

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20957

研究課題名(和文) AQP1を起点とする妊娠高血圧症候群における胎盤機能不全の理解と治療戦略の創出

研究課題名(英文) Understanding placental dysfunction and developing treatment strategies from AQP1 in hypertensive disorder of pregnancy

研究代表者

室井 慎一 (Muroi, Shin-ichi)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・研究員

研究者番号：70965714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群(HDP)の発症には胎盤の形成不全が病因の一つであると考えられているが詳細は不明である。本研究では、HDPモデルマウス胎盤におけるAQP1発現減少メカニズムおよび薬理的に調節可能な和漢薬の探索を行った。妊娠各時期の胎盤組織を用いた解析から、炎症性サイトカインによるAQP1の減少によって胎盤組織の脆弱性が亢進し、胎盤組織の機能不全が生じている可能性が示唆された。HDPで亢進するRAA系を抑制可能な複数の生薬エキスおよび成分化合物を見出した。本研究の成果は妊娠高血圧症候群の新規治療法の確立につながる有用な基礎データであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深刻な出生率の低下の背景には、社会が妊娠の機会を奪っているだけでなく妊娠高血圧症候群などの妊娠時疾患の存在も重要であるにも関わらず、有効な治療法の確立および詳細な病態形成メカニズムの解明がなされていない。本研究では妊娠高血圧症候群の病態形成メカニズムのうち、胎盤組織傷害におけるAQP1発現減少のメカニズムをモデルマウスを用いて明らかにした。さらに、妊娠高血圧症候群の新規治療薬を使用経験の豊富な和漢薬から探索することで、妊娠への影響が少ない可能性のある候補化合物を見出すことができた。本研究の成果は妊娠高血圧症候群の治療満足度の向上につながる有用な基礎データであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hypertensive disorders of pregnancy (HDP) is the most common medical problem encountered during pregnancy. Dysfunction of the placenta is thought to be one of the causes of HDP, but detailed mechanism is still unknown. In this study, we investigated the mechanism of decreased AQP1 expression in the placenta of HDP model mice and explored WAKANYAKU that can pharmacologically modulate AQP1 expression. Analysis of placental tissue at various stages of pregnancy suggested that the decrease in AQP1 caused by inflammatory cytokines may increase the fragility of placental tissue, resulting in placental tissue dysfunction. In addition, several herbal extracts and their components inhibit the RAA system, which is overactivated in HDP. These results might to be an useful data for establishing new treatment methods for HDP.

研究分野：生化学

キーワード：妊娠高血圧症候群 アクアポリン 和漢薬 レニンアンジオテンシン系 アポトーシス サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (hypertensive disorders of pregnancy: HDP) は周産期に生じる疾患の中で最も頻度が高いにも関わらず、効果的な治療法が存在しない。HDP の発症においては、胎盤の機能不全が原因の一つとして考えられているが、詳細には不明な点が多く、その理解が喫緊の課題である。水チャネルの一種である aquaporin (AQP) は、細胞膜間の水輸送以外にも細胞増殖、細胞遊走および炎症応答調節などの多彩な機能が報告されている。血管内皮細胞の AQP1 は血管新生における細胞遊走・浸潤に重要な役割を果たしており、胎盤の形成にも関与している可能性が示唆される。和漢薬は多成分系であり、単一の作用標的を持たないことから、西洋薬ではカバーできない疾患に対して効果を示すことが知られている。その作用の一端には本研究で着目している AQP の調節といったユニークな薬理作用があり、胎盤 AQP1 を調節可能な新規治療薬候補が和漢薬に存在することが期待できる。HDP において亢進するレニン - アンジオテンシン - アルドステロン (RAA) 系に着目したマウスモデル (pregnancy-associated hypertensive mice: PAH マウス) 胎盤を用いたトランスクリプトーム解析の結果から AQP1 の発現量が著明に低下していることを見出した。以上から「胎盤 AQP1 の減少が妊娠高血圧症候群の病態形成に関与する」のではないかという新仮説を想起するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、大きく2つの戦略により展開した。まず、HDP 病態における胎盤機能不全の理解および新規病態形成メカニズムの解明を目的とし、胎盤 AQP1 発現の減少の詳細な分子メカニズムを調べた。一方で、胎盤 AQP1 減少を薬理的に調節可能な和漢薬の探索も併せて行った。特に、PAH マウスで亢進する RAA 系に対して阻害活性を持つ和漢薬の探索を行った。

3. 研究の方法

(1) PAH モデルマウス胎盤の解析

PAH マウスは Human Renin 導入雄性マウスと Human Angiotensinogen 導入雌性マウスを交配させることで作製した。野生型 (WT) および PAH マウスの妊娠各時期の胎盤サンプルを用いて解析を行った。具体的には、胎盤の形成が生じる妊娠 13 日目 (P13)、母獣の血圧上昇が生じる妊娠 16 日目および出産直前の妊娠 19 日目のサンプルを用いた。胎盤サンプル中の AQP 類、炎症性サイトカインおよびアポトーシス関連因子の mRNA 発現を RT-qPCR 法で、AQP1 のタンパク量を western blot 法にてそれぞれ評価した。

(2) RAA 系を抑制可能な和漢薬の探索

アンジオテンシン受容体 (AT1R) を安定発現させた HEK-293 細胞に和漢薬を 100 ng/ml になるように 24 時間前処理し、Angiotensin II (Ang II, 100 nM) を 15 分間処理後に細胞溶解液を回収した。AT1R 受容体の活性化は ERK1/2 のリン酸化レベルを Western blot 法にて検出することで評価した。

4. 研究成果

(1) PAH マウス胎盤における AQP1 発現の詳細な解析

WT マウスの胎盤組織中の AQP1 mRNA 発現は妊娠 13 日目から 16 日目にかけて減少した (図 1A)。妊娠 16 および 19 日目の PAH マウスの胎盤では、WT と比較して AQP1 mRNA 発現量が著明に低下していた。胎盤に発現することが報告されている他の AQP アイソフォームである AQP3 および AQP8 は WT マウスにおいて妊娠各時期で変化なし、および妊娠後期にかけて発現上昇がみられた (図 1B および C) もの、WT マウスと PAH マウスとの間に著明な差はみられなかった。AQP1 タンパク量に関しては mRNA 発現とは異なり、WT マウスでは妊娠の時期によって著明な変化は見られなかった一方で、妊娠 16 および 19 日目では PAH マウスの胎盤で著明に減少していた (図 2)。本成績により PAH マウスにおける AQP1 発現の減少は、胎盤が形成され RAA 系の活性化による血圧上昇に伴って引き起こる可能性が示唆された。

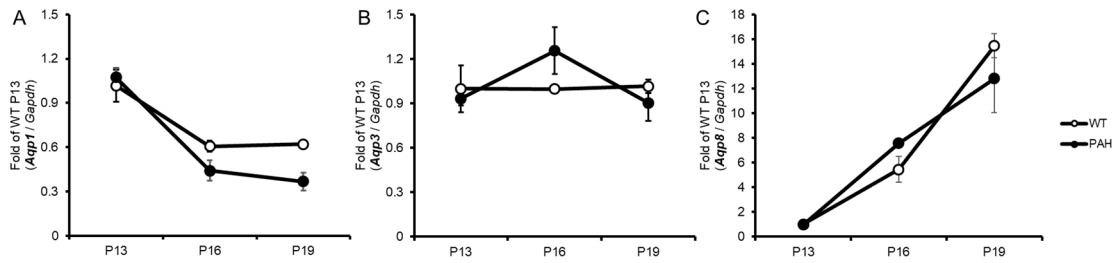


図1. WT および PAH マウスの妊娠各時期の胎盤中の AQP 類の mRNA 発現
PAH マウスでは妊娠 16 および 19 日目で *Aqp1* mRNA 発現減少した (A) 一方で, *Aqp3* (B) および *Aqp8* (C) mRNA 発現は WT と PAH マウスとの間に著明な差は確認されなかった. Mean±SEM, N=4

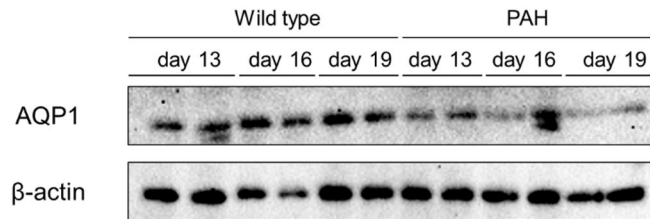


図2. WT および PAH マウスの妊娠各時期の胎盤中の AQP1 タンパク量
mRNA 発現と一致して, PAH マウスでは妊娠 16 および 19 日目で AQP1 量が減少した.

(2) AQP1 発現減少メカニズムの解析

他の組織などで AQP1 発現を減少させることが報告されている炎症性サイトカインの mRNA 発現を調べたところ, 妊娠 16 日目において PAH マウスの胎盤で *Il1b* mRNA 発現が著明に上昇していた (図3). Mean±SEM, N=4

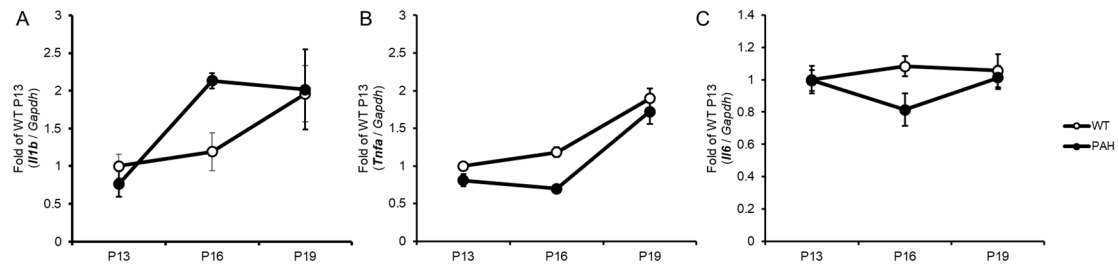


図3. WT および PAH マウスの妊娠各時期の胎盤中の炎症性サイトカインの mRNA 発現
PAH マウスでは妊娠 16 日目で胎盤中の *Il1b* mRNA 発現量が著明に上昇した (A). 一方で, *Tnfa* および *Il6* mRNA 発現にはそのような上昇は生じなかった (B および C). Mean±SEM, N=4

(3) AQP1 発現減少の病態形成における役割の解析

PAH マウス胎盤ではアポトーシスが生じている可能性が報告されており, 妊娠各時期の胎盤サンプル中のアポトーシス関連因子の mRNA 発現を調べた. 妊娠 19 日目において, PAH マウスでアポトーシスを促進する *Casp9*, *Bak* の発現が上昇, 抑制する因子である *Xiap* の発現が減少しており (図4), 胎盤組織のアポトーシスは病態の進行した妊娠 19 日目に生じていることが示唆された. 以上の成績から, PAH マウスにおける胎盤組織中の AQP1 の減少はアポトーシスに先行して生じていることがわかった. AQP1 ががん細胞でアポトーシスに対して抑制的にはたらくことと併せて考えると, 炎症性サイトカインによって引き起こされた AQP1 の発現減少により胎盤組織のアポトーシスに対する脆弱性が増大し, 組織破壊および HDP の病態が発症している可能性が示唆された.

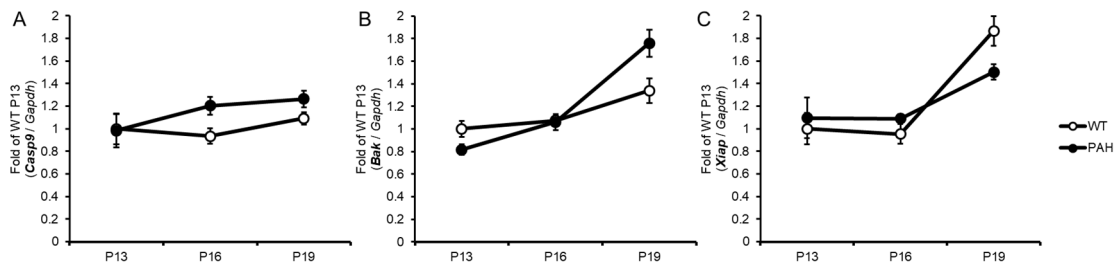


図 4. WT および PAH マウスの妊娠各時期の胎盤中のアポトーシス関連因子の RNA 発現
PAH マウスの妊娠 19 日目の胎盤組織では *Casp9* および *Bak* mRNA 発現の上昇 (A および B) および *Xiap* mRNA の減少 (C) していた . Mean±SEM, N=4

(4) RAA 系を抑制可能な和漢薬の探索

約 90 種の生薬エキスを調べたところ、抑制率 60%以上の活性をもつものが 36 種存在していた (図 5) . 活性を示したもののうち特に活性の高かったオウヒ, オウレン, カンゾウ, クジンおよびジンギョウの主成分である naringenin, berberine, glycyrrhetic acid, oxymatrine および swertiamarin はそれぞれ Ang II の処理によって引き起こされる ERK1/2 のリン酸化を著明に抑制した (図 6) . 本成績により, 各生薬エキスおよび成分化合物が HDP の新規治療薬の候補になる可能性が示唆された .

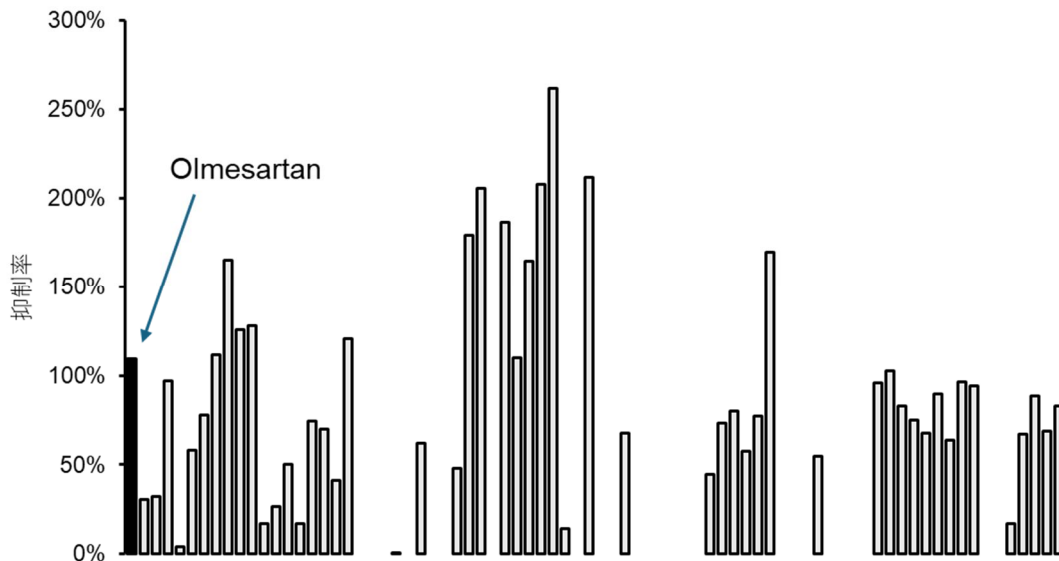


図 5. AT1R 活性化を抑制する生薬エキスの探索

AT1R 安定発現細胞を angiotensin II (100 nM) で 15 分間刺激することで引き起こした ERK のリン酸化に対する olmesartan および生薬エキス (10 μg/ml) の前処理 (24 時間) の抑制率を評価した . いくつかの生薬エキスは olmesartan に匹敵する抑制活性を示した .

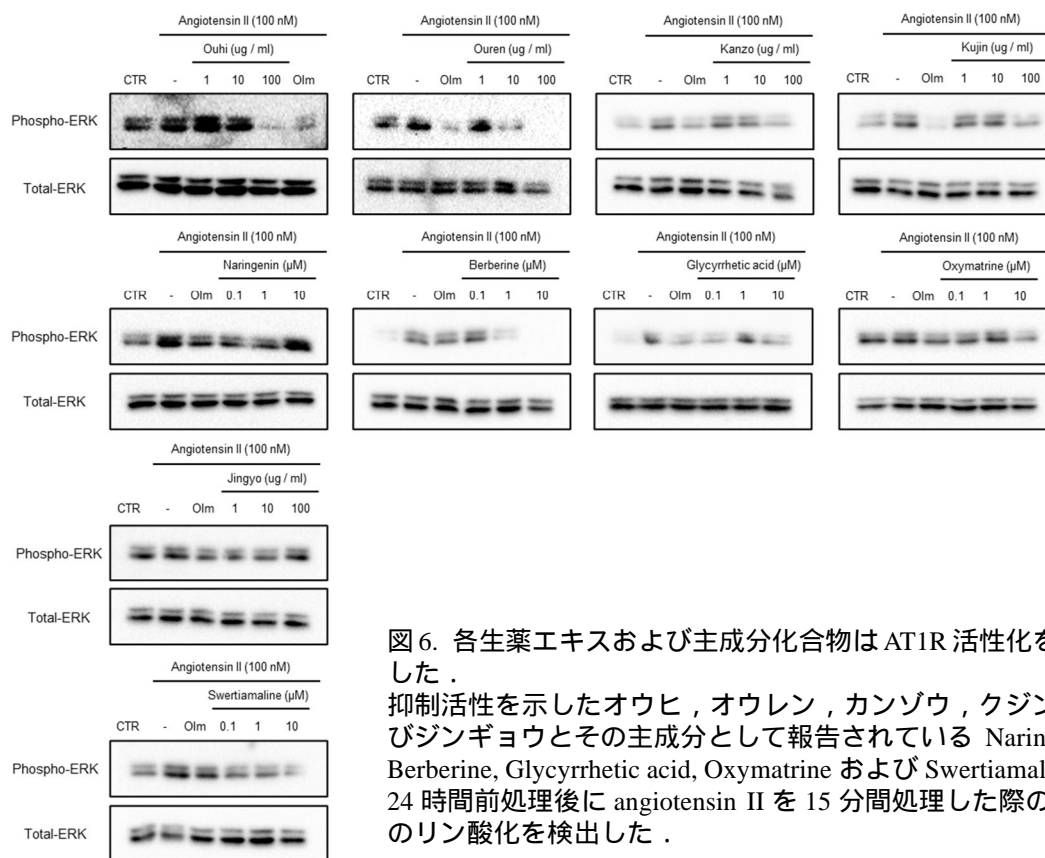


図6. 各生薬エキスおよび主成分化合物はAT1R 活性化を抑制した。
抑制活性を示したオウヒ, オウレン, カンゾウ, クジンおよびジンギョウとその主成分として報告されている Naringenin, Berberine, Glycyrrhetic acid, Oxymatrine および Swertiamaline を 24 時間前処理後に angiotensin II を 15 分間処理した際の ERK のリン酸化を検出した。

HDP は「学説の疾患」と呼ばれるほど多くの学説が存在し、詳細な病態形成メカニズムが不明な疾患である。本研究では HDP の特に胎盤組織傷害に焦点を当て、AQP1 発現減少との関連を示した。さらに、HDP で亢進する RAA 系を抑制可能な和漢薬由来成分を見出した。これら成分化合物の AQP1 発現減少に対する作用および AQP1 と HDP 病態との詳細な関連などについては今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamada Yasunari, Saito Hodaka, Araki Masaya, Tsuchimoto Yuhei, Muroi Shin-ichi, Suzuki Kyohei, Toume Kazufumi, Kim Jun-Dal, Matsuzaka Takashi, Sone Hirohito, Shimano Hitoshi, Nakagawa Yoshimi | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Wogonin, a Compound in Scutellaria baicalensis, Activates ATF4?FGF21 Signaling in Mouse Hepatocyte AML12 Cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nutrients | 6. 最初と最後の頁 3920 ~ 3920 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14193920 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Kim Jun-Dal, Kwon Chulwon, Nakamura Kanako, Muromachi Naoto, Mori Haruka, Muroi Shin-ichi, Yamada Yasunari, Saito Hodaka, Nakagawa Yoshimi, Fukamizu Akiyoshi | 4. 巻 299 |
| 2. 論文標題 Increased angiotensin II coupled with decreased Adra1a expression enhances cardiac hypertrophy in pregnancy-associated hypertensive mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 102964 ~ 102964 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.102964 | 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 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 室井 慎一、中川 嘉、深水 昭吉、金 俊達 |
| 2. 発表標題 妊娠高血圧症モデルマウスにおける心肥大に対するアドレナリン 1A 受容体発現減少の役割 |
| 3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第40回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 室井 慎一、金 俊達、深水 昭吉、中川 嘉 |
| 2. 発表標題 妊娠高血圧症候群モデルマウスにおける心臓アドレナリン 1A受容体の発現減少は心肥大を悪化させる |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山田 泰成, 齋藤 穂高, 荒木 雅弥, 槌本 侑平, 室井 慎一, 鈴木 恭平, 金 俊達, 中川 嘉 |
| 2. 発表標題 Wogonin-ATF4 による Fgf21 の発現制御機構 |
| 3. 学会等名 第77回 日本栄養・食糧学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 荒木 雅弥, 槌本 侑平, 鈴木 恭平, 山田 泰成, 齋藤 穂高, 室井 慎一, 金 俊達, 島野 仁, 中川 嘉 |
| 2. 発表標題 肝細胞・マクロファージにおけるSREBP-1aの生理機能解析 |
| 3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第41回大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 室井 慎一, 金 俊達, 三澤 智子, 粕谷 善俊, 中川 嘉 |
| 2. 発表標題 肺線維症モデルマウスの肺では酸化-還元バランスによってAQP1発現量が調節される |
| 3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|