



Title	補体関連自己免疫疾患におけるレクチン経路の関与および長期予後に関する研究
Author(s)	尾形, 裕介; Ogata, Yusuke
Description	配架番号 : 2588
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14316号
Issue Date	2020-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14316
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96743
Type	doctoral thesis
File Information	Yusuke_Ogata.pdf



学位論文

補体関連自己免疫疾患における
レクチン経路の関与および長期予後に関する研究
**(Association of the lectin complement pathway
and characterization of patients with poor long-term
prognosis in complement related autoimmune diseases)**

2020 年 12 月

北海道大学

尾形 裕介

Yusuke Ogata

学位論文

補体関連自己免疫疾患における
レクチン経路の関与および長期予後に関する研究
**(Association of the lectin complement pathway
and characterization of patients with poor long-term
prognosis in complement related autoimmune diseases)**

2020 年 12 月

北海道大学

尾形 裕介

Yusuke Ogata

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
1. 要旨	3
2. 略語表	6
3. 緒言	8
4. 第一章 補体因子 MASP-1 欠損 MRL/ <i>lpr</i> マウスおよび MASP-3 欠損 MRL/ <i>lpr</i> マウスにおける糸球体腎炎活動性の解析...	10
4.1 緒言	10
4.2 目的	12
4.3 方法	13
4.3.1 マウス	13
4.3.2 Mannan-coated plate における C4 沈着アッセイ	13
4.3.3 Zymosan-coated plate における C3 沈着アッセイ	14
4.3.4 血清抗 ds-DNA IgG 抗体の測定	14
4.3.5 血清 C3 値の測定	14
4.3.6 尿中アルブミン排泄量の測定	15
4.3.7 統計分析	15
4.4 結果	16

4.4.1	補体レクチン経路活性化能の評価	16
4.4.2	補体第二経路活性化能の評価	18
4.4.3	血清抗 ds-DNA IgG 抗体の測定	20
4.4.4	血清 C3 値の測定	21
4.4.5	尿中アルブミン排泄量の測定	22
4.5	考察	23
4.6	結語	26
5.	第二章 抗リン脂質抗体症候群およびループス腎炎患者における	
	血清 MASP 濃度の解析	27
5.1	緒言	27
5.2	目的	30
5.3	方法	31
5.3.1	研究デザイン	31
5.3.2	対象	31
5.3.3	血清 MASP-1, MASP-2, MASP-3 濃度の測定	31
5.3.4	抗リン脂質抗体の測定	32
5.3.5	統計分析	33
5.4	結果	35

5.4.1	患者背景	35
5.4.2	血清 MASP-1, MASP-2, MASP-3 濃度	37
5.4.3	PAPS における MASP と aPL, C4, C3 との相関.....	38
5.4.4	LN における MASP と尿蛋白, C4, C3 との相関	40
5.5	考察	42
5.6	結語	45
6.	第三章 抗リン脂質抗体症候群におけるクラスター分析を用いた 長期予後の解析	46
6.1	緒言	46
6.2	目的	48
6.3	方法	49
6.3.1	研究デザイン	49
6.3.2	対象および主要評価項目	49
6.3.3	抗リン脂質抗体測定法	49
6.3.4	クラスター分析	49
6.3.5	エンドポイント	50
6.3.6	統計分析	50
6.4	結果	51

6.4.1	患者背景	51
6.4.2	クラスターA：二次性 APS	51
6.4.3	クラスターB：High Risk	51
6.4.4	クラスターC：aPL	51
6.4.5	無イベント生存率(全てのイベント)	55
6.4.6	無イベント生存率(血栓症の再発)	59
6.4.7	無イベント生存率(重度の出血)	60
6.4.8	無イベント生存率(死亡)	61
6.4.9	イベント発生におけるリスク因子	62
6.5	考察	65
6.6	結語	67
7	結論	68
8	謝辞	69
9	利益相反	70
10	引用文献	71

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として発表した。

1. Yusuke Ogata, Yuichiro Fujieda, Masanari Sugawara, Taiki Sato, Naoki Ohnishi, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Olga Amengual and Tatsuya Atsumi. Morbidity and mortality in antiphospholipid syndrome based on cluster analysis : a 10-year longitudinal cohort study. Rheumatology (Oxford). in press.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 尾形裕介, 藤枝雄一郎, 菅原正成, 佐藤太貴, 大西直樹, 河野通仁, 加藤将, 奥健志, Olga Amengual, 渥美達也. 「抗リン脂質抗体症候群患者におけるクラスター分析を用いた長期予後の解析」第42回 日本血栓止血学会, 大阪, 2020年7月.

2. Yusuke Ogata, Yuichiro Fujieda, Masanari Sugawara, Taiki Sato, Naoki Ohnishi, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Olga Amengual and Tatsuya Atsumi.

「Morbidity and mortality in antiphospholipid syndrome based on cluster analysis : a 10-year longitudinal cohort study」22th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR 2020), Kyoto, Japan, 24-29 Oct 2020.

1. 要旨

【背景と目的】

補体系は重要な生体防御機構であり、補体 C3 を活性化することで病原体の排除や炎症反応を惹起する。補体系には 3 つの活性化経路が存在し、第二経路、レクチン経路、古典経路が活性化することで、第二経路成分による C3 の分解および C3b の病原体表面への結合を担う増幅系が活性化する。近年は自己免疫疾患や凝固系における MBL-associated serine protease (MASP) の関与が明らかになり、レクチン経路の重要性や補体活性化疾患の病態が注目されている。

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus : SLE) は補体経路の活性化を特徴とする自己免疫疾患であり、特にループス腎炎 (Lupus nephritis : LN) は生命予後に関わる重要な臓器合併症である。これまでの知見から病態形成には古典経路および第二経路の活性化が関与することが分かっているが、補体を標的とする治療法は未だ確立されていない。補体の関与は未解明な点も多く、特にレクチン経路の関与を検証した報告は少なく、ヒトにおいては MBL 沈着症例で尿蛋白の増悪が示唆されているが、MASP に関しては病態への関与は未だ十分に検証されていない。

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome : APS) は抗リン脂質抗体 (anti-phospholipid antibody : aPL) が持続的に陽性となり、再発性血栓症および妊娠合併症をきたす自己免疫疾患である。約半数が SLE を合併し、APS においても補体経路の活性化が病態形成に関与することが示されている。しかし SLE と同様に第二経路の関与が示唆されているものの、凝固系との関与が示されているレクチン経路の関与は未解明である。また希少疾患である APS において日本人の長期生存率は報告されておらず、再発性血栓症のリスク層別化による予後評価とともに現状の課題となっている。

第一章では MASP-1 および MASP-3 をそれぞれ単独で欠損した MRL/*lpr* マウスを作製し、MASP-1 によるレクチン経路の活性化と、MASP-3 による第二経路の活性化が LN の病態形成に及ぼす影響を解析した。第二章では primary APS (PAPS) 患者および LN 患者の血清 MASP-1, MASP-2, MASP-3 濃度を解析し MASP による補体活性化経路の病態形成への関与を検証した。第三章ではクラスター解析に基づいて APS 患者をリスク層別化し、日本人の APS と診断された患者の予後不良群を特定することを目的に研究を行った。

【対象と方法】

第一章

補体セリンプロテアーゼ MASP-1 と MASP-3 をそれぞれ単独欠損する C57BL/6

マウスを MRL/*lpr* マウスに戻し交配を行い、MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスおよび MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスを作製した。12 週齢より 2 週間ごとに採血、採尿を行い、血清中の抗 ds-DNA 抗体価，補体 C3 値，尿中アルブミン排泄量を ELISA 法により測定した。

第二章

PAPS, LN, 健常人 (HC) において血清中の MASP-1, MASP-2, MASP-3 濃度を ELISA 法により測定した。MASP 濃度と，血清 C4, C3, 尿蛋白, aPL との関連を評価した。

第三章

1990 年から 2019 年に当科で診断した APS 患者のうち，2 年以上観察可能であった患者を対象とした。クラスター分析により患者を分類し，観察期間内におけるイベント（死亡，血栓症再発，重篤な出血）の有無について後ろ向きに検討を行った。

【結果】

第一章

MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスは野生型と比較して尿中アルブミン排泄量が抑制されたが，MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスでは抑制されなかった。

第二章

血清 MASP-2 濃度は PAPS, LN において HC より有意に低かった（順に $p=0.0013$, $p=0.0156$ ）。血清 MASP-3 濃度は PAPS, LN において，HC より有意に低かった（順に $p<0.001$, $p<0.001$ ）。PAPS において，MASP-1 は IgG/IgM aPS/PT と負の相関を示し（順に $p=0.0308$, $r=-0.4415$ および $p=0.0175$, $r=-0.5010$ ），MASP-2 は IgG aPS/PT と正の相関を示した（ $p=0.0158$, $r=0.5318$ ）。LN において，MASP-1 は C4（ $p=0.0164$, $r=0.3975$ ）および C3（ $p=0.0484$, $r=0.3313$ ）と正の相関を，MASP-2 は C4 と正の相関を示し（ $p=0.0479$, $r=0.3524$ ），MASP-3 は C4 と正の相関を示した（ $p=0.0198$, $r=0.3921$ ）。

第三章

168 例の APS 患者のうち 144 例（86%）が女性であり，診断時の年齢中央値は 39 歳[30 - 55 歳]，観察期間中央値は 10 年[5 - 15 年]であった。10 年生存率は 92.7%，10 年無イベント生存率は 64.7%であった。これらの APS 患者はクラスター分析により 3 群に分類された。A 群($n=61$)は SLE の二次性 APS，B 群($n=56$)は動脈血栓症の既往，心血管リスク合併（高血圧，脂質異常症，糖尿病），高

齢患者，C 群(n=51)は aPL が全て陽性，静脈血栓症の既往が多い群であった。B 群では他の群と比較してイベント発生率が有意に高く，死亡率も高かった(log-rank test $p=0.0112$ 、 $p=0.0471$)。

【考察】

第一章

LN において，古典経路，第二経路の活性化が糸球体腎炎の病態形成に関与するが，MASP-1 による補体レクチン経路の活性化が尿中アルブミン排泄に関与する可能性が示されたため，MASP-1 は尿蛋白排泄抑制を目的とした治療標的となる可能性が考えられる。しかし糸球体や尿細管における MASP-1 の作用機序は明らかになっておらず，今後のさらなる解析が必要である。

第二章

本研究により PAPS，LN において，MASP-1，MASP-2 によるレクチン経路の活性化，および MASP-3 による第二経路の活性化が病態形成に関与する可能性が示された。両疾患において補体系を標的とした治療法は確立されておらず，特に MASP に関しては未解明な点が多い。本研究で MASP の活性化による補体活性化経路の病態への関与を示したことで，MASP に焦点をあてた病態形成機序の解明や，治療法開発の一助となることが期待される。

第三章

クラスター分析により従来の予後不良因子を組み合わせた層別化解析が可能となり，動脈血栓症の既往，心血管リスクを有する APS 患者群が，二次性 APS や aPL が全て陽性である患者群よりも死亡率やイベント発生率が高いことが明らかとなった。心血管リスクを有する患者群において，一層のリスクマネジメントを要する必要があると考えられた。

【結論】

PAPS，LN において病態形成に MASP の活性化による補体活性化経路の関与が示唆され，さらに LN においてはレクチン経路の活性化が尿蛋白排泄に関与することが示された。また補体活性化を病態のひとつとする疾患である APS で，クラスター分析により患者を 3 群に分類し長期予後を解析した結果，動脈血栓症の既往や心血管リスクをもつ APS 患者群が長期予後不良群であることが明らかとなった。これらの事実により，補体関連疾患に対して補体をターゲットにした新たな治療法の開発，血栓の総合的リスクのマネジメントを併せて行うことが予後改善に貢献する可能性が考えられた。

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.

APS	Antiphospholipid syndrome
a β 2GPI	Anti- β 2 Glycoprotein I antibody
aCL	Anti-cardiolipin antibody
aPL	Antiphospholipid antibodies
aPL-S	Antiphospholipid score
aPS/PT	Phosphatidylserine dependent anti-prothrombin antibody
BBS	Borate buffered saline
BSA	Bovine serum albumin
CRP	C-reactive protein
ds-DNA	Double stranded- deoxyribonucleic acid
dRVTT	Dilute Russell Viper venom Time
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
FB	Factor B
FD	Factor D
FH	Factor H
GAPSS	Global antiphospholipid score
GlcNAc	N-acetylglucosamine
HRP	Horseradish peroxidase
KCT	kaolin clotting time
LA	Lupus anti-coagulant
LDL	Low-density lipoprotein
LN	Lupus nephritis
MASP	MBL-associated serine protease
MAC	Membrane attack complex
MBL	Mannose-binding lectin
MCTD	Mixed connective tissue disease
PAPS	Primary antiphospholipid syndrome
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline tween

PS	Phosphatidylserine
PSL	Prednisolone
RA	Rheumatoid arthritis
SLE	Systemic lupus erythematosus
SLEDAI	SLE disease activity index
SS	Sjögren syndrome
TBS	Tris buffered saline
TF	Tissue factor

3. 緒言

補体系は第二経路， レクチン経路， 古典経路の 3 つのカスケードを軸とした重要な生体防御機構であり， 補体成分 C3 を中心として 30 種類以上のタンパク質から構成される (Ricklin et al., 2010)。最も起源が古い第二経路は無脊椎動物も備え (Lachmann, 2018)， 主に C3 の分解および病原体表面への C3b の結合を効率的に増幅させる役割をもつ。

レクチン経路， 古典経路はヒト進化の過程で確立されてきた (Nonaka and Kimura, 2006)。レクチン経路では Mannose-binding lectin (MBL) やフィコリン， コレクチンといった認識分子が細菌膜上の糖鎖を認識することで， MBL-associated serine protease (MASP)-1 や MASP-2 が活性化し， C3 転換酵素である C4b2a が生成される。古典経路では抗体が抗原を認識し， さらに抗原抗体複合体に認識分子である C1q が結合することで免疫複合体が形成され， C1r や C1s が活性化し C4b2a が生成される。両経路はともに認識分子に MASP や C1r および C1s といったセリンプロテアーゼを備えることで， 標的上で効率的に C4b2a を生成することができる。

第二経路は古典経路やレクチン経路と異なり認識分子は有さない。C3 自身が加水分解を受けることで生成される $C3(H_2O)Bb$ の働きにより C3b を生成することができ， C3b の標的への結合の増幅系としての役割を有する。生成された C3b が， D 因子 (FD) により切断された B 因子 (FB) の分解産物である Bb と結合し， C5 転換酵素である C3bBbC3b が生成される。Bb が総補体活性化反応の 90% 以上の C5 を分解することで， 強力なアナフィラトキシンである C5a， C5b が生成される (Harboe and Mollnes, 2008)。C5b は C6， C7， C8 を足場にして細胞表面に結合し， C9 が円筒状に結合することで溶菌作用を有する Membrane attack complex (MAC) や， 炎症性メディエーターを産生する sublytic MAC が生成される (Muller-Eberhard, 1985)。補体経路の活性化により， アナフィラトキシン作用， オプソニン作用， MAC による溶菌作用が発揮される。

補体レクチン経路は古典経路と異なり， 抗体を介さず感染初期で機能する自然免疫機構のひとつと考えられている。補体因子 MASP はレクチン経路の認識分子に未活性型で結合し血中を循環するセリンプロテアーゼである。これまでに MASP-1， MASP-2， MASP-3 の 3 種類のタンパクが確認され， MASP-1 と MASP-3 はスプライスバリエントである (Stover et al., 1999)。MASP はレクチン経路の認識分子が細菌， 酵母， ウイルスといった標的に結合することで一本鎖の未活性型から二本鎖の活性型となり， セリンプロテアーゼとしての機能を発揮する。MASP-1 は MASP-2 を活性化することでレクチン経路を活性化させる。MASP-3 は未だ不明な点が多いが， マウスにおいて FD を活性化することで第二経路を活性

化させることが報告されている。また MASP-1, MASP-2 はレクチン経路を活性化させるカスケードとしての役割以外に、血管透過性亢進への関与やトロンビン様作用など凝固系に関する機能も注目されている (Debreczeni et al., 2019)。

補体系は生体防御や恒常性維持の役割を担う一方、過剰な活性化により病態形成を促進することも知られる。

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus : SLE) は血清補体成分の消費を特徴とする全身性自己免疫疾患であり、ループス腎炎 (Lupus nephritis : LN) は SLE における重要な臓器障害である。病因には抗 DNA 抗体や抗 Sm 抗体などの細胞核成分に対する病原性自己抗体の産生、免疫複合体の沈着が関与し、古典経路および第二経路の過剰な活性化が病態形成を促進する。

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome : APS) は持続的な抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibody : aPL) の存在と再発性血栓症、妊娠合併症を特徴とする自己免疫疾患であるが、約半数に SLE を合併し遺伝子異常を複数共有することから SLE の類縁疾患と考えられている。我々は APS が非 SLE 膠原病群に比べ補体活性化に伴う低補体血症を呈する割合が高いことを報告した (Oku et al., 2009)。さらに補体系は凝固系と互いに反応経路を共有することも明らかとなっている。このように SLE, APS において補体系の多様な病態形成への関与が報告されているものの、レクチン経路を中心とした補体系の寄与は未だ明らかではなく、補体をターゲットとした治療も確立していない。希少疾患である APS においては治療法の確立のみならず日本人における長期生存率や再発性血栓症のリスク層別化による予後評価も現状の課題となっている。

本研究では LN, APS における補体レクチン経路の活性化を検証し APS においてはさらに長期予後不良群の特徴を明らかにすることを目標に研究を行った。

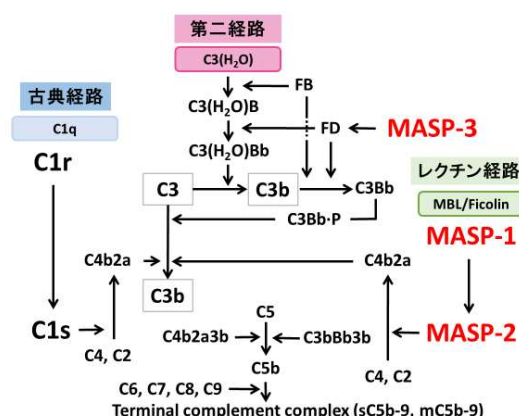


Figure 1. 補体活性化経路の概略

レクチン経路では MASP-1 が MASP-2 を活性化し、MASP-2 が C4, C2 を切断しカスケードが進んでいく。

4. 第一章

補体因子 MASP-1 欠損 MRL/ *lpr* マウスおよび MASP-3 欠損 MRL/ *lpr* マウスにおける 糸球体腎炎活動性の解析

4.1 緒言

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus : SLE) は遺伝的要因に加え、ウイルス感染、性ホルモン、紫外線などの環境要因が影響し、抗 DNA 抗体や抗 Sm 抗体などの多彩な自己抗体が産生される自己免疫疾患である。病態形成には抗体単独または抗原抗体複合体の組織への沈着と、補体成分 C1q が結合し免疫複合体が形成されることによる補体古典経路の活性化が関与すると考えられている (Oates and Gilkeson, 2002)。

これまでに補体成分 C1q 欠損 MRL+/+ マウスが作製され、抗核抗体の上昇や糸球体腎炎の増悪、アポトーシス細胞のクリアランス障害が確認されている (Mitchell et al., 2002)。ヒトにおいても C1q 欠損者 74 例中 65 例 (88%), C1r/C1s 欠損者 20 例中 13 例 (65%) が SLE 様症状を発症することが知られる (Lintner et al., 2016)。特徴的なことはヒト発症例に男女差を認めず、抗核抗体の陽性率、日光過敏や口腔内潰瘍などの皮膚粘膜症状が多いことである。これらの報告から古典経路は SLE の炎症に寄与する一方で発症に対し抑制的に働くことが示唆される。特に C1q 欠損、または補体成分の消費による低下のためアポトーシス細胞のクリアランス障害が病態形成に関与すると考えられており (Walport, 2001)、SLE 患者の末梢血から分離されたマクロファージでは貪食能の低下が示されている。

また第二経路の活性化も SLE における多臓器障害において重要である。補体 D 因子 (FD) を欠損した MRL/ *lpr* マウスの解析では、糸球体腎炎発症の抑制が示された (Elliott et al., 2004)。補体制御タンパクである H 因子 (FH) の血清レベルの低下は、ループス患者 (Lupus nephritis : LN) の腎予後不良因子として報告されている (Cohen et al., 2008)。そしてヒト腎生検組織においては properdin や

C9 沈着は予後不良のマーカーであり，尿中 C5b-9 も予後不良因子として示されている (Wang et al., 2018)。

一方でレクチン経路が LN における機能障害に関与する可能性が示唆されている。とりわけ尿蛋白に関与する可能性が報告されており，腎生検組織において Mannose binding lectin (MBL) が沈着した症例で尿蛋白が有意に高度であることが明らかになった (Nisihara et al., 2013)。マウスにおいては，MBL-associated serine protease (MASP)-1 および MASP-3 の両者を欠損した MRL/*lpr* マウスで蛋白尿の改善を認めた (Machida et al., 2018)。

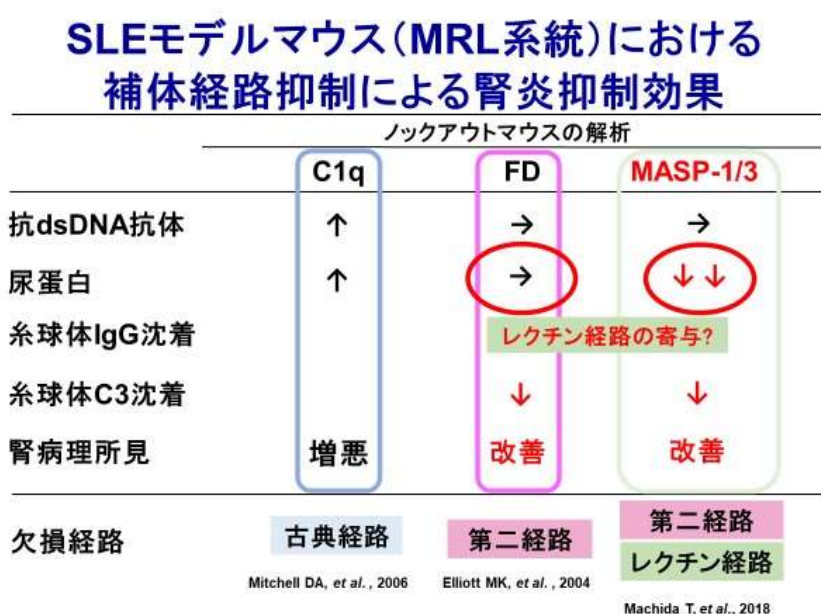


Figure 2. SLE モデルマウスにおける補体タンパク欠損の影響

第二経路単独欠損 MRL/*lpr* マウスと比較し，MASP-1 によるレクチン経路欠損が加わることで尿蛋白排泄が抑制される可能性が示唆される。

今回私は MASP-1 単独欠損 MRL/*lpr* マウスと MASP-3 単独欠損 MRL/*lpr* マウスを作製し，MASP-1 による補体レクチン経路の活性化が LN における尿蛋白排泄に及ぼす影響について研究した。既に MASP-1 によるレクチン経路と MASP-3 による第二経路の両者が同時に阻害された MRL/*lpr* マウスでは尿蛋白の抑制効果が示されているが，第二経路を単独で阻害した FD 欠損 MRL/*lpr* マウスでは尿蛋白の有意な改善を認めていない (Figure 1)。この結果から私は MASP-3 による第二経路の活性化に比して，MASP-1 によるレクチン経路の活性化が，LN における尿蛋白排泄に促進的に働くという仮説をたて研究を行った。

4.2 目的

本研究の目的は、MASP-1 によるレクチン経路および MASP-3 による第二経路の活性化が、ループス腎炎における尿蛋白排泄に及ぼす役割を検証することである。

4.3 方法

4.3.1 マウス

MASP-1 単独欠損および MASP-3 単独欠損 C57BL/6 マウスを MRL/*MpJ*-Fas/*lpr*/J (MRL/*lpr*: stock no. 000485: The Jackson Laboratory) に (Andrews et al., 1978), それぞれ 4-5 世代戻し交配した。いずれも SLE の疾患感受性領域に対応する 12 個のマイクロサテライトマーカー (D4 Mit12, D4 Mit17, D5 Mit13, D5 Mit24, D5 Mit 145, D7 Mit57, D7 Mit211, D10 Mit11, D10 Mit20, D17 Mit16, TNF) と Fas 遺伝子型について, ゲノム DNA を鋳型として PCR 法により確認した。上述の個体を自家交配しホモ欠損マウス (MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスおよび MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウス) を作製した。この研究は福島県立医科大学の遺伝子組換え実験等安全委員会の承認 (承認番号: 197) ならびに, 福島県立医科大学動物実験委員会の承認 (承認番号: 30040) を得て「福島県立医科大学動物実験規程」を遵守して実施した。

4.3.2 Mannan-coated plate における C4 沈着アッセイ

レクチン経路活性を, Mannan-coated plate における C4 沈着アッセイを用いて測定した。50 mM Na-Carbonate/bicarbonate buffer (pH9.5) で希釈した 10 µg/mL Mannan (Sigma-Aldrich) を 100 µl 96well に加え, 4 °C で一晩インキュベートし, Mannan をコートした。0.1% Tween-20 と 5 mM CaCl₂ (TBST/Ca) を含む Tris-buffered Saline (TBS) 中で, 1.0% BSA を調製し, 室温で 1 時間ブロッキングした。TBST/Ca で 3 回洗浄した後, 希釈精製したヒト C4 (5 µg/mL in TBS/Ca) をそれぞれの well に加え, 4 °C で 30 分間インキュベートした。TBST/Ca で 3 回洗浄した後, horseradish peroxidase (HRP) 結合抗ヒト C4 抗体 (MP Biomedicals) をそれぞれの well に加えた。室温で 1 時間インキュベートした後, TMB Microwell Peroxidase Substrate (Kirkegard & Perry Laboratories) を加え, 室温で 10 分間, 暗所でインキュベートした。等量の 1 M リン酸をそれぞれの well の基質溶液に添加し, TMB の発色を停止させ, 450 nm の吸光度を Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) で測定した。TBS/Ca buffer のレクチン経路活性もブランクとして測定し, 血清中の活性は, 血清サンプルの A450 と, ブランクの A450 の差として示した。

4.3.3 Zymosan-coated plate における C3 沈着アッセイ

第二経路活性を, Zymosan-coated plate における C3 沈着アッセイを用いて測定した。50 mM Na-Carbonate/bicarbonate buffer (pH9.5) で希釈した 20 µg/mL Zymosan (Sigma-Aldrich) を 100 µl 96well に加え, 4 °C で一晩インキュベートし, Zymosan をコートした。0.1% Tween-20 を含む Phosphate-buffered Saline (PBST) 中で, 1.0% BSA を調製し, 室温で 1 時間ブロッキングした。PBST で 3 回洗浄した後, Mg^{2+} -EGTA を加えた BBS buffer (0.2 M boric acid, 0.14 M NaCl, pH8.0) で段階希釈した血清サンプルを加え, 室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄した後, HRP 結合抗マウス C3 ポリクロナル抗体を well に加え, 室温で 1 時間インキュベートした。続いて TMB を加え, 室温で 10 分間, 暗所でインキュベートした。等量の 1 M リン酸を well に添加し発色を停止させ, 450 nm の吸光度を Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) で測定した。BBS buffer の第二経路活性もブランクとして測定し, 血清中の活性は, 血清サンプルの A450 とブランクの A450 の差として示した。

4.3.4 血清抗 ds-DNA IgG 抗体の測定

1xSSC (0.3 M クエン酸 Na, 0.03 M NaCl pH7.0) で希釈した 100 µl の 1 µg/mL S1 nuclease-digested Calf thymus DNA を well に加え, 37 °C で一晩インキュベートした。次に 1% BSA-PBST により, 37 °C で 1 時間ブロッキングした。PBST で 3 回洗浄後, 1/100 に希釈した血清をそれぞれの well に添加し, 室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄後, 結合した抗 ds-DNA IgG 抗体を, HRP-conjugated ヤギ抗マウス IgG (Sigma-Aldrich) で検出し, その後 TMB で発色を検出した。血清抗 ds-DNA IgG 抗体価は, 血清試料中の A450 とブランクの差として示した。

4.3.5 血清 C3 値の測定

50 mM Na-Carbonate/bicarbonate buffer (pH9.5) で希釈した 100 µL の 1 µg/mL ヤギ抗マウス C3 ポリクロナル抗体 (MP-biomedicals) を well に加え, 4 °C で一晩インキュベートした。1%BSA-PBST で, 室温で 20 分間ブロッキングした。PBST で洗浄後に, 段階希釈した血清サンプルを well に添加し, 室温で

1 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄後に、HRP 結合抗マウス C3 ポリクロナル抗体 (MP biomedical) で検出し、その後 TMB で発色を検出した。

4.3.6 尿中アルブミン排泄量の測定

マウスを 24 時間代謝ケージにおいて尿を回収し、12 週齢からはじめ 2 週間ごとに採取した。細菌の増殖を防ぐため、収集管にアンピシリン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシンを加えた。50 mM Na-Carbonate/bicarbonate buffer (pH9.5) で希釈した 100 μ L の 2.5 μ g/mL ウサギ抗マウスアルブミンポリクロナル抗体 (MP-biomedicals) を well に加え、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。1%BSA-PBST で、室温で 1 時間ブロッキングした。PBST で洗浄後に、段階希釈した尿サンプルを well に添加し、室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄後に、HRP 結合抗マウスアルブミンポリクロナル抗体 (MP biomedical) で検出し、その後 TMB で発色を検出した。マウスアルブミン (1 μ g/mL) をスタンダードとして使用し、尿中アルブミン排泄は 1 日当たりの mg で示した。

4.3.7 統計分析

対応のない両側 t 検定を行い、2 群間の群間比較を行った。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 software (ver. 7.02; GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。

4.4 結果

4.4.1 補体レクチン経路活性化能の評価

野生型 MRL/*lpr* マウス, 12 週齢の MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスおよび MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスの血清を用いた。野生型と MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスではレクチン経路活性化能が保たれていたが, MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスではレクチン経路活性が著しく低下していた (Figure 3)。

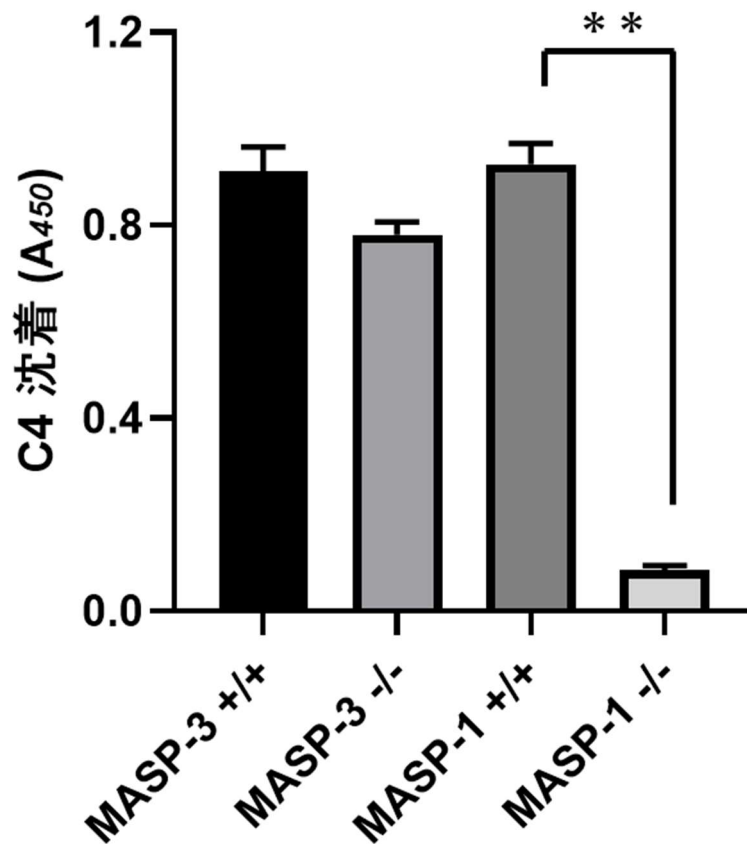


Figure 3. Mannan-coated プレートにおける C4 沈着によるレクチン経路活性化能の評価

レクチン経路活性を, Mannan-coated plate における C4 沈着アッセイを用いて測定した。** $p < 0.001$, 各群 $n=6$, MASP-3+/+および MASP-1+/+は野生型 MRL/*Ipr* マウス, MASP-3-/-は MASP-3 欠損 MRL/*Ipr* マウス, MASP-1-/-は MASP-1 欠損 MRL/*Ipr* マウスを表す。

4.4.2 補体第二経路活性化能の評価

野生型 MRL/*lpr* マウス, 12 週齢の MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスおよび MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスの血清を用いた。野生型と MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスでは第二経路活性化能が保たれていたが, MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスでは第二経路活性が著しく低下していた (Figure 4)。

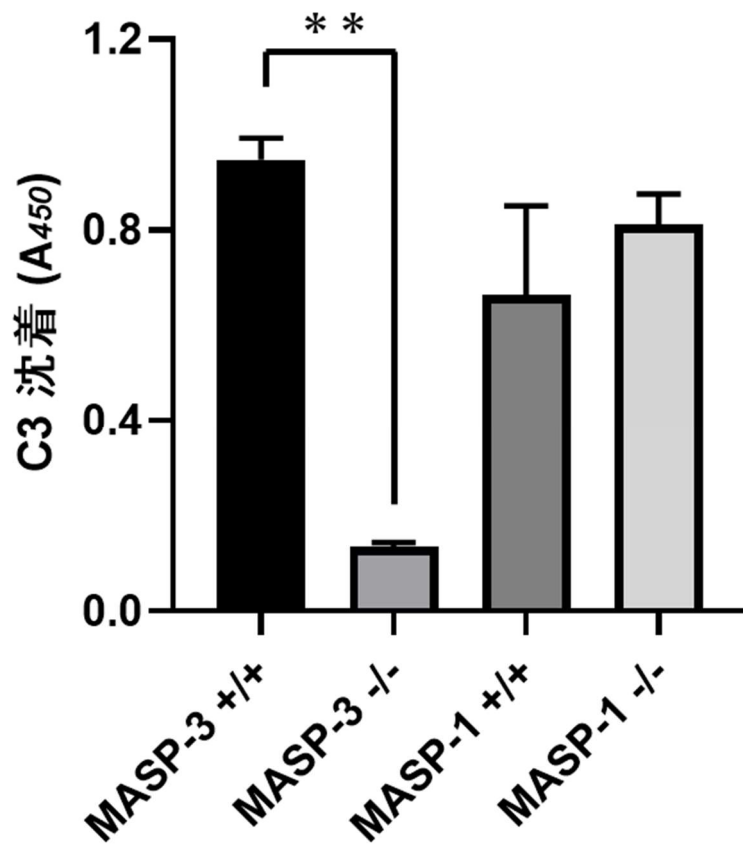


Figure 4. Zymosan-coated プレートにおける C3 沈着による第二経路活性化能の評価

第二経路活性を、Zymosan-coated plate における C3 沈着アッセイを用いて測定した。** $p < 0.001$, 各群 $n=6$, MASP-3+/+および MASP-1+/+は野生型 MRL/*lpr* マウス, MASP-3-/-は MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウス, MASP-1-/-は MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスを表す。

4.4.3 血清抗 ds-DNA IgG 抗体価の測定

野生型 MRL/*lpr* マウスと MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスは、週齢経過とともに抗 ds-DNA 抗体価の上昇を認めた。MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスは野生型同腹仔と比較して抗 ds-DNA 抗体価が低い傾向にあった。しかし 2 群間で統計的有意差は認めなかった (Figure 5)。

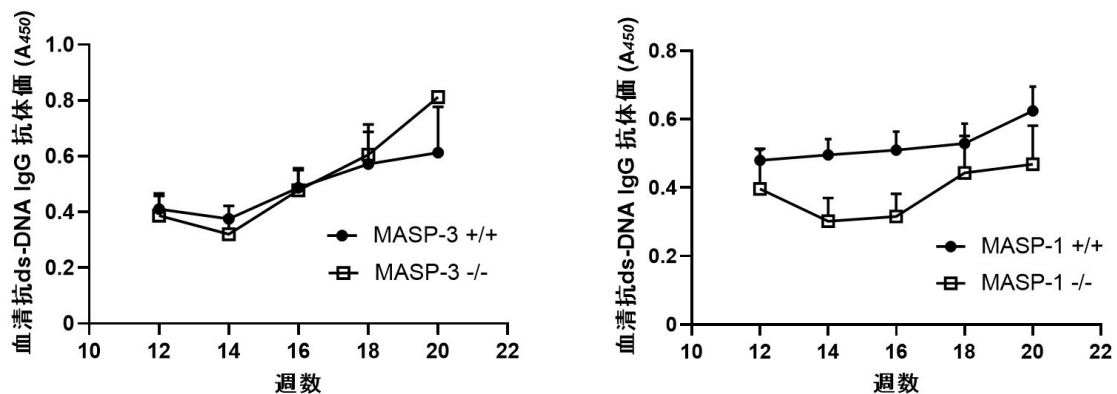


Figure 5. 週数毎の血清抗 ds-DNA 抗体価の推移

MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウス, MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスにおける血清抗 ds-DNA 抗体価を ELISA 法で測定した。各群 n=5, MASP-3+/+および MASP-1+/+は野生型 MRL/*lpr* マウス, MASP-3-/-は MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウス, MASP-1-/-は MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスを表す。

4.4.4 血清 C3 値の測定

野生型 MRL/*lpr* マウスと、MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスともに、週齢経過とともに血清 C3 値は低下傾向ではあるが、概ね横ばいであった。一方で第二経路活性が欠如している MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスに関しても、野生型同腹仔と比較して統計学的有意差は認めず、ほぼ両者とも変化はなかった (Figure 6)。

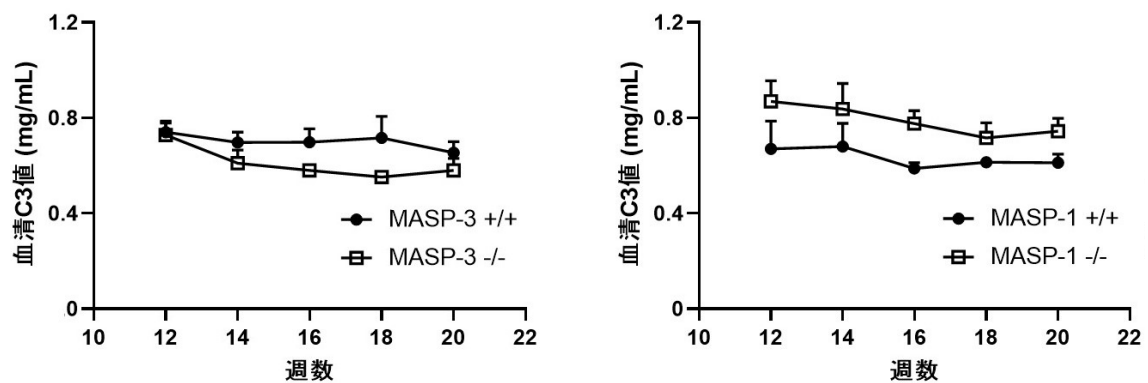


Figure 6. 週数毎の血清 C3 値の推移

MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウス, MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスにおける血清 C3 値を ELISA 法で測定した。各群 n=5, MASP-3+/+および MASP-1+/+は野生型 MRL/*lpr* マウス, MASP-3-/-は MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウス, MASP-1-/-は MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスを表す。

4.4.5 尿中アルブミン排泄量の測定

野生型 MRL/*lpr* マウスでは、週齢経過とともに尿中アルブミン排泄量の増加がみられたが、MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスでは尿中アルブミン排泄の増加はみられなかった。MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスは野生型同腹仔と同様に週齢経過とともに尿中アルブミン排泄の増加がみられた (Figure 7)。

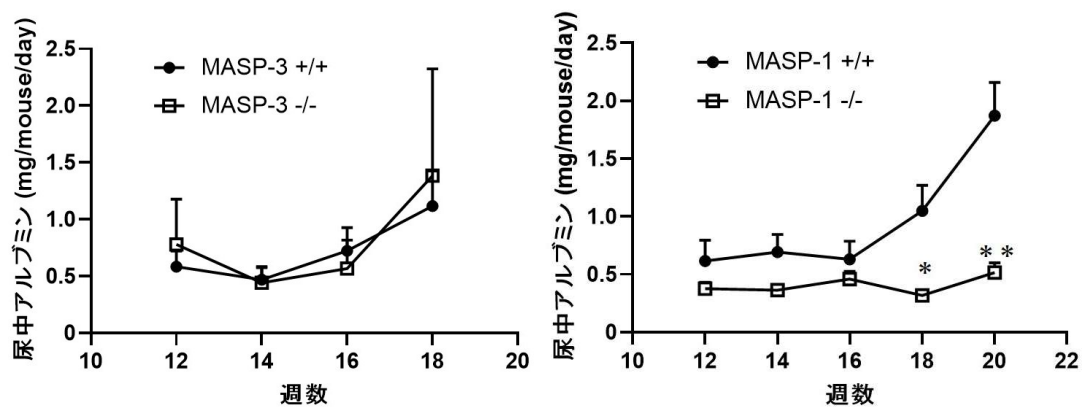


Figure 7. 週数毎の尿中アルブミン排泄量の推移

MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウス, MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスにおける尿中アルブミン排泄量を ELISA 法で測定した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, p value against Wild type, 各群 $n=5$, MASP-3 $+/+$ および MASP-1 $+/+$ は野生型 MRL/*lpr* マウス, MASP-3 $-/-$ は MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウス, MASP-1 $-/-$ は MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスを表す。

4.5 考察

本研究では補体レクチン経路を単独で阻害した MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスで尿中アルブミン排泄量が有意に抑制されたことを見出し、LN における尿蛋白漏出には MASP-1 による補体レクチン経路の活性化が関与していることを示した。

これまで SLE における補体系の役割は、古典経路が病態発症と抑制の二面性の役割をもち、第二経路が糸球体腎炎の発症に関与することが報告されていた。しかしレクチン経路においては、LN への単独関与を示すノックアウトマウスを用いた研究はなかった。

ヒトにおける MASP 欠損症は非常に稀であり、MASP 欠損症が及ぼす影響について不明な点が多い。MASP-2 欠損症は細菌感染症や炎症性肺疾患、自己免疫疾患との関連が示唆されているが一定の見解は得られていない。MASP-3 欠損症においては発生の異常と関連が示唆されているが不明な点が多い (García-Laorden et al., 2020; Garred et al., 2016)。一方で MBL 欠損症は最も一般的な補体欠損症として 10-22% の頻度でみられ、SLE の発症および疾患活動性や感染症のリスクの増加と関連することが示されている (Garred et al., 2001; Keizer et al., 2014)。

本研究では、MASP-1 欠損および MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスともに抗 ds-DNA 抗体に有意な差は認めず、MRL/*lpr* マウスに一般的に認められる皮膚炎症状も野生型同腹仔と比較して顕著な違いはなかった。また両者とも細菌感染症に罹患しやすい傾向はみられなかった。しかし尿中アルブミン排泄量は MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスで有意に抑制されたため、MASP-1 単独欠損によるレクチン経路の阻害に SLE の疾患活動性を高める可能性は乏しく、尿蛋白抑制に効果的である可能性が示された。また感染リスクを増加させる傾向もみられなかったため (データなし)、レクチン経路阻害療法を考慮した際に MASP-1 は選択肢しうる標的と考えられた。

補体レクチン経路の活性化と腎障害に関する報告には以下のようなものがある。

補体の活性化は、古典経路の活性化と免疫複合体の形成による糸球体腎炎において広く報告されている。一方でレクチン経路の活性化は、認識分子が標的分子上の Mannose, N-acetylglucosamine, 1-fucose などの特定の糖鎖を認識することで開始されるが (Nauta et al., 2003)、健常人細胞においては糖鎖末端がシアル酸化されているため活性化が妨げられている。しかし免疫複合体の形成や虚血再灌流障害により障害をうけた近位尿細管細胞は、1-フコースを異常に発現することで二次的にレクチン経路を活性化する可能性が報告されている

(Farrar et al., 2016)。

IgA 腎症 (Roos et al., 2006), 糖尿病性腎症 (Huang et al., 2019), 虚血再灌流障害 (Asgari et al., 2014) においては, 古典経路を介した免疫複合体の形成を伴わず, レクチン経路独自の活性化が腎障害の一因として報告されている。IgA 腎症においては糖鎖異常 IgA1 がレクチン経路活性化のトリガーとして注目されている。糖鎖異常により立体構造が変化し免疫原性に影響を及ぼすことは, 関節リウマチにおける IgG においても報告されている (Tsuchiya et al., 1989)。また主に腹膜 B1 細胞から産生される Natural IgM は MBL と結合することも示されており (Ehrenstein and Notley, 2010), 二次的ではないレクチン経路独自の活性化の可能性が示唆されている。

上記報告から我々は MASP-1 によるレクチン経路活性化が, LN における尿蛋白排泄の促進に働く一つの機序を以下のように考察した。

SLE では, 多彩な自己抗体の産生により糸球体に自己抗体自体または抗原抗体複合体が沈着し, 補体成分 C1q が結合することで古典経路および第二経路が活性化される (Kim et al., 2013)。LN における MBL の沈着は, IgG が沈着し古典経路が活性化したと推察される部位と同じ場所にみられ, レクチン経路は古典経路と同様の部位で活性化することが示唆されている (Lhotta et al., 1999)。そのため古典経路および第二経路の活性化により障害をうけた糸球体構成細胞, 尿細管細胞が異常な糖鎖を過剰発現することで (Farrar et al., 2016), レクチン経路が二次的に活性化された可能性は考えられる。または異常糖鎖を生じた免疫グロブリンおよび IgM に認識分子が結合することで, レクチン経路を活性化している可能性も考えられる。

一方で MASP-3 欠損 MRL/*lpr* マウスでは尿中アルブミン排泄は抑制されなかった。これまでに FD 欠損 MRL/*lpr* マウスにおいて尿中アルブミン排泄が抑制されないことが報告されており, 第二経路の単独の抑制が尿中アルブミン排泄を抑制しないという既報に矛盾しない結果となった。これらの結果から, LN における尿蛋白排泄への関与は第二経路に比べレクチン経路の関与が大きいと考えられる。

SLE 患者ではその多様な疾患背景により, 非特異的な抗炎症, 免疫抑制療法が第一選択となっている。加えて補体活性化が病態形成の増悪に関与することが知られて久しいが, 未だに補体を特異的に標的とする治療は確立されていない。我々が示した MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスにおいて尿蛋白排泄が抑制されるという結果は, 補体レクチン経路を特異的に阻害し古典経路を温存するという点からは, 特に尿蛋白排泄が臨床的問題となっている LN に対し, 特異的な補体ターゲット治療のひとつとなる可能性が考えられる。

本研究により MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスにおける尿蛋白排泄抑制効果が示唆

された。しかし LN における補体レクチン経路, MASP-1 の働きは不明な点が多く, MASP を治療標的と考えていくためには, MASP-1 による尿蛋白排泄のメカニズムを明らかにしていく必要がある。LN における補体レクチン経路欠損による組織学的評価は未だ明らかではなく, FD 欠損 MRL/*lpr* マウスと MASP-1/3 欠損 MRL/*lpr* マウスにおいて腎病理が改善したことから, MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスでは糸球体病理像の顕著な改善は得られないことも想定される。また補体レクチン経路の活性化の根拠はレクチン経路の認識分子や MASP の沈着が唯一の根拠となっている。今後は MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスの腎組織学的評価や MASP 発現量の経時的な変化などのさらなる検討が必要である。

4.6 結語

MASP-1 による補体レクチン経路の活性化は、ループス腎炎における尿蛋白排泄に促進的に働く可能性が示された。MASP-3 による第二経路の活性化は、ループス腎炎における尿蛋白排泄への関与は示されなかった。

5 第二章

抗リン脂質抗体症候群および

ループス腎炎患者における血清 MASP 濃度の解析

5.1 緒言

補体レクチン経路は古典経路と異なり、抗体を介さず感染初期で機能する自然免疫機構と考えられている。認識分子である Mannose binding lectin (MBL) およびフィコリンは細菌表面の Mannose や N-acetylglucosamine (GlcNAc) を認識し、標的に結合することができる。補体因子 MBL-associated serine protease (MASP) はレクチン経路の認識分子と Ca^{2+} 依存的に結合し、未活性型で血中を循環するセリンプロテアーゼである (Thielens et al., 2001)。これまでに MASP-1, MASP-2, MASP-3 の 3 種類が確認されており、主に肝臓で合成され血清中にそれぞれ $11 \mu\text{g/ml}$, $0.4 \mu\text{g/ml}$, $0.6 \mu\text{g/ml}$ で存在すると報告されている (Thiel et al., 2012; Ytting et al., 2007)。MASP はホモまたはヘテロダイマーを形成しており (Matsushita et al., 2013)、認識分子の細菌、酵母、ウイルスといった標的への結合を契機に、一本鎖の未活性型から二本鎖となることで活性化 (Kjaer et al., 2013)。活性化した MASP-1 は MASP-2 を活性化し (Ambrus et al., 2003)、MASP-2 は C4 および C2 を切断し C3 転換酵素である C4b2a を生成する (Fujita, 2002; Yaseen et al., 2017)。MASP-3 は活性型で血中を循環するが、その活性化機構は未だ不明である。生理的機能についても不明な点が多いが、マウスにおいては D 因子 (FD) の活性化因子であることが報告されている (Hayashi et al., 2019)。前述したように補体レクチン経路ならびに MASP-1, MASP-2, MASP-3 の個々の機能には未だ不明な点が多いが、糸球体腎炎における尿蛋白排泄や、凝固系に影響を及ぼすことが明らかになってきている (Gulla et al., 2010)。

補体系と凝固系は共に活性中心にセリンを有する酵素前駆体で血中に存在し、セリンプロテアーゼ活性を主とする酵素反応や、インヒビターがカスケードを担うという共通点がある。第二経路の活性化により生じた C5a は血管内皮細胞における組織因子 (Tissue factor: TF) mRNA を誘導する (Dzik, 2019)。Membrane

attack complex (MAC)は内皮細胞や血小板を溶解し、Phosphatidylserine(PS)を露出した微小小胞体を産生させることでプロトロンビナーゼ複合体の形成に寄与することが報告されている(Hamilton et al., 1990)。レクチン経路においては、MBLはフィブリノゲンに強い親和性を示し、フィコリンのフィブリノゲン様ドメインはフィブリノゲンの γ 鎖と共通の祖先から由来している(Endo et al., 2004)。これら認識分子とMASPの複合体は、糖鎖末端に水素結合すると凝固系を活性化しフィブリン血栓の生成につながることを実証されている(Gulla et al., 2010)。さらにMASP-1はトロンビンと構造的特徴を共有し、MASP-2はプロトロンビンの切断作用も有する。MASPの血栓への局在化も認められ、D-ダイマーによるMASP-1とMASP-2の活性化も報告されている(Kozarcanin et al., 2016)。

抗リン脂質抗体症候群(Antiphospholipid syndrome : APS)は抗リン脂質抗体(Antiphospholipid antibody : aPL)の持続的陽性を伴い再発性血栓症および妊娠合併症をひきおこす自己免疫疾患である。aPLはループスアンチコアグラント(Lupus anti-coagulant : LA), 抗カルジオリピン抗体(Anti-cardiolipin antibody : aCL), 抗 β 2GP I抗体(Anti- β 2 Glycoprotein I antibody : a β 2GPI)が国際分類基準に含まれるが、PS依存性抗プロトロンビン抗体(Phosphatidylserine dependent anti-prothrombin antibody : aPS/PT)もAPSの診断における感度、特異度が高く病態形成に関与することが報告されている(Amengual et al., 2003; Atsumi et al., 2004)。APSの血栓形成の機序として、a β 2GPIやaPS/PTにより向血栓細胞(単球, 血管内皮細胞, 血小板)においてp38MAPKのリン酸化とNF- κ Bの核内転座がおこり、TFのmRNAが誘導される機序が想定されている(Bohgaki et al., 2004)。APSの約半数がSLEを合併するが、単独で発症する場合は原発性と分類され、原発性APS(Primary APS : PAPS)においても補体の消費による低下がみられることが分かっている。これら低補体血症を伴うPAPS患者血清中において、C4aとC3aの増加を伴うがC5aの増加は認めず免疫複合体価の上昇を認めることから、補体古典経路の活性化が病態形成に関与することが示唆されている(Oku et al., 2009)。またI因子の補因子としてC3bBbを解離させ第二経路の制御因子として機能するH因子(FH)の血中濃度の低下が報告されている(Nakamura et al., 2018)。一部のAPS患者ではFHに対する自己抗体を有しており(Foltyn Zadura et al., 2015), 補体因子Bbの血中濃度の上昇も報告されていることから(Breen et al., 2012), 第二経路の活性化も示唆されている。しかし、レクチン経路においては凝固系との関連が示されているにも関わらず、APSにおける関与を示した報告は認めない。

全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus : SLE)は多彩な自己抗体が産生される自己免疫疾患である。病態形成には補体系が大きく関与し、

抗体単独または抗原抗体複合体の組織への沈着がトリガーとなり古典経路が活性化される。ループス腎炎 (Lupus nephritis: LN) は重大な臓器合併症であるが、病態形成には第二経路の関与が報告されている。一方で LN において MBL の沈着による尿蛋白の増悪が示され、レクチン経路の活性化が尿蛋白増悪に関与している可能性も示唆されている。MASP においては、SLE 患者において MASP-2 および MASP-3 の血中濃度が高値であることや、SLE Disease Activity Index (SLEDAI) に伴い MASP-3 の血中濃度が低下することが示されているが、LN との関連は明らかになっていない。加えて、LN の急性期における MASP の関与は未だ不明である。

我々は補体活性化疾患である PAPS や LN において、MASP により活性化をうける補体活性化経路の病態形成への関与を仮定し、実験を行った。

5.2 目的

本研究の目的は、抗リン脂質抗体症候群、ループス腎炎の病態における MASP により活性化をうける補体活性化経路の関与を評価することである。

5.3 方法

5.3.1 研究デザイン

本研究は横断研究である。入院時の採血または保存血清を用いて MASP 濃度の測定を行い、血清採取時の臨床情報は医療記録から収集した。全ての血清は、入院時または通常の外来受診時に患者または健常人の同意を得て採取・保存した。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（承認番号:020-0160）を得て行った。

5.3.2 対象

2006 年 7 月から 2012 年 3 月に北海道大学病院内科Ⅱを受診した PAPS 患者 30 名、LN 患者 37 名と、健常人(Healthy control : HC)21 名を対象とした。APS の診断は国際分類基準(2006 年札幌クライテリア・シドニー改変基準)に基づき(Miyakis et al., 2006), 少なくとも 2 名以上の専門医が行った。SLE の診断は米国リウマチ学会 1997 年改訂基準に基づき, LN の診断は腎生検による組織学的に基づいて行った(Hochberg, 1997)。LN 患者は 2003 年 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society 基準に基づき分類し, ClassⅢ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅲ + Ⅳ, Ⅲ + Ⅴ, Ⅳ + Ⅴの患者を対象とした(Weening et al., 2004)。LN 患者血清は治療開始前, または SLEDAI-2K $\leq$ 4 かつプレドニゾロン $\leq$ 7.5 mg/日で維持療法中に蛋白尿 >0.5 g/g·cr に増悪時のものを用いた(Franklyn et al., 2016)。血清 C4, C3 値は診療において標準化免疫比濁法で測定された結果を診療録から抽出した。

5.3.3 血清 MASP-1, MASP-2, MASP-3 濃度の測定

血清 MASP-1 濃度は市販の ELISA キットを用い, プロトコールに従って測定した(Human MASP1 Elisa Kit, MyBioSource)。ヒト抗 MASP-1 抗体が固相化された ELISA プレートに患者血清を添加し, 37 °C で 90 分間インキュベートした。液をすてた後, ビオチン標識抗体を加え, 37 °C で 60 分間インキュベート

した。洗浄後にペルオキシダーゼ標識したアビジンと発色基質を添加し、450 nm の吸光度を測定した。

血清 MASP-2 濃度は市販の ELISA キットを用い、プロトコールに沿って測定した (Human Mannan-binding lectin serine protease 2 ELISA Kit, MyBioSource)。ヒト抗 MASP-2 抗体が固相化された ELISA プレートに患者血清と、ビオチン標識ヒト抗 MASP-2 抗体を添加し、ペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンを加え、37 °C で 60 分間インキュベートした。洗浄後に発色基質を添加し、450 nm の光学濃度を測定した。

血清 MASP-3 濃度は市販の ELISA キットを用い、プロトコールに沿って測定した (Human Mannose Associated Serine Protease 3 ELISA Kit, MyBioSource)。抗 MASP-3 抗体が固相化された ELISA プレートに患者血清と抗 MASP-3 抗体を添加し、ペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンを加え、37 °C で 60 分間インキュベートした。洗浄後に発色基質を添加し、450 nm の光学濃度を測定した。

5.3.4 抗リン脂質抗体の測定

LA は semiautomated hemostasis analyzer (Start 4; Diagnostica Stago) を用い、国際血栓止血学会 (the Scientific and Standardisation Committee of the International Society of Thrombosis and Haemostasis : SSC-ISTH) のガイドラインに基づき (Brandt et al., 1995)}, 活性化トロンボプラスチン時間: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) で確認試験をおこなった。dRVVT はスクリーニングと確認試験に Gradipore LA test (Gradipore) を用いた。KCT は kaolin solution (Dade Behring) 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。

IgG aCL および IgM aCL は標準化された aCL ELISA 法により測定した (Harris et al., 1987)。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。

IgG および IgM $\alpha\beta 2\text{GPI}$ は既報に沿って in-house の ELISA 法により測定した (Amengual et al., 1996)。精製ヒト $\beta 2\text{GPI}$ はヤマサ製を使用し、照射マイクロタイタープレートは、MAXI SORP (NUNC) を使用した。4 $\mu\text{g/ml}$ 精製 $\beta 2\text{GPI}$ ・PBS 溶液をプレートに添加し、4 °C で一晩固相化した。非特異的結合を避けるため 150

μl 3%ゼラチン (BDH Chemicals)でブロッキング処理を行った。0.05%Tween20 (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 μl を2well ずつアプライした。プレートを室温で1時間インキュベートし、PBS-Tween で3回洗浄した。PBS-1%BSA でアルカリホスファターゼ (ALP)標識ヤギ抗ヒト IgG および IgM 抗体 (Sigma-Aldrich)を希釈し、50 μl/well を追加、室温で1時間インキュベートした。PBS-Tween で4回洗浄後、1 M 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)を加え溶液を 100 μL ずつ各ウェルに添加した。405 nm 吸光度 (OD) は Multiskan ascent plate reader (Thermo Electron)で測定した。IgG 抗体 (> 2.2 U/ml)および IgM 抗体(> 6.0 U/ml)の正常範囲は、健常非妊娠 132 名の 99 パーセンタイルによって設定した。

aPS/PT は既報に沿って、PS とプロトロンビンの複合体を抗原として使用した in-house の ELISA 法で測定し (Atsumi et al., 2000)た。まず PS の固相化のため、マイクロタイタープレート (スミロンタイプ S, 住友ベークライト)を使用し、50 μg/mlPS (Sigma-Aldrich)を各ウェル 40 μl ずつ撒き 4 °Cで一晩静置した。非特異的結合を避けるため、1%脂肪酸フリーの BSA (Sigma-Aldrich)および 5 mM 塩化カルシウム (BSA-Ca)を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) 150 μl でブロッキング処理を行った。0.05%Tween20 (Sigma-Aldrich)および 5 mM 塩化カルシウムを含む TBS (TBS-Tween-Ca)で3回洗浄後、10 μg/ml の精製ヒトプロトロンビン (Diagnostica Stago)を含む BSA-Ca を、50 μl ずつ半分のウェルに、BSA-Ca のみ (検体ブランク)を残りの半分のウェルにアプライし、37 °Cで1時間、インキュベーションした。洗浄後、BSA-Ca で100倍に希釈した血清 50 μl を各ウェルに加えた。ALP 結合ヤギ抗ヒト IgG/IgM 抗体と基質を加え、室温で1時間インキュベート後、吸光度を測定した。各サンプルの aPS/PT 力価は、陽性コントロールの希釈倍率に応じた標準曲線から導出した。aPS/PT の正常範囲 (IgG> 2.0 U/ml および IgM> 9.2 U/ml)は、非妊娠 132 健常対照群の 99 パーセンタイルで設定した。

5.3.5 統計分析

正規分布が仮定できない連続変数は中央値[四分位範囲]で示した。2 値変数の群間比較は Fisher' s exact test を用いた。連続変数は Kruskal-Wallis test, 群間は Steel-Dwass test により多重比較検定を行った。2 群間の相関比較は Spearman' s rank-order correlation coefficient を用いて評価した。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 JMP Pro software (ver.12.0; SAS Institute Inc) を用いて行った。

5.4 結果

5.4.1 患者背景

全患者の統計学的データ，臨床データ，検査データを Table 1 にまとめた。年齢中央値は PAPS 42.5 歳 [33.5–52.3]，LN 30.0 歳 [19.5–43.0]，HC 31.0 歳 [27.0–34.5] であった。

C4 および C3 値は，LN (C4 : 9.0 [4.0–16.5] mg/dL, C3 : 47.0 [31.0–69.0] mg/dL) で PAPS (C4 : 13.0 [10.0–20.3] mg/dL, C3 : 80.5 [72.0–95.3] mg/dL) と比べて有意に低かった。

Table 1. 患者背景

		PAPS	LN	HC	p-value
人数	n	30	37	21	
年齢	years	42.5 [33.5-52.3]	30.0 [19.5-43.0]	31.0[27.0-34.5]	0.002
女性	n (%)	27 (90.0)	30 (81.1)	17 (81.0)	0.609
血栓症	n (%)	21 (70.0)			
動脈血栓症	n (%)	15 (50.0)			
静脈血栓症	n (%)	7 (23.3)			
妊娠合併症	n (%)	11 (36.7)			
C4	mg/dL	13.0 [10.0-20.3]	9.0 [4.0-16.5]		0.012
C3	mg/dL	80.5 [72.0-95.3]	47.0 [31.0-69.0]		<0.001
CH50	U/mL	40.1 [34.9-48.3]	22.8 [10.5-40.5]		<0.001
尿蛋白定量	g/g·cr		3.37 [1.62-6.53]		

全てのデータは中央値 [四分位範囲] もしくは人数 (%) で示した。2 値変数は Fisher' s exact test, 連続変数は Kruskal-Wallis の検定を用いた

PAPS : Primary antiphospholipid syndrome, LN : Lupus nephritis, HC : Healthy control.

5.4.2 血清 MASP-1, MASP-2, MASP-3 濃度

MASP-1 濃度は 3 群間で有意な差は認めなかった。(PAPS 5.724 [1.132-6.682] ng/ml, LN 5.875 [1.974-7.554] ng/ml, HC 2.935 [1.029-4.562] ng/ml)

MASP-2 濃度は PAPS(0.368 [0.227-0.535] μ g/ml, $p=0.0013$)と LN(0.477 [0.314-0.591] μ g/ml, $p=0.0156$)が HC(0.769 [0.469-1.108] μ g/ml)と比較し有意に低値であった。

MASP-3 濃度は PAPS(10.570 [6.574-10.684] ng/ml, $p<0.001$)および LN(12.451 [6.192-14.011] ng/ml, $p<0.001$)は、それぞれ HC(56.106 [16.759-82.795] ng/ml)と比較し有意に低値であった。

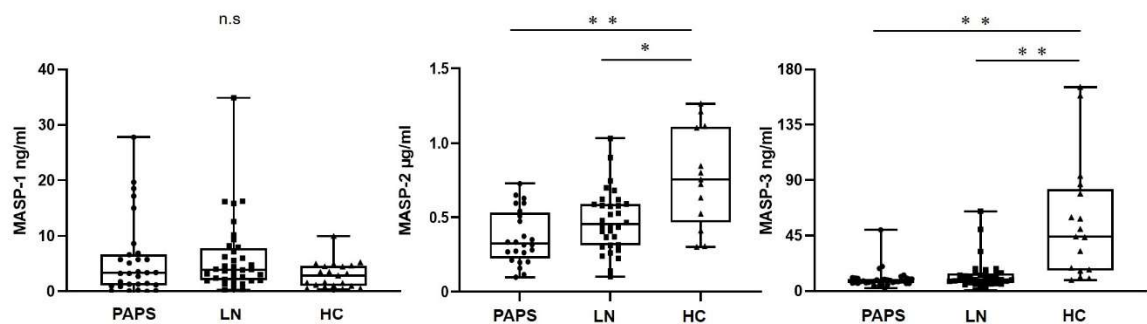


Figure 8. MASP-1, MASP-2, MASP-3 の濃度

箱は四分位範囲を示し、内部の線は中央値を示す。ヒゲは最大値および最小値を表す。* $p<0.05$, ** $p<0.001$. Kruskal-Wallis with post hoc Steel-Dwass test. PAPS: Primary antiphospholipid syndrome, LN: Lupus nephritis, HC: Healthy control, MASP: Mannose binding lectin associated serine protease.

5.4.3 PAPS における MASP と aPL, C4, C3 との相関

PAPS において, MASP-1, MASP-2, MASP-3 濃度はいずれも C4, C3 値と有意な相関を示さなかった (Table 2)。

MASP-1 濃度は IgG aPS/PT 値および IgM aPS/PT 値と負の相関を示した ($p=0.0308$, $r=-0.4415$ および $p=0.0175$, $r=-0.5010$)。

MASP-2 濃度は IgG aPS/PT 値と正の相関を示した ($p=0.0158$, $r=0.5318$)。

MASP-3 濃度はいずれの aPL とも有意な相関を示さなかった。

Table 2. PAPS における MASP と aPL, C4, C3 の相関

	MASP-1		MASP-2		MASP-3	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value
C4	-0.0716	0.7067	-0.2258	0.2888	0.0566	0.7834
C3	0.1540	0.4165	-0.3140	0.1352	-0.2399	0.2377
LA	-0.2429	0.2318	0.3609	0.1080	0.1677	0.4557
IgG aCL	0.0087	0.9677	0.0272	0.9118	-0.1772	0.4549
IgM aCL	-0.4605	0.0748	0.4930	0.0542	0.3987	0.1576
IgG a β 2GPI	0.2000	0.7139	0.1000	0.9500	-0.2000	0.9167
IgM a β 2GPI	-0.0357	0.9635	0.3000	0.6833	-0.4000	0.5167
IgG aPS/PT	-0.4415	0.0308	0.5318	0.0158	-0.0827	0.7287
IgM aPS/PT	-0.5010	0.0175	0.4178	0.0751	0.0247	0.8671

* $p<0.05$. PAPS における MASP と aPL, C4, C3 の相関関係を Spearman rank correlation coefficient を用いて解析した。PAPS: Primary antiphospholipid syndrome, MASP: Mannose binding lectin associated serine protease, aPL: Antiphospholipid antibody, aCL: Anti-cardiolipin antibody, a β 2GPI: Anti- β 2 Glycoprotein I antibody, aPS/PT: Phosphatidylserine dependent anti-prothrombin antibody.

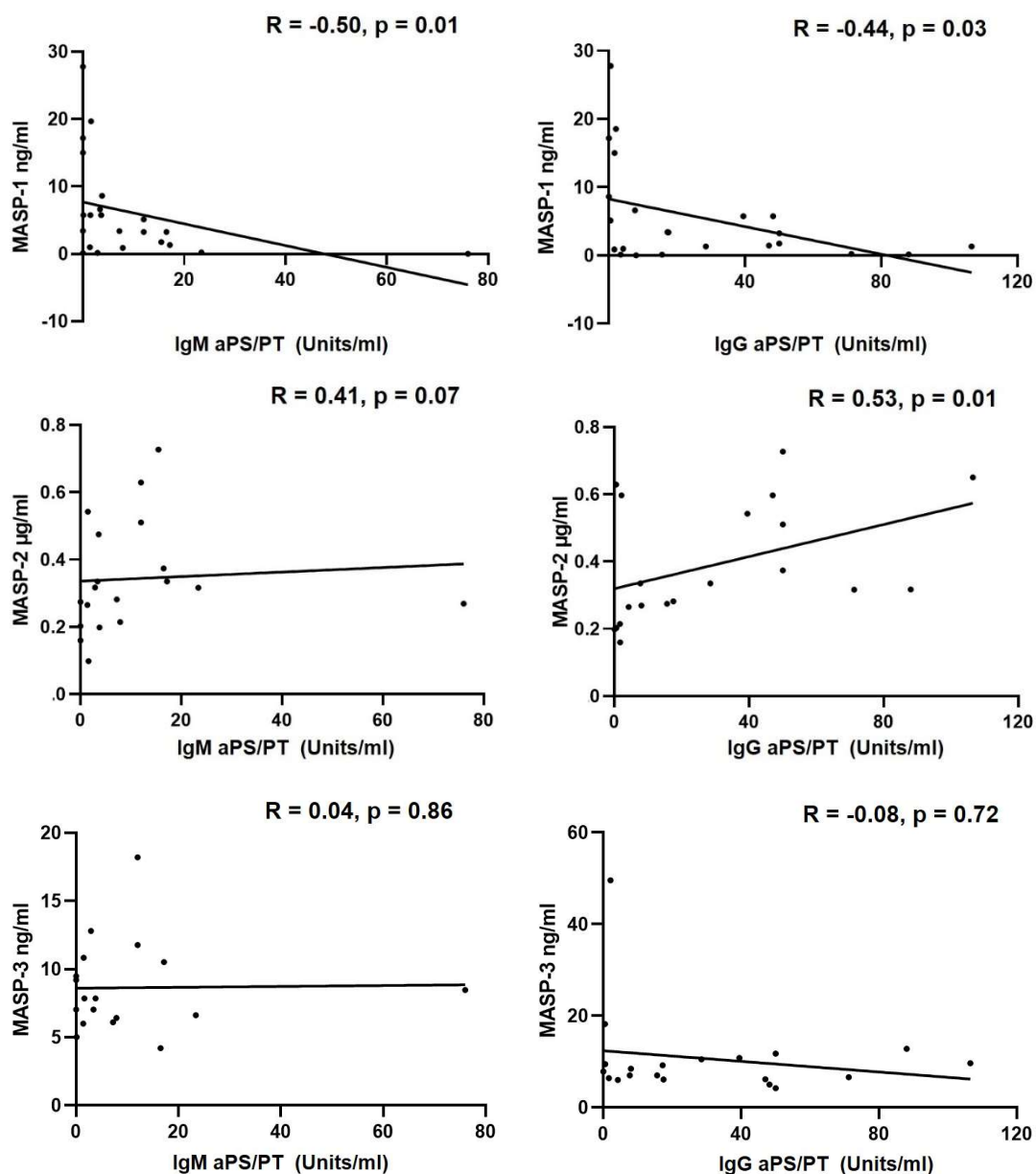


Figure 9. PAPS における MASP と aPS/PT との相関

* $p < 0.05$. PAPS における MASP と aPS/PT の相関関係を Spearman rank correlation coefficient を用いて解析した。PAPS: Primary antiphospholipid syndrome, MASP: Mannose binding lectin associated serine protease, aPL: Antiphospholipid antibody, aPS/PT: Phosphatidylserine dependent anti-prothrombin antibody.

5.4.4 LN における MASP と尿蛋白, C4, C3 との相関

LN において, MASP-1, MASP-2, MASP-3 濃度はいずれも尿蛋白と有意な相関を示さなかった (Table 3)。

MASP-1 濃度は C4, C3 値と正の相関を示した ($p=0.0164$, $r=0.3975$ および $p=0.0484$, $r=0.3313$)。

MASP-2 濃度は C4 値と正の相関を示した ($p=0.0479$, $r=0.3524$)。

MASP-3 濃度は C4 値と正の相関を示した ($p=0.0198$, $r=0.3921$)。

Table 3. LN における MASP と尿蛋白, C4, C3 の相関

	MASP-1		MASP-2		MASP-3	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value
尿蛋白	-0.0934	0.5878	0.1782	0.3293	-0.0267	0.8787
C4	0.3975	0.0164	0.3524	0.0479	0.3921	0.0198
C3	0.3313	0.0484	0.2369	0.1918	0.0101	0.9538

* $p < 0.05$. LN における MASP と尿蛋白, C4, C3 の相関関係を Spearman rank correlation coefficient を用いて解析した。LN: Lupus nephritis, MASP: Mannose binding lectin associated serine protease.

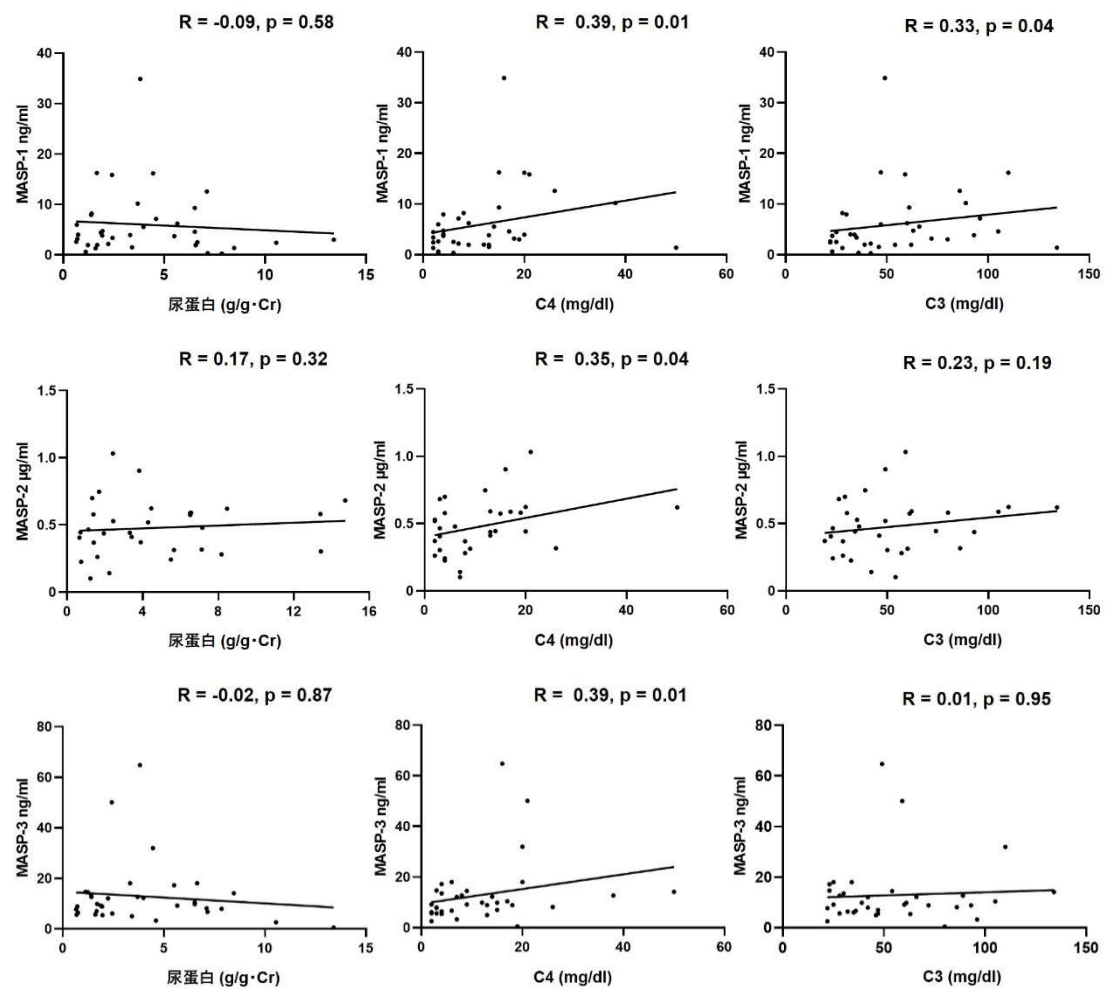


Figure 10. LNにおける尿蛋白と aPL, C3, C4 との相関

* $p < 0.05$. LNにおけるMASPと尿蛋白, C4, C3の相関関係をSpearman rank correlation coefficientを用いて解析した。LN: Lupus nephritis, MASP: Mannose binding lectin associated serine protease.

5.5 考察

本研究では PAPS と LN において、血清 MASP-2 濃度と血清 MASP-3 濃度が有意に低下していた。PAPS において MASP-1 と IgG/IgM aPS/PT が負の相関を示し、MASP-2 と IgG aPS/PT が正の相関を示していた。LN においては、MASP-1 が C4 および C3 と正の相関を示し、MASP-2 および MASP-3 が C4 と正の相関を示していた。これら一連の結果から、PAPS および LN と、レクチン経路および MASP との関連について考察する。

PAPS において血清 MASP-2 濃度が有意に低下していたが、一般的に補体カスケードの活性化において、消費が産生を上回れば血清補体タンパク濃度は低下する。そのため MASP-2 の低下は消費に起因する可能性がある。一方で血清 MASP-1 濃度に関しては有意な低下を認めなかった。これは MASP-1 が活性化せず、MASP-2 独自の機能として APS の病態に関与している可能性がある。MASP-1 が MASP-2 の活性化に大きく寄与するが、MASP-2 は MASP-1 を介さずに autoactivation することができる (Garred et al., 2016)。そのため MASP-2 と MASP-1 の血清濃度の挙動に乖離がみられた可能性がある。

また血清 MASP-2 濃度の低下が産生量の低下に起因する可能性も考えられる。しかし MASP の産生量を解析した報告はなく、Masp1 および Masp2 遺伝子が IL-1 β により upregulation され、Masp1 遺伝子が IL-6 により downregulation されることが示唆されているものの、明確な調節機構は不明である (Endo et al., 2002)。

PAPS において、血清 C4, C3 値の低下が認められる症例が一定数存在する。補体カスケードにおいて古典経路、レクチン経路の両者とも C4 と C2 の切断を介し第二経路を活性化させるため、レクチン経路が活性化したのであれば血清 C4, C3 値は消費により低下することが予想された。しかし本研究では PAPS において、血清 MASP-1, MASP-2, MASP-3 濃度は血清 C4, C3 値と相関を示さなかった。この一つの理由として、古典経路と異なりレクチン経路においては C4 の非存在下で第二経路を活性化することが報告されており (Yaseen et al., 2017), MASP による C4 を介さない活性化である可能性が考えられる。またもう一つの可能性として、レクチン経路の活性化により C4, C2 の切断が生じたとしても、必ずしも血清 C4, C3 値の低下に至らない可能性が考えられる。実際にレクチン経路の活性化が病態に関わることが組織学的に証明されている IgA 腎症では、血清 C4, C3 値の低下は一般的でない。さらに同疾患では血漿 MASP-1 濃度が上昇することが報告され、血漿 MASP-2 濃度との乖離が確認されている (Medjeral-Thomas et al., 2018)。そのため PAPS において、血清 C4, C3 が低下していない状況でも、

潜在性に補体レクチン経路が活性化している可能性は否定できない。

PAPS において、MASP-1 と IgG/IgM aPS/PT が負の相関を示し、IgG aPS/PT と正の相関を示した。レクチン経路は凝固系との関連性が示されており、MBL およびフィコリンはフィブリノゲン/フィブリンと強い親和性を有し (Endo et al., 2010), MASP-2 は Xa 因子様活性を有しプロトロンビンを切断することができる (Krarup et al., 2007)。MASP-1 はフィブリノゲンや X III 因子を切断し架橋フィブリンを生成する (Dobó et al., 2014)。さらに MASP-1 は PAR4 を切断することで、内皮細胞における p38 MAPK のリン酸化と NF- κ B の核内転座を誘導することも報告されており (Megyeri et al., 2009), aPL における向血栓細胞の活性化との共通点も多い。そのため MBL/フィコリンがフィブリノゲン/フィブリンと結合することでレクチン経路が活性化し、MASP-1 および MASP-2 によるトロンビンの生成、トロンビン作用が APS の病態に関与している可能性も考えられる。とりわけ MASP-2 がプロトロンビナーゼ複合体として効率的に機能するのであれば、MASP-2 の活性化はより強く血栓形成と関連することが考えられる (Krarup et al., 2007)。

LN においては、血清 MASP-2, MASP-3 濃度が有意に低下していた。このことは C3 低値を認める SLE 群において血清 MASP-2 および MASP-3 濃度が低いという既報に矛盾しない (Troldborg et al., 2018)。また MASP-1 が C4 および C3 と正の相関を示し、MASP-2 および MASP-3 が C4 と正の相関を示した。このことから、LN では古典経路、第二経路に加え、レクチン経路も活性化している可能性が考えられる。一般的に MBL/フィコリンといったレクチン経路の認識分子は、細菌表面の Mannose や GlcNAc を認識することでレクチン経路を活性化させるため、LN の病態形成においてレクチン経路がトリガーとなることは考えにくい。しかし MBL/フィコリンはフィブリノゲンに対する結合能を有している。また SLE は血栓症の罹患率が高い疾患であり (Bernatsky et al., 2006), MASP/serpin 複合体のレベルが血小板の活性化レベルと相関していることが示され、血小板の活性化とフィブリン形成の複合作用により MASP-1 と MASP-2 が活性化されることが示されている (Kozarcanin et al., 2016)。したがって LN において、第二経路の活性化により生じた C5a や MAC により、内皮細胞における TF 産生やプロトロンビナーゼが形成され凝固系が亢進することで、二次的にレクチン経路が活性化している可能性も推察される。

まとめると、本研究ではじめて PAPS におけるレクチン経路の関与が示された。カスケードとしてレクチン経路が活性化しているかは不明であるが、血清 MASP-2 濃度の低下がみられたことから、病態形成において MASP が関与している可能性が示された。また aPS/PT と MASP-1 が負の相関を、MASP-2 が正の相関を示した。MASP-1 および MASP-2 はそれぞれ凝固系に対する異なる機能を有し、

両者とも autoactivation することができることから、MASP-1 と MASP-2 はカスケードではなく個々のタンパクとして病態形成に寄与している可能性も考えられた。LN においても、血清 MASP-2 濃度が低下し、MASP-1、MASP-2、MASP-3 と C4 に正の相関がみられたことから、レクチン経路が活性化している可能性が考えられた。レクチン経路がトリガーとなることは疾患の特徴から考えにくいですが、凝固系が亢進することにより二次的にレクチン経路が活性化した可能性は推察される。

MASP-2 は PAPS および LN における治療標的としての発展性を有する可能性がある。MASP-2 を標的とすることで古典経路を温存しつつ、レクチン経路を抑制することができる。さらに血清 MASP-2 は他の補体タンパクに比べ低濃度であり (Troldborg et al., 2017)、標的治療薬として少量投与かつ比較的長い投与間隔の設定も期待できると考えられる。PAPS および LN における補体レクチン経路単独の関与は未だ検証されていない。今後はより MASP-2 が関与する患者群や疾患活動性との関連を探り、レクチン経路の一連のステップとしての活性化の証明、急性期と慢性期の相違点の検討を課題としたい。

5.6 結語

PAPS, LN において, MASP-1, MASP-2 によるレクチン経路の活性化および MASP-3 による第二経路の活性化が病態形成に関与する可能性が示された。

6 第三章

抗リン脂質抗体症候群患者における クラスター分析を用いた長期予後の解析

6.1 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) が持続的に陽性であることを特徴とする自己免疫疾患であり、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 (Anti-cardiolipin antibody : aCL), 抗 β 2 GPI 抗体 (Anti- β 2 Glycoprotein I antibody : a β 2 GPI) を含む (Amengual and Atsumi, 2018)。その他にホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (Phosphatidylserine dependent anti-prothrombin antibody : aPS/PT) や β 2 GPI のドメイン I に対する抗体も APS の症状と関連することが報告されている (Sciascia et al., 2014)。

aPL の持続的陽性は APS における血栓症リスクと関連しており、血栓症の再発率が高い。また APS における血栓リスクを評価するために、aPL スコア (aPL-S) と Global APS スコア (GAPSS) が提唱された (Otomo et al., 2012) (Sciascia et al., 2013)。aPL-S は個々の aPL プロファイルを表す定量的なマーカーであり、aPL-S ≥ 30 は血栓症の有意な危険因子と考えられている。GAPSS は血栓症または不育症に対する各 aPL の相対リスクを計算するためのツールである。GAPSS > 16 は将来の血栓イベントの独立した危険因子として報告されている。しかし APS 患者においてリスク層別化による予後の評価は未だ報告されておらず、APS 患者の臨床的特徴・合併症は aPL プロファイルに加えて予後不良の一因となっている可能性がある。したがって aPL プロファイル、臨床的特徴、合併症などの情報を用いて適切な予後評価を行う必要がある。クラスター解析は複数の特徴からサブグループを特定する統計学的手法である。クラスター解析を用いることで患者を分類し予後进行评估することが可能になる。第三章では、クラスター解析に基づいて日本人の APS と診断された患者の予後が悪いグループを特

定することを目的とした。

6.2 目的

本研究の目的は、クラスター分析により APS 患者をリスク層別化し長期予後不良群の特徴を明らかにすることである。

6.3 方法

6.3.1 研究デザイン

本研究は後ろ向きコホート研究であり、北海道大学病院倫理委員会（承認番号：017-0354）の承認のもと、「ヘルシンキ宣言」ならびに「Good Clinical Practice」に基づき、北海道大学病院で実施した。

6.3.2 対象および主要評価項目

当院で札幌クライテリア・シドニー改変に基づき(Miyakis et al., 2006), 1990年から2019年の期間でAPSと診断した患者を対象とした。フォローアップ期間が2年未満の患者は除外した。観察期間開始時に、高血圧、糖尿病、脂質異常症、喫煙、 $aPL-S \geq 30$ を含む動脈血栓症の危険因子を確認した。

6.3.3 抗リン脂質抗体の測定

aPLは第二章で記載した方法と同様の手法で測定した。Triple positiveは、LA, IgG/IgM aCL, IgG/IgM $\alpha \beta 2GPI$ が全て陽性であると定義された。

6.3.4 クラスタ分析

APS診断時の年齢、性別、観察期間、SLEの併発、喫煙、高血圧、脂質異常症、糖尿病、心血管リスク ≥ 3 、動脈血栓症の既往、静脈血栓症の既往、LA, aCL, $\alpha \beta 2GPI$, aPS/PT, aPL-Sを変数として用いた。階層型クラスタ分析を施行し、Euclidean距離とWard凝集法を適用した。理想的なクラスタ数を確定するためにdendrogramを参考にし、APS患者を共通の特徴毎に3つのクラスタに分類した(Figure 11)。これらのクラスタについて、後述する統計学的手法で解析を行った。

6.3.5 エンドポイント

エンドポイントはイベントの発症と定義した。イベントは、動脈または静脈血栓症の再発、重度の出血、死亡と定義した。各患者の観察期間は、APS と診断された時点から開始し、イベント発生時または観察期間終了時までとした。血栓症は画像検査により診断し、重度の出血は入院および輸血を要する出血と定義した。

6.3.6 統計分析

カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで記載し、群間比較は Fisher' s exact test を用いた。連続変数は中央値と四分位で示し、群間比較は Wilcoxon test または Kruskal-Wallis test を用いた。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 JMP Pro software (ver. 14.12.0; SAS Institute) と GraphPad Prism software (ver. 7.02; GraphPad software) を用いて行った。

6.4 結果

6.4.1 患者背景

計 168 人の APS 患者が解析された。全患者の統計学的データ，臨床データ，検査データを表 1 にまとめた。コホートは女性 144 名，男性 24 名で，発症年齢中央値は 39 歳 (29.5-55)，観察期間中央値は 10 年 (5-15) であった。クラスター分析により 168 例を 3 つのグループに分類した (Table 4)。

6.4.2 クラスターA：二次性 APS

クラスターA には 61 人 (全体の 36%) の患者が分類され，72% の患者が SLE を併発していた。観察期間の中央値は 8 年であった。観察期間中に死亡 1 例 (1.6%)，イベント 16 例 (26%) が確認された。クラスターA を二次性 APS 群とした。

6.4.3 クラスターB：High Risk

クラスターB には，他の群に比べ高齢であり，56 人 (全体の 33.3%) の患者が分類された。これらの患者は，高血圧，脂質異常症，糖尿病などの心血管リスクを有する傾向にあった。このクラスターの特徴は，動脈血栓症の有病率が高いことであった。観察期間の中央値は 9 年であった。観察期間中に死亡 8 例 (14%)，イベント 28 例 (50%) が確認された。クラスターB を High Risk 群と定義した。

6.4.4 クラスターC：aPL

クラスターC には，51 人 (全体の 30.4%) の患者が分類された。このクラスターの特徴は，Triple positive の割合が高く，静脈血栓症の有病率も多い傾向にあった。観察期間の中央値は 14 年であった。観察期間中に死亡 5 例 (9.8%)，イベント 21 例 (41%) が確認された。クラスターC を aPL 群と定義した。

Table 4. 患者背景

		全体 (n=168)	Cluster A (n=61)	Cluster B (n=56)	Cluster C (n=51)	P value
年齢	中央値 (四分位範囲)	39 (29.5-55)	32 (25-38)	56 (50-63)	39 (25-51)	< 0.001
観察期間 (月)	中央値 (四分位範囲)	10 (5-15)	8 (3-14)	9 (5-14)	14 (7-17)	0.004
女性	n (%)	144 (85.7)	52 (85.2)	49 (87.5)	43 (84.3)	0.890
Primary APS	n (%)	63 (37.5)	15 (24.6)	26 (46.4)	22 (43.1)	0.032
APS and SLE	n (%)	98 (58.3)	44 (72.1)	27 (48.2)	27 (52.9)	0.031
APS and SS	n (%)	6 (3.6)	2 (3.3)	3 (5.4)	1 (2.0)	0.775
APS and MCTD	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
APS and RA	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
高血圧	n (%)	75 (44.6)	24 (39.3)	34 (60.7)	17 (33.3)	0.010
脂質異常症	n (%)	64 (38.1)	16 (26.2)	28 (50.0)	20 (39.2)	0.028
糖尿病	n (%)	23 (13.7)	6 (9.8)	11 (19.6)	6 (11.8)	0.304
喫煙	n (%)	39 (23.2)	16 (26.2)	13 (23.2)	10 (19.6)	0.742
動脈血栓症の既往	n (%)	108 (64.3)	32 (52.5)	46 (82.1)	30 (58.8)	0.002
脳梗塞	n (%)	92 (54.8)	25 (41.0)	39 (69.6)	28 (54.9)	0.008
心筋梗塞	n (%)	6 (3.6)	2 (3.3)	3 (5.4)	1 (2.0)	0.775
下肢動脈血栓	n (%)	5 (3.0)	3 (4.9)	1 (1.8)	1 (2.0)	0.625
消化管動脈血栓	n (%)	3 (1.8)	1 (1.6)	2 (3.6)	0	0.644
眼動脈血栓	n (%)	2 (1.2)	0	2 (3.6)	0	0.201

腎動脈血栓	n (%)	1 (0.6)	0	0	1 (2.0)	0.304
大動脈血栓	n (%)	1 (0.6)	1 (1.6)	0	0	1.000
静脈血栓症の既往	n (%)	53 (31.5)	18 (29.5)	10 (17.9)	25 (49.0)	0.003
深部静脈血栓	n (%)	39 (23.2)	13 (21.3)	8 (14.3)	18 (35.3)	0.035
肺塞栓	n (%)	17 (10.1)	7 (11.5)	2 (3.6)	8 (15.7)	0.089
眼静脈血栓	n (%)	2 (1.2)	2 (3.3)	0	0	0.331
表在静脈血栓	n (%)	2 (1.2)	0	1 (1.8)	1 (2.0)	0.535
妊娠合併症の既往	n (%)	50 (34.7)	22 (42.3)	8 (16.3)	20 (46.5)	0.006
妊娠高血圧/子癇	n (%)	6 (4.2)	3 (5.8)	0	3 (7.0)	0.203
死産(≥ 10 週)	n (%)	28 (19.4)	10 (19.2)	7 (14.3)	11 (25.6)	0.447
早産 (< 34 週)	n (%)	4 (2.8)	0	1 (1.9)	3 (7.0)	0.072
習慣流産 (< 10 週)	n (%)	19 (13.2)	11 (21.2)	0	8 (18.6)	0.007
LA	n (%)	138 (82.1)	49 (80.3)	41 (73.2)	48 (94.1)	0.011
aCL IgG/IgM	n (%)	95 (56.5)	21 (34.4)	24 (42.9)	50 (98.0)	< 0.001
a β 2GPI IgG/IgM	n (%)	99 (58.9)	26 (42.6)	25 (44.6)	48 (94.1)	< 0.001
aPS/PT IgG/IgM	n (%)	116 (69.0)	38 (62.3)	30 (53.6)	48 (94.1)	< 0.001
Triple positive	n (%)	65 (38.7)	7 (11.5)	12 (21.4)	46 (90.2)	< 0.001
aPL-S	Mean (SD)	31.0 (25.0)	16.8 (12.4)	20.4 (16.3)	59.7 (20.2)	< 0.001

P-values <0.05. Kruskal-Wallis test, Fisher's Exact test を用いて解析した。APS: Antiphospholipid syndrome, SLE: Systemic lupus erythematosus, SS: Sjögren syndrome, RA: Rheumatoid arthritis, MCTD: Mixed connective tissue disease, aPL-S: anti-phospholipid antibody score, LA: Lupus anti-coagulant, aCL: anti-cardiolipin antibody, a β 2GPI: anti- β 2GlycoproteinI antibody, aPS/PT: phosphatidylserine dependent anti-prothrombin antibody.

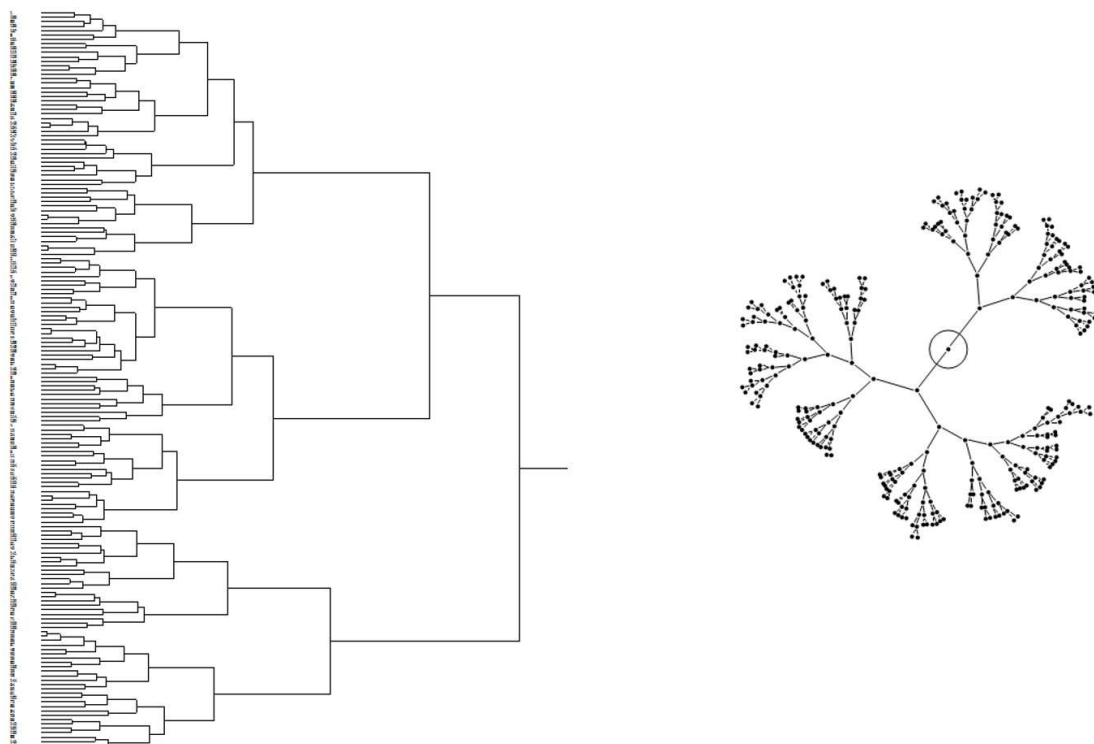


Figure 11. 階層型クラスター分析を適用した dendrogram および星座樹形図

APS 患者は一つのクラスターとみなされ, Euclidean 距離および Ward 凝集法により似た特徴をもつクラスター同士が結合された。最終的に異なる特徴をもつ 3 つのクラスターが形成された。

6.4.5 全てのイベント

観察期間内にイベントは 65 例で確認された。イベントの詳細を Table 5 に示した。Kaplan-Meier 解析では、APS 患者の 5 年および 10 年無イベント生存率は、それぞれ 81.7%および 64.7%であった (Figure 12)。クラスター分析では、クラスター B は他のクラスターと比較して有意に高いイベント発生率を示した (100 人年あたり 5.56) ($p=0.0112$: log-rank test)。

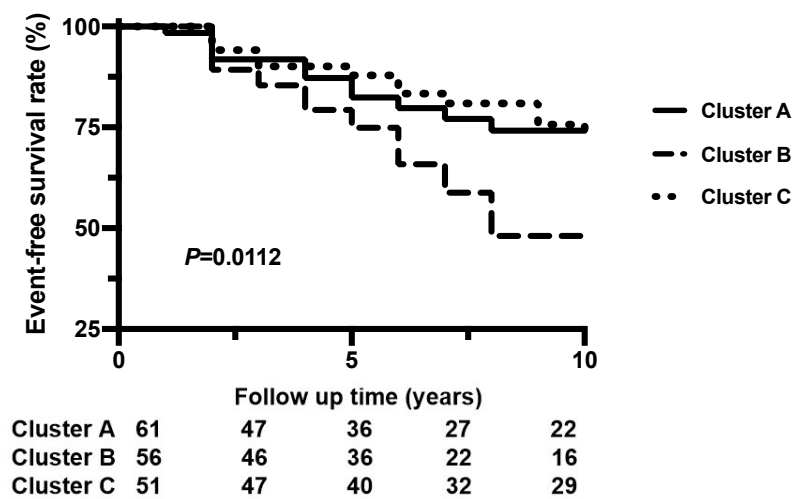
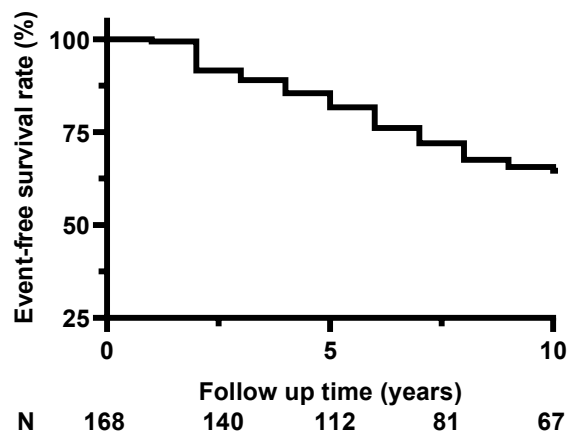


Figure 12. Kaplan-Meier 生存曲線を用いた APS 患者の無イベント生存曲線

APS 患者 168 例の無イベント生存率を Kaplan-Meier 生存曲線を用いて解析した。クラスターA: 二次性 APS, クラスターB: High Risk, クラスターC: aPL.

Table 5. 全てのイベント

		全体 (n=168)	Cluster A (n=61)	Cluster B (n=56)	Cluster C (n=51)	P value
イベント	n (%)	65 (38.7)	16 (26.2)	28 (50.0)	21 (41.2)	0.028
イベント発生率	100 人年	3.87	3.28	5.56	2.94	
血栓症再発	n (%)	47 (28.0)	14 (23.0)	19 (33.9)	14 (27.5)	0.428
動脈血栓症	n (%)	37 (22.0)	10 (16.4)	15 (26.8)	12 (23.5)	0.372
脳梗塞	n (%)	32 (19.1)	7 (11.5)	14 (25.0)	11 (21.6)	0.143
心筋梗塞	n (%)	3 (1.8)	1 (1.6)	1 (1.8)	1 (2.0)	1.000
眼動脈血栓	n (%)	1 (0.6)	1 (1.6)	0	0	1.000
下肢動脈血栓	n (%)	1 (0.6)	1 (1.6)	0	0	1.000
静脈血栓症	n (%)	10 (6.0)	4 (6.6)	4 (7.1)	2 (3.9)	0.780
深部静脈血栓症	n (%)	8 (4.8)	4 (6.6)	2 (3.6)	2 (3.9)	0.738
肺塞栓	n (%)	2 (1.2)	2 (3.3)	0	0	0.331
眼静脈血栓	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
表在静脈血栓	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
血栓症再発の発生率	100 人年	2.80	2.87	3.77	1.96	
重篤な出血	n (%)	9 (5.4)	1 (1.6)	5 (8.9)	3 (5.9)	0.214
肺胞出血	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
大動脈瘤破裂	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637

消化管出血	n (%)	2 (1.2)	0	2 (3.6)	0	0.201
頭蓋内出血	n (%)	5 (3.0)	1 (1.6)	1 (1.8)	3 (5.9)	0.445
重篤な出血の発生率	100 人年	0.54	0.20	0.99	0.42	
死亡	n (%)	14 (8.3)	1 (1.6)	8 (14.3)	5 (9.8)	0.030
血栓症に関連する死亡	n (%)	2 (1.2)	0	1 (1.8)	1 (2.0)	0.535
脳梗塞	n (%)	2 (1.2)	0	1 (1.8)	1 (2.0)	0.535
出血に関連する死亡	n (%)	2 (1.2)	0	2 (3.6)	0	0.201
肺出血	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
大動脈瘤破裂	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
他疾患に関連する死亡	n (%)	10 (6.0)	1 (1.6)	5 (8.9)	4 (7.8)	0.158
間質性肺炎	n (%)	2 (1.2)	0	1 (1.8)	1 (2.0)	0.535
SLE の増悪	n (%)	1 (0.6)	1 (1.6)	0	0	1.000
感染症	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
肺癌	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
悪性リンパ腫	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
筋萎縮性側索硬化症	n (%)	1 (0.6)	0	1 (1.8)	0	0.637
溺水	n (%)	1 (0.6)	0	0	1 (2.0)	0.304
不明	n (%)	2 (1.2)	0	0	2 (3.9)	0.091
死亡率	100 人年	0.83	0.20	1.59	0.70	

P-values <0.05. Kruskal-Wallis test または Fisher's Exact Test を用いて 3 群間を解析した。APS: Antiphospholipid syndrome, SLE: Systemic lupus erythematosus.

6.4.6 無イベント生存率：血栓症の再発

観察期間中に動脈血栓症 37 例，静脈血栓症 10 例を含む 47 例の血栓症を確認した。血栓症の発生率は 100 人年あたり 2.8 であった。クラスター A, B, C の各群において，Kaplan-Meier 解析では，10 年無イベント生存率はそれぞれ 75.5%，62.9%，83.5% であった。3 つのクラスター間には統計的に有意差は認められなかった ($p=0.1186$: log-rank test) (Figure 13)。動脈血栓症と静脈血栓症の解析でも，3 つのクラスター間で統計的な有意差は認められなかった (動脈血栓症 $p=0.10$ ，静脈血栓症 $p=0.17$)。

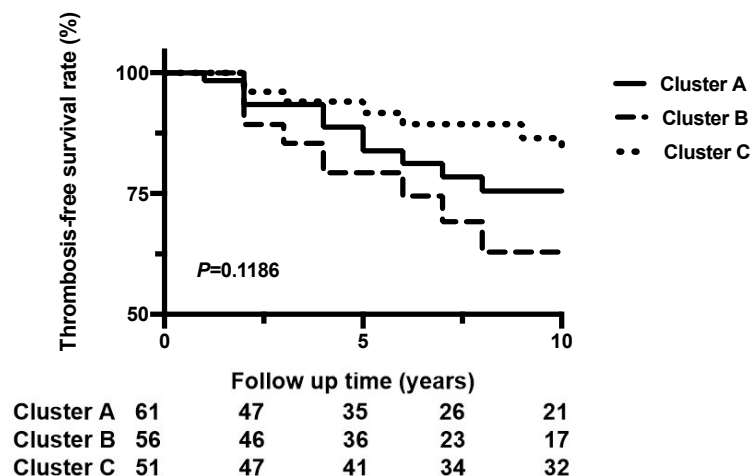


Figure 13. Kaplan-Meier 生存曲線を用いた血栓症無イベント生存曲線

3 群それぞれの血栓症無イベント生存率を Kaplan-Meier 生存曲線を用いて解析した。クラスター A: 二次性 APS，クラスター B: High Risk，クラスター C: aPL。

6.4.7 無イベント生存率：重度の出血

観察期間中に 9 例で重度の出血が確認された。重度の出血の発生率は 100 人年あたり 0.54 であった。各クラスターの Kaplan-Meier 解析では、10 年無イベント生存率はそれぞれ 98.3%, 92.2%, 92.3% であった。3 つのクラスター間には統計的に有意差は認められなかった ($p=0.1416$: log-rank test) (Figure 14)

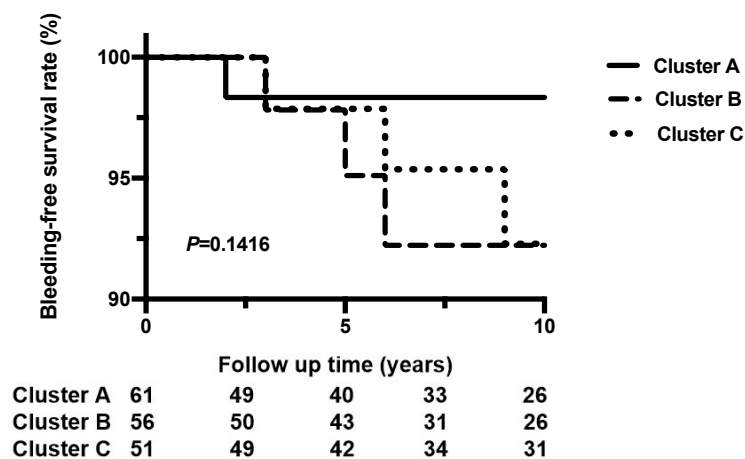


Figure 14. Kaplan-Meier 生存曲線を用いた出血無イベント生存曲線

3 群それぞれの出血無イベント生存率を Kaplan-Meier 生存曲線を用いて解析した。クラスターA：二次性 APS，クラスターB：High Risk，クラスターC：aPL.

6.4.8 無イベント生存率：死亡

観察期間中に 14 例で死亡が確認された。死亡率は 100 人年あたり 0.83 であった。クラスター分析では、クラスターBは他のクラスターと比較して有意に高い死亡率を示した(100 人年あたり 1.59) ($p=0.0471$: log-rank test) (Figure 15)。

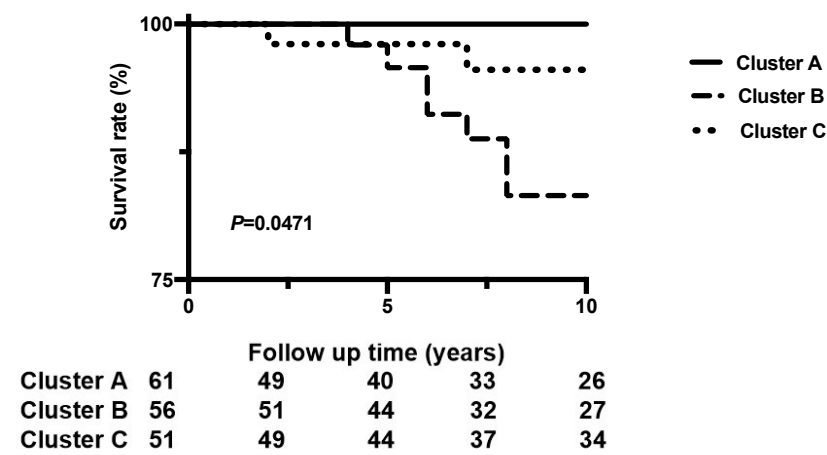


Figure 15. Kaplan-Meier 生存曲線を用いた無イベント生存曲線

3 群それぞれの無イベント生存率を Kaplan-Meier 生存曲線を用いて解析した。
 クラスターA：二次性 APS, クラスターB：High Risk, クラスターC：aPL.

6.4.9 イベント発生におけるリスク因子

イベント発生におけるリスク因子を同定するために、3 つ以上の心血管リスク、動脈血栓症の既往、Triple positive, SLE, 60 歳以上の年齢に関して Cox 比例ハザードモデルで多変量解析を行った (Table 6)。その結果、3 つ以上の心血管リスクと動脈血栓症の既往がイベント発症の有意なリスク因子であった ($p=0.006, 0.002$)。

Table 6. イベント発生におけるリスク因子

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Unadjusted Hazard Ratio	(95% CI)	P value	Adjusted Hazard Ratio	(95% CI)	P value
心血管リスク ≥ 3	2.32	(1.406 - 3.806)	0.001*	2.11	(1.246 - 3.542)	0.006*
動脈血栓症の既往	3.63	(1.838 - 8.252)	<0.001*	2.90	(1.434 - 6.705)	0.002*
Triple positive	0.83	(0.498 - 1.356)	0.456	0.77	(0.442 - 1.324)	0.349
SLE	0.90	(0.543 - 1.519)	0.685	0.84	(0.497 - 1.462)	0.540
60 歳以上の年齢	1.87	(0.991 - 3.311)	0.053	1.67	(0.861 - 3.071)	0.124

*P-values <0.05. P-values were calculated using Cox regression hazard model. SLE: Systemic lupus erythematosus. CI: Confidence interval.

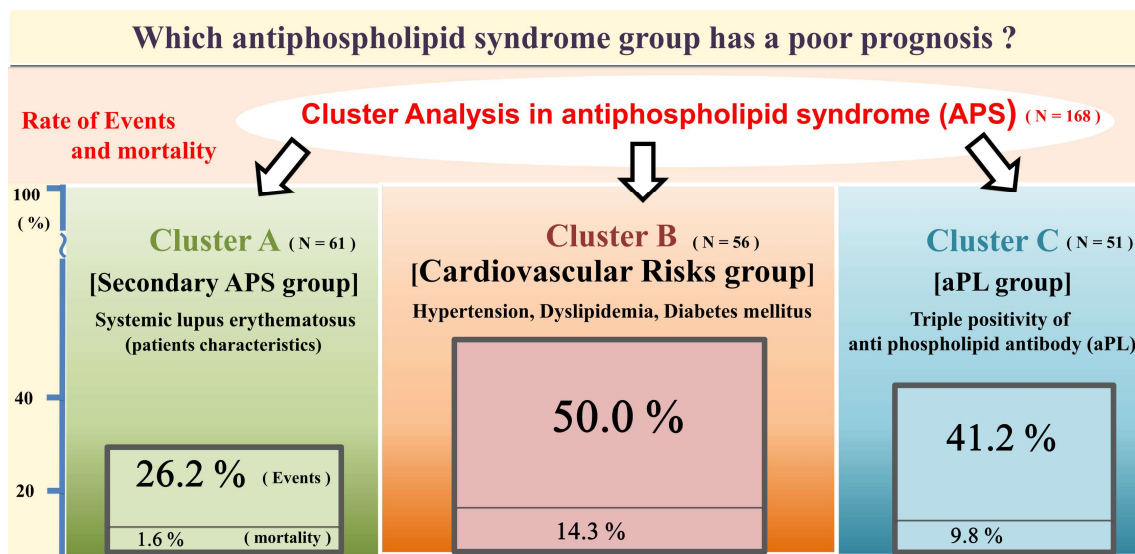


Figure 16. 結果のまとめ

3 群それぞれのイベント発生率は 26.2%, 50.0%, 41.2%であった。死亡率はそれぞれ 1.6%, 14.3%, 9.8%であった。クラスターB では統計学的に有意にイベント発生率, 死亡率が高かった (P=0.0112, P=0.0471:log-rank test)。

クラスターA : 二次性 APS, クラスターB : High Risk, クラスターC : aPL.

6.5 考察

本研究はクラスター分析に基づいた APS 患者の予後を評価した初めての後ろ向きコホート研究である。クラスター分析により、APS 患者を「二次性 APS」「High Risk」「aPL」の 3 群に分類した。このクラスタリングは、既報とは異なる分類となった(Sciascia et al., 2019)。本研究で用いたクラスタリングは、血清学的データと臨床データを兼ねて評価した分類である。

クラスターB「High Risk」では、SLE による血栓症のリスクが高いクラスターA「二次性 APS」や、Triple positive による血栓症リスクが高いクラスターC「aPL」と比較して、イベント発症のリスクが高かった。血栓症の危険因子として、高血圧、脂質異常症、糖尿病を含む心血管疾患の複数の危険因子を有していた。またクラスターB では、イベント発生率だけでなく死亡率も最も高かった。我々のコホートにおける 10 年生存率(92.7%)は、ヨーロッパの APS コホート(90.7%)と同程度であった(Cervera et al., 2015)。主な死因や、血栓症および重篤な出血の発生率は、2 つのコホートで類似していたため、人種間におけるバイアスは低い可能性が考えられる。年齢によるバイアスを除外するために、年齢を含み Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行った。その結果、3 つ以上の心血管リスクと動脈血栓症の既往がイベント発生のリスク因子であることが確認された。これらの結果より、血栓症リスクの蓄積が、イベント発生率と死亡率の増加に寄与していると考えられる。したがって、特に動脈血栓症の既往を有する APS 患者においては、これらの心血管リスク因子を是正することが重要である。

動脈血栓症の主な誘因は、動脈硬化性プラークの破綻である。 β 2GPI に対する抗体はアテローム血栓症の発症と関連している(Matsuura et al., 2008)。 β 2GPI は酸化 LDL(oxLDL)に結合し、oxLDL による炎症誘発を抑制している。APS 患者では oxLDL/ β 2GPI 複合体の血中レベルが上昇しており(Matsuura et al., 2006)、単球の活性化と組織因子の発現を誘発している(Otomo et al., 2016)。本研究では、クラスターB では脂質異常症を含む 3 つ以上の心血管リスクを有していた。したがって、aPL が介在する動脈硬化は予後不良因子である可能性がある。

本研究では、APS における予後不良群を同定するためにクラスター分析を用いた。クラスター分析を用いることにより、臨床データや検査データに関するグループ毎の特徴を明らかにすることができた。クラスターに関連した転帰を同定できることは、患者の特徴に応じた治療に有用であると考えられる。とりわけクラスター分析は新規治療法開発における臨床試験において、患者群の特徴

の分析に用いられており、APS における患者群毎の治療においても有用であると考えられる。

本研究にはいくつかの制限がある。まず研究デザインが単一施設の後向き研究であるため、患者数が不均衡である可能性である。次にコホートに男性が含まれたため、産科合併症をクラスタリングに加えることができなかったことである。最後に、治療は患者によりばらつきが大きく、クラスタリングからは除外されたことである。

結論として、クラスター分析の結果、APS 患者は「二次性 APS」「心血管リスクと動脈血栓症の既往」「Triple positive と静脈血栓症の既往」の 3 群いずれかのグループに分類されることが明らかになった。「心血管リスクと動脈血栓症の既往」のグループは、3 つのグループの中で最も予後が悪く、APS 患者において心血管リスクの蓄積がイベント発生率を増加させることが示された。APS 患者において、クラスター分析を用いたリスク層別化により、一層の心血管リスクに対するマネージメントに留意する必要があると考えられる。

6.6 結語

クラスター分析を用いることで、予後不良な APS 患者の特徴を明らかにした。心血管疾患の危険因子が APS 患者のイベント発生率および死亡率を増加させる可能性がある。

7 結論

本研究では以下の結論を得た。

1. レクチン経路を単独で阻害した MASP-1 欠損 MRL/*lpr* マウスを作製し、同マウスにおいて尿中アルブミン排泄が抑制されることを示した。このことから MASP-1 によるレクチン経路の活性化が尿蛋白排泄に関与する可能性が示された。
2. PAPS, LN において血清 MASP-2, MASP-3 濃度が有意に低下していることを示した。PAPS において, MASP-1 と IgG/IgM aPS/PT が負の相関を示し, MASP-2 と IgG aPS/PT が正の相関を示すことを明らかにした。LN において, MASP-1 は C4 および C3 と正の相関を, MASP-2 は C4 と正の相関を示し, MASP-3 は C4 と正の相関を示すことを明らかにした。このことから PAPS, LN において病態形成に MASP が関与する可能性が示された。
3. APS 患者をクラスター分析により 3 群に分類し, 動脈血栓症の既往や心血管疾患の危険因子を複数有する患者群がイベント発生率および死亡率を増加させる可能性があることを示した。このことから心血管疾患の危険因子を有する患者群が最も予後不良である可能性を示した。

補体関連疾患に対して補体を標的にした新たな治療法開発の可能性, 血栓の総合的リスクのマネジメントを併せて行うことが予後改善に貢献する可能性が考えられた。今後, 補体関連自己免疫疾患におけるレクチン経路を中心とした研究のさらなる発展や, 臨床において予後不良因子を見据えた治療戦略のために知見を集積したい。

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講師 奥健志先生には本研究の遂行にあたり、御指導、御助言を頂きました。助教 藤枝雄一郎先生からは研究への見識、論文推敲力を学びました。ここに心より深く感謝の意を表します。

また福島県立医科大学免疫学講座の関根英治先生には、補体学の基礎を御指導いただき、レクチン経路に関する研究を遂行することができました。町田豪先生にはテーマに関するご助言を多々頂き、実験に関する知見、後輩への心遣いなど、今後の自身の在り方の参考になる存在でした。大森智子先生は日ごろから良き相談相手になっていただき、石田由美さんには実験の基本手技を丁寧に御指導いただきました。ここに深謝の意を表します。

本教室膠原病グループ講師 Olga Amengual 先生、助教 加藤将先生、河野通仁先生からは研究、臨床において厳しくもあたたかい御指導を頂きました。

大学院を卒業された嶋村抄苗先生、中村浩之先生、河野通大先生、柴田悠平先生、谷村瞬先生、大西直樹先生は先輩として見習うべき、手本となる存在でした。土井基嗣先生、阿部早和子先生とは臨床において共に研鑽を積むことができました。阿部靖矢先生、狩野皓平先生、下山修平先生、麻生邦之先生、佐藤大貴先生、蜷川慶太先生、吉村大先生、菅原正成先生、竹山脩平先生、垂水政人先生は、後輩ながら見習うべき、学ぶべき点が多く、共に大学院を過ごすことができたことに感謝を申し上げます。Lee Wenshi 先生、工藤友喜さん、ジャンウエイさん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、本教室実験助手の金子由美子さん、石倉唯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、いつもそばで支えてくれた家族に心から感謝致します。

9 利益相反

本研究に際し、開示すべき利益相反状態はない。

10 引用文献

Ambrus, G., Gál, P., Kojima, M., Szilágyi, K., Balczer, J., Antal, J., Gráf, L., Laich, A., Moffatt, B.E., Schwaeble, W., *et al.* (2003). Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *170*, 1374-1382.

Amengual, O., and Atsumi, T. (2018). Antiphospholipid syndrome, "the best prophet of the future". *Modern rheumatology* *28*, 409-416.

Amengual, O., Atsumi, T., Khamashta, M.A., Koike, T., and Hughes, G.R. (1996). Specificity of ELISA for antibody to beta 2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome. *British journal of rheumatology* *35*, 1239-1243.

Amengual, O., Atsumi, T., and Koike, T. (2003). Specificities, properties, and clinical significance of antiprothrombin antibodies. *Arthritis and rheumatism* *48*, 886-895.

Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B., and Dixon, F.J. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *The Journal of experimental medicine* *148*, 1198-1215.

Asgari, E., Farrar, C.A., Lynch, N., Ali, Y.M., Roscher, S., Stover, C., Zhou, W., Schwaeble, W.J., and Sacks, S.H. (2014). Mannan-binding lectin-associated serine protease 2 is critical for the development of renal ischemia reperfusion injury and mediates tissue injury in the absence of complement C4. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *28*, 3996-4003.

Atsumi, T., Amengual, O., Yasuda, S., and Koike, T. (2004). Antiprothrombin antibodies-are they worth assaying? *Thrombosis research* *114*, 533-538.

Atsumi, T., Ieko, M., Bertolaccini, M.L., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Matsuura, E., and Koike, T. (2000). Association of autoantibodies against the phosphatidylserine-prothrombin complex with manifestations of the antiphospholipid syndrome and with the

presence of lupus anticoagulant. *Arthritis and rheumatism* 43, 1982-1993.

Bernatsky, S., Clarke, A., Gladman, D.D., Urowitz, M., Fortin, P.R., Barr, S.G., Senécal, J.L., Zummer, M., Edworthy, S., Sibley, J., *et al.* (2006). Mortality related to cerebrovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 15, 835-839.

Bohgaki, M., Atsumi, T., Yamashita, Y., Yasuda, S., Sakai, Y., Furusaki, A., Bohgaki, T., Amengual, O., Amasaki, Y., and Koike, T. (2004). The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2Glycoprotein I antibodies. *International immunology* 16, 1633-1641.

Brandt, J.T., Triplett, D.A., Alving, B., and Scharrer, I. (1995). Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thrombosis and haemostasis* 74, 1185-1190.

Breen, K.A., Seed, P., Parmar, K., Moore, G.W., Stuart-Smith, S.E., and Hunt, B.J. (2012). Complement activation in patients with isolated antiphospholipid antibodies or primary antiphospholipid syndrome. *Thrombosis and haemostasis* 107, 423-429.

Cervera, R., Serrano, R., Pons-Estel, G.J., Cerverio-Hualde, L., Shoenfeld, Y., de Ramón, E., Buonaiuto, V., Jacobsen, S., Zehner, M.M., Tarr, T., *et al.* (2015). Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 10-year period: a multicentre prospective study of 1000 patients. *Annals of the rheumatic diseases* 74, 1011-1018.

Cohen, D., Koopmans, M., Kremer Hovinga, I.C., Berger, S.P., Roos van Groningen, M., Steup-Beekman, G.M., de Heer, E., Bruijn, J.A., and Bajema, I.M. (2008). Potential for glomerular C4d as an indicator of thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis and rheumatism* 58, 2460-2469.

Debreczeni, M.L., Nemeth, Z., Kajdacs, E., Schwaner, E., Mako, V., Masszi, A., Doleschall, Z., Rigo, J., Walter, F.R., Deli, M.A., *et al.* (2019). MASP-1 Increases Endothelial Permeability. *Frontiers in immunology* 10, 991.

Dobó, J., Schroeder, V., Jenny, L., Cervenak, L., Závodszky, P., and Gál, P. (2014).

Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. *Molecular immunology* 61, 69-78.

Dzik, S. (2019). Complement and Coagulation: Cross Talk Through Time. *Transfusion medicine reviews* 33, 199-206.

Ehrenstein, M.R., and Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nature reviews Immunology* 10, 778-786.

Elliott, M.K., Jarmi, T., Ruiz, P., Xu, Y., Holers, V.M., and Gilkeson, G.S. (2004). Effects of complement factor D deficiency on the renal disease of MRL/lpr mice. *Kidney international* 65, 129-138.

Endo, Y., Liu, Y., Kanno, K., Takahashi, M., Matsushita, M., and Fujita, T. (2004). Identification of the mouse H-ficolin gene as a pseudogene and orthology between mouse ficolins A/B and human L-/M-ficolins. *Genomics* 84, 737-744.

Endo, Y., Nakazawa, N., Iwaki, D., Takahashi, M., Matsushita, M., and Fujita, T. (2010). Interactions of ficolin and mannose-binding lectin with fibrinogen/fibrin augment the lectin complement pathway. *Journal of innate immunity* 2, 33-42.

Endo, Y., Takahashi, M., Kuraya, M., Matsushita, M., Stover, C.M., Schwaeble, W.J., and Fujita, T. (2002). Functional characterization of human mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1/3 and MASP-2 promoters, and comparison with the C1s promoter. *International immunology* 14, 1193-1201.

Farrar, C.A., Tran, D., Li, K., Wu, W., Peng, Q., Schwaeble, W., Zhou, W., and Sacks, S.H. (2016). Collectin-11 detects stress-induced L-fucose pattern to trigger renal epithelial injury. *The Journal of clinical investigation* 126, 1911-1925.

Foltyn Zadura, A., Memon, A.A., Stojanovich, L., Perricone, C., Conti, F., Valesini, G., Bogdanovic, G., Hillarp, A., Shoenfeld, Y., Sundquist, J., *et al.* (2015). Factor H Autoantibodies in Patients with Antiphospholipid Syndrome and Thrombosis. *The Journal of rheumatology* 42, 1786-1793.

Franklyn, K., Lau, C.S., Navarra, S.V., Louthrenoo, W., Lateef, A., Hamijoyo, L., Wahono,

C.S., Chen, S.L., Jin, O., Morton, S., *et al.* (2016). Definition and initial validation of a Lupus Low Disease Activity State (LLDAS). *Annals of the rheumatic diseases* 75, 1615-1621.

Fujita, T. (2002). Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature reviews Immunology* 2, 346-353.

García-Laorden, M.I., Hernández-Brito, E., Muñoz-Almagro, C., Pavlovic-Nesic, S., Rúa-Figueroa, I., Briones, M.L., Rajas, O., Borderías, L., Payeras, A., Lorente, L., *et al.* (2020). Should MASP-2 Deficiency Be Considered a Primary Immunodeficiency? Relevance of the Lectin Pathway. *Journal of clinical immunology* 40, 203-210.

Garred, P., Genster, N., Pilely, K., Bayarri-Olmos, R., Rosbjerg, A., Ma, Y.J., and Skjoedt, M.O. (2016). A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunological reviews* 274, 74-97.

Garred, P., Voss, A., Madsen, H.O., and Junker, P. (2001). Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes and immunity* 2, 442-450.

Gulla, K.C., Gupta, K., Krarup, A., Gal, P., Schwaeble, W.J., Sim, R.B., O'Connor, C.D., and Hajela, K. (2010). Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. *Immunology* 129, 482-495.

Hamilton, K.K., Hattori, R., Esmon, C.T., and Sims, P.J. (1990). Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *The Journal of biological chemistry* 265, 3809-3814.

Harboe, M., and Mollnes, T.E. (2008). The alternative complement pathway revisited. *Journal of cellular and molecular medicine* 12, 1074-1084.

Harris, H.W., Jr., Murphy, H.R., Willingham, M.C., and Handler, J.S. (1987). Isolation and characterization of specialized regions of toad urinary bladder apical plasma membrane involved in the water permeability response to antidiuretic hormone. *The Journal of membrane biology* 96, 175-186.

Hayashi, M., Machida, T., Ishida, Y., Ogata, Y., Omori, T., Takasumi, M., Endo, Y., Suzuki, T., Sekimata, M., Homma, Y., *et al.* (2019). Cutting Edge: Role of MASP-3 in the Physiological Activation of Factor D of the Alternative Complement Pathway. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *203*, 1411-1416.

Hochberg, M.C. (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* *40*, 1725.

Huang, Y., Xu, J., Wu, X., Chen, X., Bai, X., Zhuang, Y., Fang, J., and Lin, X. (2019). High Expression of Complement Components in the Kidneys of Type 2 Diabetic Rats With Diabetic Nephropathy. *Frontiers in endocrinology* *10*, 459.

Keizer, M.P., Wouters, D., Schlapbach, L.J., and Kuijpers, T.W. (2014). Restoration of MBL-deficiency: redefining the safety, efficacy and viability of MBL-substitution therapy. *Molecular immunology* *61*, 174-184.

Kim, M.K., Maeng, Y.I., Lee, S.J., Lee, I.H., Bae, J., Kang, Y.N., Park, B.T., and Park, K.K. (2013). Pathogenesis and significance of glomerular C4d deposition in lupus nephritis: activation of classical and lectin pathways. *International journal of clinical and experimental pathology* *6*, 2157-2167.

Kjaer, T.R., Thiel, S., and Andersen, G.R. (2013). Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. *Molecular immunology* *56*, 413-422.

Kozarcenin, H., Lood, C., Munthe-Fog, L., Sandholm, K., Hamad, O.A., Bengtsson, A.A., Skjoedt, M.O., Huber-Lang, M., Garred, P., Ekdahl, K.N., *et al.* (2016). The lectin complement pathway serine proteases (MASPs) represent a possible crossroad between the coagulation and complement systems in thromboinflammation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* *14*, 531-545.

Krurup, A., Wallis, R., Presanis, J.S., Gál, P., and Sim, R.B. (2007). Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PloS one* *2*, e623.

Lachmann, P.J. (2018). Looking back on the alternative complement pathway.

Immunobiology 223, 519-523.

Lhotta, K., Würzner, R., and König, P. (1999). Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 14, 881-886.

Lintner, K.E., Wu, Y.L., Yang, Y., Spencer, C.H., Hauptmann, G., Hebert, L.A., Atkinson, J.P., and Yu, C.Y. (2016). Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. *Frontiers in immunology* 7, 36.

Machida, T., Sakamoto, N., Ishida, Y., Takahashi, M., Fujita, T., and Sekine, H. (2018). Essential Roles for Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease-1/3 in the Development of Lupus-Like Glomerulonephritis in MRL/lpr Mice. *Frontiers in immunology* 9, 1191.

Matsushita, M., Endo, Y., and Fujita, T. (2013). Structural and functional overview of the lectin complement pathway: its molecular basis and physiological implication. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 61, 273-283.

Matsuura, E., Hughes, G.R., and Khamashta, M.A. (2008). Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmunity reviews* 7, 558-566.

Matsuura, E., Kobayashi, K., Hurley, B.L., and Lopez, L.R. (2006). Atherogenic oxidized low-density lipoprotein/beta2-glycoprotein I (oxLDL/beta2GPI) complexes in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 15, 478-483.

Medjeral-Thomas, N.R., Troldborg, A., Constantinou, N., Lomax-Browne, H.J., Hansen, A.G., Willicombe, M., Pusey, C.D., Cook, H.T., Thiel, S., and Pickering, M.C. (2018). Progressive IgA Nephropathy Is Associated With Low Circulating Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease-3 (MASP-3) and Increased Glomerular Factor H-Related Protein-5 (FHR5) Deposition. *Kidney international reports* 3, 426-438.

Megyeri, M., Makó, V., Beinrohr, L., Doleschall, Z., Prohászka, Z., Cervenak, L., Závodszy, P., and Gál, P. (2009). Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function.

Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) *183*, 3409-3416.

Mitchell, D.A., Pickering, M.C., Warren, J., Fossati-Jimack, L., Cortes-Hernandez, J., Cook, H.T., Botto, M., and Walport, M.J. (2002). C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) *168*, 2538-2543.

Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H., PG, D.E.G., Koike, T., Meroni, P.L., *et al.* (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). Journal of thrombosis and haemostasis : JTH *4*, 295-306.

Muller-Eberhard, H.J. (1985). The killer molecule of complement. The Journal of investigative dermatology *85*, 47s-52s.

Nakamura, H., Oku, K., Ogata, Y., Ohmura, K., Yoshida, Y., Kitano, E., Fujieda, Y., Kato, M., Bohgaki, T., Amengual, O., *et al.* (2018). Alternative pathway activation due to low level of complement factor H in primary antiphospholipid syndrome. Thrombosis research *164*, 63-68.

Nauta, A.J., Raaschou-Jensen, N., Roos, A., Daha, M.R., Madsen, H.O., Borrias-Essers, M.C., Ryder, L.P., Koch, C., and Garred, P. (2003). Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. European journal of immunology *33*, 2853-2863.

Nisihara, R.M., Magrini, F., Mocelin, V., and Messias-Reason, I.J. (2013). Deposition of the lectin pathway of complement in renal biopsies of lupus nephritis patients. Human immunology *74*, 907-910.

Nonaka, M., and Kimura, A. (2006). Genomic view of the evolution of the complement system. Immunogenetics *58*, 701-713.

Oates, J.C., and Gilkeson, G.S. (2002). Mediators of injury in lupus nephritis. Current opinion in rheumatology *14*, 498-503.

Oku, K., Atsumi, T., Bohgaki, M., Amengual, O., Kataoka, H., Horita, T., Yasuda, S., and Koike, T. (2009). Complement activation in patients with primary antiphospholipid

syndrome. *Annals of the rheumatic diseases* 68, 1030-1035.

Otomo, K., Amengual, O., Fujieda, Y., Nakagawa, H., Kato, M., Oku, K., Horita, T., Yasuda, S., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., *et al.* (2016). Role of apolipoprotein B100 and oxidized low-density lipoprotein in the monocyte tissue factor induction mediated by anti- β 2 glycoprotein I antibodies. *Lupus* 25, 1288-1298.

Otomo, K., Atsumi, T., Amengual, O., Fujieda, Y., Kato, M., Oku, K., Horita, T., Yasuda, S., and Koike, T. (2012). Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis and rheumatism* 64, 504-512.

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., and Lambris, J.D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology* 11, 785-797.

Roos, A., Rastaldi, M.P., Calvaresi, N., Oortwijn, B.D., Schlagwein, N., van Gijlswijk-Janssen, D.J., Stahl, G.L., Matsushita, M., Fujita, T., van Kooten, C., *et al.* (2006). Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 17, 1724-1734.

Sciascia, S., Radin, M., Cecchi, I., Bertolaccini, M.L., Bertero, M.T., Rubini, E., Vaccarino, A., Bazzan, M., Giachino, O., Baldovino, S., *et al.* (2019). Identifying phenotypes of patients with antiphospholipid antibodies: results from a cluster analysis in a large cohort of patients. *Rheumatology (Oxford, England)*.

Sciascia, S., Sanna, G., Murru, V., Roccatello, D., Khamashta, M.A., and Bertolaccini, M.L. (2013). GAPSS: the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score. *Rheumatology (Oxford, England)* 52, 1397-1403.

Sciascia, S., Sanna, G., Murru, V., Roccatello, D., Khamashta, M.A., and Bertolaccini, M.L. (2014). Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review. *Thrombosis and haemostasis* 111, 354-364.

Stover, C.M., Schwaeble, W.J., Lynch, N.J., Thiel, S., and Speicher, M.R. (1999).

Assignment of the gene encoding mannan-binding lectin-associated serine protease 2 (MASP2) to human chromosome 1p36.3-->p36.2 by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Cytogenetics and cell genetics* 84, 148-149.

Thiel, S., Jensen, L., Degn, S.E., Nielsen, H.J., Gál, P., Dobó, J., and Jensenius, J.C. (2012). Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. *Clinical and experimental immunology* 169, 38-48.

Thielens, N.M., Cseh, S., Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Rossi, V., Jensenius, J.C., and Arlaud, G.J. (2001). Interaction properties of human mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases-1 and -2, MBL-associated protein 19, and MBL. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 166, 5068-5077.

Troldborg, A., Hansen, A., Hansen, S.W., Jensenius, J.C., Stengaard-Pedersen, K., and Thiel, S. (2017). Lectin complement pathway proteins in healthy individuals. *Clinical and experimental immunology* 188, 138-147.

Troldborg, A., Thiel, S., Trendelenburg, M., Friebus-Kardash, J., Nehring, J., Steffensen, R., Hansen, S.W.K., Laska, M.J., Deleuran, B., Jensenius, J.C., *et al.* (2018). The Lectin Pathway of Complement Activation in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of rheumatology* 45, 1136-1144.

Tsuchiya, N., Endo, T., Matsuta, K., Yoshinoya, S., Aikawa, T., Kosuge, E., Takeuchi, F., Miyamoto, T., and Kobata, A. (1989). Effects of galactose depletion from oligosaccharide chains on immunological activities of human IgG. *The Journal of rheumatology* 16, 285-290.

Walport, M.J. (2001). Complement. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 344, 1140-1144.

Wang, S., Wu, M., Chiriboga, L., Zeck, B., and Belmont, H.M. (2018). Membrane attack complex (mac) deposition in lupus nephritis is associated with hypertension and poor clinical response to treatment. *Seminars in arthritis and rheumatism* 48, 256-262.

Weening, J.J., D'Agati, V.D., Schwartz, M.M., Seshan, S.V., Alpers, C.E., Appel, G.B., Balow, J.E., Bruijn, J.A., Cook, T., Ferrario, F., *et al.* (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney international* 65, 521-530.

Yaseen, S., Demopoulos, G., Dudler, T., Yabuki, M., Wood, C.L., Cummings, W.J., Tjoelker, L.W., Fujita, T., Sacks, S., Garred, P., *et al.* (2017). Lectin pathway effector enzyme mannan-binding lectin-associated serine protease-2 can activate native complement C3 in absence of C4 and/or C2. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31, 2210-2219.

Ytting, H., Christensen, I.J., Thiel, S., Jensenius, J.C., Svendsen, M.N., Nielsen, L., Lottenburger, T., and Nielsen, H.J. (2007). Biological variation in circulating levels of mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 and the influence of age, gender and physical exercise. *Scandinavian journal of immunology* 66, 458-464.