

機関番号：23903

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791569

研究課題名 (和文) 妊娠高血圧症候群モデルを用いた血管内皮機能改善に向けての栄養介入の研究

研究課題名 (英文) Characteristic changes in endothelial function by administration of NO synthase inhibitor during placental formation

研究代表者

山本 珠生 (YAMAMOTO TAMAO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20405210

研究成果の概要 (和文) : 妊娠ラットの胎盤形成期に一酸化窒素合成酵素阻害薬の投与による妊娠高血圧症候群モデル動物を作成した。このモデル動物では、血圧の上昇、胎盤形成不全と胎仔発育不全を認めた。子宮動脈での血管内皮機能は、アセチルコリン投与による一酸化窒素の産生がむしろ亢進していた。しかしながら、細胞内 Ca^{2+} 濃度や活性酸素種の関与は認めなかった。

研究成果の概要 (英文) : It is found that administration of the NOS inhibitor L-NAME at early pregnancy developed hypertension in rat. Blood pressure was increasing, while birth body weight was smaller in L-NAME-treated rats than in saline-treated rats. Acetylcholine (ACh)-induced endothelial nitric oxide (NO) production in uterine artery was higher, although ACh-induced reactive oxygen species production was similar in L-NAME-treated rats. It is suggested that the increased endothelial NO production in uterine artery by administration of L-NAME may protect the development of hypertension in endothelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
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・産婦人科学

キーワード：妊娠高血圧症候群、血管内皮機能障害、一酸化窒素、活性酸素

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (PIH) は、高血圧を主症状とする症候群で、けいれん (子癇) や脳出血、常位胎盤早期剥離と DIC、肝障害、腎障害を発症し、妊婦死亡に至ることもある。また、PIH 患者は、後に高血圧、糖尿病、腎疾患、冠動脈疾患、脳血管障害の発症が多いとされている。児は極度の子宮内発育不全となり、神経学的後障害や児死亡の主要因となる。

これまで PIH に関する多くの病因・病態研究がおこなわれてきたが、明らかではない。現在、胎盤トロホブラストの侵入と分化不全、血管内皮機能障害、免疫不全や全身性炎症反応の関与が考えられている。最近の有力な仮説は、妊娠初期のトロホブラストの侵入不全がおきると子宮胎盤血流が減少するため血管内皮機能が活性化されて血流を増加させるが、やがて血管内皮機能が障害され、母体での血管抵抗の増加や胎児における血液循

環不全を発症するというものである。この活性化因子は、microparticle、接着因子、サイトカイン、活性酸素種や angiogenic factor [soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 や endoglin] がその標的分子であるが、詳細は明らかではない。

我々は PIH 患者血管を用いて、内皮機能異常として、(1) 一酸化窒素 (NO) の機能異常は主に血管平滑筋での NO の反応性の減少、特に NO による cGMP 生成以降の情報伝達系の down regulation である、(2) 内皮でのプロスタサイクリン産生は低下、(3) 膜過分極因子は維持され代償的に働いていることを明らかにした。一方、動物モデルは研究を進めてゆく上で必須であると考え、ニトログリセリン (NTG) 連続投与による血管内皮機能障害動物を確立した。さらに、NO 蛍光指示薬を用いた *ex vivo* での NO 測定系を確立し、内皮細胞内の NO 濃度を直接的に測定する事を可能とした。この方法により、この動物モデルの内皮機能障害は、内皮での NO 産生の減少とともに平滑筋レベルでの NO-cGMP 反応の減弱であることを明らかにした。その主なメカニズムは、局在するアンギオテンシン II の活性化や内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の uncoupling [補酵素であるテトラヒドロピオプテリン (BH₄) が低下した状態では eNOS の機能不全が生じ NO よりむしろ活性酸素 (O₂) を産生するようになる] による活性酸素の発生であることも明らかにした。その uncoupling 現象に対してアスコルビン酸の投与では効果は不十分であったが、L-アルギニン+葉酸の急性投与が有効であった。動物実験の結果をもとに妊婦に L-アルギニン+葉酸投与を行った。超音波装置を用いた Shear stress による上腕動脈径の変化 (FMD) の観察により血管内皮機能異常を推定すると PIH 発症既往の妊婦では、妊娠初期より血管内皮機能の低下を示すものが多くみられた。L-アルギニンと葉酸投与はこの機能低下を改善した。

妊婦血管を得ることは侵襲性が高く、一方超音波検査は正確な変化を捉えづらい。PIH モデル動物を作成し、内皮機能障害改善の underlying mechanism の研究を進めてゆく。

2. 研究の目的

我々は、妊娠高血圧症候群 (PIH) 妊婦より得た抵抗血管を用いた実験で、血管内皮機能の異常が発生していること、その異常は他の血管病とは異なる病態であることを明らかにした。さらに、ニトログリセリン (NTG) の長期慢性投与により血管内皮機能障害をもつ動物を作製し、血管内皮機能障害改善のための治療を目指して研究をすすめてきた。L-アルギニン+葉酸の急性投与は血管内皮機

能障害を改善した。それらの結果をもとに、PIH や高血圧発症の既往があり、血管内皮機能の低下を認めた妊婦において L-アルギニンと葉酸摂取は血管内皮機能を改善する効果があることを明らかにした。すなわち、このサプリメントは PIH の治療や発症予防に効果がある可能性を示唆した。

PIH 妊婦より得た抵抗血管を用いた実験より得た血管内皮機能の異常 [一酸化窒素 (NO) 反応性の異常] に着目し、NTG 長期慢性投与動物実験での血管内皮機能異常にみられる uncoupling 現象、L-アルギニン+葉酸の急性投与が uncoupling を改善するとの知見をベースに、我々の確立した *ex vivo* での血管内皮細胞での NO 産生測定など最新の手法、ならびに、最近の PIH の病因形成仮説である胎盤形成不全による高血圧を誘導した動物モデルを用いて、PIH の血管内皮細胞障害の underlying mechanism の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象は生後 10 週齢の妊娠 Wistar-ST ラットとした。胎盤形成期である妊娠 8 日から、浸透圧ポンプを用いて、NO 合成酵素阻害薬である N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) の皮下持続投与 (60mg/kg/day) を開始した (L-NAME 投与群、n=5)。対照群は生理食塩水を投与した (Control 群、n=6)。妊娠 15 日に浸透圧ポンプを抜去し、投与を中止した。血圧測定は、無加温型非観血式血圧計 MK-2000ST (室町機械) を用い、Tail cuff 法にて行った。妊娠 20 日に子宮および子宮動脈を摘出し、胎仔および胎盤の重量を測定した。

(2) 内皮細胞 [NO]_i 測定

ラット子宮動脈を長軸方向に切開し、内皮温存標本を作製した。標本に NO 蛍光指示薬である DAF-2 DA を負荷した。倒立蛍光顕微鏡にセットし、490 nm で励起される 535 nm の蛍光を CCD カメラにて検出した。記録された画像は解析ソフトにて画像処理を行った。生体内内皮刺激物質であるアセチルコリン (ACh) 投与による蛍光変化を経時的に測定した。[NO]_i 変化は F/F_0 の ratio 値 (F_0 は ACh 投与前の蛍光強度、 F は ACh 投与後の種々の時間で得られる蛍光強度) として表した。

(3) 内皮細胞 [Ca²⁺]_i 測定

内皮細胞温存標本に Ca²⁺ 蛍光指示薬である Fura 2-AM を負荷した。標本を倒立蛍光顕微鏡に固定し、CCD カメラを用い、340 nm (F_{340}) と 380 nm (F_{380}) で励起させた蛍光を 510 nm フィルター存在下にて検出した。[Ca²⁺]_i の変化は F_{340}/F_{380} の ratio 値として表した。ACh 投与による内皮細胞の [Ca²⁺]_i の変化を経時的に測定した。

(4) 内皮細胞内の活性酸素種 (ROS) 測定

内皮細胞温存標本に活性酸素種蛍光指示薬である CM-H₂DCFDA を負荷した。倒立蛍光顕微鏡にセットし、490 nm で励起される 535 nm の蛍光を CCD カメラにて検出した。内皮細胞内の活性酸素種の産生を、 F/F_0 の ratio 値 (F_0 は ACh 投与前の蛍光強度、 F は ACh 投与後の種々の時間で得られる蛍光強度) として表した。

本研究は名古屋市立大学動物実験倫理委員会の承認を得て施行した。

4. 研究成果

(1) 収縮期血圧は、L-NAME 投与群で有意に上昇し、L-NAME 投与を終了した妊娠 15 日以降も高値を推移した。胎児重量、胎盤重量は L-NAME 投与群で減少しており、子宮内胎仔発育不全を認めた (表 1)。

表 1

	Control群	L-NAME投与群	
Number	5	6	
収縮期血圧 (mmHg)			
初期	101±2	106±2	} ++
胎盤形成期(妊娠8-14日)	98±4	144±5 **	
胎盤完成期(妊娠15-20日)	97±4	122±5 *	
胎仔数	10.4±0.7	7.6±1.3	} †
胎仔体重 (g)	3.07±0.07	2.81±0.05 *	
胎盤重量 (g)	0.43±0.01	0.40±0.01 *	

Data are shown as mean±s.e.m.
*P<0.05, **P<0.01 vs. Control群
†P<0.05, ††P<0.01

(2) 内皮細胞 [NO]_i 測定

DAF-2 DA を負荷したラット子宮動脈を用いて、*ex vivo* 条件下で内皮細胞の [NO]_i 変化を測定した。図 1 に ACh 投与後の DAF-2 蛍光強度の経時変化を示した。ACh 投与により内皮細胞の [NO]_i は増加した。L-NAME 投与群では、ACh 投与による NO 産生が Control 群より増強した。

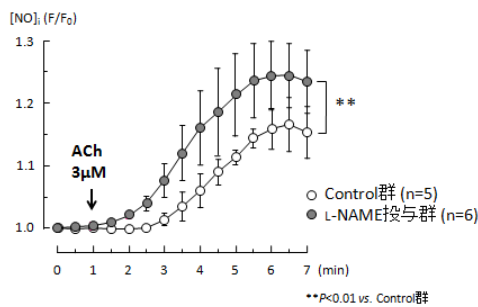


図1 ラット子宮動脈内皮細胞におけるAChによる[NO]_i上昇

(3) 内皮細胞 [Ca²⁺]_i 測定

ACh 投与にて、[Ca²⁺]_i は速やかに上昇した。その上昇の程度は L-NAME 投与群と Control 群で差を認めなかった (図 2)。

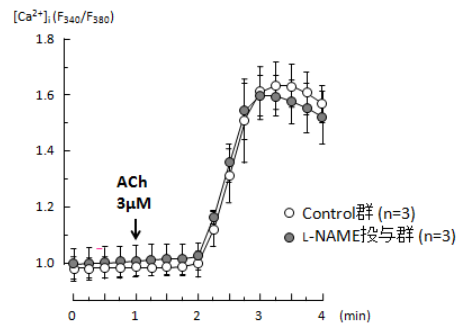


図2 ラット子宮動脈内皮細胞におけるAChによる[Ca²⁺]_i上昇

(4) 内皮細胞内の活性酸素種 (ROS) 測定

ACh 投与により、蛍光強度は上昇し、内皮細胞内の ROS の産生がみられた。その上昇の程度は L-NAME 投与群と Control 群で差を認めなかった (図 3)。

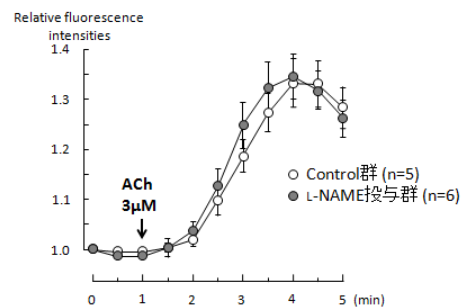


図3 ラット子宮動脈内皮細胞におけるAChによる活性酸素種産生

胎盤形成期の L-NAME 投与は、胎盤形成不全による胎仔発育不全を発症するとともに血圧が上昇することから胎盤機能不全による血管トーンズの増加を惹起した。その子宮動脈における血管内皮機能変化のメカニズムは、生体内内皮刺激物質による NO 産生の亢進による。しかし、細胞内 Ca²⁺濃度は変化しないし、また、活性酸素種発生の関与は認めなかった。

本研究は、従来の考えとは異なった我々独自の考えに基づくものである。血管内皮機能を詳細に検討することで、これまで PIH では、血管内皮での NO 産生低下であるとされてきたが、NO 反応性の異常との知見を見いだした。また、*ex vivo* の NO 産生の測定など新しい血管内皮機能の評価法を確立し、よ

り詳細な検討を可能にした。本研究では PIH 患者から得られた血管での結果をもとに動物モデルを作成し、我々の積み上げた知識と技術により作り上げた実験法を随所に活用して行った。これらの結果は、PIH の発症予防・治療に新しい可能性をもたらす研究であり、きわめて示唆に富む有益な知見が得られることから、国内外に強いインパクトを与えるとともに高い評価を得られると考えている。このアプローチによる研究をさらに進める予定である（平成 23～25 年度科研費採択）。

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 6 件）

- ① Yamamoto T, Suzuki Y, Kaneko S, Hattori Y, Obayashi S, Suzumori N, Sugiura M. Glycogen storage disease type Ia (GSD Ia) during pregnancy: Report of a case complicated by fetal growth restriction and preeclampsia. J Obstet Gynaecol Res. 2010; 36, 1125-1129. 査読有
- ② Yamamoto T, Suzuki Y, Kojima K, Suzumori N, Suzuki T. The Biological investigation of prostacyclin in preeclamptic women seen reduced endothelial function. Hypertens Pregnancy. 2010; 29, 484-491. 査読有
- ③ 鈴木佳克、山本珠生、伊藤猛雄、妊娠高血圧症候群－発症予知・予防は可能か－、産婦人科の実際、2010; 59, 335-340. 査読無
- ④ 伊藤猛雄、渡邊義将、梶栗潤子、山本珠生、中野庸一郎、白石良久、上村裕一、アンジオテンシン II による抵抗血管のトーン調節機構、循環制御、2009; 30, 121-126. 査読無
- ⑤ Kajikuri J, Watanabe Y, Ito Y, Ito R, Yamamoto T, Itoh T. Characteristic changes in coronary artery at the early hyperglycaemic stage in a rat type 2 diabetes model and the effects of pravastatin. Br J Pharmacol. 2009; 158, 621-632. 査読有

〔学会発表〕（計 10 件）

- ① 山本珠生、鈴木佳克、多田豊曠、伊藤猛雄、L-NAME 投与による胎盤形成不全発症動物における血管内皮機能異常の研究、第 62 回日本産科婦人科学会学術講演会、2010 年 4 月 24 日、東京
- ② 山本珠生、鈴木佳克、梶栗潤子、伊藤猛雄、L-NAME 投与による胎盤形成不全発症

動物における血管内皮機能異常の研究、第 83 回日本薬理学会年会 2010 年 3 月 16 日、大阪

- ③ Suzuki Y, Yamamoto T, Itoh T, Does supplementation of L-arginine plus folic acid improve reduced endothelial function seen in preeclampsia? Society for Gynecologic Investigation 3rd International Summit, Nov 12-14, 2009, Sendai
- ④ 山本珠生、鈴木佳克、伊藤猛雄、課題研究報告：妊娠高血圧症候群の血管内皮機能障害に対する葉酸ならびに L-アルギニンの改善効果の基礎的・臨床的検討、第 30 回日本妊娠高血圧学会 2009 年 8 月 28 日、岡山

〔図書〕（計 1 件）

- ① 鈴木佳克、山本珠生、妊娠高血圧症候群関連疾患、「必携 ハイリスク妊娠の診療を極める」、江口勝人編、179-185、永井書店、2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 珠生 (YAMAMOTO TAMAO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20405210