

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18697

研究課題名（和文）糖代謝異常によって誘導されるPKC 活性化の妊娠高血圧腎症発症と増悪における意義

研究課題名（英文）Protein Kinase C mediated alteration of placental angiogenic and antiangiogenic factors in pregnancy complicated with diabetes mellitus

研究代表者

光井 崇 (Mitsui, Takashi)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：60769008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病モデルマウスの妊娠を成立させ、血圧測定、タンパク尿検査などの妊娠高血圧腎症への進行度をモニタリングし、血管新生因子や抗血管新生因子であるsFlt-1、PlGFについて評価を行った。PKC の活性化状態においても胎盤組織で検討した。さらに、PKC 阻害剤を糖尿病合併妊娠モデルマウスに投与し、その変化を検討した。

実験の結果、糖尿病合併妊娠モデルマウスでは、胎盤におけるPKC の活性化の有意な増加を認め、胎盤および母体血中においてsFlt-1が有意に上昇しており、また、PlGFが有意に低下していた。さらに、PKC 阻害剤を投与することによりこれらの変化を抑制することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧腎症は、糖代謝異常合併妊娠に合併し、発症すると母体、胎児ともに重篤な合併症をもたらす、両者を死に至らす危険な疾患であるが、未だ有効な治療法が開発されていない。しかし、本研究結果から、PKC がその病態の中心的分子であり、その異常活性化が、sFlt-1、PlGFのアンバランスを引き起こし、血管新生及び血管内皮障害を引き起こしている可能性を見出した。また、これらの変化はPKC 特異的阻害剤を使用することにより抑制できた。

従って、本研究では糖代謝異常合併妊娠における妊娠高血圧腎症の発症及び増悪の機序の解明に貢献し、PKC を標的とした治療応用への可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Pregnancies were established in diabetic model mice, and the progression to preeclampsia was monitored using blood pressure measurements and proteinuria tests. The angiogenic and anti-angiogenic factors were evaluated. The activated state of PKC was also examined in placental tissue. Furthermore, we administered a PKC inhibitor to a mouse model of pregnancy with diabetes and examined its changes.

As a result of the experiment, we observed a significant increase in the activation of PKC in the placenta in the diabetic pregnancy model mouse. In the placenta and maternal bloods, sFlt-1 increases, and PlGF decrease. Furthermore, it was possible to suppress these changes by administering a PKC inhibitor.

研究分野：周産期医学

キーワード：糖尿病合併妊娠 妊娠高血圧腎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症は、妊娠 20 週以降、分娩後 12 週までに高血圧がみられ、タンパク尿を伴う。妊娠高血圧腎症は母体側、胎児側ともに重篤な合併症をもたらす、両者を死に至らす危険な疾患である。当病態発症には胎盤における血管の異常増生が要因とされているが、それを誘導する鍵因子を中心とした分子機構については、国内外で多くの研究がなされているにも関わらず十分には明らかにされていない。当問題に直面して申請者は、この分子機構を解く手がかりとなる以下の大きな 2 つの事象に着目した。

糖代謝異常による虚血と血管新生：妊娠中に糖代謝異常が起こると、胎盤では、未成熟な絨毛が増加することで慢性的虚血状態が惹起される。その結果、絨毛内での低酸素状態が持続し、異常な血管新生を伴った胎盤の血管増生につながるものと考えられている。申請者は、これまでの自身の研究から、胎盤での虚血性病変部位で、確かに HIF-1 α (低酸素誘導因子)の産生の増加と血管新生誘導因子 (sFlt-1、PlGF、VEGF) の産生の増加が起こっていることを捉えた。

糖尿病における PKC の重要性：糖尿病などの高血糖状態において、細胞内に取り込まれた多量のグルコースは、リン酸化酵素 protein kinase C (PKC) を強く活性化させる。また、PKC の異常な活性化は糖尿病性網膜症や糖尿病性腎症で誘導される血管異常の発症に関わっており、これらのことから申請者は、妊娠高血圧腎症における胎盤の異常な血管増生にも PKC が重要と考えた。PKC は、10 種類以上の分子種があることから、どの PKC 分子種が発症に重要な因子かを知る必要があり、最近になってようやくそれが PKC β であることを見出すに至った。さらに、PKC β が HIF-1 α 、sFlt-1、PlGF、VEGF の全てをポジティブに同時制御することで低酸素レスポンスと血管新生を相乗的に上昇させる現象を *in vitro* の解析から見出すに至った。

2. 研究の目的

これまでの申請者の研究成果から、糖代謝異常合併妊娠における妊娠高血圧腎症の発症と増悪過程には PKC β を介した虚血低酸素化 (HIF-1 α) とカップルした血管増生の異常 (sFlt-1、PlGF、VEGF) が中心的役割を担っているものと強く推察された。このことから、PKC β 選択的阻害剤の投与により胎盤血管を正常に戻し、妊娠高血圧腎症の発症とその進行を効率よく遮断することが実現するかもしれない。従って、本研究では申請者のこれまでの成果を基盤に、本研究をさらに *in vivo* の解析に発展させ PKC β の病態意義を高めるとともに、PKC β を中心とする病態発症及び増悪の分子メカニズムに迫ることを狙う。

3. 研究の方法

妊娠高血圧腎症発症性糖尿病合併妊娠モデルマウスを用いて PKC β の病態への意義を検討する。

1: PKC β の活性化状態と病態の進行度に正の相関性が認められるかどうか

1. 糖尿病合併妊娠モデルマウス：すでに飼育している 2 種の 2 型糖尿病発症のモデルマウス (KK/TaJcl 雌マウス (軽度の高血糖); KK-Ay/TaJcl 雌マウス (重度の高血糖)) それぞれと正常雄マウス間で妊娠を成立させ解析の対象とする。

2. 病態の評価：妊娠マウスについて、血圧検査、タンパク尿検査を行い、妊娠高血圧腎症への進行度をモニタリングする。同時に、母体胎盤の血管増生について病理解析を行う。この時、胎盤の低酸素化は HIF-1 α の誘導性を指標にウエスタンブロット解析で評価するとともに、血管新生因子群 (sFlt-1、PlGF、VEGF) についても胎盤側は定量的 PCR 法を、血中のものは ELISA 測定を行い評価する。

3. PKC β の評価：PKC β の活性化状態を、胎盤組織について行う。活性化に必須なリン酸化体を認識する抗体を用いて組織染色 (活性化の頻度や分布状態) およびウエスタンブロット解析を行いデータ化する。

2: 市販の PKC β 特異的阻害剤 LY333531 により病態が改善されるかどうか

病態改善の評価：上記の妊娠モデルマウスに PKC β 阻害剤を投与し、病態の状態変化を経時的にモニタリングする。上述の 2 と 3 の評価項目に関して同様にデータを蓄積し改善の度合いをはかるものとする。

4. 研究成果

糖尿病モデルマウス (KK/TaJcl および BKS.Cg-Dock7m+/+Leprdb/J) の妊娠を成立させ、血圧測定、タンパク尿検査などの妊娠高血圧腎症への進行度をモニタリングした。胎盤の低酸素化は HIF-1 α の誘導性を評価し、血管新生因子や抗血管新生因子である sFlt-1、PlGF については、胎盤側は定量的 PCR 法、血中のものは ELISA 測定を行い評価した。PKC β の活性化状態においても胎盤組織について行い、活性化に必須なリン酸化体を認識する抗体を用いて組織染色 (活性化の頻度や分布状態) および ELISA 測定を行いデータ化した。さらに、PKC β 特異的阻害剤を糖尿病合併妊娠モデルマウスに投与し、その変化を検討した。

実験の結果、コントロールマウスと比較し、糖尿病合併妊娠モデルマウスでは、胎盤における PKC β の活性化の有意な増加を認め、胎盤および母体血中において抗血管新生因子である sFlt-1 が有意に上昇しており、また、血管新生因子である PlGF が有意に低下していた。さらに、PKC β

特異的阻害剤を投与することによりこれらの変化を抑制することが可能であった。これらの結果から、糖尿病合併妊娠モデルマウスの胎盤において、[PKC β]-[sFlt-1の上昇およびPIGFの低下血管新生因子と抗血管新生因子の不均衡]-[妊娠高血圧腎症の病態の発症と増悪]をつなぐ分子経路の存在の可能性が示唆され、さらには、糖尿病合併妊娠モデルマウスにPKC β 阻害剤を投与することにより、この経路を遮断することが可能であった。

これらの研究データは第76回日本産科婦人科学会学術講演会のインターナショナルセッション JSOG Congress Award Candidate にて講演発表を行い、JSOG Congress Encouragement Award を受賞した。また、国際学会 FIGO 2023 World Congress で講演発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 光井 崇、三島 桜子、谷 和祐、増山 寿	4. 巻 48
2. 論文標題 糖尿病モデルマウスの胎盤での Protein kinase C を介した抗血管新生因子の産生	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 59-61
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 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Mitsui, Sakurako Mishima, Kazumasa Tani, Hisashi Masuyama
2. 発表標題 Protein Kinase C mediated alteration of placental angiogenic and antiangiogenic factors in pregnant diabetic mice
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 光井 崇、三島桜子、谷 和祐、大羽 輝、三苫智裕、大平安希子、牧 尉太、桐野智江、衛藤英理子、早田 桂、増山 寿
2. 発表標題 糖尿病モデルマウスにおけるProtein kinase Cの活性化を介した血管新生因子及び抗血管新生因子の産生
3. 学会等名 第30回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 光井 崇、三島桜子、谷 和祐、増山 寿
2. 発表標題 糖尿病マウスにおけるProtein kinase Cの活性化を介した血管新生因子及び抗血管新生因子の産生
3. 学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光井 崇、増山 寿
2. 発表標題 糖尿病マウスにおけるProtein kinase Cの活性化を介した血管新生因子及び抗血管新生因子の産生
3. 学会等名 第37回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光井 崇
2. 発表標題 The production of angiogenic and antiangiogenic factors via the activation of protein kinase C in the placenta under high-glucose conditions
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光井 崇
2. 発表標題 Upregulation of HIF-1 alpha and PKC in the placenta of pregnant diabetic mice and an increase in production of sFlt-1 in plasma
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光井 崇
2. 発表標題 高血糖条件下の胎盤におけるProtein kinase Cの活性化を介した血管新生因子及び抗血管新生因子の産生
3. 学会等名 第27回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Mitsui, Sakurako Mishima, Kazumasa Tani, Hikaru Ooba, Tomohiro Mitoma, Akiko Ohira, Chiaki Kashino, Jota Maki, Kotaro Kubo, Satoe Kirino, Eriko Eto, Kei Hayata, Yasuhiko Kamada, Hisashi Masuyama
2. 発表標題 Protein Kinase C mediated alteration of placental angiogenic and antiangiogenic factors in pregnant diabetic mice
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takashi Mitsui, Sakurako Mishima, Kazumasa Tani, Hikaru Ooba, Tomohiro Mitoma, Akiko Ohira, Chiaki Kashino, Jota Maki, Kotaro Kubo, Satoe Kirino, Eriko Eto, Kei Hayata, Yasuhiko Kamada, Hisashi Masuyama
2. 発表標題 Protein Kinase C mediated alteration of placental angiogenic and antiangiogenic factors in pregnant diabetic mice
3. 学会等名 FIGO 2023 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2023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

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