

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2007-2008  
 課題番号： 19591916  
 研究課題名（和文） ヘパリンの抗流産作用とその機転に関する研究

研究課題名（英文） A New Mechanism of Heparin Treatment for Recurrent Pregnancy Loss with Antiphospholipid Antibodies

研究代表者  
 竹下俊行（TAKESHITA TOSHIYUKI）  
 日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：60188175

研究成果の概要：抗リン脂質抗体症候群による不育症症例に対して行われているアスピリン・ヘパリン療法、特にヘパリンの抗流産作用について凝固カスケードに対する作用以外のメカニズムについて研究を行った。ヘパリンは、細胞障害性分子であるグラニューライシン濃度を低下させることが明らかとなった。また、予想に反して可溶性接着分子を増加させた。ヘパリンは抗凝固作用以外に、細胞性免疫能や血管内皮機能をコントロールすることにより流産を防止している可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：生殖医学

## 1. 研究開始当初の背景

不育症の原因は多岐にわたり、子宮形態異常（子宮奇形）、内分泌代謝異常、感染症、血液凝固異常、自己免疫異常、同種免疫異常、夫婦染色体異常などが挙げられる。このうち、抗リン脂質抗体症候群は現在不育症の原因として最も重要なもののひとつと考えられ、子宮奇形、染色体異常とともにエビデンスの確立した不育症原因病態である。

1980年代の末に、Hughesらは、抗リン脂質抗体が陽性で、動静脈血栓症や流産・死産を反復する病態をまとめて「抗リン脂質抗体症候群（APS）」として扱うことを提唱した。今や後天性血栓性素因で最も重要、かつ頻度

も高く、不育症の原因としても注目される病態である。

抗リン脂質抗体が流産や死産を起こすメカニズムとしては、抗リン脂質抗体症候群の中心的な病態が血栓症であることから、絨毛間腔での血栓形成とそれに引き続く血液供給の低下、胎盤梗塞によるものと理解されてきた。しかし、胎盤形成以前のごく早期の流産を繰り返す症例の存在などは、抗リン脂質抗体による流産の機転が必ずしも血栓・塞栓だけでは説明できないことを示すものである。また、すべての抗リン脂質抗体症候群罹患胎盤で血栓や梗塞が診られるわけではないことも、胎盤病理学的見地から明らかにな

ってきた。最近、血栓形成以外のメカニズムとして、抗リン脂質抗体が直接絨毛 trophoblast の分化・増殖を阻害する (Chamley LW ら : Lancet 1998; 352:1037-8、Di Simone N ら : Arthritis Rheum 2000; 43:140-53.) ことや、補体系の活性化を介した機序が提示されている (Holers VM ら : J Exp Med 2002; 195:211-20、Girardi G ら : J Clin Invest 2003; 112:1644-54.)。

抗リン脂質抗体を有する不育症既往妊婦に対する治療としては、抗リン脂質抗体症候群における血栓形成を標的として抗血栓療法が行われている。抗リン脂質抗体症候群では静脈血栓とともに動脈血栓症の危険を伴うといわれている。動脈血栓の予防には抗血小板薬が用いられる。低用量アスピリンは現在最も広く用いられている抗血小板薬である。しかし、抗リン脂質抗体陽性妊婦に対するアスピリン療法の有効性にはエビデンスが乏しい。プレドニゾンとアスピリンの併用、ガンマグロブリン大量療法などが試みられているが、1996年 Kutteh と 1997年の Rai らの報告でアスピリン・ヘパリン併用療法の有効性が示されるにいたり、現在では本法が抗リン脂質抗体症候群の妊娠合併症予防法としてほぼスタンダードと考えられるようになった。

ヘパリンは現在最も頻繁に使用される抗凝固剤のひとつである。抗リン脂質抗体症候群に対するヘパリンの作用機序に関しても、抗凝固作用以外のメカニズムが明らかにされつつある。胎盤・絨毛のアポトーシスを抑制したり (Bose P : Am J Obstet Gynecol. 2005 192(1):23-30., Hills FA : Mol Hum Reprod. 2006 Apr;12(4):237-43.)、補体の活性化を抑制 (Girardi G : Nat Med. 2004 10(11):1222-6.) したりして流産を防止していることが明らかになりつつある。

現在臨床現場で使用される未分画ヘパリンは、ブタ腸粘膜から精製され様々な分子量のものを含んでいる。この未分画ヘパリンの欠点を補うために開発されたのが低分子ヘパリンである。抗凝固活性が強く、出血傾向などの副作用が少ない低分子ヘパリンは、欧米では抗リン脂質抗体陽性不育症の治療薬として使われている。わが国では妊婦に対する使用が禁止されているため、使われているのはもっぱら未分画ヘパリンである。現在実地臨床でヘパリンを使用する際、肝酵素上昇やヘパリン起因性血小板減少症などの副作用はあるものの、比較的安全に使用でき大きな問題は生じていない。抗凝固活性に限って言えば、低分子ヘパリンの優位性は明らかだが、未分画ヘパリンが流・死産の防止効果において特に劣っている訳ではない (Noble LS ; Fertil Steril. 2005 83(3):684-90.)。このことは、未分画ヘパリンには抗凝固活性

を示す分画の他に、妊娠維持に特に強い作用を有する分画が含まれていることを示すと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヘパリンの抗凝固作用以外のメカニズムを明らかにすることを目的とした。流産のメカニズムのひとつに、同種免疫異常が存在すると考えられている。妊娠の維持には、Th1/Th2に代表されるサイトカインバランス、NK細胞などの自然免疫系の絶妙なバランスが必要と考えられる。このバランスが崩れると流産や、妊娠高血圧症候群などの妊娠合併症が起こる。われわれは、ヘパリンが抗リン脂質抗体症候群におけるこうした免疫系のバランスの維持に作用しているのではないかとの仮説を立て、ヘパリン療法による、NK細胞活性、Th1/Th2バランス、血清グラニューライシン等の変化をみることで、および血管内皮細胞の活性化の状態変化を観察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象症例 :

当科不育症外来で不育症原因検索スクリーニングを受け、次の条件を満たした 29 症例 (アスピリン・ヘパリン併用群 ; AH群) を対象とした。2回以上の反復流産歴、1回以上の原因不明胎内死亡の既往を有し、抗リン脂質抗体が陽性 (抗カルジオリピン抗体 I g G (> 1 0 G P L), I g M (> 8 M P L)、抗フォスファチジルエタノラミン抗体 I g G (> 0. 3), I g M (0. 4 5)、抗フォスファチジルセリン抗体 I g G (> 1. 0)) または、ループスアンチコアグラント陽性者、凝固第 X II 因子欠乏症を対象とした。アスピリンのみを投与した 2 2 症例を対照群 (A群) とした。

なお、研究の概要と実施計画は施設内倫理委員会の承認を得ており、患者への説明と同意は文書にて行った。

### (2) アスピリン・ヘパリン療法 :

妊娠を企図した周期の黄体期からバファリン®81mg またはバイアスピリン®100mg を投与した。投与期間は原則として、妊娠 3 6 週 5 日までとした。ヘパリン療法は妊娠反応陽性を確認後直ちに開始した。未分画ヘパリン (カプロシン®) 5, 0 0 0 単位を 1 2 時間毎に皮下注した。

### (3) 血液検査・検体採取 :

十分なインフォームド・コンセントのもと、妊娠反応が判明した時点 (妊娠 4 ~ 7 週) で末梢血を採取し、血算、肝機能、P T, A P T T, A T I I I, Dダイマーを測定した。同時に NK細胞活性、Th1/Th2、血清グラニューライシン、可溶性 I C A M-1、可溶性 V C A M-1 を測定した。ヘパリン療法開始後

1 週間で再度採血し、同一項目を測定した。

(4) 各種免疫パラメータの測定：

NK細胞活性：末梢血から Ficoll-Hypaque 法により単核球を分離した。<sup>51</sup>Cr をラベルした K562 細胞を標的細胞とし、E/T 比 20:1 で 4 時間混合培養した。ガンマカウンターにて培養液中に遊離した放射活性を測定、以下の式によって特異的放射活性を求めた。

$\% (^{51}\text{Cr} \text{ 特異的放出}) = [(\text{NK細胞による放出} - \text{非特異的放出}) / (\text{最大放出} - \text{非特異的放出})] \times 100$

Th1/Th2:末梢血をヘパリン採血し、直ちに BML に移送、測定は BML に委託した。

血清グラニューライシン：血清グラニューライシンは E L I S A キットを用いて測定した。96 穴平底マイクロプレートに  $5 \mu\text{g} \cdot /\text{mL}$  の抗グラニューライシン抗体 (R B 1) をコートし、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 晩静置した。10% ウシ胎仔血清でブロックし、5 回洗滌の後検体血清、およびスタンダード血清を加え 2 時間室温で静置した。プレートを 5 回洗滌した後、 $0.1\text{mg} / \text{mL}$  のビオチン化抗グラニューライシン抗体を添加し 1 時間処理、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ストレプトアビディンを加えさらに 1 時間室温で反応させた。5 回洗滌後、TMB 基質を加え 30 分静置、 $450\text{nm}$  吸光度を測定した。

可溶性 ICAM-1、可溶性 VCAM-1：E L I S A にて測定した。

(5) 統計解析

ヘパリン投与前後の測定値の比較には、対応のある t 検定を用いた。解析ソフトは JMP(SAS Institute Japan)を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) アスピリン・ヘパリン療法を行った患者の平均年齢は  $34.9 \pm 4.2$  歳、平均流産回数は  $2.42 \pm 1.32$  回であった。ヘパリン療法を行った 28 例のうち、7 例が流産に終わった (流産率 25%)。

(2) ヘパリン療法前後の末梢血 NK 細胞活性、および Th1/Th2 比の変化

ヘパリン療法前の末梢血 NK 細胞活性は  $23.4 \pm 15.2\%$ 、開始後 1 週間で  $26.3 \pm 12.7\%$  と変化を認めなかった ( $P = 0.38$ ; 対応のある t 検定)。また、Th1/Th2 比も前  $8.6 \pm 3.3$ 、後  $8.2 \pm 4.2$  と、ヘパリン療法開始後に下降傾向を示すものの、有意差を認めなかった ( $P = 0.40$ ; 対応のある t 検定)。

(3) ヘパリン療法前後の血清グラニューライシンの変化

ヘパリン療法開始直前の血清グラニューライシン濃度は、 $2.57 \pm 0.65\text{ng/ml}$  であったのに対し、開始 1 週間後では  $2.30 \pm 0.63 \text{ng/ml}$  と、統計学的に有意に低下していた ( $P < 0.005$ ; 対応のある t 検定; Fig. 3)。一方、ヘパリンを併用しないアスピリン単独群では、

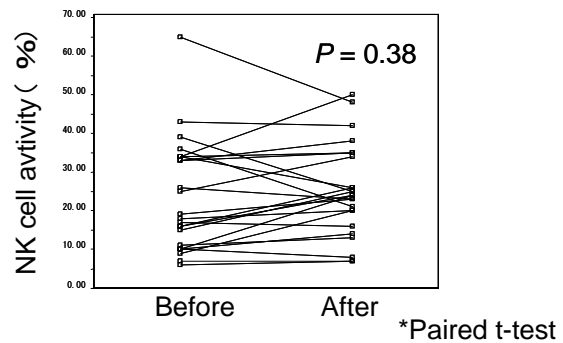


Figure 1. Changes in NK cell activity before and after the initiation of heparin therapy

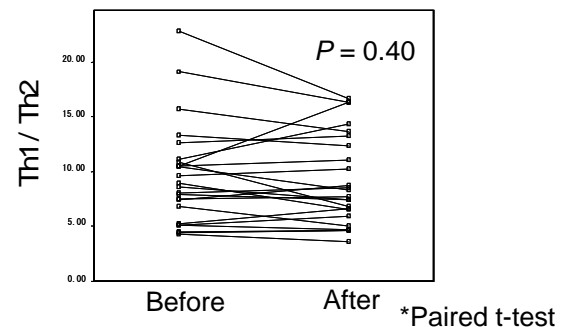


Figure 2. Changes in the Th1/Th2 ratio before and after the initiation of heparin therapy

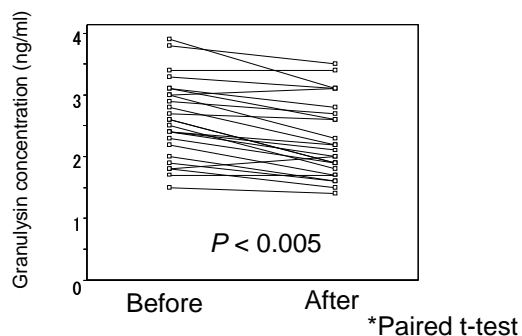
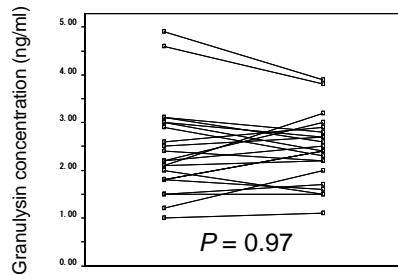


Figure 3. Changes in serum granulysin concentration before and after the initiation of heparin therapy

有意差を認めなかった ( $P = 0.97$ ; 対応のある t 検定)

(4) ヘパリン療法によるグラニューライシン増減による妊娠予後

アスピリン・ヘパリン療法を行った 28 例のうち、ヘパリン開始後にグラニューライシンが上昇したのは 4 例 (14.3%) で全例流産に至った。グラニューライシンが低下した 24 症例のうち、流産に終わった症例は 3 例のみで 12.5% に相当した。ヘパリン療法を行



\*Paired t-test

**Figure 4.** Changes in serum granulysin concentration over an interval of one week in early pregnancy with aspirin therapy

ってもグラニューライシンが低下しない場合、流産率は有意に高かった ( $P < 0.005$ ; Fisherの直接確率法)。

(5) ヘパリンの可溶性 ICAM-1、可溶性 VCAM-1 に与える影響

可溶性 ICAM-1、可溶性 VCAM-1 とともに、ヘパリン開始 1 週間後に有意に上昇した。一方、アスピリン・ヘパリン群と同時期に採取したアスピリン単独群における血清中の可溶性 ICAM-1、可溶性 VCAM-1 は変化を示さなかった。

#### 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 11 件)

1. Ishikawa A, Kudo M, Nakazawa N, Onda M, Ishiwata T, Takeshita T, Naito Z. Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human endometrial cancer in cooperation with steroid hormones. *Int J Oncol*. 32(3):565-74. 2008. 査読有り
2. Kamoi S, Ohaki Y, Mori O, Kurose K, Fukunaga M, Takeshita T. Serial histologic observation of endometrial adenocarcinoma treated with high-dose progestin until complete disappearance of carcinomatous foci-review of more than 25 biopsies from five patients. *Int J Gynecol Cancer*. 2008 Jan 22; [Epub ahead of print] 査読有り
3. Hiraizumi Y, Nishimura I, Ishii H, Tanaka N, Takeshita T, Sakuma Y, Kato M. Rat GnRH Neurons Exhibit Large Conductance Voltage- and Ca(2+)-Activated K(+) (BK) Currents and Express BK Channel mRNAs. *J Physiol Sci*. Feb;58(1):21-9. 2008 査読有り
4. Watanabe A, Yamamasu S, Shinagawa T, Suzuki Y, Miyake H, Takeshita T, Orimo H, Shimada T. Prenatal genetic diagnosis of severe perinatal (lethal) hypophosphatasia. *J Nippon*

Med Sch. 2007 Feb;74(1):65-9. 査読有り

5. Mine K, Katayama A, Matsumura T, Nishino T, Kuwabara Y, Ishikawa G, Murata T, Sawa R, Otsubo Y, Shin S, Takeshita T. Proteome analysis of human placentae: pre-eclampsia versus normal pregnancy. *Placenta*. 2007 Jul;28(7):676-87. 査読有り

6. Akira S, Mine K, Kuwabara Y, Takeshita T.: Efficacy of long-term, low-dose gonadotropin-releasing hormone agonist therapy (draw-back therapy) for adenomyosis. *Med Sci Monit*. 2009 Jan;15(1):CR1-4. 査読有り

7. Akira S, Negishi Y, Abe T, Ichikawa M, Takeshita T.: Prophylactic intratubal injection of methotrexate after linear salpingostomy for prevention of persistent ectopic pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008 Oct;34(5):885-9. 査読有り

8. Oya A, Oikawa T, Nakai A, Takeshita T, Hanawa T. Clinical efficacy of Kampro medicine (Japanese traditional herbal medicine) in the treatment of primary dysmenorrhea. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008 Oct;34(5):898-908. 査読有り

9. Oya A, Nakai A, Miyake H, Kawabata I, Takeshita T. Risk factors for peripartum blood transfusion in women with placenta previa: a retrospective analysis. *J Nippon Med Sch*. 2008 Jun;75(3):146-51. 査読有り

10. Yagi S, Oda-Sato E, Uehara I, Asano Y, Nakajima W, Takeshita T, Tanaka N. 5-Aza-2'-deoxycytidine restores proapoptotic function of p53 in cancer cells resistant to p53-induced apoptosis. *Cancer Invest*. 2008 Aug;26(7):680-8. 査読有り

11. 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*. 2008;53(7):622-8. 査読有り

12. Miyake H, Nakai A, Shimada T, Takeshita T. : Effect of first-trimester ultrasound examination for chromosomal aberrations in women undergoing amniocentesis. *J Nippon Med Sch*. 2006 Oct;73(5):271-6. 査読有り

13. Mori M, Ishikawa G, Luo SS, Mishima T, Goto T, Robinson JM, Matsubara S, Takeshita T, Kataoka H, Takizawa T. : The cytotrophoblast layer of human chorionic villi becomes thinner but maintains its structural integrity during gestation. *Biol Reprod*. 2007 Jan;76(1):164-72. 査読有り

14. 産婦人科診療Data Book 39. 不育症 竹下俊行 産婦人科の実際 Vol. 56, No. 11, Page1793-1797 2007. 査読なし

15. 不育症における第 XII 因子活性と臨床背景の検討 稲川智子 日本生殖医学会雑誌 Vol. 52, No. 4, Page243 2007. 査読なし
16. 各領域の最新診療ガイドライン 不育症のガイドライン 竹下俊行 産婦人科の世界 Vol. 59, No. 4, Page299-308 2007. 査読なし
17. 抗リン脂質抗体陽性不育症症例に対する低用量アスピリン・ヘパリン併用療法は有効か 里見操緒 日本産科婦人科学会雑誌 Vol. 59, No. 2, Page721 2007.
18. 習慣流産に対する夫リンパ球免疫療法と続発性不妊 根岸靖幸 日本産科婦人科学会雑誌 Vol. 59, No. 2, Page659 2007
19. 抗凝固療法と妊娠分娩管理 竹下俊行 日本産科婦人科学会雑誌 Vol. 59, No. 2, Page286 2007. 査読なし
20. 周産期臨床検査のポイント】産科編 不育症(習慣流産)に対する検査(解説/特集): 稲川智子(日本医科大学 産婦人科), 竹下俊行 周産期医学 38 巻増刊 Page16-21

〔学会発表〕(計 件)

1. 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  
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  
第 53 回日本生殖医学会 2008.10 神戸
2. 妊娠における母体血液中の胎盤特異的 microRNA に関する解析  
羅善順, 三嶋拓也, 石橋幸, 石川源, 竹下俊行, 松原茂樹, 瀧澤俊広  
第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2008.03 大分
5. 超高解像力蛍光顕微鏡法によるヒト初期胎盤絨毛組織における IgG 輸送の解析  
瀧澤俊広, 森美貴, 石川源, 竹下俊行  
第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2008.03 大分
6. 稲川智子, 阿部崇, 峯克也, 桑原慶充, 里見操緒, 富山僚子, 明楽重夫, 竹下俊行: 弓状子宮は不育症の原因になりうるか? 第 53 回日本生殖医学会 神戸
7. ヘパリン療法は不育症患者の血性グラニューライシン濃度を低下させる: 稲川智子, 里見操緒, 岩崎奈央, 山下恵理子, 阿部裕子, 明楽重夫, 竹下俊行 第 22 回日本生殖免疫学会 2007.11 東京
8. 染色体異常をもつ反復流産患者の次回生児獲得率: 杉浦真弓, 青木耕治, 藤井智行, 藤田富雄, 川口里恵, 丸山哲夫, 小澤伸晃, 杉俊隆, 竹下俊行, 斎藤滋 第 22 回日本生殖免疫学会 2007.11 東京
9. 抗血栓療法施行中に妊娠高血圧症候群を発症した抗リン脂質抗体陽性妊婦の 3 症例: 里見操緒, 稲川智子, 峯克也, 桑原慶充, 石川源, 磯崎太一, 澤倫太郎, 明楽重夫, 竹

下俊行 第 28 回日本妊娠高血圧学会 2007.10 愛媛

10. 習慣流産と母性について考える: 竹下俊行 第 10 回日本産科婦人科学会神奈川地方部会

11. 未分画ヘパリン・低用量アスピリンにて管理した反復脳静脈血栓症既往妊娠: 峯克也, 高橋恵理佳, 渡辺建一郎, 稲川智子, 桑原慶充, 里見操緒, 三浦敦, 石川源, 磯崎太一, 澤倫太郎, 明楽重夫, 竹下俊行 日本産科婦人科学会関東連合地方部会

12. 抗リン脂質抗体陽性妊婦に対するヘパリン療法の作用機転 細胞性免疫能の変調を介したメカニズム: 稲川智子, 里見操緒, 岩崎奈央, 山下恵理子, 阿部裕子, 峯克也, 桑原慶充, 石川源, 磯崎太一, 澤倫太郎, 明楽重夫, 竹下俊行 第 60 回日本産科婦人科学会 横浜

13. 抗リン脂質抗体陽性妊婦に対する未分画ヘパリン療法の安全性について: 里見操緒, 阿部裕子, 岩崎奈央, 稲川智子, 峯克也, 桑原慶充, 石川源, 磯崎太一, 澤倫太郎, 明楽重夫, 竹下俊行 第 60 回日本産科婦人科学会 横浜

14. 不育症における第 XII 因子活性と臨床背景の検討: 稲川智子, 峯克也, 富山僚子, 阿部崇, 西弥生, 桑原慶充, 明楽重夫, 竹下俊行 第 52 回日本生殖医学会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹下俊行 (TAKESHITA TOSHIYUKI)  
日本医科大学大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 60188175

### (2) 研究分担者

瀧澤俊広 (TAKIZAWA TOSHIHIRO)  
日本医科大学大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 90271220

石川 源 (ISHIKAWA GEN)  
日本医科大学医学部・助教  
研究者番号: 20287767

富山僚子 (TOMIYAMA YROKO)  
日本医科大学医学部・研究技術員  
研究者番号: 40409214