

令和元年6月17日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11100

研究課題名(和文) 不育症における非侵襲的着床期子宮内膜機能臨床検査法と新規関連バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Clinical significance of MMPs and TIMPs in pathogenesis of patients with recurrent pregnancy loss

研究代表者

尾崎 康彦(Ozaki, Yasuhiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50254280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：MMP-2およびMMP-9の血漿中濃度について検討した。反復流産病態の抗リン脂質抗体陽性患者と陰性患者より非妊娠時に採血を行った。対照群として出産歴があり流産歴のない女性を用いた。ELISA法により濃度測定を行った。MMP-2は対照群と反復流産群で有意差はなかったが、反復流産群を抗リン脂質抗体陽性群と陰性群とに分けて検討したところ、対照群に比べて陰性群で有意に低い結果となった。MMP-9は対照群と比べ反復流産群で有意に高い結果となった。対照群に比べて抗リン脂質抗体陽性群、陰性群ともに有意に高い結果となった。MMP-2、MMP-9が原因不明反復流産病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不育症の約25%が原因不明であり、我々はそれらにおけるプロテアーゼの関与を検討してきた。今回の検討より、妊娠初期の脱落膜組織におけるMMP-2の発現の低下が間質における絨毛の浸潤不全を介して流産を惹起している可能性が考えられた。また好中球の活性化によるMMP-9の増加が好中球エラスターゼやカテプシンGの活性化を制御して感染性の流産病態を惹起している可能性があると思われた。また非侵襲的な不育症(流産)の予知マーカーとして、子宮頸管粘液中のMMPやTIMPの応用できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of MMPs and TIMPs in recurrent pregnancy loss (RPL). The expression of MMP-2 in decidua with normal chromosome group (NC) was significantly lower than in abnormal chromosome group (AC). And the expression of MMP-9 in decidua with NC is significantly higher than in AC. The staining of MMP-2 and TIMP-2 were observed in stromal cells and in cytoplasm of only AC. MMP-9 and TIMP-1 were observed in stromal cells. Concentration of MMP-2 in plasma with APS(-) (n=10) was significantly lower than in control and MMP-9 in patients was significantly higher than control. Concentration of TIMP-1 in plasma with APS(-) was significantly lower than APS(+). The ratio of MMP9/TIMP1 in plasma with patient was significantly higher than control and ratio of MMP2/TIMP2 in APS(-) group was significantly lower than APS(+). These results suggested that MMPs and TIMPs play an important role in pathogenesis of RPL and that they can be one of the predictive factors in patients with RPL.

研究分野：医師薬学

キーワード：不育症 習慣流産 プロテアーゼ MMP TIMP 脱落膜 頸管粘液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

Matrix metalloproteinase (以下 MMP) は、ヒト生殖において妊娠初期の維持機構や胎盤形成に重要であることが報告されている。MMP-2 及び MMP-9 は主に IV 型コラーゲンからなる基底膜を分解するため、妊娠初期の着床現象において栄養膜細胞の浸潤に深く関与している。

また MMP に対する内因性の阻害因子として Tissue inhibitor of metalloproteinase (以下 TIMP) が存在しており TIMP-1 は MMP-9 前駆体や活性型 MMP と複合体を形成し MMP 活性を制御している。また TIMP-2 は MMP-2 前駆体や活性型 MMP と複合体を形成し、その活性および MMP-2 の自己分解を抑制している。

#### 2. 研究の目的

今回我々は不育症病態における主要なプロテアーゼである MMP 及び TIMP ファミリーの存在と意義について検討したので報告する。

#### 3. 研究の方法

本研究は名古屋市立大学病院臨床研究倫理委員会の承認を受けている。当院で管理された不育症患者を対象にした。

インフォームドコンセントのもとに ELISA 法にて妊娠初期の子宮頸管粘液中の MMP-2 及び MMP-9 を測定し妊娠帰結との関連を検討した。

流産手術時に採取した組織を絨毛組織および脱落膜組織に分離し、各々における MMP-2、MMP-9、TIMP-1 と TIMP-2 の存在を SDS-PAGE・ウエスタンブロット法と免疫組織染色法で確認した。

流産胎児染色体異常群と正常群の MMP-2、MMP-9、TIMP-1 と TIMP-2 の絨毛組織および脱落膜組織における発現量を ELISA 法で定量し比較検討した。

さらに ELISA 法にて妊娠初期の子宮頸管粘液中の MMP-2 及び MMP-9 の発現と妊娠帰結との関連を検討した。

流産絨毛染色体検査は G バンド分染法を用いた。

#### 4. 研究成果

SDS-PAGE・ウエスタンブロット法で流産組織の脱落膜組織と絨毛組織に抗 MMP-2 抗体、抗 MMP-9 抗体、抗 TIMP-1 抗体と抗 TIMP-2 抗体の反応性が観察された。

免疫組織染色法では流産組織の脱落膜組織と絨毛組織の細胞質に抗 MMP-2 抗体、抗 MMP-9 抗体、抗 TIMP-1 抗体と抗 TIMP-2 抗体の染色性が観察された。絨毛染色体検査正常群と異常群との間に染色性パターンの有意な差は認められなかった。

子宮頸管粘液における MMP-2 の発現は、流産群 (n=19) と生児獲得群 (n=18) とでは有意差は認めなかった。同様に MMP-9 の発現も流産群 (n=20) と生児獲得群 (n=19) では有意差は認めなかった。

ELISA 法では絨毛組織においては MMP-2 及び MMP-9 の発現は絨毛染色体検査正常群 (n=7) と異常群 (n=10) で有意差は認めなかった。

しかしながら、脱落膜組織においては絨毛染色体検査正常群 (n=7) では異常群 (n=10) より MMP-9 の発現は有意に高く ( $p < 0.05$ )、MMP-2 の発現は有意に低かった ( $p < 0.05$ )。

今回の検討より、妊娠初期の脱落膜組織における MMP-2 の発現の低下が間質における絨毛の浸潤不全を介して流産を惹起している可能性が考えられた。

また好中球の活性化によるMMP-9の増加が好中球エラスターゼやカテプシンGの活性化を制御して感染性の流産病態を惹起している可能性があると思われた。

妊娠初期脱落膜組織におけるMMP-2及びMMP-9が原因不明の不育症病態に關与している事が示唆された。

今後、不育症病態における本プロテアーゼの診断的意義の可能性や、プロテアーゼインヒビターの治療薬としての応用を検討していく。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- 1, Kawakubo-Yasukochi T, Morioka M, Ohe K, Yasukochi A, Ozaki Y, Hazekawa M, Nishinakagawa T, Ono K, Nakamura S, Nakashima M. J Dev Orig Health Dis. 2019 May 27;1-9. doi: 10.1017/S2040174419000217. (査読有り)
- 2, Danaparoid is effective and safe for patients with obstetric antiphospholipid syndrome. Yoshihara H, Sugiura-Ogasawara M, Kitaori T, Katano K, Ozaki Y. Mod Rheumatol. 2019 Mar 29;1-6.doi:10.1080/14397595.2019.1602241. (査読有り)
- 3, Failure to improve after ovarian resection could be a marker of recurrent ovarian teratoma in anti-NMDAR encephalitis: a case report. Uchida Y, Kato D, Yamashita Y, Ozaki Y, Matsukawa N. Neuropsychiatr Dis Treat. 2018 Jan 22;14:339-342. doi: 10.2147/NDT.S156603. eCollection 2018. (査読有り)
- 4, Clinical utility of decorin in follicular fluid as a biomarker of oocyte potential. Sawada Y, Sato T, Saito C, Ozawa F, Ozaki Y, Sugiura-Ogasawara M. Reprod Biol. 2018 Mar;18(1):33-39. doi: 10.1016/j.repbio.2017.12.001. Epub 2017 Dec 8. (査読有り)
- 5, The first genome-wide association study identifying new susceptibility loci for obstetric antiphospholipid syndrome. Sugiura-Ogasawara M, Omae Y, Kawashima M, Toyo-Oka L, Khor SS, Sawai H, Horita T, Atsumi T, Murashima A, Fujita D, Fujita T, Morimoto S, Morishita E, Katsuragi S, Kitaori T, Katano K, Ozaki Y, Tokunaga K. J Hum Genet. 2017 Sep;62(9):831-838. doi: 10.1038/jhg.2017.46. Epub 2017 Apr 20. (査読有り)
- 6, Genotyping analysis of protein S-Tokushima (K196E) and the involvement of protein S antigen and activity in patients with recurrent pregnancy loss. Matsukawa Y, Asano E, Tsuda T, Kuma H, Kitaori T, Katano K, Ozaki Y, Sugiura-Ogasawara M. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2017 Apr;211:90-97. doi: 10.1016/j.ejogrb.2017.01.056. Epub 2017 Feb 8. (査読有り)
- 7, Urinary sex steroid hormone and placental leucine aminopeptidase concentration differences between live births and stillbirth of Bornean orangutans (*Pongo pygmaeus*). Kinoshita K, Sano Y, Takai A, Shimizu M, Kobayashi T, Ouchi A, Kuze N, Inoue-Murayama M, Idani G, Okamoto M, Ozaki Y. J Med Primatol. 2017 Feb;46(1):3-8. doi: 10.1111/jmp.12249. Epub 2016 Nov 17. (査読有り)
- 8, Genotyping analysis of the factor V Nara mutation, Hong Kong mutation, and 16 single-nucleotide polymorphisms, including the R2 haplotype, and the involvement of factor V activity in patients with recurrent miscarriage. Izuhara M, Shinozawa K, Kitaori T, Katano K, Ozaki Y, Fukutake K, Sugiura-Ogasawara M. Blood Coagul Fibrinolysis. 2017 Jun;28(4):323-328. doi: 10.1097/MBC.0000000000000598. (査読有り)

9, Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tryptophan 2,3-Dioxygenase in Patients with Recurrent Miscarriage. Obayashi Y, Ozaki Y, Goto S, Obayashi S, Suzumori N, Ohyama F, Tone S, Sugiura-Ogasawara M. Am J Reprod Immunol. 2016 Jan;75(1):69-77. doi: 10.1111/aji.12434. Epub 2015 Oct 29. (査読有り)

10, 切迫早産の新しい概念と管理法、子宮頸管ペッサリーによる切迫早産治療法、尾崎康彦、日本産科婦人科学会雑誌 (Acta Obst Gynaec Jpn) Vol.70, No.11, 2213-2217, 2018 (査読無し)

11, 尾崎康彦、清田朋美、梅本幸裕、杉浦真弓、ヒト精子の受精能獲得におけるカルパインの役割 (Role of Calpain in Human Sperm). Reproductive Immunology and Biology, Vol.33, No.1, Nov. p1-p9, 2018 (査読無し)

〔学会発表〕(計3件)

- 1、 第23回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2018年8月3-4日、甲府、山梨  
反復流産病態におけるMMP-2およびMMP-9値の臨床的意義の検討、小澤史子、森亮介、  
大林勇輝、後藤志信、北折珠央、杉浦真弓、尾崎康彦
- 2、 第70回日本産科婦人科学会学術講演会、2018年5月10-13日、仙台(宮城)  
(1) 一般講演(ポスター): 不育症病態における酸化ストレス度と抗酸化力の役割と意義、  
尾崎康彦、後藤志信、井出祥子、小澤史子、北折珠央、杉浦真弓  
(2) 生涯研修プログラム2: 切迫早産の新しい概念と管理法、子宮頸管ペッサリーにより  
切迫早産治療法、尾崎康彦

〔図書〕(計1件)

1、尾崎康彦、杉浦真弓: 実践臨床生殖免疫学、3. 具体的な治療法の選択と注意点 アスピリン(p332-p335) ヘパリン(p336-p340) ステロイド(p341-p344) 柴原浩章編著、中外医学社、2018年

〔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:  
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:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

- 1、名古屋市立大学大学院医学研究科・医学部・不育症研究センター

[http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/news/rc\\_recurrent\\_pregnancy\\_loss.html](http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/news/rc_recurrent_pregnancy_loss.html)

2、名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科学

<https://w3hosp.med.nagoya-cu.ac.jp/section/department/sanfujinka/>

3、名古屋市立大学病院臨床シミュレーションセンター

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/simncu/>

4、日本病態プロテアーゼ学会

<http://jspp.kenkyuukai.jp/about/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：後藤志信

ローマ字氏名：Goto Shinobu

研究協力者氏名：杉浦真弓

ローマ字氏名：Sugiura Mayumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。