

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09618

研究課題名(和文) 補体活性化の妊娠高血圧症候群の病態への関与 -補体系と血管新生系のクロストーク-

研究課題名(英文) Involvement of complement activation in the pathogenesis of gestational hypertension syndrome -Crosstalk between complement system and angiogenesis-

研究代表者

富松 拓治 (Tomimatsu, Takuji)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授

研究者番号：30346209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、補体異常活性化と妊娠高血圧症候群(Hypertensive disorders of pregnancy 以下HDPと略す)の病態との関連が注目されている。我々は母体の抗血管新生状態が、血管内皮細胞からの補体活性化抑制因子(第二経路の最下流を制御する factor H)の産生を抑制することで、母体の抗血管新生状態が補体異常活性化を通して血管内皮障害に至るメカニズムを明らかにし、その上流を制御する各種の補体活性制御因子が血管新生因子や抗血管因子の影響でさまざまに発現を変化させられることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、HDPの際の母体の抗血管新生状態による補体の異常活性化のプロセスの一部ではあるが明らかになったことにより、近年開発された薬剤による補体抑制治療による、副作用に配慮した疾患特異的な補体抑制治療の実用化への布石となったと考える。

研究成果の概要(英文)：The underlying mechanism of preeclampsia by which an angiogenic imbalance results in systemic vascular endothelial dysfunction remains unclear. Complement activation directly induces endothelial dysfunction and is known to be involved in preeclampsia; nevertheless, the association between complement activation and angiogenic imbalance has not been established. This research aimed to evaluate whether angiogenic imbalance affects the expression and secretion of inhibitory complements in various cell types including endothelial cells.

An angiogenic imbalance, including decreased PlGF and increased sFlt1, suppresses CFH expression and secretion, resulting in complement activation on the surface of endothelial cells and systemic vascular endothelial dysfunction. In addition, these angiogenic imbalances affect the expression of various inhibitory proteins in different cell types.

研究分野：周産期

キーワード：妊娠高血圧症候群 血管内皮障害 補体 補体制御タンパク 抗血管新生因子

1. 研究開始当初の背景

HDP は、全妊娠の 3 - 5 % に合併する母体の血管内皮障害に伴う全身性の血管機能障害で、子癇発作、肺水腫、HELLP 症候群といった母体合併症や、早産、子宮内胎児発育遅延などの周産期合併症を来し、現在においても母児の予後にとって大きな脅威となっている。

HDP の病態に関しては、近年、胎盤から母体に分泌される抗血管新生因子による母体の抗血管新生状態が主要な病態として提唱された。子宮らせん動脈への栄養膜細胞層の侵入が障害された結果として 低酸素状態に陥った胎盤から sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) という抗血管新生因子が母体に分泌され、VEGF (vascular endothelial growth factor) や PlGF (placental growth factor) と直接結合することでその作用を阻害し、母体の抗血管新生状態を来すことが HDP の発症に深くかかわっていることが示唆された [J Clin Invest 2003: 111; N Engl J Med 2004: 350; Nat Med 2006: 12]。この抗血管新生状態という病態の発見によって HDP の病態の理解は飛躍的に進んだが、治療については臨床的に有用性が示されている報告はほとんどなされておらず、現在においても妊娠の中断(分娩)が唯一の治療となっている。臨床応用可能な治療法を開発するには、母体の抗血管新生状態以外の病態や、母体の抗血管新生状態によって引き起こされる血管内皮障害の詳細な病態解明が急務と考えられている。

補体系とは、生体が病原体を排除する際に抗体および貪食細胞を補助する自然免疫系に属する免疫システムである。近年、HDP の病態に対する補体系の関与の可能性が注目されている [Mol Immunol. 2010;47, Curr Hypertens Rep. 2017;87]。血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy : TMA) は、細小血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、血小板血栓による臓器障害を 3 主徴とする病理診断名であるが、重症の HDP、特に HELLP 症候群の症状は、TMA との類似性が非常に高いことが以前より指摘されてきた。近年、TMA を示す病態のうち、O157 感染による (STEC-HUS) と、ADAMTS13 活性の先天的あるいは後天的低下による血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) を除外して診断される 非典型的溶血性尿毒症症候群 (atypical hemolytic uremic syndrome : aHUS) の大部分が先天性の遺伝子変異あるいは後天性の自己抗体による補体経路の異常活性化を原因として発症する TMA であることが示された。また、aHUS の発症には妊娠、特に分娩がトリガーになっているとした報告もなされており、aHUS (補体系の異常活性化を原因とする TMA) と重症 HDP (特に HELLP 症候群) は臨床的な症状に加え、その病態にも深い類似点があることが示唆されている。

実際の臨床報告として、HDP 妊婦で補体の活性化の最終産物である C5b-9 の尿中の排泄が上昇していること [Hypertension. 2013;62; Obstet Gynecol. 2018;132] や、補体の活性化を示す C4d-a や C1q の免疫染色陽性の糸球体の増加 [Hypertension. 2015; 66] が報告されている。さらに、HELLP 症候群の症例に、高頻度に補体関連遺伝子の変異が認められることが報告され、重症 HDP や HELLP 症候群の発症に補体の過剰な活性化が関与していることが遺伝子レベルでも強く示唆されるようになった [JCI Insight. 2018, 22;3]。

2. 研究の目的

背景で述べたように、HDP の病態として補体異常活性化が注目されている。しかしながら、**HDP の主要な病態と認識されている「母体の抗血管新生状態」と「補体異常活性化」との関連についてはほとんど検討されていない。**抗 VEGF 抗体を用いた抗血管新生治療を施行中のがん患者においても aHUS(補体の異常活性化を原因とした TMA) の発症が報告されており[Oncol Pharm Pract 2019, 25, 1011]、我々は、**母体の抗血管新生状態と、補体の異常活性化との間に何らかの関連メカニズム(クロストーク)が存在するのではないかと考えている。**

今回の研究の目的は、**HDP の病態の中心とされている母体の抗血管新生状態と、補体の異常活性化との関連メカニズムを、補体活性化抑制因子の一つである CFH に着目して基礎的に検討するもので、抗血管新生状態と補体活性化を協調して制御する重要性に着目した。**

3. 研究の方法

1. 血管内皮細胞障害における、血管新生系との補体系の関連の検討

1-1. HUVEC に CFH の SiRNA(Santa Cruz Biotechnology)を導入した HUVEC に対して、妊婦血清を加えて、生細胞数を MTS assay で確認する。CFH による HUVEC の保護効果を検討する。(結果 1-1, Figure1)

1-2. HUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)に PIGF(100ng/mL), sFlt1(100ng/mL)(R&D systems)を加えて 24 時間培養し、補体防御蛋白である CFH の発現を RT-PCR および ELISA を行うことにより検討する。(結果 1-2, Figure2)

2. 肝細胞における補体産生に対する、血管新生系の関与の検討

HDP の妊婦血清では補体が活性化していることが知られているが、その理由は不明である。非妊時においては補体は主に肝細胞において合成されるので、HDP の妊婦では抗血管新生状態が肝細胞での補体産生に影響を与えている可能性が示唆される。

肝細胞のモデル細胞として HepG2 を用い、正常の妊婦血清に PIGF や sFlt1 をそれぞれ 100ng/ml の濃度で加えた培地にて培養する。培養上清の C3 と CFH を ELISA で、C3 と CFH の発現量 RT-PCR で測定する。これにより PIGF や sFlt1 が肝細胞における補体や補体制御蛋白の産生にどのように影響しているかを検討する。(結果 2, Figure3)

4. 研究成果

・結果 1-1, Figure1

CFH の SiRNA を導入した HUVEC では、CFH の発現が減少し (a) 妊婦血清の添加で精細胞数が減少した(b)。これにより、CFH による HUVEC の保護効果が証明された。

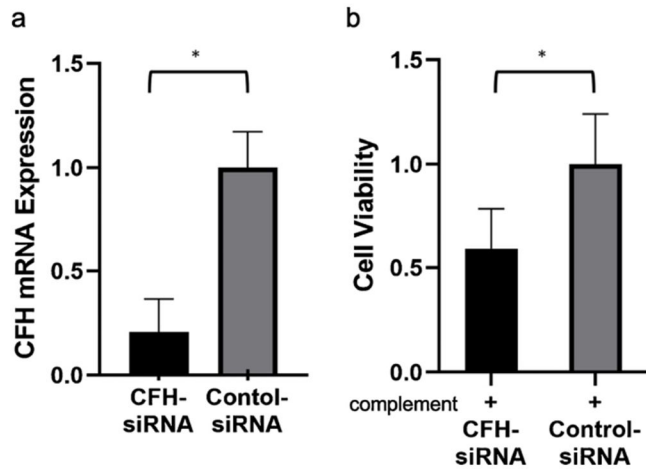


Fig. 1. *CFH* expression and viability of HUVECs transfected with *CFH*-siRNA.

(a) *CFH* expression was lower in HUVECs transfected with specific siRNA (100 nM) than in controls. Quantitative RT-PCR showed that *CFH* expression was knocked down by 80 % using specific siRNA (n = 5, P < 0.05). (b) As determined by a cell viability assay, HUVECs transfected with *CFH*-siRNA were more vulnerable than control cells after incubation with complement medium, as seen by the lower viability (n = 15; P < 0.05).

• 結果 1-2, Figure2

PIGF 添加により HUVEC からの CFH の分泌が増加し、sFlt1 の添加で CFH の分泌が減少することが RT-PCR (a) でも ELISA(b)でも示され、CFH の分泌の増加は生細胞の増加にも関連していた(c)。

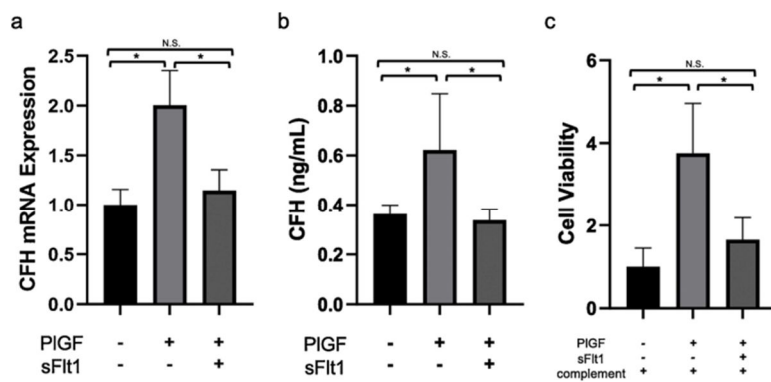


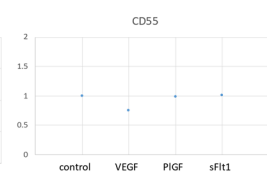
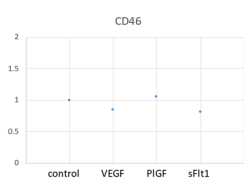
Fig. 2. Expression and secretion of *CFH* by HUVECs treated with or without angiogenic factors.

(a) Quantitative RT-PCR showed that *CFH* expression was significantly higher in HUVECs cultured with PIGF (100 ng/mL) compared with HUVECs cultured without angiogenic factors or with both PIGF and sFlt1 (100 ng/mL) (n = 5). (b) ELISA data showed that *CFH* secretion was significantly higher in HUVECs cultured with PIGF than in HUVECs cultured without angiogenic factors or with both PIGF and sFlt1 (n = 6). (c) As determined by cell viability assay, after treatment with angiogenic factors and incubation with complement medium, the survival of HUVECs treated with PIGF was significantly higher than that of HUVECs treated without angiogenic factors or with both PIGF and sFlt1 (n = 15). One-way ANOVA, *P < 0.05. NS, not significant.

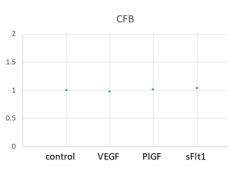
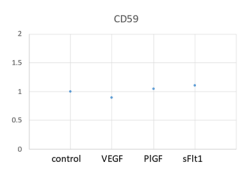
• 結果 2, Figure3

VEGF, PIGF 添加により HepG2 からの補体制御因子である CD46、CD55、CD59、CFB の産生の影響を調べた。予備実験の段階であるが血管新生因子にて肝臓よりの補体制御因子の分泌が影響を受ける可能性が示唆された。

RT-PCR HepG2



RT-PCR HepG2



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Matsuyama Tatsuya, Tomimatsu Takuji, Mimura Kazuya, Yagi Kazunobu, Kawanishi Yoko, Kakigano Aiko, Nakamura Hitomi, Endo Masayuki, Kimura Tadashi	4. 巻 145
2. 論文標題 Complement activation by an angiogenic imbalance leads to systemic vascular endothelial dysfunction: A new proposal for the pathophysiology of preeclampsia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103322 ~ 103322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2021.103322	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 該当する

〔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
研究分担者	味村 和哉 (Mimura Kazuya) (50437422)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

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