

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461403

研究課題名(和文)新規抗血栓療法をめざしたインテグリン IIb/3活性化と活性化維持機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of regulatory mechanism of sustained integrin alphaIIb beta3 activation.

研究代表者

加藤 恒 (Kato, Hisashi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20705214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インテグリン IIb/3は血栓形成に必須のフィブリノゲン受容体であり、その活性化状態はinside-outシグナルにより厳密に制御されている。しかし、inside-outシグナルの詳細は不明であり本研究課題ではヒト巨核球系細胞株CMK細胞株を用いた検討とともに出血症状を呈する症例の解析よりCaLDAG-GEFIの重要性を明らかとした。CaLDAG-GEFI欠損症例は強い出血症状を呈していたが、IIb/3活性化が遅延することが原因であることを特定し、IIb/3活性化を制御する新たな機構を示すことができた。これらの研究成果は学術雑誌Bloodへ発表した。

研究成果の概要(英文)：Platelet fibrinogen receptor integrin IIb/3 is essential for hemostasis and its activation state is tightly regulated by inside-out signaling. So far, the detailed mechanism how inside-out signaling induces activation of IIb/3 is still obscure. In this study, we determined the molecules which are important for inside-out signaling in the megakaryocytic cell line CMK and the patient with CaLDAG-GEFI deficiency who has been suffering severe bleeding problems. However, platelets with CaLDAG-GEFI deficiency showed mildly impaired IIb/3 activation. And we found the delayed IIb/3 activation in CaLDAG-GEFI deficient platelets is related to severe bleeding symptoms. Our results indicate the importance of CaLDAG-GEFI and IIb/3 activation kinetics for normal hemostasis (Blood 2016).

研究分野：血栓止血

キーワード：インテグリン IIb/3 Inside-Outシグナル CaLDAG-GEFI

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞、脳梗塞などの動脈血栓性疾患は日本人の死因の大きな割合を占めている。血栓の形成には血小板の凝集が必須のイベントであり、アスピリンなどの抗血小板薬による血小板機能の抑制が現在の臨床の現場では使用されている。しかし、抗血小板薬による血小板機能の抑制は常に出血合併症のリスクを伴い、十分なコントロールが行えない場合もある。このため血小板機能抑制効果が高く、出血リスクの少ない血小板機能制御法による動脈血栓性疾患発症予防の改善が期待されている。

血中を流れる血小板は非活性化状態にあり定常状態では血小板凝集を起こさないが、外傷などによる血管損傷を受けると瞬時に活性化し血栓形成による止血を行う。血小板同士がフィブリノゲンにより架橋され血小板凝集が形成されるが、血小板上のフィブリノゲン受容体がインテグリン α IIB β 3 (GPIIb-IIIa) であり、血小板がアゴニストによる刺激を受け誘導される inside-out シグナルが α IIB β 3 活性化状態の制御に重要な役割を果たしている。しかし、骨髄で産生される血小板は巨核球細胞質の断片から成る無核の細胞で、in vitro における培養もできないため inside-out シグナルの詳細は不明である。このため出血症状を呈する症例解析がこれまで血小板機能制御メカニズムの解明に大きく寄与してきた。我々もこれまで多くの Glanzmann 血小板無力症、ADP 受容体 P2Y₁₂ 欠損症例などの解析を行ってきたが、inside-out シグナルの理解はまだ十分ではない。

2. 研究の目的

これまでの血小板機能異常症の検討などから α IIB β 3 活性化状態は単純な ON/OFF ではなく、いったん活性化した α IIB β 3 の活性化状態を維持する機構の重要性を明らかとし、また血小板研究の制約を克服する巨核球系細胞株 CMK を用いて生理的アゴニスト刺激による α IIB β 3 活性化評価システムを樹立してきた。本研究ではこれらを用いて inside-out シグナルの詳細を明らかとする。

また恒常的に α IIB β 3 が活性化状態にある Glanzmann 血小板無力症症例の遺伝子変異に基づいて作製した α IIB-R995 変異導入遺伝子改変マウス、すでに inside-out シグナルでの重要性が示されている Rap1 の不活化型変異 Rap1b-N17 マウスを用いた解析を行うことでさらに α IIB β 3 活性化制御機構の詳細を明らかとすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) CMK 細胞での発現クローニングによる α IIB β 3 活性化機構の解明。
巨核球系細胞株 CMK における生理的アゴニストの誘導する α IIB β 3 活性化評価を可能とした CMK 細胞システムを用いて、血小板

cDNA ライブラリーの導入により inside-out シグナルに重要な新規分子の探索を行う。

(2) 遺伝子改変マウス (α IIB-R995、Rap1b-N17) を用いた血小板機能の解析。
遺伝子改変マウスより採取した血小板機能を WT マウスと比較する。血小板機能に変化が見られる場合はマウス生体内でのリアルタイムの血栓形成観察など行う。

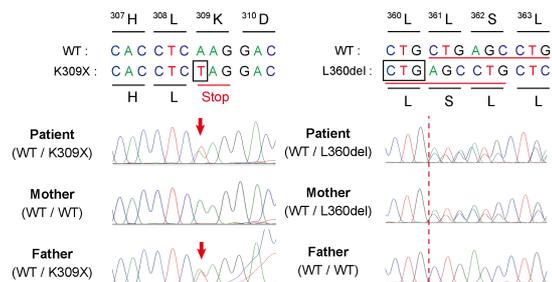
(3) 出血症状を呈する血小板機能異常症症例解析。

出血症状を呈する症例より得た血小板の機能を解析。生理的アゴニスト刺激による α IIB β 3 活性化状態に加え、活性化キネティックスの検討により inside-out シグナルに重要な分子を同定していく。

4. 研究成果

CMK 細胞での発現クローニングによる α IIB β 3 活性化機構の解明：実験手法上の制約が大きいため解明の進んでいない inside-out シグナルを検討するため、我々の樹立した CMK 細胞システムを用いた検討を行った。健常人血小板より精製した RNA を用いた cDNA ライブラリーを作製、検討を行った。

また、乳児期より出血傾向が見られる症例の血小板機能解析により、世界で 1 例目の CalDAG-GEFI 欠損症を同定した。症例の血小板は CalDAG-GEFI に父親由来の K309X、母親由来の L360del というふたつの変異が原因で発現の欠損に至ることを明らかとした。CalDAG-GEFI の inside-out シグナルにおける重要性はマウスでは示されていたが、ヒトでの作用を確認されていなかった。解析症例では一般的に行われている血小板凝集検査、フローサイトメトリーによる α IIB β 3 活性化解析などの血小板機能解析結果では



機能低下を認めるもの実際に表れている強い出血症状に相応する強い障害ではなかった。しかし、我々の樹立した α IIB β 3 活性化の時間経過の評価を可能とした velocity アッセイにより CalDAG-GEFI 欠損は α IIB β 3 の活性化速度が低下することを明らかとした。流動下でコラーゲン上に形成される血栓形成は著明に低下しており、 α IIB β 3 活性化の遅延が生理的条件下での血栓形成を障害し、実際の症例で見られている強い出血症状の原因となっていることを示すことに成功し学会、論文にて成果の報告を行った。

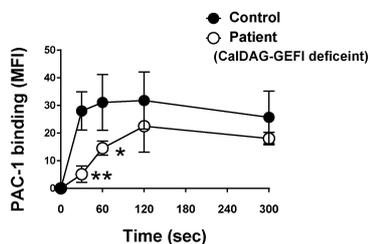


図. α IIB β 3 活性化の時間経過

健康人コントロール CalDAG-GEFI欠損症例

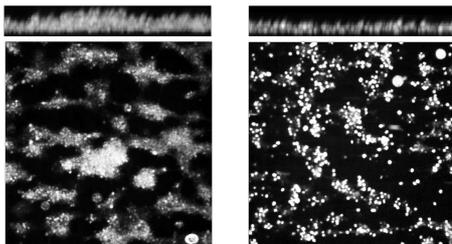


図. コラーゲン上における流動下血栓形成

この結果は α IIB β 3 活性化を評価する上で、活性化キネティクスが重要であるという新たな視点を提唱するものである。

遺伝子改変マウスを用いた血小板機能の解析では、 α IIB-R995 ノックインマウスはヒト症例同様の巨大血小板減少症様のフェノタイプを示した。 α IIB β 3 の血小板表面への発現が著明に低下していたが α IIB β 3 活性化認識抗体の結合を α IIB β 3 発現量で補正すると PAC-1 結合は α IIB-R995 ノックインマウスで軽度上昇しており、インテグリン細胞内領域が inside-out シグナルへの影響することを動物モデルで確認された。

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4件)

Kato H, Nakazawa Y, Kurokawa Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Morita D, Banno F, Honda S, Kanakura Y, Tomiya Y. Human CalDAG-GEFI deficiency increases bleeding and delays α IIB β 3 activation. *Blood*. 2016, vol.128, P2729-2733, 査読あり。DOI: 10.1182/blood-2016-03-704825
 加藤 恒、血小板異常症の診断～まれな出血傾向を見逃さないために～、臨床血液、2016、第57巻10号、p325-334、査読無、DOI: 10.11406/rinketsu.57.2159
 Liao Z, Kato H, Pandey M, Cantor JM, Ablooglu AJ, Ginsberg MH, Shattil SJ. Interaction of kindlin-2 with integrin β 3 promotes outside-in signaling responded by the α v β 3 vitronectin receptor. *Blood*. 2015, vol.125, p1995-2004, 査読あり。DOI: 10.1182/blood-2014-09-603035

加藤 恒、富山佳昭、

インテグリン IIB 3 の構造変化と活性化 : talin による活性化機構、日本血栓止血学会誌、2014、25 巻、p619-628、査読無、DOI: 10.2491/jjsth.25.619

[学会発表](計10件)

加藤 恒、血小板機能異常症の診断～まれな出血傾向を見逃さないために～、第78回日本血液学会学術集会、教育講演、2016/10/14、パシフィコ横浜(横浜、神奈川県)

森川 陽一郎、加藤 恒、芥田敬吾、柏木浩和、本田繁則、金倉 謙、富山佳昭、トロンピン受容体 PAR4 多型性の血小板機能における意義、第78回日本血液学会学術集会、2016/10/14、パシフィコ横浜(横浜市、神奈川県)

加藤 恒、Integrin inside-out activation : the role of CalDAG-GEFI in platelet integrin α IIB β 3 activation.

第38回日本血栓止血学会学術集会、2016/6/16、奈良春日野国際フォーラム薈(奈良市、奈良県)

森川 陽一郎、加藤 恒、芥田敬吾、柏木浩和、本田繁則、金倉 謙、富山佳昭、The association of PAR4

polymorphism with human platelet reactivity in Japanese. 第38回日本血栓止血学会学術集会、2016/6/17、奈良春日野国際フォーラム薈(奈良市、奈良県)

柏木浩和、清水一亘、國島伸司、坂野史明、加藤 恒、森川陽一郎、田所誠司、小亀浩市、本田繁則、宮田敏行、金倉謙、富山佳昭、 α IIB β 3 活性化変異、 α IIB(R990W)KI マウスは巨大血小板減少症とともに血小板機能障害をきたす、第37回日本血栓止血学会学術集会、2015/5/22、甲府総合市民会館(甲府市、山梨県)

Kato H, Nakazawa Y, Kashiwagi H, Tadokoro S, Morikawa Y, Morita D, Kurokawa Y, Kanakura Y, Tomiya Y. Severe bleeding tendency and impaired platelet function in a patient with CalDAG-GEFI deficiency.

International Society on Thrombosis and Hemostasis 2015 congress. 2015/6/24, Tronto convention center (Toronto, Canada)

加藤 恒、Severe bleeding tendency and impaired platelet function in a patient with CalDAG-GEFI deficiency. 第77回日本血液学会学術集会、2015/10/16、ホテル日航金沢(金沢市、石川)

清水一亘、柏木浩和、國島伸治、坂野史明、森川陽一郎、加藤 恒、田所誠司、小亀浩市、本田繁則、宮田敏行、金倉 謙、富山佳昭、インテグリン α IIB β 3 活性化変

異、 α IIb(R990W)ノックインマウスの解析、第 36 回日本血栓止血学会学術集会、2014/5/30、大阪国際交流センター（大阪市、大阪府）

Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. α IIb(R990W), a constitutive activating mutation of integrin α IIb β 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function American Society of hematology 56th Annual Meeting. 2014/12/8, Moscone Center (San Francisco, U.S.A.)

清水一巨、柏木浩和、國島伸治、坂野史明、森川陽一郎、加藤 恒、田所誠司、小亀浩市、本田繁則、宮田敏行、金倉 謙、富山佳昭、 α IIb β 3 活性化変異、 α IIb(R990W)ノックインマウスは巨大血小板減少症を伴う血小板無力症様の表現型を示す、第 76 回日本血液学会学術集会、2014/11/2、大阪国際会議場（大阪市、大阪府）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 恒 (Kato Hisashi)

大阪大学大学院医学系研究科・血液・腫瘍内科・助教

研究者番号：20705214

(2) 研究分担者

柏木 浩和 (Hirokazu Kashiwagi)

大阪大学大学院医学系研究科・血液・腫瘍内科・講師

研究者番号：10432535

(3) 連携研究者

富山 佳昭 (Yoshiaki Tomiyama)

大阪大学医学部附属病院・輸血部・准教授

研究者番号：80252667

(4) 研究協力者

一井 倫子 (Ichii Michiko)

大阪大学大学院医学系研究科・血液・腫瘍内科・寄付講座助教

研究者番号：30633010