

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16117

研究課題名（和文）抗リン脂質抗体症候群における抗リン脂質抗体と酸化ストレスの相乗的向血栓作用の解明

研究課題名（英文）Synergistic effects of antiphospholipid antibodies and oxidative stress that increase the risk of thrombosis in antiphospholipid syndrome

研究代表者

本木 由香里 (Motoki, Yukari)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80724054

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗リン脂質抗体は血管内皮細胞および末梢血単核球の組織因子発現、炎症性サイトカインやケモカイン、活性酸素種の産生を促進した。この作用は、血管内皮細胞と末梢血単核球が接触できる状態で共培養した際に顕著であった。また、抗リン脂質抗体は単球やリンパ球の血管内皮細胞への接着ならびに血管内皮細胞下への浸潤を促進した。酸化ストレスは抗リン脂質抗体による炎症性サイトカインやケモカインの産生促進作用には影響しなかったが、単球の血管内皮細胞への接着ならびに血管内皮細胞下への浸潤促進作用を助長した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗リン脂質抗体症候群は動脈・静脈を問わず繰り返し血栓症を起こすが、その機序については不明な点も多い。本研究は抗リン脂質抗体の有する炎症促進作用や細胞の遊走促進作用を明らかにし、加えて、抗リン脂質抗体症候群患者の血中が高度な酸化ストレス状態にあることに着目して、酸化ストレスが抗リン脂質抗体の作用の一部を補助することにより、相乗的に血管内に易血栓性をもたらす可能性を見出した。本研究の成果は、抗リン脂質抗体症候群の病態解明の一助となり、血栓症発症リスクを低減する予防法の切り口となる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies and oxidative stress. Antiphospholipid antibodies promoted tissue factor expression, production of inflammatory cytokines and chemokines, and reactive oxygen species in vascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). This effect was more pronounced when endothelial cells and PBMC were co-cultured under condition that allowed them to touch each other. Antiphospholipid antibodies also promoted adhesion of monocytes and lymphocytes to endothelial cells and infiltration under endothelial cells. Oxidative stress did not affect the production of proinflammatory cytokines and chemokines induced by antiphospholipid antibodies, but boosted monocyte adhesion to endothelial cells and subendothelial infiltration promoted by antiphospholipid antibodies.

研究分野：血栓止血学 病態検査学

キーワード：抗リン脂質抗体 酸化ストレス 血栓症

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は、リン脂質に関連する自己抗体である抗リン脂質抗体の出現と、それに伴う極めて多彩な合併症 (動脈血栓症 [脳血管障害・虚血性心疾患等]、静脈血栓症 [肺塞栓症・深部静脈血栓症等]、妊娠合併症) の発症を特徴とする自己免疫性血栓塞栓性疾患である。

抗リン脂質抗体は抗原特異性が多様な抗体群であり、認識するエピトープの違いにより抗カルジオリピン抗体、抗カルジオリピン/ $\beta$ 2-グリコプロテイン I 抗体、抗 $\beta$ 2GP I 抗体、抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体 (抗 PS/PT 抗体) など様々なタイプが存在し、患者の血中には複数種の抗体が混在している。APS の多彩な病態は、各種抗リン脂質抗体が持つ種々の血栓形成作用が絡み合うことにより生じ、患者の保有する抗体の組合せによって発症しやすい病態やその発症リスクが異なると考えられる。しかし、各種抗体の疾患特異性や作用は解明されておらず、APS における血栓症発症の詳細なメカニズムは未だ不明である。

これまでの研究から、抗リン脂質抗体の血栓形成作用や炎症促進作用が明らかとなり、加えて、APS 患者では単球等の遊走促進や血中酸化ストレス度の上昇が病態に関与する可能性が示唆された。しかしながら、酸化ストレスの APS 病態への関与に関する報告は少なく、APS 患者における酸化ストレス度上昇の原因や、抗リン脂質抗体と酸化ストレスとの関連については不明である。APS の病態への理解を深めるためには、抗リン脂質抗体がどのような機序で血栓形成に起因するのかを検討し、さらに、酸化ストレス度上昇の機序ならびに酸化ストレスと抗リン脂質抗体との相互作用を明らかにしなければならない。

2. 研究の目的

本研究は、APS 患者の血中に混在する複数の抗リン脂質抗体が有する血中の細胞に対する血栓形成促進作用や炎症促進作用を、血管内皮細胞と末梢血単核球の共培養条件にて検討する。また、検討から得られた抗リン脂質抗体の作用が、酸化ストレス負荷条件下において変化するか否かを検証する。

これらの検討から、血中が高度な酸化ストレス状態にある APS 患者において易血栓性を生じる機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 各種抗リン脂質抗体の血栓形成作用および炎症促進作用の解明

ヒト大動脈由来血管内皮細胞 (HAEC) と健康人末梢血単核球細胞 (PBMC) の単培養モデルおよび共培養モデルを作成した。共培養モデルは、HAEC と PBMC が接着等により直接作用できる系 (接触系) と、細胞が産生・分泌するサイトカイン等の拡散分子によってのみ相互作用できる系 (非接触系) を作成した (図 1)。

HAEC と PBMC の各培養モデルに対し、抗 PS/PT モノクローナル抗体 (231D) および APS 患者由来 IgG (APS-IgG) の添加実験を行い、細胞の組織因子発現、接着因子発現および各種サイトカイン・ケモカイン産生、活性酸素種産生について検討した。対照には健康人由来 IgG および膠原病患者由来 IgG を用いた。なお、231D の添加実験では、抗体のエピトープ提供タンパクであるプロトロンビンを補助的に添加した。

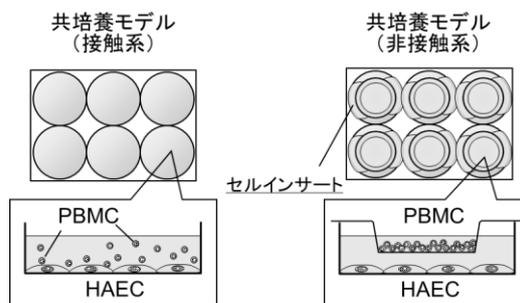


図 1. 共培養モデル (接触系・非接触系)

(2) 酸化ストレスによる細胞遊走促進作用の解明

HAEC をコラーゲンゲル上に培養し、培養上清中に PBMC を加えることにより、コラーゲンゲル上共培養モデル (図 2) を作成し、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 100 $\mu$ M または Paraquat dichloride hydrate (パラコート) 500 $\mu$ M にて酸化ストレスを負荷した。24 または 48 時間後、培養上清を回収し、細胞表面を PBS にて 3 回洗浄後、コラーゲンゲルによりコラーゲンゲル層を溶解・回収した。培養上清およびコラーゲンゲル層に含まれる細胞について、フローサイトメトリー解析した。

(3) 抗リン脂質抗体による細胞遊走促進作用の解明

(2) と同様のモデルに APS-IgG を添加し、24 または 48 時間後の培養上清およびコラーゲンゲル層に含まれる細胞について、フローサイトメトリー解析した。

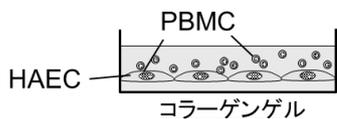


図 2. 共培養モデル (コラーゲンゲル系)

(4) 抗リン脂質抗体と酸化ストレスの相乗効果

HAEC と PBMC の共培養モデル（接触系・コラーゲンゲル系、図 2）にて、 $H_2O_2$  による酸化ストレス負荷条件下で APS 患者由来 IgG を添加し、培養上清中サイトカイン量ならびに PBMC の HAEC への接着および HAEC 下への浸潤について解析した。

4. 研究成果

(1) 各種抗リン脂質抗体の血栓形成作用および炎症促進作用の解明

APS-IgG の添加により、HAEC/PBMC 接触系共培養および非接触系共培養モデルにおいて TF mRNA の発現量が有意に増加した。特に接触系共培養モデルにおいて顕著であり、TF mRNA 発現量は、コントロールに対し APS-IgG ではおよそ 3 倍となった。一方、モノクローナル抗体である 231D の添加では、HAEC 単培養モデルにおいて TF mRNA 発現が増加したが、HAEC/PBMC 共培養モデルでは接触系・非接触系ともに有意に低下した。

次に、MCP-1 mRNA 発現は、APS-IgG の添加により、いずれの培養モデルにおいてもコントロールに比べ有意に増加した。一方、231D の添加では、HAEC/PBMC 接触系共培養において、有意に低下した。また、IL-8 mRNA 発現量は、APS-IgG の添加により、HAEC/PBMC 共培養モデルにおいて、コントロールに比べ有意に増加し、特に接触系共培養モデルにおいて顕著であった。一方、231D の添加では、いずれのモデルにおいても IL-8 mRNA 発現に変化はなかった。TNF- $\alpha$  mRNA は、HAEC/PBMC 接触系共培養においてのみ、APS-IgG の添加により発現が著明に増加した。一方、231D の添加では、いずれのモデルにおいても TNF- $\alpha$  mRNA 発現に変化はなかった。

TF、MCP-1、IL-8、TNF- $\alpha$  のいずれも、HAEC と PBMC の接触系共培養モデルにおいて mRNA の発現量ならびに APS-IgG 添加時の発現増加が大きく、抗リン脂質抗体による刺激を受けた際に、細胞同士の接触を介した相互作用により、より大きな反応を示すことが示唆された。

また、HAEC/PBMC 接触系共培養モデルに APS-IgG を添加し、24 時間後の細胞内 Total ROS 量を測定したところ、添加する IgG の種類によりばらつきはあるものの、コントロールに比べ有意に増加した。

以上の検討結果から、APS 患者の IgG には炎症性サイトカインやケモカインの産生や活性酸素種の発生を亢進する作用があり、血管内皮細胞と単核球の接触を介した作用により、APS-IgG に対する反応が増強される可能性が示唆された。

(2) 酸化ストレスによる細胞遊走促進作用の解明

コラーゲンゲル上に培養した HAEC と PBMC の共培養モデルに酸化ストレスを負荷し、単核球の HAEC への接着および HAEC 下への浸潤について検討した。単核球に含まれるいずれの細胞群も  $H_2O_2$  負荷による影響は認められなかった。一方、パラコート刺激においては、CD14 および CD3 陽性細胞の培養上清中細胞数は有意に減少し、HAEC・コラーゲンゲル層では有意に増加した（図 3）。

また、HAEC における接着因子 ICAM1 (CD54) の発現については、パラコート刺激において 1 細胞あたりの発現量が増加した（図 4）。

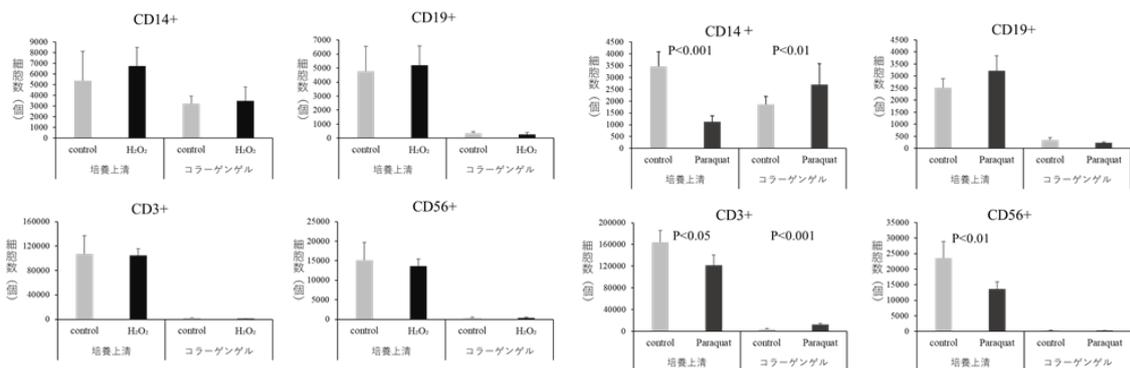


図 3. 酸化ストレス負荷時の培養上清中および HAEC・コラーゲンゲル層中細胞数

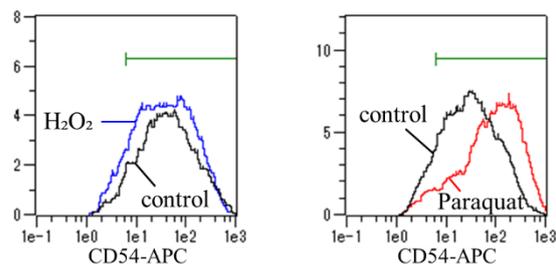


図 4. 酸化ストレス負荷時の血管内皮細胞における ICAM-1 発現量

左図： $H_2O_2$  負荷、右図：パラコート負荷

### (3) 抗リン脂質抗体による細胞遊走促進作用の解明

コラーゲンゲル上に培養した HAEC と PBMC の共培養モデルに APS-IgG を添加し、単核球の HAEC への接着および HAEC 下への浸潤について (2) と同様の検討を行った。培養上清中の CD14、CD19、CD56 陽性細胞は APS-IgG により減少し (図 5 A-D)、HAEC・コラーゲンゲル層中の CD14、CC3、CD19、CD56 陽性細胞は APS-IgG により増加した (図 5 E-H)。抗リン脂質抗体には、血液に含まれる種々の細胞に対し、血管内皮細胞への接着および血管内細胞下への浸潤を促進する作用が確認された。

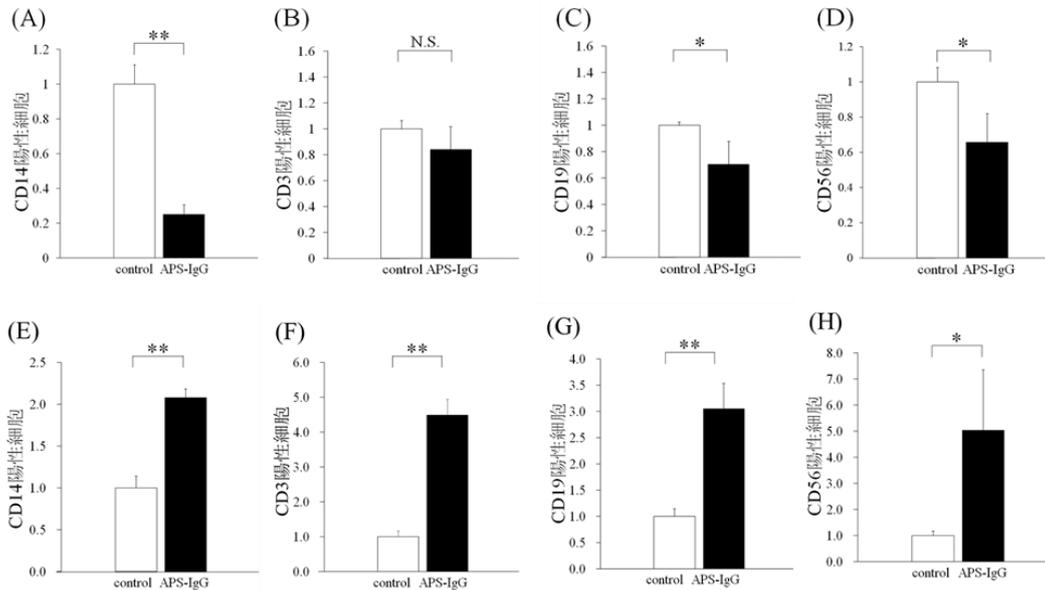


図 5. 抗リン脂質抗体添加時の培養上清中ならびに HAEC・コラーゲン層中に含まれる各種細胞数  
A-D: 培養上清中細胞数の比較、E-H: HAEC・コラーゲンゲル層中細胞数の比較

### (4) 抗リン脂質抗体と酸化ストレスの相乗効果

HAEC/PBMC 接触系共培養モデルに  $H_2O_2$ 、APS-IgG、 $H_2O_2$ +APS-IgG を添加し、24 時間後の培養上清中 IL-6、MCP-1、ICAM-1 量を測定した。APS-IgG および  $H_2O_2$ +APS-IgG 添加により培養上清中濃度は IL-6、MCP-1、ICAM-1 のいずれも高値を示した。しかしながら、APS-IgG 単独添加時と、 $H_2O_2$ ・APS-IgG 同時添加時の間に有意な差は認めなかった。

また、コラーゲンゲル上 HAEC/PBMC 共培養モデルにおいて同様の添加実験を実施した結果、APS-IgG 添加により CD14 陽性細胞数は培養上清中で減少、HAEC・コラーゲンゲル層中で増加し、 $H_2O_2$  負荷条件下の APS-IgG 添加により、さらに増加した。CD19 陽性細胞数は  $H_2O_2$ ・APS-IgG 同時添加により、HAEC・コラーゲンゲル層中細胞数が増加した。加えて、HAEC・コラーゲンゲル層中に含まれる CD14 陽性細胞は、APS-IgG 添加条件において 1 細胞あたりの CD14 発現量が低下した。また、APS-IgG の中でも添加時の HAEC・コラーゲンゲル層中に含まれる細胞数が多い IgG、すなわち、細胞の遊走を促進する作用が大きかった IgG ほど、その傾向が顕著であった。

以上の結果から、酸化ストレスは抗リン脂質抗体による単核球の血管内皮細胞への接着および浸潤作用を助長する可能性が示唆された。

### <引用文献>

- ① Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid syndrome, “the best prophet of the future”. *Mod Rheumatol* 2018; 28: 409-416.
- ② Motoki Y, Nojima J, *et al.* Antiphospholipid antibodies contribute to arteriosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus through induction of tissue factor expression and cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *Thromb Res* 2012; 130: 667-673.
- ③ Nojima J, Kaneshige R, *et al.* Increased oxidative stress may be a risk factor for thromboembolic complications in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2020; 196: 52-53.
- ④ 長谷川真梨、本木由香里他. 抗リン脂質抗体による単核球の血管内皮下組織への浸潤促進. *日本検査血液学会雑誌* 2021; 22(3): 346-354.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 長谷川真梨、本木由香里、三島千穂、清水直人、金重里沙、野島順三	4. 巻 22
2. 論文標題 抗リン脂質抗体による単核球の血管内皮下組織への浸潤促進	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本検査血液学会雑誌	6. 最初と最後の頁 346-354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Junzo Nojima, Risa Kaneshige, Yukari Motoki, Masahiro Ieko	4. 巻 196
2. 論文標題 Increased oxidative stress may be a risk factor for thromboembolic complications in patients with antiphospholipid syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis research	6. 最初と最後の頁 52-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.thromres.2020.08.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田知里、山崎澗、広重和哉、本木由香里、野島順三
2. 発表標題 酸化ストレスが抗リン脂質抗体症候群の動脈硬化病態に及ぼす影響
3. 学会等名 第68回日本医学検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川真梨、三島千穂、前田知里、金重里沙、本木由香里、野島順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体症候群における病態発症機序の解明に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第14回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 知里、本木 由香里、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体症候群の病態形成における酸化ストレスの影響
3. 学会等名 第9回 T T M フォーラム九州
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川真梨、三島千穂、清水直人、本木由香里、金重里沙、野島順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体による単球の血管内皮下組織への浸潤促進
3. 学会等名 第21回 日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川真梨、三島千穂、清水直人、金重里沙、本木由香里、野島順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体症候群における動脈硬化性疾患発症機序の解明
3. 学会等名 第11回 Thrombosis/Thrombolysis Maker Forum 九州
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------