

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08813

研究課題名(和文)血小板インテグリン活性化の分子機構および血管病変形成における意義の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of platelet integrin activation and association with vascular lesion

研究代表者

柏木 浩和 (Hirokazu, Kashiwagi)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10432535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：11b/3の恒常的活性化をきたす11b(R995W)ノックインマウスを作成し、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、骨髄および脾臓における巨核球の数・形態および分化にも異常を認めない一方で、培養巨核球を用いて巨核球におけるproplatelet形成が障害されることを明らかにした。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を示した。さらに新たな13遺伝子異常に伴う血小板減少症を見出した。本例では従来報告と異なり11b/3の恒常的活性化が認められず、11b/3異常と血小板産生および血小板機能に関する検討が進行中である。

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の恒常的活性化が血小板産生および血小板機能に及ぼす影響を、ノックインマウスを用いることにより明らかにすることができた。さらに直接11b/3の活性化を誘導しない変異によっても11b/3の変異により血小板産生に影響を与える可能性を示した。今後の更なる分子機構の解明により、血小板機能および血小板産生のメカニズムの一端が明らかにされていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We established 11b(R995W) knock-in mice, which show constitutive activation of 11b/3, and revealed that the mice showed macrothrombocytopenia like human subjects.

There are no difference in morphology and number of megakaryocytes in bone marrow and spleen between KI mice and WT mice. Megakaryocytic differentiation is not impaired in KI mice, either. However, proplatelet formation in cultured megakaryocyte was impaired in KI mice, suggesting that impaired proplatelet formation may responsible for the phenotype. KI mice showed highly impaired platelet function mainly due to reduced 11b/3 expression in platelets. We also found novel 13 mutation in macrothrombocytopenic patients. The mutation does not induce constitutive 11b/3 activation, and we are now investigating the mechanism of the integrin mutation and platelet production and function

研究分野：血液学

キーワード：インテグリン

## 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蛋白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 IIb/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ことは、IIb/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明らかにされ、申請者らは本邦における多数例の血小板無力症例の解析から、IIb/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; Kashiwagi, et al. Int J Hematol 2011)。IIb/3のリガンド結合能は厳密に制御されており、通常 IIb/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、IIb/3 活性化にはその細胞内領域に結合する talin および kindlin-3 が必須であることが証明されたが、更に申請者らは細胞内領域に結合する  $\alpha$ -actinin (Tadokoro, et al. Blood 2011) あるいは ILK (Honda, et al. Blood 2010, ProsONE 2013) が IIb/3 活性化制御に関与する可能性を示した。これら IIb/3 活性化制御分子の IIb/3 への結合は CalDAG-GEF1 による Rap1 の活性化を介していると考えられており、実際、我々は著明な出血傾向を呈する世界で2例目の CalDAG-GEF1 異常症を見いだしている。(Kato, et al. ISTH meeting 2015) しかし、これら IIb/3 活性化制御分子の相互関係は依然として不明な点が多い。特に血小板における Rap1 の effector 分子は明らかにされておらず、その解明が待たれている。

また、IIb/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可能性が知られている。申請者らは、先天性巨大血小板減少症の解析から IIb/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/産生異常を生じることが明らかにし (Kunishima, Kashiwagi, et al. Blood 2011; Kashiwagi, et al. MGGM 2013) 更に本邦に最も高頻度に認められた細胞内 IIb(R995W)変異のノックイン(KI)マウスを作製することに成功している (Kiyomizu, Kashiwagi, et al. ASH meeting 2014)。このマウスを用いることにより IIb/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る。

## 2. 研究の目的

我々の確立した新たな細胞実験系および KI マウスなどを用いて IIb/3 活性化シグナルの分子機構を解明するとともに IIb/3 シグナルによる病態への関与、特に動脈血栓症および血

血小板産生への影響を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

- 1) 血小板機能異常症あるいは血小板機能異常症の解析を通して、その原因となりうる遺伝子異常、IIb/3シグナルとの関連を明らかにする。
- 2) IIb/3シグナルと血小板機能および血栓形成、動脈硬化発症進展との関連を、IIb/3活性化変異KIマウスを用いることにより明らかにする。また血小板産生/形態異常との関連について発現細胞およびKIマウスを用いてそのメカニズムを明らかにする。

### 4. 研究成果

KIマウスにおいては、血小板減少をきたすが、骨髄および脾臓における巨核球に関しては、数およびその形態においてKIマウスにおいて明らかな異常は認めなかった(図1)。巨核球のploidyにも特に異常を認めなかった。一方、培養巨核球を用いて血小板産生の最終段階であるproplatelet形成を検討したところ、KIマウスにおいてPPP形成の低下が認められた(図2)。抗血小板抗体により誘発した血小板減少状態からの血小板数回復や、トロンボポエチン投与後の血小板増加において、KIマウスでは障害が認められることから、KIマウスにおける血小板減少の主因はproplatelet形成障害を主とする血小板産生障害によると考えられた。さらに血小板消費に関しては、ピオチン投与による血小板寿命測定において、KIマウスでは軽度の低下を認められ、このことも血小板減少に関与する可能性が考えられる。Homoマウスにおいては血小板において著明な

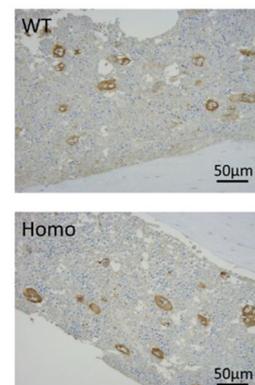


図1. 骨髄における巨核球

IIb/3発現の低下が認められ、in vitro および in vivo の血小板機能検査において血小板無力症様の血小板機能低下を認めた。以上の結果から、IIb/3の恒常的な活性化はIIb/3発現低下を介した血小板機能異常をきたすこと、および血小板産生に障害をもたらせること、またその

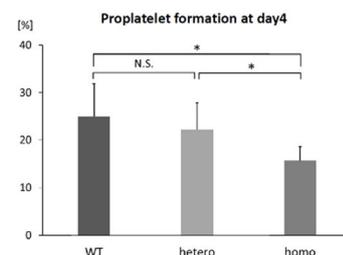


図2. Proplatelet 形成

メカニズムとしてproplatelet形成の障害が主因であることを明らかにした(Akuta K et al. J Throm Haemost 2020)。

さらに、我々は新たな家族性血小板減少症例の解析から、新規のIIb/3遺伝子異常が血小板減少に関与している可能性を示した。従来のIIb/3関連血小板減少症に認められるIIb/3異常はすべてIIb/3の恒常的な活性化を誘導するものであったが、本遺伝子異常では、IIb/3の明らかな活性化が誘導されなかった。一方で、IIb/3のみならずGPVI発現の低下も認められ、何らかのシグナル異常が生じている可能性が示唆された(芥田ら、第81回日本血液学会学術集会)。そこで、本遺伝子異常を有するKIマウスを作成に着手した。CRISPR/CAS9システムを用いてIIb/3変異を導入し、現在、F1マウスを得ることに成功している。今後、本マウスを用いてIIb/3異常と血小板産生、形態および血小板機能に関する検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10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 Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Nishiura N, Banno F, Kokame K, Kato H, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y	4. 巻 18
2. 論文標題 Knock-in mice bearing constitutively active $\text{IIb}(\text{R990W})$ mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Thromb Haemost .	6. 最初と最後の頁 497-509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14678	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 Nishiura N, Kashiwagi H, Akuta K, Hayashi S, Kato H, Kanakura Y, Tomiyama Y.	4. 巻 189
2. 論文標題 Reevaluation of platelet function in chronic immune thrombocytopenia: impacts of platelet size, platelet-associated anti- $\text{IIb} \text{ } 3$ antibodies and thrombopoietin receptor agonists	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Haematol .	6. 最初と最後の頁 760-771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16439	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 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 Adv	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	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 Int J Hematol	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 Akuta K, Kashiwagi H, Yujiri T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y	4. 巻 17
2. 論文標題 A unique phenotype of acquired Glanzmann thrombasthenia due to non-function-blocking anti- IIb3 autoantibodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thromb Haemost	6. 最初と最後の頁 208-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14323	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 Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, Sakuragi M, Nakao M, Morikawa T, Kiyokawa T, Aochi H, Nagamine K, Shibayama H, Tomiyama Y	4. 巻 59
2. 論文標題 Additional validation of Osaka method (0.01 mol/L dithiothreitol) for negating the daratumumab interference	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 2479-2480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.15305	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 Provan D, Arnold DM, Busnel JB, Chong BH, Cooper N, Gernsheimer T, Ghanima W, Godeau B, Gonzalez-Lopez TJ, Grainger J, Hou M, Kruse C, McDonald V, Michel M, Newland AC, Pavord S, Rodeghiero F, Scully M, Tomiyama Y, Wong RS, Zaja F, Kuter DJ	4. 巻 26
2. 論文標題 Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 3780-3817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2019000812	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 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 Akuta Keigo, Fukushima Kentaro, Nakata Keiichi, Hayashi Satoru, Toda Jun, Shingai Yasuhiro, Tsutsumi Kazuhito, Machida Tomohisa, Hino Akihisa, Kusakabe Shinsuke, Doi Yukiko, Fujita Jiro, Kato Hisashi, Maeda Tetsuo, Yokota Takafumi, Tomiyama Yoshiaki, Hosen Naoki, Kashiwagi Hirokazu	4. 巻 115
2. 論文標題 Autoimmune-mediated thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: significance of detecting reticulated platelets and glycoprotein-specific platelet autoantibodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 322 ~ 328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03272-x	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 Nishikawa Yukihiko, Nishida Shiyo, Kuroda Keiko, Kashiwagi Hirokazu, Tomiyama Yoshiaki, Kuwana Masataka	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of an Automated Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Measuring Thrombopoietin in Human Plasma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 313 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics12020313	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柏木浩和、富山佳昭
2. 発表標題 ITPと血小板輸血
3. 学会等名 第68回日本輸血・細胞治療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芥田敬吾、柏木浩和、西浦伸子、加藤恒、保仙直毅、金倉謙、富山佳昭
2. 発表標題 新規のインテグリン IIb 3非活性化変異 3(R734C)を認めた一家系
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishiura N, Kashiwagi H, Akuta K, Kato H, Kanakura Y, Tomiyama Y
2. 発表標題 Platelet function of chronic immune thrombocytopenia: Impact of platelet size, platelet-associated anti- IIb 3 antibodies and thrombopoietin receptor agonists.
3. 学会等名 The XXVII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisashi Kato, Shigenori Honda, Hirokazu Kashiwagi, Nobuko Nishiura, Keigo Akuta, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshiaki Tomiyama
2. 発表標題 The critical role of Kindlin-3 in initiation of physiological thrombus formation; analysis of Kindlin-3 deficient patient
3. 学会等名 The American Society of Hematology 61th Annual Meeting ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柏木浩和, 富山佳昭
2. 発表標題 抗血小板同種抗体および自己抗体の特徴とその臨床的意義
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会学術集会 ( 招待講演 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芥田敬吾, 柏木浩和, 西浦伸子, 加藤 恒, 金倉 譲, 富山佳昭
2. 発表標題 新規のインテグリン IIb 3非活性化変異 3(R734C)を認めた一家系
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 柏木浩和, 西浦伸子, 富山佳昭
2. 発表標題 Flow cytometryを用いた慢性ITP患者の血小板機能解析
3. 学会等名 第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芥田敬吾, 柏木浩和, 林悟, 中田継一, 加藤恒, 保仙直毅, 富山佳昭
2. 発表標題 トロンボポエチン受容体作動薬の切り替えが著効し寛解となった慢性ITP
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会各術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏木浩和
2. 発表標題 ITPの病態、診断と治療
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会各術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022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	加藤 恒  (Hisashi Kato)  (20705214)	大阪大学・医学系研究科・助教    (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	富山 佳昭  (Yoshiaki Tomiyama)  (80252667)	大阪大学・医学部附属病院・特任教授（常勤）    (14401)	

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