

分担課題: 不育症患者の血小板機能の検討 -レーザー散乱粒子計測法を用いた検討-

研究分担者 杉 俊隆 東海大学医学部産婦人科非常勤教授

研究要旨

Thrombophilia は不育症、血栓症の原因となると考えられており、その治療として抗血小板療法である低用量アスピリン療法が広く行われているが、不育症患者の血小板機能に関する検討はほとんどなされていない。今回我々は、レーザー散乱粒子計測法を用いて不育症患者の血小板凝集能を検討した。我々は新しい不育症のリスクファクターとして抗 phosphatidylethanolamine (PE)抗体と第 XII 因子欠乏症を世界に先駆けて発見し、報告してきた。今回の研究により、これらのリスクファクターが血小板を介して流産を引き起こしている可能性が示唆された。レーザー散乱粒子計測法による血小板凝集能検査は、不育症の risk factor の病原性解明に有用であるのみならず、不育症のスクリーニング検査として有用であると思われた。

A. 研究目的

不育症の原因はいまだ不明の事が多く、これまでのところ不育症例に対するスクリーニング法や治療法の確立には至っていない。我々は、新たな不育症の risk factor として抗 phosphatidylethanolamine (PE)抗体と抗第 XII 因子抗体を既に報告してきたが、これらの自己抗体が不育症の原因であるのかを証明するために、疫学的研究と平行して基礎的研究を施行した。

不育症患者の中で、抗 PE 抗体陽性者の約 1/3 に第 XII 因子活性低下があり、その多くは抗第 XII 因子抗体を持つ事を我々は既に報告した。抗 PE 抗体陽性者の中でも、第 XII 因子活性低下をもつ症例がもっとも流産率が高いと考えられ、抗 PE 抗体と抗第 XII 因子抗体の関係を追求する事が不育症の病原性解明に重要と思われる。

抗 PE 抗体や第 XII 因子欠乏症など thrombophilia は不育症、血栓症の原因となると考えられており、その治療として抗血小板療法である低用量アスピリン療法が広く行われているが、不育症患者の血小板機能に関する検討はほとんどなされていない。我々は、抗 PE 抗体が *in vitro* で血小板凝集能を亢進させることは既に報告したが、従来の aggregometer では感度が悪く、*in vivo* の変化を捉える事が困難であった。今回我々は、レーザー散乱粒子計測法という高感度

の方法を用いて不育症患者の血小板凝集能を検討した。

B. 研究方法

まず、抗 PE 抗体の認識部位である、kininogen D3 の合成ペプチド、LDC27 と、抗第 XII 因子抗体の認識部位である、第 XII 因子 heavy chain の合成ペプチド、IPP30 を作成した。我々は既にこれらの合成ペプチドを抗原に用いて、ELISA 法にて抗 PE 抗体陽性患者血清を用いて epitope mapping を施行したところ、多くの不育症患者の抗 PE 抗体が LDC27 だけでなく、IPP30 を認識する事を報告した。そこで、今回我々は、これらの合成ペプチドをウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作成し、その認識部位を検討した。

さらに、インフォームド Consent のもとでレーザー散乱粒子計測法 (PA-20, KOWA) を用いて不育症患者の血小板凝集能を検討した。レーザー散乱粒子計測法は、フローサイトメーターに応用されている方法であり、従来の aggregometer の 100 倍感度が良いとされている。攪拌のみで生じる血小板の自然凝集を従来の aggregometer で検出することはまれであるが、本方法により多くの不育症患者に自然凝集が見い出された。

(倫理面への配慮)

本臨床疫学研究は、「疫学研究に関する倫理

指針」に基づく倫理的原則を遵守して実施した。疫学研究に関する倫理指針の第 3 インフォームド・コンセント等によれば、本研究は既存資料のみを用いる観察研究に相当するため、口頭のみでの同意とした。また、研究を実施していること・内容・方法などに関する情報を広報し(ポスターの公示)、また、研究に参加したくない場合に拒否できる機会を設けた。

C. 研究結果

ELISA 上、LDC27 に対するポリクローナル抗体は IPP30 を認識した。また、IPP30 に対する抗体は LDC27 を認識した。これらのデータより、LDC27 を認識する抗 PE 抗体と、IPP30 を認識する抗第 XII 因子抗体は、類似した抗体である事が示唆された。

レーザー散乱粒子計測法を用いた不育症患者の血小板凝集能の検討では、不育症患者 94 人中、自然凝集を認めたのは 40.4%であった。一方、正常対照群では 6.7%に自然凝集を認めた。さらに、自然凝集を中等度以上に認めた 51 人について検討すると、抗 PE 抗体陽性は 39.2%、第 XII 因子欠乏は 37.3%、抗 PE 抗体陽性 and/or 第 XII 因子欠乏は 64.7%に認められ、自然凝集の無い 80 人の各陽性率(それぞれ、28.8%、20.0%、40.0%)に比較して高率であり、抗 PE 抗体陽性 and/or 第 XII 因子欠乏群では、統計学的に有意(64.7% vs 40.0%; $p=0.006$)であった。

一方で抗カルジオリピン抗体、プロテイン S 欠乏症、プロテイン C 欠乏症などは、自然凝集との相関は認められなかった。

D. 考察

今回の研究より、不育症患者の約 40%に *in vivo* での血小板活性化が示唆され、如何に血液凝固系亢進が不育症のバックグラウンドに存在するかが明らかになった。

我々はすでに、不育症患者のもつ抗第 XII 因子抗体の 76.5%が第 XII 因子の heavy chain の N 末端のアミノ酸 1-30(IPP30)を認識する事を報告した。この部位は、第 XII 因子の血小板 glycoprotein Ib α への結合部位である。高分子キニノーゲンと第 XII 因子は、どちらも glycoprotein Ib α の細胞外サブユニットである glycolalacin に競合的に結合し、トロンビンによる血小板活性化を阻害する事が報告されている。したがって、抗第 XII 因子抗体は、第 XII 因子が血小板の GP

Ib-IX-V に結合する事を阻害し、血栓や流産を引き起こしている可能性がある。ちなみに、高分子キニノーゲンの血小板への結合部位は、キニノーゲン、ドメイン3の Cys333-Lys345 (CNA13)であり、抗 PE 抗体の認識部位と同一である事が分かっている。第 XII 因子欠乏不育症患者の 32.4%に抗 PE 抗体が陽性であり、抗第 XII 因子抗体と抗 PE 抗体は、非常に類似した抗体である事が、今回の合成ペプチドを用いた検討で分かって来た。LDC27とIPP30のアミノ酸配列は全く異なるが、同じレセプターに競合的に結合するという事は、立体構造が類似しており、抗原性が似ている事を示唆している。そして LDC27 と IPP30 に対するポリクローナル抗体は、どちらもそれぞれ LDC27 と IPP30 の両方を認識したという今回の結果により、抗 PE 抗体と抗第 XII 因子抗体が類似した、または同一の抗体である事が示唆された。我々は既に、抗 PE 抗体の約 60%が LDC27 を認識し、第 XII 因子活性低下の約 50%が抗第 XII 因子抗体を持つ事を報告した。したがって、どちらも単独では不育症のリスクファクターとしては不十分である。しかしながら、現時点で全員に抗体の epitope mapping を行う事は不可能である。そこで、抗 PE 抗体と第 XII 因子活性の組み合わせで不育症患者を評価する事を提案する。

不育症患者の持つ第 XII 因子とキニノーゲンに対する自己抗体は、第 XII 因子とキニノーゲンが血小板の GP Ib-IX-V に結合してトロンビンによる血小板活性化を防ぐ事を阻害し、血栓や流産を引き起こしている可能性がある。今回、我々は、レーザー散乱粒子計測法を用いて不育症患者の血小板凝集能を調べたところ、抗 PE 抗体陽性 + 第 XII 因子欠乏の患者で最も有意な亢進がみられ、これらの患者で *in vivo* でも血小板が活性化している事が示唆された。一方で、抗カルジオリピン抗体、プロテイン S 欠乏症、プロテイン C 欠乏症などは、自然凝集との相関は認められず、血小板を介さない血液凝固異常である事が示唆された。

以上の様に、不育症患者における抗 PE 抗体と抗第 XII 因子抗体の病原性として、我々は血小板活性化を報告してきた。しかしながら、多くの初期流産は臍帯胎盤循環が始まる前に起こる事もあり、単純に胎盤血栓では流産の説明がつかず、血液凝固系亢進以外の病原性の存在が示唆されている。そこで我々は新たに、抗 PE 抗体の胎盤形成阻害による流産という全く新しい仮説を提唱している。

高分子キニノーゲンは、heavy chain と light chain に分けられ、その間にブラジキニンが存在する。高分子キニノーゲンが分解されると、ブラジキニンを放出し、heavy chain と light chain より成る二本鎖キニノーゲン (HKa)になる。最近の研究で、HKa は血管新生を阻害し、ブラジキニンと一本鎖キニノーゲンは血管新生を促進すると報告されている。高分子キニノーゲンがヘパリン、すなわち肥満細胞由来のグリコサミノグリカンに結合する事は以前より知られていた。最近、高分子キニノーゲンはそのドメイン3の LDC27(Leu331-Met357) およびドメイン5 (His479-His498)を介して血管内皮細胞のグリコサミノグリカンであるヘパリン硫酸とコンドロイチン硫酸に結合する事が解明された。細胞に結合した高分子キニノーゲンは、グリコサミノグリカンが高分子キニノーゲンを分解から守るため、ほとんどが血管新生を促進する一本鎖である。さらに、LDC27 に対する抗体は高分子キニノーゲンがヘパリン硫酸に結合するのを阻害する事が報告された。我々はすでに、抗 PE 抗体が LDC27 を認識する事を報告しているので、この事は、抗 PE 抗体がキニノーゲンのヘパリン硫酸への結合を阻害する事を強く示唆している。高分子キニノーゲンが細胞表面のグリコサミノグリカンから離れると言う事は、高分子キニノーゲンが分解されて HKa とブラジキニンが生じると言う事である。ブラジキニンの半減期は 30 秒、HKa の半減期は9時間であるので、抗 PE 抗体があると結果的に HKa が生じ、胎盤の血管新生を阻害し、流産を引き起こす可能性がある。そして、ヘパリンは高分子キニノーゲンを分解から守る事により、胎盤血管新生を促進し、胎盤形成を助ける事により、流産を防止するという作用機序が考えられる。我々は既に、抗 PE 抗体陽性+第 XII 因子欠乏の不育症患者に対し、低用量アスピリン単独療法を行った場合よりも、低用量アスピリン+ヘパリン併用療法を行った方が、妊娠成功率が高い事を報告した。ヘパリン療法の抗凝固作用以外の作用機序も今後の研究の重要な課題と思われる。

E. 結論

不育症のスクリーニング検査として、抗 PE 抗体と第 XII 因子活性の組み合わせで不育症患者を評価する事を提案する。不育症患者の血小板凝集能は *in vivo* でも亢進している傾向が示唆された。中でも、抗 PE 抗体および第 XII 因子欠乏と、血小板凝集能亢進との間に関連が認められた。一方で

抗カルジオリピン抗体やプロテイン S 欠乏症、プロテイン C 欠乏症は、血小板を介さない病原性がある事が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 杉 俊隆。特集 周産期診療プラクティス、不育症とその対策。産婦人科治療。第 96 巻増刊号。550-554。2008。
- 2) Matsubayashi H, Sugi T, Uchida N, Suzuki T, Izumi S-I, Mikami M. Decreased factor XII activity is associated with recurrent IVF-ET failure. *Am J Reprod Immunol*; 59: 316-322, 2008.
- 3) Inomo A, Sugi T, Fujita Y, Matsubayashi H, Izumi S-I, Mikami M. The antigenic binding sites of autoantibodies to factor XII in patients with recurrent pregnancy losses. *Thromb Haemost*; 99: 316-323, 2008.
- 4) 杉 俊隆。不育症。産科と婦人科。第 75 巻増刊号。41-46, 2008。
- 5) Sugiura-Ogasawara M, Aoki K, Fujii T, Fujita T, Kawaguchi R, Maruyama T, Ozawa N, Sugi T, Takeshita T, Saito S. Subsequent pregnancy outcomes in recurrent miscarriage patients with a paternal or maternal carrier of a structural chromosome rearrangement. *J Hum Genet*; 53: 622-628, 2008.
- 6) 杉 俊隆。不育症学級。全65ページ。金原出版。2008。
- 7) Sugi T. Autoantibody associated disruption of kallikrein-kinin system in patients with recurrent pregnancy losses. *Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol*; 18: 67-76, 2009.
- 8) 杉 俊隆。不育症と自己免疫性 thrombophilia (抗リン脂質抗体、抗第 XII 因子抗体、抗キニノーゲン抗体)。血栓止血誌; 20: 510-518, 2009.
- 9) 杉 俊隆。抗 phosphatidylethanolamine 抗体と抗第 XII 因子抗体。医学のあゆみ; 233: 169-174, 2010.
- 10) 杉 俊隆。習慣流産と血液凝固阻害薬。産科と婦人科; 77: 925-930, 2010.

- 11) 杉 俊隆。不育症。講義録 産科婦人科学。編集 石原 理、柴原浩章、三上幹男、板倉敦夫。メジカルビュー社。244-245。2010。
 - 12) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体症候群。日産婦誌；62: N150-154, 2010。
 - 13) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体。生殖医療ガイドライン 2010。日本生殖医学会編。金原出版。278-280, 2010。
 - 14) 杉 俊隆。不育症とは。月刊地域保健。東京法規出版。2010.6.38-43。
 - 15) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体症候群と静脈血栓塞栓症。臨床婦人科産科。(in press)
 - 16) Obayashi S, Ozaki Y, Sugi T, Kitaori T, Katano K, Suzuki S, Sugiura-Ogasawara M. Antiphosphatidylethanolamine antibodies might not be an independent risk factor for further miscarriage in patients suffering recurrent pregnancy loss. J Reprod Immunol; 85: 186-192, 2010.
 - 17) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体症候群の診療。産婦人科治療。2011 年増刊大特集。不妊診療のすべて。(in press)
2. 学会発表
 - 1) 杉 俊隆、三上幹男。不育症患者における Leu331-Met357 を認識する kininogen 依存性抗 PE 抗体と第 XII 因子活性との関係。第 60 回日本産科婦人科学会。横浜。2008。
 - 2) 大林伸太郎、尾崎康彦、杉 俊隆、熊谷恭子、中西珠央、杉浦真弓。不育症患者における phosphatidylethanolamine (PE) 結合蛋白を認識する抗 PE 抗体の有用性の検討。第 60 回日本産科婦人科学会。横浜。2008。
 - 3) 熊谷恭子、尾崎康彦、杉 俊隆、大林伸太郎、中西珠央、杉浦真弓。反復流産病態におけるカルパイン・カルパスタチン系の存在と意義及び phosphatidylethanolamine 結合蛋白を認識する抗 PE 抗体との関連。第 60 回日本産科婦人科学会。横浜。2008。
 - 4) Sugi T, Fujita Y. aPE which recognize LDC27 are associated with factor XII deficiency in patients with recurrent pregnancy losses. American Society for Reproductive Immunology -28th Annual Meeting, Chicago, 2008.
 - 5) 杉浦真弓、川口里恵、丸山哲夫、小澤伸晃、杉 俊隆、竹下俊行、斎藤 滋。染色体転座をもつ反復流産患者の生児獲得率に関する多施設共同研究。第 53 回日本生殖医学会。神戸。2008。
 - 6) 大林伸太郎、尾崎康彦、杉 俊隆、熊谷恭子、中西珠央、杉浦真弓。不育症患者における phosphatidylethanolamine (PE) 結合蛋白を認識する抗 PE 抗体の有用性の検討。第 53 回日本生殖医学会。神戸。2008。
 - 7) 大林伸太郎、尾崎康彦、杉 俊隆、熊谷恭子、中西珠央、杉浦真弓。不育症患者における phosphatidylethanolamine (PE) 結合蛋白を認識する抗 PE 抗体の有用性の検討。第 23 回日本生殖免疫学会。富山。2008。
 - 8) 杉 俊隆。不育症の診断と治療 up-to-date。第 443 回横浜産婦人科医会。2008
 - 9) 杉 俊隆。カリクレイン-キニン系と血栓、流産。第 18 回日本産婦人科新生児血液学会。博多。2008。(シンポジウム)
 - 10) 杉 俊隆。不育症診療 up-to-date。厚木市産婦人科医会。特別講演。2008。
 - 11) 杉 俊隆。キニノーゲンを認識する抗 PE 抗体と angiogenesis について。第 23 回日本生殖免疫学会。富山。2008。(シンポジウム)
 - 12) 杉 俊隆。抗体検査、ヘパリン療法。第 117 回日本産科婦人科学会関東連合地方部会。都市センターホテル。2009。(シンポジウム)
 - 13) 杉 俊隆。不育症患者の血小板凝集能の検討ーレーザー散乱粒子計測法を用いた検討ー。第 24 回日本生殖免疫学会。京王プラザホテル。2009。
 - 14) 杉 俊隆。抗リン脂質抗体症候群。第 62 回日本産科婦人科学会。生涯研修プログラム。クリニカルカンファレンス4。不育症。東京国際フォーラム。2010。
 - 15) 杉 俊隆。不育症診療 Up To Date。第24回横浜市西部地域産婦人科研究会。特別講演。2010。
 - 16) Sugi T. Spontaneous small platelet aggregate formation in patients with recurrent pregnancy losses and its association with thrombophilia. International symposium for immunology of reproduction. Ichō Kaikan, Osaka University. 2010.
 - 17) 杉 俊隆。流産、習慣流産、不育症について。第18回横浜臨床医学会。2010。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
杉 俊隆	不育症学級	杉 俊隆	不育症学級	金原出版	東京	2008	全65 ページ
杉 俊隆	不育症	石原 理、 柴原浩章、 三上幹男、 板倉敦夫	講義録 産科 婦人科学	メジカルビ ュー社	東京	2010	244-245
杉 俊隆	抗リン脂質抗体	日本生殖 医学会	生殖医療ガイ ドライン2010	金原出版	東京	2010	278-280

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
Matsubayashi H, Sugi T, Uchida N, Suzuki T, Izumi S-I, Mikami M.	Decreased factor XII activity is associated with recurrent IVF-ET failure.	Am J Reprod Immunol	59	316-322	2008
Inomo A, Sugi T, Fujita Y, Matsubayashi H, Izumi S-I, Mikami M.	The antigenic binding sites of autoantibodies to factor XII in patients with recurrent pregnancy losses.	Thromb Haemost	99	316-323	2008
Sugiura-Ogasawara M, Aoki K, Fujii T, Fujita T, Kawaguchi R, Maruyama T, Ozawa N, Sugi T, Takeshita T, Saito S.	Subsequent pregnancy outcomes in recurrent miscarriage patients with a paternal or maternal carrier of a structural chromosome rearrangement.	J Hum Genet	53	622-628	2008
杉 俊隆	不育症	産科と婦人科	75	41-46	2008
杉 俊隆	特集 周産期診療プラクティ ス、不育症とその対策	産婦人科治療	96	550-554	2008
Sugi T	Autoantibody associated disruption of kallikrein-kinin system in patients with recurrent pregnancy losses.	Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol	18	67-76	2009
杉 俊隆	不育症と自己免疫性 thrombophilia (抗リン脂質抗 体、抗第XII因子抗体、抗キ ニノーゲン抗体)	血栓止血誌	20	510-518	2009

Obayashi S, Ozaki Y, Sugi T, Kitaori T, Katano K, Suzuki S, Sugiura-Ogasawara M.	Antiphosphatidylethanolamine antibodies might not be an independent risk factor for further miscarriage in patients suffering recurrent pregnancy loss.	J Reprod Immunol	85	186-192	2010
杉 俊隆	抗phosphatidylethanolamine抗体と抗第XII因子抗体	医学のあゆみ	233	169-174	2010
杉 俊隆	習慣流産と血液凝固阻害薬	産科と婦人科	77	925-930	2010
杉 俊隆	抗リン脂質抗体症候群	日産婦誌	62	N150-154	2010
杉 俊隆	不育症とは	月刊地域保健	6	38-43	2010
杉 俊隆	抗リン脂質抗体症候群と静脈血栓塞栓症	臨床婦人科 産科			In press
杉 俊隆	抗リン脂質抗体症候群の診療	産婦人科治療			In press