

平成23年 5月25日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780089

研究課題名 (和文) 妊娠恒常性における胎盤の機能ネットワークに関する研究

研究課題名 (英文) Regulatory roles for the functional network of placenta on maintenance of homeostasis during pregnancy

研究代表者

石田 純治 (ISHIDA JUNJI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：30323257

研究成果の概要 (和文)：

妊娠恒常性の維持機構と胎盤の機能ネットワークの解明のため、正常妊娠マウスの胎盤を用いたマイクロアレイ解析を行い、妊娠恒常性に重要である代謝関連遺伝子や血管形成関連遺伝子のダイナミックな発現変化を同定した。また、妊娠恒常性の破綻により生じる妊娠高血圧症に関して、妊娠高血圧モデルマウスに対して複数の血圧降下剤の投与を行い、病態の発症・進展に、AT1 シグナルを介する血圧上昇作用に加え、昇圧作用とは独立した作用も深く関与することを明らかとした。

研究成果の概要 (英文)：

To clarify the regulatory roles for the functional network of placenta on maintenance of homeostasis during normal pregnancy, I used full genome expression profiling to characterize the placenta of pregnant mice at a molecular level. The dynamic changes in the expression levels of metabolism- and neoangiogenesis-related genes were identified. On the other hand, in human, it is assumed that pregnancy-induced hypertension (PIH) is resulting from the breakdown of the pregnancy homeostasis. In this study, I showed that pregnancy-associated hypertensive (PAH) mice, which were previously generated in our laboratory, exhibited the pathological condition including the criteria of PIH. In addition, by evaluating the ameliorative properties of the antihypertensive drugs in PAH mice, I demonstrated the effectiveness of blockade of AT1, a receptor of vasopressor angiotensin II, on prevention of this pregnancy-related disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：妊娠高血圧、胎盤、情報伝達、アンジオテンシン、遺伝子操作マウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、深刻な出生率の低下に伴う急速な少子化が進展する現在、国家は衰退の危機

を迎えつつある。これは、単に“子供を産むための社会的な環境不備”だけでなく、妊娠高血圧症など『妊娠・出産に伴う母体と胎児に対

する様々な危険因子』を回避できないことに大きく起因している。母体環境が胎盤を介する胎児との物質交換などの生理的相互作用によって構築されることから、妊娠という現象、またその病態異常を考察する場合、「母体」→「母胎」（母胎間ネットワーク）という概念への転換が必要である。母胎間ネットワークの本質は胎盤の担う生理的な機能ネットワークであり、胎盤の機能障害は、胎児の発育のみならず母体の恒常性をも破綻させると考えられる。

(2) 妊娠高血圧症は、妊娠後期の著しい高血圧とタンパク尿を主病態とし、罹患率は全妊婦の10%と高頻度である。重症化すると母体においては心肥大や胎盤の構造異常、痙攣などを伴う全身病態を、胎児においては子宮内発育遅延 (Intrauterine growth retardation: IUGR) を併発し、母子の死亡率を著しく高める。しかしながら、その原因は特定されておらず、有効な治療法も存在しない。

(3) これまで妊娠高血圧の発症原因として、血圧上昇系として代表的なレニン・アンジオテンシン系 (RA 系) の関与が示唆されており、妊娠高血圧患者において、RA 系の最終産物であり昇圧ホルモンである Ang II の受容体・AT1 (アンジオテンシン 1 型受容体) のシグナル亢進の可能性が報告されている (*J. Clin. Invest.*, 1999; *Nat. Med.*, 2001; *Nat. Med.*, 2008)。しかしながら、対象が妊婦・胎児であること、妊娠高血圧症の有効な病態モデルが存在しないことから、過剰な AT1 シグナルと妊娠高血圧発症との関連や病態形成メカニズムは不明である。

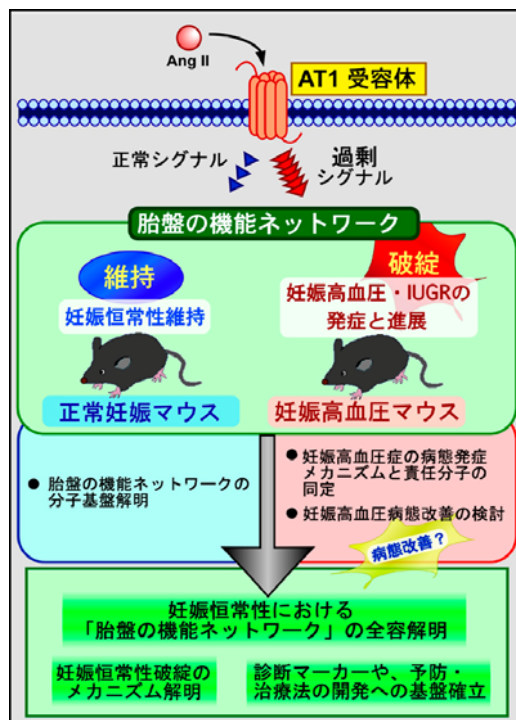
(4) 申請者は以前に、ヒトの妊娠高血圧症モデルとして、Ang II の過剰産生を病因とした「妊娠高血圧マウス」(Pregnancy-associated Hypertensive (PAH) マウス) の開発に世界に先駆けて成功した (*Science*, 1996)。この PAH マウスは、妊娠後期の高血圧に加え、タンパク尿、腎臓疾患および求心性心肥大等の臓器傷害や痙攣発作、また、胎仔病態として IUGR が 100% の個体にて観察されるなど、ヒトの“妊娠高血圧症”と同様の症状を呈する。PAH マウスを用いた解析から、申請者は妊娠高血圧病態の発症・進展に過剰な AT1 シグナルの亢進が深く関わっていることを証明してきた (*FASEB. J.*, 2004; *Mol. Endocrinol.*, 2005; *Lab. Invest.*, 2008, *Hypertens. Res.*, 2008)。AT1 活性化が妊娠高血圧病態の病因の最有力候補であることはコンセンサスとなりつつあるが、過剰な AT1 シグナルと胎盤の機能ネットワークとの関連に着目した研究は皆無である。

## 2. 研究の目的

現在、母胎間ネットワークの理解に向けた

正常、および、病態時における胎盤の機能解析は全く行われておらず、また現時点では妊娠高血圧症に対しては胎児発育への悪影響を考慮し薬剂的治療も含め有効な方法は存在しない。そこで申請者は、「妊娠恒常性の維持機構とその破綻における胎盤の機能ネットワークの解明」を本研究の目的とした。「胎盤機能」と「AT1 受容体シグナル」に注目するとともに、当研究室で開発した妊娠高血圧症モデルマウスを最大限活用して、以下の3点に焦点を絞り解析を行った (下図)。

- (1) 妊娠恒常性の維持機構と胎盤の機能ネットワークの解明
- (2) AT1 受容体による妊娠高血圧発症メカニズムの解明
- (3) 胎盤機能に着目した妊娠高血圧病態改善の検討



## 3. 研究の方法

- (1) 妊娠恒常性の維持機構と胎盤の機能ネットワークの解明

胎盤は母胎間の物質交換の場であるとともに、内分泌器官として妊娠母体や胎児に大きな影響力を持っている。そこで、胎児発育が顕著であり母体適応が求められる妊娠の後期に着目して、胎盤の経時的な網羅的遺伝子発現解析を行う。

- ① 正常妊娠マウスの胎盤に関して、妊娠 13 日目 (胎盤の形成期)、妊娠 16 日目 (胎児体重増加期)、また妊娠 19 日目 (出産前日) の発生段階に応じた経時的なマイクロアレイ解析を行う。
- ② 胎盤組織での遺伝子発現解析や母体血液

の生化学的解析、また母体の生理的变化に関する組織生理学的解析を行い、アレイ解析から得られた結果を立証する。

③胎盤は、母体と胎児の接点であるとともに、未熟な胎児の代謝機能を代償するなど様々な役割を担っている。そこでアレイ実験の結果に関して、免疫、ストレス応答、代謝など、妊娠恒常性に関わる他の機能的カテゴリーについてのデータ解析を行う。

④妊娠期間を通した胎盤機能の経時的変化と分子的相互作用を統合的に評価し、妊娠恒常性を担う「胎盤の機能ネットワーク」の解明を目指す。

(2) AT1 受容体による妊娠高血圧発症メカニズムの解明

妊娠高血圧症では、AT1 受容体のシグナル亢進を起点とした胎盤の機能ネットワークの破綻が病態発症の原因と考えられる。そこで、妊娠高血圧 (PAH) マウスを活用し、AT1 受容体を介した妊娠高血圧発症メカニズムの解明のため、以下の解析を行う。

①PAH マウスの病態解析: PAH マウスの主要臓器に関して詳細な病理解析を行い、妊娠高血圧症の物理的な組織傷害を確認する。また、母体血液を採取し生化学的解析を行い妊娠高血圧症の質的状況を把握する。

②妊娠高血圧症の発症原因の探索と特定: PAH マウスの胎盤に関して、妊娠 13 日目 (病態発症前)、妊娠 16 日目 (発症・進展過程)、また妊娠 19 日目 (病態が顕著) の発生段階に応じた経時的なマイクロアレイ解析を行う。また、PAH マウスでみられる胎盤の構造、機能変化に着目し、アレイ解析の結果から、発現変化の顕著な遺伝子を同定し、病態発症の分子的ネットワークを構築する。さらに、AT1 の作用としては、血圧上昇作用 (物理的負荷) と標的組織上の AT1 を介する直接的作用 (質的負荷) とに区別できることから、AT1 阻害剤に加えて、AT1 シグナルには影響せず直接血管を弛緩させることで血圧を下げる “ヒドララジン (Hydralazine)” を、PAH マウスへ投与することで、物理的負荷のみを遮断し、AT1 の直接的作用により惹起される病態変化とその責任因子を同定する。

(3) 胎盤機能に着目した妊娠高血圧病態改善の検討

胎盤の機能破綻は、胎児発育への直接的影響のみならず、妊娠高血圧病態の発症・進展に深く関与する。そこで「胎盤機能」の回復に焦点を当て、PAH マウスの病態に対するレスキュー実験を行う。

①胎盤に限局した一過性の遺伝子導入のためのシステムとして、膜融合を特徴とするセンダイウィルスの無毒化エンベロープを利用した「HVJ-E (Envelope) 法」を確立する。

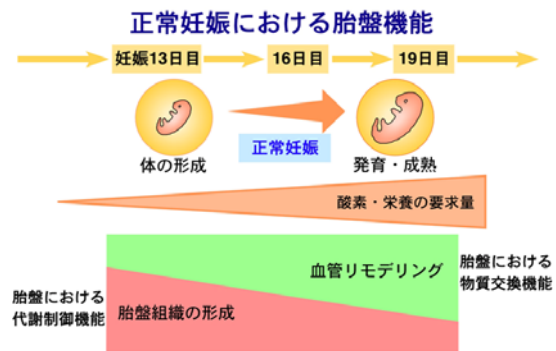
②PAH マウスの病態解析、また、アレイ解析の結果から同定した病態形成の責任候補遺

伝子に関して、遺伝子発現ベクターを病態発症時期 (妊娠 14 日目) の胎盤へ HVJ-E 法を用いて導入し、病態改善への効果を検討する。③胎盤機能に重要な、代謝亢進作用や抗酸化作用を有する物質を PAH マウスへ投与し、病態改善効果を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 妊娠恒常性の維持機構と胎盤の機能ネットワークの解明:

正常妊娠マウスの胎盤を用いた経時的マイクロアレイ解析を行い、妊娠恒常性の維持に関与する遺伝子発現プロファイリングを進めた。解析の結果、糖代謝、脂質代謝などの代謝関連遺伝子群が、妊娠中期と比較して妊娠後期に発現が低下することが判明した。一方で、妊娠の経過に伴い増加する胎盤血流量の確保に重要な「胎盤の血管リモデリング」に関して、血管形成関連遺伝子群が、妊娠後期に向かって発現上昇することを突き止めた。これら遺伝子群のダイナミックな発現変化は妊娠恒常性の維持に重要である可能性が考えられた (下図)。



(2) AT1 受容体による妊娠高血圧発症メカニズムの解明:

①組織病理学的解析から、正常妊娠マウスと比較して、PAH マウスの胎盤では、血管構造が粗雑であり脆弱な構造となっていることが判明した。また、PAH マウスの胎盤を用いたマイクロアレイ解析の結果、PAH マウスの胎盤では、細胞外基質分解酵素や血管増殖因子、また、NO 産生因子などの発現が大きく変化していることが判明した。これらの遺伝子の発現変化は、PAH マウスの胎盤血管構造の脆弱に対する分子基盤として重要である可能性が考えられた。

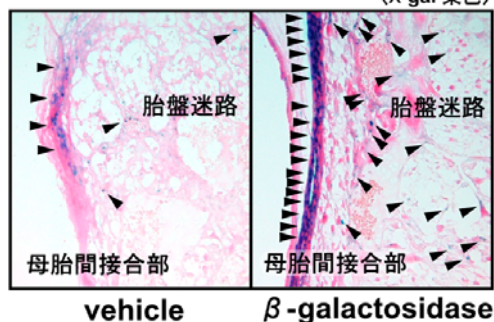
②妊娠高血圧モデルマウスに対して AT1 受容体阻害薬、または、血圧降下作用に特化したヒドララジンの投与を行い、その病態改善効果を検討した結果、ヒドララジンにより病態の改善は認められたものの不十分であったこと、また、AT1 受容体阻害薬では大幅な病態改善が認められたことから、母体および胎児病態の発症・進展に、AT1 シグナルの亢

進による血圧上昇作用に加え、AT1 を介する昇圧作用とは独立した作用が深く関与することが判明した。

(3) 胎盤機能に着目した妊娠高血圧病態改善の検討:

①胎盤への一過性の遺伝子導入のため、HVJ-E 法の確立を試みた。胎盤への  $\beta$ -galactosidase 遺伝子導入により、生理的相互作用の場である母胎間接合部と胎盤迷路層において導入遺伝子が発現することを確認した(下図、矢頭、コントロール (vehicle) でのシグナルは内在の  $\beta$ -galactosidase 様活性による)。

### HVJ-E 法による胎盤への遺伝子導入 (X-gal 染色)



②胎盤機能に重要な、代謝亢進作用や抗酸化作用を有する物質を PAH マウスへ投与し、病態改善効果を検討した。抗酸化作用を有する天然物質を、妊娠後期の PAH マウスへ投与したところ、PAH マウスの胎盤構造の脆弱化が大幅に改善されることが判明した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Araya, N., Arimura, H., Kawahara, K., Yagishita, N., Ishida, J. (他 12 名、5 番目) “Role of Kenae/CCDC125 in cell motility through the deregulation of RhoGTPase” *Int. J. Mol. Med.* 24, 605-611 (2009) (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 石田純治、中村匠子、深水昭吉「妊娠高血圧マウスの臓器障害に対する AT1 受容体阻害の改善効果」第 33 回 日本高血圧学会、2010 年 10 月 16 日、福岡県、福岡国際会議場
2. 永野克将、石田純治、松倉頼、深水昭吉「血管平滑筋特異的 APJ 受容体過剰発現マウスにおける血管収縮制御メカニズムの解明」、第 33 回 日本高血圧学会、2010 年 10

月 16 日、福岡県、福岡国際会議場

3. 永野克将、石田純治、海野まどか、松倉頼、粕谷善俊、村尾命、木村健二郎、望月直樹、深水昭吉「血管平滑筋特異的 APJ 受容体過剰発現による血管収縮制御機構の解明」、第 1 回 Molecular Cardiovascular Conference II、2010 年 9 月 4 日、北海道、小樽ホテルピアノ
4. Junji Ishida, Mitsuko Furuya, Saki Inaba, Yoshitoshi Kasuya, Sadao Kimura, Ryoichi Nemori, and Akiyoshi Fukamizu “Impaired Placental Neovascularization in Mice with Pregnancy-Associated Hypertension”, International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism CVEM 2010, April 1, 2010, Nara, Nara Prefectural New Public Hall
5. Kazuya Murata, Junji Ishida, Yumiko Noguchi, Taku Iguchi, Akira Sakairi, Shiro Nishiwaki, Naoto Masui, Tatsuo Hashimoto, Satoshi Umemura, and Akiyoshi Fukamizu “Enhanced apelin-induced hypotension by endothelial overexpression of APJ”, International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism CVEM 2010, April 1, 2010, Nara, Nara Prefectural New Public Hall
6. Katsumasa Nagano, Junji Ishida, Yasumi Hashimoto, Mei Murao, Kenjiro Kimura, Yoshitoshi Kasuya, Fumihito Sugiyama, Ken-ichi Yagami, Akiyoshi Fukamizu “Effect of APJ deficiency on diet-induced insulin resistance”, International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism CVEM 2010, April 1, 2010, Nara, Nara Prefectural New Public Hall

[図書] (計 3 件)

1. 石田純治、深水昭吉：メディカルビュー社「レニン・アンジオテンシノーゲンノックアウトマウス」*The Lipid* (2010) 21、4-9 頁
2. 濱田樹理、石田純治、深水昭吉：中外医学社「Apelin-APJ シグナルと動脈硬化」*Annual Review 循環器* 2010 (2010) 49-56 頁
3. 村田知弥、石田純治、深水昭吉：日本臨床社「レニン・アンジオテンシン系遺伝子欠損マウス：遺伝子改変動物に関する最新知見」(2009) 日本臨床「高血圧 上」、67、481-484 頁

[その他]

ホームページ等

<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 純治 (ISHIDA JUNJI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科

・講師

研究者番号：30323257