

令和 3 年 4 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08326

研究課題名(和文)新規実験システムを用いた血小板インテグリン制御分子の多角的解析とその応用

研究課題名(英文)Characterization of regulatory molecules of platelet integrin function and their clinical application

研究代表者

富山 佳昭(Tomiya, Yoshiaki)

大阪大学・医学部附属病院・特任教授(常勤)

研究者番号：80252667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：3年間の血小板インテグリンの研究成果として、以下の解析を行った。
1. GPIIb-IIIaが欠損するユニークな後天性血小板無力症(aGT)の同定、解析。通常のaGTとは異なり、抗体によりGPIIb-IIIaが欠損する症例の病態を解析した。2. 申請者らが同定したGPIIbのR995Wミスセンス変異に起因する先天性血小板減少症(Blood, 2011)の詳細な病態解析のため、GPIIbR995W変異のノックインマウス(マウスではR990W)の作製と解析を行った。3. 本邦で初めてkindlin-3欠損症を同定し、詳細な解析にてkindlin-3がインテグリン活性化に必須の分子であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。血小板は動脈血栓症の中核を形成するだけでなく、動脈硬化進展や血管新生、組織修復に大きく関与していることが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標的分子を同定することは、出血性疾患の解明のみならず、血管病発症を制御する上で必須のことと考えられる。この観点より本研究では、申請者は稀で示唆に富むヒトの血小板インテグリン IIb₃(GPIIb-IIIa)異常症を同定しその分子異常を解析した。本研究の成果は、より良い血小板機能制御法の開発に寄与するものと確信する。

研究成果の概要(英文)：The objective of this project is to identify and characterize regulatory molecules that are involved in IIb₃ (GPIIb-IIIa) function, especially IIb₃ activation. We focused on investigating human disease or human platelets for this purpose. Firstly, we identified a patient with a unique type of acquired Glanzmann thrombasthenia whose platelets lacked GPIIb-IIIa expression on their platelet surface, but contained significant amounts of GPIIb-IIIa in their inside. We identified autoantibody against GPIIb-IIIa which did not inhibit GPIIb-IIIa function, but may induce GPIIb-IIIa deficiency. Secondly, we characterized IIb(R990W) knock-in mice to reveal the molecular defects of human GPIIb-IIIa related macrothrombocytopenia (in human IIb R995W). Finally, we identified the first Japanese case of kindlin-3 deficiency with severe bleeding tendency from a new born. We demonstrated that kindlin-3 is a prerequisite molecule regarding not only IIb₃ but also L₂ activation.

研究分野：血液内科、血栓止血学

キーワード：GPIIb-IIIa 血小板 inside-outシグナル 活性化変異 kindlin-3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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、動脈硬化進展や血管新生、組織修復に大きく関与していることが明らかとなってきた (Massberg et al. *J Exp Med* 2002, 2006, Gawaz et al. *Blood* 2013)。このように血小板機能の制御機構を解明し標的分子を同定することは、出血性疾患の解明のみならず、血管病発症を制御する上で必須のことと考えられる。

血小板機能の中核をなす分子としてインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa) が知られており、その先天性欠損症が血小板無力症である。申請者の業績であるヒトの先天性血小板機能異常症の病態解析は、遺伝子改変マウス実験での決定的な弱点である「種差間による差異」を克服し、血小板機能を解析する上において極めて有用な情報を提供しうる。この観点から申請者らは、世界で初めて CD36 欠損を同定し (*Blood* 1990, 1994; *J Clin Invest* 1995; *Hum Genet* 2001)、本邦における 50 例にもおよび血小板無力症の解析を行い $\alpha_{IIb}\beta_3$ の機能部位の同定に成功している (*Blood* 1998, 2002, 2003; *J Clin Invest* 1998; *Int J Hematol* 2000 review)。

申請者らは、症例解析により新たな $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化変異を同定し、本研究にてこの異常の詳細を解析することを計画している (*Blood* 2011; *Mol Genet Genomic Med* 2013)。一方、申請者らは本邦で唯一の ADP 受容体 P2Y₁₂ 欠損例や TXA₂ 受容体欠損例、GPVI 欠損例の同定およびその病態解析を行い、ヒトにおける血栓形成における内因性 ADP の重要性を明らかにしてきた (*J Thromb Haemost* 2005, 2006, 2009, 2011)。上記の研究成果より ADP-P2Y₁₂ システムが $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の維持機構に必須であり、P2Y₁₂ が血栓サイズを規定するセンサー分子として作動していることを提唱している。しかしながら $\alpha_{IIb}\beta_3$ 機能発現機構は、その制御分子も含め充分には解明されていない。

本研究では、申請者が継続して取り組んでいる血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ 機能制御に関し、特に出血の副作用を防ぎより安全なインテグリン機能制御をめざし、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化速度変化などの申請者が開発した解析法を中心に $\alpha_{IIb}\beta_3$ の制御分子の解析をおこなう。さらに、申請者が解析を予定している血小板機能異常症は、世界でも稀で貴重な症例であり、その点でも極めてユニークな解析である。

2. 研究の目的

血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の制御分子に関し、申請者が見出した種々の血小板機能異常症や血小板減少症を、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化速度解析や $\alpha_{IIb}\beta_3$ 変異ノックインマウスの解析などを行い、その詳細を明らかにし、最終的には $\alpha_{IIb}\beta_3$ のより良い機能制御法を探索し、より安全で効率的な抗血小板薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

研究は申請者らが見出した 1) $\alpha_{IIb}\beta_3$ の発現が極度に低下しているユニークな後天性血小板無力症症例、2) $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化によるヒトの先天性血小板減少症の病態解析を目的とした $\alpha_{IIb}\beta_3$ 変異ノックインマウスの分子病態の解析、3) $\alpha_{IIb}\beta_3$ inside-out シグナルの中核を担う Kindlin-3 欠損症例の詳細な解析を行う。

上記の解析において申請者が確立した $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の速度解析を用い、シグナル伝達分子異常の $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化機構異常の詳細を明らかにする。

4. 研究成果

1) ユニークな後天性血小板無力症 (aGT) 症例の病態解析

aGT ではその大多数は先天性の血小板無力症とは異なり GPIIb-IIIa は正常に発現しており、リガンド結合を阻害する自己抗体により発症する。申請者らは、GPIIb-IIIa が欠損しているユニークな aGT の病態解析を行った。解析症例は 72 歳、男性の ITP 患者で、50 歳台ごろより血小板数は回復するも、出血症状が悪化してきた。フローサイトメトリー (FCM) による血小板表面の GPIIb-IIIa 発現解析では、健常者の 5% 程度と著減していた。一方、血小板可溶液を用いた Western blot では正常サイズの GPIIb および IIIa の発現を認め、その発現量は健常者の 50~100% 程度であり、血小板表面と血小板内の GPIIb-IIIa 発現量に乖離を認めた。患者血小板解離液および血漿中に抗 GPIIb-IIIa 抗体を認めたが、この抗体は正常血小板のアゴニスト刺激下でのリガンド結合を阻害しなかった。抗体のエピトープ解析では、他の ITP の抗体との相違は明らかではなかった。GPIIb および GPIIIa cDNA の全翻訳領域において遺伝子異常は認めなかった。培養実験において巨核球細胞株や培養巨核球に抗体を作用させると、GPIIb-IIIa の発現が低下する傾向が認められた。解析開始後より 2 年後に患者の出血症状が改善傾向となり、再度 GPIIb-IIIa 発現を検討したところ、FCM にて健常者の 20% 程度まで GPIIb-IIIa 発現の回復を認めた。以上の成績より、本 aGT の病態として GPIIb-IIIa の機能を障害せずその発現を減弱する抗体が、関与していることが示唆された。

2) IIb (GPIIb)変異ノックインマウスの分子病態の解析

申請者らは、軽度の GPIIb-IIIa 活性化と血小板減少を来す症例を発表し、新たに GPIIb-IIIa 関連先天性血小板減少症として報告してきた。その中でも、GPIIb の R995W ミスセンス変異に起因する先天性血小板減少症は本邦においてもっとも頻度が高い変異である (Blood, 2011)。その詳細な病態解析を目的として、GPIIbR995W 変異のノックインマウスモデル(マウスでは R990W)の詳細な解析を行った。血小板数は、この変異導入によりヘテロで約 10%、ホモでは約 25%減少し、血小板サイズは増大した。マウス血小板 GPIIb-IIIa の発現は、ヘテロでは軽度の発現低下(コントロールの 75%発現)であったが、ホモではコントロールの約 3%と血小板無力症に相当するまで著明に低下した。ホモマウスの巨核球 GPIIb-IIIa (コントロールの 60%発現)の解析にて GPIIb-IIIa の恒常的活性化が検出された。ホモマウスを用いて血小板造血能の解析では、巨核球数およびその ploidy には異常はなかったが、ホモマウスにおいて巨核球の proplatelet 形成の有意な減少を認めた。さらに抗 CD42b 抗体 (抗 GPIb 抗体) を投与し血小板減少を誘導しその回復を解析すると、ホモマウスでは投与後 4 日目の回復が遅延した。またトロンボポエチン投与に対する反応を解析すると、ホモマウスでは、その反応に障害が見られた。

以上、マウスモデルではヒトに較べて血小板減少は軽度であったが、血小板減少の機序としては血小板造血、特に巨核球からの proplatelet formation に障害があることが明らかとなった。

3) Kindlin-3 欠損症例の詳細な解析

本邦で初めて見出した kindlin-3 欠損症に関して、詳細な検討を行った。症例は生後 8 か月の女兒 (両親はいとこ婚) で、新生児より広汎な皮下出血を呈していた。 IIb_3 の発現は正常であったが、その活性化は、ADP、PAR1 など検討したすべてのアゴニストに対して高度に障害されていた。CaLDAG-GEFI の発現は正常である一方、kindlin-3 の発現が検出されなかった。kindlin-3 の遺伝子解析より、277 番のトリプトファン(TGG)が 1 塩基置換によりストップコドンに変異 (TAG)して、完全欠損することが判明した。流動下における血小板血栓形成は、高度に障害されており、 IIb_3 が欠損している血小板無力症と比べても、より障害が強かった。好中球における LFA-1 (L_2) 活性化を検討すると、 L_2 インテグリンの活性化も障害されていることが明らかとなった。この成績より kindlin-3 がインテグリン活性化全般に必須の分子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Nishiura N, Banno F, Kokame K, Kato H, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y.	4. 巻 18
2. 論文標題 Knock-in mice bearing constitutively active Ilb(R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Thromb Haemost.	6. 最初と最後の頁 497-509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02763-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jang JH, Tomiyama Y, Miyazaki K, Nagafuji K, Usuki K, Uoshima N, Fujisaki T, Kosugi H, Matsumura I, Sasaki K, Kizaki M, Sawa M, Hidaka M, Kobayashi N, Ichikawa S, Yonemura Y, Enokitani K, Matsuda A, Ozawa K, Mitani K, Lee JW, Nakao S.	4. 巻 192
2. 論文標題 . Efficacy and safety of romiplostim in refractory aplastic anaemia: a Phase II/III, multicentre, open-label study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 190-199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.17190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hato T, Shimada N, Kurata Y, Kuwana M, Fujimura K, Kashiwagi H, Takafuta T, Murata M, Tomiyama Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 Risk factors for skin, mucosal, and organ bleeding in adults with primary ITP: a nationwide study in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Adv.	6. 最初と最後の頁 1648-1655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020001446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishiura N, Kashiwagi H, Akuta K, Hayashi S, Kato H, Kanakura Y, Tomiyama Y.	4. 巻 189
2. 論文標題 Reevaluation of platelet function in chronic immune thrombocytopenia: impacts of platelet size, platelet-associated anti- Ilb 3 antibodies and thrombopoietin receptor agonists.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Haematol.	6. 最初と最後の頁 760-771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.16439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi H, Kuwana M, Hato T, Takafuta T, Fujimura K, Kurata Y, Murata M, Tomiyama Y	4. 巻 111
2. 論文標題 Reference guide for management of adult immune thrombocytopenia in Japan: 2019 Revision.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 329-351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02790-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akuta K, Kashiwagi H, Yujiri T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y.	4. 巻 17
2. 論文標題 A unique phenotype of acquired Glanzmann thrombasthenia due to non-function-blocking anti- IIb/3 autoantibodies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thromb Haemost.	6. 最初と最後の頁 206-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, Sakuragi M, Nakao M, Morikawa T, Kiyokawa T, Aochi H, Nagamine K, Shibayama H, Tomiyama Y.	4. 巻 59
2. 論文標題 Additional validation of Osaka method (0.01 mol/L dithiothreitol) for negating the daratumumab interference.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfusion.	6. 最初と最後の頁 2479-2480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.15305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 富山佳昭	4. 巻 30
2. 論文標題 血小板 3インテグリンと血小板血栓形成.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本血栓止血学会誌	6. 最初と最後の頁 579-585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, Sakuragi M, Nakao M, Morikawa T, Kiyokawa T, Aochi H, Nagamine K, Shibayama H, Tomiyama Y.	4. 巻 58
2. 論文標題 Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 3003-3013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.14900.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 富山佳昭	4. 巻 29
2. 論文標題 アテローム血栓症発症の分子機構の解明: Patient-Oriented Researchからの解析.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本血栓止血学会誌	6. 最初と最後の頁 765-774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 富山佳昭	4. 巻 64
2. 論文標題 抗血小板抗体の検出とその臨床的意義	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本輸血細胞治療学会誌	6. 最初と最後の頁 681-687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 富山佳昭
2. 発表標題 ガイドラインの「科学的根拠」に関する考察.
3. 学会等名 第68回日本輸血・細胞治療学会総会 (2020.5.29, 紙上開催, 紀野修一) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柏木浩和, 富山佳昭
2. 発表標題 ITPと血小板輸血
3. 学会等名 第68回日本輸血・細胞治療学会総会 (2020.5.29, 紙上開催, 紀野修一) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 芥田敬吾, 柏木浩和, 西浦伸子, 加藤恒, 保仙直毅, 金倉謙, 富山佳昭
2. 発表標題 新規のインテグリン IIb/3非活性化変異 3(R734C)を認めた一家系
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会 (2020.7.1-31, 紙上開催・オンデマンド, 富山佳昭)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 恒
2. 発表標題 血小板機能異常症解析からのメッセージ: 血小板血栓制御機構 (会長シンポジウム)
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会 (2020.7.1-31, 紙上開催・オンデマンド, 富山佳昭) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nshiura N, Kashiwagi H, Akuta K, Kato H, Kanakura Y, Tomiyama Y
2. 発表標題 Platelet function of chronic immune thrombocytopenia: Impact of platelet size, platelet-associated anti-IIb/3 antibodies and thrombopoietin receptor agonists.
3. 学会等名 The XXVII Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato H, Honda S, Kashiwagi H, Nishiura N, Akuta K, Kokame K, Miyata T, Tomiyama Y
2. 発表標題 The critical role of Kindlin-3 in initiation of physiological thrombus formation; analysis of Kindlin-3 deficient patient.
3. 学会等名 The American Society of Hematology 61th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芥田敬吾, 柏木浩和, 西浦伸子, 加藤 恒, 金倉 謙, 富山佳昭
2. 発表標題 新規のインテグリン IIb/3非活性化変異 R734Cを認めた一家系
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akuta K, Kashiwagi H, Yujiri T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y
2. 発表標題 Acquired Glanzmann thrombasthenia due to marked reduction of surface IIb/3 expression with non function-blocking anti-IIb/3 antibodies.
3. 学会等名 The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato H, Nishiura N, Akura K, Kashiwagi H, Kokame K, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y
2. 発表標題 Platelet integrin IIb/3 activation kinetics in inherited platelet functional disorders: the role of ADP receptor P2Y12, CalDAG-GEFI and kindlin-3 in IIb/3 activation by inside-out signaling.
3. 学会等名 The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kokame K, Nishiura N, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y
2. 発表標題 Ilb(R990W), a Gain-of Function Mutation of Ilb 3, Knock-in Mice Show Moderately Impaired Thrombopoiesis.
3. 学会等名 The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富山佳昭
2. 発表標題 血小板抗体の検出とその臨床的意義
3. 学会等名 第66回日本輸血・細胞治療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富山佳昭
2. 発表標題 「Shosuke Award」Molecular mechanism of atherothrombosis: lessons from patient-oriented research
3. 学会等名 第40回日本血栓止血学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	柏木 浩和 (Kashiwagi Hirokazu) (10432535)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	加藤 恒 (Kato Hisashi) (20705214)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関