

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659740

研究課題名(和文) 血液凝固因子に対する自己抗体が原因となる不育症の研究

研究課題名(英文) Study for infertility caused by the autoantibodies against blood coagulation factors

研究代表者

市原 慶和 (Ichihara, Yoshikazu)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授

研究者番号：80176304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：不育症の原因の1つとして、血液凝固因子に対する自己抗体の存在が明らかとなった。我々は、プレカリクレイン(PK)欠乏症患者を見つけ、その原因を解析したところ、PK遺伝子に変異は見出されず、抗PK抗体の存在が明らかにされた。様々な血液凝固因子に対する自己抗体を簡便・網羅的に検出するシステムが開発されれば、不育症治療の一助になると考えられた。本目的の第一段階として、PKにHalo-Tagを導入するHalo-Tag/Halo-Tagリガンドシステムを用いて、PKに対する自己抗体を検出するシステムを作成した。様々な血液凝固因子に対しても応用を試みた結果、多くは抗原タンパク質の作成ができた。

研究成果の概要(英文)：It has become apparent that autoantibodies against plasma coagulation factors is responsible for some kind of infertility. We found that the prekallikrein (PK) deficient patient, whose nucleotide sequence of prekallikrein gene was normal, had autoantibody against plasma PK. If simple and comprehensive detection system for autoantibodies against plasma coagulation factors were developed, it would be helpful for patients to reveal the cause of infertility. As the first step for this purpose, we developed the new method to detect autoantibody against plasma PK using Halo-Tag/Halo-Tag ligand system. This method could be applicable to detect autoantibodies against other plasma coagulation factors.

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 不育症 自己抗体 血液凝固因子 検出法

### 1. 研究開始当初の背景

不育症・不妊症は、出産年齢の高齢化にともない、近年の大きな社会問題になっている。不育症・不妊症の原因として、後天的な形態異常である子宮筋腫、子宮腺筋症、先天的な形態異常である中隔子宮、重複子宮、双角子宮、単角子宮などが知られている。黄体機能不全、糖尿病、甲状腺機能亢進症、甲状腺機能低下症、高プロラクチン血症などの内分泌性因子、染色体異常、血液凝固因子の異常、抗核抗体や抗リン脂質抗体などが知られている。

一方、血液凝固因子欠乏症や血液凝固因子に対する自己抗体も不育症・不妊症の原因の一つとして報告されてきている。不育症の原因とされる血液凝固因子に対する自己抗体として、これまでに血液凝固第 XII 因子 (FXII) や高分子キニノーゲン (HMWK) に対する自己抗体が報告されている。不育症患者の中には、これらの自己抗体を有する妊婦がいることが明らかにされている。なぜ、血液凝固因子に対する自己抗体が存在すると不育症になるのかについては、未だに明らかではない。しかし、血液凝固因子欠乏症や血液凝固因子に対する自己抗体が存在すると、血漿中の血液凝固因子の絶対的活性値が低下することから、血液凝固因子の活性低下が不育症の一因になることが推定される。血漿中の血液凝固因子に対する自己抗体の有無を網羅的に測定することができれば、不育症・不妊症の原因の一つについて、自己抗体の有無とその種類を特定することが可能になる。血液凝固因子に対する自己抗体の新しい検査方法が開発されれば、不育症・不妊症に悩む患者に福音がもたらされる。

### 2. 研究の目的

不育症の原因の一つとして、血液凝固因子に対する自己抗体の存在が明らかとなっている。とりわけ、FXII や HMWK に対する自己抗体と不育症の関係が指摘されている。血液凝固因子にはこの2種類以外にも多くの因子が存在する。従って、FXII や HMWK に対する自己抗体以外にも、不育症の原因となる自己抗体が存在する可能性がある。申請者

は、プレカリクレイン (PK) 欠乏症患者を見つけ、その原因を解析したところ、プレカリクレインの欠乏ではなく、抗 PK 抗体の存在が原因であると推定された。本研究ではまず抗 PK 抗体の存在を明らかにして、抗 PK 抗体を簡便に検出するシステムを構築する。様々な血液凝固因子やその関連因子一つ一つについて、活性や抗原性を調べることは、時間や経費がかかるために現実的ではない。そこで、様々な血液凝固因子や凝固関連因子に対する自己抗体を網羅的に検出するシステムを構築する。自己抗体の抗原は患者ごとに異なると推定されるので、抗原の種類を網羅的に検査できる方法を開発するメリットは大きい。様々な血液凝固因子や凝固関連因子に対する自己抗体を網羅的に検出するシステムが開発出来れば、まず不育症・不妊症と診断された患者血漿中の血液凝固因子に対する自己抗体の有無と抗原の種類を迅速・網羅的に特定できる。次いで、これらの自己抗体と不育症の相関について疫学的方法で解析することにより、不育症・不妊症のスクリーニングと原因の予測が可能になると期待される。

### 3. 研究の方法

#### 【研究計画 1】

PK 欠乏症と診断された患者に抗 PK 抗体が存在するかどうかについて、検討した。患者血漿中に抗 PK 抗体が存在するとすれば、これは PK に結合していると考えられる。そこでビオチン (Bio) 標識-抗ヒト PK ヒツジ抗体とアビジン (Avi) 標識ビー

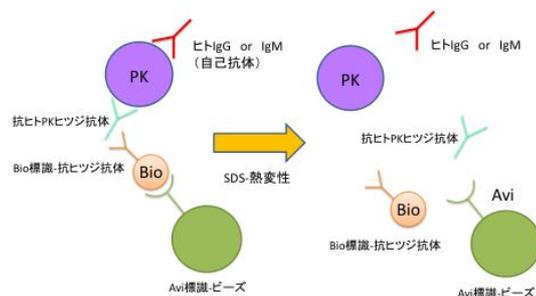


図1. PKに対する自己抗体の単離

ズで PK-抗 PK 複合体を単離する (図 1)。これらの複合体を SDS 存在下で熱変性して、SDS-PAGE に供する。次いでウエスタンブロッティ

ングを行い、電気泳動された産物を PVDF 膜に転写する。転写されたナイロン膜に HRP 標識-抗ヒト IgG 抗体、HRP 標識-抗ヒト IgM 抗体と発色基質を添加する。もし、いずれかの自己抗体が存在する

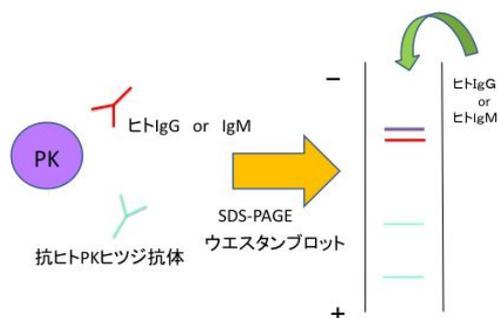


図2. PKに対する自己抗体の検出

とすれば、茶褐色のバンドが検出される(図2)。

【研究計画2】

患者由来の抗 PK 自己抗体の抗原認識部位について、合成ペプチドを用いたエピトープ解析を行う。

【研究計画3】

内因系の血液凝固因子である PK cDNA の 3' 末端に、最近開発された新しい Tag システムの Halo-Tag 配列を融合タンパク質として発現できる発現ベクターを作成する。本発現ベクターを培養細胞 HEK293 で発現させると、PK-Halo-Tag 融合タンパク質が培養液中に分泌される。これにビオチン標識した Halo-Tag リガンドを反応させると、発現された PK-Halo-Tag 融合タンパク質が、ビオチン標識の Halo-Tag リガンドを介してビオチンで標識される。従ってアビジンが固相化されたプレートを用いると、ビオチン標識された PK をアビジン固相化プレートに結合できる(図3)。

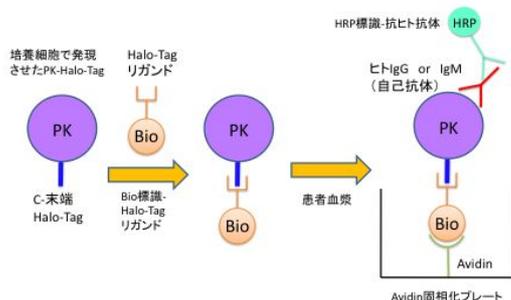


図3. PKに対する自己抗体の単離

これにより、培養細胞で発現した PK をプレート表

面に固相化できる。作成したプレートに抗 PK 抗体を有する患者血漿を反応させると、血漿中に抗 PK 抗体が存在する場合は、固相化された PK に抗 PK 抗体が結合する。今回の研究では、自己抗体のクラスは IgG と IgM に絞った。抗原に結合した自己抗体が存在すれば、HRP 標識-抗ヒト IgG 抗体や HRP 標識-抗ヒト IgM 抗体と OPD 発色基質で検出することができる(図3)。

【研究計画4】

各種血液凝固因子および血液凝固関連因子の cDNA を単離し、それぞれの C 末端に Halo-Tag を付加した発現ベクターを作製する。これらの cDNA を培養細胞で発現させると C 末端に Halo-Tag が付加された融合タンパク質が合成される。これにビオチン標識された Halo-Tag リガンドを混合すると、Halo-Tag/Halo-Tag リガンドが共有結合してその結果、発現タンパク質がビオチン標識される。96穴のタイタープレートにニュートラルアビジンを固相化して、これにビオチン標識された発現タンパク質を付加することにより、発現タンパク質をタイタープレートに固相化することができる。これに各種発現タンパク質に対する一次抗体と、それぞれに対する HRP 標識-二次抗体を反応させることにより、抗血液凝固因子抗体を検出するシステムを作成し、条件検討を行う。

【研究計画5】

本研究により開発した抗血液凝固因子抗体の網羅的検出方システムを用いて、すでに収集済みの不育症患者の血漿について解析を行ない、血液凝固関連因子と不育症の相関について検討する。

4. 研究成果

【研究計画1】

本研究では、まず血液凝固関連因子の例として、プレカリクレイン (PK) に対する自己抗体を有する患者の存在をウエスタンブロッティング法により示した。PK 欠乏症患者の血漿を研究計画1の方法により解析した(図4)。同じ検体セットを2つ作成した。レーン1、5は1年前に来院した当初の患者血漿、レーン4、8は1年後の同じ患者血漿である。また、レーン2、5およびレーン3、

7はそれぞれ別々の健常者由来の血漿を用いた。PVDF膜にHRP標識-ヤギ抗ヒトIgG抗体(レーン1~4)およびHRP標識-ヤギ抗ヒトIgM抗体(レーン5~8)を作用させて発色させると、抗ヒトIgG抗体を反応させた患者血漿のみが発色した。発色の強度は1年前の方が強かった。このことから本患者の血漿中には、抗ヒトPKIgGが存在することが明らかになった(図4)。

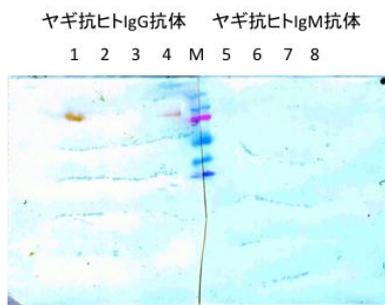


図3 PKに対する自己抗体の検出

【研究計画2】

本研究は、抗ヒトPK抗体のエピトープを解析する研究であるが、自己抗体の検出システムを作るに当たって必須ではないので、今年度は見送ることとした。

【研究計画3】

C末端にHalo-Tag配列を付加してPK-Halo-Tag融合タンパク質発現ベクターを作成した。PKはN末端のシグナルペプチドが分泌に必須である。そこでN末端のシグナルペプチド部分のみ、アップルドメイン1まで、アップルドメイン2まで、アップルドメイン3まで、アップルドメイン4まで、全長(Full)を含む6種類のHalo-Tag融合タンパク質発現ベクターを作成した。それぞれのベクターを培養細胞Hek297に導入後、その培養液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて、抗PK抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った結果、培養液中にFull-PK-Halo-Tag融合タンパク質を検出できた。そこで、ニュートラルアビジンをコートしたプレートに、ビオチン標識Halo-Tagリガンドを固相化した。これに発現したFull-PK-Halo-Tag融合タンパク質を含む培養液を添加した。これにより、PKがプレートに固相化さ

れた。抗ヒトPKヒツジ抗体を添加すると、HRP標識-抗ヒツジIgGを反応させた。OPD発色によって抗ヒトPKヒツジ抗体が結合していることを確認できたことにより、自己抗体検出システムが機能することが示された。

【研究計画4】

PK以外にHMMK、FV、FXII、FXIIIAおよびBサブユニット、FVII、GPIIb/IIIa、FXIIのcDNAを単離した。これらのcDNAをHalo-Tagベクターに挿入した発現ベクターを作成した。それぞれの発現ベクターをHEK293細胞で発現させて、それぞれのタンパク質の発現をウエスタンブロッティングで検討した。その結果、HMMK、FXII、FXIIIB、可溶性GPIIb、可溶性IIIaは発現が認められた。しかし、FV、FXIIIAは培養液中に発現タンパク質が検出されなかった。血液凝固因子cDNAの培養細胞での発現は必ずしも成功できたわけではなかった。特にFVは分子量が大きい上、不安定化因子として発見された歴史がある。血液凝固関連因子の発現系について工夫や改善を行い、Halo-Tag標識された抗原タンパク質の安定的な産生が必要であると考えられた。

【研究計画5】

研究計画4での網羅的な抗原検出系の作成に成功していないので、不育症・不妊症患者の血漿を用いた研究は未だ行っていない。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

「不育症患者に見出された血液凝固因子に対する自己抗体」

林彩子、大石知世、鶴飼友美、林佑利恵、田中千絵、山本莉央、前田圭介、勝田逸郎、岡本昌隆、市原慶和、日本臨床検査学教育学会学術大会(名古屋国際会議場)平成24年8月22日~24日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

市原 慶和 ( ICHIHARA Yoshikazu )  
藤田保健衛生大学・医療科学部・教授  
研究者番号：80176304

##### (2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：