

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560209

研究課題名(和文) vWF分子機構における血小板粘着力生成のナノバイオメカニクス

研究課題名(英文) Nanobiomechanics of adhesion force generated in the molecular mechanism of VWF

研究代表者

谷下 一夫 (TANISHITA, Kazuo)

早稲田大学・ナノ理工学研究機構・教授

研究者番号：10101776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血小板表面の糖タンパクGPIb が、血漿中のVWFと呼ばれるタンパクと結合して、粘着力を発生し、凝集・血栓形成となる。そこで、本研究では、VWFの分子レベルでの立体構造変化と粘着力のせん断速度依存性を明らかにするために、粘着力を原子間力顕微鏡によって直接測定して、粘着力発生に関して検討を行った。AFMによって得られたフォースカーブには単一ピークとマルチピークが現れ、単分子結合力は、52.0pNと求められ、光ピンセットで得られた値と一致した。マルチピークのカーブからは、VWFのアンフォルディングの特性が得られ、分子レベルの立体構造変化を捉える事が出来た。

研究成果の概要(英文)：The adhesive force due to the molecular interaction between VWF and Glycoprotein Ib has not been fully explored. Thus, we employed the Atomic force microscopy (AFM) to directly measure the adhesive force between VWF and GPIb. The Gaussian fits analysis gave the adhesive force of single bond, being 54 or 107 pN. Our consideration with the Gaussian fits analysis proposed that the adhesive force of single bond could be 54 pN, which is very close to that obtained by optical tweezers; 50 pN. Furthermore the force curve showed not only a single peak but also multiple peak. The present result suggests that adhesive force of multiple peaks increased only at 1500 /s is not due to increased single binding force but due to the increased number of bindings. AFM images showed that there were significant differences of VWF conformation between 0 and 1500 /s shear rates at concentration of 1μg/mL VWF.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス 血小板 粘着力 VWF 原子間力顕微鏡 せん断応力

1. 研究開始当初の背景

血小板は一次止血に重要な役割を果たしているが、近年、臨床医学分野ではアテローム血栓症を発症する細胞として、血小板に注目が集まっている。特に血流と関わりながら、粘着、放出及び凝集が生じている点を考慮すると、マイクロナノレベルの血栓形成のバイオメカニクスを明らかにする必要がある。血流のせん断によって誘起される血小板凝集には、フォン・ウィリアムズ因子 (vWF) が深く関わっている事が知られている。vWF は、血小板に存在する糖タンパク GPIb α と結合して、粘着力が生じる事が知られているが、そのバイオメカニクスの分子機構に関しては、不明な点が多く残されている。そこで、本研究では血栓形成の分子制御機構におけるバイオメカニクスの役割を明らかにする事を目的に、血流の刺激を受けた vWF と GPIb α との相互作用を直接計測して、粘着発生の分子機構を明らかにする。特に、血流のせん断が分子機構に与える影響に重点を置く。

2. 研究の目的

急速に血栓形成が進むアテローム血栓症の医療において、血小板粘着凝集のダイナミクスの解明が必要である。血流のせん断によって誘起される血小板凝集には、フォン・ウィリアムズ因子 (vWF) が深く関わっており、vWF は、血小板に存在する糖タンパク GPIb α と結合して、粘着力が生じる事が知られているが、そのバイオメカニクスの分子機構に関しては、不明な点が多く残されている。特に、vWF と GPIb α の間での血流のせん断依存的な相互作用を明らかにする必要がある。そこで、粘着力発生の分子機構を原子間力顕微鏡と光ピンセットなどの実験から明らかにする事を目的とする。即ちアテローム血栓症のナノバイオメカニクスの分子機

構を明らかにする。

vWF と GPIb α は、vWF 内の粘着発生ドメイン (A1) で結合されることが知られている。図 1 に、その分子モデルを示す。血栓症の分子機構を明らかにするためには、分子レ

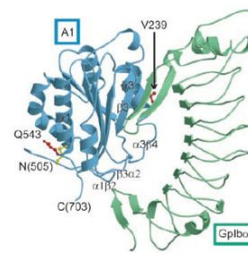


図1. vWFとGPIb α との結合の分子モデル

ベルでの粘着力の直接計測が必要である。現在、有効な計測方法としては、光ピンセットによる引っ張り試験と

原子間力顕微鏡によるフォースカーブから求める方法がある。そこで、研究期間内に、血小板凝集粘着に主要な役割を演じる vWF と GPIb α との間に生じる粘着力を原子間力顕微鏡並びに光ピンセットで直接計測し、血小板粘着の分子機構を明らかにし、特に、血流のせん断による影響に関して、マイクロナノ流体力学の観点から検討を行う。

従来、血小板粘着と凝集は、血流のせん断によって誘起される事が知られていたが、マクロ的な計測が中心で、その分子機構に関する議論が少なかった。近年のナノスケールの計測技術の進歩によって、直接計測が可能になり、分子機構が明らかになると、急速に生じるアテローム血栓症のメカニズムが解明され、創薬やステントなどの医療機器による治療法が進展する。このように臨床医学的な意義に加えて、血流とナノスケールでの分子機構との関係が明らかになることにより、新しいマイクロナノ流体力学が開拓される。これまでの流体力学は巨視的観点により体系付けられて来たが、マイクロナノレベルの流体力学が進展する貴重な機会となる。

3. 研究の方法

平行平板間の流れによって、vWF 壁面へせん断応力の刺激を与え、その状態で壁面に粘着する GPIIb/IIIa による粘着力を計測する。具体的には二通りの方法で行う。一つは、ラテックス粒子表面に被覆した GPIIb/IIIa による粘着を流路内でマクロ的に計測する。二つ目は、原子間力顕微鏡 (AFM) によって、vWF 壁面と GPIIb/IIIa との間で生じる粘着力を直接計測する。本研究では、AFM による計測結果に重点を置いて、解析を行う。これはナノスケールでの計測となる。さらに 1 分子同士で発生した粘着力を計測可能にするための工夫を行う。得られたフォースカーブは、粘着力の力学的な情報のみならず、分子の折りたたみ構造を反映したアンフォルディングの特性も得られるので、フォースカーブの解析に重点を置く。さらに光ピンセットによる方法により粘着力の実測を行い、原子間力顕微鏡との比較を行う。

【25 年度】

(1)vWF と GPIIb/IIIa との粘着力のマクロ計測：マイクロ流路によるアプローチ
実際の血小板を用いる実験に加えて、vWF と GPIIb/IIIa の相互作用の素過程を明らかにするために、ラテックス粒子上に GPIIb/IIIa を被覆した人工血小板を用いて、せん断流れにおける vWF 表面への粘着の計測を行う。平行平板流路内に懸濁液を流して、vWF 壁面への粒子の粘着を高速ビデオにより撮影して、せん断速度と粘着との関係を明らかにする。このようなマイクロ流路で得られる結果からは、分子機構を論ずる事は出来ないが、大まかな傾向を把握するためには優れた方法である。

(2)vWF と GPIIb/IIIa との粘着力のナノスケール計測：原子間力顕微鏡によるアプローチ

原子間力顕微鏡によって得られるフォースカーブから、vWF と GPIIb/IIIa との粘着力を定量的に求める事が可能である。壁面上に vWF を被覆して、原子間力顕微鏡のカンチレバー上に GPIIb/IIIa を被覆して、両者を接触させて、カンチレバーを引き上げる時のたわみによって、両者の間の粘着力を計測する。

(3)1 分子同士の相互作用の計測：マイクロ流路で、被覆された vWF 分子にせん断応力の刺激を加える。その後、vWF 分子に直接 GPIIb/IIIa が被覆されたカンチレバーを接触させて、フォースカーブを求め、カンチレバーのたわみ量から粘着力を計測する。

(4)フォースカーブのピーク特性

予備的な検討の結果、フォースカーブは、vWF 分子の重要な立体構造を反映している可能性がある。特に、マルチピークは、分子のアンフォルディングの状況を反映しているため、分子の立体的配置との関連があり、分子に関する重要な情報を含むカーブである。この観点に基づき、解析を進める。

(5)1 分子粘着力に基づく血流中の血栓形成の解析

アテローム血栓症や動脈瘤などの動脈病変で生じる血栓形成のダイナミクスを主として数値流体力学によって解析する。

【26 年度】

(1)25 年度で行った実験の継続と、フォースカーブの解析を行い、シングルピークとマルチピークの分子の意味を探る。

(2)vWF 分子の形態変化に関して、AFM により計測して、画像から vWF の流れによる変化に関して解析を行う。図 9 は、予備的に得られた画像で、白い粒子が繋がっているように見えるのが、vWF の 1 分子と考えられ、この分子の立体的な形態が、せん断流れの負荷によっ

て大きく変化する事が認められた。

(3) 血流中の血栓形成の計算機シミュレーション

(4) 2 年間で得られた結果から、粘着力発生時の分子機構のナノバイオメカニクスを明らかにする。

4. 研究成果

血小板の凝集、粘着は、血小板表面に存在している多くの糖タンパクレセプターによって統御されている。損傷された血管壁では、血小板表面の糖タンパク GPIb が高いせん断速度の基で、血漿中の vWF (von Willebrand Factor) と呼ばれるタンパクと結合して、粘着力を発生し、凝集・血栓形成となる。高いせん断応力が、GPIb と vWF の立体構造変化を誘起すると考えられており、その結果として両者の結合を促進している。そこで、本研究では、vWF の分子レベルでの立体構造変化と粘着力のせん断速度依存性を明らかにするために、粘着力を原子間力顕微鏡によって直接測定して、粘着力発生に関して検討を行った。AFM によって得られたフォースカーブの内、単一ピークによって得られた粘着力は、せん断速度には依存していない。さらに、粘着力のヒストグラムから、ガウスフィットにより、そのピーク値を求めた。Arya et al.(2005)による光ピンセットを用いた粘着力測定の結果(50pN)に近い事が分かった。さらに、ガウスフィットによる得られた極大値を50 pN の整数倍と考えて、本研究で求められた単分子結合力は、52.0pN と求められた。複数ピークに関しても粘着力を算出した結果、全ての条件において濃度依存性が見られた。複数ピークのフォースカーブで、最初のピークと2番目のピークを識別して、粘着力を求めたところ、最初のピークで

は、51.8pN、二番目のピークでは、52.0pN であった。これらの値は、単一ピークの場合の粘着力に一致しており、単分子あたりの粘着力は一定であることが示唆された。そこで、複数ピークの粘着力に有意差が生じたのは、粘着箇所の数が増えたのであって、単分子あたりの粘着力が増加したわけではないと考えた。これらの結果は、粘着力にせん断依存性があるという従来の見解と異なる結果で、分子の立体構造の変化の面から妥当性のある結果と思われる。

それぞれのピークの長さに対するヒストグラムを算出し、ガウスフィッティングをかけた。その結果、ピークの値は74.6, 69.3, 80.7, 67.4, 68.3, 74.3 nm と求められ、それらの平均値は 72.4 ± 2.4 nm と求められた。この値は1つあたり0.34~0.38 nm のアミノ酸193個(65.6~73.3 nm)から成り、非常に弱い力で unfold する VWF A2 domain の長さとも一致する。

フォースカーブに複数のピークが現れる要因として、VWFA2 ドメインのアンフォルディングが関わっている可能性が高い。光ピンセットによる A2 ドメインのアンフォルディングが直接計測された例(1)があるが、AFM によってアンフォルディングが計測された例は無い。同時に粘着力を求める事が出来るので、アンフォルディングを踏まえた粘着力の状況を把握する事が出来る。粘着力は、高せん断の時に有意差が生じたのは、分子の粘着部位が増加したと考える事が妥当で、単分子同志の粘着力が変化したのではない。この結果は、単一ピークの場合の粘着力の考察と整合する。

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 2 件)

- (1) Hiroaki TOBIMATSU, Yuichiro NISHIBUCHI, Ryo SUDO, Shinya GOTO, Kazuo TANISHITA, Adhesive forces between A1 domain of von Willebrand Factor and N-terminus domain of Glycoprotein Iba α measured by Atomic Force Microscopy, Journal of Atherosclerosis and Thrombosis (査読有り)、Vol.22, (2015) (in press)
- (2) 谷下一夫、VWF 分子機構における血小板粘着力生成のバイオメカニクス、日本バイオレオロジー学会誌 (B&R 電子版) (査読無し)、28 巻、(2014) pp.3-6.

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 飛松弘晃、西淵雄一郎、後藤信哉、須藤亮、谷下一夫、VWF 分子のアンフォルディングにおける血小板粘着力発生、日本機械学会関東支部講演会、2015 年 3 月 20 日～21 日、横浜国立大学(神奈川県横浜市)
- (2) 飛松弘晃、西淵雄一郎、後藤信哉、須藤亮、谷下一夫、VWF 分子機構における血小板粘着力生成のバイオメカニクス、日本機械学会関東支部講演会、2014 年 3 月 14 日～15 日、東京農工大学(東京都小金井市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷下一夫 (TANISHITA, Kazuo)
早稲田大学ナノ理工学研究機構・研究院教授
研究者番号：10101776

(2)研究分担者

須藤 亮 (SUDO, Ryo)
慶應義塾大学理工学部准教授
研究者番号：20407141