

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07808

研究課題名(和文)Ca1DAG-GEF1の止血分子メカニズム解明と新規機能の探索

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of hemostasis and search for novel functions of Ca1DAG-GEF1

研究代表者

古城 剛 (Kojo, Tsuyoshi)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・臨床検査技師

研究者番号：30837282

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)：止血異常を伴う血小板機能異常症の症例の一家系において全エクソーム解析を行い、Ca1DAG-GEF1をコードするRASGRP2遺伝子の変異を同定した。健康人対照者と比較しRASGRP2遺伝子変異を持つ症例では、血小板凝集能(ADP・コラーゲン・リストセチン)は減弱し、血小板活性化マーカー β 3発現は低下していた。また、ウエスタンブロットの結果より、RASGRP2遺伝子異常があるとRap1活性化状態の持続・維持ができないことが確認できた。Ca1DAG-GEF1は血小板活性化の中心分子であり、今後の治療や創薬の対象となり得ることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ca1DAG-GEF1は血小板活性化の統合的役割をもち、主には血小板凝集反応を司る分子として知られているが、そのRASGRP2遺伝子異常による血小板機能異常の詳細な検討は、新たな血小板の役割解明に繋がる可能性がある。また、原因不明の出血傾向の患者の原因の一つとしてCa1DAG-GEF1を精査する意義があり、今後の医療に貢献できる。更に、このCa1DAG-GEF1分子の血小板以外の組織や細胞における働きなどを明らかにしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Whole exome analysis was performed in a family of patients with platelet dysfunction with hemostasis abnormalities to identify mutations in the RASGRP2 gene encoding Ca1DAG-GEF1. Compared to healthy controls, platelet aggregation (ADP, collagen, and ristocetin) was reduced and platelet activation marker β 3 expression was decreased in cases with RASGRP2 gene mutations. Western blotting confirmed that RASGRP2 gene abnormalities prevented the maintenance and persistence of the Rap1 activation. These results suggest that Ca1DAG-GEF1 is a central molecule in platelet activation and is expected to be a potential target for future therapy and drug discovery.

研究分野：分子生物学

キーワード：Ca1DAG-GEF1 RasGRP2 Rap1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

止血異常を伴う血小板機能異常症の症例の一家系において、全エクソーム解析を行い Calcium-and diacylglycerol-regulated guanine exchange factor-I (CalDAG-GEFI) をコードする RAS guanyl-releasing protein-2 (RASGRP2) 遺伝子の変異を同定した。CalDAG-GEFI は Rap1 の活性化を介して α IIb β 3 integrin の inside-out signaling を担う分子であり、血小板活性化の重要分子である。RASGRP2 遺伝子の変異は世界でいくつか報告されているが、CalDAG-GEFI の血小板での制御機構、血小板以外の細胞の役割は明確でない。CalDAG-GEFI は 2004 年に血小板と血栓形成に関する分子として初めて同定され、血小板活性化経路に重要であることが報告された (Crittenden JR et al. Nat Med. 2004;10(9): 982-6.)。また、ヒトにおける CalDAG-GEFI 分子異常は 2014 年に初めて発見され、重篤な出血症状をきたすことが示された (Canault M, et al. J. Exp. Med. 2014;211(7): 1349-1362)。

2. 研究の目的

本研究では、CalDAG-GEFI の血小板における機能解析を行い、その制御機構を明らかにし、我々の解析した遺伝子変異家系の変異による止血機構の変化を検討する。将来、輸血以外での治療や血小板機能を促進する創薬への第一歩となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 刺激 (アゴニスト) による活性化の差異検出

コラーゲン (1 μ g/ml)、ADP (1 μ M)、エピネフリン (2.75 μ M)、リストセチン (1.5mg/ml) 刺激による活性化を血小板凝集能で検討する。

(2) 症例の血小板活性化の検討

Tyrod-Hepes で作成した洗浄血小板を用いて、血小板活性化マーカー CD62P、inside-out signaling の確認としてフローサイトによる PAC-1 発現量を検証する。

(3) 症例の遺伝子変異の確認

症例の一家系における、全エクソーム解析とサンガー法によるシーケンス解析をする。

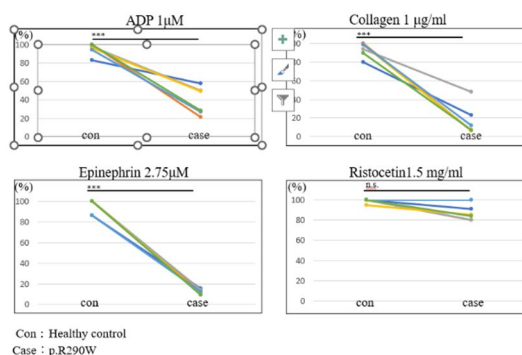
(4) 血小板シグナルの検討

α IIb β 3 integrin の inside-out signaling の活性評価に重要な Total-Rap1、Rap1 をウエスタンブロットで検討し、Rap1 Activation Assay kit (cell Biolabs, inc) を用いて Rap1-GTP pull-down により活性化状態を検討する。

4. 研究の成果

(1) コラーゲン、ADP、リストセチン、エピネフリン刺激による血小板の凝集能の差異 (下图)

健常者対象の血小板凝集能と比較し RasGRP2 遺伝子変異を持つ症例では有意差 (> 0.001) をもってコラーゲン、ADP、リストセチンの血小板凝集の低下を認めた。リストセチン添加では凝集能の低下を認めなかった。この症例における血小板凝集能低下が出血傾向につながっていることが示唆された。

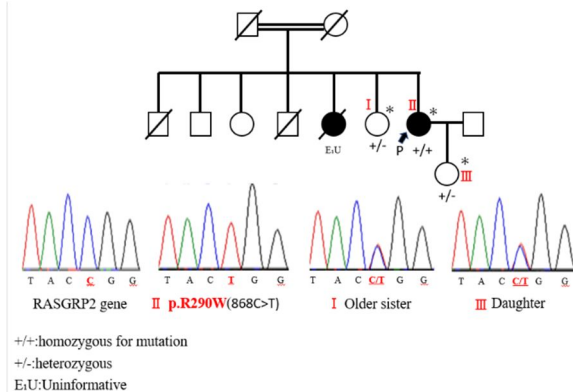


(2) 洗浄血小板を用いて、血小板活性マーカー CD62P、inside-out signaling の確認として
フローサイトによる α IIB β 3 の発現の検証

血小板の膜受容体の活性は正常であった。症例の α IIB β 3 の活性化は、ADP・TRAP6 刺激において健常人対象と比較し有意差 (< 0.05) をもって低下した。血小板活性マーカー CD62P の発現は有意差を認めなかった。症例の α IIB β 3 の発現が低下していることより inside-out signaling の活性化機能が低下していることが示唆された。

(3) 症例の一家系における、全エクソーム解析(下図)

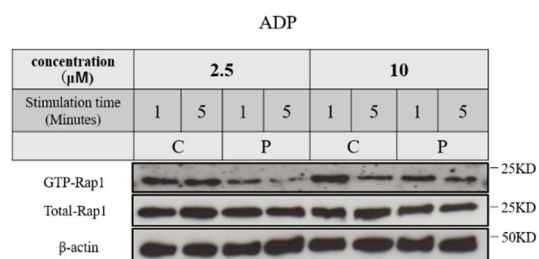
出血症状を呈した姉妹がいることから、原因遺伝子は常染色体潜性遺伝と推定され、症例、姉妹、娘の遺伝子解析を行った。サンガー法による塩基配列の解析では、本症例は常染色体潜性遺伝で 868 番目の塩基シトシンがチミンに変異しており、姉と娘はヘテロ接合体(C/T)であった。CalDAG-GEFI のこの一塩基置換によりアルギニンがトリプトファンに変わる p.Arg290Trp の変異を呈することが分かった。



(4) α IIB β 3 integrin の inside-out signaling に重要な Rap1 活性化の Rap1-GTP pull-down assay による検討

健常人対照と症例の洗浄血小板における CalDAG-GEFI 蛋白の発現は、ウエスタンブロットでほぼ同等の発現であったが、そのバンドパターンが異なっていた(データ未提示)。次にアゴニスト(ADP・TRAP6)の刺激による Rap1-GDP から Rap1-GTP の変換による Rap1 活性化を、Rap1-GTP pull-down により検討した。

ADP 刺激では(右図) 2.5 μ M・5 分刺激で Rap1 活性化の減弱を認めた。この結果より、CalDAG-GEFI の機能異常が、Rap1-GTP を Rap1-GTP に変換させた状態を持続・維持することができていないと推測される。Total-Rap1 は健常人対照、症例共に同等の発現が見られたため、Total-Rap1 のタンパク量の減少での血小板凝活性の低下は否定でき



C : Healthy control
P : p.R290W

た。TRAP6 刺激では、2.5 μ M、5 分、10 μ M、1.5 分刺激で Rap1 活性の減弱を認めた。この結果も、ADP 刺激同様に CalDAG-GEFI の機能異常が、活性化状態の Rap1-GTP の持続が維持できていないと推測された。また、TRAP6 刺激ではアゴニストの濃度を高めても同様の傾向が見られた。以上の結果は、CalDAG-GEFI の p.Arg290Trp 変異が血小板の機能異常をもたらすことを示している。

5. 今後の展望

CalDAG-GEFI の血小板以外の血球系、血管内皮細胞における役割を明確にし、症例のアミノ酸変異がそれらの機能の連関に及ぼす影響を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	山口 宗一 (Yamakuchi Munekazu) (20325814)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	大山 陽子 (Oyama Yoko) (20583470)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員 (17701)	
研究分担者	竹之内 和則 (Takenouchi Kazunori) (30646758)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
研究分担者	小浜 祐行 (Obama Yuki) (50837276)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・臨床検査技師 (17701)	
研究分担者	橋口 照人 (Hashiguchi Teruto) (70250917)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

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
---------	---------