

血小板蛋白リン酸化状態の網羅的解析を用いたインテグリン活性化機構の解明

加藤 恒

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科

【研究の背景】

血小板は出血時の止血だけではなく、心筋梗塞、脳卒中など動脈血栓発症にも大きな関わりを持ち、血栓形成には血小板フィブリノゲン受容体インテグリン α IIb β 3(GPIIb-IIIa)が必須である。 α IIb β 3は活性化状態の制御が重要で、血中を循環する血小板は非活性化状態を保つが、止血時にはアゴニスト刺激が誘導する立体構造変化によりフィブリノゲン親和性が高まり凝集形成に至る。生体機能維持のため α IIb β 3活性化は「inside-out シグナル」と呼ばれる機構で厳密な制御を受けるが、その詳細は不明な点が多い。これまでの多くの試みより、inside-out シグナルでは CalDAG-GEFI(RasGRP2)が Rap1 活性化を誘導し、続いて起こる Talin, kindlin-3 の β 3 細胞内領域への結合が α IIb β 3 の構造変化を誘導することが分かっている。しかし、骨髄巨核球の細胞質断片に由来する無核の血小板は実験手法の制約が大きく、inside-out シグナル解明の試みは容易ではない。

我々はこれまで多くの血小板無力症例、稀な血小板機能異常症(ADP受容体P2Y12欠損症、CalDAG-GEFI欠損症、kindlin-3欠損症)の解析を通じた inside-out-シグナル研究を行い、P2Y12受容体からのシグナルは α IIb β 3の持続的な活性化、CalDAG-GEFIは α IIb β 3の速やかな活性化に重要であることを示し、生体内での α IIb β 3活性化は単純なON/OFFではなく、速やか、かつ持続的な α IIb β 3活性化 kinetics が重要であることを示してきた。

【目 的】

本研究では、 α IIb β 3活性化キネティクスの重要性、その制御機構の解明によりinside-outシグナルが制御する α IIb β 3活性化の詳細を明らかとすることを目的とする。得られた結果より、新規抗血小板療法、先天性血小板機能異常症における出血コントロール法開発へつなげていく。

【方 法】

- (1) 健常人、および血小板機能異常症例より得た血小板を用いて α IIb β 3活性化キネティクスアッセイを行い、刺激前後の検体を収集。血小板蛋白リン酸化状態の変化について質量分析を用いた解析を行う。
- (2) 質量分析で得られた情報より、 α IIb β 3活性化キネティクス制御に関与する可能性のある候補分子を抽出。巨核球系細胞株CMK細胞などを用いた、候補分子の α IIb β 3活性化への作用を評価する。
- (3) 遺伝子改変マウスでの頸動脈、腸間膜動脈などにおけるin vivo血栓形成の観察より、候補分子の機能について確認を進める。

【結 果】

健常人、CalDAG-GEFI欠損症、P2Y12阻害剤処理血小板について、トロンビン受容体刺激前、刺激後30秒における蛋白リン酸化状態を質量分析により評価した。評価可能であったリン酸化ペプチド断片1,214個は586種類の血小板蛋白に由来し、1,065個はセリン残基、124個はスレオニン残基、23個はチロシンリン酸化に変化を生じていた。図1のヒートマップ

に示すように、血小板刺激前・後で蛋白リン酸化の状態は大きく変化していた。また、健常人、P2Y12 阻害剤、CalDAG-GEFI 欠損症例の間で刺激後のリン酸化状態を見ると、ヒートマップ上のリン酸化パターンは大きく異なっていた。血小板刺激前後で起こるリン酸化・脱リン酸化を dot plot に示すと、健常人血小板と CalDAG-GEI 欠損症血小板、P2Y12 阻害剤処理血小板の間でリン酸化状態の異なるペプチドが明らかとなった(図1)。これらはそれぞれ α IIb β 3 の速やかな活性化誘導、持続的な活性化誘導に関与する分子であると考えられた。

質量分析より得られた候補分子の中で、現在まで二つの血小板表面蛋白について CMK 細胞への遺伝子導入による α IIb β 3 活性化への関与についての検討を行っている。また、これら二つの分子は遺伝子改変マウスも利用可能であったため、マウス血小板を用いた機能解析も行っている。一方の分子のノックアウトマウスでは低濃度アゴニスト刺激時に軽度の血小板凝集亢進が見られており(図2)、今後は同分子のリン酸化状態の役割をさらに検討する予定としている。また別の候補分子に関連した検討を進めるため β 3 遺伝子改変マウスを作製し、今後検討を行う予定としている。

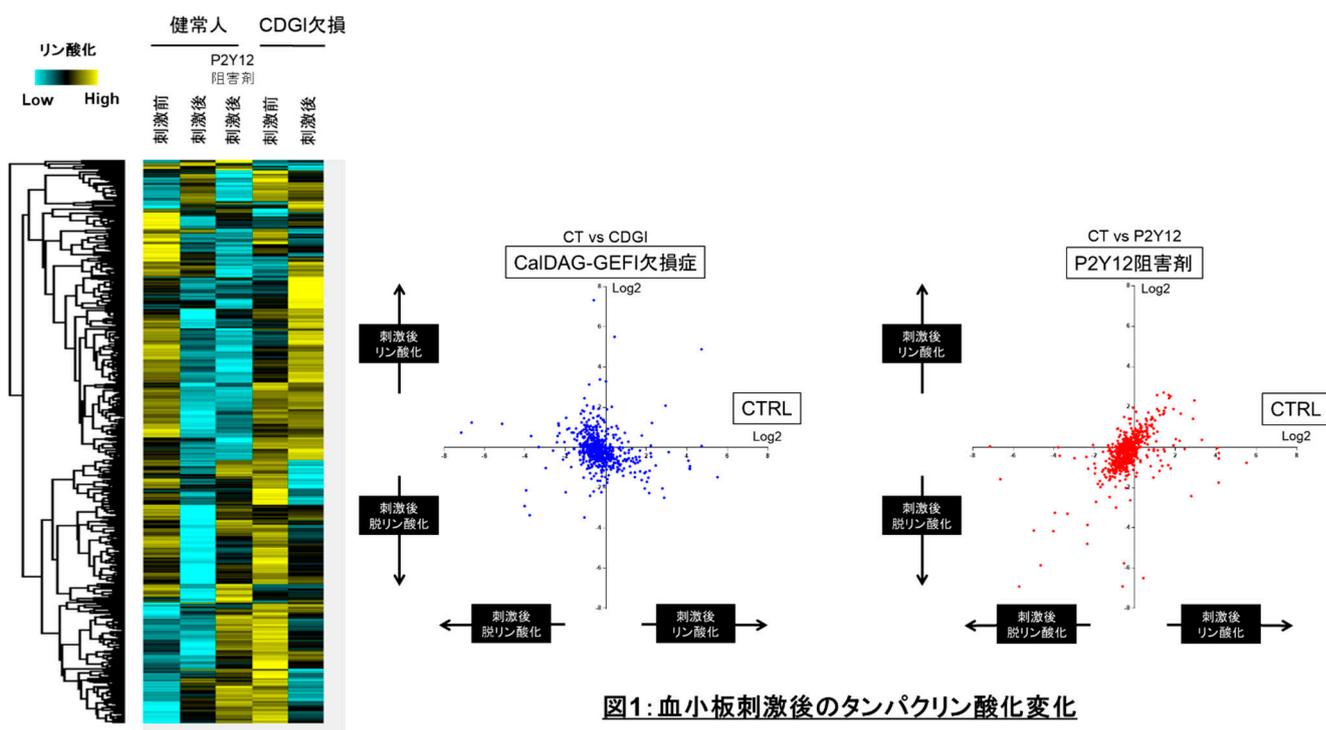


図1: 血小板刺激後のタンパクリン酸化変化

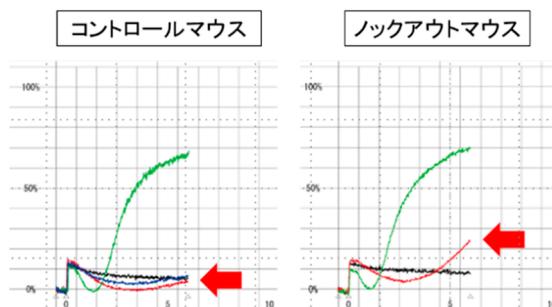


図2: コラーゲン刺激マウス血小板凝集

【考 察】

血小板機能異常症の症例解析に基づく α IIb β 3 活性化キネティクスという新たな視点から実施している検討であり、今回の質量分析より得られる情報は生理的意義の高いものと考えている。網羅的解析を実施した場合、多くの候補分子から重要

な分子の特定が大きな課題となる。これまでに得られた結果について今後引き続き検討を継続し、 α IIb β 3 活性化状態を制御する inside-out シグナルの解明を行っていく予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、実際の症例解析に基づき立案されたものであり、得られる知見は既存の抗血小板療法とは異なる α IIb β 3 活性化制御による新たな抗血小板薬の開発に貢献するものと考えられる。また発端となった症例らに対する新規の出血コントロール法開発に結び付く可能性もあり、今後の臨床においても大きな意義を持つものと考えている。

【参考・引用文献】

1. Kato H, Nakazawa Y, Kurokawa Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Morita D, Banno F, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Human CalDAG-GEFI deficiency increases bleeding and delays α IIb β 3 activation. *Blood* 2016; 128: 2729-2733.
2. 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 α IIb β 3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. *Exp Hematol* 2013; 41: 79-90.
3. Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Critical role of ADP interaction with P2Y12 receptor in the maintenance of α IIb β 3 activation: association with Rap1B activation. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1379-1387.
4. Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y. Impaired platelet function in a patient with P2Y12 deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2315-2323.
5. 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 α IIb(R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction. *J Thromb Haemost* 2020; 18: 497-509.