



Title	Markedly Reduced Expression of Platelet c-mpl Receptor in Essential Thrombocythemia
Author(s)	堀川, 曜子
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44581
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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 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	ほりかわ しみず よう こ 堀川 (清水) 曜 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 8 1 5 3 号
学位授与年月日	平成 15 年 9 月 30 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	Markedly Reduced Expression of Platelet c-mpl Receptor in Essential Thrombocythemia (本態性血小板血症におけるトロンボポエチン受容体の発現異常)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 謙 (副査) 教授 北村 幸彦 教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

【目的】

本態性血小板血症 (ET) は、骨髄増殖性疾患 (MPD) の一つに分類され、その血液像は末梢血におけるしばしば 100 万/ μ l 以上にも及ぶ著明な血小板増加と骨髄における巨核球の過形成によって特徴づけられる。ET は他の MPD と同様に造血幹細胞のクローナルな疾患であるが、染色体異常を示す症例は少なく、ET の原因となる遺伝子異常や、その病態がどのような分子機構によってもたらされるのかは明らかではない。

血小板は、骨髄内で成熟巨核球より産生されるが、生体内で適切な数の血小板が産生されるには、造血幹細胞から発生した巨核球系前駆細胞の増殖・成熟過程が適正に制御される必要がある。この過程には多くのサイトカインが関与するが、トロンボポエチン (TPO) は、その受容体 c-Mpl を介し、血小板産生に最も重要な役割を担う。

本研究では、ET 患者における TPO/c-Mpl 系の制御異常の有無を患者血清及び患者血小板を用いて検討した。

【方法ならびに成績】

1. ET 症例の血清中 TPO 濃度

正常コントロール、ET 症例、血小板増多を伴った慢性骨髄性白血病 (CML) 症例において血清中 TPO 濃度を ELISA 法にて測定した。

血清中 TPO 濃度は 21 例の正常コントロールでは 0.76 ± 0.21 fmol/ml (mean \pm SD)、13 例の ET 症例では 1.31 ± 1.64 fmol/ml であった。また、CML 症例では 0.10 fmol/ml であった。

一般に血清中の TPO は血小板表面の c-Mpl に結合し代謝されるため、血清中 TPO 濃度は血小板増多症では低値となる。しかし、ET 症例においては血小板増多にもかかわらず、血清中 TPO 濃度が正常コントロールより若干高値を示した。また、ET 症例において、血小板数と血清中 TPO 濃度の間に明らかな相関は認められなかった。

2. ET 症例の血小板における c-Mpl 及び GPIIb/IIIa 蛋白の発現

ET 症例において TPO が低値を示さない機序を明らかにするため ET 症例の血小板における c-Mpl 蛋白の発現を解析した。

a) FACS を用いた解析

5 例の正常コントロール、14 例の ET 症例、1 例の CML 症例の血小板表面の c-Mpl 及び GPIIb/IIIa の発現を検討したところ、すべての ET 症例において、正常コントロール、CML 症例と比較して c-Mpl の発現低下が認められ

た。一方、GPIIb/IIIa の発現には明らかな差は認められなかった。

b) Western blot 法を用いた解析

4例の正常コントロール、17例の ET 症例、1例の CML 症例の血小板より total lysate を単離し、c-Mpl 蛋白の発現を比較したところ、正常コントロール、CML 症例と比較して、ET 症例全例において c-Mpl 蛋白の減少（15例で著減、1例で中等度減少、1例で軽度減少）が認められた。一方、GPIIb/IIIa の発現には明らかな差は認められなかった。

3. ET 症例の血小板における c-mpl 及び GPIIb mRNA の発現

血小板より total RNA を抽出し、Northern blot 法にて c-mpl 及び GPIIb mRNA の発現を検討した。また、Northern blot 法を行うのに十分な RNA 量を得られなかった症例については半定量的 RT-PCR 法で解析した。

a) Northern blot 法を用いた解析

2例の正常コントロールでは c-mpl mRNA が強く発現されていたが、5例の ET 症例では c-mpl mRNA の発現はほとんど検出できなかった。一方、GPIIb mRNA の発現レベルには正常コントロール、ET 症例間で明らかな差は認められなかった。

b) 半定量的 PCR を用いた解析

2例の正常コントロールと比較して、4例の ET 症例では c-mpl mRNA の発現低下が認められた。一方、GPIIb mRNA の発現には両群間で明らかな差は認められなかった。

4) TPO 刺激前後の血小板蛋白のチロシンリン酸化変化

TPO 刺激前後の血小板から total lysate を単離し、抗リン酸化チロシン抗体を用いて Western blot 法を施行し、ET 症例の血小板における c-Mpl 下流のシグナル伝達系について解析した。

検討した 3 例の ET 症例の血小板において、TPO 刺激前に異常なチロシンリン酸化蛋白は認められなかった。

また、c-Mpl の発現が著明に低下していた 2 例の ET 症例の血小板では、TPO 刺激後も血小板蛋白のチロシンリン酸化はほとんど誘導されなかった。c-Mpl の発現が比較的保たれていた症例の血小板を TPO 刺激した場合、TPO によって誘導される血小板蛋白のチロシンリン酸化の濃度反応性や時間的経過は正常血小板とほとんど差はなかった。これらの結果から、ET 症例の血小板や巨核球においては、c-Mpl の恒常的活性化や TPO に対する過剰な反応は見られないと推測された。

〔総括〕

血清中 TPO 濃度は通常血小板数と逆相関するが、ET 症例では血小板増多にも関わらず血清中 TPO 濃度が低下していなかった。その機構として、ET 症例の血小板においては c-Mpl の発現が蛋白、mRNA レベルで共に低下していることが明らかとなった。また、ET 症例の血小板には恒常的活性化は認められず、逆に、c-Mpl の発現低下のために TPO からのシグナルが著明に減弱していた。これらの結果から、ET において認められる過剰な血小板産生には、TPO/c-Mpl 系とは異なる経路が関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本態性血小板血症 (ET) は他の骨髄増殖性疾患と同様に造血幹細胞のクローナルな疾患であることが証明されているが、その原因となる遺伝子異常については明らかではない。従来、ET 患者の造血前駆細胞は正常人と異なり、造血因子非存在下においても自律性に増殖することが可能、あるいは各種の造血因子に対して極めて高い感受性を示すと推測されてきた。そこで、本研究では、ET における過剰な血小板産生の分子機構を解明するために、血小板産生系で最も重要なサイトカインであるトロンボポエチン (TPO) 及びその受容体 c-Mpl の発現や機能異常の有無が検討された。

本研究の結果、ET 患者の血清中 TPO は血小板増多にも関わらず低下していないことが明らかとなった。TPO が肝臓において血小板数に左右されず常に一定量産生され、血小板表面、骨髄巨核球表面の c-Mpl に結合し代謝され分解されることを鑑みると、ET の患者巨核球、血小板では c-Mpl の発現に異常がある可能性が考えられた。この予測

に一致して、本研究により ET の患者血小板においては c-Mpl の発現が蛋白、mRNA レベルで低下していることが明らかとなった。また、ET 患者の血小板には恒常的な活性化はなく、c-Mpl の発現低下のため TPO からのシグナルも減弱していることも明らかとなった。

これらの結果は、ET においては巨核球系前駆細胞が最も重要な増殖・分化シグナルである TPO/c-Mpl 系を介さずに、異なった経路に依存して自律的に増殖・分化していることを意味するものと考えられた。また、最近、TPO の転写を促進する、あるいは TPO 蛋白の安定性を高める TPO 遺伝子の変異が家族性（常染色体優勢遺伝）血小板増多症の原因であることが示されたが、本研究結果から、通常の ET と家族性の血小板増多症は全く異なった機序により発症することも明らかとなった。

血小板を TPO で前処置すると ADP、コラーゲンなどのアゴニストによって誘導される血小板凝集が増強される。ET 症例ではしばしば血小板増多にもかかわらず血小板機能の低下により出血傾向が認められるが、本研究結果から、TPO による血小板凝集のプライミング効果が欠如していることが、ET 血小板の機能低下の一つの原因と考えられた。

以上のように、本研究結果は、ET の病態理解に極めて重要な知見を供するものであり、高い学術的価値を有している。更に、ET に対するより有効な治療薬を開発する上でも、極めて示唆に富む有用な知見を供するものであり、学位に値する研究と考えられる。