

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08360

研究課題名(和文) 血小板減少症/血栓性素因におけるG蛋白質共役型受容体GPR25の関与と機能の検討

研究課題名(英文) Functional role of a G protein-coupled receptor, GPR25, in thrombocytopenia/thrombophilia

研究代表者

羽藤 高明 (Hato, Takaaki)

愛媛大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：30172943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は血小板減少症と動静脈血栓症が併発している一大家系を見出し、その原因遺伝子異常としてG蛋白質共役型受容体の一つであるGPR25の点突然変異を見出した。患者血小板は血小板凝集能と血小板表面での凝固能が亢進していた。この遺伝子異常を導入したマウスにおいて恒常的な異常は見つからなかったが、患者血小板の産生刺激は亢進していたことから、血小板が早期に破壊されていると考えられた。

以上の所見から、GPR25は血小板を活性化させて血小板血栓の形成を促進させるが、そのような活性化血小板は循環血液中から早期に除去されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はGPR25が血小板活性化に関連した新たな血小板膜蛋白受容体であることを示唆している。GPR25の知見は血小板減少症および血栓症の新たな治療薬の開発戦略の基盤になると思われる。さらに、GPR25は受容体蛋白質の構造を有しているが、その生理的リガンドは知られていない。このリガンドは血小板活性化に関連していると思われるので、GPR25へのリガンド結合阻害薬は有力な抗血栓薬となる可能性がある。それ故、本研究の成果は将来の創薬につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We found a large family with congenital thrombocytopenia and arteriovenous thrombosis and identified mutation of a G protein-coupled receptor, GPR25. Patients had enhanced platelet aggregation and blood coagulation on the platelet surface. Mice bearing this mutation did not have constant abnormal findings. However, patient's platelets showed enhanced thrombopoiesis, suggesting early platelet destruction. This study suggests that GPR25 activates platelets and promotes platelet thrombus formation, and that such activated platelets are removed early from the systemic circulation.

研究分野：血栓止血学

キーワード：血小板 G蛋白質 血栓性素因

1. 研究開始当初の背景

先天性血小板減少症は様々な遺伝子異常によって引き起こされる症候群であり、これまでに約 20 の原因遺伝子が同定されてきた。このなかには RUNX1 や ANKRD26 のように造血器腫瘍の発症と関連している遺伝子や MYH9 のように眼、耳および腎の機能障害をきたす遺伝子があり、血小板減少のみならず様々な病態と関連する遺伝子が見出されてきている。しかしながら、先天性血小板減少症の約半数はその原因遺伝子が未だ不明である。

我々は、常染色体優性遺伝形式をとっている先天性血小板減少症の一家系を見出した。この家系の最大の特徴は、血小板減少患者に若年性の動脈および静脈血栓症が多発していることである。我々は本家系の原因遺伝子を同定するために、家系内の血小板減少患者および血小板数正常者から DNA を抽出して全エクソンを網羅的に解析して血小板減少と関連のある遺伝子を同定するというエクソーム解析を行った。その結果、G 蛋白共役型受容体 GPR25 の点突然変異が患者血小板減少症と完全に一致していることを見出し、GPR25 変異を原因遺伝子異常として同定した。GPR25 の機能はこれまで知られておらず、発現細胞や血小板との関連は報告されていない。

2. 研究の目的

我々は GPR25 が血小板減少性血栓性素因を持つ疾患群の病態を解明する手がかりになるのではないかと考えた。そこで、GPR25 の機能とその活性化シグナルを検索することによって、“血小板減少性血栓性素因”の病態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 患者血小板の機能解析

患者血液から血小板を濃縮分離して血小板凝集を測定する。また、血小板表面の凝固能を検討する。血小板が活性化されるとその表面のリン脂質が変化してアネキシン V などの陰性荷電蛋白質が露出し、凝固反応を促進するので、血小板表面凝固能の指標として患者血小板のアネキシン V 発現量をフローサイトメーターで測定する。

(2) 患者の血小板産生動態

患者骨髄中の巨核球および血中トロンボポエチン濃度を測定し、患者の血小板産生の動態をみる。また、血中トロンボポエチン濃度を ELISA 法で測定する。

(3) 抗 GPR25 モノクローナル抗体の作成

GPR25 遺伝子組み換え蛋白を免疫原としてマウスに注射して、抗 GPR25 モノクローナル抗体を作成する。スクリーニングは精製 GPR25 蛋白に対する ELISA 法を用いて行う。確認検査は Western Blot と GPR25 発現 HEK 細胞を作成してその発現をフローサイトメトリーで測定する。

(4) 遺伝子変異導入マウスの作成

GPR25 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスを作成する。次いで、GPR25 の生理的機能を知る目的で GPR25 遺伝子を欠損させたノックアウトマウスを作成する。これらのマウスの表現型を調べることによって、GPR25 の機能を検討する。

4．研究成果

(1) 患者血小板の機能解析

患者の血小板凝集を測定するとADPおよびリストセチン凝集が異常に亢進していた。また、血小板凝集は大きな一つの塊が形成されていて、極めて強固な構造であった。

血小板表面の凝固能を示すアネキシン V の発現量は健常人と比べて有意に多かった。これらの所見から、患者血小板は活性化された状態にあり、血小板凝集能および凝固促進能ともに亢進していることが示唆された。GPR25 の遺伝子変異は膜貫通領域アミノ酸の変異を起こしており、一般に膜貫通部位の変異は受容体の活性化を招来するとされている。これらのことから、患者血小板ではGPR25 が恒常的活性化状態となり、その結果、血小板凝集および凝固の機能が亢進し、血栓性素因を誘発しているのではないかと考えられた。

(2) 患者の血小板産生動態

患者の骨髓巨核球数は増加しており、造血は亢進していた。また、患者血中トロンボポエチン濃度は健常人よりも高く、血小板の産生刺激が亢進している状態であった。末梢血での患者血小板数は減少していたので、末梢での血小板の早期破壊があり、その代償機転として血小板産生が亢進している機序が考えられた。前述した成績において患者血小板は活性化されていたことを考えると、このような活性化血小板が網内系に捕捉されて循環血液中から除かれるため、血小板減少が生じ、その結果、血小板産生が亢進していると考えられた。

(3) 抗 GPR25 モノクローナル抗体の作成

抗ヒト GPR25 マウスモノクローナル抗体を作成することができた。この抗体を用いて、血小板表面に GPR25 が発現していることを確認した。また、この抗体を健常人血小板に加えて、血小板凝集能や凝固能に対する影響を検討したが、明らかな影響は見られなかった。すなわち、我々が作成したモノクローナル抗体は non-functioning 抗体と考えられ、各種組織での GPR25 発現量を調べるプローブとして有用と思われる。さらに今後、多くのモノクローナル抗体を作成していくことによって GPR25 の機能を阻害する抗体や、逆に活性化する抗体が見つかる可能性がある。それらを用いて血小板における GPR25 の役割を検討していくことができるので、その糸口となる手法を確立できた。

(4) 遺伝子変異導入マウスの作成

まず、GPR25 遺伝子変異を導入したトランスジェニックマウスを作成した。このマウスの血小板数は軽度減少から正常までばらつきが見られた。各マウスで実際に変異が導入された遺伝子量を調べるとかなりのばらつきがあり、導入効率ははさほど高くない中で個体差も大きいことが判明した。その中でも血小板減少をきたしたマウスを解剖して主要臓器の組織学的検討も行ったが、明らかな異常は見られなかった。そのため、トランスジェニックマウスの結果から結論を得ることは困難と考えられた。

次に、GPR25 ノックアウトマウスの作成を試みた。しかし、出生率が低下していてこのマウスでは妊孕性が低下しているかもしくは胎生致死になっているのではないかと考えられた。さらに詳細な検討を行う必要があると思われたが、この結果は、GPR25 が胎生期に重要な役割を担っていることを示唆していると考えられた。

(5) 総括

本研究はこれまで機能不明であった GPR25 受容体が血小板表面に発現していて、血小板活性化機構に關与していることを明らかにした。GPR25 を介した血小板の恒常的活性化は血小板凝集能と血小板表面での凝固能の亢進をもたらし、その結果、動静脈血栓症を起こすような血栓性素因が惹起されると考えられた。また、このような活性化血小板は循環血液中から除去されて、血小板減少をきたすこともわかった。このような血小板減少症の存在下で血栓性素因を有する病態は特発性血小板減少性紫斑病の一部や抗リン脂質抗体症候群でもみられることから、これらの病態に GPR25 が關連しているのかどうかについては興味深い点である。さらに、ノックアウトマウスの検討から GPR25 が胎生期に何らかの役割を担っている可能性が示唆され、GPR25 の生理的機能を探る上でも重要な知見と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hato T, Shimada N, Kurata Y, Kuwana M, Fujimura K, Kashiwagi H, Takafuta T, Murata M, Tomiyama Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 Risk factors for skin, mucosal, and organ bleeding in adults with primary ITP: a nationwide study in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1648-1655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020001446.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kashiwagi H, Kuwana M, Hato T, Takafuta T, Fujimura K, Kurata Y, Murata M, Tomiyama Y	4. 巻 111
2. 論文標題 Reference guide for management of adult immune thrombocytopenia in Japan: 2019 Revision.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 329-351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02790-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda Y, Yamanouchi J, Hato T, Yasukawa M, Takenaka K	4. 巻 30
2. 論文標題 Safe childbirth for a type 1 antithrombin-deficient woman with novel mutation in the SERPINC1 gene undergoing antithrombin concentrate therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Coagulation and Fibrinolysis	6. 最初と最後の頁 47-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MBC.0000000000000785.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 6) 柏木浩和, 桑名正隆, 羽藤高明, 高蓋寿朗, 藤村欣吾, 倉田義之, 村田満, 富山佳昭	4. 巻 60
2. 論文標題 成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2019改訂版	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 877-896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Y, Yamanouchi J, Hato T, Yasukawa M, Takenaka K	4. 巻 30
2. 論文標題 Safe childbirth for a type 1 antithrombin-deficient woman with novel mutation in the SERPINC1 gene undergoing antithrombin concentrate therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Coagul Fibrinolysis	6. 最初と最後の頁 47-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MBC.0000000000000785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamanouchi J, Tokumoto D, Ikeda Y, Maruta M, Kaneko M, Hato T, Yasukawa M.	4. 巻 57
2. 論文標題 Development of an FVIII Inhibitor in a Mild Hemophilia Patient with a Phe595Cys Mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Med	6. 最初と最後の頁 3179-3182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Y, Yamanouchi J, Kumon Y, Yasukawa M, Hato T	4. 巻 172
2. 論文標題 Association of platelet response to cilostazol with clinical outcome and CYP genotype in patients with cerebral infarction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thromb Res	6. 最初と最後の頁 14-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2018.10.003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 羽藤高明
2. 発表標題 臨床からみた血小板の役割
3. 学会等名 第15回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamanouchi, J., Hato, T., Ikeda, Y., Takenaka, K.
2. 発表標題 VWF activity is associated with bleeding symptoms in essential thrombocythemia.
3. 学会等名 XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikeda, Y., Yamanouchi, J., Hato, T., Takenaka, K.
2. 発表標題 Association of platelet response to cilostazol with clinical outcome and CYP genotype in patients with cerebral infarction.
3. 学会等名 XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakao, A., Yamanouchi, J., Ikeda, Y., Hato, T., Takenaka, K.
2. 発表標題 Psychosocial issues in mothers of children with hemophilia
3. 学会等名 XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Cooper, N., Bird, R., Hato, T., Kuter, DJ., Lozano, M., Michel, M., Platzbecker, U., Provan, D., Scheinberg, P., Tomiyama, Y., Wong, R., Busnel, JB.
2. 発表標題 Tapering and discontinuation of thrombopoietin receptor agonists in ITP: consensus summary of expert opinions.
3. 学会等名 The 24th Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽藤高明, 島田直樹, 富山佳昭, 村田満
2. 発表標題 全国ITP患者統計からみた出血症状と血小板数の関連性
3. 学会等名 第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山之内純, 秋田誠, 越智千晶, 岡本康二, 谷口裕美, 土居靖和, 新家敏之, 竹中克斗, 羽藤高明
2. 発表標題 APTT延長に対して術前にFFPが輸注された先天性プレカリクレイン欠乏症
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山之内純, 池田祐一, 羽藤高明
2. 発表標題 妊娠分娩管理における血友病保因者遺伝子診断の有用性
3. 学会等名 第41回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田祐一, 山之内純, 羽藤高明, 竹中克斗
2. 発表標題 本態性血小板血症、真性多血症患者における血流下での血栓形成能の検討
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山之内純, 羽藤高明, 池田祐一, 越智俊元, 谷本一史, 竹内一人, 薬師神芳洋, 竹中克斗
2. 発表標題 ITP患者でトロンボポエチン受容体作動薬を中止後にも完解を維持できる例がある
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanouchi J, Ikeda Y, Hato T, Yasukawa M, Takenaka K
2. 発表標題 A heterozygous mutation of G-protein-coupled-receptor 25 in a family with thrombocytopenia and thrombosis.
3. 学会等名 The 60th American Society of Hematology annual meeting and exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamanouchi J, Hato T, Ikeda Y, Asai H, Ochi T, Tanimoto T, Takeuchi K, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M:
2. 発表標題 Characterization of bleeding symptoms in patients with essential thrombocythemia
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山之内 純	愛媛大学・医学部附属病院・准教授	
	(Yamanouchi Jun)		
	(10423451)	(16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------