

B. 研究方法

1. 対象

Sapporo criteriaを満足するAPS患者のうち、抗 β_2 GPI 抗体陽性でDRB4*0103 (DR53) を持つ5例を対象とした。

2. リン脂質

9種のリン脂質 (DOPS, DPPS, DLPS, DMPS, MOPS, BBPS, lyso-BBPS, カルジオリピン, oxLig-1) を用いた。T細胞の反応性を調べる系では各種リン脂質を30%含むリポソームを用いた (岡山大学大学院医歯学総合研究科細胞化学分野松浦栄次先生より供与)。各リン脂質の β_2 GPIに対する結合性は、固相化リン脂質に β_2 GPIを反応させ、リン脂質と β_2 GPIの結合は抗 β_2 GPIモノクローナル抗体Cof-23により検出した。

3. リン脂質存在下での β_2 GPI に対する抗体反応性の検出

リン脂質を固相化したプレートに β_2 GPIあるいは β_2 GPIを含まない緩衝液を加えて10分間反応させ、さらに100倍希釈した患者血清を加えた。酵素標識抗ヒトIgG抗体を反応させ、酵素基質液を加えて発色した。 β_2 GPI(+)で β_2 GPI(-)に比べて2倍以上の吸光度を示した場合を陽性とした。

4. リン脂質存在下での β_2 GPI に対するT細胞反応性の検出

末梢血単核球をリコンビナント β_2 GPIで刺激し、3日目にIL-2を加えて培養し、10日目に生細胞を回収した。また、末梢血単核球からGM-CSFとIL-4存在下で7日間

培養することで作成した未熟樹状細胞にリポソーム単独またはリポソームに β_2 GPIを前もって混和したものをパルスし、TNF- α 存在下で2日間培養することで成熟させた。リコンビナント β_2 GPIで刺激したT細胞株と抗原をパルスした自己樹状細胞を3日間共培養し、上清中のIFN- γ 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

すべての検体は学内の倫理委員会で承認された文書によるインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

C. 研究結果

β_2 GPI 前処置の有無による各種リン脂質に対する APS および健康人血清の結合性を図 1 に示す。APS 血清は β_2 GPI で前処置した DOPS, BBPS, カルジオリピン, oxLig-1 に対して反応したが、その他のリン脂質には β_2 GPI の有無に関係なく結合しなかった。APS5 例全例が β_2 GPI 存在下で DOPS, BBPS, カルジオリピンに結合し、3 例が β_2 GPI 存在下で oxLig-1 に結合した。

β_2 GPI 存在, 非存在下における各種リン脂質に対する APS2 例の T 細胞反応性を図 2 に示す。いずれの T 細胞もリコンビナント β_2 GPI, p276-290 と反応し、 β_2 GPI に対する反応性を有していることを確認した。T 細胞の反応性は、基本的に抗体と同様のパターンを示したが、 β_2 GPI 存在下でのカルジオリピンに対する反応性が欠如あるいは検出されても非常に弱い点が血清抗体と異なっていた。

解析に用いたリン脂質のうち β_2 GPI と

結合性を有していたのは DOPS, BBPS, カルジオリピン, oxLig-1 のみであり, APS 患者抗体と T 細胞により β_2 GPI 存在下での認識されるリン脂質とほぼ一致していた。唯一の例外はカルジオリピンで, β_2 GPI に結合して抗体により認識されるが, T 細胞の増殖を誘導しなかった。

D. 考察

APS 患者血清中の自己抗体が β_2 GPI に結合するためには, β_2 GPI のカルジオリピンや紫外線照射プレートへの結合が必要なことが知られている。また, これまでの β_2 GPI 反応性 CD4⁺T 細胞クローンの解析結果から, β_2 GPI がリン脂質結合ドメインを介してリン脂質に結合することが主要なエピトープペプチド p276-290 の提示に必要なこと示されている。今回の検討により, APS 患者全例の自己抗体と自己反応性 T 細胞はともにリン脂質の結合した β_2 GPI を認識することが明らかにされた。このことは, リン脂質に結合した β_2 GPI が APS 患者における自己免疫応答の真の標的抗原であることを示唆する。

生体内には酸化 LDL, 血小板マイクロパーティクル, アポトーシス小体など陰性荷電を有するリン脂質を表面に持つ構造物が存在する。これらは循環血中で β_2 GPI が結合した状態で存在する。APS 患者ではこれら β_2 GPI 複合体に自己抗体が結合しているはずで, その免疫複合体が APC に取り込まれれば, p276-290 の発現を介して β_2 GPI 反応性 CD4⁺T 細胞の活性化を維持する。したがって, APS 患者では陰性荷電表面に結合した β_2 GPI が

自己免疫応答の維持に重要な役割を果たす可能性が高い。

今回の検討では, カルジオリピンに結合した β_2 GPI に対して自己抗体と T 細胞が異なる反応性を示した。その理由は明らかでないが, リン脂質結合後の β_2 GPI の立体構造変化や APC への取り込みの kinetics の違いがプロセッシングの過程に影響を与える可能性が推測される。

E. 結論

APS 患者の自己抗体, 自己反応性 T 細胞の β_2 GPI に対する反応性はリン脂質への結合に依存した。酸化 LDL など陰性荷電表面に結合した β_2 GPI が APS 患者における自己免疫応答の真の標的である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuwana M. β_2 -glycoprotein I: antiphospholipid syndrome and T-cell reactivity. *Thromb Res.* 114(5-6): 347-55, 2004
- 2) Kuwana M, Matsuura E, Kobayashi K, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y, Kawakami Y. Binding of β_2 -glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. *Blood.* 105(4): 1552-7, 2005
- 3) 桑名正隆: 自己免疫疾患の遺伝子学. 最

新医学、59(9月増刊号): 78-92, 2004

なし。

- 4) 鍋木淳一、桑名正隆、亀田秀人、竹内勤、岡田純、片山雅夫、吉田俊治、池田康夫: SLE・SLE 疑診例におけるループスアンチコアグランド測定の臨床的意義. 日本醫事新報. 4208: 25-8, 2004

3.その他

なし。

2.学会発表

- 1) 鍋木淳一、桑名正隆、池田康夫: IgG 抗カルジオリピン抗体陽性 SLE の分類. 第 48 回日本リウマチ学会総会 (岡山). 2004. 4.
- 2) 田中庸子、佐藤隆司、鍋木淳一、河上裕、池田康夫、桑名正隆: 全身性エリテマトーデスにおけるヘパリン依存性抗血小板第 4 因子抗体の臨床的意義. 第 32 回日本臨床免疫学会総会 (東京). 2004. 10.
- 3) Kuwana M, Nakamura M, Tanaka Y, Satoh T, Kawai M, Hirakata M, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y: Autoantibody to CD40 ligand is associated with thrombocytopenia, but not with thromboembolism. The 68th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (San Antonio). 2004. 10.
- 4) Kuwana M: β_2 -glycoprotein I : Antiphospholipid syndrome and T-cell reactivity. 11th International Congress on Antiphospholipid Antibodies (Sydney). 2004. 11.

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

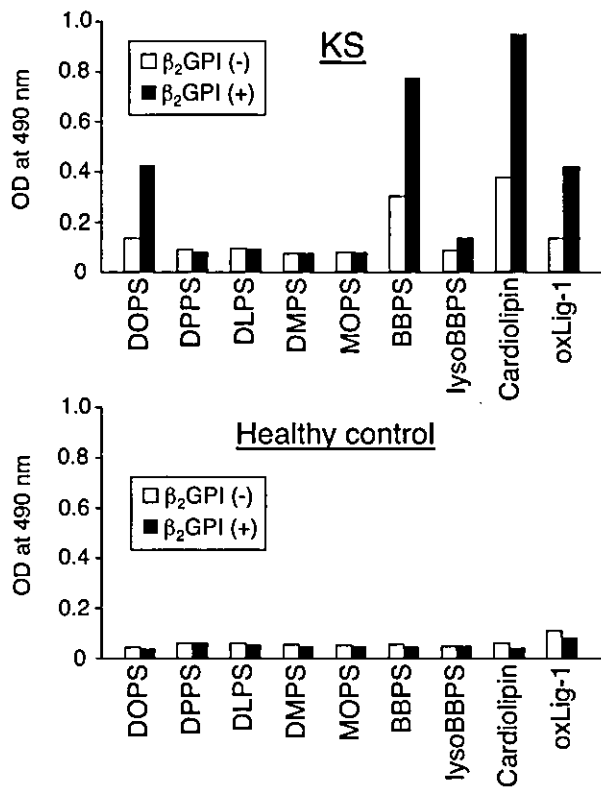


図1. APS患者KSおよび健常人血清の β_2 GPI存在、非存在下における各種リン脂質に対する結合性。

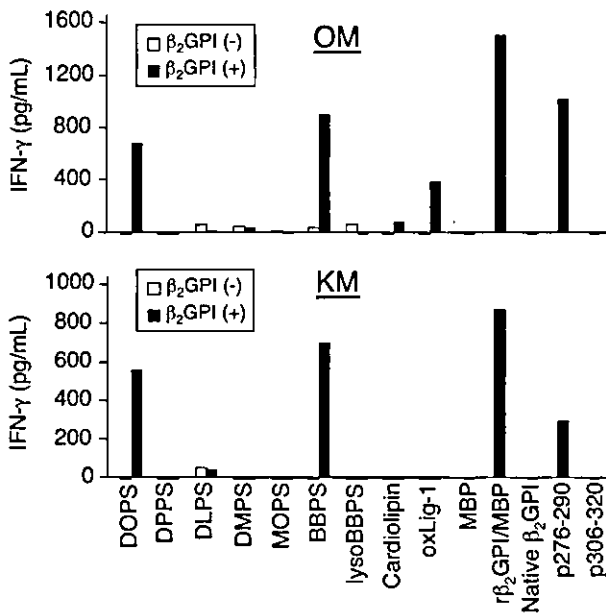


図2. APS患者2例(OM, KM)の末梢血T細胞の β_2 GPI存在、非存在下における各種リン脂質に対する結合性。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

LDLの変性およびタンパク質修飾:免疫が関与する動脈硬化の進展機序と早期診断法

分担研究者 松浦 栄次 岡山大学大学院医歯学総合研究科病態制御科学専攻
病態機構学講座(細胞化学分野) 助教授

研究要旨

昨年度までに引き続き平成16年度も、自己抗体による易血栓性が基本病態と考えられている抗リン脂質抗体症候群(APS)について、抗カルジオリピン抗体(抗 β_2 -グリコプロテイン I (β_2 GPI) 抗体)の関与する動脈血栓(動脈硬化)の進展機序の解析を行った。さらに、自己抗原となり得る酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体および C 反応性タンパク質(CRP) \cdot 酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体、および、それらの免疫複合体あるいは自己抗体 \cdot 自然抗体について臨床診断的意義を検討した。また免疫組織染色で、それら複合体の動脈硬化巣での局在を確認した。これらの研究結果に基づいて、新規臨床診断薬の開発を目指し、種々の複合体(自己抗原)および自己抗体 \cdot 自然抗体の測定法を確立した。

酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体(抗原)は、全身性エリテマトーデス(SLE)/APSのみならず、動脈硬化性の血管病変を有する糖尿病(DM)や強皮症(SSC)の血中で検出された。冠動脈疾患の危険因子と考えられてきた高感度 CRP(hsCRP)の本体は、CRP \cdot 酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体であり、DMやSLE患者で認められた。一方、RAや熱発性の急性炎症性疾患では遊離型の CRP が検出された。このように CRP には疾患で質的違いがあり分別定量が必要である。また、免疫組織染色によっても、CRP、酸化 LDL、 β_2 GPI が動脈硬化巣に存在することが確認されたが、RAの滑膜では酸化 LDLのみが検出された。

一方、IgG 抗酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体抗体は、APS/SLEでのみで高率に検出され、(自己抗体依存的な)動脈血栓形成との関連が示された。この種の抗体は、マクロファージによる酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体(自己抗原)の取り込みを促進する、いわゆる向動脈硬化様の作用を有する抗体である。逆に、動脈硬化の進展を抑制する IgM 抗酸化 LDL 自然抗体は、高脂血症モデルマウスやヒトでは DMのみならず APS/SLE 患者の血中でも認められた。

このように、SLE/APS は自己免疫疾患であるとともに、動脈硬化性の疾患であると考えられ、これら酸化 LDL 関連の自己抗原および自己抗体を測定し、診断および経過観察を行う必要がある。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)においては、血栓症(特に、動脈血栓症)の原因が、抗カルジオリピン抗体(抗 β_2 GPI 抗体)や抗プロトロンビン抗体による血液過凝固である他、動脈硬化の進展の機序が関与している可能性が示されている。さらに近年我々は、抗 β_2 GPI 抗体の生理的対応抗原が酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複

合体である可能性を示した。今年度は、これまでの結果を基に新規診断法を目指し、酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体、C 反応性タンパク質(CRP) \cdot 酸化 LDL $\cdot\beta_2$ GPI 複合体、それらの IgG 免疫複合体、および、自己抗体 \cdot 自然抗体の新規測定法を確立し、臨床意義の解析を行った。

B. 研究方法

各種抗原、抗体、および免疫複合体を ELISA 法にて測定した。

1. 酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体 ELISA

WB-CAL-1 [APS の動物モデルである (NZW x BXSB) F1 雄性マウス由来のモノクローナル抗 β_2 GPI 抗体]固相化マイクロテストプレートと HRP 標識抗ヒト apoB 抗体を用いるサンドイッチ ELISA で測定した。

2. CRP・酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体 ELISA

WB-CAL-1 固相化マイクロテストプレートと HRP 標識抗ヒト CRP 抗体を用いるサンドイッチ ELISA で測定した。標品として hsCRP と予め調製しておいた酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体を Ca 依存的に結合させた。

3. IgG 抗酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体抗体

硫酸銅酸化 LDL と β_2 GPI を Ca 非依存的に共有結合させた複合体をマイクロテストプレートに固相化し HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を用いて測定した。

4. IgG 抗酸化 LDL・ β_2 GPI 免疫複合体

Cof-23 [ヒト β_2 GPI を免疫することで得た BALB/c 由来のモノクローナル抗 β_2 GPI 抗体]をマイクロテストプレートに固相化し HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を用いて測定した。

免疫組織染色

動脈硬化巣 (頸動脈) および RA 患者の滑膜のパラフィン抱埋切片と抗 CD68 抗体、抗 SMC α 抗体、抗 β_2 GPI 抗体、抗アポ B 抗体、抗酸化 LDL 抗体などを用いて ABC 法にて、抗原の局在を確認した。

マクロファージによる β_2 GPI の取り込みに及ぼす各種 IgG および IgM 抗体の影響

マクロファージによる [125 I]酸化 LDL・

β_2 GPI 複合体の取り込み量を、各種 IgG および IgM 抗体と培養した後、測定した。

(倫理面への配慮)

倫理委員会の承認を得た上で、血漿・血清サンプルについては、インフォームドコンセントを施し、了解の得られた患者および健康人より血清並びに血漿を得た。これらの血液由来のサンプルは使用時まで -20°C で施錠して保管した。また、得られた結果等の扱いについて厳密に管理した。

C. 研究結果

酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体 (自己抗原) は、SLE や APS のみならず、DM や SSC 患者血清で陽性になるが、RA 患者血清では陽性例が認められなかった。

SLE、および DM の各患者群内で、ラテックス凝集法による血中高感度 CRP 値と CRP・ β_2 GPI・酸化 LDL 複合体値の間には強い相関関係が見られた。この実験成績は、DM、SLE 患者で、CRP は β_2 GPI・酸化 LDL 複合体と結合した状態で血中を循環していることを示している。一方、熱発性の感染症などの急性炎症や、RA などの疾患血中では、遊離型の CRP のみが検出された。

免疫組織染色では、頸動脈プラーク内の、スカベンジャー受容体を高発現する泡沫化マクロファージや活性化された血管平滑筋細胞が、CRP、 β_2 GPI、酸化 LDL 陽性であった。一方、RA の炎症滑膜では、酸化 LDL の局在は認められるものの、 β_2 GPI および酸化 LDL の局在は認められなかった他、集族マクロファージにおいてもスカベンジャー受容体の発現は認められなかった。

IgG 抗酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体抗体および IgG 酸化 LDL・ β_2 GPI 免疫複合体の何れもが、SLE/APS で高率に検出され、特に動脈血栓の既往との間に強い関連が示された。一方、IgM 抗酸化 LDL 抗体は、高脂血症モデルマウスである apoE ノックアウトマウスや LDL 受容体 ノックアウトマウスの他、ヒトでは SLE や

DM患者の血清中でもしばしば検出された。

酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体マクロファージへの取り込みは、APS 由来の IgG 抗 β_2 GPI 抗体の添加で有意に増加する一方、IgM 抗酸化 LDL 抗体の添加では抗体濃度依存的に減少した。

D. 考察

種々の酸化ストレス、高コレステロール血症、share stress、高血糖などの risk factor と関連して産生される、いわゆる、変性（酸化）LDL は、動脈硬化の進展に関わっている。実際にこの種の変性 LDL（酸化 LDL）の血中濃度を測定すると、冠動脈疾患で、一過的に増加することが数多くの研究グループより報告されている。しかしながら酸化 LDL 自体が酸化により陰性荷電を獲得していることが原因で、速やかに（標識酸化 LDL を用いた動物実験では数分以内に）肝臓等へクリアランスされ、循環血中に長期間滞留することはない。

我々は、近年、酸化 LDL が特定のリガンド（コレステリルリノレートの酸化体）を介して β_2 GPI と結合することを見だし報告してきた。前述の酸化 LDL とは異なり、この酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体は、冠動脈疾患のみならず、APS、SLE、SSC、DM、慢性腎炎などの患者血清中に広く検出された。すなわち、酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体は、慢性的に進行する動脈硬化性の血管病変部位で形成されて血中に逸脱する複合体で、その血中濃度は、病変の大きさに依存している可能性が高い。データは示していないが 2 型糖尿病においては、スタチン投与群の酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体レベルが非投与群に比べ有意に低いこともわかっている。また、APS においては動脈血栓の発症に関わる抗 β_2 GPI 抗体の生理的対応抗原である可能性が高い。

最近、高感度 CRP (hsCRP) は、冠動脈疾患のリスクファクターであると言われている。今回の研究で、CRP は、動脈硬化巣で酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体と複合体を形成し、血中へ逸脱することが明らかになった。この複合体

形成は、熱発性の急性炎症性疾患や RA ではみられず、動脈硬化の進展のマーカーになり得る。また、SLE/APS でもこの CRP 複合体が血中に現れてくることから、これらの疾患は膠原病であるとともに動脈硬化性疾患であると考えられる。

前述の通り、酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体（あるいは CRP・酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体）は、いわゆる抗カルジオリピン抗体（抗 β_2 GPI 抗体）の対応抗原であることより、現在汎用されている診断薬（抗カルジオリピン抗体）の他に、これら一連の複合体抗原および抗体の意義をさらに詳細に解析する必要がある。なお、この種の自己抗体・自然抗体については、免疫グロブリンのサブクラスも重要で、IgG 酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体抗体は、マクロファージによる本複合体の取り込みを促進（向動脈硬化様作用）するのに対して、IgM 抗酸化 LDL 自然抗体は、抑制する抗動脈硬化様作用を示す。これらの違いは、マクロファージが有する免疫受容体の貪食能の有無に依存している可能性がある。

いずれにしても、これらのマーカーを合わせて測定することで SLE/APS におけるよりの確な診断および経過観察をすることができる可能性があると期待している。

E. 結論

酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体、CRP・酸化 LDL・ β_2 GPI、および、それらの免疫複合体、あるいは複合体に対する自己抗体（自然抗体）の測定系を確立し、APS、SLE、RA、DM 患者におけるこれらの血中マーカーとしての意義について解析した。従来の抗カルジオリピン抗体と比較して、IgG 抗酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体は、APS における動脈血栓の既往とより関連が深い他、自己抗原である酸化 LDL・ β_2 GPI 複合体、CRP・酸化 LDL・ β_2 GPI、および、それらの免疫複合体の測定の意義も見いだされた。

F. 健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Lopez D, Garcia-Valladares I, Palafox-Sanchez CA, De La Torre IG, Kobayashi K, Matsuura E, Lopez LR. Oxidized low-density lipoprotein/ β ₂-glycoprotein I complexes and autoantibodies to oxLig-1/ β ₂-glycoprotein I in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* 121: 426-436, 2004.
2. Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Matsuura E, Inagaki J, Hisao H, Tanaka H, Yamakado M, Akino M, Saito H, Amasaki Y, Jodo S, Amengual O, Koike T. Nicked β ₂-glycoprotein I: A marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood* 103: 3766-3772, 2004.
3. Kasahara J, Kobayashi K, Maeshima Y, Yamasaki Y, Yasuda T, Matsuura E, Makino H. Clinical significance of serum oxidized low-density lipoprotein/ β ₂-glycoprotein I complexes in patients with chronic renal diseases. *Nephron Clin Practice* 98: c15-24, 2004.
4. Matsuura E, Lopez LR. Are oxidized LDL/ β ₂-glycoprotein I complexes pathogenic antigens in autoimmune-mediated atherosclerosis? *Clin Dev Immunol* 11:103-111, 2004.
5. Shoenfeld Y, Wu R, Dearing LD, Matsuura E. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? *Circulation* 110: 2552-2558, 2004.
6. Inagaki J, Kondo A, Lopez LR, Shoenfeld Y, Matsuura E. Anti-laminin-1 autoantibodies, pregnancy loss and endometriosis. *Clin Dev Immunol* 11: 261-266, 2004.
7. Atsumi T, Matsuura E, Koike T. *Systemic Lupus Erythematosus (Fourth Edition)* • Immunology of antiphospholipid antibodies and cofactors • Elsevier Science BV • pp1081-1105, Amsterdam, The Netherlands, 2004.
8. 松浦栄次、小林和子、小池隆夫. 自己免疫と動脈硬化. *日本アフェレシス学会学会誌* 23167-175, 2004.
9. Kondo A, Inagaki J, Kobayashi K, Tsukamoto H, Yamamoto D, Nakatsuka M, Suzuki N, Nomizu M, Amano M, Matsubayashi M, Yasuda T, Lopez LR, Shoenfeld Y, Makino T, Matsuura E. Characterization of a murine anti-laminin-1 monoclonal antibody (AK8) produced by immunization with mouse-derived laminin-1. *Clin Dev Immunol* 12: 67-73, 2005.
10. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K, Koike T. Significance of valine/leucine²⁴⁷ polymorphism of β ₂-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti- β ₂-glycoprotein I autoantibodies to the valine²⁴⁷ β ₂-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum* 52: 212-218, 2005
11. Conrad K, Bachmann M, Matsuura E, Shoenfeld Y. From animal models to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies. *Autoimmun Rev* (in press)
12. Kuwana M, Matsuura E, Kobayashi K, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y, Kawakami Y. Binding of β ₂-glycoprotein I to anionic phospholipids facilitates processing and presentation of a cryptic epitope that activates pathogenic autoreactive T cells. *Blood* (in press)
13. Kobayashi K, Lopez LR, Shoenfeld Y, Matsuura E. The Role of Innate and adaptive immunity to oxidized low-density lipoprotein in the Development of Atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* (in press)
14. Inagaki J, Kondo A, Lopez LR, Shoenfeld Y, Matsuura E. Pregnancy loss and endometriosis: pathogenic role of

anti-laminin-1 autoantibodies. *Ann NY Acad Sci* (in press)

15. Lopez LR, Hurley BL, Simpson DF, Matsuura E. Oxidized low-density lipoprotein/ β_2 -glycoprotein I complexes and autoantibodies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* (in press)
16. Lopez LR, Simpson DF, Hurley BL, Matsuura E. OxLDL/ β_2 GPI complexes and autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis and antiphospholipid syndrome: pathogenic Implications for vascular involvement. *Ann NY Acad Sci* (in press)
17. Kondo A, Inagaki J, Matsubayashi H, Lopez LR, Shoenfeld Y, Makino T, Matsuura E. Anti-laminin-1 autoantibodies and reproductive failure. *Am J Reprod Immunol* (in press)

2. 学会発表

1. Matsuura E. Atherogenic role of protein modified oxidized low-density lipoproteins and their autoantibodies. Dresden Symposium on Autoantibodies. Dresden, Germany, 2004.
2. Matsuura E. Anti-laminin-1 autoantibodies in reproductive failure: human and animal studies. Dresden Symposium on Autoantibodies. Dresden, Germany, 2004.
3. Lopez LR, Kuca J, Hurley B, Andrews J, Fink C, Merrill JT, Matsuura E. IgG antibodies to oxLDL/ β_2 GPI complexes are associated with arterial thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 2004.
4. Lopez LR, Kuca J, Hurley J, Fink C, Matsuura E. IgG and IgM anti-oxLDL/ β_2 GPI antibodies in patients with autoimmune disorders and antiphospholipid syndrome. International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 2004.
5. Lopez LR, Hurley B, Dier K, Fink C, Matsuura E. OxLDL/ β_2 GPI complexes in

patients with systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis: pathogenic implications for vascular involvement. International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 2004.

6. Lopez LR, Hurley B, Kuca J, Dier K, Fink C, Matsuura E. OxLDL/ β_2 GPI complexes and autoantibodies in patients with type II diabetes mellitus. International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 2004.
7. Matsuura E, Kobayashi K, Shoenfeld Y, Lopez LR. Role of natural antibodies and autoantibodies on development of atherosclerosis. International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 2004.
8. Inagaki J, Kondo A, Lopez LR, Shoenfeld Y, Matsuura E. Anti-laminin-1 autoantibodies, pregnancy loss and endometriosis. International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 2004.
9. Ambrozic A, Pahor V, Rozman B, Tomsic M, Kveder T, Kobayashi K, Matsuura E. Reduced concentration of β_2 GPI in RA and aPL positive patients - a probable marker of accelerated atherosclerosis? International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 2004.
10. Ames PRJ, Delgado Alves J, Lopez LR, Iannaccone L, Margarita A, Scenna G, Brancaccio V, Matsuura E. Pro-atherogenic role for IgG anti-oxidised-low-density-lipoprotein- β_2 -glycoprotein-I complex in primary antiphospholipid syndrome. International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary, 2004.
11. Matsuura E. Thrombogenic autoantigen in APS. International Congress of Reproduct Immunology, Hakone, Japan, 2004.
12. Inagaki J, Nakatsuka M, Nomizu M, Aoki K, Matsuura E. Anti-laminin-1 autoantibodies in endometriosis. International Congress of Reproduct Immunology, Hakone, Japan, 2004.
13. 小林和子、多田耕司、山本 格、保田立二、松浦栄次. 抗リン脂質抗体症候群に由来する自己抗体の血栓原性の解析. 日

- 本リウマチ学会総会、岡山、2004.
14. 田淵雅子、小林和子、多田耕司、山本 格、保田立二、松浦栄次. 血中酸化 LDL・ β_2 -グリコプロテイン I・CRP 複合体の意義. 本リウマチ学会総会、岡山、2004.
 15. 田淵雅子、小林和子、四方賢一、榎野博史、小池隆夫、保田立二、松浦栄次. 血中酸化 LDL・ β_2 -グリコプロテイン I・CRP 複合体の臨床的意義. 日本免疫学会、札幌、2004.
 16. 小林和子、田淵雅子、梶原敏充、井出将博、四方賢一、榎野博史、保田立二、小池隆夫、松浦栄次. 抗リン脂質抗体症候群に由来する自己抗体の動脈血栓への関与. 日本免疫学会、札幌、2004.
 17. 松浦栄次. 抗リン脂質抗体と酸化 LDL. 臨床化学会夏期セミナー. 鹿児島. 2004.

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働省研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

抗リン脂質抗体の発現, 血栓症発症における接着分子の関与
—接着分子ノックアウトマウスを用いた検討—

分担研究者 山崎 雅英 金沢大学大学院医学系研究科 血液内科 助手

研究要旨

接着分子ノックアウト(KO)マウスを用いて実験的 APS モデルマウスの作成を試み, 抗リン脂質抗体(aPL)発現, 血栓症発症に及ぼす接着分子の関与につき検討した. C57B2/6(wild type)マウスに β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI)を能動感作することにより実験的 APS マウスを作成した. 同様に ICAM-1, P-selectin, E-selectin, L-selectin KO マウスに β_2 -GPI を感作し実験的 APS マウスが作成されるか検討した. これらのマウスに LPS を腹腔内投与し FDP, TAT, および腎糸球体血栓の頻度(%GFD)を測定し, 本モデルの血栓傾向を解析した.

Wild type マウスでは β_2 -GPI 感作 8 週後に有意の血小板減少, APTT延長, aCL の上昇を認め, aPL の発現が確認された. ICAM-1, P-selectin, L-selectin KO マウスでも同様の変化を認めたものの E-selectin KO マウスではいずれの変化も見られなかった. LPS 腹腔内投与により, β_2 -GPI 感作 wild type マウスでは非感作マウスと比較して有意の FDP, TAT の上昇, %GFD の上昇を認めたものの, 接着分子 KO マウスではいずれのマウスも FDP, TAT, %GFD の有意の上昇を認めなかった. 以上の結果より, 抗リン脂質抗体発現には E-selectin が, 血栓症発症にはそのほかの接着分子が関与することが明らかになった.

A. 研究目的

抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome, APS)はループスアンチコアグラント(lupus anticoagulant, LA)または抗カルジオリピン抗体(anticardiolipin antibody, aCL)などの抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibody, aPL)の存在により, 反復性血栓症・不育症などの臨床症状を来す自己免疫疾患の1つと考えられる.

しかし, 本症候群における抗体産生, 血栓症発症の機序はいまだ明らかではない.

これまでの我々の検討では, 血管内皮細胞に aPL を含む免疫グロブリンを添加することにより ICAM-1, VCAM-1 の放出が有意に亢進することより, APS における血栓症発症には細胞接着分子が何らかの役割を果たしているものと考えられた.

そこで, 本年度は各種細胞接着分子ノックアウト(KO)マウスに対し aPL の主要抗原

の1つである β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI)を能動感作することにより実験的 APS モデルの作成を試み, aPL 発現ならびに血栓症発症における接着分子の関与につき検討した.

B. 方法

1. 実験的 APS モデルマウスの作成

C57B2/6(wild type)マウスに対し 20 μ g のヒト β_2 -glycoprotein I (β_2 -GPI)を Freund adjuvant とともに 2 週間間隔をあけて 2 回足背に能動感作することにより実験的 APS マウスを作成した. 同様に ICAM-1, P-selectin, E-selectin, L-selectin KO マウスに β_2 -GPI を感作し実験的 APS マウスが作成されるか検討した. 第1回 β_2 -GPI 接種 3, 4, 8, 12 週後にマウス大腿動脈より採血し, 以下の項目につき経時的に比較した. 血小板数(platelet count; Plts)は動物用血球測定装置を, prothrombin time

(PT), activated partial thromboplastin time (APTT)は KCT-4 を用い、一段法により測定した。aCL-IgG はヒト用 ELISA キットにて、FDPは LPIAにて、thrombin- antithrombin complex (TAT)はヒト用 ELISA キット (Enzygnost TAT, Behring Berke)を用いて測定した。

2. 血栓症モデルの作成

β_2 -GPI 第1回投与8週後に 5mg/kg の lipopolysaccharide (LPS)をマウス腹腔内投与した。4時間後にエーテル麻酔下にマウス大腿動脈より採血し、マウスを脱血死させた。得られた血漿を用い、Plts, APTT, FDP, TAT, aCL-IgG を測定した。脱血死直後に腎臓を摘出しホルマリン固定、PTAH 染色にて腎糸球体内フィブリン血栓を鏡検し、糸球体 100 個当たりのフィブリン血栓発症頻度をパーセント(percentage of glomerular fibrin deposits, %GFD)にて表示した。

3. 統計学的処理

得られた結果は mean \pm 2SD で表示した。測定値は Wilcoxon 検定を用い、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

動物実験は金沢大学動物実験施設にて施行した。本研究で用いる C57B2/6 マウスおよび各種接着分子 KO マウスの取扱いはワシントン条約に準拠した。

C. 結果

1. 各種凝血学的マーカーの推移

β_2 -GPI 投与前の各種接着分子KOマウスにおける Plts, APTT, aCL, FDP, TAT 値には wild type マウスと有意差が見られなかった。Wild type マウスに対し、 β_2 -GPI を反復投与し感作を試みたところ、非感作マウスと比較して Plts は β_2 -GPI 投与4週目より低下、aCL, APTTは3週目より上昇し、8週目にはその変化は有意となるとともに (p<0.005, <0.005, and <0.005, respectively), 12週目も同程度の変化であったことより、以後の検討は、 β_2 -GPI 投与8週目に行なった。

β_2 -GPI 第1回感作8週目の凝血学的検査成績を表1に示す。

L-selectin, P-selectin, ICAM-1 KO マウスでは β_2 -GPI 感作により Plts は有意に低下 (p<0.005, <0.005, and <0.005, respectively), APTT は有意に延長 (p<0.005, <0.005, and <0.005, respectively), aCL は有意に上昇 (p<0.005, <0.005, and <0.005, respectively)しており、その程度は wild typeと同程度であった。一方、E-selectin KO マウスでは β_2 -GPI 感作によっても Plts, APTT, aCL の有意の変化は認められなかった。

2. LPS 刺激による血栓形成(表2)

LPS 投与により、 β_2 -GPI 感作 wild type マウスでは FDP, TAT の有意の上昇がみられるとともに (p<0.05 and <0.01, respectively), 腎糸球体血栓頻度(%GFD)は非感作マウスと比較して有意に高率であった (p<0.01)。一方、各種接着分子 KO マウスでは β_2 -GPI 感作による FDP, TAT の有意の上昇は認めず、%GFD は β_2 -GPI 非感作 wild type マウスより有意に低値であった。

D. 考察

抗リン脂質抗体症候群における抗体産生、血栓症発症の機序についてはいくつかの報告があるもののいまだ明らかではない。今回の検討の結果、L-selectin, P-selectin, ICAM-1 KO マウスでは β_2 -GPI 感作により Plts の低下、APTT の延長、aCL の上昇を認めたものの、LPS 刺激による FDP, TAT の上昇の増加が見られなかった。また%GFDは β_2 -GPI 非感作 wild type マウスより有意に低値であった (p<0.05, <0.05, and <0.05, respectively)。以上の結果より、これらの接着分子は抗原感作による抗リン脂質の誘導には関与しないものの、血栓形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

一方、E-selectin KO マウスでは β_2 -GPI 感作による抗リン脂質抗体発現が認められなかった。この結果は本抗体の発現に E-selectin が関与している可能性を示唆する。本接着分子が抗体発現に果たす役割は不明であるが、今後更なる検討が必要である。

抗リン脂質抗体症候群症例では個々の症例により様々な抗体を有するとともに症例により臨床症状も異なるため、同一の治療法を行うことは困難であるが、今回の結果より接着分子の発現を特異的に抑制することにより、血栓症発症を抑制するとともに、E-selectin に対するインヒビター、抗体などを用いることで抗リン脂質抗体の発現をも抑制しうる可能性が示唆された。

E. 結論

接着分子 KO マウスを用いた検討の結果、各種接着分子は抗リン脂質抗体陽性症例における血栓症発症に重要な役割を果たすとともに、特に E-selectin は抗原感作による抗体産生をも抑制しうる可能性が示唆された。各種接着分子に対するインヒビター、抗体などを用いることにより、本症候群の発症を特異的に抑制できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 河嶋洋平, 山・雅英, 森下英理子, 朝倉英策, 長谷川稔, 大竹茂樹. 異なる疾患群における IgG 型抗プロトロンビン抗体測定キット 2 社間の測定値の乖離. 日本血栓止血学会雑誌(印刷中)
- 2) 山・雅英. 抗リン脂質抗体症候群. よくわかる強皮症のすべて. 永井書店. 241-250, 2004 年 2 月.
- 3) Asakura H, Okudaira M, Ontachi Y, Mizutani T, Omote M, Yoshida T, Kaneda M, Yamazaki M, Morishita E, Takami A, Miyamoto SI, Nakao S. Antithrombotic role of nitric oxide in rats under physiological conditions. *Thromb Haemost* 91(1): 71-5, 2004.
- 4) Hasegawa M, Sato S, Yanaba K, Komura K, Hayakawa I, Hamaguchi Y, Yamazaki M, Takehara K. Autoantibodies against phosphatidylserine- prothrombin complex

- ion patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 63: 1514-1517, 2004
- 5) Asakura H, Sano Y, Yoshida T, Omote M, Ontachi Y, Mizutani T, Kaneda M, Yamazaki M, Morishita E, Takami A, Miyamoto KI, Nakao S. Beneficial effect of low-molecular-weight heparin against LPS-induced DIC in rats is abolished by co-administration of tranexamic acid. *Intensive Care Med* 30: 1950-1955, 2004.
 - 6) Asakura H, Sano Y, Yamazaki M, Morishita E, Miyamoto KI, Nakao S. Role of fibrinolysis in tissue-factor-induced DIC in rats: an effect of tranexamic acid on this model. *Haematologica* 89(6): 757-758, 2004
 - 7) Asakura H, Sano Y, Omote M, Yoshida T, Ontachi Y, Mizutani T, Kaneda M, Yamazaki M, Morishita E, Takami A, Miyamoto KI, Nakao S. Significance of decreased plasma D-dimer levels following lipopolysaccharide-induced DIC in rats. *Int J Hematol* 79(4): 394-399, 2004.
 - 8) Suga Y, Asakura H, Yoshida T, Omote M, Ontachi Y, Mizutani T, Yamazaki M, Morishita E, Nakao S, Miyamoto Ken-ichi. Relationship between endothelin and the pathophysiology of tissue factor-induced and lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation in rats: a study examining the effect of an endothelin receptor antagonist. *Blood Coagulat Fibrinol.* 15: 593-598, 2004.
 - 9) 山・雅英, 長谷川稔, 佐藤伸一, 竹原和彦. 強皮症におけるフォスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体の陽性率と臨床症状との関連. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」平成 15 年度総括・分担研究報告書. 63-69, 2004.
 - 10) 山・雅英. 抗プロトロンビン抗体の接着分子発現に及ぼす影響に関する研究.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業「自己免疫疾患に関する調査研究」平成15年度総括・分担研究報告書. 72-76, 2004.

11) 山・雅英. 抗リン脂質抗体症候群. インフォームドコンセントのための図説シリーズ 膠原病 3. その他の膠原病, 医薬ジャーナル社. 74-81, 2004.

2. 学会発表

1) Yamazaki M. Antiphospholipid syndrome. 3rd Congress of Asian-Pacific Thrombosis and Haemostasis. Oct. 2004, Bangkok, Thailand (Invited Speaker, Symposist).

2) Yamazaki M, Kawashima Y, Asakura H, Nakao S. Rituximab reduces antiphospholipid antibody titers and improves hypercoagulable state without recurrent thromboses: 2-year follow up. 11th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Nov. 2004, Sydney, Australia.

3) Yamazaki M, Kawashima Y, Asakura H, Nakao S. Roles of adhesion molecules in the development of thrombosis and pregnant morbidity in antiphospholipid syndrome (APS): Studies using APS-model mice deficient of adhesion molecules. 11th

International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Nov. 2004, Sydney, Australia.

4) Kawashima Y, Yamazaki M, Asakura H, Morishita E, Otake S. Clinical significance of phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody (aPS/PT) bound only human prothrombin in APS patients with several kinds of collagen disease. 11th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. Nov. 2004, Sydney, Australia.

6) 山・雅英, 河嶋洋平, 荒幡昌久, 門平靖子, 前川実生, 御館靖雄, 林朋恵, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. 抗リン脂質抗体の誘導・発症における接着分子の

意義:接着分子ノックアウト(KO)マウスを用いた検討. 第64回日本血液学会総会・第44回日本臨床血液学会総会, 京都. 2004年9月(ワークショップ)

7) 山・雅英, 門平靖子, 前川実生, 荒幡昌久, 御館靖雄, 林朋恵, 河嶋洋平, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. 抗リン脂質抗体陽性不育症に対する少量アスピリン, ヘパリン皮下注射併用療法の有用性. 第27回日本血栓止血学会学術集会, 奈良. 2004年11月

8) 河嶋洋平, 山・雅英, 森下英理子, 朝倉英策, 大竹茂樹. 強皮症およびSLEに対する異なるaPS/PT ELISAキットを用いた抗体価測定の臨床的意義. 第27回日本血栓止血学会学術集会, 奈良. 2004年11月

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし.

2. 実用新案登録

なし.

3. その他

なし.

表1. 各種接着分子ノックアウトマウスにおける β_2 -glycoprotein I 能動感作による抗リン脂質抗体関連検査成績

	Saline (n=10)	C57 B2/6 (n=10)	L-selectin KO (n=10)	P-selectin KO (n=10)	E-selectin KO (n=10)	ICAM-1 KO (n=10)
Plts ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	69.7 \pm 10.2	32.7 \pm 8.6 *	34.6 \pm 9.7 *	31.8 \pm 8.6 *	70.4 \pm 9.7	33.1 \pm 6.9 *
APTT (sec.)	24.0 \pm 3.2	72.3 \pm 8.9 *	70.4 \pm 7.9 *	71.2 \pm 9.7 *	25.1 \pm 8.1	70.4 \pm 10.2 *
aCL (GPL)	2.6 \pm 0.9	40.1 \pm 7.1 *	41.2 \pm 5.9 *	43.1 \pm 8.1 *	3.1 \pm 1.9	52.1 \pm 8.7 *

Saline; β_2 -GP I 非感作 wild type(C57 B2/6)マウス, C57 B2/6; β_2 -GP I 感作 wild type(C57 B2/6)マウス, L-selectin KO; β_2 -GP I 感作 L-selectin KO マウス, P-selectin KO; β_2 -GP I 感作 P-selectin KO マウス, E-selectin KO; β_2 -GP I 感作 E-selectin KO マウス, ICAM-1 KO; β_2 -GP I 感作 ICAM-1 KO マウス.

Plts; 血小板数, APTT; 活性化部分トロンボプラスチン時間, aCL; 抗カルジオリピン抗体.

平均 \pm 2SD, *; $p < 0.005$ vs. Saline 群.

表2. 各種接着分子ノックアウトマウスにおけるLPS刺激による凝血学的検査成績

	Saline (n=10)	C57 B2/6 (n=10)	L-selectin KO (n=10)	P-selectin KO (n=10)	E-selectin KO (n=10)	ICAM-1 KO (n=10)
FDP	12.5 ± 4.2	21.6 ± 8.1 #	9.6 ± 3.9	13.1 ± 5.2	12.6 ± 4.8	11.9 ± 3.8
TAT	24.5 ± 4.2	61.3 ± 11.1 #	23.1 ± 6.1	19.8 ± 5.8	20.8 ± 6.0	24.1 ± 5.6
%GFD	31 ± 10.1	86 ± 18.1 #	18.3 ± 7.9 ※	20.9 ± 9.1 ※	16.5 ± 7.8 ※	19.2 ± 8.6 ※

Saline; β_2 -GP I 非感受 wild type(C57 B2/6)マウス, C57 B2/6; β_2 -GP I 感受 wild type(C57 B2/6)マウス, L-selectin KO; β_2 -GP I 感受 L-selectin KO マウス, P-selectin KO; β_2 -GP I 感受 P-selectin KO マウス, E-selectin KO; β_2 -GP I 感受 E-selectin KO マウス, ICAM-1 KO; β_2 -GP I 感受 ICAM-1 KO マウス.

FDP; フィブリン/フィブリノーゲン分解産物, トロンビン-アンチトロンビン複合体, %GFD; 腎糸球体フィブリン血栓率, 平均±2SD, #; p < 0.01, ※; p < 0.05 vs. Saline 群.

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

抗リン脂質抗体による向血栓細胞活性化の機序に関する研究

主任研究者 小池 隆夫 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 教授
研究協力者 渥美 達也 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 講師
" 保田 晋助 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 助手
" 坊垣 幸 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科 大学院生

研究要旨

抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid syndrome: 以下 APS) は β_2 グリコプロテイン I (以下 β_2 GPI) 依存性抗カルジオリピン抗体 (以下抗 CL/ β_2 GPI 抗体) をはじめとする抗リン脂質抗体と総称される一群の自己抗体が引き起こす自己免疫性血栓性疾患である。血管内皮細胞や単球系細胞に直接作用し、凝固のイニシエーターである組織因子 (tissue factor: 以下 TF) を細胞表面に発現することにより凝固系を活性化することにより、易血栓性が誘導されることが知られている。抗リン脂質抗体の主要な対応抗原として、 β_2 GPI やプロトロンビン等の、リン脂質に結合した凝固・線溶を制御するタンパクがあげられるが、抗体が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。今回我々は、抗リン脂質抗体による細胞刺激シグナルについて検討を行った。抗 CL/ β_2 GPI 抗体の刺激によりヒト末梢血単核球で発現が増強する遺伝子発現の挙動について、cDNA アレイおよびリアルタイム PCR を用いて検討を行った。その結果、MAPK 経路が抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による TF 発現に関わっていることが示唆された。さらに、単球系細胞株 RAW 264.7 を用い抗 CL/ β_2 GPI 抗体刺激による MAPK 経路のリン酸化についてウエスタンブロッティング法で検討したところ、p38 MAPK のリン酸化および NF κ B 活性化が認められた。また特異的 p38 阻害薬 (SB203580) により p38 MAPK リン酸化が阻害され、TF 発現も抑制された。また、抗 CL/ β_2 GPI 抗体による p38 MAPK リン酸化は、 β_2 GPI の非存在下では認められなかった。以上の結果より、p38 MAPK 経路は、抗リン脂質抗体刺激による単球からの TF 発現に重要な役割を果たしていると考えられ、また、p38 MAPK 経路の制御は、APS 患者の血栓向性に対する新たな治療法と成り得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

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 (リン脂質やリン脂質結合タンパク) に対する自己抗体の出現を特徴とする、難治性の自己免疫疾患である。抗リン脂質抗体症候群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、抗リン脂質抗体症候群では、 β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン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 β_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、または抗リン脂質抗体症候群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, NFκB の活性化を介して、組織因子の発現が起きることを明らかにしているが、抗体が対応抗原であるβ₂GPI やプロトロンビン等のリン脂質に結合した凝固・線溶を制御するタンパク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を目的とした。

B.研究方法

末梢血単核球および単球系細胞株を用いて、抗リン脂質抗体症候群患者の末梢血リンパ球より樹立したヒトモノクローナル IgM 型抗 CL/β₂GPI 抗体 (EY2C9) により刺激し、検討を行った。遺伝子発現の挙動については、ヒト末梢血単核球を用いて、cDNA アレイおよびリアルタイム PCR 法により検討を行った。その結果より、単球系細胞株 RAW264.7 を用いて抗 CL/β₂GPI 抗体刺激による MAPK 経路のリン酸化についてウエスタンブロットリング法で検討した。

C.研究結果

cDNA アレイおよびリアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析より、MAPK 経路が抗 CL/β₂GPI 抗体刺激による TF 発現に関わっていることが示唆された。さらに、ウエスタンブロットリング法での解析にて、抗 CL/β₂GPI 抗体による細胞刺激により、p38 MAPK のリン酸化および NFκB の核内移行が認められた。また、特異的 p38 阻害薬 (SB203580) にて抗 CL/β₂GPI 抗体刺激による p38 MAPK リン酸化が阻害され、リアルタイム PCR 法において TF 発現の抑制も確認された。また、抗 CL/β₂GPI 抗体による p38 MAPK リン酸化は、β₂GPI の非存在下では認められなかった。さらに、遺伝子発現解析の結果から、TNFα、IL-1β などの炎症性サイトカインやケモカ

インの発現亢進が認められた。

D.考察

p38 MAPK 経路は、抗リン脂質抗体刺激による単球からの TF 発現に重要な役割を果たしていると考えられた。抗 CL/β₂GPI 抗体による刺激により p38 MAPK のリン酸化に引き続き、NFκB 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考えられる。これまでの研究から、抗リン脂質抗体症候群患者由来のモノクローナル抗β₂GPI 抗体は、培養内皮細胞に接着因子 (ICAM-1, VCAM-1, E-セ렉チン) の発現を誘導し、さらにモノクローナル抗β₂GPI 抗体は、単球や内皮細胞にも外因系凝固反応のトリガーである TF の mRNA や蛋白を誘導することが示されている。p38 MAPK 阻害により TF 発現が抑制されるという今回の研究の結果より、p38 MAPK 経路の制御は APS 患者の血栓向性に対する新たな治療法と成り得る可能性が考えられる。また、抗 CL/β₂GPI 抗体による TF の発現は β₂GPI が存在しているときにのみ認められ、単球の細胞活性化は β₂GPI に依存する、すなわち細胞と β₂GPI 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る。β₂GPI はいわばアンカーとして存在しており、受容体分子や共役分子の存在が想定され、今後その分子の同定が必要である。

E.結論

TF を中心にした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、抗リン脂質抗体症候群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。p38 MAPK 経路の制御による TF 発現の制御は、抗リン脂質抗体症候群の血栓向性にたいする特異的な治療の一つとなる可能性がある。

F.健康危険情報

現在のところ、APS における in vivo での p38 阻害薬の使用は行っていない。p38 MAPK 経路は TF 発現のみならず種々の生体反応における重

要な経路であり、種々の副作用の発現の可能性も予想される。抗リン脂質抗体-p38 MAPK 経路の詳細な解明をさらに行い、よりAPSに特異的な部分をターゲットとすることにより、将来的により安全な治療法が見いだされる可能性が考えられ得る。

G.研究発表

1. 論文発表

- Li,N., Nakamura,K.,Jiang, Y.,Tsurui,H., Matsuoka,S.,Abe,M.,Ohtsuji,M.,Nishimura, H.,Kato,K.,Kawai,T.,Atsumi,T., Koike,T.,Shirai,T.,Ueno,H., Hirose,S. Gain-of-function polymorphism in mouse and human Ltk:implications for the pathogenesis of lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 13:2 171-179.2004
- Endo,T.,Nakao,S., Koizumi,K.,Nishio,M., Fujimoto,K., Sakai,T., Kuwano,K., Obara,M., Koike,T. Successful treatment with rituximab for autoimmune hemolytic anemia concomitant with proliferation of Epstein-Barr virus and monoclonalgammopathy in a post –non myeloblastic stem cell transplant patient. *Ann Hematol.*83.114-116.2004
- Yasuda,S., Atsumi,T., Ieko,M., Matsuura,E., Kobayashi,K., Inagaki,J., Kato,H., Tanaka,H., Yamakado,M., Akino,M., Saitou,H., Amasaki, Y.,Jodo,S, Amengual,O., Koike,T.: Nicked β_2 -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood.* 103:10. 3766-3772.2004
- Yamamoto,S., Tsuji,T., Matsuzaki,J., Zhange,Y., Chamoto,K., Kosaka,A., Togashi,Y., Sekikawa,K., Sawada,K., Takeshima,T. Koike,T., Nishimura,T.: Unexpected role of TNF- α in graft versus host reaction (GVHR): donor-derived TNF- α suppresses GVHR via inhibition of IFN- γ -dependent donor type-1 immunity. *Int Immunol.* 16: 811-817. 2004
- Endo,T., Mogi,Y., Koizumi,K., Nishio,M., Fujimoto,K., Sakai,T., Kumano,K., Obara,M., Ikeda,H., Koike,T.: Peripheral blood stem cell mobilization following plus rituximab therapy combined with G-CSF in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transpl.* 33.703-707. 2004
- Yasuda,S.,Ogura,N.,Horita,T.,Yasuda,I.,Hioka,T.,Kondo,N.,Fujisaku,A. Abacterial prostatitis and primary biliary cirrhosis with Sjogren's syndrome. *Mod Rheumatol* 14:70-72.2004
- Das,H.,Atsumi,T.,Fukushima,Y.,Shibuya,H.,Ito,K.,Yamada,Y., Amasaki,Y.,Ichikawa,K.,Amengual,O.,Koike,T.: Diagnostic value of antiagalactosyl IgG antibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 23:218-222.2004
- Ieko,M.,Tarumi,T.,Takeda,M.,Nito,S.,Nakabayashi,T.,Koike,T.: Synthetic selective inhibitors of coagulation factor Xa strongly inhibit thrombin generation without affecting initial thrombin forming time necessary for platelet activation in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2: 612-622.2004
- Amengual,O.,Atsumi.T.,Koike,T.: Antiprothrombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol* 112: 144-149.2004
- Yang,L.,Hakoda.M.,Iwabuchi.K.,Takeda.T.,Koike.T.,Kamatani.N.,Takada.K.: Rheumatoid Factors Induce Signaling from B cells, leading to Epstein-barr virus and B-cell activation. *J Viol* 78:18. 9918- 9923.2004
- Kataoka,H.,Koike,T. :Lupus mortality in Japan. *Autoimmun Rev* 3: 421- 422.2004
- Xiao,S.,Deshmukh,S.U.,Jodo,S.,Koike,T.,Sharma,R.,Furusaki,A.,Sung,J.S.,Ju,Shyr-Tu.: Novel negative regulator of expression in Fas Ligand(CD178)Cytoplasmic tail:Evidence for Translational Regulation and against Fas Ligand Retention in secretory lysosomes. *J Immunol* 173: 5095- 5102.2004
- Yasuda,S.,Atsumi,T.,Ieko,M.,Koike,T: β_2 -glycoprotein I,anti- β_2 -glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res* 114: 461- 465.2004
- Atsumi,T.,Amengual,O.,Yasuda,S.,Koike,T.: Antiprothrombin antibodies-are they worth assaying? *Thromb Res* 114: 533-538.2004
- Hashimoto,S.,Ogawa,Y.,Ishida,T.,Mochizuki,T.,Koike,T.,Sato,H.,Ueda,T.: Steroid-sensitive nephrotic syndrome associated with positive C1q immunofluorescence. *Clin Exp Nephrol* 8: 266- 269.2004
- Bohgaki,M.,Atsumi,T.,Yamashita,Y.,Yasuda,S.,Sakai,Y.,Furusaki,A.,Bohgaki,T.,Amengual I,O.,Amasaki,Y.,Koike,T.: The p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK)pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal

- anti-β2Glycoprotein I antibodies. *Int Immunol* 16:11. 1633- 1641.2004
17. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E, Kaihara K, Yamamoto D, Ichikawa K, Koike T. Significance of valine/leucine²⁴⁷ polymorphism of β2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti-β2-glycoprotein I autoantibodies to the valine²⁴⁷ β2-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum* 52:1.212-218.2005
 18. Sugiura-ogasawara.M.,Atsumi,T,Ozaki,Y,Koike,T.,Suzumori,K.:Phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies are not useful markers for high-risk woman with recurrent miscarriages.*Fertil Steril* 82:51440-1442.2004

2. 学会発表

1. Koike,T. : " Antiphospholipid Syndrome " 7rd International Congress SLE and Related conditions , New York,U.S.A.,May 9-13, 2004
2. Koike,T. : " Antiphospholipid Syndrome,mechanism of thrombus and complication of reproductive system " 11rd European Congress on Reproductive Immunology, Pilzen,Czech ,June 30-July 3, 2004
3. Koike,T. : " Antiphospholipid Syndrome " 11rd Asia Pacific League Associations for Rheumatology Congress, Jeju,

- Korea ,September 11- September 15, 2004
4. Atsumi,T., Koike,T. : " Antiprothrombin-is it worth assaying? " 11rd International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Sydney, Australia,12-19,November ,2004
 5. Koike,T. : " Pathogenesis of antiprothrombin antibody " 4rd International Congress on Autoimmunity, Budapest, Hungary,3-7,November ,2004
 6. 「β2 グリコプロテイン I 依存性抗カルジオリピン抗体による細胞刺激シグナルの検討」 坊垣幸, 山下由美, 渥美達也, 保田晋助, 酒井良江. 古崎章, 坊垣暁之, 天崎吉晴, 小池隆夫. 第 34 回日本免疫学会

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

(謝辞)

本研究は、北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座・第二内科、渥美達也講師、保田晋助助手および坊垣 幸大学院生の御協力で行われたことに深謝する。