

抗リン脂質抗体症候群患者由来モノクローナル 抗プロトロンビン抗体の作成とその特性

学位論文内容の要旨

1. 緒言

抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome, APS)は、血中にリン脂質に対する自己抗体が検出され、各種動静脈血栓症や習慣流産などの妊娠合併症をはじめとする多彩な臨床症状を呈する症候群である。代表的な抗リン脂質抗体には、固相酵素抗体法(Enzyme immunoassay, EIA)で検出される抗カルジオリピン抗体と活性化部分トロンボプラスチン時間などのリン脂質依存性の凝固時間の延長で判定されるループスアンチコアグラント(lupus anticoagulant, LA)があるが、LA陽性のAPS患者において抗プロトロンビン(prothrombin, PT)抗体がしばしば検出されることが明らかとなり、抗PT抗体とLAの関連が指摘されるようになった。しかし過去の報告では、抗PT抗体とAPSの臨床症状との関連については報告により差異がみられていた。抗PT抗体の検出には、通常EIA法が用いられるが、酸素化プレートに直接固相化されたPTを抗原とする方法(aPT-oxygenated)と、カルシウム存在下にホスファチジルセリン(PS)とPTの複合体を抗原とするPS依存性抗PT抗体(aPS/PT)の二種類がある。近年aPT-oxygenatedと比較しaPS/PTがAPSの臨床症状とLAの存在に強く相関することが明らかとなり、PSとPTの複合体がLAの対応抗原の一つであることが示唆された。以上のような背景からaPS/PTのAPSの病態に及ぼす影響を検討するために、APS患者よりモノクローナルaPS/PTを作成し、その免疫学的特異性ならびに、凝固学的特性を検討した。

2. 方法

APS患者末梢血より単核球を採取し、B細胞マーカーであるCD19に対する抗体が結合した磁性ビーズを使用しB細胞を精製した。続いて、Epstein-BarrウイルスをB細胞に添加しトランスフォーメーションを行い、aPS/PT抗体産生能を持つトランスフォームされたB細胞を、免疫グロブリン非産生のマウスとヒトのヘテロハイブリドーマとポリエチレングリコールを用い細胞融合をおこなった。その後aPS/PT産生ハイブリドーマを限界希釈法を繰り返すことによりクローニングした。aPS/PT産生ハイブリドーマを大量に培養し、培養上清を回収し、ゲルろ過法を用いて精製をおこなった。樹立したモノクローナル抗体の免疫学的特異性を検討するために、(1)PSとPTとの複合体に対する結合性、(2)酸素化プレートに直接固相化されたPTに対する結合性、(3)非酸素化プレートに直接固相化されたPTに対する結合性をEIA法で検討した。さらにモノクローナル抗体のエピトープを検討するために、リン脂質結合部位であるGlaドメインを有するPTのN末端側のフラグメント1とPSの複合体に対する結合性をEIA法で検討した。次にモノクローナル抗体の、APSで認められる抗カルジオリピン抗体の対応抗原である β 2-グリコプロテイン I (β 2-GPI)への結合

性および PT と同様に N 末端にリン脂質結合部位である Gla ドメインを持つ第 X 因子、第 VII 因子への結合性を EIA 法で検討した。またモノクローナル抗体が LA 活性を有するか否かを検討するため、活性化第 X 因子、第 V 因子、リン脂質、カルシウムイオンからなるプロトロンビナーゼ複合体による α -トロンビン生成に対するモノクローナル抗体の影響を、 α -トロンビンに特異的な合成基質 S-2238 を用いて検討した。リン脂質濃度の影響を検討するため添加するリン脂質濃度が低い条件と高い条件で検討を行なった。

3. 結果

2 例の APS 患者より、4 種類の IgM クラスのモノクローナル抗体(HG-4, KE-6, KF-5, KF-6)を作成した。樹立した 4 種のモノクローナル抗体はすべて aPS/PT 活性を持っていた。酸素化プレートに結合した PT に対する結合性は異なり、HG-4, KF-5, KF-6 は結合性が認められなかったものの、KE-6 は 1 μ g/ml の濃度で結合性が認められた。いずれのモノクローナル抗体も、非酸素化プレートに直接固相化した PT には結合しなかった。作成した 4 種のモノクローナル抗体とも PS とフラグメント 1 の複合体に対する結合は認められなかった。4 種のモノクローナル抗体とも β 2-GPI 依存性抗カルジオリピン抗体活性は認められず、PS と第 VII 因子、第 X 因子の複合体のいずれにも結合しなかった。トロンビン生成に及ぼす検討では、コントロールのヒトポリクローナル IgM の存在下でのトロンビン生成を 100%とした場合、リン脂質が低濃度と高濃度でのトロンビン生成はそれぞれ、HG-4 の存在下では 83.9%と 101.9%、KE-6 の存在下では 67.1%と 101%、KF-5 存在下では 41.3%と 83.8%であった。これらの 3 クローンは、リン脂質濃度を上げることによりトロンビン生成に対する抑制効果は減弱する傾向がみとめられ、LA 活性を有すると考えられた。一方、KF-6 はリン脂質濃度に関わらず、明らかなトロンビン生成の抑制効果は認められなかった。

4. 結語

2 例の APS 患者末梢血リンパ球より、4 種の IgM クラスのモノクローナル aPS/PT を作成した。4 種のモノクローナル抗体うち 3 種は、酸素化プレートに直接固相化された PT には結合せず、1 種のモノクローナル抗体は酸素化プレートに直接固相化された PT にも結合したことより、aPS/PT は aPT-oxygenated と異なった抗体と考えられるが、一部に aPT-oxygenated としての活性をもつものがあることが示された。カルシウムの存在下に PT が PS と結合すると酸素化プレートの場合とは異なる高次構造の変化が起こり、aPS/PT が認識するエピトープが表出する可能性が考えられた。4 種のモノクローナル抗体とも、PT の N 末端のフラグメント 1 と PS の複合体には結合しなかったことから、aPS/PT の認識するエピトープは PS に結合したフラグメント 1 分子上には表出しておらず、エピトープの形成には、さらに C 末端側の構造が必要であると考えられた。また 3 種のモノクローナル抗体は、in vitro でトロンビン生成を抑制し、LA 活性を持つことが明らかとなったが、一部にもたないものがあり多様性があることが示された。今後 APS の病態に及ぼす aPS/PT の影響を検討し、また測定系の標準化を行う際に、本研究で樹立したこれらのモノクローナル抗体は有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

抗リン脂質抗体症候群患者由来モノクローナル 抗プロトロンビン抗体の作成とその特性

抗リン脂質抗体症候群(APS)は、各種動静脈血栓症や習慣流産などの妊娠合併症をはじめとする多彩な臨床症状を呈し、検査所見としては血中に $\beta 2$ -グリコプロテイン I($\beta 2$ -GPI)依存性抗カルジオリピン抗体やリン脂質依存性の凝固時間の延長で判定されるループスアンチコアグラント(LA)が認められる症候群である。近年 LA 陽性の APS 患者に抗プロトロンビン(PT)抗体がしばしば検出されることが明らかとなり、抗 PT 抗体と LA の関連が指摘されるようになった。抗 PT 抗体の固相酵素抗体法による検出には、酸素化プレートに直接固相化された PT を抗原とする方法(aPT-oxygenated)と、カルシウム存在下にホスファチジルセリン(PS)と PT の複合体を抗原とする PS 依存性抗 PT 抗体(aPS/PT)の二種類がある。近年 aPT-oxygenated と比較し aPS/PT が APS の臨床症状と LA の存在に強く相関することが明らかとなった。aPS/PT の APS の病態に及ぼす影響を検討するため APS 患者よりモノクローナル aPS/PT を作成し、その免疫学的特異性ならびに凝固学的特性を検討した。

APS 患者末梢血より、磁性ビーズを使用し B 細胞を精製し、続いて EB ウイルスを添加しトランスフォームさせ培養を行なった。aPS/PT 産生細胞をスクリーニングし、パートナー細胞と細胞融合を行いハイブリドーマを樹立した。限界希釈法を繰り返しクローニングしたのち、aPS/PT 産生ハイブリドーマを大量に培養し、培養上清を精製しモノクローナル抗体を得た。2 例の APS 患者より計 4 種の IgM 型モノクローナル aPS/PT(HG-4、KE-6、KF-5、KF-6)を樹立した。樹立した 4 種のモノクローナル抗体はすべて aPS/PT 活性を持っていたが、aPT-oxygenated 活性は異なり、HG-4、KF-5、KF-6 は活性が認められなかったものの、KE-6 は 1 μ g/ml の濃度で活性が認められた。いずれの抗体も、非酸素化プレートに直接固相化した PT には結合しなかった。また 4 種の抗体とも PT の N 末端側のドメインであるフラグメント 1 と PS の複合体に対する結合は認められなかった。さらに 4 種の抗体とも $\beta 2$ -GPI 依存性抗カルジオリピン抗体活性は認められず、PS と第 VII 因子、第 X 因子の複合体のいずれにも結合しなかった。トロ

ンビン生成に及ぼす検討では、3種の抗体(HG-4、KE-6、KF-5)は、トロンビン生成を抑制し、その抑制効果はリン脂質濃度を上げることにより減弱する傾向がみとめられ、LA活性を有すると考えられた。一方、KF-6はリン脂質濃度に関わらず、明らかなトロンビン生成の抑制効果は認められなかった。

本研究の結果から aPS/PT は aPT-oxygenated と異なった抗体と考えられるが、一部にオーバーラップがあることが示された。カルシウムの存在下に PT が PS と結合すると PT 分子に酸素化プレートの場合とは異なる高次構造の変化が起こり、aPS/PT が認識するエピトープが表出する可能性が考えられた。4種のモノクローナル抗体とも、PT の N 末端のフラグメント 1 と PS の複合体には結合しなかったことから、aPS/PT の認識するエピトープは C 末端側のプレトロンビン 1 に存在するものと考えられた。また 3 種のモノクローナル抗体は、*in vitro* でトロンビン生成を抑制し、LA 活性を持つことが明らかとなったが、一部にもたないものがあり多様性があることが示された。

質疑応答においては、副査の小林教授から、同様の抗原特異性を持つモノクローナル抗体が同一部位を認識している可能性の有無、IgM をモノマーにしての検討の有無、抗体がトロンビンの生成を抑制するのか、あるいは機能を抑制するのか、などについて質問があった。次いで、副査の清水教授から、aPS/PT 陽性患者と aPT-oxygenated 陽性患者の臨床像の相違、樹立された抗体が IgG ではなく、すべて IgM であった理由、モノクローナル抗体を用いての研究の今後の展望について質問があった。最後に、主査の小池教授から抗 PT 抗体をはじめとした抗リン脂質抗体の産生機序、APS の病因についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はこれまでの文献的報告および実験結果を引用し、概ね適切に回答した。

本研究で樹立したモノクローナル抗体は、APS の病態に及ぼす aPS/PT の影響を検討し、また測定系の標準化を行ううえで、今後有用性が期待される。

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。