

学 位 論 文 題 名

The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti- β_2 Glycoprotein I antibodies

(ヒトモノクローナル抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体刺激における
p38 MAPK 経路による組織因子産生に関する研究)

学位論文内容の要旨

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome : 以下 APS) は、 β_2 グリコプロテイン I (以下 β_2 GPI) 依存性抗カルジオリピン抗体 (以下抗 CL/ β_2 GPI 抗体)、ループスアンチコアグラントなどの抗リン脂質抗体と総称される一群の自己抗体が引き起こす自己免疫性血栓性疾患である。抗リン脂質抗体が血管内皮細胞や単球系細胞に直接作用し、凝固のイニシエーターである組織因子 (tissue factor : 以下 TF) を細胞表面に発現することにより凝固系を活性化することにより、易血栓性が誘導されることが知られている。しかし、抗体が対応抗原である β_2 GPI やプロトロンビン等のリン脂質に結合した凝固・線溶を制御するタンパクに結合した後の細胞刺激シグナルについては明らかにされていない点が多い。

今回、我々は、抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナル、細胞活性化メカニズムについて検討を行うことにより APS 発症機構を解明することを目的とした。

末梢血単核球および単球系細胞株を用いて、APS 患者の末梢血リンパ球より樹立したヒトモノクローナル IgM 型抗 CL/ β_2 GPI 抗体 (EY2C9) により刺激し、検討を行った。遺伝子発現の挙動については、ヒト末梢血単核球を用いて、cDNA アレイおよびリアルタイム PCR 法により検討を行った。その結果をふまえて、単球系細胞株 RAW264.7 を用いて抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による MAPK 経路のリン酸化についてウエスタンブロットング法で検討した。

cDNA アレイおよびリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析より、MAPK 経路が抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による TF 発現に関わっていることが示唆された。さらに、ウエスタンブロットング法での解析にて、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による細胞刺激により、p38 MAPK のリン酸化および NF κ B の核内移行が認められた。また、特異的 p38 阻害薬 (SB203580) にて抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による p38 MAPK リン酸化が阻害され、リアルタイム PCR 法において TF 発現の抑制も確認された。また、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による p38 MAPK リン酸化は、 β_2 GPI の非存在下では認められなかった。さらに、遺伝子発現解析の結果から、TNF α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインやケモカインの発現亢進が認められた。

p38MAPK 経路は、抗リン脂質抗体刺激による単球からの TF 発現に重要な役割を果たしていると考えられた。抗 CL/ β_2 GPI 抗体による刺激により p38MAPK のリン酸化に引

き続き、NF κ B が核内へと移行し、TF プロモーターに結合し、TF 転写が誘導されてくる可能性が考えられる。これまでの研究から、抗リン脂質抗体症候群患者由来のモノクローナル抗 β_2 GPI 抗体は、培養内皮細胞に接着因子(ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトイン)の発現を誘導し、さらにモノクローナル抗 β_2 GPI 抗体は、単球や内皮細胞にも外因系凝固反応のトリガーである TF の mRNA や蛋白を誘導することが示されている。p38MAPK 阻害により TF 発現が抑制されるという今回の研究の結果より、p38MAPK 経路の制御は APS 患者の血栓向性に対する新たな治療法と成り得る可能性が考えられる。また、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による TF の発現は β_2 GPI が存在しているときにのみ認められ、単球の細胞活性化は β_2 GPI に依存する、すなわち細胞と β_2 GPI に結合した自己抗体との interaction によるものであると考えられる。 β_2 GPI はいわばアンカーとして存在しており、受容体分子や共役分子の存在が想定され、今後その分子の同定が必要である。

TF を中心にした向凝固性の蛋白誘導の細胞内刺激伝達システムをより詳細に解析することにより、APS 発症のメカニズムを解明するのみならず、難治性である APS の新しい治療法の確立が期待される。p38MAPK 経路の制御による TF 発現の制御は、APS の血栓向性にたいする特異的な治療の一つとなる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti- β_2 Glycoprotein I antibodies

(ヒトモノクローナル抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体刺激における
p38 MAPK 経路による組織因子産生に関する研究)

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome : 以下 APS) は、 β_2 グリコプロテイン I (以下 β_2 GPI) 依存性抗カルジオリピン抗体 (以下抗 CL/ β_2 GPI 抗体)、ループスアンチコアグラントなどの抗リン脂質抗体と総称される一群の自己抗体が引き起こす自己免疫性血栓性疾患である。抗リン脂質抗体が血管内皮細胞や単球系細胞に直接作用し、凝固のイニシエーターである組織因子 (tissue factor : 以下 TF) を細胞表面に発現することにより凝固系を活性化することにより、易血栓性が誘導されることが知られている。しかし、抗体が対応抗原である β_2 GPI やプロトロンビン等のリン脂質に結合した凝固・線溶を制御するタンパクに結合した後の細胞刺激シグナルについては明らかにされていない点が多い。本研究では、抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナル、細胞活性化メカニズムについて検討を行うことにより APS 発症機構を解明することを目的とした。

末梢血単核球および単球系細胞株を用いて、APS 患者の末梢血リンパ球より樹立したヒトモノクローナル IgM 型抗 CL/ β_2 GPI 抗体 (EY2C9) により刺激し、検討を行った。遺伝子発現の挙動については、ヒト末梢血単核球を用いて、cDNA アレイおよびリアルタイム PCR 法により検討を行った。その結果をふまえて、単球系細胞株 RAW264.7 を用いて抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による MAPK 経路のリン酸化についてウエスタンブロッティング法で検討した。cDNA アレイおよびリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析より、MAPK 経路が抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による TF 発現に関わっていることが示唆された。さらに、ウエスタンブロッティング法での解析にて、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による細胞刺激により、p38 MAPK のリン酸化および NF κ B の核内移行が認められた。また、特異的 p38 阻害薬 (SB203580) にて抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による p38 MAPK リン酸化が阻害され、リアルタイム PCR 法において TF 発現の抑制も確認された。また、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による p38 MAPK リン酸化は、 β_2 GPI の非存在下では認められなかった。さらに、遺伝子発現解析の結果から、TNF α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインやケモカインの発現亢進が認められた。p38 MAPK 経路は、抗リン脂質抗体刺激による単球からの TF 発現に重要な役割を果たしていると考えられた。抗 CL/ β_2 GPI 抗体による刺激により p38 MAPK のリン酸化に引き続き、NF κ B が核内へと移行し、TF プロモーターに結合し、TF 転写が誘導されてくる可能性が考えられた。

これまでの研究から、抗リン脂質抗体症候群患者由来のモノクローナル抗 β_2 GPI 抗体は、培養内皮細胞に接着因子(ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトリン)の発現を誘導し、さらにモノクローナル抗 β_2 GPI 抗体は、単球や内皮細胞にも外因系凝固反応のトリガーである TF の mRNA や蛋白を誘導することが示されている。p38 MAPK 阻害により TF 発現が抑制されるという今回の研究の結果より、p38 MAPK 経路の制御は APS 患者の血栓向性に対する新たな治療法と成り得る可能性が考えられた。また、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による TF の発現は β_2 GPI が存在しているときにのみ認められ、単球の細胞活性化は β_2 GPI に依存する、すなわち細胞と β_2 GPI に結合した自己抗体との interaction によるものであると考えられた。

質疑応答では、副査今村教授から、単球系細胞ではなく血管内皮細胞でも同様の結果が得られるか、他の凝固促進物質における組織因子発現と p38 MAPK 経路との関連について、抗リン脂質抗体症候群の治療へ応用するための p38 MAPK 経路に関わるより特異的な因子の有無についての質問があった。次いで主査畠山教授から、刺激抗体は IgM 抗体であることが必須条件であるか、RNA レベルでの発現の差のタンパクレベルでの確認について、抗体刺激による p38 MAPK 発現亢進の有無について、分泌型タンパクである β_2 GPI が細胞に刺激を伝える機序についての質問があった。次いで副査小池教授から、研究成果を踏まえて今後の臨床応用への展望についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

この論文は、APS の易血栓性の誘因となる TF の発現に p38 MAPK 経路が関わることを初めて明らかにした点で高く評価され、本論文の成果から今後の APS の病態解明と新しい治療開発が期待される。

審査委員一同は、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。