

## GPIb 信号伝達異常による新規先天性巨大血小板症の病態解明

國島伸治

岐阜医療科学大学 保健科学部臨床検査学科

### 【研究の背景】

Bernard-Soulier 症候群 (BSS) は、血小板膜糖蛋白 GPIb/IX を欠如する先天性巨大血小板性血小板減少症であり、GPIb  $\alpha$ 、GPIb  $\beta$ 、GPIX 遺伝子のいずれかのホモ接合性変異により引き起こされる<sup>1)</sup>。ホモ接合性患者では巨大血小板が見られ、その原因は GPIb/IX 欠如による GPIb/IX-フィラミン-アクチン連関不全である<sup>2)</sup>。一方で、ヘテロ接合性変異を有する保因者の血小板サイズに一定の見解は得られておらず、変異遺伝子の違いあるいは変異部位の違いによる信号伝達異常が引き起こす細胞骨格再構成異常が示唆されている。

### 【目 的】

優性遺伝の先天性巨大血小板症において同定されたヘテロ接合性 GPIb  $\alpha$  変異の機能解析を行い、異常 GPIb/IX 受容体を介した細胞骨格再構成と信号伝達異常を明らかにし、異常 GPIb/IX 受容体が引き起こす新規先天性巨大血小板症の病態を解明することを目指す。

### 【方 法】

血小板型 von Willebrand 病の原因遺伝子異常である GP1BA M239V、優性遺伝の Bolzano 型バリエント BSS 変異 GP1BA A156V、発現不全を引き起こす null 変異 GP1BA Y54D に加え、先天性血小板減少症の系統的鑑別診断において同定した GP1BA L43R および K152N バリエントを site-directed mutagenesis により野生型 GP1BA cDNA を含む pcDNA3.1 に構築した (pcDNA  $\alpha$ )。野生型 GP1BB および GP9 cDNA を bicistronic に発現する pBudCE4 ベクター (pBud  $\beta$  9) とそれぞれの変異を含む pcDNA  $\alpha$  を 293T 細胞に共導入し、GPIb  $\alpha$  および GPIX 発現を解析した。

本研究は、国立病院機構名古屋医療センターヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会および組み換え DNA 実験安全管理委員会にて承認されている。

### 【結 果】

野生型 GP1BB と GP9 cDNA を導入した 293T 細胞および野生型 GPIb  $\alpha$  cDNA のみを導入した 293T 細胞表面上に GPIb  $\alpha$  発現は検出されないが、野生型 GPIb  $\alpha$  cDNA を共導入することで GPIb  $\alpha$  は細胞表面上に発現した。血小板型 von Willebrand 病変異 M239V と新規変異 K152N を共導入すると野生型と同等の GPIb  $\alpha$  発現を認めたが、Bolzano 型変異 A156V、null 変異 Y54D および新規変異 L43R はごく僅かの GPIb  $\alpha$  発現を認めたのみであった。

免疫ブロットによる総 GPIb  $\alpha$  発現量解析では、M239V と K152N は正常量であり、変異を有する GPIb  $\alpha$  は合成後細胞表面上に発現することが確認された。Y54D と L43R はごく僅かの発現量が検出されるのみであり、null 変異であることが確認された。Bolzano 型変異 A156V は野生型と比較して約 50% の発現量が検出されたことから、細胞表面上への発現が阻害されることが判明した。

## 【考 察】

BSS の原因となる GPIbA 変異には、発現不全変異と機能不全変異があり、共に優性遺伝の先天性巨大血小板症の原因となることが判明した。前者では、GPIb/IX ハプロ不全により GPIb/IX-フィラミン-アクチン連関が低下し、血小板の膜骨格と細胞骨格の結合不全を来すことで血小板形態異常(巨大血小板)を引き起こすと考えられる。後者では、機能不全受容体が血小板膜上に発現し GPIb/IX-フィラミン-アクチン連関が保たれることから、GPIb 信号伝達異常による細胞骨格再構成への影響が及ぶ可能性がある。今回の研究では、血小板膜に発現する変異型受容体の信号伝達解析を行うことができなかったが、LIMK/cofilin-アクチン経路の解析を継続する予定である。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

BSS の原因となる GPIb/IX 変異の多様性を明らかにすることにより、先天性巨大血小板症の病因と病態の理解が進み、本疾患群の診断が向上する。さらに、GPIb/IX を介した異常信号伝達の解析は他の先天性血小板異常症の病態理解や抗血小板療法の開発にも繋がる。

## 【参考・引用文献】

- 1) Savoia A, et al.: Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. Hum Mut 35:1033-45, 2014.
- 2) Ware J, et al.: Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 97:2803-8, 2000.