

令和元年6月11日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11101

研究課題名(和文)炎症惹起因子を中心とした妊娠高血圧症候群の病態解明

研究課題名(英文) Mediators of Inflammation in Pathophysiology of Hypertensive Disorders in Pregnancy

研究代表者

成瀬 勝彦 (Naruse, Katsuhiko)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70453165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群の発症について、関与する因子であるDanger signalの存在を生体由来の細胞で明らかにした他、胎盤局所での遺伝子衝突の証明からもそれら因子が発現される可能性が示唆された。脂肪細胞・組織を用いた実験系においては、脂肪細胞表面のRAGEをロックダウンした場合に下流の炎症シグナルが抑制されることを確認し、この経路が妊娠高血圧症候群における全身性の炎症を惹起している可能性を明らかにした。加えてケモカインが経路の下流にあることを確認し、脂肪細胞に与えられた妊娠高血圧症候群妊婦の全身性血清由来ストレスが、その後の疾患病態の形成に深く関わることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠中の母児に致命的な影響を与える妊娠高血圧症候群において、血液中の炎症性因子が生体の組織、とくに脂肪組織に働きかけて強い炎症を引き起こし、疾患の重要な部分を占めることを明らかにした。妊娠高血圧症候群は発症してしまうと治療がなく、また児の予後も不良なことがある。発症を抑えることももちろんであるが、発症してからでもこれらの炎症性因子を抑制することができれば、母児の予後を改善することが可能になり、児の障害や母の加齢後の高血圧などを劇的に減少させることができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Existence and contribution of Danger signal on primary human cells in hypertensive disorders in pregnancy were defined. Research in placental genetic conflict were also showed this pathway. RAGE (receptor for advanced glycation end-products), strongly related to danger signal, on adipocyte and adipose tissue were found as a mediator of the pathway of inflammatory signal, which may induce systemic inflammatory response in hypertensive pregnancy. Chemokine in the pathway of inflammation was also defined in the research, which suggesting that the soluble inflammatory factors in hypertensive pregnancy contributed to pathophysiology of the disease.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠高血圧症候群 炎症 脂肪細胞 胎盤 ケモカイン サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群は周産期救急の中心となる疾患であり、現在でも脳出血・腎不全・常位胎盤早期剥離・胎児発育遅延により母児の多くの障害をもたらす。また近年の疫学研究から、本疾患は妊娠終了後に一旦は改善しても、中高年に至って同様の疾患、すなわち「本態性」高血圧症などメタボリックシンドロームの発症リスクを5~10倍にまで高め、女性の生涯のヘルスケアに悪影響を及ぼすため、病態の解明と疾患の予防が急務とされ、現在その世界的なコホート研究 (Staff AC, *Pregnancy Hypertens.* 2013 など) が開始されるなど注目の集まる分野である。

しかし、妊娠高血圧の原因そのものが長らく不明であったため、その加齢後リスクを予測・関与する因子は推定もできなかった。近年、胎盤由来の Placental Growth Factor (PlGF) が発症に関わる可能性が指摘され (Levine RJ, *N Engl J Med.* 2004 など)、液性因子の関与が次第に証明されつつある。申請者らは生体内で通常存在しながら異常時に自然免疫系を通じて炎症を強く惹起する因子、すなわち Danger Signal に原因があることを、臨床データから提唱してきた。

A. Danger Signal の関与する全身的な炎症病態

申請者は臨床での経験から、重症妊娠高血圧の病態が炎症 (特に感染に関連しない自然炎症) を主体とすることを予測していたが、その実態は証明されていなかった。申請者らはマクロファージ~Toll Like Receptor 系を中心に強い炎症作用をもたらす Danger Signal に初めて着目した。Danger Signal とは感染を伴わない生体内の炎症を伝達する系でのリガンドを総称し、具体的に炎症を起こす物質は Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) と呼ばれる。申請者らはこれら多くの DAMPs 候補の中から、脂肪組織において炎症を惹起する遊離脂肪酸 (Free Fatty Acid, FFA) や、絨毛細胞での発現が示唆されている DAMPs である RAGE リガンド (S100、HMGB1 など) が早発型・重症妊娠高血圧腎症において血清中で上昇することを初めて証明し (Naruse K, *et al. Mediators Inflamm* 2012; Naruse K *et al. J Reprod Immunol* 2012)、炎症と疾患の強い関連を裏付けた。

続いて、炎症の下流にあって病態に密接に関与するとみられるサイトカイン (アディポサイトカイン) の関与と、タンパク分解酵素 (プロテアーゼ) の発現異常についての検討を進めた。

B. 脂肪組織と由来のサイトカイン (アディポサイトカイン) の関与

妊娠高血圧症候群と加齢後のメタボリックシンドロームの関連が疫学的に指摘されており、とくに高血圧のリスクは上昇する (Veerbeek JH, *Hypertension* 2015 など)。申請者らは脂肪組織の関与を考え、まず正常妊婦血清の検討から、脂肪細胞が分泌するサイトカイン、すなわちアディポサイトカインが大きく関与している可能性を突き止めた。特にインスリン感受性を制御し、高濃度に血中に存在するアディポネクチンについて、世界で初めて正常妊婦における低値を証明し (Naruse K, *J Reprod Immunol* 2005)、重症妊娠高血圧ではこれらが異常上昇することを発表した (Naruse K, *Pregnancy Hypertens* 2011)。これらは現在世界各国で追試され、脂肪組織の疾患への関与が強く示唆されつつある。さらに脂肪組織レベルでの遺伝子変化を突き止め (Naruse K, *Med Inflamm* 2015)、NF- κ B や酸化ストレスでの活性化や脂肪組織の緩衝能も推察している。

C. 妊娠初期の胎盤着床とタンパク分解酵素 (プロテアーゼ) の異常 妊娠初期 (14 週まで) に子宮らせん動脈の分解異常が起こると、妊娠が進むにつれ胎児・胎盤への血流が不足し、酸素濃度異常から高サイトカイン血症となり、妊娠高血圧症候群 (とくにアジア人に多く治療の困難な重症型) や胎児発育遅延が起こることが分かっている (Brosens I, *Placenta* 2013)。申請者はこの着床過程において、タンパク分解酵素 (プロテアーゼ) が鍵となる役割を果たし、異なる週数 (8~10 週と 12~14 週) で浸潤の方向性を制御するプロテアーゼ・スイッチングと、低酸素での絨毛細胞浸潤阻害を発見した (Naruse K, *et al. Hum Reprod* 2009, *Placenta* 2009; Onogi A, Naruse K*, *et al. Placenta* 2011)。このプロテアーゼ・スイッチは DAMPs により誘導される。

2. 研究の目的

妊娠高血圧症候群の発症に関わる Danger Signal の異常亢進とサイトカインの変動をより明らかにする。

1) 胎盤由来の絨毛細胞を用いて、妊娠経過中に母体内に流入する DAMPs の実態が絨毛細胞であることを証明する。また DAMPs の発現が亢進される条件下で、サイトカインおよびプロテアーゼ産生の変化を生化学的手法を用いて明らかにする。

2) これまでに当科にストックされた妊娠高血圧症候群および正常妊娠の血清検体を用いて、DAMPs およびサイトカイン (アディポサイトカイン)・プロテアーゼ・関連因子の測定を行う。

3) 脂肪組織の培養系を用いて、同様にこれら DAMPs を加えて培養し、妊娠高血圧症候群の病態において DAMPs が全身性に与える異常を証明する。

4) さらに妊娠高血圧症候群由来の胎盤における免疫組織染色を行い、疾患の発症に関わる母

体由来・胎児側遺伝子のコンフリクトを予見することで、その下流にある Danger signal や炎症惹起因子の誘導について検討し、疾患の上流にある因子についても推測を進める。

3. 研究の方法

1) 脂肪細胞実験

妊娠高血圧症候群を発症した妊婦で上昇する Danger signal の代表的な一つである HMGB-1 (絨毛細胞の表面にも存在し、妊娠中の炎症のトリガーとなることが分かっている) とその受容体 RAGE について、脂肪細胞表面の RAGE を分子生物学的手法を用いてノックダウンし、ここに HMGB-1 などの Danger signal を添加する系を用いて検討した。

2) 脂肪組織実験

本研究の開始直前に脂肪組織の直接培養系を確立することができた (Naruse K, Akasaka J, *et al. Mediators Inflamm* 2015)。この実験系を活用し、同様の添加実験と、妊娠高血圧症候群妊婦由来血清の添加実験を行って同様に炎症性因子の誘導を確認した。

3) 胎盤由来絨毛細胞実験

初期胎盤・満期胎盤由来絨毛細胞・絨毛癌細胞株を用いた実験により、低酸素・ストレス環境・患者血清添加培養での Danger signal 誘導について各種の方法をもちいて検討した。

4) 胎盤局所での母児間遺伝子衝突にかかわる検討

本研究の開始後、炎症惹起因子の上流に位置する要因として母児間の遺伝子衝突 (母親由来と父親由来のインプリンティング遺伝子不均衡) が発見されたので、その検討を行うこととした。正常・妊娠高血圧症候群由来の胎盤を免疫組織染色し、これら遺伝子のコードする複数の蛋白について発現の差を検討した。

4. 研究成果

- 1) 妊娠中の母児に致命的な影響を与える妊娠高血圧症候群の発症について、関与する因子である Danger signal の存在を生体由来の細胞で明らかにした他、胎盤局所での遺伝子衝突の証明からもそれら因子が発現される可能性が示唆された。
- 2) 脂肪細胞・組織を用いた実験系においては、脂肪細胞表面の RAGE をノックダウンした場合に HMGB-1 を添加しても下流の炎症シグナルが抑制されることを確認し、この経路が妊娠高血圧症候群における全身性の炎症を惹起している可能性を明らかにした。
- 3) 加えてケモカイン (細胞内の炎症シグナルを実際の動脈硬化などの病態に直結させる因子) が HMGB-1 ~ RAGE の経路の下流にあることを確認し、脂肪細胞に与えられた妊娠高血圧症候群妊婦の全身性血清由来ストレスが、その後の疾患病態の形成に深く関わることを示唆した。
- 4) 絨毛細胞をもちいた実験でも炎症性因子の発現が亢進し、細胞の状態が変化することが明らかとなった。サイトカインおよびプロテアーゼ産生の変化については引き続き検討が進められている。
- 5) 妊娠高血圧症候群由来の胎盤における免疫組織染色では、疾患の発症に関わる母体由来・胎児側遺伝子のコンフリクトを認めている。現在確認のための実験が進められており、今後新たな発見として報告される予定である。

以上の研究成果は、2018 年の日本産科婦人科学会国際ワークショップ (International Session Workshop 5 "Possible involvement of RAGE in Hypertensive Disorders of Pregnancy", Akasaka J, *et al.*)、国際胎盤学連盟シンポジウム (DOHaD and the placenta: "Paternal-maternal-fetal genetic conflict on placenta: Imprinting disorders may effect on generationwide hypertensive disorders", Naruse K, *et al.*) などで発表されるとともに、英文教科書 (Comprehensive Gynecology and Obstetrics, Springer Inc.) にもその結果の一部が紹介されるという成果を挙げた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Naruse K, Tsunemi T, Kawahara N, Kobayashi H. Preliminary evidence of a paternal-maternal genetic conflict on the placenta: Link between imprinting disorder and multi-generational hypertensive disorders. *Placenta*. 2019, in press
2. 成瀬 勝彦. 妊娠高血圧症候群 (HDP) と胎盤 —着床・胎盤形成の異常から疾患発症まで. *医学のあゆみ* 2019, in press
3. 成瀬 勝彦. 特集 妊娠高血圧症候群—PIH から HDP へ. 9. 妊娠高血圧症候群の発症原因—子宮内炎症. *産科と婦人科* 65, 207-211, 2019
4. 成瀬 勝彦. 特集 妊婦のやせ・肥満 保健指導と分娩管理 01 総論: 妊婦のやせ・肥満と体重管理. *ペリネイタルケア* 37, 14-17, 2018
5. 成瀬勝彦. 産婦人科領域と炎症性疾患 妊娠高血圧症候群における胎盤・血管の炎症. 別冊 *BIO Clinica* 慢性炎症と疾患 産婦人科領域と炎症 6, 67-72, 2017
6. Nakano K, Tsunemi T, Akasaka J, Shigemitsu A, Naruse K, Kobayashi H. A case of very early onset eclampsia, placental abruption and intrauterine fetal death.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Naruse K. Pathophysiology of HDP: Placental disease or not? 第 11 回日本イアンドナルド超音波講座アドバンスセミナー：The 3rd Talk Battle on Maternal Fetal Medicine, 2019
2. 常見泰平, 隅田大地, 河原直紀, 佐道俊幸, 小林 浩. 早発型妊娠高血圧症候群におけるインプリティング遺伝子発現の検討. 第 42 回日本産科婦人科栄養・代謝研究会, 2018
3. 成瀬勝彦. 専攻医教育プログラム 5 妊娠高血圧腎症の診断と管理. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2018
4. Akasaka J, Tsunemi T, Nakano K, Onishi S, Kimura M, Ogawa K, Yoshimoto C, Sado T, Kobayashi H. Possible involvement of RAGE in Hypertensive Disorders of Pregnancy. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2018
5. Naruse K, Tsunemi T, Kawahara N, Kobayashi H. Symposium “DOHaD and the placenta”: Paternal-maternal-fetal genetic conflict on placenta: Imprinting disorders may effect on generationwide hypertensive disorders. International Federation of Placenta Association (IFPA) Annual meeting, 2018
6. 重光愛子, 成瀬勝彦, 赤坂珠理晃, 小池奈月, 常見泰平, 小林 浩. 絨毛外栄養膜細胞 (EVT) の低酸素環境下における uPA 系の変動と浸潤能および細胞死の変化. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2017
7. Tsunemi T, Naruse K, Koike N, Shigemitsu A, Kobayashi H. Hypoxia increased invasion of human primary extravillous trophoblast by urokinase-type plasminogen activator system. The 1st joint meeting of ISPP/PA workshop, 2016
8. 常見泰平, 重光愛子, 佐道俊幸, 小林 浩. 妊娠高血圧症候群における父性因子の関与. 第 37 回日本妊娠高血圧学会学術集会・シンポジウム, 2016
9. 佐道俊幸, 成瀬勝彦, 小林 浩. 「妊婦体重制限の功罪」妊娠中の脂質代謝異常は把握できるか? ~新たな脂質マーカーの検討から~. 第 40 回日本産科・婦人科栄養代謝研究会・シンポジウム, 2016
10. Nagayasu M, Naruse K, Akasaka J, Shigemitsu A, Tsunemi T, Yamada Y, Sado T, Kobayashi H. Inflammatory stress and deposition markers in the serum and on adipose tissue in normal and hypertensive pregnancy. International Society for Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP), 2016

〔図書〕(計 2 件)

1. Shigeru Saito (ed.), Katsuhiko Naruse et al. [Comprehensive Gynecology and Obstetrics] Preeclampsia: Basic, Genomic, and Clinical. Springer Inc., 2018
2. 成瀬勝彦. 【産科編】循環器症状 032 血圧の異常. 母と子の診断羅針盤 周産期医学 Vol.47 増刊. 東京医学社, 2017

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：赤坂 珠理晃
ローマ字氏名：AKASAKA, Juria
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：90526724

研究分担者氏名：長安 実加
ローマ字氏名：NAGAYASU, Mika
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部附属病院
職名：研究員
研究者番号(8桁)：80623496

研究分担者氏名：重光 愛子
ローマ字氏名：SHIGEMITSU, Aiko
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部

職名：助教
研究者番号（8桁）：50553244
備考：異動のため2017年3月末にて辞退

(2)研究協力者
なし

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。