

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462555

研究課題名(和文) ナノマテリアルを用いた胎盤形成異常モデルの確立をめざして

研究課題名(英文) To establish a model of placental dysplasia using nanomaterials

研究代表者

味村 和哉 (Mimura, Kazuya)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50437422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、胎盤形成およびそれに基づく病態発生に注目し、妊娠高血圧症候群(PIH)や子宮内胎児発育不全(FGR)、早産に与える影響を検討した。in vitroにおける検討として、ナノマテリアルが与える酸化ストレスや、遊走・浸潤能などに与える影響を調べた。in vivoにおける検討として、妊娠マウスにナノマテリアルを投与し胎盤低形成モデルを作成、PIHやFGRの発症について検討した。また、早産モデルとしてプロゲステロンやナノマテリアルである水酸化フラーレンがウレアプラズマ起因のTLR2依存的炎症反応を抑制、マウスでの早産予防効果も期待している。

研究成果の概要(英文)：We focused on pathogenesis in placental formation, studying the effect on pregnancy-induced hypertension (PIH) and fetal growth restriction (FGR) and preterm birth. We examined oxidative stress by nanomaterials, and the effects on migration and invasion as an in vitro study. As an in vivo study, we created a hypoplastic placental model by administering nanomaterials into pregnant mice, and examined the onset of PIH and FGR. In addition, as preterm birth model progesterone and nanomaterial hydroxide Fullerene suppressed the inflammatory reaction caused by ureaplasma TLR2 dependent system. We expected effective treatment for preterm birth in mice.

研究分野：妊娠高血圧症候群

キーワード：胎盤形成 ナノマテリアル 酸化ストレス 妊娠高血圧症候群

1. 研究開始当初の背景

周産期医療の進歩によって母体救急、早産児・低出生体重児の救命率や予後は飛躍的に改善したが、一方で母体や新生児に重大な合併症や死亡を引き起こす妊娠高血圧症候群 (PIH)・子宮内胎児発育不全 (FGR) はいまだ予防・予測法が確立していない。これらは共通して胎盤に起因する病態であり、互いにオーバーラップするところも多い。これまで胎盤形成における主な研究は PIH で行われてきた。PIH の正確な原因は依然不明であるが、その発生起序には胎盤の形成が大きく関与していると考えられている。その病態は二段階に進行し two-stage theory と呼ばれる。正常な胎盤発生では、栄養膜細胞 (トロホプラスト) は母体のらせん動脈に侵入し、動脈壁のリモデリングを促進するが、PIH 発生の第一段階では、その侵入は阻害され動脈のリモデリングは不十分となり、子宮胎盤循環の容量は非常に小さくなる。これは poor placentation と呼ばれ (Science 2005; 308:1592)、胎盤は低酸素・酸化ストレス環境下にさらされる。これは妊娠 20 週以前、臨床的兆候が出現する前に確立される。その結果、第二段階では低酸素環境となった胎盤から、全身性の内皮障害を引き起こす可溶性 fms 様チロシンキナーゼ 1 (sFlt1) などの抗血管新生因子が放出される。sFlt1 は VEGF や胎盤成長因子 (PlGF) などの前血管新生分子に拮抗する。循環中の血管新生因子と抗血管新生因子のアンバランスが血管内皮障害や母体の PIH 症状をひき起こす。これまで我々は、ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) に sFlt1 を投与すると遊走能、管腔形成能といった血管新生を低下させ、PIH の母体血管内皮モデルとして再現できることを報告してきた (Am J Obstet Gynecol. 2010;202:464.e1-6. Reprod Sci. 2010;17:556-63)。

2. 研究の目的

今回我々はこの胎盤に対する低酸素・酸化ストレスを与える物質として、これまで臓器障害性・凝固異常・酸化ストレス・炎症作用などが示唆されているナノマテリアルに注目している。ナノシリカなど様々なナノマテリアルがすでに化粧品・食品・医薬品に実用化されており、生殖世代においてもその暴露は避けられない。これまでの共同研究において、妊娠 16-17 日目の BALB/c マウス尾静脈にナノシリカ (70、300、1000nm) を投与し、18 日目に帝王切開を行い、胎盤の組織学的変化・細胞障害性について調べたところ、100nm 未満の粒子でのみ胎盤の形態異常、流産、FGR を惹起した (Nat Nanotechnol. 2011;6:321)。

今回、in vitro / in vivo における検討において、ナノマテリアルを用いることで、低酸素・酸化ストレス環境下における胎盤低形成モデルを再現することを目的とする。さらに DNA マイクロアレイ法によって遺伝子発現の差異を網羅的に解析し、胎盤形成の違いが

もたらす母児の予後について長期的に解析する。我々はこの研究が、PIH・FGR を惹起する胎盤形成異常の発症メカニズム、および低酸素・酸化ストレス環境下胎盤が母児の予後に与える影響などの解明に貢献できることを期待している。

3. 研究の方法

in vitro における検討では、BeWo 細胞およびマウス胎盤のトロホプラストを用いて、ナノマテリアルが与える酸化ストレスの影響や、遊走 / 侵入 (invasion/migration) および動脈への置換 (replacement) に与える影響を検討する。

in vivo における検討では、ナノマテリアルを妊娠マウスに投与し、低酸素・酸化ストレス環境下における胎盤形成モデルを作成し、母児に与える影響を解析する。

DNA マイクロアレイ法によって胎盤形成異常に影響する遺伝子発現の差異を網羅的に解析するとともに、胎仔に与える長期的影響を検討する。

4. 研究成果

胎盤形成およびそれに基づく病態発生に注目し、妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育不全、早産に与える影響を検討している。これまで我々は、ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) に sFlt1 を投与すると遊走能、管腔形成能といった血管新生を低下させ、PIH の母体血管内皮モデルとして再現できることを報告してきた (Am J Obstet Gynecol. 2010;202:464.e1-6. Reprod Sci. 2010;17:556-63)。さらに胎盤に対する低酸素・酸化ストレスを与える物質として、ナノマテリアルに注目し、妊娠 16-17 日目の BALB/c マウス尾静脈にナノシリカ (70、300、1000nm) を投与し、18 日目に帝王切開を行い、胎盤の組織学的変化・細胞障害性について調べたところ、100nm 未満の粒子でのみ胎盤の形態異常、流産を惹起した (Nat Nanotechnol. 2011;6:321)。我々はまず in vitro における検討として、HTR-8/SV neo 細胞やマウス胎盤のトロホプラスト初代培養系を用いて、ナノマテリアルが与える酸化ストレスや、遊走・浸潤能などに与える影響を調べた。また in vivo における検討として、妊娠マウスにナノマテリアルを投与し、胎盤を低酸素・酸化ストレス環境下におくことで胎盤低形成モデルを作成、PIH や FGR の発症について検討した。

また我々はウレアプラズマ属細菌の外膜タンパク MBA (multiple banded antigen) は TLR2 (toll like receptor) 依存的に炎症を惹起することを報告した (J Reprod Immunol. 2013;100:118-27)。今回 HeLa 細胞、293T 細胞を用いてプロゲステロンやナノマテリアルである水酸化フラーレンが TLR2 依存的炎症反応を抑制することを見出した。またマウス腹腔マクロファージを MBA の合成ペプチド (UPM-1) または TLR4 リガンドである LPS で刺

激し TLR2、TLR4 依存的炎症性サイトカインの発現について検討した。マウスにチオグリコレートを腹腔投与し腹腔マクロファージを回収、プロゲステロンや水酸化フラレーンを添加し UPM-1、または LPS で刺激後、IL-6、TNF- α 、IL-1 の発現量を評価したところ、プロゲステロンと水酸化フラレーン併用群でより炎症抑制効果を認めた。

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 13 件)

Normalisation of angiogenic imbalance after intra-uterine transfusion for mirror syndrome caused by parvovirus B19. Goa S, Mimura K, Kakigano A, Tomimatsu T, Kinugasa-Taniguchi Y, Endo M, Kanagawa T, Kimura T. Fetal Diagn Ther. 34:176-179, 2013.

Disease flare-ups and obstetric outcomes in pregnant women with systemic lupus erythematosus. Takahashi K, Mimura K, Kanagawa T, Kinugasa-Taniguchi Y, Endo M, Matsuzaki S, Kumasawa K, Hashimoto K, Tomimatsu T, Kimura T. Hypertens Res Pregnancy. 2:1-5,2013.

Imbalance of angiogenic factors and avascular edematous cystic villi in a trisomy 13 pregnancy: a case report. Kakigano A, Mimura K, Kanagawa T, Nakayama M, Kanayama T, Fujita S, Kinugasa-Taniguchi Y, Endo M, Tomimatsu T, Kimura T. Placenta. 34:628-630, 2013.

Three-dimensional sonography in the differential diagnosis of interstitial, angular, and intrauterine pregnancies in a septate uterus. Tanaka Y, Mimura K, Kanagawa T, Kajimoto E, Takahashi K, Kakigano A, Fujita S, Kinugasa-Taniguchi Y, Endo M, Kimura T. J Ultrasound Med. ,33:2031-2035,2014.

Placenta percreta with a vaginal fistula after successful management by uterine transverse fundal incision and subsequent cesarean hysterectomy. Satoko M, S Matsuzaki, Ueda Y, Egawa-Takata T, Mimura K, Kanagawa T, Morii E, Kimura T. Obstet Gynecol Sci. 57:397-400,2014

Interstitial pregnancy resulting in a viable infant coexistent with massive perivillous fibrin deposition: a case report and literature review. Tanaka Y, Mimura

K, Kanagawa T, Nakayama M, Matsuzaki S, Kinugasa-Taniguchi Y, Endo M, Kimura T. AJP Rep. 4:29-32, 2014.

Abnormal pressure-wave reflection in pregnant women with chronic hypertension: association with maternal and fetal outcomes. Tomimatsu T, Fujime M, Kanayama T, Mimura K, Koyama S, Kanagawa T, Endo M, Shimoya K, Kimura T. Hypertens Res. 37:989-92, 2014.

A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia in the presence of both anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibody: clinical and serological analysis of the subsequent pregnancy. Kiyokawa T, Koh Y, Mimura K, Nakayama K, Hosokawa M, Sakuragi M, Morikawa T, Nakao M, Aochi H, Fukumori Y, Kanagawa T, Nagamine K, Kimura T, Tomiyama Y. Int J Hematol. 100:398-401, 2014.

Thrombocytopenia associated with Mycoplasma pneumonia during pregnancy: Case presentation and approach for differential diagnosis. Nishikawa A, Mimura K, Kanagawa T, Maeda T, Tomimatsu T, Kimura T. J Obstet Gynaecol Res. 41: 1273-1277, 2015.

Hydroxylated fullerene: a potential antiinflammatory and antioxidant agent for preventing mouse preterm birth. Wakimoto T, Uchida K, Mimura K, Kanagawa T, Mehandjiev T. R, Aoshima H, Kokubo K, Mitsuda N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Kimura T, Yanagihara I. Am J Obstet Gynecol. 213(5):708.e1-9. 2015.

Severe micrognathia with 21 trisomy assessed prenatally by performing three-dimensional computed tomography. Shigeta N, Kanagawa T, Mimura K, Kimura T. Congenit Anom (Kyoto). 55(4):183-5. 2015.

Drug repositioning for preeclampsia therapeutics by in vitro screening: phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil restores endothelial dysfunction via induction of placental growth factor. Kakigano A, Tomimatsu T, Mimura K, Kanayama T, Fujita S, Minato K, Kumasawa K, Taniguchi Y, Kanagawa T, Endo M, Ishihara T, Namba T, Mizushima T, Kimura T. Reprod Sci. 22(10):1272-80. 2015

Pregnancy management for a patient with graft occlusion after right iliac artery bypass surgery.

Nakae R, Matsuzaki S,
Egawa-Takata T, Mimura K, Kanagawa
I, Kimura T. J Obstet Gynaecol Res.
41:979-984. 2015.

〔学会発表〕(計 7件)

当院における Term で分娩になった胎
児発育不全症例の転帰. 味村和哉、
金川武司、金山智子、藤田聡子、谷口
友基子、遠藤誠之、川村菜都美、
柿ヶ野藍子、木村正. 第 86 回日本超
音波医学会. 5.24-26/'13.大阪

培養細胞を用いた TLR2 を介する NF-
kB 転写活性に対するプロゲステロン、
フラレノの抑制効果. 脇本哲、
味村和哉、内田薫、金川武司、木村正、
柳原格. 第 49 回日本周産期・新生児
医学会. 7.14-16/'13.横浜

母体血清中の angiogenic imbalance
と胎盤の avascular edematous
cystic villi を認めたトリソミー13 合
併妊娠. 柿ヶ野藍子、味村和哉、金川
武司、中山雅弘、金山智子、藤田聡子、
谷口友基子、遠藤誠之、富松拓治、
木村正. 第 49 回日本周産期・新生児
医学会. 7.14-16/'13.横浜

ステロイド服用妊婦の分娩時ステロ
イドカバーについての検討. 小和貴雄、
味村和哉、瀧内剛、柿ヶ野藍子、高田
友美、松崎慎哉、熊澤恵一、金川武司、
木村正. 第 67 回日本産科婦人科学会
4.9-12/'15 横浜

徴候発現順序が妊娠高血圧症候群罹
患母児における予後に与える影響：多
施設後方視的解析. 梶本恵津子、
味村和哉、高岡幸、山下美智子、橘陽
介、脇本哲、奥野健太郎、林周作、福
井温、遠藤誠之、金川武司、木村正.
第 67 回日本産科婦人科学会
4.9-12/'15 横浜

Mimura K, Tomimatsu T, Kimura T.
A Possible Therapeutic Role of
Nicotine for Preeclampsia.
The XIX World Congress for the Study
of Hypertension in Pregnancy.
10.26-29/ ' 14 New Orleans, USA.

Mimura, K.
Possible therapeutics for
preeclampsia: Drug repositioning by
In Vitro screening via induction of
placental growth factor.
ISSHP European Congress.
9.24-26/ ' 15 Budapest, Hungary.

味村 和哉 (MIMURA KAZUYA)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50437422

(2)研究分担者

金川 武司 (KANAGAWA TAKESHI)
大阪大学・医学系研究科・招へい准教授
研究者番号：40346218

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者