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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　　宮　下　直　洋

	主査	教授	畠　山　鎮　次
審査担当者	副査	教授	廣　瀬　哲　郎
	副査	教授	佐　藤　典　宏
	副査	准教授	伊　藤　陽　一

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）

申請者は、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 変異を特定し、その分子遺伝学的機序を明らかにした。

審査にあたり、まず副査の廣瀬哲郎教授から、αIIbβ3 恒常的活性化と局在変化の因果関係につき質問があり、申請者は、活性化αIIbβ3 のダウンレギュレーションとしてのエンドサイトーシスが想定されているが、十分に解明されていないと回答した。FAK とαIIbβ3 の結合は細胞質内で可能か、という質問に対し、その結合は考えづらいと考えられていると回答した。αIIbβ3 の FAK 関連部位の変異により本家系での現象はキャンセルされるか、との質問に対し、その考えに同意し、本研究における FAK 阻害薬の実験がそれを示していると回答した。Whole exome sequence での解析方法は一般的かとの質問に対して、一般的な解析方法と認識していると回答した。既報も含め変異は狭い範囲に集中しているが、既報の家系でも同様の機序であるか、という質問に対し、同様の機序を呈していると回答した。次に副査の伊藤陽一准教授より、棒グラフは S.D.、S.E.どちらを示すかと質問があり、申請者は、S.D.であり、3 回の実験データを *t* 検定で検討したと回答した。ITP 患者の中に遺伝性疾患が 10%混在と記載があるがどのように確認されたかとの質問に対し、名古屋医療センターからの情報や報告結果をもとに記載したと回答した。ITGB3 変異だけで 10%かとの質問に対し、遺伝性血小板減少症をきたす他の遺伝子変異も含むと回答した。本家系の疾患では ITP で行われる治療は不要かとの質問に対し、本家系および既報の家系では、血

小板減少は起こるが出血傾向など臨床症状が伴わないことが多く、ステロイド投与など ITP で行われる治療は不要と考えられることから適切な診断が重要であると回答した。一般的な病院での診断は現時点で可能かという質問に対し、現状では難しく大学等でのみ診断できると回答した。遺伝子変異パネルによる検査は今後考えられるかとの質問に対し、本疾患は稀少疾患であり商業ベースでのパネル作製や検査は難しいだろうと回答した。アナグレリドの記載が一部アグリリンとなっているが別のものかという質問に対し、アグリリンは商品名でありアナグレリドに訂正すると回答した。次に副査の佐藤典弘教授より、本研究での新規知見は何かと質問があり、申請者は、FAK 恒常的リン酸化およびαIIbβ3 局在変化は遺伝性巨大血小板性血小板減少症をきたす *ITGB3* 変異はこれまでに報告されていないと回答した。遺伝性血小板減少症は現時点で臨床上どのように診断するのかという質問に対し、検体を名古屋医療センターに送ることで検査していただけると回答した。ITP との鑑別に関する質問に対し、家族歴の確認が重要であると回答した。また、ITP では血小板凝集能異常はきたさず鑑別の一助になり得ると回答した。血小板減少の原理について追加説明を求められ、巨核球が未熟な状態で、またαIIbβ3 部分的活性化により proplatelet 形成がなされることが要因であると回答した。骨髄での変化に関する質問に対し、侵襲も考慮し骨髄穿刺はしていないと回答した。最後に主査の畠山鎮次教授より、αIIbβ3 立体構造変化は塩橋形成部位でマイナス荷電のアミノ酸同士が並ぶことによるのかという質問があり、申請者はその解釈に同意した。血小板膜上のαIIbβ3 発現低下につき RNA レベルで評価したか、またエンドソームのポピュレーションとしては多いのかとの質問に対し、いずれも検討していないと回答した。学位論文内、図 9 下部の R995 が R99 となっており修正するよう指摘があった。患者血小板において、ADP 刺激によるαIIbβ3 活性化がコントロールよりも低いことの説明を求められ、申請者は血小板膜上のαIIbβ3 発現低下が関与していると考えると回答した。PAC-1 は活性化αIIbβ3 を評価するものかとの質問に対し、活性化αIIbβ3 のフィブリノゲン結合部位を認識する抗体であると回答した。活性化αIIbβ3 の機能について質問があり、血小板ではフィブリノゲンと結合し凝集反応に関与し、また細胞内へのシグナル伝達にも関与していると回答した。形態評価について、HEK293 および CHO を使った理由について質問があり、既報の論文をもとに細胞株を選択したと回答した。それに対し、巨核球系細胞株の使用、また複数の細胞株での再現性の確認が重要であるとの指摘があった。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。