

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591924

研究課題名 (和文) 不育症病態における着床期子宮内膜血流障害の存在と抗血液凝固療法の治療効果の検討

研究課題名 (英文) ROLE OF CALPAIN IN PATIENTS WITH RECURRENT MISCARRIAGE

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

研究成果の概要 (和文)：反復流産患者におけるカルパイン及びカルパスタチンの存在と意義を検討した。免疫組織染色法で分泌期子宮内膜と上皮細胞にカルパインとカルパスタチンの染色性を認めた。非妊娠時血清中抗カルパスタチン抗体は流産群で有意に高かった。抗カルパスタチン抗体と抗PE抗体に有意な相関は認めなかった。反復流産病態において子宮内膜に存在するカルパイン-カルパスタチン系が何らかの重要な役割を演じている事が認められた。

研究成果の概要 (英文)： We investigated the existence and contribution of anti-calpastatin antibody and correlation with antiphosphatidylethanolamine (anti-PE) antibody in serum of recurrent miscarriage. Subject group was patients with history of recurrent miscarriage and control group was healthy women with informed consent. We performed immunohistochemistry using mid-phase endometrium to investigate localization of calpain and calpastatin. ELISA was performed to measure anti-calpastatin antibody and PE-binding protein dependent IgG antibody in sera of non-pregnancy period in each group. Staining of μ -calpain and calpastatin were observed in the cytoplasm of stromal and epithelial cells in mid-phase endometrium but no significant differences were observed in staining patterns. Subject group of anti-calpastatin antibody in sera was 4.317 ± 0.987 (U/ml) and control group was 3.373 ± 0.653 . Subject group was significantly higher than control group. There was no significant correlation between anti-calpastatin antibody and anti-PE antibody. The result provided that calpain-calpastatin system may play important role in endometrium of recurrent miscarriage independently from anti-PE antibody-calpain pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：不育症、習慣流産、着床、抗リン脂質抗体症候群、プロテオリシス、カルパイン

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜に存在するカルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインが細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により活性化され、着床や妊娠初期の維持に重要なインテグリンβ3を分解することで細胞障害を惹起する可能性を報告してきた。カルパインは生体に広く存在し、普遍的カルパインとして活性化に必要なカルシウムイオン濃度の違いによりμ-カルパインとm-カルパインの2種類が知られている。カルパインは大サブユニット(80kDa)と小サブユニット(30kDa)により構成され、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により大サブユニットのN末端より自己消化が起こり活性型となり、種々の生理的病理的機能に関与している。カルパインの基質としてはキナーゼC、αフォドリンやインテグリンβ3などが知られている。またカルパインは虚血性心疾患、脳梗塞、アルツハイマー病、筋ジストロフィー症やヒト精子受精能などへの関与が報告されている。インテグリンは細胞接着や細胞遊走能、分化、着床や初期妊娠の維持などに関与しており、これまでの研究にて我々はインテグリンβ3が低酸素状態の子宮内膜細胞においてカルパインにより分解されることを報告してきた。

2. 研究の目的

今回我々は反復流産患者の脱落膜におけるカルパイン、インテグリンβ3、αフォドリン、カルパインの内因性インヒビターであるカルパスタチンの存在と役割を検討した。

3. 研究の方法

2回以上の流死産歴を持つ反復流産患者29例を対象群に、流死産歴のない健常女性20例を対象群とした。稽留流産と診断された患者

及び正常妊娠初期の人工妊娠中絶時の脱落膜組織をインフォームド・コンセントのもとに検体として得た。平均手術週数は反復流産群は 8.6 ± 1.5 週(6-12週)、人工妊娠中絶群は 7.9 ± 1.6 週(6-11週)であった。μ-、m-カルパイン、カルパスタチン、インテグリンβ3、αフォドリンに対する抗体を用い免疫組織染色法及び共焦点レーザー顕微鏡にて免疫二重染色法を用い脱落膜における各々の局在を観察した。またSDS-PAGE, western blot法を用いて各タンパクの発現を比較検討した。

4. 研究成果

免疫組織染色法にて脱落膜間質細胞および上皮細胞の細胞質全体にμ-カルパイン、m-カルパイン、カルパスタチン、インテグリンβ3、αフォドリンの染色性が観察された。染色性の局在の傾向は対象群と対照群に有意差は認められなかった。免疫組織二重染色法ではμ-カルパインは脱落膜細胞質への限局性をみとめたが、カルパスタチンは脱落膜細胞及び間質への拡散像を認めた。

またSDS-PAGE, western blot法における蛋白の半定量検討ではm-カルパイン;流産群 85092.8 ± 49123.9 、正常群 81344.3 ± 36756.3 、カルパスタチン;流産群 44258.6 ± 15876.6 、正常群 39586.9 ± 15323.8 、αフォドリン;流産群 1680 ± 2029 、流産群 1359 ± 614 と、流産群と正常群の間に有意差は認められなかった。しかしながらμ-カルパインは流産群 129413.8 ± 35750.3 、正常群 78977.7 ± 16436.8 と流産群に有意に多く($p < 0.05$)、インテグリンβ3は流産群 5596 ± 3140 、正常群 12523 ± 4541 と流産群で有意に少なかった($p < 0.05$)。

免疫組織二重染色法にて抗μ-カルパイン抗体の染色性が脱落膜細胞質内にとどまるの

に対し抗カルパスタチン抗体の染色性は間質においても観察された。このことから、カルパインが細胞質内に存在する蛋白質であるのに対しカルパスタチンは細胞質内でカルパインと共存するだけでなく間質においてもカルパインの作用を抑制することを示唆していると考えられた。

Western blot 法では μ -カルパインは流産群で有意に多く、インテグリン β 3は流産群で有意に少なかった。このことから、流産群の脱落膜において μ -カルパインがより多く発現し活性化され、これによりインテグリン β 3がより多く分解されることが示された。

妊娠初期の脱落膜において、何らかの原因により細胞質内のカルシウムイオン濃度が上昇し、活性化された μ -カルパインがインテグリン β 3を分解することが、反復流産の病態に関与している可能性が示唆された。

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13件)

① Obayashi S, Ozaki Y, Sugi T, Kitaori T, Katano K, Suzuki S, Sugiura-Ogasawara M, Antiphosphatidylethanolamine antibodies might not be independent risk factors for further miscarriage in patients suffering recurrent pregnancy loss.

J Reprod Immunol, 査読有, 85, 186-192, 2010

② Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, Kumagai K, Suzuki S.

Midline uterine defect size correlated with miscarriage of euploid embryos in recurrent cases. Fertil Steril, 査読有, 93, 1983-1988, 2010

③ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kaneko S, Kitaori T, Kumagai K.

Japanese single women have limited

knowledge of age-related reproductive time limits. Int J Gynecol Obstet, 査読有, 109, 75-76, 2010

④ Hussein MH, Daoud GA, Kakita H, Kato S, Goto T, Kamei M, Goto K, Nobata M, Ozaki Y, Ito T, Fukuda S, Kato I, Suzuki S, Sobajima H, Hara F, Hashimoto T, Togari H. High cerebrospinal fluid antioxidants and interleukin 8 are protective of hypoxic brain damage in newborns. Free Radic Res, 査読有, 44(4): 422-429, 2010

⑤ Hussein MH, Daoud GA, Kakita H, Kato S, Goto T, Kamei M, Goto K, Ozaki Y, Ito T, Fukuda S, Kato I, Suzuki S, Hashimoto T, Togari H. Effect of polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion on respiratory impairment, hepatocellular dysfunction, and leucopenia in a neonatal sepsis model. Pediatr Surg Int, 査読有, 26(2):187-193, 2010

⑥ Zhu C, Hallin U, Ozaki Y, Grandér R, Gatzinsky K, Bahr BA, Karlsson JO, Shibasaki F, Hagberg H, Blomgren K. Nuclear translocation and calpain-dependent reduction of Bcl-2 after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. Brain Behav Immun, 査読有, 24(5):822-30. 2010

⑦ MH Hussein, Ghada A. Daoud, Hiroki Kakita, Shin Kato, Tatenubo Goto, Michi Kamei, Kenji Goto, Yasuhiko Ozaki, Tetsuya Ito, Sumio Fukuda, Ineko Kato, Satoshi Suzuki, Takashi Hashimoto and Hajime Togari. The Immunological and Oxidative Effects of Applying an Extracorporeal Circuit in a Neonatal Sepsis Model. Nagoya Med. J. 査読有, 50. 187-197. 2010

⑧ MH Hussein, Ghada A Daoud, Hiroki Kakita, Shin Kato, Tatenubo Goto, Michi

Kamei, Kenji Goto, Yasuhiko Ozaki, Tetsuya Ito, Sumio Fukuda, Ineko Kato, Satoshi Suzuki, Takashi Hashimoto, Hajime Togari. Higher serum C5a in liver transplanted pediatric patients from female donors. *Fujita Med. J.*, 査読有, 2009.9

⑨ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, Suzumori N, Obayashi S. Suzuki S: Live birth rate according to maternal age and previous number of recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol*, 査読有, 62:314-19, 2009

⑩ Sugiura-Ogasawara M, Sato T, Suzumori N, Nakanishi T, Nozawa K, Ozaki Y: The polycystic ovary syndrome does not predict further miscarriage in Japanese couples experiencing recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol*, 査読有, 61:62-67, 2009

⑪ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T. Diagnosis and treatment methods for recurrent miscarriage cases. *Reprod Med Biol*, 査読有, 8:141-44, 2009

⑫ Kumagai K, Ozaki Y, Nakanishi T, Inomata M, Furuno T, Nakanishi M, Sugiura M: Role of μ -calpain in human decidua for recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*, 査読有, 59:339-346, 2008

⑬ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Nakanishi T, Sato T, Suzumori N, Nozawa K: Occasional antiphospholipid antibody positive patients with recurrent pregnancy loss also merit aspirin therapy: A retrospective cohort-control study. *Am J Reprod Immunol*, 査読有, 59, 235-241, 2008

[学会発表] (計24件)

① Ozaki Y, Kitaori-Nakanishi T, Nishikawa H, Sugiura M: Role of cysteine proteases and inhibitors in human

reproduction: Symposium, The Mechanism of implantation as an invasion of cancer. XII th International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, Sep 25-29, 2010, Portoroz, Slovenia

② Obayashi S, Ozaki Y, Goto S, Mizutani E, Sugiyama C, Kumagai K, Kitaori T, Yasukouchi A, Kawakubo T, Yamamoto K, Sugiura M: Role of gingipain produced from *Porphyromonas gingivalis* in preterm delivery, 25th Annual Meeting of Japan Society for Immunology of Reproduction, International Symposium for Immunology of Reproduction, Aug 28-29, 2010, Osaka, Japan

③ 水谷栄太、尾崎康彦、森幸野、後藤志信、杉山ちえ、大林伸太郎、熊谷恭子、北折珠央、国松歳己、杉浦真弓: 反復流産患者における抗 cathepsinG 抗体の存在と意義 (学会奨励賞)、第15回日本病態プロテアーゼ学会、2010年8月20-21日、大阪

④ 後藤志信、尾崎康彦、森幸野、服部幸雄、佐藤剛、安河内篤、川久保友世、国松歳己、山本健二、杉浦真弓: ヒト卵胞液中の cathepsin E の存在と意義 (学会奨励賞)、第15回日本病態プロテアーゼ学会、2010年8月20-21日、大阪

⑤ 尾崎康彦、杉山ちえ、水谷栄太、大林伸太郎、熊谷恭子、北折珠央、杉浦真弓: 反復流産患者における抗 cathepsin G 抗体の存在と意義 (高得点演題)、第62回日本産科婦人科学会学術講演会、2010年4月23日-25日、東京

⑥ Sugiura-Ogasawara M, Obayashi S, Katano K, Ozaki Y: Occasional antiphospholipid antibody positive patients also merit aspirin therapy in recurrent pregnancy loss. XIIIth

International Congress on Antiphospholipid Antibody, Apr. 13-16, 2010, Galveston, USA

⑦ 尾崎康彦、熊谷恭子、杉浦真弓：ワークショップ（不育症と免疫）、反復流産病態における脱落膜のシステインプロテアーゼ及びインヒピターの役割、第24回日本生殖免疫学会総会・学術集会、2009年11月27-28日、東京

⑧ 杉浦真弓、尾崎康彦、佐藤剛、岡田英幹、北折珠央、服部幸雄：子宮奇形をもつ反復流産患者の危険因子検索とその後の生児獲得率、第54回日本生殖医学会、2009年11月21-22日、金沢

⑨ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, Obayashi S: Embryonic factors as a cause of miscarriage, XIX International Federation of Gynecology and Obstetrics, Oct. 4-9, 2009, Cape Town, South Africa.

⑩ 杉浦真弓、尾崎康彦、北折珠央、鈴木伸宏、鈴木貞夫：ワークショップ、不育症の原因としての細胞遺伝学的探索 反復流産患者において子宮奇形は胎児染色体正常流産と関係する、第54回日本人類遺伝学会大会、2009年9月24-26日、東京

⑪ 尾崎康彦、小林碧、安河内篤、川久保友世、国松己歳、山本健二、杉浦真弓：反復流産患者の妊娠初期における cathepsin E の存在と意義、第14回日本病患プロテアーゼ学会、2009年8月21-22日、大阪

⑫ 北折珠央、尾崎康彦、大林伸太郎、杉浦真弓：ワークショップ、歯周病原因菌 *Porphyromonas gingivalis* の早産への関与、第45回日本周産期・新生児医学会、2009年7月12-14日、名古屋

⑬ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kitaori T, Kumagai K, Suzuki S: The true impact of congenital uterine anomalies on

reproductive outcome with recurrent miscarriage. 25th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Jun. 29-Jul. 1, 2009, Amsterdam, Netherlands.

⑭ 中西珠央、尾崎康彦、大林伸太郎、熊谷恭子、杉浦真弓、川久保友世、山本健二：（高得点演題）歯周病原因菌 *Porphyromonas gingivalis* の早産への関与、第61回日本産科婦人科学会学術講演会、2009年4月3日-5日、京都

⑮ 尾崎康彦、大林伸太郎、熊谷恭子、中西珠央、川久保友世、山本健二、杉浦真弓：反復流産患者の妊娠初期における cathepsin E の存在と意義、第61回日本産科婦人科学会学術講演会、2009年4月3日-5日、京都

⑯ 杉浦真弓、佐藤剛、服部幸雄、北折珠央、熊谷恭子、大林伸太郎、尾崎康彦：シンポジウム、染色体相互転座をもつ不育症患者に対する着床前診断の現状、第23回日本生殖免疫学会、2008年12月7-8日、富山

⑰ Sugiura-Ogasawara M, Sato T, Suzumori N, Nakanishi T, Nozawa K, Ozaki Y: The polycystic ovary syndrome in Japanese recurrent miscarriage patients. 64th Annual Meeting of the American Society of Reproductive Medicine, Nov 10-12, 2008, San Francisco, CA, USA.

⑱ Yasuhiko Ozaki, Shintaro Obayashi, Kyoko Kumagai, Tamao Nakanishi, Mayumi S. Ogasawara: Symposium: Calpain in human reproduction:

Role of calpain for apoptosis of luteal function in human granulosa cells. XI th International symposium on proteinase inhibitors and biological Control, Aug 31-Sept 3, 2008, Portoroz, Slovenia.

⑱ Kyoko Kumagai, Yasuhiko Ozaki, Shintaro Obayashi, Tamao Nakanishi, Mayumi S Ogasawara: Role of Calpain-Calpastatin System and Antiphosphatidylethanolamine Antibodies in Patients with Recurrent Miscarriage. XIth International symposium on proteinase inhibitors and biological Control, Aug 31-Sept 3, 2008, Portoroz, Slovenia.

⑳ Nakanishi T, Ozaki Y, Kumagai K, Obayashi S, Sugiura-Ogasawara M: Role of Cathepsins and Cystatins in Patients with Recurrent Miscarriage. Gordon Research Conferences “Proteolytic Enzymes & Their Inhibitors”, Jul 6-11, 2008, New London, NH, USA.

㉑ Ozaki Y, Obayashi S, Kumagai K, Nakanishi T, Sugiura-Ogasawara M: Role of Calpain in Human Sperm. Gordon Research Conferences “Proteolytic Enzymes & Their Inhibitors”, Jul 6-11, 2008, New London, NH, USA.

㉒ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Nakanishi T, Kumagai K, Obayashi S: Occasional antiphospholipid antibody positive patients with recurrent miscarriage also merit aspirin therapy. 28th Annual Meeting of the American Society of Reproductive Immunology, Jun.11-13, 2008, Chicago, IL, USA.

㉓ 杉浦真弓、尾崎康彦、中西珠央、熊谷恭子、大林伸太郎：シンポジウム、膠原病の難治性臓器病変への対応「抗リン脂質抗体と不育症」、第52回日本リウマチ学会、2008年4月20-23日、札幌

㉔ 杉浦真弓、佐藤剛、服部幸雄、中西珠央、野沢恭子、尾崎康彦：着床前診断不成功であ

った習慣流産患者の Emotion Impact、第 60 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会、2008年4月12-15日、東京

〔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

(2) 研究分担者

杉浦 真弓 (SUGIURA MAYUMI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30264740