



# Expression of P62, a putative collagen receptor, on human megakaryocytic leukemia cells

吉田, 明憲

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-11-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1033

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001033>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	よし だ あき のり 吉 田 明 憲 (大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第756号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成3年11月30日
学位論文題目	Expression of P62, a Putative Collagen Receptor, on Human Megakaryocytic Leukemia Cells (巨核球性白血病細胞株におけるP62 - コラーゲンレセプター - の発現)
審査委員	主査 教授 山口 延 男 教授 伊 東 宏 教授 西 塚 泰 美

## 論文内容の要旨

### 緒 言

巨核球性白血病細胞株を用いて、血小板膜糖蛋白(GP)Ⅱb, GPⅢa, GPⅠb, 血小板第4因子(PF-4)等の血小板特異蛋白の遺伝子のクローニングが行なわれ血小板特異蛋白の分子生物学が急速に進歩した。コラーゲンは止血の際の血小板活性化に重要な役割を演じており、機能発現はそのレセプターを介する反応と考えられている。しかし、血小板のコラーゲンレセプターに関する研究は端緒についたばかりで不明な点が多い。我々は、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)患者に血小板のコラーゲンレセプターに結合する自己抗体(P62抗体)を見出し報告したが、今回はこの抗体の認識する抗原の性状の解析と遺伝子クローニングの手掛かりとしてダウン症患児に合併した巨核球性白血病から樹立された巨核球性白血病細胞株(CMK)に発現されているP62抗原の性状の解析を行なった。CMK細胞のP62抗原の分子量は血小板のそれよりも明らかに小さく糖鎖の欠損が示唆された。またCMK細胞ではコラーゲン刺激によるCa<sup>2+</sup>動員機構がないことからCMK細胞上のP62抗原はコラーゲンレセプターとして機能していないことも明らかとなった。

### 実験方法

#### 細胞

CMK細胞とコントロールとして使用したHL-60細胞は10%FBS加 RPMI-1640で培養した。血小板は正常者のものを用いた。

#### P62抗体

P62抗体はITP患者より採取した血漿から Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia, Piscataway, N.J.) を使用してIgG (P62IgG) に精製した。この P62IgG の Fab fragment は正常の血小板のコラーゲン凝集を抑制した。また、不溶性コラーゲンに付着した血小板蛋白は、ウェスタンブロッティング法で P62IgG で認識できたので、P62IgG は血小板のコラーゲンレセプターを認識すると考えられた。

#### フローサイトメトリー

CMK細胞におけるコラーゲンレセプターの発現は P62IgG と GP I a / II a complex に対するモノクローナル抗体を使用して間接蛍光抗体法で測定した。

#### 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化は Fura-2AM を負荷し血小板アゴニストを添加した際の蛍光の変化を dual excitation wavelength spectrofluorometer で測定して求めた。

#### ウェスタンブロッティング

細胞を0.5% Triton X-100 buffer にて溶かし、その可溶上清を通常の SDS-PAGE sample buffer と混合し、還元あるいは非還元下で Laemmli の方法に準じて泳動しニトロセルロース膜に転写後、膜上で P62 plasma と反応させ avidin-biotin-coupled peroxidase で発色させ認識される抗原部位を同定した。

### 実験結果

①約80%のCMK細胞に GP I a / II a 抗原の発現が認められた。巨核球への分化誘導剤である 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 10nM の添加によりその発現は変化しなかった。一方、P62抗原の発現は無処置では約50%の細胞に認められTPAの添加によりその陽性率が約80%まで増加した。この結果からCMK細胞は血小板と同様のコラーゲンレセプター抗原を有しているものと考えられた。

②P62抗体により認識される蛋白は血小板では分子量が還元下で62kDa、非還元下で57kDaであった。これに対してCMK細胞では還元下、非還元下でも分子量が48kDaと43kDaであった。コントロールとして使用したHL-60細胞では48kDaに band が認められ、43kDaの band がP62抗体の認識するCMK細胞の特異的な蛋白であると考えられた。TPA添加によっても43kDaの band の分子量の増加はなかった。

③CMK細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度はトロンビン0.5 U / mlの刺激によって上昇したが、コラーゲン 5  $\mu$  g / ml では変化しなかった。

### 考 察

血小板はコラーゲンとの接触により活性化され止血に重要な役割を果たす。その活性化は血小板上のコラーゲンに対する特異的なレセプターを介して行なわれると考えられており、数種類の血小板蛋白がコラーゲンレセプターの可能性があると報告されている。その中で GP I a / II a がコラーゲン

レセプターとして必須であることについては諸家の見解が一致している。しかし、今回の共同研究者の一人 Okuma はITP患者に血小板のコラーゲンレセプターを認識すると考えられる自己抗体を見出し、その抗体で認識される部位を分子量の大きさからP62と名付け、これが GP I a/II a と同様コラーゲンレセプターとして重要な役割を果たしていることを報告した。引き続き我々は GP I a/II a が正常に存在するにもかかわらずP62抗原の欠損しているコラーゲンに反応しない血小板機能異常症を見出し、P62抗原が GP I a/II a と同様にコラーゲンレセプターとして必須であることを確認した。今回の研究ではまず P62IgG が不溶性コラーゲンに結合した血小板蛋白を認識することをウエスタンブロッティングで確認し P62IgG が血小板のコラーゲンレセプターを特異的に認識することを明らかにした。巨核球性細胞株CMKでのP62抗原をP62抗体で検索すると血小板とは異なった分子量48kDaと43kDaに存在していた。この2つの band が巨核芽球 lineage に特異的かどうかを検討するために骨髓球系 lineage の細胞株HL-60でのP62抗原と比較すると48kDaの蛋白はHL-60にも認められ、43kDaの蛋白が血小板・巨核球 lineage に特異的であるという成績が得られた。これらの蛋白の分子量は血小板で認められるP62抗原の分子量より小さく、CMK上のP62抗原はprecursor というより糖鎖の未熟なものと考えるのが妥当であると考えられた。CMK上のコラーゲンレセプターが機能を持っているかどうかを細胞内Ca<sup>2+</sup>の動員機構から検討するとトロンビンに比較してコラーゲン刺激では細胞内Ca<sup>2+</sup>の上昇がみられなかった。以上よりCMK上のP62抗原は分子量が小さくレセプターとして機能していないことが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

コラーゲンは血小板を活性化させ、トロンボキサン産生や放出反応を惹起するが、これらの現象はコラーゲンレセプターを介する反応と考えられている。コラーゲンレセプターは血小板膜抗原の GP I a/II a, GPIVを含んで、複数あるものと考えられている。最近杉山らは特発性血小板減少性紫斑病(ITP)患者血中にコラーゲン凝集を阻害する自己抗体を発生した例を報告し、その抗体が血小板膜上のP62を抗原とすること、およびP62がコラーゲンと反応して血小板活性化反応を惹起することを証明し、コラーゲンレセプターの一つと推定している。本研究者はこれらの成績をもとにして巨核芽球性白血病細胞株であるCMK細胞を用い、巨核球系細胞の分化・成熟におけるコラーゲンレセプターの発現や機能を解析し、興味ある知見を得た。

実験材料：検索対象として巨核芽球性白血病細胞株であるCMK細胞を用い、対象としてヒト前骨髓性白血病細胞株で、巨核球性性格を有しない細胞株であるHL-60を用いた。試剤として、不溶性および酸可溶性コラーゲン、トロンビン、Fura 2-AM、およびTPAを用いた。

実験方法：さきに述べたコラーゲン凝集能欠損の血小板減少症患者血清を Protein G セファローズ4を用いたアフィニティー・クロマトグラフィー法でIgG(抗P62 IgG)を分離し試剤として用いた。対照は同様にして調整した正常IgGとした。検索対象の細胞は Triton X-100 で可溶化後遠心沈澱し、その上清を SDS-PAGE で泳動し Laemmli の方法で分析した。Immunoblotting には前記

患者血漿（抗P62血漿）を用いABC（avidin-biotin-coupled peroxidase）染色法で検出した。CMK細胞のコラーゲンリセプターの解析には GPIa/IIa に対するモノクローナル抗体および抗P62 IgGを用い、flow cytometry 法で行った。血小板凝集能の測定には aggregometer を用いた。CMK細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定は dual excitation wavelength spectrofluorometer（CAF-100, Nihon Bunko Co.）を用いて行った。

成績と考按：まずGPIa/IIa, P62の2つのコラーゲンリセプターと巨核系分化との関係を検索した。CMK細胞の約80%に GPIa/IIa 抗原の発現が認められたがTPA添加でその発現は変化しないことを見出した。一方 抗P62 IgG による、いわゆるP62抗原の発現はCMK細胞の50%に認められTPA添加で80%まで増加した。この結果から、CMK細胞は血小板と同様のコラーゲンリセプター抗原を有しているものと推定した。しかしCMK細胞の免疫ブロッティングの成績では、抗P62 IgGに反応する抗原は62kDaでなく48kDaおよび43kDaに出現した。また対照のHL-60細胞では48kDaだけが認められた。抗P62 IgG との反応強度から判断して、43kDaが本来の反応物と考えた。すなわち、抗P62 IgG と反応する抗原は血小板では62kDa、CMK細胞ではより分子量の低い、43kDaと判定した。この点を追求するためにTPA添加培養後のCMK細胞を分析したが、43kDa抗原の変動はなく、P62抗原の前駆物質とは考え難いとしている。現在、抗P62 IgG と反応するCMK細胞の43kDa抗原は血小板上に発現するP62抗原の糖鎖の合成が完結していないことによるのではないかと考えている。類似の現象として巨核球上のGPIbは血小板上のものより分子量が小さいことが知られており、糖鎖合成との関係が指摘されている。また、CMK細胞はトロンビン添加では細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇がみられるのに、コラーゲン添加によるCa<sup>2+</sup>動員機構がみられないことからCMK細胞上のP62相当抗原はコラーゲンリセプターとして機能していないことも明らかにした。この現象はCMK細胞におけるP62相当抗原がより低分子量にとどまっていることと関連があるものと推定した。

本研究は血小板のコラーゲンリセプターの同定および巨核球分化における発達について、特異なITP患者の自己抗体の性状の解析と巨核球性白血病細胞株への適用を介して研究したもので、従来ほとんど行われなかった、巨核球・血小板系細胞におけるコラーゲンリセプターの多様性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。