

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860362

研究課題名(和文)抗PDGFレセプター抗体を標的とした膠原病性肺高血圧症発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Autoantibodies in connective tissue disease with pulmonary hypertension possibly play a role in the pathogenesis.

研究代表者

加藤 優子 (Kato, Yuko)

東京医科歯科大学・保健衛生学研究科・助教

研究者番号：50580875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、膠原病患者血清中の自己抗体が膠原病合併肺動脈性肺高血圧症の発症に関与するかを解明することで、その自己抗体が膠原病合併肺動脈性肺高血圧症発症の予測マーカーとなりうるかを検討することを目的としておこなったものである。
その結果、膠原病患者血清より精製した抗体成分が主に反応する肺動脈の細胞の蛋白分子を、解析したところ、PDGFレセプターよりむしろエノラーゼ1に反応していることがわかった。血清中の抗エノラーゼ1抗体の抗体価は、膠原病合併肺動脈性肺高血圧症患者の血清で、健常者より有意に高値であることがわかった。今後は本抗体が膠原病合併肺動脈性肺高血圧症の発症に関与するかさらに検討を続ける。

研究成果の概要(英文)：The process of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension in connective tissue disease largely depends on migration of pulmonary artery smooth muscle cells. Since autoantibodies in connective tissue disease patients were reported involving in cell migration, we tested whether auto-antibodies in connective tissue disease patients can play a role in the pathogenesis. IgG from patients significantly increased migration of pulmonary artery smooth muscle cells, which was greater in the patients with pulmonary arterial hypertension than those without it. Moreover, the antibodies bound to enolase 1, and the titer of IgG anti- enolase 1 antibodies was higher in the patients with pulmonary arterial hypertension than those without it. These results suggest that Anti-enolase 1 antibodies in connective tissue disease patients with pulmonary arterial hypertension may induce migration of pulmonary artery smooth muscle cells, and possibly play a pivotal role in the pathogenesis.

研究分野：免疫検査学

キーワード：自己抗体

1. 研究開始当初の背景

膠原病患者が肺動脈性肺高血圧症を発症すると、予後は極めて不良となる。しかし、肺高血圧の発症を予測するバイオマーカーは存在しない。近年、膠原病患者血清中から自己抗体「抗 PDGF レセプター抗体」が発見された。PDGF レセプターの作用から、この抗体が肺高血圧発症と関連することが推察されるが、まだ検討はなされていない。肺動脈性肺高血圧症は混合性結合組織病 (MCTD)、全身性硬化症 (SSc) や全身性エリテマトーデス (SLE) などの膠原病で比較的高率に発症するが、この膠原病性肺高血圧症の予後は極めて不良である。優れた血管拡張薬の開発によって予後が飛躍的に改善されたものの、膠原病患者の中から肺高血圧を発症する可能性の高い症例を鑑別し、発症予防や早期治療をおこなうことは非常に重要である。しかしながら、現在肺高血圧の発症予測や早期発見に有用なバイオマーカーは存在しない。

肺高血圧症の発症には肺動脈の中膜肥厚が大きな役割を果たす。これは、中膜の肺動脈平滑筋細胞が血管内膜側へ遊走・増殖することにより起こるが、特発性の肺高血圧症では、肺動脈中膜で肺動脈平滑筋細胞の増殖・遊走を促進する「血小板由来増殖因子 (PDGF)」と「PDGF レセプター」の発現が増加していることが報告されている (Perros F, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; Schermuly RT et al. *J Clin Invest* 2005)。また、PDGF レセプターの阻害剤投与により肺高血圧症が改善したとの報告もある (Ghofrani HA, et al. *N Engl J Med* 2005; Schermuly RT et al. *J Clin Invest* 2005)。これらにより、PDGF レセプターへの刺激は肺動脈平滑筋細胞の遊走・増殖を促進し、肺高血圧症の発症に重要な役割を果たしていることが予想される。

2. 研究の目的

申請時は、ヒト肺動脈平滑筋細胞を用いて、膠原病患者血清中の抗 PDGF レセプター抗体の存在の確認と、肺高血圧症発症に対する役割の解明をおこなうことで、抗 PDGF レセプター抗体が膠原病における肺高血圧症発症の予測マーカーとなりうるかを検討することを目的としていたが、検討結果により、途中からターゲットとなる自己抗体を抗 PDGF レセプター抗体から抗エノラーゼ 1 抗体に変更し、同様の目的で検討をおこなった。

3. 研究の方法

・初年度：抗 PDGF レセプター抗体など、肺高血圧合併に関与する自己抗体が存在している患者を抽出するため、膠原病患者の血清よりポリクローナル IgG を回収し、肺高血圧

発症の基礎である肺動脈平滑筋細胞の増殖・遊走に対する作用を解析する。

・次年度：自己抗体の刺激が細胞内カルシウムの上昇を介して細胞の増殖・遊走を促進させるため、膠原病患者 IgG が細胞内カルシウム濃度の上昇やカルシウム伝達経路を活性化させるかどうかを解析し、肺高血圧合併に関与する自己抗体の存在の確認と、その自己抗体を介した肺高血圧発症の分子メカニズムを明らかにする。

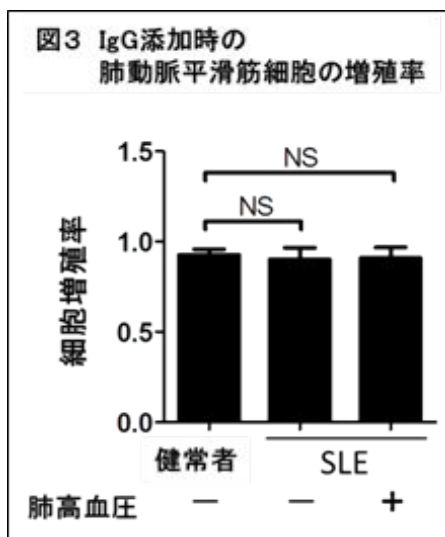
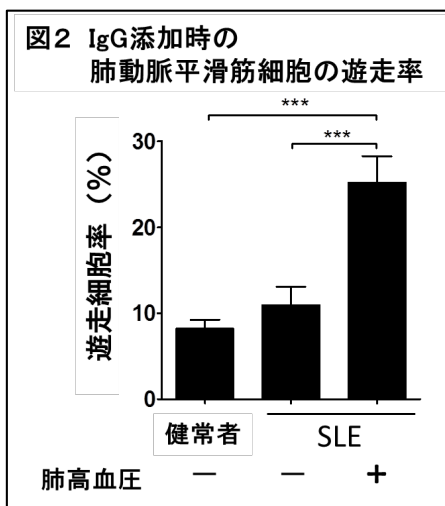
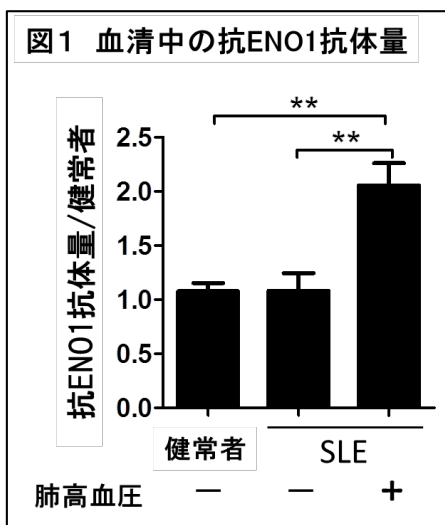
4. 研究成果

これまで、肺高血圧症における血管内膜肥厚形成の主体は、血管平滑筋細胞の「増殖」であると考えられ、多くの内膜肥厚研究で細胞増殖能の評価がおこなわれてきた。しかし、研究代表者は血管内膜肥厚の形成には血管平滑筋細胞の「遊走」が重要であることを明らかにした (Kato Y et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015)。このことから、SLE 合併肺高血圧症においても、肺動脈平滑筋細胞の「遊走」を促進する自己抗体がその発症に深く関わると考えられるが、「遊走」を促進する自己抗体は現在まで報告されていない。申請当初、遊走の強力なメディエーターである PDGF のレセプターに対する自己抗体に注目し、研究を開始した。しかし、ウエスタンブロッティングによる解析により、SLE 合併肺高血圧患者の自己抗体を含む IgG は、肺動脈平滑筋細胞の蛋白分子のうち、50 kDa 付近の蛋白分子と主に反応していることが判明し、この蛋白分子を質量分析により解析したところ、PDGF レセプターではなく、エノラーゼ 1 であることが明らかとなった。

エノラーゼ 1 は、解糖系の酵素として知られていたが、近年、細胞遊走に関与するなど、多彩な機能を持つことがわかってきた細胞内蛋白である。これに対する自己抗体「抗エノラーゼ 1 抗体」は SLE の 27% より検出されるが (Migliorini P et al. *Autoimmun Rev.* 2002) SLE をはじめとする膠原病合併肺高血圧症との関連はわかっていない。そこで、患者および膠原病患者血清中の抗エノラーゼ 1 抗体の抗体価を、ELISA 法を用いて測定した結果、SLE 合併肺高血圧症では抗エノラーゼ 1 の血中濃度が高いことが明らかとなった (図 1)。

さらに、血清から精製した IgG を添加し、は肺動脈平滑筋細胞の遊走をポイデンチャンパー法にて評価した結果、SLE 合併肺高血圧症患者血清中の IgG は、肺動脈平滑筋細胞の遊走を促進することを見出した (図 2)。加えて、細胞遊走に重要な葉状仮足の形成も増加させることを明らかにした。

一方で、この IgG は肺動脈平滑筋細胞の増殖には関与しないことを明らかにしている (図 3)。



これらの結果は抗エノラーゼ1抗体が、肺動脈平滑筋細胞の「遊走」を亢進させることによってSLE合併肺高血圧症の病態形成に関わることを示唆している。

続いて、SLE合併肺高血圧患者の自己抗体を含むIgGがどのようなメカニズムで肺動脈平滑筋細胞の遊走を促進するかを解明するため、まず、細胞遊走に重要な細胞内カルシウム濃度を測定したところ、SLE合併肺高血圧

患者の自己抗体を含むIgGは肺動脈平滑筋細胞の内の細胞内カルシウム濃度を増加させることがわかった。しかし、健常人より精製したIgGによっても細胞内カルシウム濃度の上昇がみられ、患者の方で上昇が大きいものの、有意差を得るには至らなかった。そのため現在は方法や条件を変えて検討中である。そこで、SLE合併肺高血圧患者の自己抗体を含むIgGとどのように反応するかを確認するため、蛍光免疫染色にてIgGの反応部位を検索したところ、SLE合併肺高血圧患者のIgGの対応抗原は肺動脈平滑筋細胞の細胞骨格の1つで、細胞遊走に重要な働きをする微小管と共局在していることがわかった。さらに、エノラーゼ1は微小管の構成蛋白であるtubulinと直接結合することが知られている(Keller A et al. 2007; Elias G et al Int J Biochem Mol Biol 2011など)。

これまで結果から、SLE合併肺高血圧患者の血清中にはエノラーゼ1に対する自己抗体が産生され、この抗体がtubulinの制御に関与することで、肺動脈平滑筋細胞の遊走を促進する可能性が考えられた。今後は抗エノラーゼ1抗体がどのようなメカニズムで細胞骨格の制御に関与するかをさらに検討していく予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Yuko Kato, Kazuya Shibata, Rina Ishige, Tetsuo Kubota. Anti-enolase 1 autoantibodies in SLE with pulmonary hypertension induce migration of pulmonary artery smooth muscle cells. The 60th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, Yokohama, 21, April, 2016. Yokohama, Japan.

Yuko Kato, Utako Yokoyama, Yoshihiro Ishikawa. The role of Epac1 in the regulatory mechanisms of vascular smooth muscle cell migration and neointimal formation. The 93th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Sapporo, 22-24, March, 2016. Sapporo, Japan.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 優子 (Kato Yuko)
東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・助教
研究者番号：5058075

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：