

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21791553  
 研究課題名（和文） 一過性遺伝子導入システムによる妊娠高血圧症候群マウスの作成と解析  
 研究課題名（英文） Development and analysis of a mouse model of preeclampsia using transient in vivo gene transfer system  
 研究代表者  
 香山 晋輔（KOYAMA SHINSUKE）  
 大阪大学・医学系研究科・助教  
 研究者番号：30528005

## 研究成果の概要（和文）：

近年、妊娠高血圧症候群の病態として、妊娠初期における絨毛の子宮への浸潤不全による胎盤の循環不全を根本とし、絨毛間腔の低酸素状態によって発現が増加した各種血管新生因子阻害物質が血管内皮障害を引き起こすという”Two Step Theory”が注目されている。本研究において、着床期において絨毛の子宮脱落膜への浸潤調節に関与しているとされるTIMP-3を、HVJ-E vectorを用いた生体内一過性遺伝子導入法を用いてマウス妊娠初期子宮に遺伝子導入したところ、妊娠高血圧症候群モデルマウスを作成し得た。

## 研究成果の概要（英文）：

Recently, “Two Step Theory” has received a lot of attention as pathological condition of preeclampsia, concretely speaking, reduced placental perfusion due to insufficient chorionic invasion to the uterus at early pregnancy is postulated as the root cause and maternal systemic endothelial dysfunction is induced by some over-expressed inhibitor of angiogenesis factor due to hypoxic status at placenta. In this research, we transferred TIMP-3 which is known as related factor of regulation of chorionic invasion to the decidua into the uterine cavity during implantation window, thus we successfully developed a mouse of preeclampsia.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産科婦人科学

キーワード：妊娠高血圧症候群、生体内遺伝子導入、マウスモデル、ex vivo

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群は、妊娠中に発症した高血圧を主体とし、蛋白尿などの腎機能障害をきたす疾患であり、その発症頻度は全妊婦の約

10%を占める代表的な産科合併症の一つである。重症化すれば、母体側には、全身の血管内皮障害によって肝機能障害・腎機能障害・呼吸循環障害・凝固線溶系の異常・中枢神経系の異常を認め、脳内出血・胎盤早期剥

離などで母体死亡に至る重篤なケースも存在する(Sibai B et al., Lancet 2005; 365: 785-799)。胎児側には胎盤血流減少に伴う子宮内胎児発育不全・低出生体重児などの異常を来し、母児の重症度によっては人工早産も余儀なくされるため、このことは現在の周産期医療の問題点である NICU の満床化の一端を担っている。つまり、現代医学の進歩にも拘わらず、妊娠高血圧症候群は未だ母児双方の生命予後を脅かす極めて重要な疾患である。妊娠高血圧症候群の病態の本質は、長い間“学説の疾患”と揶揄されてきたように未だ確たる原因は突き止められていないが、近年の研究ではその病態には“Two Step Theory”と言われる二つの段階を経て発症するという仮説が主流と成りつつある。具体的には、妊娠初期において遺伝的・環境的・免疫学的な要因によって起こった胎盤の子宮への浸潤不全が胎盤血液還流の減少をもたらす(First Step)、妊娠の進行に伴う絨毛間腔の低酸素状態などが原因で発現が増加した soluble VEGF receptor-1 (sVEGFR-1, sFlt-1)や soluble Endoglinといった液性因子が、VEGF や PLGF といった血管新生因子を阻害することで血管内皮障害をもたらす(Second Step)という仮説である(Lam C et al., Hypertension 2005; 46: 1077-1085) (Venkatesha S et al., Nat. Med. 2006; 12: 642-649)。

## 2. 研究の目的

我々は、当研究室においてこれまでに確立してきた HVJ-E vector を用いた妊娠マウス子宮局所への in-vivo 遺伝子導入法(Mol. Hum. Reprod. 2003; 9: 603-609, J. Reprod. Immunol. 2006; 70: 59-69)を用いて、妊娠高血圧症候群の治療戦略の研究を行い、VEGF が妊娠高血圧症候群治療における標的分子の一つになりうると報告した(Horm. Metab. Res. 2006; 38: 619-624)。本研究では、妊娠高血圧症候群の病態解明を目的として、妊娠高血圧症候群の First Step とされる病態、胎盤の子宮への浸潤不全の過程に着目した。着床期に胚が脱落膜に接着・侵入する過程において、細胞外マトリックスを分解する Matrix Metalloproteinases (MMPs) と MMPs 活性を制御する Tissue inhibitor of matrix Metalloproteinase (TIMPs) のバランスのとれた制御が着床過程に大変重要であるとされている。予備実験において胎盤浸潤の制御に TIMP3 の関与が示唆されたため、着床期の子宮脱落膜において TIMP3 を過剰発現させることで胎盤の子宮脱落膜への浸潤が不十分となり、妊娠高血圧症候群で認められる胎盤浸潤不全を再現出来るしいは妊娠高血圧症候群モデルマウスを作成することが出来

るのではないかと考え、実験を行った。

## 3. 研究の方法

我々の開発した HVJ-E vector を用いた妊娠マウス子宮腔内への高効率・一過性の遺伝子導入システムは、妊娠の各時期に応じた病態解析を目的とした遺伝子を導入することが可能であり、世界的にも他に類をみない技術である。本研究ではこの遺伝子導入システムを用い、生殖医療に携わりながら分子生物学を専門とする研究者グループ(木村・筒井・中村・香山・熊澤)が共同・協力して研究を行った。妊娠高血圧症候群の病態解明・発症予知・さらには治療戦略を最終目的とするが、まずは TIMP3 遺伝子導入マウスの作成とその解析を行った。

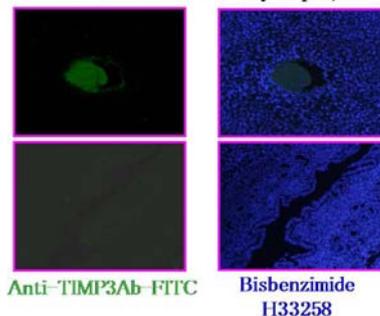
### (1) 着床期子宮における TIMP3

ウェスタンブロット法と免疫染色法を用い、TIMP3 の正常妊娠マウス子宮における発現と局在を調べたところ、胎盤形成期では発現が認められず、胎盤形成後の交配後 10.5 日目の子宮脱落膜において強い発現が認められた(図1・図2)。TIMP3 の基質の1つの Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) は、逆に胎盤形成期に子宮脱落膜で強い発現を認めたが、TIMP3 の発現が認められる時期にはその発現が減弱した(図1)。このことは、胎盤が必要以上に子宮脱落膜の深部にまで浸潤しないように TIMP3 の制御機構が働いていることを示唆している。

図1 マウス子宮における MMP9 及び TIMP3 蛋白の発現 (Western blotting法)



図2 マウス子宮における TIMP3 蛋白の局在 (免疫組織染色法, day7.5 p.c.)



(2)TIMP3 in vivo 遺伝子導入マウスの作成

TIMP3 遺伝子を発現 vector である pcDNA3 にサブクローニングした後に、pcDNA3-TIMP3 / HVJ-E vector (GenomONETM-Neo、石原産業(株))懸濁液を作製し(図3)、胎盤形成期にあたる交配後 6.5 日目の ICR マウス子宮に導入した(図4)。

TIMP3 遺伝子導入マウスの子宮における導入遺伝子発現を確認するため、交配 7.5 日目に子宮を摘出し、TIMP3 と MMP9 の蛋白発現量をウェスタンブロット法にて確認した。コントロールには ICR マウス子宮に pcDNA3 / HVJ-E vector のみを遺伝子導入したものを用いた。

図3 HVJ-E vector system

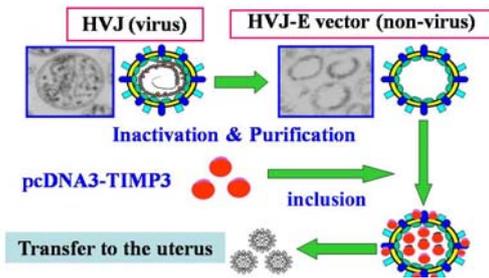


図4 HVJ-E vector system による遺伝子導入

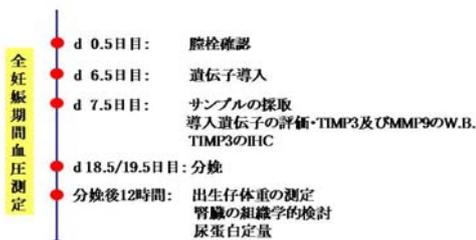


交配後6.5日目(腔栓確認=交配後0.5日目)のICRマウス(8-12週齢)にHVJ-Eベクターを導入(導入部位:feto-maternal interface)した。遺伝子導入後、10分間子宮頸部をクランプした。

(3)TIMP3 in vivo 遺伝子導入マウスの解析

TIMP3 遺伝子導入マウスに対して、妊娠中の血圧測定、尿アルブミン/尿クレアチニン比の測定、血中の sFlt-1・soluble Endoglin といった妊娠高血圧症候群発症との関与が示唆されている液性因子の測定、妊娠予後として胎児数・児出生体重、胎盤重量をそれぞれコントロールマウスのものとを比較・検討した。実験スケジュールを下に示す(図5)。

図5 実験スケジュール



4. 研究成果

(1)TIMP3 遺伝子導入マウスの作成

交配後 6.5 日目の ICR マウス子宮内に TIMP3 遺伝子を導入したところ、導入 24 時間後の子宮脱落膜において TIMP3 の強い発現を認め、MMP9 発現の減弱を認めた(図6・図7)。これにより、TIMP3 遺伝子が子宮局所に適切に導入されていることが示され、また当初の目的であった TIMP3-MMP9 の発現バランスを変化させることが出来た。

図6 TIMP3導入24時間後の子宮におけるTIMP3/MMP9の発現(day7.5 p.c.)

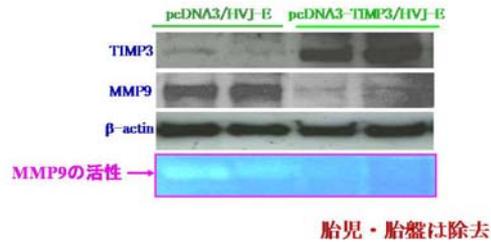
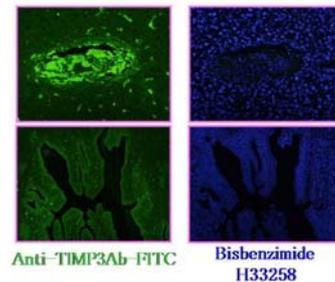


図7 遺伝子導入24時間後の妊娠マウス子宮におけるTIMP3蛋白の局在(免疫組織染色法、交配後7.5日目)



(2)TIMP3 遺伝子導入マウスの血圧の変動

交配後 6.5 日目に TIMP3 遺伝子を導入した後、マウス血圧を産褥 1-2 日目まで毎日測定し、コントロールマウスと比較検討したところ、妊娠 14.5 日目以降、TIMP3 導入マウスの収縮期血圧に有意な上昇を認めた(図8)。尿蛋白も有意差はないが増加傾向を認めた(図9)。

図8 TIMP3導入後の血圧変化

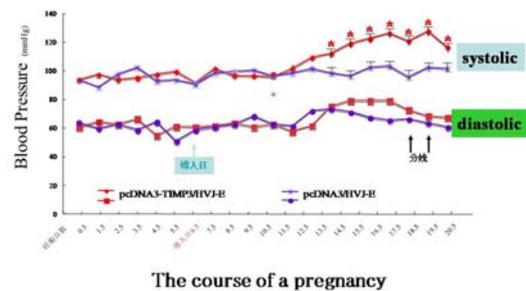
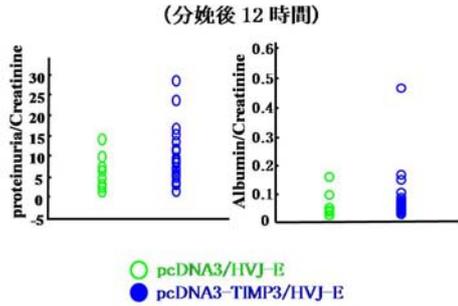


図9 TIMP3導入後の尿蛋白量の変化



(3) TIMP3 遺伝子導入マウスの妊娠予後

TIMP3 遺伝子導入マウス 14 匹とコントロールマウス 10 匹とで妊娠予後の検討を行った。胎仔数と流産率には有意差を認めなかった。胎仔体重と胎盤体重の検討では、分娩直後に測定することは困難であるため、交配後 17.5 日目に開腹して測定した。TIMP3 遺伝子導入マウスの胎仔体重と胎盤重量はコントロールマウスと比較して有意に低下を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 10)。

図10 妊娠予後の検討

Table 1

Outcome of pregnancy after TIMP3 transfer in vivo

	pcDNA3-TIMP3/HVJ-E	pcDNA3-HTF/HVJ-E	Significance
Numbers of mouse	14	10	
Average number of fetus (6.5 p.c.)	14.928 ± 0.508	14.600 ± 0.702	N.S
Average number of aborted fetus (17.5 p.c.)	2.786 ± 0.350	2.600 ± 0.476	N.S
Weight of fetus (17.5 p.c.) (g)	1.385 ± 0.194	1.591 ± 0.146	$P < 0.05$
Weight of placenta (17.5 p.c.) (g)	0.109 ± 0.016	0.111 ± 0.012	$P < 0.05$

(4) TIMP3 遺伝子導入マウスにおける血中の sFlt-1・soluble Endoglin・VEGF の測定

分娩後 12 時間のマウスから血液採取して、血中 sFlt-1・soluble Endoglin・VEGF を ELISA 法で測定した。TIMP3 遺伝子導入マウスではコントロール群と比較して有意に血中 sFlt-1 と血中 soluble Endoglin が低かった (図 11・図 12)。血中 VEGF 濃度は有意差を認めなかった (図 13)。

図11 TIMP3導入後のsFlt-1の変化

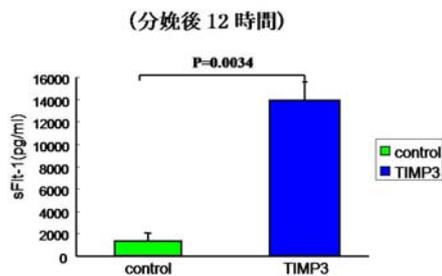


図12 TIMP3導入後のsEndoglinの変化

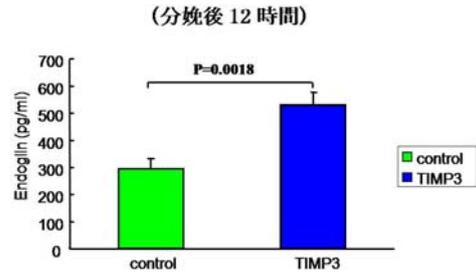
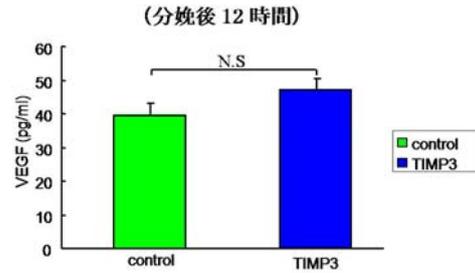


図13 TIMP3導入後のVEGFの変化



(5) 研究成果のまとめ

TIMP3 遺伝子導入マウスでは、妊娠 14.5 日目以降に収縮期血圧は有意に上昇し、尿蛋白も有意ではないものの増加傾向を認めた。また、胎仔体重と胎盤重量は有意に低下した。この病態はヒト妊娠において妊娠高血圧症候群と子宮内胎児発育不全が併発しやすい事実と一致している。また、血中 sFlt-1 濃度と血中 soluble Endoglin 濃度はともに有意な減少を認めたが、これもヒト妊娠における妊娠高血圧症候群で認められる所見である。つまり、妊娠中の子宮における TIMP3 の発現制御機構の破綻が、妊娠高血圧症候群の発症を誘導していることが証明され、このマウスが妊娠高血圧症候群モデルマウスとして有用であると考えられた。現在は Subtraction Suppressive Hybridization (SSH) 法を用い、正常妊娠マウスと比べて子宮・胎盤における遺伝子発現量の差のある遺伝子の網羅的なスクリーニングを行っており、これによって妊娠高血圧症候群の発症や成因に関与する新たな候補遺伝子の同定作業を進めている。

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 16 件) (全て査読あり)

(1) Pseudomyxoma peritonei originating from colorectal cancer during pregnancy. Koyama, S., Tomimatsu, T., Sawada, K., Kanagawa, T., Tsutsui, T., Kimura, T. J Obstet Gynaecol Res 37(3): 254-258, 2010.

(2) Cervical insufficiency following cesarean delivery after prolonged second stage of labor: experiences of two cases.

Koyama, S., Tomimatsu, T., Kanagawa, T., Sawada, K., Tsutsui, T., Kimura, T. J Obstet Gynaecol Res 36(2): 411-413, 2010.

(3) Prenatal diagnosis of polysplenia syndrome associated with increased nuchal translucency. Koyama, S., Tomimatsu, T., Kanagawa, T., Morimoto, A., Kimura, T. Prenat Diagn 30(10): 1005-1006, 2010.

(4) Spinal subarachnoid hematoma following spinal anesthesia in a patient with HELLP syndrome.

Koyama, S., Tomimatsu, T., Kanagawa, T., Sawada, K., Tsutsui, T., Kimura, T., Chang, YS., Wasada, K., Imai, S., Murata, Y.

Int J Obstet Anesth 19(1): 87-91, 2010.

(5) A case of complete hydatidiform mole with coexistent fetus: conclusive diagnosis of androgenesis of the molar placenta by variation of paternal acrocentric short arms.

Koyama, S., Tomimatsu, T., Sawada, K., Kanagawa, T., Isobe, A., Kinugasa, Y., Tsutsui, T., Kimura, T.

Am J Perinatol 27(2): 143-149, 2010.

他英文論文 4 件

他邦文論文 7 件

[学会発表] (計 12 件)

(1) Bizarre expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 in fetomaternal interface caused gestational hypertension in mice model.

Kimura, T., Zhang, Q., Nakamura, H., Kumasawa K, Koyama S., Tabata C., Tsutsui, T. XI International Congress of Reproductive Immunology. Cairns, AUSTRALIA, 8/15-19, 2010.

(2) Significance of fetomaternal interface: from implantation failure to preeclampsia in model mice.

Kimura, T., Zhang, Q., Nakamura, H., Kumasawa, K., Koyama, S., Tabata, C., Tsutsui, T. 2nd International Conference on Reproductive Immunology. (招待講演) Shanghai, China, 10/2, 2010.

(3) 香山晋輔, 朋和, 谷口友基子, 晶磯, 金川武司, 澤田健二郎, 富松拓治, 木村正  
胎児頭蓋内出血を来した特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: ITP) 合併妊娠の一症例.

第 6 2 回日本産婦人科学会学術講演会

東京都 (東京国際フォーラム), 10/2, 2010.

(4) 筒井建紀, 香山晋輔, 田畑知沙, 横井猛,

木村正, 朝倉寛之

中隔子宮を有する児希望患者に対する子宮鏡下中隔子宮切除術後の妊娠予後.

第 5 0 回日本産婦人科内視鏡学会学術講演会. 東京都 (京王プラザホテル), 7/29-31, 2010.

(5) 瀧内剛, 香山晋輔, 横井猛, 金山智子, 筒井建紀, 木村正

Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome に対して施行した腹腔鏡補助下造膈術 (Davydov 変法) の検討.

第 5 0 回日本産婦人科内視鏡学会学術講演会. 東京都 (京王プラザホテル), 7/29-31, 2010.

他国際学会 1 件

他国内学会 6 件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

香山晋輔 (KOYAMA SHINSUKE)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 30528005

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: