骨髓増殖性疾患における血小板膜蛋白の解析

藤 村 欣 吾* 武 富 嘉 亮* 蔵 本 淳*

Analysis of Platelet Membrane Glycoproteins in
Myeloproliferative DisordersKingo FUJIMURA*, Yoshinori TAKETOMI*
and Atsushi KURAMOTO*

Key words : platelet membrane glycoproteins, chronic myelogenous leukemia (CML), SDS disc electrophoresis, two dimensional electrophoresis, autoradiography

In myeloproliferative disorders, bleeding tendency and thrombosis were encountered occasionally, in the presence of extremely high platelet counts. Platelet membrane glycoproteins as receptor sites were studied by SDS disc electrophoresis and two dimensional electrophoresis in chronic myelogenous leukemia (CML, 7 cases), polycythemia vera (PV, 2 cases), primary thrombocythemia (PT, 2 cases) and myelofibrosis (MMM, 1 case). In CML group any band of abnormal molecular size was not found but the percent of GP I to all PAS stained peaks was reduced and GP III was increased statistically. Four peaks labelled with ^{125}I -Na by lactoperoxidase were appeared in accordance with PAS staining in these disorders.

In GP I peak, the ^{125}I incorporation rate was not different between normal and myeloproliferative disorders. The percent of PAS staining intensity was decreased in CML but increased in PT, PV and MMM. In GP III peak of CML, the increased percent of PAS staining and the decreased ^{125}I incorporation rate were proved compared to the control. In MMM, PV and PT, it was shown that intensity percent of PAS staining was normal but ^{125}I incorporation rate was decreased against GP III.

To analyse the dissociation between PAS stain and ^{125}I incorporation rate, the two dimensional electrophoresis was conducted with non reduced-reduced system. The autoradiographic pattern of this electrophoresis showed seven ^{125}I incorporated spots (GP Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, III and IV) in normal. The GP Ib was showed as an unclear spot and GP IV was divided in two spots in 4 of 6 CML cases. The GP IV appeared as a faint spot in two PT cases. In MMM and PV, the autoradiographic patterns were similar to those of CML cases.

Association of these findings in surface glycoproteins with abnormalities of

* 広島大学原爆放射能医学研究所内科 (〒734 広島市霞1-2-3), Department of Internal Medicine, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

epinephrine and collagen induced aggregation in these disorders are under investigation.

はじめに

骨髓増殖性疾患の経過中に出血傾向や血栓症を経験することは衆知のごとくである。これらは血小板の数的増加による可能性とともに、むしろ血小板の質的異常をも示唆し、事実Prostaglandin系の異常を示した報告もある¹⁾。現在まで本疾患においては、血餅収縮不良、出血時間延長、血小板凝集異常(特にエピネフリン)等を経験し、血小板回転の面からは血小板産生の増加を報告して来た²⁾。今回は放出、凝集反応を惹起する刺激の受容体として重要と考えられる血小板膜蛋白の解析を行った。

I. 対象

慢性骨髓性白血病(CML) 7例、真性多血症(PV) 2例、原発性血小板增多症(PT) 2例、骨髓線維症(MM) 1例、正常人6例の計18例が対象である。CMLは全例骨髓細胞Ph⁺染色体陽性で、他疾患には染色体異常を認めていない。これら骨髓増殖症12例は各年齢層を含み、血小板膜検索時の末梢血血小板数は、11例が50万/ μ l以上である。CML 7例中6例、MMの1例はBusulfan投与中であるが、他は全例無治療である。また検索時、および検索1か月前後において、出血傾向や血栓症状を示した例はない。血小板機能検査は過去において、一部の例にADPや、エピネフリン凝集異常を認めた症例が含まれている。

II. 方法³⁾⁴⁾

1. 血小板膜分離: 20mlのACD血を採取

PAS staining pattern of CML (7.5% SDS - PAGE)

(wave: 555 nm
scan rate: 2 cm/min.
calibration: 1)

Fig. 1 Glycoprotein composition of isolated CML platelet plasma membranes. Membranes were electrophoresed on 7.5% SDS-acrylamide gels, stained for carbohydrate and scanned in a densitometer. Four glycoprotein peaks I, IIa, IIb and III appeared and the GPI was the highest on absorbance rate and it was gradually decrease from GPI to GP III in control. In 6 of 7 CML cases except case Y. Itahara, the GP III was relatively high compare with the other GP peaks.

し、PRP作成後 Bufferにて3回洗滌。その後 Lactoperoxidase 法を用いて 125 I-Na を血小板に標識した後⁵⁾、Jamieson ら⁶⁾の方法を用いて

血小板膜を分離した。

2. ^{125}I 標識血小板膜の解析：

1) SDS-Disc 電気泳動：7.5% acrylamide gel にて泳動後、Coomassie blue, PAS 染色を行い、デンストメーターにかけた。また gel を、陰極側より 1 mm ずつ切断し、おのおの slice の放射活性をオートガンマーにて測定した。

2) 2次元 SDS-電気泳動：2-mercaptoethanol 無添加で ^{125}I 標識血小板膜を可溶化し、7.5% acrylamide gel で一次泳動を行った (nonreduced)。泳動後 gel を 5% 2-mercaptoethanol にて還元した後、7.5% acrylamide 平板 gel を用い 2次元泳動を行った (reduced)。Coomassie blue 染色、脱色、乾燥後、Kodak X-ray film を用い autoradiography を行った⁷⁾。

III. 結 果

1. SDS-Disc 電気泳動による解析

① PAS 染色像：正常人では陽極側より糖蛋白 (Gp) I, Gp II a, Gp II b, Gp III の4本のピークが認められ、染色性の強さからすると $\text{Gp I} > \text{Gp II} > \text{Gp III}$ の順序となる。CML では1例を除き全例に Gp III が Gp I とほぼ同程度に増加する傾向を認めた。PT, PV, MMM を含めた ET 群では、PV の1例を除いて PAS 染色パターンは基本的には正常人と著変はないが、PT の2例でも Gp I が著増を示した。これらの結果を数量化する目的で、Gp I, II a, II b, III のそれぞれのピークの高さを測定し、Gp 全体の和に対する各 Gp ピークの比率を求めた。その結果、CML では正常人に比し、Gp I が有意に低下を示し ($p < 1.0\%$)、また Gp III は有意に上昇を示した ($p < 0.5\%$) (図1)。ET 群では Gp I においてやや増加傾向を示したが統計的に有意差はなく、Gp II a, II b, III に関しても同様であった。

② Gp への ^{125}I -Na の取り込みによる解析：gel 全体の放射活性に対する各 slice の放射活性の比率を縦軸に、横軸に slice No. をとると、正常人では4本のピークが認められ、おのおのピークは PAS 陽性バンドと一致した。

Relationship between ^{125}I incorporation rate & percent of glycoprotein band I & III (PAS Staining)

Fig. 2 In GPI, there were no significant difference between the absorbance rate and the ^{125}I incorporation rate on CML, thrombocythemia (ET) and control. In GP III of CML, the absorbance rate was higher but the ^{125}I incorporation rate was lower than control. In ET, the ^{125}I incorporation rate was lower.

放射活性率は $\text{Gp III} > \text{II b} > \text{II a} > \text{I}$ の順に高く、PAS 染色ピークと逆の関係にあることはすでに示したごとくである。CML, ET 群ともに正常人と同様4本のピークを認めたが、CML では Gp III への取り込み率が正常に比し減少している。ET 群では Gp II b, III への取り込み率が低下している。

Gp I と Gp III について PAS 染色性の程度と ^{125}I 標識率との関係をみると以下のごとくである (図2)。Gp I に関しては、正常人、CML, ET 群の三者の間には特定の関係は乏しい。Gp III に関してはこれら3群は大まかな区別が可能となる。すなわち CML 群では PAS 陽性蛋白量が正常人に比し多いにもかかわらず、 ^{125}I の標識率が低い。また ET 群では、PAS 陽性蛋白量は正常群とほぼ同じであるが、 ^{125}I の標識率が低い。

2. 二次元電気泳動による解析

本法による正常人血小板膜の Coomassie blue

染色では、対角線より陰極側に明瞭な Gp II a, III が、ごく薄く Ia が認められ、陽極側によく染まる Gp II b と弱陽性に染まる Ib が認められ、Gp Ic, IV は染色されない。Autoradiography を行くと Gp Ia, Ib, II a, II b, III, IV が明瞭に判別され、Ic は II b と近接して認められる。CML では施行した 6 例に Ic の判別が不能で、4 例に Gp Ib の不明瞭、IV の部位が陽極側に解裂していた (図 3)。PT では Autoradiography 上、2 例とも Ic の判別困難で 1 例においては Gp IV が著減、他の 1 例においても正常に比しやや不明瞭であった。MMM, PV では GP Ib および IV が不明瞭で、IV は解裂を起していた。

IV. 考 案

骨髓増殖性疾患における血小板膜蛋白については、PAS 染色像より分析した Vainer や Jamieson らの報告がある。Vainer ら⁸⁾は Gp I と III の減少に加え、分子量 13.5 万の部位に異常なバンドが出現するとし、Jamieson ら⁹⁾は Gp I の低下と IV の増加が推計上有意としているが、これら膜蛋白の変化と臨床症状、血小板機能との間には相関のないことを示している。私共は PAS 染色に加え、¹²⁵I を血小板膜に標識し、その標識率、さらには二次元電気泳動を行いより詳細な膜蛋白の解析を試みた。CML に関しては、Gp I の有意の低下を認め、これは二次元で 4/6 例に Ic, Ib の Coomassie blue 染色性や ¹²⁵I 標識の低下傾向と関連があると考えられる。また Gp III の有意の増加は二次元で IV に相当する 2 本の黒化バンドを認める例が多く (解裂)、このために PAS 陽性糖量が増加し Gp III の増加を来したものと考えられるが、PAS 陽性糖量が増しても ¹²⁵I の標識率が低いことは興味あ

Fig. 3 The scheme of the autoradiographic patterns in two dimensional electrophoresis of iodinated platelet membranes obtained from CML. The first dimension was electrophoresed on nonreduced system and the second dimension was done on reduced system by 5% 2-mercaptoethanol. The seven exposed spots, Ia, Ib, Ic, IIa, IIb, III, IV appeared. Six spots without IV shift either above the diagonal line or below it, indicates that these polypeptide contained a disulfide bond. In most of the CML cases the Ic was not observed, and in 4 cases the new spot appeared below the IV and this spot (↑) was named "IV splitting" tentatively.

る点である。これは本症 Gp III, IV でのチロシン、ヒスチジンの減少結果と考えるならば、正常 GP IV とは異ったアミノ酸構成をとったため Gp IV の解裂が認められるとも考えられるし、膜表面に突出する部分が少いために標識されにくい可能性もあり、今後の問題である。PT 例では Gp III の蛋白量が正常に近いにもかかわらず ¹²⁵I 標

識率が低い。このことは二次元で Gp IV の標識低下との関連が想定される。また PAS 染色像での Gp I の増加と II b の低下傾向の意味は不明である。以上示した骨髓増殖疾患における血小板膜蛋白の異常は、CML とその他の疾患の間ではやや異った様子を取っているが、これらが臨床症状、血小板機能に関連を有するとするには早計であり今後の課題と考えたい。しかし、これらの疾患においては、正常に比し少くとも血小板膜蛋白に関して、アミノ酸組成や膜表面への蛋白の突出度に差のあることをうかがわせるものと考えられる。

(本研究は文部省総合研究(A)No.237053, No.337048, 厚生省特定疾患「特発性造血障害」調査研究の助成を受けたことを記して謝します)

文 献

- 1) 大熊 稔: 血小板放出機構異常症, とくに血小板によるアラキドン酸代謝異常について, 日本血液学会雑誌, **41**; 1004~1011, 1978.
- 2) 中川淳子, 小金丸茂喜, 井原章裕, 蔵本 淳, 円野治人: 血小板回転による血栓予知の検討—血小板増多症を中心に—, 血液と脈管, **8**; 193~198, 1977.
- 3) 蔵本 淳, 木村昭郎, 藤村欣吾: 血小板の代謝欠陥と出血, 臨床病理, **26**; 423~428, 1978.
- 4) 藤村欣吾, 高田 昇, 蔵本 淳: 血小板膜糖蛋白に関する研究, 1) 血小板抗体に対応する膜抗原の解析, 血液と脈管, **10**; 303~307, 1979.
- 5) Jenkins, C.S.P., Phillips, D.R., Clemetson, K. J., Meyer, D., Larrieu, M. J. and Lüscher, E.F.: Platelet membrane glycoproteins implicated in ristocetin-induced aggregation. Studies of the proteins on platelet from patients with Bernard-Soulier Syndrome and von Willebrand's disease. J. Clin. Invest., **57**; 112~124, 1976.
- 6) Barber, A.J. and Jamieson, G.A.: Isolation and characterization of human blood platelet membranes. J. Biol. Chem., **245**; 6357~6365, 1970.
- 7) Phillips, D. R. and Agin, P. P.: Platelet membrane glycoproteins. Evidence for the presence of non-equivalent disulfide bonds using non reduced-reduced two dimensional electrophoresis. J. Biol. Chem., **252**; 2121~2126, 1977.
- 8) Vainer, H. and Bussel, A.: Altered platelet surface glycoproteins in chronic myeloid leukemia. Int. J. Cancer, **19**; 143~149, 1977.
- 9) Bolin, R. B., Okumura, T. and Jamieson, G. A.: Changes in distribution of platelet membrane glycoproteins in patients with myeloproliferative disorders. Am. J. Hematol., **3**; 63~71, 1977.

●周産(生)期感染症の臨床指針書!

妊婦・胎児・新生児の感染症

編集 日本周産(生)期医学研究会 専門医91氏分担執筆
B5判 289頁 図102 表175 定価9,800円(〒240円)

101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768