

HIT の発症を誘導する免疫複合体の構造

Structure of the immune complex involved in HIT

前田琢磨^{1*}, 秋山正志²

Takuma MAEDA, Masashi AKIYAMA

前田琢磨

1998年
私立灘高校卒業
1999年
大阪大学医学部入学
2005年
大阪大学医学部卒業
2005年
市立吹田市民病院就職
2007年
市立吹田市民病院退職
2007年
大阪大学医学部眼科学教室就職
2007年
大阪大学医学部眼科学教室退職
2007年
市立豊中病院就職
2009年
市立豊中病院退職
2009年
国立循環器病研究センター就職
2012年
国立循環器病研究センター退職
2012年
大阪府立母子保健総合医療センター就職
2013年
大阪府立母子保健総合医療センター退職
2013年
国立循環器病研究センター就職
現在に至る

Points

- ①自己免疫性の血栓性疾患であるヘパリン起因性血小板減少症 (heparin-induced thrombocytopenia: HIT) において、投与されたヘパリンは血小板第4因子 (PF4) と結合し、さらにこれを抗原として生じた HIT 抗体との間で三元免疫複合体を形成する。この免疫複合体は血小板表面の FcγR11a 受容体への結合を介した血小板活性化やトロンビンの過剰産生をもたらし、患者の約半数で血栓塞栓症を誘発する。
- ②ヘパリンへの PF4 四量体の結合は、結合部位近傍でのヘパリン分子の局所的な直線化をもたらし、ヘパリン分子へのさらなる PF4 四量体の結合が促進される。
- ③ヘパリンが PF4 四量体の「閉じた」端側に結合することで四量体構造は安定化され、分子反対側の「開いた」端側への HIT 抗体の結合が促進され、三元免疫複合体が形成される。これら一連の過程が連続的に進行することで、FcγR11a 受容体への高い親和性を持った超高分子量の多量体が形成される。
- ④マウス非 HIT 様抗体 (RTO) は PF4 単量体に結合して PF4 の四量体化を構造的に妨げ、免疫複合体の形成を阻止することで、HIT 様モノクローナル抗体 (KKO) による *in vitro* での血小板の活性化と凝集、*in vivo* での血栓形成を阻害すると推測された。

Key words: heparin-induced thrombocytopenia (HIT), platelet factor 4 (PF4), crystal structure

1. HIT の発症機構と臨床

HIT は陽性電荷を帯びたケモカインである PF4 と陰性電荷を帯びたヘパリンが複合体を形成し、その複合体に対する IgG 抗体により引き起こされる¹⁻³⁾。結果として生じる免疫複合体は血小板上 (FcγR11a)⁴⁾ および単球上 (FcγRI)⁵⁻⁷⁾ における Fcγ 受容体をクロ

¹ 国立循環器病研究センター臨床検査部輸血管理室

² 国立循環器病研究センター分子病態部

*責任者連絡先:

国立循環器病研究センター臨床検査部輸血管理室
〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1

Tel: 06-6833-5012, Fax: 06-6872-8175

E-mail: takuma@ncvc.go.jp

スリンクし、これらを活性化する。さらに、血管内皮の変化により血小板および単球の活性化が増強され⁸⁾、トロンピンが産生される。よく、「HITですか？ ああ、血小板が下がる病気ですよ」と言われるのだが、問題は血小板減少症そのものではなく、トロンピンの過剰産生から患者の半数以上に血栓塞栓症を引き起こすことである。

なぜ、生体はこのような血栓を引き起こすだけで何のメリットもないような抗体を産生するのであろうか？ 実は最近、HIT抗体は原始的な免疫システムの誤誘導ではないかとする説がある。PF4はヘパリンだけでなく、核酸⁹⁾や細菌上のリポポリサッカロイド¹⁰⁾などの多価陰イオンに結合する。ヘパリン以外の多価陰イオンと複合体を作ったPF4は構造変化し、最初の免疫感作を引き起こす^{11, 12)}。これらのPF4-多価陰イオン複合体は免疫系に危険と判断され、IgG抗体の急速な産生を促す。これらIgG抗体は、免疫系が出会ったことのない病原体に対してさえ、オプソニン作用と貪食作用を容易にする。しかしながら、この機序が誤誘導されると、ヘパリン治療中にPF4-ヘパリン複合体に含まれた血小板に対する免疫系の二次応答として早期(5日目から14日目)に高力価のIgG抗体が産生されHITを起こすことになる、というわけである¹¹⁾。抗PF4-ヘパリン抗体は一過性の抗体反応を司るB細胞(おそらく濾胞辺縁帯B細胞)により産生される¹³⁾。

HITを起こした患者を前にした場合、臨床医は抗トロンピン薬で抗凝固を行うべきである。よく、「ヘパリンを中止するだけで経過観察していいですか？」と質問を受けるが、答えはNOである。理由はHITはヘパリンを中止しただけで、その後の代替の抗凝固療法を行わなければ、一日あたり約6%の患者が血栓塞栓症を発症すること、また代替の抗凝固療法を実施すれば血栓塞栓症の発症が減少することが報告¹⁴⁾されているからである。

HITはトロンピン産生過剰による過凝固が病態であり、ヘパリンを中止しただけでは合併症である血栓塞栓症を防止することはできないことを肝に銘じ、ヘパリン中止と同時にアルガトロバンによる抗凝固療法を開始するのが正しい治療戦略となる。

2. PF4 四量体-フォンダパリヌクス (FP) 複合体の結晶構造

PF4分子は単量体、二量体、四量体の平衡状態で存在していると考えられている。PF4分子の結晶構造においてPF4は四量体(各単量体をA鎖-D鎖と呼称する)を形成し、AB/CD二量体間の塩橋による相互作用と、ACもしくはBD二量体のN末端側の逆平行の β シート様構造によって安定化されていた¹⁵⁾。HITの発症機構の解明に重要なPF4-ヘパリン複合体およびPF4-ヘパリン-HIT抗体三元免疫複合体の構造は不明であったが、2015年、ペンシルバニア大学医学部Greene教授らのチームがその構造基盤を明らかにした¹⁶⁾ので紹介する。

彼らははじめにPF4とヘパリン様合成五糖類FPの複合体の結晶構造を決定した(ヘパリンは分子量や分子組成が不均一であり結晶化に適さない)。複合体中でPF4は「開いた」端と「閉じた」端を持つ擬対称性の四量体を形成していた(図1A)。A鎖とB鎖の間では各鎖の28番目のグルタミン酸残基(E28)がもう一方の鎖の50番目のリジン残基(K50)とおよそ3Å離れており、安定な塩橋を形成していたが、B鎖とD鎖の間はおよそ8Å離れており塩橋を形成していなかった。この非対称性の結果、PF4四量体表面の静電ポテンシャルを計算すると、二つの陽性荷電の溝が四量体の「閉じた」側にのみ形成され、そこに陰性荷電のFPが結合していた(図1B)。PF4四量体はABおよびCD二量体、ACおよびBD二量体の間で形成される。FPはA、B、CもしくはA、C、D単量体間で結合して、AB/CD、AC/BD二量体の会合を安定化させて、PF4四量体の構造をより安定にしていた。結晶格子の分析から、一つのFP分子は一つのPF4四量体の表面の溝だけでなく、対称性に関与する二番目の四量体のC末側ヘリックスに結合していた。これらの結果をもとに、次のようなPF4-ヘパリン複合体形成機構が提唱された(図1C)。初めにヘパリンは一つ目のPF4四量体に結合する。結合によりヘパリンは局所的に直線化した構造を取り二つ目のPF4四量体の結合が促進される。この過程を繰り返すことで最終的にやや強固に直鎖化したヘパリン鎖の周りにPF4四量体がクラスター化して結合した大きな抗原複合体が形成される。

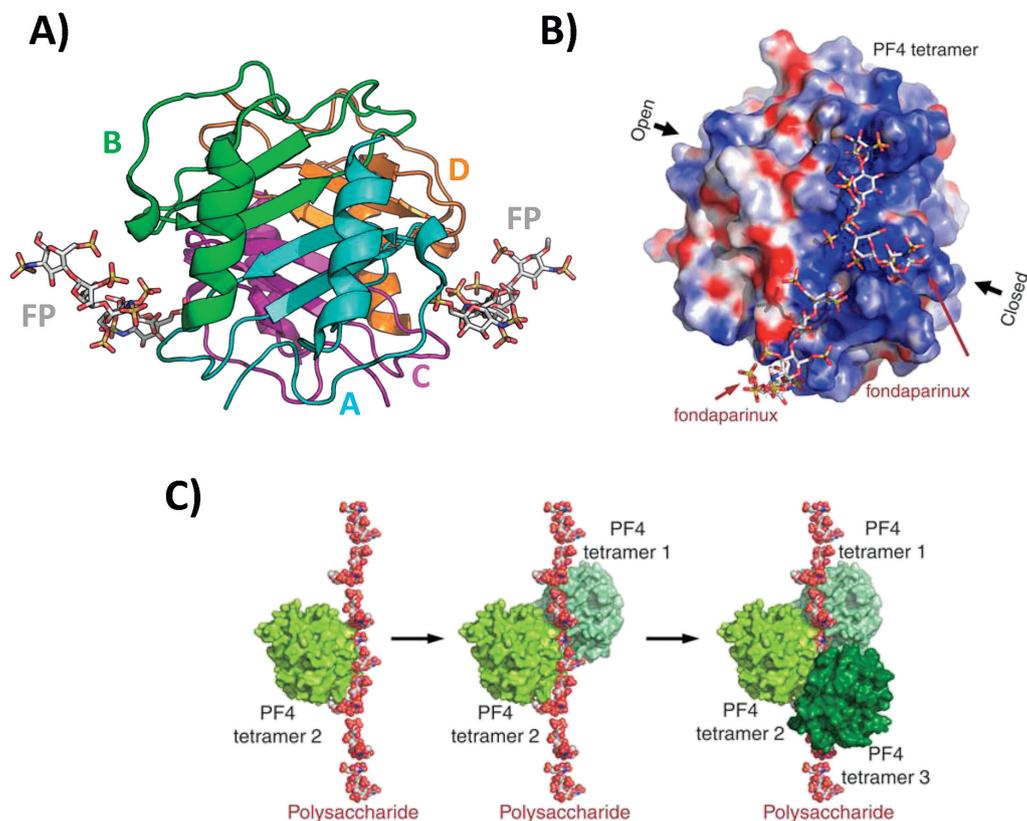


図1 PF4 四量体-フォンダパリヌクス (FP) 複合体の結晶構造

A) PF4 四量体-FP 複合体の全体構造. PF4(単量体 A 鎖: 空色, B 鎖: 緑色, C 鎖: 赤紫色, D 鎖: 橙色. FP はスティック表示.

B) PF4 四量体の静電ポテンシャル(青: 正電荷, 赤: 負電荷). FP は非対称性 PF4 四量体の「閉じた」側の正電荷表面の溝に沿って結合する.

C) 結晶格子の解析から推測される抗原複合体形成の分子機構. ヘパリンの断片に一つの PF4 四量体が結合することで(左), ヘパリン分子が局所的に直線状の構造を取り, 次の PF4 四量体の結合を促進する(中央). この過程が進行することで, 巨大な抗原複合体が形成される(右)(B および C: 文献 16 より転載).

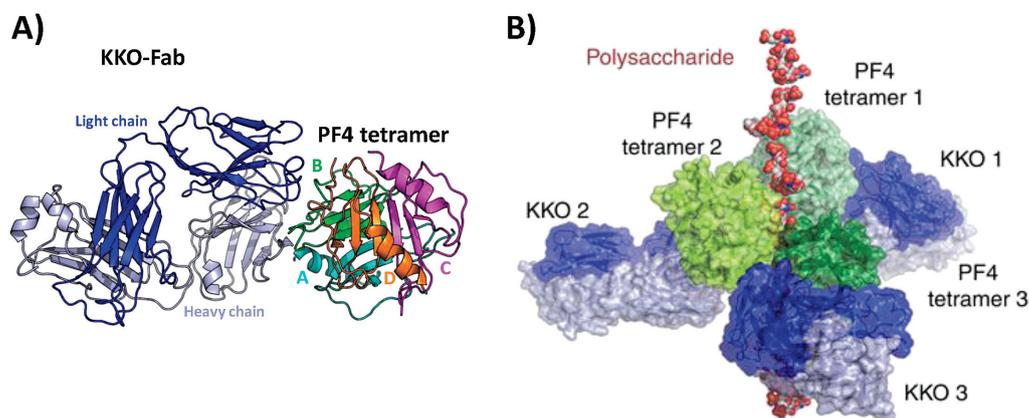


図2 PF4 四量体-KKO-Fab 断片複合体の結晶構造と免疫複合体モデル

A) PF4 四量体-KKO-Fab 断片複合体の全体構造. KKO-Fab 重鎖: 青色, KKO-Fab 軽鎖: 薄青色.

B) PF4 四量体-ヘパリン-KKO-Fab 断片三元免疫複合体モデル(サーフェイス表示). ヘパリン分子は図中では FP 同様の 7 糖ごとの不連続鎖として描かれている. 未分画ヘパリンは FP に比べて全体構造の安定性を増強させることで, 高い抗原性を持つ多数の HIT 抗体(図中では 3 分子のみを示す)が結合した免疫複合体を形成すると推測される(文献 16 より転載).

3. PF4 四量体-KKO-Fab 断片複合体の結晶構造

次に彼らは HIT 抗体の結合様式を解明するために、PF4 とマウス HIT 様モノクローナル抗体(KKO)-Fab 断片の複合体構造を決定した。KKO の投与は *in vivo* マウスモデルにおいてヘパリン誘導性血栓形成や血小板減少などヒトの HIT の主症状を再現する¹⁷⁾。さらに KKO の PF4-ヘパリン複合体への結合は血小板を活性化するヒト HIT 抗体によって阻害される¹⁸⁾。KKO-Fab 断片は PF4 四量体の中の三つの単量体(A, B, D)と接触する形で結合していた(図 2A)。この構造は PF4 の四量体化が KKO の結合に最適とするこれまでの知見と一致していた。構造学的に抗体との結合に必要なと考えられた領域に変異を導入した KKO は PF4 への結合が完全に阻害された。さらに KKO による PF4/ヘパリン存在下での血小板活性化が変異体では消失した。

4. HIT を引き起こす三元免疫複合体の構造モデル

PF4-KKO-Fab 複合体構造を PF4-ヘパリン複合体構造モデルに重ね合わせることで、PF4-ヘパリン-KKO(HIT 抗体)-Fab 三元免疫複合体モデルが作成された(図 2B)。ヘパリンは PF4 四量体の「閉じた」端に結合する。ヘパリンに結合した PF4 四量体の「開いた」端を HIT 抗体が認識して結合し、三元免疫複合体が形成される。ヘパリンの最小有効単位の FP は抗原性を持つものの HIT を引き起こすことはまれである。一方、ヘパリンは HIT を誘導しやすい。これは FP より長鎖のヘパリンの方が強い抗体結合活性を持つより安定な複合体構造を形成しやすいためと考えられる。

5. PF4 単量体-RTO-Fab 断片複合体の結晶構造

マウス非 HIT 様抗体(RTO)は KKO と同一アイソタイプだが *in vivo* マウスモデルで HIT を誘導しないマウス抗 PF4 抗体である。KKO と対照的に RTO の PF4 への結合はヘパリンによって増強されない¹⁷⁾。ELISA 上では RTO の PF4 への結合は KKO と競合しないが、同等の最大結合量を示す¹⁸⁾。予期しなかつ

たことに、RTO-Fab 断片は PF4 単量体にのみ結合していた。PF4 四量体と PF4 単量体-RTO-Fab 複合体の構造の重ね合わせから、RTO は単量体 A と B の間に結合し AB 二量体の結合を妨げる結果、HIT 抗原を形成するために必要な PF4 四量体の形成を阻害すると推測された。

6. KKO によって引き起こされる血栓能亢進の RTO による阻害

血中 PF4 は単量体、二量体、四量体の平衡状態にあると考えられている。結晶構造から予測されたように RTO が PF4 の四量体化を妨げて、KKO/ヘパリンによる血小板活性化、血栓形成を阻害するかどうかを検討した。その結果、RTO は *in vitro* において KKO およびヒト HIT IgG 抗体による血小板の活性化と凝集を阻害した。さらに、RTO はマウス PF4^{-/-}/ヒト PF4^{+/+}/ヒト FcγIIa⁺ トランスジェニックマウスのレーザー微小血管損傷モデルにおける KKO による血栓形成促進を阻害した。

7. まとめ

これらの結果から以下のような HIT 発症機構が提唱された。(1)血中において PF4 は単量体、二量体、四量体が平衡状態で存在している。ヘパリンは PF4 四量体の「閉じた」端側に結合し、コンフォメーションを安定化させ「開いた」端側を露出させる。(2)留め金の働きをするヘパリン鎖に沿って PF4 四量体がクラスター化して並んだ高い抗体結合活性を持つ大きな抗原複合体が形成される。(3)HIT 抗体が安定化した PF4 四量体の「開いた」端側に結合して、多数の抗体が結合した巨大な PF4-ヘパリン-HIT 抗体三元免疫複合体が形成される。(4)この巨大複合体は血小板表面の FcγRIIa 受容体へ高い親和性を持つことで血小板を持続的に活性化するとともに、単球や血管内皮細胞を活性化させてトロンビンの過剰生産を促し、血栓形成を促進して血小板の消耗性減少、血栓塞栓症を誘発する。

現在、HIT の治療には抗トロンビン薬が用いられているが、頭蓋内出血などの副作用が懸念される。マウス個体への RTO 投与は、PF4 の四量体化を介

した免疫複合体の形成を妨げ、KKOによる血栓形成を阻害した。将来的に特異的HIT治療薬として、PF4の四量体化を阻害する低分子化合物や抗体エンジニアリングによるRTOをベースにしたヒト化抗体の開発が期待される。

著者全員の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし

文献

- 1) Brandt S, Krauel K, Gottschalk KE, Renné T, Helm CA, Greinacher A, Block S: Characterisation of the conformational changes in platelet factor 4 induced by polyanions: towards in vitro prediction of antigenicity. *Thromb Haemost* **112**: 53–64, 2014.
- 2) Ziporen L, Li ZQ, Park KS, Sabnekar P, Liu WY, Arepally G, Shoenfeld Y, Kieber-Emmons T, Cines DB, Poncz M: Defining an antigenic epitope on platelet factor 4 associated with heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* **92**: 3250–3259, 1998.
- 3) Li ZQ, Liu W, Park KS, Sachais BS, Arepally GM, Cines DB, Poncz M: Defining a second epitope for heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis antibodies using KKO, a murine HIT-like monoclonal antibody. *Blood* **99**: 1230–1236, 2002.
- 4) Kelton JG, Sheridan D, Santos A, Smith J, Steeves K, Smith C, Brown C, Murphy WG: Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. *Blood* **72**: 925–930, 1988.
- 5) Gruel Y, Pouplard C, Lasne D, Magdelaine-Beuzelin C, Charroing C, Watier H: The homozygous FcγRIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes. *Blood* **104**: 2791–2793, 2004.
- 6) Kasthuri RS, Glover SL, Jonas W, McEachron T, Pawlinski R, Arepally GM, Key NS, Mackman N: PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγRI. *Blood* **119**: 5285–5293, 2012.
- 7) Rauova L, Hirsch JD, Greene TK, Zhai L, Hayes VM, Kowalska MA, Cines DB, Poncz M: Monocyte-bound PF4 in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* **116**: 5021–5031, 2010.
- 8) Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S: Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med* **316**: 581–589, 1987.
- 9) Jaax ME, Krauel K, Marschall T, Brandt S, Gansler J, Füll B, Appel B, Fischer S, Block S, Helm CA, Müller S, Preissner KT, Greinacher A: Complex formation with nucleic acids and aptamers alters the antigenic properties of platelet factor 4. *Blood* **122**: 272–281, 2013.
- 10) Krauel K, Weber C, Brandt S, Zähringer U, Mamat U, Greinacher A, Hammerschmidt S: Platelet factor 4 binding to lipid A of Gram-negative bacteria exposes PF4/heparin-like epitopes. *Blood* **120**: 3345–3352, 2012.
- 11) Krauel K, Pötschke C, Weber C, Kessler W, Füll B, Ittermann T, Maier S, Hammerschmidt S, Bröker BM, Greinacher A: Platelet factor 4 binds to bacteria, [corrected] inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* **117**: 1370–1378, 2011.
- 12) Kreimann M, Brandt S, Krauel K, Block S, Helm CA, Weitschies W, Greinacher A, Delcea M: Binding of anti-platelet factor 4/heparin antibodies depends on the thermodynamics of conformational changes in platelet factor 4. *Blood* **124**: 2442–2449, 2014.
- 13) Zheng Y, Yu M, Podd A, Yuan L, Newman DK, Wen R, Arepally G, Wang D: Critical role for mouse marginal zone B cells in PF4/heparin antibody production. *Blood* **121**: 3484–3492, 2013.
- 14) Greinacher A, Eichler P, Lubenow N, Kwasny H, Luz M: Heparin-induced thrombocytopenia with thromboembolic complications: meta-analysis of 2 prospective trials to assess the value of parenteral treatment with lepirudin and its therapeutic aPTT range. *Blood* **96**: 846–851, 2000.
- 15) Zhang X, Chen L, Bancroft DP, Lai CK, Maione TE: Crystal structure of recombinant human platelet factor 4. *Biochemistry* **33**: 8361–8366, 1994.
- 16) Cai Z, Yarovoi SV, Zhu Z, Rauova L, Hayes V, Lebedeva T, Liu Q, Poncz M, Arepally G, Cines DB, Greene MI: Atomic description of the immune complex involved in heparin-induced thrombocytopenia. *Nat Commun* **6**: 8277, 2015.
- 17) Arepally GM, Kamei S, Park KS, Kamei K, Li ZQ, Liu W, Siegel DL, Kisiel W, Cines DB, Poncz M: Characterization of a murine monoclonal antibody that mimics heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Blood* **95**: 1533–1540, 2000.
- 18) Sachais BS, Litvinov RI, Yarovoi SV, Rauova L, Hinds JL, Rux AH, Arepally GM, Poncz M, Cuker A, Weisel JW, Cines DB: Dynamic antibody-binding properties in the pathogenesis of HIT. *Blood* **120**: 1137–1142, 2012.