

令和元年5月29日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09829

研究課題名(和文)先天性血小板減少症の新規原因GPR遺伝子とその機能解析

研究課題名(英文)Analysis of a novel GPR gene responsible for inherited thrombocytopenia

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血栓症を合併した先天性血小板減少症患者でGPR25遺伝子に新たな変異(c.764G>T:p.G255V)を認めた。GPR25を認識するモノクローナル抗体を作製し、GPR25が血小板表面に発現していることを確認した。患者の血小板は、リガンド結合能、p-selectinの発現は、健康者と比較して、やや亢進しているものの、有意差は認めなかった。しかし、血小板凝集試験では、ADPやcollagenでの刺激で、患者血小板は凝集が亢進していた。私達が作製したGPR25変異トランスジェニックマウスで網羅的にマウス体内での血栓形成を各臓器の組織切片を作って観察したが、残念ながら血栓形成は観察できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回発見した家系は動静脈血栓症が多発している点の特徴であり、このような病態を伴った先天性血小板減少症家系の報告はない。本家系のGPR25遺伝子変異が血小板減少と血栓性素因を関連づける原因になっているのではないかと推測しており、新たな先天性血小板減少症として独立した疾患概念を確立することができる。原因不明の先天性血小板減少症の患者はITPと診断されていることが多いが、新たな血小板減少症の遺伝子診断が可能になれば、ITPと診断されている患者の中から別の単一疾患を分離できることになり、必要ないITPとしての治療(免疫抑制剤やトロンボポエチン受容体作動薬など)を避けることができるようになる。

研究成果の概要(英文)：I identified a heterozygous change (c.764G>T:p.G255V) in GPR25 gene, an uncharacterized G protein-coupled receptor. I generated anti-GPR25 monoclonal antibodies and confirmed that GPR25 was expressed on the platelet surface. The patient's platelets showed the same level of PAC1 (a monoclonal antibody recognizing the active conformation of integrin 11b/3) binding and P-selectin expression as platelets from healthy subjects. However, ADP-induced and collagen-induced aggregation of patient's washed platelets was enhanced as compared with normal washed platelets.

研究分野：血液内科

キーワード：先天性血小板減少症 血栓症 GPR25

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 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疾患であり、これまでに19の原因遺伝子が同定されている。この中には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のように眼や耳などの感覚器障害および腎機能障害をきたす遺伝子がある。このことは、先天性血小板減少症の原因遺伝子を同定する研究を行うことで、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同定できる可能性が高いことを示唆している。しかしながら、未だ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。申請者は血小板減少症患者の原因遺伝子解析を一貫して行っており、これまでにMYH9、GPIIb $\alpha$ 、GPIX、TUBB1、ANKRD26の遺伝子異常を明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

先天性血小板減少症の新規原因遺伝子 G protein-coupled receptor gene (GPR) を解析することにより、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。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疾患であるが、その約半数は原因遺伝子が不明である。申請者は、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。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ため、本家系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、次世代シーケンス解析を行い、特定の GPR 遺伝子に変異を見出した。この候補遺伝子の解析により、新たな血小板減少症の病態が解明できるとともに血栓形成の新たな機構が明らかにできることが期待される。

## 3. 研究の方法

まずは、本家系の血小板減少患者で血小板機能を検討する。次に、GPR遺伝子変異体を作成し、野生型と変異体のGPRをそれぞれインテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3が発現しているCHO細胞に遺伝子導入し、リガンド結合能、細胞接着能について検討する。

マウス ES 細胞において GPR 遺伝子を siRNA の導入によりノックダウンした後、GPR 遺伝子変異を導入し、その分化増殖における影響を検討する。さらに、近頃作製した GPR 変異トランスジェニックマウスと GPR 野生型トランスジェニックマウスの生体内での造血機能に対する影響や血栓形成機序に関する検討も行う。

## 4. 研究成果

GPR25 遺伝子変異を有する患者での血小板機能検査を行った。血小板凝集試験では、血小板数を 20 万/ $\mu$ L に調節した後、ADP 10 $\mu$ M 刺激時、collagen 3 $\mu$ g/mL 刺激時で、患者血小板は凝集が亢進していた。リガンド結合能、血小板 p-selectin の発現は、健常者と比較して、やや亢進しているものの、有意差は認めなかった。GPR25 は血小板表面に発現していることは、私達が作製した抗 GPR25 モノクローナル抗体で確認した。

また、GPR25 遺伝子変異が血栓形成に重要な役割を果たすインテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3 の活性化に及ぼす影響について検討した。まず、作成済みの GPR25 遺伝子の変異体を用い、野生型と変異型をそれぞれインテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3 が発現している CHO 細胞に遺伝子導入し、リガンド結合能 (PAC1 結合、フィブリノゲン結合) について検討するとともに、細胞接着能についても検討した。

そして、近頃作製した GPR25 変異トランスジェニックマウスを用い、まずは、血小板数を検討したが、血小板数が減少している個体や正常の個体など様々であった。その上、網羅的にマウス体内での血栓形成を各臓器の組織切片を作って観察したが、残念ながら血栓形成は観察できなかった。そこで、GPR25 遺伝子を欠損した条件下での検討を進めることを計画している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

山之内純、【自己抗体による出血・血栓:基礎と臨床の現状】 特発性血小板減少性紫斑病、  
日本血栓止血学会誌、査読無、29 巻、2018、281-287

<https://doi.org/10.2491/jjsth.29.281>

〔学会発表〕(計 3 件)

Yamanouchi, J., Hato, T., Ikeda, Y., Takeda, H., Yasukawa, M.

A heterozygous mutation of G-protein-coupled receptor 25 in a family with inherited  
thrombocytopenia and thrombosis.

XXVI ISTH Congress and 63<sup>rd</sup> Annual SSC Meeting

Berlin, Germany, 2017.7.10

山之内純, 羽藤高明, 池田祐一, 竹田浩之, 安川正貴

先天性血小板減少症と血栓症を有する家系における GPR25 遺伝子変異

第 79 回日本血液学会学術集会

東京, 2017.10.22

Yamanouchi, J., Ikeda, Y., Hato, T., Yasukawa, M., Takenaka, K.

A Heterozygous Mutation of G-Protein-Coupled Receptor 25 in a Family with Inherited  
Thrombocytopenia and Thrombosis

60th ASH Annual Meeting

San Diego, CA, U.S.A. 2018.12.1

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。