

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592486

研究課題名(和文) 妊娠高血圧腎症胎盤における血管増殖因子および低酸素応答分子の発現

研究課題名(英文) Expression of vascular growth factor and hypoxia responsive factor in preeclampsia placenta

研究代表者

山本 樹生 (YAMAMOTO, Tatsuo)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40167721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧腎症(PE)の病態解明を目的として、PE胎盤におけるPIGF、sFlt-1、MTF-1、HO-1、HIF-1 mRNAの関係を検討するとともに、胎盤絨毛へのPE血清のこれらの因子に関する影響を検討した。PE胎盤ではPIGF mRNAの発現が低下し、sFlt-1 mRNAの発現が増加する。PIGF mRNA発現低下機序として、血清因子、MTF-1、HO-1 mRNAの発現低下が、sFlt-1 mRNA発現増加機序としてPE血清関連した。PEにおけるPIGF、sFlt-1 mRNA発現の変化は、胎盤の低酸素環境のみならず、血清因子も関与することが判明した。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate pathophysiology in preeclampsia, we studied the effect of preeclampsia sera on their expression from trophoblast derived cells and the expression of PIGF, sFlt-1, MTF-1, HO-1 and HIF-1 mRNAs in placenta taken from preeclampsia. The changes of PIGF mRNA in preeclampsia placenta may relate to serum factor and the expression of MTF-1 and HIF-1 mRNA. The changes of sFlt-1 mRNA may relate to serum factor and the expression of HIF-1 mRNA. We suggested that not only hypoxia but also serum factor may play a role in the levels of PIGF and sFlt-1 in preeclampsia placenta.

研究分野：産婦人科

キーワード：PIGF VEGF sFlt-1 HIF-1α MTF-1 HO-1 sEndoglin AT1-AA

1. 研究開始当初の背景

Placenta growth factor (PlGF)はVascular endothelial growth factor (VEGF)ファミリーに属する増殖因子で、絨毛で産生される絨毛増殖を促す因子である。soluble fms-like tyrosine kinase-1(sFlt-1)は VEGF や PlGF の流血中に存在する soluble receptor であり VEGF, PlGF の作用をブロックする蛋白である。¹ soluble Endoglin (sEng)は TGF- β による eNOS(endothelial Nitric Oxide Synthase)の活性化を阻害し血管収縮を起こす。²

妊娠高血圧腎症(preeclampsia;PE)では、末梢血中の sFlt-1 および sEng の上昇、PlGF の低下が報告されている。¹ PE では、胎盤床での絨毛細胞の脱落膜および子宮胎盤血管であるらせん動脈への浸潤が阻害されている。これより胎盤の血液循環が障害され、胎盤および絨毛間腔が慢性的な虚血・低酸素状態になると考えられている。³ 近年、低酸素状態に応答する分子として、Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)、Metal-responsive transcription factor (MTF-1)および Heme Oxygenase-1 (HO-1)などの報告がある。PE では HIF-1 の発現亢進が報告されている。⁴

2. 研究の目的

PE の病態解明を目的として、胎盤における PlGF、sFlt-1、MTF-1、HO-1、HIF-1 mRNA の関係を検討するとともに、胎盤絨毛の代用として絨毛癌細胞 (JEG-3 細胞)を用いて、PE 患者より血清を採取して、血清のこれらの因子に関する影響を検討し、胎盤における PlGF および sFlt-1 mRNA の発現に及ぼす低酸素応答分子および PE 血清との関係を検討した。

3. 研究の方法

(1)正常妊婦(NP)と PE 患者より一般採血時に血清を採取した。また、胎盤は、分娩時、帝王切開時に娩出された検体より一部を採取した。

(2)NP と PE 患者胎盤における PlGF、sFlt-1、HIF-1、MTF-1、HO-1 mRNA 発現の測定を quantitative real-time PCR 法により行い検討した。

(3)絨毛癌由来細胞株(JEG-3)を 6 穴プレートにて培養し、コンフルエントとなった JEG-3 細胞に、NP および PE 患者血清を添加培養後に細胞を採取し total RNA を抽出した。これより JEG-3 細胞の各因子 mRNA 発現に対する PE 血清の影響を検討した。

(4)sFlt-1 の発現に関しては妊娠初期絨毛培養系についても検討した。

(5)PE 患者 IgG または正常妊婦 IgG を妊娠初期絨毛細胞に加え 24 時間培養、培養後上清を採取するとともに細胞を採取した。上清中の sFlt-1 および soluble Endoglin (sEng)濃度を ELISA にて、細胞より RNA を分離、real-time PCR 法にて sFlt-1 mRNA および sEng mRNA 発現を測定した。また、AT1-receptor antagonist である losartan を用いて AT1-AA の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1)実験結果

胎盤からの PlGF mRNA の発現量は PE 群で有意な低下を、sFlt-1 mRNA の発現量は有意な増加を示した。また、MTF-1 mRNA、HO-1 mRNA の発現は PE 群で有意な低下を認めた。胎盤における PlGF mRNA と MTF-1 mRNA、sFlt-1 mRNA と HIF-1 mRNA の発現量は相関を認めた。

PE 患者血清添加により JEG-3 細胞の sFlt-1 mRNA の有意な発現増加、PlGF および HO-1 mRNA の有意な発現低下を認めた。また、sFlt-1 の発現に関しては妊娠初期絨毛培養系においても sFlt-1 の発現増強を認めた。

NP 患者 IgG に比し PE 患者血清 IgG 分画は妊娠初期絨毛細胞よりの sFlt-1 および sEng の蛋白産生、sFlt-1 および soluble Endoglin (sEng) mRNA 発現を有意に増加させた。losartan により PE 患者 IgG による sFlt-1 および sEng の増加は抑制された。

(2) 結論

PEの胎盤ではPIGF mRNAの発現が低下し、sFlt-1 mRNAの発現が増加する。PIGF mRNAの発現が低下する機序として、血清因子、MTF-1、HO-1 mRNAの発現低下が推察される。一方で、sFlt-1 mRNAの発現が増加する機序としては、PE血清が、sFlt-1 mRNA発現の増加を起こしている可能性がある。PEにおけるPIGF、sFlt-1 mRNA発現の変化は、胎盤の低酸素環境のみならず、血清因子も関与することが判明した。血清因子としてIgGを考えPE血清より抽出したIgGを絨毛培養系に添加しsFlt-1およびsEng産生を検討した。IgGの添加によりsFlt-1およびsEngの産生増加が認められIgG分画もsFlt-1およびsEng産生に関与することが判明した。血清因子として考えられるものにアンジオテンシン IIレセプターに対する自己抗体 (AT-1 AA)が候補として考えられる。AT-1 AAと絨毛細胞よりの sFlt-1およびsEng発現に対する影響を検討した。その結果AT-1 AAもsFlt-1およびsEng発現に関与することが判明した。

<引用文献>

Maynard SE, Min JY, Merchan J et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1(sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 2003; 111: 649-658.

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA, CPEP Study Group: Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006; 355: 992-1005.

Redman CW, Roberts JM. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1993 Aug 21; 342: 504.

Manalo DJ, Roman A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, 2005; 105: 659-669.

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 4 件)

Kobayashi Y, Yamamoto T, Chishima F, Takahashi H, Suzuki M. Autoantibodies Isolated from Patients with Preeclampsia Induce Soluble Endoglin Production from Trophoblast Cells Via Interactions with Angiotensin II Type 1 Receptor. *Am J Reprod Immunol*. 2015 Apr; 73(4): 285-91. doi: 10.1111/aji.12340. Epub 2014 Nov 7. 査読 有

小林祐介、新屋芳里、中山琢生、高橋英幹、山本樹生

AT1-AA と妊娠高血圧症候群

周産期医学 44(11)1445-1449, 2014 査読 無

Maebayashi Asanuma A, Yamamoto T, Azuma H, Kato E, Yamamoto N, Murase T, Chishima F, Suzuki M. Expression of placenta growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase-1, metal-responsive transcription factor-1, heme oxygenase 1 and hypoxia inducible factor-1 mRNAs in pre-eclampsia placenta and the effect of pre-eclampsia sera on their expression of choriocarcinoma cells. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014 Oct; 40(10): 2095-103. doi: 10.1111/jog.12462. Epub 2014 Aug 11. 査読 有

Tatsuo Yamamoto, Fumihisa Chishima, Masahiko Matsuura. Prediction of preeclampsia using angiogenic and antiangiogenic factors

Hypertension Research in Pregnancy
1:66-70,2013 査読 有

〔学会発表〕(計 7 件)

小林祐介、新屋芳里、中山琢生、高橋英幹、
久野宗一郎、村瀬隆之、千島史尚、山本樹生
AT₁-AA の妊娠初期絨毛細胞よりの soluble
Endoglin 産生におけるサイトカインの関与
第 6 7 回日本産科婦人科学会総会 2015 年
04 月 10 日～ 2015 年 04 月 12 日 パシフィ
コ横浜 神奈川県 横浜市

前林亜紀、新屋芳里、中山琢生、高橋英幹、
東 裕福、久野宗一郎、千島史尚、山本樹生
妊娠高血圧腎症における sFlt-1 の発現に影
響を与える因子の解析

第 6 7 回日本産科婦人科学会総会 2015 年
04 月 10 日～ 2015 年 04 月 12 日 パシフィ
コ横浜 神奈川県 横浜市

新屋芳里 小林祐介 高橋英幹 中村
晃和 佐々木重胤 松浦眞彦 山本樹生
妊娠高血圧症候群における重症化、児の予後
の推定のための sFlt-1、 PlGF および sFl
t-1/PlGF 比の可能性について

第 6 6 回日本産科婦人科学会総会 2014 年
04 月 18 日～ 2014 年 04 月 20 日 東京国際
フォーラム 東京都 千代田区

小林祐介、新屋芳里、中山琢生、高橋英幹、
久野宗一郎、村瀬隆之、千島史尚、山本樹生
AT₁-AA の妊娠初期絨毛細胞よりの soluble
Endoglin 産生におけるサイトカインの関与
第 6 6 回日本産科婦人科学会総会 2014 年
04 月 18 日～ 2014 年 04 月 20 日 東京国際
フォーラム 東京都 千代田区

小林祐介、東裕福、仲尾岳大、中村晃和、
久野宗一郎、村瀬隆之、千島史尚、山本樹生
妊娠高血圧腎症患者血清中 IgG の妊娠初期
絨毛細胞よりの soluble Endoglin 産生に対
する影響

第 6 5 回日本産科婦人科学会総会 2013 年
05 月 10 日～ 2013 年 05 月 12 日 ロイトン
札幌 北海道 札幌市

小林祐介、仲尾岳大、東裕福、中村晃和、
市川 剛、久野宗一郎、村瀬隆之、千島史尚、
山本樹生

妊娠高血圧腎症患者血清中 IgG の妊娠初期
絨毛細胞よりの soluble Endoglin 産生に対
する影響

第 2 8 回日本生殖免疫学会 2013 年 11 月
30 日～ 2013 年 12 月 01 日 兵庫医科大学
平成記念会館 兵庫県 西宮市

Aki. Maebayashi , T. Yamamoto, H. Azuma,
E. Kato , S. Kuno, T. Murase , F. Chishima
EXPRESSION OF PLGF, SFLT-1, MTF-1, HO-1 AND
HIF-1 ALPHA MRNAS IN PREECLAMPSIA PLACENTA
AND EFFECT OF PREECLAMPSIA SERA ON THEIR
EXPRESSION OF CHORIOCARCINOMA CELLS, 18th
world congress of International society
for the study of hypertension in pregnancy
(ISSHP), CICG Geneva Switzerland, july
9-13, 2012

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
山本 樹生 (YAMAMOTO, Tatsuo)
日本大学・医学部・教授

研究者番号：40167721

(2)研究分担者

千島 史尚 (CHISHIMA, Fumihisa)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：50277414

久野 宗一郎 (KUNO, Souichiro)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：30350002

市川 剛 (ICHIKAWA, Go)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：80599994