

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16984

研究課題名(和文)「血小板内シグナル伝達と巨核球分化」2つに機能するPBX2分子の新規機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism of PBX2 molecule that functions in two ways: platelet signaling and megakaryocyte differentiation

研究代表者

小浜 祐行 (Obama, Yuki)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・臨床検査技師

研究者番号：50837276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、診断に至らない出血傾向を呈する症例において、同一家系内エクソーム解析により発見したPBX2を責任遺伝子とし原因解明を試みるものである。患者の血小板凝集能試験は、ADP刺激での半減と、EPI刺激での欠如を認めた。洗浄血小板を用いて血小板活性化表面マーカーであるCD62P、PAC-1を測定した結果、患者のTRAPおよびEPI刺激後のPAC-1の発現率が、対照と比較し3分の1低下していた。以上より、アデニル酸シクラーゼサイクル(AC)活性化後の経路内にPBX2が関与している可能性が示唆され、血小板内シグナル経路内に、PBX2を介した新規経路の存在をより高める結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本症例にて発見されたPBX2分子異常は世界初の報告である。

血小板凝集能試験結果および、洗浄血小板を用いた血小板活性化表面マーカーであるCD62P、PAC-1発現率の測定結果から得られた研究成果は、PBX2が血小板内シグナル経路のアデニル酸シクラーゼサイクル(AC)活性化後の経路内に関与する新たな知見へと繋がったことから、本邦における診断に至らない止血異常を有する血小板機能異常症患者の血小板機能の解明において、社会的意義は高いと言える。

研究成果の概要(英文)：This study attempts to elucidate the cause of the bleeding tendency in patients with undiagnosed bleeding tendency by identifying PBX2 as the responsible gene, which was discovered by exome analysis in the same family. Platelet aggregation test of the patient showed a half reduction in platelet aggregation with ADP stimulation and a lack of platelet aggregation with EPI stimulation. Platelet activation surface markers CD62P and PAC-1 were measured using washed platelets, and the expression rate of PAC-1 was reduced by one-third after TRAP and EPI stimulation in patients compared to controls. These results suggest that PBX2 may be involved in the pathway after adenylate cyclase cycle (AC) activation, further increasing the presence of a novel pathway mediated by PBX2 within the platelet signaling pathway.

研究分野：内科学一般関連

キーワード：血小板 血小板機能異常症 PBX2

### 1. 研究開始当初の背景

診断に至らない出血傾向を呈する症例において、同一家系内エクソーム解析を行い、責任遺伝子として、ホメオボックス遺伝子として知られる **Pre-B-cell leukemia transcription factor 2 (PBX2)** 遺伝子を発見した。PBX2 は、巨核球・血小板系列の遺伝子発現に関与する転写因子であるが、血小板機能異常との関連、シグナル伝達機構の詳細は未だ解明されていない。よって、本症例の血液検査結果を基に、以下の2つの仮説を立て、研究を開始した。

#### (1) 仮説①「血小板内シグナル経路において PBX2 を介した新規の経路が存在するの か」

本症例の血小板凝集能試験結果から、エピネフリン刺激では反応欠如、ADP 刺激では反応低下を認めた。(図1)

この結果から、 $\alpha 2A$  受容体及び、P2Y12 受容体由来する経路内において、アデニル酸シクラーゼサイクル(AC) 活性化後の下流領域に、PBX2 を介した新規の経路が存在すると仮定した。新規経路における PBX2 は、AC で生じた cAMP によってリン酸化され、血小板内 Ca イオン調節機構として機能を成す

イノシトールトリスリン酸(IP3) の転写制御に働き、その後既存として知られるシグナル経路の伝達が進むことで血小板が活性化すると仮定した。

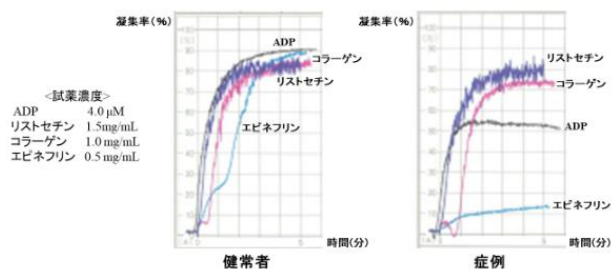


図1 血小板凝集能試験結果

#### (2) 仮説②「PBX2 は、巨核球分化へ関与するの か」

本症例では、血小板数の上昇と血小板第4因子の上昇を認めた。この結果から、遺伝子変異の入った PBX2 が、GATA-1 や ETS-1 のプロモーター活性に過剰に働くことにより、巨核球分化を誘導する PF4 遺伝子の過剰発現へと繋がり、巨核球からの血小板分化が亢進すると仮定した。

### 2. 研究の目的

本症例の血液検査結果を基に立てた2つの仮説である、仮説①「血小板内シグナル経路において PBX2 を介した新規の経路が存在するの  
か」と、仮説②「PBX2 は、巨核球分化へ関与するの  
か」を解明することを研究目的とし、血小板内シグナル並びに巨核球分化における PBX2 の機能解析を行うことにより、PBX2 が血小板生成、分化と血小板機能へ果たす役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 患者解析結果に基づく PBX2 と血小板機能の解析

対照(健常者)と患者における血小板凝集能試験の再現性を確認する。

また、血小板凝集能異常を示した  $\alpha 2A$  からの経路(Epinephrine 刺激)と、P2Y12 からの経路(ADP 刺激)においてアゴニスト刺激後の血小板活性化表面マーカー(CD62P, PAC-I) や細胞表面接着因子群の発現を解析する。更に、抗  $\alpha 2A$  受容体抗体、抗 P2Y12 受容体抗体の前処置で、各シグナルを遮断し、血小板活性化が変化するかを検討する。

#### (2) PBX2 変異体の作成・細胞への導入と、PBX2 発現による遺伝子変化を網羅的に解析する。

##### ① PBX2 変異遺伝子搭載のプラスミドベクターの作製

PBX2 の発現ベクターを Origene 社より購入し、Mutagenesis kit (Stratagene 社)を用いて当該患者にみられた SNP(single point mutation)を作成し、PBX2 変異遺伝子プラスミドとする。

##### ② 作製した PBX2 変異遺伝子のプラスミドベクターを巨核球系細胞株 Meg01 および、HEK293 細胞へそれぞれ遺伝子導入し、野生型 PBX2 と変異型 PBX2 の両者の発現を確認する。遺伝子導入は、トランスフェクション法(lipofectamine3000) とエレクトロポーション法の両法で遺伝子導入を行い、上手くいかない場合は、レンチウイルスベクターに PBX2 変異遺伝子を

挿入する。

- ③ 野生型 PBX2、変異型 PBX2 導入後の Meg01 細胞および HEK293 細胞からそれぞれタンパク質抽出・mRNA 抽出を行い、PBX2 の発現を確認後、Affimetric 社のマイクロアレイを用いて、mRNA の網羅的解析を行う。
- 以上、①～③の順で PBX2 変異遺伝子の mRNA 網羅解析で発見した巨核球系細胞分化に関わる遺伝子群、血小板のシグナル伝達に関する遺伝子群をさらに解析することで、PBX2 の血小板での役割の一端を明確にする。

#### 4. 研究成果

各実験において以下のとおり、一定の成果を得ることができた。

##### (1) 患者解析結果に基づく PBX2 と血小板機能の解析

対照（健常者）と患者における血小板凝集能試験の再現性を確認した結果、ADP 刺激での半減と、エピネフリン刺激での欠如を認めた。（図 1）

また、洗浄血小板を用いて血小板活性化表面マーカーである CD62P、PAC-I をフローサイトメトリーにて測定した結果、患者の TRAP 刺激後の CD62P の発現率と TRAP およびエピネフリン刺激後の PAC-I の発現率が、対照と比較した場合、3 分の 1 低下していた。（図 2）

・CD62Pの発現率(%)

|         | ADP  | TRAP  | コラーゲン | エピネフリン |
|---------|------|-------|-------|--------|
| 対照(健常者) | 5.1% | 21.1% | 4.3%  | 5.2%   |
| 患者      | 3.4% | 7.1%  | 3.5%  | 3.0%   |

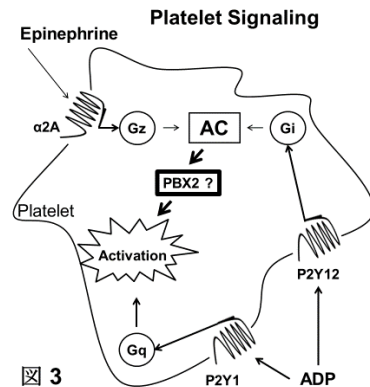
・Pac Iの発現率(%)

|         | ADP  | TRAP | コラーゲン | エピネフリン |
|---------|------|------|-------|--------|
| 対照(健常者) | 4.5% | 7.7% | 1.9%  | 3.5%   |
| 患者      | 3.6% | 2.2% | 1.2%  | 1.1%   |

図2

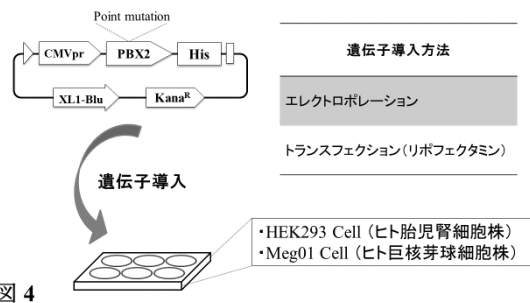
フローサイトメトリーにて測定した洗浄血小板における各アゴニスト刺激後の血小板表面マーカー CD62PおよびPac Iの発現率(%)

以上の結果から、エピネフリン刺激により活性化する  $\alpha_2A$  からの経路であるアデニル酸シクラーゼサイクル(AC) 活性化後の経路内に PBX2 が関与している可能性が示唆され、我々が仮定した血小板内シグナル経路内に、PBX2 を介した新規経路の存在をより高める結果が得られた。（図 3）



##### (2) PBX2 変異体の作成・細胞への導入と、PBX2 発現による遺伝子変化を網羅的に解析する。

野生型 PBX2 が搭載されたプラスミドベクターにおいて、1 塩基置換を伴う PCR を行い、PBX2 変異遺伝子が搭載したプラスミドベクターを作成した。（図 4）



次に、Meg01 細胞と HEK293 細胞において、それぞれの PBX2 タンパク質の発現レベルをウエスタンブロット法にて検証した。その結果、HEK293 細胞において PBX2 タンパク質の発現が確認できた。更に野生型 PBX2 が搭載されたプラスミドベクターを導入した HEK293 細胞では、PBX2 タンパク質の発現が内在性と比較すると、増強したことが確認できた。

今後、Meg01 細胞においても同様の検証を進め、野生型 PBX2、変異型 PBX2 導入後の Meg01 細胞および HEK293 細胞からそれぞれタンパク質抽出・mRNA 抽出を行い、Affimetric 社のマイクロアレイを用いて、mRNA の網羅的解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|