◆平成9年度日本血栓止血学会学術奨励賞◆

抗カルジオリピン抗体(抗 β 2GPI 抗体)の作用機序

武 谷 浩 之*

Anti- β 2-glycoprotein I (β 2GPI) Monoclonal Antibodies
with Lupus Anticoagulant-like Activity Enhance
the β 2GPI Binding to Phospholipids

Hiroyuki TAKEYA

Key words: β 2-glycoprotein I, Lupus anticoagulant, Antiphospholipid antibody, Anticardiolipin antibody, Phospholipid

1. 緒 言

抗リン脂質抗体症候群 (Anti-phospholipid syndrome; APS) はカルジオリピンやホスファチジルセリンなどのリン脂質に対する自己抗体, いわゆる抗リン脂質抗体(aPL)を有する疾患群の総称である, aPL は自己免疫疾患患者に高頻度に出現し, 患者はしばしば脳血管障害や深部静脈血栓症などの動脈や静脈の血栓症を発症することから, aPL は血栓症の発症と密接に関わると考えられているが, その産生機序や血栓症誘発機序については不明な点が多い^{1)~3)}. 最近, aPL の対応抗原はリン脂質そのものではなく, プロトロンビンや β 2-glycoprotein I (β 2GPI), プロテイン C, プロテイン S, アネキシン V などのリン脂質結合性の血漿蛋白質であることが明らかにされつつある⁴⁾⁵⁾.

β 2GPI は分子量約 50,000 の糖蛋白質で, 健康人血中に約 200 μ g/ml 存在し, その分子構造は補体系因子やセクテン族接着因子などに見られるスシドメインが 5 個から構成されている (図 1)⁶⁾. 最近, 小池, 松浦らは抗カルジオリピン抗体 (aCL) の真の対応抗原が β 2GPI である

ことを明らかにした^{7)~11)}. β 2GPI はカルジオリピンの他に, 陰性荷電リン脂質, ヘパリン, DNA などに結合する. β 2GPI の生理機能は未だ明らかではないが, 陰性荷電リン脂質への結合による内因系凝固反応の阻害作用や血小板上のプロトロンビン活性化複合体 (プロトロンビナーゼ活性) の阻害作用などから, 病的血栓形成時の凝固制御因子としての役割が示唆されている. 筆者らは抗カルジオリピン抗体, すなわち抗 β 2GPI 抗体の血栓形成における作用機序の解明を目的とし, β 2GPI とその抗体の血液凝固系およびプロテイン C 凝固制御系に及ぼす影響を検討し, 興味深い結果を得た¹²⁾¹³⁾. 本稿では aPL による血栓症発症機序について, 抗 β 2GPI モノクローナル抗体の作用機構の検討結果に基づいた筆者らの考えをご紹介します.

なお, 文中の図表は文献 13) からの引用によった.

2. aCL の真の対応抗原

1940 年代, 梅毒血清反応検査がカルジオリピン-レシチン抗原と aCL の抗原抗体反応であることが明らかとされていたが, 1950 年代, SLE

* 三重大学医学部分子病態学講座 (〒 514 津市江戸橋 2-174) : Department of Molecular Pathobiology, Mie University School of Medicine, Tsu-city, Mie 514

図1 β 2-GPIのドメイン構造 (I~V)
黒丸は糖鎖を表す

表1 抗カルジオリピン抗体 (aCL) の2タイプ

Antibody	Antigen	Coagulation test
Type A	Phospholipids+ β 2 GPI	Anticoagulant
Type B	Phospholipids+ β 2 GPI	No effect

などの自己免疫疾患患者に生物学的偽陽性が検出され、これらの患者がaCLを有することが知られるようになった。また同じ頃、梅毒偽陽性を示す患者血漿中に報告された凝固阻害因子は、後に免疫グロブリンであることが示され、またSLE患者でもっとも多く発見されたことからループスアンチコアグラント (LA) とよばれるようになった。1990年、自己免疫疾患患者のaCLは、血清あるいは血漿の非存在下においては固相化カルジオリピンに結合できないことが見いだされ、この点で梅毒患者のaCLとは異なることが示された。その後、aCLのカルジオリピンへの結合に必要なコファクターとして β 2GPIが同定された^{7)~10)}。さらに、松浦と小池らは、APS患者のaCLはカルジオリピンがなくても β 2GPIに結合することを示し、APS患者に存在するaCLの大部分が抗 β 2GPI抗体であることを明らかにした¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、aCLの

抗原がすべて β 2GPIであるか否かはさらに検討する必要がある¹⁶⁾。

3. aCLのLA活性

APS患者のLAのうち半分以上は抗プロトロンビン抗体であることが示されており、LAも抗 β 2GPI抗体と同様に、リン脂質に結合したプロトロンビンやプロトロンビンそのものを認識する抗体であることが示唆されている。他方、aCL (=抗 β 2GPI抗体)の一部はLA活性を有することが知られており (表1)、またウサギやマウスを免疫して作製したポリクローナルやモノクローナルの抗 β 2GPI抗体、さらにAPS患者のBリンパ球から確立したモノクローナル抗 β 2GPI抗体がLA活性を有することも明らかにされてきた (後述)¹³⁾。

表 2 抗 β 2 GPI 抗体の諸性質

Antibody	Origin of mAb	Subclass	Epitopes
Cof-18	BALB/c mine	IgG 1, κ	Domain V
Cof-19	immunized with	IgG 2 a, κ	Domain V
Cof-20	human β 2 GPI	IgG 1, κ	Domain III
Cof-21		IgG 1, κ	Domain IV
Cof-22		IgG 1, κ	Domain III
Cof-23		IgG 1, κ	Domain IV (close to domain V)
WB-CAL-1	NZW×BXS B F 1 mice	IgG 2 a, κ	Close to, or in Domain IV
TM1B3	Lymphocytes from	IgM, μ , λ	Domain IV
EY1C8	patients with	IgM, μ , κ	Domain IV
EY2C9	antiphospholipid	IgM, μ , λ	Domain IV
GR1D5	syndrome	IgM, μ , λ	Domain IV and/or domain V

4. aPL とリン脂質結合蛋白質との 抗原抗体反応

すでに述べたように、aPL の対応抗原は血漿中か細胞膜に存在するリン脂質結合蛋白質あるいは蛋白質-リン脂質複合体である。高親和性の抗原抗体反応では、抗体が抗原の有する酵素活性やコファクター活性を阻害し、またこの抗原抗体複合体が血中からクリアランスされることで抗原の血中濃度を減少させ、病態形成に関与する。ところが aPL は、LA の一部や低プロトロンビン血漿にみられる抗体を除いて、このような中和抗体ではない。では、抗リン脂質抗体はどのように作用して、LA 活性を発現したり、また血栓症を誘発したりするのだろうか。この aPL の作用機序について、最近、筆者らはその重要なヒントとなる実験結果を得たので次に述べてみたい。

5. LA 活性発現の分子機序

一群の aCL は LA 活性を示すが、これらの抗体がどのような分子機序で LA 活性を発現するのか、抗体の LA 活性の有無の違いはどこにあるのか、また抗体は試験管内でみられる β 2GPI の凝固阻害活性にどのような影響を与えるのかなど、こうした点はこれまでほとんど明らかでなかった¹⁷⁾。われわれは、常法に従い β 2GPI で BALB/c マウスを免疫して作製したモノクローナル抗 β 2GPI 抗体 (Cof-18~Cof-23) や APS 患者白血球から確立したモノクローナル aCL

(抗 β 2GPI 抗体) を用いて (表 2)¹⁸⁾¹⁹⁾、活性化部分トロンボプラスチン時間、希釈ラッセル蛇毒時間および精製凝固因子からなるプロトロンビナーゼ活性測定系での抗体の凝固阻害活性を測定した。その結果、これらの抗体のうち、Cof-20、Cof-21、Cof-22 および患者白血球からの EY1C8、EY2C9、GR1D5 は LA 活性を示し (図 2)、またプロトロンビナーゼ活性を阻害した。ただし、EY1C8、EY2C9、GR1D5 が LA 活性を発現するには検体血漿への新たな β 2GPI (2 μ M) の添加が必要であった。これらの抗体の示す凝固阻害活性はリン脂質濃度に依存し、高濃度のリン脂質の存在下では凝固阻害活性は消失した。そこで、 β 2GPI の固相化リン脂質への結合に及ぼすこれらの抗体の影響を解析した結果、Cof-20、Cof-21、Cof-22、EY1C8、EY2C9 は β 2GPI の固相化リン脂質への結合を増強する抗体であることが明らかとなった (図 3)。また、各抗体の β 2GPI 分子上の認識部位を解析した結果、LA 様活性を示す抗体の認識部位はスシドメイン III と IV に存在することが明らかとなった (表 2)。以上の結果から、抗 β 2GPI 抗体の LA 活性は抗 β 2GPI 抗体の認識するエピートープに依存することが示唆された。また、APS 患者からの aCL が LA 活性を発現するには、新たな β 2GPI の添加が必要だったことから、これらの抗体の β 2GPI への親和性は低いことが推測された。したがって、抗 β 2GPI 抗体の LA 活性の発現には測定系の感度や抗体の β 2GPI に対する親和性も影響すると考えられ

図2 抗 $\beta 2$ -GPIモノクローナル抗体による
希釈ラッセル蛇毒時間検査の抑制

図3 $\beta 2$ -GPIのリン脂質への結合に及ぼす
抗 $\beta 2$ -GPIモノクローナル抗体の影響
Cof-20 (○), Cof-22 (▲), Cof-21 (●),
EY1C8 (■), EY2C9 (△), 抗体なし (□),
Cof-18 (▼).

た。この一連の実験で最も重要な発見は抗 $\beta 2$ -GPI抗体が $\beta 2$ -GPIのリン脂質膜への結合を著しく増強し、 $\beta 2$ -GPIのリン脂質膜上でのクラスティングを誘導することであった(図4)。ごく最近、LA作用を有する抗プロトロンビン抗体がやはり、プロトロンビンのリン脂質膜への結合を増強することが示された²⁰⁾。これらの分子のクラスティングにより、プロトロンビナー

ゼ複合体構成因子のリン脂質への結合が阻害されてLA様活性が発現されると推測される。他方、後述するように、 $\beta 2$ -GPIとその抗体は同様の作用機序によりプロテインC凝固制御系因子の細胞膜リン脂質への結合を阻害し、凝固制御系の機能を低下させ、あるいは血管内皮細胞機能に影響をあたえて血栓症を惹起する可能性が示唆される。

6. aCLの血栓症発症の分子機序

血管内皮細胞上に存在するトロンボモジュリンはトロンビンを結合し、プロテアーゼ前駆体のプロテインCを活性化させる。活性化プロテインC (APC) はコファクターのプロテインSの存在下にVa因子・VIIIa因子を分解・失活化して凝固反応を阻害する。 $\beta 2$ -GPIはこの凝固制御反応を阻害し、凝固促進因子として機能することが示唆されている¹²⁾。正常な血管内壁上では血液の流動性を維持するため、常に一定量のAPCが生成され、凝固V因子を分解していることが推察される。この反応に関与するリン脂質(ホスファチジルセリンやホスファチジルエタノールアミン)は細胞膜二重層の内層に局在しており、血中での活性リン脂質の有効濃度は

図 4 抗 β 2-GPI モノクローナル抗体による β 2-GPI 分子のリン脂質膜上でのクラスタリング

低いものと考えられる。したがって、 β 2GPI および抗 β 2GPI 抗体がクラスタリング機序により、この反応の場を奪えば容易に凝固制御反応が阻害されると推察される (図 5)¹²⁾。ところが、止血血栓の形成のために血液凝固系を作動する状況下では、細胞膜リン脂質の局在性が失われ、過剰量のホスファチジルセリンが血漿蛋白質に曝される結果、 β 2GPI および抗 β 2GPI 抗体複合体による反応の場の占拠が不十分となり凝固系が作動する (図 5)。これが、試験管内での低リン脂質濃度時にみられる LA 活性であり、また、生体内では選択的にプロテイン C 凝固制御系が阻害されて血栓症誘発に繋がる機序と我々は考えている。また、抗 β 2GPI 抗体による細胞膜上への β 2GPI のクラスタリングは、細胞膜の流動性を低下させて、あるいは抗体の Fc 受容体や未知の β 2GPI 受容体を介して細胞機能に障害を与え、さらに一層トロンビン生成反応を促進する可能性が考えられる。 β 2GPI および

抗 β 2GPI 抗体が単球や内皮細胞で組織因子や接着因子の発現を促し、また血小板の活性化と凝集を促すなどの報告は²¹⁾、この可能性を示唆するものであろう。

7. おわりに

APS にみられる血栓症発症の分子機構として、抗 β 2GPI 抗体や抗プロトロンビン抗体によるそれぞれの抗原の細胞膜上でのクラスタリングの重要性を指摘した。しかし、aPL や LA 以外にも様々な抗リン脂質抗体が見いだされており、例えば抗ヘパラン硫酸プロテオグリカン抗体、抗ヘパリン抗体、抗トロンボモジュリン抗体、抗プロテイン C 抗体、抗プロテイン S 抗体、抗 V 因子抗体などが、アンチトロンビン凝固制御系およびプロテイン C 凝固制御系の各ステップを阻害することで血液凝固反応を亢進させ血栓形成を促進する可能性が推察される。aPL の真の対応抗原がしだいに明らかにされ

図5 β 2-GPIとaCL(抗 β 2-GPIモノクローナル抗体)の細胞膜リン脂質への結合に伴う血栓形成モデル

るに伴い、それぞれの抗体による血栓症発症機序の解明の研究は新たな出発点に立ったといえよう。

謝 辞: 本研究は鈴木宏治教授(三重大・分子病態)のご指導のもと、小池隆夫先生(北大・第二内科)、松浦栄次先生(岡山大学・分子細胞医学)、加藤久雄先生(国立循環器病センター研究所)、吉村哲郎先生(三重大・分子生物学)、浦野元先生(三重大・分子病態、産業医大・小児科)との共同研究で行われたものであり、深謝致します。

文 献

- 1) McNeil HP, Chesterman CN and Krilis SA: Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. *Adv Immunol* **49**:193-280, 1991.
- 2) Triplett DA: Antiphospholipid antibodies and thrombosis: a consequence, coincidence, or cause? *Arch Pathol Lab Med* **117**: 78-88, 1993.
- 3) Bick RL: Antiphospholipid thrombosis syndromes: etiology, pathophysiology, diagnosis and management. *Int. J Hematol* **65**:193-213, 1997.
- 4) Triplett DA: Antiphospholipid-protein antibodies: laboratory detection and clinical relevance. *Thromb Res* **78**: 1-31, 1993.
- 5) Roubey RAS: Antibodies to phospholipid-binding plasma proteins: a new view of lupus anticoagulants and other "antiphospholipid" autoantibodies. *Blood* **84**: 2854-2867, 1994.
- 6) Kato H and Enjyoji K: Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine β 2-glycoprotein I: the presence of five Sushi domain. *Biochemistry* **30**:11687-11694, 1991.
- 7) Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K and Koike T: Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* **336**: 177-178, 1990.
- 8) Koike, T. and Matsuura, E.: What is the "true" antigen for anticardiolipin antibodies. *Lancet*

- 337 : 671-672, 1991.
- 9) McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN and Krilis SA : Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation : β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc. Natl. Acad Sci USA* **87** : 4120-4124, 1990.
 - 10) Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker HC, DeBaets MH, Van Breda-Vriesman PJC, Barbui T, Zwaal RFA and Bevers EM : Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* **335** : 1544-1547, 1990.
 - 11) Koike T : Anticardiolipin antibodies and β 2-glycoprotein I. *Clin Immun Immunopathol* **72** : 187-192, 1994.
 - 12) Mori T, Takeya H, Nishioka J, Gabazza EC and Suzuki K : β 2-glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. *Thromb. Haemostas.* **70** : 598-602, 1996.
 - 13) Takeya H, Mori T, Gabazza EC, Kuroda K, Deguchi H, Matsuura E, Ichikawa K, Koike T, and Suzuki K : Anti- β 2-glycoprotein I (β 2GPI) monoclonal antibodies with lupus anticoagulant-like activity enhance the β 2GPI binding to phospholipids. *J Clin Invest* **99** : 2260-2268, 1997.
 - 14) Matsuura E, Igarashi Y, Yasuda T, Triplett DA and Koike T : Anticardiolipin antibodies recognize β 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *J Exp Med* **179** : 457-462, 1994.
 - 15) Roubey RAS, Eisenberg RA, Harper MF and Winfield JB : "Anticardiolipin" antibodies recognize β 2-glycoprotein I in the absence of phospholipid. *J Immunol* **154** : 954-960, 1995.
 - 16) Harris EN, Goldsmith G, Pierangeli S, Gharavi A and Branch W : Phospholipid binding antibodies warrant continued investigation. *Blood* **85** : 2276-2277, 1995.
 - 17) Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RFA and Bevers EM : Anticoagulant activity of β 2-glycoprotein I is potentiated by a distinct group of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemostas* **68** : 297-300, 1992.
 - 18) Igarashi M, Matsuura E, Igarashi Y, Nagase Y, Ichikawa K, Triplett DA and Koike T : Human β 2-Glycoprotein I as an anticardiolipin cofactor determined using deleted mutants expressed by a baculovirus system. *Blood* **87** : 3262-3270, 1995.
 - 19) Ichikawa K, Khamashta MA, Koike T, Matsuura E and Hughes GRV : β 2-Glycoprotein I reactivity of monoclonal anticardiolipin antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* **37** : 1453-1461, 1994.
 - 20) Rao LVM, Hoang AD and Rapaport SI : Mechanism and effects of the binding of lupus anticoagulant IgG and prothrombin to surface phospholipid. *Blood* **88** : 4173-4182, 1996.
 - 21) Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LA, Salmon JE and Silverstein RL : Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* **96** : 2211-2219, 1995.
-