

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461448

研究課題名(和文) 血小板インテグリン活性化機構の解明と動脈血栓形成に関する検討

研究課題名(英文) Arterial thrombosis and platelet integrin activation.

研究代表者

柏木 浩和 (Kashiwagi, Hirokazu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10432535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は血小板活性化機構の解明を目的とし、まずインテグリン α IIb細胞内領域に遺伝子変異を有する遺伝性巨大血小板減少症例の解析より、血小板内FAKの恒常的活性化、シグナル伝達への影響を明らかにした。さらに α IIb 3活性化変異ノックインマウス、 α IIb (R995W) の解析では、 α IIb細胞内領域の変異が血小板産生障害による血小板数の低下、血小板表面への α IIb 3発現低下を起こすとともに、著明な血小板活性化障害の原因となることを明らかとした。また、著明な出血傾向を有する症例の解析より α IIb 3活性化に必須のCalDAG-GEFI欠損症例を同定し α IIb 3活性化における重要性も明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The regulation of platelet activation is quite important for prevention of arterial thrombosis. To explore the mechanism of platelet activation, the intraplatelet signaling was analyzed in platelets of patients with macrothrombocytopenia. Increased FAK phosphorylation in all of the platelets with integrin α IIb cytoplasmic tail mutations suggests the importance of α IIb cytoplasmic tail in platelet signaling. The effect of mutation in α IIb cytoplasmic tail was also studied using α IIb-(R995W) knock-in mice. The number of platelets, platelet production, and the surface expression of α IIb 3 were decreased in knock-in mice. Furthermore, in vitro thrombus formation under flow condition was significantly impaired in knock-in mice. The analysis of a patient with bleeding problems due to CalDAG-GEFI deficiency clearly showed the role of CalDAG-GEFI in α IIb 3 inside-out signaling. These results will contribute for better anti-platelet therapy in patients with arterial thrombosis.

研究分野：血小板

キーワード：血小板 GPIIb/IIIa inside-outシグナル 血栓症

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化を基盤とした心筋梗塞や脳梗塞などの血栓症は、全死因の約 3 割を占める。これら動脈血栓症においては血小板がその主体をなすことから、血小板活性化機構を明らかにすることは緊近の課題である。血小板表面には複数の膜糖蛋白(GP)が発現しており、これらが細胞外マトリックスや可溶性蛋白の受容体として作用することにより血小板機能を制御する。血小板インテグリン α IIB β 3(GPIIb/IIIa)はフィブリノゲンおよび von Willebrand 因子の受容体として止血機能の中核を担っていることは、 α IIB β 3 の先天性欠損症である Glanzmann 血小板無力症例の著明な出血傾向からも示されている。 α IIB β 3 は通常では非活性化状態にあるが、各種血小板アゴニスト刺激からの細胞内シグナル (inside-out signal) により構造変化を生じその受容体機能を発揮するようになる。リガンドが結合した α IIB β 3 は更に細胞内にシグナルを生じ (outside-in signal) 血小板伸展、血餅退縮をきたす。 α IIB β 3 活性化には Talin や Kindlin-3 がその細胞内領域に結合することが重要であるが、その制御機構に関しては不明な点が多い。

また我々は、先天性巨大血小板減少症例の解析から α IIB β 3 の恒常的活性化を誘導する α IIB β 3 細胞内領域の変異を複数明らかにした。このことは従来関連がないと思われていた血小板産生および正常形態の維持に α IIB β 3 活性化が関与している可能性を示唆しているがその詳細なメカニズムは不明である。また α IIB β 3 の恒常的活性化が血小板機能および動脈血栓形成にどのような影響を与えるかも明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では α IIB β 3 活性化異常の症例および α IIB β 3 活性化変異ノックインマウスを用いて、 α IIB β 3 活性化機構の解明およびその血小板形態および血小板数維持における意義、更に動脈血栓形成への影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) α IIB β 3 細胞内領域とシグナル伝達： α IIB β 3 変異を導入した発現ベクターを作製、293T 細胞あるいは CHO 細胞に発現させ、 α IIB β 3 活性化および下流シグナル分子の検討を行った。

(2) α IIB β 3 活性化変異である α Ib(R995W)に相当するマウス α Ib(R990W)変異を導入したノックイン(KI)マウスを作製。以下の検討を行った：

血小板数および血小板機能の検討：出血時間、マウス血小板を用いた各種アゴニスト刺激前後の IIB β 活性化、血小板顆粒放出能を検討した。また血小板寿命および抗血小板抗体投与後の血小板減少からの回復、TPO 投

与後の血小板数増加反応を検討した。

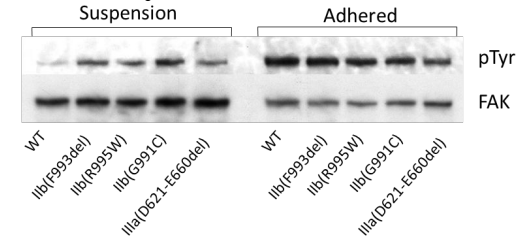
流動条件下における血小板接着能・凝集能：固相化したコラーゲンへの接着能および血栓形成能を、流動条件下で、マウスより採取した血小板を用いて検討した。

マウス血栓モデルを用いた検討：FeCl₃ を用いたマウス血栓誘発モデルを用いて、血栓形成能を検討した。

(3) 著明な出血傾向を認めた血小板機能異常症患者の原因遺伝子の検討を行った。

4. 研究成果

(1) α IIB β 3 細胞内領域とシグナル伝達：我々は、遺伝性巨大血小板減少症患者の解析から、 α IIB β 3 細胞内領域における複数の α IIB β 3 恒常的活性化変異を見いだした。これらの変異が、どのように血小板形態、血小板数、機能に影響を与えているのかを明らかにするため細胞内シグナルについての検討を行った。その結果、いずれの活性化変異においても FAK が恒常的に活性化していることが明らかになった。



(2) α IIB β 3 活性化変異 KI マウスを用いた検討：恒常的活性化変異である α Ib(R990W)変異導入マウスを作製した。変異 KI マウスはほぼメンデルの法則に則り生まれ、明らかな出血症状は認めなかった。血小板数は野生型(WT) $1.22 \pm 1.1 (\times 10^6 / \mu\text{l})$ 、ヘテロマウス [R990W(+/-)] 1.10 ± 1.4 、ホモマウス [R990W(+/+)] $0.91 \pm 1.1 (\text{mean} \pm \text{SD})$ と KI マウスで軽度低下しており、Flow cytometry にて KI マウス血小板では血小板サイズの有意な増大を認めた。

	WT	R990W (Het)	R990W (Homo)	
WBC ($\times 10^9 / \text{L}$)	7.87 \pm 2.38	7.34 \pm 2.25	6.30 \pm 2.42	n=11
RBC ($\times 10^{12} / \text{L}$)	9.84 \pm 0.44	9.82 \pm 0.47	9.45 \pm 0.47	n=11
HGB (g/dL)	14.5 \pm 0.55	14.0 \pm 0.42*	13.1 \pm 1.62*	n=11
HCT (%)	50.6 \pm 2.4	49.8 \pm 2.0	48.6 \pm 2.0	n=11
PLT ($\times 10^9 / \text{L}$)	1.220 \pm 109	1.100 \pm 144*	913 \pm 113*	n=6
RP%	8.02 \pm 1.99	7.21 \pm 1.41	7.76 \pm 2.10	n=6
ARP ($\times 10^9 / \text{L}$)	102 \pm 21.9	84.0 \pm 23.7	66.6 \pm 12.3*	n=6
TPO (pg/ml)	374 \pm 155	380 \pm 83	430 \pm 283	n=5

血小板表面 α IIB β 3 発現は WT と比べヘテロマウスで $74 \pm 3.4\%$ であり、ホモマウスでは $3.3 \pm 0.6\%$ と著明な低下を認めた。出血時間はヘテロマウスでは WT と差を認めなかったが、ホモマウスでは著明に延長していた。またコラーゲンおよび PAR4-TRAP 刺激による血小板凝集もホモマウス血小板では著明に抑制されていた。より生体内に近い条件下における血小板機能を検討するため、流動条件下でのコラーゲン上での接着および凝集塊形成

を検討したところ、ホモ KI マウスにおいては WT やヘテロ KI マウスに比べ著明な機能障害を認めた。また腸間膜動脈を用いた血栓形成モデルにおいても同様にホモ KI マウスでは血栓形成の著明な低下を認めた。以上のように、 α IIB(R990W)KI マウスにおいて、ヒトと同様に軽度の血小板減少と血小板の大型化が認められた。ホモマウスにおいては血小板 α IIB β 3 の発現低下とともに血小板機能低下が認められ、血小板無力症様の表現型を呈することが明らかとなった。

血小板数低下の原因として、ピオチン標識血小板を用いた血小板寿命の測定を行ったところ、ホモ KI マウスにおいては軽度ではあるが有意な血小板寿命の短縮を認めた(血小板半減時間: WT 29.0 ± 4.3 hr, ヘテロ KI 24.9 ± 10.6 hr, ホモ KI 19.5 ± 2.3 hr)。また、定常状態において幼若な血小板である網状血小板数の低下を認めたことから、血小板産生障害の存在が示唆された。抗血小板抗体により誘発した血小板減少からの回復やトロンボポエチン投与後の血小板増加がホモ KI マウスにおいては障害されており、これらの結果からも KI マウスにおける血小板減少の一因に血小板産生障害が関与していることが明らかとなった。

(3) 幼児期より出血傾向を認める症例の解析から、世界で 2 例目の CalDAG-GEFI 異常症を同定した。CalDAG-GEFI は RapI の活性化に關する分子であり、talin, kindlin-3 を介する α IIB β 3 の活性化に必須の分子と考えられていた。本例では α IIB β 3 が正常に発現しているにもかかわらず、各種アゴニストによる α IIB β 3 活性化が著明に障害されていた。 α IIB β 3 inside-out シグナルに關する各種分子を検討した結果、本例においては CalDAG-GEFI 発現が著明に低下していることを見だし、その原因となる遺伝子異常を明らかにした。本例においては特にアゴニスト刺激早期における α IIB β 3 活性化の障害が強くと考えられ、CalDAG-GEFI の血小板機能における重要性をヒトにおいて明らかにすることに成功した。

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)

Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. International Journal of Hematology、査読有、101 巻、2015、369-375.

DOI:10.1007/s12185-015-1741-0.

Miyakawa Y, Katsutani S, Yano T, Nomura S, Nishiwaki K, Tomiyama Y, Higashihara M, Shirasugi Y, Nishikawa M, Ozaki K, Abe T, Kikuchi K, Kanakura Y, Fujimura K, Ikeda Y, Okamoto S. Efficacy and safety of rituximab in Japanese patients with relapsed chronic immune thrombocytopenia refractory to conventional therapy. International Journal of Hematology、査読有、102 巻、2015、654-661

柏木浩和、冨山佳昭 . ITP の病態と治療の進歩 . 臨床血液 . 査読無、56 巻、2015、177-184

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. International Journal of Hematology、査読有、100 巻、2014、398-401. DOI:10.1007/s12185-014-1620-0

Tomiyama Y. Eliminate dark side from antiplatelet therapy. Blood、査読無、123 巻、2014、2599-2601. DOI:10.1182/blood-2014-03-560417.

柏木浩和、冨山佳昭 . 特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の治療 . 臨床血液、査読無、55 巻、2014、2087-2094

Kashiwagi H, Kunishima S, Kiyomizu K, Amano Y, Shimada H, Morishita M, Kanakura Y, Tomiyama Y. Demonstration of novel gain-of-function mutations of α IIB β 3: association with macrothrombocytopenia and glanzmann thrombasthenia-like phenotype Molecular Genetics & Genomic Medicine. 査読有、1 巻、2013、77-86. DOI:10.1002/mgg3.9

Kashiwagi H, Tomiyama Y. Pathology and management of primary immune thrombocytopenia. International Journal of Hematology、査読無、98 巻、2013、24-33. DOI:10.1007/s12185-013-1370-4

[学会発表](計 18 件)

加藤恒、中沢洋三、盛田大介、黒川由美、柏木浩和、森川陽一郎、金倉謙、冨山佳昭 . Severe bleeding tendency and impaired platelet function in a patient with CalDAG-GEFI deficiency . 第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16 日、ホテル日航金沢(石川県、金沢市)

Kato H, Nakazawa Y, Kashiwagi H, Tadokoro S, Morikawa Y, Morita D, Kurokawa Y, Kanakura Y, Tomiyama Y.

Severe bleeding tendency and impaired platelet function in a patient with CalDAG-GEFI deficiency. The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis(国際学会) 2015年06月24日、The Metro Tronto Convention Centre, Tronto, Canada

Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasi (国際学会) 2015年06月24日、The Metro Tronto Convention Centre, Tronto, Canada

Tomiyama Y. Immature platelet fraction (IPF) measurement for the diagnosis of ITP. The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasi (国際学会) 2015年06月20日、The Metro Tronto Convention Centre, Tronto, Canada

林悟、櫻木美基子、丸山美保、兜森修、清川知子、永峰敬丞、加藤恒、柏木浩和、金倉謙、富山佳昭 . ITP診断における網状血小板測定の意味的意義～FCM法、IPF法(XN1000とXE2100)の比較. 第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年05月23日、甲府総合市民会館(山梨県、甲府市)

柏木浩和、清水一亘、國島伸治、坂野史明、加藤恒、森川陽一郎、田所誠司、小亀浩市、本田繁則、宮田敏行、金倉謙、富山佳昭 . α IIb β 3活性化変異、 α IIb(R990W)KIマウスは巨大血小板減少症とともに血小板機能障害をきたす. 第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年05月22日、甲府総合市民会館(山梨県、甲府市)

Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. α IIb(R990W), a constitutive activating mutation of integrin α IIb β 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function. The American Society of Hematology 56th Annual Meeting. 2014年12月08日、Moscone Center, San Francisco, CA, USA

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、金倉謙、富山佳昭 . α IIb β 3活性化変異、 α 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呈す. 第76回日本血液学会学術集会. 2014年11月02日、大阪国際会議場(大阪市)

櫻木美基子、林悟、丸山美保、兜森修、

清川知子、永峰敬丞、加藤恒、柏木浩和、金倉謙、富山佳昭 . Diagnostic value of IPF% measured by XN-1000 analyzer for primary ITP is comparable with FCM method. 第76回日本血液学会学術集会、2014年11月02日、大阪国際会議場(大阪市)

柏木浩和、清水一亘、加藤恒、田所誠司、森川陽一郎、金倉謙、富山佳昭 . 第76回日本血液学会学術集会、2014年11月01日、大阪国際会議場(大阪市)

柏木浩和. 特発性血小板減少症(ITP)の治療. 第76回日本血液学会学術集会(招待講演)2014年10月31日、大阪国際会議場(大阪市)

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、金倉謙、富山佳昭 . インテグリン α IIb β 3 活性化変異、 α IIb(R990W)ノックインマウスの検討. 第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年05月31日、大阪国際交流センター(大阪市)

林悟、柏木浩和、清水一亘、西口修平、金倉謙、富山佳昭 . Pathophysiology of thrombocytopenia associated with chronic hepatitis C. 第75回日本血液学会学術集会、2013年10月11日～2013年10月13日、ロイトン札幌他(札幌)

Kashiwagi H, Kunishima S, Kiyomizu K, Amano Y, Shimada H, Morishita M, Kanakura Y, Tomiyama Y. Demonstration of novel gain-of-function mutations of α IIb β 3: association with macrothrombocytopenia and glanzmann thrombasthenia-like phenotype. The 24th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2013年06月29日～2013年07月04日、Amsterdam RAI (Amsterdam), Netherland

柏木浩和、清水一亘、田所誠司、富山佳昭、金倉謙. α IIb β 3細胞内活性化変異と血小板顆粒放出異常. 第35回日本血栓止血学会学術集会、2013年05月30日～2013年06月01日、山形国際ホテル(山形)

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学血液・腫瘍内科学ホームページ
www.med.osaka-u.ac.jp/pub/bldon/www/home.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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