

令和元年6月8日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09835

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスモデルを用いた血栓症の病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of thrombosis using genetically engineered mouse models

研究代表者

坂野 史明 (BANNO, FUMIAKI)

日本女子大学・家政学部・講師

研究者番号：00373514

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)：本研究ではこれまでに樹立した遺伝子改変マウスを用いて血栓性分子やその遺伝子変異が血栓症病態に及ぼす影響を解析した。その結果、プロテインS-K196E変異にプラスミノゲン-A622T変異が重なっても血栓症状は増悪しないこと、ADAMTS13が自然免疫応答にて過剰な好中球浸潤を抑制すること、血小板内の細胞外シグナル調節キナーゼが血栓形成の開始と維持に必須となること、プロテインキナーゼAが初期相においてのみ血栓形成を抑制すること、インテグリン IIb-R990W変異は血小板 IIb₃の恒常的活性化を誘導するが、同時に IIb₃発現量を著減させ、血小板凝集不全を引き起こす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

血栓症に関わる分子やその遺伝子変異の病態生理学的意義が明らかとなり、血栓症治療の充実につながる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the effects of thrombotic molecules and their gene mutations on the pathogenesis of thrombosis using genetically modified mice established so far. The coexistence of the plasminogen-A622T mutation did not aggravate the thrombotic tendency caused by the protein S-K196E mutation. ADAMTS13 suppressed excessive neutrophil infiltration in the innate immune response. Extracellular signal-regulated kinase in platelets was essential for initiation and maintenance of thrombus formation. Protein kinase A in platelets inhibited thrombus formation only in the early phase. The integrin IIb-R990W mutation induced constitutive activation of IIb₃ on platelets, but simultaneously reduced the expression of IIb₃ to cause impaired platelet aggregation.

研究分野：血栓止血学、生化学

キーワード：血栓症モデルマウス プロテインS プラスミノゲン ADAMTS13 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

日本人には凝固制御因子プロテインSのK196E変異が約50-60人に1人の頻度で認められる。研究代表者らは、プロテインS-K196E変異のノックインマウスを作製し、その解析から本変異がマウスの静脈血栓症状を悪化させることを明らかにした。また、日本人には線溶因子プラスミノゲンのA620T変異(マウスではA622T変異)が約20-30人に1人の頻度で認められる。研究代表者らは、プラスミノゲンA622T変異マウスを作製し、その解析から本変異は血漿プラスミノゲン活性を著減させるものの、少なくとも単独では血栓症の増悪要因とはならないことを明らかにした。また研究代表者らは、血小板凝集制御因子ADAMTS13の欠損マウスを作製し、本欠損マウスでは微小血管内血小板血栓形成が亢進しており、脳梗塞、心筋梗塞および静脈血栓症のリスクが高まることを明らかにした。これらの例をはじめとして、研究代表者らは、これまでに血栓形成に関わる因子の遺伝子欠損マウスや変異マウスを複数樹立して、その解析を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに樹立した遺伝子改変マウスの解析を更に進めることで、各分子や遺伝子変異が血栓症やその関連疾患に及ぼす影響を明らかにすると共に、それぞれのマウスを新たな抗血栓療法開発のためのモデルとして確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プロテインS-K196Eおよびプラスミノゲン-A622T二重変異マウスの解析

プラスミノゲン-A622T変異がプロテインS-K196Eに起因する静脈血栓傾向に影響を及ぼすか否かを解析するため、プロテインS-K196E変異とプラスミノゲン-A622T変異の二重変異マウスを樹立した。

マウスに組織因子を下大静脈から投与することで肺塞栓を惹起し、呼吸停止までの時間を20分間測定して生存率を調べた。また、呼吸停止2分後に右心室からEvans blueを注入し、肺全体の染色像から肺血管閉塞スコア(0 = 閉塞無し~4 = 完全閉塞の5段階)を判定した。

(2) ADAMTS13欠損マウスの解析

ADAMTS13と炎症時の自然免疫応答との関連性を明らかにするため、侵襲性肺アスペルギルス症モデルを用いてADAMTS13欠損マウスの症状を解析した。

マウスの気管支に*Aspergillus fumigatus*の分生子を投与することで感染を誘導し、誘導14日間の生存率を比較した。また、感染24時間後の肺組織中の真菌量を測定し、肺切片の組織化学的解析を行った。

(3) 蛍光共鳴エネルギー移動バイオセンサー発現マウスの解析

血栓形成過程における血小板内プロテインキナーゼ活性のin vivo調節機構を明らかにするため、細胞外シグナル調節キナーゼおよびプロテインキナーゼAに対する蛍光共鳴エネルギー移動バイオセンサーを発現するトランスジェニックマウスのライブラリー解析を行った。

マウスの腹部皮膚を切開し、皮下細動脈にレーザーを照射して内皮傷害を誘発した。この血管傷害部位での血小板血栓形成および血小板内での細胞外シグナル調節キナーゼ活性およびプロテインキナーゼA活性を二光子顕微鏡下に経時的に観察した。

(4) インテグリン 11b-R990W変異マウスの解析

インテグリン 11bのR995W変異(マウスではR990W変異)は日本人の先天性巨大血小板減少症患者に最も高頻度に見られる遺伝子変異である。本変異が血小板の数、形態および機能に及ぼす影響を解析するため、11b-R990W変異のノックインマウスを作製した。

マウスの血小板数および血小板サイズを測定後、血小板膜上の11b 3受容体の発現量および活性化状態をフローサイトメトリーにて測定した。さらに、血小板機能への変異の影響を解析するため、アゴニスト惹起血小板凝集、in vitro血流下血小板血栓形成、in vivo腸間膜動脈内血小板血栓形成、尾部切断面出血時間の解析を行った。

4. 研究成果

(1) プロテイン S-K196E およびプラスミノゲン-A622T 二重変異マウスの解析

肺塞栓誘発後の生存率を野生型マウス、プロテイン S-K196E 変異マウス、プラスミノゲン-A622T 変異マウス、プロテイン S-K196E とプラスミノゲン-A622T 二重変異マウスの 4 系統で比較した結果、プラスミノゲン A622T 変異マウスの生存率は野生型マウスと同等であり、二重変異マウスの生存率は、野生型マウスに比べると低下したが、プロテイン S-K196E 変異マウスとは同等であった。また、Evans blue 注入による肺血管閉塞スコアも生存率と同様の結果を示した。したがって、日本人に高頻度に見られるプラスミノゲン-A620T 変異は少なくとも血栓症に対しては安全な変異であると考えられた。

(2) ADAMTS13 欠損マウスの解析

ADAMTS13 欠損マウスでは *A. fumigatus* 感染後の生存率が野生型マウスと比べて低下した。感染 24 時間後に ADAMTS13 欠損マウスの肺では野生型マウスに比べてより多くの真菌増殖が認められた。組織切片の観察から、ADAMTS13 欠損マウスでは肺血管周囲への好中球の浸潤が顕著であり、急性炎症の亢進を示す所見が得られた。ADAMTS13 欠損マウスの骨髄から回収した好中球の活性化能自体には異常が認められなかったことから、ADAMTS13 は真菌性肺炎をはじめとする急性炎症過程において、過剰な好中球動員を抑制しており、この ADAMTS13 の機能はフォンビルブランド因子の断片化を介するものと推察された。

(3) 蛍光共鳴エネルギー移動バイオセンサー発現マウスの解析

マウス皮下細動脈傷害部位での血小板血栓形成過程において、細胞外シグナル調節キナーゼ活性は生じる血栓の中心部分に強く認められ、血栓形成の開始と維持の両方にその活性化が必須となることが明らかになった。一方、プロテインキナーゼ A 活性は血栓の下流側表面に検出され、血小板が活性化、凝集していく過程の初期段階においてのみ、血小板血栓形成を抑制しうることが判明した。

(4) インテグリン IIb-R990W 変異マウスの解析

インテグリン IIb-R990W 変異マウスは正常に出生したが、軽度の血小板減少と血小板サイズの上昇が認められた。本変異マウスの血小板では、フィブリノーゲン受容体 IIb 3 が恒常的に活性化していたが、その発現量は逆に著しく低下していた。この結果、アゴニスト惹起血小板凝集、in vitro 血流下血小板血栓形成、in vivo 腸間膜細動脈内血小板血栓形成はいずれも本変異マウスで野生型マウスに比べて著明に抑制されており、尾部切断面からの出血時間も延長していた。以上の結果から、インテグリン IIb-R995W 変異は巨大血小板減少症に加えて、血小板無力症と同様の重度血小板機能不全を引き起こすことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

坂野麻里子, 坂野史明, フライ油の劣化過程における遊離脂肪酸生成機構, オレオサイエンス, 査読有, 19, 89-92, 2019.

坂野麻里子, 坂野史明, 遠藤泰志, 藤本健四郎, 酸価はフライ油の単純加水分解では無く酸化劣化の指標の一つである, 日本調理科学会誌, 査読有, 50, 239-244, 2017. (DOI: 10.11402/cookeryscience.50.239)

Hasibeder A, Pruffer S, Ebner K, Reuter S, Lopez PA, Scharrer I, Banno F, Stassen M, Schild H, Jurk K, Bosmann M, Beckert H, Radsak MP, ADAMTS-13 regulates neutrophil recruitment in a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis, Sci Rep, 査読有, 7, 7184, 2017. (DOI: 10.1038/s41598-017-07340-3)

Tashima Y, Banno F, Kita T, Matsuda Y, Yanamoto H, Miyata T, Plasminogen Tochigi mice exhibit phenotypes similar to wild-type mice under experimental thrombotic conditions, PLoS One, 査読有, 12, e0180981, 2017. (DOI: 10.1371/journal.pone.0180981)

Hiratsuka T, Sano T, Kato H, Komatsu N, Imajo M, Kamioka Y, Sumiyama K, Banno F, Miyata T, Matsuda M, Live imaging of extracellular signal-regulated kinase and protein kinase A activities during thrombus formation in mice expressing biosensors based on Förster resonance energy transfer, J Thromb Haemost, 査読有, 15, 1487-1499, 2017. (DOI:

10.1111/jth.13723)

坂野史明, ADAMTS13 のノックアウトマウス, 日本血栓止血学会誌, 査読有, 27, 86-90, 2016. (DOI: 10.2491/jjsth.27.86)

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 IIb 3 activation, Blood, 査読有, 128, 2729-2733, 2016. (DOI: 10.1182/blood-2016-03-704825)

Miyata T, Maruyama K, Banno F, Neki R, Thrombophilia in East Asian Countries: Are there any genetic differences in these countries?, Thromb J, 査読有, 14, 25 eCollection, 2016. (DOI: 10.1186/s12959-016-0109-x)

[学会発表](計9件)

坂野史明, 静脈血栓塞栓症に対するn-3系多価不飽和脂肪酸の効果, 第7回あしなが予防医学研究会, 帝京大学, 2019年2月16日.

Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kokame K, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y, IIb (R990W) knock-in mice show impaired thrombopoiesis, 第80回日本血液学会学術集会, 大阪国際会議場, 2018年10月12-14日.

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 IIb 3 活性化変異 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, ロイトン札幌, 2018年6月28-30日.

Matsuda M, Hiratsuka T, Sano T, Kato H, Komatsu N, Imajo M, Kamioka Y, Sumiyama K, Banno F, Miyata T, Live imaging of extracellular signal-regulated kinase and protein kinase A activities during thrombus formation in mice expressing biosensors based on Forster resonance energy transfer, 第40回日本血栓止血学会学術集会, SPC シンポジウム2, ロイトン札幌, 2018年6月28-30日.

菊池節子, 大沼佳乃, 三浦里花, 郡司尚子, 善方美千子, 坂野史明, 小幡明雄, 藤本健四郎, 減塩醤油を活用した浅漬風味調味野菜の調理科学的開発研究, 第29回福島県栄養改善学会, 郡山市労働福祉会館, 2017年12月6日.

菊池節子, 善方美千子, 坂野史明, 藤本健四郎, 小幡明雄, 減塩醤油を用いた減塩調理への慣れの評価(第4報)-減塩調理の慣れに必要な期間について-, 日本調理科学会平成29年度大会, お茶の水女子大学, 2017年8月31-9月1日.

Hasibeder A, Pruffer S, Ebner K, Reuter S, Lopez PA, Scharrer I, Banno F, Stassen M, Schild H, Jurk K, Bosmann M, Beckert H, Radsak MP, ADAMTS-13 regulates neutrophil recruitment in a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis, 22nd Congress of European Hematology Association, IFEMA-Feria de Madrid, Madrid, Spain, 2017年6月22-25日.

宮田敏行, 坂野史明, 田嶋優子, 柳本広二, 小亀浩市, Mouse genetics と血栓止血学, 第39回日本血栓止血学会学術集会, 会長シンポジウム, 名古屋国際会議場, 2017年6月8-10日.

善方美千子, 坂野史明, 菊池節子, 小幡明雄, 藤本健四郎, 減塩醤油を用いた減塩調理への慣れの評価, 第53回日本食生活学会大会, 大阪樟蔭女子大学, 2016年11月26日.

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(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。