

令和 3 年 5 月 18 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：18K08327

研究課題名(和文) 血小板インテグリン活性化ダイナミクスを制御する分子機構の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism for platelet integrin activation kinetics

研究代表者

加藤 恒 (Hisashi, Kato)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20705214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血小板機能の制御機構を解明するために行った、血小板機能異常症症例血小板を用いた質量分析による網羅的蛋白リン酸化状態の解析で健康人血小板と比べ蛋白リン酸化状態の異なる多くの分子を同定することができ、個々の分子についての検討を進めることができた。また血小板フィブリノゲン受容体 IIb/3 の恒常的活性化変異を持つマウスモデルの検討、IIb/3 に対する自己抗体を持つ症例の解析より、IIb/3 発現の変化と血小板機能の関連について明らかにした。またフローサイトメトリーを用いた新規アッセイによる ITP 症例の検討から ITP 症例における血小板機能の詳細を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は止血のみでなく脳卒中や心筋梗塞など動脈血栓症の発症に重要な血小板活性化機構の解明をめざしたものである。我々のこれまでにやってきた検討より、血小板機能にとって最も重要なフィブリノゲン受容体インテグリン IIb/3 が「速やか」かつ「持続的」に活性化することが生体内で重要なことを示してきた。核を持たない血小板は実験上の制約が大きく、血小板機能制御の詳細は明らかにされていない。しかし本研究の着眼点、および先天性血小板機能異常症の症例血小板への質量分析を応用した網羅的解析により得られた知見は、今後の新規抗血小板薬開発へと結びつく可能性があり、大きな社会的意義を持つものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined the altered phosphorylation status of molecules in platelets from congenital bleeding disorders by mass spectrometry and identified molecules possibly important for platelet integrin activation. Also, the analyses of transgenic mice which express constitutively activated integrin IIb/3 (IIb-R995W) found the association of IIb/3 activation with reduced IIb/3 expression and impaired platelet function. Platelets of ITP patients were determined by novel flow cytometry-based aggregation assay and found the impaired platelet function in ITP patients.

研究分野：血栓止血

キーワード：血小板 動脈血栓症 インテグリン

1. 研究開始当初の背景

血小板は止血に必須の血球成分であるとともに心筋梗塞や脳卒中など動脈血栓症の発症にも関与している。病的血栓を起こすことなく正常な止血を行うために血小板機能が重要であることは先天性血小板機能異常症で見られる出血症状、抗血小板薬によって得られる動脈血栓症予防効果などからも明らかである。しかし骨髄の巨核球細胞質の断片に由来する血小板は核を持たず、培養や遺伝子導入といった他の細胞で一般に用いられる実験手技を利用することができず、血小板の活性化メカニズム解明は十分に行われていない。

止血の場において血小板の機能の中心的存在がフィブリノゲン受容体インテグリン α IIb β 3 (GPIIb-IIIa) である。 α IIb β 3 の先天性な遺伝子異常により発症する Glanzmann 血小板無力症患者が出血症状を伴うことより α IIb β 3 が止血に欠かすことができないことは明らかであるが、 α IIb β 3 の発現のみでなくその活性化制御も極めて重要である。 α IIb β 3 の活性化は inside-out シグナルにより制御されており、我々はこれまでに ADP 受容体 P2Y₁₂ (Shiraga M. et al. J Thromb Haemost 2005; 3: 2315-)、CalDAG-GEFI (Kato H. et al. Blood 2016; 128: 2729-)、Kindlin-3 欠損症 (Kato H. et al. ISTH meetng 2017) といった稀な止血機能異常症の解析を行い、inside-out シグナルによる α IIb β 3 活性化の詳細について検討を進めてきた。

2. 研究の目的

我々が開発した α IIb β 3 活性化キネティクス測定法を血小板機能異常を有する症例血小板の解析に応用して得られた知見、「生体内での止血には α IIb β 3 の単なる ON/OFF ではなく「速やか」で「持続的な」活性化キネティクスの重要性についてさらに検討を進めることで inside-out シグナルの詳細を明らかとすること。またこれらを応用することで、アスピリンや ADP 受容体 P2Y₁₂ 阻害剤など既存の抗血小板薬と全く異なる視点、作用を持つ新規抗血小板薬開発へと結びつけていくことを研究の目的としている。

3. 研究の方法

1) 血小板インテグリン α IIb β 3 活性化キネティクスの解析

血小板刺激後の α IIb β 3 活性化の経時的变化について、我々が開発した α IIb β 3 キネティクスアッセイにより活性化 α IIb β 3 認識抗体 PAC-1 の結合をフローサイトメトリーで検出した。

2) 質量分析を用いたリン酸化ペプチドショットガンプロテオミクスによる inside-out シグナル機構の検討

シグナル機構の網羅的解析が困難な血小板において、 α IIb β 3 キネティクスアッセイにより明らかとした「速やか」で「持続的な」 α IIb β 3 活性化制御メカニズム解明のため血小板活性化後のタンパクリン酸化状態の網羅的解析を行った。

3) α IIb-R995W 遺伝子改変マウスを用いた α IIb β 3 作用の検討

α IIb β 3 の恒常的活性化が見られた症例解析より得た知見に基づき α IIb-R995W 変異を有する遺伝子改変マウスを作製。 α IIb β 3 活性化が血小板に及ぼす作用の検討を行った。

4) 免疫性血小板減少症 (ITP)、血小板無力症症例における血小板機能の解析

α IIb β 3 に対する自己抗体により発症する ITP、抗 GPIIb-IIIa 抗体により後天性血小板無力症を発症した症例の解析を行うことで α IIb β 3 の持つ作用について検討を行った。

4. 研究成果

1) 健常人血小板、血小板機能異常症の症例血小板について質量分析により、血小板活性化後のタンパクリン酸化の変化を網羅的に解析した。その結果 2,881 個のリン酸化ペプチド断片を得ることができた。健常人、症例の間でリン酸化状態を比較することで *inside-out* シグナルにおいて α IIb β 3 の「速やか」で「持続的な」活性化制御に重要と思われる分子を選択。これらについてこれまでに我々が樹立した巨核球系細胞株 CMK を用いた α IIb β 3 活性化分析法を用い、候補分子に関する機能の検討を進めた。

2) α IIb β 3 が恒常的に活性化している α IIb-R995W 遺伝子改変マウスでは巨大血小板減少症を呈していた。また血小板表面への α IIb β 3 発現低下を伴っており出血時間の延長、生理的条件下での血栓形成など血小板全体の機能は障害されることを明らかとした。 α IIb β 3 の過剰な活性化が α IIb β 3 の発現に影響すること、またこれによる血小板産生低下、特に骨髓巨核球における *proplatelet* 形成の低下がもたらされることを明らかとした。

3) α IIb β 3 に対する自己抗体により血小板破壊亢進をもたらす ITP、 α IIb β 3 に対する自己抗体による後天性血小板無力症を呈した症例血小板を用いた機能解析を行い α IIb β 3 活性化についての理解を深めることができた。ITP では血小板数低下により血小板機能の解析が困難であるが、フローサイトメトリーを用いた新たな血小板凝集測定法により、ITP 症例では個々の血小板機能が低下していることを明らかとした。また後天性血小板無力症では自己抗体の結合した α IIb β 3 の血小板内への *internalization* が亢進した結果血小板機能異常を呈することを明らかとした。

リン酸化タンパクショットガンプロテオミクスによる *inside-out* シグナル機構の解明にはさらに継続的な検討を要するが、本研究により α IIb β 3 活性化機構の理解、新たな役割を明らかとすることができた。

5. 主な発表論文等

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

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 IIb/3 antibodies and thrombopoietin receptor agonists	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	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 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 IIb/3(R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	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） 10.1111/jth.14678	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 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 2018年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

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：血小板血拴制御機構
3. 学会等名 第42回日本血拴止血学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 恒、伊藤康彦、柏木浩和、西浦伸子、芥田敬吾、小亀浩市、宮田敏行、保仙直毅、金倉謙、富山佳昭
2. 発表標題 Kindlin-3欠損血小板の血栓形成が明らかにする血栓形成メカニズム
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020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 61th American Society of Hematology Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishiura N, Kashiwagi H, Akuta K, Kato H, Kanakura Y, Tomiyama Y
2. 発表標題 Platelet function of chronic immune thrombocytopenia
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 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, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Nishiura N, Banno F, Kokame K, Kato H, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y
2. 発表標題 IIb(R990W), a gain-of function mutation of IIb 3. Knock-in mice show moderately impaired thrombopoiesis.
3. 学会等名 60th American Society of Hematology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisashi Kato, Nobuko Nishiura, Keigo Akuta, Hirokazu Kashiwagi, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, Yoshiaki Tomiyama
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 IIb 3 Activation By inside-out Signaling
3. 学会等名 60th American Society of Hematology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 恒、柏木浩和、森川陽一郎、芥田敬吾、西浦伸子、本田繁則、小亀浩市、宮田敏行、金倉謙、富山佳昭
2. 発表標題 血小板機能異常症におけるフィブリノゲン受容体インテグリン IIb 3活性化キネティクスの評価
3. 学会等名 第40回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2018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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加藤 恒	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 3
3. 書名 今日の治療薬2020-特発性血小板減少性紫斑病	

〔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 (Hirokazu Kashiwagi) (10432535)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究 分担者	富山 佳昭 (Yoshiaki Tomiyama) (80252667)	大阪大学・医学部附属病院・特任教授(常勤) (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
---------	---------