

財団法人日中医学協会
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2005 年 3 月 25 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

廬 山



中国人研究者名： _____
尾崎 由基男 職名： 教授
指導責任者名： _____
所属機関名 山梨大学医学工学総合研究部臨床検査医学
〒 409-3898
所在地： 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110-
電話： 055-273-9884 内線： _____

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ 血小板上コラーゲン受容体を介する活性化経路

3. 成果の概要 (100字程度)

血栓形成における血小板活性化のメカニズムの検討を行った。初期反応に von Willebrand 因子の受容体である GPIb とコラーゲン受容体である GPVI が重要であるが、本研究により、この2つの受容体が血小板微小膜領域(GEMs)において会合していることを明らかにすることができた

4. 研究業績

第25回日本血栓止血学会学術集会 (平成15年東京)

(1) 学会における発表

血小板膜上における GPIb 複合体とコラーゲン受容体 GPVI の連関

第26回日本血栓止血学会学術集会 (平成16年奈良)

VWF-GPIb を介した血小板活性化信号伝達はコレステロールに富む細胞膜微小領域 (GEMS) に依存している

第2回日英血小板研究会 (平成16年オックスフォード, 英国)

Interaction of the glycoprotein (GP)Ib complex with the platelet collagen receptor GPVI

(2) 発表した論文

無

有 (雑誌名・題名)

血小板上コラーゲン受容体を介する活性化経路

研究者氏名	廬 山
中国所属機関	中日友好病院検査部
日本研究機関	山梨大学医学工学総合研究部臨床検査医学講座
指導責任者	教授 尾崎 由基男
共同研究者名	講師 浅妻 直樹

要旨

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の発症には血小板機能亢進が大きく関与することが明らかになっている。血栓形成における血小板活性化機構が解明されれば動脈硬化の進展を抑制することも可能になることが期待できる。血栓形成の初期反応には、血小板膜糖蛋白 GPIb と血中 von Willebrand 因子 (VWF) との結合と、GPVI と血管内皮下組織であるコラーゲンとの結合、の2つの反応が重要である。この2つの系はこれまで独立して作用すると考えられていた、しかし本研究により、血小板膜上のコレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ領域 (GEMs または raft) に GPIb と GPVI の会合が認められた。また大部分の GPVI は GEMs 領域に局在しているのに対して、GPIb は血小板に発現している全 GPIb の約 10% の GPIb が GEMs に分布しているにすぎないが、VWF-GPIb、または GPVI を介した血小板活性化により GEMs に存在する GPIb が活性化時間依存的に増加することが明らかになった。これらの結果より、GPVI と GPIb は血小板膜上の GEMs を通じて共役して血小板活性化反応を引き起こし血栓形成反応を促進させることが示唆された。また、VWF-GPIb を介した血小板活性化により Btk が刺激依存的にチロシンリン酸化され、この Btk のチロシンリン酸化が PI3-Kinase 阻害剤によって抑制されないことを見いだした。GPIb を介した血小板信号伝達においては、Btk が PI3-Kinase に依存していないか、上流に位置している可能性が示唆された。

Key Words

血小板、VWF、GPIb、GPVI、シグナル伝達、GEMs

緒言

血小板は血管損傷部位における止血栓形成において中心的な役割を果たすことは以前から知られているが、近年、血小板機能亢進が心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の発症にも大きく関与することが明らかになってきた。従って血小板活性化のメカニズムを明らかにすることは、動脈硬化の発症機構の解明や、その治療薬の発見にもつながる可能性をも期待でき、現代医学の重要なテーマの1つとして注目されている。

血栓形成の初期反応には、血小板と血中 von Willebrand 因子 (VWF) の結合と、血小板と血管内皮下組織であるコラーゲンとの結合が重要である。前者の結合においては血小板膜 (GP) Ib が VWF の受容体として働いており、後者の結合においてはコラーゲン受容体の1つである GPVI が特に重要であることが最近の研究から明らかになっている。GPIb、GPVI はともに血小板受容体であり、VWF-GPIb を介して血管内で血小板凝集が形成されることや、内皮下組織に GPVI が結合して血栓形成が開始されることなどが明らかになってきており、近年、GPIb、または GPVI を介した血小板内信号伝達の解明が盛んになされている。

GPVI は 1999 年にクローニングされたコラーゲン受容体であり、Fc 受容体 γ 鎖と恒常的に結合している¹。コラーゲンと血小板 GPVI の結合により、Src ファミリーチロシンキナーゼ (Fc 受容体 γ 鎖の ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 領域がチロシンリン酸化を引き起こし、細胞内シグナルの活性化に繋がっていく²。GPIb は VWF に対する受容体であり、血小板に 25,000 copy 発現しており、GPIX-V とともに複合体を形成している。血中 VWF との結合により血小板活性化が生じ、血小板凝集が形成される。先天的に GPIb が欠損している Bernard-Soulier 症候群では出血傾向がみられることから、GPIb が止血栓に重要であることがわかる。我々のこれまでの

研究から、VWFとGPIbの結合によりFc受容体鎖がチロシンリン酸化されることがわかり、GPIbとFc受容体鎖が刺激依存的に結合してくることが明らかになった³。また、VWF-GPIbによる血小板活性化によりSrcファミリーキナーゼあるSrcがGPIbに結合してくることも判明した⁴。また、元来GPIbに結合し血小板活性化を招くと考えられていた蛇毒alboaggregin AがGPVIにも結合し、血小板活性化を生じていることが明らかになった⁵。これはGPIbとGPVIが近傍で共役する可能性を示唆したものである。このようにこれまで独立して血栓形成に関与していると考えられているGPVI、あるいはVWF-GPIbを介した細胞内情報伝達が、実は非常にクロストークしている可能性が示唆された。

T細胞やB細胞などの免疫細胞においては、Fc受容体鎖を介した信号伝達系は細胞膜上に存在するスフィンゴ脂質、コレステロールや信号伝達物質に富んだ細胞膜微小領域（GEMs: glycosphingolipid-enriched microdomains, またはraft）に局在することが報告されている⁶。本研究では、我々は血小板膜上でGPIbとGPVIが会合している可能性を検討し、さらにこのGPIbとGPVIの結合が血小板膜上のGEMsでみられるか解明するとともに、VWF-GPIbを介した血小板活性化メカニズムの検討を進めた。

方法：

(1) 薬を内服していない健康健全人よりクエン酸ナトリウム加採血した血液を100 µg 12分遠心し、多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) を得、さらにTyrode Buffer, ACDを用いて洗浄血小板浮遊液を調整した。この洗浄血小板にVWFと、VWF結合蛇毒蛋白であるbotrocetin, またはGPVI刺激蛇毒蛋白であるconvulxinを加えた。Botrocetinが結合したVWFは活性化型VWFに構造変化し、GPIbに結合し、GPIbを介した血小板活性化が生じる。一定時間反応後、Triton X-100を加えて可溶化させた。可溶化血小板を抗各種抗体により免疫沈降した。試料をSDS-PAGEで展開し、PVDF膜に転写後、抗リン酸化チロシン抗体、抗GPIb抗体などによりWestern blotしてチロシンリン酸化の状態やGPIbとGPVIの会合の変化を検討した。

(2) GEMsの調整：無刺激血小板、あるいはVWF-botrocetinによる刺激血小板をTriton X-100で可溶化後、等量の80%スクロースを加えた（スクロース終濃度は40%）。この上層に25%スクロースを重層し、さらにその上層に0%スクロース液を重層し、これを200,000g 2.5時間4°Cの条件で超遠心を行った。GEMs領域は上層1/4程の液層に白い不溶性の層として得ることができる。また非GEMsとして、最下層の液層をGEMsと等量回収した。これらをSDSで可溶化して、SDS-電気泳動により蛋白を分離して目的の抗体を用いてWestern blotして蛋白の検出を行った。またGEMs層と非GEMs層を抗体抗GPVI抗体を用いて免疫沈降し、抗GPIb抗体を用いてGEMsにおけるGPIbとGPVIの会合を検討した。

結果、考察：

(1) 抗GPVI抗体を用いた免疫沈降により、無刺激血小板においてGPVIとGPIbが複合体を形成していることが認められた。GEMsにおける各々の受容体の分布は無刺激血小板においてGPIbの一部がGEMs領域に分布しており、VWF-botrocetin刺激、あるいはconvulxin刺激によりGEMsに分布するGPIbが増加した。GPVIはその大部分がGEMsに局在していた。このことはVWFに結合したGPIbが血小板膜上でGEMsに移動しGEMs領域のGPIbがクラスタリングすることにより血小板活性化することが示唆された。またGPIbとGPVIの会合がGEMs領域に特異的に見られ、非GEMs領域では認められなかった。またGEMs構造を破壊するコレステロール吸着剤であるmethyl β cyclodextrinを添加した血小板ではGEMsに分布するGPIbやGPVIは認められず、GPIbとGPVIの会合も消失した。これらの結果より、血栓形成において、GPVIとGPIbが血小板膜上のGEMs領域で会合を増すことにより血小板活性化が生じる可能性が考えられ、GEMs領域がGPVIとGPIbの共役の場として重要な役割を担っていることが示唆された。活性化血小板において非GEMs領域のGPIbがGEMs領域に移動するメカニズムはまだ解明できていない。ShrimpらはGEMs領域にあるGPIbはpalmitoylationされていることを報告しているが⁷、我々はGEMs領域にあるGPIbと非GEMs領域にあるGPIbがVWFによりクラスタリングされて非GEMs領域のGPIbがGEMs領域に移動する可能性を考えている。今後はこの仮説を検証していく予定である。

(2) VWF-GPIbを介した血小板活性化において血小板活性化蛋白であるBtk, Phospholipase Cγ-2 (PLCγ-2)の変化を検討した。PLCγ-2は細胞の活性化によるカルシウム上昇に重要な酵素であり、これまでにVWF-GPIbを介した血小板活性化

により PLC γ -2 のチロシンリン酸化が生じることが確認されている。VWF-GPIb を介した活性化血小板を PLC γ -2 を免疫沈降しチロシンリン酸化を調べたところ、PLC γ -2 とともに 75kDa 付近に PLC γ -2 に共沈するチロシンリン酸化蛋白を認めた。一方、Btk は Tec ファミリーに属するチロシンキナーゼの 1 つであり、PLC γ -2 とともに血小板細胞内カルシウム増加に重要な蛋白である、今回、VWF-GPIb を介した血小板活性化により Btk (Bruton's tyrosine kinase, 78 kDa) がチロシンリン酸化されることを見だし、PLC γ -2 に共沈する 75 kDa のチロシンリン酸化蛋白に Btk が含まれ、Btk も VWF-GPIb を介した血小板活性化に重要である可能性が示唆された。これまで他の細胞系では、Btk は Phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase) の下流で作用し、PI3-K 活性阻害剤により抑制されると報告されている 8。ところが今回の検討では、VWF-GPIb による Btk のチロシンリン酸化は PI3-kinase の酵素活性阻害剤により抑制されなかった。この結果より、血小板においては Btk は既報のように PI3-Kinase の下流ではなく、PI3-Kinase の上流に位置しているか、あるいは Pi3-kinase と独立した活性化経路がある可能性が示唆された。Btk と PI3-kinase の相互作用については今後、Btk、あるいは PI3-kinase 欠損マウス血小板を用いた実験をおこなう。また、Tec ファミリーの Btk 以外のチロシンキナーゼの関与についても検討を加える。

引用文献：

1. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TNC, Clemetson KJ. *J Biol. Chem.* 274: 29019-29024, 1999
2. Asazuma N, Wilde JL, Berlanga O, et al. *J. Biol. Chem.* 275: 33427 - 33434, 2000
3. Wu Y, Inoue K, Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y, Berndt MC, Ozaki Y. *Blood* 97: 3836-3845, 2001
4. Wu Y, Asazuma N, Satoh K, Yatomi Y, Takafuta T, Berndt MC, Ozaki Y. *Blood* 101: 3469-3476, 2003
5. Asazuma N, Marshall S, Berlanga O, Snell D, Poole A, Berndt MC, Watson SP. *Blood* 97: 3989-3991, 2001
6. Wonerow P, Obergfell A, Wilde J, Bobe R, Asazuma N, et al. *Biochem J.* 364: 755-765, 2002
7. Shrimpton C, Borthakur G, Larucea S, Cruz MA, Dong JF, Lopez JA. *J Exp Med* 196: 1057-1066, 2002
8. Suzuki H, Matsuda S, Terauchi Y, Fujiwara M, Ohteki T, Asano T, Behrens TW, Kouro T, Takatsu K, Kadowaki T, Koyasu S. *Nature Immun.* 4: 280-286, 2003

学会発表

第 25 回日本血栓止血学会学術集会 (平成 15 年東京)

血小板膜上における GPIb 複合体とコラーゲン受容体 GPVI の連関

浅妻 直樹, 林 香春, 佐藤 金夫, 廬山, 井上 克枝, 高蓋 寿朗, 諸井 将明, 半田 誠, 尾崎 由基男

第 26 回日本血栓止血学会学術集会 (平成 16 年奈良)

VWF-GPIb を介した血小板活性化信号伝達はコレステロールに富む細胞膜微小領域 (GEMS) に依存している

浅妻 直樹, 廬山, 佐藤 金夫, 井上 克枝, 半田 誠, 尾崎 由基男

第 2 回日英血小板研究会 (平成 16 年オックスフォード, 英国)

Interaction of the glycoprotein (GP)Ib complex with the platelet collagen receptor GPVI

Asazuma N, Suzuki-Inoue K, Lu S, Satoh K, Handa M, Moroi M, Berndt MC, Ozaki Y.