

Title	Recognition of highly restricted regions in the $\beta$ -propeller domain of $\alpha$ IIB by platelet-associated anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia
Author(s)	清水, 一亘
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59794">https://hdl.handle.net/11094/59794</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【80】

氏 名	きよ みず かず のぶ 清 水 一 亘
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 9 0 6 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 $\beta$ -propeller domain of $\alpha$ IIb by platelet-associated anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 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 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 自己抗体は $\alpha$ IIb の $\beta$ 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 謙 (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 ( $\alpha$  IIb  $\beta$  3) や GPIb/IX/V 等が報告されているが、特に  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 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  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 抗体のエピトープとしては、 $\alpha$  IIb の N 末端にある  $\beta$  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、エーテル分離法にて platelet eluate を作成した。ヒト及びマウスの  $\alpha$  IIb 及び  $\beta$  3 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 ( $\beta$  3) 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  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 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  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 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  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 抗体であることが確認された。次に本抗体はマウス  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 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。この結果を利用して、ヒト-マウスキメラ  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を使用してエピトープを解析することにした。

まずヒト  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の  $\alpha$  IIb 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  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 と比べ大きく低下し、さらに  $\alpha$  IIb の N 末端にある  $\beta$  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  $\alpha$  IIb にある  $\beta$  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、 $\beta$  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、今回明らかでない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  $\kappa$  /  $\lambda$  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  $\kappa$  鎖、1 例で  $\lambda$  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  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 抗体はマウス  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 には反応せず、ヒト-マウスキメラ  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 を使用した解析にて、本抗体のエピトープは主に  $\alpha$  IIb にある  $\beta$  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  $\kappa$  /  $\lambda$  の偏位を認められた。以上の結果から本抗体は  $\alpha$  IIb 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  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 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  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 抗体がマウスの  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 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-マウスキメラ  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 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  $\alpha$  IIb サブユニットにある  $\beta$  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  $\kappa$  /  $\lambda$  鎖の偏位も確認している。血小板関連抗  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 抗体が  $\alpha$  IIb 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。