

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591429

研究課題名(和文) GPIIb/IIIa 異常による新規病態の解明

研究課題名(英文) Characterization of a novel disease entity due to GPIIb/IIIa mutations

研究代表者

國島 伸治 (KUNISHIMA, SHINJI)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・高度診断研究部・室長

研究者番号：60373495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：先天性巨大血小板性血小板減少症の新規病因として、GPIIb/IIIa受容体の膜近傍領域変異を明らかにした。この領域はGPIIb/IIIa定常状態構造の維持に重要であるため、変異によりGPIIb/IIIaは恒常的に活性化状態となり、リガンド結合なしで信号伝達が起こる。血小板膜上へのGPIIb/IIIa発現は低下し、活性化型GPIIb/IIIaを認識するPAC1抗体の結合を認めるがP-セレクチン発現は認めない。変異型GPIIb/IIIaを強制発現させた培養巨核球からは大型で少数の血小板が産生された。本病態は本邦の先天性巨大血小板性血小板減少症において3番目に高頻度である。

研究成果の概要(英文)：We identified and characterized the juxtamembrane domain mutations of the GPIIb/IIIa receptor as a novel etiology of congenital macrothrombocytopenia. Because this domain is important for the inactive conformation the receptor, GPIIb/IIIa become constitutively activated by the mutation without ligand binding. The surface expression of platelet GPIIb/IIIa is decreased. There is spontaneous binding of PAC1 antibody, which recognizes active conformation of GPIIb/IIIa, to resting platelets without P-selectin expression. Large and decreased platelets were produced from the mutant GPIIb/IIIa-transduced megakaryocytes. This condition is the third most common cause of congenital macrothrombocytopenia in Japan.

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：先天性血小板減少症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) われわれは、本邦初の Bernard-Soulier 症候群の分子異常を解明して以来、10 数年に渡り先天性巨大血小板性血小板減少症の病因病態解析を行なっている。May-Hegglin 異常の遺伝子座を決定後、原因遺伝子 *MYH9* を同定、検査診断法を確立し、新規疾患概念の *MYH9* 異常症を提唱し、その分子病態と臨床症状を明らかにした。また、先天性巨大血小板性血小板減少症の新規病因として微小管異常を明らかにした。

(2) 先天性巨大血小板性血小板減少症はきわめてまれであると考えられてきたが、日常診療において充分遭遇する頻度で存在し、特発性血小板減少性紫斑病と診断され、不必要な治療を受ける症例が少なくないことが明らかになっている。先天性巨大血小板性血小板減少症の正診率向上のために、新規病因の探索と鑑別診断法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

(1) 血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa の先天性欠損は、重篤な出血傾向を呈する血小板無力症を引き起こす。血小板無力症では血小板凝集機能を欠如するが、血小板数と血小板サイズは正常である。われわれは、先天性巨大血小板性血小板減少症の系統的解析において新規の GPIIb、GPIIIa 遺伝子変異を同定した。

(2) 本研究の目的は、GPIIb/IIIa 異常の新規病態を明らかにし、巨大血小板産生機序を解明し、先天性血小板減少症の分類と鑑別診断を発展させることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

先天性巨大血小板性血小板減少症を疑う症例で、Bernard-Soulier 症候群とその保因者、*MYH9* 異常症、1-tubulin 異常、2B 型 von Willebrand 病が除外された 27 症例を対象として GPIIb および GPIIIa 遺伝子配列解析を行なった。その後、新規の先天性巨大血小板性血小板減少症の解析にフローサイトメトリーによる GPIIb/IIIa 異常症のスクリーニング検査を行なった。

### (2) 血小板 GPIIb/IIIa 発現解析

末梢血から血小板を分離し、GPIb、GPIX、GPIIb、GPIIIa、GPIIb/IIIa 複合体に対する抗体を用いたフローサイトメトリー解析を行なった。GPIIb/IIIa 発現低下を認める症例については PAC-1 抗体結合を追加解析した。

### (3) GPIIb/IIIa 強制発現解析

症例解析において同定した変異の解析は、血小板より mRNA を抽出後、cDNA を合成し、PCR により野生型および変異型の全長 GPIIb cDNA および野生型の全長 GPIIIa cDNA を有する発現ベクターを作製した。D723H 変異を有

する GPIIIa 発現ベクターは部位特異的変異導入により作製した。

293T 細胞および CHO 細胞に GPIIb および GPIIIa 発現ベクターを遺伝子導入し、GPIIb/IIIa 発現と細胞形態をそれぞれフローサイトメトリーと免疫染色により解析した。また、導入細胞での FAK リン酸化を解析した。

GPIIb および GPIIIa cDNA を、それぞれ pGCDNsamIRES/EGFP および pGCDNsamIRES/huK0 レトロウイルスベクターに組み込み、VSVG 発現プラスミドと共にパッケージング細胞に感染後、レトロウイルスを得た。胎生 13.5 日マウス胎児肝臓細胞に GPIIb および GPIIIa 発現レトロウイルスを感染後、TPO 存在下にて培養し巨核球へと分化させ、胞体突起形成を観察した。

## 4. 研究成果

(1) 先天性巨大血小板性血小板減少症を疑う 27 症例中、1 症例において GPIIb 遺伝子にヘテロ接合性 R995W 変異を同定した。この変異は正常人 100 人において検出されず、多型としても登録されていなかった。

(2) 患者血小板膜上への GPIIb および GPIIIa 発現は低下し、PAC-1 抗体とフィブリノゲンの結合が認められたが、血小板活性化の指標となる P-セレクチン発現は認められなかった。新規症例においては GPIIb/IIIa 発現低下を指標に解析を進め、7 症例で GPIIb R995W を含めた 5 種類の GPIIb あるいは GPIIIa 遺伝子変異を同定した。

GPIIb R995W 変異は 4 家系で同定された。GPIIb 遺伝子のハプロタイプを決定したところ、4 家系全てで異なる GPIIb 遺伝子ハプロタイプを有していた。

(3) 293T 細胞を用いた強制発現実験においても患者血小板と同様に、4 種の変異型 GPIIb/IIIa へは PAC-1 結合が認められ、GPIIb/D723H GPIIIa も同様であり、変異型 GPIIb/IIIa 受容体は活性化状態にあることが示された。また、FAK の恒常的リン酸化も観察された。

(4) GPIIb R995W 変異が巨核球の血小板産生に与える影響を解析するため、マウス胎児肝臓細胞へ GPIIb と GPIIIa cDNA をレトロウイルスにより導入し、巨核球へと分化後に胞体突起形成を観察した。R995W 変異を有する GPIIb cDNA を導入した巨核球では、野生型と比較してより大きな胞体突起が観察され、R995W 変異は巨大血小板産生の病因となることが示唆された。

本研究は、従来血小板形態との関連性が全く報告されていなかった GPIIb/IIIa の異常が先天性巨大血小板性血小板減少症の原因となることを明らかにした。同定した変異は細

胞膜領域にあり、静止期 GPIIb/IIIa の構造保持のために必要であるため、変異により恒常的受容体活性化を引き起こす。GPIIb/IIIa の恒常的活性化は巨核球が十分に分化成熟する以前に血小板を産生するため、大型血小板と血小板減少もたらずことが示唆された。

#### 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 24 件)

1. Kashiwagi H, Kunishima S, Kiyomizu K, Amano Y, Shimada H, Morishita M, Kanakura Y, Tomiyama Y. Demonstration of novel gain-of-function mutations of IIb 3: association with macrothrombocytopenia and Glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Mol Genet Genomic Med.* 2013;1(2):77-86. doi: 10.1002/mgg3.9.
2. Kitamura K, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Furukawa K, Miyano S, Ogawa S, Kunishima S. Normal neutrophil myosin IIA localization in an immunofluorescence analysis can rule out MYH9 disorders. *J Thromb Haemost.* 2013;11(11):2071-3. doi: 10.1111/jth.12406.
3. Sato T, Kunishima S, Shirayama R, Ichikawa S, Sakai M, Kusuhara K. Bernard-Soulier syndrome due to compound heterozygosity for a novel glycoprotein Ib mutation. *Acta Haematol.* 2014;131(1):46-9. doi: 10.1159/000351057.
4. Miura K, Kurihara H, Horita S, Chikamoto H, Hattori M, Harita Y, Tsurumi H, Kajiho Y, Sawada Y, Sasaki S, Igarashi T, Kunishima S, Sekine T. Podocyte expression of nonmuscle myosin heavy chain-IIA decreases in idiopathic nephrotic syndrome, especially in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(12):2993-3003. doi: 10.1093/ndt/gft350.
5. Noris P, Favier R, Alessi MC, Geddis AE, Kunishima S, Heller PG, Giordano P, Niederhoffer KY, Bussel JB, Podda GM, Vianelli N, Kersseboom R, Pecci A, Gnan C, Marconi C, Auvrignon A, Cohen W, Yu JC, Iguchi A, Miller Imahiyerobo A, Boehlen F, Ghalloussi D, De Rocco D, Magini P, Civaschi E, Biino G, Seri M, Savoia A, Balduini CL. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood.* 2013;122(11):1987-9. doi: 10.1182/blood-2013-04-499319.
6. Suzuki N, Kunishima S, Ikejiri M, Maruyama S, Sone M, Takagi A, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T, Matsushita T. Establishment of mouse model of MYH9 disorders: heterozygous R702C mutation provokes macrothrombocytopenia with leukocyte inclusion bodies, renal glomerulosclerosis and hearing disability *PLoS One.* 2013;8(8):e71187. doi: 10.1371/journal.pone.0071187.
7. Hirata S, Takayama N, Jono-Ohnishi R, Endo H, Nakamura S, Dohda T, Nishi M, Hamazaki Y, Ishii E, Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H, Kunishima S, Eto K. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. *J Clin Invest.* 2013;123(9):3802-14. doi: 10.1172/JCI64721.
8. Kunishima S, Hayakawa A, Fujita K, Saito H. Transient macrothrombocytopenia associated with maternal-neonatal HPA-21bw incompatibility. *Thromb Res.* 2013;131(6):e286-8. doi: 10.1016/j.thromres.2013.05.005.
9. Kunishima S, Imai T, Kobayashi R, Kato M, Ogawa S, Saito H. Bernard-Soulier syndrome caused by a hemizygous GPIb mutation and 22q11.2 deletion. *Pediatr Int.* 2013;55(4):434-7. doi: 10.1111/ped.12105.
10. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 2013;92(3):431-8. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.01.015.
11. Murayama S, Akiyama M, Namba H, Wada Y, Ida H, Kunishima S. Familial cases with MYH9 disorders caused by MYH9 S96L mutation. *Pediatr Int.* 2013;55(1):102-4. doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03619.x.

12. Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M. Identification of the integrin  $\alpha$ <sub>3</sub>L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *Br J Haematol.* 2013;160(4):521-9. doi: 10.1111/bjh.12160.
13. Kunishima S, Tomii T, Kudo K, Saito H. G to T transversion at the first nucleotide of exon 26 of the MYH9 gene results in a novel missense mutation and abnormal splicing in platelets. *Eur J Med Genet.* 2012;55(12):763-5. doi: 10.1016/j.ejmg.2012.09.001.
14. Kitamura K, Kunishima S, Tahara M, Ogiwara S, Dobata N, Dobata T, Sugihara A, Nakashima T, Sasaki Y, Nagumo K, Kubota M, Kinugawa Y, Ieko M, Kumaki S. Transient hemiparesis in a 14-year-old boy with MYH9 disorders. *Int J Hematol.* 2012;96(3):376-9. doi: 10.1007/s12185-012-1149-z.
15. Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H, Kojima T. Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med.* 2012;366(25):2390-6. doi: 10.1056/NEJMoa1201994.
16. Uyeda T, Echizenya T, Eto S, Ohtani K, Sato T, Takahashi T, Ito E, Yonesaka S, Kunishima S. Adams-Oliver syndrome and familial MYH9 mutation. *Pediatr Int.* 2012;54(3):407-9. doi: 10.1111/j.1442-200X.2011.03466.x.
17. Matsunaga T, Mutai H, Kunishima S, Namba K, Morimoto N, Shinjo Y, Arimoto Y, Kataoka Y, Shintani T, Morita N, Sugiuchi T, Masuda S, Nakano A, Taiji H, Kaga K. A prevalent founder mutation and genotype-phenotype correlations of OTOF in Japanese patients with auditory neuropathy. *Clin Genet.* 2012;82(5):425-32. doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01897.x.
18. Ishida M, Mori Y, Ota N, Inaba T, Kunishima S. Association of a novel in-frame deletion mutation of the MYH9 gene with end-stage renal failure: case report and review of the literature. *Clin Nephrol.* 2013;80(3):218-22. doi: 10.5414/CN107237.
19. Tsuburaya R, Uematsu M, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Kunishima S, Kato M, Haginoya K, Tsuchiya S. Unusual ribbon-like periventricular heterotopia with congenital cataracts in a Japanese girl. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(3):674-7. doi: 10.1002/ajmg.a.34258.
20. Takeyama M, Uchida Y, Arai I, Kamamoto T, Nishikubo T, Kanehiro H, Sado T, Kunishima S, Takahashi Y. Efficacy of inchinkoto for a patient with liver fibrosis complicated with transient abnormal myelopoiesis in Down's syndrome. *Pediatr Int.* 2011;53(6):1093-6. doi: 10.1111/j.1442-200X.2011.03365.x.
21. Flatland B, Kunishima S. Successful immunostaining demonstrates abnormal intracytoplasmic MYH9 protein (NMMHC-IIA) in neutrophils of a dog with May-Hegglin anomaly. *Vet Clin Pathol.* 2011;40(4):409-10. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00378.x.
22. Hao J, Kunishima S, Guo X, Hu R, Gao W. A large family with MYH9 disorder caused by E1841K mutation suffering from serious kidney and hearing impairment and cataracts. *Ann Hematol.* 2012;91(7):1147-8. doi: 10.1007/s00277-011-1370-5.
23. Shiota M, Kunishima S, Hamabata T, Nakata M, Hata D. Early diagnosis improves the quality of life in MYH9 disorder. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;58(2):314-5. doi: 10.1002/pbc.23268.
24. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H. Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the  $\alpha$ <sub>IIb</sub> $\beta$ <sub>3</sub> receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood.* 2011;117(20):5479-84. doi: 10.1182/blood-2010-12-323691.

[学会発表](計13件)

1. 國島伸治 先天性巨大血小板症(シンポジウム「次世代シーケンサーによる小児血液、腫瘍疾患における研究の進展」第55回日本小児血液・がん学会学術集会 平成25年11月29-12月1日 福岡)
  2. Shinji Kunishima, Yusuke Okuno, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Hideki Muramatsu, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Koji Miyazaki, Michio Sakai, Masatoshi Ohtake, Ryoji Kobayashi, Akihiro Iguchi, Gen Niimi, Makoto Otsu, Yoshiyuki Takahashi, Satoru Miyano, Hidehiko Saito, Seiji Kojima, and Seishi Ogawa *ACTN1* mutations cause congenital macrothrombocytopenia 第75回日本血液学会総会 平成25年10月11-13日 札幌
  3. Shinji Kunishima, Yusuke Okuno, Masashi Sanada, Koji Miyazaki, Michio Sakai, Akihiro Iguchi, Satoru Miyano, Hidehiko Saito, Seiji Kojima, and Seishi Ogawa *ACTN1* mutations cause congenital macrothrombocytopenia (symposium) XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 29-July 4, 2013, Amsterdam
  4. 國島伸治 周産期血液疾患のUp to Date「先天性巨大血小板症の病因解明と鑑別診断の進歩」(ワークショップ)第23回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会 平成25年6月7-8日 奈良
  5. 國島伸治 先天性血小板異常症の分子病態 -先天性巨大血小板症- (教育講演) 第35回日本血栓止血学会学術集会 平成25年5月30-6月1日 山形
  6. Shinji Kunishima Inherited platelet disorders (Symposium) International Workshop on Hemostasis and Thrombosis, Bangkok, Thailand, May 24-26, 2013
  7. Shinji Kunishima Platelet function tests (Symposium) International Workshop on Hemostasis and Thrombosis, Bangkok, Thailand, May 24-26, 2013
  8. 國島伸治 分野別シンポジウム「先天性血液疾患の病態研究に関する最近の進歩」(シンポジウム)血小板異常症 第116回日本小児科学会学術集会 平成25年4月19-21日 広島
  9. 國島伸治 早川 晶 藤田花織 母子間HPA-21bw不適合に認められた一過性巨大血小板症第20回小児ITP研究会 平成24年11月17日 東京
  10. 國島伸治 先天性巨大血小板症(教育講演)(教育セッション7 血小板・ITP) 第53回日本小児血液・がん学会学術集会 平成23年11月25-27日 前橋
  11. Shinji Kunishima Diagnosis of congenital macrothrombocytopenias (Symposium) XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, July 23-28, 2011, Kyoto
  12. 國島伸治 Hao Jihong(郝冀洪) 山村喜美 May-Hegglin異常単球における封入体第12回日本検査血液学会学術集会 平成23年7月17-18日 倉敷
- 〔図書〕(計7件)
1. 國島伸治:血小板産生とその異常-先天性巨大血小板症- Annual Review 2014 血液(2014年1月)(高久史磨、小澤敬也、坂田洋一、金倉謙、小島勢二編集) 中外医学社、東京、p186-191, 2014.
  2. 國島伸治: Bernard-Soulier 症候群 日本臨床 新領域別症候群シリーズNo22 血液症候群第2版、日本臨床社、東京、p399-402, 2013.
  3. 國島伸治: Fechtner 症候群 日本臨床 新領域別症候群シリーズNo22 血液症候群第2版、日本臨床社、東京、p383-5, 2013.
  4. 國島伸治: Sebastian 症候群 日本臨床 新領域別症候群シリーズNo22 血液症候群第2版、日本臨床社、東京、p380-2, 2013.
  5. 國島伸治: Epstein 症候群 日本臨床 新領域別症候群シリーズNo22 血液症候群第2版、日本臨床社、東京、p372-4, 2013.
  6. 國島伸治、齋藤英彦: May-Hegglin anomaly . 標本に学ぶ血液疾患症例、医薬ジャーナル社、大阪、p276-80、2012年1月
  7. 國島伸治: 先天性巨大血小板症の原因となるGPIIb/IIIa異常 Annual Review 2012 血液(2012年1月)(高久史磨、小澤敬也、坂田洋一、金倉謙、小島勢二編集) 中外医学社、東京、p181-191
- 〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.nnh.go.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

國島伸治 ( KUNISHIMA SHINJI )

研究者番号 : 60373495