

課題名 (タイトル) :

変異型血小板 GPIb VWF 間の結合エネルギーの解明

利用者氏名 : 後藤 信哉

所属 : 光量子工学研究領域 エクストリームフォトンクス研究グループ 画像情報処理研究チーム

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

心筋梗塞、脳梗塞などの心血管疾患の発症、血管損傷部位の止血には血小板細胞が必須の役割を演じる。心血管疾患を発症する病的血栓、止血を担う止血血栓ともに血管内皮損傷部位への血小板の集積から始まる。過去の実証的研究により、冠動脈、脳血管などの動脈血流の条件にて血管内皮損傷部位への血小板細胞の接着には、血小板膜糖蛋白 GPIb α と血漿蛋白 von Willebrand 因子 (VWF) の相互作用が必須であることが示されている (Goto S, et al. *J Clin Invest*, 1996)。

HPCI 戦略分野 1 において血小板細胞の接着モデルの作成を担当した。動脈血流条件下の血小板細胞の接着は膜糖蛋白 GPIb α と VWF の接着により一義的に規定される。両分子の接着と血流を組み込んだ血小板細胞接着シミュレーターを作成し、流路に障害物があると障害物の下流に血小板が集積することを予測計算した

(Tomita A, et al. *J Atheroscler Thromb*, 2015)。理化学研究所の RICC と「京」を用いて、GPIb α と VWF の接着構造を原子間の力場データベース CHARMM 22 (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics)と分子動力学計算ソフトウェア NAMD (Nanoscale Molecular Dynamics) を用いて予測計算した。両分子の重心間距離を 0.5Å 毎に引き剥がして安定構造を予測計算し、各構造の Potential of Mean Force (PFM) を算出した。距離と PFM の関係から、両分子の接着力を 67 pN と予測計算した (Shiozaki S, et al. *J Atheroscler Thromb*, 2016)。原子間力顕微鏡を用いた実証実験により分子動力学計算の予測計算の妥当性を担保した (Tobimatsu H, et al. *J Atheroscler Thromb*, 2015)。過去の実証的研究の積み重ねとコンピューターシミュレーションの連成により、マイクロメートルスケールの血小板細胞の接着動態をナノメートルスケールの GPIb α と VWF の接着構造から構成論的に予測する基盤を確立した。

Shiozaki らが行った NAMD の計算では静的条件における接着力を予測している。実際、動脈では、血管内皮の損傷部位に血流により運搬された血小板が衝突するイメージである。静的条件の接着と、流れて来た血小板細胞が急速に血管損傷部位に停止する条件には差がある。従来の NAMD の計算に、図 1 に示す血小板細胞が

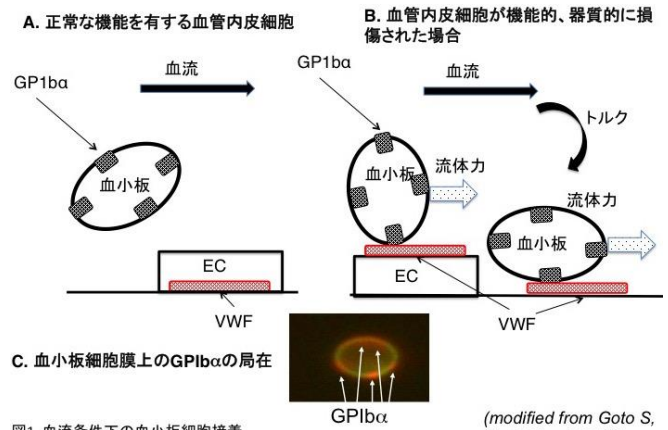


図1. 血流条件下の血小板細胞接着

(modified from Goto S, et al. *Circ J*, 2015)

受ける流体力を GPIb α 、VWF 分子に負荷される外力に落とし込むモデル化が必須である。GPIb α は血小板細胞に発現する膜糖蛋白、VWF は血管壁損傷部位に吸着する血漿蛋白である (図 1)。GPIb α の C 末端側が血小板細胞膜を貫通している。NAMD の計算の対象は VWF との結合部位を有する N 末端側のみである。マイクロメートルスケールの血小板細胞が受ける流体力をナノメートルスケールの分子が受ける力に変換するプログラムを従来の NAMD に追加する必要がある。

Wild type GPIb α と wild type VWF の結合力予測計算の妥当性は原子間力顕微鏡、Flow chamber を用いた定量的実証的研究により確認した。しかし、CHARMM-22 のデータベース作成時点において Quantum Mechanics (QM)は Molecular Mechanics (MM)に簡素化して取り込まれている。Wild type において妥当であった結合力予測計算が広く GPIb α 、VWF 接着予測に普遍化可能か否かを検証するためには、GPIb α 、VWF 分子内のアミノ酸変異体の接着動態予測計算と実証実験の連成が役立つ。実際、ヒトにおいて GPIb α 、VWF の結合能を喪失させ、

出血性合併症を惹起する両分子の変異体の存在が知られる。リストセチン存在下、動脈血流存在下など特殊な条件下のみに認められる GPIIb/IIIa と VWF の結合が、これらの刺激なしの条件でも起こるアミノ酸変異体も出血性疾患を発症することが知られる。すなわち、GPIIb/IIIa と VWF の相互作用は止血、血栓形成の初期段階にて極めて重要な役割を演じるため、両分子が相互作用できない変異体、両分子が常に吸着して消費されてしまう病態では重篤な出血イベントを避けたい。出血性疾患として表現型がわかっているアミノ酸変異体として GPIIb/IIIa の G233V 変異体、VWF の C509R, R611C, R552A 変異体などが知られる。In silico にてこれらのアミノ酸変異体の接着動態予測計算を行い、実証的生物学的実験との連成により QM/MM 計算の妥当性の範囲の拡大を目指す。

GPIIb/IIIa と VWF の相互作用は心筋梗塞、脳梗塞などの発症にも必須の役割を演じると想定される。これらの疾病は中年以降に発症するため、遺伝子型の相違によりアミノ酸配列の差異を認めても、確率的現象として疾病の発症とアミノ酸配列の関連の論理的連関を明確にすることが困難である。現状では、世界中の心筋梗塞、脳梗塞などの症例から数万例のサンプルを抽出し、薬剤 A と薬剤 B にランダムに割り付けて予後を観察し、「平均的症例」の「標準治療」の確立を目指している。アスピリン、クロピドグレルなどの抗血小板薬も、心筋梗塞、脳梗塞再発予防における「標準治療」として広く使用されている。血小板の活性化を阻害する抗血小板療法により患者集団としては出血イベントリスクが増加する。個別症例のなかには心筋梗塞、脳梗塞後であっても抗血小板薬の介入が副作用増加にしか寄与しない症例もいる。出血、血栓などの頻度高く見られる臨床事象は確率的現象であるため、ゲノム情報から構成論的に疾病発症を理解することは困難である。GPIIb/IIIa, VWF のアミノ酸変異体として、現時点までの研究では、心筋梗塞、脳梗塞を発症リスクの高い症例、抗血小板薬が不要である症例、などは確認されていない。QM/MM 計算に基づく GPIIb/IIIa/VWF の動的接着構造予測と心筋梗塞、脳梗塞発症確率の関連、抗血小板薬の薬効予測論理の確立を目指す。

2. 具体的な利用内容、計算方法

過去に静的条件において、GPIIb/IIIa と VWF の安定構造予

測計算、重心間距離依存性の PFM 計算に用いた CHARMM-22 データベースと NAMD ソフトウェアパッケージを用いる (Shiozaki S, et al. *J Atheroscler Thromb*, 2016)。これらのソフトウェアは理化学研究所の RICC、「京」、東京大学の FX-10 において動作確認している。本年度は HOKUSAI におけるコンパイルに時間を要した。年度の後半になってコンパイルが可能となり、共同研究者が別アカウントにて GPIIb/IIIa の G233V 変異体を計算することが可能となった。別アカウントでは 4 つの GPU (TESLA K20) を用いて CUDA に対応する NAMD を行った。外力を NAMD に取り込むモデルを考案した。

3. 結果

ソフトウェアのコンパイルが早期に可能となった FX-10 を用いて VWF のアミノ酸変異体と Wild type GPIIb/IIIa の安定結合構造予測計算を行った (図 2)。これ

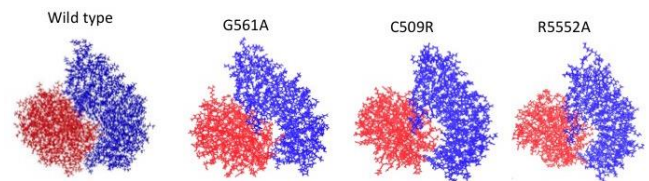


図2. VWFの1アミノ酸置換体とGPIIb/IIIaの安定結合構造

らの変異体は生体に重篤な出血イベントを惹起することが既知の変異体である。安定結合構造には大きな差異はなかった。重心間距離と PFM の関係を示す必要がある。

HOKUSAI ではプログラムのコンパイルに時間を要した。実態として本アカウントでは計算資源を殆ど使用しなかった。年度後半にプログラムのコンパイルに成功したため、共同研究者が GPIIb/IIIa の G233V 変異体と wild type VWF の構造、接着力予測計算を施行した。来年度以降、両分子の各種変異体の結合力予測計算を本格的に施行したい。

マイクロメートルスケールの血小板細胞が受ける流体力をナノメートルスケールの GPIIb/IIIa と VWF の分子間相互作用に組み入れるモデルは作成した。現時点ではそのモデルは公表の段階ではない。

4. まとめ

GPIIb/IIIa と VWF の分子内アミノ酸変異体の安定構造予測計算を行った。マイクロメートルスケールの血小板細胞が受ける流体力をナノメートルスケールの GPIIb/IIIa 分子と VWF 分子の相互作用に落とし込むモデルを作成し

た。

実態として本年度の計算資源を消費しなかった。

5. 今後の計画・展望

医学の領域では、世界の「平均的症例」における「標準治療」を大規模ランダム化比較試験の集積により示す Evidence Based Medicine から、個人の遺伝子の差異に注目し、個別症例の特性に基づいた個別医療を提案する Precision Medicine への構造的変化が起こっている。小児期に発症する難病、成人において発症するとは言っても、発症と細胞における遺伝子変異の関係が明確になっている悪性腫瘍の領域では遺伝子型、アミノ酸配列の個人差に基づいた Precision Medicine への転換が比較的容易であった。心筋梗塞、脳梗塞などの心血管病は生活習慣との関連もあり、遺伝子型の寄与が難病、悪性腫瘍よりも明確ではない。しかし、実際の診療の現場では、血圧、コレステロール値、喫煙、運動習慣の有無などの条件が同一であっても、進化感疾患を発症する症例と発症しない症例があり、心血管病の家族歴を有する症例はリスクが高いため、遺伝子、アミノ酸配列の寄与はある。

動脈血流条件下における血小板細胞の接着は血小板膜糖蛋白 GPIb α と VWF の接着により一義的に規定されるため、これらの分子内のアミノ酸変異と心筋梗塞、脳梗塞発症リスクの寄与を確率的に示すことは可能と考える。われわれが Wild type GPIb α と VWF の結合において示した接着力予測計算が妥当であれば、これらの分子内のアミノ酸変異の有無と心筋梗塞、脳梗塞の定量的発症リスクを関連付ける指標となる可能性がある。プログラムのコンパイルにも成功し、血小板細胞の受ける流体力の因子の取込にも成功したので、今後、計算資源の許す限りの網羅的結合動態予測計算を施行したい。

6. 利用がなかった場合の理由

過去に静的条件において、GPIb α と VWF の安定構造予測計算、重心間距離依存性の PFM 計算に用いた CHARMM-22 データベースと NAMD ソフトウェアパッケージは理化学研究所の RICC、「京」において動作を確認し、研究成果をあげた (*Shiozaki S, et al. J Atheroscler Thromb, 2016*)。しかし、今回は RICC、「京」における計算に従事していた研究者の別機関への移籍もあり、コンパイルに時間を要した。このため、

平成 28 年度 利用研究成果リスト

【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】

Shiozaki, S., Takagi, S. & Goto, S. Prediction of Molecular Interaction between Platelet Glycoprotein Ibalph and von Willebrand Factor using Molecular Dynamics Simulations. *J Atheroscler Thromb* 23, 455-464 (2016). 但し書き：昨年までに報告していたか否か記憶に確証がないので記載します。昨年度に in press などに記載されていれば削除してください。

【国際会議、学会などでの口頭発表】

1. 招待講演. Goto S. APPLICATION OF HIGH PERFORMANCE COMPUTING TECHNOLOGY FOR CARDIOLOGY. The 77th SOCIETÀ ITALIANA DI CARDIOLOGIA. Dec 18, 2016 Rome, Italy

【その他（プレスリリース、学術会議以外の一般向けの講演など）】

SIC (SOCIETÀ ITALIANA DI CARDIOLOGI) News. Dec 18, 2016 page 7. APPLICATION OF HIGH PERFORMANCE COMPUTING TECHNOLOGY FOR CARDIOLOGY (in Italian). ただし、本記事はイタリア心臓病学会における後藤信哉の発表をもとに取材者が作成した記事です。当日の発表の中では理研のスーパーコンピューターを用いたことを示していますが、取材記事はイタリア語で作成されているので、理研が適切に引用されているか否かの判断が困難です。