

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08371

研究課題名（和文）プロテオミクスが同定するインテグリン α IIb β 3活性化機構から新規抗血小板療法へ研究課題名（英文）Elucidation of integrin α IIb/ β 3 activation mechanism by proteomics and exploration of

研究代表者

加藤 恒 (Kato, Hisashi)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20705214

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）：血小板は正常な止血のみでなく動脈血栓症の発症にも関与するため、その機能が厳密に制御されることが極めて重要である。しかし血小板は核を持たない血球成分のため、一般に行われる実験手法が適応できず、その機能解析は十分に行われていない。本研究では止血異常を呈する症例血小板を用いたプロテオミクス解析により、血小板機能の中心となるフィブリノゲン受容体GPIIb-IIIa活性化機構の解明を試みている。独自の活性化解析手法の使用と合わせ、生体内で血栓形成に重要な機能を果たす可能性のある候補分子を特定し、これら分子機能の詳細について研究を進めた。将来の新規抗血小板薬開発に貢献できるものと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の身体にとって過剰な出血、病的血栓とともに血液の循環障害をきたし臓器機能に大きな影響を与えるため、血小板が正常に機能することが極めて重要である。現在もアスピリンなどの抗血小板薬が広く使用されているが、出血副作用と血栓予防効果のバランスが改善されたより良い抗血小板薬が必要とされている。しかし、一般に血小板機能に関する研究は実験手技上の制約が大きいため十分に行われておらず一般臨床への貢献も十分ではない。

本研究は血小板機能異常症の解析に基づき立案されたもので、生体内での血小板機能に重要なメカニズムを明らかにする重要なものであり、新規抗血小板薬開発につながる可能性のある社会的意義の高い検討である。

研究成果の概要（英文）：Platelets play a crucial role in normal hemostasis and pathogenic arterial thrombosis. The strictly regulated platelet function is extremely important. However, due to their lack of a nucleus, it is difficult to apply conventional experimental techniques to platelet research, and their functional analysis remains insufficient. In this study, we attempted to elucidate the mechanism of activation of the fibrinogen receptor GPIIb-IIIa, which is central to platelet function, using proteomics analysis with platelets from patients with rare bleeding disorder. By employing unique activation analysis methods, we identified candidate molecules that may play important roles in thrombus formation in vivo and proceeded to study the detailed functions of these molecules. We believe that this research could contribute to the development of novel antiplatelet drugs in the future.

研究分野：血栓止血

キーワード：血小板 インテグリン フィブリノゲン受容体 抗血小板薬

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

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同時に心筋梗塞や脳卒中など動脈血栓症の発症にも関与する。正常な止血を行い、かつ病的血栓も起こさないためには血小板が正しく機能することが極めて重要である。実際に先天性血小板機能異常を持つ症例では出血症状が見られ、抗血小板薬による動脈血栓症予防効果などからもその重要性が明らかである。しかし血小板は核を持たない血球成分のため、一般の血球で用いられる実験手技の活用が制限され、血小板活性化メカニズムの詳細は不明のままである。

我々はこれまで出血症状を呈する多数の症例の診療から、血小板機能解析を詳細に行うことで血小板機能制御メカニズムの解明を試みてきた。特に血小板機能の中心的存在フィブリノゲン受容体インテグリン α Ib β 3 (GPIIb-IIIa) の先天的遺伝子異常による Glanzmann 血小板無力症患者の解析を多数行うとともに、 α Ib β 3 の活性化を制御する inside-out シグナルについて 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 meeting 2017) などの稀な止血機能異常症の解析から多くの知見を得て検討を進めてきた。

2. 研究の目的

血小板機能の制御は多くの動脈血栓症予防、または治療につながる可能性が高いにも関わらず、血小板固有の特徴によりその活性化機構は分かっておらず、大きなアンメットニーズが存在している。我々はこれまで診断してきた血小板機能異常症の血小板機能解析を通じて「生体内での止血には血小板 α Ib β 3 活性化は単なる 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を提唱してきた。この機構の検討を進め、生体内で重要な inside-out シグナルを通じた α Ib β 3 活性化の詳細を明らかとする。これにより、既存のアスピリン、ADP 受容体 P2Y12 阻害剤などとは全く異なる作用を持つ新規抗血小板薬開発へ貢献することが本研究の目的となる。

3. 研究の方法

1) 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

我々が開発した α Ib β 3 キネティクスアッセイにより血小板刺激後の α Ib β 3 活性化経時的变化を明らかとし、「速やか」で「持続的な」 α Ib 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ショットガンプロテオミクスにより実施した。解析は血小板機能異常症症例より得た血小板、または阻害剤処理を行った健常者ドナー血小板を用いて行った。

2) 巨核球系細胞 CMK システム、iPS 細胞由来巨核球を用いた特定候補分子の機能確認

我々の樹立した遺伝子導入可能な α Ib β 3 活性化実験を可能とした CMK 細胞システム、iPS 細胞由来巨核球を用いて、プロテオミクス解析より特定された α Ib β 3 活性化制御に重要と思われる分子の機能の詳細について検討を行った。

3) リン酸化部位情報を活用した候補分子の作用機構、分子相互作用の検討

プロテオミクス解析、CMK 細胞と iPS 細胞由来巨核球を用いた検討で α IIB β 3 活性化制御における重要性が確認された候補分子について、シグナルの詳細を検討するために in vitro における分子機構の検討を行った。

4. 研究成果

健常人血小板、血小板機能異常症の血小板を用いて血小板活性化が誘導するタンパクリン酸化状態の変化をショットガンプロテオミクスにより網羅的に解析した。2,881 個のリン酸化ペプチド断片について、健常人と血小板機能異常症症例の間でリン酸化状態を比較から α IIB β 3 の「速やか」で「持続的な」活性化制御に関与が考えられる候補分子を抽出。In silico で pathway 解析を実施するとともに、両方でリン酸化状態の乖離が大きい分子について巨核球系細胞株 CMK、iPS 細胞由来巨核球を用いた検討を行った。複数の候補分子について、 α IIB β 3 活性化への関与、影響の層別化はまだ今後の検討を要する状態であるが、独自の解析手法による新たな分子の関与についての検討を実施することができている。また、一部の候補分子について、遺伝子改変マウスの活用に向けての準備を進めることができた。

網羅的解析から得られる情報は膨大なものとなるため、現時点で検討は十分ではなく引き続き新規作用機序を持つ抗血小板療法開発に向けた IIB β 3 活性化制御機構の解明を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kobayashi Sachiko, Kita Shunbun, Okuzaki Daisuke, Fujishima Yuya, Otsuki Michio, Kato Hisashi, Nishizawa Yasuko, Miyashita Kazuya, Yokoyama Chieko, Fukuhara Atsunori, Morii Eiichi, Shimomura Iichiro	4. 巻 25
2. 論文標題 Favine/CCDC3 deficiency accelerated atherosclerosis and thrombus formation is associated with decreased MEF2C-KLF2 pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105252 ~ 105252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105252	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 Tanaka Katsunao, Koseki Masahiro, Kato Hisashi, Miyashita Kazuya, Okada Takeshi, Kanno Kotaro, Saga Ayami, Chang Jiuyang, Omatsu Takashi, Inui Hiroyasu, Ohama Tohru, Nishida Makoto, Yamashita Shizuya, Sakata Yasushi	4. 巻 30
2. 論文標題 Anti-GPIIb/IIIa Antibody-Positive Autoimmune Hyperchylomicronemia and Immune Thrombocytopenia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 100 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.63348	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 Keigo, Fukushima Kentaro, Nakata Keiichi, Hayashi Satoru, Toda Jun, Shingai Yasuhiro, Tsutsumi Kazuhito, Machida Tomohisa, Hino Akihisa, Kusakabe Shinsuke, Doi Yukiko, Fujita Jiro, Kato Hisashi, Maeda Tetsuo, Yokota Takafumi, Tomiyama Yoshiaki, Hosen Naoki, Kashiwagi Hirokazu	4. 巻 115
2. 論文標題 Autoimmune-mediated thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: significance of detecting reticulated platelets and glycoprotein-specific platelet autoantibodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 322 ~ 328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03272-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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小池翠、加藤恒、中田継一、保仙直毅、柏木浩和
2. 発表標題 硝子体出血の止血管理が困難であった Glanzmann 血小板無力症の一例
3. 学会等名 第44回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 芥田敬吾、福島健太郎、中田継、林悟、堤一仁、日野彬央、戸田淳、草壁信輔、上田智朗、藤田二郎、加藤恒、横田貴史、富山佳昭、保仙直毅、柏木浩和
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植後 ITP の診断における網状血小板比率、抗血小板自己抗体測定の意味
3. 学会等名 第44回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏木浩和、桑名正隆、村田満、島田直樹、高蓋寿郎、山之内純、加藤恒、羽藤高明、富山佳昭
2. 発表標題 新たな成人ITP診断基準案とその検証
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤恒、小関正博、岡田健志、柏木浩和、中田継一、保仙直樹、富山佳昭
2. 発表標題 巨大血小板減少を契機に診断したシトステロール血症の一例
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芥田敬吾、柏木浩和、中田継一、加藤恒、保仙直樹、富山佳昭
2. 発表標題 トロンボポエチン受容体作動薬の切り替えが著効し緩解となった慢性ITP
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
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
研究分担者	柏木 浩和 (Kashiwagi Hirokazu) (10432535)	大阪大学・医学部附属病院・准教授 (14401)	
研究分担者	中田 継一 (Nakata Keiichi) (80849844)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (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
---------	---------