

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依存性プロテイン
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教授

研究要旨

プロテインZ (PZ) はプロテインZ依存性プロテインインヒビター(ZPI)の補因子として、活性型FX (FXa)を効果的に不活性化する働きを助けるので、抗凝固作用を持つタンパク質である。低PZ血症が血栓症や再発性流産、早期胎児死亡などの症例の一部に関与しているという報告があるが、日本人におけるデータが皆無なので、生殖年齢にある正常日本人女性と正常妊婦、不妊症症例においてPZとPZI値を測定したところ、正常日本人女性は白人より低値であること、妊娠時に増加すること、不妊症では増加しないという予備的な結果が得られた。従って、PZとPZIは妊娠の維持に働いている可能性がある。

A. 研究目的

[目的と意義]

日本人におけるプロテインZ (PZ) とプロテインZ依存性プロテインインヒビター (ZPI)の正常値を決定し、これらの妊娠における変動と不育症との関係を明らかにすることが目的である。本研究の実施によりそれらの何れかの、あるいは両者の異常値が不育症の原因である可能性や不育症のマーカーになる可能性に結論が下され、臨床的に貢献することが期待される。

[背景]

PZは、肝臓で合成される偽セリンプロテアーゼであり、N末端領域にγ-カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基を有するビタミンK依存性蛋白質の一つである。血中ではPZは、serpinファミリーに属するZPIとの複合体として存在し、リン脂質上でカルシウム依存性に活性型FX (FXa)を効果的に不活性化する。PZとZPIの血中濃度は個人差が大きい、その原因の一部はゲノムの塩基配列の多型に基づいており、少なくとも一部は実際に血漿PZレベルに影響を及ぼす。

当初、低PZ血症は出血に関与しているという報告されたが、FXaを不活性化するというPZ-ZPI系の機能からは、両者の減少はむしろ血栓形成を促進すると推測される。事実、PZ欠乏症例は虚血性脳血管障害の相対危険度が高いこと、急性冠症候群に相関することなどが報告されている。我々は、深部静脈血栓

症や自然流産を繰り返した世界初の先天性PZ欠乏症 (白人)の遺伝子変異を同定したが、これはGlaドメイン内のGlu30アミノ酸をGlnに置換し、変異蛋白質の細胞内輸送を障害するので、細胞外への分泌を阻害する。また、ZPI遺伝子のナンセンス変異保持者は静脈血栓症のオッズ比が高いことも報告されている。このように、血中PZレベル低値と血栓症の関係は濃厚である。

妊娠中は凝固亢進状態にあるが、胎盤の血液循環は凝固・線溶のバランスの上に成り立っており、出血性素因である凝固XIII因子欠損症は反復性自然流産を、血栓傾向である抗凝固因子プロテインCやSの欠損症も流産を合併する。従って、血栓症を惹起する低PZ血症も胎盤機能不全を惹起する可能性が高い。事実、欧米では、正常妊娠では血中PZ濃度が増加するのにも拘らず、再発性流産、早期胎児死亡などの症例の一部は逆に低値を示し、特に後者ではPZ欠乏の割合が高いという複数の報告がある。また、抗PZ抗体の存在が胎児死亡に関与しているという論文もある。これらには異論もあるが、最近、低PZ血症が早産や子癩に関与しているという報告、更に上述した遺伝的多型性は再発性流産に関係があるという論文が加わった。

ところが、我が国では、妊娠合併症と血中PZ濃度との関係はおろか、正常妊娠、更に健常人における正常値さえ決定されていないので、日本人独自の解析が不可欠である。

B. 研究方法

[対象と検体]

文書によるインフォームドコンセントが得られた、生殖年齢にある正常非妊娠女性 (n=20)、正常妊婦 (n=32) および不育症症例 (n=146) を対象とした。対象者の肘静脈からクエン酸採血を行い、遠心して血漿を得た。周産期における PZ および ZPI の変動を追跡するため、同一症例の妊娠初期 (6-12 週)、中期 (20-25 週)、後期 (30-37 週) および産褥期に採血を行った。

[測定方法]

PZ および ZPI の抗原量は、特異抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法にて測定した。PZ および ZPI それぞれに対する抗体を ELISA プレートの各ウェルに注入することにより、抗原捕捉用抗体 (PZ: ウサギ由来抗 PZ 抗体, ZPI: ウサギ由来抗 ZPI 抗体 MQ126) を固定化した。各ウェルを洗浄した後、ウシ血清アルブミンでブロッキングし、希釈した血漿検体を注入して、2 時間インキュベートした。その後各ウェルを洗浄し、抗原検出用抗体 (PZ: ペルオキシダーゼ標識ヒツジ由来抗 PZ 抗体, ZPI: ビオチン標識ウサギ由来抗 ZPI 抗体) を加え、1.5 時間インキュベートした。ZPI 測定系では、さらに洗浄後にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え、1 時間インキュベートした。5 回洗浄した後に、3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を加え、15-20 分反応を行った後に、450nm の吸光度をプレートリーダーにて測定した。得られたデータは、正規性の検定および F 検定の後に、Student's t-test あるいは Welch's t-test を用いて有意差検定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、山形大学及び名古屋市立大学の倫理委員会の承認を得て実施された。対象者からは、文書による同意を得た。

C. 研究結果

生殖年齢にある正常な日本人女性 20 名の血中 PZ および ZPI レベルは、それぞれ $1.34 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ 、 $2.25 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$ であった。

一方、周産期における血中 PZ および ZPI レベルは、正常非妊婦時に比べ増加し、PZ は、初期: 2.34 ± 0.80 、中期: 2.54 ± 0.93 、後期: 3.10 ± 1.04 と上昇し、産褥期: $2.56 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$ であった。ZPI は、初期: 3.56 ± 0.82 、中期: 4.34 ± 0.70 、後期: 4.74 ± 0.73 、産褥期: $4.04 \pm 0.93 \mu\text{g/mL}$ といずれも有意に高値を示した ($p < 0.001$, $n=32$)。以上の妊娠初期から後期にかけての PZ および ZPI が増加は、統計学的に有意 (PZ: $p=0.002$, ZPI: $p < 0.001$) であった。また、不育症の 146 例では、ZPI は $3.64 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ と軽度な増加に留まったのに対し、PZ は $2.12 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$ と正常妊婦の各期に比べ PZ レベルが有意に低値であった (PZ: $P < 0.02 - 0.001$ 、ZPI: $P < 0.02 - 0.001$; ただし前期を除く)。

D. 考察

正常日本人女性における血漿 PZ、ZPI のレベルが初めて決定され、PZ 値は報告されている白人の値よりも低い傾向があることが判明した。ただし、例数が 20 名と少ないので、更に研究を継続してより信頼できる測定値を出す必要がある。また、正常日本人男性における血漿 PZ、ZPI のレベルも不明なので、今後対象者の範囲を拡大すべきであろう。

PZ および ZPI は、共に周産期において有意に増加し、妊娠の維持に有用な役割をしていると思われる。背景で述べたように周産期における PZ の増加は既に報告されていたが、周産期における ZPI の増加は全く新しい知見であり、妊娠の維持における役割やその分子機序に大いに興味を持たれる。

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。現時点では、原因であるか結果であるか不明であるが、PZ 低値の群と高値の群の不妊症になる割合を比較することによって、近い将来、結論を出すことができるかも知れない。

また、PZ および ZPI が周産期において増加することから、これらのタンパク質が特にエストロゲンやプロゲステロンのような性ホルモンによって転写調節されている可能性が示唆される。そのメカニズムは、PZ および ZPI 遺伝子の発現調節エレメントの解析によって明らかにすることができるので、分子細胞生物学的なアプローチを実施したい。

最後に PZ、ZPI 変動の臨床的な側面については、不育症では PZ のみ低下することから、これらの調節機序の解明は不育症の診断や治療をする上で有用な知見になる可能性があり、新しい別のコホートで再検する必要がある。

E. 結論

我が国における血漿 PZ、ZPI のレベルの測定を初めて実施し、白人との違いがある可能性、妊娠時に増加するという事実、不妊症では増加しないという予備的な知見を得た。今後、これらを確認し、その意義を解明するよう努力したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Souri M., Iwata H., Zhang WG., Ichinose A.: Unique secretion mode of human Protein Z: Its Gla domain is responsible for inefficient, Vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. Blood, 2009, Feb 2. 電子版.

2. 学会発表

- 1) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: 分泌型ルシフェラーゼを用いたビタミン K 依存性タンパク質分泌メカニズムの解析. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会. 2008 年 11 月 20 日-22 日. 大阪.

- 2) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: γ -グルタミルカルボキシラーゼはビタミン K 依存性タンパク質の Cargo receptor である. BMB2008. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会. 2008 年 12 月 9 日-12 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
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

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
Souri M., Iwata H., Zhang WG., <u>Ichinose A.</u>	Unique secretion mode of human Prote in Z:Its Gla domain is responsible for in-efficient, Vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion.	Blood		電子版	2009