

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860774

研究課題名(和文) 抗 2-Glycoprotein I 抗体による炎症性血栓形成機序の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of inflammation-induced thrombosis by anti Beta-2-glycoprotein I antibodies.

研究代表者

中川 久子 (Nakagawa, Hisako)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任助教

研究者番号：60615342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：Beta-2-glycoprotein I (B2GPI)は抗リン脂質抗体症候群(Anti-phospholipid syndrome: APS)の主要抗原である。本検討では、抗B2GPI抗体による補体活性化への影響を解析した。その結果、C3とB2GPIの結合には抗B2GPI抗体による影響は認められなかったが、C5b-9複合体形成およびC3aによる血管透過性について、B2GPIによる抑制効果は抗B2GPI抗体存在下で有意に阻害された。このことから抗B2GPI抗体はB2GPIとC3の結合の後に続く、補体カスケード制御に対し、B2GPIの持つ補体制御効果を抑制するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Beta-2-glycoprotein I (B2GPI) is one of the major autoantigens in patients with anti-phospholipid syndrome (APS), an autoimmune disorder characterized by thrombosis and pregnancy morbidity. To investigate the function of anti B2GPI antibody in complement system, we asked whether anti B2GPI antibody affects the C3/B2GPI binding. Bound B2GPI and anti B2GPI to C3 was determined by ELISA. As a results, anti B2GPI antibody did not affect the C3/B2GPI binding. B2GPI and anti B2GPI antibody were added to normal human serum, complement was activated via the alternative pathway, and C5b-9 levels were determined by ELISA. B2GPI inhibited complement activation, and C5b-9 generation was reduced by ~45%. On the other hands, a significant increase in C5b-9 deposition was observed by addition of anti B2GPI antibody. We concluded that the anti B2GPI antibody regulate the effects of B2GPI in the complement system.

研究分野：分子生物学

キーワード：補体 APS B2GPI

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗 B2GPI 抗体の血栓形成機序は自己抗体の存在により B2GPI の陰性荷電リン脂質への結合が高まり B2GPI の持つ protein C に対する抑制作用が強調される事(線溶系抑制) 血小板の ApoE レセプターへの結合を介して血小板の粘着性を亢進する事(血小板の活性化) 内皮細胞や単球表面に結合し p38MAPK の系を介して組織因子を発現し、局所を過凝固に導く事(内皮細胞マクロファージの活性化)などが報告されている。

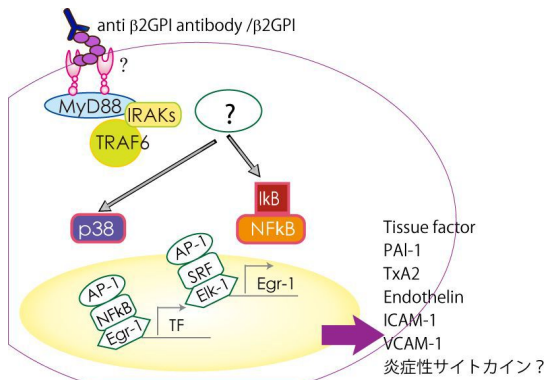


図1 抗 B2GPI 抗体による内皮細胞活性化

(2) APS、特に妊娠合併症の病態は補体活性化の関連が示唆されており、患者由来の IgG を妊娠マウスに投与した所、ほぼ 4 倍の確立で胎児が死亡することや、C3 欠損あるいは C5 欠損マウスに抗リン脂質抗体を注入しても血栓傾向にならないこと、APS 患者では低補体が認められ、アナフィラトキシンである C3a や C4a は高値を示す事等が報告されている。これらのことから APS の低補体傾向は補体の産生障害ではなく、補体が活性化し消費されることによる結果であり、APS の血栓形成機構には補体 C3 や C5 が関連しているものと示唆される。APS に限らず低補体血症が流産と相関する事が臨床的に確かめられており、補体活性化は妊娠予後と直接関与する可能性も報告されている。抗 B2GPI 抗体は、結果として補体を活性化し血栓傾向および胎児死亡に関連する。しかし生体内でどのような機序で補体活性化や血栓が形成されるのか明らかにされていない。

2. 研究の目的

不育症や動静脈血栓症の原因の一つとされる抗 B2GPI 抗体は血栓症などの臨床症状と強くリンクし、B2GPI を介して向血栓因子を誘導する。本研究は抗 B2GPI 抗体の補体活性化作用とそれに伴う炎症性の血栓形成機序を解析し、分子生物学的手法を用いて抗リン脂質抗体症候群や不育症の血栓治療へつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗 B2GPI 抗体による C3/B2GPI 結合

への影響を検討するため ELISA 法を用いて B2GPI および抗 B2GPI の C3 の結合への作用を検討した。

(2) 抗 B2GPI 抗体による補体経路の最終産物である C5b-9 の産生への影響を検討した。古典経路による C5b-9 の産生には IgM を固相し、第 2 経路による産生には LPS を固相した。20% ヒト血清、B2GPI または factor H、抗 B2GPI を 15 分 37 °C で恒温静置した後、固相した 96well plate に添加した。C5b-9 抗体を加え 30 分恒温静置し、492nm で測定を行った。

(3) ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を用い C3/B2GPI/factor H/factor I の C3a 産生による血管透過性への影響および抗 B2GPI 抗体添加後の透過性の変化を FITC-dextran の透過により検討した。Transwell insert chamber に HUVECs 単層を形成させ、C3/B2GPI/factor H/factor I (抗 B2GPI 抗体) を添加し 37 °C 4 時間静置した。4 時間後 FITC-dextran を添加し 30 分静置した後 chamber 内液の蛍光強度を比較した (Ex 485nm/ Em 530)。

また、血管内皮細胞の VE カドヘリンのエンドサイトーシスの解析を行った。VE カドヘリンエンドサイトーシスは HUVECs に anti-VE cadherin antibody を加え、preincubate した C3/B2GPI/factor H/factor I (抗 B2GPI 抗体) を添加し、4 時間 37 °C で静置後、4% パラホルムアルデヒドおよび 0.5% Triton X-100 で固定透過処理を行った。Alexa 488 mouse IgG を添加し、VE カドヘリン蛍光染色を行った。画像を得た後蛍光強度を統計的に比較した。

(4) C3b はアポトーシス細胞の細胞膜に結合しオプソニン化し食細胞に取り込ませる作用を有する。その際 B2GPI 存在下では C3b のアポトーシス細胞への接着が促進される事が明らかにされていることから、抗 B2GPI 抗体存在下での C3b の接着を検討する。アポトーシス誘導因子であるスタウロsporin を用いて HUVECs cell(2x10⁷) をアポトーシスさせ、C3b/B2GPI/抗 B2GPI 抗体を添加し C3b 抗体により結合した C3b を検出した。

4. 研究成果

(1) 抗 B2GPI 抗体による C3/B2GPI の結合への影響を検討した結果、C3 は既報の通り B2GPI との結合を示した。同様の反応系に抗 B2GPI 抗体を添加したものにおいても同程度の C3 の結合が確認され、抗 B2GPI 抗体による差は認められなかった。

(2) 補体 generation への作用を検討した結果、B2GPI 存在下では既報の通り C5b-9 複合体量が濃度依存的に抑制されたこのこ

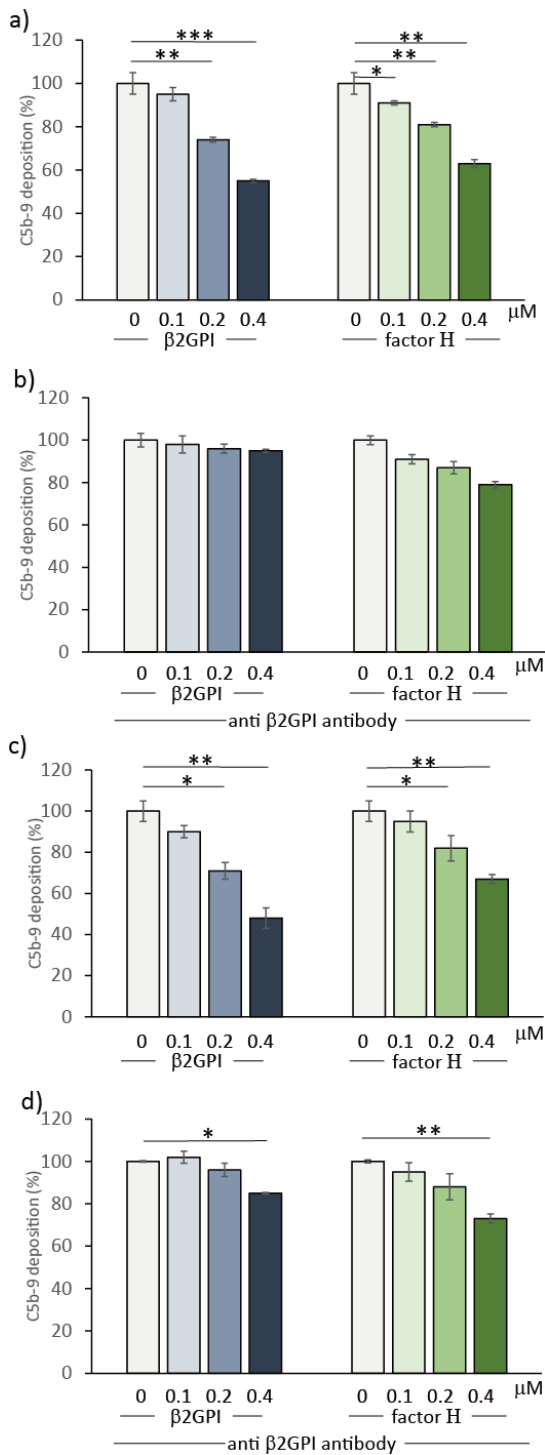


図 2. 抗 B2GPI 抗体による C5b-9 複合体 level への影響

とより B2 が補体制御因子であることを追認した。また Factor H についても同様の傾向が認められた。この作用は古典経路と第二経路のいずれにおいても認められた (図 2a,c, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.01$)。この反応系に抗 B2GPI 抗体を添加したものは、B2GPI の C5b-9 複合体形成抑制を抗 B2GPI 抗体により解除され、コントロールと同程度の C5b-9 複合体形成が認められた (図 2b,d)。これらのことから、B2GPI の補体制御機能を抗 B2GPI 抗体によって抑制される事により、補体は活性化するものと考えられた。

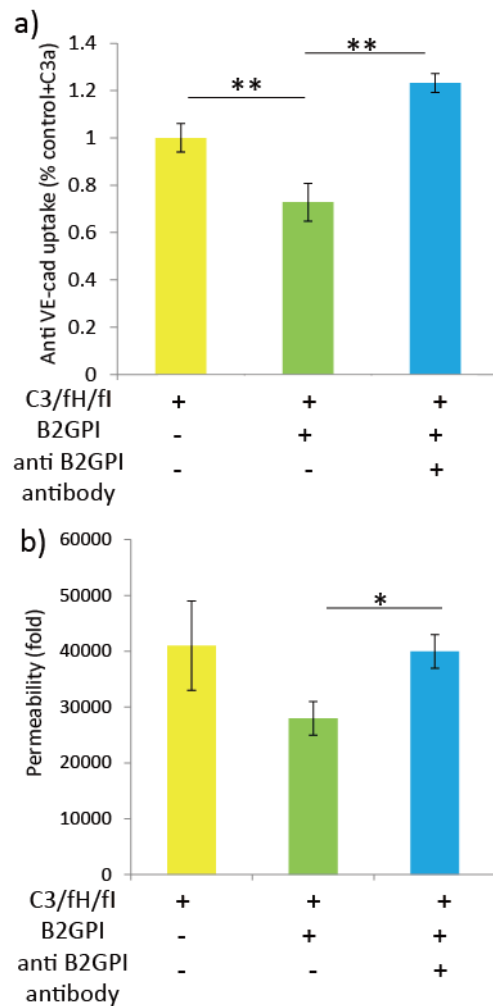


図 3. 抗 B2GPI 抗体による血管透過性への影響

(3) C3a、C5a は補体活性化により産生され血管透過性を亢進し、白血球浸潤を促進する炎症性メディエーターである。抗 B2GPI 抗体の C3a による血管透過性への関連性を検討した。VE カドヘリンエンドサイトーシスへの影響を検討した結果、C3a 存在下では B2GPI および nicked B2GPI は抑制傾向が認められたが有意な差は得られなかった。抗 B2GPI 抗体を添加した場合、B2GPI によるエンドサイトーシスの抑制が解除され、エンドサイトーシスが有意に亢進した (図 3a, ** $p<0.01$)。透過性においても同様の傾向が認められたが、有意な差は得られなかった。一方 VEGF-A 存在下では B2GPI の添加によりエンドサイトーシスが有意に抑制されることを別の試験により認めている。このことから、C3a による血管透過性亢進に対する B2GPI の効果は VEGF-A の阻害効果と比較し、非常に弱いものであったが、炎症反応時、補体活性化が過剰に起きている状況下では、抗 B2GPI 抗体は C3a 産生亢進および血管透過性を亢進している物と推察された。

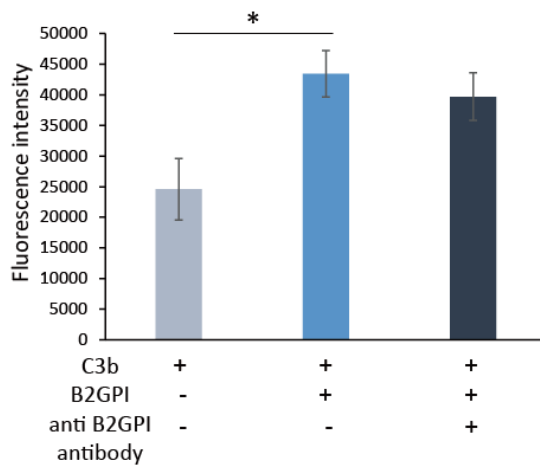


図 4. 抗 B2GPI 抗体による C3b のアポトーシス細胞接着への影響

(4) C3b はアポトーシス細胞の細胞膜に結合しオプソニン化し食細胞に取り込ませる作用を有する。その際 B2GPI 存在下では C3b のアポトーシス細胞への接着が促進される事が明らかにされていることから、抗 B2GPI 抗体存在下での C3b の接着を検討した。その結果、C3b のアポトーシス細胞への接着は既報の通り、B2GPI 存在下で有意に増強した(図 4、* $p < 0.05$)。さらに抗 B2GPI 抗体を添加した結果、C3b のアポトーシス細胞への接着は B2GPI のみ添加時と比較し、効果に差は認められなかった。このことは C3 および C3b が B2GPI との結合により構造変化しているためと考えられた。

以上のことから、抗 B2GPI 抗体は B2GPI と C3 の結合、後に続く補体カスケード制御に対し、B2GPI の持つ補体制御効果を抑制するものと考えられた。ただしアフィラトキシンとして産生される C3a の血管透過性亢進や C3b のアポトーシス細胞クリアランスに対する影響は低いものであった。今後、抗 B2GPI 抗体存下の C3 構造の変化の解析が必要と考えられ、さらに in vivo において線溶系と補体活性、血小板、マクロファージの血栓形成の相互作用を解明することにより、APS のみならず不育症の治療応用につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Hisako Nakagawa, Shinsuke Yasuda, Tadaaki Miyazaki
Pleiotropic role of β 2-glycoprotein I: apart from antiphospholipid syndrome.
Current Angiogenesis 査読あり 2014, volume 3, issue 3, page 132-138
<http://benthamscience.com/journal/index.php?journalID=cag#top>

[学会発表](計 4 件)

中川久子、宮崎忠昭

Beta-2-Glycoprotein I の機能と生理的意義
第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2014 6/19,20 北海道大学(北海道、札幌市)

Hisako Nakagawa, Tadaaki Miyazaki
Inhibitory effects of beta 2 Glycoprotein I in angiogenesis and tumorigenesis
The 18th International Vascular Biology Meeting 2014 4/14-17 みやこめっせ(京都市、京都市)

Nakagawa Hisako, Miyazaki Tadaaki
Inhibitory effects of Beta 2 Glycoprotein I in angiogenesis and tumorigenesis
第 72 回日本癌学会学術総会 2013 10/3-5 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

S. Yasuda, A. Kubota, H. Nakagawa, K. Kuroki, Y. Fujieda, K. Oku, T. Bohgaki, O. Amengual, T. Horita, K. Maenaka, T. Atsumi
Role of β 2-Glycoprotein I and β 2-Glycoprotein I Domain V in Angiogenesis
The International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity (CORA 2013) 2013 4/4-6 Budapest (Hungary)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 久子 (NAKAGAWA, Hisako)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任助教
研究者番号: 60615342