

氏名	とも けんじろう 塘 賢二郎
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第1896号
学位授与の日付	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Qualitative Platelet 12-Lipoxygenase Abnormality in a Patient with Essential Thrombocythemia. (本態性血小板増多症患者に認められた血小板12-リポキシゲナーゼの質的異常についての研究)
論文調査委員	(主査) 教授 内山 卓 教授 伊藤和彦 教授 大熊 稔

論 文 内 容 の 要 旨

骨髓増殖性疾患(MPD)において、血小板12-リポキシゲナーゼ(12-LOX)活性が低下あるいは欠損するものが存在する。これらMPD患者における血小板12-LOX活性欠損の機序は酵素蛋白の欠損であり、転写レベルでの発現量の異常であると報告されてきたが、本研究では酵素蛋白量は十分存在するにもかかわらず、その活性を欠損している患者を見だし、MPD患者における本酵素活性欠損の新たな機序を明らかにした。

12-LOX活性の完全欠損を示すMPD患者4名の血小板全溶解物をSDS-PAGEで展開し、抗12-LOXポリクローナル抗体でイムノプロットをして検討した。本態性血小板増多症であった1患者(K.Y.)を除く3名の患者では12-LOX蛋白が検出されず、以前より報告されていた酵素蛋白の欠損による酵素活性欠損であることが確認された。しかし、1患者(K.Y.)においては酵素蛋白は正常量存在し、かつ電気泳動上の分子量が正常人の12-LOX蛋白よりわずかに大であった。次に、この患者(K.Y.)の血小板および正常人の血小板のホモジネートを遠心法により、可溶画分とマイクロゾーム画分に分離し、各画分の12-LOX蛋白の分布をイムノプロット法で検討したが、患者と正常人で12-LOX蛋白の分布の違いは認められなかった。12-LOXの酵素活性の通常の測定には洗浄血小板全体を用いたが、さらに、抗12-LOXモノクローナル抗体による血小板からの免疫沈降物の酵素活性を¹⁴Cアラキドン酸を用いて比較検討した。4名の患者および正常人の血小板ホモジネートを作り、抗12-LOXモノクローナル抗体で免疫沈降した沈降物の酵素活性を調べたところ、正常人では活性が認められたが、4名の患者全てでその活性は著明に減少していた。また、患者(K.Y.)血小板に12-LOX活性の抑制因子が存在しないか否かを正常人血小板に種々な割合で患者血小板を混合して酵素活性を測定することにより検討したところ、その存在は否定的であった。

患者(K.Y.)血小板ホモジネートの抗12-LOXモノクローナル抗体による免疫沈降物の電気泳動上の

分子量は、血小板全溶解物での場合と同様、正常人よりわずかに大きかった。そこで、この分子量の違いが糖鎖による修飾によるものであるかどうかを、免疫沈降物につき検討したところ、正常人でも患者 (K. Y.) でも、12-LOX 蛋白の糖鎖による修飾は認められなかった。次に、患者 (K. Y.) の血小板より mRNA を、またそのリンパ球より genomic DNA をそれぞれ抽出し、両者を用いて、12-LOX の蛋白コーディング領域の塩基配列を解析した。すでに諸家より報告されている正常の DNA 塩基配列と比較したところ、活性の欠損および分子量の差を説明できるような、塩基配列異常は認められなかった。

以上の成績から、本症例 (K. Y.) においては、12-LOX 酵素蛋白の転写後、糖鎖の修飾以外のなんらかの修飾を受けて、その酵素活性が欠損しかつ分子量が電気泳動上大きくなっていると結論され、MPD 患者における血小板 12-LOX 活性の欠損にはこれまでに報告されてきた量的な欠損以外に、質的 (機能的) な欠損が存在することが初めて明らかになった。

論文審査の結果の要旨

骨髄増殖性疾患 (MPD) においては、血小板12-リポキシゲナーゼ (12-LOX) 活性が欠損するものが存在し、酵素蛋白の量的な欠損によるものであると報告されてきた。本研究では、12-LOX 活性の完全欠損を示す MPD 患者 4 例の血小板をイムノブロット法で検討したところ、本態性血小板増多症であった 1 患者において酵素蛋白が正常量存在し、この患者の 12-LOX 蛋白の電気泳動上の分子量は正常人より大であることを見出した。また、この患者の 12-LOX 蛋白の可能性画分とマイクロゾーム画分における分布に異常はなく、患者血小板に 12-LOX 活性の抑制因子の存在も否定的であった。12-LOX 蛋白の糖鎖による修飾は、正常人でも患者でも認められず、患者の12-LOX の蛋白コーディング領域の塩基配列の解析では、酵素活性の欠損および分子量の差を説明しうる異常は認められなかった。

以上の研究は、これまでに報告されてきた 12-LOX の量的な欠損以外に、質的 (機能的) な欠損が存在することを初めて明らかにした点に特徴があり、MPD 患者における 12-LOX 活性の欠損機序の解明に寄与するところ大である。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 9 年 2 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。