

## 血小板刺激伝達系異常症-トロンボキサン受容体異常症

布 施 一 郎\*

Congenital Platelet Thromboxane A<sub>2</sub> Receptor Abnormality

Ichiro FUSE\*

**Key words** : platelet thromboxane A<sub>2</sub> receptor, platelet dysfunction, impaired signal transduction, point mutation

### 1. 概念・歴史

トロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) は強力な血小板凝集惹起作用と血管収縮作用を持ち、血小板放出反応や二次凝集発現における重要な mediator の一つである。血小板トロンボキサン受容体異常症は、血小板膜表面に存在するトロンボキサン受容体の質的異常により、TXA<sub>2</sub> に対する凝集や放出反応が欠損する先天性血小板機能異常症である。TXA<sub>2</sub> に対する血小板凝集異常症の報告は 1981 年以來、幾つかの報告があるが<sup>1)~4)</sup>、刺激伝達異常を推測した最初の報告は 1987 年の牛首らによるものであり<sup>5)</sup>、次いで 1993 年に著者らが報告している<sup>6)</sup>。

### 2. 病態・遺伝子解析

血小板膜上の TXA<sub>2</sub> 受容体は既にクローニングされており、すべての G 蛋白共役型受容体に共通の膜 7 回貫通型の構造をしている<sup>7)</sup>。TXA<sub>2</sub> で血小板を刺激すると TXA<sub>2</sub> は血小板膜上の TXA<sub>2</sub> 受容体と結合し、Gq 蛋白を介して phospholipase Cβ (PLCβ) が活性化される。

PLCβ は主として血小板膜リン脂質である phosphatidylinositol, 特に phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) を水解し、二つの重要な second messenger である diacylglycerol (DG) と inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) を産生する (図 1)。DG は protein kinase C (PKC) を活性化し、主として 47 K 蛋白をリン酸化し、IP<sub>3</sub> は細胞内カルシウムの動員を介して、Ca<sup>2+</sup>-calmodulin 依存性の myosin light chain kinase を活性化して、20 K 蛋白をリン酸化する。

一方、IP<sub>3</sub> によって惹起された細胞内 Ca 濃度の上昇は phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 活性化の引き金となり、また直接 TXA<sub>2</sub> により G 蛋白を介して PLA<sub>2</sub> が活性化され、主として膜リン脂質の phosphatidylcholine (PC) に作用してアラキドン酸を遊離させる。遊離したアラキドン酸は cyclooxygenase (prostaglandin endoperoxide synthase) の作用で prostaglandin G<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> に変換され、さらに thromboxane synthase の作用で TXA<sub>2</sub> が産生される。産生された TXA<sub>2</sub> は前述の 47 K, 20 K 蛋白のリン酸化と協同して血小板放出反応を惹起するものと考えられて

\*新潟大学医学部附属病院・輸血部 [〒 951-8520 新潟市旭町 1-754]

Division of Blood Transfusion, Niigata University Medical Hospital [1-754 Asahimachi, Niigata 951-8510, Japan]

Tel : 025-227-2734 Fax : 025-227-0826 e-mail : fuse@med.niigata-u.ac.jp

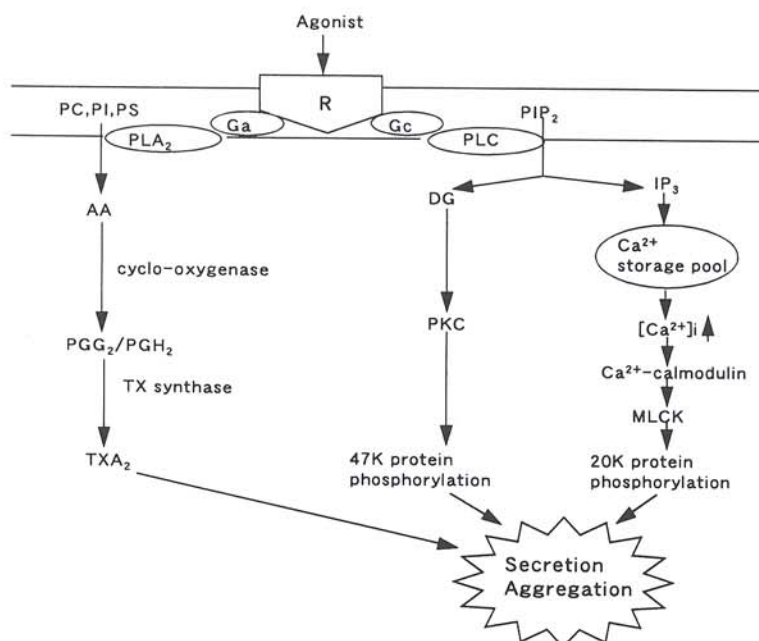


図1 Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) による血小板活性化機構  
 R: thromboxane A<sub>2</sub> 受容体, Gc, Ga: G 蛋白, PLC; phospholipase C, PLA<sub>2</sub>; phospholipase A<sub>2</sub>, PIP<sub>2</sub>; phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate, IP<sub>3</sub>; inositol-1, 4, 5-trisphosphate, DG; diacylglycerol, PKC; protein kinase C, MLCK; myosin light chain kinase, PC; phosphatidylcholine, PI; phosphatidylinositol, PS; phosphatidylserine, AA; arachidonic acid, PGG<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>; prostaglandin G<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>.

いる。

血小板トロンボキサン受容体異常症においては、血小板自身のアラキドン酸代謝、すなわち TXA<sub>2</sub> 産生能は正常である。さらに産生された TXA<sub>2</sub> の血小板への結合も正常であるが、その情報が G 蛋白を介した PLC 活性化に結びつかないために、TXA<sub>2</sub> 産生を介する血小板二次凝集や TXA<sub>2</sub> 自身による血小板凝集が欠損する。

本症における TXA<sub>2</sub> 受容体と PLCβ 間の刺激伝達異常の原因は、患者血小板における TXA<sub>2</sub> 受容体の遺伝子解析および発現実験により、1994 年に明らかにされた<sup>8)</sup>。すなわち、本症血小板では、TXA<sub>2</sub> 受容体の膜 7 回貫通構造のうち、first cytoplasmic loop に存在する Arg<sup>60</sup> が Leu に変異していることが明らかにされ(図 2)、さらにこの異常を pEF-BOS vector に insert し、calcium phosphate method にて

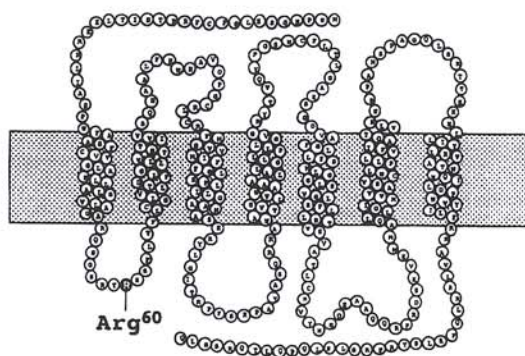


図 2 TXA<sub>2</sub> 受容体の構造と本症における異常部位

CHO (Chinese Hamster Ovary) cell に発現させると、外来性 TXA<sub>2</sub> との結合は正常にもかかわらず、IP<sub>3</sub> 産生が欠損しており、本症血小板と同様の異常が出現することが確認された<sup>8)</sup>。このことは、TXA<sub>2</sub> 受容体の first cytoplasmic loop に存在する Arg<sup>60</sup> およびその近傍が、G 蛋

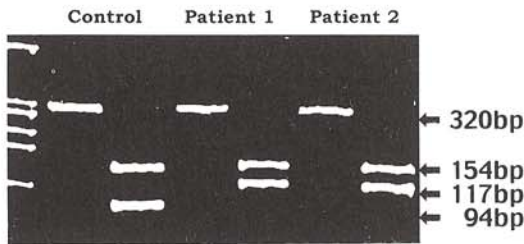


図3 TXA<sub>2</sub>受容体の遺伝子的解析  
制限酵素 (*Hha*1) による切断部位の差を示す。

白-PLC $\beta$ 系への刺激伝達機構に関与する重要な部位であることを示唆している。

この変異の有無は、患者末梢血由来の genomic DNA を制限酵素 *Hha*1 で処理することで、簡便に検出することができる。すなわち、first cytoplasmic loop を PCR 法にて増幅した後、*Hha*1 で処理すると、正常では GCGC (CGC  $\rightarrow$  Arg<sup>60</sup>) を認識して図3のように 154 bp と 94 bp に切断されるが、GCTC (CTC  $\rightarrow$  Leu<sup>60</sup>) の変異が存在すると、この部位での *Hha*1 による切断がなされず、154 bp と 117 bp の fragment が生ずる。したがって、117 bp の存在は、Arg<sup>60</sup> $\rightarrow$ Leu の変異が存在することを意味しており、もっとも簡便な診断法である。著者らは本症を6例経験しているが、現在のところ、この変異以外の異常を見出しておらず、その意味で重要な検査法である<sup>9)~11)</sup>。

### 3. 症例・家系の提示、症状、検査所見

筆者らが最初に見出した症例について提示する<sup>9)</sup>。症例は53歳男性で、生来創部からの過剰出血を指摘されていた。42歳で胃切除術、43歳時にも尿管結石にて手術を受けているが、両手術時とも術後出血が続き、輸血を受けた既往がある。家族歴では娘3人にも皮下出血、歯肉出血、月経過多などの出血症状が認められた。出血性素因検査では、血小板数は正常で、凝固線溶系検査にも異常なく、出血時間は Simplate 1 で 12.0 分と延長していた (正常: 4.5~9.5 分)。血小板凝集能検査では TXA<sub>2</sub> アナログである

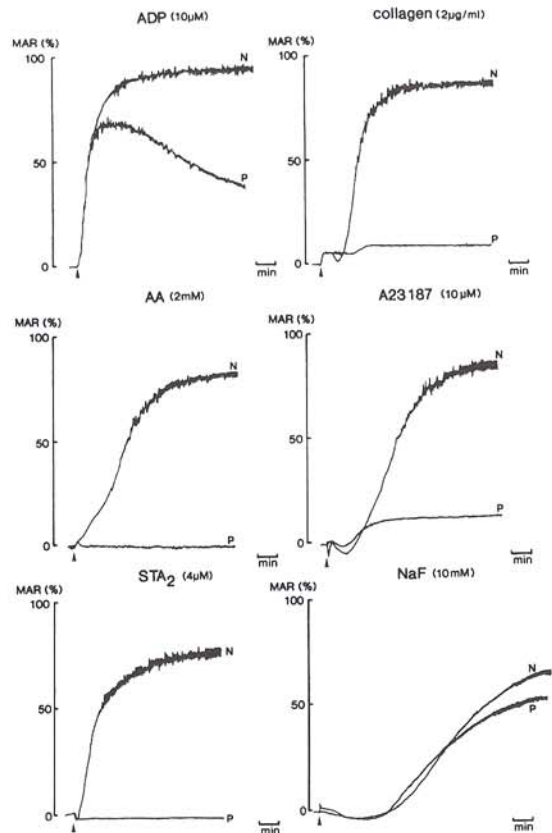


図4 本症における代表的な血小板凝集能検査  
N; normal control, P; patient

STA<sub>2</sub> (Stable TXA<sub>2</sub>) 凝集が欠損しており、内因性 TXA<sub>2</sub> 産生に依存した凝集 (ADP 二次凝集, コラゲン凝集, アラキドン酸凝集など) も欠損していた (図4)。また、娘3人の血小板凝集能も発端者ほど強くはないが、同様の異常を認めた。患者血小板の各種アゴニスト刺激時の TXB<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub> の安定代謝産物) 産生は正常であり、外来性 TXA<sub>2</sub> との結合も、TXA<sub>2</sub> の agonist ligand である [<sup>3</sup>H]-U 46619 と antagonist ligand である [<sup>125</sup>I]-PTA-OH を用いて解析したが、正常であった。

以上より、TXA<sub>2</sub> 受容体-Gq-PLC $\beta$  の刺激伝達異常を疑い、TXA<sub>2</sub> を含む各種アゴニスト刺激時の PLC $\beta$  活性を polyphosphoinositides および inositol phosphates 産生量を指標に検討すると、図5の如くで、患者血小板はトロンピン

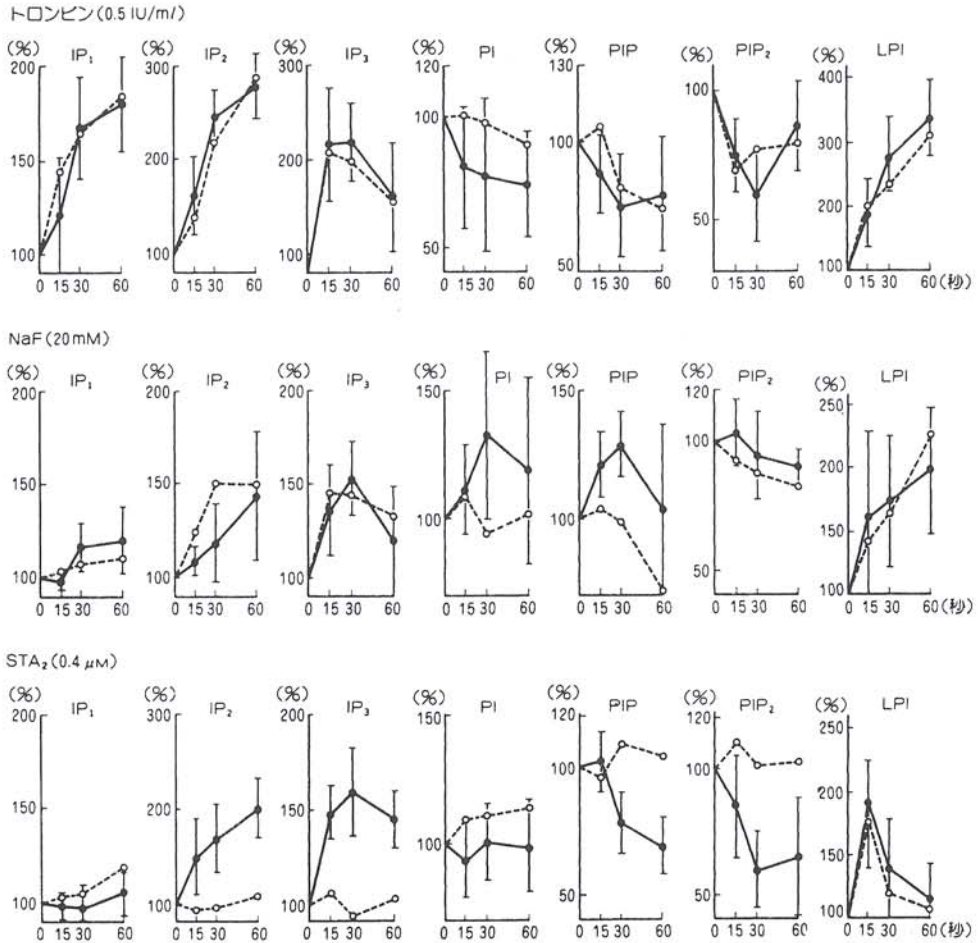


図5 本症におけるイノシトールリン脂質代謝上段よりトロンピン, NaF, STA<sub>2</sub> 刺激時の polyphosphoinositides, inositol phosphates 産生量の経時的变化を示す。  
●—●: 正常コントロール (Mean±SD, n=4)  
○---○: 患者血小板

や NaF 刺激により PIP<sub>2</sub> の break down と inositol phosphates (IP<sub>1</sub>, IP<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub>) の産生増加を認めましたが, STA<sub>2</sub> 刺激では, これらの現象を認めなかった。また, GTPase 活性についても, STA<sub>2</sub> 刺激時においてのみ欠損していた<sup>6)9)</sup>。これらの事は本症血小板が STA<sub>2</sub> 刺激時においてのみ, 特異的に Gq および PLCβ の活性化が起きていない事を示しており, 本症の病因の主体が TXA<sub>2</sub> 受容体と PLCβ 間の刺激伝達異常にあることを強く示唆している。本家系はその後の検討で, 発端者が TXA<sub>2</sub> 受容体の Arg<sup>60</sup>→

Leu 変異の homozygote 例であり, 娘3人が heterozygote 例であることが明らかとなり, 別の家系の報告も合わせて<sup>8)</sup>, 本症が常染色体性優性遺伝であることが示されている。

#### 4. 治療の進歩, 現状

手術時など大量出血が予想される場合は血小板輸注を行う。しかし, 幸い本症の出血傾向は比較的軽度であり, 日常生活には支障のないことが多い。

## 5. 解析, 診断施設の紹介

本症の発見およびその病態解析は, 主として京都大学医学部第一内科および新潟大学医学部第一内科によって行われたものである。したがって, 両施設において本症の診断, 解析が可能であるが, 本症診断の糸口は TXA<sub>2</sub> アナログによる血小板凝集能検査を施行することにあるので, スクリーニング検査として是非取り入れて頂く事を希望したい。

### 文 献

- 1) Wu KK, Le Breton GC, Tai HH, Chen YC: Abnormal platelet response to thromboxane A<sub>2</sub>. *J Clin Invest* **67**: 1801-1804, 1981.
- 2) Lages B, Malmsten C, Weiss HJ, Samuelsson B: Impaired platelet response to thromboxane A<sub>2</sub> and defective calcium mobilization in a patient with a bleeding disorder. *Blood* **57**: 545-552, 1981.
- 3) Samama M, Lecrubier C, Conard J, Hotchen M, Breton-Gorius J, Vargaftig B, Chignard M, Lagarde M, Dechavanne M: Constitutional thrombocytopathy with subnormal response to thromboxane A<sub>2</sub>. *Br J Haematol* **48**: 293-303, 1981.
- 4) Okuma M, Takayama H, Uchino H: Subnormal platelet response to thromboxane A<sub>2</sub> in a patient with chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol* **51**: 469-477, 1982.
- 5) Ushikubi F, Okuma M, Kanaji K, Sugiyama T, Ogorochi T, Narumiya S, Uchino H: Hemorrhagic thrombocytopathy with platelet thromboxane A<sub>2</sub> receptor abnormality: Defective signal transduction with normal binding activity. *Thromb Haemost* **57**: 158-164, 1987.
- 6) Fuse I, Mito M, Hattori A, Higuchi W, Shibata A, Ushikubi F, Okuma M, Yahata K: Defective signal transduction induced by thromboxane A<sub>2</sub> in a patient with a mild bleeding disorder: Impaired phospholipase C activation despite normal phospholipase A<sub>2</sub> activation. *Blood* **81**: 994-1000, 1993.
- 7) Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S: Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature* **349**: 617-620, 1991.
- 8) Hirata T, Kakizuka A, Ushikubi F, Fuse I, Okuma M, Narumiya S: Arg<sup>60</sup> to Leu mutation of the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. *J Clin invest* **94**: 1662-1667, 1994.
- 9) Fuse I, Hattori A, Mito M, Higuchi W, Yahata K, Shibata A, Aizawa Y: Pathogenetic analysis of five cases with a platelet disorder characterized by the absence of thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)-induced platelet aggregation in spite of normal TXA<sub>2</sub> binding activity. *Thromb Haemost* **76**: 1080-1085, 1996.
- 10) Higuchi W, Fuse I, Hattori A, Aizawa Y: Mutations of the platelet thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) receptor in patients characterized by the absence of TXA<sub>2</sub>-induced platelet aggregation despite normal TXA<sub>2</sub> binding activity. *Thromb Haemost* **82**: 1528-1531, 1999.
- 11) Fuse I, Higuchi W, Aizawa Y: Pathogenesis of a bleeding disorder characterized by platelet unresponsiveness to thromboxane A<sub>2</sub>. *Semin Thromb Haemost* **26**: 43-45, 2000.