

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293342

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群の成立機序の解明と、それに基づく予防方法、治療方法の開発

研究課題名(英文) Exploit of novel preeclampsia model mice by a simple intervention, and elucidation of mechanism of onset of it

研究代表者

熊澤 恵一 (KUMASAWA, KEIICHI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90444546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、新規の侵襲Zを妊娠10日のマウスに行うことにより、妊娠高血圧症候群の新規モデルマウスを作製できた。この侵襲Zにより妊娠マウスが流産することはないが、妊娠中の胎盤が虚血状態になる。侵襲Zを行うとその4日後頃より血圧上昇を認め、分娩後、血圧は妊娠前近くに戻る。この点も、分娩が唯一の治療方法である妊娠高血圧症候群を模倣している。さらに、このモデルマウスに血管新生因子Wを投与することにより、侵襲Zによる症状を軽減することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We performed novel intervention Z to pregnant mice at embryonic 10 day. The mice revealed preeclamptic phenotype. The intervention Z did not increase abortion rate. However the placenta was accompanied with hypoxia, which is usual in preeclampsia. Four days after the intervention, blood pressure began to elevate. And after delivery the blood pressure recovered to the non-pregnant level. This phenotype mimicked the human preeclampsia. Additionally using the angiogenic factor W, we succeeded in the amelioration of hypertensive phenotype induced by the intervention Z.

研究分野：医歯薬学

キーワード：妊娠高血圧症候群 胎盤特異的遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群は「妊娠 20 週以降、分娩後 12 週まで高血圧が見られる場合、または高血圧に尿タンパクを伴う場合のいずれかで、かつこれらの症状が単なる妊娠の偶発合併症でない場合によるものをいう」と定義され、全妊婦の 5~10% が発症する高頻度の産科合併症である。さらに重症化すれば、脳内出血、常位胎盤早期剥離などで母児の生命を脅かす。低医療資源国では重症化により未だに最大の妊産婦死亡原因である。さらに、現時点において根本的治療は妊娠の終了、つまり分娩しかなく、早産を増やすことにもつながる。

妊娠高血圧症候群は古くはヒポクラテスの著書にも記載があり、以後多くの研究者が原因を解明しようとしてきたが、「学説の病」と言われる程に病因論も多岐に渡り、未だ解明されていない。妊娠高血圧症候群は古くはヒポクラテスの著書にも記載があり、以後多くの研究者が原因を解明しようとしてきたが、「学説の病」と言われる程に病因論も多岐に渡り、未だ解明されていない。近年になり“Two Step Theory”と言われる二段階を経て発症するという仮説が主流となってきている。すなわち、妊娠初期に遺伝的、環境的、免疫学的な要因によって起こった胎盤の子宮への浸潤不全が胎盤血流還流の減少をもたらす(First Step)、妊娠の進行に伴う絨毛間腔の低酸素状態などが原因で発現が増加した soluble VEGF receptor 1(sVEGFR-1,sFLT1) や soluble Endoglin といった、液性因子が VEGF や PlGF といった血管新生因子を阻害することで血管内皮障害をもたらす、高血圧、尿タンパクを生じる(Second Step) という仮説である。(JCI 2003, Nat, Med2006)

妊娠高血圧症候群の疾患成立機序、治療方法の開発が十分に進まなかった原因の一つとして、モデル動物が存在しなかったことが挙げられる。我々がかつて治療方法開発につながるモデルマウスを作製した(図が(Kumasawa et al, PNAS 2011))

上記モデルマウスを用いて治療法開発に取り組み、pravastatin が治療効果、予防効果を認めることを示した。

上記モデルマウスは上述の Two Step Theory の Second Step のモデルであり、First Step のモデルを作製することにより、予防、治療など

の開発により貢献できると考え、作製を試みた。

2. 研究の目的

胎盤侵入不全モデルならびに早期重症型発症モデルの作成と重症化メカニズムの解析を行う。

妊娠高血圧症候群発症が、必ずしも遺伝的要因であるとは考えにくいため、遺伝子導入などを使用しない、新規モデルマウスの作製。

さらに、我々は preliminary に妊娠高血圧症候群と関連する物質として FactorX, FactorY を見つけている。(図 2) これらの物質が新規モデルマウスで発症しているかを検索した。

図 1-a

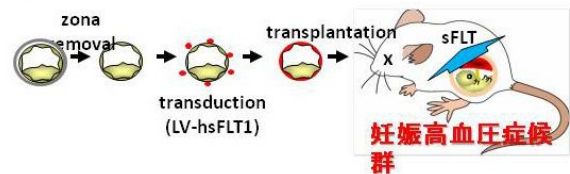


図 1-b

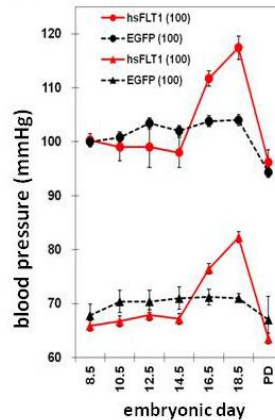


図 1-c 尿タンパク (E18.5 に測定) (albumin/creatinin)

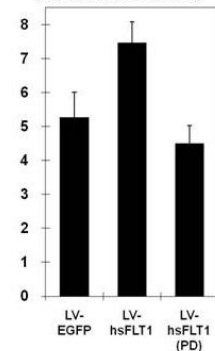
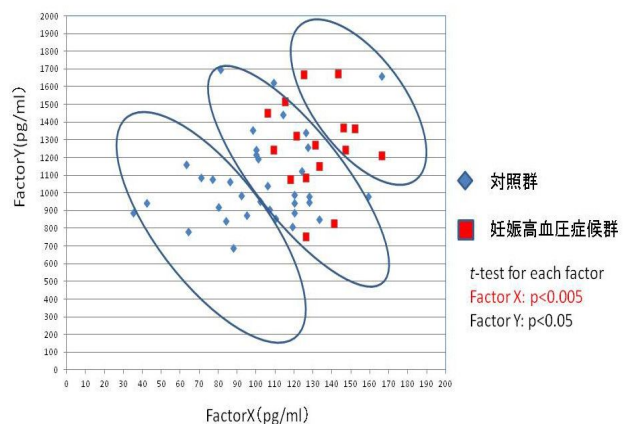


図 2 FactorX, FactorY (ELISA data)



3. 研究の方法

妊娠高血圧症候群は遺伝因子が主たる原因であるという報告はない。そのため、遺伝子導入によらない方法により妊娠高血圧症候群のモデルマウス作製を試みた。

マウスに対する侵襲として、血管障害を起こしえる侵襲、胎盤に対する侵襲、胎児に対する侵襲を考慮した。その中で血管障害を起こすであろう侵襲Zを行った。

上記侵襲Zを様々な程度で行い、その侵襲により妊娠率にどのような変化を与えるか観察する。さらに侵襲を加えたマウスの血圧、尿タンパク測定を行う。

胎生18日にマウスに帝王切開を加え、胎児、胎盤の重量を測定し、妊娠高血圧症候群に随伴することも多い子宮内胎児発育遅延を発症するかの観察を行う。

さらにマウスの血清中のFactorX, FactorYの濃度を妊娠各機関で侵襲Zとの関連を調べる。

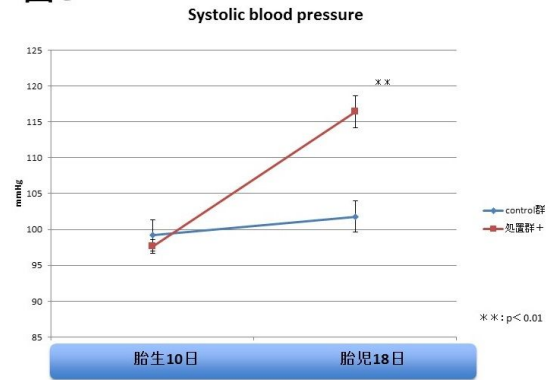
4. 研究成果

新規の侵襲Zを妊娠10日のマウスに行うことにより、妊娠高血圧症候群の新規モデルマウスを作製できた。この侵襲Zにより妊娠マウスが流産する、あるいは流産率が増加しない状況の設定も簡便にできた。妊娠中の胎盤が虚血状態になる。侵襲Zを行うとその4日後頃より胎盤が虚血になった影響で血圧上昇を認め、分娩後、血圧は妊娠前近くに戻る(図3)。妊娠後半に血圧が上昇し、さらに分娩後に血圧が改善しているという点で、このマウスは妊娠高血圧症候群のモデルマウスとして適切であると考えられる。

尿タンパクはこの侵襲Zにより有意な変化は見いだせなかった。マウスの腎機能は人に比しかなり高く、そのため、腎機能に変化を見出すほどの侵襲が得られなかったと考えている。

そのほか、胎児胎盤重量も有意に減少することはなかった。マウスは多産であり、人での減少をそのままマウスで比較することが困難であったと判断した。

図3



FactorX, FactorY に関しては、十分検証ができず、今後の課題となった。

このモデルマウスを用いて化学物質Wを投与することにより、妊娠高血圧症候群様病態の改善を認めた。

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 14 件)

1. Miyake T, Kumasawa K, Sato N, Takiuchi T, Nakamura H, Kimura T. Soluble VEGF receptor1 (sFLT1) induces non-apoptotic death in ovarian and colorectal cancer cells. Sci Rep. (in press)
DOI: 10.1038/srep24853
2. Ito Y, Maehara K, Kaneki E, Matsuoka K, Sugahara N, Miyata T, Kamura H, Yamaguchi Y, Kono A, Nakabayashi K, Migita O, Higashimoto K, Soejima H, Okamoto A, Nakamura H, Kimura T, Taniguchi T, Hata K. Novel Nonsense Mutation in the NLRP7 Gene Associated with Recurrent Hydatidiform Mole. Gynecol Obstet Invest. (in press)
3. Naoi H, Kumasawa K, Nakamura H, Nishikawa A, Kimura T. Investigation of the Prognosis of 28 Patients with Retained Placenta After Delivery. Gynecol Obstet. (in press)
4. Tnanaka M, Matsuzaki S, Kumasawa K, Suzuki Y, Endo M, Kimura T. Cervical varix complicated by placenta previa: A case report and literature review. J Obstet Gynaecol Res. (in press)

5. Kakigano A, Tomimatsu T, Mimura K, Kanayama T, Fujita S, Minato K, Kumasawa K, Taniguchi Y, Kanagawa T, Endo M, Ishihara T, Namba T, Mizushima T, Kimura T. (2015) Drug repositioning for preeclampsia therapeutics by in vitro screening: phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil restores endothelial dysfunction via induction of placental growth factor. *Reprod Sci.* 22:1272-1280.
Doi: 10.1177/1933719115574340.
 6. Tamura E, Tabata Y, Yamada C, Okada S, Iida M. (2015) Autologous fat augmentation of the vocal fold with basic fibroblast growth factor: Computed tomographic assessment of fat tissue survival after augmentation. *Acta Otolaryngol.* 135(11): 1163-1167.
Doi: 10.3109/00016489.2015.1064544.
 7. 三宅達也、筒井建紀、正木秀武、藤森由香、後安聡子、大八木知史、熊澤恵一、木村正. (2015) ART 治療における卵巣過剰刺激症候群に対する Cabergoline の予防効果の検討. *産婦人科の進歩.* 67: 270-275.
 8. Nakamura H, Hosono T, Minato K, Hamasaki, T, Kumasawa K, Kimura T. (2014) Importance of optimal local uterine blood flow for implantation. *J Obstet Gynaecol Res.* 40:1668-1673.
Doi: 10.1111/jog.12418.
 9. Matsuzaki S, Yoshino K, Kumasawa K, Satou N, Mimura K, Kanagawa T, Ueda Y, Kimura T. (2014) Placenta percreta managed by transverse uterine fundal incision with retrograde cesarean hysterectomy: a novel surgical approach. *Clin Case Rep.* 2:260-264.
Doi: 10.1002/ccr3.108.
 10. Thang N M, Kumasawa K, Tsutsui T, Nakamura H, Masaki H, Ono T, Kimura T. (2013) Overexpression of endogenous TIMP-2 increases the proliferation of BeWo choriocarcinoma cells through the MAPK-signaling pathway. *Reprod Sci.* 20:1184-1192.
Doi: 10.1177/1933719113477485.
 11. Takahashi K, Mimura K, Kanagawa T, Kinugasa-Taniguchi Y, Endo M, Matsuzaki S, Kumasawa K, Hashimoto K, Tomimatsu T, Kimura T. (2013) Disease flare-ups and obstetric outcomes in pregnant women with systemic lupus erythematosus. *Hypertens Res Pregnancy.* 1:103-107.
 12. Kimura T, Ogita K, Kumasawa K, Tomimatsu T, Tsutsui T. (2013) Molecular analysis of parturition via oxytocin receptor expression. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 52:165-170.
Doi: 10.1016/j.tjog.2013.04.004.
 13. Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, Tomita Y, Isobe A, Hashimoto K, Kinose Y, Mabuchi S, Hisamatsu T, Takahashi T, Kumasawa K, Nagata S, Morishige K, Lengyel E, Kurachi H, Kimura T. (2013) miR-92a Inhibits Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer Cells by Inhibiting Integrin alpha5 Expression. *AM J Pathol.* 182: 1876-1889.
 14. 中村仁美, 木村 正, 田畑泰彦. (2013) 子宮に対する drug delivery system の開発. *産婦人科の実際.* 62:2182-2183.
- 〔学会発表〕(計 56 件)
1. Koizumi K, Nakamura H, Matsuzaki T, Kuroda S, Yasui Y, Furuya K, Miyake T, Takiuchi T, Kumasawa K, Kimura T. Development of a new local drug delivery system for the uterus using bio-nanocapsule. American Society for Reproductive Medicine 2015 Annual Meeting. Baltimore, U.S.A. 10.19-21/15.
 2. Nakamura H. Vaginal electrical impedance is an effective parameter to evaluate the prospect of uterine receptivity. IFFS/JSRM International Meeting. 2015. Yokohama, Japan.

- 4.26-29/15.
3. 小和貴雄、味村和哉、瀧内 剛、柿ヶ野藍子、高田友美、松崎慎哉、熊澤恵一、金川武司、木村 正. ステロイド服用妊婦の分娩時ステロイドカバーについての検討. 第67回日本産科婦人科学会. 横浜. 4.9-12/'15.
 4. 佐藤紀子、熊澤恵一、海野ひかり、山下美智子、小泉花織、繁田直哉、田中絢香、安井悠里、古谷毅一郎、金 南孝、三宅達也、藤森由香、瀧内 剛、中村仁美、木村 正. 当院で妊娠中に抗凝固療法を実施した症例の検討. 第3回関西生殖医学集談会第47回関西アンドロロジーカンファレンス合同研究会. 大阪. 3.7/'15.
 5. 熊澤恵一. 簡易にできる高血圧モデルマウスの作成. 第29回日本生殖免疫学会. 東京. 12.11-13/'14.
 6. 小泉花織、中村仁美、松崎高志、黒田俊一、瀧内 剛、熊澤恵一、木村 正. Bio-nanocapsule(BNC)を用いた子宮局所への新しい drug delivery system の構築. 第29回日本生殖免疫学会. 東京. 12.11-13/'14.
 7. Kumasawa K. The exploration of preeclampsia model mice. 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy. Tokyo, Japan. 9.18-20/'14.
 8. Mimura K, Matsuzaki S, Kanagawa T, Matsuzaki S, Kumasawa K, Endo M, Tomimatsu T, Kimura T. The outcome of critically ill obstetric patients: An 8-year review in a tertiary care center. 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy. Tokyo, Japan. 9.18-20/'14. 婦人科学会. 東京. 4.18-20/'14.
 9. 島津由紀子、金川武司、味村和哉、柿ヶ野藍子、松崎慎哉、高田友美、熊澤恵一、橋本香映、谷口友基子、木村 正. 重症妊娠高血圧腎症自身は帝王切開の適応ではない. 第66回日本産科婦人科学会. 東京. 4.18-20/'14.
 10. Furuya K, Kumasawa K, Matsuzaki S, Mimura K, Taniguchi Y, Hashimoto K, Toshihiro Kimura, Kanagawa T, Kimura T. Analysis and obstetrical management in patients with extremely AMA. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility Kobe, Japan. 11.13/'13
 11. 熊澤恵一、松崎慎哉、味村和哉、谷口友基子、橋本香映、遠藤誠之、金川武司、木村 正. 当院における超高齢妊娠 (Extremely AMA)の予後の後方視的検討. 第49回日本周産期・新生児医学会. 横浜. 7.14-16/'13.
 12. 古谷毅一郎、熊澤恵一、松崎慎哉、味村和哉、木村敏啓、谷口友基子、橋本香映、金川武司、筒井建紀、木村 正. 当院における超高齢妊娠 (Extremely AMA) 予後の検討. 第128回近畿産科婦人科学会. 滋賀. 6.15-16/'13. Nakamura H, Masaki H, Fujimori Y, Kumasawa K, Tsutsui T, Kimura T. Modelling uterine macrophage-epithelial cell communication in vitro using peripheral blood monocytes. 第65回日本産科婦人科学会. 札幌. 5.10-12/'13.
 13. 金 南孝、熊澤恵一、正木秀武、中村仁美、荻田和秀、筒井建紀、木村 正. BeWo 細胞に TIMP2 を過剰発現させると、MAPK 経路を通じて細胞増殖が催促する. 第65回日本産科婦人科学会. 札幌. 5.10-12/'13.
 14. 細野剛良、山本愛美、伊木千尋、中村仁美、木村 正. マウスの膈の 1KHz インピーダンス値による子宮内膜着床能の前方視的評価. 第65回日本産科婦人科学会. 札幌. 5.10-12/'13.
 15. 古谷毅一郎、熊澤恵一、松崎慎哉、味村

和哉、谷口友基子、木村敏啓、橋本香映、
金川武司、筒井建紀、木村正。当院にお
ける超高齢妊娠(Extremely AMA)予後の
検討。第 65 回日本産科婦人科学会。札
幌。5.10-12/'13。

16. 直居裕和、荻田和秀、熊澤恵一、西川愛
子、吉田 晋、福井 温、佐藤 敦、鹿
戸佳代子、木村 正。当施設における分
娩後の胎盤遺残 28 例を用いた予測因子
の検討。第 65 回日本産科婦人科学会。
札幌。5.10-12/'13。

〔図書〕(計 1 件)

1. 笹野智之、松本有里、熊澤恵一、馬淵誠
士。(2015) 第一部 第5章 画像検査で
はここを診よう！(産婦人科疾患の画像
と実際)。もう困らない！プライマリ・
ケアでの女性の診かた(井上真智子編)
羊土出版。48-62。

〔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

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： 9 0 4 4 4 5 4 6

- (2) 木村 正 (KIMURA, Tadashi)
大阪大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号： 9 0 2 4 0 8 4 5

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： 8 0 4 6 7 5 7 1

(3)連携研究者

()

研究者番号：