

## 学位論文題名

抗リン脂質抗体が誘導する単球活性化における  
CD36の関与

## 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) は抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies: aPL) が持続的に検出され、血栓症または妊娠合併症を呈する自己免疫疾患である。外因系凝固反応のイニシエーターである組織因子 (tissue factor: TF) の向血栓細胞における発現上昇が APS の病態において最も重要な因子と考えられている。aPL で処理された単球、血管内皮細胞では TF の発現が上昇し、これらの反応はインターロイキン (interleukin: IL) -6 に代表される炎症性サイトカインの発現上昇を伴う。しかし、これらの一連の反応における細胞表面受容体については多くの報告があつて一定の見解が得られていない。CD36 はクラス B スカベンジャー受容体ファミリーに属する 88-kDa の 2 回膜貫通型糖タンパクで、単球、マクロファージ、血小板、毛細血管内皮細胞に発現し、脂質ラフトに局在している。CD36 は陰性荷電リン脂質、酸化 LDL など様々なリガンドを認識し、動脈硬化、血栓など様々な機能を調節する。CD36 が向血栓細胞に発現していること、陰性荷電リン脂質をリガンドとしていること、血栓に関与していることより、今回私は CD36 が APS の病態における細胞表面受容体の 1 つとして関与している可能性を考え、遺伝学的ならびに分子生物学的検討を行った。

【対象、材料と方法】1. 遺伝子型分析. 原発性 APS 患者 39 名, APS を合併した全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 患者 69 名, APS を合併していない SLE 患者 265 名, 健常人 422 名, 計 795 名の日本人を対象とし, 末梢血よりゲノム DNA を抽出し, 2 つの主要な CD36 遺伝子多型である rs3765187 (Pro90Ser), rs1049654 のアレル頻度を TaqMan PCR ジェノタイピング法を用いて調べた。rs3765187 (Pro90Ser) は CD36 遺伝子エクソン 4 上に存在するミスセンス変異で, 日本人において CD36 欠損と強く関連することが示されている。2. マウス腹腔マクロファージ刺激実験. CD36 ノックアウト (knock out: KO) および C57BL/6J 野生型 (wild type: WT) マウスより採取したマウス腹腔マクロファージ (Mouse peritoneal macrophages: MPM) を 10% ウシ胎児血清添加 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に懸濁し, 懸濁液に aPL を加え培養, TF および IL-6 の遺伝子発現解析を real-time PCR 法により行った。細胞を刺激する aPL として, ループスアンチコアグラントが陽性で抗カルジオリピン抗体 (anticardiolipin antibodies: aCL) または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 antibodies: aPS/PT) のどちらか一方が陽性の APS 患者の血清より精製した全 IgG (それぞれ Pt-aCL, Pt-aPS/PT), ループスアンチコアグラント活性を有するマウスモノクローナル aPS/PT IgG である 231D の 3 種類を用いた。3. ヒト末梢血単核球刺激実験. 健常人より採取した末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を 10% ウシ胎児血清添加 DMEM に懸濁し, 懸濁液にヒト CD36 に対し中和作用を有する抗 CD36 抗体と aPL (Pt-aCL, Pt-aPS/PT または 231D) を同時に加え培養, TF および IL-6 の遺伝子発現解析を real-time PCR 法により行った。

【結果】1. CD36 遺伝子多型のアレル頻度. rs3765187 (Pro90Ser) のマイナーアレル頻度は, 健常人 (10.2%) と比較し APS 患者 (2.8%) において有意に低かった。統計学的な

有意差は得られなかったが、原発性 APS 患者 (2.6%)、APS 合併 SLE 患者 (2.9%) それぞれにおいても健常人と比較して同様のオッズ比が得られた。一方、APS を合併していない SLE 患者 (7.9%) においては健常人と有意な差が認められなかった。rs1049654 のマイナーアレル頻度は疾患間で有意な差が認められなかった。2. MPM において aPL が誘導する TF と IL-6 遺伝子の発現。実験に用いた 3 種類の aPL はいずれも陰性対照と比較し MPM において有意に TF 遺伝子の発現を誘導したが、aPL が誘導した TF 遺伝子の発現は WT マウスと比較して CD36KO マウスにおいて有意に低かった。同様の傾向は IL-6 遺伝子の発現においても認められた。3. ヒト PBMC において aPL が誘導する TF と IL-6 遺伝子の発現。実験に用いた 3 種類の aPL はいずれも健常人 PBMC において陰性対照と比較し有意に TF 遺伝子の発現を誘導したが、抗 CD36 抗体は aPL が誘導する TF 遺伝子の発現を濃度依存的に抑制した。同様の傾向は IL-6 遺伝子の発現においても認められた。

【考察】本研究により、CD36 欠損に関連する遺伝子変異の頻度が APS 患者において低く、CD36 の欠損および機能低下が aPL により誘導される単球 TF、IL-6 遺伝子の発現を抑制することが示された。これらの結果より、CD36 は複数存在する細胞表面受容体の 1 つとして、また脂質ラフトに局在し様々な分子と会合する特性から他の受容体と協調して APS の病態形成に関与している可能性が考えられた。また、CD36 の発現や機能を抑制することが APS の治療選択肢の 1 つとなりうる可能性が示唆された。CD36 欠損者が易出血性を含む重篤な臨床症状を呈さないことより、CD36 を標的とした治療は高い認容性が期待できる。

【結論】1. CD36 欠損に関連している遺伝子多型のマイナーアレル頻度は健常人と比較し抗リン脂質抗体症候群患者において低かった。2. 抗リン脂質抗体が誘導する組織因子、インターロイキン-6 遺伝子の発現は野生型と比較し CD36 欠損マウス腹腔マクロファージにおいて低かった。3. 抗 CD36 抗体は健常人末梢血単核球において抗リン脂質抗体が誘導する組織因子、インターロイキン-6 遺伝子の発現を濃度依存的に抑制した。4. 本研究において、遺伝学的、分子生物学的の両面から CD36 が抗リン脂質抗体症候群の病態形成に関与している可能性が示唆された。CD36 は新たな、より病態に即した治療標的となる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

## 抗リン脂質抗体が誘導する単球活性化における CD36の関与

抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome: APS) は抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies: aPL) が持続的に検出され、血栓症または妊娠合併症を呈する自己免疫疾患である。外因系凝固反応のイニシエーターである組織因子 (tissue factor: TF) の向血栓細胞における発現上昇が APS の病態において最も重要な因子と考えられている。しかし、これらの反応における細胞表面受容体については多くの報告があつて一定の見解が得られていない。CD36 はクラス B スカベンジャー受容体ファミリーに属する膜貫通型糖タンパクで、単球、マクロファージ、血小板、毛細血管内皮細胞に発現し、陰性荷電リン脂質、酸化 LDL など様々なリガンドを認識し、動脈硬化、血栓など様々な機能を調節する。そこで本研究では CD36 が APS の病態における細胞表面受容体の 1 つとして関与している可能性を考え、遺伝学的ならびに分子生物学的検討を行うこととした。

研究には、まず遺伝子学的検討として、原発性 APS 患者 39 名、APS を合併した全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 患者 69 名、APS を合併していない SLE 患者 265 名、健常人 422 名、計 795 名の日本人を対象とし、日本人において CD36 欠損と強く関連する遺伝子多型である rs3765187 (Pro90Ser) のアレル頻度を TaqMan PCR ジェノタイピング法を用いて調べた。rs3765187 (Pro90Ser) のマイナーアレル頻度は、健常人 (10.2%) と比較し APS 患者 (2.8%) において有意に低かった。統計学的な有意差は得られなかったが、原発性 APS 患者 (2.6%)、APS 合併 SLE 患者 (2.9%) それぞれにおいても健常人と比較して同様のオッズ比が得られた。一方、APS を合併していない SLE 患者 (7.9%) においては健常人と有意な差が認められなかった。次に分子生物学的検討として、CD36 ノックアウト (knock out: KO) および C57BL/6J 野生型 (wild type: WT) マウスより採取したマウス腹腔マクロファージ (Mouse peritoneal macrophages: MPM) を aPL で刺激し、TF の遺伝子発現解析を real-time PCR 法により行った。細胞を刺激する aPL として、APS 患者の血清より精製した全 IgG およびループスアンチコアグラント活性を有するマウスモノクローナル抗体を用いた。MPM において aPL が誘導した TF 遺伝子の発現は WT マウスと比較して CD36KO マウスにおいて有意に低かった。最後に同様の検討を健常人より採取した末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) および抗 CD36 抗体を用いて行った。健常人 PBMC において抗 CD36 抗体は aPL が誘導する TF 遺伝子の発現を濃度依存的に抑制した。

本研究により、CD36 欠損に関連する遺伝子変異の頻度が APS 患者において低く、CD36 の欠損および機能低下が aPL により誘導される単球 TF、IL-6 遺伝子の発現を抑制することが示された。これらの結果より、CD36 は複数存在する細胞表面受容体の 1 つとして、また他の受容体と協調して APS の病態形成に関与している可能性が考えられた。また、CD36 の発現や機能を抑制することが APS の治療選択肢の 1 つとなりうる可能性が示唆された。CD36 欠損者が易出血性を含む重篤な臨

床症状を呈さないことより、CD36 を標的とした治療は高い認容性が期待できる。

質疑応答では、副査の筒井裕之教授から CD36 遺伝子変異と血栓リスクとの関連、CD36 の機能と血栓との関連、CD36 とその他の血栓性疾患との関連、臨床応用の具体策についての質問があった。次いで副査の今村雅寛教授から TF の発現を完全に抑制する実験系の有無、CD36 を標的とした治療に期待できる臨床効果、CD36 以外の受容体の候補についての質問があった。さらに、主査の小池隆夫教授より CD36 以外の治療の候補、CD36 のリガンドである酸化 LDL との関与についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去の文献報告や未発表であった実験結果などを引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、スカベンジャー受容体である CD36 が APS の病態に関与しているという新しい知見を示したことが高く評価され、今後の APS の病態解析、ならびに APS に対する新規治療の開発が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。