

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16202

研究課題名(和文) 抗リン脂質抗体症候群における自己抗体産生機序の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of autoantibody production in antiphospholipid syndrome

研究代表者

藤枝 雄一郎 (Fujieda, Yuichiro)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70790872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、1)プロトロンビンとMHC class IIの複合体が細胞表面に発現し、抗リン脂質抗体(aPS/PT)が結合すること、2)その結合はHLA alleleで異なること、3)PMAで刺激した単球細胞内でプロトロンビンが合成されること、4)単球細胞で合成されたプロトロンビンは抗リン脂質抗体(aPS/PT)と結合することが明らかとなった。これらの結果によって、新たな抗リン脂質抗体症候群の病態が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗リン脂質抗体症候群(APS)は凝固・線溶タンパクに対する自己抗体により、血栓症または妊娠合併症を生じる疾患である。抗リン脂質抗体(aPL)の抗原はリン脂質ではなく、リン脂質に結合する凝固・線溶タンパクであり、病原性自己抗体と考えられており、APSは自己免疫性血栓症として分類される。しかしながら、依然として治療は抗血栓療法のみしかなく、病態に基づいた根本的治療の確立が求められている。本研究によって新たな病態が明らかとなった。今後の治療法の確立に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study has clarified that 1) over-expressed prothrombin/MHC II complexes were detected on THP-1 cells surface by aPS/PT, 2) the dependency of MHC II allele differences on aPS/PT binding was confirmed, 3) PMA treated monocyte cell line synthesized prothrombin, 4) the prothrombin showed stronger binding with aPS/PT compared with non-pathogenic monoclonal anti-PT antibody. These are novel findings in the pathogenesis of antiphospholipid syndrome.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：抗リン脂質抗体 抗原提示 プロトロンビン MHC class II

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は凝固・線溶タンパクに対する自己抗体により、血栓症または妊娠合併症を生じる疾患である。抗リン脂質抗体 (aPL) の抗原はリン脂質ではなく、リン脂質に結合する凝固・線溶タンパクであり、代表的なものとしてカルジオリピン (CL) に結合するβ2グリコプロテイン 1 (β2GPI)、ホスファチジルセリン (PS) に結合するプロトロンビン (PT) が知られている。これらの抗体は病原性自己抗体と考えられており、APS は自己免疫生血栓症として分類される。しかしながら、依然として治療は抗血栓療法のみしかなく、病態に基づいた根本的治療の確立が求められている。免疫抑制療法が確立していない理由の一つとして、抗体のターゲットが、単球、血小板、血管内皮細胞、補体など多岐にわたることが考えられ、抗体の除去もしくは抗体産生抑制が根本的治療であると想定される。本研究では、抗リン脂質抗体産生細胞を同定し、新規治療を確立することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究では、抗リン脂質抗体症候群 (APS) において病原性自己抗体であるホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体 (aPS/PT) の産生細胞を同定し新規治療を確立することを目的とする。近年明らかとなったミスフォールドタンパクの MHC class II による抗原提示に着目し、aPS/PT 産生細胞を同定するアッセイを確立すること、そして同定した細胞に対する新規治療の可能性を考え、検証する。

3. 研究の方法

(1) MHC class II による PT の抗原提示の検討

HEK293T 細胞に Flag で標識した PT と MHC class II を強制発現させ、フローサイトメリー (FCM) を用いて、細胞表面における PT と MHC class II の発現を評価した。PT と MHC class II 発現の同定には抗ヒト PT 抗体、マウスモノクローナル抗体である 231D (aPS/PT)、抗 HLA-DR 抗体を用いた。

(2) PT/ MHC class II 複合体形成の検討

HEK293T 細胞に Flag で標識した PT と HLA-DR4 を強制発現させ、免疫沈降法を用いて、PT と MHC class II の直接結合の有無を評価した。

(3) THP-1 細胞における PT 合成能の検討

単球細胞の cell line である THP-1 細胞と肝細胞の cell line である HepG2 細胞を用いて、それぞれの PT 合成能を Western Blotting (WB) および FCM により評価した。THP-1 細胞と HepG2 細胞はそれぞれ無処置で培養した細胞および phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) で 12 時間刺激後、48 時間培養した細胞で評価した。

4. 研究成果

(1) 抗 HLA-DR 抗体および抗 PT 抗体または aPS/PT が結合する細胞集団が観察され、細胞表面における PT と MHC class II の発現を確認した。抗 HLA-DR 抗体と抗 PT 抗体、抗 HLA-DR 抗体と aPS/PT が共に陽性の細胞集団が観察され、PT/MHC II 複合体が HEK293T 細胞表面に存在することが示唆された (図 1)。また網羅的に MHC class II を強制発現した HEK293T 細胞と aPS/PT の抗体結合親和性は HLA allele 毎に異なり、aPS/PT の結合は発現させた HLA allele に影響することを確認した。

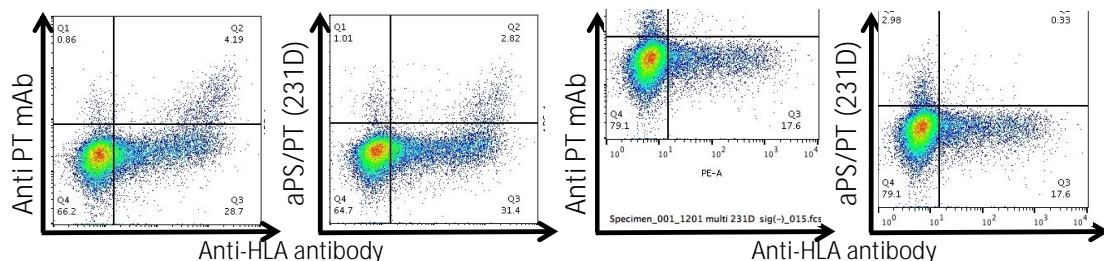


図 1 : MHC ClassII による PT の抗原提示の検討

(2) PT/ MHC class II 複合体形成の検討

Flag で標識した PT と HLA-DR4 を強制発現させた HEK293T 細胞の細胞 lysate を抗 Flag 抗体と抗 HLA-DR 抗体で免疫沈降した。抗 Flag 抗体で HLA-DR が、抗 DR 抗体で Prothrombin が共沈降され、Prothrombin と HLA-DR が複合体を形成していることが示唆された。

(3) THP-1 細胞における PT 合成能の検討

抗 PT 抗体を用いた WB の評価では、PMA で刺激した THP-1 細胞 lysate で精製 PT と同じ大きさのタンパク質が確認された(図2)。無刺激で培養した THP-1 細胞および細胞上清では抗 PT 抗体に認識されるタンパク質は同定されなかった。

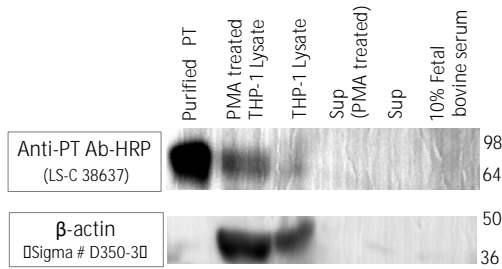


図2：THP-1 細胞における PT 合成能の検討 (Western blotting)

一方で、FCM の細胞内染色の評価では PMA で刺激した THP-1 細胞で抗 PT 抗体と aPS/PT で認識される抗原が確認された。THP-1 で合成された PT は抗 PT 抗体と比較して、aPS/PT との結合親和性が高かった(図3)。

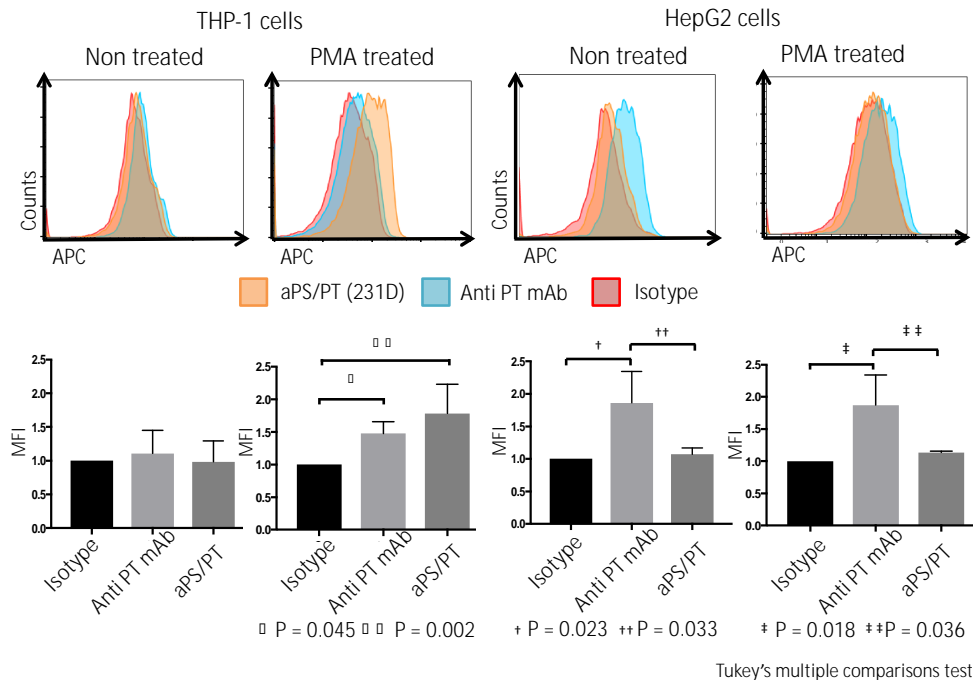


図3：THP-1 細胞における PT 合成能の検討 (Flowcytometry)

WB および FCM の結果から、THP-1 細胞は PMA 刺激により PT 蛋白を合成した。合成された PT は抗 PT 抗体と比較して、aPS/PT との結合親和性が高かった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

査読有り Ohnishi N, Fujieda Y, Hisada R, Nakamura H, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Yasuda S, Hisashi Arase , Atsumi T. Antigenic property of Prothrombin/HLA-DR complex on procoagulant cells in patients with antiphospholipid syndrome. American College of Rheumatology Annual Meeting 2018, Chicago, USA, 19-24 Oct. 2018

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大西 直樹

ローマ字氏名：Naoki Ohnishi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。