

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09247

研究課題名(和文)新規妊娠高血圧腎症モデルマウスの開発と胎盤・胎仔血管発達評価法の確立

研究課題名(英文) Development of a new model mouse for preeclampsia and establishment of placental / fetal blood vessel development evaluation method.

研究代表者

堰本 晃代 (Sekimoto, Akiyo)

東北大学・薬学研究科・助手

研究者番号：40781745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでに我々が開発に成功しているRUPP-PEモデル作成の術式を改良および遺伝子組み換えマウスと組み合わせ、ウイルスを使わずに安定した表現型を示し、幅広く使用できる妊娠高血圧腎症マウスモデルの開発および重症度の異なる妊娠高血圧腎症モデルマウス作成に成功した。さらに妊娠高血圧腎症発症原因と考えられる発育異常胎盤の血管発達評価法を構築するため、胎盤血管樹脂模型の作成方法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧腎症(PE)は、その発症機序には不明な点が多く、早期発見・治療は未だ確立されていない。これまでPE発症機序の解明が困難であった一因は、ヒトのPEに近い病態を再現でき制限なく利用できるモデル動物が確立されていないことにあった。本研究によりウイルスを使わずに安定した表現型を示し、幅広く使用できる妊娠高血圧腎症マウスモデルの開発および重症度の異なる妊娠高血圧腎症モデルマウス作成に成功した。PE発症機序の解明や新規薬物治療法を確立する基盤を構築できた。

研究成果の概要(英文)：We improved the RUPP-PE modeling technique that we have succeeded in developing and combined it with transgenic mice to show a stable phenotype without using viruses, and it can be widely used for preeclampsia. We succeeded in developing a model of preeclampsia and creating a model of preeclampsia with different severity. Furthermore, in order to construct a method for evaluating the vascular development of stunted placenta, which is considered to be the cause of the onset of preeclampsia, we were able to establish a method for creating a placental vascular casting model.

研究分野：実験動物学

キーワード：妊娠高血圧腎症 疾患モデルマウス 胎仔発育不全 血管模型 遺伝子組み換え

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症 (preeclampsia, PE) は、妊婦の 2~5% (日本では年間約 2 万人) に発症し、母体死、胎児発育不全、児死亡をもたらすことが少なくない。PE 発症の原因として発育異常のある胎盤から抗血管新生因子が母児へ循環し、血管内皮障害 (endotheliosis: 血管内皮の膨化・血管内腔の狭小化) を引き起こし、母体末梢組織および胎児胎盤の血流障害・低酸素・栄養不足・炎症をもたらすことが主な病因と考えられている。加えて PE 発症には遺伝的要因も強く関与していると考えられているが、その要因には不明な点が多い。さらに PE の根本的な薬物治療法は確立されていない。催奇形性がなく妊婦に処方できる降圧薬によって母体降圧・脳出血予防は可能であるが、内皮障害が改善しないため胎児胎盤系への血流のさらなる減少をもたらす。胎児発育不全や死亡をもたらす。そのため、いまだ分娩による病的胎盤除去が唯一の治療法であるが、その結果、未熟児で生まれた子供達は精神発達異常等を呈しやすい。そこで、PE 発症機序を解明し、早期発見・治療する方法の確立が重要である。

これまで PE 発症機序の解明が困難であった一因は、ヒトの PE に近い状態を再現でき制限なく利用できる動物モデルが確立されていないことにある。胎盤から分泌される抗血管新生因子である可溶性 fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) をアデノウイルスを用いて過剰発現させたマウスが PE モデルとして広く用いられているが、ウイルスの投与量や発現量の調整が難しく、流産を起こしやすい。また、表現型が不安定で、飼育場所や実験場所に制限がある。

そこで、ウイルスを使わずに安定した表現型を示し、幅広く使用できる PE マウスモデルを開発し、その胎盤-胎仔の血管発達を評価することで PE 発症機序の解明や新規薬物治療法を確立する基盤を構築できると考えた。

2. 研究の目的

我々はこれまでに ICR マウスを用いて子宮動静脈を縫合系で結紮することにより血圧上昇、タンパク尿、血管内皮障害、胎仔発育不全が認められ、PE の特徴的な病態を認めたマウス RUPP-PE モデルの作成に成功している。そこで本研究では、この術式を改良して RUPP-PE モデル最適作成条件を検討し、重症度の異なる PE モデルマウス作成と遺伝子改変動物の種類が豊富な C57BL/6J 系統マウスへの応用を目指した。また、血管機能恒常性維持に寄与する NO の産生や胎仔成長に重要な役割を果たす内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 欠損マウスを用いて RUPP-PE 重症化モデルマウス開発を試みた。さらにそれらのモデル動物を用いて PE の胎盤 胎仔の血管発達を評価する方法を構築することにより、PE 発症機序の解明および早期発見・治療する方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス RUPP-PE モデル作成最適条件の確立

妊娠 ICR もしくは C57BL/6J (B6J) マウスに、卵巣・子宮動静脈を縫合系で結紮もしくは径の明らかなナイロン糸と共に結紮したのち、ナイロン糸を引き抜くことで血管を狭窄させる RUPP 手術を行った。手術前および手術 3 日後に収縮期血圧を測定した。満期産前日の胎仔数および生死を RUPP 手術時と比較して生存率を評価し、胎仔重量を測定して胎仔発育不全を評価した。また、母体の血管内皮障害を評価するため母体腎臓の組織学的解析を行い、腎機能を評価するため尿中アルブミン/クレアチニンを測定した。以上よりマウス系統および子宮流入血流量の違いによる PE 病態の重症度を評価し、RUPP-PE モデル作成の最適条件を確立する。

(2) マウス重症 RUPP-PE モデルの開発

ICR 系統に戻し交配した妊娠 eNOS KO もしくは野生型 (WT) マウスに RUPP もしくは Sham 手術を行った。満期産前日の胎仔数および生死を RUPP 手術時と比較して生存率を評価し、胎仔重量を測定して胎仔発育不全を評価した。また、母体の血管内皮障害を評価するため母体腎臓の組織学的解析を行い、腎機能を評価するため尿中アルブミン/クレアチニンを測定した。加えて、PE 重症化の指標として肝機能を評価するために、母体血漿中の AST および ALT を測定した。

(3) マイクロ CT を用いた胎盤・胎仔血管発達評価法確立のための血管模型作成法の検討

PE における胎盤血管発達を評価するために、胎盤・胎仔血管模型の作成方法を検討した。マイクロ CT で撮影可能な血管模型を作成するには、シリコンラバー製 X 線造影剤マイクロフィルを胎盤の微細血管に注入する必要がある。そのため、胎盤内の血液を完全に除去する灌流方法 (挿管位置、還流液の種類、灌流速度など) およびマイクロフィルを微細血管に注入する方法 (樹脂の硬度、注入速度など) を詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) マウス RUPP-PE モデル作成最適条件の確立

マウス系統ならびに子宮血管の結紮部位と狭窄の程度によって、妊娠維持および胎仔の成長

に差があることがわかった。また、妊娠を維持しながら胎仔発育不全を呈した最適条件においても、マウス系統によって母体の PE 表現型は異なり、B6J では血圧の上昇を認めなかった。よって、RUPP-PE モデルマウス作成は、「妊娠 14.5 日齢の ICR マウスの卵巣・子宮動静脈を 0.75mm ナイロン糸と共に縫合糸で結紮したのちナイロン糸を引き抜いて血管を狭窄させること」が最適な条件であると結論付けた。

(2) マウス重症 RUPP-PE モデルの開発

KO/RUPP 群では胎仔発育不全、高血圧、血管内皮障害の増悪が認められた。また、HELLP 症候群に特徴的な肝酵素 (AST) は上昇傾向を認めたが、ALT に変化は認められなかった。以上より *eNOS* 欠損 RUPP-PE モデルは、PE 病態が一部増悪したことから、重症 PE モデルとして有用であることが示唆された。

(3) マイクロ CT を用いた胎盤・胎仔血管発達評価法確立のための血管模型作成法の検討

脱血のための灌流条件、樹脂注入条件を詳細に検討し、胸部大動脈からカテーテルを挿入して、カテーテル先端を腹部大動脈から子宮への分岐部に留置すること、子宮血管が心臓と同じ高さになるようにマウス下半身を沈下させる台を自作して灌流・注入することで、胎盤血管の血管模型の作製に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamakage Shu, Oe Yuji, Sekimoto Akiyo, Obata Hirofumi, Yasuta Miho, Sato Emiko, Kumakura Satoshi, Sato Hiroshi, Sugawara Junichi, Ito Sadayoshi, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 193
2. 論文標題 Protease-activated receptor 2 contributes to placental development and fetal growth in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 173 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2020.06.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Emiko, Tsunokuni Yukako, Kaneko Manami, Saigusa Daisuke, Saito Ritsumi, Shimma Shuichi, Sekimoto Akiyo, Kawana Yoshiko, Oe Yuji, Ito Sadayoshi, Sato Hiroshi, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 527
2. 論文標題 Metabolomics of a mouse model of preeclampsia induced by overexpressing soluble fms-like tyrosine kinase 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1064 ~ 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.04.079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sekimoto Akiyo, Tanaka Kayo, Hashizume Yamato, Sato Emiko, Sato Hiroshi, Ikeda Tomoaki, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 521
2. 論文標題 Tadalafil alleviates preeclampsia and fetal growth restriction in RUPP model of preeclampsia in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 769 ~ 774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imaruoka Kenta, Oe Yuji, Fushima Tomofumi, Sato Emiko, Sekimoto Akiyo, Sato Hiroshi, Sugawara Junichi, Ito Sadayoshi, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 510
2. 論文標題 Nicotinamide alleviates kidney injury and pregnancy outcomes in lupus-prone MRL/lpr mice treated with lipopolysaccharide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 587 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minato Takahiro, Ito Takuya, Kasahara Yoshiyuki, Ooshio Sayaka, Fushima Tomofumi, Sekimoto Akiyo, Takahashi Nobuyuki, Yaegashi Nobuo, Kimura Yoshitaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Relationship Between Short Term Variability (STV) and Onset of Cerebral Hemorrhage at Ischemia - Reperfusion Load in Fetal Growth Restricted (FGR) Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2018.00478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Nobuyuki, Li Feng, Fushima Tomofumi, Oyanagi Gen, Sato Emiko, Oe Yuji, Sekimoto Akiyo, Saigusa Daisuke, Sato Hiroshi, Ito Sadayoshi	4. 巻 244
2. 論文標題 Vitamin B3 Nicotinamide: A Promising Candidate for Treating Preeclampsia and Improving Fetal Growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 243 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.244.243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 堰本晃代、橋爪大和、佐藤恵美子、田中佳世、梅川孝、伊藤貞嘉、佐藤博、池田智明、高橋信行
2. 発表標題 RUPP-PEモデルマウスを用いた妊娠高血圧腎症に対するタダラフィル治療効果の検討
3. 学会等名 第40回日本妊娠高血圧学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋爪大和、堰本晃代、佐藤恵美子、佐藤博、高橋信行
2. 発表標題 重症妊娠高血圧腎症マウスモデルの開発
3. 学会等名 第40回日本妊娠高血圧学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiyo Sekimoto, Tomofumi Fushima, Yuji Oe, Kiyomi Kisu, Sadayoshi Ito, Hiroshi Sato, Nobuyuki Takahashi
2. 発表標題 NOVEL REDUCED UTERINE PERFUSION PRESSURE (RUPP) MODEL OF PREECLAMPSIA IN MICE
3. 学会等名 ISARSH2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堰本 晃代、成田 由紀、佐藤 恵美子、佐藤 博、伊藤 貞嘉、高橋 信行
2. 発表標題 eNOS欠損マウスにおける硝酸ナトリウム(NaNO3)投与の影響
3. 学会等名 第39回日本妊娠高血圧学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堰本 晃代、成田 由紀、佐藤 恵美子、佐藤 博、伊藤 貞嘉、高橋 信行
2. 発表標題 eNOS欠損マウスにおける硝酸ナトリウム(NaNO3)投与の影響
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	高橋 信行 (Takahashi Nobuyuki) (40588456)	東北大学・薬学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------