

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590696

研究課題名(和文)抗リン脂質抗体症候群の新たな鑑別診断法の確立と病態発症機序の解明

研究課題名(英文) A novel ELISA system for simultaneous detection of six subclasses of anti-phospholipid antibodies for prediction of thrombotic complications among SLE patients with anti-phospholipid syndrome

研究代表者

野島 順三 (NOJIMA, Junzo)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30448071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：APSの基礎疾患として代表的な全身性エリテマトーデス患者を対象に、6種類の抗リン脂質抗体をELISAにて同時測定し、APSに関連する各種合併症発症およびLA活性発現との関連を解析した。その結果、動脈血栓症の最も強い危険因子としてaPS/PTが、静脈血栓症の危険因子としてa 2GPIが特定された。また、習慣性流死産の発症にはaCL/ 2GPIとaPS/PTが関連していた。

今後は、複数の抗リン脂質抗体をELISAにて同時に測定し、患者血中に存在する抗リン脂質抗体のタイプの決定と抗体価の定量がAPSの検査診断として重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We newly developed an ELISA system for simultaneous detection of six specific categories of aPLs: anti-cardiolipin (aCL), anti- 2-glycoprotein I (a 2GPI), anti-cardiolipin/ 2-glycoprotein I (aCL/ 2GPI), anti-phosphatidylserine (aPS), anti-prothrombin (aPT), and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT). They were measured in 331 patients with SLE including 63 patients with arterial thromboembolic complications, 64 with venous thromboembolic complications, and 43 with recurrent fetal loss. The concentration of aPS/PT was most closely associated with arterial thrombosis. In contrast, the concentration of a 2GPI was most closely related to venous thrombosis. Furthermore, both aCL/ 2GPI and aPS/PT were independently associated with episodes of recurrent fetal loss.

Anti-phospholipid syndrome in patients with SLE can be classified by antigenic specificities of their aPLs as to their susceptibility to arterial and/or venous thromboembolic complications or obstetric complications.

研究分野：血栓止血学

キーワード：抗リン脂質抗体 全身性エリテマトーデス ELISA

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 (脳血管障害・虚血性心疾患・深部静脈血栓症・肺塞栓症・閉塞性動脈硬化症・習慣性流死産など) を特徴とする自己免疫性血栓性疾患である。

これまでの研究で、抗リン脂質抗体は抗原特異性が多様であり、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 (aCL)・抗β₂-グリコプロテイン抗体 (aβ₂GPI)・抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体 (aPS/PT)・抗アネキシン抗体 (aAN)・抗アネキシン抗体 (aAN)・抗プロテイン S 抗体 (aPS)・抗キニノゲン抗体 (aKN) など、同一の患者血中に数種類の抗体が混在していることが明らかとなっているが、各種抗リン脂質抗体を同時に鑑別測定できる検査法は確立されていない。さらに、それぞれの抗リン脂質抗体が持つ疾患特異性や血栓形成作用は殆ど解明されていない。

2. 研究の目的

APS では、血中に多種多様な抗リン脂質抗体が混在し、その種別で血栓形成機序が異なることから、出現する抗体の組み合わせで APS 特有の多彩な合併症 (脳梗塞・心筋梗塞・肺塞栓症・習慣性流死産など) が生じることを、我々はこれまでの研究で先駆的に明らかにしてきた。

本研究では、各抗体を認識エピトープ別に同時測定できる Multiplex-ELISA を開発し、そのタイピングにより APS の合併症パターンを的確に予測できる新たな検査診断法を確立する。さらに、患者から同定された抗体を認識エピトープ別に単離・精製し、分子レベルで各抗体の血栓形成機序 (組織因子発現・サイトカイン産生・酸化ストレス発現) を総合的に解明する。

3. 研究の方法

(1) 認識エピトープ別抗リン脂質抗体 ELISA の開発と新たな APS 鑑別診断検査法の確立

APS の基礎疾患として代表的な全身性エリテマトーデス患者を対象に、6 種類の抗リン脂質抗体 (抗カルジオリピン抗体, 抗カルジオリピン/β₂ グリコプロテイン抗体: aCL/β₂GP, 抗β₂ グリコプロテイン抗体: aβ₂GP, 抗ホスファチジルセリン抗体, 抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体: aPS/PT, 抗プロトロンビン抗体) を ELISA にて同時測定し、APS に関連する各種合併症発症および LA 活性発現との関連を解析した。

(2) 各種抗リン脂質抗体の血栓形成作用の解明

代表的な APS 患者血漿から Protein G カラムと抗原カラムクロマトグラフィーの手法を用いて認識エピトープ別に各種抗リン脂質抗体を単離・精製する。そして、正常ヒト臍帯動脈内皮細胞 (HUAEC) と末梢単核球細胞 (PBMC) の共培養実験系にて、細胞表面 TF および接着分子の発現・各種サイトカインの産生・酸化ストレスの発現等を促進させる抗体のエピトープを特定する。

細胞 (PBMC) の共培養実験系にて、細胞表面 TF および接着分子の発現・各種サイトカインの産生・酸化ストレスの発現等を促進させる抗体のエピトープを特定する。

4. 研究成果

(1) APS の基礎疾患として代表的な全身性エリテマトーデス患者を対象に、6 種類の抗リン脂質抗体を ELISA にて同時測定し、APS に関連する各種合併症発症および LA 活性発現との関連を解析した。その結果、動脈血栓症の最も強い危険因子として aPS/PT が、静脈血栓症の危険因子として aβ₂GPI が特定された (図 1, 2)。また、習慣性流死産の発症には aCL/β₂GPI と aPS/PT が関連していた (図 3)。さらに、LA 活性の発現には、β₂GPI に対する抗リン脂質抗体と PT に対する抗リン脂質抗体がそれぞれ独立して関連しており、特に aPS/PT の存在が LA 活性の発現に強く関連していることが示唆された (図 4)。

今後は、複数の抗リン脂質抗体を ELISA にて同時に測定し、患者血中に存在する抗リン脂質抗体のタイプの決定と抗体価の定量が APS の検査診断として重要であると考えられる。

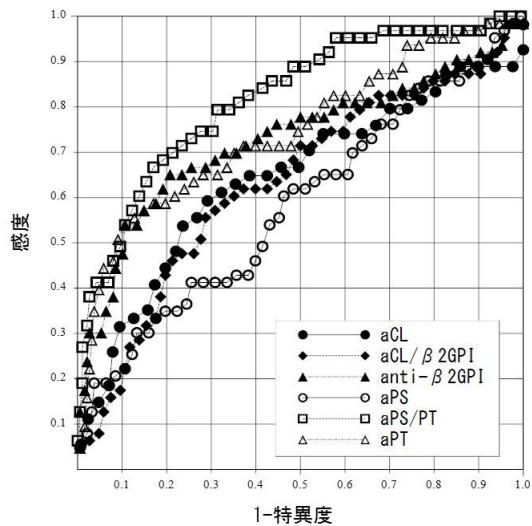


図1. 動脈血栓症に対する各種抗リン脂質抗体の関連性

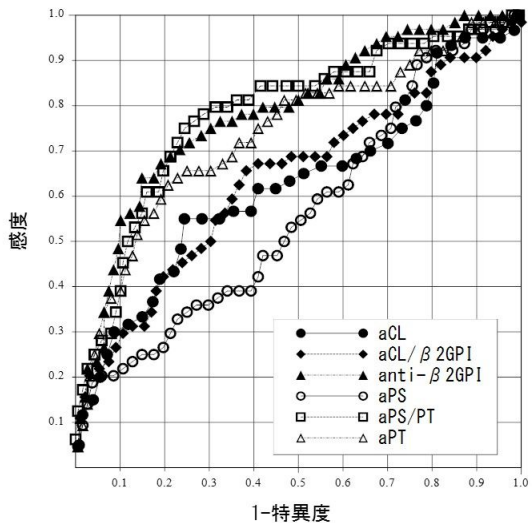


図2. 静脈血栓症に対する各種抗リン脂質抗体の関連性

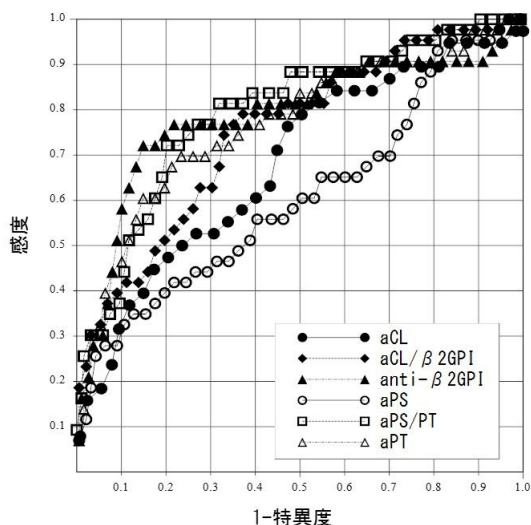


図3. 習慣流産に対する各種抗リン脂質抗体の関連性

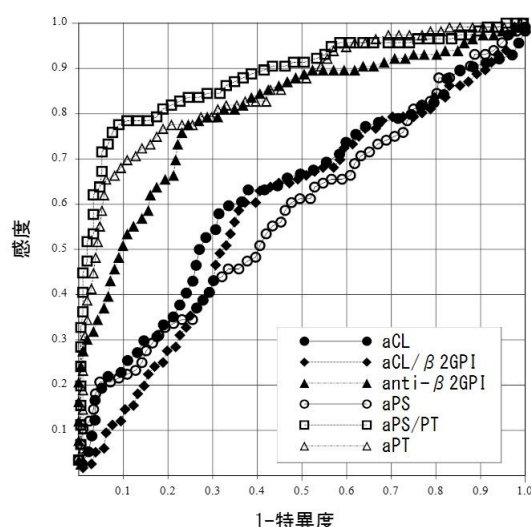


図4. LA活性に対する各種抗リン脂質抗体の関連性

(2) 代表的な APS 患者血漿 (aβ2GPI と aPS/PT が共に陽性の患者 5 例、aβ2GPI 単独陽性患者 3 例・aPS/PT 単独陽性患者 2 例) から純化・精製した IgG 抗体を用いた末梢単核球細胞 (PBMC) 刺激実験にて、aβ2GPI-IgG と aPS/PT-IgG は、それぞれ単独で単球表面への組織因子 (TF) 発現、培養液中への炎症性サイトカイン (TNFα・IL-1β) の産生、さらには単球走化性活性化因子 (MCP-1) の産生を惹起することを明らかにした。さらに、これらの作用は aβ2GPI と aPS/PT が共に陽性の IgG にて強力に促進されることを確認した。

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 7 件)

Nojima J, Motoki Y, Aoki N, Tsuneoka H, Ichihara K. A novel ELISA system for simultaneous detection of six subclasses of anti-phospholipid antibodies for prediction of thrombotic complications among SLE patients. *Thromb Res.* 133(6): 1135-1140, 2014. (査読有)
DOI: 10.1016/j.thromres.2014.03.032

本木由香里, 青木なつみ, 常岡英弘, 市原清志, 野島順三. Multiple aPL-ELISAs を用いた抗リン脂質抗体症候群検査診断の有用性. *日本検査血液学会雑誌.* 15(2): 154-161, 2014. (査読有)

Yamamoto S, Kishishita Y, Yoshida M, Miura D, Suzuki H, Ishikawa K, Miyazaki H, Nojima J, Yamamoto M, Ishikawa T. Activation of different signals identified with glia cells contribute to the progression of hyperalgesia. *Cell Mol Neurobiol.* 33(2): 167-174, 2013. (査読有)

DOI: 10.1007/s10571-012-9881-8

Tsuruoka K, Tsuneoka H, Kawano M, Yanagihara M, Nojima J, Tanaka T, Yamamoto M, Ichihara K. Evaluation of IgG ELISA using N-lauroyl-sarcosine-soluble proteins of *Bartonella henselae* for highly specific serodiagnosis of cat scratch disease. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 74(3): 230-235, 2012 (査読有)

DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.028

Matsui T, Tasaki M, Yoshioka T, Motoki Y, Tsuneoka H, Nojima J. Temperature- and time-dependent changes in TLR2-activated microglial NF-κB activity and concentrations of inflammatory and anti-inflammatory factors. *Intensive Care Med.* 38(8): 1392-1399, 2012 (査読有)

DOI: 10.1007/s00134-012-2591-3

Motoki Y, Nojima J, Yanagihara M, Tsuneoka H, Matsui T, Yamamoto M, Ichihara K. Anti-phospholipid 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.* 130: 667-673, 2012 (査読有)

DOI: 10.1016/j.thromres.2011.11.048

Matsui T, Motoki Y, Inomoto T, Miura D, Kato Y, Hino K, and Nojima J. Temperature-related effects of adenosine triphosphate-activated microglia on pro-inflammatory factors. *Neurocrit Care.* 17: 293-300, 2012 (査読有)

DOI: 10.1007/s12028-011-9639-z

[学会発表](計 19 件)

Makiko Osato, Jun-ichi Nishimura, Yukari Motoki, Satoru Hayashi, Yasutaka Ueda, Junzo Nojima, and Yuzuru Kanakura. Oxidative Stress and Intravascular Hemolysis in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *The American Society of Hematology* 2014 December 6-9, 2014. San Francisco, CA, USA.

藤田基, 荻野泰明, 中原貴志, 野島順三, 宮内崇, 金田浩太郎, 河村宜克, 小田泰崇, 鶴田良介. 重症敗血症患者におけるリコンビナントロンボモジュリンの酸化ストレス抑制効果の検討. 第 42 回日本救急医学会総会・学術集会. 2014 年 10 月 28 30 日 福岡

国際会議場（福岡県福岡市）

野島順三．抗リン脂質抗体症候群の検査診断と病態発症機序について．第 20 回東海 KOAG 研究会 特別講演 2014 年 9 月 18 日 ホテルキャッスルプラザ（愛知県名古屋市）招待講演

野島順三．心肺停止症候群の予後因子としての相対的酸化ストレス度．第 12 回酸化ストレス・抗酸化セミナー 2014 年 7 月 27 日 野村コンファレンスプラザ日本橋（東京都中央区）

野島順三．血管内皮細胞が掌る血栓制御機構 血小板・凝固・線溶機構のバランスと破綻 高知県臨床検査技師会学術部血液研究班講演会 2014 年 3 月 1 日 NHO 高知病院（高知県高知市）招待講演

本木由香里、野島順三．抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体（aPS/PT）ELISA キットの健常人参考値の設定と血栓性合併症との関連．第 8 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 2014 年 2 月 22 日 野村コンファレンスプラザ日本橋（東京都中央区）

野島順三．抗リン脂質抗体症候群の疾患概念と診断プロセス．第 34 回山口臨床血液例会 特別講演 2014 年 1 月 24 日 小郡第一総合病院（山口県山口市）招待講演

野島順三．血小板・凝固・線溶機構のバランスと破綻—後天性凝固異常症を中心に—．岡山県臨床検査技師会講演会 特別講演 2013 年 11 月 30 日 川崎医科大学（岡山県倉敷市）招待講演

本木由香里、青木なつみ、野島順三．Multiplex-ELISA 開発による抗リン脂質抗体症候群の検査診断の向上．第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2013 年 8 月 28 日 大阪大学コンベンションセンター（大阪府吹田市）

青木なつみ、本木由香里、山本美佐、野島順三．全身性エリテマトーデス患者における単球走化性活性化因子（MCP-1）濃度と抗リン脂質抗体および血栓性合併症発症との関連．第 14 回日本検査血液学会学術集会 2013 年 7 月 28 日 京王プラザホテル（東京都新宿区）

本木由香里、青木なつみ、山本美佐、河野裕夫、常岡英弘、野島順三．抗リン脂質抗体症候群患者における動脈硬化性病変発症機序の解明．第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 7 日 ロイトン札幌（北海道札幌市）

野島順三、本木由香里、青木なつみ．各種抗リン脂質抗体 ELISA の標準化に向けて aPLs-ELISA の臨床的意義と健常人基準範囲の設定．第 7 回日本血栓止血学会学術標準化委員会（SSC）シンポジウム．2013 年 1 月 12 日 東医保健会館（東京都新宿区）

本木由香里、青木なつみ、常岡英弘、大島綾香、國延沙央里、野島順三．Multiplex-ELISA による抗リン脂質抗体測定の臨床的意義（1）- プロトロンビンに対す

る抗体を中心に 第 45 回中四国支部医学検査学会 2012 年 11 月 3-4 日（岡山県岡山市）

青木なつみ、本木由香里、常岡英弘、大島綾香、國延沙央里、野島順三．Multiplex-ELISA による抗リン脂質抗体測定の臨床的意義（1）- β 2-glycoprotein に対する抗体を中心に 第 45 回中四国支部医学検査学会 2012 年 11 月 3-4 日 岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

野島順三．抗リン脂質抗体症候群および後天性血友病の概念と検査診断プロセス．広島県臨床検査技師会研修会 特別講演 2012 年 9 月 22 日 広島市民病院（広島県広島市）招待講演

山本美佐、本木由香里、野島順三、河野裕夫．全身性エリテマトーデス（SLE）における早発性粥状動脈硬化症の発症機序の解明—自己免疫複合体が血管内皮へ及ぼす影響—第 9 回日本病理学会カンファレンス 2012 年 8 月 3 日 ホテルニュータナカ（山口県山口市）

山本美佐、本木由香里、野島順三、高橋睦夫．SLE における早発性粥状動脈硬化症の発症機序の解明—接着因子発現と単球貪食能への影響—第 13 回日本検査血液学学術集会 2012 年 7 月 29 日 高槻現代劇場（大阪府高槻市）

本木由香里、野島順三、大島綾香、國延沙央里、青木なつみ、常岡英弘、山本美佐、市原清志．全身性エリテマトーデス患者における抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体測定の臨床的意義．第 13 回日本検査血液学学術集会 2012 年 7 月 28 日 高槻現代劇場（大阪府高槻市）

青木なつみ、本木由香里、野島順三．酵素固相化面積測定法（ELISA）による各種抗リン脂質抗体測定の臨床的意義．第 13 回 TTM フォーラム 2012 年 3 月 9 日 大手町サンケイプラザ（東京都千代田区）

〔図書〕（計 2 件）

野島順三．基礎医学 人体の構造と機能．第 10 章 血液・造血系系．止血機構 凝固・線溶系．216-228，2013．著書（共著）

野島順三．臨床に直結する血栓止血学．中外医学社．血栓止血関連検査「抗カルジオリピン抗体，抗カルジオリピン-2GP 複合体抗体，抗 2GP 抗体」．90-91，2013．著書（共著）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

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