

2. 学会発表

- 1) 山田秀人(2010)自己免疫疾患合併妊娠の管理. 三地区合同産婦人科医会研修会(特別講演), 2月18日, 神戸
- 2) 山田秀人(2010)習慣流産の免疫・遺伝学的背景と免疫グロブリン療法. 第20回生殖医学研究会(特別講演)4月2日, 京都
- 3) 山田秀人(2010)自己免疫疾患合併妊娠の管理. 神戸市医師会学術講演会(特別講演), 4月10日, 神戸
- 4) 山田秀人(2010)不育症の原因・治療と新たな展開. 兵庫県立淡路病院講演会(特別講演), 5月27日, 洲本
- 5) 山田秀人(2010)習慣流産の免疫・遺伝学的背景と免疫グロブリン療法. 第25回武庫川産婦人科セミナー(特別講演), 7月17日, 西宮
- 6) 山田秀人(2010)難治性習慣流産に対する免疫グロブリン療法. 第13回日本IVF学会(教育講演), 9月19日, 大阪
- 7) 山田秀人(2010)自己免疫疾患合併妊娠, 低置・前置胎盤の管理. 第88回北海道産科婦人科学会学術講演会(特別講演), 10月23日, 札幌
- 8) 山田秀人(2010)自己免疫疾患合併妊娠の管理. 加古川市民病院学術研究会(特別講演), 10月29日, 加古川

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

不育症患者の約半数は原因不明とされる。兵庫県内で唯一、不育症の専門外来がある神戸大医学部付属病院（神戸市中央区）は、原因不明の患者に対し免疫細胞の働きを抑える効果がある血液製剤「ガンマグロブリン」を大量投与する新しい治療を試みている。同大学大学院医学研究科産科婦人科学分野の山田秀人教授（5）に具体的な内容を聞いた。

◇
 一どのような治療か。
 「妊娠5週前後から1日1回20%のガンマグロブリンを3日間か5日間、静脈に点滴します。人によっては発疹が出るなどアレルギー反応が出ることもある

神戸大大学院医学研究科産科婦人科学分野
 山田秀人教授に聞く



「カフェイスの取り過ぎや喫煙は流産率を5倍に上げてほしい」と話す山田秀人教授＝神戸市中央区楠町？

NK細胞の働きを抑制

血液製剤投与で効果

ので、様子を見ながら3時間か免疫細胞の二つ「ナチュラルキラー細胞」が活性化し、ついでに子宮内の胎児を敵と見なし、攻撃するために流産が起きる。昨年6月までに方

「原因不明の不育症患者が流産した際、一部が胎盤になるを脱着した際、一部が胎盤になるを脱着した際に、免疫細胞をガンマグロブリンで抑え、免疫バランスを改善するのが目的です」

「効果は、4〜8回の流産歴がある不育症患者で、昨年6月までに方

「副作用は、治療を受けた15%の患者に軽い発熱や発疹が認められました。血液製剤なのでウイルス感染の可能性はゼロではありませんが、確率は極めて低く、今のところ感染例はありません」

者と早産した患者が5人ずついました。流産や死産した15人のうち10人は胎児側の染色体異常が原因なので、治療の有無にかかわらず流産したといえます。単純に考えれば、実際88%の患者に効果があつた計算です」

「神戸新聞」2010年9月25日 第4面

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
Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G	Anti- β 2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-control study.	J Reprod Immunol	84	95-99	2010
Mitsubishi T, Warita K, Tabuchi Y, Takasaki I, Kondo T, Sugawara T, Hayashi F, Wang ZY, Matsumoto Y, Miki T, Takeuchi Y, Ebina Y, Yamada H, Sakuragi N, Yokoyama T, Nanmori T, Kitagawa H, Kant JA, Hoshi N	Global gene profiling and comprehensive bioinformatics analysis of a 46,XY female with pericentric inversion of the Y chromosome.	Congenit Anom (Kyoto)	50	40-51	2010
Mitsubishi T, Warita K, Sugawara T, Tabuchi Y, Takasaki I, Kondo T, Hayashi F, Wang ZY, Matsumoto Y, Miki T, Takeuchi Y, Ebina Y, Yamada H, Sakuragi N, Yokoyama T, Nanmori T, Kitagawa H, Kant JA, Hoshi N	Epigenetic abnormality of SRY gene in the adult XY female with pericentric inversion of the Y chromosome.	Congenit Anom (Kyoto)	50	85-94	2010
Shimada S, Yamada H, Atsumi T, Yamada T, Sakuragi N, Minakami H	Intravenous immunoglobulin therapy for aspirin- heparinoid-resistant antiphospholipid syndrome.	Reprod Med Biol	9	217-221	2010

Yamada H, Ohara N, Amano M.	Current concepts on immunological etiologies in recurrent spontaneous abortion and intravenous immunoglobulin therapy.	Res. Adv. in Reproductive Immunology	1	1-21	2010
山田秀人.	難治性習慣流産の免疫グロブリン療法.	週間日本医事新報	4487	52-57	2010
山田秀人, 小橋元, 渥美達也.	抗リン脂質抗体は産科異常, 特に妊娠高血圧症候群と関連する.	産婦人科の実際	59 (5)	789-794	2010
天野真理子, 森實真由美, 山田秀人.	不育と遺伝因子	産婦人科の実際	59 (12)	1969- 1983	2010
山田秀人.	不育症の病因と治療-難治性習慣流産に対する免疫グロブリン療法-	北産婦医学会報	123	2-11	2010

分担研究報告 18

分担課題:不育症患者に対する免疫グロブリン治療 自然流産に対する遺伝学的解析

研究分担者:小澤伸晃 国立成育医療研究センター周産期診療部医長

研究要旨

国立成育医療研究センター周産期診療部不育診療科を受診された不育症患者を対象とし、前年度に引き続き不育症のリスク因子と各病態の治療成績に関する調査を行った。その中で今年度は不育症に対する新たな治療法として免疫グロブリン治療に注目した。これまでに 8 症例に対して本治療が行われたが、難治性不育症患者ならびに抗凝固療法で奏功しない抗リン脂質抗体症候群患者に対して良好な成績が得られている。また流産染色体分析として、通常の染色体分析に加えてアレイ CGH 法による解析を行っており、FISH 法や STR 法による解析を併用することにより、不育症診療における新たな流産染色体分析法としての有用性が示唆された。

A. 研究目的

全妊娠の約 15%に発生する流産を繰り返す場合は不育症と呼称され、全女性の約 2~5%は不育症患者であると推定されている。昨年度に引き続き本年度も、多施設共同研究により、不育症のリスク因子と各病態の治療成績に関する調査を前方視的研究で解析しているが、本年度は、不育症に対する新たな治療法として大量ヒト免疫グロブリン治療に注目し、難治性不育症患者ならびに抗凝固療法に抵抗する抗リン脂質抗体症候群患者における本治療の有用性を検討した。

また自然流産に対する遺伝学的解析においては、昨年度から引き続いてアレイ CGH 法による解析症例を蓄積し、FISH 法や STR 法など先端的遺伝学的診断技術を組み合わせた解析手法の有用性に関して検討した。

B. 研究方法

【不育症に対する免疫グロブリン治療】

各種治療に抵抗する難治性不育症患者ならびに抗凝固療法に抵抗する抗リン脂質抗体症候群患者を対象に、大量ヒト免疫グロブリン治療(妊娠初期に 20g 点滴静注x5 日間 1クール)を行った。

【流産染色体分析における先端的遺伝学的診断技術の応用】

(1)アレイ CGH(Comparative Genomic Hybridization)法

CGH マイクロアレイとしては、東京医科歯科大学難治疾患研究所で開発された MCG Genome-Disorder Array(既知の疾患座位ならびに各染色体のサブテロメア領域を 550-660 個の BAC クローンでカバーしたアレイ)を用いた。

(2) STR 解析

倍数体や絨毛検体への母体由来 DNA の混入の有無を検索するために、検体と母体由来の DNA に対して STR(short tandem repeat)解析を行った。

(3) FISH 解析

凍結された保存検体に対して、13、18、21、X/Y 染色体に対するプローブを用いて FISH 法を行い倍数体の有無を検索した。

(倫理面への配慮)

臨床データの集約の際は、「診療情報に対する 2 次利用の同意書」に基づいて解析を行った。アレイ CGH 法に関しては施設倫理委員会承認の下に、インフォームドコンセントが得られた症例を対象とした。

C. 研究結果

1)難治性不育症ならびに抗リン脂質抗体症候群に対する免疫グロブリン治療の試み

これまで難治性不育症患者に対しては、3名(各々の既往初期流産回数は7回、10回、8回)に免疫グロブリン治療が行われたが、1名は流産に至り(絨毛染色体正常)、1名は出産に至り、1名は現在妊娠継続中である。

また過去に抗凝固療法を行うも子宮内胎児死亡や重症妊娠高血圧症候群や血栓症などを呈した、抗リン脂質抗体症候群患者5名に対して、抗凝固療法に加えて免疫グロブリン治療を行った。いずれも最終的に生児獲得には成功したが、妊娠中期に早期破水となった症例や再度妊娠中期に重症妊娠高血圧症候群を発症し娩出を余儀なくされた症例が1例ずつ認められた。また継続的に抗体価を測定した症例では、妊娠週数に伴い抗体価が低下する傾向を示した。

2) 流産染色体分析における先端的遺伝学的診断技術の応用

自然流産検体に対するGDアレイによる解析は、これまでに計108例に行い、すべて解析は可能で、そのうち74例(68.5%)に異常が検出された。検体には通常の流産手術時に得られた検体だけでなく、進行流産となった検体も含まれた。異常を認めた74例の内訳は、ゲノムコピー数の過剰がありトリソミーが疑われた症例が59例、ゲノムコピー数の欠失がありモノソミーが疑われた症例が12例、両者ともに認め不均衡型転座が疑われた症例が1例であった。

また、GDアレイ正常でXXを呈した症例19例に対してSTR解析を行ったが、2例で3倍体、7例で母体DNAの混入が確認された。一方、GDアレイ正常例で行ったFISH解析の結果では、17例中7例で3倍体あるいは4倍体の可能性が考えられた。そのため最終的な染色体異常率は80.2%となった。

D. 考察、E. 結論

本研究班では、多施設共同研究により本邦不育症患者におけるリスク因子の抽出と治療効果の判定を行っている。当センターからは本年度計113組の不育症カップルが登録された。集積されたデータの解析結果は今後の不育診療体系の確立に貢献すると考えられる(詳細な結果に関しては別項参照)。

今回当施設では、不育症に対する新たな治療法として可能性のある大量ヒト免疫グロブリン治療に注目した。種々の治療が奏功しない原因不明不育症患者や、標準的治療として確立した抗凝固療法(ヘ

パリン+アスピリン製剤)に抵抗する抗リン脂質抗体症候群患者に対して、大量ヒト免疫グロブリン治療を行い、その有用性を検討した。症例数は少ないものの、結果的にほとんどの症例で生児獲得に成功した。

習慣流産に対する免疫グロブリン療法の作用機序としては、マクロファージのFcレセプターのブロック、補体介在性障害の減弱、免疫複合体性炎症の抑制、自己抗体に対する抗イディオタイプ抗体作用、Th1サイトカインの産生抑制、細胞増殖の抑制などが挙げられている(日産婦誌、2002;54(9):N416-22)。その有益性について現在のところ立証はされていないが、原因不明の場合に行われる治療手段の選択肢は限定されており、今後さらに症例数を蓄積して検討していくべきである。

また、抗凝固療法などの従来の標準的な治療法によっても奏功しない難治性抗リン脂質抗体症候群(intractable Antiphospholipid syndrome=iAPS)合併不育症患者においても、現在有効性の確立された治療法は存在せず、実際の臨床現場では妊娠を断念せざるを得ないこともある。今回の症例では、妊娠中期の前期破水や重症妊娠高血圧症候群の発症などにより早産となった症例はあったが、すべての症例で最終的に生児を獲得することに成功した。抗凝固療法とは異なり、免疫グロブリン治療は細胞性免疫から液性免疫、局所の炎症に至るまで広範囲な抑制が期待でき、妊娠という環境下で活性化される抗リン脂質抗体の産生とそれに伴う組織障害を直接抑制する作用を持つ可能性がある(Rheumatology. 2008;47:645-651)。

流産が母体要因であるか胎児要因であるかを判定することは不育診療上きわめて重要である。これまで最も高頻度な胎児要因である染色体異常を検索する方法として、細胞培養後のG-banding法による染色体分析が主流であったが、G-banding法による解析では培養操作を必要とし煩雑であると同時に、解像度の上で限界があり、系統的に効率よく遺伝学的検索が行われているとは言い難い。そのため最近では、培養操作を必要としないDNAを用いた検索手段が生殖・周産期領域にも応用されてきており、流産検体、出生前診断としての羊水検体に対する試みが国内外で報告されてきている(Am J Med Genet A 2006;140:2786-93)。

今回の検討より自然流産検体に対して、必要な量のDNAが確保できればアレイCGH法を用いて染色体異常が正確に解析できることが確認された。アレ

イCGH法など先端的遺伝学的診断技術を組み合わせて行うことは、従来の染色体検査の技術的問題を補完すると同時に、全染色体を網羅的に高解像度で検索することが可能であり、流死産の遺伝学的要因で高頻度に発生する染色体異常を正確に検出する上でも、また新たな流死産の遺伝学的メカニズムを同定するためにも重要な意義があると考えられた。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小澤伸晃、他：高齢妊娠と流産リスク. 産婦の実際 59(2):167-172, 2010.
- 2) 小澤伸晃、他：産婦人科領域におけるアレイCGH 3.産科領域のCGH解析. 産婦の実際 59(2):237-243, 2010.
- 3) 小澤伸晃、他：流産胎児の遺伝学的解析. 産婦の実際 59(12):2009-2014, 2010.

2. 学会発表

- 1) 小澤伸晃、他：アレイCGH法を用いた流産原因の遺伝学的解析と不育症診療への応用(第50回日本先天異常学会)
- 2) 小澤伸晃、他：流死産症例における原因検索と次回妊娠予後(第46回日本周産期・新生児医学会)
- 3) Ozawa N、他：The potential use of array-based comparative genomic hybridization for cytogenetic analysis of spontaneously expelled miscarriages (IFFS 20th World Congress on Fertility and Sterility 2010)

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
小澤伸晃、他	高齢妊娠と流産リスク	産婦の実際	59(2)	167-172	2010
小澤伸晃、他	産婦人科領域におけるアレイCGH 3.産科領域のCGH解析	産婦の実際	59(2)	237-243	2010
小澤伸晃、他	流産胎児の遺伝学的解析	産婦の実際	59(12)	2009-2014	2010

分担研究報告 19

分担課題: 不育症に対する抗血小板療法／抗凝固療法に関するアンケート調査報告

研究分担者 木村 正 大阪大学大学院医学系研究科産科学婦人科学 教授
研究協力者 筒井 建紀 大阪大学大学院医学系研究科産科学婦人科学 講師

研究要旨

不育症患者の治療法としてしばしば選択される抗血小板療法／抗凝固療法の適応や治療期間について、全国の周産期施設と不妊治療施設に対し、郵送によるアンケート調査を行った。その結果、不育症治療としての低用量アスピリン療法やヘパリン療法は、その適応が必ずしも明確でないにもかかわらず行われていることがあることが判明した。今後、これらの治療法の適応や治療期間、有効性についてさらなる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

不育症はその原因が多岐にわたり、原因をつきとめるために行うべき検査や治療の選択に苦慮することが少なくない。我々は、不育症患者の治療法としてしばしば選択される抗血小板療法／抗凝固療法の適応や治療期間について、全国の周産期施設と不妊治療施設に対し、郵送によるアンケート調査を行い、その結果をまとめたので報告する。

B. 研究方法

日本産科婦人科学会 ART 登録施設 621 施設、周産期登録施設 87 施設に対し、アンケート調査を行った。その内容は、低用量アスピリン療法・ヘパリン療法・両者の併用療法について、その適応、使用薬剤、治療開始／終了時期を質問した。

(倫理面への配慮) 今回のアンケート結果から、患者の特定はできないように配慮した。

C. 研究結果

回答率は不妊治療施設 34.0%、周産期施設 37.9%であった。その結果は、以下の通りである。①約 80%以上の施設で低用量アスピリン療法が施行され、約 50%以上の施設でヘパリン療法が施行されていた。②不育症患者に行うスクリーニング検査のうち、免疫学的検査・血液凝固系検査に異常を認めなくても、原因不明不育症の治療として、約 30%の施設で低用量アスピリン療法が施行されていた。③低用量アスピリン療法の開始時期は、不妊治療施設では黄体期が約 50%、尿妊娠反応陽性時が約 50%であるのに対し、周産期施設では尿妊娠反応

陽性時が約 70%であった。ヘパリン療法開始時期は、不妊治療施設・周産期施設共に、約 60%が尿妊娠反応陽性時であった。④低用量アスピリン療法終了時期は、約 30%の施設で妊娠 22 週～28 週、約 50%の施設で妊娠 29～36 週であった。また、ヘパリン療法終了時期は、約 40%の施設で陣痛発来時であった。

D. 考察

免疫学的検査や血液凝固系検査で異常を認める不育症だけでなく、原因不明不育症に対しても低用量アスピリン療法やヘパリン療法が行われ、治療効果があると判断される症例が存在する場合がある。原因不明不育症の中に、母体による胎児の拒絶反応に関わるまだ同定されていない免疫学的機序や血液凝固因子異常が存在する可能性があり、これらの解明が急務である。

E. 結論

不育症に対する治療として、低用量アスピリン療法やヘパリン療法は、その適応が必ずしも明確でないにもかかわらず、広く行われていることが判明した。これらの治療法の適応や治療期間、有効性についてさらに検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
未発表
2. 学会発表
 - 1) 不育症に対する抗血小板療法／抗凝固療法に関するアンケート調査 田畑知沙、筒井建紀、林正美、中村仁美、大八木知史、若林敦子、瀧内剛、正木秀武、香山晋輔、木村正 第 136 日本生殖医学会関西支部集談会 平成 23 年 3 月 5 日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他

分担研究報告 20

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 東京大学産科婦人科学准教授

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ている。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。昨年度までの研究において、我々は、抗 β_2 GPI 抗体が、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 を発現する trophoblast からの IL-12 誘導が起こることを明らかにし、また、この現象が、患者血清でも誘導されることも確認した。さらに、ヒト脱落膜リンパ球から iNKT 細胞を誘導し、CD1d を強制発現させた絨毛癌細胞株(JEG/CD1d)と共培養し、ヒト脱落膜 iNKT 細胞が、CD1d を介して絨毛細胞からの炎症性サイトカイン IL12 の産生を誘導することを証明した。本年度は、trophoblast 上の CD1d と脱落膜 iNKT との相互作用が、抗 β_2 GPI 抗体の存在により、どのように変化し、局所における妊娠免疫反応がどのような影響を検討することとした。iNKT 細胞を誘導したヒト脱落膜リンパ球と、JEG/CD1d 細胞との共培養に、抗 β_2 GPI 抗体またはコントロール IgG を添加し、IL-12、Interferon (IFN)- γ 誘導を観察した。その結果、JEG/CD1d 細胞では、18 時間後に抗 β_2 GPI 抗体添加群の IL12 産生が陰性コントロール IgG 添加群の 3 倍にまで有意に増加した。JEG では抗 β_2 GPI 抗体存在下でも、IL12 産生の増加を認めなかった。IFN- γ の産生については、抗 β_2 GPI 抗体添加群と陰性コントロール IgG 添加群との比較で、IL12 と異なり JEG、JEG/CD1d 両者において、抗 β_2 GPI 抗体添加群で、18 時間後に IFN- γ の産生が増加する傾向にあったが、JEG/CD1d 細胞においてのみ有意差を認めた。

以上より、抗 β_2 GPI 抗体が存在すると、抗 β_2 GPI 抗体による CD1d の架橋反応で産生された IL12 が脱落膜 iNKT 細胞を活性化させ、iNKT 細胞からの IFN- γ 分泌が増加して trophoblast 上の CD1d 発現を増加させ、さらに CD1d 発現細胞からの IL12 分泌を促進するというサイクルが必要以上に活性化され、これにより、母体胎児境界における局所の炎症が過剰となり、流産を引き起こすことが示唆された。

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、流産が起こるとされている。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。

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 T helper 1 (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、interleukin (IL)-12 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、human leukocyte antigen (HLA) 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。

我々は、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を目的とし、昨年度までの研究において、CD1d を恒常的に発現する trophoblast 株 Jeg3/CD1d の表面において、CD1d 発現に一致して PS、 β_2 GPI が存在していること、また、抗 CD1d 抗体に加え、抗 β_2 GPI 抗体添加でも架橋反応による IL-12 の発現が認められ、抗 β_2 GPI 抗体が、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 を発現する trophoblast からの IL-12 誘導が起こることを明らかにした。この架橋反応は、 β_2 GPI 依存性抗 cardiolipin 抗体陽性不育症の患者血清を Jeg3/CD1d 培養系に添加しても誘導された。さらに、フローサイトメトリー法による解析で、ヒト脱落膜リンパ球に対する α GalCer 刺激により V α 24V β 11 陽性の脱落膜 iNKT 細胞数が増加することを確認し、この細胞と Jeg3/CD1d との共培養で Jeg3/CD1d から IL12 が誘導が確認されることを確認した。しかし、脱落膜 iNKT 細胞からの IL4、IFN- γ 誘導は確認できなかった。

本年度は、最終年度の研究として、trophoblast 上の CD1d と脱落膜 iNKT との相互作用が、抗 β_2 GPI

抗体の存在により、どのように変化し、局所における妊娠免疫反応がどのような影響を検討することとし、抗リン脂質抗体による流産発症機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 人工中絶症例から採取したヒト脱落膜リンパ球を iNKT 誘導剤 α GalCer で刺激し、iNKT 細胞 rich な脱落膜リンパ球を誘導した。
2. この脱落膜リンパ球を Jeg3/CD1d、CD1d と細胞外ドメインが共通で細胞内シグナル伝達が起こらないキメラ分子 CD1d/a を発現する JEG3/CD1d/a、もしくは Jeg3 と共培養し、この培養系に抗 β_2 GPI 抗体またはコントロール IgG を添加した。
4. IL-12、Interferon (IFN)- γ 誘導を ELISA 法で観察した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の採取、使用は、施設倫理委員会の承認のもと、インフォームド・コンセントを取得して、実施した。

C. 研究結果

1. JEG/CD1d 細胞では、18 時間後に抗 β_2 GPI 抗体添加群の IL12 産生が陰性コントロール IgG 添加群の 3 倍にまで有意に増加した。JEG や JRG/CD1d/a では抗 β_2 GPI 抗体存在下でも、IL12 産生の増加を認めなかった。
2. IFN- γ の産生についても、抗 β_2 GPI 抗体添加群と陰性コントロール IgG 添加群の比をとり各細胞間で比較した。IL12 と異なり全ての細胞の抗 β_2 GPI 抗体添加群で、18 時間後に IFN- γ の産生が増加する傾向にあったが、JEG/CD1d 細胞においてのみ有意差を認めた。

D. 考察

母体の脱落膜組織に胎児の EVT が適切に浸潤していくことが、胎盤形成が正しく行われる鍵となるが、この過程では局所で厳密にコントロールされた炎症反応が必要である。脱落膜 iNKT と EVT 上の CD1d の相互作用により産生される IL-12 はこの炎症反応に寄与していると考えられる。しかし、この母体胎児境界に抗 β_2 GPI 抗体が存在すると厳密にコントロールされた環境が乱される。本研究において、抗 β_2 GPI 抗体が存在す

ると、PS- β_2 GPI 複合体を介して CD1d 分子が架橋され、IL12 産生が増加するとともに、CD1d-脱落膜リンパ球間の相互作用による IL12 産生がさらに刺激されることが示された。また特に CD1d 発現細胞と脱落膜リンパ球の接する胎児母体境界では抗 β_2 GPI 抗体存在下で IFN- γ 産生が増加することがわかった。すなわち、抗 β_2 GPI 抗体が存在すると、抗 β_2 GPI 抗体による CD1d の架橋反応で産生された IL12 が母体 IFN- γ 産生細胞である iNKT 細胞を活性化させ、iNKT 細胞からの分泌が増加した IFN- γ が trophoblast 上の CD1d 発現を増加させて、さらに CD1d 発現細胞からの IL12 分泌を促進するというサイクルが必要以上に活性化されることが示された。これにより、母体胎児境界における局所の炎症が過剰となり、流産を引き起こすことが示唆された。

E. 結論

抗 β_2 GPI 抗体による流産が、絨毛細胞上の CD1d と脱落膜 iNKT 細胞を介した過剰な炎症によるという新しい流産機序が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
投稿中
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

分担研究報告 21

分担課題: 絨毛癌細胞(BeWo)での抗 β 2-GPI 抗体によるサイトカイン産生について

研究分担者 山本 樹生 日本大学産婦人科学分野教授

研究要旨

抗 β 2-GPI 抗体の絨毛細胞に対する作用を検討するため、BeWo 細胞に phosphatidylserine を発現させさらに β 2-GPI を結合させた系を作成し、抗 β 2-GPI 抗体が作用した絨毛癌細胞でのサイトカイン産生について検討した。

抗 β 2-GPI 抗体陽性 IgG は BeWo 細胞に作用して proinflammatory cytokine である IL6 および IL8 を産生させた。抗 β 2-GPI 抗体は絨毛細胞に結合したのち proinflammatory cytokine 産生させ、抗リン脂質抗体を伴う妊娠において炎症反応を増加させる可能性を推察した。

A. 研究目的

抗 β 2-GPI 抗体の作用機序として胎盤の血栓、絨毛機能障害の他に抗 β 2-GPI 抗体が血管内皮細胞や胎盤絨毛を活性化する機構が報告されている。今回、抗 β 2-GPI 抗体の絨毛細胞に対する作用を検討するため、BeWo 細胞に phosphatidylserine を発現させさらに β 2-GPI を結合させた系を作成し、抗 β 2-GPI 抗体が作用した絨毛癌細胞でのサイトカイン産生について検討した。

B. 研究方法

インフォームド・コンセントを得て正常非妊娠婦人および抗 β 2-GPI 抗体陽性婦人より血清を採取し、Protein G カラムにて IgG を抽出した。絨毛癌細胞 (BeWo 細胞) を 24-well tissue culture plate に播き、folksoline を用い分化させ、さらに一定量の抽出 β 2-GPI を添加後培養した。その後、各 IgG を反応させ 24 時間後に上清を採取、サイトカイン産 (IL2, IL4, IL10, TNF- α , IFN- γ and GM-CSF) について suspension array system Bio-Plex (BIO-RAD) を用いて検討した。

C. 研究結果

抗 β 2-GPI 抗体陽性 IgG の添加により正常非妊娠婦人 IgG 添加比し上清中 IL6 および IL8 の有意な増加が認められた。

D. 考察

抗 β 2-GPI 抗体は BeWo 細胞に作用して proinflammatory cytokine である IL6 および IL8 を産生させた。抗 β 2-GPI 抗体は絨毛細胞に結合したのち proinflammatory cytokine 産生させ、抗リン脂質抗体を伴う妊娠において炎症反応を増加させ胎盤の機能を阻害し流産・死産を生ずる可能性がある。これにはシグナル伝達物質 NF- κ B を作動させる可能性がある。抗 β 2-GPI 抗体は、絨毛癌細胞のみならず上毛細胞においてもシグナル伝達分子を活性する可能性がある。

E. 結論

抗 β 2-GPI 抗体陽性 IgG は BeWo 細胞に作用して proinflammatory cytokine である IL6 および IL8 を産生させた。抗 β 2-GPI 抗体は絨毛細胞に結合したのち proinflammatory cytokine 産生させ、抗リン脂質抗体を伴う妊娠において炎症反応を増加させる可能性を推察した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Effects of anti β 2-GPI antibody on PIGF, VEGF and sVEGFR1 production from cultured choriocarcinoma cell line Go Ichikawa, Tatsuo Yamamoto, Fumihisa Chishima, Akikazu Nakamura, Souichirou Kuno, Takayuki Murase,

Manami Suzuki J Obstet Gynecol Reseach in press

- 2) 抗 β 2GPI 抗体とその作用機序 山本樹生、市川 剛、千島史尚、医学のあゆみ 233(2)163-167,2010

2. 学会発表

- 1) β 2-GPI を結合させた絨毛癌細胞(BeWo)内での抗 β 2-GPI 抗体によるシグナル伝達機構の解明 市川 剛、加藤恵理奈、中村晃和、浅沼亜紀、林 忠佑、久野宗一郎、千島史尚、山本樹生 第62回日産婦学会 東京 4月 2010
- 2) 抗 β 2-GPI 抗体による絨毛癌細胞(WeWo)でのTLRs mRNA の発現変化について中村晃和、市川 剛、千島史尚、宮川康司、鈴木真美、山本樹生 第62回日産婦学会 東京 4月 2010
- 3) Effects of anti β 2-GPI antibody on the expression of TLRmRNA and cytokine production in choriocarcinoma cell Tatsuo Yamamoto ,Akikazu Nakamura,Aki Asanuma, Cyuyu Hayashi, Go Ichikawa,Souichirou Kuno,Takayuki Murase,Fumihisa Chisima, Manami Suzuki 30th Annual meeting of american society reproductive immunology 2010
- 4) Signal transduction in choricarcinoma cell line caused by anti β 2-GPI antibody binding, Go Ichikawa, Erina Kato,Akikazu Nakamura,Aki Asanuma, Cyuyu Hayashi, Souichirou Kuno,Fumihisa Chisima, Manami Suzuki, Tatsuo Yamamoto 30thAnnual meeting of of american society reproductive immunology 2010
- 5) Effects of anti β 2-GPI antibodies on the production of cytokines in choriocarcinoma (WoBo) cell Tatsuo Yamamoto, Aki Asanuma, Cyuyu Hayashi, Go Ichikawa, Fumihisa Chisima, Manami Suzuki, 11th International Society Immunology reproduction Aug 2010
- 6) 抗 β 2-GPI 抗体による絨毛癌細胞(WeWo)でのTLRs mRNA の発現変化について 中村晃和、市川 剛、千島史尚、宮川康司、鈴木真美、山本樹生 第18回 胎盤学会 9月 2010

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
Go Ichikawa, Tatsuo Yamamoto, Fumihisa Chishima , Akikazu Nakamura, Souichirou Kuno, Takayuki Murase, Manami Suzuki	Effects of anti β 2-GPI antibody on PIGF ,VEGF and sVEGFR1 production from cultured choriocarcinoma cell line	J Obstet Gynecol Reseach			in press
山本樹生、市川 剛、 千島史尚	抗 β 2GPI 抗体とその作用機 序	医学のあゆみ	233(2)	163-167	2010