

抗 β_2 -glycoprotein I 抗体の対応抗原の立体構造の解析Antigenic structures recognized by anti- β_2 -glycoprotein I autoantibodies

学位論文内容の要旨

抗リン脂質抗体症候群は、動・静脈血栓症や習慣流産、血小板減少により特徴づけられる疾患である。抗リン脂質抗体症候群において、抗リン脂質抗体、特に抗カルジオリピン抗体やループスアンチコアグラントは臨床的に非常に重要である。1990年に、3つの独立した研究グループが、抗カルジオリピン抗体がカルジオリピンに結合するためには50 kDaのコファクターが必要であることを報告した。抗リン脂質抗体症候群患者の抗カルジオリピン抗体は、通常のプレートに固相化された β_2 -GPIには結合しないが、酸素化ポリスチレンプレートに固相化された β_2 -GPIには結合する(抗 β_2 -GPI抗体)。 β_2 -GPIのドメイン欠損蛋白との結合実験にて、抗 β_2 -GPI抗体は、ドメインI, II, III, IVより成るドメイン欠損蛋白を認識するが、ドメインI, II, IIIより成るドメイン欠損蛋白は認識しないことが示され、ドメインIV上に抗 β_2 -GPI抗体の主要なエピトープがあり、ドメインIV, Vよりなるドメイン欠損蛋白を抗 β_2 -GPI抗体が認識しないことよりドメインVを欠失することが、このエピトープの表出に重要であることが示された。これらの結果より、抗 β_2 -GPI抗体のエピトープは、遊離の β_2 -GPI上にはなく、ドメインIV上のドメインVに隠された部分にあることが推測されていた(以下 cryptic epitope)。

β_2 -GPIは、Schultzeらにより初めて報告されたヒト血清中に約200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で存在する分子量50 kDaの糖蛋白である。 β_2 -GPIは、約60個のアミノ酸残基で構成される5個の相同性のある構造をもったモチーフで構成され、各モチーフは、システインを多く含んでおり、分子内でそれぞれ2つのジスルフィド結合を構成している。この繰り返し構造は、short consensus repeats (SCR)あるいは complement control protein repeats (CCP)、スドメインと名付けられた。ドメインVは82個のアミノ酸から構成され、6個のシステインを含み、他のドメインと異なっている。最近、 β_2 -GPI結晶構造のX線解析が報告された。

本研究では、 β_2 -GPIの結晶構造解析に基づいて、 β_2 -GPIの水溶液中での高次構造を、エネルギー最小化と分子力学シミュレーションを行い最適化し決定した。最適化した立体構造モデルのドメインIVとVの間には3つの静電的結合、アスパラギン酸(D)¹⁹³-リジン(K)²⁴⁶, D²²²-K³¹⁷, およびグルタミン酸(E)²²⁸-K³⁰⁸, が認められた。ファージランダムペプチドライブラリーより、抗 β_2 -GPI抗体に結合するペプチドをスクリーニングし、立体構造モデル上で、エピトープを検索することにより、抗 β_2 -GPI抗体が認識するエピトープの構造を決定した。抗リン脂質抗体症候群患者より作成したモノクローナル抗 β_2 -GPI抗体EY1C8, EY2C9, TM1G2および、抗リン脂質抗体症候群モデルマウス由来の抗 β_2 -GPI抗体WBCAL-1の抗原決定基は、ドメインIV上に同定された。決定されたエピトープは、主として疎水性ア

ミノ酸で構成されており、ドメイン IV 上の複数のループにまたがって存在し、全てのエピトープがトリプトファン (W)²³⁵ を含んでいた。β₂-GPI の高次構造モデルにおいて、遊離のβ₂-GPI では、エピトープとしての W²³⁵ やその周囲に存在するアミノ酸残基は、ドメイン V により覆い隠された位置に存在することが示された。

エピトープに共通な W²³⁵ の重要性と、ドメイン IV-V 間の静電結合のエピトープ表出における役割を検討するために、W²³⁵ をロイシン (L) に置換したβ₂-GPI と、ドメイン IV-V 間の静電的結合に関与する D¹⁹³, D²²², および E²²⁸ をバリン (V) に置換した変異導入β₂-GPI を作成し、それらに対する抗β₂-GPI 抗体の結合性を固相酵素抗体法で検討した。マウスを免疫して作製したモノクローナル抗ヒトβ₂-GPI 抗体、Cof-18, -20, -21, -22, -23 (それぞれ、遊離のβ₂-GPI のドメイン V, III, IV, III, IV を認識することが、β₂-GPI ドメイン欠損蛋白との結合実験にて証明されている。) の、β₂-GPI への結合性は、D¹⁹³, D²²², E²²⁸ の V への置換によりほとんど変化しなかった。しかし、抗リン脂質抗体症候群患者および、抗リン脂質抗体症候群モデルマウスより作製したモノクローナル抗体、EY2C9, WBCAL-1 のβ₂-GPI への結合性は、V への変異を導入すると全て低下し、特に 3 カ所に変異を導入したβ₂-GPI に対してはほとんど結合しなかった。β₂-GPI の分子モデルとこの実験結果から、ドメイン V はこれらの 3 カ所でドメイン IV と結合し、この結合は、抗β₂-GPI 抗体が認識するドメイン IV 上の cryptic epitope の表出に重要であると考えられた。

しかし、少数の抗リン脂質抗体症候群患者血清は、静電結合部位 3 カ所に変異を導入したときに抗体の結合が増強したことから、モノクローナル抗体とは異なったエピトープを認識する抗β₂-GPI 抗体の存在が示唆された。以上の結果を総合すると、ドメイン IV 上の cryptic epitope には多様性があり、抗リン脂質抗体症候群患者血中の抗β₂-GPI 抗体は、そのエピトープの特性より少なくとも 2 種類に分けられることが示唆された。ドメイン IV-V 間の静電結合がどちらのエピトープの表出にも重要であり、両エピトープはドメイン IV 上の比較的近い位置にある可能性があると考えた。

抗β₂-GPI 抗体が認識するエピトープがドメイン IV 上の W²³⁵ 近傍の比較的限られた領域に同定されたがそれらは同一ではなかったことは、抗リン脂質抗体症候群患者における抗β₂-GPI 抗体産生において、β₂-GPI 上の単一のエピトープに対する抗体産生に引き続き、抗原分子内で epitope spreading が起こっていることを示唆する。抗リン脂質抗体症候群の臨床像は、動脈あるいは静脈血栓症であるが、それらは患者ごとに必ずしも均一ではない。この臨床像の違いが、各患者での抗β₂-GPI 抗体の epitope spreading の違いに起因しているのかも知れない。今後、抗β₂-GPI 抗体の抗原特異性を標的とした合成ペプチド等による特異的な免疫抑制療法に発展させ得る可能性があり、興味深い知見と考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 西 村 孝 司

学位論文題名

抗 β_2 -glycoprotein I 抗体の対応抗原の立体構造の解析

Antigenic structures recognized by anti- β_2 -glycoprotein I autoantibodies

抗リン脂質抗体症候群 (APS) において、抗リン脂質抗体、特に抗カルジオリピン抗体は臨床的に非常に重要である。1990 年に抗カルジオリピン抗体がカルジオリピンに結合するためには 50 kDa のコファクターが必要であることが報告され、そのコファクターは β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI) であった。APS 患者の抗カルジオリピン抗体は、通常のプレートに固相化された β_2 -GPI には結合しないが、カルジオリピンと結合した β_2 -GPI や酸化ポリスチレンプレートに固相化された β_2 -GPI には結合する (抗 β_2 -GPI 抗体)。 β_2 -GPI のドメイン欠損蛋白との結合実験にて、抗 β_2 -GPI 抗体のエピトープは、遊離の β_2 -GPI 上にはなく、ドメイン IV 上のドメイン V に隠された部分にあることが推測されていた (以下 cryptic epitope)。最近、 β_2 -GPI の結晶構造の X 線解析が報告された。

本研究では、 β_2 -GPI の結晶構造解析に基づいて、CHARM を用いて、 β_2 -GPI の水溶液中での立体構造モデルを構築した。立体構造モデルのドメイン IV と V の間には 3 つの静電的結合、アスパラギン酸 (Asp)¹⁹³-リジン (Lys)²⁴⁶, Asp²²²-Lys³¹⁷, およびグルタミン酸 (Glu)²²⁸-Lys³⁰⁸, が認められた。ファージランダムペプチドライブラリーより、抗 β_2 -GPI 抗体に結合するペプチドをスクリーニングし、立体構造モデル上で、エピトープを検索することにより、抗 β_2 -GPI 抗体が認識するエピトープの構造を決定した。APS 患者より作成したモノクローナル抗 β_2 -GPI 抗体、EY1C8, EY2C9, TM1G2 および、APS モデルマウス由来の抗 β_2 -GPI 抗体、WBCAL-1 の抗原決定基は、ドメイン IV 上に同定された。決定されたエピトープは、主として疎水性アミノ酸で構成されており、ドメイン IV 上の複数のループにまたがって存在し、全てのエピトープがトリプトファン (Trp)²³⁵ を含んでいた。 β_2 -GPI の立体構造モデルにおいて、遊離の β_2 -GPI では、エピトープとしての Trp²³⁵ やその周囲に存在するアミノ酸残基は、ドメイン V により覆い隠された位置に存在することが示された。

エピトープに共通な Trp²³⁵ の重要性とドメイン IV-V 間の静電結合のエピトープ表出における役割を検討するために、Trp²³⁵ をロイシン (Leu) に置換した β_2 -GPI と、ドメイン IV-V 間の静電的結合に関与する Asp¹⁹³, Asp²²², および Glu²²⁸ を Val に置換した β_2 -GPI の変異体を作成し、それらに対する抗 β_2 -GPI 抗体の結合性を固相酵素抗体法で検討した。マウスを免疫して作製したモノクローナル抗ヒト β_2 -GPI 抗体、Cof-18, -20, -21, -22, -23 (それぞれ、遊離の β_2 -GPI のドメイン V, III, IV, III, IV を認識することが、 β_2 -GPI ドメイン欠損蛋白

との結合実験にて証明されている。)の、 $\beta 2$ -GPI への結合性は、Asp¹⁹³、Asp²²²、Glu²²⁸の Val への置換によりほとんど変化しなかった。しかし、APS 関連抗体である EY2C9、WBCAL-1 の $\beta 2$ -GPI への結合性は、Val への変異を導入すると全て低下し、特に 3カ所に変異を導入した $\beta 2$ -GPI に対してはほとんど結合しなかった。 $\beta 2$ -GPI の分子モデルとこの実験結果から、ドメイン V はこれらの 3カ所でドメイン IV と結合し、この結合は、抗 $\beta 2$ -GPI 抗体が認識するドメイン IV 上の cryptic epitope の表出に重要であると考えられた。

副査小野江教授から、申請者に、 $\beta 2$ -GPI の生理的役割や APS 患者の抗体と $\beta 2$ -GPI を免疫して作成した抗体の違いや Cof-18 の持つリン脂質と $\beta 2$ -GPI の結合を阻害する作用の治療への応用の可能性についての質問があった。

次いで、副査西村教授から、生理的に存在する $\beta 2$ -GPI や APS における血栓症の発症機序とそのトリガーとなる要因についてや自己抗体の役割についての質問があった。最後に、主査小池教授から、本研究に B 細胞のエピトープを同定することを目的とした意義と今後の治療への応用につき質問があった。いずれの質問対しても、申請者は概ね適切に回答した。

本論文における検討から、今後は APS における血栓発症機序の解明や治療薬の開発への応用が期待される。審査委員一同は、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あわせ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。