

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09800

研究課題名（和文）胎児発育不全に対するタダラフィル投与の安全性に関する分子基盤の確立

研究課題名（英文）Establishment of the molecular basis for the safety of tadalafil administration for fetal growth retardation.

研究代表者

池田 智明（Ikeda, Tomoaki）

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80202894

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、胎盤のmTORシグナル伝達に対するタダラフィルの効果を検討した。L-NAME誘発FGRを発症したマウスにタダラフィルを投与したところ、p-mTORの発現は、FGRマウスにおいて、分娩後13日目には有意に低下したが、タダラフィル投与後17日目にはコントロールと同レベルまで回復した。この結果は、mTORシグナル経路の下流で作用する4E-binding protein 1（4E-BP1）およびS6 ribosomal（S6R）蛋白質についても同様であった。マウスのFGRのタダラフィル治療が、胎盤のmTORシグナル伝達を改善し、胎児の成長を促進することを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タダラフィルがmTORシグナルを変化させ、胎盤における胎児胎盤循環の促進を介して胎児の発育を促進することを示した。今後は、タダラフィルの詳細な作用機序をさらに解明し、臨床試験を通じてFGRおよびPE治療におけるmTORシグナルへの役割を確認することが重要である。そして、臨床試験での実証は、様々な問題を抱えるFGRによって出生した児の、予後の改善に繋がるという社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the effect of tadalafil on placental mTOR signaling. tadalafil treatment of mice with L-NAME-induced FGR resulted in a significant decrease in p-mTOR expression in FGR mice on day 13 postpartum, but by day 17 after tadalafil treatment but recovered to the same level as controls by day 17 after tadalafil administration. This result was also true for 4E-binding protein 1 (4E-BP1) and S6 ribosomal (S6R) proteins, which act downstream of the mTOR signaling pathway. We demonstrated that tadalafil treatment of FGR in mice improves placental mTOR signaling and promotes fetal growth.

研究分野：周産期

キーワード：胎児発育不全

## 1. 研究開始当初の背景

胎児発育不全 (FGR; fetal growth restriction) は、以下のメカニズムで発症する。妊娠初期に胎盤が子宮に接着する段階で、胎盤床における螺旋動脈血管壁のトロポブラストへの置換 (螺旋動脈の remodeling) 不全が起こると、螺旋動脈が拡張せず、胎盤の低酸素・虚血が起こる。胎児の成長に伴い、胎児への酸素・アミノ酸などの供給が追いつかなくなると胎児は FGR が発症する。FGR は、胎児発育が抑制されるため、胎児・新生児死亡率は上昇し、脳障害・精神発達遅滞などの合併症のハイリスク群である。更に、慢性的な低酸素・低栄養に暴露されることによって、将来的な自閉症・学習障害などの広汎性発達障害、高血圧・2型糖尿病などの生活習慣病のハイリスク群となることが判明している。一方で、胎児発育を促進させるための治療法がないのが現状であり、発育が抑制された胎児の状態を嚴重に観察しながら、胎児の状態が極めて悪化した時点で分娩させるしか方法がなく、多くの FGR 児が早産かつ低体重での出生を余儀なくされる。

我々は、原発性肺高血圧症を有する妊婦に投与された、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬の 1 つであるタダラフィルが、肺血管拡張作用に加えて胎児発育促進作用を有する可能性を見出したことを契機に、タダラフィルを FGR の新規治療薬として開発を開始した。基礎的研究において、NO 合成阻害薬である L-NAME (N<sup>-</sup>-nitro-L-arginine methyl ester) を用いて、FGR モデルマウスを作成した。FGR モデルマウスにタダラフィルを投与し、タダラフィル非投与群と比較し、胎仔体重の有意な増加を観察した。加えて、FGR モデルマウスでは、胎仔脳の免疫染色によって灰白質のシナプス形成、白質の髄鞘化、microglia 発現が抑制されていることが観察されたが、タダラフィル投与にてこれらの改善が観察された。これらの基礎研究の結果、ヒトへの安全性を検証するための第 Ⅰ 相試験を実施し、母体・胎児の安全性が確認された。また、第 Ⅰ 相試験において、タダラフィル投与において、有意な胎児・新生児・乳児死亡の減少と妊娠延長効果・胎児発育促進作用が確認された。本研究では、基礎的研究においてこれまで使用した FGR モデルマウスを用いて、タダラフィル・シルデナフィルの作用に関する分子機構を明らかにし、第 Ⅲ 相試験への移行を目指す。

## 2. 研究の目的

胎児成長に関連する主要な調節因子の 1 つである mTOR (mammalian target of rapamycin) 特に mTOR complex1 シグナルに着目し、FGR 胎盤におけるタダラフィルの作用機序を明らかにすることを目的とした。タダラフィルは平滑筋細胞の PDE5 を阻害することで、平滑筋細胞を弛緩させる局所的な cGMP の分解を抑制する。これにより、子宮胎盤の血流と胎盤の酸素供給が増加し、胎児の成長が促進される。また、マウスにおいて、タダラフィルが胎盤の母体血管洞を拡張し、胎盤の低酸素性変化を改善する。胎盤における Mechanistic Target of rapamycin (mTOR) シグナルは、胎児の成長と発達に重要な役割を果たしており、その制御不全は流産につながる可能性がある。セリン/スレオニンキナーゼである mTOR は、ヒト胎盤のシンシチオトロポブラストにおいて高発現している。mTOR は、細胞内外の成長因子、アミノ酸、ストレスなどの様々なシグナルを感知し、細胞の成長、代謝活性、生存を制御する。胎盤では、2つの細胞内複合体、mTOR 複合体 (mTORC) 1 と mTORC2 を形成し、いずれも発現している。mTORC1 は、S6 Kinase 1 (S6K1) と 4E-binding protein 1 (4E-BP1) のリン酸化を介してタンパク質翻訳を促進し、主に細胞の増殖と代謝の調節に関与しているが、mTORC2 は細胞の増

殖と生存に重要な役割を担っていると考えられている。さらに、mTORC1 は、胎盤におけるタンパク質合成やエネルギー集約的な能動輸送に重要なトロフォブラストの ATP 産生を制御することにより、間接的に胎盤の栄養センサーとして機能している。最近では、mTOR シグナルが母体循環から胎盤への栄養輸送を「直接」制御していることが示されている。さらに、mTOR の主要な下流標的のリン酸化に基づくいくつかの研究は、ヒト FGR 胎盤において mTOR シグナル伝達活性が抑制されていることを示した。したがって、FGR 胎盤における mTOR シグナル活性に対するタダラフィルの効果を評価することで、FGR に対する治療効果およびその基礎となる作用機序を理解するための知見が得られると仮定した。

本研究の目的は、FGR 胎盤における mTORC1 シグナル活性に対するタダラフィルの効果を評価することであった。さらに、その作用機序を理解するために、mTORC1 シグナルの主要な下流標的である 4E-BP1 および S6 リボソーム蛋白 (S6R) の発現を調査した。本研究により、タダラフィルの FGR に対する有益な効果の作用機序に関する重要な詳細が明らかになるため、今後の FGR の臨床研究に役立つと思われる。

### 3 . 研究の方法

胎盤の mTOR シグナル伝達に対するタダラフィルの効果を検討した。L-NG-ニトロアルギニンメチルエステル (L-NAME) 誘発 FGR およびそれに伴う子癩前症 (PE) を発症したマウスにタダラフィルを投与したところ、胎盤のリン酸化 mTOR シグナルが減少し、胎盤が正常に機能することを確認した。胎盤のリン酸化 mTOR (p-mTOR) シグナルは、蛍光免疫組織化学染色とウェスタンブロットングで評価した。

### 4 . 研究成果

p-mTOR の発現は、FGR マウスにおいて、分娩後 13 日目には有意に低下したが、タダラフィル投与後 17 日目にはコントロールと同レベルまで回復した。この結果は、mTOR シグナル経路の下流で作用する 4E-binding protein 1 (4E-BP1) および S6 ribosomal (S6R) 蛋白質についても同様であった。本研究において、マウスの FGR のタダラフィル治療が、胎盤の mTOR シグナル伝達を改善し、胎児の成長を促進することを実証した。タダラフィルの作用機序に関する重要な詳細を提供し、FGR に関する将来の臨床研究に役立つと思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maki Shintaro, Tanaka Hiroaki, Tsuji Makoto, Furuhashi Fumi, Magawa Shoichi, Kaneda Michiko K., Nii Masafumi, Tanaka Kayo, Kondo Eiji, Tamaru Satoshi, Ogura Toru, Nishimura Yuki, Endoh Masayuki, Kimura Tadashi, Kotani Tomomi, Sekizawa Akihiko, Ikeda Tomoaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Safety Evaluation of Tadalafil Treatment for Fetuses with Early-Onset Growth Restriction (TADAFER): Results from the Phase II Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 856 ~ 856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8060856	査読の有無 無
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 Maki Shintaro, Kato Ineko, Enomoto Naosuke, Takakura Sho, Nii Masafumi, Tanaka Kayo, Tanaka Hiroaki, Hori Shinsuke, Matsuda Kana, Ueda Yukito, Sawada Hirofumi, Hirayama Masahiro, Sudo Akihiro, Ikeda Tomoaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Developmental Evaluation of Infants Who Have Received Tadalafil in Utero for Fetal Growth Restriction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1448 ~ 1448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9051448	査読の有無 無
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 Tachibana Ryota, Umekawa Takashi, Yoshikawa Kento, Owa Takao, Magawa Shoichi, Furuhashi Fumi, Tsuji Makoto, Maki Shintaro, Shimada Kyoko, Kaneda Michiko K., Nii Masafumi, Tanaka Hiroaki, Tanaka Kayo, Kamimoto Yuki, Kondo Eiji, Kato Ineko, Ikemura Kenji, Ikeda Tomoaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Tadalafil treatment in mice for preeclampsia with fetal growth restriction has neuro-benefic effects in offspring through modulating prenatal hypoxic conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2001 ~ 2008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36084-x	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	田中 博明  (Tanaka Hiroaki)  (30727996)	三重大学・医学部附属病院・講師   (14101)	
研究分担者	田中 佳世  (Tanaka Kayo)  (60812310)	三重大学・医学系研究科・助教   (14101)	
研究分担者	真木 晋太郎  (Maki Shintaro)  (90794371)	三重大学・医学部附属病院・助教   (14101)	

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
---------	---------