

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461466

研究課題名(和文) 抗リン脂質抗体症候群において補体活性化を惹起する異常機序について

研究課題名(英文) The mechanisms of triggering complement activation in patients with antiphospholipid syndrome

研究代表者

奥 健志 (OKU, KENJI)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70544295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗リン脂質抗体症候群(APS)は血栓症と習慣流産を来す自己免疫疾患だが、その発症機序に補体系の異常活性化が関与すると考えられている。本研究では、APSにおける補体活性化の起点について検討し、補体第1成分(C1q)に対する自己抗体がAPS患者で高率に認められ難治性病態において高力価である。抗C1q抗体の存在は補体前期蛋白の異常活性化と相関する。モノクローナル抗C1q抗体はin vitroで単球細胞や血管内皮細胞を活性化し、凝固蛋白の産生亢進を促すことを解明した。抗C1q抗体の産生は免疫抑制療法で抑制されるため、APSのうちとりわけ難治例に免疫抑制療法が効果的な一群が存在する可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Antiphospholipid syndrome(APS)is an autoimmune disease that is characterized with the arterial/venous thrombosis and/or pregnancy morbidity in the presence of antiphospholipid antibody(aPL). Complement activation is one of the major pathogenesis besides procoagulant activity of the aPL. We have investigated the origination of the complement activation and clarified that the 1) autoantibodies against the 1st component(C1q) of the complement system is frequently observed in the sera of patients with APS and the high titer of the autoantibodies significantly observed in the refractory APS 2) The presence of the anti-C1q antibodies is related with the activation of early components of the complement system 3) monoclonal anti-C1q antibodies activated monocytes or endothelial cells and induced procoagulant activities in vitro. As anti-C1q antibodies are readily inhibited with the immunosuppressants, there is a possibility that the refractory APS patients may effectively be treated.

研究分野：抗リン脂質抗体症候群を中心とした自己免疫疾患の研究

キーワード：抗リン脂質抗体症候群 補体古典経路 抗C1q抗体 C1q

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は、病原性自己抗体とされる抗リン脂質抗体 (APL) の存在の下、繰り返す動静脈血栓症である。APL の病原性は直接的な向凝固細胞 (単球や血管内皮細胞等) 活性化による血栓傾向が主因とされるが、申請者は、その他に補体古典経路が常時 APS 患者で活性化され、2 次的に向凝固細胞の活性化を来すことを報告した (Oku et al, Ann Rheum Dis, 2009)。APS では非発症時でも常に古典経路の活性化が起こり、細胞活性化因子であり血栓傾向を増強するアナフィラトキシンが産生され、特に何らかの生体ストレス (感染等) が加わることによって補体系の活性が補体古典経路の後期経路に波及し、強力な細胞活性化と共に凝固異常が亢進し、血栓症を来すと推定する。

しかし、APS における補体活性化は、古典経路の initiator である C1q 蛋白の典型的な活性化仮定である抗原抗体複合体 (IC) の形成では説明困難である。即ち 1) APL は IgG2 主体でありこの自己抗体が形成する IC は C1q の活性化能が乏しい 2) APS ではそもそも血清 IC の増多が乏しい 3) APL 抗体価と補体活性化が相関しない等を申請者は解析した。一方、APS の類縁疾患で、補体古典経路活性化を特徴の一つとする全身性エリテマトーデス (SLE) では、近年、C1q に対する自己抗体が高発現していることが報告された。同抗体は中和抗体ではなく、IC のみならず陰性荷電リン脂質に結合し構造変化した C1q を標的として補体経路を活性化する。つまり、本抗体は補体活性化の増強因子であり、かつ、IC が介在しなくとも補体を活性化させうる。

SLE では活性化補体蛋白のクリアランス異常が認められる。即ち、赤血球上に発現する補体レセプター 1 (CR1) が著減しており、補体が吸着した異物の網内系への運搬が障害され結果的に、補体系の異常活性化に繋がると予測されている。また、補体制御蛋白は補体系の異常活性化を抑制する蛋白群で、その機能異常は補体の異常活性化に繋がる。

APS は良好な疾患モデル動物が存在しない点が病態解明の障害となっている。マウスに APL を注入し作成される従来のモデルは、APL の病原性に着目して作成されたが、血栓傾向を促進するが自律的血栓症を発症せず、何らかの追加因子が必要であると考えられている。

2. 研究の目的

APS 患者における補体活性化の機序について検討し、その結果を参考に APS モデル動物を作成することを目的とした。

APS における補体活性化の機序のうち、活性化の initiator の存在が明らかではなかった。即ち、APS では SLE を除いた他の膠原病疾患や健常人に比べて異常に亢進した補体系の活性化が出現しているのだが、その原因として、古典経路活性化の最も一般的な要因である IC 産生以外の要因を推定した。その候補

として抗 C1q 抗体及び補体制御因子の異常を推定して検討した。

更に、得られた結果を元に APS モデル動物の作成を試みた

3. 研究の方法

北海道大学病院膠原病外来を受診した原発性 APS 患者を対象コホートとして、SLE 患者、非 SLE 膠原病患者、健常人を対照として抗 C1q 抗体及び補体制御因子について検討した。

(1) 抗 C1q 抗体 : 2002 年～2013 年に当科を外来を受診し 2 年以上のフォローアップ期間があった患者のうち、同意を得た連続 40 名の APS 患者について検討した。抗 C1q 抗体は solid-phase ELISA キット (Buhlman Laboratories AG, Switzerland) を用いて測定した。血清 C3, C4 値は比濁分析法で CH50 は活性は Mayer 法で測定した。アナフィラトキシン (C3a, C4aC5a) は radioimmunoassay kit (Human Assay, GE Healthcare Bioscience, London, UK) で測定した。いずれも基準値はキット製造会社の推奨値を用いた。血清免疫複合体値は RF IgG ELISA 法で測定した。

APL は IgG/IgM 抗カルジオリピン抗体、IgG/IgM 抗 2GPI 抗体、IgG/IgM フォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体はいずれも標準的な手法 (in-house ELISA) で測定した (Otomo et al, Arthritis Rheum 2012 等)。APL のうちループスアンチコアグulant は国際血栓止血学会の推奨法に基づいて測定した。

(2) 補体制御因子 : (1) の検討時と同様のコホート患者に対して補体値 (C3, C4, CH50 活性)、抗リン脂質抗体、免疫複合体に加えて、補体制御因子として membrane cofactor protein (CD46) と H 因子を測定した。それぞれ ELISA kit for Membrane Cofactor Protein (Cloud-Clone Corp., Houston USA), Human Complement Factor H ELISA (Assay Pro, St. Charles, USA) を用いて測定した。更に、抗 H 因子抗体の測定を Western Blotting 法でおこなった。10well の 7.5% アクリルアミドゲルに、SDS-PAGE で精製 H 因子を 5 μ L/well 泳動、転写し、1 レーンごとに分割したメンブレンに一次抗体としてスキムミルクで患者血清 (100 倍希釈) と、コントロールとしてマウス抗ヒト H 因子モノクローナル抗体 (1000 倍希釈) を一晩反応させ、洗浄した後、サンプルには Anti Human IgG (Fc specific) - Peroxidase, antibody produced in goat (SIGMA A0170-IML)、コントロールには Peroxidase - conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti - Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research LABORATORIES, INC) を 2 次抗体として用い、Amerisham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (RPN2209 GE Healthcare (UK)) 又は、Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (WBKLS0500 Millipore Corporation, Billerica, MA01821 U.S.A.) で検出した。

(3) モデル動物の作成: balb/c マウスを用いて抗 C1q 抗体と APL を投与するモデルを作成した。既報の balb/c に APL を投与するモデル(強力な血管障害を加えることによって血栓サイズが増大するが自然発症の血栓症は認めない)を参考にモノクローナルマウス APL(抗カルジオリピン抗体)である wbc1-1 とモノクローナルマウス抗 C1q 抗体である JL-1 を用いて in vitro での血栓傾向を確認した上で投与を行い、血栓傾向の確認及び解析を行う。

4. 研究成果

(1) APS 患者における検討 APS 患者において抗 C1q 抗体が、健常人や非 SLE 膠原病疾患患者に比べて高率に認められた (APSvs 健常人 vs 非 SLE 膠原病 15/40 vs 0/20 vs 1/40)。SLE 患者での抗 C1q 抗体の陽性率は高値であった (11/20)。更に、抗 C1q 抗体の力価はアナフィラトキシンのうち C4a 値と相関を認めた ($p=0.013$, $r=0.53$)。抗 C1q 抗体の存在は APS の特定の症状や抗リン脂質抗体の種類・力価と明らかな相関を認めなかった。一方、予防治療下で血栓症もしくは妊娠合併症を発症した APS を refractory APS と定義したところ、7/40 が該当したが、抗 C1q 抗体の力価が高値であった (32.9 vs 11.0)、20U/ml をカットオフとするとオッズ比 81.0 (95%CI 7.45-88) で予防投与下での APS 症状の発症を認めた。

アナフィラトキシンのうち C5a は強力な向凝固活性を有しており、寛解時の APS 患者においてはいずれも陰性であったが、経時的にアナフィラトキシンを計測したところ、C5a が出現した 2 症例においていずれも数日内に血栓症を発症した。2 症例は感染症を契機に補体活性化が進行し、低補体血症の進行も認めて、その後に向血栓傾向の著明な亢進を伴い血栓症を併発したと推測した。抗 C1q 抗体の存在が、感染症など 2nd hit の存在下で、著しい血栓傾向を来たして、予防治療の効果を超えて血栓を誘発すると推測している。これらの結果については日本血栓止血学会総会、日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC)、国際血栓止血学会、アメリカリウマチ学総会、国際抗リン脂質抗体学会で発表し、投稿した (Oku et al, Rheumatology(Oxford) Epub ahead 及び Oku et al, Autoimmun Rev, in press)。

(2) APS 患者において補体制御因子のうち H 因子の血中濃度が特異的に減少していることを確認し、現在投稿準備中である。血清 MCP 値は非 SLE 膠原病患者と APS 患者において有意差を認めなかったが、血清 H 因子は低値を認めた (APSvs 非 SLE 膠原病患者 $180.1 \pm 62.6 \mu\text{g/ml}$ vs $368.5 \pm 88.9 \mu\text{g/ml}$, $p < 0.0001$)

これら成果を用いて、APS モデルマウスを作成中だが本研究期間では十分な確認ができなかった。モノクローナルマウス抗 C1q 抗体 JL-1 を 2 週間間隔で 10-1000ug/body で投与

を行ったが一定の結果を得るに至っていない。今後、個体数を増やして検討を進めるとともに、H 因子 KO マウスを用い、かつマウスモノクローナル APL を共投与することにより APS 患者の補体活性化機序に近いモデルを作成し解析を進める。

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 12 件)

1. Fujieda Y, Amengual O, Matsumoto M, Kuroki K, Takahashi H, Kono M, Kurita T, Otomo K, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Maenaka K, Hatakeyama S, Nakayama KI, Atsumi T. Ribophorin II is involved in the tissue factor expression mediated by phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on monocytes. Rheumatology (Oxford) 2016, Epub ahead 査読有り
2. Oku K, Nakamura H, Kono M, Ohmura K, Kato M, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Amengual O, Atsumi T. Complement and thrombosis in the antiphospholipid syndrome. Autoimmune Reviews, 2016 in press. 査読あり
3. Oku K, Amengual O, Hisada R, Ohmura K, Nakagawa I, atanabe T, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. Autoantibodies against component 1q subcomponent (C1q), contribute to complement activation an recurrent thrombosis/ pregnancy morbidity in anti-phospholipid syndrome (APS). Rheumatology (Oxford) 2016, in press 査読あり
4. Otomo K, Amengual O, Fujieda Y, Nakagawa H, Kato M, Oku K, Horita T, Yasuda S, Matsumoto M, Nakayama KI, Hatakeyama S, Koike T, Atsumi T. Role of apolipoprotein B100 and oxidized low-density lipoprotein in the monocyte tissue factor induction mediated by anti- 2 glycoprotein I antibodies. Lupus 2016 in press 査読有り
5. Shimizu Y, Yasuda S, Kato M, Oku K, Bohgaki T, horita T, Kusumi I, Atsumi T. Post-steroid neuropsychiatric manifestations are significantly more frequent in SLE compared with other systemic autoimmune diseases and predict better prognosis compared with de novo neuropsychiatric SLE. Autoimmun Rev Epub ahead, 2016 査読あり
6. Oku K, Amengual O, Bohgaki T, Horita T,

- Yasuda S and Atsumi T An independent validation of the global anti-phospholipid syndrome scores in a Japanese cohort of patients with autoimmune diseases. *Lupus* 2015, 24:774-5
Doi:10.1177/0961203314561284 査読あり
7. Kitaori T, Sugiura-Ogasawara M, Oku K, Papisch W, Ebata T, Ozaki Y, Katano K, Atsumi T. Determination of clinically significant tests for antiphospholipid antibodies and the cut off levels for obstetric anti-phospholipid syndrome. *Lupus*, 24(14): 1505-19, 2015 査読有り
8. Oku K, Amengual O, Hisada R, Oomura K, Nakagawa N, Watanabe T, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. The function and the significance of full-automated tests for detecting antiphospholipid antibodies. *Japanese Journal of Clinical Immunology* 2015, 38:157-63 Doi: 10.2177/jsci.38.157 査読あり
9. Yamada T, Ishiguro N, Oku K, Higuchi I, Nakagawa I, Noguchi A, Yasuda S, Fukumoto T, Iwasaki S, Akizawa K, Furugen A, Yamaguchi H, Iseki K. Successful colistin treatment of multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa infection using a rapid method for determination of colistin in plasma usefulness of therapeutic drug monitoring, *Biol Pharm Bull*, 38(9):1430-3, 2015 査読あり
10. Kono M, Yasuda S, Stevens R, Koide H, Kurita T, Shimizu Y, Kanetsuka Y, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Shimizu T, Majima T, Koike, Atsumi T. RasGRP4-dependent arthritis and proliferation of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol*. 67:396-407, 2015 査読あり
11. Matsuki Y, Atsumi T, Yamaguchi K, Hisano M, Arata N, Oku K, Watanabe N, Sago H, Takasaki Y, Murashima A. Clinical features and pregnancy outcome in anti-phospholipid syndrome patients with history of severe pregnancy complications. *Mod Rheumatol*, 25(2): 215-8, 2015 査読あり
12. Kurita T, Yasuda S, Oba K, Odani T, Kono M, Otomo K, Fujieda Y, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Atsumi T. The efficacy of tacrolimus in patients with interstitial lung diseases complicated with poly- myositis or dermatomyositis. *Rheumatology(Oxford)*, 54(8):1536, 2015 査読あり
- 〔学会発表〕(計 10 件)
1. Oku K, Kanetsuka Y, Amengual O, Nakamura H, Oomura K, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, de Laat B and Atsumi T. Procoagulant property of a novel patient-derived autoimmune IgG type monoclonal anticardiolipin antibody that binds to beta 2 glycoprotein domain I but not to total beta 2 glycoprotein I molecule. American College of Rheumatology, 79th Annual Scientific Meeting, San Francisco, (USA), 7-11 November 2015
 2. Watanabe T, Oku K, Amengual O, Hisada R, Oomura K, Shida S, Shimizu Y, Kato M, Bohgaki T, Horita T, Yasuda S, Ishizu A, Arase H and Atsumi T. Reduction of HLA Class II Expression and Beta-2-Glycoprotein I Presentation By Fluvastatin in Vitro and in Vivo: Possible Mechanism of Statin-Induced-Deprocoagulation in the Antiphospholipid Syndrome. American College of Rheumatology, 79th Annual Scientific Meeting, San Francisco, (USA), 7-11 November 2015
 3. Amengual O, Murakami M, Jago EH, Bohgaki T, Oku K, Otaki J and Atsumi T. Impact of a medical English program in communication skills of graduate medical students. The annual meeting of the Spanish Society for medical Education. Murcia, (Spain) 28-31 October 2015
 4. Amengual O, Murakami M, Jago EH, Bohgaki T, Oku K, Otaki J and Atsumi T. Impact of a medical English course on communication skills of medical students. The 47th Annual Meeting of the Japan Society for medical Education. Toki Messe Niigata Convention Center(Niigata) 24-25 July, 2015
 5. Yasuda S, Shimizu Y, Kono M, Shimamura S, Noguchi A, Shida , Watanabe T, Kato M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T Atsumi T. Myxovirus resistance protein A (MX1) levels are elevated in T cells of the patients with SLE and serum Mx1 is a marker of neuropsychiatric SLE. 11th international Congress on Systemic Lupus Erythematosus. Vienna, (Austria) 2-6 September 2015.
 6. Oku K, Amengual O, Hisada R, Oomura K, Nakagawa I, Watanabe T, Bohgaki T,

- Horita T, Yasuda S and Atsumi T. Predictive markers for thrombotic events in autoimmune diseases: comparison of Antiphospholipid Score (aPL-S) and Global Anti-phospholipid Syndrome Score (GAPSS). International Society on Thrombosis and Haemostasis; ISTH2015.Toronto(Canada) 20-25June 2015
7. Yasuda S, Shimamura S, Shimizu Y, Kono M, Shimizu T, Takahata M, Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T Atsumi T. Overexpression of RasGRP4 in proliferative synovitis induces activation of Erk and p38-MAPK. FOCis meeting. San Diego,(USA) 24-17 June 2015. 6月
 8. Noguchi A, Yasuda S, Kono M, kato M,Oku K, Bohgaki T, Amengual O, Horita T, Sato T, Tsujino I, Nishimura M, Atsumi T. Cardiac magnetic resonance imaging detects disease-specific biventricular involvement in patients with systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. The Annual European Congress of Rheumatology EULAR, Rome, (Italy) 10-13 June 2015
 9. Amengual O, Fujita D, Ota E, Carmona L, Oku K, Sugiura-Ogasawara M, Murashima A, Atsumi T. Prophylaxis for the prevention of obstetric complications in asymptomatic women with antiphospholipid antibodies. The Annual European Congress of Rheumatology EULAR, Rome, (Italy) 10-13 June 2015
 10. Amengual O, Forastiero R, Sugiura-Ogasawara M, Oku K, Otomo K, Alves J, C. Favas C, Zigon P, Ambrozic A, Tomšic M, Ruiz-Irastorza G, Ruiz-Arruza I, Bertolaccini ML, Norman GL, Shums Z, Arai J, et al. Significance of IgG phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody testing for the diagnosis of antiphospholipid syndrome: results from the initial and validation studies. The Annual European Congress of Rheumatology EULAR, Rome, (Italy) 10-13 June 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥 健志 (OKU KENJI)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号: 70544295

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし