

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462578

研究課題名(和文)原因不明不育症における新規自己抗体とその標的抗原の同定

研究課題名(英文) A basic and clinical approach to risk factors of recurrent pregnancy loss &#8211; Identification of a novel antibody associated with seronegative obstetric antiphospholipid syndrome (SN-APS)

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・大学院教授

研究者番号：60188175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断基準を満たすが血清学的にAPSの基準を満たさない不育症患者(Seronegative obstetrical antiphospholipid syndrome: SN-APS)に特異的な新規自己抗体/標的分子の同定を試みたところ、SN-APS患者の約1割より、アルキル化処理を受けた補体分子C9に特異的に反応する自己抗体が検出された。母体間インターフェイスにおいて補体活性は補体調節因子の発現・局在によって厳格に調節されているが、本研究結果は反復流産既往患者における抗C9抗体の検出は、不育症の原因を探る臨床マーカーとして有用な可能性を示唆している。

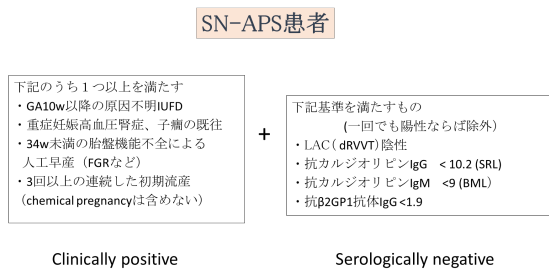
研究成果の概要(英文)：There is a subpopulation of patients with clinical symptoms of APS, but the lack of serological markers (seronegative APS). We collected peripheral blood from SN-APS outpatients with known thrombotic predisposition (protein S deficiency, protein C deficiency, factor XII deficiency, or presence of anti-phosphatidylethanolamine antibodies). Two-dimensional immunoblotting was performed with pooled control and SN-APS sera as the primary antibody, and complement molecule C9 were identified as reactive spots specific to SN-APS serum. Autoantibody for C9 was detected in 2/14 SN-APS patients with no known thrombotic predisposition, and in 1/12 SN-APS patients with a known thrombotic predisposition other than APS by WB using purified C9 treated with iodoacetamide. The reaction was not seen in control sera (0/4). This study suggests that some SN-APS pathologies relate to autoantibodies that react to specific C9 epitopes expressed under fixed conditions.

研究分野：産婦人科

キーワード：不育症 抗リン脂質抗体症候群(APS) 血清学的陰性APS 補体分子C9

1. 研究開始当初の背景：

不育症の原因は多岐にわたるが、約 3 割存在するとされる原因不明不育症の中に、臨床的に抗リン脂質抗体症候群 (APS) の診断基準を満たすが血清学的に APS の基準を満たさない不育症患者 (Seronegative obstetrical antiphospholipid syndrome : SN-APS) が存在している。SN-APS の病態は明らかでないが、大量免疫グロブリン療法が奏効する症例が存在することからも、既知の抗リン脂質抗体とは異なる未知の自己抗体によって APS と類似した臨床症状が惹起されている可能性が示唆される。



2. 研究の目的

不育症患者血清を用いた二次元免疫ブロッティング解析を起点とし、SN-APS 患者に特異的な新規自己抗体/標的分子の同定を行い、診断マーカーの確立、新規治療戦略の開発を目指す。

3. 研究の方法

当科外来を受診した 不育症患者のうち、臨床的に抗リン脂質抗体症候群 (APS) の診断基準を満たすが血清学的に APS の診断基準を満たさない不育症患者 (Serologically negative-APS: SN-APS) 患者 (n=19: 既知血栓素因あり; プロテイン S 欠乏症・第Ⅻ因子欠乏症・抗 PE 抗体陽性のいずれかが陽性, n=13: 既知血栓素因なし) および流産歴の SN-APS ない二回経産婦 (n=4: Control) より末梢血を採取し、血清を分離保存した。

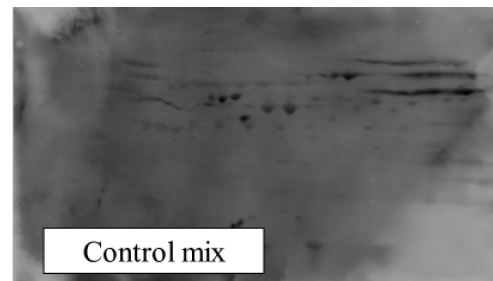
ボランティア (n=6) より採取分離した血漿タンパクをアルブミン・IgG 吸着カラムで精

製し血漿タンパク抗原とした。精製血漿タンパクを抗原とし、コントロール血清および SN-APS 患者 3 人の血清プールを一次抗体とした二次元免疫ブロッティングを行い、後者に特異的な反応性スポットを質量分析器により同定した。さらにターゲット分子を用いたウェスタンブロッティングによる検出系を確立し、検体中の自己抗体の有無につき解析を行った。

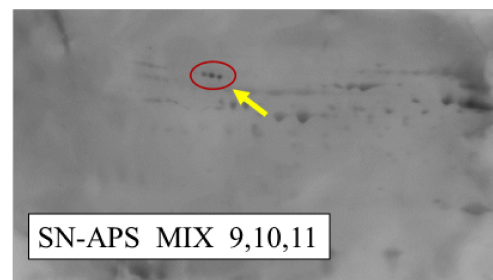
4. 研究成果

SN-APS の病態関連分子候補のスクリーニング・同定

精製血漿タンパクを抗原とし、コントロール血清および異なる SN-APS 患者血清のプール (I. SN-APS MIX No.6, 7, 8、II. SN-APS MIX No.9, 10, 11) を一次抗体とした二次元免疫ブロッティングにおいて、ディファレンシャル解析を行った結果、二つの特異的な反応性スポットが確認された。



4 等電点 7

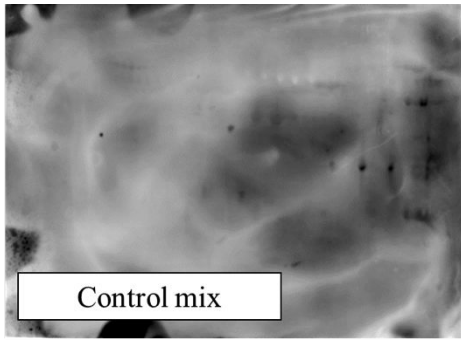


4 等電点 7

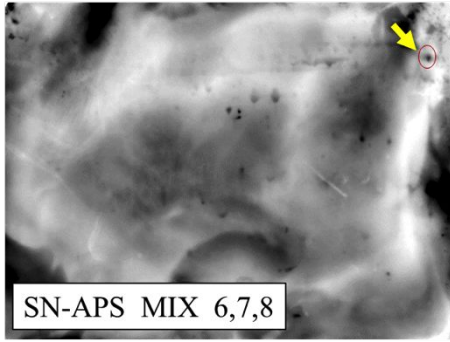
マッチングした蛋白スポットを質量分析器により解析し、それぞれ a) “C9” および “フィブリノーゲン” が同定された。

スポットの再現性の確認

二次元免疫ブロッティングを反復しスポ



4 等電点 7

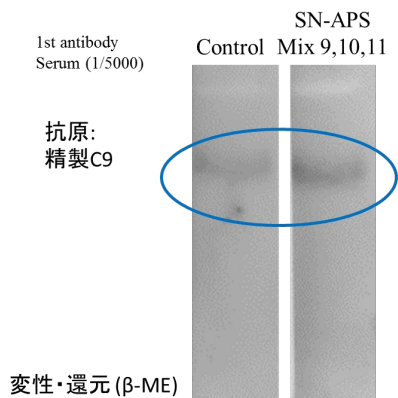


4 等電点 7

ットの再現性を確認すると共に、精製血漿蛋白と精製抗原を同時に二次元電気泳動する事により、検出されたスポットが精製抗原と生化学的に同一である事を確認した。

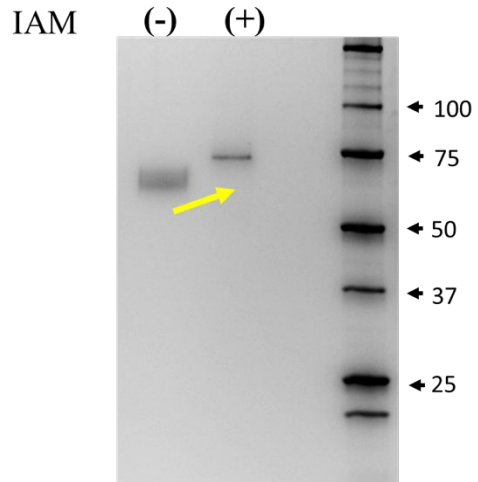
ウェスタンブロッティングによる検出系の確立

a) 精製 C9 を抗原とした SDS-ウェスタンブロッティングでは、いずれも SN-APS 患者のプール血清と反応を認めなかった。

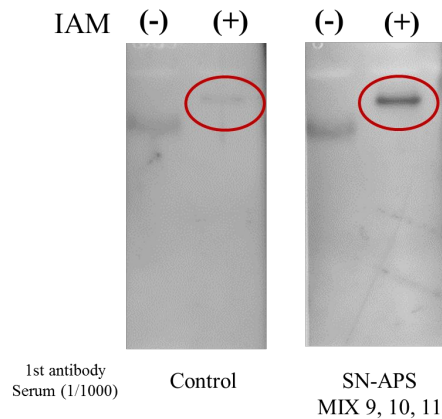


二次元電気泳動に特異的なタンパク処理ステップが抗原性に影響している可能性を考え、精製C9にヨードアセトアמיד (IAM)

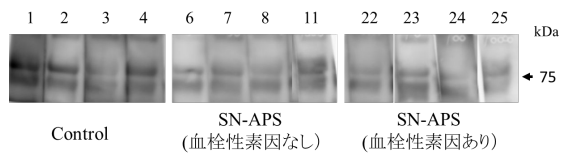
によるアルキル化処理を行った。SDS-PAGEでは分子量が増加しよりシャープなバンドを呈した。



IAM 処理後の精製 C9 を用いたウェスタンブロットでは C9 反応性のバンドがクリアに検出され、この方法による血清中の抗 C9 抗体の検出が可能となった。

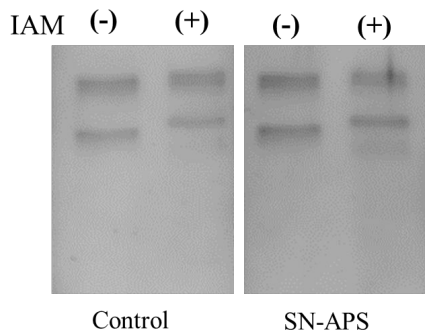


b) 精製フィブリノーゲンを抗原としたウェスタンブロッティングでは、コントロール血清においてもバンドが検出され、SN - APS 血清とパターンを認めなかった。



さらに IAM 処理による抗原性にも変化を認

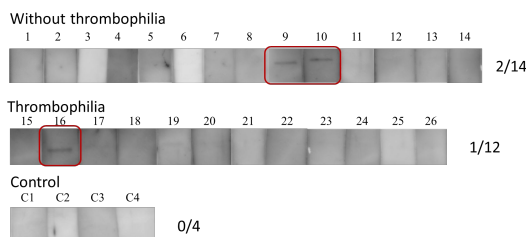
めなかった。



不育症患者血清における抗 C9 抗体の検出

の検討を踏まえ、IAM 処理を行った精製 C9 を抗原とするウェスタンブロッティングを施行した。

既知血栓素因を有さない SN-APS 患者血清 13 検体のうちの 2 つ、既知血栓素因を認める SN-APS 患者血清 19 検体のうちの 1 つより抗 C9 抗体が検出された。



C9 欠損症との関連についての検討

本邦で約 0.1% の頻度で認める C9 欠損症との関連を調べるために、ELSA により各血清中の C9 を定量したところ、抗 C9 抗体陽性検体と他の検体で有意差を認めなかった。また、抗 C9 抗体陽性検体の CH50 値はいずれも正常範囲であり、精製 C9 の添加によって変化を示さず、機能的にも C9 欠損症との関連は否定的と考えられた。

まとめ

SN-APS 患者の約 1 割より、アルキル化処理を受けた補体分子 C9 に特異的に反応する自己抗体が検出された。母体間インターフェイスにおいて補体活性は補体調節因子の発

現・局在によって厳格に調節されており、その破綻が APS 患者の流産病態に関与する事が報告されている。本研究は、一部の原因不明不育症病態においても補体調節機能の破綻が関与している可能性を示唆している。この点において、反復流産既往患者における抗 C9 抗体の検出は、不育症の原因を探る臨床マーカーとして有用な可能性が考えられる。

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 1 件)

Y. Kuwabara, A. katayama, S. Kurihara, M. yonezawa, N. Ouchi, T.Takeshita, Search for pathology-related molecules in seronegative obstetric antiphospholipid syndrome using two-dimensional immunoblotting. Journal of Reproductive Immunology, 査読有
106 巻, 2014, 16-17,
DOI: 10.1016/j.jri.2016.10.024

[雑誌論文] (計 1 件)

Y. Kuwabara, A. katayama, S. Kurihara, M. yonezawa, N. Ouchi, T.Takeshita, Search for pathology-related molecules in seronegative obstetric antiphospholipid syndrome using two-dimensional immunoblotting. Journal of Reproductive Immunology, 査読有
106 巻, 2014, 16-17,
DOI: 10.1016/j.jri.2016.10.024

[学会発表] (計 2 件)

二次元免疫プロットを用いた、Seronegative obstetrical antiphospholipid syndrome における病態関連分子の探索 (第 31 回 日本生殖免疫学会総会・学術集会, 平成 28 年 12 月)

A proteomic approach to identify pathology-related molecules in patients with seronegative obstetric antiphospholipid syndrome (日本産科婦人科学会 第 69 回学術集会, 平成 29 年 4 月)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 俊行 (TOSHIYUKI, Takeshita)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 20227721

(2) 研究分担者

桑原 慶充 (KUWABARA, Yoshimitsu)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 40373013