

平成21年 4月 23日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591109  
 研究課題名（和文） 新規実験システムの構築とそれを用いた $\alpha_{11b}\beta_3$ 機能制御機構の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanism for  $\alpha_{11b}\beta_3$  function by employing newly developed experimental system.  
 研究代表者  
 富山 佳昭 (TOMIYAMA YOSHIAKI)  
 大阪大学・医学部附属病院・講師  
 研究者番号：80252667

## 研究成果の概要：

本研究において、申請者らはインテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ に関して新たにリガンドカイネティックアッセイを開発し、種々のアゴニスト刺激における $\alpha_{11b}\beta_3$ のダイナミックな解析を行った。さらに巨核球系細胞株であるCMK細胞を用いた遺伝子操作可能な実験系も確立した。これらの実験系を用いて、ADP受容体P2Y<sub>12</sub>は初期の $\alpha_{11b}\beta_3$ 活性化には必須ではないが、活性化の維持に重要であること、Semaphorin 3A (Sema 3A)は、アゴニスト刺激によるAktの活性化およびRap1Bの活性化を抑制することが明らかになった。

以上より、P2Y<sub>12</sub>が $\alpha_{11b}\beta_3$ 活性化の維持に必須の分子であり、Sema 3Aが血小板機能の負の制御因子として機能していることが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：インテグリン、 $\alpha_{11b}\beta_3$ 、P2Y<sub>12</sub>、巨核系細胞株、CMK

## 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞など動脈硬化を基盤とした動脈血栓症は、現代社会における高齢化やメタボリックシンドロームの増加に伴い著しく増加しており、本邦のみならず世界の死因の約30%を占める極めて重大な疾病である。この現状からも、血管病、

特に動脈血栓性疾患の発症抑制およびその制御法の開発は現代医療に課せられた最重要課題の一つであると言える。血小板は動脈血栓発症の中核を形成するだけでなく、IL-1 $\beta$ やMCP-1、CD40L、SDF-1などのサイトカインを放出し動脈硬化進展や血管新生に大きく関与していることが最

近明らかとなってきた。このように血小板機能の制御機構を解明し機能制御における標的分子を同定することは、血管病発症を制御する上で必須のことと考えられる。

止血および病的血栓の分子機構としては、コラーゲンやADPなどの血小板活性化物質に対する受容体からの血小板活性化シグナルと血小板表面上の種々の接着分子が協調して作働し血栓を形成すること、さらにインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa)が血小板凝集に必須であることが明らかにされている。しかしながら、傷害部位において血栓は無限に増大するのではなく、その大きさは限定される。このことから、血栓形成は血小板活性化機構だけでなくその抑制機構とのバランスにより制御されていることは容易に想像される。しかしながら、NOやプロスタサイクリン以外の血小板機能抑制分子に関しての知見は皆無に等しいのが現状である。また、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ はダイナミックにその機能を変化させているが、このカイネティクスに関する詳細も不明のままである。

## 2. 研究の目的

申請者らは、現在までの研究成果として、P2Y<sub>12</sub>受容体欠損患者の詳細な解析を基盤として1)ADP-P2Y<sub>12</sub>システムがほとんど全ての血小板アゴニスト刺激時の $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の維持機構に必須であることを明らかにし、P2Y<sub>12</sub>が血栓サイズを規定するセンサーとして作動していることを提唱した。2)CMK細胞を用いて分化に伴う遺伝子変化の網羅的解析結果を基盤として、新たな $\alpha_{IIb}\beta_3$ 機能抑制分子(あるいは血小板機能制御分子)として以下の分子の同定に成功している(SHPS-1-CD47システム、Semaphorin 3A、Adiponectin)。本研究では、上記の成果を踏まえ、血小板機能、特に $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化制御機構のさらなる解明をめざし、従来検出されていなかったダイナミックに変化する $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化を検出する新たな有核細胞を用いた実験系を構築することを目指し、さらには血小板機能制御分子の分子機構を解明し、新たな抗血栓療法の創生に寄与することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1). $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の新規実験システムの構築

$\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化の検出は、そのindicatorであるFITC標識-PAC-1抗体の結合が定常状態に達するまでに30分を要するため、ダイナミックな変化を検出しえない。新規実験系では、従来の結合実験を改変し、ダイナミックな $\alpha_{IIb}\beta_3$ 機能変化を検出するために、巨核系細胞をPAR1にて刺激後、30秒ごとにFACSにて瞬時にPAC-1結合量を測定する新たな解析法(リガンドカイネティックアッセイ)を行なう。この系を用いてCMK巨核球細胞株や培養巨核球における $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の時間軸解析を行う。

### (2). 血小板機能制御分子の分子機構の解析

スタンダードな実験手法および新規実験システムを用いて以下の検討を行なう。

①P2Y<sub>12</sub>欠損血小板での $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の時間軸解析

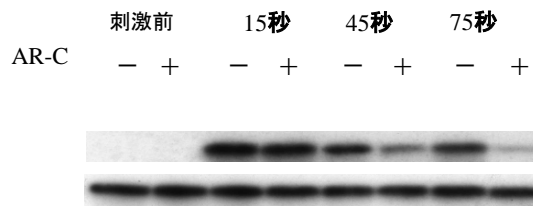
②CMK細胞を用いて、種々の遺伝子導入実験を行い、候補分子の機能を明らかにする。

③Semaphorin 3A(Sema 3A)、アディポネクチン、SHPS-1の血小板やCMK細胞に及ぼす作用を解析する。

## 4. 研究成果

本研究においては、新たにリガンドカイネティックアッセイを開発し、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ のダイナミックな変化を詳細に解析した。その結果、P2Y<sub>12</sub>欠損血小板の刺激直後のリガンド結合速度は正常コントロールと差を認めなかった。30秒後では、正常コントロールでは結合速度が増加したが、P2Y<sub>12</sub>欠損血小板ではリガンド結合速度が低下し、150秒後ではその速度は著明に減少した。さらにそのシグナル伝達において、P2Y<sub>12</sub>欠損血小板においては刺激初期のRap1Bの活性化は惹起されるものの、その活性化が維持できないことも明らかになった。これらの結果は、P2Y<sub>12</sub>阻害剤であるARC69931MX (AR-C)を用いても再現された。下図は血小板を50 $\mu$ M PAR1ペプチドにて刺激したときのRap1の活性化を示しているが、P2Y<sub>12</sub>阻害剤の存在時においてもRap1の活性化は十分に惹起されるが、その活性化の持続時間がコントロールと較べ極めて短時間であった。このRap1活性化の時間的な変動は、

P2Y<sub>12</sub>欠損血小板において刺激直後の $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ 活性化が正常コントロール血小板と比べ差を認めなかった成績と合致するものである。



上段：活性化型Rap1、下段：Rap1全体

さらに、培養巨核球のみならず巨核系細胞株CMKにおいても生理的なPAR1刺激において3~5分をピークとして一過性に $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ が活性化することを明らかにした。この活性化はP2Y<sub>12</sub>阻害剤ARC69931MXによっても抑制されなかった。このCMK細胞にP2Y<sub>12</sub>を発現させると、 $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ の活性化の持続時間が延長した。以上より、巨核球においては、少なくとも機能的なP2Y<sub>12</sub>は発現しておらず、そのため $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ は一過性に活性化するのみであることが示された。

一方、Semaphorin 3A (Sema 3A) は $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ の初期活性化を抑制し、さらに放出反応も抑制するなど血小板機能を広範に抑制するが、その作用としてGPCRを介した刺激としてトロンビン、GPCRを介さない刺激としてconvulxin (CVX) によるGPVIからのシグナル伝達を解析した。その結果、Sema 3AがこれらのアゴニストによるAktの活性化およびRap1Bの活性化を抑制することが明らかになった。一方、Sema 3Aはトロンビンによる細胞内Caイオン上昇は抑制しないが、CVXによる細胞内Caイオン上昇を若干抑制した。

以上より、P2Y<sub>12</sub>が $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ 活性化の維持に必須の分子であり、Sema 3Aが血小板機能の負の制御因子として機能していることが明らかになった。

## 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 8 件)

- ① 富山佳昭：特発性血小板減少性紫斑病. 臨床血液 49(10):14-21, 2008 査読有
- ② 富山佳昭：造血障害に対する免疫抑制療

法：特発性血小板減少性紫斑病. 血液フロンティア 18(7):87-93, 2008 査読無

- ③ 富山佳昭：抗血小板薬の種類とその作用機序. Clinician 567:18-22, 2008 査読無
- ④ Masaie H, Oritani K, Yokota T, Takahashi I, Shirogane T, Ujii H, Ichii M, Saitoh N, Maeda T, Tanigawa R, Oka K, Hoshida Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Adiponectin binds to chemokines via the globular head and modulates interactions between chemokines and heparan sulfates. Exp Hematol. 35(6):947-956, 2007 査読有
- ⑤ 富山佳昭：紫斑の種類と病因. 日本血栓止血学会誌 18(6):559-562, 2007 査読無
- ⑥ 柏木浩和, 富山佳昭：Semaphorin 3Aによる血小板機能抑制. Angiology Frontier6(3):18-24, 2007 査読無
- ⑦ 富山佳昭：血栓形成のメカニズム up-to-date. Angiology Frontier6(3):11-17, 2007 査読無
- ⑧ 富山佳昭, 倉田義之：血液疾患をどのように診断するか：血小板減少症. モダンフイジシャン 27(4):511-514, 2007 査読無

[学会発表] (計 16 件)

- ① The American Society of Hematology 50th Annual meeting (2008.12.6-9, San Francisco, USA, Kaushansky K)  
Tadokoro S, Shiraga M, Kashiwagi H, Kamae T, Akiyama M, Nakazawa T, Kanakura Y, Tomiyama Y: (Poster) A role for  $\alpha$ -actinin in inside-out  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$  signaling.
- ② 第31回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11.20-22, 大阪, 松尾 理)  
富山佳昭：(教育講演) 血栓形成の分子機構：促進機構と抑制機構。
- ③ 第31回日本血栓止血学会学術集会 (2008.11.20-22, 大阪, 松尾 理) 本田 繁則, 池島裕子, 田所誠司, 前田祐輔, 木下タロウ, 富山佳昭, 宮田敏行. (学術推進 SPC シンポジウム) 発現クローニングによるインテグリン機能発現分子の同定。
- ④ 49th Korean Society of Hematology Meeting (2008.11.1, Jeju, Korea, Cho HC)  
Tomiyama Y: (Education Session) Positive or negative regulatory system for platelet function.
- ⑤ 第70回日本血液学会総会 (2008.10.10-12, 京都, 須田年生)

- 富山佳昭：(教育講演) 特発性血小板減少性紫斑病。
- ⑥ 第 70 回日本血液学会総会  
(2008. 10. 10-12, 京都, 須田年生)  
白鹿正通, 釜江 剛, 中澤剛士, 秋山正夫, 田所誠司, 柏木浩和, 本田繁則, 富山佳昭, 金倉 讓: (口演) インテグリン  $\alpha_{IIB}\beta_3$  機能における P2Y<sub>12</sub> の役割 - $\alpha_{IIB}\beta_3$  と rap1 活性化の同期性-
- ⑦ 第 70 回日本血液学会総会  
(2008. 10. 10-12, 京都, 須田年生)  
本田繁則, 田所誠司, 前田裕輔, 富山佳昭, 木下タロウ, 宮田敏行. (優秀ポスター) 変異導入法を用いたインテグリン機能発現分子の同定.
- ⑧ 5th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis (2008.9.18, Singapore, Republic of Singapore, Tien SL)  
Tomiya Y.: (Plenary session) Positive or negative regulatory system for platelet function.
- ⑨ 第 56 回日本輸血・細胞治療学会総会  
(2008. 4. 25-27, 福岡, 佐川公矯)  
秋山正夫, 柏木浩和, 東道公人, 田所誠司, 金倉 讓, 富山佳昭: (一般口演) 抗 GPVI 抗体に起因すると思われる GPVI 欠損症の一例.
- ⑩ 第 72 回日本循環器学会総会  
(2008. 3. 28-30, 福岡, 松崎益徳)  
富山佳昭 (ランチョンセミナー) 血栓形成の分子機構: ADP 受容体 P2Y<sub>12</sub> の役割.
- ⑪ 第 30 回日本血栓止血学会学術集会  
(2007. 11. 15-17, 三重, 鈴木宏治)  
田所誠司, 秋山正夫, 釜江 剛, 白鹿正通, 柏木浩和, 富山佳昭, 金倉 讓 (口演)  $\alpha$ -Actinin による血小板インテグリン  $\alpha_{IIB}\beta_3$  活性化制御機構の解析.
- ⑫ 第 30 回日本血栓止血学会学術集会  
(2007. 11. 15-17, 三重, 鈴木宏治)  
秋山正夫, 柏木浩和, 東道公人, 清沢伸幸, 東道伸二郎, 諸井将明, 釜江 剛, 田所誠司, 白鹿正通, 富山佳昭, 金倉 讓: (ポスター) 抗 GPVI 抗体に起因すると思われる GPVI 欠損症の一例.
- ⑬ 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会 (2007. 10. 11-13, 横浜, 堀田知光・押味和夫) 田所誠司, 秋山正夫, 釜江 剛, 白鹿正通, 柏木浩和, 富山佳昭, 金倉 讓: (口演) Talin と  $\alpha$ -actinin

による血小板インテグリン  $\alpha_{IIB}\beta_3$  活性化調節機構の解析.

- ⑭ 第 39 回日本動脈硬化学会総会・学術集会  
(2007. 7. 13-14, 大阪, 上田真喜子)  
富山佳昭: (シンポジウム) アテローム血栓症発症における血小板の役割: アディポネクチンの抗血栓作用.
- ⑮ XXI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2007.7.6-12, Geneva, Switzerland, Bounameaux H)  
Akiyama M, Kashiwagi H, Kamae T, Tadokoro S, Shiraga M, Tomiya Y, Kanakura Y: Semaphorin 3A antagonizes agonist-induced PI3 kinase pathway in platelets (Oral)
- ⑯ The 5th Aso International Meeting  
(2007.5.17-19, Aso, Japan, Saito H)  
Akiyama M, Kashiwagi H, Kamae T, Tadokoro S, Shiraga M, Tomiya Y: Semaphorin 3A inhibits platelet function via PI3 kinase-dependent pathways.(Poster)

[図書] (計 1 件)

1. Tomiya Y, Shiraga M, Kashiwagi H: Positive and negative regulation of integrin function. In Tanaka K and Davie EW, eds. Recent advance in thrombosis and hemostasis. Springer Japan KK, Japan, Tokyo, pp243-252, 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富山 佳昭 (TOMIYAMA YOSHIAKI)  
大阪大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 80252667

### (2) 研究分担者

織谷 健司 (ORITANI KENJI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号: 70324762

柏木 浩和 (KASHIWAGI HIROKAZU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 10432535