

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791156

研究課題名(和文) 妊娠高血圧腎症と Placental protein 5 (PP5) の関連の検討

研究課題名(英文) Investigation on association of Placental Protein 5 (PP5) with preeclampsia.

研究代表者

小川 幸 (OGAWA MIYUKI)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60448660

研究成果の概要(和文)：正常妊娠症例の血清をフィルターに通し超遠心した沈殿を microparticle (MP) 分画として回収し、PP5に関連する凝固蛋白である組織因子(TF)並びにPP5のWestern blotを施行、PP5の大部分がMPに含まれることが判明した。これはTFが惹起する血液凝固をPP5が抑制することを示唆する。妊娠高血圧腎症症例の血清でPP5に結合する蛋白質の傾向を分析したが、一定の傾向はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：We measured the concentration of PP5 in the maternal serum of normal pregnancy, after passed through 0.22 μ M filter. And we centrifuged the filtered serum 100Kxg, and collected the precipitate as microparticle (MP), and the supernatant as non-MP. As we measured the PP5 concentration in the non-MP along with the western blotting for tissue factor (TF) and PP5 in the MP, we confirmed that the majority of the PP5 is contained in the MP. This strongly suggested that PP5 suppresses the coagulation triggered by TF from the placenta-derived MP. However, the flow cytometry revealed that the signal of PP5 was not seen in the MPs, which suggested that PP5 exists in an unusual form, such as dimers. We further tried the same analysis with the serum from the patients with preeclampsia, never to find any particular trends.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：周産期医学

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：Placental Protein 5, 妊娠高血圧腎症, microparticle

1. 研究開始当初の背景

1970年代にドイツのBohnらが胎盤から抽出した約50種類の糖タンパク質の一つ、Placental Protein 5 (PP5)は妊婦の血清中にも高濃度で存在する。我々は、分泌された後の成熟型PP5のみを認識するマウス・モノクローナル抗体を作成し、これを用いてPP5を定量するSandwich ELISAのシステムを確立して解析した結果、既に報告されているとおり妊娠高血圧腎症の症例で血清PP5濃度が正常例と比較し有意に上昇していることが判明した。しかしその意義については明らかとなっていない。さらに妊婦血清中に高濃度で存在することから、血清中で何らかの機能を果たしている可能性があるが、その機能は明らかとなっていない。

近年抗凝固因子として、セリンプロテアーゼ及びマトリックスメタロプロテアーゼを抑制する物質として、また増殖刺激活性を持つ物質としての側面からのPP5の研究も行われているが、未だ明らかにされていない。

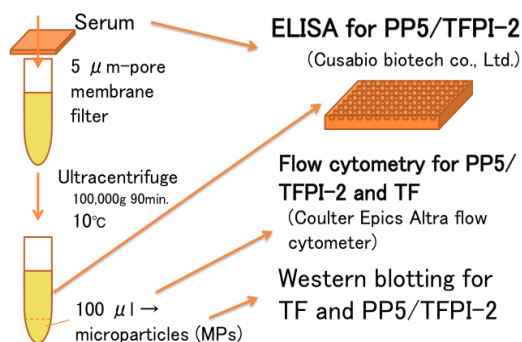
2. 研究の目的

PP5の胎盤及び妊婦血清中における生理機能、および妊娠高血圧腎症における病的意義の解明を試みるのが、本研究の目的であった。

3. 研究の方法

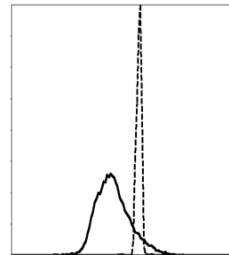
正常妊娠症例の血清をpore size 0.22 μ mのフィルターを通した後に、ELISA法によりPP5の濃度を測定した。続いて、100Kxgで超遠心して沈殿をmicroparticle (MP)分画、上清を非MP分画として回収した。非MP分画のPP5の濃度を測定、MP分画について組織因子(TF)並びにPP5のWestern blotを施行した。同様の実験を妊娠高血圧腎症症例の血清においても行った。

方法



妊娠36週正常妊娠症例の血清(n=20)を検体とした。

血清中のMPs



破線: 直径1 μ mビーズ

実線: 血清を超遠心した沈殿から得られた検体

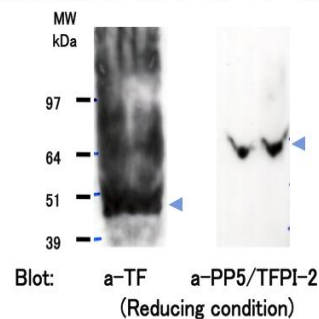
Controlである1 μ mビーズより微小な粒子、すなわちMPsが検出された。

また胎盤検体を用いてPP5の電子顕微鏡での免疫染色法を行い、PP5を胎盤絨毛表面に吸着していると思われるGlypican、Syndecanといった糖鎖の発現について、妊娠高血圧腎症症例と正常例とで比較する実験を計画した。

4. 研究成果

正常妊娠例ではPP5の大部分がMPに含まれることが判明した。このことは、胎盤由来MPのTFが惹起する血液凝固をPP5が抑制していることを示唆するものであった。

Western blotting of MPs for TF and PP5/TFPI-2

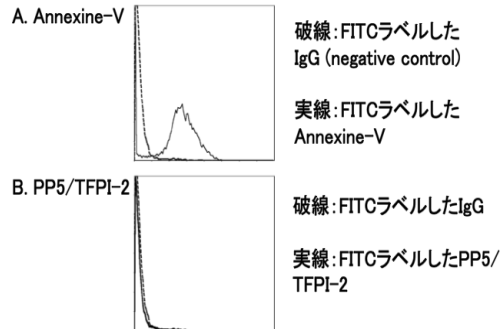


TF—予想される分子量のうち高い方にsmearしている。糖鎖修飾と考える。

PP5/TFPI-2—予想分子量の約2倍の大きさのシグナル。何らかの修飾か、共有結合による2量体形成が予想される。

しかしflow cytometryを行った結果は、PP5のシグナルはMP分画にはみられず、特殊な2量体などの状態で存在していることがうかがわれた。妊娠高血圧腎症症例におけるPP5の存在様式については、一定の傾向はみられなかった。

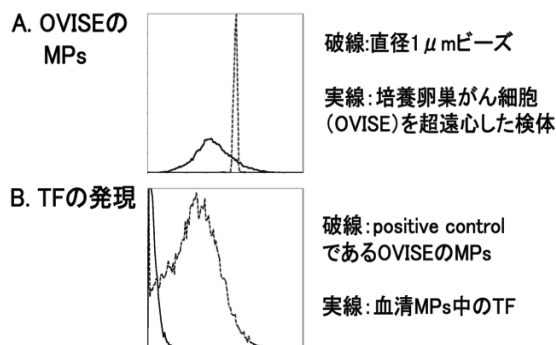
MPs中のPP5/TFPI-2 (flowcytometry)



MPsの指標の1つであるAnnexine-Vについてはpositiveだが、PP5/TFPI-2については、positiveな反応は見られない。

またTFについてもflow cytometryを行ったが、やはりpositive controlである培養卵巣がん細胞OVISEのTFと同様のシグナルは検出されなかった。TFも糖鎖修飾を受けているためと思われた。

MPs中のTF



Positive controlであるOVISEのMPsで検出されたTFは、血清中のMPsからは検出されていない。

電子顕微鏡による免疫染色については、手技に関して問題があり研究期間中には完成しなかった。

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3件)

1. 片山春奈, 岡本真知, 納田容子, 北山玲子, 水島大一, 葛西路, 中島祐子, 田野島美城, 三原卓志, 小川幸, 奥田美加, 高橋恒男, 平原史樹, 中山昌樹 妊娠初期より既往帝王切開創部離開が疑われた1例 日本産科婦人科学会神奈川地方部会誌 (0910-2485) 46巻2号 Page100-103 (2010. 01)
2. 小川幸, 堀口晴子, 奥田美加 常位胎盤早

期剥離の臨床像 産婦人科の実際 (0558-4728) 58巻13号 Page2079-2083 (2009. 12)

3. 田野島美城, 三原卓志, 小川幸, 奥田美加, 高橋恒男, 平原史樹 児を救命市得たケトアシドーシスで発症した非自己免疫性劇症I型糖尿病の2例 日本周産期・新生児学会雑誌 45:156-160, 2009

[学会発表] (計11件)

1. 小川幸, 田野島美城, 奥田美加, 高橋恒男: 血清 placental protein 5 (PP5)/tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2) の存在様式の検討 第18回日本胎盤学会学術集会 2010. 9. 30 熊本県熊本市

2. Ogawa M. The current status of perinatal medicine in Kanagawa. Yokosuka naval hospital perinatal meeting. Yokosuka, Kanagawa, 2010. 9

3. 吉崎敦雄, 田中智子, 榎本紀美子, 三原卓志, 小川幸, 石川浩史, 石川淑, 豊島勝昭, 川滝元良, 猪谷泰史 2児それぞれに片肺無低形成症を認めた1絨毛膜1羊膜性双胎の1例 第46回日本周産期新生児医学会学術集会 2010. 7 兵庫県神戸市

4. 田中智子, 三原卓志, 榎本紀美子, 吉崎敦雄, 小川幸, 石川浩史, 川滝元良, 猪谷泰史 母体および胎児のQT延長症候群の2例 第46回日本周産期新生児医学会学術集会 2010. 7 兵庫県神戸市

5. 榎本紀美子, 高見美緒, 田中智子, 吉崎敦雄, 三原卓志, 小川幸, 石川浩史 胎児診断された腹壁破裂28例の検討 第62回日本産科婦人科学会学術講演会 2010. 4 東京都

6. 田中智子, 高見美緒, 榎本紀美子, 吉崎敦雄, 三原卓志, 小川幸, 石川浩史 胎児期に動脈管瘤と診断された症例の検討 第62回日本産科婦人科学会学術講演会 2010. 4 東京都

7. 吉崎敦雄, 高見美緒, 田中智子, 榎本紀美子, 三原卓志, 小川幸, 石川浩史 妊娠中に原因不明羊水過多が疑われた症例の検討 第62回日本産科婦人科学会学術講演会 2010. 4 東京都

8. 高見美緒, 田中智子, 榎本紀美子, 吉崎敦雄, 三原卓志, 小川幸, 石川浩史 CTGにて“sinusoidal pattern”を認めた新生児消化管出血の1例 MCA-PSVのピットフォール

第 118 回日本産科婦人科学会関東連合地方部
会 2009.11 埼玉県さいたま市

9. 田中智子, 高見美緒, 榎本紀美子, 吉崎
敦雄, 三原卓志, 小川幸, 石川浩史 胎児
肝間葉性過誤腫の一例 第 118 回日本産科婦
人科学会関東連合地方部会 2009.11 埼玉県
さいたま市

10. 吉崎敦雄, 長瀬寛美, 小澤克典, 田中
智子, 小川幸, 石川浩史, 長澤真由美, 川
滝元良, 猪谷泰史 胸腹部巨大血管腫の 1 例
(その 1) 胎児経過 第 45 回日本周産期・新
生児医学会学術集会 2009.7 愛知県名古屋
市

11. 藤川善子, 斉藤圭介, 茶木修, 平原史
樹, 岡本真知, 田野島美城, 三原卓志, 小
川幸, 奥田美加, 高橋恒男 若年性特発性関
節炎合併妊娠の検討 第 382 回日本産科婦人
科学会神奈川地方部会 2008.7 神奈川県横
浜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 幸

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60448660

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし