

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：84408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670735

研究課題名(和文) 不育症に対する新規自己抗体探索プロテオミクス

研究課題名(英文) autoantibody-targeted proteomics for recurrent pregnancy loss

研究代表者

和田 芳直 (WADA, YOSHINAO)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・その他部局等・母性内科・医師

研究者番号：00250340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗トランスグルタミナーゼ2(TG2)抗体が不育症の原因となり得る可能性について調べた。自己免疫疾患81名の血清について、抗TG2-IgG抗体をELISAにより探索し、2名が抗TG2-IgG抗体陽性であった。TG2への結合はリコンビナントTG2を抗原とするウェスタンブロッティングにより確認した。うち1名は2回の流産を経験し、抗凝固療法は無効であった。原因不明の不育症患者12名からは抗TG2抗体陽性者は見つからなかった。以上から、抗TG2抗体は時に他の自己抗体と併存する場合のあることがわかった。抗TG2抗体が不育症の原因となるかどうかについて、さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility that anti-transglutaminase 2 (TG2) autoantibodies can be a cause of recurrent pregnancy loss. ELISA of anti-TG2-IgG antibodies searched on 83 sera of systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome found two patients to be positive. Binding to TG2 was confirmed by Western blotting using recombinant TG2 as an antigen. One of the patients had recurrent miscarriage which was unresponsive to anti-coagulation. Both patients had no celiac disease-like digestive symptoms. Twelve patients with recurrent pregnancy loss of unknown causes were anti-TG2 antibody negative. From these results, it was found that the anti-TG2 antibodies may be present in parallel with other autoantibodies. However, it was not possible to draw conclusions about the anti-TG2 antibody as a cause of recurrent pregnancy loss.

研究分野：医学

キーワード：不育症 自己抗体 トランスグルタミナーゼ

1. 研究開始当初の背景

反復する流産、死産、早期新生児死亡や繰り返す胎児発育不全の原因として染色体異常・子宮形態異常・内分泌異常・血液凝固異常・免疫異常・感染症などがあげられるが半数以上は原因不明である。原因を特定できない症例には有効な治療を実施できないか、エビデンスが希薄な治療を選択せざるを得ない状況である。

一方、自己抗体は不育症の原因となる場合がある。特に、全身性エリテマトーデス等の膠原病に見られる各種の抗リン脂質抗体は不育症の明確なリスク因子であるが、抗核抗体陽性等により自己免疫現象が推測されるものの抗リン脂質抗体を保有しない症例も多く、他の自己抗体が原因となっている症例が相当数あると推測されている。

抗リン脂質抗体陽性者における不育症(「産科的抗リン脂質抗体症候群」)については、エビデンスに基づいた治療や妊娠中の流産死産予防法が立てられているが、原因不明である場合には、不十分なエビデンスをもとにした抗凝固療法や抗血小板療法が行われているのが現状である。

2. 研究の目的

自己抗体にフォーカスして、抗リン脂質抗体に続く不育症の原因探索を行うため、本研究では、不育症の原因となり得る可能性のある自己抗体として抗トランスグルタミナーゼ2抗体(抗TG2抗体)を取り上げた。

TG2は組織トランスグルタミナーゼとも呼ばれ、タンパク質同士の架橋やグルタミンからグルタミン酸への変換(脱アミド化反応)を触媒する機能をもつ酵素であり、多くの組織においてユビキタスに発現している。TG2に対する自己抗体は、小麦のグリアジンに代表されるプロラミン類タンパク質へのアレルギーによっておこる腸疾患セリアック病患者の大多数にみられることが知られているが、セリアック病女性には、反復流産、胎児発育遅延、早産の頻度が高いことが報告され[1]、抗TG2抗体がこれらの妊娠合併症に関わるという臨床的・基礎的研究結果も報告されている[2,3]。

TG2が胎盤絨毛上皮からのマイクロパーティクル(おそらくエキソゾーム)放出に関わるという組織細胞生物学的な報告があり[4]、また、本研究代表者らは絨毛表面を覆うトロホプラスト細胞の分化過程におこる細胞融合にはグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素GAPDHの翻訳後修飾が必要で、その修飾反応の実体はTG2が触媒する脱アミド化であることを報告した[5]。

これらの知見をもとに、TG2に対する自己抗体がTG2機能を障害することで胎盤の機能や正常な胎盤形成を障害することにより不育症を惹起するのではないかと仮説を立てた。そして、原因不明の不育症患者の中に抗TG2抗体陽性者を見出すことで、不育

症のリスク評価ができるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

まず、不育症患者における抗TG2抗体保有率を調べるために必要な倫理承認(#741)を得た。

研究期間中に受診する不育症患者数は多くないため、まずは、匿名化保存された自己免疫疾患患者(すべて妊娠可能年齢女性)血清を試料とし、INOVA社のQUANTA lite Rh-tTG IgGおよびIgA ELISAキットにより抗TG2抗体を測定して、自己免疫疾患患者における抗TG2抗体保有状況をみるパイロットスタディを行った。

上で同定した抗TG2抗体陽性者の血清IgGがTG2(研究室において大腸菌で作製したリコンビナント蛋白)に結合することをウェスタンブロット法で確認した。

また、原因不明の不育症における抗TG2抗体陽性頻度を調べるために、上記ELISAキットを用いて不育症患者の血清をスクリーニングした。

4. 研究成果

全身性エリテマトーデスあるいはSSA抗体陽性者(シェーグレン症候群)83名の血清について抗TG2-IgG抗体をELISAにより探索したところ、2名がIgG抗体陽性であった(表)。TG2-IgA抗体の陽性者はなかった。

表. 抗TG2抗体ELISA結果

(単位: AU)

1.362±1.099 (mean ± SD)

分布: 0.6-7.3 (n=83)

発見された陽性者の検査値: 6.0, 7.3

判定: 弱陽性>6.0、陽性>9.0

ELISAが実際に抗TG2抗体を検出しているかについて、自家にて作成したリコンビナントTG2を抗原とするウェスタンブロットイングにより確認したところ、対照に比して有意にTG2への結合が見られ、この患者には抗TG2抗体を保有することが確かめられた(図)。また、この結果は、本研究で用いたELISAが有効であることも示していた。

臨床的には、陽性者2名のうち1名は流産歴がなく、無治療にて生児を得た。もう1名は1回の自然流産後の妊娠で抗凝固療法を行ったが、流産(胎児死亡)となった。いずれの患者にもセリアック病様の消化器症状の病歴はなかった。

原因不明の不育症患者12名からは抗TG2抗体陽性者は見つからなかった。

以上の結果から、抗TG2抗体は時に他の自己抗体と並立して存在する場合があるこ

とがわかった。抗 TG2 抗体が不育症の原因となることについて結論を得ることはできなかったが、他の自己抗体があり、かつ、抗凝固療法などが奏功しない不育症患者について、さらに検討すべきと考えられた。

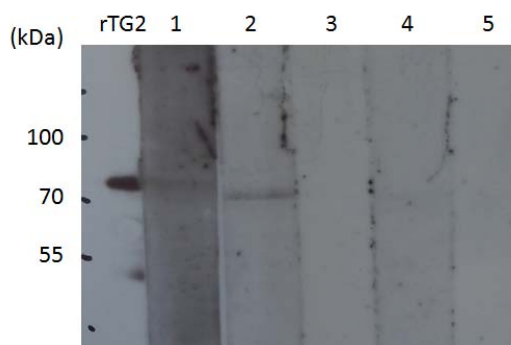


図. 患者血清に検出された抗 TG2-IgG 抗体 (ウェスタンブロッティング)

リコンビナント TG2 を各レーンに電気泳動(SDS-PAGE)し、PVDF 膜に転写した後、各レーンを短冊状に切り取り、患者血清とインキュベートし、抗ヒト IgG 抗体により検出した。

lane-2 が ELISA で陽性の患者血清

#### <引用文献>

- ① Tersigni C. et al. Hum Reprod Update. 2014; 20(4): 582-593.
- ② Sónora C. et al. Am J Reprod Immunol. 2014; 72(5): 485-495.
- ③ Di Simone N. Am J Gastroenterol. 2010; 105(10): 2254-2261.
- ④ Robinson et al. Biol Reprod. 2007; 77(4): 648-657.
- ⑤ Iwai et al. J Biol Chem. 2014; 289(8): 4989-4999.

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yamamoto S, Wada Y. Awareness, use and information sources of folic acid supplementation to prevent neural tube defects in pregnant Japanese women. Public Health Nutr 2018; 21(4): 732-739.  
doi: 10.1017/S1368980017003172
- ② Wada Y, Yoshida-Yamamoto S, Wada Y, Nakayama M, Mitsuda N, Kitajima H. Trans fatty acid accumulation in the human placenta. J Mass Spectrom 2017; 52: 139-143.  
doi: 10.1002/jms.3910
- ③ Miyasato-Isoda M, Waguri M, Yamada Y, Miyano A, Wada Y. Anti-Ro52

antibody level is an important marker of fetal congenital heart block risk in anti-Ro/SSA antibody positive pregnancy. Mod Rheumatol. 2017; 21:1-7.

doi: 10.1080/14397595.2017.1374235

- ④ 和田芳直, 宮里 (磯田) 舞, 山田佑子, 宮野章, 和栗雅子. 母体の抗 Ro/SSA 抗体による胎児心房室ブロックのリスク評価と予防. 大阪母子医療センター雑誌. 2017; 33(1,2): 1-7

##### [学会発表] (計 4 件)

- ① 和田芳直, 大門江津子. ループスアンチコアグラント陽性者における抗トランスグルタミナーゼ抗体. 第 1 回日本母性内科学会学術集会 2016.7.30
- ② 和田芳直, 大門江津子. 妊娠高血圧の 1 症例におけるアンギオテンシン II AT1 受容体抗体の産後推移. 第 1 回日本母性内科学会学術集会 2016.7.30
- ③ 和田芳直, 平野慎也. 全身性カルニチン欠乏症妊婦の内科管理. 第 114 回日本内科学会講演会 2017.4.15
- ④ 和田芳直, 山本周美. わが国における妊娠前からの葉酸サプリメント服用の現状: 一施設におけるアンケート調査. 第 2 回日本母性内科学会学術集会 2017.6.24

##### [図書] (計 1 件)

- ① 和田芳直. コラム: 葉酸とサプリメント. こどもの心と体の成長・発達によい食事. 金芳堂, 2016. 18

##### [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  
<https://www.mch.pref.osaka.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 芳直 (WADA, Yoshinao)  
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪  
母子医療センター・医師  
研究者番号：00250340

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )