

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08816

研究課題名(和文) GPR25遺伝子による血小板減少性血栓性素因を呈する疾患病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of disease pathophysiology associated with thrombocytopenic thrombophilia by GPR25 gene

研究代表者

山之内 純 (Yamanouchi, Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10423451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：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。私は、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、GPR25遺伝子に変異を見出した。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、やや亢進しているのみであった。そこで、GPR25遺伝子ノックアウトマウスを作製し、このマウスの表現系を形態学的に詳細に観察した。

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と思われる。

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. I confirmed platelet counts of the transgenic mouse with GPR25 mutant. These platelet counts were various. Also, I could not confirm thrombosis in the transgenic mouse with GPR25 mutant. Then, I generated the GPR KO mouse, and observed this mouse in morphological detail.

研究分野：血液内科

キーワード：血小板減少症 血栓性素因 GPR25

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 α 、GPIX、TUBB1、ANKRD26の遺伝子異常を明らかにしてきた。

今回、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。この家系の最大の特徴は、血小板減少患者に若年時に動脈および静脈血栓症が多発していることにある。患者血小板の機能解析では通常の生理的アゴニストによる血小板凝集能や顆粒蛋白発現には異常はないが、一部のアゴニストに対して血小板凝集が異常に亢進していた。また、骨髄では巨核球増多が見られた。これらの所見から、この家系では特定の遺伝子変異によって血小板が恒常的に活性化されるために網内系で活性化血小板が除去されて血小板減少が生じ、さらに残存した活性化血小板による血栓性素因が生じているのではないかと仮説を立てた。そこで、本家系の原因遺伝子の同定を目的として、家系内の血小板減少患者および血小板数正常者からDNAを抽出し、次世代シーケンサーで解析を行った。その結果、血小板減少患者群にのみ存在するG protein-coupled receptor gene (GPR) 25の変異を見出した。血小板減少と血栓性素因の関連はまだ報告されていないが、一部の特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) や抗リン脂質抗体症候群 (APS) においては血小板が減少するにもかかわらず血栓傾向にあることが知られており、本家系と類似の病態は後天的にも存在する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先天性血小板減少症の新規原因遺伝子G protein-coupled receptor gene (GPR) 25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である。

先天性血小板減少症は血小板減少に加えて、造血器腫瘍や骨形成障害、眼や耳などの感覚器障害、腎機能障害を伴う疾患がこれまで報告されており、これら疾患での原因遺伝子の同定は血小板減少症の病態だけでなく、生体内で重要な働きをしている遺伝子の発見につながっている。今回発見した家系は動静脈血栓症が多発している点が特徴であり、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、本家系での原因遺伝子が同定されれば、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。また、本家系での病態を明らかにすることで、血小板減少症および血栓症の新たな治療薬の開発戦略の基盤を確立でき、さらに、本研究の遂行により一部のITPや抗リン脂質抗体症候群の患者では血小板減少に血栓性素因を併発する一因が明らかになることで、これらの疾患の病態および治療にも一石を投じることができるものと思われる。

3. 研究の方法

GPR25遺伝子変異を有する患者での血小板機能検査を行う。

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ており、凝固の場となるリン脂質の発現が亢進しているかをannexin Vの発現で確認する。

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 α IIb β 3の活性化に及ぼす影響について検討する。まず、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 α IIb β 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する。

そして、GPR25変異トランスジェニックマウスを用い、血小板数を検討し、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する。

また、GPR25遺伝子ノックアウトマウスを作製し、このマウスの表現系を形態学的に詳細に観察する。その結果によって、異常臓器を中心としてさらに研究計画を立案する。特に、血栓症が起こっているかどうかを詳細に検討する。血栓症がない場合でも、血栓形成機序についてマウス腸間膜動脈にFeCl₃溶液を塗布することで血小板血栓形成を誘発し、血栓により血管が閉塞するまでの時間を測定することで、血管障害部位での血小板血栓形成能を検討する。また、造血器系に関しては、このマウスの骨髄細胞を用いた*in vitro*実験系で分化増殖能に関する検討を実施する。

4 . 研究成果

GPR25 遺伝子変異を有する患者での血小板凝集試験では、血小板数を 20 万/ μ L に調節した後、ADP 10 μ M 刺激時、collagen 3 μ 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。血栓形成能観測解析システム (T-TAS) を用いて、血栓形成の過程の測定を行ったが、血小板数が少なく、観察できなかった。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ており、凝固の場となるリン脂質の発現が亢進しているかを annexin V の発現で確認したところ、annexin V の発現は亢進していた。

そして、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。また、現在、GPR25 遺伝子ノックアウトマウスを作製し、このマウスの表現系を形態学的に詳細に観察した。

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 Ikeda Yuichi, Yamanouchi Jun, Hato Takaaki, Yasukawa Masaki, Takenaka Katsuto	4. 巻 30
2. 論文標題 Safe childbirth for a type 1 antithrombin-deficient woman with novel mutation in the SERPINC1 gene undergoing antithrombin concentrate therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Coagulation & Fibrinolysis	6. 最初と最後の頁 47～51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MBC.0000000000000785	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 Ikeda Yuichi, Tanimoto Kazushi, Azuma Taichi, Fujiwara Hiroshi, Ochi Toshiki, Asai Hiroaki, Nabe Shogo, Maruta Masaki, Takeuchi Kazuto, Yamanouchi Jun, Kitazawa Sohei, Takenaka Katsuto	4. 巻 100
2. 論文標題 Disseminated infection with novel human adenovirus (genotype 79) following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2421～2422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-020-04151-x	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 Ikeda Yuichi, Yamanouchi Jun, Takenaka Katsuto	4. 巻 100
2. 論文標題 Effects of ruxolitinib on secondary myelofibrosis following chronic neutrophilic leukemia with the CSF3R T618I mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2639～2641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-020-04185-1	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山之内純
2. 発表標題 血小板減少症のオーバービュー
3. 学会等名 第14回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山之内純
2. 発表標題 血小板減少をきたす疾患
3. 学会等名 第15回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021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

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