

令和元年6月12日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11427

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群における血管内皮細胞の形態学的変化と抗凝固薬の保護効果機序の検証

研究課題名(英文) The study of morphological analysis for glycocalyx on vascular endothelial cells and protective effects of anticoagulant agent in pregnancy induced hypertension rat model

研究代表者

日野 博文(Hino, Hirofumi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70308500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群(PIH)モデルでは有意に観血的動脈圧上昇、VEGFR1上昇、アルブミン尿、胎児死亡率上昇を認め、PIHの臨床病態と近似することが示された。PIH群では大脳、腎系球体ともにGcx層の破綻が示された。また、腎系球体では抗凝固薬の投与はGcx改善効果を示す一方、大脳では効果がなかった。またGcx層の主構造であるシンデカン1は有意に低下したが、両抗凝固薬とも改善効果を認めなかった。PIHで尿中アルブミン量増加、Evans Blue 染色による腎系球体血管透過性亢進を有意に認める一方、両凝固薬は血管透過性亢進に対して改善を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧症候群(PIH)の臨床像に非常に近似した動物モデルが確立されたこと、ならびに現在まで他の疾患において報告されてきたglycocalyxの破綻がPIHモデルにおいても生じていることが初めて確認されたことは非常に大きな意義がある。また、この変化は臓器において変化しており、水分の血管透過性に関して毛細血管種類によることが判明し、今後のPIH治療に対して新たな研究方向性が示されたことは有意義であると考えられる。今回の結果により我々が現在まで示してきた抗凝固薬のPIHへの改善効果が血管透過性へは及ばないことが判明したことはPIHの病態研究において有意義であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is evident that this animal model mimics the clinical features of PIH by increasing VEGFR-1, which is specific for PE, in addition to maternal hypertension, albuminuria. It is found that Gcx layer in endothelium occurs in the cerebrum and glomerulus. Moreover, it is found that endothelial permeability with associated interstitial fluid shift and generalized edema occurred due to deterioration of Gcx structure affects in this PIH model. Although it is expected that anticoagulant agents play a major role in the protective effect of capillary permeability by attenuating GCX damage, anticoagulants possess no effects on capillary permeability.

研究分野：集中治療医学

キーワード：妊娠高血圧症候群 グリコカリックス シンデカン1 血管透過性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

PIHの母児死亡率に対する影響は強く、直接的な母体死亡率の10-15%に関与している(1)。また、PIHの胎児発育不全が児死亡率にも影響を与えている。その発症機序は未だ不明のことが多く、確立した直接的な治療法が無い。現在のPIH治療は降圧療法など症候に対するアプローチが主となっている。そのため、PIHの原因究明および集学的な治療法の確立が早急に望まれている。

近年、血管内皮細胞上のglycocalyx(Gcx)と呼ばれる層状の構造物の全容が明らかになりつつあり、その構造上の特徴と機能に注目が集まってきている(2)。

Gcx層は血管透過性への関与のみならず、thrombomodulin(TM)など血管保護物質の格納場所である。また、抗凝固物質や抗酸化物質の接着部位としても機能を有し、血管内皮細胞保護作用を有する重要な構造物である。Gcx層は炎症などで容易に脱落消失することが知られ、我々も血管炎症性のある動物モデル(敗血症ラット)の坐骨神経毛細血管におけるGcx層の脱落を確認した。敗血症と同様にPIHの末梢血管内皮細胞においてもGcx層の脱落が生じていると予想されるが、現在までPIHにおける末梢血管のGcx層構造変化に迫った実験的アプローチは皆無である。

PIHでは血管炎症と凝固反応は重要な因子である。その応答では一般的に第Xa因子やトロンピンが中心的な役割を果たすことが明らかになっている(3)。興味深いことに、抗炎症作用を有する第Xa因子阻害薬のDanaparoid sodium(DS)やトロンピンを制御するrecombinant-TM(r-TM)は、Gcx層構成成分と同構造を有する。これらは、Gcx層の脱落抑制効果や内皮細胞から脱落したglucosaminoglycan(GAGs)のGcx層への再接着効果に関与することが期待され、本研究の着想に至った。また、PIHでは血管内皮細胞表面にprotease activated receptor(PAR)1、2が発現し、トロンピン、第Xa因子はPAR1、PAR2を介して血管内皮細胞を活性化し、血管透過性を亢進すると報告がある(4)。よって、DS、r-TMの投与はプロテアーゼの制御を介して内皮保護作用を発揮する可能性も期待される。我々は以前、PIHラットモデルにおけるr-TM投与が母児状態を改善することを報告(5)したが、その改善効果の機序は不明であり、PIHの治療応用へと進めるためにはその機序の解明が必要となる。

### 2. 研究の目的

以下のことを研究目的とした。

- (1) PIHラットモデルにおけるGcx層形態学的変化と血管透過性およびDS、r-TMの保護効果の検証。
- (2) PIHラットモデルの脳、腎系球体において、Gcx層形態学的変化、Evans blue染色法における血管透過性により、各部位の血管内皮細胞の形態学的評価と機能的評価を行う。且つその突合により両者の相関性を検証する。また、臓器別による差異を比較する。
- (3) 同実験モデルを用いてDS、r-TMの保護効果を検証する。
- (4) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用い、LPSおよびL-NAME存在下でのGcx層の形態的变化および水分透過性の変化を検証する。

### 3. 研究の方法

- (1) PIH動物モデルにおけるGcx層の形態学的検証とDS、r-TMの保護効果の検証  
交配後の10週齢雌性Wistar系妊娠ラットを用い、対照群(C)、DS群(CD)、r-TM群(CT)、PIH群(P)、PIH+DS群(PD)、PIH+r-TM群(PT)の6群に分類する(各群n=4)。過去の投与量検証研究に基づき、P、PD、PT群では妊娠7日目より、N-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride(L-NAME) 3mg/kg/dayの経口投与を開始、妊娠14日目にlypopolysaccharide(LPS)の10μg/kgを1時間持続投与しPIHモデルを作製する。CD、PD群では妊娠17日から21日の4日間、DS(300IU/kg)、またCT、PT群ではr-TM(3mg/kg)を外頸静脈より単回投与する。妊娠21日目にペントバルビタール25mg/kgを腹腔内投与、イソフルラン1%吸入下に観血的血圧測定施行し、Alcian Blue・ランタン染色/灌流固定後に脳、両側腎を摘出し、レジン包埋後、毛細血管垂直断面(150nm)を無作為に20部位抽出し、電子顕微鏡下で形態学的変化を検証する。シンデカン1は免疫染色を行い共焦点レーザーにて測定を行う。採血した血液は、直ちに血清に分離し、モデルの評価として血算、Vascular endothelial growth factor receptor 1(VEGFR1)を測定した。
- (2) 血管透過性の検証  
同モデルにおいて2% Evans blue dye (4ml/kg)投与後、生理的食塩水で脱血・脱染後、下大静脈より採血、脳および腎を摘出する。摘出検体は切片を作製し、蛍光顕微鏡にて漏出面積を分析し、群間比較した。

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用いたLPSおよびL-NAME存在下でのGcx層の形態的变化および水分透過性の変化は上記(1)(2)のモデルおよび研究手法確立に時間を要したため、施行できなかった。

### 4. 研究成果

- (1) PIHモデルの確立:  
PIHモデルでは有意に観血的動脈圧上昇、VEGFR1 上昇、アルブミン尿、胎児死亡率上昇を認め、PIHの臨床病態と近似することが示された。
- (2) PIH群におけるGcx層の脱落と腎系球体におけるDS、r-TMによるGcx層の改善効果の発見:  
電子顕微鏡による脳・腎系球体の毛細血管Gcx層の検証を行い、PIH群では両臓器ともにGcx層の破綻が示された(図1)。また、腎系球体ではDS、r-TMともにGcx改善効果を示す一方、脳では効果が示されなかった。腎系球体における共焦点レーザー顕微鏡を用いたGcx層の主構造であるシンデカン1の免疫染色量は有意に低下したが、両抗凝固薬ともシンデカン1低下への効果を認めなかった。機能的検討ではPIHで尿中アルブミン量増加、蛍光顕微鏡を用いたEvans Blue染色による腎系球体血管透過性亢進を有意に認める(図2)一方、DS、r-TMともに血管透過性亢進に対して改善を示さなかった。

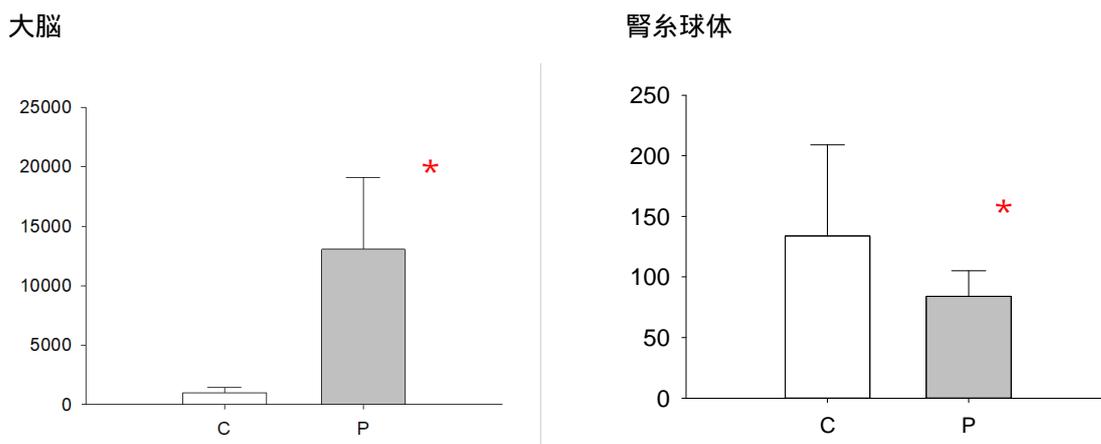


図1、各臓器におけるGcx層厚(nm、C:対照群、P:PIH群)

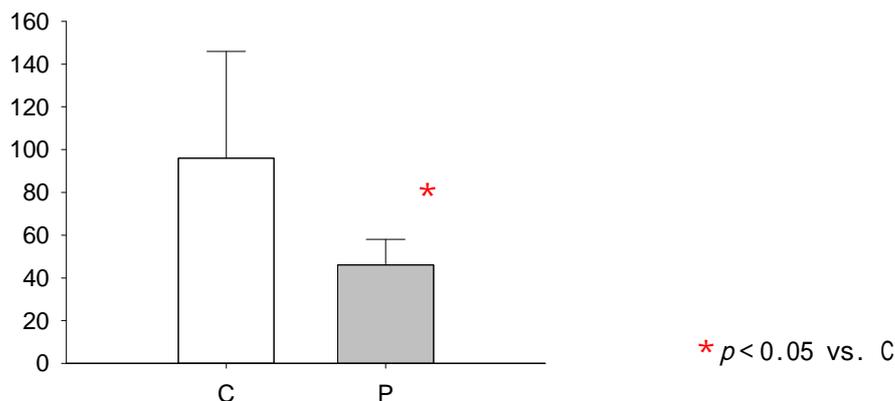


図2、血管透過性比較(エチレンブルー漏出面積比較、C:対照群、P:PIH群)

#### <引用文献>

- (1) Duley L. Semin Perinatol 33, 2009
- (2) Becker BF, et al. Cardiovascu Res 87, 2010
- (3) Coughlin SR. Nature 407, 2000
- (4) Wang Y, et al. J Clin Endocrinol Metab 87, 2002
- (5) Shin M, et al. J Obstet Gynaecol Res 40, 2014

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計7件)

発表者(代表)名、発表標題、学会等名、発表年

日野博文、Disruption of Glycocalyx on Cerebral and Glomerular Blood Vessel in a Rat Model of pre-eclampsia and protective effects of Danaparoid Sodium、第44回日本微小循環学会総会、2019

日野博文、Deterioration of Glycocalyx on cerebral and glomerular blood vessel in a rat model of pre-eclampsia.- "Et tu, Glycocalyx?-"、第43回日本微小循環学会総会、

2018

Hirofumi Hino, Degradation of Glycocalyx on Cerebral and Glomerular Blood Vessel in a Rat Model of Pre-eclampsia and protective effects of Danaparoid Sodium, Anesthesiology 2018 annual meeting, 2018

日野博文, 妊娠高血圧症候群モデルでの Glycocalyx、Syndecan1 の変化と血管透過性、日本蘇生学会第 37 回大会、2018

日野博文, 妊娠高血圧症候群モデルにおける大脳、腎系球体の Glycocalyx の破綻、第 122 回日本産科麻酔学会学術集会、2018

日野博文, 妊娠高血圧症候群ラットモデルにおける大脳、腎系球体の Glycocalyx の変化、第 45 回日本集中治療医学会、2018

H. Hino, Does recombinant thrombomodulin act as a drug for pregnancy induced hypertension?, The 16th joint scientific conference of the KSCCM and JSICM 2016, 2016

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。