

学位論文題名

Suppressed Intrinsic Fibrinolytic Activity
by Monoclonal Anti Beta-2 Glycoprotein I Autoantibodies :
Possible Mechanism for Thrombosis In Patients
With Antiphospholipid Syndrome

(モノクローナル抗 β 2GPI抗体の内因系線溶活性抑制作用と、抗リン脂質抗体症候群患者における血栓形成の成因への関与についての研究)

学位論文内容の要旨

1. 緒言

抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome, APS)は、各臓器の動脈及び静脈の血栓症や習慣流産など妊娠合併症をはじめとする多彩な臨床症状を呈する症候群であり、血清中に抗リン脂質抗体が検出される。抗リン脂質抗体には、固相酵素抗体法(Enzyme immunoassay, EIA)で検出され血清糖蛋白である β 2-glycoprotein I (β 2GPI)を対応抗原とする抗カルジオリピン抗体 (aCL=抗 β 2GPI抗体)と、活性化部分トロンボプラスチン時間などのリン脂質依存性の凝固時間の延長で検出されるループスアンチコアグラント(lupus anticoagulant, LA)などがある。これらの抗体と血栓形成の成因の関係については、まだ不明な点も多い。一方、凝固第 XII 因子は、内因系凝固活性の initiator として知られるが、同時に内因系線溶活性の initiator でもある。過去の報告では、 β 2GPI が凝固第 XII 因子の作用を抑制するとされており、抗 β 2GPI 抗体も β 2GPI を介して凝固第 XII 因子の活性に作用することが予想された。以上の背景から、 β 2GPI、モノクローナル抗 β 2GPI 抗体の内因系線溶活性への影響、さらに、凝固 XII 因子活性化への影響を検討した。

2. 方法

はじめに、内因系線溶活性測定のため合成基質を用いた測定系を確立した。ユーグロブリン分画にプラスミノゲン、リン脂質、合成基質 S-2251 を加え、カオリンを添加することにより、XII 因子をトリガーとした内因系線溶活性が活性化され、プラスミンが生成される。生成したプラスミンによって合成基質 S-2251 が発色し、これを吸光度計で測定した。カオリンの有無の吸光度の差を内因系線溶活性とした。10 名の健常者血漿から標準血漿 (PNP) を作成し、ユーグロブリン分画を調整後、12.5、25、59、100%に希釈し内因系線溶活性を測定して標準曲線として使用した。モノクローナル抗 β 2GPI 自己抗体は、抗 β 2GPI 自己抗体をもつモデルマウス NZW/BXSB-F1 から作成した WBCAL-1 と、APS 患者から得た IgM 抗体である EY2C9 の 2 種類を用いた。

まず、PNP から作成したユーグロブリン分画に β 2GPI を段階希釈し加え、内因系線溶活性を測定し、続いて、 β 2GPI 存在下でユーグロブリン分画に WBCAL-1 および EY2C9 を添加し内因系線溶活性を測定して、 β 2GPII および抗 β 2GPII 抗体の内因系線溶活性に対

する影響を検討した。さらに、 β 2GPI 完全欠損患者血漿から作成したユーグロブリンに β 2GPI 存在・非存在下で抗 β 2GPI 抗体を添加し内因系線溶活性を測定し、抗 β 2GPI 抗体の β 2GPI 依存性を確認した。次に、抗 β 2GPI 抗体の内因系線溶への作用機序を明らかにするため、次の実験をおこなった。はじめに凝固 XII 因子活性化に対する β 2GPI および抗 β 2GPI 抗体の影響を検討するため以下の方法を用いた。リン脂質を十分に加えたプレカリクレイン欠乏血漿にカオリンを添加することにより XII 因子が活性化され、生成した活性化 XII 因子 (XIIa) を合成基質 S-2302 で測定した。 β 2GPI 存在下で WBCAL-1 および EY2C9 を加えて、XII 因子活性化へのこれらの抗体の影響を検討した。つづいて過剰な XIIa を加えた条件で β 2GPI、WBCAL-1 存在下での内因系線溶活性の測定を行い、モノクローナル抗 β 2GPI 抗体の作用の変化を観察した。

最後に、APS 患者の内因系線溶活性を評価するため、14 名の APS 患者および、18 名の健常者の血漿からユーグロブリン分画を作成し、内因系線溶活性を測定し比較検討した。

3. 結果

PNP から作成したユーグロブリンに β 2GPI を添加し内因系線溶活性を測定したところ、 β 2GPI の濃度依存的に内因系線溶活性は有意に抑制された。また、一定濃度の β 2GPI 存在下で、モノクローナル抗 β 2GPI 抗体を添加して内因系線溶活性を測定したところ、抗体の濃度に依存して内因系線溶活性は著しく抑制された。また、 β 2GPI 欠乏血漿から作成したユーグロブリンに、 β 2GPI の存在・非存在下でモノクローナル抗 β 2GPI 抗体を加えたところ、 β 2GPI 存在下でのみ内因系線溶活性の抑制効果が見られた。

プレカリクレイン欠乏血漿および合成基質 S-2302 を用いた凝固 XII 因子活性化の実験において、 β 2GPI は XIIa の生成を有意に抑制した。ここに WBCAL-1 および EY2C9 を添加すると、これらのモノクローナル抗 β 2GPI 抗体は β 2GPI の XII 因子活性化の抑制作用を阻害した。さらに、過剰な XIIa 存在下で内因系線溶活性を測定したところ、 β 2GPI 存在下で WBCAL-1 は XII 因子活性化を抑制した。

抗リン脂質抗体症候群患者血漿から作成したユーグロブリン分画の内因系線溶活性は、健常者群と比較し、有意に低下していた。

4. 結語

ユーグロブリン分画の内因系線溶活性を測定するため、合成基質 S-2251 を用いた新しい測定系を作成した。この測定系では、プラスミノゲン過剰状態のユーグロブリン分画にカオリンを加え、内因系線溶を刺激し、カオリンにより生成したプラスミンを測定し内因系線溶活性とした。この測定系を用いて β 2GPI および抗 β 2GPI 抗体の、ユーグロブリン分画の内因系線溶に対する影響を検討した。 β 2GPI は従来報告されたとおり、内因系線溶活性の抑制作用を示した。また、二種類のモノクローナル抗 β 2GPI 抗体はいずれも内因系線溶活性を抑制し、その効果は、 β 2GPI 依存性であった。

内因系線溶の initiator である凝固 XII 因子活性化に対して、従来の報告では β 2GPI および、マウスを免疫して作成したポリクローナル抗 β 2GPI 抗体は凝固 XII 因子活性化を抑制するとされていたが、今回の我々の実験では、 β 2GPI は凝固 XII 因子活性化に抑制的に作用するが、モノクローナル抗 β 2GPI 自己抗体は β 2GPI の作用に拮抗するように作用した。この作用のちがいについては、異種抗原に対する抗 β 2GPI 抗体と自己抗体としての抗 β 2GPI 抗体のエピトープの相違と関連しているかもしれない。また、XIIa 過剰状態でもモノクローナル抗 β 2GPI 抗体は内因系線溶活性を抑制した。このことから、モノクローナル抗 β 2GPI 抗体は、凝固 XII 因子活性化の抑制ではなく、XIIa の作用、またはそれより下流の XIIa によって活性化されるプレカリクレインの作用などに影響して、内因系線溶活性を抑制すると予想された。

APS 患者のユーグロブリン分画では、健常者群に比較して内因系線溶活性が低下しており、抗 β 2GPI 抗体の内因系線溶活性抑制作用が臨床的にも APS 患者の血栓形成の病態に関与していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

Suppressed Intrinsic Fibrinolytic Activity by Monoclonal Anti Beta-2 Glycoprotein I Autoantibodies : Possible Mechanism for Thrombosis In Patients With Antiphospholipid Syndrome

(モノクローナル抗 β 2GPI抗体の内因系線溶活性抑制作用と、抗リン脂質抗体症候群患者における血栓形成の成因への関与についての研究)

抗リン脂質抗体症候群(APS)は、各臓器の動脈及び静脈の血栓症や習慣流産など妊娠合併症をはじめとする多彩な臨床症状を呈する症候群であり、血清中に抗リン脂質抗体が検出される。抗リン脂質抗体のひとつである抗カルジオリピン抗体 (=抗 β 2GPI抗体)は、 β 2-glycoprotein I (β 2GPI)を対応抗原とし、固相酵素抗体法で検出される。一方、凝固第XII因子は内因系凝固活性の initiator として知られるが、同時に内因系線溶活性の initiator でもある。過去の報告では、 β GPIが凝固第XII因子の作用を抑制するとされており、抗 β 2GPI抗体も β 2GPIを介して凝固第XII因子の活性化に作用することが予想された。以上の背景から、 β 2GPI、モノクローナル抗 β 2GPI抗体の内因系線溶活性、凝固第XII因子活性化への影響を検討した。

はじめに、内因系線溶活性測定のため合成基質を用いた測定系を確立した。ユーグロブリン分画にプラスミノゲン、リン脂質、合成基質 S-2251 を加え、カオリンを添加することにより、XII因子をトリガーとした内因系線溶活性が活性化され、プラスミンが生成される。生成したプラスミンによって合成基質 S-2251 が発色し、これを吸光度計で測定した。この方法を用いて、 β 2GPI およびモノクローナル抗 β 2GPI抗体の内因系線溶活性を測定した。モノクローナル抗 β 2GPI抗体としては、抗 β 2GPI自己抗体をもつモデルマウス NZW/BXSB-F1 から作成した WBCAL-1 と、APS患者から得た IgM抗体である EY2C9 の2種類を用いた。 β 2GPI およびモノクローナル抗 β 2GPI抗体はともにユーグロブリン分画の内因系線溶活性を抑制した。 β 2GPI完全欠損患者血漿から作成したユーグロブリンに β 2GPI存在・非存在下でモノクローナル抗 β 2GPI抗体を添加し内因系線溶活性を測定したところ、モノクローナル抗 β 2GPI抗体は β 2GPI抗体の存在下でのみ内因系線溶活性を抑制し、モノ

クローナル抗 β 2GPI 抗体が β 2GPI 依存性に内因系線溶活性を抑制することが確認された。また、プレカリクレイン欠乏血漿及び合成基質 S-2302 を使用した方法を用いて、凝固 XII 因子活性化に対する β 2GPI およびモノクローナル抗 β 2GPI 抗体の影響を検討したところ、 β 2GPI は XIIa の生成を有意に抑制したが、モノクローナル抗 β 2GPI 抗体は XIIa の生成抑制作用を示さなかった。過剰な XIIa 存在下でもモノクローナル抗 β 2GPI 抗体は内因系線溶活性を抑制したことより、モノクローナル抗 β 2GPI 抗体は、凝固 XII 因子活性化の抑制ではなく、XIIa の作用、またはそれより下流の XIIa によって活性化されるプレカリクレインの作用などに影響して、内因系線溶活性を抑制すると予想された。また、APS 患者のユーグロブリン分画の内因系線溶活性は、健常者に比べ有意に低下しており、抗 β 2GPI 抗体の内因系線溶活性抑制作用が臨床的にも APS 患者の血栓形成の病態に関与していることが示唆された。

質疑応答においては、副査の今村教授から、 β 2GPI は生体内の凝固線溶機構において主要な働きを担っているのか否か、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の作用の違いの理由について、モノクローナル抗体の IgG 型、IgM 型で作用に差はあるのか、などについて質問があった。ついで主査の浅香教授から、凝固第 XII 因子の凝固活性への影響とそれに対する β 2GPI および抗 β 2GPI 抗体の作用について、また、APS 患者の中で IgG 型と IgM 型の抗体を持つ者で症状の差はあるのか、などについて質問があった。最後に副査の小池教授から、内因系線溶機構のリン脂質依存性について、内因系線溶機構における抗 β 2GPI 抗体の作用部位の可能性について、などの質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はこれまでの文献的報告および実験結果を引用し、概ね適切に回答した。

本論文における検討から、APS 患者の血栓形成要因の一つとして内因系線溶活性の低下が考えられ、今後 APS 患者の血栓形成の病態を考え治療を行っていくうえで有用と考えられた。また、本研究で確立した内因系線溶活性測定法は、APS をはじめ血栓症などにおける内因系線溶を評価において、今後の有用性が期待される。

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。