

平成 21 年 5 月 6 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19591146

研究課題名（和文） 血小板産生における細胞骨格蛋白質フィラミンの役割の解明

研究課題名（英文） Analysis of filamin' s role in platelet production

研究代表者

岡村 孝 (OKAMURA TAKASHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：30136436

研究成果の概要：

GPIb α プロモーター下に緑色蛍光蛋白質 GFP を発現させさらにその 3' 非翻訳領域に細胞骨格蛋白質フィラミン A の発現を特異的に抑制する micro RNA 配列を挿入する事で血小板特異的にフィラミンをノックダウンした巨核球、血小板を ES 細胞から得る事ができた。GFP の発現とフィラミンの発現は逆相関を認めたと、GFP の発現が弱くさらに高発現株をスクリーニング中である。同様のコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作成中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：移植再生医療、血小板

1. 研究開始当初の背景

(1) 血小板は止血に重要な細胞であり、血小板輸血はガン、造血器腫瘍などの治療や外科手術において欠くことのできない補助治療である。しかしながら冷蔵保存が出来ないため常に供給不足が問題となっている。

(2) 現在 ES 細胞を用いた再生医療が注目を

集めているが腫瘍化する危険性があり、臨床応用を考えると解決すべき問題が多い。血小板は核のない細胞である為、腫瘍化する事が無く ES 細胞を用いた再生医療の最も有望なターゲットであり、将来の血小板輸血に替わる可能性を秘めている。

- (3) 我々は先天性の巨大血小板性血小板減少と出血傾向を呈する Bernard-Soulier 症候群のモデルマウスを用いる事で細胞骨格蛋白質フィラミンと血小板膜蛋白質 GPIb α の相互作用が血小板産生に重要な役割を演じている事を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

- (1) 現在 ES 細胞から巨核球、血小板を作る事が可能だが、*in vitro* では産生過程で GPIb α が切断され、血小板機能が低下している。フィラミン-GPIb α の血小板産生における役割を明らかにする事ができれば、ES 細胞から機能的な血小板を供給できると考えられる。
- (2) フィラミンを血小板特異的にノックダウンさせたマウス及び ES 細胞株を樹立し、*in vivo* 及び *in vitro* でのフィラミンの血小板産生における役割を明らかにする事である。

3. 研究の方法

- (1) ヒト GPIb α プロモーター3kb の下流に緑色蛍光蛋白 GFP そのさらに下流にフィラミン A をノックダウンする micro RNA 配列を挿入した vector を作成する。
- (2) このベクターを ES 細胞株(E14tg2A)にトランスフェクトし抗生剤 zeocine で培養することで stable clone を樹立する。
- (3) これらのクローンを胚葉体形成法で分化させさらに Thrombopoetin (Tpo)で培養することで GFP 陽性のフィラミンをノックダウンさせた巨核球、血小板を *in vitro* で産生させる。
- (4) 同様のコンストラクトを受精卵に導入することでトランスジェニックマウスを作成する。
- (5) これらの *in vitro* 及び *in vivo* での血小板産生過程を可視化(GFP)し、比較すると共に産生された血小板の解析を行う。

4. 研究成果

我々は細胞骨格蛋白質フィラミン A と血小板膜蛋白質 GPIb α の相互作用が血小板産生、血小板活性化に重要な役割を演じている事を明らかにしてきた。

- (1) 始めに CMV プロモーターの下に緑色蛍

光蛋白 EGFP の cDNA をその下流にフィラミンをノックダウンする micro RNA 配列を挿入した vector を作成し、これを用いてフィラミン A の発現が 10%以下の ES 細胞株の樹立に成功した。さらにフィラミンの発現は造血細胞分化に必要な事を明らかにした。

- (2) 次に CMV プロモーターをヒト GPIb α プロモーター3kb に置き換えたコンストラクトを作成し実験を行った。ES 細胞株 (E14tg2A)にこのコンストラクトをトランスフェクトし抗生剤 zeocine で培養することで stable clone を樹立した。これらのクローンを胚葉体形成法で分化させさらに Thrombopoetin (Tpo)で培養することで GFP 陽性の巨核球、血小板を得る事ができた。現時点では GFP の発現が弱いためさらに高発現株をスクリーニング中である。またこの系で得られた GFP 陰性血小板はすでにマウス末梢血血小板と比べてもサイズが大きく、*in vitro* の系での血小板の大きさの評価は難しいと考えられた。現在同じコンストラクトからベクター由来の配列を取り除き直線化し (4.7kb) このコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作成中である。

- (3) 今後これら *in vitro* 及び *in vivo* で血小板産生の過程を real time で観察する事でフィラミンの血小板産生における役割を明らかにする。2つの系で産生された血小板の差異 (膜タンパク質の発現、切断、血小板の活性化の有無)を明らかにすることで *in vitro* で機能的な血小板産生を行う為の必要条件の検討を行う。

- (4) ES細胞から機能的な血小板を十分量産生することができれば、冷蔵保存が出来ないため常に供給不足が問題となっている血小板輸血の安定した供給源となる事が可能である。

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 8 件)

1: Ohtsubo K, Sata M, Kawaguchi T, Morishige S, Takata Y, Oku E, Imamura R, Seki R, Hashiguchi M, Osaki K, Yakushiji K, Kanaji T, Yoshimoto K, Ueno T, Okamura T. Characterization of the light chain-restricted clonal B cells in peripheral

blood of HCV-positive patients.
Int J Hematol. 2009;89:452-9.
査読有

2: Kanaji S, Kanaji T, Honda M, Nakazato S, Wakayama K, Tabata Y, Shibata S, Gondo H, Nakamura I, Node K, Miura M, Miyahara M, Okamura T, Nagumo F, Ohta S, Izuhara K. Identification of four novel mutations in F5 associated with congenital factor V deficiency.

Int J Hematol. 2009;89:71-5.
査読有

3: Nishikii H, Eto K, Tamura N, Hattori K, Heissig B, Kanaji T, Sawaguchi A, Goto S, Ware J, Nakauchi H. Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells.

J Exp Med. 2008;205:1917-27.
査読有

4: Oku E, Kanaji T, Takata Y, Oshima K, Seki R, Morishige S, Imamura R, Ohtsubo K, Hashiguchi M, Osaki K, Yakushiji K, Yoshimoto K, Ogata H, Hamada H, Izuhara K, Sata M, Okamura T. Periostin and bone marrow fibrosis.

Int J Hematol. 2008;88:57-63.
査読有

5: Guerrero JA, Shafirstein G, Russell S, Varughese KI, Kanaji T, Liu J, Gartner TK, Bäuml W, Jarvis GE, Ware J. In vivo relevance for platelet glycoprotein Iba residue Tyr276 in thrombus formation.

J Thromb Haemost. 2008;6:684-91.
査読有

6: Kanaji T. Lower factor XII activity is a risk marker rather than a risk factor for cardiovascular disease: a rebuttal.

J Thromb Haemost. 2008;6:1053-4.
査読有

7: Kanaji S, Kanaji T, Migita M, Kunishima S, Kunicki TJ, Okamura T, Izuhara K. Characterization of a patient with atypical amegakaryocytic thrombocytopenia.

Eur J Haematol. 2008;80:361-4.
査読有

8: Suva LJ, Hartman E, Dilley JD, Russell S, Akel NS, Skinner RA, Hogue WR, Budde U, Varughese KI, Kanaji T, Ware J.

Platelet dysfunction and a high bone mass phenotype in a murine model of platelet-type von Willebrand disease.

Am J Pathol.2008;172:430-9.
査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Platelet having a W127X mutation in GPIX express sufficient residual amounts of GPIIb α chain to support ristocetin-mediated agglutination and adhesion to VWF and collagen under condition of flow. Kanaji T, Takata Y, Moroi M, Seki R, Oku E, Sano M, Nakazato S, Izuhara K, Sueoka E, Imamura Y, Okamura T.

50th American Society of Hematology, December 6th, San Francisco.

2. 初診時から30年後にType 2N/3と遺伝子診断できたVon Willebrand病姉妹例の解析 金地 泰典、緒方 秀章、吉本 幸治、関 律子、高田 由香、奥 英二郎、森重 聡、大坪 維範、今村 理恵、橋口 道俊、大崎 浩一、薬師寺 和昭、岡村 孝
第30回日本血栓止血学会学術集会 2007年11月15日、志摩

3. 骨髄増殖性疾患(MPD)におけるJAK2V617F変異の頻度と病態の検討. 高田 由香、金地 泰典、緒方 秀章、吉本 幸治、薬師寺 和昭、橋口 道俊、大崎 浩一、今村 理恵、大坪 維範、奥 英二郎、森重 聡、関 律子、南野 隆一、岡村 孝.
第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11日、横浜

4. 無巨核球性血小板減少症患者におけるc-mplとGPVIの発現相関 金地 泰典、金地 佐千子、右田昌宏、国島 伸治、出原 賢治、岡村 孝.

第69回日本血液学会総会、第49回日本臨床血液学会総会 2007年10月11日、横浜

[図書] (計 1 件)

Hamasaki N, and Kanaji T. Clinical role of protein S deficiency in Asian population. Tanaka K, Daivie EW (Eds). Springer. **Recent advance in thrombosis and hematosi**s 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

〈2008年度〉

岡村 孝 (OKAMURA TAKASHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：30136436

〈2007年度〉

金地 泰典 (KANAJI TAISUKE)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40363428

(2) 研究分担者

〈2007年度〉

岡村 孝 (OKAMURA TAKASHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：30136436

(3) 連携研究者