

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659409

研究課題名(和文)ADPリボシルシクラーゼの妊娠高血圧腎症における役割

研究課題名(英文)Role of ADP ribosyl cyclase in pathogenesis of preeclampsia

研究代表者

高橋 信行(TAKAHASHI, NOBUYUKI)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40588456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧腎症(preeclampsia, PE)は妊娠によって発症する高血圧で、蛋白尿を伴い、母子の周産期死亡の大きな原因となっている。妊婦に投与が許可されている降圧薬で母体の降圧が得られても、PEの根本的病態である血管内皮障害(endotheliosis)が改善しないため、胎児・胎盤への血流が減少してしまい、胎児の予後が悪化することが多い。本研究ではニコチンアミドがPEの治療に有効であることをマウスモデルを用いて明らかにした。今後、臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Pre-eclampsia (PE), hypertension and proteinuria developing after 20 weeks of gestation, is the cause of maternal and fetal deaths. The only definitive treatment currently available to save the mother and/or the baby is induced delivery. Anti-hypertensives acceptable for use during pregnancy help control maternal blood pressure in PE, but they do not prevent pre-term delivery nor correct the fetal growth restriction associated with PE. We have demonstrated that nicotinamide reduces the hypertension and proteinuria in mice having a pre-eclampsia-like condition, delays miscarriages and alleviates the fetal growth restriction. Nicotinamide is the first substance that benefits both mother and offspring by targeting a pathway specifically dysfunctional in PE. It merits evaluation for preventing or treating PE in humans.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学高血圧学

キーワード：高血圧 蛋白尿 妊娠 流産 子宮内胎児発育不全

## 1. 研究開始当初の背景

我々の共同研究者 Karumanchi は胎盤由来の soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) が PE の病因に重要であることを示した (JCI 2003, NEJM 2004)。しかし、降圧薬の多くが妊婦に禁忌であり、PE の血圧管理は困難である。また、PE では胎児の発育は遅延する。

### (1). Endothelin と PE

PE 妊婦の血清 ET-1 は高値を示す。我々は eNOS の低下が ET 系を活性化して PE を悪化することをはじめて直接示した (Li, Takahashi JASN 2012)。即ち、sFlt-1 を過剰発現したメス eNOS<sup>-/-</sup> マウスの血圧上昇、蛋白尿 (UAE)、podocyte effacement は ET-1 とその受容体 (ETAR) の腎臓での発現増加を伴い、ETAR 阻害薬 ambrisentan にて改善した。

### (2). Endothelin と ADPRC

cyclic ADP ribose は ET-1 や Ang II による細胞内 Ca の動員に重要である。我々の共同研究者 Arendshorst はその合成酵素である ADPRC を nicotinamide を用いて阻害すると、あるいは主な ADPRC である CD38 の KO マウスで、ET-1 や Ang II による腎血流量の減少が改善することを示した (Am J Physiol 2009)。

CD38<sup>-/-</sup> マウスはやや血圧が低めであるものの健康で奇形等を示さずホモ同土をかけあわせても問題なく繁殖する。従って ADPRC の阻害は PE の治療に有用と考えられる。

### (3) 当該分野における本研究の学術的な特色及び予想される結果と意義

ADPRC の阻害は胎児に悪影響をおよぼすことなく PE の高血圧および尿蛋白を改善すると考えられる。しかし、PE の治療に ADPRC の阻害を用いることは今まで報告がない。我々の仮説通りに ADPRC 阻害の PE への有用性が示されれば PE 治療の画期的な薬剤の開発の基礎ができることになり、妊娠中断をせずに母体の心血管合併症の減少が可能となり、未熟児の出生を減少できることが期待される。また、ADPRC の阻害は PE のみならず他の腎疾患の治療にも有用であると期待される。

## 2. 研究の目的

nicotinamide や CD38 KO マウスを用いて

ADPRC の阻害や欠如が sFlt-1 過剰発現による PE 様所見を改善するかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

実験 1: nicotinamide を WT sFlt-1 過剰発現マウスに投与し、血圧、24 時間尿中アルブミン排泄量 (UAE)、クレアチニンクリアランス (Ccr)、糸球体毛細血管の endotheliosis 等の PE 様所見が改善するか検討する。(Fig. 1)

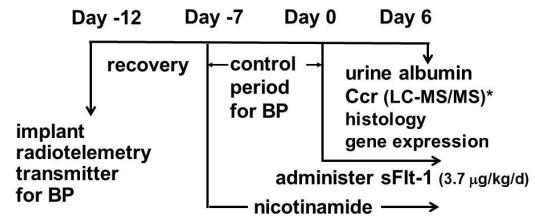


Fig. 1 Experimental Protocol. 4-month old non-pregnant female C57BL/6 WT and eNOS<sup>-/-</sup> mice will be continuously injected with sFlt-1 protein using osmotic minipump. \*Takahashi et al. KI 2007

nicotinamide が PE 様所見を改善するかどうかを検討するため、sFlt-1 を過剰発現させた非妊娠 WT マウスに nicotinamide (0, 83, 167, 500 mg/kg/day) を gavage を用いて経口投与して血圧、24 時間 UAE、Ccr、糸球体毛細血管の endotheliosis 等が改善するかどうか調べる。

高用量の nicotinamide はヒトで肝障害を起こす可能性が示唆されている。今まで我々は sFlt-1 の過剰発現をアデノウイルスを用いて行ってきたが、アデノウイルスそれ自体が肝障害を起こすため PE による肝障害の評価が難しい。そこで本実験ではマウス sFlt-1 タンパク 3.7 µg/kg/day あるいは PBS コントロールを osmotic minipump を用いて投与することにより過剰発現させ (Murphy et al. Hypertension 2010) 肝機能の評価ができるようにする。

全身の血管の endotheliosis により尾動脈の血流が減少し tail-cuff では血圧を測定できない。そこで我々は radiotelemetry を用いて横行大動脈での血圧を連続的に測定している (Li, Takahashi JASN 2012)。

24 時間 UAE と Ccr はマウスを一匹ずつ代謝ケージに入れ、尿中アルブミンは ELISA キット、血中および尿中クレアチニンは LC-MS/MS を用いた研究代表者らが開発した方法にて分担研究者の佐藤恵美子が測定する (Takahashi 2007)。

代謝ケージ実験終了後マウスを安楽死させて

腎臓の光学顕微鏡・電子顕微鏡を用いた解析を分担研究者の佐藤博らが行う。

endotheliosis は糸球体の open capillary volume の減少と糸球体内皮細胞の fenestration の減少にて評価する。また、podocyte effacement を foot process width と number of slits per mm GBM で定量し評価する。また、肝機能 AST, ALT を測定する。

我々の予備実験では 500 mg/kg/day の nicotinamide は WT sFlt-1 過剰発現マウスの尿中 UAE を約半分に減少したことから本研究は非常に有望である。

実験 2：CD38 の欠如が PE 様所見を改善するかどうかを CD38<sup>-/-</sup> sFlt-1 過剰発現マウスで CD38<sup>+/+</sup> sFlt-1 過剰発現マウスと比較しての実験 1 と同様な項目が改善するか検討する。また、eNOS<sup>-/-</sup> sFlt-1 過剰発現マウスで CD38 の欠如が PE 様所見を改善するか検討する。

主な ADPRC である CD38 の欠如が PE 様所見を改善するかどうかを CD38<sup>-/-</sup> sFlt-1 過剰発現マウスが CD38<sup>+/+</sup> sFlt-1 過剰発現マウス（各 15 匹）と比較しての実験 1 と同様な項目において改善しているか調べることにより検討する。

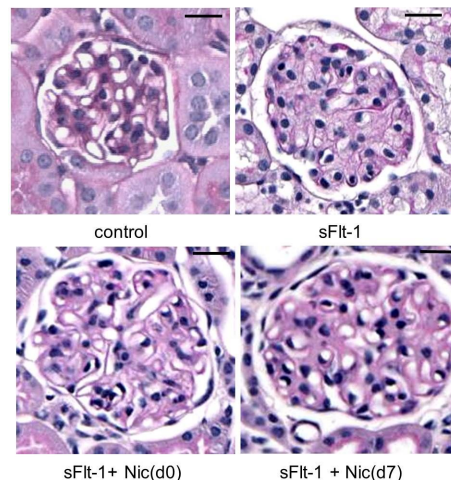
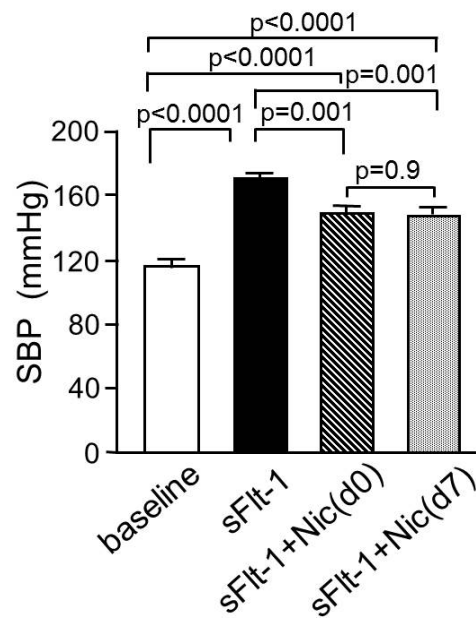
CD38 は主な ADPRC であるが CD157 も ADPRC 活性がある。CD38KO マウスの腎を含めたほとんどの臓器では CD157 の発現は野生型の 30% へと減少している (Am J Physiol 2009)。これは KO で用いた Neo 遺伝子により CD157 の発現が干渉されたためと考えられる。従って CD38 欠損による表現型が CD157 で代償されている可能性は否定的であるが、CD38 と CD157 のダブル KO を作らないと ADPRC が高度に阻害されたときの効果と副作用は明らかになりにくい。これらの遺伝子は同じ染色体上に 40kb のみの距離をおいて位置しており、交配によりダブル KO を作成するのは不可能である。そこで、次善の策として CD38<sup>-/-</sup> sFlt-1 過剰発現マウスや eNOS<sup>-/-</sup>; CD38<sup>-/-</sup> sFlt-1 過剰発現マウスに nicotinamide を投与して実験 1 同様に実験する。

#### 4. 研究成果

今まで我々は sFlt-1 の過剰発現をアデノウイルスを用いて行ってきたが、アデノウイルスそれ自体が肝障害を起こすため PE による肝障害の評価が難しい。そこでマウス sFlt-1 タンパク 3.7 μg/kg/day あるいは PBS コント

ロールを osmotic minipump を用いて投与することにより過剰発現させ (Murphy et al. Hypertension 2010) 肝機能の評価ができることを期待したが、非妊娠マウスに sFlt-1 タンパク 3.7 μg/kg/day あるいはその 10 倍量の sFlt-1 タンパクを浸透圧ポンプを用いて投与しても、血圧の上昇は見られなかった。

そこで、アデノウイルス (1x10<sup>9</sup> pfu) を用いて sFlt-1 を過剰発現した野生型 (WT) 非妊娠マウスにニコチンアミド (500 mg/kg/day) を経口投与することにより、ニコチンアミドが sFlt-1 による血圧の上昇・尿中アルブミン排泄量の増加・腎糸球体毛細血管の内皮障害を改善することを明らかにした。(下図にニコチンアミド治療による血圧の変化および endotheliosis の改善を示す。) ニコチンアミドの投与は sFlt-1 投与と同時に予防的に行っても [Nic (d0)]、sFlt-1 投与 7 日後すでに血圧上昇・蛋白尿など PE が発症してからでも [Nic (d7)]、血圧の上昇・尿中アルブミン排泄量の増加・腎糸球体毛細血管の内皮障害を改善した。



なお、sFlt-1 投与開始後、5 か月ですべてのマウスが死亡したが、ニコチンアミドの投与で生存率は上昇し、特に予防的投与により生存率は上昇し、ほとんどすべてが観察期間の5 か月生じた。このことから、PE のハイリスクの妊婦にはニコチンアミドの予防的投与が有効であると期待される。

非妊娠マウスと異なり、妊娠マウスに非妊娠時と同様に  $1 \times 10^9$  pfu の sFlt-1 発現アデノウイルスを投与すると、すべてのマウスが数日以内に流産した。そこでウイルス量を  $6 \times 10^8$  pfu に減少することにより、流産・早産が減少し、ニコチンアミドはさらに流産・早産を減少させた。

また、sFlt-1 発現アデノウイルスにより子宮内胎児発育不全すなわち、胎児の体重の減少が見られたが、ニコチンアミドはこれを正常化させた。

ニコチンアミドの用量については、500mg/kg/day で上記の効果が統計的有意に認められた。蛋白尿の減少についてはその1/3量の167mg/kg/dayでも有意な改善が見られたが、そのさらに1/2量の84mg/kg/dayでは有意な効果は認められなかった。子宮内胎児発育不全などの他のパラメータについても効果があると推定されるが、これらはばらつきが大きい。統計的有意な改善にするにはかなりのサンプル数が必要と考えられる。

しかしながら、マウスにおいて167mg/kg/dayはヒトに換算すると700mg/50kg/dayであり、ニコチンアミドの通常使用量を超えるものの、安全に使用できる量である。ただし、妊婦でのニコチンアミドの安全性は必ずしもきちんとしたデータがなく、今後確かめる必要がある。

CD38<sup>-/-</sup> sFlt-1 過剰発現マウスではPEが軽快すると予想されたが、特に明らかな改善は見られなかった。このことからニコチンアミドがPEを改善する機序としてADP ribosyl cyclase 阻害の寄与は少ないと考えられる。

## 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 1件)

Li F, Hagaman JR, Kim H-S, Maeda N, Jennette JC, Faber JE, Karumanchi, SA, Smithies O, Takahashi, N et al. eNOS deficiency acts through endothelin to aggravate sFlt-1-induced preeclampsia-like phenotype J Am Soc

Nephrol 査読有 2012 23:652-660

doi: 10.1681/ASN.2011040369

〔学会発表〕(計 5件)

高橋 信行、Pharmacotherapy of preeclampsia. 第46回国際妊娠病態生理学会(招待講演)2014年9月18日~20日、東京

高橋 信行、ニコチンアミドが妊娠高血圧腎症を改善する機序。腎と妊娠研究会 2014年3月1日、川越

高橋 信行、ニコチンアミドは妊娠高血圧の治療に有効である。日本腎臓学会 2013年5月9日~12日、東京

高橋 信行、ニコチンアミドは妊娠高血圧に有効である。日本妊娠高血圧学会 2012年9月7日~8日、長崎

高橋 信行、ニコチンアミドは妊娠高血圧の治療に有効である。腎と妊娠研究会 2012年3月3日、つくば

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: ニコチンアミドによる妊娠高血圧症候群、流産・早産、及び子宮内胎児発育遅延の改善

発明者: 国立大学法人東北大学

権利者: 国立大学法人東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-163726

出願年月日: 2013年8月7日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 信行 (TAKAHASHI, NOBUYUKI)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 40588456

### (2) 研究分担者

佐藤 博 (SATO, HIROSHI)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 60215829

佐藤 恵美子 (SATO, EMIKO)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：20466543