

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09826

研究課題名(和文) 血小板インテグリンシグナル機構の解明と血管病変形成に関する検討

研究課題名(英文) Analysis of platelet integrin signaling and association with vascular diseases

研究代表者

柏木 浩和 (KASHIWAGI, Hirokazu)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10432535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は小児期より強い出血症状を認める患者症例の検討から、Ca/DAG-GEFIおよびKindlin-3の欠損症を見出した。更に 11b/3活性化カインेटィックスアッセイを用いることにより、出血症状にはアゴニスト刺激後の 11b/3活性化速度が重要であることを明らかにした。また 11b/3の恒常的活性化をきたす 11b(R995W)ノックインマウスの検討から、KIマウスにおいてはヒトと同様に巨大血小板減少を呈すること、またその原因として巨核球におけるproplatelet形成が障害されること、またKIマウスにおいては主に 11b/3の発現低下に伴う強い血小板機能障害を呈することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血小板は動脈硬化性血管病変の形成に中心的役割を担う。今回の研究により血小板機能の中で最も重要である 11b/3の活性化に必須の分子とそのメカニズムの一端を明らかにした。また 11b/3の恒常的活性化が血小板産生の障害および血小板機能に重大な影響を与えることをマウスモデルを用いて明らかにした。これらにより 11b/3活性化の生体内における新たな生理的意義を明らかにするとともに、11b/3活性化を制御する抗血小板薬開発の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We identified Ca/DAG-GEFI deficiency and kindlin-3 deficiency by analysis of patients with severe bleeding tendency from their infancy. Using our developed 11b/3 activation kinetic assay, we revealed that delayed activation of 11b/3 leads to severe bleeding tendency. Furthermore, we analyzed constitutive active 11b(R995W) knock-in mice, and found that the mice showed macrothrombocytopenia like human subjects. We found that impaired proplatelet formation may be responsible for the phenotype. KI mice also showed highly impaired platelet function mainly due to reduced 11b/3 expression in platelets.

研究分野：血栓・止血学

キーワード：インテグリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化を基盤とした心筋梗塞や脳梗塞などの血栓症は、本邦および世界における死因の約3割を占めている。これらの疾患は血小板を主体とした動脈血栓がその原因である。更に近年、血小板は血栓形成だけでなく癌の増殖・転移や免疫機構など、幅広い病態に関与することが明らかにされてきており、血小板機能の制御機構を明らかにすることは多様な疾患への新たな治療戦略の開発につながる。血小板表面には複数の膜糖蛋白(GP)が発現しており、これらが各種細胞外マトリックスや可溶性物質の受容体として作用することにより血小板機能を制御する。特にインテグリン $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb/IIIa) はフィブリノゲンおよび von Willebrand 因子の受容体として血小板機能の中核を担っている。我々は、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ の先天性欠損/異常症である Glanzmann 血小板無力症の解析を通して、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ の遺伝子異常、機能部位、生理的意義を明らかにしてきた (Honda, et al. J Clin Invest 1998;102:1183-92.; Kashiwagi, et al. Int J Hematol 2011;93:106-11)。 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ のリガンド結合能は厳密に制御されており、通常 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ は非活性化状態にあるが、各種アゴニスト受容体からの細胞内シグナル (inside-out シグナル) により構造変化を生じ、その受容体機能を発揮するようになる。近年になり、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 活性化にはその細胞内領域に結合する talin および kindlin-3 の重要性が明らかにされてきた。更にこれら $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 活性化制御分子の $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ への結合には Rap1 の活性化が関与している可能性が考えられていたが、依然として詳細は不明であった。また、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ はリガンド結合後に細胞内に新たなシグナル (outside-in シグナル) を生じることにより血小板伸展反応や血餅退縮をきたし、動脈血栓形成および動脈硬化進展に関与している。申請者らは、先天性巨大血小板減少症の解析から $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ の細胞内変異により生じる恒常的な outside-in シグナルにより血小板形態/産生異常を生じる可能性を示した (Kunishima, Kashiwagi, et al. Blood 2011;117:5479-84, Kashiwagi, et al. MGGM 2013;1:77-86)。更に本邦に最も高頻度に認められた細胞内 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (R995W) 変異のノックイン (KI) マウスの作製に成功し、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ シグナルの異常が病態にどのような影響を与えるか解析することが可能となっていた。

2. 研究の目的

血小板機能異常を有する症例の解析に加えて、我々が開発した $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 活性化動態解析法および αIIb 活性化 KI マウスなどを用いて、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 活性化シグナルの分子機構を解明するとともに、 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 活性化シグナルによる血小板機能および血小板産生への影響および病態、特に出血症状と動脈血栓形成への関与について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) インテグリンシグナル制御機構の解析

幼小児期より強い出血傾向を呈した血小板機能異常症の原因遺伝子の解明および分子機構の解析を行った。特に $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 活性化との関連を、我々が開発した $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 活性化カイネティクスアッセイを用いた解析を行い、インテグリン細胞内結合蛋白の制御機構についての検討を行った。

(2) $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (R995W) KI マウスを用いた検討

$\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (R995W) KI マウスを用いて、in vitro および in vivo における血小板機能の解析を行った。また血小板の消費および産生に関する検討を行い、KI マウスに認めた血小板減少症の原因解明を行った。

4. 研究成果

(1)我々は小児期より強い出血症状を認める患者検体の検討から、CalDAG-GEFI および kindlin-3 欠損症を見出すことに成功した。興味深いことに通常の α IIb β 3 活性化測定法 (PAC1 binding assay) では、CalDAG-GEFI 欠損症では、比較的 α IIb β 3 活性化が保たれていた。P2Y12 欠損症においては PAC1 binding assay で強い α IIb β 3 活性化障害を認めるにもかかわらず出血傾向が軽度であることから、我々の開発した α IIb β 3 活性化カイネティックスアッセイを用いて、これら 3 例の α IIb β 3 活性化動態の比較を行った。その結果、P2Y12 欠損症では早期の α IIb β 3 活性化速度は正常であるが、その活性化の維持が障害されているのに対して、CalDAG-GEFI 欠損症では、早期の α IIb β 3 活性化速度が著明に障害されていることが明らかとなった。また kindlin-3 欠損例では、 α IIb β 3 活性化反応はほとんど認められなかった。以上の結果から、 α IIb β 3 活性化に必須とされている CalDAG-GEFI と kindlin-3 の α IIb β 3 活性化機構にはそれぞれの特徴があること、また出血症状の出現には α IIb β 3 活性化の速度が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(2) α IIb(R995W)ホモ KI マウスにおいては、同じ変異を有するヒトと同様に巨大血小板減少を認めた。KI ホモマウスにおいては、血小板数の低下とともに幼若な血小板である網状血小板産生の低下が認められた。骨髄および脾臓において KI マウスでは巨核球数の低下は認めず、また脾臓のサイズも野生型と差を認めなかった。更に KI マウスにおいて巨核球の成熟過程における障害も認めなかった。一方、胎児肝細胞を用いて proplatelet 形成に関する検討を行い、ホモマウスでは野生型あるいはヘテロマウスと比べ、proplatelet 形成の障害が存在することを明らかにした。更にトロンボポエチン投与後、あるいは GPIb 抗体を用いた血小板減少からの回復において、ホモマウスでは血小板回復の遅延が認められた。以上の結果から、ホモマウスにおいては血小板産生の低下、特に血小板産生の最終段階である proplatelet 形成が障害されていることが血小板減少の主因であると考えられた。また KI マウスにおける血小板機能を検討した結果、KI マウスでは著明な出血時間の延長および血小板凝集能の低下を認めた。更に、より生理的な条件に近い流動条件下でのコラーゲン上での接着および凝集塊形成において、ホモ KI マウスにおいては WT やヘテロ KI マウスに比べコラーゲン上への接着には大きな障害は認めなかったが、血小板凝集形成に著明な障害を認めた。そこで、腸間膜動脈を用いて FeCl₃ による強い血管障害時の血栓形成能についての検討を行ったところ、やはりホモ KI マウスでは血栓形成の著明な低下を認めた。これらの結果から、 α IIb β 3 の恒常的活性化変異は強い血小板機能障害を生じることとも明らかとなった。KI マウスにおいては血小板における α IIb β 3 発現の低下を認めており、活性化変異による α IIb β 3 発現への影響が血小板機能低下に大きく関与していると考えられた。これらの結果から、 α IIb β 3 細胞内領域変異による恒常的な活性化により血小板産生の最終段階において障害が生じ、巨大血小板減少症となること、 α IIb β 3 発現異常を伴った著明な血小板機能異常が生じることが KI マウスを用いることにより証明された。またこれにより血管における血栓病変形成が著明に障害されることが明らかとなり、本研究により α IIb β 3 からの恒常的な活性化シグナルの生体への影響の一旦が明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Akuta K, [Kashiwagi H](#), Yujiri T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, [Tomiya Y](#). A unique phenotype of acquired Glanzmann thrombasthenia due to non-function-blocking anti- α IIb β 3 autoantibodies. *J Thromb Haemost.* 2019 Jan;17(1):206-219. doi: 10.1111/jth.14323. 査読有

Hosokawa M, [Kashiwagi H](#), Nakayama K, Sakuragi M, Nakao M, Morikawa T, Kiyokawa T, Aochi H, Nagamine K, Shibayama H, [Tomiya Y](#). Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the

daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method). *Transfusion*. 2018 Dec;58(12):3003-3013. doi: 10.1111/trf.14900. 査読有

Morikawa Y, Kato H, Kashiwagi H, Nishiura N, Akuta K, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Protease-activated receptor-4 (PAR4) variant influences on platelet reactivity induced by PAR4-activating peptide through altered Ca²⁺ mobilization and ERK phosphorylation in healthy Japanese subjects. *Thromb Res*. 2018 Feb;162:44-52. doi: 10.1016/j.thromres.2017.12.014. 査読有

Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kiyokawa T, Nagamine K, Fujita J, Maeda T, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Immature platelet fraction (IPF) as a predictive value for thrombopoietic recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2018 Mar;107(3):320-326. doi: 10.1007/s12185-017-2344-8. 査読有

柏木浩和 . 後天性血小板機能異常症 . 日本血栓止血学会誌 2018;29:620-624. <https://doi.org/10.2491/jjsth.29.620> 査読無

Kato H, Nakazawa Y, Kurokawa Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Morita D, Banno F, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Human CalDAG-GEFI deficiency increases bleeding and delays α IIb β 3 activation. *Blood*. 2016 Dec 8;128(23):2729-2733. doi:10.1182/blood-2016-03-704825. 査読有

Fujita S, Kashiwagi H, Tomimatsu T, Ito S, Mimura K, Kanagawa T, Endo M, Miyoshi T, Okamura Y, Tani Y, Tomiyama Y, Kimura T. Expression levels of ABCG2 on cord red blood cells and study of fetal anemia associated with anti-Jr(a). *Transfusion*. 2016 May;56(5):1171-1181. doi: 10.1111/trf.13515. 査読有

[学会発表](計 20 件)

Kato H, Nishiura N, Akuta K, Kashiwagi H, Kokame K, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. Platelet integrin α IIb β 3 activation kinetics in inherited platelet function disorders: the role of ADP receptor P2Y₁₂. CalDAG-GEFI and kindlin-3 in α IIb β 3 activation by inside-out signaling. The American Society of Hematology 60th Annual Meeting. Dec 1-4, 2018, San Diego, USA

Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kokame K, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y. α IIb(R990W), a gain-of-function mutation of α IIb β 3, knock-in mice show moderately impaired thrombopoiesis. The American Society of Hematology 60th Annual Meeting. Dec 1-4, 2018, San Diego, USA

芥田敬吾、清水一亘、柏木浩和、國島伸治、坂野史明、小亀浩市、西浦伸子、森川陽一郎、加藤恒、本田繁則、金倉謙、宮田敏行、富山佳昭 . インテグリン α IIb β 3 活性化変異 α IIb (R990W) ノックインマウスにおける血小板産生障害 . 第 80 回日本血液学会学術集会 . 2018 年 10 月 12-14 日 大阪国際会議場 (大阪府、大阪市)

西浦伸子、芥田敬吾、森川陽一郎、加藤恒、柏木浩和、金倉謙、富山佳昭 . フローサイトメトリーを使った ITP 患者の血小板機能検査 . 第 80 回日本血液学会学術集会 . 2018 年 10 月 12-14 日大阪国際会議場 (大阪府、大阪市)

西浦伸子、柏木浩和、芥田敬吾、森川陽一郎、加藤恒、本田繁則、金倉謙、富山佳昭 . FCM を用いた血小板減少患者における血小板機能 ~ 凝集能を含めた検討 . 第 40 回日本血栓止血学会学術集会. 2018 年 6 月 28-30 日 ロイトン札幌 (北海道、札幌市)

加藤恒、柏木浩和、森川陽一郎、芥田敬吾、西浦伸子、本田繁則、小亀浩市、宮田敏行、金倉謙、富山佳昭 . 血小板機能異常症におけるフィブリノゲン受容体インテグリン α IIb β 3 活性化キネティックスの評価 . 第 40 回日本血栓止血学会学術集会 2018 年 6 月 28-30 日 ロイトン札幌 (北海道、札幌市)

芥田敬吾、清水一亘、柏木浩和、國島伸治、坂野史明、小亀浩市、西浦伸子、森川陽一郎、加藤恒、本田繁則、金倉謙、宮田敏行、富山佳昭 . インテグリン α IIb β 3 活性化変異 α IIb (R990W) ノックインマウスにおける血小板産生障害 . 第 40 回日本血栓止血学会学術集会 2018 年 6 月 28-30 日 ロイトン札幌 (北海道、札幌市)

Akuta K, Kashiwagi H, Yujiti T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Acquired Glanzmann thrombasthenia due to marked reduction of surface α IIb β 3 expression with non function-blocking anti- α IIb β 3 antibodies. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis. July 28-30, 2018, Hokkaido, Japan

芥田敬吾、柏木浩和、湯尻俊昭、西浦伸子、森川陽一郎、加藤恒、本田繁則、金倉謙、富山佳昭 . 非機能阻害抗体による血小板表面の著明なインテグリン α IIb β 3 発現低下を来した後天性血小板無力症 . 第 79 回日本血液学会学術集会 . 2017 年 10 月 20-22 日 東京国際フォーラム (東京都、東京)

加藤恒、伊藤康彦、柏木浩和、森川陽一郎、芥田敬吾、西浦伸子、金倉謙、富山佳昭 . α IIb β 3 activation kinetics reveals distinctive roles of critical molecules in inside-out signaling 第 79 回日本血液学会学術集会 . 2017 年 10 月 20-22 日 東京国際フォーラム (東京都、東京)

Akuta K, Kashiwagi H, Yujiti T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Acquired Glanzmann thrombasthenia due to marked reduction of surface α IIb β 3 expression with non function-blocking anti- α IIb β 3 antibodies. International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress. July 8-13, 2017, Berlin, Germany

Kato H, Ito Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Akuta K, Nishiura N, Honda S, Kokame K, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. Complete failure of integrin α IIb β 3 activation in kinetic assay association with severe bleeding problem in a patient with kindlin-3 deficiency. International Society on Thrombosis and Haemostasis Congress. July 8-13, 2017, Berlin, Germany

芥田敬吾、柏木浩和、湯尻俊昭、西浦伸子、森川陽一郎、加藤恒、本田繁則、金倉謙、富山佳昭 . GPIIb/IIIa の著明な発現低下を認めた後天性血小板無力症 . 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 . 2017 年 6 月 8-10 日 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

加藤恒、伊藤康彦、柏木浩和、森川陽一郎、芥田敬吾、西浦伸子、金倉謙、富山佳昭 . Kindlin-3 欠損に起因した血小板無力症/白血球接着不全症 (LAD-III) の解析 . 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 . 2017 年 6 月 8-10 日 名古屋国際会議場 (愛知県、名古屋市)

森川陽一郎、加藤恒、芥田敬吾、柏木浩和、本田繁則、金倉謙、富山佳昭 . トロンピン受容体 PAR4 多型性の血小板機能における意義 . 第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年 10 月 14 日 パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

柏木浩和 . ITP の病態、診断および治療 . (招待講演) 第 17 回日本検査血液学会学術集会 . 2016 年 8 月 7 日福岡国際会議場 (福岡県、福岡市)

森川陽一郎、加藤恒、芥田敬吾、柏木浩和、本田繁則、金倉謙、富山佳昭 . The association of PAR4 polymorphism with human platelet reactivity in Japanese. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会 2016 年 6 月 17 日 奈良春日野国際フォーラム (奈良県、奈良市)

加藤恒、柏木浩和、富山佳昭 . Integrin inside-out activation: the role of CalDAG-GEFI in platelets integrin α IIb β 3. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会 2016 年 6 月 16 日 奈良春日野国際フォーラム (奈良県、奈良市)

柏木浩和、藤田聡子、富松拓治、木村正、富山佳昭 . Jra 不適合妊娠の臨床像と胎児貧血の機序 . 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会 2016 年 4 月 30 日 国立京都国際会館 (京都府、京都市)

柏木浩和 . 血小板血栓形成の分子メカニズム : 最新の話 . 第 41 回日本脳卒中学会総会 (招待講演) 2016 年 4 月 15 日 ロイトン札幌 (北海道、札幌市)

[その他]

ホームページ等 <http://www.hematology.pro/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 富山 佳昭

ローマ字氏名 : (TOMIYAMA, Yoshiaki)

所属研究機関名 : 大阪大学

部局名 : 医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80252667

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。