

学 位 論 文 題 名

Involvement of β 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages

(β 2-グリコプロテイン I および抗カルジオリピン抗体による
マクロファージの酸化 LDL 取り込みの抑制に関する研究)

学位論文内容の要旨

β 2-グリコプロテイン I (β 2-GPI) は、血中に約200 μ g/mlの濃度で存在する分子量約5万の血漿蛋白 (別名、アポリポ蛋白H) であり、種々の陰性荷電物質 (ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ヘパリン硫酸、デキストラン硫酸など) に結合性を有しその結果、リン脂質依存的な血液凝固カスケードを抑制する。この蛋白は、326個のアミノ酸からなるシングルペプチドで、分子内ジスルヒド結合により形成される5個のスドメインとよばれる繰り返し構造からなることや、第5ドメインに存在するCKNKEKKCというアミノ酸配列がリン脂質結合部位であることが明かにされている。

抗カルジオリピン抗体は、カルジオリピン、ホスファチジルセリンなどのリン脂質と結合して構造変化を起こした β 2-GPI分子上に現れるcrypticなエピトープを認識する抗 β 2-GPI抗体であることが示されている。本抗体は、梅毒などの感染症患者では検出されず、抗リン脂質抗体症候群の患者血清中に特異的に検出され、種々の血栓症や習慣流産の発症に関与していると考えられている。ところで、本抗体が約3割の割合で認められる全身性エリテマトーデス (SLE) では、動脈硬化病変が発生・進展しやすいことが知られている。一方、粥状動脈硬化病変の形成には、血中単球由来マクロファージによるスカベンジャー受容体を介した酸化LDLの細胞内取り込み、および泡沫化が関与していると考えられている。そこで今回は、マクロファージによる酸化LDLの取り込みにおよぼす抗カルジオリピン抗体の影響について検討した。その結果以下のことが明らかとなった。

1) リポ蛋白に対する β 2-GPIおよびWB-CAL-1抗体 (抗リン脂質抗体症候群の疾患モデルマウス由来のモノクローナル抗体) の反応性

リポ蛋白を健常人新鮮血漿より超遠心法で調製し、5 μ M CuSO₄と37℃で24時間培養して酸化した。 β 2-GPIは、LDLとは全く結合しないが、酸化LDLとは有意な結合性を示した。酸化LDL、 β 2-GPIはそれぞれ単独では抗カルジオリピン抗体 (WB-CAL-1抗体) に認識されないが、これらが結合することにより本抗体に認識されるようになった。さらに β 2-GPI

およびWB-CAL-1抗体の結合は、酸化LDLのBligh-Dyer法によるクロロホルム画分(すなわち、脂質画分)に対して特異的に認められた。このことは、リン脂質と同様に、酸化LDL分子中の脂質(酸化脂質)に結合することで構造変化を起こした β 2-GPIがWB-CAL-1抗体によって認識されることを示している。 β 2-GPIは、前述の通り、陰性荷電を有するリン脂質とCKNKEKKCという配列で結合することが知られているが、酸化LDLの場合も同じ結合部位を介していると思われる。

2) マクロファージによる酸化LDLの取り込みにおよぼす β 2-GPIおよび抗カルジオリピン抗体の影響

マウス由来マクロファージ細胞株であるJ774A.1に対する酸化LDLの結合、取り込み、および分解は、 β 2-GPIの添加により濃度依存的に抑制された。WB-CAL-1抗体およびCof-22抗体(ヒト β 2-GPIをBalb/cマウスに免疫して得られたモノクローナル抗 β 2-GPI抗体)を β 2-GPI存在下、培養液に添加するとマクロファージへの酸化LDLの結合は、対照群と比べ著明に増加した。一方、 β 2-GPI非存在下では酸化LDLのマクロファージへの結合は、抗体を加えてもほとんど変化しなかった。以上の結果は、酸化LDLが β 2-GPI依存的に抗カルジオリピン抗体(抗 β 2-GPI抗体)によって認識され、抗体を介してマクロファージに結合することを示している。この結合は、マクロファージのFc receptorを介している可能性がある。

以上のように、抗リン脂質抗体症候群において、 β 2-GPIおよび抗カルジオリピン抗体を介した動脈硬化の発症機序が存在する可能性が示された。このことは、抗カルジオリピン抗体に関する新しい知見であり、重要な臨床意義を持つものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

Involvement of β 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages

(β 2-グリコプロテイン I および抗カルジオリピン抗体による
マクロファージの酸化 LDL 取り込みの抑制に関する研究)

全身性エリテマトーデス(SLE)では患者の約3割に抗カルジオリピン抗体(aCL)が認められるが、本抗体は構造変化を起こした β 2-GPIを認識する抗体であることが知られている。また、SLEでは動脈硬化病変が発生・進展しやすいことが知られているが、この粥状動脈硬化病変の形成には、マクロファージによるスカベンジャー受容体を介した酸化LDLの取り込みが関与している。そこで酸化LDLの取り込みにおよぼす β 2-GPI、aCLの影響について検討したところ、以下のことが明らかになった。1) β 2-GPIは、LDLとは結合しないが、酸化LDLとは有意な結合性を示した。2) β 2-GPIは酸化LDLと結合して構造変化をおこし、抗カルジオリピン抗体の認識するエピトープが出現した。3) マウス由来マクロファージ細胞株であるJ774A.1への酸化LDLの取り込みは、 β 2-GPIの添加により濃度依存的に抑制された。4) 抗カルジオリピン抗体を β 2-GPI存在下に添加するとマクロファージへの酸化LDLの結合は、抗体非存在下と比べ著明に増加した。以上の実験結果は、 β 2-GPIはマクロファージの泡沫化を抑制するという抗動脈硬化作用を有するが、aCLの存在はマクロファージの泡沫化を促進し、動脈硬化の危険因子となる可能性があることを示している。

試問に際し、1) 生理的濃度の β 2-GPIで酸化LDLのマクロファージへの取り込みは抑制されるか 2) 酸化HDL、酸化VLDLに対する β 2-GPIの役割 3) 酸化LDL- β 2-GPI複合体のスカベンジャーレセプターを介する取り込みにおよぼすpolyinosinic acidの阻害効果について 4) β 2-GPIに対する抗カルジオリピン抗体の認識部位、およびその構造解析 5) W/B F1 mouseの冠動脈病変 6) 動脈硬化モデルマウスでの自己抗体の有無 7) 動脈硬化抵抗性動物であるマウスにおけるスカベンジャーレセプターの意義 8) β 2-GPIおよび抗カルジオリピン抗体のin vivoでの動脈硬化におよぼす役割を今後どのように検討していったらよいかなどの質問があった。また、酸化LDLは抗体依存性にマクロファージに結合するが、この結

合がFc receptorを介しているかどうかについてはFc fragmentを調整するなどのさらなる検討が必要と指摘された。

申請者は、現在までの実験結果および論文を引用し概ね適切な回答をした。

この論文は、1) β 2-GPIは単独では抗動脈硬化作用を有する。2) 抗カルジオリピン抗体の存在は血栓症のみならず動脈硬化の危険因子ともなる可能性がある、という2つの新しい知見を示したものであり重要な臨床的意義を持つものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位をうけるのに十分な資格を有するものと判定した。