

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 2 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659735

研究課題名(和文) 子宮頸管粘液を用いた新規妊娠高血圧症候群予知マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of a new marker to predict pregnancy-induced hypertension in the cervical mucus

研究代表者

常見 泰平 (TSUNEMI, TAIHEI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20599831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠高血圧症候群(PIH)は母児の転帰不良や後遺症をもたらす周産期合併症である。PIHの発症予知を頸管粘液に着目して新規PIH発症予知マーカーの開発を考えた。頸管粘液で酸化ストレス蛋白等を測定したが、有意な結果は得られなかった。PIHの原因のひとつとして絨毛細胞の浸潤低下がある。初期絨毛細胞の浸潤が低酸素環境やセリンプロテアーゼであるuPA系に制御されていることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Pregnancy Induced Hypertension (PIH) is perinatal complications that result in poor outcome and subsequent complications for mothers or babies. For the prediction of onset of PIH, we attempted the development of a new PIH onset prediction marker by focusing on cervical mucus. Oxidative stress proteins were measured in the cervical mucus, however, no significant results were obtained. One of the causes of PIH is reduced infiltration of trophoblastic cell. It was confirmed that the initial infiltration of villus cells was controlled by uPA system, including serine protease and low-oxygen environment.

研究分野：産科

キーワード：妊娠高血圧症候群

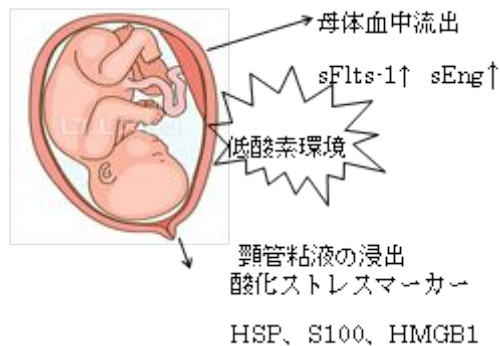
1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (PIH) は現代においても母児の転帰不良や後遺症をもたらす周産期合併症である。PIH は妊娠の中断以外に原因治療法はないため、臨床的症候の発現前に将来の発症を予測し、早期の医療介入によって発症や病勢悪化を抑制することが最良の治療法である。そのため PIH の発症予知は、周産期医療における喫緊の課題である。そこでマイクロアレイ技術やプロテオミクス技術を駆使し、胎盤組織や胎児・母体血液ではなく頸管粘液を用いて実地臨床で簡単に測定できる感度・特異度が高い新規 PIH 発症予知マーカーの開発を行い、早期の医療介入によって PIH の発症や病勢悪化を抑制することができると考えた。

2. 研究の目的

(1) 妊娠高血圧症候群 (PIH) の原因は、初期胎盤血管形成不全をもとにした母体の血管内皮細胞障害と言われている。PIH 胎盤、早産胎盤と正常胎盤を比較し、両者に相違する遺伝子と蛋白の発現変化を分子生物学的に検討してきた。胎盤で見られた遺伝子変化が頸管粘液中タンパクで再現されるかを、ELISA を用いて測定する予備実験を行った。その結果、PIH 発症時の頸管粘液中に酸化ストレス・解毒タンパクの過剰発現を認めた。したがって、胎盤局所で起こっている変化を頸管粘液中で測定することができると判断した。この予備実験を元に、本研究では血中 sFlt-1 を凌駕する感度・特異度の高い新規 PIH 発症予知マーカーの開発を行うことを目的とした。

(2) 妊娠高血圧症候群の原因のひとつとして妊娠初期の絨毛細胞の浸潤の低下により胎盤形成が不十分で低酸素環境となり、酸化ストレス・解毒酵素の過剰発現と考えられている。絨毛細胞の浸潤に着目し、浸潤に関わる因子について検討した。浸潤に関わる因子がわかれば、PIH の原因、診断、治療に寄与する目的とした。



3. 研究の方法

(1) PIH 胎盤と正常胎盤をマイクロアレイで網羅的な遺伝子解析し、PIH 特異的な遺伝子群を同定する。PIH 予知マーカーや関連した酸化ストレス物質の頸管粘液中の濃度を経時的に測定し、sFlt-1 や可溶性エンドグリンと比較し、実際に PIH 予知マーカーとなり得ることを臨床試験で実証する

(2) 妊娠高血圧症候群の原因のひとつとして絨毛細胞の浸潤の低下により胎盤形成が不十分で低酸素環境となり、酸化ストレス・解毒酵素の過剰発現と考えており (図1 タイプ1) 絨毛細胞の浸潤低下に着目し、生体由来の検体から浸潤に関わる絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, EVT) を抽出し、浸潤に影響について検討した。妊娠初期の絨毛は低酸素環境にあるとされており、低酸素環境下での EVT 浸潤を検討することで、生体環境が EVT の浸潤にどのように関わっているかを検討した。浸潤に関わるセリンプロテアーゼ系であるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (uPA) 系の関与について検討し、PIH の原因について検討をした。

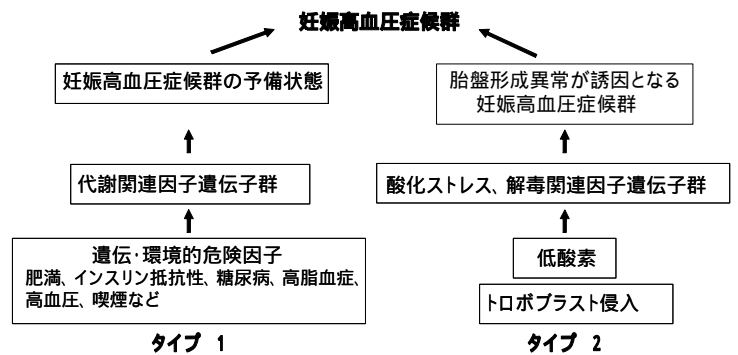


図 1

4. 研究成果

(1) PIH 胎盤の特異的な遺伝子群の同定を試みたが新たな遺伝子群を同定することはできなかった。妊婦、非妊婦の頸管粘液を採取し HSP, S100, HMGB1 などの酸化ストレス、解毒タンパクの発現を ELISA 法で調べたが、正常妊婦と妊娠高血圧症候群の妊婦で有意な結果は得られなかった。血中 sFlt-1 を凌駕する感度・特異度の高い新規 PIH 発症予知マーカーの開発を行うことを目的としていたが、現状は研究当初の目的に到達できていない。

(2) 生体組織からの絨毛外栄養膜細胞

(extravillous trophoblast, EVT) の純粋分離培養に成功した。

絨毛外栄養膜細胞 (EVT) を抽出し、絨毛細胞の浸潤について検討した。

通常酸素下に比べ、絨毛細胞の環境である低酸素下において EVT の浸潤が亢進を確認した。

低酸素において低酸素誘導因子である HIF-1 の発現の亢進を認めた。(図 2)

妊娠初期の低酸素は絨毛の浸潤に関わる因子と考えられた。

低酸素環境下では uPA 系の発現の亢進を確認した。(図 2)

HIF-1 をノックダウンした EVT での浸潤の低下を認めた。

uPA 系の蛋白発現の低下も認めた。(図 3)

uPAR 阻害ペプチドを用いて、EVT の浸潤を検討したところ、阻害ペプチドを使用した場合に有意に浸潤の低下を認めた。

uPA 系が EVT の浸潤に関与している可能性が示唆された。

以上より妊娠初期の絨毛は低酸素環境下で浸潤を亢進し、低酸素誘導因子である HIF-1 を介して uPA 系の発現を亢進することで EVT の浸潤を促進すると考えられた。(図 4)

妊娠初期の低酸素環境下が絨毛細胞の浸潤に適していることを確認した。

今回の研究により今後 uPAR 阻害ペプチドを用いて、マイクロアレイで網羅的に遺伝子解析を実施し、uPAR ペプチドを用いた際に過剰発現する候補遺伝子群の抽出を行うことで PIH に特異的な遺伝子群の同定できる可能性がある。

マウスに uPAR ペプチドを投与し、子宮筋層の浸潤の程度、胎盤形成の影響を病理学的に検討し、胎盤を免疫染色およびマイクロアレイを用いて、遺伝子発現の変化を検討することで PIH の新たな遺伝子群の同定などに寄与できる可能性がある。

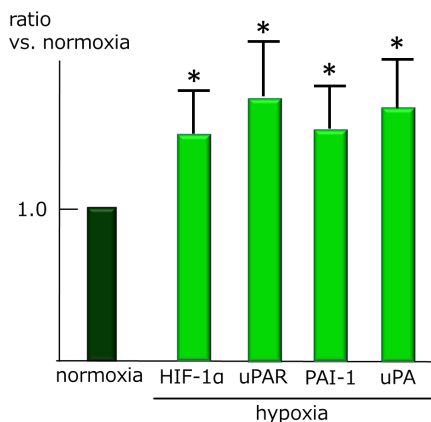


図 2

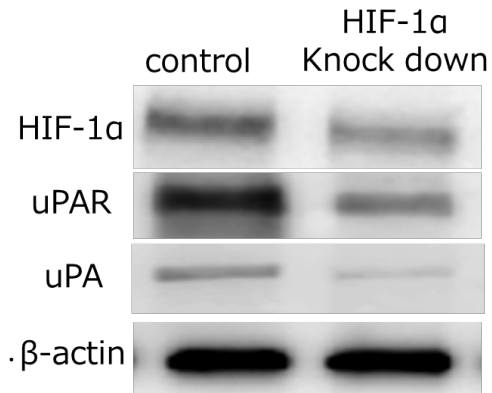


図 3

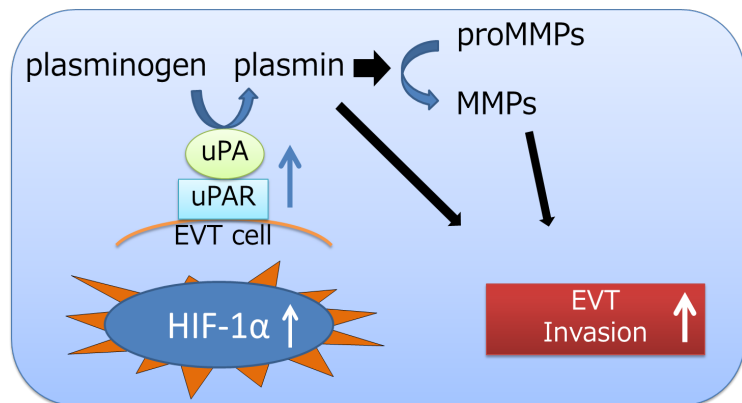


図 4

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)

[学会発表](計 4 件)

TSUNEMI TAIHEI

Hypoxia increases urokinase-type plasminogen activator receptor(uPAR) and hypoxia induced factor(HIF)-1alpha in early human extravillous trophoblast.

世界胎盤学会 2012年9月19日 広島県

TSUNEMI TAIHEI

The urokinase plasminogen activator (uPA) system under hypoxic condition in human primary invasive trophoblast

世界生殖免疫学会 2013年5月31日

ポストン

常見 泰平

妊娠初期酸素環境下における絨毛外栄養膜細胞の浸潤能と uPA 系の変動

プロテアーゼ学会

2013年8月 大阪 千里中央

TSUNEMI TAIHEI

Hypoxia increased invasion of primary human extravillous trophoblast via enhance of urokinase-type plasminogen activator system

世界胎盤学会 2014年9月11日 パリ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常見 泰平 (TSUNEMI TAIHEI)

奈良県立医科大学 産婦人科学教室 助教

研究者番号：20599831

(2) 研究分担者

小林 浩 (KOBAYASHI HIROSHI)

奈良県立医科大学 産婦人科 教授

研究者番号：40178330

成瀬 勝彦 (NARUSE KATSUHIKO)

研究者番号：70453165