

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18709

研究課題名(和文)母体免疫異常に起因する流産とPZPの関連性の解明

研究課題名(英文)Analysis of relationship between PZP and miscarriage caused by maternal immune abnormality

研究代表者

柏木 寛史(Kashiwagi, Hirofumi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：10710460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はPZPが炎症を感知して発現亢進し、組織局所でリンパ球浸潤を抑制して炎症制御に働く可能性を示したことである。胎盤局所に炎症を来す炎症性異常妊娠においては、PZPは胎盤の炎症を抑制し、流産や胎児機能不全から保護的に働く可能性が考えられた。また、胎児組織は胎盤から母体循環に流入するが、母体全身を循環するPZPがアログラフトによる免疫応答を抑制し、妊娠中の免疫環境を維持する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PZPは血漿タンパク質であり測定が容易でモニタリングに適するため、抗体産生が原因となる流産や免疫に関連したトロフォブラスト形成不全に伴う産科合併症の発生を早期診断し、病状の評価にも有用である可能性がある。また液性タンパク質であり合成が容易で、これらの予防や治療に関する研究面での新たなアプローチや創薬にも道を開く可能性がある。また、本研究のマウスモデルは、胎盤局所のみならず、全身性の免疫調節にPZPがどのように寄与するのか明らかにするために有用である。

研究成果の概要(英文)：The results of this study show that PZP can detect inflammation and enhance its expression, suppress lymphocyte infiltration locally in tissues, and act on inflammation control. In the case of abnormal pregnancy that cause local inflammation of the placenta, PZP may suppress placental inflammation and protect against miscarriage and fetal dysfunction. It is also possible that PZP, which circulates throughout the mother's body, suppresses the immune response by allografts and maintains the immune environment during pregnancy.

研究分野：炎症性異常妊娠

キーワード：Pregnancy zone Protein 妊娠 免疫異常 炎症性疾患 流産

1. 研究開始当初の背景

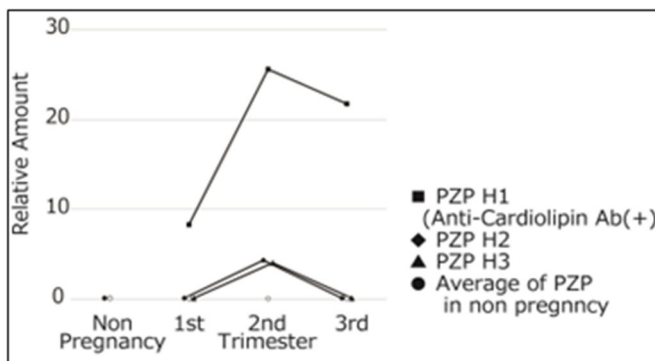
現在の周産期医学において、全妊娠期間を通じて流産および早産は一定の確率で発症する。その原因は、免疫学的異常や胎児染色体異常、母体血液凝固能異常、絨毛膜羊膜炎、子宮頸管無力症など多岐にわたるが、妊娠初期の流産では特に免疫学的異常が顕著である。

母体にとって胎児組織はアログラフトとして認識され免疫反応の対象となりうるが、正常の妊娠では“免疫寛容”が成立し、胎児は免疫機構による排除を免れている。しかし、アログラフトに対する免疫寛容が破綻すると、胎児側の組織に免疫反応が誘導されて炎症が起こり、流産の原因となっていると考えられている。特に流産と抗体に関係があることはよく知られている。抗リン脂質抗体症候群では抗カルジオリピン抗体等の自己抗体が胎盤の炎症を誘導し、血液型不適合妊娠の抗胎児抗体は胎児組織を拒絶する反応を示し、それらは合わせて妊娠初期流産の原因の約3割を占めると報告されている。

よって母体の免疫寛容を維持して炎症および抗体産生をコントロールすることは、妊娠の維持にとって大変重要である。抗リン脂質抗体症候群では抗血小板薬・抗凝固薬に加え重症例ではステロイドが使用されている。また、抗胎児抗体が原因で起こる流産に対してはタクロリムスが使用されている。これらの薬剤は免疫抑制剤であり、妊娠免疫環境および炎症を改善させ得るが、その一方で抗体産生に關与する液性免疫のみならず細胞性免疫を含んだ免疫全般を強力に抑制するため、易感染状態や悪性腫瘍の発生リスク等が問題となり治療法として確立されていない。

そこで申請者は先行実験において、自己抗体陽性であるが妊娠が維持される症例における妊娠関連タンパク質動態を解析した。自己抗体陽性・陰性の各妊婦群をリクルートし、妊娠の Trimester 毎に血漿を採取し、LC-MS を用いて妊娠中の血漿タンパク質動態を網羅的解析したところ、抗カルジオリピン抗体陽性の妊婦で自己抗体陰性の妊婦と比べて Pregnancy zone protein(PZP)血漿濃度が高値を示しながら妊娠中に推移する症例の存在を確認した。(図1)

図1



PZP は妊娠中、特に中期に血漿濃度が非妊娠時の 100 倍以上まで著増し、胎盤を含む全身の血液中を灌流し、免疫抑制機能を果たす血漿タンパク質であるが、その血中濃度には個人差がある。PZP の免疫抑制機能については Philip らが PZP と TGF-beta が結合することを、Skornicka らが PZP と PP-14 が結合することを報告しているなど多くの報告がされている。しかし、免疫学的異常による流産を抑制しているかどうかについての報告はない。

「自己抗体陰性の妊婦と比較して、自己抗体を産生しているが流産を起こさず正常産まで至った妊婦では妊娠中高い血漿 PZP 濃度を示した」ということは、母体免疫を抑制し妊娠を維持するために PZP が重要な役割を果たしている可能性が高いことを意味している。そこで本研究では、自己抗体および抗胎児抗体の産生が原因となる流産において PZP の果たす役割を明らかにしたいと考えた。

今までに抗リン脂質抗体症候群や血液型不適合妊娠などの自己抗体および抗胎児抗体による免疫学的異常を原因とする流産において、これらの抗体と炎症に関する機構に關連した研究は多く報告されているが、これらの抗体があるにもかかわらず正常産まで妊娠を維持することができた症例の原因究明はなされていない。また PZP と流産の關連、PZP の流産抑制機能を量的、質的に解析した報告は今まで全く存在せず、申請者の研究は「PZP の量的あるいは質的变化が流産と関係する」という全く新しい着眼点による独創的なものであった。

申請者は先行実験において、ヒトと浸潤性胎盤を持つコモンマーモセット(CM)の妊娠中の血漿 PZP 動態を比較し、PZP の免疫抑制作用が霊長類進化の過程で維持されている重要な機能であることを明らかにした。また、霊長類間で PZP のアミノ酸構造を比較したところ、PZP に特徴的なアミノ酸配列である BAIT 領域は他の領域に比べタンパク質の homology が顕著に低かった。この結果より、進化の過程において BAIT 領域は不安定な領域であり、ヒトでも SNPs や変異が蓄積されていることが明らかとなった。この領域には様々なプロテアーゼ認識部位が存在し、PZP は結合後のタンパク質構造変化によりプロテアーゼを阻害する。BAIT 領域に結合する炎症性プロテアーゼとしては Proline-Endopeptidase(PE)が挙げられる。PE は炎症の際に好

中球のケモアトラクタントとして働き、呼び寄せられた好中球は炎症性サイトカインを産生して他の免疫担当細胞を誘導する。そのため申請者は「BAIT領域のアミノ酸変異により結合できるプロテアーゼが変化することは免疫抑制機能の破綻をひきおこし、正常な妊娠が維持できず流産に至る原因となる可能性がある」というもう一つの独自の仮説のもと本研究を進めた。

さらに、PZP は血漿タンパク質であり測定が容易でモニタリングに適するため、抗体産生が原因となる流産の早期診断や病状の評価にも有用である可能性がある。また液性タンパク質であり合成が容易で、これら流産の予防や治療に関する研究面での新たなアプローチや創薬にも道を開く可能性があるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、臨床検体から自己抗体および抗胎児抗体陽性妊婦の流産における PZP の発現量との関連性および構造変化を明らかにし、さらに PZP の量的変化と妊娠の関連性をマウスモデルで明らかにすることを目的とした。

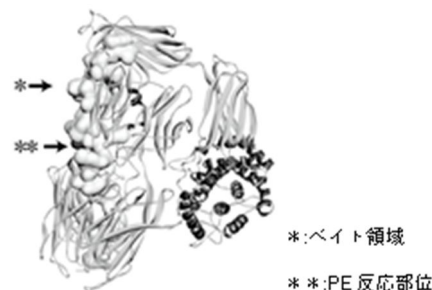
3. 研究の方法

本研究は、実験 1 : PZP の血漿動態解析、実験 2 : PZP の機能解析の 2 本柱で遂行した。

実験 1 に関して、東海大学産婦人科産科外来を受診する妊婦のうち、同意を得られた妊婦から検体採取を行った。自己抗体・抗胎児抗体陽性の妊婦血漿と正常妊婦の血漿をそれぞれ採取し、PZP、ステロイドホルモンの血中濃度等の比較検討を進めた。自己抗体陽性妊婦で PZP が高値、妊娠高血圧症候群妊婦で PZP が低値を示す傾向を認めた。また分娩時の胎盤における PZP の発現に関して比較実験データを集積した。

実験 2 に関して、PZP のバイト領域における遺伝子変異の発生頻度を NCBI の SNP GeneView ツールを用いて解析したところ、バイト領域に SNP が発生しやすいことが示唆された。また、ホモロジーモデリングによる PZP の 3 次構造解析を行ったところ、PZP のプロテアーゼインヒビターとしての機能の特異性が示唆されるものであった。これらの結果は、Human PZP and common marmoset A2ML1 as pregnancy related proteins. Scientific Reports. Mar 20;10(1):5088. doi: 10.1038/s41598-020-61714-8. 2020 において論文発表を行った。

図 2. ヒト PZP の立体構造解析



研究協力者の実験動物中央研究所において、ヒト PZP に CAG をプロモーターとして遺伝子導入した NOG マウスを作成し、全身での PZP の発現を確認した。さらに、PZP 発現 NOG マウスでは PZP 非発現 NOG マウスに比較して肺、肝臓でリンパ球浸潤と組織破壊が抑制傾向にあることがわかった。これは PZP のプロテアーゼインヒビターとしての機能が組織への炎症性の細胞の浸潤を抑制することによるものであることが示唆された。

4. 研究成果

PZP の血漿動態解析に関しては、妊娠中の PZP を ELISA を用いて解析した。PZP は 2nd trimester をピークに非妊時の 100 倍以上に増加し、3rd trimester を過ぎると緩やかに減少し、分娩後は速やかに非妊娠時レベルまで低下するという妊娠動態を示した。また胎盤絨毛管腔血を採取して PZP を測定したところ、妊婦血漿の 10 分の 1 程度まで減少していることが確認された。PZP は母体肝臓で大部分が産生され胎盤へ流入されており、胎盤での産生は少量であることが示唆された。さらに、臍帯血中の PZP は非妊娠時レベルであり、胎盤での胎児側への流入がないことも示唆された。

さらに申請者は、ステロイドホルモンについても解析を行った。プロゲステロンは絨毛間腔血濃度が生理的妊娠血漿濃度の 10 倍程度高値であった。プロゲステロンは免疫寛容に寄与することが報告されているが、胎盤でのトロフォブラストに対する免疫寛容にプロゲステロンが寄与している可能性が示唆された。

PZP の機能解析に関し、PZP トランスジェニック (PZP Tg) NOG マウスを作製し、Littermates にヒト末梢血単核球 (PBMC) の移植実験を行なった。PZP Tg NOG マウスでは、肺胞組織へのリンパ球の浸潤は遅延し、気管支周辺に集積すること、肝実質へのリンパ球浸潤も遅れることが示唆され、異種移植片に対する拒絶反応に関しては抑制する傾向があることが示唆された。また、これらの PZP Tg-NOG マウス()を NOG マウス()と交配し、妊娠率・出生率を確認した。その結果、数例の出産例はあるものの、妊娠が極めて起こりにくい傾向が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanao Mitsuzuka, Atsuko Togo, Yasuhira Kannno, Tomoaki Narayama, Hirofumi Kashiwagi, Masaru Hayashi, Yumiko Goto, Hitoshi Ishimoto	4. 巻 45
2. 論文標題 Monochorionic Diamniotic Twin Pregnancy; a Retrospective Study on Twintwin Transfusion Syndrome and Related Disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tokai J Exp Clin Med.	6. 最初と最後の頁 81-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kashiwagi H, Ishimoto H, Izumi SI, Seki T, Kinami R, Otomo A, Takahashi K, Kametani F, Hirayama N, Sasaki E, Shiina T, Sakabe K, Mikami M, Kametani Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Human PZP and common marmoset A2ML1 as pregnancy related proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61714-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirofumi KASHIWAGI, Hitoshi ISHIMOTO, Yoshihiro Nishijima Shun-ichiro IZUMI, Mikio MIKAMI
2. 発表標題 Study on the Kinetics of Pregnancy-Related Proteins Comparing Non-Human Primate and Human
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirofumi KASHIWAGI, Yoshie KAMETANI, Shun-ichiro IZUMI, Hitoshi ISHIMOTO
2. 発表標題 Alternative Expression of PZP in Human and A2ML1 in Common Marmoset as Pregnancy-Related Proteins
3. 学会等名 SSR 52nd Annual Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------