

機関番号：24601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791571

研究課題名 (和文)

アディポカイン・テクノロジーを用いた妊娠合併症の早期発症予知・治療法の開発

研究課題名 (英文) Innovation of prognosis and therapeutic method for complications in pregnancy using adipokine technology

研究代表者

成瀬 勝彦 (KATSUHIKO NARUSE)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70453165

研究成果の概要 (和文)：

正常妊娠・妊娠合併症における脂肪細胞の液性因子分泌と、絨毛細胞に与える影響を証明するため、脂肪細胞由来のサイトカイン (アディポサイトカイン)、特にアディポネクチンについて研究した。妊娠高血圧妊婦においてアディポネクチン分泌に遊離脂肪酸 (FFA) が影響を与えることが示唆された。また、正常妊娠経過中に血清中の多量体アディポネクチンとケモカインが有意に関連することを証明した。

研究成果の概要 (英文)：

Cytokines derived from adipocyte (adipocytokine), mainly adiponectin, were studied to clarify the effects of adipocyte on trophoblasts in normal and complicated pregnancy. The effect of free fatty acid on secretion of adiponectin was suggested in pregnancy induced hypertension. Additionally, coordinational alteration of high molecular weight adiponectin and chemokine in the course of normal pregnancy were clarified.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 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：7308 (A)産科学

キーワード：脂肪細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの妊娠は、たとえ正常であっても胎児の生育や授乳を目的にインスリン抵抗性が亢進する偽メタボリック・シンドローム状態に約40週間さらされることが分かっている。このことから、妊娠中の重篤な合併症である妊娠高血圧や妊娠糖尿病は一般成人の高血圧や糖尿病と同じく、このインスリン抵抗性が原因になるものと考えられてきた。

しかし申請者らを含む世界の研究者の努

力に従って、これらの疾患が一般的なインスリン抵抗性に立脚する部分と、むしろ正反対である部分の双方を併せ持つことが次第に明らかとなってきた。その結果を説明しうるものとして現在着目されているのが、脂肪細胞機能に着目した研究技術、すなわちアディポカイン・テクノロジーである。

脂肪細胞はこれまでエネルギーの貯蔵能以外の機能が注目されることは少なかったが、近年の研究で数多くのサイトカインを分

泌する巨大な内分泌臓器であることが明らかとなってきた。その代表格が炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 TNF- $\alpha$  と、これに対し抑制系に働くと共に、インスリンの感受性も高めるアディポネクチンである。

筆者らは妊娠高血圧に認められるサイトカインの変動を検討するうち、まず炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の可溶性レセプター sTNF-R1 が有意に上昇することを見いだした(成瀬ら、*糖尿病と妊娠* 5, 84-90, 2005)。これは通常の高血圧と同様の所見であったが、これに対して、インスリン感受性作用と抗炎症作用を持つ代表的な脂肪細胞由来のサイトカインであるアディポネクチンにつき、世界で初めて正常の妊娠で(通常の高血圧と同様に)低下していることと、妊娠高血圧で(通常の高血圧と正反対に)上昇していることを報告した(Naruse K, et al. *J Reprod Immunol* 65, 65-75, 2005)。

この研究は代表者が日本学術振興会・科学研究費補助金(若手スタートアップ、2007年~2008年)を得てさらに進展し、より活性の高い多量体アディポネクチンを指標にできる可能性を指摘するに至った。たとえば、妊娠糖尿病妊婦3例において活性型アディポネクチンは正常妊婦の10パーセンタイル下限にコントロールされていること(成瀬勝彦、*糖尿病と妊娠* 8, 55-58, 2008)、妊娠高血圧での活性型アディポネクチン比率の上昇が脳性利尿ペプチド(BNP)と関連し、脂肪細胞レベルでアディポネクチン上昇に関与している可能性が高いこと(成瀬ら、*日本妊娠高血圧学会雑誌* 15, 21-24, 2007)などを次々と発表し、これら妊娠合併症におけるサイトカイン変動の多くが脂肪細胞によって起こっている可能性、ならびにそのコントロールの重要性を臨床経験に即して提唱してきた。

しかしこれらの相関性を実際の脂肪細胞において確認する方法はまだ基礎的技術が確立されているに過ぎず、また実際に妊婦の脂肪組織でどのような反応が生じているのかについては研究が行われていなかった。妊娠中の合併症は胎児要因・胎盤要因・母体の自己免疫といった多くの要因により発症するとされているが、その研究の多くは一元的であり、現代人に最も発症しやすい脂肪細胞機能異常を原因究明の中心に据えた多角的な研究は存在していなかった。

## 2. 研究の目的

①生体由来の脂肪細胞と、またサイトカインの影響を受ける妊娠成立局所の細胞として胎盤の絨毛細胞を用い、細胞内外のサイトカインの分泌と誘導がどのような経路で起こっているかを生化学的・分子生物学的手法により検討する。

②同時に妊娠高血圧・妊娠糖尿病妊婦の血清においてアディポネクチンおよびその他のサイトカインを早期より経時的に測定してその変動を明らかにすると共に、実際に脂肪細胞や絨毛細胞に添加する実験を行ってその影響を確認する。

③最終的に実験動物を用いて、アディポネクチンやその他影響の示唆されたサイトカインを投与して妊娠やインスリン抵抗性、血圧に与える影響を検討することで、妊娠高血圧・妊娠糖尿病の発症や重症化による悲劇的な母児の転帰を改善するためのコントロール基準や新たな治療的介入・創薬につなげることを目標としている。

## 2. 研究の方法

① 検体の採取:倫理委員会による審査と承認、患者からの文書による承諾を得て、正常妊婦および合併症(妊娠高血圧・妊娠糖尿病・肥満など)妊婦より、妊婦健診時に行われる採血と同時に血清を得る。また分娩時に胎盤を採取する。人工妊娠中絶時の絨毛組織についても採取した。

② 脂肪細胞の培養:市販の系統細胞である前駆脂肪細胞を用いて分化培地中で分化させ、以降の検討に用いた。

③ 絨毛細胞の分離:満期胎盤・初期中絶絨毛は可視的に血管や梗塞部位を取り除いた後、十分血液を除きながらメスで細分した後、トリプシン分解とパーコール比重法を用いて分離した。

④ 添加実験:脂肪細胞に液性因子の添加を行った。絨毛細胞は低酸素環境(0.1%、もしくは5%)での培養を行った。

⑤ サイトカイン分泌・誘導の検討:上清中の液性因子分泌についてELISA法を用いて詳細に検討する。細胞内の伝達因子についてはWestern blot、EIA法により測定した。

⑥ 妊婦健診の施行・保存血清を用いたサイトカイン濃度異常の検索:妊娠高血圧・妊娠糖尿病の発症例、出生児体重の異常やその他の合併症を発症した例について、血清中のアディポネクチンを中心としたサイトカイン濃度の検討を行った。

⑦ マウスを用いた実験:正常妊娠マウスないし高血圧モデルマウスを用いてこれを妊娠させ、血圧の変動や体重増加の反応を測定し記録すると共に、児の重量、妊娠期間の短縮・延長の有無、組織学的に胎盤形成に異常がないかどうか、催奇形性やその他の妊娠合併症の発症有無について検索した。

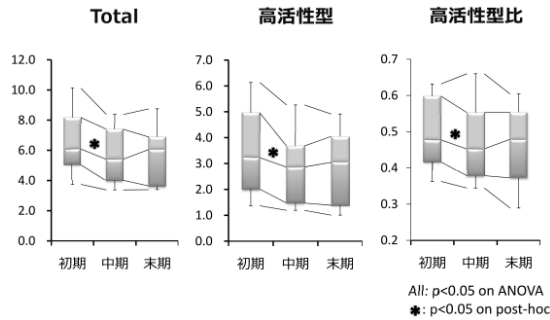
⑧ 研究結果の発表と報告:研究結果については国内外の学会で発表した。

## 3. 研究成果

① 正常妊娠経過中のアディポサイトカイン変動について

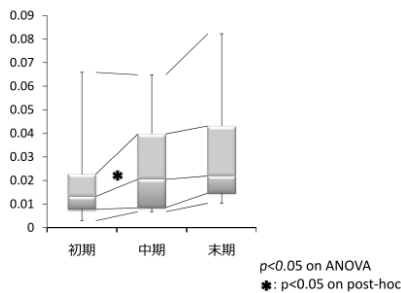
アディポネクチンは正常妊娠経過中に低下し、特に妊娠初期～中期にかけて有意に低下した。高活性型アディポネクチンとその比も有意に低下した。このことは、アディポサイトカインが妊娠中の生理的なインスリン抵抗性と相関していることを示している(図1)。

図1  
アディポネクチン(μg/ml)



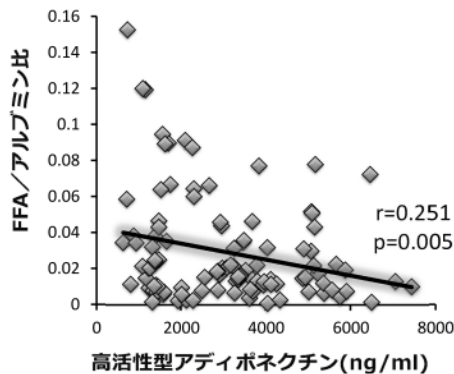
また、脂肪細胞においてインスリン抵抗性を高めるための液性因子として遊離脂肪酸 (Free fatty acid, FFA) が挙げられていることから、我々は正常妊婦血中の遊離脂肪酸 (アルブミンで補正) を検討し、妊娠経過中に有意に上昇することを明らかにした(図2)。

図2  
遊離脂肪酸(FFA)/アルブミン比



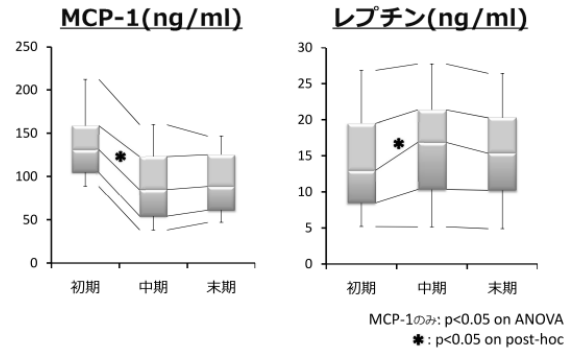
正常妊婦において、高活性型アディポネクチンと遊離脂肪酸は有意な負の相関を示すことも証明した(図3)。

図3



他のアディポサイトカイン・ケモカインの変動を検討すると、レプチンは弱いながらも一般的なインスリン抵抗性に呼応した変動を示したが、その変動は弱かった。ケモカインである MCP-1 について、妊娠経過中に有意な低下を示した。これはインスリン抵抗性を病態として発現するのは相反する挙動であり、妊娠中のインスリン抵抗性が生理的なものであって、病態につながることはないよう血中でコントロールされる仕組みが初めて示唆された(図4)。

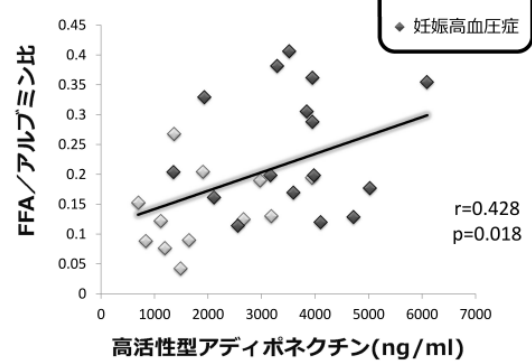
図4



② 妊娠合併症におけるアディポサイトカイン変動

妊娠高血圧症を加えたプロットでは、正常妊娠と異なり、遊離脂肪酸と高活性型アディポネクチンは正の相関を示すことが明らかとなった(図5)。このことは、脂肪細胞のレベルでは妊娠高血圧などの合併症において、正常妊娠とは異なる経路が働いていることを強く示唆するものである。

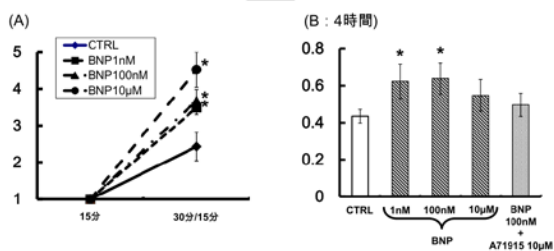
図5



③ 脂肪細胞におけるアディポネクチン産生刺激因子の検討

脂肪細胞培養系を用いて添加実験を行い、上清中にアディポネクチンを放出する因子を検討したところ、脳性利尿ペプチド(BNP)が有意に短期相・長期相でアディポネクチン濃度を高めることが明らかとなった(図6)。また、BNPによって細胞内で誘導される因子はcGMPであることも確認している。

図6



④ 絨毛細胞における低酸素培養系実験

妊娠初期絨毛細胞を低酸素条件下で培養したところ、5%の酸素環境ではプロテアーゼ産生・浸潤能とも変化がなかった。0.1%の低酸素刺激においてはプロテアーゼの産生、浸潤能とも低下することが明らかになった。これは一般的ながん細胞の動態とは異なるものである。

⑤ マウスを用いた実験

正常マウス・インスリン抵抗性マウス（遺伝子ノックアウトにて作成）を用いて妊娠経過を観察し、その胎仔数・血糖値・血圧・体重の変化について記録する方法を確立した。

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 8 件）

1. Otun HA, Lash GE, Innes BA, Bulmer JN, Naruse K, Hannon T, Searle RF, Robson SC. Effect of tumour necrosis factor- $\alpha$  in combination with interferon- $\gamma$  on first trimester extravillous trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 88; 1-11, 2011.
2. Oi H, Naruse K, Noguchi T, Sado T, Kimura S, Kanayama N, Terao T, Kobayashi H. Fatal Factors of Clinical Manifestations and Laboratory Testing in Patients with Amniotic Fluid Embolism. *Gynecol Obstet Invest.*70; 138-144, 2010.
3. Naruse K, Innes BA, Bulmer JN, Robson SC, Searle RF, Lash GE. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. *J Reprod Immunol* 86; 148-150, 2010.
4. 成瀬勝彦. 妊娠とアディポネクチン～正常妊婦の血中濃度推移と脂肪細胞における基礎的検討～. *糖尿病と妊娠* 10; 32-35, 2010.
5. 成瀬勝彦, 小林 浩, 佐道俊幸, 坂田麻理子, 吉田昭三, 大野木 輝. アディポ

ネクチンを指標とした妊娠糖尿病および妊娠高血圧症候群の早期予知と介入効果～インスリン抵抗性周産期疾患の減少を目指して～. 第41回「医学研究助成」研究報告集（三井生命厚生事業団）41; 7-9, 2010.

6. Lash GE, Naruse K, Innes BA, Robson SC, Searle RF, Bulmer JN. Secretion of Angiogenic Growth Factors by Villous Cytotrophoblast and Extravillous Trophoblast in Early Human Pregnancy. *Placenta* 31; 545-548, 2010.
7. Naruse K, Lash GE, Bulmer JN, Innes BA, Otun HA, Searle RF, Robson SC. The urokinase plasminogen activator (uPA) system in uterine natural killer cells in the placental bed during early pregnancy. *Placenta* 30; 398-404, 2009.
8. Ishii M, Naruse K, Hattori A, Tsujimoto M, Ishiura S, Numaguchi Y, Murohara T, Kobayashi H, Mizutani S. Oxytocin Hypersensitivity in Pregnant P-LAP Deficient Mice. *Life Sci.* 84; 668-672, 2009.

〔学会発表〕（計 16 件）

1. Naruse K, Onogi A, Sado T, Noguchi T, Komeda S, Koyama E, Nishioka K, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Correlation of free fatty acid and adiponectin in hypertensive pregnancy: key molecules for homeostatic inflammatory linkage. 17th World congress of the International Society for the Study of Hypertension (ISSHP). 2010.10.5. Melbourne, Australia
2. Naruse K, Onogi A, Noguchi T, Sado T, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Invasive activities of primary extravillous trophoblast via altered activity in low oxygen condition. XI International Congress of Reproductive Immunology (ICRI). 2010.8.15. Palm Cove Resort, Cairns, Australia
3. Naruse K, Onogi A, Sado T, Shigetomi H, Komeda S, Koyama E, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Adipocyte-derived cytokines alteration for systemic inflammation in hypertensive pregnancy: Studies into maternal serum and adipocyte cell line. 3rd SGI International Summit 2009. November 12, 2009, Sendai, Japan.

4. Onogi A, Naruse K, Shigetomi H, Yoshizawa Y, Noguchi H, Sado T, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Effects of Adiponectin in Differentiation, Invasion and Migration of Human Trophoblastic Cells. 15th World Congress of International Federation of Placenta Association (IFPA). October 6, 2009, Adelaide, Austraria
5. Naruse K, Onogi A, Sado T, Shigetomi H, Yoshida S, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Adipocyte-derived cytokines in hypertensive pregnancy: A trigger for systemic inflammation. European branch of International Society for Study of Hypertension in Pregnancy (ESSHP). September 10, 2009, Oxford, England.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成瀬 勝彦 (KATSUHIKO NARUSE)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70453165