周産期心筋症の新規診断法の確立～臨床導入に必要なバソインヒビン計測基準値の検証

Elevated vasoinhibin derived from prolactin and cathepsin D activities in sera of Peripartum Cardiomyopathy

大橋（石田）充代[1),2)]

周産期心筋症は、妊産褥婦であれば誰もが発症する危険性があるが診断が難しい疾患である。近年、授乳ホルモンであるプロラクチンが心筋内活性酸素カテプシンＤの上昇を契機に、血管障害性を持つバソインヒビンへと変化し、周産期心筋症の原因になるとの新たな病因が提唱された。我々は、これまで非常に困難で定量化もされていなかった血中バソインヒビンの定量化に成功し、周産期心筋症におけるバソインヒビン診断法を確立しつつある。しかし、観察研究のため、診断時心機能などの患者背景が異なり、更に検討数が少ないという問題点がある。そこで本研究では周産期心筋症との合併率４０％である妊娠高血圧症候群のうち特に子癇前症におけるバソインヒビンの関連性に焦点を絞り調査した。その結果バソインヒビン量およびカテプシンＤ活性は健常妊婦より子癇前症患者において高く、バソインヒビン量とカテプシンＤ活性の間に有意な正の相関がみられた。

N-terminal cleaved variants larger than 11kda derived from prolactin was named vasoinhibin that have anti-angiogenic and pro-apoptotic properties. Vasoinhibin has been reported to have relation with several diseases including in pregnancy induced hypertension (PIH). Vasoinhibin was detected from urine and amnion liquid in preeclampsia. In order to clarify pathogenic mechanisms of preeclampsia, we tried to detect vasoinhibin amount and Cathepsin D activity in preeclampsia patient's serum and to determine the relationship between these factors and the disease. Correlations between vasoinhibin amounts and Cathepsin D activities were analyzed by pearson product-moment correlation coefficient. Vasoinhibin amounts at a month before delivery and the first day after delivery in patients with preeclampsia were significantly higher than those in normal controls. Furthermore, despite almost normalized blood pressure in patients with preeclampsia, vasoinhibin amounts at a month after delivery in all patients with preeclampsia were significantly higher those in normal controls. Similarly, Cathepsin D activities at every determined period in all patients with preeclampsia were higher than those in normal controls. Vasoinhibin amounts and Cathepsin D activities had significantly positive correlation with preeclampsia. These results suggest that vasoinhibin may relate the occurrence of preeclampsia. Although several enzymes, such as matrix metalloproteinase family, are known to produce vasoinhibin, this study suggests that Cathepsin D can cleave prolactin into vasoinhibin among patients with preeclampsia. It is difficult to predict the occurrence of preeclampsia in pregnant women. We need further investigations to know whether vasoinhibin and Cathepsin D are useful marker for early detection of preeclampsia.

Key Words: peripartum cardiomyopathy, prolactin, vasoinhibin

Michiyo Ohashi [1),2)]
１）明治大学農学部生命科学科 ２）国立成育医療センター周産期病態研究部
１）Laboratory of Functional Anatomy, Department of Life Sciences, Faculty of Agriculture, Meiji University, ２）Department of Maternal-Fetal Biology, National Research Institute for Child Health and Development

1. 背景と目的

近年、妊産褥婦に不可欠な授乳ホルモンプロラクチンが、カテプシンＤによりプロテアーゼ切断を受けてバソインヒビンへと変化し、周産期心筋症の原因になると提唱された（**図１**、引用文献１）。この報告を受けバソインヒビンの研究を行なっていた申請者と、我が国の周産期心筋症患者を実際に多数診察していた国立循環器病研究センターの神谷は共同研究を開始した。神谷らが全国調査を行った一方で、申請者はバソインヒビン量及びカテプシンＤ活性の測定方法を確立した。

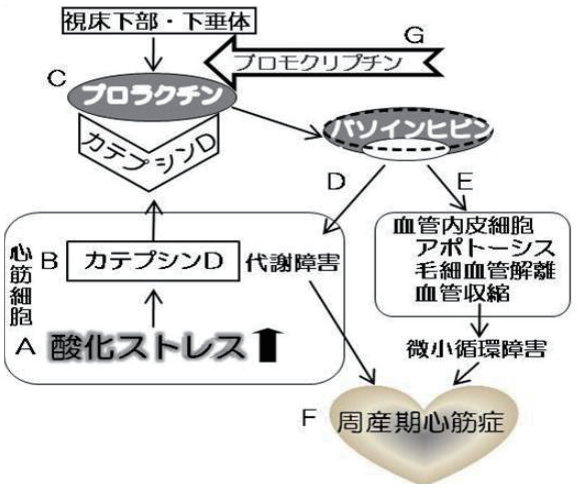

図１．バソインヒビンによる周産期心筋症の発症機序

A) 妊娠に伴い心臓血管形成機能が亢進するが、一部　の妊婦では酸化ストレスが増加
B) 酸化ストレス上昇に伴いプロラクチンを切断するカテプシンD発現が増加
C) カテプシンDによりプロラクチンがバソインヒビンへと変化
D) バソインヒビンにより酸化ストレスとカテプシンDの影響が加速
E) バソインヒビンが内皮細胞のアポトーシスや毛細血管の解離、心筋細胞内の代謝障害を誘導
F) 心臓機能不全発症
G) ブロモクリプチン投与でプロラクチン発現を抑制すると心機能が改善
Denise Hilfiker-Kleiner　2007, Cellを改変

その後我々と神谷らは、Pregnancy Associated Cardiomyopathy and Hypertension-Essential Research (PREACHER) を立ち上げ、全国より周産期心筋症を含む心疾患合併妊娠検体を収集している。そして試験的にバソインヒビン量及びカテプシンＤ活性測定を行い、測定結果を担当医に返却している。

本研究は周産期心筋症患者のうち約４０％が妊娠高血圧症候群を合併していることに着目し、妊娠高血圧症候群のなかでも子癇前症患者に焦点を絞り、血中バソインヒビン量及びカテプシンＤ活性測定を行うことで症状との関連性を見出し、治療の一助とすることを目的とする。妊娠関連疾患は、妊娠による体調の変化と捉えられ患者自身が症状を自覚することは少ない。子癇前症は症状を早期に発見して治療を行うことが肝心であるが発症を予見するような因子は見つかっていない。よってバソインヒビンが子癇前症を予見するリスクファクターと成り得る可能性を模索した。

2. 材料と方法

検体

この研究は 2010 年 11 月に国立循環器病研究センター倫理委員会の承認を得ている。全ての被験者にはインフォームド・コンセントに同意している。血清は３つの時点で早朝に採取した（産前、出産直後、出産１ヶ月後）これらのサンプルは後の解析まで -80 度で保存した。4 人の健常妊婦と 6 人の子癇前症患者を研究対象とした。

バソインヒビン量測定

アジレント社のバイオアナライザーを用い、高

感度のバソインヒビン量測定を行う。まず検体血清250 μLをAlbumin/IgG除去処理後、ポリクローナルヒトプロラクチン抗体にて免疫沈降する。その後バイオアナライザーにて測定を行う。

カテプシンD活性測定

カテプシンD活性測定はHilfiker-Kleinerらの方法に準じている。SensoLyte520 Cathepsin D Activity AssayKit（AnaSpec, USA）を用いて測定を行った。キットの原理は、サンプルにカテプシンD特異的な基質を加え、その分解量を測定するものである。基質の分解によって発される蛍光をマルチラベルカウンターで測定し、検量線から分解した基質の量を算出した。測定はトリプリケートで行い、測定された基質分解量を、inter assay間で常に測定した妊娠女性血清の値をキャリブレーターとして使用し数値（%）を示した。サンプルのカテプシンD活性はキャリブレーターを100%とした値で示している。

統計解析

数値はmean ± SEMで示した。統計解析はStudent's t-testとχ二乗検定を用いた。相関解析はPearson correlation coefficientによって行った。有意水準はP value <0.05とした。

3. 結果

被験体の特徴

全ての被験者は単胎妊娠であった。年齢の平均は健常妊娠群が33.5 ± 1.6歳、子癇前症群が32.4 ± 1.4歳であった。喫煙者は存在しなかった。全ての被験者は授乳を行っていた。収縮期血圧と拡張期血圧、妊娠期間、帝王切開実施数、新生児体重、胎児発育不全において2郡間に有意な差があった。弛緩出血といった妊娠合併症はみられなかった。HELLP症候群や肺水腫を合併した患者はいなかった。

バソインヒビンとカテプシンDの定量

バソインヒビン量は、健常妊娠者と比較して子癇前症では高い傾向にあった（妊娠中(5.15 ± 2.25 FU vs. 1.96 ± 1.32 FU), 出産直後(3.58 ± 1.20 FU vs. 2.84 ± 1.73 FU)）。一方、出産1ヶ月後において、子癇前症群のバソインヒビン量は、健常妊娠者と比較して有意に高かった(6.31 ± 2.20 FU vs. 0.45 ± 0.17 FU, P<0.05)（**図2**）。カテプシンD活性は健常妊娠者と比較して子癇前症では全ての時期で高い傾向にあった（妊娠中(201.7 ± 29.2 % vs. 137.8 ± 17.5 %)、出産直後(183.9 ± 12.9 % vs. 138.7 ± 27.9 %)、出産1ヶ月後(183.3 ± 26.3 % vs. 103.7 ± 14.0 %)（**図3**）。血清中で検出されたバソインヒビンがカテプシンDによって切断されているのかを確かめるために、バソインヒビン量とカテプシンD活性の相関解析を行った。全てのサンプル間においてバソインヒビン量とカテプシンD活性の間に弱い正の相関があった(r=0.323)（Data not shown）。その一方でプロラクチン量とバソインヒビン量の間に相関関係はなかった（Data not shown）。また、バソインヒビン量とカテプシンD活性が子癇前症の重症度を反映しているのかを検証した。その結果、妊娠中のバソインヒビン量は中度子癇前症より重度子癇前症のほうが高い傾向にあった（Data not shown）。

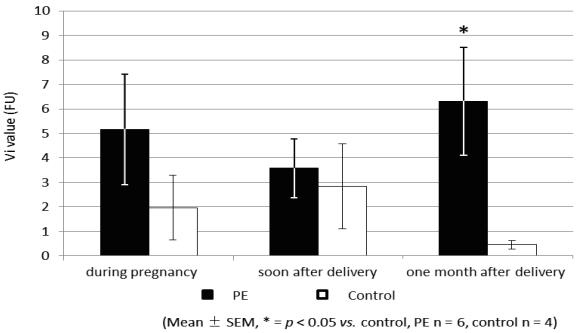

図2．子癇前症患者と健常妊娠者のバソインヒビン量比較
Vi: バソインヒビン　PE: 子癇前症

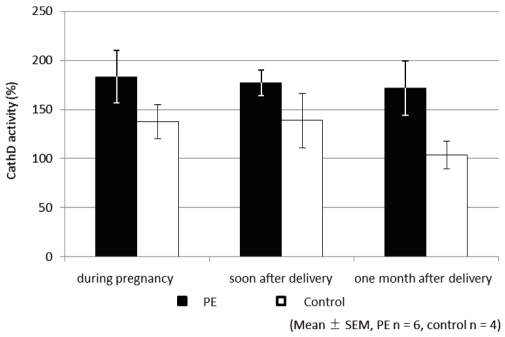

図3．子癇前症患者と健常妊娠者のカテプシンD活性の比較
Cath D: カテプシンD　PE: 子癇前症

4. 考察

我々は初めて子癇前症患者血清中から定量的にバソインヒビンを検出した。これまでの研究でもバソインヒビンとカテプシンＤを子癇前症患者からウエスタンブロッテイング法によって検出した報告はあるが、血中のバソインヒビン量が非常にすくないため定量的なバソインヒビン測定法は困難であるとみなされていた（引用文献２）。さらにこれまでに糖尿病性網膜症や周産期心筋症といったいくつかの疾患にバソインヒビン量が関与すると報告されているため（引用文献２）、我々の方法がそれら疾患に有用であるかもしれない。

子癇前症患者血清中のバソインヒビン量は健常妊娠者と比べて高い値であった。上昇したバソインヒビン量が子癇前症の原因であるとは断言できないが、近年の研究では、尿中のプロラクチン量と増加したバソインヒビン量が、その重症度を反映する指標であるとの報告もある。子癇前症患者におけるバソインヒビン量は、健常妊娠者と比べて全ての時期で高い傾向にあり、特に出産１ヶ月後には有意に高い値を示した。カテプシンＤ活性も同様に子癇前症患者では健常妊娠者と比べて高い傾向にあった。出産１ヶ月後の健常妊娠者においてはバソインヒビン量とカテプシンＤ活性が低下するのに対して、子癇前症患者では両因子が高いままであった。これらの結果はバソインヒビン量とカテプシンＤ活性が妊娠負荷によって増加することを示唆する。子癇前症患者において、バソインヒビン量とカテプシンＤ活性が産後も減少しなかったことは、それらの増加が妊娠と関係ないことを示すかもしれない。ほとんどの場合、子癇前症は産後回復するが、血管障害が産後も遷延することが報告されている。子癇前症患者では、産後にしばしば発症する周産期心筋症を合併するものも存在する。

バソインヒビン量とカテプシンＤ活性の間に正の相関関係がみられた。この結果は子癇前症患者においてカテプシンＤがプロラクチンをバソインヒビンへと切断することを示唆する。カテプシンＤはリソソーム性アスパラギン酸プロテアーゼであり、ヒトプロラクチンを 15, 16,8 17.2kDa に切断する。カテプシンＤは酸性条件下で働くため、中性条件である循環血中ではプロラクチンを切断しない。そのため、プロラクチンはいずれかの組織においてカテプシンＤによって切断されるのだろう。カテプシンＤはリソソームで働き、また細胞外へ分泌されることが示されているため、分泌されたカテプシンＤが血流へと入り血清中で検出されたのだろう。その一方で、バソインヒビンが、胎盤の血管障害に関わる bone morphogenetic protein 1（BMP １）やマトリクスメタロプロテアーゼ（MMP）によってもプロラクチンから産生されるとの報告がある。そのため、バソインヒビンと子癇前症の関連性を明らかにするためにも、これらカテプシンＤ以外の酵素を解析する必要があるだろう。

［文献］

１）Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, Forster O, Quint A, Landmesser U, Doerries C, et al. 2007 A Cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. Cell 128 589-600.

２）Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC & de la Escalera GM 2006 Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. Trends in Endocrinology and Metabolism 17 301-307.