

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659460

研究課題名(和文) コラーゲンを標的とした新規血小板凝集阻害分子の低分子化と抗血小板薬開発研究

研究課題名(英文) Development of a novel anti-platelet drug targeted for collagen-induced platelet aggregation

研究代表者

吉田 栄人 (Yoshida, Shigeto)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10296121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：蚊の唾液から発見されたタンパクAAPPは複雑なカスケードで誘導されるコラーゲン刺激性の血小板凝集を強力に抑制するタンパク分子である。本研究ではi) AAPPはアスピリンより優れた血小板凝集阻害活性を持っており、出血助長の副作用がないこと、ii) AAPPのコラーゲン結合部位はエクソン3-4であること、iii) X線結晶解析によりAAPPは線状層状構造をとっている非常に奇異なタンパクであることが明らかとなった。以上の結果より、AAPPのin vivo薬効および安全性が示され、さらにその活性部位の分子構造が明らかとなったことで新規抗血小板薬としての開発の期待が高まった。

研究成果の概要(英文)：AAPP, a mosquito saliva protein, specifically blocks platelet adhesion to collagen by binding directly to collagen and subsequently causing platelet aggregation. The aim of this study was to identify the active region of AAPP responsible for the anti-thrombotic activity because we hypothesized that AAPP could be used as a candidate anti-platelet drug. We identified that the essential moiety of AAPP for collagen binding and anti-thrombotic activity was in the region encoded by exon 3-4. The crystal structure of this domain was also determined. AAPP inhibited whole blood aggregation induced by collagen at 100 mg/kg body weight. AAPP prevented pulmonary death at a lower dose (3 mg/kg) without prolongation of bleeding time compared with aspirin (100 mg/kg) that compromised hemostasis. These results indicate that AAPP has great potential as a new anti-platelet agent with a better risk/benefit ratio than that seen with aspirin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：抗血小板薬 コラーゲン ハマダラカ 唾液タンパク 結晶構造

1. 研究開始当初の背景

急性発症する重篤な心筋梗塞や脳梗塞といった虚血性疾患の多くが血栓症であるため、予防、治療に用いる抗血小板療法は極めて重要である。一方、生理的な止血機能を阻害する抗血小板療法では不可逆的に出血性合併症が惹起される。この“副作用”を回避するためには、血小板を標的とする従来のコンセプトとは異なる新しい作用機序を有する抗血小板薬を開発する必要がある。研究代表者はヒトが忌み嫌う吸血昆虫である蚊より出血助長を抑制するポテンシャルを秘めた抗血小板薬の候補分子 AAPP を発見(Yoshida et al. Blood. 2008)していた。

2. 研究の目的

AAPP は、複雑なカスケードで誘導されるコラーゲン刺激性の血小板凝集を強力に抑制するタンパク分子である。AAPP は傷害血管をターゲットにしているため、血小板の機能を完全に阻害することではなく、局所投与により血栓形成の起点となる血管傷害部位においてのみ抗血小板作用を発揮する。従って全身的には正常な止血機能を維持し、現行薬の副作用で問題となっている出血助長を阻止することが期待される。創薬化を目指し、AAPP の i)コラーゲン結合部位の同定 (< 12 アミノ酸) および ii)血小板凝集阻害効果 (薬効) を数値化・評価するための in vivo 病態モデル (血小板の集積率測定) を構築し、既存薬 (アスピリン) との薬効比較を研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) AAPP 薬効評価系の確立

in vivo 止血モデルを用いて出血助長の副作用を定量化する

致死性の肺血栓モデルを用いてコラーゲン刺激性の血小板凝集を AAPP が抑制する程度をアスピリンと比較する。

(2) AAPP の活性部位の同定

AAPP の血小板凝集阻害活性部位は、その高次構造部位に存在している。通常のアミノ酸配列からの予測はできない。活性部位を解明するには AAPP の結晶構造の情報が必要となっている。このため AAPP をモノクローナル抗体と結合させた状態で共結晶化する技術を開発し、モノクローナル抗体を結合して AAPP を安定化する共結晶化の条件を検討し、X 線結晶構造解析を行う。

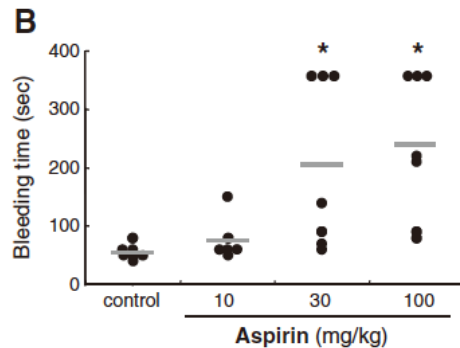
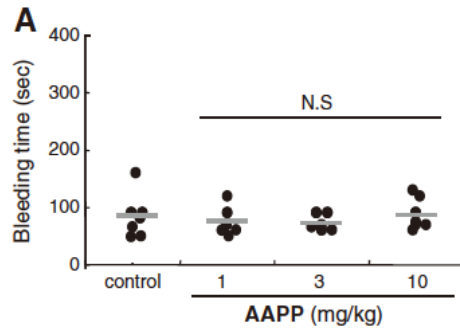
4. 研究成果

(1) AAPP はアスピリンより優れた血小板凝集阻害活性を持っており、出血助長の副作用なし。

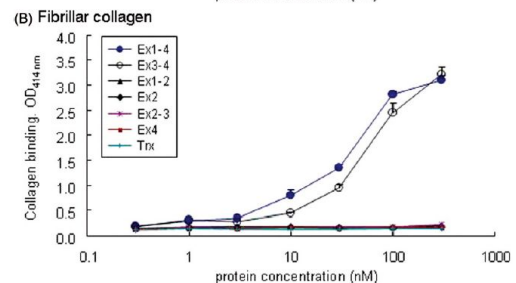
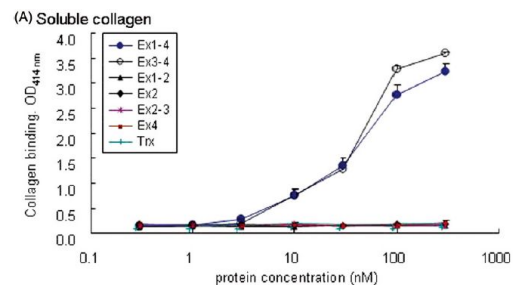
in vivo 止血モデル: AAPP 投与後にマウス尾静脈を切っても通常通りに止血した。一方、アスピリン投与群では止血することができ

なかった。また AAPP は白血球数、ヘマトクリット値に悪影響を及ぼさなかった。

肺血栓モデル: AAPP あるいはアスピリンをマウスの尾静脈から接種後、コラーゲンを接種し、肺血栓を起こさせると AAPP 投与群で著しい生存率 (アスピリンの 10 倍) を示した。

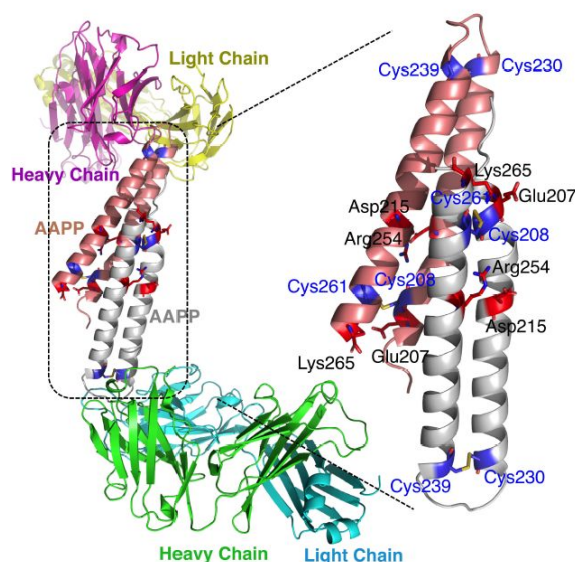


(3) AAPP のコラーゲン結合部位を限定創薬化実現に向け AAPP の低分子化を目指し、AAPP 欠失変異体の作製を行い、コラーゲン結合部位の同定を行った。その結果、AAPP のコラーゲン結合部位はエクソン 3-4 であることが明らかになった。



(4) AAPP の血小板凝集阻害をキャンセルできるモノクローナル抗体 (8H7 mAb) の取得に成功した。さらに、8H7 mAb の AAPP 結合部位を同定し、そのアミノ酸配列を決定した (特許出願)。

(5) 組換え AAPP と 8H7 mAb との共結晶化法を開発し、部分的ではあるが X 線結晶解析に成功した。構造解析の結果、AAPP は線状層状構造をとっている非常に奇異なタンパクであることが明らかとなった。



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 4 件)

- (1) Sugiyama K, Iyori M, Sawaguchi A, Akashi S, Tame JR, Park SY, Yoshida S: The crystal structure of the active domain of Anopheles anti-platelet protein, a powerful anti-coagulant, in complex with an antibody. *J Biol Chem* 2014 in press (査読有り)。
- (2) Yamamoto D, Yokomine T, Sumitani M, Yagi K, Matsuoka H, Yoshida S: Visualization and live imaging analysis of a mosquito saliva protein in host animal skin using a transgenic mosquito with a secreted luciferase reporter system. *Insect Mol Biol*. 22: 685-93, 2013 (査読有り)。
- (3) Sumitani M, Kasashima K, Yamamoto DS, Yagi K, Yuda M, Matsuoka H, Yoshida S: Reduction of malaria transmission by transgenic mosquitoes expressing an anti-sporozoite antibody in their salivary glands. *Insect Mol Biol*. 22: 41-51, 2013

(査読有り)。

- (4) Hayashi H, Kyushiki H, Nagano K, Sudo T, Iyori M, Matsuoka H, Yoshida S: Identification of the active region responsible for the anti-thrombotic activity of anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito. *Platelets*. 24: 324-332, 2013 (査読有り)。

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 伊従光洋, 藤吉里紗, 舟津知宏, 澤口明日香, Din Syafruddin, 吉田栄人. インドネシア人における蚊唾液タンパクに対する抗体価とマラリア感染. 第 66 回日本衛生動物学会大会 2014 年 3 月 21-23 日 岐阜大学 (岐阜)
- (2) 伊従光洋, 澤口明日香, 吉田栄人. 2 種の蚊由来唾液タンパクにおける生物学的機能比較. 第 70 回日本衛生動物学会西日本支部大会 2013 年 10 月 26-27 日 越前市福祉健康センター (越前市)
- (3) 吉田栄人. Genetic modification (GM) ハマダラカの唾液腺内のマラリア原虫の動態の in vivo イメージング. 第 69 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2013 年 10 月 19-20 日 穴吹ホール (高松)
- (4) 伊従光洋, 藤吉里紗, 澤口明日香, 吉田栄人. ハマダラカ唾液タンパク AAPP に対する抗体の特性. 第 54 回日本熱帯医学会大会 2013 年 10 月 3-5 日 長崎パブリックホール (長崎)
- (5) 吉田栄人 「Vector-borne diseases 研究: ラボからフィールドへ」 トランスジェニック蚊を用いたマラリア原虫-唾液腺相互作用の解明. 日本獣医寄生虫学会シンポジウム 2013 年 3 月 28 日 東京大学駒場キャンパス (東京)
- (6) Yoshida S, Yamamoto D, Sumitani, M, Matsuoka H.: Salivary glands as vaccine delivery target. XXIV International Congress of Entomology (ICE 2012) 2012.8.19-23. Exco-Daegu Exhibition Hall (Korea, Daejeon)
- (7) 炭谷めぐみ, 笠島克巳, 八木啓太, 山本大介, 油田正夫, 松岡裕之, 吉田栄人. 抗マラリアスポロゾイト抗体を唾液腺で発現する遺伝子組換えハマダラカはマラリア伝播能を喪失する. 第 30 回北陸病害動物研究会 2012 年 6 月 30 日 三国文化未来館ホール (板井市)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：Anopheline Anti-Platelet Protein

を認識する抗体又は抗体断片

発明者：吉田栄人

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：特願 2013-031891

出願年月日：2013年2月21日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 栄人 (YOSHIDA Shigeto)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10296121

(2)研究分担者

伊従 光洋 (IYORI Mitsuhiro)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：20608351