

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860370

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

研究課題名(英文) Establishment of a new diagnostic method for antiphospholipid antibody syndrome and elucidation of pathogenic mechanism

研究代表者

本木 由香里 (MOTOKI, Yukari)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80724054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗リン脂質抗体症候群(APS)は抗リン脂質抗体の出現に伴い、動静脈血栓症を発症する疾患である。本研究では、APS患者の血中が高度の酸化ストレス状態であることを明らかにし、抗リン脂質抗体や酸化ストレスが血管内皮細胞や単核球の組織因子発現やケモカイン・炎症性サイトカインの産生を増加させ、一酸化窒素合成酵素の産生を抑制することを見出した。これにより、抗動脈硬化作用を有する一酸化窒素の産生が低下し、血管壁の炎症や動脈硬化が進展することで、APS患者に易血栓性がもたらされると考えられる。また、APS診断において測定すべき抗リン脂質抗体の種類について提唱した。

研究成果の概要(英文)：Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by arterial and/or venous thrombosis associated with antiphospholipid antibodies. IgG from APS patients and anti-phosphatidylserine/prothrombin antibody (aPS/PT) increased expression of tissue factor (TF) and production of chemokines from endothelial cells (EC). Oxidative stress level was significantly higher in sera of APS patients than in those of healthy subjects. Treatment with oxidative stress led to increase in expression of TF, chemokines, but decrease in the expression of eNOS of EC. The decrease in eNOS leads to a decrease in production of NO, and anti-arteriosclerotic effect by NO might be decreased. It is suggested that the decrease of NO and increase of TF, proinflammatory cytokine and chemokines are cause of thrombosis in APS patients. In the examination of APS, measurement of anti-cardiolipin antibody (aCL) -IgG is the first test item, followed by measurements of aPS/PT-IgG and aCL-IgM are recommended.

研究分野：抗リン脂質抗体症候群

キーワード：抗リン脂質抗体症候群 抗リン脂質抗体 血栓症 酸化ストレス

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・習慣流産など) を特徴とする自己免疫性血栓塞栓性疾患である。

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)、抗カルジオリピン/2-グリコプロテイン抗体 (aCL/2GP)、抗2GP抗体 (a2GP)、抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体 (aPS/PT)、抗キヌゲン抗体など多種多様なタイプが存在し、患者の血中には複数種の抗体が混在していることが明らかとなっている。しかし、各種抗リン脂質抗体を鑑別測定できる検査法は確立されておらず、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ほとんど解明されていない。

研究代表者はこれまでに APS の基礎疾患として代表的な全身性エリテマトーデス (SLE) 患者を対象に、各種抗リン脂質抗体の疾患特異性と血栓形成作用に関する一連の研究を展開してきた。その成果として、(1) 6 種類の抗リン脂質抗体を鑑別測定できる ELISA を確立し、各種抗体の疾患特異性を統計学的に解析した結果、動脈血栓症の最も強い危険因子として aPS/PT、静脈血栓症の危険因子として a2GP が特定された。さらに習慣流産の発症には aCL/2GP と aPS/PT が関連していた。(2) APS 患者血漿より分離・精製した IgG を用いた正常単核球刺激実験にて、抗リン脂質抗体が単核球の組織因子 (TF) 発現や炎症性サイトカイン産生を惹起することを明らかにし、APS における血栓塞栓症発症機序には、TF 依存性血栓形成とサイトカイン誘発性炎症反応の相乗効果が関連していることを提唱した。

APS 患者血中に存在する抗リン脂質抗体は特異性の異なる多種類の抗体群で構成されており、APS 患者が発症する多様な病態には、それぞれ異なった特異性を持つ抗リン脂質抗体が関与している可能性が考えられる。したがって、APS の多彩な臨床病態を適切に鑑別診断するためには、それぞれの合併症の発症に特異性の高い抗リン脂質抗体のタイプを特定し、それらの抗体を認識エピトープ別に鑑別測定できる ELISA システムの開発が必須である。さらに、APS に関連する多彩な合併症の発症機序を解明するためには、患者血中に混在する種々の抗リン脂質抗体について、個々の抗体が持つ血栓形成作用を検討しなければならない。

各種抗リン脂質抗体の疾患特異性や血栓形成作用が明確になれば、APS の病態解明が急速に進み有効な治療法の確立も期待出来る。

2. 研究の目的

(1) 認識エピトープ別抗リン脂質抗体測定による効率的な APS 鑑別診断検査法の確立

APS 検査診断の向上を目的に、SLE 患者を対象に複数の抗リン脂質抗体価測定を実施し、合併症と各種抗体価との関連や、APS の検査診断上、測定の優先度の高い抗体について検討する。

(2) 各種抗リン脂質抗体の血栓形成作用および炎症促進作用の解明

血管内皮細胞と末梢血単核球細胞 (PBMC) における細胞表面 TF 発現・接着分子の発現・各種サイトカインの産生・一酸化窒素 (NO) 産生・活性酸素種産生に影響を与える因子について検討するとともに、抗体の血栓形成作用や細胞傷害作用がどのような機序を介して惹起されるのか各種阻害剤を用いて解明する。

3. 研究の方法

(1) SLE 患者、APS 患者、健常人を対象に、aCL (IgG および IgM)、aCL/2GP (IgG)、a2GP (IgG および IgM)、aPS/PT (IgG および IgM) について、市販の ELISA キットおよび自動分析装置を用いた測定システムにて抗体価を測定した。APS 患者において高率に検出される抗体ならびに APS 検査診断上、測定が有用と思われる抗体について統計学的に解析した。

(2) ヒト大動脈由来血管内皮細胞 (HAEC) およびヒト伏在静脈内皮細胞 (HSaVEC) と末梢血単核球細胞 (PBMC) に対し、抗リン脂質抗体陽性患者由来 IgG、抗リン脂質抗体陰性患者由来 IgG、健常人由来 IgG、モノクローナル aPSPT (231D) の添加実験を行い、細胞表面 TF 発現・ケモカインおよび炎症性サイトカインの産生・一酸化窒素 (NO) 産生について、細胞の mRNA 発現ならびに細胞培養上清中タンパク濃度測定を実施した。

(3) APS 患者 (63 症例) を対象に血清中の酸化ストレス値 (dROMs テスト) と抗酸化力値 (BAP テスト) を測定し、健常人 (312 例) の測定値と比較し、APS 患者血中の酸化ストレス度を評価した。

(4) HAEC および HSaVEC に過酸化水素 (100 μ M) を添加し、酸化ストレス負荷モデルとした。酸化ストレス負荷による細胞の TF 発現や、ケモカインの産生、一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の産生への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) APS 患者における血栓症の発症と各種抗リン脂質抗体価の関係を解析した結果、aCL または a2GP 関連抗体の IgG クラスおよび aPS/PT-IgG との関連が強いことが明らかと

なった。特に aCL-IgG は APS 患者における陽性率が高く、APS 検査診断においては、まず、aCL-IgG 測定を第一検査項目とし、次に aPS/PT-IgG の測定を実施することが有用であると考えられる。しかし、これら IgG クラスの抗体が全て陰性にもかかわらず、血栓症を発症する患者が一部みられ、このような症例では aCL、a 2GPI、aPS/PT のいずれかの IgM クラスが陽性であった。APS を疑う患者において、IgG クラスの抗体が陰性である場合に IgM クラスの抗体を追加測定することが有用であると考えられる。

研究代表者は日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップにて抗リン脂質抗体測定 ELISA の標準化にも取り組んでおり、国内の APS 診療に携わる方々に対し、APS 検査診断法の標準化と、ELISA 測定のアプローチについても合わせて発信していくことにより、検査精度が向上していくことが期待される。

(2) 抗リン脂質抗体陽性 IgG には PBMC のケモカイン (MCP-1、IL-8) および炎症性サイトカイン TNF- α の産生を促進し、HAEC の TF mRNA の発現を増幅し、ケモカイン (MCP-1 および IL-8) の産生を増加させる一方、eNOS mRNA の発現を抑制する作用が認められた。また、aPS/PT のモノクローナル抗体である 231D には PBMC の MCP-1 産生や TF の発現ならびに HAEC および HSaVEC の MCP-1 産生を促進する作用が認められた。これらの作用は、抗リン脂質抗体陰性の IgG ではみられなかった。

(3) APS 患者の血中酸化ストレス度を評価した結果、APS 患者では健常人に比べ、酸化ストレス値 (活性酸素代謝産物量を反映) が有意に高く (図 1)、抗酸化力値 (還元能力を反映) は著しく低下している (図 2) ことが明らかとなった。酸化ストレス値と抗酸化力値の比を表す相対的酸化ストレス度 (酸化ストレス値 \div 抗酸化力値 \times 補正係数) は、酸化ストレス値の上昇と抗酸化力値の低下を反映し、APS 患者では異常高値を示す症例が多数認められた (図 3)。APS 患者の血中では非常に高度な酸化ストレス状態であることが示唆される。

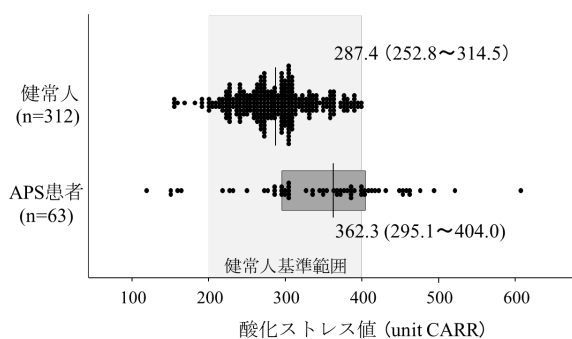


図 1 . APS 患者では血中酸化ストレス値が高値を示す

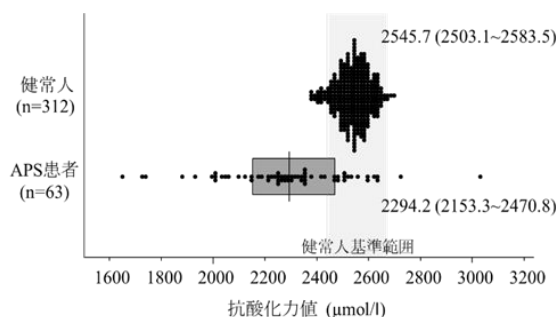


図 2 . APS 患者では血中抗酸化力値が著明に低下している

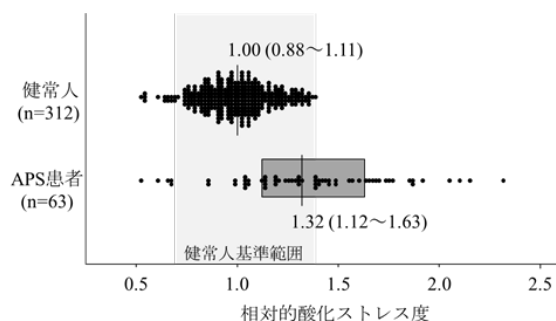


図 3 . APS 患者では相対的酸化ストレス度が高値を示す

(4) HAEC への過酸化水素添加実験から、酸化ストレスの負荷によって、HAEC および HSaVEC における TF mRNA 発現やケモカイン (MCP-1 および IL-8) の産生が増加し、一方、eNOS mRNA の発現は低下することを見出した。

(5) (2) ~ (4) の結果より、APS 患者の血中には高い酸化ストレス状態にあり、酸化ストレスと抗リン脂質抗体によって、血管内皮細胞の eNOS 産生が低下している可能性が示唆された。eNOS は血管内皮細胞が有する一酸化窒素 (NO) 合成酵素であり、eNOS の産生低下は血管内皮細胞の NO 産生・放出の低下を招く。NO は、血管拡張作用や血小板凝集を抑制する作用、血管内皮細胞下への細胞の浸潤を抑制する作用など、抗動脈硬化性作用を有しており、NO の産生低下はこれらの抗動脈硬化性作用を減ずると考えられる。加えて、APS 患者の血中では、抗リン脂質抗体や酸化ストレスによる炎症性サイトカインやケモカインの産生増加により、血管壁の炎症や動脈硬化が進展し、易血栓性をもたらす可能性が考えられる。

(6) APS 患者の血栓症発症には、一般的な危険因子に加え、抗リン脂質抗体による作用が関与している。当初、酸化ストレスの影響については検討を予定していなかったが、今回、患者血中の酸化ストレス度が亢進していることが明らかとなり、他の危険因子の非存在

下においても血栓症を発症する原因の一端を見出した。しかしながら、APS 患者において酸化ストレス度が高い原因については不明である。今後、その原因について、抗リン脂質抗体との関連を中心に検討を進めることにより、APS 患者における血栓症発症機序の解明につながる知見が得られることが十分に期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Junzo Noijma, Yukari Motoki, Kazusa Hara, Toshiyuki Sakata, Kiyoshi Ichihara. Novel enzyme immunoassay system for simultaneous detection of six subclasses of antiphospholipid antibodies for differential diagnosis of antiphospholipid syndrome. Blood coagulation & fibrinolysis, 査読有, 28(4), 2017, 316-322.
DOI: 10.1097/MBC.0000000000000599

Junzo Nojima, Yukari Motoki, Kazusa Hara, Toshiyuki Sakata, Hidehiro Tsuneoka, Kiyoshi Ichihara. Detection of antibodies against domain 1 of 2- glycoprotein I is key in predicting thromboembolic complications in patients with systemic lupus erythematosus. Thrombosis Research, 査読有, 153, 2017, 83-84.
DOI: 10.1016/j.thromres.2017.02.001.

本木由香里、野島順三、吉田美香、關谷暁子、原和冴、森下英理子、家子正裕、ELISA による抗リン脂質抗体価測定の標準化に向けて、日本血栓止血学会誌、査読無、27 巻、2016、644-652
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsth/27/6/27_2016_JJSTH_27_6_p644-652/article/-char/ja/

〔学会発表〕(計6件)

本木由香里、吉田美香、關谷暁子、原和冴、家子正裕、森下英理子、野島順三、日本における抗リン脂質抗体 ELISA の標準化に向けて 第3報、第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2017年1月21日、野村コンファレンスプラザ日本橋(東京都・中央区)

本木由香里、野島順三、原和冴、阪田敏幸、AcuStar-EIA システムによる抗リン脂質抗体検査法の確立、第38回日本血栓止血学会学術集会、2016年6月16-18日、奈良春日野国際フォーラム 麓 ~I・RA・KA~(奈良県・奈良市)

村田知奈美、原和冴、玉利知佳子、本木由

香里、野島順三、抗リン脂質抗体症候群の病態に対する酸化ストレスの影響、第16回TTMフォーラム学術集会、2016年3月5日、大手町サンケイプラザ(東京都・千代田区)

本木由香里、吉田美香、關谷暁子、原和冴、家子正裕、森下英理子、野島順三、日本における抗リン脂質抗体 ELISA の標準化に向けて 第2報、第10回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2016年2月20日、野村コンファレンスプラザ日本橋(東京都・中央区)

本木由香里、野島順三、抗リン脂質抗体による血栓形成作用、第15回TTMフォーラム学術集会、2015年3月7日、大手町サンケイプラザ(東京都・千代田区)

本木由香里、野島順三、日本における抗リン脂質抗体 ELISA の標準化に向けて、第9回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2015年2月28日、野村コンファレンスプラザ日本橋(東京都・中央区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

本木 由香里 (MOTOKI, Yukari)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 80724054