

## 妊娠中毒症の発症と胎盤ミトコンドリア遺伝子

## Placental mitochondrial gene and pathogenesis of preeclampsia

名古屋大学産婦人科学教室

倉内 修、古井俊光、板倉敦夫、水谷栄彦、友田 豊

Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya University

Osamu Kurauchi, Toshimitsu Furui, Atuo Itakura, Shigehiko Mizutani, Yutaka Tomoda

目的：人ミトコンドリアは電子伝達系を構成する13個のたんぱくをコードする環状DNAをもち1)、細胞あたり数百個存在する細胞小器官である。ミトコンドリア遺伝子の正常な発現は、各細胞が正しく機能するために必須である。従ってLinnaneら2)は、ミトコンドリア遺伝子変異の蓄積は臓器の機能障害を引き起こすと述べている。

また胎盤で行われる能動輸送においては、ミトコンドリアで産生されたエネルギーが必要である。妊娠中毒症では、しばしば子宮内胎児発育遅延を生じ、一つの原因として胎盤における能動輸送の障害が起こっていると考えられる。従って妊娠中毒症の発症とミトコンドリアにおけるエネルギー産生障害との関連性を検討することは重要である。

そこで本研究では、ミトコンドリア遺伝子によってコードされるチトクロームCオキシダーゼサブユニットI(CoI)の発現量、チトクロームCオキシダーゼ活性、細胞あたりのミトコンドリアDNAのコピー数と欠失を正常および妊娠中毒症胎盤において検討した。

対象と方法：正常および妊娠中毒症胎盤は、患者同意のもと、人工妊娠中絶、選択的帝王切開および自然分娩時に採取した。両群間において妊娠週数(正常：36.1.0±4.8、妊娠中毒症：33.8±4.8)、母体年齢(正常：28.0±3.8、妊娠中毒症：28.4±5.3)に有意な差は認めな

かった。平均出生児体重は、正常で2388±875g、妊娠中毒症では1358±612gであった。また妊娠中毒症例の出生児体重はすべて1.5SD以下であった。妊娠中毒症の診断基準は、収縮期血圧と拡張期血圧がそれぞれ140と90mmHg以上で全身性の浮腫とたんぱく尿を示した純粹型妊娠中毒症とした。

ミトコンドリアの抽出はKennawayらの方法に従った。チトクロームCオキシダーゼ活性は還元型チトクロームCを基質として測定した。またサクシネート-ユビキノロンオキシドリダクターゼ活性は、2、6-ジクロロインドフェノールのユビキノロン依存性の還元量を測定することにより行った。

二種のプライマー(A：5'-TTCATGCCCATCGTCCTAGA-3'、B：5'-GGGGAAGCGAGGTTGACCTG-3')はミトコンドリアDNAの5.45kbフラグメントを増幅するために用いた。プライマーC(5'-CTATTATTCGGCGCATGAGC-3')とD(5'-GAATGAGCCTACAGATGATA-3')はCoI遺伝子の1.3kb領域を増幅するために使用した。胎盤ミトコンドリアDNAの調製は笠原らおよびBoghenhagenとClaytonの方法に準じて行った。また18S rDNAをコードするDNAはDr. Dimauro(Columbia University, NY)とDr. Sylvester(Hahnemann University, PA)より提供を受けランダ

ムプライミングDNAラベリング法により $^{32}\text{P}$ -dCTPで標識したのちプローブとして用いた。ノザンプロットおよびサザンプロットはそれぞれ神戸らおよびDim Mauroらの方法に従って行った。

成績：Figure 1Aに正常および妊娠中毒症胎盤におけるチトクロームCオキシダーゼ活性を示した。妊娠中毒症群の平均値 ( $58.5 \pm 17.1$  nmol/min/mg mitochondria protein) は正常群 ( $93.0 \pm 18.6$ ) に比し有意に低値を示した。一方核内遺伝子によってコードされるサクシネート-ユビキノンオキシドリダクターゼ活性は両群間に差を認めなかった (Figure 1B)。

次にCoI mRNA量とその分子量をノザンプロットにより検討した (Figure 2)。分子量は両群間において同様 (1.5 kb) であったが、その発現量は妊娠中毒症群では正常群に比し約60%と低値であった。一方、ベータアクチンの発現量は妊娠経過とともに減少する傾向を示したが両群間において有意差を認めなかった。

Figure 3に示すように胎盤ミトコンドリアDNA量は、妊娠経過とともに減少したが、両群間において差は認めなかった。

考察：今回の我々の結果からチトクロームCオキシダーゼ活性とCoIの発現量が妊娠中毒症胎盤において有意に低下していることが判明した。一方、核内遺伝子によってコードされるサクシネート-ユビキノンオキシドリダクターゼ活性は両群間に差を認めなかったことは、今回調製したミトコンドリアの純度に両群間に差がないことおよびチトクロームCオキシダーゼ活性のみが妊娠中毒症胎盤において特異的に低下していることを示している。さらにサクシネート-ユビキノンオキシドリダクターゼの4個のサブユニットは核内遺伝子によってコードされていることから妊娠中毒症胎盤において核内遺伝子の発現量に変化がないと考えられた。

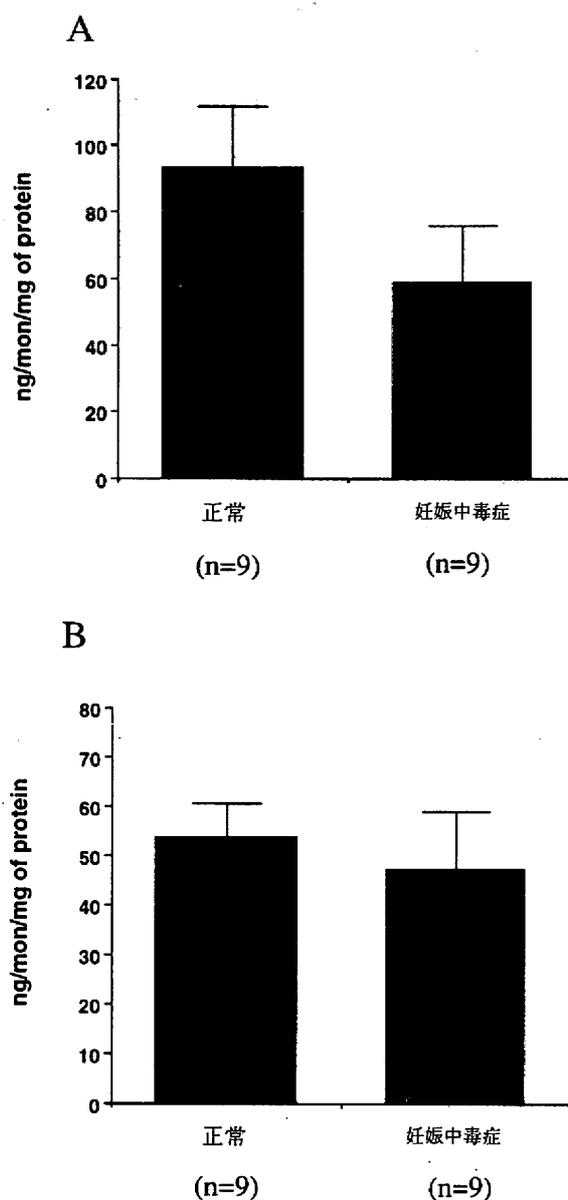


Figure 1. 正常妊娠と妊娠中毒症胎盤におけるチトクロームCオキシダーゼとサクシネート-ユビキノンオキシドリダクターゼ活性。数値は平均 $\pm$ SDで示す。チトクロームCオキシダーゼ活性は妊娠中毒症胎盤において有意 ( $P < 0.001$ ) に低値を示した。

ミトコンドリアDNAはDループ領域に存在する単一のプロモーターでその転写が制御されている。従ってCoIの発現量の低下はミトコンドリア遺伝子によってコードされるすべてのmRNAの発現が低下していることを意味し、その結果ミトコンドリアにおけるエネルギー産生障害に至ると考えられる。次に妊娠中毒症胎盤にみられるCoI mRNAの低下がプロモーターにおける転写障害が原因であることを確かめるために我々は細胞あたりのミトコンドリアDNA量を検討した。核内DNAに対するミトコンドリアDNAの比率は妊娠経過とともに減少する傾向を示したが、両群間に有意な差は認めなかった。さらに加齢や変性疾患の患者にみられる4977bpの欠失は両群ともに今回の研究では認められなかった。欠失を含めたミトコンドリア遺伝子変異は多くの場合細胞分裂が活発でない細胞に見られる。確かに胎盤トロフォブラストは、満期近くにおいてさえ増殖能力を維持している。従って今回の結果からもミトコンドリア遺伝子異常が妊娠中毒症胎盤に見られたミトコンドリア遺伝子の発現低下に重要であるとは思われなかった。

本研究から妊娠中毒症胎盤のCoI mRNAの発現低下がミトコンドリアDNAのプロモーターにおける転写の障害であることが類推される。この原因としてはDNAポリメラーゼや転写因子の活性低下、あるいはミトコンドリアにおけるATPやカルシウムイオン濃度の低下が考えられる。妊娠中毒症時に見られる胎盤の循環障害がこれらの因子の低下に関与しているのかも知れない。

これまで妊娠中毒症の原因については多くの研究にもかかわらず一定の見解は得られていない。最近ミトコンドリアのエネルギー産生と妊娠中毒症に見られる栄養代謝障害との関連性が注目されている。ShanklinとSibaiら<sup>3)</sup>は妊娠中毒症においては、血管内皮細胞のミトコンドリアは形態学

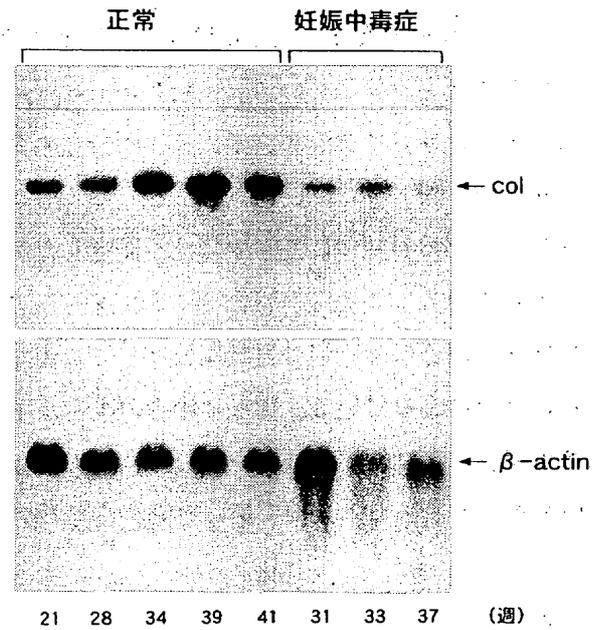


Figure2. ノザンブロットによる正常および妊娠中毒症胎盤におけるCoI発現量を示す。下段にはベータアクチンの発現量を示した。妊娠中毒症胎盤ではCoI発現量は正常に比較して約60%であった。

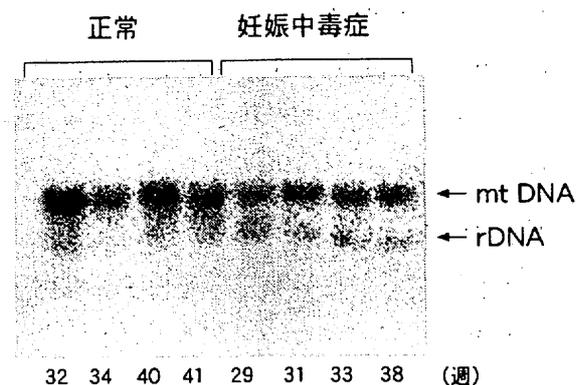


Figure3. サザンブロットによる正常および妊娠中毒症胎盤における細胞あたりのミトコンドリアDNAのコピー数の検討。両群間にrDNAに対するミトコンドリアDNAの比率に差を見ない。

的には膨化し、クリステの数が減少していることから、これらの変化が妊娠中毒症の病態と関連していることを報告している。またTorbergsenら4)は、ミトコンドリア病の家系に妊娠中毒症の発生率が高いこと、さらにBerkowitzら5)はミトコンドリア病を持つ患者に妊娠中毒症が発症した例を報告している。これらの報告はミトコンドリアの機能異常が妊娠中毒症の発症原因として重要であることを物語っている。従って細胞のエネルギー産生障害として妊娠中毒症をとらえ、その発症機序を検討することも重要であると考えられた。

#### 文献

- 1) Attardi G. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *Inv Rev Cytol* 1985;93:93-145.
- 2) Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases. *Lancet* 1989;i:642-5.
- 3) Shanklin DR, Sibai BM. Ultrastructural aspects of preeclampsia. II. Mitochondrial changes. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:943-53.
- 4) Torbergsen T, Oian P, Mathisen E, Borud O. Preeclampsia-a mitochondrial disease? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1989;68:145-8.
- 5) Berkowitz K, Monteaguro A, Marks F, Jackson U, Baxi L. Mitochondrial myopathy and preeclampsia associated with pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:146-7.