

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591101
研究課題名（和文）抗リン脂質抗体症候群における B 細胞をターゲットとした新規治療法の開発
研究課題名（英文）Development of novel therapy which targets B lymphocytes against antiphospholipid syndrome
研究代表者
山崎 雅英 140414><~@4F4; <78
金沢大学・医学系・講師
研究者番号：50242558

研究成果の概要：

抗リン脂質抗体症候群(APS)は抗リン脂質抗体の存在により、反復性血栓症・不育症を来す自己免疫疾患であるがその根治療法は確立していない。本研究において、実験的 APS モデルマウスを用い、B 細胞を傷害することにより抗リン脂質抗体の発現抑制・臨床症状の発症を抑制可能であることが確認された。以上の検討結果より、B 細胞発現抑制療法により、APS の病態制御が可能である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床学・血液内科学

キーワード：抗リン脂質抗体症候群，B 細胞，APS モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群(APS)は抗カルジオリピン抗体(aCL)またはループスアンチコアグラント(LA)などの抗リン脂質抗体(aPL)の存在により血栓症・不育症を来す自己免疫疾患の1つであるが、抗体産生や血栓形成機序についてはいまだに不明の点が多い。また本疾患ではSLEなど他の膠原病と異なり、プレドニゾロンなどの免疫

抑制療法の有効性は証明されておらず、現段階では血栓再発予防としての強力な抗血栓療法が唯一確立された治療法である(N Engl J Med. 349:1177-9, 2003)。この点が、APSの発現機序を解明し、治療法を開発する上で他の自己免疫疾患とは異なる重要な点である。しかし、ワーファリンを含む強力な抗血栓薬を永続的に投与することは、その催奇形性や出血の危険性が

あるため、抗リン脂質抗体産生を抑制するような新規根治療法の確立が求められている。

①-1:抗体産生細胞であるB細胞を傷害することにより、APSの根治療法が確立できないか？

研究代表者はこれまで、全身の諸臓器に微小血栓を来たし致死的な転帰をとる劇症型抗リン脂質抗体症候群(CAPS)症例6例に対し、血漿吸着療法によりaPLを選択的に吸着除去した後、メチルプレドニゾンパルス療法などの強力な免疫抑制療法と抗血栓療法を併用することで、全例で抗体価を低下させ、救命し得たことを報告した(Jpn J Dermatol 112:1611-6, 2002)。また、著明な血小板減少による出血症状と血栓症の両者を有する難治性APS症例に対し、CD20陽性細胞を選択的に傷害するキメラ型抗CD20モノクローナル抗体rituximabを投与することにより、7例中全例で血小板減少の改善を認めた。また5例では抗リン脂質抗体価が低下・消失し、3年経過した現在も抗体価の再上昇が無く、重篤な副作用も見られなかった(表1)。これはrituximabがAPSに奏効したという世界で初めての報告であり、Arthritis Rheumatismに掲載予定されている。しかし、2例では抗リン脂質抗体価の低下は認められず、症例によりその効果が異なる可能性もあり、更なる検討が必要であると考えられた。

以上の結果から、少なくともAPSの一部の症例では何らかの免疫抑制療法により寛解状態に導入できる可能性があると考えられるが、どのような特徴を有する症例で免疫抑制療法が有効か、またどのような治療法が奏効するのかなど、検討課題は多い。

APSは抗体依存性自己免疫疾患であると考えられることから、自験例も踏まえて、抗体産生細胞であるB細胞を選択的に傷害して抗リン脂質抗体の産生を抑制することにより、免疫不全などの副作用も少ない根治的治療法が確立できる可能性があるが、そのためには基礎的な検討が必要であ

った。

2. 研究の目的

抗リン脂質抗体症候群(APS)は抗リン脂質抗体の存在により血栓症・不育症を来たす自己免疫疾患であるが、根治療法は確立しておらず、永続的な抗血栓療法が必要である。しかし、ワーファリンを含む強力な抗血栓薬を永続的に投与することは、その催奇形性や出血の危険性があるため、抗リン脂質抗体産生を抑制するような新規根治療法の確立が求められている。APSは抗体依存性自己免疫疾患であると考えられることから、抗体産生細胞であるB細胞を選択的に傷害して抗リン脂質抗体の産生を抑制することにより、免疫不全などの副作用も少ない根治的治療法が確立できる可能性がある。

そこで、研究代表者が確立した、実験的APSモデルマウスに対し、マウス抗ヒトCD20モノクローナル抗体(rituximab)を投与し、B細胞をターゲットとしたAPSに対する新規治療法の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(I)APSモデルマウスに対するマウス抗ヒトCD20抗体rituximab投与前後の凝血学的・免疫学的パラメータの経時的変化の観察

① APSモデルマウスの作成：

Wild typeの6週齢C57BL/6マウスに Freund adjuvantを加えた β_2 -GPI 20 μ gを後足底部に皮下注射する。4週間後、同量の β_2 -GPIをboosterとして皮下投与することによりマウスAPSモデルを作成する。卵アルブミン 20 μ gを同様に投与したマウスを対照とした。

② APSモデルマウスに対するMB20-11投与とAPS関連パラメータ、B220陽性B細胞の経時的測定：

上記APSモデルマウスに対し、抗CD20抗体であるrituximab 150 μ gをマウス尾静脈より静脈投与する。生理的食塩水静脈投与群を対照群とする。

MB20-11 または saline 投与 1, 2, 4, 8, 12, 16週後(各々 β_2 GPI感作9, 10, 12, 16, 20, 24週後)にマウス大

腿静脈より採血し、抗リン脂質抗体症候群関連検査項目として血小板数（動物用血球測定器にて測定）、APTT（coagulometer KC-4Aを用い、一段法にて測定）、aCL（MBL社「MESACUPカルジオリピンテスト」）、aCL/ β_2 GPI（ヤマサ社「抗CL・ β_2 GPIキット」）を測定する。同時にフローサイトメトリーにてB220陽性細胞数を測定し、流血中のB細胞数の変化（除去）を確認する。

③LPS投与による凝血学的パラメータの変動と、フィブリン血栓の程度の評価：（LPSモデル実験に習熟している研究協力者（御館靖雄 学士）が実施）

上記②の検討の結果、MB20-11投与によりAPS関連検査成績の有意の改善が確認された時点で、10mg/kgのlipopolysaccharide (LPS)を腹腔内投与する。4時間後にエーテル麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血し、脱血死させる。得られた血液を用いて血小板数、thrombin-antithrombin III complex (TAT)、D-dimerなどの凝血学的検査、およびALT、Crなどの臓器障害マーカーの測定を行うとともに、肝・腎臓を摘出、ホルマリン固定してPTAH染色を施し、鏡顕下で肝類洞、および腎糸球体におけるフィブリン血栓率を測定する。以上の実験により、抗リン脂質抗体症候群モデルマウスにおけるB細胞除去療法の血栓形成抑制効果を凝血学的マーカー、臓器障害マーカー、ならびに病理学的所見から決定する。

④マウス抗マウスCD20抗体を用いたB細胞除去療法の持続期間の確認：

実験的APSモデルマウスにMB20-11投与16週（ β_2 GPI能動感作24週）後より4週間隔で定期的にマウス(n=3)より採血し、B220発現B細胞数をフローサイトメトリーで確認するとともに、血小板数、APTT、aCL、aCL/ β_2 GPIを測定し、B細胞除去療法による抗リン脂質抗体産生抑制効果が持続する期間を検討した。

4. 研究成果

APSモデルマウスは β_2 -GPI初回投与4週後より血小板減少、APTTの延長傾向を示

し、8~12週後にその変化は最大となり、また抗カルジオリピン抗体(aCL)も有意に上昇した。 β_2 -GPI初回投与と同時にMB20-11を投与すると8週後の血小板減少、APTT延長、aCL上昇は有意に抑制された。血中B220陽性B細胞はrituximab投与翌日に測定感度以下となり、このB細胞の消失は8週間持続した。

B細胞はMB20-11投与20週後から出現し、投与30週後には投与前値に復した。一方、血小板数、APTTは投与40週まで正常値を維持し、aCL、aCL/ β_2 GPIは投与20週より上昇傾向を示したものの40週後まで、投与前値より有意に低値を示した。以上の結果より本モデルにおいてはB細胞除去療法がAPSの痕治療法となりうる可能性が示唆された。

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22件）

1. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y. Differences in anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies and cutaneous vasculitis between regular livedo reticularis and livedo racemosa. Rheumatology (Oxford) 2009. Mar 9. (Epub ahead of print), 査読有.
2. 田畑伸子, 早坂薫, 石橋昌也, 山崎雅英. ホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン(aPS/PT)抗体が養成であった Livedoid Vasculopathy の1例. 皮膚科の臨床. 51(2): 139-141, 2009. 査読有.
3. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y. High titer of serum antiphospholipid antibody levels in adult Henoch-Schonlein purpura and cutaneous leukocytoclastic angitis. Arthritis Rheumatism. 59(4): 561-567, 2008. 査読有.
4. 井出葉子, 高田実, 武藤美香, 村田浩, 宇原久, 斎田俊明, 山崎雅英. 網状皮斑および皮膚潰瘍患者におけるループス抗

- 凝固因子. 日本皮膚科学会雑誌. 118(8): 1519-1526, 2008. !
5. Morishita E, Sekiya A, Hayashi T, Kadohira Y, Maekawa M, Yamazaki M, Asakura H, Nakao S, Ohtake S. Increased macrophage colony-stimulating factor levels in patients with Graves' disease. *Int J Hematol.* 88(3): 272-277, 2008. !
 6. Omote M, Asakura H, Takamichi S, Shibayama M, Yoshida T, Kadohira Y, Maekawa M, Yamazaki M, Morishita E, Nakao S, Wada T. Changes in molecular markers of hemostatic and fibrinolytic activation under various sampling conditions using vacuum tube samples from healthy volunteers. *Thromb Res* 123(2): 390-395, 2008. !
 7. Hayashi T, Morishita E, Ohtake H, Oda Y, Ohta K, Arahata M, Kadohira Y, Maekawa M, Ontachi Y, Yamazaki M, Asakura H, Takami A, Nakao S. Expression of annexin II in human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms. *Thromb Res* 123(2): 274-280, 2008. !
 8. Nakaya I, Toyama T, Uchiyama A, Miwa A, Kawabata M, Yamazaki M, Iida H. Pulmonary hemorrhage, due to rupture of small muscular arteries, in an autopsy case of systemic lupus erythematosus with antiphospholipid antibodies. *Mod Rheumatol* 18: 529-531, 2008. !
 9. Kawakami T, Yamazaki M, Kawasaki K, Mizoguchi M, Soma Y. Therapeutic effect of argatroban on rheumatoid vasculitis with antiphosphatidylserine-prothrombin complex antibody. *Arch Dermatol* 144(8): 1075-1076, 2008. !
 10. 山崎雅英. 抗リン脂質抗体症候群の診断と治療. *Monthly Book Derma* 136: 47-54, 2008. 査読無.
 11. 山崎雅英, 朝倉英策, 尾崎由基男. 臨床検査: 現状と展望 5. 血液疾患 2) 凝固・線溶系. 日本内科学会雑誌 97(12): 2974-2982, 2008. 査読無.
 12. 山崎雅英, 安納美知子. 免疫抑制療法患者の感染対策. *Circles for the future of quality care* 10(3): 12-18, 2008. 査読無.
 13. Kawakami T, Ohka S, Mizoguchi M, Soma Y, Yamazaki M. Remission of hepatitis B virus-related cryoglobulinemic vasculitis with entecavir. *Ann Intern Med* 149(12): 911-912, 2008. !
 14. 山崎雅英. Ximelagatran and melagatran compared with dalteparin for prevention of venous thromboembolism after total hip or knee replacement: the METHRO II randomized trial. 血栓と循環「データブック 血栓症の大規模臨床試験 PART2」. 15: 523-525, 2007. 査読無.
 15. 山崎雅英. 2. 血栓・塞栓症診断の血液検査 5) 血栓性素因の検査 (2) APS の検査. 血栓・塞栓症の病態・検査・治療. *Medical Technology.* 35: 1371-1379, 2007. 査読無.
 16. 山崎雅英. 5. おもな血栓・塞栓症の病態と検査 3) 抗リン脂質抗体症候群. *Medical Technology.* 35: 1462-1470, 2007. 査読無.
 17. 山崎雅英. 抗リン脂質抗体症候群の検査と診断. *Medical Technology.* 35: 149-160, 2007. 査読無.
 18. 高道小百合, 表美香, 朝倉英策, 御館靖雄, 林朋恵, 山崎雅英, 森下英理子, 吉田知孝, 藤田信一, 中尾眞二. プロトロンビン時間正常かつトロンボテスト低値の症例のループスアンチコアグラント. *日本検査血液学会雑誌.* 8: 28-35, 2007. !
 19. 杉盛千春, 田中政彰, 竹越國夫, 山内高弘, 山崎雅英. 汎血球減少症の鑑別診断. *日本内科学会雑誌.* 96: 1235-1242, 2007. !
 20. 袖本衣代, 伊川友香, 村田朋子, 富田郁代, 金原拓郎, 山崎雅英, 八田尚人. ループス抗凝固因子陽性患者に生じた難治性下腿潰瘍の1例. *皮膚科の臨床.* 49:

- 1039-1041, 2007. 査読有.
21. Echigo T, Hasegawa M, Inaoki M, Yamazaki M, Sato S, Takehara K. Antiphospholipid antibodies in patients with autoimmune blistering disease. *J Am Acad Dermatol.* 57: 397-400, 2007. 査読有.
 22. Kawakami T, Yamazaki M, Mizoguchi M, Soma Y. High titer of anti-phosphatidylserine-prothrombin complex antibodies in patients with cutaneous polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheumatism.* 57: 1507-1513, 2007. 査読有.

[学会発表] (計 18 件) (筆頭演者のみ記載)

I. 特別講演・シンポジウム

1. 山崎雅英. 抗リン脂質抗体症候群の最近の話題. 第1回神経脈管エコー検査セミナー. 2008.12.13. 仙台・広南病院
2. 山崎雅英, 門平靖子, 前川実生, 林朋恵, 御館靖雄, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. 抗血小板療法モニタリングとしての血小板由来マイクロパーティクル (PDMP) の有用性. 第31回日本血栓止血学会学術集会 SPC シンポジウム. 2008.11.20-11.22. 大阪・大阪国際交流センター

II. 国際学会

1. Yamazaki M, Y.Kadohira, M.Maekawa, E.Morishita, H.Asakura, S.Nakao. IgM-aPS/PT Induces to Recurrent Abortions by Microcirculatory Disturbance. 5th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis. 2008.9.18 - 9.20. Singapore・Grand Copthorne Waterfront Hotel
2. Yamazaki M, Y.Kadohira, M.Maekawa, E.Morishita, H.Asakura, S.Nakao. Plasma Level of Platelet-Derived Microparticles (PDMP) may be a Useful Indicator of Antiplatelet Therapy. The Third United Kingdom - Japan Platelet

- Conference. 2008.9.17 - 9.18. Singapore・Grand Copthorne Waterfront Hotel
3. Yamazaki M, Kadohira Y, Maekawa M, Arahata M, Ontachi Y, Morishita E, Asakura H, Nakao S. PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF VASCULOPATHY IN SYSTEMIC SCLERODERMA (SSC): PLATELET ACTIVATION INDUCED BY APL IS ASSOCIATED WITH ARTERIAL THROMBOSES AND DIGITAL PITTING SCAR IN SSC PATIENTS. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007.7.6-7.12, Geneva, Switzerland.
 4. Yamazaki M, Kadohira Y, Maekawa M, Arahata M, Ontachi Y, Morishita E, Asakura H, Nakao S. CLINICAL SIGNIFICANCE OF PLATELET-DERIVED MICROPARTICLE (PDMP) IN APS: PLASMA LEVELS OF PDMP WERE SIGNIFICANTLY ELEVATED IN APS PATIENTS WITH ARTERIAL THROMBOSES. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 2007.7.6-7.12, Geneva, Switzerland.
 5. Yamazaki M Kadohira Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Nakao S. Pathophysiological mechanisms of vasculopathy in systemic scleroderma (SSc): Platelet activation induced by antiphospholipid antibody (aPL) is associated with arterial thromboses and digital pitting scar in SSc patients. Professor E. Carwile LeRoy Memorial International Workshop on Scleroderma. 2007.5.18-5.20, 東京
 6. Yamazaki M, Kadohira Y, Ontachi Y, Asakura H, Nakao S. PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF VASCULOPATHY IN SYSTEMIC SCLERODERMA (SSc): PLATELET ACTIVATION INDUCED BY aPL IS ASSOCIATED WITH ARTERIAL THROMBOSES AND DIGITAL PITTING SCAR IN SSc PATIENTS. 12th International Congress on Antiphospholipid Antibodies.

2007. 4. 18-4. 20. Florence, Italy
7. Yamazaki M, Kadohira Y, Maekawa M, Ontachi Y, Asakura H, Nakao S. PHOSPHATIDYLSERINE-DEPENDENT ANTI-PROTHROMBIN ANTIBODY-IgM IS ASSOCIATED WITH LIVEDO RETICULOPATHY. 12th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. 2007. 4. 18-4. 20. Florence, Italy

Ⅲ. 一般演題

1. 山崎雅英, 長谷川稔, 藤本学, 竹原和彦. 新規抗リン脂質抗体「フォスファアチジルセリン依存性 IgM 型抗プロトロンビン抗体」の臨床的意義. 厚生労働省「強皮症における病因解明と根治的治療法の開発」研究班 2008 年度班会議・第 12 回強皮症研究会議合同会議. 2009. 1. 17, 東京・エーザイ東京コミュニケーションオフィス会議室
2. 山崎雅英, 中村万理, 中村國雄. ステロイド投与により輸血非依存性 MDS に改善した急性骨髄性白血病の 1 例. 第 19 回日本老年医学会 北陸地方会. 2008. 11. 15, 富山・富山大学杉谷キャンパス
3. 山崎雅英, 門平靖子, 前川実生, 林朋恵, 御館靖雄, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. IgM 型抗プロトロンビン抗体は微小循環障害を惹起し, 妊娠初期習慣性流産の原因となる. 第 60 回日本血液学会総会. 2008. 10. 10-2008. 10. 12. 京都・京都国際会議場
4. 山崎雅英. 後天性血友病の診断. 第 1 回石川県ヘモフィリア懇話会. 2008. 9. 27, 金沢・金沢都ホテル
5. 山崎雅英, 門平靖子, 前川実生, 林朋恵, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. 血栓, 出血症状をともに認めた APTT 延長, 血小板減少例. 第 9 回日本検査血液学会学術集会. 2008. 7. 26-7. 27. 三重・三重県総合文化センター
6. 山崎雅英, 門平靖子, 前川実生, 荒幡昌久, 御館靖雄, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. 抗リン脂質抗体症候群に対する抗血栓療法の相違による血小板由来マ

イクロパーティクルと臨床症状の関連.
第 30 回日本血栓止血学会,
2007. 11. 15-17, 伊勢志摩

7. 山崎雅英, 門平靖子, 前川実生, 御館靖雄, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二. 抗リン脂質抗体症候群に対する抗血栓療法の相違による血小板由来マイクロパーティクルと臨床症状の関連. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会, 2007. 10. 11-10. 13, 横浜
8. 山崎雅英, 門平靖子, 御館靖雄, 渥美達也, 家子正裕, 朝倉英策. ループスアンチコアグラント (LA) 確認試験標準化の試み. 日本検査血液学会第 8 回学術集会. 2007. 7. 21-7. 22, 福井
9. 山崎雅英, 島樋 茂, 山崎 宏人, 高見昭良, 奥村 廣和, 西川 晋吾, 中尾 眞二. 初発時に播種性血管内凝固 (DIC) を合併しなかった 急性前骨髄性白血病 (APL). 第 202 回日本内科学会北陸地方会. 2007. 6. 10, 福井

〔図書〕 (計 3 件)

1. 山崎雅英. 止血薬, 抗線溶薬. 救急・集中治療「やさしく学べる血小板・血栓止血の管理」丸藤 哲 (編), 総合医学社, 東京, 2008; 791-797.
2. 山崎雅英, 中尾眞二. 第 2 部 各疾患別ステロイド薬の使い方 2. 血液疾患. ステロイド薬の選び方・使い方ハンドブック. 山本一彦 (編). 羊土社, 東京, Pp 83-111, 2007.
3. 山崎雅英, 舟田久. 免疫グロブリン製剤と G-CSF 製剤. 新感染症症候群 (上). 山口恵三 (編). 日本臨床社, 大阪. Pp321-325, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 雅英 (YAMAZAKI MASAHIDE)
金沢大学・医学系・講師
研究番号: 50242558

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし