

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18638

研究課題名（和文）胎児発育不全の改善に果たすタダラフィルの作用機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of tadalafil for fetal growth restriction

研究代表者

田中 博明（Tanaka, Hiroaki）

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30727996

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,400,000円

研究成果の概要（和文）：mTORシグナルに着目し、ヒト胎盤におけるmTORシグナルの下流で働くps6とeIF-4の活性が、FGRに対してタダラフィルを投与した後にどのように変化するかを調べ、その作用メカニズムの解明を目指した。ps6およびeIF-4の発現は、それぞれウェスタンブロッティングおよび酵素結合免疫吸着法により調べた。ps6とeIF-4のレベルは、FGR胎盤で対照胎盤よりも有意に高かったが、タダラフィル投与後は対照レベルまで減少した。タダラフィルは、FGR胎盤のps6、eIF-4Eのレベルをコントロール胎盤で観察されるレベルまで回復させ、FGRの治療戦略として有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児発育不全（FGR）は、胎児発育が抑制され低体重で出生するため、新生児死亡率、脳性麻痺の発症率は増加する。更に、将来的な広汎性発達障害、生活習慣病のハイリスク群となることが判明しているが、胎児発育を促進させるための治療法がないのが現状である。これまでに、タダラフィルはFGRに対する胎内治療薬として有効である可能性を基礎研究、臨床試験によって示してきた。FGRに対する胎内治療の実現は、FGRで出生した新生児の様々な合併症を減らし、少子化により減少する出生児への質の高い安全を提供する社会的意義がある。本研究は、FGRに対するタダラフィルの作用機序の1つを解明したことに学術的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Focusing on mTOR signaling, we investigated how the activities of ps6 and eIF-4, which act downstream of mTOR signaling in human placenta, are altered after tadalafil administration to FGR to elucidate their mechanisms of action. The levels of ps6 and eIF-4 were significantly higher in FGR placentas than in control placentas, but decreased to control levels after tadalafil administration. Tadalafil restored the levels of ps6 and eIF-4E in FGR placentas to the levels observed in control placentas, suggesting that it is a promising therapeutic strategy for FGR.

研究分野：周産期

キーワード：胎児発育不全

1. 研究開始当初の背景

胎児発育不全 (FGR ; fetal growth restriction) は、胎児発育が抑制され低体重で出生するため、新生児死亡率は上昇し、脳性麻痺の発症率も増加する。更に、慢性的な低酸素・低栄養に暴露されることによって、将来的な自閉症・学習障害などの広汎性発達障害、高血圧・2型糖尿病などの生活習慣病のハイリスク群となることが判明している。一方で、胎児発育を促進させるための治療法がないのが現状であり、発育が抑制された胎児の状態を嚴重に観察しながら、胎児の状態が極めて悪化した時点で分娩させるしか方法がなく、多くの FGR 児が早産かつ低体重での出生を余儀なくされる。原発性肺高血圧症を有する妊婦からは、母体が低酸素であるため、胎児の発育が抑制され、小さい児が出生する。しかし、原発性肺高血圧の治療薬であるホスホジエステラーゼ 5 (PDE5) 阻害薬が投与されている妊婦からは、正常体重の胎児が出生することが観察された。この知見から、胎盤形成不全による低酸素のため、胎児の発育が抑制される FGR に対しても効果がある可能性を見出した。

これまでに、FGR に対するタダラフィル投与の有効性と安全性を検証するため、基礎研究と臨床試験を実施した。基礎的研究では、NO 合成阻害薬である L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester) を母獣に投与することによって FGR モデルマウスを作成し、タダラフィルを投与することで、胎仔体重の増加の改善が観察され、胎盤における母体血管洞の拡張が観察された。また、ヒトに対する臨床試験 (第 Ⅰ 相・第 Ⅱ 相試験) を実施し、タダラフィルの母体・胎児に対する安全性と、有意な胎児発育の改善が観察された。

本研究は、次の段階として、タダラフィルの作用機序の解明を目的として、FGR に対するタダラフィルの分子機構を得るための基礎研究を実施する。

2. 研究の目的

胎児発育には、酸素や栄養など様々な調節因子が関わっている。その調節因子の 1 つとして、ラパマイシン (mTOR) シグナリングが報告されている。mTOR シグナリングのメカニズムのターゲットは、セリン/スレオニンキナーゼである。mTOR シグナリングは、ホルモン、成長因子、栄養素、エネルギー、ストレス信号に応答して、細胞の代謝、成長、生存の中心的な調節因子として機能する。したがって、mTOR は胎児の臓器の成長に重要であり、mTOR が機能しない場合は、不育症として流産となる。

本研究では、mTOR シグナリングに着目し、FGR に対してタダラフィルを投与した場合、ヒト胎盤における mTOR シグナリングの下流である phospho-rps6 と phospho-eIF-4E がどのように変化するか検討し、FGR に対するタダラフィルの作用機序の解明を目指す。

3 . 研究の方法

採取した胎盤を分割し、-80 で凍結保存するか、固定した。胎盤は 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (PBS) (pH 7.4) 中の 4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク、日本) で固定し、包埋した上で胎盤切片を作製した。胎盤切片を、抗低酸素誘導因子 (HIF) -2 抗体とともに、室温で一晩インキュベートした。その後、切片をヤギ抗ウサギ IgG で 2 時間ブロープし、その後ペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼ複合体で 2 時間インキュベートし、Peroxidase Stain DAB Kit で処理して観察した。

凍結保存した胎盤試料を溶解バッファー (50 mM Tris-HCl, 150 mM 塩化ナトリウム [NaCl], 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム [SDS], 1% Nonidet P40, 1% デオキシコール酸ナトリウムおよびプロテアーゼホスファターゼ阻害剤カクテル) 中で均質化して、30 分間氷上に溶解させた。試料を 15,000G、4 で 30 分間遠心分離し、得られた上清を胎盤タンパク質として解析に使用した。10-20% Bis-Tris ゲルで分離した胎盤タンパク質をポリフッ化ビニリデン膜 (ATTO) に転写した。この膜を以下の一次抗体とインキュベートした: ウサギ抗リボソームタンパク質 S6、抗ホスホリボソームタンパク質 S6 (Ser235/236)、マウス抗 α -アクチン。二次抗体として、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識二次抗ウサギ抗体を使用した。胎盤中のリン酸化 eIF-4E 量は、Human Phospho-eIF4E(S209) ELISA kit を用い、測定した。

4 . 研究成果

HIF-2 タンパク質のシグナル強度は、FGR 群でコントロール群に比べ有意に高かった (コントロール 2.3 ± 0.18 , FGR 4.1 ± 0.15 , $p < 0.01$)。一方、FGR + タダラフィル群では、FGR 群と比較して HIF-2 タンパク質の発現が有意に低下し (FGR 4.1 ± 0.15 および FGR + Tadalafil 2.3 ± 0.17 , $p < 0.01$)、FGR 群とコントロール群の間には有意差は認められなかった ($p > 0.99$)。

コントロール群、FGR 群、FGR + タダラフィル群の胎盤試料において、mTOR シグナル伝達への影響を評価した。胎盤の mTOR シグナル活性は、mTORC1 の下流で作用する rpS6 と eIF-4E のタンパク質量の比率を定量することで測定した。3 群間の総 rpS6 タンパク質発現に有意差は認められなかった (コントロール 1.167 ± 0.08772 , FGR 0.9043 ± 0.1084 , FGR + Tadalafil 1.132 ± 0.0789 ; one-way ANOVA $p = 0.1359$; Figure 3B)。一方、リン酸化 rpS6 (Ser235/236) の発現は、FGR 群の胎盤試料がコントロール群の胎盤試料よりも有

意に高かった(コントロール 0.659 ± 0.06485 , FGR 1.32 ± 0.09076 , FGR + Tadalafil 0.890 ± 0.06799 ; one-way ANOVA $p < 0.01$, post-hoc Tukey $p < 0.01$ for control versus FGR, $p = 0.06$ for control versus FGR + Tadalafil, and $p < 0.01$ for FGR versus FGR + Tadalafil).

リン酸化 eIF-4E (Ser209) の発現は、FGR 群の胎盤でコントロール群の胎盤より有意に高く、FGR + タダラフィル群ではコントロール群のレベルまで減少した(コントロール 1.05 ± 0.0645 , FGR 1.63 ± 0.115 , FGR + Tadalafil 1.11 ± 0.114 ; one-way ANOVA $p < 0.01$, post-hoc Tukey $p < 0.01$ for control versus FGR, $p = 0.89$ for control versus FGR + Tadalafil, $p < 0.01$ for FGR vs FGR + Tadalafil).

FGR 胎盤では低酸素マーカーである HIF-2 の発現が増加しており、タダラフィル投与により HIF-2 の発現がコントロール胎盤で観察されるレベルまで減少した。そして、FGR では mTOR の下流で作用する phospho-rps6 と phospho-eIF-4E のタンパク質発現が上昇しており、タダラフィルはこの上昇をコントロール群で観察されるレベルまで改善していることが確認され、FGR によるタダラフィルによる作用機序の 1 つが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tsuchiya Kyoka, Tanaka Kayo, Tanaka Hiroaki, Maki Shintaro, Enomoto Naosuke, Takakura Sho, Nii Masafumi, Toriyabe Kuniaki, Katsuragi Shinji, Ikeda Tomoaki	4. 巻 56
2. 論文標題 Tadalafil Treatment Ameliorates Hypoxia and Alters Placental Expression of Proteins Downstream of mTOR Signaling in Fetal Growth Restriction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 722 ~ 722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicina56120722	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 Tanaka H, Maki S, Magawa S, Nii M, Tanaka K, Ikemura K, Toriyabe K, Ikeda T	4. 巻 55
2. 論文標題 Maternal Blood Concentration of Tadalafil and Uterine Blood Flow in Pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 708 ~ 708
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicina55100708	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------