

氏名(本籍)	あ 安	しま 島	あつし 厚	(茨城県)
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第3784号			
学位授与年月日	平成17年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	collagen 受容体 GPVI 欠損症例の解析			
主査	筑波大学教授	医学博士	川上	康
副査	筑波大学助教授	博士(医学)	重田	治
副査	筑波大学助教授	医学博士	島居	徹
副査	筑波大学助教授	博士(医学)	堤	明人

## 論文の内容の要旨

### (目的)

血小板は、生理的な止血機構のみならず病的血栓形成において、中心的な役割を担うが、血小板機能は十分解明されていない。血小板機能異常によって生じる出血傾向は、通常の臨床検査では原因解明が困難であり、さらに症例数が非常に少ない場合には解析が進みにくく、glycoprotein (GP) VI欠損症に関しても、現在までにわずか6例の報告しかない。報告された症例におけるGP VI欠損の原因も単一ではなく、GP VIの機能ともども不明な点が多い。

発症当初血小板減少を呈しimmune thrombocytopenia (ITP) と診断したにもかかわらず、血小板数回復後も出血症状が持続する一症例を経験した。ITPとしては不可解な経過をたどっており、何らかの血小板機能異常が強く疑われたため、本症例の出血傾向を検討し、未だ不明な点の多い血小板機能異常症の原因解明を試みた。

### (対象と方法)

症例は、発症時20歳の日本人女性で出血傾向(皮下出血、歯肉出血)を主訴とし、当初血小板減少を認め、ITPと診断した。血小板数は無治療で回復したが、その後も軽度の出血傾向が持続した。informed consentを得て、患者末梢血を採取し血小板を精製し、実験に供した。

血小板機能は血小板凝集能、血小板粘着能により評価した。血小板タンパクの発現は、特異抗体によるimmuno blotting, flow cytometryによって解析した。細胞内情報伝達系の解析は、特異抗体による免疫沈降ののち、immuno blottingを行った。RNAレベルでのGP VI発現をRT-PCRにより解析した。

### (結果)

血小板凝集能の検討では、患者血小板はcollagenによる凝集のみ著しく低下していた。collagenの受容体として、GP VI, integrin  $\alpha 2\beta 1$ などが知られているので、GP VIに特異的に結合するagonistであるcollagen-related peptide VI (CRP), convulxin (CVX)を用いて血小板凝集を測定した。患者血小板はこれらのagonistに全く反応しないことより、患者血小板ではGP VIの機能が欠如していると考えられた。さらに固

相化 collagen に対する粘着能も著しく低下していることが確認された。GP VI タンパクの欠損を確認するために、GP VI および GP VI と結合して存在する FcR $\gamma$  鎖に対する特異抗体を用いて immuno blotting を行った。患者血小板では、GP VI、FcR $\gamma$  鎖ともにタンパク量が著しく低下していた。さらに CVX 刺激に伴う FcR $\gamma$  鎖のチロシンリン酸化を検討したが、患者血小板ではリン酸化が著しく低下していた。

これまで報告された GP VI 欠損症は、抗 GP VI 自己抗体によるか先天性の原因の何れかであることより、本症例の GP VI 欠損の原因を解析した。自己抗体の存在を検討するために、患者血漿を固相化し  $^{125}\text{I}$  標識 GP VI の結合能を検討したが、患者血漿では健常人と同様、有意な結合は確認できなかった。また患者 IgG を用いて健常人血小板溶解液に対する反応を immuno blotting で検討したが、特異的なバンドを見いだすことはできなかった。これらの実験結果より自己抗体の存在は否定的であったので、先天性 GP VI 欠損の可能性を検討した。母親の血小板を採取し collagen で刺激したときの凝集能、GP VI の発現を検討したが、母親の血小板に異常は認められなかった。患者血小板から mRNA を精製し、GP VI および FcR $\gamma$  鎖の発現を RT-PCR で確認したが、患者血小板においてこれら mRNA のサイズに異常はなく、半定量的 RT-PCR で、患者血小板ではむしろ GP VI の発現が健常人よりも多いことが確認された。さらに GP VI の翻訳領域の sequence を解析したが、sequence の異常は認められなかった。

#### (考察)

本症例は、collagen による血小板凝集、粘着能が著しく低下し、GP VI、FcR $\gamma$  鎖のタンパク発現が低下していたことより、GP VI 欠損症と診断された。GP VI 欠損症は希な血小板機能異常症であり、症例が文献的には 7 例めの報告である。抗 GP VI 自己抗体が原因の GP VI 欠損症は過去に 2 例報告されているが、何れも自己抗体が GP VI を介して血小板を活性化させる。症例では患者血漿を健常人血小板に添加しても、血小板活性化を惹起することはなく、また binding assay でも患者 Ig の GP VI への結合を見いだすことはできなかった。一方、母親血小板の解析、患者血小板の GP VI mRNA の検討、GP VI 翻訳領域の sequence の何れにも異常はないことより、先天性の GP VI 欠損症も否定的である。従って症例の GP VI 欠損の原因としては、1) 未だ検出されない抗 GP VI 自己抗体が存在する、2) GP VI がタンパク分解されやすく、GP VI が膜表面に存在できず検出できなかった、という 2 つの可能性が考えられる。GP VI の膜表面における不安定性に関しては、最近 matrix metalloproteinases (MMP) によって GP VI がタンパク分解を受けるという報告が見られ、本症例において MMP による GP VI 分解が亢進している可能性がある。

#### (結論)

持続する軽度の出血傾向を呈する GP VI 欠損症患者の原因解析を行った。GP VI 欠損症は過去に 6 例の報告があり、その病因は抗 GP VI 自己抗体による GP VI の発現低下と、遺伝性 GP VI 欠損症に大別されるが、本症例の病因はそのいずれとも一致しなかった。本症例の病因として、1) 検出不能の自己抗体が存在する、2) GP VI が何らかの原因でタンパク分解を受けやすく、正常に発現され膜表面に出現するが、通常より速い速度で分解され消失するという、2 つの可能性が考えられる。2) については、matrix metalloproteinases (MMPs) の活性亢進が原因になっている可能性がある。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

GP VI 欠損症の報告は、本論文を含めて世界で 7 例目と貴重な症例報告である。さらに、症例における GP VI 活性低下の機序を様々な分子生物学的検討を加えることにより明らかにしている GP VI は血栓形成における重要な因子であり、著者が解明した GP VI 活性低下の機序は、症例の病態解明のみならず、血栓形成における血小板作用の詳細な解明につながる可能性があり、今後さらなる研究の発展が期待される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。