免疫グロブリンスーパーファミリー

井上 修*

Immunoglobulin superfamily

Osamu INOUE

要約：Immunoglobulin-superfamily (Ig-SF) は原始的な生物にも存在する膜蛋白である。生命の進化に合わせ機能が継ぎ足され、現在は数千種類の多様性を持つ一大ファミリーとなった。その一部は、血栓止血の中心的な役割を担う血小板でも、膜蛋白として利用されている。傷からの出血を早く止めることが生存競争の重要課題であった哺乳類では、血小板膜上に Ig-SF を持つことが迅速な血栓止血に決定的なアドバンテージをもたらした、現在の繁栄の一因になったと想像される。本稿では血小板膜上の Ig-SF に焦点をあて、その役割について紹介したい。

Key words: platelets, Ig-SF, Fc, ITAM, ITIM

井上 修

1996年3月 山梨医科大学医学部
卒業
同年5月 NTT関東通信病院内科
系レジデント(～2001年3月)
2001年4月 University of Oxford,
academic visitor
同年10月 同D.Philos course (～
2005年3月卒業)
2003年11月 山梨大学附属病院
検査部 医員
2005年4月 同助教
2010年4月 山梨大学大学院医学
工学総合研究部臨床検査医学
助教
2013年4月 山梨大学医学部附属
病院安全管理部感染制御室
特任准教授

血小板は骨髓巨核球から生成される無核の巨核球細胞質フラグメントである。ヒト血小板の直径は約3 μm 、末梢血流中での寿命は8日前後である。細胞質には分泌顆粒である α 顆粒が数十個と濃染顆粒が数個存在し、前者にはfibrinogenやvon Willebrand factor (VWF)等の蛋白質性の、後者にはadenosine diphosphate (ADP)やserotoninなど非蛋白質性の生理活性物質が貯蔵されている。外傷などにより出血が始まると、血小板は直ちに血管壁傷害部位に接着し、活性化される。活性化した血小板は分泌顆粒を放出、放出された生理活性物質が周囲の血小板をさらに活性化することで凝集塊を形成し、速やかに血栓止血を完了する。このように血小板がその主たる役割を演じるためには、血小板表面に外部からの刺激を血小板内部に伝達し“血小板を活性化する”ためのアンテナが必要となる。免疫グロブリンスーパーファミリー (immunoglobulin-superfamily; Ig-SF) はこのアンテナの一群として機能している。

1. Ig-SF とは？

細胞表面に発現する様々な膜蛋白のうち、分子内に免疫グロブリン (Ig) または免疫グロブリン様ドメイン (Ig ドメイン) を持つ蛋白を総じて Ig-SF と総称する。その基本型である免疫グロブリン (Ig) は重鎖 (H 鎖) 2 本と軽鎖 (L 鎖) 2 本が Y 字型に組み合わせられた Y 字型 4 本鎖構造をとっている。H 鎖には γ 鎖、 μ 鎖、 α 鎖、 δ 鎖、 ϵ 鎖の 5 種類、L 鎖には λ 鎖と κ 鎖の 2 種類があり、これらの組み合わせにより IgM や IgG 等の Ig アイソタイプが決定される。また、Y 字の 2 本の腕を Fab 部分、軸の部分を Fc 部分と呼ぶ。Fab 部分の先端にある抗原認識部位を可変領域 (V 領域)、Fab の残りの部分と Fc 部分をあわせて定常領域 (C 領域) と呼ぶ。一方、Ig-SF の Ig ドメインでも、V 領域に類似する構造を持つものを V セット、C 領域に類似する構造を持つものを C セットと呼ぶ。C 領域や C セットには、それぞれ V 領域に類似の配列を持つ C2 と、類似しない C1 がある。

Ig-SF は原始的な鞭毛虫の段階で既に 6 個認められることから、生物が発生した初期段階から存在していたと考えられる。その後も Ig 蛋白をコードする遺伝子と他の蛋白遺伝子の間で重複や混成といっ

*責任者連絡先：

山梨大学医学部附属病院安全管理部 感染制御室
〒409-3898 山梨県中央市下河東 1110
Tel: 055-273-1111 (内線 6783), Fax: 055-273-6713
E-mail: oinoue@yamanashi.ac.jp

た継ぎはぎ(進化)がくりかえされ、ナメクジウオの段階で718種類、ヒトに至っては3400種類以上の多様なIg-SF蛋白が存在するまでに多様化した。

Ig-SFに属する膜蛋白の多くは特定の構造を認識する受容体としてカルシウムイオン非依存性にリガンドと同種親和性結合または異種親和性結合し、細胞内にシグナルを惹起し、免疫防御機構以外の役割も演じている。これらの受容体には、細胞内ドメインに活性化シグナルを惹起するITAM motif (immunoreceptor tyrosin-based activation motif) を持つものと抑制性シグナルを惹起するITIM motif (immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif) を持つものがある。ITAM motifはY-x-x-L配列(Y: tyrosine, L: leucine, x: 任意)を持ち、通常2つ、6~8アミノ酸を挟んで存在する。これらITAM motifのYが2箇所リン酸化されると、Syk(血小板)やZAP-70(T細胞)などリン酸化チロシンに結合するSH2ドメインを2つ持つキナーゼが結合し、活性化シグナルが惹起される¹⁾。ITIM motifは(L/I/V/S)-x-Y-x-x-(L/V)(L: leucine, I: isoleucine, V: valine, S: serine, Y: tyrosine, x: 任意)を持ち、やはり通常は2つ存在する。Yがリン酸化されることでSH2ドメインを2つ持つフォスファターゼが結合し、抑制性のシグナルを惹起する。このようにIg-SFには細胞内シグナルの活性化と抑制化を調節する重要な役割を演じるものもある²⁾。

Ig-SFに属する膜蛋白は血小板膜上に複数発現しており、細胞内シグナルを惹起して血小板機能の調節に関わるものが知られている(図1)。

2. GPVI/FcR γ -chain

Glycoprotein VI (GPVI)はIg-SFに属しNK細胞に発現するnatural killer receptorsとの相関性が高いI型膜蛋白である³⁾。分子量は約62 kDa、血小板膜上には1血小板あたり1500~3000 copy発現している^{4,5)}。GPVIは分子量約12 kDaのFc receptor gamma-chain (FcR γ)と関連した形で血小板膜上に共発現しており、FcR γ を遺伝子改変により欠損させたマウスにはGPVIの発現も認められなくなる⁶⁾。一方でGPVIを欠損させてもFcR γ の発現は欠損しない⁷⁾。

GPVIは出血時間が軽度延長しコラーゲン刺激に

よる血小板凝集を欠損した日本人症例の研究により同定されたコラーゲン受容体である⁸⁾。この症例では、健康人の血小板lysateを電気泳動した際に62 kDa付近に泳動されるGPVIを特異的に認識する抗体が血液中に存在しており、しかし患者血小板にはGPVIの発現が認められなかった。その後も数名のGPVI欠損症例が報告され、これらの症例検討からGPVIがコラーゲン受容体として機能していることが裏付けられた⁹⁻¹²⁾。

GPVIの細胞外ドメインには2つのC2セット(Ig-C2-like domain)が存在する。Ig-C2-like domainには蛋白の折りたたみ構造に重要なN-glycosylation siteが1箇所あり、球状構造をとっている。Ig-C2-like domainは先端から順にD1, D2ドメインと呼ばれる。D1ドメインがコラーゲンへの結合に重要と考えられている^{13,14)}。その細胞膜側はO-glycosylation siteを多数持つmucin-like domainとなっている。細胞膜貫通部分に存在するアルギニン残基は、GPVIとFcR γ の連関に重要な役割を担っている。細胞内ドメインにはプロリンに富む領域(proline-rich region)が存在し、この部位には活性化シグナル分子の最上流にあたるSrc family kinaseが自身のSH3ドメインを介して結合する。GPVIはIII型コラーゲン分子の $\alpha 1$ (III)線維上のGly-Pro-HyP (G-P-O)配列を認識し、血小板活性化シグナルを惹起することが報告されている。コラーゲン1分子中にはG-P-O配列が約10%の頻度、約30個、含まれている。結晶解析によると、GPVIは血小板膜上でD2を介して2分子が近接して配置し、対になった2つのD1が螺旋状のコラーゲン線維の4分子分、約55Å離れた位置のG-P-O配列を認識しているようである¹⁵⁾。コラーゲンと結合したGPVIは、血小板内に活性化シグナルを惹起する。この際に重要な役割を演じるのがGPVIと関連して発現するFcR γ である。(FcR γ はFc受容体の γ 鎖のみからなる膜蛋白でFc γ 受容体とは異なる分子である。)FcR γ には細胞内ドメインに2つのITAM motifが存在する。GPVIに結合したSrc family kinaseのFynやLynはこのITAM motifのYをリン酸化する。するとリン酸化チロシンに結合するSH2 domainを2つ持つSykがITAM motifへ結合する。Sykは自分で、あるいは隣のGPVI/FcR γ のITAMに結合したSykと互いにY525/526部位にあるチロ

図1 血小板膜上に発現する主な immunoglobulin-superfamily
血小板膜上の Ig-SF は ITAM motif を持つもの、ITIM motif を持つもの、自身ではこれらの motif を持たないが、他の膜蛋白の ITAM/ITIM motif を利用してシグナルを惹起するものなど、多様な仕組みでシグナルを惹起する膜蛋白が存在する。生理的な役割が解明されていない膜蛋白も多い。

シン残基をリン酸化し、kinase 活性を持つ。一連のメカニズムは、同じ Ig-SF の T-cell 受容体における ZAP-70 を介した信号伝達系と類似している¹⁶⁾。以降活性化カスケードが作動し、LAT, SLP-76, SLAP-130, Gads といったアダプター蛋白のチロシンリン酸化を経てシグナル伝達に必要な分子が細胞膜近傍へ集められた後、Tec family kinase の Btk/Tec による phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) の活性化へと繋がる¹⁷⁾。PLC γ 2 は血小板膜の phosphatidylinositol 2-phosphate (PIP2) を水解し、イノシトール 3 リン酸 (IP3) とジアシルグリセロール (DG) を生成させ、IP3 は細胞内カルシウムストア上の IP3 受容体を介して細胞内カルシウムを動員し、DG は PKC の活性化を引き起こす。GPVI が活性化するシグナル分子はさらに RAP や PI3K 等の活性化も惹起し、最終的に細胞骨格改の再構成による変形、顆粒内のセロトニンや ADP、フィブリノーゲンといった生理活性物質の放出、細胞膜からのアラキドン酸遊離とトロンボキサン A2 の合成および放出、それぞれの活性物質に対応する血小板膜上の活性化受容体を介した血小板の更なる活性化等¹⁸⁾が連続して起こり、インテグリン α IIb β 3 の活性化による血小板凝集反応やインテグリン α 2 β 1 を介したコラーゲンへの血小板接着や血小板血栓の形成など、血管壁損傷時の

血栓止血帰転にイメージされる種々の血小板活性化反応の中心的な役割を演じる。

3. Fc γ RIIa (CD32)

Fc γ RIIa は IgG の Fc 部分を認識する低親和性 Fc 受容体で、血小板と白血球に発現する¹⁹⁾。分子量は約 42 kDa、1 回膜貫通型の膜蛋白で、血小板膜上には 1 血小板あたり 2000~3000 copy 発現している²⁰⁾。Fc 受容体の一鎖である Fc γ とは異なり、Ig の Fc 部分を認識する受容体そのものである。Fc γ RIIa は GPVI 同様に 2 つの C2 セット (Ig-C2-like domain) が細胞外ドメインに認められる。さらに自身の細胞内ドメインに 2 つの ITAM motif を持っている。したがって、惹起される活性化シグナルは、主に GPVI と同様に Src family kinase-Syk-PLC γ 2 の組み合わせとなる。

Fc γ RIIa は heparin-induced thrombocytopenia (HIT) の病態を引き起す責任受容体として知られている²¹⁾。様々な病態を背景に血小板から放出される platelet factor 4 (PF4) と治療目的で患者に投与されたヘパリンが結合すると、PF4 の構造が変化し新たな抗原部位が表出され、この部位をリガンドとする特異的 IgG 抗体 (抗 PF4/ヘパリン抗体) も産生される。

それらの抗体の中で血小板 FcγRIIa を介して血小板を活性化作用のある特殊な抗体が産生された場合、これを HIT 抗体と呼ぶ。HIT 抗体の Fc 部分は FcγRIIa を介して血小板を活性化し、活性化血小板からはマイクロパーティクルが放出され、マイクロパーティクル上の組織因子によりトロンビンが過剰に産生される。その結果、血小板活性化(凝集)とトロンビン産生過多(凝固系亢進)による重篤な血小板減少症や血栓塞栓症が引き起こされると考えられる。一方、FcγRIIa の生体内での生理的役割については、血清中の IgG をキャッチして血小板 α 顆粒内へ小胞輸送する釣り竿としての役割に加え、活性化受容体としての役割が報告されている。インテグリン αIIbβ3 がそのリガンドであるフィブリノーゲンに結合すると FcγRIIa の ITAM 部位にあるチロシン残基や Syk, PLCγ2 等の活性化シグナル分子がチロシンリン酸化され、これらのチロシンリン酸化が FcγRIIa 阻害抗体で強く抑制されること、FcγRIIa を発現していない血小板では fibrinogen 上での血小板伸展が抑制されること等である^{22, 23)}。さらに動脈を傷害して血栓形成の差異を見る *in vivo* 血栓モデルでも、FcγRIIa を発現させたマウスでは通常のマウスと比較して血栓形成が促進されることも報告されている²⁴⁾。FcγRIIa は、インテグリン αIIbβ3 からの outside-in シグナルを増強する役割を担っているのだろうと推測される。

4. Junctional adhesion molecule (JAM, JAM-1, JAM-A, The F11 receptor)

血小板を活性化させる抗ヒト血小板膜蛋白モノクローナル抗体 F11 の認識部位として発見された JAM は 1 回膜貫通型の受容体で、上皮細胞や血管内皮細胞間のタイトジャンクション形成に関わる膜蛋白として知られるが、血小板や赤血球、リンパ球にも発現している。細胞外ドメインに 2 つの C2 セット (Ig-C2-like domain) が存在するが、細胞内ドメインには ITAM motif は存在しない²⁵⁾。血小板膜上の JAM は 29 kDa のコア部分に糖鎖が付加され、32 kDa の JAM-1 と 35 kDa の JAM-2 として発現している²⁶⁾。

JAM に結合した F11 は、その Fc 部分が FcγRIIa

に結合することで血小板凝集を惹起する。Fab 部分のみの F11-Fab フラグメントでは血小板凝集は惹起されない。しかし固相化した F11 へ接着した血小板が示すスプレディングは FcγRIIa を抗体 (IV.3) で阻害しても抑制されないことから、FcγRIIa を介さない血小板活性化経路が存在する可能性も示唆されている。²⁵⁾

血小板膜上の JAM がどのような生理的役割を担っているかは不明の点が多いが、原因不明の血小板減少を来した患者血清中に JAM に対する自己抗体が検出された事例も報告されており²⁵⁾、JAM は HIT と同様のメカニズムで血小板を過剰に活性化し、血栓症や血小板減少症を引き起こす可能性がある受容体と認識する必要がある。

5. PECAM-1 (CD31)

Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) は血小板、血管内皮細胞、好中球などに発現しており、隣り合った細胞の PECAM-1 と同種親和性に結合する。血小板では活性化抑制シグナルを惹起する受容体で、分子量は約 130 kDa、1 回膜貫通型の膜蛋白で、血小板膜上には 1 血小板あたり 8000~10000 copy 程度発現している^{27, 28)}。PECAM-1 は細胞外ドメインに 6 つの C2 セット (Ig-C2-like domain) が存在するが、その中でも 1 番先端の Ig-C2-like domain が同種親和性結合に重要と考えられる²⁸⁾。細胞内ドメインには 2 つの ITIM motif が存在する。リガンド結合により Src kinase が C 末側の Y をリン酸化すると、次いで N 末側の Y が Csk や Btk といった non-receptor tyrosine kinases (NRTKs) によりリン酸化される。こうして ITIM motif の 2 つの Y がリン酸化されると、SH2 ドメインを 2 つ持つフォスファターゼの SHP-2 や SHP-1 が結合する²⁹⁾。SHP は GPVI/FcγR からの Src family kinase による活性化シグナルと、同じく Src を介した GPIb-IX-V 複合体からの活性化シグナルを脱リン酸化により抑制的に調節する³⁰⁻³²⁾。ITIM のチロシンリン酸化を担う NRTK は ITAM シグナルで活性化される phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の下流で活性化されるため、PECAM-1 は ITAM からの血小板活性化シグナルを減速するブレーキ役として機能して

いると思われる³³⁾。実際、PECAM-1 欠損マウスではコラーゲン刺激での血小板凝集や顆粒放出反応が亢進し、*in vivo* 血栓モデルでも血管傷害部位での血栓形成が PECAM-1 欠損マウスで亢進し閉塞時間も短縮するなど、PECAM-1 からの ITIM シグナルが欠損した状態では GPVI/FcR γ を介した ITAM シグナルが亢進することが報告されている^{31, 34, 35)}。一方で、PECAM-1 欠損マウス血小板では血餅退縮が減弱することなどから、PECAM-1 がインテグリン α IIb β 3 からの outside-in シグナルを促進するとの報告も為されている³⁶⁾。PECAM-1 は血小板機能の抑制を司る Ig-SF と思われるが、血栓止血メカニズムにおけるネットの役割は依然として不明である。

6. その他

Fc ϵ RI

α 鎖 1 本、 β 鎖 1 本、 γ 鎖 2 本からなる高親和性の IgE-Fc 受容体で、 β 鎖と γ 鎖にそれぞれ 2 つの ITAM motif を持つ。T 細胞に加え、血小板・巨核球系での発現が報告されている³⁷⁾。RANTES の放出を惹起しアレルギー反応の遷延に関与する可能性が示唆されているが³⁸⁾、詳細は不明である。

G6b-B

血小板膜上には糖鎖の違いで 25 kDa と 28 kDa の 2 種類が発現している。細胞外ドメインに 1 つの Ig-like domain を持つ。構造を詳しく述べた論文は無い。細胞内ドメインには 2 つの ITIM motif が存在し、SHP-1、SHP-2 により抑制性のシグナルを惹起すると考えられる。G6b にはヘパリンが結合するが、これが血小板機能に影響を与えているかは不明である。抗体で G6b-B をクロスリンクすると GPVI 刺激で惹起される血小板凝集反応が減弱することから³⁹⁾、PECAM-1 と同様の役割を演じていると予想される。G6b-B 欠損マウスには macrothrombocytopenia と血小板機能低下が観察される⁴⁰⁾。同マウスの巨核球は metalloproteinase の産生が亢進し膜蛋白が過剰に shed されており、proplatelet formation の異常も認められる。G6b-B による抑制性シグナルは巨核球からの血小板産生に重要である可能性が示唆されるが、血栓止血メカニズムにおける生体内での役割は依然不明である。

TLT-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-like transcript-1)

細胞外ドメインに 1 つの V セット (Ig-V-like domain) が存在する。TREMs は好中球やマクロファージ、樹状細胞などに発現する活性化受容体で、自然免疫応答に関与している。血小板膜上の TLT-1 は CD62p と同様に α 顆粒膜表面に発現し、活性化に伴い血小板膜表面に表出される。細胞内ドメインに 2 つの ITIM motif が存在し、SHP-1 や SHP-2 が結合して血小板機能の抑制を作用する可能性が考えられるが、詳細は不明である^{41, 42)}。

DNAM-1 (CD226)

細胞外ドメインに 2 つの V セット (Ig-V-like domain) を持つ 65 kDa の膜蛋白である。細胞内ドメインには ITAM motif や ITIM motif は存在しない。NK 細胞や T 細胞にも発現し、細胞傷害機能やサイトカインの放出に関与している。血小板膜上には 1 血小板あたり 1200 copy 程度発現している⁴³⁾。DNAM-1 のリガンドはよくわかっていないが、ある種の腫瘍が発現する Ig-SF の Necl-5 と結合する可能性が報告されている⁴⁴⁾。DNAM-1 は巨核球や活性化血小板が血管内皮細胞へ接着する現象に関わると考えられるが、血管内皮細胞側のリガンドや DNAM-1 下流の細胞内シグナル伝達メカニズムは不明である。Mast cell では Fc ϵ RI と synergistic に機能し、Fyn や LAT、PLC γ 2 を介した活性化シグナルを惹起している⁴⁵⁾。血小板にも Fc ϵ RI や Fyn、LAT、PLC γ 2 が発現しており、同様のシグナル伝達メカニズムが存在する可能性がある。

Gas6 (growth arrest-specific gene 6) 受容体 (TAM 受容体)

Gas6 は protein S と類似した蛋白で、 γ カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメインを持つ。血小板 α 顆粒から放出され⁴⁶⁾、抗血栓作用を示すと報告されている⁴⁷⁾。Gas6 欠損マウスの詳細については、下田純一先生の総説に詳しくまとめられている⁴⁸⁾。

Gas6 受容体は 3 つのグループ、Tyr3 (Rse, Brt, Tif, Dtk, Etk2, Sky), Axl (Ufo, Ark, Tyro7), Mer (c-Eyk, Nyk, Tyro12) が知られており、それぞれの頭文字をとって TAM 受容体と呼ばれる。TAM 受容体は細胞外ドメインに 2 つの Ig-C2-like domain と、細胞内ドメインに tyrosine kinase domain を持つ。TAM 受容

体からの血小板活性化シグナル下流で PI3K が活性化されることから、インテグリン $\alpha\text{IIb}\beta 3$ の活性化に関わる可能性がある⁴⁹⁾。

7. 最後に

現在、抗血小板薬として最短距離にいるのは GPVI/Fc γ 阻害薬であろう。抗血小板薬には「血小板凝集は抑えるが出血はしにくい」という相反する特性が求められる。これまで報告された GPVI 欠損症患者ではコラーゲン凝集は完全に欠損するものの重篤な出血傾向は認められていない。GPVI とヒト IgG-Fc 部分の融合蛋白 Ravacept を脳梗塞を発症させたマウスに投与すると、梗塞巣や脳浮腫の減少と機能回復に良好な結果を得たとの報告がなされている⁵⁰⁾。

血小板 Ig-SF には研究が進み治療薬開発段階のものから詳細不詳のものまで様々あり、研究開拓が待たれるフロンティアである。今後の研究発展を期待したい。

著者の利益相反 (COI) の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Reth M: Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**: 383–384, 1989.
- 2) Ravetch JV, Lanier LL: Immune inhibitory receptors. *Science* **290**: 84–89, 2000.
- 3) Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ: The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem* **274**: 29019–29024, 1999.
- 4) Chen J, Diacovo TG, Grenache DG, Santoro SA, Zutter MM: The $\alpha(2)$ integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol* **161**: 337–344, 2002.
- 5) Best D, Senis YA, Jarvis GE, Eagleton HJ, Roberts DJ, Saito T, Jung SM, Moroi M, Harrison P, Green FR, Watson SP: GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood* **102**: 2811–2818, 2003.
- 6) Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirnigbl H: Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the Fc γ chain. *J Biol Chem* **275**: 23998–24002, 2000.
- 7) Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reininger A, Ruggeri ZM, Ware J: The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* **102**: 1701–1707, 2003.
- 8) Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H: A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood* **69**: 1712–1720, 1987.
- 9) Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K: A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* **84**: 1440–1445, 1989.
- 10) Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K: Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol* **89**: 124–130, 1995.
- 11) Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Arai M, Yamamoto N, Takahashi H, Okuma M: Collagen-stimulated activation of Syk but not c-Src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem* **272**: 63–68, 1997.
- 12) Takahashi H, Moroi M: Antibody against platelet membrane glycoprotein VI in a patient with systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol* **67**: 262–267, 2001.
- 13) Smethurst PA, Jouts-Korhonen L, O'Connor MN, Wilson E, Jennings NS, Garner SF, Zhang Y, Knight CG, Dafforn TR, Buckle A, IJsseldijk MJ, De Groot PG, Watkins NA, Farndale RW, Ouwehand WH: Identification of the primary collagen-binding surface on human glycoprotein VI by site-directed mutagenesis and by a blocking phage antibody. *Blood* **103**: 903–911, 2004.
- 14) Dumont B, Minullina I, Loyau S, Monteiro RC, Lacapere JJ, Arocas V, Jandrot-Perrus M: Chimeric Fc receptors identify ligand binding regions in human glycoprotein VI. *J Mol Biol* **361**: 877–887, 2006.
- 15) Horii K, Kahn ML, Herr AB: Structural basis for platelet collagen responses by the immune-type receptor glycoprotein VI. *Blood* **108**: 936–942, 2006.
- 16) Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A: ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**: 649–662, 1992.
- 17) Watson SP, Asazuma N, Atkinson B, Berlanga O, Best D, Bobe R, Jarvis G, Marshall S, Snell D, Stafford M, Tulasne D, Wilde J, Wonerow P, Frampton J: The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen. *Thromb Haemost* **86**: 276–288, 2001.
- 18) Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: Critical role of ADP interaction with P2Y₁₂ receptor in the maintenance of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activation: association with Rap1B activation. *J Thromb Haemost* **4**: 1379–1387, 2006.
- 19) Rosenfeld SI, Looney RJ, Leddy JP, Phipps DC, Abraham GN, Anderson CL: Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane

- protein shared by monocytes. *J Clin Invest* **76**: 2317–2322, 1985.
- 20) Karas SP, Rosse WF, Kurlander RJ: Characterization of the IgG-Fc receptor on human platelets. *Blood* **60**: 1277–1282, 1982.
 - 21) Visentin GP, Ford SE, Scott JP, Aster RH: Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest* **93**: 81–88, 1994.
 - 22) Gratacap MP, Hérault JP, Viala C, Ragab A, Savi P, Herbert JM, Chap H, Plantavid M, Payrastré B: FcγRIIA requires a Gi-dependent pathway for an efficient stimulation of phosphoinositide 3-kinase, calcium mobilization, and platelet aggregation. *Blood* **96**: 3439–3446, 2000.
 - 23) Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ: Identification of FcγRIIA as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood* **112**: 2780–2786, 2008.
 - 24) Zhi H, Rauova L, Hayes V, Gao C, Boylan B, Newman DK, McKenzie SE, Cooley BC, Poncz M, Newman PJ: Cooperative integrin/ITAM signaling in platelets enhances thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood* **121**: 1858–1867, 2013.
 - 25) Sobocka MB, Sobocki T, Banerjee P, Weiss C, Rushbrook JI, Norin AJ, Hartwig J, Salifu MO, Markell MS, Babinska A, Ehrlich YH, Kornecki E: Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation. *Blood* **95**: 2600–2609, 2000.
 - 26) Gupta SK, Pillarisetti K, Ohlstein EH: Platelet agonist F11 receptor is a member of the immunoglobulin superfamily and identical with junctional adhesion molecule (JAM): regulation of expression in human endothelial cells and macrophages. *IUBMB Life* **50**: 51–56, 2000.
 - 27) Newman DK, Hamilton C, Newman PJ: Inhibition of antigen-receptor signaling by Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) requires functional ITIMs, SHP-2, and p56(lck). *Blood* **97**: 2351–2357, 2001.
 - 28) Dhanjal TS, Ross EA, Auger JM, McCarty OJ, Hughes CE, Senis YA, Buckley CD, Watson SP: Minimal regulation of platelet activity by PECAM-1. *Platelets* **18**: 56–67, 2007.
 - 29) Jackson DE, Kupcho KR, Newman PJ: Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that are required for the cellular association and activation of the protein-tyrosine phosphatase, SHP-2. *J Biol Chem* **272**: 24868–24875, 1997.
 - 30) Cicmil M, Thomas JM, Leduc M, Bon C, Gibbins JM: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets. *Blood* **99**: 137–144, 2002.
 - 31) Jones KL, Hughan SC, Dopheide SM, Farndale RW, Jackson SP, Jackson DE: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a negative regulator of platelet-collagen interactions. *Blood* **98**: 1456–1463, 2001.
 - 32) Rathore V, Stapleton MA, Hillery CA, Montgomery RR, Nichols TC, Merricks EP, Newman DK, Newman PJ: PECAM-1 negatively regulates GPIb/V/IX signaling in murine platelets. *Blood* **102**: 3658–3664, 2003.
 - 33) Tourdot BE, Brenner MK, Keough KC, Holyst T, Newman PJ, Newman DK: Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)-mediated inhibitory signaling is regulated by sequential phosphorylation mediated by distinct nonreceptor tyrosine kinases: a case study involving PECAM-1. *Biochemistry* **52**: 2597–2608, 2013.
 - 34) Patil S, Newman DK, Newman PJ: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen. *Blood* **97**: 1727–1732, 2001.
 - 35) Falati S, Patil S, Gross PL, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett NE, Pixton KL, Weiler H, Cooley B, Newman DK, Newman PJ, Furie BC, Furie B, Gibbins JM: Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood* **107**: 535–541, 2006.
 - 36) Wee JL, Jackson DE: The Ig-ITIM superfamily member PECAM-1 regulates the “outside-in” signaling properties of integrin α(IIb)β3 in platelets. *Blood* **106**: 3816–3823, 2005.
 - 37) Joseph M, Gounni AS, Kusnierz JP, Vorng H, Sarfati M, Kinet JP, Tonnel AB, Capron A, Capron M: Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur J Immunol* **27**: 2212–2218, 1997.
 - 38) Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K, Nakahata T, Furukawa S, Okumura K, Ra C: Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcεRI) in human platelets and its intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood* **93**: 2543–2551, 1999.
 - 39) Newland SA, Macaulay IC, Floto AR, de Vet EC, Ouwehand WH, Watkins NA, Lyons PA, Campbell DR: The novel inhibitory receptor G6B is expressed on the surface of platelets and attenuates platelet function in vitro. *Blood* **109**: 4806–4809, 2007.
 - 40) Mazharian A, Wang YJ, Mori J, Bem D, Finney B, Heising S, Gissen P, White JG, Berndt MC, Gardiner EE, Nieswandt B, Douglas MR, Campbell RD, Watson SP, Senis YA: Mice lacking the ITIM-containing receptor G6b-B exhibit macrothrombocytopenia and aberrant platelet function. *Sci Signal* **5**: ra78, 2012.
 - 41) Barrow AD, Astoul E, Floto A, Brooke G, Relou IA, Jennings NS, Smith KG, Ouwehand W, Farndale RW, Alexander DR, Trowsdale J: Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2. *J Immunol* **172**: 5838–5842, 2004.
 - 42) Washington AV, Schubert RL, Quigley L, Disipio T, Feltz R, Cho EH, McVicar DW: A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the α-granules of megakaryocytes and platelets. *Blood* **104**: 1042–1047, 2004.
 - 43) Scott JL, Dunn SM, Jin B, Hillam AJ, Walton S, Berndt MC, Murray AW, Krissansen GW, Burns GF: Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. *J Biol Chem* **264**: 13475–13482, 1989.
 - 44) Morimoto K, Satoh-Yamaguchi K, Hamaguchi A, Inoue Y, Takeuchi M, Okada M, Ikeda W, Takai Y, Imai T: Interaction

- of cancer cells with platelets mediated by Necl-5/poliovirus receptor enhances cancer cell metastasis to the lungs. *Oncogene* **27**: 264–273, 2008.
- 45) Bachelet I, Munitz A, Mankutad D, Levi-Schaffer F: Mast cell costimulation by CD226/CD112 (DNAM-1/Nectin-2): a novel interface in the allergic process. *J Biol Chem* **281**: 27190–27196, 2006.
- 46) Ishimoto Y, Nakano T: Release of a product of growth arrest-specific gene 6 from rat platelets. *FEBS Lett* **466**: 197–199, 2000.
- 47) Gould WR, Baxi SM, Schroeder R, Peng YW, Leadley RJ, Peterson JT, Perrin LA: Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses. *J Thromb Haemost* **3**: 733–741, 2005.
- 48) 下田純一, 濱本高義: Gas 6 の欠損マウス. *血栓止血誌* **12**: 514–521, 2001.
- 49) Cosemans JM, Van Kruchten R, Olieslagers S, Schurgers LJ, Verheyen FK, Munnix IC, Waltenberger J, Angelillo-Scherrer A, Hoylaerts MF, Carmeliet P, Heemskerk JW: Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *J Thromb Haemost* **8**: 1797–808, 2010.
- 50) Goebel S, Li Z, Vogelmann J, Holthoff HP, Degen H, Hermann DM, Gawaz M, Ungerer M, Münch G: The GPVI-Fc fusion protein Revacept improves cerebral infarct volume and functional outcome in stroke. *PLoS One* **8**: e66960, 2013.