

氏名	坂田 飛鳥
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 465 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	細胞内蛋白質 Paxillin がマウス血小板活性化に果たす役割
論文審査委員	(委員長) 教授 古川 雄 祐 (委員) 教授 遠藤 仁 司 准教授 加藤 一 夫

論文内容の要旨

1 研究目的

血小板は血小板特異的インテグリンとリガンドとの結合による凝集反応により止血に寄与する。リガンドとの結合に重要なインテグリン親和性変化には Talin や Kindlin などの細胞内蛋白質が重要であるが、他の細胞内蛋白質の関与は明らかでない。細胞内蛋白質 Paxillin はインテグリンの α 鎖に結合し、インテグリンを介した様々な細胞機能に関与すると考えられている。しかしながら、血小板活性化における役割は明らかとされていない。本研究の目的は Paxillin が血小板活性化に果たす役割とその機序を明らかとすることである。

2 研究方法

血小板は無核の細胞であり、直接の発現遺伝子導入が困難である。このため、我々は Paxillin 発現を抑制する shRNA 配列を GFP とともに発現させることのできるレンチウイルスベクターを作製し、このウイルスを感染させた骨髓細胞をマウスに移植することで、Paxillin 発現の抑制された GFP 陽性血小板を得た (Pxn-KD 血小板)。得られた血小板の活性化指標としてインテグリン活性化と α 顆粒放出をフローサイトメーターで評価した。血小板凝集能は透過度法を用いて測定した。血小板放出反応は血小板活性化後の上清中に含まれる血小板第 4 因子、セロトニン、トロンボキサン B_2 濃度を ELISA, または EIA で測定することで評価した。インテグリンの outside-in signaling 評価はフィブリノゲン上での血小板伸展反応と血餅退縮反応で行った。血小板内のシグナル観察として細胞内 Ca^{2+} を蛍光プローブで、Rap1b 活性化を活性化 Rap1b と結合する GST 融合タンパクとの pull-down 法で評価した。in vivo の血栓形成能は腸間膜動脈に対するレーザー照射、または塩化鉄による大腿動脈傷害で惹起した血栓形成をリアルタイムに共焦点顕微鏡で観察することで評価した。また、尾切断後の止血までの時間を出血時間として測定した。

3 研究成果

得られた Pxn-KD 血小板はコントロール血小板と比較して、やや大型であった。骨髓移植後の GFP 陽性血小板数に変化は認めなかった。Pxn-KD 血小板は、種々のアゴニスト刺激によるインテグリン活性化、並びに放出反応がコントロールと比較して亢進していた。血小板凝集

能においても、より弱い刺激で強い凝集反応を認めた。実際の α 顆粒、濃染顆粒からの放出物は増加し、トロンボキサン合成能も亢進していた。フィブリノゲン上の血小板伸展反応と血餅退縮はいずれも亢進した。このPxn-KD血小板の活性化亢進の制御機構を明らかにするため、アゴニスト刺激後の細胞内リン酸化蛋白質、細胞内 Ca^{2+} 動員、Rap1b活性化を検討した。蛋白質チロシンリン酸化、及び細胞内 Ca^{2+} 動員は増強しなかったが、Rap1bの活性化が増強していた。血小板インテグリン $\alpha IIb\beta 3$ を恒常的に発現するCHO細胞で、Pxn-KDはインテグリン構造変化に影響を与えなかった。生体内での血栓形成能を確認するために、腸間膜動脈でレーザー照射による血栓形成を観察したところ、Pxn-KD血小板をもつマウスの血栓形成能は増強していた。塩化鉄を用いた大腿動脈血栓モデルでも同様の結果であった。尾切断後の出血時間はPxn-KD血小板を持つマウスで有意に短縮した。

4 考察

マウス血小板においてPaxillinが活性化の負の制御因子として働いていることを明らかにした。今回の結果では、複数のアゴニスト刺激に対する血小板活性化が一様に亢進しており、Paxillinが複数の異なる血小板活性化受容体からの共通した経路を制御している可能性が示唆された。チロシンリン酸化反応、ならびに細胞内 Ca^{2+} 動員が増加せず、インテグリン構造変化に対しても直接影響を及ぼさなかったことから、ホスホイノシチドターンオーバーの下流、もしくは、それとは無関係の経路で、インテグリンの上流シグナルを制御していると推測される。その因果関係は明らかではないが、Pxn-KDにより、Rap1bが亢進したことは興味深い。過去の報告で、Rap1b、または、その活性化を担うCa1DAG-GEFのノックアウトマウスの血小板はPxn-KD血小板と真逆の表現型を示している。今後はRap1bシグナルの増強がPxn-KDの表現型を決定する因子か、またこの制御機構が血小板のみでなく他の細胞にも認められる現象かを検討する必要がある。過去に血小板活性化を正に制御する蛋白質の報告はあるが、負に制御する蛋白質の報告は少ない。負に制御する蛋白質としては、ITIMモチーフを持つ受容体などが報告されているが、特定の血小板活性化受容体からのシグナルを制御する報告がほとんどである。Paxillinのように複数の経路からのシグナル伝達を抑制する報告はなく、さらに詳細な作用部位の解明を行う必要がある。今回の検討では、ヒト血小板におけるPaxillinの重要性は不明であるが、ヒト血小板にはHic-5というPaxillin類似蛋白質が主に発現している。Hic-5がヒト血小板で同様の機能を担っているかどうか興味深い。また今回の手法で血小板の止血機能を人為的に亢進させることに成功しており、本手法を用いて人工多能性幹細胞(iPS細胞)からの血小板産生において、止血機能を改善した血小板製剤開発に結びつく可能性がある。

5 結論

本研究ではPaxillinがマウス血小板におけるインテグリンを介した双方向の血小板活性化に対する情報伝達を抑制的に制御していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

血小板の活性化にはインテグリンが重要な働きをしている。損傷血管壁への結合には血小板膜上の GP I b/IX/V 複合体が関与しており、次いで GPVI を介して活性化された PKC によって Rap1b が RIAM、Talin と複合体を形成、GP II b/III a (インテグリン α II b β 3) と結合し、そのリガンド親和性を向上させる。Paxillin はインテグリンの細胞内ドメイン近傍に talin・vinculin とシグナル伝達複合体を形成するが、血小板における機能については未だ不明の点が多い。本研究において申請者らは、shRNA を用いて paxillin の発現をノックダウンした骨髓細胞を移植し、レシピエントより血小板を採取して機能解析を行った。

Paxillin 発現がほぼ消失した血小板において、細胞質面積および GP II b/III a・GP I b の発現の有意な増加がみられた。機能的には、特異的アゴニストによるインテグリン活性化・血小板放出反応・トロンボキサン合成の亢進が認められた。また血餅退縮能も亢進していることから、outside-in signal によるインテグリンの活性化もおこっていると考えられた。一方、GPVI 刺激後のチロシンリン酸化と細胞内カルシウム動員に変化は見られなかったが、Rap1b の活性化が増強していた。Paxillin 抑制による血小板の活性亢進が in vivo でも確認された。

本研究は、マウス血小板において paxillin が活性化抑制因子として働いていることを初めて示したものである。複数のアゴニスト刺激で同様な結果が得られたことより、paxillin は血小板活性化の共通経路を抑制していると考えられる。このような抑制メカニズムはこれまでに報告がなく、高い新規性を有する知見である。本研究はすでに国際英文誌である Thrombosis Journal に accept されており、博士 (医学) の学位に十分な質を有していると考えられる。誤字・脱字など細部の修正をもって合格とした。

最終試験の結果の要旨

申請者はほぼ学位論文のとおりにより発表を行った。発表は大変に分かりやすく、時間もほぼ予定どおりであった。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

審査員からは以下のような質問およびコメントが出された。

1. GP I b α promoter-driven GFP を用いて血小板のマーカーとしているが、巨核球や他の細胞系でも発現するのではないかと？ 解析対象の純度をどう担保しているのか？
2. Paxillin 発現抑制にて Rap1b の活性が亢進するというデータを示しているが、そのメカニズムは何か？ GAP 活性は測定しているか？
3. Paxillin は構造タンパクと考えられるが、情報伝達に関与しているのか？ 下流分子として FAK-Src が活性制御を受ける可能性は検討したか？
4. Paxillin を抑制した際の paxillin/talin/vinculin の assembly の変化は確認したか？
5. ヒトの血小板では paxillin は存在しないということであるが、代わりとなる分子が存在するのか？ 臨床応用を考えると、ヒトにおける paxillin 相当分子を同定することは必須と思われる。
6. ヒトとマウスでは動脈硬化の topology が異なっているが、paxillin の発現の違いが関

与している可能性が考えられるのではないか？

7. Paxillin ノックアウトマウスの死因は何か？

申請者はいずれの質問に対しても的確に返答し、有意義な discussion が行われた。発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断、最終試験に合格とした。