

学位論文題名

Increased expression of Phospholipid Scramblase 1 in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus

(全身性エリテマトーデス患者単球における
Phospholipid Scramblase1 発現亢進)

学位論文内容の要旨

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus:SLE) は、代表的な自己免疫疾患であり、多彩な自己抗体の出現を認め様々な臨床症状や免疫系の異常を呈する。血栓症は、SLE の生命、機能予後に関与する重大な合併症である。早期動脈硬化の進展や、血栓原性自己抗体の存在、そして向凝固細胞である単球の活性化などの機序が考えられている。活性化された単球は、組織因子と呼ばれる凝固活性を有する蛋白を発現する。これは、外因系凝固カスケードのイニシエーターであるため凝固、血栓形成過程において重要である。

一方、血栓形成に関与する重要な分子の一つに陰性荷電リン脂質がある。ホスファチジルセリン (Phosphatidylserine:PS) は代表的な陰性荷電リン脂質である。通常 PS は細胞内膜に偏在し細胞外膜での発現はわずかであるが、細胞活性化やアポトーシス時には細胞外膜に表出する。PS が細胞外膜に表出するとそこに凝固因子が選択的に結合し、局所的に凝固反応が進行する。つまり、陰性荷電リン脂質の PS の細胞膜表面への発現亢進は凝固亢進、血栓形成に強く関与している。

SLE では血栓原性自己抗体である抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibody:aPL) の出現をしばしば認める。これは、細胞膜表面の陰性荷電リン脂質に結合した血漿蛋白を標的抗原としている。aPL は SLE だけではなく、難治性再発性の血栓症を繰り返す原発性抗リン脂質抗体症候群 (primary antiphospholipid syndrome:PAPS) にも認められる、APS に SLE が合併すると二次性抗リン脂質抗体症候群と呼ばれこれらの疾患では血栓症合併率が高い。病原性自己抗体である aPL が向凝固細胞である単球に作用すると組織因子が発現することが報告されており、血栓症合併率が高い SLE では PS などの陰性荷電リン脂質の過剰発現が引き起こされている可能性が考えられる。

陰性荷電リン脂質である PS を細胞外に輸送する膜蛋白質として Phospholipid scramblase1 (PLSCR1) が知られている。PLSCR1 はヒト赤血膜で同定され血小板や胸腺、脾臓など様々な組織での発現が報告されており PLSCR1 による PS の輸送は細胞活性化や組織の損傷など細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したときに起こる。PLSCR1 の機能異常や機能低下により出血傾向を示す疾患の報告があり PLSCR1 による PS の輸送が止血、凝固反応と何らかの関係があることが考えられるため、SLE における血栓形成患者における PLSCR1 や PS 発現異常が向血栓傾向とどう関与するか検討した。

対象は、3ヶ月以内に血栓症や妊娠合併症を含めて病勢の増悪のない SLE 患者 60 名 (抗リン脂質抗体症候群合併 23 名、以下 APS)、健常人 43 名である。これらの対象の末梢血から CD14+細胞を分離した。SLE 疾患活動性を示す SLE Disease Activity Index (SLEDAI) の平均は 2.6 であった。

得られた CD14+細胞の cDNA を用いて全長 PLSCR1 の発現を確認したところ 3 種類の新規スプライスバリエントを全ての対象で同定した。このスプライスバリエントの蛋白発現は認められず、全長の PLSCR1 のみ蛋白発現を確認した。この結果より、全長 PLSCR1mRNA を定量したところ、健常人と比較して SLE 患者で有意に亢進していた (健常人 vs SLE : 1.3 ± 0.4 vs 2.9 ± 1.5 , $p < 0.0005$)。

SLE 患者における単球での PS 発現量を FITC 標識アネキシン V を用いたフローサイトメトリー法にて測定したところ、健常人と比較し有意な亢進を認めた ($17.8 \pm 2.9\%$ vs $25.7 \pm 5.8\%$, $p < 0.008$)。次に血漿中 D-dimer 値を検討した。結果は SLE 患者で有意に D-dimer 値が上昇していた ($0.4 \pm 0.3 \text{ g}/\mu\text{l}$ vs $1.3 \pm 0.7 \text{ g}/\mu\text{l}$, $p = 0.003$)。

本研究より SLE の単球において PLSCR1mRNA の発現亢進を認めた。このことは細胞膜表面における PS の過剰発現に繋がり、疾患活動性、急性の血栓形成がなくともトロンビン・プラスミン生成が亢進しており凝固準備状態であることが明らかとなった。PLSCR1 は様々な成長因子や $\text{INF}\alpha$ で発現が亢進されることがわかっている。SLE の病態で重要なサイトカインである $\text{INF}\alpha$ と PLSCR1mRNA 発現亢進の結果は何らかの形で関与している可能性がある。単球における PLSCR1 発現亢進、PS 過剰発現は SLE における血栓形成の一因と考えられ、PLSCR1 発現が血栓形成に与える影響についてさらなる研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 島 和 昭

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 小 池 隆 夫

(医学研究科内科学講座・第二内科)

学 位 論 文 題 名

Increased expression of Phospholipid Scramblase 1 in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus

(全身性エリテマトーデス患者単球における
Phospholipid Scramblase1 発現亢進)

審査は、審査担当者全員出席の下、申請者の研究要旨の説明後、本研究、提出論文とそれに関連した事項について口頭試問の形式にて行った。審査論文の概要は以下の通りである。

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus:SLE)は、代表的な自己免疫疾患であり、多彩な自己抗体の出現を認め様々な臨床症状や免疫系の異常を呈する。その中で血栓症は、SLE の生命、機能予後に関与する重大な合併症である。機序としては早期動脈硬化の進展や、血栓原性自己抗体の存在、そして向凝固細胞である単球の活性化などが考えられている。活性化された単球は、組織因子と呼ばれる凝固活性を有する蛋白を発現するが、これは外因系凝固カスケードのイニシエーターであり凝固、血栓形成において重要である。

一方、血栓形成に関与する重要な分子の一つに陰性荷電リン脂質がある。ホスファチジルセリン(Phosphatidylserine:PS)は代表的な陰性荷電リン脂質である。通常PSは細胞内膜に偏在し細胞外膜での発現は僅かであるが、細胞活性化やアポトーシス時に細胞外膜に表出する。PS が細胞外膜に表出するとそこに凝固因子が選択的に結合し、凝固反応が進行する。つまり、PS の細胞外膜への発現亢進は凝固、血栓形成に強く関与している。

SLE では血栓原性自己抗体である抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibody:aPL)の出現を認める。これは、細胞外膜の陰性荷電リン脂質に結合した血漿蛋白を標的抗原としている。aPL は SLE だけではなく、難治性再発性の血栓症を繰り返す原発性抗リン脂質抗体症候群(primary antiphospholipid syndrome:PAPS)にも認められる、APS に SLE が合併すると二次性抗リン脂質抗体症候群と呼ばれ血栓症合併率が高い。aPL は病原性自己抗体で向凝固細胞である単球に作用すると組織因子が発現することが報告されており、血栓症合併率が高い SLE では PS の過剰発現が引き起こされている可能性が考えられる。

PS を細胞外に輸送する膜蛋白質として Phospholipid scramblase1 (PLSCR1) が知られている。PLSCR1 はヒト赤血球膜で同定され血小板や胸腺、脾臓など様々な組織での発現が報告されており PLSCR1 による PS の輸送は細胞活性化や損傷など細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇時に起こる。PLSCR1 の機能異常や機能低下により出血傾向を示す疾患の報告があり PLSCR1 による PS の輸送が止血、凝固反応と何らかの関係があることが考えられる。そこで SLE における血栓形成と PLSCR1 や PS 発現異常が向血栓傾向とどう関与するか検討した。

対象は、3ヶ月以内に血栓症や妊娠合併症を含めて病勢増悪のない SLE 患者 60 名(抗リン脂質抗体症候群合併 23 名、以下 APS)、健常人 43 名である。これら対象の末梢血から CD14+細胞を抽出した。SLE 疾患活動性を示す SLE Disease Activity Index (SLEDAI) の平均は 2.6 であった。

得られた CD14+細胞の cDNA を用いて RT-PCR を行った結果、3 種類の新規スプライスバリエントをすべての対象で同定した。しかしいずれのバリエントも蛋白質としての発現は認められず全長 PLSCR1 のみ蛋白発現を確認した。これより健常人と SLE 患者群の単球における全長 PLSCR1 mRNA の定量、PS 発現、D-dimer 値について検討したところいずれにおいても患者群で優位に発現が亢進していた。このことは細胞膜表面における PS の過剰発現に繋がり、疾患活動性、急性の血栓形成がなくともトロンビン・プラスミン生成が亢進し凝固準備状態であることが明らかとなった。また、PLSCR1 は様々な成長因子や $INF\alpha$ で発現が亢進されることがわかっている。SLE の病態で重要なサイトカインである $INF\alpha$ と PLSCR1 mRNA 発現亢進の結果は何らかの形で関与している可能性がある。単球における PLSCR1、PS の発現亢進は SLE における血栓形成の一因と考えられた。

論文審査にあたり、論文申請者による研究要旨説明後、本研究および関連する研究について口頭試問を行った。主な質問事項は、1) 単球、組織因子における血栓の重要性、2) 膜蛋白質の種類、3) INF 以外に PLSCR1 発現を誘導するもの、4) スプライスバリエントの意義、4) PLSCR1 蛋白構造の意義、5) SLE 患者に対して全身麻酔をする際の注意点、6) 血管内皮細胞での PLSCR1 発現についてなどであった。

これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られた。本研究は、

SLE 患者では疾患活動性がなくとも単球が活性化しており、凝固準備状態であることを証明した。

本研究は SLE 患者における血栓形成の一因が PLSCR1 発現亢進であることを明らかにし、今後、この面における研究発展、進展に寄与する礎となると考えられ、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。