

## 血小板インテグリン活性化制御機構の解析と新規抗血小板療法の開発

芥田敬吾<sup>1)</sup>, 柏木浩和<sup>2)</sup>, 加藤 恒<sup>2)</sup>, 富山佳昭<sup>1)</sup>

1) 大阪大学医学部附属病院 輸血部

2) 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】

血小板は生理的止血および病的血栓形成の中心となる細胞である。血小板表面には複数の膜糖蛋白が発現しており、中でもインテグリン  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 (GPIIb/IIIa) は血小板機能の中心を担っている。 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の先天性欠損症、機能異常症は血小板無力症として知られ、血小板凝集が障害され、重度の出血傾向を来す。血小板無力症は通常、血小板数正常で、形態異常も認めない。また、 $\alpha$  IIb KO マウス、 $\beta$  3 KO マウスいずれも血小板数は野生型 (WT) マウスと同等であることから  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 変異が血小板減少を来すとは考えられていなかった。しかし近年、先天性巨大血小板性血小板減少症の患者で  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の遺伝子変異が複数報告されており、我々は本邦の症例、4 家系 11 名で  $\alpha$  IIb (R995W) 変異を見出している。本変異は血小板において  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の恒常的活性化が見られることが特徴であるが、 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 変異が血小板減少や血小板機能に影響を及ぼすメカニズムについてはまだあまり解明されていない。

### 【目 的】

恒常的  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 活性化がもたらす病態、特に血小板産生、血小板機能に及ぼす影響について解析する。 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 活性化シグナルの分子機構を解明し、 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 シグナルの動脈血栓症および動脈硬化への影響を明らかにする。

### 【方 法】

ヒト  $\alpha$  IIb (R995W) 変異に相当する  $\alpha$  IIb (R990W) ノックイン (KI) マウスを作製した。KI マウスの血球数、血小板産生、血小板膜糖蛋白の発現、血小板機能の評価を行った。また、先天性血小板減少症が疑われ紹介された症例とその家系の解析を行った。

### 【結 果】

$\alpha$  IIb (R990W) KI マウスは巨大血小板性血小板減少症を呈した。血小板産生の指標となる網状血小板数はホモマウスで有意に低下しており、また抗血小板抗体により誘発した血小板減少からの回復は KI マウスで有意に遅延していた。さらにトロンボポエチン投与に対する血小板増加も WT、ヘテロマウスと比較しホモマウスで有意に障害されていた。ホモマウスでは軽度の血小板寿命の短縮を認めたが、これらの結果から KI マウスにおける血小板減少は主に血小板産生障害に由来することが示唆された。骨髄および脾臓の巨核球数、形態、巨核球の ploidy は WT と KI マウスでほぼ同等であった。胎児肝を培養し分化させた巨核球の proplatelet 形成は WT、ヘテロマウスと比較し、ホモマウスで有意に障害されていた。これらの結果から proplatelet 形成の障害を主因とした血小板産生障害が血小板減少の主因であることが示唆された。血小板の  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 発現はヘテロマウスで WT の 75% 程度、ホモマウスでは WT の 3% 程度と著明に減少しており、ホモマウスでは血小板凝集が著明に障害されていた。

また、先天性血小板減少症が疑われた症例とその家系の解析から新たな  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 変異である  $\beta$  3 (R734C) を見出した。

本変異は巨大血小板性血小板減少症、血小板  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の発現低下と関連することが示唆された。また、発現細胞を用いた検討により本変異は  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 活性化誘導変異ではないことが示された。

### 【考 察】

邦人の症例、4 家系 11 名で見出された  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 変異  $\alpha$  IIb (R995W) に相当する  $\alpha$  IIb (R990W) ノックインマウスを作製することで、本変異が巨大血小板性血小板減少症を誘導すること、proplatelet 形成の障害を主因とした血小板産生障害が血小板減少の主因であることが示された。また、血小板の  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 発現がホモマウスで著明に減少し、血小板機能障害が見られることが明らかになった。

現在、 $\beta$  3 (R734C) 変異の病態解明のため KI マウスを作製中である。 $\beta$  3 (R734C) KI マウスの解析、 $\alpha$  IIb (R990W) KI マウスとの比較を行うことで  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 変異による血小板減少症の病態について解析を進めたいと考えている。 $\alpha$  IIb (R990W) KI マウスと動脈硬化モデルマウスである ApoE KO マウスを交配し、これに高コレステロール食負荷を行うことによって、動脈硬化性病変発症およびその進展について検討することを予定している。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまで解明されていなかった  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 変異が血小板減少や血小板機能に影響を及ぼすメカニズムの一端を明らかにした。 $\alpha$  IIb (R990W) (+/+) マウスでは血小板において  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 発現が著明に減少するため、今後、 $\alpha$  IIb (R990W) KI マウスと動脈硬化モデルマウスを交配し解析を行うことが、新たな作用点を標的とした抗血小板療法の開発につながる可能性がある。

### 【参考・引用文献】

- 1) 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  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 117(20):5479-84, 2011.
- 2) Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Nishiura N, Banno F, Kokame K, Kato H, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y. Knock-in mice bearing constitutively active  $\alpha$  IIb (R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction. *J Thromb Haemost.* 18(2):497-509, 2020.