

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591151

研究課題名（和文）

新規血小板機能抑制分子セマフォリン3Aの抑制機構および抗血栓作用に関する検討

研究課題名（英文）

Analysis of inhibitory mechanism and antithrombotic effects of a novel anti-platelet function molecule, semaphorin 3A

研究代表者

柏木 浩和 (KASHIWAGI HIROKAZU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10432535

研究成果の概要（和文）：新規血小板機能抑制分子である可能性のあるセマフォリン3Aにおける血小板機能抑制メカニズムについて検討を行った。従来明らかにされていた Rac-paxillin を介した actin 重合阻害効果に加え、PI3 kinase の下流に存在する Rap1 および AKT をすることを明らかにした。この抑制機構はアゴニストによって異なっており、トロンビンやコンバルキシン刺激では Rap1、Akt ともに抑制するが、ADP 刺激においては、主に AKT のリン酸化を抑制していた。これらの結果から、セマフォリン3AのPI3 kinase系を抑制することにより血小板機能を抑制するが、ADP 刺激においては AKT を直接阻害するメカニズムが存在する可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the mechanism of inhibition of platelet function by semaphorin 3A. In addition to inhibition of actin polymerization via suppression of Rac-paxillin pathway, we found that semaphorin 3A inhibits downstream molecules of PI3 kinase, Rap1 and AKT. Interestingly, semaphorin 3A inhibited both thrombin- or convulxin-induced Rap1 and AKT activation, it inhibited mainly ADP-induced AKT phosphorylation. These results indicate that semaphorin 3A inhibits PI3 kinase pathway, and it may have direct inhibitory effects on ADP-induced AKT activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・血栓・止血学

キーワード：血小板、セマフォリン、シグナル伝達、血栓、動脈硬化

## 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞、脳梗塞に代表される動脈血栓性疾患は、がんとともに現代における主要な死因であり、その克服は現代医療の大きな目標のひとつである。動脈血栓において血小板が重要な役割を果たしていることは、基礎的な検討に加え、臨床的にも冠動脈インターベンション後の冠動脈イベント発生頻度が血小板インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GP IIb/IIIa) の阻害剤で抑制されることから瞭に示されている。また最近、Massbergらは血小板の血管内皮への接着が動脈硬化性病変の発症に必須であることを明らかにしている (Massberg S, et al. *J Exp Med* 196(7): 887-896, 2002)。従って、血小板機能を制御することは動脈血栓性疾患の予防および治療に重要であると考えられる。このような観点からアスピリン、パナルジンに代表される抗血小板剤がすでに臨床的に広く使用されているが、その効果は不十分であり、新たなメカニズムに基づく抗血小板剤の開発が望まれている。

血小板機能は血小板活性化機構と抑制化機構のバランスのなかで制御されているが、現在まで血小板機能抑制機構としては、Prostaglandin I<sub>2</sub>, Nitric oxide およびPECAMが知られているが、それ以外の血小板機能抑制機構はほとんど知られていない。セマフォリンは、そのアミノ末端付近にSema domainを保存領域として持つ分子ファミリーであり、膜結合型、分泌型、GPI-anchor型などのサブクラスに分類される。セマフォリン3A(Sema3A)は分泌型蛋白であり、神経軸束の侵入を阻止する反発因子として知られている。我々はSema3Aがアゴニスト刺激による $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化、血小板凝集および接着後の血小板進展など広範な血小板機能抑制作用をもつことを明らかにした (Kashiwagi H, et

al. *Blood* 106(3):913-921, 2005)。しかし、その詳細なメカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、Sema3Aの血小板機能抑制機構の分子メカニズムを明らかにすること、またin vivoでその影響を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

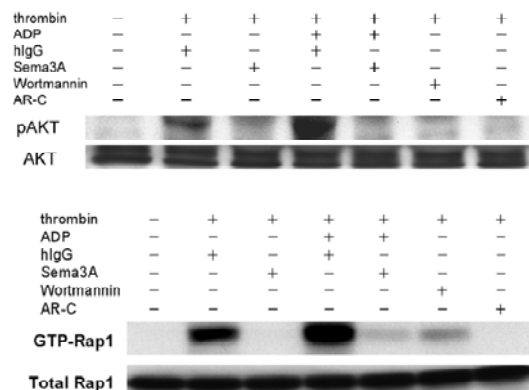
Recombinant Sema3A/Fcを用いて、血小板活性化後のシグナル分子に対する影響を検討した。血小板の活性化には、Gタンパク共有受容体からのシグナルに対する影響を検討するため、ADP、トロンビン、またコラーゲン受容体からのシグナル検討のためにconvulxinを用いた。検討したシグナル分子としては、PI3 kinaseによるその活性が制御されていることが知られているAktおよびRap1の活性化、また顆粒放出、Ca mobilizationに対する影響を検討した。

In vivoにおけるSema3Aの影響を検討するため、Sema3A/Adeno virusの作成および血栓モデルとしてレーザー誘発血栓モデルに対する影響に対する検討を行った。

## 4. 研究成果

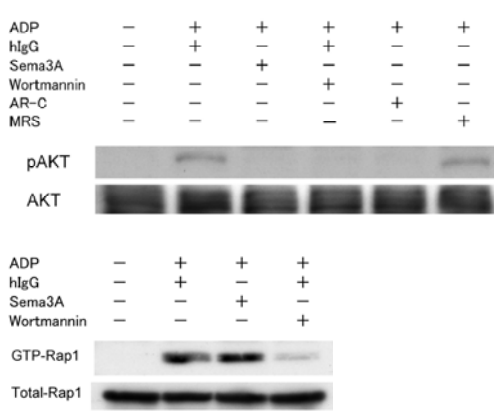
(1) トロンビン刺激後のAktのリン酸化およびRap1の活性化はSema3Aで抑制された。

Figure 1: トロンビン刺激後のAktリン酸化およびRap1の活性化



同様の結果が Convulxin 刺激においても得られたが、ADP 刺激においては Akt のリン酸化は抑制されたが Rap1 の抑制化は認められなかった。

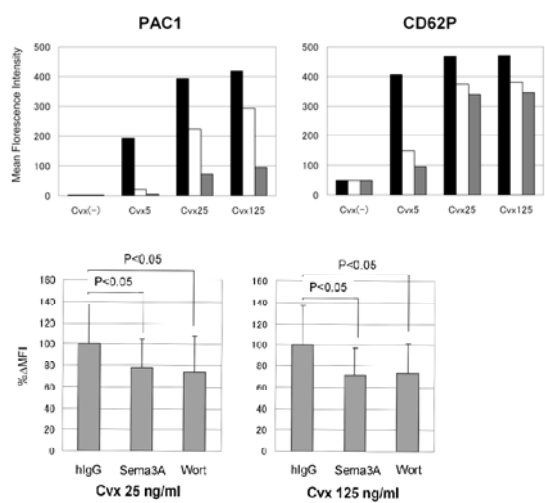
Figure 2. ADP刺激後のAktリン酸化およびRap1の活性化



このことは、Sema3A は少なくとも ADP 刺激においては Akt を直接抑制メカニズムが関与する可能性を示している。

(2) Convulxin 刺激後の顆粒放出および Ca mobilization に対する Sema3A の影響を検討したところ、Sema3A は濃度依存性にこれらを抑制することが明らかとなった。

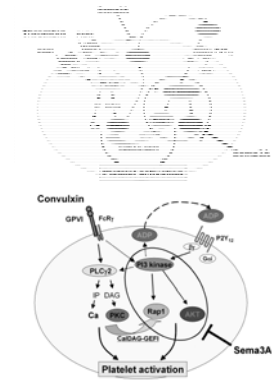
Figure 3. Sema3Aによるconvulxin刺激後のαIIbβ3活性化(PAC1結合)、顆粒放出(CD62発現), Ca mobilizationに対する影響



(3) 以上の結果から、Sema3A はトロンビンと convulxin においては PI3 kinase を中心

に下記のようなメカニズムで血小板活性化を抑制することが示唆された。一方、ADP 刺激に関しては Akt を直接抑制メカニズムが存在する可能性が示唆された。

Figure 4. Sema3Aによるconvulxinおよびトロンビン刺激の抑制メカニズムの仮説



(4) Sema3A 発現ベクターの改良を続けることにより、血栓モデルに対する検討を引き続き行った。アデノウイルスベクターによる蛋白発現が不良であったが、ウイルス濃縮方法を改善することにより、培養細胞においては Sema3A 発現を増加させる可能性が示された。またレーザー照射による血栓モデル手技の改善を行うことにより、Sema3A の血栓形成抑制についての検討を行うことが可能とすることができた。

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 15 件)
- ① Kunishima S, Kashiwagi H, et al (12 人中 2 番目). Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the αIIbβ3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. Blood. Published on line, 査読有
- ② Kamae T, Kashiwagi H, et al (8 人中 5 番目). Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in thromboxane A(2) receptor. J Thromb Haemost Published on line, 査読有
- ③ Nishida S, Kashiwagi H, et al (15 人

- 中 3 番目) . Successful treatment of acquired hemophilia A, complicated by chronic GVHD, with tocilizumab. Mod Rheumatol, Published on line, 査読有
- ④ Kashiwagi H, et al (9 人中 1 番目) Molecular analysis of a patient with type I Glanzmann thrombasthenia and clinical impact of the presence of anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 alloantibodies. Int J Hematol 93;106-111, 2011, 査読有
- ⑤ Tadokoro S, Kashiwagi H, et al (8 人中 5 番目) . A potential role for  $\alpha$ -actinin in inside-out  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 signaling. Blood 117;250-258, 2010, 査読有
- ⑥ Suzuki-Inoue K, Kashiwagi H, et al (13 人中 7 番目) . Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: Embryonic/Neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. J Biol Chem 285; 24494-24507, 2010, 査読有
- ⑦ Bhavaraju K, Tomiyama Y, et al (8 人中 5 番目) . Antagonism of P2Y(12) reduces physiological thromboxane levels. Platelets 21;604-609:2010, 査読有
- ⑧ Nomura S, Tomiyama Y, et al (10 人中 3 番目) . Effects of bisphosphonate administration on the bone mass in immune thrombocytopenic purpura patients under treatment with steroids. Clin Appl Thromb Hemost 16; 622-627, 2010 査読有
- ⑨ Akiyama M, Kashiwagi H, et al (8 人中 2 番目) . Presence of platelet-associated anti-GPVI autoantibodies and restoration of GPVI expression in patients with GPVI deficiency. J Thromb Haemost 7; 1373-1383, 2009, 査読有
- ⑩ Honda S, Tomiyama Y, et al (7 人中 6 番目) . Integrin-linked kinase associated with integrin activation. Blood 113; 5304-5313, 2009, 査読有
- ⑪ 柏木浩和, 秋山正夫, 富山佳昭. 自己抗体と血小板機能異常. 日本血栓止血学会誌 21; 271-277, 2010, 査読無
- ⑫ 林 悟, 柏木浩和, 等 (6 人中 4 番目). 網状血小板測定法 2 法の比較検討と臨床的有用性の検討 - フローサイトメトリー (FCM) 法と多項目自動血球分析装置 XE-2100 による自動測定 (IPF) 法 -. 臨床病 57;1039-1044, 2009, 査読有
- ⑬ 柏木浩和. 止血機序とその破綻. 日本内科学会誌 98; 1554-1561, 2009, 査読無
- ⑭ 柏木浩和. 本態性血小板血症の診断と治療. 日本血栓止血学会誌 19;206-209, 2008, 査読無
- ⑮ 柏木浩和, 富山佳昭. 知っておきたい血管医学用語「セマフォリン」. Vascular Medicine 4;368-371, 2008, 査読無
- [学会発表] (計 19 件)
- ① Kamae T, Kashiwagi H, et al. Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in thromboxane A2 receptor. The American Society of Hematology 52nd Annual meeting. 2010.12.5, Orlando, USA
- ② Miyazaki K, Tomiyama Y, et al. Evaluation of Romiplostim in a randomized placebo-controlled phase 3 study of a Japanese population with chronic immune thrombocytopenia (ITP). The American Society of Hematology 52nd Annual meeting. 2010.12.5, Orlando, USA
- ③ Matsubara K, Kashiwagi H, et al. R995W mutation in integrin  $\alpha$ IIb-gene (*ITGA2B*) is a novel cause for congenital macrothrombocytopenia. 第 72 回日本血液学会総会, 2010.9.26, 横浜
- ④ Nakazawa T, Kashiwagi H, et al. Agonist induced  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation in genetically engineered human megakaryocytic cell line, CMK. 第 72 回日本血液学会総会, 2010.9.25, 横浜
- ⑤ 西山美保, 柏木浩和, 等. XE-5000 を用いた幼若血小板比率測定に及ぼす抗凝固剤および保存温度の影響 - 検体安定性の検討 -. 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会, 2010.9.10, 東京
- ⑥ 柏木浩和, 富山佳昭. 血小板異常症における血小板抗体の臨床的意義とその対策. 第 58 回日本輸血・細胞治療学会総会, 2010.5.28, 名古屋
- ⑦ 柏木浩和, 等. FACS にて血小板輸血の有用性を検討しえた抗血小板抗体を有する胃癌合併 Glanzmann 血小板無力症の一例. 第 33 回日本血栓止血学会学術集会, 2010.4.24, 鹿児島
- ⑧ 釜江 剛, 柏木浩和, 等. 血小板トロンボキサン受容体異常症患者 (nt.167-8) における 1 塩基挿入ヘテロ接合体) の血小板機能解析. 第 33 回日本血栓止血学会学術集会, 2010.4.24, 鹿児島
- ⑨ 永峰啓丞, 柏木浩和, 等. 抗 Jr<sup>a</sup> 抗体によ

- る胎児貧血と考えられたJr<sup>a</sup>血液型不適合妊娠の一症例. 第53回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会, 2009. 11. 28, 京都
- ⑩ 釜江 剛、柏木浩和, 等. 血小板トロンボキサン受容体異常症における新規遺伝子異常 - nt.167-8における1塩基挿入. 第71回日本血液学会学術集会, 2009. 10. 23-25, 京都
- ⑪ Akiyama M, Kashiwagi H, et al. Presence of platelet-associated anti-GPVI autoantibodies and restoration of GPVI expression in patients with GPVI deficiency. The XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2009. 7. 11-16, Boston, USA
- ⑫ Kunishima S, Kashiwagi H, et al. A heterozygous ITGA2B R995W mutation causes constitutive activation of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 receptor and results in congenital macrothrombocytopenia. The XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2009. 7. 11-16, Boston, USA
- ⑬ Honda S, Tomiyama Y, et al. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. The XXII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2009. 7. 11-16, Boston, USA
- ⑭ 柏木浩和, 等.  $\alpha$ IIb(R995W)変異を認めた先天性巨大血小板減少症例における $\alpha$ IIb $\beta$ 3活性化に関する検討. 第32回日本血栓止血学会学術集会, 2009. 6. 4-6, 福岡
- ⑮ Tadokoro S, Kashiwagi H, et al. A role for  $\alpha$ -actinin in inside-out  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 signaling. The American Society of Hematology 50th Annual meeting. 2008. 12. 6-9, San Francisco, USA
- ⑯ 秋山正夫、柏木浩和, 等. ITP合併GPVI欠損例の解析～GPVI欠損発症のメカニズムに関する検討. 第31回日本血栓止血学会学術集会, 2008. 11. 20-22, 大阪
- ⑰ 竹田洋樹、柏木浩和, 等. 抗血小板抗体出現により水頭症と尿路結石の管理に難渋した血小板無力症の一例. 第70回日本血液学会総会, 2008. 10. 10-12, 京都
- ⑱ 柏木浩和. 特発性血小板減少性紫斑病. 第89回近畿血液学会地方会, 2008. 6. 21, 大阪
- ⑲ 秋山正夫、柏木浩和, 等. 抗GPVI抗体に起因すると思われるGPVI欠損症の一例.

第56回日本輸血・細胞治療学会総会,  
2008. 4. 25-27, 福岡

[図書] (計5件)

- ① 柏木浩和. 造血器腫瘍治療 これは困ったぞ、どうしよう? 第2版. 中外医学社 p296-306, 2010
- ② 富山佳昭、本田繁則. Annual Review血2010年版. 中外医学社 p160-167, 2010
- ③ 富山佳昭. 今日の治療指針2009年版. 医学書院 p516-517, 2009
- ④ 富山佳昭. Annual Review血液2009年版. 中外医学社 p193-198, 2009
- ⑤ 富山佳昭. EBM 血液疾患の治療2010-2011. 中外医学社 p434-438, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.hematology.pro/xoops/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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