

令和元年9月9日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10098

研究課題名(和文) 妊娠初期の胎児において低酸素誘導因子HIF-1が制御する因子の検索

研究課題名(英文) Factors controlled by hypoxia inducible factor HIF-1 in the fetus during early pregnancy

研究代表者

桃井 伸緒 (MOMOI, NOBUO)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10285033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗てんかん薬であるフェニトインを妊娠初期の妊娠マウスに投与し、小動物用超音波高感度イメージングシステムで母体および胎児の心行動態を観察し、用量依存性に胎児徐脈が起きることを、始めて生体内で確認しました。この機序は、フェニトインが胎児心筋に特異的に発現しているイオンチャンネル(HERGチャンネル)を阻害することにあります。フェニトインは母親の心行動態には影響を与えないため、本実験モデルは妊娠初期に起きる胎児低酸素のモデルとして有用と考えられます。このモデルを用いて、胎児組織の低酸素マーカーについて評価し、母体血中マイクロRNAの変化について調べているところです。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低酸素が妊娠初期の胎児に及ぼす影響については、主に母体自体を高度の低酸素下に置く実験系で行われてきましたが、胎児の生体内での観察が行われないことと、低酸素が母体自体に引き起こす影響が無視されるという欠点がありました。本実験系はこれらの欠点を補うことができます。マイクロRNA(miRNA)は、20-25塩基からなる低分子のRNAで、母体miRNAが胎盤を通過し胎児の遺伝子発現を制御していることが報告されています。胎児低酸素で生じたmiRNA発現変化を母体血中で検出できれば、現在の技術では評価が困難な妊娠初期胎児のバイオマーカーとして利用できる可能性があると考えられます。

研究成果の概要(英文)：We administered phenytoin, an antiepileptic drug, to pregnant mice during the early gestation, and assessed the maternal and embryonic cardiovascular function using high resolution echocardiography. It was first confirmed in vivo that maternal phenytoin exposure induced the fetal bradycardia in a dose-dependent manner. The mechanism is that phenytoin inhibits an ion channel (HERG channel) specifically expressed in the developing fetal myocardium. This experimental model was considered to be useful as a model for fetal hypoxia that occurs early in pregnancy, as phenytoin did not influence maternal cardiovascular function. We have assessed hypoxia marker in embryos and are investigating circulating microRNAs in maternal blood.

研究分野：小児循環病学および胎児心臓病学

キーワード：胎児 低酸素 心行動態

## 1. 研究開始当初の背景

胎児組織は、常時、低酸素状態に置かれている。妊娠初期の胎児においては、この低酸素が低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor : HIF) の活性化を介して、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: Vegf)、erythropoietin、glucose transporter isoform-1 (Glut-1)、insulin-like growth factor binding protein-1 (Igfbp-1)、6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (Pfkfb3) などの発現を誘導し、臓器形成を促進する (DEVELOPMENTAL DYNAMICS 2001; 220: 175-186)。しかし、過度の低酸素暴露は、子宮内発育遅延、胎児死亡や胎児奇形の原因となるだけでなく、適応反応がエピジェネティック制御機構を介して遺伝子発現調節を引き起こし、将来的に生活習慣病の発生率を上昇させることも示唆されている (胎児プログラミング説) (Am J Clin Nutr 2000; 71: 1344S-1352S)。胎児プログラミングの高感受期は、臓器の形成時期である妊娠 2~3 ヶ月までの妊娠初期にあたる。低酸素が、この妊娠初期の胎児に及ぼす影響については、8%の酸素濃度下に6時間、母体マウスを置いた実験において、胎子の Vegf、erythropoietin、Glut-1、Igfbp-1 の発現が誘導されることが示された (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008; 295: R583-R595)。妊娠初期の胎子を低酸素環境に暴露させる動物実験は、この研究のように主に母体自体を低酸素下に置くことにより行われてきたが、この実験系を用いて胎子に起きている変化を検討することには2つの問題がある。1つは、母体を低酸素環境下においたとしても、胎子の血行動態を観察していないため、実際に胎子がどの程度の低酸素状態にあるかが明らかにされないことである。もう1つの問題は、低酸素環境下に置かれるために母体自体に起きる血行動態変化や内分泌代謝等の変化が胎児に影響を及ぼしたり、母体内で増減した物質が胎盤を通過したりする可能性があることである。

本研究代表者は、これまで、小動物用超音波高感度イメージングシステム (Vevo660, Visual Sonics, Canada) を用いて、心臓形態形成初期 (単心房単心室・総動脈幹) の在胎日齢 (ED) 9.5 から、心臓内構造がほぼ完成する ED13.5 までのマウスの胎子心機能について調べてきた (Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008; 284: H2248-2256、J Obstet Gynaecol Res. 2012; 38:1343-1352)。同機器は、妊娠早期の胎子心行動態を、母体内 (in vivo) で、かつ低侵襲に測定することを可能とする。

フェニトインは胎児催奇形性を有し、その原因が胎児徐脈であることは、in vitro の実験で推測されてきた。この徐脈の機序は、フェニトインが、胎児期早期に重要な役割を有している心筋細胞の急速活性型遅延整流電流 (I<sub>Kr</sub>) を阻害することによる (Epilepsia. 2002; 43: 457-68)。この I<sub>Kr</sub> チャネル阻害薬を投与して胎児徐脈を誘発する実験系は、母体を低酸素状態にせず、かつ母体血行動態も有意に変化させないため、これまでの母体低酸素を用いた実験系で生じる母体自体が低酸素に対して起こす反応が胎児へ影響するという欠点を補いつつ、胎児低酸素を誘発できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、I<sub>Kr</sub> チャネル阻害薬を用いることにより、母体を低酸素状態にせず胎子低酸素を誘導し、小動物用超音波高感度イメージングシステムを用いて子宮・胎盤血行動態を含めた胎子心行動態を観察しつつ、胎子組織におきる Vegf、Glut-1、Igfbp-1 等の変化を miRNA の発現も含めて研究する。胎児プログラミングの高感受期は、臓器の形成時期である妊娠 2~3 ヶ月までの妊娠初期にあたり、今回の研究はこの時期を対象とする。妊娠初期の胎児は低酸素に高い耐容性を示すことから、胎児低酸素が生じても死亡に至ることなく経過し、その影響がマスクされたまま、出産にいたることも考えられる。しかし、妊娠初期の胎児が、低酸素により心行動態変化のみならず遺伝子変化まできたしているとする、発達予後、および将来の生活習慣病にまで影響が及ぶと考えられる。本研究の明らかにする事象は、子供が健康に出生し成長するためには、妊娠が判明してからではなく、妊娠可能女性が日常からどのような胎児環境を保つことが重要かを示唆し、社会的啓蒙に寄与する可能性を有する。また、現在は評価することができない妊娠初期胎児のバイオマーカーの開発に寄与する可能性も有する。

## 3. 研究の方法

在胎日齢 (ED) 11.5 の母マウスにフェニトインを皮下投与し、胎子徐脈が誘導された群 (フェニトイン群) と、生理食塩水を投与する群 (対照群) について、心行動態を観察する。心行動態は小動物用超音波高感度イメージングシステムを用いて投与前後で観察し、具体的な観察方法は以下の通りである。

母マウスを吸入麻酔下で加温ベッドおよび加温用ランプを用いて体温の管理を行いながら、小動物用超音波高感度イメージングシステム (Vevo 2100, Visual Sonics, Canada) を用いて胎児心行動態を観察する。Mモード法を用いて心室壁運動を測定し、ドプラ法を用いて動脈幹・背側大動脈・内頸動脈・臍帯動脈・子宮動脈の血流を測定する。血流量の計算は血管面積×ドプラ法による速度時間積分を用いて行う。母マウスの心拍出量測定も Vevo2100 を用いて肺動脈血流量を連続的に記録することにより行う。母マウスの血圧は小動物血圧測定装置 (BP-98A-L, softron, Japan) を用いて 20 秒毎に、動脈血酸素飽和度は小動物用パルスオキシメータ (mouseOxPuls, STARR life sciences corp, USA) を用いて連続的に、また体温および

心電図は vevo2100 に内蔵されている計測システムを用いて、胎仔の超音波イメージングと一緒に vevo2100 内のハードディスクに記録する。

次に、HIF-1、および誘導される Vegf、erythropoietin、Glut-1、Igfbp-1、Bnip3 について、胎仔・胎盤・子宮筋における発現を両群で比較する。血行動態測定後に、母体を安楽死させ、胎仔は血流再分布の評価のために頭部と体部に分けたのち、複数の胎仔・胎盤・子宮筋をホモジェネートして検体を作成する。定量 RT-PCR 法を用いて、HIF-1、Vegf、erythropoietin、Glut-1、Igfbp-1、Pfkfb3、Bnip3 といった低酸素マーカーの発現の相違を、フェニトイン群と対照群で比較する。

胎仔の低酸素が確認されたならば、miRNA のアレイ解析を行う。方法は、ED11.5 の心血管動態評価後に採取した胎仔頭部および体部の一部、胎盤を直ちに RNA 保存試薬 (RNA later, Ambion) に浸漬する。RNA 抽出には mirVana microRNA Isolation kit (Ambion) を用いる。RNA の品質が NanoDrop1000 (LMS) で、吸光度 260/280 比が 1.8~2.1、かつ 2100 バイオアナライザ (Agilent) にて、RNA Integrity Number が国際基準の 7.0 以上の検体を選定し、各群 4 例ずつ、計 8 検体をアレイ解析に用いる。miRNA アレイ解析は TaqMan Low Density Array rodent, Card A and Card B (Applied Biosystems 社) で行い、同社の Expression Suite Software にて約 700 種類の miRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR にて測定する。CardA にはこれまで役割が明らかにされている miRNA が、CardB には役割が明らかにされていない miRNA が搭載されている。約 700 種類のうち、各群で発現量に有意差を認められた miRNA の中で Hif-1、Glut-1、Igfbp-1、erythropoietin 等に結合しうる miRNA があるかどうかを miRNA データベース Targetscan version 5.1 を用いて検出し、標的となる miRNA を同定する。両群に非妊娠マウスにフェニトインを投与した群を加えた 3 群の母体の血清中の miRNA 発現においても、各群 3 検体を用いて胎仔と同様の方法でアレイ解析を行い、フェニトイン投与妊娠マウスに特異的に発現している miRNA も同定する。

#### 4. 研究成果

コントロール群とフェニトイン 50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 投与の 4 群の比較において、投与後 12 時間の時点で、それぞれの群で 0%、10%、18.5%、17.0% に胎仔心停止が見られ、心停止胎仔を除いた胎仔の心拍数も投与前との比較で、+20.2%、-10.9%、-32.0%、-46.2% と用量依存性に低下した。同様に胎仔背側大動脈血流も +51.4%、+4.9%、-40.0%、-83.6% と用量依存性に低下し、in vivo で初めて妊娠マウスへのフェニトイン投与により胎仔マウスが徐脈に至ることを示した。母体の心血管動態には各群で差は認めなかった。また、投与後 24 時間でも同様に胎仔マウスが徐脈に至ることが示された。なお、フェニトインの母体血中濃度を投与後 4 時間、12 時間、24 時間で HPLC を用いて測定したところ、投与後 12 時間で最も高くなり、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 投与で、それぞれ、21.2 µg/kg、31.7 µg/kg、41.5 µg/kg であり、50mg/kg 投与でヒトの治療濃度 (5-20 µg/kg) を若干超える程度であった。

胎仔組織低酸素の定量評価目的に、リアルタイム PCR 法を用い、低酸素遺伝子マーカーである HIF-1、エリスロポエチン、Vegf、GLUT-1、VEGF、Pfkfb3、erythropoietin、IGFBP1、Bnip3 の発現定量評価を行った。コントロール群に比較しフェニトイン投与群 (24 時間) で、胎仔の体部の HIF-1 と erythropoietin の発現増加が得られたが、その他の低酸素マーカーの遺伝子発現には有意差が認められず、胎仔が低酸素に至っていることを証明することはできなかった。低酸素状態が短いことが低酸素遺伝子マーカーの発現に差が出なかった原因と推測し、フェニトインの暴露時間を延ばして同様の評価を行った。投与後 48 時間で心血管動態を観察すると、75mg 投与の胎仔のほとんどが心停止に陥っていることが判明したため、新たに 60mg/kg 投与の群を作成した。現在、60mg/kg 投与群や 50mg/kg 連日投与群について、低酸素マーカーの発現を確認するとともに miRNA の検体採取を継続中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：青柳 良倫  
ローマ字氏名：Aoyagi Yoshimichi  
所属研究機関名：福島県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：助手  
研究者番号（8桁）：30509469

研究分担者氏名：金井 祐二  
ローマ字氏名：Kanai Yuji  
所属研究機関名：福島県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：助手  
研究者番号（8桁）：60448628

研究分担者氏名：郷 勇人  
ローマ字氏名：Go Hayato  
所属研究機関名：福島県立医科大学  
部局名：医学部  
職名：助手  
研究者番号（8桁）：30443857

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。