

HTR8 に添加してその viability を観察した。また、浸潤の程度を matrigel assay で観察した。NK 細胞活性化による絨毛細胞傷害性をテラスキャン法により検討した。

④ 寄生虫由来抗原による免疫学的流産治療の可能性の実験的研究

免疫機序による不育症モデルである DBA/2J オス X CBA/J メスの系にオスモテックポンプで rDiAg メス背部皮下に無菌的に植え込み妊娠 13 日目に屠殺し、生存胎仔数と吸収胎仔数を判定した。血中サイトカインを Bioplex suspension array によって網羅的に解析した。

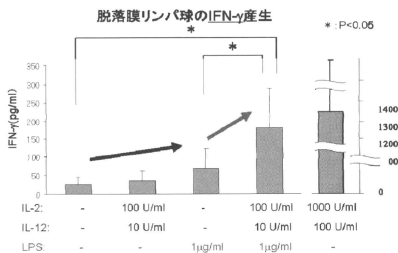
(倫理面への配慮)

臨床検体、実験動物、感染性病原体を用いた実験では各々、倫理委員会、動物実験安全委員会、バイオリスク管理委員会の承認を得た。ヒトの臨床検体を用いる実験では提供者にあらかじめ書面で同意を得た。特に妊娠中絶検体を用いた検討では、説明と同意は本研究班に属さない医師が患者の自由意志を確認した。

C. 研究結果

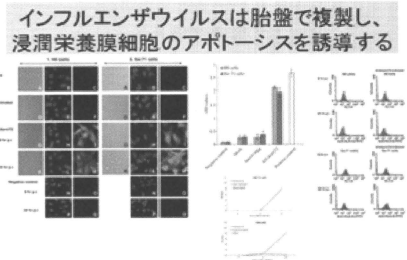
① Th1 サイトカインによる粘膜NK細胞の活性化に関する研究

妊娠の成立と維持には Th2 優位の免疫環境が重要であり、Th1 型の応答は、母体の細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞を活性化し、胎児胎盤を傷害する。さらに両者の関係に、第三の因子として細菌やウイルス感染が影響する可能性がある。我々はグラム陰性菌の内毒素である LPS が Toll 様受容体 (TLR) 4 を介して脱落膜リンパ球を活性化する過程に、Th1 誘導サイトカインがどのように作用するのかを検討した。その結果、IL-2、IL-12 は脱落膜単核細胞の LPS 感受性を亢進して IFN- γ 産生を増強するが、TNF α の産生には影響しないことが明らかになった。



② 胎盤絨毛におけるインフルエンザウイルス複製

従来肺胞上皮と消化管上皮でしか複製しないと考えられていた低毒性の季節性インフルエンザウイルス (H3N2) がヒト絨毛癌細胞で効率よく複製し、細胞をアポトーシスに陥らせること、細胞の分化の程度によりインフルエンザウイルス感受性が異なることを明らかにした。いわゆる新型インフルエンザ H1N12009 pdm における検討では H3N2 に比較して複製効率が低くアポトーシス誘導活性も低いことが明らかになった。

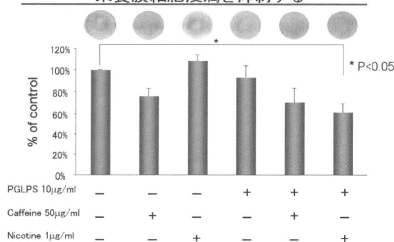


• Trinh DQ. Am J Reprod Immunol. 2009 Sep;62(3):139-46

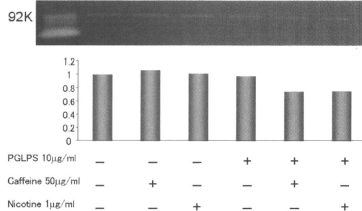
③ 歯周病の胎盤機能に及ぼす影響

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膿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* (PG) 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 PG やによる直接的絨毛細胞傷害はみられないが、これが 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、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することを明らかにした。

PGLPSはニコチンの存在下で
栄養膜細胞浸潤を抑制する



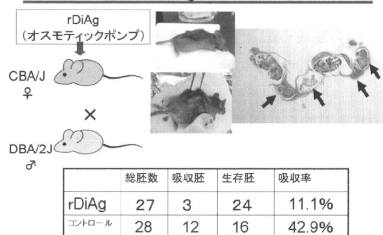
PGLPSはニコチン、カフェインの存在下で
MMP9の発現を抑制する



④ 寄生虫由来抗原による免疫学的流産治療の
可能性の実験的研究

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。不育症においてアレルギー疾患同様に Hygiene hypothesis が成立する可能性を検討するため、免疫機序による不育症モデルである DBA/2J オス X CBA/J メスの系にオスモティックポンプで rDiAg メス背部皮下に無菌的に植え込み妊娠 13 日目に屠殺し、生存胎仔数と吸収胎仔数を判定した。その結果非投与群の 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。

寄生虫抗原 rDiAg による不育症治療



D. 考察

胎児胎盤が妊婦にとって、半非自己であることは間違いない。従って、これを許容するためには寛容が成立する必要がある。しかし、妊婦を免疫不全患者と同一視することは完全な誤りであり、胎児胎盤に特異的な免疫寛容が成立していると考えらるべきである。感染症に対する免疫応答が生じることは、非妊娠者も妊娠している患者も同様であるが、その質が変化している可能性がある。我々の研究より、Th1 型のサイトカイン環境は本来無害である常在菌に対する粘膜免疫応答を活性化し、胎児胎盤を傷害する可能性が示唆された。次に絨毛癌細胞はインフルエンザウイルスに感受性があることから、妊娠中にインフルエンザウイルスに感染すると、胎盤が直接傷害され、低酸素状態や代謝障害によって胎児の神経学的発育に影響を及ぼす可能性が示唆された。最後に妊娠は Th2 優位の現象であることは大筋で正しいとしても、Th1/Th2 二分法のスキームのみでは説明できない現象も少なくない。最近、IL-17 を産生する Th17 細胞が独自の細胞集団であり、様々な自己免疫疾患のみならず、移植臓器や胎児胎盤の拒絶にも関与する。Th17 は IL-23 によって誘導されることから、寄生虫抗原の主要なターゲットは IL-23 と考えられる。流早産の原因の一つとしての感染症に注目している研究者は内外ともに少ないが、感染症(寄生虫)と宿主との共進化を考へ、寄生虫由来の物質でこれを治療しようという逆転的な発想は申請者独自のものである。

E. 結論

生命にとって自己（種ではなく、あくまで自己と子孫親類縁者）の遺伝子の複製と保存が生き残るための至上命題であるが、寄生体、特に病原微生物から自己を守る生態防御も生殖と同様の重要性がある。多くの生物は感染防御と生殖が天秤にかかるような状態にあれば、あえて不妊や流早産を選択し、次の生殖機会を待つという適応戦略をとる。胎児もろとも感染症で死んでしまえば自己の遺伝子の複製がなしえないからである。臨床的には、妊娠による免疫状態の変調が時に胎児胎盤を傷害する諸刃の剣となりえるという事実を理解し、積極的な抗菌薬やワクチン投与を進めてゆく必要があらう。

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.
- 3) Trinh QD, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Shibata T, Shimotai Y, Kuroda K, Mizuguchi M, Ushijima H, Mor G, Hayakawa S. H3N2 influenza A virus replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell lines and induces their rapid apoptosis. Am J Reprod Immunol. 2009 Sep;62(3):139-46.

- 4) 相澤志保子[小峰](日本大学 医学部病態病理学系微生物学分野), 早川智 【妊娠免疫 Update 子宮内臓局所免疫と妊娠】 Toll-like receptor の胎盤における機能 : 医学のあゆみ 233 巻 2 号 Page147-150 2010 【著書】
 - 5) 早川 智 産婦人科学領域への関与 清野宏編著 臨床粘膜免疫学 シナジー 2010
 - 6) 早川 智 妊婦の感染症 山口 徹他 編 今日の治療指針 vol53 2011 医学書院
- ### 2. 学会発表
- 1) 根岸正実, 林田志峯, 岡崎隆行, 庄田亜紀子, 西川正能, 大島教子, 早川智, 稲葉憲之 Th1 サイトカインは脱落膜免疫細胞の LPS 感受性を亢進する 第 62 回日本産科婦人科学会 2010 年 4 月 23 日 東京
 - 2) 根岸正実, 泉泰之, 大島教子, 稲葉憲之, 早川智 Th1 サイトカインはヒト脱落膜リンパ球の LPS 感受性を亢進する 第 37 回日本臨床免疫学会 2009 年 11 月 14 日 東京
 - 3) 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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
早川 智	産婦人科学領域への関与	清野 宏編	臨床粘膜免疫学	シナジー	東京	2010	
早川 智	妊婦の感染症	山口 徹他編	今日の治療指針 vol53	医学書院	東京	2011	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Trinh QD, Izumi Y, Komine-Aizawa S, Shibata T, Shimotai Y, Kuroda K, Mizuguchi M, Ushijima H, Mor G, Hayakawa S.	H3N2 influenza A virus replicates in immortalized human first trimester trophoblast cell lines and induces their rapid apoptosis.	Am J Reprod Immunol.	62(3)	139-46	2009
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.	17(10)	1500-6	2010
相澤志保子[小峰], 早川智	【妊娠免疫Update 子宮内膜局所免疫と妊娠】 Toll-like receptorの胎盤における機能	医学のあゆみ	233(2)	147-150	2010
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.	65(1)	20-7	2011

総合分担研究報告 33

分担課題名: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

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ために、ZPIの新しいアッセイ系を開発した。また、本測定系を用いて、ZPIとPZの血中レベルが妊娠期に上昇すること、非妊娠健康常女性に比べて不育症では増加しないこと、子宮内胎児死亡例や抗リン脂質抗体症候群ではPZが有意に低値であることなどの事実を見出した。更に、遊離ZPI(総ZPI—PZ)を概算し、妊娠期や不育症であるのに拘らずほぼ一定であることなどを発見した。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ことから、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ZPIとPZ産生へ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

[目的と意義]

日本人におけるプロテイン Z(PZ)とプロテイン Z 依存性タンパク質分解酵素インヒビター(ZPI)の正常値を決定し、これらの妊娠における変動と不育症との関係を明らかにすることが目的である。本研究の実施により、それらの何れかの、あるいは両者の異常値が不育症の原因である可能性や不育症のマーカーになる可能性に結論が下され、臨床的に貢献するか否かを判定する。

[背景]

PZは、肝臓で合成される偽セリンプロテアーゼであり、N末端領域にγ-カルボキシグルタミン酸(Gla)残基を有するビタミンK依存性タンパク質の一つである。PZは、血中ではserpinファミリーに属するZPIとの複合体として存在し、リン脂質上でカルシウム依存性に活性型FX(FXa)を効果的に不活性化する。PZとZPIの血中濃度は個人差が大きい、その原因の一部はゲノムの塩基配列の多型に基づいており、少なくとも一部は実際に血漿PZレベルに影響を及ぼす。

当初、低PZ血症は出血に関与していると報告

されたが、FXaを不活性化するというPZ-ZPI系の機能からは、両者の減少はむしろ血栓形成を促進すると推測される。事実、PZ欠乏症例は虚血性脳血管障害の相対危険度が高いこと、急性冠症候群に相関することなどが報告されている。我々は、深部静脈血栓症や自然流産を繰り返した世界初の先天性PZ欠乏症(白人)の遺伝子変異を同定したが、これはGlaドメイン内のGlu30アミノ酸をGlnに置換し、変異タンパク質の細胞内輸送を障害するので、細胞外への分泌を阻害する。また、ZPI遺伝子のナンセンス変異保持者は静脈血栓症のオッズ比が高いことも報告されている。このように、血中PZレベル低値と血栓症の関係は濃厚である。

妊娠中は凝固亢進状態にあるが、胎盤の血液循環は凝固・線溶のバランスの上に成り立っており、出血性素因である凝固XIII因子欠損症は反復性自然流産を、血栓傾向である抗凝固因子プロテインCやSの欠損症も流産を合併する。従って、血栓症を惹起する低PZ血症も胎盤機能不全を惹起する可能性が高い。事実、欧米では、正常妊娠では血中PZ濃度が増加するのに対して、再発性流産、早期胎児死亡などの症例の一部は逆

に低値を示し、特に後者ではPZ欠乏の割合が高いという複数の報告がある。また、抗PZ抗体の存在が胎児死亡に関与しているという論文もある。これらには異論もあるが、最近、低PZ血症が早産や子癇に関与しているという報告、更に上述した遺伝的多型性は再発性流産に関係があるという論文が加わった。

また、PZはほぼ全てZPIと結合して複合体型として血中に存在するが、ZPIの一部は遊離型として単独で存在する。因みに、PZ-ZPI複合体は活性型X因子を、遊離ZPIは活性型XI因子を阻害することが知られている。従って、妊娠期の抗凝固状態の変動を理解する為には、PZ-ZPI複合体と遊離ZPIの濃度やバランスを知ることが必要である。

ところが、我が国では、妊娠合併症と血中PZ濃度との関係はおろか、正常妊娠、更に健常人における正常値さえ決定されていないので、日本人独自の解析が不可欠である。

B. 研究方法

(1) 対象と検体

本研究は、山形大学及び名古屋市立大学、富山大学の倫理委員会の承認を得て実施された。文書によるインフォームドコンセントが得られた、生殖年齢にある正常非妊娠女性(n=42)、正常妊婦(n=32)および不育症症例(n=146)を対象とした。対象者の肘静脈からクエン酸採血を行い、遠心して血漿を得た。周産期におけるPZおよびZPIの変動を追跡するため、同一症例の妊娠初期(6~12週)、中期(20~25週)、後期(30~37週)および産褥期に採血を行った。

(2) PZのELISAによる測定方法

PZの抗原量は、特異抗体を用いたサンドイッチELISA法にて測定した[ZYMUTEST Protein Z (Hyphen BioMed社)]。抗ヒトPZ抗体固相化済みのELISAプレートに希釈した血漿検体を注入して、2時間インキュベートした。その後各ウェルを洗浄し、抗原検出用抗体(ペルオキシダーゼ標識ヒツジ由来抗PZ抗体)を加え、1.5時間インキュベートした。5回洗浄した後に、3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を加え、15-20分反応を行った後に、希硫酸を加えて反応を停止し、450nmの吸光度をプレート

リーダーにて測定した。

(3) 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。

(4) ヒト血漿からのZPIタンパク質精製の検討

Hanらによって報告されている精製手順(Proc Natl Acad Sci USA, 1998)を参考にして、Step 1: クエン酸バリウム沈殿によるビタミンK依存性タンパク質の除去

Step 2: 硫酸分画(45-75%画分)

Step 3: ポリエチレングリコール(PEG)分画(7.5~18%画分)

Step 4: 陽イオン交換クロマトグラフィー(Phosphocellulose)

Step 5: ヘパリンセファロース

について、一部のステップを組み合わせで別々に実施し、精製効率の検討を行った。

Step 3については、ヒト凍結血漿10 mLをクエン酸バリウム吸着後、上清について硫酸分画を行った。沈殿を10 mLの20 mM Tris (pH

7.5), 150 mM NaCl, 1 mM diisopropylfluorophosphate (DFP)に溶解した。次に、各硫酸画分に PEG を添加して分画した。沈殿は 5 mL の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4), 1 mM DFP に溶解した。Step 4 については、90 mL の凍結血漿をバリウム吸着後、30-75%硫酸画分、7.5-18% PEG 画分を順次回収し、40 mL の 0.1% Tween 20, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4), 1mM DFP に溶解したものを Phosphocellulose P-11 (15 mL) を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。20~500 mM リン酸緩衝液の濃度勾配にて吸着タンパク質を溶出した。Step 5 については、Phosphocellulose 画分 (6-10)を 0.1% Tween 20 で3倍に希釈後、Heparin-Sepharose カラム (4 mL) にアプライした。20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4)で洗浄後、20~500 mM リン酸緩衝液の濃度勾配にて吸着タンパク質を溶出した。各精製のステップの前後で、ZPI を抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 を用いたウエスタンブロットにより検出した。

(5) ELISA によるヒト血漿の ZPI タンパク質量測定

抗 ZPI ポリクロナール抗体 (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ポリクロナール抗体 (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、TMB 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。

(6) RT-PCR による PZ および ZPI 発現量の解析

ヒト由来肝癌細胞株 HepG2 を用いてエストロジオールおよびプロゲステロン添加時における PZ および ZPI の発現への影響について調べた。エストロジオールおよびプロゲステロンは 1 μ g/mL 濃度で培養液に添加し、48 時間後に RNA を抽出し発現の変化を調べた。HepG2 よりの RNA の抽出は、グアニジンチオシアネート

法を用い、オリゴ(dT)20 プライマーおよび M-MLV 逆転写酵素を用いて逆転写を行った。得られた cDNA および PZ、ZPI および GAPDH の特異プライマーを用いて PCR をおこない各成分の発現を調べた。用いたプライマーは下記の通りである。

PZ センス:

5' -CACCGGATCTACAGGACCTC-3'

PZ アンチセンス:

5' -CATGGACGTGCGTTATCTTG-3'

ZPI センス:

5' -CATGGAGAAAATGGGTGACC-3'

ZPI アンチセンス:

5' -AGTGCCCTTTCATCAACTTC-3'

GAPDH センス:

5' -CATCACCATCTTCCAGGAGC-3'

GAPDH アンチセンス:

5' -TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG-3'

PZ, ZPI および GAPDH はそれぞれ、28, 25, および 18 サイクルの PCR を行った後に、PCR 産物を 2.0%アガロースゲル泳動にて検出した。デンストメーターを用いて各バンドの濃さを半定量的に測定した。

(7) PZ 発現調節のルシフェラーゼアッセイによる解析

プロゲステロンが PZ の発現に寄与する機構を明らかにするため、PZ 遺伝子の 5' -上流領域(-3058/+11)を挿入した pGL3-basic ルシフェラーゼベクターを用いてルシフェラーゼ活性測定をおこなった。10 μ g のレポーターベクターおよび β ガラクトシダーゼベクターを 3×10^5 個の HepG2 細胞にトランスフェクトし、24 時間培養した後に 1 μ g/mL の濃度となるようプロゲステロンを添加し、48 時間後にルシフェラーゼアッセイに供した。

得られたデータは、正規性の検定および F 検定の後に、Student's t-test あるいは Welch's t-test を用いて有意差検定を行った。

(8) 統計解析法

各検体を3回ずつ測定し、統計ソフト 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

(1) 組換え ZPI の哺乳類細胞及び昆虫細胞での発現

抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 によって、DsRed 融合 ZPI が約 80 kDa の位置にウエスタンブロットで培養上清中に検出された。別の抗 ZPI 抗体 H-137 を用いたウエスタンブロットでも、DsRed 融合 ZPI が約 80 kDa の位置に検出されたが、やや感度は低かった。これにより、哺乳動物細胞発現系で分泌型組換え ZPI タンパク質を発現することが可能であることが確認された。次に、安定発現細胞株を樹立して、組換えタンパク質をより多く発現するクローンを得た。組換え ZPI は、0-45%より 0-75%硫酸分画に多く、0-20%よりも 0-10%PEG 分画に多く得られた。Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィーでは、組換え ZPI はフラクション 4-7 に溶出された。

単離した組換えバキュロウイルス (rbvZPI) を感染させた Sf21 細胞の培地を回収し、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ところ、分子量約 58kDa と哺乳類細胞で発現した組換え ZPI よりやや小さかった。これは、昆虫細胞では、炭水化物付着部位に糖の付加がされていないためと思われる。

(2) ヒト血漿からの ZPI タンパク質精製

硫酸分画では、0-45%、45-75%の両分画に ZPI タンパク質が現れ、Han らの報告と異なり 0-45%により多く得られた。PEG 分画では、0-7.5%、7.5-17.5%の両分画に ZPI タンパク質が現れ、0-7.5%により多く得られた。Phosphocellulose P-11 (15 mL) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーでは、フラクション 7-10 に ZPI タンパク質が溶出された。Heparin-Sepharose クロマトグラフィーでは、フラクション 6-8 に ZPI タンパク質が溶出された。ただし、フラクション 4, 5 にも大量のアルブミンの干渉を受けたと思われるバンドの痕跡が認められた。

(3) プロテイン Z(PZ) 依存性プロテアーゼインヒビター (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。

(4) 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 の変化はなかったため、平均年齢の違いによるものではない。

(5) 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。

(6) 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。

(7) 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。

(8) 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、健常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。

(9) 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絶対濃度を定量することを可能にしたので、遊離ZPI濃度を算出して比較したところ、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。

(10) PZ および ZPI の発現量に対するエストラジオールおよびプロゲステロンの影響

PZ および ZPI のエストラジオールおよびプロゲステロンによる発現の変化を調べたところ、PZ は、エストラジオールの添加では有意な発現の増加が見られなかったが、プロゲステロンの添加により有意に発現が亢進した($p < 0.05$)。エストラジオールとプロゲステロンを同時に添加すると、更に発現が亢進する傾向が見られた。一方、ZPI は、エストラジオールおよびプロゲステロンを添加しても、その発現に有意な差が見られなかった。

(11) PZ 遺伝子発現に対するエストラジオールおよびプロゲステロンの影響

ルシフェラーゼアッセイの結果でも、RT-PCRと同様に、PZ 遺伝子を導入した細胞をプロゲステロンで処理すると有意に発現活性が亢進することが観察された ($p < 0.005$)。一方、エストラジオール添加では有意な差は見られなかった。

D. 考察

本研究の主な成果は、以下の3点である。

ZPI の組換えタンパク質の生合成に成功し、これを検出する特異的抗体も確認したので、新ELISAアッセイ系の開発に成功した。

我が国における血漿 PZ、ZPI のレベルの測定を初めて実施し、白人との違いがある可能性、妊娠時に増加するという事実、不育症では増加しないという知見を得た。

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。

哺乳動物細胞発現系及びバキュロウイルス発現系の両者で、組換えZPIタンパク質を発現することが可能であることが確認された。昆虫細胞で発現された組換えZPIのバンドの分子量は約58kDaと哺乳類細胞で発現されたものよりやや小さかったが、炭水化物付着部位に糖の付加がないためと思われる、このバンドは目的のZPIタンパク質であることを示していると考えられた。

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、まず、組換えZPIタンパク質を発現する哺乳類細胞安定株を樹立した。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、後述する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。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。

本研究により、ZPIとPZの血中レベルが妊娠期に上昇すること、不育症においては不変であることが発見されたが、その正常妊娠における生理

的意義、不育症における因果関係は不明であり、妊娠時に増加する両遺伝子の発現調節機構も全く解明されていない。

両者を発現する肝癌細胞の培養系で、エストロゲンとプロゲステロンの影響を調べたところ、プロゲステンによって PZ 遺伝子の発現が有意に増加すること、ZPI 遺伝子の発現は不変であることが判明した。ただし、本実験系では肝癌細胞株を用いて、かつ過剰量のホルモンを投与しているので、必ずしも生体内の両遺伝子の発現状態を反映しているとは言えない。

E. 結論

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。

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) Souri M, Iwata H, Zhang WG, Ichinose A: Unique secretion mode of human protein Z: Its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. *Blood* 2009, 113(6): 3857-3864.
 - 2) 一瀬白帝: 不育症と凝固 XIII 因子. *日本血栓止血学会誌*, 2009; 20(5): 519-526.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: 分泌型ルシフェラーゼを用いたビタミン K 依存性タンパク質分泌メカニズムの解析. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪; 2008 年 11 月 20-22 日
 - 2) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: γ -グルタミルカルボキシラーゼはビタミン K 依存性タンパク質の Cargo receptor である. *BMB2008* (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸; 2008 年 12 月 9-12 日
 - 3) 岩田宏紀, 杉浦真弓, 一瀬白帝: 正常妊娠と不育症におけるプロテイン Z およびプロテイン Z 依存性プロテアーゼインヒビターの動態. 第 9 回 TTM フォーラム学術集会, 東京; 2009 年 3 月 7 日
 - 4) 岩田宏紀, 杉浦真弓, 一瀬白帝: 妊娠および不育症におけるプロテイン Z およびプロテイン Z 依存性プロテアーゼインヒビターの動態. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会, 北九州; 2009 年 6 月 4-6 日
 - 5) Souri M, Iwata H, Zhang WG, Nakagaki T, Ichinose A: γ -Glutamyl carboxylase is a cargo receptor for vitamin K-dependent proteins. XXII International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Congress with 55th Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting, July 11-16, 2009, Boston, MA, USA
 - 6) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: 翻訳後修飾反応を触媒する γ -グルタミルカルボキシラーゼは基質タンパク質の細胞内輸送における積荷受容体として働く. 第 17 回山形分子生物学セミナー, 鶴岡; 2009 年 12 月 16 日
 - 7) 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

- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
Souri M, Iwata H, Zhang WG, Ichinose A:	Unique secretion mode of human protein Z: Its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion.	Blood	113(6)	3857-3864	2009
一瀬白帝	不育症と凝固XIII因子.	日本血栓止血学会誌	20(5)	519-526.	2009
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

総合分担研究報告 34

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

流産、不育につながる染色体の数の異常(異数性)のメカニズムについて、そのモデル動物(メダカ)の作出を行った。ホモ変異体は受精後 2 日目には発生異常をおこし、細胞レベルで染色体の異数性や PCS を起こした。

A. 研究目的

妊娠後、初期発生を含め7割が妊娠継続できない。その主な原因として染色体の正常な分配が行われない染色体異数性の問題が挙げられている。この異数性の原因の一つに姉妹染色体合着に関わるコヒーシ複合体の不安定性が考えられている。コヒーシ複合体の一つである SMC3 のアセチル化を起こす *ESCO2* 遺伝子の変異体モデル動物を作出し、染色体の数の異常に正面から向き合うための基礎的な解析を行う。

B. 研究方法

変異原(ENU)を用いた大規模な遺伝子変異体作出・解析には、わが国固有のメダカ(*O. latipes*)を使用した。変異メダカ作製のメリットとして、哺乳類の解析に比べ、卵が大量に採取できること、卵が透明なため胎生致死個体も容易に観察できること、場所、費用の負担が少ないこと、などがあげられる。また、胎内発生の可視化が行えるため、胎内死亡する変異体の解析にも適している。この手法を用い、*ESCO2* 遺伝子の変異個体における染色体異常を細胞毎に調べた。

また、*ESCO2* 遺伝子の転写調節機構に関しては、これまで報告がない。ヒト *ESCO2* 遺伝子の 5' 領域からコアプロモーター領域を同定し、ルシフェラーゼアッセイ、EMSA、ChIPなどの手法を用いて基本転写因子を同定した。

(倫理面への配慮)

施設内動物委員会で承認を受け、規定を遵守し研究を行っている。

C. 研究結果

これまで姉妹染色体の合着異常を起こす世界でも非常にまれな疾患原因遺伝子の同定を行った(Vega, et al. Nature Genet, 2005)。染色体が分裂前に中心体で結合しているいわゆる X 字状にならず、平行(線路様)になる(PCS)ことが特徴である。5771 個のメダカ精子遺伝子プールから、合着にかかわると考えられる遺伝子 *ESCO2* のスクリーニングを行い、6 つのミスセンス変異を見出した。これらの交配の結果、この変異をホモにもつ卵を得ることに成功した。卵の解析の結果、約 4 分の 1 の確立で卵の発生異常を確認した。さらに、発生段階を追って解析した結果、発生の停止は特に細胞増殖の盛んな臓器を中心にアポトーシスを起こしていることが確認された。さらに、受精後 2 日目の卵の細胞の解析により *ESCO2* 変異メダカでは PCS が約 3 割の細胞で、また 7 割の細胞において染色体が長軸方向に縮んだ形態(hyper-condensation)を認めた。さらに、80% 弱の細胞で染色体の異数性が認められた(論文投稿中)。

D. 考察

姉妹染色体合着に関わるコヒーシ複合体の中の SMC3 のアセチル化に関わる *ESCO2* の変異体を作成した。この変異体は、正常発生過程における細胞増殖を行うことができず、アポトーシスによって多

くの細胞死が認められ、受精後 2 日から発生異常が観察された。受精後 1-2 日後の染色体分析で、PCS や染色体数の異常が認められた。このことは、異数性発症のメカニズム、女性のエイジングによる染色体の数異常(Down 症など)の増加、そして、不育症の一つのメカニズムと捕らえることができる。

E. 結論

染色体異数性のおこるメカニズムにコヒーシオン複合体安定性に関わる ESCO2 が関与していることが示唆された。

(その他の主な研究)

1. 日本人に認められる習慣性流産と関連する SNP を見出した。(藤田保健衛生大学、倉橋教授らとの共同研究)
2. ナノ粒子の母胎投与による胎盤構造異常について病理的な解析を行った。(大阪大学・堤教授、斉藤班長らとの共同研究)
3. 流産、早産起因微生物の解析を行い、ウレアプラズマの病原因子を単離した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Kato T, Pryor-Loishi K, Nakanishi I, Fujita T, Ymayoshi Y, Markoff A, Yanagihara I, Udagawa Y, Kurahashi H. Polymorphism in annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. *Molecular Human Reproduction*. in press.
- 2) Nozaki M, Wakae K, Tamaki N, Sakamoto S, Ohnishi K, Uejima T, Minato N, Yanagihara I*, Agata Y. Regulation of T Cell Receptor V γ 2 Gene Rearrangement by the Helix-Loop-Helix Protein, E2A. *International Immunology*, in press
- 3) Ohnishi K, Nakahira K, Unzai S, Mayanagi K, Hashimoto H, Honda T, Yanagihara I* Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiology letters*, in press
- 4) Yanagihara I*, Nakahira K, Yamane T, Kaieda S, Mayanagi K, Hamada D, Fukui T, Ohnishi K, Kajiyama S, Shimizu T, Sato M, Ikegami T, Ikeguchi M, Honda T, Hashimoto H. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(21), pp16267-74, 2010
- 5) Nishihara M, Sonoda M, Matsunami K, Yanagihara K, Yonemoto N, Ida S, Namba F, Shimomura I, Yanagihara I*, Waguri M. Birth length is a predictor of adiponectin levels in Japanese young children. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 23, pp913-920, 2010
- 6) Nishihara M, Yamada M, Nozaki M, Nakahira K, Yanagihara I*. Transcriptional regulation of the human *establishment of cohesion 1 homolog 2* gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(1), pp111-7, 2010
- 7) Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, Mimura K, Yamada M, Kitajima H, Suehara N, Yanagihara I*. Placental features of chorioamnionitis colonized with *Ureaplasma* species in preterm delivery. *Pediatric Research*, 67(2), pp166-72, 2010
- 8) Hamada D, Hamaguchi M, Suzuki KN, Sakata I, Yanagihara I. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a case for EspB as an intrinsically less-ordered effector. *FEBS J*, 277(11), pp2409-15, Review, 2010
- 9) Mimura K, Tomimatsu T, Sharentuya N, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Nicotine restores endothelial dysfunction caused by excess sFlt1 and sEng in an in vitro model of preeclamptic vascular endothelium: a possible therapeutic role of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 202(5), pp464.e1-6. 2010
- 10) Kinugasa-Taniguchi Y, Tomimatsu T, Mimura K, Kanagawa T, Shimoya K, Murata Y, Kimura T. Human C-reactive protein enhances vulnerability of immature rats to

- hypoxic-ischemic brain damage: a preliminary study. *Reprod Sci.* 17(5), pp419-25. 2010
- 11) Sharentuya N, Tomimatsu T, Mimura K, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Nicotine suppresses interleukin-6 production from vascular endothelial cells: a possible therapeutic role of nicotine for preeclampsia. *Reprod Sci.* 17(6), pp556-63. 2010
 - 12) Tskitishvili E, Sharentuya N, Temma-Asano K, Mimura K, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Fukuda H, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K. Oxidative stress-induced S100B protein from placenta and amnion affects soluble Endoglin release from endothelial cells. *Mol Hum Reprod.* 16(3), pp188-99. 2010
 - 13) Hamaguchi M, Hamada D, Suzuki KN, Sakata I, Yanagihara I. Molecular basis of actin reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* EspB to alpha-catenin. *FEBS Journal*, 5(24), pp6260-7, 2008
 - 14) Hamada D, Tsumoto K, Sawara M, Tanaka N, Nakahira K, Shiraki K, Yanagihara I. Effect of an amyloidogenic sequence attached to yellow fluorescent protein. *Proteins*, 2(3), pp811-21, 2008
 - 15) 橋本博、山根努、池口満徳、中平久美子、柳原格. 「腸炎ビブリオが産生する耐熱性溶血毒 TDH の構造と機能」. *日本結晶学会誌*, 52, 285-289, 2010
 - 16) 中山聡一郎、中山雅弘、味村和哉、光田信明. 「妊娠高血圧症候群の病態解明—分子機構を中心に—胎盤からみた妊娠高血圧症候群」. *産婦人科の実際*, 59, 1005-1011, 2010
 - 17) 味村和哉、柳原格. 「妊娠高血圧症候群」. *大阪府立母子医療センター雑誌*, 25(2), pp9-11, 2009
 - 18) 西原正泰、南 佐和子、八木重孝、米本直裕、柳原格、樋口隆造. 「和歌山県における後期死産の検討(2003-2007年)」. *日本周産期・新生児医学会雑誌*, 45(4), pp1350-3, 2009
 - 19) 柳原格、下屋浩一郎. 「胎内感染と流産・新生児合併症」. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 44(4), pp1032-3, 2008
 - 20) 白石淳、北島博之、藤村正哲、難波文彦、柳原格、長谷川妙子、田端厚之、中山雅弘. 「当センターにおける超早産児からのウレアプラズマ属細菌の検出頻度とその臨床背景」. *近畿新生児研究会会誌*, 17, pp31-5, 2008
 - 21) 中山雅弘、柳原格、濱中拓郎、末原則之、白石淳、北島博之. 「FIRS の制御に向けた7年、胎盤病理と生殖・胎内環境整備」. *日本周産期・新生児医学会雑誌*, 44(2), p318, 2008
 - 22) 柳原格. 「妊婦及び早産児からのウレアプラズマ属細菌の分離培養」. *日本産婦人科感染症研究会会誌*, 24, pp41-5, 2008
 - 23) 野崎昌俊、柳原格. 「V(D)J 組換え— Accessibility から病態解析まで—」. *大阪府立母子医療センター雑誌*, 24(2), pp65-70, 2008
2. 学会発表
 - 1) 太田小百合、宮村浩徳、西澤春紀、稲垣文香、江草悠美、藤田富雄、柳原格、宇田川康博、倉橋浩樹. 「習慣流産におけるアネキシン A5 遺伝子多型の検討」, 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010.12.7-10、神戸、ポスター
 - 2) 柳原格、中平久美子、大西紀陽久、本田武司. 「腸炎ビブリオの産生する TDH の構造学的解析」, 第 83 回日本細菌学会総会、2010.3.27-29、横浜、ワークショップ口演&ポスター
 - 3) 柳原格、中平久美子、大西紀陽久、真柳浩太、橋本博、本田武司. 「腸炎ビブリオの産生する thermostable direct hemolysin(TDH) の構造学的解析」, 第 57 回トキシシンポジウム、2010. 7. 14-16、大津、オーラル
 - 4) 柳原格. 「ウレアプラズマ感染 —流産そして次世代への影響—」, 第 37 回日本マイコプラズマ学会 2010.6.10-11、東京、シンポジスト
 - 5) 北島博之、柳原格. 「ウレアプラズマ感染早産胎盤における絨毛膜羊膜炎の病理像」, 近畿腸管微生物研究会、2010.6.5、大阪、口演
 - 6) 柳原格. 「LPS 誘導性早産モデルマウスに対するチオレドキシンの有効性」, 京都大学ウイルス研究所ミニシンポジウムレドックス生命医学の展望(ATL Allergy TRX)、2010.3.15、京都、招待講演
 - 7) 内田薫、清水隆、柳原格. 「妊娠マウスを用いた *Ureaplasma parvum* 由来 multiple banded antigen (MBA) による胎内炎症惹起機構の解明」, 第 37 回日本マイコプラズマ学会、

- 2010.6.10-11、東京、オーラル
- 8) 内田薫、野崎昌俊、柳原格.「妊娠マウスを用いた *Ureaplasma parvum* による胎内炎症惹起機構の解明を目指して」、第 46 回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、オーラル&ポスター
 - 9) 味村和也、藤田富雄、中山雅弘、光田信明、柳原格.「当センターの原因不明不育症患者における 1st trimester 流産検体の病理学的所見の分類」、第 46 回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、オーラル&ポスター
 - 10) 奥山宏臣、清水義之、佐々木隆士、内田薫、柳原格、稲村昇.「胎児消化管におけるサーフアクタント蛋白質 A と D の局在と産生に関する検討」、第 46 回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、オーラル&ポスター
 - 11) 野崎昌俊、難波文彦、内田薫、西原正泰、柳原格.「Lipopolysaccharide(LPS)誘発早産モデルマウスにおけるチオレドキシン(TRX)の早産抑制効果」、第 46 回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、ポスター
 - 12) 野崎昌俊、柳原格、縣保年「bHLH 転写因子 E2A による V γ 2 遺伝子再構成の制御機構」、第 20 回 Kyoto T cell Conference、2010.6.4-5、京都、オーラル
 - 13) 宮村浩徳、西澤春紀、稲垣文香、江草悠美、藤田富雄、柳原格、宇田川康博、倉橋浩樹.「アネキシン A5 遺伝子多型と習慣流産の関連」、第 55 回日本人類遺伝学会総会、2010.10.28-30、大宮、ポスター
 - 14) Hiroshi Hashimoto, Kumiko Nakahira, Tsutomu Yamane, Takashi Fukui, Kiyohisa Ohnishi, Toshiyuki Shimizu, Takeshi Honda, Mitsunori Ikeguchi, Mamoru Sato, Itaru Yanagihara.「Structural study of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*」、日本生物物理学会総会、2010. 9-20-22、仙台、ポスター
 - 15) Masatoshi Nozaki, Nobuyuki Tamaki, Shuji Sakamoto, Itaru Yanagihara, Yasutoshi Agata.「Regulation of V γ 2 gene rearrangement by the helix-loop-helix protein, E2A」14th International Congress of Immunology、2010.8.22-17、神戸、ポスター
 - 16) Itaru Yanagihara, 「The pathological findings and molecular mechanisms of *Ureaplasma* spp. infection in preterm delivery」7th European Society for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynaecology (ESIDOG), 2010.10.2-5, Trieste, Italy, Invited Speaker
 - 17) Mitsuhide Hamaguchi, Yoshinori Murao, Masahiro Tanaka, Noriko Tsuda, Toshihumi Uejima, Katsuyuki Maruyama, Itaru Yanagihara, Ikuhiro Sakata.「The mRNA expression of fatty acid amide hydrolase in human whole blood may correlate with recovery in patients with sepsis」第 38 回日本救急医学会学術集会、2010.10.9-11、東京、ポスター
 - 18) 柳原格. LPS 誘導性早産モデルマウスに対するチオレドキシンの有効性京都大学ウイルス研究所ミニシンポジウムレドックス生命科学の展望: ATL Allergy TRX. 京都、March 15, 2010.
 - 19) 柳原格、中平久美子、大西紀陽久、本田武司. 腸炎ビブリオの産生する TDH の構造学的解析. 第 83 回日本細菌学会総会、横浜、March 27-29, 2010.
 - 20) 大西紀陽久、中平久美子、本田武司、柳原格.「TRH (TDH-related hemolysin)の精製と高次構造解析」、第 82 回日本細菌学会総会、2009.3.12-14、名古屋、ポスター
 - 21) 柳原格、中平久美子、大西紀陽久、本田武司「Tetrameric Structure of Thermostable Direct Hemolysin」(TDH の 4 量体構造)、第 82 回日本細菌学会総会、2009.3.12-14、名古屋、ポスター
 - 22) 柳原格、難波文彦、北島博之、中山雅弘、藤村正哲.「大阪府立母子保健総合医療センターにおける感染性早産制御に向けた試み」、第 112 回日本小児科学会、2009.4.17-19、奈良、オーラル
 - 23) 徳力周子、五十嵐愛子、巨田尚子、田村知史、畑郁江、塚原宏一、眞弓光文、高橋仁、西島浩二、小辻文和、長谷川妙子、小出亜希子、柳原格、佐々木裕子、見理剛「*Ureaplasma urealyticum* 感染が病因と考えられ呼吸管理に難渋した Wilson-Mikity 症候群の 1 例と、当院における極低出生体重児の血清 KL-6 値についての検討」、第 15 回未熟児新生児医療研究会、2009.9.21、京都、オーラル
 - 24) 徳力周子、五十嵐愛子、巨田尚子、田村知史、畑郁江、塚原宏一、眞弓光文、高橋仁、西島浩

- 二、小辻文和、長谷川妙子、小出亜希子、柳原格、佐々木裕子、見理剛「*Ureaplasma urealyticum* 感染が病因と考えられ呼吸管理に難渋した Wilson-Mikity 症候群の 1 例」、第 45 回中部日本小児科学会、2009.9、名古屋
- 25) 野崎昌俊、難波文彦、中山雅弘、白石 淳、濱中拓郎、西原正泰、北島博之、末原則幸、柳原格。「ウレアプラズマ属による組織学的絨毛膜羊膜炎-特徴的胎盤病理像とその詳細-」第 45 回日本周産期・新生児医学会学術集会、2009.7.12-14、名古屋、オーラル
- 26) 濱口満英、濱田大三、鈴木香代、坂田育弘、柳原格。「腸管出血性大腸菌の産する EspB の α -カテニン結合を介したアクチン再構成の分子機構」、第 56 回日本生化学会近畿支部例会、2009.7.18、大阪、オーラル
- 27) 森田明広、長谷川妙子、中平久美子、谷口善仁、武田俊一、近藤寿人、豊田敦、榊佳之、島田敦子、武田洋幸、柳原格。「Roberts 症候群モデルメダカの作製と表現型の解析」、日本動物学会第 80 回大会、2009.9.17-19、静岡、ポスター
- 28) Itaru Yanagihara, Kumiko Nakahira, Hiroshi Hashimoto, Kiyouhisa Ohnishi, Akihiro Morita, Takeshi Honda . 「Analysis of tetrameric structure of TDH」, 44th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, 2009.11.17-19, San Diego, CA, USA, Invited
- 29) Namba Fumihiko, Mikiko Kobayashi-Miura, Junji Yodoi, Itaru Yanagihara . 「Thioredoxin-1 prevents LPS-induced preterm delivery in mouse model. (5165.2)」, , Pediatric Academic Societies Annual Meeting 2009, 2009.5.2-5, Baltimore, USA
- 30) Yanagihara K, Nagai T, Imai K, Arai H, Toribe Y, Mano T, Suzuki Y, Yamada M, Yanagihara I. 「Diagnosis and clinical research on glucose transporter 1 deficiency syndrome in Asia causing intractable epilepsy and various neurological symptoms in early infancy」10th. Asian & Oceanian Congress of Child Neurology, 2009.6, Daegu, Korea, 一般演題
- 31) 長谷川妙子、柳原格。「当センターにおける流早産胎盤からの *Ureaplasma* spp. 検出頻度とその胎盤病理」、日本第 81 回日本細菌学会、2008.3. 24-26、京都、一般口演
- 32) 中平久美子、大西紀陽久、本田武司、柳原格。「腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒(TDH)変異体の活性構造相関解析」、第 81 回日本細菌学会、2008.3. 24-26、京都、一般口演
- 33) 大西紀陽久、中平久美子、本田武司、柳原格。「TRH(TDH-related hemolysin)の精製とその構造的特徴」、第 81 回日本細菌学会、2008.3. 24-26、京都、一般口演
- 34) 大西紀陽久、中平久美子、本田武司、柳原格。「TRH(TDH-related hemolysin)の精製と高次構造の解析」、第 61 回日本細菌学会関西支部、2008. 11. 8、京都、一般口演
- 35) 長谷川妙子、柳原格。「*Ureaplasma* spp.の早産への関与」、第 35 回日本マイコプラズマ学会、2008. 5. 30-31、東京、一般口演
- 36) 難波文彦、柳原格。「感染性/炎症性早産モデルに対するチオレドキシン投与の効果」、第 53 回日本未熟児新生児学会、2008. 10、札幌、一般口演
- 37) 中山雅弘、桑江優子、松岡圭子、藤原太、白石淳、北島博之、濱中拓郎、末原則幸、長谷川妙子、難波文彦、柳原格。「CAM 胎盤におけるウレアプラズマの検出とその胎盤病理」、日本周産期・新生児医学会、2008.7.13-15、横浜
- 38) 柳原格。「遺伝子治療の現場と展望」、府民公開講座「母と子の明日に向けて「子供の病気いろいろ」、2008.7.5:大阪(第5回室堂セミナー)、講演
- 39) 柳原格。「胎児炎症反応症候群の制御に向けた7年間 アミロイド形成能を持つ細菌毒素 TDH の解析」、京都大学ウイルス研究所セミナー、2008.4.9、京都、招待講演
- 40) Namba F, Kitajima H, Nakayama M, Matsunami K, Yanagihara K, Nishihara M, Yamada M, Hirano S, Fujimura M, Yanagihara I. 「Anti-annexin A2 IgM antibody in preterm infants: Its association with chorioamnionitis」, Pediatric Academic Societies Annual Meeting, 2008. 5, Honolulu, Hawaii.
- 41) Namba F, Nakayama M, Nishihara M, Nozaki M, Shiraiishi J, Hamanaka T, Kitajima H, Suehara N, Yanagihara I. 「Placental Features of Chorioamnionitis Colonized With *Ureaplasma* Species in Preterm Delivery」, 15th Congress of Federation of Asia and Oceania Perinatal

Societies, 2008.5, Nagoya, Japan

- 42) Hara K, Kurosaki T, Yagyu M, Shimizu T, Yanagihara I, Sato M, Hiroshi Hashimoto. 「Crystallographic study of zinc finger domain of ECO1 involved in sister chromatid cohesion」, International Union of Crystallography, 2008.8.23-31, Osaka.

研究最前線 28、バンカル(神戸新聞)、77 秋号、pp74-77、2010

- (6)柳原格.「加熱すると毒性が戻る不思議な菌：感染症と災害(2)」、アピタル、エマージェンシー・コール、朝日新聞ホームページ asPara クラブ、2010.6.26

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許

- (1)特許公開 2010-90055、淀井淳司、三浦美樹子、柳原格、難波文彦、中平久美子. 母体投与用薬 実用新案登録
- (2)特許公開 2008-81467
梶野勉、福嶋喜章、岩井覚司、松田雅敏、濱田大三、柳原格. 人工的に自己組織能が付与された合成タンパク質及びその複合体並びに複合体の製造方法

2. その他

- (1)藤田保健衛生大倉橋浩樹、母子センター研究所 柳原格ら、「習慣流産の遺伝子発見」2011/02/02 毎日新聞 朝刊、中日新聞 朝刊、朝日新聞 朝刊
web page
日本経済新聞、朝日新聞、毎日新聞、中日新聞、47NEWS(共同通信)、東京新聞、大阪日日新聞、京都新聞、その他
- (2)柳原格、橋本博.「加熱しても消えない、食中毒原因菌・腸炎ビブリオの毒性に迫れ！！」 「SPring-8 NEWS」55号の「研究成果・トピックス欄」2011年3月号掲載予定
- (3)柳原格、本田武司.「加熱で再び毒性」の謎解明、朝日新聞科学欄、2010.5.25
- (4)柳原格、橋本博、本田武司.「食中毒原因菌の腸炎ビブリオの毒性は加熱してもなぜ消えないのか？ - 腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒(TDH)の構造解明」SPring-8 ホームページ、プレスリリーストピックス、2010.5.21
http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2010/100521
- (5)柳原格.「食中毒の原因、腸炎ビブリオ～加熱しても毒が消えない理由～」、播磨科学公園都市・