

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591070

研究課題名（和文） RIAM欠損血小板を用いたインテグリン活性化の分子機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of integrin inside-out signaling using RIAM deficient platelets.

研究代表者

渡邊 直英（WATANABE NAOHIDE）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90338054

研究成果の概要（和文）：血小板機能がどのような遺伝子によって制御されているのかを解明するために、我々は細胞内蛋白である RIAM 欠損血小板をもつマウスを作製し、その血小板機能を検討した。その結果、我々が以前報告した様に RIAM 欠損血小板では、血小板凝集惹起剤に対するフィブリノーゲン結合能が低下していたが、完全に消失している訳ではない事が確認された。その結果から、RIAM は血小板インテグリンのフィブリノーゲンに対する親和性の調節に関わっているが、その機能を補完する様な別の遺伝子の存在も示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate the molecular mechanism of platelet function, we generated platelet specific RIAM-deficient mice. However, the fibrinogen binding was not completely inhibited by RIAM deletion, the RIAM-deficient platelets showed impaired fibrinogen binding in response to platelet agonists, as we previously reported. These results suggest that RIAM has important role in controlling affinity of platelet integrin against fibrinogen, and that there are other similar function proteins in platelet.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血栓止血、血小板、インテグリン、RIAM

1. 研究開始当初の背景

(1) 血小板は出血を止めるために働く重要な血球細胞であるが、基礎となる病気が存在する場合には血栓を形成し、心筋梗塞や脳梗塞などの血栓症の原因となる。

(2) 血小板は、細胞外からの刺激を受けると、血漿蛋白であるフィブリノーゲンと結合し、フィブリノーゲンが血小板を架橋する形で血栓を形成し、止血機能を発揮する。

(3) フィブリノーゲンに結合する血小板膜上の蛋白がインテグリン α IIb β 3 であり、細胞外からの様々な刺激は血小板膜上の受容体を通じて細胞内の複数の遺伝子の連鎖反応を引き起こし、最終的にインテグリン α IIb β 3 の細胞内部位に作用し、細胞外部位のフィブリノーゲンに対する親和性を上昇させる。

(4) 我々は、この細胞内での連鎖反応に関わる遺伝子として RIAM というタンパク質を発見した。

(5) ノックダウンとよばれる遺伝子発現抑制手法を用いて RIAM の発現を阻害した培養細胞では、RIAM を発現抑制していない細胞に比べ、細胞外刺激に対するインテグリン α IIb β 3 のフィブリノーゲンへの結合能が低下している事が明らかとなり、RIAM が細胞外の刺激に対して細胞膜上の受容体より引き起こされる細胞内の遺伝子の連鎖反応に関与している事がわかった。しかし、この実験で、インテグリン α IIb β 3 のフィブリノーゲンへの結合能は半分程にしか低下しておらず、残存するインテグリン α IIb β 3 の活性は、ノックダウンによる遺伝子発現抑制が完全ではなかった事によるものか、RIAM の機能を補完する遺伝子が他に存在するのか定かではなかった。

2. 研究の目的

(1) これまでの血栓症に対する薬剤は、細胞外からの刺激に対する血小板上の受容体をブロックする事で血栓形成を抑制してきた。しかし、細胞外からの刺激は無数にあるため、全ての受容体をブロックする事は出来ない。

(2) 様々な受容体からの細胞内の遺伝子の連鎖反応は最終的にインテグリン α IIb β 3 の細胞内部位に作用する事から、これに関わる遺伝子とその役割がわかれば、一つの遺伝子の機能を止めるだけで複数の受容体からの連鎖反応（複数の外部からの刺激）を一度にブロックできる可能性もある。そんな薬剤があれば、これまでよりも効果的に血栓症を予防できる可能性がある訳である。

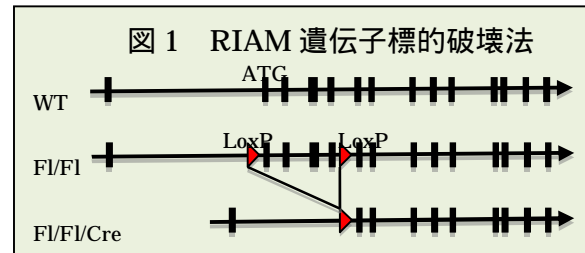
(3) 血小板内の情報を伝える連鎖反応に関わる遺伝子自体やその機能を詳細に解析する事で、その遺伝子が薬剤の標的として適しているかが明らかになる。

(4) 我々が発見した RIAM が、血小板のどのような機能に、どの様に関わっているのかを明らかにする事を目的としており、それにより抗血栓薬の標的になるにふさわしい遺伝子か否かを評価する事を最終的な目標としている。

3. 研究の方法

(1) RIAM がどんな細胞でどのような機能に関わっているか定かではない中で、RIAM の血小板における機能を解析するために、標的遺伝子破壊の手法を応用し、血小板のみで RIAM を欠損したマウスを作製する。具体的には、図 1 の様に正常の RIAM 遺伝子のゲノム配列のイントロンの部分に LoxP という配列を挿入した変異遺伝子を相同組み替えて正常 RIAM 遺伝子と入れ替えたマウス (FI

/FI) を作製します。次にこのマウスと血小板特異的に Cre という組み替え酵素を発現するマウスと掛け合わせて最終的に FI/FI/Cre マウスを作製します。この FI/FI/Cre マウスの巨核球（血小板の前駆細胞）では Cre が発現した事で LoxP で挟まれた領域が切り取られ、正常な蛋白が作れなくなる事になります。

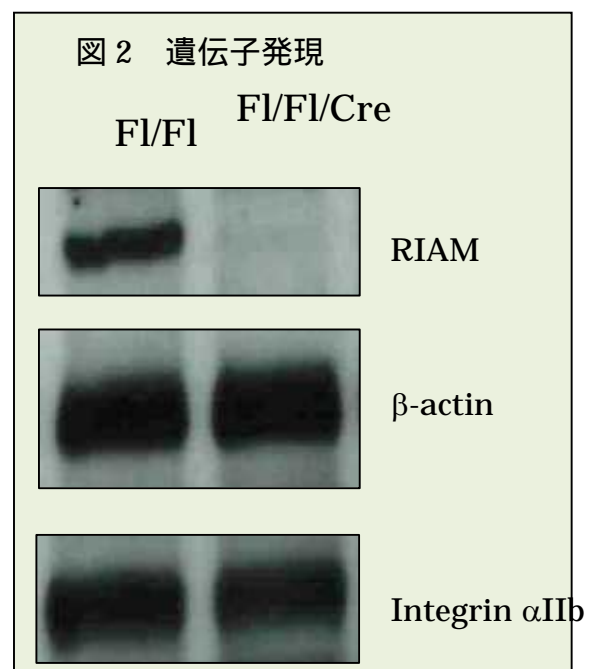


(2) RIAM 欠損血小板の、細胞外の刺激に対するフィブリノーゲン結合能、顆粒放出能、粘着能、凝集能などを in vitro で正常血小板と比較する。

(3) RIAM 欠損血小板を持つマウスの出血時間および血栓形成能を in vivo で正常マウスと比較する。

4. 研究成果

(1) RIAM 欠損血小板を持つマウスを作製。正常マウスおよび RIAM 欠損血小板を単離し、その蛋白の発現をウエスタンブロット法にて確認した。RIAM 欠損血小板では、RIAM の発現が見られなかったが、血小板特異的なインテグリン IIb および全ての細胞で発現の見られるアクチンの発現量には差がみられなかった。



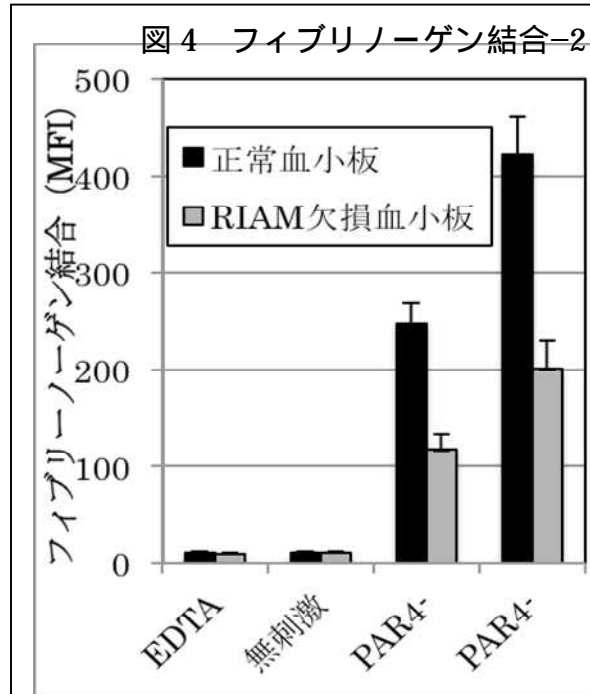
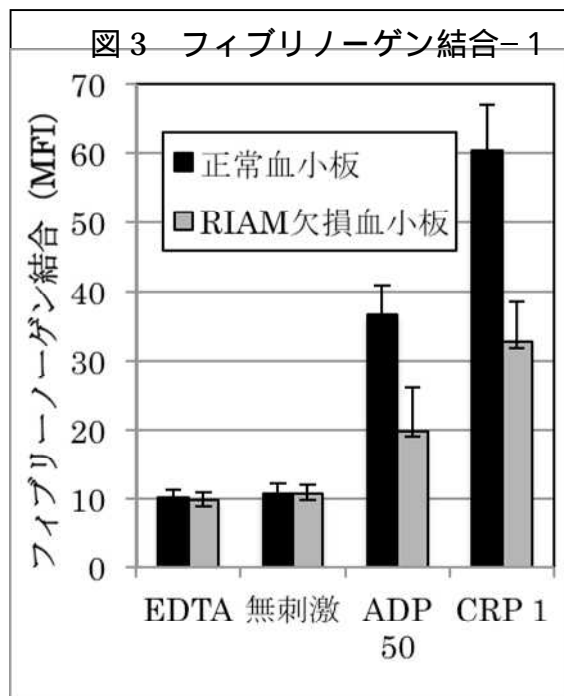
(2) RIAM 欠損血小板の様々な血小板凝集惹起剤に対するフィブリノーゲン結合量の検討。

正常マウスおよび RIAM 欠損血小板を単離し、血小板凝集を惹起する生理活性物質で刺激して蛍光標識フィブリノーゲンの血小板への結合量をフローサイトメーターで検討した。

血小板凝集を惹起する生理活性物質としては、ADP、コラーゲン受容体 GPVI のアゴニストである CRP、トロンビン受容体アゴニストである PAR4-AP を使用した。

ADP、CRP、PAR4-AP いずれの血小板凝集惹起剤に対しても RIAM 欠損血小板では、正常血小板と比較して、フィブリノーゲンの結合量が 30～40% 程度まで低下しており、RIAM がこの機能に関わっている事が改めて確認された。

また、以前我々が報告した培養細胞を用いた研究の結果と同様に RIAM が欠損していてもある程度のフィブリノーゲン結合が認められる事から、RIAM の機能を補完する様な他の遺伝子の存在が明らかとなった。(図 3, 4)



(3) 今後の研究計画

研究期間中には、予定していた RIAM 欠損血小板の解析が十分に終わらなかったため、今後、血小板のその他の機能である粘着、凝集、顆粒放出能などの in vitro の検討と合わせて、出血時間や血栓形成能などの in vivo の検討を加え、論文その他で成果発表を行う予定である。

また、今回の成果で血小板が外部からの刺激に対してフィブリノーゲンと結合し、凝集する過程において RIAM 以外の遺伝子が RIAM の機能を補完している事が確認されたので、その遺伝子の詳細についてもこれから解明するつもりである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 直英 (WATANABE NAOHIDE)

慶應義塾大学医学部・助教

研究者番号：90338054

(2)研究分担者 該当者なし

(3)連携研究者 該当者なし