

氏名	江城久子
(ふりがな)	(えしろ ひさこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 号
学位審査年月日	平成24年 6月 9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	白血球除去療法(LCAP)による関節リウマチ患者血清蛋白質の変化 (Changes of protein expression in the serum derived from patients with rheumatoid arthritis by leukocytapheresis (LCAP)treatment)
論文審査委員	(主) 教授 佐 浦 隆 一 教授 吉 田 龍 太 郎 教授 花 房 俊 昭

学位論文内容の要旨

《背景と目的》

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、多発性の関節炎を主症状とする全身性炎症性疾患である。薬物療法抵抗性の RA に対する白血球除去療法 (Leukocytapheresis: LCAP) の有効性が報告されているが、その作用機序は十分に解明されていない。LCAP 後の白血球の動態については、末梢血から活性化白血球が除去されたのち、一過性に白血球が急激に増加する「オーバーシュート現象」が報告されている。しかし、オーバーシュート現象により血清中の生理活性物質がどのように変化するのは不明である。そこで、LCAP 前後における血清蛋白質量の網羅的な解析を行うことにより、LCAP の作用機序の一端が明らかになるのではないかと考え、LCAP 前後での RA 患者の血清蛋白質量の変動をプロテオーム解析し、LCAP の作用機序と治療効果との関連について検討した。

《対 象》

症例は薬物治療抵抗性のために LCAP が初めて導入された RA 患者 11 例(男性 1 例、女性 10 例、平均年齢 59.5 歳)である。罹病期間は平均 9 年であり、RA 病期は Steinbrocker の Stage 分類で Stage I : 2 例、Stage II : 7 例、Stage IV : 2 例、RA 機能は Steinbrocker の機能分類で Class1 : 1 例、Class2 : 7 例、Class3 : 3 例であった。

《方 法》

1) RAの疾患活動性の評価

LCAP施行直前と5回目終了直後に、C反応蛋白質 (CRP)、赤血球沈降速度 (ESR)、白血球数、腫脹関節数、圧痛関節数、疼痛のVisual Analogue Scale (VAS)、Disease Activity Score 28 (DAS28)、Modified Health Assessment Questionnaire (MHAQ) を評価し、治療による疾患改善度はAmerican College of Rheumatology (ACR) 20%改善を用いて判定した。

2) プロテオーム解析

全症例の血清を混合した試料、およびACR20%改善を達成した2例の血清を混合した試料をプロテオーム解析した。まず、それぞれの血清混合試料より可溶性蛋白を抽出し、2次元電気泳動装置を用いて蛋白質を分離後、comassie brilliant blue染色を行い、変化が認められたスポットをゲルから切り抜き、トリプシンによるゲル内消化後、質量分析して蛋白質を同定した。

3) フローサイトメトリー

フローサイトメーターで、LCAP実施前後における白血球のCD46、CD55の発現量の変化を検討した。

4) 統計学的解析

統計学的解析はt-検定を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

《結 果》

- 1) 圧痛関節数、VAS、DAS28 (CRP)、DAS28 (ESR)は有意な低下を認めた。ACR20%改善を認めた症例は 11 例中 2 例 (18.2%)であった。
- 2) 二次元電気泳動では、LCAP 前後に変化したスポットを複数検出した。これらのスポットの質量分析の結果、補体 B 因子、Bb、 $\alpha 2$ マクログロブリン、血清アミロイド蛋白 A (serum amyloid A、以下、SAA)が同定できた。全症例を混合した試料では補体 B 因子は減少し、Bb と $\alpha 2$ マクログロブリンは増加していた。ACR20%改善を達成した症例を混合した試料では、補体 B 因子と SAA は減少し、Bb と $\alpha 2$ マクログロブリンが増加していた。
- 3) LCAP 前後での白血球の CD46、CD55 発現率は、それぞれ 89.5%から 96.6%、92.2%から 95.0%へと増加傾向を示した。

《考 察》

LCAP による補体関連因子の変化は、LCAP 後には補体 B 因子は減少し、補体 B 因子のフラグメントである Bb が新たに出現した。補体 B 因子は補体反応の第 2 経路の構成因子であり Ba と Bb に分解されるが、この Bb は C3 転換酵素の構成因子となり、C3 を分解し C3b を形成する。そして、第 2 経路の初期に形成される C3b は、RA の病因に関連する免疫複合体と結合することにより免疫複合体を可溶化する。このように LCAP を行うことで、補体反応の一部が活性化され、結果として RA の病因に関与する可能性が高い免疫複合体が可溶化されることも、LCAP による抗リウマチ効果の発現機序のひとつと考えられる。さらに、白血球中の補体制御因子である CD46 と CD55 は、C3 転換酵素活性を失活させ補体反応を停止させるが、LCAP 後に CD46 および CD55 陽性白血球の発現率が増加したことから、LCAP に伴うオーバーシュート現象により末梢血中に動員された CD46 および CD55 陽性白血球が補体反応を制御することも、LCAP による抗リウマチ効果の発現機序のひとつと推測される。

LCAP による血清中のサイトカインなど生理活性物質の変化については、LCAP5 回目終了後に ACR20%改善を達成した症例では SAA が減少していた。SAA は炎症性サイトカイ

ンの刺激により肝細胞から産生されるので、この LCAP による SAA の減少は、LCAP による炎症性サイトカインの低下を反映している可能性がある。すなわち、LCAP 施行後には $\alpha 2$ マクログロブリン産生が増加していたが、 $\alpha 2$ マクログロブリンは単球マクロファージ系細胞、星状グリア細胞などから産生され、TNF- α などのサイトカインと結合し、その作用を制御する蛋白質である。したがって、LCAP 後のオーバーシュート現象により新たに末梢血中に動員された単球、マクロファージからの $\alpha 2$ マクログロブリン産生が増加した結果、炎症性サイトカインの作用が抑制され、抗リウマチ効果が発現した可能性も考えられる。

《まとめ》

LCAP 導入により対象 RA 患者 11 名の圧痛関節数、VAS、DAS28 (CRP)、DAS28 (ESR) は有意な低下を認めたが、全例とも薬物治療抵抗性であり ACR20%改善を認めた症例は 11 例中 2 例 (18.2%) であった。

LCAP 前後における RA 患者の血清蛋白質量の網羅的な解析を行うことにより、血清中の補体 B 因子は減少、 $\alpha 2$ マクログロブリンは増加し、補体 B 因子のフラグメントである Bb が新たに出現することが示された。また、補体制御因子である CD46 および CD55 陽性白血球数の増加も認められた。

LCAP はこれらの補体経路の制御、オーバーシュート現象に伴うと考えられる白血球や単球マクロファージ系細胞、星状グリア細胞などの動員を介した炎症性サイトカインの抑制などにより、抗リウマチ効果を発現している可能性が示された。

(様式 甲 6)

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

薬剤抵抗性の関節リウマチ (RA) に対する、白血球除去療法 (Leukocytapheresis: LCAP) の有効性が報告されている。LCAP における白血球の動態については、末梢血から活性化白血球が除去された結果、一過性に白血球が急激に増加するオーバーシュート現象がみられることが報告されているが、LCAP の作用機序は十分に解明されていない。

申請者は本研究において、LCAP 施行直前と 5 回目終了直後に RA の疾患活動性の評価、血清蛋白質の変動のプロテオーム解析、白血球の CD46、CD55 の発現の変動のフローサイトメトリーにより、LCAP の作用機序と治療効果との関連について検討した。

その結果、LCAP の実施により圧痛関節数、VAS、DAS28 (CRP)、DAS28 (ESR) は有意に改善し、全例とも薬物治療抵抗性であり ACR20% 改善を認めた症例は 11 例中 2 例 (18.2%) であったが、プロテオーム解析では、LCAP 後に血清中の補体 B 因子は減少、 $\alpha 2$ マクログロブリンは増加、補体 B 因子のフラグメントである Bb が新たに出現することを示した。さらに、フローサイトメトリーでは白血球の CD46、CD55 発現率の増加傾向を明らかにした。一方、ACR20% 改善を達成した症例では、炎症性サイトカインの作用により肝細胞で産生される SAA が LCAP 後に減少していたことも示している。

これらの結果から申請者は、LCAP 前後における白血球の表面抗原の発現率の変化や血清蛋白質量の変動を網羅的に解析することにより、LCAP によるオーバーシュート現象で末梢に動員された白血球の作用で血清中に増加した $\alpha 2$ マクログロブリンの何らかの作用、および補体反応の第 2 経路の初期反応活性化による免疫複合体の可溶化、炎症性サイトカインの作用の抑制など LCAP の抗リウマチ効果の作用機序の一端を明らかにした。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

中部日本整形外科災害外科学会雑誌 55(3): 451-459, 2012