

## 学位論文題名

抗リン脂質抗体症候群における血栓傾向病態の解明と  
血栓症リスクの評価法

## 学位論文内容の要旨

<第一部>【背景と目的】全身性エリテマトーデスにしばしば合併する抗リン脂質抗体症候群 (APS) は、血栓性疾患である。APS の代表的なマーカー抗体である抗カルジオリピン抗体 (aCL) とその対応抗原の $\beta 2$ グリコプロテイン I ( $\beta 2$ GPI) が APS の病原性に強く関与する。向血栓傾向の病態において単球における組織因子 (TF) の発現誘導は特に重要だが、aCL と  $\beta 2$ GPI の向血栓細胞活性化は *in vitro* では培養液中の血清濃度に依存していた。血清中に  $\beta 2$ GPI と結合する分子があり、この分子が単球系の TF 発現に関与すると考え、プロテオミクス的手法を用いてこのタンパクの同定を行い、APS の血栓病態を明らかにすることを本研究の目的とした。

【材料と方法】 $\beta 2$ GPI に結合する血漿中分子を検索するため、まず FLAG タグ付き  $\beta 2$ GPI Fusion protein を作成した。FLAG- $\beta 2$ GPI vector を作成し、HEK293T 細胞にトランスフェクトし上清分泌タンパクをウェスタンブロットで確認した。精製 FLAG- $\beta 2$ GPI をヒト血清中にインキュベートし、抗FLAG抗体でアフィニティー精製したものを SDS-PAGE 後、銀染色した。ゲル上に分離したいくつかの候補蛋白を online-nano LC-MS/MS および nrNCBI database MASCOT algorithm によって解析し、 $\beta 2$ GPI 結合蛋白を検索した。

【結果】同定された蛋白のうち、血清中蛋白は ApoB100 (APOB)のみであり、ほかは細胞内シャペロンや夾雑物と考えられた。APOB と  $\beta 2$ GPI の直接結合は ELISA で確認できず、酸化 low density lipoprotein (LDL) 中に含まれる  $\beta 2$ GPI の Ligand (=Ox-Lig1) を介して、 $\beta 2$ GPI と酸化 LDL が血清中で結合している可能性が示唆された。抗 CL/ $\beta 2$ GPI 抗体の単球における TF 発現に酸化 LDL が関与するか調べるため、マウス単球系細胞 (RAW264.7) を用い、WBCAL-1 抗体 (モノクローナル抗 CL/ $\beta 2$ GPI 抗体) および酸化 LDL の存在、非存在下での TF mRNA 発現を Realtime RT-PCR で検討した。酸化 LDL および WBCAL-1 抗体の存在下で非常に強い TF mRNA の発現亢進を認めた。この発現亢進は、APS 患者 (aCL 陽性) の血清 IgG による刺激でも確認された。また、この TF の発現誘導は酸化 LDL の主要なレセプターであるスカベンジャー受容体 (SR-A, CD36, LOX-1) の阻害抗体により有意に抑制された。

【結論】プロテオミクス解析から  $\beta 2$ GPI のヒト血清中における主要な結合タンパクは酸化 LDL と考えられた。酸化 LDL が抗リン脂質抗体症候群における血栓形成病態に関与する可能性が示唆された。

<第二部>【背景と目的】APS 患者において酸化 LDL/ $\beta 2$ GPI 複合体の血中濃度が健常人に比して有意に高いことが報告されている。酸化 LDL 関連物質として Lipoprotein-associated phospholipase A2 (LpPLA2) 測定が知られている。酸化 LDL が APS 患者に高発現する理由について遺伝子学的手法を用いて検討を行った。

【対象と方法】まず酸化 LDL 関連物質 LpPLA2 の APS 患者における活性を測定した。LpPLA2 測定には APS 89 名 (原発性 APS (PAPS) 38 名、続発性 51 名) APS を合併していない SLE 14 名、関節リウマチ 11 名、強皮症 8 名、健常人 50 名の血清を用いた。次に、LpPLA2 関連 GWAS より同定された 5 個の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) について解析した。SNP 解析には APS 91 名 (PAPS 43 名、続発性 48 名)、APS を合併していない SLE 138 名、健常人 378 名の血液から採取した DNA を用いた。

【結果】LpPLA2 活性は、PAPS の平均値が  $240.1 \pm 76.9$  IU/L、続発性 APS が  $226.2 \pm 103.9$  IU/L であり、こららはいずれも健常人と比較して有意に高値であった (PAPS:  $p < 0.0001$ ,

SLE 合併 APS :  $p=0.004$  ; t-test)。APOE/APOC1 (rs4420638 A/G、第 19 染色体)、LpPLA2 (rs1805017 A/T、第 6 染色体) の 2 個の SNP が APS と関連していた。rs4420638 AG +GG 遺伝子型頻度は APS 患者に有意に多く (OR[95% C.I.] = 1.69 [1.02 - 2.79],  $p=0.0038$ )、rs1805017 CT+TT 遺伝子型頻度は APS 患者に有意に少なかった (OR[95% C.I.] = 0.36 [0.18 - 0.71],  $p=0.0028$ )。

【結論】 APS 患者に酸化 LDL が高発現する理由の一つに SNP の関与が示唆された。

< 第三部 > 【背景と目的】 血栓症の二次予防治療を行っているにも関わらず血栓症を反復する APS 患者が多く存在する。このような患者の血栓傾向を制御する薬剤の開発が望まれるが、患者個々の血栓症リスクを評価、予測するマーカーの開発も重要である。複数の抗リン脂質抗体 (APL) 検査により Antiphospholipid スコア (aPL-スコア) を定義し、APS の診断および血栓症予測の可能性について評価した。

方法: 2 つの自己免疫疾患の患者グループを研究対象とした。第一グループは 233 人で 2009 年の APL プロフィールを分析した。5 つのループスアンチコアグラント (LA) 検査および 6 つの ELISA (IgG/M 抗カルジオリピン抗体、IgG/M anti  $\beta$  2glycoprotein I 抗体および IgG/M のホスファチジルセリン依存性アンチプロトンピン抗体) の結果を用いて aPL-スコアを定義し、血栓症および妊娠合併症の既往と比較した。第二グループは 441 人であり観察期間中の新規血栓症の発症と aPL-スコアについて Retrospective に評価した。296 人 (72%) が 2 年以上フォローアップされ、観察期間中央値は  $68 \pm 15$  か月だった。

【結果】: 第一グループでは、血栓症および妊娠合併症を持った患者 ( $n=46$ ) の aPL-スコアが有意に高値であり ( $p=0.00001$ )、ROC 曲線下 AUC は 0.752 だった。第二グループでは 32 人の患者が新規血栓症を発症した。aPL-スコアが 30 点以上の患者において、血栓症発症のオッズ比 [95% C.I.] は 5.27 [2.32 - 11.95,  $p<0.0001$ ] だった。多変量解析で「aPL-スコアが 30 点以上」は、血栓症の独立した危険因子だった (ハザード比 [95% CI] = 3.144 [1.383 - 7.150],  $p=0.006$ )。

【結論】 aPL-スコアは、APS 診断の定量的マーカーとして有用であり、血栓症リスクの予測マーカーとなりうる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渥 美 達 也  
副 査 教 授 畠 山 鎮 次  
副 査 教 授 筒 井 裕 之

学位論文題名

## 抗リン脂質抗体症候群における血栓傾向病態の解明と 血栓症リスクの評価法

本論文は、抗リン脂質抗体症候群（APS）における血栓傾向病態について解析した基礎的検討、並びに、個々の患者における血栓症リスクを解析した臨床的検討に関する研究論文である。

APSは後天性の血栓症素因として重要であり、この疾患に存在する自己抗体（＝抗リン脂質抗体(aPL)）がAPSの血栓傾向病態に強く関与する。本論文では多数のaPL検査を一元的に定量化する「抗リン脂質抗体スコア（aPL-スコア）」を作製した。296人の膠原病患者のaPL-スコアを算出し、血栓症の発症頻度について後ろ向きに解析したところ、aPL-スコアが30点以上の患者において、血栓症の発症頻度が有意に高まった。この検討から、抗リン脂質抗体が複数および高力価で存在すると血栓症のリスクが高まることが示唆された。

aPLの代表的抗体が抗カルジオリピン抗体(aCL)であり、その対応抗原が $\beta$ 2グリコプロテインI( $\beta$ 2GPI)である。血栓傾向病態において単球における組織因子(TF)の誘導は特に重要である。無血清状態ではaCLと $\beta$ 2GPIの単球細胞活性化が誘導されず、血清中に $\beta$ 2GPI関連タンパクが存在する可能性がある。本論文ではこの $\beta$ 2GPI関連タンパクの検索を行った。FLAGタグ付き $\beta$ 2GPI Fusion proteinをヒト血清中に混和し抗FLAG抗体でアフィニティー精製したものを質量分析を用いて解析したところApoB100(APOB)が同定された。APOBは酸化LDLの担体タンパクであり、 $\beta$ 2GPIと酸化LDLが血清中で結合している可能性が示唆された。マウス単球系細胞において、WBCAL-1抗体(モノクローナル抗CL/ $\beta$ 2GPI抗体)および酸化LDLの存在下で非常に強いTF mRNAの発現亢進を認めた。以上より $\beta$ 2GPIの主要な結合タンパクは酸化LDLと考えられた。

APS患者において酸化LDL関連物質LpPLA2のAPS患者における活性を測定したところ、健常人と比較して有意に高値であった。LpPLA2関連のSingle Nucleotide Polymorphism (SNP)について解析したところ、APOE(rs4420638 A/G)、LpPLA2(rs1805017 A/T)の2個のSNPがAPSと関連していた。APS患者に酸化LDLが高発現する理由の一つにSNPの関与が示唆された。

本研究に対して副査筒井教授から①実際に血栓症を起こしたAPS患者の酸化LDLは高いか②APS患者には静脈血栓症も多いがスタチンを使った場合にどの程度予後改善するのか③APLスコアの研究では治療の関与がどの程度あるのか、といった質問があった。それに対して、①現在そのデータは無く、既報もない②酸化LDLの多い患者を選択し適切に投与すれば予後改善効果が期待できるのではないかと③治療について規定しない研究であり、実際には高リスクとされる患者に何らかの抗血栓療法がおこなわれていると回答があった。次に副査畠山教授から① $\beta$ 2GPIが三量体を形成することを実際に計測したのか②スカベンジャー受容体からの細胞内シグナルはどのような系を想定しているか③SNPの存在で逆にLpPLA2活性が高まるメカニズムはなにか、といった質問があった。それに対して、①サンドイッチELISAの手法で測定された既報がある②主にMAPK系が働くとする報告があ

り、同様の経路を想定している③APOE 関連 SNP は APOE の機能を落とし LDL の代謝を下げ、血中に LDL が滞留することで酸化 LDL が増えるという説が報告されていると回答があった。次に主査渥美教授から①APS 患者において酸化  $\beta$  2GPI が増えるとする報告との一貫性はあるか②抗リン脂質抗体を抑制する治療の効果が乏しいのはなぜか、といった質問があった。それに対して、①酸化 LDL が血中に過剰に存在すれば一部の  $\beta$  2GPI は結合し、一部は酸化修飾を受ける可能性がある②APS の正確な病態解明によって病原性に直接関与する分子を局所で抑えることが重要ではないかと回答があった。最後にフロアより小池隆夫北海道大学名誉教授から、欧米で若年性ループスの動脈硬化が知られておりこの SNP と関連があれば興味深いといったコメントがあった。

この論文は、APS において抗リン脂質抗体が血栓症のリスクであることを臨床検討から明らかにし、基礎検討によって血栓傾向の病原性に酸化 LDL が深く関与することを見出した。また、APS に酸化 LDL が高発現する原因の一つに SNP が関与することを初めて示した。これらの研究は今後の APS の病態解明や新規治療の開発に役立つことが期待される。

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。