

学 位 論 文 題 名

The elucidation of the prothrombotic mechanism
mediated by prothrombin in antiphospholipid syndrome
(プロトロンビンを介する抗リン脂質抗体症候群の血栓形成機序解析)

学位論文内容の要旨

第一部

目的：本邦における抗リン脂質抗体症候群（APS）の臨床的像を明らかにする

方法：1988年から2010年までに北海道大学病院リウマチ膠原病外来を受診し、APS分類基準（札幌クライテリアシドニー改変）を満たした141例を、診断時から2010年まで観察し、血栓症のリスク因子について解析した。また観察期間中におけるイベント（死亡、血栓症再発、重篤な出血合併症）の有無について後ろ向き研究をおこなった。

結果：APSと診断した141例（女性119例、男性22例）の平均年齢は44歳（範囲：9-79歳）で、70例（49.6%）が原発性APSであり、71例（50.4%）が全身性エリテマトーデス（SLE）を合併していた。血栓症は121例（85.8%）の患者に認め、動脈血栓症は93例（66.0%）、静脈血栓症は46例（32.6%）に認められた。最も頻度が高い血栓症は、脳梗塞86例（86/141（61.0%））であり、続いて深部静脈血栓症33例（33/141（23.4%））であった。70例の女性が妊娠し、45例（64.3%）がAPSによる妊娠合併症を認めた。抗リン脂質抗体の内訳は、ループスアンチコアグラントが116例（82.3%）、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体が98例（69.5%）、抗カルジオリピン抗体が83例（58.9%）、抗 β_2 グリコプロテインI抗体が73例（51.8%）であった。APS患者を動脈血栓症の有無で比較し、リスクファクターを解析したところ、年齢10歳毎（OR：1.82、95%CI：[1.30-2.54]）、高血圧（OR：3.26、95%CI：[1.16-9.14]）がリスクファクターとして示された。予後に関しては、10年生存率が93%であり、血栓症の再発は3.5回/100人年であった。糖尿病合併患者は、非糖尿病合併患者と比較して有意にイベント発生率が高かった（Log-rank $p=0.04$ ）。

結論：本研究により日本人のAPS患者の臨床像が明らかとなった。またホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体は多くのAPS患者に認められ、診断マーカーとして非常に重要な抗体である

第二部

背景：抗リン脂質抗体症候群（APS）は、血中に抗リン脂質抗体（aPL）が証明され、動脈血栓症、静脈血栓症、妊娠合併症をきたす自己免疫疾患である。APS で認められる aPL は直接、向凝固細胞（血管内皮細胞、単球、血小板）を活性化する病原性自己抗体と考えられている。我々は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 APS の診断において感度、特異度が高いことを示し、aPS/PT のモノクローナル抗体である 231D を作成し aPS/PT によって向凝固細胞活性化が起こることを確認した。以上から aPS/PT は APS 患者の病態に関わっている病原性自己抗体であると考えられるが、aPS/PT が刺激を細胞内部に伝達する受容体については不明である。

目的：プロテオミクスの手法を用いてプロトロンビンおよび aPS/PT の結合に関与するタンパクの同定を行い、APS の血栓病態を明らかにする。

方法：FLAG タグ付加リコンビナントヒトプロトロンビン（rhFLAG-PT）を作製し、rhFLAG-PT と RAW264.7 細胞をインキュベートし、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。ゲル上で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、プロトロンビン結合タンパクを同定した。プロトロンビンおよび RibophorinII（RPN2）との結合を確認するために、His タグ V5 タグ付加リコンビナントヒト RPN2（His-V5-RPN2）を作製し、cotransfection assay、酵素免疫測定法（ELISA）、表面プラズモン核磁気共鳴（SPR）をおこなった。単球の活性化に RPN2 が関与していることを検討するために、RPN2 の RNA 干渉（siRNA）を用いて、231D で誘導される組織因子（TF）の発現をリアルタイム PCR によって確認した。

結果：質量分析により糖転移酵素である RibophorinII（RPN2）がプロトロンビンと結合する膜タンパクとして同定された。プロトロンビンと RPN2 の結合を cotransfection assay、ELISA、SPR により確認した。RPN2 siRNA でノックダウンした RAW264.7 細胞を、プロトロンビンおよび 231D で刺激したところ、TF 発現が有意に低下した。

結論：RPN2 をプロトロンビン結合膜タンパクとして同定した。RPN2 は APS 患者において血栓症の病態生理に関与している可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	有賀	正
副査	准教授	松本	美佐子
副査	准教授	森松	組子
副査	教授	渥美	達也

学位論文題名

The elucidation of the prothrombotic mechanism mediated by prothrombin in antiphospholipid syndrome

(プロトロンビンを介する抗リン脂質抗体症候群の血栓形成機序解析)

抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome, APS) は、血中に抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies; aPL) とよばれる自己抗体が証明され、動脈血栓症、静脈血栓症、妊娠合併症をきたす自己免疫疾患である。現在 aPL はリン脂質を直接認識するのではなく、 $\beta 2$ -グリコプロテイン I ($\beta 2$ GPI) やプロトロンビン (PT) などリン脂質に結合し構造変化を来した血漿タンパクを認識することがわかっており、 $\beta 2$ GPI 依存性抗カルジオリピン抗体 (aCL/ $\beta 2$ GPI)、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) と呼ばれている。近年 aPS/PT が APS の新しい aPL として注目されている。本研究では、第一部で、日本人 APS 患者のデータベース構築、および aPS/PT の陽性率と血栓症や妊娠合併症との関連を検討し、第二部では aPS/PT による血栓症形成に関与する新規分子の発見について述べる。

第一部：本邦における APS のデータベースを構築し、血栓症のリスク因子および観察期間中におけるイベント（死亡、血栓症再発、重篤な出血合併症）の有無について後ろ向き研究をおこなった。APS と診断した 141 例（女性 119 例、男性 22 例）の平均年齢は 44 歳（範囲：9-79 歳）で、血栓症は 121 例（85.8%）の患者に認め、動脈血栓症は 93 例（66.0%）、静脈血栓症は 46 例（32.6%）に認められた。最も頻度が高い血栓症は、脳梗塞 86 例（61.0%）であった。また aPS/PT が 98 例（69.5%）陽性であり、他の抗リン脂質抗体と比較して高頻度であった。APS 患者を動脈血栓症の有無で比較したところ、高血圧（OR：3.26、95%CI：[1.16-9.14]）がリスクファクターとして示された。予後に関しては、10 年生存率が 93%であった。本研究により日本人の APS 患者の臨床像が明らかとなった。また aPS/PT は多くの APS 患者に認められ、診断マーカーとして非常に重要な抗体であることが示された。

第二部：aPS/PT は直接、向凝固細胞（血管内皮細胞、単球、血小板）を活性化する病原性自己抗体と考えられるが、aPS/PT が刺激を細胞内部に伝達する受容体については不明であるため、プロテオミクスの手法を用いてプロトロンビンおよび aPS/PT の結合に関与するタンパクの同定

を行なった。質量分析により糖転移酵素である RibophorinII (RPN2) がプロトロンビンと結合する膜タンパクとして同定され、プロトロンビンと RPN2 の結合を cotransfection assay、ELISA、SPR により確認した。次いで、Flowcytometry を用いて RPN2 がヒト単球および RAW264.7 細胞膜表面に存在していることを確認した。最後に RPN2 siRNA を用いて、RAW264.7 細胞膜表面の RPN2 をノックダウンし、その後プロトロンビンおよびマウスモノクローナル PS/PT 抗体 (231D) で刺激したところ、組織因子(TF ; Tissue factor)の mRNA 発現が有意に低下した。以上の結果から、RPN2 は APS 患者において aPS/PT が誘導する TF 発現に関与しており、APS 患者の血栓形成機序に関与している可能性がある。

質疑応答では、副査松本准教授より、なぜ自己抗体が作られてしまうのか、プロトロンビンおよび β 2GPI における知見について、ループスアンチコアグラントの陽性率と ELISA の陽性率(特に a β 2GPI)が乖離している理由について、妊娠合併症との関連についての質問があった。次いで、主査有賀教授より、aPS/PT のモノクローナル抗体を whole のヒトのプロトロンビンを免疫し作製したことに関して、PS/PT の複合体を特異的に認識する抗体をつくる方法として、別の方法があったのではないかと指摘、抗リン脂質抗体のモノクローナル抗体を投与による APS モデルマウスの可能性について、リツキシマブなどの抗体除去療法の APS に対する有効性について、p38MAPK が TF の発現に一番重要といえる根拠に関して質問があった。次いで、副査森松准教授より、PS との関連について、ER 膜に存在するはずの RPN2 が細胞膜に発現する生物学的意義について質問があった。次いで副査渥美教授より、高血圧と抗リン脂質抗体の出現の関連について、APS の治療戦略について、研究成果を踏まえて今後の臨床応用への展望についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

この論文は、APS の血栓形成メカニズムに関与する新規分子を発見したことで高く評価され、本論文の成果から今後の APS の病態解明と新しい治療開発が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。