



Title	A Gln747 → Pro Substitution in the $\alpha$ IIb Subunit is Responsible for a Moderate $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Deficiency in Glanzmann Thrombasthenia
Author(s)	田所, 誠司
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41619">https://hdl.handle.net/11094/41619</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	田所 誠司
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14490号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	A Gln747→Pro Substitution in the $\alpha$ IIb Subunit is Responsible for a Moderate $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Deficiency in Glanzmann Thrombasthenia ( $\alpha$ IIbサブユニットの Gln747→Pro アミノ酸置換に起因する血小板無力症の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次
	(副査) 教授 北村 幸彦 教授 金倉 讓

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

血小板無力症は、フィブリノーゲンや von Willebrand 因子の受容体として血小板機能の中核を担うインテグリン  $\alpha$  IIb $\beta$ 3の量的あるいは質的異常に起因する常染色体劣性遺伝の出血性疾患である。血小板無力症患者の  $\alpha$  IIb および  $\beta$ 3の遺伝子を解析することによって、本邦における血小板無力症の遺伝子異常の特徴を明らかにするとともに、 $\alpha$  IIb $\beta$ 3の発現やリガンド結合能に対する構造機能連関をより明らかにすることを目的とした。

#### 【方法ならびに成績】

血小板無力症患者 MT と MS の 2 症例の遺伝子解析を施行した。両者とも幼少時より出血傾向があり、リストセチンを除く全ての生理的アゴニストによる血小板凝集を欠如していた。イムノプロット法で血小板の  $\alpha$  IIb $\beta$ 3を定量したところ、MT では  $\alpha$  IIb が 15%,  $\beta$ 3 が 22%, MS では  $\alpha$  IIb が 4%,  $\beta$ 3 が 8% に低下しており、それぞれ II 型、I 型と分類した。患者血小板より RNA を分離し、 $\alpha$  IIb および  $\beta$ 3の cDNA を RT-PCR 法で増幅した後、全翻訳領域の塩基配列を解析した。MT, MS とも  $\alpha$  IIb cDNA の A2334→C 点突然変異による Gln747→Pro ミスセンス変異 (Pro747) を認めた。II 型の MT は、の Pro747変異のホモ接合体で、I 型の MS はヘテロ接合体であった。MS では、エクソン18のアクセプターサイト AG に G→A 点突然変異を認め、 $\alpha$  IIb のエクソン18をスキップするようなスプライス異常を生じていた。Allele-specific Restriction Enzyme Analysis 法 (ASRA) を用いて MS の両親の DNA を解析したところ、Pro747変異は父親由来であり、スプライス異常は母親由来であった。したがって、I 型の患者 MS は  $\alpha$  IIb の Pro747変異とスプライス異常の複合ヘテロ接合体であることが確認された。さらに、ASRA 法で、本邦の血小板無力症患者 17 例の遺伝子を解析したところ  $\alpha$  IIb の Pro747変異は 4 症例に認められた (ホモ接合体 2 例、ヘテロ接合体 2 例)。

次に、 $\alpha$  IIb の Pro747置換が II 型血小板無力症の原因である事を証明するため、発現ベクター pcDNA3 に Pro747  $\alpha$  IIb を組み込んだプラスミドを作製し、野生型の  $\beta$ 3とともにリン酸カルシウム法を用いて 293 細胞に導入して  $\alpha$  IIb $\beta$ 3の発現を検討した。FACS では、 $\alpha$  IIb $\beta$ 3に対する種々のモノクローナル抗体いずれにおいても、変異型  $\alpha$  IIb $\beta$ 3との結合量は野生型と比べると低下していた。細胞表面タンパクをビオチン標識し、 $\alpha$  IIb $\beta$ 3複合体に対するモノクローナル抗体の AP2 を用いて免疫沈降したところ、変異型では  $\alpha$  IIb $\beta$ 3の発現量の低下を認めた。また、変異

型では $\alpha$ llbの前駆体(pro  $\alpha$ llb)も共沈しており、pro  $\alpha$ llb $\beta$ 3複合体も細胞表面へ発現していると考えられた。野生型および変異型 $\alpha$ llb $\beta$ 3発現細胞を可溶化し、 $\alpha$ llb $\beta$ 3に対するポリクローナル抗体を用いたイムノブロット法にて解析すると、細胞全体でも変異型 $\alpha$ llb $\beta$ 3の発現の低下が示されたが、pro  $\alpha$ llb量は両者で差を認めなかった。そこで、変異型 $\alpha$ llb $\beta$ 3の発現の低下が、生合成過程のどの段階の障害によるものかを明らかにするために [ $^{35}$ S]-メチオニンを用いて細胞内のタンパク合成を追跡した。 $\alpha$ llbのみを導入した時のpro  $\alpha$ llbの細胞内での安定性は変異型と野生型に違いは認められなかった。 $\alpha$ llbと $\beta$ 3を共に導入した時、pro  $\alpha$ llbと $\beta$ 3の複合体形成にも野生型との違いは認められなかった。しかしながら、24時間後まで追跡すると、pro  $\alpha$ llbが $\beta$ 3と複合体を形成してから、野生型ではpro  $\alpha$ llbが切断されて $\alpha$ llbに変化したが、変異型では $\alpha$ llbへ切断されないpro  $\alpha$ llbの残存が多く認められた。すなわち、変異型では小胞体でpro  $\alpha$ llbと $\beta$ 3が複合体を形成するが、その後のゴルジ装置へ輸送およびゴルジ装置でのpro  $\alpha$ llbから $\alpha$ llbへの切断過程に障害を生じることが明らかとなった。さらに、 $\alpha$ llbの747番目の残基Glnの重要性を検討するために、Gln747をAlaに置換して $\alpha$ llb $\beta$ 3の発現を解析したが、Ala747 $\alpha$ llb $\beta$ 3の細胞表面への発現は野生型と同じであった。

$\alpha$ llb $\beta$ 3の発現においては、 $\alpha$ llbの747番目の残基がGlnであることは必須ではなく、むしろProに置換することによって生合成過程に障害を及ぼすと考えられた。続いて、 $\alpha$ llb $\beta$ 3の活性化抗体であるPT25-2で刺激した後、リガンド類似抗体のPAC-1を用いてPro747 $\alpha$ llb $\beta$ 3変異型のリガンド結合能を検討したが、機能障害は認められなかった。したがって、 $\alpha$ llbのPro747変異は血小板無力症における $\alpha$ llb $\beta$ 3の量的異常の原因であり、質的異常は来さないと考えられた。

### 【総括】

II型の血小板無力症の新しい遺伝子異常として $\alpha$ llbサブユニットのGln747→Proアミノ酸置換を同定し、発現実験にて $\alpha$ llbのPro747変異が、pro  $\alpha$ llb $\beta$ 3複合体の細胞内輸送、ならびにpro  $\alpha$ llbの成熟を障害することを初めて示した。この $\alpha$ llbのPro747変異は本邦に特徴的で4症例に認められた。患者MSでは $\alpha$ llbのPro747変異にエクソン18スキップを伴っており、I型の表現型を呈した。これらの成績は、血小板機能に重要な役割を果たしているインテグリン $\alpha$ llb $\beta$ 3の発現に必要な構造や、I型とII型の表現型を規定する遺伝子異常に新たな知見を加えることができるものと考える。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、臨床症例を出発点として遺伝子解析を行い、発現実験を行って血小板無力症の病因を解明している。血小板無力症はインテグリン $\alpha$ llb $\beta$ 3の先天性欠損疾患であり、血小板凝集の中心を担うインテグリン $\alpha$ llb $\beta$ 3の構造機能連関を解析する上で非常に貴重な疾患である。さらにインテグリン $\alpha$ llb $\beta$ 3は、心筋梗塞などの動脈血栓症の治療薬の標的として注目されている。本研究では、 $\alpha$ llbサブユニットに異常をもつII型血小板無力症を発現実験を施行して詳細に検討し、747番目のPro残基がpro  $\alpha$ llb $\beta$ 3の小胞体からGolgi装置への輸送やpro  $\alpha$ llbのcleavageに影響することを初めて示した。また、本邦の血小板無力症の遺伝子異常の特徴も考察されている。全体を通して、臨床医としてのpatient-oriented researchが十分なされており、学位に値する論文と考えられる。