The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Recognition of highly restricted regions in the β-propeller domain of αIIb by platelet-accociated anti-αIIbβ3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia
Author(s)	清水, 一亘
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59794
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

【80】

氏　　名	清　水　一　亘（きよ　みず　かず　のぶ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学　位　記　番　号	第　２５９０６　号
学位授与年月日	平成25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臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-accociated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. （特発性血小板減少性紫斑病における血小板関連抗αIIbβ３自己抗体はαIIbのβプロペラドメインの高度に限定された領域を認識する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　金倉　　譲 （副査） 教　授　森井　英一　　教　授　熊ノ郷　淳

論文内容の要旨

〔目　的〕

血小板関連抗体（platelet-associated(PA) antibodies）は特発性血小板減少性紫斑病における血小板減少に重要な役割を果たしている。その機序としては、血小板に結合することで網内系における血小板の貪食・破壊を亢進させること、及び骨髄巨核球に直接作用して巨核球の成熟を抑制することで血小板産生を低下させることが挙げられる。この抗体の標的として、GP(glycoprotein)IIb/IIIa(αIIbβ３)やGPIb/IX/V等が報告されているが、特にαIIbβ３抗体は43-57%と高率に検出され、最も重要な抗原であると考えられている。PA-抗αIIbβ3抗体のエピトープとしては、αIIbのN末端にあるβプロペラドメインの重要性が報告されているが、詳細は明らかとはなっていない。本研究では本抗体のエピトープを解析することを目的とした。

〔方法〕

Primary ITP(immune thrombocytopenia)患者より全血の採血を行い、エーテル解離法にてplatelet eluateを作成した。ヒト及びマウスのαIIb及びβ3は293T細胞にlipofectionにて発現させ、platelet eluateと反応させてフローサイトメトリーにて解析した。CD61(β3)高発現領域を解析対象とし、細胞に結合したIgGを定量的に評価した。

〔成績〕

Primary ITP患者76名中26名（34%）にPA-抗αIIbβ3抗体が認められた。十分に検体量が得られた15名を対象としてさらに解析を行った。まず、解析した患者のPA抗体の大部分はαIIbβ3の発現がほとんどみられない血小板無力症患者の血小板とは結合しなかったため、解析対象とした患者のPA抗体の大部分がαIIbβ3抗体であることが確認された。次に本抗体はマウスαIIbβ3発現細胞への結合がほとんどみられないことが明らかとなった。この結果を利用し、ヒトーマウスキメラαIIbβ3を使用してエピトープを解析することにした。

まずヒトαIIbβ3のαIIbサブユニットをマウスに置き換えたキメラにて本抗体の反応性がヒトαIIbβ3と比べ大きく低下し、さらにαIIbのN端にあるβプロペラドメインのN端半分のみ（W4:4-1 loopまで）をマウスに置き換えたキメラにおいても反応性が大きく低下することから、本抗体はαIIbにあるβプロペラドメインのN-terminal halfを認識していると考えられた。さらに網羅的にエピトープを解析するために、βプロペラドメインのN-terminal halfにおいて、N端よりloop毎にヒトからマウスに置き換えたところ、ある特定のloopがマウスに置き換わると反応性が大きく低下することが判明し、自己抗原として重要な次の3つの認識領域を同定することができた。

1) W1:1-2とW2:3-4 loopからなる領域：これらのloopは隣り合う構造にあり、2名がこの部位を認識していた。さらに1アミノ酸のみマウス配列に変異させたW1:1-2のS29K、R32S及びW2:3-4のE136Q、R139G変異により、これらの抗体の結合は著明に抑制された。よってこの4つのアミノ酸が本抗体との結合に必須な残基であると考えられた。

2) W1:2-3 loopを含む領域：5名はこの領域を認識しており、うち1名はW1:2-3のみを認識し、W1:2-3 loop内の1アミノ酸変異体G44N、P45Aにてほとんど結合がみられなくなり、結合に必須な残基と考えられた。残り4名はW1:2-3に加えてW2:3-4およびW3:3-4 loopにより構成される領域を認識すると考えられ、症例によってW2:3-4 loop内の1アミノ酸変異体であるP135L、E136Q、R139Gにてほとんど結合がみられなり、結合に必須な残基と考えられた。

3) W3:4-1を含む領域：4名はこの領域を認識していた。うち3名はW3:4-1に隣接するW4:4-1も含めた領域を認識すると考えられた。

残り4名については、今回明らかなエピトープは同定できなかった。

さらに本抗体のIgG軽鎖であるκ/λ鎖の偏位をフローサイトメトリーで解析したところ、エピトープの同定された11例中9例でκ鎖、1例でλ鎖への偏位を認めたことから、本抗体のclonalityが示唆された。

〔総　括〕

Primary ITP患者のPA 抗-αIIbβ3抗体はマウスαIIbβ3には反応せず、ヒトーマウスキメラαIIbβ3を使用した解析にて、本抗体のエピトープは主にαIIbにあるβプロペラドメインのN-terminal halfに位置していた。また同部位において3つの主要な認識領域を発見し、また結合に必須となるアミノ酸の同定に成功した。本抗体の多くでIgG軽鎖κ/λの偏位を認められた。以上の結果から本抗体はαIIbの高度に限定された領域を認識していると考えられ、そのclonalityについても示唆された。

論文審査の結果の要旨

血小板関連抗血小板自己抗体は特発性血小板減少性紫斑病の病因に重要な役割を果たしているが、そのエピトープの詳細は明らかでない。本研究では自己抗原として重要な血小板インテグリンαIIbβ3に対するこの自己抗体の結合部位を解析している。まず抗αIIbβ3抗体がマウスのαIIbβ3にほとんど結合しないことを見出し、この特性に着目してヒトーマウスキメラαIIbβ3発現細胞に対する抗体の反応性を解析することで、エピトープが主にαIIbサブユニットにあるβプロペラドメインのN端上流域に位置していることを明らかにしている。さらに同領域内に自己抗原として3つの主要な抗原認識部位及び結合に必須となる7つのアミノ酸を同定するとともに、本抗体の大部分においてκ/λ鎖の偏位も確認している。血小板関連抗αIIbβ3抗体がαIIbの高度に限定された領域を認識することを明らかとした研究であり、学位論文に値する。