The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Analysis of the Epitopes Recognized by Platelet-Associated Anti-GPIIb-IIIa Autoantibodies in Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP)
Author(s)	小杉, 智
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42841
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　小杉　智（こすぎ　さとる）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　15867　号

学位授与年月日　平成13年2月13日

学位授与の要件　学位規則第4条第2項該当

学位論文名　Analysis of the Epitopes Recognized by Platelet-Associated Anti-GPIIb-IIIa Autoantibodies in Chronic Immune Thrombocytopenic Purpura (ITP)
（慢性ITPにおける血小板結合抗血小板膜糖蛋白（GP）IIb-IIIa自己抗体のepitope解析）

論文審査委員　（主査）
教　授　松澤　佑次

（副査）
教　授　金倉　譲　　教　授　網野　信行

論文内容の要旨

【目的】

慢性自己免疫性血小板減少性紫斑病は自己免疫性血液疾患の一つで、抗血小板自己抗体による血小板破壊の亢進がその本態である。抗血小板膜糖蛋白（GP）IIb-IIIa抗体は本疾患における主要な自己抗体のひとつであるが、この抗体の認識する膜糖蛋白上のepitopeは、いまだ不明である。血小板結合（platelet-associated）抗GPIIb-IIIa自己抗体のepitopeを明らかにすることは、この疾患の病態を解明し、特異的抗体除去療法など新規治療法を開発する上で重要である。本研究において私は、エーテルにて解離した血小板結合抗体を用いてそれらの認識するepitopeについて解析し、併せて血清抗体のそれと比較検討した。

【方法ならびに成績】

1）抗GPIIb-IIIa自己抗体の検出

3種類のモノクローナル抗体[AP2（complex-specific抗体），AP3（抗GPIIIa）、Tab（抗GPIIb)]を用いたmodified antigen-capture ELISA（MACE）で慢性ITP患者37例の血小板結合抗体解離液を解析した。14例（38%）が血小板結合抗GPIIb-IIIa抗体陽性で、どのモノクローナル抗体を用いたMACEでも同じ検出率であった。一方、57例の血清を解析した場合はそれぞれのMACEで検出率は異なり、AP2－12例（21%）、AP3－9例（16%）、Tab－19例（33%）であった。

2）EDTA処理血小板との反応

次に抗GPIIb-IIIa自己抗体と5 mM EDTAで37℃20分処理した血小板上のGPIIb-IIIaとの反応性を検討した。EDTA処理によりGPIIb-IIIa分子内のCa^{2+}が失われGPIIbとGPIIIaは解離するため、複合体特異的なepitopeは消失するが、GPIIb上もしくはGPIIIa上のepitopeは保たれる。MACEにおいて、10例中9例の血小板結合抗体は、EDTA処理血小板上のGPIIb-IIIaに対する反応性が著明に低下していた。また、免疫沈降法においては、血小板結合抗体はEDTA処理血小板のGPIIb、GPIIIaいずれの分子も沈降しなかった。このことから、ほとんどの血小板結合抗体は、GPIIb-IIIa複合体特異的な2価イオン依存性の構造を認識していると考えられた。血清抗体では、EDTA処理した血小板のGPIIb-IIIaへの反応性が血小板結合抗体と異なる場合が5例中2例認められた。これらの成績は、血清抗体と血小板結合抗体とで認識するepitopeが異なる場合があることを示唆している。

3）血管内皮細胞上の$\alpha_v\beta_3$との反応

抗GPIIb-IIIa抗体のepitopeをさらに解析するため、血管内皮細胞上のインテグリン$\alpha_v\beta_3$との反応性を検討した。$\alpha_v\beta_3$はGPIIb-IIIa（インテグリン$\alpha_{IIb}\beta_3$）と同じβ鎖を有するため、抗GPIIIa抗体は$\alpha_v\beta_3$にも反応するが、抗GPIIb抗体やcomplex-specific抗体は反応しない。臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）とAP3（抗β_3抗体）を用いたMACEで検討すると、血小板結合抗体は、検討した12例全例で$\alpha_v\beta_3$と反応しなかった。このことから、血小板結合抗体はGPIIb-IIIaに特異的な構造を認識しているという上記の結果が支持された。一方、血清中には$\alpha_v\beta_3$に反応する抗体が80例中23例（29%）に認められた。血清に抗GPIIIa抗体があり$\alpha_v\beta_3$に交差反応している可能性を考え、血小板とHUVECを用いたcross-adsorption studyを行ったところ、GPIIb-IIIaとの交差反応性に起因せず$\alpha_v\beta_3$に特異的に反応する抗$\alpha_v\beta_3$抗体が血清中にのみ存在することが明らかとなった。この抗$\alpha_v\beta_3$抗体陽性例は、陰性例に比較して血小板数が低く、摘脾無効例が多い傾向が見られた。

【総括】

慢性ITPにおける血小板結合抗GPIIb-IIIa自己抗体は、GPIIb-IIIaの2価イオン依存性の複合体特異的な構造を認識していることを明らかにした。一方、血清中の抗GPIIb-IIIa抗体は、同じ症例でも血小板結合抗体とは異なった部位を認識している場合があることも示唆した。さらに、患者血清中においてのみ抗$\alpha_v\beta_3$抗体が存在することを初めて示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、抗GPIIb-IIIaモノクローナル抗体とEDTA処理血小板および血管内皮細胞を用いて、慢性ITPにおける血小板結合抗GPIIb-IIIa自己抗体のepitopeの解析を行い、血清中に認められる抗体との比較を行ったものである。その結果、1）血小板結合抗GPIIb-IIIa自己抗体は、ほとんどの症例でGPIIb-IIIa特異的な2価イオン依存性の構造を認識していること、2）血清抗GPIIb-IIIa抗体が血小板結合抗体と異なったepitopeを認識する症例があること、3）血清中には抗GPIIb-IIIa抗体以外に、抗$\alpha_v\beta_3$抗体が存在すること、を明らかにし、血小板結合自己抗体の認識するepitopeの新しい性質と、血清中の新しい抗体の存在を示した。本研究の結果は、血小板結合抗体の解析にはGPIIb-IIIaの立体構造に関する知識の集積と考察が非常に重要であることを示唆し、今後の研究の方向を示している。また、今回新たに見いだされた血清抗$\alpha_v\beta_3$抗体の存在が、ITPの予後因子となりうる可能性を示唆している。よって、ITPにおける血小板結合抗体と血清抗体の新しい性質を明らかにした本論文は、臨床的に極めて意義のあるものと考えられ、十分学位授与に値すると認める。