HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	血小板凝集能異常を伴う遺伝性巨大血小板性血小板減少症をきたす新規遺伝子変異ITGB3 p.T720del変異の同定と機能解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	宮下, 直洋
Description	配架番号：2412
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13033号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70830
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Naohiro_Miyashita_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　　宮下　直洋

学 位 論 文 題 名

血小板凝集能異常を伴う遺伝性巨大血小板性血小板減少症をきたす新規遺伝子変異 *ITGB3* p.T720del 変異の同定と機能解析

(A novel heterozygous *ITGB3* p.T720del mutation inducing spontaneous activation of integrin αIIbβ3 in autosomal dominant macrothrombocytopenia with aggregation dysfunction)

【背景と目的】

日常診療において血小板減少をみる機会は少なくない。血小板減少をきたす原因は多岐にわたり、その多くは後天的要因（ITP、肝硬変、SLE、骨髄異形成症候群、急性白血病、再生不良性貧血など）による。その中で、遺伝性巨大血小板性血小板減少症は、巨大血小板産生、血小板減少を特徴とした稀な先天性血小板疾患である。遺伝性巨大血小板性血小板減少症をきたす遺伝子変異はこれまでに 18 の遺伝子に見出されており、代表的なものとして *MYH9* 異常症、ベルナール・スーリエ症候群などがある。近年、インテグリン αIIb をコードする遺伝子 *ITGA2B*、インテグリン β3 をコードする遺伝子 *ITGB3* における変異が常染色体優性遺伝による遺伝性巨大血小板性血小板減少症の原因遺伝子変異となることが報告され注目されている。*ITGA2B*、*ITGB3* の変異は、血小板無力症の原因遺伝子変異として有名であるが、その変異部位により臨床形質が大きく異なることが報告されている。*ITGA2B* 変異または *ITGB3* 変異を原因とする遺伝性巨大血小板性血小板減少症における変異部位は細胞内ドメインの非常に狭い範囲に集積する。遺伝性巨大血小板性血小板減少症を来すとされる既報の *ITGA2B* 変異、*ITGB3* 変異では、恒常的かつ部分的なインテグリン αIIbβ3 の活性化を認めるとされているが、それ以降の分子遺伝学的な機序については十分に明らかにはされていない。本研究では、北海道大学病院血液内科において遺伝性巨大血小板性血小板減少症の一家系において有症者に特異的な遺伝子変異を見出し、その機能解析を行うことを目的に検討を進めた。

【材料と方法】

本家系における有症者、健常者の血小板検体を用いて、血小板凝集能検査、フローサイトメトリーによる血小板膜上のインテグリン αIIbβ3 の発現および活性化レベルの検討を行った。また、本家系における有症者、健常者から抽出したゲノム DNA を用いて、全エクソームシークエンス、サンガーシークエンスを行った。見出された変異のインテグリン αIIbβ3 複合体立体構造への影響を検討するため、タンパク構造解析ソフトウェアである SWISS-MODEL、Cn3D 4.3.1.を用い、タンパク立体構造予測モデルを構築した。さらに、*ITGA2B*（野生型）、*ITGB3*（野生型）、*ITGB3* p.D723H（既報変異、陽性コントロール）、*ITGB3* p.T720del の各発現ベクターを作製し、細胞株（293T、CHO）への一過性発現で *ITGB3* p.720del の FAK リン酸化、細胞形態変化への関与

について検討した。

【結果】

全エクソームシークエンスの結果、本家系の有症者に特異的な遺伝子変異として *ITGB3* p.720del 変異が見出された。この遺伝子変異はこれまでに報告のない新規遺伝子変異であり、本家系における遺伝性巨大血小板性血小板減少症の原因となっていると考えられた。サンガーシークエンスにより全ての有症者において片アリルの *ITGB3* p.720del 変異を認めた。インテグリン αIIbβ3 複合体立体構造予測モデルにおいて、*ITGB3* p.720del 変異がある場合には、野生型と異なり、*ITGA2B* R995 と *ITGB3* D723 の塩橋形成が阻害され、インテグリン αIIbβ3 複合体は強制的に活性化状態である Extended form（活性化型）を形成することを示した。血小板を用いた検討にて、本家系の有症者においては ADP、コラーゲン刺激に対する血小板凝集能が低下していることを示した。有症者ではインテグリン αIIbβ3 の血小板膜表面の発現は健常コントロールの 40%程度にまで低下しており、かつ血小板非刺激状態でもインテグリン αIIbβ3 は恒常的に活性化していることを明らかにした。有症者におけるインテグリン αIIbβ3 活性化レベルは、ADP による血小板刺激時よりは低値であり、部分的な活性化に留まっていた。細胞株に *ITGA2B* 発現ベクター、*ITGB3* 発現ベクターを共発現させた実験において、*ITGB3*（p.D723H）発現細胞、*ITGB3*（p.T720del）発現細胞において下流シグナルである FAK の恒常的リン酸化が起きていることをウェスタンブロッティングにて確認した。また、*ITGB3*（p.D723H）発現細胞、*ITGB3*（p.T720del）発現細胞において、異常突起形成、細胞辺縁不整、偏菱形変化といった形態変化を示すことを蛍光免疫染色にて確認した。さらに *ITGB3*（p.D723H）発現細胞、*ITGB3*（p.T720del）発現細胞で示した FAK 恒常的リン酸化および細胞形態変化は、FAK リン酸化阻害薬により濃度依存性に阻害されることを示し、変異インテグリン αIIbβ3 複合体を介した FAK 恒常的リン酸化が細胞形態変化に強く関連することを明らかにした。

【考察・結論】

ITGB3 p.T720del 変異により、非刺激下では安定的に保たれるはずの膜近傍のインテグリン αIIb R995 とインテグリン β3 D723 の塩橋形成が阻害され、強制的に Extended form（活性化型）のインテグリン αIIbβ3 複合体が形成される。これによりその下流のシグナル伝達が促進され、FAK の恒常的リン酸化が起こることを明らかにした。巨核球においては、チロシンリン酸化 FAK は RhoA を抑制し、アクチン-ミオシン IIA の架橋分離によるアクチンリモデリングを惹起、それに引き続く異常 proplatelet 形成、巨大血小板産生、血小板減少を来すと考えられる。血小板において、活性化されたインテグリン αIIbβ3 は内在化し、血小板膜表面のインテグリン αIIbβ3 発現が低下することで血小板凝集能異常に関与することが示唆された。*ITGA2B*、*ITGB3* の細胞内ドメインでの変異は上記の特徴を有する遺伝性巨大血小板性血小板減少症として独立した疾患群であるが、家族歴の情報なしに ITP と診断されている患者の中に一定数この疾患群が含まれると考えられる。正しく診断されなかったこれらの症例では、ステロイド投与や脾臓摘出など不必要な治療介入をなされる可能性がある。今回新規遺伝子変異 *ITGB3* p.T720del を見出し、病態解明を目的とした機能解析結果を報告することにより、この疾患群の認知度の向上および本疾患群患者の QOL の向上に寄与できるものと考える。本疾患において FAK 阻害剤にて巨大血小板、血小板減少を回復できる可能性があるが、有症者における臨床症状は既報を含めいずれも軽度であり、治療介入の必要性は乏しい。一方、本家系の解析から明らかとなったインテグリン αIIbβ3 の恒常的 FAK リン酸化を介した血小板凝集能低下機序は、抗血小板薬として新規分子標的治療薬の開発につながる可能性がある。