

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790313

研究課題名（和文） 血栓症の分子機序に対する新規モデルの確立

研究課題名（英文） Creation of a molecular and structural model of mouse thrombosis

研究代表者 Nicolas Prévost

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・助教

研究者番号：60561967

研究成果の概要（和文）：

本課題では、血漿成分フォンヴィルブランド因子（vWF）の挙動に着目して血栓形成機構の解明を試みた。培養細胞に効率良く vWF を一過的発現させる方法を樹立することで、細胞外へ分泌された野生型及び変異型 vWF 多量体の局在と生理的機能が明らかとなった。現在、vWF 欠損マウスの血流中における vWF の挙動の解析、および vWF 分子の X 線構造解析により、vWF の挙動と構造の関連性の解明に取り組んでいる。

研究成果の概要（英文）：

Real-time labeling and analysis of vWF:

Initial plan: Labeling of vWF in CHO cells using fluorophore-labeled vWF-targeted peptide.

Outcome: unsuccessful.

Approach used: We have created an HEK293T cell line that stably expresses the human histamine receptor 1 (HEK293T-HRH1). Transient expression of WT and mutant vWF in HEK293T-HRH1 results in constitutive expression of vWF multimers in pod-like structures on the surface of the cell. The amount of vWF multimers secreted on the surface of the cell can be greatly enhanced by histamine treatment of HEK293T-HRH1 cells. This cell model has allowed us to successfully express all 12 vWF constructs and label them by immunostaining and monitor vWF string release, proteolysis and/or platelet binding in real-time microscopy flow chamber assays.

Conclusion: we have created the first cellular model that allows the simultaneous detection of intact or cleaved vWF strings and platelets in live cells in the absence or presence of flow. This assay has allowed us to perform a thorough testing of our candidate vWF mutants and establish that some of them were utterly resistant to cleavage by ADAMTS13 even at very high shear rates. As expected, these proteolysis-resistant mutants were capable of promoting rapid platelet accumulation under flow.

In vivo studies:

Initial plan: Creation of a knock-in construct for the expression of our most-proteolysis resilient and pro-thrombotic vWF A2 mutant in live mice.

Outcome: grossly inadequate funding has rendered this approach unfeasible.

Approach used: we have started breeding vWF-null mice in our facility and we are currently in the process of performing plasma vWF reconstitution experiments in these animals. We have subcloned all our vWF constructs into pLIVE vectors. Hydrodynamic injection of these constructs into vWF animals allows us to stably induce hepatocyte-driven expression of WT or mutant vWF in live animals for up to a month. Ongoing experiments will demonstrate whether expression of our cleavage-resistant

mutants is indeed sufficient to induce thrombotic thrombocytopenic *purpura* in these animals.

Crystallography

Initial plan: purification and X-ray crystallography analysis of WT and mutant vWF.

Outcome: we have been extremely successful in purifying large amounts of uncontaminated recombinant vWF A2 proteins. Crystal preparation is currently underway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	2,500,000	750,000	3,250,000
23年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、病態医化学

キーワード：分子病態学・血栓症

1. 研究開始当初の背景

止血機構や血栓形成のメカニズムは、古くから研究の対象となっており、そこに関わる細胞内外の分子間相互作用に関するモデルは、日進月歩の勢いで国内外の研究者によって明らかにされつつある。血漿中の糖タンパク質フォンヴィルブランド因子 (von Willebrand factor, vWF、図1) もその一つであり、(1)止血機構の初期段階で血小板-血小板、血小板-コラーゲン線維の結合の仲介、(2)血液凝固第VIII因子 (FVIII) との複合体形成によるFVIIIの血中分解の抑制及び局在的血栓形成の促進、という重要な役割を果たす。主に血管内皮細胞で合成されるvWFは、2,050残基から成るマルチドメインタンパク質で、モノマーがジスルフィド結合で多数連なったホモマルチマーとして血中へ分泌される。vWFに含まれるVWAドメイン (vWF A1、A2、A3) は、約200残基のアミノ酸から成り、真核生物、細菌や古細菌に至る多くの生物を構成するタンパク質に見られる。

また、VWAドメインスーパーファミリーメンバーは、インテグリン、細胞接着分子、細胞外マトリックス、イオンチャンネル、血漿タンパク質、転写因子など多岐に渡り、その機能はタンパク質相互作用に関わるとされている。

加えて、遺伝学的手法を用いて、VWAドメインと関節炎や筋ジストロフィー発症の関連が明らかとなった。近年行われた構造解析では (Structure 14: 1611, 2006)、VWAドメインの立体構造変化がその機能を発揮するのに重要であると示唆された。

更に、高い張り応力のような物理的な力の存在下で、vWF A2ドメインの折り畳み構造がほぐれ、血漿中のプロテアーゼADAMTS13によるvWF切断が可能になることが報告された。

ADAMTS13によるvWF切断は、vWFマルチマーと血小板結合を伴う不必要な血栓形成を抑制するためにも不可欠である。

ごく最近では、カルシウムがこのvWF A2ドメインの立体構造変化を促進するという報告もある (Nat commun 2: 1385, 2011)。

これらの結果はvWF A2ドメインが、周囲の物理的環境の変化に対応する、いわゆる「メカノセンサー」としての機能を有することを示唆しているが、その詳細は不明な点が多い。本研究の着想に至った経緯は、細胞膜上に存在する分子が、周囲の物理的な力を感知して細胞や組織レベルでの応答に至るという発見 (Oncogene, 2009) に基づいている。

また、近年樹立された *Adamts13* ノックアウトマウスでは、超高分子量vWF (UL-vWF) マルチマーが増加したものの、予想に反して内因性の血栓形成増加は見られなかった (J Clin Invest 115: 2752-2761, 2005)。しかし、平行板型フローチャンバーによる局所的な高張り応力による刺激下や、コラーゲンや志賀毒素投与などによって血小板血栓形成能が亢進した (Blood 107: 3161-3166, 2006, J Clin Invest 115: 2752-2761, 2005) ことから、血栓形成メカニズムには、ADAMTS13の他に付加的要因の存在することが予想される。

我々はこれまで、vWF A2ドメインの構造を維持するべくジスルフィド結合を挿入し

たvWF A2ドメイン組換えタンパク質を複数種類準備した。こうした変異の導入は、ADAMTS13による分解に対する抵抗性を持たせると同時に、メカノセンサーとして機能を発揮するために重要なvWF A2ドメイン内のアミノ酸配列の同定も可能であると言える。

従って本研究では、これを利用することで、血栓形成におけるvWF A2ドメインの機能解析に取り組むべきであると考えているに至った。

2. 研究の目的

vWFは、止血機構において血管障害部位での血小板の粘着・凝集反応開始に関与する。近年、11あるドメインの一つvWF A2ドメインが、流血中の高ずり応力下で立体構造変化を起こし、血漿プロテアーゼADAMTS13によるvWF切断を促進すると報告された(図1)。

ホモマルチマーとして分泌されるvWFの切断は、血流という絶え間ない物理的な力の存在する血管内で、不必要な血栓形成を防ぐために重要である。

本研究では、メカノセンサーとしてのvWF A2ドメインに着目して、血栓形成の分子機構の解明を目的とする。これは、詳細な血栓症発症メカニズムの理解にも寄与するといえる。

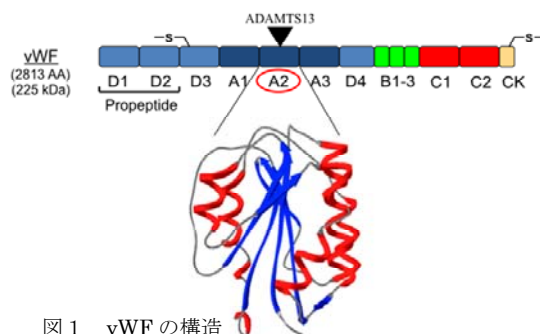


図1 vWFの構造

3. 研究の方法

本研究では、血栓形成の制御機構を、メカノセンサーとして機能するvWF A2ドメインが血中のvWFマルチマー量の調節に関わるという視点から解析した。

最初に、蛍光標識したvWF分子を培養細胞で発現させてその挙動を調べることを試みたが、発現レベルが低く改良を要した。

そこで、ADAMTS13切断抵抗性を持たせるため、vWF A2ドメインに変異を入れた組換えタンパク質を活用することにした。

A2ドメインに変異を持つvWF遺伝子を発現ベクターに組み込んで一過的に培養細胞に発現させたところ、十分なvWFタンパク質の発現量が確認できた(図2)。

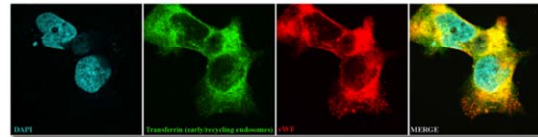


図2 培養細胞に発現したvWF 左から DAPI、Transferrin (early/recycling endosome)、vWF、重ね合わせたもの

我々が構築した12種類の変異型vWF発現系(図3)のそれぞれについて、免疫染色によりその局在を明らかにし、溶液中でのvWF多量体の構造変化や分解、そして血小板との相互作用についてその経時変化を観察した。

また、分解抵抗性と血栓形成促進性をもつvWF A2変異体を発現するノックインマウスを作成を試みたが、完成には至っていない。

しかし現在、安全性に優れたプラスミドベクターを利用して、vWF欠損マウスに目的の変異型vWFを遺伝子導入する方法を採用して解析を行っている。

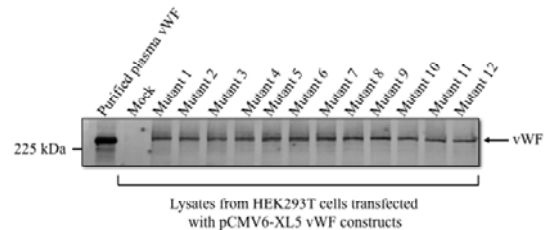


図3 12種類のvWF A2ドメイン変異体の培養細胞における発現

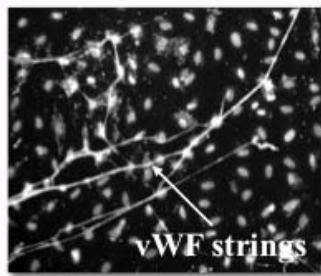
さらに、vWF A2ドメイン組換えタンパク質を精製し、その構造解析も同時に行った。

我々が構築しているvWF A2ドメインの変異は、ヒト・マウスそれぞれで既に10種類以上に及ぶが、組換えvWF A2タンパク質の大量精製法を確立し、共同研究により解析を進めている。

4. 研究成果

蛍光標識したvWF標的ペプチドを用いて、培養細胞におけるvWFの挙動の可視化を試みたが、十分なvWFの発現量が得られなかった。

そこで、別の培養細胞にあらかじめヒトヒスタミン受容体(HRH1)を安定発現させて、更にvWFを一過的に発現させる方法を採用した(図4)。



Histamine-treated HUVEC

図4 vWF 多量体の可視化 HRH1 を安定発現する培養細胞 (HUVEC) に、ヒスタミン存在下で vWF を過剰発現させて、vWF に対して免疫染色した。vWF 多量体がさや状となり細胞表面に蓄積している。

その結果、ヒスタミン処理により、細胞は効率良くまた十分量の野生型及び変異型 vWF の産生が可能となり、細胞外へ分泌された vWF 多量体は、さや状につながる構造で細胞表面に蓄積することを確認した。

申請者は 12 種類の変異型 vWF 発現系を構築しているが、それぞれについて、免疫染色によりその局在を明らかにし、流液中での vWF 多量体の構造変化や分解、そして血小板との相互作用についてその経時変化を観察することが可能となった。

その結果、変異型 vWF のあるものは、vWF 特異的分解酵素である ADAMTS13 による分解に抵抗性を持ち、流液下での血小板蓄積が亢進することが明らかとなった。この実験系の開発は、vWF の血流中における挙動を可視化した点で意義があるといえる。そして、こうした多彩な変異導入により得られる結果は、vWF の挙動と構造の関連の解明に大きなヒントを与えるものと考えている。

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)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/Prevost/IndexJ.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 Nicolas Prévost

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・助教

研究者番号：60561967