

平成27年度～平成28年度厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業))
総合分担研究報告書

抗リン脂質抗体関連血小板減少症の病態解明と治療指針の構築に関する研究

研究分担者 井上 克枝 山梨大学大学院総合研究部医学域臨床検査医学 教授

研究要旨

免疫性血小板減少症と抗リン脂質抗体関連血小板減少症は共に血小板減少が生じるが、後者では出血傾向と血栓症の両方の対策が必要であり、両者の鑑別は重要である。抗リン脂質抗体関連血小板減少症の診断基準の策定が急務であるが、そのためには病態の理解が必須である。同症で生じていると思われる血小板活性化を検出する方法に関する助言を行い、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビンモノクローナル抗体 D231 の血小板活性化に及ぼす影響を検討した。しかし、血小板凝集能検査、生理的な流血条件下での血栓形成を検出する T-TAS では、体が血小板活性化に与える影響を検出できなかった。

A.研究目的

免疫性血小板減少症と抗リン脂質抗体関連血小板減少症は共に血小板減少が生じるが、後者では出血に加えて血栓症の予防・治療が必要であり、両者の鑑別は重要である。抗リン脂質抗体関連血小板減少症の診断基準の策定が急務であるが、そのためには病態の理解が必須である。抗リン脂質抗体関連血小板減少症は血小板数 5 万/ μ l 程度で、出血や血栓傾向を来すほどではない状態で、血栓症を発症することが多いが、まれに出血傾向が出現する場合がある。研究代表者らが作製した、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビンモノクローナル抗体 231D は、ADP 惹起血小板凝集を抑制するという予備データが得られ、本抗体が抗リン脂質抗体関連血小板減少症における出血傾向の原因の一つではないかと考えた。

B.研究方法

1. 健常人多血小板血漿(PRP)を用いて、Born の比濁法と流血条件下で生理的な血栓形成能を検討できる Total Thrombus-formation Analysis System (T-TAS)を用いて、血小板凝集あるいは血栓形成における 231D の影響を検討した。

2. 倫理面への配慮

本研究は、健常人の血液サンプルを使用する研究が含まれる。研究の施行にあたっては、患者に十

分なインフォームド Consent をおこなうとともに、個人情報等の扱いは十分注意しておこなった。

C.研究結果

1. PRP を用いた実験では、231D が ADP 惹起血小板凝集を抑制するというデータの再現は取れず、T-TAS でも、231D の影響は認められなかった。他のモノクローナル抗体も得られていない。

D.考察

ハイブリドーマの継代によりモノクローナル抗体の性質が変化したことが考えられる。サブクローニングしてもう一度検討するのが良いのではないかと考えた。

E.結論

本研究において、抗リン脂質抗体の抗リン脂質抗体関連血小板減少症の発症への関与が明らかとなる可能性がある。

F.健康危険情報

本研究期間においては、健康危険情報として報告すべきものはなかった。

G.研究発表

1.学会発表

1) 井上 克枝 「血栓止血を超えた血小板の役割」 第 34 回 日本臨床化学会甲信越支部総会 招待講演(教育講演) 2016 年 6 月 11 日(土)

石和温泉 ホテル甲斐路

2) 井上克枝 「血小板活性化受容体 CLEC-2 の血栓止血以外の役割」 第6回血栓止血研究会 - Tokyo 招待講演(特別講演) ベルサール飯田橋ファースト 2016年7月2日(土)

3) 井上克枝 「ヘビが教えてくれた血小板の意外な役割」 山梨大学・山梨医科大学同窓会総会 招待講演 2016年7月9日(土) 古名屋ホテル

4) 井上克枝 「血小板活性化受容体 CLEC-2 の発見から将来展望まで: 血栓止血を超えた血小板の役割」 第3回長崎血液凝固セミナー 招待講演(特別講演) 2016年9月29日(木) 長崎大学医学部 良順会館

5) 井上克枝 血栓止血関連検査の基礎と血小板研究の新展開 第11回安曇野シンポジウム 2016.10.16 安曇野(特別講演)

6) 井上克枝 血小板活性化受容体 CLEC-2 の発見から将来展望まで: 血栓止血を超えた血小板の役割 第3回長崎血液凝固検査セミナー 2016.9.29 長崎大学良順会館 (特別講演)

7) 井上克枝 血小板活性化受容体 CLEC-2 の血栓止血以外の役割 第6回血栓止血研究会 - Tokyo 2016.7.2 ベルサール飯田橋ファースト (特別講演)

8) Katsue Suzuki-Inoue. Roles of a platelet Clec-2 within and beyond clotting. Proteases in Hemostasis and Vascular Biology, FACEB Science Research Conference (invited speaker) 2015.6.8, Keystone, USA

9) 井上克枝 血小板活性化受容体 CLEC-2 の血

栓止血とそれ以外における役割. 特別講演(招待講演) 第35回大阪血液学セミナー 2015.7.24 大阪 大阪大学

10) 井上克枝 血小板活性化受容体 CLEC-2 の血栓止血、癌転移、リンパ管新生における役割 第17回さくら造血細胞セミナー 特別講演(招待講演) 15.7.1 東京 日本大学医学部リサーチセンター

2.論文発表

1) Suzuki-Inoue K. CLEC-2/podoplanin and thromboinflammation. **Blood**. 2017;129: 1896-1898.

2) Kono H, Fujii H, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Furuya S, Hirayama K, Akazawa Y, Nakata Y, Sun C, Tsukiji N, Shirai T, Ozaki Y. The platelet-activating receptor C-type lectin receptor-2 plays an essential role in liver regeneration after partial hepatectomy in mice. **J Thromb Haemost**. 2017;15:1-11

3) Furuya F, Ishii T, Tamura S, Takahashi K, Kobayashi H, Ichijo M, Takizawa S, Kaneshige M, Suzuki-Inoue K, Kitamura K. The ligand-bound thyroid hormone receptor in macrophages ameliorates kidney injury via inhibition of nuclear factor- κ B activities. **Sci Rep**. 2017;7:43960.

4) Iwaki T, Nagahashi K, Takano K, Suzuki-Inoue K, Kanayama N, Umemura K, Urano T. **Thromb Haemost**. Mutation in a highly conserved glycine residue in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 causes polymerisation. 2017 in press

5) Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, Satoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. **J Thromb Haemost**. 2017;15:513-525.

6) Suzuki-Inoue K, Osada M, Ozaki Y. Physiologic and pathophysiologic roles of interaction between C-type lectin-like receptor 2 and podoplanin: partners from in utero to adulthood. **J Thromb Haemost**. 2017;15(2):219-229.

7) Ozaki Y, Tamura S, Suzuki-Inoue K. New horizon in platelet function: with special reference to a recently-found molecule, CLEC-2. **Thromb J**. 2016 Oct 4;14(Suppl 1):27.

8) Podoplanin-positive periarteriolar stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2.

Tamura S, Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, Shirai T, Sasaki T, Osada M, Satoh K, Ozaki Y.

Blood. 2016 Jan 21. pii: blood-2015-08-663708.

9) Platelets Regulate the Migration of Keratinocytes via Podoplanin/CLEC-2 Signaling during Cutaneous Wound Healing in Mice.

Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, Kishida T, Wada M, Nakamura N, Takenaka H, Mazda O, Urano T, Suzuki-Inoue K, Tokura Y, Katoh N.

Am J Pathol. 2016 Jan;186(1):101-8.

10) Inhibition of IgE-mediated allergic reactions by pharmacologically targeting the circadian clock.

Nakamura Y, Nakano N, Ishimaru K, Ando N, Katoh R, Suzuki-Inoue K, Koyanagki S, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nakao A.

J Allergy Clin Immunol. 2015 Nov 7. pii: S0091-6749(15)01370-6.

11) CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow.

Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Kobayashi H, Suzuki-Inoue K, Suda T. J Exp Med. 2015 Nov

16;212(12):2133-46.

12) Vascular Smooth Muscle Cells Stimulate Platelets and Facilitate Thrombus Formation through Platelet CLEC-2: Implications in Atherothrombosis.

Inoue O, Hokamura K, Shirai T, Osada M, Tsukiji N, Hatakeyama K, Umemura K, Asada Y, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y.

PLoS One. 2015 Sep 29;10(9):e0139357.

13) Measurement of soluble C-type lectin-like receptor 2 in human plasma.

Kazama F, Nakamura J, Osada M, Inoue O, Oosawa M, Tamura S, Tsukiji N, Aida K, Kawaguchi A, Takizawa S, Kaneshige M, Tanaka S, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y.

Platelets. 2015;26(8):711-9. doi:

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他