

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患制作研究事業）  
分担研究報告書

子癇前症患者血清において Vasoinhibin 量と Cathepsin D 活性が上昇する

大橋（石田）充代 国立成育医療研究センター バイオバンク  
秦 健一郎 国立成育医療研究センター 周産期病態研究部

## 要旨

子癇前症(Preeclampsia: PE)とは、高血圧とタンパク尿を主徴とした妊娠関連疾患である。全妊娠の 5-10%ほどが発症し、その発症原因は未だ不明な点が多い。近年、プロラクチンの異型であるバソインヒビン(Vasoinhibin: Vi)が PE 患者の血液、羊水、尿において増加することが示されている。しかしながら周産期の女性における、Vi の定量的研究は行われていなかった。そのため、本研究では PE 患者と健常妊婦の血清から、定量的に Vi を検出し、その産生酵素である CathepsinD (CathD)の活性を測定比較することを目的とした。その結果、Vi 量は健常妊婦と比較して PE 患者で高い値を示した。同様に CathD 活性は PE 患者で高い値であった。さらに、中度 PE よりも重度 PE ではより Vi 量が多い傾向にあり、CathD 活性は血圧と正の相関傾向を示すことが明らかになった。以上から、Vi は PE に関与する可能性が示唆され、さらに病状の軽重に関わる可能性が示された。

## A. 背景

### プロラクチンとは

プロラクチン(Prolactin: PRL)とは下垂体前葉から分泌されるペプチドホルモンである。ヒトでは 199 アミノ酸残基、マウスでは 197 アミノ酸残基からなり、分子量は約 23kDa である。3 つのジスルフィド結合と 4 つのヘリックスを特徴とし、構造と機能の類似性から、成長ホルモン(Growth hormone: GH)と胎盤性ラクトジェン(Placental lactogen: PL)と同一の GH/PRL ファミリーに属する。

PRL は標的細胞膜表面の PRL 受容体(Prolactin receptor: PRLR)と結合することでシグナル伝達を行う。PRL-R は一回膜

貫通型の受容体であり、PRL と結合すると二量体を形成する。二量体を形成しリン酸化された受容体は JAK/STAT 経路を通してシグナル伝達を行う。

PRL は和名では乳腺刺激ホルモンとも呼ばれ、主要な作用はその名が示す通り泌乳を促進することである。哺乳類では乳腺の発達、乳汁の産生、妊娠の維持、母性行動の誘発、鳥類ではそ嚢の発達およびそ嚢乳の産生、魚類では産卵のための遡上における浸透圧調整に関与するなど、種を跨いで生殖や哺育に深く関わるホルモンである。これ以外にも 300 にもおよぶ機能があることが知られており、そのひとつに血管新生がある。

血管新生とは既存の血管から新たに血管が出芽、分枝することを指し、創傷治癒や女性性周期に伴う子宮内膜の周期的な肥厚、胎盤増殖時にみられる。PRLはホルモンの性質上、妊娠時の胎盤や胎児における血管新生と血液循環制御に寄与していると考えられる。

### バソインヒビンとは

バソインヒビン(Vasoinhibins: Vi)とはGH/PRLファミリーのタンパク質がN末端側を含む11-18kDaで酵素切断された、抗血管新生作用を示す異型の総称である。1980年に本来23kDaであるPRLに16kDaの異型が存在することが報告され、その後GH、PLにも同様の異型があることが明らかになった。

Viを産生する酵素は数種類あることが確認されている。PRLではCathepsin D (CathD), Matrix metalloproteinase (MMP)-1, 2, 3, 8, 9, 13, Bone morphogenetic protein 1 (BMP-1)がViを産生することが報告されている。CathDはアスパラギン酸プロテアーゼの一種であり、最もPRL切断酵素としての研究が進んでいる酵素である。CathDは酸性条件下でヒトPRLを15, 16.8, 17.2 kDaのViに切断する。MMPは細胞外基質を分解する酵素であり中性条件下でPRLを切断する。MMP-1, 2, 9はヒトPRLを12, 16, 17 kDaに、MMP-3は12, 17 kDaに、MMP-8, 13は16, 17 kDaに切断する。BMP-1はPRLを17 kDaに切断する。GHはplasmin, thrombin, subtilisin, chymotrypsinによってViへと切断され、PLはPlasminによって切断される。

ViはPRL-Rと結合するが、その結合は非常に弱く、PRLと同様のシグナル伝達は起こらないとされている。Viは血管内皮細胞の膜表面に強力に結合し、その結合はPRLRとは異なる52kDaと32kDaのタンパク質と結合する可能性が示唆されている。近年の報告ではPlasminogen activator inhibitor -1と複合体を形成することが報告されているが、Viの全ての作用を説明できる特定の受容体は発見されていない。

Viは血管内皮細胞に対して、血管発芽抑制、遊走抑制、増殖抑制、アポトーシス誘導を行うことで血管新生を抑制し、一酸化窒素の産生を抑制することで血管攣縮を引き起こすことが明らかになっている。

これらPRL-Viがもたらす拮抗した血管新生作用が崩壊することで、疾病が引き起こされる可能性が示されている。糖尿病性網膜症は糖尿病の合併症の一つであり、視野狭窄や視力の低下、失明を招く疾患である。この網膜症は眼底の血管から脆弱な毛細血管が新生することで、網膜の圧迫や硝子体内への出血を起こす。この患者血中ではVi濃度が低いことが示された。この糖尿病性網膜症のようにPRL-Viの均整崩壊によって疾患が引き起こされる例があり、PRLの分泌が昂進する周産期の妊娠関連疾患にViが関与する可能性が考えられている。

### 子癇前症とは

子癇前症(PE)とは妊娠20週以降に高血圧を呈する疾患であり、全妊婦のおよそ10%が発症することが報告されている。PEは母体、胎児、新生児の死亡につながることもあり、重症の場合、脳血管障害、胎盤

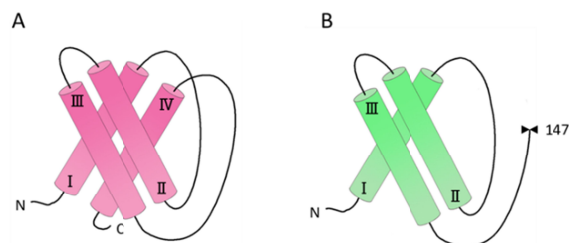


Figure.A PRL、Viの構造模式図

A:未切断PRL  
B:Vi

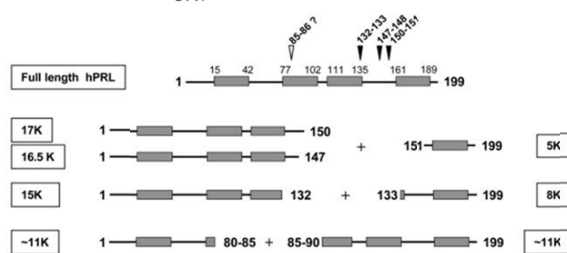


Figure.B ウシCathDによるヒトPRLの切断部位

引用: Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., Martial, J.A., Kelly, P.A., and Goffin, V. (2004). Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: Study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Molecular Endocrinology* 18, 2522-2542.

早期剥離、HELLP 症候群や肺水腫を合併する。胎盤らせん動脈の形成不全が PE の原因であるとみなされているが、確かな発症機構は未解明なままである。

また、PE を含む妊娠高血圧症候群は国立循環器病研究センターの神谷らの報告によると、周産期心筋症との合併率 38%と非常に高い。PRL と妊娠高血圧腎症の関連は 30 年以上前から研究されており、近年には、PE 患者尿中 PRL 濃度が健常妊娠者と比較して高く、重度になるにつれて PRL 濃度が上昇する事や、重症 PE 患者尿中から Vi が検出されたという報告がある。また、PE 血清中や羊水からも Vi が検出され、その羊水は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) による内皮細胞増殖を阻害したという報告もある。さらに、Masumoto らは岡山大学病院において 4 人の重症な妊娠高血圧症の胎盤において、Vi を検出している。これらの結果は、

つ

た妊娠高血圧症患者の胎盤において、CathD による PRL 切断が起こることを示唆しているのかも知れない。

## B. 目的

本研究は PE 患者血中から Vi、CathD を検出することで症状との関連性を見出し、治療の一助とすることを目的とする。妊娠関連疾患は、妊娠による体調の変化と捉えられ、患者自身が症状を自覚することは少ない。PE は症状を早期に発見して治療を行うことが肝要であるが、発症を予見するような因子は見つかっていない。よって Vi が PE を予見するリスクファクターと成り得る可能性を模索した。

## C. 材料と方法

## 研究対象

7人の健常妊婦(control群)と9人のPE患者(PE群)を研究対象とした。この研究においてPE群を子癩前症(妊娠20週以降に140/90 mmHg以上の高血圧があり、かつ200 mg/24 hours以上)、加重型子癩前症(妊娠20週以前にタンパク尿がない高血圧の女性が300mg/24h以上のタンパク尿を新たに発症する、または高血圧とタンパク尿が妊娠20週以前にあった女性において突然タンパク尿や血圧の上昇をする)とした。PEの重症度は中度(血圧140/95 mmHg以上160/95 mmHg未満、尿タンパク質3mg/day未満)、重度(血圧160/110 mmHg以上、尿タンパク質3mg/day以上)に分けた。年齢、過去の病歴、薬歴、血圧を採血時点で解析した。この研究は2010年11月に国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得ており、全ての被験者はインフォームド・コンセントに同意している。

## 研究検体

血清は早朝に採取し、産前(特にPE群ではPE発症後)、出産直後、出産1ヶ月後の3つの時点で行った。これらのサンプルは後の解析まで-80度で保存した。

## Vasoinhibn量測定

Vi測定はJakobらの方法を改良して行った。血清をAlbumin/IgG Removal Kit (Merck, Darmstadt, Germany)によって前処理し、Protein G-Agaroseで16h、4℃でインキュベートすることで、血清中のアルブミンとIgGを除去した。遠心分離し、上清を回収した。その後の免疫沈降法にはヒトPRLのポリクローナル抗体(anti-hPRL-IC-5, CYTO (National

Hormone & Peptide Program, New York, USA)を用いて行った。

免疫沈降後のサンプルをWBによって解析した。サンプルにsample buffer (0.5M Tris-HCl (pH 6.8), 20% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS, and 1% (v/v) 2-mercaptoethanol)を加え、95℃ 5min インキュベートした。このサンプルを15%ゲルによるSDS-PAGEで電気泳動した。泳動後のゲルをメンブレンに転写し、PRLのN末端抗体(anti-hPRL monoclonal antibody clone 5602, Diagnostics Biochem Canada, Ontario, Canada)と反応させた。反応後メンブレンを洗浄し、二次抗体( Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP), Abcam, Cambridge, UK)と反応させた。ImmunoStar LD (Wako, Osaka, Japan)によって目的タンパク質を可視化し、LAS-4000 (Fuji film K.K., Tokyo, Japan)によって検出した(Figure 1A)。

免疫沈降後のサンプル中のViをAgilent Protein 80 Kit (Agilent Technologies, California, USA) and Bioanalyzer (Agilent Technologies)によって検出した。結果は電気泳動図で示し、ピークの高さがVi量を示す蛍光単位(fluorescence unit: FU)であり、ピークの位置が分子量を示す(Figure 1B)。

## Cathepsin D 活性測定

CathD活性測定は、SensoLyte® 520 Cathepsin D Activity Assay Kit (Anaspec, California, USA)を用いて行った。このKitはFRETペプチドを基質に使用しており、酵素活性が測定可能である。FRETペプチドが酵素によって切断されると蛍光の増加として検出される。

解析はトリプリケートで行い、インターアッセイ間を補正するために、非妊娠女性血清の値をキャリブレーターとして使用した。サンプルの CathD 活性はキャリブレーターを 100%とした値で示している。

#### 血中生化学的データ

血液の生化学的データは SRL, Inc., (Tokyo, Japan)において測定を行った。PRL、脳性ナトリウム利尿ペプチド、総タンパク質、アルブミン、クレアチニンを血中から測定した。

#### 統計解析

数値は mean ± SEM で示した。統計解析は Student's *t*-test を用いた。相関解析は Pearson correlation coefficient によって行った。有意水準は *P* value <0.05 とした。

### **D. 結果**

#### 被験体の特徴

妊娠時の平均年齢は control 群が 32.6±1.3 歳、PE が 32.7±1.1 歳であった。BMI は control 群が 19.1±0.5 kg/m<sup>2</sup>、PE が 23.1±2.7 kg/m<sup>2</sup> であり、有意な差はなかった。平均血圧は、出産前 control で 108±3/66±3 mmHg、PE で 155±4/95±4 mmHg、出産直後において control で 113±5/73±5 mmHg、PE で 127±4/75±3 mmHg、出産 1 ヶ月後において control で 113±4/70±3 mmHg、PE で 129±4/81±3 mmHg であった。出産前の尿中総タンパク質は control が 85±23 mg/dl、PE が 205±91mg/dl であった。PE 群の 7 人の患者は出産直後に降圧治療を受けており、そのうち 1 人がメチルドパ、4 人がニフェジピン、2 人がニカルジピンを投薬された。HELLP 症候群や肺水腫を合併した PE 患

者はいなかった。

#### 生化学的マーカー

Table 2 では 3 つの時期での生化学的マーカーの結果を示している。妊娠期の血中 PRL は PE において有意に高く (427.7±65.3 ng/ml vs. 283.0±48.2 ng/ml, *P*<0.05)、アルブミンは PE において有意に低かった (3.1±0.1 g/dl vs. 3.5±0.1 g/dl, *P*<0.05)。出産直後のアルブミンも PE において有意に低い値を示した (2.6±0.2 g/dl vs. 3.2±0.1 g/dl, *P*<0.05)。

#### Vi と CathD の定量

Vi 量は、control と比較して PE では妊娠中 (4.32±1.74 FU vs. 2.28±0.80 FU, *P*=0.33)、出産直後 (4.78±1.2 FU vs. 2.64±1.2 FU, *P*=0.24)と高い傾向にあった。さらに出産 1 ヶ月後、PE の Vi 量は、control と比較して有意に高かった (6.14±1.8 FU vs. 0.55±0.23 FU, *P*<0.05, Figure 2)。

CathD 活性は control と比較して PE では、妊娠中 (183.3±26.8 % vs. 156.1±16.3 %, *P*=0.41)、出産直後 (217.2±41.4 % vs. 128.5±16.5 %, *P*=0.07)において高い傾向にあった。出産 1 ヶ月後において、PE における CathD 活性は control と比較して有意に高い値を示した (197.1±34.7 % vs. 102.3±8.8 %, *P*<0.05, Figure 3)

次に、Vi 量と CathD 活性が PE の重症度を反映しているのかを検証した。PE を重症度に応じて 2 群に分類した結果、出産前の Vi 量は、重度 PE (5.62±2.61 FU, n=6) は中度 PE (2.15±1.33 FU, n=3) よりも高い傾向を示した (*P*=0.37, Figure 4)。また、Vi と尿中アルブミン (*r*=0.75, *P*=0.05) と正の相関がみられた。加えて、CathD 活性は収縮期血圧 (*r*=0.77, *P*=0.07)、拡張期血圧 (*r*=0.75,

P=0.16)と正の相関を示す傾向にあった。

Table 1 被験体の特徴

	PE	Control
Age (years)	32.7±1.1	32.6±1.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.1±2.7	19.1±0.5
Blood pressure (mmHg)		
During pregnancy	155±4/95±4	108±3/66±3
Soon after delivery	127±4/75±3	113±5/75±3
One month after delivery	129±4/81±3	113±4/70±3
Proteinuria (mg/dl)	205±91	85±23
Gastational weeks at delivery (weeks)	33.3±1.4	39.3±0.2

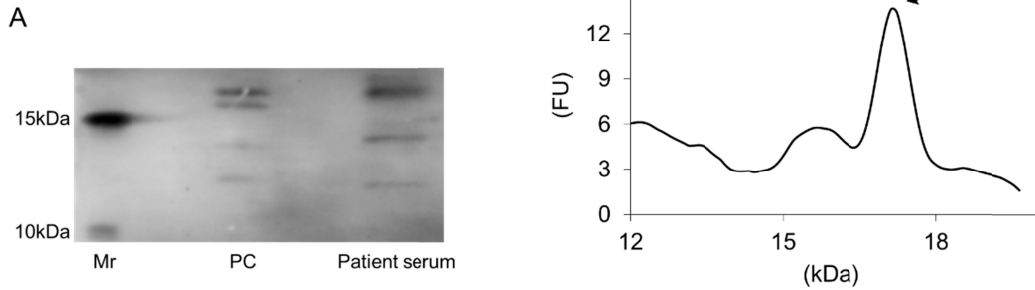
PE: Preeclampsia, BMI: Body mass index

Table 2 血中生化学マーカー

	PE			Control		
	During pregnancy	Soon after delivery	One month after delivery	During pregnancy	Soon after delivery	One month after delivery
Blood test						
Prolactin (ng/ml)	427.7±65.3*	311.0±66.2	47.1±6.1	283.0±48.2	369.2±75.5	94.6±40.8
Brain natriuretic peptide (pg/ml)	15.8±4.3	30.1±3.7	10.9±2.3	17.8±4.5	25.3±6.9	10.8±2.3
Total protein (g/dl)	6.1±0.3	5.6±0.4	7.3±0.2	6.3±0.2	6.1±0.2	7.2±0.1
Albumin (g/dl)	3.1±0.1*	2.6±0.2*	4.2±0.1	3.5±0.1	3.2±0.1	4.3±0.0
Creatinine (mg/dl)	0.60±0.04	0.58±0.03	0.59±0.03	0.50±0.05	0.51±0.03	0.52±0.03

PE: Preeclampsia, \*P<0.05

**Figure 1**



**Vasoinhibin 検出法の検証**

(A) 免疫沈降後 PE 患者血清の western blotting 解析

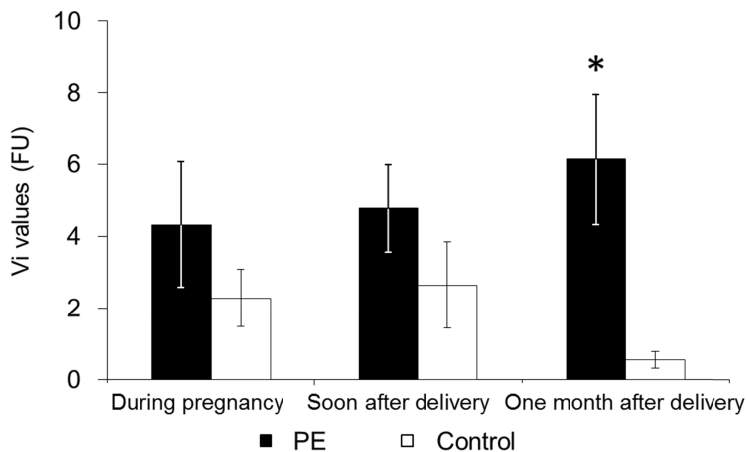
子癇前症患者血清を PRL 抗体によって免疫沈降し、PRL N 末端認識抗体にて western blotting 法で検出を行った。患者血清において 12, 14.5, 17 kDa にバンドが検出された。

Positive control (PC: human prolactin + bovine cathepsin D, citrate phosphate buffer, 37 °C, 10 min)は 12, 14, 16, 17 kDa にバンドが検出された。Mr: molecular weight marker

(B) Bioanalyzer によるキャピラリー電気泳動解析

キャピラリー電気泳動解析を(A)と同様の免疫沈降患者血清を用いて行った。図の縦軸は Vi の量を表す Fluorescent unit (FU)であり、横軸は分子量を示す。矢印で示した波形のピークの分子量は 17 kDa である。Vi 量をピークから background を補正して算出すると、本図では 8.8 FU を示す。

**Figure 2**



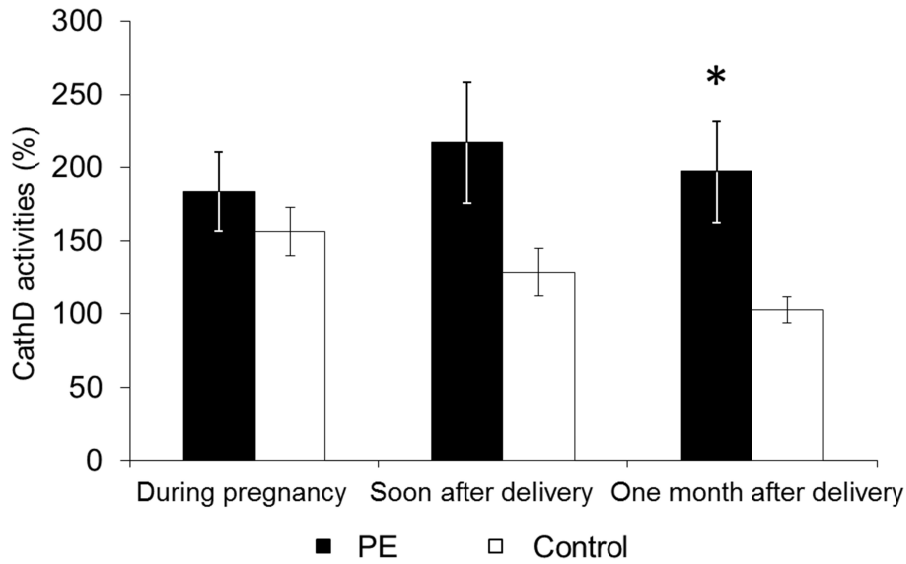
**Figure 2 子癇前症患者および健常妊婦血清中の Vasoinhibin 量**

子癇前症(PE)と健常妊婦(control)における血清 Vi 量を示した。黒い縦棒が PE を、白い縦棒が control を示す。縦軸が Vi 量を示す FU 値である。

(Mean ± SEM, \*P<0.05)



**Figure 3**

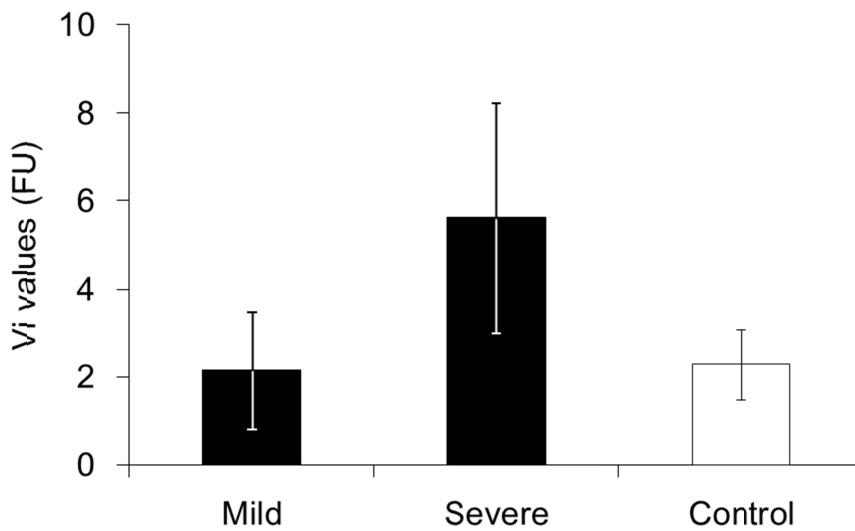


**子癇前症患者および健常妊婦血清中の CathD 活性**

子癇前症(PE)と健常妊婦(control)における血清 CathD 活性を示した。黒い縦棒が PE を、白い縦棒が control を示す。縦軸が CathD 活性である。

(Mean ± SEM, \*P<0.05)

**Figure 4**



**中度子癇前症と重度子癇前症における Vasoinhibin 量**

中度(Mild)、重度(Severe)子癇前症および健常妊婦(control)における Vi 量。黒い縦棒が子癇前症、白い縦棒が control を示す。縦軸が Vi 量を示す FU 値である。

(Mean ± SEM)

## E. 考察

本研究において、我々は初めて PE 患者血清中から定量的に Vi を検出した。本研究の Vi 測定法は Jakob らの方法を改良したものであり、CathD 活性測定法は Hilfiker-Kleiner らと同様の方法である。これまでの研究においても Vi と CathD を PE 患者から WB 法によって検出してきたが、血中の Vi 量が非常に少量であるため定量的な Vi 測定法を確立することは困難であるとみなされていた。我々はここで初めて PE 患者において定量的に Vi を検出したことを報告する。本研究での WB の結果と定量的測定法とを比較すると、同様の結果が得られていることが確認できる。これまでの研究で糖尿病性網膜症や周産期心筋症といったいくつかの疾患に Vi が関与すると報告されているため、我々の方法がそれら疾患に有用であるかもしれない。

本研究において、PE 血清中 Vi 量は健常 control と比べて高い値であった。この結果は過去の知見と一致するものである。しかし、Vi 量の上昇が PE の原因であるか結果であるかは未だ不明である。近年の研究では、尿中の PRL 量と増加した Vi 量が、その重症度を反映する信頼できる指標であると報告されている。そのため、Vi は単なる生化学的マーカーというよりも PE の発病に寄与すると示唆されてきた。仮に Vi が PE の結果として生じるとすれば、PE で起こる腎臓クリアランスの低下やアシドーシス、胎盤虚血によって Vi が増加すると考えることができる。CathD はこれまでに PRL を酸性条件下で切断し、その切断は細胞外領域の局所的な酸性条件下で起こることが示されてきた。加えて、胎盤における PRL

の mRNA 発現は、胎盤を虚血させた実験モデルにおいて上昇することが報告されている。そのため Vi は、PRL 発現が増加し CathD 活性に必要な局所的酸性条件が生じる虚血の結果増加するのかもしれない。この可能性を明らかにするためにさらなる研究が必要である。

PE 患者における Vi 量は、健常 control と比べて全ての時期で高い傾向にあり、特に出産 1 ヶ月後には有意に高い値を示した。CathD 活性も同様に PE 患者では健常 control と比べて高い傾向にあり、出産 1 ヶ月後では有意に高かった。出産 1 ヶ月後の健常 control においては Vi 量と CathD 活性が低下するのに対して、PE 患者では両因子が高いままであった。これらの結果は Vi 量と CathD 活性が妊娠負荷によって増加することを示唆する。PE 患者において、Vi 量と CathD 活性が産後も減少しなかったことは、それらの増加が妊娠と関係ないことを示すかもしれない。ほとんどの場合、PE は産後回復するが、血管障害が産後も遷延することが報告されている。また、PE 患者では、産後にしばしば発症する周産期心筋症を合併するものも存在する。さらに、Vi と尿中タンパク質、CathD と血圧の間に正の相関傾向がみられたことから、Vi は周産期にある女性において血管障害や心筋症を引き起こしている可能性が考えられる。

これまでの研究では、Vi の持つ抗血管新生作用が、糖尿病性網膜症や周産期心筋症といった血管系の疾患に関与していると報告されている。糖尿病性網膜症とは糖尿病の合併症のひとつであり、重篤な場合失明を引き起こす疾患である。ここでは、過度の血管新生によって脆弱な新生血管が網膜

微小循環に生じ、これら新生血管からの出血が網膜の障害へとつながる。糖尿病性網膜症患者では、健常 control と比べて、Vi 量が極端に少ないか、全く検出されないことが報告されている。周産期心筋症とは左心室の拡張を主徴とし、出産 1 ヶ月前から産後 5 ヶ月の間に発症する心疾患であると定義される。その発症機構はいまだ明らかではないが、近年の報告では Vi と CathD が周産期心筋症に関与することが報告されている。その報告において、心筋特異的に STAT3 をノックアウトした周産期心筋症の実験モデルでは、酸化ストレスによって増加した CathD が PRL を Vi へと切断することが示された。この研究では周産期心筋症患者の血清中から WB によって Vi が検出され、CathD 活性が健常 control よりも高いことが報告されている。さらに、およそ 40% の周産期心筋症患者が PE を合併することが知られている。Vi がもつ抗血管新生作用と血管攣縮作用が PE の発症に寄与しており、PE 発症の可能性として胎盤らせん動脈の形成不全が考えられている。Vi が母体と胎児間の血管新生を抑制し、不完全に胎盤血管の形成に寄与するとともに、胎盤の発達に加えて、高濃度の Vi が末梢血管収縮による高血圧に関与しているのかもしれない。

CathD はリソソーム性アスパラギン酸プロテアーゼであり、ヒト PRL を 15, 16,8 17.2kDa に切断する。CathD は酸性条件下で働くため、中性条件である循環血中では PRL を切断しない。そのため、PRL はいずれかの組織において CathD によって切断されるのだろう。CathD はリソソームで働き、また細胞外へ分泌されることが示され

ている。分泌された CathD が血流へと入り血清中で検出された可能性が考えられる。その一方で、近年の報告では Vi が、胎盤の血管障害に関わる bone morphogenetic protein 1 によって切断されることが報告されている。その報告では Vi が妊娠糖尿病患者の胎盤から検出され、その実験モデルにおいて胎盤中の bone morphogenetic protein 1 の発現が上昇したことが示された。加えて、PE において MMP もまた PRL を Vi へと切断することが示唆されている。PE 患者の MMP 量は、妊娠初期に健常 control よりも高いことが示されている。そのため、Vi と PE の関連性を明らかにするためにも、これら CathD 以外の酵素を解析する必要があるだろう。

## F. 発表

### 論文発表

R. Nakajima, **M. Ishida**, C. A. Kamiya, J. Yoshimatsu, M. Suzuki, A. Hirota, T. Ikeda and T. Harigaya  
Elevated vasoinhibin derived from prolactin and cathepsin D activities in sera of patients with preeclampsia  
Hypertension Research  
38(12):899-901,2015

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
「該当なし」
2. 実用新案登録  
「該当なし」
3. その他

研究協力者 中嶋亮順