

19990611

厚生省重点研究事業

SLEにおける難治性病態の早期診断と治療

平成11年度研究業績報告書

平成12年3月

主任研究者 小池 隆夫

-目次-

(1) 構成員名簿	5
(2) 総括研究報告書	9
(3) 分担研究報告書	
1. 抗リン抗体脂質症候群: キメラ抗カルジオリピン抗体 (抗 $\beta$ 2グリコプロテインI抗体) を用いた抗カルジオリピン抗体測定系の標準化	17
小池 隆夫 (北海道大学医学部内科学第二講座)	
2. 抗リン抗体脂質症候群: 抗プロトロンビン抗体の特性	22
小池 隆夫 (北海道大学医学部内科学第二講座)	
3. 抗リン抗体脂質症候群: 抗プロトロンビン抗体のエピトープ	25
住田 孝之 (筑波大学医学部臨床医学系内科)	
4. 間質性肺炎: 肺胞上皮細胞の増殖因子を用いた新しい治療	34
土肥 眞 (東京大学医学部アレルギー・リウマチ科)	
5. 難治性腎炎: ループス腎炎の画像診断	42
江口 勝美 (長崎大学医学部内科学第一講座)	
6. 難治性腎炎: 自己抗原 GOR とループス腎炎	51
小池 竜司 (東京医科歯科大学内科学第一講座)	
(4) 研究成果の刊行に関する一覧表	59

## (1) 構成員名簿

平成11年度 厚生省特定疾患調査研究事業（重点事業）研究者名簿

区分	氏名	所属施設名	職名	所属施設所在地	E-Mail	上段電話番号 下段FAX番号
主任	小池 隆夫	北海道大学医学部内科学第二講座	教授	〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目	tkoike@med.hokudai.ac.jp	(011)716-1161(内5913) (011)706-7710
分担	江口 勝美	長崎大学医学部内科学第一講座	教授	〒852-8501 長崎市坂本一丁目7-1	eguchi@net.nagasaki-u.ac.jp	(095)849-7260 (095)849-7270
分担	住田 孝之	筑波大学臨床医学系内科	教授	〒305-0005 茨城県つくば市天王台1-1-1	tsumita@md.tsukuba.ac.jp	(0298)53-3105 (0298)53-3105
分担	小池 竜司	東京医科歯科大学内科学第一講座	助手	〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-45	kryu.med1@med.tmd.ac.jp	(03)5803-5206 (03)5803-0131
分担	土肥 眞	東京大学医学部 アレルギー・リウマチ科	助手	〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1	DOHI-PHY@h.u.tokyo.ac.jp	(03)3815-5411(内3193) (03)3815-5954

経理事務担当者

区分	氏名	所属	職名	所属施設所在地	E-Mail	上段電話番号 下段FAX番号
経理	渥美 達也	北海道大学医学部内科学第二講座	講師	〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目	atu3tat@med.hokudai.ac.jp	(011)716-1161(内5913) (011)706-7710

(2) 平成11年度総括研究報告書  
(重点研究事業)

主任研究者 小池 隆夫

北海道大学医学部内科学第二講座

## SLE における難治性病態の早期診断と治療

主任研究者 小池 隆夫  
(北海道大学医学部内科学第二講座)

### 研究要旨

全身性エリテマトーデス (SLE) は、多彩な自己抗体の出現と腎や中枢神経系をはじめ、多臓器障害を特徴とする、代表的な自己免疫疾患である。近年、早期診断や早期からの積極的な治療により、本症の生命予後は著しく改善したが、あらゆる治療に抵抗する難治性の病態も依然として存在する。本研究ではその中から血栓症と習慣流産を伴う抗リン脂質抗体症候群、間質性肺炎及び難治性腎炎の 3 つの難治性病態に焦点を絞り、それらの病因を明らかにし、早期診断法を確立し、治療法の開発を試みた。

抗リン脂質抗体症候群に関しては、抗リン脂質抗体症候群モデルマウス由来のモノクローナル抗カルジオリピン抗体、WBCAL-1 の可変部領域と、ヒト $\kappa$ および $\gamma$ 1 鎖定常部領域よりなるキメラ抗体、HCAL を産成する、ミエローマ細胞株を樹立した。得られたキメラ抗体は、多くの施設で、固相化されたカルジオリピンおよび $\beta$ 2-GPI に良好な反応性を示した。HCAL を用いて測定した抗カルジオリピン抗体価は、臨床像との関連が認められた。HCAL は、IgG クラスの抗カルジオリピン抗体および抗 $\beta$ 2-GPI 抗体測定系の標準血清として有用であると考えられた。抗カルジオリピン抗体およびループスアンチコアグラントとは別の特異性を有する抗プロトロンビン抗体の測定系が確立され、抗リン脂質抗体症候群における臨床的な有用性が明らかになった。

間質性肺炎に関しては、肺胞上皮細胞に対する増殖因子である HGF が、肺線維症のマウスモデルを用いた *in vivo* の実験で、肺傷害に引き続く線維化に抑制効果を発揮する事が明らかとなった。ループス腎炎を早期に診断するため、非侵襲的検査法である MRI (核磁気共鳴映像) を使用した。設定条件を決定する目的でループス腎炎のモデルマウスである MRL/lpr マウスを使用、MRI 撮影(9T)を行った。麻酔下生存マウスにおける腎臓 MRI では、呼吸性移動、心拍のアーチファクトの影響で腎皮質病変の描出は困難であったが、腎皮質・髄質の区別はついた。マウス腎摘出後のフロリナート液中の腎臓 MRI 撮影では、組織染色のスライスに匹敵する解像度が得られた。ループス腎炎患者の腎臓 MRI 撮影(1T)においても、腎皮質・髄質の区別はついたが、腎皮質病変の詳細な描出は困難であった。

若年女性において SLE の発病、重篤なループス腎炎が多発する事実より女性ホルモンとの関連に着目し、前年度エストロゲンで発現誘導されることを報告した HCV 関連自己抗原と認識されている GOR 遺伝子産物に対する抗体と SLE 患者および腎炎合併に伴う疾患活動性との関連を検討した。しかしながら従来 HCV と抗原交差性が存在すると推測されていた領域はヒトでは翻訳されないことが判明し、ヒトにおける翻訳部分を抗原とする ELISA の系を樹立し 52 名の SLE 患者を含む 201 名の血清サンプルで抗 GOR 抗体の存在を検討した。抗 GOR 抗体を高値で保有する患者は確かに存在するものの、SLE 患者における特異性や腎炎の合併や悪化などの疾患活動性の変化との相関は認められなかった。

## A.研究目的

一般的な SLE 患者の生命予後は本症の早期発見が可能となり、また治療法の大幅な進歩により著しく改善されきた。しかし、抗リン脂質抗体症候群、間質性肺炎、難治性ループス腎炎のような難治性の病態も存在し、患者の OQL や生命予後を著しく阻害している。抗リン脂質抗体症候群は SLE に最も多く併発し、特に脳梗塞に代表される動脈系の血栓症が約半数の患者に認められる。また SLE 患者の流産の最大の原因ともなっている。間質性肺炎は SLE 患者において肺高血圧や肺胞出血と同様に、患者の生命予後を左右する重大な肺合併症である。またループス腎炎の中にはあらゆる治療に抵抗し腎不全に進行する、極めて難治な一群が存在する。本研究の目的は、多彩な SLE の病態の中から上記の抗リン脂質抗体に起因する病態（動・静脈血栓症、習慣流産、血小板減少及び CNS ループスの一部）、間質性肺炎及び難治性ループス腎炎の 3 つの病態に焦点を絞り、それらの病因、早期診断及び新たな治療法を開発し、患者の OQL や生命予後の改善を計るものである。

## B.研究方法

1) 抗リン脂質抗体症候群：①自然発症抗リン脂質抗体症候群マウス由来のモノクローナル aCL、WBCLAL-1 の可変部領域遺伝子と、ヒト $\gamma$ 1 と $\kappa$ 定常部領域遺伝子を持つプラスミドを作成し、マウス形質細胞株に導入し、ヒト $\gamma$ 1 定常部領域を持った、aCL 活性及び抗 $\beta$ 2-GPI 抗体活性を有するキメラ抗体産生安定形質発現細胞株を、このキメラ抗体の活性と多施設の aCL 測定系の標準血清との比較を行った。②プロトロンビンの二つのフラグメント（fragment-1 と prethrombin-1）を用いて抗プロトロンビン抗体が認識する抗原（B 細胞エピトープ）を解析した。5 種類のリコンビナント欠損

蛋白を作成して B 細胞エピトープについて検討した。

2) 間質性肺炎：肺胞上皮細胞に対する増殖因子である肝細胞増殖因子(HGF)の経気管支投与が、マウスの気管支・肺胞上皮細胞に対して in vivo で増殖活性を示す事を確認した。この結果にもとづき、マウスのブレオマイシン惹起性肺線維症モデルを用いて、HGF の肺線維化に対する抑制効果を検討した。

3) 難治性ループス腎炎=①SLE における難治性病態の一つであるループス腎炎を早期に診断するため、非侵襲的検査法である MRI(核磁気共鳴映像)を使用した。設定条件を決定する目的でループス腎炎のモデルマウスである MRL/lpr マウスを使用、MRI 撮影(T1)を行った。②ヒトにおける翻訳部分を抗原とする ELISA の系を樹立しヒト血清サンプルで抗GOR抗体の存在を検討した。

## C.研究結果

### 抗リン脂質抗体症候群

抗カルジオリピン抗体 (aCL) は、抗リン脂質抗体症候群の疾患マーカーであり、その病態形成に関与すると考えられている。抗リン脂質抗体症候群患者の血中に認められる抗カルジオリピン抗体は、血栓形成の制御にも関わるアポ蛋白である $\beta$ 2-グリコプロテイン I ( $\beta$ 2-GPI)を認識することが明らかにされてきた。これらの抗体の測定法を確立し、標準化することは、多施設が協力して、抗リン脂質抗体症候群の臨床像を明らかにし適切な治療法を検討していく上で重要である。ヒト IgG クラスの aCL 及び抗 $\beta$ 2-GPI 抗体測定系の標準となる抗体を得るため、自然発症抗リン脂質抗体症候群マウス由来のモノクローナル aCL、WBCLAL-1 の可変部領域遺伝子と、ヒト $\gamma$ 1 と $\kappa$ 定常部領域遺伝子を持つプラスミドを作成し、マウス形質細胞株に導入し、ヒト $\gamma$ 1 定常部領域を持った、aCL 活性及び抗 $\beta$ 2-GPI 抗体活性を

有するキメラ抗体産生安定形質発現細胞株を、このキメラ抗体の活性と、多施設の aCL 測定系の標準血清との比較を行った。キメラ抗体は、多くの研究施設で用いられてきた IgG aCL 測定系の標準血清と同様の抗原への反応性を示した。キメラ抗体を標準として測定した、SLE 患者血中の IgG aCL 価は、抗リン脂質抗体症候群の臨床像との関連が認められた。作成したキメラ抗体は、IgG aCL および抗 $\beta$ 2-GPI 抗体測定系の標準として有用であると考えられた。

抗リン脂質抗体症候群の病因として重要な自己抗体の一つである抗プロトロンビン抗体において、その産生の分子機構と機能を解明し、抗原特異的な治療の可能性を追究することを試みた。その結果、1) 抗プロトロンビン抗体の測定方法を確立した。2) プロトロンビンの二つのフラグメント (fragment-1 と prethrombin-1) を用いて抗プロトロンビン抗体が認識する抗原 (B 細胞エピトープ) を解析したところ、それぞれのフラグメントに B 細胞エピトープが存在していた。3) 抗リン脂質抗体症候群患者では、fragment-1 あるいは prethrombin-1 のどちらかに対する抗体が存在していた。4) 妊娠中毒症と流産患者には、抗プロトロンビン抗体の陽性率が高く、さらに、妊娠中毒症と fragment-1 抗体、流産患者と prethrombin-1 抗体との関連が強く示唆された。5) 5 種類のリコンビナント欠損蛋白を作成して B 細胞エピトープについて検討した結果、prethrombin-1 上の B 細胞エピトープは AA272-622 に存在している事が判明した。以上より、プロトロンビンの B 細胞エピトープの解析により抗体機能の予測、特異的制御の可能性が示された。

### 間質性肺炎

SLE を始めとする膠原病に合併した間質性肺炎の治療戦略のひとつとして、肺への

障害の早期に、肺胞上皮細胞の修復を促すことが考えられる。本研究では、肺胞上皮細胞に対する増殖因子である肝細胞増殖因子(HGF)の経気管支投与が、マウスの気管支・肺胞上皮細胞に対して *in vivo* で増殖活性を示す事を確認した。この結果にもとづき、マウスのブレオマイシン惹起性肺線維症モデルを用いて、HGF の肺線維化に対する抑制効果を検討したところ、肺内コラーゲン、病理学的なスコアリングの両者の指標で、抑制効果が認められた。さらにその機序として、上皮細胞に対する増殖効果に加えて、遊走能の亢進、細胞表面線溶系の活性化が判明した。昨年度の研究結果と合わせ考えると、HGF とインターフェロン・ガンマの両者を組み合わせることが、間質性肺炎の進展を抑制する新たな治療戦略の一つとなる可能性が示唆され、今後検討を続ける事が重要であると考えられた。

### ループス腎炎

SLE における難治性病態の一つであるループス腎炎を早期に診断するため、非侵襲的検査法である MRI(核磁気共鳴映像)を使用した。設定条件を決定する目的でループス腎炎のモデルマウスである MRL/lpr マウスを使用、MRI 撮影(9T)を行った。麻酔下生存マウスにおける腎臓 MRI では、呼吸性移動、心拍のアーチファクトの影響で腎皮質病変の描出は困難であったが、腎皮質・髓質の区別はついた。マウス腎摘出後のフロリナート液中の腎臓 MRI 撮影では、組織染色のスライスに匹敵する解像度が得られた。ループス腎炎患者の腎臓 MRI 撮影(1T)においても、腎皮質・髓質の区別はついたが、腎皮質病変の詳細な描出は困難であった。その原因として、MRI 自体の解像度の問題が大きかった。T2 強調像および脂肪抑制画像において腎皮質・髓質のコントラストが良好となった。また、横断像より矢状断像や冠状断像の方が良好な画像が得られた。今後、MRI 機器の解像度の向上により



ループス腎炎患者の腎病変の描出が可能となると考えられた。

若年女性において SLE の発病、重篤なループス腎炎が多発する事実より女性ホルモンとの関連に着目し、前年度エストロゲンで発現誘導されることを報告した HCV 関連自己抗原と認識されている GOR 遺伝子産物に対する抗体と SLE 患者および腎炎合併に伴う疾患活動性との関連を検討した。しかしながら従来 HCV と抗原交差性が存在すると推測されていた領域はヒトでは翻訳されないことが判明し、ヒトにおける翻訳部分を抗原とする ELISA の系を樹立し 52 名の SLE 患者を含む 201 名の血清サンプルで抗 GOR 抗体の存在を検討した。抗 GOR 抗体を高値で保有する患者は確かに存在するものの、SLE 患者における特異性や腎炎の合併や悪化などの疾患活動性の変化との相関は認められなかった。いっぽう GOR 遺伝子産物自体の機能や特徴の検討の結果、この分子が多量体を形成する核蛋白であり、遺伝子導入による強制発現細胞は炎症性ケモカイン産生応答に対して抑制的に作用し、エストロゲンやその下流の分子が単独では SLE の病態を助長するとは限らない可能性が示された。従って今後性ホルモンと SLE 発病及びその難治化との関連を考える上で、その作用機序を理解して他のステロイドホルモンや共役分子の関与を考慮した複雑な系として検討と解析を行っていく必要性を認識した。

## D. 考察

### 抗リン脂質抗体症候群

抗リン脂質抗体症候群患者の血中に認められる抗カルジオリピン抗体は、血栓形成の制御にも関わるアポ蛋白である $\beta 2$ -グリコプロテイン I ( $\beta 2$ -GPI)を認識する。この抗体の測定法を確立し、標準化することは、多施設が協力して、抗リン脂質抗体症候群の

臨床像を明らかにし適切な治療法を検討していく上で重要である。これまで、aCL の測定のための標準血清は存在せず、各施設間で独自に調整していた。そこで aCL 活性及び抗 $\beta 2$ -GPI 抗体活性を有するキメラ抗体産生安定形質発現細胞株を作製し、多施設の aCL 測定系の標準血清との比較を行った。その結果、作成したキメラ抗体は、IgG aCL および抗 $\beta 2$ -GPI 抗体測定系の標準として有用であることが明らかになった。この抗体は、すでにヨーロッパにおける多施設共同研究における標準抗体として既に使用されている。また、アメリカリウマチ協会および WHO の標準抗体となる事が決まっている。すなわち、このキメラ抗体は aCL の世界標準血清として今後多くの施設で用いられるようになると思われる。

抗リン脂質抗体症候群の患者血中に認められる代表的な自己抗体は aCL とループスアンチコアグラントであるが、第三の自己抗体として抗プロトロンビン抗体が重要である事が本研究で明らかになった。本抗体も直接プロトロンビンに反応するのではなく、放射線照射したプレートにプロトロンビンを固相化するか、Ca とフォスファチジルセリンの存在下でプロトロンビンに結合する性質を持っている（フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体）。この自己抗体は疾患特異性が極めて高く、今後 $\beta 2$ -GPI 依存性抗カルジオリピン抗体やループスアンチコアグラントとともに、抗リン脂質抗体症候群のスクリーニングには必須の検査になると思われる。

### 間質性肺炎

今年度の検討により、HGF は肺胞上皮細胞に対する増殖促進活性のみでなく、遊走能の亢進、線溶系の活性化といった多様な機序によって、ブレオマイシンにより引き起こされる肺傷害・線維化に対して抑制効果を示す事が明らかとなった。ブレオマイシンを用いたマウスモデルでは、肺腔内の

線維化からリモデリングへと至る過程が、人における実際の間質性肺炎・線維症のプロセスと似ており、その事がこのモデルが汎用されて来た大きな理由である。しかしながら、SLEで認められる急性進行性の肺傷害のモデルとしては、その発症に免疫学的な機序の関与が明らかではないため、このモデルは必ずしも完全ではない。今後は、免疫複合体による肺炎モデルやMRL/lprマウスなど、他の実験モデルでHGFの効果を追試・確認する事も必要であろう。同時に、免疫学的な機序の関与した肺傷害モデルの開発も、SLEにおける急性進行性肺傷害の病態の解析の上で有益であろう。

HGFを臨床応用に向けて展開する場合の問題点として、増殖因子である故に、過剰投与により細胞の癌化を来す可能性が考えられる。現在、肝臓疾患や腎臓疾患などでHGFを臨床応用した例での発癌の報告は無いが、長期投与を視野に入れた場合には、細心の注意が必要であろう。

近年、HGFの免疫抑制作用も明らかにされつつある。機序としては、TGF- $\beta$ の活性化を通じた間接作用と、直接作用の両者の可能性が考えられる。知見の集積に伴い、免疫学的機序の関与した肺病変に対するHGFの応用に対しての新しい理論的根拠が見いだされる事が期待される。

### ループス腎炎

ループス腎炎を早期に診断するため、非侵襲的検査法であるMRI(核磁気共鳴映像)を使用した。設定条件を決定する目的でループス腎炎のモデルマウスであるMRL/lprマウスを使用、MRI撮影(9T)を行ったが、今後設定条件のさらなる検討が必要と考えられた。長時間撮影で解像度は向上するが、マウスは死亡する可能性が高く、短時間で解像度が向上する設定条件が必要である。マウス腎摘出後のフロリナート中の腎臓MRI撮影では、MRL/lprマウス、Balb/c

マウスともに、組織染色のスライスに匹敵する解像度が得られたこと、28週令MRL/lprマウスにおける組織像(弱拡)において、腎皮質部に糸球体が確認できたことから、設定条件しだいでは、糸球体病変の描出も可能であると考えられる。さらに、GdDTPA造影、腎動脈のMR Angiography(血管造影)を使用することによって、糸球体内での血管と細胞とのコントラストが付き、糸球体病変が描出できる可能性がある。また、血管自体の病変の描出も検討できる。さらに、マウス専用の表面コイルを作製することにより、さらに鮮明な画像が得られる。以上から、今後マウス専用MRI装置(SPECTROSPIN 400, 9T)を使用したMRL/lprマウスの腎臓MRI撮影はループス腎炎患者の腎臓MRI撮影の設定条件を決定する目的で有用と考えられた。

ループス腎炎患者の腎臓MRI撮影においても、解像度を向上させる条件の検討が必要と考えられた。被験者側の検討としては、空腹時撮影、抗コリン剤投与、MRI側の検討としては、より正確な呼吸同期、グラデIENTエコノミー法、高速スピネコノミー法を用いることにより、より鮮明でアーチファクトの少ない画像が得られると思われる。さらに、GdDTPA造影も検討が必要であろう。今後開発され、臨床応用される高解像度のMRI機器の使用も検討したい。

エストロゲンによって発現誘導されるGOR遺伝子産物ヒトホモログは、ヒトにおいて抗原性を有するが、SLE患者において抗GOR抗体は特異性や疾患活動性との相関はないものと考えられた。また従来C型肝炎ウイルスとの抗原交差性を指摘されていた領域はヒトにおいては翻訳されず、HCV感染やSLEで見られる自己免疫現象にGOR遺伝子産物が介在している可能性も低いと考えられた。

いっぽうGOR遺伝子産物自身やエストロゲンは炎症応答に対して単独では抑制的に

作用する可能性が高く、SLE の病態や難治化における性ホルモンの役割は他のステロイドホルモンレセプターや共役分子などの関与を含めた複雑なものであることが予想され、その理解の上に新たな解析アプローチを進めていく必要性が考えられた。

## E. 結論

全身性エリテマトーデス (SLE) は、多彩な自己抗体の出現と腎や中枢神経系をはじめ、多臓器障害を特徴とする、代表的な自己免疫疾患である。近年、早期診断や早期からの積極的な治療により、本症の生命予後は著しく改善したが、あらゆる治療に抵抗する難治性の病態も依然として存在する。本研究ではその中から血栓症と習慣流産を伴う抗リン脂質抗体症候群、間質性肺炎及び難治性腎炎の 3 つの難治性病態に焦点を絞り、それらの病因を明らかにし、早期診断法を確立し、治療法の開発を試みた。抗リン脂質抗体症候群に関する研究では、抗リン脂質抗体症候群モデルマウス由来のモノクローナル aCL、WBCAL-1 の可変部領域と、ヒト $\kappa$ および $\gamma 1$  鎖定常部領域よりなるキメラ抗体、HCAL を、マウスミエローマ細胞株にて発現させ、安定形質発現細胞株を得た。得られたキメラ抗体 HCAL は、多くの施設で、各々の施設の測定法にて、固相化されたカルジオリピンおよび $\beta 2$ -GPI に良好な反応性を示した。HCAL を用いて測定した aCL 価は、臨床像との関連が認められた。HCAL は、IgG クラスの aCL および抗 $\beta 2$ -GPI 抗体測定系の標準血清として有用であると考えられた。

間質性肺炎に関しては、肺胞上皮細胞に対する増殖因子である HGF は、多様な機序によって、肺傷害に引き続く線維化に抑制効果を発揮する事が明らかとなった。今後は、1) 他の肺傷害モデルでの追試や、免疫学的な機序の関与した新たな動物モデルの開発、2) HGF による発癌性の検討、3) 抗線維化サイトカインである IFN- $\gamma$  との協

調作用の検討、などが重要な課題であると考えられた。

ループス腎炎に関しては、現在臨床で使用中の MRI は磁場強度で 1 T であるため、ループス腎炎患者における腎皮質病変の詳細な解析は困難であったが MRL マウスの腎臓 MRI 撮影の検討から今後 MRI 機器の解像度の向上によりループス腎炎患者の腎病変の描出が可能となると考えられた。

エストロゲンによって発現誘導される GOR 遺伝子産物ヒトホモログは、ヒトにおいて抗原性を有するが、SLE 患者において抗 GOR 抗体は特異性や疾患活動性との相関はないものと考えられた。また従来 C 型肝炎ウイルスとの抗原交差性を指摘されていた領域はヒトにおいては翻訳されず、HCV 感染や SLE で見られる自己免疫現象に GOR 遺伝子産物が介在している可能性も低いと考えられた。いっぽう GOR 遺伝子産物自身やエストロゲンは炎症応答に対して単独では抑制的に作用する可能性が高く、SLE の病態や難治化における性ホルモンの役割は他のステロイドホルモンレセプターや共役分子などの関与を含めた複雑なものであることが予想され、その理解の上に新たな解析アプローチを進めていく必要性が考えられた。

(3) 平成11年度分担究報告書  
(重点研究事業)

## 分担研究者報告書

### キメラ抗カルジオリピン抗体（抗 $\beta$ 2-グリコプロテインI抗体）を用いた 抗カルジオリピン抗体測定系の標準化

分担研究者： 小池隆夫  
（北海道大学医学部内科学第二講座）

#### 研究要旨

抗カルジオリピン抗体（aCL）は、抗リン脂質抗体症候群の疾患マーカーであり、その病態形成に関与すると考えられている。抗リン脂質抗体症候群患者の血中に認められる aCL は、血栓形成の制御にも関わるアポ蛋白である $\beta$ 2-グリコプロテインI ( $\beta$ 2-GPI)を認識することが明らかにされてきた。これらの抗体の測定法を確立し、標準化することは、多施設が協力して、抗リン脂質抗体症候群の臨床像を明らかにし適切な治療法を検討していく上で重要である。ヒト IgG クラスの aCL 及び抗 $\beta$ 2-GPI 抗体測定系の標準となる抗体を得るため、自然発症抗リン脂質抗体症候群マウス由来のモノクローナル aCL、WBCAL-1 の可変部領域遺伝子と、ヒト $\gamma$ 1 と $\kappa$ 定常部領域遺伝子を持つプラスミドを作成し、マウス形質細胞株に導入し、ヒト $\gamma$ 1 定常部領域を持った、aCL 活性及び抗 $\beta$ 2-GPI 抗体活性を有するキメラ抗体産生安定形質発現細胞株を、このキメラ抗体の活性と、多施設の aCL 測定系の標準血清との比較を行った。キメラ抗体は、多くの研究施設で用いられてきた IgG aCL 測定系の標準血清と同様の抗原への反応性を示した。キメラ抗体を標準として測定した、全身性エリテマトーデス患者血中の IgG aCL 価は、APS の臨床像との関連が認められた。作成したキメラ抗体は、IgG aCL および抗 $\beta$ 2-GPI 抗体測定系の標準として有用であると考えられた。

#### A. 研究目的

抗カルジオリピン抗体（aCL）やループスアンチコアグラント等のいわゆる抗リン脂質抗体は、全身性エリテマトーデス（SLE）およびその関連疾患々々血中にしばしば認められる。これらの抗体は、習慣流産、動・静脈血栓症、血小板減少症と関連することが知られており、これらの臨床像を持ち、血中に

抗リン脂質抗体が証明される患者群は、抗リン脂質抗体症候群と呼ばれている<sup>1)</sup>。最近の研究により、SLE 患者や抗リン脂質抗体症候群患者の血清中の aCL は、カルジオリピンそのものではなく、カルジオリピンに結合した凝固・線溶系に関連したアポ蛋白、 $\beta$ 2-グリコプロテイン I ( $\beta$ 2-GPI)が対応抗原であり、ループスアンチコアグラントの一部は、プロトロンビンが対応抗原であることがわ

かってきた。すなわち、自己免疫疾患患者にみられる抗リン脂質抗体は、リン脂質そのものを認識するのではなく、リン脂質に結合した凝固・線溶に関連する蛋白を認識することが示されてきている。

代表的な抗リン脂質抗体である aCL は、抗リン脂質抗体症候群の疾患マーカーであるのみならず、血液凝固・線溶・血管内皮細胞機能に影響を及ぼし、抗リン脂質抗体症候群の病態形勢に重要な役割を果たしていると考えられている。現在抗リン脂質抗体症候群の詳細な臨床像、予後、より適切な治療戦略に関する臨床研究が多く施設で精力的に行われている。異なった研究施設における臨床研究の結果を比較検討する上で、aCL の測定結果を多施設での比較・換算できることが重要である。しかし、今までの aCL 測定系の標準は、患者のプール血清を用いて作成されており、ロット間で力価の違いがやすく、安定した再現性のある標準とはなり難い。またプール血清を用いた標準血清は量に限りがあるため、各施設で独自の標準血清を作成し、国際的な標準血清を用いてその力価を決め被検血清の測定の標準として用いられてきた。そのため、測定値に施設間の違いが出易かった。

それに対し、抗リン脂質抗体症候群患者リンパ球を用いて作成した、モノクローナル aCL は、無尽蔵に生産でき、測定系の標準として適している。IgM クラスのモノクローナル aCL は、すでに我々が作成し保有しているが<sup>2)</sup>、IgG クラスのモノクローナル aCL を作成することは非常に難しい。そこで、IgG クラスの aCL 測定系の標準となりうる、抗リン脂質抗体症候群モデルマウス由来のモノクローナル aCL の可変部領域と、ヒト $\gamma$ 定

常部領域を持ったキメラ抗体を作成し、その有用性を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

抗リン脂質抗体症候群自然発症モデルマウス、NZW x BXS B F1 マウスより作成した、抗リン脂質抗体症候群患者由来の aCL と同様の特異性を持ったモノクローナル抗体 WBCAL-1 の可変部領域遺伝子の塩基配列を 5'RACE 法を用いて明らかにし、クローニングした。クローニングした可変部領域遺伝子を、ヒト $\kappa$ および $\gamma$ 1 定常部遺伝子が組み込まれたプラスミド（九州大学医学部渡辺武教授より供与を受けた。）に組み込み、マウスミエローマ細胞株 P3-X63-Ag8.U1 に、lipotransfection 法にて導入しキメラ抗体（HCAL）産生安定形質発現細胞株を得た。

抗リン脂質抗体症候群患者血中の aCL は、血清中のアポ蛋白 $\beta$ 2-グリコプロテイン I ( $\beta$ 2-GPI) の存在下でカルジオリピンに結合し<sup>3-5)</sup>、さらに、カルジオリピンが存在しなくても、酸素原子を導入したポリスチレンプレートに固相化された $\beta$ 2-GPI に結合することがすでに示されている<sup>2,6)</sup>。そこで、キメラ抗体の、 $\beta$ 2-GPI 存在下でのカルジオリピンへのおよび、酸素原子が導入されたポリスチレンプレートに固相化された $\beta$ 2-GPI に対する反応性を固相酵素抗体法にて検討した<sup>7)</sup>。

HCAL の力価を、現在比較的広く使われている Harris ら<sup>8)</sup>の定めた aCL 抗体価の単位、GPL を用いて測定し、HCAL 濃度を、GPL へ変換する式を算定した。

HCAL を抗リン脂質抗体症候群に関する研究を行っているアメリカ、ヨーロッパ等の 18 の施設に送付し、HCAL と各施設で用いている標準血清の $\beta$ 2-GPI 存在下でのカルジ

オリピンと、酸素原子が導入されたポリスチレンプレートに固相化されたβ2-GPI への反応性を各施設の測定法にて比較検討した。同時に3種類の異なった力価を持った被検血清を送付し、その抗カルジオリピン抗体及び抗β2-GPI 抗体価を各施設で測定した。

北海道大学医学部第2内科にて治療しているSLE患者94例のaCL抗体価を測定し抗リン脂質抗体症候群関連の臨床像である動・静脈血栓症、習慣流産、血小板減少症との関連を検討した。HCAL 20 ng/ml 相当の抗体価を持つ血清の力価を1単位と設定し、健常人100例のIgG aCL抗体価の平均+3SDであるIgG aCL 11単位を正常上限に設定した。

### C. 結果と考察

WBCAL-1の可変部領域遺伝子は、57塩基よりなるリーダー領域と重鎖は342塩基、κ鎖は336塩基の可変部領域遺伝子により規定されていることを明らかにクローニングした。クローニングした遺伝子を、ヒトγ1およびκ鎖定常部領域遺伝子を持ったプラスミドに組み込み、マウスミエローマ細胞株P3-X63-Ag8.U1細胞に発現させ、安定形質発現細胞株を得、クローニングした。クローニングした形質発現細胞培養上清中に、aCL抗体活性を持ち、ヒトγ定常部を持つキメラ抗体(HCAL)が、1-2 μg/mlの濃度で検出された。クローニングした細胞は、凍結保存が可能であり、融解後も抗体を産生した。

固相酵素抗体法にて6.3 ng/mlから200 ng/mlの濃度のHCALは、β2-GPI存在下で固相化されたカルジオリピンへ濃度依存性に結合した。HCALは、酸化ポリスチレンプレートに固相化されたヒトβ2-GPIにも、

同様に濃度依存性に結合した(図1)。HCALの、固相化されたカルジオリピンおよび、β2-GPIへの反応性は、高力価のaCLが血中に証明される患者血清と同様であった。

HCAL 0.084, 0.7, 0.33, 0.67, 1.3, 1.7 μg/mlのaCL活性を、現在広く世界で使われているaCL測定単位、GPL Unitに合わせた測定系で測定すると各々、11, 12, 18, 25, 38, 59 GPLであった(図2)。HCALの濃度は、次の式にてGPL Unitに換算可能であった。 $GPL\ Unit = 32.9 \times (HCAL\ 濃度\ (\mu g/ml))^{0.503}$ 。

抗リン脂質抗体症候群に関する研究を行っている18研究施設においてHCALのカルジオリピンへの反応性を検討した結果、17施設で、HCALはIgGクラスのaCL測定の標準曲線となりうる良好なカルジオリピンへの結合曲線が得られた。HCALのカルジオリピンへの結合性は、各施設の標準血清の結合性とほぼ同様であった。HCALは酸化ポリスチレンプレートに固相化されたβ2-GPIへも、各施設で用いられてきた標準血清と同様の良好な結合性を示した。3種類の被検血清のIgG aCL抗体価を、各施設でHCALを標準血清とした固相酵素抗体法にて測定したところ良好な測定結果を得た。

SLE患者94例におけるIgG aCL抗体価と、APSの臨床像である血栓症(動脈血栓・塞栓症、静脈血栓・塞栓症)、習慣流産、血小板減少症との関連を検討した。抗リン脂質抗体症候群の症状・所見を持った患者群において、IgG aCL抗体価は有意に高値であった。特に、血栓症との関連が強かった。IgG aCL陽性者において、抗リン脂質抗体症候群の症状を持った患者が多い傾向が認められた。

#### D. 結論

抗リン脂質抗体症候群モデルマウス由来のモノクローナル aCL、WBCAL-1 の可変部領域と、ヒト $\kappa$ および $\gamma$ 1 鎖定常部領域よりなるキメラ抗体、HCAL を、マウスミエローマ細胞株にて発現させ、安定形質発現細胞株を得た。得られたキメラ抗体 HCAL は、多くの施設で、各々の施設の測定法にて、固相化されたカルジオリピンおよび $\beta$ 2-GPI に良好な反応性を示した。HCAL を用いて測定した aCL 価は、臨床像との関連が認められた。HCAL は、IgG クラスの aCL および抗 $\beta$ 2-GPI 抗体測定系の標準血清として有用であると考えられる。

#### E. 参考文献

1. Hughes, G. R. V., Harris, E. N., Gharavi, A. E. : The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol.* 1986, 13:3, 486-9.
2. Ichikawa, K., Khamashta, M. A., Koike, T., Matsuura, E., Hughes, G. R. V.:  $\beta$ 2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 1994, 37:10, 1453-61.
3. Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K., Koike, T. : Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet.* 1990, 336:8708, 177-8.
4. McNeil, H. P., Simpson, R. J., Chesterman, C. N., Krilis, S. A.: Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta$ 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:11, 4120-4.
5. Galli, M., Comfurius, P., Maassen, C., Hemker, H. C., de Baets, M. H., van Breda-Vriesman, P. J., Barbui, T., Zwaal, R. F., Bevers, E. M.: Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet.* 1990, 335:8705, 1544-7.
6. Matsuura, E., Igarashi, Y., Yasuda, T., Triplett, D. A., Ko\_I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med.* 1994, 179:2, 457-62.
7. Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Atsumi, T., Matsuura, E., Kobayashi, S., Hughes, G. R., Khamashta, M. A., Koike, T. : A chimeric antibody with the human g1 constant region as a putative standard for assays to detect IgG  $\beta$ 2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin and anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum.* 1999, 42:11, 2461-70.
8. Harris, E. N., Gharavi, A. E., Patel, S. P., Hughes G. R. V. : Evaluation of the anticardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol.* 1987, 68:1, 215-22.



**A**

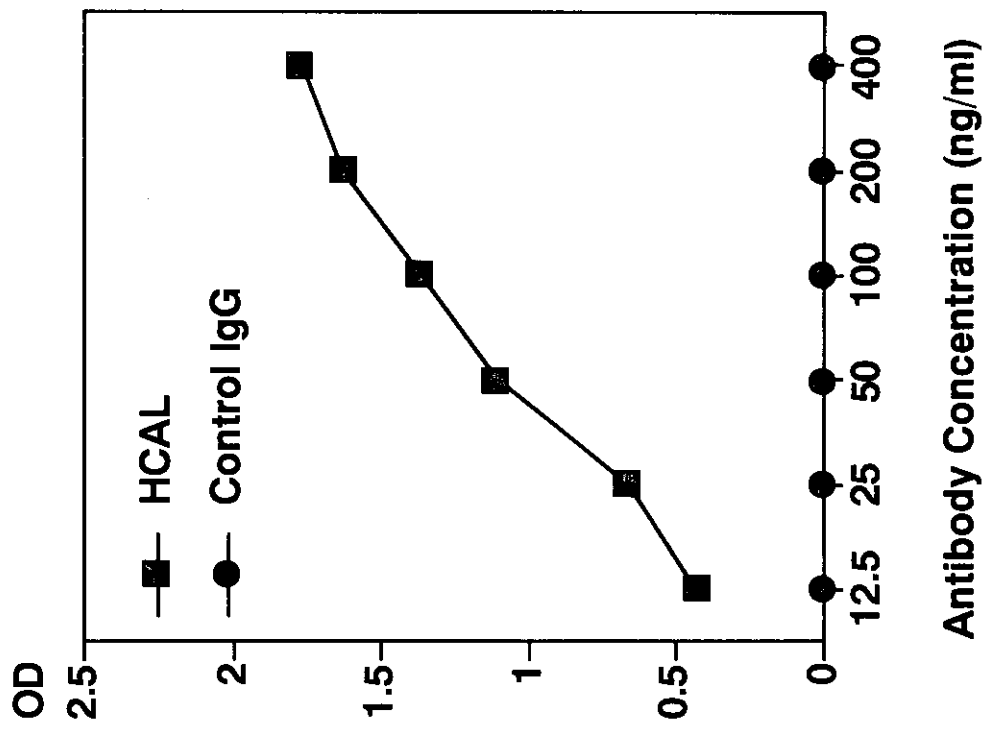


图1

**B**

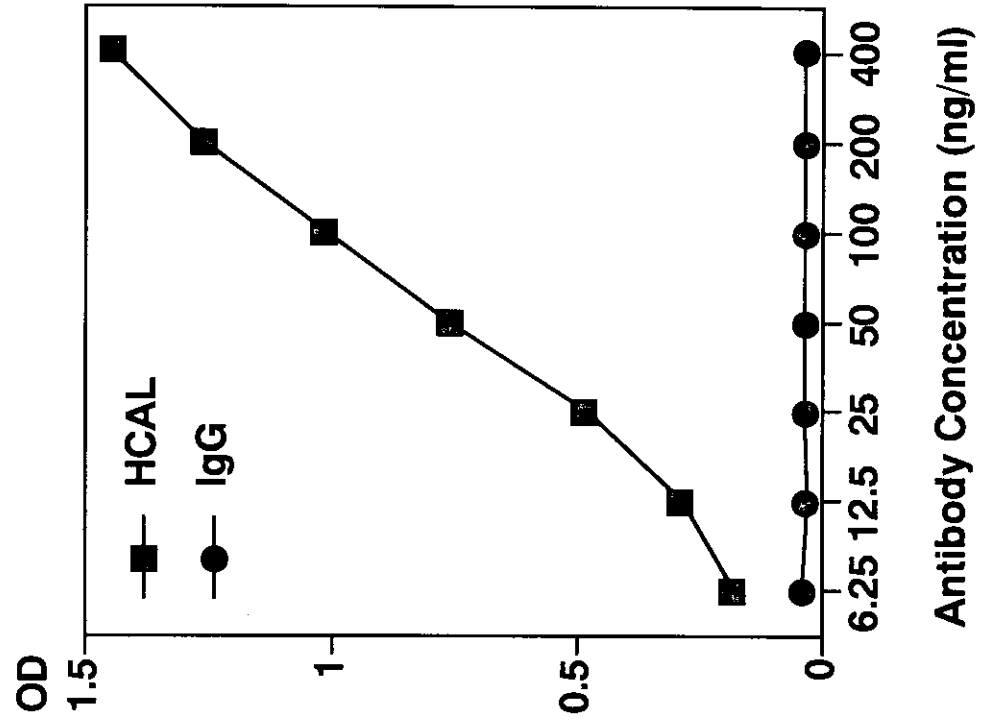


图2

## 抗リン脂質抗体症候群：抗プロトロンビン抗体の特性

分担研究者：小池 隆夫  
(北海道大学医学部内科学第二講座)

### 研究要旨

抗リン脂質抗体症候群(APS)は後天性血栓傾向としては最も頻度の高い病態として注目されている。APS の診断には抗リン脂質抗体の検出が必須である。抗リン脂質抗体はリン脂質あるいはリン脂質結合蛋白と反応する多様な自己抗体の一群であり、その検出は必ずしも容易でない。今回、抗リン脂質抗体のひとつである抗プロトロンビン自己抗体の測定方法を検討した。その結果、ホスファチジルセリンに結合させたプロトロンビンを抗原にしたアッセイで検出される抗体（ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体）が APS とよく相関していた。また、ヒトプロトロンビンで免疫したマウスよりモノクローナル抗プロトロンビン抗体を作成し、その特性を患者抗体と比較した。

### A.研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)は後天性血栓傾向としては最も頻度の高い病態として注目されている。APS の診断には抗リン脂質抗体の検出が必須である。抗リン脂質抗体はリン脂質あるいはリン脂質結合蛋白と反応する多様な自己抗体の一群であり、その検出は必ずしも容易でない。今回、抗リン脂質抗体のひとつである抗プロトロンビン自己抗体の測定方法を検討した。その結果、ホスファチジルセリンに結合させたプロトロンビンを抗原にしたアッセイで検出される抗体（ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体）が APS とよく相関していた。また、ヒトプロトロンビンで免疫したマウスよりモノクローナル抗プロトロンビン抗体を作成し、その特性を患者抗体と比較した。

### B.研究方法

当科膠原病外来を受診した 265 例を対象とした。臨床経過はカルテおよび病歴聴取により注意深く調査した。LA 測定に用いる

Platelet free plasma(PFP)は、0.105M クエン酸ナトリウムを 1/10 量含む採血管を用いて採血後ただちに 4°C、2,000 g にて 15 分間遠心し、径 0.22 $\mu$ m のフィルターを通して分注、凍結保存した。同時に血清サンプルを採取した。

aPS/PT は、PS を ELISA プレートに固相化後、5mM CaCl<sub>2</sub> の存在下でプロトロンビンを加え、PS-プロトロンビン複合体をプレート上の抗原として測定した。プロトロンビン単独を抗原とする抗プロトロンビン抗体(aPT)アッセイは、照射 ELISA プレート(Maxisorp, Nunc 社)にプロトロンビンを直接固相化して測定した。IgG aCL はウシ血清をブロッキング剤やサンプル希釈液として用いる標準法で測定し、GPL 標準単位で力価をもとめた。陽性血清については aCL 活性の $\beta$ 2GPI 依存性を調べた。

ワーファリンを使用していない患者では希釈ラッセル蛇毒時間(dRVVT)およびその確認試験にて LA を調べた。

aPS/PT あるいは aPT 陽性サンプルでは

0.5MNaCl 存在下でアッセイをおこない、抗体結合の塩抵抗性を検討した。さらに、血漿中のプロトロンビンの活性を凝固検査で、抗原量をサンドイッチ ELISA で測定した。また、Balb/c マウスを免疫して5種類のモノクローナル aPS/PT を作成し、それらのプロトロンビンに対する反応性を aPT やウエスタンブロットで検討した。

### C. 研究結果と考察

IgG aPT/PS は 29 例に検出できた。陽性患者は原発性 APS 4 例、SLE 24 例で、その他の疾患（慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群など）ではすべて陰性であった。APS にみられる臨床症状（動・静脈血栓症、習慣流産、血小板減少症）の既往のある患者は 90/265 例(34%)であり、この患者群における aPS/PT の臨床的意義（オッズ比[95%CI]、感度、特異度、positive predictive value)は、4.42 [1.96 - 9.97]、21.1%、93.9%、65.5%であり、aPS/PT は特異度の高いマーカーであった。一方、aPT のそれらは 1.44 [0.72 - 2.90]、18.8%、86.1%、41.0%であり、APS と有為な相関はなかった。

aPT のみ陽性サンプル(n=20)と aPS/PT のみ陽性サンプル(n=16)の 0.5MNaCl 存在下での塩抵抗性は後者が優位に強かった ( $23.4 \pm 18.7\%$  vs  $47.4 \pm 25.4\%$ ,  $p=0.003$ )。5 種のモノクローナル aPS/PT のうち、1 種類のみが aPT とウエスタンブロットで検出されたが、他の 4 種はいずれでも検出されなかった。

以上の結果は、IgG aPS/PT は APS の臨床症状に極めて特異性の高いマーカーとしての可能性を示唆した。aPT で検出される抗プロトロンビン抗体は、aPS/PT 陽性者にもみられる一方、多くの不一致例が認められた。aPT と LA や APS の相関は弱く、aPT の APS のマーカーとしての有用性は確認されなかった。LA や APS と関連した抗プロトロンビン抗体検出の方法としては aPT より aPS/PT が優れていることが示された。

aPS/PT は aPT より塩抵抗性が強く、高

親和性を示している可能性がある。さらにモノクローナル抗体の反応性から、プロトロンビンの抗原性には多様性があり、すくなくともあるエピトープはプロトロンビンにホスファチジルセリンが結合しておこる構造変化が必要であり、その構造変化は酸化プレートとの結合によっては再現できないことが明らかとなった。

### D. 結論

抗プロトロンビン抗体の意義は測定法によって異なっていた。aPT/PS は APS の臨床症状に特異性の高いマーカーとしての役割をもつ可能性が示された。aPS/PT は aPT よりもおそらく親和性が高く、そのエピトープは aPT と同一でないものが少なくとも存在する。

### F. 参考文献

1. Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, Nagae H, Ichikawa K, Triplett DA et al. Human  $\beta$ 2-glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using deleted mutants expressed by a Baculovirus system. *Blood* 1996;87:3262-70.
2. Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA, Koike T. Anticardiolipin antibodies recognize  $\beta$ 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* 1994;179:457-62.
3. Takeya H, Mori T, Gabazza EC, Kuroda K, Deguchi H, Matsuura E et al. Anti-beta2-glycoprotein I (beta2GPI) monoclonal antibodies with lupus anticoagulant-like activity enhance the beta2GPI binding to phospholipids. *J Clin Invest* 1997;99:2260-8.
4. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991;66:629-32.
5. Arvieux J, Darnige L, Caron C, Reber G,

Bensa JC, Colomb MG. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1995;74:1120-5.

6. Horbach DA, van Oort E, Donders RC, Derksen RH, de Groot PG. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. Comparison between different assays for the detection of antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1996;76:916-24.

7. Bertolaccini ML, Atsumi T, Khamashta MA, Amengual O, Hughes GRV. Autoantibodies to human prothrombin and clinical manifestations in 207 patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998;25:1104-8.