



Title	A naturally-occurring Try143His $\alpha$ IIb mutation abolishes $\alpha$ IIb $\beta$ 3 function for soluble ligands but retains its ability for mediating cell adhesion and clot retraction : comparison with other mutations causing ligand-binding defects
Author(s)	清井, 映男
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44691">https://hdl.handle.net/11094/44691</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	清井 映男
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 18142 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	A naturally-occurring Tyr143His $\alpha_{IIb}$ mutation abolishes $\alpha_{IIb}\beta_3$ function for soluble ligands but retains its ability for mediating cell adhesion and clot retraction: comparison with other mutations causing ligand-binding defects (血小板無力症より見出された $\alpha_{IIb}$ 143Tyr→His 置換によりインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ は可溶化リガンドに対する結合能が障害されるが、固相化リガンドに対する細胞接着能および血餅退縮能は残存している)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 譲  (副査) 教授 北村 幸彦 教授 萩原 俊男

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

血小板表面の膜糖蛋白  $\alpha_{IIb}\beta_3$  は、血小板による生理的な止血血栓および病的血栓形成過程において重要な役割を果たしている。  $\alpha_{IIb}\beta_3$  は接着分子の一つであるインテグリンファミリーに属しており、フィブリノーゲンや von Willebrand 因子、フィブロネクチン、ビトロネクチンのレセプターとして機能し、血小板と血小板の接着現象である血小板凝集塊形成に必要不可欠な分子であることが明らかにされている。血小板無力症 (Glanzmann thrombasthenia) は先天的なインテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  の量的または質的異常に起因する先天性血小板機能異常症であり、 $\alpha_{IIb}\beta_3$  の生体における重要性やその構造と機能の関連を解析する上で格好のモデルとなる。今回私は、 $\alpha_{IIb}\beta_3$  の質的異常に起因する血小板無力症症例の遺伝子異常を明らかにするとともに、変異  $\alpha_{IIb}\beta_3$  のリガンド結合能、細胞接着能および血餅退縮能への影響について検討し、インテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  の機能部位を解析することを目的とした。

## 〔方法〕

血小板無力症症例 Osaka-12 は 21 才女性。家系に血族結婚なし。ADP、エピネフリン、コラーゲンによる血小板凝集は欠如していた。患者血小板の mRNA を直接シーケンス法で解析し、野生型と変異型の  $\alpha_{IIb}$ cDNA を  $\beta_3$ とともに 293 細胞に導入して発現実験を行った。リガンド結合能はリガンド類似抗体 (OP-G2、PAC-1) および FITC でラベルしたフィブリノーゲンを用いたフローサイトメトリー法で解析した。変異型の  $\alpha_{IIb}\beta_3$  を恒常に発現する細胞は、変異を含む部位を RT-PCR 法で増幅して組み込んだ発現ベクターを 293 細胞に強制発現させ、G418 でセレクションして得た。野生型と変異型の発現細胞を用いて固相化フィブリノーゲンに対する細胞接着能を acid phosphatase 活性の定量で比較するとともに、接着した細胞を phalloidin で染色して蛍光顕微鏡による細胞の形態的な観察を行なった。接着細胞における Focal adhesion kinase (FAE) のリン酸化は免疫沈降後のイムノプロット法で検討した。また、ガラス試験管内でのフィブリンクロットの退縮を経時的に観察した。さらに、 $\alpha$  サブユニットの 160Phe と 161Ser 間の 2 アミノ酸挿入に起因する機能欠失変異 ( $KO\alpha_{IIb}\beta_3$ ) および Asp163Ala  $\alpha_{IIb}\beta_3$  変異発現細

胞と比較検討した。

### [ 成 績 ]

血小板表面上の  $\alpha_{IIb}\beta_3$  の発現は症例 Osaka-12 では正常コントロールと比べて約 36–41% であった。 $\alpha_{IIb}$  サブユニットを認識するモノクローナル抗体である TP80、 $\beta_3$  サブユニットを認識するモノクローナル抗体である AP3 と比較して  $\alpha_{IIb}\beta_3$  複合体を認識するモノクローナル抗体である AP2 の結合の低下が著明であった。cDNA の遺伝子解析にて  $\alpha_{IIb}$  サブユニット内に 143Tyr (TAC) → His (CAC) 置換を認めた。ゲノム DNA ではこの変異のヘテロ接合体であったが RT-PCR では変異 mRNA のみ検出され、他のアレルの mRNA は著減していると考えられた。変異遺伝子を導入した発現実験において、Tyr143His  $\alpha_{IIb}\beta_3$  では TP80、AP3 の結合は正常であったが血小板と同様に AP2 の結合が著明に低下していた。Tyr143His  $\alpha_{IIb}\beta_3$  にはリガンド類似抗体および FITC ラベルのフィブリノーゲンはいずれも結合しなかった。Tyr143Ala  $\alpha_{IIb}\beta_3$  でも同様の結果であった。発現細胞を用いて行った固相化フィブリノーゲンに対する細胞接着能は、Tyr143His  $\alpha_{IIb}\beta_3$  発現細胞では野生型に比べて細胞接着能が有意に低下するものの、わずかな接着が認められ、蛍光顕微鏡による観察においては細胞の spreading が認められた。KO  $\alpha_{IIb}\beta_3$  および Asp163Ala  $\alpha_{IIb}\beta_3$  発現細胞では細胞接着はほとんど認めなかった。接着細胞における FAK のリン酸化は、Tyr143His  $\alpha_{IIb}\beta_3$  発現細胞では野生型に比べて著明に低下していた。また、Tyr143His  $\alpha_{IIb}\beta_3$  発現細胞ではフィブリンクロットの退縮を認めたが、KO  $\alpha_{IIb}\beta_3$  発現細胞では退縮はほとんど認めなかった。

### [ 総 括 ]

Tyr143His  $\alpha_{IIb}\beta_3$  では可溶化リガンド結合能は消失するが、固相化リガンドに対する細胞接着能および血餅退縮能は完全には障害されない。一方、KO  $\alpha_{IIb}\beta_3$  および Asp163Ala  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ではすべてのリガンドに対する結合能が障害された。以上より、 $\alpha_{IIb}$  サブユニットの機能部位として Asp163 がより重要であることが示唆された。種々のリガンドを用いたインテグリンの詳細な機能解析は、その機能部位の同定に有用であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は先天性血小板異常症である血小板無力症の原因となる新たな遺伝子異常を明らかにするとともに、遺伝子変異がインテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  の機能に及ぼす影響を詳細に検討している。

インテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  の質的異常に起因する血小板無力症症例の遺伝子異常の解析から  $\alpha_{IIb}$  の N 末端部分の  $\beta$  プロペラ構造が機能発現に重要であることを示した。さらに詳しく  $\beta$  プロペラ内の他の遺伝子異常と比較検討して、Tyr143His  $\alpha_{IIb}\beta_3$  では可溶化リガンド結合能は消失するが固相化リガンドに対する細胞接着能および血餅退縮能は完全には障害されないこと、一方で 160 番残基と 161 番残基の間の 2 アミノ酸挿入の異常や Asp163Ala  $\alpha_{IIb}\beta_3$  では可溶化リガンドおよび固相化リガンドに対する結合能に加えて血餅退縮能も障害されることを示した。すなわち、W3 4-1 ループの遺伝子異常がインテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  の細胞接着能や血餅退縮能に及ぼす影響を初めて明らかにし、W3 4-1 ループの中でも 163Asp 残基が重要であることを示した。

インテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$  は血小板の凝集に必要不可欠な分子であり、生体内における血栓形成過程に重要な役割を果たしている為、その機能や構造を明らかにし制御することは血栓性疾患の予防や治療に有用である。本論文は、遺伝子変異の解析によりインテグリンの機能部位を同定し、 $\alpha_{IIb}$  の W3 4-1 ループの中でもリガンド結合において特に重要な残基を明らかにしたもので、学位に値すると考える。