

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462489

研究課題名(和文) 2GPI/MHCクラスIIに対する自己抗体の証明と産科異常病因解析

研究課題名(英文) Autoantibody to beta2GPI/MHC class II and obstetrical complications

研究代表者

山田 秀人(Yamada, Hideto)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40220397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：不育症患者のaB2GPI/HLA-DR7(ネオセルフ)抗体と不育症との関係を明らかにすることを目的とした。不育症女性108人を対象とした。流死産歴無し生産歴ありのコントロール女性100人の99%ile(52.6 U/ml)を基準値として、対象で抗体を測定した。結果、不育症女性108人中、23人(21%)が、ネオセルフ抗体陽性であった。陽性であった不育症女性23人中、17人は他のaPLも陰性であった。原因不明の不育症69人中12人(17%)でネオセルフ抗体が陽性であることを初めて明らかにした。ネオセルフ抗体は、新たな不育症の原因である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This prospective study aimed to investigate whether aB2GPI/HLA-II is associated with recurrent pregnancy loss (RPL). Serum level of aB2GPI/HLA-II as well as common aPL (aCL IgG/IgM, aCLB2GPI IgG and LA) in all subjects were measured. The normal range of serum aB2GPI/HLA-II level was established by using the 99th percentile cutoff point for 100 fertile controls. The median (range) serum levels of aB2GPI/HLA-II in control population was 0 (0-308.2) U, and the normal range of it was determined to be 52.6 U or less. One hundred and eight women with RPL were enrolled from December 2016 to September 2017, and serum levels of aB2GPI/HLA-II in them was found to be median 10.3 (range, 0-1952.0) U. Twenty-three (21%) of the 108 women with RPL tested positive for aB2GPI/HLA-II. Seventeen (74%) of the 23 women tested negative for common aPL. Twelve (52%) of the 23 women had unexplained RPL. A novel antibody against B2GPI/HLA-II complexes may be involved in the pathology of RPL.

研究分野：産科婦人科

キーワード：抗リン脂質抗体 不育症

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は、抗リン脂質抗体 (aPL) を有する患者が動脈血栓症や反復・習慣流産 (不育症)、妊娠高血圧症候群や胎児発育不全による早産など産科合併症を呈する症候群である (Miyakis et al. *J Thromb Haemost* 2006)。aPL の対応抗原は、リン脂質自体ではなく、リン脂質の結合蛋白 (コファクター) もしくは、リン脂質と結合蛋白複合体であると考えられてきた (Galli et al. *Lancet* 1990)。リン脂質結合蛋白の主たる分子は、2-グリコプロテイン I (2GPI) とされる (Bas de Laet et al. *Clin Immunol* 2004)。現在、APS の診断検査基準に含まれる抗カルジオリピン抗体 (aCL 2GPI) は、ELISA プレートに固相化されたカルジオリピンと緩衝液中の 2GPI の複合体に対する自己抗体を測定する (Galli et al. *Lancet* 1990)。また同様に、検査基準に含まれる抗 2GPI 抗体 (a 2GPI) では、放射線照射で酸化処理した ELISA プレートに固相化された 2GPI に対する自己抗体を測定する方法が一般的であった (Amengual et al. *Br J Rheumatol* 1996)。

我々はこれまでに、日本人を対象とした前方視的研究において、aPL 陽性の妊婦では、妊娠高血圧症候群および早産などの産科合併症リスクが著しく増加することを報告した (Yamada et al. *J Reprod Immunol* 2009, 2010)。しかしながら、APS を疑う十分な臨床症状が存在するにも拘わらず、現在一般的な上記測定方法では aPL が検出されないために、APS と診断できない、いわゆる“血清学的陰性抗リン脂質抗体症候群: Seronegative antiphospholipid syndrome” が臨床的に大きな問題とされる (Hughes et al. *Ann Rheum Dis* 2003)。一方、APS の診断臨床基準に含まれる反復・習慣流産 (不育症) に関して、厚生労働省研究 (斉藤班、2010) に拠れば、不育症患者 527 人のうち、aPL がリスク因子であったのは 10.2% のみで、原因不明が 65.3% にも及ぶことが判明した。

荒瀬らは最近、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II 分子が、小胞体でペプチドに分解された抗原をヘルパー T 細胞に提示する従来とは異なった抗原提示機構を発見した (Jiang et al. *Int Immunol* 2013)。それは、MHC クラス II 分子がペプチドへの分解を免れたミスフォールド抗原蛋白を提示し、ミスフォールド抗原に特異的な B 細胞受容体を持つ B 細胞を直接、活性化する新しい抗原提示機構である。さらに、自己免疫疾患患者の血清中に、特定の MHC クラス II アレルに提示されたミスフォールド抗原蛋白に結合する自己抗体が存在することを発見し、自己免疫疾患の病態に関連することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、APS 患者で、特定の MHC ク

ラス II アレルに提示されたミスフォールド 2GPI を認識する自己抗体 (抗 2GPI/MHC クラス II 複合体抗体) の存在と特徴を解析し、APS 病態との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

倫理委員会の承認と同意を得て研究を遂行した。

(1) MHC クラス II 分子によるミスフォールド 2GPI の抗原提示効果を培養細胞で解析した。

(2) 患者血液中の抗 2GPI/MHC クラス II 複合体抗体の存在を証明する。流産組織や胎盤に対して免疫蛍光染色や in situ proximity-ligation assay で局在を調べた。

(3) スタンダード血清を設定し、ELISA 標準曲線による定量化法によって正常基準値 (99%ile) を決定する。健常人、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫疾患患者の血清を用い、抗 2GPI/MHC クラス II 複合体抗体価を測定する。前方視的に自己抗体が抗リン脂質抗体症候群の病態ならびに流産、早産、胎児発育不全、妊娠高血圧症候群など産科異常の発生に関連しているかを解析した。

4. 研究成果

(1) 2GPI、HLA-DR7 および GFP を共発現させた 293T 細胞は、2GPI 単独発現細胞とは異なり、細胞表面に 2GPI を発現していた。

(2) APS 患者より樹立した抗 2GPI mAb (EY2C9) は、2GPI/MHC クラス II (HLA-DR7) 複合体に良く結合し、2GPI 単独とは結合しない。この結合反応は、2GPI カルジオリピン複合体によりブロックされた。

(3) APS 患者血中に 2GPI/MHC クラス II 複合体に対する自己抗体が存在することを世界で初めて明らかにした。

2 回以上の流産ないし 1 回以上の死産の既往がある不育症女性 108 人を対象とした。流産歴無し、生産歴あり、抗リン脂質抗体 (aPL) 陰性、自己免疫疾患無しの女性 100 人をコントロールとした。コントロール女性の血清の 99%ile を基準値として、対象でネオセルフ抗体価を測定した。結果として、52.6 U/ml が基準値となった。不育症女性 108 人中、23 人 (21%) が、ネオセルフ抗体陽性であった。ネオセルフ抗体陽性であった不育症女性 23 人中、17 人 (74%) は、他の aPL も陰性であった。陽性 23 人中、9 人 (39%) が、不育症精査で原因/リスク因子が不明であった。また、原因/リスク因子不明 不育症 69 人中 12 人 (17%) でネオセルフ抗体が陽性であることが初めて明らかになった。

以上のことから、これまで原因/リスク因子不明とされていた不育症女性の 17% で陽性になったことから、a 2GPI/HLA-DR7 複合体抗体は、新たな不育症の原因である可能性が示された。前向きコホート研究や介入研究の

臨床試験によって、因果関係の決定が今後期待される。

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10件)

Maesawa Y, Yamada H, Deguchi M, Ebina Y. History of biochemical pregnancy was associated with the subsequent reproductive failure among women with recurrent spontaneous abortion. *Gynecol Endocrinol*, 査読あり, 31(4), 2015, 306-308

Yamada H, Deguchi M, Maesawa Y, Nakajima Y, Nishino Y, Tanimura K, Ebina Y. Medium-dose intravenous immunoglobulin therapy for women with six or more recurrent miscarriages. *J Reprod Immunol*, 査読あり, 109, 2015, 48-51

Tanimura K, Suenaga T, Jin H, Arase N, Hirayasu K, Kohyama M, Ebina Y, Yasuda S, Horita T, Katayama I, Lanier L.L, Atsumi T, Yamada H, Arase H. 2-glycoprotein I / HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood*, 査読あり, 125, 2015, 2835-2844

Ebina Y, Ieko M, Naito S, Kobashi G, Deguchi M, Minakami H, Atsumi T, Yamada H. Low levels of plasma protein S, protein C and coagulation factor XII during early pregnancy and adverse pregnancy outcome. *Thromb Haemost*, 査読あり, 114(1), 2015, 65-69

Shinozaki N, Ebina Y, Deguchi M, Tanimura K, Morizane M, Yamada H. Protein S deficiency complicated pregnancy in women with recurrent pregnancy loss. *Gynecol Endocrinol*, 査読あり, 32(8), 2016, 672-674

Ebina Y, Shimada S, Deguchi M, Maesawa Y, Iijima N, Yamada H. Divergence of helper, cytotoxic, and regulatory T cells in the decidua from miscarriage. *Am J Reprod Immunol*, 査読あり, 76(3), 2016, 199-204

Ebina E, Nishino Y, Deguchi M, Maesawa Y, Nakajima Y, Yamada H. Natural killer cell activity in women with recurrent miscarriage: Etiology and pregnancy outcome. *J Reprod Immunol*, 査読あり, 120, 2017, 42-47

Deguchi M, Yamada H, Sugiura-Ogasawara M, Morikawa M, Fujita D, Miki A, Makino S,

Murashima A. Factors associated with adverse pregnancy outcomes in women with antiphospholipid syndrome: A multicenter study. *J Reprod Immunol*, 査読あり, 122, 2017, 21-27

Deguchi M, Maesawa Y, Kubota S, Morizane M, Tanimura K, Ebina Y, Yamada H. Factors associated with adverse pregnancy outcomes in women with systematic lupus erythematosus, *J Reprod Immunol*, 査読あり, 125, 2017, 39-44,

Shimada S, Ebina Y, Iijima N, Deguchi M, Yamada H. Decidual CD68⁺HLA-DR⁺CD163⁺ M1 macrophages increase in miscarriages with normal fetal chromosome. *Am J Reprod Immunol*, 査読あり, 79, 2018, e12791. DOI: 10.1111/aji.12791

[学会発表](計6件)

山田秀人 プロテイン S, 抗リン脂質抗体と産科異常. 周産期医学特別講演会(特別講演), 2015年9月12日, アスペンホテル、札幌

山田秀人 不育症の最近: プロテイン S, 抗リン脂質抗体, 免疫グロブリン療法. 第2回東海生殖周産期研究会(特別講演), 2016年1月30日, 名古屋大学、名古屋

山田秀人 産科での抗リン脂質抗体と凝固因子測定の意義. 第17回日本検査血液学会学術集会(セミナー), 2016年8月6日, アクロス福岡、福岡

山田秀人 産科の最近: プロテイン S, 抗リン脂質抗体, 免疫グロブリン療法. 第6回京都周産期カンファレンス(特別講演), 2016年11月12日, 京都ホテル、京都

山田秀人 不育症の最近: 凝固と免疫異常. 新潟大学講演会(特別講演), 2018年2月1日, 新潟大学、新潟

山田秀人 不育症の最近: 凝固と免疫異常. NHK 生殖医療研究会(招請講演), 2018年3月14日, ホテルモンレー、大阪

[図書](計3件)

出口雅士, 谷村憲司, 山田秀人. 抗リン脂質抗体検査. 周産期医学必修知識第8版 第46巻増刊号, 東京医学社、東京、2017, 114-117

谷村憲司, 山田秀人. 甲状腺ホルモンと妊娠/不妊症/不育症 2) 不妊症. 甲状腺ホルモンと関連疾患. 日本甲状腺学会雑誌増大号, 日本甲状腺学会 60周年記念書籍(赤水尚史, 吉村 弘, 山田正信編), メディカルレビュー社, 東京, 2017, 85-99

山田秀人 . 流産 (習慣流産 ・ 不育症を含む) .
今日の治療指針 2018 年版 . 医学書院 . 東京 ,
2018 , 1325-1326

〔 産業財産権 〕
なし

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
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山田 秀人 (YAMADA , hideto)
神戸大学 ・ 大学院医学研究科 ・ 教授
研究者番号 : 4022039

(2) 研究分担者

出口 雅士 (DEGUCHI , masashi)
神戸大学 ・ 大学院医学研究科 ・ 特命教授
研究者番号 : 50403291

谷村 憲司 (TANIMURA , kenji)
神戸大学 ・ 医学部附属病院 ・ 講師
研究者番号 : 80593988

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし