

氏名・(本籍)	廣 谷 秀 一 (岡山県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第74号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与年月日	平成2年3月24日
学位論文題目	Lectin affinity blotting 法を用いた慢性骨髄増殖性疾患における血小板糖蛋白の解析

審査委員	主査 教授	上 田 潔
	副査 教授	細 田 四 郎
	副査 教授	野 崎 光 洋

論 文 内 容 要 旨

〔目 的〕

慢性骨髄増殖性疾患(CMPD)ー慢性骨髄性白血病(CML)、本態性血小板血症(ET)、原発性骨髄線維症(MF)、真性多血症(PV)ーにおいては経過中に血小板増多症が持続し、血栓症あるいは出血傾向を呈することが知られている。また血小板機能異常、即ち血小板凝集能異常や血小板粘着能の低下を認めることも多く、CMPDにおいては血小板の数的異常のみならず質的異常が存在することが示唆されている。一方、血小板の凝集や粘着過程に血小板膜糖蛋白が関与することが明らかにされてきているが、CMPDにおいてもこれらの血小板膜糖蛋白(GP)の異常を認めたとする報告も散見される。今回我々は、CMPDにおける血小板膜糖蛋白の質的異常を明らかにする目的で、lectin affinity blotting 法を用いてレクチン親和性を解析することにより血小板糖蛋白の糖鎖構造の変化を検討した。

〔方 法〕

対象としたのはCMPDの32症例で、内訳はCML 10例、ET 13例、MF 5例、PV 4例である。患者および健常者より採取した20mlのEDTA加血より血小板を分離、EDTA加TBSにて血小板を洗浄後、2% SDS、5% 2-ME、10% glycerol、3mM EDTAを含んだ0.06M Tris-HCl、pH 6.8を 1.5×10^9 cells/mlの濃度になるよう加え可溶化、さらに蛋白濃度が5mg/mlになるように調整した。100℃水浴中で5分間処理後、その10 μ lをsodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE)に展開した。泳動毎にstandard controlとして健常者の1例より得た可溶化血小板を同一ゲル内に添加した。

泳動後、蛋白をニトロセルロース膜に転写。ニトロセルロース膜を生食水で洗浄後、0.05% Tween 20-PBS 中で1時間処理。さらに生食水で洗浄後、各種ビオチン化レクチン (Con A、LCA、WGA、PNA) 各々 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む PBS 溶液中で1時間 incubation した。PNA 染色の場合は、反応前に neuraminidase による処理を行った。反応後、生食水で洗浄し、ABC 法にて発色させた。乾燥後、それぞれの band の染色強度を、デンストメーターにて得られた peak の面積より求め、standard とした対照群 (健常者) の1例で求められた染色強度に対する比率 (%) を算出した。他の4例の健常者についても standard control 例のそれを100としてそれぞれ比率 (%) を求め、これを control 群として疾患群との比較検討を行った。

〔結果〕

血小板膜糖蛋白 (GP) のうち Con A 染色では GP IIb、IIIa、IIIb、V の、LCA 染色では TS P、GP IIb、IIIa の、WGA 染色では GPIb、IIb、IIIa の、PNA 染色では GPIb の同定が可能であった。CMPD 群では対照群に比して、GP IIb、IIIa の Con A に対する親和性、および GP IIb の LCA に対する親和性の有意の低下を認めた。逆に、GP IIIb の Con A に対する親和性、および GPIb の PNA に対する親和性は有意に増加していた。さらに ET では GP V の Con A に対する親和性の有意の低下を認め、MF では GP IIIa の WGA に対する親和性の有意の低下を認めた。

〔考察〕

糖結合性蛋白質であるレクチンは、一定の糖構造を特異的に認識する。Con A と LCA は糖鎖の中でも α -mannose と α -glucose に高い親和性を有するが、glucose が糖蛋白中に見出だされることは希であり、両レクチンは主に mannose を認識すると考えられ、今回 Con A/LCA を用いた染色法による GP IIb、IIIa、V の減少、および GP IIIb の有意の増加は、これら糖蛋白糖鎖における mannose glycosylation の異常を示唆する。一方、WGA は sialic acid, N-acetylglucosamin と高い親和性を有するが、MF で GP IIIa の WGA に対する親和性の有意の低下を認めており、本症での GP IIIa 糖鎖における sialic acid/GlcNAc glycosylation の異常が示唆された。また PNA は β -galactose、特に Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc という糖鎖構造に高い親和性を有する。今回 neuraminidase/PNA を用いた方法では GPIb の染色性の有意の増加を認め、GPIb 糖鎖における galactose glycosylation の異常が示唆された。

〔結論〕

(1) Lectin affinity blotting 法により CMPD 症例に血小板糖蛋白の糖鎖異常を明らかにした。(2) CMPD では GP IIb、IIIa の Con A に対する親和性、および GP IIb の LCA に対する親和性の有意の低下を認めた。逆に、GP IIIb の Con A に対する親和性、および GPIb の PNA に対する親和性は有意に上昇していた。(3) さらに ET では GP V の Con A に対する親和性の

有意の低下を認め、MF では GPⅢa の WGA に対する親和性の有意の低下を認めた。(4)これら血小板糖蛋白の糖鎖構造の異常が CMPD 症例における止血血栓異常発現の一要因と考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

本論文は、血小板膜糖蛋白 (GP) の腫瘍性変化における質的異常を、多能性幹細胞の腫瘍性増殖である慢性骨髄増殖性疾患 (CMPD) を対象として、レクチン親和性から検討したものである。CMPD32 症例より得た可溶化血小板を、SDS-PAGE 後ニトロセルロース膜に転写し、mannose に親和性をもつ Con A / LCA、シアル酸、GlcNAc に親和性をもつ WGA、及び galactose に親和性をもつ PNA に反応させ、avidin-biotin complex 法にて発色後、それぞれの GP の染色強度をデンストメーターにて測定し、対象群との比較を行なった。それにより、CMPD では GPIIb、Ⅲa の Con A に対する親和性、および GPIIb の LCA に対する親和性が有意に低下し、逆に GPIIb の Con A に対する親和性、及び GPIb の PNA に対する親和性が有意に増加することを明らかにした。さらに病態別に検討を加えることにより、本態性血小板血症 (ET) での GPV の Con A に対する親和性の低下、骨髄嚢維症 (MF) での GPⅢa の WGA に対する親和性の低下が起こることを確認した。また CMPD では、比較的高頻度に (32 例中 5 例に)、分子量 65kd、pI 5.7 の未知の糖蛋白が出現することを見いだした。

以上の実験結果より、CMPD における血小板糖蛋白質に、高頻度に glycosylation の異常が存在することが明らかとされた。

今回検討された糖蛋白の中でも特に GPIb、IIb、Ⅲa は血小板の主要な機能である粘着、凝集過程に深くかかわっており、これらに質的な異常を認めたことは注目に値する。これまでに CMPD における血小板については、PAS 染色上 GPIb の減少と GPIIb の増加が報告されているが、今回のように糖鎖構造の変化にまで言及したのは初めてであり、本疾患群での止血血栓異常の原因としての新しい知見と考えられる。よって本研究は学位論文として価値あるものと認める。