

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591925

研究課題名 (和文) LIF 欠損マウスを用いた難治性習慣流産に対する子宮内膜再生動物モデル作成

研究課題名 (英文) The significance of leukemia inhibitory factor in recurrent miscarriage.

研究代表者

杉浦 真弓 (SUGIURA MAYUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30264740

研究成果の概要 (和文)：流産脱落膜のLIF (45kDa) の存在を確認した。脱落膜のLIF濃度は流産群と人工流産群の有意差は認めなかった。妊娠初期頸管粘液中のLIF濃度は生児獲得群と流産群で有意差を認めなかったが、染色体正常流産群で低値である傾向を認めた。

SYCP3変異は習慣流産患者101例中1名、出産歴のある対照82例中1名に認め、患者の流産絨毛は2回とも正常であり、SYCP3変異は胎児染色体異常習慣流産に関与しないことが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Leukaemia inhibitory factor (LIF) was found to exist in the decidua tissue by Western blot. There was no difference of the concentration of LIF between the aborted and artificial aborted decidua and also no difference of the concentration of LIF derived from cervical fluid at 4-5 weeks gestation between subsequent live birth and miscarriage groups. However, the concentration in chemical pregnancy and miscarriage with normal embryonic karyotype tended to be higher than that with abnormal embryonic karyotype.

SYCP3 mutation was found in one of 101 patients and one of 82 fertile women and may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

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：習慣流産、不育症、LIF、SYCP3

1. 研究開始当初の背景

習慣流産は約1%の頻度であり、女性の晩婚化によって増加しておりわが国の少子化の一因である。夫婦染色体均衡型転座4.5% (Sugiura et al. *Fertil Steril* 2004, 81, 367-373)、子宮奇形3.2%、抗リン脂質抗体症候群10% (Ogasawara et al. *Am J Reprod Immunol* 1999, 41, 86-90)が原因である。一方、妊娠の15%に起こる散発流産の50-70%は胎児染色体異常によることが知られているが、習慣流産においても胎児染色体数異常を反復する症例が51%存在することが明らかになった (Ogasawara et al. *Fertil Steril* 2000, 73, 300-304)。私たちは遺伝子多型の関与 (Makino et al. *Am J Reprod Immunol* 2004, 52, 60-66)、片親性ダイソミーの関与を証明しており (Tsukisiro et al. *J Hum Genet* 2005; 4: 112-117)、胎児染色体異常以外にも遺伝子、エピジェネティック異常が流産の原因であることが明らかになりつつある。

また、最近、胎児染色体異常は偶然起こるのではなく染色体不分離を起こすSYCP3遺伝子変異によって必然的に起こることが報告された (Bolor et al. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 14-20)。Bolorらは習慣流産患者26人中2人に変異を見つけた。

一方、胎児染色体正常の原因不明症例では治療に苦慮することがある。10回以上流産した難治性習慣流産患者においては過去に有用性が報告された免疫療法、抗凝固療法、ステロイド療法を施行しても出産に成功しない。

欧米では24回流産した習慣流産患者が代理出産によって生物学的に自身の児を出産したと報告されている。これらの難治性習慣流産患者には流産以外の病的所見はない。つまり、発生の初期、妊娠10週未満

にのみ必須の遺伝子欠損が疑われるが個々の遺伝子は特定されていない。

2004年に骨髄移植によってドナー由来の幹細胞からレシピエントの子宮に内膜上皮と間質細胞が発生することが報告された (Taylor et al. *JAMA* 2004, 292, 81-85)。またヒト子宮内膜幹細胞の分離も可能であり (Kato et al. *Hum Reprod* 2007, 21, 1214-1223)、子宮内膜幹細胞移植の実現可能性が示されている。幹細胞移植によって難治性習慣流産患者は自分自身の子宮によって出産できる可能性がある。臨床応用に際して問題はあがるが、この動物モデルはまだ報告がない。

Leukemia Inhibitory Factor (LIF)は哺乳類において欠損しても受精卵は正常に発生し、正常胚をLIF欠損マウスに胚移植すると不妊である、すなわち着床に必須であることが証明されている (Stewart et al. *Nature* 1992, 359, 76-79)。LIF欠損マウスを用いて正常マウスの骨髄移植によりドナー由来の子宮内膜細胞を導入して出産可能となることを証明することが当初の目的であった。

このような動物モデルはまだ世界中に報告はされていない。この動物モデルが出産可能であれば、臨床応用については骨髄抑制の問題があるとしても難治性習慣流産に悩む患者に新たな選択肢が提示できると考えた。

2. 研究の目的

LIF欠損マウスを探したが、上記の報告者であるStewart CLや国内報告者数人に依頼したが、入手できなかった。そこでマウス実験をあきらめ、臨床研究に変更することにした。LIFは受精卵の着床に関わる重要な因子であり、原因不明不妊症患者の子宮内腔洗浄液中の濃度は低いという報告が

ある。しかし習慣流産におけるLIFの役割に関する報告はない。今回我々は流産病態における子宮内膜着床因子であるLIFの存在と意義を調べることを目的とした。

また、習慣流産患者においてSYCP3が胎児染色体異常と臨床的に関与するかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) すべての発生段階でほぼ全ての臓器で蛍光タンパクEGFPを発現するトランスジェニックマウスCXNEGFPを作成した。

CXNEGFPの子宮、卵巣を摘出し、組織をホルマリン固定し、凍結切片を作成した。鶴見大学解剖学黒田範行共同研究者の指導を受け、子宮内膜を蛍光顕微鏡で観察した。

(2) 自然及び人工流産手術時に得られた子宮内容組織より脱落膜組織を分離し、ウェスタンブロット法でLIFの存在を検討した。

(3) また組織からタンパクを抽出しELISA法にてLIFを測定した。

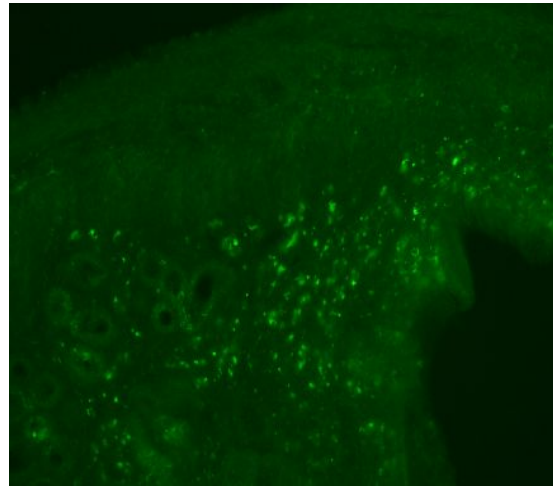
(4) さらに反復流産患者の妊娠初期頸管粘液中のLIFをELISA法で測定しその後の妊娠帰結を比較検討した。

(5) 習慣流産患者101例と出産歴があり流産のない82例の血液中のDNAを抽出し、エクソン7-9のシーケンスを行った。

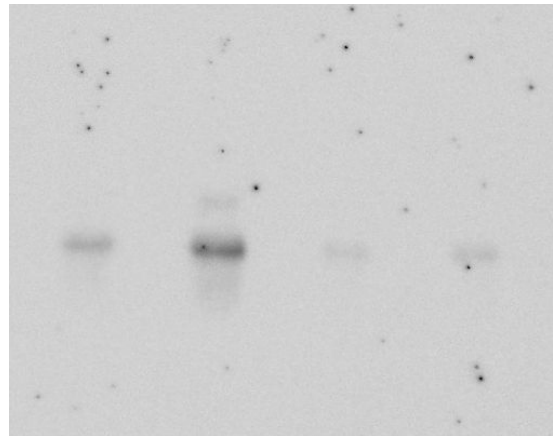
(6) 101例の患者の過去の流産絨毛の染色体解析を行った。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜上皮細胞および間質細胞に特異的に蛍光がみられた。子宮筋層の蛍光は弱かった。念のため、anti-GFP蛍光組織染色法も行ったが蛍光強度は変わりなかったので今後は抗体を用いなくても内膜細胞の観察が可能であることが確認できた。



(2) ウェスタンブロット法で脱落膜組織においてLIF (45 kDa) が検出された。



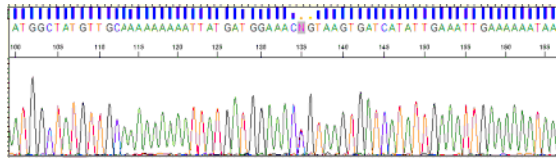
脱落膜 脱落膜 絨毛 絨毛

(3) ELISA法にて脱落膜においてLIFが検出されたが、自然流産群(n=42, 8.14 ± 6.67 pg/mg/1mg protein)と人工流産群(n=37, 10.48 ± 8.17)でLIF濃度の有意差は認められなかった。

(4) また、反復流産患者の妊娠初期頸管粘液中においてLIFが検出された。頸管粘液中のLIFは生児獲得群(n=61, 59.15 ± 53.04)と流産群(n=20, 73.57 ± 48.22)で有意差を認めなかった。流産群においては化学妊娠(n=3, 65.40 ± 16.01)、染色体異常(n=6, 72.26 ± 14.45)、染色体正常(n=11,

66.57±56.77)であり、染色体正常群で低値である傾向を認めた。

(5) SYCP3 エクソン 8 の 657T>C 変異を患者 1 例、対照 1 例に認めた。



(6) 変異を認めた患者の過去 2 回の流産絨毛は 46,XX と 46,XY であり、SYCP3 変異は胎児染色体異常流産と関係ないことが明らかになった。

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 14 件)

- ① Mizutani E, Suzumori N, Ozaki Y, Oseto K, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. SYCP3 mutation may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy. Hum Reprod in press. 査読あり
- ② 杉浦真弓「不育症・習慣流産」産婦人科学レビュー2011 in press. 査読なし (依頼原稿)
- ③ Obayashi S, Ozaki Y, Mizutani E, Suzumori N, Miyoshi I, Sugiura-Ogasawara M. The clinical significance of leukemia inhibitory factor in recurrent miscarriage. 準備中
- ④ 杉浦真弓、尾崎康彦、片野衣江. 綜説シリーズ—現代医学の焦点—「習慣流産の診断と治療」日本臨床 2010; 68: 2351-2356. 査読なし (依頼原稿)
- ⑤ 杉浦真弓「周産期医療と胎盤—抗リン脂質抗体症候群」周産期医学 2010; 40: 1133-1136. 査読なし (依頼原稿)
- ⑥ 杉浦真弓「習慣流産に関する着床前診断の意義—スクリーニングと均衡型転座保因者に対して—」産婦人科診療～pros and cons～産婦人科の実際 2010; 59: 397-401. 査読なし (依頼原稿)
- ⑦ 杉浦真弓「不育症に対する抗凝固療法」産婦人科の実際 2010;59: 1291-1295. 査読なし (依頼原稿)
- ⑧ 杉浦真弓「習慣流産の診断と治療—この疾患はどう変わってきたか」現代医学 2010; 58: 133-136. 査読なし (依頼原稿)
- ⑨ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T. Diagnosis and treatment methods for recurrent miscarriage cases. Reprod Med Biol 2009; 8: 141-144. 査読なし (依頼原稿)
- ⑩ 杉浦真弓「不育症の診断と治療」産婦人科治療 2009; 99: 655-660. 査読なし (依頼原稿)
- ⑪ 杉浦真弓「不育症既往妊娠の予後」産婦人科の実際「いま周産期領域に増えるリスク」. 58. 1919-1924. 2009. 査読なし (依頼原稿)
- ⑫ 杉浦真弓「不育症の診断と治療」日本血栓止血学会誌. 20. 501-505. 2009. 査読なし (依頼原稿)
- ⑬ 杉浦真弓「不育症の診断と治療」日本産科婦人科学会誌. 61. 1737-1741. 2009. 査読なし (依頼原稿)
- ⑭ 杉浦真弓「不育症」日本産科婦人科学会雑誌研修コーナー. 60. N-505-509. 2008. 査読なし (依頼原稿)

〔学会発表〕（計 12 件）

- ① 杉浦真弓「不育症の遺伝学的原因の検索」第 16 回信州遺伝子診療研究会。2011. 1. 28. 信州大学。
- ② 杉浦真弓.「不育症の遺伝学的原因と対策」第 31 回北陸臨床遺伝研究会特別講演。2010. 11. 21. 富山。
- ③ 杉浦真弓.「不育症の検査と治療」第 55 回日本生殖医学会教育講演。2010. 11. 11-12. 徳島
- ④ 水谷栄太、鈴木伸宏、大瀬戸久美子、大林伸太郎、熊谷恭子、尾崎康彦、中西真、杉浦真弓「習慣流産におけるSYCP3遺伝子変異解析」第55回日本人類遺伝学会（2010年10月28日～30日 大宮）
- ⑤ 杉浦真弓「不育症の診断と治療」第 17 回産婦人科 ME セミナー。2010. 7. 4. 大阪毎日オーバルホール。
- ⑥ 杉浦真弓「不育症のカウンセリング」第 62 回日本産科婦人科学会生涯研修プログラム。2010. 4. 23-25. 東京フォーラム
- ⑦ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, Obayashi S. Embryonic factors as a cause of rmiscarriage. XIX International Federation of Gynecology and Obstetrics. 2009. 10. 4-9. Cape Town.
- ⑧ 杉浦真弓「着床前診断の現状と問題点」第 54 回人類遺伝学会 Education Program 4 出生前診断。2009. 9. 24-26. 品川
- ⑨ 杉浦真弓、尾崎康彦、北折珠央、鈴木伸宏、鈴木貞夫. 反復流産患者において子宮奇形は胎児染色体正常流産と関係する。第 54 回人類遺伝学会 WS 企画不育症の原因としての細胞遺伝学的探索。2009. 9. 24-26. 品川
- ⑩ 杉浦真弓. 「染色体検査とその対応」第 117 回関東連合地方部会シンポジウム「不育症の診断と治療」2009. 6. 14. 都市センター（東京）
- ⑪ 杉浦真弓. 教育講演「不育症の診断と治療」第 61 回日本産科婦人科学会。2009. 4. 3-5. 京都
- ⑫ 杉浦真弓. 教育講演「不育症の診断と治療」第 35 回日本産婦人科医会学術集会。2008. 10. 11-12. 福井

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 真弓 (SUGIURA MAYUMI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30264740

(2) 研究分担者

尾崎 康彦 (OZAKI YASUHIKO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50254280

鈴木 伸宏 (SUZUMORI NOBUHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70326148

三好 一郎 (MIYOSHI ICHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10183972
(H21→H22：連携研究者)