-Japan Platelet Conference, Singapore, September 17, 2008

4) Stephanie M. Jung: Palmitoylated phosphorylated-ITAM peptides specifically inhibit activation induced through the platelet-specific collagen receptor GPVI. The 13th Meeting on Thrombosis & Rheology, Tokyo, March 15, 2008

5) 諸井将明 他 : GPVI二量体を認識する組換えFab抗体。第31回日本血栓止血学会学術集会、大阪、2008年11月21日

6) 秋山正夫 他 : ITP合併GPVI欠損例の解析～GPVI欠損発症メカニズムに関する検討。第31回日本血栓止血学会学術集会、大阪、2008年11月21日

7) Jung SM et al.: Von Willebrand factor-glycoprotein Ib and integrin alpha2beta1-collagen interactions make complementary, collagen-type-specific contributions to adhesion. 21st Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Geneva, Switzerland, July 10, 2007

8) Stephanie M. Jung, 他 : Cell-permeable peptide that specifically inhibits GPVI-induced platelet activation. 第30回日本血栓止血学会学術集会、志摩、2007年11月17日

9) 秋山正夫 他 : 抗GPVI抗体に起因すると思われるGPVI欠損症の一例。第30回日本血栓止血学会学術集会、志摩、2007年11月16日

〔図書〕（計 2 件）

1) Jung SM, Moroi M: Platelet collagen receptors. “Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008” Eds; Tanaka K, Davie EW; Springer, p231-242, 2008

2) Jung SM, Moroi M: Platelet glycoprotein VI. “Multichain immune recognition receptor signaling from spatiotemporal organization to human disease” Ed; Sigalov AB, Landes Bioscience, p53-63, 2008

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸井 将明 (MOROI MASA AKI)
久留米大学・分子生命科学研究所・教授
研究者番号：00049074

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

大沼 雅明 (OHNUMA MASA AKI)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：20223901
三浦 芳樹 (MIURA YOSHIKI)
久留米大学・分子生命科学研究所・講師
研究者番号：90279240