

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461405

研究課題名(和文)先天性血小板減少症の新たな原因遺伝子の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel causative gene responsible for congenital thrombocytopenia

研究代表者

羽藤 高明 (HATO, TAKAAKI)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30172943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は血小板減少症と動静脈血栓症が併発して発症している一大家系を見出し、その原因遺伝子の同定を試みた。その結果、G蛋白共役型受容体の一つであるGPR25の点突然変異を見出した。この遺伝子異常を導入したトランスジェニックマウスを作成したところ、一部に血小板減少がみられたものの個体差があり、GPR25を原因遺伝子変異と断定するには至らなかった。また、GPR25は血小板表面に存在していることを確認した。さらに、患者血小板は血小板凝集塊の構造が緻密となっていて、凝集しやすくかつ強固な凝集塊が形成されていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We found a large family with congenital thrombocytopenia and arteriovenous thrombosis. As a consequence of genetic analysis, we could identify mutation of a G protein-coupled receptor, GPR25. Transgenic mice bearing this mutation showed thrombocytopenia in some mice, but not in others, suggesting inconclusive evidence. We successfully generated anti-GPR25 monoclonal antibody and our antibody experiments confirmed the expression of the GPR25 protein on the platelet surface. Moreover, functional analysis revealed that patient's platelets had enhanced platelet aggregation and formed firm aggregates in agonist-induced platelet aggregation.

研究分野：血栓止血学

キーワード：血小板減少症 血栓性素因 動脈血栓症 静脈血栓症 血小板凝集

1. 研究開始当初の背景

先天性血小板減少症は様々な遺伝子異常によって引き起こされる症候群であり、これまでに 19 の原因遺伝子が同定されている。このなかには RUNX1 や ANKRD26 のように造血器腫瘍の発症と関連している遺伝子や MYH9 のように眼、耳および腎の機能障害をきたす遺伝子があり、血小板減少のみならず様々な病態と関連している遺伝子が見出されてきている。しかしながら、先天性血小板減少症の約半数はその原因遺伝子が不明のままである。

我々は、常染色体優性遺伝形式をとっている先天性血小板減少症の一大家系を見出した。この家系の最大の特徴は、血小板減少患者に若年性の動脈および静脈血栓症が多発していることである。また、患者血小板機能の解析では通常の生理的アゴニストによる血小板凝集能や顆粒蛋白発現には異常がないが、一部のアゴニストに対して血小板凝集が異常に亢進していた。また、骨髄では巨核球増多が見られた。我々はこれらの所見から、この家系ではある遺伝子の変異によって血小板が恒常的に活性化されているために網内系で活性化血小板が除去されて血小板減少が生じ、さらに残存活性化血小板による血栓性素因が生じているのではないかとの仮説を立てた。そこでまず本家系の原因遺伝子を同定するために、家系内の血小板減少患者および血小板数正常者から DNA を抽出して全エクソンを網羅的に解析して血小板減少と関連のある遺伝子を同定するというエクソーム解析を行った。最初に家系内 4 人の解析を行ったところ、71 の原因遺伝子候補が見出され、さらに 5 人のエクソーム解析を追加したところ 5 つの遺伝子候補に絞り込むことができた。

2. 研究の目的

先天性血小板減少症は様々な遺伝子異常によって引き起こされる症候群であるが、その約半数は原因遺伝子が不明である。我々は、

常染色体優性遺伝形式をとっている先天性血小板減少症の一家系を見出したが、その家系では血小板減少患者に動静脈血栓症が多発していた。本家系での原因遺伝子は血小板減少と血栓性素因の両病態に関連していると考え、それを同定するために全エクソンをターゲットとしたエクソーム解析を行ったところ、5 つの候補遺伝子を同定した。この中から原因遺伝子を決定し、遺伝子組み換え蛋白の発現実験およびマウス個体での *in vivo* 解析を通じて本家系の病態を明らかにすることによって、新たな血小板減少症の疾患概念を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は次の 4 つの計画に大きく分けられ、各計画の骨子は以下の通りである。

(1) 原因遺伝子を決定し、患者血小板機能を解析する。5 つに絞り込んでいる候補遺伝子から原因遺伝子を特定し、患者血小板活性化反応を解析する。

(2) ES 細胞を用いた遺伝子発現実験によって血小板造血への影響を明らかにする。原因遺伝子およびその siRNA を ES 細胞に導入し、血小板造血に及ぼす影響を検討する。

(3) ノックアウトおよびノックインマウスの作成によって個体レベルでの影響を探る。ノックアウトおよびノックインマウスを作成し、血小板 kinetics と血栓誘発能を検討する。

(4) 血小板減少と血栓性素因を併発している患者群での原因遺伝子関連疾患を検索する。血小板減少と血栓傾向の併発患者群に対し、同定遺伝子変異の有無と血小板機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 原因遺伝子の同定

原因遺伝子を同定するために全エクソンを網羅的に解析するエクソーム解析を行った。その結果、G 蛋白共役型受容体の一つである GPR25 の点突然変異を見出した。この遺伝子異常の発現と血小板減少・血栓症が出現

している表現型は家系内で完全に一致していたことから GPR25 が原因遺伝子ではないかと考えられた。

(2) 患者血小板機能の解析

患者血小板を用いた活性化機能の検討では血小板凝集受容体の活性化や血小板放出反応に異常は見られなかったが、生理的アゴニストによる血小板凝集塊の構造が緻密となっていて、患者血小板は凝集しやすくかつ強固な凝集塊が形成されていることがわかった。これらのことから、GPR25 遺伝子の異常が GPR25 受容体から血小板内に何らかの細胞内活性化シグナルを発生させ、血小板凝集を促進・安定化させていることが推察された。

(3) モノクローナル抗体の作成と解析

GPR25 に対するモノクローナル抗体を作成し、それを用いて血小板表面に GPR25 が発現していることを証明した。このモノクローナル抗体は血小板機能には影響をおよぼさなかった。

(4) 遺伝子改変マウスの作成

この遺伝子異常を導入したトランスジェニックマウスを作成したところ、一部のマウスに血小板減少がみられたものの個体差があり、GPR25 を原因遺伝子の変異であると断定するほどの実験結果は得られなかった。これはトランスジェニックマウスでの遺伝子発現がランダムに生じるため、一定した結果が得られないためではないかと考えられた。そのため、我々は GPR25 変異のノックインマウスおよびノックアウトマウスを作成して、GPR25 の生理的役割を探っている。

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 6 件)

1. Mori S, Yamanouchi J, Okamoto K, Hato T, Yasukawa M: A novel frameshift mutation leading to inherited type I antithrombin deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 査読有、28:189-192, 2017

DOI: 10.1097/MBC.0000000000000555

2. Yamanouchi J, Hato T, Shiraishi S, Takeuchi K, Yakushijin Y, Yasukawa M: Vancomycin-induced Immune Thrombocytopenia Proven by the Detection of Vancomycin-dependent Anti-platelet Antibody with Flow Cytometry. *Intern Med*, 査読有、55:3035-3038, 2016 DOI: 10.2169/internalmedicine.55.6902
3. Yamanouchi J, Hato T, Kunishima S, Niiya T, Nakamura H, Yasukawa M: A novel MYH9 mutation in a patient with MYH9 disorders and platelet size-specific effect of romiplostim on macrothrombocytopenia. *Ann Hematol*, 査読有、94:1599-1600, 2015 DOI: 10.1007/s00277-015-2416-x
4. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Sato Y, Onishi S, Yasukawa M: Development of exogenous FVIII-specific inhibitor in a mild hemophilia patient with Glu272Lys mutation. *Haemophilia*, 査読有、20:e179-182, 2014. DOI: 10.1111/hae.12363
5. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Azuma T, Yasukawa M: Severe immune thrombocytopenia secondary to Waldenström's macroglobulinemia with anti-GPIb/IX monoclonal IgM antibody. *Ann Hematol*, 査読有、93:711-712, 2014. DOI: 10.1007/s00277-013-1857-3
6. Yamanouchi J, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M: Dramatic and prompt efficacy of *Helicobacter pylori* eradication in the treatment of severe refractory iron deficiency anemia in adults. *Ann Hematol*, 査読有、93:1779-1780, 2014 DOI: 10.1007/s00277-014-2052-x

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Yamanouchi J, Hato T, Ikeda Y, Asai H, Matsubara E, Tanimoto K, Takeuchi T, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: High serum thrombopoietin levels in a favorable subpopulation of MDS with thrombocytopenia 第 78 回日本血液学会学術集会 2016.10.13 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
2. Yamanouchi J, Hato T, Matsubara E, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Function of Integrin IIb 3 in Essential Thrombocythemia with Calreticulin Mutation. 57th annual meeting of American Society of Hematology 2015.12.7 Orlando, USA
3. Yamanouchi J, Hato T, Nakanishi H, Asai H, Matsubara E, Tanimoto K, Takeuchi K, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Effect of calreticulin mutation on integrin α IIb β 3 function. 第 77 回日本血液学会学術集会 2015.10.16 石川県立音楽堂、石川県金沢市
4. Yamanouchi J, Hato T, Yasukawa M: ASSOCIATION OF PLATELET RESPONSE TO CILOSTAZOL WITH CLINICAL OUTCOME AND CYP GENOTYPES IN PATIENTS WITH CEREBRAL INFARCTION. 25th International Society of Thrombosis and Haemostasis Congress, 2015.6.22 Toronto, Canada
5. 山之内純、羽藤高明 VASP リン酸化測定によるシロスタゾール薬効判定と脳梗塞再発および CYP 遺伝子多型との関連 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015.5.23 甲府市総合市民会館、山梨県甲府市
6. Jun Yamanouchi, Takaaki Hato, Etsuko Matsubara, Taichi Azuma, Hideyuki

Nakanishi, Hiroshi Fujiwara, Yoshihiro Yakushijin, Masaki Yasukawa: Activation status of integrin α IIb β 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation. The 56th annual meeting of American Society of Hematology 2014.12.8 San Francisco, USA

7. 山之内純、羽藤高明、中西英元、浅井洋晶、松原悦子、谷本一史、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、安川正貴 Activation status of integrin α IIb β 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation 第 76 回日本血液学会総会 2014.10.31 大阪国際会議場、大阪市北区
8. 山之内純、羽藤高明 クロピドグレル服用脳梗塞患者での VASP assay に対する CYP 遺伝子多型とシロスタゾール併用の影響 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、大阪市天王寺区

〔図書〕(計 7 件)

1. 羽藤高明 血小板輸血に関する最近の理解 Annual Review 2016 血液 198-204, 2016 中外医学社、東京
2. 羽藤高明 HUS/TTP と DIC の鑑別 腎と透析 診療指針 2016 454-457, 2016 東京医学社、東京
3. 羽藤高明 血栓性血小板減少性紫斑病 今日の治療指針 2014 PP654-655, 2014 医学書院 東京
4. 羽藤高明 先天性および後天性血管障害による出血 血液疾患最新の治療 2014-2016 pp217-220, 2014 南江堂 東京
5. 羽藤高明 血小板輸血の適応とそのピットフォール 出血性疾患の実践診療マニュアル pp59-64, 2014 南江堂 東京

6. 羽藤高明 新鮮凍結血漿の適応とそのピ
ットフォール 出血性疾患の実践診療
マニュアル pp65-70, 2014 南江堂
東京

7. 羽藤高明 凝固因子製剤の分類とその適
応 出血性疾患の実践診療マニュアル
pp71-77, 2014 南江堂 東京

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽藤 高明 (Hato, Takaaki)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30172943

(2) 研究分担者

山之内 純 (Yamanouchi, Jun)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10423451

(3) 連携研究者

安川 正貴 (Yasukawa, Masaki)
愛媛大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60127917