

	もも い あき ひと
氏 名	桃 井 明 仁
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第46号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	BAFF is Expressed on Human Platelets and Upregulated by Activation (BAFF は血小板上にも発現し、活性化により発現が 増強する)
論文審査委員	主査 教授 内 藤 眞 副査 教授 相 澤 義 房 副査 教授 岡 田 正 彦

博士論文の要旨

近年、活性化をうけた血小板表面における CD154 の発現が見いだされ、血清中の可溶性 CD154 濃度と心血管イベントとの関連、動脈硬化の発症および進展における血管内皮細胞上の CD40 との相互作用の重要性が報告されている。別の TNF family member である BAFF (B-Cell-Activating Factor belonging to the TNF Family) は、これまで単球やマクロファージ、樹状細胞、顆粒球、T 細胞に発現が報告され、B 細胞の生存、維持に重要な役割を果たしていることが報告された。今回我々は、血小板上にも BAFF が発現していること、また活性化によりその発現が増強することを初めて見いだした。

Flow cytometry において血小板表面の BAFF 抗原を定量的に測定した結果、BAFF の発現がみられる例があることがわかった。また、CD41a、CD63、および CD154 を活性化マーカーとしてトロンビン刺激を行ったところ活性化血小板表面においては発現が増強し、さらに活性化前には認められなかった例においても血小板表面上に BAFF が発現した。

次に、RNA、および蛋白レベルで血小板における BAFF の発現を検討した。細胞株 (U937, Daudi, Meg-01, CMK-11-5 : 単球系の白血病細胞株 U937 は陽性コントロール、B 細胞系のリンパ腫細胞株 Daudi は陰性コントロールとして使用) および血小板より RNA を抽出し、RT-PCR 法により、巨核球系白血病細胞株である Meg-01 や CMK-11-5 においても BAFF メッセンジャー RNA の存在を確認することができた。血小板における BAFF メッセンジャー RNA は確認できなかった。しかしウエスタンブロッティング法により蛋白レベルで検討した結果、上記の巨核球系細胞株および血小板においても membrane bound form と同 size の BAFF 蛋白の存在が確認された。血小板の lysate を用いた ELISA 系による検討でも BAFF 蛋白の同定が可能であった。以上の結果より、BAFF は血小板の成熟課程で合成され、成熟血小板においては膜結合型蛋白として貯蔵されており、活性化に応じて表面に発現する機序の可能性を考えた。

CD154 を含め多くの TNF family member 蛋白は、膜結合型が splicing を受け、可溶型として血清中に放出される機序が存在するが、血小板における BAFF においても同様の機序があるの

かという疑問について、ELISA 系により活性化および非活性化血小板上清中の BAFF 濃度の測定を試みた。予想に反し活性化血小板上清中の BAFF 濃度の上昇は認められなかった。血清中の可溶性 BAFF は、血小板に由来が主ではない可能性が考えられた。

血小板が発現する BAFF はどのような意味をもつのか。一部の例では活性化前の血小板においても発現が認められた。それは健常人に比し、統計学的な有意差はなかったが、C 型慢性肝炎患者やそのキャリアーにおいてより顕著である傾向がみられた。膠原病あるいはアレルギー疾患患者においては、症例数が少ないこともあるが差は認められなかった。これらの例においては、すでに循環血液中の血小板が活性化されており、血小板上の BAFF の発現は全身性の炎症反応の存在を反映しているのではないかと考えた。最近、動脈硬化の形成過程を一種の炎症反応としてとらえる考えが一般化してきており、そこには顆粒球、リンパ球、血管内皮細胞、血管壁、血小板など多くの細胞が関与し、それぞれ重要な役割を担っている。中でも血小板が発現した CD154 と血管内皮の CD40 との間の相互作用が注目されている。本研究でのデータはないが、活性化血小板における BAFF の発現は、このような局所の炎症反応の場において、BAFF を介した血小板と B 細胞（および BAFF レセプターを持った一部の T 細胞）との相互作用が存在するとすれば、重要な意味を持つのではないかと推察した。

審査結果の要旨

申請者は TNF family member である BAFF (B-Cell-Activating Factor belonging to the TNF Family) は、トロンビンで活性化された血小板表面で発現が増強し、活性化前には認められなかった血小板表面上にも BAFF が発現することを見出した。

次いで、RT-PCR 法により巨核球系白血病細胞株である Meg-01 や CMK-11-5 で BAFF の mRNA の存在を確認したが、血小板では認められなかった。ウエスタンブロッティング法では、巨核球系細胞株および血小板に膜結合型蛋白と同 size の BAFF が確認された。また血小板の lysate でも ELISA 法で BAFF 蛋白が同定されたが、活性化した後の血小板上清中に BAFF の上昇は認められず、血中の可溶性 BAFF は血小板由来ではないと考えられた。これまでの検索で血小板の BAFF は C 型慢性肝炎患者やそのキャリアーなどで高値例があった。

BAFF は血小板の成熟過程で合成され、膜結合型蛋白として貯蔵されており、活性化時に表面に発現すると考えられる。動脈硬化巣など炎症により血小板が活性化されると BAFF が表面に発現し、B 細胞（および BAFF レセプターを持った一部の T 細胞）との相互作用を示す可能性が示唆された。これらの知見を見出した点に学位論文としての価値を認める。