

氏 名（本籍） わた 渡 なべ 邊 み 美 き 紀

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 6 4 9 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 2 年 3 月 2 3 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科
（ 博 士 課 程 ） 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 血 管 内 皮 細 胞 ATⅢ 結 合 性 ヘ パ リ ン 糖 鎖 に 対 す る
自 己 抗 体 ： 新 た な 血 栓 症 診 断 の 標 識 抗 体 と し て の
有 用 性

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 伊 藤 貞 嘉 教 授 佐 藤 靖 史

教 授 佐 々 木 毅

論文内容要旨

【研究目的】

自己免疫の関与する血栓症として抗リン脂質抗体症候群（APS）が知られている。しかし抗リン脂質抗体が陰性である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く、APSとは異なるメカニズムの存在が推定される。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、その糖鎖上にアンチトロンビンⅢ（ATⅢ）と特異的に結合する五糖体配列（heparin polysaccharide；HPS）を有しており、HPSが流血中のATⅢと結合し、血管内皮表面の抗凝固性を維持している。よってHPSに対する自己抗体（抗HPS抗体）が存在すると、抗体がHPSに結合す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。本研究は、抗HPS抗体が、抗リン脂質抗体を含む既知の血栓症関連抗体とは異なった新たな血栓症・流産の指標となり得るか否かを検証することを目的とした。

【研究結果】

- ① 抗HPS抗体検出法の確立：市販のヘパリンをATⅢカラムで吸着しATⅢ結合部位を多く含む分画を精製し、HPS抗原として用いた。さらに後述するモノクローナル抗HPS抗体を標準として血中抗HPS抗体価の定量化を計った。
- ② ヒトモノクローナル抗HPS抗体の採取：抗HPS抗体陽性患者から得た末梢血B細胞をEBVでトランスフォームし、抗HPS抗体陽性細胞を選択しSHM-D33と細胞融合した。抗HPS抗体産生性ハイブリドーマを選択し、培養上清からモノクローナル抗HPS抗体を精製した。
- ③ 各疾患における抗HPS抗体出現有無の検討：抗HPS抗体は血栓症患者86人のうち18人（20.9%）（抗リン脂質抗体症候群27例のうち10例、その他の自己免疫疾患9例のうち4例、動脈硬化症および基礎疾患をもたない51例のうち3例）、習慣性流産患者30人のうち14人（46.7%）（抗リン脂質抗体症候群7例のうち2例、その他の自己免疫疾患4例のうち2例、糖尿病1例のうち0例、基礎疾患をもたない患者18例のうち10例）、血栓症の既往がない患者111人のうち3人（2.7%）（自己免疫疾患50例のうち3例、健常人61例のうち0例）で認められた。つまり抗HPS抗体陽性患者のうち血栓症では18人のうち8人、習慣性流産では14人のうち12人が、抗リン脂質抗体陰性であった。
- ④ 抗HPS抗体陽性例の検討：抗HPS抗体単独陽性患者は抗リン脂質抗体単独陽性患者（APS例）に比較し習慣性流産の頻度が多く、脳硬塞と腎梗塞の頻度が少なかったが、血栓症の部位はAPSと同様であった。また抗HPS抗体単独陽性患者では抗核抗体が高率に陽性（16例のうち14

例)であったが、自己免疫疾患に特有な症状をもつのは3例のみであった。抗リン脂質抗体症候群に特徴的な血小板減少、APTT延長は抗HPS抗体単陽性患者では認められなかった。

⑤抗HPS抗体特異性の検討：モノクローナル抗HPS抗体、および血清中の抗HPS抗体の、HPS・血管内皮細胞・カルジオリピン・プロトロンビン・ β 2GP1・DNAなどに対する結合特異性を調べた。モノクローナル抗HPS抗体・血清抗HPS抗体ともHPSおよび血管内皮細胞に特異的に結合したが、その他の抗原には結合しなかった。また抗HPS抗体のHPSおよび血管内皮細胞に対する結合は、HPSおよびATⅢによってのみ抑制された。

【研究の意義・独創的な点】

- ①簡便で感度の高い抗HPS自己抗体測定系を確立した。
- ②ヒトモノクローナル抗HPS抗体および血中抗HPS抗体の特異性解析によりこれらがHPSおよび血管内皮細胞に特異的な新しい自己抗体であることを明らかとした。
- ③抗HPS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、本病態診断の指標として有用であることを示した。

以上は国内外で初めての知見であり、臨床的にも有用で意義深い。

審査結果の要旨

自己免疫の関与する血栓症として抗リン脂質抗体症候群（APS）が知られている。しかし、抗リン脂質抗体が陰性である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く、APSとは異なるメカニズムの存在が推定される。血管内皮細胞上の糖蛋白であるヘパリン硫酸プロテオグリカンは、その糖鎖上にアンチトロンビンⅢ（ATⅢ）と特異的に結合する五糖体配列（heparin polysaccharide：HPS）を有しており、HPSが流血中のATⅢと結合し、血管内皮表面の抗凝固性を維持している。よって、HPSに対する自己抗体（抗HPS抗体）が存在すると、抗体がHPSに結合す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。本研究は抗HPS抗体が、抗リン脂質抗体を含む既知の血栓症関連抗体とは異なった新たな血栓症・流産の指標となり得るか否かを検証することを目的とした。その結果、以下の知見を得た。

① 抗HPS抗体検出法の確立：市販のヘパリンから精製したHPS抗原を用い、抗HPS抗体ELISAを確立した。② ヒトモノクローナル抗HPS抗体の採取：抗HPS抗体陽性患者から得た末梢血B細胞をEBVでトランスフォームし、抗HPS抗体陽性細胞を選択し、SHM-D33と細胞融合した。抗HPS抗体産生性ハイブリドーマを選択し、培養上清からモノクローナル抗HPS抗体を精製した。③ 各疾患における抗HPS抗体出現有無の検討：抗HPS抗体は血栓症患者86人のうち18人、習慣性流産患者30人のうち14人、血栓症の既往がない患者111人のうち3人で認められた。抗HPS抗体陽性患者のうち血栓症では18人のうち8人、習慣性流産では14人のうち12人が抗リン脂質抗体陰性であった。④ 抗HPS抗体陽性例の検討：抗HPS抗体単独陽性患者では抗核抗体が高率に陽性（16例のうち14例）であったが、自己免疫疾患に特有な症状を持つのは3例のみであった。抗リン脂質抗体症候群に特徴的な血小板減少、APTT延長は抗HPS抗体単独陽性患者では認められなかった。⑤ 抗HPS抗体特異性の検討：モノクローナル抗HPS抗体、及び血清中の抗HPS抗体の結合特異性を調べた。モノクローナル抗HPS抗体・血清抗HPS抗体ともHPS及び血管内皮細胞に特異的に結合したが、その他の抗原には結合しなかった。また、抗HPS抗体のHPS及び血管内皮細胞に対する結合は、HPS及びATⅢによるのみ抑制された。

以上の結果より、簡便で感度の高い抗HPS自己抗体測定系を確立した。また、ヒトモノクローナル抗HPS抗体及び血中抗HPS抗体の特異性解析により、これらがHPS及び血管内皮細胞に特異的な新しい自己抗体であることを明らかにした。さらに、抗HPS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、本病態診断の指標として有用であることを示した。これらのことは国内外で初めての知見であり、臨床的にも有用で意義深い。よって、十分学位に値するものと思われる。