

博士(医学)酒井良江

学位論文題名

ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の
血栓原性についての検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome: APS) は、全身の動脈血栓症や妊娠合併症を主症状とし、抗リン脂質抗体が証明される自己免疫疾患である。抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies: aPL) は、凝固学的検査によるループアンチコアグulant (lupus anticoagulant: LA) あるいは、固相酵素抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) で検出される。ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibody: aPS/PT) は、 Ca^{2+} の存在下でリン脂質と結合したヒトプロトロンビンを認識する抗体であり、そのエピトープはプロトロンビンがリン脂質に結合した際にあらたに表出するものであることが推定されている。また aPS/PT は、LA の責任抗体であること、APS の臨床症状に強い相関をもつことが示されており、APS の病態形成において重要な役割を担うものと考えられてきた。APS 患者においては、*in vitro* で LA は "anticoagulant" としてはたらき、*in vivo* では "procoagulant" をしめすというパラドックスが存在する。しかし、aPS/PT の *in vivo* における血栓形成にたいする病理学的機序および、*in vitro* におけるループアンチコアグulant の機序、抗体が認識するエピトープはまだ解明されていない。aPS/PT が APS 患者の血栓形成傾向におよぼす作用について検討するため、aPS/PT 陽性の APS 患者と健常人における血栓形成マーカーと線溶亢進をあらわすマーカーを測定した。さらに、*In vitro* における aPS/PT の LA 作用について、マウスモノクローナル aPS/PT を用いてトロンビン生成に対する効果について検討した。

【対象と方法】APS 診断基準を満たす患者 36 人と 127 人の健常人について、トロンビン生成マーカーとして血漿中プロトロンビンフラグメント 1+2、トロンビン - アンチトロンビン複合体、線溶亢進マーカーとして、可溶性フィブリン、D ダイマー、フィブリン／フィブリン溶解産物を測定した。APS 患者については、血栓症状の出現から最短でも 6 ヶ月以上経過したのちに採取した静脈血を用いて行なった。

また、8 週令のメス Balb/c マウスにヒトプロトロンビンを免疫して得た脾臓細胞からハイブリドーマを作成し、マウスモノクローナル抗プロトロンビン抗体、231D を得た。モノクローナル抗体の免疫学的特徴を検討するため、ホスファチジルセリンとプロトロンビンの複合体 (PS/PT)、およびプロトロンビン単独に対する結合性につき ELISA 法にて検討した。また、231D と APS 患者 aPS/PT の抗原認識部位の共通性を検討するため、APS 患者血漿から精製した IgG と PS/PT の結合の、231D の拮抗阻害作用についての検討をおこなった。さらに、*in vitro* でトロンビン複合体 (リン脂質、 $CaCl_2$ 、ヒト精製活性化第 V 因子 (FVa)、ヒト活性化第 X 因子 (FXa)、ヒト精製プロトロンビン) からトロンビンが生成される系を作成し、231D を添加によるトロンビン生成に対する効果について検討した。

【結果】血漿中のトロンビン生成マーカーと線溶亢進マーカーレベルは、aPS/PT 陽性患者において、健常人と比較し基準値以上である率が有意に高かった。マウスモノクローナル抗プロトロンビン抗体の免疫学的特徴についての検討では、231D は PS/PT に強く結合し、プロ

トロンビン単独への結合は弱かった。エピトープの共通性についての検討では、固相化 PS/PT に対する ELISA において、aPS/PT 陽性 APS 患者 IgG の PS/PT に対する結合は、231D によって 35-70% 抑制された。In vitro におけるトロンビン生成に対する 231D の効果についての検討では、FVa が 0 あるいはごく低濃度 (0.1 ng/mL) の条件においては、231D はトロンビン生成を濃度依存的に最大 87%まで増加させた。反対に、高濃度の FVa (1.0 ng/mL) が存在するとき、231D はトロンビン生成を最大 35%まで減少させた。FVa 非存在下においては、FXa 濃度の上昇にともなって、231D のトロンビン生成増強効果が亢進した。FXa 濃度が上昇するにつれ、231D のトロンビン生成抑制効果は消失した。

【考察】aPS/PT 陽性 APS 患者では、血栓症状を生じていない状態においても健常人に比し血漿中でトロンビン生成亢進および線溶亢進状態にあることから、aPS/PT の存在が in vivo における APS の向血栓状態に関与している可能性が考えられた。また、231D は PS/PT を認識し、PS/PT 上で APS 患者 aPS/PT と部分的にエピトープを共有することから、同抗体が APS 患者 aPS/PT と類似の性質を持つと考えられた。このモノクローナル抗体を用いた、トロンビン生成に対する効果について検討においては、231D のトロンビン生成抑制効果は FVa 依存性であったことから、その効果は FVa の阻害作用であることが推測された。FVa 非存在下における 231D のトロンビン生成亢進作用については、231D がプロトロンビンとホスファチジルセリンの親和性を高め、リン脂質表面におけるプロトロンビン濃度を高めることでトロンビン生成を亢進させた可能性が推測された。231D が FVa と FXa の濃度バランスによってトロンビン生成に対し相反する効果を持っていることから、これが aPS/PT の in vitro と in vivo のトロンビン生成にたいするパラドックスに関わっている可能性が考えられた。

【結論】ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) 陽性抗リン脂質抗体症候群 (APS) 患者では、非血栓時においても凝固線溶亢進状態にあることを明らかにし、同抗体が in vivo での APS の向血栓状態に関与している可能性を示した。ホスファチジルセリン依存性マウスモノクローナル抗ヒトプロトロンビン抗体、231D がホスファチジルセリン結合プロトロンビン (PS/PT) を認識し、PS/PT 上で APS 患者 aPS/PT と部分的にエピトープを共有することを明らかにし、同抗体が APS 患者 aPS/PT と類似の性質を持つことを示した。231D は in vitro において、活性化第 V 因子 (FVa) 非存在下においてはトロンビン生成を亢進させ、FVa 高濃度においてはそれを抑制することを明らかにし、231D が FVa と活性化第 X 因子 (FXa) 濃度のバランスにより、トロンビン生成亢進と抑制の相反する効果を示すことを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査教授 小池 隆夫

副査教授 畠山 鎮次

副査教授 今村 雅寛

学位論文題名

ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の 血栓原性についての検討

【背景と目的】抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome: APS)は、全身の動脈血栓症や妊娠合併症を主症状とし、抗リン脂質抗体が証明される自己免疫疾患である。抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibodies: aPL)は、凝固学的検査によるループスアンチコアグulant(lupus anticoagulant: LA)あるいは、固相酵素抗体法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)で検出される。ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibody: aPS/PT)は、 Ca^{2+} の存在下でリン脂質と結合したヒトプロトロンビンを認識する抗体であり、そのエピトープはプロトロンビンがリン脂質に結合した際にあらたに表出するものであることが推定されている。また aPS/PT は、LA の責任抗体であること、APS の臨床症状に強い相関をもつことが示されており、APS の病態形成において重要な役割を担うものと考えられてきた。APS 患者においては、*in vitro* で LA は “anticoagulant” としてはたらき、*in vivo* では “procoagulant” をしめすというパラドックスが存在する。しかし、aPS/PT の *in vivo* における血栓形成にたいする病理学的機序および、*in vitro* におけるループスアンチコアグulantの機序、抗体が認識するエピトープはまだ解明されていない。aPS/PT が APS 患者の血栓形成傾向におよぼす作用について検討するため、aPS/PT 陽性の APS 患者と健常人における血栓形成マーカーと線溶亢進をあらわすマーカーを測定した。さらに、*in vitro* における aPS/PT の LA 作用について、マウスモノクローナル aPS/PT を用いてトロンビン生成に対する効果について検討した。

【対象と方法】APS 診断基準を満たす患者 36 人と 127 人の健常人について、トロンビン生成マーカーとして血漿中プロトロンビンフラグメント 1+2、トロンビン-アンチトロンビン複合体、線溶亢進マーカーとして、可溶性フィブリン、D ダイマー、フィブリン／フィブリン溶解産物を測定した。APS 患者については、血栓症状の出現から最短でも 6 ヶ月以上経過したのちに採取した静脈血を用いて行なった。また、8 週令のメス Balb/c マウスにヒトプロトロンビンを免疫して得た脾臓細胞からハイブリドマを作成し、マウスモノクローナル抗プロトロンビン抗体、231D を得た。モノクローナル抗体の免疫学的特徴を検討するため、ホスファチジルセリンとプロトロンビンの複合体(PS/PT)、およびプロトロンビン単独に対する結合性につき ELISA 法にて検討した。また、231D と APS 患者 aPS/PT の抗原認識部位の共通性を検討するため、APS 患者血漿から精製した IgG と PS/PT の結合の、231D の拮抗阻害作用についての検討をおこなった。さらに、*in vitro* でトロンビン複合体(リン脂質、 $CaCl_2$ 、ヒト精製活性化第 V 因子(FVa)、ヒト活性化第 X 因子(FXa)、ヒト精製プロトロンビン)からトロンビンが生成される系を作成し、231D を添加によるトロンビン生成に対する効果について検討した。

【結果】血漿中のトロンビン生成マーカーと線溶亢進マーカーレベルは、aPS/PT 陽性患者において、健常人と比較し基準値以上である率が有意に高かった。マウスモノクローナル抗プロトロンビン抗体の免疫学的特徴についての検討では、231D は PS/PT に強く結合し、プロトロンビン単独への結

合は弱かった。エピトープの共通性についての検討では、固相化 PS/PT に対する ELISAにおいて、aPS/PT 陽性 APS 患者 IgG の PS/PT に対する結合は、231D によって 35-70% 抑制された。In vitro におけるトロンビン生成に対する 231D の効果についての検討では、FVa が 0 あるいはごく低濃度 (0.1 ng/mL) の条件においては、231D はトロンビン生成を濃度依存的に最大 87% まで増加させた。反対に、高濃度の FVa (1.0 ng/mL) が存在するとき、231D はトロンビン生成を最大 35% まで減少させた。FVa 非存在下においては、FXa 濃度の上昇にともなって、231D のトロンビン生成増強効果が亢進した。FXa 濃度が上昇するにつれ、231D のトロンビン生成抑制効果は消失した。

【考察】aPS/PT 陽性 APS 患者では、血栓症状を生じていない状態においても健常人に比し血漿中でトロンビン生成亢進および線溶亢進状態にあることから、aPS/PT の存在が in vivo における APS の向血栓状態に関与している可能性が考えられた。また、231D は PS/PT を認識し、PS/PT 上で APS 患者 aPS/PT と部分的にエピトープを共有することから、同抗体が APS 患者 aPS/PT と類似の性質を持つと考えられた。このモノクローナル抗体を用いた、トロンビン生成に対する効果について検討においては、231D のトロンビン生成抑制効果は FVa 依存性であったことから、その効果は FVa の阻害作用であることが推測された。FVa 非存在下における 231D のトロンビン生成亢進作用については、231D がプロトロンビンとホスファチジルセリンの親和性を高め、リン脂質表面におけるプロトロンビン濃度を高めることでトロンビン生成を亢進させた可能性が推測された。231D が FVa と FXa の濃度バランスによってトロンビン生成に対し相反する効果を持っていることから、これが aPS/PT の in vitro と in vivo のトロンビン生成にたいするパラドックスに関わっている可能性が考えられた。

【結論】ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) 陽性抗リン脂質抗体症候群 (APS) 患者では、非血栓時においても凝固線溶亢進状態にあることを明らかにし、同抗体が in vivo での APS の向血栓状態に関与している可能性を示した。ホスファチジルセリン依存性マウスモノクローナル抗ヒプロトロンビン抗体、231D がホスファチジルセリン結合プロトロンビン (PS/PT) を認識し、PS/PT 上で APS 患者 aPS/PT と部分的にエピトープを共有することを明らかにし、同抗体が APS 患者 aPS/PT と類似の性質を持つことを示した。231D は in vitro において、活性化第 V 因子 (FVa) 非存在下においてはトロンビン生成を亢進させ、FVa 高濃度においてはそれを抑制することを明らかにし、231D が FVa と活性化第 X 因子 (FXa) 濃度のバランスにより、トロンビン生成亢進と抑制の相反する効果を示すことを明らかにした。

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充分な資格を有するものと判定した。