

令和 5 年 11 月 1 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09623

研究課題名(和文) 妊娠初期胎児の子宮内低酸素とmicroRNAの関連について

研究課題名(英文) The relationship between intrauterine hypoxia and microRNA in early pregnancy fetuses

研究代表者

桃井 伸緒 (Momoi, Nobuo)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10285033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎児心筋細胞のHERGチャネル電流(IKr)を阻害し徐脈を引き起こし、低酸素状態にすることがin vitroでのみ観察されているフェニトインを、妊娠胎日齢(ED)11.5のマウスに投与し、小動物用超音波高感度イメージングシステムを用い、胎児の心行動態を評価観察した。フェニトイン投与群で用量依存性に心拍数と背側大動脈血流量の低下を認め、in vivoで初めて妊娠マウスへのフェニトイン投与により胎児マウスが徐脈に至ることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児低酸素の動物実験は、主に母胎自体を低酸素下に置くことにより行われてきたが、母体への侵襲が胎児に及ぼす影響を除外できない欠点があった。今回使用したフェニトインの母胎投与は、低侵襲で母胎血行動態に影響を与えることなく、胎児を徐脈から低酸素状態にすることを可能にする。現在、胎児低酸素モデルとしての確立を目指しており、確立後、低酸素が胎児microRNAに変化を及ぼさないかどうか、胎盤を通過するmicroRNAにより母胎血液で胎児低酸素を検知できないかを検討していく。また、本実験は、HERGチャネル阻害薬の妊娠初期における使用の危険性とその機序を改めて示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Phenytoin has been observed in vitro to inhibit the HERG channel current (IKr) in fetal cardiomyocytes and cause fetal bradycardia and hypoxia. Phenytoin was administered to mice at gestational age 11.5, and fetal hemodynamics were evaluated and observed using a high-sensitivity ultrasound imaging system for small animals. A dose-dependent decrease in heart rate and dorsal aortic blood flow was observed in the phenytoin-treated group, demonstrating that phenytoin administration to pregnant mice induces bradycardia in fetal mice for the first time in vivo.

研究分野：小児科学

キーワード：胎児低酸素 フェニトイン 血行動態

1. 研究開始当初の背景

胎児組織は、常時、低酸素状態に置かれている。妊娠初期の胎児においては、この低酸素が低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor: HIF) の活性化を介して、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: Vegf)、erythropoietin、glucose transporter isoform-1 (Glut-1)、insulin-like growth factor binding protein-1 (Igfbp-1)、6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (Pfkfb3) などの発現を誘導し、臓器形成を促進する (DEVELOPMENTAL DYNAMICS 2001; 220: 175-186)。しかし、過度の低酸素暴露は、子宮内発育遅延、胎児死亡や胎児奇形の原因となるだけでなく、適応反応がエピジェネティック制御機構を介して遺伝子発現調節を引き起こし、将来的に生活習慣病の発生率を上昇させることも示唆されている (胎児プログラミング説) (Am J Clin Nutr 2000; 71: 1344S-1352S)。胎児プログラミングの高感受期は、臓器の形成時期である妊娠 2 ~ 3 ヶ月までの妊娠初期にあたる。低酸素が、この妊娠初期の胎児に及ぼす影響については、8%の酸素濃度下に 6 時間、母体マウスを置いた実験において、胎仔の Vegf、erythropoietin、Glut-1、Igfbp-1 の発現が誘導されることが示された (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008; 295: R583-R595)。妊娠初期の胎仔を低酸素環境に暴露させる動物実験は、この研究のように主に母体自体を低酸素下に置くことにより行われてきたが、この実験系を用いて胎仔に起きている変化を検討することには 2 つの問題がある。1 つは、母体を低酸素環境下においたとしても、胎仔の血行動態を観察していないため、実際に胎仔がどの程度の低酸素状態にあるかが明らかにされないことである。もう 1 つの問題は、低酸素環境下に置かれるために母体自体に起きる血行動態変化や内分泌代謝等の変化が胎児に影響を及ぼしたり、母体内で増減した物質が胎盤を通過したりする可能性があることである。

本研究代表者は、これまで、小動物用超音波高感度イメージングシステム (Vevo660, Visual Sonics, Canada) を用いて、心臓形態形成初期 (単心房単心室・総動脈幹) の在胎日齢 (ED) 9.5 から、心臓内構造がほぼ完成する ED13.5 までのマウスの胎仔心機能について調べてきた (Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008; 284: H2248-2256、J Obstet Gynaecol Res. 2012; 38:1343-1352)。同機器は、妊娠早期の胎仔心血行動態を、母体内 (in vivo) で、かつ低侵襲に測定することを可能とする。

フェニトインは胎児催奇形性を有し、その原因が胎児徐脈であることは、in vitro の実験で推測されてきた。この徐脈の機序は、フェニトインが、胎児期早期に重要な役割を有している心筋細胞の急速活性型遅延整流電流 (I_{Kr}) を阻害することによる (Epilepsia. 2002; 43: 457-68)。この I_{Kr} チャネル阻害薬を投与して胎児徐脈を誘発する実験系は、母体を低酸素状態にせず、かつ母体血行動態も有意に変化させないため、これまでの母体低酸素を用いた実験系で生じる母体自体が低酸素に対して起こす反応が胎児へ影響するという欠点を補いつつ、胎児低酸素を誘発できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、Ikr チャネル阻害薬を用いることにより、母体を低酸素状態にせず胎仔低酸素を誘導し、小動物用超音波高感度イメージングシステムを用いて子宮・胎盤血行動態を含めた胎仔心行動態を観察しつつ、胎仔組織におきる Vegf、Glut-1、Igfbp-1 等の変化を miRNA の発現も含めて研究する。胎児プログラミングの高感受期は、臓器の形成時期である妊娠 2 ~ 3 ヶ月までの妊娠初期にあたり、今回の研究はこの時期を対象とする。妊娠初期の胎児は低酸素に高い耐容性を示すことから、胎児低酸素が生じても死亡に至ることなく経過し、その影響がマスクされたまま、出産にいたることも考えられる。しかし、妊娠初期の胎児が、低酸素により心行動態変化のみならず遺伝子変化まできたしているとする、発達予後、および将来の生活習慣病にまで影響が及ぶと考えられる。本研究の明らかにする事象は、子供が健康に出生し成長するためには、妊娠が判明してからではなく、妊娠可能女性が日常からどのような胎児環境を保つことが重要かを示唆し、社会的啓蒙に寄与する可能性を有する。また、現在は評価することができない妊娠初期胎児のバイオマーカーの開発に寄与する可能性も有する。

3 . 研究の方法

在胎日齢 (ED) 11.5 の母マウスにフェニトインを皮下投与し、胎仔徐脈が誘導された群 (フェニトイン群) と、生理食塩水を投与する群 (対照群) について、心行動態を観察する。心行動態は小動物用超音波高感度イメージングシステムを用いて投与前後で観察し、具体的な観察方法は以下の通りである。

母マウスを吸入麻酔下で加温ベッドおよび加温用ランプを用いて体温の管理を行いながら、小動物用超音波高感度イメージングシステム (Vevo 2100, VisualSonics, Canada) を用いて胎児心行動態を観察する。Mモード法を用いて心室壁運動を測定し、ドプラ法を用いて動脈幹・背側大動脈・内頸動脈・臍帯動静脈・子宮動脈の血流を測定する。血流量の計算は血管面積 × ドプラ法による速度時間積分を用いて行う。母マウスの心拍出量測定も Vevo2100 を用いて肺動脈血流量を連続的に記録することにより行う。母マウスの血圧は小動物血圧測定装置 (BP-98A-L, softron, Japan) を用いて 20 秒毎に、動脈血酸素飽和度は小動物用パルスオキシメータ (mouseOxPuls, STARR life sciencescorp, USA) を用いて連続的に、また体温および心電図は vevo2100 に内蔵されている計測システムを用いて、胎仔の超音波イメージングと一緒に vevo2100 内のハードディスクに記録する。

次に、HIF-1、および誘導される Vegf、erythropoietin、Glut-1、Igfbp-1、Bnip3 について、胎仔・胎盤・子宮筋における発現を両群で比較する。血行動態測定後に、母体を安楽死させ、胎仔は血流再分布の評価のために頭部と体部に分けたのち、複数の胎仔・胎盤・子宮筋をホモジェネートして検体を作成する。定量 RT-PCR 法を用いて、HIF-1、Vegf、erythropoietin、Glut-1、Igfbp-1、Pfkfb3、Bnip3 といった低酸素マーカーの発現の相違を、フェニトイン群と対照群で比較する。

胎仔の低酸素が確認されたならば、miRNA のアレイ解析を行う。方法は、ED11.5 の心

血行動態評価後に採取した胎仔頭部および体部の一部、胎盤を直ちに RNA 保存試薬(RNA later, Ambion) に浸漬する。RNA 抽出には mirVana microRNA Isolation kit(Ambion)を用いる。RNA の品質が NanoDrop1000(LMS)で、吸光度 260/280 比が 1.8~2.1、かつ 2100 バイオアナライザ (Agilent) にて、RNA Integrity Number が国際基準の 7.0 以上の検体を選定し、各群 4 例ずつ、計 8 検体をアレイ解析に用いる。miRNA アレイ解析は TaqMan Low Density Array rodent, Card A and Card B(Applied Biosystems 社)で行い、同社の Expression Suite Software にて約 700 種類の miRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR にて測定する。CardA にはこれまで役割が明らかにされている miRNA が、CardB には役割が明らかにされていない miRNA が搭載されている。約 700 種類のうち、各群で発現量に有意差を認められた miRNA の中で Hif-1、Glut-1、Igf1bp-1、erythropoietin 等に結合しうる miRNA があるかどうかを miRNA データベース Targetscan version 5.1 を用いて検出し、標的となる miRNA を同定する。両群に非妊娠マウスにフェニトインを投与した群を加えた 3 群の母体の血清中の miRNA 発現においても、各群 3 検体を用いて胎仔と同様の方法でアレイ解析を行い、フェニトイン投与妊娠マウスに特異的に発現している miRNA も同定する。

4 . 研究成果

CD1 マウス交配で得られた、妊娠マウスを使用した。胎児心筋細胞の HERG チャネル電流(IKr)を阻害し徐脈を引き起こし、低酸素状態にすることが in vitro でのみ証明観察されている薬剤であるフェニトインを、妊娠在胎日齢 (ED) 11.5 のマウスに投与した。フェニトイン投与後に、小動物用超音波高感度イメージングシステムを用い、in vivo で胎仔の心行動態を評価観察した。コントロール群とフェニトイン 50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 投与の 4 群の比較において、投与後 12 時間の時点で、それぞれの群で 0%、10%、18.5%、17.0%に胎仔心停止が見られ、心停止胎仔を除いた胎仔の心拍数も投与前との比較で、+20.2%、-10.9%、-32.0%、-46.2%と用量依存性に低下した。同様に胎仔背側大動脈血流も +51.4%、+4.9%、-40.0%、-83.6%と用量依存性に低下し、in vivo で初めて妊娠マウスへのフェニトイン投与により胎仔マウスが徐脈に至ることを示した。投与後 24 時間でも同様に胎仔マウスが徐脈に至ることが示された。次に、フェニトイン投与胎仔の低酸素の評価目的に、組織低酸素マーカーである pimonidazole hydrochloride (HypoxyprobeTM-1)を用いた組織学的検討を行った。フェニトイン投与 12 時間、24 時間時点で、コントロール群と比較してフェニトイン投与胎仔群の組織は HypoxyprobeTM-1 により強く染色される傾向にあり、母体フェニトイン投与により胎仔が徐脈から低酸素状態が誘発されていることが示された。組織低酸素の定量評価目的に、リアルタイム PCR 法を用い、低酸素遺伝子マーカーである HIF-1 、エリスロポエチン、GLUT-1、VEGF、Pfkfb3、IGFBP1、Bnip3 の発現定量評価を行ったが、コントロール群とフェニトイン投与群 (24 時間) において低酸素マーカーの遺伝子発現には有意差が認められず、胎仔が低酸素に至っていることを直接証明す

ることはできなかった。低酸素状態が短いために低酸素遺伝子マーカーの発現に差が出なかったと考え、フェニトインの暴露時間を延ばして同様の評価を行った。フェニトインをED11.5に投与して48時間後にコントロール群とフェニトイン50mg/kg、60mg/kgの3群で胎仔心血行動態を評価した。フェニトイン75mg/kg以上の投与群では48時間後に100%胎仔心停止が認められたため評価からは外した。胎仔の心拍数は投与前との比較で、+27%、-5%、+4%と用量依存性に低下する傾向にあった。しかしフェニトイン投与12時間と24時間と比較してフェニトイン投与48時間後の徐脈の程度が軽度であったことから、胎仔が低酸素に至っている可能性は低いと考えられたために、組織学的検討と低酸素遺伝子マーカーの測定は行わないこととした。さらにフェニトインの暴露時間を延ばして胎仔の低酸素時間を延ばすことが必要であると考えている。

現在のところ、フェニトインが胎仔徐脈を引き起こす様子は、*in vivo*で初めて証明できているが、胎仔低酸素マーカーに影響を及ぼすことは証明できていない。フェニトイン投与方法を改善し、胎仔低酸素を引き起こすモデルを確立することを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	郷 勇人 (GO HAYATO) (30443857)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	青柳 良倫 (AOYAGI YOSHIMICHI) (30509469)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	金井 祐二 (KANAI YUJI) (60448628)	福島県立医科大学・医学部・助手 (21601)	

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