

氏名	林 智也
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	第 5683 号
学位授与年月日	平成 23 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者
学位論文名	Establishment of a cell line panel for the detection of antibodies against human platelet antigen 4b (ヒト血小板抗原-4b に対する抗体検出のためのパネル細胞の作製)
論文審査委員	主 査 北川 誠一 教授                      副 査 日野 雅之 教授 副 査 中嶋 弘一 教授

## 論文内容の要旨

### 【目的】

血小板輸血不応や新生児血小板減少症の原因として、血小板抗原（HPA）に対する抗体の関与が報告されている。HPA に対する抗体を検出するため、血小板を使用した高感度な方法が開発されてきた。しかし、既存の HPA 抗体検出法は血小板を必要とすることから、測定に必要な低頻度の抗原を発現している血小板を得る事は困難である、等、種々の問題がある。したがって、血小板抗体検出に使える血小板を使用しない代替法は役に立つと考えられる。日本において、HPA に係る同種免疫性新生児血小板減少症に HPA-4b 抗体はしばしば関連している。そこで我々は HPA-4b 抗体検出のための細胞パネルを樹立する事を試みた。

### 【方法】

HPA-4b をコードする糖蛋白 IIIa (GPIIIa) 遺伝子を GPIIb 遺伝子と一緒にピューロマイシン抵抗性遺伝子、ネオマイシン抵抗性遺伝子を含むレトロウイルスベクターを用いて K562 細胞（これは浮遊細胞である）に導入した。限界希釈法によりクローン化した後、HPA-4b を高発現している細胞を HP-4b と命名し、ピューロマイシン、ネオマイシン存在下で培養維持した。樹立した細胞を評価するため、免疫沈降・western blot およびヒト抗血清を用いて monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) 法を行った。

### 【結果】

培養した細胞において、導入遺伝子の発現は 6 ヶ月以上観察され、GPIIIa と GPIIb は複合体を形成している事が明らかとなった。MAIPA 法の結果、HPA-4b を含む抗血清では全て陽性で、健常人血清や HLA 抗体を含む血清は全て陰性であった。また、細胞を用いた MAIPA 法と従来行なわれている血小板を用いた MAIPA 法と比較したところ、検出感度に差はなかった。

### 【結論】

これらの結果は、今回構築した細胞パネルは HPA-4b 特異抗体を高感度に検出可能であり、血小板の代替物として使用できることを示唆する。

## 論文審査の結果の要旨

血小板輸血不応例や新生児同種免疫性血小板減少症などの原因として、ヒト血小板抗原（human platelet antigen ; HPA）に対する抗体の存在がある。抗 HPA 抗体検出のためにヒト血小板を用いた高感度な検査法が現在開発されている。しかし、これらの検査法は目的とする低頻度の抗原を発現しているヒト血小板の入手がしばしば困難である等の問題点がある。したがって、ヒト血小板を用いない代替検査法は有用と考えられる。本邦においては、新生児同種免疫性血小板減少症の原因として抗 HPA-4b 抗体の関与が報告されている。これらの背景のもとに、本研究では抗 HPA-4b 抗体検出のための細胞パネルを樹立することを目的とした。

ピューロマイシン抵抗性遺伝子とネオマイシン抵抗性遺伝子を含むレトロウイルスベクターを用

いて、K562 細胞に GPIIb 遺伝子と共に HPA-4b をコードする GPIIIa 遺伝子を導入した。限界希釈法によりクローン化した後、導入した遺伝子を高発現している細胞を HP-4b と命名し、ピューロマイシンとネオマイシン存在下で培養維持した。免疫沈降法、Western blot 法および MAIPA (monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens) 法を用いて樹立した細胞を評価した。

導入した遺伝子は 6 か月以上にわたって安定して発現していた。また、これらの遺伝子産物である GPIIIa と GPIIb は複合体を形成していた。樹立した細胞を用いて MAIPA 法により解析すると、抗 HPA-4b 抗体を含む血清は全て陽性であり、健常人血清や抗 HLA 抗体を含む血清は全て陰性であった。したがって、今回樹立した細胞株 (HP-4b 細胞) を用いて抗 HPA-4b 抗体を特異的に検出できることが明らかになった。HP-4b 細胞と従来から行われているヒト血小板を用いた抗体検査法を比較すると、その検出感度は同程度であった。これらの結果は、今回作製した細胞パネルを用いると抗 HPA-4b 抗体を高感度に検出することが可能であり、本細胞パネルがヒト血小板の代替として有用であることを示している。

本研究は、ヒト血小板抗原-4b (HPA-4b) に対する抗体を高感度に検出可能なパネル細胞株の作製に成功したことを明らかにしており、その医学的意義は大きい。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を授与されるに値するものと判断された。