

氏 名	佐 野 匠
(ふりがな)	(さの たくみ)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 30 年 7 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Recombinant human soluble thrombomodulin as an anticoagulation therapy improves recurrent miscarriage and fetal growth restriction due to placental insufficiency - the leading cause of preeclampsia
	(遺伝子組換え型ヒトロンボモジュリン製剤は流産や胎児発育不全および妊娠高血圧腎症の原因となる胎盤形成不全を改善する)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 石 坂 信 和 教授 近 藤 洋 一

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《研究目的》

習慣流産は生殖可能女性の約 1%が罹患する。一部の患者では胎盤形成不全を起こしているため、妊娠が継続した場合においても、胎児発育不全や妊娠高血圧症候群などの合併症のリスクが高いことが知られている。正常な胎盤形成には血管新生因子のバランスが重要とされ、流産、胎児発育不全や妊娠高血圧症候群の胎盤ではヘモジデリンやフィブリン沈着の増加などを特徴とする過剰な血液凝固がみられる。

遺伝子組換え型ヒトロンボモジュリン製剤 (r-TM) は過剰なトロンビンを阻害すること

で抗凝固作用を示す薬剤で、本邦を中心に播種性血管内凝固症候群（DIC）の治療に広く用いられている。

そこで今回我々は、流産率 27.5%と高率な自然発生の流産モデルであり、また近年アンジオテンシンⅡへの感受性亢進や蛋白尿などの特徴から妊娠高血圧症候群モデルであるともされているマウスモデル（CBA/J×DBA/2）に対して、r-TM 投与を行うことで、母児の妊娠予後の改善の可能性と血管新生因子の発現などについて検討した。

## 《材料および方法》

### 1.流産マウスモデル作成と妊娠予後の検討

CBA/J（雌）、DBA/2（雄）マウスを交配させ（CBA/J×DBA/2）、妊娠確認直後から妊娠母獣に1日1回 r-TM 0.1mg/kg および 1.0mg/kg を15日間連続で皮下投与。r-TM 投与群（TM(+)）、生食投与群（TM(-)）、正常群（CBA/J×BALB/C）（Control）の3群で比較した。投与15日後、安楽死させ解剖し、流産率、生存胎仔のサイズおよび体重を解析した。

### 2.胎盤の組織学的検討

上記1.で得られた胎盤組織について、抗フィブリノゲン抗体による免疫組織化学染色を行い、病理学的検討を行った。フィブリノゲン沈着の程度は Allred score を用いて半定量化し解析した。

### 3.マウス組織を用いた血管新生因子の発現の検討

上記で得られた妊娠マウスモデルの組織から以下の実験を行った。

#### 3.1 r-TM による血管新生因子への影響

上記1.で得られた胎盤組織から total RNA を抽出し、cDNA を合成。RT-PCR を行い、各群の vascular endothelial growth factor (VEGF)、VEGF の受容体である Flt-1、

placental growth factor (PLGF) の遺伝子発現について検討した。

### 3.2 r-TM による soluble Flt-1 産生への影響

解剖時に採取した妊娠マウス血清の soluble Flt-1 (sFlt-1) 蛋白量を ELISA kit を用いて測定した。

## 4. 統計

2 群間の有意差は Student's t-test で解析し、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 《結果》

#### 1. 流産マウスモデル作成と妊娠予後の検討

流産率は Control 2.08%、TM(-) 28.14%、TM(+) 11.9%と TM(+)で有意な流産率の低下を認めた ( $p < 0.01$ )。胎仔サイズおよび重量は Control 2.35cm, 1.46g、TM(-) 2.18cm, 1.26g、TM(+) 2.38cm, 1.41g であり、TM(+)で胎仔サイズ、重量の有意な改善を認めた ( $p < 0.01$ )。これらの結果から r-TM により流産率と発育不全の改善した可能性が示唆された。TM 0.1mg/kg 投与群と TM 1mg/kg 投与群で検討したが、上記結果に有意な差はなかった。

#### 2. 胎盤の組織学的検討

胎盤組織を用いた免疫組織化学染色において、control 群である CBA/J×BALB/c 胎盤に比較して、CBA/J×DBA/2 TM(-)胎盤では、迷路部およびスポンジオトロホブラストに広範囲にフィブリノゲン沈着を認めた。また TM(+)では同部でのフィブリノゲン沈着は減少していた。Allred score として半定量化した結果、TM(-)に比較し TM(+)で有意にフィブリノゲン沈着が減少していた。(Control vs TM(-) vs TM(+)) 0.67 vs 7.33 vs 2.0  $p < 0.05$ )

#### 3. マウス組織を用いた血管新生因子の発現の検討

### 3.1 r-TM による血管新生因子への影響

VEGF の発現が TM(-)に比較し、TM(+)で有意に増加していた ( $p<0.01$ )。

Flt-1 の発現は TM(-)に比較し、TM(+)で有意に増加していた ( $p<0.01$ )。

PLGF の発現は TM(-)に比較し、TM(+)で有意に減少していた ( $p<0.01$ )。

TM(+)で PLGF の減少が見られたが、胎盤形成不全における PLGF 低下の理由は未解明である。これらの結果から r-TM 投与により一部の血管新生因子が増加した可能性が示唆された。

### 3.2 r-TM による soluble Flt-1 産生への影響

sFlt-1 の発現は TM(-)に比較し、TM(+)で有意に減少していた ( $p<0.01$ )。

上記から r-TM 投与により胎盤で抗血管新生因子である sFlt-1 生成を阻害した可能性が示唆された。

### 《結論》

本研究で r-TM による抗凝固療法は、胎盤のフィブリノゲン沈着を減少させることに加え、血管新生因子である VEGF、Flt-1 の胎盤における発現を回復させたり、sFlt-1 産生を低下させることが明らかになった。これらの作用により r-TM は、流産および妊娠高血圧腎症モデルマウスにおいて流産および胎児発育不全を改善させる可能性が示唆されたが、その詳細なメカニズムについては更なる検討が必要である。

## 論文審査結果の要旨

習慣流産は生殖可能女性の約 1%が罹患するが、一部の患者の胎盤は形成不全を起こしており、妊娠が継続した場合においても、この胎盤形成不全から胎児発育不全や妊娠高血圧症候群などの合併症のリスクが高いことが知られている。胎盤形成には血管新生因子のバランスが重要とされる。胎盤形成不全ではヘモジデリンやフィブリン沈着の増加といった過剰な血液凝固を示唆する所見がみられることから、申請者は新たな抗凝固治療を模索し、近年、習慣流産や妊娠高血圧症候群での減少が認められるトロンボモジュリンに着目した。遺伝子組換え型ヒトトロンボモジュリン製剤は本邦で開発され、播種性血管内凝固症候群 (DIC) に対する抗凝固療法として広く用いられている。本研究は習慣流産および妊娠高血圧症候群に対する治療法としての遺伝子組換え型ヒトトロンボモジュリン製剤の効果を自然発生の流産/妊娠高血圧症候群モデルである CBA/J×DBA/2 において検討したものである。申請者らはまずマウス胎盤の免疫組織化学染色により、胎盤組織へのフィブリノゲン沈着を調べた。その結果、治療群では無治療群に比較して、フィブリノゲン沈着が減少しており、胎盤における血液凝固の亢進状態を改善させたことが示唆された。流産率、胎仔サイズ、胎仔重量についての検討では、治療群では無治療群に比較して有意な改善を認め、流産防止と胎児発育不全の改善が明らかとされた。次に機序の解明のために血管新生因子の発現を検討した。VEGF、Flt-1、PLGF の胎盤での発現を RT-PCR で検討したところ、VEGF、Flt-1 においては治療群で無治療群に比較して発現の増加を認めた。PLGF においては発現の低下を認めたが、胎盤形成不全におけるその理由は不明である。次に抗血管新生因子である可溶性 Flt-1 (sFlt-1) の血清濃度を ELISA で検討し、治療群で無治療群に比較して発現の低下を認めた。これらより遺伝子組換え型ヒトトロンボモジュリン製剤は血管新生因子である VEGF、Flt-1 の発現を上昇させ、また抗血管新生因子である sFlt-1 の発現を低下させたことが明らかとなった。申請者は本研究で、遺伝子組換え型ヒトトロンボモジュリン製剤による抗凝固療法は、胎盤のフィブリノゲン沈着を減少させ、また血管新生因子を改善させることを示した。このことは胎盤形成不全によって引き起こされる一連の疾患である流産および妊娠高血圧腎症の新規の治療薬として期待できる可能

性を示唆しており、臨床的に重要な知見と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Placenta 65: 1-6, 2018