

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592469

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群における胎盤の脂質代謝バランスとその意義の解明

研究課題名(英文) Lipid metabolism in preeclamptic placenta

研究代表者

巽 啓司 (Tatsumi, Keiji)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：10324633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧腎症(Preeclampsia = PE)の発症・進行には、酸化ストレスや炎症が関与する。PEの胎盤では、抗酸化遺伝子群の転写因子Nrf2活性が低下していた。in vitroでは、低酸素環境でNrf2活性は低下するが、statinによりその活性が増加した。Nrf2発現を抑制し酸化ストレスを加えると、抗酸化遺伝子群発現は抑制されたが、statin添加によりそれらの発現は増加した。また、酸化ストレスを加えると活性酸素種(ROS)の増加が認められたが、statinにより減弱した。statinはNrf2を活性化させ、PEに対する治療となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress and inflammation are considered to be deeply involved in preeclampsia.

The activation of Nuclear factor erythroid 2-related factor2(Nrf2), a key transcriptional regulator against oxidative stress, was significantly suppressed in preeclamptic placentas. In vitro, Nrf2 activation was suppressed under hypoxic conditions, but it was augmented by statin. Nrf2 knockdown resulted in insufficient enhancement of antioxidant and cytoprotective genes under oxidative stress. In contrast, the Nrf2 signaling was augmented by statin. Reactive oxygen species(ROS) levels were observed treated with H₂O₂, while statin treatment significantly attenuated the H₂O₂-induced ROS levels. Statin may have a potential therapeutic role for preeclampsia.

研究分野：婦人科学産科学

キーワード：妊娠高血圧腎症 酸化ストレス statin Nrf2

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症(Preeclampsia = PE)は妊娠 20 週以降に生じる高血圧と蛋白尿を主徴とする疾患で、全妊娠の 2-8%に合併する。周産期領域における母体の主要な死亡原因となるほか、胎児にとっても子宮内発育不全や子宮内死亡の原因となりうる。その発症機序として、現在推定されている有力な説は以下のようである。すなわち妊娠初期に絨毛外栄養膜細胞(EVT)の母体血管への浸潤障害に起因する血管リモデリング不良により、絨毛間腔に十分な母体血液が供給されず、胎盤は低酸素環境と酸化ストレスにさらされる。その結果、胎盤から可溶性 VEGF 受容体(sFLT1)や可溶性 TGF- β 受容体(sENG)の分泌が増加するとともに、胎盤増殖因子(PIGF)が減少することが知られ、これらの因子が PE の病態に深く関わっていることが指摘されている(Levine et al.2004)。また実際に sFLT1 や sENG が腎障害など PE 様の症状を引き起こすことが動物実験により確認されている(Maynard et al.2003)。また sFLT1/PIGF 比が PE 発症に先だって上昇することが報告され(Moore et al.2007)、PE 発症予知マーカーとして検討が進められている。

しかしながら、PE の病態はいまだ完全に解明されておらず、またその発症時期や症状重症度にバリエーションが多く、また胎児発育遅延(FGR)を伴うことが多いが、必ずしも必発ではないことから、単一の機序によって発症・増悪するとは想定しがたい。われわれは、PE には多系統の因子が関連し、それらのバランスの破綻が PE の発症や増悪に大きく関係していると考え、PE や FGR の病的な胎内環境における胎盤や卵膜における分子調節機構についての研究を進めてきた。

近年 HMG-CoA reductase inhibitor である pravastatin に関する知見が報告されてきた。pravastatin は高脂血症治療薬であり、sFLT1 過剰発現によって惹起された実験動物の PIH 様症状を改善したことが報告されている(Kumasawa et al. 2011)が、その作用機序の詳細については明らかでない。妊娠中、母体の血中脂質は増加し、生理的な高脂血症状態となるが、PE の母体においては正常妊娠にもまして母体の血中脂質が高値となるほか、動脈硬化の進展に深く関与する酸化 LDL も高値となる。酸化 LDL は血管壁の炎症反応を惹起することにより動脈硬化を促進し、血栓性梗塞に関与していることが知られているが、母体血中には酸化 LDL が存在し PE 症例で増加することが報告されている。また酸化 LDL 受容体 lectin-like oxidized LDL receptor1(LOX-1)は酸化 LDL のスカベンジャー受容体としてその作用を制御している可能性が示唆されている(Sawamura et al.2007)。これまでに、胎盤では血管内皮細胞のみならず絨毛細胞にも発現していることが報告されているが、PE における発現変化は明らかではなく、その生理的役割について

の知見は乏しい。胎盤には LOX-1 や、脂質排出トランスポーター ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)が強く発現しており、ABCA1 を調節する転写因子 Liver X Receptor(LXR)も存在している。そこで、われわれは、妊娠中の脂質代謝、特に酸化 LDL と LOX-1 および ABCA1 に注目した。

PE の胎盤では抗酸化ストレス遺伝子である heme oxygenase1(HO-1)が低下している。しかし、その機序は不明であり、HO-1 を含む抗酸化遺伝子群の発現を統一的に制御している重要な転写因子 nuclear factor erythroid 2-related factor2(Nrf2)の、胎盤、特に PE の胎盤における Nrf2 活性化を検討した研究はほとんどなかった。しかしながら、胎盤における脂質代謝バランスは PE の病態の指標となり、それを制御することが PE の治療法となりうる考えた。胎盤における LOX-1 の減少と Nrf2 の低活性化は PE に寄与する(Chigusa Y, et al. 2012)ことは以前に報告した。

2. 研究の目的

PE の胎盤における Nrf2 シグナルの機能障害の根拠となるメカニズムを解明すること、PE に対する statin の潜在的な治療的役割を模索することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト絨毛細胞癌株である JAR 細胞を用いて、JAR 細胞および胎盤組織培養系において Nrf2/HO-1 pathway が機能することを、Nrf2 活性化剤 (DEM) を用いて確認した。

JAR 細胞に酸化 LDL を添加し、Nrf2 の活性化、HO-1、LOX-1、ABCA1、LXR の発現変化を検討した。

JAR 細胞に LOX-1 阻害抗体を前処置したのちに酸化 LDL を添加し、HO-1、ABCA1 の発現変化を検討した。

また JAR 細胞を 1%酸素下で 24 時間組織培養し、低酸素に対する Nrf2 活性の発現変化を検討した。

siRNA を用いて、Nrf2 を knock down した。Nrf2 における酸化ストレス(H₂O₂ 100 μ M)と HMG-CoA 還元酵素阻害剤である simvastatin(50 μ M)の影響とその標的遺伝子発現を、RT-PCR および Western blotting にて検討した。

ヒト不死化絨毛細胞株(TCL-1)に H₂O₂(100 μ M) \pm simvastatin(50 μ M)を添加し、活性酸素種(ROS)レベルを flow cytometry にて検討した。

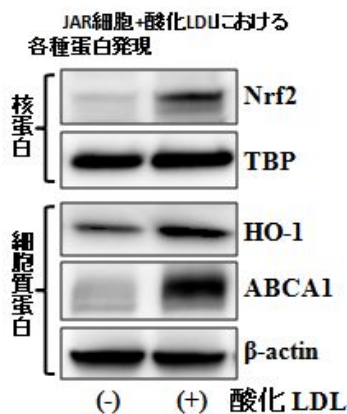
4. 研究成果

JAR 細胞および胎盤組織培養系において DEM を添加すると、Nrf2 の活性化(核内集積)および下流遺伝子 HO-1 の発現増強がみられ、

絨毛細胞においても Nrf2/HO-1 pathway が正常に機能することが確認された。

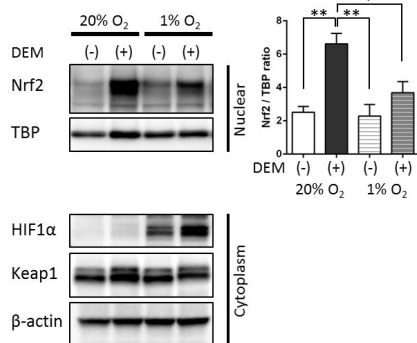
JAR 細胞に酸化 LDL を添加すると、Nrf2 の活性化（核内集積）および HO-1 の発現増強がみられた。また酸化 LDL は ABCA1、LXR の発現を増強させた。（Figure1）

Figure1



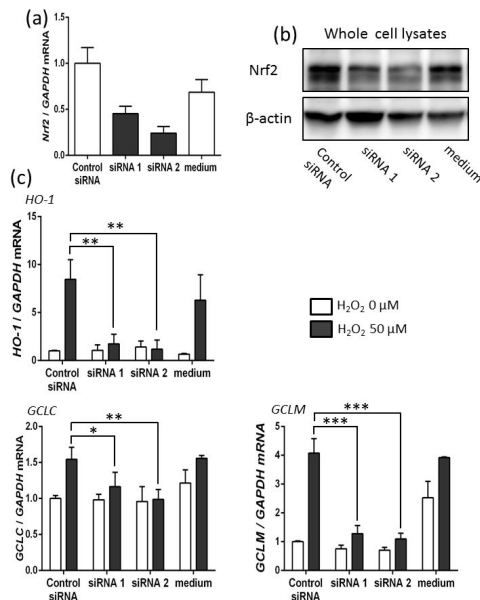
JAR 細胞に Nrf2 活性化剤である DEM を添加すると、Nrf2 の活性化（核内集積）が増加した。この Nrf2 活性は低酸素環境下で明らかに抑制されていた。また HIF1 α 蛋白は、低酸素環境により明らかに増加していた。細胞質蛋白である Keap1 蛋白(Nrf2 抑制性因子)は、低酸素や DEM によって影響を受けなかった。（Figure2）

Figure2



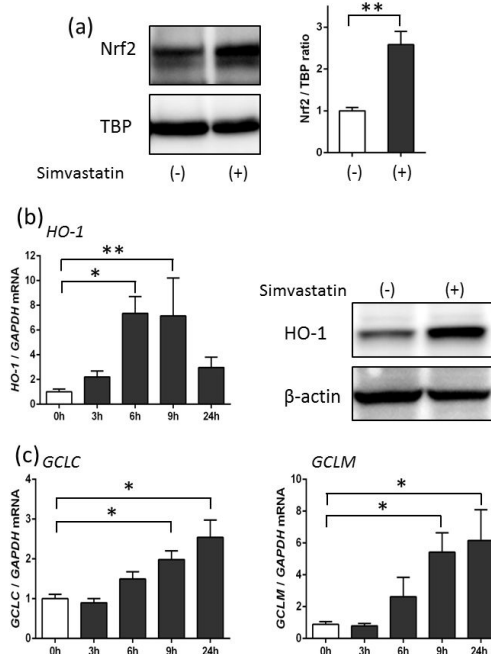
JAR 細胞において、2 種類の siRNA によってそれぞれ Nrf2 は knock down された。Preeclampsia では酸化ストレスが増加するとされている。JAR 細胞に siRNA を添加した 24 時間後に、H₂O₂(50 μ M)を添加しその 6 時間後の発現をみると、H₂O₂ を添加しない群と比較し、抗酸化ストレス遺伝子である HO-1、GCLC、GCLM の発現が増加したが、Nrf2 の siRNA はこれらの mRNA 発現を明らかに抑制した。（Figure3）

Figure3



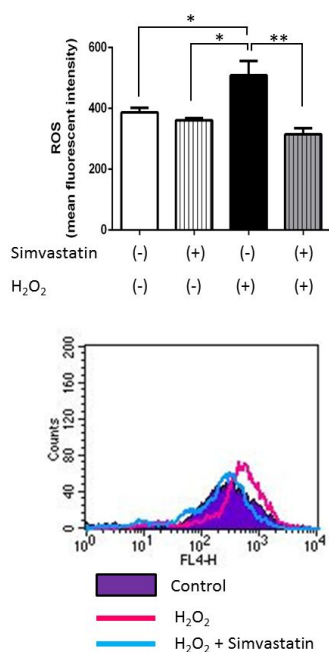
JAR 細胞に simvastatin(50 μ M)を添加すると、6 時間後に Nrf2 活性が亢進した。また、simvastatin は添加後 6-9 時間後に、明らかに HO-1 の mRNA 発現を増強し、蛋白レベルでも添加後 6 時間後に増加を認めた。さらに、simvastatin は時間依存性に GCLC、GCLM の mRNA 発現を明らかに増加させた。（Figure4）

Figure4



JAR 細胞において、細胞毒性のない濃度の H₂O₂ では ROS の増加は認められなかったが、TCL-1 細胞において、H₂O₂ で ROS レベルの増加が認められ、simvastatin によって減弱した。（Figure5）

Figure5



これらの結果から、以下のことが示唆された。
Nrf2 活性抑制する因子に関しては、今日までほとんど知られていないが、低酸素は Nrf2 活性の重要な抑制性制御因子の 1 つである。
simvastatin は絨毛細胞において、Nrf2 シグナルの活性を通して酸化ストレスを阻害し、preeclampsia に対する statin の潜在的な治療的役割を担う。

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 2 件)

Chigusa Y, Tatsumi K, Kondoh E, Fujita K, Nishimura F, Mogami H, Konishi I
Decreased lectin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1) and low Nrf2 activation in placenta are involved in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97: E1862-70
DOI: 10.1210/jc.2012-1268

Chigusa Y, Kondoh E, Mogami H, Nishimura F, Ujita M, Kawasaki K, Fujita K, Tatsumi K, Konishi I
ATP-binding cassette transporter A1 expression is decreased in preeclamptic placentas. *Reprod Sci.* 2013;20:891-8
DOI: 10.1177/1933719112468956

[学会発表](計 4 件)

千草 義継、巽 啓司、西村 史朋、
藤田 浩平、最上 晴太、近藤 英治、
小西 郁生

Preeclampsia の胎盤では、転写因子 Nrf2(NF-E2-related factor2)の活性が低下している

第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会
2012 年 4 月 13 日 ~ 15 日、兵庫県神戸市

Chigusa Yoshitsugu

Disruption of Nrf2 signaling due to decreased expression of lectin-like oxidized LDL receptor 1(LOX1) is involved in preeclampsia

18th International federation of Placenta Associations Meeting

2012 年 9 月 18 日 ~ 21 日、広島県広島市

Yoshitsugu Chigusa ,Eiji Kondoh ,Haruta Mogami ,Fumitomo Nishimura ,Mari Ujita , Kaoru Kawasaki , Kohei Fujita , Keiji Tatsumi , Ikuo Konishi

ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression is decreased in preeclamptic placentas

第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会
2013 年 5 月 10 日 ~ 12 日、北海道札幌市

千草義継, 近藤英治, 最上晴太, 川崎薫,
清川晶, 宇治田麻里, 西村史朋, 藤田浩平,
小西郁生

Statin は絨毛細胞における酸化ストレス防御機構(Nrf2 system)を活性化させる

第 21 回日本胎盤学会学術集会
2013 年 10 月 25 日 ~ 26 日、愛知県名古屋市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

巽 啓司
研究者番号: 10324633

(2)研究分担者

近藤 英治
研究者番号: 10544950
小西 郁生
研究者番号: 90192062