

財団法人 日中医学協会

2011 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

平成 24 年 3 月 9 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名 尾崎 由基男 
所属機関名：山梨大学医学部
所属部署名：臨床検査医学 職名：教授
所 在 地：山梨県中央市下河東 1110
電 話：055-273-6770 内線：055-273-6924

1. 助成金額： 1,000,000 円
2. 研究テーマ ジスルフィド異性化酵素 ERp57 の血小板活性化、血栓形成における役割

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：尾崎 由基男	職名：教授
所属機関名：山梨大学医学部	部署名：臨床検査医学
中国側研究者氏名：武 芸	職名：教授
所属機関名：蘇州大学医学部	部署名：血液研究所

4. 当該研究における発表論文等

無し

(ただし、アメリカ血液学会雑誌、 Blood に投稿予定)

5. 成果の概要

ジスルフィド異性化酵素 ERp57 の機能を調べるために、ノックアウトマウスの作成を行った。ノックアウトマウスは正常に生まれ、軽度血小板数が低下していたが、他の血球数には異常がなかった。トロンビン、GPVI 刺激剤のコンバルキシンによる血小板凝集はやや低下していたが、リコンビナントの ERp57 を加えることにより、血小板凝集は回復した。また血小板顆粒内容の放出も軽度低下していた。GPVI 刺激による GPIIb/IIIa の活性化状態を判定する JON/A 結合をみると、ERp57 欠損血小板では明らかに低下しており、いわゆる inside-out GPIIb/IIIa 活性化の信号伝達経路にも異常があることが示唆された。また、血栓を安定化させることに重要とされる clot retraction も低下していた。動物を用いた生体実験系では、出血時間の延長、及び塩化第二鉄を用いた頸動脈血栓形成も ERp57 ノックアウトマウスでは低下していた。以上のことより、ERp57 は血小板の種々の機能を正常に保つことが示唆され、また生体内でも血小板機能保持に重要なことが示された。

6. 本研究における中国人共同研究者の役割及び業績

武芸氏は ERp57 ノックアウトマウスの作成、血小板凝集能、血小板顆粒放出能、GPIIb/IIIa 活性化 などの検討を行い、本研究の主要な役割を担った。

ジスルフィド異性化酵素 ERp57 の血小板活性化、血栓形成における役割

研究者氏名	尾崎由基男
日本研究機関	山梨大学医学部臨床検査医学
研究者氏名	武 芸
中国所属機関	蘇州大学医学部血液研究所

要旨

ジスルフィド異性化酵素 ERp57 の機能を調べるために、ノックアウトマウスの作成を行った。ノックアウトマウスは正常に生まれ、軽度血小板数が低下していたが、他の血球数には異常がなかった。トロンビン、GPVI 刺激剤のコンバルキシンによる血小板凝集はやや低下していたが、リコンビナントの ERp57 を加えることにより、血小板凝集は回復した。また血小板顆粒内容の放出も軽度低下していた。GPVI 刺激による GPIIb/IIIa の活性化状態を判定する JON/A 結合をみると、ERp57 欠損血小板では明らかに低下しており、いわゆる inside-out GPIIb/IIIa 活性化の信号伝達経路にも異常があることが示唆された。また、血栓を安定化させることに重要とされる clot retraction も低下していた。動物を用いた生体実験系では、出血時間の延長、及び塩化第二鉄を用いた頸動脈血栓形成も ERp57 ノックアウトマウスでは低下していた。以上のことから、ERp57 は血小板の種々の機能を正常に保つことが示唆され、また生体内でも血小板機能保持に重要なことが示された。

Key Word ジスルフィド異性化酵素、 ERp57、血小板活性化、血栓

緒言 細胞膜上、また細胞内には 複数のシステイン残基が存在する蛋白が多く認められる。特に分子量の大きい蛋白には多数の S-S 結合があり、この S-S 結合を中心にして、蛋白分子が回転することにより、分子にねじれが生じる可能性がある。ねじれにより立体構造が変化し、蛋白の機能が影響を受けることは容易に想像でき、S-S 結合を外してねじれを無くし、蛋白の立体構造を元の状態に戻すジスルフィド異性化酵素が知られている。

血小板にもいくつかのジスルフィド異性化酵素が発見されているが、それらの血小板における役割はあまり明らかにされていない。本研究は ジスルフィド異性化酵素のなかでも、まだほとんど研究されていない ERp57 の血小板活性化、血栓形成における役割を解明しようとするものである。

結果 及び 考察

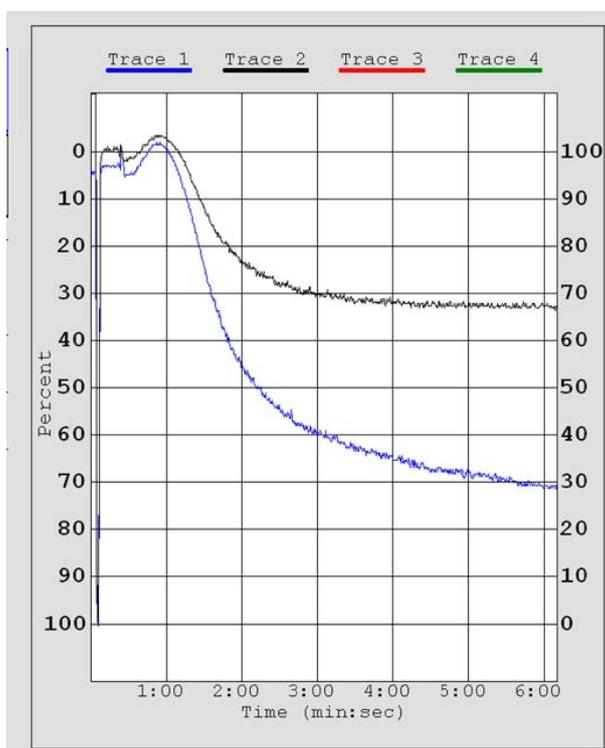
1. ERp57 のノックアウトマウス

当該研究者等は PF4Cre 法を使い、ERp57 のノックアウトマウスの作成を試みた。その結果として、ERp57 を完全に無くしたマウスの作成に成功した。ノックアウトマウスは正常に生まれ、また繁殖力も低下していなかった。

ノックアウトマウスの血算を調べると、赤血球、白血球数はほぼワイルドタイプと同じであったが、血小板数は 20% 程度の低下を認めた。血小板上の GPIIb/IIIa、GPIb、GPVI 等の主要な膜糖タンパクは同様に発現していた。

2. ERp57 欠損マウスの凝集能を調べると、GPVI に作用する convulxin 刺激、トロンビン刺激ともに血小板凝集能は軽度低下していた。しかし、強い濃度の刺激剤を用いると、ワイルドタイプの血小板凝集との差はなくなった。また、低下している血小板凝集に対して、recombinant の ERp57 を加えることにより、凝集能は回復した。これにより、正常な ERp57 の存在は血小板凝集の維持に必要なことが示唆された。

図 1. ワイルドタイプ (青色) に対して、ERp57 ノックアウトマウスからの血小板 (黒色のトレース) は 血小板凝集が低下している。



3. ERp57 欠損血小板は、血小板凝集能のみでなく、血小板 α 顆粒内容の放出も低下していた。

さらに、GPVI 刺激による GPIIb/IIIa の活性化状態を判定する JON/A 結合をみると、ERp57 欠損血小板では明らかに低下しており、いわゆる inside-out GPIIb/IIIa 活性化の信号伝達経路にも異常があることが示唆された。

Clot retraction は 血小板を含むフィブリン塊が収縮する現象であり、血小板活性化が関与する血栓の安定性に重要な反応とされている。特に血小板 GPIIb/IIIa と凝固第 XIII 因子が重要であることが知られている。血小板多血漿にトロンビンを加え、凝集塊を形成させたのち経過を観察すると、血小板凝集塊が 40~60 分位で収縮するのが認められる。ERp57 欠損血小板を用いた場合、clot retraction の開始が遅れ、また最終的な収縮の度合いも明らかに低下していた。これらのことから、ERp57 は生理的、病的な血栓の安定化に大きな役割を果たすことが示唆された。

4. 以上のことより、ERp57 は血小板機能のいくつかの重要な経路に大きな役割を果たすことが示唆された。生体内での止血、血栓形成に対する影響を評価するため、ノックアウトマウスを用いて、尻尾からの出血時間、また 塩化鉄を用いた頸動脈血栓形成の実験を行った。結果として、ERp57 欠損動物では、出血時間の延長、また頸動脈血栓形成の遅延を認め、ERp57 が生体における止血、病的血栓形成に関与することが証明できた。