

抗リン脂質抗体症候群の鑑別診断検査法の確立と 病態発症機序の解明

野島 順三*

〔Key Words〕 抗リン脂質抗体症候群、動・静脈血栓症、酵素固相化免疫測定法

はじめに

我々の研究室では、「基礎的検討と臨床的応用」のバランスのとれた臨床検査学研究を目標としている。「研究のアイデアは患者さんから、そして研究成果は患者さんのために」をモットーに、臨床講座や臨床検査部とコラボレーションしながら、新たな臨床検査法の開発や難治疾患の病態解明に日々取り組んでいる。患者さんの臨床病態を詳細に観察し、そこから得たヒントやアイデアをうまく基礎的検討に持ち込む。そして、試験管の中で実証した研究成果を臨床応用し疾病の診断や病態解明に役立てる。これこそが私達が目指す「基礎的検討と臨床的応用」のバランスのとれた理想的な臨床検査学研究である。本稿では、抗リン脂質抗体症候群という未だ検査診断法も治療法も確立されていない難治疾患の鑑別診断検査法の確立と病態発症機序の解明に関する研究を紹介したい。

I. 抗リン脂質抗体症候群検査診断の現状

抗リン脂質抗体症候群 (anti-phospholipid syndrome: APS) は、リン脂質に関連する自己抗体である抗リン脂質抗体の出現と、それに伴う動脈お

よび静脈の血栓性合併症や習慣流産などを特徴とする自己免疫性血栓塞栓性疾患である。APS の検査診断には抗リン脂質抗体の検出が必須であり、現在の APS 診断分類基準改定案では、国際血栓止血学会標準化委員会 (ISTH-SSC) のガイドラインに従ったループスアンチコアグラント (LA) 活性の定性試験と、酵素固相化免疫測定法 (ELISA) による抗カルジオリピン抗体 (aCL) および抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体 ($a\beta_2$ GPI) の定量法が採用されている。

現在、病院の検査室における抗リン脂質抗体の検査は、主に LA 活性の定性検査にて実施されている。しかし、LA 検査は、スクリーニング試験 → クロスミキシング試験 → 確認試験など多段階の測定系による判定が必要であり、一般の検査室でルーチン検査に組み込むことは至難の業である。さらに、測定試薬の選択や血漿検体の処理方法など問題点が多く標準化には程遠い。一方、ELISA に関しても、抗リン脂質抗体は抗原特異性が多様であり、認識するエピトープの違いにより幾つかのタイプが存在していることが明らかとなっているが、測定系が確立されているのは aCL と $a\beta_2$ GPI のみで、他の抗リン脂質抗体により引き起こされる多くの APS 症例が見逃されていることが危惧

*山口大学大学院医学系研究科・生体情報検査学 nojima-j@yamagichi-u.ac.jp

されている。

II. APS 鑑別診断検査法の確立

これまでの研究成果から、APS 患者の血液中には多種多様な抗リン脂質抗体が混在しており、それぞれの抗体が持つ種々の血栓形成作用が複雑に絡み合っ APS 特有の多彩な合併症(脳血管障害・虚血性心疾患・深部静脈血栓症・肺塞栓症・閉塞性動脈硬化症・血小板減少症・習慣流産など)が引き起こされると推測される¹⁾。したがって、APS の多彩な臨床病態を適切に鑑別診断するためには、複数種の抗リン脂質抗体を同時に測定し、それぞれの合併症の発症に特異性の高い抗リン脂質抗体のタイプを特定することが重要となる。

我々の研究室では、抗リン脂質抗体の重要なエピトープ提供タンパクである β_2 GPI とプロトロンビン(PT)を用いて、認識エピトープが異なる 6 種類の抗リン脂質抗体：aCL・aCL/ β_2 GPI・a β_2 GPI・抗ホスファチジルセリン抗体(aPS)・抗ホスファチジルセリン抗体/プロトロンビン抗体(aPS/PT)・抗プロトロンビン抗体(aPT)を ELISA にて同時に測定し、各種合併症の発症に関連の深い抗体のタイプの特定を試みた。APS の基礎疾患として最も代表的な全身性エリテマトーデス(SLE)331 症例を対象とした臨床研究²⁾にて、動脈血栓症の最も強い危険因子として aPS/PT が、静脈血栓症の危険因子として a β_2 GPI が

特定された。aPS/PT と a β_2 GPI は、血小板減少症との関連性も認められ、抗リン脂質抗体による血栓形成と血小板減少との間に一部共通した機序がある可能性が考えられる。また、習慣流産の発症には aCL/ β_2 GPI が最も強く関連しており、血栓性合併症と妊娠合併症では異なるタイプの抗リン脂質抗体が関連している可能性が示唆される。

現在、新たな抗リン脂質抗体の検索も含めて、臨床的有用性の高い抗リン脂質抗体を複数種・同時に鑑別測定できる ELISA システムの開発を進めている(図 1)。この ELISA システムで患者が持つ抗体をタイピングすることにより、患者毎に発症しやすい合併症や発症リスクを推測できる新たな APS 検査診断法の確立を目指す。最終的には、多施設共同で、効率よく正確に APS を鑑別診断でき、実際の臨床現場で広く活用できる検査診断ガイドラインを作成する予定である(図 2)。

III. 抗リン脂質抗体症候群の

病態発症機序の解明

抗リン脂質抗体により惹起される合併症は、脳血管障害・虚血性心疾患・閉塞性動脈硬化症などの動脈血栓塞栓症から、深部静脈血栓症や肺塞栓症などの静脈血栓塞栓症、さらには血小板減少症や習慣流産など極めて多彩であり、それぞれの病態に各々異なった血栓形成作用が複雑に関与していると推測されるが、これら多彩な合併症の多く

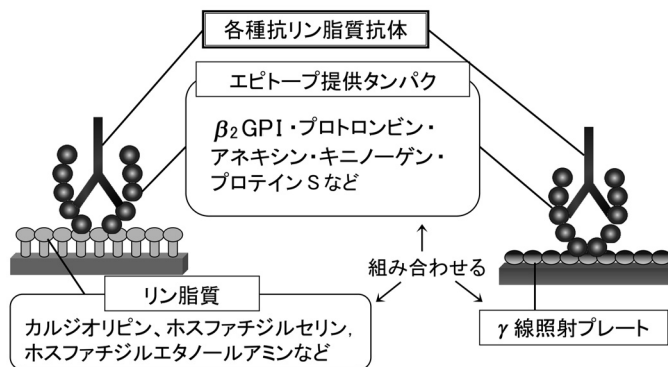


図 1 抗リン脂質抗体を認識エピトープ別に複数種・同時に測定できる ELISA システムの開発

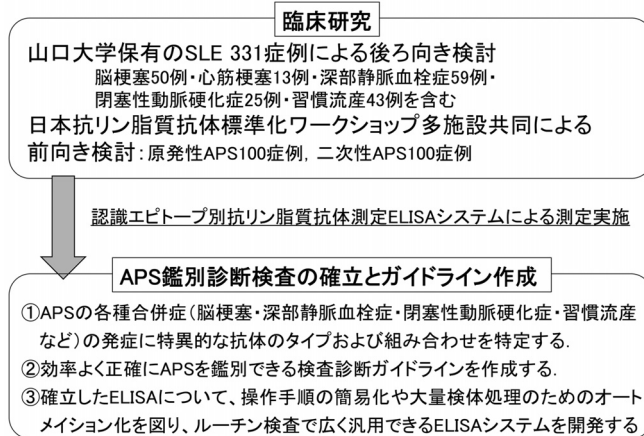


図2 新たな抗リン脂質抗体症候群の鑑別診断検査法の確立とガイドライン作成

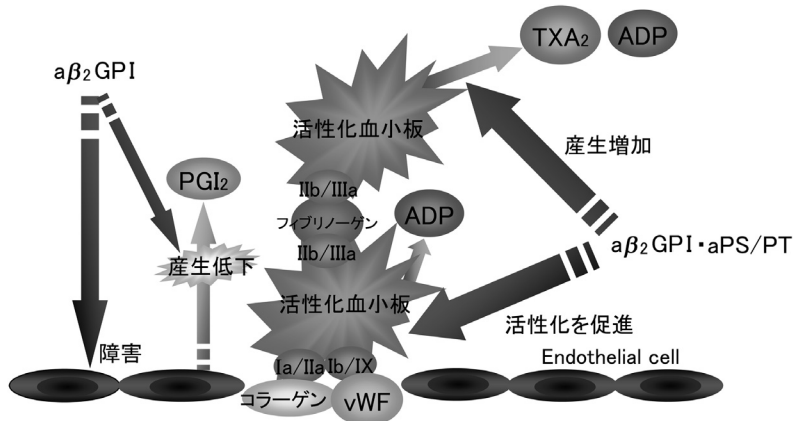


図3 抗リン脂質抗体による血小板活性化の亢進

を説明できる発症機序は未だ解明されていない。

我々の研究室では、SLE患者を対象とした臨床研究に加えて、患者血漿から単離・精製したIgG抗体やモノクローナル抗体を用いて、各種抗リン脂質抗体が持つ血栓形成作用および細胞傷害作用について、独自開発したヒト大動脈内皮細胞(HAEC)・末梢血単核球(PBMC)・血小板の共培養(接触系・非接触系)実験系により、細胞内mRNA発現・細胞表面分子・培養上清産生分子・細胞間ネットワーク経路・細胞内シグナル伝達経路の観点から系統的に解明するという臨床と基礎の両面からAPSの病態を捉え、疾患の克服を目指す一連の研究を展開している。

これまでの研究成果を概説すると、① $\alpha_2\beta_1$ GPIとaPS/PTは低濃度ADPなど他の因子による可逆性の血小板活性化を有意に促進させ、トロンボキサンA₂(TXA₂)やADPの産生を増加させることにより不可逆性の血小板凝集塊を形成することを明らかにした。さらに、SLE患者を対象とした臨床研究において、 $\alpha_2\beta_1$ GPIとaPS/PTが共に陽性の患者で脳梗塞の発症率が極めて高いことを明らかにし、APSに関連する脳血管障害の発症に抗リン脂質抗体による血小板活性化促進作用が強く関連していることを提唱した^{3,4)}(図3)。

② $\alpha_2\beta_1$ GPIとaPS/PTがリン脂質を介した反応を阻害することにより間接的にAPCの抗凝固活性

を抑制することを明らかにした^{5,6)}。さらに、抗リン脂質抗体の一部には、APC やプロテイン S に直接結合する抗体が存在しており、これらの抗体は後天性の APC-レジスタンス反応を引き起こすことにより、静脈血栓塞栓の一つの病因となることを明らかにした⁷⁾ (図 4)。③ $a\beta_2$ GPI と aPS/PT が単球の組織因子(TF)発現や炎症性サイトカイン産生を惹起することを明らかにし、APS における血栓塞栓症発症機序には、TF 依存性血栓形成とサイトカイン誘発性炎症反応の相乗効果が

関連していることを提唱した⁸⁾。そして、抗リン脂質抗体陽性患者の多くで、末梢血液中の単球表面 TF 発現が亢進していることを明らかにし、この単球 TF の発現亢進が、SLE 患者におけるアテローム性動脈硬化病変の発症・進展に強く関連していることを示した。さらに、抗リン脂質抗体に関連するアテローム性動脈硬化病変は閉塞性動脈硬化症へと進行し、狭心症や心筋梗塞など虚血性心疾患を引き起こす極めて重要な危険因子となることを明らかにした^{9,10)} (図 5)。

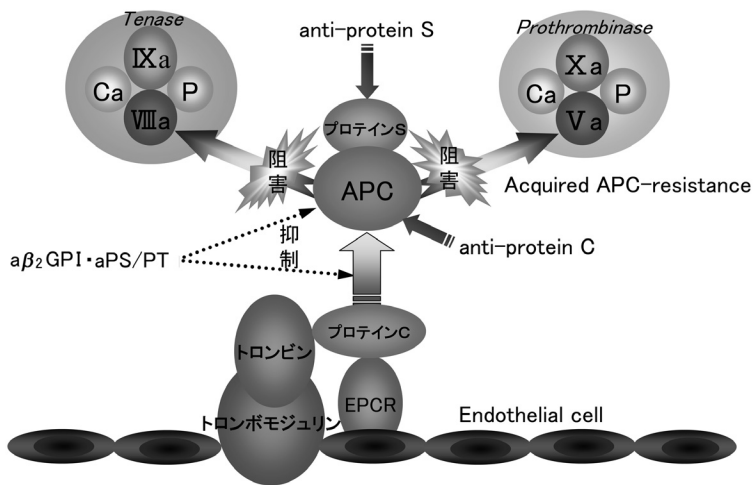


図 4 抗リン脂質抗体による活性化プロテイン C 系凝固制御機構の阻害

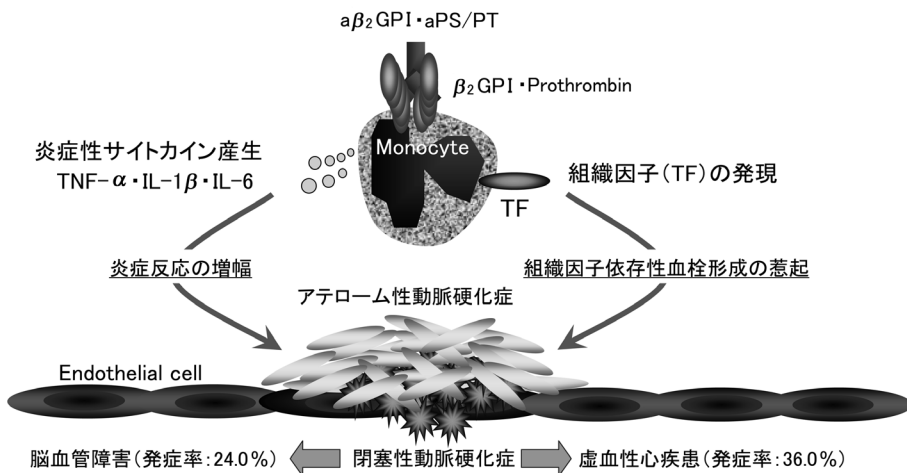


図 5 抗リン脂質抗体による単球組織因子発現および炎症性サイトカイン産生の亢進

近年、APS の病態発症機序の解明は分子レベルの研究により新たな展開を迎えようとしている。今後、それぞれのエピトープ提供タンパクの解析がさらに進み、個々の抗体が持つ作用が明らかになるにつれ、APS の病態解明が急速に進むことが期待される。

おわりに

医学系研究科・保健学領域の大学院教員として、臨床検査学の研究や臨床検査システムの開発を担う保健学博士(臨床検査科学者)の育成は重要な使命と考える。臨床検査学の研究は、基礎と臨床の両面からバランスよく研究を進め、その成果が臨床検査医学の進歩・発展に繋がるのが理想である。その思いを、抗リン脂質抗体症候群の研究を通じて学生に伝えたい。そして、保健学博士を取得して医療の中心で活躍した臨床検査技師が、その経験を基に、研究・教育者として次の世代の臨床検査技師教育に携わってくれることを心から願っている。

文 献

- 1) Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, et al. Association between the prevalence of antibodies to β_2 -glycoprotein I, prothrombin, protein C, protein S, and annexin V in patients with systemic lupus erythematosus and thrombotic and thrombocytopenic complications. *Clin Chem* 2001; 47: 1008-15.
- 2) Nojima J, Motoki Y, Aoki N, et al. A novel ELISA system for simultaneous detection of six subclasses of anti-phospholipid antibodies for prediction of thrombotic complications among SLE patients. *Thromb Res* 2014; 133: 1135-40.
- 3) Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, et al. Strong correlation between the prevalence of cerebral infarction and the presence of anti-cardiolipin/ β_2 -glycoprotein I and anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies. *Thromb Haemost* 2004; 91: 967-76.
- 4) Nojima J, Iwatani Y, Suehisa E, et al. The presence of anti-phosphatidyl-serine/prothrombin antibodies is the strongest risk factor for both arterial and venous thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Haematologica* 2006; 91: 699-702.
- 5) Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, et al. Acquired activated protein C resistance is associated with the co-existence of anti-prothrombin antibodies and lupus anticoagulant activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 2002; 118: 577-83.
- 6) Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, et al. Acquired activated protein C resistance associated with IgG antibodies against β_2 -glycoprotein I and prothrombin as a strong risk factor for venous thromboembolism. *Clin Chem* 2005; 51: 545-52.
- 7) Nojima J, Iwatani Y, Ichihara K, et al. Acquired activated protein C resistance is associated with IgG antibodies to protein S in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Res* 2009; 124: 127-31.
- 8) Nojima J, Masuda Y, Iwatani Y, et al. Tissue factor expression on monocytes induced by anti-phospholipid antibodies as a strong risk factor for thromboembolic complications in SLE patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365: 195-200.
- 9) Nojima J, Masuda Y, Iwatani Y, et al. Arteriosclerosis obliterans associated with anti-cardiolipin antibody/ β_2 -glycoprotein I antibodies as a strong risk factor for ischaemic heart disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2008; 47: 684-9.
- 10) Motoki Y, Nojima J, Yanagihara M, et al. Anti-phospholipid antibodies contribute to arteriosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus through induction of tissue factor expression and cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *Thromb Res* 2012; 130: 667-73.