HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗リン脂質抗体症候群の血栓病態解明の研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	大西, 直樹
Description	配架番号：2509
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14046号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77871
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoki_Onishi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　大西 直樹

学 位 論 文 題 名

抗リン脂質抗体症候群の血栓病態解明の研究

(Thrombotic pathology of Antiphospholipid syndrome)

【背景と目的】

抗リン脂質抗体症候群(APS)は、血中の抗リン脂質抗体(aPL)が関連する自己免疫性血栓症および妊娠合併症をきたす自己免疫性疾患である。APS の血栓形成の機序として、aPL の存在下で向血栓細胞(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 2nd hit theory が想定されている。APS の病態解明は未だ不十分であり、血栓症の治療は二次予防が主体であるが、動静脈血栓を分けて血栓再発二次予防戦略を選択することの重要性が示唆されている。抗血小板薬二剤併用療法(DAPT)は、再発性の心筋梗塞や脳卒中の二次予防法であるが、APS 患者における DAPT の血栓再発予防効果は明らかではない。第一章では、APS の動脈血栓再発二次予防に一定の見解が得られていないことから、後ろ向きに動脈血栓症の既往を有する APS 患者における DAPT の血栓症二次予防効果および安全性を検証した。ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)は APS 分類基準に使用されていない aPL ではあるが、APS の臨床症状と強く相関している。aPS/PT は血栓症発症リスクである知見から、aPL の profile を用いて APS の血栓リスクの層別化をする aPL-Score や GAPSS に含まれている。第二章では、APS の血栓病態の解明が、APS の根本的な治療方法開発につながることに期待し、aPS/PT の血栓形成機序に焦点を当てた研究を行なった。

【方法と結果】

第一章：1990 年から 2016 年に当科で APS とした 206 例のうち、2 年以上観察可能で、かつ動脈血栓症を発症した 90 例を対象とした。患者は治療によって 4 群(Wf 単独群：Wf 群、 抗血小板単剤群:AP 群、Wf+抗血小板群:Wf+AP 群、抗血小板二剤併用療法群:DAPT 群)に分けた。動脈血栓症発症から血栓症再燃までを観察期間とし、血栓症の再燃の有無、有害事象(重篤な出血合併症, 死亡)の有無について後ろ向きに解析した。90 例中 73 例(81%)が女性であり、診断時年齢中央値は 45 歳 [31 - 53 歳]であった。観察期間中央値 8 年[5 - 13 年]で、Wf 群(13 例)、AP 群(41 例)、Wf＋AP 群(21 例)、DAPT 群(15 例)の 4 群に分けられた。観察期間内の血栓症の再発は 40 例(再発率 4.96/100 人年)、動脈血栓症 35 例、静脈血栓症 5 例であった。動脈血栓症再発は脳梗塞(29 例, 32.2%)が最も多く、静脈血栓症再発は深部静脈血栓症(3 例, 3.3%)が最も多かった。Kaplan-Meier 法で求められる event free survival において、全体の 10 年無血栓再発率は 62%であり、Wf 群は他の治療群と比較し再発が多いことが示された(Log-rank P=0.0027)。それぞれの治療群における血栓の再発率は、Wf 群 11.58/100 人年、AP 群 5.47/100 人年、Wf+AP 群 3.72/100 人年、DAPT 群

1.81/100 人年であった。動脈血栓症既往を有する APS 患者の血栓症再発の独立した因子を同定する目的で COX 回帰分析を行い、Wf 単剤加療が独立した血栓再発リスク因子であることが示された。重篤な出血合併症や死亡は 20 例(3.58/100 人年)、重篤な出血合併症が 9 例、死亡が 14 例(重篤な出血 3 例を含む)であった。それぞれの発症率は、Wf 群: 0.59/100 人年、AP 群 2.14/100 人年、Wf+AP 群 2.21/100 人年、DAPT 群 2.89/100 人年であった。4 群間において、重篤な出血合併症や死亡に有意な差は認めなかった。

第二章：近年、β2 グリコプロテイン I(β2GPI)が蛋白そのままの形で主要組織適合遺伝子複合体クラス II(MHC class II)とともに細胞表面に表出することが報告され、抗β2GPI 抗体がβ2GPI/ MHC class II 複合体に結合する事で補体依存性の細胞障害を惹起する可能性が示された。MHC class II を発現する抗原提示細胞であり、かつ向血栓細胞である単球が合成したプロトロンビン(PT)蛋白を、PT/MHC class II 複合体として抗原提示し、その複合体を aPS/PT が認識することで、血栓発症の病態に関わるのではないかと仮説を立て、下記実験を行なった。実験 1 は PT と MHC class II を強制発現した HEK293T 細胞を用いて、PT/ MHC class II 複合体が細胞表面に輸送されるかをフローサイトメリー(FCM)で確認した。抗 PT 抗体と aPS/PT を用いて、PT/ MHC class II 複合体が HEK293T 細胞の細胞表面に表出することを確認した。また強制発現した HLA アリルの違いで抗体結合親和性が異なる事を確認した。実験 2 は Phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)で刺激した THP-1 細胞を用いて、単球に PT 合成能があるかをウェスタンブロッティングおよび FCM で確認した。PMA 刺激した THP-1 細胞は PT 蛋白合成能を有していることを確認したが、PMA 刺激した THP-1 細胞の細胞内染色で、HepG2 細胞にみられない aPS/PT との結合が確認され、THP-1 細胞で構造変化を起こした PT を合成する可能性が示された。実験 3 は PMA と Interferon(IFN)γで共刺激した THP-1 細胞とヒト単球細胞を用いて、単球が合成した PT が MHC class II とともに細胞表面に表出するかを FCM で確認した。IFNγ+PMA 刺激を行った THP-1 細胞と健常者のヒト単球細胞で aPS/PT の結合が確認された。一方で aPS/PT IgG 陽性の APS 患者のヒト単球細胞では、無処置の状態で aPS/PT が結合することが示された。

【考察】

第一章の結果から、抗血小板剤を用いた治療、特に DAPT は動脈血栓症の既往を有する APS 患者における血栓症の再発を抑制し、かつ出血合併症の少ない安全な治療である可能性が示された。第二章の結果から、PMA 刺激した単球で合成された PT が、IFNγ 刺激によって MHC class II とともに単球細胞表面に表出し、aPS/PT に認識される事を確認した。細胞表面の PT/ MHC class II 複合体は aPS/PT に認識される新規対応抗原であり、APS の病態に関わっている可能性が示された。

【結論】

第一章で血栓二次予防治療の gold standard は動静脈血栓に関わらずワルファリンであるが、我々は動脈血栓症の再発予防に焦点を当てた臨床研究をおこない、日本から世界に APS 患者の DAPT の可能性について報告した。第二章で PMA 刺激した単球で合成された PT が、IFNγ 刺激によって MHC class II とともに単球細胞表面に表出し、aPS/PT に認識される事を確認した。細胞表面の PT/ MHC class II 複合体は aPS/PT に認識される事から APS の自己抗体産生や血栓病態に関わっている可能性が示唆された。