

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

分担課題：不妊症における抗 PE 抗体と第 XII 因子活性の病原性に関する研究

研究分担者 杉 俊隆 東海大学産科婦人科学准教授

研究要旨

不妊症のスクリーニング検査として、抗 PE 抗体と第 XII 因子活性を測定する事の有用性を、基礎的および疫学的に検討した。

A. 研究目的

不妊症の原因はいまだ不明の事が多く、これまでのところ不妊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、新たな不妊症の **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妊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。

不妊症患者における抗 PE 抗体の病原性として、我々は既に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ラ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ラ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ラ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。

不妊症患者の中で、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妊症の病原性解明に重要と思われる。

B. 研究方法

先ず、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、これら の ポリクローナル 抗体 を 妊娠 ラット に 投与 し、その 妊娠 に対する 影響 に関して 検討 した。

さらに、疫学研究 としては、2006 年から 2008 年 まで の 間 で、抗 PE 抗体 陽性、第 XII 因子 活性 低下 の どちら か、あるいは 両方 を 満たす 症例 の 治療 方針 と 妊娠 予後 の 多施設 調査 を 行った。

(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 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 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。

また、レトロスペクティブ 研究 では、抗 PE 抗体 陽性、かつ 第 XII 因子 活性 低下 不育 症 症例 アスピリン+ヘパリン 療法 を 施行 した 群 での 妊娠 成功率 は 12/15 (80.0%) で 良好 であ った が、残念 ながら、無治療 群 は 一人 も 無く、アスピリン 単独 群 は 一人 しか いな かった ため、治療 の 有用 性 に関して は 不明 であ った。第 XII 因子 活性 低下 不育 症 症例 では、アスピリン+ヘパリン 療法 を 施行 した 群 での 妊娠 成功率 は 24/31 (77.4%)、アスピリ

ン 単独 群 では 12/20 (60%)、無治療 群 は いな かった。抗 PE 抗体 陽性 不育 症 症例 では、アスピリン+ヘパリン 療法 を 施行 した 群 での 妊娠 成功率 は 18/25 (72%)、アスピリン 単独 群 では 5/7 (71.4%)、無治療 群 は 一人 であ った。

D. 考察

キノノーゲン は、LDC27 を 介して、第 XII 因子 は、IPP30 を 介して 血小板 上 の トロンビン レセプター である GP Ib-IX-V に 競合 的に 結合 し、血小板 活性化 を 抑制 する 事 が 知ら れて いる。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 フォクター 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。

疫学 調査 では、抗 PE 抗体 陽性、かつ 第 XII 因子 活性 低下 不育 症 症例 に アスピリン+ヘパリン 療法 を 施行 した 群 での 妊娠 成功率 は 12/15 (80.0%) で 良好 であ った が、残念 ながら、無治療 群 は 一人 も 無く、アスピリン 単独 群 は 一人 しか いな かった ため、治療 の 有用 性 に関して は 不明 であ った。第 XII 因子 活性 低下 不育 症 症例 では、アスピリン+ヘパリン 療法 を 施行 した 群 での 妊娠 成功率 は 24/31 (77.4%)、アスピリン 単独 群 では 12/20 (60%) であり、ヘパリン 併用 群 の 成功率 が 高い 傾向 に あ った。第 XII 因子 活性 低下 不育 症 症例 の 場合、それ なり の 治療 を しな ければ 予後 が 悪い の か も し れ ない。

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。これらのリスクファクターが不育症の原因なのか、また、その治療法は何かに関しては、プロスペクティブスタディーの結果を待つ。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 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) 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.
- 5) Sugi T. : Autoantibody associated disruption of kallikrein-kinin system in patients with recurrent pregnancy losses. *J. J. Obstet. Gynecol. Neonat. Hematol.* in press.
- 6) 杉俊隆: 不育症. 産科と婦人科. 第 75 巻増刊号. 41-46, 2008.
- 7) 杉俊隆: 不育症学級. 全 65 ページ. 金原出版. 2008.

2. 学会発表

- 1) 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, June 10-14, 2008. Chicago, USA.
- 2) 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. 2008 年 4 月 12 日-15 日. 横浜. .
- 3) 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. 2008 年 4 月 12 日-15 日. 横浜.
- 4) 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. 2008 年 4 月 12 日-15 日. 横浜.
- 5) 杉浦真弓, 川口里恵, 丸山哲夫, 小澤伸晃, 杉俊隆, 竹下俊行, 齋藤滋: 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. 2008 年 10 月 23 日-24 日. 神戸.
- 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. 2008 年 10 月 23 日-24 日. 神戸.
- 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. 2008 年 12 月 6 日-7 日. 富山.
- 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. 2008 年 6 月 27 日-28 日. 福岡.
(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. 2008 年 12 月 6 日-7 日. 富山. (シンポジウム)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
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

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

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., <u>Sugi T.</u> , 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., <u>Sugi T.</u> , 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., <u>Sugi T.</u> , 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	622-623	2008
<u>Sugi T.</u>	Autoantibody associated disruption of kallikrein-kinin system in patients with recurrent pregnancy losses.	J. J. Obstet. Gynecol. Neonat. Hematol.		in press	
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
杉 俊隆	不育症	産科と婦人科	第75巻増刊号	41-46	2008