

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591596

研究課題名(和文)酸化ストレスの視点から見た胎盤機能不全における絨毛細胞機能障害機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on the role of oxidative stress on placental dysfunction and trophoblast function

研究代表者

福島 恒太郎 (Fukushima, Kotaro)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：40304779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症や虚血再灌流障害によって生成される活性酸素種がPIHの病態形成過程への関与を明らかにするために、XOとその基質であるXanthine(X)の同時添加、H₂O₂、スカベンジャーおよびTCDDが培養絨毛細胞に与える影響、合併症のない妊婦の分娩までの血圧と周産期予後、絨毛細胞の浸潤障害が少ない前置胎盤のPIHの発症頻度を検討し、X/XOによって生成されるH₂O₂がEVTにアポトーシスを誘導しうること、TCDDは絨毛細胞のアポトーシスを誘導しないこと、PIHを発症しなくても妊娠32週以降血圧の血圧は胎児発育に影響を与えること、前置胎盤妊婦ではPIH発症頻度が低いこと、がわかった。

研究成果の概要(英文)：This study was aim to clarify the biological influence of reactive oxygen species (ROS) produced by XO on extravillous trophoblast (EVT) cell and investigate possible role of the EVT function on the pathogenesis of preeclampsia. X/XO decreased the cell growth by H₂O₂ production, increased the urate level and the apoptotic cell ratio significantly. The Pre-HT group had a significantly lower mean birth weight and a larger negative deviation from the standard birth weight. The DBP elevation after 32 weeks of gestation was a risk factor for SGA. After 28-30 weeks, there was a statistically significant difference in the incidence of PIH. In conclusion, ROS produced by XO induced apoptosis and affected EVT function including invasion and differentiation. Our clinical data from a recent population database in Japan could strengthen epidemiologic evidence that trophoblast invasion is related to the pathogenesis of PIH.

研究分野：基盤C(一般)

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：Trophoblast 妊娠高血圧症候群

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群(PIH)は、全身の細動脈の攣縮ならびに凝固線溶系の異常を特徴的な病像とする疾患である。本症候群の病因・病態の中心には、妊娠初期の絨毛細胞の脱落膜への侵入異常をはじめとする細胞分化の異常に起因する胎盤の形成障害(Zhou, J Clin Invest. 1997)と妊娠中期以降母体における血管内皮細胞障害(Roberts, Lancet 2001)の2つが関与するといわれる。近年合胞体細胞の破壊とその Debris の血中流入などが関与することが示唆されているが、いまだ2つの事象が結びつく機序の説明は確立されていない。

我々はヒト不死化絨毛外絨毛細胞(EVT)株 TCL1細胞を用いてPIH患者血清に絨毛細胞障害因子が存在すること(Fukushima, 2001)、TNFがEVTのインテグリンの発現変化とそのシグナルが浸潤、細胞死、分化調節に関与すること(Fukushima, 2003)、EVTが示すマトリゲル上で血管内皮に特異的な形態変化(tube formation)にVEGFと血管内皮特異的インテグリン V₃が関わること(Fukushima, 2005)、を明らかにした。さらにこの過程では低酸素に反応する転写因子 Hypoxia inducible factor 1 alpha(HIF1A)遺伝子が、20%酸素濃度下でも発現が上昇し、その発現、転写活性とtube formation能が相関することを明らかにしてきた(Fukushima, 2008)。これらのことから、絨毛細胞の機能分化には妊娠初期の特異的な酸素濃度下での調節が大きく関わっており、その破綻が諸種の病的妊娠の発症に関与するものと考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、炎症や酸素濃度、炎症や虚血再灌流障害によって生成される活性酸素種・酸化ストレスを中心に、絨毛細胞とその外的環境の連関の観点から、PIHや流産、IUGRなどの病態形成過程を明らかにすることを目的とした

3. 研究の方法

1) 妊娠高血圧症候群(PIH)の病態形成には活性酸素種(ROS)を介した血管内皮機能等の妊娠維持機構の失調が関与すると考えられている。近年PIH患者胎盤ではXanthine oxidaseの発現および活性が上昇していることが報告された。我々もPIH患者血清中の尿酸、過酸化水素濃度が対照妊婦に比し有意に高値を示しかつ相関することを報告した。そこで本研究ではROSが絨毛外絨毛細胞(EVT)に与える生物学的影響を明らかにすることを目的に、ヒト不死化EVT細胞株(TCL1)の培養上清中にXanthine(X)2.3mM, Xanthine oxidase (XO) 0.015U/mLを加え、6,12時間後の生着細胞数ならびに上清中の

尿酸濃度、TUNEL法によりアポトーシス細胞の割合、ボイデンチェーンバー法により浸潤細胞数を、それぞれ測定した。統計学的検定にはt検定を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

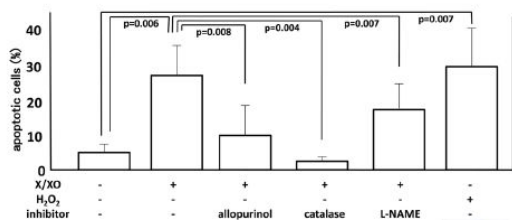
3) 米国高血圧合同委員会 JNC 7 報告では収縮期血圧(SBP)130mmHg以上140mmHgないし拡張期血圧(DBP)80mmHg以上90mmHg未満をPre-hypertensive (pHT) rangeとして定義しているが、妊婦はその対象に含まれておらず妊娠中のpHTの臨床的意義は不明である。本研究では妊娠中の妊娠高血圧症候群(PIH)を伴わないpHTが胎児発育に与える影響を明らかにすることを目的とし、2008年から2010年に当院で管理し妊娠34週以降に分娩にいたった母体、胎児に合併症のない474症例において、分娩前2週間(妊娠後期、中央値37週)以内の血圧がpHTの定義を満たす71例をpHT群、満たさない403例を対照群として、妊娠前期(20週未満、中央値16週)の血圧、妊娠前後期のBMI、児の出生体重とそのZスコア、APGAR値、臍帯動脈血pH、母体血中クレアチニン、尿酸値について比較し、妊娠前後期のBMI、収縮期、拡張期血圧それぞれについてsmall for gestational age (SGA)児の発症について多変量解析を行った。PIHを発症したものは除外した。Zスコアは日本超音波医学会の基準値を用いて求めた。統計学的検討はMan-Whitney U検定、多重ロジスティック回帰を用いP値0.05未満を有意とした。研究は当院の臨床データ取り扱い規則に沿って行った。

4) 前置胎盤(PP)と妊娠高血圧症候群(PIH)は、ともに母児周産期罹病における重要な産科疾患である。PIHでは母体脱落膜、筋層への絨毛細胞浸潤が阻害されていること、一方PPでは絨毛細胞の浸潤の増加による癒着胎盤発症リスクの上昇が知られている。すなわち、相反する絨毛細胞のふるまいがみられる両疾患が併存する頻度は低下すると予想されるが、近年の大規模データベース(DB)で検討の報告は少ない。本研究では本邦のDBを用いてこの仮説を検証することを目的に2005年から2009年に日本産科婦人科学会周産期DBに登録された妊娠22-38週に分娩となった初妊婦のうち合併症、喫煙、飲酒のない22,359例をPP群859例、非PP群21,500例にわけPIHの発症頻度を全体ならびに週数別(22-24, 25-27, 28-30, 31-33, 34-36, 37-38)に比較した。検討にあたってはDBの利用規程に沿い、同学会周産期委員会の許可を得た。統計学的検討にはカイ2乗検定を用いた。

4. 研究成果

1) 生着細胞数の0時間に対する6,12時間後の相対比は対照群では 0.7 ± 0.1 , 1.1 ± 0.1 であったのに対し、X/XOを加えたTCL1(X/XO添加群)では 0.1 ± 0.0 , $0.1 \pm$

0.0 と有意に小さかった。同じく培養上清中尿酸値(mg/dL)は、対照群の 0.0 ± 0.0 , 0.0 ± 0.0 に比し X/XO 添加群では 4.3 ± 0.1 , 4.3 ± 0.1 と有意に高値であった。アポトーシス細胞の割合は対照群 $0.0 \pm 0.0\%$ に対し X/XO 添加群では $93.9 \pm 2.4\%$ と有意に高かった。浸潤細胞数は、対照群と X/XO 添加群でそれぞれ 32.3 ± 8.0 と 11.3 ± 4.9 であり、X/XO 添加群で有意に少数であった。このアポトーシスはカタラーゼによって完全に、アロプリノールや L-NAME で部分的に抑制された。つまり、XO が産生する ROS は TCL1 細胞にアポトーシスを誘導するとともに、細胞浸潤能を抑制した。この結果から、ROS が EVT の分化や細胞生存の調節に関与していることが示唆された。



図：X,XO 添加による絨毛細胞へのアポトーシス誘導と阻害剤の効果

2) 活性酸素種の供給源となり得る TCDD は絨毛細胞のアポトーシスを誘導しないことがわかった (Fukushima, HET,2011)

3) pHT 群は対照群に比し妊娠前期の収縮期、拡張期血圧が有意に高値で、出生体重および Z スコアが有意に小さかった ($P < 0.05$)。母体血中尿酸値は有意に高値であったが ($P < 0.01$)、クレアチニン値には差がなかった。多変量解析では妊娠 32 週以降の拡張期血圧上昇が SGA 児のリスク因子であった (オッズ比 1.09, $P < 0.05$)。

すなわち pHT 妊婦の中には、正常血圧範囲であっても PIH と連続した病態を呈する症例があると考えられた。(Fukushima ら、Hypertens Res2012)

Table 1 Clinical profiles and outcomes of subjects

	Normotensive range: SBP<130 and DBP<90	Pre-hypertensive range: 130<SBP<140 and/or 90<DBP<100 range	P values
Maternal profile			
Maternal age	N=403 31.3 ± 4.6	N=71 31.4 ± 4.6	0.40
Maternal height (cm)	158.4 ± 5.4	158.5 ± 5.2	0.29
Gravidity*	1 (0-3)	1 (0-3)	0.61
Parity*	1 (0-5)	0 (0-5)	0.37
Nulipara**	191 (47.4%)	39 (54.9%)	0.25
GW at delivery (kg)	36.3 (34.1-41.9)	36.1 (34.1-41.9)	0.90
CS**	132 (32.8%)	21 (29.6%)	0.68
Perinatal outcome			
Birth weight (g)	N=403 2860 ± 421	N=71 2765 ± 605	0.03
Deviation from standard birth weight (z-score)	0.11 ± 1.11	-0.27 ± 1.15	0.01
SGA (< -2SD)***	15 (3.7%)	8 (11.3%)	0.01
Mac**	203 (50.4%)	35 (49.3%)	0.90
APGAR (5min)†	9 (1-10)	9 (8-10)	0.54
Low APGAR (< 7)**	6 (1.5%)	0 (0.0%)	0.60
Cord blood pH	7.3 ± 0.07 (N=391)	7.29 ± 0.07 (N=68)	0.73
Acidosis (< 7.2)**	36 (9.4%)	7 (10.0%)	0.82
Before 20 weeks			
SBP	N=403 21.4 ± 3.1	N=71 22.1 ± 3.3	0.12
DBP (mmHg)	109 ± 11	118 ± 11	< 0.001
GW at measurement (kg)	61 ± 9	67 ± 10	< 0.001
GW at measurement (kg)	16.3 (17.6-13.9)	16.1 (15.3-13.9)	0.84
32 weeks onwards			
SBP	N=403 24.9 ± 3.3	N=71 25.6 ± 3.3	0.065
DBP (mmHg)	113 ± 10	129 ± 7	NE
GW at measurement (kg)	66 ± 8	79 ± 5	NE
GW at measurement (kg)	37.3 (33-41)	37.3 (32-42)	0.7
Weeks to delivery	1.03 ± 0.6	0.99 ± 0.58	0.61
Maternal blood sampling			
Creatinine (mg/dl)†	N=148 0.47 (0.29-0.87)	N=33 0.52 (0.36-0.8)	0.062
Uric acid (mg/dl)†	4.3 (0.9-7.8)	4.9 (3.7-5.9)	< 0.05
GW at sampling (kg)	36.4 (34.1-41.3)	36.4 (34.1-41.9)	0.49
Weeks to delivery	0.89 ± 0.8	0.99 ± 0.58	0.35

Abbreviations: BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; GW, weeks of gestation; SBP, systolic blood pressure; SGA, small for gestational age. Data are expressed as either the mean ± s.d., median (range) or % number of cases (%). The P-values for the comparison between normotensive and pre-HT levels were calculated using either the unpaired t-test, Mann-Whitney test, **χ²-test (GraphPad Prism 5, GraphPad Software, CA, USA). P-values < 0.05 were considered significant. Gray shaded values showed statistically significance.

表：妊娠 32 週以降の Pre-HT 域血圧と正常血圧妊婦の臨床背景、周産期予後の比較

4) PP 群は非 PP 群に比し、分娩週数が早く (36.3 ± 2.4 対 36.6 ± 3.1 週, $P < 0.0001$), 母体年齢が高かった (32.2 ± 4.7 対 29.9 ± 5.2 才, $P < 0.0001$)。また PIH の発症率は (0.9 対 10.4% , $P < 0.0001$) 低かった。

PP 群では PIH を発症する前に分娩となる症例が多い可能性があるため、週数別に PIH の発症頻度を比較した (表 2)。妊娠 28 週以降では、28-30 (6.1 対 23.1%), 31-33 (3.4 対 24.0%), 34-36 (1.2 対 17.2%), 37-38 (0.2 対 6.4%) 週において、PP 群における PIH の発症率はそれぞれ有意に低かった。

つまり、本邦の大規模 DB を用いた検討でも、絨毛細胞浸潤の様相が異なる前置胎盤と妊娠高血圧症候群の併存する頻度は低く、絨毛細胞の浸潤障害が妊娠高血圧症候群の病態形成に関わっていることが臨床疫学的にも示唆された。

	Number of patients	Maternal age	Gestational weeks at delivery	PIH ratio
Previa	859	32.2 ± 4.7	36.3 ± 2.4	8 0.93%
non-previa	21500	29.9 ± 5.2	36.6 ± 3.1	2239 10.41%
P Value		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

図：前置胎盤、非前置胎盤症例における PIH 発症頻度

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Effect of transient TCDD exposure on immortalized human trophoblast-derived cell lines.

Fukushima K, Tsukimori K, Li D, Takao T, Morokuma S, Kato K, Seki H, Takeda S, Matsumura S, Wake N.

Hum Exp Toxicol. 2012 Jun;31(6):550-6.

Blood pressure measurements within the JNC7 pre-hypertensive range after 32 weeks of gestation are a risk factor for decreased fetal growth.

Fukushima K, Morokuma S, Tsukimori K, Murata M, Wake N.

Hypertens Res. 2012 Jan;35(1):128-30.

The predictive value of anti-SS-A antibodies titration in pregnant women with fetal congenital heart block.

Anami A, Fukushima K, Takasaki Y, Sumida T, Waguri M, Wake N, Murashima A.

Mod Rheumatol. 2013 Jul;23(4):653-8.

Oxidative stress produced by xanthine oxidase induces apoptosis in human extravillous trophoblast cells.

Murata M, Fukushima K, Takao T, Seki H, Takeda S, Wake N.

J Reprod Dev. 2013;59(1):7-13.

前置胎盤初妊婦では妊娠高血圧症候群発症の頻度が低い 周産期登録データベース 22,359 分娩の解析から (福嶋 恒太郎, 加藤 聖子 産婦人科の実際 (0558-4728)62 巻 13 号 Page2197-2200(2013))

〔学会発表〕(計 3 件)

前置胎盤初妊婦では妊娠高血圧症候群発症の頻度が低い 周産期登録データベース 22359 分娩の解析から

第 34 回日本妊娠高血圧学会 H25.10.4-5 富山市

前置胎盤初妊婦では妊娠高血圧症候群発症の頻度が低い 周産期登録データベース 22359 分娩の解析から

第 49 回日本周産期新生児医学会 H25.7.14-16、横浜市

妊娠 32 週以降の Pre-hypertension は妊娠高血圧症候群を発症しなくても胎児発育を阻害する

第 64 回日本産科婦人科学会 H24.4.12-15 神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福嶋恒太郎 (FUKUSHIMA KOTARO)

研究者番号: 4024397

(2) 研究分担者

浅野間 和夫 (ASANOMA KAZUO)

研究者番号: 30380413

藤田 恭之 (FUJITA YASUYUKI)

研究者番号: 20398077

諸隈 誠一 (MOROKUMA SEIICHI)

研究者番号: 50380639