

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390269

研究課題名 (和文) 抗リン脂質抗体症候群：病因の解明と新たな治療ターゲット

研究課題名 (英文) Pathogenesis of antiphospholipid syndrome and new therapeutic target

研究代表者 小池 隆夫 Koike Takao  
 北海道大学・大学院医学研究科・教授  
 80146795

研究成果の概要：

代表的な抗リン脂質抗体である抗 $\beta_2$ グリコプロテイン I 抗体(抗 $\beta_2$ GPI 抗体)の血栓原性を明らかにする目的で、単球やマクロファージ細胞株に抗 $\beta_2$ GPI 抗体を作用させ、抗 $\beta_2$ GPI 抗体と結合ないし相互作用する細胞表面分子について、免疫沈降法により共沈させ、ウエスタンブロット法あるいは質量分析法などを用いて同定を試みた。質量分析法で同定された複数の候補細胞質蛋白の中でゲルゾリンが $\beta_2$ GPI と結合していることがウエスタンブロット法で確認された。ゲルゾリンはインテグリン $\alpha_5\beta_1$  と共役し、抗 $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激に関与する可能性が示唆された。細胞表面分子のみならず抗 $\beta_2$ GPI 抗体と結合ないし相互作用する流血中の可溶性分子についても検策した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：

- |                |                   |             |
|----------------|-------------------|-------------|
| (1) 抗リン脂質抗体症候群 | (2) $\beta_2$ GPI | (3) 血栓形成    |
| (4) プロテオーム解析   | (5) シグナル伝達        | (6) p38MAPK |
| (7) ゲルゾリン      | (8) インテグリン        |             |

## 1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome:以下 APS)とは、多彩な動・静脈血栓症、習慣流産および血小板減少を主要徴候として、抗カルジオリピン(CL)抗体、ループスアンチコアグラントなどの抗リン脂質抗体の出現を特徴とする、難治性の自己免疫疾患である。APSの本態は血栓症であり、現在ではリスクファクターの存在しない患者に認められる動・静脈血栓症のなかでも最も頻度が高いものとして位置づけられている。また最近では抗カルジオリピン抗体の存在と動脈硬化の関連も指摘されている。これまでの *in vitro* および *in vivo* の研究により、APS では、抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体をはじめとする一群の自己抗体が血管内皮細胞や単球系細胞などを刺激し、凝固反応のイニシエーターとなる組織因子(TF)を細胞表面に発現し凝固系を活性化することにより、易血栓性が誘導されるということを明らかにされてきた。さらに、抗 $\beta_2$ GPI モノクローナル抗体や抗プロトロンビンモノクローナル抗体、またはAPS患者から分離した抗リン脂質抗体を含むサンプルを用いて、血管内皮細胞・単球・マクロファージ細胞株に反応させ、MyD-88, NF- $\kappa$ B の活性化を介して、TFの発現が起きることを明らかにしているが、抗体が対応抗原に結合した後の細胞刺激シグナルについては明らかにされていない点が多い。抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナル、細胞活性化メカニズムについて検討を行うことにより抗リン脂質抗体症候群発症機構を解明し、さらにシグナル伝達制御による病態制御を可能とすることが本研究の背景である。

## 2. 研究の目的

本研究では、抗 $\beta_2$ -GPI抗体と結合する細胞表面分子の同定を行い、受容体、共役分子な

どの機能について解析を行う。MyD88 より p38MAPK リン酸化までのさらなる経路について、ウエスタンブロットリング法などにより解析を行う。さらに、p38MAPK リン酸化後のTF発現までの経路について、yeast two-hybrid 法、ゲルシフト法などを用いて解析を行い、抗リン脂質抗体の病原性、つまり〈血栓形成機序〉を分子生物学的に解明することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

$\beta_2$ GPI と結合する細胞表面タンパク質の検出のため、まず、FLAG タグ $\beta_2$ GPI 発現ベクターを構築する。発現させたリコンビナントFLAG タグ $\beta_2$ GPI を、RAW264.7 の細胞溶解液と混合する。その混合物を使用し、抗FLAG抗体アフィニティークロマトグラフィーにより FLAG タグ $\beta_2$ GPI と複合体を形成するタンパク質( $\beta_2$ GPI 関連プロテオーム)を網羅的に分離する。このサンプルを SDS-PAGE により分離しバンドとして確認できるものはMALDI-TOFを使用してタンパク質を同定する。もしくは SDS-PAGE のバンドに関係なくゲルを数10に均等に切り出し、すべてをESI-LC-MS/MSにより解析する。

解析の結果得られたタンパク質につき、 $\beta_2$ GPI との結合を FACS 法およびウエスタンブロットリング法にて確認をする。さらにそのタンパク質の存在の有無による抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激シグナルの変動について、ウエスタンブロットリング法およびルシフェラーゼアッセイにより解析を行う。

## 4. 研究成果

末梢血単核球(PBMC)および単球系細胞株において、ヒトモノクローナル抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体での刺激により p38 MAPK のリン酸化が上昇し、NF- $\kappa$ B の活性化をひきおこし、TF が発現することを認めた。また、RAW264.7 の細胞溶解液とリコンビナントFLAGタグ $\beta_2$ GPIを混

合し、抗 FLAG 抗体アフィニティークロマトグラフィーにより $\beta_2$ GPI 関連プロテオームを分離した。このサンプルを ESI-LC-MS/MS により解析したところ、複数のタンパク質が同定された。候補の細胞膜タンパク質の中で、ゲルゾリンが $\beta_2$ GPI と結合していることがウエスタンブロットイング法にて確認された。また、フローサイトメーターによりゲルゾリンが細胞膜表面上でインテグリン $\alpha 5\beta 1$  と結合することが確認され、さらに $\beta_2$ GPI がゲルゾリン、インテグリン $\alpha 5\beta 1$  を含む複合体と結合することが確認された。また、ルシフェラーゼアッセイにより、抗インテグリン抗体によるインテグリン $\alpha 5\beta 1$  阻害により、抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激シグナルが減弱することが確認された。

以上の結果から以下の結論が導き出された。

(1) 抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による刺激により、細胞表面のインテグリン $\alpha 5\beta 1$  を介して、p38 MAPK のリン酸化が起こり、NF- $\kappa$ B が核内へと移行し、TF プロモーターに結合し、TF 転写が誘導されてくる可能性がある。

(2) 抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による TF の発現は $\beta_2$ GPI が存在しているときにのみ認められることより、単球の細胞活性化は単球の細胞活性化は $\beta_2$ GPI に依存する、すなわち細胞と $\beta_2$ GPI に結合した自己抗体との interaction によるものであると考えられ、そこには受容体分子や共役分子の存在が想定される。

(3) 今回同定したタンパク質のなかで、ゲルゾリンはインテグリン $\alpha 5\beta 1$  と共役し、抗 CL/ $\beta_2$ GPI 抗体による細胞刺激に関与している可能性が示唆された。

(4) 今後、向凝固性の蛋白誘導の細胞内刺激伝達システムをより詳細に解析することにより、APS 発症のメカニズムを解明するのみならず、難治性である抗リン脂質抗体症候群の新しい治療法の確立が期待される。

## 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 32 件)

1. Horita T, Atsumi T, Yoshida N, Nakagawa H, Kataoka H, Yasuda S, Koike T. STAT4 single nucleotide polymorphism, rs7574865 G/T, as a risk for antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. (in press), 査読有
2. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, Amengual O, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis*. (in press), 査読有
3. Nishio M, Endo T, Fujimoto K, Yamamoto S, Obara M, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Kasahara I, Sato N, Koike T. FCGR3A-158V/F polymorphism may correlate with the levels of immunoglobulin in patients with non-Hodgkin's lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 82(2):143-7, 2008, 査読有
4. Oku K, Atsumi T, Amengual O, Koike T. Antiprothrombin antibody testing: detection and clinical utility. *Semin Thromb Hemost*. 34(4):335-339, 2008, 査読有
5. Fukaya S, Yasuda S, Hashimoto T, Oku K, Kataoka H, Horita T, Atsumi T, Koike T. Clinical features of haemophagocytic syndrome in patients with systemic autoimmune diseases: analysis of 30 cases. *Rheumatology*. 47(11):1686-1691, 2008, 査読有
6. Goto H, Nishio M, Kumano K, Fujimoto K, Yamaguchi K, Koike T. Discrepancy

- between disease activity and levels of vascular endothelial growth factor in a patient with POEMS syndrome successfully treated with autologous stem-cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 42(9):627-629,2008,查読有
7. Shiratori S, Yasumoto A, Tanaka J, Shigematsu A, Yamamoto S, Nishio M, Hashino S, Morita R, Takahata M, Onozawa M, Kahata K, Kondo T, Ota S, Wakasa K, Sugita J, Koike T, Asaka M, Kasai M, Imamura M. A retrospective analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL): clinical impact of graft-versus-leukemia/lymphoma effect. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14:817-823,2008,查読有
  8. Bohgaki M, Tsukiyama T, Nakajima A, Maruyama S, Watanabe M, Koike T, Hatakeyama S. Involvement of Ymer in suppression of NF-kappaB activation by regulated interaction with lysine-63-linked polyubiquitin chain. *Biochim Biophys Acta.* 1783(5):826-837,2008,查読有
  9. Atsumi T, Amengual O, Koike T. Etiopathology of the Antiphospholipid syndrome, In: Tanaka K, Davie EW, editor. *Recent Advances in Thrombosis and Haemostasis 2008.* 521-535,2008,查読有
  10. Shigematsu A, Kondo T, Yamamoto S, Sugita J, Onozawa M, Kahata K, Endo T, Shiratori S, Ota S, Obara M, Wakasa K, Takahata M, Takeda Y, Tanaka J, Hashino S, Nishio M, Koike T, Asaka M, Imamura M. Excellent outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a conditioning regimen with medium-dose VP-16, cyclophosphamide and total-body irradiation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14(5):568-575,2008,查読有
  11. Atsumi T, Horita T, Minori T, Koike T. Exchange of information in Rheumatology between East and West : From Man'yo-shu to the Future. *Arthritis Rheum.* 58(2):140-142,2008,查読有
  12. Kon Y, Atsumi T, Hagiwara H, Furusaki A, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Amengual O, Koike T. Thrombotic microangiopathy in patients with phosphatidylserine dependent antiprothrombin antibodies and antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 26(1):129-132,2008,查読有
  13. Okamoto T, Atsumi T, Shimizu C, Yoshioka N, Koike T. The potential role of macrophage migration inhibitory factor on the migration of vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.* 15(1):13-19,2008,查読有
  14. Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Autoimmune disease after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmun Rev.* 7(3):198-203,2008,查読有
  15. Kataoka H, Atsumi T, Hashimoto T, Horita T, Yasuda S, Koike T. Polymyalgia rheumatica as the manifestation of unclassified aortitis. *Mod Rheumatol.* 18(1):105-108,2008,查読有
  16. Nishio M, Endo T, Nakao S, Sato N, Koike T. Reversible cardiomyopathy due to secondary hemochromatosis with multitransfusions for severe aplastic

- anemia after successful non-myeloablative stem cell transplantation. *Int J Cardiol.* 127:400-401,2008,査読有
17. Kataoka H, Atsumi T, Hashimoto T, Horita T, Yasuda S, Koike T. Polymyalgia rheumatica as the manifestation of unclassified aortitis. *Mod Rheumatol.* 18(1):105-108,2007,査読有
  18. Bohgaki T, Atsumi T, Koike T. Multiple autoimmune diseases after autologous stem-cell transplantation. *New Engl J Med.* 357(26):2734-2736,2007,査読有
  19. Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y. Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *PNAS.* 104(46):18205-18210,2007,査読有
  20. Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 \*6 and \*26. *CID.* 45(9):1230-1237,2007,査読有
  21. Ieko M, Nakabayashi T, Tarumi T, Naito S, Yoshida M, Kanazawa K, Mizukami K, Koike T. Soluble fibrin monomer degradation products as a potentially useful marker for hypercoagulable states with accelerated fibrinolysis. *Clin Chim Acta.* 386(1-2), 38-45, 2007,査読有
  22. Yasuda S, Stevens RL, Terada T, Takeda M, Hashimoto T, Fukae J, Horita T, Kataoka H, Atsumi T, Koike T. Defective expression of ras guanyl nucleotide-releasing protein 1 in a subset of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 179(7): 4890-4900,2007,査読有
  23. Atsumi T, Cho YR, Leng L, McDonald C, Yu T, Danton C, Hong EG, Mitchell RA, Metz C, Niwa H, Takeuchi J, Onodera S, Umino T, Yoshioka N, Koike T, Kim JK, Bucala R. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. *J. Immunol.* 179(8):5399-5406,2007,査読有
  24. Atsumi T, Chiba H, Yoshioka N, Bucala R, Koike T. Increased fructose 2,6-bisphosphate in peripheral blood mononuclear cells of patients with diabetes. *Endocr J.* 57(4): 517-520,2007, 査読有
  25. Natsuga K, Sawamura D, Homma E, Nomura T, Abe M, Muramatsu R, Mochizuki T, Koike T, Shimizu H. Amicrobial pustulosis associated with IgA nephropathy and Sjögren's syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 57:523-526, 2007,査読有
  26. Horita T, Ichikawa K, Kataoka H, Yasuda S, Atsumi T, Koike T. Human monoclonal antibodies against the complex of phosphatidylserine and prothrombin from patients with the antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 16(7):509-516,2007, 査読有
  27. Amengual O, Atsumi T, Komano Y, Kataoka H, Horita T, Yasuda S, Koike T. A polymorphism in human platelet

antigen 6b and risk of thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 56(8):2803-2809,2007,査読有

28. Masuda H, Atsumi T, Fujisaku A, Shimizu C, Yoshioka N, Koike T. Acute onset of type 1 diabetes accompanied by acute hepatitis C: the potential role of proinflammatory cytokine in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 75(3):357-361,2007,査読有
29. Nishio M, Fujimoto K, Yamamoto S, Endo T, Sakai T, Obara M, Kumano K, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Sato N, Koizumi K, Mukai M, Koike T. Delayed redistribution of CD27, CD40 and CD80 positive B cells and the impaired in vitro immunoglobulin production in patients with non-Hodgkin lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 137(4):349-354,2007,査読有
30. Minauchi K, Nishio M, Itoh T, Yamamoto S, Fujimoto K, Sato N, Koike T. Hepatosplenic alpha/beta T cell lymphoma presenting with cold agglutinin disease. *Ann Hematol.* 86(2):155-157,2007,査読有
31. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, Sasano H, Koike T. Unilateral adrenalectomy improves insulin resistance and polycystic ovaries in a middle-aged woman with virilizing adrenocortical adenoma complicated with Cushing's syndrome. *J Endocrinol Invest.* 30:65-69,2007,査読有
32. Koike T, Atsumi T. "Resurrection of

thrombin" in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 56(2):393-394,2007,査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Koike,T. : "Development of Autoimmune Diseases : A Lesson from Stem Cell Transplantation", 6<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity , Porto, Portugal , September 13,2008
2. Koike,T. : " Multiple autoimmune diseases after CD34+ selected autologous hematopoietic stem cell transplantation in a patient with systemic sclerosis" The Mosaic of Autoimmunity , Kfar Maccabiah, Israel, February11, 2008
3. Koike,T. : " Antiphospholipid antibodies and cell activation" 12<sup>th</sup> International Congress on Antiphospholipid Antibodies , Florence, Italy, April18, 2007
4. Koike,T.:"Recent Progress in Systemic Autoimmune Diseases"第8回国際SLE学会、上海、May 23-25,2007

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小池 隆夫 (KOIKE TAKAO)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号 : 80146795

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし