

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590681

研究課題名(和文) SLEおよび抗リン脂質抗体症候群における自己抗体の病態形成活性検出法の検討

研究課題名(英文) Detection of pathogenic activity of the autoantibodies in SLE and antiphospholipid syndrome

研究代表者

窪田 哲朗 (Kubota, Tetsuo)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号：90205138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：全身性エリテマトーデスや抗リン脂質抗体症候群における病態形成性自己抗体の選択的検出を目指して、まず、抗DNA抗体や抗リン脂質抗体がどのように病態形成に関わっているのかを検討した。その結果、リン脂質と交差反応する抗DNA抗体の一部は単球に組織因子の発現を誘導すること、マクロファージ様細胞にBAFFやIL-1の発現を誘導することなどが明らかになり、自己抗体が病態形成にも関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this study is selective detection of pathogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid syndrome. For the first step, we studied whether anti-DNA and antiphospholipid antibodies have activities to induce expression of specific molecules which have been suggested to play a role in the pathogenesis. Some antibodies cross-reactive with DNA and phospholipid induced expression of tissue factor in monocytes, and BAFF or IL-1 in macrophage-like cells, suggesting that these autoantibodies have pathogenic activities.

研究分野：免疫血清学

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 抗DNA抗体 抗リン脂質抗体

1. 研究開始当初の背景

膠原病では種々の自己抗体が検出されるが、それらが病態形成にどのように関わっているかについては不明の点が多い。たとえば全身性エリテマトーデス(SLE)では、抗 DNA 抗体と DNA の免疫複合体が沈着して III 型アレルギーの機序で腎炎を惹起するとされているが、免疫複合体が沈着するだけでは腎炎を発症するとは限らないし、まして腎炎以外の病態の発症機序については不明の点が多い。

そのような中で、SLE の病態形成における IFN- γ や BAFF (B cell activating factor) などのサイトカインの重要性を示唆する研究結果が報告されている。私たちも、患者血清および患者末梢血細胞を用いた検討で、SLE 患者では IFN- γ 産生能が更新していること、それが単球に BAFF 産生を誘導すること、さらに SLE の単球は、健常人の単球より BAFF 産生能が亢進していることを報告してきた (Harigai, Kubota, et al. J Immunol 2008)。

また、抗リン脂質抗体症候群(APS)は、動脈血栓症、妊娠合併症を繰り返す、血清中に抗リン脂質抗体が検出される症候群で、SLE との合併例が多い。抗リン脂質抗体の中でも、とくにカルジオリピン- β 2 グリコプロテイン I 複合体 (CL- β 2GPI) と反応する抗体が検出される症例に血栓症の頻度が高いことが知られ、臨床検査でも測定されている。しかし、抗 CL- β 2GPI 抗体がどのような機序で血栓症を引き起こすのかは、充分解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、抗 DNA 抗体が SLE の病態形成にどのように関わるか、抗リン脂質抗体がどのように APS の病態を引き起こすか、SLE と APS は何故合併しやすいのか、などの点を明らかにすることを目的として計画された。このような研究によって病態形成性抗体の特徴が明らかにされ、そのような抗体を選択的に検出する方法が開発されれば、臨床的に有用性の高い新しい臨床検査法の開発につながる可能性もある

3. 研究の方法

(1) 抗体

マウスモノクローナル抗体 2C10 (IgG2b, κ) および H241 (IgG2b, κ) は SLE 様病態を自然発症する MRL/lpr マウス由来、WB-6 は APS 様病態を自然発症する (NZWxBXSB) F1 マウス由来で、いずれも dsDNA 結合活性

をもつ。さらに H241 と WB-6 は、CL- β 2GPI とも反応する。対照として dsDNA, CL- β 2GPI いずれとも結合しないマウスモノクローナル抗体 MPC-11 (IgG2b, κ) を用いた。各抗体産生細胞の培養上清を 4°C で攪拌しながら、50% 飽和硫酸アンモニウムで塩析した後、Protein G カラムを用いて精製したものを使用した。

(2) 細胞

ヒト末梢血単核球(PBMC)は、健常人末梢血より比重遠心法で分離した。PBMC およびヒト急性単球性白血病細胞株(THP-1)は、10% 牛胎児血清、1% 非必須アミノ酸、2 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを加えた RPMI-1640 培地で培養した。

THP-1 を 24 well 細胞培養プレートに撒き (2×10^5 cells/well), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を終濃度濃度 5 ng/ml になるように加え、37 °C, 5% CO₂ インキュベーターで 2 日間培養したものを、マクロファージ様に分化した細胞として使用した。

(3) リアルタイム PCR

PBMC は 48 well 細胞培養プレートに (1×10^6 cells/200 μ l/well), PMA 処理 THP-1 細胞は 24 well 細胞培養プレートに撒き (2×10^5 cells/200 μ l/well), 2C10, WB-6, H241, MPC-11 を 10 μ g/ml, または LPS を 25 ng/ml 加え、37 °C, 5% CO₂ インキュベーターで 3 時間培養した。Isogen II™ (ニッポン・ジーン) を用いて total RNA を抽出し、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR™ を用いて cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR の反応は、各プライマー 3 pmol, テンプレート cDNA 10 ng, Sybr Fast qPCR Master Mix 2x Universal (KAPA Biosystems) 5 μ l の全量 10 μ l で行った。Illumina Eco™ (Illumina) を用いて、GAPDH の発現を基準とした遺伝子の相対的な発現量を数値化した。

4. 研究成果

健常人 PBMC に抗 DNA 抗体を添加して、3 時間後に total RNA を回収、血栓形成傾向をもたらす組織因子(TF)および、SLE の病態との関わりが示唆されているサイトカイン BAFF と IFN- γ の mRNA 発現をリアルタイム PCR で検討した。その結果、WB-6 と H241 は陰性コントロールとして用いた MPC-11

と比べて、有意に TF mRNA の発現を亢進させた (図 1)。この実験条件では 2C10 による TF mRNA 発現は有意ではなかった。いずれの抗体も、PBMC に BAFF や IFN- γ の mRNA 発現を誘導する活性は示さなかった。

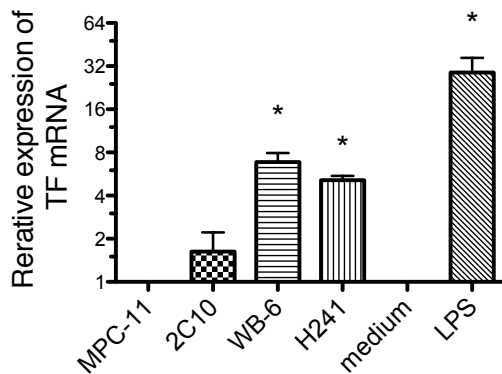


図 1 抗 DNA 抗体による PBMC の TF 発現誘導. 健康人 PBMC に各抗 DNA 抗体を加えて 3 時間培養した後、TF 遺伝子の GAPDH に対する相対的発現量をリアルタイム PCR で測定した。

つぎに、PMA で分化させたマクロファージ様細胞に抗 DNA 抗体を添加して、3 時間後に、TF、BAFF および、自然免疫の初期炎症に主要な役割を果たす IL-1 β の mRNA の発現を、リアルタイム PCR で検討した。その結果 WB-6 と H241 は BAFF mRNA 発現を亢進させた (図 2)。また、H241 は IL-1 β mRNA の発現を亢進させた (図 3)。しかし、いずれの抗体も TF mRNA の発現を亢進させることはなかった。

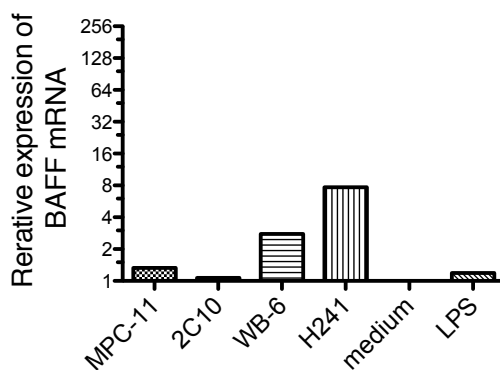


図 2 抗 DNA 抗体によるマクロファージ様細胞の BAFF mRNA 発現誘導. PMA 処理 THP-1 細胞を各抗 DNA 抗体を加えて 3 時間培養した後、BAFF 遺伝子の相対的発現量をリアルタイム PCR で測定した。

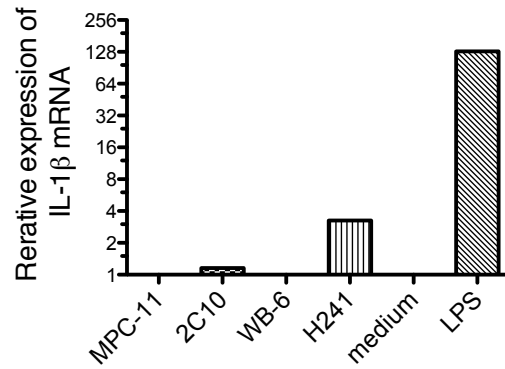


図 3 抗 DNA 抗体によるマクロファージ様細胞の IL-1 β mRNA 発現誘導. PMA 処理 THP-1 細胞に各抗 DNA 抗体を加えて 3 時間培養した後、IL-1 β 遺伝子の相対的発現量をリアルタイム PCR で測定した。

以上の結果より、CL- β 2GPI とも交差反応する抗 DNA 抗体は、単球に結合して血栓形成傾向を誘導し、APS を引き起こす可能性があることが示唆された。さらに、そのような抗体はマクロファージ様細胞に BAFF や IL-1 β の発現を誘導して、SLE の病態を悪化させる可能性があることが示唆された。

このように、抗 DNA 抗体は従来知られていなかった機序により、SLE の病態形成に関わっていることが考えられる。しかし、上記の実験において抗 DNA 抗体が細胞に結合する機序は不明であり、そのような点を含めて今後検討を続ける必要がある。

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 8 件) (すべて査読あり)

- 1) Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM, Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, Ohara O, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yagüe J,

- Nishikomori R, Aróstegui JI. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis* 74:603-610, 2015.
- 2) Ito S, Hara Y, Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther* 16:R52, 2014. (doi: 10.1186/ar4483)
 - 3) Shimogaki S, Ito S, Komatsu S, Koike R, Miyasaka N, Umezawa K, Kubota T. Inhibition of the NF- κ B pathway as a candidate therapeutic strategy for cryopyrin-associated periodic syndrome. *Mod Rheumatol* 24:517-524, 2014.
 - 4) Takayasu A, Miyabe Y, Yokoyama W, Kaneko K, Miyabe C, Fukuda S, Kubota T, Miyasaka N, Nanki T. CCL18 activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 40:1026-1028, 2013.
 - 5) Yamamoto A, Morio T, Kumaki E, Yamazaki H, Iwai H, Kubota T, Miyasaka N, Kohsaka H. A case of pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne (PAPA) syndrome accompanied by nephrosclerosis, splenomegaly and intestinal lesions. *J Genet Syndr Gene Ther* 4:183, 2013. (doi: 10.4172/2157-7412.1000183)
 - 6) Nanki T, Onoue I, Nagasaka K, Takayasu A, Ebisawa M, Hosoya T, Shirai T, Sugihara T, Hirata S, Kubota T, Harigai M, Miyasaka N. Suppression of elevations in serum C-reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. *Ann Rheum Dis* 72:1100-1102, 2013.
 - 7) Nishimura M, Nii T, Trimova G, Miura S, Umezawa K, Ushiyama A, Kubota T. The NF- κ B specific inhibitor DHMEQ prevents thrombus formation in a mouse model of antiphospholipid syndrome. *J Nephropathol* 2:114-121, 2013.
 - 8) Suzuki F, Kubota T, Miyazaki Y, Ishikawa K, Ebisawa M, Hirohata S, Ogura T, Mizusawa H, Imai T, Miyasaka N, Nanki T. Serum level of soluble CX3CL1/fractalkine is elevated in patients with polymyositis and dermatomyositis, which is correlated with disease activity. *Arthritis Res Ther* 14:R48, 2012. (doi: 10.1186/ar3761)
- [学会発表] (計 11 件)
- 1) 渡邊浩基, 野口佳裕, 伊藤卓, 高橋正時, 小池竜司, 窪田哲朗. Muckle-Wells 症候群における聴平衡障害の検討. 第 59 回日本聴覚医学会, 下関 (山口), 2014 年 11 月 27~28 日.
 - 2) Ito S, Tagami C, Hara Y, Kubota T. A possible mechanism of NLRP3 inflammasome hypersensitivity in cryopyrin-associated periodic syndrome. 2013 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, San Diego, CA, USA, October 25-30, 2013.
 - 3) 中川権史, 井澤和司, 西小森隆太, 河合朋樹, 八角高裕, 津下充, 小林法元, 河島尚志, 谷口敦夫, 窪田哲朗, 松林正, 平家俊男. CAPS に対するアナキンラ治療の有効性及び安全性の後方視的検討. 第 57 回日本リウマチ学会, 京都, 2013 年 4 月 18~20 日.
 - 4) Takahashi S, Kubota T. Inhibition of the NF- κ B pathway as a candidate strategy for treatment of cryopyrin-associated periodic syndrome. 12th Meeting of the Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine, Kyoto, November 29-December 1, 2012.
 - 5) Ito S, Iwata M, Kubota T. Simultaneous inhibition of NF- κ B and caspase-1 by a cell-permeable compound DHMEQ leads to potent suppression of IL-1 β . 12th Meeting of the Asian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine, Kyoto, November 29-December 1, 2012.
 - 6) 高安愛子, 宮部斉重, 金子佳代子, 宮部千恵, 横山和佳, 福田真, 窪田哲朗, 宮

坂信之, 南木敏宏. CCL18 による関節リウマチ線維芽細胞様滑膜細胞の活性化. 第 56 回日本リウマチ学会, 東京, 2012 年 4 月 26~28 日.

- 7) 山本晃央, 山崎隼人, 窪田哲朗, 上阪等, 宮坂信之. 若年性特発性関節炎とクローン病の疑いと診断されていた PAPA 症候群の一例. 第 56 回日本リウマチ学会, 東京, 2012 年 4 月 26~28 日.
- 8) 梅澤夏佳, 小池竜司, 窪田哲朗, 野口佳裕, 宮坂信之. 新生児期に発症し, 成人後に診断に至った Muckle-Wells 症候群の 1 例. 第 587 回日本内科学会関東地方会, 東京, 2012 年 5 月 12 日.
- 9) 高橋里河, 窪田哲朗. NF- κ B 経路はクリオピリン関連周期熱症候群の病態発現に主要な役割を果たしている. 第 7 回日本臨床検査学教育学会, 名古屋, 2012 年 8 月 22~24 日.
- 10) 伊藤さやか, 原諭吉, 窪田哲朗. NLRP3 インフラマソームの制御機構. 第 40 回日本臨床免疫学会, 東京, 2012 年 9 月 27~29 日.
- 11) 高橋里河, 窪田哲朗. クリオピリン関連周期熱症候群の病態形成には NF- κ B 経路が重要である. 第 59 回日本臨床検査医学会, 京都, 2012 年 11 月 29 日~12 月 2 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 哲朗 (KUBOTA, Tetsuo)
東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・教授
研究者番号 : 90205138