

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592401

研究課題名(和文) 生殖医学におけるTIMPの役割 - 着床障害マウスにおける不妊症と妊娠高血圧症候群 -

研究課題名(英文) Role of TIMP in reproductive medicine-infertility and preeclampsia in mouse model with implantation failure

研究代表者

筒井 建紀 (Tsutsui, Tateki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00294075

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)：細胞外マトリックス分解酵素Matrix Metalloproteinase (MMP) を抑制するTIMP3(Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3)に注目し、妊娠初期マウス子宮への一過性遺伝子導入系を作製し、妊娠子宮に及ぼす影響を検討した。その結果、TIMP3導入マウスはコントロールマウスに比べて、妊娠14.5日以降の収縮期血圧が有意に上昇し、胎仔にIUGRを引き起こした。TIMP3は、妊娠高血圧症候群の成因に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Preeclampsia is regarded as a pregnancy-specific syndrome of reduced organ perfusion. Although there's still no single theory that can account for all of the clinical symptoms in preeclampsia, the pathologic hallmark appears to be complete or partial failure of trophoblast invasion. To assess the effect of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3) which inhibits the activity of matrix metalloproteinases on pregnancy, we established a mouse model of a local and transient in vivo TIMP3 gene transfer system using Hemagglutinating virus of Japan envelope vector. Transient transfection of TIMP3 into the pregnant mouse uterine cavity on days 6.5 p.c. led to the raise of systolic blood pressure after 14.5 p.c. compared with a control mouse. We also observed the tendency of intrauterine growth restriction in the pups of TIMP3 gene transfer group compared with control group. We speculated that TIMP3 would play a pivotal role in the development of preeclampsia.

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：生殖医学 妊娠高血圧症候群 着床不全 TIMP MMP 不妊症

1. 研究開始当初の背景

現在の日本は、深刻な出生率の低下に伴う極端な少子化及び、世界一の高齢化というジレンマを抱え、国家的な危機を迎えつつあるといっても過言ではない。少子化の原因には、子供を持つ親の生活環境における社会的整備の遅れや、女性の社会進出による晩婚・晩産化がある。今や不妊に悩むカップルは10組に1組とされ、また一方で、40歳台の初産婦も珍しくはなくなってきた。このような現状において、妊娠を望むカップル全員にめでたく妊娠を成立させ、妊娠経過及び分娩が安全に取り扱われ、健康な児を出産させるか、という難題にどう取り組むかが、我々産婦人科医に課された使命である。

しかし、不妊症患者では、その原因が明らかでないものが多いことが実情であり、また高齢妊娠に伴う合併症は多岐にわたり、例えば妊娠高血圧症候群など、その原因や治療法が充分解明されていない疾患も多い。

2. 研究の目的

妊娠高血圧症候群は、妊娠中に発症した高血圧を主体とし、蛋白尿などの腎機能障害をきたす疾患であり、その発症頻度は全妊婦の約10%を占める代表的な産科合併症の一つである。重症化すれば、母体側には肝機能障害・凝固線溶系の異常・呼吸循環障害・中枢神経系の異常を認め、胎児側には、致死的な多臓器不全を惹起し、母児双方の生命予後を脅かす疾患である。妊娠高血圧症候群の病態の本質は、妊娠の負荷による恒常性の維持機構が破綻した適応不全であると考えられている。その成因として、血管内皮障害・血管攣縮・凝固異常・血小板/好中球の活性化による胎盤循環不全、あるいは絨毛細胞の脱落膜への浸潤不全に

よる胎盤機能不全など諸説があるが、未だ確たる原因を突き止められていない。

3. 研究の方法

我々は、以上のような背景のもと、妊娠高血圧症の病態を解明するモック的で、これまでに確立してきたHVJ-E vectorを用いた妊娠マウス子宮局所へのin-vivo 遺伝子導入法(Nakamura H et al. Mol. Hum. Reprod. 2003, 9: 603-609, Koyama S et al. J Reprod Immunol. 2006, 70:59-69)を用いて、妊娠高血圧症候群モデルマウスの作製とその治療戦略についての研究を開始した。

4. 研究成果

我々は妊娠高血圧症候群の主病態を、胎盤の子宮脱落膜への浸潤不全による胎盤機能不全と捉えた。胚は着床の際、脱落膜に接着・侵入していくが、その過程では細胞外マトリックスを分解するMatrix metalloproteases(MMPs)が重要な役割を果たしている。また、MMPsの活性を制御するTissue inhibitors of matrix metalloproteases (TIMPs)は、MMPsのインヒビターとして、その活性を制御している。この2つのプロテアーゼ活性のバランスのとれた制御が、着床過程や胎盤の正常な機能発現に大変重要であると考えられる(Cell and Tissue Research 1998, 291:133-148)。

TIMPs 遺伝子には、4つのサブタイプ(TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4)が知られ、子宮脱落膜で強い発現を認めるものは、TIMP-1とTIMP-3である。まず我々は、TIMP-3 遺伝子の正常妊娠マウスの子宮脱落膜における発現をウエスタンブロット法にて確認した。その結果、胎盤形成期では発現が消失し、胎盤が形成された後の交配後10.5日目以降に強い発現が認められることが明らかとな

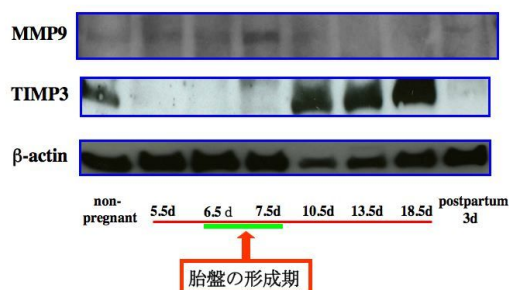
った(図1)。TIMP-3の基質の一つであるMatrix metalloproteinase 9 (MMP9)は、逆に胎盤形成期に子宮脱落膜での発現が認められるが、TIMP-3の発現を認める時期にはその発現が減弱した(図1)。これは、胎盤が過度に子宮脱落膜の深部にまで浸潤しないようTIMP3による制御機構が作動していると考えられた。

もし交配後10.5日目より早期に、子宮脱落膜でTIMP-3の発現を認めれば、胎盤の子宮脱落膜への浸潤が不十分となり、妊娠高血圧症候群で認められる shallow placenta (浸潤の浅い胎盤)を再現できるのではないかと考え、胎盤形成期にあたる交配後6.5日目のICRマウス(8-12週齢)の子宮局所にHVJ-E発現ベクターを用いてTIMP-3遺伝子を導入した。その結果、子宮脱落膜において、交配7.5日目にTIMP-3の発現を認め、興味深いことにMMP9の発現については減弱を認めた(図2)。

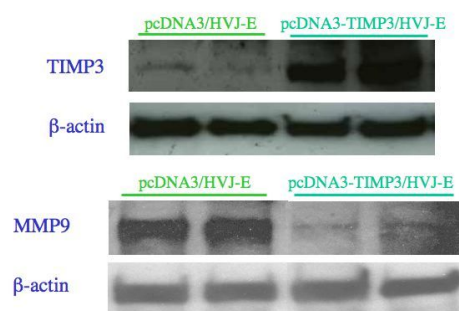
また、TIMP-3遺伝子導入マウスは、妊娠後半期の尾動脈収縮期血圧の上昇を認め、着床期子宮内膜側のTIMP遺伝子の manipulation が妊娠高血圧症を惹起する可能性が示唆された。分娩後には、尾動脈収縮期血圧は下降傾向を示した(図3)。

出生胎仔体重は、TIMP-3遺伝子導入マウスで有意な減少を認めた(図4)。尿アルブミン/クレアチニン比は、TIMP-3遺伝子導入マウスで高くなる傾向が認められたが、有意差は認めなかった(図5)。腎臓の形態及び、胎盤の子宮脱落膜への浸潤については、病理学的にはTIMP-3遺伝子導入の有無により有意差を認めなかった(data not shown)。

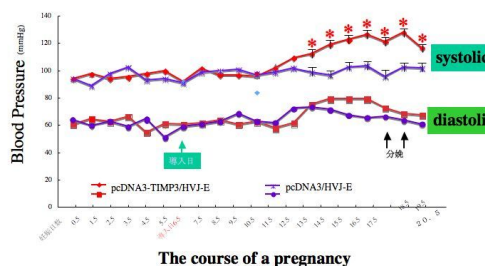
(図1) マウス子宮におけるMMP9/TIMP3の発現



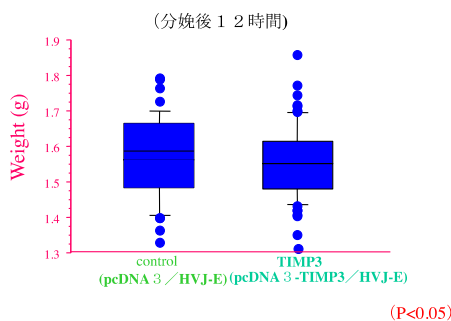
(図2) TIMP3導入24時間後の子宮におけるMMP9/TIMP3の発現 (day7.5 p.c)



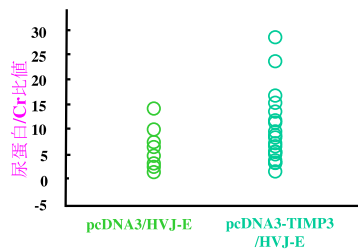
(図3) TIMP3導入後の血圧変化



(図4) 出生後胎仔体重の比較



(図 5)  
TIMP3導入後の尿蛋白/クレアチニン比の変化  
(分娩後12時間)



本研究の3年間の間、我々がこれまで取り組んできた一過性子宮局所における遺伝子導入法を用いて、妊娠高血圧症候群の病態の解明を目的とし、TIMP-3の子宮局所における機能を解析することができた。すなわち、着床後早期(交配6.5日目)にTIMP-3を遺伝子導入することにより、絨毛細胞のMMP9活性を一過性に抑制し、妊娠後期尾動脈収縮期血圧を上昇させた。しかし、ヒト妊娠高血圧症候群の病態として特徴的な絨毛細胞の子宮脱落膜での浸潤不全や蛋白尿の増悪などの所見を認めなかったため、この遺伝子の過剰発現だけでは妊娠高血圧症候群の全てを説明することはできないことも判明した。

妊娠高血圧症候群は、その原因を特定できない「学説の疾患」と呼ばれてきたが、TIMP-3一過性遺伝子導入により、ヒト妊娠高血圧症候群の病態にやや近いモデルマウスを作製する事に成功した。今後さらに研究をすすめ、さらに妊娠高血圧症候群の本質的な病態に迫ることができるようにしたいと考える。

#### 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 8 件)

- Miyoshi, Y., Ohta, H., Namba, N., Tachibana, M., Miyamura, T., Miyashita, E., Hashii, Y., Oue, T., Isobe, A., Tsutsui, T., Kimura, T., Ozono, K. Low serum concentrations of anti-Müllerian hormone are common in 53 female childhood cancer survivors. *Horm Res Paediatr.* 79(1): 17-21, 2013.
- Kimura, T., Ogita, K., Kumasawa, K., Tomimatsu, T., Tsutsui, T. Molecular analysis of parturition via oxytocin receptor expression. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 52(2): 165-170, 2013.

- Koyama, S., Tomimatsu, t., Kanagawa, K., Tsutsui, t., Kimura, T. Reliable predictors of neonatal immune thrombocytopenia in pregnant women with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol.* 87(1):15-21, 2012.
- Temma-Asano, K., Tskitishvili, E., Kanagawa, T., Tomimatsu, T., Tsutsui, T., Kimura, T., Chang, Y.S., Nakamura, T., Nakai, Y., Shimoya, K. Effects of 4-hydroxy-2-nonenal, a major lipid peroxidation-derived aldehyde, and N-acetylcysteine on the cyclooxygenase-2 expression in human uterine myometrium. *Gynecol Obstet Invest.* 72(1):37-42, 2011.
- Koyama, S., Tomimatsu, T., Kanagawa, T., Kumasawa, K., Tsutsui, T., Kimura, T. Reliable predictors of neonatal immune thrombocytopenia in pregnant women with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Kematol.* 87(1): 15-21, 2012.
- Nguyen, T. M., Nakamura, H., Wakabayashi, A., Kanagawa, T., Koyama, S., Tsutsui, T., Hamasaki, T., Kimura, T. Estimation of mouse fetal weight by ultrasonography: application from clinic to laboratory. *Lab Anim.* 46(3): 225-230, 2012.
- Koyama, S., Tomimatsu, T., Kanagawa, T. Tsutsui, T., Kimura, T. The amnioscope strikes back as a useful device for pinhole amniotomy in the management of polyhydramnios. *AJP Rep.* 1(2): 99-104, 2011.
- Koyama, S., Tomimatsu, T., Sawada, K., Kanagawa, T., Tsutsui, T., Kimura, T. Pseudomyxoma peritonei originating from colorectal cancer during pregnancy. *J Obstet Gynecol Res.* 37: 254-258, 2011.

#### 〔学会発表〕(計 3 件)

- 後安聡子、筒井建紀、三宅達也、古谷毅一郎、金南孝、藤森由香、瀧内剛、正木秀武、中村仁美、熊澤恵一、木村正  
妊娠中に抗血栓療法を施行した症例の妊娠・分娩予後 第65会日本産科婦人科学会 札幌 5/10-12/13
- 筒井建紀  
Cryo Tissueを使用した卵巣組織凍結の実際 第15会日本IVF学会学術講演会 大阪 9/30/12
- 正木秀武、筒井建紀、中村仁美、香山晋輔、田畑知沙、熊澤恵一、後安聡子、藤森由香、木村正  
不育症に対する抗血小板療法・抗凝固療法に関するアンケート調査の解析 第56回日本生殖医学会 横浜 12/7-9/11

#### 〔図書〕(計 2 件)

- 筒井建紀 化学療法による卵巣毒性がん・生殖医療妊孕性温存の診療(鈴木直、竹原祐志編) 医歯薬出版 42-51, 2013.
- 筒井建紀 “緩慢凍結法”について

卵巣組織凍結・移植 新しい妊孕性温存療法の実践（鈴木直編）医歯薬出版 28-36, 2013.

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

筒井建紀（TSUTSUI TATEKI）  
大阪大学大学院・医学系研究科・准教授  
研究者番号：00294075

### (2) 研究分担者

中村仁美（NAKAMURA HITOMI）  
大阪大学大学院・医学系研究科・助教  
研究者番号：80467571

熊澤恵一（KUMASAWA KEIICHI）  
大阪大学大学院・医学系研究科・助教  
研究者番号：90444546

### (3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：