



Title	抗リン脂質抗体症候群の病態解明の研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	久田, 諒
Description	配架番号 : 2402
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13023号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70312
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Hisada_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 久田 諒

学 位 論 文 題 名

抗リン脂質抗体症候群の病態解明の研究

(Pathogenesis of Antiphospholipid syndrome)

【背景と目的】抗リン脂質抗体症候群(APS)は、抗リン脂質抗体(aPL)と総称される複数の抗体群が関連する自己免疫性血栓症および妊娠合併症である。我々は近年 aPL プロファイルを経路別リスクに応じスコア化した抗リン脂質抗体スコア(aPL-S)を提案し、aPL の抗体価は血栓症リスクを反映していることを示した。しかし副腎皮質ステロイドなど一般的な免疫抑制剤により aPL の抗体価が減少しないことが多く、aPL の産生機序を含めた APS の病態については不明な点が多い。本研究では第一章で APS 患者の末梢血リンパ球サブセット解析を行い病態解明の一助とするとともに、第二章では *ex vivo* で APS 患者の末梢血単核球細胞(PBMC)を刺激、培養する系を用いて aPL 産生サブセットの同定を試みた。また、第三章、第四章では臨床における aPL の重要性に着目した。第三章では aPL 陽性患者における血小板減少と血栓症発症リスクの関連について、aPL-S を用いた層別解析を加えて分析し、第四章では全身性エリテマトーデス(SLE)患者における特発性大腿骨頭壊死(ION)の発生リスクについて、aPL および aPL-S との関連に注目して解析を行った。

【対象と方法】

第一章：北海道大学病院内科 II に通院または入院中の primary APS (PAPS)患者 26 名、SLE 合併続発性 APS (SLE/APS)患者 19 名、対照として健常者 10 名の血液より PBMC を分離し、フローサイトメトリーを用いて 20 の T/ B cell サブセットに分類しその割合を比較した。更に PAPS 患者 14 名からゲノム DNA を抽出し、SLE や血栓症との関連が知られている 21 種の一塩基多型(SNP)と末梢血リンパ球サブセットとの関連や、PBMC の mRNA 発現量との関連について解析した。

第二章：APS 患者の PBMC を刺激、培養し、培養上清から aPL を検出する *ex vivo* の系を確立するため、培養および検出条件の最適化を行った。その上で、BD FACSAria™ II を用いて sorting を行い、APS 患者の PBMC から CD19+CD20+ B cells または CD19+CD20- B cells を deplete した細胞群を抽出した。それぞれの細胞群を上記で確立した条件で培養し、培養上清中の aPL 量を測定および比較した。

第三章：2002 年 4 月から 2006 年 3 月までに北海道大学病院内科 II を受診し抗リン脂質抗体を測定した連続 953 名を対象として、aPL 陽性・陰性患者につき、血小板減少群、非血小板減少群の患者背景、aPL のプロファイル、フォローアップ期間中の最初の血栓症イベントについて解析した。更に aPL-S と血小板数による層別解析も行った。

第四章：2000 年 1 月から 2016 年 12 月までに北海道大学病院内科 II を受診し SLE と診断され、治療を開始した連続 150 名のうち、観察期間中に ION の精査・スクリーニング目的に股関節 MRI 検査を撮像された 82 名を対象とした。MRI 検査 T1 強調像で大腿骨頭に band sign を認めた症例を ION(+)群、MRI 検査で同所見を認めなかった症例を ION(-)群と定義し、両群間の患者背景、aPL のプロファイル、治療前の SLE の活動性や血液検査所見、治療内容について後ろ向きに解析した。

【結果】

第一章：末梢血リンパ球サブセット解析の結果、PAPS、SLE/APS 患者いずれにおいても、健常者と比べて type 2 T helper cells、type 17 T helper cells の増加、regulatory T cells の減少、memory B cells の減少、plasmablast の増加、regulatory B cells の減少が見られた。また Toll like receptor 7 (TLR7) の SNP (rs 3853839) が memory B cells の減少や plasmablast の増加と関連してしており、更に TLR7 の下流に当たる Interferon (IFN) 関連の gene expression (Ly6e、Mx1、IFIT1、IFIT3) をスコア化した IFN score の高値とも関連していた。

第二章：APS 患者の PBMC を IL-6、IL-21、APRIL、CD40 ligand で刺激、培養し、ELISA および cell assay を用いて培養上清中の aPL を測定することで、ex vivo の系で aPL を産生および検出する方法を確立した。更に、CD20 陽性 B 細胞を deplete した PBMC の培養上清から aPL が検出された一方、CD20 陰性 B 細胞を deplete した PBMC の培養上清からは aPL が検出されなかった。

第三章：aPL 陽性患者において血小板減少は aPL、特に aPL-S と相関があり、血小板減少の存在により血栓症発症リスクが有意に上昇していた。また血小板数および aPL-S による層別解析の結果、low aPL-S ($0 < \text{aPL-S} < 30$) 患者群において、血小板減少群は非血小板減少群と比較して血栓症の発症リスクが有意に上昇していた。一方、high aPL-S ($\text{aPL-S} \geq 30$) 患者群においては、血小板減少の有無で血栓症の発症リスクに有意差は見られなかった。

第四章：単変量解析で ION(+) 群では ION(-) 群と比較して、男性、蝶形紅斑、高 triglyceride 血症、高用量のステロイド投与 ($> 0.8 \text{ mg PSL/kg/day}$)、aPL 陽性および aPL-S 高値 (≥ 30) が有意に高率に見られた。更に多変量解析にて、高用量のステロイド投与、高 TG 血症、aPL-S 高値が独立したリスク因子として抽出された。特に aPL-S 高値かつ高 TG 血症の患者では非常に高い頻度で ION が発生していることが示された。

【考察】第一章のサブセット解析の結果、SLE でこれまで報告されているサブセット偏位と同様の偏位が確認され、APS が SLE と類似の病態であることが示唆された。更に TLR7 の SNP が memory B cells の減少や plasmablast の増加、および IFN 関連の遺伝子発現と関連していることが明らかとなり、APS 患者における B 細胞の分化に遺伝的要因が関与している可能性が示唆された。第二章では ex vivo の系で PBMC から aPL を産生、検出する方法を確立し、sorting による細胞サブセットの抽出および培養上清の解析により、CD20 陰性 B 細胞が aPL 産生に関連していると考えられた。この結果は末梢血で plasmablast が増加していることや、抗 CD20 モノクローナル抗体が臨床で APS に対して十分な効果が得られないことと矛盾せず、興味深い結果であった。plasmablast を含む CD20 陰性 B 細胞を抑制する治療が aPL の減少に寄与する可能性があり、将来の治療への応用が期待される。第三章では aPL 陽性血小板減少患者は有意に aPL-S が高く、血栓症をきたしうることを示した。更に血小板数と aPL-S の併用により、aPL 陽性患者における血栓症発症リスクを層別化できる可能性を示唆した。第四章では SLE-ION のリスク解析を行い、aPL-S 高値を独立したリスク因子として初めて抽出した。aPL に関連した微小血栓の出現が ION のリスクを高めていると考えられ、予防法を含めた今後の更なる研究が望まれる。

【結論】APS 患者における末梢血リンパ球サブセットおよび SNP、PBMC mRNA の関連を明らかにし、更に aPL 産生サブセットとして、plasmablast を含む CD20 陰性 B 細胞の関与を示した。臨床研究においては、aPL 陽性血小板減少症の血栓症発症リスク増加を示し、aPL-S を含めた層別化を提唱した。また、SLE-ION のリスク因子として aPL-S 高値を新たに抽出した。APS は未だに未解明な部分の多い難治性疾患であり、これらの研究をもとに更なる病態解明の発展がなされ、根本的な治療方法の開発につながることに期待したい。