

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17108004

研究課題名（和文） 妊娠中毒症における母胎間ネットワークの解明

研究課題名（英文） **Feto-maternal network on pregnancy-induced hypertension**

研究代表者

深水 昭吉 (FUKAMIZU AKIYOSHI)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：60199172

研究成果の概要（和文）：

当研究室にて開発した「妊娠中毒症モデルマウス」を活用し、(1) 妊娠中毒症の発症原因として、母胎間ネットワークの「要」である胎盤の血管内皮細胞障害を発端とした機能障害を特定するとともに、本モデルマウスがヒトの重篤な妊娠時疾患である HELLP 症候群と類似の症状を示すこと、(2) 母胎間相互作用の破綻により多臓器不全と新生児死亡を伴う子宮内胎児発育遅延 (IUGR) を発症すること、(3) 新規の心血管機能制御系である APJ 受容体が本モデルマウスの著しい腎臓障害を一層増悪化する可能性があること、を明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, using the model mice associated with hypertension during pregnancy (PAH) developed in our laboratory, we have investigated (1) the pathogenesis of pregnancy-associated hypertension and the feto-maternal network, (2) the development of intrauterine growth retardation (IUGR) and its molecular mechanism, and (3) the possible involvement of a new cardiovascular system, APJ, in the pathogenesis of hypertension during pregnancy. In PAH mice, the dysfunction of endothelial cells in the placenta as the core of feto-maternal network known to play an integral part of pregnancy was observed, suggesting the development of IUGR. All pups associated with IUGR born from hypertensive mothers showed cardiac hypertrophy, anemia like phenotypes, and atrophy of many organs other than the heart, and died one day after birth. Furthermore, PAH mice showed the similar phenotypes to human HELLP syndrome. Moreover, it was suggested that APJ was involved in the exacerbation of proteinuria induced in PAH mice at the late pregnancy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	21,800,000	6,540,000	28,340,000
2006年度	20,500,000	6,150,000	26,650,000
2007年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2008年度	16,400,000	4,920,000	21,320,000
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
総計	83,300,000	24,990,000	108,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：妊娠中毒症、妊娠高血圧症候群、母胎間ネットワーク、レニン-アンジオテンシン系、子宮内発育遅延、トランスジェニックマウス、アペリン-APJ受容体、胎児-胎盤系

1. 研究開始当初の背景

新生児の発育は、出産後の環境に規定されるだけでなく、むしろ出産前の母体内環境に大きく左右される。母体環境は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、現時点では妊娠中毒症に対しては胎児発育への悪影響を考慮し、薬剤的治療も含め有効な方法はない。母体の安全を優先し血圧を下げようとする降圧治療法がとられているが、血圧の上昇は胎児への血流量確保のための補償的な応答であると考えられ、血圧を無理矢理に下げってしまうことは胎児にとってはより状況を悪くしてしまう可能性がある。妊娠中毒症の病態の発症・進展は、血圧制御系と深く関連している。

血圧制御において代表的な昇圧系であるレニン・アンジオテンシン系は、正常血圧の維持に必須であることに加え、妊娠中毒症の発症・進展にも重要な役割を担っており、ヒトの妊娠中毒症患者ではレニン-アンジオテンシン系の感受性亢進がその病態の増悪化の大きな原因と考えられている。我々は、レニン-アンジオテンシン系の構成因子であるヒトレニン (hRN) 導入 (-Tg) ♂ マウスと交配させた昇圧ホルモン・アンジオテンシン II の前駆体・ヒトアンジオテンシノーゲン (hAG)-Tg ♀ マウスが、ヒトの妊娠中毒症と同様に、妊娠後期特異的に高血圧が誘発されることを世界で初めて発見した (妊娠高血圧マウス: *Science* 274, 995-998, 1996)。この妊娠高血圧マウスは、アンジオテンシン II 依存的な高血圧に加え、タンパク尿、腎臓疾患、胎盤浮腫および求心性心肥大等の臓器傷害や痙攣発作を伴う“妊娠中毒症”に酷似した症状を呈すること、妊娠高血圧マウスからの産児は全て IUGR を発症し、周産期に高頻度で死亡することを突き止めた (*FASEB J.* 18, 388-390, 2004)。マウスとヒトの胎盤の構造は分類上同じグループである「絨毛性胎盤構造」を持つことから、この妊娠高血圧マウスはヒトの妊娠中毒症のモデルマウスとして定義できる。本モデルでは、胎児-胎盤系で産生されるヒトレニンの母体血中への移行が高血圧発症の引き金になることが明らかになっており、母胎間ネットワークが恒常性維持に極めて重要であることを示している。

当研究室では、心血管系にて発現しており、新しい血圧制御系として注目されている 7 回膜貫通型受容体 APJ をクローニングし、作製した APJ 受容体遺伝子欠損マウスがリガンドであるアペリン投与による血圧が降

下せず、アンジオテンシン II 感受性が高いことを証明した (*J. Biol. Chem.* 279, 26274-26279, 2004)。このことは、APJ 受容体シグナルを制御することが妊娠時疾患に対する新たな予防・治療法の開発へとつながる可能性を示すものである。

2. 研究の目的

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、妊娠中毒症など『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。妊娠、出産の分子メカニズムの解明と妊娠時疾患の原因解明が必須であるが、今尚、正常妊娠自体、および異常 (疾患: 妊娠中毒症) 状態の分子基盤と妊娠という現象との因果関係はほとんど解明されていないのが現状である。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」から「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と我々は考えている。妊娠中毒症や子宮内胎児発育遅延 (IUGR) などの妊娠時疾患において、胎児の発育のみならず組織傷害を含めた母体の恒常性に大きな影響力を持つ母胎間ネットワークについての解明は全く行われておらず、また現時点では妊娠中毒症に対しては胎児発育への悪影響を考慮し、薬剤的治療も含め有効な方法は存在しない。そこで我々は、妊娠時の恒常性維持とその破綻によって生じる病態発症メカニズムを明らかにするために、当研究室で開発した妊娠中毒症モデルマウスを最大限活用し、以下の 3 点に焦点を絞ることとした。

- (1) 妊娠中毒症の発症メカニズムと母胎間ネットワークの解明
- (2) 子宮内胎児発育遅延 (IUGR) の病態解析とその発症原因の特定
- (3) 新規の心血管機能制御系である APJ 受容体の妊娠時疾患への関与とその分子メカニズムの解明

3. 研究の方法

① 妊娠中毒症の発症メカニズムと母胎間ネットワークの解明: hAG-Tg ♀ マウスと hRN-Tg ♂ マウスを交配させ妊娠高血圧マウスを作製し、各妊娠時期や出産時の病態解析に加え、血液や組織のサンプリングを行ない、病態の発症・進展を担う標的分子の特定

とそのメカニズムの解明を、特に、妊娠高血圧マウスで認められる血管構造の脆弱化に着目して行った。

②子宮内胎児発育遅延 (IUGR) の病態解析とその発症原因の特定: 妊娠高血圧マウスからの新生児より採取した血液サンプルや組織サンプルを用いて、各種病態マーカー因子の動態、各臓器での病態イベントの詳細を解析することにより、IUGR の病態原因・死亡原因の特定を試みた。また、妊娠高血圧マウスへの AT1 阻害剤投与、また、血圧降下作用に特化した降圧剤である Hydralazine 投与により、母体および胎児病態に対する高血圧による物理的負荷とアンジオテンシン II のホルモンシグナルとしての質的負荷との分離解析を行った。

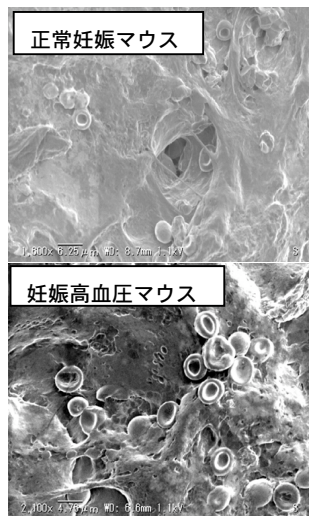
③新規の心血管機能制御系である APJ 受容体の妊娠時疾患への関与とその分子メカニズムの解明: 妊娠高血圧マウスにおける各妊娠時期や出産時における APJ 受容体の発現解析を行った。また、当研究室にて開発した APJ 受容体遺伝子欠損マウス (APJ-KO マウス) を用い、妊娠高血圧マウスから APJ 受容体をさらに欠損させたマウス (PAH/APJ-KO マウス) 作製し、その病態変化を検討することで、APJ 受容体の妊娠高血圧病態への関与を評価した。

4. 研究成果

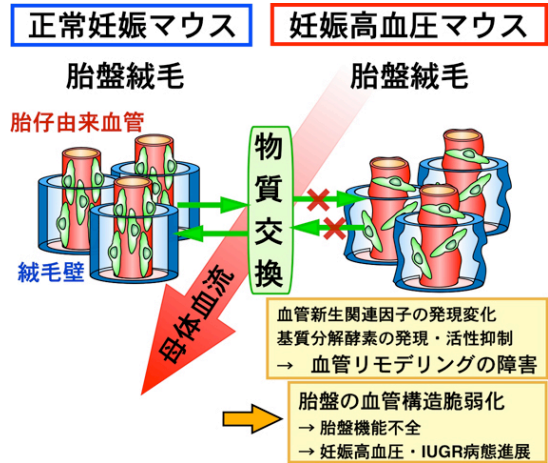
(1) 妊娠中毒症の発症メカニズムと母胎間ネットワークの解明

我々は、妊娠高血圧マウスの妊娠 19 日目の胎盤では、物質交換の場である母胎間接合部における梗塞巣の形成や apoptosis が増加していることを見出した。また、電子顕微鏡観察により妊娠高血圧マウスの胎盤における血管表面の内皮細胞に傷害が起きていることや (右図)、母体由来および胎児由来の血管構造が粗雑で母胎間ネットワークの場が極めて脆弱な構造になっていることが判明した。これらの

原因として、胎盤の遺伝子発現解析から、複数の血管新生関連因子が時期特異的に発現抑制や亢進するなどの変化が認められ、さらに、胎盤の母胎間接合部において基質分解を調節する複数酵素の発現および活性の低下が認められた。これら現象が病態

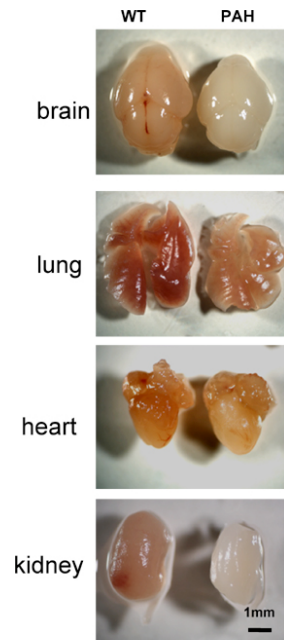


の進展する妊娠 16 日目より加速されることを証明し、胎盤機能の低下の大きな原因を特定した (下図)。さらに、妊娠高血圧マウスが、溶血や肝障害マーカーの上昇、また、血小板減少など、妊娠高血圧症の重篤病態である HELLP 症候群と類似の症状を示すことが明らかとなった。



(2) 子宮内胎児発育遅延 (IUGR) の病態解析とその発症原因の特定

妊娠高血圧マウスからの IUGR 産児では、各臓器の高度な貧血様所見 (下図、PAH; 妊娠高血圧マウス)、また、胎児貧血、有核赤血球増加 (低酸素状況) が明らかとなった。また、**心臓**では心胸郭比 (CTR) の上昇や心室壁の肥厚を伴う心不全様所見が、**肝臓**では脈管構造の乱れと一部で肝鬱血が、**肺**では上皮細胞分化異常を伴う肺胞の開放度の低下と呼吸不全を原因とするチアノーゼの所見が、さらに**腎臓**では組織の大きさと糸球体数の減少やアポトーシスの増加にともなう腎機能低下の



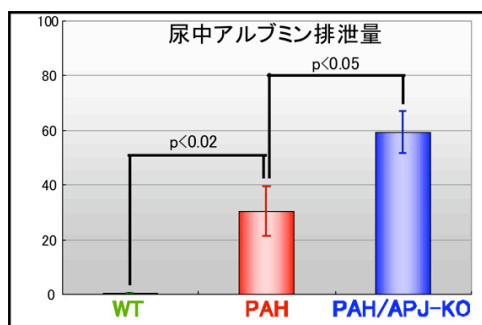
各臓器の高度な貧血様外観

可能性が示され、IUGR 産児は生後母体から独立することにより急激な変化を求められる恒常性維持を担う**主要臓器の機能不全**を呈している可能性が判明しつつあり、IUGR 産児の死亡原因と考えられた。また、妊娠高血圧マウスへの降圧剤・Hydralazine 投与によ

り、血圧の低下とある程度の組織病態の改善が認められたものの、IUGR と新生仔死亡は改善しなかった。一方で、AT1 阻害剤の投与では、母体病態の顕著な改善に加えて、胎仔病態としての IUGR および新生仔死亡を回避できることが判明した。

(3) 新規の心血管機能制御系である APJ 受容体の妊娠時疾患への関与とその分子メカニズムの解明

APJ 受容体シグナルは、Akt の活性化を介する細胞遊走活性を有すること、血管平滑筋ではカルシウム動員シグナルを惹起することや酸化ストレス誘導により動脈硬化進展に関与する可能性を突き止めた。さらに、マウスの交配実験により上述の妊娠高血圧マウスのバックグラウンドで APJ 受容体を欠損させたところ、妊娠高血圧マウスでみられていた妊娠後期の著しい蛋白尿がより増悪化することが判明した（下図、未発表）。蛋白尿を含む腎臓の機能障害は妊娠中毒症において高血圧と並ぶ 2 大病態の一つであり、妊娠中毒症の判断基準であるとともに蛋白尿自体が病態の増悪化に大きく寄与していることが判明しつつある。腎臓において AT1 シグナルの活性化は酸化ストレス産生と虚血誘導により腎機能障害を引き起こすことが知られている。興味深いことに、APJ 受容体のリガンドであるアペリンが低酸素に応答して発現誘導されることが最近報告され、血管保護作用を有する NO の APJ 受容体を介した産生増強が、妊娠高血圧マウスの腎臓病態の増悪化を防いでいる可能性が考えられる。このことは、APJ 受容体と腎機能との関連研究が皆無であることに加え、APJ 受容体シグナルを制御することが妊娠時疾患や他の腎機能障害を呈する病態に対する新たな予防・治療法の開発へとつながる可能性を示すものである。



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 29 件)

① Asaba Y, Ito M, Fumoto T, Watanabe

K, Fukuhara R, Takeshita S, Nimura Y, Ishida J, Fukamizu A, and Ikeda K. Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension. **J. Bone Miner. Res.** 24, 241-250 (2009) (査読有)

② Kurosaka M, Suzuki T, Hosono K, Kamata Y, Fukamizu A, Kitasato H, Fujita Y, and Majima M. Reduced angiogenesis and delay in wound healing in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. **Biomed. Pharmacother.** 63, 627-634 (2009) (査読有)

③ Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Noda K, Ozawa Y, Fukamizu A, Tsubota K, Itoh H, Oike Y, and Ishida S. (Pro)renin receptor-mediated signal transduction and tissue renin-angiotensin system contribute to diabetes-induced retinal inflammation. **Diabetes** 58, 1625-1633 (2009) (査読有)

④ Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, Noda K, Ozawa Y, Fukamizu A, Tsubota K, Itoh H, Oike Y, and Ishida S. (Pro)renin receptor promotes choroidal neovascularization by activating its signal transduction and tissue renin-angiotensin system. **Am. J. Pathol.** 173, 1911-1918 (2008) (査読有)

⑤ Sakairi A, Ishida J, Honjo K, Inaba S, Nakamura S, Sugiyama F, Yagami K, and Fukamizu A. Angiotensin type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in mice with pregnancy-associated hypertension. **Hypertens. Res.** 31, 2165-2175 (2008) (査読有)

⑥ Hirota K, Sakamaki JI, Ishida J, Shimamoto Y, Nishihara S, Kodama N, Ohta K, Yamamoto M, Tanimoto K, and Fukamizu A. A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. **J. Biol. Chem.** 283, 32432-32441 (2008) (査読有)

⑦ Hamada J, Kimura J, Ishida J, Kohda T, Morishita S, Ichihara S, and Fukamizu A. Evaluation of novel cyclic analogues of apelin. **Int. J. Mol.**

- Med.* 22, 547-552 (2008) (査読有)
- ⑧ Ohno O, Ye M, Koyama T, Yazawa K, Mura E, Matsumoto H, Ichino T, Yamada K, Nakamura K, Ohno T, Yamaguchi K, Ishida J, Fukamizu A, and Uemura D. Inhibitory effects of benzyl benzoate and its derivatives on angiotensin II-induced hypertension. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 7843-7852 (2008) (査読有)
- ⑨ Kato H, Ishida J, Nagano K, Honjo K, Sugaya T, Takeda N, Sugiyama F, Yagami K, Fujita T, Nangaku M, and Fukamizu A. Deterioration of atherosclerosis in mice lacking angiotensin II type 1A receptor in bone marrow-derived cells. *Lab. Invest.* 88, 731-739 (2008) (査読有)
- ⑩ Lu H, Rateri DL, Feldman DL, Jr RJ, Fukamizu A, Ishida J, Oesterling EG, Cassis LA, and Daugherty A. Renin inhibition reduces hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 984-993 (2008) (査読有)
- ⑪ Furuya M, Ishida J, Inaba S, Kasuya Y, Kimura S, Nemori R, and Fukamizu A. Impaired placental neovascularization in mice with pregnancy-associated hypertension. *Lab. Invest.* 88, 416-429 (2008) (査読有)
- ⑫ Yayama K, Miyagi R, Sugiyama K, Sugaya T, Fukamizu A, and Okamoto H. Angiotensin II regulates liver regeneration via type 1 receptor following partial hepatectomy in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1356-1361 (2008) (査読有)
- ⑬ Tanimoto K, Sugiura A, Kanafusa S, Saito T, Masui N, Yanai K, and Fukamizu A. A single nucleotide mutation in the mouse renin promoter disrupts blood pressure regulation. *J. Clin. Invest.* 118, 1006-1016 (2008) (査読有)
- ⑭ Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, Mukai H, Kasuya Y, and Fukamizu A. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol. Cell* 32, 221-231 (2008) (査読有)
- ⑮ Furuya M, Ishida J, Aoki I, and Fukamizu A. Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension. *Vasc. Health Risk Manag.* 4, 1301-1313 (2008) (review) (査読有)
- ⑯ Hashimoto T, Kihara M, Imai N, Yoshida S, Shimoyamada H, Yasuzaki H, Ishida J, Toya Y, Kiuchi Y, Hirawa N, Tamura K, Yazawa T, Kitamura H, Fukamizu A, and Umemura S. Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 171, 1705-1712 (2007) (査読有)
- ⑰ Hashimoto T, Kihara M, Ishida J, Imai N, Yoshida S, Toya Y, Fukamizu A, Kitamura H, and Umemura S. Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1267-1672 (2006) (査読有)
- ⑱ Hashimoto T, Kihara M, Sato K, Matsushita K, Tanimoto K, Toya Y, Fukamizu A, and Umemura S. Expression of cyclooxygenase-2 in the juxtaglomerular apparatus of angiotensinogen gene-knockout mice. *Nephron Physiol.* 102, 1-8 (2006) (査読有)
- ⑲ Kato H, Ishida J, Imagawa S, Saito T, Suzuki N, Matsuoka T, Sugaya T, Tanimoto K, Yokoo T, Ohneda O, Sugiyama F, Yagami K, Fujita T, Yamamoto M, Nangaku M, and Fukamizu A. Enhanced erythropoiesis mediated by activation of the renin-angiotensin system via angiotensin II type 1a receptor. *FASEB J.* 19, 2023-2025 (2005) (査読有)
- ⑳ Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, Crackower MA, Fukamizu A, Hui CC, Hein L, Uhlir S, Slutsky AS, Jiang C, and Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436, 112-116 (2005) (査読有)
- ㉑ Hashimoto Y, Ishida J, Yamamoto R, Fujiwara K, Asada S, Kasuya Y, Mochizuki N, and Fukamizu A. G protein-coupled APJ receptor signaling induces focal adhesion

formation and cell motility. *Int. J. Mol. Med.* 16, 787-792 (2005) (査読有)

- ② Shimizu T, Oishi T, Omori A, Sugiura A, Hirota K, Aoyama H, Saito T, Sugaya T, Kon Y, Engel JD, Fukamizu A, and Tanimoto K. Identification of cis-regulatory sequences in the human angiotensinogen gene by transgene coplacement and site-specific recombination. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2938-2945 (2005) (査読有)
- ③ Kouyama R, Suganami T, Nishida J, Tanaka M, Toyoda T, Kiso M, Chiwata T, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Fukamizu A, Horiuchi M, Hirata Y, and Ogawa Y. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology* 146, 3481-3489 (2005) (査読有)
- ④ Takimoto-Ohnishi E, Saito T, Ishida J, Ohnishi J, Sugiyama F, Yagami K, and Fukamizu A. Differential roles of renin and angiotensinogen in the feto-maternal interface in the development of complications of pregnancy. *Mol. Endocrinol.* 19, 1361-1372 (2005) (査読有)

[学会発表] (計 35 件)

- ①「妊娠高血圧症候群における血管新生の病態解析」古屋充子、石田純治、武内利直、碓井宏和、中谷行雄、深水昭吉 (第 97 回 日本病理学会、平成 20 年 5 月 15 日、石川)
- ②「妊娠高血圧症モデルマウスにおける胎盤の血管構造変化に関する研究」石田純治、古屋充子、稲葉早希、粕谷善俊、木村定雄、根守良一、深水昭吉 (第 30 回 日本妊娠高血圧学会、平成 21 年 8 月 29 日、岡山)
- ③「妊娠高血圧マウスの心臓リモデリングに対する AT1 シグナル阻害の改善効果」中村匠子、石田純治、坂入旭、本城花織、稲葉早希、杉山文博、八神健一、深水昭吉 (第 30 回 日本妊娠高血圧学会、平成 21 年 8 月 29 日、岡山)

[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

深水 昭吉 (FUKAMIZU AKIYOSHI)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：60199172

(2) 研究分担者

谷本 啓司 (TANIMOTO KEIJI)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：90261776
(H17→H18)

加香 孝一郎 (KAKOU KOUICHIROU)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師
研究者番号：60311594

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
(H17→H19)

大徳 浩照 (DAITOKU HIROAKI)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師
研究者番号：30361314