

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791528

研究課題名（和文） 胎盤特異的遺伝子導入による妊娠高血圧症候群モデルマウスの作製とその解析

研究課題名（英文） Development and analysis of a novel preeclampsia model using a placenta-specific gene manipulation method.

研究代表者

森岡 裕香（MORIOKA YUKA）

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任助教

研究者番号：00360264

研究成果の概要（和文）：本研究では、我々が独自に開発した胎盤特異的な遺伝子操作技術を応用し、以下のような成果を得た。血管新生阻害因子である可溶性 VEGF 受容体 1（sFLT1）を胎盤特異的に過剰発現させることで、妊娠後期の母体の血圧上昇やタンパク尿など、ヒト妊娠高血圧症候群患者の病態を忠実に再現した、新しい疾患モデルマウスの作製に成功した。さらにこのマウスを利用して、プラバスタチンが胎盤増殖因子 PGF の発現を誘導し、病態の治癒効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Previously, we established a placenta-specific gene manipulation method. Applying this technology, we expressed soluble VEGF receptor 1 (sFLT1) known as an anti-angiogenic factor, specifically in the murine placenta. The mice showed hypertension and proteinuria during pregnancy. These are similar symptoms of human preeclampsia patients. We further showed that pravastatin induced the VEGF-like angiogenic factor placental growth factor (PGF) and ameliorated the symptoms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：妊娠高血圧症候群、胎盤、レンチウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

血圧上昇とタンパク尿に代表される妊娠高血圧症候群（Pregnancy-induced hypertension: PIH）は、妊産婦の約1割で発症し、子宮内胎児発育不全も多く併発する。重症化すると母児ともに危険を伴い、妊娠の中断を余儀なくされる。分娩もしくは帝王切

開後の、胎盤の脱落により症状が回復することから、胎盤異常が原因であろうと考えられているものの、発症メカニズムは未だに明らかにされておらず、根本的な治療法の開発には至っていない。基礎的な研究を進展させるためには、有用な疾患モデル動物の作製が望まれる。

近年、PIH 患者の血中における、可溶性血管内皮細胞増殖因子受容体 1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1: sFLT1) 濃度の上昇と、胎盤増殖因子 (Placental growth factor: PGF) 濃度の低下が報告されており、発症原因候補因子として注目を集めている。PGF は FLT1 に結合して血管新生作用を示すが、sFLT1 は遊離の PGF と結合してナチュラルなアンタゴニストとして働く。また、別の血管新生抑制因子である可溶性エンドグリン (soluble endoglin: sENG) についても、PIH 患者における血中濃度の上昇が報告されている。

これらの報告を受けてこれまでに、sFLT1 や sENG を発現するアデノウイルスベクターを尾静脈内投与し、全身性に過剰発現させることで、PIH モデルマウスの作製が試みられている。しかしながらこの方法では、原因候補因子が母体の肝臓や全身の血管壁から発現することになり、胎盤由来の因子が間接的に全身性の影響を引き起こしていることが予想される PIH の病態を、正確に反映しているとは言い難い。

一方で、我々はこれまでに、透明帯を除去した胚盤胞期胚にレンチウイルス (Lentivirus: LV) ベクターを感染させることで、胎盤特異的に遺伝子操作する技術の開発に成功している。この技術を応用すれば、理想的な PIH モデル動物が誕生すると期待できる。

2. 研究の目的

(1) 胎盤特異的な遺伝子導入技術を利用した PIH モデルマウスの作製

疾患の原因解明や、予防・診断・治療法開発のためには、有用なモデル動物の存在が極めて重要である。そこで本研究では、まず、ヒト PIH の病態を忠実に再現できる、モデルマウスの作製を目的とする。

PIH 患者の臨床的な所見としては、以下のような報告がある。

- ・PIH 患者では、sFLT1 ならびに sENG の血中濃度が上昇している
- ・PIH の症状は、分娩もしくは帝王切開後の胎盤の脱落により回復する

両者を考え合わせると、PIH 患者では胎盤から過剰量の sFLT1 ならびに sENG が分泌され、間接的に全身性の作用を誘導している可能性が強く示唆される。そこで、独自に開発した技術を利用して両因子を胎盤特異的に発現させることで、新しい PIH モデルマウスの確立を目指す。

(2) PIH 発症メカニズムの解明と予防・診断・治療法の開発

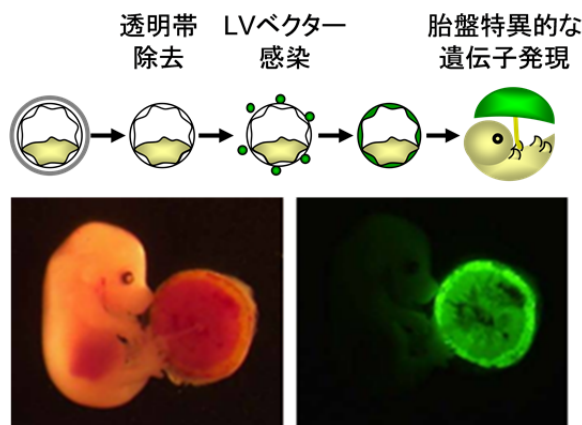
これまでに胎盤特異的に sFLT1 や sENG を発現させた報告はなく、胎盤から分泌された

過剰量の両因子が、全身性または胎盤局所でのように作用するかを詳細に解析することはできなかった。そこで、(1)で作製した新しい PIH モデルマウスを利用して、胎盤の病理組織学的解析や、マイクロアレイによる胎盤の遺伝子発現解析を行い、発症メカニズムの解明や診断マーカーの探索、疾患の予防法や治療法の開発に繋がる情報の収集を試みる。さらに、得られた情報の有用性を、PIH モデルマウスを利用して検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PIH モデルマウスの作製と評価

PIH の原因候補因子として注目されている sFLT1 を、胎盤特異的に過剰発現させることで【図 1】、疾患モデルマウスの作製を試みる。具体的には、透明帯を除去したマウス胚盤胞期胚に、sFLT1 を搭載した LV ベクター (LV-sFLT1) を感染させ、偽妊娠マウスに移植する。LV ベクターの感染濃度により、胎盤における sFLT1 の発現量を制御することが可能であるため、種々の濃度でベクターを感染させて影響を観察し、理想的なモデルマウスの確立を試みる。コントロールとしては、緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein: EGFP) を発現する LV ベクター (LV-EGFP) を使用する。これまでの実績から、我々が開発した技術を用いれば、100%確実に、全ての胎盤で遺伝子発現が可能である。



【図 1】胎盤特異的な遺伝子操作

作製した PIH モデルマウスの有用性は、妊娠後期の母体における、sFLT1 の血中濃度、血圧、尿タンパクの上昇ならびに、分娩後のこれらの症状の回復を指標として評価する。具体的には、胎盤が形成され始める妊娠 8.5 日目から、経日的に各項目を解析する。血中 sFLT1 濃度は ELISA キットを使用して定量し、血圧は、ソフトロン社製のラット・マウス用非観血自動血圧測定装置を用いて、安静期の収縮期血圧ならびに拡張期血圧を測定する。

尿タンパクは、代表的なアルブミン/クレアチニン比について、専用キットで解析する。

さらに、出生時の胎児と胎盤の重量を測定し、成長不全を評価する。

(2)PIH 発症に及ぼす PGF の影響

胎盤ならびに胎児の発育に必須であることが知られている PGF は、FLT1 に結合して血管新生作用を示すが、sFLT1 は遊離の PGF と結合してアンタゴニストとして働く。このことから PIH モデルマウスでは、過剰に産生された sFLT1 が PGF の働きを阻害することで、異常が引き起こされる可能性が考えられる。そこで、LV ベクターを利用して、sFLT1 と同時に PGF も胎盤特異的に過剰発現させ、PIH の発症や進行に与える影響を評価する。

(3)胎盤の病理組織学的解析

PIH モデルマウスの胎盤組織切片を作製し、sFLT1 の過剰発現が胎盤の形成や機能に及ぼす影響を、病理組織学的に解析する。

(4)PIH 発症に及ぼすプラバスタチンの影響

ヒドロキシメチルグルタリル補酵素 A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤であり、高脂血症薬として使用されているスタチン類は、近年、血管内皮に対する保護作用を有することが示されている。さらに、自然流産モデルマウスに対する治療効果も報告されている点に注目し、PIH モデルマウスにプラバスタチンを腹腔内投与することで、病態に与える影響を評価する。

(5)マイクロアレイ解析を利用した PIH 関連因子の探索

正常妊娠マウスの胎盤と PIH モデルマウスの胎盤における遺伝子発現を、マイクロアレイ解析により比較し、発現に差のある遺伝子を選び出す。正常妊娠胎盤としては LV-EGFP 感染胎盤を利用し、LV ベクター感染による影響を除く工夫を行う。また、LV ベクターによる遺伝子発現強度の個体差を補正するために、各群 6 個ずつプールした胎盤から RNA を調製する。*in silico* で発現パターンや機能ドメイン検索などを行うことにより候補の遺伝子を絞り込むが、sFLT1 は血管新生経路と深く関わっていることから、血管新生および関連因子に標的を絞った比較を行うことで、効率的に解析を進める。

最終的に絞り込まれた遺伝子については、胎盤特異的な過剰発現やノックダウン技術を応用することで個体レベルでの解析を行い、PIH の発症、増悪、治癒に関与するかを検証する。さらに、これらの情報をもとに、診断マーカーの探索や予防・治療法の開発に繋げる。

4. 研究成果

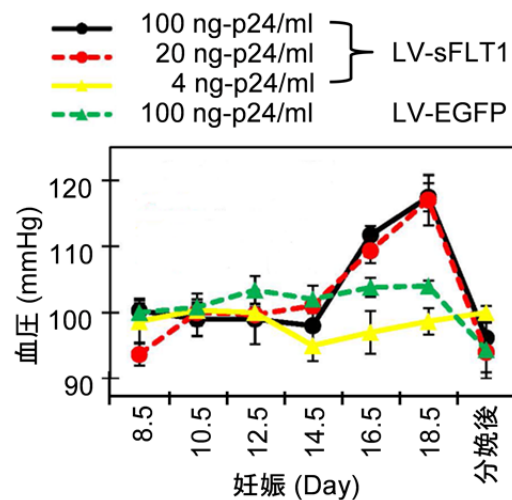
(1)PIH モデルマウスの確立

LV-sFLT1 を種々の濃度で胚盤胞期胚に感染させて偽妊娠マウスに移植することで、PIH モデルマウスの作製を試み、以下のような解析結果を得た。

①母体の血中 sFLT1 濃度、血圧、尿タンパク
血中 sFLT1 濃度に関しては、感染濃度依存的に高値が観察され、妊娠が進行して胎盤が最大となる妊娠 18.5 日目まで上昇し続けた。一方で血圧は、カプシドタンパク質 p24 濃度 20 ng/ml 以上で LV ベクターを感染させた群において、妊娠 16.5 日目に急激な上昇が観察され、18.5 日目にピークを迎えた【図 2】。また、妊娠 18.5 日目の尿中アルブミン/クレアチニン比を測定したところ、コントロール群と比較して約 1.4 倍の高値を示した。いずれも、分娩後は速やかにコントロール群と同程度まで下降した。

②胎児・胎盤重量

妊娠 18.5 日目に帝王切開により胎児と胎盤を摘出し、重量を測定したところ、コントロール群と比較して 14~19%の重量低下が観察された。



【図 2】 LV-sFLT1 の感染濃度と母体血圧

以上の結果は、ヒト PIH 患者で報告されている血中 sFLT1 濃度の上昇、妊娠後期の高血圧、タンパク尿の病態を忠実に反映しており、子宮内胎児発育遅延も観察されている。さらに、分娩に伴う胎盤の脱落により母体の症状が回復する事実とも一致することから、有用な PIH モデルマウスの確立に成功した。

(2)PGF が PIH 発症に関与する

LV ベクターを利用して、sFLT1 と同時に PGF も胎盤特異的に過剰発現させたところ、母体血中では PGF 濃度の上昇に伴って sFLT1 濃度が低下し、sFLT1 の過剰発現に伴う血圧上昇やタンパク尿など、PIH 病態の発現が抑制さ

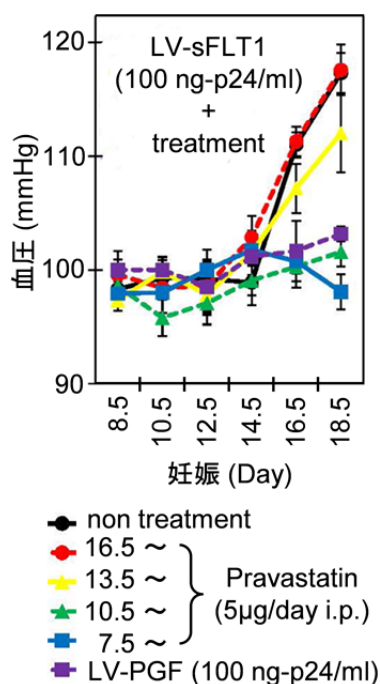
れた【図3】。このことから、sFLT1によるPGFの機能阻害が、PIH発症に関与している事が明らかとなった。

(3) 胎盤の病理学的解析

PIHモデルマウスの胎盤組織切片をコントロール群と比較した結果、ラビリンス層の厚みが薄く、血管形成不全が観察された。

(4) プラバスタチンはPGFの発現を誘導してPIH発症を抑制する

PIHモデルマウスに毎日プラバスタチンを腹腔内投与したところ、妊娠10.5日目以前に投与を開始することで、妊娠後期の母体の血圧上昇が有意に抑制された【図3】。さらに、尿タンパクの上昇や、子宮内胎児発育遅延も観察されず、PIHの発症が抑制された。プラバスタチン投与によるPIH発症抑制メカニズムについて解明を試みたところ、プラバスタチン投与マウスでは血中PGF濃度の上昇が誘導されていることが明らかとなり、研究成果(2)に示したのと同じ機序でsFLT1の血中濃度を低下させ、結果としてPIHの発症が抑制されている可能性が強く示唆された。



【図3】 血圧上昇に対する予防・治療効果

(5) マイクロアレイ解析を利用したPIH関連因子の探索

マイクロアレイ解析は既に終了し、候補遺伝子の絞り込みなどを行っているが、本研究期間内に、個体レベルで有用性を示す因子の同定には至らなかった。引き続き、残りの候補遺伝子の解析を進める予定である。

本研究成果をまとめると、sFLT1を胎盤特異的に過剰発現させることで、ヒトPIH病態を忠実に反映した、疾患モデルマウスを確立できた。このモデルマウスを利用することで、PIHの発症原因の1つとして、胎盤からのsFLT1の過剰発現と、それに伴うPGFの機能阻害が関与することが明らかとなり、プラバスタチン投与により、PGFの発現誘導を介してPIHの病態を予防・改善できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Kumasawa Keiichi、Ikawa Masahito、Kidoya Hiroyasu、Hasuwa Hidetoshi、Saito-Fujita Tomoko、Morioka Yuka、Takakura Nobuyuki、Kimura Tadashi、Okabe Masaru、Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model.、Proc Natl Acad Sci U S A.、査読有、Vol.108、No.4、2011、pp.1451-1455、DOI : 10.1073/pnas.1011293108

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森岡 裕香 (MORIOKA YUKA)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・特任助教
研究者番号：00360264

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：