

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
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)	1969-83	2010
佐田文宏, 山田秀人	早産と遺伝因子	産婦人科の実際	59(12)	1991-2000	2010

分担研究報告 26

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 因子の遺伝子解析に関しては追加症例はなかった。

p32 のノックアウトマウスは胎生 9.5 日で著明な成長遅延を示し、10.5 日では細胞増殖はほとんど観察されなかった。p32 ノックアウトマウスより樹立した MEF 細胞の解析から、p32 はミトコンドリア内でのミトコンドリア DNA でコードされる蛋白質翻訳に必須であることを見出し、“ミトコンドリア内での蛋白質翻訳に特異的な RNA 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) 血栓症関連遺伝子変異解析

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)細胞を樹立した。その細胞の増殖能、ミトコンドリア電子伝達系活性、ミトコンドリア DNA、mRNA ならびに翻訳能を測定する。

(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) 血栓症関連遺伝子変異解析

今年度は新たな解析はなかった。

(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

(図1)。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。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2)。

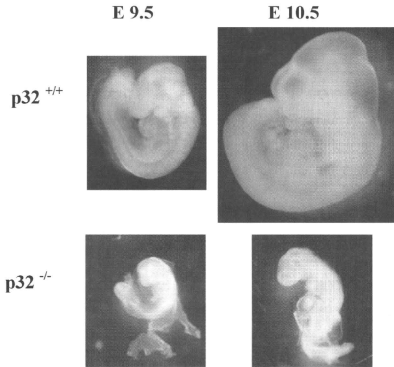


図1 p32 ノックアウトマウス胎児

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ところ複合体I, III, IVの活性低下が認められた。その原因はミトコンドリア内翻訳の阻害であった(図3)。

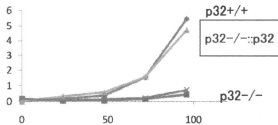


図2 p32 ノックアウト細胞の増殖能の低下

D. 考察

今年度は不育症の血液凝固系因子の遺伝子検査の実施はなかったが、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、ミトコンドリア内での蛋白質翻訳が特

異的に阻害されることから、ミトコンドリアRNAへの結合が認められることから、ミトコンドリアRNAシャペロンであることが示唆される。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RNA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翻訳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。

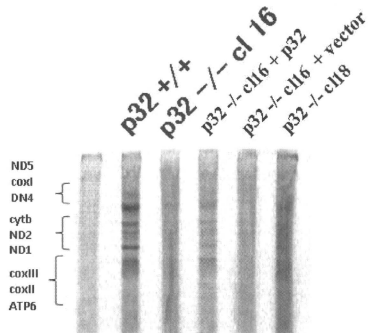


図3 ミトコンドリア内蛋白質翻訳

E. 結論

今後さらに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“ミトコンドリア内翻訳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) Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Abe, Y., Kuma, H., Kang, D., Hamasaki, N. and Hirai, T. (2010) Structure of the membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography. *J Mol Biol*, 397, 179–189.
- 2) Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N. and Mitsuoka, K. (2010) Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals. *J Struct Biol*, 169, 406–412.
- 3) Uchiyama, T., Ohgaki, K., Yagi, M., Aoki, Y., Sakai, A., Matsumoto, S. and Kang, D. (2010) ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation. *Nucleic Acids Res*, 38, 5554–5568.
- 4) Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Harada, Y., Kadowaki, M., Shimono, N. and Kang, D. (2010) Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia. *Int J Antimicrob Agents*, 35, 387–391.
- 5) Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Eriguchi, Y., Nagasaki, Y., Shimono, N. and Kang, D. (2010) Clonal spread in Eastern Asia of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* serogroup O25 strains, and associated virulence factors. *Int J Antimicrob Agents*, 35, 444–450.
- 6) Takazaki, S., Abe, Y., Yamaguchi, T., Yagi, M., Ueda, T., Kang, D. and Hamasaki, N. (2010) Mutation of His 834 in human anion exchanger 1 affects substrate binding. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 903–908.

- 7) Sekiguchi, K., Akiyoshi, K., Okazaki, N., Yamada, H., Suzuki, M., Maeda, T., Suenobu, S., Izumi, T. and Kang, D. (2010) PLEDs in an infant with congenital protein C deficiency: a case report. *Clin Neurophysiol*, 121, 800–801.
- 8) Schumann, G., Canalias, F., Joergensen, P.J., Kang, D., Lessinger, J.M. and Klauke, R. (2010) IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice. *Clin Chem Lab Med*, 48, 615–621.
- 9) Ruhanen, H., Borrie, S., Szabadkai, G., Tyynismaa, H., Jones, A.W., Kang, D., Taanman, J.W. and Yasukawa, T. (2010) Mitochondrial single-stranded DNA binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial nucleoid organisation. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 931–939.

2. 学会発表

なし

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
Yamaguchi, T., Ikeda, Y., Abe, Y., Kuma, H., Kang, D., Hamasaki, N. and Hirai, T	Structure of the membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography.	J Mol Biol	397	179-189	2010
Yamaguchi, T., Fujii, T., Abe, Y., Hirai, T., Kang, D., Namba, K., Hamasaki, N. and Mitsuoka, K.	Helical image reconstruction of the outward-open human erythrocyte band 3 membrane domain in tubular crystals.	J Struct Biol.	169	406-412	2010
Uchiumi, T., Ohgaki, K., Yagi, M., Aoki, Y., Sakai, A., Matsumoto, S. and Kang, D.	ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation.	Nucleic Acids Res,	38	5554-5568	2010
Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Harada, Y., Kadowaki, M., Shimono, N. and Kang, D.	Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli strains in Asia.	Int J Antimicrob Agents	35	387-391	2010
Uchida, Y., Mochimaru, T., Morokuma, Y., Kiyosuke, M., Fujise, M., Eto, F., Eriguchi, Y., Nagasaki, Y., Shimono, N. and Kang, D.	Clonal spread in Eastern Asia of ciprofloxacin-resistant Escherichia coli serogroup O25 strains, and associated virulence factors.	Int J Antimicrob Agents	35	444-450	2010
Takazaki, S., Abe, Y., Yamaguchi, T., Yagi, M., Ueda, T., Kang, D. and Hamasaki, N.	Mutation of His 834 in human anion exchanger 1 affects substrate binding.	Biochim Biophys Acta	1798	903-908	2010

Sekiguchi, K., Akiyoshi, K., Okazaki, N., Yamada, H., Suzuki, M., Maeda, T., Suenobu, S., Izumi, T. and Kang, D.	PLEDs in an infant with congenital protein C deficiency: a case report.	Clin Neurophysiol,	121	800-801	2010
Schumann, G., Canalias, F., Joergensen, P.J., Kang, D., Lessinger, J.M. and Klauke, R.	IFCC reference procedures for measurement of the catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice.	Clin Chem Lab Med	48	615-621	2010
Ruhanen, H., Borrie, S., Szabadkai, G., Tynnismaa, H., Jones, A.W., Kang, D., Taanman, J.W. and Yasukawa, T.	Mitochondrial single-stranded DNA binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial nucleoid organisation.	Biochim Biophys Acta	1803	931-939.	2010

分担研究報告 27

分担課題:慢性感染症による不育症の解析

研究分担者 早川 智 日本大学部病態病理学系微生物学分野教授

研究要旨

生殖器外の慢性感染症は病原微生物の直接毒性以外に、炎症性サイトカインの産生を介して胎児胎盤を傷害する。一方、寄生虫感染症は疫学的に習慣流産の抑制因子となる可能性がある。本年度、我々は 1) 歯周病の胎児胎盤への影響 2) 寄生虫由来抗原による習慣流産治療薬の開発を中心に研究を行った。その結果、歯周病の原因菌として最も頻度の高い *Porphyromonas gingivalis* の LPS (PG-LPS) は単独では絨毛細胞を傷害せず、NK 細胞の活性化を介して絨毛を傷害すること、一方、若年性歯周病の病原菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* には直接傷害性が見られた。興味深いことに PG-LPS は suboptimal のニコチンやカフェインの存在下で不死化絨毛細胞株の浸潤を抑制した。寄生虫の実験では、rDiAg は典型的な不育症モデルである CBAXDBA マウスの系で、流産率を 1/4 に抑制した。感染とこれに伴う慢性炎症応答、寄生虫の宿主免疫修飾作用の研究から不育症診療に新たな解析と治療法の展望が開ける可能性がある。

I 歯周病と流早産

A. 研究目的

母体のコントロール不良の歯周病は、早産や胎児発育遅延 (IUGR) による低出生体重の原因となると考えられている。また近年、歯周病は慢性尿路感染や細菌性陰症とともに妊娠高血圧症候群の重要なリスク因子としても注目されている。その機序として、歯周病起因菌 *Porphyromonas gingivalis* などによる胎盤の直接的傷害のほか、母体免疫系の活性化による寛容の破綻が想定されている。我々は先に、*P. gingivalis* や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* による直接の絨毛細胞傷害はみられないが、これらが NK 細胞を活性化し、絨毛癌細胞株 BeWo に対する Foaming 誘導による細胞傷害の原因になることを明らかにした。一方、歯周病妊婦では喫煙やカフェイン飲料の大量摂取など他のハイリスク行動を取る患者が多いことも指摘されている。*P. gingivalis* による胎盤機能障害を *in vitro* で検討するため以下の実験を行った。

B. 研究方法

不死化初期浸潤絨毛細胞株 HTR8 は RPMI 1640 培地に 10% fetal bovine serum、100 Uml⁻¹ penicillin、100 Uml⁻¹ streptomycin、10mM

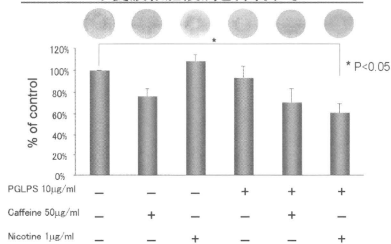
HEPES、100μM non-essential amino acid、1mM sodium pyruvate を添加した培地で培養した。細胞の浸潤能は matrigel assay で検討した。各種濃度の *P. gingivalis* 由来 LPS (PGLPS) を添加し、さらに、カフェインあるいはニコチンを添加し、浸潤に与える影響を検討した (倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた基礎的研究であり特に倫理委員会への申請は行っていないが、*P. gingivalis* は BSL2 の病原微生物であり、バイオリスク管理委員会の登録と認可を受けた。

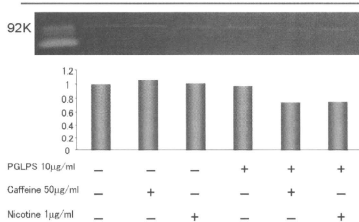
C. 研究結果

PGLPS は 0.1-10 μg/ml までの濃度で HTR8 の浸潤を抑制しなかったが、ニコチン 1μg/ml との共存下では有意に浸潤を抑制した (図)。カフェインもしくはニコチン単独刺激では浸潤抑制は軽度であり、歯周病と他の生活因子の相乗作用が推定された。MMP-9 の発現は PG-LPS とカフェインもしくはニコチンの存在下で強く抑制された。

PGLPSはニコチンの存在下で
栄養膜細胞浸潤を抑制する



PGLPSはニコチン、カフェインの存在下で
MMP9の発現を抑制する



D. 考察

P. gingivalis の菌体成分が子宮内に到達した場合、PGLPS 単独では trophoblast の子宮筋層への浸潤に影響を与えないが、喫煙やカフェイン飲料の過量摂取が相乗的に作用し浸潤を抑制する可能性がある。これら複数の因子が、母体血管改築による胎児胎盤血流の担保を阻害し、早産、IUGR、妊娠高血圧症候群のリスクとなる可能性が示唆された

一般的な菌周疾患の進行は緩慢であるのに対し、早期発症性菌周炎は若年者や30歳代で急速な菌周組織の破壊がみられるのが特徴である。なぜ、破壊が起きるのは、まだ完全には解明されていないが、病原体(細菌)の毒性と、宿主の遺伝的感受性が関与する可能性がある。菌周病の妊娠合併症への関与はまだ、確定的な結論を得ていないが、我々の研究結果より若年性菌周病は単独で、最近の直接毒性により、成人型の菌周病はニコチンやカフェイン摂取など他の要因が相乗的に作用する可能性がある。

II 寄生虫抗原による習慣流産抑制

A. 研究目的

マラリアやインフルエンザなどの全身の感染症、CMV,クラミジア,グラム陰性桿菌などによる局所的な感染症が、流早産の原因となることは論を俟たない。しかし、途上国では寄生虫疾患が多い一方、同種免疫異常による不育症の患者は稀である。医療アクセスや現地医療機関の診断能力の問題はあるとしても、アレルギー疾患同様に Hygiene hypothesis が成立する可能性がある。寄生虫の立場からすると、自らが宿主による拒絶を免れると同時に、妊娠を継続させることで次の世代の新たな宿主を生み出すことは理にかなっている。同種免疫異常の治療として従来、夫リンパ球による免疫療法が広く行われてきたが、感染症や自己抗体の誘導などの副作用や、さらに治療効果の確実性の点より、近年は行われない傾向にある。それに代わる治療としてイムノグロブリン大量投与療法が行われている。しかし、前者はエビデンスはあるものの非常に高額とな点や重症感染症や血小板減少性紫斑病など重篤な状態に適応となるイムノグロブリンという限られた医療資源を人命に直接関わらず、また緊急性のない不育症に大量に使用するという医療倫理的問題がある。一般には悪玉である感染にかかわる因子、特に寄生虫由来物質を習慣流産治療に使用するというアイデアは我々独自のものであるが rDiAg は既に精製され、I型糖尿病やMSモデルマウスなど Type1 免疫応答による疾患動物における治療効果が報告されて本研究では妊娠免疫における効果を動物で検討するため以下の実験を行った。

B. 研究方法

Clark らによって免疫機序による不育症モデルとして報告され、すでに確立した DBA/2J オス X CBA/J メスの mating を行い、以下の方法で rDiAg の免疫調節作用と流産予防効果の有無を判定した。

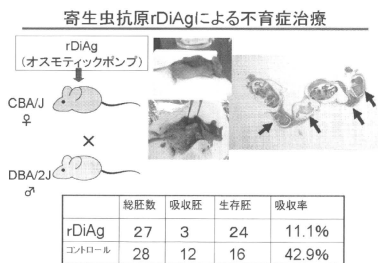
- 1) 予め、8-10週目の CBA/J メス背部皮下に無菌的にオスモティックポンプ植え込み手術を行い、1-30 μ g の rDiAg を投与した。
- 2) DBA/2J オスと mating を行い、陰栓確認で交尾を判定した
- 3) 妊娠 13 日目に屠殺し、生存胎仔数と吸収胎仔数を判定した
- 4) 胎盤・脱着膜の組織学的検討と、サイトカイ

ンの定量を行った。
(倫理面への配慮)

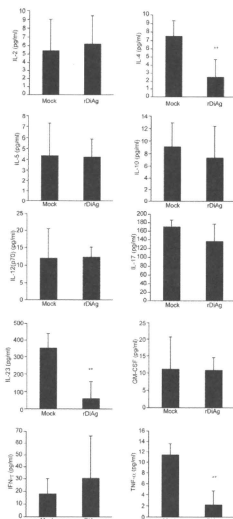
日本大学動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

非投与群の DBA/2J オス X CBA/J メスの胎児吸収は、42.9%であったが、rDiAg 投与により 11.1%まで減少した。



血中サイトカインの解析では IL-4, IL-23, TNF- α が有意に減少し、IL-17 は減少傾向を見たが有意差はなかった。他の type 1 (IL-2, IFN- γ) type2 (IL-5, IL-10) サイトカインは変動しなかった。



D 考察 寄生虫由来抗原 rDiAg は習慣流産モデルマウスで統計的に有意に妊娠予後を改善した。その機序は従来知られていた Th2 の誘導ではなく、Th1, Th2 とともに抑制する新たな機構があると考えられた

E. 結論

III の結果より、口腔をはじめとする全身の慢性感染に伴う炎症応答は流産の病態に関与する可能性が示唆された。寄生虫の宿主免疫修飾作用の研究から不育症診療に新たな治療法の展望が開ける可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komine-Aizawa S, Yamazaki T, Yamazaki T, Hattori S, Miyamoto Y, Yamamoto N, Haga S, Sugitani M, Honda M, Hayakawa S, Yamamoto S Influence of advanced age on Mycobacterium bovis BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with Mycobacterium tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2010 Oct;17(10):1500-6.
- 2) Negishi M, Izumi Y, Aleemuzzaman S, Inaba N, Hayakawa S. Lipopolysaccharide (LPS)- induced Interferon (IFN)-gamma production by decidual mononuclear cells (DMNC) is interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent. Am J Reprod Immunol. 2011 Jan;65(1):20-7.

2 学会発表

- 1) Shihoko Komine-Aizawa, Yasuyuki Izumi, and Satoshi Hayakawa The therapeutic potential of the recombinant antigen from Dirofilaria immitis (rDiAg) for immune mediated pregnancy loss. 14th International Congress of Immunology. Workshop 26 Aug 2010 Kobe

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
Komine-Aizawa S, Yamazaki T, Yamazaki T, Hattori S, Miyamoto Y, Yamamoto N, Haga S, Sugitani M, Honda M, <u>Hayakawa S</u> , Yamamoto S	Influence of advanced age on Mycobacterium bovis BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with Mycobacterium tuberculosis.	Clin Vaccine Immunol.	17(10)	1500-6	2010
Negishi M, Izumi Y, Aleemuzzaman S, Inaba N, <u>Hayakawa S</u> .	Lipopolysaccharide (LPS)- induced Interferon (IFN)-gamma production by decidual mononuclear cells (DMNC) is interleukin (IL)-2 and IL-12 dependent.	Am J Repr Immunol.	65(1)	20-7	2011

分担研究報告 28

分担課題:日本人の不育症におけるプロテイン Z と
プロテイン Z 依存性プロテアーゼ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

プロテイン Z(PZ)依存性タンパク質分解酵素インヒビター(Protein Z-dependent Protease Inhibitor; ZPI)の新しい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株を樹立し、ウェスタンブロットによって特異性が確認された抗体を用いて新 ELISA 測定系を構築した。また、本測定系を用いて、これ迄の我々の研究により発見されていた、ZPIとPZの血中レベルが妊娠期に上昇すること、非妊娠健常女性に比べて不育症では増加しないこと、などの事実を確認した。更に、PZと同様に ZPI の測定値を濃度として mg/mL(質量/容量)で表現することを可能にしたので、遊離 ZPI(総 ZPI-PZ)を概算し、妊娠期、不育症でもほぼ一定であることを発見した。従って、妊娠期には抗活性型凝固第 X 因子活性は増加するが、抗活性型凝固第 XI 因子活性には変化がないと考えられる。ZPIとPZは、更年期における女性ホルモン補充療法や卵巣摘出術の前後で変化しないので、肝癌細胞培養系での検討結果とは異なり、エストロゲンとプロゲステロンなどホルモンの関与は否定的であり、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]

妊娠期におけるプロテイン Z(PZ) 依存性タンパク質分解酵素インヒビター(PZ-dependent Protease Inhibitor; 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、不育症の診断や予防に貢献する。

[背景]

ZPI は、PZ との複合体型は活性型凝固第 X 因子を抑制するが、遊離型 ZPI は活性型凝固第 XI 因子を抑制することが試験管内の実験で明らかにされている。一方、臨床例では PZ の低下が静脈血栓症や自然流産と関与していることが報告されているが、ZPIについては静脈血栓症での低下が報告されているものの、妊娠や流産との関係は不明であった。

これまでの我々の研究により、正常日本人女性における PZ、ZPI の相対的な血漿レベルが初めて測定され、日本人においても血中 PZ 濃度は周

産期において有意に増加して妊娠の維持に貢献していると思われた。一方、不育症の症例では、正常妊娠に比べ PZ の上昇が認められず、PZ の不足が抗凝固能の不足を引き起こす可能性が示唆された。また、ZPI も周産期において上昇することが、初めて明らかになっている。

さて、PZ と同様に ZPI の測定値を濃度として mg/mL(質量/容量)で表現し、不育症における遊離 ZPI(総 ZPI-PZ)の意義を検討するためには、既知の量の ZPI が必要であり、これを標準物質として各個人の血中濃度を較正しなければならない。そこで、今回は、組換え ZPI タンパク質を発現する哺乳類細胞株を樹立し、特異性と感受性を共に満足する抗体を選択し、新しい定量方法を開発した。この方法により、総 ZPI 量から PZ 量を差し引いて、遊離 ZPI 量を概算することが初めて可能になった。

B. 研究方法

1) 組換え ZPI の哺乳類細胞と昆虫細胞での発現

新しい ZPI のアッセイ系を開発し、標準タンパク質として用いる為に必要な組換えタンパク質を発現する細胞株を樹立した。DsRed タグとの融合 ZPI cDNA を BHK 細胞に一過性に導入し、無血清培地で 24 時間インキュベートした後に回収した培地および細胞溶解物を、抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 (共同研究者より供与されたもの) あるいは H-137 (市販のもの) を用いたウエスタンブロットにより解析した。

安定発現株を樹立する為に、BHK 細胞に ZPI 発現ベクターを導入後 G418 で選別し、得られたクローンの培養上清を抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析によりスクリーニングした。次に、株化した ZPI 安定発現 BHK 細胞の培養上清 90 mL から 75% 硫酸で沈殿したタンパク質を透析脱塩後、Heparin-Sepharose カラム (0.5 mL) にアプライした。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.4) で洗浄後、0.1-1 M リン酸緩衝液の濃度勾配で吸着タンパク質を溶出した。

バキュロウイルス発現系でより大量の組換えタンパク質を得る為に、組換え型ウイルスを作製した。組換えウイルスを Sf21 細胞に感染後、3 日間血清フリー培地で培養して培地を回収し、抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析を行った。

2) ELISA によるヒト血漿の ZPI タンパク質量測定

抗 ZPI ポリクローナル抗体 (MQ-126) を固相化した 96 穴プレートに、2% BSA で 200 倍に希釈した血漿 0.1 ml を入れて、4 時間反応した。血漿を除去後 Tween-TBS で 5 回洗浄し、ビオチン標識抗 ZPI ポリクローナル抗体 (MQ-191) 希釈液 (1:1,000) 0.1 ml を加えて 2 時間反応させた。Tween-TBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン希釈液 (1:1,000) を入れて 1 時間反応した。Tween-TBS で洗浄後、Tetramethylbenzidine 基質を反応させ、希硫酸にて反応を停止した後、450 nm の吸光度を測定した。BHK 細胞にヒト ZPI cDNA を安定導入し発現、部分精製した組換え体 ZPI を標準物質として測定し、濃度を算出した。

3. PZ の ELISA 測定

市販の ZYMUTEST Protein Z (Hyphen BioMed

社) を用いて測定した。

4) 統計解析法

各検体を 3 回ずつ測定し、統計ソフトウェア JMP6.0 を用いて各統計解析を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究の組換え DNA 実験については山形大学遺伝子組換え実験安全委員会の、臨床研究については山形大学医学部倫理委員会の審議と承認を得て行った。血液検体は、共同研究者が対象者の同意書を得て採取した。

C. 研究結果

不育症における抗凝固システムの意義を明らかにする試みを実施した。

1) ZPI の ELISA による測定システムの開発

ヒト ZPI cDNA を培養細胞に導入して組み換えタンパク質を産生させ、ELISA システムの標準物質として用いて絶対濃度を決定した。

2) 日本人健常対照の血中 ZPI 及び PZ 濃度の測定とドイツ人との比較

平均年齢 34 歳の健康な非妊娠日本人女性において ZPI 濃度を測定したところ、平均年齢 28 歳の健康な非妊娠ドイツ人女性より有意に低かった。PZ 濃度も、ドイツ人女性より低い傾向にあった。年齢による ZPI と PZ の変化はなかったので、平均年齢の違いによるものではない。

3) 血中 ZPI 及び PZ 濃度の関係

血中では全ての PZ が ZPI と結合していることが知られており、両者の濃度に相関があることが報告されているので、非妊娠日本人女性のデータを統計的に解析したところ、有意な相関が認められた。これは、非妊娠ドイツ人女性においても同様であった。

4) 日本人の正常妊娠における ZPI 及び PZ 濃度の変動

日本人正常妊娠女性において ZPI 及び PZ 濃度を測定したところ、非妊娠女性よりも妊娠初期の ZPI は高く、初期よりも中期、中期よりも後期と有意に増加し、産褥期には有意に低下した。一方、PZ 濃度は、妊娠初期は非妊娠女性と有意差はなかったが、中期は初期より有意に高くなり、後期は更に増加して、産褥期には有意に低下した。従って、ZPI と PZ は異なる遺伝子発現制御を受けていると思われる。

5) ZPI 及び PZ 濃度とホルモンの関係

妊娠に伴って増加するエストロゲンとプロゲステロンが ZPI 及び PZ 濃度に影響を与えている可能性が高いので、日本人更年期女性においてホルモン補充療法開始前後で測定したところ、両抗凝固タンパク質濃度に有意な変化は認められなかった。

6) 不育症における ZPI 及び PZ 濃度

日本人の不育症において ZPI 及び PZ 濃度を測定したところ、非妊娠女性と有意差はなく、全ての正常妊娠期間の値よりも有意に低かった。

7) 正常妊娠と不育症における遊離 ZPI 濃度と PZ/ZPI 比

新開発した ELISA システムが ZPI 濃度を定量することを可能にしたので遊離 ZPI 濃度を計算したところ、全妊娠期間中一定レベルであった。不育症においても、正常な非妊娠女性との差はなかった。一方、不育症の PZ/ZPI 比は正常妊娠の中期と後期と比較すると有意に低かった。これは、正常妊娠の中期と後期において ZPI より PZ の増加が大きいことを反映している。

妊娠により両抗凝固タンパク質は増加するのに拘らず不育症では増加しないので、今後、別の抗凝固タンパク質であるプロテイン S との関係を解析する必要がある。

D. 考察

PZ と同様に ZPI の測定値を濃度として mg/mL (質量/容量) で表現し、不育症における遊離 ZPI (総 ZPI-PZ) の意義を検討するためには、既知の量の ZPI が必要であり、これを標準物質として各個人の血中濃度を較正しなければならない。そこで、先ず、組換え ZPI タンパク質を発現する哺乳類細胞と昆虫細胞株を樹立した。多くの種類のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を詳細に検討し、特異性と感受性を共に満足するものを選択し、新しい定量方法を開発した。この方法により、総 ZPI 量から PZ 量を差し引いて、遊離 ZPI 量を概算することが可能になった。

総 ZPI 量は、PZ 量に先駆けて妊娠初期から増加し、分娩後1週間で非妊娠正常健康者のレベルに低下する。総 ZPI 量は PZ 量と同様不育症では増加せず、遊離 ZPI 量も周産期、不育症でほぼ一定であった。妊娠に伴って総 ZPI 量と PZ 量が増加するので、更年期を過ぎた女性で、女性

ホルモン製剤を服用している症例と服用していない症例で、PZ、ZPI レベルを測定したが、明らかな変化は認められなかった。また、病変卵巣を外科的に摘出した症例と保存的に治療した症例において、治療前後の PZ、ZPI レベルを比較したが、肝癌細胞培養系での検討結果とは異なり、卵巣ホルモンの影響は認められなかったので、ホルモン以外の、例えばサイトカインなどの影響を今後は追究する必要がある。

なお、少数例ではあるが、子宮内胎児死亡例(5例)や抗リン脂質抗体症候群(12例)では PZ が有意に低値であった。更に症例数や対象疾患を増やして各種の病態に ZPI と PZ の果たす役割を追究し、意義や ZPI と PZ の血中レベルの変動のメカニズムを解明する必要がある。

不育症の原因の一部として重要な凝固異常の実態が明らかになりつつある。特に、正常日本人女性の血中 ZPI 及び PZ 濃度を決定したこと、不育症では ZPI 濃度が増加しないことは、本研究による新知見である。抗凝固系の持続的機能低下も胎盤循環不全に関与しているので、他の原因が同定されない症例では両抗凝固タンパク質を測定して、必要に応じて抗凝固療法を行うという新しい道を拓くことが期待される。

E. 結論

不育症の原因の全てが解明されているとはいえず、症例とその家族の苦痛はいまだ除かれてはいない。不育症に関連している候補因子を一つ一つ解析して、分子機序を解明して、治療法を確立し、国民にお知らせすることにより、症例とその家族に希望を持って頂くことが可能になる。ZPI 及び PZ の研究は、その長い階段の一段である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝: ヒト protein Z の分泌様式. 血液・腫瘍科, 2010; 60(2): 183-91.
- 2) 惣宇利正善: ヒト protein Z の独特な分泌様

式:GLAドメインによる非効率、ビタミンK依存性かつワーファリン感受性な分泌. 日本血栓止血学会誌, 2010;21(3):327-33.

- 3) 一瀬白帝:血液凝固と凝固制御. 臨床検査, 2011;印刷中

2. 学会発表

- 1) 一瀬白帝:血栓止血に関わる最近の話題. VTE Protection Seminar in MIYAGI 2010 特別講演, 仙台;2010年1月29日
- 2) 惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: Unique secretion mode of human protein Z: its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. 第33回日本血栓止血学会学術集会 ISTH 2011 Memorial Award, 鹿児島;2010年4月22-24日
- 3) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝: ヒト Protein Z のユニークな分泌様式. 第6回麒麟塾, 東京;2010年6月5日
- 4) 惣宇利正善, 杉浦真弓, 齋藤 滋, 吉田隆之, 倉智博久, Bettina Kemkes-Matthes, Joost Meijers, 一瀬白帝: プロテイン Z 依存性タンパク質分解酵素インヒビターの新しい測定法の開発と周産期、不育症、更年期、卵巣摘出術における検討. 第11回TTMフォーラム学術集会, 東京:2011年3月5日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

山形大学に以下の発明届を提出して手続き中である。

プロテイン Z(PZ)依存性プロテアーゼインヒビター(ZPI)とPZのELISAによる測定値を用いたフリーZPIおよびPZ/ZPI比の決定法(2010年8月)

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
惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝	ヒトprotein Zの分泌様式.	血液・腫瘍科	60(2)	183-191	2010
惣宇利正善	ヒトprotein Zの独特な分泌 様式: GLAドメインによる非 効率、ビタミンK依存性かつ ワーファリン感受性な分泌.	日本血栓止血学 会誌	21(3)	327-333	2010
一瀬白帝	血液凝固と凝固制御.	臨床検査			2011 in print

分担研究報告 29

分担課題: 姉妹染色体の異数性に関する研究

研究分担者 柳原 格 大阪府立母子保健総合医療センター研究所
研究協力者 味村和哉 大阪府立母子保健総合医療センター研究所/大阪大学
研究協力者 光田信明 大阪府立母子保健総合医療センター産科

研究要旨

姉妹染色体異数性を起すモデルメダカの作成に成功した。本年度は長らく学会等でも議論されてきた流早産起因細菌ウレアプラズマについて炎症反応惹起メカニズムの解析を行った。ウレアプラズマの周産期領域における病原因子として臨床分離株由来精製リポ蛋白質及び、合成リポペプチドを同定し、*in vitro/in vivo*においてその病原性・病態メカニズムを証明した。さらに、新たな切り口として病原微生物の粒子径が病原発揮機構に寄与する可能性を示した。また、日本人習慣性流産患者に多く認められる SNP を同定し、あらたな治療戦略の可能性が示唆されたのであわせて報告する。

A. 研究目的

1954 年 Shepard によってヒトウレアプラズマが分離されて以来、その病原性については議論が続いてきた。その理由として、本菌が健康成人生殖器内より高率に(40-80%)分離されており、もはや正常細菌叢を形成する細菌の一種として認識されていること、また菌の分離培養や血清学的診断が一般に難しいことなどがあげられる。そこで、我々は、改良型ウレアプラズマ培地を作製し、*Ureaplasma* spp. や *Mycoplasma hominis* の分離を行ってきた。前方視的に行った流早産胎盤(151例)の *Ureaplasma* spp. の培養では42%が培養陽性であった。疫学的に CAM と *Ureaplasma* spp. 培養陽性の関連性を報告した(Namba & Hasegawa, Ped. Res. 2010)。

1. 本研究では低病原性細菌の病原性を証明する目的にてウレアプラズマの病原因子を同定した。

2. ウレアプラズマは最小の細菌でそのサイズは100-300nmである。ナノシリカを用いた粒子の妊娠マウス投与を行い、粒子サイズと胎盤機能障害について解析を行った。

3. 大規模な海外の調査で、ヘパリン療法は原因不明の習慣性流産には効果が認められないとされる。そこで日本人習慣性流産患者の遺伝的要因について SNP 解析し、これまで原因不明とされてきた習慣性流産患者においても抗凝固療法などの

適応となる可能性のある患者を分類し、治療対象となるのか否かを検討するための解析を行った(各社報道)。

B. 研究方法

1. ウレアプラズマの病原因子探索

これまでにマイコプラズマのリポ蛋白質は TLR2, TLR6 に結合し、シグナルを細胞内に伝えていることが知られている。ウレアプラズマにもそのような免疫反応を惹起するリポ蛋白質の存在は知られていた。そこで、ウレアプラズマ培養液より、TritonX-114 二層分離法によりリポ蛋白質を精製し、また、ジアシル化したペプチドを合成した。TLR2 を導入した HeLa 細胞を精製したリポ蛋白質及び、合成リポペプチドで刺激し、NF- κ B 活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した。次に精製リポ蛋白質及び、合成リポペプチドを妊娠 15 日目のマウスの子宮内に投与し、妊娠 18 日目における胎仔・胎盤への影響を調べた。

2. 粒子サイズとマウス胎盤機能障害の解析
妊娠 16 日マウスに平均粒子径 70nm, 300nm, 1000nm のシリカ粒子をそれぞれ尾静脈より静脈内投与し、18 日目に解析を行った。

3. 習慣性流産 SNP 解析

アネキシン A5 遺伝子のプロモーター領域の