◆トピックス◆

血小板刺激伝達系異常症-トロンボキサン受容体異常症

布施 一郎*

Congenital Platelet Thromboxane A₂ Receptor Abnormality

Ichiro FUSE*

Key words : platelet thromboxane A₂ receptor, platelet dysfunction, impaired signal transduction, point mutation

1. 概念・歴史

トロンボキサン A₂ (TXA₂) は強力な血小板凝集惹起作用と血管収縮作用を持ち、血小板放出反応や二次凝集発現における重要な mediator の一つである。血小板トロンボキサン受容体異常症は、血小板膜表面に存在するトロンボキサン受容体の質的異常により、TXA₂ に対する凝集や放出反応が欠損する先天性血小板機能異常症である。TXA₂ に対する血小板凝集異常症の報告は 1981 年以来、幾つかの報告があるが^{1)~4)}、刺激伝達異常を推測した最初の報告は 1987 年の牛首らによるものであり⁵⁾、次いで 1993 年に著者らが報告している⁶⁾。

2. 病態・遺伝子解析

血小板膜上の TXA₂ 受容体は既にクローニングされており、すべての G 蛋白共役型受容体に共通の膜 7 回貫通型の構造をしている⁷⁾。TXA₂ で血小板を刺激すると TXA₂ は血小板膜上の TXA₂ 受容体と結合し、Gq 蛋白を介して phospholipase C β (PLC β) が活性化される。

PLC β は主として血小板膜リン脂質である phosphatidylinositol, 特に phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP₂) を水解し、二つの重要な second messenger である diacylglycerol (DG) と inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP₃) を産生する (図 1)。DG は protein kinase C (PKC) を活性化し、主として 47 K 蛋白をリン酸化し、IP₃ は細胞内カルシウムの動員を介して、Ca²⁺-calmodulin 依存性の myosin light chain kinase を活性化して、20 K 蛋白をリン酸化する。

一方、IP₃ によって惹起された細胞内 Ca 濃度の上昇は phospholipase A₂ (PLA₂) 活性化の引き金となり、また直接 TXA₂ により G 蛋白を介して PLA₂ が活性化され、主として膜リン脂質の phosphatidylcholine (PC) に作用してアラキドン酸を遊離させる。遊離したアラキドン酸は cyclooxygenase (prostaglandin endoperoxide synthase) の作用で prostaglandin G₂, H₂ に変換され、さらに thromboxane synthase の作用で TXA₂ が産生される。産生された TXA₂ は前述の 47 K, 20 K 蛋白のリン酸化と協同して血小板放出反応を惹起するものと考えられて

*新潟大学医学部附属病院・輸血部 [〒 951-8520 新潟市旭町 1-754]

Division of Blood Transfusion, Niigata University Medical Hospital [1-754 Asahimachi, Niigata 951-8510, Japan]

Tel : 025-227-2734 Fax : 025-227-0826 e-mail : fuse@med.niigata-u.ac.jp

図 1 Thromboxane A₂ (TXA₂) による血小板活性化機構

R: thromboxane A₂ 受容体, Gc, Ga: G 蛋白, PLC; phospholipase C, PLA₂; phospholipase A₂, PIP₂; phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate, IP₃; inositol-1, 4, 5-triphosphate, DG; diacylglycerol, PKC; protein kinase C, MLCK; myosin light chain kinase, PC; phosphatidylcholine, PI; phosphatidylinositol, PS; phosphatidylserine, AA; arachidonic acid, PGG₂/PGH₂; prostaglandin G₂/H₂.

いる。

血小板トロンボキサン受容体異常症においては、血小板自身のアラキドン酸代謝、すなわち TXA₂ 産生能は正常である。さらに産生された TXA₂ の血小板への結合も正常であるが、その情報が G 蛋白を介した PLC 活性化に結びつかないために、TXA₂ 産生を介する血小板二次凝集や TXA₂ 自身による血小板凝集が欠損する。

本症における TXA₂ 受容体と PLCβ 間の刺激伝達異常の原因は、患者血小板における TXA₂ 受容体の遺伝子解析および発現実験により、1994 年に明らかにされた⁸⁾。すなわち、本症血小板では、TXA₂ 受容体の膜 7 回貫通構造のうち、first cytoplasmic loop に存在する Arg⁶⁰ が Leu に変異していることが明らかにされ (図 2)、さらにこの異常を pEF-BOS vector に insert し、calcium phosphate method にて

図 2 TXA₂ 受容体の構造と本症における異常部位

CHO (Chinese Hamster Ovary) cell に発現させると、外来性 TXA₂ との結合は正常にもかかわらず、IP₃ 産生が欠損しており、本症血小板と同様の異常が出現することが確認された⁸⁾。このことは、TXA₂ 受容体の first cytoplasmic loop に存在する Arg⁶⁰ およびその近傍が、G 蛋

図3 TXA₂受容体の遺伝子学的解析
制限酵素 (*Hha*1) による切断部位の差を示す。

白-PLC β 系への刺激伝達機構に関与する重要な部位であることを示唆している。

この変異の有無は、患者末梢血由来の genomic DNA を制限酵素 *Hha*1 で処理することで、簡便に検出することができる。すなわち、first cytoplasmic loop を PCR 法にて増幅した後、*Hha*1 で処理すると、正常では GCGC (CGC $\rightarrow$ Arg⁶⁰) を認識して図3のように154bpと94bpに切断されるが、GCTC (CTC $\rightarrow$ Leu⁶⁰) の変異が存在すると、この部位での *Hha*1 による切断がなされず、154bpと117bpの fragment が生ずる。したがって、117bpの存在は、Arg⁶⁰ $\rightarrow$ Leuの変異が存在することを意味しており、もっとも簡便な診断法である。著者らは本症を6例経験しているが、現在のところ、この変異以外の異常を見出しておらず、その意味で重要な検査法である^{9)~11)}。

3. 症例・家系の提示、症状、検査所見

筆者らが最初に見出した症例について提示する⁶⁾。症例は53歳男性で、生来創部からの過剰出血を指摘されていた。42歳で胃切除術、43歳時にも尿管結石にて手術を受けているが、両手術時とも術後出血が続き、輸血を受けた既往がある。家族歴では娘3人にも皮下出血、歯肉出血、月経過多などの出血症状が認められた。出血性素因検査では、血小板数は正常で、凝固線溶系検査にも異常なく、出血時間は Simplate 1 で12.0分と延長していた(正常:4.5~9.5分)。血小板凝集能検査では TXA₂ アナログである

図4 本症における代表的な血小板凝集能検査
N; normal control, P; patient

STA₂ (Stable TXA₂) 凝集が欠損しており、内因性 TXA₂ 産生に依存した凝集 (ADP 二次凝集, コラゲン凝集, アラキドン酸凝集など) も欠損していた(図4)。また、娘3人の血小板凝集能も発端者ほど強くはないが、同様の異常を認めた。患者血小板の各種アゴニスト刺激時の TXB₂ (TXA₂ の安定代謝産物) 産生は正常であり、外来性 TXA₂ との結合も、TXA₂ の agonist ligand である [³H]-U 46619 と antagonist ligand である [¹²⁵I]-PTA-OH を用いて解析したが、正常であった。

以上より、TXA₂ 受容体-Gq-PLC β の刺激伝達異常を疑い、TXA₂ を含む各種アゴニスト刺激時の PLC β 活性を polyphosphoinositides および inositol phosphates 産生量を指標に検討すると、図5の如くで、患者血小板はトロンピン

図5 本症におけるイノシトールリン脂質代謝
 上段よりトロンビン, NaF, STA₂ 刺激時の polyphosphoinositides, inositolphosphates 産生量の経時変化を示す。
 ●—●: 正常コントロール (Mean±SD, n=4)
 ○---○: 患者血小板

や NaF 刺激により PIP₂ の break down と inositol phosphates (IP₁, IP₂, IP₃) の産生増加を認めたが, STA₂ 刺激では, これらの現象を認めなかった。また, GTPase 活性についても, STA₂ 刺激時においてのみ欠損していた⁶⁾⁹⁾。これらの事は本症血小板が STA₂ 刺激時においてのみ, 特異的に Gq および PLCβ の活性化が起きていない事を示しており, 本症の病因の主体が TXA₂ 受容体と PLCβ 間の刺激伝達異常にあることを強く示唆している。本家系はその後の検討で, 発端者が TXA₂ 受容体の Arg⁶⁰→

Leu 変異の homozygote 例であり, 娘3人が heterozygote 例であることが明らかとなり, 別の家系の報告も合わせて⁸⁾, 本症が常染色体性優性遺伝であることが示されている。

4. 治療の進歩, 現状

手術時など大量出血が予想される場合は血小板輸注を行う。しかし, 幸い本症の出血傾向は比較的軽度であり, 日常生活には支障のないことが多い。

5. 解析, 診断施設の紹介

本症の発見およびその病態解析は, 主として京都大学医学部第一内科および新潟大学医学部第一内科によって行われたものである。したがって, 両施設において本症の診断, 解析が可能であるが, 本症診断の糸口は TXA_2 アナログによる血小板凝集能検査を施行することにあるので, スクリーニング検査として是非取り入れて頂く事を希望したい。

文 献

- 1) Wu KK, Le Breton GC, Tai HH, Chen YC: Abnormal platelet response to thromboxane A_2 . *J Clin Invest* **67**: 1801-1804, 1981.
- 2) Lages B, Malmsten C, Weiss HJ, Samuelsson B: Impaired platelet response to thromboxane A_2 and defective calcium mobilization in a patient with a bleeding disorder. *Blood* **57**: 545-552, 1981.
- 3) Samama M, Lecrubier C, Conard J, Hotchen M, Breton-Gorius J, Vargaftig B, Chignard M, Lagarde M, Dechavanne M: Constitutional thrombocytopathy with subnormal response to thromboxane A_2 . *Br J Haematol* **48**: 293-303, 1981.
- 4) Okuma M, Takayama H, Uchino H: Subnormal platelet response to thromboxane A_2 in a patient with chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol* **51**: 469-477, 1982.
- 5) Ushikubi F, Okuma M, Kanaji K, Sugiyama T, Ogorochi T, Narumiya S, Uchino H: Hemorrhagic thrombocytopathy with platelet thromboxane A_2 receptor abnormality: Defective signal transduction with normal binding activity. *Thromb Haemost* **57**: 158-164, 1987.
- 6) Fuse I, Mito M, Hattori A, Higuchi W, Shibata A, Ushikubi F, Okuma M, Yahata K: Defective signal transduction induced by thromboxane A_2 in a patient with a mild bleeding disorder: Impaired phospholipase C activation despite normal phospholipase A_2 activation. *Blood* **81**: 994-1000, 1993.
- 7) Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S: Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A_2 receptor. *Nature* **349**: 617-620, 1991.
- 8) Hirata T, Kakizuka A, Ushikubi F, Fuse I, Okuma M, Narumiya S: Arg⁶⁰ to Leu mutation of the human thromboxane A_2 receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. *J Clin invest* **94**: 1662-1667, 1994.
- 9) Fuse I, Hattori A, Mito M, Higuchi W, Yahata K, Shibata A, Aizawa Y: Pathogenetic analysis of five cases with a platelet disorder characterized by the absence of thromboxane A_2 (TXA_2)-induced platelet aggregation in spite of normal TXA_2 binding activity. *Thromb Haemost* **76**: 1080-1085, 1996.
- 10) Higuchi W, Fuse I, Hattori A, Aizawa Y: Mutations of the platelet thromboxane A_2 (TXA_2) receptor in patients characterized by the absence of TXA_2 -induced platelet aggregation despite normal TXA_2 binding activity. *Thromb Haemost* **82**: 1528-1531, 1999.
- 11) Fuse I, Higuchi W, Aizawa Y: Pathogenesis of a bleeding disorder characterized by platelet unresponsiveness to thromboxane A_2 . *Semin Thromb Haemost* **26**: 43-45, 2000.