

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 藤枝雄一郎

### 学位論文題名

#### The elucidation of the prothrombotic mechanism mediated by prothrombin in antiphospholipid syndrome

(プロトロンビンを介する抗リン脂質抗体症候群の血栓形成機序解析)

#### 第一部

目的：本邦における抗リン脂質抗体症候群（APS）の臨床的像を明らかにする

方法：1988年から2010年までに北海道大学病院リウマチ膠原病外来を受診し、APS分類基準（札幌クライテリアシドニー改変）を満たした141例を、診断時から2010年まで観察し、血栓症のリスク因子について解析した。また観察期間中におけるイベント（死亡、血栓症再発、重篤な出血合併症）の有無について後ろ向き研究をおこなった。

結果：APSと診断した141例（女性119例、男性22例）の平均年齢は44歳（範囲：9-79歳）で、70例（49.6%）が原発性APSであり、71例（50.4%）が全身性エリテマトーデス（SLE）を合併していた。血栓症は121例（85.8%）の患者に認め、動脈血栓症は93例（66.0%）、静脈血栓症は46例（32.6%）に認められた。最も頻度が高い血栓症は、脳梗塞86例（86/141（61.0%））であり、続いて深部静脈血栓症33例（33/141（23.4%））であった。70例の女性が妊娠し、45例（64.3%）がAPSによる妊娠合併症を認めた。抗リン脂質抗体の内訳は、ループスアンチコアグラントが116例（82.3%）、ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体が98例（69.5%）、抗カルジオリピン抗体が83例（58.9%）、抗 $\beta$ 2グリコプロテインI抗体が73例（51.8%）であった。APS患者を動脈血栓症の有無で比較し、リスクファクターを解析したところ、年齢10歳毎（OR：1.82、95%CI：[1.30-2.54]）、高血圧（OR：3.26、95%CI：[1.16-9.14]）がリスクファクターとして示された。予後に関しては、10年生存率が93%であり、血栓症の再発は3.5回/100人年であった。糖尿病合併患者は、非糖尿病合併患者と比較して有意にイベント発生率が高かった（Log-rank  $p=0.04$ ）。

結論：本研究により日本人のAPS患者の臨床像が明らかとなった。またホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体は多くのAPS患者に認められ、診断マーカーとして非常に重要な抗体である

## 第二部

背景：抗リン脂質抗体症候群（APS）は、血中に抗リン脂質抗体（aPL）が証明され、動脈血栓症、静脈血栓症、妊娠合併症をきたす自己免疫疾患である。APSで認められるaPLは直接、向凝固細胞（血管内皮細胞、単球、血小板）を活性化する病原性自己抗体と考えられている。我々はホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体（aPS/PT）がAPSの診断において感度、特異度が高いことを示し、aPS/PTのモノクローナル抗体である231Dを作成しaPS/PTによって向凝固細胞活性化が起こることを確認した。以上からaPS/PTはAPS患者の病態に関わっている病原性自己抗体であると考えられるが、aPS/PTが刺激を細胞内部に伝達する受容体については不明である。

目的：プロテオミクス的手法を用いてプロトロンビンおよびaPS/PTの結合に関与するタンパクの同定を行い、APSの血栓病態を明らかにする。

方法：FLAGタグ付加リコンビナントヒトプロトロンビン（rhFLAG-PT）を作製し、rhFLAG-PTとRAW264.7細胞をインキュベートし、抗FLAG抗体でアフィニティー精製したものをSDS-PAGE後、銀染色した。ゲル上で分離したいくつかの候補蛋白をonline-nano LC-MS/MSおよびnrNCBI database MASCOT algorithmによって解析し、プロトロンビン結合タンパクを同定した。プロトロンビンおよびRibophorinII（RPN2）との結合を確認するために、HisタグV5タグ付加リコンビナントヒトRPN2（His-V5-RPN2）を作製し、cotransfection assay、酵素免疫測定法（ELISA）、表面プラズモン核磁気共鳴（SPR）をおこなった。単球の活性化にRPN2が関与していることを検討するために、RPN2のRNA干渉（siRNA）を用いて、231Dで誘導される組織因子（TF）の発現をリアルタイムPCRによって確認した。

結果：質量分析により糖転移酵素であるRibophorinII（RPN2）がプロトロンビンと結合する膜タンパクとして同定された。プロトロンビンとRPN2の結合をcotransfection assay、ELISA、SPRにより確認した。RPN2 siRNAでノックダウンしたRAW264.7細胞を、プロトロンビンおよび231Dで刺激したところ、TF発現が有意に低下した。

結論：RPN2をプロトロンビン結合膜タンパクとして同定した。RPN2はAPS患者において血栓症の病態生理に関与している可能性がある。