

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791090

研究課題名(和文) 接着斑分子Hic-5欠損血小板を用いたインテグリン活性化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin α IIb β 3 activation and platelet aggregation in mice.

研究代表者

金山 朱里 (Kaneyama, Shuri)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：10338535

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)：本研究では最終的に細胞接着斑分子Hic-5がインテグリン α IIb β 3の活性化制御に関与し、血小板凝集に重要な役割を担っていることを示した。具体的にはHic-5遺伝子改変マウスを用いた個体レベルでの出血能変化として、Hic-5欠損により出血時間が大幅に延長することが明らかとなった。さらに血小板凝集抑制メカニズムについて、Hic-5欠損血小板では血小板凝集の直接の担い手である α IIb β 3の活性化が抑制されていること、 α IIb β 3活性化時の結合アクチン量が減少することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Hic-5, a member of the paxillin family, serves as a focal adhesion adaptor protein associated with α IIb β 3. Hic-5 function in α IIb β 3 activation and subsequent platelet aggregation remains unknown. To address this question, platelets from Hic-5 $^{-/-}$ mice were analyzed. Hic-5 $^{-/-}$ mice displayed a significant hemostatic defect and resistance to thromboembolism, which were explained in part by weaker thrombin-induced aggregation in Hic-5 $^{-/-}$ platelets. Mechanistically, Hic-5 $^{-/-}$ platelets showed limited activation of α IIb β 3 upon thrombin treatment. Morphological alteration in Hic-5 $^{-/-}$ platelets after thrombin stimulation on fibrinogen plates was also limited. As a direct consequence, the quantity of actin co-immunoprecipitating with the activated α IIb β 3 was smaller in Hic-5 $^{-/-}$ platelets than in wild-type platelets. We identified Hic-5 as a novel and specific regulatory factor for thrombin-induced α IIb β 3 activation and subsequent platelet aggregation in mice.

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：血栓・止血学

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞、心筋梗塞など動脈血栓症の成因の一つに血小板活性化とそれに伴う動脈硬化性病変部位での血栓形成が挙げられる。血栓形成に関する機序に関しては、詳細は不明な点が多く血小板機能異常症の原因遺伝子や分子が明確にされていない症例も多い。血小板の凝集は、凝集に必須の接着リセプターであるインテグリン IIb 3 が最終的に活性化されることで引き起こされる。IIb 3 の活性化は Inside-Out および Outside-In という二つの細胞内分子機構により制御されている。その機序は米国の Kauchansky K. や Shattil SJ らによって精力的に解析が進められているものの、未だ不明である。この分野では近年、Talin、kindlin、RIAM といったインテグリン結合分子の一部が Inside-Out signal の主要調節因子であることが注目されている。この中で Talin は Hic-5 と同じく接着斑に局在し、かつ Hic-5 と結合することが既に報告されている。よって Hic-5 が血小板凝集の Inside-Out および Outside-In signal の制御に重要な役割を担っているとの仮説のもと、IIb 3 活性化機構について解析する。

2. 研究の目的

血小板凝集および活性化に関与する分子は多く知られているが、個体レベルで実際に出血状態を変化させる特定分子に関する報告は少ない。本研究では ROS 下流の mediator 1 分子のみに焦点をあて、アダプター分子である Hic-5 による細胞接着制御機構が血管生理の制御において重要な役割を持つことを示すとともに、血栓形成を引きがねとして発症する動脈硬化性疾患に関与する接着シグナルの新たな分子的背景の一端を明らかにすることを目的とし検討を行った。

3. 研究の方法

(1) Hic-5 欠損による血小板機能変化

In vivo

出血時間 (bleeding time) および再出血時間 (rebleeding time) 測定を行い、個体レベルでの出血・止血状態に変化が生じているか検討した。

In vitro

血小板凝集能測定: Hic-5 欠損マウス血小板を用いて血小板凝集能検査を行う。その際、安定した結果を得るために洗浄血小板を用い、Thrombin、collagen、U46619 など複数の

アゴニストの組み合わせで検討する。凝集測定器は PA-200 (aggregometer, Kowa) を用いて凝集塊の大きさ、数を経時的に測定した。

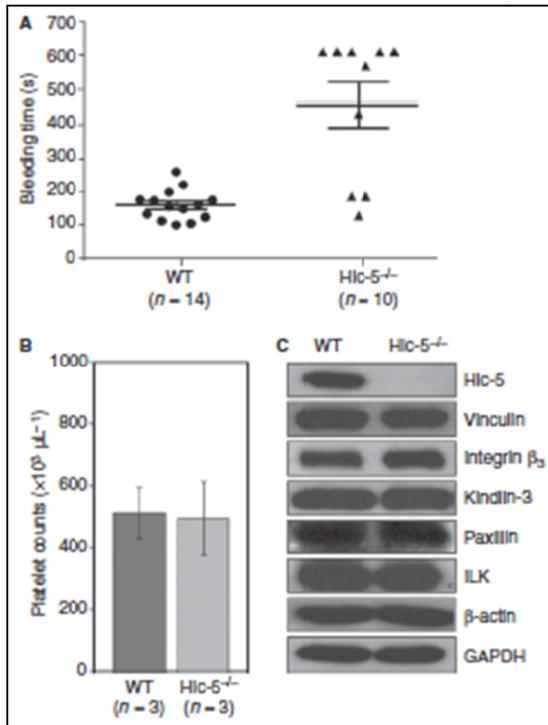
(2) 血小板活性化分子機構への Hic-5 の関与 (インテグリン活性化、inside-out signal): Talin、kindlin などが関与する Inside-Out signal による IIb 3 活性化は血小板凝集に必須であることが知られている。まず Hic-5 欠損血小板刺激時に、IIb 3 の活性化が正常に起きているか抗 CD41 抗体、抗活性化型 IIb 3 抗体 (JON/A) を用いて FACS 解析を行った。さらに、Hic-5 が血小板内のどのインテグリン下に局在しているか magnetic beads を用いた免疫沈降ウエスタンブロットにより調べた。さらに IIb 3 下の Hic-5 結合分子が Hic-5 欠損によりインテグリンとの相互作用に変化が起きるか、免疫沈降により他の分子の蛋白量変化を検討した。また、Hic-5 結合因子 Talin は 2 1 に局在し、活性化刺激依存的に IIb 3 下へ移動しインテグリンの活性化に関与することが明らかになっている。このような血小板内局在変化の可能性を考え、免疫電子顕微鏡法でこれら分子の詳細な細胞内局在を検討した。

(3) 血小板細胞骨格変化 (細胞接着能、伸展能、outside-in signal): Hic-5 は膜貫通型 ECM 受容体であるインテグリン直下に局在し接着シグナル制御に関与していることが報告されている。よって血小板凝集能変化が確定した場合、インテグリン下流シグナルや細胞骨格制御を含めた形態変化について解析した。具体的には、fibrinogen 上での血小板伸展能 (細胞形態とアクチン骨格蛍光染色による光顕レベルでの細胞骨格観察)、走査電子顕微鏡による微細構造変化の観察 (同時に lamellipodia、filopodia 形成細胞数の定量) を行った。

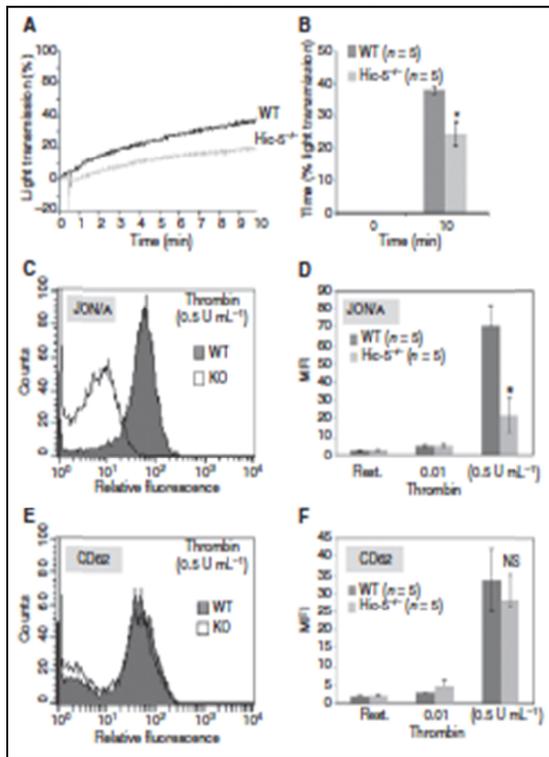
4. 研究成果

(1) Hic-5 欠損による血小板機能変化

Hic-5 欠損による血小板機能の変化について、個体レベルでの出血時間延長という結果が得られ、生体の止血過程における Hic-5 の重要性が明らかとなった。この現象が血小板自身の凝集能抑制を介した変化であるか洗浄血小板を用いた血小板凝集能検査により検討した結果、Hic-5 欠損血小板では、Thrombin 刺激特異的に凝集能が抑制されていることが明らかとなった。

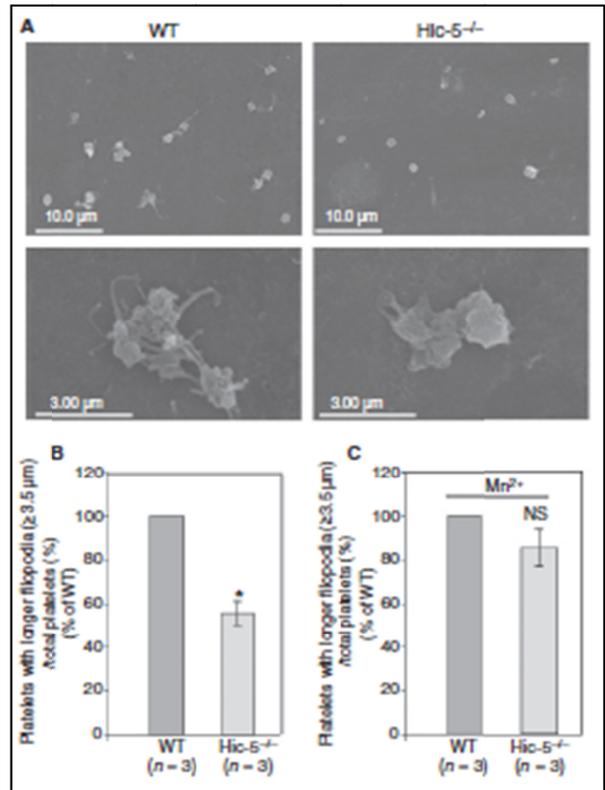


(2) 血小板活性化分子機構へのHic-5の関与



血小板凝集の直接の担い手である 11b 3 の活性化制御を介することが、抗 CD41 抗体、抗活性型 11b 3 抗体(JON/A)を用いた FACS 解析より明らかになった。

(3) 血小板細胞骨格変化



血小板刺激時の形態変化について走査電子顕微鏡を用いて微細構造変化解析した結果、Hic-5 欠損血小板では fibrinogen 上で長い filopodia を形成できる細胞数が減少していた。

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) Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Arita-Okubo S, Offermanns S, Itabe H, Miyazaki T, Miyazaki A. Identification of Hic-5 as a Novel Scaffold for the MKK4/p54 JNK Pathway in the Development of Abdominal Aortic Aneurysms. *J Am Heart Assoc.* 2014 May 8;3(3). 査読有

(2) Miyazaki T, Koya T, Kigawa Y, Oguchi T, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Calpain and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(3):228-37. 査読有

(3) Kim-Kaneyama JR, Miyauchi A, Lei XF, Arita S, Mino T, Takeda N, Kou K, Eto K,

Yoshida T, Miyazaki T, Shioda S, Miyazaki A. Identification of Hic-5 as a novel regulatory factor for integrin α IIb β 3 activation and platelet aggregation in mice. *J Thromb Haemost.* 2012 Sep;10(9):1867-74. 査読有

(4) Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S, Miyauchi A, Miyazaki T, Miyazaki A. Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) as a potential therapeutic target for vascular and other disorders. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(7):601-7. 査読有

(5) Kim-Kaneyama JR. Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) as a potential therapeutic target. *Seikagaku.* 2012 Apr;84(4):261-5. 査読有

(6) Koya T, Miyazaki T, Watanabe T, Shichiri M, Atsumi T, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A. Salusin- β accelerates inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF- κ B signaling in LDL receptor-deficient mice in vivo and HUVECs in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Jul;303(1):H96-105. 査読有

(7) Miyazaki T, Taketomi Y, Takimoto M, Lei XF, Arita S, Kim-Kaneyama JR, Arata S, Ohata H, Ota H, Murakami M, Miyazaki A. m-Calpain induction in vascular endothelial cells on human and mouse atheromas and its roles in VE-cadherin disorganization and atherosclerosis. *Circulation.* 2011 Dec 6;124(23):2522-32. 査読有

(8) Nagashima M, Watanabe T, Terasaki M, Tomoyasu M, Nohtomi K, Kim-Kaneyama JR, Miyazaki A, Hirano T. Native incretins prevent the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Diabetologia.* 2011 Oct;54(10):2649-59. 査読有

(9) Kim-Kaneyama JR, Takeda N, Sasai A, Miyazaki A, Sata M, Hirabayashi T, Shibamura M, Yamada G, Nose K. Hic-5 deficiency enhances mechanosensitive apoptosis and modulates vascular remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Jan;50(1):77-86. 査読有

(10) インクレチンの正常ヒト大動脈血管平滑筋細胞に対する増殖抑制効果についての

検討友安雅子, 金山朱里, 長嶋理晴, 寺崎道重, 宮崎章, 平野勉
糖尿病 54(Supplement 1) S.115 2011年4月

(11) インクレチンのヒト大動脈血管平滑筋細胞に対する増殖・遊走抑制効果についての検討友安雅子, 金山朱里, 長嶋理晴, 寺崎道重, 宮崎章, 平野勉
糖尿病合併症 25(Supplement 1) 83 2011年9月

〔学会発表〕(計12件)

(1) 金山 朱里
Hic-5 deficiency enhances mechanosensitive apoptosis and modulates vascular remodeling 第43回日本動脈硬化学会学術集会(札幌, 2011年7月)

(2) Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama, Shigeko Arita, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Hic-5 deficiency blocks the development of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms in mice. 第44回日本動脈硬化学会総会(福岡, 2012年7月)

(3) 島袋 充生、大川 知奈美、東田 真由子、佐藤 寛美、黒部 裕嗣、高尾 正一郎、平田陽一郎、中山 泰介、雷 小峰、金山 朱里、福田 大受、山田 博胤、佐藤 匡央、北川 哲也、佐田 政隆。エゼチミブ投与によるブタ心臓周囲脂肪ならびに心筋組織の酸化コレステロール・脂肪酸分画の変動:GC/MS法による検討。第60回日本心臓病学会学術集会(石川, 2012年9月)

(4) 金山 朱里、雷 小峰、有田 茂子、宮内 彩、宮崎 章
The role of hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) in atherosclerotic diseases. 第20回日本血管生物医学会学術集会(徳島, 2012年12月) シンポジウム

(5) Shigeko Arita, Joo-ri Kim-Kaneyama, Xiao-Feng Lei, Takuro Miyazaki, Akira Miyazaki. Deletion of hydrogen peroxide-inducible clone-5 inhibits atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E knockout mice. 第45回日本動脈硬化学会総会(東京, 2013年7月)

(6) 金山 朱里、雷 小峰、有田茂子、宮崎拓郎、宮崎 章. Hic-5 deficiency blocks the development of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms by inhibiting

c-Jun N-terminal kinase 2 in mice. 第21回
日本血管生物医学会学術集会。(大阪,
2013年9月)シンポジウム

(7) 宮崎 拓郎、礪波 一夫、秦 勝志、
雷 小峰、金山 朱里、反町 洋之、栗原
裕基、宮崎 章. Calpain-6 による動脈硬化
病変およびマクロファージ pinocytosis の制
御. 第21回日本血管生物医学会学術集会。
(大阪, 2013年9月)

(8) 宮崎 拓郎、礪波 一夫、秦勝志、雷
小峰、金山 朱里、反町 洋之、栗原 裕
基、宮崎 章. Calpain-6 による動脈硬化病
変およびマクロファージ pinocytosis の制御。
第86回日本生化学会大会。(横浜, 2013
年9月)

(9) 金山 朱里
新規動脈硬化性疾患制御分子 Hic-5 の機能
解析 第43回日本心脈管作動物質学会(神
戸, 2014年2月)シンポジウム

(10) Xiao-Feng Lei, Joo-ri Kim-Kaneyama,
Shigeko Arita, Takuro Miyazaki, Akira
Miyazaki. Hic-5 deficiency blocks the
development of abdominal aortic aneurysms in
mice. The 17th international vascular biology
meeting (Wiesbaden, June, 2012)

(11) Kim-Kaneyama JR, Miyauchi A, Lei XF,
Arita S, Mino T, Takeda N, Kou K, Eto K,
Miyazaki T, Miyazaki A Identification of Hic-5
as a novel regulatory factor for integrin α IIb β 3
activation and platelet aggregation in mice.
The 17th international vascular biology meeting
(Wiesbaden, June, 2012)

(12) M. Tomoyasu, T. Watanabe, J
Kaneyama-Kim, M. Terasaki, K. Nohtomi, K.
Sato, F. Itoh, A. Miyazaki, and T. Hirano
Incretin-based treatments suppress human
macrophage foam cell formation and vascular
smooth muscle cell migration and proliferation
contributing to atherosclerosis prevention.
The 49th EASD Annual Meeting (Barcelona,
September, 2013)

〔図書〕(計1件)

血管生物医学事典(日本血管生物医学会編
集)第一章25, 26執筆

〔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〕
ホームページ等

http://www10.showa-u.ac.jp/~biochem/Biochem/Biochem_top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
金山 朱里 (Shuri Kaneyama)
昭和大学医学部生化学講座 講師
研究者番号: 10338535

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: