

令和 3 年 8 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02943

研究課題名(和文)胎盤内酸化ストレス調整機構を標的とした妊娠高血圧症候へのナノ医薬治療導入

研究課題名(英文) Application of nanomedicine therapy for hypertensive disorders of pregnancy focusing on the molecular mechanisms related to oxidative stress regulation the placenta

研究代表者

藤井 知行 (Fujii, Tomoyuki)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：40209010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：リゾフォスファチジン酸(LPA)シグナル経路に着目して妊娠高血圧症候群(HDP)病理機序の解明を進めた。LPA産生酵素であるオートタキシン(ATX)の産生量の変化を介して、LPAシグナルが胎盤内の酸化ストレスの制御に関与し、そのシグナルの異常がHDPの発症の背景機序となることが示唆された。続いて、ナノ医薬によるHDP治療法を探索した。胎盤通過性のない、ナノミセルキャリアの条件設定を行った。抗酸化作用を有するスタチン系薬剤をキャリアに封入してHDPマウスモデルへの投与を行い、高血圧および胎児発育の改善を認めた。スタチン内包ミセルキャリアは胎児毒性のないHDPの新規治療戦略となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧症候群(HDP)は胎盤の機能破綻に伴って生じ、胎盤内の酸化ストレスの集積が機能破綻に関与する因子として指摘されてきた。本研究は、LPAシグナル経路と胎盤の酸化ストレスの関係を解明し、脂質メデイエーターによる酸化ストレス制御というHDPの病態理解に新たな視点を与えた。さらに、本研究は胎児毒性の危険性がある薬剤について胎盤通過性の問題についてナノ医薬技術を用いて克服することで、母体への抗酸化ストレス作用を有するスタチンをHDPの治療に導入するための新規アプローチを提示することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the pathoetiology of hypertensive disorders of pregnancy (HDP) focusing on the relevance of lysophosphatidic acid (LPA) signaling pathway to placental oxidative stress. We revealed that LPA signaling is involved in the regulation of placental oxidative stress with alteration in the production of autotaxin (ATX), an LPA-producing enzyme, and that dysregulation in this signaling is a hidden mechanism for the development of HDP. We explored the therapeutic potential of nanomedicine for HDP focusing on oxidative stress. The optimal conditions of nano-micelle carrier which can avoid placental transfer were determined. Expecting anti-oxidative stress efficacy, statins encapsulated in the carrier were administered to HDP mouse models. Consequently, hypertension and fetal growth were improved. Statin-micelle carrier can be a novel therapeutic approach for HDP without fetal toxicity.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠 妊娠高血圧症候群 マウスモデル 絨毛細胞 胎盤 リゾフォスファチジン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎児の成長を支える胎盤では酸素の需要、供給バランスが妊娠時期により大きく変化し、そこに生じる酸化ストレス (oxidative stress: OS) の調整機構は胎盤機能維持に重要となる。胎盤内では発生した活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の負荷に対して抗酸化経路の活性化が生じることでバランスが調整されていると推測される。こうした OS バランスの制御機構の破綻は妊娠異常の発生に関わっている。

妊娠高血圧症候群 (hypertensive disorder of pregnancy: HDP) は母児の健康を脅かす重大な周産期疾患である。HDP 妊婦の胎盤局所および全身的に OS 増加が生じているとされ、それが HDP の病態形成に深く関与すると考えられてきた。しかし HDP 胎盤の機能障害と OS 制御機構との相互的關係、そこに介在する分子機構は未解明である。本研究では、胎盤内の OS 制御に対するリゾフォスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) シグナル経路に焦点を置いて、胎盤内の OS 制御について新たな知見を探求した。そして、そこで得られた知見をもとに胎盤通過性のないミセルキャリアを用いたナノ医薬技術を応用し、抗酸化作用薬剤を用いた新たな HDP の治療戦略を構築することを目指すこととした。

2. 研究の目的

胎盤内の酸化ストレスの集積は、妊娠高血圧症候群 (HDP) における病態機序の中心的要因とされている。本研究では特に脂質メディエーターであるリゾフォスファチジン酸 (LPA) と酸化ストレス制御の關係に着目して HDP の病理機序の解明を進める。そして、ナノ医薬技術を応用して胎盤通過性のない薬剤キャリアを用いて胎盤内酸化ストレスの抑制による新たな HDP の治療戦略の構築することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

課題 1 : LPA シグナル経路による胎盤内酸化ストレスの抑制と HDP 発症の關係

1) 臨床検体を用いた解析

臨床検体として、正常妊娠および HDP 妊娠のそれぞれで、異なる妊娠時期の妊婦血清と分娩時の胎盤を収集した。リゾフォスファチジン酸 (LPA) の主要な産生酵素であるオートタキシン (ATX) の血清中濃度と胎盤重量および児発育の關係を検討した。また、血清中の酸化ストレス物質と抗酸化力の比により求められる oxidative stress index (OSI) を測定して ATX との相関を調べた。胎盤における ATX-LPA シグナル関連分子の発現について HDP 胎盤と正常胎盤の間での比較を行った。

2) In-vitro での検討

絨毛細胞株および初代絨毛細胞のそれぞれを用いて、ATX-LPA システムと酸化ストレス関連因子の關係を検討した。低酸素飢餓ストレス環境下で酸化ストレスを絨毛細胞株に与える in-vitro のモデル (OGD-R モデル) における ATX の発現と抗酸化ストレス遺伝子群を誘導する転写因子である Nrf2 の相互的關係を調べた。酸化ストレスに伴う ATX-LPA シグナル経路の変化が胎毛細胞機能に与える影響として細胞遊走能に着目して検討した。

課題2：酸化ストレス制御による HDP 治療法の開拓

胎盤通過性を制御できる PEG 化ミセルキャリアの開発を進めた。サイズ、PEG 化状態の異なる複数のポリマーミセルキャリア候補ライブラリーのなかから、胎盤通過性のない至適条件を探索した。また、酸化ストレス作用の薬剤作用が知られているスタチン系薬剤（シンバスタチン）をミセルキャリアに搭載して、アンギオテンシン 2 の持続注入による HDP モデルマウスに対してこのスタチンミセル（M-sim）を投与して HDP の症状の変化を確認した。

4．研究成果

課題1：LPA シグナル経路による胎盤内酸化ストレスの抑制と HDP 発症の関係

妊婦末梢血中に検出される ATX は非妊娠時と比較して高値を示し妊娠進行に伴い濃度が上昇し、産褥では速やかに非妊娠時のレベルとなり、主に胎盤での産生に由来していることが確認された。正常妊娠では出生体重/胎盤重量比と妊娠中期の血清オートタキシン濃度の間には負の相関を認めたことから、ATX の胎盤産生は胎児発育調整に関わることが示唆された。HDP との関連では、後期発症の妊娠高血圧症候群では妊娠後期に ATX 濃度が高値となることが確認された。病型の中で慢性高血圧(CH)、加重型妊娠高血圧腎症(SPE)の症例では正常例より血清 ATX 濃度が 2-3 倍の高い値を示していた。それらの症例の妊娠に伴う ATX 濃度の上昇は、正常妊娠との顕著な違いはなかったことから、高血圧を合併する母体では胎盤以外の臓器において ATX が慢性的に高い状態にありそれが病態形成に関与していると考えられた。血清中の酸化ストレスマーカーとの関係では ATX 濃度は OSI が正の相関を示しており、胎盤における酸化ストレスに反応して ATX-LPA シグナル経路が活性化していることが推定された。HDP 胎盤では、重度の胎盤機能障害が生じている early-onset type の HDP では ATX の発現低下が認められた一方で LPA 受容体の発現は顕著に上昇しており、ATX-LPA シグナル経路の破綻が early-onset HDP の背景機序に関与していると推測された。

In-vitro での検討として、OGD-R モデルにより酸化ストレス付加にする絨毛細胞の反応を見た。ATX の発現上昇が認められた。酸化ストレス負荷は、酸化ストレス遺伝子群を誘導する転写因子である Nrf2 の核内移行を促進することが従来知られている。ATX は酸化ストレスに対して発現が上昇しており、この反応は Nrf2 活性化を介していることを確認した。さらに、絨毛細胞は Nrf2 刺激剤により遊走能が更新し、この現象は LPA シグナル阻害により阻止されたことから、Nrf2 活性化に引き続いて生じる LPA シグナルは絨毛細胞の機能的変化を誘導していることが示唆された。

課題2：酸化ストレス制御による HDP 治療法の開拓

胎盤通過性を制御できる PEG 化ミセルキャリアの開発を進めた。サイズ、PEG 化状態の異なる複数のポリマーミセルキャリア候補を妊娠マウスに投与して母体、胎仔の薬剤分布を確認した。20nm サイズのキャリアでは胎盤集積性が増加する一方で胎仔への薬剤移行が生じないことが分かった。

次に、シンバスタチンをアンギオテンシン 2 の持続注入による HDP モデルマウスに投

与して、胎盤内の酸化ストレスの改善と共に母獣の高血圧・尿蛋白の抑制、胎盤障害および胎仔の発育障害の改善が得られることを確認した。しかし、シンバスタチンは胎児への薬剤移行が生じておりヒト妊娠への応用において胎児毒性の発生が懸念された。前期の胎盤通過性のないミセルキャリア条件に合致させて、シンバスタチン (Sim) を内包したミセルキャリア (M-Sim) 作成して、妊娠マウスに投与してマウス内の各臓器の分布を確認した。肝臓、腎臓および胎盤に集積を認める一方で、胎児への移行は認めなかった。そこで、M-Sim を HDP モデルマウスに投与して、疾患の病態の変化を観察した。M-sim の投与により、母獣の高血圧および尿蛋白が軽減し、同時に胎児発育に改善を認めた。

成果のまとめ

妊娠高血圧症候群(HDP)は胎盤の機能破綻に伴って生じ、胎盤内の酸化ストレスの集積が機能破綻に関与する因子として指摘されてきた。本研究は、中心的脂質メディエーターである ATX-LPA シグナル経路が胎盤の酸化ストレスの制御と密接な関係関係を持つことを示し、HDP の病態理解に新たな視点を与えた。さらに、本研究では胎児毒性の危険性がある薬剤について胎盤通過性の問題についてナノ医薬技術を用いて克服することを目指した。Strong statin に分類されるシンバスタチンにより母体の酸化ストレスの軽減を介した HDP の改善をマウスモデルにおいて確認した。そして、胎盤通過性のないドラッグデリバリーシステムとして、シンバスタチンのミセル内包型薬剤として投与するという HDP 治療のための新規アプローチを提示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iriyama Takayuki, Wang Guan, Yoshikawa Midori, Mimura Nobuko, Matsui Haruka, Sayama Seisuke, Kumasawa Keiichi, Nagamatsu Takeshi, Koga Kaori, Kotani Tomomi, Niimi Kaoru, Yamamoto Eiko, Kellems Rodney E., Xia Yang, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased LIGHT leading to sFlt-1 elevation underlies the pathogenic link between hydatidiform mole and preeclampsia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46660-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Nobutaka, Hatano Masaru, Nagamatsu Takeshi, Nakamura Masato	4. 巻 3
2. 論文標題 Successful right heart remodelling and subsequent pregnancy in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension undergoing balloon pulmonary angioplasty: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Heart Journal - Case Reports	6. 最初と最後の頁 ytz063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ehjcr/ytz063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Tatsuya, Nagamatsu Takeshi, Schust Danny J., Ichikawa Mayuko, Kumasawa Keiichi, Yabe Shinichiro, Iriyama Takayuki, Hirota Yasushi, Osuga Yutaka, Aoki Junken, Yatomi Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 82
2. 論文標題 Placental expression of lysophosphatidic acid receptors in normal pregnancy and preeclampsia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kumasawa Keiichi, Nakayama Toshio, Hashimoto Ayako, Kubota Kaori, Takahashi Yuko, Furuya Hitomi, Shitara Rieko, Seyama Takahiro, Tsuruga Tetsushi, Iriyama Takayuki, Nagamatsu Takeshi, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 2019
2. 論文標題 Management of a pregnant woman with hypouricemia: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oxford Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 omz035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/omcr/omz035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 永松 健	4. 巻 49
2. 論文標題 【妊娠高血圧症候群update】病態 胎盤sflt-1の発現.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 1352-1353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 永松 健	4. 巻 48
2. 論文標題 疾患と検査値の推移 妊娠高血圧症候群.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 検査と技術	6. 最初と最後の頁 148-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasagawa Tadashi, Nagamatsu Takeshi, Morita Kazuki, Mimura Nobuko, Iriyama Takayuki, Fujii Tomoyuki, Shibuya Masabumi	4. 巻 8
2. 論文標題 HIF-2 , but not HIF-1 , mediates hypoxia-induced up-regulation of Flt-1 gene expression in placental trophoblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35745-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katoh Yoshihisa, Seyama Takahiro, Mimura Nobuko, Furuya Hitomi, Nakayama Toshio, Iriyama Takayuki, Nagamatsu Takeshi, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 2018
2. 論文標題 Elevation of maternal serum sFlt-1 in pregnancy with mirror syndrome caused by fetal cardiac failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oxford Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 omx112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/omcr/omx112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagamatsu Takeshi, Fujii Tatsuya, Schust Danny J., Tsuchiya Naoko, Tokita Yohei, Hoya Mari, Akiba Naoya, Iriyama Takayuki, Kawana Kei, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki	4. 巻 80
2. 論文標題 Tokishakuyakusan, a traditional Japanese medicine (Kampo) mitigates iNKT cell-mediated pregnancy loss in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13021 ~ e13021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 永松 健	4. 巻 70
2. 論文標題 Molecular Mechanisms to Regulate Trophoblast Cell Functions and Cervical	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本産科婦人科学会雑誌ACTA OBST GYNAEC JPN	6. 最初と最後の頁 2604 2614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 柳澤 愛実, 永松 健, 西森 裕美子, 三角 史, 三村 暢子, 秋葉 直也, 入山 高行, 熊澤 恵一, 大須賀 穰, 藤井 知行
2. 発表標題 Atx-Ipaシステムの胎盤内酸化ストレス調節への寄与に関する検討.
3. 学会等名 第40回日本妊娠高血圧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oda H, Nagamatsu T, Kumasawa K, Iriyama T, Osuga Y, Fujii T.
2. 発表標題 The development of placenta targeting simvastatin nano-micelle treatment in the mouse model of preeclampsia: Challenge for clinical application of drug delivery system to avoid the adverse effect on fetus during pregnancy.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui H, Iriyama T, Yoshikawa M, Niimi K, Yamamoto E, Kotani T, Nagamatsu T, Koga K, Osuga Y, Fujii T.
2. 発表標題 Light elevation underlies sflt-1 overproduction in hydatidiform mole: An implication for the pathogenic link between molar pregnancy and preeclampsia.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujii T, Nagamatsu T, Morita K, Iriyama T, Osuga Y, Fujii T.
2. 発表標題 Shifting of hif subtypes expression during syncytialization is associated with the regulation of vegf family molecules in human trophoblast cells.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永松 健
2. 発表標題 学術奨励賞受賞講演 絨毛細胞機能および子宮頸管熟化を制御する分子システムと妊娠維持機構
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Nishimori, Takeshi Nagamatsu, Tatsuya Fujii, Nobuko Mimura, Takayuki Iriyama, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii
2. 発表標題 Serum autotaxin level as a biomarker to reflect placental function
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Nagamatsu
2. 発表標題 Placental autotaxin as a regulatory factor of placental function and fetal growth
3. 学会等名 The 20th Congress of Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies (FAOPS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Nagamatsu
2. 発表標題 Drug delivery system to regulate placental transfer using nano-micelle technology to avoid harmful effect on the fetus
3. 学会等名 Congress of International Federation of Placental Association 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Oda, Takeshi Nagamatsu, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii
2. 発表標題 Attenuation of Angiotensin II-Induced Preeclamptic Symptoms by Recombinant Thrombomodulin in Mice - a novel therapeutic approach for preeclampsia
3. 学会等名 Congress of the International Society of Hypertension in Pregnancy (ISSHP) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	廣田 泰 (Hirota Yasushi) (40598653)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究 分担者	永松 健 (Nagamatsu Takeshi) (60463858)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------