HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	原因不明の不育症における抗C1q自己抗体の病原性に関する研究
Author(s)	大村, 一将
Description	配架番号：2599
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14513号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14513
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81513
Type	doctoral thesis
File Information	Kazumasa_Ohmura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

原因不明の不育症における抗 C1q 自己抗体の病原性に関する研究

(Pathogenic role of anti-C1q autoantibodies in recurrent pregnancy loss of unknown etiology)

2021 年 3 月

北海道大学

大村　一将

Kazumasa Ohmura

学位論文

原因不明の不育症における抗 C1q 自己抗体の病原性に関する研究

(Pathogenic role of anti-C1q autoantibodies in recurrent pregnancy loss of unknown etiology)

2021 年 3 月

北海道大学

大村　一将

Kazumasa Ohmura

目次

発表論文目録及び学会発表目録 1

要旨 3

1. 緒言 7

1.1. 不育症 7

1.2. 抗 C1q 抗体 8

1.3. 仮説および本研究の目的 9

2. 略語表 10

3. 第一章　uRPL 患者および OAPS 患者における抗 C1q 抗体価の検討 .. 13

3.1. 緒言 14

3.2. 対象と方法 15

3.2.1. 研究デザイン 15

3.2.2. 対象患者 15

3.2.3. 抗 C1q 抗体測定 16

3.2.4. 補体価の評価 16

3.2.5. 統計学的解析方法 16

3.3. 結果 17

3.3.1. 患者背景 17

3.3.2. 抗 C1q 抗体陽性率 19

3.3.3. 抗 C1q 抗体価 21

3.3.5. uRPL 群における補体価と抗 C1q 抗体測定値の関連 23

3.4. 考察 26

4. 第二章　抗 C1q モノクローナル抗体を用いた流産モデルマウスの確立 29
4.1. 緒言 30
4.2. 方法 31
4.2.1. 妊娠マウスにおける抗 C1q モノクローナル抗体投与方法の検討 -予備実験 1- 31
4.2.1.1. 方法 31
4.2.1.2. 胎仔吸収率の算出 32
4.2.1.3. 結果　-抗 C1q モノクローナル抗体投与方法の検討- 33
4.2.2. 抗 C1q モノクローナル抗体投与による胎仔評価時期の検討 -予備実験 2- 35
4.2.2.1. 方法 35
4.2.2.2. 胎仔重量の測定 35
4.2.2.3. 結果　-胎仔評価時期の検討- 36
4.2.3. 抗 C1q モノクローナル抗体による妊娠マウスへの影響に関する検討 38
4.2.3.1. 方法 38
4.2.3.2. 胎仔吸収率、胎仔重量および胎盤重量の測定 39
4.2.3.3. 血清 C3a および C1q 値の測定 39
4.2.3.4. 胎盤の免疫組織化学染色 39
4.2.3.5. 統計学的解析方法 40
4.3. 結果 41
4.3.1. 各群における検討対象マウス数 41
4.3.2. 摘出した子宮、胎仔および胎盤の肉眼像 42
4.3.3. 胎仔吸収率 44
4.3.4. 胎仔重量 46
4.3.5. 胎盤重量 48

4.3.6. 血清 C3a および C1q 値 50
4.3.7. 免疫組織化学染色 52
4.4. 考察 56

5. 第三章　抗 C1q モノクローナル抗体投与妊娠マウスにおける補体活性化経路遮断による影響に関する検討 57
5.1. 緒言 58
5.2. 方法 59
5.2.1. 方法 59
5.2.2. 評価項目および統計学的解析方法 59
5.3. 結果 60
5.3.1. 各群における検討対象マウス数 60
5.3.2. 各群における胎仔吸収率、胎仔重量、胎盤重量、血清 C3a および C1q 値 60
5.3.3. 免疫組織化学染色 64
5.4. 考察 66

6. 考察 67

7. 結論 69

8. 謝辞 70

9. 利益相反 71

10. 引用文献 72

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Kazumasa Ohmura, Kenji Oku, Tamao Kitaori, Olga Amengual, Ryo Hisada, Masatoshi Kanda, Yuka Shimizu, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Mayumi Sugiura-Ogasawara and Tatsuya Atsumi, Pathogenic roles of anti-C1q antibodies in recurrent pregnancy loss, Clin Immunol. 203, 37-44 (2019).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Kazumasa Ohmura, Kenji Oku, Tamao Kitaori, Ryo Hisada, Hiroyuki Nakamura, Masatoshi Kanda, Yuka Shimizu, Toshiyuki Bohgaki, Olga Amengual, Tetsuya Horita, Shinsuke Yasuda, Mayumi Sugiura-Ogasawara and Tatsuya Atsumi, Autoantibodies against complement component 1q subcomponent are associated with recurrent pregnancy loss in patients who do not fulfill the Sapporo Criteria, Sydney revision. The 15th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, 21-24 September, 2016, Girne, Turkish Republic of Northern Cyprus

2. 大村一将、奥健志、北折珠央、藤枝雄一郎、加藤将、坊垣暁之、アメングアル・オルガ、保田晋助、杉浦真弓、渥美達也、「抗 C1q 自己抗体は習慣性流産の原因となる新たな病原性自己抗体である」第 54 回日本臨床分子医学会学術集会、2017 年 4 月 14-15 日、東京

3. Kazumasa Ohmura, Kenji Oku, Tamao Kitaori, Olga Amengual, Michihiro Kono, Shun Tanimura, Hiroyuki Nakamura, Eri Sugawara, Ryo Hisada, Sanae Shimamura, Yuka Shimizu, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Shinsuke Yasuda, Mayumi Sugiura-Ogasawara and Tatsuya Atsumi, Anti-C1q Antibodies Contribute to the Pathogenesis of Recurrent Pregnancy Loss via Complement Activation. 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017 年 4 月 20-22 日、福岡

要旨

【背景と目的】不育症（recurrent pregnancy loss：RPL）は妊娠の約 5%の頻度で認められ、胎児染色体異常や母体側要因等の原因検索によっても約 25%が原因の特定ができずに原因不明と分類される。この原因不明の不育症（unexplained recurrent pregnancy loss：uRPL）の患者血清における補体価高値、胎盤組織における補体の著明な沈着から不育症と補体活性化との関連が示唆され、uRPL 患者の胎盤組織に古典的補体活性化経路の指標である C4d の沈着が認められる。不育症の原因の 1 つである産科的抗リン脂質抗体症候群（obstetric antiphospholipid syndrome: OAPS）においても C4d 沈着の程度と胎児予後が相関することが示され、OAPS において流産予防として用いられるヘパリンには抗凝固作用による効果のみならず補体活性化を制御することで抗炎症効果を持つことが流産予防の作用として重要であることが明らかとなった。uRPL は多彩な病因を含んだ疾患群であり、流産予防にはアスピリンおよびヘパリンによる抗凝固療法や免疫抑制療法などが用いられるが効果は限定的である。有効な治療が確立していない uRPL の中でどのような患者で補体活性化を認めるか、また抗補体治療が有効な患者群が存在するかどうかの知見は十分得られていない。一方で正常妊娠では Maternal-fetal interface において豊富に存在している補体制御因子による補体活性化の制御が妊娠維持に重要であるとされ、補体蛋白 C1q は不育症のみならず正常妊娠においても胎盤組織に広く沈着し、母子間の感染制御などの役割を担っている。この C1q を抗原とする抗 C1q 自己抗体は古典的補体経路の活性化を介して全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus: SLE）における腎炎の病勢と関連が示されており、抗 C1q 抗体価は疾患活動性のマーカーの 1 つとされる。本研究では妊娠において胎盤に広く沈着している C1q に着目し、uRPL において抗 C1q 自己抗体が C1q と結合することで過度の補体活性化を引き起こすことで病原性をもちうるのではないかとの仮説を立てた。第一章では uRPL および OAPS と抗 C1q 抗体との関係を明らかにすることを目的とした。第一章で得られた結果をもとに、第二章では妊娠において抗 C1q 抗体の胎児へ与える影響を明らかにすることを目的とし、妊娠マウスに抗 C1q モノクローナル抗体を投与し胎仔、胎盤に与える影響および補体活性化について検討した。第三章では抗 C1q 抗体を投与した妊娠マウスにおいて補体活性化経路の遮断によ

る胎仔および胎盤における影響を検討した。
第一章：uRPL 患者および OAPS 患者における抗 C1q 抗体価の検討
【方法】不育症の原因が特定できなかった患者 134 例（uRPL 群）、OAPS 患者 27 例、妊娠合併症の既往のない出産歴のある全身性自己免疫疾患患者（CTD 群）27 例、健常者（HC 群）27 例の血漿検体を用いて ELISA 法によって抗 C1q 抗体価を測定した。
【結果】抗 C1q 抗体の陽性率は uRPL 群において HC 群と比較して有意に高頻度であり(35 % vs. 7 %、$p<0.01$, Wilcoxon 検定)、OAPS 群においても HC 群と比較して有意に高頻度であった(30 % vs. 7 %、$p<0.05$, Wilcoxon 検定)。CTD 群と HC 群の間には統計学的な有意差はなかった。抗 C1q 抗体価は uRPL 群において HC 群と比較して有意に高力価であり（$p<0.0001$、Dunn's post hoc test）、OAPS 群も HC 群と比較して有意に高力価であった（$p<0.001$、Dunn's post hoc test）。uRPL 群における抗 C1q 抗体価と血漿 C1q 値の間に統計学的に有意な相関関係は認められなかった。
第二章および第三章：抗 C1q モノクローナル抗体を用いた流産モデルマウスの確立および抗 C1q モノクローナル抗体投与妊娠マウスにおける補体活性化経路遮断による影響に関する検討
【方法】8-12 週齢の妊娠が成立した BALB/cAJcl マウスへ抗 C1q マウスモノクローナル抗体（JL-1）を尾静脈より投与した。雄マウスと mating を行い翌日に膣プラグを確認した日を妊娠 day1 とした。胎仔重量が十分増加する妊娠日齢を検討し評価日を妊娠 day16 と定めた。JL-1 投与スケジュールは投与回数および 1 回あたりの容量で 4 つの群について胎仔吸収率を比較することで検討し、妊娠 day8 および day12 に 1 回あたり 500 μg/kg を投与することを決定した。JL-1 を投与した JL-1 群、isotype 対照群としてモノクローナル IgG2b 投与群（mIgG 群）および PBS 投与群（PBS 群）について、妊娠 day16 における胎仔吸収率、胎仔重量、胎盤重量、血清 C3a 値をそれぞれ測定し、胎盤組織の補体蛋白の免疫組織化学染色を行った。次に、妊娠 day8 において JL-1 を投与する 30 分前に抗 C5aR 抗体を投与し、抗 C5aR 抗体投与群（anti-C5aR 群）とともに isotype 対照群として ratIgG2b 抗体投与（ctrIgG 群）について同様の検討を行った。
【結果】JL-1 群は 9 匹、mIgG 群は 6 匹および PBS 群は 5 匹であった。胎仔吸収率は、JL-1 群で他の 2 群と比較して有意に高く、胎仔重量および胎盤重量は他の 2 群と比較して有意に低値であった。血清 C3a は JL-1 群で有意に高値であり、胎盤組織の C1q、C3、C4d 免疫組織化学染色では他の 2 群と比較して有意に広範な沈着を認めた。次に、JL-1 を投与した anti-C5aR

群は 8 匹、mIgG を投与した anti-C5aR 群は 5 匹、JL-1 を投与した ctrIgG 群は 10 匹、mIgG を投与した ctrIgG 群は 5 匹であった。anti-C5aR を前投与した JL-1 群において、ctrIgG を前投与した JL-1 群と比較して胎仔吸収率、胎仔重量、胎盤重量、血清 C3a 値の有意な差を認め、mIgG を投与した 2 群といずれの評価項目でも同程度の値であった。血清 C3a は JL-1 群で有意に高値であり、胎盤組織の免疫組織化学染色においては、anti-C5aR を前投与した JL-1 群において、ctrIgG を前投与した JL-1 群と比較して C1q、C3、C4d ぞれぞれの沈着の程度は弱く観察された。

【考察】第一章では抗 C1q 抗体が uRPL 患者血漿において高頻度かつ高力価で検出され、不育症の原因の 1 つである OAPS 患者においても同様であることを明らかとした。APS 患者および他の自己抗体を有する不育症患者において抗 C1q 抗体が高頻度で検出されたという既報はあるものの、明らかな原因を有さない不育症患者においても高頻度で検出された点は新たな知見であった。本臨床研究デザインの限界から経時的な抗体価の推移および多施設での検討については行えておらず今後の課題である。

第二章では、抗 C1q 抗体の妊娠へ与える影響を検討するため妊娠マウスに抗 C1q モノクローナル抗体を投与することで、高率に胎仔死亡、子宮内胎仔発育不全が観察され、血清および胎盤病理において補体活性化を確認することで、抗 C1q 抗体が不育症における新たな病因の 1 つである可能性が示唆された。第三章では、抗 C1q モノクローナル抗体を用いた流産モデルマウスに抗 C5aR 抗体によって補体活性化経路を阻害することで流産モデルマウスにおいて観察された妊娠合併症の所見が緩和されることを示し、補体活性化経路の遮断が不育症において流産予防治療となる可能性が考えられた。

【結論】抗 C1q 抗体は原因不明の不育症の新たな病因の 1 つである可能性を見いだし、原因不明の不育症患者のうち抗 C1q 抗体を有する患者群においては抗補体治療が有効な治療となる可能性が示された。

1. 緒言

1.1. 不育症

不育症（recurrent pregnancy loss：RPL）は、一般的には 2 回以上の流産および子宮内胎児死亡の既往がある状態と定義され、約 5%の頻度で認められる(Sugiura-Ogasawara et al., 2014)。その原因の 41%は胎児染色体異常に起因し、母体側の要因としては自己免疫疾患、子宮奇形、内分泌代謝異常および凝固異常などがある一方、上記原因精査をうけるも約 25%が原因不明と分類される(Sugiura-Ogasawara et al., 2012)。この原因不明の不育症（unexplained recurrent pregnancy loss：uRPL）は、原因が特定されず病因に関しては多様性をもつ患者集団であると推測されるが、患者血清における補体価高値、胎盤組織における補体の著明な沈着を認めることから、不育症と補体活性化との関連が示唆されている(Girardi, 2018; Regal et al., 2015)。実際に Maternal-fetal interface においては補体制御因子が豊富であり、これらによる補体活性化の制御がなされていることが正常妊娠に重要であるとされる(Girardi et al., 2020)。

原因不明の絨毛膜炎および不育症における検討では、ヒト胎盤組織において古典的補体経路活性化の指標の 1 つである補体成分 C4d 沈着が特徴的であることが示され(Bendon et al., 2015; Meuleman et al., 2016; Rudzinski et al., 2013)、不育症の原因の 1 つである産科的抗リン脂質抗体症候群（obstetric antiphospholipid syndrome: OAPS）においては C4d 沈着の程度と胎児予後が相関することが示された(Cohen et al., 2011)。またマウスにおける検討では抗リン脂質抗体による胎盤組織での補体活性化およびそれによって生じるアナフィラトキシンである C5a, C3a によって惹起される炎症病態が不育症に関わることが示された(Girardi et al., 2003; Holers et al., 2002)。

原因不明の不育症に対する治療は、アスピリンおよびヘパリンを用いた抗凝固治療が行われるが治療効果は限定的であり(de Jong et al., 2014; Kaandorp et al., 2010)、他にステロイド治療、免疫グロブリン大量療法なども行われるものの(Christiansen et al., 2015; Han et al., 2012; Laskin et al., 1997; Maruyama et al., 1994)、有効性は確立していない。近年、炎症性サイトカインのうち TNF-α（tumor necrosis factor-alpha）の遺伝子多型との関連(Li et al., 2016)および胎盤における炎症および免疫異常が病態に関

わることが示され(Berman et al., 2005; Saito et al., 2016)、治療として抗TNFα 抗体を用いた抗サイトカイン治療、カルシニューリン阻害薬による免疫抑制治療などが行われている(Nakagawa et al., 2017; Nakagawa et al., 2015; Winger et al., 2009)。OAPS 患者の妊娠管理では流産予防としてヘパリン治療が行われるが、抗リン脂質抗体による流産モデルマウスにおいて、ヘパリンは抗凝固治療としての効果のみならず抗補体治療として抗炎症効果を示すことが明らかとなり(Girardi et al., 2004)、過度の補体活性化を制御することが有力な治療となりうることが示された。一方で、原因不明の不育症患者においても補体活性化を認めるものの(Sugiura-Ogasawara et al., 2006)、どのような患者で補体活性化を認めるか、また抗補体治療が有効な患者群が存在するかどうかの知見は未だ得られていない。

1.2. 抗 C1q 抗体

補体蛋白の１つである C1q を自己抗原とする抗 C1q 抗体は腎炎を有する全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus：SLE）患者との関連が指摘され(Siegert et al., 1991)、その抗体価はループス腎炎の再燃を予測することが示された(Matrat et al., 2011; Meyer et al., 2009)。抗 C1q 抗体は自己免疫疾患、感染症などでも認められ、特に低補体性蕁麻疹様血管炎（hypocomplementemic urticarial vasculitis : HUV）患者の 100%で、混合性結合組織病（mixed connective tissue disease：MCTD）の 94%で、血管炎を伴う関節リウマチ患者の 77%で検出されるが、これら疾患では腎炎は通常併発しない(Beurskens et al., 2015; Kallenberg, 2008)。抗 C1q 抗体が SLE 患者において腎組織障害を来す機序には、C1q が結合し形成された免疫複合体の存在が必要であり、可溶性 C1q には結合せず bound form C1q の CLR（collagen like region）に対する自己抗体が古典的経路を介した補体活性化を来すことで病原性をもつことが示され、SLE と HUV などの他疾患とを鑑別する組織特異的な作用の理由とされた(Trouw et al., 2003a; Trouw et al., 2004; Trouw et al., 2003b)。

1.3. 仮説および本研究の目的

妊娠において胎盤にはC1qが広く沈着する(Agostinis et al., 2017; Sinha et al., 1984)ことから抗C1q抗体がC1qと結合することで過度の補体活性化を引き起こした結果不育症における病原性をもちうるのではないかとの仮説を立てた。本研究では、不育症患者の抗C1q抗体の陽性率を明らかとし、その病原性を検討することを目的とした。

2.　略語表

本文中のおよび図中で使用した略語は以下の通りである。

aCL	anticardiolipin antibodies
ACR	American College of Rheumatology
Anti-C1q	anti-C1q antibody
Anti-C5aR	anti- complement component C5a receptor antibody
APS	antiphospholipid syndrome
aPS/PT	phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibodies
CLR	collagen like region
CTD	connective tissue diseases
C1q	complement component 1q subcomponent
C3a	complement component C3a
C5a	complement component C5a
C5aR	complement component C5a receptor
db	decidua basalis
DM	dermatomyositis
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
EULAR	European League Against Rheumatism
HC	healthy controls
HUV	hypocomplementemic urticarial vasculitis
IgG2b	immunoglobin G2b
LA	lupus anticoagulant
lz	labyrinth zone
MCTD	mixed connective tissue disease
mIgG	monoclonal IgG
OAPS	obstetric antiphospholipid syndrome
PBS	phosphate buffered saline
PM	polymyositis
RA	rheumatoid arthritis
RPL	recurrent pregnancy loss
SD	standard deviations
SLE	systemic lupus erythematosus

SS	Sjögren’s syndrome
SSc	systemic sclerosis
Th17	T helper 17 cell
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha
uRPL	unexplained recurrent pregnancy loss

3.　第一章

uRPL 患者および OAPS 患者における抗 C1q 抗体価の検討

3.1. 緒言

RPL と補体活性化との関連が示唆され(Altemani et al., 1992; Girardi, 2018; Kwak-Kim et al., 2013)、不育症の１疾患である OAPS 患者においても、重要な病態の１つとして補体活性化の関与が知られている(Girardi et al., 2003; Girardi et al., 2004)。近年抗リン脂質抗体症候群（antiphospholipid syndrome : APS）患者において抗 C1q 抗体が高率に認められ、APS における病態機序の１つとされる補体活性化との関連が示された(Oku et al., 2016)。妊娠において、胎盤には C1q が広く沈着し(Sinha et al., 1984)、C1q は正常妊娠を維持する役割をもつとされる(Agostinis et al., 2017)。妊娠と抗 C1q 抗体の存在との関連については、抗リン脂質抗体および抗絨毛性ゴナドトロピン抗体陽性患者で健常者と比較して高率に認められたという報告があるものの(Menzhinskaya et al., 2015)、抗 C1q 抗体と uRPL および OAPS との関連についての知見は得られていない。

uRPL 患者および OAPS 患者の血漿における抗 C1q 抗体を ELISA (enzyme linked immune-solvent assay) 法により測定し、uRPL および OAPS と抗 C1q 抗体の関係を明らかにすることを目的とした。また血中補体価と抗 C1q 抗体測定結果との関連について検討した。

3.2. 対象と方法

3.2.1. 研究デザイン

本研究は、後ろ向き横断研究である。原因不明の不育症患者（uRPL）の保存血漿における抗 C1q 抗体の陽性率および抗体価を測定し、血漿保存時の患者年齢、妊娠歴、出産歴、臨床検査値の各項目を医療記録から収集した。この研究はヘルシンキ宣言と臨床試験の基本理念に従って施行し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 015-0072）。

3.2.2. 対象患者

2008 年から 2013 年に名古屋市立大学産婦人科を受診し、不育症の原因が特定できなかった患者および 2010 年から 2016 年に北海道大学病院内科 II で加療された OAPS 患者を対象とした。また出産歴があり妊娠合併症の既往を有しない全身性自己免疫疾患患者（connective tissue diseases: : CTD）および健常者（healthy controls: : HC）を対照群とした。CTD 患者のうち、抗 C1q 抗体を高頻度に認める全身性エリテマトーデス（systemic lupus erythematosus：SLE）、混合性結合組織病（mixed connective tissue disease：MCTD）、および関節リウマチ（rheumatoid arthritis：RA）に血管炎を伴う患者(Kallenberg, 2008)は除外した。OAPS、CTD、HC 群は uRPL 群と年齢をそろえ、20 歳未満および 45 歳以上は除外した。APS の診断は、2003 年札幌クライテリアシドニー改変(Miyakis et al., 2006)を用いて行った。RA の診断は 2010 年アメリカリウマチ学会（American College of Rheumatology：ACR）/ヨーロッパリウマチ学会（European League Against Rheumatism：EULAR）分類基準(Aletaha et al., 2010a; Aletaha et al., 2010b)、強皮症（systemic sclerosis：SSc）は 2013 年 ACR/EULAR 分類基準(van den Hoogen et al., 2013)、多発性筋炎/皮膚筋炎（polymyositis/dermatomyositis：PM/DM）は 1975 年の Bohan と Peter の診断基準(Bohan et al., 1975a, b)、シェーグレン症候群（Sjögren’s syndrome：SS）は 2016 年 ACR/EULAR 分類基準(Shiboski et al., 2017)をそれぞれ用いた。

3.2.3. 抗 C1q 抗体測定

血漿中の抗 C1q 抗体は、ELISA 法による測定キット (Buhlmann Laboratories AG, Switzerland) を用いて行った。付属の測定マニュアルに従い 15 U/mL を cut-off とし、抗 C1q 抗体陽性あるいは陰性の判断をした。

3.2.4. 補体価の評価

保存血液検体が利用可能な uRPL 群において、保存血漿から C1q の測定を行い、また診療録から血液採取時の C3、C4、CH50 の各測定値を得て、抗 C1q 抗体測定結果との関連を検討した。

3.2.5. 統計学的解析方法

抗体価は中央値［四分位範囲］で示し、他の連続変数は平均 ± 標準偏差（standard deviations：SD)、カテゴリー変数は実数値もしくはパーセンテージで示した。連続変数の群間比較は対応のない t 検定あるいは Wilcoxon 順位和検定を用い、抗体価の群間比較は Dunn 法による事後比較を用いた。抗体陽性率の群間比較は、Wilcoxon 検定を用いた。抗 C1q 抗体価と C1q 値との相関関係は Spearman 順位相関係数を用いて解析した。抗 C1q 抗体の有無による血清補体価の比較は多重比較による調整を行わない one-way ANOVA を用いて解析した。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は JMP®10.0.2（SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA）を用いた。

3.3. 結果

3.3.1. 患者背景

uRPL 群 134 名、OAPS 群 27 名、CTD 群 27 名、HC27 名を対象とした。CTD 群での疾患別内訳は、RA 12 例、DM/PM 5 例、SSc 4 例、SS 4 名、その他 2 名であった。

患者背景を Table 1 に示す。年齢に各群間で差は認めなかった。uRPL 群で抗リン脂質抗体が検出されたのは、lupus antigoagulant（LA） 3 例（2 %）、anti-cardiolipin antibody（aCL） 2 例（1 %）であったが、いずれも OAPS の分類基準は満たさなかった。uRPL 群において抗リン脂質抗体のうち phosphatidylserine-dependent antiprothorombin antibodies （aPS/PT）は検出されなかった。

患者 1 人あたりの妊娠回数（平均 ± SD）はそれぞれ uRPL 群（3.1 ± 1.4）、OAPS 群（2.8 ± 1.3）、CTD 群（2.3 ± 1.1）、HC（1.9 ± 1.7）であったが、出産回数（平均 ± SD）は uRPL 群（0.23 ± 0.46）および OAPS 群（0.96 ± 0.75）では低値となり HC 群（1.3 ± 0.6） と比較して有意な差を認めたが、CTD 群（1.4 ± 1.2）では HC 群との有意差は認められなかった。

Table 1. uRPL 群、OAPS 群、CTD 群および HC 群における患者背景

	uRPL	OAPS	CTD	HC
患者数, n	134	27	27	27
年齢 (歳)	33.7 ± 4.5	35.6 ± 5.1	36.3 ± 5.6	35.8 ± 5.6
妊娠回数/人	3.1 ± 1.4	2.8 ± 1.3	2.3 ± 1.1	1.9 ± 1.7
出産回数/人	0.23 ± 0.46	0.96 ± 0.75	1.4 ± 1.2	1.3 ± 0.6
LA 陽性, n (%)	3 (2 %)	18 (67 %)	2 (7 %)	1 (4 %)
aCL 陽性, n (%)	2 (1 %)	15 (56 %)	1 (4 %)	0 (0 %)
aPS/PT 陽性, n (%)	0 (0 %)	13 (48 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

カテゴリー変数は患者数 (%)、 連続変数は平均 ± SD で示した。

aCL, anti-cardiolipin antibody: aPS/PT, phosphatidylserine-dependent antiprothorombin antibodies: CTD, connective tissue disease: HC, healthy controls: LA, lupus anticoagulant: OAPS obstetric antiphospholipid syndrome: uRPL, unexplained recurrent pregnancy loss: SD, standard deviation:

3.3.2. 抗 C1q 抗体陽性率

uRPL 群 134 例、OAPS 群 27 名、CTD 群 27 名、HC 群 27 名の抗 C1q 抗体陽性率を Table 2 に示す。uRPL 群では 47 例（35 %）、OAPS 群では 8 例（30 %）、CTD 群では 3 例（11 %）、HC 群では 2 例（7 %）で抗 C1q 抗体が陽性であった。uRPL 群は HC と比較して抗 C1q 抗体陽性率は有意に高かった（$p<0.01$, Wilcoxon 検定）。OAPS 群は HC と比較して抗 C1q 抗体陽性率は有意に高かった（$p<0.05$, Wilcoxon 検定）が、CTD 群と HC 群との間には統計学的な有意差は認められなかった。

Table 2. uRPL、OAPS、CTD および HC 各群における抗 C1q 抗体陽性率

	uRPL (N=134)	OAPS (N=27)	CTD (N=27)	HC (N= 27)
Prevalence of anti-C1q, N (%) (cut off >15 U/mL)	47 (35 %)**	8 (30 %)*	3 (11 %)	2 (7 %)

カテゴリー変数は患者数（%）で示した。*p<0.05、**p<0.01、Wilcoxon 検定を用いて HC 群と比較した。

CTD, connective tissue disease: HC, healthy controls: OAPS obstetric antiphospholipid syndrome: uRPL, unexplained recurrent pregnancy loss:

3.3.3. 抗 C1q 抗体価

uRPL 群 134 例、OAPS 群 27 名、CTD 群 27 名、HC 群 27 名の抗 C1q 抗体測定値を Figure 1 に示す。各群における抗体価（中央値［四分位範囲］）は、uRPL 群では 12［8.0-21.0］U/mL、OAPS 群では 9.8［0-22.0］U/mL、CTD 群では 2.1［0-8.1］U/mL および HC 群では 0［0-1.8］U/mL であった。uRPL 群および OAPS 群は HC 群と比較して有意に高力価であった。CTD 群と HC 群との間には統計学的な有意差は認められなかった。

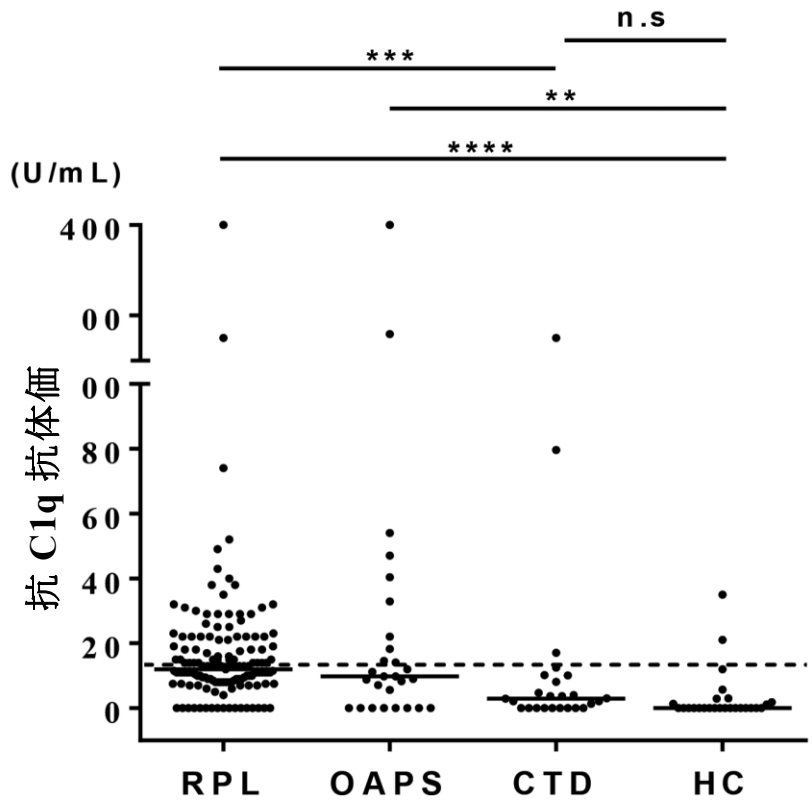


Figure 1. 血漿における抗 C1q 抗体価の比較

RPL 群では抗 C1q 抗体価は対照群と比較して有意に高力価であった。
(****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, Dunn's post hoc test)。
CTD, connective tissue disease: HC, healthy controls: OAPS obstetric antiphospholipid syndrome: uRPL, unexplained recurrent pregnancy loss:

3.3.5. uRPL 群における補体価と抗 C1q 抗体測定値の関連

uRPL 群のうち保存血液検体から血漿 C1q 値が測定できたのは 30 例であった。抗 C1q 抗体価と血漿 C1q 値との相関関係は認められなかった（Figure 2）。

血清 C3、C4、CH50 の測定値のすべてが診療録から得られたのは抗 C1q 抗体陽性例 17 例、抗 C1q 抗体陰性例 27 例であった。抗体陽性例と陰性例における補体価を比較したところ、C3 値は抗 C1q 抗体陽性例で有意に低値であった（83.0 ± 11.3 vs 96.2 ± 18.1 mg/dL, p=0.002）が、C4 値および CH50 値では有意な差は認められなかった。C4：17.5 ± 5.1 vs 19.1 ± 6.7 mg/dL, p=0.64、CH50：51.1 ± 10.6 vs. 54.9 ± 9.6 U/mL, p=0.30）（Figure 3）。

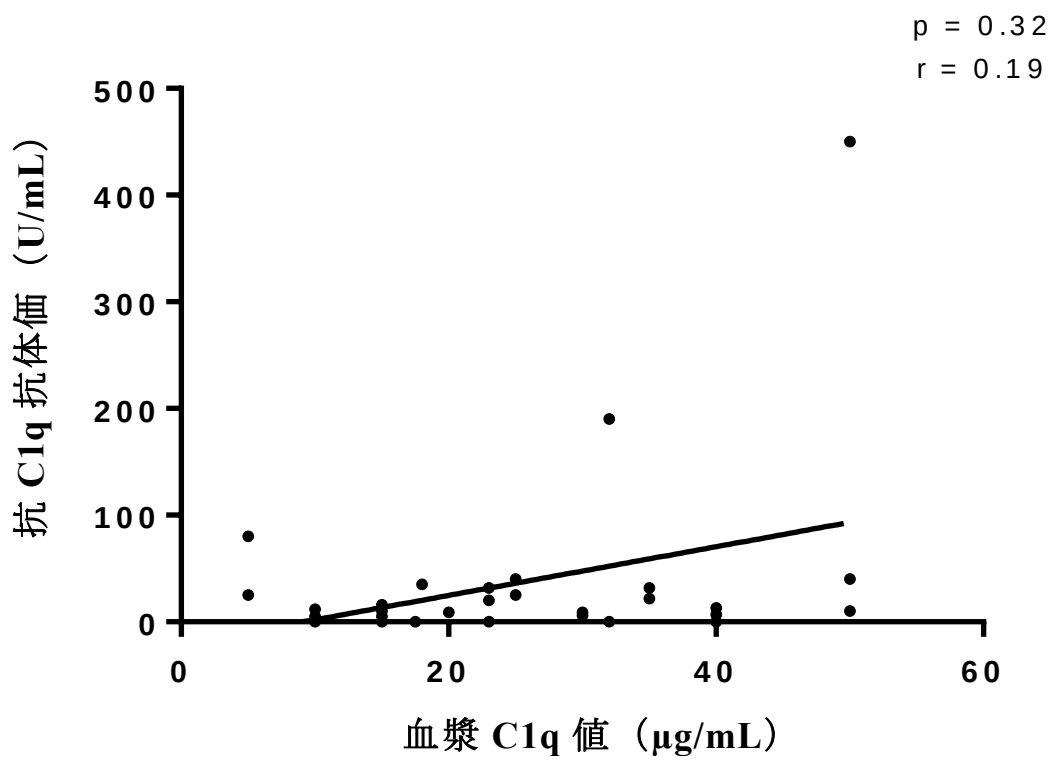


Figure 2. uRPL 患者における血漿 C1q 値と抗 C1q 抗体価との相関関係
血漿 C1q 値と抗 C1q 抗体価との間には相関関係は認められなかった（p=0.32, Spearman の順位相関係数 0.19）。

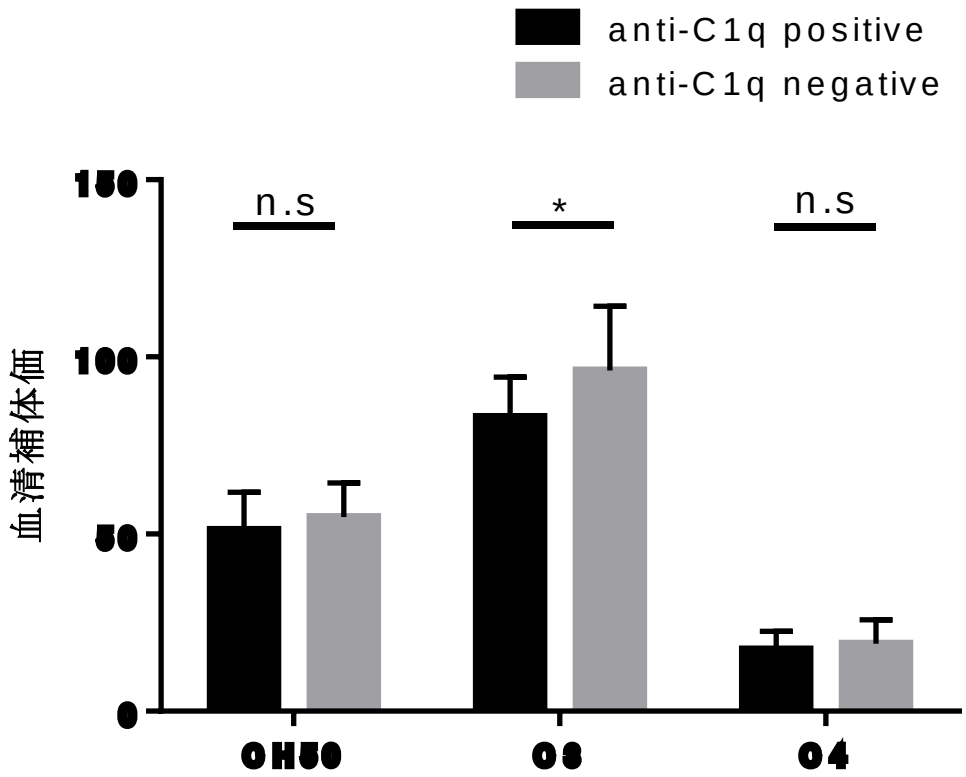


Figure 3. 抗 C1q 抗体陽性 uRPL 患者（17 例）および陰性 uRPL 患者（27 例）における血清補体価

抗 C1q 抗体陽性 uRPL 患者における血清 C3 値は抗体陰性患者より有意に低下していたが、C4, CH50 値には 2 群間で有意な差は認められなかった（*p=0.002, one-way ANOVA)。

3.4. 考察

uRPL 群および OAPS 群は、HC 群と比較して妊娠回数は多いが出産回数は有意に低く不育症の特徴を示していた。抗 C1q 抗体陽性率は uRPL 群および OAPS 群において HC 群と比較して有意に高いことが示されたが、HC 群における抗 C1q 抗体陽性率は既報(Sinico et al., 2005)と比較して高い結果であった。HC 群として対象とした数が少なかったことに加えて要因の 1 つとして、今回用いた ELISA キットは抗原として C1q 分子全体を用いており、病原性が示唆されている CLR に対する抗体のみならず様々な抗 C1q 抗体群を測定していることが推測された。また不育症患者の妊娠第 1 期における抗 C1q 抗体は、抗リン脂質抗体あるいは抗絨毛性ゴナドトロピン抗体を有する場合には陽性率が 20 %であったとの報告があるが(Menzhinskaya et al., 2015)、自己抗体を有さない不育症患者における抗 C1q 抗体陽性率、および抗体価の検討は未だなされておらず、本研究の結果は新たな知見であった。

次に、uRPL 群および OAPS 群における抗 C1q 抗体価は、出産歴があり妊娠合併症既往を有しない HC 群に比較して有意に高力価であった。抗 C1q 抗体価は、ループス腎炎においては疾患活動性ないしは再燃の指標になることが報告されており抗体価が病勢を反映すると考えられている(Emad et al., 2020; Gensous et al., 2017; Matrat et al., 2011; Meyer et al., 2009)。一方、uRPL 群における抗 C1q 抗体陽性/陰性間での補体価（C3、C4、CH50）の比較においては、C3 において 2 群間で有意差を認めたものの、C4、CH50 では統計学的な差は認められなかった。C3、C4 の値については既報では不育症で上昇あるいは減少しているという報告がそれぞれあり(Micheloud et al., 2007; Sugiura-Ogasawara et al., 2006)、uRPL は様々な背景患者を含んだ疾患群であることが推測される。uRPL の中で抗 C1q 抗体の有無によって補体価に違いがあるかどうかについては今までに報告はない。本研究では抗 C1q 抗体が補体活性化を惹起するかどうかを含めての検討はできなかったが、この点は横断的研究である本研究の限界でもあり、今後経時的な抗体価の推移を含めた前向き検討を行うことで不育症における抗 C1q 抗体価と臨床的特徴が明らかになる可能性が考えられた。

最後に、患者背景では uRPL 群で抗リン脂質抗体陽性例を 5 例認めたが、いずれも APS 分類基準は満たさなかった。CTD 群および HC 群においても APS 分類基準を満たさないものの抗リン脂質抗体陽性例を 3 例および 1 例

で認めた。CTD、HC における aPL 陽性頻度は様々な報告があり、それらと結果は大きな相違がないものであった。

次の研究として、妊娠時における抗 C1q 抗体の病原性について検討を行った。

4．第二章

抗 C1q モノクローナル抗体を用いた流産モデルマウスの確立

4.1. 緒言

第一章では原因不明の不育症患者において抗 C1q 抗体が高頻度かつ高力価に検出されることが示されたが、その病原性については不明のままである。不育症患者の胎盤組織に認められる C4d 沈着(Bendon et al., 2015; Meuleman et al., 2016; Rudzinski et al., 2013)や OAPS 患者由来の抗リン脂質抗体を投与したマウスでの検討で認められる補体活性化の結果(Girardi et al., 2003; Holers et al., 2002)から、不育症の病態に補体活性化が関わることが示されている。抗 C1q モノクローナル抗体を用いたマウスの検討では補体活性化を介した腎炎が誘発されることが示されており(Trouw et al., 2003b)、抗 C1q 抗体による補体活性化が不育症の病態へ関与するのではないかとの仮説を立てた。第二章では妊娠マウスを用いて抗 C1q 抗体が妊娠下で胎仔へ与える影響について検討を行うこととした。

抗マウス C1q モノクローナル抗体（JL-1）を用いて、妊娠マウスにおける胎仔および胎盤に与える影響を検討する。

4.2. 方法

4.2.1. 妊娠マウスにおける抗 C1q モノクローナル抗体投与方法の検討　-予備実験 1-

4.2.1.1. 方法

本研究は BALB/c AJcl マウスを用いて行い、マウスはすべて日本クレアより購入した。動物の取り扱いは「北海道大学動物実験に関する規定」に則り，北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った。実験には 8-12 週齢の雌マウスおよび 8-20 週齢の雄マウスを使用した。マウスは北海道大学動物実験施設の常温管理された specific-pathogen-free ルームで飼育した。雌マウスは 1 ケージに 3-5 匹を入れ性周期がそろうように飼育した。

雌雄の mating は、雌マウスの膣を目視で確認し発赤が強くなった状態の雌マウスを、1 匹ずつ飼育した雄マウスのケージ内へ、午後 5 時から午後 7 時までの間に移し行った。翌日午前 7 時から 9 時の間に雌マウスの膣プラグを目視で確認し、膣プラグが存在していた場合、確認日を妊娠 day1 として定めた。膣プラグが存在しない場合は、妊娠不成立と判断し、もとのケージに戻し以降 10 日間は mating を行わず、妊娠不成立であることを腹部の視診および触診によって確認した。

妊娠 day8 および day12 あるいはいずれかにおいて、妊娠した雌マウスをケージから出し、マウス保定器を用いて固定した状態で、JL-1（HM1096, Hycult Biotech）を 250 μg/kg, あるいは 500 μg/kg の容量で total 100 μL の PBS に溶解し尾静脈より投与した。手技は、短時間で行えることおよび麻酔の妊娠への影響が懸念されるため無麻酔で行った。妊娠 day8 あるいは day12 に 500 μg/kg の各投与群、妊娠 day8 および day12 に 250 μg/kg, あるいは 500 μg/kg の投与群の 4 群を対象とした。

妊娠マウスは、妊娠 day16 において頸椎脱臼による物理的方法によって安楽死処置を行い、開腹し子宮を摘出した。

4.2.1.2. 胎仔吸収率の算出

妊娠 day16 において摘出した子宮内から生存した胎仔および吸収された胎仔を取り出し、全胎仔数に占める吸収胎仔割合である胎仔吸収率（resorption rate）を算出した。吸収された胎仔は黒色の凝血塊様で認められた。

4.2.1.3. 結果　-抗 C1q モノクローナル抗体投与方法の検討-

各群での胎仔吸収率は、JL-1 を妊娠 day8 に 500 μg/kg で投与した群（25 %, 10 %, 25 %）、JL-1 を妊娠 day12 に 500 μg/kg で投与した群（0 %, 14.3 %, 50 %）、JL-1 を妊娠 day8 および day12 に 250 μg/kg で投与した群（0 %, 12.5 %, 30 %）、JL-1 を妊娠 day8 および day12 に 500 μg/kg で投与した群（36.4 %, 67 %, 28.6 %, 50 %, 41.7 %, 36.4 %, 44.4 %）であった（Figure 4）。JL-1 を妊娠 day8 および day12 に 500 μg/kg で投与した群が他の投与方法よりも胎仔吸収率が高かった。

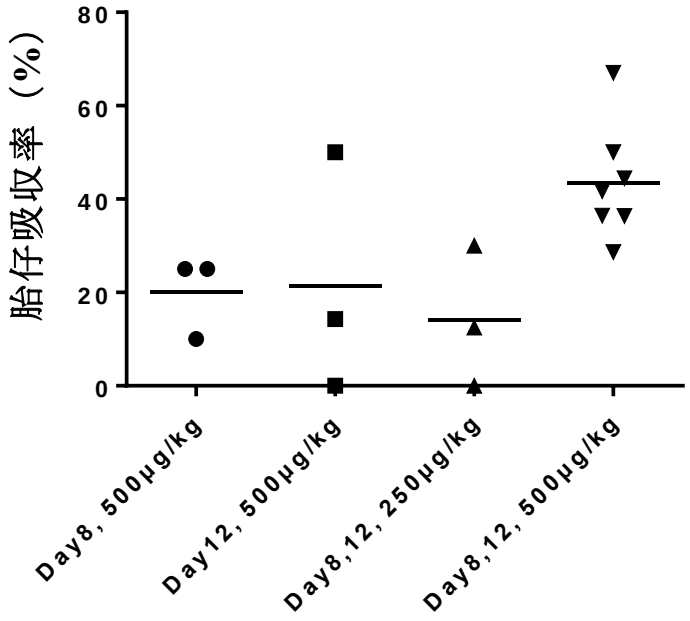


Figure 4. 妊娠マウスにおける各 JL-1 投与方法による胎仔吸収率

妊娠マウスに抗 C1q モノクローナル抗体（JL-1）を尾静脈より投与した。

JL-1 を妊娠 day8 および day12 に 500 μg/kg 投与した群で、他の投与方法（妊娠 day8 に 500 μg/kg で投与群、妊娠 day12 に 500 μg/kg で投与群、妊娠 day8 および day12 に 250 μg/kg で投与群）よりも胎仔吸収率が高かった。

4.2.2. 抗 C1q モノクローナル抗体投与による胎仔評価時期の検討　-予備実験 2-

4.2.2.1. 方法

4.2.1.と同様の方法で、妊娠 day8 および day12 において妊娠した雌マウスをケージから出し、マウス保定器を用いて固定した状態で、JL-1（HM1096, Hycult Biotech）（JL-1 群）あるいは JL-1 の isotype control としてモノクローナル IgG2b (M077-3, MBL)（mIgG 群）を 500 μg/kg の容量で total 100 μL の PBS に溶解し尾静脈より投与した。加えて PBS 100 μL を尾静脈より投与した PBS 群の 3 つの群を対象とした。手技は、短時間で行えることおよび麻酔の妊娠への影響が懸念されるため無麻酔で行った。

妊娠マウスは、妊娠 day14、day15、day16 において頸椎脱臼による物理的方法によって安楽死処置を行い、開腹し子宮を摘出した。

4.2.2.2. 胎仔重量の測定

妊娠 day14-16 において摘出した子宮内から生存した胎仔を取り出した。生存した胎仔を子宮から剥離し、羊膜から剥離したのち電子上皿天秤を用いて重量を測定し平均値を求めた。

4.2.2.3. 結果　-胎仔評価時期の検討-

妊娠 day15 における JL-1 投与群および mIgG 投与群のマウスでは胎仔が確認できず妊娠不成立であったため胎仔重量の測定ができなかった。JL-1 投与群のうち、妊娠 day14 の胎仔数は 8、妊娠 day16 の胎仔数は 9 であり、平均重量はそれぞれ 182.5 mg、232.2 mg であった。mIgG 投与群のうち、妊娠 day14 の胎仔数は 9、妊娠 day16 の胎仔数は 11 であり、平均重量はそれぞれ 111.1 mg、311.8 mg であった。PBS 投与群のうち、妊娠 day14 の胎仔数は 8、妊娠 day15 の胎仔数は 8、妊娠 day16 の胎仔数は 10 であり、平均重量はそれぞれ 150 mg、236.3 mg、290 mg であった（Figure 5）。

3 群ともに妊娠日の経過により胎仔重量の増加傾向が続くことが確認でき、妊娠 day17 以降は出産にいたる可能性があるため、妊娠 day16 を胎仔評価日に決定した。

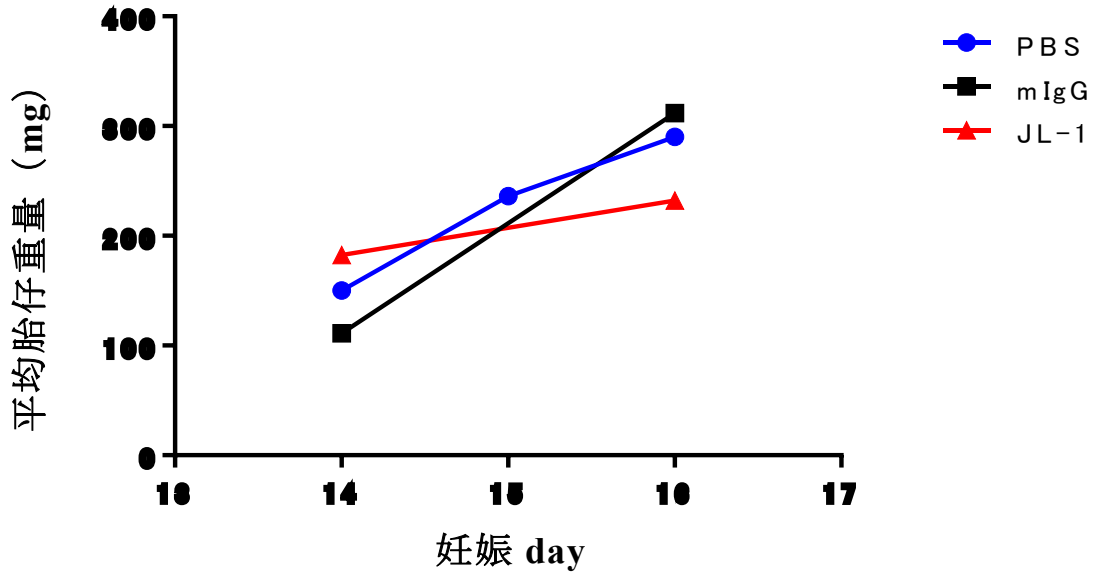


Figure 5. JL-1, mIgG, PBS 各投与妊娠マウス（各 n=1）における胎仔平均重量

妊娠マウスにぞれぞれ抗 C1q モノクローナル抗体（JL-1)、モノクローナル IgG2b（mIgG）あるいは PBS を尾静脈より投与した。
各投与群においても胎仔平均重量は妊娠 day14 以降 day16 まで増加傾向がつづく。

4.2.3. 抗 C1q モノクローナル抗体による妊娠マウスへの影響に関する検討

4.2.3.1. 方法

本研究は BALB/c AJcl マウスを用いて行い、マウスはすべて日本クレアより購入した。動物の取り扱いは「北海道大学動物実験に関する規定」に則り，北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った．実験には 8-12 週齢の雌マウスおよび 8-20 週齢の雄マウスを使用した。マウスは北海道大学動物実験施設の常温管理された specific-pathogen-free ルームで飼育した．雌マウスは 1 ケージに 3-5 匹を入れ性周期がそろうように飼育した。

雌雄の mating は、雌マウスの膣を目視で確認し発赤が強くなった状態の雌マウスを、1 匹ずつ飼育した雄マウスのケージ内へ、午後 5 時から午後 7 時までの間に移し行った。翌日午前 7 時から 9 時の間に雌マウスの膣プラグを目視で確認し、膣プラグが存在していた場合、確認日を妊娠 day1 として定めた。膣プラグが存在しない場合は、妊娠不成立と判断し、もとのケージに戻し以降 10 日間は mating を行わず、妊娠不成立であることを腹部の視診および触診によって確認した。

妊娠 day8 および day12 において、妊娠した雌マウスをケージから出し、マウス保定器を用いて固定した状態で、total 100μL の PBS に溶解した JL-1（HM1096, Hycult Biotech）（JL-1 群）あるいは JL-1 の isotype control としてモノクローナル IgG2b (M077-3, MBL)（mIgG 群）を 500 μg/kg の容量で尾静脈より投与した。また PBS 群として PBS 100 μL を尾静脈より投与し計 3 群で検討した。手技は、短時間で行えることおよび麻酔の妊娠への影響が懸念されるため無麻酔で行った。

妊娠マウスは、妊娠 day16 において頸椎脱臼による物理的方法によって安楽死処置を行い、心臓血をすみやかに採取し血清を分離した。

4.2.3.2. 胎仔吸収率、胎仔重量および胎盤重量の測定

妊娠 day16 において摘出した子宮内から全胎仔を取り出し、全胎仔数に占める吸収胎仔割合である胎仔吸収率（resorption rate）を算出した。吸収された胎仔は黒色の凝血塊様で認められた。生存した胎仔および胎盤は１つ１つ剥離し電子上皿天秤を用いて重量を測定した。

4.2.3.3. 血清 C3a および C1q 値の測定

妊娠 day16 において採取した血清を用いて、C3a 濃度を ELISA kit (SEA387Mu, Cloud-Clone Corp) で、C1q 濃度を ELISA kit (HK211, Hycult Biotech) で測定した。

4.2.3.4. 胎盤の免疫組織化学染色

妊娠 day16 に採取した胎盤を OCT コンパウンドに埋没させ凍結し、10 μm の厚さで組織切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。4 %パラホルムアルデヒドで 4 ℃、7 分間固定し、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するため 1 %過酸化水素を混ぜたメタノールに室温で 30 分間浸した。PBS で洗浄後、一次抗体 ラット抗マウス C1q モノクローナル抗体 (HM1044, Hycult Biotech)、ラット抗マウス C3 モノクローナル抗体（HM1045, Hycult Biotech）を 200 倍希釈、ラビット抗マウス C4d ポリクローナル抗体（HP8033, DAKO）を 50 倍希釈で滴下し、室温で 60 分間静置した。PBS で洗浄後、二次抗体ビオチン化抗ラットまたは抗ラビット IgG を 100 倍希釈で滴下し、室温で 30 分間静置した。Horseradish peroxidase 標識ストレプトアビジン（PK4000, Vector）を用いて検出し、3,3’-diaminobenzidine 染色（DAKO）およびヘマトキシリンで染色した。

4.2.3.5. 統計学的解析方法

胎仔吸収率、胎仔重量、胎盤重量、血清 C3a 値、血清 C1q 値は、平均値および標準偏差（SD）で表記し、JL-1 群、mIgG 群、PBS 群の 3 群間で Tukey's honestly significant difference を用いて多重比較検定を行った。

胎盤組織における C1q、C3、C4d 各免疫組織染色では 400 倍で病理像を撮影した画像をもとに、任意の 5 視野における胎盤組織全体の面積に対する染色陽性面積率を、Image J を用いて画像解析を行い定量化した。各染色陽性面積率は JL-1 群、mIgG 群、PBS 群の 3 群間で one-way ANOVA 法によって比較した。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は GraphPad Prism Software 6（GraphPad, San Diego, California, USA）を用いて行った。

4.3. 結果

4.3.1. 各群における検討対象マウス数

Mating の翌日に膣プラグの存在を確認したのは、Jl-1 群は 9 匹、mIgG 群は 11 匹、PBS 群は 9 匹であった。うち、JL-1 群で 1 匹、mIgG 群で 2 匹、PBS 群で 1 匹は妊娠 day16 において胎仔が確認できなかった。また妊娠マウスのうち、mIgG 群で 3 匹、PBS 群で 3 匹については、妊娠中に給水プラグの不具合により飼育ケージが水没する等の高ストレス状態になったため検討から除外した。残る JL-1 群 9 匹、mIgG 群 6 匹、PBS 群 5 匹について検討した。

4.3.2. 摘出した子宮、胎仔および胎盤の肉眼像

各群における摘出した子宮、胎仔および胎盤の代表的な肉眼像を Figure 6 および 7 に示す。

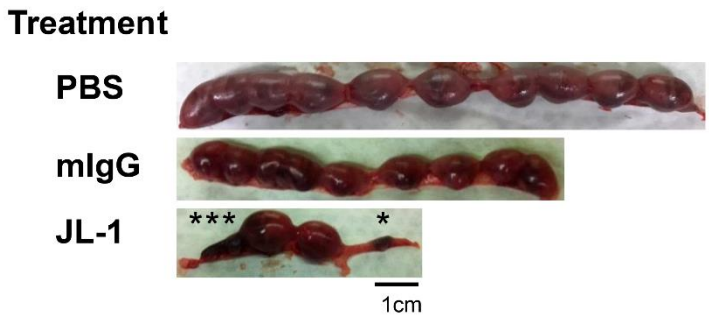


Figure 6. PBS、mIgG および JL-1 各群における摘出した子宮の肉眼像

妊娠 day16 において摘出した子宮において吸収胎仔は黒色の凝血塊様に認められた。生存胎仔および吸収胎仔を合計した全胎仔にしめる吸収胎仔の割合（resorption rate）を算出した。

*吸収胎仔

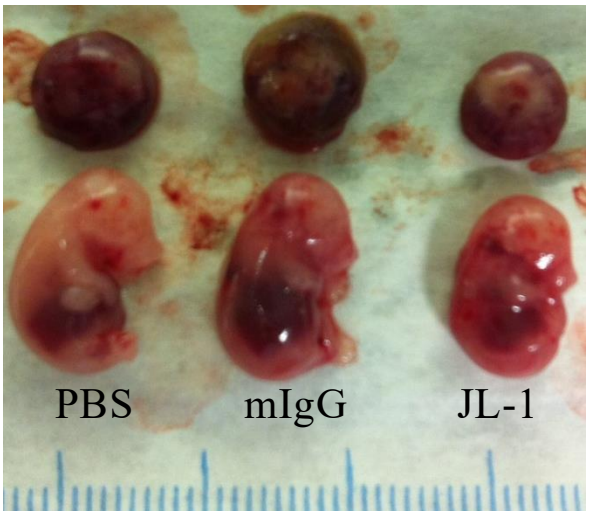


Figure 7. PBS、mIgG および JL-1 各群における子宮内より摘出した胎盤（上）および胎仔（下）の肉眼像

妊娠 day16 において個々の羊膜を剥離し摘出した胎盤および胎仔を示す。それぞれの重量を測定した。

4.3.3. 胎仔吸収率

JL-1 群、mIgG 群、PBS 群の 3 群における胎仔吸収率を Figure 8 に示す。胎仔吸収率は、JL-1 群において 0.44 ± 0.12、mIgG 群において 0.16 ± 0.11、PBS 群において 0.14 ± 0.15 であった（平均 ± SD）。JL-1 群は、mIgG 群（$p<0.01$、Turkey's honestly significant difference）および PBS 群（$p<0.01$、Turkey's honestly significant difference）と比較して有意に高率であった。

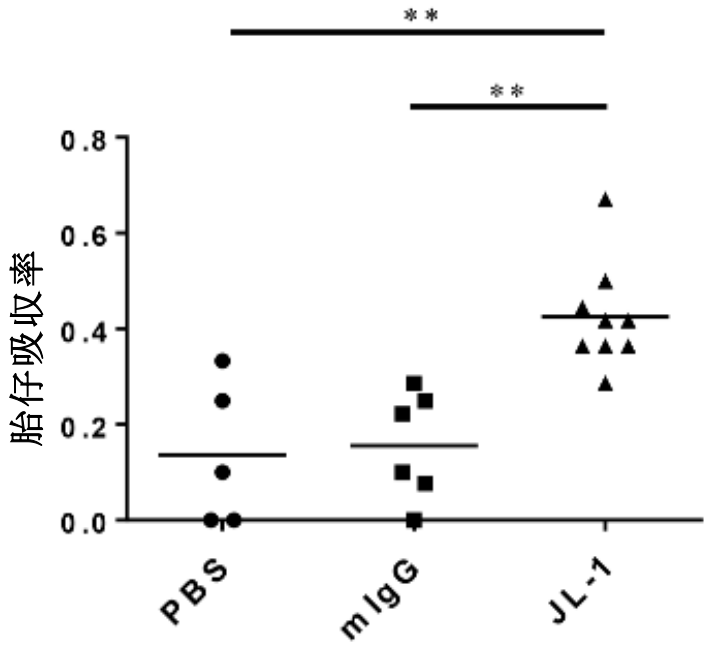


Figure 8. PBS 群、mIgG 群および JL-1 群における胎仔吸収率

妊娠 day16 における胎仔吸収率を算出した。

JL-1 群の胎仔吸収率は対照群である mIgG 群および PBS 群と比較して有意に高値であった。

**p<0.01、Turkey's honestly significant difference

4.3.4. 胎仔重量

JL-1 群、mIgG 群、PBS 群の 3 群における胎仔重量を Figure 9 に示す。胎仔重量は、JL-1 群において 322 ± 98 mg、mIgG 群において 358 ± 70 mg、PBS 群において 381 ± 76 mg であった（平均 ± SD）。胎仔数は、JL-1 群 38 匹、mIgG 群 46 匹、PBS 群 39 匹であった。胎仔重量は JL-1 群において、mIgG 群（$p<0.05$、Turkey's honestly significant difference）および PBS 群（$p<0.01$、Turkey's honestly significant difference）と比較して有意に低値であった。

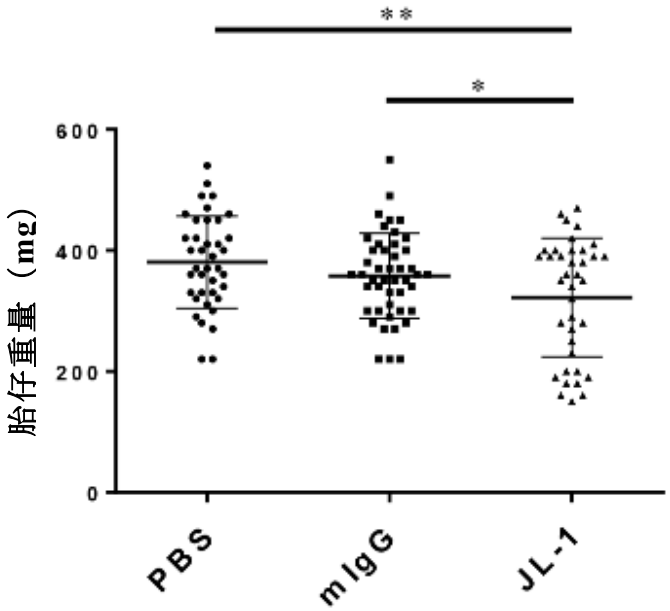


Figure 9. PBS 群、mIgG 群および JL-1 群における胎仔重量

妊娠 day16 における胎仔の重量を計測した。

JL-1 群の胎仔重量は対照群である mIgG 群および PBS 群と比較して有意に低値であった。

*p<0.05、**p<0.01、Turkey's honestly significant difference

4.3.5. 胎盤重量

JL-1 群、mIgG 群、PBS 群の 3 群における胎盤重量を Figure 10 に示す。胎盤重量は、JL-1 群において 138 ± 14 mg、mIgG 群において 148 ± 13 mg、PBS 群において 152 ± 13 mg であった（平均 ± SD）。胎盤数は、JL-1 群 38、mIgG 群 46、PBS 群 39 であった。胎盤重量は JL-1 群において、mIgG 群（$p<0.01$、Turkey's honestly significant difference）および PBS 群（$p<0.0001$、Turkey's honestly significant difference）と比較して有意に低値であった。

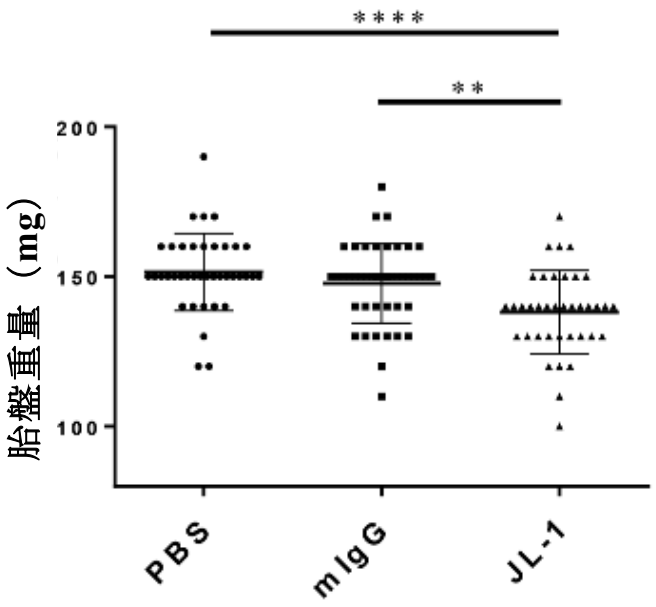


Figure 10. PBS 群、mIgG 群および JL-1 群における胎盤重量

妊娠 day16 における胎盤の重量を計測した。

JL-1 群の胎盤重量は対照群である mIgG 群および PBS 群と比較して有意に低値であった。

****p<0.0001、**p<0.01、Turkey's honestly significant difference

4.3.6. 血清 C3a および C1q 値

JL-1 群 9 匹、mIgG 群 6 匹、PBS 群 5 匹のうち採取した血清について溶血等を認める検体は除外し、JL-1 群 6 検体、mIgG 群 5 検体、PBS 群 3 検体について検討した。JL-1 群、mIgG 群、PBS 群の 3 群における血清 C3a 値を Figure 11 に、血清 C1q 値を Figure12 に示す。

血清 C3a 値（平均 ± SD）は、JL-1 群において 1810 ± 532 ng/mL、mIgG 群において 846 ± 140 ng/mL、PBS 群において 819 ± 172 ng/mL であり、JL-1 群において、mIgG 群（$p<0.01$、Turkey's honestly significant difference）および PBS 群（$p<0.01$、Turkey's honestly significant difference）と比較して有意に高値であった。

血清 C1q 値（平均 ± SD）は、JL-1 群において 141 ± 27 μg/mL、mIgG 群において 109 ± 10 μg/mL、PBS 群において 118 ± 21 μg/mL であり、JL-1 群における値は mIgG 群（$p=0.07$、Turkey's honestly significant difference）および PBS 群（$p=0.32$、Turkey's honestly significant difference）と比較して有意な差は認められなかった。

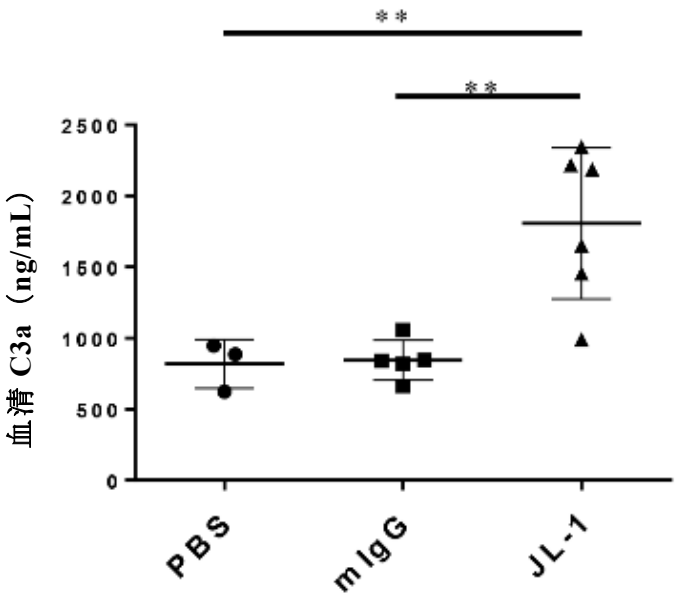


Figure 11. PBS 群、mIgG 群および JL-1 群における血清 C3a 値

妊娠 day16 に採取した血清中の C3a 値を測定した。

JL-1 群の血清 C3a 値は対照群である mIgG 群および PBS 群と比較して有意に低値であった。

**p<0.01、Turkey's honestly significant difference

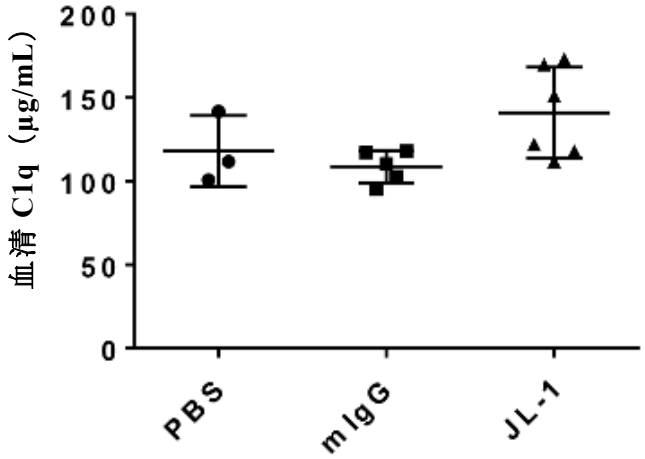


Figure 12. PBS 群、mIgG 群および JL-1 群における血清 C1q 値

妊娠 day16 に採取した血清中の C1q 値を測定した。

JL-1 群の血清 C1q 値は対照群である mIgG 群および PBS 群と比較して有意な差は認められなかった。Turkey's honestly significant difference

4.3.7. 免疫組織化学染色

胎盤数は、JL-1 群 38、mIgG 群 46、PBS 群 39 であった。3 群における免疫組織化学染色の代表的な病理像のうち弱拡大像を Figure13 に、400 倍視野を Figure 14 に示す。弱拡大像では、3 群ともに基底脱落膜部（decidua basalis：db）に C1q および C3 の広範な沈着を認めた。JL-1 群では加えて迷路部（labyrinth zone：lz）での沈着も顕著であった。400 倍視野では JL-1 群では、基底脱落膜部に C1q、C3、C4d のいずれも染色部位を強く認めたが、mIgG 群および PBS 群ではいずれの染色とも弱く認めるのみであった。

3 群における C1q、C3、C4d の各染色陽性面積率をランダムに撮影した 5 視野について算出した。C1q、C3、C4d の各染色陽性面積率を Figure 15 に示す。C1q 染色陽性面積率（平均 ±SD）は、JL-1 群で 22 ± 8 %, mIgG 群で 8.7 ± 7.2 %, PBS 群で 2.3 ± 1.0 %であり、有意な差を認めた（$p<0.05$, one-way ANOVA）。C3 染色陽性面積率（平均 ± SD）は、JL-1 群で 25 ± 17 %, mIgG 群で 8.7 ± 6.0 %, PBS 群で 6.4 ± 0.2 %であり、有意な差を認めた（$p<0.05$, one-way ANOVA）。C4d 染色陽性面積率（平均 ± SD）は、JL-1 群で 17 ± 8.6 %, mIgG 群で 5.6 ± 7.2 %, PBS 群で 2.1 ± 1.5 %であり、有意な差を認めた（$p<0.05$, one-way ANOVA）。

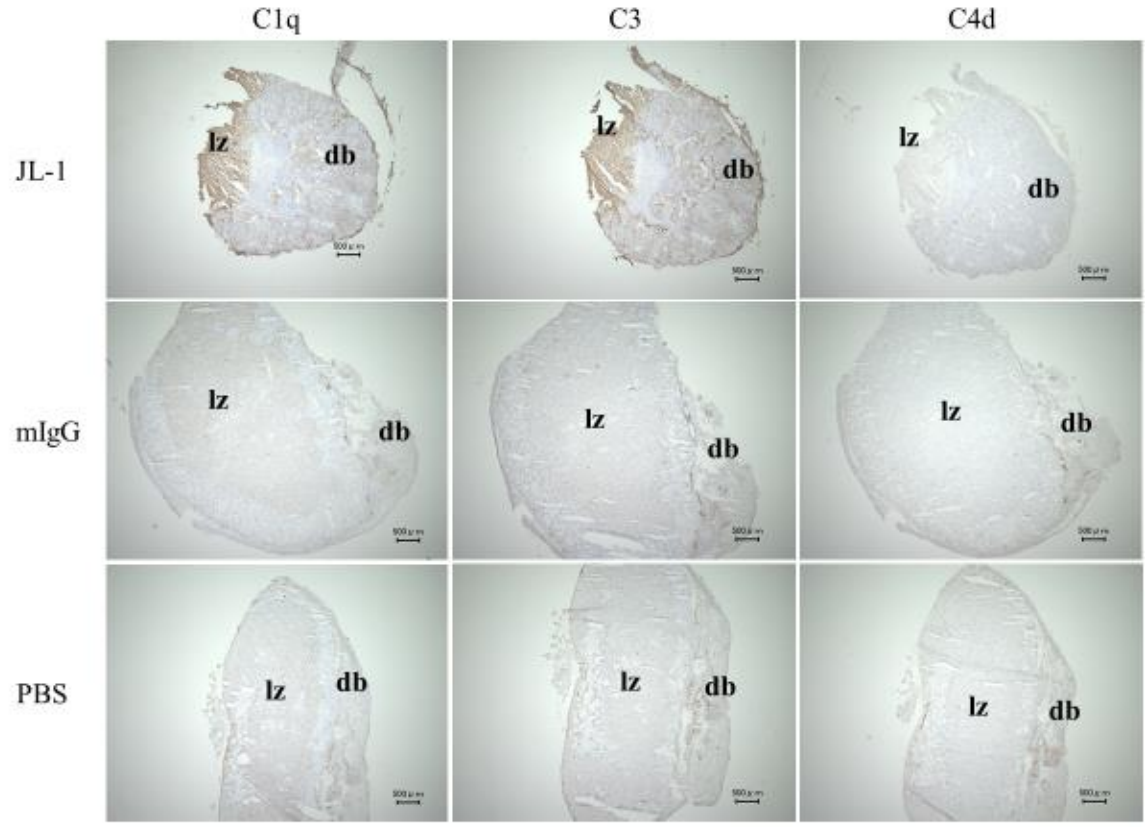


Figure 13. C1q、C3、C4d 免疫組織化学染色の病理像（弱拡大）

妊娠 day16 に摘出した胎盤組織の免疫組織化学染色を行った。

弱拡大では JL-1 群、mIgG 群、PBS 群ともに基底脱落膜部（db）に C1q および C3 の広範な沈着を認めるが、JL-1 群では迷路部（lz）での沈着が顕著である。

db, decidua basalis: lz, labyrinth zone:

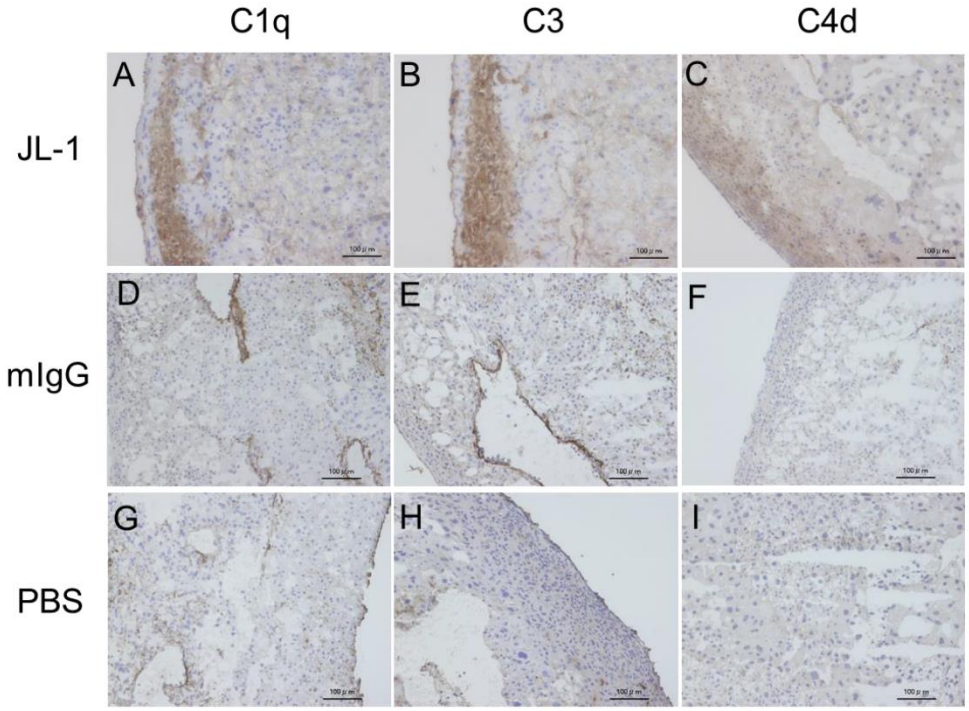


Figure 14. C1q、C3、C4d 免疫組織化学染色の病理像（400 倍視野）

妊娠 day16 に摘出した胎盤組織の免疫組織化学染色を行った。

JL-1 群では、基底脱落膜部に C1q（A）、C3（B)、C4d（C）いずれも染色部位を強く認めるが、mIgG 群および PBS 群ではいずれの染色とも弱く認めるのみである。

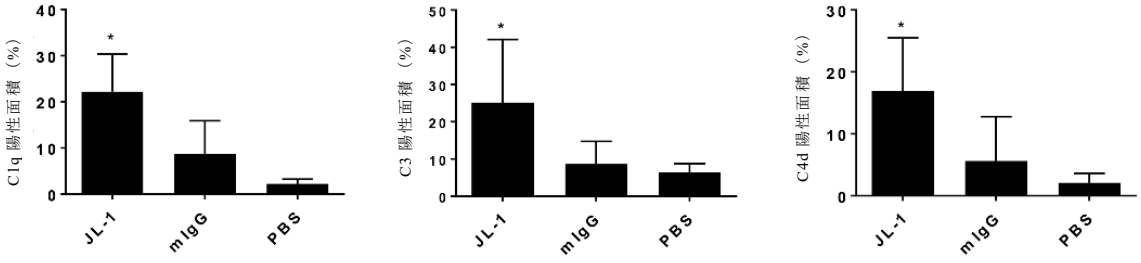


Figure 15. C1q、C3、C4d 染色陽性面積率

妊娠 day16 に摘出した胎盤組織の免疫組織化学染色における陽性面積の割合を算出した。

C1q、C3、C4d のいずれにおいても JL-1 群での陽性面積率は mIgG 群および PBS 群と比較して高値であった（*p<0.05, one-way ANOVA）。

4.4. 考察

第二章において、妊娠マウスへ抗 C1q モノクローナル抗体を投与することで子宮内において吸収胎仔が高率に出現することを示した。妊娠の判断は mating 翌日の膣プラグの確認で行ったが、day16 において胎仔が確認されなかったマウスについては子宮内に吸収胎仔は存在せず、妊娠が成立していなかったと考えられた。一方で膣プラグが確認できなかったが数日後に腹部の診察で妊娠が成立していた例も観察された。膣プラグによる妊娠の判断は直接的な妊娠の判断方法ではないが抗リン脂質抗体を用いた既報でも同様に行われている方法(Girardi et al., 2003; Holers et al., 2002)であり、妊娠成立率は本研究でも実験に耐えうるものであったと考えられた。抗体の投与スケジュールは(de la Torre et al., 2012; Holers et al., 2002; Kawaguchi et al., 2012)の方法を参考に、投与回数および投与量については検討が必要なため予備実験 1 で検討を行い、投与スケジュールを決定した。胎仔の評価では子宮内発育不全の検討を念頭においたため、胎仔重量の十分な評価が得られる妊娠日数を予備実験 2 で検討した。既報での評価日についても本検討の結果もそれらと合致しており適切であったと考えられた(Girardi et al., 2003)。また、妊娠維持においてマウスへの過度のストレスによって吸収胎仔が増加することが報告されており、本研究において認められた給水プラグの不具合によるケージ内の浸水の影響が生じたマウスについては除いて検討した(Bonney et al., 2014)。本検討で用いた抗 C1q モノクローナル抗体は(Trouw et al., 2004)らの報告でマウスにおいて補体活性化を生じて糸球体腎炎を発症させることから採用したが、本検討でも妊娠 day16 において胎盤における C4d 免疫組織染色の所見が示された。C4d は補体における古典的経路の活性化を示すバイオマーカーであり、C4d が沈着した部位は補体活性化が生じた近位であるとされる(Meuleman et al., 2016)。同時に対照群と比較して、血清 C3a 値は有意に高く、抗 C1q モノクローナル抗体によって古典的補体経路が活性化されたことが示唆された。また血清 C1q 値の低下あるいは欠損が妊娠において妊娠高血圧腎症等と関連することが報告されているが(Agostinis et al., 2016; Sutton et al., 2020)、抗 C1q モノクローナル抗体投与群と対照群との比較においては統計学的には血清 C1q 値には差は認められなかった。

次に抗 C1q モノクローナル抗体投与による流産モデルマウスを用いて、補体経路の遮断による影響を検討した。

5．第三章

抗 C1q モノクローナル抗体投与妊娠マウスにおける補体活性化経路遮断による影響に関する検討

5.1. 緒言

第二章において抗 C1q モノクローナル抗体を投与したマウスにおいて高率に吸収胎仔が生じることが明らかとなり、OAPS 患者由来の抗リン脂質抗体を投与したマウスでの検討の結果(Girardi et al., 2003; Holers et al., 2002)と同様に古典的補体経路の活性化が観察された。第三章では、古典的補体経路の活性化が妊娠へ及ぼす影響を検討するため、補体活性化経路の遮断による抗 C1q モノクローナル抗体投与妊娠マウスへの影響について検討することにした。

補体活性化経路遮断には抗 C5a 受容体抗体を用い、抗 C1q モノクローナル抗体を投与する前に抗 C5a 受容体抗体を投与し、妊娠マウスにおける胎仔および胎盤に与える影響を検討する。

5.2. 方法

5.2.1. 方法

4.2.3.で記載した方法に加えて、妊娠 day8 において、妊娠した雌マウスをケージから出し、マウス保定器を用いて固定した状態で、JL-1 あるいは JL-1 の isotype control の mIgG 投与の 30 分前に、total 100μL の PBS に溶解した抗 C5a receptor モノクローナル抗体（anti- complement component C5a receptor antibody：anti-C5aR）（clone20/70, HM1076, Hycult Biotech）（anti-C5aR 群）あるいはその isotype control として rat IgG2b (MAB0061, R&B Systems)（ctrIgG 群）を 500 μg/kg の容量で尾静脈より投与した。投与後にマウス保定器からマウスをケージに戻し、再度マウス保定器を用いて固定した状態で、total 100 μL の PBS に溶解した JL-1（HM1096, Hycult Biotech）（JL-1 群）あるいはその isotype control のモノクローナル IgG2b (M077-3, MBL)（mIgG 群）を 500 μg/kg の容量で尾静脈より投与した。手技は、短時間で行えることおよび麻酔の妊娠への影響が懸念されるため無麻酔で行った。前投与および妊娠 day8 および day12 の投与内容による 4 群について検討した

妊娠マウスは、妊娠 day16 において頸椎脱臼による物理的方法によって安楽死処置を行い、心臓血をすみやかに採取し血清を分離した。

5.2.2. 評価項目および統計学的解析方法

4.2.3.に記載した内容と同じ方法で、胎仔吸収率（resorption rate)、胎仔重量、胎盤重量、血清 C3a および C1q 値、胎盤組織における C1q、C3、C4d の各免疫組織化学染色像を評価項目とした。統計学的解析方法は 4.2.3.5.と同じ方法で表記し、anti-C5aR を前投与した JL-1 群および ctrIgG を前投与した JL-1 群の 2 群間の比較を Student's t-test を用いて行った。すべての p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は GraphPad Prism Software 6（GraphPad, San Diego, California, USA）を用いて行った。

5.3. 結果

5.3.1. 各群における検討対象マウス数

Mating の翌日に膣プラグの存在を確認したのは、anti-C5aR 群は 15 匹、ctrIgG 群は 18 匹であった。うち、anti-Ca5R 群で 2 匹、ctrIgG 群で 2 匹は妊娠 day16 において胎仔が確認できなかった。また妊娠マウスのうち、ctrIgG 群の 1 匹は妊娠中に給水プラグの不具合により飼育ケージが水没したため高ストレス状態になったと判断し検討から除外した。残る anti-C5aR 群 13 匹のうち、JL-1 を投与したのは 8 匹（JL-1 群）、mIgG を投与したのは 5 匹（mIgG 群）、残る ctrIgG 群 15 匹のうち、JL-1 を投与したのは 10 匹（JL-1 群）、mIgG を投与したのは 5 匹（mIgG 群）であった。

5.3.2. 各群における胎仔吸収率、胎仔重量、胎盤重量、血清 C3a および C1q 値

anti-C5aR を前投与した JL-1 群および mIgG 群、ctrIgG を前投与した JL-1 群および mIgG 群の 4 群における摘出した子宮、胎仔および胎盤の代表的な肉眼像を Figure 16 (A) に示す。吸収胎仔は黒色の凝血塊様に認められた。

4 群における胎仔吸収率を Figure 16 (B) に示す。胎仔吸収率（平均 ± SD）は、anti-C5aR を前投与した JL-1 群において 0.18 ± 0.11、ctrIgG を前投与した JL-1 群において 0.40 ± 0.18 であり、2 群間で有意な差を認め、anti-C5aR の前投与群で胎仔吸収率の低下を認めた（$p<0.05$、Student's t-test）。同様に、anti-C5 を前投与した mIgG 群において 0.16 ± 0.10、ctrIgG を前投与した mIgG 群において 0.11 ± 0.06 であった。

4 群における胎仔重量を Figure 16 (C) に示す。胎仔重量（平均 ± SD）は、anti-C5aR を前投与した JL-1 群において 393 ± 52.5 mg（N=54）、ctrIgG を前投与した JL-1 群において 342 ± 62.3 mg（N=52）であり、2 群間で有意な差を認め、anti-C5aR の前投与群で胎仔重量の増加を認めた（$p<0.001$、Student's t-test）。同様に、anti-C5 を前投与した mIgG 群において 394 ± 91.9 mg（N=34）、

ctrIgG を前投与した mIgG 群において 419 ± 71.3 mg（N=31）であった。

4 群における胎盤重量を Figure 16 (D) に示す。胎盤重量（平均 ± SD）は、anti-C5aR を前投与した JL-1 群において 149 ± 17.4 mg（N=54）、ctrIgG を前投与した JL-1 群において 137 ± 24.4 mg（N=52）であり、2 群間で有意な差を認め、anti-C5aR の前投与群で胎盤重量の増加を認めた（$p<0.05$、Student's t-test）。同様に、anti-C5aR を前投与した mIgG 群において 156 ± 30.0 mg（N=34）、ctrIgG を前投与した mIgG 群において 162 ± 23.7 mg（N=31）であった。

4 群における血清 C3a 値を Figure 16 (E) に示す。血清 C3a 値（平均 ± SD）は、anti-C5aR を前投与した JL-1 群において 1072 ± 330 ng/mL、ctrIgG を前投与した JL-1 群において 1434 ± 423 ng/mL であり、2 群間で有意な差を認め、anti-C5aR の前投与群で血清 C3a 値は低値であった（$p<0.05$、Student's t-test）。同様に、anti-C5aR を前投与した mIgG 群において 1146 ± 278 ng/mL、ctrIgG を前投与した mIgG 群において 1012 ± 255 ng/mL であった。

最後に、4 群における血清 C1q 値を Figure 16 (F) に示す。血清 C1q 値（平均 ± SD）は、anti-C5aR を前投与した JL-1 群において 159 ± 58.4 μg/mL、ctrIgG を前投与した JL-1 群において 153 ± 39.0 μg/mL であり、2 群間で有意な差は認められなかった（$p=0.79$、Student's t-test）。同様に、anti-C5aR を前投与した mIgG 群において 121 ± 25.1 μg/mL、ctrIgG を前投与した mIgG 群において 116 ± 16.8 μg/mL であった。

(A)

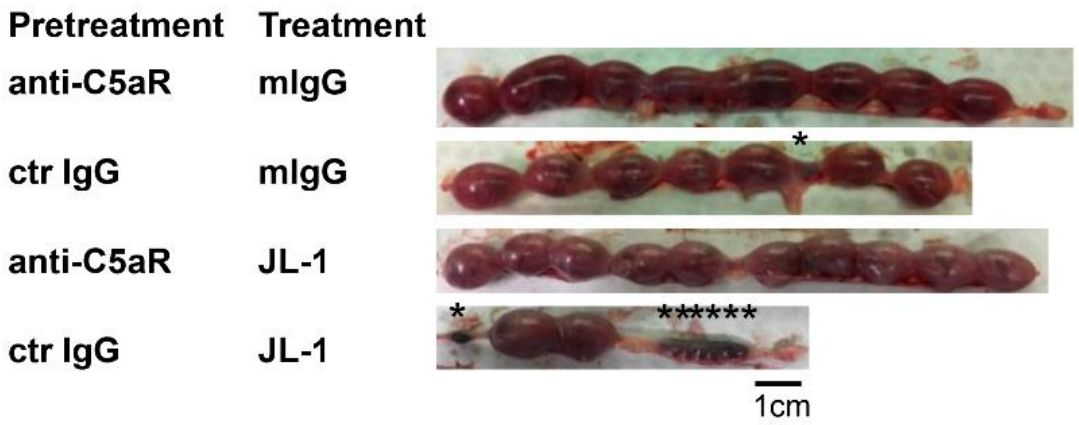


Figure 16（A）. anti-C5aR または ctrIgG の前投与を行った JL-1 群および mIgG 群の各群における摘出した子宮の肉眼像

妊娠 day16 に摘出した子宮において吸収胎仔は黒色の凝血塊様に認められた。生存胎仔および吸収胎仔を合計した全胎仔にしめる吸収胎仔の割合（resorption rate）を算出した。

*吸収胎仔

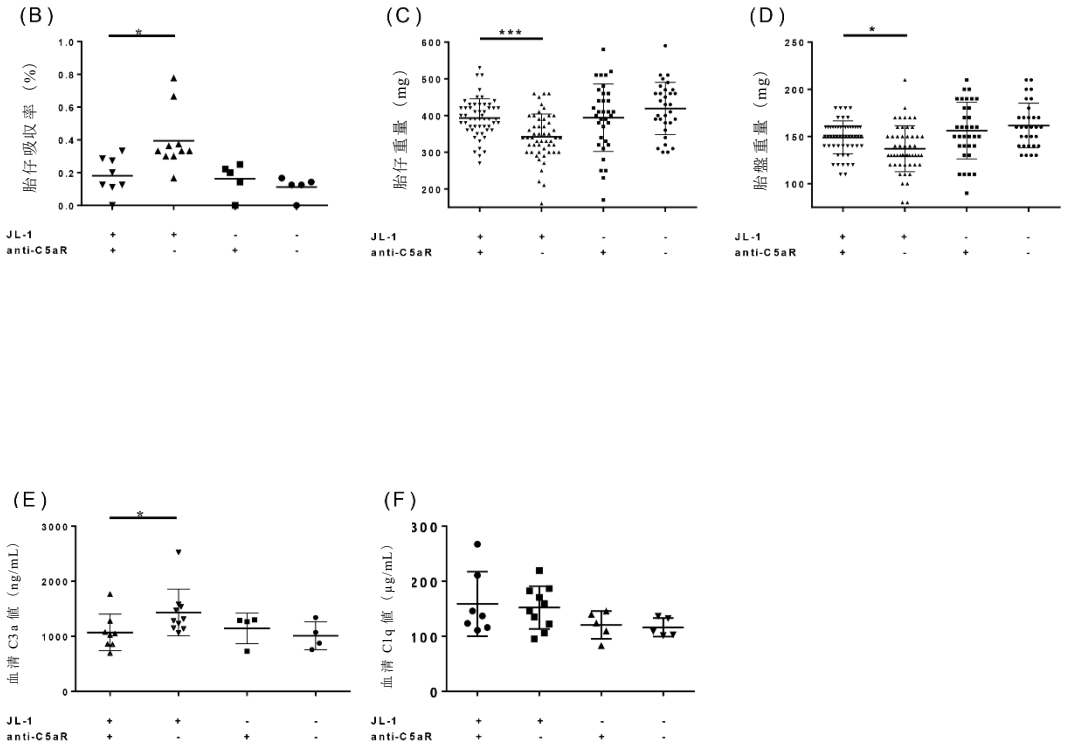


Figure 16（B-F）. anti-C5aR (anti-C5aR +)または ctrIgG (anti-C5aR -) の前投与を行った JL-1 群(JL-1 +) および mIgG 群 (JL-1 -) の各群における胎仔吸収率、胎仔重量、胎盤重量、血清 C3a 値および血清 C1q 値

妊娠マウスの妊娠 day16 における胎仔、胎盤、血清を用いて評価した。

anti-C5aR を前投与した JL-1 群（anti-C5aR + JL-1 + ）と ctrIgG を前投与した JL-1 群（anti-C5aR - JL-1 + ）との比較において、胎仔吸収率（B）は anti-C5aR の前投与群で低下を認め（$p<0.05$、Student's t-test）、胎仔重量（C）では anti-C5aR の前投与群で増加を認め（$p<0.001$、Student's t-test）、胎盤重量（D）では anti-C5aR の前投与群で増加を認め（$p<0.05$、Student's t-test）、血清 C3a（E）では anti-C5aR の前投与群で低下を認めた（$p<0.001$、Student's t-test）が、血清 C1q 値では有意な差は認められなかった。

***$p<0.001$、*$p<0.05$、Student's t-test

5.3.3. 免疫組織化学染色

anti-C5aR を前投与した JL-1 群と ctrIgG を前投与した JL-1 群とにおける C1q、C3、C4d の免疫組織化学染色の代表的な病理像（400 倍視野）を Figure 17 に示す。

ctrIgG を前投与した JL-1 群では、基底脱落膜部に C1q、C3、C4d のいずれも染色部位を強く認めたが、anti-C5aR を前投与した JL-1 群においてはいずれの染色とも弱く認めるのみであった。

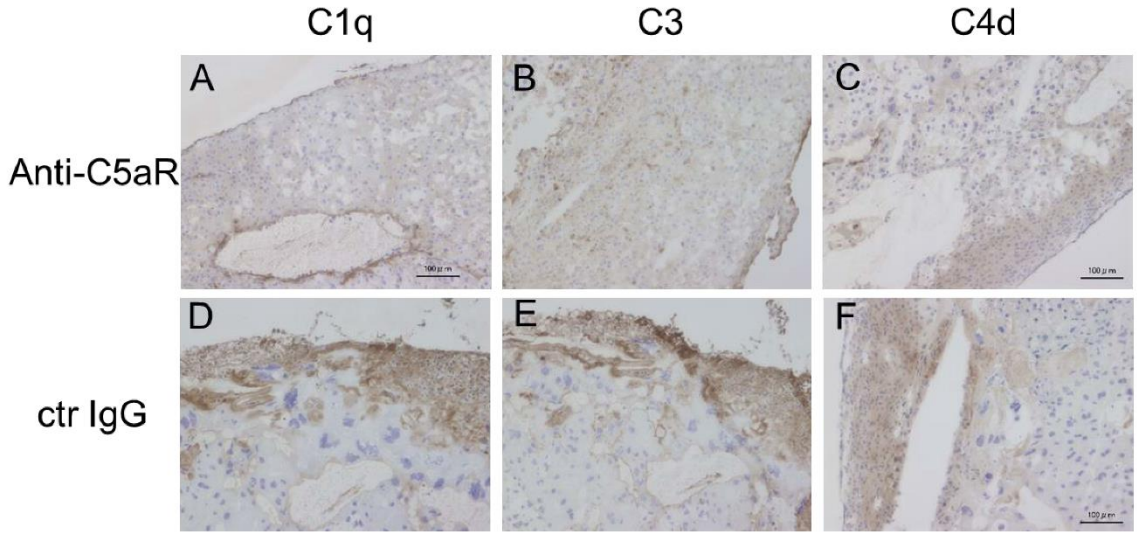


Figure 17. anti-C5aR あるいは ctrIgG を前投与した JL-1 群における免疫組織化学染色像（400 倍視野）

妊娠 day16 に摘出した胎盤組織の免疫組織化学染色を行った。

Anti-C5aR の前投与した JL-1 群（上段）では ctrIgG を前投与した JL-1 群（下段）と比較して、C1q（A、D)、C3（B、E）および C4d（C、F）のいずれとも染色像が弱く観察された。

5.4. 考察

第三章において、anti-C5aR の前投与によって抗 C1q モノクローナル抗体を投与した妊娠マウスで認められた高率な胎仔吸収が緩和されることを示した。また胎仔重量の低値、胎盤重量の低値および血清 C3a 値高値のいずれも緩和され、胎盤組織における免疫組織化学染色では C4d 沈着も弱く観察された。

補体 C5a は、不育症に含まれる産科的抗リン脂質抗体症候群モデルマウスおよび子宮内発育不全において中心的な役割を担っていると報告されており(Denny et al., 2015; Girardi et al., 2003)、C5a 受容体を介して好中球の動員、脱落膜における TNF-α 等の炎症性サイトカインの放出の結果、胎児へ障害を与えるとされる(Girardi et al., 2003b)。本研究での anti-C5aR 前投与による対照群との比較において、胎仔吸収率、血清 C3a および胎盤における免疫組織化学染色の所見の変化が観察されたことは、C5aR 阻害効果が抗 C1q モノクローナル抗体による病原性を緩和できるものと推測される。しかしながら、本研究では抗 C1q モノクローナル抗体が妊娠マウスへ影響を及ぼす分子生物学的な検討はできておらず、病原性のメカニズムの解明にはさらなる検討が必要であると考えらえれた。

6. 考察

妊娠において、胎児と母子間の免疫寛容の成立は妊娠の成立および維持において重要であり(Ghaebi et al., 2017)、感染症、自己免疫疾患などの炎症を惹起する病因によってこの免疫寛容に破綻が生じうる。通常胎児-母子間の免疫寛容は主に制御性 T 細胞によって調整されているが(Heitmann et al., 2016; Inada et al., 2013; Saito et al., 2016; Zhao et al., 2007)、炎症性サイトカイン、過度の補体活性化などによる炎症によって、末梢血および胎盤組織における制御性 T 細胞および Th17 細胞（T helper 17 cell）のバランスが Th17 優位となり、胎盤組織における免疫寛容の破綻、ひいては流産を引き起こす原因の１つとなるとされる(Lee et al., 2011; Wang et al., 2010; Wu et al., 2016)。

胎盤組織における補体蛋白は、古典的な自然免疫における initiator としての役割のみならず、C1q、C3 などの補体活性化経路の早期に関連する補体蛋白は胎盤における胎盤機能維持に重要な役割を担っていることが明らかとなった(Chighizola et al., 2020)。すなわち C1q はヒト胎盤組織において、不育症、妊娠高血圧症候群などの妊娠合併症のみならず正常妊娠においても広く沈着し、母子間の感染制御などの役割を担っている。また不育症、妊娠高血圧症候群の患者においては補体活性化が認められ(Sugiura-Ogasawara et al., 2006)、特に抗リン脂質抗体症候群における多くの検討から補体活性化が病態に関わることが明らかとなった。一方で抗リン脂質抗体症候群などの原因が特定されない不育症患者においても補体活性化が認められ、その病因については明らかになっていない。

本研究の第一章において、原因不明の不育症患者では抗 C1q 抗体が高率に、かつ高力価に認められた。同様に不育症の１つである産科的抗リン脂質抗体症候群患者においても同様の結果であり、既報と同様の結果であった(Oku et al., 2016)。一方、経時的な抗体価の変化について評価できていない点、限られた施設での検討である点などは本研究の限界である。抗 C1q 抗体が不育症の原因の１つであることを明らかにするには今後の多施設での縦断的な前向き研究での検討が必要である。第二章では、妊娠マウスの実験において抗 C1q モノクローナル抗体の投与により高率に胎仔死亡、子宮内胎仔発育不全が認められ、血清および胎盤病理において補体活性化を確認し、抗 C1q 抗体が不育症における新たな病因の 1 つであることが示唆された。抗 C1q 抗体が胎盤組織あるいは重要臓器を含めた全身においてどのように

作用して病原性を発揮するか細胞分子学的なメカニズムあるいは免疫寛容に関わる免疫担当細胞への影響等に関する検討については今後の課題としたい。また、妊娠マウスの検討での抗 C1q 抗体の投与スケジュールは妊娠前あるいは妊娠初期における抗 C1q 抗体の影響を検討できておらず、この点についても今後の検討課題と考えられた。

最後に第三章において、抗 C5aR 抗体によって補体活性化経路を阻害することでこれら妊娠合併症を緩和できることを示した結果は、今後未だ特異的治療のない不育症患者において、抗補体治療が新規治療となりうる患者群が存在する可能性が示唆された点は本研究で得られた成果と考えられた。

7. 結論

- 抗 C1q 抗体は、原因不明の不育症患者において健常者と比較し有意に高頻度かつ高力価であった。
- OAPS 患者において、抗 C1q 抗体は健常者と比較し有意に高頻度かつ高力価であった。
- 妊娠マウスへのマウス抗 C1q モノクローナル抗体（JL-1）投与（JL-1 投与群）によって、胎仔吸収はコントロール群の比較し高率に認められた。
- JL-1 投与群では、胎仔重量、胎盤重量はコントロール群と比較し有意に低値であった。
- JL-1 投与群では、コントロール群と比較し血清 C3a 値は有意に高く、胎盤組織において C1q、C3、C4d の広範な沈着を認めた。
- 抗 C5aR 抗体の前投与により、胎仔吸収率、胎仔低重量、胎盤低重量、血清 C3a 値は有意に改善した。

本研究では，まず原因不明の不育症患者の血漿を用いて抗 C1q 抗体が高率に、かつ高力価に認められることを示した。不育症の原因の１つである OAPS 患者においても同様の結果であった。次に妊娠マウスを用いた実験において、抗 C1q モノクローナル抗体が胎仔吸収率および胎仔体重に影響を与え、血清中、胎盤組織において補体活性化を来すことを示し、新たな流産モデルマウスを確立した。続いてこの妊娠モデルマウスにおいて抗 C5aR 抗体により補体活性化経路を遮断することで上記所見が緩和されることを示した。これらの検討から、抗 C1q 抗体は原因不明の不育症において新たな病因の１つである可能性を見いだし、補体活性化経路の遮断が流産予防治療となりうることを示した。

今後の課題として本研究では検討できなかった抗 C1q 抗体の妊娠中の力価の推移ならびに妊娠前に存在する抗 C1q 抗体の妊娠に与える影響について検討し研究を発展することができると考えられる。さらに、この病態メカニズムと自己抗体の発現機序などを研究することで、未だ特異的治療のない不育症患者の中から本研究に合致する患者群を同定し、特異的治療の確立を目指す研究進展を行うことが重要な課題であると考えられた。

8. 謝辞

本稿は筆者が北海道大学大学院医学研究科　免疫・代謝内科学分野（現北海道大学大学院医学院　免疫・代謝内科学教室）博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものであります。稿を終えるにあたり，同分野教授　渥美達也先生には指導教官として本研究の機会を与えていただき、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

名古屋市立大学大学院産科婦人科分野教授　杉浦真弓先生および講師　北折珠央先生には本研究の遂行にあたり、血液検体ならびに診療情報の提供をいただき本研究のご指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。本研究全般にわたり直接御指導をいただきました本分野講師　奥健志先生に深く感謝の意を表します。

本分野膠原病グループ准教授　保田晋助先生（現東京医科歯科大学　膠原病・リウマチ内科学教授)、非常勤講師　堀田哲也先生、助教　坊垣暁之先生（現北海道医療大学　医療技術学部教授)、Olga Amengual 先生（現講師)、加藤将先生ならびに藤枝雄一郎先生におかれましては、本研究の遂行にあたり日々多大なる助言をいただきました。心より感謝を申し上げます。当科実験助手　下道真由美さん、金子由美子さんの御協力により本研究が遂行されました。心より感謝を申し上げます。胎盤組織プレパラートの作成および免疫組織化学染色では札幌総合病理研究所に御協力いただきました。心より感謝申し上げます。その他にも多くの諸先輩方、大学院でともに学んだ皆様の存在がなければ本研究の遂行は不可能でした。心より感謝を申し上げます。

最後に、日々の糧をいつも与えてくれた妻と胎児期から叱咤激励してくれた息子に心より感謝を申し上げます。

9. 利益相反

本研究にあたり開示すべき利益相反状態はない。

10. 引用文献

Agostinis, C., Stampalija, T., Tannetta, D., Loganes, C., Vecchi Brumatti, L., De Seta, F., Celeghini, C., Radillo, O., Sargent, I., Tedesco, F.*, et al.* (2016). Complement component C1q as potential diagnostic but not predictive marker of preeclampsia. Am J Reprod Immunol 76, 475-481.

Agostinis, C., Tedesco, F., and Bulla, R. (2017). Alternative functions of the complement protein C1q at embryo implantation site. J Reprod Immunol 119, 74-80.

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., 3rd, Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D.*, et al.* (2010a). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum 62, 2569-2581.

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., 3rd, Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D.*, et al.* (2010b). 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Ann Rheum Dis 69, 1580-1588.

Altemani, A.M., Norato, D., and Baumel, C. (1992). Immunological studies in placentas with villitis of unknown etiology: complement components and immunoglobulins in chorionic villi. J Perinat Med 20, 129-134.

Bendon, R.W., Coventry, S., Thompson, M., Rudzinski, E.R., Williams, E.M., and Oron, A.P. (2015). Significance of C4d Immunostaining in Placental Chronic Intervillositis. Pediatr. Dev. Pathol. 18, 362-368.

Berman, J., Girardi, G., and Salmon, J.E. (2005). TNF-alpha is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss. J.

Immunol. 174, 485-490.

Beurskens, F.J., van Schaarenburg, R.A., and Trouw, L.A. (2015). C1q, antibodies and anti-C1q autoantibodies. Mol. Immunol. 68, 6-13.

Bohan, A., and Peter, J.B. (1975a). Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). N Engl J Med 292, 344-347.

Bohan, A., and Peter, J.B. (1975b). Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). N Engl J Med 292, 403-407.

Bonney, E.A., and Brown, S.A. (2014). To drive or be driven: the path of a mouse model of recurrent pregnancy loss. Reproduction 147, R153-167.

Chighizola, C.B., Lonati, P.A., Trespidi, L., Meroni, P.L., and Tedesco, F. (2020). The Complement System in the Pathophysiology of Pregnancy and in Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases During Pregnancy. Front Immunol 11, 2084.

Christiansen, O.B., Larsen, E.C., Egerup, P., Lunoee, L., Egestad, L., and Nielsen, H.S. (2015). Intravenous immunoglobulin treatment for secondary recurrent miscarriage: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. BJOG. 122, 500-508.

Cohen, D., Buurma, A., Goemaere, N.N., Girardi, G., le Cessie, S., Scherjon, S., Bloemenkamp, K.W., de Heer, E., Bruijn, J.A., and Bajema, I.M. (2011). Classical complement activation as a footprint for murine and human antiphospholipid antibody-induced fetal loss. J. Pathol. 225, 502-511.

de Jong, P.G., Kaandorp, S., Di Nisio, M., Goddijn, M., and Middeldorp, S. (2014). Aspirin and/or heparin for women with unexplained recurrent miscarriage with or without inherited thrombophilia. Cochrane. Database. Syst. Rev., Cd004734.

de la Torre, Y.M., Pregnolato, F., D'Amelio, F., Grossi, C., Di Simone, N., Pasqualini, F., Nebuloni, M., Chen, P., Pierangeli, S., Bassani, N., *et al.* (2012). Anti-phospholipid induced murine fetal loss: novel protective effect of a peptide targeting

the β2 glycoprotein I phospholipid-binding site. Implications for human fetal loss. J Autoimmun 38, J209-215.

Denny, K.J., Coulthard, L.G., Mantovani, S., Simmons, D., Taylor, S.M., and Woodruff, T.M. (2015). The Role of C5a Receptor Signaling in Endotoxin-Induced Miscarriage and Preterm Birth. Am J Reprod Immunol 74, 148-155.

Emad, G., and Al-Barshomy, S.M. (2020). Anti-C1q antibodies in lupus nephritis and their correlation with the disease activity. Saudi J Kidney Dis Transpl 31, 342-352.

Gensous, N., Marti, A., Barnetche, T., Blanco, P., Lazaro, E., Seneschal, J., Truchetet, M.E., Duffau, P., and Richez, C. (2017). Predictive biological markers of systemic lupus erythematosus flares: a systematic literature review. Arthritis Res Ther 19, 238.

Ghaebi, M., Nouri, M., Ghasemzadeh, A., Farzadi, L., Jadidi-Niaragh, F., Ahmadi, M., and Yousefi, M. (2017). Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. Biomed. Pharmacother. 88, 61-73.

Girardi, G. (2018). Complement activation, a threat to pregnancy. Semin Immunopathol 40, 103-111.

Girardi, G., Berman, J., Redecha, P., Spruce, L., Thurman, J.M., Kraus, D., Hollmann, T.J., Casali, P., Caroll, M.C., Wetsel, R.A.*, et al.* (2003). Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. J. Clin. Invest. 112, 1644-1654.

Girardi, G., Lingo, J.J., Fleming, S.D., and Regal, J.F. (2020). Essential Role of Complement in Pregnancy: From Implantation to Parturition and Beyond. Front Immunol 11, 1681.

Girardi, G., Redecha, P., and Salmon, J.E. (2004). Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. Nat. Med. 10, 1222-1226.

Han, A.R., Ahn, H., Vu, P., Park, J.C., Gilman-Sachs, A., Beaman, K., and Kwak-Kim, J. (2012). Obstetrical outcome of anti-inflammatory and anticoagulation therapy in women with recurrent pregnancy loss or unexplained infertility. Am. J. Reprod. Immunol. 68, 418-427.

Heitmann, R.J., Weitzel, R.P., Feng, Y., Segars, J.H., Tisdale, J.F., and Wolff, E.F. (2016). Maternal T Regulatory Cell Depletion Impairs Embryo Implantation Which Can Be Corrected With Adoptive T Regulatory Cell Transfer. Reprod. Sci. 24, 1014-1024.

Holers, V.M., Girardi, G., Mo, L., Guthridge, J.M., Molina, H., Pierangeli, S.S., Espinola, R., Xiaowei, L.E., Mao, D., Vialpando, C.G., *et al.* (2002). Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss. J. Exp. Med. 195, 211-220.

Inada, K., Shima, T., Nakashima, A., Aoki, K., Ito, M., and Saito, S. (2013). Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content. J. Reprod. Immunol. 97, 104-111.

Kaandorp, S.P., Goddijn, M., van der Post, J.A., Hutten, B.A., Verhoeve, H.R., Hamulyak, K., Mol, B.W., Folkeringa, N., Nahuis, M., Papatsonis, D.N., *et al.* (2010). Aspirin plus heparin or aspirin alone in women with recurrent miscarriage. N. Engl. J. Med. 362, 1586-1596.

Kallenberg, C.G. (2008). Anti-C1q autoantibodies. Autoimmun. Rev. 7, 612-615.

Kawaguchi, R., Nunomura, S., Umehara, N., Nikaido, T., Huppertz, B., Tanaka, T., and Ra, C. (2012). Multiple injections of anti-mouse β2glycoprotein 1 antibody induce FcRγ-dependent fetal growth restriction (FGR) in mice. Placenta 33, 540-547.

Kwak-Kim, J., Agcaoili, M.S., Aleta, L., Liao, A., Ota, K., Dambaeva, S., Beaman, K., Kim, J.W., and Gilman-Sachs, A. (2013). Management of women with recurrent pregnancy losses and antiphospholipid antibody syndrome. Am J Reprod Immunol 69, 596-607.

Laskin, C.A., Bombardier, C., Hannah, M.E., Mandel, F.P., Ritchie, J.W., Farewell, V., Farine, D., Spitzer, K., Fielding, L., Soloninka, C.A., *et al.* (1997). Prednisone and aspirin in women with autoantibodies and unexplained recurrent fetal loss. N. Engl. J. Med. 337, 148-153.

Lee, S.K., Kim, J.Y., Hur, S.E., Kim, C.J., Na, B.J., Lee, M., Gilman-Sachs, A., and Kwak-Kim, J. (2011). An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3(+) regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. Hum. Reprod. 26, 2964-2971.

Li, H.H., Xu, X.H., Tong, J., Zhang, K.Y., Zhang, C., and Chen, Z.J. (2016). Association of TNF-alpha genetic polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk: a systematic review and meta-analysis. Reprod. Biol. Endocrinol. 14, 6.

Maruyama, T., Makino, T., Iwasaki, K., Sugi, T., Saito, S., Umeuchi, M., Ozawa, N., Matsubayashi, H., and Nozawa, S. (1994). The influence of intravenous immunoglobulin treatment on maternal immunity in women with unexplained recurrent miscarriage. Am. J. Reprod. Immunol. 31, 7-18.

Matrat, A., Veysseyre-Balter, C., Trolliet, P., Villar, E., Dijoud, F., Bienvenu, J., and Fabien, N. (2011). Simultaneous detection of anti-C1q and anti-double stranded DNA autoantibodies in lupus nephritis: predictive value for renal flares. Lupus 20, 28-34.

Menzhinskaya, I.V., Van'ko, L.V., Kashentseva, M.M., Kiryushchenkov, P.A., and Sukhikh, G.T. (2015). Incidence of Autoantibodies to C1Q Complement Component in Women with Miscarriages and Autoantibodies to Phospholipids and Chorionic Gonadotropin. Bull Exp Biol Med 160, 260-263.

Meuleman, T., Cohen, D., Swings, G.M., Veraar, K., Claas, F.H., and Bloemenkamp, K.W. (2016). Increased complement C4d deposition at the maternal-fetal interface in unexplained recurrent miscarriage. J. Reprod. Immunol. 113, 54-60.

Meyer, O.C., Nicaise-Roland, P., Cadoudal, N., Grootenboer-Mignot, S., Palazzo, E., Hayem, G., Dieude, P., and Chollet-Martin, S. (2009). Anti-C1q antibodies antedate

patent active glomerulonephritis in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis. Res. Ther. 11, R87.

Micheloud, D., Sarmiento, E., Teijeiro, R., Jensen, J., Rodríguez Molina, J.J., Fernández-Cruz, E., and Carbone, J. (2007). Hypocomplementemia in the absence of autoantibodies in women with recurrent pregnancy loss. Allergol Immunopathol (Madr) 35, 90-94.

Miyakis, S., Lockshin, M.D., Atsumi, T., Branch, D.W., Brey, R.L., Cervera, R., Derksen, R.H., PG, D.E.G., Koike, T., Meroni, P.L., *et al.* (2006). International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost 4, 295-306.

Nakagawa, K., Kwak-Kim, J., Kuroda, K., Sugiyama, R., and Yamaguchi, K. (2017). Immunosuppressive treatment using tacrolimus promotes pregnancy outcome in infertile women with repeated implantation failures. Am. J. Reprod. Immunol. 78, e12682.

Nakagawa, K., Kwak-Kim, J., Ota, K., Kuroda, K., Hisano, M., Sugiyama, R., and Yamaguchi, K. (2015). Immunosuppression with tacrolimus improved reproductive outcome of women with repeated implantation failure and elevated peripheral blood TH1/TH2 cell ratios. Am. J. Reprod. Immunol. 73, 353-361.

Oku, K., Amengual, O., Hisada, R., Ohmura, K., Nakagawa, I., Watanabe, T., Bohgaki, T., Horita, T., Yasuda, S., and Atsumi, T. (2016). Autoantibodies against a complement component 1 q subcomponent contribute to complement activation and recurrent thrombosis/pregnancy morbidity in anti-phospholipid syndrome. Rheumatology (Oxford) 55, 1403-1411.

Regal, J.F., Gilbert, J.S., and Burwick, R.M. (2015). The complement system and adverse pregnancy outcomes. Mol Immunol 67, 56-70.

Rudzinski, E., Gilroy, M., Newbill, C., and Morgan, T. (2013). Positive C4d immunostaining of placental villous syncytiotrophoblasts supports host-versus-graft rejection in villitis of unknown etiology. Pediatr. Dev. Pathol. 16, 7-13.

Saito, S., Shima, T., Nakashima, A., Inada, K., and Yoshino, O. (2016). Role of Paternal Antigen-Specific Treg Cells in Successful Implantation. Am. J. Reprod. Immunol. 75, 310-316.

Shiboski, C.H., Shiboski, S.C., Seror, R., Criswell, L.A., Labetoulle, M., Lietman, T.M., Rasmussen, A., Scofield, H., Vitali, C., Bowman, S.J., *et al.* (2017). 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. Ann Rheum Dis 76, 9-16.

Siegert, C., Daha, M., Westedt, M.L., van der Voort, E., and Breedveld, F. (1991). IgG autoantibodies against C1q are correlated with nephritis, hypocomplementemia, and dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus. J. Rheumatol. 18, 230-234.

Sinha, D., Wells, M., and Faulk, W.P. (1984). Immunological studies of human placentae: complement components in pre-eclamptic chorionic villi. Clin. Exp. Immunol. 56, 175-184.

Sinico, R.A., Radice, A., Ikehata, M., Giammarresi, G., Corace, C., Arrigo, G., Bollini, B., and Li Vecchi, M. (2005). Anti-C1q autoantibodies in lupus nephritis: prevalence and clinical significance. Ann N Y Acad Sci 1050, 193-200.

Sugiura-Ogasawara, M., Nozawa, K., Nakanishi, T., Hattori, Y., and Ozaki, Y. (2006). Complement as a predictor of further miscarriage in couples with recurrent miscarriages. Hum. Reprod. 21, 2711-2714.

Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Katano, K., Suzumori, N., Kitaori, T., and Mizutani, E. (2012). Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. Hum. Reprod. 27, 2297-2303.

Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., and Suzumori, N. (2014). Management of recurrent miscarriage. J. Obstet. Gynaecol. Res. 40, 1174-1179.

Sutton, E.F., Gemmel, M., Brands, J., Gallaher, M.J., and Powers, R.W. (2020). Paternal deficiency of complement component C1q leads to a preeclampsia-like

pregnancy in wild-type female mice and vascular adaptations postpartum. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 318, R1047-r1057.

Trouw, L.A., Duijs, J.M., van Kooten, C., and Daha, M.R. (2003a). Immune deposition of C1q and anti-C1q antibodies in the kidney is dependent on the presence of glomerular IgG. Mol. Immunol. 40, 595-602.

Trouw, L.A., Groeneveld, T.W., Seelen, M.A., Duijs, J.M., Bajema, I.M., Prins, F.A., Kishore, U., Salant, D.J., Verbeek, J.S., van Kooten, C., *et al.* (2004). Anti-C1q autoantibodies deposit in glomeruli but are only pathogenic in combination with glomerular C1q-containing immune complexes. J. Clin. Invest. 114, 679-688.

Trouw, L.A., Seelen, M.A., Duijs, J.M., Benediktsson, H., Van Kooten, C., and Daha, M.R. (2003b). Glomerular deposition of C1q and anti-C1q antibodies in mice following injection of antimouse C1q antibodies. Clin. Exp. Immunol. 132, 32-39.

van den Hoogen, F., Khanna, D., Fransen, J., Johnson, S.R., Baron, M., Tyndall, A., Matucci-Cerinic, M., Naden, R.P., Medsger, T.A., Jr., Carreira, P.E., *et al.* (2013). 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum 65, 2737-2747.

Wang, W.J., Hao, C.F., Yi, L., Yin, G.J., Bao, S.H., Qiu, L.H., and Lin, Q.D. (2010). Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. J. Reprod. Immunol. 84, 164-170.

Winger, E.E., Reed, J.L., Ashoush, S., Ahuja, S., El-Toukhy, T., and Taranissi, M. (2009). Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin improves pregnancy rates in women undergoing IVF. Am. J. Reprod. Immunol. 61, 113-120.

Wu, L., Li, J., Xu, H.L., Xu, B., Tong, X.H., Kwak-Kim, J., and Liu, Y.S. (2016). IL-7/IL-7R signaling pathway might play a role in recurrent pregnancy losses by increasing inflammatory Th17 cells and decreasing Treg cells. Am. J. Reprod.

Immunol. 76, 454-464.

Zhao, J.X., Zeng, Y.Y., and Liu, Y. (2007). Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy. J. Reprod. Immunol. 75, 71-81.