HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗リン脂質抗体陽性全身性エリテマトーデス患者に対するスタチン製剤の血栓症抑制効果とその機序の解明［全文の要約］
Author(s)	渡邊, 俊之
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2194 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12043号
Issue Date	2015-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60493
Type	doctoral thesis
File Information	Toshiyuki_Watanabe_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文(要約)

抗リン脂質抗体陽性全身性エリテマトーデス患者に対する

スタチン製剤の血栓症抑制効果とその機序の解明

(Preventive effects of statin on developing thrombosis in lupus patients with antiphospholipid antibodies and its mechanism)

２０１５ 年 １２ 月

北 海 道 大 学

渡 邊 俊 之

【背景】抗リン脂質抗体症候群(APS)とは、抗リン脂質抗体(aPL)に関連した自己免疫性血栓症および妊娠合併症と定義され、約半数が全身性エリテマトーデス(SLE)に合併する。代表的な aPL として抗カルジオリピン抗体(aCL)、β2-グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体(aCL/β2GPI)、抗β2GPI 抗体(aβ2GPI)があり、これらは同義とされる。APS の病態は病原性自己抗体である aPL が血管内皮細胞や単球など向血栓細胞を活性化させることで形成される。APS の治療は抗血栓療法に二次予防が中心であるが、祖血栓症予防効果および安全性は十分とはいえない。さらには無症候性 aPL 陽性者に対する、血栓症の一次予防は確立されていないなど問題が存在する。近年、脂質異常症の治療薬であるスタチン製剤は動脈血栓症の一次・二次予防、静脈血栓症の一次予防に有効であることが示され、また *in vitro* および *in vivo* において、aPL による血栓傾向を抑制することが報告されており、APS の治療薬として期待されてきた。しかしながら APS 患者及び aPL 陽性者に対するスタチン製剤の血栓症抑制効果については立証されていない。そこで第一部ではスタチン製剤の aPL 陽性 SLE に対する血栓症一次予防の有効性を検証し、第二部でその機序について解析を行った。

第一部

【目的】aPL 陽性 SLE 患者におけるスタチン製剤の血栓症一次予防効果を明らかにする。

【方法】1997 年 4 月から 2014 年 2 月の間に当科で初発の SLE と診断され、かつ血栓症の既往および抗血栓薬による治療歴がない患者を対象とした。SLE の診断は米国リウマチ学会の 1997 年改訂 SLE 分類基準の 4 項目以上を満たすものとした。エンドポイントを血栓症の発症もしくは血栓症による死亡とした。血栓症の定義は、有症状かつ画像検査もしくは組織学的検査のいずれかで血栓を同定できたものとした。観察期間は、観察開始時からイベント発症時、死亡時、または最終観察時までとし、血栓症の発症および血栓症発症リスク、スタチン製剤の有効性について後ろ向きに解析した。統計解析は、Fisher の直接確率検定、Student の t 検定、Mann-Whitney の U 検定、Log-rank 検定によって実施し、P 値が 0.05 未満を統計学的有意とした。Log-rank 検定で有意差を認めた因子から Pearson の積率相関係数検定で内部相関のある因子を除外し、年齢と性別を因子に加え、Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行った。すべての統計解析は SPSS ver22.0(Chicago, Illinois, USA)を用いて行った。なお、この研究はヘルシンキ宣言と医薬品の臨床試験の基本理念に従って施行した。

【結果】152 人(女性 138 人、男性 14 人)が本研究に登録され、78 人(女性 70

人、男性 8 人)が aPL 陽性で、74 人(女性 68 人、男性 6 人)が aPL 陰性であった。全患者 152 人の SLE 発症時年齢中央値は 31 歳(四分位(IQR) 22-45 歳)観察期間中央値は 65 ヶ月(IQR 28-117)であった。aPL 陽性群の SLE 発症時年齢中央値は 30 歳(四分位(IQR) 21-41 歳)、観察期間中央値は 69 ヶ月(IQR 27-118 ヶ月)であった。aPL 陰性群の SLE 発症時年齢中央値は 33 歳(IQR 24-46 歳)、観察期間中央値は 46 ヶ月(IQR 15-110 ヶ月)であった。既知の血栓症危険因子について、aPL 陽性群と陰性群を比較したところ、aPL 陰性群で高血圧症の合併頻度が高く($p = 0.030$)、それ以外の因子に関しては 2 群間に統計学的有意差を認めなかった。SLE 診断後 3 ヶ月以内に開始された治療薬については、aPL 陽性群で GCs と免疫抑制剤の投与頻度が有意に低かった($p = 0.016$、$p = 0.012$)。スタチン製剤及び抗血栓薬の投与頻度は両群で差は見られなかった。

全患者 152 人において、SLE 発症後中央値 5.5 ヶ月(IQR 1-46 ヶ月)で 22 人が血栓症を発症した。aPL 陽性群において、SLE 発症後中央値 6 ヶ月(IQR 1.5-63 ヶ月)で 15 人(19%)が血栓症を発症し、発症率は 2.99/100 人年であった。aPL 陰性群においては、SLE 発症後中央値 2 ヶ月(IQR 0.5-10 ヶ月)で 7 人(10%)が血栓症を発症し、発症率は 1.21/100 人年であった。統計学的に有意差は認められなかったが、aPL 陽性群で血栓症発症する傾向が認められた($p = 0.143$)。

血栓症の内訳は、aPL 陽性群で脳梗塞が 6 人、深部静脈血栓症(DVT)が 4 人、肺血栓塞栓症(PE)が 3 人、DVT+PE が 2 人であり、aPL 陰性群で脳梗塞が 4 人、腸管梗塞が 1 人、DVT が 1 人、PE が 1 人であった。3 人が観察期間中に死亡し、死因は感染症、肝不全、自殺がそれぞれ 1 人であり、血栓症による死亡は観察されなかった。

aPL 陽性群、陰性群において各背景因子に対して Log-rank 検定を行い、血栓症リスク因子の候補を抽出した。aPL 陽性群において、血栓症発症群ではループス腎炎の頻度が有意に低値であった($p = 0.019$)。一方、aPL 陰性群において、血栓症発症群では SLE 発症時年齢(10 歳毎)が高く、高血圧症の合併頻度も有意に高かった($p = 0.002$、$p = 0.029$)。aPL 陽性群における aPL と血栓症に関しては、IgG-aCL は血栓症発症群 15 人のうち 5 人(33%)、血栓症非発症群 63 人のうち 7 人(11%)で陽性であった($p = 0.003$)。その他の aPL では血栓症との関連性は認められなかった。治療薬に関しては、aPL 陽性群において血栓症発症群 15 人のうち 1 人(6.7%)、血栓症非発症群 63 人のうち 22 人(35%)がスタチン製剤を内服していた。aPL 陽性群ではスタチン製剤は有意に血栓症の発症を抑制していたが($p = 0.021$)、aPL 陰性群ではスタチン製剤の血栓症抑制効果は認められなかった($p = 0.881$)。

これらの因子に相関分析を行ったところ、ループス腎炎とスタチン製剤の使用に内部相関を認めたため、ループス腎炎は多変量解析の候補因子から除外した

Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析で、aPL 陽性群では高齢発症、IgG-aCL 陽性が血栓症発症のリスク因子として同定された。またスタチン製剤の使用は血栓症発症に抑制的であった。一方、aPL 陰性群においては解析した因子のいずれも血栓症と関連は見られなかった。

【結語】aPL 陽性 SLE 患者において高齢発症、IgG-aCL 陽性は血栓症発症のリスクであり、発症早期のスタチン製剤投与は血栓症一次予防に有効であった。

第二部

aPL による血栓傾向に対してスタチン製剤がどのように作用するかは不明である。aPL の代表的な対応抗原であるβ2GPI は血漿蛋白であり、通常は細胞外に分泌されるが、細胞内で human leukocyte antigen (HLA) class II がミスフォールドしたβ2GPI と結合すると、β2GPI/HLA classII 複合体として細胞表面に表出されることが報告された。また HLA class II の抗原提示能およびβ2GPI/HLA classII 複合体に対する APS 患者 IgG やヒトモノクローナル IgM 型 aβ2GPI(EY2C9)の結合能は疾患感受性遺伝子である DRB7 において顕著であることを証明し、さらに EY2C9 がβ2GPI/HLA classII 複合体を介して補体依存性の細胞障害を惹起することを報告した。そこで、第二部では *in vitro* でβ2GPI /human leukocyte antigen (HLA) class II 複合体に対するスタチン製剤の影響を検討し、*in vivo* の解析として APS モデルラットにスタチン製剤の投与を行い、血栓症抑制効果を検討した。

実験１　スタチン製剤の HLA classII 発現低下を介した病原性自己抗原提示抑制

【目的】β2GPI/HLA classII 複合体を発現した単球や血管内皮細胞に対するスタチン製剤の作用を検討する。

【方法】不死化臍帯静脈血管内皮細胞(HUEhT-1)とヒト急性単球性白血病細胞(THP-1)に Neon™ Transfection System (Life technologies)を用いたエレクトロポレーション法で HLA-DRA*01:01(DRA)、HLA-DRB1*07:01(DRB7)、β2GPI の遺伝子を導入した。DRB7 のコントロールには HLA-DRB1*08:01(DRB8)を用いた。トランスフェクタントにおける HLA-DR とβ2GPI の細胞表面への発現および EY2C9 のβ2GPI/HLA classII への結合をフローサイトメトリー(FCM)で行った。

遺伝子導入後にフルバスタチンを 0.01 μM、0.1 μM、1 μM、10 μM の濃度で添加した。またフルバスタチンの拮抗剤であるメバロン酸を 100 μM 加え、遺伝子導入 48 時間後に HLA-DR とβ2GPI の細胞表面への発現および EY2C9 のβ2GPI/HLA classII への結合を FCM で確認した。
【結果】HUEhT-1 と THP-1 において、β2GPI のみ遺伝子導入した場合では、β2GPI は細胞表面に検出されなかった。β2GPI はHLA-DR と共発現した細胞表面に検出され、DRB7 ではβ2GPI の細胞表面への発現及び EY2C9 の細胞への結合が亢進していた。HUEhT-1 と THP-1 において、フルバスタチンの濃度依存性に HLA-DR とβ2GPI の発現および EY2C9 の結合が低下し、その作用はメバロン酸により拮抗された。

実験 2　APS モデルラットに対するスタチン製剤の血栓症抑制効果
【目的】APS モデルラットである env-pX ラットにフルバスタチンを投与し、血栓症の抑制効果と免疫学的変化について検討する。
【方法】グルコースを MilliQ 水(Merck Millipore, Billerica, MA, USA)で溶解し、5%ブドウ糖液を作成した。5%ブドウ糖液でフルバスタチンを溶解し、4 μg/ml の濃度に調整した。8 週齢、オスの env-pX ラットにフルバスタチン 4 μg/ml 溶液を 50 ml、30 日間連日経口摂取させた。コントロール群は 5%ブドウ糖液 50 ml を同様に 30 日間連日経口摂取させた。ラットの頭数はそれぞれ 3 匹とした。フルバスタチンの投与前、投与 10 日後、投与 20 日後、投与 30 日後に尾部より採血を行い、4℃で直ちに遠心分離し、使用まで-80℃で保存した。標準 aCL ELISA 測定法において、検出抗体をアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgM 抗体からアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ラット IgM 抗体(Abcam, Cambridge, MA, USA)に変更し、IgM-aCL を測定した。フルバスタチンを 30 日間投与終了後に屠殺し、大脳＋小脳、唾液腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓＋膵臓、腎臓、小腸＋腸間膜、精巣(右)、精巣(左)、皮膚＋皮下組織(骨格筋)、足関節(2 切片)の計 14 ヶ所の組織を採取し、Hematoxilin-Eosin 染色を行い、血栓症の総数を測定した。
【結果】フルバスタチン投与群と非投与群の平均血栓数はそれぞれ 1±0、5.3±1.8 個であり($p = 0.059$)、フルバスタチンによる血栓症抑制効果に統計学的有意差は得られなかったが、血栓症を抑制する傾向は認められた。フルバスタチン投与群と非投与群の両群とも、IgM-aCL の力価は経時的に上昇したが、フルバスタチン投与群において、IgM-aCL の産生は抑制された。
【結語】フルバスタチンは *in vitro* において、血管内皮細胞および単球系細胞上に発現したβ2GPI/HLA classII 複合体と aβ2GPI との結合を阻害した。

また env-pX ラットを用いた *in vivo* の検討においては、フルバスタチンは aCL の産生を抑制し、血栓症の発症を抑制する傾向が見られた。