

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461650

研究課題名(和文) 低酸素が心臓形態形成期の胎児心行動態に及ぼす影響について

研究課題名(英文) Effects of hypoxia on developing murine embryonic cardiovascular function

研究代表者

桃井 伸緒 (MOMOI, NOBUO)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10285033

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)：本研究では、心臓形態形成期にあたる妊娠初期の胎児が低酸素に対して示す心行動態を、小動物用超音波高感度イメージングシステムを用いてマウス母体内で観察した。胎児心筋に強く発現しているカリウムチャンネル、IKrチャンネルをブロックするフェニトインを用い胎児を徐脈にすることで、胎児低酸素モデルを作成した。組織低酸素マーカーを用いて組織低酸素を評価し、低酸素誘導性因子(HIF-1)関連の遺伝子発現で胎児内血流再分布を評価した。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effect of hypoxia on developing murine embryonic cardiovascular function using high-resolution echocardiography in utero. Because a specific potassium ion current (IKr) is of major importance for embryonic cardiac repolarization, phenytoin that inhibits IKr has the potential to result in embryonic bradycardia. After making a hypoxic embryo model by phenytoin administration to the mother, we assessed the hypoxic status of the embryo using a hypoxia marker, pimonidazole. We also evaluated the blood redistribution in the fetus resulting from hypoxia by looking at the gene expression changes, which are transcriptionally activated by hypoxia inducible factor (HIF-1).

研究分野：小児科学

キーワード：胎児 心行動態 低酸素

1. 研究開始当初の背景

本邦における 2500g 未満の低出生体重児の頻度は近年増加し、20 年前の約 2 倍に達した。この背景には、高齢出産と多胎妊娠の増加があるとされるが、その他の要因も関与している可能性がある。胎児、特に発生初期の胎児は低酸素に対して高い耐容性を有するが、長時間や過度の低酸素（胎児低酸素）は発育不全や催奇形性をもたらす。胎児低酸素は、臍帯過捻転等の子宮胎盤循環の機械的・器質的障害で発生する他、子宮動脈収縮や胎児不整脈などでも起きうる。低酸素が胎児に対して及ぼす影響は、疫学調査や、妊娠後期の動物実験、胎児培養や胎児心筋細胞を用いた母体外での実験で証明されてきた。しかし、これまでの方法では妊娠初期の胎児心行動態を母体内で観察することが困難であるため、妊娠初期の胎児に実際にどのような心行動態変化が生じているかを母体内で観察した研究はない。

本研究代表者は、これまで、小動物用超音波高感度イメージングシステム (vevo660, VisualSonics, Canada) を用いて、心臓形態形成初期（単心房単心室・総動脈幹）の在胎日齢 (ED) 9.5 から、心臓内構造がほぼ完成する ED13.5 までのマウスの胎仔心機能について調べてきた。同機器は、妊娠早期の胎仔心行動態を、母体内で、かつ低侵襲で測定することを可能とする。これまでに行った胎児低酸素に関する実験は、母マウスを 10 分おきに 45 秒間無酸素下におく実験系で行い、母体が低酸素となった約 3 分後に ED11.5 の胎仔心拍出量は最低となり徐々にベースラインに復すること、また、低酸素ストレスが繰り返されると、この心拍出量低下が緩和される適応反応があることを報告した。加えて、あらかじめコーヒー 1、2 杯分の血中濃度になるようなカフェインを母体に投与した場合には、この低酸素に対する適応反応が消失することも示した。この実験は、これまで胎児低酸素との関連が示唆されていなかったカフェインでさえ、胎仔が低酸素に対して示す心行動態に変化を与えることを示している。したがって、これまで胎児低酸素と関連づけられてきた薬剤や環境が、妊娠初期の胎児心行動態にも影響を与える可能性は充分にある。また、胎児低酸素を含む胎児機能不全（ジストレス）では選択的血管収縮により、多くの血流を生命維持に必要な組織へ供給させる血流再配分が起きることが知られているが、妊娠初期の胎児において、どのような血流再配分が起きるかを観察した研究はない。

2. 研究の目的

研究の目的は、妊娠マウスを用いて、胎仔低酸素が心臓形成期の ED11.5 の胎仔に及ぼす影響を、血流再分布を中心に調べることにした。ED11.5 は、心室中隔が形成され始め、総動脈幹が大動脈と肺動脈へ分割される直

前の時期にあたる。胎仔血流再配分については、組織低酸素マーカーである

pimonidazole hydrochloride (Hypoxyprobe™-1) を用いて、組織学的に検討することとした。

胎仔低酸素を誘導する実験系として、当初は母体を低酸素に曝すことを予定したが、胎仔低酸素を持続させるには、母体を非常に高度の低酸素下に置く必要があった。低酸素が母体自体に引き起こす内分泌代謝変化が胎仔に影響を及ぼす可能性があり、また臨床で見られる胎児低酸素とかけ離れてしまうことが考慮されたため、本研究では母体へのフェニトイン投与を用いた実験系を作成することとした。母体へのフェニトイン投与は口蓋裂、口唇裂、指低形成、子宮内発育不全などの催奇形を有することが知られているが、原因としては、フェニトインが胎児心筋細胞の hERG カリウムチャネルの遅延整流電流 (I_{kr}) を阻害し胎児徐脈をきたし胎児低酸素が生じるためとされている。I_{kr} は胎仔期早期に重要な役割を有しており、*in vitro* の実験や帝王切開によるラット胎仔心拍動観察などで、妊娠後期では効果が見られないが、妊娠初期～中期では胎仔徐脈が見られることが示されている。しかしながら、子宮内で母体心行動態と一緒に胎仔徐脈を観察した実験はなく、このことを明らかにすることも本研究の目的とした。

これら心臓発生時期にあたる妊娠初期の胎児におきる変化を実証し、健全な胎児管理の上で重要な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

生後 10～12 週齢の CD-1 マウス雌雄の交配により作成した妊娠マウスを用いた。交配は雄 1 匹に対して未経産の雌 2～3 匹を用いて夜間を通して行い、翌朝に膣栓が認められた日を在胎日齢 (embryonic day : ED) 0.5 とした。ED11.5 の母体および胎仔の心行動態観察後、フェニトインを母体へ皮下投与し、12 時間、24 時間後に再度、母体および胎仔の心行動態を観察した。フェニトインの投与量により、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 投与群に分け、コントロール群には生理食塩水を投与した。心行動態の測定は、1.6～1.8 %濃度のイソフルレン吸入による全身麻酔下に、加温ベッドおよび加温用ランプを用いて妊娠マウスの体温を 37 台に保ちながら、小動物用超音波高感度イメージングシステム (Vevo 2100, VisualSonics, Canada) を用いて行った。M モード法により母体の心室壁運動を計測し、次にドプラ法にて母体の心拍出量および胎仔の背側大動脈 (dorsal aorta : DA)、頸動脈 (carotid artery : CA)、臍帯動脈 (umbilical artery : UA) の血流を、速度時間積分値 (velocity-time integral : VTI) による VTI × 心拍数 (HR) を指標として計測した。母体の血圧は小動物血圧測定装置 (BP-98A-L, softron, Japan) を用いて、体温および心電

図は Vevo2100 に内蔵されている計測システムを用いて、胎子の超音波イメージングと一緒に Vevo2100 内のハードディスクに記録した。

心拍動態評価直後に組織低酸素マーカー、Hypoxyprobe™-1 (60mg/kg) を静脈内投与して、2 時間後に子宮内から取り出し、ホルマリン固定し、後に Hypoxyprobe™ モノクローナル抗体を用いて染色し、胎児・胎盤・子宮の酸素分布について検討した。

比率の検定は Pearson の ² 検定で検定し、各群の平均値は平均 ± 標準誤差で表し、平均値の差は Kruskal-Wallis 検定を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 母体フェニトイン血中濃度

母体フェニトイン血中濃度を、高速液体クロマトグラフィーを用いて、投与後 4 時間、12 時間、24 時間で測定した。12 時間後の血中濃度が最も高く、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 投与群で、それぞれ 21.2 μg/ml、31.7 μg/ml、41.2 μg/ml であり、通常臨床で有効血中濃度の目安である 10~20 μg/ml をやや上回る濃度であった (図 1 上段)。

(2) 母体フェニトイン投与後の胎子心停止率

コントロール群では胎子心停止は認めなかったが、母体にフェニトインを投与した群では用量依存性に心停止した胎子が多く観察された。50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 投与群の心停止率は、投与後 12 時間では、それぞれ 7.7%、24.9%、26.0% であり、24 時間後では 13.8%、40.2%、74.2% であった (図 1)。

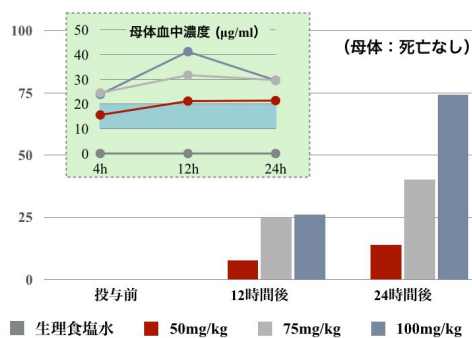


図1 母体フェニトイン投与後の胎子心停止率 (%)

(3) 母体フェニトイン投与後の心拍動態

母体におけるフェニトイン投与前後の心拍数変化は、コントロール群、フェニトイン投与群で有意差はなかった。心停止を認めた胎子を除外した胎子心拍数のフェニトイン投与前後の変化は、コントロール群では +9.6 ± 2.7% と投与後に増加したが、フェニトイン群では用量依存性に心拍数は有意に低下し、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 投与群の心拍数の変化は、-8.5 ± 2.0%、-32.0 ± 2.2%、-44.8 ± 1.5% であった (図 2)。

母体の心拍出量、血圧の変化には各群に有

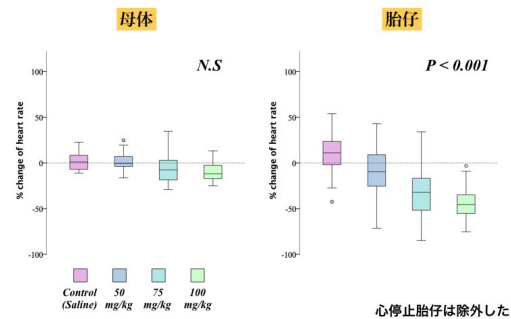
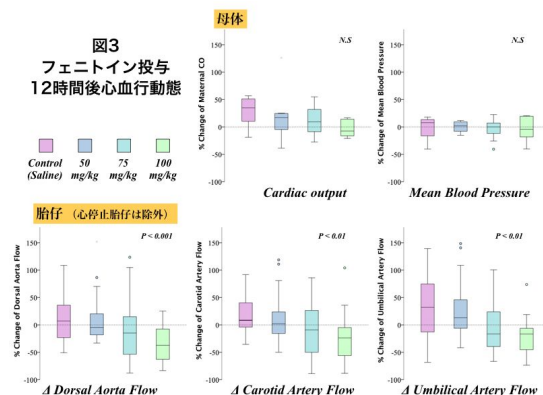


図2 フェニトイン投与12時間後心拍数

意差を認めなかった。胎子におけるコントロール群、50mg/kg 投与群、75mg/kg 投与群、100mg/kg 投与群の投与前後の変化は、背側大動脈で、それぞれ、+9.3 ± 10.0%、+7.2 ± 6.6%、-9.8 ± 10.0%、-36.2 ± 7.2%、頸動脈で +19.1 ± 7.9%、+11.5 ± 5.9%、-6.9 ± 9.1%、-23.7 ± 10.1%、臍帯動脈で +29.7 ± 14.6%、+29.5 ± 10.2%、-6.1 ± 8.5%、-20.6 ± 8.5%、と用量依存性に有意の血流量低下を認めた。部位別の低下の程度については、背側動脈 > 頸動脈 > 臍帯動脈の順であったが、有意差はなかった (図 3)。



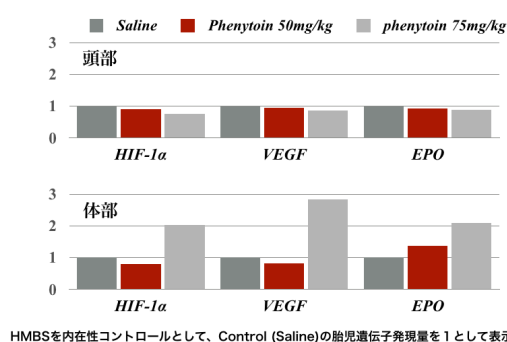
(4) Hypoxyprobe™-1 による組織染色

コントロール群胎子組織でも染色が認められ、胎子組織が正常でも低酸素である影響と考えられた。フェニトイン投与群で強く染色される傾向を認めたが、現時点では用量依存性の差異や、血流再分布による胎子内低酸素細胞の局在を明らかにすることはできていない。今後、定量化に向け検討を進める予定である。

(5) 低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor: HIF) と、誘導される因子の評価

胎児組織は、常時、低酸素状態に置かれており、妊娠初期の胎児においては、この低酸素が HIF の活性化を介して、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)、erythropoietin (EPO)、glucose transporter isoform-1 (Glut-1)、insulin-like growth factor binding protein-1 (Igfbp-1) などの発現を誘導し、

臓器形成を促進する。Hypoxprobe™-1 による評価に限界が生じる可能性があるために、これらの因子を用いて胎児低酸素の評価を試みた。HIF-1、および誘導される VEGF や EPO について、胎仔・胎盤・子宮筋における発現を各群で比較した。血行動態測定後に、母体を安楽死させ、胎仔は血流再分布の評価のために頭部と体部に分けたのち、検体を作成した。先行研究では、フェニトイン 75mg/kg 母体投与を行った胎仔の体部の HIF-1、VEGF、EPO の遺伝子発現が増加していることが示されている。今後、胎盤・子宮筋を含めて検討するとともに、低酸素で誘導される Glut-1、Igfbp-1、Bnip3 などについて Western blot 法および定量 RT-PCR 法を用いて検討していく予定である。(図 4)



HMBSを内在性コントロールとして、Control (Saline)の胎児遺伝子発現量を1として表示

図4 母体フェニトイン投与後の胎児遺伝子発現

(6)まとめ

フェニトインの催奇形性は、フェニトインが胎児心筋細胞の hERG カリウムチャネルの遅延整流電流 (I_{Kr}) を阻害し、胎児徐脈をきたし胎児低酸素を生じさせるためとされてきた。このことは、*in vitro*の実験や帝王切開によるラット胎仔心拍動観察などで観察されてきたが、今回の研究では *in vivo* で、母体と胎仔の心行動態を測定し、血中濃度との関連も明らかにすることができた。HERG チャネル電流 (I_{Kr}) 阻害作用を有する薬剤としては、その他の抗てんかん薬や、抗不整脈薬・抗ヒスタミン薬の一部、マクロライド系抗生物質などがある。臨床においては、心臓形成期にあたる妊娠初期の胎仔心行動態が測定されることはなく、副作用がマスクされてしまう可能性があり、妊娠中の使用について更に注意を喚起する必要性が示唆された。

これまで、妊娠初期の胎仔を低酸素環境に暴露させる動物実験は、母体を高度の低酸素下に置くことにより行われてきたが、今回確立した実験系は母体を低酸素にせず、胎仔を低酸素状態に置くことができる。母体を高度の低酸素下に長時間置いた場合には、母体自体に起きる血行動態変化や内分泌代謝等の変化が胎児に影響を及ぼしたり、母体内で増減した物質が胎盤を通過したりする可能性があるが、この実験系ではそのことを除外で

きる利点を有する。現在、この実験系を用いて胎仔に生じる遺伝子変化を検討中である。妊娠初期の胎児が、低酸素により心行動態変化のみならず遺伝子変化まできたしているとすると、発達後、および将来の生活習慣病にまで影響が及ぶと考えられる。本研究の明らかにした事象は、子供が健康に出生し成長するためには、妊娠が判明してからではなく、妊娠可能女性が日常からどのような胎児環境を保つことが重要かを示唆している。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

第14回 日本周産期循環管理研究会
(2016年5月21日、福島市)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

桃井 伸緒 (MOMOI NOBUO)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10285033

(2)研究分担者

青柳 良倫 (AOYAGI YOSHIMICHI)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号: 30509469

金井 祐二 (KANAI YUUJI)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号: 60448628