

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10031

研究課題名(和文)既存の自己抗体が未特定の自己免疫疾患における網羅的抗リン脂質抗体の検討

研究課題名(英文)A comprehensive study of antiphospholipid antibodies in autoimmune diseases for which existing autoantibodies are unspecified

研究代表者

是松 聖悟 (Seigo, Korematsu)

大分大学・医学部・客員教授

研究者番号：60264347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は抗カルジオリピン(CL)抗体が陰性であったSLEに網膜中心静脈閉塞症を合併した症例において、血管内皮細胞のリン脂質の主要構成成分である抗ホスファチジルコリン(PC)抗体が上昇している例を見だし報告した。今回は、基礎疾患未確定の小児の脳梗塞例の中に、リン脂質抗体が上昇している例がないかを検討した。対象児のうち、2回ともに抗CL抗体がCut off値を超えて上昇していたのは1名のみであったが、抗PC抗体、抗PE抗体は3名、抗PS抗体は2名に継続した上昇がみられた。リン脂質の微量構成成分に対する抗CL抗体が陰性の場合でも、主要構成成分に対するリン脂質抗体の上昇している例があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高リン脂質抗体症候群は従来、抗カルジオリピン抗体の測定によってなされていたが、リン脂質の微量構成成分に対する抗カルジオリピン抗体が陰性の場合でも、主要構成成分に対するリン脂質抗体の上昇している例があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Cerebral infarction in children is rare and often occurs secondary to moyamoya disease, hereditary coagulopathies, vasculitis, antiphospholipid antibody syndrome, heart disease, mitochondrial disease. However, in some cases, the causes of cerebral infarction is unknown. In this study, we detected increased levels of serum anti-phosphatidylcholine and anti-phosphatidylethanolamine IgG antibodies in three pediatric patients with cerebral infarction whose primary disorders are unknown by routine examination. For the five disease control patients of cerebral infarction due to other primary disorders, there was no such increase in these antibodies levels.

Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine are a major component of the phospholipids of vascular endothelial cells, while cardiolipin is a minor component. Anti-phosphatidylcholine and anti-phosphatidylethanolamine antibodies, as well as anti-cardiolipin antibody, might also be risk factors with cerebral infarction.

研究分野：小児科学

キーワード：リン脂質抗体 脳梗塞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

種々の自己免疫疾患において、自己抗体が病態形成に関与していることが証明されているが、臨床的に自己免疫疾患と診断されても、自己抗体が証明できないことは少なくない。

今回の研究の発端となったのは、我々の次の2つの症例報告である。

第1 (Korematsu S et al. *BMC Pediatr* 2014) は、網膜中心静脈閉塞による網膜出血 (Fig. 1) を来した全身性エリテマトーデス (SLE) の15歳女児の症例報告である。経過から、SLEに抗リン脂質抗体症候群が続発したことが示唆されたが、診断に必要な血清抗カルジオリピン (CL) IgG抗体、抗2GPI抗体、ループスアンチコアグラントは陰性であった。そこで、CL以外のリン脂質に対する抗体の測定系を確立したところ、抗ホスファチジルコリン (PC) IgG抗体、抗ホスファチジルエタノラミン (PE) IgG抗体等の上昇を見いだした。この結果から、抗CL抗体は陰性のため、診断基準は満たさないが、抗リン脂質抗体症候群の病態があると判断し、ステロイド、抗凝固療法を行ったところ、患児の症状は改善した。

第2 (Korematsu S et al. *Vaccine* 2014) は、自己免疫性視神経炎の2例である。ともにインフルエンザワクチン後に発症し、自己免疫が原因と考えられたが、視神経脊髄炎にて検出されることのある抗アクアポリン4抗体は陰性であった。しかし、この2例に対しても、抗PC IgG抗体等の上昇を見いだした。

## 2. 研究の目的

小児の脳梗塞は稀で、もやもや病や先天性凝固異常症、抗リン脂質抗体症候群、心疾患、ミトコンドリア病などに併発することがあるが、原因が特定できないこともある。今回は、基礎疾患未確定の小児の脳梗塞例の中に、リン脂質抗体が上昇している例がないかを検討した。

ヒトの関節軟骨や滑膜血管にはPCやPE、スフィンゴミエリン (SM) 等のリン脂質が高濃度含有されており、若年性特発性関節炎における、これら抗リン脂質抗体とその臨床的意義を検討した。

予防接種の副反応に急性散在性脳脊髄炎や視神経炎、関節炎などがあり、その基礎病理として、血管周囲の炎症細胞浸潤がある。一方、ヒトの血管内皮細胞や髄鞘、視神経、関節軟骨にはPCやPE等のリン脂質が高濃度含有されている。今回、ワクチン副反応における血管炎の基礎病態に、抗リン脂質抗体関与の有無を検討した。

血管炎の原因として抗リン脂質抗体症候群があるが、川崎病におけるこの抗体の関与についての検討は乏しい。動脈内皮細胞膜を構成するリン脂質の主成分であるPC、PEと、本来は微量しか存在しないが従来の一般的視標であるCLに対する抗体の産生動態を検討した。

## 3. 研究の方法

対象は2009年-2014年に大分大学医学部小児科に入院し、脳血管病変、凝固異常、心疾患、代謝疾患等の特定にいたらなかった小児の脳梗塞の患児3名 (3か月、1歳、5歳)。3か月あけた2回の採血から得られた血清を用いて、CL、PC、PE、PS (ホスファチジルセリン) に対するIgG抗体をELISA法にて測定した。病的対照児としてProtein C欠損症による脳梗塞例2名 (1か月、7歳) の1回の血清とし、Cut off値は、自己免疫疾患、血液凝固異常のない食物アレルギーの対照児6名の平均+2標準偏差とした。

7歳発症の全身型の女児。非ステロイド系解熱鎮痛薬、メトトレキサート、メチルプレドニゾロンにて治療するも、12歳時に再燃し、抗IL6受容体抗体療法を導入。その後寛解し、15歳時から無投薬で現在16歳。保存血清より、ELISA法にて、抗PC、PE、SM、CLに対するIgG抗体を測定し、血清IL6値と対比した。

8名 (基礎疾患: 若年特発性関節炎7名、全身性エリテマトーデス1名。4.1~17.2歳、中央値11.5歳、男/女=3/5)。予防接種: インフルエンザ (2例)、MR (2例)、2価ヒトパピローマウイルス (1例)、4価ヒトパピローマ (2例)。文書による同意を得て、ワクチン接種前、1か月後に採取した血清より、ELISA法にて、PC、PE、CLに対するIgG抗体を測定した。年齢適合健常児4名の平均+2標準偏差をcut off値とした。

症例は 3 か月 / 2 歳 2 か月、ともに男児。発熱、結膜充血等から川崎病と診断。症例 1 は IVIG に反応、症例 2 は IVIG 投与 3 回目で解熱するも、それぞれ 5 / 4mm の冠動脈瘤を形成した。

#### 4 . 研究成果

脳梗塞の症例で、2 回ともに抗 CL 抗体が Cut off 値を超えて上昇していたのは 1 名のみであったが、抗 PC 抗体、抗 PE 抗体は 3 名、抗 PS 抗体は 2 名に継続した上昇がみられた。Protein C 欠損症による脳梗塞例 2 名にこれらの抗体の上昇はみられなかった (Table 1)。抗 CL 抗体以外のリン脂質抗体の病的意義は検討課題である。ただしリン脂質の微量構成成分に対する抗 CL 抗体が陰性の場合でも、主要構成成分に対するリン脂質抗体の上昇している例があることを示した (Korematsu S et al. Bain Dev 2017)。

**Table 1. Results of anti-phospholipids antibodies**

patients with cerebral infarction	age	CL IgG	PC IgG	PE IgG	PS IgG
1	3m	<b>1.76</b>	<b>1.25</b>	<b>0.81</b>	0.34
	6m	0.80	<b>0.76</b>	<b>0.81</b>	0.34
2	1y 3m	0.68	<b>1.72</b>	<b>1.67</b>	<b>1.77</b>
	1y 7m	<b>1.18</b>	<b>1.75</b>	<b>1.60</b>	<b>1.84</b>
3	5y 9m	<b>1.42</b>	<b>1.46</b>	<b>1.42</b>	<b>1.29</b>
	6y 1m	0.44	<b>1.54</b>	<b>1.33</b>	<b>1.38</b>
<b>disease controls</b>					
1 (protein C deficiency)	1m	0.59	0.28	0.50	0.53
2 (protein C deficiency)	7y 5m	0.19	0.19	0.23	0.17
3 (protein C deficiency)	7y 6m	0.38	0.32	0.70	0.66
4 (protein C deficiency)	7y 6m	0.25	0.23	0.30	0.25
5 (cerebral infarction after varicella)	4y 5m	0.23	0.10	0.07	0.20
<b>control</b>					
1	1y 0m	0.75	0.54	0.63	0.62
2	1y 3m	0.70	0.54	0.64	0.64
3	1y 8m	0.73	0.59	0.43	0.51
4	2y 10m	0.61	0.55	0.46	0.48
5	4y 1m	0.68	0.57	0.57	0.50
6	5y 0m	n.e.	0.55	0.62	0.65
<b>cut-off level</b> (controls' mean+2SD)		<b>0.80</b>	<b>0.60</b>	<b>0.74</b>	<b>0.72</b>

CL: cardiolipin, PC: phosphatidylcholine, PE: phosphatidylethanolamine, PS: phosphatidylserine, n.e.: not examined

若年性特発性関節炎の症例の初診時 (7 歳) / 寛解時 (10 歳) / 再燃時 (12 歳) / 再寛解薬剤中止後 (16 歳) の血清 IL6 (<10 pg/ml): 162 / 5 / 25 / 8 に対し、抗 PC-IgG 抗体 (<0.12): 0.36 / 0.11 / 0.20 / 0.07、抗 PE-IgG 抗体 (<0.14): 0.30 / 0.09 / 0.14 / 0.05、抗 SM-IgG 抗体 (<0.12): 0.17 / 0.07 / 0.13 / 0.06、抗 CL-IgG 抗体 (<0.10): 0.19 / 0.05 / 0.09 / 0.04 で、抗 PC-IgG 抗体は病勢と相関した。関節軟骨や滑膜血管に高濃度分布する抗 PC 抗体は、JIA 増悪因子となりえ、特異性の高い抗 PC 抗体吸着療法の有用性を示唆した。

インフルエンザワクチンを接種した 2 名に抗体 PC-IgG 抗体の 2 倍以上の上昇がみられ (前 / 1 か月後 = 0.156 / 0.324 OD, 0.072 / 0.147 OD : cut off 値 0.078) うち 1 名は抗 CL-IgG 抗体も上昇した (0.130 / 0.366 : cut off 値 0.241)。他ワクチンの前後では、抗 PC 抗体 (平均 0.133 / 0.107) 抗 PE 抗体 (平均 0.247 / 0.195 : cut off 値 0.301) 抗 CL 抗体 (平均 0.215 / 0.220) に変化はなかった。今回の 8 例にはワクチンによる臨床的な副反応はみられなかったが、インフルエンザワクチンは抗 PC 抗体の上昇を惹起し、血管炎の発症 / 増悪に関与している可能性を示唆した。

川崎病の症例 1 の病日 4 / 6 / 15 の抗 PC-IgG 抗体 ( $<0.086$  OD) は  $0.164 / 0.106 / 0.102$ 、抗 PE-IgG 抗体 ( $<0.098$  OD) は  $0.129 / 0.098 / 0.079$  と上昇するも、抗 CL-IgG 抗体は正常であった。症例 2 の病日 1 / 6 / 14 / 20 の抗 PC-IgG 抗体は  $0.045 / 0.083 / 0.134 / 0.139$  と、瘤形成の時期に一致して上昇したが、抗 PE-IgG 抗体、抗 CL-IgG 抗体の上昇はなかった。抗 PC-IgG 抗体が冠動脈瘤形成に関与している可能性を示唆した。このため、次のステップとして前向き研究として川崎病 50 例の初診時の血清を用いて、抗 PC、抗 PE、抗 CL 抗体を測定し、免疫グロブリン不応例と反応例を比較したが、両者に有意差は見られなかった。

いくつかの疾患や予防接種後に複数の抗リン脂質抗体が上昇することがわかった。これらの病的意義は今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Korematsu S, Yamada H, Miyahara H, Ihara K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Increased levels of anti-phosphatidylcholine and anti-phosphatidylethanolamine antibodies in pediatric patients with cerebral infarction.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Dev	6. 最初と最後の頁 542-546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2017.01.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 是松聖悟、宮原弘明、山田博
2. 発表標題 小児脳梗塞例における抗リン脂質抗体の検討
3. 学会等名 日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2016年

〔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