

図3 抗PE抗体の血小板凝集能に与える影響

識する抗PE抗体IgGを加えた血小板に著明な血小板凝集能の亢進が観察された(図3)。以上のことより、抗PE抗体も血小板を介した血栓・流産の原因となりうる事が示唆され、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た。

第XII因子欠乏症(抗第XII因子抗体)

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もっとも高頻度に報告されており、抗リン脂質抗体がそれに続いている⁹⁾。著者らの不

育症外来でも同様の結果が得られている。さらにその後、抗リン脂質抗体の検討が同じグループにより行われ、著者らの不育症外来と同様、抗PE抗体がもっとも高頻度にみられたと報告されている⁵⁾。

さて、抗PE抗体、すなわちキ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-キニン系の蛋白であるからである(図4)。

第XII因子欠乏症が反復血栓症の患者に多いということは以前より知られていた。反復動脈血栓または心筋梗塞患者の20%、反復静脈血栓症患者の8%に第XII因子欠乏症が存在すると報告されている¹⁰⁾。第XII因子欠乏症における血栓形成の原因として、ブラジキニン産生が減少することによって血管内皮細胞からのtissue plasminogen activator (tPA)の分泌が減少するためではないかと推測されている¹¹⁾。そして、20年ほど前より第XII因子欠乏症と反復流産との関係が報告されるようになった¹²⁾。

著者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。非常に興味深いことに、第XII因子欠

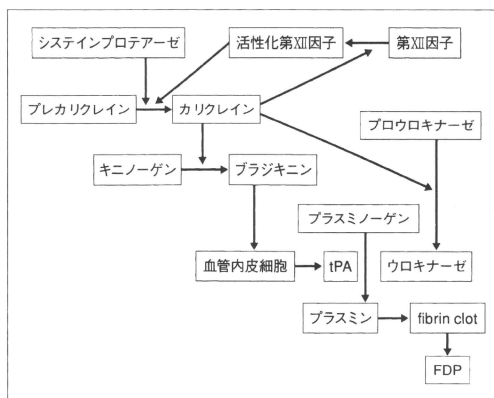


図4 カリクレイン-キノーゲン-キニン-線溶系

乏症患者 34 人中 18 人 (52.9%) が何らかの自己抗体陽性 (おもに抗リン脂質抗体と抗核抗体) であり, 13 人 (38.2%) は抗リン脂質抗体陽性であった。このことより第XII因子欠乏には自己抗体が関与していることが強く示唆された。

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¹³⁾。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¹⁴⁾。

ついで著者らも第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。それによると, 不育症患者において抗第XII因子抗体の有無と, 第XII因子欠乏の有無の間に統計学的に有意な相関が観察され, 抗第XII因子抗体が第XII因子活性低下を引き起こしていることが強く示唆された。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いえないが, 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。

著者らは, 不育症患者のもつ抗第XII因子抗体の76.5%が第XII因子の heavy chain の N 末端のアミノ酸 1~30 を認識することを報告した¹⁵⁾。この部位は第XII因子の血小板 glycoprotein I b α への結合部位である。高分子キニノーゲンと第XII因子はどちらも glycoprotein I b α の細胞外サブユニットである glycolalacin に競合的に結合し, トロンビンによる血小板活性化を阻害することが報告されている。したがって, 抗第XII因子抗体は第XII因子が血小板の GP I b-IX-V に結合することを阻害し, 血栓や流産を引き起こしている可能性がある。ちなみに, 高分子キニノーゲンの血小板への結合部位はキニノーゲン, ドメイン 3 の Cys333-Lys345 (CNA13) であり, 抗 PE 抗体の認識部位と同一であることがわかっている。第XII因子欠乏不育症患

者の 32.4% に抗 PE 抗体が陽性であり, 抗第XII因子抗体と抗 PE 抗体は非常に類似した抗体であることが合成ペプチドを用いた検討でわかってきている。

まとめると, 不育症患者のもつ第XII因子とキニノーゲンに対する自己抗体は, 第XII因子とキニノーゲンが血小板の GP I b-IX-V に結合してトロンビンによる血小板活性化を防ぐことを阻害し, 血栓や流産を引き起こしている可能性がある。最近著者らは, レーザー散乱粒子計測法を用いて不育症患者の血小板凝集能を調べたところ, 抗 PE 抗体陽性+第XII因子欠乏の患者で亢進がみられ, これらの患者では *in vivo* でも血小板が活性化していることが示唆された。

第XII因子 (Hageman factor) 欠乏症自体が本当に血栓症や流産の原因になるかに関してはいまだ結論が出ていない。たとえば, 先天的第XII因子欠損症で知られる John Hageman は最終的には術後肺塞栓で死亡したが, 長生きであった。また最近の報告では, 第XII因子ノックアウトマウスは流産も血栓も起こさなかった。これらのことを総合すると, 第XII因子欠乏自体ではなく, 第XII因子に対する自己抗体の存在が血栓・流産を引き起こすというのが著者の仮説である¹⁶⁻¹⁸⁾。

第XII因子活性を測定するときに注意すべきことは, 第XII因子活性はホルモンの影響を強く受けることである。すなわち, 妊娠中と授乳中は第XII因子活性は高くなるので, かならず非妊娠時に測定する必要がある。また, 第XII因子活性低下の不育症患者が妊娠した場合, 第XII因子活性はみかけ上正常化するが, 抗第XII因子抗体が消えて治ったわけではないので, 治療を中止するべきではない。

カリクレイン-キニン系の破綻と流産

女性の生殖系は体内で 2 番目にキニノーゲンおよびその代謝産物の豊富な部位であるといわれている。ラットでは各臓器のキニノーゲンの濃度は, 血漿 12.2 $\mu\text{g/ml}$, 子宮 10.9 $\mu\text{g/ml}$, 肝 0.4 $\mu\text{g/ml}$, 腎 1.2 $\mu\text{g/ml}$ と報告されており¹⁹⁾, 生殖器の組織および血漿中のキニノーゲンの濃度は, 排卵, 妊娠, 出産に伴って変動すると報告されている^{19,20)}。

カリクレイン-キニン系(図4)は、胎児・胎盤の血管に存在していることが最近明らかになってきている^{21,22)}。胎盤の大きな血管や臍帯ではなく、絨毛の毛細血管内皮細胞にキノーゲンやプレカリクレイン、カリクレインが存在することが報告されており²³⁾、キニンが胎盤の毛細血管に局限して産生されていることが示唆されている²⁴⁾。キニンは、抗凝固、線溶促進作用だけでなく、血流を増加させるなどの生物学的活性をもったペプチドであり、胎盤内で放出され、胎盤の血流や代謝産物の経胎盤輸送などを調節する重要な役割を担っている可能性が指摘されている。つまりカリクレイン-キニン系は、全身の血液凝固、線溶系のみならず、とくに生殖の領域で非常に重要な位置を占めていると考えられる。

高分子キノーゲンは heavy chain と light chain に分けられ、その間にブラジキニンが存在する。高分子キノーゲンが分解されると、ブラジキニンを放出し、heavy chain と light chain よりなる二本鎖キノーゲン(HKa)になる。最近の研究で、HKaは血管新生を阻害し、ブラジキニンと一本鎖キノーゲンは血管新生を促進すると報告されている²⁵⁾。高分子キノーゲンがヘパリン、すなわち肥満細胞由来の glycosaminoglycan(GAG)に結合することは以前より知られていた。最近、高分子キノーゲンはそのドメイン3のLDC27およびドメイン5(His479-His498)を介して血管内皮細胞のGAGであるヘパリン硫酸とコンドロイチン硫酸に結合することが解明された²⁶⁾。細胞に結合した高分子キノーゲンはGAGが高分子キノーゲンを分解から守るため、ほとんどが血管新生を促進する一本鎖である²⁷⁾。さらにRennéらは、LDC27に対する抗体は高分子キノーゲンがヘパリン硫酸に結合するのを阻害することを報告した²⁶⁾。著者はすでに、抗PE抗体がLDC27を認識することを報告している⁷⁾、このことは抗PE抗体がキノーゲンのヘパリン硫酸への結合を阻害することを強く示唆している。

高分子キノーゲンが細胞表面のGAGから離れるということは、高分子キノーゲンが分解されてHKaとブラジキニンが生じるということである。ブラジキニンの半減期は30秒、HKaの半

減期は9時間であるので、抗PE抗体があると結果的にHKaが生じ、胎盤の血管新生を阻害し、流産を引き起こす可能性がある。そしてヘパリン療法は肥満細胞由来のGAGであるヘパリンが高分子キノーゲンに結合し、キノーゲンの分解を防ぐことにより胎盤の血管新生を促進し、流産を防いでいる可能性がある。

著者らの臨床成績であるが、抗PE抗体陽性でなおかつ第XII因子欠乏の不育症患者にアスピリン単独療法を施行したところ、妊娠成功率は64.7%であったが、アスピリン+ヘパリン併用療法を施行したところ、妊娠成功率は92.9%となり、統計学的に有意($p=0.017$)な改善がみられた²⁸⁾。

おわりに

前述したとおり、最近、第XII因子欠乏症などカリクレイン-キニン系の蛋白の欠乏と反復流産との関係が報告されている。また、キノーゲン依存性抗PE抗体や、抗第XII因子抗体など、カリクレイン-キニン系蛋白に対する自己抗体と反復流産との関係も報告されている。カリクレイン-キニン系は妊娠維持に重要な役割を果たしていると考えられるので、その破綻は流産に直結する可能性がある。

カリクレイン-キニン系の破綻による流産の特徴は妊娠10週未満に起こることである。現時点での治療は低用量アスピリン療法やヘパリン療法などの抗凝固療法があげられる。しかし最近、著者はGAG、とくにヘパリンがELISA中で劇的に抗PE抗体の抗体価を低下させることを報告しており、ヘパリンの抗体中和作用または吸着作用が重要である可能性がある。さらに、ヘパリンはカリクレイン-キニン系、とくにブラジキニンを介して血管新生、つまりは胎盤形成を促進するという報告もあり、直接胎盤に作用して流産を防止する可能性もある。ヘパリンは単に血液凝固系に作用するのみならず、妊娠維持に直接重要な役割を果たしている可能性がある。

文献

- 1) Roubey, R. A. S. : *Blood*, **84** : 2854-2867, 1994.
- 2) Sugi, T. and McIntyre, J. A. : *Blood*, **86** : 3083-

- 3089, 1995.
- 3) Miyakis, S. et al. : *J. Thromb. Haemost.*, **4** : 295-306, 2006.
 - 4) Sugi, T. et al. : *Fertil. Steril.*, **71** : 1060-1065, 1999.
 - 5) Gris, J. C. et al. : *Thromb. Haemost.*, **84** : 228-236, 2000.
 - 6) Sugi, T. et al. : *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, **30** : 326-332, 2004.
 - 7) Katsunuma, J. and Sugi, T. et al. : *J. Thromb. Haemost.*, **1** : 132-138, 2003.
 - 8) Sugi, T. and McIntyre, J. A. : *Thromb. Res.*, **84** : 97-109, 1996.
 - 9) Gris, J. C. et al. : *Thromb. Haemost.*, **77** : 1096-1103, 1997.
 - 10) Halbmayer, W. M. et al. : *Thromb. Haemost.*, **68** : 285-290, 1992.
 - 11) Levi, M. et al. : *J. Clin. Invest.*, **88** : 1155-1160, 1991.
 - 12) Schved, J. F. et al. : *Fertil. Steril.*, **52** : 335-336, 1989.
 - 13) Gallimore, M. J. and Winter, J. M. : *Thromb. Haemost.*, **79** : 87-90, 1998.
 - 14) Jones, D. W. et al. : *Thromb. Haemost.*, **81** : 387-390, 1999.
 - 15) Inomo, A. and Sugi, T. et al. : *Thromb. Haemost.*, **99** : 316-323, 2008.
 - 16) Sugi, T. and Makino, T. : *J. Reprod. Immunol.*, **53** : 269-277, 2002.
 - 17) Sugi, T. and Makino, T. : *Am. J. Reprod. Immunol.*, **47** : 283-288, 2002.
 - 18) Sugi, T. and Makino, T. : *Curr. Drug Targets*, **6** : 551-557, 2005.
 - 19) Adam, A. et al. : *Biochem. Pharmacol.*, **38** : 1569-1575, 1989.
 - 20) Hossain, A. M. et al. : *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **173** : 830-834, 1995.
 - 21) Weerasinghe, K. M. and Gadsby, J. E. : *Endocrinology*, **131** : 1777-1781, 1992.
 - 22) Miatello, R. M. et al. : *Hypertension*, **23** (Suppl. 1) : 193-197, 1994.
 - 23) Hermann, A. et al. : *Placenta*, **17** : 223-230, 1996.
 - 24) Mutoh, S. et al. : *Agents Actions*, **38** (II) : 320-329, 1992.
 - 25) Colman, R. W. et al. : *J. Thromb. Haemost.*, **1** : 164-170, 2003.
 - 26) Renné, T. et al. : *J. Biol. Chem.*, **275** : 33688-33696, 2000.
 - 27) Renné, T. et al. : *J. Immunol.*, **175** : 3377-3385, 2005.
 - 28) 杉 俊隆 : EBM に基づく不妊症診療の実際. 金原出版, 2007, p.55.

* * *

特集

抗凝固療法の新しい展開

[IV. 産科領域における血液凝固線溶系]

8. 習慣流産と血液凝固阻害薬

杉 俊隆すぎ たかふみ

杉ウイメンズクリニック不育症研究所。

要旨

近年、抗リン脂質抗体症候群の治療方針として低用量アスピリン＋ヘパリン皮下自己注射がスタンダードな治療法になりつつある。さらに、プロテインS欠乏症、プロテインC欠乏症、第XII因子欠乏症などのthrombophiliaにもこの治療が応用されつつある。アスピリンやヘパリンの妊娠中の投与は胎盤早期剥離を引き起こす危険な治療であるという偏見もいまだみられる。本稿ではEBMに基づき、治療の安全性と有用性に関して解説する。

Key Words 抗リン脂質抗体、ヘパリン、アスピリン

以前よりSLEをはじめとする自己免疫疾患の患者にpregnancy lossが多いことが知られ、母体の免疫能の異常が妊娠維持に障害を起こす可能性が指摘されてきた。最近になって、それが抗リン脂質抗体という自己抗体によって引き起こされるという説が目されるようになり、抗リン脂質抗体と関連する不育症、血栓症をまとめて抗リン脂質抗体症候群と称し、広く認知されるようになった¹⁾。また、抗リン脂質抗体以外にも、血栓性素因(thrombophilia)があれば不育症になることが報告され、プロテインS欠乏症、プロテインC欠乏症、第XII因子欠乏症などが注目されている。

抗リン脂質抗体症候群の治療指針

いまだ不明な点の多い症候群であり、抗リン

脂質抗体陽性不育症患者の治療方針も完全には確立してはいないが、ヘパリンが有効であり、低用量アスピリン＋ヘパリン5,000U皮下自己注射12時間ごとというのがスタンダードな治療法になりつつある。

以前の抗リン脂質抗体症候群の不育症に対する治療法はステロイドによる免疫抑制療法であった。大量のプレドニゾロンが必要であるが、有効性が報告されている。ヘパリン療法に匹敵するプレドニゾロンの量は40mg/日であり、妊娠成功率は約75%と報告されている。しかしながら、プレドニゾロンはヘパリンと比べて早産、低出生体重児、妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病など副作用が多いので注意が必要であり、最近では世界的にSLEなどを背景にもつ2次性抗リン脂質抗体症候群の症例を除き、使用されなくなった。

エビデンス

本稿は、EBMに基づいて、抗リン脂質抗体症候群の治療方針を解説したい。したがって、まずエビデンスとなるいくつかの論文の要旨を紹介する。

①Silver RK, et al : *Am J Obstet Gynecol* 1993 ; 169 : 1411-1417.²⁾

目的：抗リン脂質抗体陽性不育症患者に対して、アスピリン単独療法とアスピリン+プレドニゾロン併用療法を比較した。

方法：39人の不育症患者を、低用量アスピリン+プレドニゾロン併用群(17人)と低用量アスピリン単独群(22人)に分けて検討した。アスピリンは81mg/日を投与、プレドニゾロンは20mg/日で開始し、抗体価を見ながら増減した。

結果：34人の患者に関して評価ができた(プレドニゾロン+低用量アスピリン併用12人、アスピリン単独22人)。34人全員が生児を得た。プレドニゾロン+低用量アスピリン併用群はアスピリン単独群より有意に早産が多く(8/12 vs 3/22)、プレドニゾロン暴露は早産の独立した危険因子であった。

結論：低用量アスピリンにプレドニゾロンを併用することは、妊娠成功率を改善せず、抗リン脂質抗体陽性患者に産科的合併症を引き起こした。

②Laskin CA, et al : *N Engl J Med* 1997 ; 337 : 148-153.³⁾

目的：抗リン脂質抗体陽性患者に反復流産がみられることはよく知られている。そのような患者はまた、SLE患者によくみられるような自己抗体を合わせもつことも珍しくない。そのような患者をプレドニゾロンとアスピリンで治療すると、流産の危険を軽減するかどうか調べた。

方法：最低2回以上原因不明流産既往のある非妊婦女性773人に対して、抗核抗体、抗DNA抗体、抗リンパ球抗体、抗カルジオリビン抗体、ルーブスアンチコアグラントを測定した。少なくとも1つの自己抗体陽性患者385人中、後に妊娠した202人を無作為に二分して、プレドニゾロン(0.5-0.8mg/Kg/日)とアスピリン(100mg/日)か、placeboを妊娠中投与した。

結果：治療群の65%と、placebo群の56%に生児が生まれた($p=0.19$)。治療群は、placebo群と比較して早産が多かった(62% vs 12%, $p<0.001$)。母体の副作用は、高血圧(治療群13%; placebo群5%; $p=0.05$)と糖尿病(15%と5%; $p=0.02$)が多かった。

結論：自己抗体陽性反復流産患者を、プレドニゾロンとアスピリンで治療することは、生児獲得率を向上させることに関して効果はなく、早産の危険を上昇させる。

③Kutteh WH : *Am J Obstet Gynecol* 1996 ; 174 : 1584-1589.⁴⁾

目的：抗リン脂質抗体症候群の治療として、低用量アスピリン療法単独と、低用量アスピリン+ヘパリン併用療法を比較した。

方法：抗リン脂質抗体陽性で最低3回以上の連続した自然流産の既往のある50人の患者のプロスペクティブ、single-centerの調査である。

結果：アスピリン単独療法を受けた患者25人中11人(44%)と、アスピリン+ヘパリン併用療法を受けた患者25人中20人(80%)が生児を獲得した($p<0.05$)。

結論：抗リン脂質抗体陽性習慣流産患者群で、アスピリン+ヘパリン併用療法は低用量アスピリン単独療法と比較して有意に妊娠の予後を改善した。

④Rai R, et al : *BMJ* 1997 ; 314 : 253-257.⁵⁾

目的：抗リン脂質抗体陽性習慣流産患者において、低用量アスピリン+ヘパリン併用療法は

低用量アスピリン単独療法と比較して生児獲得率を高めるか検証した。

方法：Randomised controlled trial. 抗リン脂質抗体陽性習慣流産患者 90人が対象。低用量アスピリン (75 mg/日) または、低用量アスピリン十ヘパリン 5,000 U 皮下注 12 時間ごとに投与。尿検査で妊娠反応陽性確認次第、低用量アスピリンを開始し、34 週で治療は終了。両治療群の生児獲得率を比較した。

結果：低用量アスピリン十ヘパリン療法の生児獲得率は 71% (32/45)、アスピリン単独療法では 42% (19/45) であった (オッズ比 3.37)。流産の 90% 以上は 1st trimester に起きた。51 の生児獲得に成功した妊娠中、12 (24%) は 37 週以前に早産した。アスピリン十ヘパリン併用療法では、腰椎の骨密度は平均して 5.4% 減少した。

結論：抗リン脂質抗体が関係した習慣流産患者に対して、アスピリン十ヘパリン併用療法はアスピリン単独療法と比較して有意に生児獲得率を高めた。

⑤ Coomarasamy A, et al : *Obstet Gynecol* 2003 ; 101 : 1319-1332.⁶⁾

目的：妊娠高血圧症候群の既往、慢性高血圧、糖尿病、腎疾患など、high risk の患者にアスピリンを投与し、周産期死亡や妊娠高血圧症候群の予防に効果があるかを検討した。

方法：MEDLINE, EMBASE, Cochrane Library, National Research Register, SCISEARCH, ISI Conference Proceedings より、すべての randomized trial を抽出し、そのなかで信頼性の高いと思われる 14 の論文について、metaanalysis を施行した。

結果：14 の論文、12,416 人の患者について検討したところ、周産期死亡と妊娠高血圧症候群の減少に関して、アスピリン療法の有意な効果が認められた。また、アスピリンには、早産の減少、出生時体重の 215 g 増加という効果も認

められた。副作用に関しては、アスピリンによるいかなる弊害も認められなかった。胎盤早期剥離、胎児脳室内出血や、その他の新生児出血のリスクは増加しなかった。アスピリンの催奇形性を示唆するデータも得られなかった。

結論：アスピリンは、high risk の患者に対して、周産期死亡と妊娠中毒症の risk を減少させた。これらの結果と、アスピリンの安全性と低費用を考慮すると、アスピリン療法は妊娠高血圧症候群の予防として考慮されるべきである。

根拠となった臨床研究の問題点と限界

論文①と②では、プレドニゾロンを使用してもしなくても生児獲得率に差は出なかったとあるが、これらの論文では、抗リン脂質抗体症候群診断基準案を満たさない 2 回流産既往の患者や、抗リン脂質抗体以外の自己抗体陽性患者も含まれており、これらの論文からプレドニゾロンが抗リン脂質抗体症候群に無効であるとはいえないが、副作用が多いということに関しては証明されたといえる。論文③④では、アスピリン単独療法では生児獲得率約 40% であったのが、アスピリン十ヘパリン併用療法では約 70～80% に向上した。残念ながら、これらの論文には無治療対照群がないので、アスピリン単独療法が抗リン脂質抗体症候群に有効か否かは依然として不明である。論文⑤は、抗リン脂質抗体症候群の治療に関する論文ではなく、妊娠中毒症の予防にアスピリンが有効であったという論文である。この論文により、妊娠中における低用量アスピリン療法の安全性が、かなりの信頼性をもって証明されたといえる。

ヘパリンの抗凝固作用以外の作用機序

抗リン脂質抗体症候群の胎盤には確かに血栓が多いが、胎児死亡の原因としては不十分なこ

とが多いこと、抗リン脂質抗体症候群の胎盤は小さいことなど、抗リン脂質抗体が血栓を介して胎児死亡を起こしているだけではなく、胎盤血管障害を介する病原性が疑われている。そして、ヘパリンが有効な理由は、抗血栓作用だけでなく、胎盤血管形成促進が考えられる。胎盤ができあがった妊娠中期からヘパリンを開始しても効果が期待できないこと、1日1万単位という抗凝固作用を期待するには少ない用量で有効であるなどのことがその仮説を支持している。

女性の生殖系は、体内で2番目にキヌノーゲンおよびその代謝産物の豊富な部位であるといわれている。ラットでは、各臓器のキヌノーゲンの濃度は、血漿 12.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、子宮 10.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、肝臓 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、腎臓 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と報告されており⁷⁾、生殖系の組織および血漿中のキヌノーゲンの濃度は、排卵、妊娠、出産に伴って変動すると報告されている⁷⁾⁸⁾。

カリクレイン-キニン系は胎児、胎盤の血管に存在していることが最近明らかになってきている⁹⁾¹⁰⁾。胎盤の大きな血管や臍帯ではなく、絨毛の毛細血管内皮細胞にキヌノーゲンやプレカリクレイン、カリクレインが存在することが報告されており¹¹⁾、キニンが胎盤の毛細血管に限局して産生されていることが示唆されている¹²⁾。キニンは抗凝固、線溶促進作用だけでなく、血流を増加させるなどの生物学的活性をもったペプチドであり、胎盤内で放出され、胎盤の血流や代謝産物の経胎盤輸送などを調節する重要な役割を担っている可能性が指摘されている。つまり、カリクレイン-キニン系は、全身の血液凝固、線溶系のみならず、特に生殖の領域で非常に重要な位置を占めていると考えられる。

高分子キヌノーゲンは、heavy chain と light chain に分けられ、その間にブラジキニンが存在する。高分子キヌノーゲンが分解されると、ブラジキニンを放出し、heavy chain と light chain

よりなる二本鎖キヌノーゲン (HKa) になる。最近の研究で、HKa は血管新生を阻害し、ブラジキニンと一本鎖キヌノーゲンは血管新生を促進すると報告されている¹³⁾。高分子キヌノーゲンがヘパリン、すなわち肥満細胞由来の glycosaminoglycan (GAG) に結合することは以前より知られていた。最近、高分子キヌノーゲンはそのドメイン 3 の LDC27 およびドメイン 5 (His479-His498) を介して血管内皮細胞の GAG であるヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸に結合することが解明された¹⁴⁾。細胞に結合した高分子キヌノーゲンは、GAG が高分子キヌノーゲンを分解から守るため、ほとんどが血管新生を促進する一本鎖である¹⁵⁾。さらに Remeらは、LDC27 に対する抗体は高分子キヌノーゲンがヘパラン硫酸に結合するのを阻害することを報告した¹⁴⁾。筆者はすでに、抗 phosphatidylethanolamine (PE) 抗体が LDC27 を認識することを報告している¹⁶⁾。このことは、抗 PE 抗体がキヌノーゲンのヘパラン硫酸への結合を阻害することを強く示唆している。高分子キヌノーゲンが細胞表面の GAG から離れるということは、高分子キヌノーゲンが分解されて HKa とブラジキニンが生じることである。ブラジキニンの半減期は 30 秒、HKa の半減期は 9 時間であるので、抗 PE 抗体があると結果的に HKa が生じ、胎盤の血管新生を阻害し、流産を引き起こす可能性がある。そして、ヘパリン療法は、肥満細胞由来の GAG であるヘパリンが高分子キヌノーゲンに結合し、キヌノーゲンの分解を防ぐことにより、胎盤の血管新生を促進し、流産を防いでいる可能性がある。

われわれの臨床成績であるが、抗 PE 抗体陽性でなおかつ第 XII 因子欠乏の不育症患者にアスピリン単独療法を施行したところ、妊娠成功率は 64.7%であったが、アスピリン+ヘパリン併用療法を施行したところ、妊娠成功率は 92.9%となり、統計学的に有意 ($p=0.017$) な改

善がみられた¹⁷⁾。

わが国の患者に適応する際の 注意点

ヘパリンに関しては、日本で販売されている皮下注用製剤(カプロシン[®])の自己注射は保険が適応されないこともあり、残念ながら、日本ではまだヘパリン療法があまり普及しているとは言い難いため、依然として抗リン脂質抗体症候群の治療にプレドニゾロンが使用される傾向がある。しかしながら、最近では世界的にプレドニゾロンはSLEなどを合併した二次性抗リン脂質抗体症候群を除いて妊娠中には使用されなくなっており、低用量アスピリン+ヘパリン療法にとって代わられた。また、プロテインS欠乏症や、プロテインC欠乏症などの血液凝固系蛋白異常によるthrombophiliaに免疫抑制剤であるプレドニゾロンを使用するのは見当違いである。プレドニゾロンは抗リン脂質抗体など自己抗体を介すthrombophiliaの治療には有効だが、抗凝固療法ではない。さらに、最近では低分子ヘパリンの妊娠中における有用性と安全性が報告され、欧米では低分子ヘパリンが第一選択となりつつある。日本では、欧米に比較してヘパリン惹起性血小板減少症の頻度が低いため、未分画ヘパリンの副作用が問題になることはほとんどなく、高価で緊急時に硫酸プロタミンで中和しにくい低分子ヘパリンを使用する理由があまりない。

また最近、DICや血栓症に対してヘパリン硫酸を主成分とするオルガン[®]の有用性が報告されているが、抗リン脂質抗体症候群の妊婦へ投与した場合の有用性と安全性に関しては、まったくエビデンスがないので注意が必要である。オルガンは半減期が長く、1日1回の投与で済むが、逆にいえば急に分娩になった時も効果は持続し、出血が増える危険がある。ヘパリンのように硫酸プロタミンで中和することも

できないので、妊娠中は使いづらい。また、皮下注用製剤がないこと、ヘパリンに比較して非常に高価であることなども問題である。また、最近筆者は、GAG、特にヘパリンがELISA中で劇的に抗PE抗体の抗体価を低下させることを報告しており、ヘパリンの抗体中和作用または吸着作用が重要である可能性があるが、オルガン[®]のこの効果はヘパリンの1/200しかなく、ヘパリンの代替薬としての効果も疑問である。

ヘパリン自己注射は、患者に対して非常な苦痛を伴うと誤解されている場合があるが、それは間違いである。インスリン自己注射用の注射器(30Gの針)を使い、1回5,000単位(0.2mL)を自己注射することは、それほど患者に苦痛を与えない。静注用ヘパリン5,000単位(5mL)を皮下注したり、携帯用ポンプで24時間持続静注するといった方法が取られている場合、患者に苦痛を与える。特に、ヘパリンを携帯用ポンプで持続静注する場合、ヘパリンには防腐剤が添加されていないので、常温で数日間ヘパリンを携行することは、感染の危険があり、問題である。

わが国では、アスピリンを出産予定日12週以内に用いることは禁忌とされているが、低用量アスピリンを妊娠末期に用いたことにより胎児動脈管に対して影響が出たという報告は今のところなく、最近欧米では論文⑤に示された通り、周産期のトラブルを避けるためにも分娩当日まで使用される傾向にある。

●文 献

- 1) Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al : International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999 ; 42 : 1309-1311.
- 2) Silver RK, et al : Comparative trial of prednisone plus aspirin versus aspirin alone in the treatment of anticardiolipin antibody-positive obstetric patients. *Am J Obstet Gynecol* 1993 ; 169 : 1411-1417.
- 3) Laskin CA, et al : Prednisone and aspirin in women with autoantibodies and unexplained recurrent fetal loss. *N Engl J Med* 1997 ; 337 : 148-153.
- 4) Kutteh WH : Antiphospholipid antibody-associated recur-

- rent pregnancy loss : treatment with heparin and low-dose aspirin is superior to low-dose aspirin alone. *Am J Obstet Gynecol* 1996 ; 174 : 1584-1589.
- 5) Rai R, Cohen H, Dave M, Regan L : Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). *BMJ* 1997 ; 314 : 253-257.
 - 6) Coomarasamy A, Honest H, Papaioannou S, Gee H, Khan KS : Aspirin for prevention of preeclampsia in women with historical risk factors : a systematic review. *Obstet Gynecol* 2003 ; 101 : 1319-1332.
 - 7) Adam A, et al : Quantification of rat T-kininogen using immunological methods. *Biochem Pharmacol* 1989 ; 38 : 1569-1575.
 - 8) Hossain AM, et al : Kininogen present in rat reproductive tissues is apparently synthesized by the liver, not by the reproductive system. *Am J Obstet Gynecol* 1995 ; 173 : 830-834.
 - 9) Weerasinghe KM, Gadsby JE : The presence of glandular kallikrein in rabbit fetal placental conditioned medium. *Endocrinology* 1992 ; 131 : 1777-1781.
 - 10) Miatello RM, et al : Biochemical evidence for a kallikrein-like activity in rat reproductive tissue. *Hypertension* 1994 ; 23 (Suppl) : 193-197.
 - 11) Hermann A, et al : High and low molecular weight kininogen and plasma prekallikrein/plasma kallikrein in villous capillaries of human term placenta. *Placenta* 1996 ; 17 : 223-230.
 - 12) Mutoh S, et al : Studies on blood coagulation-fibrinolysis system regarding kallikrein-kinin system in the utero-placental circulation during normal pregnancy, labor and puerperium. *Agents and Actions* 1992 ; 38/II : 320-329.
 - 13) Colman R, et al : Inhibition of angiogenesis by antibody blocking the action of proangiogenic high-molecular-weight kininogen. *J Thromb Haemost* 2003 ; 1 : 164-170.
 - 14) Renne T, et al : High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation of endothelial cells. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 33688-33696.
 - 15) Renne T, et al : Local bradykinin formation is controlled by glycosaminoglycans. *J Immunol* 2005 ; 175 : 3377-3385.
 - 16) Katsunuma J, Sugi T, et al : Kininogen domain 3 contains regions recognized by antiphosphatidylethanolamine antibodies. *J Thromb Haemost* 2003 ; 1 : 132-138.

- 17) 杉 俊隆 : EBMに基づく不育症診療の実際. 金原出版, 2007 ; p55.

著者連絡先

〒202-0033

神奈川県横浜市港北区新横浜 2-12-1

新横浜光伸ビル7階

杉ウイメンズクリニック不育症研究所

杉 俊隆

一口メモ

thrombophilia (血栓性素因) に関係する妊娠の異常として多くみられるものは、反復流産、妊娠高血圧症候群、常位胎盤早期剝離、子宮内胎児発育遅延 (IUGR)、子宮内胎児死亡 (IUDF) などが挙げられる。その原因として、抗リン脂質抗体、プロテイン S 欠乏症、プロテイン C 欠乏症、AT-III 欠乏症、フィブリノーゲン異常症、第 XII 因子欠乏症などが報告されている。

低用量アスピリンやヘパリンを妊娠中に投与すると、副作用として胎盤早期剝離が引き起こされ危険であるので使用するべきではないという誤った意見があるが、アスピリンやヘパリンにはそのような副作用は報告されていない。胎盤早期剝離は脱着膜ラセン動脈の血栓に続発する破綻出血により引き起こされると考えられ、治療中に早期剝離が起きた場合、むしろ抗凝固療法が不十分であったと考えるべきかもしれない。

(杉 俊隆)

クリニカルカンファレンス4 不育症

2) 抗リン脂質抗体症候群

座長：横浜市立大学
平原 史樹

杉ウイメンズクリニック不育症研究所
東海大学
杉 俊隆

日本医科大学
竹下 俊行

抗リン脂質抗体症候群

抗リン脂質抗体と不育症、血栓症との関係は広く知られるようになり、抗リン脂質抗体症候群として注目を浴びている。表1に示したものは、2006年に改訂された抗リン脂質抗体症候群の診断基準である¹⁾。これによると、いくら抗リン脂質抗体が陽性でも、初期流産2回の既往しかなければ、診断基準を満たさない。また、抗リン脂質抗体が陽性でも、40GPLまたはMPL以上の抗体価がなければいけない。さらに、不育症外来で高頻度に見つかる抗 phosphatidylethanolamine(PE)抗体は、この診断基準には入っていない。したがって、実際不育症外来でこの診断基準を満たす患者さんはほとんどいない。

実際、診療を行っていて、抗リン脂質抗体の存在を疑うべき状況を表2に列挙した。習慣流産は当然としても、妊娠10週(CRL 30mm)以降の原因不明子宮内胎児死亡は1回でもあったら検査を行うべきである。また、妊娠34週未満に分娩に追い込まれた早期発症、重篤な妊娠高血圧症候群や、常位胎盤早期剥離などの胎盤血管障害も抗リン脂質抗体などの血栓性素因を疑うべきである。

抗 phosphatidylethanolamine(PE)抗体(抗キヌノーゲン抗体)と第XII因子

妊娠初期流産を繰り返すタイプの不育症患者は、抗リン脂質抗体症候群の診断基準にある抗カルシオリピン抗体やループスアンチコアグulantが陽性のことは少なく、むしろ抗PE抗体を持つことが多い。したがって、この抗体の測定も重要である。1995年に筆者は、抗PE抗体がPEそのものではなく、PEに結合したキヌノーゲンを認識するということを世界で初めて発見した²⁾。この知見に基づいて、筆者は抗PE抗体を測定するELISA法を開発し、今ではSRL社に検査を依頼すれば、日本中の病院で測定が可能である。この測定法で、不育症患者における抗PE抗体を測定したところ、不育症における抗PE抗

Antiphospholipid Syndrome

Toshitaka SUGI

Laboratory for Recurrent Pregnancy Loss, Sugi Women's Clinic

Tokai University School of Medicine, Kanagawa

Key words: Antiphosphatidylethanolamine antibody · Factor XII · Heparin · Aspirin · Kininogen

(表1) 抗リン脂質抗体症候群診断基準(2006年改訂)

臨床所見	
血栓症:	1回またはそれ以上の <ul style="list-style-type: none"> ・動脈血栓 ・静脈血栓 ・小血管の血栓症(組織、臓器を問わない)
妊娠の異常:	<ul style="list-style-type: none"> ・3回以上の連続した原因不明の妊娠10週未満の流産(本人の解剖学的、内分泌学的原因、夫婦の染色体異常を除く) ・1回以上の胎児形態異常のない妊娠10週以上の原因不明子宮内胎児死亡 ・1回以上の新生児形態異常のない妊娠34週未満の重症妊娠高血圧腎症、子癩または胎盤機能不全に関連した早産
検査所見	
抗カルジオリピン抗体	<ul style="list-style-type: none"> ・IgGまたはIgM ・中、高抗体価(>40GPLまたはMPL、または>99 percentile) ・12週間以上の間隔をあけて、2回以上陽性 ・標準化されたELISAで測定
ループスアンチコアグラント	<ul style="list-style-type: none"> ・12週間以上の間隔をあけて、2回以上陽性 ・International Society on Thrombosis and Hemostasisのガイドラインに従って検出
抗 β_2 glycoprotein I抗体	<ul style="list-style-type: none"> ・IgGまたはIgM ・抗体価>99 percentile ・12週間以上の間隔をあけて、2回以上陽性 ・標準化されたELISAで測定

臨床所見が1つ以上、検査所見が1つ以上存在した場合、抗リン脂質抗体症候群と診断する

体の重要性が浮かび上がって来たのである。また、最近では抗PE抗体は流産だけでなく、血栓症、妊娠高血圧症候群との関係も報告されている。

さらに抗PE抗体がキヌノーゲンのどの部位を認識しているのか、合成ペプチドを用いてepitope mappingを行ったところ、キヌノーゲン依存性抗PE抗体の70.8%は、キヌノーゲン、ドメイン3のLeu331-Met357(LDC27)を認識することが明らかになった³⁾。この部位は、キヌノーゲンが血小板に結合し、血小板活性化を抑制している部位と一致する。したがって、抗PE抗体が結合することによりキヌノーゲンの抗血小板活性が阻害されると考えられ、抗PE抗体の血小板を介した病原性を強く示唆している。逆に言えば、この部位を認識しない抗PE抗体の病原性は不明である。したがって、抗PE抗体が陽性だからといって過去の流産の原因であ

(表2) 抗リン脂質抗体の存在を疑うべき状況

- ・反復流産、習慣流産
- ・妊娠10週以降の原因不明子宮内胎児死亡
- ・早期発症、重篤な妊娠高血圧症候群
- ・妊娠に関連した血栓症
- ・常位胎盤早期剥離
- ・子宮内胎児発育遅延
- ・自己免疫疾患合併妊娠
(SLE、ITP、橋本病、パセドウ病など)
- ・梅毒血清反応の生物学偽陽性
- ・aPTTの延長

ると診断したり、治療の対象にするのは早急である。病原性のある抗体を見極める必要がある。そこで有用なのが、第XII因子活性である。

我々は、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⁴。それによると、不育症患者において抗第XII因子抗体の有無と、第XII因子欠乏の有無の間に、統計学的に有意な相関が観察され、抗第XII因子抗体が第XII因子活性低下を引き起こしていることが強く示唆された。第XII因子欠乏不育症患者の32.4%に抗PE抗体が陽性であり、抗第XII因子抗体と抗PE抗体は、非常に類似した抗体であることが、合成ペプチドを用いた検討で分かって来ている。不育症患者の持つ第XII因子とキニノーゲンに対する自己抗体は、第XII因子とキニノーゲンが血小板のGPIIb-IX-Vに結合してトロンピンによる血小板活性化を防ぐことを阻害し、血栓や流産を引き起こしている可能性がある。

要するに、抗PE抗体陽性で、第XII因子活性低下を伴う場合、過去の流産の原因である可能性が高く、治療を要すると思われる。我々の治療成績は、アスピリン単独療法の妊娠成功率は64.7%、アスピリン+ヘパリン併用療法では92.9%で、統計学的に有意($p=0.017$)であった⁵。

抗リン脂質抗体症候群の治療

低用量アスピリン+ヘパリン5,000単位皮下自己注射12時間ごとというのがスタンダードな治療法になりつつある。以前の抗リン脂質抗体症候群の不育症に対する治療法はステロイドによる免疫抑制療法であった。大量のプレドニゾンが必要であるが、有効性が報告されている。ヘパリン療法に匹敵するプレドニゾンの量は40mg/日であり、妊娠成功率は約75%と報告されている。しかしながら、プレドニゾンはヘパリンと比べて早産、低出生体重児、妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病など副作用が多いので注意が必要であり、最近では世界的にSLEなどを合併した二次的抗リン脂質抗体症候群の症例を除き、使用されなくなった。

低用量アスピリン療法

アスピリン療法は、60~100mg/日の投与が一般的である。アスピリンの用量を増やした場合、アスピリンの抗血栓作用はかえって減弱する(アスピリンジレンマ)。したがって、アスピリンは低用量である100mg/日程度が望ましい。最近のmetaanalysisの検討によると、低用量アスピリン療法によるいかなる弊害も認められなかった⁶。胎盤早期剥離、胎児脳室内出血や、その他の新生児出血のリスクは増加しなかった。アスピリンの催奇形性を示唆するデータも得られなかったと結論付けられている。投与終了時期に関しては、本邦では、アスピリンを出産予定日12週以内に用いることは禁忌とされているが、低用量アスピリン療法を妊娠末期に用いたことにより胎児動脈管に対して重篤な影響がでたという報告は今のところなく、最近欧米では、周産期のトラブルを避けるためにも分娩当日まで使用される傾向にある。

ヘパリン療法

未分画ヘパリン5,000単位を12時間ごと(1万単位/日)に注射する方法である。海外では在宅自己注射が一般的である。日本ではヘパリンの在宅自己注射は法的には問題ないが、保険が適応されない。ヘパリンは、投与中に分娩や緊急手術になった場合など、硫酸プロタミンで中和することが可能である。しかしながら、低分子ヘパリンやダナバロイドナトリウム(オルガン[®])などは、中和効果はあまり期待出来ない上に、未分画ヘパリンに較べて半減期が長く、なかなか血中濃度が下がらないので、緊急時には不安が残る。へ

パリンの胎児に対する副作用であるが、ヘパリンは低分子ヘパリンも含めて胎盤透過性がないこともあり、問題ない。ヘパリンの副作用として、胎盤早期剥離を心配する人がいるが、ヘパリンは逆に胎盤早期剥離や妊娠高血圧症候群などの胎盤血管障害を予防する効果が報告されている⁷⁾。ヘパリンの投与は、分娩前日に終了する。ヘパリン投与中に陣発した場合は、次のヘパリン注射を中止し、血中濃度のピーク(注射後2～4時間後)が分娩に重ならないように気をつければ問題ない。

カリクレイン—キニン系の破綻と流産

女性の生殖器系は、体内では血漿に次いで2番目にキニノーゲンおよびその代謝産物の豊富な部位であると言われている。高分子キニノーゲンは、heavy chain と light chain に分けられ、その間にブラジキニンが存在する。高分子キニノーゲンが分解されると、ブラジキニンを放出し、heavy chain と light chain より成る二本鎖キニノーゲン(HKa)になる。最近の研究で、HKaは血管新生を阻害し、ブラジキニンと一本鎖キニノーゲンは血管新生を促進すると報告されている。高分子キニノーゲンがヘパリン、すなわち肥満細胞由来の glycosaminoglycan(GAG)に結合することは以前より知られていた。最近、高分子キニノーゲンはそのドメイン3の LDC27およびドメイン5(His479-His498)を介して血管内皮細胞の GAG であるヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸に結合することが解明された。細胞に結合した高分子キニノーゲンは、GAG が高分子キニノーゲンを分解から守るため、ほとんどが血管新生を促進する一本鎖である。さらに LDC27に対する抗体は高分子キニノーゲンがヘパラン硫酸に結合することを阻害することが報告された。筆者はすでに、抗 PE 抗体が LDC27 を認識することを報告している²³⁾。このことは、抗 PE 抗体がキニノーゲンのヘパラン硫酸への結合を阻害することを強く示唆している。高分子キニノーゲンが細胞表面の GAG から離れると言うことは、高分子キニノーゲンが分解されて HKa とブラジキニンが生じると言うことである。ブラジキニンの半減期は30秒、HKaの半減期は9時間であるので、抗 PE 抗体があると結果的に HKa が生じ、胎盤の血管新生を阻害し、流産を引き起こす可能性がある。そして、ヘパリン療法は、肥満細胞由来の GAG であるヘパリンが高分子キニノーゲンに結合し、キニノーゲンの分解を防ぐことにより、胎盤の血管新生を促進し、流産を防いでいる可能性がある。

ヘパリンの抗凝固作用以外の作用機序

上記の如く、ヘパリンの作用機序として胎盤の血管新生促進という可能性があるが、もう一つ興味深い現象がある。それは、ヘパリンが存在すると抗リン脂質抗体の結合が阻害され、抗体価が低下するということである。ELISAの系に未分画ヘパリンを添加すると、きれいに用量依存性に抗リン脂質抗体の抗体価の減少が見られる。抗 PE 抗体の場合1IU/mLのヘパリンを添加すると抗体価は約半分になる。1IU/mLは、ヘパリン5,000単位を注射した場合の血中濃度に相当する。一方で、ヘパラン硫酸(オルガラン[®]の主成分)を添加した場合も抗リン脂質抗体の抗体価は用量依存性で下がるが、抗 PE 抗体に関して言えば、オルガラン[®]の効果は未分画ヘパリンの1/200に過ぎない。オルガラン[®]は抗血栓作用に関しては既に多くの報告があるが、不育症の治療に有用かに関しては報告が無い。現時点では、ヘパリンの代替薬として使用して良いのか、慎重に検討する必要がある²⁾。

おわりに

抗リン脂質抗体症候群の現時点での治療は、低用量アスピリン療法やヘパリン療法など

の抗凝固療法が挙げられる。しかしながら、最近筆者は、GAG、特にヘパリンがELISA中で劇的に抗PE抗体の抗体価を低下させることを報告しており、ヘパリンの抗体中和作用または吸着作用が重要である可能性がある。さらにヘパリンは、カリクレイン-キニン系、特にブラジキニンを介して血管新生、つまりは胎盤形成を促進するという報告もあり、直接胎盤に作用して流産を防止する可能性もある。ヘパリンは単に血液凝固系に作用するのみならず、妊娠維持に直接重要な役割を果たしている可能性がある。

《参考文献》

1. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RHWM, De Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295—306
2. Sugi T, McIntyre JA. Autoantibodies to phosphatidylethanolamine(PE) recognize a kininogen-PE complex. *Blood* 1995; 86: 3083—3089
3. Katsunuma J, Sugi T, Inomo A, Matsubayashi H, Izumi S-I, Makiono T. Kininogen domain 3 contains regions recognized by antiphosphatidylethanolamine antibodies. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 132—138
4. Inomo A, Sugi T, Fujita Y, Matsubayashi H, Izumi S-I, Mikami M. The antigenic binding sites of autoantibodies to factor XII in patients with recurrent pregnancy losses. *Thromb Haemost* 2008; 99: 316—323
5. 杉 俊隆. EBMに基づく不育症診療の実際. 東京: 金原出版. 2007: 54—59
6. Coomarasamy A, Honest H, Papaioannou S, Gee Harry, Khan SK. Aspirin for prevention of preeclampsia in women with historical risk factors: A systematic review. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 1319—1332
7. Rey E, Garneau P, David M, Gauthier R, Leduc L, Michon N, Morin F, Demers C, Kahn SR, Magee LA, Rodger M. Dalteparin for the prevention of recurrence of placental-mediated complications of pregnancy in women without thrombophilia: a pilot randomized controlled trial. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 58—64
8. 杉 俊隆. 不育症学級. 東京: 金原出版. 2009: 47



話 題

ヒトprotein Zの分泌様式*

惣 宇 利 正 善** 岩 田 宏 紀**
張 偉 光** 一 瀬 白 帝**

Key Words: protein Z, secretion, vitamin K, warfarin, γ -carboxylation

はじめに

Protein Z(PZ)はビタミンK依存性の血漿糖蛋白質である。成熟型ヒトPZは13個の γ カルボキシグルタミン酸(Gla)残基を含む360アミノ酸からなり、凝固VII, IX, X因子(FVII, FIX, FX)やプロテインCと類似したドメイン構造(N末端からGlaドメイン, 2つの上皮成長因子様ドメイン, セリンプロテアーゼドメイン)をもつ(図1-A)¹⁾²⁾。しかしながら, セリンプロテアーゼの触媒中心を構成するHisとSerを欠くために, PZはプロテアーゼとしては機能しない。PZの生理的役割は長らく不明であったが, ノックアウトマウスの解析³⁾とPZ依存性プロテアーゼインヒビター(ZPI)の発見⁴⁾により, 抗凝固因子として機能し凝固の調節に働くことが最近になって明らかとなっている。

ビタミンK依存性蛋白質は, Glaドメインにある10個前後のグルタミン酸残基(図1-B)が翻訳後に小胞体内でGla残基へと変換(Gla化)されることで, カルシウムイオンを介したリン脂質膜への結合能を獲得する⁵⁾⁻⁷⁾。凝固・抗凝固因子のリン脂質膜への結合は, 凝固・抗凝固反応の促進に不可欠であり, したがって, Gla化はビタミンK依存性蛋白質の機能に必須の翻訳後修飾である。小胞体膜蛋白質の γ グルタミルカルボキシラーゼ(GCX)はGla化を触媒する酵素であり, その反応において還元型のビタミンKを必要と

する⁸⁾。Gla化に伴い酸化されたビタミンKはビタミンKエポキシドレダクターゼ(VKOR)により還元され, 再びGCXの補酵素として用いられる⁹⁾¹⁰⁾。経口抗凝固薬であるワルファリンは, VKORを阻害してGCXへの還元型ビタミンKの供給を止めることで, 機能することができるとビタミンK依存性蛋白質の産生を抑制する(図2)¹¹⁾。

PZの血中濃度は個人差が大きく, また, ワルファリン投与により, 他のビタミンK依存性蛋白質と比べて著しく減少する¹²⁾。本稿では, PZの血中濃度を制御しうるユニークな分泌様式について, われわれが得た知見を紹介する¹³⁾。

PZはFXと比べて著しく分泌効率が悪い

PZ cDNAの発現ベクターをBHKやHEK293細胞に一過性に導入した場合, Western blottingによる解析では培養上清中へのPZの分泌を検出することはできず, cDNA導入後に細胞をビタミンK存在下でインキュベートした場合にのみ, わずかではあるが培地中にPZが検出されるようになる(図3-A)。対照的に, PZと同じくビタミンK依存性蛋白質であるFXは, ビタミンK添加の有無にかかわらず培地中への分泌が容易に検出される。パルスチエイス実験の結果から, 細胞内で合成されたFXの50%以上が2時間以内に細胞外へ分泌されるのに対して, PZの分泌は合成8時間後でも10%以下であり, きわめて効率が悪いことが示されている(図3-B, C)。

* Unique secretion mode of human protein Z.

** Masayoshi SOURI, Ph.D., Hiroki IWATA, Ph.D., Wei Guang ZHANG, M.D. & Akitada ICHINOSE, M.D., Ph.D.: 山形大学医学部分子病理学(☎990-9585 山形市飯田西2-2-2); Department of Molecular Patho-Biochemistry and Patho-Biology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata 990-9585, JAPAN

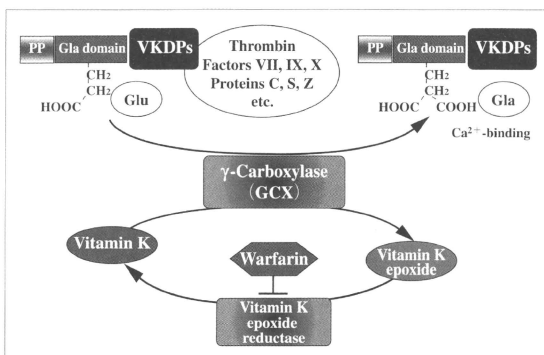


図2 GCXによるGla化反応とビタミンKサイクル
PP: プロロペプチド, VKDP: ビタミンK依存性蛋白質

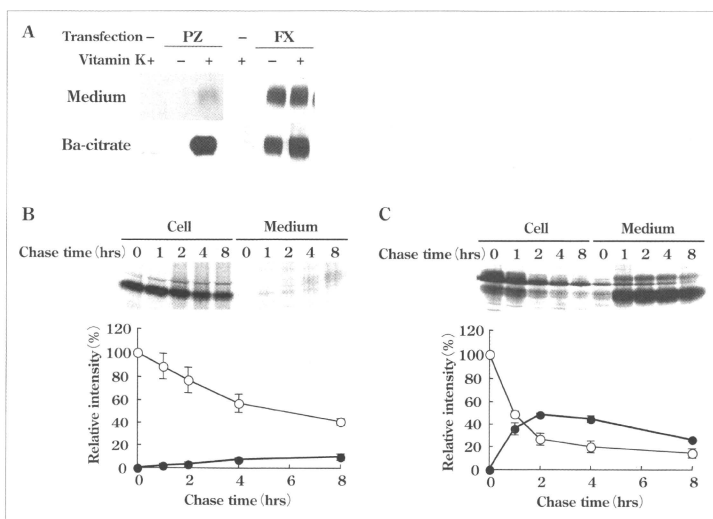


図3 HEK293細胞におけるPZおよびFXのcDNA発現
A: 培養上清およびクエン酸バリウム吸着物(Ba-citrate)のWestern blotting解析. B, C: PZ(B)およびFX(C)のバルスチェイス実験. 細胞内(○)および培地中(●)の³⁵Sラベル蛋白質の時間変動を示した.

PZの分泌に必須であることを示唆するものである。Gla化したビタミンK依存性蛋白質は、クエン酸バリウム沈澱に吸着して回収することができる。ビタミンK未添加時、添加時のいずれ

とも、培地中のPZ^{MetLac}の90%以上がクエン酸バリウムで回収されており、予想どおり、分泌されたPZ^{MetLac}のほぼすべてがGla化されていることが示された(図4-D)。これに反して、FX^{MetLac}で

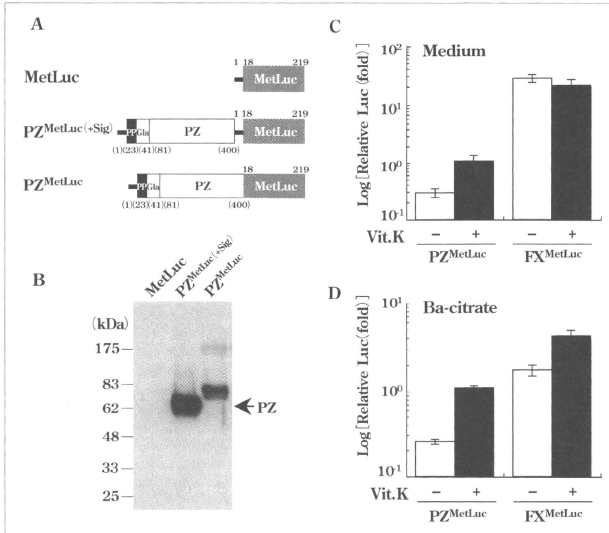


図4 HEK293細胞におけるMetLuc融合PZおよびFXの発現

A: MetLuc融合PZの構築。MetLucの1~17のアミノ酸は分泌シグナル配列である。括弧内の数字はPZのアミノ酸番号を表す。PP:プロペプチド, Gla:Glaドメイン。**B**:培地中に分泌された蛋白質をクエン酸バリウムに吸着し、抗PZ抗体を用いてWestern blotting解析した。矢印は本来のPZが移動する位置を表す。**C**:ビタミンK(Vit.K)未添加時(□)および添加時(■)に培地中に分泌されたルシフェラーゼ活性、クエン酸バリウムに吸着回収した活性を**D**に示した。

は、ビタミンK未添加の場合6%、添加した場合でも20%しかクエン酸バリウムで回収されず、培地中に分泌されているFX^{MetLuc}の多くが未修饰型であること、すなわち、FXの分泌においてGla化は必ずしも要求されないことを現している。

経口抗凝固薬であるワルファリンは、VKORを阻害して還元型ビタミンKを枯渇させ、ビタミンK依存性蛋白質のGla化を抑制する(図2)。PZ^{MetLuc}の分泌はワルファリンの添加により著しく抑制されており(図5-A)、PZの分泌におけるビタミンK要求性が改めて確認された。また、この結果は、ワルファリン投薬時の血中PZ濃度の著しい低下¹²⁾が、遺伝子発現・産生への影響¹⁵⁾よりもむしろ分泌抑制の結果であることを強く示唆している。一方、FX^{MetLuc}については、PZと同様にGla化が抑制されているにもかかわらず、

高濃度(0.1mg/m)のワルファリンを添加した場合でも、未添加時の40%が培地中へと分泌されており(図5-B)、ワルファリン治療時の患者血漿に非Gla化FXが存在すること¹⁶⁾をよく再現している。

GlaドメインがPZのビタミンK依存性/ワルファリン感受性分泌を決定している

以上のように、PZの分泌はビタミンK依存性/ワルファリン感受性(Gla化要求性)およびその効率といった点でFXと大きく異なっている。Gla化反応は、ビタミンK依存性蛋白質のプロペプチドを介したGCXとの基質-酵素複合体の形成と、それに引き続きGlaドメイン内にある十数個のグルタミン酸残基のカルボキシル化であることから⁸⁾、PZとFXとの分泌様式の違いが、プロペ

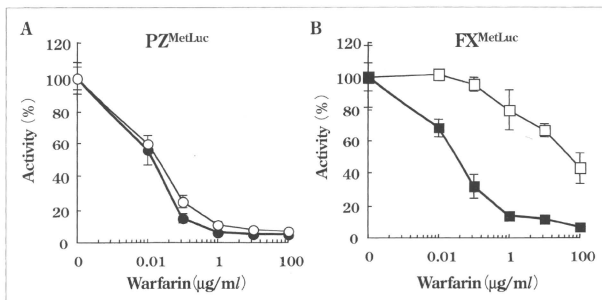


図5 PZ^{MetLuc}(A)およびFX^{MetLuc}(B)の分泌におけるワルファリンの影響
 ビタミンK存在下でワルファリンを処理し、培地中に分泌されたルシフェラーゼ活性を
 ○(PZ^{MetLuc})、□(FX^{MetLuc})で、培地からクエン酸バリウム吸着で回収した活性を●(PZ^{MetLuc})、
 ■(FX^{MetLuc})で示した。ワルファリン未添加時の活性を100%で表した。

チドもしくはGlaドメインの構造の違いに起因するものと予想された。そこで、PZとFXの間でプロペプチドとGlaドメインをさまざまな組み合わせで互いに交換したところ、FXのGlaドメインを導入したPZでは分泌量が増加し、かつワルファリンに抵抗性となったのに対して、PZのGlaドメインを導入したFXでは、分泌量が著しく低下するとともにワルファリンに感受性を示すようになった(図6-A, B)。さらに、PZとFXのプロペプチドとGlaドメインをさまざまな組み合わせでMetLucのN末端に連結した場合にも、PZのGlaドメインをもつMetLucの分泌は、低レベルであるとともにワルファリンに感受性であるのに対して、FXのGlaドメインをもつMetLucの分泌は高レベルであり、かつワルファリンに抵抗性であった(図6-C)。このように、PZ分泌の低効率とビタミンK依存性/ワルファリン抵抗性は、Glaドメインにより決定されていることが明らかとなった。

**Gla化依存的な分泌経路は
 PZとFXとの間で共通である**

上述のようにPZとFXは互いに異なる分泌様式を示すが、興味深いことに、同時に発現させた場合に、互いの分泌を抑制する現象が認められる。このことは、PZとFXが共通の分泌経路(装置)を共有することを示唆している。PZの分泌は、

プロペプチドとGlaドメインからなるminiconstructを共発現させることで有意に抑制され、特にFXのプロペプチドを有するminiconstructで阻害が顕著である(図7-A)。一方のFXは、PZのGlaドメインを持つminiconstructにより、ビタミンK添加時の分泌が有意に抑制される(図7-B)。さらに、Gla化蛋白質(クエン酸バリウムで回収される蛋白質)の分泌は、miniconstructによる抑制のパターンがPZとFXでよく一致しており、少なくともGla化依存的な分泌経路は共通であることが強く示唆される。Gla化を触媒するのがGCXであることと、GCXとの親和性が最も高いFXのプロペプチド¹⁷⁾が強くPZの分泌を抑制していることから、GCXがPZとFXの共通の分泌経路に含まれている可能性が高い。GCXはまた、小胞体膜蛋白質であることから、あるいは細胞内での輸送装置として働いているのかもしれない。

**PZレベルの低値を示す血栓症
 患者から同定されたE30Q変異は
 分泌障害をもたらす**

PZが抗凝固に寄与することから、PZの欠乏は血栓症のリスクとなりうる。実際、マウスにおいて、凝固欠陥型V因子変異体(FV^{Leiden})の血栓傾向がPZ欠損により強まることが示されている³⁾。われわれは、頻繁に深部静脈血栓を繰り返し、血中のPZレベルが異常低値を示すドイツ人女性