

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791069

研究課題名(和文) 巨核球造血・血小板機能を制御する細胞内分子機構の解析 - 血栓症予防の可能性を探る -

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism regulated during megakaryopoiesis and platelet function

研究代表者

上妻 行則 (Kozuma, Yukinori)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90550145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：巨核球は、造血幹細胞から巨核球系特異的サイトカインであるトロンボポエチン(TPO)の作用を受け、分化・成熟し、分化の最終段階で胞体突起を形成し、血小板を産生するが、その分子メカニズムや産生された血小板活性化制御機構には不明な点が多く存在する。今回の研究では、巨核球胞体突起形成や CD62P など血小板機能に野生型巨核球、血小板と CD226, calpastatin ノックアウトまたは p38a +/- で差が認められた。従って、CD226 や calpain-calpastatin, p38MAPK は巨核球胞体突起及び血小板活性化を制御する可能性である分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Megakaryocytes (MKs) differentiate from hematopoietic stem cells under the control of a lineage-specific cytokine, thrombopoietin (TPO). Final stage of the maturation is characterized by platelet release from the ends of long thin cytoplasmic processes called proplatelet. However, the mechanism for regulating proplatelet formation and platelet activation produced from MKs have not been completely understood. In this study, proplatelet formation and platelet function including CD62P and PS exposure were different between wild-type (WT) and CD226 knockout (KO) or calpastatin KO or p38a +/- MKs and platelets. These results suggest that CD226, calpain-calpastatin and p38 MAPK are involved in proplatelet formation and platelet function.

研究分野：血栓・止血学

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：巨核球 血小板

1. 研究開始当初の背景

血小板の母細胞である巨核球は、GATA-1などの転写因子や巨核球系特異的サイトカインであるトロンボポエチン (TPO) の作用により、造血幹細胞から核の多倍化と胞体の成熟を伴いながら分化・成熟し、分化の最終段階で胞体突起を形成する。この胞体突起形成過程は TPO 非依存性に進行し、その胞体の先端が断裂し、血小板が産生される。TPO の発見以降、TPO により惹起される情報伝達系は詳細に解析されてきたが、造血幹細胞から巨核球への分化、巨核球からの血小板産生において、どのような細胞内情報伝達物質が関与しているか、十分には解明されていない (総説: 小島ら, 日本血栓止血学会誌 2006;17: 261-271)。その原因は、骨髓内巨核球の絶対数が少ないこと、他血球と比較して脆弱であることなどから研究材料として扱いにくく、巨核球内情報伝達系を系統的に解析するための有効な実験系が確立されなかったことにある。

一方、巨核球より産生された血小板は、血球のなかで最小の細胞であるが、巨核球より細胞数が多く研究対象として扱いやすいため、血小板活性化分子やその活性化機構など詳細な検討が行われてきたが、生体内で血小板活性化を抑制する分子については nitric oxide (NO) や prostaglandin I₂ (PGI₂) など小数しか見出されていないため、血栓性疾患における有効な予防法・治療法は十分には確立されていない。

申請者はこれまでに、平成 20 年度 日本学術振興会特別研究員 特別研究員奨励費、平成 21・22 年度 科研費 (若手研究 (スタートアップ)) の支給のもと研究を行い、少ない細胞数で巨核球動態、血小板活性化を正確に測定する実験系も構築し、以下の知見を得た。

- (1) Bcl-xL の発現は巨核球生存に重要であること、Bcl-xL タンパクは TPO を介した Akt の活性化を通して apoptosis を抑制していることを証明した。(Kozuma Y et al. J Thromb Haemost. 2007; 5 : 1274-1282)
- (2) caspase 活性化は初期巨核球造血、特に造血幹細胞から巨核球への commitment に重要であること、さらに巨核球胞体突起形成、巨核球からの血小板産生には caspase 活性化は関与しないことを明らかにした。(Kozuma Y et al. Leukemia 2009; 23 : 1080-1086)
- (3) pro-apoptotic protein, Bim は造血幹細胞の細胞周期や巨核球の apoptosis を制御する重要な分子であることを見出した。Kozuma Y et al. J Thromb Haemost. 2010; 8 : 1088-1097)
- (4) Immunoglobulin super family に属する CD226 が血小板機能を負に制御する接着分子である可能性を見出した。
- (5) P38 MAPK や calpain などの分子が巨核

球成熟・胞体突起形成に重要な役割を担う可能性が示唆された。

2. 研究の目的

巨核球は、核の多倍化と胞体の成熟を伴いながら分化・成熟し、分化の最終段階で胞体突起を形成し血小板を産生するが、巨核球造血においてどのような細胞内情報伝達物質が関与しているか、産生された血小板の活性化制御分子は何であるかは、今日なお十分には解明されていない。申請者はこれまでに、CD226, calpain-calpastatin 系, p38 MAPK, calpain が巨核球造血を、CD226 が血小板活性化を制御する可能性を見出した。本研究では、巨核球造血、血小板機能、血栓形成における p38 MAPK, calpain, CD226 を介した細胞内情報伝達系を探索することにより、血小板増多・減少症、血栓症など様々な血小板関連疾患の予防・治療法開発への可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス

本研究では、CD226, calpastatin, p38 a のノックアウト (KO) マウスを用いた。

(2) 血小板機能解析

本研究の *in vitro*, *in vivo* 血小板機能解析の手法は、Kojima H et al. J Thromb Haemost. 2006; 4 : 2433-2444 を参照した。

in vitro でのマウス血小板機能解析

血小板粘着能 (collagen, fibrinogen などへの血小板接着・形態変化を蛍光顕微鏡で観察)

血小板凝集能 (血小板惹起物質: ADP, collagen, convulxin など)

血小板内における細胞内情報伝達系の解析 (免疫沈降法及び western blotting)

血小板活性化マーカーの測定 (active GPIIb/IIIa などを flow cytometry で測定)

in vivo でのマウス血小板機能解析

血栓形成能解析 (マウス腸間膜微小血管を塩化鉄にて障害させ、生じる血栓を生体蛍光顕微鏡下で観察)

出血時間測定

(3) 巨核球造血解析

本研究の *in vitro*, *in vivo* による実験手技は、Kozuma Y et al. Leukemia 2009; 23 : 1080-1086 と Kozuma Y et al. J Thromb Haemost. 2010; 8 : 1088-1097 を参照した。

巨核球造血能の *in vitro* 培養系解析

成熟巨核球の胞体突起形成能 (immunocytochemistry 後に蛍光顕微鏡で観察)

造血幹細胞から TPO で誘導した巨核球の分化能 (核 ploidy を flow cytometry で観察)

造血幹細胞 frequency (造血幹細胞

胞 :CD34-/c-kit+/Sca-1+/Lin- を flow cytometry で測定)

巨核球における細胞内情報伝達系の解析 (免疫沈降法及び western blotting)

巨核球造血能の in vivo 解析

定常状態における血小板数

マウスに抗血小板抗体、5-FU などの抗がん剤投与により血小板数を減少させた後の血小板回復能 (血小板数を経時的に観察)、骨髄中巨核球サイズ、核 ploidy (flow cytometry で観察)

血小板回復期の巨核球の形態学的観察

(4) がん転移の分子メカニズム解析

血小板凝集能 (血小板惹起物質の代わりにがん細胞株を添加)

細胞遊走能測定 (ダブルチャンバーを用いた migration assay、wound healing assay) 細胞浸潤能測定

4. 研究成果

(1) 血小板機能における CD226 の役割

in vitro における血小板機能解析では、CD112/CD36 または CD155/CD36 fusion protein を血小板と pre-incubate させた後の血小板凝集能は、CD112/CD36 では collagen, convulxin などの agonist においてコントロールと比較して有意に低下していたが、CD155/CD36 においては有意な低下は認められなかった。そこで、CD226 に対する抗体またはコントロール抗体をあらかじめ pre-incubate した後、CD112/CD36 fusion protein と反応させ、凝集能を測定すると convulxin において低下した血小板凝集能が回復した。また CD112/CD36 fusion protein と collagen または fibrinogen を混合し、チャンバースライドにコートし、血小板粘着能を測定したところ、コントロール群と比較して低下した。次に、この CD226-CD112 を介した血小板機能抑制メカニズムを明らかにするために、western blotting を用いて情報伝達系の解析を行ったところ、CD112/CD36 fusion protein 添加により、Akt 及び p44/42 のリン酸化レベルがコントロールと比較して低下していることが明らかとなった。CD226 の血小板機能への関与をさらに検討するために、塩化鉄を用いて CD226 KO マウスまたは野生型 (WT) マウスにおける血栓形成能を評価したところ、CD226 KO マウスでは血栓形成が速やかに行われ、出血時間も短縮していた。以上のことから、CD226 は血小板活性化を負に制御する重要な分子である可能性が示唆された。

(2) 巨核球造血における CD226 の役割

造血前駆細胞 (c-kit+/Lineage- 細胞) を採取し、TPO 存在下で培養後、CD226 mRNA 及びタンパクの発現を確認したところ、巨核球に分化するに従いその強い発現が認められた。そこで、巨核球における CD226 の役

割を明らかにするために、巨核球胞体突起形成能及び巨核球 ploidy の測定を行ったが、WT と CD226 KO 巨核球に差は認められなかった。しかしながら、WT または CD226 KO 巨核球を stromal 細胞と共培養したところ、WT 巨核球の胞体突起形成は抑制されたが、CD226 KO では抑制されなかった。そこで、in vivo における血小板産生能を評価するために 5-FU を投与したところ、CD226 KO マウスでは血小板の回復が早く、また骨髄内巨核球が増加していた。次に、CD226 は巨核球からの血小板産生のみならず、造血幹細胞からの分化・成熟にも関与する可能性を考え、造血前駆細胞を採取し、TPO 存在下で培養したところ、CD226 KO では WT と比較して、成熟巨核球が増加していた。さらに CD112/CD36 fusion protein を用いて巨核球における情報伝達系を解析したところ、幾つかの分子のリン酸化の亢進が認められた。以上のことから、CD226 は巨核球分化及び巨核球からの血小板産生を制御する分子である可能性が示唆された。

(3) 血小板機能における calpastatin の役割

精製した血小板に calpain 阻害剤、calpeptin を添加し、calpain の血小板機能への影響を検討したところ、CD62P や MP など各種血小板活性化マーカーや血小板凝集能が calpeptin 添加により影響を受けることが明らかとなった。血小板には calpain1 及び calpain2 の 2 分子が存在することが知られているが、血小板を A23187 で刺激すると、calpain1 は経時的に活性化するものの、calpain2 は活性化しなかった。以上の結果から、calpain は血小板活性化に必要な分子であることが示唆された。一方、生体内では calpain の内在性阻害タンパクである calpastatin により calpain の活性化が制御されていることが知られているが、血小板活性化における calpastatin による calpain 制御の重要性は未だ明らかでない。そこで、calpastatin KO マウスより血小板を精製し、機能解析を行ったところ、calpastatin KO 血小板では CD62P や active-GP IIb/IIIa の発現が WT 血小板と比較して有意に高いことが明らかとなったが、出血時間に差は認められなかった。また血小板凝集能は WT 血小板と比較して同等または若干低下する傾向が認められた。以上のことから、calpain および calpastatin は血小板活性化、なかでも特に血小板からの分泌を制御する役割を担う可能性が示唆されたので、今後は分泌を制御する calpain の基質は何であるかを詳細に検討していくとともに、calpastatin KO 血小板では active GP IIb/IIIa の発現が WT よりも高かったにも関わらず、出血時間に差が認められなかったことの原因について現在検討中である。

(4)巨核球造血における p38 MAPK の役割

p38a mRNA 及びタンパクの発現を確認したところ、巨核球及び血小板で強い発現が認められた。そこで、巨核球における p38a の役割を検討するために、WT マウスより精製した巨核球に p38 阻害剤である SB202190 を添加し、胞体突起形成能を測定したところ、阻害剤濃度依存性に胞体突起形成が抑制された。また造血前駆細胞を精製し、TPO 存在下で培養した際に阻害剤を添加したが、巨核球 ploidy に影響を与えなかった。これらの結果から、p38a は巨核球からの血小板産生を制御する分子である可能性が考えられたので、p38a KO マウスの解析を行った。P38a -/- マウスは貧血のため胎生致死となるため、まず p38a +/- マウスの解析を行った。血小板数は WT と比較し p38a +/- マウスで有意に低下していたものの、血小板サイズ及び脾臓サイズに差は認められなかった。巨核球胞体突起形成は WT と比較し、p38a +/- 巨核球で有意に低下していたが、巨核球 ploidy に差は認められなかった。また、骨髓内巨核球数は p38a +/- マウスで有意に増加していた。さらに造血前駆細胞を TPO 存在下で培養したところ、WT と比較して p38a +/- 巨核球の割合が増加していたが、巨核球 ploidy に差は認められなかった。次に、生体内における血小板産生能を評価するために 5-FU の投与を行ったところ、5-FU 投与後の血小板の回復は p38a +/- マウスで遅延しており、overshoot 時の血小板数も p38a +/- マウスで低下していた。しかしながら、骨髓内巨核球数は p38a +/- マウスで増加していた。この原因を明らかにするために、造血幹細胞の割合及び造血幹細胞の細胞周期を測定したが、両者で差は認められなかった。以上のことから、p38a は巨核球胞体突起形成及び造血幹細胞から巨核球への分化に関与する可能性が示唆されたが、今回の研究成果は p38a +/- マウスの解析であるため、現在 p38a -/- マウスより巨核球を精製し、解析を継続中である。

(5)血小板を介したがん転移分子メカニズムの解析

過去、がん患者に血栓症が頻発し、血小板ががんの血行性転移に重要な役割を果たすことが報告されているが、そのメカニズムは不明な点が多い。そこで、マウスメラノーマ由来細胞株 B16/BL6 及びマウス直腸がん由来細胞株 colon-26 を用いて血小板を介したがん転移分子メカニズムについて検討を行った。まず、B16/BL6 細胞株を精製した血小板に添加し、血小板凝集能を測定したところ、agonist の添加がなくても血小板凝集が惹起された。また、この血小板凝集が血小板と腫瘍細胞の接着によるものか、それとも腫瘍細胞から放出される液性因子によるものかを flow cytometry により検討したところ、血小板と腫瘍細胞の接着により血小板凝集

が惹起されることが明らかとなった。次に、がん転移の過程における腫瘍細胞の分子メカニズムについては様々な細胞内情報伝達物質の報告がなされているが、なかでも calpain の関与は支持される傾向にあるものの、その直接的な関与については殆ど報告がない。そこで、腫瘍細胞における calpain1 及び calpain2 の発現を確認したところ、両者の発現を認めた。次に、腫瘍細胞に calpain 阻害剤である ALLN を添加し、浸潤能及び遊走能を測定したところ、浸潤能及び遊走能共に阻害剤濃度依存性に抑制された。このことから、腫瘍細胞における calpain が転移に重要な役割を担う可能性が示唆された。しかしながら、calpain は生体において広く分布する分子であり、血小板にもその発現は認められる。従って、今後は、calpain の下流で作動する分子は何であるのか、血小板と腫瘍細胞の接着に重要な分子は何であるかを明らかにするべく、現在も解析を行っている。

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 3 件)

- (1) Kudo T, Sato T, Hagiwara K, Kozuma Y, Yamaguchi T, Ikehara Y, Hamada M, Matsumoto K, Ema M, Murata S, Ohkochi N, Narimatsu H, Takahashi S. C1galt1-deficient mice exhibit thrombocytopenia due to abnormal terminal differentiation of megakaryocytes. Blood 2013; 122 : 1649-1657. doi:10.1182/blood-2012-12-471102, 査読有
- (2) Takahashi K, Kozuma Y, Suzuki H, Tamura T, Maruyama T, Fukunaga K, Murata S, Ohkohchi N. Human platelets promote liver regeneration with kupffer cells in SCID mice. J Surg Res 2013; 180 : 62-72. 査読有
- (3) 上妻 行則. 巨核球造血とアポトーシス. 日本血栓止血学会誌 2012; 23 : 552-558. 査読無

[学会発表](計 6 件)

- (1) Kozuma Y, Kojima H, Tashiro Y, Ninomiya H. Caspase-3 activation regulates platelet lifespan but it is not involved in microparticle (MP) formation and phosphatidylserine (PS) exposure. XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2013 年 6 月 25 日-26 日, Amsterdam (Netherlands)
- (2) 上妻 行則, 関崎 沙織, 田代 ゆう子, 小島 寛, 二宮 治彦. 血小板における

caspase-3 活性化の意義の検討、第 35 回日本血栓止血学会学術集会、2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日、山形

- (3) 高橋 一広, 村田 聡一郎, 上妻 行則, 鈴木 英紀, 野渡 剛之, 丸山 岳人, 田村 孝史, 野崎 礼次, 池田 直哉, 川崎 卓也, 大河内 信弘. 第 112 回日本外科学会、2012 年 4 月 12 日-14 日、千葉
- (4) 高橋 一広, 上妻 行則, 鈴木 英紀, 野渡 剛之, 丸山 岳人, 田村 孝史, 野崎 礼次, 村田 聡一郎, 大河内 信弘. 第 48 回日本肝臓学会、2012 年 6 月 7 日-8 日、金沢
- (5) Takahashi K, Kozuma Y, Suzuki H, Ohkiuchi N. Human platelets promote liver regeneration with Kupffer cells in SCID mice. The 7th Tsukuba Medical Science Research Meeting、2012 年 10 月 30 日-11 月 2 日、Tsukuba (Japan)
- (6) Kozuma Y, Ninomiya H, Shibuya K, Shibuya A, Kojima H. Platelet activation is negatively regulated by the molecular interaction of platelet surface CD226 with CD112 expressed on endothelial cells. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis、2011 年 7 月 23 日-28 日、Kyoto (Japan)

〔図書〕(計 1 件)

(1) 編集：山内 一由、分担：上妻 行則、若葉マーク 臨床検査技師エッセンス・ノート 2 臨床形態検査、止血・凝固・線溶機構、217 頁 (142～155 頁)、メジカルビュー社、2013 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上妻 行則 (Kozuma, Yukinori)
筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90550145

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：