

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10682

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群の病態悪化に関わる脂肪組織の影響～新規培養法を用いた証明

研究課題名(英文) Involvement of adipose tissue in hypertensive disorders of pregnancy

研究代表者

赤坂 珠理晃 (AKASAKA, Juria)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90526724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：新規培養法として99.5%培地含有ゲルを用いて脂肪組織の浮遊を防ぐ三次元培養を行った。皮下脂肪に比して内臓脂肪組織培養では炎症に関連する液性因子が上昇した。内臓脂肪組織培養では妊娠高血圧腎症患者血清を添加するとTNF $\alpha$ 、IL-6、CRP、FFAなどの炎症に関連する液性因子が上昇し、細胞障害性マーカーのLDHは低下していた。培養後の脂肪組織のmRNAを抽出し定量RT-PCRを行ったところ生体に対し不利に働く遺伝子と同時に生体に対して有利に働く遺伝子も上昇を認めた。妊婦において皮下脂肪と内臓脂肪の働きが異なることが確認された。脂肪組織が生体において防御機能を有することが判明した。

研究成果の概要(英文)： We performed new culture method that is three-dimensional culture, using hydropeptide gel containing 99.5% of culture medium to prevent for floating of the fat. In visceral adipose tissue culture, humoral factor related to inflammation rose more in comparison with subcutaneous adipose tissue culture. In addition preeclampsia patient serum to visceral adipose tissue culture, humoral factor related to inflammation such as TNF $\alpha$ , IL-6, CRP and FFA rose, but LDH which is cytotoxic marker decreased. Genes in total mRNA extracted from adipose tissue after culture were analyzed with quantitative RT-PCR. The gene which acted for the living body disadvantageously rose, at the same time the gene which acted for the living body profitably rose. It was confirmed that in a pregnant woman function of visceral adipose tissue is different from subcutaneous adipose tissue. Adipose tissue play a defensive role for living body.

研究分野：産婦人科

キーワード：妊娠高血圧症候群 脂肪組織 組織培養 炎症 三次元培養

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群の転帰には脳出血・腎不全・常位胎盤早期剥離・子宮内胎児発育遅延などがあり、母体・胎児に生命学的・神経学的予後不良となる症例が未だ多数存在する。昨今の晩婚化や出産年齢の高齢化により、今後ますます本疾患の重要性が増すことが容易に予想される。

妊娠高血圧症候群の原因は未だ確定されていないが、病態生理学的特徴として胎盤形成の異常、血管内皮の異常、過剰な炎症反応などが提唱されている。また近年、脂肪組織は単なる脂肪の貯留を行うだけでなく、免疫反応・内分泌・代謝・炎症における重要臓器であるとの考え方がなされてきた。両者を結び付ける点として「炎症」があげられ、妊娠高血圧症候群の危険因子として肥満があることから、妊娠高血圧症候群と脂肪との間には密接な関係があると思われるが、両者の関係には未だ不明な部分が多い。これまで我々は、妊娠高血圧症候群患者と正常妊婦の血清の検討から、脂肪細胞が分泌するアディポネクチン（インスリン感受性を制御し抗炎症作用も有する）が、正常妊婦では低値であることを証明し、重症妊娠高血圧患者では異常高値であることを発表した。これらは脂肪組織と妊娠高血圧症候群の強い関連を示唆する。

妊婦における脂肪の働きを明らかにすることが妊娠高血圧症候群の解明に大きな役割を果たすと思われる。

## 2. 研究の目的

妊娠高血圧症候群の治療は現在の医療においても対症療法であり、根本的治療は妊娠の終結のみである。それによって得られる母児の予後は決して十分なものとは言えない。脂肪組織の有する防御機構が解明されれば、対症療法だけではなく疾患の治癒もしくは予防を行える可能性がある。

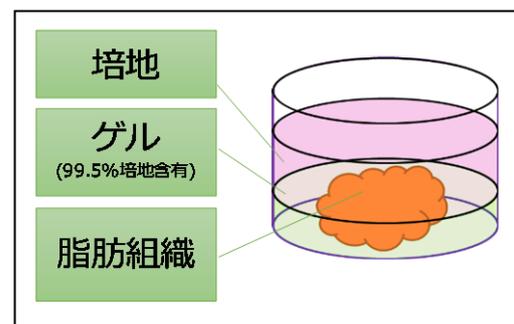
従来、脂肪に関する培養研究はいずれも脂肪細胞を用いたものであったが、本研究では脂

肪組織を用いた新規培養法を開発した。脂肪組織は脂肪細胞だけでなく、リンパ球・繊維芽細胞・結合組織・マクロファージなど様々な因子により構成される。脂肪組織は脂肪細胞単独での働きのみならず、実際の生体においてはその周囲を構成するさまざまな因子と相互的に作用しながら働いている。そのため脂肪組織培養はより生体内に近い条件を反映し、これによって得られる知見は新しく、このことは妊娠高血圧症候群の新規治療法や診断法の発見を革新的に進めることにつながる可能性がある。妊娠高血圧症候群の管理以外にも、妊娠高血圧症候群の類縁疾患を含めたその他の妊娠合併症の管理や、内分泌・代謝を筆頭とする他領域の影響は大きなものになると予想される。

## 3. 研究の方法

### 1) 脂肪組織を用いた三次元培養法

新規培養法の特徴として①脂肪細胞ではなく脂肪組織を用いる②組織の浮遊を防ぐために 99.5%培地含有ゲル (PuraMatrix, Becton Dickinson & Co.)を用いた三次元培養（下図）、の二点がある。



培養に用いる脂肪組織および患者血清はいずれも当院の倫理委員会の承認を得て採取している。内臓脂肪組織は卵巣癌根治術で行われる大網切除より採取し、皮下脂肪は反復帝王切開患者から採取を行った。血清添加実験を行うための患者血清は妊婦健診や診療上採血を施行した時に同時に採取した。

### 2) 脂肪組織培養後の上清に対する ELISA 法を用いた液性因子測定

皮下脂肪組織と内臓脂肪組織の働きの違いを調べるために 10%濃度で患者血清を添加し、37℃、21%酸素 5%二酸化炭素条件下で 24 時間組織培養を行った。培養後に上清を回収し炎症のマーカーとして TNF  $\alpha$ 、IL-6、CRP、遊離脂肪酸(FFA)を ELISA 法で測定した。アポトーシスマーカーとして M30M65 比を、細胞障害性マーカーとして LDH の測定を行った。

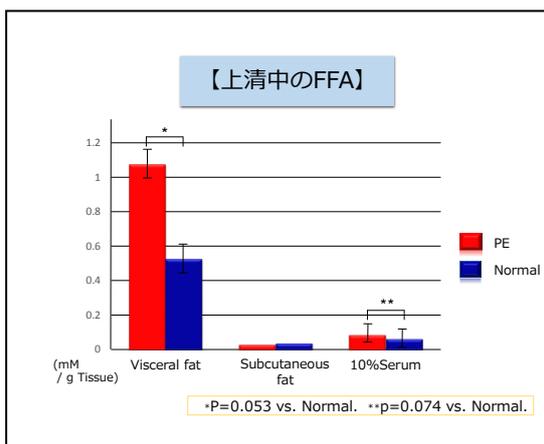
### 3) 脂肪組織培養後の脂肪組織の遺伝子解析

培養後の脂肪組織から mRNA を抽出し、定量 RT-PCR アレイを施行した。免疫、酸化ストレス、インスリン抵抗性に関連する遺伝発現を測定した。

## 4. 研究成果

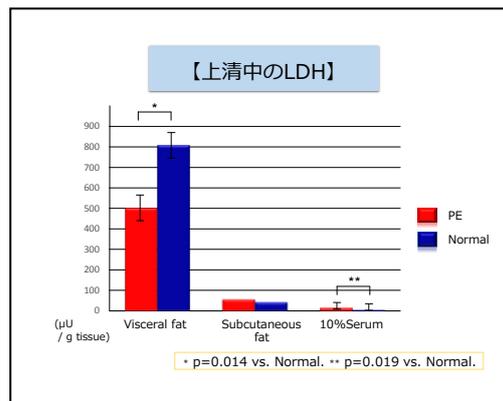
### 1) 妊婦の皮下脂肪組織と内臓脂肪組織の働きの違い

内臓脂肪組織と皮下脂肪組織それぞれに対して、正常妊婦血清と妊娠高血圧腎症患者血清を添加する組織培養を行った。培養後の上清において炎症性マーカーである TNF  $\alpha$ 、IL-6、CRP、FFA のいずれもが、皮下脂肪組織培養に比して有意に上昇していた。このことは妊婦の皮下脂肪組織と内臓脂肪組織の働きの違い、特に炎症においては内臓脂肪組織が重要な働きを有することが明らかとなった。



また細胞障害性についても評価を行った。アポトーシスマーカーである M30M65 比が妊娠高血圧腎症患者血清添加群が正常妊婦血清添加群に比して上昇している一方、細胞障害性マーカーである LDH は妊娠高血圧腎症患者血清添加群が正常妊婦血清添加群に比して低下していた。このことは妊娠高血圧腎症患者血清が炎症リガンドを含んでいること

を示唆していること、内臓脂肪組織が細胞障害性を緩和する働きを有している可能性を示唆している。



### 2) 脂肪組織の防御機能に関する検討

培養後の脂肪組織の mRNA を抽出し炎症をターゲットにした遺伝子について定量 RT-PCR を行っ

た。免疫反応において Th1 優位を誘導する IL-18 が上昇している一方、BCL6、CCL28、LTB4R のように Th2 優位を誘導する遺伝子の上昇を認めた。TLR4 のような酸化ス

トレスに対して反応性を示す遺伝子の上昇があるが、PRDX5、MIF、NFE2L1、CSF3R のような宿主免疫を高める遺伝子の上昇を認めた。同様にインスリン抵抗性を誘導

するような IFNGR2、NFX1 の上昇もあればインスリン感受性を誘導する遺伝子である IL10RA の上昇も認めた。これらのことから脂肪組織は炎症などの病態に対して

不利に働く遺伝子を誘導するとともに、生体に対して有利に働く遺伝子も誘導する。脂肪組織が生体において防御機能を有することが認められた。

### 3) 今後の展望

脂肪組織培養実験を行うことにより妊娠高血圧症候群において脂肪組織、とりわけ内臓脂肪組織が重要であることが確認された。添加実験に用いる血清を他の疾患にかえることにより、他の疾患における脂肪組織の働きも究明していきたい。

また組織培養で得られた知見を元に細胞培養での実験(共培養実験など)を行うことにより、脂肪組織における細胞間の相互作用についても明らかにしていきたい。

## 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)

〔学会発表〕(計 6 件)

①重光 愛子、赤坂 珠理晃、常見 泰平、  
成瀬 勝彦、佐道 俊幸、小林 浩：妊娠高  
血圧妊婦血清存在下の脂肪組織培養系におけ  
るプロテアーゼと細胞障害、日本病態プロテ  
アーゼ学会学術集会、2015年08月21日～  
2015年08月22日 千里ライフサイエンスセ  
ンター

②赤坂 珠理晃、成瀬 勝彦、常見 泰平、  
重光 愛子、佐道 俊幸、小林 浩：脂肪組  
織培養系を用いた妊娠高血圧腎症における生  
体内炎症の証明 日本産科婦人科学会第68回  
学術講演会 2016年04月21日～  
2016年04月24日 東京国際フォーラム

③Nagayasu M, Naruse K, Akasaka J,  
Shigemitsu A, Tsunemi T,  
Yamada Y, Sado T, Kobayashi H.  
Inflammatory stress and deposition markers  
in the serum and on adipose tissue in  
normal and hypertensive pregnancy.  
the 20th World Congress meeting of the  
International  
Society for the Study of Hypertension in  
Pregnancy (ISSHP) (国際学会)  
2016年10月23日～ Sao Paulo, Brazil  
2016年10月26日

④赤坂 珠理晃、中村 春樹、今中 聖悟、  
佐々木 義和、長安 実加、重光 愛子、常  
見 泰平、佐道 俊幸、小林 浩  
内臓脂肪細胞は妊娠高血圧症候群における  
炎症カスケードに關与する  
69th annual Congress of the Japan Society  
of Obstetrics and Gynecology  
2017年4月13日～4月16日、広島

⑤赤坂 珠理晃、常見 泰平、佐道 俊幸、  
小林 浩  
内臓脂肪細胞は妊娠高血圧症候群における  
炎症に關与する  
第41回日本産科婦人科栄養代謝研究会  
2017年8月18日～8月19日、奈良

⑥ Juria Akasaka、Taihei Tunemi, Mai  
Kimura, Chiharu Yoshimoto, Toshiyuki  
Sado, Hiroshi Kobayashi  
Possible involvement of RAGE in  
Hypertensive Disorders of Pregnancy  
70th annual Congress of the Japan Society  
of Obstetrics and Gynecology

2018年5月10日～5月13日、仙台  
6. 研究組織

(1) 研究代表者  
赤坂 珠理晃 (AKASAKA JURIA)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90526724

(2) 研究分担者  
小林 浩 (KOBAYASHI HIROSHI)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40178330

重光 愛子 (SHIGEMITSU AIKO)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50553244

成瀬 勝彦 (NARUSE KATSUHIKO)  
奈良県立医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：70453165