

しかし AEAQA はさらに強い抗原とはならない例のほうがむしろ多い。A の代わりにすべてのアミノ酸を合成反応に添加した XXXXX をベースとし、一つのポジションを特定のアミノ酸に固定した（例えば AXXXX）ペプチドの混合物を一つ一つ合成したものが combinatorial peptide library である。この例では 20 アミノ酸 x 5 positions = 100 通りのライブラリーができ上がる（ファージなどは使っていない全く degenerate な合成物である）。これを用いると、前記のような矛盾はいくらか解決できる⁽²³⁾。しかし、実際は、combinatorial peptide library を使った場合でも、たとえば XEXXX と XXXQX を組み合わせた XEXQX よりも XEXMX のほうがさらに強い活性を持っているにもかかわらず、XXXMX は弱い応答しか誘導できないなどという組み合わせが数多く存在する。我々は combinatorial peptide library に逆相 HPLC と質量分析を組み合わせることによりこの問題を解決した⁽²⁰⁾。方法の流れは以下の通りである。

1) Self K-ras 由来のペプチド (3EYKLVVVGAGGVGKSALT20) に反応するヒト CD4T 細胞クローンが認識するコアペプチドを同定し、その部分を randomize した combinatorial peptide library (EYKLVXXXXXXXXXSALT-based) を合成して T 細胞応答を観察した (図 3)。

2) 応答を増強する置換の和がさらに強い応答を誘導するわけではないことを確認した (図 4)。

3) 図 3 で応答を増強するアミノ酸残基をすべてのポジションに有するペプチドの混合物を合成した (図 5A: 理論的には 480 種類のペプチドの混合物である)。これを逆相 HPLC で分画し、各画分の増殖誘導活性を定量したところ、fraction 23 に強い活性が認められた (図 5B)。

4) Electrospray ionization 型の質量分析機で野生型ペプチドを分析すると、予想通り、多価イオンが観察された (図 6A)。多価イオンの情報は合成過程で生じた出来損ないの短いペプチドを区別させてくれるので利用価値がある。そこで fraction 23 (図 6D) および前後の画分 (図 6B,C,E,F) を分析したところ、質量数 1834 に対応するシグナル (例えば $(M+2H)^{2+} = 918.0$) は図 5B の増殖誘導活性の分画パターンとよく似たシグナル強度の変化をしめした。

5) 480 種類のペプチドのうち 1834 0.15% の範囲内に収まるペプチドを合成し、増殖活性を定量した。他にも疑わしいシグナルが 4 種類存在したので、疎水性スコアが野生型ペプチドよりも高いもの (図 5B の retention time よりめざす superagonist は野生型ペプチドよりも疎水性であると推測できる) を合成した (その一部を表 2 に示した)。予想通り、1836.23 の質量を持つペプチド 2 種類が 100 倍近い活性を持つスーパーアゴニストとして同定された (野生型のペプチドの ED50 が 0.11 mM であるのに対して、スーパーアゴニストのそれは 0.0021 と 0.0018)。これらは 14VG15 を 14MI15 と 14ML15 に置換したものであった (図 7)。

スーパーアゴニスト同定の戦略は、特定の T 細胞応答の in vivo または ex vivo 刺激による増強や、自己免疫病における分子擬態の解析、さらには特異性未知の T 細胞が認識するリガンドの同定などに威力を発揮するであろう。

C. 結論

β 2-GPI のクリプティックなエピトープが抗原提示される特殊な環境やメカニズムを解明すること、ならびに交叉反応するペプチドを同定することが、抗 β 2-GPI 抗体の産生および APS 発症の病因を理解し、さらに

は治療に応用するために重要なヒントを提供するものと期待される。後者に関してはその基礎的方法論を確立することができた。

D. 参考文献

1. Tanaka Y, Ogawa M, Nishimura Y, Matsushita S: Efficient induction of human CD4+ T cell lines reactive with a self-K-ras-derived peptide in vitro, using a mAb to CD29. *Hum Immunol* 59:343, 1998.
2. Granados J, Vargas-Alarcon G, Drenkard C, Andrade F, Melin-Aldana H, Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D: Relationship of anticardiolipin antibodies and antiphospholipid syndrome to HLA-DR7 in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Lupus* 6:57, 1997.
3. Savi M, Ferraccioli GF, Neri TM, Zanelli P, Dall'Aglio PP, Tincani A, Balestrieri G, Carella G, Cattaneo R: HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in northern Italian systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 31:1568, 1988.
4. McHugh NJ, Maddison PJ: HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32:1623, 1989.
5. Hartung K, Coldewey R, Corvetta A, Deicher H, Kalden JR, Krapf F, Lang B, Lakomek HJ, Liedvogel B, Peter HH, et al.: MHC gene products and anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus results of a multicenter study. SLE Study Group. *Autoimmunity* 13:95, 1992.
6. Goldstein R, Moulds JM, Smith CD, Sengar DP: MHC studies of the primary antiphospholipid antibody syndrome and of antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 23:1173, 1996.
7. Vargas-Alarcon G, Granados J, Bekker C, Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D: Association of HLA-DR5 (possibly DRB1*1201) with the primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients. *Arthritis Rheum* 38:1340, 1995.
8. Arnett FC, Thiagarajan P, Ahn C, Reveille JD: Associations of anti-b2-glycoprotein I autoantibodies with HLA class II alleles in three ethnic groups. *Arthritis Rheum* 42:268, 1999.
9. Hashimoto H, Yamanaka K, Tokano Y, Iida N, Takasaki Y, Kobasawa K, Nishimura Y: HLA-DRB1 alleles and b2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 16:423, 1998.
10. Matsushita S, Takahashi K, Motoki M, Komoriya K, Ikagawa S, Nishimura Y: Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB1*0405 and -DRB1*0406 complexes: Implication for the HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. *J Exp Med* 180:873, 1994.
11. Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA: T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346:183, 1990.
12. Martin R, Jaraquemada D, Flerlage M, Richert J, Whitaker J, Long EO, McFarlin DE, McFarland HF: Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol* 145:540, 1990.
13. Jingwu Z, Medaer R, Hashim GA, Chin Y, van den Berg-Loonen E, Raus JC: Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. *Ann Neurol* 32:330, 1992.
14. Lohmann T, Leslie RDG, Hawa M, Geysen M, Rodda S, Londei M: Immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 343:1607, 1994.
15. Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y: Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest* 102:1393, 1998.
16. Salvetti M, Jung S, Chang SF, Will H, Schalke BC, Wekerle H: Acetylcholine receptor-specific T-lymphocyte clones in the normal human immune repertoire: target epitopes, HLA restriction, and membrane phenotypes. *Ann Neurol* 29:508, 1991.
17. Sommer N, Harcourt GC, Willcox N, Beeson D, Newsom-Davis J: Acetylcholine receptor-reactive T lymphocytes from healthy subjects and myasthenia gravis patients. *Neurology* 41:1270, 1991.
18. Moiola L, Karachunski P, Protti MP, Howard JF, Jr., Conti-Tronconi BM: Epitopes on the b subunit of human muscle acetylcholine receptor recognized by CD4+ cells of myasthenia gravis patients and healthy subjects. *J Clin Invest* 93:1020, 1994.

19. Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, Racke MK: Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 101:725, 1998.
20. Tanaka, Y., Ohyama, H., Ogawa, M., Nishimura, Y. and Matsushita, S. Identification of peptide superagonists for a self-K-ras-reactive CD4+ T cell clone using combinatorial peptide libraries and mass spectrometry. *J. Immunol.* 162: 7155-7161, 1999
21. Matsushita, S., Takahashi, K., Motoki, M., Komoriya, K., Ikagawa, S. and Nishimura, Y. Allele specificity of structural requirement for peptides bound to HLA-DRB1*0405 and -DRB1*0406 complexes: Implication for the HLA-associated susceptibility to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome. *J. Exp. Med.* 180: 873-883, 1994
22. Yokomizo, H., Matsushita, S., Murakami, S., Fujita, H., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Ogawa, M. and Nishimura, Y. Augmentation of immune response by an analog of the antigenic peptide in a human T-cell clone recognizing mutated Ras-derived peptides. *Hum. Immunol.* 52: 22-32, 1997
23. Hemmer, B., B. T. Fleckenstein, M. Vergelli, G. Jung, H. McFarland, R. Martin, and K. H. Wiesmuller. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J. Exp. Med.* 185:1651, 1997
24. Matsushita, S., Kohsaka, H. and Nishimura, Y. Evidence for self- and non-self-peptide partial agonists that prolong clonal survival of mature T cells in vitro. *J. Immunol.* 158: 5685-5691, 1997
25. Matsuoka, T., Kohrogi, H., Ando, M., Nishimura, Y. and Matsushita, S. Altered TCR ligands affect antigen-presenting cell responses: Upregulation of IL-12 by an analogue peptide. *J. Immunol.* 157: 4837 - 4843, 1996
26. Chen, Y-Z., Matsushita, S. and Nishimura, Y. Response of a human T cell clone to a large panel of altered peptide ligands carrying single residue substitutions in an antigenic peptide: characterization and frequencies of TCR agonism and TCR antagonism with or without partial activation. *J. Immunol.* 157: 3783 - 3790, 1996
27. 松下 祥: MHC・ペプチド複合体と抗原提示, 宮坂昌之、谷口克編:「標準免疫学」, 医学書院, (東京) 145-161, 1997
28. Chen, Y-Z., Matsushita, S. and Nishimura, Y. Single residue polymorphism at the DRb37 affects recognition of peptides by T cells. *Hum. Immunol.* 54: 30-39, 1997

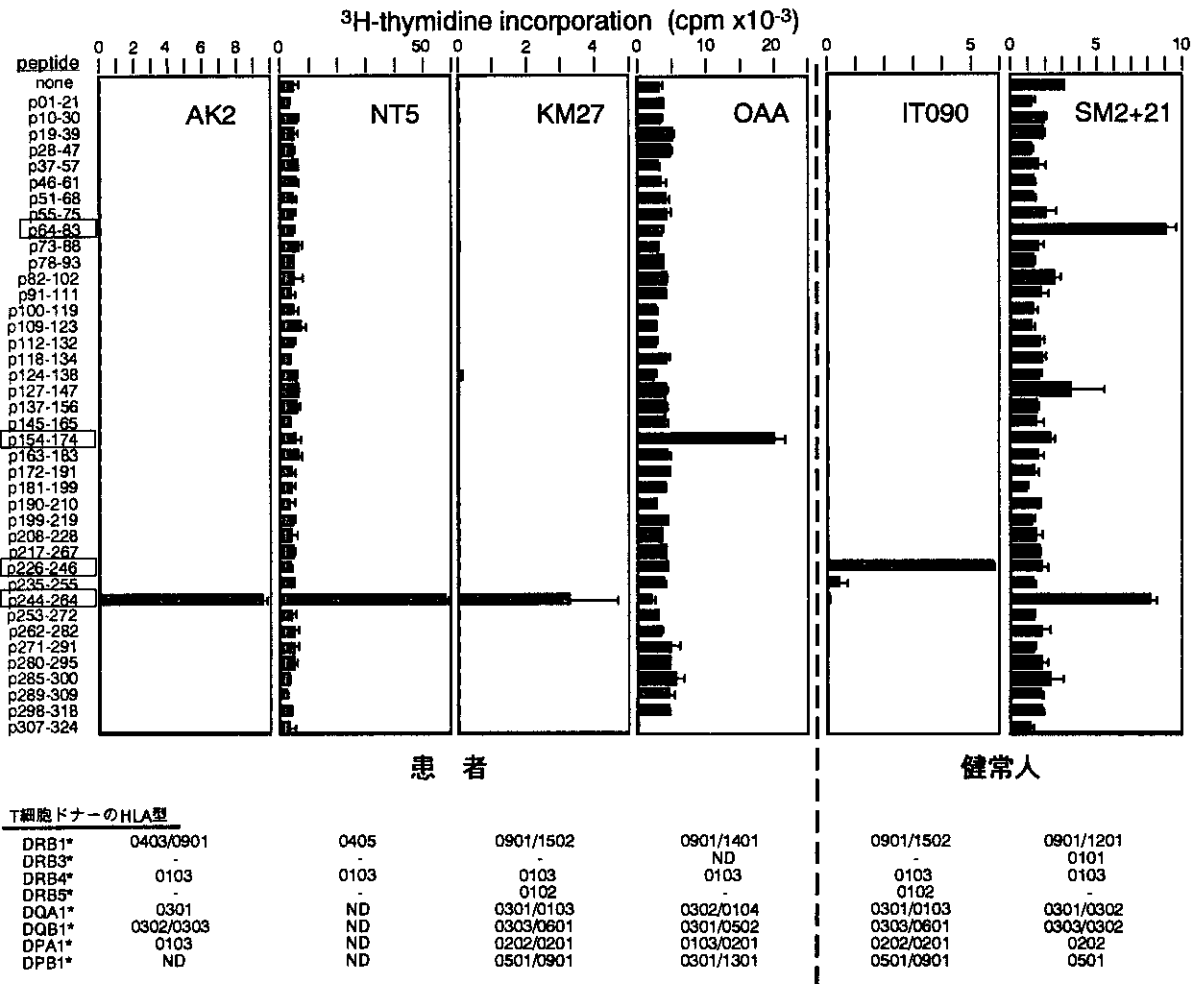


図 1 β_2 GPIオーバーラッピングペプチドに対するT細胞増殖反応

ヒト β_2 GPIに由来するオーバーラッピング合成ペプチドに対するT細胞株の増殖応答を示した。4名の患者（AK、NT、KMおよびOA）と2名の健常人（ITおよびSM）より樹立したT細胞株を各 β_2 GPIペプチド $10 \mu\text{M}$ で刺激した。SMから得られた2つのT細胞株SM2およびSM21は混合した後に各 β_2 GPIペプチドで刺激した。T細胞は培養後54時間に ^3H -チミジンを加えて、さらに18時間培養した後の放射活性の取り込みを測定した。グラフは、デュプリケイトで培養して得られた測定値（cpm）の平均値+標準偏差を示した。T細胞エピトープを含むペプチドを四角で囲み、T細胞のドナーのHLAクラスII対立遺伝子をグラフの下に表示した。ND；HLAタイピング未施行

表1 β_2 GPIペプチド反応性T細胞株の性質およびドナーの情報

T細胞株 (クローン)	疾患	年齢・ 性別	抗 β_2 GPI IgG (U/ml)	^a エピトープ (コア)	拘束 HLAクラスII 分子	IFN- γ /IL-4 ^b
AK2 (AK2.2.9)	APS ^c (SLEに続発)	41 女	>125	p244-264 (p248-261)	DR4 (DRB1*0403)	1.54
NT5 (NT5.3.1)	SLE	39 女	11.9	p244-264 (p247-262(261))	DR53 (DRB4*0103)	1.39
KM27	SLE	52 女	28.8	p244-264 (p246-260)	DP9 (DPA1*0201+DPB1*0901 ^d)	12.4
OAA	APS ^e (SLEに続発)	36 女	67.7	p154-174	ND ^f	2.96
IT090 (IT090.3.1)	健康	32 男	<1.2	p226-246	DR15 (DRB1*1502)	77.8
SM2 ^g	健康	23 女	<1.2	p64-83	DR52 (DRB3*0101)	36.1
SM21 ^g	健康	23 女	<1.2	p244-264 (p248(247)-261)	DR53 (DRB4*0103)	336

^a 血清抗 β_2 GPI IgGの正常値は3.5 U/ml未満。

^b 特異的ペプチドに反応して産生したサイトカインの比を示した。

^c 患者AKは脳梗塞の既往を有している。

^d DPA1*0201-DPB1*0901 複合体はアロPBMCをAPCとしたT細胞増殖反応と連鎖不平衡 (66) をもとに推測した。

^e 患者OAは習慣性流産の既往を有している。

^f OAAの拘束分子は同定できていない。

^g SM2とSM21は同じドナーから樹立された。

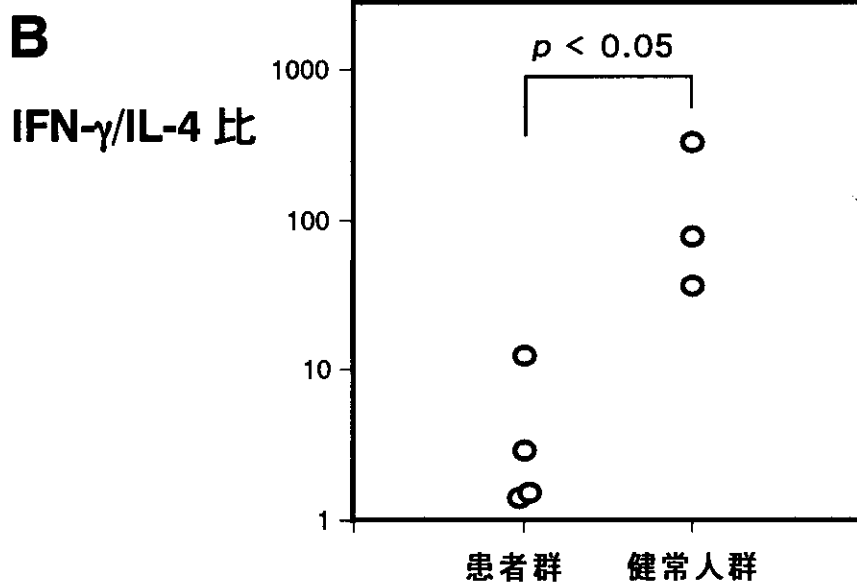
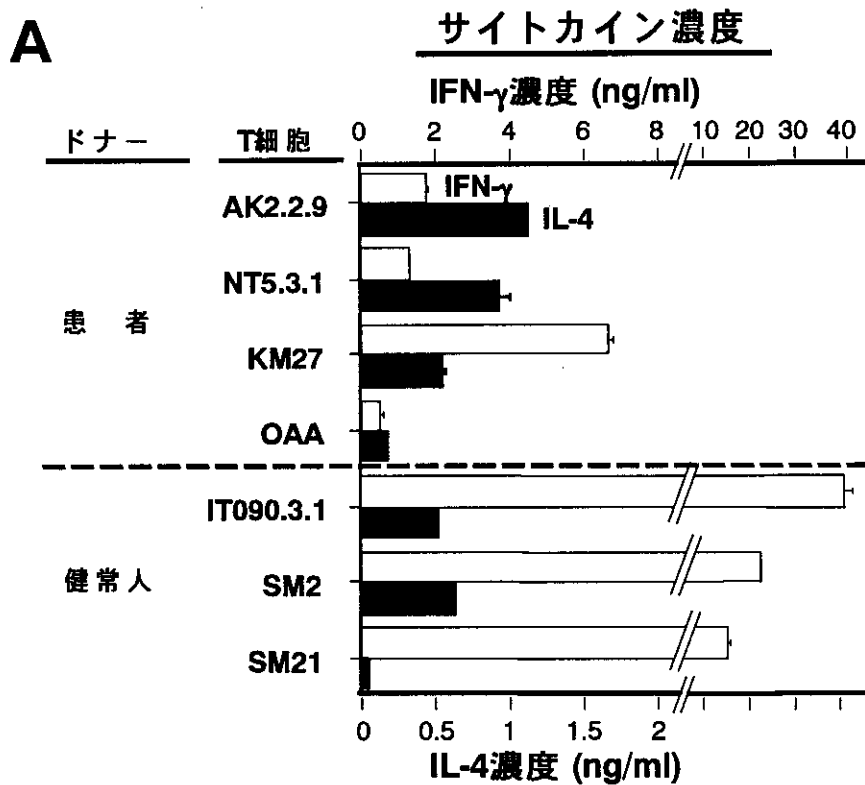


図 2 β_2 GPIペプチド反応性T細胞のサイトカイン産生

A. T細胞をX線照射した自己PBMC (1.5×10^5 個) もしくは拘束HLA分子を共有するアロPBMC (1.5×10^5 個) の存在下に特異的ペプチド $10 \mu\text{M}$ で刺激した。48時間培養後、 $150 \mu\text{l}$ /ウェルの培養液のうちの上清 $80 \mu\text{l}$ を採取して、IL-4およびIFN- γ の濃度をELISAで測定した。サイトカイン濃度は、採取した上清をデュプリケートでELISAを行って得た測定値の平均+標準偏差で示した。

B. IFN- γ /IL-4比を計算して患者由来のT細胞群と健常対照由来のT細胞群との間で比較した。

表2 ヘプチド配列、疎水性、ならびに抗原活性

observed peak m/z	theoretical m.w.	m.w.	sequence	relative hydrophobicity score	ED ₅₀		
583.6/875.0	1748	1748.07	EYKLVVVVGAGGVGKSALT	-1.3	0.11		
918.0	1834	1834.15	EYKLVVVVGAGEVAKSALT	-2.1	∞		
		1835.09	EYKLVVVVGAGEVAESALT	-1.6	∞		
		1836.23	EYKLVVVVGAGGMLKSALT	+0.6	0.0021		
		1836.23	EYKLVVVVGAGGMIKSALT	+1.2	0.0018		
		1836.23	EYKLVVVVMAGGVAKSALT	+3.2	0.050		
476.5	1902	1900.22	EYKLVVVVGAGEVHKSALT	-7.1	NT		
		1900.22	EYKLVVVVGAHEVGKSALT	-7.1	NT		
		1900.28	EYKLVVVGAHGMPSALT	-7.5	NT		
		1901.16	EYKLVVVVGAGEVHESALT	-6.6	NT		
		1901.16	EYKLVVVVGAHEVGESALT	-6.6	NT		
		1901.22	EYKLVVVGAHGMPSALT	-7.0	NT		
		1902.30	EYKLVVVGAHGMYSALT	-1.8	∞		
		1902.30	EYKLVVVVMAGGVHKSALT	-1.8	∞		
		1902.30	EYKLVVVMAHGVGKSALT	-1.8	∞		
		632.3	1894	1892.19	EYKLVVVVGAGWVAESALT	+0.9	∞
				1892.25	EYKLVVVVGAGEMPKSALT	-7.7	NT
1893.19	EYKLVVVVGAGEMPESALT			-7.2	NT		
1894.27	EYKLVVVVGAGEMYSALT			-2.0	∞		
1894.27	EYKLVVVVMAGEVGSALT			-2.0	∞		
1894.33	EYKLVVVVMAGGMPKSALT			-2.4	∞		
1895.21	EYKLVVVVGAGEMVESALT			-1.5	∞		
1895.21	EYKLVVVVMAGEVGESALT			-1.5	∞		
1895.27	EYKLVVVVMAGGMPESALT			-1.9	∞		

ED₅₀はμMで表わされており∞は増殖誘導能がないことを示す。小さい数字ほど抗原活性が大きい。
 一行目の配列は野生型ペプチドであり、relative hydrophobicity scoreが-1.3より大であればそのペプチドは野生型ペプチドよりも疎水性である。

Wild-type : EYKLVVVVGAGGVGKSALT
 Relative position # : 1 2 3 4 5 6 7 8 9
 Library design : EYKLVXXXXXXXXXSALT

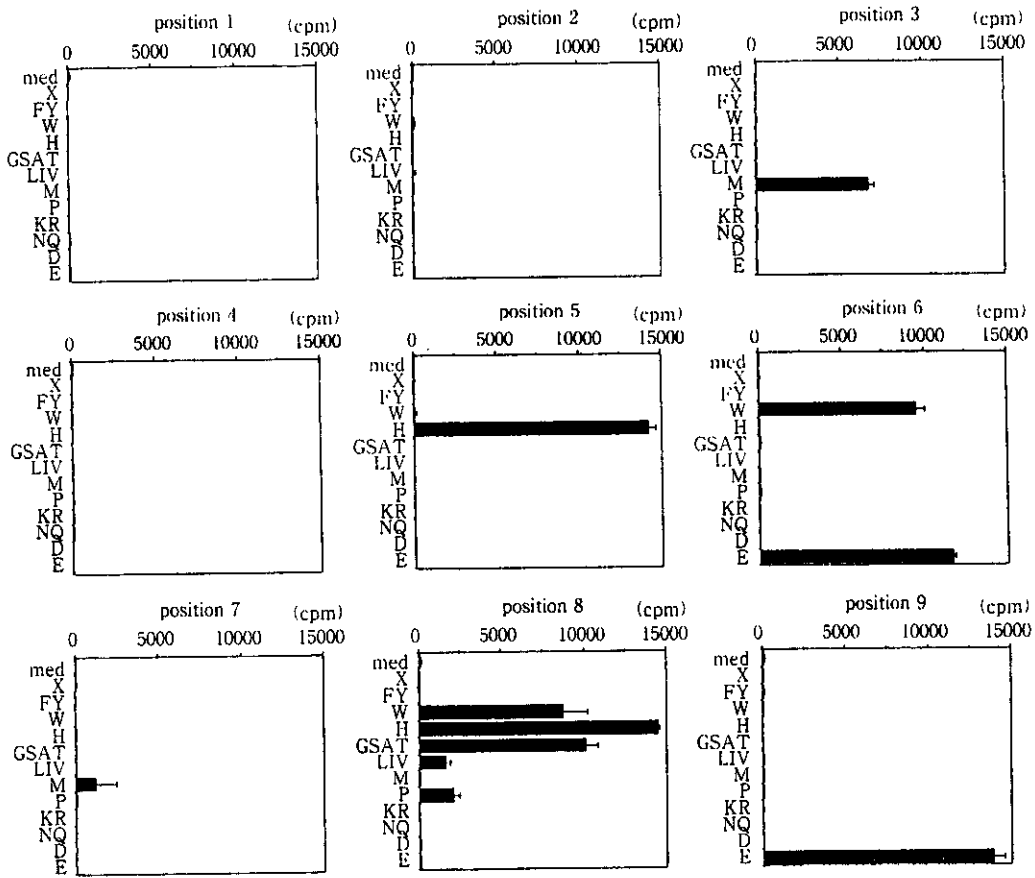


図3 X9コンビナトリアルペプチドライブラリーのT細胞刺激活性

ライブラリーのデザインはトップに示されている。たとえばposition 3のパネルで応答を誘導しているペプチドはEYKLVXXXXXXXXXSALTの配列を有する。各ペプチドは150 μ MでT細胞クローン+APCと共培養された。

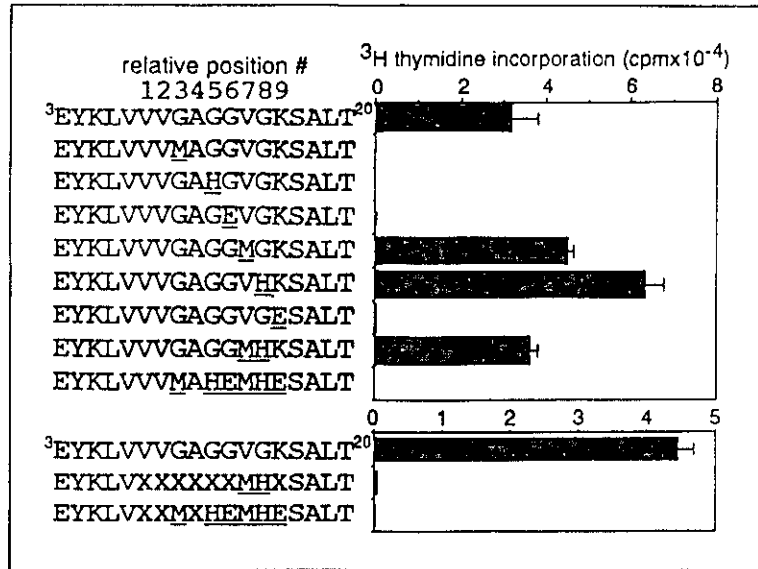


図4 複数の置換を有するペプチドに対するT細胞応答
 有利な置換の和がスーパーアゴニストを生むわけではない。上部パネルは0.1 μM 、
 下部パネルは100 μM (野生型は1 μM)で培養に加えられた。

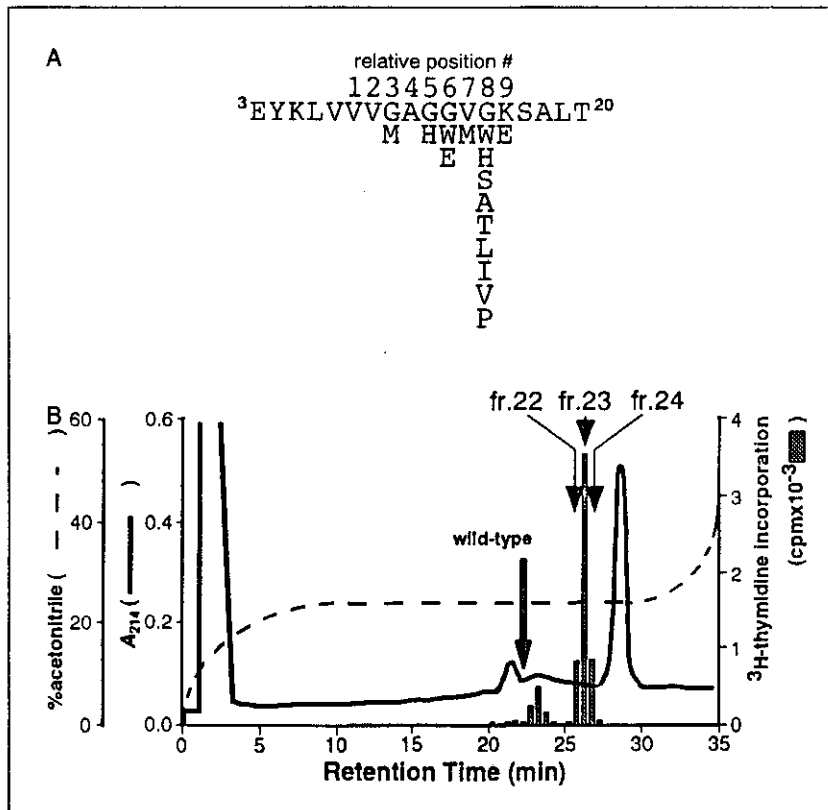


図5 HPLC分画と抗原活性
 太い矢印は野生型ペプチドのretention timeを示す。

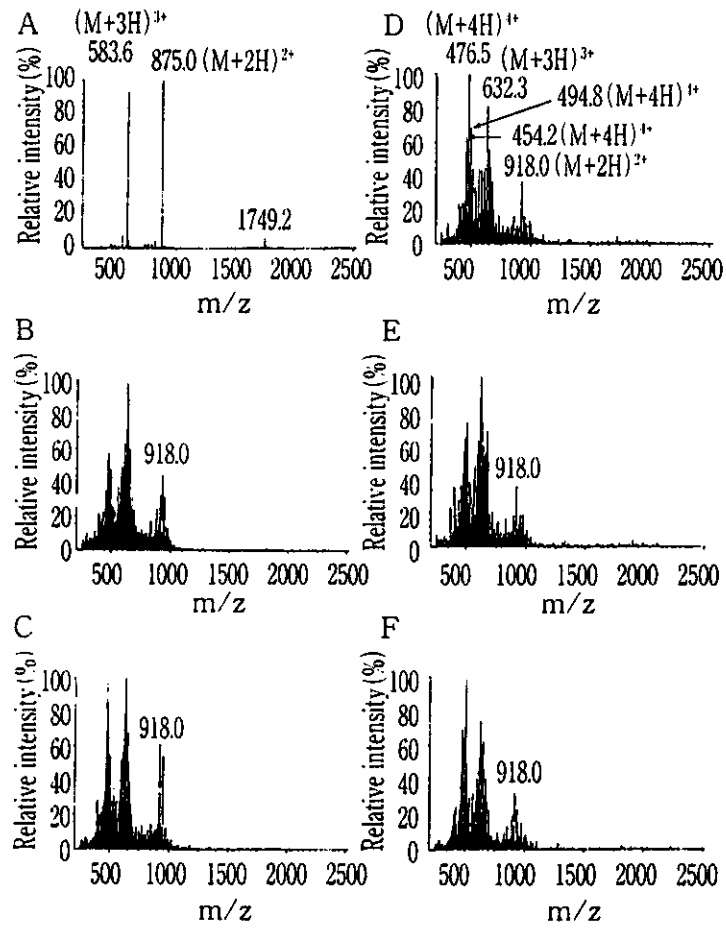


図6 HPLC画分の質量分析. Aは野生型ペプチドの分析結果
以下fraction 21(B), 22(C), 23(D), 24(E), 25(F)

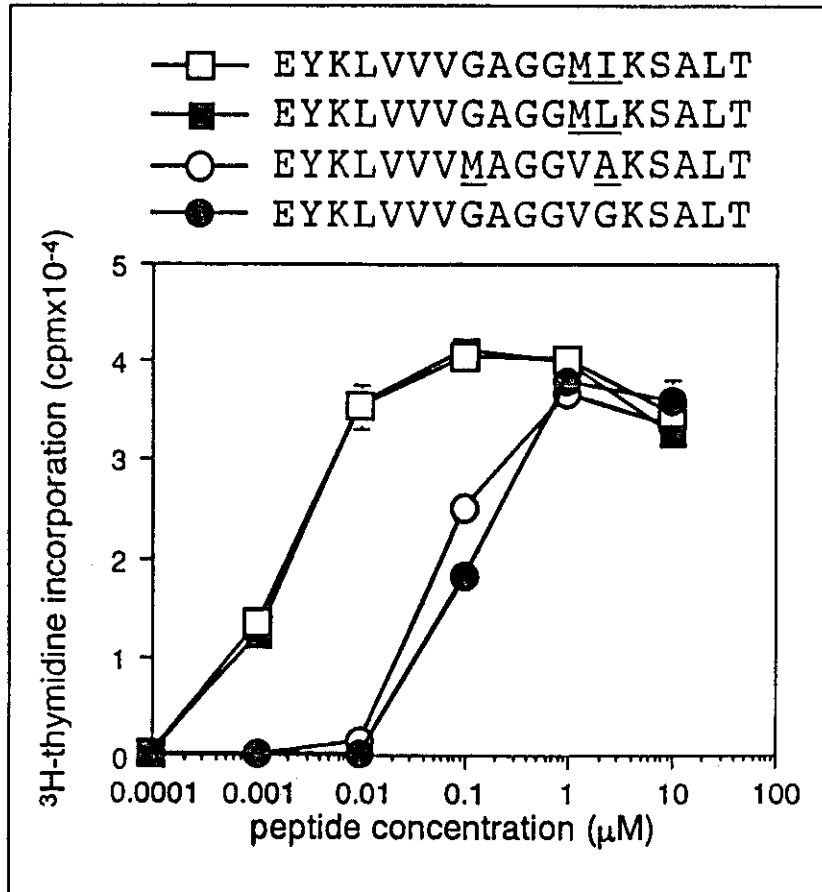


図7 スーパーアゴニストと野生型ペプチドの dose response

黒丸が野生型ペプチド，四角で示したのがスーパーアゴニストである。

抗リン脂質抗体症候群における自己抗体の関与した動脈硬化の発症機序の解明

研究協力者 松浦栄次

(岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設細胞工学部門)

研究要旨

β 2-グリコプロテイン I (β 2-GPI) が特異的に認識するリガンドを酸化 LDL より精製し同定したところ、cholesteryl-linoleate の酸化物であった。本リガンド含有リポソームのマクロファージへの結合は、 β 2-GPI および抗リン脂質抗体症候群 (APS) 由来の抗 β 2-GPI 抗体存在下で有意に増加した。一方、APS 患者血清中の β 2-GPI・リガンド複合体に対する自己抗体の陽性例および血清中酸化 LDL の異常高値例が動脈血栓症の既往例と有意に相関した。以上の結果は、酸化 LDL に対する自己抗体の反応が APS における動脈血栓の発症に深く関与している可能性を示すものである。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群 (APS) とは、動・静脈血栓や習慣流産などの臨床症状を有する難治性の自己免疫疾患で、抗カルジオリピン抗体やループスアンチコアグラントなどの抗リン脂質抗体による易血栓性が本疾患の基本病態と考えられている。我々はこれまでに、抗カルジオリピン抗体がリン脂質膜に結合した血漿アポリポ蛋白、 β 2-グリコプロテイン I (β 2-GPI)、を認識すること、および本抗体の認識するエピトープが cryptic で陰性荷電をもつ疎水表面と相互作用して β 2-GPI が構造変化を起こしたとき初めて β 2-GPI 分子表面に露出されることを明らかにした。¹⁻⁴⁾ β 2-GPI は、326 個のアミノ酸からなる分子量約 5 万の糖蛋白で、*in vitro* の実験系では、リン脂質依存的な内因性血液凝固反応の抑制、血小板のプロトロンビナーゼ活性の抑制、および ADP 依存的な血小板凝集反応の抑制、などの他に、活性化

プロテイン C の抗凝固作用を阻害することが示されているが、本蛋白の真の生理機能については必ずしも明らかにされていない。

ところで、酸化変性を受けた血漿 LDL は、動脈硬化の発症に深く関わる因子であると考えられている。脂質過酸化反応が進行するとともに、アルデヒド類などの脂質過酸化生成物により蛋白質側鎖も修飾され、表面電荷の変化や重合が起こる。同時に蛋白質部分は、ラジカル反応を受けてアミノ酸側鎖の変化や断片化などの変化を生じる。このように多様な修飾を受けている酸化 LDL の分析は難しく、最近まで正確に測定することさえもできず、生体内での酸化 LDL の構造、局在、濃度、および生成機構など、その実態についてはほとんど明らかにされていない。近年我々は、動脈硬化の初期現象として知られている酸化 LDL のマクロファージによる取り込みとそれに伴う泡沫化に、 β 2-GPI および抗 β 2-GPI 抗体

の関与する新たな機序が存在することを見いだした。⁵⁾ 本研究では、血漿 LDL の酸化により現れる β 2-GPI に特異的なリガンドの構造解析、リガンドのマクロファージの泡沫化への関与、およびリガンド・ β 2-GPI 複合体への抗 β 2-GPI 自己抗体の反応性と血中酸化 LDL の臨床的意義について解析した。

B. 研究方法

血漿 LDL の調製と酸化. LDL は、ヒト血漿より超遠心法により精製した。LDL の酸化は、硫酸銅 5 μ M 存在下での 37 $^{\circ}$ C、8 時間のインキュベーションにより行い、TBARS の増加とアガロースゲル電気泳動の移動度の増加を確認した。

β 2-GPI に特異的なリガンドの精製と同定. 酸化 LDL から Folch の方法により抽出した脂質画分を、二段階のシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開し、 β 2-GPI および抗 β 2-GPI 抗体をプローブとする ligand blotting で、 β 2-GPI のリガンドを特定した。さらに、TLC プレート上でモリブデン反応、オルシン-硫酸反応、および Lieberman-Burchard 反応を行い、 β 2-GPI リガンドの特性を調べる一方、リガンドを逆相 HPLC で精製し、LC/MS により構造を決定した。

マクロファージによる取り込み実験. リガンドを 3 H ラベルしたホスファチジルコリンを含有するリポソームに組み込んで、マウス由来のマクロファージ (J774.1) に対する結合量を測定した。また、 β 2-GPI および APS モデルマウス由来の抗 β 2-GPI 抗体 (WB-CAL-1) 存在下での J774.1 細胞へのリポソームの結合量を測定した。

β 2-GPI ・リガンド複合体に対する自己抗体の検出. リガンド固相化プレートに β 2-GPI 存在下で血清サンプルをインキュベートし、標識抗ヒト IgG 抗体で β 2-GPI ・リガンド複合体に対する自己抗体を検出した。

酸化 LDL の測定. WB-CAL-1 抗体固相化プレートと標識抗 apoB 抗体を用いるサンドイッチ ELISA で、 β 2-GPI 依存的に結合した血清サンプル由来の酸化 LDL を定量した。

β 2-GPI 特異的免疫複合体の測定. β 2-GPI の native な構造を認識するマウス抗 β 2-GPI 抗体を固相化したプレートおよび標識抗ヒト IgG 抗体を用い、血清サンプル中の β 2-GPI ・抗 β 2-GPI 抗体免疫複合体を検出した。

C. 研究結果

β 2-GPI 特異的リガンド.

β 2-GPI および抗 β 2-GPI 抗体が酸化 LDL から抽出した脂質画分に特異的な反応を示すことを明らかにし、この酸化 LDL 脂質画分から、 β 2-GPI および抗 β 2-GPI 自己抗体の反応性を指標に、 β 2-GPI に特異的なリガンド (oxLig-1) を単離精製した。oxLig-1 は、リンや糖を含まず、Lieberman-Burchard 反応 (コレステロール反応) 陽性であった。LC/MS による解析の結果、oxLig-1 は cholesteryl-linoleate の酸化体であることが示めされた。 β 2-GPI および抗 β 2-GPI 自己抗体が関与する酸化 LDL のマクロファージへの結合。

酸化 LDL のモデルとして、ホスファチジルセリン (以下 PS) と、oxLig-1 を含むリポソームを各々調製し、J774 細胞への結合実験を行った。PS-リポソームの結合量は、PS 含有量に依存的に増加したものの、oxLig-1 リポソームの結合ではリガンド濃度依存性は殆ど見られなかった。

PS-リポソームと異なり、oxLig-1-リポソームと J774 との結合は、 β 2-GPI の添加で抑制されなかった。ところが、 β 2-GPI と抗 β 2-GPI 抗体を同時に加えると J774 細胞への oxLig-1 リポソームの結合は顕著に増加し、その増加の程度は、PS-リポソームのスカベンジャー受容体を介する結合の 5~10 倍であった (図 1)。

β 2-GPI \cdot oxLig-1 複合体に対する自己抗体の臨床的意義。

oxLig-1 固相化プレートに β 2-GPI存在下で血清を反応させ、 β 2-GPI \cdot oxLig-1 複合体に対する自己抗体を測定した。SLE を合併した APS で、自己抗体陽性例と動脈血栓症の既往例との間に有意な相関が見られた ($P<0.01$)。一方、静脈血栓症の既往例とは相関が全く認められなかった。

血清中酸化 LDL。

血清中酸化 LDL 値は、健常人に比べて、APS で有意に高く、SLE 合併 APS では原発性 APS よりもさらに高値を示した。この血清中酸化 LDL は SLE 患者の 61% で異常高値を示し、また、APS 患者において抗 β 2-GPI 抗体価との相関は認められなかった。特に、SLE 合併 APS における酸化 LDL 高値例と動脈血栓症の既往例との間に有意な相関が認められた ($p<0.00001$)。

β 2-GPI 特異的免疫複合体。

APS 患者血清中の、 β 2-GPI 特異的免疫複合体の量と、抗 β 2-GPI 自己抗体価の両者間に有意な相関が見られた ($r^2=0.96$)。

D. 考察

動脈硬化の発症には、高脂血症などによる血中の LDL の増加、特に、内皮細胞の傷害による酸化 LDL の産生増加が重要である

という考えが広く受け入れられている。酸化 LDL に関しては、内皮依存性血管弛緩反応の抑制、白血球接着分子および平滑筋細胞増殖因子の発現誘導、内皮細胞の遊走の抑制など動脈硬化に関連した作用が多数報告されている。血管内皮細胞が酸化 LDL の刺激により接着分子 (ICAM-1, VCAM-1) を発現すると血液中の単球が内皮細胞に接着し、内膜下へと進入する。単球・マクロファージは、酸化 LDL を貪食して泡沫化しアテロームを形成する。これらの過程で、血管内皮細胞やマクロファージは、種々の増殖因子、サイトカインを産生するが、それらが中膜平滑筋細胞に作用して、フェノタイプ変換、内膜への遊走と増殖を促進し、複雑な粥状動脈硬化病変が形成されるというものである。

一方、我々は、 β 2-GPI および抗 β 2-GPI 抗体が硫酸銅処理により調製した酸化 LDL のマクロファージへの取り込みに関与していることを報告してきた⁵⁾。酸化 LDL は、スカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれるが、 β 2-GPI が同時に存在すると、 β 2-GPI の濃度依存的に酸化 LDL のマクロファージへの取り込みが部分的に抑制される。これは、酸化 LDL に β 2-GPI が結合することによって酸化 LDL 表面が β 2-GPI で覆い隠されてスカベンジャー受容体に認識されなくなるためと考えてきた。PS-リポソームを用いる検討でも、同様の β 2-GPI による取り込み抑制効果が認められた。ところが、今回精製した β 2-GPI に特異的でスカベンジャー受容体に認識されないリガンド (oxLig-1) を含有するリポソームではこの作用は見られていない。すなわち、 β 2-GPI は、特異的なリガンド、oxLig-1、を

介して酸化 LDL に結合し立体障害 (steric hindrance) 的にスカベンジャー受容体とそれに特異的なリガンドの結合を阻害するものと考えられる。

この実験系で、抗 β 2-GPI 自己抗体が存在すると、酸化 LDL および oxLig-1-リポソムの取り込みがスカベンジャー受容体を介した PS-リポソムの取り込みの 5~10 倍に増加する。この取り込みは、マクロファージの Fc 受容体を介するものと考えられ、循環血流中に抗 β 2-GPI 抗体が存在する APS 患者では、酸化 LDL に β 2-GPI を介して抗 β 2-GPI 抗体が結合し、それらをマクロファージが取り込むことがアテロームの形成の要因になるのであろう (図 2)。

ところで、酸化 LDL に特異的な抗体を用いた酸化 LDL の ELISA がこれまでも複数開発されてきたが、めざましい成果をあげているものは少ない。我々は、プレートに、APS の実験モデルマウス由来のモノクローナル抗 β 2-GPI 自己抗体 (WB-CAL-1) を固相化し、 β 2-GPI と血清サンプルを加え、さらにモノクローナル抗 apoB 抗体を反応させるサンドイッチ ELISA で、血清中の酸化 LDL を定量的に測定した。【結果】に示すとおり、この方法を用いて原発性 APS および SLE 合併 APS を対象に血清中の酸化 LDL 濃度を測定したところ、APS 患者、特に、SLE 合併 APS、で高値を示した。さらに、酸化 LDL 異常高値例は動脈血栓症の既往例と強い相関を示した。

SLE 合併 APS では、血管内皮細胞の障害により産生されるスーパーオキシド・ヒドロキシラジカルによって酸化を受けた酸化 LDL が β 2-GPI および抗 β 2-GPI 抗体の標的となりマクロファージの取り込みを介し

てアテロームの形成に向かったと考えられる。

また、抗 β 2-GPI 抗体が免疫複合体として APS 患者血流中を循環している可能性が示された。抗 β 2-GPI 自己抗体の認識する cryptic なエピトープは、 β 2-GPI が何らかの陰性荷電を有するキャリアと結合しないと発現されない。従って、血管内皮障害に伴って産生される酸化 LDL は、APS 患者血中で抗 β 2-GPI 抗体との免疫複合体として存在している可能性が強く、自己免疫が関与する動脈硬化のリスクファクターであると考えられる。

E. 結論

この様に、動脈硬化、特にアテローム形成、に深く関与すると思われる酸化 LDL と、 β 2-GPI および APS 由来の抗 β 2-GPI 抗体の反応性が異なる角度から示され、また、これらと動脈血栓症との関係が示されたことは、APS における抗 β 2-GPI 自己抗体依存的な動脈血栓症の発症機序が存在することを強く示唆するものである。また、動脈硬化の発症に関与する β 2-GPI 特異的なリガンドが酸性リン脂質ではなく酸化 cholesteryl-linoleate であったことより、この精製リガンドを用いる抗 β 2-GPI 抗体測定法および酸化 LDL の新規測定法を用いて APS における動脈血栓症の予知に努めるべきであろう。

F. 参考文献

- 1) Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K., Koike, T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. Lancet 1990, 336: 177-178.

- 2) Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K., Suzuki, T., Sumida, T., Yasuda, T., Koike, T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *J. Immunol.* 1992, 148: 3885-3891.
- 3) Matsuura, E., Igarashi, Y., Yasuda, T., Triplett, D.A., Koike, T. Anticardiolipin antibodies recognize β 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J. Exp. Med.* 1994, 179: 457-462.
- 4) Igarashi, M., Matsuura, E., Igarashi, Y., Nagae, H., Ichikawa, K., Triplett, D.A., Koike, T. Human β 2-glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using mutants expressed by a baculovirus system. *Blood.* 1996, 87: 3262-3270.
- 5) Hasunuma, Y., Matsuura, E., Makita, Z., Katahira, T., Nishi, S., Koike, T. Involvement of β 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 1997, 107: 569-573.

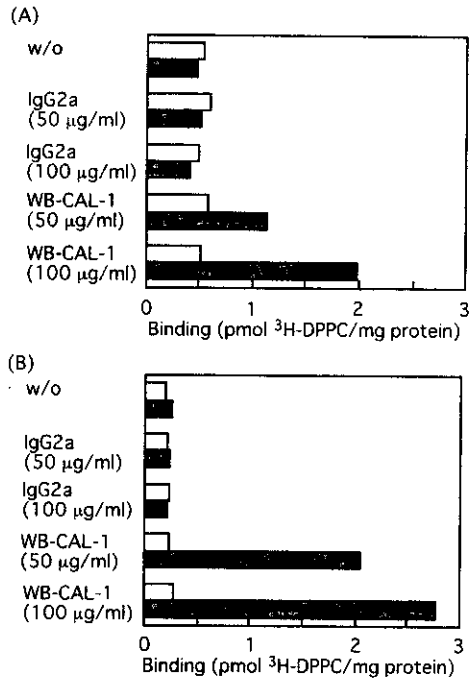


図1. β_2 -GPIおよび抗 β_2 -GPI抗体を介したリポソームのマクロファージへの取り込み. (A) PS-リポソーム、(B) oxLig-1-リポソーム

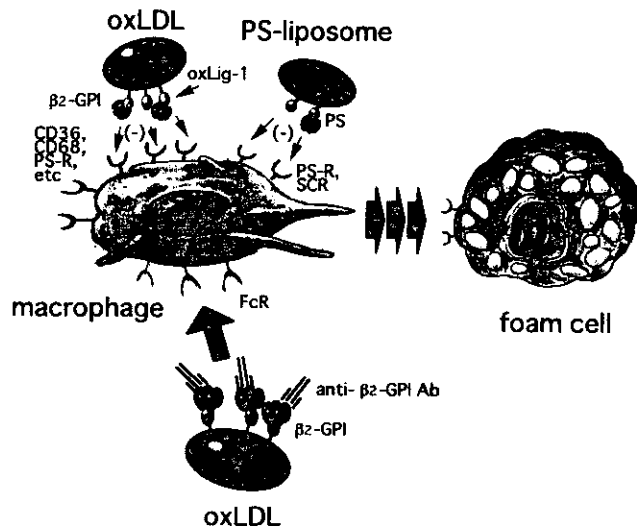


図2. 予測される自己抗体関与のマクロファージによる酸化LDL取り込みの機序

新たな免疫血栓症の指標としての抗血管内皮五糖体(VPS)自己抗体

研究協力者：佐々木毅
(東北大学・第二内科免疫・血液病制御学)

研究要旨

動脈硬化症を有しない例での血栓症の原因は抗リン脂質抗体症候群 (APS) 等を除き、ほとんどの例で不明である。我々は、これまで自己免疫疾患患者の血中に血管内皮細胞上のヘパラン硫酸の ATIII 結合部位(vascular pentasaccharide, VPS)を認識する自己抗体が存在することを報告してきた。本研究ではこの抗体が APS を含む血栓症診断の指標となりうるか否かを追求した。

A. 研究目的

自己免疫の関与する血栓症として血管炎・抗リン脂質抗体症候群(APS)が知られているが、これらとは診断できないにもかかわらず血栓症を発症する自己免疫性疾患症例も少なくない。血管内皮細胞上の糖蛋白であるヘパラン硫酸プロテオグリカンは、その糖鎖上にヘパリンと同様なアンチトロンビン III(ATIII)と特異的に結合する五糖体配列を有しており、これが流血中の ATIII と結合することにより、血管内皮細胞表面の抗凝固性を維持していることが知られている(図 1A)。この ATIII 結合部位に対する自己抗体が存在すると、ATIII のヘパラン硫酸への結合がブロックされることにより血管内皮細胞上の抗凝固活性が阻害され血栓症が誘導される可能性がある(図 1B)。我々は、自己免疫疾患例の IgG 中にヘパリンと反応する自己抗体が存在することを見い出してきた。本研究では、本抗体の血栓症診断における臨床的意義を追究することを目

的とした。このため、血清を検体とした VPS に対する抗体を容易に検出する ELISA の系を確立した。これより、血栓症および習慣性流産との関連でスクリーニングを行い、さらに抗 VPS 抗体陽性および陰性患者群間の臨床像を比較し、抗 VPS 抗体検出の臨床的有用性を追究した。

B. 研究方法及び研究結果

1) 抗 VPS 抗体の特異性

VPS に対するヒトモノクローナル抗体および血清より精製したポリクローナル自己抗体を用い、これらの結合特異性を分析した。いずれの抗体も VPS および内皮細胞にのみ特異性を有し、カルジオリピン・プロトロンビンあるいは β 2-glycoprotein-1 への結合は認めず、抗リン脂質抗体とは異なる抗体と考えられた。

2) 対象症例

APS33 例、抗リン脂質抗体(APA)陰性で血栓症のエピソードを有する 22 例、APA 陰性で反復流産 26 例、血栓症の既往をもた

ない164例の血清を、当院通院例から得た。

3) 抗VPS抗体ELISA

ヘパリンより ATIII 結合アガロースを用いて精製したVPSを抗原としてELISAの系を確立した。モノクローナル抗VPS抗体を標準として、結果はunitに換算して表現した。

4) 血清スクリーニング (図2)

上記245例および正常人61例の抗VPS抗体、抗 β 2-GP1抗体、抗CL抗体、抗PT抗体、Lupus anticoagulantを測定した。抗VPS抗体は抗リン脂質抗体症候群33例中10例(36.3%)、APA陰性血栓症22例中6例(27.2%)、APA陰性反復流産26例中14例(53.8%)、その他の疾患164例中3例(1.8%)、正常人61例中0例(0%)に陽性であり、APA陰性の血栓症あるいは流産例においてもしばしば本抗体が検出されることが明らかとなった。これに対し、抗 β 2-GP1抗体、抗PT抗体とLACはAPS患者のみで陽性であった。

5) 臨床像の比較

さらに本抗体の臨床的意義を明らかとするため、血栓症あるいは連続流産の既往を有する症例を抗VPS抗体およびAPAの有無により、(I)両者性群(n=10)、(II)両者陰性群(n=25)、(III)抗VPS単独陽性群(n=22)、(IV)APA単独陽性群(n=20)、に分け、III-IV群間の臨床像を比較した。その結果、脳梗塞(III:3/22例;IV:11/20例)および腎梗塞(III:0/22例;IV:6/20例)はIV群において、反復流産(III:14/22例;IV:5/20例)はIII群において高頻度に認めた。また、IV群では、III群に比して有意の血小板低下(III: 23.1 ± 4.5 万;IV: 16.5 ± 7.4 万)とAPTT延長(III: 33.0 ± 6.3 秒;IV: 61.6 ± 34.7

秒)が認められたが、その他の血球数、抗DNA抗体、血清補体価、ATIII、トロンボモジュリンには、両群間に有意差は認められなかった。

C. 考察

本抗体に関連して、抗リン脂質抗体APAと共にヘパリン硫酸(HS)或いはヘパリンに反応しうる自己抗体との異同の検討を必要とする。これまで報告されている市販のHSの殆どは腎糸球体基底膜に由来しているが、これはVPSを含まない。我々が検索した範囲内で各臓器由来の血管内皮細胞より調整しえたHSもVPS抗体と反応しない。また、HSらは抗VPS抗体とVPSの反応を阻害しないので抗HS抗体とは異なるカテゴリーに属する。

抗VPS抗体はこれまで我々が報告してきたヘパリンに反応しうる自己抗体とほぼ一致する。しかし、血清サンプルを用いた場合に、ヘパリンを抗原としたELISAでは陽性頻度が著しく低い。これは、ヘパリンは多様な構造をもつフラグメントの集合体であるので、VPSエピトープが少ないためと推定された。事実、VPSを有するフラグメントを精製した抗原を用いることにより血清サンプルによる抗VPS抗体のスクリーニング検出が容易となった。

今回の血清スクリーニング成績、臨床像との比較検索、更には、抗VPS抗体の特異性に関する研究により、抗VPS抗体はAPAとは異なること、抗VPS抗体はAPS以外の血栓症、習慣性流産のマーカーとなりうる事が判明した。この事は、以下の点よりも理解されやすい。すなわち、血管内皮細胞表面における抗凝固活性のかなりの部

分は、ATIII が内皮細胞上の VPS に結合し TAT 複合体の形成を促進することにより維持されている。したがって抗 VPS 抗体の ATIII 結合部位への結合はこの抗凝固活性を低下させ、血栓症を惹起することが推定されるためである。

D. 結論

- 1) 簡便で感度の高い抗 VPS 自己抗体測定系を確立した。
- 2) 抗 VPS 抗体は、抗リン脂質抗体症候群とは異なる血栓症・流産例に検出でき、新たな免疫性血栓症診断の指標として有用であることを示した。

E. 参考文献

Watanabe M, Shibata S, Muryoi T and Sasaki T. Association of thrombosis and recurrent fetal loss with anti-heparin autoantibody. *Arth. Rheum.* 40: S1699, 1997.

Shibata S, Harpel PC, Gharavi A, Rand J and Fillit H. Autoantibodies to heparin from patients with antiphospholipid antibody syndrome inhibit formation of antithrombin III-thrombin complexes. *Blood* 83:2532-2540, 1994.

Thunberg L, Backstrom G and Lindahl U: Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. *Carbohydrate Res.* 100:393-410, 1982.