

学 位 論 文 題 名

抗リン脂質抗体症候群における向血栓細胞活性化機序

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 抗リン脂質抗体症候群 (APS) は一群の病原性自己抗体である抗リン脂質抗体 (APL) に関連する全身の動静脈血栓症および妊娠合併症を主病態とする。APL は、血漿蛋白と陰性荷電リン脂質の複合体に対応する自己抗体で、主な抗体は β_2 グリコプロテイン I (β_2 GPI) 依存性抗カルジオリピン抗体 ($\alpha\beta_2$ GPI/CL) である。これは血漿蛋白である β_2 GPI と陰性荷電リン脂質であるカルジオリピンの複合体に対する自己抗体である。一方、ループスアンチコアグラント (LAC) は凝固検査を用いて機能的に APL を検出するので、間接的に自己抗体の存在を証明する。これは APL が単一の自己抗体ではなく複数存在するためである。

APS の病態機序は不明な点が多いが、 $\alpha\beta_2$ GPI/CL のモノクローナル抗体を用いた検討から APL が直接、向血栓細胞 (血栓形成に関与する細胞; 血管内皮細胞、単球、血小板) を活性化する機序が重要と考えられている。 $\alpha\beta_2$ GPI/CL モノクローナル抗体を血漿蛋白と共にこれら細胞に対して *in vitro* で投与すると細胞内シグナル蛋白である p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介して、これら細胞が活性化される。活性化の際に、単球や血管内皮細胞の表面に発現する組織因子 (TF) は外因系凝固カスケードを開始する、凝固反応において重要な分子である。また、血管内皮細胞は活性化により接着因子を発現し、単球をはじめ様々な細胞の局所への吸着を促進する。これらの反応によって血栓傾向を得ると考えられている。この機序は $\alpha\beta_2$ GPI/CL で確認されているが、他の APL ではこれまで確認されていなかった。近年、 $\alpha\beta_2$ GPI/CL と並んで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) が主要な APL と考えられるようになってきたが、我々はそのモノクローナル抗体である 231D を作成した。231D は、aPS/PT ELISA で特異的に検出され、濃度依存性に LAC 活性を有するため、自己免疫性 aPS/PT の機能を代替していると推測される。本研究では 231D を用いることによって aPS/PT の向血栓細胞活性化について検討した。

更に、近年、モデルマウスにおいて APS 妊娠合併症に補体活性化が関与することが報告され、APS 血栓症に対しても向血栓細胞活性化を惹起することによって関与すると推定されていた。補体活性化に伴い産生される各補体蛋白の断片ペプチド (アナフィラトキシン; C3a, C4a, C5a) が重要な分子であり、向血栓細胞をアナフィラトキシンレセプターを介して活性化する。更に、主に活性化された単球によって分泌される腫瘍壊死因子 (TNF) α が、2 次的に向血栓細胞を活性化させるという機序が推定されていた。APS はしばしば全身性エリテマトーデス (SLE) に合併し (2 次性 APS)、SLE では補体活性化を頻繁に認める。しかし、非 SLE 合併 APS 患者 (原発性 APS) において補体活性化の存在や病態における意義は不明であった。本研究では APS 患者における補体活性化の病態機序への関与を検討した。【対象と方法】 ヒト末梢血単核細胞 (PBMC)、マウス単球細胞株 (RAW264.7)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に 231D をヒトプロトロンビン (PT) の存在下に投与し、TF mRNA の発現亢進を real-time PCR を用いて定量的に評価した。また、PBMC を用い、231D による刺激による凝固時間の短縮を測定し、TF 発現を機能的に評価した。更に、細胞内シグナル蛋白の活性化をアレイアッセイでスクリーニング的に評価し、その結果から p38MAPK リン酸化をシグナル細胞活性 ELISA キットを用い定量的に評価した。また

p38MAPK 阻害剤 (SB203580) を用いて細胞活性化への効果を検討した。HUVEC において接着因子 mRNA の発現を検討した。

北海道大学病院第 2 内科外来を 1996 年から 2006 年の間に受診した原発性 APS 患者 36 名と非 SLE 膠原病患者 42 名及び健常人 36 名を検討した。各群で血清 C3, C4 値及び血清 CH50 活性を検討した。また、血清アナフィラトキシン値を検討した。APS 群で補体活性化抑制因子である H 因子、I 因子を測定した。APS 群において血漿 TNF α 値を測定し補体活性化との相関を検討した。APS 群において、血清免疫複合体値を測定し、低補体血症の産生機構について考察した。[結果] PT の存在下に 231D を投与された PBMC, RAW264.7, HUVEC のいずれにおいても TF mRNA の有意な発現亢進を認めた。PT の非存在下に 231D を投与した群では有意な TF mRNA の発現亢進を認めなかった。凝固検査を用いた機能的検討でも 231D を PT の存在下で投与した群で凝固亢進が認められ、機能的にも TF 発現亢進が推測された。HUVEC では各接着因子 mRNA の発現が亢進する傾向にあったが有意ではなかった。アレイアッセイの結果から 231D による細胞活性化において p38MAPK の活性化が認められたが、他のシグナル蛋白の活性化を認めなかった。そして ELISA の結果から、PT の存在下に 231D で刺激した際に有意に p38MAPK のリン酸化亢進を認めた。また p38MAPK 阻害剤により TF mRNA の発現亢進は有意に抑制された。

原発性 APS では対照群に比べ、有意に血清補体値の低下を認めた。また、血清 C3a, C4a は、92% の症例で高値で、特に低補体群で上昇傾向にあった。血清 C5a は全ての症例で陰性であった。補体制御因子は全ての症例で発現低下を認めなかった。低補体血症 (低 CH50 血症) 群で血漿 TNF α 高値を伴った。[考察・結論] aPS/PT は $\alpha\beta_2$ GPI/CL と同様に in vitro での向血栓細胞活性化能を認め、単球や血管内皮細胞における TF 発現を亢進した。p38MAPK はその活性化反応の主要な細胞内シグナル蛋白であった。APL による直接的な向血栓細胞活性化機序は APL に共通である可能性があり、p38MAPK 経路の阻害は APS の有望な治療となりうる可能性がある。

APS 患者において高率に低補体血症を認めた (原発性 APS 群 vs 非 SLE 膠原病群 C3: 69.4% vs. 9.52%, OR 21.59, 95%CI 6.18-75.42; C4: 61.1% vs. 7.1%, OR 15.32, 95%CI 4.48-52.31; CH50: 47.2% vs. 2.4%, OR 36.68, 95%CI 4.54-296.26)。アナフィラトキシン高値を認めるため低補体血症は補体産生低下ではなく補体活性化が原因と考えられた。補体活性化抑制因子の低下を認めず、血清免疫複合体値の亢進を認める為、APL による免疫複合体の形成が補体活性化の一因と考えられた。更に、低補体血症群において血漿 TNF α 値の亢進を認め、病態発症への関与が示唆された。補体活性化の制御が APS の有望な治療となりうる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 笠 原 正 典

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学 位 論 文 題 名

抗リン脂質抗体症候群における向血栓細胞活性化機序

本論文は、抗リン脂質抗体症候群（APS）の主要な病態機序として想定される向血栓細胞活性化について検討した研究である。APS における血栓症は抗リン脂質抗体（APL）の存在下に出現するが、病原性自己抗体である APL は向血栓細胞（単球、血管内皮細胞、血小板）活性化を通して向凝固状態を形成し、凝固の準備状態を形成する。

本論文では、向血栓細胞活性化の機序として APL による直接的活性化機序と補体経路の活性化を介した 2 次的な機序の存在を示し解析した。

APS において主要な APL である β_2 グリコプロテイン I (β_2 GPI) 依存性抗カルジオリピン抗体 ($\alpha\beta_2$ GPI/CL) と並んで近年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) が主要な自己抗体として認識されている。著者らは aPS/PT のモノクローナル抗体を作成し、同抗体を用いて *in vitro* で単球や血管内皮細胞を活性化して凝固因子の 1 つで凝固外因系の initiator である組織因子の発現が亢進することを示した。また、これら細胞活性化の際に、細胞内シグナル蛋白である p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) が活性化されることが判明し、これらの現象は $\alpha\beta_2$ GPI/CL モノクローナル抗体を用い観察される向血栓細胞活性化と類似し、APS に共通の病態発症機序であると推測された。

一方、近年、APS 妊娠モデルマウスを用いた検討から APS における妊娠合併症に補体活性化が関与していると推測されている。しかし、実際に APS 患者に補体活性化が合併している可能性や補体活性化が APS 血栓症の病態機序にいかに関与しているかといった点についてはこれまで検討されたことがなかった。著者らは北海道大学病院第 2 内科外来を受診した全身性エリテマトーデス (SLE) を合併しない原発性 APS 患者 36 名を非 SLE 膠原病患者 42 名及び健常人 36 名を対照として検討した。その結果、原発性 APS では対照群に比べて有意に補体値の低下を認めた。また、補体活性化の際に産生される補体蛋白の断片ペプチドであるアナフィラトキシンが有意に発現亢進していた。APS ではほとんどの症例で補体活性化が認められ、とりわけ低補体血症を伴う症例ではアナフィラトキシン値の上昇が著明であった。アナフィラトキシンは向血栓細胞活性化能を有するため、APS では補体活性化に伴う血球活性化が合併していると考えられ多。また低補体血症を認める APS 患者では血清免疫複合体値や血漿腫瘍壊死因子 (TNF) α 値の陽性率も有意に高かった。これらのことから APS 患者では免疫複合体を介した補体活性化とその結果として、単球系細胞をはじめとした向血栓細胞活性化が認められると推測された。

本研究に対して副査笠原教授から①陰性荷電リン脂質が膜内から膜外に移行するメカニズム②APS モデルマウスの詳細③p38MAPK 経路のうち APS に特異的な経路の存在の有無について、質問があった。それに対して①膜蛋白 scramblase が細胞活性化時に細胞膜構造を変化させる②病原性抗体であるヒト APL をマウスに注射することにより APS 類似の病態を発現させることができる③APS 特異的な経路は今までのところ知られていないと回答

があった。次に副査畠山教授から①モノクローナル aPS/PT の selection 法②p38MAPK 経路の上下流の経路③組織因子は分泌蛋白であり lumen から exocytosis で膜にでるものと考えられる。Membrane traffic の働きでアクチンなどがもっと早い段階で、直接的な反応として動くということも考えられないかといった質問があった。①マウスにヒトプロトロンビンを免疫したモノクローナル抗体のうち、ホスファチジルセリンとプロトロンビンの複合体に特異的に結合し、かつループスアンチコアグラント活性を有し、APS 患者の aPS/PT と competitive な性質を有する抗体である②細胞刺激による組織因子 mRNA の発現は数時間後から亢進するためより早期の直接的反応ではなく蛋白分泌が主と考えられるとの回答があった。最後に主査小池教授から①APS は SLE の亜型であるか②APS で陰性荷電リン脂質に対する自己抗体が出現するのはなぜかといった質問があった。①低補体血症を伴う APS でも必ずしも SLE に移行するわけではないことなどから APS は SLE の亜型とはいえないのではいか②前述した scramlase の異常発現など陰性荷電リン脂質の異常表出が合併している可能性も否定できないとの回答があった。

この論文は、初めて aPS/PT の向血栓細胞活性化を示し、また、妊娠モデルマウスでしか確認されていなかった APS での補体活性化について患者でも同様に認められ、それが 2 次的に向血栓細胞活性化を来すことを示した。これらの点で高く評価され、今後の APS の病態解明や新規治療の開発に期待される。

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