

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591420

研究課題名(和文)血小板アポトーシス反応の生理的役割と臨床的意義

研究課題名(英文)Physiological role and clinical significance of platelet apoptosis

研究代表者

羽藤 高明 (HATO, TAKAAKI)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30172943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：私どもは血小板アポトーシス制御因子であるBak/Bcl-XL系の異常によって血小板数の異常をきたす疾患があるのではないかと考え、骨髄異形成症候群患者を対象にBakおよびBcl-XL遺伝子の塩基配列解析を行った。その結果、Bcl-XL遺伝子に5つの点突然変異を認めた。これらの各遺伝子変異をヒト細胞に導入したがアポトーシスは誘導されず、病態に関与している変異ではないと考えられた。また、本態性血小板血症の患者においても検討を行ったが、変異を有する症例は見出されなかった。これらのことからBak/Bcl-XL系の異常によって血小板数の異常をきたす造血器腫瘍疾患は極めてまれであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined if the Bak and Bcl-XL genes that are regulators for platelet apoptosis have mutations in patients with thrombocytopenia or thrombocytosis. The direct sequencing of these genes in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) found 5 point mutations in the Bcl-XL gene. Transfection of each mutant gene into human cell lines did not induce cell apoptosis, suggesting no involvement of these mutations in the pathogenesis of thrombocytopenia. We also determined the sequences of Bak and Bcl-XL genes in patients with essential thrombocythemia (ET). However, no patient had mutations in these genes. These results suggest that the Bak and Bcl-XL mutations are not responsible for thrombocytopenia or thrombocytosis in hematological malignancies including MDS and ET.

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：血小板減少 血小板増加 アポトーシス 造血器腫瘍

1. 研究開始当初の背景

アポトーシスは生体の恒常性を維持するために必須の機構であり、その異常は癌や自己免疫疾患の発症を誘発する。ほとんどの体細胞はアポトーシス機構の制御下にあるが、無核である血小板はアポトーシスではなく、活性化されると網内系で処理されてその寿命を終えるとされてきた。しかし、最近、血小板にもアポトーシス機構が備わっていて、アポトーシスが血小板寿命を規定していることが明らかになった。血小板では、前アポトーシス調節因子の Bak と抗アポトーシス因子の Bcl-XL が主に関わっていて、両者のバランスで血小板寿命が規定されている。すなわち、Bak の欠失は血小板寿命を延長させ、逆に Bcl-XL の機能不全は血小板寿命を短縮させて血小板減少を招来する。これらの知見から Bak および Bcl-XL 遺伝子の異常はアポトーシスの異常をきたして血小板減少症ないし血小板増加症をきたすことが推測されるがそのような報告はまだない。また、アポトーシスに陥った血小板と活性化血小板との関連についてもまだ明らかでない。

2. 研究の目的

私どもは血小板アポトーシス制御因子である Bak/Bcl-XL 系の異常によって血小板数の異常をきたす疾患があるのではないかと考えた。私どもは緩慢な経過をとる骨髓異形成症候群 (MDS) と本態性血小板血症 (ET) を対象として血小板内 Bak/Bcl-X 系に異常があるかどうかを検討することを計画した。

本研究では、MDS、特に血小板減少が先行する型と JAK2 変異陰性 ET 症例において Bak および Bcl-XL 遺伝子の変異解析と血小板アポトーシス機構に関わる各蛋白質の変化を測定することによって Bak/Bcl-XL 系の異常の有無と血小板異常についての関連を検討し、不均一な疾患群である MDS および ET の中で、新たな病態を有する一群を明らかにすることを試みた。また、アポトーシス血小板と活性化血小板の相違点を見出そうとした。

3. 研究の方法

(1) 血小板アポトーシスの異常と血小板減少・増多症との関連性

ET と MDS 患者血小板から mRNA を抽出し、血小板アポトーシス関連遺伝子 (Bak, Bcl-XL) の変異を検索した。

患者血小板のアポトーシスマーカーおよび蛋白機能解析を行う

(2) 血小板アポトーシス反応と活性化血小板との関連性

アポトーシス誘導血小板反応と血小板活性化反応における相違点について Scott 症候群疑い患者血小板を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) ET 患者での既知遺伝子変異の検索

ET の発症に深い関連のあることが知られている JAK2 V617F 等の既知の遺伝子変異についてアレル特異的 PCR 法を用いて検討した。37 例の ET 患者のうち、22 例 (59%) が JAK2 V617F 変異陽性であり、1 例が MPL W515L 変異陽性であった (3%)。したがって 14 例 (38%) の症例では JAK2 変異陰性であり、これらの患者では Bak/Bcl-XL 系の異常が発症に関与している可能性があると考えられた。

(2) 既知遺伝子異常のない ET 患者での Bak/Bcl-XL 遺伝子変異の検索

既知遺伝子異常のない ET 患者 14 例を対象として Bak および Bcl-XL の全エクソンについて遺伝子配列を決定したところ、Bak 遺伝子には既知の single nucleotide polymorphism (SNP) 以外には異常を認めなかったが、Bcl-XL 遺伝子には 5 例において T69P, S72T, S74T, G147C, E153D の各アミノ酸置換変異を伴う点突然変異を認めた。

(3) Bak/Bcl-XL 遺伝子変異の発現実験による機能解析

私どもが見出した 5 つの Bcl-XL 遺伝子の異常がアポトーシス異常に関連しているのかどうかを明らかにするために各遺伝子変異を導入した pcDNA3 発現ベクターを作成し、ヒト細胞である T293 細胞で発現させて、

Annexin V などのアポトーシスマーカーの変化と細胞増殖を観察した。その結果、これらの遺伝子変異の導入によってアポトーシスは誘導されず、病態に関与している遺伝子変異ではないと考えられた。

(4) MDS 患者での Bak/Bcl-XL 遺伝子変異の検索

血小板減少を認め、芽球の増加がみられない MDS 患者 40 例において Bak および Bcl-XL 遺伝子の変異を検索したが変異を認める症例は一例もなかった。

(5) アポトーシス誘導血小板反応と血小板活性化反応における相違点の検討

我々は Scott 症候群という極めてまれな疾患が疑われる患者について精査を行った。本患者血小板は血小板活性化反応の中でアポトーシス血小板に共通の血小板反応が欠如しているとされている。したがって、血小板活性化とアポトーシス誘導血小板の反応相違点を探る貴重な材料となることが期待される。そこで、本患者血小板について血小板表面におけるリン脂質依存性凝固反応について慎重に検討を重ねたが、Scott 症候群に特徴的な異常所見は見られないことが判明し、相違点を探ることができなかった。

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 7 件)

1. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Sato Y, Onishi S, Yasukawa M: Development of exogenous FVIII-specific inhibitor in a mild hemophilia patient with Glu272Lys mutation. *Haemophilia*, 査読有, 20:e179-182, 2014.
DOI:10.1111/hae.12363.
2. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Azuma T, Yasukawa M: Severe immune thrombocytopenia secondary to Waldenström's macroglobulinemia with anti-GPIIb/IX monoclonal IgM antibody.

Ann Hematol, 査読有, 93:711-712, 2014.
DOI:10.1007/s00277-013-1857-3

3. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Hayashi T, Yasukawa M: Novel causative and neutral mutations in a patient with protein C deficiency. *Thromb Res*, 査読有, 131:466-468, 2013.
DOI:10.1016/j.thromres.2013.01.021.
 4. 山之内 純、羽藤高明、三好一宏、小林慎治、東 太地、長谷川 均、安川正貴 rituximab を投与した難治性血栓性血小板減少性紫斑病の 3 症例 臨床血液 査読有, 54:205-209, 2013.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/54/2/54_205/_article
 5. 藤山泰二、井上仁、羽田野雅英、伊藤英太郎、米永吉邦、渡邊常太、串畑史樹、高田泰次、羽藤高明、羽賀博典 抗 HLA 抗体に伴う液性拒絶反応、血小板輸血不応症にて急激な経過をたどった生体部分肝移植の 1 例 肝臓 査読有, 54:51-59, 2013.
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/kanzo/-char/ja/>
 6. Shikata H, Yakushijin Y, Matsushita N, Sakai A, Sugita A, Nakamura N, Yamanouchi J, Azuma T, Hato T, Yasukawa M: Role of activation-induced cytidine deaminase in the progression of follicular lymphoma. *Cancer Sci* 査読有, 103:415-421, 2012.
DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02186.x.
 7. 羽藤高明 抗血小板薬モニター検査の臨床的意義 日本血栓止血学会誌 査読有, 23:352-357, 2012.
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjsth/-char/ja>
- 〔学会発表〕(計 5 件)
1. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Kunishima S, Yasukawa M. Successful treatment of

MYH9 disorders with romiplostim for neurosurgery. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13, 札幌市

2. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Yasukawa M. Novel causative and neutral mutations in a patient with protein C deficiency. The 24th congress of the international society of thrombosis and haemostasis 2013.6.29-7.04, Amsterdam, Netherlands
3. 山之内純、佐藤友理、新家敏之、羽藤高明 軽症血友病患者 A に出現したインヒビターの性状と遺伝子変異の解析 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 2013.5.30-6.01、山形市
4. Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Yasukawa M. Identification of causative and neutral mutations in a patient with protein C deficiency. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10.19-10.21, 京都市
5. 山之内純、羽藤高明 VASP リン酸化を指標にした抗血小板薬シロスタゾールの簡便な薬効モニタリング法の確立 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012.6.9, 東京

〔図書〕(計 4 件)

1. 羽藤高明 血栓性血小板減少性紫斑病 今日の治療指針 2014 654-655, 2014 医学書院
2. 羽藤高明 先天性および後天性血管障害による出血 血液疾患最新の治療 2014-2016 217-220, 2014 南江堂
3. 羽藤高明 血小板輸血の適応とそのピットフォール 出血性疾患の実践診療マニュアル 59-64, 2014 南江堂
4. 羽藤高明 Neutrophil extracellular traps (NETs)と血小板血栓形成 Annual Review 血液 2012、192-197, 2012. 中外医学社

〔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

羽藤 高明 (Hato, Takaaki)
愛媛大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 30172943

(2) 研究分担者

安川 正貴 (Yasukawa, Masaki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 60127917

山之内 純 (Yamanouchi, Jun)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10423451

(3) 連携研究者

なし