

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591889

研究課題名（和文）

妊娠母体血管の内皮機能と弾性変化からみる子宮内環境悪化とその修復の可能性

研究課題名（英文） The analysis of maternal endothelial function in the deteriorated intrauterine condition and the possibility of repairing the fetal status

研究代表者

千坂 泰（CHISAKA HIROSHI）

東北大学・病院・講師

研究者番号：40323026

研究成果の概要：卵巣ホルモンの調節によりヒト血管内皮前駆細胞（EPC）数は妊娠週数と共に上昇し、胎盤形成や血管新生に関与することが示唆された。また、子宮内環境の悪化モデルとして、母体低栄養（低蛋白、葉酸欠乏）の解析により、低栄養が胎児発育不全や胎児組織にエピジェネティックな遺伝子発現を起こす事、低栄養に子宮内炎症が加わると新生児脳障害を起こす可能性があることが分かった。以上より母体栄養摂取が胎児発育において重要であることが直接的に示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：胎児プログラミング、低蛋白食、葉酸欠乏食、エピジェネティック、ヒストン修飾、ビタミン補充、胎児発育不全、Igf axis

1. 研究開始当初の背景

第二次世界大戦中ナチスドイツ占領下のオランダにおいて、極端な食糧不足が起こったいわゆる Dutch Famine の時代に胎児期を過ごした世代を追跡調査した結果、その人々において耐糖障害、高血圧、統合失調症などの発症頻度が少々していることが明らかにな

った。その後の疫学的・生物学的研究により妊娠中の母体の低栄養が胎児の栄養障害や低出生体重の原因となりまた胎児プログラミングが起きることで、成人後に肥満、糖尿病、高血圧、冠動脈疾患などの成人病の発症に関連があるという、成人病胎児期発症説が提唱され子宮内環境に関する研究が盛んで

ある。胎児プログラミングについての詳細なメカニズムはいまだに不明であるが、多くは胎盤を介する胎児栄養障害に起因すると考えられているが、その中で母体栄養障害（妊娠中の母体低栄養）がどのように母体の全身器官特に子宮内で組織の血管構築や血管機能維持機構にどのような障害をあたえ、子宮内環境の悪化、胎児発育への影響をもたらしているかは不明である。この病態を理解し、子宮内環境の改善を目指すことはプログラミングをあらかじめ予防することにもつながる大変重要な問題である。また、周産期医療・新生児医療の進歩に伴い、低、超低出生体重児や早産児における生命予後は飛躍的に改善している一方で、その5~15%で脳性麻痺、25~50%で認識・行動障害も含めた発達障害が認められる。胎児期における脳白質障害は脳性麻痺の責任病変としてよく知られているが、主に運動神経が傷害される脳性麻痺のみならず、認識障害、行動障害、統合失調症をはじめとする精神疾患の責任病変としても注目されている。胎児期の胎児脳白質障害の本態は稀突起膠細胞の障害であるとの報告があり、また白質障害の外因性因子として、低酸素虚血や炎症であると考えられている。これらの知見より母体・子宮内環境・胎児発育を様々な角度から研究していくことは大変重要であり本研究を進めることとなった。

2. 研究の目的

妊娠中、子宮、胎盤の血管系の新生と機能維持に血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell: EPC) が重要な役割を担う可能性が考えられているため、本研究ではまず妊娠中のヒトの末梢血中単核球の培養を行い、妊娠中のEPC動態の解析することを目的とした。次に母体低栄養が子宮、胎盤の血管系にどのような影響を与えているか、また、胎児発育や遺伝子発現がどのように変化するのかにつき母体低蛋白負荷や早産の原因として重要視されている子宮内炎症による胎児への影響について解析することを目的とした。また、栄養素の中で特に葉酸は胎児にとって必要不可欠なビタミンであり、妊娠中の葉酸摂取は児の出生後の生活習慣病罹

患予防に効果があるとされる。葉酸はメチオニン代謝サイクルのなかでメチル基のドナーとして働き、胎児発育においてもエピジェネティックな役割を果たすであろうと予測されるがその詳細は未だ不明であるため葉酸によるエピジェネティック制御機構も含めて解析することとした。

3. 研究の方法

倫理委員会の承認を得た後、

(1) 母体血管内皮新生と維持に関わる血管内皮前駆細胞 (EPC) の妊娠週数による変化とその制御機構をヒトおよびマウス末梢血液を用いて解析した。また、EPCを動員すると考えられている血中エストロジオール、SDF-1 (Stromal cell derived factor-1/CXCL12)、G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor; 顆粒球コロニー刺激因子) の濃度を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法で測定した。血液 20 ml を同量の PBS で希釈し、ゆっくりと Ficol1 上に重層し、400 G で 30 分遠心分離する。単核球層を回収し PBS で洗浄遠心後、ペレットに RBC Lysis Buffer (eBioscience) を加え赤血球を溶血させる。PBS で 2 回洗浄後、 8×10^6 cells/ml の細胞をフィブロネクチンコートしたスライドグラスで培養する。培地は EGM-2 MV Bullet kit (TAKARA BIO) を使い、内容は Medium (EBM-2) に VEGF、hFGF-B、R3-IGF-1、hydrocortisone、ascorbic acid、GA1000、gentamycin/streptomycin、5%FBS を添加したものである。4 日後に培地交換し、7 日後に倒立顕微鏡で視野中のクラスター数を測定し、3 視野の平均クラスター (Colony-forming unit) 数を EPC 数として評価する。

マウス

血液 0.7 ml を 2 ml の PBS で希釈し、ゆっくりとリンホセパール II 上に重層し、400 G で 30 分間遠心分離する。単核球層を回収し PBS で洗浄遠心後、ペレットに RBC Lysis Buffer (eBioscience) を加え赤血球を溶血させる。PBS で 2 回洗浄後、 1×10^6 cells/cm² の細胞をフィブロネクチンコートしたスライドグラスで培養する。培地は EGM-2 MV Bullet kit

(TAKARA BIO INC、Ohtsu、Japan)を用いる。培地は3日後に交換し、5日目に10・g/ml Ac-Dil-LDL (Biomedical technologies)を取り込ませる。取り込んだ細胞の蛍光像を蛍光顕微鏡のカメラ (Leica) で撮影し、一視野 (1.5mm²) 中のAc-Dil-LDL陽性細胞数を測定する。3視野の平均を算出し、EPC数として評価する。

(2) マウス母獣の低栄養モデルとして低蛋白モデルとしてカゼインを通常餌の半量にした群、また葉酸欠乏モデルとして葉酸欠乏餌を与えた群として通常餌の群 (コントロール群)と比較検討した。Dutch famineの疫学的検討では妊娠数数により、低栄養にさらされた妊娠週により、児の発現型が変化していた。したがって、IUGRになるにはどの時期に母獣への低タンパクをおこすのが適切な時期か、すなわち妊娠週数にwindowがあるのかを検討するため妊娠期間全期間を通じて低栄養にした群と妊娠前後半に分けて栄養を変化させた群とで比較検討した。さらには、ビタミン、特に葉酸、ビタミンB6、12等を飼料に添加する事により、このIUGRが改善するか、またこのメカニズムとしてepigeneticが関与するかを検討した。さらに胎児発育への影響として低栄養と共に、母獣の子宮にLPS、GCSF等を投与して、炎症を起こした場合に胎児の脳にどのような変化が生じるのかを、稀突起膠細胞を中心に観察した。また、葉酸欠乏モデルの解析として、コントロール群(C)、妊娠後期に葉酸欠乏餌を与えた群(FD(8-17))、妊娠全期間葉酸欠乏餌を与えた群(FD(0-17))につき、妊娠17日目に胎児肝臓、脳および胎盤を採取し定量RT-PCR解析を行い、様々な遺伝子発現変化を検討するとともに、変化のあった遺伝子においてクロマチン免疫沈降法(ChIP)によるヒストン修飾解析と、Bisulfite DNA Sequencing法によるDNAメチル化解析によりエピジェネティック変化についても解析した。

4. 研究成果

(1) 妊娠中のヒトの末梢血中単核球の培養を行い、妊娠中のEPC動態の解析を行った。

ヒトにおいて末梢血中のEPC数は妊娠週数の進行とともに上昇した。血中エストラジオール濃度も妊娠週数の進行につれ上昇を示し、EPC数と妊娠週数、EPC数と血中エストラジオール濃度には正の相関があることが明らかになった。今回の研究により、妊娠においてエストラジオールがダイナミックに末梢血中EPC数を調節し、胎盤形成や血管新生、血管内皮細胞活性などに関与する可能性が示唆された。EPCは妊娠週数と共に増加しエストラジオールにより制御されている可能性が明らかになった。

(2) マウス母獣低栄養モデルにおいて、妊娠全期間を通して蛋白摂取量を制限した群ではコントロール群に比べ胎仔体重には有意な変化が見られなかったが、妊娠後半期に制限した群では有意な減少を認め、特に妊娠後半の母体低栄養が胎児発育不全に関与することが明らかとなった。また、この制御機構には胎仔肝臓Igf2遺伝子のヒストン修飾が関与していることを見出した。さらに興味深いデータとしてこの妊娠後半蛋白制限マウスに葉酸、ビタミンB6、12を補充すると胎仔体重がコントロール群と同じレベルに回復することが分かり、妊娠中のビタミン摂取の重要性が示された。さらに、早産児脳障害機構の解析として母体低蛋白とLPS投与による子宮内炎症負荷についての検討では、母体低蛋白負荷に子宮内炎症が加わると、胎仔脳の未熟な稀突起膠細胞は変化しないが新生仔脳の稀突起膠細胞の減少が認められた。このことより母体低蛋白負荷により稀突起膠細胞の分化成熟が傷害され、その脆弱性に子宮内炎症が加わることにより新生仔における稀突起膠細胞が減少していることが示唆された。また、妊娠後半葉酸欠乏食による胎仔への影響の解析においては、胎仔体重、胎盤重量ともにコントロール群に比べ有意に減少しておりこの傾向は特にメスで顕著であった。この胎仔脳の解析により、Hdac7aというヒストン修飾に関わる遺伝子発現がメスにおいて有意に減少していることも分かった。葉酸欠乏によって

子宮内胎児発育不全が誘発される可能性、また胎盤発育における葉酸必要量には性差がある可能性が示唆された。また **Hdac7a** の変化は **FD** 群においてヒストンアセチル化が促進していることを示し、葉酸欠乏下ではエピジェネティック変化がおこっていることを示唆している。また、葉酸欠乏によるメス胎仔への影響は成人病胎児期発症説を裏付けるべく、生活習慣病を誘発する遺伝子に発現変化をおこしている可能性が推察された。

これらの結果により、母獣の栄養摂取が胎仔のエピジェネティックな遺伝子発現に関与し胎児プログラミングに影響を及ぼすことが示された。今後の妊娠管理において母体の栄養状態を十分に考慮することが重要であることが明らかとなった。

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 Okamura K. Serum levels of SDF-1 throughout normal pregnancy and patients with preeclampsia. *Journal of Society for Gynecologic Investigation*. 2007, 13:228A 査読有

[学会発表] (計3件)

① 千坂 泰

母体葉酸欠乏が及ぼす胎盤発育および Igf-axis の発現制御のエピジェネティック基盤解析
第16回日本胎盤学会学術集会
平成20年11月14日
静岡県浜松市

② Chisaka Hiroshi

Transcriptional suppression of *IGF* mediated by altered histone modifications in a maternal protein restricted IUGR mouse model.
34th Fetal and Neonatal Physiological Society meeting
2007.8.28 Sendai, Japan

③ Chisaka Hiroshi

Epigenetic stability and developmental plasticity in cloned placentae during somatic cell nuclear transfer.
34th Fetal and Neonatal Physiological Society meeting
2007.8.27 Sendai, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千坂 泰 (CHISAKA HIROSHI)
東北大学・病院・講師
研究者番号：40323026

(2) 研究分担者

岡村 州博 (OKAMURA KUNIHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90124560

岡本 聡 (OKAMOTO SATOSHI)

東北大学・病院・臨床検査技師
研究者番号：40420020

(3) 連携研究者

なし