

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16547

研究課題名（和文）抗リン脂質抗体による血栓形成作用の解明

研究課題名（英文）Elucidation of thrombus formation by antiphospholipid antibody

研究代表者

金重 里沙（Kaneshige, Risa）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30844104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は抗リン脂質抗体（aPL）による種々の血栓形成・細胞障害作用の解明を目的とし、患者血漿からアフィニティー精製した各種IgG-aPLと独自に開発したヒト単核球/多核顆粒球培養実験系を用いて検討した。

本研究結果より、炎症性サイトカインがaPLによる単球表面組織因子（TF）発現に対してポジティブのプライミング作用を有することに加え、aPLによる単球TF発現にCD14抗原が関与している可能性を見出した。さらに、aPLが好中球細胞外トラップ（NETs）形成を引き起こす可能性を明らかにした。APS患者では、aPLによりNETsや単球表面TF発現を中心とする血栓形成作用が増幅されると推測できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

aPLにより引き起こされる、単球表面TF発現による外因系凝固の活性化や血管障害・血管炎症に関与するNETs形成促進作用は、APSにおける動・静脈血栓症発症機序の中心的な役割を担っていると推測される。

本研究において、aPL刺激による単球表面TF発現に関与している細胞表面レセプターを解明するとともに、TF発現が炎症性サイトカインにより増強されること、好中球が関与する血栓形成作用（NETs形成）についても明らかにした。本研究結果はAPSの病態発症機序の解明に繋がるのみならず、新たな治療戦略のエビデンスとなる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate various thrombus formation and cytotoxic effects by antiphospholipid antibody (aPL).

The results of this study indicate that inflammatory cytokines have a positive priming effect on aPL-induced monocyte surface tissue factor (TF) expression. Moreover, we revealed a signal by aPLs was transmitted via CD14 and may induce various inflammatory reactions such as TF expression on monocytes. Furthermore, we found that aPL induces the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). In APS patients, it can be speculated that aPL amplifies the thrombogenic effect centered on NETs and monocyte surface TF expression.

These findings have important potential not only to elucidate the pathogenesis of APS, but also to serve as evidence for new therapeutic strategies.

研究分野：血栓止血学 臨床検査医学

キーワード：抗リン脂質抗体症候群 抗リン脂質抗体 CD14抗原 好中球細胞外トラップ

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、患者血液中にリン脂質に関する自己抗体である抗リン脂質抗体 (aPL) が出現することにより、動・静脈血栓症や妊娠合併症などを引き起こす自己免疫疾患である。APS の検査診断では aPL の検出が必須であるが、ELISA による測定系が確立されているのは抗カルジオリピン抗体 (aCL) と抗 β_2 グリコプロテイン I 抗体 (a β_2 GPI) のみで、他の aPL により引き起こされる APS 症例が見逃されていることが危惧される。

APS 患者では、個々の aPL が持つ種々の血栓形成作用が複雑に絡み合って多彩な合併症が引き起こされると推測される。したがって、単一の aPL を保有する患者群よりも複数種の aPL を保有する患者群でより重篤な合併症を発症することが危惧される。

そこで、血栓性合併症との関連が強いことが示唆されている 2 つの aPL (aCL/ β_2 GPI・aPS/PT) が共に陽性である aPL を用い、IgG-aPL による血栓形成に関与する細胞活性化作用及び細胞障害作用を解明するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、患者血中に出現する aPL の中でも血栓性合併症と関連の強い aCL/ β_2 GPI 及び aPS/PT の細胞活性化作用及び細胞障害作用を明らかにすることで、患者毎にリスクの高い合併症を推測できる新たな APS 検査診断法を確立するとともに、aPL による種々の血栓形成・細胞障害作用の解明を目的として実施した。具体的には、IgG-aPL にて単球や好中球を刺激し、aPL を認識する単球表面レセプター及び細胞内シグナル伝達経路、炎症状態における aPL の単球 TF 発現の増強作用、aPL の好中球細胞外トラップ (NETs) 形成への関与などについて総合的に解析した。さらに、APS の検査診断において臨床的有用性の高い aPL について検討した。

3. 研究の方法

代表的な APS 患者血漿よりプロテイン G カラムにて、IgG-aPL をアフィニティー精製し、各抗体に対応する抗原 (リン脂質とエピトープ提供タンパクの複合体) をリガンドとした抗原カラムクロマトグラフィーにて各種 aPL を単離・精製した。

独自に開発したヒト単核細胞 (PBMC) / 多核顆粒球 (PMNC) 培養実験系にて、IgG-aPL を添加し、阻害剤等を用いた aPL を認識する細胞表面レセプターの検討、各種刺激因子を添加したプライミング作用を有する因子の特定、aPL の NETs 形成への関与について解析することにより、aPL による血栓形成作用や細胞障害作用が亢進されるか検討した。さらに、APS 症例と non APS 症例を対象とした臨床研究にて、臨床的有用性の高い aPL について検討した。

4. 研究成果

(1) aPL の血栓形成作用を増幅させる炎症メディエーターの解明

単球に対しプライミング作用を有する因子を探索するとともに、プライミング処理により、後続刺激である aPL による血栓形成作用が亢進あるいは抑制されるかを検証した。ヒト末梢単核細胞 (PBMC) 培養実験系にて、まず単核球を各種サイトカイン (TNF- α ・IL-1 β ・IL-6・IL-10) で前処理 (プライミング処理) した。プライミング処理後、SLE/APS 患者由来の IgG-aPL にて PBMC を刺激し、単球表面組織因子 (TF) の発現をフローサイトメトリー解析した。

その結果、炎症性サイトカインである TNF- α ・IL-1 β 及び IL-6 で処理後に、IgG-aPL 刺激を行うと、TF の発現が増加することを確認した (図 1-3)。一方で、抗炎症サイトカインである IL-10 による前処理後に IgG-aPL 刺激を行うと、単球表面の TF 発現が抑制されることを確認した (図 4)。

SLE 患者では、血管炎をベースに血栓症が引き起こされることが知られており、炎症部位では局所的にサイトカイン等の炎症メディエーターが高値であると推測される。その結果サイトカインや自己抗体の作用により慢性的に単球が刺激され、さらに抗リン脂質抗体が存在することにより、単球表面 TF 発現を中心とする血栓形成作用が増幅される可能性を見出した。

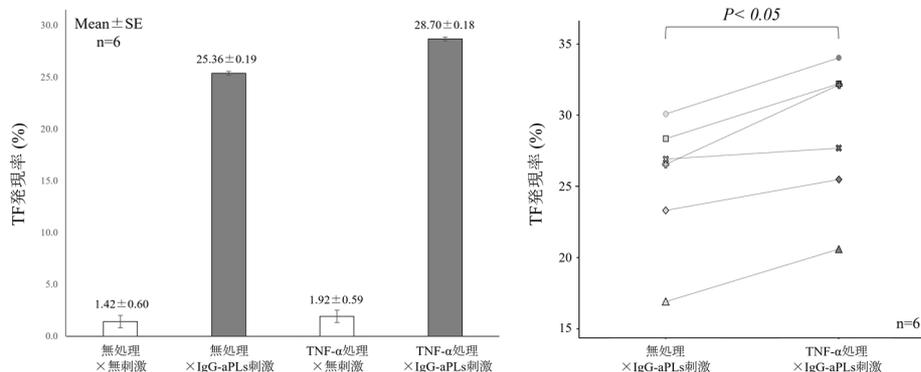


図 1. TNF- α にて単核球を前処理した際の TF 発現量の解析

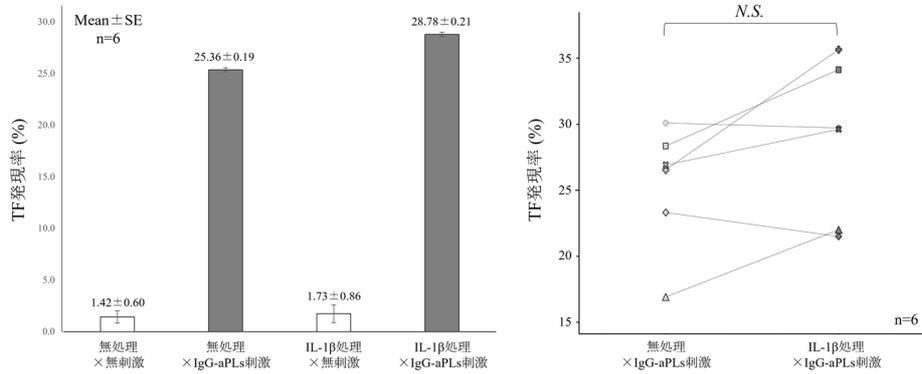


図 2 . IL-1β にて単核球を前処理した際の TF 発現量の解析

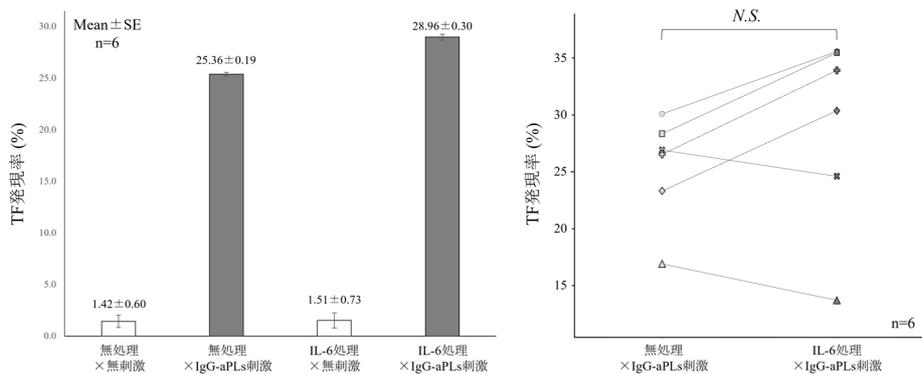


図 3 . IL-6 にて単核球を前処理した際の TF 発現量の解析

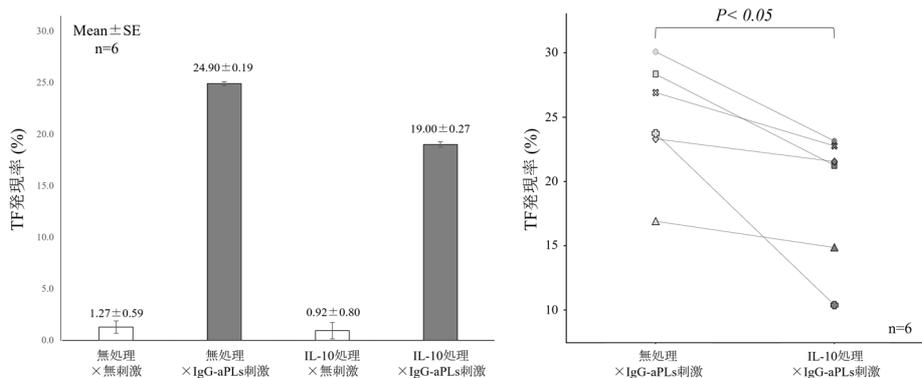


図 4 . IL-10 にて単核球を前処理した際の TF 発現量の解析

(2) aPL が認識する単球表面レセプターの探索

これまでの研究成果より、PBMC を aPL で刺激することにより、単球表面の TF 発現並びに単核球からの TNF-α 産生が増幅されることを明らかにしてきた。今回、aPL 刺激により単球が TF を発現する際に単球表面 CD14 抗原が shedding する現象を捉えた。

したがって本研究では、CD14 が aPLs を認識するレセプターであると仮定し、TF 発現のトリガーとなり得るか検討した。

その結果、CD14 抗原の shedding の度合いは aCL/β₂GPI 及び aPS/PT がそれぞれ single positive である IgG-aPL で刺激した場合よりも、両抗体が double positive である IgG-aPL で刺激した場合に大きかった。さらに、IgG-aPL にて刺激する前に単球をモノクローナル抗 CD14 抗体 (CD14mAb) で処理することで、double positive IgG-aPL 刺激による単球表面の TF 発現が有意に抑制されることを明らかにした (図 5)。ゆえに、aPL による単球表面 TF 発現には、CD14 抗原が関与していることが示唆された。

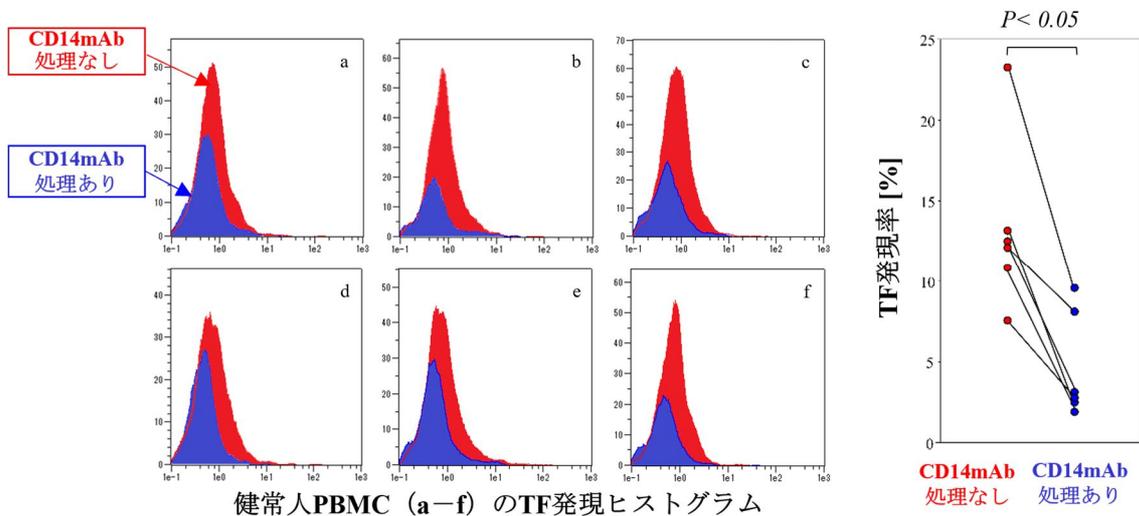


図 5 . CD14mAb 処理による単球表面 TF 発現抑制作用

(3) aPL の好中球細胞外トラップ NETs 形成への関与

本邦における APS の半数は膠原病に合併する二次性 APS であり、代表的な基礎疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) に併発する APS (SLE/APS) は、重篤かつ多彩な血栓症を発症することが知られているが、その病態機序は未だ解明されていない。近年、SLE 患者では病原微生物を能動的にトラップする好中球細胞外トラップ (NETs) が生じやすいことが報告されている。

本研究では、PMNC を aPL で刺激することにより、NETs 形成が促進されるか検討した。その結果、死細胞割合・好中球エラスターゼ活性・ROS 産生細胞の増加が引き起こされることを明らかにした。さらに aPL 刺激により、PMNC の膨化・NE の細胞外放出・細胞平均面積が増加することを免疫蛍光染色にて明らかにした (図 6)。本研究成果より、aPL 刺激によって引き起こされた好中球の細胞死は NETs であると推測され、APS 患者では、aPL により NETs を中心とする血栓形成作用が引き起こされるとともに単球表面 TF 発現を中心とする血栓形成作用が増幅されると推測できる。

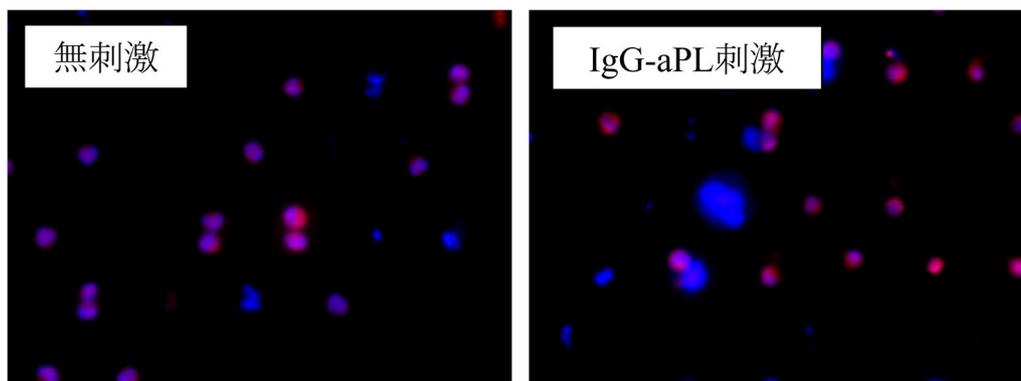


図 6 . IgG-aPL 刺激による好中球の細胞面積の増大

(4) 各種 aPL の APS 診断能の検討

現在の APS 診断基準に採用されている aPL のうち、4 種類 (抗カルジオリピン抗体 (aCL) 及び抗 β_2 -グリコプロテイン I 抗体 (a β_2 GPI) の IgG・IgM クラス) は標準化されたイムノアッセイを用いて測定することと定義されている。本研究では、Manual assay (MESACUP-2 test 【MBL 社】・QUANTA Lite® 【INOVA 社】) 及び、Automated assay (MEBLux test 【MBL 社】搭載 STACIA 【LSI メディエンス社】・QUANTA Flash® 【INOVA 社】搭載 ACL AcuStar® 【Werfen 社】・EliA 搭載ファディア 100 【ともにサーモフィッシャー社】) を用い、4 種類の aPL の抗体価測定を実施した。その結果、各種アッセイにおける APS 診断能を算出したところ、aCL IgG で AUC が 0.84 - 0.92、a β_2 GPI IgG で 0.86 - 0.93、aCL IgM で 0.61 - 0.63、a β_2 GPI IgG で 0.57 - 0.66 とであり、IgG クラスの aPL が APS の検査診断において臨床的有用性が高いことが示された。

引用文献

1. 瀬分 望月、金重 里沙他．全身性エリテマトーデスにおける抗リン脂質抗体の血栓形成作用を増幅させる炎症メディエーターの探索．
医学検査 2023 ; 72(1) : 19-24 .
2. 金重 里沙他．抗リン脂質抗体による単球表面組織因子発現に対する CD14 抗原の関与．
医学検査 2022 ; 71(3) : 397-403 .
3. Risa Kaneshige, et al. Determination of diagnostic threshold in harmonization and comparison of clinical utility for five major antiphospholipid antibody assays used in Japan.
Journal of Clinical Laboratory Analysis 2022; 36(e24340): 1-11.
4. 金重 里沙他．aPLs-EIA 試薬搭載 AcuStar®による抗リン脂質抗体価測定の有効性．
日本検査血液学会雑誌 2020 ; 21(2) : 145-152 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 瀬分 望月、金重 里沙、中本 碧、本木 由香里、野島 順三	4. 巻 72
2. 論文標題 全身性エリテマトーデスにおける抗リン脂質抗体の血栓形成作用を増幅させる炎症メディエーターの探索	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学検査	6. 最初と最後の頁 19 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14932/jamt.22-47	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 金重 里沙、三島 千穂、長谷川 真梨、清水 直人、三島 健太郎、本木 由香里、野島 順三	4. 巻 71
2. 論文標題 抗リン脂質抗体による単球表面組織因子発現に対するCD14抗原の関与	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学検査	6. 最初と最後の頁 397 ~ 403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14932/jamt.21-104	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 Kaneshige Risa, Motoki Yukari, Yoshida Mika, Oku Kenji, Morishita Eriko, Ieko Masahiro, Ichihara Kiyoshi, Nojima Junzo	4. 巻 36(e24340)
2. 論文標題 Determination of diagnostic threshold in harmonization and comparison of clinical utility for five major antiphospholipid antibody assays used in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Laboratory Analysis	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcla.24340	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 長谷川 真梨、本木 由香里、三島 千穂、清水 直人、金重 里沙、野島 順三	4. 巻 22
2. 論文標題 抗リン脂質抗体による単核球の血管内皮下組織への浸潤促進	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本検査血液学会雑誌	6. 最初と最後の頁 346 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 三島 健太郎、金重 里沙、本木 由香里、野島 順三	4. 巻 70
2. 論文標題 抗リン脂質抗体スクリーニングELISAの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学検査	6. 最初と最後の頁 647 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14932/jamt.21-21	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 Nojima Junzo, Kaneshige Risa, Motoki Yukari, Ieko Masahiro	4. 巻 196
2. 論文標題 Increased oxidative stress may be a risk factor for thromboembolic complications in patients with antiphospholipid syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 52 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2020.08.007	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 野島 順三、本木 由香里、金重 里沙、吉田 美香、關谷 暁子、奥 健志、森下 英理子、家子 正裕	4. 巻 21
2. 論文標題 抗リン脂質抗体検査の標準化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本検査血液学会雑誌	6. 最初と最後の頁 382 ~ 390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 金重 里沙、本木 由香里、吉田 美香、關谷 暁子、清水 直人、奥 健志、森下 英理子、家子 正裕、野島 順三	4. 巻 21
2. 論文標題 aPLs-EIA試薬搭載AcuStarによる抗リン脂質抗体価測定の有用性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本検査血液学会雑誌	6. 最初と最後の頁 145 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 原 和冴、本木 由香里、金重 里沙、野島 順三	4. 巻 69
2. 論文標題 Multiplex-EIA systemを利用した抗リン脂質抗体スクリーニング検査システムの検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学検査	6. 最初と最後の頁 160 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14932/jamt.19-82	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 -

[学会発表] 計21件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 本木 由香里、金重 里沙、野島 順三
2. 発表標題 日本における新規抗リン脂質抗体価測定試薬の有用性の検討
3. 学会等名 第17回 日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金重 里沙、本木 由香里、野島 順三
2. 発表標題 日本における自動分析装置搭載・抗リン脂質抗体測定試薬の方法間比較と有用性の検証
3. 学会等名 日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップ 第10回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石丸 春奈、金重 里沙、瀬分 望月、鍵谷 彩恵、藤原 沙弥、鎌田 理緒、中本 碧、本木 由香里、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体による炎症性細胞増幅作用
3. 学会等名 第16回 日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 真梨、本木 由香里、三島 千穂、清水 直人、金重 里沙、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体による単核球の血管内皮下組織への浸潤促進
3. 学会等名 第23回 日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬分 望月、金重 里沙、本木由香里、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体の好中球細胞外トラップ (NETs) 形成への関与
3. 学会等名 第23回 日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬分 望月、金重 里沙、中本 碧、三島 健太郎、本木 由香里、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体による好中球細胞外トラップ (NETs) 形成促進作用の解明
3. 学会等名 第71回 日本医学検査学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金重 里沙、本木 由香里、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体による活性化プロテインC抑制作用および単球活性化作用
3. 学会等名 第43回 日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三島 健太郎、金重 里沙、本木 由香里、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体スクリーニングELISAの確立
3. 学会等名 第70回日本医学検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬分 望月、中本 碧、金重 里沙、本木 由香里、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体の血栓形成作用を増幅させる炎症メディエーターの探索
3. 学会等名 第15回 日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三島 健太郎、金重 里沙、本木 由香里、野島 順三
2. 発表標題 抗トロンボモジュリン抗体測定ELISAの開発
3. 学会等名 第15回 日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川 真梨、三島 千穂、清水 直人、金重 里沙、本木 由香里、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体症候群における動脈硬化性疾患発症機序の解明
3. 学会等名 第11回 Thrombosis/Thrombolysis Maker Forum 九州
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金重 里沙、本木 由香里、吉田 美香、奥 健志、森下 英理子、家子 正裕、野島 順三
2. 発表標題 各種抗リン脂質抗体測定法の臨床的有用性の検証－臨床的カットオフ値の設定と方法間比較－
3. 学会等名 日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップ 第9回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金重 里沙、本木 由香里、吉田 美香、奥 健志、森下 英理子、家子 正裕、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体測定法のカットオフ値の設定と臨床的有用性の検証
3. 学会等名 第16 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金重 里沙、本木 由香里、吉田 美香、奥 健志、森下 英理子、家子 正裕、野島 順三
2. 発表標題 自動分析装置による抗リン脂質抗体検査の標準化 3 社の自動分析装置による抗体価および陽性率の比較
3. 学会等名 日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップ 第 8 回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金重 里沙、本木 由香里、吉田 美香、奥 健志、森下 英理子、家子 正裕、野島 順三
2. 発表標題 aPLs-EIA試薬搭載Acustarによる抗リン脂質抗体価測定の有用性
3. 学会等名 第21回 日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川 真梨、三島 千穂、清水 直人、本木 由香里、金重 里沙、野島 順三
2. 発表標題 抗リン脂質抗体による単球の血管内皮下組織への浸潤促進
3. 学会等名 第21回 日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 美香、關谷 暁子、金重 里沙、奥 健志、森下 英理子、家子 正裕、野島 順三
2. 発表標題 自動分析装置を用いた抗リン脂質抗体測定の有用性
3. 学会等名 第21回 日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2020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