

令和 6 年 9 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20752

研究課題名（和文）細胞内代謝を標的とした抗リン脂質抗体症候群の新規治療開発

研究課題名（英文）Novel mechanisms of antiphospholipid antibody syndrome targeting intracellular metabolism.

研究代表者

久田 諒（Hisada, Ryo）

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：00832370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：抗リン脂質抗体(aPL)による単球活性化の新たな機序として、細胞内代謝に着目した。ヒト単球の細胞株を用いて、フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 aPS/PTをin vitroで添加し、seahorse analyzerを用いて細胞内代謝について測定した所、有意に亢進する代謝経路を見出した。機能解析のため、当該の代謝経路を阻害する薬剤を用いて、単球活性化マーカーである組織因子の発現を測定した所、濃度依存性に組織因子の発現を抑制することが明らかとなった。更に、網羅的メタボローム解析を施行した所、上記と同様の代謝経路の亢進が見られた他、別の代謝経路の有意な亢進についても確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、抗リン脂質抗体による刺激は単球の細胞内代謝を変動させ活性化をきたしている可能性が示唆された。現在特異的な治療が無く、抗血栓療法による対症療法に留まっている抗リン脂質抗体症候群において、細胞内代謝は新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A new mechanism of monocyte activation by antiphospholipid antibodies (aPL) focused on intracellular metabolism. Using a human monocyte cell line, phosphatidylserine-dependent anti-prothrombin antibodies were added in vitro and intracellular metabolism was measured using a seahorse analyzer, which revealed a specific metabolic pathway that was significantly enhanced. For functional analysis, drugs that inhibited the specific metabolic pathway were used, and dose-dependently suppressed the expression of tissue factor, a marker of monocyte activation. This study suggests that stimulation with aPL may alter intracellular metabolism and activate monocytes. Intracellular metabolism may be a new therapeutic target in antiphospholipid antibody syndrome.

研究分野：Rheumatology

キーワード：APS Monocyte Metabolic pathway

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は、抗リン脂質抗体 (aPL) によって引き起こされる自己免疫性血栓症および妊娠合併症が主な病態である。aPL は、血栓形成に関連する複数の抗体群を含み、その中でも抗カルジオリピン抗体 (aCL)、抗 2 グリコプロテイン I 抗体 (a 2GPI) およびループスアンチコアグラント (LA) が最もよく知られている。APS の診断には、これらの抗体と臨床症状 (血栓症や反復流産など) との組み合わせが用いられる。

APS は後天的な血栓傾向疾患として非常に頻度が高く、再発リスクが高いことから、その病態を理解し、治療法を確立することが急務である。現時点では、APS に対する根本的な治療法はなく、主な治療は抗凝固療法に依存している。これは、aPL が血管内皮細胞、単球、血小板といった向血栓性の細胞を活性化させ、血栓形成のリスクを高めることが知られているためである。APS 患者はしばしば血栓の再発を繰り返すため、効果的な血栓予防が重要な課題となっている。

このような背景から、APS における血栓形成の機序に注目が集まっている。aPL が単球に結合し、単球を活性化させることで、血栓形成に関与する分子が発現する。特に、単球は外因性凝固経路の重要な分子である組織因子 (TF) の産生を促進し、これが血栓形成の引き金となることが示されている。これまでの研究では、APS 患者の単球において TF の発現が増加していることが確認されており、単球の活性化が APS の病態形成において重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、その具体的な分子機構は未解明であり、単球の活性化を抑制する新たな治療法の開発が求められている。

近年、細胞内代謝が自己免疫疾患における細胞の機能に大きな影響を与えることが明らかになりつつある。特に、解糖系 (glycolysis)、グルタミン代謝 (glutaminolysis)、脂質代謝 (fatty acid metabolism) といった代謝経路が、細胞の増殖、分化、機能維持、さらには細胞死に至るまでの一連のプロセスにおいて重要な役割を果たすことが示されている。しかし、これまでの代謝研究の多くは T 細胞や B 細胞に焦点を当てており、単球に関する研究は十分に進んでいない。これは、関節リウマチや全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患において、T 細胞や B 細胞が中心的な役割を果たしていると考えられ、単球の関与が比較的小さいと考えられてきたためである。

APS においては、単球が重要な役割を果たしていることから、その細胞内代謝に焦点を当てることは新たな治療標的を見つけるための鍵となる可能性がある。これまで、APS の病態における単球の細胞内代謝に関する研究はほとんど報告されておらず、本研究ではこの未解明領域にアプローチし、APS の新しい治療法の開発につながる可能性を探ることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、APS における単球活性化に関連する細胞内代謝経路の役割を解明し、新たな治療ターゲットを見出すことである。特に、単球の解糖系 (glycolysis) がどのように活性化され、血栓形成に寄与するかを調べる。さらに、この代謝経路の制御に関与する分子機構を特定し、APS の病態形成における代謝の重要性を明らかにする。本研究は、APS に対する新規治療法の基礎を築くことを目指している。

3. 研究の方法

1. 単球活性化条件の最適化

ヒト単球株 THP-1 に aPL の一つであるフォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) を *in vitro* で添加し、単球の活性化条件 (抗体の濃度、培養時間) を最適化した。単球の活性化マーカーとして、組織因子 (TF) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定し、最も発現が増加する条件を特定した。

2. 細胞内代謝の測定

最適化された条件を用い、aPS/PT 刺激下での単球の代謝変動を Seahorse XF Glycolytic Rate Assay を用いて測定した。具体的には、解糖系の主要指標である Glycolysis、Glycolytic capacity (解糖能)、Glycolytic reserve (解糖予備能) を解析し、aPL 刺激による代謝変化を明らかにした。また、ミトコンドリア呼吸 (酸素消費率) も併せて測定し、単球のエネルギー代謝全体を把握した。

3. メタボローム解析

aPS/PT 刺激を行った THP-1 細胞について、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社 (HMT) に委託し、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) を用いて網羅的メタボローム解析を実施した。この解析により、Glycolysis 関連を含む種々の代謝物質の aPS/PT 刺激による変動を調査した。

4. Glycolysis 阻害の効果測定

Glycolysis 阻害薬である 2-DG を用いて、解糖系が単球の活性化に与える影響を評価した。aPS/PT 刺激下の THP-1 細胞に対して 2-DG を添加し、TF mRNA の発現量をリアルタイム PCR で測定した。2-DG の濃度依存的な TF 発現の抑制効果を確認することで、解糖系の重要性を評価した。

5. シグナル伝達経路の解析

単球の解糖系活性化がどのシグナル経路を介して行われるかを解明するため、ROS (活性酸素種) の産生および p38MAPK pathway の活性化を Flow cytometry および Western blotting を用いて解析した。aPS/PT 刺激による ROS の産生変動を測定し、ROS 依存的なシグナル伝達の有無を評価した。また、p38MAPK およびそのリン酸化型である phospho-p38MAPK の発現を Western blotting で測定し、解糖系がどの経路を介して単球を活性化するかを調査した。

4. 研究成果

1. 単球活性化条件の確立

aPS/PT 添加により、最適な単球活性化条件を確立した。具体的には、aPL の濃度と培養時間を調整することで、単球における TF 発現が最大となる条件を特定した。この条件下では、aPS/PT 刺激群で TF 発現が control IgG 刺激群に対して 1.5 ~ 2 倍に増加することが確認された。

2. 細胞内代謝測定

Seahorse XF Glycolytic Rate Assay を用いた測定では、aPS/PT 刺激により解糖系が顕著に亢進していることが示された。具体的には、Glycolytic capacity および Glycolytic reserve が aPS/PT 刺激群で有意に増加しており、解糖系の活性化が単球の活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. メタボローム解析

CE-MS を用いたメタボローム解析では、解糖系に関連する代謝産物である Glucose-6-Phosphate、Fructose-6-Phosphate、Fructose-1,6-Bisphosphate が有意に増加していることが確認された。解糖系が APS における単球の活性化に直接関与している可能性を示唆している。

4. Glycolysis 阻害の効果

Glycolysis 阻害薬 2-DG を用いた実験では、解糖系を阻害することで、TF 発現が濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。これにより、単球の活性化には解糖系が不可欠であることが示された。

5. シグナル伝達経路の解析結果

aPS/PT 刺激による ROS 産生には大きな変動は認められなかったが、Western blotting の結果、aPS/PT 刺激により phospho-p38MAPK/p38MAPK 比が増加しており、解糖系が p38MAPK シグナルを介して単球の活性化に寄与していることが示唆された。

これらの結果は、解糖系が APS における単球の活性化において重要な役割を果たしていることを示しており、この代謝経路が将来的に APS に対する新規治療標的となる可能性を示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------