

Decreased amount of mPl and reduced expression of glycoprotein α IIb/ β 3 and glycoprotein α IIb on platelets from patients with refractory anemia: analysis by a non-isotopic quantitative ligand binding assay and immunofluorescence

著者	泉 正和
雑誌名	浜松医科大学学報. 学位授与記録
巻	20
ページ	98-100
発行年	2003-03-07
URL	http://hdl.handle.net/10271/1651

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 374号	学位授与年月日	平成15年 3月 7日
氏名	泉 正 和		
論文題目	<p>Decreased amount of <i>mpl</i> and reduced expression of glycoprotein II b/III a and glycoprotein I b on platelets from patients with refractory anemia : analysis by a non-isotopic quantitative ligand binding assay and immunofluorescence (不応性貧血患者の血小板 <i>mpl</i> および糖蛋白 II b/III a、I b 発現量の低下:非放射性リガンド-レセプター結合試験と蛍光抗体法による分析)</p>		

博士(医学) 泉 正 和

論文題目

Decreased amount of *mpl* and reduced expression of glycoprotein II b/III a and glycoprotein Ib on platelets from patients with refractory anemia: analysis by a non-isotopic quantitative ligand binding assay and immunofluorescence (不応性貧血患者の血小板 *mpl* および糖蛋白 II b/III a、Ib 発現量の低下：非放射性リガンドーレセプター結合試験と蛍光抗体法による分析)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

トロンボポエチンは巨核球-血小板系の細胞増殖をつかさどるサイトカインであり再生不良性貧血や不応性貧血(RA)等の血小板減少症患者において血小板の増加作用が期待されている。この受容体は血液幹細胞から骨髄巨核球、血小板細胞上で発現している。RA では顆粒球コロニー刺激因子やエリスロポエチンといった既に臨床応用されているサイトカインに対する反応性は低下しているが、その原因の一つとして細胞表面上のサイトカイン受容体数の減少が報告されている。今後臨床応用されてくるトロンボポエチンの有効性に関わる因子として、トロンボポエチン受容体数を検討することは有意義である。今回非放射性リガンドーレセプター結合試験と蛍光抗体法を用い、RA 患者の本受容体の発現量を測定した。また血小板上糖蛋白である Gp II b/III a と GpIb の発現量を測定し、両者の関係についても検討した。

〔材料ならびに方法〕

18名の健常者および21名の RA 患者から ACD 採血した血液から血小板浮遊液を調製し、以下の2法で血小板表面のトロンボポエチン受容体と糖蛋白 Gp II b/III a、GpIb を測定した。①非放射性リガンドーレセプター結合試験：血小板浮遊液(1×10^6 個)にビオチン標識化トロンボポエチン(50ng/ml)を加え37℃で60分反応後、ストレプトアビジン-RED670(2 μ g/ml)と室温で30分反応させた。②蛍光抗体法による分析：血小板浮遊液(2×10^5 個)に、マウスの抗トロンボポエチン受容体モノクローナル抗体 20 μ l を加え室温で60分反応させた後、山羊の phycoerythrin (PE) 標識-抗マウス免疫グロブリン抗体と60分間反応させ染色した。また、血小板糖蛋白 Gp II b/III a、GpIb は、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD41 および CD42b モノクローナル抗体と60分間反応させ染色した。トロンボポエチン受容体の数は、フローサイトメーターで測定した結果から、非放射性リガンドーレセプター結合試験では Kolmogorov-Smirnov 検定で算出した D 値で、また蛍光抗体法では平均蛍光強度で評価した。

〔結果〕

RA 患者の D 値は 0.05 ± 0.03 (平均値 \pm 標準偏差) であり、健常人の 0.15 ± 0.05 と比べ有意に低下していた ($p < 0.0001$)。また、糖蛋白 Gp II b/III a、GpIb の平均蛍光強度もそれぞれ 28.8 ± 8.8 および 20.8 ± 7.7 と、健常人の 93.2 ± 22.6 および 67.4 ± 9.1 と比べ有意に低下していた ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$)。また、トロンボポエチン受容体の D 値と糖蛋白 Gp II b/III a、GpIb の平均蛍光強度の相関係数は $\rho = 0.794$ ($p < 0.0001$)、 $\rho = 0.774$ ($p < 0.0001$) と、両者共に高い相関関係が認められた。なお、トロンボポエチン受容体数を表す D 値と平均蛍光強度の相関係数は $\rho = 0.899$ ($p < 0.0001$) であった。

〔考察〕

非放射性リガンドレセプター結合試験、モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法の2方法による解析の結果、RA患者においては血小板上トロンボポエチン受容体数が減少しており、骨髓巨核球を用いた解析結果と同様の結果であった。また、同時に測定された血小板の主要な糖蛋白であるGp IIb/IIIa、GpIbの平均蛍光強度も低下しており、RA患者における血小板機能の低下を裏付ける結果であった。RA患者においてはトロンボポエチンの効果が減少している可能性があり、使用量の増量や他のサイトカインとの併用が考慮されるべきと思われた。非放射性リガンドレセプター結合試験は、微量のサイトカイン受容体数を他の細胞表面抗原の発現量と同時に解析できる優れた測定法と考えられる。

〔結論〕

RA患者では、骨髓巨核球における結果と同様に血小板表面でもトロンボポエチン受容体と糖蛋白Gp IIb/IIIa、GpIbの発現が減少していた。RA患者においては、エリスロポエチンや顆粒球コロニー刺激因子が骨髓機能回復に十分な効果をもたないのと同様に、トロンボポエチンの血小板増殖作用も低いことが予想される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、巨核球-血小板系の細胞増殖をつかさどるサイトカインの受容体である *mpl* の発現量が不応性貧血(RA)症例の血小板では低下していることから、血液幹細胞や骨髓巨核球の *mpl* リガンド(トロンボポエチン)への応答性が低下している可能性を示したものである。*mpl* 発現量は非放射性リガンド結合試験と蛍光抗体法を用い、フローサイトメーターで測定した。同時に測定した血小板糖蛋白であるGp IIb/IIIaとGpIbの発現量、及び血中 *mpl* リガンド量から、RA症例における *mpl* リガンドへの応答性を検討した。

方法は以下の通りである。18名の健常者および21名のRA患者から採取した血液から血小板浮遊液を調整し、ビオチン標識化 *mpl* リガンドを用いた非放射性リガンドレセプター結合試験と、抗 *mpl* 受容体モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体により *mpl* 発現量を測定した。*mpl* 数は、非放射性リガンドレセプター結合試験ではKolmogorov-Smirnov検定で算出したD値で、また蛍光抗体法では平均蛍光強度で評価した。また、血小板糖蛋白Gp IIb/IIIa、GpIbは、fluorescein isothiocyanate(FITC)標識抗CD41およびCD42bモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法で測定した。

その結果RA患者のD値(0.05 ± 0.03 、平均値 \pm 標準偏差)は健常人(0.15 ± 0.05 と)と比べ有意($p < 0.0001$)に低下しており、*mpl* 発現量が少ないことが示された。また、糖蛋白Gp IIb/IIIa、GpIbの平均蛍光強度もRA症例(28.8 ± 8.8 、 20.8 ± 7.7)では健常人(93.2 ± 22.6 、 67.4 ± 9.1)と比べ有意($p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$)に低下しており、これらの糖蛋白の発現量の低下が確認された。また、*mpl* の発現量を示すD値と糖蛋白Gp IIb/IIIa、GpIbの発現量を示す平均蛍光強度の相関係数は各々 $\rho = 0.794$ ($p < 0.0001$)、 $\rho = 0.774$ ($p < 0.0001$)であり、両者共に高い相関関係が認められた。ELISAで測定した血中 *mpl* リガンド濃度はRA症例(6.01 ± 6.83)の方が健常人(0.71 ± 0.34)より高値を示した。これらの結果より、RA患者においては血小板上 *mpl* が減少しており、血中 *mpl* リガンドが高いにも関わらず巨核球の成熟・分化が障害され、十分な血小板機能が発現していないとしている。これはRA患者における血小板機能の低下を裏付ける結果であった。これはまたRA患者ではエリスロポエチンや顆粒球コロニー刺激因子が骨髓機能回復に十分な

効果をもたないのと同様に、*mpl* リガンドの血小板数増加作用も低いことを予想させる結果である。

本論文は新規な方法を用いて末梢血中の血小板の微量のサイトカイン受容体数と他の機能蛋白の発現量を同時に解析し、RA 症例では *mpl* の発現低下に伴う応答性の障害により、血小板の分化も未熟であることを明らかにした点で重要である。また、*mpl* リガンドによる RA 治療の問題点を提起した点も重要であり、審査委員会ではこれらを高く評価した。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

- 1) *mpl* のリガンド結合における種差の影響
- 2) 血小板検体調整方法の妥当性
- 3) 対照検体採取・調整方法の妥当性
- 4) 受容体数及び血小板膜上糖蛋白発現量をフローサイトメトリーを用いて計測する妥当性
- 5) Kolmogorov-Smirnov 検定で算出した D 値で評価する妥当性
- 6) 放射性物質標識リガンドを用いた受容体数測定方法の利点と欠点
- 7) 血小板膜糖蛋白 II b/III a 及び Ib 発現に及ぼす血小板数の影響
- 8) 統計処理方法の妥当性
- 9) *mpl* リガンド測定方法の特異性
- 10) 内因性 *mpl* リガンド除去方法の妥当性
- 11) *mpl* の発現調節機構
- 12) RA での *mpl* 発現量低下の原因
- 13) RA 症例の血小板機能と血小板寿命
- 14) 血小板増多を示す骨髄増殖性疾患の *mpl* 発現量

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 浦野哲盟
副査 大橋京一 副査 本郷輝明