

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591242

研究課題名（和文） 血栓形成のポジティブおよびネガティブ制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of positive or negative regulatory mechanism for thrombus formation

研究代表者

富山 佳昭 (TOMIYAMA YOSHIAKI)

大阪大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80252667

研究成果の概要（和文）：

血小板機能はポジティブおよびネガティブ機構により制御されている。本研究では、ポジティブ機構として、ADP 受容体 P2Y12、コラーゲン受容体である GPVI、トロンボキサン A2 受容体に関して、これら受容体の異常症患者の解析をおこなった。特に P2Y12 は α IIb β 3 の活性化維持機構に重要であることを明らかにした。一方、ネガティブ機構として細胞内蛋白である α actinin は α IIb β 3 活性化に対しネガティブに制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Platelet function is regulated in the balance of positive and negative regulators. In this study, we have characterized ADP receptor P2Y12, collagen receptor GPVI, and thromboxane A2 receptor as positive regulators in patients with abnormality of these receptors. Of interest is that P2Y12-mediated signaling plays a critical role in the sustained α IIb β 3 activation. Inversely, we demonstrated that α -actinin plays as a negative regulator and negatively regulate α IIb β 3 activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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： α IIb β 3、P2Y12、巨核系細胞株、GPVI、トロンボキサン A2

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化を基盤とした致死的な動脈血栓症は、現代社会における高齢化やメタボリックシンドロームの増加に伴い著しく増加しており、本邦のみならず世界の死因の約 30% を占める極めて重大な疾病である。この現状からも、血管病、特に動脈血栓性疾患の発症抑制およびその制御法の開発は現代医療に課せられた最重要課題の一つであると言え

る。血小板は動脈血栓発症の中核を形成するだけでなく、IL-1 や MCP-1、CD40L、SDF-1 などのサイトカインを放出し動脈硬化進展や血管新生に大きく関与していることが最近明らかとなってきた (Massberg et al. J Exp Med 2002, 2006)。このように血小板機能の制御機構を解明し標的分子を同定することは、血管病発症を制御する上で必須のことと考えられる。血小板に関しては活性化物

質によるポジティブフィードバック機構が知られている。一方では、申請者らは一連の研究にて semaphorin 3A, SHPS-1, adiponectin などが血小板機能を抑制する物質として機能することを世界に先駆けて明らかにしてきた。このように血栓形成は活性化物質と抑制物質のバランスにより制御されている。しかしながら、その詳細はいまだ不明な点も多い。本研究では申請者らが明らかにしてきた血小板の機能制御機構に関して、 α IIb β 3 や P2Y₁₂ のみならず GPVI やトロンボキサン A2 受容体に関しての解析を行った。

2. 研究の目的

本研究では血小板活性化、特に α IIb β 3 の活性化制御機構のさらなる解明をめざし、ダイナミックに変化する α IIb β 3 活性化および非活性化を検出する新たな有核細胞 CMK を用いた実験系を構築することを目指す。この実験系を用いて、ADP 受容体 P2Y₁₂ の α IIb β 3 活性化維持機構（非活性化抑制機構）、 α アクチニンの α IIb β 3 活性化への作用を解析する。血小板機能抑制機構を血小板および新規実験系を用いて解明することを目指す。また、ヒトの血小板機能異常症の病態解析として GPVI 欠損症やトロンボキサン A2 受容体欠損症の分子病態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血小板を用いた機能制御機構の解析

分子異常に起因する血小板機能異常症の機能解析を行い、その分子の血小板機能さらには生体内での作用を解析する。

申請者が同定した P2Y₁₂ の α IIb β 3 活性化の維持機構、の血小板機能抑制機構の分子機構に関し血小板を用いて、 α IIb β 3 活性化の速度解析、Rap1B、Akt、PI3K、PLC γ 2 など主要なシグナル伝達分子の詳細な時間軸解析（刺激後数秒から解析）を行う。

(2) 巨核球系細胞を用いた遺伝子改変手法による解析

巨核球系細胞株 CMK 細胞、さらには臍帯血由来の培養巨核球を用いる。詳細な時間軸解析にて CD42b 陽性 CMK 細胞上 α IIb β 3 が PAR1 刺激により 3 分後には著明に活性化することが明らかとなった。しかしながら、30 分後ではその活性化がほとんど検出できない。この活性化維持の傷害の分子機構に関して以下の手法により解析する。①P2Y₁₂ を中心に、PI3K、Rap1B などのシグナル分子の過剰発現系での検討 ②レンチウイルス (FG12 ベクター、U6 プロモーター下に sh RNA を発現) を用いた遺伝子ノックダウンシステムの構築

4. 研究成果

本研究における成果は以下のとおりであ

る。

(1) コラーゲンの血小板機能ポジティブ機構として、血小板 GPVI を介した血小板活性化が知られているが、本研究において、後天性 GPVI 欠損症に関し新たな病型を見出した。本研究にて解析した症例 (12 歳女児) は ITP の発症とともに止血困難な鼻出血および紫斑が出現。血小板凝集にては、コラーゲン凝集能が特異的に低下していた。患者血小板では GPVI が特異的に欠損していたが、患者血漿中には抗 GPVI 抗体は検出されなかった。また GPVI や FcR γ の翻訳領域に遺伝子異常を認めなかった。患者血小板の PAIgG が増加していたため、血小板結合抗体をエーテルにて解離し解析すると、抗 α IIb β 3 抗体に加えて抗 GPVI 抗体が検出された。本例を無治療にて経過観察していると、血小板数の回復とともに GPVI の発現の回復が観察され、後天性 GPVI 欠損症であることが明らかとなったが、GPVI の回復と共に血小板結合 GPVI 抗体の減少が観察され、GPVI 欠損に抗体の関与が示唆された。GPVI は convulxin にて刺激するとネガティブフィードバック機構により shedding 機構により血小板表面から消失する。本症例血小板では GPVI の shedding は観察されず、GPVI の internalization が欠損の主因と考えられた。

(2) 血小板アゴニストとして重要なトロンボキサン A2 (TXA2) の受容体異常症および α IIb β 3 遺伝子異常に伴う先天性血小板減少症を新たに同定し、その分子機構の解析を行った。TXA2 受容体異常症としては、現在まで 2 種類のミスセンス変異が報告されているのみであり、そのキャリアー (ヘテロ体) においても血小板機能異常を呈する。この機序として、ミスセンス変異がドミナントネガティブに受容体機能を抑制している可能性が指摘されていた。報告者は、新たに c.167dupG 遺伝子異常のヘテロ体を同定した。この遺伝子異常により TXA2 受容体は欠損する。事実、発端者は正常の TXA2 受容体の発現が約 50% に減少しているのみであるが、血小板機能の異常が観察されたため、ドミナントネガティブの作用は否定的である。受容体が 50% に減少すると血小板機能異常が誘導される機序として、TXA2 受容体の半減により血小板放出反応が傷害され、血小板からの ADP 放出の低下を来すことが一因であることが明らかになった。また、同じ遺伝子異常を有する父親には出血傾向はなく、TXA2 受容体の半減のみでは出血症状を来さないことが示唆された。

(3) α IIb β 3 の異常に起因する遺伝子血小板減少症をあたりに同定した。本例では、 α IIb の細胞内領域における α IIb (G991C) を有する遺伝性血小板減少症であった。血小板は大型で、血小板数は 3 万/ μ L に低下してい

た。293T細胞に発現させた α IIb β 3 (G991C) β 3は恒常的に活性化されていた。報告者らは、すでに α IIb (R995W)が血小板減少を来すことを見出しており、これらの結果より、 α IIb β 3の活性化異常が血小板数および形態異常に関与する可能性が示された。

(4)ADP受容体P2Y12の α IIb β 3活性化維持機構、つまり非活性化抑制機構を解析するため、P2Y12を恒常的に発現する巨核球細胞株CMK細胞(CMK-P2Y12)を新たに樹立した。CMK-P2Y12では、CMKとは異なり α IIb β 3の活性化が維持され、P2Y12が α IIb β 3活性化の維持に必須であることが証明された。さらに α actininは β 3の細胞内領域の結合蛋白であるが、血小板刺激時に、 β 3との結合が可逆的であること、その可逆的な結合が α IIb β 3活性化の可逆性と同調することを明らかにした。新規実験系であるCMKシステムにて、 α actininの過剰発現、ノックダウンを行い、 α actininが α IIb β 3活性化(inside-outシグナル)に抑制的に作用していることを明らかにした。

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11件)

- ① Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H: Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. Blood 査読有 117: 5479-5484, 2011 DOI: 10.1182/blood-2010-12-323691
- ② Kamae T, Kiyomizu K, Nakazawa T, Tadokoro S, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in the thromboxane A₂ receptor. J Thromb Haemost 査読有 9: 1040-1048, 2011 DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04245.x.
- ③ Tadokoro S, Nakazawa T, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y: A potential role for α -actinin in inside-out α IIb β 3 signaling. Blood 査読有 117: 250-258, 2011 DOI: 10.1182/blood-2009-10-246751
- ④ Kashiwagi H, Kiyomizu K, Kamae T, Nakazawa T, Tadokoro S, Takiguchi S, Doki Y, Kanakura Y, Tomiyama Y: Molecular analysis of a patient with type I Glanzmann thrombasthenia and clinical impact of the

presence of anti- α IIb β 3 alloantibodies. Int J Hematol 査読有 93: 106-111, 2011 DOI: 10.1007/s12185-010-0731-5

- ⑤ Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y: Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: Embryonic/Neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. J Biol Chem 査読有 285: 24494-24507, 2010 DOI: 10.1074/jbc.M110.130575
- ⑥ Honda S, Shirohani-Ikejima H, Tadokoro S, Maeda Y, Kinoshita T, Tomiyama Y, Miyata T: Integrin-linked kinase associated with integrin activation. Blood 査読有 113: 5304-5313, 2009 DOI: 10.1182/blood-2008-07-169136
- ⑦ Akiyama M, Kashiwagi H, Todo K, Moroi M, Berndt, MC, Kojima H, Kanakura Y, Tomiyama Y: Presence of platelet-associated anti-glycoprotein (GP)VI autoantibodies and restoration of GPVI expression in patients with GPVI deficiency. J Thromb Haemost 査読有 7: 1373-1383, 2009 DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03510.x

[学会発表] (計17件)

- ① Nakazawa T, Tadokoro S, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Tomiyama Y, Kanakura Y. Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for α IIb β 3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology 2011.12.11 San Diego, USA
- ② 富山佳昭: ITP治療におけるトロンボポエチン受容体作動薬の位置付け. 第96回近畿血液学会地方会(招待講演) 2011.11.12 大阪
- ③ 富山佳昭: 血小板減少/機能異常症治療の最近の話題. 第18回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム(招待講演) 2011.10.21 埼玉
- ④ Kamae T, Kiyomizu K, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y: Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in thromboxane A₂ receptor. The American Society of Hematology 52nd Annual meeting. 2010.12.5 Orange Country Convention Center, Orlando, USA

- ⑤ 富山佳昭: 血小板の活性化機構: ADP の果たす役割. (シンポジウム) 第 17 回日本血液代替物学会年次大会 (招待講演) 2010. 10. 18 熊本、熊本市国際交流会館
- ⑥ 柏木浩和, 富山佳昭: 血小板異常症における血小板抗体の臨床的意義とその対策. (シンポジウム) 第 58 回日本輸血・細胞治療学会総会 (招待講演) 2010. 5. 28 名古屋、名古屋国際会議場
- ⑦ 富山佳昭, 宮川義隆, 岡本真一郎, 勝谷慎也, 木村昭郎, 大越 靖, 二宮治彦, 小杉浩史, 野村昌作, 尾崎勝俊, 池田康夫, 小尾伸之, 桂 幸一, 金倉 讓: 治療抵抗性慢性特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者に対するエルトロンボパグの臨床試験成績. 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010. 4. 24 鹿児島、城山観光ホテル
- ⑧ 柏木浩和, 秋山正夫, 中澤剛士, 清水一亘, 釜江 剛, 田所誠司, 瀧口修司, 土岐祐一郎, 金倉 讓, 富山佳昭: FACS にて血小板輸血の有用性を検討しえた抗血小板抗体を有する胃癌合併 Glanzmann 血小板無力症の一例. 第 33 回日本血栓止血学会学術集会 2010. 4. 2 鹿児島、城山観光ホテル
- ⑨ Tomiyama Y, Miyakawa Y, Okamoto S, Katsutani S, Kimura A, Okoshi Y, Ninomiya H, Kosugi H, Nomura S, Ozaki K, Ikeda Y, Koh N, Katsura K, Kanakura Y: Six month treatment of low dose eltrombopag is rfficacious in Japanese patients with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). The 51st Annual Meeting of the American Society of Hematology 2009.12.5 New Orleans, U.S.A.
- ⑩ 釜江 剛, 大塚欣敏, 中澤剛士, 秋山正夫, 田所誠司, 白鹿正通, 柏木浩和, 金倉 讓, 富山佳昭: 血小板トロンボキサン受容体異常症における新規遺伝子異常-nt. 167-8 における 1 塩基挿入-. 第 71 回日本血液学会学術集会 2009. 10. 24 京都
- ⑪ Akiyama M, Kashiwagi H, Todo K, Moroi M, Berndt, MC, Kojima H, Kanakura Y, Tomiyama Y: Presence of platelet-associated anti-GPVI autoantibodies and restoration of GPVI expression in patients with GPVI deficiency. The XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2009.7.13 Boston, U.S.A.
- ⑫ 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 第 91 回近畿血液学地方会 2009. 6. 20 奈良
- ⑬ 柏木浩和, 國島伸治, 武 弘典, 金倉

讓, 富山佳昭: α IIb (R995W) 変異を認めた先天性巨大血小板減少症例における α IIb β 3 活性化に関する検討. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会 2009. 6. 5 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富山 佳昭 (TOMIYAMA YOSHIAKI)
大阪大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80252667

(2) 研究分担者

織谷 健司 (ORITANI KENNJI)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 70324762

柏木 浩和 (KASHIWAGI HIROKAZU)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 10432535

白鹿 正通 (SHIRAGA MASAMICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40397683
平成 21 年に異動のため研究分担者より
削除