Nak^a抗原に関する血清学的検討

三谷 孝子 芳賀 寛史 荒関 みき
小端 哲二 池田 久實 関口 定美

北海道赤十字血液センター

(平成3年10月12日受付)

SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE NAK^a ANTIGEN

Takako Mitani, Hiroshi Haga, Miki Araseki, Tetsuji Kobata,
Hisami Ikeda and Sadayoshi Sekiguchi
Hokkaido Red Cross Blood Center

The Nak^a antigen is an isoantigen on platelet GPIV (CD36) and Nak^a negative platelets are deficient of GPIV. The Nak^a epitope defined by anti-Nak^a serum is also recognized by OKM5, a monoclonal anti-GPIV (CD36). This was shown by blocking experiments, in which the reactivity of OKM5 was completely blocked by the pretreatment of the platelets with anti-Nak^a serum and vice versa. Quantitative studies of the Nak^a-GPIV epitope on platelets and monocytes were performed both with the OKM5 and anti-Nak^a serum. Amounts of the Nak^a-GPIV epitope on monocytes were 4 times as many as those on platelets. Monocytes from Nak^a negative platelets donors could express the epitope, which varied quantitatively from the one comparable to that of Nak^a negative platelets to the other to that of Nak^a positive platelets. Two distinct Nak^a-GPIV positive patterns of Nak^a positive platelets were also observed in monocytes and appeared to be genetically determined. Since mRNA for CD36 is present in Nak^a negative platelets as well as monocytes, the genetic control of Nak^a-GPIV expression must be at post-translation level.

Nak^a 抗原は血小板輸血に不応性を示す患者血清により同定され、その抗原の適合性は血小板輸血効果に大きく影響する¹⁾。Nak^a抗原は血清学的解析において、当初血小板特異同種抗原と考えられた。その主な根拠は family study により常染色体共優性の遺伝形式をとること、日本人での抗原頻度が約97%であったことである¹⁾。その後 Nak^a epitope について Tomiyama らは¹³¹I を表面標識した血小板抗原と抗 Nak^a血清との反応より Nak^a抗原が血小板膜蛋白 GPIV (CD36) に局在することを証明した²⁾。Shibata ら³⁾は混合受身赤血球凝集試験 (MPHA) を用い、抗 Nak^a血清と GPIV (CD36) に対する monoclonal 抗体 OKM5⁴⁾ とは血清学的に同一な反応性を示すことを報告し Nak^a抗原が GPIV 上の epitope であることを確認すると同時に抗 Nak^a血清と OKM5 とが同じ

epitope に向かっていることを示唆した。また Yamamoto ら⁵⁾は日本人及び米国人由来の Nak^a 陽性・陰性血小板を使用し、Nak^a陰性血小板には電気泳動上で GPIV に相当する部分にはスポットが見られず、OKM5や polyclonal なウサギ抗 GPIV と反応する GPIV 蛋白も証明されないことより Nak^a陰性血小板には GPIV が欠損している、すなわち Nak^a抗原は、iso-antigen であると推定した。

今回われわれは抗 Nak^a血清と抗 GPIV monoclonal 抗体、OKM5の認識する epitope は同一もしくは非常に近接していること、この Nak^a-epitope を認識する monoclonal 抗体を利用して Nak^a-GPIV の血小板及び単球での発現を検討した結果、発現が遺伝的に調節されていると推定されること、単球の Nak^a-GPIV は血小板のその約 4

倍量あり Nak^a陰性者の単球上にも弱いながら発現していることを見出した。

材料および方法

<抗体>

抗 Nak^a血清：ランダム血小板輸血にも HLA 適合血小板輸血にも不応性を示す急性骨髄性白血病患者（38歳既婚女性）の血清。患者の妊娠歴はない。抗 Sib^a血清⁶⁾：京都赤十字センターから分与。

monoclonal 抗体：OKM5（抗 GPIV, Ortho 社），SZ2（抗 GPIb, Immunotech），P2（抗 GPIIb/IIIa, Immunotech），4B4（抗 GPI_a/II_a, Coulter）w6/32（抗 HLA-class I, Dakopatts），Leu-M3（抗 CD14, Becton Dickinson）。

<血小板の酸処理>

血小板を pH3.0 溶液で処理することにより HLA 抗原性を除去する Kurata らの方法⁷⁾に準じ行った。血小板を $1 \times 10^6/\mu\text{l}$ となるよう酸処理バッファー（0.263M citric acid, 0.123M Na₂HPO₄, 1%BSA, pH 3.0）で浮遊し、氷水中で 10 分間放置する。放置後クエン酸バッファーを加え中和し、洗浄後血小板を 1%paraformaldehyde（pH 7.0）で固定する。

<flow cytometry>

1%paraformaldehyde 固定した血小板と抗体を 37°C 45 分間反応させ、反応後 FITC-conjugated anti IgG（Kallestad 社）を加え室温 30 分間反応させ、蛍光を有する血小板をフローサイトメーター FACScan（Becton-Dickinson 社）で測定した。

測定には Consort30 プログラムを使用し 15,000 個の血小板について蛍光強度を測定した。

単球は Ficoll Hypaque にて分離した単核球に、単球に対するモノクローナル抗体 Leu-M3（PE 標識）を反応させ CD14 陽性細胞を単球とし OKM5（FITC 標識）と反応させる二重染色を行い、FCM により測定した。

<ブロッキング実験>

酸処理血小板（ $25/\mu\text{l}$, $10^5/\mu\text{l}$ ）をブロック抗体と 37°C 60 分間反応させる。過剰未反応のブロック抗体を洗浄除去した後、目的とする抗体と室温 30 分間反応させ、洗浄後 FITC 標識抗 Ig と反応さ

		OKM5	
		+	-
anti-Nak ^a	+	110	0
	-	0	5

図1 抗 Nak^a血清/OKM5の血小板パネルに対する反応

せ血小板の蛍光強度を FCM で測定した。

結 果

① OKM5と抗 Nak^aの血清の反応性

115例の血小板パネルと OKM5 および抗 Nak^a血清との反応を FCM で検討した（図1）。血小板は酸処理により HLA-クラス I 抗原を不活化し使用した。OKM5と抗 Nak^a血清の反応は完全に一致し、両者陽性が110例、両者陰性は5例であり OKM5と抗 Nak^a血清は血清学的に同一の特異性を有するものと思われ、Shibata ら³⁾の MPHA を用いた成績を確認することができた。

② ブロッキング実験

OKM5 および抗 Nak^a血清は前述の如く血清学的に同一の反応性を有し両者の認識する epitope は同一である可能性が示唆された。次に直接的に両抗体の認識する epitope について検討した。図2は各種抗体でブロックした Nak^a陽性血小板と抗 Nak^a血清および OKM5 との反応を示す。抗 Nak^a血清に対する反応性は P2（抗 GPIIb/IIIa）および SZ2（抗 GPIb）では、ブロックされず、抗 GPIV である OKM5 により完全にブロックされる。同様に OKM5 に対する反応性は抗 Yuk^b血清（GPIII_a）、抗 Sib^a（GPIb）ではブロックされず、抗 Nak^a血清により完全にブロックされ、抗 Nak^a血清と OKM5 の反応は互いによりブロックされた。すなわち OKM5 の認識する epitope と Nak^a epitope は同一であるか、もしくは互いに非常に近接していると推定された。

③ Nak^a陽性血小板と OKM5/抗 Nak^a血清との反応

OKM5と抗 Nak^a血清の血小板パネルとの反応性を FCM の mode で検討した。血小板は酸処理により HLA クラス I 抗原を不活化し使用した。

図2 ブロッキング実験

抗 Nak^a血清と OKM5 の血小板パネルに対する反応性は非常に類似し、Nak^a陽性血小板に対する

図3 抗 Nak^a血清の血小板パネルに対する反応性

両者の反応は強く反応する群と弱く反応する2群に分かれた。抗原量を比較するため、Furihataらの方法⁸⁾に従い抗 Nak^a血清を saturate した状態で Nak^a陽性血小板の mode を測定した(図3)。任意の53例の血小板について抗 Nak^a血清との反応性を検討したところ、強く反応する血小板は17

表1 OKM5/Nak^a epitope に関する家系調査

Family	#	Nak ^a phenotype	peak mode*				
			anti-Nak ^a	OKM5 (GPIV)	P2 (GPIIb/IIIa)	SZ2 (GPIb)	4B4 (GPIa/IIa)
S	F 1	—	3.1	1.9	233.6	117.6	35.7
	M 2	—	4.2	2.0	217.4	88.1	30.9
	C1 3	—	4.3	2.3	225.3	81.9	41.2
	C2 4	—	4.1	2.0	219.6	73.5	30.9
M	F 5	+	101.8	79.0	175.0	115.1	21.4
	M 6	+	113.4	79.8	168.8	119.4	19.3
	C1 7	+	121.2	73.5	135.9	117.5	19.3
	C2 8	+	115.3	73.5	175.0	122.2	26.7
O	F 9	+	47.7	59.2	202.2	61.4	29.5
	M 10	+**	27.7	12.0	188.1	53.1	20.8
	C1 11	—	1.7	2.5	188.1	68.4	24.3
K	F 12	+	47.6	33.2	198.2	121.9	35.7
	M 13	+	50.7	42.7	213.4	140.9	34.4
	C1 14	—	3.4	2.0	199.2	122.4	36.1

* 各血小板膜蛋白に対する MoAb を saturation した状態でその反応を FCM の mode により測定した。

F=father, M=mother, C=child

** The Nak^a expression is extremely weak.

例 (32%), 弱く反応する血小板は36例 (68%) であった。

また抗 Nak^a血清と弱く反応する血小板の mode (mode50前後) は, 強く反応する血小板 (mode100前後) の約1/2に相当した。同上53例の血小板に対する OKM5の反応性は抗 Nak^a血清のそれと全く一致した。さらに, Nak^a epitope の遺伝的背景を家系調査を行ない検討した (表1)。S 家系は全員 Nak^a陰性, M 家系は全員強い反応性を示した。子が Nak^a陰性である O, K 家系は, 両親共に弱く反応する群に属した。この家系調査の結果は Nak^a/OKM5 epitope の発現調節は遺伝的支配を受けていることを示唆している。しかしながら, O 家系の母 (#10) については OKM5/抗 Nak^a血清に対し弱い反応を示す血小板よりもさらに弱い反応性を示した。他の血小板膜蛋白 (GPIb, GPIIb/IIIa, GPIa/IIa) の epitope については4家系において大きな差は認められなかった。

④ 単球上の GPIV

GPIV は CD36として血小板以外の組織にも分布し, 末梢血では単球にも存在することがわかっている。Nak^a陰性者は前述の如く血小板上の GPIV を欠損すると推定されるが, 単球上の GPIV について検討した。Leu-M3陽性細胞を単球とし, その OKM5 epitope を FCM で検討した (表2)。その結果 Nak^a陽性者のみならず Nak^a陰

表3 Nak^a陽性血小板・単球の OKM5に対する反応性

パネル#	OKM5に対する反応性 (mode)	
	血小板	単 球
1	55	240
2	45	147
3	50	203
4	49	214
5	49	215
6	97	401
7	94	344
8	108	401
9	95	356

性者 (#2~#5) の単球上にも GPIV は存在することが判明したが, Nak^a陽性者 (#6~#11) の単球上の GPIV に比べ明らかに peak mode は低く量的に少ないことが示された。さらに, Nak^a陰性の #1 については単球上の GPIV が証明されなかった。Nak^a陽性血小板では OKM5/Nak^a epitope が量的に二種類のパターンが存在することを観察したが, 単球上でも同様なことが観察されるか検討した。OKM5を saturate した状態で血小板と単球の mode を測定した (表3)。血小板と同様に Nak^a陽性者の単球においても OKM5 epitope のバラエティーが観察され, #1~#5 の弱く反応する (mode 約200) 群の mode は, #6~#9 の強く反応する (mode 約400) の1/2に相当した。また, 単球上の OKM5 epitope の強弱は血小板上の強弱と相関した。またいずれのパネルにおいても血小板の Nak^a-GPIV は単球のその約1/4であった。

考 察

GPIV (CD36) に対するモノクローナル抗体である OKM5と抗 Nak^a血清はパネル血小板との反応において同一の特異性を有することが明らかとなり, さらにブロッキング実験により Nak^a epitope と OKM5の認識する epitope は同一もしくは非常に近接することを確認できた。Nak^a抗原は iso-antigen あり Nak^a陰性血小板上には GPIV が欠損していると推定されるため⁵⁾, OKM5 は monomorphic な抗体と言うことになる。Nak^a epitope を認識する monoclonal 抗体の存在を確

表2 単球上の OKM5

panel #	Nak ^a phenotype	mode OKM5
# 1	—	5.3
# 2	—	85.0
# 3	—	117.7
# 4	—	217.4
# 5	—	225.4
# 6	+	617.5
# 7	+	647.7
# 8	+	666.1
# 9	+	684.4
#10	+	722.3
#11	+	742.3

CD14陽性細胞を単球とし, OKM5を saturation した状態で FCM の mode を測定

認できたことは日常の血小板型タイピング上のみならず, Nak^a-GPIV の組織分布や量的発現を検討する上で有意義なことと考える。事実今回の検討では, OKM5/抗 Nak^a血清に対する Nak^a陽性血小板の mode は明らかに 2 群に区別され, 血小板の mode は単球の mode とも関連した。Furihata ら⁸⁾は FCM を使用し血小板抗原 PI^{A1}について, PI^{A1} heterozygote(A1/A2)の血小板上の PI^{A1}の epitope は, PI^{A1} homozygote(A1/A1)の1/2に相当することを報告している。しかし, Nak^a抗原は iso-antigen であり, Nak^a陰性血小板にも GPIV (CD36) mRNA が存在することから⁹⁾, Nak^a抗原の量的な発現の調節は PI^{A1}のような gene dosage effect によるものではないと考えられる。Nak^a陰性血小板の GPIV (CD36)の発現については, その細胞質中にも OKM5で検出される GPIV 分子は存在しないことから(データ示さず), mRNA から完全な GPIV 分子に翻訳・修飾される過程に障害が生じている可能性, もしくは血小板上の GPIV は単球上のその約1/4量であることから, Nak^a陰性血小板中の GPIV (CD36) mRNA が量的に非常に少ないために発現されている微量な GPIV (CD36)を現行の FCM では検出できない可能性が推定される。PCR により GPIV (CD36) mRNA の存在の有無は検討し得るが量的差異は論じられない。また血小板の mRNA 量は非常に少ないため, ノーザン・ブロット解析等の通常の方法で mRNA の量的比較を検討するのは困難と考えられる。

Nak^a抗原の発現調節が遺伝的な支配を受けていることは, 我々の家系調査からも推定される。しかし, O 家系の母の血小板の GPIV が非常に少ないこと, また Nak^a陰性者の単球上の GPIV についても, まったく表現されていないものから弱いながら表現されているものまで観察されたことから, 単一の遺伝子座による調節支配とは考えづらい。

GPIV は thrombospondin^{10)~12)}や collagen のレセプターとされているが, GPIV 欠損が推定される Nak^a陰性者は他の GP 欠損者が何らかの出血凝固障害をあらわすのに対し臨床何らかの病的変

化を示さない。その理由の一部は collagen receptor が GPIV 以外にも複数存在すること, また Nak^a陰性者の血小板上にも少量の GPIV が存在している可能性があることから説明出来るかも知れない。いずれにしてもこのことは非常に興味深い点であり, 今後 Nak^a陰性者の血小板凝集能, 粘着能等について検討を加える必要があると思われる。

まとめ

① 抗 Nak^a血清と抗 GPIV monoclonal 抗体 OKM5は血清学的に同一な特異性を有することが確認できた。

② ブロッキング実験より Nak^a epitope と OKM5の認識する epitope は同一であるか, もしくは互いに非常に近接していると推定された。

③ Nak^a陽性血小板の Nak^a-GPIV の抗原量を検討したところ 2 群に分かれ, 抗原量の少ない群は多い群の約1/2に相当した。Nak^a陽性者の単球においても同様な結果が得られた。また単球上の Nak^a-GPIV の抗原量は血小板のその約 4 倍に相当した。

④ Nak^a陰性者の単球上にも Nak^a-GPIV は発現されている。しかし, その量は Nak^a陽性者に比べ明らかに少なく 1 例については単球上の Nak^a-GPIV は欠損していた。

⑤ Nak^a-GPIV の血小板および単球上での発現調節に関しては遺伝的支配を受けていると推定されるが, 単一遺伝子座による調節支配とは考えづらい。

References

- 1) Ikeda, H., Mitani, T., Ohnuma, M., Haga, H., Ohtsuka, S., Kato, T., Nakase, T. and Sekiguchi, S.: A new platelet-specific antigen, Nak^a, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang.*, 57: 213-217, 1989.
- 2) Tomiyama, Y., Take, H., Ikeda, H., Mitani, T., Furubayashi, T., Mizutani, H., Yamamoto, N., Tandon, N.N., Sekiguchi, S., Jamieson, G.A., Kurata, Y., Yonezawa, T. and Tarui, S.: Identification of the platelet-specific alloantigen, Nak^a, on platelet membrane glycoprotein IV. *Blood*, 75(3): 684-687, 1990.
- 3) Shibata, Y., Kim, N., Morita, S., Ishijima, A.

- and Okazaki, S.: Monoclonal antibody OKM5 and platelet alloantibody anti-Nak^a have the same specificity. *Proc. Japan Acad.*, 66: 41–41, 1990.
- 4) Talle, M.A., Rao, P.E., Westberg, E., Allegar, N., Nakowski, M., Mitter, R.S. and Goldstein, G.: Pattern of antigenic expression on human monocytes and defined by monoclonal antibodies. *Cell Immunol.*, 78: 83–87, 1983.
- 5) Yamamoto, N., Ikeda, H., Tandon, N.N., Herman, J., Tomiyama, Y., Mitani, T., Sekiguchi, S., Lipsky, R., Kralisz, U. and Jamieson, G.A.: A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donors; Nak^a-platelet lack detectable GPIV (CD36). *Blood*, 76: 1698–1703, 1990.
- 6) Saji, H., Maruya, E., Fujii, H., Maekawa, T., Akiyama, Y., Matsuura, T. and Hosoi, T.: New platelet antigen, Sib^a, involved in platelet transfusion refractoriness in a Japanese man. *Vox Sang.*, 56: 283–287, 1989.
- 7) Kurata, Y., Oshida, M., Take, H., Furubayashi, T., Nakao, H., Tomiyama, Y., Kanayama, Y., Nagao, N., Okubo, Y., Yonezawa, T. and Tarui, S.: New approach to eliminate HLA class I antigens from platelet surface without cell damage: Acid treatment at pH 3.0. *Vox Sang.*, 57: 199–204, 1989.
- 8) Furihata, K., Nugent, D.J., Bissonette, A., Aster, R.H. and Kunicki, T.J.: On the association of the platelet-specific alloantigen, Pen^a, with glycoprotein IIIa. *J. Clin. Invest.*, 80: 1624–1630, 1987.
- 9) Lipsky, R.H., Sobieski, D.A., Tandon, N.N., et al.: Detection GPIV (CD36) mRNA in Nak^a-platelets. *Thrombosis and Hemostasis*, 65: 456–457, 1991.
- 10) Asch, A.S., Barnwell, J., Silverstein, R.L. and Nachman, R.L.: Isolation trombospodin membrane receptor. *J. Clin. Invest.*, 79: 1054–1061, 1987.
- 11) McGregor, J.L., Catimel, B., Parmentier, S., Clezardin, P., Dechavanne, M. and Leung, L.L. K.: Rapid purification and partial characterization of human platelet glycoprotein IIIb. *J. Biol. Chem.*, 264(5): 501–506, 1989.
- 12) Tandon, N.N., Kralisz, U. and Jamieson, G.A.: Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for plateletcollagen adhesion. *J. Biol. Chem.*, 264(13): 7576–7583, 1989.
-