

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592479

研究課題名(和文)着床期子宮内膜血流量の新規評価法の確立及び不育症の原因解明と治療効果判定への応用

研究課題名(英文)Role of cathepsin E in patients with recurrent miscarriage

研究代表者

尾崎 康彦(Ozaki, Yasuhiko)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50254280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Cathepsin E (Cat E) 活性が血清中及び頸管粘液中で検出され、頸管粘液中のCat E活性は生児獲得群に対し流産群で有意に低値であった。流産手術時に得られた脱落膜組織中のCat Eの発現量は対照群に対し反復流産患者では有意に低値であった。蛍光多重免疫組織染色法では脱落膜細胞に染色性を認め、CD14陽性細胞、CD68陽性細胞との染色性の一致が観察された。脱落膜中マクロファージにおいてCat Eが検出され、IFN- $\gamma$ 、LPS刺激にて発現量は有意に時間依存性に低値となった。

The results suggested that activity of Cat E produced by decidual macrophages plays an important role in the mechanism of early pregnancy.

研究成果の概要(英文)：We investigated the existence and contribution of cathepsin E (Cat E) in early pregnancy of patients with recurrent miscarriage. With informed consent, sera, cervical mucous, decidua and villi were surgically collected from patients with recurrent miscarriage. An activity of Cat E was detected in sera and cervical mucous. The Cat E activity in cervical mucous of patients with spontaneous miscarriages was lower than that of successful pregnancy. By immunohistochemistry, the staining of Cat E was detected in the cytoplasm of stromal and epithelial cells in decidua and villi. In decidua, the staining of Cat E was observed in CD14 positive cells and CD68 positive cells. Western blot analysis showed Cat E expression in decidual macrophages. By addition of LPS and IFN- $\gamma$ , Cat E expression in cell lysate of decidual macrophages was decreased.

The results suggested that activity of Cat E produced by decidual macrophages plays an important role in the mechanism of early pregnancy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：不育症 習慣流産 カテプシン プロテアーゼ マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

不育症とは妊娠はするものの流産や死産を繰り返し児を得られない状態と定義され、厚生労働省研究班の調査では妊娠経験者の4.2%で発生し140万人の存在が推計されると報告されている。検査によって抗リン脂質抗体症候群、夫婦の染色体異常、内分泌学的異常や子宮奇形などがみつかることがあるが、約70%には夫婦それぞれに原因が見つからず、その多くが胎児の染色体異常であることを我々は報告してきたが、残りの25%は未だ原因不明である。

我々はこれまでの検討で様々cathepsin群とそのインヒビターであるcystatinが不育症病態において重要な役割を果たしていることを報告してきた。一方、アスパラギン酸プロテアーゼであるcathepsin Eはアレルギーなどの免疫反応や腫瘍の増殖・転移に関与しており癌病態においてcathepsin Eは血管新生抑制因子であるendostatinや癌細胞特異的アポトーシス誘導因子であるTRAILを産生し、腫瘍の増殖、転移を抑制している。

## 2. 研究の目的

今回我々は生殖免疫と腫瘍免疫との類似性を考慮し不育症病態におけるcathepsin Eの役割を検討した。

## 3. 研究の方法

Cathepsin Eノックアウトマウスの産仔数を検討し、非妊娠時の子宮の病理学的検討を行った。KYS-1 (cathepsin E特異的消光性蛍光基質)を用いたプロテアーゼ活性測定法を確立し、反復流産患者(n=21)の妊娠初期頸管粘液中のcathepsin E活性とその後の妊娠帰結とを比較検討した。流産手術時に得られた子宮内容組織におけるcathepsin Eの存在をウェスタンブロット法で検討し、不育症患者(n=49)と対照群(n=24)とで半定量比較した。共焦点レーザー顕微鏡、蛍光顕微鏡を用いた蛍光多重

免疫組織染色法で子宮内容組織におけるcathepsin Eの局在を検討した。

不育症患者の流産手術時に得られた脱落膜組織よりマクロファージを抽出し、IFN- $\gamma$  (100 U/ml)、LPS (1mg/ml)と共に培養し、cathepsin Eの発現をウェスタンブロット法にて検討した。

上記の臨床検体は全て患者同意のもとに実験に供した。

## 4. 研究成果

Cathepsin Eノックアウトマウスの平均産仔数はwild typeと比較して有意に減少がみられた( $p < 0.001$ )。また非妊娠時子宮には腫瘍が形成されており、病理学的には子宮内膜間質に形成された肉芽腫であった。

不育症患者の妊娠初期頸管粘液中にcathepsin E活性が検出された。頸管粘液中のcathepsin E活性は生児獲得群( $0.2040 \pm 0.22$ , n=10)に対し流産群( $0.0995 \pm 0.06$ , n=11)で有意に低値であった( $p < 0.01$ )。

流産手術時に得られた脱落膜組織中のcathepsin Eの発現量は対照群( $84.51 \pm 8.69$ )に対し反復流産患者( $97.86 \pm 18.42$ )では有意に低値であった( $p < 0.05$ )。

蛍光多重免疫組織染色法では脱落膜細胞に染色性を認め、CD14陽性細胞、CD68陽性細胞との染色性の一致が観察された。

cathepsin EはCD14陽性細胞の細胞質に顆粒状に局在が見られた。

脱落膜より抽出したマクロファージにおいてcathepsin E発現が検出され、IFN- $\gamma$ 、LPS刺激にて発現量は有意に減少がみられた。

今回我々は妊娠初期のヒト子宮におけるcathepsin Eの存在及び活性化状態を初めて明らかにした。妊娠初期脱落膜中のマクロファージなどの免疫担当細胞が産生するcathepsin Eの活性低下が反復流産病態において重要な役割をしていると考えられた。

妊娠初期の頸管粘液中のプロテアーゼ活性は脱落膜中の状態を反映していると考えられ、頸管粘液中の cathepsin E 活性がその後の妊娠の予後因子になりうる。また、流産病態における cathepsin E に関連するマクロファージの活性化機構に対して、抗炎症反応に関連する治療法が応用される可能性がある。

#### 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)

1, Asano E, Ebara T, Yamada-Namikawa C, Kitaori T, Suzumori N, Katano K, Ozaki Y, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. Genotyping Analysis for the 46 C/T Polymorphism of Coagulation Factor XII and the Involvement of Factor XII Activity in Patients with Recurrent Pregnancy Loss. PLoS One.9;9(12).2014. doi: 10.1371/journal.pone.0114452. eCollection 2014. (査読有り)

2, Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N. Management of recurrent miscarriage. J Obstet Gynaecol Res. May;40(5):1174-9.2014. doi:10.1111/jog.12388. PMID: 24754846. (査読有り)

3, Oseto K, Suzumori N, Nishikawa R, Nishikawa H, Arakawa A, Ozaki Y, Asai H, Kawai M, Mizuno K, Takahashi S, Shirai T, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Kajiyama H, Kikkawa F, Sugiura-Ogasawara M. Mutational analysis of FOXL2 p.C134W and expression of bone morphogenetic protein 2 in Japanese patients with granulosa cell tumor of ovary. J Obstet Gynaecol Res. May;40(5):1197-204. 2014. doi: 10.1111/jog.12324. Epub 2014 Apr 2. PMID:24689977. (査読有り)

4, Goto S, Ozaki Y, Suzumori N, Yasukochi A, Kawakubo T, Furuno T, Nakanishi M, Yamamoto K, Sugiura-Ogasawara M. Role of cathepsin E in decidual macrophage of patients with recurrent miscarriage. Mol Hum Reprod. May;20(5):454-62. 2014. doi:10.1093/molehr/gau008. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24464956. (査読有り)

5, Kawakubo T, Yasukochi A, Toyama T, Takahashi S, Okamoto K, Tsukuba T, Nakamura S, Ozaki Y, Nishigaki K, Yamashita H, Yamamoto K. Repression of cathepsin E expression increases the risk of mammary carcinogenesis and links to poor prognosis in breast cancer. Carcinogenesis. Mar;35(3):714-26.2014. doi: 10.1093/carcin/bgt373. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24242330. (査読有り)

6, Katano K, Suzuki S, Ozaki Y, Suzumori N, Kitaori T, Sugiura-Ogasawara M. Peripheral natural killer cell activity as a predictor of recurrent pregnancy loss: a large cohort study. Fertil Steril.100(6):1629-34. 2013. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.1996. Epub 2013 Sep 4. PMID: 24012195. (査読有り)

7, Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N. Müllerian anomalies and recurrent miscarriage. Curr Opin Obstet Gynecol. Aug;25(4):293-8. 2013. doi: 10.1097/GCO.0b013e3283632849. Review. PMID: 23812381. (査読有り)

8, Goto S, Suzumori N, Obayashi S, Ozaki Y, Sugiura-Ogasawara M. Two cases of prenatally diagnosed sacrococcygeal teratoma type I with different clinical

features. *Congenit Anom (Kyoto)*. Jun;53(2):92-4. 2013.doi: 10.1111/j.1741-4520.2012.00369.x.PMID:23751044.

( 査読有り )

9, Sugiura-Ogasawara M, Suzuki S, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T. Frequency of recurrent spontaneous abortion and its influence on further marital relationship and illness: the Okazaki Cohort Study in Japan. *J Obstet Gynaecol Res*. Jan;39(1):126-31. 2013. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01973.x.Epub 2012 Aug 13.PMID:22889462. ( 査読有り )

10, Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. Aug;27(8):2297-303. 2012. doi: 10.1093/humrep/des179. Epub 2012 May 31. PMID:22661547. ( 査読有り )

[学会発表](計 13 件)

1, Shinobu Goto, Yasuhiko Ozaki, Satomi Kurakane, Yuki Obayashi, Kyoko Kumagai, Tamao Kitaori, Nobuhiro Suzumori, Mayumi Sugiura-Ogasawara.: Role of calpain in human placenta of patients with fetal growth restriction. The 46<sup>th</sup> International Congress on Pathophysiology of Pregnancy and The 35<sup>th</sup> Meeting of Japan Society for the Study of Hypertension in Pregnancy. Sept. 18-20, 2014, 京王プラザ(東京都、新宿区)

2, Tamao Kitaori, Mari Izuhara, Eriko Hashimoto, Yuko Hayashi, Kinue Katano, Yasuhiko Ozaki, Mayumi Sugiura-Ogasawara.: Determination of clinically significant tests for

antiphospholipid antibodies and cutoff levels for obstetric antiphospholipid syndrome. The 46<sup>th</sup> International Congress on Pathophysiology of Pregnancy and The 35<sup>th</sup> Meeting of Japan Society for the Study of Hypertension in Pregnancy. Sept. 18-20, 2014, 京王プラザ(東京都、新宿区)

3, Ozaki Y, Goto S, Obayashi Y, Kumagai K, Kitaori T, Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M.: Role of Cathepsins and Cystatins in Pathogenesis of Recurrent Miscarriage. XIV Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, 2014.9.5-10. (invited) Portorož (Slovenia)

4, Yuki Obayashi, Yasuhiko Ozaki, Shinobu Goto, Shintaro Obayashi, Kyoko Kumagai, Tamao Kitaori, Mayumi Sugiura. : Role of Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 with Recurrent Miscarriage. XIV Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, 2014.9.5-10. Portorož (Slovenia)

5, Shinobu Goto, Yasuhiko Ozaki, Satomi Kurakane, Yuki Obayashi, Kyoko Kumagai, Tamao Kitaori, Nobuhiro Suzumori, Mayumi Sugiura-Ogasawara.: Role of calpain in human placenta of patients with fetal growth restriction. XIV Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, 2014.9.5-10. Portorož (Slovenia)

6, Tamao Kitaori, Eriko Hashimoto, Mayumi Sugiura-Ogasawara, Kenji Oku, Wolfgang Papisch, Yasuhiko Ozaki, Kinue Katano, Tatsuya Atsumi.: Determination

of clinically significant tests for antiphospholipid antibodies and cutoff levels for obstetric antiphospholipid syndrome. Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology, June 29 - July 2, 2014. Munich (Germany)

7, Kinue Katano, Sadao Suzuki, Yasuhiko Ozaki, Nobuhiro Suzumori, Tamao Kitaori, Mayumi Sugiura-Ogasawara.: Peripheral natural killer cell activity as a predictor of recurrent miscarriage. large cohort study, The Conjoint Meeting of the International Federation of Fertility Societies and the American Society for Reproduction Medicine, Oct.12-17,2013. Boston (USA)

8, Sugiura-Ogasawara M, Kitaori T, Ozaki Y, Katano K, Atsumi T.: Trial for standardization of the measurement for antiphospholipid antibodies in recurrent pregnancy loss. 14th International congress on Antiphospholipid antibodies. Sept.18-21, 2013. Rio de Janeiro (Brasil)

9, Hayashi Y, Suzumori N, Mizutani E, Kitatori T, Katano K, Ozaki Y, Sugiura-Ogasawara M.: Analysis of polymorphisms in Annexin A5 gene in women with recurrent pregnancy loss. The ESHRE 29th Annual Meeting, July 7-10, 2013. London (UK)

10, Shinobu Goto, Yasuhiko Ozaki, Atsushi Yasukochi, Tomoyo Kawakubo, Mayumi Sugiura, Kenji Yamamoto.: Role of cathepsin E in decidual macrophage of patients with recurrent miscarriage. XIIIth International Symposium on Proteinases, Inhibitors And

Biological Control, Sept.22-26, 2012. Portorož (Slovenia)

11, Yasuhiko Ozaki, Shinobu Goto, Keisuke Goto, Eita Mizutani, Nobuhiro Suzumori, Mayumi Sugiura-Ogasawara.: Symposium, Alzheimer, clinics, calpains, ..., Calpain in human reproduction: role of calpain in human placenta of patients with intrauterine growth restriction. XIIIth International Symposium on Proteinases, Inhibitors And Biological Control, Sept.22-26, 2012, Portorož. (Slovenia) (invited)

12, Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Kitaori T.: Antiphospholipid antibody syndrome in recurrent miscarriage. 4<sup>th</sup> Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction. Aug.31-Sept.2, 2012.大阪インターナショナルコンベンションセンター(大阪府、大阪市)

13, Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E.: Abnormal embryonic karyotype as the most frequent cause in patients with recurrent miscarriage. 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE, July 1-4, 2012. Istanbul (Turkey)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://fuiku.jp/>  
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/obgyne.dir/index.html>

6. 研究組織  
(1) 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・准教授  
研究者番号: 50254280