



Bernard-Soulier 症候群

藤村 欣吾*¹, 藤元 貴啓*¹, 下村 壮司*²

Bernard-Soulier Syndrome

Kingo FUJIMURA*¹, Takahiro FUJIMOTO*¹, Takeshi SHIMOMURA*²

Key words : platelet function abnormality, GPIb/IX/V Complex, gene analysis, knock-out mouse, vWF receptor function

1. 概念・歴史

Bernard-Soulier 症候群は 1948 年 Bernard と Soulier によって出血時間延長, 大型血小板を伴う血小板減少を認め, 先天的に出血傾向を示す若年男性が報告されたことに始まる。以来同様な症例が報告され, 多くが常染色体性劣性遺伝形式を取り血族結婚が認められる家系が多い。本症候群の血小板については 1969 年 Grottum と Solum によって膜のシアル酸が減少していることによって電気泳動度が遅いことが示され, 1973 年には Howard や Caen らによってリストセチン凝集能がフォンウィルブラント病と同様に低下ないし欠如していることが明らかにされた。1974 年には Weiss らがウサギ大動脈内皮下組織への粘着障害を報告し, フォンウィルブラント因子 (vWF) に対するレセプターの欠如を推測した。その後ウシ vWF に対する血小板凝集の欠如を始め多くの血小板の質的異常が報告された。1975 年 Nurden らは血小板膜蛋白の SDS-PAGE を行い, PAS 染色陽性の

3つの主要血小板膜糖タンパクの内 GPI が欠損していることを明らかにした。このことは多くの研究者によって確認されると共に Clemetson らは合計 4 つのポリペプチド (GPIb α , GPIb β , GPIIX, GPV) が欠損している事を示した。以後 GPIb/IX/V 複合体が vWF レセプターと同定され, 本症は vWF レセプターの欠如ないし機能障害と考えられている。本症については最近 2 つの総説が相次いで発表されているので参照されたい¹⁾²⁾。

2. 病態・遺伝子解析

1) 病態と臨床症状

BSS の病態は, vWF に対する血小板膜受容体 GPIb/IX/V 複合体の欠如, 低下あるいは機能異常によって一次止血の初期段階である血小板粘着反応が障害される結果, 幼少時より出血傾向を来す, 常染色体劣性遺伝形式をとる血小板機能異常症の 1 つである。家族歴に血族結婚が認められることが多い。

*¹ 広島大学大学院医学系研究科病態薬物治療学講座 [〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3]
Department of Clinical Pharmaceutical Science Graduates School of Medicine [1-2-3 Kasumi Minami-ku Hiroshima 734-855 Japan]

*² 広島大学医学部付属病院血液内科 [〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3]
Department of Clinical Hematology, Hiroshima University Hospital [1-2-3 Kasumi Minami-ku Hiroshima 734-8551 Japan]
Tel. 082-257-5298, 5295 Fax. 082-257-5299 e-mail : fujimot@pharm.
hiroshima-u.ac.jp, fujimura@pharm.hiroshima-u.ac.jp

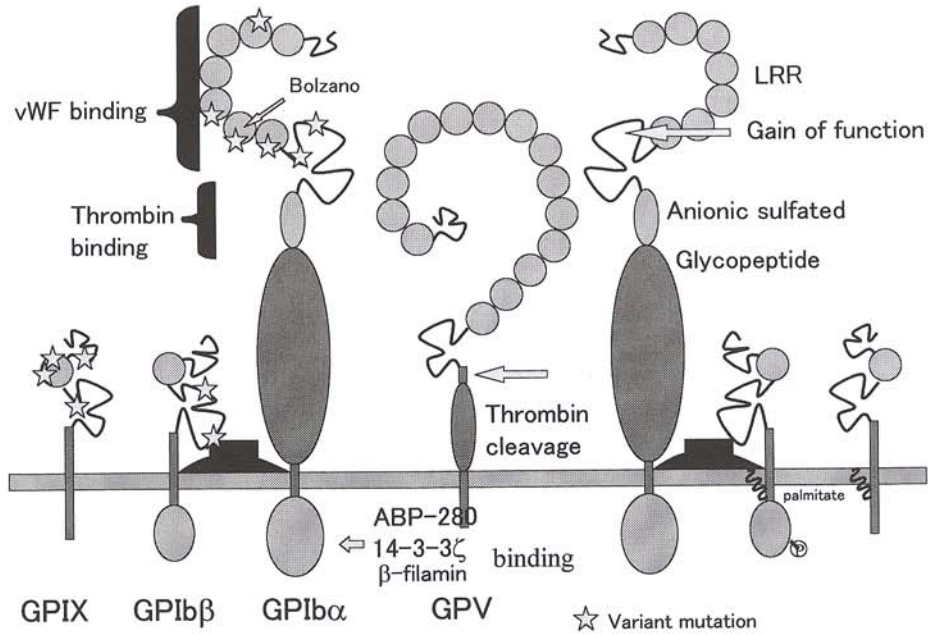


図1 GPIIb/IIIa/V複合体の構造と主な遺伝子異常部位

臨床検査上血小板粘着障害による出血時間の延長、巨大、ないし大型血小板を伴う血小板減少を示す。血小板機能検査では血小板粘着反応低下、リストセチン、ボトロセチン凝集消失ないし低下、ADP、エピネフィリン、コラーゲン凝集は正常、トロンビン凝集遅延が認められる。FCM、免疫プロットによる血小板膜蛋白の解析では variant 型を除いて、GPIIa、GPIIb、GPIIX、GPV がいずれも程度に差はあるが認められないか減少している。

血小板機能異常を伴っているため血小板数の割合に出血傾向が激しい。機械的な外力が加わる場合は勿論であるが自然に出血することも多い。皮下出血は日常認められるが、鼻出血、歯肉出血、生理出血の遷延、止血困難などが多い。

発症頻度は定かでないが100万人に1人以下との報告がある。

2) 遺伝子と遺伝子解析

GPIIb/IIIa/V複合体は4つのそれぞれ異なる遺伝子により支配を受けたサブユニット GPIIa (染色体17p12)、GPIIb (22q11.2)、

GPIIX (3q21)、GPV (3q29) から構成されている4量体で、おのおのの構成比は2:2:2:1である事がモノクローナル抗体の結合実験に基いて明らかにされている³⁾⁴⁾。coding sequenceは4つのサブユニットの内 GPIIb を除いていずれも1本のエクソンから成り立っている。GPIIbには coding sequenceの開始後10塩基のイントロン1つが認められている。これらのプロモーター領域には巨核球系-赤芽球系への分化に重要なGATA、あるいはETS等が結合するが、GPVを除いてTATAボックスやCAATボックスは認められていない。GPVにはTATAボックスが存在する。

4つのサブユニットはロイシンに富んだ24個のアミノ酸の繰り返し構造、すなわちロイシンリッチリピート構造(LRR)を有しており、その数は GPIIaには7個、GPIIb 1個、GPIIX 1個、GPVに15個存在することも特徴である⁵⁾(図1)。

BSS症例の遺伝子解析は質的異常を示す例(variant型)はおのおののサブユニットの機能

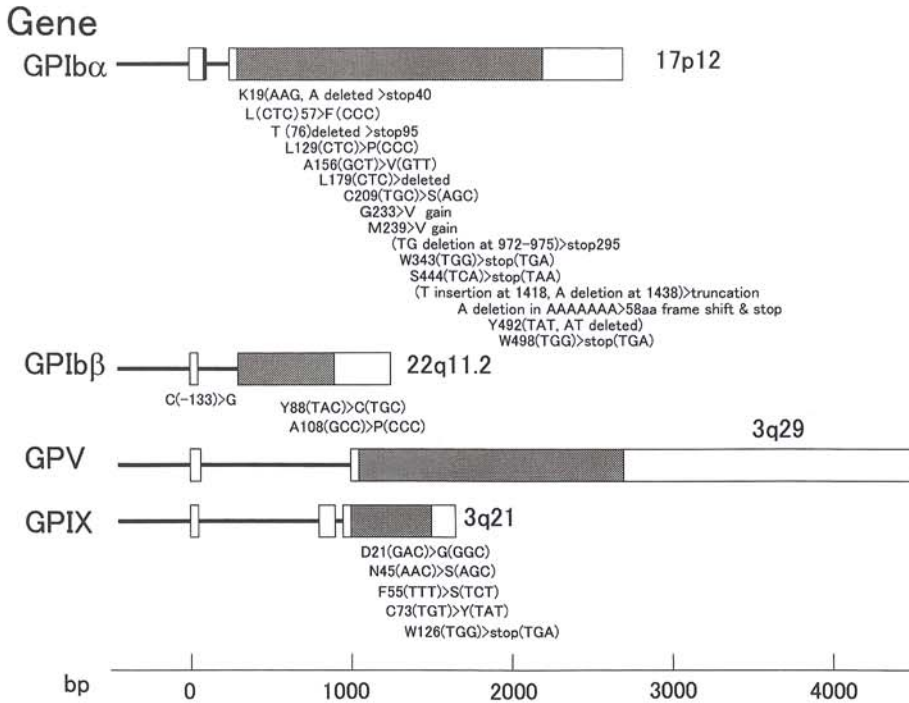


図 2 報告されている主な遺伝子異常部位

ドメインの解明に、量的異常を示す例は GPIIb/IX/V 複合体の形成過程と膜上への発現機構の解明に大きな貢献を果たしている。量的異常を示す症例では、4つのサブユニットのうち1つに遺伝子異常が生じた結果、ほかのサブユニットは正常であるにもかかわらず、細胞内で複合体形成不全が起こり膜上へのサブユニットの発現が行われないうちに、GPIIb, IX, V が消失ないし減少すると考えられている。

現在までに多くの症例の遺伝子解析がなされた結果、GPIIb α , GPIIb β , GPIX に欠失、挿入によるフレームシフト、点変異の結果によるナンセンスミューテーション、ミスセンスミューテーション等遺伝子異常は多様であることが判明した。しかしながら GPV に遺伝子異常の認められた BSS 症例の報告はない (図 2)。

(1) 質的異常 (variant 型)

GPIIb α には従来より N 末から 300 残基の間に vWF の A1 ドメインやトロンピンとの結合部位が存在することが知られていた (図 1)。

このうち陰性荷電を示す N 末から 269~287 内の 3 つのチロシン残基が硫酸化されている部位や Cys 248-Cys 209, Cys 264-Cys 211 の S-S 結合、およびロイシンリッチリピート (LRR) 構造が大切であるとされている。

LRR 構造内での変異を持つ BSS 症例においては (第 1 LRR 内の Leu 57→Phe 置換で唯一常染色体性優性遺伝例, 第 6 LRR 内の Ala 156→Val~Bolzano 型) GPIIb/IX/V 複合体が少なからず膜表面へ発現しているにも関わらず vWF との結合能が低下している⁶⁷⁾。

第 5 LRR 内の Leu 129→Pro 症例ではリストセチン凝集が障害されているが、血小板表面への GPIIb/IX/V 複合体の発現、ならびに vWF 結合は 40%程度認められている。第 7 LRR 内の 3 塩基欠失による Leu 179 の欠損例も報告されている (Nancy I)⁶⁸⁾。

LRR 構造はブタのリボヌクレアーゼインヒビターの結晶解析結果を基に推測され、 α ヘリックス構造が外側を形成し、 β シート構造が内

側を形作る結果馬蹄形をとり、目的の蛋白との結合表面を大きくしている構造が推測されている。従って GPIb α の LRR 構造内のアミノ酸の置換は立体構造に変化をもたらす vWF との結合を障害するものと考えられる。

しかし Bolzano 型の解析結果は、トロンビン結合が正常であることからロイシンリッチリピート構造は vWF の結合に重要であるがトロンビンの結合には関与しないことが類推されている。

この他 Trp 498 \rightarrow stop の変異ではほかの膜貫通領域を欠いた変異に比べ GPIb β と結合する領域を含み、さらに膜貫通領域を一部保持しているが細胞内ドメインが認められない変異であるためにシグナルが伝達されないと考えられている。従って GPIb α の細胞内ドメインは GPIb/GPIX の膜上への発現には重要ではないと思われる。

(2) 量的異常

GPV を除いたそれぞれのサブユニットについて多様の異常例が報告されている。いずれも細胞内でのサブユニット間の複合体形成が行われず細胞内で変性、処理されたり、膜貫通部位の異常によって膜への挿入不全のために血小板膜上への発現が消失ないし低下する例が多い。GPIX や GPIb β に遺伝子異常のある BSS 症例では、GPIb α の発現が極端に低下しているのに対し、GPIb α に異常のある症例では GPIX や GPIb β の発現が少ないが認められ、GPV はいずれの異常においても発現は低下しているが完全欠損例はない。このことは GPIb/IX/V 複合体の細胞内での形成、血小板膜への発現には GPV の関与は少なく、GPIX や GPIb β が重要であることが推測された。

これらサブユニット遺伝子を CHO 細胞へ遺伝子導入し複合体の再構成実験系が行われた結果、GPIX と GPIb β 、GPIb α と GPIb β はそれぞれ GPIb α や GPIX がなくても結合が見られるのに対し、GPIb α と GPIX は GPIb β が存在しないと結合が見られないことが明らかとなっ

た。つまり GPIb β が GPIb α と GPIX の間に介在することが複合体の形成、安定化に重要であり、GPV の介在は GPIb α のトロンビンの結合親和性を高めるのに必要であるとされた。

GPIb β の変異についても報告が増している。最初に報告されたのは DiGeorge/Velo-cardio-facial 症候群に BSS 所見を示した症例で、GPIb β が局在する一方の 22q11.2 が欠失し DiGeorge/Velo-cardio-facial 症候群を呈し、これとあいまって他方の GPIb β 遺伝子のプロモーター領域で転写因子 GATA-1 が結合する部位-133 の点突然変異 (C \rightarrow G) により BSS が発症したものである⁹⁾。転写部位に異常が認められた初めての症例である。この他 Thy 88 \rightarrow Cys, Ala 108 \rightarrow Pro の 2 つの変異を認めた double heterozygote 症例、シグナルペプチド領域に 13 塩基の欠失を認めた症例、Thy 88 \rightarrow Cys の homozygote 症例が 2 家系報告されている¹⁰⁾。これらの症例では GPIb β を始めとして GPIb α 、GPIX も著減している。

GPIX に関しては LRR 領域のコドン 21 の A \rightarrow G による Asp \rightarrow Gly とコドン 45 の A \rightarrow G による Asn \rightarrow Ser 変異に基づく double heterozygote 症例では GPIb、GPIX の発現は認められず、GPIX の LRR は GPIb β との結合に重要であると類推され、その後 Asn \rightarrow Ser のホモの症例に基づく発現実験で確認されている。この他 Cys 73 \rightarrow Tyr 変異例、Cys 97 \rightarrow Tyr 変異例が報告されいずれも発現実験でサブユニットの発現異常が確認されている¹¹⁾¹²⁾。

3. 症例・家系の提示・症状・検査所見・ノックアウトマウスでの成績と整合性

1) 自験例の病歴・症状・検査所見・遺伝子解析症例: 26 歳, 女性。

病歴: 2 歳時より出血傾向があり某病院にて血小板減少があることより ITP と診断され副腎皮質ステロイド療法を受けていた。しかし血小板数は増加せず、15 歳時月経出血が止まら

ず血小板輸血を受け、以後度々血小板輸血を必要としていた。16歳時リストセチン凝集低下、GPIbの欠損が判明しBSSと診断された。抜歯時の止血管理目的にて来院。

家族歴: 両親は血族結婚。3人兄弟のうち妹にも同様の症状がありBSSと診断されている。ほかに出血傾向を示すヒトはいない。

現症: 打撲時の紫斑以外特記すべきことなし。

検査所見: 白血球数5,800, 分類に異常なし。Hb 12.5 g/dl, 血小板数3.8万, 標本上巨大血小板を認める。MPV 17.3, リストセチン凝集能欠如, 血小板FCM解析—各種GPIb α , GPIb/IX, GPIX, GPVモノクロナール抗体に対して反応低下ないし欠如(図3, 4)。GPIIb/IIIa抗体に対する反応は正常。同様の所見は妹にも認められたが、両親、弟は正常であった(図5)。ウエスタンブロットイングにて本症例、妹、いずれにおいても抗GPIb α , 抗GPVと反応するバンドは認められなかった。肝機能異常は認めなかったが輸血によると思われるHCV抗体陽性である。

遺伝子解析結果は図6に示す。452番目のアミノ酸をコードする1塩基が欠損した結果フレームシフトが起こり、ストップコドンが生じることによってGPIb α が発現しなくなったものと考えられた(図7)。

2) ノックアウトマウスについて

(1) GPIb ノックアウトマウス

最近GPIb α 遺伝子をノックアウトしたマウスが作成された¹³⁾。このマウスは骨髄巨核球異常、巨大血小板、血小板減少、出血傾向等を認めヒトBSSと表現形は一致しておりヒトBSSのモデルとなり得ることが判明している。このマウスの生殖能は正常と変わらない。

このマウスをヒトGPIb α 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスと交配し生まれたマウスにおいてはBSSの表現形は改善し、ヒト由来GPIb α とマウス由来サブユニットGPIb β , GPIX, GPVが複合体を形成し機能

することが判明した。すなわち出血時間も正常化し血小板数もほぼ正常となっている。

このことから本症の究極的な治療として遺伝子治療が有用である可能性を示したものとして貴重である。

(2) GPV ノックアウトマウス

GPVについては遺伝子異常の報告がなく、GPVの異常がBSSを示すのかいなか興味もたれていた。また遺伝子クローニングがなされたにもかかわらずその機能は不明であり、これらを解決するためにGPVノックアウトマウスの知見が待ちこがねられていた。昨年2つの施設からほぼ時を同じくしてGPVノックアウトマウスが報告された¹⁴⁾¹⁵⁾。

その結果いずれの報告においてもGPVをノックアウトしてもBSSは起こらず、血小板数、サイズは共に正常、ボトロセチン凝集も正常であった。従ってGPVはGPIb, GPIXの発現や機能には必要ではないことが明らかになった。しかしGPV欠損マウスでは低濃度トロンビンに対する反応は、凝集能、フィブリノーゲン結合能で調べる限り亢進し、出血時間も短縮したため、GPVは血小板活性化におけるnegative regulatorとしての機能を行っているとする報告と、トロンビンによる活性化には必要でないとする報告もあり機能については未だ混沌としている。従ってGPVノックアウトマウスの表現形は現時点では予期に反した結果で益々不可解になってきた。このほかのサブユニットに関するノックアウトマウスの報告はない。

4. 治療の進歩・現状

止血管理については血小板輸血を超える製剤はない。従って外科的手術時、分娩時、重篤な出血時等は血小板輸血で対応する。この場合GPIb/IX/V複合体に対する同種抗体が生じ輸血効果、止血効果が減弱するために不必要な血小板輸血は慎むべきである。

日常生活においては打撲などの外傷を避ける

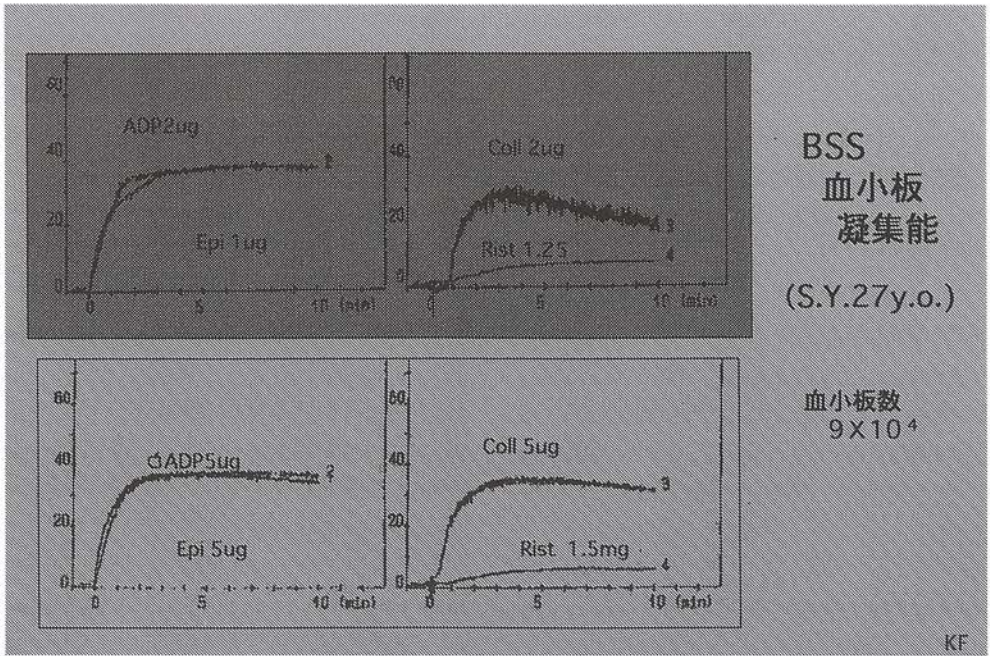


図 3 BSS 症例の血小板凝集能

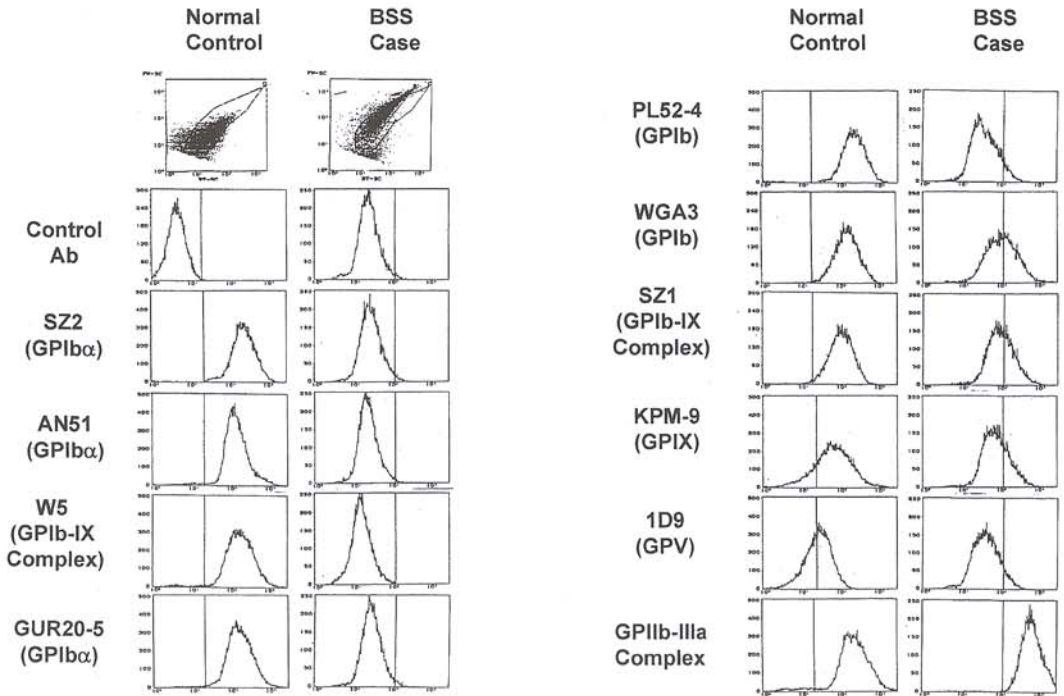


図 4 Flow Cytometric Analysis of platelet Glycoproteins

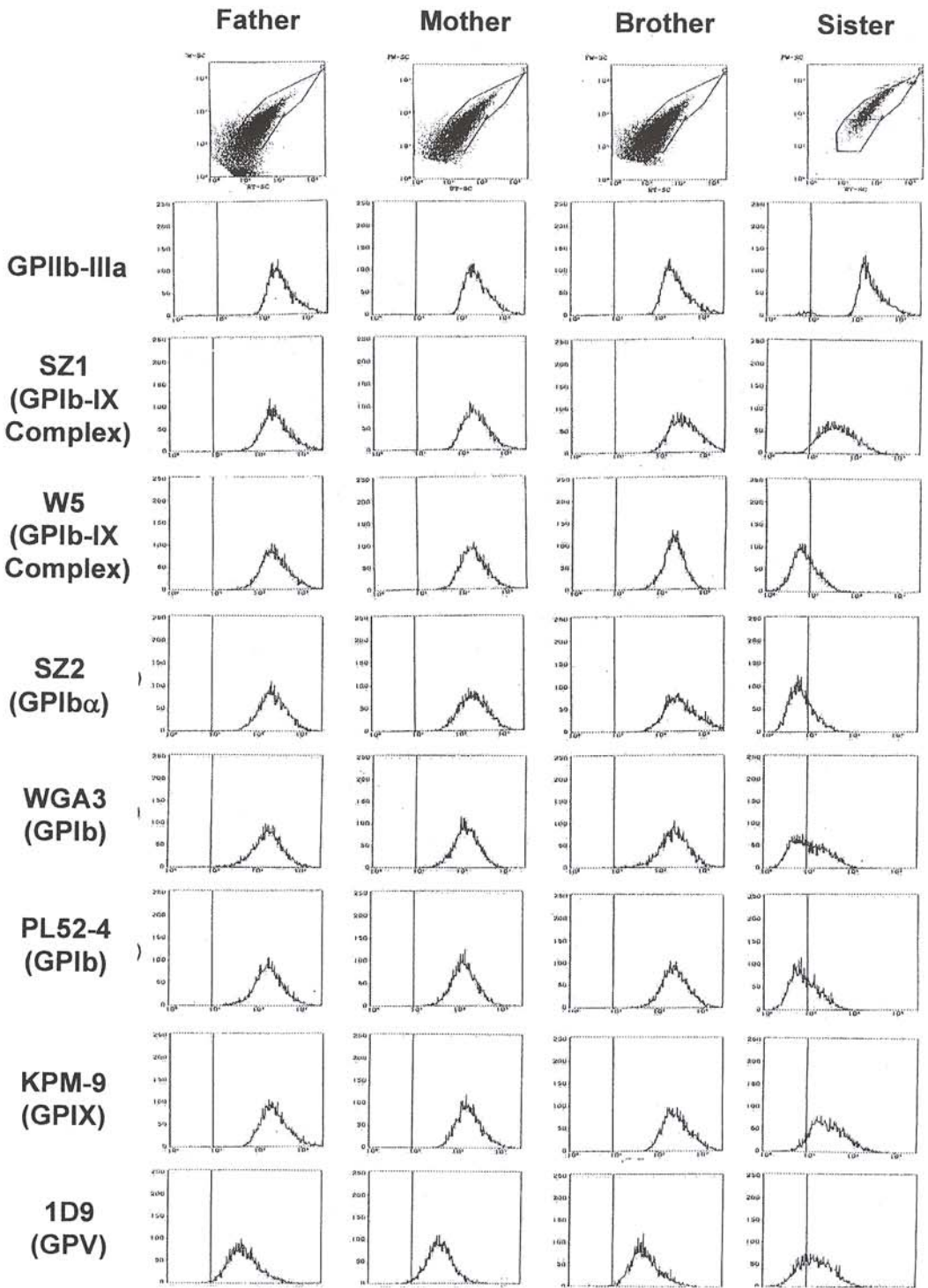
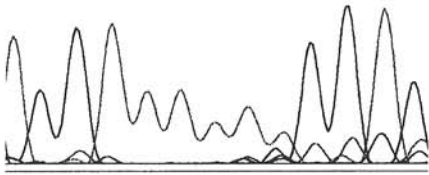


図 5 Flow Cytometric Analysis of platelet Glycoproteins of the BSS Family



Normal subject

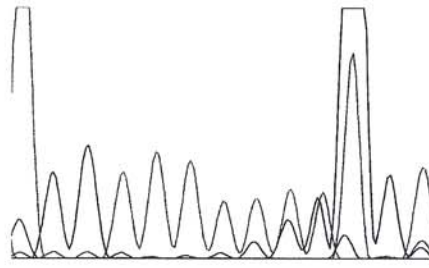


図6 Gene Analysis of BSS Case (GPII α Gene, Nucleotide 1929~1942)

ように指導し、本症の理解と出血傾向に対する教育を行う。

出血の日常的予防として、トランスアミンを用いる。

DDAVPが出血時間を短縮する報告がある。出血による貧血には鉄剤で対応する。

遺伝子解析が個々の症例で可能になり、また末梢血幹細胞移植が可能になっている現在では、自己幹細胞への正常サブユニット遺伝子を導入することによる遺伝子治療が模索されるべきものと考えている。

5. 遺伝子解析・診断施設の紹介

診断・遺伝子解析の方法は日常行われている検査、研究の範囲内で行えるものであることを考えるとどこでも可能である。しかし日常業務として行われていなかったり、過去に経験のない施設では時間的にも、経済的にも障害になる場合がある。この点われわれの施設では日常対応可能な検査としており該当症例があれば御連絡戴きたい。

(連絡先: Tel.082-257-5298, 5295, Fax.082-

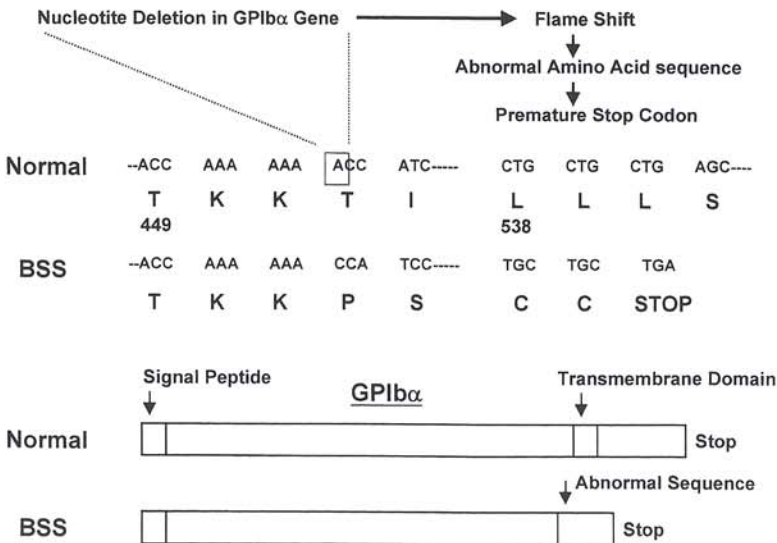


図7 Predicted Abnormality of GPII α in the BSS Platelets

257-5299, e-mail.fujimot@pharm.hiroshima-u.ac.jp, fujimura@pharm.hiroshima-u.ac.jp)

ほかにもわれわれと同様の施設はあるが確認が取れていないので割愛させていただきます。

文 献

- 1) Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Khargham V, Berndt MC: Bernard-Soulier syndrome. *Blood* **91**: 4397-4418, 1998.
- 2) Nurden AT: Inherited abnormalities of platelet. *Thromb Haemost* **82**: 468-480, 1999.
- 3) Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AE: Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem* **267**: 364-369, 1992.
- 4) Kawano H, Suzuki H, Tanoue K, Kimura A, Fujimura K: Down-regulation and redistribution of GPV/GPV₁, a subunit of von Willbrand factor receptor (GPIb/IX/V complex), on the surface membrane of thrombin-stimulated human platelets. *Brit J Haematol* **104**: 55-63, 1999.
- 5) Shimomura T, Fujimura K, Maehama S, Takemoto M, Oda K, Fujimoto T, Oyama R, Suzuki M, Ichihara K, Tanaka K, Titani K, Kuramoto A: Rapid Purification and characterization of human Platelet GPV: the amino acid sequence contains Leucine-rich repetitive modules as in GPIb. *Blood* **75**: 2349-2356, 1990.
- 6) Miller JL, Lyle VA, Cunningham D: Mutation of leucine-57 to phenylalanine in a platelet GPIb α leucine tandem repeat occurring in patients with an autosomal dominant variant of Bernard-Soulier disease. *Blood* **79**: 439-446, 1992.
- 7) Ware J, Russell SR, Marchese P, Murata M, Mazzucato M, DeMarco L, Ruggeri ZM: Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet GPIb α resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest* **92**: 1213-1220, 1993.
- 8) De La Salle C, Baas M-J, Lanza F, Schwartz A, Hanau D, Chevalier J, Gachet C, Briquel ME, Cazenave JP: A three-base deletion removing a leucine residue in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib α associated with a variant of Bernard-Soulier syndrome (Nancy I). *Brit J Haematol* **89**: 386-396, 1995.
- 9) Budarf ML, Konkle BA, Ludlow LB, Michaud D, Yamashiro DA, McDonald McGinn D, Zackai EH, Driscoll DA: Identification of a patient with a Bernard-Soulier syndrome and a deletion in the DiGeorge/Velo-cardio-facial chromosomal region in 22q11.2. *Hum Mol Genet* **4**: 763-766, 1995.
- 10) Kunishima S, Lopetz JA, Kobayashi S, Imai N, kamiya Y, Saitou H, Naoe T: Missense mutations of the GPIb β gene impairing the GPIb α / β disulfide linkage in a family with giant platelet disorder. *Blood* **89**: 2404-2412, 1997.
- 11) Noda M, Fujimura k, Takafuta T, Shimomura T, Fujimoto T, Yamamoto N, Tanoue K, Arai M, Suehiro A, Kakishita E, Shimasaki A, Kuramoto A: Heterogenous expression of GPIb, IX and V in platelet from two patients with Bernard-Soulier syndrome caused by different genetic abnormalities. *Thromb Haemost* **74**: 1411-1415, 1995.
- 12) Noda M, Fujimura k, Takafuta T, Shimomura T, Fujii T, Katsutani S, Fujimoto T, Kuramoto A, Yamazaki T, Mochizuki T, Matsuzaki M, Sano M: A point mutation in GPIX coding sequence (Cys⁷³ (TGT) to Tyr (TAT)) causes impaired surface expression of GPIb-IX-V complex in two families with Bernard-Soulier syndrome. *Thromb Haemost* **6**: 874-878, 1996.
- 13) Ware J, Russell S, Ruggeri ZM: Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: The Bernard-Soulier syndrome. *PNAS* **97**: 2803-2808, 2000.
- 14) Ramakrishnan V, Reeves PS, DeGuzman F, Deshpande U, Ministri-Madrid K, DuBridge RB, Phillips DR: Increased thrombin responsiveness in platelets from mice lacking glycoprotein V. *PNAS* **96**: 13336-13341, 1999.
- 15) Kahn ML, Diacovo TG, Bainton DF, Lanza F, Trejo Coughlin SR: Glycoprotein V-deficient Platelets have undiminished thrombin responsive-Ness and do not exhibit a Bernard-Soulier Phenotype. *Blood* **94**: 4112-4121, 1999.