◆トピックス◆

Primary ITP における抗 α IIb β 3 自己抗体のエピトープ解析：抗 α IIb β 3 抗体は β プロペラドメイン内の高度に限定された領域を認識する

清水一亘^{*1}, 柏木浩和^{*1}, 富山佳昭^{*1,2}

清水一亘

Epitope analysis of anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary ITP :
Recognition of highly restricted regions in the β -propeller
domain by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies

Kazunobu KIYOMIZU^{*1}, Hirokazu KASHIWAGI^{*1},
Yoshiaki TOMIYAMA^{*1,2}

2003年3月 大阪市立大学医学部医学科卒業
同 年5月 市立吹田市民病院内科
2006年6月 大阪府立成人病センター
血液・化学療法科
2008年6月 大阪大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科
2009年4月 大阪大学大学院医学系研
究科博士課程血液・腫瘍
内科学入学
2013年3月 同修了
同 年4月 大阪大学大学院医学系研
究科血液・腫瘍内科学

Key words: ITP, epitope, α IIb β 3

1. はじめに

Primary immune thrombocytopenia (primary ITP; 特発性血小板減少性紫斑病) における血小板減少の主たる病態は網内系での血小板破壊と骨髄における血小板産生の低下にある^{1)~4)}。すなわち抗血小板自己抗体によりオプソニン化された血小板は網内系でFc γ 受容体や補体受容体を介してマクロファージなどの貪食細胞に補足され貪食・破壊される¹⁾。また抗血小板自己抗体は *in vitro* で巨核球の成熟障害や細胞障害を誘導することが報告されており、これにより血小板産生は低下する^{5)~6)}。また抗血小板自己抗体のうち血清抗体は親和性が低く病的意義は乏しいとされており、血小板結合抗体 [platelet-associated (PA) antibody] が病態に重要な役割を果たしていると考えられている⁷⁾。抗血小板抗体の自己抗原とし

ては、血小板膜蛋白である GPIIb/IIIa (α IIb β 3) や GPIb/IX/V などが報告されているが、特に抗 α IIb β 3 抗体は43~57%と最も高率に検出される^{7)~10)}。我々の研究室では10年以上前より、PA-anti- α IIb β 3 抗体の認識部位の同定に取り組んでおり、最近になり新たな知見を得たので紹介する¹¹⁾。

2. PA-anti- α IIb β 3 抗体は α IIb にある β プロペラドメインを認識する

PA-anti- α IIb β 3 抗体の認識部位に関しては、2000年頃までに本抗体がCaイオン依存性の立体的構造を認識すること、また同じ β 3インテグリンである $\alpha_v\beta_3$ とは全く反応しないことから、本抗体が主に α IIbを認識していることが示された^{12)~14)}。 α IIbのN端にはW1-W7の7

^{*1} 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2]

Department of Hematology and Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine
[2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan]

Tel: 06-6879-3871 Fax: 06-6879-3879 e-mail: kiyomin1220@yahoo.co.jp, kashi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

^{*2} 大阪大学医学部附属病院輸血部 [〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15]

Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital
[2-15 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan]

Tel: 06-6879-5887 Fax: 06-6879-5889 e-mail: yoshi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

つの繰り返し構造からなる β プロペラ領域が存在する. 2001 年, 我々の研究室では β プロペラドメイン内の 2 塩基挿入によりリガンド結合能を消失した KO mutant を用いて, ITP 患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体の約 1/3 が KO mutant への反応性が著明に低下していることを示した¹⁵⁾. また McMillan らは α_v の β プロペラドメインを α IIb に置換した α IIb- α_v/β 3 変異株を用いることにより, PA-anti- α IIb β 3 抗体の多くが α IIb の β プロペラ領域を認識することを示した¹⁶⁾. これらの結果から, PA-anti- α IIb β 3 抗体のエピトープとして β プロペラドメインの重要性が明らかとなった. しかし, α IIb と α_v あるいはそれ以外のインテグリンの β プロペラドメインのアミノ酸配列は大きく異なるため, それ以上の解析は困難であった.

3. PA-anti- α IIb β 3 抗体は β プロペラドメインの N 末端側半分を認識する

更なるエピトープの解析は, 意外な実験結果から可能となった. 我々は, ITP 患者の PA 抗体の解析過程でヒト血小板とは反応するもののマウス血小板とは反応しない PA 抗体が存在することに気づいた. そこで, PA-anti- α IIb β 3 抗体のマウス α IIb β 3 との反応性を検討したところ, primary ITP 患者 6 例の PA-anti- α IIb β 3 抗体は, 293T 細胞に発現させたヒト α IIb β 3 には結合するにもかかわらず, マウス α IIb β 3 にはほとんど結合しなかった. そこで, ヒト-マウスキメラ α IIb β 3 を作成することにより, PA-anti- α IIb β 3 抗体のエピトープの同定を試みた.

76 例の primary ITP 患者の血小板解離液を検討し, 26 例 (34%) で PA-anti- α IIb β 3 抗体が検出され, その中で十分な検体量の得られた 15 名について解析を進めた. まず, α IIb, β 3 を各々片方ずつマウスに置き換えたキメラ α IIb β 3 との反応性を検討したところ, β 3 をマウスに置き換えたキメラでは反応性が保たれるのに対し, α IIb をマウスに置き換えたキメラでは反応性が大きく低下することが分かった. よって従来の報告通り本抗体は主に α IIb を認識していると考えられた. α IIb の β プロペラドメインは W1 か

図 1 primary ITP 患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体は β プロペラドメインの N-terminal half を認識する

Primary ITP 患者の PA 抗体の α IIb β 3 の変異株発現細胞に対する反応性をフローサイトメトリーで解析し, ヒト α IIb β 3 発現細胞に対する反応性と比較した. α IIb の β プロペラドメインの N-terminal half (W1-W4; Leu1-Trp235) がマウスに置き換えられると反応性が大きく損なわれるのに対し (■), 同部位でヒト配列を残すと反応性が保たれる (□) ことから, PA-anti- α IIb β 3 抗体は β プロペラドメインの N-terminal half を主に認識すると考えられた.

ら W7 より構成されるが, その N-terminal half (W1-W4; Leu1-Trp235) のみをマウスに置換するとヒト α IIb β 3 と比較して大きく反応性が低下するのに対し, 同部位のみヒト配列を残した場合には反応性が保たれたことから, 本抗体は主に β プロペラドメインの N-terminal half を認識していると考えられた (図 1).

4. PA-anti- α IIb β 3 抗体のエピトープの同定とクロナリティ解析

β プロペラドメインの N-terminal half において, 順次ヒト配列をマウス配列に置換する, あるいはマウス配列をヒト配列に置換することにより, PA-anti- α IIb β 3 抗体のエピトープの詳細をさらに解析した. その結果, 3 つの主要な領域 (A 領域, B 領域, C 領域) の同定に成功した (図 2). 15 例中 11 例がこの領域のいずれかを認識していたが, これらの中で特に興味深い 3 例を紹介する.

PT17 および PT23 は図で示す A 領域を認識し, その領域内に存在する Arg32 および Arg139 をそれぞれマウス残基に置換することによりその反応性は著明に低下した (図 3-A). PT17 において

図2 primary ITP 患者における PA-anti- α IIb β 3 抗体の認識領域

Primary ITP 患者の PA 抗体における α IIb β 3 上の自己抗原としての認識領域を示す。図中に黄色で示した領域は α IIb の N 末端に位置している β プロペラドメインの N-terminal half (W1-W4; Leu1-Trp235) を示している。この領域においてヒトマウスメラ α IIb β 3 に対する患者自己抗体の反応性を詳細に検討することにより、自己抗原としての重要な 3 つの認識領域を同定することができた。 β プロペラドメインの W1-W7 の各ドメインは各々 4 本の β -strand 構造 (1, 2, 3, 4) を持っており、さらに各 β -strand 構造をつなぐ 4 本の small loop 構造 (4-1, 1-2, 2-3, 3-4) が表面に露出する構造をとっている。A 領域は W1: 1-2 loop 及び W2: 3-4 loop から成っており、primary ITP 患者 15 例中 2 例が認識していた。B 領域は W1: 2-3 loop, W2: 3-4 loop, W3: 3-4 loop から成り、5 例が認識しており、さらにそのうち 1 例は W1: 2-3 loop のみを排他的に認識していると考えられた。C 領域は W3: 4-1 loop 及び W4: 4-1 loop から成り、4 例が認識していた。

は Ser29 および Glu136 残基も抗体結合に重要であることが明らかとなった。また PT36 は B 領域を認識しており、この領域内に存在する Gly44 および Pro45 のマウス残基への置換により、著明な反応性の低下を認めた (図 3-B)。さらにこれらの症例においては IgG 軽鎖において明らかな κ/λ の偏位が認められ、PA-anti- α IIb β 3 抗体における clonality の存在が示唆された (図 3-C)。エピトープが同定しえた 11 例のうち、1 例を除いて κ/λ の偏位が認められたことから、primary ITP においては特定の B cell clone が活性化されていることが示唆された。

5. おわりに

今回、我々は primary ITP 患者の PA-anti-

図3 primary ITP 患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体では特定の B cell clone が活性化されていることが示唆される

(A) 図 1 と同様に α IIb β 3 変異株発現細胞に対する PA 抗体の反応性をフローサイトメトリーで解析した。図 2 の A 領域を認識する 2 名の患者 (PT17, 23) の PA 抗体では、同領域の Arg32 及び Arg139 をマウス配列である Ser 及び Gly に置換すると反応性が大きく損なわれることから、これら 2 つのアミノ酸が結合に必須のアミノ酸であることが明らかとなった。(B) (A) と同様にして、図 2 の B 領域を認識する患者のうち 1 名の PA 抗体は (PT36)、同領域の Gly44 及び Pro45 をマウス配列である Asn 及び Ara に置換すると反応性が大きく損なわれることから、これら 2 つのアミノ酸が結合に必須のアミノ酸であることが明らかとなった。(C) 上記 3 名の患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体の IgG 軽鎖は、PT17 では λ , PT23 及び 36 では κ に偏位していたことから、primary ITP 患者の PA-anti- α IIb β 3 抗体では特定の B cell clone が活性化されていることが示唆された。

α IIb β 3 抗体の多くが β プロペラドメイン内の高度に限定された領域を認識することを見出し、一部の症例ではあるが、抗体結合に必須となるアミノ酸を同定することができた。ITP の病因については、一部の 2 次性 ITP ではウイルス蛋白と α IIb β 3 の分子構造の相同性が関係している可能性が報告されているが¹⁷⁾、未だ primary ITP 発症のメカニズムは解明されておらず、本研究が primary ITP の病態解明の一助となることが期待される。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS: Immune thrombocytopenic purpura. N Engl J Med **346**: 995-1008, 2002.
- 2) Karpatkin S: Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic pur-

- pura. *Lancet* **349** : 1531-1536, 1997.
- 3) McMillan R : The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* **44** : S3-S11, 2007.
- 4) Nugent D, McMillan R, Nichol JL, Slichter SJ : Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia : increased platelet destruction and/or decreased platelet production. *Br J Haematol* **146** : 585-596, 2009.
- 5) Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, Esselink MT, Koornstra JJ, Smit JW, Louwes H, Vellenga E, de Wolf JT : Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **103** : 500-506, 2004.
- 6) McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J : Suppression of *in vitro* megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* **103** : 1364-1369, 2004.
- 7) Tomiyama Y, Kosugi S : Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol* **81** : 100-105, 2005.
- 8) Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH : Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood* **88** : 194-201, 1996.
- 9) McMillan R, Wang L, Tani P : Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost* **1** : 485-491, 2003.
- 10) Warner MN, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG : A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* **104** : 442-447, 1999.
- 11) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y : Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood* **120** : 1499-1509, 2012.
- 12) Fujisawa K, Tani P, McMillan R : Platelet-associated antibody to glycoprotein IIb/IIIa from chronic immune thrombocytopenic purpura patients often binds to divalent cation-dependent antigens. *Blood* **81** : 1284-1289, 1993.
- 13) McMillan R, Lopez-Dee J, Loftus JC : Autoantibodies to alphaIIb β 3 in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura bind primarily to epitopes on alphaIIb. *Blood* **97** : 2171-2172, 2001.
- 14) Kosugi S, Tomiyama Y, Honda S, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kiyoi T, Kurata Y, Matsuzawa Y : AntialphaIIb β 3 antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* **85** : 36-41, 2001.
- 15) Kosugi S, Tomiyama Y, Honda S, Kato H, Kiyoi T, Kashiwagi H, Kurata Y, Matsuzawa Y : Platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura recognizing epitopes close to the ligand-binding site of glycoprotein (GP) IIb. *Blood* **98** : 1819-1827, 2001.
- 16) McMillan R, Wang L, Lopez-Dee J, Jiu S, Loftus JC : Many α IIb β 3 autoepitopes in chronic immune thrombocytopenic purpura are localized to alphaIIb between amino acids L1 and Q459. *Br J Haematol* **118** : 1132-1136, 2002.
- 17) Li Z, Nardi MA, Karpatkin S : Role of molecular mimicry to HIV-1 peptides in HIV-1-related immunologic thrombocytopenia. *Blood* **106** : 572-576, 2005.