

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670455

研究課題名(和文) 抗リン脂質抗体症候群におけるアデノシン二リン酸(ADP)受容体を介した血栓形成機

研究課題名(英文) The mechanism of adenosine diphosphate receptor mediated thrombus formation in antiphospholipid syndrome.

研究代表者

渥美 達也 (Atsumi, Tatsuya)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20301905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスモノクロナル抗リン脂質抗体231Dは、preliminaryな検討で血小板ADP凝集能低下を誘導したが、再精製された抗体では再現できず、3種のサブクローンいずれを用いても、やはり十分な再現性を示さなかった。一方、ヒトモノクロナル抗体であるEY2C9や一部の患者IgGでは認めた。現在、その機序について検討中である。更に、 μ チップを用いフロー下の白色血栓を観察するT-TAS $\&$ reg;では、抗リン脂質抗体存在下での性血栓傾向は乏しかった。抗リン脂質抗体を含めた動脈血栓症の予防に頻用されるADP受容体(P2Y12)阻害剤はAPSで効果的でない可能性もあり今後の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：With any of the subtypes of 231D, a mouse monoclonal antiphospholipid antibody, dysfunction of adenosine diphosphate (ADP) induced platelet aggregation was not detected in a reproducible manner. By contrast, EY2C9, a human monoclonal antiphospholipid antibody or purified IgG from sera of antiphospholipid syndrome(APS) patients induced suppression of ADP triggered platelet aggregation. The mechanism of the phenomena is under analysis.

In flow-analysis with the micro-tip mimicked sclerotic-artery, monoclonal antiphospholipid antibody did not show the decisive tendency of creating white blood clot. Inhibitor of P2Y12, the major ADP receptor on the platelet membrane, is widely used for the prophylaxis of thrombosis in patients with the history of arterial thrombosis including APS patients. However, our data suggest that there may be certain amount of patients in APS that the ADP inhibitor is not effective enough for preventing the recurrent thrombosis.

研究分野：膠原病・リウマチ学

キーワード：抗リン脂質抗体 血小板 アデノシン2リン酸(ADP)

1. 研究開始当初の背景

APS の病態の本態は病原性自己抗体群である APL による向凝固状態(凝固傾向)の惹起であり、同抗体が向凝固細胞(血管内皮細胞、単球)を活性化し凝固蛋白を産生させる事を我々は報告した。APS では APL が作り出す向凝固状態に、感染症等生体ストレスが加わり一気に血栓を形成する(2nd hit theory)が、このストレス反応に異常がある可能性を申請者は想定した。APL は向凝固細胞と同様に血小板も活性化すると推定されていたが、申請者らは、APL が ADP (血小板凝集能測定に用いられる)添加後の血小板凝集を減弱させるという予想と異なる予備実験結果を得た。

血小板凝集能は ADP 等の凝集誘導物質を濃厚血小板血漿(PRP)に投与し、経時的に凝集塊形成を観察し評価した。一般的に活性化血小板の凝集能は亢進するが、APS 患者 PRP や APL を添加された健常人 PRP では ADP 誘発凝集の著明な抑制を認めた。凝集抑制は不可逆的とされる 2 次凝集に特異的で、即時的な 1 次凝集は障害されなかった。

ADP 誘発血小板凝集は受容体 P2Y12(2 次凝集)、P2Y1(1 次凝集)が特異的に関与する。P2Y12 の発現は血小板に特異的と考えられていたが、グリア細胞で発現し神経細胞の貪食に関与することや(Nat Neuroscience,2007)、向凝固細胞での発現(J Immunol,2011)も確認された。現在では、ADP 受容体(P2Y1,P2Y12,P2Y13)をはじめとするヌクレオチド受容体は生体内に広く発現し、共働細胞行動を決定づけると考えられている。APL によりもたらされる P2Y12 の機能障害が向凝固細胞の ADP への細胞応答を変化させると推定し、単球細胞を用い APL 投与下に 2 次的に ADP を作用させ、著明な凝固蛋白の発現亢進を認めた。この結果から、APS において向凝固細胞は生体ストレス(ADP 分泌)に異常反応を示し、凝固蛋白の異常発現を認めると考え、本研究にて検証した。

2. 研究の目的

自己免疫血栓症である抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断や病態に関する研究を長期間継続している。APS は、原因不明の自己免疫疾患としての興味のみならず、若年に発症して再発が極めて多い脳梗塞や肺塞栓の原因として、臨床上も重要な位置を占める疾患である。

アデノシン二リン酸(ADP)は生体ストレス時に細胞からオートクリン、パラクリン的に放出され周囲の細胞応答を惹起し種々の免疫反応や炎症の trigger となる。申請者らは、種々の抗リン脂質抗体(APL)で処理した向凝固細胞に ADP を付加することにより、凝固蛋白産生が著明に亢進するという予備実験結果を得た。一方、まったく予想に反して、止血機構の基本である血小板凝集は同様の

処理によって大きく阻害された。このことから、APL による血小板の活性化と凝集抑制というパラドックスに本症候群の病態解明のカギが存在する、と推定し、特異的治療法開発のチャンスがある、と想定した。

3. 研究の方法

血小板を用いて得られた予備実験の検証を、向血栓細胞を用いておこなう。すなわち、APL の ADP 受容体に対する効果を明らかにした。また、ADP 受容体以外のストレスによる細胞活性化経路の関与をあわせて検討した。それらが証明されたら、APL と ADP による向血栓細胞の活性化シグナルを検討した。

以上の実験によって、APS の病態を特異的に制御するためのターゲット分子を絞り込むことができ、さらに、In Vitro の実験の進捗次第で、確認できた機序を応用した APS モデルマウスの作成に着手した。

4. 研究成果

マウスモノクロナル抗リン脂質抗体 231D は、preliminary な検討で血小板 ADP 凝集能低下を誘導したが、再精製された抗体では再現できず、3 種のサブクローンいずれを用いても、やはり十分な再現性を示さなかった。一方、ヒトモノクロナル抗体である EY2C9 や一部の患者 IgG では認めた。その機序について検討中である。

更に、 μ チップを用いフロー下の白色血栓を観察する T-TAS[®]では、抗リン脂質抗体存在下での性血栓傾向は乏しかった。抗リン脂質抗体を含めた動脈血栓症の予防に頻用される ADP 受容体(P2Y12)阻害剤は APS で効果的でない可能性もあり今後の検討が必要である。

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 9 件)

1. Matsuki Y, Atsumi T, Yamaguchi K, Hisano M, Arata N, Oku K, Watanabe N, Sago H, Takasaki Y, Murashima A. Clinical features and pregnancy outcome in antiphospholipid syndrome patients with history of severe pregnancy complications. Mod Rheumatol 査読有 (in press) doi: 10.1007/s00296-014-2951-0.
2. Oku K, Amengual O, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. An independent validation of the Global Anti-Phospholipid Syndrome Score in a Japanese cohort of patients with autoimmune diseases. Lupus 査読有 (in press)
3. Amengual O, Horita T, Binder W, Norman GL, Shums Z, Kato M, Otomo K,

- Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Yasuda S, Atsumi T. Comparative analysis of different enzyme immunoassays for assessment of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies. *Rheumatology International* 査読有 34: 1225-30, 2014 doi:10.1007/s00296-014-2951-0.
4. Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, Atsumi T, Chighizola CB, Forastiero R, de Groot P, Lakos G, Lambert M, Meroni P, Ortel TL, Petri M, Rahman A, Roubey R, Sciascia S, Snyder M, Tebo AE, Tincani , Willis R . 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. *Autoimmun Rev* 査読有 13: 917-930, 2014 doi: 10.1016/j.autrev.2014.05.001
 5. Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 査読有 12: 792-5, 2014. doi: 10.1111/jth.12537.
 6. Oku K, Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid scoring: significance in diagnosis and prognosis. *Lupus* 査読有 23: 1269-72, 2014 doi: 10.1177/0961203314537361.
 7. 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 23:81-8, 2013 doi: 10.1007/s10165-012-0642-9.
 8. 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* 査読有 52: 1775-84, 2013. doi: 10.1093/rheumatology/ket234.
 9. Kato M, Atsumi T, Oku K, Amengual O, Nakagawa H, Fujieda Y, Otomo K, Horita T, Yasuda S, Koike T. The involvement of CD36 in the monocyte activation by antiphospholipid antibodies. *Lupus* 査読有 22:761-71, 2013. doi: 10.1177/0961203313490242.
 1. Oku K, Amengual O, Hisada R, Oomura K, Nakagawa I, Watanabe T, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. Markers of thrombotic events in autoimmune diseases: comparison of Antiphospholipid Score (aPL-S) and Global Anti-phospholipid Syndrome Score (GAPSS) , The 78th American College of Rheumatology Annual Meeting, 14-19 November, 2014, The Boston Convention Exhibition center (Boston, USA)
 2. Watanabe T, Oku K, Amengual O, Sugawara E, Hisada R, Ohmura K, Shimamura S, Nakagawa I, Noguchi A, Fukui T, Shida H, Kono M, Shimizu Y, Kurita T, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. The protective effects of statins for thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus positive for antiphospholipid antibodies. The 78th Annual Meeting of American College of Rheumatology, November 14-19, 2014, Boston Convention Exhibition center (Boston, USA)
 3. Atsumi T. International multi-centre study in Phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies (aPS/PT) for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. 60th Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee (SSC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). The Wisconsin center (Milwaukee, USA), 23-26 June 2014
 4. Atsumi T. Antiphospholipid syndrome. 9th International Congress on Autoimmunity. Nice, France, 26 March 2014.
 5. Atsumi T, Amengual O. Antibodies to Prothrombin. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, 18-21 September 2013 Hotel Softil Rio de Janeiro Copacabana (Rio de Janeiro, Brazil)
 6. Atsumi T. Antiphospholipid Scoring: significance in diagnosis and prognosis. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, 18-21 September 2013, Hotel Softil Rio de Janeiro Copacabana (Rio de Janeiro, Brazil)
 7. Oku K, Amengual O, Watanabe T, Kanetsuka Y, Fujieda Y, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. Autoantibodies against component of complement one contribute to the complement activation and manifestation of refractory cases in antiphospholipid syndrome (APS). 24th

congress of the international society on
thrombosis and haemostasis, June
29-July 4, 2013, Amsterdam
RAI(Amsterdam, Neitherland)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渥美 達也 (TATSUYA ATSUMI)
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

奥 健志 (KENJI OKU)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：20301905