

学位論文題名

抗カルジオリピン抗体の対応抗原 β_2 グリコプロテイン I の
血管内皮細胞における発現の検討

学位論文内容の要旨

緒言

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome: APS) とは、動静脈血栓症、習慣流産、血小板減少などの臨床症状を呈し、その患者血中に抗カルジオリピン抗体 (aCL) やループスアンチコアグラントといった抗リン脂質抗体の存在を認める自己免疫疾患で、1983 年 Hughes らにより提唱された疾患概念である。

aCL は当初、カルジオリピンに直接結合すると考えられていたが、近年の研究により APS 患者に特徴的に認められる aCL は、カルジオリピンそのものを認識するのではなく、カルジオリピンなどの陰性荷電を有するリン脂質との結合により構造変化した β_2 グリコプロテイン I (β_2 GPI) に出現する cryptic な epitope を認識する抗体であることが示された。つまり APS 患者に認められる aCL は、抗 β_2 GPI 抗体と呼称すべき抗体であると考えられている。

この APS の主要な自己抗原である β_2 GPI の機能は、いまだ不明な点が多いが、ADP 惹起による血小板凝集の抑制、トロンビン及び凝固因子 Xa の生成阻害、内因性凝固反応の抑制などが報告されており、リン脂質依存的な血液凝固反応を抑制し抗凝固活性をもたらすことが知られている。その一方で、活性化プロテイン C の抗凝固活性を阻害することも報告されており、 β_2 GPI は凝固反応を促進と抑制の両面から制御している極めて興味深い蛋白である。

本研究では、ヒトの種々の臓器における β_2 GPI の mRNA の発現を詳細に検討し、さらに凝固線溶系の場合としての血管内皮細胞の重要性に着目し、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における β_2 GPI mRNA と蛋白の発現を解析した。

材料と方法

1. 検体と細胞

大脳、小脳、心、肺、肝、脾、腎、筋、大動脈、下大静脈、小腸、大腸の各臓器は剖検検体より得た。

血管内皮細胞 HUVEC は継代数 3 代までの細胞を、肝癌由来細胞 HepG2、子宮頸癌由来細胞 HeLa は対数増殖期の細胞を使用した。

2. Northern blot 解析

各臓器より AGPC 法にて得た total RNA 20 μ g を 1% agarose gel 上で泳動し、ナイロン膜にプロットした。Probe は、肝癌由来の β_2 GPI cDNA より PCR 法にて DIG ラベルして作製した。この Probe とナイロン膜を 50 $^{\circ}$ C で一昼夜反応させ、洗浄し、さらにアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体と反応させた後、CSPDTM を用い蛍光発色させた。

3. RT-PCR

1 μ g/ml の lipopolysaccharide (LPS) の存在下で 5 時間刺激培養した HUVEC、及び、HepG2、HeLa の各培養細胞より AGPC 法にて total RNA を抽出した。

上記 total RNA 1 μ g をそれぞれ oligo-dT primer を用いて逆転写反応を行い cDNA を得た。この cDNA を鋳型にして β 2GPI の各 primer を用い PCR を行った。

4. cDNA cloning

HUVEC の cDNA phage library を大腸菌に感染させて *in vivo* excision を行い、Plasmid に変換した。ClonCapture cDNA selection systemTM により biotin 化した β 2GPI probe を作成し、RecA 蛋白存在下に 1 μ g の plasmid library との三重鎖を形成させた後、streptavidin を結合した磁気ビーズで目的 cDNA を含む plasmid を濃縮した。濃縮された plasmid library を DIG ラベルした β 2GPI probe を用いて colony hybridization によりスクリーニングし、得られた陽性 clone の塩基配列を解析した。

5. 細胞内 β 2GPI 蛋白の染色、および FACS による検出

HUVEC、HepG2、HeLa に細胞内蛋白輸送阻害剤 GolgiStopTM を加えて 5 時間培養した。これらの細胞を氷上で Cytofix/CytopermTM kit を用いて処理した。各細胞に 10 μ g/ml のモノクローナル抗 β 2GPI 抗体、またはコントロールマウス IgG を氷上で 30 分間反応させた後洗浄し、さらに FITC 標識ヤギ抗マウス Ig F(ab')₂ で 30 分反応させた。蛍光強度は FACS CaliburTM で解析した。

結果

ヒト組織における β 2GPI mRNA の発現

各臓器における β 2GPI mRNA の発現を Northern blot 法で解析したところ、肝で多量の β 2GPI mRNA の発現が見られ、筋にも肝とほぼ同等量の発現を認めた。その他、大動脈、下大静脈、心、腎に極めて微量の β 2GPI mRNA の発現が認められた。

血流と直接接触する血管組織における β 2GPI mRNA の発現は、注目すべき知見と考えられたため、培養血管内皮細胞である HUVEC を用いて以下の検討を行った。

HUVEC における β 2GPI mRNA の発現

β 2GPI の primer を用いて HUVEC の cDNA で RT-PCR を行ったところ、予想された 419 bp の単一バンドが検出された。その発現程度は未刺激 HUVEC ではわずかであったが、LPS 刺激後著しく増加した。対照とした HeLa では β 2GPI の発現は見られなかった。

次に、完全長の β 2GPI mRNA が発現しているかを検討する目的で、 β 2GPI の異なる領域を増幅する 3 種類の primer を用い RT-PCR を行った。肝臓由来の β 2GPI cDNA を template に用いた場合と同様に HUVEC 由来の cDNA を用いても、それぞれの primer で 419 bp、308 bp、305 bp の予想された単一バンドが検出された。

以上の結果より、HUVEC において完全長の β 2GPI の発現が示唆されたため、HUVEC cDNA library をスクリーニングした。得られた陽性 clone の塩基配列を解析し、5'および3'の non-coding region を含む完全長の β 2GPI cDNA を確認した。

HUVEC における β 2GPI 蛋白の発現

β 2GPI が蛋白として HUVEC より産生されているかを確認するため、モノクローナル抗 β 2GPI 抗体を用い、細胞内染色法を用いた FACS による解析を行った。

陽性コントロールとして用いた HepG2 では、抗 β 2GPI 抗体による染色でコントロール IgG と比し 10 倍以上の蛍光強度の増大がみられ、ヒストグラムは右に大きく移動した。これに対し β 2GPI mRNA の発現が見られなかった HeLa では、蛍光強度は control IgG と差はなかった。 β 2GPI mRNA の発現が確認された LPS 刺激後 HUVEC では、2 種類のモノクローナル抗体いずれを用いた場合も明かな蛍光ヒストグラムの移動が見られた。

結語

本研究においては、APS の主要な自己抗原である β 2GPI のヒト組織における発現を詳細に検討した。その結果従来発現が知られていた肝以外に筋、大動脈、大静脈、心などにおいても β 2GPI mRNA の発現が認められた。血管内皮の凝固線溶系の場としての役割に着目し、血

管内皮細胞 HUVEC を用いてさらに検討したところ、HUVEC は完全長の $\beta 2$ GPI mRNA を発現し、その発現は LPS 刺激により著明に増加することが明かとなった。さらに特異的抗体と細胞内染色をもちいた flow cytometry による解析で、LPS 刺激 HUVEC は細胞内に $\beta 2$ GPI 蛋白を発現することが証明された。以上より肝のみならず血管内皮細胞もまた $\beta 2$ GPI を産生し、また血管内皮局所で産生された $\beta 2$ GPI が凝固線溶の制御や APS の病態形成にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 上 出 利 光

学位論文題名

抗カルジオリピン抗体の対応抗原 β_2 グリコプロテイン I の 血管内皮細胞における発現の検討

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome: APS) 患者血清中に認められる抗カルジオリピン抗体は、カルジオリピンそのものを認識するのではなく、カルジオリピンなどの陰性荷電を有するリン脂質との結合により構造変化した β_2 グリコプロテイン I (β_2 GPI) に出現する cryptic な epitope を認識する抗体であることが知られている。

この APS の主要な自己抗原である β_2 GPI の機能は、いまだ不明な点が多いが、ADP 惹起による血小板凝集の抑制、トロンビン及び凝固因子 Xa の生成阻害、内因性凝固反応の抑制などが報告されており、リン脂質依存的な血液凝固反応を抑制し抗凝固活性をもたらすことが知られている。その一方で、活性化プロテイン C の抗凝固活性を阻害することも報告されており、 β_2 GPI は凝固反応を促進と抑制の両面から制御している極めて興味深い蛋白である。

β_2 GPI は、主に肝で産生され、その約 40% がリポ蛋白分画中に、残りは血中に約 200 μ g/ml の濃度でフリーの状態が存在しているが、肝以外の臓器での発現の有無は詳細にはわかっていない。

そこで APS における主要な自己抗原である β_2 GPI のヒトの種々の臓器における産生を検討する目的で、以下の実験を行った。

剖検検体より得たヒトの種々の臓器よりそれぞれ全 RNA を抽出し、ノーザンブロット法で β_2 GPI の mRNA の発現を検討した。その結果、肝臓以外に骨格筋、大動脈、大静脈、心、腎においても β_2 GPI mRNA の発現が認められた。血管組織における β_2 GPI mRNA の発現は、 β_2 GPI の凝固線溶系の制御因子としての役割を考え併せると、注目すべき知見と考えられた。そこで凝固線溶反応の場である血管内皮細胞に着目し、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における β_2 GPI mRNA の発現を RT-PCR 法と HUVEC cDNA ライブラリースクリーニングで解析し、さら

に蛋白発現をモノクローナル抗 β_2 GPI 抗体を用いた細胞質内フローサイトメトリーで検討した。その結果、HUVEC においても完全長 β_2 GPI mRNA の発現が認められ、その発現は LPS 刺激により増強した。また、HUVEC は細胞内に β_2 GPI 蛋白を発現することが判明した。

HUVEC は、血管内皮細胞の基本的性質をよく反映する材料として用いられていることから、ヒト血管内皮細胞は β_2 GPI 蛋白を産生している結論づけることができた。

β_2 GPI と血管内皮細胞との関わりとして、(1) β_2 GPI が、血管内皮細胞上での外因系凝固反応の開始点である Tissue Factor、Factor VII による Factor X の活性化を抑制している、(2) β_2 GPI は血管内皮細胞上で activated protein C (APC) や protein S の機能を抑制している、(3) β_2 GPI は血管内皮細胞のリン脂質に結合し、抗カルジオリピン抗体の抗原を提示する、などが報告されている。これらはすべて肝から流血中に供給される β_2 GPI との関係でのみ考えられてきた。

本研究により、血管内皮細胞自体も β_2 GPI 産生していることが明らかになり、流血中の β_2 GPI のみならず血管局所で産生される β_2 GPI も凝固線溶の制御や APS の病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、APS における血栓形成機構を理解する上での新たな鍵となりうる可能性とが考えられた。

発表終了後、吉木教授より使用した剖検検体の死因と年齢、各臓器に含まれる血管がノーザンブロットの結果へ及ぼす影響、HUVEC の刺激に LPS を使用した理由、HUVEC のサイトカインによる刺激の検討の有無、流血中での aCL と β_2 GPI の状態及びその反応について質問があった。続いて、上出教授より HUVEC 以外の血管内皮細胞における β_2 GPI 発現の検討の提案があり、血管内皮、 β_2 GPI、凝固系蛋白の局在及び局所での作用 β_2 GPI のポリモルフィズムと APS の関連について質問があった。最後に小池教授より動脈内皮での β_2 GPI 発現の有無、APS において発症頻度の高い脳梗塞と β_2 GPI の局所での発現との関連についての質問があった。これらの質問に対し、申請者は概ね適切な回答をした。

この論文は、抗リン脂質抗体症候群における主要な自己抗原である β_2 GPI の発現に関する基礎的検討を詳細に行った研究として高く評価され、今後、 β_2 GPI の生理的機能や抗リン脂質抗体症候群の病態形成機序の解明に大きく貢献するものと期待される。

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。