

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591815
 研究課題名 (和文) カリクレインーキニン系、凝固線溶系の破綻と着床不全、流産に関する研究
 研究課題名 (英文) Disruption of kallikrein-kinin system, blood coagulation and fibrinolysis in patients with recurrent pregnancy losses.
 研究代表者
 杉 俊隆 (SUGI TOSHITAKA)
 東海大学・医学部・准教授
 研究者番号：70196707

研究成果の概要：

我々は、不育症または反復流産の新しい原因として抗 phosphatidylethanolamine (PE) 抗体と抗第 XII 因子抗体の存在をすでに報告した。今回我々は、抗第 XII 因子抗体の epitope mapping を行い、抗第 XII 因子抗体と抗 PE 抗体は、類似した抗体である事を見出した。キニノーゲンと第 XII 因子は血小板上のトロンビンレセプターである GP Ib-IX-V に競合的に結合し、血小板活性化を抑制する事が知られている。これらの抗体は血小板を刺激して、血栓や流産を引き起こしている可能性があり、不育症の新しい原因である事が示唆される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：不育症、習慣流産、抗リン脂質抗体、抗 phosphatidylethanolamine 抗体、第 XII 因子

1. 研究開始当初の背景

近年、抗リン脂質抗体と反復流産、子宮内胎児死亡、血栓症との関係が注目をあびており、抗リン脂質抗体症候群と称されるようになった。約 20 年前より抗

リン脂質抗体の測定が RIA や ELISA 法で行われるようになったが、1990 年になって、多くの抗リン脂質抗体は実はリン脂質そのものを認識するのではなく、リン脂質に結合した血漿蛋白を認識す

るといことが解明された。最初に発見された目標抗原は β 2-glycoprotein I (β 2 GPI)であり、次いでprothrombinが発見された。これらの蛋白は抗カルジオリピン抗体やループスアンチコアグラントなど、電気的陰性のリン脂質に対する抗体の目標抗原である。しかしながら、これらの抗リン脂質抗体の病原性は未だ良く解明されていない。また、抗カルジオリピン抗体やループスアンチコアグラントは主に妊娠中期以降の子宮内胎児死亡に関係するが、不育症に一番多い妊娠初期流産を繰り返す患者に対してこれらの抗リン脂質抗体を測定しても陽性に出る事は殆どない。さらに、restingな状態では血小板や血管内皮細胞などの細胞膜外層上には電気的陰性のリン脂質はほとんど存在せず、抗カルジオリピン抗体やループスアンチコアグラントが結合して血栓を引き起こすという仮説には説得力が無い。そこで我々は、細胞膜外層上に多く存在する電気的中性のリン脂質に対する抗体に注目して研究をしてきた。その結果我々は、電気的中性のリン脂質であるphosphatidylethanolamine (PE) に対する抗体の目標抗原の存在を世界で初めて発見し、それがkininogenであることを発表した (Sugi T, McIntyre JA. Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex. Blood, 86: 3083-89, 1995)。

High molecular weight kininogen (HK) は、factor XII (FXII)、prekallikrein (PK) と共に contact activation に必要な血液凝固因子であり、また、カリクレイン-キニン系の蛋

白でもある。これらの蛋白の欠乏は、in vitro ではcontact systemのスクリーニングテストであるaPTTを延長させるが、実際はHK、PK、FXII 欠乏症患者は出血傾向ではなく、逆に血栓をおこす事がされており、これらの蛋白の in vivo での生理的役割は不明であった。近年、これらの蛋白は生理的状态では陰性荷電の surface ではなく、内皮細胞などの細胞膜に集合することがわかり、抗凝固、線溶促進機能がある事が解明されつつある。我々も、抗 PE 抗体は正常血小板の凝集能を in vitro で亢進させることを報告した。以上の事を総合すると、カリクレイン-キニン系の蛋白を認識する自己抗体と、血小板活性化を介した流産、血栓との関係も合理的といえる。このような病原性のあるkininogen依存性の抗PE抗体のスクリーニングをSLE、反復流産、血栓症などの患者に対して施行したところ、かなりの頻度で陽性者がいることが明らかになってきた。特に不育症群では、抗PE抗体は高頻度に見られ、他のグループも我々を支持する結果を報告している。さらに重要な事は、不育症の2大原因としてkininogen依存性の抗PE抗体とならんで最近FXII欠乏症が報告された事である。FXII欠乏症は自己抗体の関連が疑われており、どちらの原因も自己抗体を介したカリクレイン-キニン系の破綻と位置付けられ、新しい不育症の原因として我々は注目しており、新しい流産機序の仮説を発表した。この仮説は国際的に受け入れられ、2001年にクロアチアで開催された第8回国際生殖免疫学会において学会賞を受賞した。

2. 研究の目的

現在の不育症の原因検索は不十分であ

り、原因不明となる症例も多い。本研究の目的は、自己抗体を介したカリクレイン-キニン系の破綻という全く新しい不育症の原因を確立し、その流産機序を解明し、さらには治療方法を検討することにある。近年、カリクレイン-キニン系の妊娠における重要性が報告されており、特にブラジキニンの着床、胎盤構築、胎盤血流における役割が示唆されている。この系の破綻は、初期流産だけでなく、化学流産を繰り返す症例、体外受精不成功例など、着床不全、原因不明の難治性不妊症に関係する可能性もあり、本研究はその原因解明、治療につながる可能性もある。本研究は、従来の抗カルジオリピン抗体を中心とした抗リン脂質抗体症候群とは異なる、全く新しい抗リン脂質抗体症候群の存在を確立することにより、いまだ多く存在する原因不明不育症症例を減らすことが目標である。我々は、世界でも有数の規模の不育症外来を持っており、また kininogen 依存性の抗 PE 抗体の発見者としてすでに多くのデータの蓄積もあり、世界をリードしている。一つの自己抗体の発見から始まった研究ではあるが、今ではカリクレイン-キニン系の破綻と妊娠維持の異常という仮説を提唱するに至り、今後は生殖領域にとどまらず、脳梗塞、心筋梗塞など重篤な血栓症の原因解明、予防および治療法確立への発展も期待できる。

3. 研究の方法

不育症患者に対して、抗 PE 抗体を始めとした 13 種類の抗リン脂質抗体、第 XII 因子活性、抗第 XII 因子抗体、血小板機能検査のスクリーニングを施行した。抗 PE 抗体や、抗第 XII 因子抗体が安定して強陽性の患者血

清を得、その後の研究に使用した。抗第 XII 因子抗体に関しては、その第 XII 因子上の epitope mapping を行った。まず、Western blot を用いて抗体の認識部位を絞り込んだ。すなわち、二本鎖の活性化第 XII 因子を還元し、SDS-PAGE 施行後、blot により抗体が light chain と heavy chain の何れを認識するか、何人かの陽性患者血清を用いて確認した。ついで合成ペプチドを作成し、ELISA を用いて mapping を行った。第 XII 因子の heavy chain N-末端の領域が有力な抗第 XII 因子抗体の認識部位であり、その確認作業を中心に研究を行った。Epitope mapping 後、抗 PE 抗体の認識部位である kininogen D3 の合成ペプチド、LDC27 と、抗第 XII 因子抗体の認識部位である、第 XII 因子 heavy chain の合成ペプチド、IPP30 を作成した。我々は既にこれらの合成ペプチドを抗原に用いて、ELISA 法にて抗 PE 抗体陽性患者血清を用いて epitope mapping を施行したところ、多くの不育症患者の抗 PE 抗体が LDC27 だけでなく、IPP30 を認識する事を報告した。そこで、今回我々は、これらの合成ペプチドをウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作成し、その認識部位を検討した。

4. 研究成果

第 XII 因子のアミノ酸配列を文献的に考慮して合成ペプチドを作成し、epitope mapping を施行したところ、amino-terminal の 1-30 のアミノ酸を認識する事を示唆されたので、それを用量依存、抑制試験などで確認した。第 XII 因子は血小板膜糖蛋白の glycoprotein Ib-IX-V 複合体に結合し、トロンビン依存性血小板凝集を抑制することが報告されてい

る。また、その抑制部位は第 XII 因子の 1-28 のアミノ酸上にあると報告されている。今回の我々のデータは、抗第 XII 因子抗体が、第 XII 因子の血小板抑制作用を阻害し血栓、流産を引き起こしている可能性を示唆するものである。また、ELISA 上、LDC27 に対するポリクローナル抗体は IPP30 を認識した。また、IPP30 に対する抗体は LDC27 を認識した。これらのデータより、LDC27 を認識する抗 PE 抗体と、IPP30 を認識する抗第 XII 因子抗体は、類似した抗体である事が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Sugi T. Autoantibody associated disruption of kallikrein-kinin system in patients with recurrent pregnancy losses. Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol; 67-76, 2009. (査読無し)

2. Matsubayashi H, Sugi T, Uchida N, Suzuki T, Izumi S-I, Mikami M. Decreased factor XII activity is associated with recurrent IVF-ET failure. Am J Reprod Immunol; 59: 316-322, 2008. (査読有り)

3. 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; 99: 316-323, 2008. (査読有り)

4. Sugiura-Ogasawara M, Aoki K, Fujii T, Fujita T, Kawaguchi R, Maruyama T, Ozawa N, Sugi T, Takeshita T, Saito S. Subsequent pregnancy outcomes in recurrent miscarriage patients with a paternal or maternal carrier of a structural chromosome rearrangement. J Hum Genet; 53: 622-628, 2008. (査読有り)

5. 杉 俊隆. 自己抗体検査(抗リン脂質抗体)。日産婦誌。59, N51-N56, 2007. (査読無し)

6. 杉 俊隆. 抗リン脂質抗体。生殖医療ガイドライン 2007。日本生殖医学会編。金原出版。268-269、2007。(査読無し)

7. Matsubayashi H, Sugi T, Arai T, Shida M, Kondo A, Suzuki T, Izumi S-I, McIntyre JA. Antiphospholipid antibodies in serum and follicular fluid: is there a correlation with IVF implantation failure? Human Reproduction; 22: 3043-3044, 2007. (査読有り)

8. Matsubayashi H, Sugi T, Arai T, Shida M, Kondo A, Suzuki T, Izumi S-I, McIntyre JA. IgG-antiphospholipid antibodies in follicular fluid of IVF-ET patients are related to low fertilization rate of their oocytes. Am J Reprod Immunol; 55: 341-348, 2006. (査読有り)

9. 杉 俊隆. 易血栓性患者の妊娠管理。日本血栓止血学会誌。17, 418-423, 2006. (査読無し)

10. Cai L-Y, Izumi S-I, Koido S, Uchida N, Suzuki T, Matsubayashi H, Sugi T, Shida N, Kikuchi K, Yoshikata K. Abnormal placental cord insertion may induce intrauterine growth restriction in IVF-twin pregnancies. Human Reproduction; 21: 1285-1290, 2006. (査読有り)

[学会発表] (計 12 件)

1. 杉 俊隆、三上幹男。不育症患者における Leu331-Met357 を認識する kininogen 依存性抗 PE 抗体と第 XII 因子活性との関係。第 60 回日本産科婦人科学会。横浜。2008。

2. Sugi T, Fujita Y. aPE which recognize LDC27 are associated with factor XII deficiency in patients with recurrent

pregnancy losses. American Society for Reproductive Immunology -28th Annual Meeting, Chicago, 2008.

3. 杉浦真弓、川口里恵、丸山哲夫、小澤伸晃、杉 俊隆、竹下俊行、斎藤 滋。染色体転座をもつ反復流産患者の生児獲得率に関する多施設共同研究。第 53 回日本生殖医学会。神戸。2008。

4. 杉 俊隆。カリクレイン-キニン系と血栓、流産。第 18 回日本産婦人科新生児血液学会。博多。2008。(シンポジウム)

5. 杉 俊隆。キニノーゲンを認識する抗PE抗体とangiogenesisについて。第 23 回日本生殖免疫学会。富山。2008。(シンポジウム)

6. Sugi T. Autoantibodies to factor XII and kininogens in patients with recurrent pregnancy losses. X International Congress of Reproductive Immunology. Croatia. 2007. (invited speaker)

7. 杉 俊隆。不育症患者における妊娠中の kallikrein-kinin系の検討。第 21 回日本生殖免疫学会。東京。2007。

8. 杉 俊隆、三上幹男。不育症患者における妊娠中の第XII因子活性の変動。第 59 回日本産科婦人科学会。京都。2007。

9. 杉 俊隆、藤田嘉美。不育症患者における kininogen依存性抗PE抗体のepitopeと第XII因子活性との関係。第 52 回日本生殖医学会。秋田。2007。

10. 杉 俊隆、藤田嘉美。不育症患者においてLDC27を認識する抗PE抗体は、第XII因子活性低下と関係する。第 22 回日本生殖免疫学会。東京。2007。

11. 杉 俊隆。着床前診断は染色体転座をもつ習慣流産夫婦に有用か。第 58 回日本産科婦人科学会。横浜。2006

12. 杉 俊隆、松林秀彦、和泉俊一郎。不育症患者における妊娠中の凝固線溶系の変動。

第 51 回日本生殖医学会総会。大阪。2006。

[図書] (計 2 件)

1. 杉 俊隆 不育症学級。金原出版。全 76 ページ。2009 年

2. 杉 俊隆 EBMに基づく不育症診療の実際。金原出版。全 78 ページ。2007 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉 俊隆 (SUGI TOSHITAKA)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：70196707

(2) 研究分担者

菊池 公孝 (KIKUCHI KIMITAKA)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：30366017
(~2007 年)

(3) 連携研究者

菊池 公孝 (KIKUCHI KIMITAKA)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：30366017
(2008 年)