

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461463

研究課題名(和文) 血小板とフォン・ビルブランド因子の相互作用を中心とした血栓形成の制御

研究課題名(英文) Regulation of thrombus formation by modulating platelet-von Willebrand factor interaction

研究代表者

松井 太衛 (MATSUI, Taei)

藤田保健衛生大学・保健学研究科・教授

研究者番号：90183946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血栓は、血小板 GPIb と血漿タンパク質であるフォン・ビルブランド因子(VWF)の相互作用が発端となって形成される。本研究では、VWF に特異的に結合して GPIb 依存性の血小板凝集を惹起するヘビ毒由来タンパク質のボトロセチン2に着目し、VWF や GPIb との結合に重要なアミノ酸残基を同定した。さらに GPIb との結合に関与する2つの塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換することで、VWF に結合するが血小板凝集を惹起せず、逆に VWF のによる血小板凝集を阻害する変異体ボトロセチン2の作製に成功した。本研究は VWF を標的としたユニークな抗血栓剤の開発につながる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Platelet plug formation is triggered by the early interaction between platelet GPIb and von Willebrand factor (VWF). I have focused on the structure and function of botrocetin2, the snake venom derived protein that specifically binds to VWF and induces GPIb-dependent platelet agglutination. I have elucidated important residues of botrocetin2 for binding to VWF and GPIb, respectively. By substituting basic two residues of botrocetin2 that are important for GPIb-binding to acidic residues, this mutant botrocetin2 showed no agonist activity for platelet agglutination, conversely, it deprived VWF of platelet agglutinability. Present results suggest the possibility that this mutant botrocetin2 may lead to an anti-thrombus reagent specifically targeting VWF.

研究分野：血栓止血学

キーワード：フォン・ビルブランド因子 血小板 GPIb ボトロセチン2 血小板凝集 抗血栓 組換えタンパク質

1. 研究開始当初の背景

血栓形成の異常は、エコノミー症候群をはじめ、脳梗塞や肺塞栓、心筋梗塞など深刻な循環障害を招き、死因の上位を占める。したがって、血栓形成メカニズムの解明を始め、血栓形成の制御や血栓性素因の診断、検査はこれらの予防や治療においても非常に重要な意味を持っている。

初期の血栓形成においては、血漿中のフォンウィルブラント因子(VWF)と血小板膜受容体である GPIb の相互作用が最も重要であり、GPIb を介した刺激の繰り返しは血小板内に伝達され、血小板の活性化と凝集を導く。この、VWF-GPIb 依存性の血小板凝集は、試験管内では一般に放線菌由来のリストセチンによってミミックされ、VWF 異常に起因するフォンウィルブラント病(VWD)や GPIb 欠損に起因するベルナル・スーリエ症候群の補助診断に用いられている。

リストセチンは、1970 年代に抗生物質候補として開発されたが、血小板凝集作用があり、そこから転用された試薬である。調製が容易であるため、現在も VWF-GPIb 依存性血小板凝集の検査試薬としてゴールドスタンダードとなっている。しかしながら、リストセチンは、イヌやモルモットなどの実験動物では効果がないこと、有効濃度が 1mg/mL 前後と比較的高く、2mg/mL 以上ではフィブリノゲンを沈殿させること、陰性荷電や Pro に結合し VWF に特異的ではないなどの弱点があった。これに対して、ヘビ毒(南米産マムシ科ヘビ *Bothrops jararaca*) からスクリーニングされたボトロセチンは、広く動物種を選ばず、基礎研究に有利であるばかりでなく、1-4 µg/mL 程度で VWF 特異的に結合して血小板凝集を惹起する。また、ボトロセチンの作用機序や立体構造が解明され、ボトロセチンは、VWF (A1 ドメイン) に結合し、この複合体が GPIb との高い親和性を持った結合面を形成することで血小板凝集を惹起することが明らかにされている。

このようにボトロセチンは、リストセチンの弱点をカバーし、*in vitro* での検査試薬として極めて有用であり、優位性を持っている。しかしながら、リストセチンのように標準試薬とならないのは、ボトロセチンが天然毒由来であるため、精製の煩雑さに加えて粗毒のメーカーやロット間での不均一性もあり、検査試薬としての実用化が難しいからである(市販品も見つかるが高価である)。さらにワシントン条約により、粗毒の入手自体が困難となっていることもその理由の 1 つであ

る。そこで、本研究室では、これらの問題を払拭するべく、組換えボトロセチンの産生をめざしてきた。先行研究では、ヘビの毒腺から得られた cDNA ライブラリー中からボトロセチンとホモロジーの高い cDNA をクローニングした。この cDNA を培養細胞で発現させたところ、ボトロセチンとほぼ同様の活性を示したことからこれを組換えボトロセチン 2 (rBot2) と名づけた。さらにいくつかの荷電アミノ酸残基を逐次 Ala に置換した変異導入 rBot2 を用いて、血小板凝集惹起活性に関与するアミノ酸残基を明らかにした。

2. 研究の目的

(1) ボトロセチンの作用機序をさらに詳細に解析するために、本研究では rBot2 を用いて、まだ解明されていない VWF 及び GPIb との結合に必須のアミノ酸残基(あるいは領域)を明らかにする。

(2) GPIb との結合に関与する rBot2 のアミノ酸残基が明らかになれば、VWF には結合するが血小板凝集を惹起しない rBot2 変異体を作り出す。

(3) さらに VWF との結合には影響しないが、GPIb との結合を積極的に阻害する変異体を設計し、VWF の血小板凝集惹起活性を抑制する抗血栓性を持った新規タンパク質の創製をめざす。本研究は、このように VWF に対するボトロセチンの特異的な結合能を生かした新しい組換えタンパク質の作製を目標とした。

この他、別のヘビ毒由来の VWF-GPIb 依存性血小板凝集惹起タンパク質であるピチセチンや、同じく本研究室でクローニングしたヘビ毒由来の GPIb 結合タンパク質、に関して、血栓形成制御に関する研究指針を示していたが、時間がなく研究期間内に進めることができなかつたため省略する。

これまでに本研究室で cDNA クローニングをおこなってきたボトロセチン、ピチセチン、GPIb-BP を中心に、量的な到達目標として組換えタンパク質の大量調製法と効率的な精製法を確立する。質的な到達目標としては、アミノ酸変異を導入しながら組換えタンパク質における構造と血小板-VWF 間の制御活性相関を分子レベルで精査する。特に VWF と GPIb との結合部位(重要アミノ酸残基の決定)の特定を進め、その部分のアミノ酸変異体によるドミナントネガティブな阻害タンパク質の産生をはじめ、活性部位の狭小化、限局化を進め、さらに小型の活性物質の創製を目指していく。さらに VWF に結

合し GPIb の結合を直接ブロックする新規タンパク質の探索をおこなうなど、ヘビ毒の多様性を十分に活用し、遺伝子工学を利用することで、血栓形成の基礎研究や、臨床検査、抗血栓剤への臨床応用に役立つ優れた分子ツールを創り出すことを目的とした

3. 研究の方法

(1) 変異体 rBot2 の調製と発現。rBot2 の cDNA に対して、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いて変異を導入した。変異が正しく導入されていることを DNA シークエンスにより確認した。この cDNA を含むプラスミドを Maxiprep Kit (Qiagen 社) で増幅した。10% FBS を含む D-MEM 培養液で培養した 293T 細胞 (細胞バンク) に対して、GeneJuice (Novagen 社) を用いてプラスミドをトランスフェクトした。48-72 時間後、培養液を回収し、タンパク分解酵素阻害剤カクテルを添加して冷凍保存した。

(2) 変異体 rBot2 の精製。抗ボトロセチンモノクローン抗体を固相化した抗体カラムを作製した。このカラムに細胞培養液を流し、十分カラムを T (BS で洗浄した後、pH2.7 の酸性溶液で吸着画分を溶出させた。280nm の吸収をモニターし、ピーク画分を集め中和した後、遠心濃縮した。タンパク質濃度は BSA を標準物質として BCA 法 (Pierce 社) で定量した。また、一部を SDS-PAGE にかかけ、純度を検定した。

(3) 変異体 rBot2 の VWF 及び GPIb 結合活性の測定。変異体及び野生型 rBot2 を PVDF 膜に定量的に固相化したドットプロットに対して VWF を反応させ、抗 VWF 抗体で VWF の結合を検出した。同様に ELISA プレートに VWF を固相化し、rBot2 変異体を添加して、抗ボトロセチン抗体により rBot2 の結合を評価した。さらに ELISA プレートに固相化した VWF に対して rBot2 変異体と GPIb 由来のグリコカリシンを同時に添加し、グリコカリシンの結合を評価した。このため、グリコカリシンは前もってビオチン標識した。

(4) 血小板凝集アッセイ。インフォームドコンセントを得た健常者から採血し、クエン酸血から多血小板血漿 (PRP) を得る。血球計算機で 30 万血小板/ μL に調製後、250 μL をキュベットに入れ、凝集メーターを用いて 37 で透過光量を測定した。試験液を 5 μL 添加して数分間透過光量をモニターした。リストセチン凝集に対する影響は、PRP に変異

体 rBot2 を添加し、2 分後にリストセチン (1-1.5mg/mL) を添加した。

(5) ずり応力惹起血小板凝集 (SIPA)。PRP をコーンプレート型血小板凝集系にセットし、試験液添加後に抗ずり応力を負荷し、レーザー光を使って血小板凝集をモニターした。SIPA 解析は、奈良医大輸血部の松本雅則教授に協力いただいた。

(6) rBot2 の立体構造推測。ボトロセチン-VWF-GPIb 三者複合体の立体構造モデルを参考に、rBot2 のホモロジーモデリングを行い、VWF や GPIb との接触面にあるアミノ酸残基を推定した。

4. 研究成果

(1) ボトロセチン 2 の VWF 及び GPIb との結合に関与するアミノ酸残基の同定：先行研究で、5 種の Ala 置換変異体 rBot2 (Glu 107Ala、Asp 70Ala、Asp 88Ala、Arg 115Ala、Lys 117Ala) は血小板凝集惹起活性が低下することを見出している。これらの Ala 置換変異体 rBot2 の、VWF や グリコカリシン (GPIb) との結合活性を調べた。PVDF 膜に定量的にドット・プロットした変異体 rBot2 の、VWF との結合態度を図 1 に示す。Asp 70、Asp 88、Glu 107 の Ala 置換変異体で VWF との結合活性の低下がみられた。

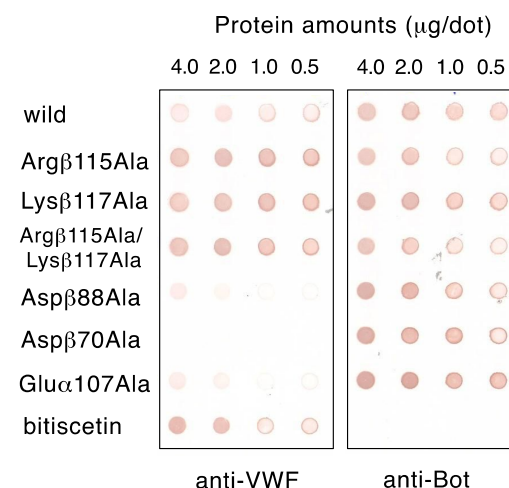


図 1：ドットプロット法による変異体 rBot2 の VWF 結合

また Arg 115、Lys 117 の各変異体では VWF との結合は野生型と変わらなかったが、グリコカリシンとの結合活性が低下していた (図 2)。一方、GPIb の N 末端側に接触すると予想して調製した Glu 48、Asp 50、Lys 108、Asp 109、Leu 59、Lys 60 の Ala 置換体などは、野生型と同じ血小板凝集惹起活性を示した。これらの結果から、rBot2 を構成するアミノ酸残基のうち、Asp 70、Asp 88、Glu 107

はVWFとの結合に、Arg 115、Lys 117はGPIbとの結合に關与するものと推定された。

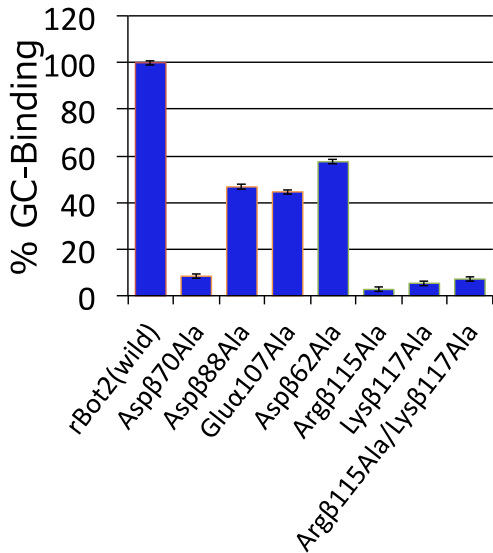


図2 ELISAによる変異体rBo2-VWF複合体とのグリコカリシン(GC)の結合

(2) 抗血栓性ドミナントネガティブ・ボトロセチンの作製：Arg 115、Lys 117の位置をrBot2-VWF-GPIb三者複合体の立体構造モデルから解析したところ、GPIbのAsp222が近傍にあることが明らかとなった。これら荷電アミノ酸間の正・負の静電的な相互作用がrBot2とGPIb間の結合親和性の基になると予想し、互いに反発し合う荷電アミノ酸に置換することで、VWFに結合するが血小板凝集を阻害する活性を持った変異体rBot2が作製できるのではないかと考えた。そこで、これらの塩基性残基を酸性アミノ酸に置換することでより強い反発が観察されることを期待して、Glu

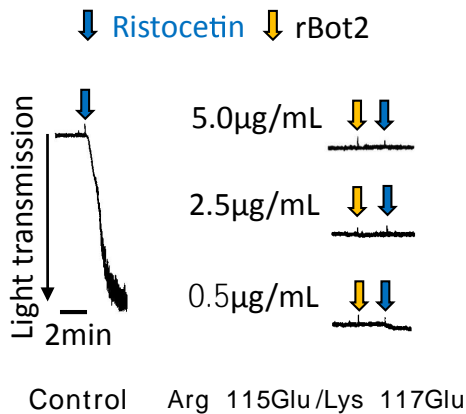


図3 変異体rBo2によるリストセチン凝集の阻害

に置換した変異体を作製した。単独でGluに置換した変異体rBot2このダブル変異体はVWFとの結合能は変化しなかったが、血小板凝集惹

起活性は示さず、さらにリストセチンによる血小板凝集を濃度依存的に阻害した(図3)。この結果から、Arg 115Glu、Lys 117Gluのダブル変異体rBot2は、VWFに特異的に結合しGPIb依存性血小板凝集を阻害する変異体と考えられた。

(3) 変異体rBot2のずり応力惹起血小板凝集(SIPA)に及ぼす影響：奈良医大輸血部(松本教授)との共同研究により変異体rBot2のSIPAに対する影響を調べた。その結果、VWFとの結合に重要なアミノ酸である鎖のAsp70をAlaに置換した変異体はVWFとの結合をELISA系では示さず、血小板凝集惹起活性も弱かったが、SIPAでは血小板凝集を促進させた。また、1アミノ酸置換の変異体は、ELISAではグリコカリシンとの結合が低下したが、SIPAではこれを阻害せず、むしろ促進的に作用した。これに対し2箇所のアミノ酸置換変異体(Arg 115Glu/Lys 117Glu)はリストセチン惹起血小板凝集の阻害と同様に、SIPA凝集を阻害した(図4)。すなわち、VWFに結合する活性はそのままに血小板との相互作用を持たず、逆に血小板の相互作用を抑制する新規のタンパク質であることが示された。

さらに、rBot2とVWFとの複合体の立体構造モデルから、両者の接触点をサーベイし、先の2箇所の荷電アミノ酸に加えていくつかの候補荷電アミノ酸残基を選定し、これも逆荷電アミノ酸に置換することでより強い血小板凝集阻害効果を狙って発現を行った。

Arg 115Glu/Lys 117Gluに加えて、鎖のGlu18やAsp62をArgに置換した2種類の発現体はいずれもリストセチン惹起凝集を阻害したが、Arg 115Glu/Lys 117Gluのダブル変異体とほぼ同じ活性を示したことから、この2カ所で十分であると推定された。また、Gluの代わりに同じ酸性アミノ酸であるAspに置換したArg 115Asp/Lys 117Aspを発現させて活性を調べたが、Glu置換体とほぼ同じリストセチン凝集阻害活性を示した。したがって、ダブル変異体によるリストセチン凝集阻害活性は酸性アミノ酸に置換されたことによるrBot2の立体構造の大きな変化によることも考えられるが、むしろ酸性アミノ酸残基間の静電的な反発に起因することが示唆された(以上、論文投稿準備中)。

現在の発現系は哺乳類動物細胞を使った系であり、実験室レベルの発現にとどまっている。工業規模で発現を行うためには大量発現系の構築が問題となる。このため、昆虫細胞

発現系でのrBot2を試行した。昆虫細胞での発現ベクターを本研究室で作製し、発現は和光純薬に委託した。ポトロセチン2の2つのサブユニットのcDNAを同時に昆虫細胞にコトラン

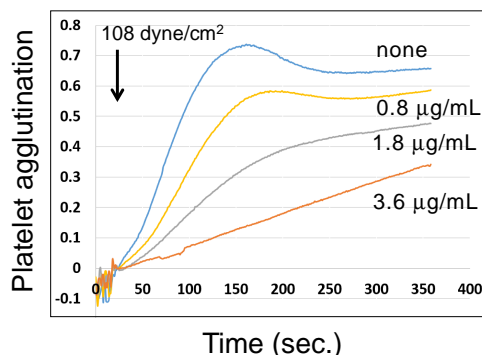


図4 Arg 115Glu/Lys 117Glu変異体rBot2によるSIPAの阻害

スフェクションして得られた培養液を抗ポトロセチン抗体カラムにかけることで、ヒト培養細胞(293T)と同程度のrBot2の産生に成功した。今回は50mLの小規模の培養であるが、昆虫細胞を大量培養することでrBot2の大量産生も可能になると思われた。今後、研究資金が得られれば、今回得られた変異体rBot2の発現も試行したいと考える。

(5) 今後の展望と課題：本研究によって、組換えポトロセチンのVWFやGPIbに対する作用機作がまた1つ明らかになった。さらに、それを手がかりとしてポトロセチン本来の血小板凝集の惹起活性とは逆の血小板凝集阻害活性を示す変異体の創出に成功した。また、昆虫細胞での発現は、リストセチンに代わるVWF-GPIb依存性血小板凝集惹起タンパク質として組換えポトロセチンを用いる可能性を示したものと言える。本研究で初めて作製された、リストセチンやずり応力による血小板凝集を阻害する活性を持った変異体は、in vivoにおいても、血小板凝集を抑制できる可能性がある。現在までに、血小板凝集を抑制する薬剤はディスインテグリンをはじめほとんどがGPIIb/IIIaを抑えるものである。GPIbを抑制するヘビ毒がいくつか報告されているが、実験動物を使ったin vivo実験では血小板減少が観察され、実用化されていない。唯一、anfibatideと名付けられたヘビ毒由来のGPIb結合タンパク質が動物実験でも血栓形成を抑えることが最近報告されているのみである。GPIbやGPIIb/IIIa抑制性タンパク質は、直接これらの膜タンパク質と結合するため、血小板に何らかのシグナルを発生させる可能性があり、そのようなシグナルを生み出さずに機能を制御するのは難しいものがある。また、

体内を循環している血小板をカバーするのは難しい。

一方、VWF側をブロックするのは、主にモノクローン抗体から派生した小型化抗体と、DNAアプタマーに限定されている。今回、本研究で創出された変異体rBot2は、血小板には作用せずVWF特異的に結合してその血小板凝集活性を抑制する点でin vivoでも同様の活性を持つならば極めて有用であると思われる。また、血小板ではなくVWFを一時的に抑制することは、抗血栓剤として有用であるほか、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)などのVWFが亢進した血栓性状態を治療する1つの薬剤となる可能性がある。今後は、in vitroからin vivoでのアッセイ系に広げてその作用を詳しく調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Hasan I., Sugawara S., Fujii Y., Koide Y., Terada D., Imura N., Fujiwara T., Takahashi K.G., Kojima N., Rajia S., Kawsar S.M., Kanaly R.A., Uchiyama H., Hosono M., Ogawa Y., Fujita H., Hamako J., Matsui T., Ozeki Y. : MytiLec, a Mussel R-Type Lectin, Interacts with Surface Glycan Gb3 on Burkitt's Lymphoma Cells to Trigger Apoptosis through Multiple Pathways. *Mar Drugs*. 査読有 13(12): 7377-7389, 2015 doi: 10.3390/md13127071.

Hasan I., Watanabe M., Ishizaki N., Sugita-Konishi Y., Kawakami Y., Suzuki J., Dogasaki C., Rajia S., Kawsar S.M., Koide Y., Kanaly R.A., Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Fujii Y., Iriko H., Hamako J., Matsui T., Ozeki Y. : A Galactose-Binding Lectin Isolated from *Aplysia kurodai* (Sea Hare) Eggs Inhibits Streptolysin - Induced Hemolysis. *Molecules*. 査読有 5;19(9): 13990 - 14003, 2014 doi: 10.3390/molecules190913990.

松井太衛、濱子二治：フォンウィルブラント因子の糖鎖構造と機能～ABO血液型～. *血液フロンティア* 査読無 24(8): 45-54, 2014 https://www.iyaku-j.com/iyaku/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=28676.

Dijkstra J.M., Takizawa F., Fischer U., Friedrich M., Soto-Lampe V., Lefèvre C., Lenk M., Karger A., Matsui T., Hashimoto K.: Identification of a gene for an ancient cytokine, interleukin 15-like, in mammals; interleukins 2 and 15 co-evolved with this third family member, all sharing binding motifs for IL-15R. Immunogenetics. 査読有 66(2):93-103, 2014 doi: 10.1007/s00251-013-0747-0.

松井太衛、瀧子二治: pH とずり応力に感受性を持つ血漿タンパク質である von Willebrand 因子の構造と機能. 日本血栓止血学会誌 査読無 24(1): 68-75, 2013 <http://doi.org/10.2491/jjsth.24.68>.

[学会発表](計10件)

Matsui T., Hori A, Hamako J, Matsushita F, Takagishi N, Kondo K, Kano T, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y.: Regulation of VWF-GPIIb interaction with modified recombinant botrocetin. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH2015), Toronto (Canada), June 20-25, 2015.

高岸波穂, 堀有沙, 瀧子二治, 松下文雄, 松本雅則, 早川正樹, 藤村吉博, 狩野泰輝, 近藤一直, 松井太衛: 変異導入組換えポトロセチン-2 を用いた血小板凝集の制御. 第37回日本血栓止血学会学術集会、山梨県甲府市、2015年5月21-23日

松井太衛: *Bitis arietans* ヘビ毒に含まれる血小板凝集惹起タンパク質 bitiscetin の構造と機能. トキシシンポジウム運営委員会ミニセミナー、東京、2015年2月28日

松井太衛: フォンウィルブランド因子のグリコバイオロジー. 第20回 ADAMTS13 研究会、奈良県奈良市、2014年9月18日

松井太衛、堀有沙、瀧子二治、松下文雄、松本雅則、藤村吉博: VWF-GPIIb 依存性血小板凝集を惹起するヘビ毒ポト

ロセチンの発現と機能制御. 第61回トキシシンポジウム、徳島県徳島市、2014年9月3-5日

高岸波穂、堀有沙、松下文雄、瀧子二治、狩野泰輝、近藤一直、松本雅則、藤村吉博、松井太衛: VWF-GPIIb 依存性血小板凝集を制御する組換えポトロセチン-2 変異体の発現. 第9回日本臨床検査学教育学会学術大会、東京、2014年8月20-22日

狩野泰輝、堀有沙、松下文雄、瀧子二治、近藤一直、松井太衛: ELISA 系を用いた血液型 A、B 転移酵素活性の検出. 第8回日本臨床検査学教育学会学術大会、大阪市、2013年8月26-28日

堀有沙、狩野泰輝、松下文雄、瀧子二治、松井太衛: VWF と GPIIb 依存性血小板凝集を惹起する組換えポトロセチン-2 の作用部位の解析. 第8回日本臨床検査学教育学会学術大会、大阪市、2013年8月26-28日

狩野泰輝、堀有沙、松下文雄、瀧子二治、松本雅則、藤村博、松井太衛: ヒト VWF に存在する ABO(H) 血液型抗原の付加経路の解析. 第35回日本血栓止血学会学術集会、山形県山形市、2013年5月30-6月1日

堀有沙、狩野泰輝、松下文雄、瀧子二治、松本雅則、藤村博、松井太衛: 組換えポトロセチン-2 における VWF および GPIIb 結合サイトの解析. 第35回日本血栓止血学会学術集会、山形県山形市、2013年5月30-6月1日

[その他]

ホームページ等

web page:

<http://www.fujita-hu.ac.jp/teacher/health/e-health/m-taei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井太衛 (MATSUI, Taei)

藤田保健衛生大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 90183946