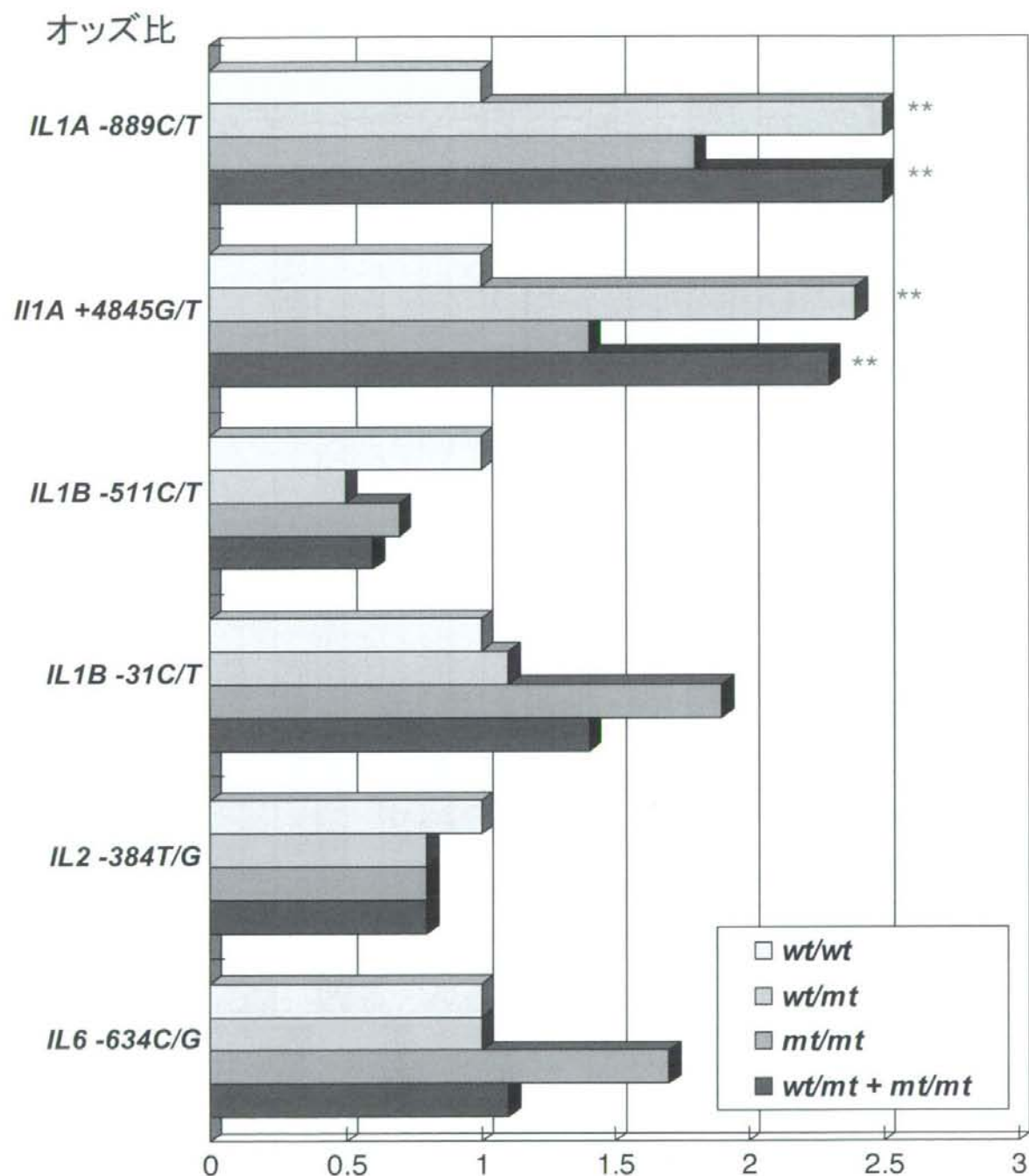
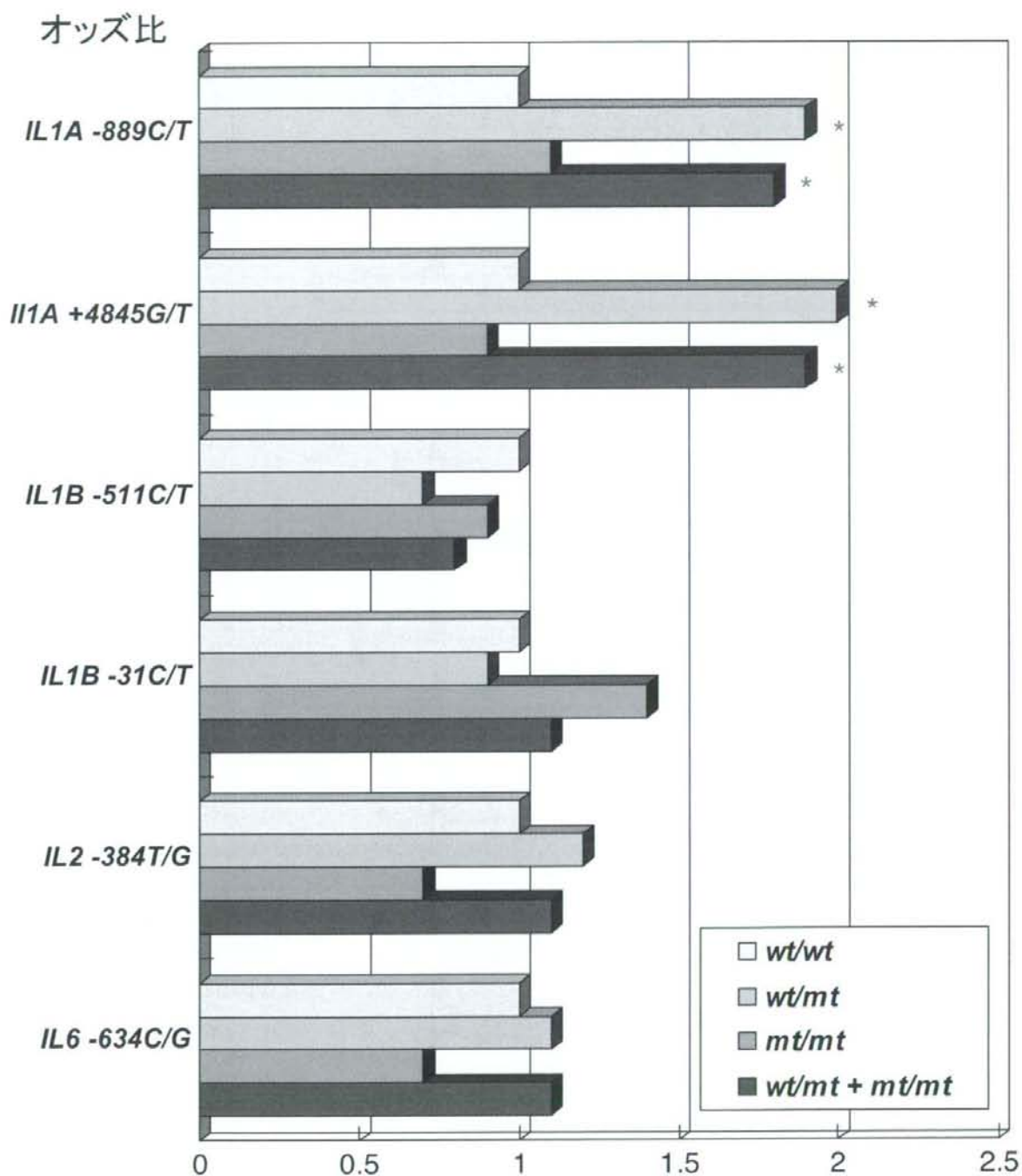


図2 炎症性サイトカイン遺伝子多型と早産



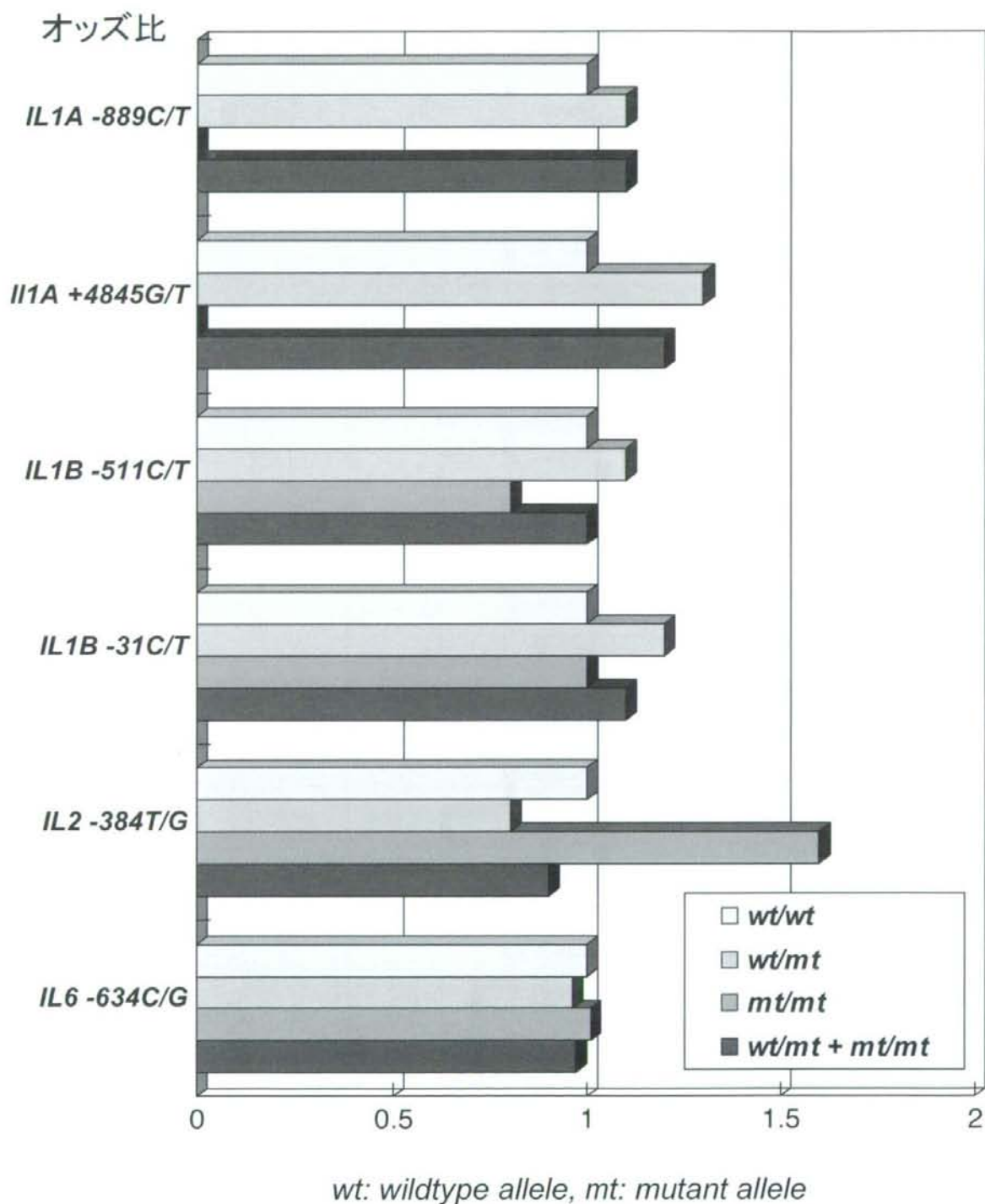
** $P < 0.01$ wt: wildtype allele, mt: mutant allele

図3 炎症性サイトカイン遺伝子多型と低出生体重



* $P < 0.05$ wt: wildtype allele, mt: mutant allele

図4 炎症性サイトカイン遺伝子多型と不育症



分担研究報告書 17

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担課題：不妊症と着床不全に関する研究

研究分担者 木村 正 大阪大学器官制御外科学教授
筒井 建紀 大阪大学器官制御外科学講師

研究要旨

不妊症の原因の一つに黄体機能不全が挙げられる。黄体機能不全は、子宮内膜の脱落膜化不全を引き起こす。我々は、不妊症と黄体機能不全による着床不全という観点から、子宮内膜のSTAT3発現とプロゲステロンとの関連について検討した。

A. 研究目的

マウス着床期に子宮内膜に発現を認めるSTAT3とプロゲステロンのシグナル伝達経路を解明することを目的とする。

B. 研究方法

マウス子宮内膜にHVJ-Eベクターを用いた一過性遺伝子導入法により、STAT3デコイを子宮内膜に発現させ、プロゲステロン発現及び着床との関わりを検討する。

(倫理面への配慮)

ヒトでの検討の前に、マウスでの検討を行なうため、倫理面での配慮は特に不要である。

C. 研究結果

マウス交配後1.5日目にHVJ-Eベクターを用いたSTAT3デコイの導入により、着床期(交配後5日目)のSTAT3活性は約50%抑制された。またSTAT3デコイ導入群では約75%以上のマウスで妊娠を認めなかった。しかし、STAT3導入マウスはコントロールと比較し、血中プロゲステロンレベルに差はなく、また子宮内膜におけるプロゲステロン受容体の発現にも差を認めなかった。

D. 考察

STAT3が、マウス着床期の子宮内膜に発現し、着床に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、STAT3の発現は、プロゲステロンやその受容体の発現とは関連していない。今後はプロゲステロンとSTAT3との関連について研究をすすめ、不妊症の原因としての黄体機能不全とSTAT3との

の関連について検討を続ける予定である。

E. 結論

マウス子宮内膜のSTAT3は、胚の着床現象に重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tskitishvili E., Komoto Y., Kinugasa Y., Kanagawa T., Song M., Mimura K., Tomimatsu T., Kimura T., Shimoya K. The human tumor-associated antigen RCAS1 in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *J. Reprod. Immunol.* 77: 100-108, 2008.
- 2) Khan M. A. H., Ogita K., Ferro, V. A., Kumasawa K., Tsutsui T., Kimura T.: Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-1) and T-helper epitopes in saline, suppresses rodent fertility. *Vaccine.* 26:1365-1374, 2008.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tskitishvili E., Komoto Y., Kinugasa Y., Kanagawa T., Song M., Mimura K., Tomimatsu T., <u>Kimura T.</u> , Shimoya K.	The human tumor-associated antigen RCAS1 in pregnancies complicated by pre-eclampsia.	J. Reprod. Immunol.	77	100-108	2008
Khan M. A. H., Ogita K., Ferro V. A., Kumasawa K., <u>Tsutsui T.</u> , <u>Kimura T.</u>	Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-1) and T-helper epitopes in saline suppresses rodent fertility.	Vaccine	26	1365-1374	2008

分担研究報告書 18

分担課題：生殖補助医療における化学的流産の背景に関する研究

研究分担者 藤井 俊策 弘前大学大学院医学研究科准教授

研究要旨

化学的流産は臨床的妊娠から除外されているが、その背景には原因不明不妊と流産の既往があり、抗リン脂質抗体の陽性者が多かった。不妊治療における生児獲得率向上には、化学妊娠を臨床的妊娠として取り扱い調査する必要がある。

A. 研究目的

生殖補助医療（ART）周期は妊娠成立までのタイムテーブルが厳密に規定されており、流産例の臨床経過を把握しやすい。化学的流産は、血中または尿中でHCGが検出されたにもかかわらず臨床的妊娠徴候が確認されずに月経をみた場合で、臨床的妊娠から除外されている。

B. 研究方法

黄体補助にHCGを使用しないART周期において成立した化学妊娠の背景を分析した。（倫理面への配慮）

本研究は弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

化学妊娠は10例の10周期、移植あたり1.6%（10/608）で認められた。そのうち、不育症スクリーニング検査の陽性者は5例（50%）で、いずれも自己抗体または抗リン脂質抗体のいずれかが陽性であった。一方、稽留流産またはIUPDは26例の29周期で発生し、原因検索が行われた周期の66.7%（12/18）が染色体異数性または明らかなCAMが原因であった。このうち不育症スクリーニング検査の陽性者は4例（22.2%）のみで、うち2例は子宮奇形であった。

D. 考察

化学的流産となった患者の背景には原因不明不妊と流産の既往があり、抗リン脂質抗体陽性者が多かった。

E. 結論

不妊症と不育症とはオーバーラップしており、ARTにおける生児獲得率を向上する

ためには、化学妊娠を流産と同様に臨床的妊娠として取り扱う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yuzawa E., Fujii S., et al. : Retinoic acid-inducible gene-1 is induced by interferon-gamma and regulates CXCL11 expression in HeLa cells. *Life. Sci.* 82:670-675, 2008.

2) Fujii S. : Biomarkers for embryo quality. *J. Mamm. Ova. Res.* 25:1, 2008.

3) Wu R., Fujii S., et al. : Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 22:527-535, 2007.

4) Fukuhara R., Fujii S., et al. : Erythrocytes counteract the negative effects of female ageing on mouse preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Hum. Reprod.* 23:2080-2085, 2008.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yuzawa E., <u>Fujii S.</u> , et al	Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interferon-gamma and regulates CXCL11 expression in HeLa cells.	Life. Sci.	82	670-675	2008
<u>Fujii S.</u>	Biomarkers for embryo quality.	J. Mamm. Ova. Res.	25	1	2008
Wu R., <u>Fujii S.</u> , et al	Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome.	Hum. Reprod.	22	527-535	2007
Fukuhara R., <u>Fujii S.</u> , et al	Erythrocytes counteract the negative effects of female ageing on mouse reimplantation embryo development and blastocyst formation.	Hum. Reprod.	23	2080-2085	2008

分担研究報告書 19

分担課題：抗リン脂質抗体による不育症発症メカニズムに関する研究

研究分担者 藤井 知行 東京大学大学院医学系研究科産婦人科学准教授

研究要旨

習慣流産のリスクファクターである抗リン脂質抗体(aPL)の中で、特に β_2 GPI依存性 aPL の、血液凝固異常以外の流産発症メカニズムについて、CD1d 抗原に注目して研究した。CD1d 抗原はヒト白血球抗原(HLA)類似の膜蛋白質であり、自己のリン脂質を含むリン脂質を提示し、初期の胎盤 extravillous trophoblast 表面に発現している。我々は、CD1d を恒常的に発現する trophoblast 株 Jeg3/CD1d を樹立し、CD1d、Phosphatidylserine (PS)、 β_2 GPI の細胞表面存在を観察し、さらに、抗 CD1d 抗体、抗 β_2 GPI 抗体により、CD1d 抗原の架橋反応を観察した。その結果、Jeg3/CD1d の細胞表面において、CD1d 発現に一致して PS、 β_2 GPI の存在が認められた。また、抗 CD1d 抗体だけでなく、抗 β_2 GPI 抗体でも架橋反応による interleukin (IL)-12 の発現が、認められた。以上より、抗 β_2 GPI 抗体は、PS- β_2 GPI 複合体と結合した trophoblast 表面の CD1d と間接的に結合し、その相互作用によって CD1d の架橋反応が起こり、CD1d⁺ trophoblast からの IL-12 誘導が起こると考えられた。妊娠初期に、extravillous trophoblast 上の CD1d と母体抗 β_2 GPI 依存性 aPL が反応することにより過剰な炎症性反応が起こって、流産が発症しうると考えられた。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体(aPL)は不育症のリスクファクターである。aPL が関与する流産では血液凝固異常を介するメカニズムが提唱されており、胎盤血管内の血栓形成により胎盤機能が障害されて、流産が起るとされている。しかし、aPL は胎盤血管未形成の妊娠初期流産を反復する習慣流産にも関連性が報告されており、その流産発症メカニズムは必ずしも明らかになっていない。aPL の中でも、不育症を引き起こす力が特に強いと考えられている β_2 glycoprotein I (β_2 GPI) 依存性 aPL は、陰性荷電を持つリン脂質と結合した β_2 GPI と反応し、血栓形成を誘導することにより、中期流産を発症させるとされているが、最近、trophoblast への直接的な細胞傷害作用による初期習慣流産発症機転も報告された。

さて、妊娠成立時の胎盤形成において、受精卵から分化した胎児側細胞である trophoblast は、母体側組織である子宮脱落膜に侵入していく。胎児の組織適合抗原はその半分が父親由来であり、母体からみると、胎児は半同種移植片である。したがって、trophoblast も母体の免疫担当細胞に認識され、移植免疫反応により、本来、排除されるはずであるが、実際は、母体に排除されず、増殖していく。近年、免疫反応を、細胞性免疫反応発動性の T helper 1 (Th1) 反応と、液性免疫発動性の T helper 2 (Th2) 反応に分類し、そのバランスで生体の免疫全体が制御されるとする考えが提唱されている。細胞性免疫は、移植免疫において、移植片を排除する主たる反応であり、妊娠においては Th1 が抑制され、Th2 優位優位になることによって、胎児が母体から排除されず、妊娠が維持されると考え

られている。その中で、我々はこれまで、trophoblast が発現する HLA-G 抗原が、脱落膜リンパ球からのサイトカイン分泌を Th2 優位にシフトさせるなどして、免疫学的妊娠維持反応におけるセンタープレーヤーとして機能していることを報告してきた。しかし、一方で、Th1 反応が全く誘起されないと、妊娠が成立しないことも分かっていた。受精卵は、胞胚期に子宮内膜に着床し、その中に侵入していくが、この過程で、内膜組織を破壊し、浸潤する必要がある。Th1 反応やそれに関連した炎症反応が重要であると考えられている。したがって、妊娠局所における Th1 反応を含む炎症反応の詳細を検討することは、妊娠成立および維持における免疫反応の仕組みを明らかにし、その異常に基づく、不育症をはじめとする種々の妊娠合併症の発症機転の解明に重要である。

CD1d 抗原は、HLA 近傍領域でコードされる HLA 類似抗原であり、trophoblast に発現されている。この抗原は HLA class I 抗原とほぼ同様の構造を持ち、invariant natural killer T cell (iNKT) に認識され、それにより双方の細胞から分泌される Th1 サイトカインを介した局所炎症反応を誘導する働きを有している。実際、産婦人科領域においても、子宮頸管上皮細胞が CD1d 抗原を発現し、局所の iNKT などの免疫細胞との相互作用により、粘膜の感染防御反応に重要な関与をしていることがわかっている。一方、iNKT 細胞は子宮脱落膜にも存在することがわかっており、trophoblast が CD1d 抗原を発現していることと合わせて、妊娠免疫に CD1d 抗原が重要な働きをしていることが考えられる。また、CD1d 分子は、抗 CD1d 抗体により分子架橋反応をおこし、細胞内のリン酸化カスケードにより、IL12 などのサイトカイン分泌を誘導し、Th1 反応を導くことも知られている。さらに、HLA 抗原がペプチドを細胞表面に提示するのと異なり、CD1d 抗原はリン脂質を提示する作用を有していることから、不育症の原因である抗リン脂質抗体症候群の病態に重要な

関与をしている可能性がある。

そこで今年度の研究目的は、trophoblast 上の CD1d を介した β_2 GPI 依存性 aPL による流産メカニズムを解明することとし、特に、1. trophoblast 上の CD1d がリン脂質を抗原提示し、このリン脂質に β_2 GPI が結合していること、2. 抗 β_2 GPI 抗体により、CD1d の分子架橋反応が誘導されて、trophoblast から IL12 などのサイトカイン分泌が起こること、の 2 点を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. CD1d および CD1a/d 遺伝子を絨毛癌由来の細胞株 JEG にレトロウィルスベクターを用いて導入した。なお、CD1a/d キメラ分子は、細胞表面の抗原性は Cd1d と同様だが、細胞内の cytoplasmic tail がいないためにリン酸化カスケードが起らない。この分子を、今回の実験の control として用いた。
2. CD1d と陰性荷電リン脂質である phosphatidylserine (PS) が細胞表面に共存していることを蛍光免疫染色とフローサイトメトリー法で確認した。
3. CD1d と β_2 GPI が細胞表面に共存していることを蛍光免疫染色とフローサイトメトリー法で確認した。
4. CD1d 分子と β_2 GPI-PS 複合体分子の結合を IP-Western 法で確認した。
5. 機能解析として、抗 β_2 GPI 抗体により、CD1d 分子架橋反応が誘導されるか、IL12 産生を定量的 PCR 法と ELISA を用いて、検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床検体を対象としておらず、倫理上、特に問題になる点はない。

C. 研究結果

1. CD1d 導入 JEG 細胞表面に、CD1d と PS が dot 状に共存していることが、免疫染色により証明された。
2. CD1d 導入 JEG 細胞表面に、CD1d と β_2 GPI が共存していることが、免疫染色により証明された。
3. CD1d 導入 JEG 細胞表面には、PS と β_2 GPI がともに存在しているが、CD1d を発現しない JEG 細胞表面には PS、 β_2 GPI とも存在していないことが、フローサイトメトリーにより証明された。
4. CD1d 抗体で免疫沈降し、抗 β_2 GPI 抗体でプロットする IP-Western 法により、CD1d 導入 JEG 細胞で、CD1d 分子と β_2 GPI 分子の結合が証明された。
5. 培養上清への抗 β_2 GPI 抗体添加により、CD1d 導入 JEG 細胞では、IL12p40 mRNA の発現が有意に上昇していた。しかし、JEG 細胞および CD1a/d 導入 JEG 細胞では、IL12p40 mRNA の発現は変化しなかった。また、CD1d 導入 JEG 細胞の培養上清中の IL12p40 タンパク濃度も抗 β_2 GPI 抗体添加により上昇した。

D. 考察

今回の研究により、trophoblast 上の CD1d は PS を抗原提示し、その PS に β_2 GPI が結合していることが示された。さらに抗 β_2 GPI 抗体により、CD1d 抗原の分子架橋反応が起こり、IL-12 分泌が促進されることが示された。妊娠初期に extravillous trophoblast 上の CD1d と母体抗 β_2 GPI 依存性 aPL が反応することにより、CD1d の分子架橋反応が誘導され、分泌される IL-12 を介して、Th1 反応が促進されることが考えられる。この反応には、trophoblast 周囲に存在する母体の iNKT も関与すると考えられ、その結果、局所の過剰な炎症反応が誘起されて、流産が発症しうると考えられた。

E. 結論

trophoblast 上の CD1d を介した β_2 GPI 依存性 aPL による新たな流産メカニズムが存在する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
岩澤有希、川名 敬、藤井知行、永松 健、松本順子、三浦紫保、山下隆博、兵藤博信、上妻志郎、武谷雄二：絨毛細胞上に存在するリン脂質抗原提示分子「CD1d」を介した、 β_2 glycoprotein I 依存性抗リン脂質抗体による新規流産メカニズムに関する検討。第 23 回日本生殖免疫学会総会・学術集会。2008 年 12 月 6-7 日。富山。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書 20

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担課題：Granulysinと流産に関する研究

研究代表者 齋藤 滋 富山大学産科婦人科学教授
中島 彰俊 富山大学産科婦人科学助教

研究要旨

細胞傷害性T細胞またはNK細胞の産生する細胞傷害性蛋白（特にGranulysin）による流産誘導メカニズムを解明することにより、いままで不明であった不育症誘導因子をあきらかにする。

A. 研究目的

これまでに不育症の原因といわれるものは多数報告されているが、どれが最も重要かという点においては未だ不明な点ばかりである。そこで、これまで不明であった流産の実行因子を同定し、それら実行因子の活性化を調整する原因を同定することが、不育症の解明につながると考え、研究を開始した。

これまで脱落膜リンパ球は、胎児細胞への免疫寛容等の機構により胎盤を形成し、妊娠維持に正の役割を果たすと考えられてきた。それら細胞の活性化が、胎児由来細胞である絨毛外栄養膜細胞の排除（つまり流産誘導）に関与しないかを検討した。

B. 研究方法

脱落膜リンパ球は6-11週前後において実施された人工流産手術を実施された患者10名および流産手術を実施した20名から、説明と同意（インフォームド・コンセント）を得た上で検体を採取した。

（倫理面への配慮）

研究結果は、結果のみを公表し、対象者の個人情報の漏洩が起らないように配慮した。

C. 研究結果

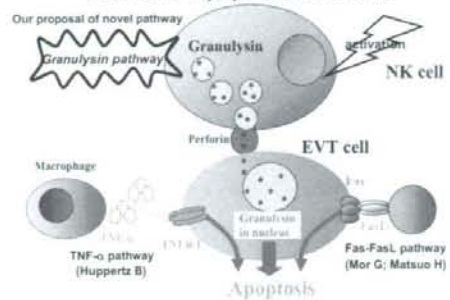
1. 脱落膜における細胞傷害性顆粒蛋白の発現の検討：Granulysin/Granzyme B/Perforinの発現を流産検体および正常妊娠検体にて検討すると、基底脱落膜におけるGranulysin (Gr) 陽性細胞数は、流産例で正常妊娠に比し有意に増加していた。一方で、他の傷害性顆粒タンパクであるPerforin/Granzyme Bの発現には有意差を認めなかった。2. 脱落膜リンパ球におけるGranulysin陽性細胞の検討：Gr発現細胞をフローサイトメトリー法において検討したところ、CD56^{bright}NK (CD56⁺⁺)細胞にのみGrは強発現しており、T細胞にほとんどGrの発現を認めなかった。また、流産例のGr陽性CD56⁺⁺細胞は正常妊娠と比較して有意に高かった。さらに興味深いことに、二重免疫染色において、流産例で絨毛外栄養膜(EVT)細胞の核内にGr発現を認め、これらの細胞がアポトーシスに陥っていた。EVTのmRNA発現レベルにおいて、Gr発現は認められなかったことより、Gr陽性CD56⁺⁺細胞がEVTにGrを導入している事が推測された。そこでAp誘導とGrの核内移行の関係を解明するためin vitroにてIL-2刺激した脱落膜リンパ球からCD56⁺⁺細胞を分離し、EVTセルラインと共培養を行った。その実験結果から、EVT細胞内でGrの核内移行が観察された。つまり、実験的にもCD56⁺⁺細胞からEVTにGrが導入され、そのGrが核内移行することが証明された。

また、このNK細胞から分泌されたGrのEVTへの移行は細胞接触(トランスウェル実験)およびPerforin依存性(Perforin抑制剤処理によりGrのEVTへの移行が観察されなくなる)であることが分かった。さらに、EVT細胞にGFP融合Grを強発現させたところ、Grは細胞質から核内に移行し、それと共にApの増加を認めた。追加として、Grの細胞内移動メカニズムの解明のため、GFPx2分子を結合したGFPx2-Granulysin発現ベクターを作成した。これは、GFPx2は分子量の関係から核内に単純拡散できないことが分かっている。しかしながら、EVT細胞内に導入されたGFPx2-Granulysinは核内に集積することを我々は証明した。つまり、Grは能動的に核内に移行することでアポトーシス誘導に関与することが示された。

D. 考察

今回の結果より、脱着膜リンパ球における血管形成に重要な役割を果たすと考えられてきたNK細胞(母体由来)が、直接絨毛外栄養膜細胞(胎児由来)を直接攻撃、アポトーシスを誘導することを世界に先駆けて報告した。また、この現象は流産が誘導される重要な機構であると推定される。なぜなら、これまで流産の主な原因のひとつとされる染色体異常を認める症例のみならず、その異常を認めない症例においても同様にこの機構が働いている事が確認されたためである。つまり、何らかの誘導因子がNK細胞の活性化を引き起こし流産を誘導すると考えられるわけである。この結果に加え、これまでに我々はTh1/Th2バランスの観点からTh1有意な状況が流産に関与すること、流産症例血清におけるGranulysin濃度が正常妊娠例と比較し高値を示すことを報告してきた。このことは、これまで報告されてきた流産の誘導因子とされるものが、NK細胞におけるGranulysinの発現に影響しうるか、Th1有意な状況を誘導しうるかなど今までになかった不育症因子の検査法となりうると考えられ、臨床応用も含め臨床結果と対比させていきたいと考えている。

自然流産では、NK細胞がGranulysinを介してEVT細胞にApoptosisを誘導する



E. 結論

細胞障害性顆粒蛋白であるGranulysinは母体由来の脱着膜NK細胞から、胎児由来細胞である絨毛外栄養膜細胞に分泌され、絨毛外栄養膜細胞にアポトーシスを誘導する。この機構は、流産誘導に重要な役割を果たす。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表 1. 論文発表

Nakashima A., Shiozaki A., Myojo S, Ito M., Tatematsu M., Sakai M., Takamori Y., Ogawa K., Nagata K., Saito S.: Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion. American Journal of Pathology. 173(3):653-664, 2008.

2. 学会発表

1) Nakashima A., Shiozaki A., Myojo S, Ito M., Tatematsu M., Saito S.: Decidual Natural Killer cell derived granulysin induces apoptosis of extravillous trophoblast in miscarriage. 14th International Federation of Placenta Associations Meeting. September 10-13, 2008, Seggau Castle, Austria.

2) 中島彰俊, 塩崎有宏, 伊藤実香, 立松美樹子, 明星須晴, 齋藤滋: 流産症例において、Granulysin陽性NK細胞はExtra-villous trophoblast (EVT) をアポトーシスに陥らせる。第16回日本胎盤学会学術集会, .2008年11月13日-14日, 浜松。

3) 中島彰俊, 塩崎有宏, 明星須晴, 伊藤実香, 立松美樹子, 齋藤滋: 脱落膜NK細胞由来 Granulysinは絨毛外トロホプラストにアポトーシスを誘導し、流産誘導に関与する。第23回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 2008年12月6-7日, 富山。

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Nakashima A.</u> , <u>Shiozaki A.</u> , <u>Myojo S.</u> , <u>Ito M.</u> , <u>Tatematsu M.</u> , <u>Sakai M.</u> , <u>Takamori Y.</u> , <u>Ogawa K.</u> , <u>Nagata K.</u> , <u>Saito S.</u>	Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abor- tion.	American Journal of Pathology	173(3)	653-664	2008

分担研究報告書 21

分担課題：抗β2-glycoprotein1(GP1)抗体の絨毛癌細胞株よりの
Placenta growth factor (PlGF), vascular endothelial
growth factor (VEGF) および soluble vascular endothelial growth
factor receptor-1 (sVEGFR1) 産生への影響に関する研究

研究分担者：山本 樹生 日本大学医学部医学科産科婦人科学教室教授

研究要旨

抗β2-GPI抗体は血栓を生じ胎盤機能を障害する以外に、抗β2-GPI抗体が絨毛よりのPlGF産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を阻害する可能性を証明した。これには補体は関与せず、絨毛細胞表面に結合し作用する可能性がある。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体、特に抗β2-GPI抗体の胎盤絨毛に対する影響を検索するため増殖因子に注目し、抗β2-GPI抗体の絨毛癌細胞よりのPlGF、VEGFおよびsVEGFR1の産生に与える影響を検討した。

B. 研究方法

培養絨毛癌細胞に抗β2-GPI抗体の陽性および陰性血清を添加し24時間後の上清中の各因子を測定した。PlGFの産生抑制因子を検索するため抗β2-GPI抗体陽性および陰性血清よりIgGを抽出し、絨毛癌細胞よりのPlGF産生に対するIgGの影響を検討した。PlGF産生抑制が補体の影響をうけるかどうか検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は日本大学の倫理委員会の承認を受けて実施している。

C. 研究結果

1. 抗β2-GPI抗体の陽性血清では陰性血清に比し上清中のPlGF値の低下認めたが、VEGF、sVEGFR1値において差を認めなかった。
2. 抗β2-GPI抗体陽性血清よりのIgGは絨毛癌細胞よりのPlGF産生を抑制したが、陰性血清よりのIgGはPlGF産生を抑制しなかった。
3. 添加血清の補体非働化の有無によりPlGF産生抑制は変化しなかった。

D. 考察

抗β2-GPI抗体陽性血清のPlGFの産生抑制作用はIgG、すなわち抗体によるものと考えた。PlGF産生抑制が補体の影響をうけるかどうか検討したが、添加血清の補体非働化の有無によりPlGF産生抑制は変化しなかった。このため抗β2-GPI抗体によるPlGF産生抑制は補体の影響をうけないと考えた。作用機転としては絨毛細胞表面のフォスファチジルセリンに結合したβ2-GPIに結合し作用することがPlGF産生抑制に関与している可能性を推察している。

E. 結論

抗β2-GPI抗体は血栓を生じ胎盤機能を障害する以外に、抗β2-GPI抗体が絨毛よりのPlGF産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を阻害する可能性を証明した。これには補体は関与せず、絨毛細胞表面に結合し作用する可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Yamamoto T., Murase T., Kuno S., Ichikawa G., Chishima F.: Leukocyte subpopulation in ascites of women with preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 60(4):318-324, 2008.
 - 2) 山本樹生: 妊娠時の免疫系. *周産期医学*, 38増刊号, 48-53, 2008.