

分担課題: 抗 β 2-glycoprotein I(GPI)抗体の不育症における病態形成メカニズムの検討

研究分担者 山本 樹生 日本大学産婦人科学分野教授

研究要旨

1. 抗 β 2-GPI 抗体は血栓を生じ胎盤機能を障害する以外に、抗 β 2-GPI 抗体が絨毛よりの PIGF 産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を阻害する可能性を証明した。これには補体は関与せず、絨毛細胞表面に結合し作用する可能性がある。

2. 抗 β 2-GPI 抗体は JEG-3 細胞に作用し TLR 3,4,5,6,9,10 mRNA の発現を亢進した。 β 2-GPI 抗体陽性例では、TLR を介した炎症反応 が亢進され、これらは妊娠の維持に障害を与え、不育症病態形成に関与する可能性が推察される。

3. 抗 β 2-GPI 抗体陽性 IgG は BeWo 細胞に作用して proinflammatory cytokine である IL6 および IL8 を産生させた。抗 β 2-GPI 抗体は絨毛細胞に結合したのち proinflammatory cytokine 産生させ、抗リン脂質抗体を伴う妊娠において炎症反応を増加させる可能性を推察した。

A. 研究目的

1. 抗リン脂質抗体、特に抗 β 2-GPI 抗体の胎盤絨毛に対する影響を検索するため増殖因子に注目し、抗 β 2-GPI 抗体の絨毛癌細胞よりの PIGF, VEGF および sVEGFR1 の産生に与える影響を検討した。

2. 抗 β 2-GPI 抗体は、血管内皮細胞の TLR4 に結合し作用するメカニズムが知られている。しかし、胎盤絨毛細胞における TLR との関係はあまり知られていない。抗 β 2-GPI 抗体陽性 IgG を作用させた時の絨毛癌細胞での TLR mRNA 発現を検討し不育症の関与を検討した。

3. 抗 β 2-GPI 抗体が作用した絨毛癌細胞ではサイトカイン産生が起こり不育症の病態を形成する可能性を検討するため、抗 β 2-GPI 抗体が作用した絨毛癌細胞でのサイトカイン産生について検討した。

B. 研究方法

培養絨毛癌細胞に抗 β 2-GPI 抗体の陽性および陰性血清を添加し 24 時間後の上清中の各因子を測定した。PIGF の産生抑制因子を検索するため抗 β 2-GPI 抗体陽性および陰性血清より IgG を抽出し、絨毛癌細胞よりの PIGF 産生に対する IgG の影響を検討した。PIGF 産生抑制が補体の影響をうけるかどうか検討した。絨毛癌細胞(JEG-3 細胞)に抗 β 2-GPI 抗体陽性 IgG を添加、培養し JEG-3 細胞における TLR の mRNA 発現を検討した。

JEG-3 細胞を 6-well tissue culture plate で培養し、90% confluence の状態になった状態で RPMI 培養液に抗 β 2-GPI 抗体陽性 IgG を添加し 24 時間培養した。培養後細胞を採取し、total-RNA を抽出した。TLR の mRNA の発現を real time PCR にて検討した。

絨毛癌細胞 (BeWo 細胞) を 24-well tissue culture plate に播き、forskoline を用い分化させ、さらに一定量の抽出 β 2-GPI を添加後培養した。その後、各 IgG を反応させ 24 時間後に上清を採取、サイトカイン産生(IL2, IL4, IL10, TNF-alpha, IFN-gamma and GM-CSF)について suspension array system を用いて検討した。

C. 研究結果

1. 抗 β 2-GPI 抗体の陽性血清では陰性血清に比し上清中の PIGF 値の低下認めしたが、VEGF、sVEGFR1 値において差を認めなかった。抗 β 2-GPI 抗体陽性血清よりの IgG は絨毛癌細胞よりの PIGF 産生を抑制したが、陰性血清よりの IgG は PIGF 産生を抑制しなかった。

2. 添加血清の補体非働化の有無により PIGF 産生抑制は変化しなかった。4. 抗 β 2-GPI 抗体は JEG-3 細胞に作用し TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 の発現を亢進した。亢進の度合は、TRL によって差を認めた。TLR7, 8 では発現の亢進を認め

なかった。

3.抗 β 2-GPI抗体陽性IgGの添加により正常非妊娠婦人IgG添加比し血清中IL6およびIL8の有意な増加が認められた。

D. 考察

抗 β 2-GPI抗体陽性血清のPIGFの産生抑制作用はIgG、すなわち抗体によるものと考えた。PIGF産生抑制が補体の影響をうけるかどうか検討したが、添加血清の補体非働化の有無によりPIGF産生抑制は変化しなかった。このため抗 β 2-GPI抗体によるPIGF産生抑制は補体の影響をうけないと考えた。作用機転としては絨毛細胞表面のフォスファチジルセリンに結合した β 2-GPIに結合し作ることがPIGF産生抑制に関与している可能性を推察している。抗 β 2-GPI抗体の作用として β 2-GPIを介して内皮細胞の活性化をもたらすことも知られている。しかし、抗 β 2-GPI抗体の結合する血管内皮細胞におけるレセプターの詳細は不明である。抗 β 2-GPI抗体は血管内皮細胞に結合しさまざまな作用が発現すると考えられる。少なくとも3つのメカニズムが考えられる。1つは血管内皮細胞表面の陰性荷電部(陰性荷電リン脂質)と β 2-GPIの結合、2つ目はAnnexin IIに結合した β 2-GPIの結合である。3つ目はTLRを介した作用である。絨毛癌細胞でのTLR発現機序は、今後検討を要するが、正常絨毛でも抗 β 2-GPI抗体によりTLRの発現が亢進すると考えられる。抗 β 2-GPI抗体はBeWo細胞に作用してproinflammatory cytokineであるIL6およびIL8を産生させた。抗 β 2-GPI抗体は絨毛細胞に結合したのちproinflammatory cytokine産生させ、抗リン脂質抗体を伴う妊娠において炎症反応を増加させ胎盤の機能を障害し流産・死産を生ずる可能性がある。これにはシグナル伝達物質NF- κ Bを作動させる可能性がある。抗 β 2-GPI抗体は、絨毛癌細胞のみならず絨毛細胞においてもシグナル伝達分子を活性する可能性がある。

E. 結論

抗 β 2-GPI抗体は血栓を生じ胎盤機能を障害する以外に、抗 β 2-GPI抗体が絨毛よりのPIGF産生を抑制して胎盤機能を障害し胎児発育を障害する可能性を証明した。これには補体は関与せず、絨毛細胞表面に結合し作用する可能性がある。TLR発現機序は、今後検討を要するが抗 β 2-GPI抗体陽性例では、TLRを介した炎症反応が亢進され、これ

らは妊娠の維持に障害を与え、不育症病態に関与する可能性が推察された。抗 β 2-GPI抗体陽性IgGはBeWo細胞に作用してproinflammatory cytokineであるIL6およびIL8を産生させた。抗 β 2-GPI抗体は絨毛細胞に結合したのちproinflammatory cytokine産生させ、抗リン脂質抗体を伴う妊娠において炎症反応を増加させる可能性を推察した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Effects of anti β 2-GPI antibody on PIGF ,VEGF and sVEGFR1 production from cultured choriocarcinoma cell line Go Ichikawa, Tatsuo Yamamoto, Fumihisa Chishima ,Akikazu Nakamura, Souichirou Kuno,Takayuki Murase, Manami Suzuki J Obstet Gynecol Reseach in press
- 2) 抗 β 2GPI抗体とその作用機序 山本樹生、市川 剛、千島史尚、医学のあゆみ 233(2)163-167,2010
- 3) Tomohiro Nakayama, Tatsuo Yamamoto Comparison between essential hypertension and pregnancy-induced hypertension:a genetic perspective Endocrine Journal 56(8), 921-934,2009
- 4) 市川 剛、山本樹生 抗 β 2 グリコプロテイン I 抗体による絨毛障害 臨床免疫・アレルギー科 52 巻 2 号、188-189,2009
- 5) 山本 樹生、青木 洋一、中村 晃和 III 不育症の検査・診断 B免疫因子【抗リン脂質抗体】 臨床婦人科産科 第63巻 第4号,629-631,2009.
- 6) Yamamoto T, Murase T, Kuno S, Ichikawa G, Chisima F. Leukocyte Subpopulation in Ascites of Women with Pre-Eclampsia. Am J Reprod Immunol. 60(4)318-324,2008

2. 学会発表

- 1) 市川 剛、加藤恵理奈、中村晃和、浅沼亜紀、林 忠佑、久野宗一郎、千島史尚、山本樹生 β 2-GPI を結合させた絨毛癌細胞(BeWo)内での抗 β 2-GPI抗体によるシグナル伝達機構の解明 第62回日産婦学会 東京 4月 2010

- 2) 中村晃和、市川 剛、千島史尚、宮川康司、鈴木真美、山本樹生 抗 β 2-GPI 抗体による絨毛癌細胞(WeWo)での TLRs mRNA の発現変化について 第62回日産婦学会 東京 4月 2010
- 3) Tatsuo Yamamoto ,Akikazu Nakamura,Aki Asanuma, Cyuyu Hayashi, GoIchikawa,Souichirou Kuno,Takayuki Murase,Fumihisa Chisima, Manami Suzuki Effects of anti β 2-GPI antibody on the expression of TLRmRNA and cytokine production in choriocarcinoma cell 30th Annual meeting of american society reproductive immunology 2010
- 4) Go Ichikawa,Erina Kato,Akikazu Nakamura,Aki Asanuma, Cyuyu Hayashi, Souichirou Kuno, Fumihisa Chisima, Manami Suzuki, Tatsuo Yamamoto Signal transduction in choricarcinoma cell line caused by anti β 2-GPI antibody binding 30thAnnual meeting of of american society reproductive immunology 2010
- 5) Tatsuo Yamamoto, Aki Asanuma, Cyuyu Hayashi, Go Ichikawa, Fumihisa Chisima, Manami Suzuki, Effects of anti β 2-GPI antibodies on the production of cytokines in choriocarcinoma (WoBo) cell 11th International Society Immunology reproduction Aug 2010
- 6) 中村晃和、市川 剛、千島史尚、宮川康司、鈴木真美、山本樹生 抗 β 2-GPI 抗体による絨毛癌細胞(WeWo)での TLRs mRNA の発現変化について 第18回 胎盤学会 9月 2010
- シンポジウム
- 7) 市川 剛、加藤恵理奈、中村晃和、浅沼亜紀、林 忠佑、久野宗一郎、千島史尚、鈴木真実、山本樹生 Trophoblast に関わる免疫と臨床病態 抗 β 2 グリコプロテイン I 抗体による絨毛障害メカニズム 第 17 回日本胎盤学会学術集会 2009年 10月 東京
- 8) 市川 剛、中村晃和、東 裕福、浅沼亜紀、林忠佑、久野宗一郎、村瀬隆行、千島史尚、鈴木真実、山本樹生 抗 β 2-GPI 抗体が作用した絨毛癌細胞内でのシグナル伝達 第24回日本生殖免疫学会発表 2009年 11月 東京
- 9) 中村晃和、東 裕福、浅沼亜紀、林 忠佑、市川 剛、久野宗一郎、村瀬隆行、千島史尚、鈴木真実、山本樹生 抗 β 2-GPI 抗体が作用した絨毛癌細胞での TLR の発現 第24回日本生殖免疫学会発表 2009年 11月 東京
- 10) Go ICHIKAWA, Tatsuo YAMAMOTO, Youchi AOKI, Souichiro KUNO, Takayuki MURASE, Humihisa CHISHIMA Effects of anti β 2-GPI antibody positive sera on VEGF, PlGF, Endoglin and sVEGFR1 production from cultured choriocarcinoma cell line. 28th Annual meeting of American society of immunology reproduction Chicago June 2008
- 11) 市川 剛、中村晃和、久野宗一郎、村瀬隆之、千島史尚、山本樹生 妊娠高血圧症候群における抗リン脂質抗体の絨毛細胞機能への影響 第29回妊娠高血圧学会 福島 10月 2008年
- 12) 市川 剛、中村晃和、鈴木真実、久野宗一郎、村瀬隆之、山本樹生 β 2-GPI 抗体の絨毛癌細胞よりの PlGF 産生に対する影響、補体の影響について 第 53 回日本生殖医学会総会・学術講演会 神戸 10月 2008
- 13) 青木 洋一、市川 剛、久野 宗一郎、村瀬 隆之、千島 史尚、山本 樹生 胞状奇胎と正常妊娠における末梢血および脱落膜 NK 細胞の検討 第 16 回 日本胎盤学会学術集会、11月 14日、神戸
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto T, Murase T, Kuno S, Ichikawa G, Chisima F.	Leukocyte Subpopulation in Ascites of Women with Pre-Eclampsia.	<u>Am J Reprod Immunol.</u>	60(4)	318-324	2008
Tomohiro Nakayama, Tatsuo Yamamoto	Comparison between essential hypertension and pregnancy-induced hypertension:a genetic perspective	Endocrine Journal,	56(8)	921-934	2009
市川 剛、 <u>山本樹生</u>	抗 β 2 グリコプロテイン I 抗 体による絨毛障害	臨床免疫・ アレルギー科	52巻2号	188-189	2009
<u>山本 樹生</u> 、青木 洋一、 中村 晃和	Ⅲ 不育症の検査・診断 B免疫 因子【抗 β 2 脂質抗体】	臨床婦人科産科	第63巻 第4号	629-631	2009
<u>山本樹生</u> 、市川 剛、 千島史尚	抗 β 2 GPI 抗体とその作用 機序	医学のあゆみ	233(2)	163-167	2010
Go Ichikawa, Tatsuo Yamamoto, Fumihisa Chishima , Akikazu Nakamura, Souichirou Kuno, Takayuki Murase, Manami Suzuki	Effects of anti β 2-GPI antibody on PIGF ,VEGF and sVEGFR1 production from cultured choriocarcinoma cell line	J Obstet Gynecol Reseach			in press