



Title	抗リン脂質抗体症候群の病態解明の研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13023
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70313
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Hisada.pdf



学位論文

抗リン脂質抗体症候群の病態解明の研究
(Pathogenesis of Antiphospholipid syndrome)

2018 年 3 月

北海道大学

久田 諒

Ryo Hisada

目次

発表論文目録及び学会発表目録.....	1
1. 緒言.....	3
2. 略語表.....	5
3. 第一章.....	7
APS 患者における末梢血サブセット解析および一塩基多型(SNP)との関連について	7
3.1 背景.....	8
3.1.1 末梢血サブセット解析.....	8
3.1.2 SNP 解析.....	9
3.2 目的.....	10
3.3 対象と方法.....	11
3.3.1 APS 患者の末梢血サブセット解析.....	11
3.3.2 PAPS 患者の SNP とサブセットとの関連.....	18
3.3.3 PAPS 患者の PBMC mRNA 発現及び SNP との関連.....	20
3.4 統計学的解析.....	22
3.5 結果.....	23
3.5.1 APS 患者の末梢血サブセット解析.....	23
3.5.1.1 T cell サブセット.....	23
3.5.1.2 B cell サブセット.....	33
3.5.1.3 Breg cell サブセット.....	39
3.5.2 PAPS 患者のサブセットと SNP との関連.....	41
3.5.3 PAPS 患者の PBMC mRNA 発現及び SNP との関連.....	45
3.6 考察.....	48

4. 第二章	50
aPL 産生細胞サブセットの同定.....	50
4.1 背景	51
4.2 目的	52
4.3 対象と方法	53
4.3.1 健常者 PBMC 培養上清中の IgG/IgM 測定.....	53
4.3.2 APS 患者 PBMC 培養上清中の aPL 測定	54
4.3.2.1 aCL-IgG/IgM ELISA.....	54
4.3.2.2 aβ2GPI-IgG/IgM cell assay	55
4.3.3 APS 患者における aPL 産生細胞サブセットの同定.....	56
4.3.4 統計学的解析.....	58
4.4 結果	59
4.4.1 健常者 PBMC 培養上清中の IgG/IgM 測定.....	59
4.4.2 APS 患者 PBMC 培養上清中の aPL 測定	61
4.4.2.1 aCL-IgG/IgM ELISA.....	61
4.4.2.2 cell assay による PBMC 培養中 aβ2GPI-IgG/IgM 測定	64
4.4.3 APS 患者における aPL 産生細胞サブセットの同定.....	69
4.5 考察	72
5. 第三章	73
抗リン脂質抗体症候群における血小板減少と血栓症リスクに関する研究.....	73
5.1 背景	74
5.1.1 抗リン脂質抗体患者における血小板減少症と血栓症.....	74
5.2 対象と方法.....	75
5.2.1 研究デザイン	75
5.2.2 対象、および主要評価項目	76
5.2.3 aPL および aPL-S の測定.....	77
5.2.4 統計解析.....	80

5.3	結果	81
5.3.1	aPL と血小板減少の関連についての解析	81
5.3.2	aPL と血小板数による血栓症発症リスクの解析	84
5.3.3	aPL-S と血小板数による血栓症発症リスクの解析	86
5.4	考察	88
6.	第四章	90
	SLE 患者における特発性大腿骨頭壊死発生と aPL の関連性の検討	90
6.1	背景	91
6.2	目的	93
6.3	対象と方法	94
6.3.1	研究デザイン	94
6.3.2	対象、および主要評価項目	94
6.3.3	aPL および aPL-S の測定	95
6.3.4	統計解析	95
6.4	結果	96
6.5	考察	103
7.	総括及び結論	104
8.	謝辞	105
9.	引用文献	106

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Ryo Hisada, Masaru Kato, Eri Sugawara, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi. Thrombotic risk stratification by platelet count in patients with antiphospholipid antibodies: a longitudinal study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **15**, 1782-1787 (2017).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 久田諒、加藤将、中川育磨、坊垣暁之、奥健志、堀田哲也、保田晋助、渥美達也：「抗リン脂質抗体陽性血小板減少症における血栓症発症リスク」第43回日本臨床免疫学会総会, 2015年10月22-24日, 神戸
2. 久田諒、加藤将、河野通大、柴田悠平、谷村瞬、菅原恵理、大村一将、神田真聡、服部敏之、中村浩之、嶋村抄苗、中川育磨、志田玄貴、清水裕香、奥健志、坊垣暁之、堀田哲也、保田晋助、渥美達也：「全身性エリテマトーデス患者における特発性大腿骨頭壊死症の背景因子の検討」第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016年4月21-24日, 横浜
3. Ryo Hisada, Masaru Kato, Eri Sugawara, Kazumasa Ohmura, Ikuma Nakagawa, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi.” Thrombocytopenia in patients with antiphospholipid antibodies: a paradoxical thrombotic risk factor” The Annual European Congress of Rheumatology 2016, 8-11 June 2016, London, United Kingdom
4. 久田諒、加藤将、大村一将、中川育磨、奥健志、坊垣暁之、Olga Amengual、堀田哲也、保田晋助、渥美達也：「抗リン脂質抗体陽性血小板減少症における血栓症発症リスクの解析」第38回日本血栓止血学会学術集会, 2016年6月16-18日, 奈良
5. Ryo Hisada, Masaru Kato, Hisako Nakagawa, Eri Sugawara, Masatoshi Kanda, Kazumasa Ohmura, Ikuma Nakagawa, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi.” Deviation of T and B cell Subset and Its Association

with Single Nucleotide Polymorphisms in Patients with Antiphospholipid Syndrome” American College of Rheumatology Annual Meeting 2016, 11 - 16 November, 2016, Washington D.C., USA

6. Ryo Hisada, Masaru Kato, Michihiro Kono, Shun Tanimura, Hiroyuki Nakamura, Eri Sugawara, Kazumasa Ohmura, Sanae Shimamura, Yuka Shimizu, Hisako Nakagawa, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi.” Deviation of T and B cell Subset and Its Association with Single Nucleotide Polymorphisms in Antiphospholipid Syndrome” The 61th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, 20–22 April, 2017, Fukuoka., Japan
7. 久田諒、加藤将、菅原恵理、中村浩之、大村一将、中川久子、藤枝雄一郎、奥健志、坊垣暁之、Olga Amengual、堀田哲也、保田晋助、渥美達也：「抗リン脂質抗体症候群における末梢血リンパ球サブセットおよび一塩基多型(SNP)の解析」第 38 回日本血栓止血学会学術集会, 2017 年 6 月 8-10 日, 名古屋
8. Ryo Hisada, Masaru Kato, Naoki Ohnishi, Michihiro Kono, Shun Tanimura, Eri Sugawara, Hiroyuki Nakamura, Kazumasa Ohmura, Sanae Shimamura, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, Tatsuya Atsumi.” High Risk of Idiopathic Osteonecrosis in SLE Patients with High Antiphospholipid Score and Hypertriglyceridemia” The Annual European Congress of Rheumatology 2017, 14-17 June 2017, Madrid, Spain

1. 緒言

抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome: APS) は、抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibody: aPL)と総称される複数の共通した特異性をもつ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。APS は後天性血栓傾向疾患としては最も頻度が高いもののひとつであり、通常血栓性疾患とは異なり静脈系のみならず動脈系をもおかす。重篤な血栓症が生命予後や生活機能を規定するばかりでなく、他の血栓傾向疾患と比べて再発が非常に多いことから、臨床的に重要な症候群である。また妊娠合併症のおもな症候は不育症、とりわけ反復流産(いわゆる習慣流産)であり、「治療可能な」不育症として産科学的にも重要である。

APS は単独で発症すれば原発性と分類されるが、約半数は全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE)に合併する。診断基準としてサッポロクライテリア・シドニー改変¹と呼ばれる国際分類基準案が広く使用されており、aPL の一種であるループスアンチコアグラント(lupus anticoagulant: LA)、抗カルジオリピン抗体(anticardiolipin antibodies: aCL)、抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体(anti- β_2 -glycoprotein I antibodies: a β_2 GPI)のいずれかの存在が必須である。(Table 1)

現在、抗血栓療法による血栓症の再発予防が治療の主体となっており、特異的な治療は無い。APS における血栓形成の機序として、aPL の存在によって、向血栓細胞(単球、血管内皮細胞、血小板)が血栓準備状態となり(first hit)、感染、手術侵襲、エストロゲン製剤の使用、長期臥床などの要素が加わり(second hit)、血栓が形成されると想定されているが(2nd hit theory)²、その病態解明は未だ不十分であり、様々な研究が進められている。我々は近年 aPL profile を血栓症のリスクに応じスコア化した抗リン脂質抗体スコア(antiphospholipid score: aPL-S)を提案した³。aPL-S は APS の診断や将来の血栓症の予測に効果的であり、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が、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 の産生機序については不明な点が多い。

本研究では APS の病態を解明することを目的とし、第一章で APS 患者の末梢血リンパ球サブセットを行い病態解明の一助とするとともに、第二章では ex vivo で末梢血単核球細胞(peripheral blood mononuclear cells: 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。更に、第三章、第四章にて二つの臨床研究を行った。実臨床において aPL が影響する病態として血小板減少や SLE 患者における大腿骨頭壊死との関連をそれぞれ検討し、新たな視点から aPL 高力価の影響を示し、aPL の抗体価を下げる治療の必要性を明らかにすることとした。

Table 1. 抗リン脂質抗体症候群改訂分類基準 (Sydney revised Sapporo criteria)¹

少なくとも 1 つの臨床所見と少なくとも 1 つの検査所見が確認できた場合抗リン脂質抗体症候群と診断する (※1)

臨床所見

1. 血栓症 (※2)

画像検査や病理検査で確認できる動脈または静脈血栓症 (血管の大小や発生場所は問わない. 血管炎によるもの, 表層性の静脈血栓は除外する)

2. 妊娠合併症

- ・妊娠 10 週以降の他に原因のない正常形態胎児死亡
- ・子癇, 重症の妊娠高血圧腎症や胎盤機能不全(※3)による 34 週未満の早産
- ・3 回以上続けての妊娠 10 週未満の自然流産(母体の解剖学的異常, 内分泌学的異常, 父母の染色体異常を除く)

検査所見

1. ループスアンチコアグラント(LA)が少なくとも 12 週間はなれて 2 回以上検出されること(LA の測定は国際血栓止血学会のガイドラインに従う)
2. 中等度以上 (40 GPL または 40 MPL 以上, あるいはコントロールの 99%タイル以上) の IgG または IgM クラス抗カルジオリピン抗体が 12 週間はなれて 2 回以上検出されること
3. 中等度以上 (コントロールの 99%タイル以上) の IgG または IgM クラス抗 β 2GP I 抗体が 12 週間はなれて 2 回以上検出されること

※1 臨床症状と aPL の検出間隔が 12 週以下または 5 年以上のとき, APS の分類を行うべきではない.

※2 先天性・後天性の血栓素因が共存しても APS を除外する理由とならないが, 年齢 (男性>55 歳, 女性>65 歳), 高血圧症, 糖尿病, 高 LDL 血症, 低 HDL 血症, 喫煙, 若年性心血管障害の家族歴, 肥満, ミクロアルブミン尿, 腎機能低下, 家族性血栓症, 経口避妊薬, 悪性腫瘍, 長期臥症, 手術などの危険因子の有無によって (a) あり (b) なしのサブグループに分類する.

※3 一般的な胎盤機能の臨床像とは, (i) non-stress test における無反応など, 胎児低酸素を示唆する胎児検査異常 (ii) 胎児低酸素を示唆するドップラー所見 (iii) 乏羊水症 (iv) 出産後の体重<10%タイル

2. 略語表

本文中のおよび図中で使用した略語は以下の通りである.

aCL	anticardiolipin antibodies
ACR	American College of Rheumatology
ALP	alkaline phosphatase
aPL	antiphospholipid antibody
aPL-S	antiphospholipid score
APRIL	a proliferation-inducing ligand
APS	antiphospholipid syndrome
aPS/PT	anti-phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody
aPTT	activated partial thromboplastin time
a β 2GPI	anti- β 2-glycoprotein I antibodies
BMI	body mass index;
Breg	Regulatory B cells
BSA	bovine serum albumin
CI	confidence interval
dRVVT	dilute Russell viper venom time
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GP	glycoproteins
IL	interleukin
ION	idiopathic osteonecrosis of the femoral head
IQR	interquartile range
ITP	immune thrombocytopenic purpura
KCT	kaolin clotting time
LA	lupus anticoagulant
MFI	mean fluorescence intensity
mPSL	methylprednisolone
MRI	magnetic resonance imaging
OD	optical density
PAPS	primary antiphospholipid syndrome
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PEI	polyethyleneimine

PSL	prednisolone
SD	standard deviation
SLE	systemic lupus erythematosus
SLE/APS	systemic lupus erythematosus/ antiphospholipid syndrome
SLEDAI	systemic lupus erythematosus disease activity
SNP	single nucleotide polymorphism
TBS	tris-buffered saline
Tfh	Follicular helper T cells
TG	triglyceride
Th	Helper T cells
TIA	turbidimetric immuno assay
TLR	toll like receptor
Treg	Reguratory T cells

3. 第一章

APS 患者における末梢血サブセット解析および
一塩基多型(SNP)との関連について

3.1 背景

3.1.1 末梢血サブセット解析

自己免疫疾患の病態は自己寛容の破綻としてとらえられ、なかでも獲得免疫の中心であり免疫応答をコントロールする T 細胞の分化・成熟に異常があることが示唆されている。T 細胞サブセットにはヘルパー型 T 細胞(Helper T cells: Th)、キラー型 T 細胞および制御性 T 細胞 (Regulatory T cells: Treg)があり、Th はその機能により Th1、Th2、Th17、濾胞性ヘルパーT 細胞(Follicular helper T cells: Tfh)などの亜群に分類される。また、自己抗体産生や T 細胞への抗原提示機能に重要な役割を持つ B 細胞は Transitional, Naïve, Memory B 細胞、形質芽細胞(Plasmablasts)および最終分化した形質細胞などのサブセットに分類される。全身性自己免疫患者の病態把握や治療効果の判定には、これら T 細胞・B 細胞サブセットのポピュレーションおよびそれぞれの機能について解析することが重要と考えられ、これらの検討から明らかになった異常を是正することを目指すことで、実臨床での治療効果が期待できる可能性がある。

これまで、ヒト末梢血免疫担当細胞サブセットの解析はおもにフローサイトメトリー法を用いて行われてきたが、そこで使用される表面マーカーに対する抗体や蛍光色素の使用などに関しては統一されたプロトコールが無く、特定の疾患における細胞亜集団の解析結果が報告によりまちまちである原因の一つと考えられる。そこで、近年ヒト末梢血免疫担当細胞サブセットの解析の標準化が提案され^{4,5}、本邦でもこの手法を取り入れた解析プロトコールを取り入れてゆくことが複数の施設で試みられつつある⁶。

全身性エリテマトーデスや関節リウマチなど、種々の自己免疫疾患においてサブセット解析が行われてきた^{7,8}が、抗リン脂質抗体症候群については既報が少なく⁹、今回抗リン脂質抗体症候群における末梢血サブセット解析を行うこととした。

3.1.2 SNP 解析

人の遺伝子の塩基の配列において、個体間に 1 %以上存在する変異の事を遺伝子多型(genetic polymorphism)と呼ぶ。特に、1 塩基について存在する多型を一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)と呼び、遺伝子多型の中でも特に頻度が高いことから特に着目されている。人における個人差は、この SNP の違いにより大部分が決定されることが推測されている。SNP の遺伝子機能や遺伝子発現に与える影響を解明することにより、個人の体質に合わせたより良い治療法、薬剤の選択や医薬品の開発が可能になると考えられている。

近年、末梢血リンパ球サブセットと SNP との関わりが注目されており¹⁰、本研究では APS 患者における SNP 解析を行い、末梢血サブセットとの相関を解析するとともに、関連する gene expression について PBMC の mRNA を用いて測定し、SNP との関連性について解析した。

3.2 目的

APS 患者の末梢血免疫担当細胞のサブセットおよび SNP を解析することで、疾患における免疫学的病態を明らかにする。

3.3 対象と方法

3.3.1 APS 患者の末梢血サブセット解析

北海道大学病院内科Ⅱに通院または入院中の原発性抗リン脂質抗体症候群(primary antiphospholipid syndrome: PAPS)患者、全身性エリテマトーデス合併続発性抗リン脂質抗体症候群(systemic lupus erythematosus/ antiphospholipid syndrome: SLE/APS)患者について末梢血サブセット解析を行った。対照として健常者についても同様に解析を行った。PAPS、SLE/APS 群については、PSL 5 mg/day 以下で他の免疫抑制剤を併用していない患者のみを対象とした。

対象患者および健常人よりヘパリン管にて静脈血 20ml を採取し、Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare Biosciences, England) を用いて、PBMC を分離した。その後 Th 細胞パネル、Treg 細胞パネルおよび B 細胞パネルに分割し、それぞれの表面マーカーを認識する蛍光標識抗体を添加し、静置、洗浄後に BD FACSAria™ II (BD Biosciences)を用いたフローサイトメトリー法により各サブセットの割合を測定した。T 細胞サブセット解析の際に使用した表面抗原マーカーは、CD3, CD4, CD25, CD45RA, CD127, CD45RA, CCR6, CCR7, CXCR3, CXCR5 の 10 種類、B 細胞サブセット解析では CD3, CD4, CD24, CD27, CD38, IgD の 6 種類を使用し、ヒト細胞サブセット分類の標準化を目標として検討を進めているアメリカのプロジェクトである Human Immunology Project Consortium の提言⁴をもとに作成された厚生労働省研究班ヒト末梢血単核球 (PBMC) 解析マニュアルに沿って行われた。

解析対象とする T,B 細胞群は Table 2 の通りであり、フローサイトメトリー画像を Figure 1-3 に示す。

また制御性 B 細胞(Regulatory B cells; Breg)については、既報¹¹に沿って PBMC を ODN 2006 Type B CpG (10 µg/ml, Miltenyi Biotec)で刺激し、66-72 時間後に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ionomycin (1 µg/ml, Sigma Aldrich), brefeldin A (1x solution, Biolegend, San Diego, USA)で再刺激し、更に 6 時間後に FIX & PERM® Cell Permeabilization Kit (Invitrogen, Massachusetts, USA)、IL10 蛍光標識抗体を用いて細胞内染色を行い、IL10+CD19+細胞の比率をフローサイトメトリー法により測定した。(Figure 4)

なお、上記で用いた蛍光標識抗体は全て Biolegend 社より購入した。

本研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て、APS 患者および健常人とも文書同意を得て行った (承認番号 014-0071)。

Table 2. 解析対象サブセット一覧

サブセット名	表面抗原マーカー
CD4+ T cells	CD3+ CD4+
Helper T cells	CD3+ CD4+ CXCR5- CD45RA-
Th1 cells	CD3+ CD4+ CXCR5- CD45RA- CXCR3+ CCR6-
Th2 cells	CD3+ CD4+ CXCR5- CD45RA- CXCR3- CCR6-
Th17 cells	CD3+ CD4+ CXCR5- CD45RA- CXCR3- CCR6+
Tfh cells	CD3+ CD4+ CXCR5+ CD45RA-
Central memory T cells	CD4+ CD25- CD45RA-CCR7+
Effector memory T cells	CD4+ CD25- CD45RA-CCR7-
Naïve T cells	CD4+ CD25- CD45RA+CCR7+
Effector T cells	CD4+ CD25- CD45RA+CCR7-
Treg cells	CD4+ CD25+ CD127~dim
Activated Treg cells	CD4+ CD25+ CD127~dim CD45RA-
Resting Treg cells	CD4+ CD25+ CD127~dim CD45RA+
Transitional B cells	CD3- CD19+ CD24++ CD38++
Naïve B cells	CD3- CD19+ CD27- IgD+
Total memory B cells	CD3- CD19+ CD27+
Pre-switched memory B cells	CD3- CD19+ CD27+ IgD+
Post-switched memory B cells	CD3- CD19+ CD27+ IgD-
CD27- IgD- cells	CD3- CD19+ CD27- IgD-
Plasmablasts	CD3- CD19+ CD20- CD27++ CD38++
Breg cells	CD19+ IL10+

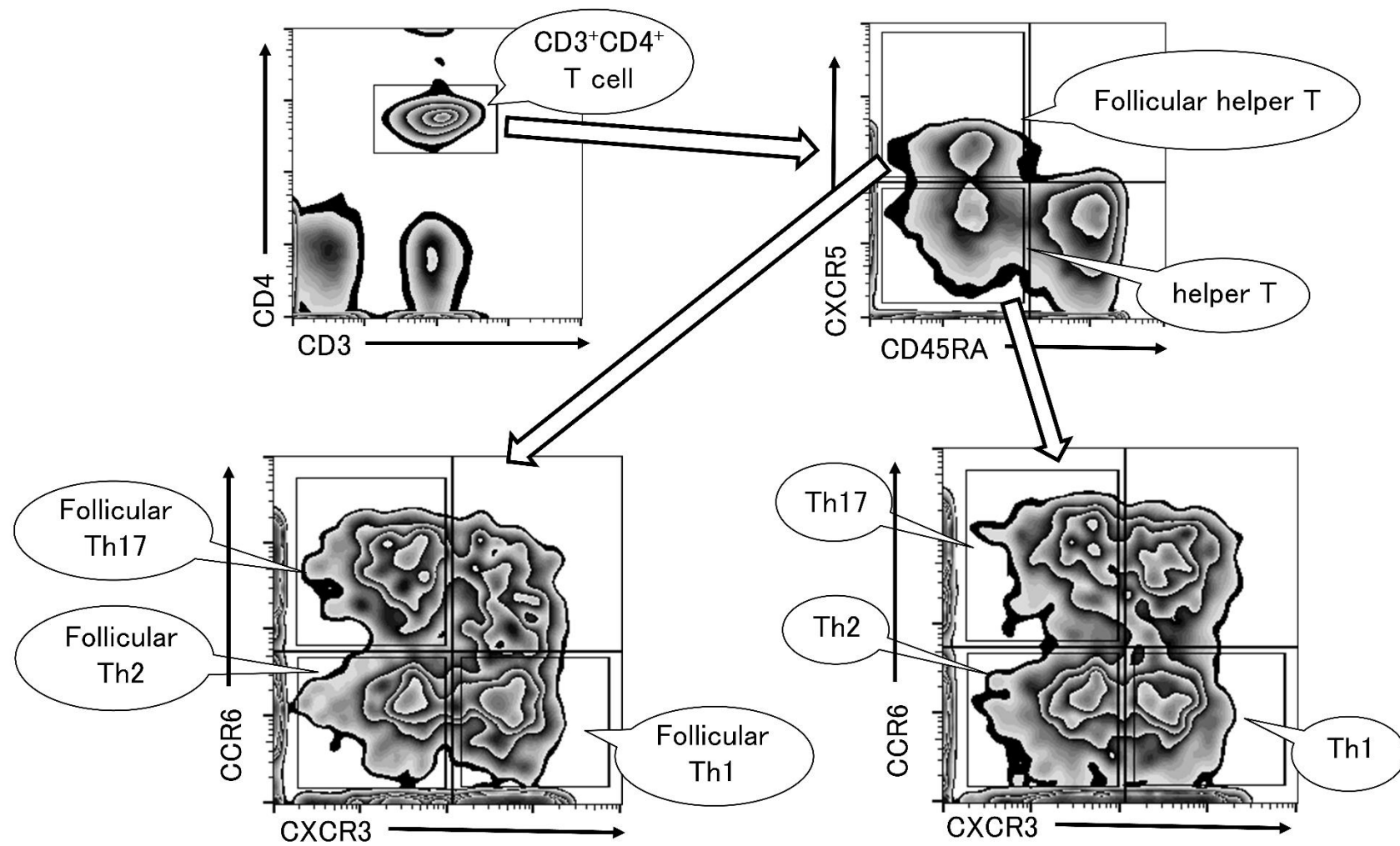


Figure 1. Th cell サブセット解析(自験例)

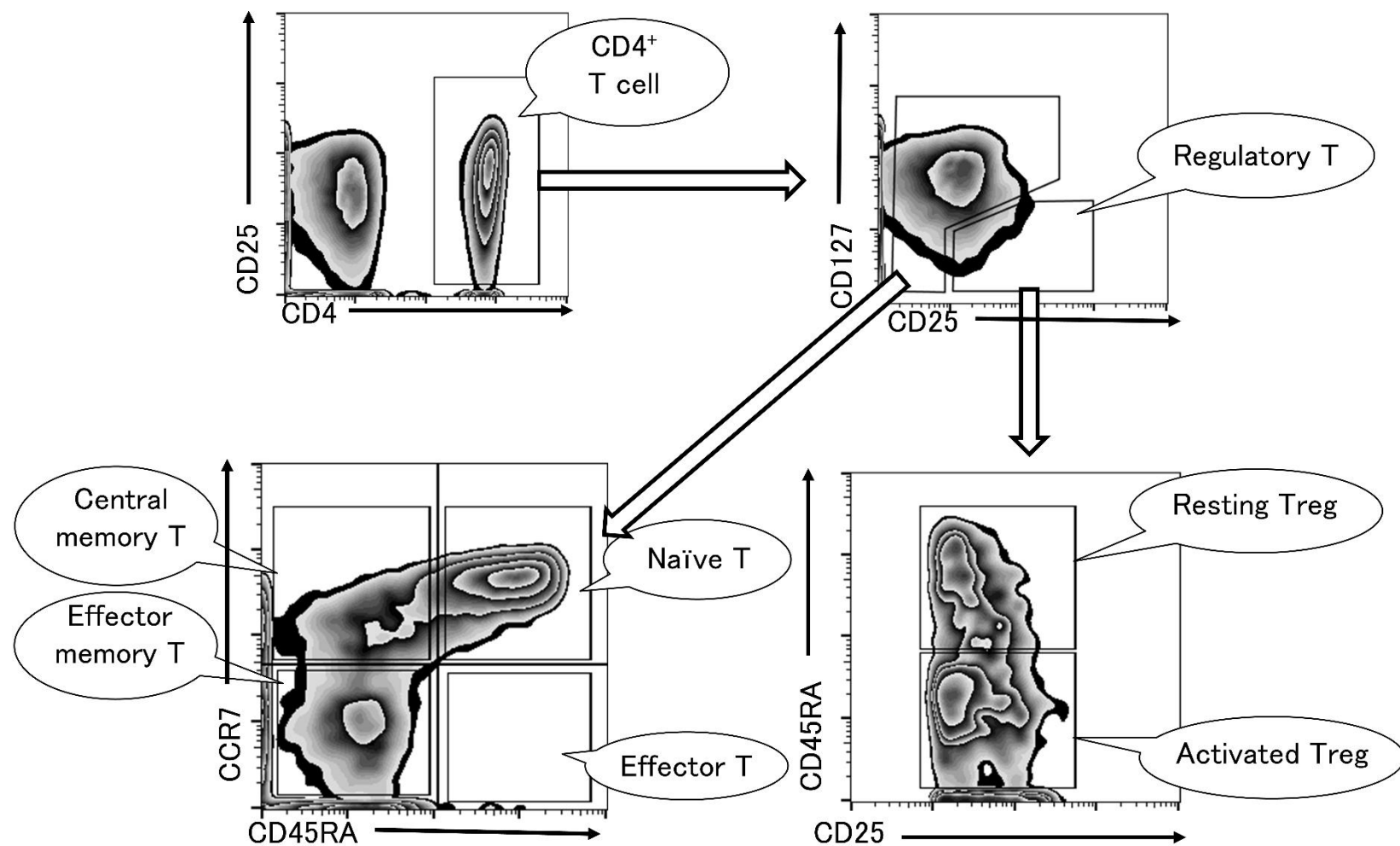


Figure 2. Treg cell サブセット解析(自験例)

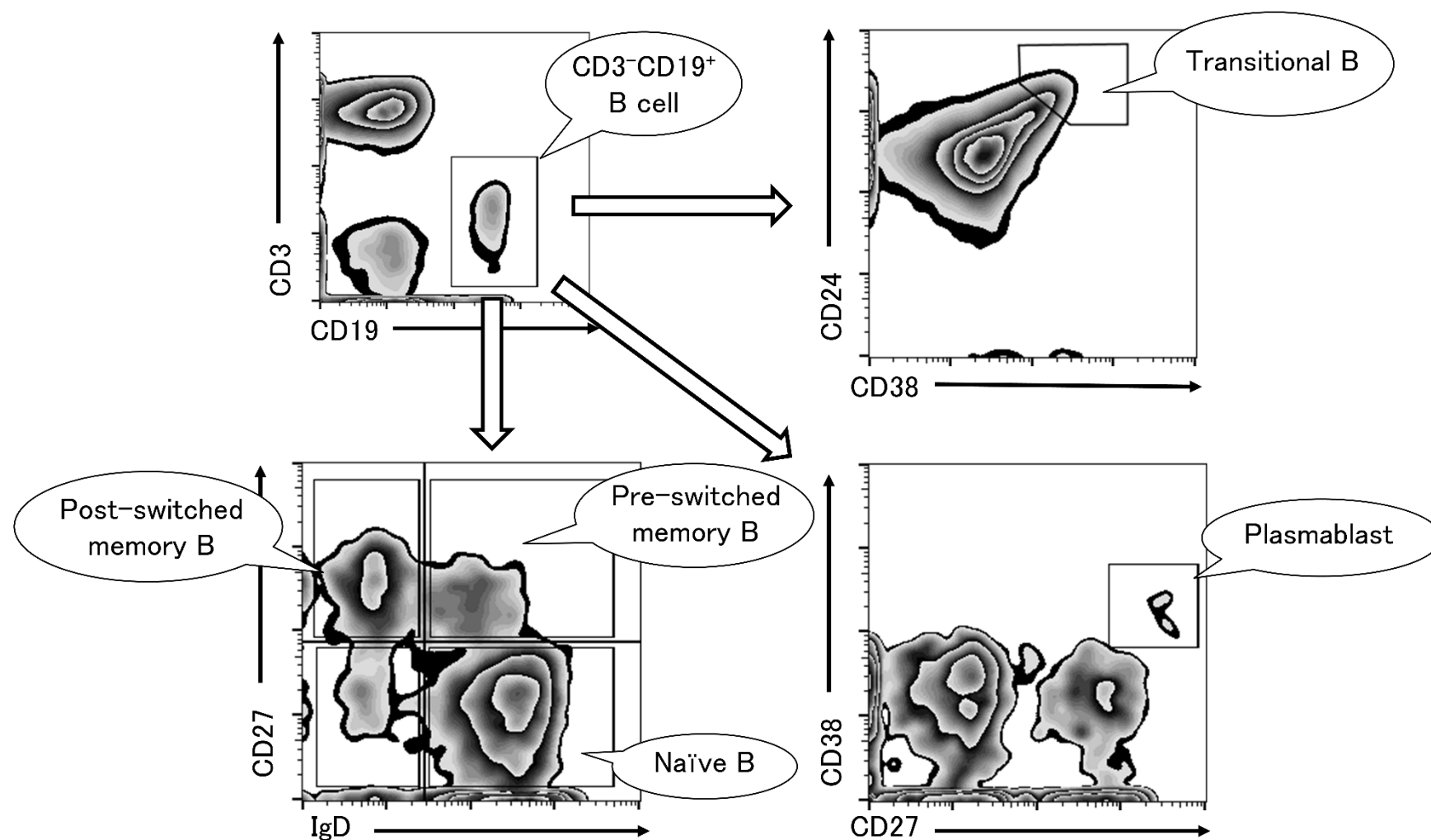


Figure 3. B cell サブセット解析(自験例)

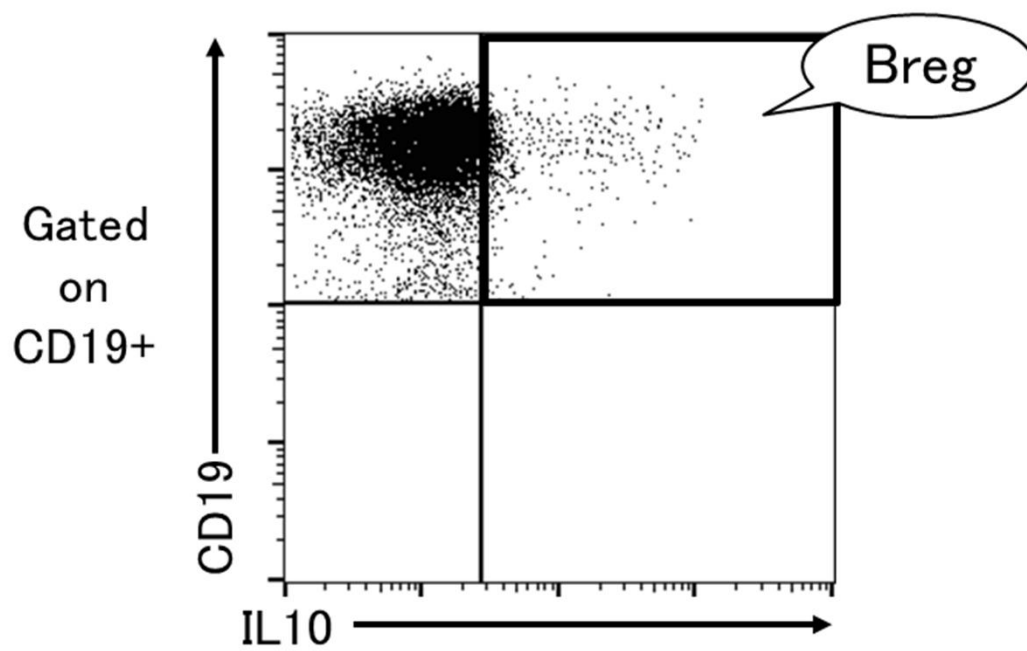


Figure 4. Breg cells サブセット解析(自験例)

3.3.2 PAPS 患者の SNP とサブセットとの関連

3.3.1 でサブセット解析を施行した PAPS 患者のうち遺伝子検査に同意を得られた患者群を対象とした。

対象患者からゲノム DNA を抽出し、SNP の判定を行った。SLE および血栓症において既報で関連が示されている 21 の SNP について検出した。検出した SNP の詳細を Table 3 に示す。

ゲノム DNA は血清分離後の末梢血血球成分より、Dna Quick II (Genomic DNA Separation Kit) (DS ファーマバイオメディカル、大阪)を使用して抽出し、-80℃で保存した。

SNP genotyping は Taqman® Sample-to-SNP™ Kit (Applied Biosystems, California, USA) を使用し、測定機器は 7500Fast リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応は初期に 95℃20 秒、その後 95℃3 秒、60℃30 秒を 40 サイクルである。プライマーには TaqMan genotyping assay を用いた。

更に 3.3.1 で明らかにした PAPS 患者のサブセット解析結果と、上記 SNP との関連について解析した。

Table 3. SNP リスト

		Genotype
TLR7	rs 179010	C/T
	rs 3853839	C/G
TNFAIP3	rs13192841	A/G
	rs2230926	T/G
	rs6922466	A/G
TNFSF13	rs11552708	G/A
TNFSF4	rs10798269	G/A
	rs844644	A/C
BLK	rs2248932	C/T
BANK1	rs3733197	G/A
TYK2	rs2304256	A/C
IRF5	rs2004640	G/T
	rs10954213	A/G
FCGR2A	rs1801274	A/G
FCGR2B	rs1050501	C/T
FCG3A	rs396991	G/T
CD45	rs4915154	A/G
CR2	rs4308977	A/G
	rs1048971	G/A
	rs17615	G/A
AGTRL1	rs9943582	G/A

3.3.3 PAPS 患者の PBMC mRNA 発現及び SNP との関連

3.3.2 で SNP を解析した PAPS 患者について、有意差が得られた SNP と関連する PBMC mRNA の発現量を real-time qPCR を用いて、定量的に評価した。

3.3.1 と同様の方法で採取した PBMC から RNA を精製し、SuperScript (Invitrogen) を用いて逆転写を行い、cDNA を作製した。得られた cDNA について、TLR7, Ly6e, Mx1, IFIT1, IFIT3, GAPDH に対する特異的なプライマー(Table 4)と Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems)を用い、ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) で初期変性 (95°C, 10 分) 後、95°Cで 15 秒、60°Cで 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクル増幅した。各サンプルの mRNA の発現量を GAPDH mRNA 発現量で補正後、健常人の代表サンプル 3 検体の平均値を基準値として $\Delta\Delta CT$ 法による定量評価を行った。

また、Ly6e, Mx1, IFIT1, IFIT3 の gene expression から、既報^{12,13}に沿って下記の計算式で IFN score を計算した。

$$\sum_{i=1}^4 = \left(\frac{Gene\ i_{patient} - Gene\ i_{control}}{SD(Gene\ i_{control})} \right)$$

続いて、mRNA 発現量および IFN score と、3.3.2 で明らかにした SNP との相関について解析した。

Table 4. Primer リスト

gene	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (3' – 5')
TLR7	AGGTGGAAGCAGACAGGAGA	TCTCCCAGACACACTTGCAG
Ly6e	CTTACGGTCCAACATCAGAC	GCACACATCCCTACTGACAC
Mx1	GGGTAGCCA CTGGACTGA	AGGTGGAGCGATTCTGAG
IFIT1	TCAAAGTCAGCAGCCAGTCTCA	GCCTCCTTGGGTTCGTCTATAA
IFIT3	AACTACGCCTGGGTCTACTATCACTT	GCCCTTTCATTTCTTCCACAC
GAPDH	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	TCATAAGTCCCTCCACGATG

3.4 統計学的解析

各サブセット比率について、PAPS 群、SLE/APS 群、健常者群の 3 群間で **kruskal wallis test** 検定により有意差があると確認されたサブセットについて、各群間で **Dunn** 検定によるノンパラメトリック解析を行った。

それぞれの **SNP** におけるサブセット比率については、各アレル群間の比較は 3 群間の場合、**kruskal wallis** 検定、**Dunn** 検定を用いて、2 群間の場合 **Mann-Whitney** の **U** 検定を用いてノンパラメトリック解析を行った。

PAPS患者におけるSNPの各allele群間の遺伝子発現量($\Delta\Delta$ CT値)の比較は、**Mann-Whitney**のU検定によりノンパラメトリック解析を行った。

統計解析はGraphPad Prism 7 (Graphpad Software, California, USA)を用いて行った。

3.5 結果

3.5.1 APS 患者の末梢血サブセット解析

T cell サブセット、B cell サブセット解析は PAPS 患者 26 名(女性 22 名, 男性 4 名, 38.7 ± 8.6 歳, 平均 $\pm$ 標準偏差 (standard deviation: SD)), SLE/APS 患者 19 名 (女性 16 名, 男性 3 名, 36.2 ± 10.8 歳, 平均 $\pm$ SD)、健常人 10 名 (女性 8 名, 男性 2 名, 32.2 ± 10.4 歳, 平均 $\pm$ SD)を対象とした。

3.5.1.1 T cell サブセット

CD4+ T cells (CD3+ CD4+)は 3 群間で有意差を認めなかった。(Figure 4)

Helper T cells (CD3+ CD4+ CXCR5- CD45RA-), Th2 cells (CD3+ CD4+ CXCR5- CD45RA- CXCR3- CCR6-), Th17 cells (CD3+ CD4+ CXCR5- CD45RA- CXCR3- CCR6+)は PAPS 群、SLE/APS 群で健常者と比べて有意な増加が見られたが、Th1 cells (CD3+ CD4+ CXCR5- CD45RA- CXCR3+ CCR6-)は 3 群間で有意差を認めなかった。(Figure 5,6)

Follicular helper T cells (CD3+ CD4+ CXCR5+ CD45RA-), Follicular helper T1 cells (CD3+ CD4+ CXCR5+ CD45RA- CXCR3+ CCR6-), Follicular helper T2 cells (CD3+ CD4+ CXCR5+ CD45RA- CXCR3- CCR6-), Follicular helper T17 cells (CD3+ CD4+ CXCR5+ CD45RA- CXCR3- CCR6+)は 3 群間で有意差を認めなかった。(Figure 7,8)

Treg cells (CD4+ CD25+ CD127~dim), Resting Treg cells (CD4+ CD25+ CD127~dim CD45RA+), Activated Treg cells (CD4+ CD25+ CD127~dim CD45RA-)は PAPS 群、SLE/APS 群で健常者と比べて有意な減少が見られた。(Figure 9,10)

Central memory T cells(CD4+ CD25- CD45RA-CCR7+), Effector memory T cells(CD4+ CD25- CD45RA-CCR7-), Naïve T cells(CD4+ CD25- CD45RA+CCR7+), Effector T cells(CD4+ CD25- CD45RA+CCR7-)は 3 群間で有意差を認めなかった。(Figure 11,12)

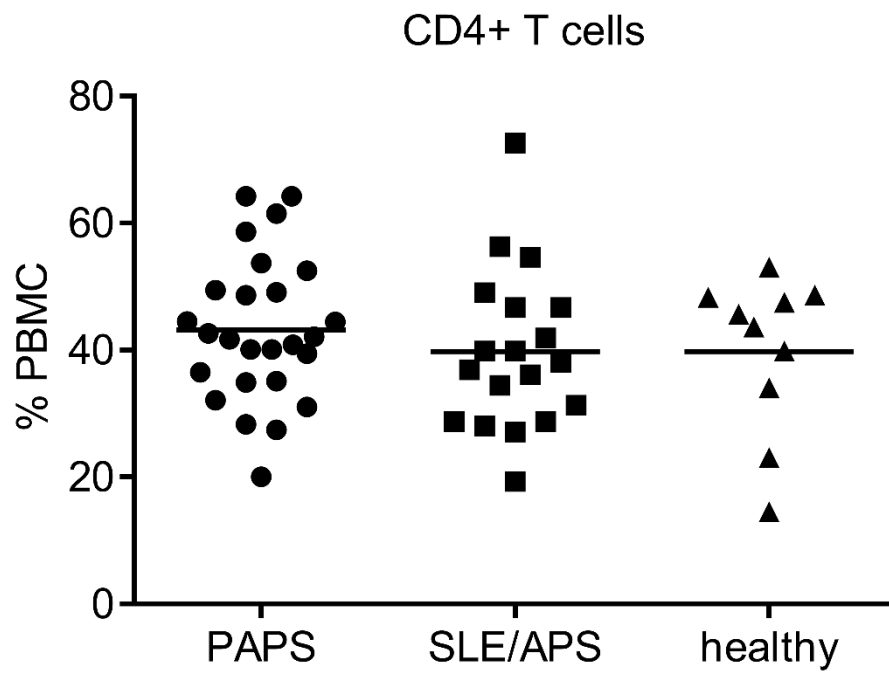


Figure 4. CD4+ T cells サブセット比率

CD4+ T cells は 3 群間で有意差は見られなかった。(kruskal wallis test)

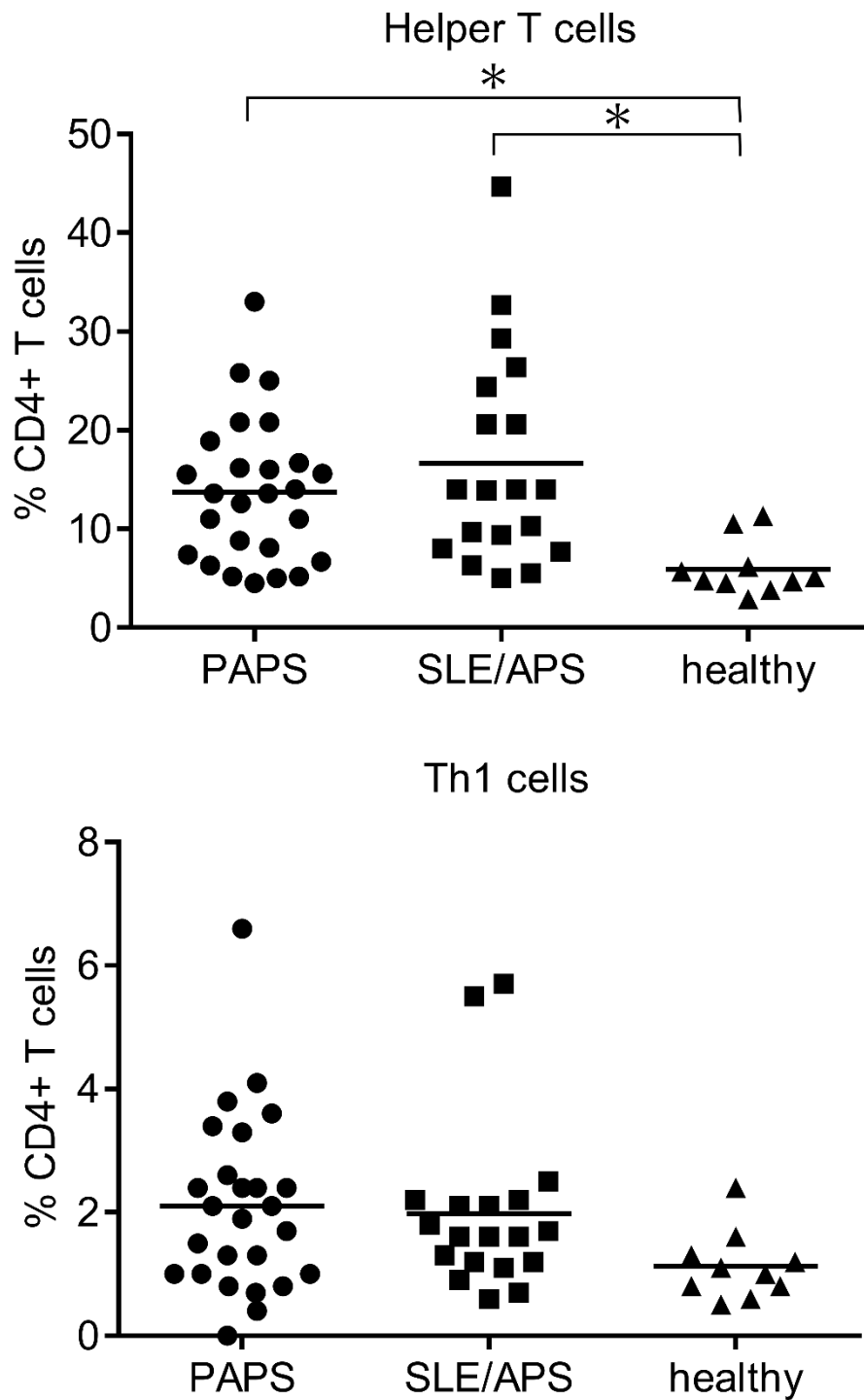


Figure 5. Helper T cells, Th1 cells サブセット比率

Helper T cells は PAPS、SLE/APS 群で健常者と比べ有意な増加が見られた。

Th1 cells は 3 群間で有意差は見られなかった。

(* $p < 0.05$, Dunn test after kruskal wallis test)

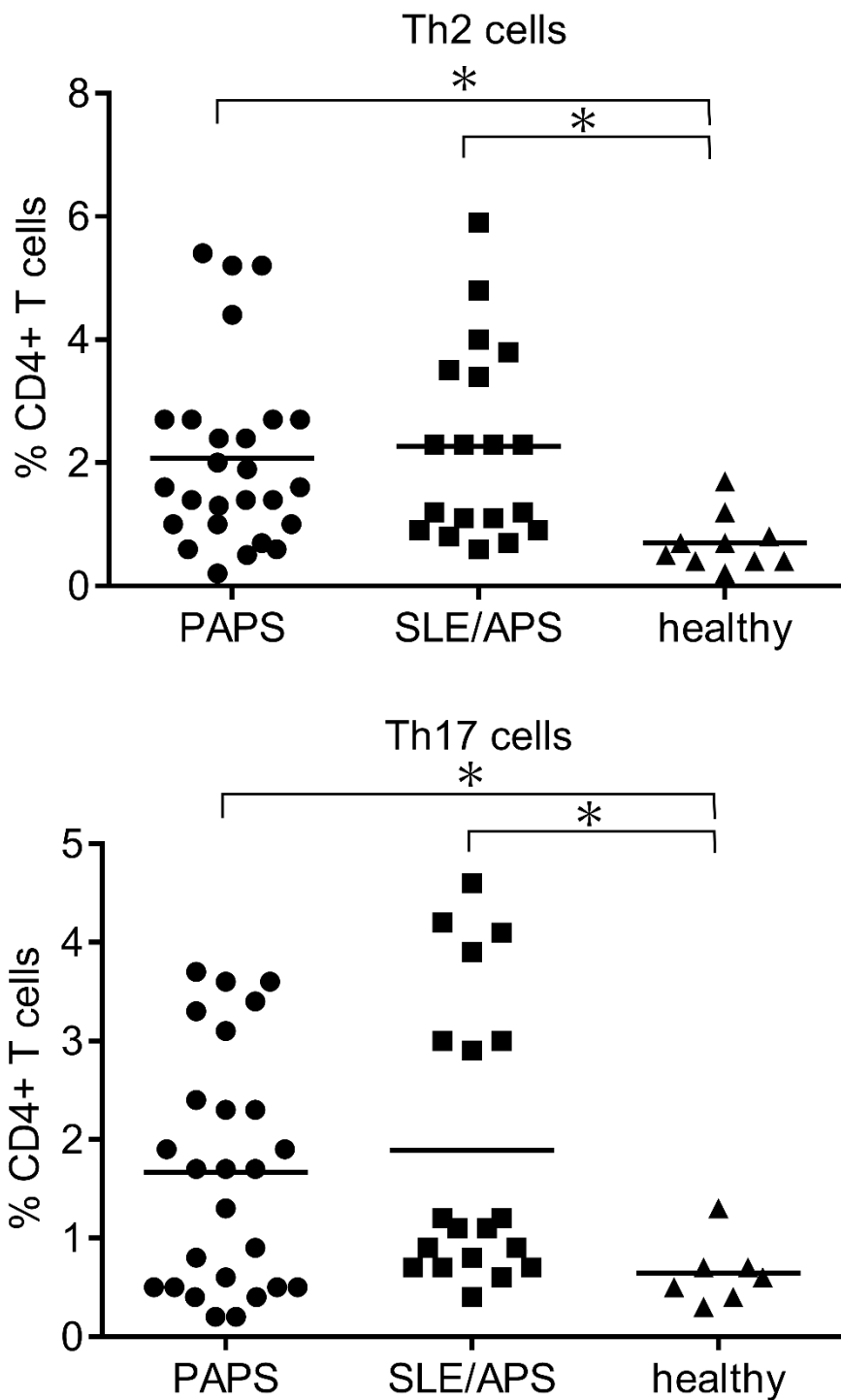


Figure 6. Th2 cells, Th17 cells サブセット比率

Th2 cells、Th17 cells は PAPS、SLE/APS 群で健常者と比べ有意な増加が見られた。

(* $p < 0.05$, Dunn test after kruskal wallis test)

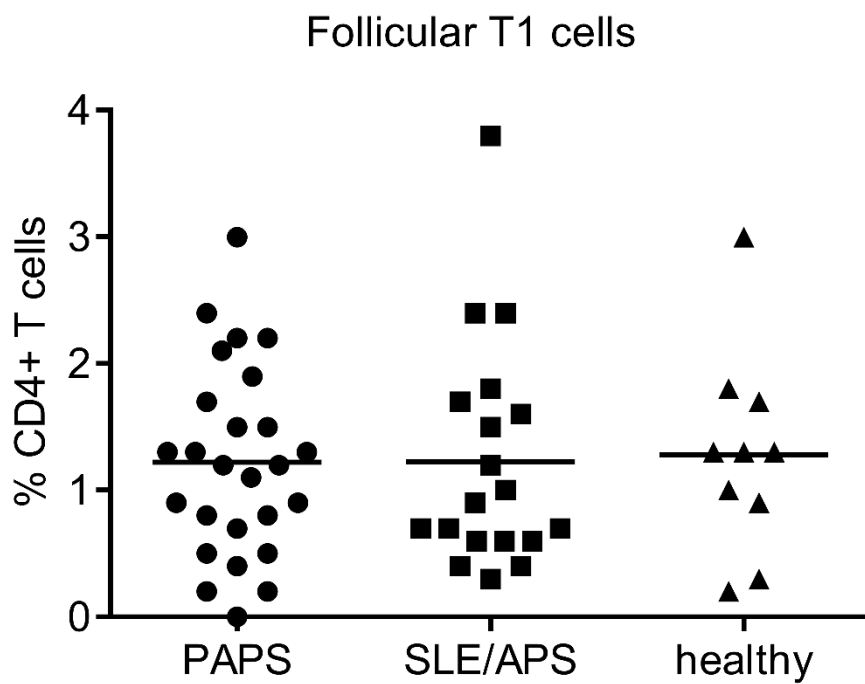
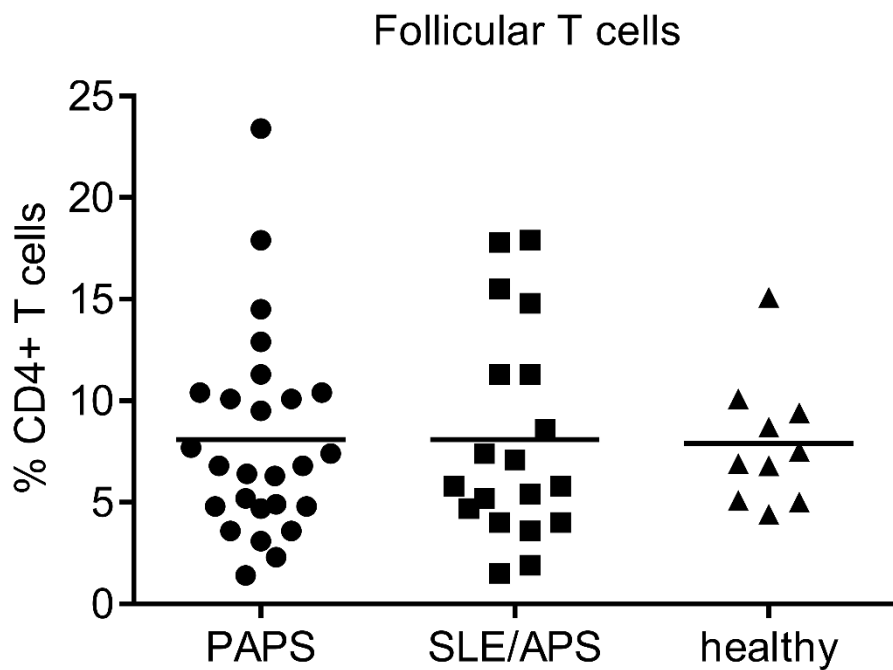


Figure 7. Follicular T cells, Follicular T1 cells サブセット比率
 Follicular T cells, Follicular T1 cells は3 群間で有意差は見られなかった。
 (kruskal wallis test)

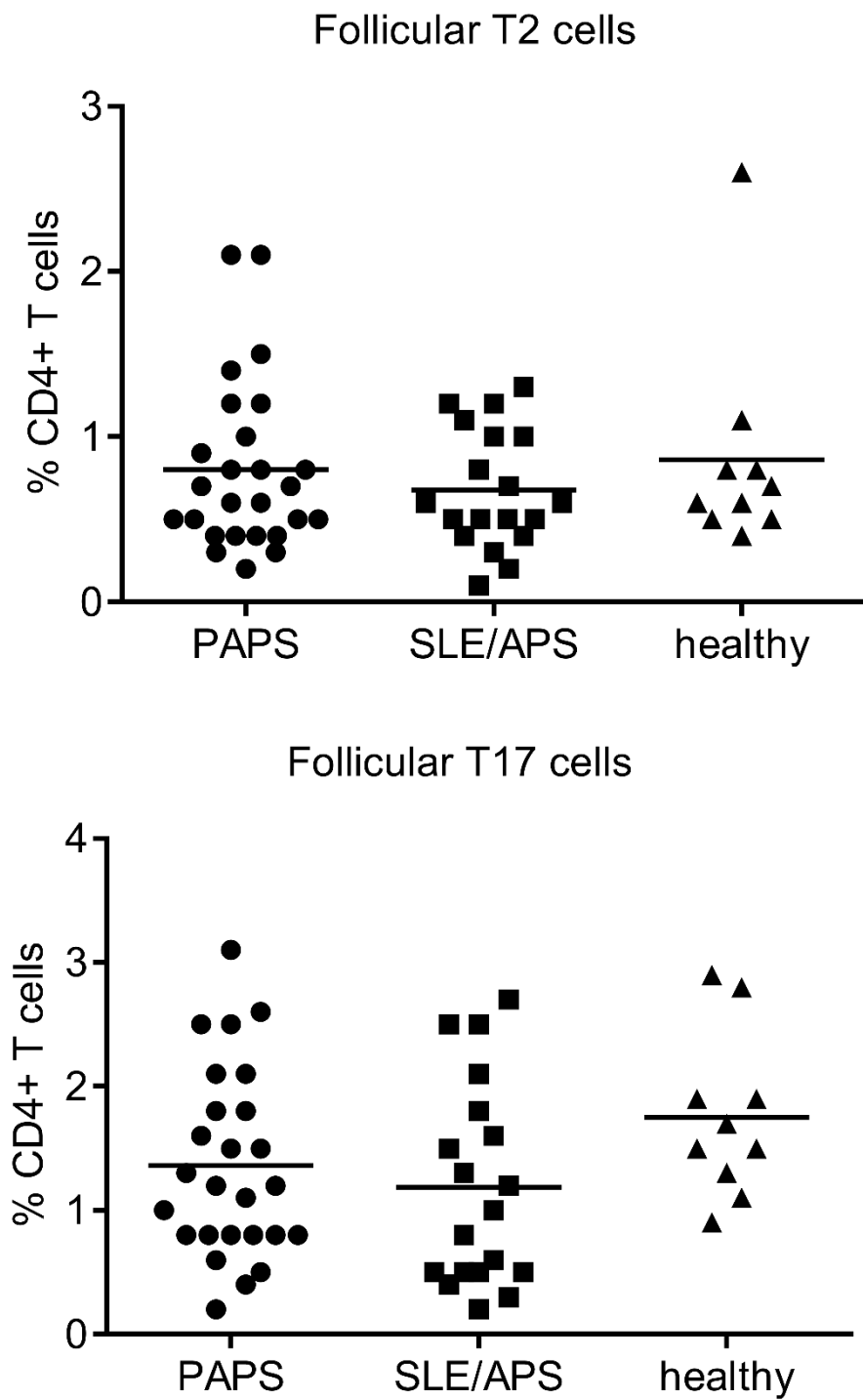


Figure 8. Follicular T2 cells, Follicular T17 cells サブセット比率
 Follicular T2 cells, Follicular T17 cells は3 群間で有意差は見られなかった。
 (kruskal wallis test)

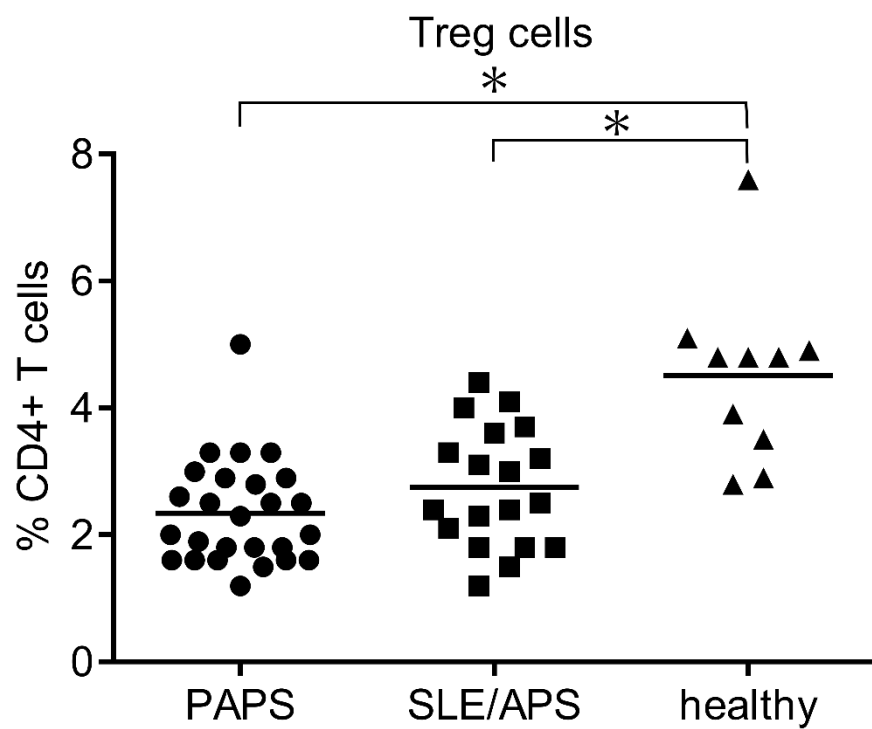


Figure 9. Treg cells サブセット比率

Treg cells は PAPS、SLE/APS 群で健常者と比べ有意な減少が見られた。

(* $p < 0.05$, Dunn test after kruskal wallis test)

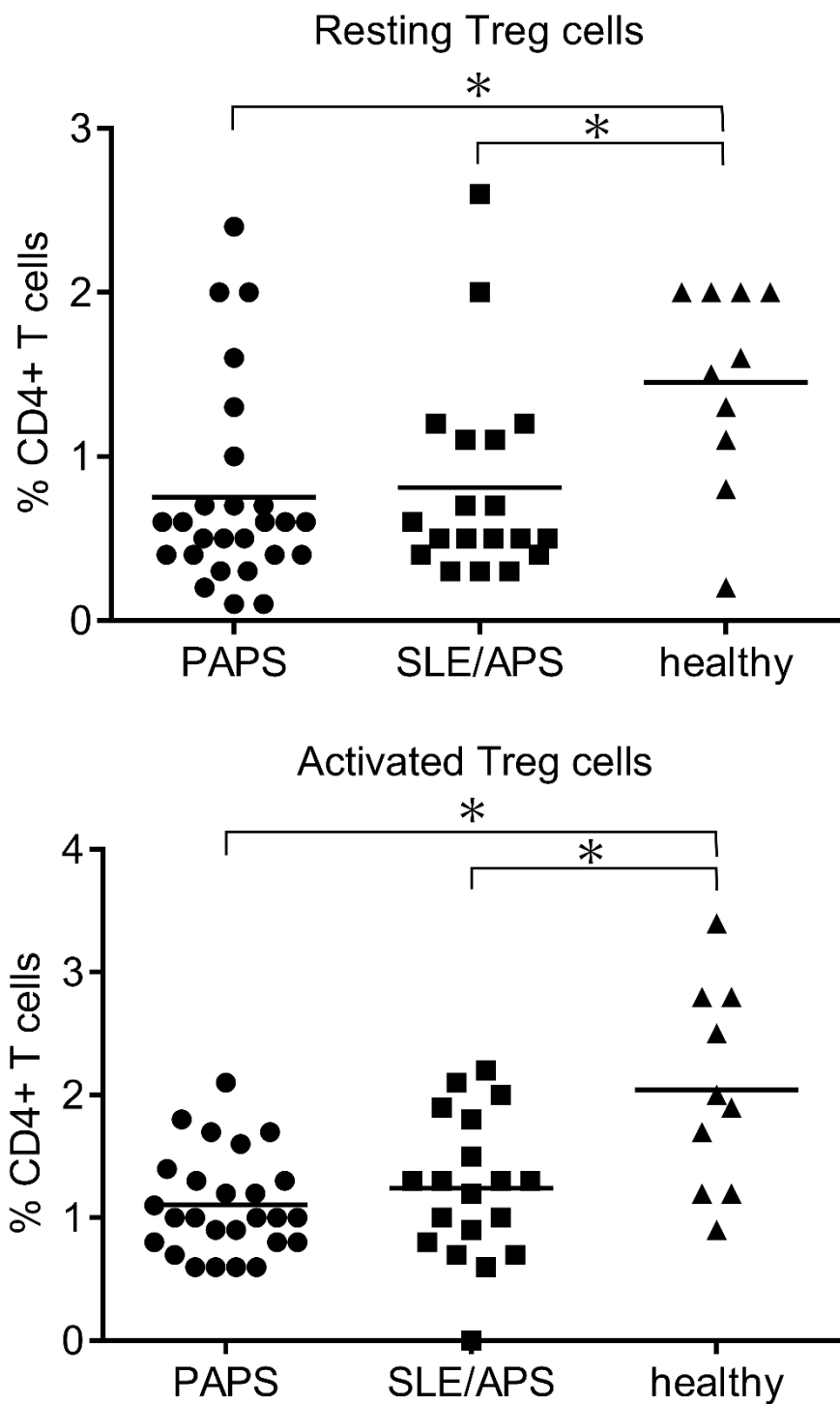


Figure 10. Resting Treg cells, Activated Treg cells サブセット比率
 Resting Treg cells, Activated Treg cells は PAPS、SLE/APS 群で健常者と比べ有意な減少が見られた。(* $p < 0.05$, Dunn test after kruskal wallis test)

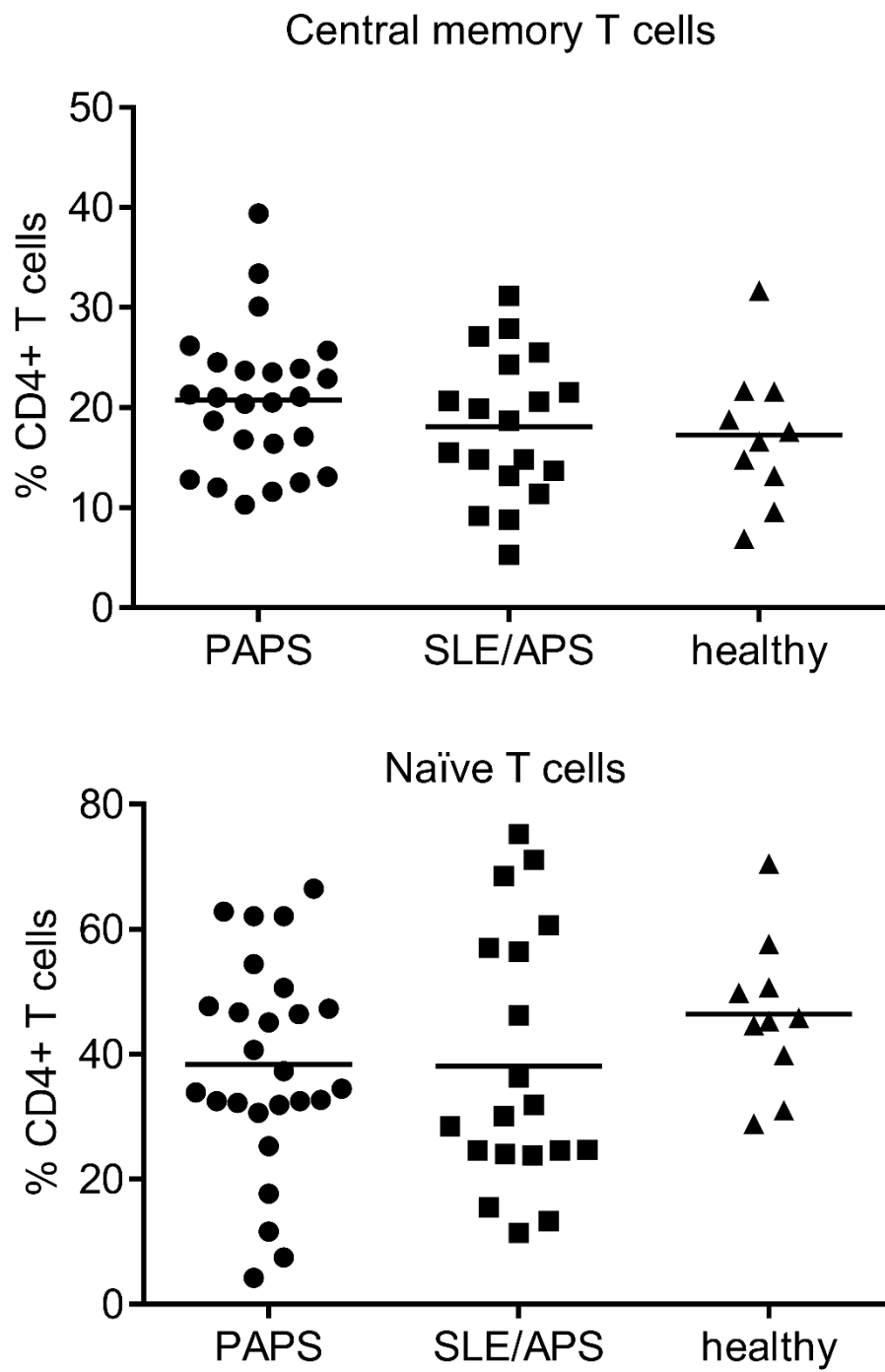


Figure 11. Central memory T cells, Naïve T cells サブセット比率
 Central memory T cells, Naïve T cells は 3 群間で有意差は見られなかった。
 (kruskal wallis test)

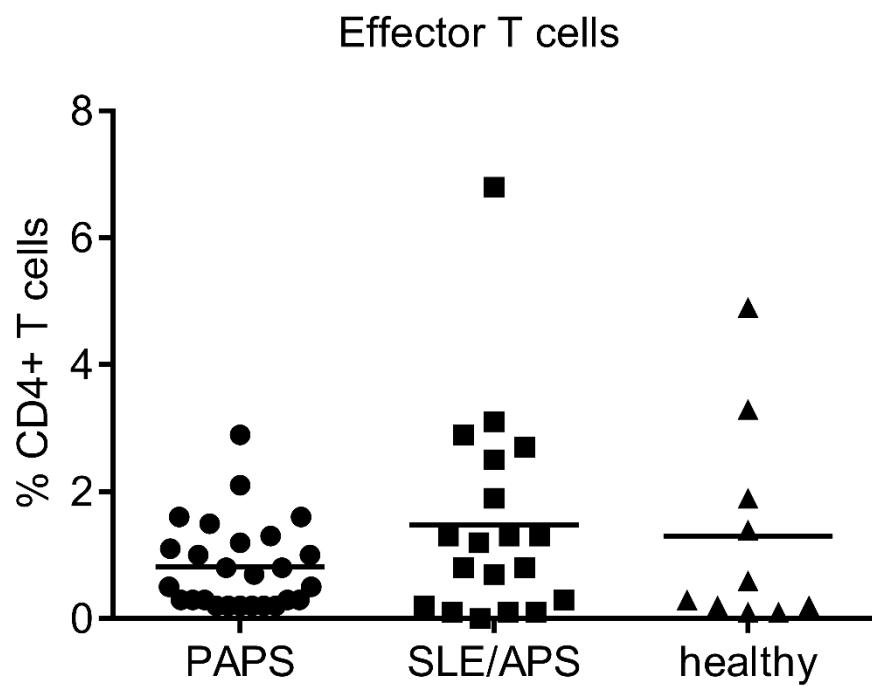
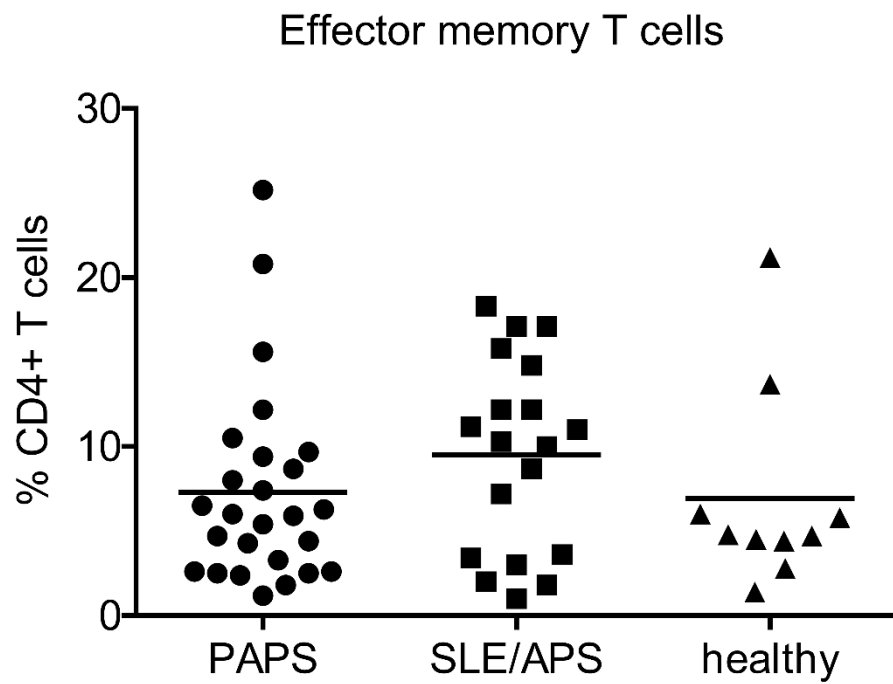


Figure 12. Effector memory T cells, Effector T cells サブセット比率
 Effector memory T cells, Effector T cells は 3 群間で有意差は見られなかった。
 (kruskal wallis test)

3.5.1.2 B cell サブセット

CD19+ B cells は SLE/APS 群で PAPS 群、健常者と比べ有意な減少が見られた。(Figure 13)

Traditional B cells (CD3- CD19+ CD24++ CD38++)は 3 群間で明らかな有意差を認めなかった。(Figure14)

Total memory B cells (CD3- CD19+ CD27+), Pre-switched memory B cells (CD3- CD19+ CD27+ IgD+), Post-switched memory B cells (CD3- CD19+ CD27+ IgD-)は PAPS 群、SLE/APS 群で健常者と比べて有意な減少が見られた。(Figure14,15)

Plasmablasts (CD3- CD19+ CD27++ CD38++)は PAPS 群、SLE/APS 群で健常者と比べて有意な増加が見られた。(Figure 16)

CD27- IgD- cells (CD3- CD19+ CD27- IgD-), Naïve B cells (CD3- CD19+ CD27- IgD+) は 3 群間で明らかな有意差を認めなかった。(Figure 16,17)

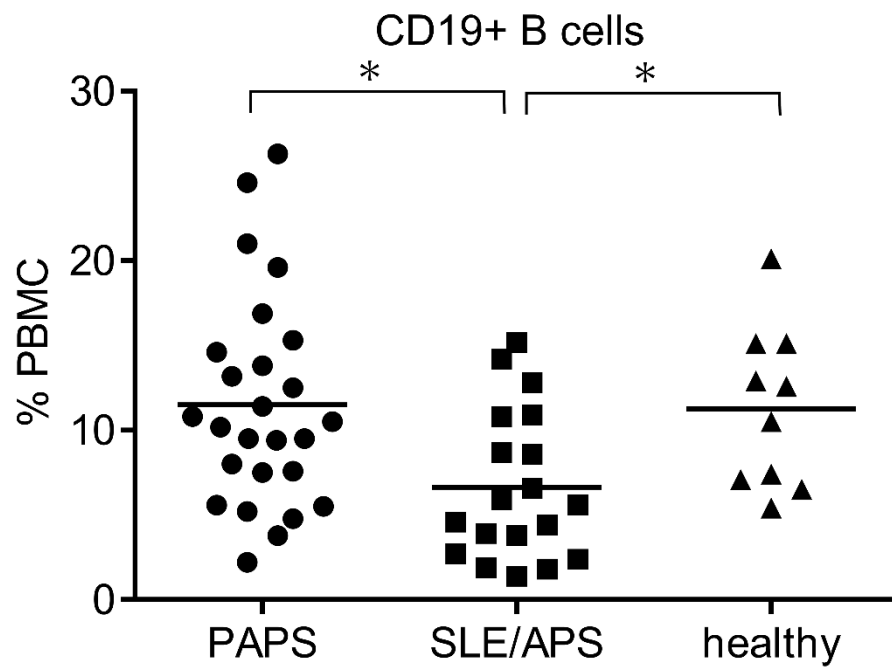


Figure 13. CD19+ B cells サブセット比率

CD19+ B cells は SLE/APS 群で PAPS 群、健常者と比べ有意な減少が見られた。

(* $p < 0.05$, Dunn test after kruskal wallis test)

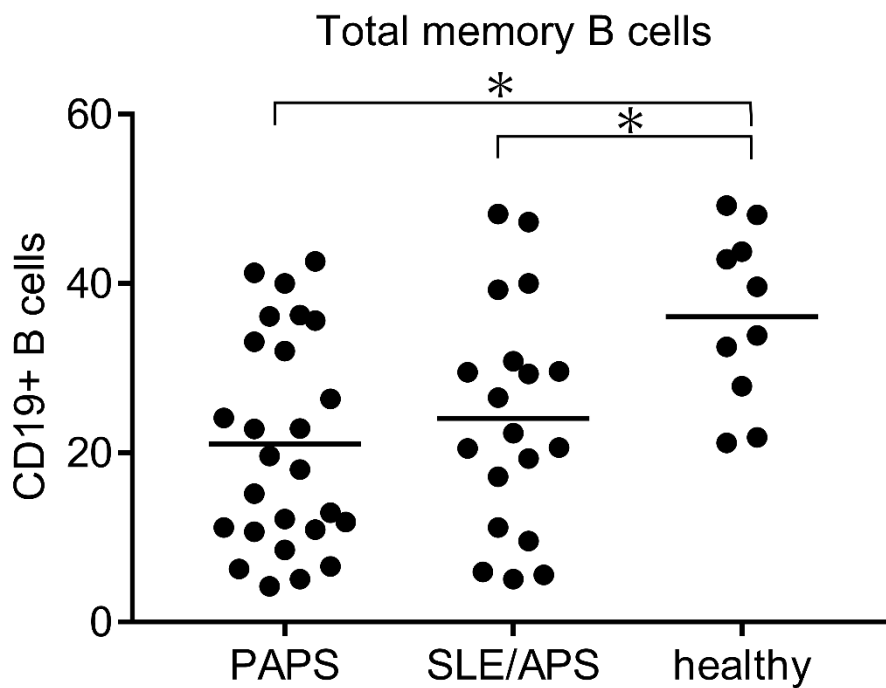
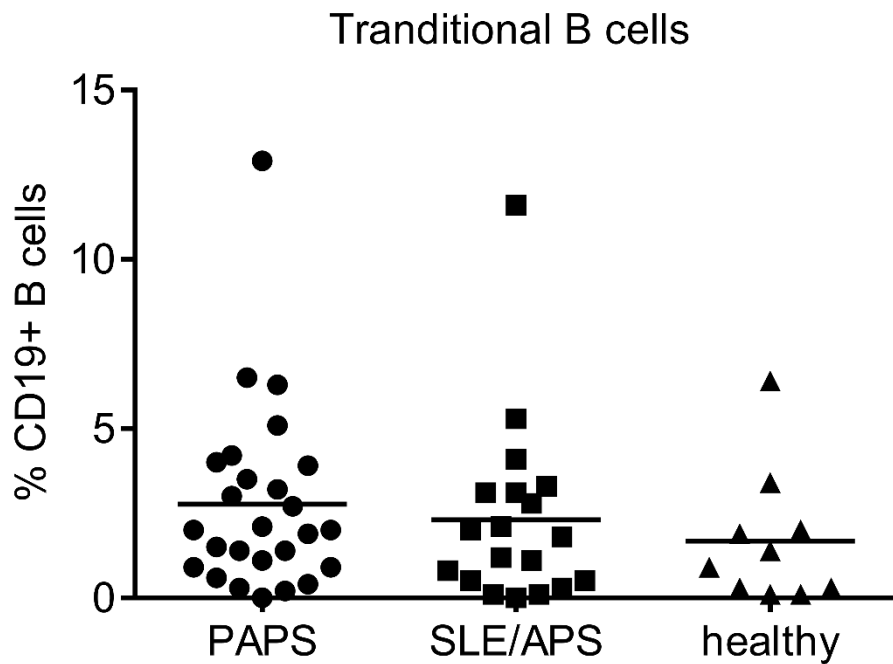


Figure 14. Traditional B cells、Total memory B cells サブセット比率
 Traditional B cells は 3 群間で有意差は見られなかった。
 Total memory B cells は PAPS、SLE/APS 群で健常者と比べ有意な減少が見られた。
 (* $p < 0.05$, Dunn test after kruskal wallis test)

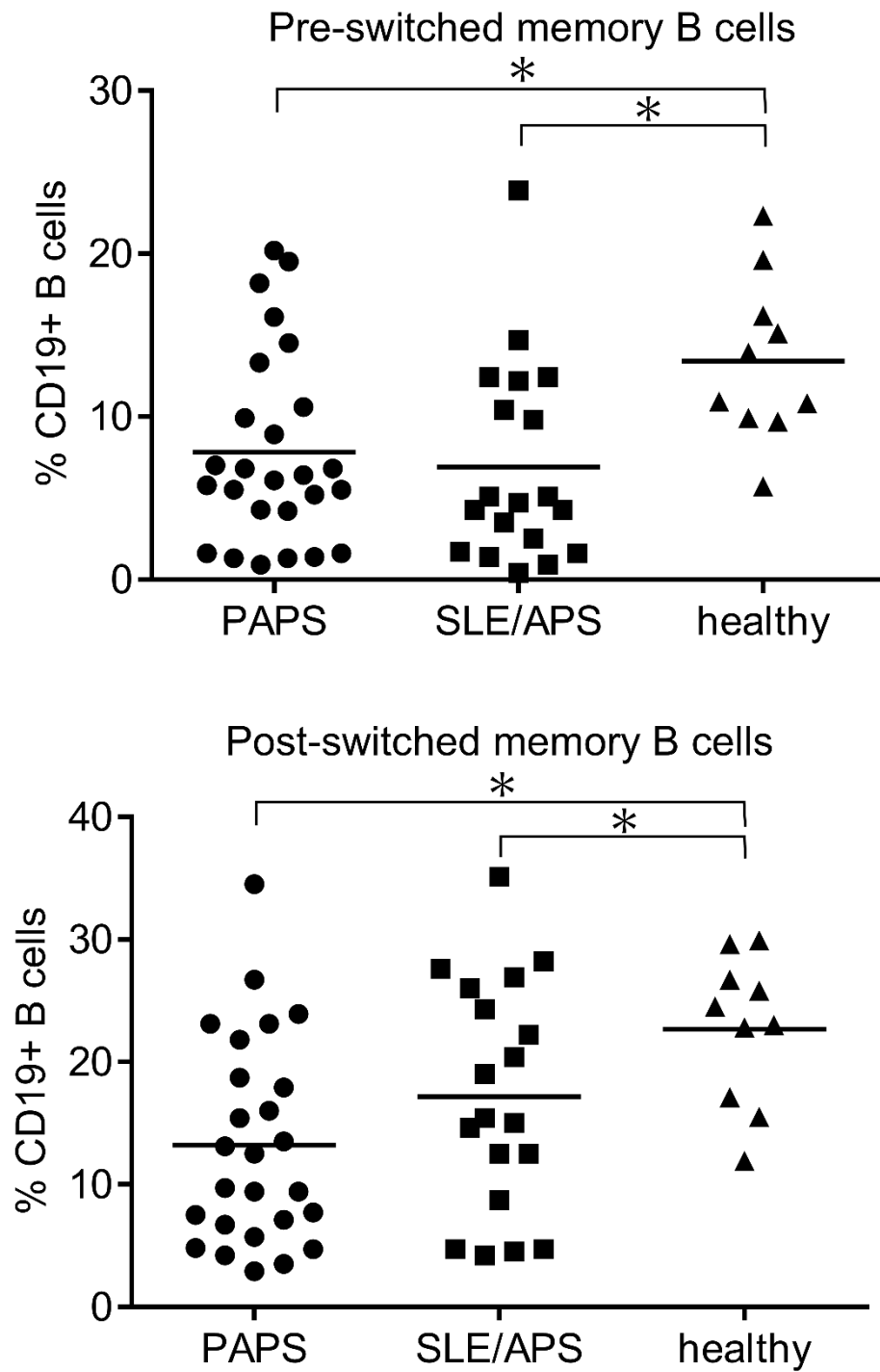


Figure 15. Pre-switched memory B cells、Post-switched memory B cells サブセット比率
Pre-switched memory B cells、Post-switched memory B cells はPAPS 群、SLE/APS 群で
健常者と比べ有意な減少が見られた。(* $p < 0.05$, Dunn test after kruskal wallis test)

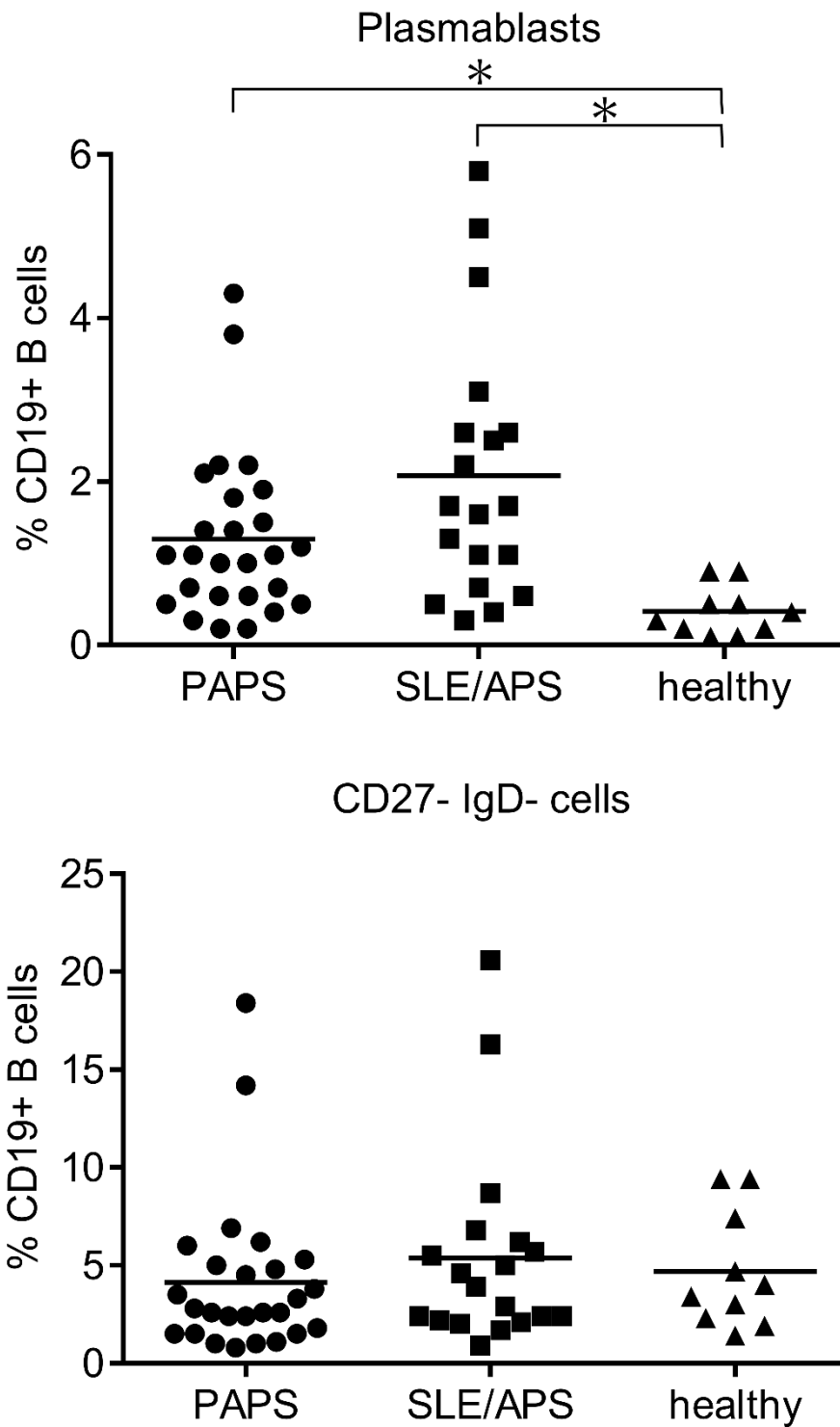


Figure 16. Plasmablasts、CD27- IgD- cells サブセット比率
 Plasmablasts は PAPS 群、SLE/APS 群で健常者と比べ有意な増加が見られた。
 CD27- IgD- cells は 3 群間で有意差は見られなかった。
 (* $p < 0.05$, Dunn test after kruskal wallis test)

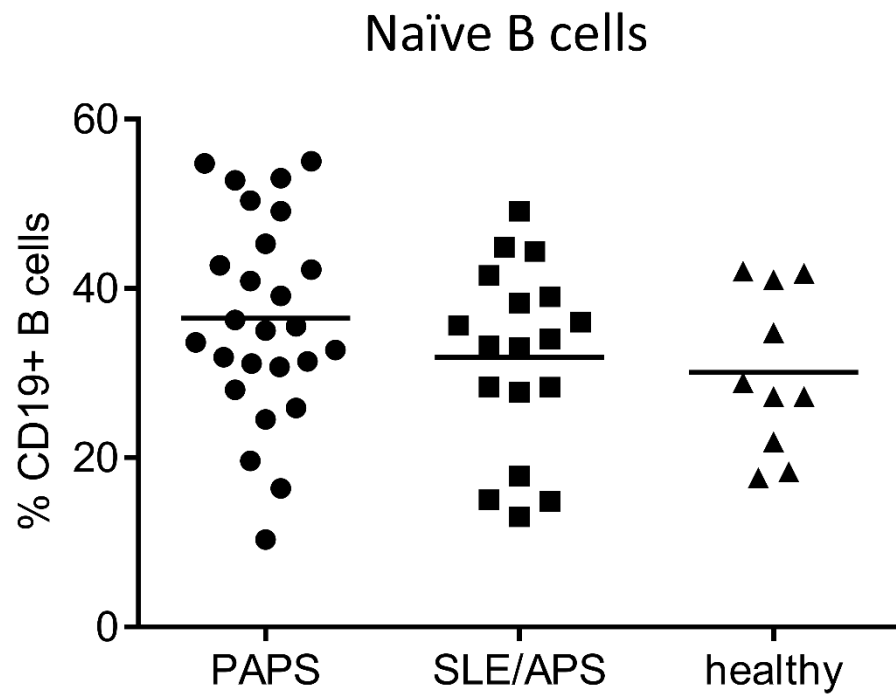


Figure 17. Naïve B cells サブセット比率

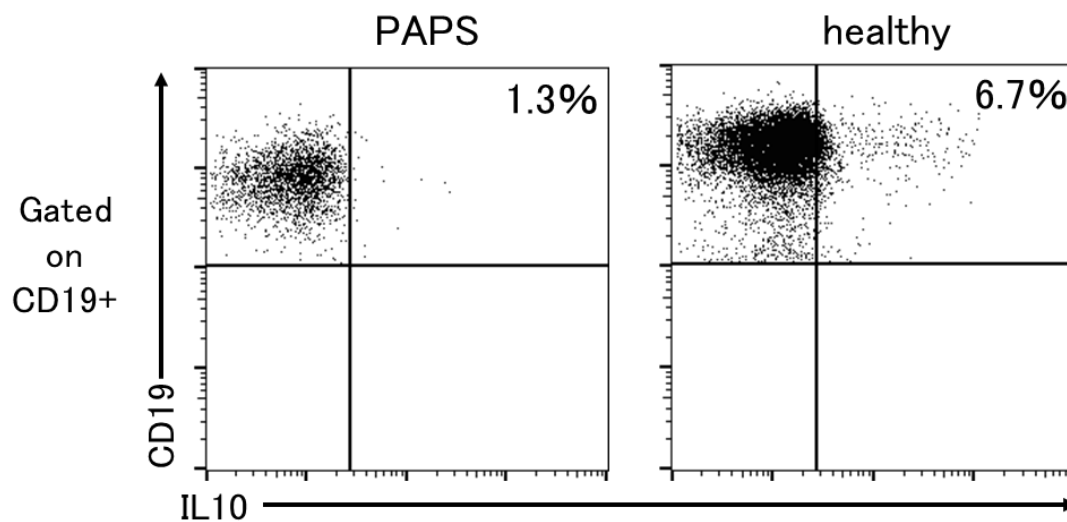
Naïve B cells は3群間で有意差は見られなかった。(kruskal wallis test)

3.5.1.3 Breg cells サブセット

Breg cells サブセット解析は PAPS 患者 10 名(女性 9 名, 男性 1 名)、SLE/APS 患者 7 名 (女性 6 名, 男性 1 名,)、健常人 5 名 (女性 4 名, 男性 1 名)を対象とした。

Breg cells (CD19+ IL10+)は PAPS 群、SLE/APS 群で健常人と比べて有意な減少が見られた。(Figure 18)

A



B

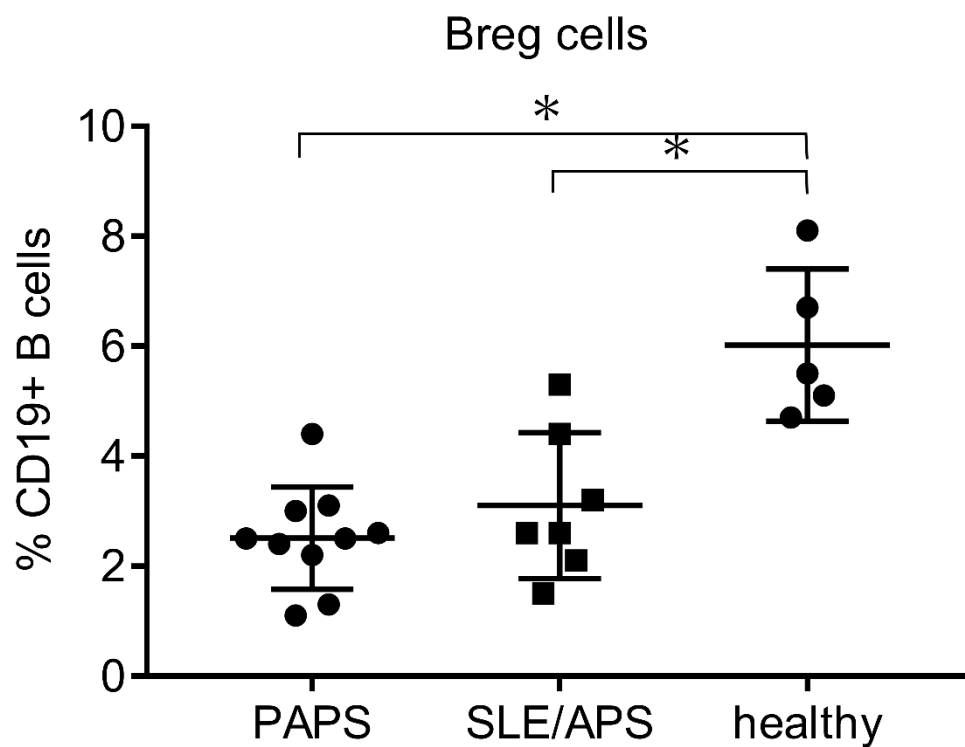


Figure 18. Breg cells サブセット比率

(A) PAPS 患者, 健常者の Dot plot

(B) Breg cells は PAPS 群、SLE/APS 群で健常者と比べて有意な減少が見られた。

(*p<0.05, Dunn test after kruskal wallis test)

3.5.2 PAPS 患者のサブセットと SNP との関連

遺伝子検査に同意が得られた PAPS 患者 14 名(すべて女性, 34.7 ± 8.6 歳, 平均 $\pm$ SD)の SNP を検出し、3.5.1 で有意差を認めたサブセットとの相関を解析した。

toll like receptor (TLR) 7 SNP (rs 3853839)は Plasmablasts、Total memory B cells、Post-switched memory B cells、Pre-switched memory B cells 比率において allele 群間に有意差が見られ、他の SNP 変異とサブセットでは allele 群間での有意差は見られなかった。(Table 5)

TLR7 SNP (rs 3853839)の G/G allele 群において、G/C allele 群と比べて有意な Plasmablasts の増加、Total memory B cells の減少が見られた。(Figure 19,20)

Table 5. SNP allele 群間におけるサブセット比率の有意差(p 値)

		Helper T	Th2	Th17	Treg	Activated Treg	Resting Treg	Total memory B	Post-switch memory B	Pre-switch memory B	Plasma blasts	Breg
TLR7	rs 179010	0.815	0.391	0.697	0.183	0.240	0.062	0.586	0.697	0.533	0.349	0.629
	rs 3853839	0.439	0.106	0.477	0.746	0.650	0.477	0.013*	0.014*	0.048*	0.033*	0.329
TNFAIP3	rs13192841	0.586	0.185	0.350	0.754	0.639	0.815	0.243	0.101	0.938	0.533	0.432
	rs2230926	0.815	0.436	0.938	0.273	0.389	0.242	0.312	0.876	0.102	0.310	0.394
	rs6922466	0.297	0.410	0.269	0.819	0.668	0.271	0.660	0.738	0.388	0.320	0.296
TNFSF13	rs11552708	0.305	0.436	0.521	0.580	0.157	0.654	0.773	0.666	0.206	0.492	0.529
TNFSF4	rs10798269	0.768	0.557	0.691	0.656	0.713	0.592	0.463	0.121	0.952	0.389	0.812
	rs844644	0.322	0.479	0.777	0.887	0.570	0.777	0.886	1.000	0.671	0.156	0.912
BLK	rs2248932	0.888	1.000	0.436	0.068	0.055	0.085	0.157	0.119	0.723	0.887	0.533
BANK1	rs3733197	0.789	0.688	0.789	0.420	0.788	0.285	0.423	1.000	0.181	0.422	0.241
TYK2	rs2304256	0.263	0.582	0.405	0.991	0.659	0.341	0.737	0.622	0.778	0.385	0.291
IRF5	rs2004640	0.918	0.421	0.968	0.175	0.290	0.078	0.800	0.658	0.266	0.659	0.128
	rs10954213	0.295	0.749	0.907	0.769	0.511	0.447	0.566	0.835	0.336	0.231	0.349
FCGR2A	rs1801274	0.241	0.420	0.769	0.269	0.659	0.558	0.181	1.000	0.092	0.420	0.938
FCGR2B	rs1050501	0.423	0.284	0.789	0.590	0.282	0.284	0.306	0.592	0.108	0.593	0.911
FCG3A	rs396991	0.253	0.316	0.668	0.719	0.566	0.352	0.391	0.316	0.668	0.617	0.412
CD45	rs4915154	1.000	0.277	0.236	0.691	0.691	0.693	0.693	0.429	1.000	0.921	0.812
CR2	rs4308977	1.000	1.000	0.554	0.395	0.234	0.446	0.866	1.000	0.672	0.933	0.483
	rs1048971	0.152	0.276	0.404	0.881	0.502	0.989	0.867	0.954	0.656	0.254	0.174
	rs17615	0.280	0.440	0.643	0.816	1.000	0.487	0.065	0.064	0.216	0.315	0.846
AGTRL1	rs9943582	0.526	0.603	0.216	0.237	0.397	0.520	0.430	0.413	0.676	0.209	0.938

*p<0.05, using kruskal wallis test, Mann–Whitney U test

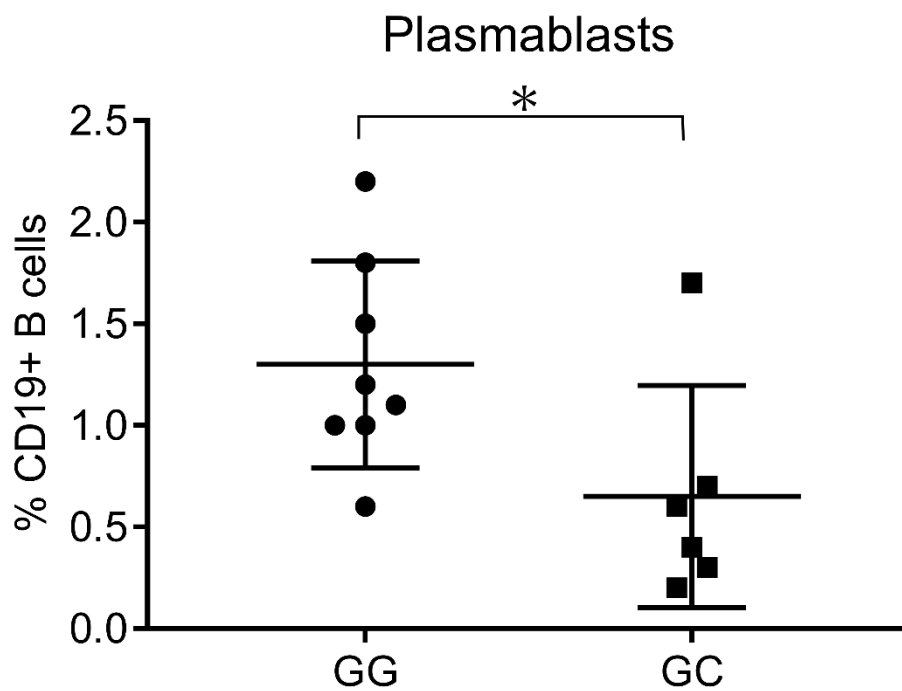


Figure 19. TLR7 SNP(rs 3853839) allele 毎の Plasmablasts 比率

G/G allele 群において、G/C allele 群と比べて有意な Plasmablasts の増加が見られた。

(*p<0.05, Mann–Whitney U test)

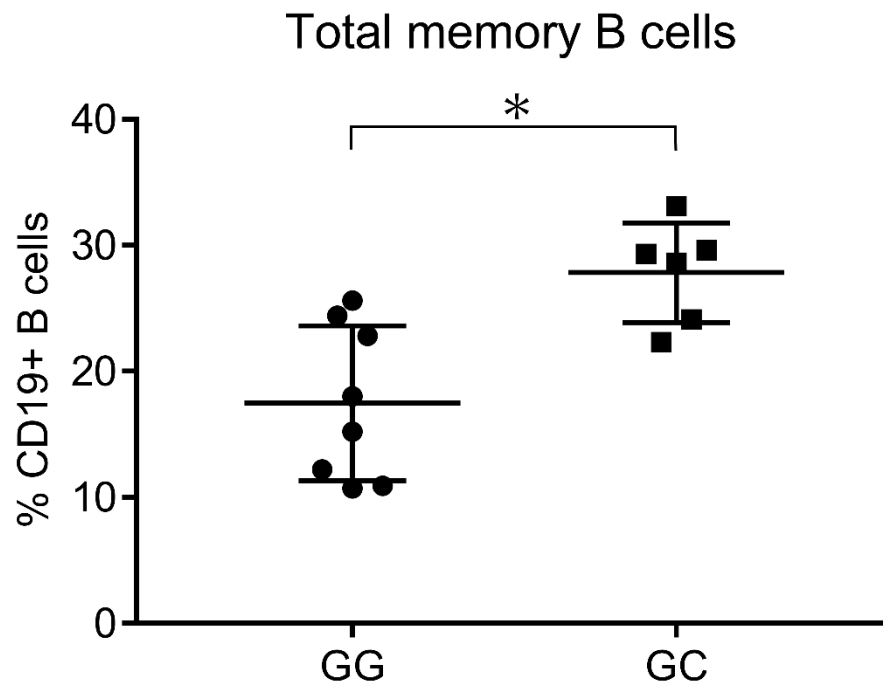


Figure 20. TLR7 SNP(rs 3853839) allele 毎の Total memory B cells 比率
 G/G allele 群において、G/C allele 群と比べて有意な Total memory B cells の減少が見られた。(* $p < 0.05$, Mann–Whitney U test)

3.5.3 PAPS 患者の PBMC mRNA 発現及び SNP との関連

3.5.2 で SNP を同定した PAPS 患者 14 名について、PBMC の mRNA 発現を測定し、SNP との関連を解析した。対象の遺伝子として、3.5.2 で有意差を認めた SNP と関連する TLR7 と、TLR7 の下流にあたる Ly6e, Mx1, IFIT1, IFIT3、および house keeping 遺伝子として GAPDH について測定した。

TLR7 gene expression は TLR7 SNP (rs 3853839) G/G allele 群において、G/C allele 群と比べて高かったが、有意差は見られなかった。(Figure 21)

また、Ly6e, Mx1, IFIT1, IFIT3 の gene expression より算出した IFN score は TLR7 SNP (rs 3853839) G/G allele 群において、G/C allele 群と比べて有意に高値であった。(Figure 22)

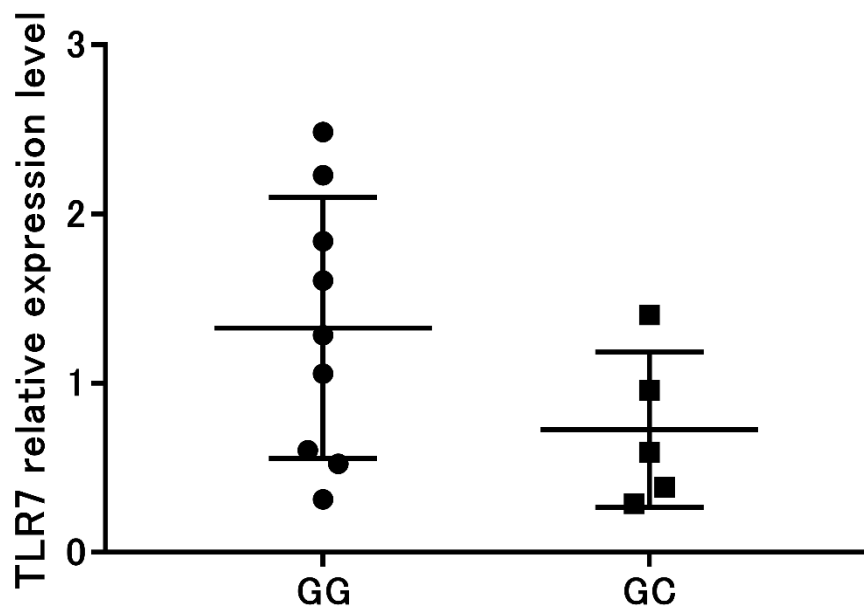


Figure 21. TLR7 SNP(rs 3853839)の allele 毎の TLR7 gene expression

TLR7 gene expression は G/G allele 群において、G/C allele 群と比べて高かったが、有意差は無かった。(p = 0.059, Mann–Whitney U test)

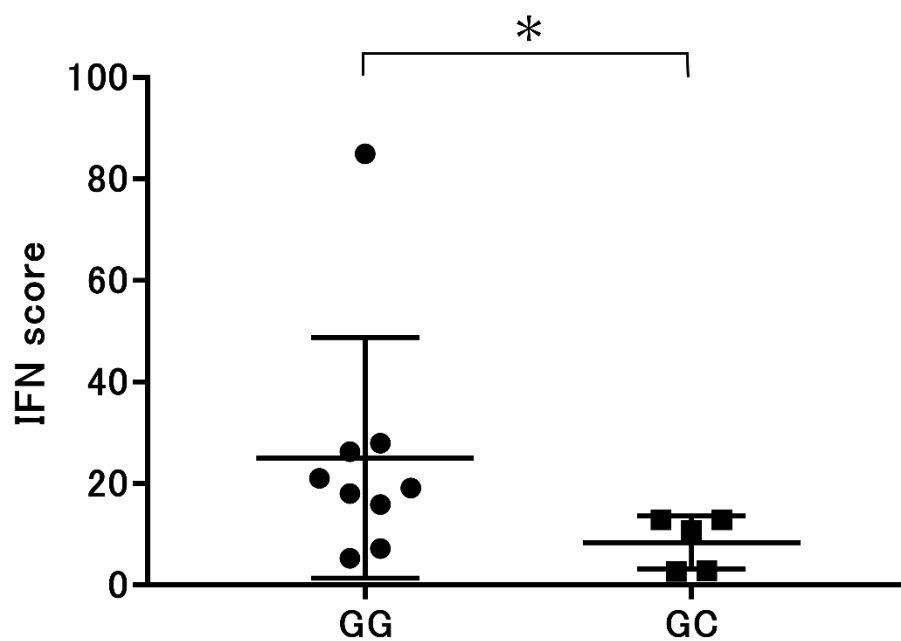


Figure 22. TLR7 SNP(rs 3853839)の allele 毎の IFN score

Ly6e, Mx1, IFIT1, IFIT3 の gene expression より算出した IFN score は G/G allele 群において、G/C allele 群と比べて有意に高値であった。(* $p < 0.05$, Mann–Whitney U test)

3.6 考察

本研究では APS 患者における末梢血サブセットの特徴および SNP との関連を明らかにすることを目的とした。

これまでの研究で、様々な自己免疫疾患と末梢血サブセットとの関連が報告されている。例えば SLE 患者では活動期に Plasmablasts の増加¹⁴と Pre-switched memory B cells の減少が見られ、Pre-switched memory B cells の減少度が自己抗体量と関連した¹⁵。T cell では Th1 cells や Treg cells の減少および Th17 の増加が見られた^{16,17}。関節リウマチ患者では Treg cells や Central memory T cells の減少が見られた¹⁸。一方、APS においては研究が進んでおらず、PAPS 患者や SLE/APS 患者において Treg cells の減少が報告されている程度にとどまっている^{9,19}。

また、近年 SNP と膠原病の関係について多くの研究が進められ、様々な疾患関連遺伝子が同定されている。更に、SNP と末梢血サブセットとの関連が注目されてきており、Mario Roederer らは 669 名の双子についてゲノムワイド解析を行い、様々なサブセットが SNP と関連していることを示した¹⁰。しかし膠原病患者において、SNP とサブセットの関連について解析した研究は現時点で見当たらず、本研究は APS 患者を対象とした初めての解析である。

本研究でのサブセット解析の結果、PAPS、SLE/APS 患者いずれにおいても、Th2、Th17 cells の増加、Treg cells の減少、Memory B cells の減少、Plasmablasts の増加、Breg cells の減少が見られた。

APS 患者の T 細胞サブセット解析において、免疫応答の抑制に働く Treg cells の減少が見られ、炎症性疾患や自己免疫疾患の発症に関わる Th17 cells の増加や、Th2 > Th1 のサイトカインバランスとなっていることが示された。Th2 や Th17 は IL-4、IL-5、IL-17 などのサイトカインを介して B 細胞の成熟に働くことが知られており、これらのサブセット変化が Memory B cells の減少や Plasmablasts の増加に関与している可能性が考えられた。更に、抗体産生に直接関連する B 細胞において Plasmablasts が増加していたことで、Plasmablasts がより深く APS の病態および aPL の産生に関与していることが推測された。また、Breg cells は IL-10 産生を介して T 細胞や抗原提示細胞の活性化を抑制し、免疫応答を抑制することが知られている²⁰。多発性硬化症²¹や SLE¹¹、強皮症²²などで Breg cells が減少していることが報告され、自己免疫疾患における重要性が近年注目されているが、今回、APS 患者においても Breg が減少していることが初めて確認された。

これらの T cell、B cell のサブセット変化は SLE において同様の報告がされており、APS が SLE と類似の病態であることを示唆している。APS 患者では SLE の合併例が

多く、また primary APS と診断された患者も経過中に SLE を発症するなど、両疾患の近似性は非常に高いと考えられているが、末梢血リンパ球サブセットの観点からもそれが証明されたことは興味深い。

更に本研究では、TLR7 の SNP (rs 3853839) が Memory B cells の減少や Plasmablasts の増加と関連していることを明らかにし、APS 患者における B 細胞の分化に遺伝的要素が関与している可能性が示唆された。TLR7 ligand が B 細胞分化を促進することは *in vitro* で示されており²³、実際、本研究でも TLR7 SNP (rs 3853839) の各 allele 間の比較で、PBMC の TLR7 gene expression には有意差は認められなかったものの、TLR7 の下流に当たる IFN 関連の gene expression (Ly6e、Mx1、IFIT1、IFIT3) をスコア化した IFN score は G/G allele 群で有意に高値であった。この TLR7 SNP と gene expression の関係は SLE 患者において既に報告されており、TLR7 (rs 3853839) の G/G allele 群において、TLR7 gene expression は高い傾向があり、また IFN score が有意に高値であった、と本研究と同様の結果が得られた¹²。

なお、本研究における limitation として、一部の PAPS、SLE/APS 患者において治療薬として副腎皮質ステロイドが使用されていることが挙げられるが、PSL 5mg/day 以下に限定した症例を対象としており、実際に PAPS 患者においてステロイド非使用例と使用例を比較しても各サブセット比率は同様の傾向が見られたことから、結果に大きな影響は及ぼしていないものと考えられた。

本研究の結果、APS 患者のサブセットは SLE 患者と類似していることが示された。更に TLR7 SNP および IFN signature との関連が見られており、遺伝的背景が関与している可能性が示唆された。また Plasmablasts の増加が見られることから、aPL 産生において Plasmablasts が抗体産生に関与している可能性が想起された。

そのため、次の研究として、Plasmablasts を含む CD20 陰性 B 細胞と抗体産生の関係を *ex vivo* の系を用いて検討することとした。

4. 第二章

aPL 産生細胞サブセットの同定

4.1 背景

aPL は病原性を有する自己抗体と考えられているが、副腎皮質ステロイドなど一般的な免疫抑制剤により aPL の抗体価は減少しないことが多く、aPL の産生機序については不明な点が多い。

近年、血管炎など他の膠原病に対して Rituximab (抗 CD20 モノクローナル抗体) の効果が認められているが、APS においては Rituximab 投与後でも抗体価がほとんど変化しないことが知られている²⁴。B 細胞は大多数が CD20 陽性細胞で形成されるが、Plasmablasts などの CD20 陰性 B 細胞が aPL 産生に関与している可能性が考えられる。第一章のサブセット解析の結果においても、APS 患者の B 細胞サブセットで Plasmablasts が健常者と比べて有意に増加しており、Memory B cells が減少していることが明らかとなった。

視神経脊髄炎という中枢神経系の慢性炎症性脱髄疾患において、疾患特異的自己抗体である抗アクアポリン 4 抗体が *ex vivo* の系で Plasmablasts から産生されていることが示され²⁵、実臨床で Plasmablasts の産生を抑える治療を行うことにより効果を示した症例が報告されている²⁶。このように抗体産生リンパ球サブセットを同定することで、aPL 産生を抑制する特異的治療に繋がる可能性がある。

そこで、*ex vivo* で PBMC の培養上清から aPL 産生を検出する方法を確立し、更に PBMC から特定のサブセットを *deplete* して培養上清中の aPL 産生量の変動するか検討することで、抗体産生サブセットの同定を試みた。

4.2 目的

APS 患者の PBMC より *ex vivo* の系で aPL 産生を検出できる条件、測定方法を確認し、APS 患者における aPL 産生サブセットを同定する。

4.3 対象と方法

4.3.1 健常者 PBMC 培養上清中の IgG/IgM 測定

培養条件の最適化のため、まず健常者の PBMC を用いて培養上清の IgG/IgM 値を測定し、刺激、培養日数について条件検討を行った。

健常者 4 名より 3.3.1 と同様の方法で分離した PBMC (細胞数 50,000 cells/well) を、Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (Sigma-Aldrich) に 10% の fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL) と penicillin/streptomycin (100 U/ml, Sigma-Aldrich) を添加した培地を用いて 5% CO₂, 37°C の条件で培養した。B 細胞の分化刺激として、IL(interleukin)-6 (1 ng/ml, Biolegend)/IL-21 (50 ng/ml, Biolegend)、CD40 ligand (1 µg/ml, Biolegend)、APRIL (a proliferation-inducing ligand) (300 ng/ml, PeproTech, New Jersey, USA) を用い、それぞれの単刺激または共刺激後 3, 6, 8 日後の培養上清を採取した。培養上清中の human IgG/IgM については、N-アッセイ TIA IgG/IgM-SH ニットーボー(NITTOBO MEDICAL CO., LTD, Japan)を用いて JCA-BM シリーズ自動分析装置 クリナライザ(JCA-BM8030) (Japan Electron Optics Laboratory, Japan)で測定した。

なお、本研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て、APS 患者および健常人とも文書同意を得て行った (承認番号 017-0165)。また、細胞の transfection については、北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に従って行った。

4.3.2 APS 患者 PBMC 培養上清中の aPL 測定

4.3.2.1 aCL-IgG/IgM ELISA

続いて、APS 患者の PBMC を、細胞数、刺激、培養日数について、4.3.1 で IgG/IgM 産生に最適と考えられた条件で培養した。その培養上清を採取し、aPL の一種である抗カルジオリピン抗体(aCL)-IgG/IgM を enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。また control として、健常者 3 名の PBMC を同様に培養し、上清中の aCL-IgG/IgM を測定した。

ELISA は血清中の aCL-IgM/IgG 測定時に使用される、標準化されたプロトコール²⁷に準じて下記の方法で測定した。

照射マイクロタイタープレート Maxi Soap (Nunk, Denmark)に cardiolipin solution from bovine heart (50 µg/mL, Sigma-Aldrich)またはエタノールを 4℃で一晩静置し固相化を行った。非特異的結合を避けるため、bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)を添加し blocking を行った。phosphate buffered saline (PBS)で 4 回洗浄後、培養上清 50 µL を各ウェルに分注して 2 時間静置した。PBS で 4 回洗浄後、アルカリホスファターゼ(alkaline phosphatase: ALP)標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体(Sigma-Aldrich)または ALP 標識ヤギ抗ヒト IgM 抗体 (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA)を添加し、室温で 1 時間静置した。再度 PBS で 4 回洗浄後、1M ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8)に 1 mg/mL p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (Sigma-Aldrich) を加えた溶液を 100 µL ずつ各 well に添加し酵素反応を行った。120 分の反応後、各ウェルの蛍光強度を測定した。405 nm 吸光度(optical density: OD)は Multiskan ascent plate reader (サーモエレクトロン社、ウォルサム、USA) で測定した。同一検体で cardiolipin およびエタノールで固相化された well 毎の吸光度の差を計算し、同様のプロセスで同時測定した既知濃度 standard サンプルから標準曲線を作成した。標準曲線と比較し、検体中の自己抗体濃度を算出した。測定結果は IgG、IgM のクラスごとに GPL-U/mL, MPL-U/mL で表記した。

なお、患者血清の aCL-IgM/IgG 測定では、50 倍希釈した血清 50 µL を上記と同様の方法で測定した。

4.3.2.2 a β 2GPI-IgG/IgM cell assay

HEK293T cell に β 2GPI、HLA-DRA*01:01、DRB1*07:01 を co-transfection することで細胞表面の HLA 上に β 2GPI 蛋白が提示されることが知られており²⁸、aPL の一種である抗 β 2GPI 抗体(a β 2GPI)-IgG/IgM を検出するため、cell assay を用いた測定系の確立を行った。

まず、HEK293T cell に polyethyleneimine (PEI)を用いて β 2GPI、HLA-DRA*01:01、DRB1*07:01、GFP vector を co-transfection した transient expression cell を作成した。この cell assay を用いて、APS 患者血清において、血清中の aPL が検出可能か確認した。

APS 患者血清および健常者血清に、transfection 48 時間後の transient expression HEK293T cell を加え、20 分間 4°C で静置した。遠心後、APC anti-human IgG (Biolegend)または APC anti-human IgM (Biolegend)を加え 15 分 4°C 暗所で静置し、洗浄後に BD FACS Aria™ II を用いたフローサイトメトリーを行った。control として GFP のみを transfection した HEK293 cell を用いて同様の測定を行い、GFP 陽性細胞群における両者の APC MFI (mean fluorescence intensity)を比較することで、a β 2GPI-IgG/IgM の抗体量を測定した。

測定系の確立後、APS 患者および健常者の PBMC 培養上清を用いて同様の方法でフローサイトメトリーを行い、抗 β 2GPI 抗体(a β 2GPI)-IgG/IgM の抗体量を比較した。

4.3.3 APS 患者における aPL 産生細胞サブセットの同定

4.3.2 にて *ex vivo* の系で PBMC からの aPL 産生を確認した上で、CD20 陽性または CD20 陰性 B 細胞が抗体産生に関与しているか調べるため、PBMC から一部の population を以下の方法で sorting して培養し、その培養上清中の aPL を測定、比較した。

APS 患者の PBMC に APC anti-CD19 antibody (biolegend)、PE anti-CD20 antibody (biolegend)を加え、15 分暗冷所に静置し、遠心後に BD FACS Aria™ II を用いて sorting を行い、CD19+CD20+ cells および CD19+CD20- cells を deplete した細胞群を抽出した。sorting 前後のフローサイトメトリー像を Figure 23 に示す。

それぞれの細胞群について、4.3.2.1 および 4.3.2.2 と同様の方法で培養上清中の aPL を測定し、比較した。

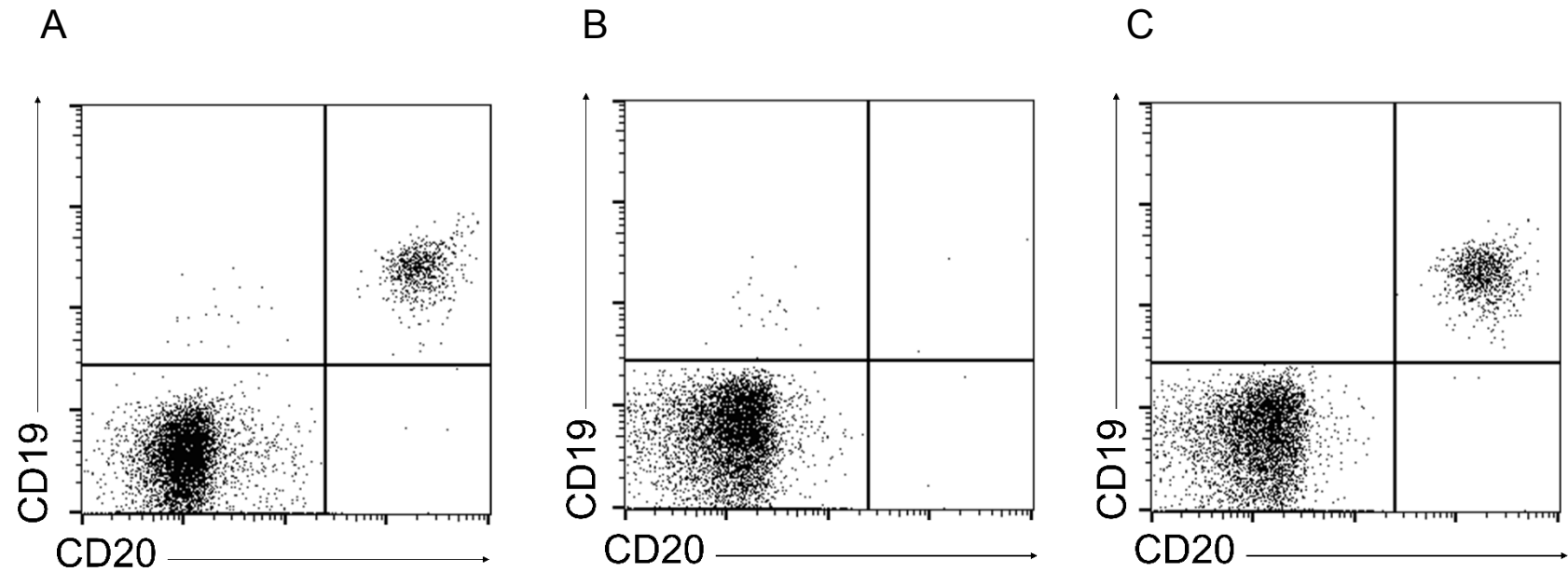


Figure 23. sorting による CD20 陽性/陰性 CD19+ B cells の変動

(A)sorting 前の PBMC (B) CD19+ CD20+ B cells depletion 後 (C) CD19+ CD20- B cells depletion 後
sorting 効率は 99%以上であった。

4.3.4 統計学的解析

IgG (TIA)、IgM (TIA)の抗体価は平均 $\pm$ SD で表し、各サブセットにおける aPL 産生の群間比較は **paired-t test** を行い、統計学的解析を行った。p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は **GraphPad Prism 7 (Graphpad Software)**を用いて行った。

4.4 結果

4.4.1 健常者 PBMC 培養上清中の IgG/IgM 測定

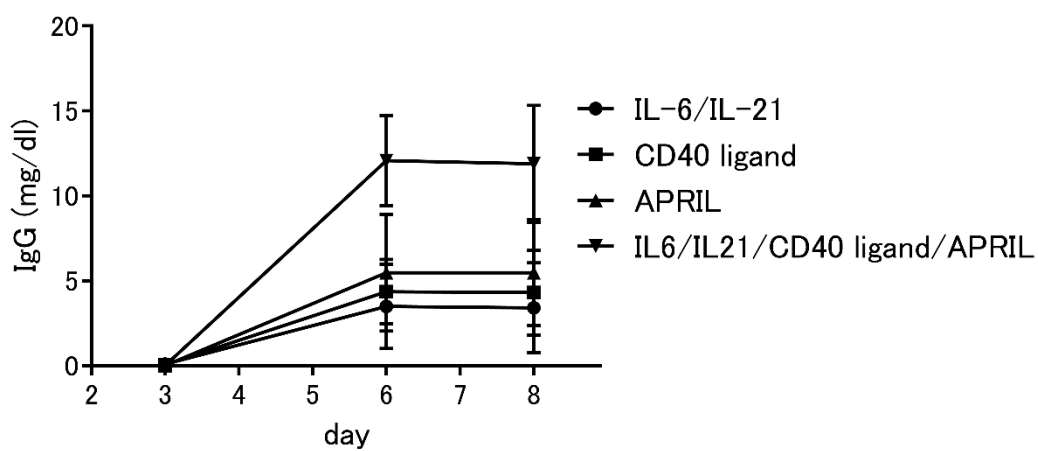
健常者 4 名の PBMC を IL-6/IL-21、CD40 ligand、APRIL の単刺激または共刺激下で培養し、それぞれの培養上清を day3,6,8 で採取し培養上清中の IgG、IgM を測定した。

いずれの刺激でも day3 では検出が見られず、day6,8 で IgG、IgM とともに検出された。

IgG (TIA)について、IL-6/IL-21 の単刺激では 3.5 ± 2.5 mg/dL (day6)、 3.4 ± 2.7 mg/dL (day8)、CD40 ligand の単刺激では 4.4 ± 1.9 mg/dL (day6)、 4.3 ± 2.5 mg/dL (day8)、APRIL の単刺激では 5.5 ± 3.4 mg/dL (day6)、 5.5 ± 3.1 mg/dL (day8)、IL-6/IL-21、CD40 ligand、APRIL の共刺激で 12.1 ± 2.7 mg/dL (day6)、 11.9 ± 3.4 mg/dL (day8) であり、IL-6/IL-21、CD40 ligand、APRIL の共刺激で最も高値を認めた。(Figure 24A)

IgM (TIA)について、IL-6/IL-21 の単刺激では 0.11 ± 0.06 mg/dL (day6)、 0.15 ± 0.05 mg/dL (day8)、CD40 ligand の単刺激では 0.15 ± 0.08 mg/dL (day6)、 0.14 ± 0.09 mg/dL (day8)、APRIL の単刺激では 0.15 ± 0.11 mg/dL (day6)、 0.11 ± 0.06 mg/dL (day8)、IL-6/IL-21、CD40 ligand、APRIL の共刺激で 0.34 ± 0.15 mg/dL (day6)、 0.34 ± 0.21 mg/dL (day8) であり、IL-6/IL-21、CD40 ligand、APRIL の共刺激で最も高値を認めた。(Figure 24B)

A



B

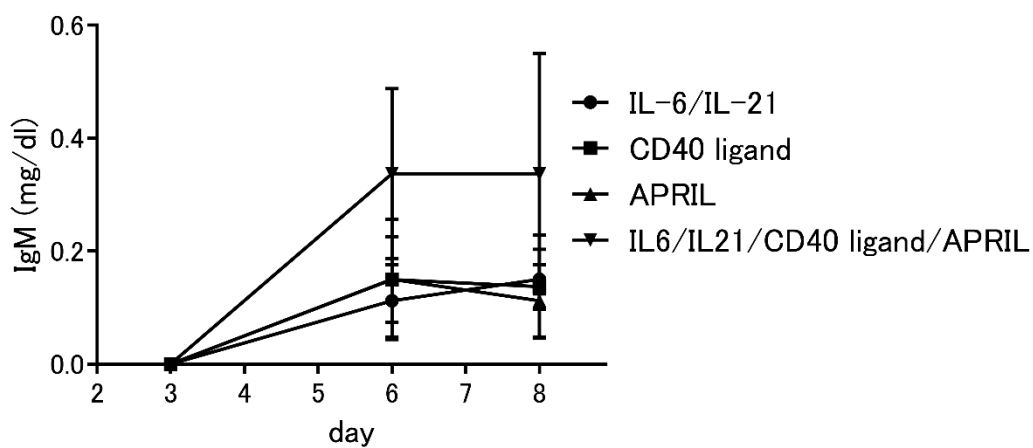


Figure 24. 健常者 PBMC 培養上清中の IgG/IgM 測定

健常者において、day6,8 の培養上清で IgG、IgM を検出した。またいずれも IL-6/IL-21、CD40 ligand、APRIL の共刺激で最高値を認めた。

4.4.2 APS 患者 PBMC 培養上清中の aPL 測定

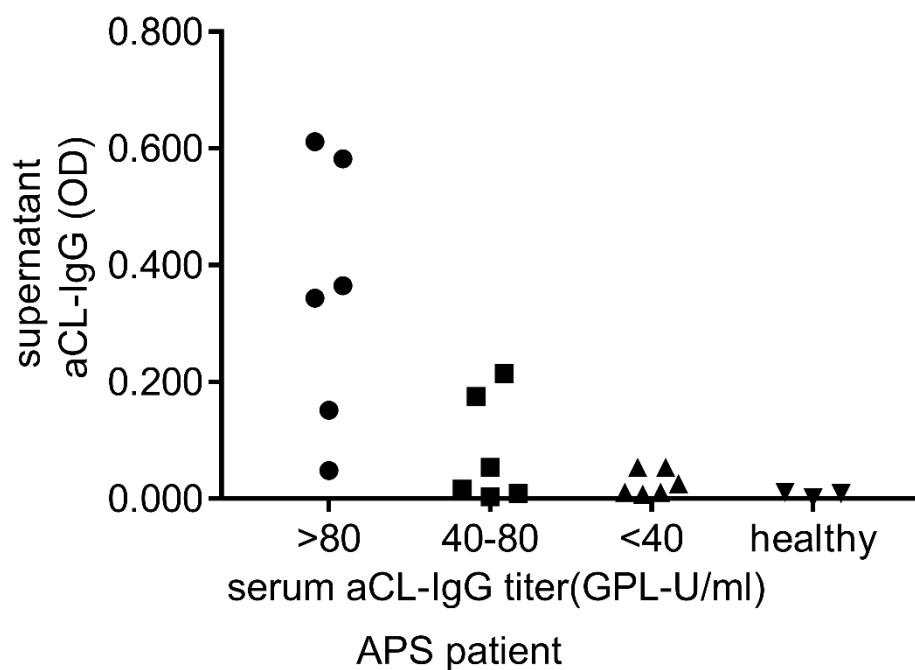
4.4.2.1 aCL-IgG/IgM ELISA

APS 患者 18 名の PBMC を IL-6、IL-21、CD40 ligand、APRIL の共刺激で培養し、それぞれの培養上清を day6 で採取し培養上清中の aCL-IgG/IgM を測定した。また control として、健常者 3 名の PBMC を同様に培養し、上清中の aCL-IgG/IgM を測定した。

APS 患者 4 名の PBMC 培養上清で aCL-IgG OD > 0.300、aCL-IgG titer > 8.0 GPL-U/mL と高値を認めた。特に血清中の aCL-IgG titer が高値であった症例では、高い OD 値を検出した。一方、健常者 3 名の PBMC 培養上清から aCL-IgG は検出されなかった。(Figure 25)

また、aCL-IgM はいずれの培養上清からも検出されなかった。(Figure 26)

A



B

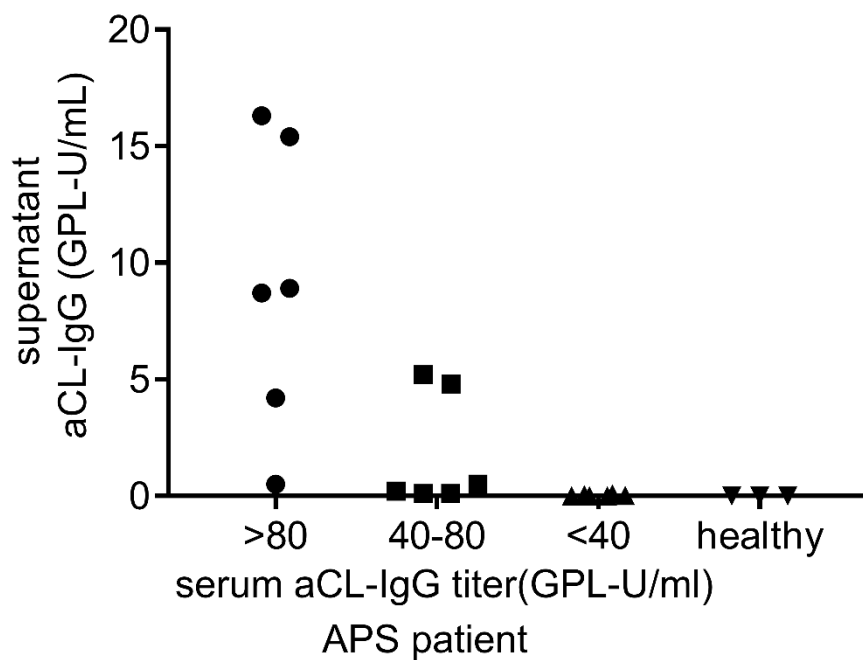


Figure 25. PBMC 培養上清中の aCL-IgG (ELISA) (A) aCL-IgG OD (B) aCL-IgG titer
serum aCL-IgG 高値の APS 患者において、PBMC 培養上清から aCL-IgG を検出した。

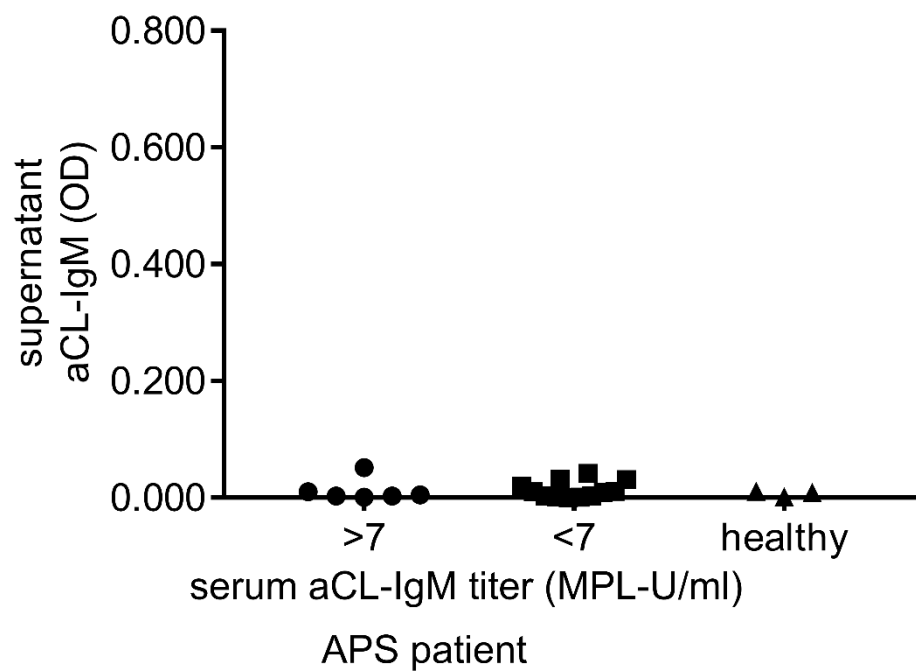


Figure 26. PBMC 培養上清中の aCL-IgM (ELISA) OD

APS 患者、健常者の PBMC 培養上清のいずれからとも、aCL-IgM は検出されなかった。

4.4.2.2 cell assay による PBMC 培養中 $\alpha\beta 2\text{GPI-IgG/IgM}$ 測定

transient expression cell assay の系を確立するため、まず APS 患者血清と健常者の血清を用いて確認を行った。

APS 患者血清では $\alpha\beta 2\text{GPI-IgG}$ 、 $\alpha\beta 2\text{GPI-IgM}$ とともに検出可能であった一方、健常者の血清ではいずれも検出されなかった。(Figure 27,28)

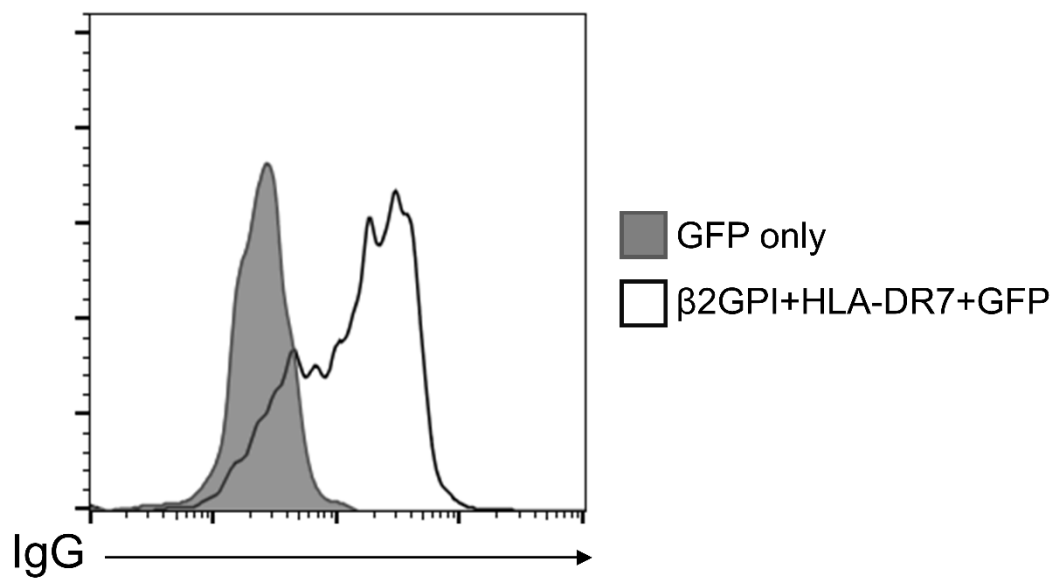
cell assay が機能していることが確認できたため、続いて APS 患者の PBMC 培養上清を用いて同様の方法でフローサイトメトリーを行い、 $\alpha\beta 2\text{GPI-IgG/IgM}$ の MFI を比較した。

APS 患者 1 名の PBMC 培養上清において $\alpha\beta 2\text{GPI-IgG}$ をわずかに検出したが、健常者の PBMC 培養上清からは検出されなかった。(Figure 29)

また APS 患者 1 名の PBMC 培養上清において $\alpha\beta 2\text{GPI-IgM}$ を検出したが、健常者の PBMC 培養上清からは検出されなかった。(Figure 30)

他に 4 名の APS 患者で同様に $\alpha\beta 2\text{GPI-IgM}$ を検出した。

A APS patient serum



B Healthy control serum

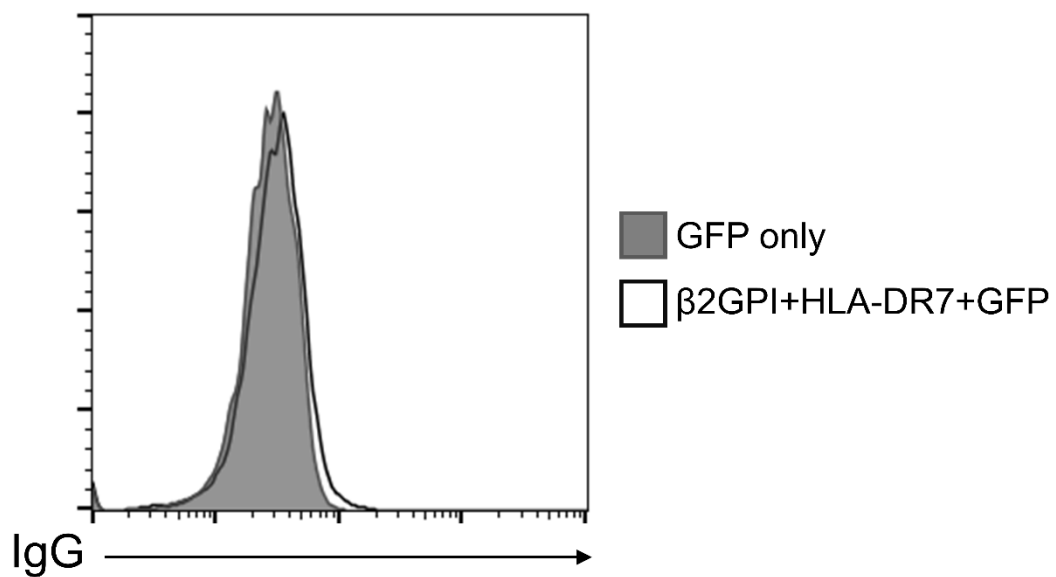
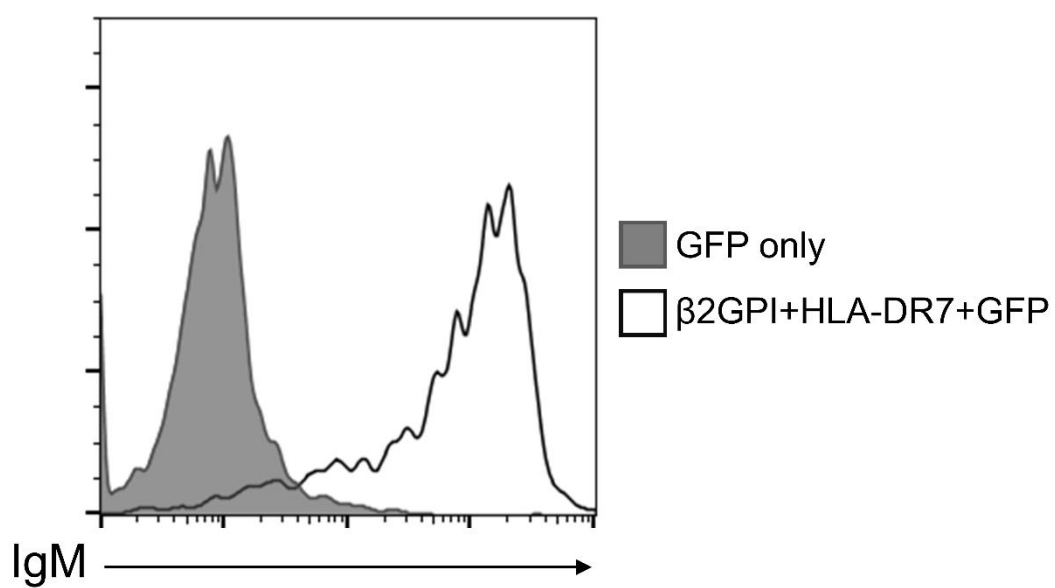


Figure 27. APS 患者、健常者の血清中の $\alpha\beta 2\text{GPI-IgG}$

APS 患者の血清において、 $\alpha\beta 2\text{GPI-IgG}$ を検出したが、健常者の血清からは検出されなかった。

A APS patient serum



B Healthy control serum

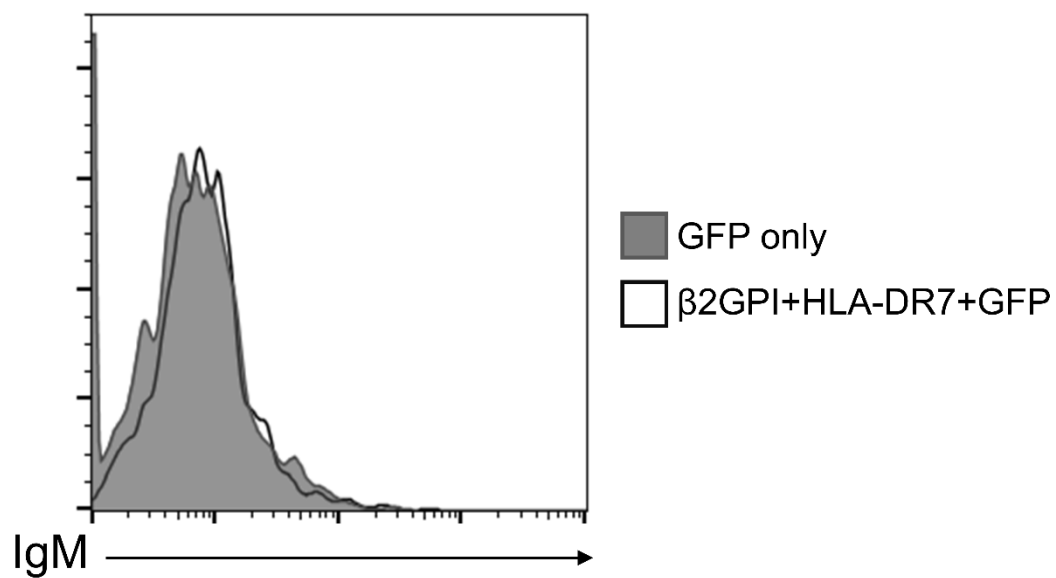
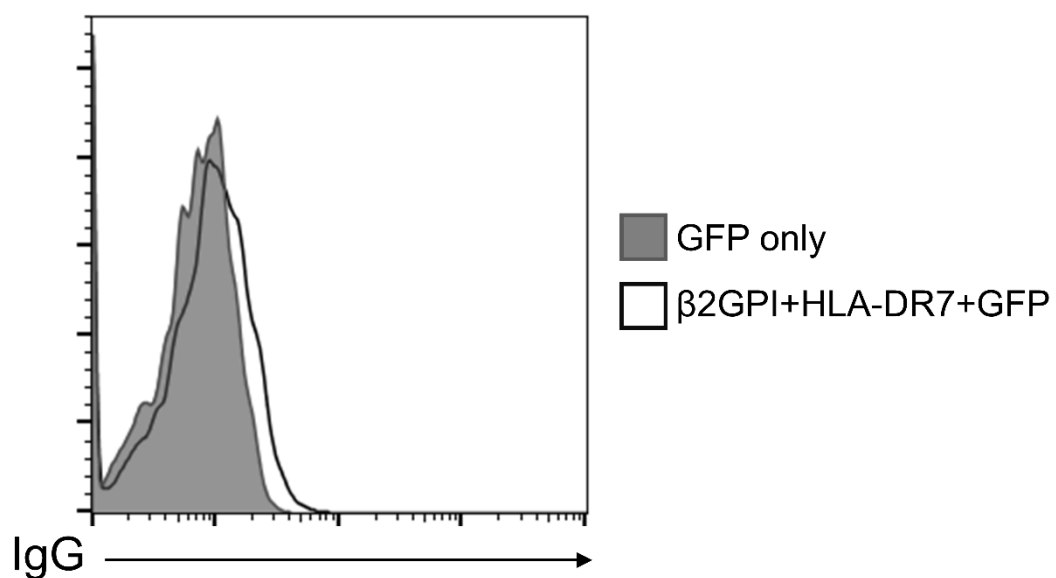


Figure 28. APS 患者、健常者の血清中の $\alpha\beta 2\text{GPI-IgM}$

APS 患者の血清において、 $\alpha\beta 2\text{GPI-IgM}$ を検出したが、健常者の血清からは検出されなかった。

A APS patient supernatant



B Healthy control supernatant

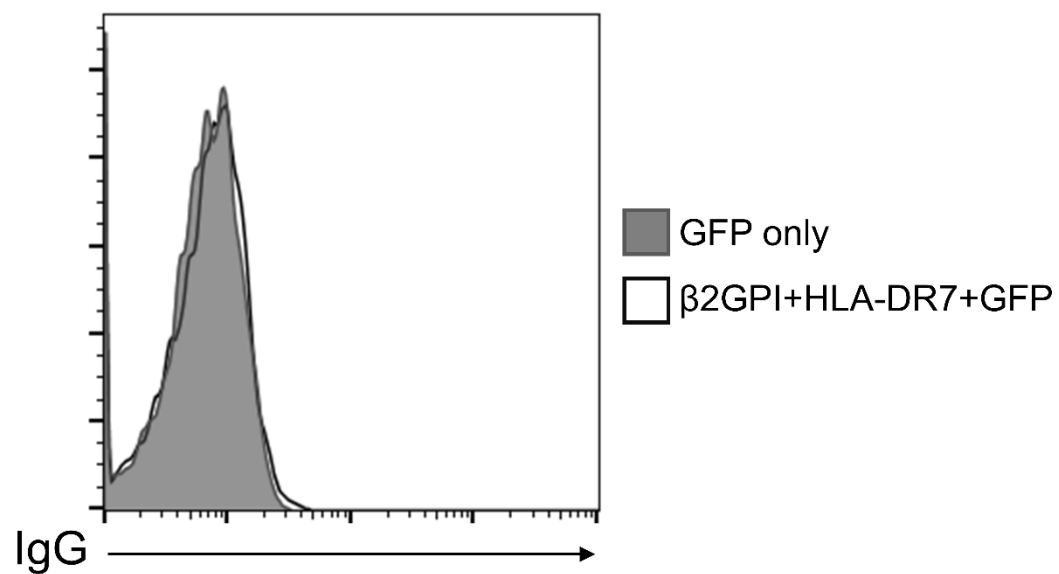
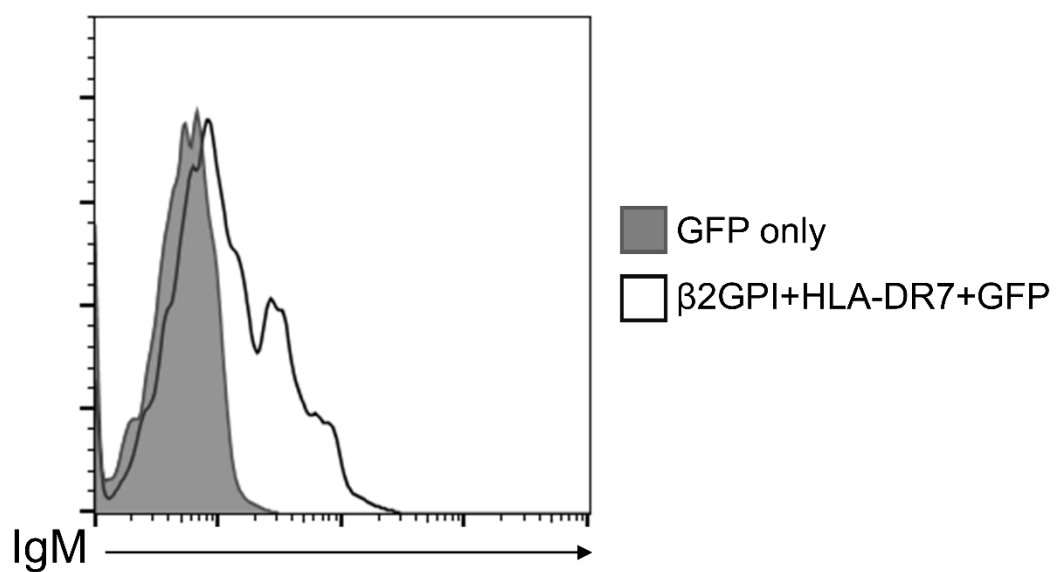


Figure 29. APS 患者、健常者の PBMC 培養上清中の $\alpha\beta 2$ GPI-IgG

APS 患者の PBMC 培養上清において $\alpha\beta 2$ GPI-IgG をわずかに検出したが、健常者の PBMC 培養上清からは検出されなかった。

A APS patient supernatant



B Healthy control supernatant

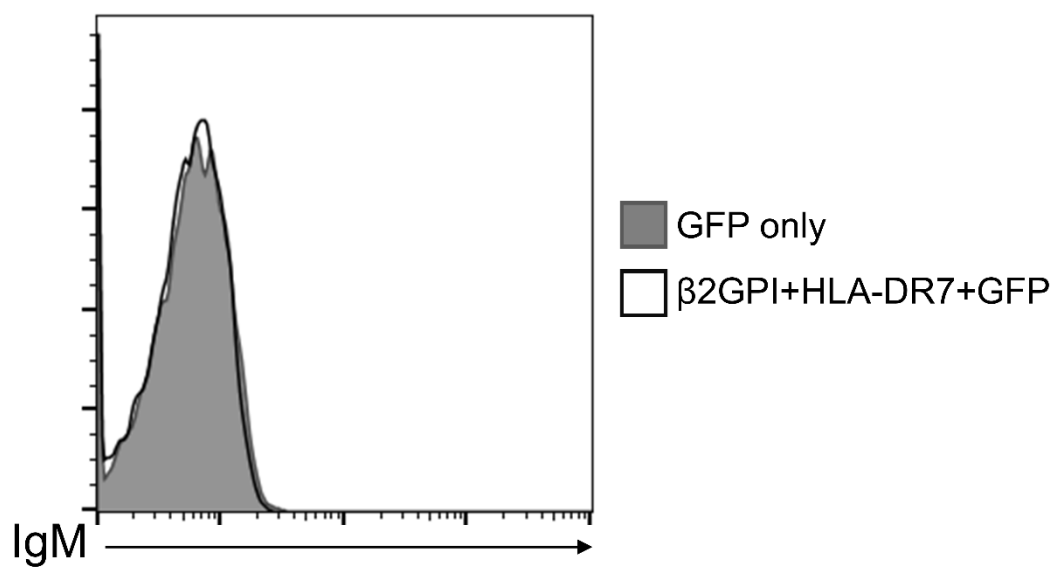


Figure 30. APS 患者、健常者の PBMC 培養上清中の $\alpha\beta 2\text{GPI-IgM}$

APS 患者の PBMC 培養上清において $\alpha\beta 2\text{GPI-IgM}$ を検出したが、健常者の PBMC 培養上清からは検出されなかった。

4.4.3 APS 患者における aPL 産生細胞サブセットの同定

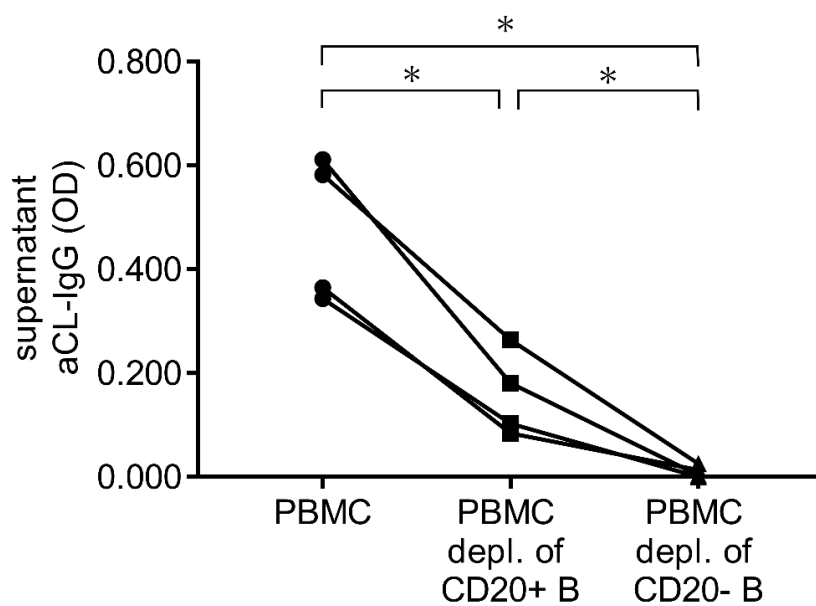
続いて、APS 患者の PBMC を sorting し、CD20 陽性 B 細胞と CD20 陰性 B 細胞を deplete した。それぞれの細胞群を細胞数 50,000 cells/well で培養し、day6 の培養上清について 4.3.2.1 および 4.3.2.2 の方法で aPL を測定し比較した。

PBMC および CD20+ B cells を deplete した PBMC の培養上清から aCL-IgG を検出したが、CD20- B cells を deplete した PBMC の培養上清からは aCL-IgG は検出されなかった。(Figure 31)

cell assay においても、CD20+ B cells を deplete した PBMC の培養上清から α 2GPI-IgM を検出したが、CD20- B cells を deplete した PBMC の培養上清からは α 2GPI-IgM は検出されなかった。(Figure 32)

なお、aCL-IgM (ELISA)、 α 2GPI-IgG (cell assay)についてはいずれの sorting cell 培養上清からも検出されなかった。

A



B

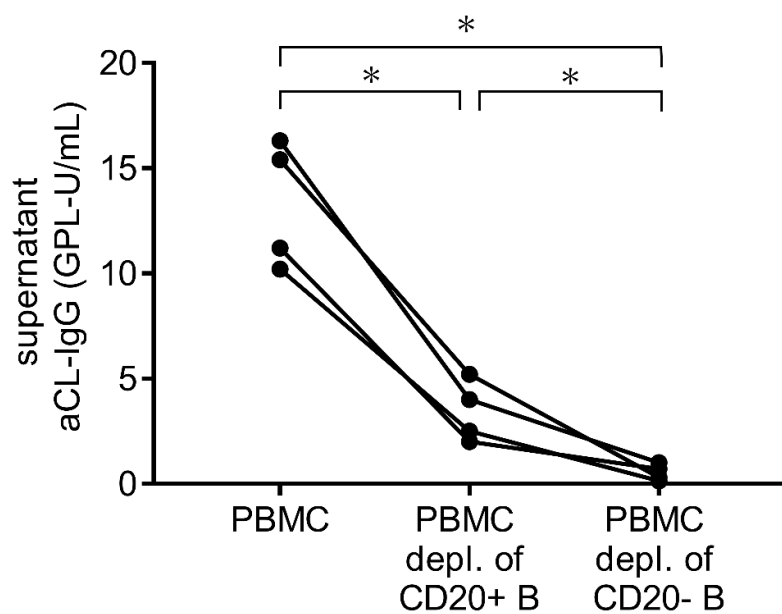


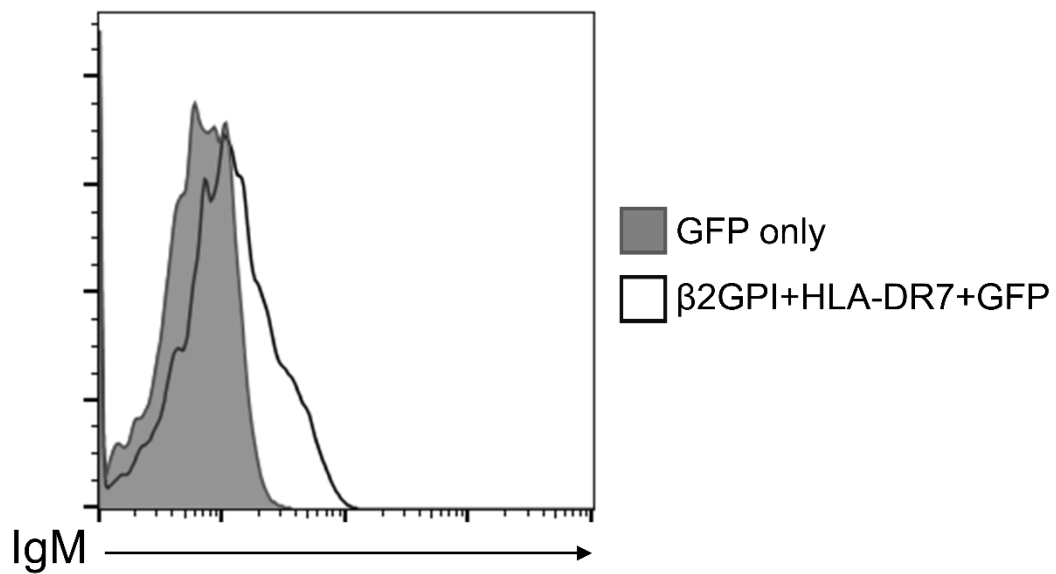
Figure 31. PAPS 患者 PBMC および depleting cells 培養上清中の aCL-IgG (ELISA)

(A) aCL-IgG OD (B) aCL-IgG titer

CD20+ B cells を deplete した PBMC の培養上清から aCL-IgG を検出したが、CD20- B cells を deplete した PBMC の培養上清から aCL-IgG は検出されなかった。

(*p<0.05, paired t test)

A PBMC depl. of CD20+ B cells supernatant



B PBMC depl. of CD20- B cells supernatant

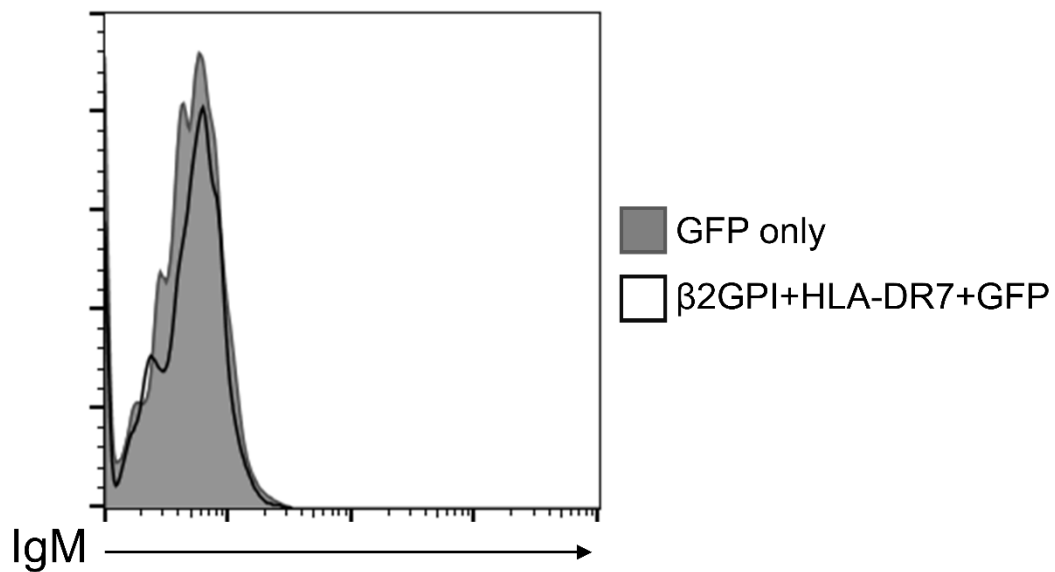


Figure 32. PAPS 患者 depleting cells 培養上清中の $\alpha\beta$ 2GPI-IgM

CD20+ B cells を deplete した PBMC の培養上清から $\alpha\beta$ 2GPI-IgM を検出したが、CD20- B cells を deplete した PBMC の培養上清から $\alpha\beta$ 2GPI-IgM は検出されなかった。

4.5 考察

APS は自己免疫性の血栓性疾患であるが、劇症型 APS などの特殊な病態および基礎疾患に SLE などの自己免疫疾患がある場合を除いて、ステロイドや免疫抑制剤は通常使用されない。実際、レトロスペクティブな解析では通常の免疫抑制療法により抗体価の抑制は必ずしも得られず、血栓再発予防にも効果は認められなかったと報告されている²⁹。近年、抗 CD20 モノクローナル抗体である Rituximab は、CD20 陽性 B 細胞を治療ターゲットとし、血管炎などの膠原病で疾患特異的自己抗体の産生を抑制することが知られているが、APS 患者における Rituximab の効果を調べた phase2 study では治療前後で aPL の抗体価に変動を認めなかった²⁴。aPL の産生機序については不明な点が多く、現時点で APS に特異的な治療法は存在しない。APS 患者の急性期の動静脈血栓症に対しては、抗凝固療法や線溶療法など血栓症に対する治療や二次予防のみが行われているのが現状である。

我々は第一章で APS 患者の末梢血サブセットにて Plasmablasts が増加していることを確認した。Plasmablasts は CD20 陰性 B 細胞であり、視神経脊髄炎や関節リウマチにおいて、疾患特異的自己抗体の産生に Plasmablasts が寄与されていることが示されている^{25,30} ように、APS においても、Plasmablasts を含む抗 CD20 陰性 B 細胞が aPL 産生に関連している可能性を考え、本実験を行った。

まず、IL-6、IL-21、APRIL、CD40 ligand を用いて B 細胞を刺激し、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 PBMC から aPL を産生および検出する方法を確立した。続いて BD FACSAria™ II を用いて sorting を行い、CD20 陽性・陰性 B 細胞を deplete した細胞群で培養を行った。CD20 陽性 B 細胞を deplete した PBMC から aPL 産生が見られた一方、CD20 陰性 B 細胞を deplete した PBMC からは aPL 産生が見られなかった。

これらの結果は、Plasmablasts を含む CD20 陰性 B 細胞が aPL 産生に関与していることを示唆しており、Rituximab が実臨床で aPL 減少に寄与しないことと矛盾しない結果であった。Plasmablasts を抑制する治療が APS において有効である可能性があり、今後の治療に繋がることが期待される。

5. 第三章

抗リン脂質抗体症候群における血小板減少と 血栓症リスクに関する研究

5.1 背景

5.1.1 抗リン脂質抗体患者における血小板減少症と血栓症

APS 患者には non-criteria manifestation と呼ばれる、血栓症・妊娠合併症以外の症状をしばしばきたすことが知られており、腎症、血小板減少症、皮膚症状、心弁膜症、神経症が挙げられる³¹。APS 患者における血小板減少症の頻度は 20-53%と報告されており³²、他の膠原病よりも明らかに多い。更に、1000 例の APS 患者を解析した多施設前向き研究では 10 年のフォローアップ期間中に 8.7%が新たに血小板減少症を発症した³³。しかし、APS 患者の血小板減少症はほとんどが血小板数 5 万/ μ L 以上の軽度減少に留まり、治療介入を要するほどの減少を呈する症例はほとんど無い。また、APS 患者における血小板減少症の病態については不明な点が多い^{34,36}。

特発性血小板減少性紫斑病(immune thrombocytopenic purpura: ITP)患者において、aPL の存在が血栓症リスクを増加させることが知られており、5 年間のフォローアップで aPL 陽性患者の 61%が血栓症を発症したが、aPL 陰性患者ではわずか 2.3%に留まった³⁷。APS 患者においても血小板減少が血栓症発症リスクになる可能性が考えられているが、これまで十分な解析はなされていない。

本研究では、aPL 陽性・陰性患者における血小板減少症と血栓症発症率を解析する。また、当科では aPL の種類・力価を換算して計算する抗リン脂質抗体スコア (aPL-S) を提唱しており³、aPL-S と血小板減少の関連についても解析するとともに、aPL-S と血小板減少の有無による血栓症発症リスクの層別化を試みる方針とした。

5.2 対象と方法

5.2.1 研究デザイン

本研究は後ろ向き単施設縦断研究である。aPL 陽性患者における血小板減少症の有無と血栓症発症との関連を明らかにすることを目的とした。また aPL-S と血小板数による層別解析も行い、両者による血栓症発症リスクの層別化についても検討した。臨床検査値、画像所見、臨床経過などの患者データは医療記録を用いて収集した。この研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 016-0206)。

5.2.2 対象、および主要評価項目

2002 年 4 月から 2006 年 3 月の間に北海道大学病院内科Ⅱ膠原病外来を受診し、抗リン脂質抗体を測定した連続 953 名を対象とした。フォロー期間が 2 年以内の 262 名については解析に不適と考え除外した。691 名のフォローアップ期間の中央値は 128 ヶ月であった。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(年齢、性別、病名、喫煙歴、生活習慣病の既往歴、血栓症の既往歴、抗血栓療法の使用歴)、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。

血小板減少群は aPL 測定時に血小板数 15 万/ μ L 以下の患者と定義し、血栓症については脳梗塞、心筋梗塞、総腸骨動脈などの動脈血栓症と深部静脈血栓症や肺塞栓などの静脈血栓症について、CT や MRI、血管造影で確認されたものと定義した。また SLE の診断はアメリカリウマチ学会 (American College of Rheumatology: ACR) の 1997 年改訂分類基準^{38,39}を用いて行った。

5.2.3 aPL および aPL-S の測定

血漿サンプルは、10% 0.105M クエン酸ナトリウムを含む試験管に採取した静脈血を、4°Cで直ちに遠心分離し、濾過により血小板を除去し-80°Cで保管したものを使用した。抗リン脂質抗体は以下の方法を用いて測定した。

ループスアンチコアグラント(LA)は semiautomated hemostasis analyzer (Start 4, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, France) を用い、国際血栓止血学会の標準化委員会推奨のガイドライン⁴⁰に基づき、活性化トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time: aPTT)、希釈ラッセル蛇毒時間 (dilute Russell viper venom time: dRVVT)、カオリン凝固時間 (kaolin clotting time: KCT) で判定した。aPTT 測定のスクリーニングとミキシングテストに PTT-LA (Diagnostica Stago)を用い、StacLOT LA kit (Diagnostica Stago)で確認試験を行った。dRVVT はスクリーニングと確認試験に Gradipore LA test (Sydney New South Wales, Australia) を用いた。KCT は kaolin solution (Dade Behring, Liederbach, Germany) 標準プロトコールを用いて測定した。40 人の健常者の 99 パーセンタイルを LA テストのカットオフと設定した。

抗カルジオリピン抗体(aCL-IgG, aCL-IgM)は標準化された ELISA 法により測定した²⁷。132 名の健常人 aCL ELISA を施行し、結果の 99 パーセンタイルを aCL の正常範囲 (IgG> 18.5 GPL および IgM> 7.0 MPL)と設定した。

抗 β 2GPI 抗体 (a β 2GPI-IgG, IgM) は既報⁴¹に沿って in-house ELISA を用いて測定した。精製ヒト β 2GPI はヤマサ製 (東京)を使用し、照射マイクロタイタープレート Maxi Soap (Nunk,)に 4 μ g/mL 精製 β 2GPI $\cdot$ PBS 溶液を添加し、4°Cで一晩静置し固相化を行った。非特異的結合を避けるため 150 μ L 3%ゼラチン (BDH ケミカルズ株式会社, Poole)でブロッキング処理した。0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich)を含む PBS (PBS-Tween) で 3 回洗浄後、1% ウシ血清アルブミン(BSA) (Sigma-Aldrich)を含む PBS (PBS-1% BSA)で 50 倍希釈した患者血清 50 μ L を 2 well ずつアプライした。Plate を室温で 1 時間 incubate し、PBS-Tween で 3 回洗浄した。PBS-1%BSA で ALP 標識ヤギ抗ヒト IgG および IgM 抗体(Sigma-Aldrich)を希釈し、50 μ L/well 追加し室温で 1 時間 incubate した。PBS-Tween で 4 回洗浄後、1M ジエタノールアミン緩衝液(pH 9.8)に 1 mg/mL p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム(Sigma-Aldrich) を加えた溶液を 100 μ L ずつ各 well に添加した。405 nm 吸光度(OD)は Multiskan ascent plate reader (サーモエレクトロン社) で測定した。132 名の健常人 a β 2GPI ELISA を施行し、結果の 99 パーセンタイルを aCL の正常範囲 (IgG> 2.2 U/ml および IgM> 6.0 U/ml)と設定した。

ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(anti-phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody: aPS/PT-IgG, IgM)は、既報⁴²に沿ってホスファチジルセリンとプロトロンビンの複合体を抗原として使用した in-house ELISA を用いて測定した。照射マイクロタイタープレート Maxi Soap (Nunk)に ホスファチジルセリン(50 µg/mL, Sigma-Aldrich)を添加し、一晚静置し固相化を行った。非特異的結合を避けるため 1%脂肪酸フリーのウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich)および 5mM 塩化カルシウム (BSA-Ca)を含むトリス緩衝生理食塩水(tris-buffered saline: TBS) 150 µL でブロッキング処理した。0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich)および 5mM 塩化カルシウムを含む TBS (TBS-Tween-Ca) で 3 回洗浄後、10 µg/mL のヒトプロトロンビン (Diagnostica Stago, France)を含む BSA-Ca を 50 µL ずつ半分の well に、BSA-Ca のみを残り半分の well にアプライし、37°C 1 時間 incubate した。洗浄後、BSA-Ca で 100 倍に希釈した血清 50 µL を各 well に加えた。ALP 標識ヤギ抗ヒト IgG および IgM 抗体と基質を加え、室温で 1 時間 incubate 後、吸光度を測定した。132 名の健常人 aPS/PT ELISA を施行し、結果の 99 パーセントイルを aCL の正常範囲 (IgG> 2.0 U/ml および IgM> 9.2 U/ml)と設定した。

aPL スコア(aPL-S)は複数の抗リン脂質抗体測定を一元的に定量化するものであり、既報³に沿って $[aPL-Score] = 5 \times \exp(([\text{Odds Ratio}] - 5)/4)$ の計算式を用いて算出した。抗リン脂質抗体毎のオッズ比および aPL スコアについて、Table 6 に示す。

Table 6. aPL test 毎のオッズ比および aPL スコア

	カットオフ	感度(%)	特異度(%)	オッズ比	95%信頼区間	aPL スコア
aPTT 混合試験	>49 sec.	39.1	89.3	5.36	2.53 - 11.4	5
aPTT 確認試験(比率)	>1.3	19.6	95.2	4.81	1.79 - 12.9	2
	>1.1	30.4	90.9	4.38	1.96 - 9.76	1
KCT 混合試験	>29 sec.	45.6	88.8	6.64	3.17 - 13.9	8
dRVVT 混合試験	>45 sec.	28.2	90.9	3.93	1.74 - 8.88	4
dRVVT 確認試験(比率)	>1.3	17.4	94.7	3.72	1.38 - 10.1	2
	>1.1	28.3	90.4	3.7	1.65 - 8.27	1
IgG-aCL (GPL)	>30	15.2	98.4	11	2.72 - 44.5	20
	>18.5	19.5	94.6	4.31	1.63 - 11.3	4
IgM-aCL (MPL)	>7	6.52	96.3	1.79	0.45 - 7.22	2
IgG-β2GPI (U)	>15	23.9	98.4	19.3	5.11 - 72.7	20
	>2.2	30.4	92.5	5.4	2.35 - 12.4	6
IgM-β2GPI (U)	>6	8.7	91.4	1.02	0.32 - 3.20	1
IgG-aPS/PT (U)	>10	19.6	97.8	11.1	3.25 - 38.1	20
	>2	28.3	95.7	8.81	3.39 - 22.9	13
IgM-aPS/PT (U)	>9.2	6.52	98.9	6.45	1.05 - 39.8	8

5.2.4 統計解析

連続変数は正規分布している場合は平均 $\pm$ 標準偏差 (SD)、正規分布していない場合は中央値 [四分位範囲(interquartile range: IQR)] で示し、対応のない t 検定もしくは Mann-Whitney U 検定にて統計学的解析を行った。カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示し、群間比較は Fisher's exact test にて統計学的解析を行った。

血小板数と aPL score との相関関係は Spearman の順位相関係数にて統計学的解析を行った。血栓症発症率については Kaplan-Meier 法を用いて解析した。

すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は GraphPad Prism 7 (Graphpad Software)を用いて行った。

5.3 結果

5.3.1 aPL と血小板減少の関連についての解析

まず、aPL と血小板数との関係につき、横断的に解析を行った。

本研究では 691 名の患者を対象とした。内訳は、SLE 患者 238 例、関節リウマチ患者 110 例、原発性 APS 患者 38 例、血管炎症候群患者 33 例、多発性筋炎/皮膚筋炎患者 26 例、その他 246 例であった。291 例(42.1%)が少なくとも 1 つ以上の aPL が陽性であった。血小板減少は aPL 陽性群の方が aPL 陰性群と比較して有意に高頻度でみられた (14.1% [43/291] vs 9.5% [38/400], $p = 0.041$)。aPL 陽性患者において、LA と aPS/PT は血小板減少群で非血小板減少群と比較して高頻度で見られた。更に、aPL-S は血小板減少群で有意に高値であった。(Table 7)

aPL-S と血小板数について、Spearman の順位相関係数にて統計学的に有意な相関が見られた。(Figure 33)

また aPL 陰性患者群において、SLE 患者は血小板減少群に高頻度に見られた。(Table 7)

Table 7. 患者背景

	aPL (+)		p	RR (95% CI)	aPL (-)		p	RR (95% CI)
	Low platelet count(+)	Low platelet count(-)			Low platelet count(+)	Low platelet count(-)		
Patient number, n	43	248			38	362		
Age (years)	49.3 ± 14.7	49.4 ± 14.6	0.967		49.4 ± 10.9	48.9 ± 15.5	0.846	
Female, n (%)	34 (79.1)	206 (83.1)	0.518	0.952 (0.808 - 1.121)	32 (84.2)	279 (77.1)	0.413	1.093 (0.942 - 1.268)
SLE, n (%)	23 (53.6)	98 (39.5)	0.096	1.354 (0.984 - 1.861)	19 (50.0)	101 (27.9)	0.008*	1.792 (1.252 - 2.565)
Smoking, n (%)	9 (20.9)	41 (16.5)	0.512	1.266 (0.664 - 2.412)	5 (13.1)	50 (13.8)	1.000	0.953 (0.405 - 2.243)
Hypertension, n (%)	14 (32.6)	53 (21.4)	0.118	1.523 (0.931 - 2.492)	11 (28.9)	77 (21.3)	0.304	1.361 (0.796 - 2.326)
Dyslipidemia, n (%)	13 (30.2)	53 (21.4)	0.236	1.415 (0.847 - 2.363)	7 (18.4)	78 (21.5)	0.835	0.855 (0.426 - 1.717)
Diabetes mellitus, n (%)	3 (7.0)	23 (9.3)	0.778	0.752 (0.236 - 2.397)	5 (13.1)	45 (12.4)	0.801	1.058 (0.447 - 2.505)
Past history of thrombosis, n (%)	16 (37.2)	63 (25.4)	0.136	1.465 (0.941 - 2.281)	3 (7.9)	48 (13.3)	0.450	0.595 (0.195 - 1.820)
aPL profile								
LA, n (%)	35 (81.4)	161 (64.9)	0.035*	1.254 (1.058 - 1.486)				
aCL, n (%)	26 (60.5)	142 (57.3)	0.740	1.056 (0.811 - 1.376)				
aβ2GPI, n (%)	16 (37.2)	62 (25.0)	0.134	1.488 (0.955 - 2.321)				
aPS/PT, n (%)	23 (53.5)	90 (38.3)	0.041*	1.474 (1.066 - 2.038)				
aPL score	15.0 [7.5-34]	8.5 [2-21]	0.003*					
Medication								
Glucocorticoid, n (%)	28 (65.1)	129 (52.0)	0.136	1.252 (0.976 - 1.606)	22 (57.9)	119 (32.9)	0.004*	1.761 (1.294 - 2.398)
Antiplatelet therapy, n (%)	18 (41.9)	69 (27.8)	0.072	1.505 (0.992 - 2.256)	3 (7.9)	36 (9.9)	1.000	0.794 (0.257 - 2.456)
Anticoagulant therapy, n (%)	8 (18.6)	28 (11.3)	0.208	1.648 (0.805 - 3.372)	3 (7.9)	24 (6.6)	0.733	1.191 (0.376 - 3.771)

*p<0.05, using Fisher's exact test, independent t test, Mann-Whitney U test. RR, relative risk; CI, confidence interval.

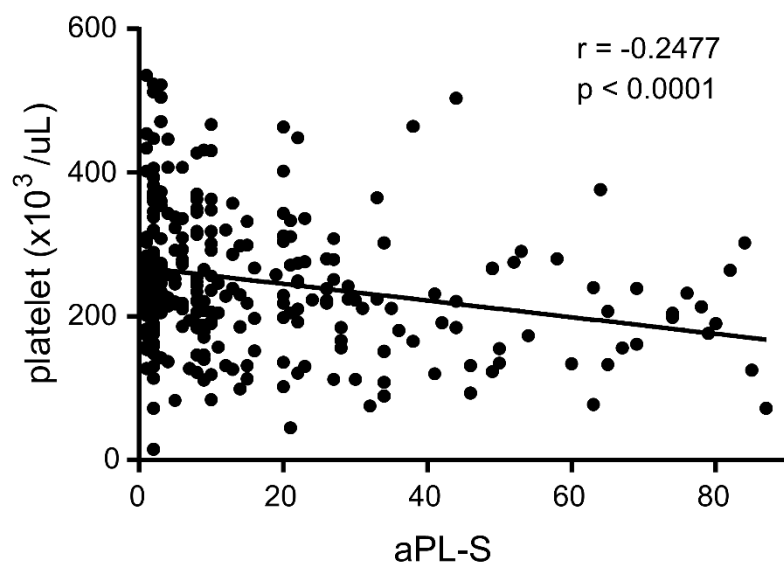


Figure 33. aPL 陽性患者における aPL-S と血小板数
aPL-S と血小板数に負の相関が見られた。(Spearman の順位相関係数)

5.3.2 aPL と血小板数による血栓症発症リスクの解析

次に、aPL 陽性、陰性患者群における血小板数と血栓症イベント発症との関連を縦断的に解析した。

aPL 測定日からフォローアップ最終日までに出現した血栓症イベントを対象とした。フォローアップ期間は中央値 128 ヶ月(四分位範囲 76-148 ヶ月)であり、691 例中 53 例で血栓症が出現した。32 例が動脈血栓症、21 例が静脈血栓症であった。

aPL 陽性患者において、血小板減少群は非血小板減少群と比較して有意に高頻度に血栓症を発症した(2.34 vs. 0.96 per 100 person-years, $p = 0.021$)。一方、aPL 陰性患者においては血小板減少群と非血小板減少群で血栓症発症の頻度に有意差を認めなかった(0.89 vs. 0.54 per 100 person-years, $p = 0.423$)。(Fig. 34A)

SLE 患者 238 例(34%)についてサブグループ解析を行い、SLE の有無に関わらず aPL 陽性血小板減少群では血栓症発症率が有意に増加していた。(Fig. 34B)

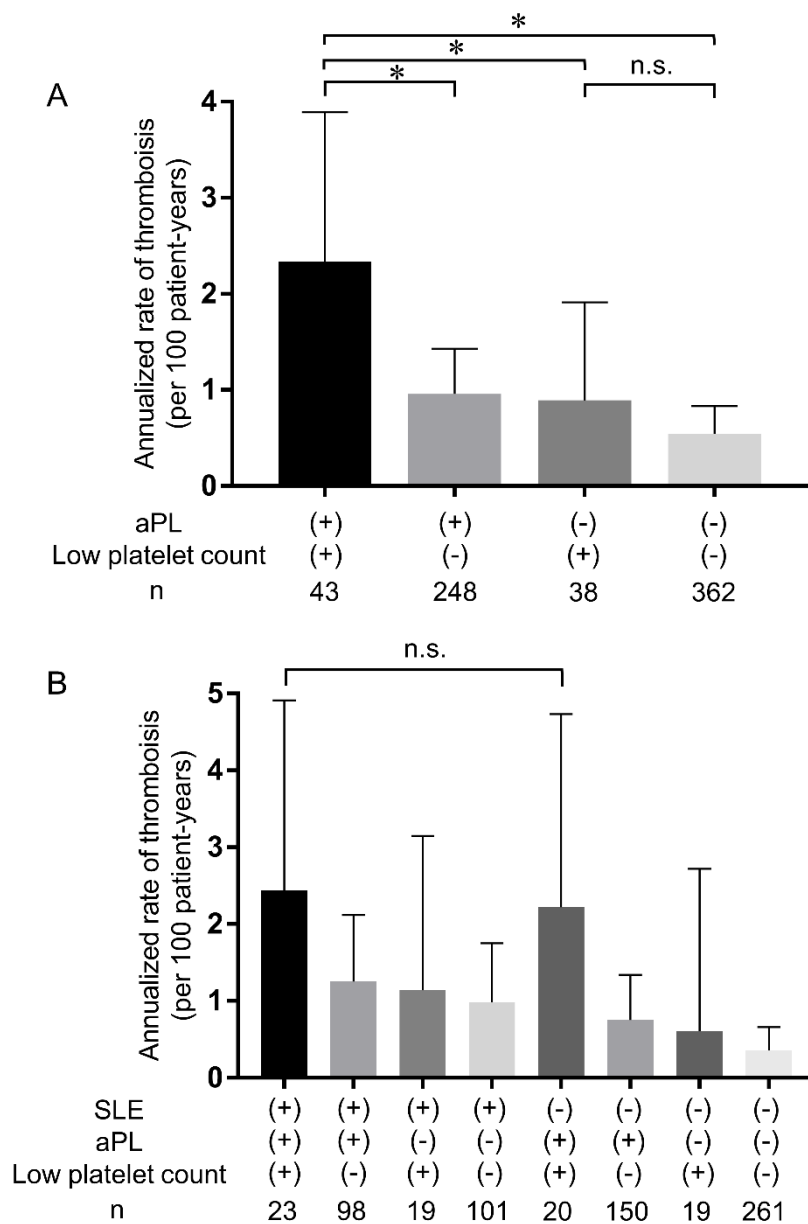


Figure 34. aPL、血小板減少、および SLE の有無で層別化した患者群における血栓症発症率(100 人年あたり)

aPL 陽性患者において、血小板減少群は非血小板減少群と比較して有意に高頻度に血栓症を発症したが、aPL 陰性患者においては両群に有意差を認めなかった。また SLE の有無に関わらず同様の傾向を認めた。(n.s., no statistical significance. * $p < 0.05$, Dunnett's test.)

5.3.3 aPL-S と血小板数による血栓症発症リスクの解析

各患者群における血栓症発症リスクについて、Kaplen-Meier 解析を行い、aPL-S による層別解析を行った。

Kaplen-Meier 解析においても、aPL 陽性患者では血小板減少群において非血小板減少群よりも有意に血栓症を引き起こし、aPL 陰性患者では血小板数に関わらず血栓症の頻度に差がなかった。(Fig. 35A, B)

次に、aPL 陽性患者における血小板減少と血栓症発症リスクについて更に検討するため、aPL を low aPL-S ($0 < \text{aPL-S} < 30$) と high aPL-S ($\text{aPL-S} \geq 30$) の 2 群に層別化し、血小板数と血栓症発症について解析した。

low aPL-S 患者群(242 例)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増加していた。一方、high aPL-S 患者群(48 例)において、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。(Fig. 35C, D)

これらの結果は血小板数と 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が層別化できる可能性を示唆している。

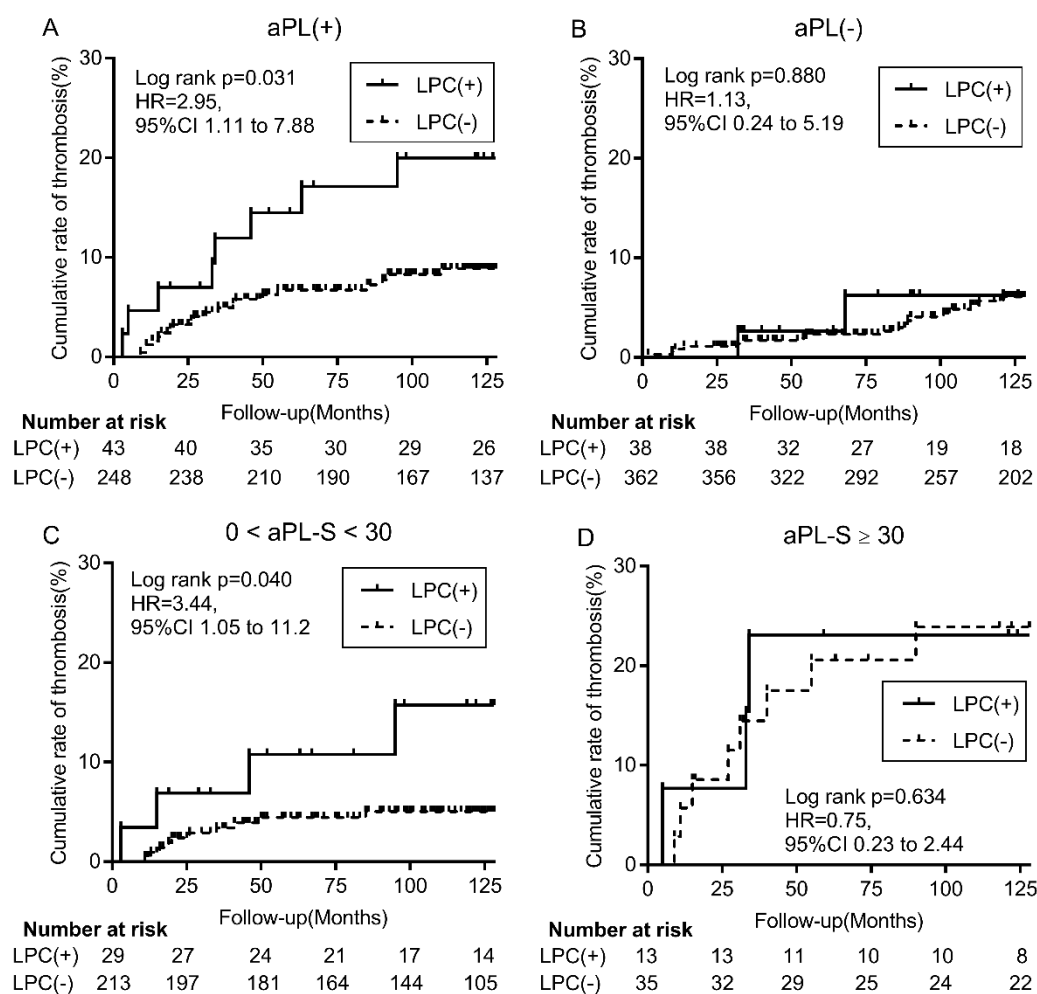


Figure 35. 血小板減少の有無により分類した各患者群における累積血栓症発症率 (A) aPL 陽性患者 (B) aPL 陰性患者 (C) low aPL-S ($0 < \text{aPL-S} < 30$) 患者 (D) high aPL-S ($\text{aPL-S} \geq 30$) 患者

low aPL-S 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増加していた。一方、high aPL-S 患者群において、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。

(LPC, low platelet count; HR, hazard ratio; CI, confidence interval. Kaplan-Meier analysis)

5.4 考察

本研究は北海道大学病院内科 II で aPL を測定された患者を対象とし、血小板数と血栓症発症リスクに着目した単施設後ろ向き観察研究である。

これまでのコホート研究で APS 患者は他の膠原病患者と比べて血小板減少が高率に見られることが知られているが³²、その病態については明らかではない。ITP 患者において aPL の存在が血栓症発症リスクを増大させることは、前向きコホート研究³⁷やシステマティックレビュー⁴³で示されている。一方、我々の研究では aPL 陽性患者における血小板減少と血栓症発症についての関連について示した。

Krause らによる後ろ向き観察研究では APS 患者において血小板減少の有無に関わらず血栓症の頻度は変わらなかったと報告されているが⁴⁴、APS 患者のみの解析では妊娠合併症により APS と診断された患者を除く全ての患者が血栓症を発症しているため、血栓症発症頻度が極めて高く正確なリスクを反映していない可能性がある。一方、我々は non APS の患者も含めることで、血栓症発症リスクが解析可能であった。また aPL-S も解析に含めることで、high aPL-S 患者では血小板減少の有無に関わらず血栓症リスクが高いことを示した。

aPL 関連血小板減少症の発症メカニズムとして、血小板機能活性化による破壊亢進、血小板産生低下、脾臓における血小板貯蔵の増加、偽性血小板減少の 4 つが考えられている³⁵。これらのメカニズムのうち、aPL による血小板機能活性化と血小板膜蛋白(glycoproteins: GP)に対する自己抗体による血小板破壊が血栓症発症リスクに関連している可能性がある。aPL が血小板膜蛋白、特に GPIIb/IIIa の発現を亢進し⁴⁵、in vitro の研究では抗 β 2GPI 抗体と二量体 β 2GPI の複合体が血小板膜表面蛋白に結合し、血小板の活性化を引き起こすことが知られている⁴⁶。また aPL 陽性血小板減少患者では血小板 GPIb/IX と GPIIb/IIIa に対する自己抗体が高力価であった⁴⁷。実際、APS 患者において抗血小板療法により血小板数が増加する症例が見られた⁴⁸。抗血小板療法により血小板膜蛋白の発現が減少し、抗 β 2GPI 抗体・二量体 β 2GPI 複合体と血小板膜表面蛋白の結合が阻害された可能性が考えられる。

aPL 患者における血栓症の一次予防についてはエビデンスが乏しく⁴⁹、患者毎の血栓症リスクの層別化は現在大きな課題となっている。我々は以前 high aPL-S (aPL-S $\geq$ 30)が血栓症発症の独立したリスク因子であることを明らかにした³。一方、low aPL-S (0<aPL-S<30)は血栓症発症リスクではなく、aPL 陰性患者と同程度の血栓症発症率であった³。今回、血小板数と aPL-S を併せた解析により、low aPL-S 患者においても血小板減少を呈すると血栓症発症リスクが高まることを示し、個別の予防医療に繋がる可能性を示唆した。

研究の limitation としては、日本人のみの単施設での検討であること、aPL の測定や抗血栓療法の有無は主治医の判断によって選択されており、バイアスとなっている可能性があることが挙げられる。

本研究は aPL 陽性患者において血小板数により血栓症発症リスクを層別化した初めての研究である。血小板減少は膠原病患者において aPL、特に aPL-S と相

関があり、血小板減少または high aPL-S の存在が血栓症発症リスクとなることを示した。これらの発見は APS や aPL carrier、ITP 患者への治療に新たな知見を与えるとともに、APS の病態解明の一助となるだろう。

6. 第四章

SLE 患者における特発性大腿骨頭壊死発生と aPL の関連性の検討

6.1 背景

膠原病疾患において、副腎皮質ステロイド(以下ステロイド)は治療の中心となる薬剤である。しかし、頻度は比較的稀ではあるが、投与後に大腿骨頭が阻血性壊死に陥り、股関節機能が失われる難治性疾患である大腿骨頭壊死症を発症することがある。海外では **steroid-induced osteonecrosis** と呼ばれるが、ステロイドとの直接的な因果関係は完全に証明されていないことから、本邦では特発性大腿骨頭壊死(**idiopathic osteonecrosis of the femoral head: ION**)と呼ばれている。ステロイドと ION 発生の具体的な機序については不明な点が多いが、ステロイドにより惹起される凝固異常、脂質代謝異常、酸化ストレスが関与していると考えられている。

ION の診断には画像検査として股関節の X 線や核磁気共鳴画像(**magnetic resonance imaging: MRI**)が用いられるが、特に MRI は早期発見に優れており、T1 強調像で大腿骨頭に帯状低信号域(**band sign**)が見られることが特徴である。典型的な MRI 画像を Figure 36 に示す。また ION は投与 3-6 ヶ月以内に発生し、以降の新規発生例はほぼ見られない⁴⁴。

膠原病患者の中でも SLE は高頻度(約 4~40%)に ION をきたすことが知られている⁵⁰。SLE 患者における ION 発生の背景因子についてはこれまでいくつかの既報があるが、定見は得られていない。また aPL は、微小血栓の出現により ION 発生リスクを高めると推測されている⁵¹が、実際に ION のリスク因子であるかは論文によって見解が分かれている^{52,53}。また本邦において SLE-ION の背景因子について解析した論文は乏しい。

そこで今回、当院における SLE 患者の ION 発生の背景因子を検討するとともに、aPL および複数の aPL 測定を一元的に定量化した aPL-S と ION との関連について解析した。



Figure 36. ION の MRI 画像
MRI T1 強調像で右大腿骨頭に帯状低信号域を認める。

6.2 目的

SLE 患者の ION 発生リスク因子を検討し、aPL および aPL-S との関連を解析する。

6.3 対象と方法

6.3.1 研究デザイン

本研究は後ろ向き単施設縦断研究である。SLE 患者における ION 発生のリスク因子を解析し、特に aPL および aPL-S との関連を明らかにすることを目的とした。臨床検査値、画像所見、臨床経過などの患者データは医療記録を用いて収集した。

なお、本研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 016-0437）。

6.3.2 対象、および主要評価項目

2000 年 1 月～2016 年 12 月に北海道大学病院内科Ⅱ膠原病外来を受診し SLE と診断され、治療を開始した連続 150 例のうち、観察期間中に ION の精査・スクリーニング目的に股関節 MRI を撮像された 82 例を対象とした。

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(年齢、性別、病名、喫煙歴、生活習慣病の既往歴、血栓症の既往歴、抗血栓療法の使用歴)、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。

また SLE の診断は ACR1997 年改訂分類基準^{38,39}を用いて行った。

6.3.3 aPL および aPL-S の測定

5.2.3 と同様の方法で行った。

6.3.4 統計解析

連続変数は正規分布している場合は平均 $\pm$ 標準偏差 (SD)、正規分布していない場合は中央値 [IQR (四分位範囲)] で示し、カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示した。

統計解析は Fisher の正確検定、Mann-Whitney U 検定を用いて行い、p 値が 0.05 未満である場合に有意差ありと定義した。

また、ION 発生リスク因子解析のため、単変量解析にて有意であった項目 ($p < 0.05$) について多重ロジスティック解析を行い、オッズ比(odds ratio: OR) および 95%信頼区間(confidence interval: CI) を示した。

統計解析は GraphPad Prism 7 (Graphpad Software)を用いて行った。

6.4 結果

研究期間内に 150 例の SLE 患者が抽出され、うち 82 例で股関節 MRI 検査を施行された。82 例全例でステロイド治療が開始されており、そのうち ION(+) 群は 37 例であった。(Figure 37)

患者背景では、初診時年齢の中央値は ION(+) 群 27.0 歳、ION(-) 群 30.0 歳であり、ION(+) 群では ION(-) 群と比べて男性の比率が有意に多かった。肥満や喫煙、飲酒歴、既往歴(高血圧、脂質異常症、糖尿病)について両群間に有意差を認めなかった。(Table 8)

SLE に伴う臨床症状では、顔面紅斑が ION(+) 群で有意に多く、円板状皮疹、光線過敏、口腔内潰瘍、関節炎、漿膜炎、腎障害、神経障害、血算異常は両群間で有意差を認めなかった。これらの症状、検査所見から計算される SLE の疾患活動性指標である SLEDAI スコアの中央値は ION(+) 群 17.0、ION(-) 群 17.0 と有意差を認めなかった。また入院時の高トリグリセリド(triglyceride: TG)血症の頻度が ION(+) 群で有意に高かったが、低 HDL コレステロール血症や高 LDL コレステロール血症の頻度は両群間で有意差を認めなかった。(Table 8)

治療内容では、高用量のステロイド投与(>0.8 mg PSL/kg/day)が ION(+) 群で有意に高頻度だった。一方、メチルプレドニゾロンパルス療法の施行率や抗血小板薬、抗凝固薬、スタチンの使用率は両群で有意差を認めなかった。(Table 8)

aPL プロファイルでは、aPL 陽性、aPL-S 高値が ION(+) 群で有意に多く見られたが、各 aPL については両群間で有意差は見られなかった。(Table 9)

aPL-S は ION(+) 群が ION(-) 群と比べて有意に高値であり、特に高 aPL-S (≥ 30) 患者 12 名のうち、9 名 (75%) が ION を発生した。一方、低 aPL-S (< 30) 患者は 25 名中 13 名 (52%)、aPL 陰性患者では 45 例中 15 例 (33%) が ION を発症した。(Figure 38)

また、多変量解析では高用量のステロイド投与、高 TG 血症、aPL-S 高値が独立した因子として抽出された。(Table 10)

aPL-S、TG 値により層別した 4 群の解析では、aPL-S 高値と高 TG 血症のいずれか、または両方を満たす患者群において、いずれも満たさない患者群と比べて有意に ION 発生が高率であった。(Figure 39)

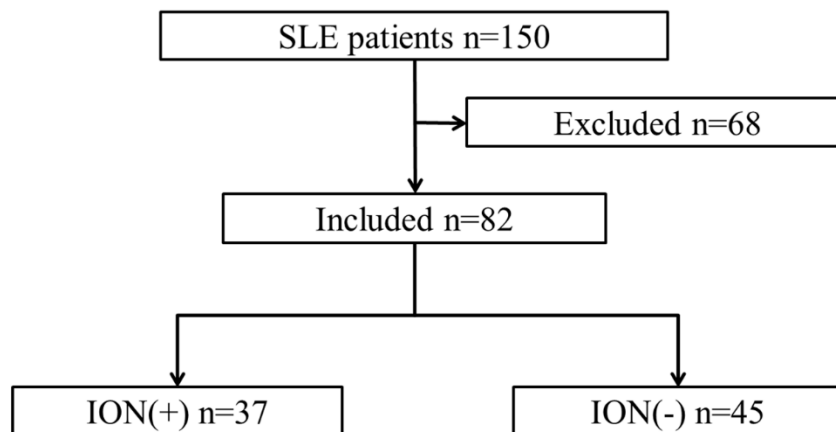


Figure 37. プロトコール

82 例で股関節 MRI 検査を施行され、ION 発生群は 37 例、ION 非発生群は 45 例であった。

Table 8. 患者背景

	ION (+) (n=37) n (%)	ION (-) (n=45) n (%)	p value
Age (years, Median, IQR)	27.0 [17.5 – 40.0]	30.0 [21.5 – 36.5]	0.473
Male	10 (27.0)	3 (6.7)	0.016*
Obesity (BMI >25)	10 (27.0)	8 (19.5)	0.423
Smoking	15 (40.5)	12 (26.7)	0.239
Heavy drinking	0 (0.0)	0 (0.0)	1.000
Clinical manifestation			
Malar rash	22 (63.6)	16 (33.3)	0.045*
Discoid rash	10 (27.0)	7 (15.6)	0.275
Photosensitivity	13 (35.1)	11 (24.4)	0.335
Oral ulcers	6 (16.2)	4 (8.9)	0.335
Arthritis	16 (43.2)	28 (62.2)	0.120
Serositis	7 (18.9)	8 (17.8)	1.000
Renal disorder	20 (54.1)	23 (51.1)	0.827
Neurologic disorder	10 (27.0)	8 (17.8)	0.423
Hematologic disorder	30 (81.1)	38 (84.4)	0.772
SLEDAI score (Median, IQR)	17 [11.0 – 21.5]	17.0 [10.0 – 23.0]	0.661
Low HDL cholesterol	18 (48.7)	14 (31.1)	0.118
High LDL cholesterol	5 (13.5)	6 (13.3)	1.000
Hypertriglyceridemia	23 (62.2)	12 (26.7)	0.002*
High dose corticosteroid (> 0.8mg PSL/kg/day)	34 (91.9)	21 (46.7)	<0.001*
mPSL pulse	21 (56.8)	18 (40.0)	0.131
Intravenous cyclophosphamide	17 (46.0)	11 (24.4)	0.061
antiplatelet therapy	16 (43.2)	12 (26.7)	0.161
anticoagulation therapy	6 (16.2)	5 (11.1)	0.532
statin	14 (37.8)	13 (28.9)	0.481

*p<0.05, using Fisher's exact test, Mann–Whitney U test

Heavy drinking, more than 168g alcohol/week; Low HDL cholesterol, fasting HDL cholesterol levels <40 mg/dL; High LDL cholesterol, fasting LDL cholesterol levels >140 mg/dL; Hypertriglyceridemia, fasting triglyceride levels >150 mg/dL; BMI, body mass index; SLEDAI, systemic lupus erythematosus disease activity; PSL, prednisolone; mPSL, methylprednisolone; IQR, interquartile range.

Table 9. aPL プロファイル

	ION (+) (n=37) n (%)	ION (-) (n=45) n (%)	p value
Any aPL	22 (59.5)	15 (33.3)	0.026*
LA	13 (35.1)	9 (20.0)	0.141
IgG aCL	11 (29.7)	6 (13.3)	0.100
IgM aCL	7 (18.9)	7 (15.6)	0.772
IgG a β_2 GPI	7 (18.9)	5 (11.1)	0.361
IgM a β_2 GPI	7 (18.9)	4 (8.9)	0.210
IgG aPS/PT	10 (27.0)	7 (15.6)	0.275
IgM aPS/PT	7 (18.9)	4 (8.9)	0.210
aPL score ≥ 30	9 (24.3)	3 (6.7)	0.031*

*p<0.05, using Fisher's exact test

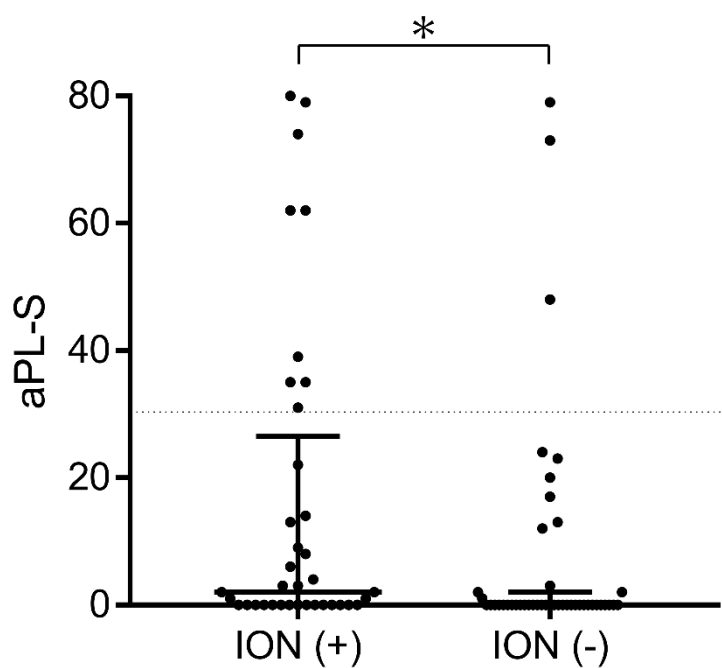


Figure 38. ION(+)群、ION(-)群の aPL-S
 ION(+)群では ION(-)群と比べて aPL-S が有意に高値であった。
 (* $p < 0.05$, Mann–Whitney U test)

Table 10. 多变量解析

	Odds ratio (95% CI)	p value
High dose corticosteroid	16.11 (4.01 – 92.54)	<0.001*
Hypertriglyceridemia	5.66 (1.79 – 20.73)	0.003*
aPL score ≥ 30	5.27 (1.08 – 34.52)	0.040*
Male	4.56 (0.92 – 28.59)	0.064
Malar rash	3.03 (0.95 – 10.67)	0.060

*p<0.05, using Logistic regression analysis

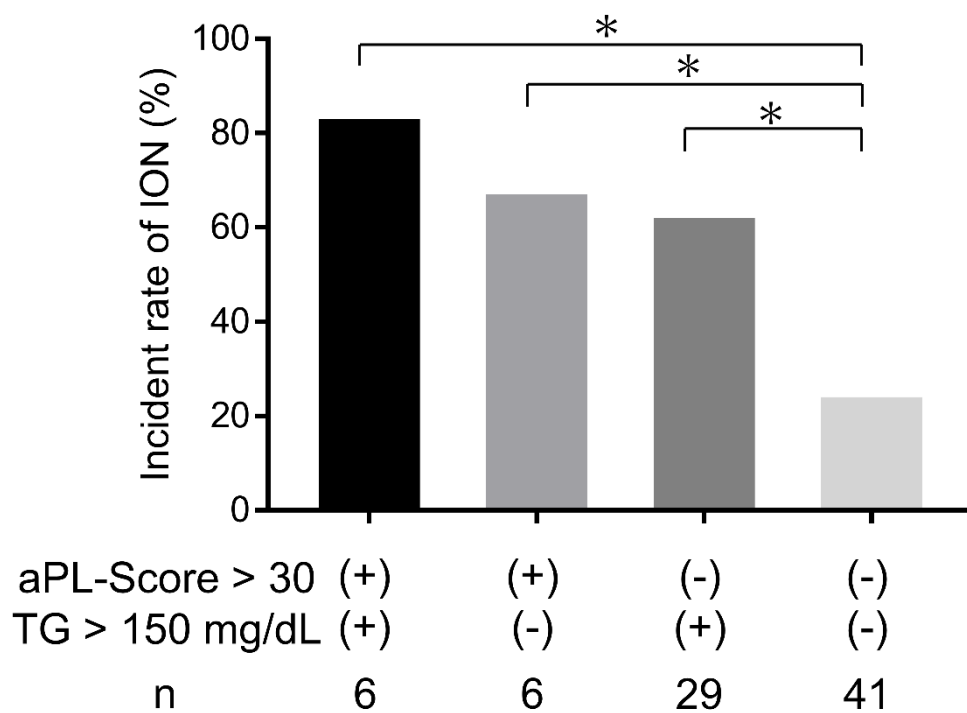


Figure 39. aPL-S、TG 値により層別した 4 群での ION 発生率
aPL-S 高値と高 TG 血症のいずれか、または両方を満たす患者群において、
いずれも満たさない患者群と比べて有意に ION 発生が高率であった。
(*p<0.05, Fisher's exact test test)

6.5 考察

本研究の結果、当院の SLE 患者の単変量解析において、ION 発生群では、男性、蝶形紅斑、高 TG 血症、高用量のステロイド投与(>0.8 mg PSL/kg/day)、aPL 陽性および aPL-S 高値(≥ 30)を高率に認めた。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。更に、aPL score 高値かつ高 TG 血症の患者では非常に高い頻度で ION を発症していることが示された。

SLE 患者における ION 発生の背景因子についてはこれまで様々な報告があり、Mont らは静脈血栓症や血管炎の臨床症状、aPL 陽性、ステロイド最大投与量および cytotoxic drug の使用が ION 発生群で有意に多かったと報告し⁵⁴、Sayarlioglu らは若年および男性、口腔内潰瘍、漿膜炎、ステロイド最大投与量を背景因子として挙げた⁵²。また多変量解析でステロイド投与量は独立した因子であった⁵⁵。SLE-ION のリスク因子について解析した唯一のメタアナリシスでは、16 の論文を対象とし、関節炎、クッシング症状、消化器症状、高血圧症、口腔内潰瘍、胸膜炎、腎障害、血管炎、cytotoxic drug、ステロイド治療がリスク因子となりうると指摘された。しかし対象論文数が十分ではなく、論文によっては control 群における ION の除外に画像所見を用いていないことなどから、正確なリスク因子の解析には更なる検討が必要と結論付けられた⁵⁶。

今回我々は aPL-S 高値を SLE-ION の新たなリスク因子として抽出した。血栓塞栓症のリスク因子である aPL の存在が SLE-ION のリスク因子であるかは、これまで論文によって異なる結果が得られている。実際本研究でも aPL-S 高値では非常に高リスクである一方、aPL-S 低値ではリスクが高まらない傾向が見られている。これまでの報告では aPL の数や titer について注目したものは無いことから、aPL score 高値の患者を多く含んだ患者群を解析した論文では aPL がリスク因子となり、少ない患者群の解析ではリスク因子として抽出されなかった可能性が考えられる。

また、高 TG 血症が SLE-ION のリスクであることは既に指摘されているが⁵⁷、aPL-S と併せて評価することで更に高いリスクとなりうることを示された。これらの結果は SLE-ION の病態において微小血栓・塞栓による大腿骨頭の虚血が関与している可能性を示唆している。

現時点で SLE-ION の有効な予防方法は定まっていないが、早期発見により免荷や圧壊前の骨切り術などの対応を行うことにより予後を改善できる可能性があり、高リスク患者をあらかじめ把握することは非常に重要である。

本研究では新たに aPL-S 高値が SLE-ION のリスク因子となりうることを示した。多施設での前向き研究や、ION の予防法の開発も含め、今後の更なる検討が待たれる。

7. 総括及び結論

抗リン脂質抗体症候群の病態解明のため、基礎研究として末梢血リンパ球サブセット解析および抗体産生サブセットの同定について研究を行った。また臨床研究として、aPL 陽性血小板減少症における血栓症発症リスクおよび SLE-ION 患者における aPL のリスク解析を行い、aPL の存在が病態に及ぼす影響について検討した。

第一章のサブセット解析の結果、PAPS、SLE/APS 患者いずれにおいても、Th2 cells、Th17 cells の増加、Treg cells の減少、Memory B cells の減少、Plasmablasts の増加、Breg cells の減少が見られた。これらの結果は APS が SLE の類似の病態であることを支持するものであった。更に TLR7 の SNP が Memory B cells の減少や Plasmablast の増加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 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同定の結果、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 Plasmablasts 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効果が見られないことと矛盾せず、興味深い結果であった。

第三章では aPL 陽性血小板減少患者における血栓症発症リスクを解析し、同患者群では aPL-S が高く、有意に血栓症をきたしうることを示した。更に aPL-S と血小板減少の有無で層別解析を行い、low aPL-S 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増加していた。一方、high aPL-S 患者群において、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。これらの結果は血小板数と 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が層別化できる可能性を示唆している。

第四章では SLE-ION のリスク解析を行い、aPL score 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研究が待たれる。

本研究では、二つの臨床研究を通じて aPL の高力価が実臨床において様々な病態と関連することを明らかとし、aPL の抗体価を下げる治療の必要性が示された。そして基礎研究の結果から、Plasmablasts を含む CD20 陰性 B 細胞を抑制する治療が aPL 産生を減少させる可能性が示唆された。多発性骨髄腫に対して保険適応となった anti-CD38 monoclonal antibody や SLE に対して治験が行われている anti-Interferon α receptor monoclonal antibody など、様々な自己免疫疾患や悪性腫瘍において治療薬の候補として期待される各種薬剤が CD20 陰性 B 細胞や aPL 産生に及ぼす影響について研究を進めていく。

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の解明がなされ、根本的な治療方法の開発につながることに期待したい。

8. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室教授 渥美達也先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

本教室膠原病グループ助教 加藤 将先生には本研究の遂行にあたり、終始、御指導、適切な御助言を頂きました。ここに心より深く感謝の意を表します。

第二章の SNP 測定に関しては、本教室膠原病グループ非常勤講師 堀田哲也先生、以前本教室膠原病グループに在籍し、現在は北海道大学遺伝子病制御研究所に所属している中川久子先生に本研究の御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。また、第二章の末梢血リンパ球サブセット解析、第三章の aPL 産生細胞サブセットの同定において、大学院を修了された神田真聡先生に検討から解析まで多大な御協力、御指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

本教室膠原病グループ准教授 保田晋助先生、助教 Olga Amengual 先生、坊垣暁之先生、奥健志先生、藤枝雄一郎先生、大学院生の嶋村抄苗先生、野口淳史先生、菅原恵理先生、中村浩之先生、河野通大先生、柴田悠平先生、谷村瞬先生、阿部靖矢先生、狩野皓平先生、下山修平先生、Lee Wenshi 先生、曾若櫻さん、工藤友喜さん、大学院を修了された河野通仁先生、栗田崇史先生、渡邊俊之先生、志田玄貴先生、清水裕香先生、中川育磨先生、大村一将先生には研究遂行にあたり日頃より有益な御討論、御助言を頂き、心より深く感謝を申し上げます。

また、本教室実験助手の下道真由美さん、金子由美子さん、櫻井美和さん、山田あや香さんの御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。心より感謝を申し上げます。この他にも、この論文作成にあたり、御協力、御助言、御支援をいただきました多くの諸先輩方、同僚、後輩、スタッフの皆様に対しまして、心より感謝を申し上げます。また、いつも暖かく見守り励ましてくれた家族に心から感謝致します。

9. 引用文献

- 1 Miyakis, S., Lockshin, M., Atsumi, T., Branch, D., Brey, R., Cervera, R., Derksen, R., De Groot, P., Koike, T. & Meroni, P. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **4**, 295-306 (2006).
- 2 Pierangeli, S. S. & Erkan, D. Antiphospholipid syndrome treatment beyond anticoagulation: are we there yet? *Lupus* **19**, 475-485.
- 3 Otomo, K., Atsumi, T., Amengual, O., Fujieda, Y., Kato, M., Oku, K., Horita, T., Yasuda, S. & Koike, T. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum* **64**, 504-512 (2012).
- 4 Maecker, H. T., McCoy, J. P. & Nussenblatt, R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* **12**, 191-200 (2012).
- 5 Finak, G., Langweiler, M., Jaimes, M., Malek, M., Taghiyar, J., Korin, Y., Raddassi, K., Devine, L., Obermoser, G., Pekalski, M. L., Pontikos, N., Diaz, A., Heck, S., Villanova, F., Terrazzini, N., Kern, F., Qian, Y., Stanton, R., Wang, K., Brandes, A., Ramey, J., Aghaeepour, N., Mosmann, T., Scheuermann, R. H., Reed, E., Palucka, K., Pascual, V., Blomberg, B. B., Nestle, F., Nussenblatt, R. B., Brinkman, R. R., Gottardo, R., Maecker, H. & McCoy, J. P. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Sci Rep* **6**, 20686 (2016).

- 6 Kubo, S., Nakayamada, S., Yoshikawa, M., Miyazaki, Y., Sakata, K., Nakano, K., Hanami, K., Iwata, S., Miyagawa, I., Saito, K. & Tanaka, Y. Peripheral Immunophenotyping Identifies Three Subgroups Based on T Cell Heterogeneity in Lupus Patients. *Arthritis Rheumatol* **69**, 2029-2037 (2017).
- 7 Simpson, N., Gatenby, P. A., Wilson, A., Malik, S., Fulcher, D. A., Tangye, S. G., Manku, H., Vyse, T. J., Roncador, G., Huttley, G. A., Goodnow, C. C., Vinuesa, C. G. & Cook, M. C. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **62**, 234-244 (2010).
- 8 Fedele, A. L., Tolusso, B., Gremese, E., Bosello, S. L., Carbonella, A., Canestri, S. & Ferraccioli, G. Memory B cell subsets and plasmablasts are lower in early than in long-standing rheumatoid arthritis. *BMC Immunol* **15**, 28 (2014).
- 9 Dal Ben, E. R., do Prado, C. H., Baptista, T. S., Bauer, M. E. & Staub, H. L. Decreased levels of circulating CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in patients with primary antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol* **33**, 876-879 (2013).
- 10 Roederer, M., Quaye, L., Mangino, M., Beddall, M. H., Mahnke, Y., Chattopadhyay, P., Tosi, I., Napolitano, L., Terranova Barberio, M., Menni, C., Villanova, F., Di Meglio, P., Spector, T. D. & Nestle, F. O. The genetic architecture of the human immune system: a bioresource for autoimmunity and disease pathogenesis. *Cell* **161**, 387-403 (2015).
- 11 Heinemann, K., Wilde, B., Hoerning, A., Tebbe, B., Kribben, A., Witzke, O. & Dolff, S. Decreased IL-10(+) regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scand J Rheumatol* **45**, 312-316 (2016).

- 12 Feng, X., Wu, H., Grossman, J. M., Hanvivadhanakul, P., FitzGerald, J. D., Park, G. S., Dong, X., Chen, W., Kim, M. H., Weng, H. H., Furst, D. E., Gorn, A., McMahon, M., Taylor, M., Brahn, E., Hahn, B. H. & Tsao, B. P. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **54**, 2951-2962 (2006).
- 13 Shen, N., Fu, Q., Deng, Y., Qian, X., Zhao, J., Kaufman, K. M., Wu, Y. L., Yu, C. Y., Tang, Y., Chen, J. Y., Yang, W., Wong, M., Kawasaki, A., Tsuchiya, N., Sumida, T., Kawaguchi, Y., Howe, H. S., Mok, M. Y., Bang, S. Y., Liu, F. L., Chang, D. M., Takasaki, Y., Hashimoto, H., Harley, J. B., Guthridge, J. M., Grossman, J. M., Cantor, R. M., Song, Y. W., Bae, S. C., Chen, S., Hahn, B. H., Lau, Y. L. & Tsao, B. P. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15838-15843 (2010).
- 14 Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G. R., Lipsky, P. E., Radbruch, A. & Dorner, T. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **165**, 5970-5979 (2000).
- 15 Rodriguez-Bayona, B., Ramos-Amaya, A., Perez-Venegas, J. J., Rodriguez, C. & Brieva, J. A. Decreased frequency and activated phenotype of blood CD27 IgD IgM B lymphocytes is a permanent abnormality in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther* **12**, R108 (2010).
- 16 Talaat, R. M., Mohamed, S. F., Bassyouni, I. H. & Raouf, A. A. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE)

- patients: Correlation with disease activity. *Cytokine* **72**, 146-153 (2015).
- 17 Ohl, K. & Tenbrock, K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol* **45**, 344-355 (2015).
 - 18 Matsuki, F., Saegusa, J., Miyamoto, Y., Misaki, K., Kumagai, S. & Morinobu, A. CD45RA-Foxp3(high) activated/effector regulatory T cells in the CCR7 + CD45RA-CD27 + CD28+central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* **438**, 778-783 (2013).
 - 19 Dal Ben, E. R., do Prado, C. H., Baptista, T. S., Bauer, M. E. & Staub, H. L. Patients with systemic lupus erythematosus and secondary antiphospholipid syndrome have decreased numbers of circulating CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg and CD3(-)CD19(+) B cells. *Rev Bras Reumatol* **54**, 241-246 (2014).
 - 20 Menon, M., Blair, P. A., Isenberg, D. A. & Mauri, C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* **44**, 683-697 (2016).
 - 21 Knippenberg, S., Peelen, E., Smolders, J., Thewissen, M., Menheere, P., Cohen Tervaert, J. W., Hupperts, R. & Damoiseaux, J. Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naive/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol* **239**, 80-86 (2011).
 - 22 Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Takehara, K. & Fujimoto, M. Decreased levels of regulatory B cells in patients with systemic sclerosis: association with autoantibody production and disease activity. *Rheumatology (Oxford)* **55**, 263-267 (2016).

- 23 Simchoni, N. & Cunningham-Rundles, C. TLR7- and TLR9-responsive human B cells share phenotypic and genetic characteristics. *J Immunol* **194**, 3035-3044 (2015).
- 24 Erkan, D., Vega, J., Ramon, G., Kozora, E. & Lockshin, M. D. A pilot open-label phase II trial of rituximab for non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* **65**, 464-471 (2013).
- 25 Chihara, N., Aranami, T., Sato, W., Miyazaki, Y., Miyake, S., Okamoto, T., Ogawa, M., Toda, T. & Yamamura, T. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3701-3706 (2011).
- 26 Araki, M., Matsuoka, T., Miyamoto, K., Kusunoki, S., Okamoto, T., Murata, M., Miyake, S., Aranami, T. & Yamamura, T. Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neuromyelitis optica: a pilot study. *Neurology* **82**, 1302-1306 (2014).
- 27 Harris, E. N., Gharavi, A. E., Patel, S. P. & Hughes, G. R. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* **68**, 215-222 (1987).
- 28 Tanimura, K., Jin, H., Suenaga, T., Morikami, S., Arase, N., Kishida, K., Hirayasu, K., Kohyama, M., Ebina, Y., Yasuda, S., Horita, T., Takasugi, K., Ohmura, K., Yamamoto, K., Katayama, I., Sasazuki, T., Lanier, L. L., Atsumi, T., Yamada, H. & Arase, H. beta2-Glycoprotein I/HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood* **125**, 2835-2844 (2015).
- 29 Khamashta, M. A., Cuadrado, M. J., Mujic, F., Taub, N. A., Hunt, B. J. & Hughes, G. R. The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody

- syndrome. *N Engl J Med* **332**, 993-997 (1995).
- 30 Kerkman, P. F., Rombouts, Y., van der Voort, E. I., Trouw, L. A., Huizinga, T. W., Toes, R. E. & Scherer, H. U. Circulating plasmablasts/plasmacells as a source of anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **72**, 1259-1263 (2013).
 - 31 Abreu, M. M., Danowski, A., Wahl, D. G., Amigo, M. C., Tektonidou, M., Pacheco, M. S., Fleming, N., Domingues, V., Sciascia, S., Lyra, J. O., Petri, M., Khamashta, M. & Levy, R. A. The relevance of "non-criteria" clinical manifestations of antiphospholipid syndrome: 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Technical Task Force Report on Antiphospholipid Syndrome Clinical Features. *Autoimmun Rev* **14**, 401-414 (2015).
 - 32 Cervera, R., Tektonidou, M. G., Espinosa, G., Cabral, A. R., Gonzalez, E. B., Erkan, D., Vadya, S., Adrogue, H. E., Solomon, M., Zandman-Goddard, G. & Shoenfeld, Y. Task Force on Catastrophic Antiphospholipid Syndrome (APS) and Non-criteria APS Manifestations (II): thrombocytopenia and skin manifestations. *Lupus* **20**, 174-181 (2011).
 - 33 Cervera, R., Serrano, R., Pons-Estel, G. J., Ceberio-Hualde, L., Shoenfeld, Y., de Ramon, E., Buonaiuto, V., Jacobsen, S., Zeher, M. M., Tarr, T., Tincani, A., Taglietti, M., Theodossiades, G., Nomikou, E., Galeazzi, M., Bellisai, F., Meroni, P. L., Derksen, R. H., de Groot, P. G., Baleva, M., Mosca, M., Bombardieri, S., Houssiau, F., Gris, J. C., Quere, I., Hachulla, E., Vasconcelos, C., Fernandez-Nebro, A., Haro, M., Amoura, Z., Miyara, M., Tektonidou, M., Espinosa, G., Bertolaccini, M. L., Khamashta, M. A. & Euro-Phospholipid Project, G. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a

- 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Ann Rheum Dis* **74**, 1011-1018 (2015).
- 34 Amengual, O., Atsumi, T., Oku, K., Suzuki, E., Horita, T., Yasuda, S. & Koike, T. Phospholipid scramblase 1 expression is enhanced in patients with antiphospholipid syndrome. *Mod Rheumatol* **23**, 81-88 (2013).
- 35 Artim-Esen, B., Diz-Kucukkaya, R. & Inanc, M. The significance and management of thrombocytopenia in antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* **17**, 14 (2015).
- 36 Cuadrado, M. J., Mujic, F., Munoz, E., Khamashta, M. A. & Hughes, G. R. Thrombocytopenia in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* **56**, 194-196 (1997).
- 37 Diz-Kucukkaya, R., Hacıhanefioglu, A., Yenerel, M., Turgut, M., Keskin, H., Nalcaci, M. & Inanc, M. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in patients presenting with immune thrombocytopenic purpura: a prospective cohort study. *Blood* **98**, 1760-1764 (2001).
- 38 Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N. & Winchester, R. J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **25**, 1271-1277 (1982).
- 39 Hochberg, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **40**, 1725 (1997).
- 40 Pengo, V., Tripodi, A., Reber, G., Rand, J. H., Ortel, T. L., Galli, M., De Groot, P. G., Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the,

- S., Standardisation Committee of the International Society on, T. & Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* **7**, 1737-1740 (2009).
- 41 Amengual, O., Atsumi, T., Khamashta, M. A., Koike, T. & Hughes, G. R. Specificity of ELISA for antibody to beta 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* **35**, 1239-1243 (1996).
- 42 Atsumi, T., Ieko, M., Bertolaccini, M. L., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Matsuura, E. & Koike, T. Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the presence of lupus anticoagulant. *Arthritis Rheum* **43**, 1982-1993 (2000).
- 43 Moulis, G., Audemard-Verger, A., Arnaud, L., Luxembourger, C., Montastruc, F., Gaman, A. M., Svenungsson, E., Ruggeri, M., Mahevas, M., Gerfaud-Valentin, M., Brainsky, A., Michel, M., Godeau, B., Lapeyre-Mestre, M. & Sailler, L. Risk of thrombosis in patients with primary immune thrombocytopenia and antiphospholipid antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* **15**, 203-209 (2016).
- 44 Krause, I., Blank, M., Fraser, A., Lorber, M., Stojanovich, L., Rovinsky, J. & Shoenfeld, Y. The association of thrombocytopenia with systemic manifestations in the antiphospholipid syndrome. *Immunobiology* **210**, 749-754 (2005).
- 45 Espinola, R. G., Pierangeli, S. S., Gharavi, A. E. & Harris, E. N. Hydroxychloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* **87**, 518-522 (2002).

- 46 Shi, T., Giannakopoulos, B., Yan, X., Yu, P., Berndt, M. C., Andrews, R. K., Rivera, J., Iverson, G. M., Cockerill, K. A., Linnik, M. D. & Krilis, S. A. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies in complex with beta2-glycoprotein I can activate platelets in a dysregulated manner via glycoprotein Ib-IX-V. *Arthritis Rheum* **54**, 2558-2567 (2006).
- 47 Galli, M., Daldossi, M. & Barbui, T. Anti-glycoprotein Ib/IX and IIb/IIIa antibodies in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* **71**, 571-575 (1994).
- 48 Alliot, C., Messouak, D., Albert, F. & Barrios, M. Correction of thrombocytopenia with aspirin in the primary antiphospholipid syndrome. *Am J Hematol* **68**, 215 (2001).
- 49 Gomez-Puerta, J. A. & Cervera, R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* **48-49**, 20-25 (2014).
- 50 Nagasawa, K., Tada, Y., Koarada, S., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Murai, K., Ueda, A., Yoshizawa, S. & Ohta, A. Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: prospective study by MRI. *Lupus* **14**, 385-390 (2005).
- 51 Haque, W., Kadikoy, H., Pacha, O., Maliakkal, J., Hoang, V. & Abdellatif, A. Osteonecrosis secondary to antiphospholipid syndrome: a case report, review of the literature, and treatment strategy. *Rheumatol Int* **30**, 719-723 (2010).
- 52 Sayarlioglu, M., Yuzbasioglu, N., Inanc, M., Kamali, S., Cefle, A., Karaman, O., Onat, A. M., Avan, R., Cetin, G. Y., Gul, A., Ocal, L. & Aral, O. Risk factors for avascular bone necrosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* **32**, 177-182 (2012).

- 53 Mok, C. C., Lau, C. S. & Wong, R. W. Risk factors for avascular bone necrosis in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* **37**, 895-900 (1998).
- 54 Mont, M. A., Glueck, C. J., Pacheco, I. H., Wang, P., Hungerford, D. S. & Petri, M. Risk factors for osteonecrosis in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology* **24**, 654-662 (1997).
- 55 Calvo-Alen, J., McGwin, G., Toloza, S., Fernandez, M., Roseman, J. M., Bastian, H. M., Cepeda, E. J., Gonzalez, E. B., Baethge, B. A., Fessler, B. J., Vila, L. M., Reveille, J. D., Alarcon, G. S. & Group, L. S. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA): XXIV. Cytotoxic treatment is an additional risk factor for the development of symptomatic osteonecrosis in lupus patients: results of a nested matched case-control study. *Ann Rheum Dis* **65**, 785-790 (2006).
- 56 Zhu, K. K., Xu, W. D., Pan, H. F., Zhang, M., Ni, J., Ge, F. Y. & Ye, D. Q. The risk factors of avascular necrosis in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Inflammation* **37**, 1852-1864 (2014).
- 57 Kuroda, T., Tanabe, N., Wakamatsu, A., Takai, C., Sato, H., Nakatsue, T., Wada, Y., Nakano, M. & Narita, I. High triglyceride is a risk factor for silent osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* **34**, 2071-2077 (2015).