血小板インテグリンシグナル機構の解明と血管病変形成に関する検討

柏木浩和

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

【研究の背景】

動脈硬化を基盤とした心筋梗塞や脳梗塞などの血管病変形成において血小板は中心的役割を果たす。また、血小板は癌の増殖・転移や免疫機構など、幅広い病態に関与することが明らかにされてきており、血小板活性化の制御機構を明らかにすることは多様な疾患への新たな治療戦略の開発につながる。血小板機能の主たる部分は各種アゴニスト受容体からの活性化シグナル(インサイド-アウトシグナル)によるインテグリンαIIbβ3 のリガンド結合能の獲得およびαIIbβ3 へのリガンド結合後に血小板内に誘導される細胞内シグナルによるが、これらシグナルの分子機構の詳細は不明である。

【目　　的】

αIIbβ3 恒常的活性化変異の病態に対する影響を、ノックインマウスを用いて検討する。血小板機能異常症患者血小板を用いて、αIIbβ3 活性化異常の分子機構を明らかにする。

【方　　法】

1. インテグリンシグナル制御機構の解析
   αIIbβ3 活性化異常を生じる血小板無力症および kindlin-3 欠損症血小板を用いて、流動条件下におけるコラーゲンへの個々の血小板の接着反応を CellTracker software を用いて検討した。またαIIbβ3 の発現低下を認めた後天性血小板無力症例においてそのメカニズムを検討した。
2. αIIbβ3 恒常的活性化変異であるαIIb(R990W)を導入したノックインマウスを用いて、血小板減少をきたすメカニズムについて検討した。

【結　　果】

1. αIIbβ3 欠損(血小板無力症)血小板においては、流動条件下において正常血小板と同程度のコラーゲンへの接着を認めたが、血小板凝集塊を形成することはできなかった。一方、kindlin-3 欠損血小板においては、コラーゲンへの接着自体が大きく障害されており、その後の血小板凝集塊の形成も認めなかった。本研究結果は 2019 年第 61 回 ASH meeting において発表された[1)]。
2. αIIb(R990W)ノックインマウスにおいては、ヒトにおけるαIIb(R995W)変異と同様に巨大血小板減少症が認められた。骨髄における巨核球数および ploidy は野生型と比べて差を認めなかったが(図 1)、proplatelet 形成がホモノックインマウスにおいて有意な低下が認められた(図 2)。ノックインマウスにおいてはαIIbβ3 の発現低下を認め、主にこのことによると思われる著明な血小板機能低下が認められた。本研究結果は Journal of Thrombosis and Haemostasis 誌での掲載が決定している[2)]。

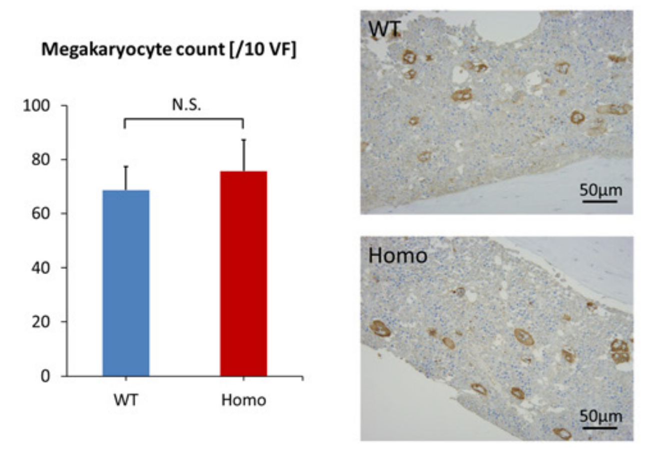

図１．骨髄における巨核球数には野生型とホモノックインマウスで差を認めなかった。抗 VWF 抗体にて巨核球を染色

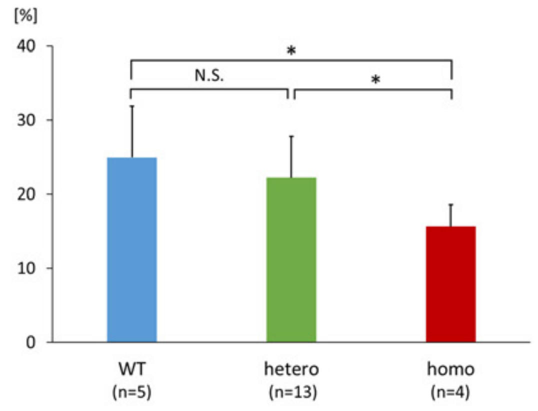

図２．Fetal liver を用いた proplatelet 形成の検討にて、ホモノックインマウスでは proplatelet 形成の低下を認めた。

【考　　察】

αIIbβ3 の活性化を誘導するインサイドアウト･シグナルには、talin, kindlin-3、CalDAG-GEFI などが必須であることが明らかにされてきているが、その詳細は依然として不明な点が多かった。今回、我々は、αIIbβ3 欠損血小板と kindlin-3 血小板を用いた詳細な検討から、kindlin-3 においては血小板凝集形成異けでなく、コラーゲンへの接着能も著明に低下することを明らかにした。このことは kindlin3 はαIIbβ3 だけではなく血小板におけるコラーゲン受容体であるα2β1 の機能も阻害することによると考えられ、kindlin-3 は広範なインテグリン活性化に必須の分子であることが明らかとなった。

更に本邦において多く認められαIIb(R995W)変異を持つ先天性巨大血小板減少症のメカニズムを明らかにする目的で作成したαIIb(R990W)変異ノックインマウスにおいて、本変異が proplatelet 形成を抑制することが血小板減少症の主たるメカニズムであることを明らかにした。αIIbβ3 が血小板機能だけでなく血小板産生にも影響を与えることを証明するとともに、この結果はαIIbβ3 からの恒常的な活性化シグナルが細胞骨格系に影響を与えている可能性を示唆しており、血管病変形成にも影響を与えることが予想された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回の研究により、αIIbβ3 活性化の分子機構の一端が明らかとなり、またシグナル異常により血小板機能だけでなく細胞骨格系を介して血小板産生にも影響を与える可能性が示された。これらの結果は今後の抗血小板療法開発における分子標的検討の重要性とともに、インテグリン機能制御により、血小板機能だけでなく血小板数もコントロールしうる可能性を示唆している。

【参考・引用文献】

1) Kato H, Honda S, Kashiwagi H, et al. The Critical Role of Kindlin-3 in Initiation of Physiological Thrombus Formation Analysis of Kindlin-3 Deficient Patient. *61st American Society of Hematology Annual Meeting* 2019
2) Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, et al. Knock-in mice bearing constitutively active αIIb (R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction. *J Thromb Haemost* 2019 (Epub print ahead)