

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591422

研究課題名(和文)新規実験系による血栓形成の制御分子の解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory molecule in platelets for thrombosis employing CMK cell system

研究代表者

富山 佳昭 (TOMIYAMA, Yoshiaki)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80252667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：インテグリン IIb/3は血栓形成の中核を形成し、その機能は病的環境においてダイナミックに変化する。本研究では、申請者が開発したCMK細胞システムを用いてその分子機構を解析した。

CMKにおける IIb/3活性化は、CHO細胞とは異なり talin-1 head domain (THD) を強制発現させるのみでは活性化せず、血小板と同じくアゴニスト刺激が不可欠であり、talin-1およびkindlin-3依存性であった。種々の talin-1変異体を用いた解析により、talinと 3のmembrane proximal regionとの結合が IIb/3活性化に極めて重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Platelet integrin IIb/3 plays a crucial role in thrombosis as well as hemostasis. In this study, we have investigated the regulatory mechanism for IIb/3 function employing novel CMK cell system.

We demonstrated that agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 were crucial for IIb/3 activation in CMK cells: overexpression of talin head domain is sufficient for the activation of IIb/3 exogenously expressed on CHO cells, but not for endogenous IIb/3 expressed on CMK cells in the absence of agonists.

In addition, employing several talin mutants, we strongly suggested that interaction between talin-1 and membrane proximal region of 3 plays a crucial role in IIb/3 activation.

研究分野：血栓・止血

キーワード：インテグリン IIb/3 CMK inside-out signaling talin-1 kindlin-3

1. 研究開始当初の背景

血管病、特に動脈血栓性疾患の発症抑制およびその制御法の開発は現代医療に課せられた最重要課題の一つであると言える。事実、動脈硬化を基盤とした致死的な動脈血栓症は、現代社会における高齢化やメタボリックシンドロームの増加に伴い著しく増加しており、本邦のみならず世界の死因の約 30%を占める極めて重大な疾病である。血小板は動脈血栓発症の中核を形成するだけでなく、IL-1 や MCP-1、CD40L、SDF-1 などのサイトカインを放出し動脈硬化進展や血管新生に大きく関与していることが最近明らかとなってきた (Massberg et al. J Exp Med 2002, 2006)。このように血小板機能、特にその機能の中核である血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の制御機構を解明し標的分子を同定することは、出血性疾患の解明のみならず、血管病発症を制御する上で必要不可欠である。

世界の多くの研究者は $\alpha_{IIb}\beta_3$ の制御機構を解析する有効な実験系が無い場合、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ を異所性に 293T 細胞や CHO 細胞に発現させ機能解析しているが、これらの系で得られた成果が血小板にそのまま応用しうるかは疑問が多い。Talin-1 の $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化における重要性は CHO にて同定されたが、その後 talin-1 の conditional KO マウスにてその重要性が証明された。一方 kindlin3 は直接 KO マウスを作製し、その重要性が証明された (Nieswandt, et al. J Exp Med 2007, Moser, et al. Nat Med 2008)。しかしながら、CHO 細胞には kindlin3 の発現はなく、kindlin2 が発現しており、このことも血小板と相違を際立させている。

2. 研究の目的

本研究では血小板機能、特に $\alpha_{IIb}\beta_3$ 機能の制御機構のさらなる解明をめざし、申請者が新たに確立した CMK 細胞システムを用いて種々の talin および kindlin3 変異分子の導入や knockdown により $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

CMK 細胞システムは、CHO 細胞や 293T 細胞とは異なり、CD42b-high 分画において研究成果の項に示すように生理的刺激により $\alpha_{IIb}\beta_3$ が一過性活性化する極めてユニークな実験システムである。この成績は、血小板における $\alpha_{IIb}\beta_3$ 制御機構をこの実験システムが保持していることを示している。

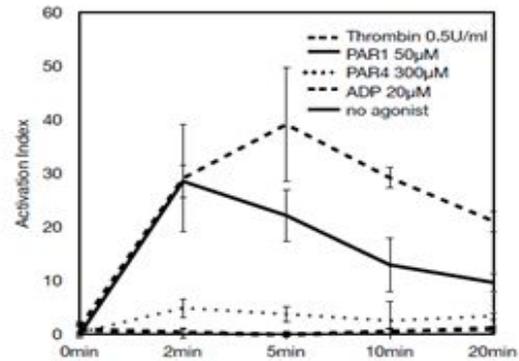
レンチウイルスベクターを用いた遺伝子ノックダウンを行う。

一方、以下の分子に関しては一過性の過剰発現系を用いてその分子機構を明らかにする: Talin-1 全長、talin head domain (THD)、さらには種々の talin 変異体 (Talin の autoinhibition 変異体、膜結合部位変異体、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 結合変異体など)。 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化は PAC-1 抗体を用いた短時間反応系 (initial

velocity assay) にて解析した。

4. 研究成果

下図に示すように CMK 細胞は生理的アゴニスト濃度により一過性ではあるが、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ が活性化することを確認した。



RNAi による蛋白発現ノックダウン、あるいは蛋白過剰発現を用いて、talin-1 と kindlin-3 の遺伝子改変を行った。Talin-1 あるいは kindlin-3 をノックダウンすると $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化は著しく障害された。このことより、CMK 細胞システムにおける $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化は血小板と同様に、talin-1、kindlin3 依存性であることが示された。

THD の過剰発現は CHO 細胞ではアゴニスト刺激を必要とせず $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化を誘導するが、申請者の CMK 細胞システムでは $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化はアゴニスト刺激が必須であった。THD、talin-1 全長および kindlin-3 の過剰発現にてアゴニスト存在下での $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化は有意に増加した。Talin-1 の自己抑制を解除する変異体において、talin-1 全長では $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化は増強したが、THD では増強しなかった。Talin-1 と $\alpha_{IIb}\beta_3$ の結合部位に関して、種々の talin 変異体を作製し解析した結果、talin と $\alpha_{IIb}\beta_3$ membrane proximal region との結合が、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ membrane distal region の NPXY モチーフ結合に比較し、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化において極めて重要であることが明らかとなった。

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 10 件)

1. Tomiyama Y. Eliminate dark side from antiplatelet therapy. Blood, 査読有, 123:2599-2601, 2014. doi: 10.1182/blood-2014-03-560417
2. Kiyokawa T, Koh Y, Mimura K, Nakayama K, Hosokawa M, Sakuragi M, Morikawa T, Nakao M, Aochi H, Fukumori Y, Kanagawa T, Nagamine K, Kimura T, Tomiyama Y. A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia in the presence of both anti-HPA-4b and

- anti-HPA-5b antibody: clinical and serological analysis of the subsequent pregnancy. *Int J Hematol*, 査読有, 100:398-401, 2014. doi: 10.1007/s12185-014-1620-0
3. Honda S, Shirokuni-Ikejima H, Tadokoro S, Tomiyama Y, Miyata T. The Integrin-Linked Kinase-PINCH-Parvin Complex Supports Integrin IIb 3 Activation. *PLoS One*, 査読有, 8:e85498, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0085498
 4. Nakazawa T, Tadokoro S, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for IIb 3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Exp Hematol*, 査読有, 41:79-90, 2013. doi: 10.1016/j.exphem.2012.09.011
 5. Kashiwagi H, Tomiyama Y. Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia. *Int J Hematol*, 査読有, 98:24-33, 2013. doi: 10.1007/s12185-013-1370-4
 6. 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. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 査読有, 1:77-86, 2013. doi: 10.1002/mgg3.9
 7. Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Shigekawa M, Shimizu S, Hayashi Y, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Kiyomizu K, Tadokoro S, Tomiyama Y, Hayashi N, Takehara T. Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages. *Cell Death Differ*, 査読有, 19:1856-1869, 2012. doi: 10.1038/cdd.2012.88.
 8. Shirasugi Y, Ando K, Miyazaki K, Tomiyama Y, Iwato K, Okamoto S, Kurokawa M, Kirito K, Hashino S, Ninomiya H, Mori S, Yonemura Y, Usuki K, Wei H, Lizambri R. An open-label extension study evaluating the safety and efficacy of romiplostim for up to 3.5 years in thrombocytopenic Japanese patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Int J Hematol*, 査読有, 95:652-659, 2012. doi: 10.1007/s12185-012-1065-2.
 9. Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Recognition of highly restricted regions in the α -propeller domain of IIb by platelet-associated anti-IIb 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood*, 査読有, 120:1499-1509, 2012. doi: 10.1182/blood-2012-02-409995.
 10. Tomiyama Y, Miyakawa Y, Okamoto S, Katsutani S, Kimura A, Okoshi Y, Ninomiya H, Kosugi H, Nomura S, Ozaki K, Ikeda Y, Hattori T, Katsura K, Kanakura Y. A lower starting dose of eltrombopag is efficacious in Japanese patients with previously treated chronic immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*, 査読有, 10:799-806, 2012. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04695.x.
- [学会発表](計22件)
1. 第76回日本血液学会学術集会 (2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 大阪) 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 森川陽一郎, 加藤 恒, 田所誠司, 小亀浩市, 本田繁則, 宮田敏行, 金倉 讓, 富山佳昭 (発表日 11.2) (一般口演) IIb 3 活性化変異、IIb(R990W)ノックインマウスは巨大血小板減少症を伴う血小板無力症様の表現型を示す
 2. 第76回日本血液学会学術集会 (2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 大阪) 櫻木美基子, 林 悟, 丸山美保, 兜森 修, 清川知子, 永峰啓丞, 加藤 恒, 柏木浩和, 金倉 讓, 富山佳昭 (発表日 11.2) (一般口演) Diagnostic value of IPF% measured by XN-1000 analyzer for primary ITP is comparable with FCM method
 3. 第36回日本血栓止血学会学術集会 (2014.5.29-31, 大阪国際交流センター, 大阪, 大阪) 富山佳昭 (発表日 5.30) (教育講演) 血小板機能異常症の分子病態
 4. 第36回日本血栓止血学会学術集会 (2014.5.29-31, 大阪国際交流センター, 大阪, 大阪) 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 森川陽一郎, 加藤 恒, 田所誠司, 小亀浩市, 本田繁則, 宮田敏行, 金倉 讓, 富山佳昭 (発表日 5.31) (口演) インテグリン IIb 3 活性化変異、IIb(R990W)ノックインマウスの解析
 5. 第36回日本血栓止血学会学術集会 (2014.5.29-31, 大阪国際交流センター, 大阪, 大阪) 本田繁則, 池島裕子, 田所誠司, 富山佳昭, 宮田敏行 (発表日 5.31) (ポスター) インテグリン α IIb β 3 機能発現における Integrin-linked kinase の役割
 6. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014.5.15-17, 奈良県文化会館, 奈良, 奈良) 清川知子, 中山小太郎純友, 細川美香, 櫻木美基子, 森川珠世, 中尾まゆみ, 青地 寛, 永峰啓丞, 味村和哉, 木村 正, 高 陽淑, 福森泰雄, 富山佳昭 (発表日 5.15) (口演) HPA5b 抗体に起因する NAIT

- 症例：第1子と第2子のHPA抗体の解析
7. The American Society of Hematology 56th Annual Meeting (2014.12.6-9, Moscone Center, San Francisco, USA) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y (発表日 12.8)(Poster) IIb(R990W), a constitutive activating mutation of integrin IIb 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function
 8. 第75回日本血液学会学術集会 (2013.10.11-13, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館, 北海道, 札幌) 林 悟, 柏木浩和, 清水一亘, 西口修平, 金倉 謙, 富山佳昭(発表日 10.11)(ポスター) Pathophysiology of thrombocytopenia associated with chronic hepatitis C
 9. 第35回日本血栓止血学会学術集会 (2013.5.30-6.1, 山形国際ホテル, 山形, 山形) 柏木浩和, 清水一亘, 田所誠司, 富山佳昭, 金倉 謙 (発表日 5.30)(口演) IIb 3細胞内活性化変異と血小板顆粒放出異常
 10. 第35回日本血栓止血学会学術集会 (2013.5.30-6.1, 山形国際ホテル, 山形) 加藤 恒, Sanford J. Shattil, 富山佳昭(発表日 5.31)(口演) 腫瘍細胞インテグリン1活性化の転移における重要性
 11. 第35回日本血栓止血学会学術集会 (2013.5.30-6.1, 山形国際ホテル, 山形, 山形) 清水一亘, 柏木浩和, 加藤 恒, 田所誠司, 本田繁則, 金倉 謙, 富山佳昭 (発表日 6.1)(ポスター) Primary ITP患者の血小板関連抗 IIb 3抗体のエピトープの同定と臨床経過に関する検討
 12. 平成25年日本検査血液学会静岡支部学術集会 (2013.3.23, 静岡市立静岡病院, 静岡, 静岡) 富山佳昭 (発表日 3.23)(講演) 血小板減少症の病態と診断
 13. The 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2013.6.29-7.4, Amsterdam RAI, Amsterdam, Netherland) Tomiyama Y, Kiyomizu K, Kashiwagi H (発表日 6.29)(SSC meeting, Oral) Autoantigenic epitopes on GPIIb-IIIa in ITP
 14. 第74回日本血液学会学術集会 (2012.10.19-21, 京都国際会議場, 京都, 京都) Tomiyama Y, Kiyomizu K, Kashiwagi H (発表日 10.19)(シンポジウム) Pathophysiology and diagnosis of primary immune thrombocytopenia
 15. 第74回日本血液学会学術集会 (2012.10.19-21, 京都京都国際会議場, 京都, 京都) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Tomiyama Y, Kanakura Y(発表日 10.20)(一般口演) PA anti-GPIIb/IIIa Abs in primary ITP recognize highly restricted regions in GPIIb with clonality
 16. 第34回日本血栓止血学会学術集会 (2012.6.7-9, ハイヤットリージェンシー 東京, 東京, 新宿) 柏木浩和, 清水一亘, 富山佳昭 (発表日 6.7)(シンポジウム) Abnormal thrombopoiesis associated with integrin IIb 3 activating mutations
 17. 第34回日本血栓止血学会学術集会 (2012.6.7-9, ハイヤットリージェンシー 東京, 東京, 新宿) 中澤剛士, 田所誠司, 清水一亘, 柏木浩和, 本田繁則, 金倉 謙, 富山佳昭 (発表日 6.7-9)(ポスター) ヒト巨核球系細胞株CMKにおけるIIb 3の活性化には agonist, talin-1, kindlin-3が必須である
 18. 第34回日本血栓止血学会学術集会 (2012.6.7-9, ハイヤットリージェンシー 東京, 東京, 新宿) 清水一亘, 柏木浩和, 中澤剛士, 田所誠司, 本田繁則, 金倉 謙, 富山佳昭 (発表日 6.8)(口演) ITP患者のPA anti-GPIIb/IIIa抗体の多くはGPIIbプロペラ領域の極めて限定された部位に結合する
 19. 第60回日本輸血・細胞治療学会総会 (2012.5.25-27, ホテルハマツ, 福島, 郡山) 富山佳昭 (発表日 5.26)(教育講演) 難治性特発性血小板減少性紫斑病の治療
 20. 第109回日本内科学会講演会 (2012.4.13-15, みやこめっせ, 京都, 京都) 富山佳昭 (発表日 4.15)(教育講演) 新規薬剤による免疫性血小板減少症の治療
 21. The 17th Congress of the European Hematology Association (2012.6.14-17, Amsterdam, Netherlands) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y (発表日 6.15)(Poster) Platelet-associated anti-GPIIb/IIIa autoantibodies in primary immune thrombocytopenia recognize highly restricted regions in the beta-propeller domain of GPIIb with clonality.
 22. The 17th Congress of the European Hematology Association (2012.6.14-17, Amsterdam, Netherlands) Tomiyama Y (発表日 6.16) (EHA-JSH Joint Symposium) Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia

〔図書〕(計5件)

1. 柏木浩和, 富山佳昭. 血小板機能異常症. よくわかる血栓・止血異常の診療(金倉 譲, 富山佳昭編), 中山書店, 東京, 2014, 297 ページ(92-104)
2. 富山佳昭. ITP の治療指針. EBM 血液疾患の治療 2015-2016 (金倉 譲, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸編), 中外医学社, 東京, 2014, 555 ページ(408-412)
3. 富山佳昭. 免疫性血小板減少性紫斑病. 血液疾患 最新の治療- 2014-2016 - (直江知樹, 小澤敬也, 中尾眞二編), 南江堂, 東京, 2014, 373 ページ(221-224)
4. 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 今日の治療指針 2013 年版(山口 徹, 北原光夫, 福井次矢編), 医学書院, 東京, 2013, 1955 ページ(621-623)
5. Tomiyama Y. Thrombopoietin receptor agonists. In Current & Emerging Treatments for Immune Thrombocytopenia. (Salama A edit) Future Medicine, UK, 2013, 129 ページ (88-106). doi: 10.2217/ebo.12.186

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学医学部附属病院輸血部

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/hp-blood/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

富山 佳昭 (TOMIYAMA Yoshiaki)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80252667

(2)研究分担者

柏木 浩和 (KASHIWAGI Hirokazu)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10432535

田所 誠司 (TODOKORO Seiji)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80403062