

## 血小板粘着障害の臨床

岡村, 孝  
九州大学大学院医学研究院病態修復内科学

<https://doi.org/10.15017/7218230>

---

出版情報：福岡医学雑誌. 92 (4), pp.80-88, 2001-04-25. Fukuoka Medical Association  
バージョン：  
権利関係：



---

## 解 説

---

### 血小板粘着障害の臨床

九州大学大学院医学研究院病態修復内科学

岡 村 孝

#### 1. はじめに

血小板は、血管内皮細胞剥離部では内皮下組織に接して粘着をきたし、続いて凝集反応を惹起することによって1次止血が成立する。この粘着凝集機構には、多くの血漿蛋白や血小板膜蛋白が関与し、それぞれの遺伝子異常や後天的原因によって出血傾向を生じる。血小板粘着障害をきたしうる最も多い病態は、血小板減少症であり、造血不全（再生不良性貧血、骨髓異形成症候群など）、自己免疫（特発性血小板減少性紫斑病）あるいは血栓形成に伴う消費（血栓性血小板減少性紫斑病、汎発性血管内凝固症候群など）などによって発症する。ここでは、主に血漿蛋白である von Willebrand 因子（vWF）の異常である von Willebrand 病（vWD）と血小板膜蛋白である糖タンパク GP Ib/IX/V 複合体の異常である Bernard-Soulier 症候群（BSS）の病態について述べる。

#### 2. 血小板粘着機序および血栓形成機序

血管内皮細胞表面では、血液の流動性を保つためいろいろな分子がそれぞれの役割を果たしている。しかし、内皮細胞が機能的あるいは機械的に障害を受けた場合、血液細胞および血漿蛋白が相互に作用しあって血管壁を修復する機構が働く<sup>5)</sup>。血管内皮細胞が剥離した部での血小板粘着および凝集を模式化したのが図1である。血漿蛋白である vWF が内皮下組織に存在するコラーゲンと接すると、血流のずり応力に依存して vWF がコラーゲンに結合し、この vWF を認識し血小板が粘着する。vWF は血小板膜蛋白である GPIb/IX/V 複合体あるいは GPIIb/IIIa 複合体（インテグリン  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ）と結合し、このシグナルが血小板内に伝達され血小板濃縮顆粒からの ADP やトロンボキサン  $A_2$  などが放出されるとさらに血小板膜蛋白 GPIIb/IIIa 複合体が表面に露呈するようになりこれがフィブリノゲンの受容体となり血小板凝集が生じる。また、血小板膜蛋白 GPIa/IIa（インテグリン  $\alpha_2\beta_1$ ）あるいは GPVI は直接コラーゲンと結合する。このように血小板粘着・凝集がおこると血小板膜リン脂質組成も変化し、ミクロバーテイクルの放出も起こり、血液凝固活性化反応の場を提供することとなり血栓形成が出現する。内皮下組織に存在し、単球や内皮細胞表面に発現した組織因子が引き金となり産生されたトロンピンは、局所的な血栓形成や血小板活性化をきたし血小板の凝集放出反応が増幅される。また、血小板  $\alpha$  顆粒から各種増殖因子や凝固線溶因子も放出され内膜肥厚や中膜平滑筋増殖などの動脈硬化性病変の形成ならびに血管新生にも関与することが考えられる。

#### 3. von Willebrand 因子（vWF）および von Willebrand 病（vWD）

vWF は、分子量 275 kD の糖蛋白で血漿中には約 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で存在する。産生細胞は血管内皮細胞が主体であり、vWF プロトマーは、Golgi で糖鎖の付着や sulfation を経て、post Golgi でマルチマー形成（ジスルフィド結合）および vWF antigenII が切断され、内皮細胞の Weibel-Palade 小体に蓄積されている。vWF は、炎症性サイトカインや、アドレナリン・バゾプレッシンなどのホルモンの刺激で血中へ放出される（図1）。また、vWF は

---

Takashi OKAMURA

Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

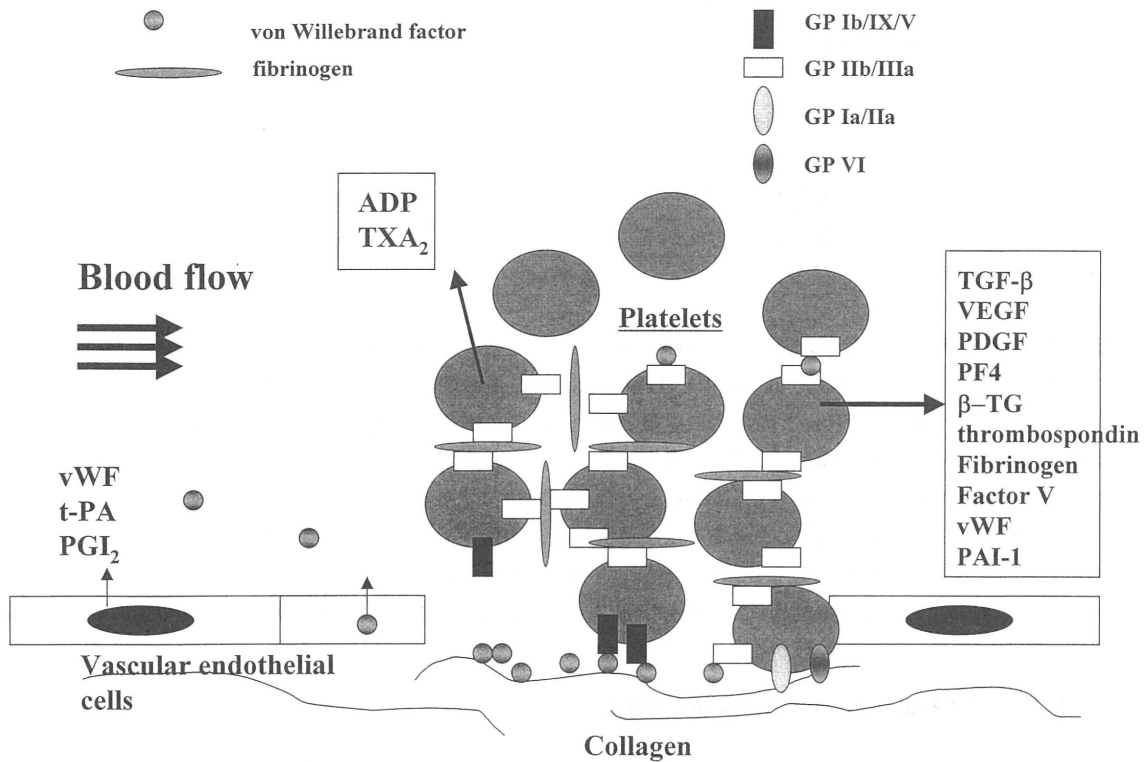


図1 血小板粘着・凝集機序

血小板  $\alpha$  顆粒にも存在している。血漿において巨大な VWF マルチマーは、メタロプロテアーゼである vWF cleavage protease で適度の構造に分解され、血小板粘着・凝集反応および凝固第 VIII 因子のキャリアーとして機能している。vWF 遺伝子は、染色体 12 p 12-pter に存在し、178 kb に及ぶ巨大な遺伝子で 52 のエクソンからなっている。また、22 番染色体長腕には偽遺伝子が存在し、97% の相同性を有しているため遺伝子解析を困難にしている<sup>3)</sup>。2,050 個のアミノ酸からなる成熟単一 vWF は、N 末から VIII 因子結合部位、GPIb $\alpha$  結合部位、コラーゲン結合部位および C 末近傍 1,744-1,747 にインテグリンと結合する RGDS 配列があり、各ドメイン構造を呈している。

vWD は、vWF 遺伝子異常に伴う vWF の質的および量的異常をきたし、先天性の出血傾向を呈する疾患である。主に常染色体優性遺伝形式をとる。分類は、表 1 のように量的低下をきたす type 1 と、質的異常をきたす type 2 があり、いくつかの subtype に分類される。完全欠損をきたす重症型が type 3 であり、劣性遺伝である<sup>6)</sup>。診断は、出血時間の延長と活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の軽度延長でスクリーニングされ、vWF 活性、vWF 抗原量、第 VIII 因子活性、リストセチン惹起血小板凝集能ならびにマルチマー解析結果で vWD の診断と分類が一般的には可能である。

われわれは、type 2B vWD 患者 3 名の遺伝子解析を行い、その変異部位を同定した<sup>1)</sup>。Type 2B は、血小板膜糖蛋白 GPIb $\alpha$  との親和性が亢進という機能異常を呈するもので臨床的にはリストセチン惹起血小板凝集が亢進することで診断できる。このためパゾプレッシン誘導体である DDAVP 投与により血管内皮細胞に貯蔵されている異常 vWF が放出されるため血小板を凝集させ、著明な血小板数の低下をきたす (図 2)。vWF の GPIb $\alpha$  結合部位は A1 ドメインであり、509 Cys と 695 Cys の間のジスルフィド結合によって形成されるループ構造が重要であるといわれている (図 3)。よって A1 ドメインを PCR で増幅し塩基配列を決定することによって type 2B の遺伝子解析は

表 1 von Willebrand 病の分類

| type | vWF の性状      | vWF マルチマー構造 | 遺伝形式  |
|------|--------------|-------------|-------|
| 1    | 量的低下         | 異常なし        | 優性    |
| 2A   | GPIb 結合能の低下  | 高分子欠如       | 優性・劣性 |
| 2B   | GPIb 結合能亢進   | 高分子欠如       | 優性・劣性 |
| 2M   | GPIb 結合能低下   | 高分子欠如なし     | 優性・劣性 |
| 2N   | VIII 因子結合能低下 | 問わず         | 優性・劣性 |
| 3    | 完全欠損         | 欠損          | 劣性    |

可能である。われわれの症例では、545 Arg → Cys のヘテロミスセンス変異が 2 例と 553 Val → Met のヘテロミスセンス変異が 1 例であった (図 3)。Type 2B vWD では、この他の部位のアミノ酸置換でも同じ表現系がみられ、ある特定のアミノ酸のみが GPIb $\alpha$  との結合に重要ではなく、この部位の構造変化が流速負荷により機能ドメインの表面への露出につながり GPIb $\alpha$  との結合を容易にすると説明されている。また、これらのアミノ酸置換がホモ接合体であろうとヘテロ接合体であろうと GPIb $\alpha$  との親和性は同じであることが in vitro 発現系で証明されている。553 Val → Met 症例は、経過中妊娠し、分娩方法を選択するため胎児の子宮内遺伝子診断を行った。妊娠 39 週で子宮内胎児臍帯血を採取し有核細胞から DNA を調整し、PCR 増幅 DNA を AccII による allele specific restriction analysis (図 4) および DNA 塩基配列決定を行い、胎児は異常遺伝子を持たず正常型アレルのみであることが判明し、母体の出血管理のもと正常分娩が施行できた。

#### 4. vWF 受容体および Bernard-Soulier 症候群

血小板膜には多くの膜蛋白が存在し、それぞれのリガンドに対する特異的な受容体として機能している。vWF に対する受容体として GPIb/IX/V 複合体がある。この複合体は、図 5 のように GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX および GPV の 4 つの膜蛋白からなり、7 個のペプチドが一つの受容体機能単位を形成している。これらの膜蛋白は、共通構造として細胞外ドメイン N 末に leucine rich repeat (LRR) を持つが、この機能についてはまだ不明である。vWF と結合するのは GPIb $\alpha$  の N 末領域である。GPIb $\alpha$  は、分子量 140 kD の糖蛋白で N 末が細胞外で、N 末から LRR、糖鎖付着部、膜貫通部および細胞内ドメインからなり、GPIb $\beta$  と膜直上部でジスルフィド結合している。また一部は膜直上部で calpain などの蛋白分解酵素により切断され細胞外ドメインがグリコカリシンとして血漿中に存在している (図 6b)。vWF が GPIb $\alpha$  に結合し、続いて起こる GPIIb/IIIa の露出などの細胞内イベントとしての血小板活性化メカニズムについての詳細は不明である。GPIb $\alpha$  遺伝子は染色体 17 p 12-pter に存在しアミノ酸をコードする領域は単一エクソン (約 2 kb) からなっている。GPIb $\beta$  は第 22 番染色体、GPIX 遺伝子は第 3 番染色体にあり、いずれもアミノ酸翻訳領域は単一エクソンからなり、非常に短い遺伝子である (図 6a)。これら複合体蛋白が蛋白構造だけでなく遺伝子構造も類似性をもつことは興味ある点である。

Bernard-Soulier 症候群 (BSS) は、この GPIb/IX/V 複合体が膜に欠如した先天性出血性疾患 (常染色体劣性遺伝) であり、血小板機能異常症としては、血小板無力症に次いで多い。ヘテロ接合体では出血傾向はみられず正常表現系である。BSS は、臨床的に出血時間の延長、血小板数低下および巨大血小板の存在が特徴であり、次いでリストセチン惹起血小板凝集の欠如、血小板膜フローサイトメトリーにより GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX, GPV の欠如をみることで確定診断可能である。ときに特発性血小板減少性紫斑病と診断されて副腎皮質ステロイドホルモン剤投与や摘脾などが施行されることもあるので末梢血のスメア標本をよく観察し巨大血小板の存在に注意することが重要である。BSS の責任遺伝子としては、GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  および GPIX のいずれかであるが、現在のところ GPV 遺伝子異常による BSS の報告はない。これらの一つの遺伝子異常に伴う蛋白発現欠如により他の複合体蛋白の膜発現も低下するため、機能分子としての複合体は全体として欠損することになる。

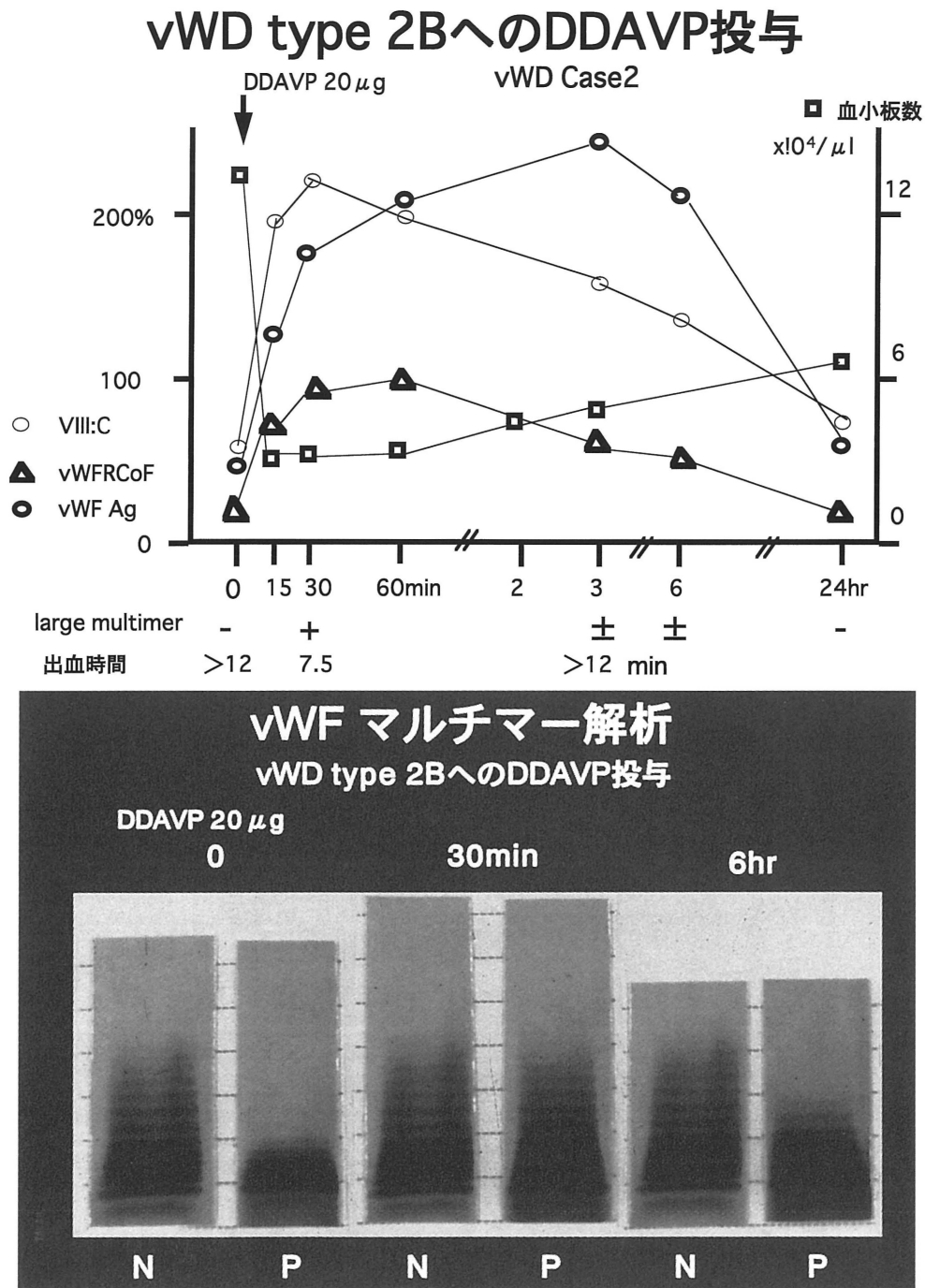


図2 vWD type 2B 患者への DDAVP 投与  
 上. DDAVP 投与後の臨床検査値の変動  
 VIII:C: 第 VIII 因子活性, vWFRCoF: vWF 活性, vWF Ag: vWF 抗原量  
 下. DDAVP 投与後の vWF マルチマーパターン (SDS アガロース泳動)  
 N: 正常者血漿      P: vWD type 2B 患者血漿

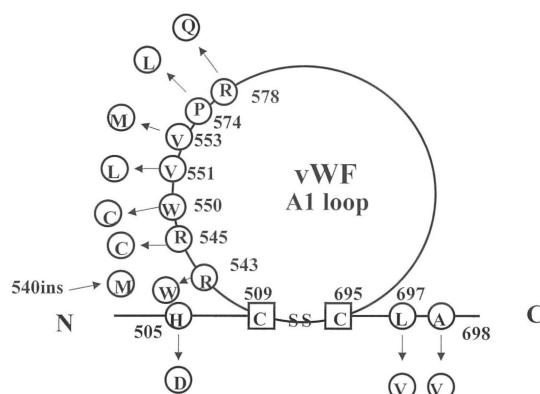


図3 vWF A1ドメイン構造とvWD type 2B症例における変異部位



図4 vWD type 2B 患者児の出生前遺伝子診断  
正常者、患者およびその胎児 DNA を AccII で切断し、アガロース電気泳動を施行。患者のみがヘテロ接合体であり、児は正常であった。

われわれは、遺伝子解析で確認した2例の GPIb $\alpha$  異常および2例の GPIX 異常を経験し、病態を解析した。それぞれの欠損症代表例のフローサイトメトリーパターンを図7に示す。GPIb $\alpha$  欠損例と GPIX 欠損例において、複合体膜蛋白モノクローナル抗体を用いて膜上での発現量を検討すると、責任蛋白の完全欠損と複合体蛋白全体の発現量が減少するのは当然であるが、GPIb $\alpha$  欠損例では GPIX はかなり残存しているが、反対に GPIX 欠損例では GPIb $\alpha$  や GPV はわずかに存在しているにすぎない。GPV は、その膜での存在に GPIb $\alpha$  が必須であることが知ら

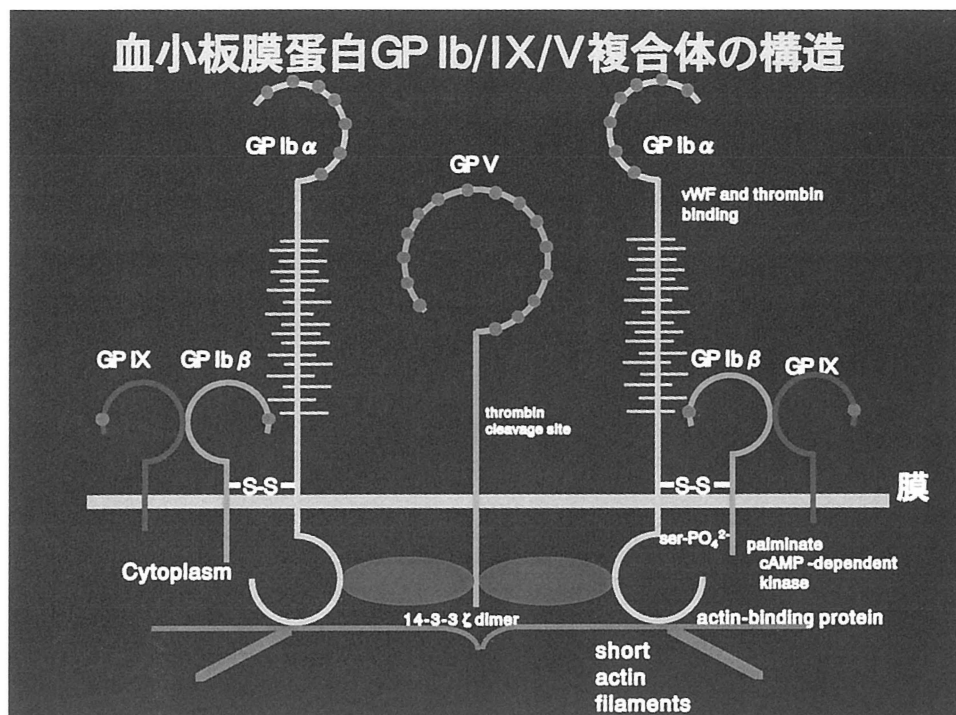


図5 血小板膜蛋白  
GPIb/IX/V 複合体の構築モデル

れ、GPIb $\alpha$  欠損例ではほとんど発現がみられないが GPIX 欠損例では GPIb $\alpha$  が部分的に存在しているため GPV も膜発現がみられるものと解釈される。さらに GPIb $\alpha$  の複合体形成には GPIb $\beta$  と GPIX の存在が必要である、このように膜蛋白複合体形成にも hierarchy が存在することが考えられ、フローサイトメトリーでの発現パターンをみることにより BSS 責任遺伝子が推定可能である<sup>2)</sup>。

GPIb $\alpha$  欠損を示す BSS 症例 1 では、塩基番号 972-975 の TGTG 繰り返し配列が 2 塩基欠失するホモ接合体であり、frameshift をきたし stop codon ができるため膜貫通部をもたない truncated form となる。このタイプでは Western blot で血漿中および血小板内にも GPIb $\alpha$  抗原は存在しなかったため巨核球での細胞内分解経路で処理されて膜蛋白形成障害をきたしたものと考えられる。症例 2 は、複合ヘテロ接合体であり、母より 1,438-1,444 の連続した 7 個の A のうち一つが欠失した allele を、父より 1,418 に T の一塩基挿入した allele を受け継ぎ、両方の allele も膜直上部で frameshift をきたし C 末に異常ペプチドが付着した分子の形成が予想される。このタイプでは、血漿および血小板内には GPIb $\alpha$  様抗原は存在し、膜を素通りして血漿中に分泌されるものと考えられる (図 6b)<sup>2)</sup>。

一方, GPIX 欠損例の 2 例ではどちらもホモ接合体で, 73 Cys → Tyr の missense mutation と 126 Try → Stop の nonsense mutation であった. 73 Cys → Tyr の発現実験でも膜に GPIX の存在はみられず, 構造異常により細胞内分解機構により処理されるものと解釈される.

BSS では、なぜ巨大血小板が産生されるのか現在も不明である。巨大血小板は、GPIb/IX/V 欠損だけでなく、nonmuscle myosin heavy chain 9 遺伝子異常で発症する May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome あるいは Fechtner syndrome などでもみられ<sup>7)</sup>、これらの蛋白欠損と巨大血小板生成との関わりについて興味を持たれる。

われわれは、BSS だけでなく血小板無力症を含めた先天性血小板機能異常症において消化管 angiodysplasia を合併し、重篤な消化管出血をきたすことを報告した。切除小腸の組織像をみると粘膜下層に不規則に拡張・蛇行し

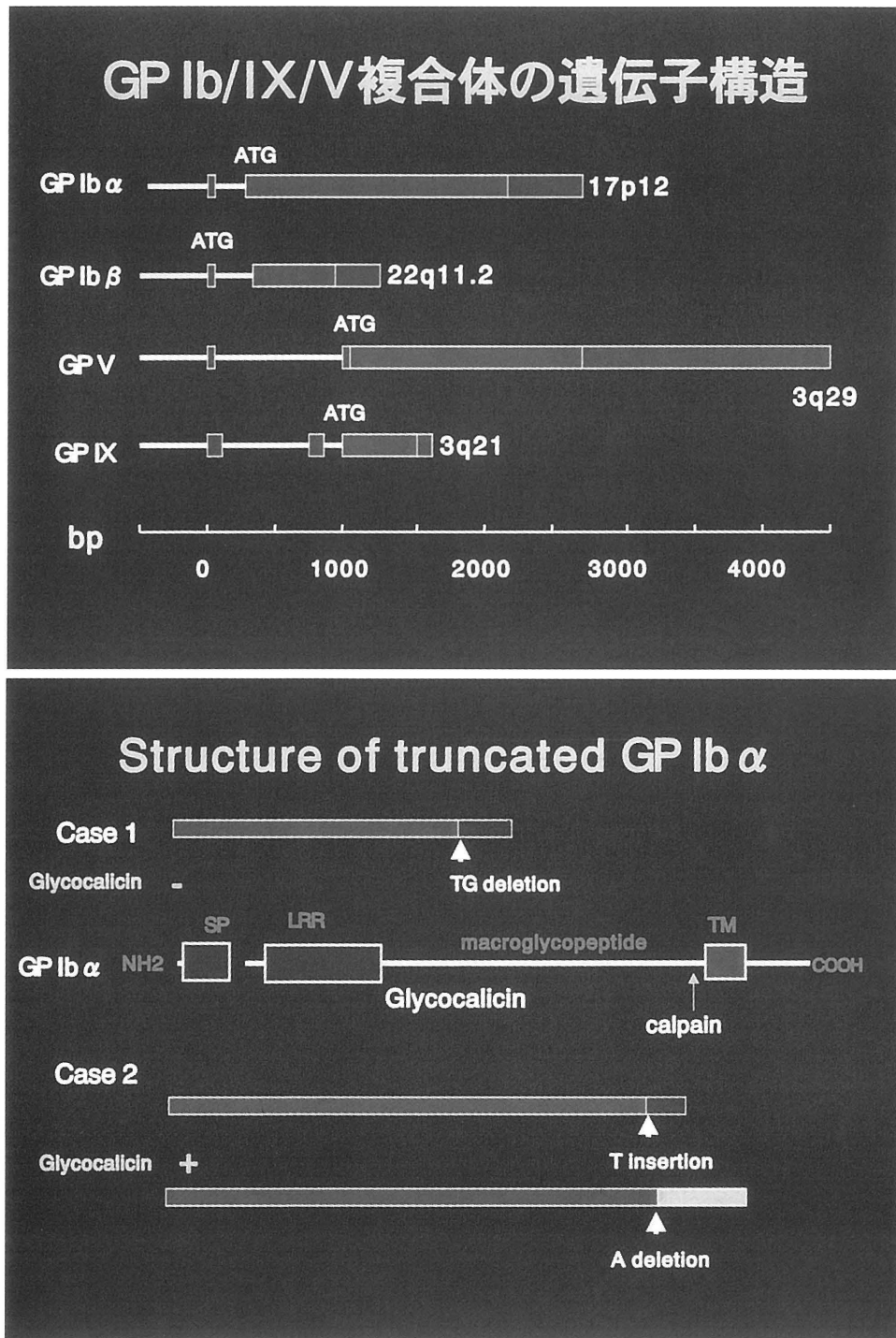


図6 血小板膜蛋白  
GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX および GPV の遺伝子構造, ならびに正常 GPIb $\alpha$  および BSS 患者異常 GPIb $\alpha$  蛋白の構造



# BSS患者血小板膜蛋白 フローサイトメトリー解析

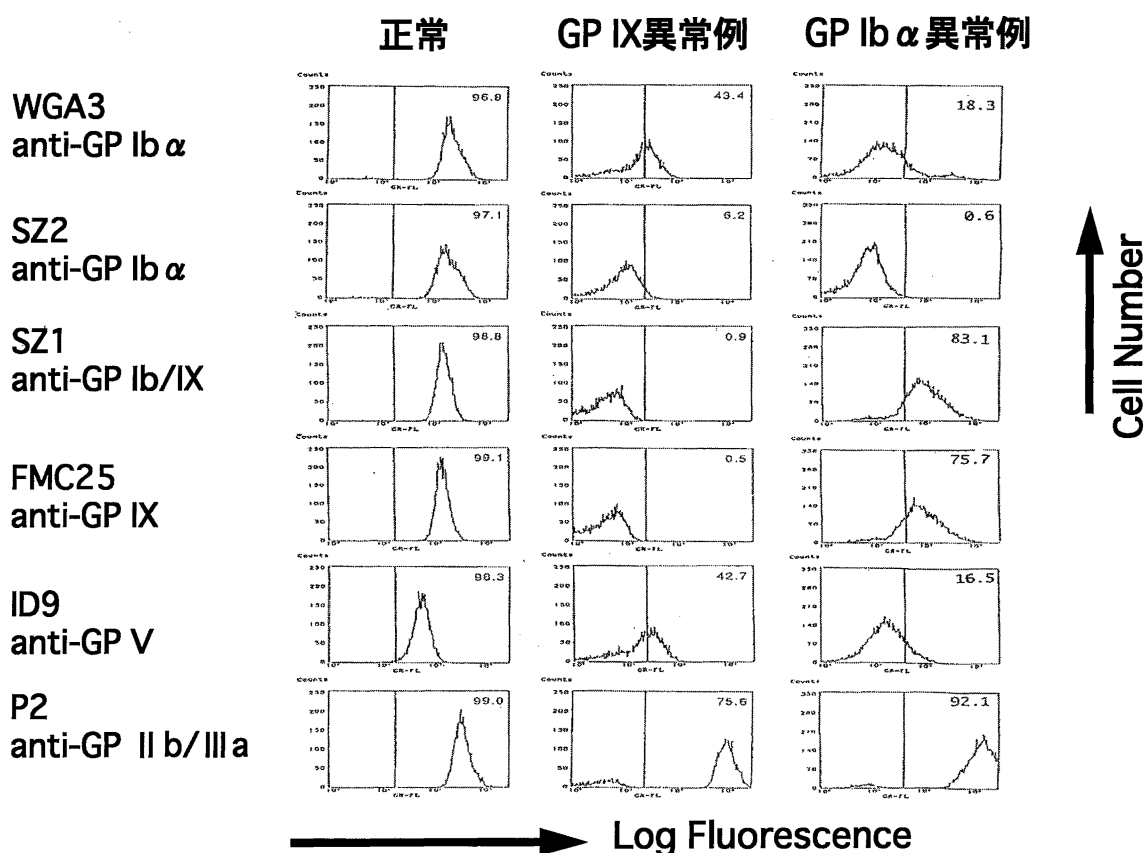


図7 正常者およびBSS患者代表例の血小板膜蛋白発現パターン

た血管が増加し、壁が薄く一部破綻している像がみられた(図8)。消化管 angiodysplasia は、以前より vWD において高率に合併することが知られ、血小板粘着現象が血管の修復や新生にも関与する可能性が示唆された<sup>4)</sup>。

## 5. おわりに

近年、相同組替え技術により GPIb $\alpha$  遺伝子の knock out マウスが報告された<sup>8)</sup>。予想どおりヒトにおける BSS と同じ表現系を呈し、モデル動物として使用できるようになった。もっとも期待される成果は、遺伝子治療による BSS の治癒が可能であるか？ということであろう。現時点での臨床応用に関しては、ベクターを含めた造血幹細胞への遺伝子導入効率および安全性の問題、巨核球系への特異的発現系の確立、遺伝子導入幹細胞の増幅技術、移植前処置の安全性の問題など、さまざまなクリアすべき問題点が多々ある。その他にも、vWF と GPIb $\alpha$  との結合機作、GPIb/IX/V 複合体からの血小板活性化シグナルの解明および巨大血小板形成機序などの分野で今後の研究が進むであろう。これらの基礎的研究の進歩により臨床的にも血栓予防、血栓症治療さらには動脈硬化の予防などの分野



図 8 BSS 患者症例 2 における切除小腸の組織標本 (HE 染色, X100)

への応用が大いに期待される。

## 6. 謝辞

本研究は、九州大学名誉教授仁保喜之教授のご指導のもと、九州大学第一内科金地泰典君、村川昌弘君、大崎浩一君および黒岩三佳君とともに行った。また、広島大学藤村欣吾先生にはフローサイトメトリーでご協力いただいた。

## 文 献

- 1) Kanaji T, Okamura T, Kuroiwa M et al.: A sequence analysis of von Willebrand factor mRNA, gene and pseudogene in two patients with von Willebrand disease type 2B, and investigation of gene conversion in its gene. *Int J Hematol* 64: 53-59, 1996.
- 2) Kanaji T, Okamura T, Kuroiwa M et al.: Molecular and genetic analysis of two patients with Bernard-Soulier syndrome. Identification of new mutations in glycoprotein Ib $\alpha$  gene. *Thromb Haemost* 77: 1055-1061, 1997.
- 3) Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA et al.: Human von Willebrand factor gene and pseudogene: structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 30: 253-269, 1991.
- 4) Okamura T, Kanaji T, Osaki K, et al.: Gastrointestinal angiodysplasia in congenital platelet dysfunction. *Int J Hematol* 656: 79-84, 1996.
- 5) Ruggeri ZM: Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 78: 611-616, 1997.
- 6) Sadler JE: A revised classification of von Willebrand disease. For the subcommittee on von Willebrand factor of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. *Thromb Haemost* 71: 520-525, 1994.
- 7) Seri M, Savino M, Heath KE et al.: Mutations in *MYH9* result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. *Nature Genetics* 26: 103-105, 2000.
- 8) Ware J, Russell S and Ruggeri ZM: Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: The Bernard-Soulier syndrome. *PNAS* 97: 2803-2808, 2000.