

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590568

研究課題名(和文) 抗リン脂質抗体による血栓形成および細胞障害機序の解明

研究課題名(英文) Studies on the pathogenic mechanisms of anti-phospholipid antibodies responsible for the thrombotic formation and cell activation.

研究代表者

野島 順三 (NOJIMA JUNZO)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30448071

研究成果の概要(和文):

全身性エリテマトーデス(SLE)患者における動脈血栓塞栓症発症機序の解明を目的に、抗リン脂質抗体が末梢血単核球による組織因子(TF)発現や炎症性サイトカイン産生にどのような影響を及ぼすのか検討した。その結果、抗リン脂質抗体が単球とリンパ球の相互作用によるTF発現やTNF- α 、IL-1 β 、IL-6の産生を増幅させることを確認し、これがSLE患者における動脈血栓塞栓症の重要な病因となることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):

The main objective of this study was to clarify the role of anti-phospholipid antibodies (aPL) in the pathogenesis of arterial thromboembolic complications in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Our study demonstrated that aPL cause persistently high TF expression and inflammatory cytokine production in the interaction of monocytes and lymphocytes, which may be an important mechanism for the pathogenesis of arterial thromboembolic complications in SLE patients with APS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：全身性エリテマトーデス、抗リン脂質抗体症候群、動脈血栓塞栓症、組織因子、単球、炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は多種多様な自己抗体の出現と多臓器病変を特徴とする代表的な全身性自己免疫疾患である。SLE患者に認められる多彩な病態の中でも、脳血管障害と虚血性心疾患は死因の上位を

占める重篤な合併症であり、その発症機序解明と発症の発端となる危険因子の特定は極めて重要である。

近年、SLE患者に合併する種々の動・静脈血栓症の発症にリン脂質に関連した自己抗体である抗リン脂質抗体の出現が密接に関

連していることが明らかとなり、抗リン脂質抗体症候群 (APS) という疾患概念が確立されている。APS は、ループスアンチコアグulantや抗カルジオリピン抗体などに代表される抗リン脂質抗体の出現と、それに伴う種々の血栓塞栓性病態 (脳梗塞・心筋梗塞・深部静脈血栓症・肺塞栓症など) や妊娠合併症 (習慣性流産など) を特徴とする自己免疫性血栓性疾患であるが、その発症機序の多くははまだ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、APS における動脈血栓塞栓性病態の発症機序を解明する目的で、SLE 患者血漿および健常人血漿より純化・精製した IgG を用いた正常単核球培養刺激実験モデルにより、抗リン脂質抗体が末梢血単核球の TF 発現や炎症性サイトカイン (TNF- α ・IL-1 β) 産生にどのような影響を及ぼすか検討した。さらに、SLE 患者および健常人を対象とした臨床研究で、抗リン脂質抗体による TF 発現増幅作用が動脈血栓塞栓症の発症にどのように関連しているのか統計学的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 対象: The American Rheumatism Association の診断基準を満たした SLE 患者 93 症例 (女性 90 名、男性 3 名、平均年齢 39.8 歳) を対象とした。各種画像検査にて、動脈血栓塞栓症が合計 19 例 (脳血管障害 11 例、虚血性心疾患 8 例)、静脈血栓塞栓症が合計 21 例 (深部静脈血栓症 9 例、肺塞栓症 4 例、四肢静脈血栓塞栓症 4 例、血栓性静脈炎 4 例) を確定診断した。さらに、抗リン脂質抗体症候群分類基準に従い、SLE93 症例を APS 合併例 27 例と APS 非合併例 66 例に確定分類した。正常コントロール群として、血栓性合併症の病歴が無く、末梢血液検査、止血・凝固機能検査、肝機能検査、自己抗体検査等の異常を認めなかった健常人 47 名 (女性 37 名、男性 10 名、平均年齢 44.4 歳) を対照とした。

正常コントロール群として、血栓性合併症の病歴が無く、末梢血液検査、止血・凝固機能検査、肝機能検査、自己抗体検査等の異常を認めなかった健常人 47 名 (女性 37 名、男性 10 名、平均年齢 44.4 歳 [22-74 歳]) を対照とした。

(2) 方法: SLE 患者血漿および健常人血漿より純化・精製した IgG (APS 由来 IgG 8 例、non-APS 由来 IgG 6 例、健常人由来 IgG 6 例) を用いて健常人末梢血より分離した正常単核球培養細胞を刺激し、TF・TNF- α ・IL-1 β の messenger RNA (mRNA) 発現量をリアルタイム RT-PCR 法にて定量し、培養上清中の TNF- α ・IL-1 β ・IL-6 濃度を ELISA にて測定した。さらに SLE 患者および健常人を対象に生体内の単球表面 TF 発現量および血清中

TNF- α ・IL-1 β ・IL-6 濃度を比較検討し、動脈血栓塞栓症 (脳血管障害・虚血性心疾患) 発症との関連性を統計学的に解析した。

4. 研究成果

(1) 各 IgG 刺激による単核球内 TF・TNF- α ・IL-1 β mRNA 発現量の比較

①TF mRNA の発現は、normal-IgG 刺激時および non-APS-IgG 刺激時と比較して、APS-IgG 刺激時では明らかに発現が増幅された (図 1A)。②炎症性サイトカイン (TNF- α ・IL-1 β) の mRNA 発現は、normal-IgG 刺激時や non-APS-IgG 刺激時と比較して、APS-IgG 刺激時では明らかな TNF- α および IL-1 β mRNA の発現増幅を確認した (図 1B-C)。

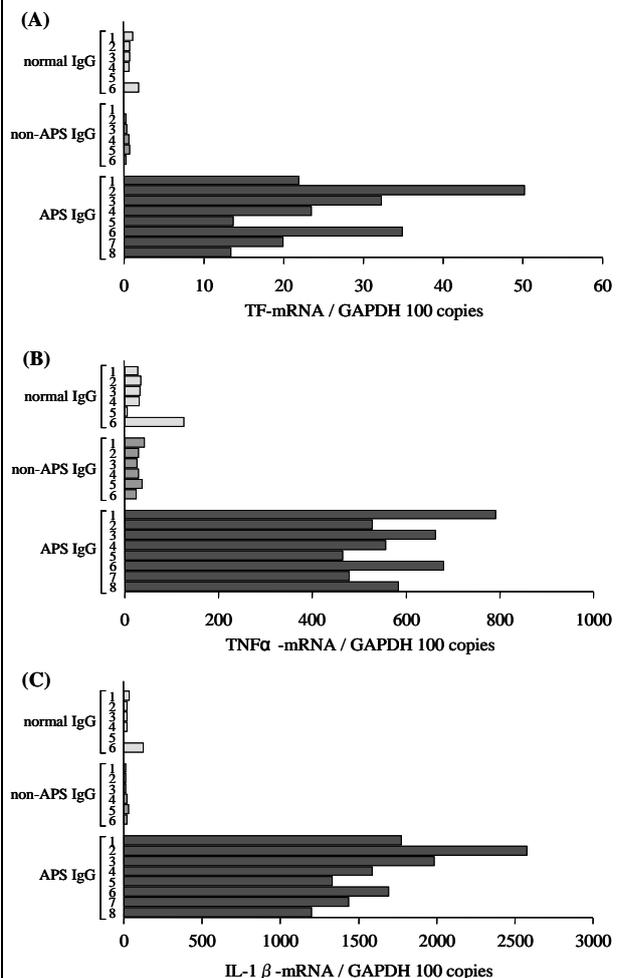


図1 単核球内 TF・TNF- α ・IL-1 β mRNA発現量の比較

(2) IgG 刺激による単核球からの炎症性サイトカイン産生量の比較

①培養上清中への TNF- α および IL-1 β 産生は、normal-IgG 刺激時および non-APS-IgG 刺激時では僅かだが、APS-IgG 刺激時では、明らかな TNF- α と IL-1 β の産生増加が認められた (図 2A-B)。②培養上清中への IL-6 の産生は、APS-IgG 刺激時でのみ認められ、

normal-IgG および non APS-IgG 刺激では全く認められなかった (図 2C)。

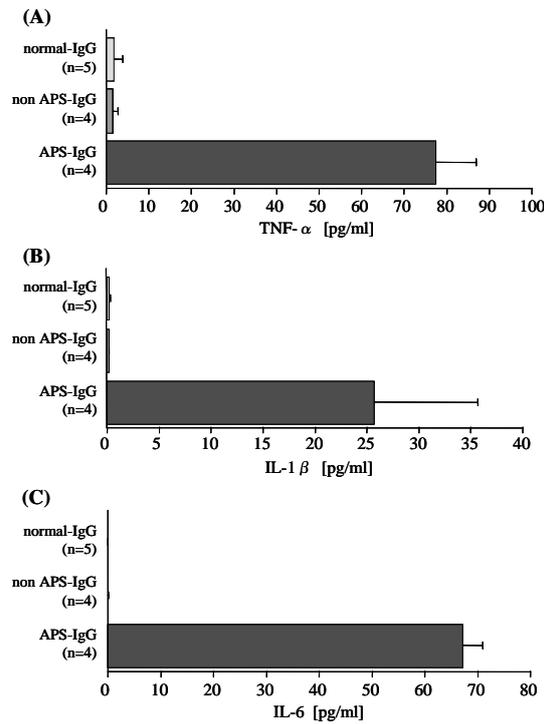


図2 単核球からの炎症性サイトカイン産生量の比較

(3) p38 MAPK 阻害による APS-IgG 刺激時の単核球内 TF・TNF-α mRNA 発現の抑制

APS-IgG 刺激による単核球内 TF 発現および TNF-α 産生促進作用の細胞内シグナル伝達経路を解明する目的で、上記実験 (1) と同様の正常単核球培養刺激実験系に p38 MAPK の阻害剤である SB203580 を添加し、APS-IgG 刺激による単核球内 TF および TNF-α mRNA の発現が抑制されるか否か検討した。

①TF mRNA の発現は、図 3A に示す如く、p38 MAPK 阻害剤 (SB203580) の添加により、44.8%~70.3% (n=4) の発現抑制が確認された。

②TNF-α mRNA の発現も p38 MAPK 阻害剤の添加により、48.8%~63.9% (n=4) の発現抑制が認められた (図 3B)。

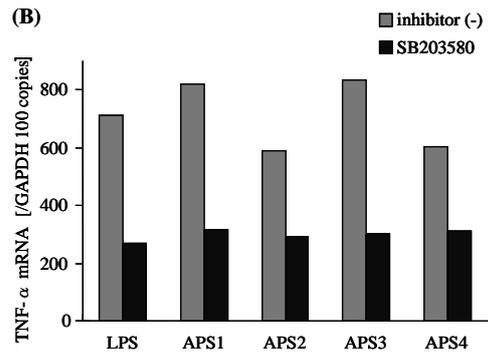
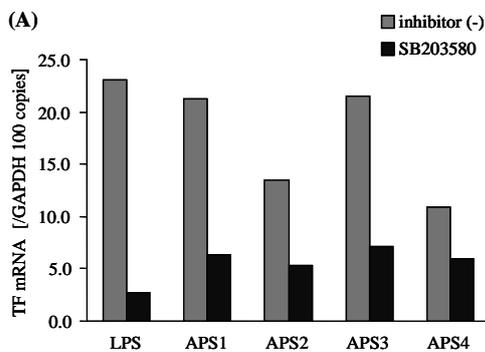


図3 p38 MAPK阻害によるTF・TNF-α mRNA発現の抑制

(4) SLE 患者血中単球に占める細胞表面 TF 発現単球の割合

SLE 症例 (n=93) と健常人 (n=47) の 2 群間で末梢血単球表面の TF 発現量を比較した結果、図 4A に示す如く、健常人群では $4.04 \pm 2.39\%$ (mean \pm SD) と、ほとんど TF の発現が認められないのに対して、SLE 群では $16.66 \pm 19.91\%$ と明らかに単球表面 TF の発現が亢進していた。さらに、SLE 群を APS 合併例 (n=27) と APS 非合併例 (n=66) に分類し、単球表面 TF の発現量を比較検討した結果、APS 非合併例の $9.43 \pm 11.97\%$ に比較して APS 合併例では $34.33 \pm 24.25\%$ と異常亢進していた (図 4B)。

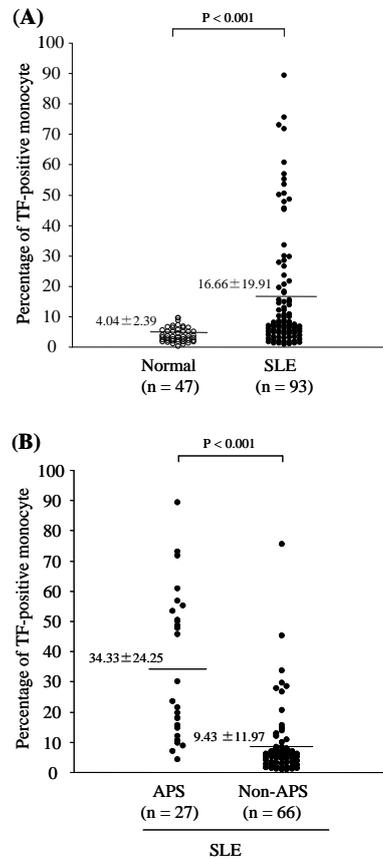


図4 SLE患者および健常人における末梢血単球TF発現量の比較

(5) SLE 患者における単球表面 TF 発現亢進と動脈血栓塞栓性疾患発症の関連

末梢血単球 TF 発現量の健常人基準値である 11.2% を cut-off 値とし、SLE93 症例を TF-positive 群 (n=35) と TF-negative 群 (n=58) に分類して、2 群間における抗リン脂質抗体の出現率および動脈血栓塞栓性疾患の発症率を比較した。

① 抗リン脂質抗体の出現率は、TF-positive 群では 57.1% (20/35 例) と TF-negative 群の 10.3% (6/58 例) に比較して明らかに高く ($P < 0.0001$)、末梢血単球表面 TF 発現増幅と抗リン脂質抗体出現との間に強い関連性が示唆された。

② 動脈血栓塞栓性疾患の発症率は、TF-positive 群では 45.7% (16/35 例) と TF-negative 群の 13.8% (8/58 例) に比較して明らかに高く ($P < 0.001$)、抗リン脂質抗体による末梢血単球表面 TF 発現増幅と動脈血栓塞栓性疾患発症との間に強い関連性が示唆された (図 5)。

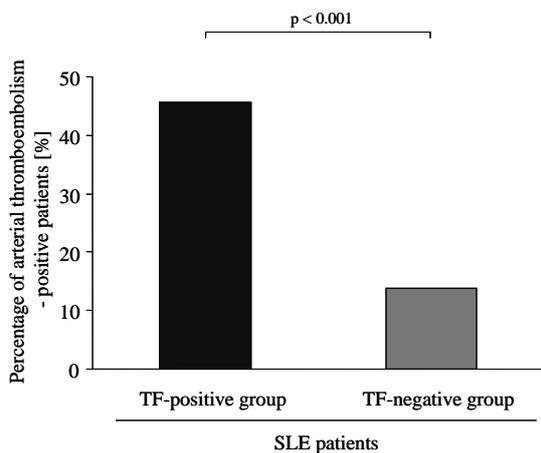


図5 末梢血単球表面TF発現と動脈血栓塞栓性疾患との関連

(6) APS 患者における血清中サイトカイン濃度の検討

APS 合併 SLE 症例群 (n=34) と健常人群 (n=27) の 2 群間における血清中サイトカイン (TNF- α ・IL-1 β ・IL-6) 濃度を比較検討した。

① 血清中 TNF- α 濃度は、健常人群の 3.59 ± 4.28 pg/ml (mean \pm SD) に比較して APS 合併 SLE 症例群では 12.09 ± 14.91 pg/ml と明らかに高値を示した (図 6 A)。

② 血清中 IL-1 β 濃度は、健常人群、APS 合併 SLE 症例群ともに全例感度以下であった (図 6 B)。

③ 血清中 IL-6 濃度は、健常人群は全例が 10pg/ml 未満であったのに対し、APS 合併 SLE 症例群では高値を示す症例が 5 例認められた (図 6 C)。

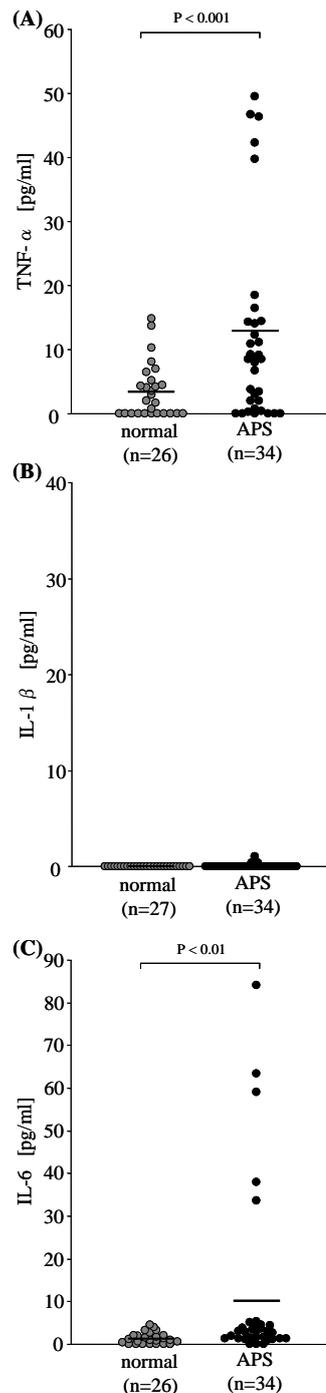


図6 APS患者における血清中サイトカイン濃度の検討

以上の知見により、全身性自己免疫疾患である SLE 患者では、種々の自己抗体や炎症反応による慢性的な刺激により単球や血管内皮細胞が活性化されやすい状態にあると推測される。加えて、抗リン脂質抗体が存在する APS 合併例では、単球表面 TF の発現や炎症性サイトカインの産生が亢進し、TF 依存性の血栓形成やサイトカイン誘発性の炎症反応が増幅されることにより、脳血管障害や虚血性心疾患などの動脈血栓塞栓性疾患が発症・進展すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Nojima J, Motoki Y, Tsuneoka H, Kuratsune H, Matsui T, Yamamoto M, Yanagihara M, Hinoda Y, Ichihara K. "Oxidation stress index" as a possible clinical marker for the clinical evaluation of non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2011. (In press). 査読有り
- ② Tsuneoka H, Yanagihara M, Nojima J, Ichihara K. Antimicrobial susceptibility by Etest of *Bartonella henselae* isolated from cats and human in Japan. *J Infect Chemother*. 16: 446-448, 2010. 査読有り
- ③ Yanagihara M, Tsuneoka H, Sugasaki M, Nojima J, Ichihara K. Multispacer Typing of *Bartonella henselae* Isolates from Humans and Cats, Japan. *Emerg Infect Dis*. 16: 1983-1985, 2010. 査読有り
- ④ Yanagihara M, Tsuneoka H, Hoshide S, Ishido E, Umeda A, Tsukahara M, Nojima J, Ichihara K, Hino K, Hirai I, Yamamoto Y. Molecular typing of *Bartonella henselae* DNA extracted from human clinical specimens and cat isolates in Japan. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 60: 44-48, 2010. 査読有り
- ⑤ Tsuneoka H, Yanagihara M, Otani S, Katayama Y, Fujinami H, Nagafuji H, Asari S, Nojima J, Ichihara K. A first Japanese case of *Bartonella henselae*-induced endocarditis diagnosed by prolonged culture of a specimen from the excised valve. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 68: 174-176, 2010. 査読有り
- ⑥ 野島順三, 宮川真由美, 児玉麻衣, 本木由香里, 常岡英弘, 市原清志, 日野田裕治. 自動分析装置 BM-1650 による酸化ストレス度の測定. *医学検査*, 59(3), 199-207, 2010. 査読有り
- ⑦ Nojima J, Iwatani Y, Ichihara K, Tsuneoka H, Ishikawa T, Yanagihara M, Takano T, Hidaka Y. Acquired activated protein C resistance is associated with IgG antibodies to protein S in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Res*. 124: 127-131, 2009. 査読有り
- ⑧ 野島順三. 社会人大学院で行う最先端臨床検査—抗リン脂質抗体症候群の病

態解明に関する研究—. *臨床病理 (日本臨床検査医学会誌)* 57(8): 786-791, 2009. 査読有り

- ⑨ Nojima J, Masuda Y, Iwatani Y, Kuratsune H, Watanabe Y, Suehisa E, Takano T, Hidaka Y, Kanakura Y. Arteriosclerosis obliterans associated with anti-cardiolipin antibody/ β 2-glycoprotein I antibodies as a strong risk factor for ischaemic heart disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 47: 684-689, 2008. 査読有り
- ⑩ Nojima J, Masuda Y, Iwatani Y, Suehisa E, Futsukaichi Y, Kuratsune H, Watanabe Y, Takano T, Hidaka Y, Kanakura Y. Tissue factor expression on monocytes induced by anti-phospholipid antibodies as a strong risk factor for thromboembolic complications in SLE patients. *Biochem Biophys Res Commun*. 365: 195-200, 2008. 査読有り
- ⑪ 増田有美子, 野島順三, 岩谷良則, 末久悦次, 二日市良彰, 日高洋, 金倉讓. 全血法によるエンドトキシン誘発単球表面組織因子発現量の測定と臨床応用. *日本検査血液学会雑誌* 9: 23-29, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- ① 野島順三. 抗リン脂質抗体症候群と臨床検査. 第 43 回中国四国医学検査学会シンポジウム II 形態検査部門「血栓症に迫る」2010 年 11 月 7 日 (松江) 島根県民会館
- ② 本木由香里, 野島順三. 自動分析装置 BM-1650 による酸化ストレス度の測定. 第 43 回中国四国医学検査学会 2010 年 11 月 6 日 (松江) 島根県民会館
- ③ 野島順三. 抗リン脂質抗体標準化: アジア地域における各種抗リン脂質抗体の基準値設定と人種差分析. 第 5 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム, 2010 年 10 月 30 日 (東京) 東医健保会館
- ④ 本木由香里, 野島順三. 全身性エリテマトーデス患者の動脈硬化性病態における抗リン脂質抗体の影響. 第 11 回日本検査血液学会学術集会, 2010 年 7 月 24-25 日 (東京) 東京ビックサイト
- ⑤ 野島順三. 抗カルジオリピン抗体, 抗プロトロンビン抗体 (aPT/PS) 測定の問題点: 我が国における基準範囲は? 第 4 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム, 2009 年 11 月 21 日 (東京)

- 慶応大学
- ⑥ 野島順三. 血小板・凝固・線溶機構と機能検査—凝固・線溶異常の診断プロセス, 大阪臨床検査技師会・血液検査部門, 2009年11月(大阪)(特別講演)あべのメディックス
 - ⑦ 野島順三. 抗リン脂質抗体症候群の診断と血栓形成機序, 第11回中国凝固線溶研究会, 2009年7月(広島)(特別講演)ホテルチューリッヒ東方2001
 - ⑧ 野島順三. 抗リン脂質抗体症候群の検査・診断から病態解明へ, ベックマンコールター・ヘマトロジー講演会 in Osaka 2009, 2009年3月(大阪)(特別講演)毎日新聞ビル オーバルホール

[図書] (計1件)

- ① 野島順三他 医学書院 検査と技術「免疫反応と臨床検査」, 2010, 959-961

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野島 順三 (NOJIMA JUNZO)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 30448071

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

市原 清志 (ICHIHARA KIYOSHI)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 1014495