

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（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591074

研究課題名（和文） 抗プロトロンビン自己抗体の病原性の分子生物学的検討

研究課題名（英文） Pathogenesis of autoantibodies against prothrombin

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では抗リン脂質抗体症候群(APS)にみられる自己抗体の主要な対応抗原のひとつであるプロトロンビンに注目し、抗プロトロンビン抗体がどのように血栓傾向と関連するかを検討した。抗プロトロンビン抗体は、向血栓細胞である単球や血管内皮細胞に結合してそれらを活性化する。その際、細胞膜表面に発現するリボフォリン II がプロトロンビンの受容体として機能する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this research was to clarify how autoantibodies against prothrombin, one of the major markers of antiphospholipid syndrome(APS), are related with thrombophilia in patients with APS. The antiprothrombin antibodies affected endothelial cells or monocytes, leading to the over-expression of procoagulant substances. In this procedure, ribopholin II, present on cell surface, was likely to be involved as a receptor of prothrombin molecule.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,400,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,390,000

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、血栓症、自己免疫、ループスアンチコアグラント

1. 研究開始当初の背景

血栓症とその関連疾患は、我が国の直接死因あるいは生活の制限の原因としてもっとも重要な疾患のひとつである。多くの患者で血栓傾向の理由は明らかでないが、最近抗リン脂質抗体症候群(APS)とよばれる自己免疫性血栓症が高頻度に存在することがわかってきた。APSを定義する国際基準は申請者も含めたコミッティーで議論され決定された。APS患者にみられる抗リン脂質抗体は免疫学的に多様性に富んでいる。はじめに明らかにされた抗リン脂質抗体の対応抗原は $\beta 2$ グリコプロテインI($\beta 2$ GPI)である。 $\beta 2$ GPIがそれまで抗カルジオリピン抗体とよばれていた抗リン脂質抗体の対応抗原であることが明らかにされ、以後 $\beta 2$ GPI分子を中心に抗リン脂質抗体の免疫学的特徴や血栓形成機序の研究がおこなわれてきた。次に注目された抗リン脂質抗体の対応抗原として、凝固第II因子であるプロトロンビンがある。申請者はホスファチジルセリンに結合したプロトロンビンを抗原としたELISA(ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体)を樹立し、この方法で極めてAPSに特異度の高い抗体を検出できることをはじめて見出した。

2. 研究の目的

$\beta 2$ GPIおよびプロトロンビンに対する自己抗体の特質や、APSの血栓機序を明らかにすることにより、APSにおいて特異的、確実な診断方法そして抗血栓療法が可能となり、やがては現在「特発性」とされている難治性血栓疾患の原因解明や治療法確立のきっかけになることを本研究の最終目的とする。また、APSは自己抗体が直接おこす代表的な疾患であり、本研究が難治性病態を多く合併する膠原病・全身性自己免疫疾患の克服へのモデルとなることもあわせて期待

したい。

3. 研究の方法

ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の向血栓細胞活性化の機序の解明：プロテオミクスによる検討

プロテオミクスとは、タンパク質の大規模、網羅的、包括的解析である。プロテオミクスはタンパク質の同定、タンパク質のプロファイリング、さらにタンパク質相互作用解析によりなるが、タンパク質の同定・プロファイリングについては、二次元電気泳動によるプロテオーム可視化と微量のタンパク質でもきわめて高精度に修飾まで含めて同定できる質量分析により行う。これまでの検討により、FLAG結合プロトロンビンを作成し、それを精製して、単球系セルラインの細胞溶解液と混和した。抗FLAG抗体アフィニティークロマトグラフィーによりFLAGタグプロトロンビンと複合体を形成するタンパク質(プロトロンビン関連プロテオーム)を網羅的に分離した。このサンプルをSDS-PAGEにより分離し一次元電気泳動のバンドあるいは二次元電気泳動のスポットとして可視化した。

上記にて可視化できたバンドあるいはスポットをプロテアーゼによりゲル内消化し、抽出したペプチド混合物を脱塩し、試料の一部をMALDI-TOFを用いて測定し、マスフィンガープリンティング法によりデータベースを検索する。もしくはSDS-PAGEのバンドに関係なくゲルを数10に均等に切り出し、すべてをESI-LC-MS/MSにより解析する。さらにそのタンパク質の存在の有無によるホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体による細胞刺激シグナルの変動について、ウエスタンブロッティング法、ルシ

フェラーゼアッセイおよびセル ELISA により解析を行う。同定不能であれば、de novo シークエンス法により、より長いアミノ酸配列を読み取る。配列から蛋白データベースの検索を行い、遺伝子クローニングを行った。

4. 研究成果

質量分析により糖転移酵素である RibophorinII (RPN2) がプロトロンビン結合タンパクとして同定された。候補タンパクとプロトロンビンとの結合は、cotransfection assay では確認できたが、その親和性を SPR で測定するには至らなかった。RPN2 が細胞表面に出現しているという報告がなかったので、抗 RPN2 抗体を用いたフローサイトメトリー、免疫染色などにより、RPN2 の細胞表面の存在を示した。プロテオミクス解析からプロトロンビン結合タンパクの候補として RPN2 が同定されたが、同分子の病態における関与は今後の研究によって証明されるであろう。

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 23 件)

1. Oku K, Amengual O, Zigon P, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. Essential role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the tissue factor gene expression by the phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody. *Rheumatol* (in press) 査読有
2. Kato M, Atsumi T, Oku K, Amengual O, Nakagawa H, Fujiedal Y, Otomo K, Horita T, Yasuda S, Koike T. The involvement of CD36 in the monocyte activation by antiphospholipid antibodies. *Lupus* (in press) 査読有

3. 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.
4. 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*. 査読有 93(1):72-80, 2013. 10.1038/labinvest.2012.153. Epub 2012 Nov 12.
5. 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. Epub 2012 Nov 22
6. 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. 10.1007/s10165-012-0658-1. Epub 2012 May 10.
7. Kameda H, Kanbe K, Sato E, Ueki Y, Saito K, Nagaoka S, Hidaka T, Atsumi T, Tsukano M, Kasama T, Shiozawa S, Tanaka Y, Yamanaka H, Takeuchi T. A

- merged presentation of clinical and radiographic data using probability plots in a clinical trial, the JESMR study. *Ann Rheum Dis* 72:310-2, 2013. 10.1136/annrheumdis-2012-201804. Epub 2012 Sep 12. 査読有
8. 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.
 9. 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.
 10. Giannakopoulod 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. *JAutoimmun.* 査読有 39(3):121-9, 2012. 10.1016/j.jaut.2012.05.005. Epub 2012 Jun 13.
 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*; 査読有 71(11):1820-6. 2012. 10.1136/annrheumdis-2011-200838. Epub 2012 Apr 13.
 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 Act1mRNA in B cells of patients with Sjögren's syndrome]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 査読有 35(1):75-80. 2012.
 14. 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.
15. 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.
 16. Fukae J, Isobe M, Kitano A, Henmi M, Sakamoto F, Narita A, Ito T, Mitsuzaki A, Shimizu M, Tanimura K, Matsushashi 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.* 52(3):523-8, 2012. 10.1093/rheumatology/kes 査読有 310. Epub 2012 Nov 28.
 17. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G, Takahashi H, Tada Y. Risk modification by CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in the association of cigarette smoking and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Scand J Rheumatol* 査読有 41:103-9, 2012. 10.3109/03009742.2011.608194. Epub 2012 Jan 4.
 18. Noda S, Ogura M, Tsutsumi A, Udagawa T, Kamei K, Matsuoka K, Kitamura H, Atsumi T, Ito S. Thrombotic microangiopathy due to multiple autoantibodies related to antiphospholipid syndrome. *Pediatr Nephrol* 査読有 4: 681-5, 2012. 10.1007/s00467-011-2085-5. Epub 2011 Dec 31.
 19. Ozaki S, Atsumi T, Hayashi T, Ishizu A, Kobayashi S, Kumagai S, Kurihara Y, Kurokawa MS, Makino H, Nagafuchi H, Nakabayashi K, Nishimoto N, Suka M, Tomino Y, Yamada H, Yamagata K, Yoshida M, Yumura W. Severity-based treatment for Japanese patients with MPO-ANCA-associated vasculitis: the JMAAV study. *Mod Rheumatol* 査読有 22: 394-404, 2012. 10.1007/s10165-011-0525-5. Epub 2011 Sep 18.
 20. Kato M, Atsumi T. Management of resolved hepatitis B in patients with low anti-hepatitis B surface titer who undergo aggressive immunosuppressive therapy: reply to the letter by Mori. *J Rheumatol* 査読有 39:1293-4, 2012. 10.3899/jrheum.120117
 21. Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed OW, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. A Genome-Wide Association Study Identified AFF1 as a Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus in Japanese. *PLoS Genet* 査読有 8:e1002455, 2012. 10.1371/journal.pgen.1002455. Epub 2012 Jan 26.
 22. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G, Tada Y, Takahashi H. Cigarette Smoking, Alcohol Consumption, and Risk of Systemic Lupus Erythematosus: A Case-control Study in a Japanese

Population. J Rheumatol 査読有
39:1363-70, 2012.
10.3899/jrheum.111609. Epub 2012 May 15.
10.1111/j.1365-2362.2012.02697.

23. Oku K, Amengual O, Atsumi T.
Pathophysiology of thrombosis and
pregnancy morbidity in the
antiphospholipid syndrome. Eur J Clin
Invest 査読有 42. 1126-35, 2012.
10.1111/j.1365-2362.2012.02697. x

[学会発表] (計1件)

1. Atsumi T. Phosphatidylserine
dependent antiprothrombin
antibodies significance and
international standardization. 58th
Annual Scientific and Standardization
Committee Meeting, International
Society on Thrombosis and Haemostasis,
Liverpool, 28-30 June 2012

[図書] (計3件)

1. 渥美達也:「抗リン脂質抗体症候群」。875-6
(永井良三、大田健編集:今日の治療と看護
改訂第3版、南江堂、東京) (2013)
2. 坊垣暁之、渥美達也:「全身性エリテマト
ーデス」。224-5 (田中良哉 編:免疫・
アレルギー疾患の分子標的と治療薬事典、
羊土社、東京) (2013)
3. 藤枝雄一郎、渥美達也:「抗リン脂質抗体
症候群」。453-7 (金倉譲、木崎昌弘、鈴木
律朗、神田善伸編集:EBM 血液疾患の治療
2013-2014、中外医学社、東京) (2012)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者
()
研究者番号:

(3)連携研究者
()
研究者番号: