

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591165

研究課題名（和文） 抗リン脂質抗体症候群における向血栓機構の解明と分子標的療法の開発

研究課題名（英文） Studies on thrombophilic diathesis and development of a novel molecular-targeting therapy in antiphospholipid syndrome

研究代表者

窪田 哲朗 (KUBOTA TETSUO)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授

研究者番号：90205138

研究成果の概要（和文）：

抗β2-グリコプロテイン I (β2-GPI)抗体陽性の全身性エリテマトーデス(SLE)患者血清 IgG を健康人末梢血単核球に添加すると、IL-1βや TNFαなどの炎症性サイトカインおよび、凝固促進活性を有する組織因子の発現が誘導された。IL-1βや TNFαの刺激によって血管内皮細胞が発現する CX3CL1 は健康人血小板のコラーゲン粘着能を、CCL5 は凝集能をそれぞれ亢進させた。これらのサイトカイン、ケモカイン、組織因子の発現はいずれも、新規 NF-κB 阻害剤 DHMEQ で抑制された。また、抗リン脂質抗体症候群(APS)のマウスモデルを作出し、患者血清中の抗体または新たに作製したモノクローナル抗β2-GPI 抗体を投与することによって、血栓形成傾向が誘導されることを確認した。モノクローナル抗β2-GPI 抗体は 2 本鎖(ds)DNA とも交差反応し、SLE と APS の病態形成基盤の共通性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

IgG fraction of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) who had anti-β2-glycoprotein I (β2-GPI) antibodies induced expression of inflammatory cytokines such as IL-1β and TNFα, and tissue factor with procoagulant activity on peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers. On vascular endothelial cells, IL-1β and TNFα induced CX3CL1 which in turn increased platelet adhesive activity to collagen, and CCL5 which induced platelet aggregation. Expression of these cytokines, chemokines and tissue factor was all suppressed by a novel NF-κB inhibitor DHMEQ. In addition, a mouse model of antiphospholipid syndrome (APS) was established in which prothrombotic status was induced by injection of anti-β2-GPI antibodies from patients or newly made monoclonal anti-β2-GPI antibody. The monoclonal antibody showed cross-reactivity with double-stranded(ds)DNA, suggesting the common mechanism playing a role in pathogenesis of SLE and APS.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：臨床免疫学

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：抗リン脂質抗体症候群, 抗β2-グリコプロテイン I 抗体, 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群(APS)は、動脈または静脈の血栓症と、流産、早産などの妊娠合併症を主症状とし、 $\beta 2$ -グリコプロテイン I ($\beta 2$ -GPI)やプロトロンビンなどのリン脂質結合性蛋白質に対する自己抗体が検出される症候群であり、後天性の易血栓性疾患の中では最も高頻度に認められる。APSによる血栓症としては、脳梗塞、心筋梗塞、下肢深部静脈血栓症、肺梗塞などが多く、稀には治療に抵抗して多臓器に血栓が多発する劇症型も存在する。

本症候群における易血栓性の機序は複雑で未だ不明の点も多いが、近年の研究により抗 $\beta 2$ -GPI抗体が重要な働きを演じていることが示唆されている。すなわち、抗 $\beta 2$ -GPI抗体は単球に結合すると組織因子の発現を亢進して外因性凝固系を活性化すること、それにはMAPキナーゼの経路を介した転写因子NF- κ Bの活性化が必要であることなどが報告されている。

研究代表者らは、膠原病の病態形成における種々のケモカインの関わりについて研究してきたが、その過程でAPSでは血清中の可溶性CX3CL1(fractalkine)が高値を呈する症例が多いことに気付いた。最近CX3CL1は血小板の粘着能を亢進させるという報告や、CCL5(RANTES)が血小板凝集を誘発するという報告もあり、種々のケモカインが血小板血栓の形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。また、研究代表者らは、独自に開発したNF- κ B阻害剤(-)-dehydroxymethylepoxyquinomicin(DHMEQ)を用いて、NF- κ B経路を阻害することで、マウスのコラーゲン誘導関節炎の炎症を軽減できること、破骨細胞の分化を抑制して骨破壊を軽減できることを証明してきた。

2. 研究の目的

以上を踏まえて、本研究では、抗 $\beta 2$ -GPI抗体によって発現が誘導される種々のケモカインの血小板機能に及ぼす効果について明らかにするとともに、それらのケモカインや単球における組織因子の発現をDHMEQで抑制できるか否かについて、下記の観点からを検討することを目的とした。

- (1) 患者血清中より抗 $\beta 2$ -GPI抗体を精製し、本抗体が単球に組織因子の発現を誘導することを確かめる。
- (2) その結果として外因性凝固経路が活性化することを確認する。

- (3) 抗 $\beta 2$ -GPI抗体が血管内皮細胞に作用して、種々のケモカインの発現を誘導することを確認する。

- (4) そのようなケモカインが血小板の機能を活性化するか否かを検討する。

- (5) 以上の、凝固系と血小板の活性化とをDHMEQで抑制できるか否かを明らかにする。

- (6) DHMEQの抗血栓効果を、in vivo実験モデルにおいても検証する。

3. 研究の方法

(1) 抗体

本研究は東京医科歯科大学医学部倫理委員会、東京医科歯科大学動物実験委員会、および国立保健医療科学院動物実験委員会の承認を得て実施した。

全身性エリテマトーデス(SLE)で、 $\beta 2$ -GPI依存性抗リン脂質抗体(抗 $\beta 2$ -GPI抗体)陽性の患者、および陰性の患者より末梢血を採取し、血清を分離後、Melon-Gel(Thermo Fisher Scientific)を用いてIgG分画を得た。一部は、CNBr-activated Sepharose 4B(GE Healthcare)にヒト $\beta 2$ -GPI(Arotec Diagnostics)を結合させてカラムに充填し、これを通すことによって $\beta 2$ -GPI反応性抗体を除去してから用いた。

モノクローナル抗体は、(NZWxBXSB)F1マウス脾細胞を、形質細胞株SP2と融合させ、カルジオリピンと牛胎児血清(FCS)を吸着させたELISAプレートに対する反応性を指標として、IgGクラスの抗体産生クローンを選別した。

(2) 抗 $\beta 2$ -GPI抗体の単球に対する生物活性の検討

健康人末梢血単核球は、Ficoll-Conray液を用いて比重遠心法で分離した。組織因子の発現はフローサイトメーター(EPICS XL, Beckman Coulter)を用いてCD14陽性細胞にゲーティングして解析した。組織因子の凝固促進活性は、健康人血漿と単核球を浮遊させたPBSとの混合液の、Ca再加時間を測定することで評価した。NF- κ B阻害剤DHMEQは既報に従って合成し、DMSOに溶解して使用した(Suzuki Y, et al. Tetrahedron 2004;60:7061-6)。ケモカインの発現は、RT-PCR法およびELISA法にて定量的に評価した。

(3) 抗β2-GPI 抗体 of 血小板に対する生物活性 of 検討

クエン酸採血した健康人末梢血を 160 g, 15 分間遠心して, 血小板浮遊液を得た。これに 1 μM プロスタグランジン E₁ (PGE₁) を加えて 800 g で 15 分遠心し, 血小板を PGE₁ 加 HEPES-Tyrode 液に浮遊させて, 37 °C に 15 分間静置した。この洗浄過程を再度繰り返した後, 血小板を 2 mM CaCl₂ 加 Tyrode 液 (pH 7.4) に浮遊させて実験に用いた。CX3CL1 と CCL5 は Peprotech から購入した。ケモカインで刺激した血小板 of コラーゲンへの粘着活性は, 既報に従って閉鎖循環系の中で実施した(Okamura Y, et al. J Artif Organs 2006;9:251-8)。

(4) APS の in vivo モデル of 作出

BALB/c マウス(雄)に, dorsal skinfold chamber (DSC) を既報にしたがって装着した(Ushiyama A, et al. Microvasc Res 2004;68:147-52)。抗β2-GPI 抗体を腹腔内に接種し, 2 時間後に体重 1 g あたり 0.1 μg の Dylight 488 標識抗マウス GPIIb/IIIa 抗体 (Emfret Analytics) を静注して, イソフルラン吸入麻酔下で, 正立蛍光顕微鏡(BX50WI, Olympus) に固定した。Continuum (Minilite I, Electro-Optics) を用いて DSC 内の小血管にパルスレーザーを照射し, 血栓形成過程を観察, 録画した。

抗β2-GPI 抗体を腹腔内に接種したマウスの活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は, クエン酸採血した血液から血漿を分離して, APTT 試薬 (HemosIL APTT-SP, Instrumentation Laboratory) を加え, Spectrozyme FXa (American Diagnostica) を用いた発色法で測定した。

(5) モノクローナル抗体 of 特異性 of 検討

本研究で作製した抗β2-GPI 抗体 WB-6, および既報 of 抗 dsDNA 抗体 2C10 の特異性は, ELISA の直接法と阻害法で検討した(Kubota T, et al. J Biol Chem 1996;271:6555-61)。

4. 研究成果

(1) 患者血清中の抗β2-GPI 抗体 of 生物活性

β2-GPI 依存性抗リン脂質抗体(抗β2-GPI 抗体)陽性 of SLE 患者血清 IgG を健康人末梢血単核球に反応させると, 組織因子(TF) of 発現が有意に増強した(図 1a)。このような効果は, 抗β2-GPI 抗体陰性 of SLE 患者 IgG および,

健康人 IgG では認められなかった。さらに, 抗 β2-GPI 抗体陽性 IgG の効果は, β2-GPI-Sepharose カラムを通して抗β2-GPI 抗体を吸収すると消失した。また, 細胞にあらかじめ DHMEQ を添加しておく, 組織因子 of 発現増強効果は消失した。

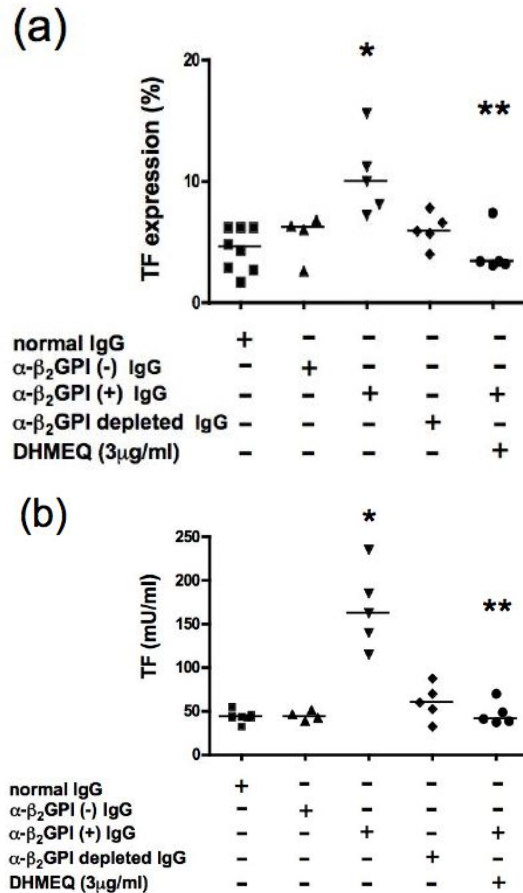


図 1 患者血清 IgG の単球に対する生物活性 (a) 抗体を反応させた健康人末梢血 CD14 陽性細胞をフローサイトメトリーで評価した組織因子(TF) of 発現率。

(b) 抗体を反応させた健康人末梢血単核球 of 浮遊液を混合した血漿, Ca 再加時間で評価した TF としての凝固促進活性。

*: normal IgG と比べて有意の上昇 (p < 0.05)

** : anti-β2-GPI (+) IgG と比べて有意の低下 (p < 0.05)

上記 of 組織因子発現増強が, 真に凝固系を活性化することを確認するために, 健康人血漿に抗体を反応させた細胞を浮遊させて, カルシウム再加時間を測定した。その結果, 抗β2-GPI 抗体陽性 IgG を反応させた細胞を加えることにより, 健康人血漿 of 凝固活性が有意に亢進した(図 1b)。このような効果は, 抗β2-GPI 抗体陰性 of SLE 患者 IgG および, 健

常人 IgG では認められず、また、DHMEQ によって有意に抑制された。

さらに、抗 β 2-GPI 抗体陽性 IgG は、健常人末梢血単核球に、IL-1 β や TNF α などの炎症性サイトカインの mRNA 発現を誘導したが、このような効果も DHMEQ によって抑制された。

(2) ケモカインの血小板活性に対する効果

ヒト臍帯由来血管内皮細胞株 HUVEC および、ヒト脳小血管由来細胞株 HBMEC を、IL-1 β または TNF α で刺激すると、CX3CL1, CCL5 などのケモカインの発現が誘導され、これらも DHMEQ によって抑制されることが確かめられた。つぎに、ケモカインが血小板の機能に及ぼす効果について検討した。フローチェンバー内で血小板浮遊液を循環させて、コラーゲンで被覆したガラス板に付着した血小板数を計測したところ、CX3CL1 は有為に健常人血小板のコラーゲンへの粘着能を亢進させることが観察された。一方、CCL5 は血小板凝集能を惹起することが、比濁法および電子顕微鏡を用いた観察で確認された。

以上の結果より、患者血清中の抗 β 2-GPI 抗体は単球を活性化して組織因子の発現を誘導し、血漿凝固能を亢進させること、さらに同時に産生される炎症性サイトカインが血管内皮細胞に作用すると、血小板の粘着能や凝集能を亢進させる活性のあるケモカインが放出されること、これらの抗 β 2-GPI 抗体によって直接的および間接的にもたらされる向血栓傾向は、いずれも NF- κ B 依存性で DHMEQ によって抑制されることが証明された。

(3) APS の in vivo モデルの作出

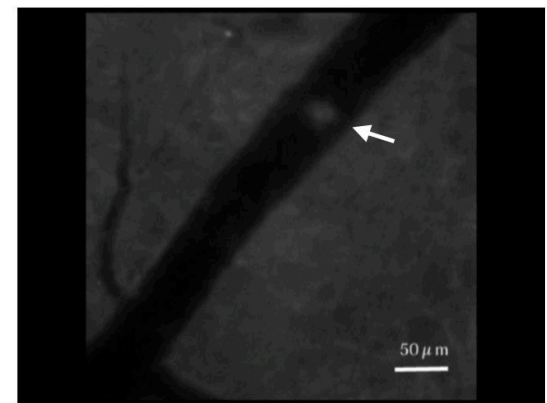
抗 β 2-GPI 抗体が APS において向血栓傾向を生じる要因の一つであること、その効果のいくつかは NF- κ B 阻害剤 DHMEQ で抑制できることを in vivo で確認するために、マウスを用いたモデルの作製に取り組んだ。図 2a のように、正常マウス背部の皮膚に DSC とよばれる軽いプラスチック製の器具を装着し、生きたままの状態動物に大きな苦痛を与えることなく、皮膚の小血管を顕微鏡下に観察できるようにした。このようなマウスに、抗 β 2-GPI 抗体陽性患者 IgG 300 μ g を 2 回腹腔内投与し、2 時間後に蛍光標識した抗血小板抗体を静注して、DSC の窓から観察できる小血管にパルスレーザーを照射すると、図 2b

に示すように血栓形成が観察された。無処置マウスにレーザー照射しても血栓は形成され難かったため、抗 β 2-GPI 抗体は in vivo においても向血栓傾向を誘導する効果があると考えられた。

図 2 (a)



図 2 (b)



抗 β 2GPI抗体陽性患者IgGによる向血栓傾向。皮膚の小静脈を観察できるような処置をした正常マウスに抗 β 2GPI抗体陽性患者IgGを投与してからレーザー照射すると、血栓（矢印）が形成されたが、健常人IgGを投与した場合には血栓は生じなかった。

(4) モノクローナル抗 β 2-GPI 抗体の作製

さらなる検討を続けるために、患者 IgG を使用していたのでは同一の評品を充分量入手することが困難であるため、モノクローナル抗 β 2-GPI 抗体を作製することにした。APS 様病態を自然発症する(NZWxBXSB)F1 マウス脾細胞を、形質細胞株 SP2 と融合させ、抗体産生クローンは、カルジオリピン (CL) 吸着プレートに FCS を反応させた ELISA プレートとの反応性で選別した。そのようにして得た CL-FCS 反応性モノクローナル抗体が、CL と結合した FCS 中の β 2-GPI を認識していることを確認するために、ヒト血漿より精製

された β 2-GPIを用いて、特異性を精査した。

その結果、図3aに示すように、モノクローナル抗体 WB-6 は、CL- β 2-GPI 複合体と強く反応し、 β 2-GPI 単独とは反応しなかった。すなわち本抗体は、APSにおける血栓症のエピソードとの相関性が強いといわれている β 2-GPI 依存性抗リン脂質抗体としての特徴を示すものであった。

WB-6 を正常の BALB/c マウスに投与すると、APTT の延長が認められ、患者 IgG の場合と同様にパルスレーザー照射によって血栓形成も観察され、本抗体は病因抗体としての生物活性を有していることが明らかとなった。

さらに WB-6 の特異性を精査していたところ、図3bに示すように、dsDNA とも反応することが明らかになった。これは、SLE と APS の病態形成に共通の基盤が存在することを示唆する所見として興味深い。

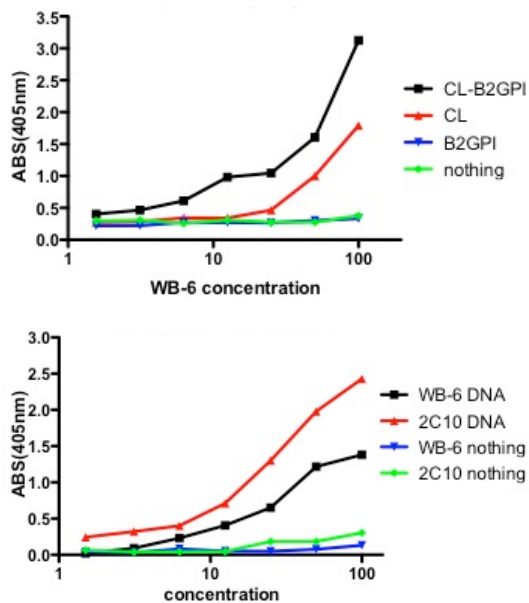


図3 ELISAによるモノクローナル抗リン脂質抗体 WB-6 と、モノクローナル抗 dsDNA 抗体 2C10 の特異性の検討

(a) ELISA プレートにカルジオリピンを吸着させた場合 (CL)、CL 吸着後にさらに β 2-GPI を結合させた場合 (CL- β 2-GPI)、無処置プレートに β 2-GPI のみ吸着させた場合 (β 2-GPI)、および何も吸着させなかった場合 (nothing) の、WB-6 の反応性。横軸は抗体濃度 (μ g/ml)。

(b) ELISA プレートを UV 照射した後、dsDNA または溶媒 (TBS: nothing) を反応させ、WB-6 または 2C10 を反応させた。横軸は抗体濃度 (μ g/ml)。

(5) まとめと今後の課題

本研究によって、*in vitro* の実験系において、患者血清中の抗 β 2-GPI 抗体が単球に組織因子の発現を誘導して、血漿の凝固能を亢進することが確認され、そのような効果が新規 NF- κ B 阻害剤 DHMEQ で抑制できることが判明した。患者血清中の抗 β 2-GPI 抗体は、炎症性サイトカインの発現も促し、それらのサイトカインは血管内皮細胞に作用して血小板活性を増強するケモカインの発現を誘導した。これらのサイトカインやケモカインの発現も、DHMEQ で抑制できることが判明し、NF- κ B 経路を阻害することが様々な作用点において APS の向血栓傾向を抑制するのに有効である可能性が示唆された。

上記の仮説を *in vivo* で証明するために、DSC を装着したマウスを用いて、小血管における血栓形成過程を顕微鏡下に観察できる実験系を作出した。実際、マウスに患者血清由来、またはマウスモノクローナル抗 β 2-GPI 抗体を投与した後にパルスレーザーで血管を傷害すると、血栓が形成されやすいことが観察された。しかし、この実験系を用いて薬効評価等を行うためには、血栓形成傾向を客観的、定量的に評価するパラメータが現時点では不十分であり、今後さらに検討を続ける必要がある。現在、血栓のサイズの測定や血栓形成のカイネティクスの検討に加えて、抗体投与後のマウスの循環血中の単球の状態をフローサイトメトリーや PCR 法で解析することを試みている。

また、本研究中に作製したモノクローナル抗 β 2-GPI 抗体は、dsDNA とも交差反応することが明らかになった。抗 DNA 抗体と抗リン脂質抗体の関連性については、1980 年代にモノクローナル抗体を用いて、1 本鎖(ss)DNA とカルジオリピンに交差反応性を示す抗体が存在することが証明されている(Lafer EM, et al. J Exp Med 1981;153:897-909. Rauch J, et al. Eur J Immunol 1984;14:529-34)。これらの報告は、SLE 患者に梅毒血清反応偽陽性がしばしば認められることの原因を説明する結果としては面白い。しかし、SLE の典型例では病勢と良く相関するのは ssDNA ではなく dsDNA に対する抗体であり、一方 APS の血栓症には β 2-GPI 依存性抗リン脂質抗体が良く相関することが知られるようになった。すなわち、Lafer や Rauch の示した抗体は、臨床的には重要性の低いものと見なさざるを

得ない。ところが、本研究で作製したモノクローナル抗体は、 β 2-GPI 依存性抗リン脂質抗体でありながら、かつ dsDNA とも反応するという結果を示しており、SLE と APS の病態形成に共通の基盤が存在することを示唆する結果として興味深い。今後さらに複数のモノクローナル抗体について、それらの特異性と生物活性を検討してゆきたいと考えている。

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 4 件)

- 1) 窪田哲朗, 福谷泰子. 抗リン脂質抗体症候群における単球, 血管内皮細胞, 血小板の活性化. リウマチ科, 査読無, 39 巻, 2008, 421-427.
- 2) 越智小枝, 窪田哲朗. 抗リン脂質抗体症候群 (梗塞像). 内科, 査読無, 103 巻, 2009, 165-168.
- 3) Kubota T, Fukuya Y, Hashimoto R, Kanda T, Suzuki H, Okamura Y, Nanki T, Miyasaka N, Umezawa K. Possible involvement of chemokine-induced platelet activation in thrombophilic diathesis of antiphospholipid syndrome. An attractive target for the NF- κ B-specific inhibitor DHMEQ. Ann N Y Acad Sci, 査読有, 1173 巻, 2009, 137-145.
- 4) 窪田哲朗. 膠原病における NF- κ B 経路. The Chemical Times. 査読無, 219 号, 2011, 8-12.

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 窪田哲朗, 福谷泰子, 南木敏宏, 宮坂伸之. 抗リン脂質抗体症候群の向血栓傾向におけるケモカインの作用に関する検討. 第 52 回日本リウマチ学会. 2008 年 4 月, 札幌.
- 2) Kubota T. Platelet activation by chemokines may play a role in the prothrombotic property of antiphospholipid syndrome. 6th International Congress on Autoimmunity. 2008 年 9 月, Porto, Portugal.
- 3) 窪田哲朗. 抗リン脂質抗体症候群における血栓形成傾向のメカニズム. 第 19 回日本リウマチ学会関東支部学術集会, 2008 年 12 月, 高崎.

今後学会発表する予定ですでに抄録が採択されているもの。

- 1) Trimova G, Nii T, Nishimura M, Ito S, Miura S, Miyasaka N, Kubota T. dsDNA binding activity of pathogenic cardiolipin-dependent anti- β 2 glycoprotein-1 antibody. 1st Symposium of the Asian Pacific League of

Associations of Rheumatology, 2011 年 4 月 16 日, Taipei, Taiwan.

- 2) 西村美里, 窪田哲朗. 抗リン脂質抗体症候群はなぜ全身性エリテマトーデスに多いか. 第 55 回日本リウマチ学会, 2011 年 4 月 25 日, 東京.

[その他]

研究代表者が指導教員となった論文

- 1) 新居登紀子. 抗リン脂質抗体症候群の動物モデルの作製. 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科平成 21 年度修士論文.
- 2) 三浦修平. 抗リン脂質抗体の特異性に関する研究. 東京医科歯科大学保健衛生学研究科平成 22 年度卒業論文.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 哲朗 (KUBOTA TETSUO)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・准教授

研究者番号 : 90205138

(2) 研究分担者

梅澤 一夫 (UMEZAWA KAZUO)

慶応義塾大学・理工学部・教授

研究者番号 : 70114402

(H21-22: 連携研究者)

(3) 連携研究者

鈴木 英紀 (SUZUKI HIDENORI)

(財) 東京都医学研究機構・電子顕微鏡室・主任研究員

研究者番号 : 30158977

(H21-22: 連携研究者)