

学位論文題名

アポトーシスに陥ったリンパ球に対する
 β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) と
抗 β_2 -GPIの結合性の検討

学位論文内容の要旨

多臓器にわたる障害と多彩な自己抗体の出現を認める代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)では、その血栓症・習慣流産・血小板減少などの病態に、抗カルジオリビン抗体(aCL)やループスアンチコアグラント(LA)といった抗リン脂質抗体の存在が関与していることが知られている。SLEの診断基準を満たさず、他の自己免疫疾患の所見を持たない若年発症の脳梗塞、心筋梗塞、肺梗塞患者や、習慣流産患者においても、抗リン脂質抗体が証明されることがあり、このような患者群に対して、抗リン脂質抗体症候群(APS)の名称が用いられるようになった。

近年、aCLはカルジオリビンそのものを認識するのではなく、カルジオリビンと β_2 -グリコプロテインI(β_2 -GPI)の結合したcomplexを認識し、その結合部位(epitope)は、カルジオリビンに結合することで構造変化を起こした β_2 -GPIに出現する“crypticなepitope”であることが示された。このような病的意義のあるaCLは β_2 -GPI依存性aCL、さらには単に抗 β_2 -GPI抗体と呼ばれるようになりつつある。

分子量50kDaの血中糖蛋白である β_2 -GPIは、血漿中に150~300 μ g/mlの濃度で存在しており、カルジオリビンやホスファチジルセリン(PS)などの酸性リン脂質との結合性を有する。活性化血小板では、 β_2 -GPIは脂質二重膜である細胞膜の外層に露出したPSに結合して、カルシウム依存性凝固反応を抑制する。aCL(抗 β_2 -GPI抗体)は、血小板膜に結合した β_2 -GPIに結合し β_2 -GPIの働きを抑制して逆に過凝固の状態に導くと考えられる。PSの露出は活性化血小板のみでみられる現象ではなく、細胞死の一形態であり、“programmed cell death”とも呼ばれるアポトーシスでもその初期段階から認められる。リン脂質結合蛋白でありかつ凝固抑制蛋白であるアネキシンVをプローブとして細胞表面上に露出したPSをflow cytometryで検出すると、アポトーシスの諸変化の進行とよく相関することが示された。アネキシンVは血管内皮細胞内に存在しているのに対し、 β_2 -GPIは血中に高濃度で存在していることから、血流中のアポトーシス細胞に対して容易に結合して影響を及ぼすものと考えられ、アネキシンVとアポトーシス細胞との結合と比較して、臨床的意義が大きいと推測される。

一方、 β_2 -GPIが酸化低比重リポ蛋白(酸化LDL)に結合すること、および酸化LDLに結合した β_2 -GPIに対して更に β_2 -GPI依存性aCL(抗 β_2 -GPI抗体)が結合することによってマクロファージへの酸化LDLの結合が増加することが報告されており、Fcレセプターを介した自己抗体依存的な酸化LDLの貪食機序が存在することが考えられる。アポトーシス細胞は、酸化LDL同様 β_2 -GPIの結合の標的となっており、血中に抗 β_2 -GPI抗体が存在することでアポトーシス細胞が β_2 -GPIを介した抗 β_2 -GPI抗体の結合の標的となり得る。従って、自己抗体依存的

なマクロファージによるアポトーシス細胞貪食の機序が存在する可能性がある。

本研究ではヒトT細胞白血病細胞であるJurkat細胞に抗ヒトFas抗体によりアポトーシスを誘導し、アポトーシスの過程における $\beta 2$ -GPIおよび抗 $\beta 2$ -GPI抗体の生理的意義を解明するために、APS患者由来およびAPSモデルマウス由来のモノクローナル抗 $\beta 2$ -GPI抗体を用いて、これらの抗体のアポトーシス細胞および $\beta 2$ -GPIへの反応性をflow cytometryで検討した。これまでにみられたマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に対する $\beta 2$ -GPIおよび抗 $\beta 2$ -GPI抗体の関与についての報告では、抗 $\beta 2$ -GPI抗体としては $\beta 2$ -GPIを動物に免疫して人為的に作成したもの、あるいは、APS患者由来であってもポリクローナルな抗体が使われており、その反応特異性については必ずしも論じられてはいない。APS患者あるいはAPSモデルマウス由来であり、APS患者血中に認められる抗 $\beta 2$ -GPI抗体と同様 $\beta 2$ -GPI上のcrypticなepitopeを認識する、モノクローナル抗 $\beta 2$ -GPI抗体を用いて解析を行ったのは本研究が初めてである。

Jurkat細胞を抗ヒトFas抗体で刺激しアポトーシスを誘導した結果、経時的な形態学的変化およびDNAの断片化の進行と、アポトーシス誘導細胞への $\beta 2$ -GPIの結合がほぼ並行していることが示された。ヒト $\beta 2$ -GPIをマウスに免疫して得られたモノクローナル抗 $\beta 2$ -GPI抗体では、 $\beta 2$ -GPIの第3ドメインを認識するCof-22抗体ではアポトーシス細胞、 $\beta 2$ -GPI、およびCof-22抗体の三者による複合体を形成する傾向が見られたのに対し、第5ドメインを認識するCof-18抗体を用いた実験ではアポトーシス細胞に対する $\beta 2$ -GPIの結合を抑制する傾向が見られた。 $\beta 2$ -GPI上のcrypticなepitopeを認識するヒトAPS患者由来のモノクローナル抗体(EY-1C8抗体)、あるいはヒトAPSの動物モデル(WBF1マウス)由来の抗体(WB-CAL-1抗体)を用いた場合には、Cof-22抗体と同様にアポトーシス細胞、 $\beta 2$ -GPI、および抗 $\beta 2$ -GPI抗体の三者による複合体を形成する傾向が見られた。しかしながら、抗 $\beta 2$ -GPI抗体の結合が明らかなJurkat細胞数と、 $\beta 2$ -GPIの結合のみが明らかな細胞数とに乖離が認められた。個々のアポトーシス細胞上の $\beta 2$ -GPIの結合量の差や、結合した $\beta 2$ -GPIの構造変化の程度、各抗体の $\beta 2$ -GPIに対する親和性の違いなどが原因となり、 $\beta 2$ -GPIの結合のみが明らかなJurkat細胞数と抗 $\beta 2$ -GPI抗体の結合も明らかとなる細胞数、またその結合程度にこのような差をもたらしていると考えられる。

抗 $\beta 2$ -GPI抗体は $\beta 2$ -GPIを介してアポトーシス細胞に結合することでもAPSの病態形成に関与している可能性が示された。また、抗 $\beta 2$ -GPI抗体のAPSの病態への関与を論じる場合には、用いる抗体が認識するepitopeが正しく把握されていないと、結果に大きな違いが生じることが示された。これらの結果は、APSの病態形成に対する抗 $\beta 2$ -GPI抗体の果たす役割を解明する上で、重要な情報を与えるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

アポトーシスに陥ったリンパ球に対する

β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) と

抗 β_2 -GPI の結合性の検討

本研究は、抗リン脂質抗体症候群患者に出現する、酸性リン脂質と β_2 -glycoprotein I(β_2 -GPI)との複合体を認識し、酸性リン脂質に結合した β_2 -GPI上に露出される”cryptic な epitope”に結合する抗 β_2 -GPI 抗体が、細胞死の一形態であるアポトーシスに陥ったリンパ球をターゲットとして結合しうることを示すものである。研究にあたっては、マウスにヒト β_2 -GPI を免役して得られた抗ヒト β_2 -GPI 抗体 (Cof-22 抗体、Cof-18 抗体)、抗リン脂質抗体症候群のモデルマウス由来の”cryptic な epitope “に結合する抗 β_2 -GPI 抗体(WB-CAL-1 抗体)、抗リン脂質抗体症候群患者に由来する”cryptic な epitope “に結合する抗 β_2 -GPI 抗体 (EY-1C8 抗体)の、すべてモノクローナルな抗体を用いた。ヒトT細胞性白血病細胞である Jurkat 細胞を抗ヒト Fas 抗体を用いてアポトーシスに誘導し、ヒト血漿から精製した β_2 -GPI をビオチン化し、アポトーシス細胞への β_2 -GPI の結合を flow cytometry で観察したところ、アポトーシスの進行過程と β_2 -GPI 結合細胞の出現は平行して認められた。また、ビオチン化 β_2 -GPI とともに β_2 -GPI 上の異なるドメインを認識する抗 β_2 -GPI 抗体を加え、ビオチン化 β_2 -GPI のアポトーシス細胞への結合にどのような影響を与えるのかを観察した。アポトーシス細胞への β_2 -GPI の結合は、 β_2 -GPI のリン脂質への結合部位を含む第5ドメインを認識して結合する Cof-18 抗体によって抑制されたが、第3ドメインを認識する Cof-22 抗体では抑制されなかった。このことより、抗体が認識するエピトープが異なると、抗 β_2 -GPI 抗体がアポトーシス細胞への β_2 -GPI の結合に与える影響は違ったものになりうることを示された。また、アポトーシス細胞への β_2 -GPI の結合には β_2 -GPI のリン脂質結

合部位が重要であることが示された。また、 $\beta 2$ -GPI を介しての抗 $\beta 2$ -GPI 抗体のアポトーシス細胞への結合を flow cytometry で検討したところ、抗 $\beta 2$ -GPI 抗体が結合したアポトーシス細胞の出現もまた、アポトーシスの進行に沿って増加していた。これらの結果により、アポトーシス細胞は $\beta 2$ -GPI と抗 $\beta 2$ -GPI 抗体との複合体を形成する事が示された。また、マクロファージ(M ϕ)の Fc-レセプター(Fc-R)を介して貪食除去されうること、抗リン脂質抗体症候群において出現する抗 $\beta 2$ -GPI 抗体は、アポトーシス細胞への結合によっても病態形成に関与しうることが考えられた。発表終了後、副査の吉木教授からM ϕ を用いた実験の有無、スカベンジャーレセプターを介する貪食と Fc-R を介した貪食での差の有無、血小板以外に活性化された細胞に対して $\beta 2$ -GPI と抗 $\beta 2$ -GPI 抗体の結合の可能性についての質問があった。続いて、副査の上出教授から、実際に $\beta 2$ -GPI と抗 $\beta 2$ -GPI 抗体およびアポトーシス細胞による複合体の患者血中での増加の確認の有無、 $\beta 2$ -GPI と抗 $\beta 2$ -GPI 抗体との複合体がもたらす影響は、凝固系に対する場合とM ϕ による貪食処理とどちらに優位に働くのか、 $\beta 2$ -GPI とアネキシン-V とではどちらの方がアポトーシスの検出の感度がよいのか、 $\beta 2$ -GPI と抗 $\beta 2$ -GPI 抗体、およびアポトーシス細胞による複合体は一般の免疫複合体と同様に考えてよいのかとの質問があった。これらの質問に対し、申請者は概ね適切な回答をした。最後に、今後の研究に対する展望を述べ、質疑応答を終了した。

この論文は、抗リン脂質抗体症候群において出現する主要な自己抗体である抗 $\beta 2$ -GPI 抗体の生体内での役割の一部を解明する研究として高く評価され、今後の研究により抗リン脂質抗体症候群の病態形成機序の一端が解明されるものと期待される。

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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。