

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390198

研究課題名（和文） 抗リン脂質抗体症候群の発症メカニズムの分子病態論的解析

研究課題名（英文） The analysis of molecular pathogenesis and mechanisms for antiphospholipid syndrome.

研究代表者

小池 隆夫 (KOIKE TAKAO)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80146795

研究成果の概要（和文）： β 2GPI のヒト血清中における主要な結合タンパクは酸化 LDL であり、酸化 LDL が抗リン脂質抗体症候群（APS）における血栓形成病態に関与する可能性がある。酸化 LDL 関連分子 LpPLA2 は APS に高発現しており、欧米の GWAS で明らかにされた LpPLA2 関連 SNP について検討したところ、APS 患者にこの SNP の異常が認められた。APS 患者に酸化 LDL が多い理由の一つに SNP の関与が示された。

研究成果の概要（英文）：Oxidized LDL was detected as a major β 2GPI binding plasma molecule by proteomics analysis. The presence of oxidized LDL upregulated aCL/ β 2GPI induced TF expression on monocytes, suggesting the involvement of oxidized LDL in the pathophysiology of thrombosis in patients with APS. LpPLA2, oxidized LDL related molecule, was higher expressed in plasma of patients with APS than those without. As performing SNP analysis for LpPLA2 related genes detected by GWAS, two risk alleles were more frequent in patients with APS compared to healthy controls, suggesting that gene anomaly in patients with APS was partially involved in high expression of oxidized LDL in patients with APS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	43,200,000	18,720,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：抗リン脂質抗体症候群、 β 2GPI、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群は後天性血栓性疾患として重要であり「抗リン脂質抗体」と呼ばれる多彩な自己抗体が病態に深く関与する。抗 β 2GPI 抗体を含むこれらの自己抗体がどのような分子学的メカニズムに基づいて血栓症を引き起こすかについて不明な点が多い。

2. 研究の目的

抗 β 2GPI 抗体と結合する分子の同定を行い、細胞表面の受容体、共役分子などの機能について、分子生物学、遺伝子学を含む各種生物学的手法を幅広く用いることで、抗リン脂質抗体の病原性、つまり「血栓形成機序」を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

β 2GPI に結合する分子をプロテオミクス解析により同定し、さらに申請者が既に明らかにした MyD88 から p38MAPK リン酸化、組織因子発現までの経路について解析を行った。FLAG タグ結合 β 2-GPI 発現ベクターを構築し、リコンビナント FLAG タグ β 2GPI を精製し、血漿サンプルと混合した。その混合物を使用し、抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより FLAG タグ β 2GPI と複合体を形成する蛋白質 (β 2GPI 関連プロテオーム) を網羅的に分離した。このサンプルを SDS-PAGE により分離し質量分析計を用いて関連分子を測定した。関連分子の同定後、それらに関連する遺伝子多型を調べ、抗リン脂質抗体症候群の血栓形成病態における遺伝学的関与を調べた。SNP 解析には APS 91 名 (PAPS 43 名、続発性 48 名)、APS を合併していない SLE 138 名、健常人 378 名の血液から採取した DNA を用いた。

4. 研究成果

質量分析計による検討の結果、 β 2GPI 関連分子としてアポリポrotein B100 (APOB) が検出された。APOB と β 2GPI の直接結合は ELISA で確認できず、酸化 low density lipoprotein (LDL) 中に含まれる β 2GPI の Ligand (=Ox-Lig1) を介して、 β 2GPI と酸化 LDL が血清中で結合している可能性が示唆された。マウス単球系細胞 (RAW264.7) を用い、WBCAL-1 抗体 (モノクローナル抗 CL/ β 2GPI 抗体) および酸化 LDL の存在、非存在下での単球の TF mRNA 発現を Realtime RT-PCR で検討したところ、酸化 LDL および WBCAL-1 抗体の存在下で非常に強い TF mRNA の発現亢進を認めた。 β 2GPI のヒト血清中における主要な結合タンパクは酸化 LDL と考えられ、酸化 LDL が抗リン脂質抗体症候群における血栓形成病態に関与する可能性が示唆された。

酸化 LDL 関連分子のリポ蛋白質関連フォスホリパーゼ A2 (LpPLA2) が、抗リン脂質抗体症候群患者に高発現することを見出した。LpPLA2 関連 GWAS より同定された 5 個の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) について解析したところ、APOE/APOC1 (rs4420638 A/G、第 19 染色体)、LpPLA2 (rs1805017 A/T、第 6 染色体) の 2 個の SNP が APS と関連していた。rs4420638 AG+GG 遺伝子型頻度は APS 患者に有意に多く (OR[95% C. I] = 1.69 [1.02 -2.79], p=0.0038)、rs1805017 CT+TT 遺伝子型頻度は APS 患者に有意に少なかった (OR[95% C. I] = 0.36 [0.18- 0.71], p=0.0028)。これらの結果から APS 患者に酸化 LDL が高発現する理由の一つに SNP の関与が示唆された。

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 20 件)

- ① Amengual O, Atsumi T, Oku K, Suzuki E, Horita T, Yasuda S, Koike T. Phospholipid scramblase 1 expression is enhanced in patients with antiphospholipid syndrome. *Mod Rheumatol*. 査読有 23(1):81-8, 2013. 10.1007/s10165-012-0642-9. Epub 2012 Apr 24.
- ② K Fukaya S, Matsui Y, Tomaru U, Kawakami A, Sogo S, Bohgaki T, Atsumi T, Koike T, Kasahara M, Ishizu A. Overexpression of TNF- α -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Lab Invest*. 93(1):72-80, 2013. 10.1038/labinvest. 査読有 2012. 153. Epub 2012 Nov 12.
- ③ Takamura A, Hirata S, Nagasawa H, Kameda H, Seto Y, Atsumi T, Dohi M, Koike T, Miyasaka N, Harugau M. A retrospective study of serum KL-6 levels during treatment with biological disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis patients: a report from the Ad Hoc Committee for Safety of Biological DMARDs of the Japan College of Rheumatology. *Mod Rheumatol*. 査読有 23(2):297-303, 2013. 10.1007/s10165-012-0658-1. Epub 2012 May 10.
- ④ Harigai M, Takamura A, Atsumi T, Dohi M, Hirata S, Kameda H, Nagasawa H, Seto Y, Koike T, Miyasaka N. Elevation of KL-6 serum levels in clinical trials of tumor necrosis factor inhibitors in patients with rheumatoid arthritis: a report from the Japan College of Rheumatology Ad Hoc Committee for Safety of Biological DMARDs. *Mod Rheumatol*. 査読有 23(2):284-96, 2013. 10.1007/s10165-012-0657-2. Epub 2012 May 17.
- ⑤ Kamishima T, Kato M, Atsumi T, Koike T, Onodera Y, Terae S. Contrast-enhanced whole body joint MR Imaging in rheumatoid patients on tumour necrosis factor-alpha agents: a pilot study to evaluate novel scoring system for

- MR synovitis Clin Exp Rheumatol. 査読有 31(1):154, 2013. Epub 2012 Nov 22.
- ⑥ Fujieda Y, Atsumi T, Amengual O, Odani T, Otomo K, Kato M, Oku K, Kon Y, Horita T, Yasuda S, Koike T. Predominant prevalence of arterial thrombosis in Japanese patients with antiphospholipid syndrome. Lupus; 査読有 21(14):1506-14, 2012. 10.1177/0961203312458469. Epub 2012 Aug 30.
- ⑦ Ebata S, Hashimoto S, Suzuki A, Ito M, Maoka T, Ishikawa Y, Mochizuki T, Koike T. A case of adefovir-induced membranous nephropathy related to hepatitis B caused by lamivudine-resistant virus after liver transplant due to Byler's disease. Clin Exp Nephrol. 査読有 16(5):805-10, 2012. 10.1007/s10157-012-0680-9. Epub 2012 Aug 22.
- ⑧ Odani T, Yasuda S, Ota Y, Fujieda Y, Kon Y, Horita T, Kawaguchi Y, Atsumi T, Yamanaka H, Koike T. Up-regulated expression of HLA-DRB5 transcripts and high frequency of the HLA-DRB5*01:05 allele in scleroderma patients with interstitial lung disease. Rheumatology (Oxford). 査読有 51(10):1765-74, 2012. Epub 2012 Jun 20.
- ⑨ Giannakopoulou B, Gao L, Qi M, Wong JW, Yu DM, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM, Atsumi T, Koike T, Hogg P, Qi JC, Krilis SA. Factor XI is a substrate for oxidoreductases: enhanced activation of reduced FXI and its role in antiphospholipid syndrome thrombosis. J Autoimmun. 査読有 39(3):121-9, 2012. 10.1016/j.jaut.2012.05.005. Epub 2012 Jun 13.
- ⑩ Takeuchi T, Miyasaka N, Tatsuki Y, Yano T, Yoshinari T, Abe T, Koike T. Inhibition of plasma IL-6 in addition to maintenance of an efficacious trough level of infliximab associated with clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: analysis of the RISING Study. Ann Rheum Dis. 査読有 71(9):1583-5, 2012. 10.1136/annrheumdis-2011-201069. Epub 2012 May 5.
- ⑪ Sakai R, Tanaka M, Nanki T, Watanabe K, Yamazaki H, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Atsumi T, Koike T, Nakajima A, Tamura N, Fujii T, Dobashi H, Tohma S, Sugihara T, Ueki Y, Hashiramoto A, Kawakami A, Hagino N, Miyasaka N, Harigai M; REAL Study Group. Drug retention rates and relevant risk factors for drug discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis patients receiving anticytokine therapy with different target molecules. Ann Rheum Dis; 71(11):1820-6, 2012.
- ⑫ Sakai R, Komano Y, Tanaka M, Nanki T, Koike R, Nagasawa H, Amano K, Nakajima A, Atsumi T, Koike T, Ihata A, Ishigatsubo Y, Saito K, Tanaka Y, Ito S, Sumida T, Tohma S, Tamura N, Fujii T, Sugihara T, Kawakami A, Hagino N, Ueki Y, Hashiramoto A, Nagasawa K, Miyasaka N, Harigai M; REAL Study Group. Time-dependent increased risk for serious infection from continuous use of tumor necrosis factor antagonists over three years in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Care Res; 査読有 64(8):1125-34, 2012. 10.1136/annrheumdis-2011-200838. Epub 2012 Apr 13.
- ⑬ Nakagawa Y, Kataoka H, Kurita T, Nakagawa H, Yasuda S, Horita T, Atsumi T, Koike T. [Impaired expression of Act1 mRNA in B cells of patients with Sjögren's syndrome]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 査読有 35(1):75-80, 2012.
- ⑭ Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Yoshinaga T, Freundlich B, Suzukawa M. Safety and effectiveness of switching from infliximab to etanercept in patients with rheumatoid arthritis: results from a large Japanese postmarketing surveillance study. Rheumatol Int. 査読有 32(6):1617-24, 2012. 10.1007/s00296-011-1807-0. Epub 2011 Feb 18.
- ⑮ Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Fujii K, Yoshinaga T, Freundlich B, Suzukawa M. Safety and effectiveness responses to etanercept for rheumatoid arthritis in Japan: a sub-analysis of a post-marketing surveillance study

focusing on the duration of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 査読有 32(6):1511-9, 2012.

10.1007/s00296-010-1784-8. Epub 2011 Feb 16.

- ⑯ Hirakawa E, Saito K, Hirata S, Atsumi T, Koike T, Tanaka Y. A case of catastrophic antiphospholipid antibody syndrome complicated with systemic lupus erythematosus, double positive for anti-cardiolipin/ β (2) glycoprotein I and anti-phosphatidylserine/prothrombin autoantibodies. *Mod Rheumatol.* 査読有 22(5):769-73, 2012.

10.1007/s10165-011-0563-z. Epub 2011 Nov 29.

- ⑰ Tanaka Y, Harigai M, Takeuchi T, Yamanaka H, Ishiguro N, Yamamoto K, Miyasaka N, Koike T, Kanazawa M, Oba T, Yoshinari T, Baker D; Golimumab in combination with methotrexate in Japanese patients with active rheumatoid arthritis: results of the GO-FORTH study. *Ann Rheum Dis.* 査読有 71(6):817-24, 2012.

10.1136/ard.2011.200317. Epub 2011 Nov 25.

- ⑱ Koike T, Harigai M, Ishiguro N, Inokuma S, Takei S, Takeuchi T, Yamanaka H, Tanaka Y. Safety and effectiveness of adalimumab in Japanese rheumatoid arthritis patients: postmarketing surveillance report of the first 3,000 patients. *Mod Rheumatol.* 査読有 22(4):498-508, 2012.

10.1007/s00296-010-1784-8. Epub 2011 Feb 16.

- ⑲ Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Horita T, Yasuda S, Koike T. The efficacy of antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum.* 査読有 64(2):504-12, 2012.

10.1002/art.33340.

- ⑳ Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsuhashi M, Kamishima T, Atsumi T, Koike T. Positive synovial vascularity in patients with low disease activity indicates smouldering inflammation leading to joint damage in rheumatoid arthritis: time-integrated joint inflammation estimated by synovial

vascularity in each finger joint. *Rheumatology.* 査読有 52(3):523-8, 2012. 10.1093/rheumatology/kes310. Epub 2012 Nov 28.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Koike, T. ” Catastrophic Antiphospholipid Syndrome;CAPS ”, Manila, Philippines, Asian Lupus Summit 2012, November 29-30, 2012 Shangri-La Hotel (Philippines)

- ② Koike, T. ” New Concepts in Antiphospholipid syndrome”, Manila, Philippines, Asian Lupus Summit 2012, November 29-30, 2012 Shangri-La Hotel (Philippines)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 隆夫 (KOIKE TAKAO)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80146795

(2) 研究分担者

渥美 達也 (ATSUMI TATSUYA)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20301905

(3) 連携研究者

()

研究者番号：