

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>Sugi T</u>	Autoantibody associated disruption of kallikrein-kinin system in patients with recurrent pregnancy losses.	Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol	18	67-76	2009
<u>杉 俊隆</u>	不育症と自己免疫性 thrombophilia (抗リン脂質抗体、抗第XII因子抗体、抗キニノーゲン抗体)	血栓止血誌	20	510-518	2009
<u>杉 俊隆</u>	抗 phosphatidylethanolamine抗体と抗第XII因子抗体	医学のあゆみ		in press	
<u>杉 俊隆</u>	習慣流産と血液凝固阻害薬	産科と婦人科		in press	

## 分担研究報告 26

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：不育症に係わる遺伝要因、環境要因及びそれらの交互作用

研究分担者 佐田 文宏 国立保健医療科学院疫学部 社会疫学室長  
山田 秀人 神戸大学大学院医学研究科産科婦人科学講座 教授

研究要旨

原因不明の不育症は、一種の生活習慣病とみなされ、遺伝要因に環境要因が加わり、交互に影響し合うことにより発症するものと考えられている。環境要因を評価しようとする場合、交絡要因をコントロールするのが難しく、正確な曝露量を評価したデータを取ることが困難であるため、一致した結果は得られていない。しかしながら、喫煙、コカイン服用、中等度の飲酒、カフェイン摂取、肥満は不育症と関連があるという報告がある。本研究では、妊婦の生活習慣、居住環境、ストレス要因等の環境要因及び異物・ステロイド代謝等のこれまでに妊娠アウトカムに影響を及ぼすと報告のある遺伝子多型と不育症との関連を症例対照研究の形で検討した。2001～2006年に北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性（n=204）と産後外来を受診し、流産、子宮内膜症、子宮腺筋症、子宮内発育遅延等の既往のない健常経産婦（n=383）に対し、生活習慣、居住環境、ストレス等に関する質問紙調査を実施し、産科異常と関連があると報告のある5種類の一塩基多型（SNPs）、即ち *CYP1A1* 遺伝子 rs4646903 (3698T>C)、*GSTP1* 遺伝子 rs1695 (I105V)、*COMT* 遺伝子 rs4680 (V158M)、*NQO1* 遺伝子 rs1800566 (P187S)及び *PAPPA* 遺伝子 rs7020782 (Y1224S)を allelic discrimination (TaqMan) assay により、遺伝子型を解析した。喫煙・飲酒習慣を考慮しない場合には、*CYP1A1* 遺伝子 rs4646903 の CC 型において、不育症のリスクが約 2.8 倍上昇し、*COMT* 遺伝子 rs4680 の AA 型において、不育症リスクは、約 0.4 倍に低下した。喫煙習慣を考慮すると、*CYP1A1* 遺伝子 rs4646903 において、非喫煙群の TT 型に比べ、不育症のリスクが、喫煙群の CC 型では、約 6.1 倍上昇した。本研究により、不育症においても、遺伝子-環境相互作用により疾患リスクが上昇することが示唆された。

A. 研究目的

不育症の病因としては、転座や子宮形態異常のような原因の明白なものを除けば、一種の生活習慣病とみなされ、遺伝要因に環境要因が加わり、交互に影響し合うことにより発症するものと考えられている。環境要因としては、食事・生活習慣、居住環境およびストレス要因などが不育症のリスクに関与することに関心が持たれている。このような環境要因を評価しようとする場合、交絡要因をコントロールするのが難しく、正確な曝露量を評価したデータを取ることが困難であるため、一致した結果は得られていない(1)。しかしながら、いくつかの環境要因が妊娠アウトカムに影響を与えることは報告されてきた(1-6)。喫煙は、栄養膜機能に悪影響を及ぼし、量依存的に不育症のリスクを上昇させる(2)。コカイン服用は喫煙とともに、不育症のリスクを上昇させる(3)。中等度

の飲酒は、妊娠初期の不育症のリスクを上昇させる(4)。カフェイン摂取も量依存的に不育症リスクとの関連が見られ、1日当たり300mg以上の摂取で不育症リスクを有意に上昇させる(5)。BMI 30kg/m<sup>2</sup>を超える肥満は、妊娠初期の流産、不育症のリスクを上昇させる(6)。本研究では、生活習慣、居住環境およびストレス要因等の環境要因及び異物・ステロイド代謝等のこれまでに妊娠アウトカムに影響を及ぼすと報告のある遺伝子多型が、不育症に及ぼす影響や相互作用を明らかにすることを目的に実施した。

B. 研究方法

2001～2006年に北海道大学病院産科の不育症外来を受診した女性（n=204）と産後外来を受診し、流産、子宮内膜症、子宮腺筋症、子宮内発育遅延等の既往のない健常経産婦（n=383）に対し、食事・

生活習慣、居住環境、職業、妊娠初期の健康状態、産科既往歴、ストレスと関連した状態-特性不安 (STAI) に関する質問紙調査を実施し、採血を行った。ストレスに対する不安を示す状態尺度 (A-State) の得点、比較的安定した個人内特性を示す特性尺度 (A-Trait) の得点を算出し、症例群と対照群の平均値、標準偏差を求めた。居住環境に関しては、設問毎に症例群、対照群の割合を求めた。症例 - 対照群間の平均値の差を対応のない t 検定により、比率を  $\chi^2$  検定により解析した。また、産科異常と関連があると報告のある 5 種類の一塩基多型 (SNPs)、即ち *CYP1A1* 遺伝子 rs4646903 (3698T>C)、*GSTP1* 遺伝子 rs1695 (I105V)、*COMT* 遺伝子 rs4680 (V158M)、*NQO1* 遺伝子 rs1800566 (P187S) 及び *PAPPA* 遺伝子 rs7020782 (Y1224S) を allelic discrimination (TaqMan) assay により、遺伝子型を解析した。不育症をアウトカムとして、母親の年齢で調整したロジスティック回帰分析により、オッズ比と 95%信頼区間を求めた。統計解析には SPSS 17.0 を用いた。

#### (倫理面への配慮)

本研究は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会において承認のうえ実施した。インフォームドコンセントは「疫学研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。以上のように、本研究は、倫理面の十分な配慮のうえ行った。

### C. 研究結果

症例群の A-State の平均得点 (SD) は、39.4 (10.1)、対照群の平均得点 (SD) は、38.5 (9.5)、症例群の A-Trait の平均得点 (SD) は、42.9 (9.6)、対照群の平均得点 (SD) は、41.9 (9.8) であり、いずれも症例群が若干高値を示したが、統計学的には有意ではなかった (図 1)。喫煙・飲酒の生活習慣や居住環境との相互作用もみられなかった。

居住環境に関しては、(1) 現在の居住地、(2) 住宅の階数、(3) 廃棄物 (ごみ) 処理施設からの距離、(4) 製紙工場からの距離及び (5) 幹線道路 (片道 2 車線以上) からの距離に関して、症例群と対照群の頻度差を比較したが、いずれも有意ではなかった (図 2)。

喫煙・飲酒習慣を考慮しない場合には、各 SNP

における遺伝子型のオッズ比を図 3 に示す。*CYP1A1* 遺伝子 rs4646903 の CC 型において、不育症のリスクが約 2.8 倍上昇し (95%信頼区間 1.5-5.4)、*PAPPA* 遺伝子 rs7020782 の CC 型で軽度上昇傾向が認められた (オッズ比 1.7、95%信頼区間 0.6-4.4)。一方、*COMT* 遺伝子 rs4680 の AA 型において、不育症リスクは、約 0.4 倍に低下した (95%信頼区間 0.1-1.0)。喫煙・飲酒習慣を考慮すると、*CYP1A1* 遺伝子 rs4646903 において、非喫煙群の TT 型に比べ、不育症のリスクが、非喫煙群の CC 型では、約 2.4 倍 (95%信頼区間 1.1-5.2)、さらに喫煙群の CC 型では、約 6.1 倍 (95%信頼区間 1.3-28.6) 上昇した (図 4)。一方、非飲酒群の TT 型に比べ、不育症のリスクが、非飲酒群の CC 型では、約 2.9 倍 (95%信頼区間 1.2-6.7)、飲酒群の CC 型では、約 2.4 倍 (95%信頼区間 0.7-3.7) 上昇したが、後者は有意ではなかった (図 5)。他の SNP においては、喫煙・飲酒習慣を考慮しても、有意なリスクの変化は認められなかった。

### D. 考察

流産は、不安、抑うつ、否認、怒り、夫婦関係の崩壊、喪失感、不十分などの顕著な情緒的な反応を引き起こし得る (1)。様々な心理社会要因が免疫系に影響を及ぼし、いわゆる“精神-神経-免疫-内分泌ネットワーク”が流産に関与することが提唱されている (7,8)。また、不育症例において、抑うつ状態が流産を引き起こし得る要因の一つであることが示唆されている (9)。このような見地から、本研究では、状態-特性不安 (STAI) を用い、不育症例群と対照群との間のストレスに対する不安を示す状態尺度 (A-State)、比較的安定した個人内特性を示す特性尺度 (A-Trait) を比較したが、有意差は認められず、喫煙・飲酒習慣、居住環境及び各遺伝子型との相互作用も認められなかった。

一方、異物・ステロイド代謝等のこれまでに妊娠アウトカムに影響を及ぼすと報告のある遺伝子多型のうち、*CYP1A1* 遺伝子 rs4646903 において、不育症のリスクの上昇が認められ、喫煙により増強することが観察された。*CYP1A1* 遺伝子 rs4646903 の変異アリルは、肺がん等の悪性腫瘍のリスクを高めることが知られており (10)、不育症や低出生体重等の妊娠アウトカムに影響を及ぼすことが知られている (11-14)。また、喫煙との相互作用により、疾患リスクが増強することが報告されている (11,14)。*CYP1A1* の活性の高い変異ア

リルによって、煙草煙に含まれる化学物質から不安定な代謝産物への産生が増加し、細胞内で毒性が増すことが原因と考えられている。本研究において、不育症においても、このような機序により疾患リスクが上昇することが示唆された。

#### E. 結論

本研究では、*CYP1A1* 遺伝子 rs4646903 の CC 型において、不育症のリスクが約 2.8 倍上昇し、喫煙が加わると約 6.1 倍にも上昇した。不育症においても、遺伝子 - 環境相互作用により疾患リスクが上昇することが示唆された。

#### [参考文献]

1. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet*. 2006 Aug 12;368(9535):601-11. Review.
2. Lindbohm ML, Sallmén M, Taskinen H. Effects of exposure to environmental tobacco smoke on reproductive health. *Scand J Work Environ Health*. 2002;28 Suppl 2:84-96.
3. Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N, Markovic N, Shaw LM, Day NL, Kline J. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 1999 Feb 4;340(5):333-9.
4. Kesmodel U, Wisborg K, Olsen SF, Henriksen TB, Secher NJ. Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol*. 2002 Jan-Feb;37(1):87-92.
5. Rasch V. Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003 Feb;82(2):182-8.
6. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Hum Reprod*. 2004 Jul;19(7):1644-6.
7. Kaplan HB. Social psychology of the immune system: a conceptual framework and review of the literature. *Soc Sci Med*. 1991;33(8):909-23.
8. Clark DA, Arck PC, Jalali R, Merali FS, Manuel J, Chaouat G, Underwood JL, Mowbray JF. Psycho-neuro-cytokine/endocrine pathways in immunoregulation during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1996 Apr;35(4):330-7.
9. Sugiura-Ogasawara M, Furukawa TA, Nakano Y, Hori S, Aoki K, Kitamura T. Depression as a potential causal factor in subsequent miscarriage in recurrent spontaneous aborters. *Hum Reprod*. 2002 Oct;17(10):2580-4.
10. Kawajiri K. *CYP1A1*. *IARC Sci Publ*. 1999;(148):159-72.
11. Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H, Xu X. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA*. 2002 Jan 9;287(2):195-202.
12. Suryanarayana V, Deenadayal M, Singh L. Association of *CYP1A1* gene polymorphism with recurrent pregnancy loss in the South Indian population. *Hum Reprod*. 2004 Nov;19(11):2648-52.
13. Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H. Genetic factors in fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost*. 2005 Jun;31(3):334-45.
14. Sasaki S, Kondo T, Sata F, Saijo Y, Katoh S, Nakajima S, Ishizuka M, Fujita S, Kishi R. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, *CYP1A1* and *GSTM1* affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod*. 2006 Feb;12(2):77-83.

F. 健康危険情報  
特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし (準備中)
  2. 学会発表
1. Sata F, Yamada H, Nakao H, Minakami H, Kishi R, Imai H. Lifestyle, physical burden and anxiety in pregnant women and recurrent pregnancy loss. 21<sup>st</sup> International Conference of Environmental Epidemiology, Dublin, Ireland, August 25-29, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

図1 STAI(状態-特性不安検査)

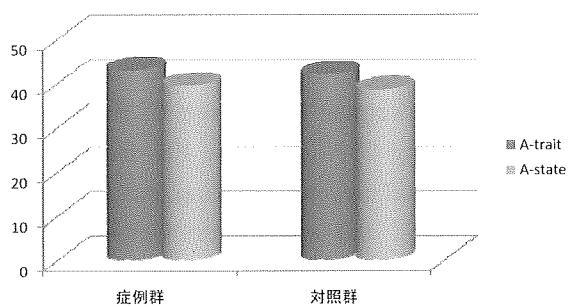
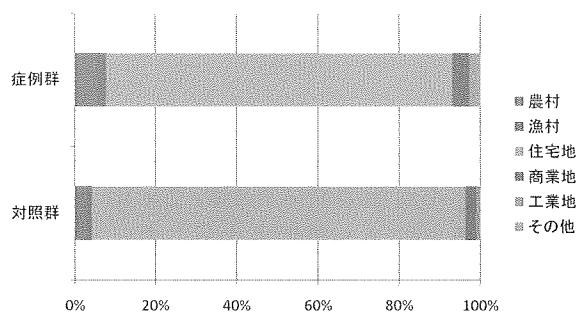
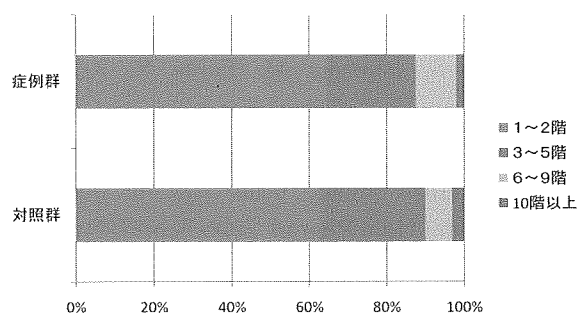


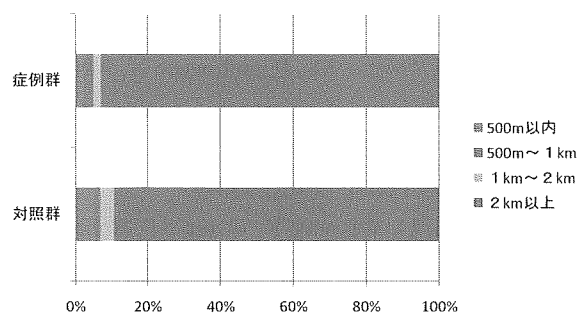
図2 居住環境 (1) 現在の居住地



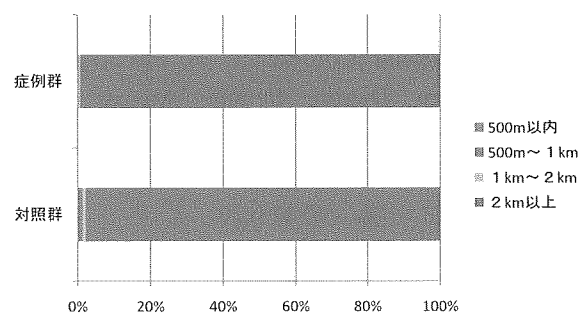
(2) 住宅の階数



(3) 廃棄物(ごみ)処理施設からの距離



(4) 製紙工場からの距離



(5) 幹線道路(片道2車線以上)からの距離

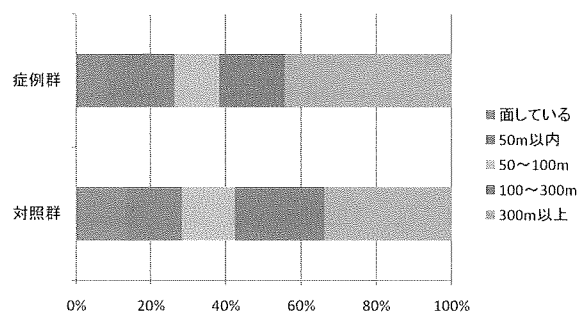


図3 各SNPにおける不育症リスク

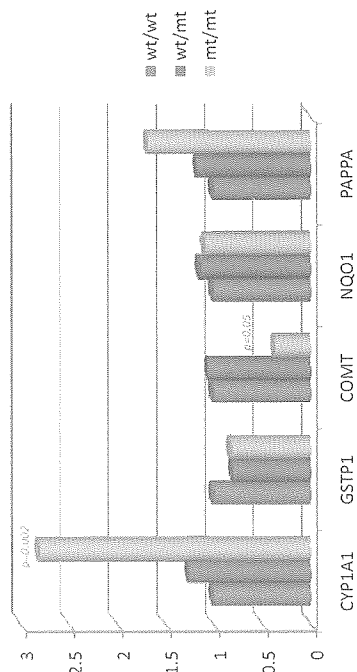


図4 CYP1A1 rs4646903における喫煙習慣と不育症リスク

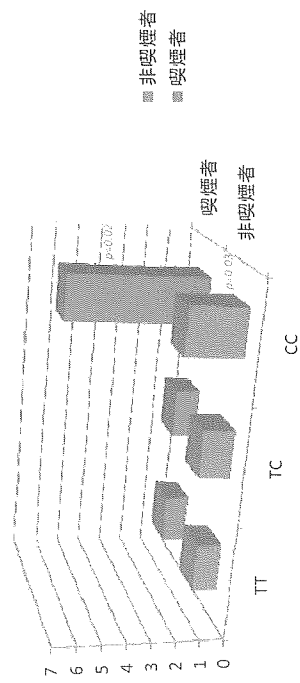
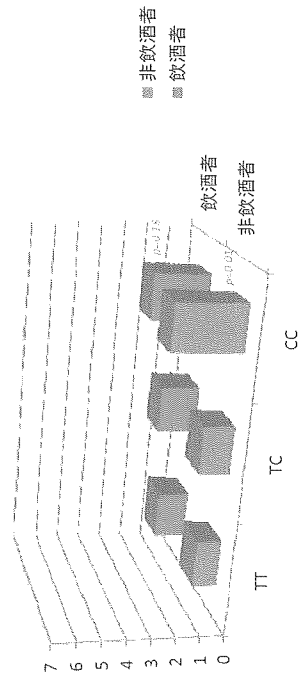


図5 CYP1A1 rs4646903における飲酒習慣と不育症リスク



## 分担研究報告 27



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：不育症患者の血栓性素因の遺伝学的解析、流産とミトコンドリア

研究分担者 康 東天 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野教授

研究要旨

不育症例でプロテイン S、プロテイン C、第 XII 因子の遺伝子解析を行い、プロテイン C で未報告の遺伝子変異を見出した。今後遺伝子解析症例を増やして行き、遺伝子異常の頻度を明らかにする。

p32 のノックアウトマウスより樹立した MEF 細胞の解析から、p32 が“ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロン”という、今までに報告の無い新しい機能を持つ蛋白質である可能性が示唆された。p32 のノックアウトマウスが胎児の成長におけるミトコンドリアでのエネルギー代謝の重要性を明らかにするための新しいマウスモデルになる可能性を示している。

A. 研究目的

本邦における不育症の実態は不明であり、かつ不育症例に対するスクリーニング法や治療法の確立には至っていない。これらを明らかにするため、不育症のリスク因子の検索と評価を行う必要がある。リスク因子の1つとして、血液凝固異常の関与が強く示唆されている。本研究では、不育症における血液凝固異常の関与のなかでも、プロテイン S、プロテイン C、凝固因子 XII の（1）遺伝子変異と（2）活性の観点から明らかにすることで、EBM に基づいた不育症の診断、検査、および治療に関する指針の確立に寄与することを目的としている。また、胎児の成長におけるミトコンドリアでのエネルギー代謝の重要性を明らかにするためのマウスモデルの作製とその機能解析を行う。

B. 研究方法

（1）遺伝子変異解析

XII 因子、Protein C、Protein S 活性検査は一次スクリーニングとして各施設で全て行ない、低下症例について Protein C、Protein S は全エクソンの遺伝子配列決定を行ない、XII 因子については活性に大きな影響を与える第 46 塩基の多型を調べる。

（2）p32 ノックアウトマウスの作製と解析

p32 蛋白質は従来 RNA スプライシング因子の1つとして、核で作用すると考えられていた因子であるが、分担研究者の康のグループがそのほとん

どがミトコンドリアマトリックスに存在し、酸化的リン酸化による ATP 合成に重要な役割を果たしていると報告したものである。p32 のノックアウトマウスは胎児発育におけるミトコンドリア機能不全の良いモデルになると考えられる。

p32 の全身ノックアウトマウスを作製し、その胎児からマウス胎児線維芽細胞（MEF）細胞を樹立。そのミトコンドリア電子伝達系機能を測定。

（倫理面への配慮）

研究方法、試料提供協力者に対する説明同意等、九州大学を含む各大学倫理委員会で承認された計画のもとで行われている。

C. 研究結果

（1）遺伝子変異解析

今年度は4例の解析を行った。

（2）p32 ノックアウトマウスの作製と解析

p32 ノックアウトマウスは胎生 10.5 日で致死であった。そこで胎児より MEF 細胞を樹立した。樹立した細胞の細胞増殖は野生型に比べ、きわめて不良であった（図 1）。細胞増殖は p32 cDNA の導入により回復したことから、p32 遺伝子の欠損が原因と考えられる。

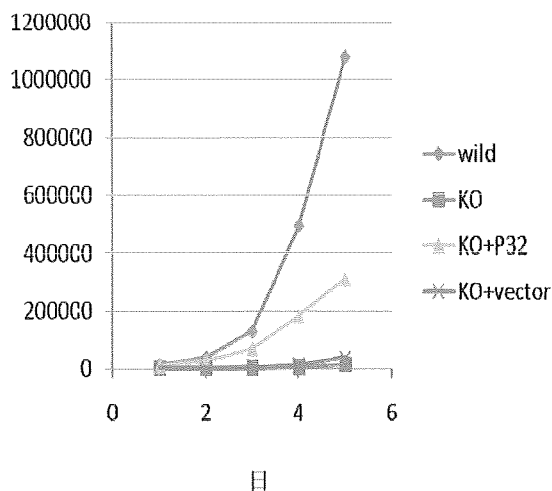


図1 細胞増殖

細胞増殖能の低下がミトコンドリア電子伝達系機能の低下によるかを調べるため、ミトコンドリア電子伝達系の各複合体の活性を測定した（図2）。複合体 I, III, IV の活性低下が認められた。

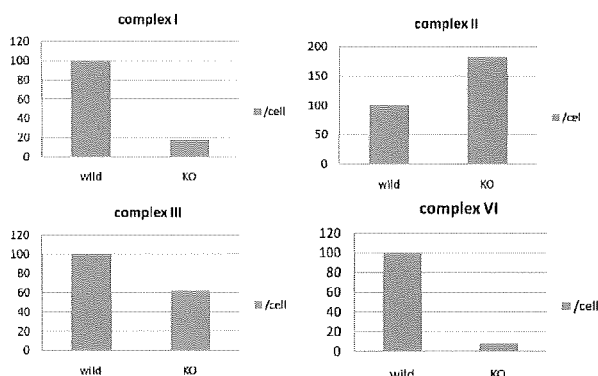


図2 電子伝達系複合体活性

#### D. 考察

今年度は4例の不育症の血液凝固系因子の遺伝子検査を実施した。今後も遺伝子検査症例を増やしていくことで、プロテイン S、プロテイン C、第 XII 因子の遺伝子異常の不育症での役割がより明らかになっていくであろう。

p32 のノックアウトマウスから樹立した MEF 細胞ではミトコンドリア DNA にコードされた蛋白質を含む複合体のみで、活性低下が見られた。ミトコンドリア DNA 量やミトコンドリア DNA 由来の mRNA 量に変化が無いことから、p32 は、ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロンであることが示唆される。ミトコンドリア内で翻訳された蛋白質も正しくフォールディング

するためには、シャペロン蛋白質が当然必要であるが、これまで、ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロンの存在は報告されておらず、ミトコンドリア機能異常症における新しい疾患概念の提唱につながる可能性があると期待している。今後ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロンであることをさらに明確にするために、MEF 細胞を使い、ミトコンドリアでの翻訳レベル、ミトコンドリア DNA コード蛋白質の半減期、電子伝達系複合体の高次構造状態を明らかにしていく必要がある。

#### E. 結論

不育症例でプロテイン S、プロテイン C、第 XII 因子の遺伝子解析を行い、プロテイン C で未報告の遺伝子変異を見出した。今後も、遺伝子解析症例を増やして行き、遺伝子異常の頻度を明らかにする。

p32 のノックアウトマウスより樹立した MEF 細胞の解析から、p32 が“ミトコンドリア内で翻訳される蛋白質に特異的なシャペロン”という、今までに報告の無い新しい機能を持つ蛋白質である可能性が示唆された。p32 のノックアウトマウスが胎児の成長におけるミトコンドリアでのエネルギー代謝の重要性を明らかにするための新しいマウスモデルになる可能性を示している。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) M. Sumitani, K. Kasashima, E. Ohta, D. Kang and H. Endo, Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids, J Biochem, (2009).
- 2) J.L. Pohjoismaki, S. Goffart, H. Tyynismaa, S. Willcox, T. Ide, D. Kang, A. Suomalainen, P.J. Karhunen, J.D. Griffith, I.J. Holt and H.T. Jacobs, Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks, J Biol Chem 284, (2009), pp. 21446-57.

- 3) M. Ono, Y. Aoki, M. Masumoto, T. Hotta, Y. Uchida, Y. Kayamori and D. Kang, High-dose penicillin G-treatment causes underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method, *Clin. Chim. Acta* 407, (2009), pp. 75-76.
- 4) M. Ishimura, M. Saito, S. Ohga, T. Hoshina, H. Baba, M. Urata, R. Kira, H. Takada, K. Kusuhara, D. Kang and T. Hara, Fulminant sepsis/meningitis due to *Haemophilus influenzae* in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy, *Eur J Pediatr* 168, (2009), pp. 673-7.
- 5) E. Hokazono, S. Osawa, T. Nakano, Y. Kawamoto, Y. Oguchi, T. Hotta, Y. Kayamori, D. Kang, Y. Cho, K. Shiba and K. Sato, Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-III, *Ann Clin Biochem* 46, (2009), pp. 296-301.
- 6) A. Fukuoh, K. Ohgaki, H. Hatae, I. Kuraoka, Y. Aoki, T. Uchiumi, H. T. Jacobs and D. Kang, DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase, *Genes Cells* 14, (2009), pp. 1029-42.
- 7) T. Kanki, D. Kang and D. J. Klionsky, Monitoring mitophagy in yeast; The Om45-GFP processing assay, *Autophagy* 5, (2009), pp. 1-4.
- 8) A. Fukuoh and D. Kang, Methods for Assessing Binding of Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) to DNA, *Methods Mol Biol* 554, (2009), pp. 87-101.
- 9) T. Yamaguchi, T. Fujii, Y. Abe, T. Hirai, D. Kang, K. Namba, N. Hamasaki and K. Mitsuoka, Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals, *J. Struct. Biol.* In press
- 10) T. Yamaguchi, Y. Ikeda, Y. Abe, H. Kuma, D. Kang, N. Hamasaki, T. Hirai, Structure of membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography, *J. Mol. Biol.* In press
2. 学会発表
- 1) Mitochondria: genome, ROS, and cellular functions Dongchon Kang (Invited speaker) SFRR (Society of Free Radical Research) International Free Radical School in Japan 2-6 September 2009 (Yuzawa, Niigata)
- 2) ミトコンドリア病とミトコンドリアDNA. 康 東天 (招待教育講演) 第49回日本臨床化学学会年次学術集会 (長崎) 2009年9月18日-20日
- 3) Importance of Mitochondrial Genome in Cellular Functions Dongchon Kang (Invited speaker, Symposium: Mitochondrial Dysfunction: Cell Life and Death Decisions) The 21st Annual Meeting of the Korean Society of Molecular and Cellular Biology (KSMCB) 15-16 October, 2009 (Seoul, Korea)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
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
M. Sumitani, K. Kasashima, E. Ohta, D. Kang, H. Endo,	Association of a novel mitochondrial protein M19 with mitochondrial nucleoids,	J Biochem,	146(5)	725-732	2009
J. L. Pohjoismaki, S. Goffart, H. Tynnismaa, S. Willcox, T. Ide, D. Kang, A. Suomalainen, P. J. Karhunen, J. D. Griffith, I. J. Holt, H. T. Jacobs	Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks,	J Biol Chem	284	21446-21457	2009
M. Ono, Y. Aoki, M. Masumoto, T. Hotta, Y. Uchida, Y. Kayamori, D. Kang,	High-dose penicillin G-treatment causes underestimation of serum albumin measured by a modified BCP method,	Clin. Chim. Acta	407	75-76	2009
M. Ishimura, M. Saito, S. Ohga, T. Hoshina, H. Baba, M. Urata, R. Kira, H. Takada, K. Kusuhara, D. Kang, T. Hara,	Fulminant sepsis/meningitis due to Haemophilus influenzae in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy,	Eur J Pediatr	168	673-677	2009

E. Hokazono, S. Osawa, T. Nakano, Y. Kawamoto, Y. Oguchi, T. Hotta, Y. Kayamori, D. Kang, Y. Cho, K. Shiba, K. Sato,	Development of a new measurement method for serum calcium with chlorophosphonazo-II I,	Ann Clin Biochem	46	296-301	2009
A. Fukuoh, K. Ohgaki, H. Hatae, I. Kuraoka, Y. Aoki, T. Uchiumi, H.T. Jacobs, D. Kang,	DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase,	Genes Cells	14	1029-1042	2009
T. Kanki, D. Kang, D.J. Klionsky,	Monitoring mitophagy in yeast; The Om45-GFP processing assay,	Autophagy	5	1-4	2009
A. Fukuoh D. Kang,	Methods for Assessing Binding of Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) to DNA,	Methods Mol Biol	554	87-101	2009
T. Yamaguchi, T. Fujii, Y. Abe, T. Hirai, D. Kang, K. Namba, N. Hamasaki, K. Mitsuoka,	Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals,	J. Struct.			in press
T. Yamaguchi, Y. Ikeda, Y. Abe, H. Kuma, D. Kang, N. Hamasaki, T. Hirai,	Structure of membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography,	J. Mol. Biol.			in press

## 分担研究報告 28

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：感染と不育

研究分担者 早川 智 日本大学病態病理学系微生物学分野教授

研究要旨

正常妊娠では局所あるいは全身の免疫応答が Th2 にシフトする。Th1 サイトカインは直接に、あるいは免疫細胞を介して間接的に胎児胎盤を傷害するが、着床や絨毛浸潤の調節など生理的な意義もある。本研究では、Th1 優位の免疫環境がグラム陰性桿菌細胞壁の主要成分である LPS に対する局所の自然免疫応答にどのような影響を及ぼすかを検討した

A. 研究目的

妊娠の成立と維持には Thelper(Th)2 優位の免疫環境が重要であり、母体と胎児の接点にある脱落膜リンパ球が Th2 型の応答をすることが大きな役割を果たしている。逆に Th1 型の免疫応答は、母体の細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞を活性化し局所的には、胎児胎盤を傷害して、切迫流早産や胎児発育遅延の原因となり全身的には妊娠高血圧症候群や HELLP 症候群といった生命に関わる異常妊娠の原因になる。さらに両者の関係に、もうひとつ重要な因子として細菌やウイルス感染が影響する可能性がある。病原体認識機構の一つである Toll 様受容体 (Toll like receptor : TLR) は自然免疫応答の主役で、病原体の特異的な構成成分を認識して自然免疫応答の活性化を誘導する。ヒトでは 11 種類が報告されており、そのうち、グラム陰性菌の細胞壁の構成成分であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide : LPS) を認識するのが TLR4 である。本研究ではグラム陰性菌の内毒素である LPS が、TLR4 を介して脱落膜リンパ球を活性化する過程に、Th1 誘導サイトカインがどのように作用するのか検討することを目的とした。

B. 研究方法

妊娠初期に社会経済的理由にて人工妊娠中絶を受けた妊婦より、脱落膜組織を採取した。脱落

膜組織を細切し、メッシュを通した後、比重遠心法にて脱落膜単核球(Decidual mononuclear cells : DMNC)を分離した。DMNC に IL-2、IL-12、および LPS を添加して 48 時間培養し、その上清中の IFN- $\gamma$ および TNF- $\alpha$ を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。また、フローサイトメトリーで T 細胞マーカーの CD3、粘膜型 NK 細胞マーカー CD56、TLR4、IL-2 レセプターである CD25、IL-12 レセプターである CD212 の発現、および培養後の TLR4、CD25、CD212 の発現を解析した。DMNC における TLR4 の発現を RNA レベルで確認するために reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。測定値は平均値±標準偏差で示した。各データの解析は Mann Whitney 検定にて行い、危険率 5% で有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

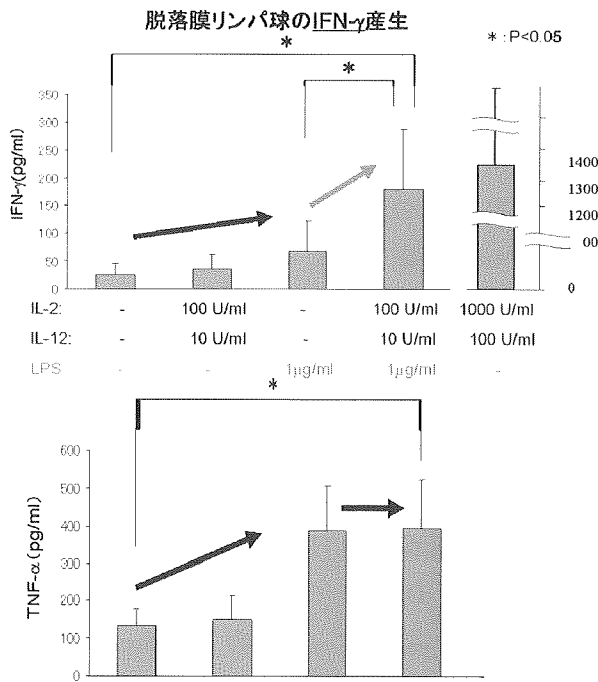
すべての実験は獨協医科大学および日本大学医学部の倫理委員会の承認を得て行った。事前に本人・パートナーより文書による承諾を得た。検体を採取する医師と、研究者は別の組織に所属し、研究目的で妊娠中絶の適応を広げることがないように予め固い意志で中絶を希望する患者のみを対象とした。

C. 研究結果

1. 脱落膜リンパ球は 非刺激時には、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  とも産生を認めなかった。
2. LPS 単独刺激により、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  とも

産生が誘導された。

3. IL-2 + IL-12 の存在下では LPS 刺激による IFN- $\gamma$  産生は増強された。
4. LPS 刺激による TNF- $\alpha$  産生は IL-2 + IL-12 による増強を受けなかった。
5. IL-2+ IL-12 は CD56 陽性細胞の CD69 発現を増強したが、TLR 4 自体の発現は顕著な変化はなかった
6. 粘膜型 NK 細胞株でも同様の結果を得た。



#### D. 考察

IL-2、IL-12 のみでは誘導されない IFN- $\gamma$  の産生が LPS の存在下で著しく増強したことより、Th1 優位の免疫環境では、LPS に対する感受性が高ま

ることが示唆された。このことは、グラム陰性菌によって引き起こされる尿路感染症や子宮内感染症が、妊娠異常を引き起こすというデータに一致する。また、妊娠維持のために母体、胎児の次に重要な因子が LPS であるとする最近の報告を支持するものである。IL-2、IL-12 が DMNC の LPS 感受性を亢進する機序として、TLR4 シグナルが CD25、CD212 の発現を亢進させ Th1 サイトカインの感受性を亢進する可能性が示唆された。TNF- $\alpha$  の産生が IL-2、IL-12 の存在に影響されないことは、進化の上でその起源が NK 細胞や NKT 細胞特異的な IFN- $\gamma$  よりも古く別のコントロールを受けている可能性が示唆される。感染に伴う異常妊娠の予防には、それを引き起こす IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  の産生を抑えることよりも、抗菌薬の適正投与により子宮胎盤にまで到達する LPS の量を減らす事が重要であると考えられた。

(一行分あける)

#### E. 結論

LPS が DMNC の IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  の産生を誘導することを明らかにした。しかし、IFN- $\gamma$  の産生は IL-2、IL-12 に依存しているが、TNF- $\alpha$  の産生は IL-2、IL-12 の影響を受けないという異なった病態が存在することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Negishi M et al. Lipo polysaccharide (LPS) induced Interferon (IFN)- $\gamma$  production by decidual mononuclear cells is Interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent. submitted

##### 2. 学会発表

根岸正実, 泉泰之, 大島教子, 稲葉憲之, 早川智 Th1 サイトカインはヒト脱落膜リンパ球の LPS 感受性を亢進する 第 37 回日本臨床免疫学会 11 月 14 日 東京



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
Trinh QD, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Shibata T, Shimotai Y, Kuroda K, Mizuguchi M, Ushijima H, Mor G, Hayakawa S.	H3N2 influenza A virus replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell lines and induces their rapid apoptosis.	Am J Reprod Immunol.	62(3)	139-146	2009
Ohto H, Yonemura Y, Takeda J, Inada E, Hanada R, Hayakawa S, Miyano T, Kai K, Iwashi W, Muto K, Asai F	Japanese Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy (JSTMCT). Guidelines for managing conscientious objection to blood transfusion.	Transfus Med Rev.	23(3)	221-228	2009
早川智	女性生殖器における 感染防御機構 オー バービュー	Hormone Frontier in Gynecology	16(4)	295-299	2009
早川智, 木下優子	原因不明の不妊症に 対する漢方療法	産婦人科の 実際	58(11)	1767-1772	2009

## 分担研究報告 29

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：日本人の不妊症におけるプロテイン Z と  
プロテイン Z 依存性プロテインインヒビターの解析

研究分担者 一瀬 白帝 山形大学医学部 分子病態学講座 教授

研究要旨

新しいプロテイン Z 依存性タンパク質分解酵素インヒビター(Protein Z-dependent Protease Inhibitor; ZPI)のアッセイ系を開発する為に必要な組換えタンパク質を発現する細胞の樹立を試みたところ、特異的な抗体を用いたウェスタンブロットによって哺乳類細胞と昆虫細胞の培養系で明らかな発現が確認された。今後、本抗体を用いて新 ELISA アッセイ系を構築する予定である。また、前年度の研究により、ZPI とプロテイン Z(PZ)の血中レベルが妊娠期に上昇することが発見されたので、両者を発現する肝癌細胞の培養系で、エストロゲンとプロゲステロンの影響を調べたところ、プロゲステロンによって PZ 遺伝子の発現が有意に増加すること、ZPI 遺伝子の発現は不変であることが判明した。従って、エストロゲンとプロゲステロンの ZPI と PZ の血中レベルの変動のメカニズムや妊娠維持に果たす役割、意義を更に追究する必要がある。

A. 研究目的

目的：妊娠期における ZPI と PZ の血中レベルの変動のメカニズム、それらが妊娠維持に果たす役割、意義を解明し、不妊症の診断や予防に貢献する。

背景：前年度の研究により、ZPI と PZ の血中レベルが妊娠期に上昇すること、不妊症においては不変であることが発見されたが、その正常妊娠における生理的意義、不妊症における因果関係は不明である。そこで、本年度は妊娠時に増加する女性ホルモンの両遺伝子の発現調節機構に対する影響を解析した。

また、PZ はほぼ全て ZPI と結合して血中に存在するが、ZPI の一部は遊離型として単独で存在する。因みに、PZ-ZPI 複合体は活性型 X 因子を、遊離 ZPI は活性型 XI 因子を阻害することが知られている。従って、妊娠期の抗凝固状態の変動を理解する為には、PZ-ZPI 複合体と遊離 ZPI の濃度やバランスを知ることが不可欠である。ところが、PZ 濃度は mg/ml と絶対値で測定結果を出すことができるが、ZPI 濃度は正常人の血漿プールを 100%とした相対値でしか表せないため、PZ-ZPI 複合体や遊離 ZPI 濃度も計測できない。そこで、本年度は、ELISA 系に用いるための ZPI タンパク質の標

準物質を作製した。

B. 研究方法

1) RT-PCR による PZ および ZPI 発現量の解析

ヒト由来肝癌細胞株 HepG2 を用いてエストラジオールおよびプロゲステロン添加時における PZ および ZPI の発現への影響について調べた。エストラジオールおよびプロゲステロンは 1  $\mu$ g/mL 濃度で培養液に添加し、48 時間後に RNA を抽出し発現の変化を調べた。HepG2 よりの RNA の抽出は、グアニジンチオシアネート法を用い、オリゴ(dT)20 プライマーおよび M-MLV 逆転写酵素を用いて逆転写を行った。得られた cDNA および PZ、ZPI および GAPDH の特異プライマーを用いて PCR をおこない各成分の発現を調べた。用いたプライマーは下記の通りである。

PZ センス：

5' -CACCGGATCTACAGGACCTC-3'

PZ アンチセンス：

5' -CATGGACGTGCGTTATCTTG-3'

ZPI センス：

5' -CATGGAGAAAATGGGTGACC-3'

ZPI アンチセンス：