

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860805

研究課題名(和文)先天性血小板減少症の責任遺伝子同定と病態解析

研究課題名(英文) Identification of disease gene and pathologic analysis of congenital thrombocytopenia

研究代表者

小林 良行 (Kobayashi, Yoshiyuki)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号：20723290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：先天性血小板減少症の新規責任遺伝子の同定を試みたが、検討症例では新規責任遺伝子同定には至らなかった。また、血小板減少及び機能異常の機序を解明する目的でインテグリンシグナルの下流の蛋白の機能解析を行い、RhoAシグナルの関連性は示唆されたが、その他のシグナル経路の関与は証明できなかった。インテグリンシグナルの下流の経路の関与が証明できれば、今後の先天性血小板減少症患者の治療・管理に直結する有益な成果となりうると考えている。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify new candidate gene of thrombocytopenia, but we could not identify disease gene in our study cases. We also performed functional analysis of integrin outside-in signal to elucidate the mechanism of thrombocytopenia and platelet dysfunction. As the mechanism of them, the relevance of inactivation of RhoA signaling has been suggested, but the involvement of other signaling pathways could not be proven. Further investigations are necessary to elucidate the mechanism and obtain the beneficial outcome in the treatment and management of patients.

研究分野：小児科

キーワード：血小板減少症 インテグリンシグナル 恒常的活性化状態

1. 研究開始当初の背景

止血機構に重要な役割を果たす血小板の異常は量的異常と質的異常に大別でき、さらに先天性と後天性に分けることができる。量的異常である血小板減少症の病因は多様で、多くものは後天性要因によるものであると考えられてきたが近年、先天性要因によるものが稀ではないことが明らかになってきた。近年の分子遺伝学の発達により種々の先天性血小板異常症の原因遺伝子が同定され、これまで慢性特発性血小板減少症とされてきた症例の遺伝学的検討を含めた診断の見直しが行われるようになってきている。しかしながら、依然として原因遺伝子の不明な疾患や分子病態が明らかになっていない疾患は多いといわざるを得ない状況である。本邦における先天性血小板減少症の最近の報告では、確定診断に至る例の半数以上を MYH9 異常症と Bernard-Soulier 症候群が占めており、*ITGA2B/ITGB3* 遺伝子異常による症例は 5%程度と考えられている。一方で残りの 30%程度の症例は遺伝子異常が同定されていない。さらに慢性特発性血小板減少症とされている症例を含めると診断未確定症例が数多く存在していると予想される。*ITGB3* 遺伝子はインテグリン β_3 をコードする遺伝子であり、インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa 複合体) はフィブリノゲン (Fg) とフォンヴィレブランド因子 (VWF) の受容体である。従来から本受容体の先天性欠損では Glanzman 血小板無力症を引き起こすことがよく知られており先天性血小板減少症の原因とはならないと考えられていた。しかし近年、*ITGB3* 遺伝子の細胞膜周辺領域のヘテロ接合性変異が、巨大血小板を伴う血小板減少症に関わっていることが報告された¹⁾⁻³⁾。我々は、先天性血小板減少症家系例において *ITGB3* 遺伝子の細胞膜周辺領域のヘテロ接合性変異を同定し報告した。この症例で血小板凝集能が低下することを同定し、インテグリン下流の RhoA シグナルの持続的抑制のため、巨核球からの異常な胞体突起形成が促進されることで正常な血小板の産生が阻害され、最終的に血小板形態異常、血小板減少につながる可能性を明らかにした。しかし依然として血小板減少及び形態異常を来す分子メカニズムは不明である。

(参考文献)

- 1) Ghevaert C, et al. (2008) *Blood*, 111, 3407-3414
- 2) Jayo, A, et al. (2010) *Haematologica*, 95, 1158-1166.
- 3) Kunishima, S, et al. (2011) *Blood*, 117, 5479-5484 .

2. 研究の目的

慢性血小板減少症例を集積し先天性血小板減少症のスクリーニングを行う。先天性血小板減少症が疑われる症例について、血小板機能解析から候補責任遺伝子を絞り込み遺伝子解析を行う。さらに既存の遺伝子変異が同定できない症例を対象に次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による網羅的な解析により、新規責任遺伝子の同定を行う。我々は以前の報告で、インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa 複合体) の下流のシグナルに着目し RhoA シグナルの持続的抑制により、巨核球の伸展反応が促進することを明らかにした。しかし依然として血小板減少及び形態異常を来す分子メカニズムは不明である。インテグリンシグナルの下流は RhoA 以外にも多くのタンパク質が関与しており、様々なシグナルがクロストークしている。我々は、本変異が RhoA 以外のシグナル伝達に対しても影響を及ぼしており、それらが血小板減少の原因の一端を担っていると考えている。その作業仮説に基づいて、シグナル伝達経路を網羅的に解析することで、血小板減少、形態異常の原因の追究を行う。先天性血小板減少症は正確な診断に至っていない症例が多いと考えられ、正確な診断は、予後の予測、適切な治療の選択、これまで行われてきた不要な治療の中止などにつながると考えられる。そのため、今回の研究は患者の疾患管理に直結した大変意義深い研究と考えている。

3. 研究の方法

先天性血小板減少症が疑われる症例を対象に、塗抹標本による血小板形態や色調の評価、白血球封入体の有無の観察、ADP やコラーゲン、リストセチンによる凝集能検査を行う。また、フローサイトメトリーを用いて GPIb/IX と GPIIb/IIIa の血小板表面への発現や血小板活性化状態についても検討しスクリーニングを行う。スクリーニングを行なった上で Sanger 法にて既存の遺伝子変異 (*GP1BA*, *GP1BB*, *GP9*, *MYH9*, *ITGA2B*, *ITGB3*, *VWF*, *TUBB1* など) の同定を行う。候補遺伝子のアプローチを行うとともに、遺伝子変異を認めない症例において次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析により責任遺伝子の同定を試みる。また、*ITGB3* 遺伝子変異を認めた症例の解析では、変異インテグリン (T562N, D723H, L718P) 安定発現細胞株を用いて *ITGB3* 変異が血小板減少をきたす分子病態を明らかにする。インテグリンシグナル伝達に及ぼす影響について下流の cSrc, FAK, RhoA シグナルを ELISA 法、免疫沈降/ウエスタンブロット法などを用いて検討していく。具体的にはウエスタンブロットにて RhoA 発現の解析、免疫沈降/ウエスタンブロット法を用いて FAK や cSrc のリン酸化及び脱リン酸化の状態の検討、また ELISA 法を用いて RhoA シグナル

の活性化状態を検討する。また巨核球からの胞体突起、血小板形成に至る過程を免疫染色を用いて蛍光顕微鏡で観察を行う。

4. 研究成果

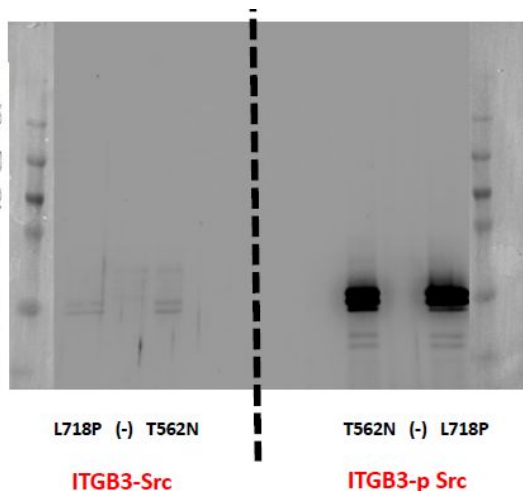
a. 先天性血小板減少症、機能異常症が疑われる症例を対象とした責任遺伝子解析

出血傾向を来していた血小板機能異常症と考えられる1男児例に関して、健常者と考えられた罹患児の母の検体と併せて次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析を施行した。データベース dbSNP に登録されている SNP を除外したミスセンス変異の数は 332 個まで絞り込まれたが、責任遺伝子の同定に至らず、現在も解析中である。

また、小児期より ITP と診断され、慢性的に血小板減少をきたしている母体より出生した新生児が血小板数 1 万/ μ l から 3 万/ μ l と著明な血小板数低下を来しており、回復を認めなかったため、解析を施行したが、生後 3 か月頃より血小板数の改善を認めたという症例もあった。

b. インテグリンシグナル伝達に及ぼす影響に関して免疫沈降/ウエスタンブロット法を用いた検討

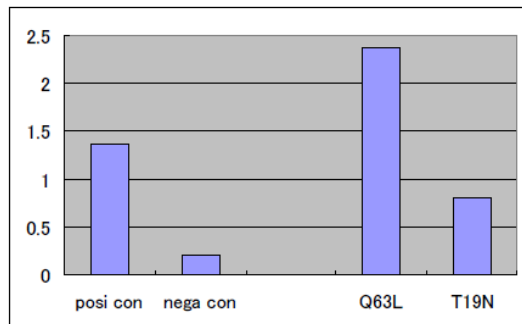
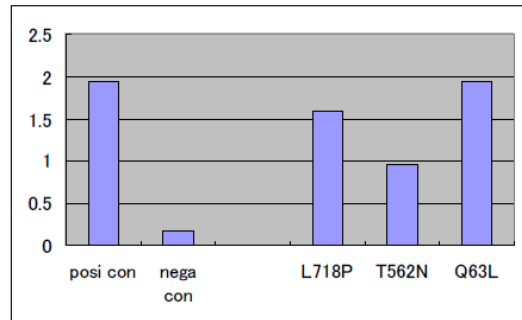
(figure 1)リン酸化 Src は、ITGB3 の恒常的部分活性型変異体である L718P 変異体で同定され、恒常的完全活性型変異体である T562N では同定されないという仮説に基づいた実験であったが、リン酸化 Src はともに同定できず、インテグリン下流シグナルにおける Src の関連性について、証明できなかった。



c. ELISA 法を用いた RhoA シグナルの活性化状態の検討

(figure 2,3)

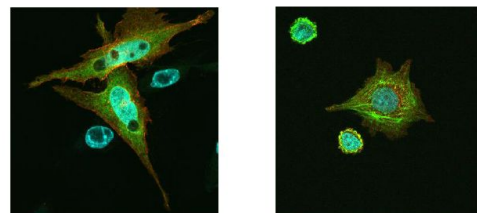
RhoA の恒常的活性型変異体 (Q63L) と優性阻害型変異体 (T19N) を用いて検討したが、ITGB3 の恒常的部分活性型変異体である L718P 変異体では、恒常的活性型変異体と比較して RhoA の活性化状態が低いことを確認した。本検討は複数回行い、同様の結果を得られた。



d. 安定発現細胞株を用いた免疫染色

(figure 4)

L718P 変異体が CHO-K1 細胞に stable に発現する系を確立し、固相化 fibrinogen 上で異常な胞体突起様の形態を示すことを確認した。



e. 考察および今後の展開

インテグリンシグナルの下流は RhoA, Src, FAK 以外にも多くのタンパク質が関与しており、様々なシグナルがクロストークしている。L718P 変異は RhoA 以外のシグナル伝達に対しても影響を及ぼしており、それらが血小板減少の原因の一端を担っていると考えていたが、血小板減少、形態異常の原因となるシグナル伝達経路を証明することは困難であった。

先天性血小板減少症の病因、病態の解析が詳細に行われれば、正確な診断、適切な治療選択、不要な治療介入の回避につながると考える。具体的には、これまでに慢性免疫性血小板減少症として グロブリン治療や摘脾などが行われていた症例では、薬剤による副反応や易感染性などの有害事象を認めていた可能性があり、回避できる。また、その他に具体的な治療選択肢として血小板輸血、造血幹細胞移植、遺伝子治療、DDAVP 製剤、TPO 受容体アゴニストなどがあげられるが、頻回の血小板輸血では抗体産生による以後の血小板輸血不応状態のリスクが回避できず、その他の治療も効果やリスクの面から大きな問題を抱えている。TPO 受容体アゴニストに関しては近年、*MYH9* 遺伝子異常に伴う血小板減少症において、血小板数増加の報告があり、投与により出血リスクを回避できる可能性が注目されている。本研究の成果により *ITGA2B/ITGB3* 遺伝子異常に伴う血小板減少症でも同様の機序が証明できれば、治療薬としての選択も考慮できる可能性が高くなるというメリットがあり、今後の先天性血小板減少症患者の治療・管理に直結する有益な成果となりうると考えている。

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)

[学会発表](計 1 件)

小林良行, インテグリン β 3(GP111a) 遺伝子変異を同定できた先天性血小板減少症の 2 家系, 第 117 回日本小児科学会学術集会, 2014 年 4 月 11-13 日, 名古屋国際会議場.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 良行 (KOBAYASHI YOSHIYUKI)

広島大学病院・医科診療医

研究者番号: 20723290