

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791848

研究課題名(和文)動物モデルを用いた妊娠高血圧症候群の重症化の機序解明と治療に関する研究

研究課題名(英文)Characteristic changes of endothelial function in preeclampsia model rat by administration of nitric oxide synthase inhibitor

研究代表者

山本 珠生 (Yamamoto, Tamao)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20405210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤形成不全による高血圧を誘導した妊娠高血圧腎症(preeclampsia; PE)モデル動物を用いて、PEの血管内皮機能障害の機序解明を確立するための研究を目的とした。

妊娠ラットの胎盤形成期に、一酸化窒素(NO)合成酵素阻害薬であるN^G-Nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)を持続投与することにより、PEモデル動物を作成した。このモデル動物では血圧は上昇し、脱落膜内血管へのトロホブラスト侵入不全がおこり、胎盤形成不全、胎仔発育不全を認めた。子宮動脈内皮細胞のNO産生は亢進していたが、細胞内Ca濃度や活性酸素種産生に変化はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Preeclampsia is characterized as an increased peripheral vascular resistance. It is found that administration of the NOS inhibitor L-NAME at early pregnancy developed hypertension in rat similar to preeclampsia. Furthermore, we found action of endothelial nitric oxide (NO) was reduced due to possibly reactive oxygen species (ROS) in preeclamptic women. We investigated whether this administration modulates NO and ROS production in uterine artery endothelial cells at late pregnancy in rat. Blood pressure was higher and birth body weight was smaller in L-NAME-treated rats than in control rats. Trophoblast invasion was reduced in L-NAME-treated rats. ACh-induced endothelial NO production was higher, while endothelial cell ROS production and Ca increase was similar, in L-NAME-treated rats when compared with those in control rats. It is suggested that the increased endothelial NO production in uterine artery seen in L-NAME-treated rats may function to protect the development of hypertension.

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：妊娠高血圧腎症 血管内皮機能障害 一酸化窒素 活性酸素 胎盤形成不全

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症 (preeclampsia) は、高血圧を主症状とする症候群で、脳血管障害 (子癇、脳出血、脳梗塞) や DIC により妊婦死亡に至ることもある。一方、児はしばしば子宮内発育不全を呈し、時に神経学的後障害や児死亡に至る。母体同様、将来の生活習慣病のハイリスク因子ともいわれている。

preeclampsia に関して多くの病因・病態研究がおこなわれてきたが、未だ不明な点が多い。preeclampsia は高血圧を主症状とし、血液凝固異常も発生していることから血管内皮機能障害が病態形成の中心とされている。我々は preclampsia 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 cyclic GMP 生成以降の情報伝達系の down regulation であること、2) 内皮でのプロスタサイクリン産生が低下すること、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。

妊婦血管を得ることは侵襲性が高く、血管内皮機能障害の機序の検討をすすめていくためには動物モデルの作成や NO 測定系の確立が必要と考え、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作成した。NO の測定は、NO が短寿命のラジカル種であり、かつ、その放出がわずかであることから、摘出した血管標本から遊離した NO を測定することは困難である。NO 感受性蛍光色素である diaminofluorescein-2 (DAF-2) を用い、*ex vivo* の条件下で個々の内皮細胞内の経時的な NO 濃度測定を可能とする digital imaging 法を確立した。この方法により、内皮細胞での詳細な NO 産生が観察できるようになった。NTG 連続投与動物では、血圧は変化しないものの、血管内皮の NO 産生減少ならびに血管平滑筋の NO-cyclic GMP 反応の減弱を認めた。この血管内皮機能異常は、血管壁に局在するアンジオテンシン 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を産生するようになる] による活性酸素の発生増加によることも明らかにした。

2. 研究の目的

我々は preclampsia 妊婦の大網抵抗血管を用いて、形態および内皮由来弛緩因子として NO、プロスタサイクリン、膜過分極因子の特性変化の研究を行ってきた。この研究では繰り返し多量の標本の入手が必要であるが、その入手は不可能である。

preeclampsia の病因として、妊娠初期のトロホプラストの母体血管への侵入不全により、母体での血管内皮機能障害が発生するとの仮説が提唱されている。すなわち、子宮胎盤血流が減少した結果、血流を増加させるために血管内皮機能が活性化 (endothelial

cell activation) されるが、代償できないと血管内皮機能障害に至り、母体での血管抵抗の増加や胎児における血液循環障害が発生する。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] がその標的分子とされるが、詳細は明らかではない。

子宮胎盤循環不全を発症した preclampsia モデル動物を作成し、その血管内皮機能の特性変化を解明することを目的とした。胎盤形成期に NO 合成酵素阻害薬である N-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を投与することにより、preeclampsia モデル動物を作成し、子宮動脈の血管内皮における NO 産生や活性酸素種産生を *ex vivo* 下で直接的に測定し、血管内皮機能の検討を行った。

3. 研究の方法

対象は生後 10 週齢の妊娠 Wistar-ST ラットとした。NO 合成酵素阻害薬である N-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を、胎盤形成期である妊娠 8 日から、浸透圧ポンプを用いて皮下持続投与 (60mg/kg/day) を開始した (L-NAME 投与群)。対照群は生理食塩水を投与した (Control 群)。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を用い、Tail cuff 法にて行った。妊娠 20 日に麻酔下に子宮および子宮動脈を摘出した。胎仔体重および胎盤重量を測定した。胎盤標本のサイトケラチン染色を行い、トロホプラストの脱落膜内血管への侵入を観察した。

子宮動脈を長軸方向に切開し、内皮温存標本を作製した。生体内内皮刺激物質であるアセチルコリン (ACh) 投与による内皮細胞内の NO 産生、Ca²⁺濃度の変化、活性酸素種 (ROS) の産生を観察した。標本に NO 蛍光指示薬 (DAF-2 DA)、Ca²⁺蛍光指示薬 (Fura 2-AM)、ROS 蛍光指示薬 (CM-H₂DCFDA) をそれぞれ負荷し fluorescence imaging system を用いて *ex vivo* 条件下で測定した。標本を倒立蛍光顕微鏡下に固定し、ACh 投与による蛍光変化を CCD カメラにて検出し経時的に測定した。記録された画像は解析ソフトにて画像処理を行った。

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

L-NAME 投与群において、収縮期血圧は L-NAME 投与開始後より有意に上昇し、妊娠 15 日に投与を終了した後も収縮期血圧は高値を継続した。

胎盤重量と胎仔体重は L-NAME 投与群で有意に減少しており、胎盤形成不全、子宮内胎児発育不全を認めた。胎盤標本のサイトケラチン染色にて、トロホプラストの脱落膜内血

管への侵入を観察した。Control 群では脱落膜内血管ヘトロボラストが侵入し、血管内腔が拡張していた。一方、L-NAME 投与群では、脱落膜内の血管へのトロボラスト侵入は少なく、内皮細胞が保たれている部位が多く観察され血管内腔の拡張が阻害されていた。

子宮動脈内皮温存標本における内皮細胞の NO 産生を観察した。両群とも ACh 刺激により内皮細胞内蛍光強度が上昇し、NO 産生がみられた。L-NAME 投与群では NO 産生が Control 群より亢進していた。ACh 刺激により Ca^{2+} 濃度は速やかに上昇したが、上昇の程度に両群で差は認められなかった。ACh 刺激により、内皮細胞内の ROS の産生がみられ、L-NAME 投与群と Control 群で差を認めなかった。

胎盤形成期に NO 合成阻害薬である L-NAME を投与したラットでは、脱落膜内血管へのトロボラスト侵入が阻害され、胎盤形成不全を発症し胎仔発育が抑制された。子宮動脈において NO 産生は障害されておらず、むしろ産生が亢進していた。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に差はみられず、活性酸素種産生も差はなかった。これは、 Ca^{2+} /CaM 増加を介した NO 産生制御系とは異なる、 Ca^{2+} 濃度非依存性の PI3K-Akt 系を介した eNOS の活性調節系が関与している可能性が考えられた。L-NAME 投与中止後も高血圧が持続しており、何らかの化学伝達物質が局所で産生された結果、preeclampsia と同様に (NO 産生障害ではなく) NO 機能が低下し、血管トーンスの増加による高血圧が惹起された可能性が考えられた。

このモデルでは NO 産生は減少しておらず、NO 反応性の減少が示唆された。単なる NO 供給薬の投与では、この病態は改善しないと考えられ、改善する方法の一つとして、これまで行った研究で示唆された L-アルギニンと葉酸の投与が有用かもしれない。この研究はきわめて有用であることは間違いないが、妊婦血管を得ることは侵襲性が高く、動物モデルを作成することで、病態の解明だけでなく、予防・治療に発展させていくことが必須であり、長年の研究にも関わらず、そのハードルは高い。このモデル動物の特性変化を同定するのでさえ、そのハンドリングは容易でないのが現状である。本検討において、予防・治療の検討に入るには不十分な状態であり、さらにいくつかの研究課題をのりこえて研究を進める必要がある。

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 13 件)

Kojima R, Matsuura A, Yamamoto T, Watanabe K, Suzuki Y. Characteristic changes in systemic blood pressure in eclampsia. *Hypertens Res Pregnancy*.

(in press) 査読有

Yamamoto T, Matsuura A, Suzuki Y. Characteristic changes in calcium metabolism in preeclamptic women in Japan. *Hypertens Res Pregnancy*. 2013; 1: 108-112. 査読有

<http://dx.doi.org/10.14390/jssh.1.108>

Suzuki Y, Adachi T, Ohno Y, Matsuda H, Naruse K, Metoki H, Nakai Y, Nakamoto O, Watanabe K, Ohkuchi A, Yamamoto T. Committee report on cerebrovascular disorders, including eclampsia and emergency medical services, of the Japan Society for the Study of Hypertension in Pregnancy. *Hypertens Res Pregnancy*. 2013; 1: 8-12. 査読有

<http://dx.doi.org/10.14390/jssh.1.8>

Watanabe K, Suzuki Y, Yamamoto T. Incidence of eclampsia in Japanese women. *Hypertens Res Pregnancy*. 2013; 1: 31-34. 査読有

<http://dx.doi.org/10.14390/jssh.1.31>

Matsuura A, Yamamoto T, Watanabe K, Suzuki Y. Characteristic changes in systemic blood pressure just before the onset of eclampsia. *Hypertens Res Pregnancy*. 2013; 1: 35-39. 査読有

<http://dx.doi.org/10.14390/jssh.1.35>

鈴木佳克, 松浦綾乃, 山本珠生. 子癇の治療. *血圧*. 2013; 20: 40-44. 査読無

鈴木佳克, 松浦綾乃, 山本珠生. 妊娠と高血圧. *日本医師会雑誌*. 2013; 142 特別号(1): S280-S283. 査読無

鈴木佳克, 山本珠生. 妊娠高血圧症候群管理治療ガイドライン. *医学の歩み*. 2013; 241: 1123-1128. 査読無

鈴木佳克, 山本珠生. 妊娠中の血管内皮機能と栄養. *周産期医学*. 2012; 42: 236-239. 査読無

山本珠生. 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. *産科と婦人科*. 2012; 79: 353-355. 査読無

山本珠生, 鈴木佳克. 妊娠高血圧腎症. *日本臨床 腎臓症候群(第 2 版)(下)*. 2012; 18: 784-789. 査読無

鈴木佳克, 山本珠生, 伊藤猛雄. 妊娠高血圧腎症 (PE) における高血圧の発症機序と重症化決定因子. *腎と妊娠*. 2011; 71: 771-775. 査読無

山本珠生, 鈴木佳克. PIH 妊婦の入院管理と分娩時の注意点. *ペリネイタルケア*. 2011; 30: 42-47. 査読無

[学会発表](計 22 件)

Suzuki Y, Yamamoto T. The underlying mechanisms in reduced action of endothelial nitric oxide in resistance artery in preeclampsia. ISSHP European Congress 2013, June 11-14, 2013, Rica Ishavshotel, Tromsø, Norway

Suzuki Y, Yamamoto T. Characteristic changes in endothelial function in uterine artery by administration of no synthase inhibitor during period of placental formation. XVIII ISSHP World Congress, July 9-12, 2012, Geneva, Switzerland

山本珠生, 鈴木佳克, 他. L-NAME 投与による胎盤形成不全発症動物にみられる血管内皮機能異常の研究. 第 34 回日本妊娠高血圧学会, 2013 年 10 月 4 - 5 日, 富山市, 富山国際会議場

〔図書〕(計 2 件)

鈴木佳克, 山本珠生, 他. PIH における降圧薬による管理法:産褥期(授乳期)および中高年に至るまで. 日本妊娠高血圧学会編. 「妊娠と高血圧 内科医・産科医のための薬剤療法マニュアル」金原出版, 2013; 120-125.

鈴木佳克, 山本珠生. 杉村基, 竹田省編. 「産科診療マニュアル」日本医学館, 2013; 217-226.

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