

令和元年6月24日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11105

研究課題名(和文) 疾患モデルマウスを用いた常位胎盤早期剥離に対する革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Trial for Innovative Therapy against Placental Abruption by Using Model Mouse

研究代表者

長島 隆 (NAGASHIMA, TAKASHI)

杏林大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40338116

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)：研究代表者は、BMP4とBMP7が常位胎盤早期剥離の原因遺伝子であるBMPR2に結合する蛋白であることを解明した。さらに、BMP4またはBMP7が子宮内にない遺伝子改変マウスを作成し、解析することで、BMP4とBMP7がどのように常位胎盤早期剥離に関与するのか検討した。その結果、遺伝子改変マウスは妊娠中期で妊娠子宮が経時的な重量減少を示し、妊孕性が極度に低下すること、要因として妊娠維持に必要な子宮内膜の脱落膜化が機能不全に陥ることを解明した。またその原因として、脱落膜化細胞の増殖と分化の減弱、脱落膜化組織内の血管新生の障害、血管新生を制御する遺伝子の発現低下、などが関与することを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、BMP4とBMP7が常位胎盤早期剥離に関与することが明らかとなった。さらに、これらの蛋白質がなぜ常位胎盤早期剥離の原因遺伝子となり得るのかが明らかとなった。同疾患の新規治療法の開発には至らなかったが、原因遺伝子とその疾患機序が明らかになったことで、治療法の開発に一定の成果を示すことができたと考えられる。最終年度は、同疾患を来した患者の同意のもと、その胎盤と血液を採取してトータルRNAと全ゲノムを回収したのち、マイクロアレイや次世代シーケンサーで解析し、BMP4とBMP7に関連する遺伝子群の解明を試みた。同解析の結果が、常位胎盤早期剥離の治療法開発を推進するものと確信している。

研究成果の概要(英文)：We revealed that BMP4 and BMP7 are binding proteins of BMPR2 which is one of regulative genes concerned placental abruption. Additionally, we tried to clarify how BMP4 and BMP7 are related to placental abruption by making and investigating transgenic mice with lacking BMP4 and BMP7 in the uterus. As the results, the mice showed weight decreasing of the pregnant uterus in 2nd trimester and severe subfertility caused by decidual defect of the endometrium. We also revealed proliferation and differentiation defects of the decidual cells, angiogenetic defect in the decidual cells, and gene expression change, which regulate angiogenesis and vascularization.

研究分野：生殖内分泌学

キーワード：常位胎盤早期剥離 子宮特異的 ノックアウトマウス BMPR2 BMP4 BMP7 脱落膜化 妊孕性低下

1. 研究開始当初の背景

妊娠期間において、妊婦は多くの妊娠関連疾患を発症するリスクを抱えている。中でも特に常位胎盤早期剥離は、全妊婦の約 0.5~1.5%に認め、基底脱着膜からの出血により形成された胎盤後血腫が、これに隣接する胎盤を圧迫・剥離し胎盤機能を障害することで、高率に子宮内胎児死亡を生じ得る。この子宮内出血は、増悪すると母体の出血死を招くこともある。さらに、同疾患の病因と病態には未だ不明のものが多く、的確な早期診断と治療方法、ならびに予防方法が確立されていないため、妊娠関連疾患のなかでも特に母体と胎児の死亡率が高い、重篤な疾患とされている。出血の発生機序として、これまで、細菌感染を契機とした窒素酸化物や活性酸素の発生により、子宮内膜のアポトーシスが発生することで血管構造が破綻すると考えられてきた。しかし、細菌感染を契機とした常位胎盤早期剥離はごく稀であることから、主たる発症原因とは考えられていない。また、高血圧疾患、過短臍帯の索引、外力による外傷なども病因とされているが、いずれもその機序は不明である。一方、発症リスク因子として、同疾患の既往歴、前期破水、高齢妊娠、多産婦、多胎妊娠、羊水過多、血栓症、喫煙、子宮筋腫などが知られているが、いずれの病態も同疾患を伴うことは稀である。よって、もともと患者に常位胎盤早期剥離を発症し易い遺伝的素因が存在し、上記のリスク因子により同疾患が誘発されると考えられてきた。しかし、これまで同疾患の遺伝的背景は明らかにされず、その機序も不明であった。だが近年、研究代表者が BMP 蛋白の受容体の一つである BMPR2 に関し、子宮特異的に BMPR2 を欠損する (*Bmpr2* cKO) マウスが、妊娠中期に子宮内胎児発育遅延と常位胎盤早期剥離を来し、全例流産となることを発見した (Nagashima et al. J Clin Invest 2013; 図 1)。また、この遺伝子改変マウスの解析により、初めて常位胎盤早期剥離の遺伝的背景が明らかとなり、同疾患の発症メカニズムをもとにした新たな治療戦略を描き出すことが可能となった。一方、これまで BMP2 などの BMP 蛋白が、BMPR2 に結合するリガンドとして同定されてきた。しかし、子宮特異的に BMP2 を欠損する (*Bmpr2* cKO) マウスは、*Bmpr2* cKO マウスとは異なり、着床不全を来す (Lee et al. Mol Cell Biol 2007)。従って、両者の表現形が異なることから、BMP2 は妊娠中期において BMPR2 のリガンドとして働いていないと考えられ、BMP2 以外のリガンドを介したシグナル伝達の破綻が、常位胎盤早期剥離の発症要因であると推測された。これまで研究代表者は、遺伝子クローニング技術を用いて、BMPR2 のリガンドとして働く蛋白の同定を行ってきた。その結果、BMP4 と BMP7 が、妊娠中期の子宮内で BMPR2 のリガンドとして働いていることを明らかにした。よって、BMP4 と BMP7 がどのように常位胎盤早期剥離の発症メカニズムに関与しているのかを明らかにすることで、同疾患の根治を目指す革新的な治療戦略につながるとの着想に至り、本研究を行う考えとなった。

2. 研究の目的

近年、我が国では、女性の高学歴化と社会進出により、晩婚化とそれに伴う高齢妊娠が急速に進んでいる。また、高齢を要因とする不妊症患者の増加により、体外受精を含む生殖補助医療が急速に普及し、多胎妊娠が増加している。上記に加え、妊娠年齢の上昇に伴い、高血圧疾患や子宮筋腫を合併した妊娠も増加の一途を辿っている。上記の高齢妊娠、多胎妊娠、高血圧疾患、子宮筋腫は、いずれも常位胎盤早期剥離における重要な発症リスク因子であることから、同疾患の発症数は今後も増加していくと考えられる。さらに、常位胎盤早期剥離の母体胎児死亡率は極めて高いことから、その治療戦略の確立は、我が国にとって極めて急務であるといえる。BMPR2 は、これまで全く遺伝的背景が不明であった常位胎盤早期剥離に対し、研究代表者が世界に先駆けて原因遺伝子の一つとして同定した遺伝子であり、近年、原発性肺高血圧症の原因遺伝子でもあることなど (Lane KB et al. Nat Genet 2000)、世界中で活発に研究が進められている。しかし、BMPR2 の下流に存在するシグナル伝達物質である SMAD1、SMAD2、SMAD5 の発現は、正常マウスと比較して、*Bmpr2* cKO マウスの子宮では変化を認めないことから、SMAD 蛋白とは異なるシグナル伝達物質が常位胎盤早期剥離の発症メカニズムに関与するなど、未だ解明されていない問題も多く残されている。本研究ではこれらの問題にも取り組み、常位胎盤早期剥離の標的因子を同定することで、臨床応用に向けた基盤作りを行おうと試みた。その上で、未だ明らかとなっていない常位胎盤早期剥離の発症メカニズムを解明すると共に、同疾患の根治を目指す革新的な診断方法や治療方法を開発し、臨床応用に発展させるための基礎的データの収集と、基盤となる技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 子宮特異的に BMP4 と BMP7 を欠損する (*Bmpr4* cKO と *Bmpr7* cKO) マウスを作成し、解析することで、BMP4 と BMP7 を介した常位胎盤早期剥離の発症メカニズムに関する知見を得ようと試みた。
- (2) マウスの解析により得られた知見をもとに、遺伝子クローニング技術を用いることで、常位胎盤早期剥離の診断と治療に対して、標的因子となり得るシグナル伝達物質を同定しようと試みた。

- (3) 同定された標的因子に対して、特異的にその発現を制御することが可能であるウイルスベクターと抗体ベクターを作成しようと試みた。
- (4) 作成されたウイルスベクターと抗体ベクターを用いて、想定通りに標的因子の発現を制御することが可能なのか、一般培養細胞を用いて検証しようと試みた。
- (5) 作成されたウイルスベクターと抗体ベクターによって、BMPR2の欠損により失われた子宮内膜細胞の機能を回復させることが可能なのか、モデルマウスである *Bmp2* cKO マウスより単離・培養された子宮内膜細胞を用いて検証しようと試みた。
- (6) 作成されたウイルスベクターと抗体ベクターを、実際に常位胎盤早期剥離の治療薬として臨床応用することが可能なのか、*Bmp2* cKO マウスに投与して、その治療効果を判定しようと試みた。
- (7) 作成されたウイルスベクターと抗体ベクターを、常位胎盤早期剥離の治療薬として使用することが可能なのか、投与されたマウスの解析を行うことで、その安全性を確認しようと試みた。

4. 研究成果

Bmp4 cKO は、妊娠初期では、妊娠子宮の重量や着床関連遺伝子(*Ptgs3*, *Areg*, *Wnt4*, *Wnt6*) の発現で、コントロールマウス(*Bmp4* Ctrl)との間に差を認めなかった。しかし、妊娠中期では、妊娠性が極度に低下し妊娠子宮が重量減少を示すこと(図1)、その要因として妊娠の維持に必要な子宮内膜の脱落膜化が機能不全に陥ることを明らかにした(図2)。また、脱落膜化不全の原因として、脱落膜化細胞の分化と増殖が低下していること(図2)、脱落膜化組織内の血管新生が障害され血管径が細くなっていること、その原因として血管新生を制御する遺伝子の発現が低下していることを明らかにした(図3)。*Bmpr2* cKO の妊娠子宮でも同じ異常を認めることから、BMP4 が胎盤形成期における、BMPR2 のリガンドであると考えられた。そして、これらの知見を基に最終年度は、常位胎盤早期剥離を来した胎盤と、通常の経膈分娩となった胎盤から脱落膜化組織を採取し、それぞれのゲノムDNA とトータルRNA を回収した。さらに、次世代シーケンサーを用いたゲノムDNA

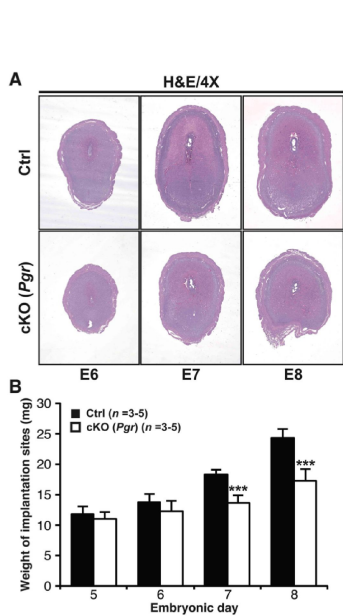


図1. *Bmp4* cKO マウスの妊娠子宮の重量減少。妊娠中期から妊娠重量の減少を示した。A. 形態的に妊娠子宮の増大が抑制された。B. 重量減少は、妊娠週数の進行とともに顕著になった。

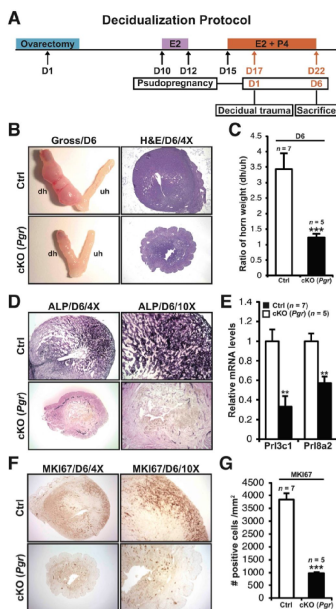


図2. *Bmp4* cKO マウスの脱落膜化の機能不全。脱落膜化刺激で顕著な脱落膜化の低下を示した。A. 脱落膜化プロトコル。B/C. 脱落膜化後の子宮重量の減少。D/E. 分化マーカーの発現減少。F/G. 増殖マーカーの発現減少。

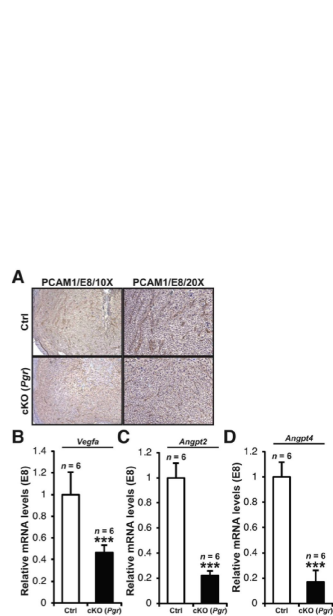


図3. 脱落膜化組織内の血管径の縮小と血管新生マーカーの発現減少。A. *Bmp4* cKO の妊娠組織内で血管径の縮小を認める。B/C/D. 同妊娠組織内で血管新生マーカーの発現減少を認める。

の変異有無、ならびにマイクロアレイを用いた RNA の発現比較を行い、BMP4 と BMP7 に関連する遺伝子群の解明を試みた。その結果、血管新生や組織の分化・増殖に關与する特定の遺伝子群が、常位胎盤早期剥離を来した患者の胎盤内で、特異的に発現低下を来していることが明らかとなった。今後もこの解析を続け、常位胎盤早期剥離の発症機序の解明に取り組む考えである。

5. 主な発表論文等

- {雑誌論文}(計 0 件)
- {学会発表}(計 1 件)

Nagashima T, Ishida M, Tanaka K, Matsushima M, Matsuzawa Y, Izawa T, Furukawa S, Kobayashi Y, and Iwashita M, Bone morphogenic protein 4 (BMP4) is required for establishment of an adequate uterine decidualization and vascularization to support normal pregnancy、第 70 回日本産科婦人科学会・学術講演会、2018 年 5 月 11 日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。