

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08876

研究課題名(和文) 単球で合成されるプロトロンビンが関与する抗リン脂質抗体産生機序の解明

研究課題名(英文) The prothrombin/MHC II complexes on cell-surface of monocytes is the antigenic targets 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PMA刺激下でTHP1において、プロトロンビン(PT)のタンパクが発現すること、PMAで刺激したTHP1および抗リン脂質抗体症候群(APS)患者の単球は、抗PT抗体よりも、抗リン脂質抗体であるホスファチジルセリン依存性抗ヒトPT抗体(aPS/PT)と強い結合を示すことを確認した。18名のAPS患者において、2名がPT-mono陽性であった。ワルファリン(Wf)非内服下と内服下でFCMを行ったところ、Wf非内服下ではaPS/PTが結合し、Wf内服下ではaPS/PTの結合を認めなかったことから、APS患者においてPT-monoが存在し、またWfによってPTの発現が抑制されることが示された。

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・線溶タンパクである。新たに提唱されたミスフォールド/HLA複合体に対する抗体の検出は抗リン脂質抗体の新たな検出方法であること、さらにプロトロンビン/HLA複合体が単球で発現している現象は、APSの病態生理の解明に近づいた発見である。さらにワルファリンのみが治療薬としてなぜ有効なのかを間接的に証明できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：1) PMA treated THP-1 cells synthesized PT, which showed stronger binding with aPS/PT compared with non-pathogenic monoclonal anti-PT antibody. 2) aPS/PT binding to PT/MHC II complexes was confirmed in co-stimulated THP-1 cells and cell-surface PT was detected on monocyte in APS patient and aPS/PT binding to the monocyte was confirmed. 3) Cell-surface PT was detected on monocytes in two out of 18 APS patients and aPS/PT binding to the monocytes was confirmed. 4) Immunofluorescence staining, and PLA identified PT/HLA complex expressed on monocyte surface in patients with APS. 5) TF mRNA and protein expression was significantly higher in monocyte cocultured with APS IgG compared with healthy control IgG. 6) When the tests were performed with and without warfarin in a same patient, aPS/PT binding was disappeared without warfarin, indicating that Warfarin may affect the prothrombin expression in patients with APS.

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 単球 ミスフォールドタンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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 $\beta 2$ グリコプロテイン I ($\beta 2$ GPI)、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。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。申請者は、HEK293T 細胞 (ヒト腎臓上皮細胞株) を用い PT/MHC class II 複合体に aPS/PT が結合することを発見した際に、肝臓内で抗原提示および向血栓細胞の活性化が起きるのではなく、単球で PT が合成されればミスフォールド仮説を用いて APS の病態を証明できると仮説をたてた。まずデータベースから単球に PT の mRNA が存在すること、タンパクとして PT の発現が予想されていることを確認した。さらに 1997 年に PMA 刺激下でヒト細胞株である THP1 に PT の mRNA 発現および培養上清に向凝固作用があることが報告されており (Dabid L, et al, Exp Mol Pathol 1997)、仮説の検証をはじめた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、単球が PT を合成すること、そして合成された PT が APS の病態に関わることを明らかにすることが目的である。さらには単球と肝臓で合成される PT の違いを明らかにし、単球特異的に PT 合成を阻害する新規治療確立を目指す。これまで PT は肝臓で合成される凝固タンパクとされていたが、申請者は単球でも PT が合成されることを確認している。さらに単球が合成する PT が aPS/PT の抗原である可能性が高く、単球と肝臓で合成される PT の違いが aPS/PT の antigenicity に寄与していることを証明することは、極めて学術的独自性が高い研究である。

3. 研究の方法

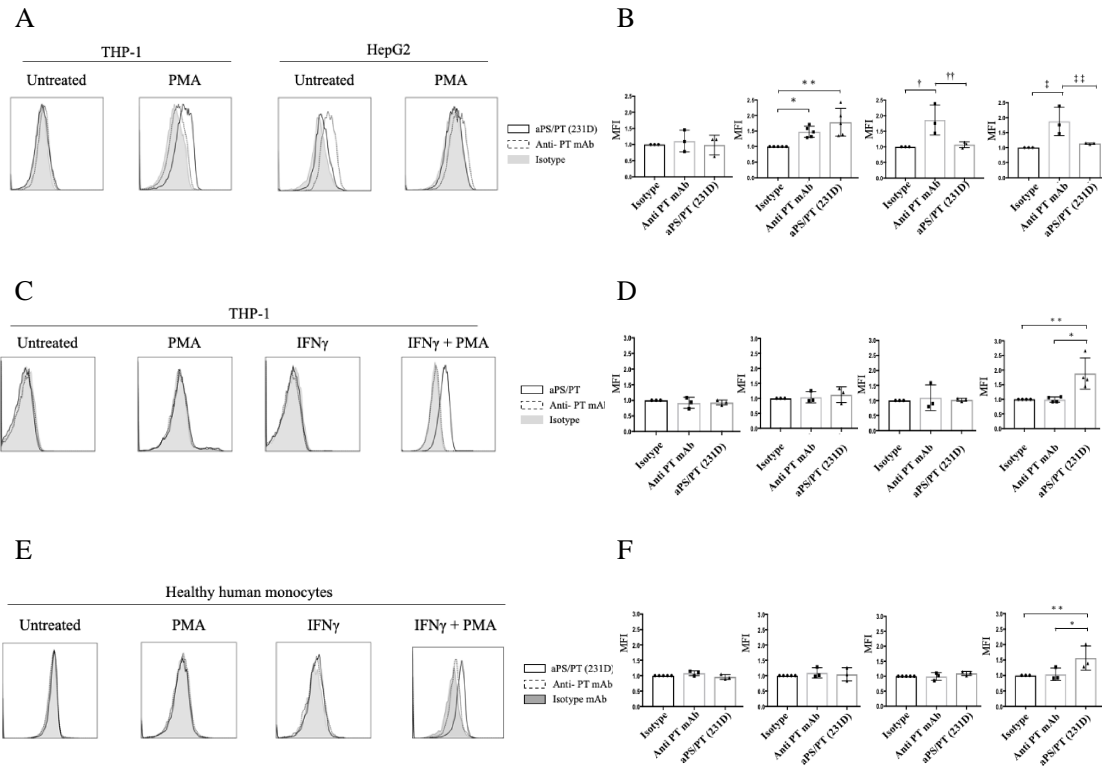
(1). PMA 刺激下で THP1 における PT の mRNA およびタンパク発現を確認する。さらに健常人から採取した末梢血を Ficoll 密度勾配遠心法でヒト末梢血単核球 (PBMC) を分離し、Pan Monocyte Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて、磁気細胞分離技術で negative selection を行ない、PMA 刺激下で THP1 における PT の mRNA およびタンパク発現を確認する。さらに PMA で刺激した THP1 および単球に IFN γ を加えることで細胞表面に PT が発現することをフローサイトメトリーで確認した。

(2). APS 患者から分離した単球を、サイトスピンを用いてスライドに単層塗抹標本を作成し、免疫蛍光染色にて細胞表面のプロトロンビンの発現を観察するとともに、フローサイトメトリーで細胞表面のプロトロンビンの発現を観察した。HLA と PT が結合しているかは、近接ライゲーションアッセイ (PLA) を用いて確認した。

(3). APS 患者の PBMC を用いて、プロトロンビン発現単球がどの程度存在するかを確認した。

4. 研究成果

(1). Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 刺激下でヒト単球細胞 (THP1) とヒト単球において、プロトロンビン (PT) タンパクが発現すること、さらに PMA で刺激した THP1 および単球に IFN γ を加えることで細胞表面に PT が発現することを確認した。プロトロンビンを発現する単球を PT-mono と名づけた。



(2). 抗リン脂質抗体症候群 (APS) 患者の単球の表面には PT/HLA の複合体が存在し、抗 PT 抗体よりも、抗リン脂質抗体であるホスファチジルセリン依存性抗ヒトプロトンビン抗体 (aPS/PT) と強い結合を示すことを確認した。

(3). 18 名の APS 患者において、2 名が PT-mono 陽性であった。ワルファリン (Wf) 非内服下と内服下で FCM を行ったところ、Wf 非内服下では aPS/PT が結合し、Wf 内服下では aPS/PT の結合を認めなかったことから、APS 患者において PT-mono が存在し、また Wf によってプロトンビンの発現が抑制されることが示された。

近年の APS 研究の動向としては、補体や好中球細胞外トラップ (NETs: neutrophil extracellular trap) の関与など自然免疫が関わる病態解明やインターフェロン や B 細胞を活性化させるサイトカインの関与から、抗体産生の制御を目的とした研究が報告されている。単球が合成する PT のタンパクの発現、抗リン脂質抗体の結合を確認したのは世界初であり、APS の病態解明のブレークスルーであると考えられる。単球では刺激下でのみ PT を合成するため、単球特異的に PT 合成を阻害するメカニズムの発見が創薬につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujieda Y, Amengual O	4. 巻 8
2. 論文標題 New insights into the pathogenic mechanisms and treatment of arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 93-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5152/eurjrheum.2020.20058.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ogata Y, Fujieda Y, Sugawara M, Sato T, Ohnishi N, Kono M, Kato M, Oku K, Amengual O, Atsumi T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Morbidity and mortality in antiphospholipid syndrome based on cluster analysis: a 10-year longitudinal cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	6. 最初と最後の頁 1331-1337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keaa542.	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 -
1. 著者名 Sato T, Nakamura H, Fujieda Y, Ohnishi N, Abe N, Kono M, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Yasuda S, Atsumi T	4. 巻 28
2. 論文標題 Factor Xa inhibitors for preventing recurrent thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome: a longitudinal cohort study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lupus	6. 最初と最後の頁 1577 ~ 1582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0961203319881200	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 -
1. 著者名 Fujieda Yuichiro, Atsumi Tatsuya	4. 巻 15
2. 論文標題 Has lupus anticoagulant testing had its day?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Reviews Rheumatology	6. 最初と最後の頁 324 ~ 325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41584-019-0218-6	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 -

1. 著者名 Hisada RYO, Kato Masaru, Sugawara ERI, Kanda Masatoshi, Fujieda Yuichiro, Oku Kenji, Bohgaki Toshiyuki, Amengual Olga, Horita Tetsuya, Yasuda Shinsuke, Atsumi Tatsuya	4. 巻 17
2. 論文標題 Circulating plasmablasts contribute to antiphospholipid antibody production, associated with type I interferon upregulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 1134 ~ 1143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14427	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9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Fujieda Y, Ohnishi N, Kono M, Kato M, Oku K, Amengual O, Arase H, Atsumi T.
2. 発表標題 The prothrombin/MHC class II complexes on procoagulant cells as the novel immune target for pathogenic antiphospholipid antibodies.
3. 学会等名 The International Society on Thrombosis and Haemostasis 2020 Virtual Congress 2020 virtual congress. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤枝雄一郎、大西直樹、河野通仁、加藤将、奥健志、Olga Amengual、荒瀬尚、渥美達也
2. 発表標題 単球細胞表面上のプロトロンビン/MHC class II複合体は抗リン脂質抗体の新規対応抗原である
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ohnishi N, Fujieda Y, Kono M, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Yasuda S, Hisashi Arase, Atsumi T.
2. 発表標題 Prothrombin/MHC class II complexes on procoagulant cells are novel immune target for pathogenic antiphospholipid antibodies
3. 学会等名 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (ICAPA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohnishi N, Fujieda Y, Kono M, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Yasuda S, Hisashi Arase, Atsumi T
2. 発表標題 The prothrombin/MHC class II complexes on procoagulant cells as the novel immune target for pathogenic antiphospholipid antibodies
3. 学会等名 The International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aso K, Fujieda Y, Sato T, Ohnishi N, Kono M, Kato M, Oku K, Amengual O, Yasuda S, Atsumi T
2. 発表標題 Discrimination of intracranial vasculitis from thrombotic antiphospholipid syndrome in lupus patients with antiphospholipid antibodies.
3. 学会等名 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (ICAPA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato T, Amengual O, Fujieda Y, Nakamura H, Ohnishi N, Abe N, Kono Michihito, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Yasuda S, Atsumi T
2. 発表標題 IgM antiphospholipid antibodies: long term follow-up and thrombotic risk.
3. 学会等名 The International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato T, Amengual O, Fujieda Y, Nakamura H, Ohnishi N, Abe N, Kono Michihito, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Yasuda S, Atsumi T.
2. 発表標題 Longitudinal efficacy and safety of direct factor Xa inhibitors. in patients with antiphospholipid syndrome.
3. 学会等名 The 16th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujieda Y
2. 発表標題 HLA/protein complex in APS
3. 学会等名 The 17th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fujieda Y, Wei J, Kono M, Kato M, Amengual O, Atsumi T.
2. 発表標題 Interaction of antiphospholipid antibodies and autoantigens in patients with antiphospholipid syndrome.
3. 学会等名 The 17th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (国際学会)
4. 発表年 2022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

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