

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658249

研究課題名(和文) アネキシンA5の妊娠維持機構

研究課題名(英文) A role for Annexin A5 in the pregnancy

研究代表者

汾陽 光盛 (Kawaminami, Mitsumori)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：00153007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質であるアネキシンA5の生理機能は不明のままだった。申請者は、アネキシンA5ノックアウトマウス(Anxa5K0)を調べ、アネキシンA5が無いと胎盤内に血栓が出来易くなり、胎児死の起こることを明らかにした。これは、ヒトの疾病につながるアネキシンA5の機能を初めて実証した結果である。この知見を発展させ、Anxa5K0胎盤のジャンクショナルゾーンに血小板血栓の出来ることを明らかにした。更に、ヘパリンの投与によって胎児数の減少が改善されることを示し、血小板血栓の形成にフィブリン析出の関与することも明らかにした。本研究の最初の成果を2012年に論文として報告した。

研究成果の概要(英文)：Annexin A5 (Anxa5) is a calcium dependent phospholipid binding protein and a member of annexin family proteins. While it has been assumed that Anxa5 would be involved in the anticoagulant action in the placenta, there has no direct evidence. We have demonstrated that Anxa5 has a crucial role in the anticoagulation during pregnancy by using Anxa5 knockout mice. We confirmed that aggregation of platelets occurred in the placenta of Anxa5K0. We have reported this already (Sci, Rep. 2. 827).

研究分野：動物生命科学

科研費の分科・細目：統合動物科学

キーワード：アネキシンA5 不育症 血小板 凝固 抗リン脂質症候群

1. 研究開始当初の背景

カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質であるアネキシン A5 は、アポトーシス検出キットに用いられることで有名になったが、その本来の生理機能は長く不明のままだった。タンパク質発見当初は、様々な機能を追求する研究成果として様々なグループによって発見されたため、10を超える名前がついた時期があった。その中で妊娠時に胎盤で血液凝固を防止する蛋白質の候補とする成果があり胎盤性凝固阻止タンパク質という名前もつけられたが、爾来20年以上実際に凝固防止に機能していることは証明されずにいた。申請者は、アネキシン A5 ノックアウトマウス (Anxa5K0) を調べ、胎盤内に血栓が出来易くなり、胎児死の起きていることを観察した。これは、子癩前症や不育症などのヒトの疾病につながるアネキシン A5 の機能を初めて実証した結果と考えられた。観察された胎児死の機序を明らかにし、この知見を発展させ新規の診断法、治療法開発につなげる生理学的研究が是非必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、アネキシン A5 の妊娠維持機構を明らかにし、1) 母体のアネキシン A5 が如何にして胎盤内に移送されるのか、2) アネキシン A5 の胎盤における膜修復機能の実態、3) 凝固カスケードに対するアネキシン A5 の作用機序を明らかにし、アネキシン A5 による正常妊娠維持機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

Anxa5K0 を用いた胎児・胎盤の組織学的精査と血小板凝集検査を中心に様々な実験手技を導入した。膜修復機構に関する実験は協力を仰いだボルドー大学の Brisson 教授との共同研究開始に至ることが出来ず未着手である。但し、annexin 研究について将来的に

共同研究の可能性を探ること、情報交換を続けることは可能となった。また、本研究費で国際アネキシン会議に参加することも出来、口頭発表1題とポスター発表3題を行うと共に、アネキシン研究の先端を知ることが出来た。状況の変化に合わせて本計画の方法と実験内容の変更も行った。

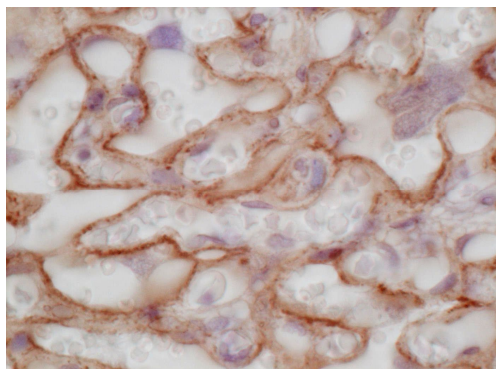
4. 研究成果

Anxa5K0 の産子数が少ないことは確かめており、胎盤内の血管に血栓の生じていることも確認していた。まず、例数をかなり増やし観察された胎児の減少が確実に Anxa5K0 の遺伝形質であることを確認した。そこで、血栓の性質を調べるためにフィブリンと血小板のマーカー蛋白質である CD61 の免疫組織化学を行った。フィブリンの小塊は wild と Anxa5K0 双方に認められたが、その発現量に両者の差はなかった。胎盤内の大きな血栓はフィブリンには染色されず、CD61 にのみ染色された。Junctional zone のらせん動脈につながる大血管に出来る血栓が血小板凝集によるものであることが明らかになった。但し、ヘパリン投与によって血栓形成が抑制されたことから、少量のフィブリンは血小板凝集に必須であると考えられた。更に、Anxa5K0 と wild の血液を試験管にとり、凝固時間を比べると Anxa5K0 で凝固の遅れることも観察された。即ち、アネキシン A5 は正常のフィブリン析出による凝固機序にも必要であることが明らかになった。

次に、胎盤内アネキシン A5 の分布を免疫組織化学法で調べた。Wild と Anxa5K0 をそれぞれ母親、父親として組み合わせを全て作製し、それぞれの妊娠マウスから胎盤を採取した。母親が Anxa5K0 の場合にのみ胎盤内で血液に触れる表面のアネキシン A5 が消失した。父親が Anxa5K0 の場合には wild と比べて顕著な変化はなく、アネキシン A5 が母胎から供給されることが確認された。胎盤の絨毛組

織内にアネキシン A5 が認められたが、これは胎児由来で凝固防止には関与しないことも明らかになった。

下図は胎盤内 junctional zone におけるアネキシン A5 の分布を免疫組織化学法で観察した結果である。



アネキシン A5 の妊娠維持機構に関する実験結果を総合して 2012 年に論文発表した。



OPEN

Loss of Maternal Annexin A5 Increases the Likelihood of Placental Thrombosis and Foetal Loss

SUBJECT AREAS:
MEDICAL RESEARCH
DEVELOPMENTAL BIOLOGY
REPRODUCTIVE BIOLOGY
PROTEINS

Hiroshi Ueki¹*, Tomoko Mizushima¹, Tetsuro Lacharathakhan¹, Ryota Terahama¹, Yasuhiro Nishimura², Daengjai Reanrakwong³, Tomohiro Yonezawa⁴, Shiro Kusuda⁵, Yoshihisa Hasegawa⁶, Bernd Bruchvogel⁶, Ernst Pöschl⁶ & Mikumori Kawaminami¹

更に実験を続け、血小板機能に及ぼすアネキシン A5 の影響を様々な方法で調べた。1) LPS 投与の産子数減少に及ぼす影響：LPS を妊娠マウスに投与して妊娠維持に対する影響を調べた。統計的に有意な差のある結果は得られなかったが、Anxa5K0 で LPS 投与群の妊娠障害効果の大きい傾向が認められた。興味深いことに LPS 投与動物の分娩後の産子の生存性にもアネキシン A5 の有無が影響した。血液凝固との関連は明らかでない。2) 血小板のマーカーとなる CD61 の免疫組織化学を Anxa5K0 と wild の様々な組織で行った。肺、脾臓、腎臓、下垂体を調べたが、明瞭な陽性反応は認められなかった。何故、胎盤でだけ血小板が凝集するのか、他組織でも凝集の起こりやすい時期があるのか等課題が残った。

3) 採血血液の塗抹標本を用いた血小板凝集の観察。採血後すぐにスライドガラス上に血液を塗布し、顕微鏡下で観察を続けた。Anxa5K0 から採取した血液で血小板凝集が多く観察された。但し、wild の血液でも血小板凝集が観察された。

血液塗抹中の血小板凝集。



単純な塗抹標本で上図のような凝集像は見られるが、定量化には至っていない。

ヘパリンは、アンチトロンピンを活性化することで、最終的にトロンピンや活性化 X 因子の活性抑制に至る。本研究ではヘパリンが血小板凝集を抑制する結果が得られた。フィブリンは血小板凝集に促進的に関与することが知られており、観察された効果はフィブリンを介するものと考えられた。しかし、アネキシン A5 はまず血小板凝集抑制を作用機序としていることが明らかになった。

本研究の成果は以上のごとくで、アネキシン A5 の血小板への作用の実体については共同研究体制を作れなかったことや、当てにしていた機器の利用が出来なかったことなどの理由で進捗は期待を下回った。しかし、研究開始時に比べてアネキシン A5 の機能をより明らかにすることが出来、論文発表にまでつながったことは大きな成果である。

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 3 件)

Ueki H, Mizushina T, Laharatchathanin T, Terashima R, Nishimura Y, Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S, Hasegawa Y, Brachyogel B, Poschl E, Kawaminami M. Loss of maternal annexin A5 increases the likelihood of Placental platelet thrombosis and foetal loss. Scientific reports 2012, 2:827 DOI: 10.1038/srep00827 査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

小野寺桃子, 水品智菜, 尾崎 優, 武藤 顕一郎, 米澤智洋, 久留主志朗, 汾陽光盛 アネキシン A5 ノックアウトマウスの黄体形成ホルモン(LH)分泌 第156回日本獣医学会 岐阜市(岐阜県)2013/9/20

汾陽光盛, 中村祐希, 米澤智洋, 久留主志朗 ラット発情前期の黄体形成ホルモン(LH)サージに伴う下垂体前葉でのアネキシン A5 の変化 第156回日本獣医学会 岐阜市(岐阜県)2013/9/20

Kawaminami M, Ueki H, Nidhimuts Y, Rieanrakwong D, Yonezawa T, Kurusu S. Annexin A5 of maternal blood is prerequisite for preventing fetal loss during intact pregnancy. The Endocrine Society's 94th Annual Meeting (Houston, Texas, USA) 2012/6/24

〔産業財産権〕

取得状況(計 2 件)

名称:細胞増殖抑制剤
発明者:汾陽光盛
権利者:学校法人北里研究所
種類:特許
番号:特許5320719号
取得年月日:2012/7/6
国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

汾陽 光盛(KAWAMINAMI, Mitsumori)
北里大学・獣医学部・教授
研究者番号:00153007

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし