

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19591100

研究課題名 (和文) トロンボキサン受容体を介する血小板機能の制御—臨床例からのアプローチ

研究課題名 (英文) Pathogenetic analysis of signal transduction pathway in patients with platelet unresponsiveness to exogenous thromboxane A₂.

研究代表者

布施 一郎 (FUSE ICHIRO)

新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号：90242429

研究成果の概要：

血小板機能の発現には、各種の膜表面受容体 (ADP受容体、コラゲン受容体、トロンボキサン受容体など) と、受容体以降の刺激伝達機構の関与が極めて重要な役割を占める。申請者らは血小板機能異常症のうち、このどちらかの障害に起因するものを血小板シグナル伝達異常症とする概念を提唱し、すでに前者の病型のひとつとして、トロンボキサン受容体の異常によるシグナル伝達異常症 (first cytoplasmic loopのArg⁶⁰→Leuの変異) を報告している。今回は同様の血小板凝集異常を呈するにもかかわらず、この変異が認められない症例を対象に病因解析を行った。その結果、①GqとPLCβ間の刺激伝達異常、②血小板内のGαqの発現量の減少、③細胞内Ca動員、MLCリン酸化へ至る血小板活性化経路よりdistalの経路の異常か、これらの経路とはindependentな他の経路の異常、が病因と考えられる例を発見した。

この事は、血小板トロンボキサン受容体を介する機能異常症には受容体の異常のみならず、これとカップルした G 蛋白の量的異常や PLCβとの連関異常、さらにその遠位部の異常など多型にわたることが明らかとなり、血小板トロンボキサン受容体を介する機能制御に新たな知見を与えるものと思われた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血小板、刺激伝達、機能異常症、トロンボキサン受容体

1. 研究開始当初の背景

血小板機能の発現には、各種の膜表面受容体 (ADP 受容体、コラゲン受容体、トロンボキサン(TX)受容体など) と、受容体以降の刺激伝達機構の関与が極めて重要な役割を占める。申請者らは血小板機能異常症のうち、このど

ちらかの障害に起因するものを血小板シグナル伝達異常症とする概念を提唱し、すでに前者の病型として、トロンボキサン受容体の異常によるシグナル伝達異常症 (トロンボキサン不応症) を (Blood 81: 994, 1993, J Clin Invest 94: 1662, 1994, Thromb Haemost 76: 1080, 1996,

Thromb Haemost 82: 1528, 1999)、後者の病型として細胞内 Ca 動員以降のシグナル伝達異常症の存在を明らかにしている(Br J Haematol 112: 603, 2001, Br J Haematol 122: 870, 2003)。

血小板トロンボキサン受容体(TXR)異常症は、血小板 TXR の異常により TX と TXR は正常に結合するものの、その情報が伝達されない血小板シグナル伝達異常症で、TXR の膜 7 回貫通構造のうち、first cytoplasmic loop に存在する Arg⁶⁰→Leu の変異により生ずることが申請者によって明らかにされている。このことは Arg⁶⁰が TXR と三量体 G 蛋白である Gq 及び phospholipase C β (PLC β)間の情報伝達に重要な役割を占めていることを示唆しており、既に欧米の血液学の教科書にも記載されている。

しかし、申請者らは今までの研究によって、TX 受容体の Arg⁶⁰→Leu 変異を呈さないトロンボキサン不応症を見いだしている。本研究ではこれらの臨床症例の障害部位の解析を通じて、トロンボキサン受容体を介する血小板活性化機序の解明を行った。

2. 研究の目的

TXA₂やCa ionophore に対する凝集欠損を主徴とするトロンボキサン不応症の病因解析を行い、7 回膜貫通型のトロンボキサン受容体のどの部位がG 蛋白へと連関する情報伝達に重要なのか、また TX 受容体以降のどの活性化経路が生理的に重要なのかを明らかにし、それによってトロンボキサン受容体を介する血小板活性化機構を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

健康人及び血小板トロンボキサン不応症が疑われる患者血小板を用いて、受容体 (TXA₂受容体) の遺伝子解析、及び受容体以降の刺激伝達機構のうち phospholipase C β (PLC β)の活性化や細胞内カルシウム動員、蛋白リン酸化の解析を行う。障害が明らかとなった症例については、その異常部位が実際に病因となっているかどうかを発現実験にて確認した。また、異常が見いだせなかった症例については、Gq/11, G12, G13 などの三量体 G 蛋白の解析や rho, cytoskeleton assembly の解析なども合わせて行った。

4. 研究成果

(1) トロンボキサン受容体異常症に関する研究

①トロンボキサン受容体の構造に関する研究

ヒトトロンボキサン受容体 (以下 TP) のクローニングは当初胎盤及び巨核球細胞株からなされたが、すべての G 蛋白共役型受容体に共通の膜 7 回貫通型の構造をしている。しかし、その後の薬理学的検討から TP には isoform が存在することが示唆され、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) から第 2 の TP がクローニングされた。

現在ヒトでは 2 種類の TP isoform が存在し、前者を TP α 、後者を TP β としているが、両者の構造をみると N 端から 328 アミノ酸は共通で、C 端のみが異なった構造をしており、TP α は 15 アミノ酸、TP β は 79 アミノ酸から成っている。この 2 つの isoform は TP 遺伝子エクソン 3 内の alternative splicing によって生ずるが、両者の構造の異なる C 端に注目すると、TP β は TP α よりもセリン残基を 11 個、スレオニン残基を 4 個多く含んでおり、TP α にはないチロシン残基も含んでいることから、種々のリン酸化酵素のターゲットとなることが考えられ、それが両者の機能上の差異となって出現するものと思われた。

血小板には TP α と TP β の両者の mRNA が発現しているが、これらの isoform に特異的な抗体を用いて検討すると TP α しか発現していないことから、血小板における主要な受容体は TP α と考えられた。一方、血管平滑筋には両者が、血管内皮細胞には TP β のみが発現しており、血管系を介する止血機序に関与しているものと推定される。

②血小板のトロンボキサン受容体を中心とする刺激伝達

TXA₂で血小板を刺激すると TXA₂は血小板膜上の TP α と結合し、Gq 蛋白を介して phospholipase C β (PLC β)が活性化される。PLC β は主として血小板膜リン脂質である phosphatidylinositol、特に phosphatidyl inositol-4, 5-bisphosphate (PIP₂)を水解し、二つの重要な second messenger である diacylglycerol (DG) と inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP₃)を産生する。DG は protein kinase C (PKC) を活性化し、主として 47K 蛋白をリン酸化し、IP₃は細胞内カルシウムの動員を介して、Ca²⁺-calmodulin 依存性の myosin light chain kinase を活性化して、20K 蛋白をリン酸化する。

一方、IP₃によって惹起された細胞内 Ca 濃度

の上昇は phospholipase A₂ (PLA₂) 活性化の引き金となり、また直接 TXA₂ により G 蛋白を介して PLA₂ が活性化され、主として膜リン脂質の phosphatidylcholine (PC) に作用してアラキドン酸を遊離させる。遊離したアラキドン酸は cyclooxygenase (prostaglandin endoperoxide synthase) の作用で prostaglandin G₂, H₂ に変換され、更に thromboxane synthase の作用で TXA₂ が産生される。産生された TXA₂ は前述の 47K, 20K 蛋白のリン酸化と協同して血小板放出反応を惹起するものと考えられている。

申請者らは TXA₂ による血小板凝集の発現には前述の TP を介したシグナル以外に TP を介さないシグナル伝達経路が必要なことを明らかにした。すなわち、Tpα-Gq-PLCβ の経路によって Ca 動員や PKC の活性化が起き、その際血小板から放出された ADP や epinephrine が Gi と関連している ADP 受容体 (P2T_{AC}, 現在は P2Y₁₂) や a_{2A}-adrenergic 受容体と結合して adenylyl cyclase 活性を抑制し、a_{11b}b₃ (血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa) の活性化を介して血小板凝集が出現するというもので、Gq に連関した受容体 (TP) と Gi に連関した他の受容体の両者の関与が必要である。

血小板 Tpα に連関している Gq 以外の G 蛋白としては、現在のところ G_i family に属する G₁₂, Gq family に属する G₁₁, G₁₆, G₁₂ family に属する G₁₂, G₁₃, 及び Gh が報告されている。これらのうち、G₁₁, G₁₆ は Gq と同様 PLC の活性化やカルシウムシグナリングに関与しており、G₁₂ は adenylyl cyclase を抑制すると共に shape change に関与していることを明らかにした。また、G₁₂ と G₁₃ も他の細胞ではアクチンを中心とした細胞骨格の organization に関与していることから、おそらく shape change に関係しているものと考えられる。一方、高分子量 G 蛋白である Gh (tissue transglutaminase としても作用) も、Tpα による PLC 活性化を促進すると考えられた。

③Tpα と TPβ の機能上の差異

TPα と TPβ のリガンド結合能や PLCβ 活性化能、アゴニスト依存性のリン酸化レベルは同等であるが、adenylyl cyclase 活性に及ぼす影響や、アゴニスト刺激によって惹起される internalization, PGI₂ による反応性の低下 (脱感受性, desensitization), 及びそれに及ぼす A-kinase の影響には大きな差異が見られた。両受容体を Chinese Hamster ovary cell (CHO

cell) に発現させて、adenylyl cyclase 活性に対する影響をみると、TPα は活性化するが、TPβ は逆に抑制されたことから、両者の構造が異なる C 端細胞内ドメインにその原因、具体的には異なる G 蛋白が関連している可能性が考えられた。また、アゴニスト刺激によっておこる受容体の internalization は、細胞応答にとって極めて重要であるが、TPα では認められず、TPβ で認められたことから、C 端細胞内ドメインの 355-366 番アミノ酸が重要な役割を担っていると考えられた。一方、逆に PGI₂ による脱感受性は TPα で認められるのに対して、TPβ では認められず、TPα の PGI₂ による脱感受性は A-kinase 阻害剤である H-89 で抑制され、PKC 阻害剤である GF109203X では抑制されなかったことから、TPα の C 端細胞内ドメインには A-kinase によって特異的にリン酸化をうける部位があるものと考えられた。

④血小板トロンボキサン受容体異常症

TXA₂ による血小板凝集が欠損する機能異常症の報告は 1981 年以来、幾つかの報告がある。これらの報告例がすべて同一の病因かどうかは明らかでないが、トロンボキサン受容体からのシグナル伝達異常に起因する病型があることを推測した最初の報告は 1987 年の牛首らであり、次いで 1993 年に申請者らが報告している。

これらの症例では血小板自身のアラキドン酸代謝、すなわち TXA₂ 産生能は正常で、産生された TXA₂ の血小板への結合も正常であるが、その情報が G 蛋白を介した PLCβ 活性化に結びつかないために、TXA₂ 産生を介する血小板二次凝集や TXA₂ 自身による血小板凝集が欠損する。

ここでは、まず申請者らが今回の研究期間内に経験した症例を呈示し、その病態解析の結果について報告する。

A) 症例・家系の提示、症状、検査所見

症例は 42 才男性で、生来創部からの過剰出血を指摘されていた。22 才で虫垂切除術を受けているが、術後出血が続き、輸血を受けた既往がある。家族歴では娘、妹にも皮下出血、歯肉出血、月経過多などの出血症状が認められた。出血性素因検査では、血小板数は正常で、凝固線溶系検査にも異常なく、出血時間は Simplate 1 で 15.0 分と延長していた (正常: 4.5-9.5 分)。血小板凝集能検査では TXA₂ アナログである STA₂ (Stable TXA₂) 凝集が欠損しており、内因性 TXA₂ 産生に依存した凝集 (ADP 二次凝集、コラ

ゲン凝集、アラキドン酸凝集など)も欠損していた。また、娘、妹の血小板凝集能も発端者ほど強くはないが、同様の異常を認めた。患者血小板の各種アゴニスト刺激時の TXB₂ (TXA₂の安定代謝産物) 産生は正常であり、外来性 TXA₂との結合も、TXA₂の agonist ligand である [³H]-U46619 と antagonist ligand である [¹²⁵I]-PTA-OH を用いて解析したが、正常であった。

以上より、TP-Gq-PLCβの刺激伝達異常を疑い、TXA₂を含む各種アゴニスト刺激時の PLCβ活性を polyphosphoinositides 及び inositolphosphates 産生量を指標に検討すると、患者血小板はトロンビンや NaF 刺激により PIP₂の break down と inositol phosphates (IP₁, IP₂, IP₃)の産生増加を認めたが、STA₂刺激では、これらの現象を認めなかった。また、GTPase 活性についても、STA₂刺激時においてのみ欠損していた。

これらの事は本症血小板が STA₂刺激時においてのみ、特異的に G 蛋白及び PLCβの活性化が起きていない事を示しており、本症の病因の主体が TP と PLCβ間の刺激伝達異常であることを強く示唆した。

B) 血小板トロンボキサン受容体の遺伝子解析

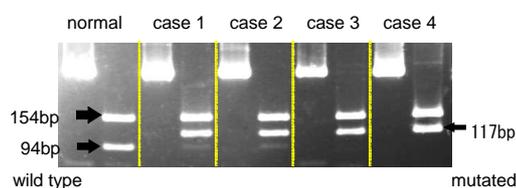
本症における TP と PLCβ間の刺激伝達異常の原因として TP 自体の異常と、それ以降の刺激伝達機構の異常の2つの原因が考えられるが、本症血小板 TP の遺伝子解析及び発現実験を行ったところ、その病因が前者であることを明らかにした。すなわち、本症血小板では、TP の膜7回貫通構造のうち、first cytoplasmic loop に存在する Arg⁶⁰が Leu に変異していることが明らかにされ、更にこの異常を pEF-BOS vector に insert し、calcium phosphate method にて CHO cell に発現させると、外来性 TXA₂との結合は正常にもかかわらず、IP₃産生が欠損しており、本症血小板と同様の異常が出現することが確認された。

申請者らの発見した家系では、その後の検討で発端者が TP の Arg⁶⁰→Leu 変異の homozygote 例であり、娘、妹が heterozygote 例であることが明らかとなり、以前に申請者らが報告した家系の報告と合わせて、本症が常染色体性優性遺伝であることを明らかにした。

今回の結果は、TP の first cytoplasmic loop に存在する Arg⁶⁰及びその近傍が、G 蛋白-PLCβ活性化への刺激伝達機構に関与する重要な部位

であることを改めて示唆している。

本症で見いだされた Arg⁶⁰→Leu の変異の有無を簡便に見いだす方法として、患者末梢血由来の genomic DNA を制限酵素 *Hha*I で処理することを考えた。すなわち、first cytoplasmic loop を PCR 法にて増幅した後、*Hha*I で処理すると、正常では GCGC (CGC→Arg⁶⁰) を認識して 154bp と 94bp に切断されるが、GCTC (CTC→Leu⁶⁰) の変異が存在すると、この部位での *Hha*I による切断がなされず、154bp と 117bp の fragment が生ずる(下図)。したがって、117bp の存在は、Arg⁶⁰→Leu の変異が存在することを意味しており、最も簡便な診断法である。著者らは、現在までに本変異を呈する症例を6例経験している。



各症例とも、左レーンは白血球由来ゲノム DNA の PCR 産物、それを制限酵素 *Hha*I で処理し、右レーンに同時に泳動した。

C) 他型の血小板 Tpa-Gq-PLCβの連関異常

血小板 Tpa は前述のごとく、膜7回貫通型の構造をしており、N 端の細胞外ドメイン (head)、3つの細胞外及び細胞内ループ、及び C 端の細胞内ドメイン (tail) からなっている。TP と Gq のシグナル伝達異常の原因として TP や Gαq に遺伝子変異はないが、TP 自体のリン酸化レベルがもともと亢進しているために、GTPγS 結合能の亢進や Gαq palmitate の turn over 亢進を認め、結果として (おそらく少量のアゴニストに常に接触しているために) TP が不応状態になっている病態が考えられる。このような血小板の状態は犬において認められており、epinephrine 処理をすると、TP のリン酸化レベルの低下と共に改善し、TP-Gq の連関も回復すると報告されている。

申請者らは TXA₂の血小板 TP への結合は正常で、TXA₂刺激時の GTPase 活性も正常に惹起されるにもかかわらず、PLCβの活性化が惹起されない 38 才の男性症例を経験した。この症例では TP 自体の遺伝子異常はなかったことから、Arg⁶⁰→Leu の変異以外の病因が考えられ、Gq と PLCβ

間のなんらかの刺激伝達異常を疑って検索中である。

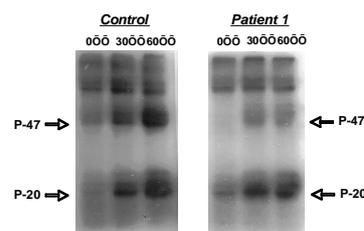
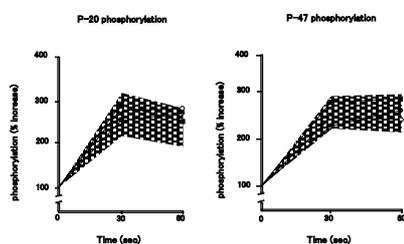
また、申請者らは $G\alpha_q$ の血小板での発現量の低下によって TXA_2 を含めた多くのアゴニストに対する凝集異常と出血傾向を呈する 46 才女性の症例を経験した。この症例は $G\alpha_q$ の cDNA には遺伝子異常がないにもかかわらず、血小板の $G\alpha_q$ mRNA レベルは 35%までに低下していた。すなわち、血小板内の $G\alpha_q$ の発現量の減少（おそらく mRNA の安定性を制御する機構の障害が原因）が血小板機能異常を惹起すると考えられた症例であり、血小板トロンボキサン受容体を介する刺激伝達異常症には多くの病型があることが強く示唆された。

(2) 細胞内 Ca 動員以降のシグナル伝達異常症に関する研究

トロンボキサン受容体の異常がないにもかかわらず、A23187、ionomycin などの Ca ionophore に対する凝集が欠損し、出血傾向を呈する症例 (3 例) についてその病因解析を行った。

これらの症例の血小板では A23187 に対する凝集が欠損しているにもかかわらず、A23187 や、トロンビン、トロンボキサナーナログである STA2 刺激時のイノシトール 3 リン酸の産生や Ca 動員はすべて正常であった。さらに、上記 3 種類のアゴニスト刺激時の 47 K 蛋白 (Pleckstrin) や 20K 蛋白 (myosin light chain, MLC) のリン酸化も全く正常に認められた (下図)。

これらのことは、本症血小板では protein kinase C 活性化から細胞内 Ca 動員、MLC リン酸化へ至る血小板活性化経路には異常がなく、これより distal の経路の異常か、これらの経路とは independent な他の経路の異常が疑われた。



(3) コラゲン凝集異常症に関する研究

コラゲンに対してのみ凝集が欠損している血小板機能異常症に対しても同様に、その病因解析を行った。すなわち本症血小板を用いて、コラゲンや他のアゴニスト (トロンビン、ADP など) 刺激時の phospholipase C (PLC) 活性化、細胞内 Ca 動員、Glycoprotein IIb/IIIa (CD41) 活性化の検討を行うと、本症血小板ではコラゲン刺激時にのみこれらの反応が認められず、他のアゴニスト刺激時ではすべて正常であった。このことは本症血小板では PLC 活性化-細胞内 Ca 動員-Glycoprotein IIb/IIIa (CD41) 活性化の経路そのものには異常なく、その障害部位はコラゲン受容体から PLC 活性化へ至る経路であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Saito A, Narita M, Yokoyama A, Watanabe N, Tochiki N, Satoh N, Takizawa J, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y, Shinada S, Takahashi M: Enhancement of anti-tumor cytotoxicity of expanded gammadelta T cells by stimulation with monocyte-derived dendritic cells. *J Clin Exp Hematol* 47: 61-72, 2007.
- ② 布施一郎: 血液疾患をどのように診断するか - 血小板増加症 *Modern Physician* 27(4): 507-510, 2007.
- ③ Tochiki N, Narita M, Zheng Z, Lu C, Saitoh A, Watanabe N, Satho N, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y, Takahashi M: Induction of recipient cell-specific donor T-cell anergy by UV-C-irradiated recipient immature monocyte-derived dendritic cells. *Bone Marrow Transplant* 41:1037-1045, 2008.
- ④ Kobayashi T, Hirai H, Iino M, Fuse I, Mitsumura K, Washiyama K, Kasai S, Ikeda K: Inhibitory effects of the antiepileptic drug ethosuximide on G protein-activated inwardly rectifying K^+ channels.

Neuropharmacol 56: 499-506, 2009.

〔図書〕（計 1 件）

布施一郎：西村書店、メデイカルノート 検査の基本 血小板機能検査、出血性素因検査、血液型・輸血関連検査、2008、pp. 28-38. （下條文武編集）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布施 一郎 (FUSE ICHIRO)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：90242429

(2) 研究分担者

古川 達雄 (FURUKAWA TATSUO)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：00272849

鳥羽 健 (TOBA KEN)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：60313540

(3) 連携研究者

なし