

シンポジウム1 妊娠中毒症の病因—分子生物学的視点から—

妊娠中毒症と血管内皮障害—過凝固・交感神経活性化・血管攣縮および
ノックアウトマウスモデルによる病因の検討—

浜松医科大学助教授 小林 隆 夫

目 的

我々は血管内皮障害こそが妊娠中毒症(以下 EPH)諸症状の本態であり,これに過凝固状態,交感神経系活性化,血管攣縮などが密接に関連しあい,悪循環を形成しながら EPH 病態を完成するものと考えている.本研究では,EPH における血管内皮障害の病態をさまざまな角度で捉えると共に,臨床例での検討に加え,野生型(WT)マウス・ラット・家兎及びノックアウトマウスを用いて EPH 誘発モデルを作成し,病態の解明と新しい治療の確立を目的とする.

方 法

臨床例の検討はすべて日産婦分類による重症 EPH 例である.(1)凝固線溶系の異常を検討し,antithrombin(AT),thrombin-antithrombin complex(TAT),FDP D-Dimer 及び血小板数を用い,正準相関分析にて重症度の指標を作成する.血小板数は妊娠初期と分娩前における血小板数減少量(Δ plt)で表す.(2)血管作動性物質である endothelin-1(ET),catecholamines(CA)及び neuropeptide Y(NY)濃度を測定する.(3)Magnetic Resonance Imaging Angiography(MRA)を入院時及び分娩後に施行し,血管攣縮の有無を検索する.(4)超音波断層装置で左腎静脈径を正常例と比較検討する.また EPH 例において腹大動脈,下大静脈,左腎静脈,脾静脈等の異常を超音波断層装置及び MRA にて検索する.(5)マウス・ラット・家兎を用い,過凝固,血管攣縮,子宮内胎仔発育不全(IUGR)を来す EPH 誘発モデルを作成する.① ET を家兎に静注し,全身の血管攣縮を誘発せしめ,血管内皮障害の程度,血液凝固線溶系の変化を観察する.②ラット・家兎の腹腔神経節を LPS(Lipopolysaccharide)で刺激し血管攣縮を誘発する.刺激前後の ET, CA, 肝腎機能,凝固系及び各臓器の病理学的変化を検討する.③妊娠 ICR マウスにリン脂質のミセルである phosphatidylserine/phosphatidylcholine (PS/PC) 1mg を day 5.5 から day 16.5 まで尾静脈に投与し,血圧上

昇・IUGR 誘発モデルを作成する.血圧は tail-cuff method で測定する.これにリン脂質結合凝固抑制物質である annexin V(AV),さらに heparin, AT を投与し,病態が改善されるか否かを検討する.

④ murine VEGF(vascular endothelial growth factor)10ng を day 5.5 から day 16.5 まで妊娠 ICR マウス尾静脈に投与し,血圧上昇・IUGR 誘発モデルを③と同様に作成する.(6)ノックアウト(Ko)マウスによる EPH モデルの作成.①タンパクリン酸化を抑制して細胞増殖を調節する CDK(cyclin-dependent kinase)inhibitor の一つである p57^{Kip2} Ko マウスを作成,胎仔・母獣に対する影響を検討する.a)母獣の妊娠産褥期の血圧,蛋白尿の検討,b) day 17.5 での母獣の血小板数,AT 活性,ET 抗原量の測定,c)屠殺時に子宮ごと取り出し,p57^{Kip2} mutant 胎仔並びに胎盤の組織学的検討,d)胎盤を homogenate し,その上清で Western blotting を行い,VEGF の発現を比較検討.さらに mRNA を抽出,RT-PCR を行い,VEGF mRNA レベルを ABIprism5700 System を用いて定量する.② LDL 受容体(LDLr),Syndecan 4(heparan sulfate 受容体)等の Ko マウスを用い,同様に検討する.

成 績

(1) EPH 例(n=101)は正常妊婦(n=72)に比し,AT 活性の低下(79.9 vs. 96.4%),TAT の増加(24.8 vs. 4.6ng/ml),D-Dimer の増加(3.7 vs. 0.2 μ g/ml), Δ plt の増加(-5.0 vs. -0.8 万/ μ l)がいずれも有意で,高度の過凝固状態を呈していた.EPH 例でも経陰分娩成功例と帝王切開(帝切)施行例では,帝切群においてその異常は有意であり,凝固系の異常は EPH 重症度を反映していた.また次の式により重症度及び妊娠中断時期の判別が可能であった.すなわち, $Y = \{-0.019 \times AT\} + \{0.067 \times TAT\} + \{0.067 \times D-Dimer\} + \{-0.064 \times \Delta plt\} + 0.706$ である.各マーカーの数値をそのまま代入すると正常妊婦では-0.77,EPH では1.41($p < 0.0001$)となり,EPH の中では帝切群で1.62,経陰群で0.52($p < 0.05$)であった.帝切による妊娠中断

時期の判別は、1.2(経腔群の平均+2SD)以上と考えられる。(2) EPH 及び子癇症例では、正常妊婦に比し ET, CA(epinephrine, norepinephrine), NY 濃度がいずれも有意に上昇していた。これは血管作動性物質増加と交感神経活性化を証明するものである。(3) MRA 施行した EPH15 例のうち 12 例(子癇 3 例では全例)に脳動脈の攣縮が、HELLP 症候群症例では肝動脈の攣縮がみられた。EPH 例の血管攣縮は前・中・後大脳動脈に及び、後大脳動脈に攣縮がみられた例の多くでは視覚障害を訴えた。EPH の病態形成において血管攣縮は極めて重要な役割を果たしているものと考えられる。(4) EPH 例において現在までに判明した異常は、腹大動脈の蛇行・狭窄・偏位、下腸間膜静脈の下行・拡張、脾・左腎静脈短絡、左卵巣静脈の拡張、特発性門脈圧亢進症等であり、特に左腎静脈の鬱滞度が大きい症例ほど妊娠早期から EPH が悪化していた。また、正常妊婦の左腎静脈径は妊娠後期に 6.4mm であるのに対し、EPH 例では早発型で 9.8mm、晩発型で 8.7mm といずれも有意に拡張していた。これらの事実は、EPH の病態形成において腹部交感神経節や左腎静脈及びその周囲の血管との解剖学的関係が関与していることを示唆する。(5) ① ET を家兎に静注すると全身の血管攣縮が誘発され、血管内皮障害・血液凝固線溶系の変化や肝・腎など臓器障害が著明で、子癇や HELLP 症候群における症状や検査結果に類似していた。②ラット・家兎の腹腔神経節を LPS で刺激すると、対照群に比し有意に血圧上昇、蛋白尿増加、肝酵素増加、CA 増加、血小板減少、肝・腎障害等がみられた。交感神経節刺激は CA 分泌を促進し、血管攣縮の誘因になると考えられる。③ PS/PC を妊娠マウスに投与すると、生食投与群(n=8)に対し PS/PC 群(n=6)では、day 17.5 での血圧は有意に上昇(101 vs. 124mmHg)、AT 活性の減少(89 vs. 76%)、TAT の有意な増加(6.6 vs. 23ng/ml)、血小板数の有意な減少(102 vs. 88 万/ μ l)、蛋白尿の増加(26 vs. 86mg/dl)、胎仔体重(1.3 vs. 1.2 g)及び胎盤重量(0.14 vs. 0.13g)の有意な低下を認めたほか、胎盤内の血管や絨毛間腔での著明なフィブリン沈着を示した。この事実から凝固亢進・胎盤内血栓形成の結果、母獣の血圧上昇・胎仔 IUGR を来することが判明した。このモデルに AV, heparin, AT を PS/PC と同時に投与し凝固亢進を抑制すると、血圧上昇が抑制され、TAT も低

下した。これら抗凝固療法はヒトへの臨床応用の可能性を示唆する。④ VEGF 投与でも③と同様、母獣の血圧上昇・胎仔 IUGR、胎盤内血栓形成が認められた。この事実は、VEGF と EPH の関連性を示唆する。(6) ① a) p57^{Kip2} mutant 胎仔を妊娠したマウスは WT 胎仔を妊娠したマウスに比し、有意に血圧が上昇(138 vs. 101mmHg)、蛋白尿が増加した。b) また同様に、有意に血小板数が減少、AT 活性が低下(68 vs. 122%)、ET 抗原量が増加(105 vs. 32pg/ml)した。c) mutant 胎盤重量は WT 胎盤重量に比し有意に大きく、かつ、スポンジ層絨毛細胞の過剰増殖並びに絨毛間腔での著明な血栓形成を示した。d) 胎盤での VEGF 発現は mutant 胎盤が WT 胎盤より多かったが、VEGF の splicing(VEGF120, 164, 188)は二者とも同一であった。VEGF mRNA のレベルは、mutant 胎盤が WT 胎盤より多かった。この事実は絨毛細胞の過剰増殖、胎盤内凝固が EPH 発症と密接に関連しており、その原因として VEGF の関与が示唆された。②他の Ko マウスモデルは現在検討中であるが、LDLrKo マウスは WT マウスに比し、妊娠中有意に高血圧となった。また、Syndecan 4 Ko マウスの胎盤はスポンジ層のフィブリン沈着が著明であった。これらは脂質代謝異常や heparan sulfate 異常による血管内皮障害と EPH 発症を示唆する。

結 論

EPH は、全く健常な母体でも胎盤側に原因がある場合や、逆に胎盤は正常でも母体側の血液凝固や血管系に異常がみられる場合に発症し得る。我々は臨床例の検討から凝固線溶系異常、左腎静脈系異常、交感神経系活性化等に起因する血管内皮障害が血管攣縮の誘因となり、EPH 病態を形成していることを明らかにした。そして、トロンビン異常に基づく AT 療法が EPH に有効であることを初めて証明した。今回は、過凝固・胎盤内血栓形成による血管内皮障害に着目した EPH 発症動物モデルを作成し、分子生物学的視点からその病態を論じた。その結果、原因は何にせよ胎盤内過凝固に起因する絨毛間腔内の血管内皮障害が、母体の血管内皮障害と相俟って EPH 病態を形成する大きな要因の一つであることが明確になった。そして、血管内皮障害改善の抗凝固療法として AV, ヘパリン, AT 等が有用であり、今後の治療の選択肢になり得ると思われた。