



## Molecular basis of actin reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* EspB to $\alpha$ -catenin

Mitsuhide Hamaguchi<sup>1,2,3</sup>, Daizo Hamada<sup>1,3</sup>, Kayo N. Suzuki<sup>1,\*</sup>, Ikuhiro Sakata<sup>2</sup> and Itaru Yanagihara<sup>1</sup>

1 Department of Developmental Infectious Diseases, Research Institute, Osaka Medical Center for Maternal and Child Health, Japan

2 Department of Emergency Critical Care Medicine, School of Medicine, Kinki University, Osaka, Japan

3 Division of Structural Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University, Japan

### Keywords

actin branching; actin bundling; co-sedimentation; pyrene-actin polymerization; type III secretion system

### Correspondence

D. Hamada, Division of Structural Biology (GCOE), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medicine, Kobe University, 7-5-1 Kusunokicho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan  
Fax: +81 78 382 5816  
Tel: +81 78 382 5817  
E-mail: daizo@med.kobe-u.ac.jp

### \*Present address

Laboratory of Cell Migration, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan

(Received 27 August 2008, revised 17 October 2008, accepted 17 October 2008)

doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06750.x

Several Gram-negative pathogenic bacteria, including enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* (EHEC and EPEC, respectively), have evolved a complex protein secretion system (termed type III secretion) to deliver bacterial effector proteins into host cells that then modulate host cellular functions [1]. EspB is an *E. coli* type III system protein that interacts with various biomolecules such as EspA [2], EspD [3],  $\alpha$ -catenin [4],  $\alpha_1$ -antitrypsin [5] and myosin [6]. The multifunctionality of EspB may be due to its

EspB is a multifunctional protein associated with the type III secretion system of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, and interacts with various biomolecules including  $\alpha$ -catenin in the host cell. The binding of EspB to  $\alpha$ -catenin is thought to be involved in actin reorganization during bacterial infection, although the precise mechanism of this phenomenon is still unclear. Recent research shows that dimerization of  $\alpha$ -catenin dissociates it from E-cadherin/ $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -catenin complexes, and that the dimer suppresses Arp2/3-mediated actin branching or polymerization. These results inspired us to evaluate the effect of EspB on the functions of  $\alpha$ -catenin. Based on a series of *in vitro* biochemical approaches, including pull-down, co-sedimentation and pyrene-actin polymerization assays combined with transmission electron microscopy, we conclude that EspB promotes all the functions of dimeric  $\alpha$ -catenin described above. These results clarified the molecular basis of reorganization of actin filaments during infection with enterohaemorrhagic *Escherichia coli*.

partially folded structure, a structure it adopts even under near native conditions [7]. EspB has been shown to recruit  $\alpha$ -catenin in host cells, at the EHEC adherence site, by direct interaction with the injection needles of EspA filaments [8,9]. Recruitment of  $\alpha$ -catenin is known to be essential for EHEC-induced attaching and effacing (A/E) lesion formation [4].

$\alpha$ -catenin contains three vinculin homology domains (VH1, VH2 and VH3, from N- to C-terminal) [10], and is present as monomeric and/or dimeric native

### Abbreviations

A/E, attaching and effacing; EHEC, enterohaemorrhagic *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; GST, glutathione S-transferase; GST-E-cadherin, fusion of GST with the E-cadherin cytosolic sequence; pyrene-actin, pyrene-labelled actin; TEM, transmission electron microscopy; WASp-VCA, activation domain of the Wiskott-Aldrich syndrome protein.

states in solution [11].  $\alpha$ -catenin binds to  $\beta$ -catenin through its N-terminal VH1 domain, and  $\beta$ -catenin binds to the cytoplasmic domain of E-cadherin located at epithelial cell-cell junctions [12]. The C-terminal VH3 domain binds to actin filaments, and induces bundling [13]. Such structural organizations are stable and maintain the structural integrity of tissues [14]. It was therefore thought that  $\alpha$ -catenin links the adhesion protein E-cadherin through  $\beta$ -catenin to the actin cytoskeleton [15]. By contrast, recent analysis suggested more dynamic properties of  $\alpha$ -catenin, i.e. monomeric  $\alpha$ -catenin binds more strongly to the E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex than dimeric  $\alpha$ -catenin, and dimerization of  $\alpha$ -catenin promotes dissociation of  $\alpha$ -catenin from E-cadherin/ $\beta$ -catenin complexes and preferential binding of actin filaments and induction of actin bundling. This process is in competition with Arp2/3-mediated actin branching [11,16]. Thus,  $\alpha$ -catenin is an allosteric protein whose molecular properties are associated with the ability to form different oligomeric states [17].

These experimental data inspired us to evaluate the effect of EspB on the various functions of  $\alpha$ -catenin. We therefore analysed the relationships of actin filaments,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin, E-cadherin and EspB by various biochemical approaches *in vitro*, such as pull-down, co-sedimentation and pyrene-labelled actin (pyrene-actin) polymerization assays in conjunction with transmission electron microscopy (TEM). These data provide insight into the mechanism of actin reorganization induced by EspB and its effects on the interaction of  $\alpha$ -catenin with actin filaments.

## Results and Discussion

### Effect of EspB on the E-cadherin/ $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -catenin complex

$\alpha$ -catenin in host cells associates with E-cadherin/ $\beta$ -catenin complexes at adherence junctions on the surface of the host cell membrane, and forms a heterotrimer of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and  $\alpha$ -catenin [15]. Thus, it is interesting to evaluate how the presence of EspB affects the stability of the E-cadherin/ $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -catenin trimer. In order to probe these interactions, we used a pull-down assay system based on glutathione *S*-transferase (GST) fusions of the cytoplasmic domain of human E-cadherin (GST-E-cadherin) [18] (Fig. 1).

As shown in lane 5 in Fig. 1,  $\alpha$ -catenin binds to the GST-E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex in the absence of EspB. However,  $\alpha$ -catenin dissociates from the complex structures on addition of EspB in a dose-dependent

manner (lanes 2–4 and 6–8 in Fig. 1). Interestingly,  $\beta$ -catenin remains bound to GST-E-cadherin even in the presence of EspB, which suggests that EspB does not interfere with the interaction between E-cadherin and  $\beta$ -catenin but affects the affinity of  $\alpha$ -catenin for  $\beta$ -catenin. It is important to note that EspB binds to the C-terminal VH3 domain of  $\alpha$ -catenin [4], whereas  $\beta$ -catenin recognizes the N-terminal VH1 domain of  $\alpha$ -catenin [12]. Therefore, binding of EspB to the C-terminal VH3 of  $\alpha$ -catenin may induce conformational changes, not only in this domain, but also around the VH1 domain, and thus promote dissociation of  $\alpha$ -catenin from the GST-E-cadherin/ $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -catenin complex.

### Effect of EspB on the interaction between $\alpha$ -catenin and actin filaments

Purified  $\alpha$ -catenin binds and bundles actin filaments *in vitro*, and the actin-binding site of  $\alpha$ -catenin maps onto the VH3 domain [13,14]. As EspB binds to VH3, we speculated that EspB might also affect the interaction between  $\alpha$ -catenin and actin filaments. Indeed, co-sedimentation assays using ultracentrifugation of actin filaments indicated that EspB enhances the amount of  $\alpha$ -catenin that is bound to actin filaments in a dose-dependent manner (Fig. 2). Importantly, EspB also co-sedimented with actin filaments in the presence of  $\alpha$ -catenin, whereas EspB does not bind to actin filaments in the absence of  $\alpha$ -catenin. These results indicate that EspB,  $\alpha$ -catenin and actin filaments form complex structures, and that the affinity of  $\alpha$ -catenin for actin is enhanced by the specific interaction between EspB and  $\alpha$ -catenin.

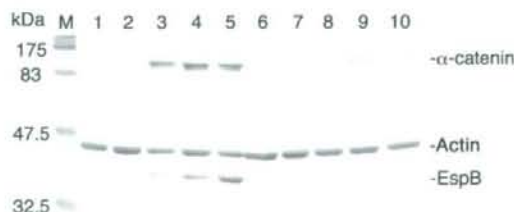


**Fig. 1.** Effect of EspB on GST-E-cadherin/ $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -catenin. EspB was added to a GST-E-cadherin/ $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -catenin complex. Lanes 1–4 are unbound fractions (for supernatant) and lanes 5–8 are fractions bound to glutathione-Sepharose beads (or pellet). EspB concentrations were 0 (lanes 1 and 5), 10 (lanes 2 and 6), 20 (lanes 3 and 7) and 40  $\mu$ M (lanes 4 and 8).

### EspB suppresses Arp2/3-mediated actin polymerization

Previous research by Drees *et al.* [11] clearly demonstrated that dimeric  $\alpha$ -catenin suppresses Arp2/3-mediated actin polymerization. EspB induces reorganization of actin filaments *in vivo* [19] and also binds to  $\alpha$ -catenin. Furthermore, our co-sedimentation experiment indicated that EspB promotes the interaction between  $\alpha$ -catenin and actin filaments. Thus, we hypothesized that the binding of EspB to  $\alpha$ -catenin would further decrease the rates of Arp2/3-mediated actin polymerization.

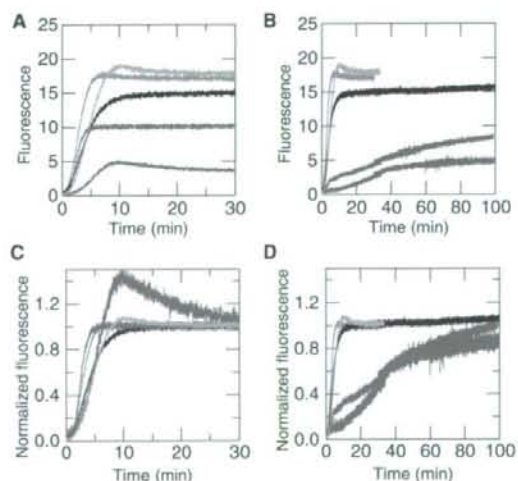
We first observed actin polymerization in the presence of purified Arp2/3 complex, and/or the activation domain (VCA) of the Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASp-VCA), using a standard pyrene-actin fluorescence assay [19,20]. As reported by Drees *et al.* [11], the Arp2/3 complex in the presence of WASp-VCA strongly accelerated the actin polymerization rate (Fig. 3, green) [20] in comparison to that without inclusion of any components other than actin itself (Fig. 3, orange). The presence of  $\alpha$ -catenin, however, suppressed Arp2/3-mediated actin polymerization (Fig. 3, blue) as demonstrated by Drees *et al.* [11]. Importantly, the absolute fluorescence intensity in the plateau region obtained in the presence of  $\alpha$ -catenin, Arp2/3 and WASp-VCA (Fig. 3A,B, blue) was almost half of that found with or without both Arp2/3 and WASp-VCA (Fig. 3A,B, orange and green). However, given that several components, e.g. myosin V [21] or SipA [22] that can bind to actin filaments induce quenching of the fluorescence intensity of pyrene-actin, we speculate that this difference in fluorescence intensity in the plateau region of Fig. 3A,B might be due to a similar quenching effect possibly induced by binding of  $\alpha$ -catenin to actin filaments. To eliminate such a



**Fig. 2.** Effect of EspB on the binding of  $\alpha$ -catenin to actin filaments.  $\alpha$ -catenin was added to pre-formed actin filaments in the presence (lanes 1–5) or absence of EspB (lanes 6–10).  $\alpha$ -catenin concentrations were 0 (lanes 1 and 6), 5 (lanes 2 and 7), 10 (lanes 3 and 8), 20 (lanes 4 and 9) and 40  $\mu$ M (lanes 5 and 10).

possibility, normalized data are presented in Fig. 3C,D.

Figure 3 shows the actin polymerization rates in the presence of Arp2/3, WASp-VCA,  $\alpha$ -catenin and EspB. As we expected, the presence of EspB, in conjunction with  $\alpha$ -catenin, further reduced the rates of actin polymerization mediated by Arp2/3 complex and WASp-VCA, even when the concentration of  $\alpha$ -catenin was relatively low at 1.25 or 2.5  $\mu$ M (Fig. 3, red). Importantly, under the same conditions, but without EspB, the suppression effect of  $\alpha$ -catenin on actin polymerization was less significant (Fig. 3, blue). The rate of actin polymerization was slightly reduced in the presence of EspB only (Fig. 3, black versus orange). However, the effect was less significant compared to the case in the presence of EspB,  $\alpha$ -catenin, Arp2/3 and WASp-VCA (Fig. 3, red). These results clearly demonstrate that EspB enhances the ability of  $\alpha$ -catenin to decrease the rate of Arp2/3- and WASp-VCA-mediated actin polymerization, possibly by increasing the affinity of  $\alpha$ -catenin for actin filaments, as demonstrated by co-sedimentation assays (Fig. 2).



**Fig. 3.** EspB suppresses Arp2/3-mediated actin polymerization by binding to  $\alpha$ -catenin. The effect of  $\alpha$ -catenin and EspB on Arp2/3-mediated actin polymerization was monitored using the pyrene-actin assay. Assembly reactions contained 5.0  $\mu$ M actin containing 10% pyrene actin, 50 nM Arp2/3 complex, 50 nM WASp-VCA, 1.25 or 2.5  $\mu$ M  $\alpha$ -catenin, and 10  $\mu$ M EspB. (A–D) orange, actin alone; green, actin, Arp2/3 and WASp-VCA; black, actin and EspB; (A,C) blue, actin, Arp2/3, WASp-VCA and 1.25  $\mu$ M  $\alpha$ -catenin; red, actin, Arp2/3, WASp-VCA, 1.25  $\mu$ M  $\alpha$ -catenin and EspB; (B,D) blue, actin, Arp2/3, WASp-VCA and 2.5  $\mu$ M  $\alpha$ -catenin; red, actin, Arp2/3, WASp-VCA, 2.5  $\mu$ M  $\alpha$ -catenin and EspB. Both raw (A,B) and normalized fluorescence intensities (C,D) as a function of time are shown.

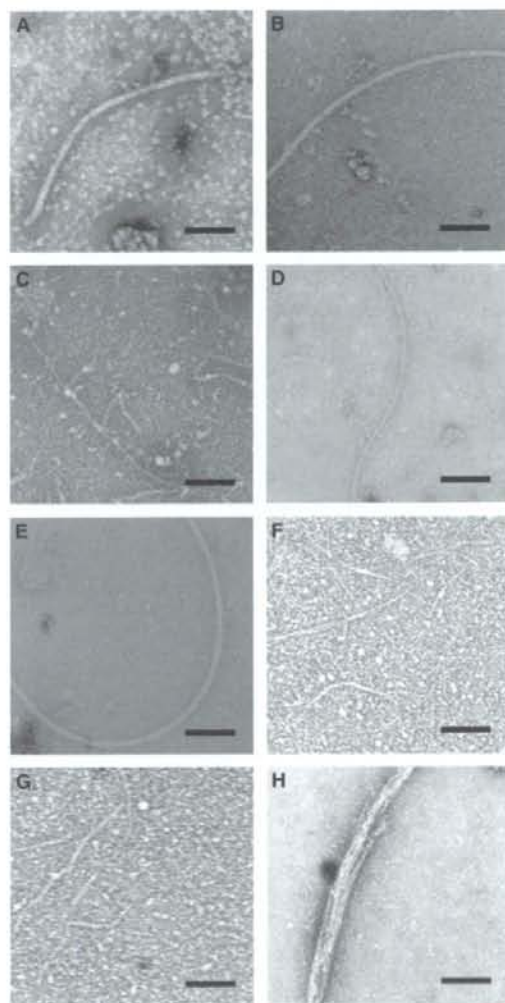
### Morphology of actin filaments

The data in Fig. 3 indicate that EspB binds to  $\alpha$ -catenin and promotes the ability of  $\alpha$ -catenin to inhibit the Arp2/3-mediated acceleration of actin polymerization. The binding of  $\alpha$ -catenin induces bundling of actin filaments [23], whereas addition of Arp2/3 and WASP-VCA promotes the branching of actin filaments [24]. We therefore determined whether the binding of EspB to  $\alpha$ -catenin in the presence of Arp2/3 and WASP-VCA affects the morphology of actin filaments using negative-stain TEM. These data are summarized in Fig. 4 and Table 1.

From close analysis of the morphological properties of actin filaments in the presence of various factors, we temporarily classified them into three categories, types A, B and C. Type A comprises branched actin filaments, and the diameter of single filament units distinguishable in TEM images is approximately 8 nm. Type B is typically observed in actin solutions without any additional components, and contains loosely bundled filaments formed by the stacking of much thinner filaments; the diameter of the single thin filaments is approximately 15 nm. Type C comprises highly bundled actin filaments, typical of the filaments formed in the presence of  $\alpha$ -catenin, and thicker than type B filaments. The diameter of the bundled filaments varies significantly depending on the extent of stacking of filaments. Thus, it is difficult to define the diameter of filaments in type C morphology. It seems likely that type C filaments are formed by the association of type B filaments, probably due to the presence of  $\alpha$ -catenin.

In the absence of other proteins, actin formed unbranched straight filaments formed by the stacking of thinner filaments with a diameter of  $14.8 \pm 2.8$  nm (type B; Fig. 4A). This value is consistent with that previously reported in the literature [23]. Importantly, addition of EspB alone to the actin solution had almost no effect on the morphology of the actin filament, and the diameter of the minimal filament unit observable in TEM images was  $16.2 \pm 2.2$  nm (type B; Fig. 4B). This is consistent with the above observations showing that EspB itself does not directly interact with actin filaments (Fig. 2) and does not significantly affect the rate of actin polymerization (Fig. 3).

The presence of Arp2/3 and WASP-VCA in the actin solution, on the other hand, induced branching, and the diameter of the experimentally observable thinnest filaments in the TEM images was  $7.6 \pm 1.5$  nm (type A; Fig. 4C). By contrast, addition of  $\alpha$ -catenin alone to the actin solution promoted a higher extent of bundling of filaments (type C; Fig. 4D). These results are consistent with previous observations [25,26]. Addition of EspB to



**Fig. 4.** Actin filaments using negative-stain transmission electron microscopy (TEM). Assembly reactions comprised  $5 \mu\text{M}$  actin containing 10% pyrene-actin,  $50 \text{ nM}$  Arp2/3 complex,  $50 \text{ nM}$  WASP-VCA,  $1.25 \mu\text{M}$   $\alpha$ -catenin and  $10 \mu\text{M}$  EspB. (A) actin alone; (B) actin and EspB; (C) actin, Arp2/3 and WASP-VCA; (D) actin and  $\alpha$ -catenin; (E) actin,  $\alpha$ -catenin and EspB; (F) actin, Arp2/3, WASP-VCA and EspB; (G) actin, Arp2/3, WASP-VCA and  $\alpha$ -catenin; (H) actin, Arp2/3, WASP-VCA,  $\alpha$ -catenin and EspB. Scale bars = 200 nm.

the solution containing  $\alpha$ -catenin and actin also induced bundling of actin filaments, classified as type C (Fig. 4E). Addition of EspB to the solution containing actin, Arp2/3 and WASP-VCA produced branched filaments formed from thinner filaments with diameters of  $8.6 \pm 1.4$  nm (type A; Fig. 4F). Thus, EspB itself

**Table 1.** Morphology of actin filaments in the presence of various proteins.

Additional components	Filament diameter (nm) <sup>a</sup>	Morphology	Panel in Fig. 4 <sup>1</sup>
Arp2/3, WASp-VCA	7.6 ± 1.5	Type A <sup>b</sup>	C
Arp2/3, WASp-VCA, $\alpha$ -catenin	8.4 ± 1.8	Type A	G
Arp2/3, WASp-VCA, EspB	8.6 ± 1.4	Type A	F
No other components	14.8 ± 2.8	Type B <sup>c</sup>	A
EspB	16.2 ± 2.2	Type B	B
$\alpha$ -catenin	— <sup>d</sup>	Type C <sup>e</sup>	D
$\alpha$ -catenin, EspB	—	Type C	E
Arp2/3, WASp-VCA, $\alpha$ -catenin, EspB	—	Type C	H

<sup>a</sup> Mean diameter of the thinnest actin filaments in each condition that is distinguishable in TEM images. <sup>b</sup> Branched filament with diameter of approximately 8 nm. <sup>c</sup> Slightly bundled filament formed by the stacking of thinner filaments with diameter of approximately 15 nm. <sup>d</sup> It was impossible to define the size of the minimal filament unit due to the significant stacking of filaments. <sup>e</sup> Highly bundled filament. See text for more details on the classification of filament morphology. <sup>1</sup> The panels in Fig. 4 showing the corresponding TEM images.

does not affect the morphology of branched actin filaments promoted by Arp2/3 and WASp-VCA.

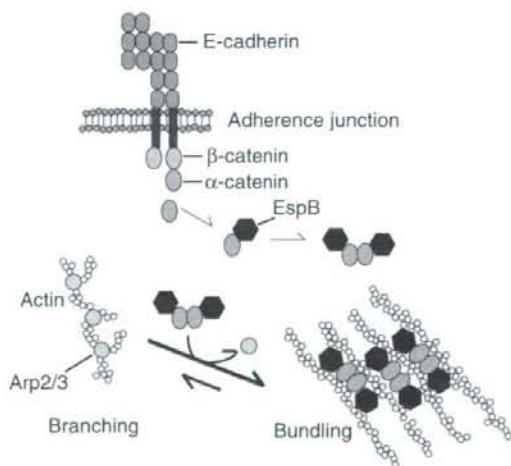
Addition of 1.25  $\mu$ M of  $\alpha$ -catenin to the solution containing actin, Arp2/3 and WASp-VCA did not affect the morphology of actin filaments, and branched filaments with diameters of 8.4 ± 1.8 nm were observed (type A; Fig. 4G). This diameter is similar to that found for the branched filaments in the absence of  $\alpha$ -catenin but with Arp2/3, WASp-VCA and EspB (8.6 ± 1.4 nm) (type A; Fig. 4G). Interestingly, addition of EspB to the solution containing actin, Arp2/3, WASp-VCA and even only a small amount of  $\alpha$ -catenin (1.25  $\mu$ M) promoted the bundling of actin filaments (type C; Fig. 4H), over-riding the promotion of actin branching effected by Arp2/3 and WASp-VCA. These results suggest that binding of EspB to  $\alpha$ -catenin significantly enhances the ability of  $\alpha$ -catenin to compete with the branching effect of Arp2/3 and WASp-VCA.

### Role of EspB in actin reorganization

The present data provides evidence that EspB promotes both the dissociation of  $\alpha$ -catenin from the E-cadherin/ $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -catenin complex and  $\alpha$ -catenin-induced suppression of Arp2/3-mediated actin polymerization (Fig. 5), at least *in vitro*. It has been shown previously that these effects of  $\alpha$ -catenin are consistent with the observation that  $\alpha$ -catenin competes with Arp2/3 for actin filaments to prevent the actin branching or polymerization mediated by Arp2/3 [11]. This may or may

not affect the final amount of actin molecule incorporated into actin filaments, but our data do not provide conclusive evidence for this due to uncertainty as to whether the absolute intensity observed in the pyrene-actin polymerization assay includes possible fluorescence quenching by binding of various proteins. Further quantitative analysis is required to clarify whether any quenching effects of  $\alpha$ -catenin may occur. Our results were obtained under well-defined *in vitro* conditions, leaving the question of whether the same effects are found *in vivo* when EHEC infects a host cell.

EspB is a protein that is involved in actin reorganization, but it is also required for first attachment of the EspA filamentous needle [27]. Therefore, bacteria lacking the *espB* gene [28] or even the regions corresponding to the  $\alpha$ -catenin binding site, i.e. the coding region for the N-terminal part of EspB [11], are unable to translocate virulence factors, including EspB itself, into the host cell. This property of EspB prevents us from testing the specific effect of this protein upon  $\alpha$ -catenin binding using a model system, e.g. using cultured cells. On the other hand, in the case of EHEC infection, actin accumulation is observed underneath the pedestals formed at the infection sites [29], and importantly, both  $\alpha$ -catenin and EspB accumulate at the same sites where bundled actin filaments are present [4]. This indicates that EspB also affects the morphology of actin filaments *in vivo*, possibly by binding to  $\alpha$ -catenin.



**Fig. 5.** Schematic representation of the mechanism of actin reorganization promoted by EspB. EspB binds to  $\alpha$ -catenin and promotes the dissociation of  $\alpha$ -catenin from the E-cadherin/ $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -catenin complex at adherence junctions. The binding of EspB to  $\alpha$ -catenin enhances the ability of  $\alpha$ -catenin to suppress Arp2/3-mediated actin polymerization by competitively interacting with actin filaments and inducing bundling of actin filaments.

It has recently been reported that EspB from EPEC binds to myosin and inhibits its ability to facilitate effacement of microvilli and anti-phagocytosis [6]. This observation, taken together with our experimental data, is consistent with the fact that heterologous expression of EspB from EPEC in HeLa cells reduced the number of stress fibers and affects cellular morphology [30]. If EspB from EHEC also inhibits the function of myosin, EspB affects both actin and myosin indirectly or directly to facilitate actin reorganization, probably in combination with other bacterial virulence factors.

It is also important to note that virulence factors from EHEC other than EspB are also associated with host-cell actin reorganization. These proteins include TccP [31], TccP2 [32] and Tir [31]. However, in contrast to EspB, they activate the N-WASP or WASP-VCA that promotes Arp2/3-mediated actin polymerization or branching [33,34]. If EspB plays the role suggested by our data during actual infection by EHEC, it is important to evaluate how the interplay between the activators of N-WASP or WASP-VCA and the competitive role of EspB is controlled by bacteria to induce actin reorganization in the host cell.

Finally, it is important to note that the reactions described above, promoted by EspB, are all facilitated by dimerization of  $\alpha$ -catenin. Thus, it is important to evaluate the stoichiometry of  $\alpha$ -catenin/EspB complexes. However, we have not obtained strong evidence for an enhanced population of dimeric  $\alpha$ -catenin in the presence of EspB (M. Hamaguchi and D. Hamada, unpublished results). On the other hand, our results were all obtained using a relatively low-resolution technique, including size-exclusion chromatography, by which is difficult to analyse the stoichiometry of hetero-oligomeric structures when proteins assume a less-ordered conformation (EspB) or consist of several domains ( $\alpha$ -catenin). Further analyses of the structural properties of  $\alpha$ -catenin/EspB complexes using techniques with higher resolution, e.g. dynamic light or small angle X-ray scattering or analytical ultracentrifugation, are required to clarify the mechanisms by which EspB promotes the reactions that are promoted by dimeric  $\alpha$ -catenin.

## Experimental procedures

### Materials

EspB was purified as described previously [7]. The cDNA clone of  $\alpha$ -catenin was kindly provided by M. Ozawa (Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, Japan), and the clone of  $\beta$ -catenin was obtained from a human thymus Matchmaker cDNA library

(Clontech, Palo Alto, CA). These proteins were expressed using *E. coli* BL21(DE3) transformed with an expression vector produced by ligating the coding sequence of human  $\alpha$ -catenin digested with *NdeI* and *SalI*, or the sequence of  $\beta$ -catenin digested with *BamHI* and *SalI*, into the multicloning site of pET28a (Novagen, Madison, WI, USA). The expressed  $\alpha$ -catenin or  $\beta$ -catenin was purified using chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) charged with  $\text{NiCl}_2$  in 20 mM sodium phosphate at pH 7.4, washed with 20 mM sodium phosphate at pH 7.4, and eluted using a 0–0.5 M imidazole gradient. For  $\alpha$ -catenin, the eluted fractions were further purified using S-Sepharose (GE Healthcare) in 20 mM Tris/HCl at pH 8.0, and eluted using a 0–2.0 M NaCl gradient and S-200 column chromatography (GE Healthcare) with 20 mM sodium phosphate (pH 7.0), 0.1 M NaCl, 5.0 mM 2-mercaptoethanol and 0.1 mM EDTA. For  $\beta$ -catenin, the eluted fractions were purified using Q-Sepharose in 20 mM Tris/HCl (pH 8.0), and eluted using a 0–2.0 M NaCl gradient and S-200 column chromatography (GE Healthcare) with 20 mM sodium phosphate (pH 7.0), 0.1 M NaCl, 5.0 mM 2-mercaptoethanol and 0.1 mM EDTA.

The cDNA clone of E-cadherin was obtained from human verified full-length cDNA clones (OpenBiosystems, Huntsville, AL, USA). GST and a GST fusion of the E-cadherin cytosolic sequence (GST-E-cadherin) were expressed using Rosetta(DE3) transformed with the empty vector pGEX4T-1 (GE Healthcare) (for GST expression) or an expression vector produced by ligating a coding sequence of the cytosolic region (R732–D882) of human E-cadherin digested with *NdeI* and *SalI* into the multicloning site of pGEX4T-1 (for expression of the GST-E-cadherin fusion). The pellet was resuspended in 50 mL of 20 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1.0 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 10  $\mu\text{M}$  phenylmethanesulfonyl fluoride. Cells were disrupted by sonication on ice with short bursts. Lysed bacteria were centrifuged at 15 000 *g* for 10 min. The supernatant was collected and incubated with glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare), and washed three times with 10 beads volume of 20 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1.0 mM EDTA. GST and GST-E-cadherin bound to beads were eluted using 20 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1.0 mM EDTA, 20 mM reduced glutathione. For GST-E-cadherin, the fractions were purified by S-200 column chromatography (GE Healthcare). Arp2/3 from bovine brain, recombinant WASP-VCA and pyrene-actin were purchased from Cytoskeleton Inc (Denver, CO, USA). Rabbit actin was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Other chemicals were of reagent grade and were purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) or Wako Chemicals (Osaka, Japan).

### GST pull-down assay

GST pull-down assays were performed using GST-E-cadherin or GST alone on glutathione-Sepharose beads (GE

Healthcare). Solutions containing 50  $\mu$ M GST-E-cadherin (or GST), 100  $\mu$ M  $\alpha$ -catenin, 100  $\mu$ M  $\alpha$ -catenin and various concentrations of EspB were incubated in 0.5 mL of 20 mM sodium phosphate (pH 7.0), 0.1 M NaCl, 5.0 mM 2-mercaptoethanol and 0.1 mM EDTA for overnight at 4 °C. Proteins bound to the beads were washed three times with 10 beads volume of the same buffer by removing supernatant after centrifugation at 10 000 g for 1 min. and eluted with 10 mM reduced glutathione. The flow-through and eluted solutions, i.e. unbound proteins and proteins bound to GST-E-cadherin or GST, respectively, were analysed by SDS-PAGE and stained using Coomassie blue (R-250).

### Ultracentrifugation

The co-sedimentation assay with actin filaments was performed using a Beckman Optima TLX ultracentrifuge (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA). The TLX rotor 120.2 was used. Solutions containing 10  $\mu$ M of preformed actin filaments with various concentrations of  $\alpha$ -catenin and/or EspB in 20 mM sodium phosphate (pH 7.0), 100 mM NaCl, 5.0 mM 2-mercaptoethanol and 1.0 mM EDTA were incubated for 30 min at 25 °C, and centrifuged at 113 000 g for 2 h. The amounts of protein that co-precipitated with actin filaments were estimated by SDS-PAGE of the precipitate. The gels were stained using Coomassie blue (R-250).

### Actin polymerization

Actin polymerization rates were measured by the change in pyrene-actin fluorescence upon incorporation into actin filaments using a FP-6500 spectrofluorometer (JASCO Co., Tokyo, Japan). The final concentrations of actin, pyrene-actin and EspB were 4.5, 0.5 and 10  $\mu$ M. The concentrations of Arp2/3 and WASp-VCA were 50 nM. The concentration of  $\alpha$ -catenin was either 1.25 or 2.5  $\mu$ M. The samples were initially prepared in G buffer, which consists of 5.0 mM Tris/HCl (pH 8.0), 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM ATP and 0.5 mM dithiothreitol. The polymerization reaction was initiated by addition of a 1/10 volume of a 10 $\times$  concentrated solution of F buffer (200 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM ATP).

### TEM study

Samples from the pyrene-actin polymerization assay were analysed by TEM. The solution was incubated overnight and diluted tenfold with buffer containing 20 mM sodium phosphate (pH 7.0), 100 mM NaCl, 5.0 mM 2-mercaptoethanol and 1.0 mM EDTA. The solutions were applied to formvar- and carbon-coated grids (Nisshin EM Co. Ltd, Tokyo, Japan) for 1 min. The grids were washed with

buffer, negatively stained with 2% aqueous uranyl acetate for 2 min, and examined using Hitachi transmission electron microscope H-7100 (Hitachi High-Tech., Tokyo, Japan). The diameter reported is the mean of 20 randomly selected parts of either bundled or branched filaments.

### Acknowledgements

We thank Yoshitaka Horiuchi and Katsumi Okumoto of the Kinki University Life Science Research Institute for assistance with TEM analysis. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) from the Japanese Society for the Promotion of Science (D.H.) and by the National Center for Child Health and Development, Japan (I.Y.).

### References

- Galan JE & Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322–1328.
- Daniell SJ, Kocsis E, Morris E, Knutton S, Booy FP & Frankel G (2003) 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**, 301–308.
- Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H & Schmidt MA (2001) Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**, 213–222.
- Kodama T, Akeda Y, Kono G, Takahashi A, Imura K, Iida T & Honda T (2002) The EspB protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with  $\alpha$ -catenin. *Cell Microbiol* **4**, 213–222.
- Knapstein S, Ide T, Schmidt MA & Heusipp G (2004)  $\alpha$ 1-Antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **72**, 4344–4350.
- Iizumi Y, Sagara H, Kabe Y, Azuma M, Kume K, Ogawa M, Nagai T, Gillespie PG, Sasakawa C & Handa H (2007) The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host Microbe* **2**, 383–392.
- Hamada D, Kato T, Ikegami T, Suzuki KN, Hayashi M, Murooka Y, Honda T & Yanagihara I (2005) EspB from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* is a natively partially folded protein. *FEBS J* **272**, 756–768.
- Ebel F, Podzadel T, Rohde M, Kresse AU, Kramer S, Deibel C, Guzman CA & Chakraborty T (1998) Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol Microbiol* **30**, 147–161.

- 9 Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G & Frankel G (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**, 2166–2176.
- 10 Rudiger M (1998) Vinculin and  $\alpha$ -catenin: shared and unique functions in adherens junctions. *BioEssays* **20**, 733–740.
- 11 Drees F, Pokkutta S, Yamada S, Nelson WJ & Weis WI (2005)  $\alpha$ -Catenin is molecular switch that binds E-cadherin- $\beta$ -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**, 903–915.
- 12 Pokutta S & Weis WI (2000) Structure of the dimerization and  $\beta$ -catenin binding region of  $\alpha$ -catenin. *Mol Cell* **5**, 533–543.
- 13 Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ & Weis WI (2002) Biochemical and structural definition of the 1-afadin-and actin-binding sites of  $\alpha$ -catenin. *J Biol Chem* **277**, 18868–18874.
- 14 Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD & Morrow JS (1995)  $\alpha$ 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 8813–8817.
- 15 Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R & Hoschuetzky H (1994) Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* **107**, 3655–3663.
- 16 Yamada S, Pokkutta S, Drees F, Weis WI & Nelson WJ (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**, 889–901.
- 17 Yang J, Dokurno P, Tonks NK & Barford D (2001) Crystal structure of the M-fragment of  $\alpha$ -catenin: implications for modulation of cell adhesion. *EMBO J* **20**, 3645–3656.
- 18 Hu Y, Leo C, Yu S, Huang BCB, Wang H, Shen M, Luo Y, Daniel-Issakani S, Payan DG & Xu X (2004) Identification and functional characterization of a novel human misshapen/Nck interacting kinase-related kinase, hMINK $\beta$ . *J Biol Chem* **279**, 54387–54397.
- 19 Tobe T & Sasakawa C (2002) Species-specific cell adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by type IV bundle-forming pili. *Cell Microbiol* **4**, 29–42.
- 20 Prehoda KE, Scott JA, Mullins RD & Lim WA (2000) Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* **290**, 801–806.
- 21 De La Cruz EM, Sweeney HL & Ostap EM (2000) Muscle chemistry and force. *Biophys J* **79**, 1524–1529.
- 22 Zhou D, Mooseker MS & Galán JE (1999) Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* **283**, 2092–2095.
- 23 Bullitt ES, DeRosier DJ, Coluccio LM & Tilney LG (1988) Three-dimensional reconstruction of an actin bundle. *J Cell Biol* **107**, 597–611.
- 24 Volkmann N, Amann KJ, Stoilova-McPhie S, Egile C, Winer DC, Hazelwood L, Heuser JE, Li R, Pollard TD & Hanein D (2001) Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* **293**, 2456–2459.
- 25 Pollard TD & Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453–465.
- 26 Takenaka T & Miki H (2001) WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* **114**, 1801–1809.
- 27 Hartland EL, Daniell SJ, Delahay RM, Neves BC, Wallis T, Shaw RK, Hale C, Knutton S & Frankel G (2000) The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. *Mol Microbiol* **35**, 1483–1492.
- 28 Donnenberg MS, Yu J & Kaper JB (1993) A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol* **175**, 4670–4680.
- 29 Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA & Finlay BB (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**, 511–520.
- 30 Taylor KA, Luther PW & Donnenberg MS (1999) Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun* **67**, 120–125.
- 31 Garmendia J, Phillips AD, Carlier MF, Chong Y, Schuller S, Marches O, Dahan S, Oswald E, Shaw RK, Knutton S *et al.* (2004) TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* **6**, 1167–1183.
- 32 Ogura Y, Ooka T, Whale A, Garmendia J, Beutin L, Tennant S, Krause G, Morabito S, Chinen I, Tobe T *et al.* (2007) TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization. *Infect Immun* **75**, 604–612.
- 33 Uruno T, Liu J, Li Y, Smith N & Zhan X (2003) Sequential interaction of actin-related proteins 2 and 3 (Arp2/3) complex with neural Wiscott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cortactin during branched actin filament network formation. *J Biol Chem* **278**, 26086–26093.
- 34 Cantarelli VV, Kodama T, Nijstad N, Abolghait SK, Nada S, Okada M, Iida T & Honda T (2007) Tyrosine phosphorylation controls cortactin binding to two enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effectors: Tir and EspFu/TccP. *Cell Microbiol* **9**, 1782–1795.



## 周産期診療プラクティス

### II. 妊 娠—B. 異常妊娠

#### 4. 不育症とその対策

*Management of recurrent pregnancy losses*

杉 俊 隆

*SHIGI Toshitaka*

永 井 書 店

## 周産期診療プラクティス

### II. 妊 娠—B. 異常妊娠

#### 4. 不育症とその対策

*Management of recurrent pregnancy losses*

杉 俊 隆

*Shigeo Sugii*

東海大学医学部専門診療学系産婦人科 准教授

KEY WORDS ● 不育症, 第XII因子, 抗PE抗体, 染色体転座

不育症の原因はいまだ不明の点が多いが、最近のこの領域の進歩は目覚ましいものがあり、検査や治療方針は大幅に変化しつつある。わずか10年前までは常識と思われていた検査、治療が今では否定されているものもある。本稿では最近の知見をもとに、日常の实地診療に役立つよう概説する。

#### ■ ■ ■ はじめに

子宮はいまだにブラックボックスであり、着床から妊娠、分娩に至るまで utero-placental unit で何が起きているのか不明の点が多い。それにもかかわらず不育症の分野は最近10年で大いなる発展を遂げてきた。その内容は、生殖免疫、血液凝固学の進歩に依るところが多く、高度に専門化しつつある。新たな原因、治療が明らかにされるだけでなく、従来より不育症の原因、治療として確立しているかと思われた分野が見直されつつある。

例えば、内分泌系の異常が良い例である。不育症の患者に対して内分泌系の検査を施行し、何か異常が見出されればそれが原因であると診断して治療することは非常に基本的なことであると一般には考えられている。しかしながら、意外にも内分泌異常が本当に流産の原因になりうるのか証明されていないことが多い。不育症の分野の“常識”を、EBMの観点から再検討する必要がある

と思われる<sup>1)</sup>。

表1は当院で施行している不育症一般検査を示したものである。本稿では、実際の不育症診療に役に立つ知見をいくつか紹介したい。

#### ■ ■ ■ 黄体機能不全

非妊娠時の高温期の途中で血中プロゲステロン値が10ng/ml未満ならば黄体機能不全と診断し、治療の対象となると考えている不育症外来は多い。その場合、黄体ホルモン投与やhCG投与にて補充することになる。しかしながら黄体機能不全が不妊の原因ではなく、一度成立した妊娠に対して本当に流産を反復して惹き起こすかに関しては否定的な報告もある。もちろん、体外受精や外科的に黄体を摘出した場合などは、妊娠維持のために黄体ホルモンの補充が必須であるが、生理的条件下での黄体機能不全が本当に流産の原因になりうるかに関しては、よく検討されていないのが現状である。

表1 不妊症一般検査

1. 問診、基礎体温
2. 感染症検査  
クラミジア PCR、子宮頸部・腔内培養、血算、CRP
3. 内分泌検査  
下垂体機能（プロラクチン）  
黄体機能（高温期中間黄体ホルモン）  
甲状腺機能（freeT3, freeT4, TSH）  
糖尿病検査（空腹時血糖）
4. 子宮内腔形態異常  
子宮卵管造影、子宮鏡、超音波検査
5. 夫婦染色体検査
6. 免疫学的検査  
抗核抗体、抗DNA抗体、RF、抗SSA抗体、不規則抗体検査  
抗リン脂質抗体、  
Lupus Anticoagulant (dRVVT)  
抗カルジオリピン（CL）抗体 IgG, IgM  
抗カルジオリピン-β<sub>2</sub>GPI複合体抗体 IgG  
抗フォスファチジルセリン（PS）抗体 IgG, IgM, IgA  
抗フォスファチジルエタノールアミン（PE）抗体 IgG, IgM, IgA
7. 血液凝固系検査  
血小板数、MPV（mean platelet volume）、aPTT、PT、TAT、α<sub>2</sub>PIC、  
血小板凝集能（レーザー散乱粒子計測法）  
第XII因子活性  
プロテインC活性、抗原量  
プロテインS活性、抗原量

確かに黄体機能不全はプロゲステロン欠乏をきたし、その結果流産の原因となりうるが、多くの場合は妊娠中のプロゲステロンの欠乏はほかの原因に起因する流産の必然的、二次的結果と考えられる。不妊症患者における黄体機能不全の頻度は20~60%と報告されているが、これらは非妊娠時の高温期の話であって、妊娠周期の黄体機能をあらかじめ評価しうる信頼できる方法は存在しない。妊娠時の黄体は非妊娠時の黄体とは異なるので、非妊娠サイクルでの黄体機能の評価は妊娠時を反映しないといわれている。

初期流産に終わった妊娠周期の着床前期の黄体ホルモン値は、妊娠成功時と比べて差が認められなかったと報告されている。また、不妊症患者の非妊娠周期の高温期中間での血清プロゲステロン値を評価し、黄体機能不全のある群とない群に分けて次回妊娠の流産率を比較したところ、無治療にもかかわらず両群に差を認めなかったという報告もある。

以上のように、黄体機能不全が流産の原因にな

りうるのか疑わしいにもかかわらずホルモン療法は広く行われている。その効果については多くの報告があるが、黄体ホルモンの補充療法については、流産の危険を減らすというに十分な根拠は見出されていない。確かにいくらかは効果があることを示唆するデータはあるが、証明するにはより多くの検討が必要である。

結論として、不妊症患者で黄体機能不全と診断した場合に、黄体ホルモン補充を行うことが決して不適當であるとは言わないが、黄体機能不全が流産の原因であると決めつける前に、ほかにも流産の原因が存在する可能性は考慮したほうが良いと思われる。

### ■■■ 高プロラクチン血症

意外なことに、高プロラクチン血症が反復流産の原因となりうるという説は今のところ証明されていない。多くの論文は、未治療の高プロラクチン血症の患者の流産率は高くないと報告している。

正常妊娠においてもフロラクチンレベルは妊娠初期より上昇し、非妊時の10倍に達すると報告されており、フロラクチンの存在が直接妊娠を妨害するとは考えにくい、しかしながら、言うまでもなく高フロラクチン血症は不妊症の原因となりうる。高フロラクチン血症と診断された場合は治療することに反論は無い、しかしながら、原因不明不妊症患者に対して、潜在性高フロラクチン血症も考慮してTRH testを行い、陽性であった場合に潜在性高フロラクチン血症が不妊症の原因であると断定することには疑問を覚える。

### ■ ■ ■ 甲状腺機能異常

甲状腺機能異常は流産の原因としてしばしば挙げられているが、意外なことに甲状腺ホルモン値の異常が流産の原因になりうるかに関しては、その直接的な証拠はまだ無いのが現状であり、逆に最近否定的な論文が相次いで報告され注目を浴びている、しかしながら、バセドー氏病や橋本病にみられる甲状腺に対する自己抗体が反復流産の率の上昇と関係するという報告はいくつかある。

その理由は不明であるが、自己免疫疾患はいくつかの自己抗体を併せもつことがよくあるので、抗リン脂質抗体など妊娠に対して病原性のあるほかの自己抗体を介して流産が起きている可能性は否定できない、したがって、甲状腺機能異常を見つけた場合は内科に甲状腺疾患の診断と治療を依頼し、甲状腺機能を整えてもらい、それをもって不妊症の治療とするのではなく、自己免疫疾患患者であるとして甲状腺以外の不妊症の原因を、とくに自己抗体を重点的に検索する必要がある。

### ■ ■ ■ 染色体異常

夫婦いずれかに染色体の異常があると、不妊症の原因になりうるという仮説は意外とまだ証明されていない、確かに転座があれば流産率は上昇するが、それだけで過去の何回もの流産を説明できるかは不明である、最近の論文をいくつか紹介し、

解説したい。

オランダのグループは、夫婦いずれかに染色体異常(相互転座、ロバートソン転座、逆位を含む)をもつ25の習慣流産カップルについて、その後の妊娠の予後を検討したところ、43妊娠中、30妊娠(70%)が生児を得たと報告している<sup>2)</sup>、そのうち26妊娠において出生前診断を施行し、15妊娠(58%)は正常の染色体であり、11妊娠(42%)において親と同様の均衡型転座が見出された、残念ながら25のキャリアーのカップルの染色体異常の詳細については不明である。

またイスラエルのグループは、661の習慣流産夫婦の次回妊娠成功率を報告している<sup>3)</sup>、彼らは染色体異常(転座、モザイク、逆位を含む)をもつ夫婦の73妊娠中、33妊娠(45.2%)が生児を得たと報告した、一方、染色体正常夫婦の588妊娠中、325妊娠(55.3%)が生児を得たと報告し、両者に統計学的有意差を認めなかった、以上のように、習慣流産夫婦において染色体の異常が流産の原因になりうるかについては、否定的な結果が最近相次いで報告されている。

最後に日本の報告であるが、Sugiuraらは1,284組の不妊症夫婦について調査したところ、58人(4.5%; 夫21人、妻37人)が均衡型転座保因者であり、そのうち11人はロバートソン型転座であったと報告している<sup>4)</sup>、次回妊娠の生児獲得率は、夫に均衡型相互転座がある18カップル中7人(38.9%)、妻に均衡型相互転座がある29カップル中8人(27.6%)であり、まとめると夫婦いずれかに均衡型相互転座があるカップルの次回妊娠の生児獲得率は15/47(31.9%)であった、また、ロバートソン型転座保因者の次回妊娠の生児獲得率は7/11(63.6%)であり、染色体異常の無いカップルとそれほど差は無かった。

不妊症患者に染色体異常が見出された場合、本当にそれが流産の原因なのか、慎重に検討すべきである、染色体以外のほかの不妊症の原因検索も必要であろう、また以上の論文を総合すると、着床前診断が今後の治療の選択肢に挙げられるかに関しては慎重に検討する必要がある。

## ■ ■ ■ 抗フォスファチジルエタノールアミン (PE) 抗体

抗カルジオリピン (CL) 抗体や lupus anticoagulant (LA) に特徴的なのは、妊娠中期以降の子宮内胎児死亡である。しかしながら、臨床で一番多くみられるのは妊娠初期流産を繰り返す不育症であり、そのような患者に対して抗 CL 抗体や LA を検査しても陽性に出ることは期待するほどは多くない。われわれは、妊娠10週未満の流産を繰り返す反復初期流産患者139人に対して、抗リン脂質抗体のスクリーニングを施行したところ、陰性荷電リン脂質を認識する抗 CL 抗体、抗フォスファチジルセリン (PS) 抗体、LA に関しては、患者群と正常対照群で陽性率に差を認めなかったが、抗 PE 抗体は IgG が 20.1%、IgM が 12.2%、IgA が 1.4% の陽性率であり、正常対照群と比較して統計学的に有意 ( $p = 0.0002$ ) であった<sup>1)</sup>。したがって、反復初期流産患者に最も多くみられる抗リン脂質抗体は抗 PE 抗体であるという結論に達した。このことは、われわれが1999年に発表し<sup>2)</sup>、2000年になってフランスの Gris らによって同様の結果が報告された<sup>3)</sup>。さらに、不育症患者のもつ PE 結合蛋白依存性抗 PE 抗体の90.5%はキニノーゲンを認識することが明らかになった<sup>4)</sup>。また、抗 PE 抗体と流産だけでなく、抗 PE 抗体と血栓症との関係も報告されている。

抗 PE 抗体は血小板を介して血栓、流産の原因となりうるということが報告されており、抗血小板療法である低用量アスピリン療法の有用性が示唆されている。

## ■ ■ ■ 第 XII 因子に対する自己抗体

NOHA study によると、妊娠初期流産を繰り返すタイプの不育症では、第 XII 因子欠乏症が流産の危険因子として最も高頻度に報告されており、抗 PE 抗体がそれに続いている<sup>5,6)</sup>。われわれの不育症外来でも同様の結果が得られている。抗 PE 抗体、すなわちキニノーゲンを認識する抗体と並

んで、第 XII 因子欠乏症が高頻度にみられたことは非常に興味深い。なぜならば、キニノーゲンも第 XII 因子も同じカリクレイン-キニン系の蛋白だからである。

われわれの不育症外来において191人の不育症患者をスクリーニングしたところ、34人 (17.8%) が第 XII 因子活性60%未満であった。一方、正常対照群60人中第 XII 因子活性60%未満であったのは1人であった。

最近になって、抗リン脂質抗体陽性患者に第 XII 因子欠乏症が高頻度に存在するという報告がされた<sup>7)</sup>。また、第 XII 因子に対する自己抗体が存在することにより免疫複合体が形成され、第 XII 因子欠乏症が起こるのではないかという仮説が提唱された。その後、抗リン脂質抗体陽性患者において第 XII 因子に対する自己抗体の存在が報告された<sup>8)</sup>。次いでわれわれも、第 XII 因子欠乏不育症患者において第 XII 因子に対する自己抗体の存在を報告した<sup>9)</sup>。第 XII 因子に対する自己抗体は、不育症のリスクファクターのリストに加えるべきかもしれない。第 XII 因子に対する自己抗体は検出するときにリン脂質の存在は必要ないので、抗リン脂質抗体の仲間とは言えないが、抗リン脂質抗体自体がリン脂質ではなく、リン脂質に結合した血液凝固関連蛋白を認識することが解明された現在、そのような議論はナンセンスかもしれない。

## ■ ■ ■ 抗 PE 抗体陽性、第 XII 因子欠乏症不育症患者の治療方針

われわれは、抗 PE 抗体と第 XII 因子欠乏不育症患者の治療法について検討した。抗 PE 抗体陽性かつ第 XII 因子欠乏不育症患者に対して、インフォームド Consent のもとで低用量アスピリン療法 (LDA)、または低用量アスピリン+ヘパリン併用療法 (LDA + hep) を施行した。抗 PE 抗体陽性でなおかつ第 XII 因子欠乏症例 ( $n = 35$ ) 中、妊娠成功率は LDA 群 ( $n = 17$ ) は 64.7%、LDA + hep 群 ( $n = 28$ ) は 92.9% であった ( $p = 0.017$ )。

第 XII 因子は、エストロゲンの影響を受けて妊

娠中は血中濃度が著しく上昇する。したがって、妊娠中および授乳中に活性値の評価をすべきではない。また、第XII因子欠乏不育症患者が妊娠して第XII因子活性が亢進し、数値が正常化しても、抗第XII因子抗体が流産の原因と考えるならば、決して血栓傾向が軽快したわけではないので、治療を中止すべきではない。

## ■ ■ ■ おわりに

本稿では紙面の都合上、基本的な話は割愛した。

## 文 献

- 1) 杉 俊隆: EBMに基づく不育症診療の実際。基礎から臨床へ、第1版、金原出版、2007。
- 2) Goddijn M, et al: Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 19: 1013-1017, 2004.
- 3) Carp H, et al: Parental karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 81: 1296-1301, 2004.
- 4) Sugiura-Ogasawara M, et al: Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril* 81: 367-373, 2004.
- 5) Sugi T, et al: Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses. *Fertil Steril* 71: 1060-1065, 1999.
- 6) Gris JC, et al: Antiphospholipid and antiprotein syndromes in non-thrombotic, non-autoimmune women with unexplained recurrent primary early foetal loss. *Thromb Haemost* 84: 228-236, 2000.
- 7) Gris JC, et al: Prospective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. *Thromb Haemost* 77: 1096-1103, 1997.
- 8) Gallimore MJ & Winter JM: Factor XII determinations in the presence and absence of phospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 79: 87-90, 1998.
- 9) Jones DW, et al: Antibodies to FXII associated with lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 81: 387-390, 1999.
- 10) Sugi T & Makino T: Autoantibodies to contact proteins in patients with recurrent pregnancy losses. *J Reprod Immunol* 53: 269-277, 2002.
- 11) Scott JR: Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 2000: CD000112 update, *Cochrane Database Syst Rev* 2003.

また、同種免疫異常に関しては現時点では検査、治療ともにEBMに乏しく研究段階にあるため、今回は触れていない。とくに夫リンパ球免疫療法に関しては、2001年にScottが世界中で施行された18の randomized control studyのメタアナリシスを行ったところ、その有用性は確認されなかったため、現時点では臨床に取り入れるのは時期尚早である<sup>11)</sup>。

特集 生殖医療の現状と問題

## 不育症の原因と治療

齋 藤 滋

別 刷

日本医師会雑誌

第137巻・第1号

平成20(2008)年4月

# 不育症の原因と治療

齋藤 滋\*

キーワード 流産・死産 抗リン脂質抗体 凝固因子異常 ヘパリン

## はじめに

流産は全妊娠の約15%に発生するが、3回以上繰り返し流産する場合を習慣流産と呼ぶ。不育症は、流産以外に死産や早産を繰り返し、生児が得られない症候群である。習慣流産の頻度は理論的には0.3~0.4%であるが、実際の頻度は1~2%であり、理論値を上回っているため、何らかの病因があって流産を繰り返していると考えられる。

Ogasawaraらによると、既往流産歴が2回、3回、4回と増加するにつれて、次回の流産率が43.7%、44.6%、61.9%と増加する<sup>1)</sup>。一方、流産胎児の染色体異常率は、流産回数が2回で59.0%、3回で55.3%、4回で38.9%、5回で38.9%、6回で28.6%と、流産回数が増すにつれて減少する。これらの臨床的事実は、既往流産回数が増すにつれ、胎児側要因(染色体異常)ではなく、母体もしくは父側に何らかの要因があり、流産・死産を繰り返すことを強く示唆する。

不育症の病因・病態は多彩であり、かつ頻度もさほど多くないため、日本国内での正確な不育症の頻度や、不育症と関連するリスク因子も不明であった。2005年に日本産科婦人科学会生殖・内分泌委員会が927組の不育症患者を集積し、そのリスク因子ならびに各種治療法の

生児獲得率を報告し<sup>2)</sup>、ようやく不育症に対するスクリーニング法、治療法が示されるようになった。

本稿では、現時点における不育症の原因(リスク因子)と、治療法につき概説する。

## 1. 不育症患者の検査異常頻度

日本産科婦人科学会生殖・内分泌委員会による927組のデータを表1に示す<sup>2)</sup>。これらの結果は、基本的に同委員会が示すスクリーニング法を行った結果であるが、残念ながらすすべての登録例が、すすべての検査法を施行しておらず、不十分な結果であることを付記しておく。夫婦いずれかの染色体異常率は7.7%(うち女性4.72%、男性3.4%、男女共0.3%)であり、均衡型転座は3.1%であった。染色体異常例の頻度は決してまれではないため、不育症のスクリーニングとして必須の検査項目であると考えられる。そのほか、子宮卵管造影法(HSG)により子宮形態異常が9.0%(弓状子宮が最も多く4.8%)、内分泌異常として甲状腺機能亢進が2.8%、機能低下が2.9%、糖尿病が1.2%を占めていた。

自己免疫異常である抗リン脂質抗体症候群は、血栓や流・死産歴があり、 $\beta_2$ GPI依存性抗カルジオリピン抗体、抗カルジオリピン抗体、ルーブスアンチコアグラント(LA)検査のいずれかが陽性であった場合に診断される。日本産科婦人科学会のデータでは不育症例のうち、この診断基準に当てはまる頻度は2~3%ときわめて

\*さいとう・しげる：富山大学大学院医学薬学研究部教授(産科婦人科)、昭和59年奈良県立医科大学大学院医学研究科修了。主研究領域/生殖免疫、不育症、早産、妊娠高血圧症候群、サイトカイン。



表1 日本における不育症の頻度

検査異常の種類		%
染色体異常	夫婦染色体異常	7.7
	夫婦染色体均衡型転座	3.1
子宮形態異常		9.0
内分泌異常	甲状腺機能亢進	2.8
	甲状腺機能低下	2.9
	糖尿病	1.2
自己免疫異常	抗リン脂質抗体	約19
	$\beta_2$ GPI 依存性抗カルジオリピン抗体	
	基準値 1.9	1.1
	基準値 3.5	1.0
	ループスアンチコアグラント (LA: dRVVT 法)	1.6
	キニノーゲン依存性抗 PE 抗体	16.8
凝固因子異常	第 XII 因子欠乏性 (< 50%)	28.3
原因不明 (同種免疫異常を含む)		約30

(齋藤 滋他: 日産婦会誌 2005; 57; 1057-1059 より引用)

表2 染色体異常を有する不育症症例のその後の妊娠予後

報告者	染色体異常	症例数	生産率* (のべ妊娠)%
Stephenson, et al (2006)	相互転座	28	62.9
	Robertson 転座	12	69.2
	逆位	7	100
Sugiura-Ogasawara, et al (2004)	相互転座	47	35.8
	Robertson 転座	11	63.6
Goddijn, et al (2004)	相互/Robertson 転座	25	73.2
Carp, et al (2004)	相互/Robertson 転座	44	43.2
	逆位	15	53.3

\*流産や死産をせず、新生児死亡もなかった症例の率

低率であった<sup>2)</sup>。抗リン脂質抗体症候群の診断基準には含まれないが、キニノーゲン依存性抗フォスファチジルエタノールアミン (PE) 抗体陽性率が 16.8% を占めていることは特筆すべきことである。両者を合計して 19.0% の症例で抗リン脂質抗体が陽性となっている。

凝固因子異常として凝固第 XII 因子欠乏が 28.3% に認められた。残りの約 30% が原因不明となるが、少数例で施行されていたプロテイン S 値の低下や NK 活性値の高値が<sup>5)</sup>、比較的頻度の高いリスク因子であったため、これらをスクリーニングで検査すると、原因不明はさらに低率になると予想される。特に日本人では民族

的にプロテイン S 欠乏が多く、不育症のスクリーニングに加えてもよい検査法と思われる。そのため現在、日本生殖免疫学会で進めている「日本人の不育症リスク因子とその予後について」の検討ではプロテイン S も必須の検査項目として加えている (詳細は日本生殖免疫学会ホームページ [http://jsir.umin.jp/JPN/j\\_top\\_frame.html](http://jsir.umin.jp/JPN/j_top_frame.html) 参照)。

また、NK 活性高値も母体免疫異常の一側面を示す所見であり、日本生殖免疫学会では選択検査項目に含めている。NK 活性が 42% 以上では、次回流産率が 70% を超えるとする報告がある<sup>3)</sup>。

## II. 病因別にみた不育症の治療

### 1. 染色体異常

不育症カップルにとって、染色体異常と診断されるほどつらいものはない。夫婦で検査を受ける前に十分な説明が必要であるとともに、結果を告知した後のカウンセリングに十分な時間をかけるべきである。

患者の多くは、染色体異常を絶望的に受け取ることが多いが、表2に示すごとく、不育症例で染色体異常と診断された後の妊娠での生児獲得率は、かなり高率である。欧米では、これら染色体異常をもつカップルに着床前診断(PGD)が行われ、本邦においても一部の施設で施行されているが、生児獲得率は自然妊娠における獲得率を決して超えるものではない。不育症カップルに対して、自然妊娠での生児獲得率を十分に説明し、次回妊娠での成功の希望がもてるように説明することが重要である。

### 2. 子宮形態異常

子宮卵管造影でスクリーニングを行い、異常を認めたと際、MRI等で確認することが多い。最も頻度が高い異常は弓状子宮、次いで中隔子宮である。これまでの諸家の報告では、子宮形成手術を施行後、70~80%の生児獲得率が得られており、子宮形態異常をもつ不育症例に対して手術療法を積極的に行う根拠となっていた。しかし、未治療の子宮形態異常例の妊娠継続率が70%とする報告もあり<sup>4,5)</sup>、必ずしもガイドラインで示されるような治療法は確立していない。

### 3. 内分泌異常

甲状腺機能異常や糖尿病が判明すれば、内科専門医を紹介し、精査のうえ、治療後に妊娠をするように指導する。また妊娠中も、内科医と連携を取りながら管理することが望ましい。

### 4. 抗リン脂質抗体症候群

過去に血栓症や妊娠10週未満の3回以上の流産、または1回以上の妊娠10週以降の流産

もしくは死産、妊娠34週未満の妊娠高血圧症候群、子癩、または胎盤機能不全による早産を認め、 $\beta_2$ GPI依存性抗カルジオリピン抗体、抗カルジオリピン抗体、もしくはLA検査が陽性であった場合、抗リン脂質抗体症候群と診断される。

興味あることに、300例以上の抗リン脂質抗体陽性不育症例で、過去の血栓症既往が1例しか認められなかったとする報告もあり<sup>6)</sup>、血栓症の既往のある不育症はむしろまれである。ただし、血栓症のない抗リン脂質抗体陽性の不育症例を8年間追跡した結果によると、アスピリン投与群では31例中2例のみが血栓症を発症したのに対し、アスピリン非投与群での血栓症の発症率は34例中19例と高率であった<sup>7)</sup>。この結果は、出産後も抗凝固療法を行ったほうが血栓症のリスクを軽減できる可能性を示唆する。現在、前方視的なスタディが行われており、その結果が待たれるところである。

抗リン脂質抗体陽性の不育症に対して、低用量アスピリン(low dose aspirin; LDA)の投与が行われてきたが、ヘパリンとLDAの併用のほうが流産予防率が高い<sup>8)</sup>。また、ステロイド投与群とヘパリン+LDA併用群では治療効果は同等であったが、ステロイド群では早産や前期破水例が増加したため<sup>9)</sup>、ヘパリン+LDA併用療法が基本的な治療法となっている。これまでヘパリンの作用機序は凝固抑制と考えられてきたが、ヘパリンには補体活性化を抑制する作用があり、そのため流産・死産を減少させることがマウスモデルで証明されている<sup>10)</sup>。

ワルファリンは抗凝固作用があるが、補体活性化を抑制する作用がなく、かつ胎盤通過性があり催奇性があるため、妊娠時には禁忌である。2006年のJAMA誌に掲載された抗リン脂質抗体の管理指針には、妊娠すれば妊娠6週までにワルファリンを中止し、直ちにヘパリンで管理すべきと述べられている(図1)<sup>4)</sup>。

抗PE抗体は、フォスファチジルエタノール

抗リン脂質抗体（抗カルジオリピン抗体,  $\beta_2$ GPI 依存性抗カルジオリピン抗体）陽性もしくは LA 陽性



図 1 抗リン脂質抗体陽性例の管理指針

(Lim W, et al : JAMA 2006 ; 295 : 1050 - 1057 より引用, 改変)

アミンに結合したキニノーゲンに対する自己抗体であり線溶系を抑制する<sup>11)</sup>。抗 PE 抗体陽性の不育症は抗リン脂質抗体症候群の診断基準には当てはまらないが、日本人の不育症のなかで抗 PE 抗体陽性率は 16.8% ときわめて高い (表 1)。抗 PE 抗体者に対する治療法は確立していないが、抗リン脂質抗体症候群に準じた治療法が行われている。しかし、抗 PE 抗体陽性例に対する低用量アスピリンやヘパリン療法の有用性については今後検証する必要がある。

## 5. 凝固因子異常

凝固第 XII 因子の欠乏もしくは活性低下 (通常、50% 以下を低下症とする) は、肺塞栓をはじめとする血栓症を起こすことが知られているが、不育症にも関連している<sup>12)</sup>。LA 陽性者に抗第 XII 因子抗体が検出されることも報告されている。日本産科婦人科学会での調査<sup>13)</sup>、ならびに NOHA Study<sup>14)</sup>でも第 XII 因子欠乏症が流産の危険因子として高頻度に報告されている。凝固第 XII 因子欠乏症の不育症に対して、LDA、LDA+ヘパリン療法とも良好な成績が報告されている<sup>12,14)</sup>。

プロテイン S 欠乏症は日本人では約 2% に認められるが、不育症例では高頻度で認められる。妊娠 10 週以降の流・死産の既往のあるプロテイン S 欠乏不育症例に LDA 療法を行った際の生児獲得率は 7% と低く、ヘパリン療法を行った際の生児獲得率が 79% との報告があるため<sup>15)</sup>、これらの症例に対しては積極的にヘパリン療法を行ったほうがよいと考えられている。

## 6. その他の要因

不育症の 20~40% に NK 活性が高値を示し、亢進した細胞性免疫により胎児が攻撃されている可能性がある。Aoki らは連続 2 回流産した反復流産例の非妊時に末梢血 NK 活性を測定し、NK 活性高値例では 71% が次回妊娠で流産に終わったのに対し、NK 活性正常例での流産率は 20% にとどまることを示した<sup>16)</sup>。

夫リンパ球免疫療法により NK 活性が低下することは報告されているが<sup>16)</sup>、NK 活性高値の不育症を対象とした夫リンパ球免疫療法の有用性についてはいまだ検討されていない。現在のところ Cochrane データベースでは、原因不明の不育症に対するリンパ球免疫療法の有効性は

認められないとしている<sup>17)</sup>。しかし、日本産科婦人科学会生殖・内分泌委員会のデータでは、生産歴がなく、NK活性を除くすべてのスクリーニング検査が陰性であった症例に、夫リンパ球免疫療法を行った場合、80.9%に生児が得られており、症例を的確に選択すれば、夫リンパ球免疫療法は有効である可能性がある<sup>2)</sup>。

夫リンパ球免疫療法は輸血であるので、感染症のスクリーニングを施行し、輸血の同意書を得たうえで、リンパ球に放射線照射を行い、患者の十分なインフォームドコンセントを得て施行することが望ましい。

## おわりに

これまで日本における不育症の病因や治療法は明らかでなかったが、ようやくその実態がみえてきた。系統的なスクリーニングを行い、不育症専門医による各病因ごとの的確な治療を行うことで、多くの不育症カップルが生児を得ることを切望する。

### ..... 文 献 .....

- 1) Ogasawara M, Aoki K, Okada S, *et al*: Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril* 2000; 73: 300-304.
- 2) 齋藤 滋, 石原 理, 久保春海他: ヒト生殖のロス(習慣流産等)に対する臨床実態の調査小委員会(生殖・内分泌委員会)(平成15年度専門委員会報告). *日産婦会誌* 2005; 57: 1057-1059.
- 3) Aoki K, Kajira S, Matsumoto Y, *et al*: Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995; 345: 1340-1342.
- 4) Kirk EP, Chuong CJ, Coulam CB, *et al*: Pregnancy after metroplasty for uterine anomalies. *Fertil Steril* 1993; 59: 1164-1168.
- 5) Heinonen PK: Reproductive performance of women with uterine anomalies after abdominal or hysteroscopic metroplasty or no surgical treatment. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1997; 4: 311-317.
- 6) Branch WD, Eller AG: Antiphospholipid syndrome and thrombosis. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49: 861-874.
- 7) Erkan D, Merrill JT, Yazici Y, *et al*: High thrombosis rate after fetal loss in antiphospholipid syndrome: effective prophylaxis with aspirin. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1466-1467.
- 8) Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW: Management of antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. *JAMA* 2006; 295: 1050-1057.
- 9) Cowchock PS, Reece EA, Balaban D, *et al*: Repeated fetal losses associated with antiphospholipid antibodies: a collaborative randomized trial comparing prednisone with low-dose heparin treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1318-1323.
- 10) Girardi G, Redecha P, Salmom JE: Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med* 2004; 10: 1222-1226.
- 11) Sugi T, Katsunuma J, Izumi S, *et al*: Prevalence and heterogeneity of antiphosphatidylethanolamine antibodies in patients with recurrent early pregnancy losses. *Fertil Steril* 1999; 71: 1060-1065.
- 12) Ogasawara MS, Iinuma Y, Aoki K, *et al*: Low-dose aspirin is effective for treatment of recurrent miscarriage in patients with decreased coagulation factor XII. *Fertil Steril* 2001; 76: 203-204.
- 13) Gris JC, Ripard-Neveu S, Maugard C, *et al*: Respective evaluation of the prevalence of haemostasis abnormalities in unexplained primary early recurrent miscarriages. The Nimes Obstetricians and Haematologists (NOHA) Study. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1096-1103.
- 14) 杉 俊隆, 牧野恒久: わが教室における不育症対策. *産婦治療* 2005; 91: 199-204.
- 15) Gris JC, Mercier E, Ouéré I, *et al*: Low-molecular-weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder. *Blood* 2004; 103: 3695-3699.
- 16) Gafer U, Sredni B, Segal J, *et al*: Suppressed cell-mediated immunity and monocyte and natural killer cell activity following allogeneic immunization of women with spontaneous recurrent abortion. *J Clin Immunol* 1997; 17: 408-419.
- 17) Scott JR: Immunotherapy for recurrent miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (1): CD000112.