

令和元年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08973

研究課題名(和文)特発性血小板減少性紫斑病における巨核球成熟障害の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis of megakaryocyte maturation disorder in idiopathic thrombocytopenic purpura

研究代表者

佐藤 隆司 (SATO, TAKASHI)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：90407114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：特発性血小板減少性紫斑病(ITP)における自己抗体が巨核球成熟障害の病態に関与するか検討した。ITP患者血漿中の抗トロンボポエチン(TPO)抗体は約24%、抗TPO受容体抗体は約10%に認められ、健康人血漿中では認められなかった。また、抗TPO抗体及び抗TPO受容体抗体のうち半数例は、巨核球系細胞におけるTPO受容体の下流シグナルのリン酸化を阻害する機能的な自己抗体であり、それらの抗体はITPの巨核球成熟障害に関与している可能性が示唆された。一方、TPO受容体作動薬であるエルトロンボパグは機能的な自己抗体の有無に関わらず、巨核球系細胞の下流シグナルのリン酸化を誘導することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ITP患者血漿中からTPOやTPO受容体に対する自己抗体が見出された。さらに、それらの自己抗体の半数例は巨核球系細胞であるUT-7/TPOの下流シグナルに影響を及ぼし、巨核球成熟を抑制する機能的な自己抗体であることが示唆された。これらの結果は、ITPの病態形成機序の解析、治療の作用機序の解明や新たな治療法の開発に繋がる可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To determine the prevalence and pathogenic role of anti-thrombopoietin (TPO) and anti-TPO receptor (TPOR) antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) patients. Anti-TPO, anti-TPOR antibodies from 132 patients with ITP and 70 healthy controls were measured by ELISA. To investigate whether anti-TPO, anti-TPOR antibodies inhibited functional interactions between TPO and TPO receptors, we examined ERKs, downstream signals induced by recombinant human TPO (rhTPO) in TPOR-expressing UT-7/TPO. Furthermore, eltrombopag was used instead of rhTPO. Anti-TPO antibodies were detected in 24% of ITP patients and anti-TPOR antibodies were detected in 10% of patients, and none of healthy controls. In half of antibody-positive samples inhibited the phosphorylation of ERK in UT-7/TPO, which might be related to the blocking of rhTPO by anti-TPO or anti-TPOR antibodies. Eltrombopag improved the phosphorylation of ERK in UT-7/TPO in the presence of functional anti-TPO or anti-TPOR antibodies.

研究分野：血液検査学

キーワード：特発性血小板減少性紫斑病 巨核球 自己抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) は血小板膜糖蛋白である GPIIb/IIIa などに対する自己抗体が産生され、その自己抗体と結合してオプソニン化された血小板が網内系の貪食細胞により破壊され、血小板減少をきたす自己免疫疾患である (*N Eng J Med* 346:996,2002)。一方、ITP 患者の電子顕微鏡による巨核球の形態はアポトーシスの特徴が見られ (*Blood* 103:500,2004)、骨髓標本の巨核球の多くは小型かつ未熟であり、巨核球の成熟障害や血小板産生能の低下も考えられているが、その機序は不明な点が多い。

トロンボポエチン (TPO) は巨核球系細胞の増殖と分化に関与し、血小板産生を促進する造血因子である。再生不良性貧血などの造血障害による血小板減少症では TPO 濃度が著増しているが、ITP での TPO 濃度は正常または軽度増加しているのみである (*Thromb Haemost* 76:675, 1996)。一方、ITP の治療法として、TPO 自体ではなく TPO 受容体を活性化させ、巨核球造血を促し血小板産生を誘導する TPO 受容体作動薬が開発されている (*Thromb Haemost* 10:799, 2012、*Int J Hematol* 95:652, 2012)。ITP 患者において TPO 受容体作動薬の有効率は約 80% と良好であるが、約 20% は不応症例であり、その相違の詳細は不明である。

ITP 患者や血小板減少を伴う全身性エリテマトーデス患者血漿中から低頻度ではあるが、TPO 受容体 (TPOR) に対する自己抗体を見いだされている (*Arthritis Rheum* 46:2148, 2002)。また、抗 TPOR 抗体を有する患者は骨髓における巨核球低形成と強く関与することが報告されている。さらに、研究代表者は TPO 自体に対する自己抗体の存在も明らかにした。しかし、抗 TPO 抗体や抗 TPOR 抗体の頻度や機能などの検討はほとんどなく、詳細な自己抗体の役割は明らかになっていない。また、これまで巨核球に特異的な自己抗体の検索もほとんど行われていない。

2. 研究の目的

ITP における自己抗体、特に抗 TPO 抗体、抗 TPOR 抗体や巨核球に反応を示す自己抗体を解析し、巨核球成熟障害との関連性を検討することが目的である。

3. 研究の方法

(1) ELISAによる抗TPO抗体、抗TPO受容体抗体の検出

96ウェルELISAプレートにリコンビナントヒトTPO (rhTPO) (R&D Systems)、または、rhTPO受容体 (R&D Systems) を加え、4℃、オーバーナイトで固相化した。0.05% Tween 20含有PBS (PBS-T) で洗浄し、3% BSAで1時間ブロッキングした。一次抗体として健常人またはITP患者血漿を反応させ、PBS-Tで洗浄後、二次抗体としてHRP標識抗ヒトIgG抗体を1時間反応させた。PBS-Tで洗浄後、発色液を各ウェルに加えた。1N硫酸で反応を止め、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度450nm (reference 540nm) を測定した。

(2) 免疫沈降/ウエスタンブロット法による抗TPO抗体、抗TPO受容体抗体の検出

IPP緩衝液、プロテインGセファロースとITP患者または健常人血漿を加え、室温で2時間反応させた。その後、免疫沈降物をIPP緩衝液で洗浄し、抗原を加え、4℃で2時間反応させた。抗原はELISAに用いたリコンビナント蛋白を用いた。IPP緩衝液で洗浄後、免疫沈降物をSDS-PAGEで分画し、ウエスタンブロット法にて自己抗体の有無を検出した。

(3) 抗TPO抗体、抗TPO受容体抗体の機能解析

巨核球系由来細胞であるUT-7/TPOはrhTPO添加により増殖する細胞である。また、UT-7/TPOにrhTPOを加えるとTPO受容体の下流シグナルであるERKがリン酸化される。そこで、UT-7/TPO培養系にrhTPOおよび抗TPO抗体陽性精製IgG (血漿)、または抗TPOR抗体陽性精製IgG (血漿) を添加し、自己抗体の有無によりrhTPOの作用が阻害 (中和) され、ERKのリン酸化に影響を与えるか検討した。

さらに、UT-7/TPO培養系においてrhTPOの代わりにエルトロンボバグ (AduoQ BioScience) を添加し、抗TPO抗体や抗TPOR抗体がERKのリン酸化に影響を及ぼすか検討した。

(4) ³⁵S-免疫沈降法 (³⁵S-IP) による巨核球に反応を示す自己抗体の検出

巨核球に特異的な自己抗体の存在を同定するため、³⁵S-IPを行なった。1検体当たり 1×10^6 個の UT-7/TPO に ³⁵S-メチオニン (1.85MBq) を加え CO₂ インキュベーター内で 16 時間培養した。培養した細胞を洗浄し、cOmplete mini 含有 ULTRARIPA[®] kit for Lipid Raft を用いて溶解し、遠心後、上清を ³⁵S-メチオニン標識 UT-7/TPO 蛋白抗原液とした。

IPP 緩衝液、プロテイン A セファロースと ITP 患者または健常人血漿を加え、4℃、一晩で反応した。免疫沈降物を IPP 緩衝液で洗浄し、作成した ³⁵S-メチオニン標識 UT-7/TPO 蛋白抗原液を加え、4℃で2時間反応させた。IPP 緩衝液で洗浄後、サンプル緩衝液を加え、電気泳動用試料とした。調整した試料を SDS-PAGE で分画し、フィルムに感光後、現像しバンドを検出した。

(5) 抗原解析

³⁵S-IP を行い、120kDa 付近にバンドが検出された。ITP 患者血漿中の自己抗体と反応する 120kDa 蛋白抗原を SDS-PAGE で分画し、クマシーブルー染色したゲルの 120kDa 付近を切り出

した。切り出した蛋白を nano LC-MS/MS (日本バイオサービス) で解析し、自己抗体と反応する抗原を同定した。

(6) 免疫沈降/ウエスタンブロット法による抗ヘキソキナーゼ I (HKI) 抗体の検出

1 検体当たり 1×10^6 個の UT-7/TPO を cOmplete mini 含有 ULTRARIPA[®] kit for Lipid Raft を用いて溶解し UT-7/TPO 蛋白抗原液とした。その後、免疫沈降/ウエスタンブロット法を行い、抗ヘキソキナーゼ I 抗体の検出を行なった。

4. 研究成果

(1) ELISA による抗 TPO 抗体、抗 TPO 受容体抗体の検出

ITP 患者血漿 132 例、健常人血漿 70 例を用いて、抗 TPO 抗体、抗 TPO 受容体抗体の検出を試みた。抗 TPO 抗体、抗 TPO 受容体抗体偽陽性の可能性も考慮し、ELISA 及び免疫沈降/ウエスタンブロット法で共に陽性となったものを抽出した。その結果、ITP 患者血漿では抗 TPO 抗体が約 24%、抗 TPO 受容体抗体が約 10% に認められた。一方、健常人血漿では抗 TPO 抗体及び抗 TPO 受容体抗体は認められなかった。

(2) 抗 TPO 抗体、抗 TPO 受容体抗体の機能解析

抗 TPO 抗体、抗 TPO 受容体抗体の機能を検討するため、抗体陽性例の精製 IgG または血漿を用いて、UT-7/TPO の TPO 受容体の下流シグナルに与える影響を検討した。その結果、抗 TPO 抗体及び抗 TPO 受容体抗体のうち半数例は、下流シグナルである ERK のリン酸化の減弱が見られた。リン酸化の減弱が見られた自己抗体は機能的な自己抗体であることが明らかとなり、それらの抗体は ITP の巨核球成熟障害に関与している可能性が示唆された。

また、UT-7/TPO 培養系にエルトロンボパグと機能的な自己抗体を加え、ERK のリン酸化を検討したところ、全例でリン酸化の改善が認められた。エルトロンボパグはこれら自己抗体陽性例に対して有効な薬剤である可能性が示唆された。

(3) 巨核球系細胞と反応を示す自己抗体の検出及び自己抗原の同定

ITP 患者 31 例の血漿を用いて、UT-7/TPO 蛋白抗原と反応を示す自己抗体を検出した。その結果、ITP 患者 31 例中 5 例 (16%) で分子量 120kDa 蛋白と反応する自己抗体が認められた。分子量 120kDa 蛋白を nano LC-MS/MS で解析したところ、分子量及びスコアから、HKI である可能性が考えられた。

(4) 免疫沈降/ウエスタンブロット法による ITP 患者血漿中の抗 HKI 抗体の検出

市販の抗 HKI 抗体を用いて IP/WB 法を行った結果、分子量 120kDa 蛋白が HKI であることが明らかとなった。抗 HKI 抗体は ITP 患者 113 例中 9 例 (8.0%) で認められ、健常人 22 例では検出されなかった。ITP 患者における抗 HKI 抗体の機能解析は行われておらず、今後検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Uojima H, Arase Y, Itokawa N, Atsukawa M, Satoh T, Miyazaki K, Hidaka H, Sung JH, Kako M, Tsuruya K, Kagawa T, Iwakiri K, Horie R, Koizumi W. Relationship between response to lusutrombopag and splenic volume. *World Journal of Gastroenterology*. 24(46): 5271-5279, 2018. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 瀧口隼人、魚嶋晴紀、宮崎浩二、日高央、久保誠、堀江良一、佐藤隆司. 肝疾患に伴う二次性免疫性血小板減少症における抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数および血漿 BAFF 濃度の検討. 第 65 回日本臨床検査医学会学術集会 (東京) 2018.11.16

2. 瀧口隼人、魚嶋晴紀、宮崎浩二、日高央、久保誠、堀江良一、佐藤隆司. 一次性免疫性血小板減少症 (ITP) と肝疾患に伴う二次性 ITP における抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞数および BAFF 濃度の検討. 第 46 回日本臨床免疫学会総会 (軽井沢) 2018.11.9

3. Satoh T, Miyazaki K, Horie R. Analysis of anti-thrombopoietin receptor antibodies in patients with immune thrombocytopenia. The 10th congress of the Asian-Pacific Society on thrombosis and Hemostasis (Sapporo). 2018. 6. 28-30

4. Satoh T, Miyazaki K, Horie R. Analysis of anti-thrombopoietin receptor antibodies in patients with immune thrombocytopenia. The 23rd Congress of the European Hematology Association. (Stockholm). 2018. 6. 14-17

5. 佐藤隆司、宮崎浩二、堀江良一. 免疫性血小板減少症 (ITP) におけるトロンボポエチン受容体抗体の検出および抗体の機能解析. 第 18 回日本検査血液学会学術大会 (北海道) 2017.7

〔図書〕(計 2 件)

1. Satoh T, Kuwana M. "Autoimmune Thrombocytopenia" T cell abnormalities. (Editors: Ishida, Y and

Tomiyama Y) Springer nature, Singapore, p63-72, 2017.

2. Satoh T, Kuwana M. “Autoimmune Thrombocytopenia” Differential Diagnosis: Secondary ITP. (Editors: Ishida, Y and Tomiyama Y) Springer nature, Singapore, p97-105, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 1 件）

名称：抗トロンボポエチン抗体の検出方法、免疫性血小板減少症の検出方法及びキット

発明者：佐藤隆司

権利者：学校法人 北里研究所

種類：特許

番号：特許第 6085746 号

取得年：2017 年 2 月 10 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/ahs/ml/ketsueki/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。