

分担課題:日本人の不育症におけるプロテイン Z と プロテイン Z 依存性プロテアーゼインヒビターの解析

研究分担者 一瀬 白帝 山形大学医学部 分子病態学講座 教授

研究要旨

プロテイン Z(PZ)依存性タンパク質分解酵素インヒビター(Protein Z-dependent Protease Inhibitor; ZPI)の新しいアッセイ系を開発する為に必要な組換えタンパク質を発現する細胞株を樹立し、ウェスタンブロットによって特異性が確認された抗体を用いて新 ELISA 測定系を構築した。また、本測定系を用いて、これ迄の我々の研究により発見されていた、ZPIとPZの血中レベルが妊娠期に上昇すること、非妊娠健常女性に比べて不育症では増加しないこと、などの事実を確認した。更に、PZと同様にZPIの測定値を濃度としてmg/mL(質量/容量)で表現することを可能にしたので、遊離ZPI(総ZPI-PZ)を概算し、妊娠期、不育症でもほぼ一定であることを発見した。従って、妊娠期には抗活性型凝固第X因子活性は増加するが、抗活性型凝固第XI因子活性には変化がないと考えられる。ZPIとPZは、更年期における女性ホルモン補充療法や卵巣摘出術の前後で変化しないので、肝癌細胞培養系での検討結果とは異なり、エストロゲンとプロゲステロンなどホルモンの関与は否定的であり、ZPIとPZの血中レベルの変動のメカニズムや妊娠維持に果たす役割、意義を更に追究する必要がある。

A. 研究目的

[目的]

妊娠期におけるプロテイン Z (PZ) 依存性タンパク質分解酵素インヒビター (PZ-dependent Protease Inhibitor; ZPI)とPZの血中レベルの変動のメカニズム、それらが妊娠維持に果たす役割、意義を解明し、不育症の診断や予防に貢献する。

[背景]

ZPIは、PZとの複合体型は活性型凝固第X因子を抑制するが、遊離型ZPIは活性型凝固第XI因子を抑制することが試験管内の実験で明らかにされている。一方、臨床例ではPZの低下が静脈血栓症や自然流産と関与していることが報告されているが、ZPIについては静脈血栓症での低下が報告されているものの、妊娠や流産との関係は不明であった。

これまでの我々の研究により、正常日本人女性におけるPZ、ZPIの相対的な血漿レベルが初めて測定され、日本人においても血中PZ濃度は周

産期において有意に増加して妊娠の維持に貢献していると思われた。一方、不育症の症例では、正常妊娠に比べPZの上昇が認められず、PZの不足が抗凝固能の不足を引き起こす可能性が示唆された。また、ZPIも周産期において上昇することが、初めて明らかになっている。

さて、PZと同様にZPIの測定値を濃度としてmg/mL(質量/容量)で表現し、不育症における遊離ZPI(総ZPI-PZ)の意義を検討するためには、既知の量のZPIが必要であり、これを標準物質として各個人の血中濃度を較正しなければならない。そこで、今回は、組換えZPIタンパク質を発現する哺乳類細胞株を樹立し、特異性と感受性を共に満足する抗体を選択し、新しい定量方法を開発した。この方法により、総ZPI量からPZ量を差し引いて、遊離ZPI量を概算することが初めて可能になった。

B. 研究方法

1) 組換え ZPI の哺乳類細胞と昆虫細胞での発現

新しい ZPI のアッセイ系を開発し、標準タンパク質として用いる為に必要な組換えタンパク質を発現する細胞株を樹立した。DsRed タグとの融合 ZPI cDNA を BHK 細胞に一過性に導入し、無血清培地で 24 時間インキュベートした後に回収した培地および細胞溶解物を、抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 (共同研究者より供与されたもの) あるいは H-137 (市販のもの) を用いたウエスタンブロットにより解析した。

安定発現株を樹立する為に、BHK 細胞に ZPI 発現ベクターを導入後 G418 で選別し、得られたクローンの培養上清を抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析によりスクリーニングした。次に、株化した ZPI 安定発現 BHK 細胞の培養上清 90 mL から 75%硫酸で沈殿したタンパク質を透析脱塩後、Heparin-Sepharose カラム (0.5 mL) にアプライした。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.4) で洗浄後、0.1-1 M リン酸緩衝液の濃度勾配で吸着タンパク質を溶出した。

バキュロウイルス発現系でより大量の組換えタンパク質を得る為に、組換え型ウイルスを作製した。組換えウイルスを Sf21 細胞に感染後、3 日間血清フリー培地で培養して培地を回収し、抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析を行った。

2) ELISA によるヒト血漿の ZPI タンパク質量測定

抗 ZPI ポリクロナール抗体 (MQ-126) を固相化した 96 穴プレートに、2% BSA で 200 倍に希釈した血漿 0.1 ml を入れて、4 時間反応した。血漿を除去後 Tween-TBS で 5 回洗浄し、ビオチン標識抗 ZPI ポリクロナール抗体 (MQ-191) 希釈液 (1:1,000) 0.1 ml を加えて 2 時間反応させた。Tween-TBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン希釈液 (1:1,000) を入れて 1 時間反応した。Tween-TBS で洗浄後、Tetramethylbenzidine 基質を反応させ、希硫酸にて反応を停止した後、450 nm の吸光度を測定した。BHK 細胞にヒト ZPI cDNA を安定導入し発現、部分精製した組換え体 ZPI を標準物質として測定し、濃度を算出した。

3. PZ の ELISA 測定

市販の ZYMUTEST Protein Z (Hyphen BioMed

社) を用いて測定した。

4) 統計解析法

各検体を 3 回ずつ測定し、統計ソフトウェア JMP6.0 を用いて各統計解析を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究の組換え DNA 実験については山形大学遺伝子組換え実験安全委員会の、臨床研究については山形大学医学部倫理委員会の審議と承認を得て行った。血液検体は、共同研究者が対象者の同意書を得て採取した。

C. 研究結果

不育症における抗凝固システムの意義を明らかにする試みを実施した。

1) ZPI の ELISA による測定システムの開発

ヒト ZPI cDNA を培養細胞に導入して組み換えタンパク質を産生させ、ELISA システムの標準物質として用いて絶対濃度を決定した。

2) 日本人健常対照の血中 ZPI 及び PZ 濃度の測定とドイツ人との比較

平均年齢 34 歳の健康な非妊娠日本人女性において ZPI 濃度を測定したところ、平均年齢 28 歳の健康な非妊娠ドイツ人女性より有意に低かった。PZ 濃度も、ドイツ人女性より低い傾向にあった。年齢による ZPI と PZ の変化はなかったため、平均年齢の違いによるものではない。

3) 血中 ZPI 及び PZ 濃度の関係

血中では全ての PZ が ZPI と結合していることが知られており、両者の濃度に相関があることが報告されているので、非妊娠日本人女性のデータを統計的に解析したところ、有意な相関が認められた。これは、非妊娠ドイツ人女性においても同様であった。

4) 日本人の正常妊娠における ZPI 及び PZ 濃度の変動

日本人正常妊娠女性において ZPI 及び PZ 濃度を測定したところ、非妊娠女性よりも妊娠初期の ZPI は高く、初期よりも中期、中期よりも後期と有意に増加し、産褥期には有意に低下した。一方、PZ 濃度は、妊娠初期は非妊娠女性と有意差はなかったが、中期は初期より有意に高くなり、後期は更に増加して、産褥期には有意に低下した。従って、ZPI と PZ は異なる遺伝子発現制御を受けていると思われる。

5) ZPI 及び PZ 濃度とホルモンの関係

妊娠に伴って増加するエストロゲンとプロゲステロンが ZPI 及び PZ 濃度に影響を与えている可能性が高いので、日本人更年期女性においてホルモン補充療法開始前後で測定したところ、両抗凝固タンパク質濃度に有意な変化は認められなかった。

6) 不育症における ZPI 及び PZ 濃度

日本人の不育症において ZPI 及び PZ 濃度を測定したところ、非妊娠女性と有意差はなく、全ての正常妊娠期間の値よりも有意に低かった。

7) 正常妊娠と不育症における遊離 ZPI 濃度と PZ/ZPI 比

新開発した ELISA システムが ZPI 濃度を定量することを可能にしたので遊離 ZPI 濃度を計算したところ、全妊娠期間中一定レベルであった。不育症においても、正常な非妊娠女性との差はなかった。一方、不育症の PZ/ZPI 比は正常妊娠の中期と後期と比較すると有意に低かった。これは、正常妊娠の中期と後期において ZPI より PZ の増加が大きいことを反映している。

妊娠により両抗凝固タンパク質は増加するのに拘らず不育症では増加しないので、今後、別の抗凝固タンパク質であるプロテイン S との関係解析する必要がある。

D. 考察

PZ と同様に ZPI の測定値を濃度として mg/mL (質量/容量) で表現し、不育症における遊離 ZPI (総 ZPI-PZ) の意義を検討するためには、既知の量の ZPI が必要であり、これを標準物質として各個人の血中濃度を較正しなければならない。そこで、まず、組換え ZPI タンパク質を発現する哺乳類細胞と昆虫細胞株を樹立した。多くの種類のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を詳細に検討し、特異性と感受性を共に満足するものを選択し、新しい定量方法を開発した。この方法により、総 ZPI 量から PZ 量を差し引いて、遊離 ZPI 量を概算することが可能になった。

総 ZPI 量は、PZ 量に先駆けて妊娠初期から増加し、分娩後 1 週間で非妊娠正常健常者のレベルに低下する。総 ZPI 量は PZ 量と同様不育症では増加せず、遊離 ZPI 量も周産期、不育症でほぼ一定であった。妊娠に伴って総 ZPI 量と PZ 量が増加するので、更年期を過ぎた女性で、女性

ホルモン製剤を服用している症例と服用していない症例で、PZ、ZPI レベルを測定したが、明らかな変化は認められなかった。また、病変卵巣を外科的に摘出した症例と保存的に治療した症例において、治療前後の PZ、ZPI レベルを比較したが、肝癌細胞培養系での検討結果とは異なり、卵巣ホルモンの影響は認められなかったため、ホルモン以外の、例えばサイトカインなどの影響を今後は追究する必要がある。

なお、少数例ではあるが、子宮内胎児死亡例(5例)や抗リン脂質抗体症候群(12例)では PZ が有意に低値であった。更に症例数や対象疾患を増やして各種の病態に ZPI と PZ の果たす役割を追究し、意義や ZPI と PZ の血中レベルの変動のメカニズムを解明する必要がある。

不育症の原因の一部として重要な凝固異常の実態が明らかになりつつある。特に、正常日本人女性の血中 ZPI 及び PZ 濃度を決定したこと、不育症では ZPI 濃度が増加しないことは、本研究による新知見である。抗凝固系の持続的機能低下も胎盤循環不全に関与しているため、他の原因が同定されない症例では両抗凝固タンパク質を測定して、必要に応じて抗凝固療法を行うという新しい道を拓くことが期待される。

E. 結論

不育症の原因の全てが解明されているとは言いがたく、症例とその家族の苦痛はいまだ除かれてはいない。不育症に関連している候補因子を一つ一つ解析して、分子機序を解明して、治療法を確立し、国民にお知らせすることにより、症例とその家族に希望を持って頂くことが可能になる。ZPI 及び PZ の研究は、その長い階段の一段である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝: ヒト protein Z の分泌様式. 血液・腫瘍科, 2010; 60(2): 183-91.
- 2) 惣宇利正善: ヒト protein Z の独特な分泌様

式:GLAドメインによる非効率、ビタミンK依存性かつワーファリン感受性な分泌. 日本血栓止血学会誌, 2010;21(3):327-33.

- 3) 一瀬白帝:血液凝固と凝固制御. 臨床検査, 2011;印刷中

2. 学会発表

- 1) 一瀬白帝:血栓止血に関わる最近の話題. VTE Protection Seminar in MIYAGI 2010 特別講演, 仙台;2010年1月29日
- 2) 惣宇利正善, 張 偉光, 岩田宏紀, 一瀬白帝: Unique secretion mode of human protein Z: its Gla domain is responsible for inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. 第33回日本血栓止血学会学術集会 ISTH 2011 Memorial Award, 鹿児島;2010年4月22-24日
- 3) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝: ヒトProtein Zのユニークな分泌様式. 第6回麒麟塾, 東京;2010年6月5日
- 4) 惣宇利正善, 杉浦真弓, 齋藤 滋, 吉田隆之, 倉智博久, Bettina Kemkes-Matthes, Joost Meijers, 一瀬白帝: プロテインZ依存性タンパク質分解酵素インヒビターの新しい測定法の開発と周産期、不育症、更年期、卵巣摘出術における検討. 第11回TTMフォーラム学術集会, 東京;2011年3月5日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

山形大学に以下の発明届を提出して手続き中である。

プロテイン Z(PZ)依存性プロテアーゼインヒビター(ZPI)とPZのELISAによる測定値を用いたフリーZPIおよびPZ/ZPI比の決定法(2010年8月)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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
惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 一瀬白帝	ヒトprotein Zの分泌様式.	血液・腫瘍科	60(2)	183-191	2010
惣宇利正善	ヒトprotein Zの独特な分泌様式: GLADメインによる非効率、ビタミンK依存性かつワーファリン感受性な分泌.	日本血栓止血学会誌	21(3)	327-333	2010
一瀬白帝	血液凝固と凝固制御.	臨床検査			2011 in print