

|   |   |                                      |         |           |      |
|---|---|--------------------------------------|---------|-----------|------|
| Mitsuhashi 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 |
| Mitsuhashi 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-   | 北産婦医会報                               | 123     | 2-11      | 2010 |

総合分担研究報告 24

## 分担課題: 不育症のリスク因子抽出と各病態の治療成績(免疫グロブリン治療を中心に) 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、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。その中で治療としては、免疫グロブリン治療に注目したが、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た。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

本研究班では多施設共同研究により、不育症に関連すると考えられる遺伝的要因、免疫学的要因、血液凝固学的要因、子宮形態的要因等について統計学的に分析し、各要因別の治療法の有効性を前方視的研究で解析した。そのなかで当施設では、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ており、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、自然流産検体に対する染色体分析法として、アレイ CGH 法など DNA を用いた解析法に当施設は注目してきた。アレイ CGH 法など先端的遺伝学的解析法は従来の G-banding 法の問題点を解決できる可能性があり、内外で生殖・周産期領域に応用されているが、現状ではいずれも明確な有効性に関しては不明であり、今後の診療へ応用できるレベルには達していない。そこで本研究では、流産検体に対して先端的遺伝学的手法を用いた解析を行い、将来の臨床応用が可能かどうか検討することを目的とした。

### B. 研究方法

国立成育医療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、不育症一般検査を行い、治療方針を決定し妊娠管理を行った。治療を行うも流産に至った場合は、流産絨毛染色体検査を行い、胎児側要因による流産であるかどうかの鑑別を行った。臨床経過、検査結果、治療方法、治

療結果などの診療情報を記載したシートを作成し、データを解析した。

#### 【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】

一部の流産検体に対して、各種遺伝学的手法により染色体分析を行った。

(1)G-banding 法

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

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)を使用した。

(3)STR 解析

(4)FISH 解析

#### (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 法など先端的遺伝学的診断技術を用いた解析に関しては、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のみを対象とした。

### C. 研究結果

2008年4月から2010年10月までに不育症カップル計194組が登録された。登録患者の平均年齢は35.3歳、平均BMIは20.5、平均既往流産回数(10週未満)は2.39回であった。本研究班では多施設共同研究として、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おり、集積されたデータの解析結果は今後の不育診療体系を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)。

#### 【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。

#### 【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】

G-banding法はこれまでに、計168例の自然流産に対して行われたが、21例(12.5%)は培養不良のため結果が得られなかった。したがって147例の分析結果となったが、染色体異常は113例に観察され、常染色体トリソミー、Xモノソミー、倍数体、不均衡型構造異常の順に高頻度に検出された。

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。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

難治性習慣流産患者や抗凝固療法抵抗性の抗リン脂質抗体症候群患者に対する免疫グロブリン療法に関して散発的に内外で報告が続いているが、その有益性について現在のところ立証はされてはいない。本研究では難治性習慣流産患者3名中2名、抗凝固療法抵抗性の抗リン脂質抗体症候群患者5名全員で生児獲得に成功したが、免疫グロブリン療法を行っても奏功しない症例も存在することより、今後更なる検討が必要である。

流産や胎児異常の多くは遺伝学的異常に起因しており、そのなかで最も高頻度なものが染色体異常である。現在染色体異常の検索としては、細胞培養後のG-banding法による染色体分析が主流となっているが、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。今回導入したアレイCGH法による解析では、検査に必要な量のDNAが抽出さえできれば検索が可能であり、培養による影響は受けず、自然排出検体からの診断も可能である。また、母体組織(DNA)混入の鑑別や倍数体などの同定には、今回行ったSTR法やFISH法を併用した解析手法が有用であった。

### E. 結論

今回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たが、種々の治療が奏功しない原因不明不育症患者や、抗凝固療法に抵抗する抗リン脂質抗体症候群患者に対して、その有用性が示唆された。

また、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が、アレイCGH分析など先端的遺伝学的診断技術を用いた染色体異常の解析手法は従来のG分染法の問題点を解決できる可能性があり、不育診療においては有用であると考えられた。

### F. 健康危険情報

該当せず。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ozawa N, Maruyama T, Nagashima T, Ono M, Arase T, Ishimoto H, Yoshimura Y. Pregnancy outcomes of reciprocal translocation carriers who have a history of repeated pregnancy loss. *Fertil Steril* 90(4):1301-4, 2008
- 2) 小澤伸晃:【産婦人科専攻医の研修 何を教える?何を学ぶ?(生殖医療編)】不育症の管理(解説/特集). *産科と婦人科*. 76(6), 703-708. 2009.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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) Ozawa N, et al: Cytogenetic analyses of spontaneous abortions by array comparative genomic hybridization (24<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. 2008.7).
- 2) 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(第 53 回 日本人類遺伝学会 2008.9).
- 3) 小澤伸晃, 他: 夫婦染色体異常と胎児染色体異常(第 45 回日本周産期・新生児医学会 2009.7).
- 4) Ozawa N, et al: Cytogenetic investigation of miscarriage by DNA-based analysis combined with FISH analysis (25<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. 2009.7).
- 5) 小澤伸晃, 他: アレイ CGH による分析(第 54 回日本人類遺伝学会 2009.9).
- 6) 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 2010.7).
- 7) 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 2010.7).
- 8) Ozawa N, et al: The potential use of

array-based comparative genomic hybridization for cytogenetic analysis of spontaneously expelled miscarriages (IFFS 20th World Congress on Fertility and Sterility 2010.9).

## 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  |
|----------------|--|---------------|--------|-----------|------|
| Ozawa N, et al | Pregnancy outcomes of reciprocal translocation carriers who have a history of repeated pregnancy loss. | Fertil Steril | 90(4)  | 1301-4    | 2008 |
| 小澤伸晃           | 【産婦人科専攻医の研修 何を教える?何を学ぶ?(生殖医療編)】 不育症の管理(解説/特集)  | 産科と婦人科        | 76(6)  | 703-709   | 2009 |
| 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 |



総合分担研究報告 25

## 分担課題:着床障害マウスモデルを用いた不育症の成因に関する基礎的研究 及び不育症治療と thrombophilia に関する臨床的研究

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

不育症の原因の一つである黄体機能不全による着床不全の観点から、プロゲステロンと子宮内膜の STAT3 発現との関連について、マウスモデルを用いた基礎的検討を行った。また臨床的な見地から、続発性反復流産患者についての後方視的な検討から、反復流産・習慣流産の原因としての thrombophilia が、同一個体でも常に変動している可能性が示唆された。さらに、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・不妊治療施設への郵送によるアンケート調査を実施し、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についての現況について調査し、これらの治療法の適応や有効性について、さらに検討を必要とすることが示唆された。

### A. 研究目的

不育症の原因と治療法について、マウスを用いた基礎的検討、および臨床データおよびアンケートを用いた臨床的検討を行い、その解明を試みた。

### B. 研究方法

①マウス子宮内膜に HVJ-E ベクターを用いた一過性遺伝子導入法により、STAT3 デコイを着床期子宮内膜に強制発現させ、プロゲステロン発現と着床との関係について検討した。②1回以上の自然妊娠・分娩歴があるにも関わらず、その前後に2回以上の自然流産を繰り返した続発性反復流産患者についての検討を行った。③不育症に対する抗血小板療法／抗凝固療法の実情に関する全国アンケート調査を行った。

### C. 研究結果

①着床期子宮内膜への STAT3 デコイの導入により、子宮内膜 STAT3 活性は約 50%抑制され、デコイ導入群では約 75%以上のマウスで妊娠を認めなかった。血中プロゲステロン値、プロゲステロン受容体の発現に差を認めなかった。②自然妊娠・分娩歴のある反復流産患者6症例のう

ち、3症例に抗リン脂質抗体やプロテイン S の異常を認めた。うち、1症例は、抗血小板療法にて妊娠・分娩に至った。また以前指摘された抗リン脂質抗体症候群を、現在は全く認めず、無治療で妊娠・分娩に至った1症例も経験した。③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。免疫学的検査・血液凝固系検査に異常を認めなくても、約 30%の施設で低用量アスピリン療法が施行されていた。低用量アスピリン療法の開始時期は、施設により黄体期或は尿妊娠反応陽性時が選択されていた。ヘパリン療法開始時期は、約 60%の施設で尿妊娠反応陽性時が選択されていた。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

①STAT3 がマウス着床期の子宮内膜に発現し、チャック症に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、STAT3 の発現は、プロゲステロンやその受容体の発現とは関連を認めなかった。②性成



熟期の女性において、流産の原因となりうる thrombophilia の状態は、同一個体においても常に変動し、流産になりやすい時期と生産をもたらす時期が、時間の経過とともに移り変わる可能性が示唆された。③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、さらに治療効果があると判断される症例が存在する場合が認められた。原因不明不育症のうち、母体による胎児の拒絶反応に関わる未同定の免疫学的機序や血液凝固因子異常が存在する可能性が示唆された。

## E. 結論

①マウス子宮内膜の STAT3 は、胚の着床現象に重要な役割を果たしていることが示唆された。②過去に thrombophilia を認めた個体においてもその状態は常に変動しており、流産の起こりやすい時期と起こりにくい時期がある可能性が示唆された。これは、thrombophilia が原因と考えられる原発性習慣流産患者が無治療で生産に至ったり、生産歴のある女性がその後 thrombophilia と考えられる流産を繰り返したりする現象の理論的裏付けとなる可能性を示唆するものである。③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

- 1) The human tumor-associated antigen RCAS1 in pregnancies complicated by pre-eclampsia. Tskitishvili, E., Komoto, Y., Kinugasa, Y., Kanagawa, T., Song, M., Mimura, K., Tomimatsu, T., Kimura, T., Shimoya, K. Journal of Reproductive Immunology 77:100-108,2008.
- 2) Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-1) and T-helper epitopes in saline suppresses rodent fertility. Khan, M.A.H.,

Ogita, K., Ferro, V.A., Kumasawa, K., Tsutsui, T., Kimura, T. Vaccine 26:1365-1374, 2008.

- 3) Two multipotential transcription factors, NF-kappaB and Stat-3, play critical and hierarchal roles for implantation Tadashi Kimura, Kazuhide Ogita, Keiichi Kumasawa, Shinsuke Koyama, Tateki Tsutsui, and Hitomi Nakamura Indian J Physiol Pharmacol, 54, 27-32; 2010.
2. 学会発表
  - 1) 北村梨紗、筒井建紀、田畑知沙、熊澤恵一、渡辺宜信、根来英典、朝野久美子、張慶、李楠、荻田和秀、木村正 自然妊娠・分娩歴のある反復流産症例についての検討 第52回日本生殖医学会 平成19年10月25-26日 秋田
  - 2) 子宮局所における一過性遺伝子導入方法を用いた着床不全マウスモデルの作製 香山晋輔、中村仁美、谷口武、荻田和秀、熊澤恵一、張慶、筒井建紀、金田安史、木村正 第53回日本生殖医学会 平成20年10月24日 神戸
  - 3) 着床期子宮局所におけるSTAT-3活性の
  - 4) 役割 中村仁美、香山晋輔、谷口武、荻田和秀、熊澤恵一、張慶、筒井建紀、古山将康、杉野法広、田村博史、金田安史、木村正 第13回日本生殖内分秘学会 平成20年11月29日 大阪
  - 5) 一過性遺伝子導入方法を用いた着床現象の検討 中村仁美、香山晋輔、谷口武、荻田和秀、熊澤恵一、張慶、筒井建紀、古山将康、杉野法広、田村博史、金田安史、木村正 第23回日本生殖免疫学会 平成20年12月6~7日 富山
  - 6) 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回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  
特になし。

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  |
|--|--|------------------------------------|----|-----------|------|
| Tskitishvili , E., Komoto, Y., Kinugasa, Y., Kanagawa, T., Song, M., Mimura, K., Tomimatsu , T., <u>Kimura ,T.</u> Shimoya, K.       | The human tumor-associated antigen RCAS1 in pregnancies complicated by pre-eclampsia.  | Journal of Reproductive Immunology | 77 | 100-108   | 2008 |
| Khan, M.A.H., Ogita, K., Ferro, V.A., Kumasawa, K., <u>Tsutsui ,T.</u> , <u>Kimura, T.</u>   | Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-1) and T-helper epitopes in saline suppresses rodent fertility. | Vaccine                            | 26 | 1365-1374 | 2008 |
| <u>Tadashi Kimura,</u><br>Kazuhide Ogita,<br>Keiichi Kumasawa,<br>Shinsuke Koyama,<br><u>Tateki Tsutsui,</u> and<br>Hitomi Nakamura, | Two multipotential transcription factors, NF-kappaB and Stat-3, play critical and hierarchal roles for implantation                                    | Indian J Physiol Pharmacol         | 54 | 27-32     | 2010 |

総合分担研究報告 26



## 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 $\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ 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、胎盤 extravillous trophoblast 表面に発現し、invariant natural killer T 細胞(iNKT)の標的分子である CD1d 抗原に注目して研究した。 $\beta_2$ GPI 依存性抗カルジオリピン抗体が $\beta_2$ GPI 2 分子と結合すること、CD1d が自己のリン脂質である phosphatidylserine (PS)を抗原提示すること、また PS が $\beta_2$ GPI と複合体を形成し、細胞表面に存在することがすでに報告されている。本研究では、 $\beta_2$ GPI 依存性抗カルジオリピン抗体が CD1d を介し直接的に絨毛細胞に作用し、サイトカイン分泌を促進することにより流産に関与するのではないかと考え、母体胎児境界における胎児側 CD1d と母体 iNKT の相互作用、さらにはこの相互作用に $\beta_2$ GPI 依存性抗カルジオリピン抗体が及ぼす影響を検討して、この抗体が流産を引き起こす機序を明らかにすることを目的とした。

本研究の成果は以下の通りである。1. 抗 $\beta_2$ GPI 抗体が、PS- $\beta_2$ GPI 複合体と結合した trophoblast 表面の CD1d と間接的に結合することを明らかにした。2. 抗 $\beta_2$ GPI 抗体と CD1d との相互作用によって CD1d 架橋反応と同様の反応が起こり、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。3.  $\beta_2$ GPI 依存性抗カルジオリピン抗体陽性の不育症患者血清でも、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。4. 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 IL-12 の産生を誘導することを証明した。5. ヒト脱落膜 iNKT 細胞と CD1d 細胞との相互作用に、抗 $\beta_2$ GPI 抗体が干渉すると、IL12 産生がさらに増加し、IFN- $\gamma$ の産生が増加するが、IL-4 産生は増加しないことを明らかにした。

以上より、抗 $\beta_2$ GPI 抗体が存在すると、抗 $\beta_2$ GPI 抗体と CD1d の架橋反応様の相互作用で産生された IL12 が脱落膜 iNKT 細胞を活性化させ、iNKT 細胞からの IFN- $\gamma$ 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活性化されることがわかった。一方、IL-4 の産生は増加しないことから、母体胎児境界においては Th1/Th2 バランスが Th1 にシフトすることとなり、局所の炎症が過剰となって、流産を引き起こす可能性が示唆された。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。本研究により、 $\beta_2$ GPI 依存性抗リン脂質抗体による流産が、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機序が示された。

### A. 研究目的

不育症の中で、習慣流産は 3 回以上自然流産を繰り返す状態と定義され、その原因は多岐にわたる。

その中で最近注目されているのが、自己免疫異常の 1 つである抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome; APS)である。APS は

1986年にHughesらによって抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibody; APL)が陽性で、かつ血小板減少症、血栓症、または流産のいずれかの臨床症状を認める症候群として提唱された。周産期領域でもAPSについて様々な臨床研究がなされ、APSが習慣流産のみならず、妊娠10週以降の原因不明の子宮内胎児死亡、妊娠高血圧症候群、また胎児発育不全とも強く関連していることが明らかになってきた。

APSはPhosphatidylserine(PS)などの陰性荷電を持つリン脂質に対する自己抗体の産生により引き起こされるが、APLの真の対応抗原はリン脂質そのものではなく、リン脂質に結合する $\beta_2$ -glycoprotein I( $\beta_2$ GPI)などの血漿蛋白である。 $\beta_2$ GPIは細胞膜リン脂質に結合し血液凝固カスケード、血小板凝集やin vitroで活性化された血小板のプロトロンビナーゼ活性を抑制する因子である。 $\beta_2$ GPI依存性抗カルジオリピン抗体は、この機能を妨げ凝固能を亢進させて血栓傾向を誘導し、胎盤内の血栓形成を促進させるために胎盤機能不全が生じ流産を引き起こすと考えられてきたが、胎盤血管形成がなされ血流が確立する妊娠9-10週以前の流産についてはそれだけでは説明困難である。

絨毛細胞は胎盤付着部位から母体子宮内膜内へと浸潤しつつExtravillous trophoblast(EVT)へと分化していく。その分化の過程においてEVTの増殖能、浸潤能など細胞特性がダイナミックに変化してゆくと知られている。EVTの増殖、浸潤過程においては、EVTが発現するHLA-G抗原をはじめとするHLA抗原系や、EVTと母体免疫細胞が分泌する多くのサイトカイン、ケモカイン、また血管新生関連因子など、種々の分子が働いていることが明らかになっている。その中で、本研究ではmajor histocompatibility complex(MHC) I類似の抗原提示分子であるCD1dに注目した。

CD1dは自己、または細菌由来の糖脂質を抗原提示するMHCclass Iに類似した膜たんぱく質である。ヒトV $\alpha$ インバリエントNKT細胞(iNKT)はinvariant V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11T cell receptor(iTCR)を発現しており、このiTCRを通じて抗原提示細胞のCD1dを特異的に認識し、活性化される。CD1dを認識し活性化されたiNKT細胞からはinterleukin(IL)-4やinterferon(IFN)- $\gamma$ が急速に分泌され、T helper(Th)1/Th2バランスが調節されるようになる。一方CD1d発現細胞からもIL-12、IL-15、IL-4、IL-10などのサイトカインが分泌されNK細胞を活性

化する。またCD1dは近接する複数の分子が架橋されるとNF- $\kappa$ Bを通じてCD1d発現細胞内cytoplasmic tailのチロシン基のリン酸化が誘導される。この反応により、CD1d発現細胞よりIL-12、IL-10などのサイトカインが急速に分泌されるようになることも知られている。

本研究ではAPSを引き起こす代表的な抗リン脂質抗体である $\beta_2$ GPI依存性抗カルジオリピン抗体が、 $\beta_2$ GPI 2分子と安定的に結合すること、CD1dが自己のリン脂質であるPSを抗原提示することに着目した。PSが $\beta_2$ GPIと複合体を形成し、細胞表面に存在することはすでに報告されていることから、 $\beta_2$ GPI依存性抗カルジオリピン抗体がCD1dを介し直接的に絨毛細胞に作用し、サイトカイン分泌を促進することにより流産に関与するのではないかと考え、母体胎児境界における胎児側CD1dと母体iNKTの相互作用、さらにはこの相互作用に $\beta_2$ GPI依存性抗カルジオリピン抗体が及ぼす影響を検討して、この抗体が流産を引き起こす機序を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

ヒト絨毛癌由来の細胞株JEGに、CD1d遺伝子、または機能実験における陰性コントロールとして細胞外構造がCD1d、細胞内構造がCD1aであるキメラ分子(細胞内へのシグナル伝達を行わない)CD1d/aを導入し、CD1dあるいはCD1d/aを恒常的に発現するtrophoblast株JEG/CD1dおよびJEG3/CD1d/aを樹立した。次いで、CD1dあるいはCD1d/a、PS、 $\beta_2$ GPIの細胞表面存在をフローサイトメトリー法によって観察した。またCD1dとPS- $\beta_2$ GPI複合体の結合をIP-Western blot法で確認した。JEG/CD1d、JEG3/CD1d/a、JEGに対して、抗CD1d抗体、コントロールIgGおよびクロスリンカーとしての二次抗体を添加し、CD1d抗原の架橋反応が誘導されるか、炎症性サイトカインであるIL-12の発現をELISAおよび定量的RT-PCR法で検討した。また、生体内ではクロスリンカーとしての二次抗体は存在しないが、抗 $\beta_2$ GPI抗体は $\beta_2$ GPI 2分子と結合することから、抗 $\beta_2$ GPI抗体単独でも架橋反応様の反応が生じないかと考え、各trophoblast株培養系に抗 $\beta_2$ GPI抗体を単独で添加して、IL-12の発現を検討した。さらに、脱落膜中の母体iNKTと胎児側CD1dの相互作用を検討するため、ヒト脱落膜から脱落膜リンパ球を分離し、iNKTの増殖誘導剤

$\alpha$  GalCer を 7 日間添加して培養した。添加前後で  $V\alpha 24V\beta 11$  陽性 iNKT の細胞数をフローサイトメトリー法で比較した。JEG/CD1d もしくは JEG に、 $\alpha$  GalCer 刺激した脱落膜 iNKT を加え共培養し、上清中の IL-12 の濃度を測定した。さらに、JEG/CD1d、JEG3/CD1d/a、JEG に、脱落膜 iNKT を加えた共培養系に抗 $\beta_2$ GPI 抗体またはコントロール IgG を添加した群と添加しない群で、炎症性サイトカイン IL12、IFN $\gamma$ 、および IL-4 の産生を ELISA 法および定量的 RT-PCR 法で観察した。

(倫理面への配慮)

ヒトから採取した生体試料および臨床情報を使用する研究については、施設研究倫理委員会の承認を得たうえで、文書による同意を得て実施した。

### C. 研究結果

フローサイトメトリー法では、JEG3/CD1d/、JEG3/CD1d/a の細胞表面に CD1d 発現 (CD1d/a の細胞外ドメインは CD1d と同一) が認められ、その発現に一致して PS、 $\beta_2$ GPI の存在も認められた。次いで、JEG、JEG3/CD1d 細胞のタンパク質を抽出し、抗 CD1d 抗体を用いて免疫沈降をおこなった。沈殿に対して HRP 標識した抗 $\beta_2$ GPI 抗体あるいは抗 AnnexinV 抗体 (PS を検出) を用いて Western blot 法により band を検出した。JEG3/CD1d 細胞においては  $\beta_2$ GPI および PS の band が確認できたが、JEG 細胞では認められなかった。以上より、JEG/CD1d 細胞表面において、CD1d、PS、 $\beta_2$ GPI が複合体を形成していることが確認された。抗 CD1d 抗体 + 二次抗体による架橋反応では、JEG/CD1d において IL-12 誘導能の増加が確認されたが、JEG/Cd1d/a や JEG においては確認されなかった。JEG/CD1d における IL-12 誘導能の増加は抗 $\beta_2$ GPI 抗体単独でも認められ、抗 $\beta_2$ GPI 抗体は二次抗体なしに CD1d の架橋反応と同様の反応を誘導することがわかった。また、脱落膜リンパ球に対する  $\alpha$  GalCer 刺激により  $V\alpha 24V\beta 11$  陽性の iNKT の細胞数が約 15 倍に増加し、この細胞を以下の実験で脱落膜 iNKT として使用することとした。脱落膜 iNKT と JEG/CD1d との共培養では、培養液中の IL12 濃度上昇が ELISA 法で確認されたが、JEG との共培養では上昇しなかった。すなわち、CD1d と脱落膜 iNKT の相互作用でも、IL-12 産生が誘導され

ていることがわかった。次に抗 $\beta_2$ GPI 抗体存在下で脱落膜 iNKT を JEG/CD1d、JEG/Cd1d/a あるいは JEG と共培養した。抗 $\beta_2$ GPI 抗体添加群とコントロール IgG 添加群の IL12 産生の比をとり各細胞間で比較したところ、JEG/CD1d 細胞では、18 時間後に抗 $\beta_2$ GPI 抗体添加群の IL12 産生がコントロール IgG 添加群の 3 倍にまで増加した。しかし、JEG/Cd1d/a や JEG では抗 $\beta_2$ GPI 抗体存在下でも、IL12 産生の増加を認めず、この差は有意であった。次に同様の系で IFN- $\gamma$  および IL-4 の産生についても、抗 $\beta_2$ GPI 抗体添加群とコントロール 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 $\beta_2$ GPI 抗体添加群で、18 時間後に IFN- $\gamma$  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、JEG/Cd1d/a や JEG では有意差を認めなかった。IL-4 の産生増加はいずれの細胞でも認められなかった。

### 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 $\beta_2$ 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 $\beta_2$ GPI 抗体が存在すると、PS- $\beta_2$ GPI 複合体を介して CD1d 分子の架橋反応と同様の反応が誘導され、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 $\beta_2$ GPI 抗体存在下で IFN- $\gamma$  産生が増加するものの IL-4 産生は増加しないことがわかった。すなわち、抗 $\beta_2$ GPI 抗体が存在すると、IL12 が母体 IFN- $\gamma$  産生細胞である iNKT 細胞を活性化させ、iNKT 細胞から分泌された IFN- $\gamma$  が EVT 上の CD1d 発現を増加させて CD1d 発現細胞からさらに IL12 分泌が促進されるというサイクルが活性化されることがわかった。一方、IL-4 の産生は増加しないことから、母体胎児境界においては Th1/Th2 バランスが Th1 にシフトすることとなり、局所の炎症が過剰となって、流産を引き起こす可能性が示唆された。



#### E. 結論

$\beta_2$ GPI 依存性抗リン脂質抗体による流産が、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

- 1) 岩澤有希、川名 敬、藤井知行、永松 健、松本順子、三浦紫保、山下隆博、兵藤博信、上妻志郎、武谷雄二：絨毛細胞上に存在するリン脂質抗原提示分子「CD1d」を介した、 $\beta_2$ glycoprotein I 依存性抗リン脂質抗体による新規流産メカニズムに関する検討。第 23 回日本生殖免疫学会総会・学術集会。富山。2008.12
- 2) 岩澤有希、川名敬、藤井知行、永松健、松本順子、三浦紫保、吉田志朗、兵藤博信、山下隆博、上妻志郎、武谷雄二：絨毛細胞上に存在するリン脂質抗原提示分子「CD1d」を介した、 $\beta_2$ glycoprotein I 依存性抗リン脂質抗体による新規流産メカニズムに関する検討。第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、京都、2009.4
- 3) Iwasawa Y, Kawana K, Fujii T, Nagamatsu T, Matsumoto J, Miura S, Yamashita T, Hyodo H, Kozuma S, Taketani Y: A possible pathogenic mechanism of recurrent miscarriage associated with  $\beta_2$  glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibody through the function of CD1d. 29th Annual Meeting of The American Society for Reproductive Immunology, Orlando, FL, USA, 2009.6
- 4) Iwasawa Y, Kawana K, Miura S, Fujii T: A novel pathogenic mechanism of recurrent miscarriage associated with  $\beta_2$ glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibody through CD1d on the trophoblast. 14th International Congress of Mucosal Immunology. Boston, MA, USA, 2009.7

#### 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



総合分担研究報告 27

分担課題: 抗  $\beta$  2-glycoprotein(I GPI)抗体の不育症における病態形成メカニズムの検討

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

1. 抗  $\beta$  2-GPI 抗体は血栓を生じ胎盤機能を障害する以外に、抗  $\beta$  2-GPI 抗体が絨毛よりの PIGF 産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を阻害する可能性を証明した。これには補体は関与せず、絨毛細胞表面に結合し作用する可能性がある。
2. 抗  $\beta$  2-GPI 抗体は JEG-3 細胞に作用し TLR 3,4,5,6,9,10 mRNA の発現を亢進した。 $\beta$  2-GPI 抗体陽性例では、TLR を介した炎症反応 が亢進され、これらは妊娠の維持に障害を与え、不育症病態形成に関与する可能性が推察される。
3. 抗  $\beta$  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  $\beta$  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

1. 抗リン脂質抗体、特に抗  $\beta$  2-GPI 抗体の胎盤絨毛に対する影響を検索するため増殖因子に注目し、抗  $\beta$  2-GPI 抗体の絨毛癌細胞よりの PIGF, VEGF および sVEGFR1 の産生に与える影響を検討した。

2. 抗  $\beta$  2-GPI 抗体は、血管内皮細胞の TLR4 に結合し作用するメカニズムが知られている。しかし、胎盤絨毛細胞における TLR との関係はあまり知られていない。抗  $\beta$  2-GPI 抗体陽性 IgG を作用させた時の絨毛癌細胞での TLR mRNA 発現を検討し不育症の関与を検討した。

3. 抗  $\beta$  2-GPI 抗体が作用した絨毛癌細胞ではサイトカイン産生が起こり不育症の病態を形成する可能性を検討するため、抗  $\beta$  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

培養絨毛癌細胞に抗  $\beta$  2-GPI 抗体の陽性および陰性血清を添加し 24 時間後の上清中の各因子を測定した。PIGF の産生抑制因子を検索するため抗  $\beta$  2-GPI 抗体陽性および陰性血清より IgG を抽出し、絨毛癌細胞よりの PIGF 産生に対する IgG の影響を検討した。PIGF 産生抑制が補体の影響をうけるかどうか検討した。絨毛癌細胞(JEG-3 細胞)に抗  $\beta$  2-GPI 抗体陽性 IgG を添加、培養し JEG-3 細胞における TLR の mRNA 発現を検討した。

JEG-3 細胞を 6-well tissue culture plate で培養し、90% confluence の状態になった状態で RPMI 培養液に抗  $\beta$  2-GPI 抗体陽性 IgG を添加し 24 時間培養した。培養後細胞を採取し、total-RNA を抽出した。TLR の mRNA の発現を real time PCR にて検討した。

絨毛癌細胞 ( BeWo 細胞) を 24-well tissue culture plate に播き、folskoline を用い分化させ、さらに一定量の抽出  $\beta$  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、サイトカイン産生(IL2,IL4, IL10, TNF-alpha,IFN-gamma and GM-CSF)について suspension array system を用いて検討した。

C. 研究結果

1. 抗  $\beta$  2-GPI 抗体の陽性血清では陰性血清に比し上清中の PIGF 値の低下認められたが、VEGF、sVEGFR1 値において差を認めなかった。抗  $\beta$  2-GPI 抗体陽性血清よりの IgG は絨毛癌細胞よりの PIGF 産生を抑制したが、陰性血清よりの IgG は PIGF 産生を抑制しなかった。

2. 添加血清の補体非働化の有無により PIGF 産生抑制は変化しなかった。4. 抗  $\beta$  2-GPI 抗体は JEG-3 細胞に作用し TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 の発現を亢進した。亢進の度合は、TRL によって差を認めた。TLR7, 8 では発現の亢進を認め

なかった。

3.抗 $\beta$ 2-GPI抗体陽性IgGの添加により正常非妊娠婦人IgG添加比し血清中IL6およびIL8の有意な増加が認められた。

#### D. 考察

抗 $\beta$ 2-GPI抗体陽性血清のPIGFの産生抑制作用はIgG、すなわち抗体によるものと考えた。PIGF産生抑制が補体の影響をうけるかどうか検討したが、添加血清の補体非働化の有無によりPIGF産生抑制は変化しなかった。このため抗 $\beta$ 2-GPI抗体によるPIGF産生抑制は補体の影響をうけないと考えた。作用機転としては絨毛細胞表面のフォスファチジルセリンに結合した $\beta$ 2-GPIに結合し作ることがPIGF産生抑制に関与している可能性を推察している。抗 $\beta$ 2-GPI抗体の作用として $\beta$ 2-GPIを介して内皮細胞の活性化をもたらすことも知られている。しかし、抗 $\beta$ 2-GPI抗体の結合する血管内皮細胞におけるレセプターの詳細は不明である。抗 $\beta$ 2-GPI抗体は血管内皮細胞に結合しさまざまな作用が発現すると考えられる。少なくとも3つのメカニズムが考えられる。1つは血管内皮細胞表面の陰性荷電部(陰性荷電リン脂質)と $\beta$ 2-GPIの結合、2つ目はAnnexin IIに結合した $\beta$ 2-GPIの結合である。3つ目はTLRを介した作用である。絨毛癌細胞でのTLR発現機序は、今後検討を要するが、正常絨毛でも抗 $\beta$ 2-GPI抗体によりTLRの発現が亢進すると考えられる。抗 $\beta$ 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 $\beta$ 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- $\kappa$ Bを作動させる可能性がある。抗 $\beta$ 2-GPI抗体は、絨毛癌細胞のみならず絨毛細胞においてもシグナル伝達分子を活性化させる可能性がある。

#### E. 結論

抗 $\beta$ 2-GPI抗体は血栓を生じ胎盤機能を障害する以外に、抗 $\beta$ 2-GPI抗体が絨毛よりのPIGF産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を阻害する可能性を証明した。これには補体は関与せず、絨毛細胞表面に結合し作用する可能性がある。TLR発現機序は、今後検討を要するが抗 $\beta$ 2-GPI抗体陽性例では、TLRを介した炎症反応が亢進され、これ

らは妊娠の維持に障害を与え、不育症病態に関与する可能性が推察された。抗 $\beta$ 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 $\beta$ 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  $\beta$ 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 $\beta$ 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
- 3) Tomohiro Nakayama, Tatsuo Yamamoto Comparison between essential hypertension and pregnancy-induced hypertension:a genetic perspective Endocrine Journal 56(8), 921-934,2009
- 4) 市川 剛、山本樹生 抗 $\beta$ 2 グリコプロテイン I 抗体による絨毛障害 臨床免疫・アレルギー科 52巻2号、188-189,2009
- 5) 山本 樹生、青木 洋一、中村 晃和 III 不育症の検査・診断 B免疫因子【抗リン脂質抗体】臨床婦人科産科 第63巻 第4号629-631,2009.
- 6) Yamamoto T, Murase T, Kuno S, Ichikawa G, Chisima F. Leukocyte Subpopulation in Ascites of Women with Pre-Eclampsia. Am J Reprod Immunol. 60(4)318-324,2008

##### 2. 学会発表

- 1) 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  $\beta$ 2-GPIを結合させた絨毛癌細胞(BeWo)内での抗 $\beta$ 2-GPI抗体によるシグナル伝達機構の解明 第62回日産婦学会 東京 4月 2010

- 2) 中村晃和、市川 剛、千島史尚、宮川康司、鈴木真美、山本樹生 抗 $\beta$ 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 第62回日産婦学会 東京 4月 2010
- 3) Tatsuo Yamamoto ,Akikazu Nakamura,Aki Asanuma, Cyuyu Hayashi, GoIchikawa,Souichirou Kuno,Takayuki Murase,Fumihisa Chisima, Manami Suzuki Effects of anti  $\beta$ 2-GPI antibody on the expression of TLRmRNA and cytokine production in choriocarcinoma cell 30<sup>th</sup> Annual meeting of american society reproductive immunology 2010
- 4) Go Ichikawa,Erina Kato,Akikazu Nakamura,Aki Asanuma, Cyuyu Hayashi, Souichirou Kuno, Fumihisa Chisima, Manami Suzuki, Tatsuo Yamamoto Signal transduction in choriocarcinoma cell line caused by anti  $\beta$ 2-GPI antibody binding 30<sup>th</sup>Annual meeting of of american society reproductive immunology 2010
- 5) Tatsuo Yamamoto, Aki Asanuma, Cyuyu Hayashi, Go Ichikawa, Fumihisa Chisima, Manami Suzuki, Effects of anti  $\beta$ 2-GPI antibodies on the production of cytokines in choriocarcinoma (WoBo) cell 11<sup>th</sup> International Society Immunology reproduction Aug 2010
- 6) 中村晃和、市川 剛、千島史尚、宮川康司、鈴木真美、山本樹生 抗 $\beta$ 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 第18回 胎盤学会 9月 2010

#### シンポジウム

- 7) 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、鈴木真実、山本樹生 Trophoblast に関わる免疫と臨床病態 抗 $\beta$ 2 グリコプロテイン I 抗体による絨毛障害メカニズム 第 17 回日本胎盤学会学術集会 2009年 10月 東京
- 8) 市川 剛、中村晃和、東 裕福、浅沼亜紀、林 忠佑、久野宗一郎、村瀬隆行、千島史尚、鈴木真実、山本樹生 抗 $\beta$ 2-GPI 抗体が作用した絨毛癌細胞内でのシグナル伝達 第24回日本生殖免疫学会発表 2009年 11月 東京
- 9) 中村晃和、東 裕福、浅沼亜紀、林 忠佑、市川 剛、久野宗一郎、村瀬隆行、千島史尚、鈴木

木真実、山本樹生 抗 $\beta$ 2-GPI 抗体が作用した絨毛癌細胞での TLR の発現 第24回日本生殖免疫学会発表 2009年 11月 東京

- 10) Go ICHIKAWA, Tatsuo YAMAMOTO, Youchi AOKI, Souichiro KUNO, Takayuki MURASE, Humihisa CHISHIMA Effects of anti $\beta$ 2-GPI antibody positive sera on VEGF, PlGF, Endoglin and sVEGFR1 production from cultured choriocarcinoma cell line. 28<sup>th</sup> Annual meeting of American society of immunology reproduction Chicago June 2008
- 11) 市川 剛、中村晃和、久野宗一郎、村瀬隆之、千島史尚、山本樹生 妊娠高血圧症候群における抗リン脂質抗体の絨毛細胞機能への影響 第29回妊娠高血圧学会 福島 10月 2008年
- 12) 市川 剛、中村晃和、鈴木真実、久野宗一郎、村瀬隆之、山本樹生  $\beta$ 2-GPI 抗体の絨毛癌細胞よりの PlGF 産生に対する影響、補体の影響について 第 53 回日本生殖医学会総会・学術講演会 神戸 10月 2008
- 13) 青木 洋一、市川 剛、久野 宗一郎、村瀬 隆之、千島 史尚、山本 樹生 胎状奇胎と正常妊娠における末梢血および脱落膜 NK 細胞の検討 第 16 回 日本胎盤学会学術集会、11月 14日、神戸

#### 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