

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20168

研究課題名(和文) 不育症に対する新たな治療～骨髄由来血管内皮前駆細胞による血管再生と新規抗血栓薬～

研究課題名(英文) The new therapy of loss of pregnancy ~ Endothelial progenitor cells for vascular medicine and recombinant human soluble thrombomodulin

研究代表者

藤田 太輔 (Fujita, Daisuke)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90411371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換え型ヒトロンボモジュリン(r-TM)による抗凝固療法は、胎盤のフィブリノゲン沈着を減少させ、また発現を増加させる血管因子があることが明らかになった。この作用により流産/妊娠高血圧腎症モデルマウスにおいて流産および胎児発育不全を改善させることが明らかとなった。r-TMは胎盤形成不全によって引き起こされる妊娠高血圧腎症の病態をも改善させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recombinant human Thrombomodulin(r-TM) as an anticoagulation therapy has the potential for the medical treatment of recurrent miscarriage and fetal growth restriction due to improved angiogenic factors. Additionally, r-TM treatment has the potential for the recovery of preeclampsia.

研究分野：周産期、不育症

キーワード：不育症 遺伝子組換え型ヒトロンボモジュリン製剤 リコモジュリン 抗凝固療法 sFlt-1 preeclampsia 妊娠高血圧腎症 習慣性流産

1. 研究開始当初の背景

妊娠が成立しても流産・死産を繰り返す不育症は、毎年本邦で約3万人が発症している。不育症の要因としては、夫婦の染色体異常、子宮形態異常、甲状腺機能等の内分泌異常、抗リン脂質抗体症候群、のように原因のはっきりしている場合もあるが、不育症患者の約60%は原因不明であり、治療には苦慮することが多い。

近年、原因不明不育症において、流産絨毛病理組織検体にみられる絨毛間腔への広範囲のフィブリン沈着 massive perivillous fibrin deposition (MPFD) が注目されており、我々の所有する妊娠初期流産絨毛の病理検体においても、絨毛間腔に広範囲にフィブリン沈着を認めている。原因不明不育症における MPFD と過凝固状態の関与が最近示唆されており、血管新生促進因子と抗血管新生因子の不均衡が流産の原因および予測因子となりうることが報告された。また、以前より、凝固阻止因子の欠乏による血栓性素因と流産との関連は示唆されており、不育症患者に対して本邦では抗血小板療法であるアスピリンや、抗凝固療法であるヘパリンを用いた治療がおこなわれている。しかし欧米におけるランダム化比較臨床試験では、これらの治療による流産率の改善は認めなかったと報告されている。したがって原因不明不育症の病態解明と有効な治療法の新たな確立が求められている。

トロンボモジュリン(TM)は血管内皮細胞に存在する糖蛋白で、トロンピンと複合体を形成しトロンピンによるプロテインC(PC)の活性化を1000-2000倍に促進する。活性化されたPC(APC)は、凝固因子Va、VIIIaを不活化し、凝固系が抑制される。すなわち、TMはトロンピンと結合することによりトロンピンの凝固促進作用を阻止するモジュレーターとして働く。さらに、活

性化したPCは、免疫反応において中心的役割を果たす転写因子NF- κ Bの活性化を阻害することにより、抗炎症効果をも発揮することが知られている。これらの作用から、遺伝子組み換えTM製剤(rTM)が、本邦では2008年5月に播種性血管内凝固症候群(DIC)の治療薬として保険収載された。rTMは血中半減期が20時間と長いためヘパリンのような24時間持続投与の必要がなく、また、抗炎症効果も発揮するため、その利便性と有効性で注目されている。

そこで新規抗血栓薬であるrTMの原因不明不育症に対する効果を検討し、その有用性と最適な投与方法を検討することは、既存の治療に難治性の原因不明不育症の新たな治療戦略となりえると考えた。

また近年、多能性幹細胞・前駆細胞の解析に伴い再生医療が発達し、障害を受けた臓器の再生の開発が進められている。その一つである骨髄に由来する血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell; EPC)は、末梢血中の単核球成分の一部として存在し、これまで胎児期のみに行われると考えられていた血管発生が出生後も行われていることが明らかとなり、重症の冠動脈疾患や下肢虚血疾患の血管再生療法にEPCが臨床応用され始めている。骨髄より末梢血中に動員されたEPCは新しく作られる血管に直接作用して血管壁の構成成分となるとともに(血管発生への関与)、EPCが合成するサイトカインが既存の血管内皮細胞の増殖・遊走を促進する(血管新生への関与)、という2つの方法で血管形成を促進する。原因不明不育症では複数の血管形成促進因子の異常との関連がメタアナリシスで報告されており、血管形成不全の改善が原因不明不育症に有用な可能性が示唆される。我々は、マウス骨髄より採取し妊娠マウスに投与したEPCが胎盤に集積することを予備実験で確認しており、原因不明不育症マウスにお

ける血管形成不全を改善する可能性が期待される。

そこで先述した新規抗血栓薬である rTM と、血管再生治療である EPC の原因不明不育症に対する効果を検討し、その有用性と最適な投与方法を検討することは、既存の治療に難治性の原因不明不育症の新たな治療戦略となりえると考えた。

2. 研究の目的

難治性不育症の新しい薬剤の開発に向けて、rTM の絨毛形成、血管形成に対する基礎的を行うこと。また流産率が約 30% と高率であり、さらにアンギオテンシンの感受性亢進や蛋白尿など、その特徴から流産/妊娠高血圧腎症モデルとされるマウス (CBA/J × DBA/2) に rTM を投与することで流産予防の可能性について検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 流産/妊娠高血圧腎症モデルマウス作成と妊娠予後の検討

CBA/J (雌)、DBA/2 (雄) マウスを交配させ (CBA/J × DBA/2)、妊娠確認直後から妊娠母獣に 1 日 1 回 rTM 0.1 mg/kg および 1.0 mg/kg を 15 日間連続で皮下投与した。rTM 投与群 (TM(+))、rTM 非投与群 (TM(-))、正常群 (CBA/J × BALB/c (野生型)) (Control) の 3 群で比較した。投与 15 日後、安楽死させ解剖し、流産率、生存胎仔のサイズおよび体重を解析した。

(2) 胎盤の組織学的検討

上記(1)で得られた胎盤組織について、抗フィブリノゲン抗体による免疫組織学的染色を行い、病理学的検討を行った。フィブリノゲン沈着の程度は All Red score を用いて半定量化し解析した。

(3) マウス組織を用いた血管新生因子の発現の検討

上記で得られた妊娠マウスモデルの組織から以下の実験を行った。

rTM による血管新生因子への影響

上記(1)で得られた胎盤組織から total RNA を抽出し、cDNA を合成。RT-PCR を行い、各群の VEGF、Flt1、PLGF の発現について検討した。

rTM による solubleFlt-1 (sFlt-1) 産生への影響

解剖時に採取した妊娠マウス血清の sFlt-1 蛋白量を ELISA kit を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 流産マウスモデル作成と妊娠予後の検討

流産率は Control 2.08 %、TM(-) 28.14 %、TM(+) 11.9 % と TM(+) で有意な ($p < 0.01$) 流産率の低下を認めた。胎仔サイズおよび重量は Control 2.35 cm, 1.46 g、TM(-) 2.18 cm, 1.26 g、TM(+) 2.38 cm, 1.41g であり、TM(+) で胎仔サイズ、重量の有意な ($p < 0.01$) 改善を認めた。これら結果から rTM により流産率と発育不全が改善する可能性が示唆された。TM 0.1 mg/kg 投与群と TM 1 mg/kg 投与群で検討したが、上記結果に有意な差を認めなかった。

(2) 胎盤の組織学的検討

胎盤組織を用いた免疫組織学的染色において、control 群である CBA/J × BALB/c 胎盤と比較して、CBA/J × DBA/2 TM(-) 胎盤では、迷路部およびスポンジオトロホプラストに広範囲にフィブリノゲン沈着を認めた。また TM(+) では同部でのフィブリノゲン沈着は減少していた。All red score とし半定量化した結果、TM(-) に比較し TM(+) で有意にフィブリノゲン沈着が減少していた。(Control vs TM(-) vs TM(+)) 0.67 vs 7.33 vs 2.0 $p < 0.05$

(3) マウス組織を用いた血管新生因子の発現の検討

rTMによる血管新生因子への影響

VEGF・Flt1の発現がTM(-)に比較し、TM(+)で有意に($p<0.01$)増加していた。またPLGFの発現はTM(-)に比較し、TM(+)で有意に($p<0.01$)減少していた。上記からrTM投与により発現を増加させる血管因子がある可能性が示唆された。

rTMによるsolubleFlt-1産生への影響

sFlt-1の発現はTM(-)に比較し、TM(+)で有意に($p<0.01$)減少していた。上記からrTM投与により胎盤での抗血管新生因子であるsFlt-1生成が阻害された可能性が示唆された。

(4)結論

本研究でrTMによる抗凝固療法は、胎盤のフィブリノゲン沈着を減少させ、また発現を増加させる血管因子があることが明らかになった。この作用により流産/妊娠高血圧腎症モデルマウスにおいて流産および胎児発育不全を改善させることが明らかとなった。rTMは、sFlt-1産生を低下させることで胎盤形成不全によって引き起こされる妊娠高血圧腎症の病態をも改善させる可能性が示唆された。これらの研究成果について、ScienceDirect Placenta(journal homepage:www.elsevier.com/locate/placenta)に投稿し、2018年3月23日に受理された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Sano T, Terai Y, Daimon A, Nunode M, Nagayasu Y, Okamoto A, Fujita D, Hayashi M, Ohmichi M. Recombinant human soluble thrombomodulin as an anticoagulation therapy improves recurrent miscarriage and fetal growth restriction due to placental insufficiency - The leading

cause of preeclampsia. Placenta. 2018 May;65:1-6.doi:10.1016/j.placenta.2018.03.006. Epub 2018 Mar 26. 査読有

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. 2017 Aug;122:21-27. doi:10.1016/j.jri.2017.08.001. Epub 2017 Aug 4. 査読有

2017 Aug 4. 査読有

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. The first genome-wide association study identifying new susceptibility loci for obstetric antiphospholipid syndrome. J Hum Genet. 2017 Sep;62(9):831-838. doi:10.1038/jhg.2017.46. Epub 2017 Apr 20. 査読有

Daimon A, Terai Y, Nagayasu Y, Okamoto A, Sano T, Suzuki Y, Kanki K, Fujita D, Ohmichi M. A Case of Intestinal Obstruction in Pregnancy Diagnosed by MRI and Treated by Intravenous Hyperalimentation. Case Rep Obstet Gynecol. 2016;2016:8704035. doi:10.1155/2016/8704035. Epub 2016 Nov 24. 査読有

Amengual O, Fujita D, Ota E, Carmona L, Oku K, Sugiura-Ogasawara M, Murashima A, Atsumi T. Primary prophylaxis to prevent obstetric complications in asymptomatic women with antiphospholipid antibodies: a systematic review. Lupus. 2015 Oct

;24(11):1135-42. doi:10.1177/
0961203315578765. Epub 2015 Mar 25.

Review. 査読有

Kato S, Tanabe A, Kanki K, Suzuki Y,
Sano T, Tanaka K, Fujita D, Terai Y,
Kamegai H, Ohmichi M. Local injection of
vasopressin reduces the blood loss
during cesarean section in placenta
previa. J Obstet Gynaecol Res. 2014
May;40(5):1249-56.doi:10.1111/jog.1235
6. Epub 2014 Apr 21. 査読有

Neki R, Miyata T, Fujita T, Kokame K,
Fujita D, Isaka S, Ikeda T, Yoshimatsu
J. Nonsynonymous mutations in three
anticoagulant genes in Japanese patients
with adverse pregnancy outcomes. Thromb
Res. 2014 May;133(5):914-8. doi:
10.1016/j.thromres.2014.02.012. Epub
2014 Feb 21. 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤田 太輔 (FUJITA Daisuke)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 90411371

(2)研究協力者

佐野 匠 (SANO Takumi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 30817185