

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790549

研究課題名(和文)ヘムオキシゲナーゼ-1による血栓制御機構が妊娠予後改善にもたらす効果の解明

研究課題名(英文)Effect of coagulation-regulation system by heme-oxygenase 1 on improvement of pregnancy outcome.

研究代表者

關谷 暁子(SEKIYA, Akiko)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：10452111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：不育症は、血液凝固・線溶系および免疫機能の異常が病態に大きく関与していると考えられているが、その機序には不明な点が多い。

正常妊婦における母体血中の凝固活性化マーカーの推移を分析したところ、経過の順調な妊娠でも凝固活性化マーカーが大きく増加していた。また、胎盤由来細胞に炎症性刺激を加えると、組織因子および線溶阻止因子の発現が増加した。一方、血管内皮細胞にフルバスタチンを添加すると抗血栓蛋白の発現が増加した。以上より、妊娠中の母体は生理的に血栓形成準備状態にあり、炎症などの付加的要因が胎盤内血栓を誘発するが、フルバスタチンにより血管内皮の抗血栓性を強固にし、血栓傾向を軽減できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of recurrent miscarriage is poorly understood.

The blood coagulation-associated laboratory data of normal pregnant women demonstrated increased levels of thrombotic markers such as prothrombin fragment 1+2, thrombin-antithrombin complex, soluble fibrin and d-dimer. In BeWo cells, an in vitro model of the human placenta, TNF- α treatment enhanced expression of procoagulant proteins including tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Meanwhile, fluvastatin enhanced expression of anticoagulant proteins including tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats (ADAMTS13) in human umbilical vein endothelial cells.

Those results indicate that pregnant women are at higher risk of thrombosis, which is accelerated by inflammation in some cases of adverse pregnancy outcome. Fluvastatin may improve antithrombotic properties of endothelium and attenuate thrombotic tendencies during pregnancy.

研究分野：血栓・止血学

キーワード：不育症 妊娠 血栓 ヘムオキシゲナーゼ-1 スタチン

1. 研究開始当初の背景

不育症とは、妊娠はしても流産、子宮内胎児死亡、新生児死亡などを繰り返して生児が得られない場合をさす。不育症は、血液凝固・線溶系および免疫機能の異常が病態に大きく関与していることが考えられるが、その機序には不明な点が多い。われわれは以前より、免疫調節作用、抗酸化作用を有し、妊娠維持に重要な役割を果たす酵素ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) に注目し、HO-1 が免疫調節作用、抗酸化作用に加えて抗血栓作用を有することを明らかにしてきた。不育症モデルマウスに HO-1 遺伝子発現を誘導すると妊娠予後が向上することが報告されているが、その効果が HO-1 による血栓形成抑制作用を介したものであるかどうかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、HO-1 がもつ抗血栓効果が胎盤における病的血栓形成を抑制し、妊娠予後を改善する可能性について検討した。まず、正常妊娠における母体の凝血的変化を明らかにした。次に、胎盤由来細胞を用いて不育症モデルを作成し、炎症性刺激下における血液凝固・線溶系関連因子発現への影響を調べた。また、HO-1 誘導作用を有する薬剤であるスタチンが、血管内皮において血栓抑制作用をもたらすかどうかについて検討した。

3. 研究の方法

(1) 妊娠にともなう凝血的検査データの分析

流産、死産、子宮内胎児発育遅延等の既往がなく、検討期間中も経過が順調であった妊娠 8~12 週、18~22 週、28~32 週、34~38 週の妊婦と、産後 1 カ月、3 カ月、6 カ月の経産婦より得た 114 検体について、アンチトロンビン、フィブリノゲン、プロトロンビンフラグメント 1+2 (F1+2)、トロンビン・アンチトロンビン複合体 (TAT)、可溶性フィブリンモノマー複合体 (SF)、プラスミン・2 プラスミンインヒビター複合体 (PIC)、D ダイマーを測定した。

(2) 胎盤由来細胞を用いた不育症胎盤モデルの樹立

胎盤の主要な構成成分であるトロフォブラストのモデルとして、ヒト絨毛癌由来 BeWo 細胞を用い、炎症性刺激が胎盤における過凝固状態をもたらすかどうかについて検討した。BeWo 細胞を通常どおり培養した場合 (正常妊娠モデル) と、TNF- α による炎症性刺激を加えた場合 (不育症モデル) において、血液凝固の発端となる組織因子 (TF)、凝固阻止因子であるトロンボモジュリン (TM) および組織因子経路インヒビター (TFPI)、血栓溶解を阻止するプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ 1 (PAI-1) の発現を検討した。

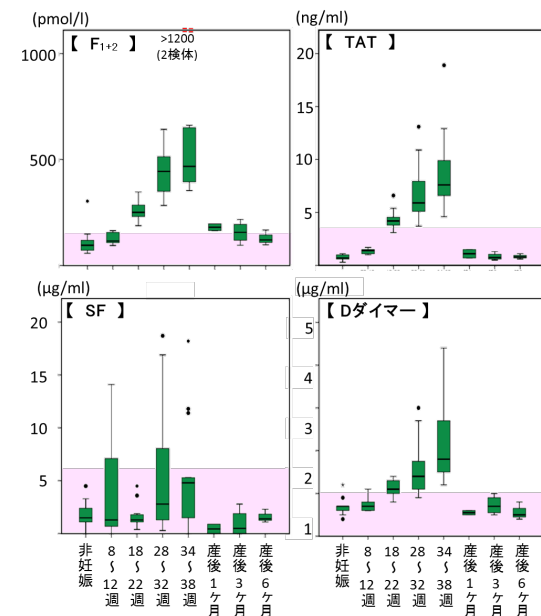
(3) 血管内皮細胞を用いた検討

血管内皮細胞は胎盤のもうひとつの主要な構成成分である。今回、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、HO-1 を誘導することが報告されているスタチンが凝固・線溶系関連因子の発現を調節し、抗血栓効果をもたらすかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 妊娠にともなう凝血的検査データの分析

健常妊婦において妊娠週数の進行に伴い、凝固活性化マーカーである F1+2、TAT、SF、D ダイマー値の上昇を認めた (図 1)。また、経過の順調な妊娠でも、凝血的にはかなりの凝固活性化状態となっている例が存在することが確認された。出産に伴う出血リスクを回避するため、母体は妊娠すると生理的に非妊娠時よりも高凝固・低線溶の状態となる。胎盤での血液凝固は胎児にとって致命的となることから、正常妊娠では、母体が高凝固状態であるにも関わらず胎盤での血栓形成は抑制されていると考えられた。



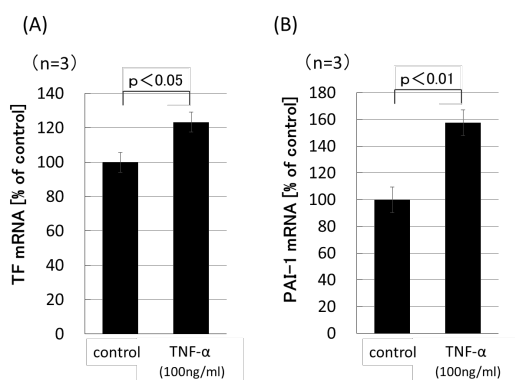
【図1】 妊娠中および産後の凝固活性化マーカーの経時的推移

(2) 胎盤由来細胞を用いた検討

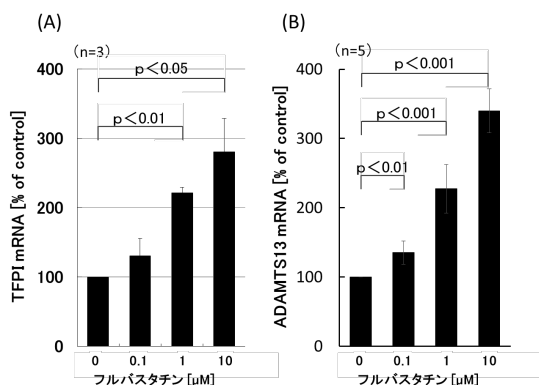
BeWo 細胞に炎症性サイトカインである TNF- α を添加すると、TF mRNA は約 1.2 倍、PAI-1 mRNA は約 1.6 倍に発現が増加した (図 2)。一方、TM および TFPI は TNF- α 添加による有意な変動をみとめなかった。このことから、TNF- α による炎症性刺激下において、凝固活性化および線溶抑制が凝固阻止に対して有意となり、胎盤が過凝固状態に陥ると考えられた。

(3) 血管内皮細胞を用いた検討

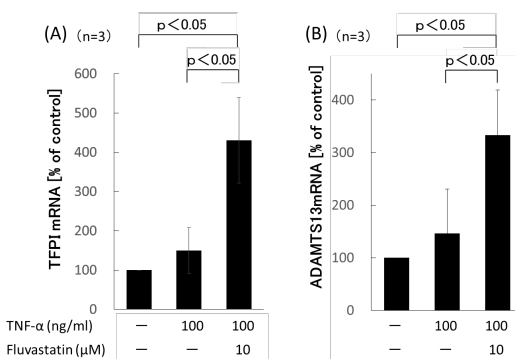
HUVEC にフルバスタチンを添加すると、24 時間後に TFPI mRNA 発現量は約 3 倍に、抗血栓蛋白である a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13) mRNA 発現は約 3.5 倍に増加した (図 3)。さらに、HUVEC に TNF- α を添加し、過凝固状態を惹起した場合でも、フルバスタチンを添加すると、TFPI 発現は約 4 倍、ADAMTS13 発現は約 3 倍に増加した (図 4)。以上より、フルバスタチンは TFPI および ADAMTS13 の発現を誘導することにより血管内皮の抗血栓性を強固にし、炎症によって惹起される血栓傾向を軽減すると考えられた。



【図2】 BeWoにおける、炎症性刺激による組織因子(A) およびPAI-1 (B)発現の増加



【図3】 HUVECにおける、スタチンによるTFPI(A)およびADAMTS13(B)発現誘導



【図4】 HUVECにおける、炎症性刺激下でのスタチンによるTFPI(A) およびADAMTS13(B)発現誘導

(4) まとめ

本研究により、妊娠維持の中核ともいえる胎盤には、母体の循環とは別個の局所的な凝固制御機構が存在することが示唆された。したがって、胎盤における凝固制御機構のメンテナンスが妊娠予後を改善する可能性があると考えられる。胎盤由来細胞を用いた実験で示されたように、炎症性ストレス下では胎盤が過凝固状態に陥るが、スタチンによる抗血栓効果を血管内皮細胞にもたらすことにより、胎盤における血栓形成を阻止できる可能性が示された。このことは、不育症や、血栓傾向を有する患者の妊娠予後を改善する新たな治療戦略となりうる。

スタチンは H0-1 誘導以外にも様々な作用を有するため、スタチンの抗血栓効果がどの程度 H0-1 に依存しているか、今後更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計6件)

Sekiya A, Morishita E, Maruyama K, Torishima H, Ohtake S. Fluvastatin upregulates the expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb: In press*. 2015. (査読有)

DOI: 10.5551/jat.28175

Taniguchi F, Morishita E, Sekiya A, Yamaguchi D, Nomoto H, Kobayashi E, Takata M, Kosugi I, Takeuchi N, Asakura H, Ohtake S. Late onset thrombosis in two Japanese patients with compound heterozygote protein S deficiency. *Thromb Res*. 135(6):1221-3, 2015. (査読有)

DOI: 10.1016/j.thromres.2015.03.023

Maruyama K, Morishita E, Karato M, Kadono T, Sekiya A, Goto Y, Sato T, Nomoto H, Omi W, Tsuzura S, Imai H, Asakura H, Ohtake S, Nakao S. Antithrombin deficiency in three Japanese families: one novel and two reported point mutations in the antithrombin gene. *Thromb Res*. 132(2):e118-23, 2013. (査読有)

DOI: 10.1016/j.thromres.2013.06.001

Maruyama K, Morishita E, Yun T, Sekiya A, Asakura H, Ohtake S, Yachie A. Carbon monoxide (CO)-releasing molecule-derived CO regulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor type 1 in human endothelial cells. *Thromb Res*. 130(3), e188-193, 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計 30 件)

關谷暁子: ワルファリンおよび NOAC 使用例における, アンチトロンビン, プロテイン C, プロテイン S 活性値の試薬間比較, 第 15 回 TTM フォーラム, 2015 年 3 月 7 日, 大手町サンケイプラザ(東京都千代田区)

關谷暁子: 血中可溶性 Mer チロシンキナーゼは妊娠中に増加する, 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 2014 年 5 月 29 日~31 日, 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

野本明華: 健常妊婦における血液凝固関連マーカーの経時的変動, 第 14 回日本検査血液学会学術集会, 2013 年 7 月 27, 28 日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

林朋恵: 妊婦における血液凝固線溶マーカーの経時的変動, 第 35 回日本血栓止血学会学術集会, 2013 年 5 月 30 日~6 月 1 日, 山形国際ホテル(山形県山形市)

關谷暁子: 健常妊婦における血液凝固関連マーカーの経時的変動, 第 37 回北陸臨床病理集談会, 2012 年 9 月 8 日, 福井県立病院(福井県福井市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

關谷 暁子 (SEKIYA, Akiko)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号: 10452111