

## 妊娠時血圧制御の高次制御機構に関する研究

### Regulatory Mechanism of Blood Pressure upon Pregnancy

深水昭吉

Akiyoshi Fukamizu

筑波大学応用生物化学系・先端学際領域研究センター

University of Tsukuba

Maternal hypertension is a common complication of pregnancy and its pathophysiology remains an open question. This phenomenon was studied by mating transgenic mice expressing components of the renin-angiotensin system. When female mice expressing human angiotensinogen were mated with males expressing human renin, the pregnant females displayed a transient elevation of blood pressure in late pregnancy, due to secretion of human renin into the maternal circulation through placenta. Blood pressure returned to normal levels after delivery of the pups. Histopathologic examination revealed uniform enlargement of glomeruli associated with an increase in urinary protein excretion, myocardial hypertrophy, and necrosis and edema in the placenta. Neonates in size born from hypertensive mothers were smaller than those from normotensive mothers. These mice may provide molecular insights into pregnancy-associated hypertension.

#### 1. 研究目的

個体が妊娠・出産というプロセスを経て発生・発達し成長していくために、臓器や組織に酸素や栄養を供給することは必要不可欠であり、それは血管を流れる血液によって媒介される。そこで、安定した血行動態を維持するために、様々な血圧調節系が機能している。また、非妊時に比べホルモンや体液バランスが大きく変動する妊娠時では、母体内環境を一定に保ち、致命的な障害を受けずに出産できるよう血圧調節系を含む恒常性維持機構が備わっている。

その重要性故に、血圧調節系の機能破綻は、成人においては高血圧の引き金となり、動脈硬化、脳卒中や腎臓病などの循環器疾患発症のリスクファクターの一つと考えられている。また、妊娠という負荷に母体が対応できず適応不全が原因となって発生すると考えられる“妊娠中毒症”は、周産期死亡や母体死亡の主要原因の一つとなっている。妊娠中毒症自体は、高血圧・蛋白尿・浮腫などの臨床症状に基づいた定義であるが、その中には様々な病因病態が含まれていると考えられている。その発症には、複数の遺伝要因と環境要因が関与していると推定されているが、現在までに病態発生

の分子機構は不明である。

申請者らは、発生工学的手法を駆使して、ヒト遺伝子（血圧調節ホルモン・アンジオテンシン）機能に基づく妊娠期間特異的に高血圧を誘発するトランスジェニック (Tg) マウスの系統を世界で初めて確立した (図 1) (*Science* 274, 995-998, 1996)。

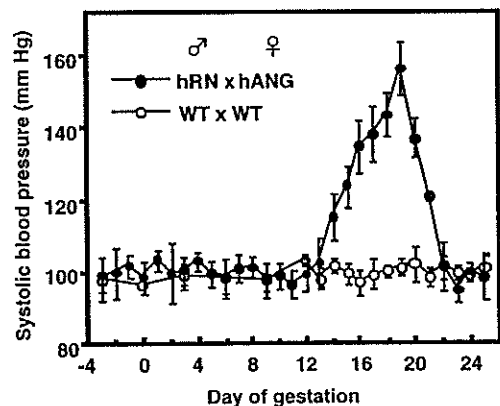


図 1 妊娠高血圧マウスの血圧変動

Fig. 1. Change in blood pressure during pregnancy

この時に、タンパク尿の排泄、腎疾患、及び求心性心肥大等の臓器障害や痙攣発作を伴う“妊娠中毒症”に類似した症状が観察された。

そこで本研究は、妊娠時血圧調節の生体高次制御機構をシグナル伝達の分子・個体メカニズムを介して解明することを目的とした。

## 2. 研究経過

### 2. 1 母体・胎児の観察

妊娠中に高血圧が発症した母体から生まれた新生児は、通常出産の新生児と比べて有意に小さいことが知られている。これは、高血圧による胎盤への血流低下が生じ、胎児への栄養供給の不備が考えられている。すなわち、妊娠高血圧は母体への負荷を増大させるだけでなく、胎児への大きな影響を及ぼしている。そこで、妊娠中に高血圧を発症した母体からの新生児を、正常妊娠マウスからの新生児と比較検討した。

### 2. 2 Conditional-transgenic マウスの作製

本モデルマウスでは、♂ヒトレニン (hRN) 遺伝子 Tg と♀ヒトアンジオテンシノーゲン (hANG) 遺伝子 Tg を交配した時、アンジオテンシン産生に依存した高血圧を妊娠中に発症する (図 1)。しかし、その逆の交配では、妊娠高血圧は発症しない。

一般的に、血管収縮ホルモンであるアンジオテンシン II は、平滑筋細胞等の細胞膜上に存在するアンジオテンシン II 受容体を介してその作用を発揮している。そこで、妊娠高血圧の発症メカニズムを個体レベルで解明するために、アンジオテンシン II 1 a 型受容体 (AT1a) 遺伝子欠損マウスと hANG-Tg を戻し交配することによって、AT1a 遺伝子欠損を hANG-Tg の遺伝的背景に移入した。

作製した conditional-transgenic マウスを hRN-Tg と交配させることで、妊娠中の高血圧の発症を解析した。

### 2. 3 レニン遺伝子欠損マウスの作製と解析

アンジオテンシン産生系であるレニン-アンジオテンシン系の律速因子は、酸性プロテアーゼのレニンである。本系の妊娠高血圧発症の関与を調べる第一歩として、レニン遺伝子欠損マウスを作製した。レニンの唯一の基質であるアンジオテンシノーゲンの遺伝子欠損マウスの表現型と比較しながら、レニンの個体機能を解析した。

### 2. 4 AT1a 共役因子のクローニング

AT1a のシグナル伝達経路は、おもに Gq を介して行われている。妊娠中の血圧制御に関与するシグナル経路を解明する第一歩として、AT1a 結合因子を同定することを試みた。

AT1a の細胞内ドメインである C-末端の約 50 アミノ酸残基を用い、yeast two hybrid スクリーニングを行った。

## 3. 研究成果

### 3. 1 母体・胎児の観察

図 2 に、♂hRN-Tg と交配して妊娠した♀hANG-Tg から生まれた新生児 (A) と、♂hANG-Tg と交配して妊娠した♀hRN-Tg から生まれた新生児 (B) を示した。両者とも遺伝型は同じであるにもかかわらず、妊娠高血圧を発症した母体から生まれた新生児は、明らかに小さいことが示された。サイズ以外の表現型の相違は、現在検討中である。

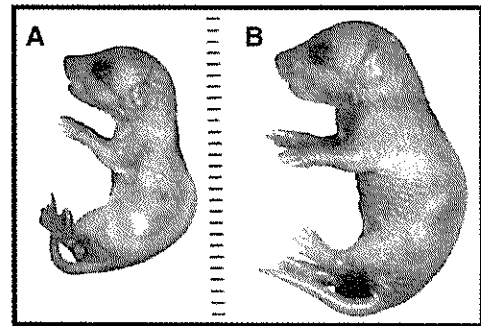


図 2 新生児マウスの比較

Fig. 2. Comparison of neonates from hypertensive (A) and normotensive (B) mothers

### 3. 2 Conditional-transgenic マウスの作製

戻し交配によって、hANG-Tg/AT1a-KO マウスを作製した。この♀マウスと、♂hRN-Tg を交配させることで、妊娠中に高血圧が発症するかを検討した。この時、♀hANG-Tg を妊娠高血圧発症のコントロールとして比較検討した。その結果、AT1a を欠損するマウスでは、図 1 に示すような妊娠後期に発症する高血圧が、全く観察されなかった。この事実は、妊娠後期に発症する高血圧は、AT1a を介することが明らかとなった。

妊娠高血圧を発症するメスマウスでは、腎臓の糸球体の腫大と著しいタンパク尿の排泄が観察

された。しかし、hANG-Tg/AT1a-KO マウスでは、タンパク尿の排泄が生じていなかった。これらの結果から、妊娠中のタンパク尿の発症に AT1a 経路が重要な役割を果たしていることが予想された。

### 3. 3 レニン遺伝子欠損マウスの作製と解析

レニン遺伝子欠損マウスを、TT2 ES 細胞を用いて作製した(研究論文リスト: [20])。レニン遺伝子欠損マウスでは、血中のアンジオテンシンは検出されなかった。それに伴い、著しい低血圧を呈することが明らかになった。また、生後2~4ヶ月齢のホモ接合体において、アンジオテンシノーゲン遺伝子欠損マウスで見られたような腎髄質や乳頭の著しい萎縮および腎盂の拡張が見られ、腎動脈血管平滑筋の肥厚が観察された。以上の結果から、循環中のアンジオテンシン産生系においてレニン機能を代償する酵素や、全身性における血圧維持を代償する系が存在しないことが判明した。

レニン-アンジオテンシン系の中樞作用が知られているが、我々はアンジオテンシノーゲン遺伝子欠損マウスにおいて、apoptosis によると思われる海馬・小脳における顆粒細胞の減少を報告した。しかし、レニン遺伝子欠損マウスではそのような顕著な所見は観察されなかった。また、中枢神経系のグリア細胞の一つであるアンジオテンシノーゲンを産生するアストロサイトに、アンジオテンシノーゲン遺伝子欠損マウスで機能異常が見出された。すなわち、アストロサイトは血液脳関門の機能的支持体として重要な役割を果たしているが、アンジオテンシノーゲン遺伝子欠損マウスの脳に一過性の虚血性脳損傷を施すと、血液脳関門の機能再生が著しく障害されていることが判明した。一方、レニン遺伝子欠損マウスの脳の損傷治癒は、野生型のそれと有意差が認められなかった。以上の結果は、中枢神経系におけるアストロサイトを介した血液脳関門の再構築に、レニン経路以外のアンジオテンシン産生系の持つ役割が示唆されたものである。

### 3. 4 AT1a 共役因子のクローニング

AT1a の C-末端残基を用いて、yeast two hybrid screening を行った結果、低分子量 G タンパクの一つである Rab5 をクローニングした。Rab5 は、7 回膜貫通型受容体のインターナリゼーションに関連していることが知られているが、実際に AT1a への関与が示唆されたのは初めてである。

また、Rab5 はさまざまな因子と heterodimer を形成することが良く研究されているが、本研究から Rab5 が homodimer を形成することが明らかになった [24]。

## 4. 今後の課題と発展

妊娠中毒症の発症率はかなり高く、高血圧を伴うものは妊娠全体の約 10 %程度と考えられているが、本症の成因は未解決である。それは、発症の分子メカニズムが把握されていないだけでなく、本症候群を総括的または側面的に理解するための遺伝的背景が明確なモデル動物が存在しないのが一因であった。

残念ながら、未だに妊娠中毒症は周産期死亡や母体死亡の主要原因の一つとなっており、本症の成因解明は、単に学問上の問題だけでなく、社会的要請として重要視されている。成人高血圧症の研究は膨大であるが、妊娠時血圧調節の高次機能解明の研究はやっと黎明期を迎えたに過ぎない。

少子化が叫ばれている現在、周産期病学に新たなスポットが当てられ始めている。特に欧米では、既に先行されており、我々の開発したマウスに大きな注目が集められている。本モデルマウスは、母体の疾患研究に役立つだけでなく、妊娠高血圧が持つ胎児・新生児への影響を検討するための有用なものであることが明らかになった。母胎の妊娠中における疾患発生の詳細な検討を今後も継続していく予定である。

## 5. 研究論文リスト

- [1] Kihara, M., Umemura, S., Sumida, Y., Yokoyama, N., Yabana, M., Nyui, N., Tamura, K., Murakami, K., Fukamizu, A., and Ishii, M.: Genetical deficiency of angiotensinogen produces an impaired urine concentrating ability in mice. *Kidney Int.* 53, 548-555 (1998)
- [2] Kihara, M., Umemura, S., Yabana, M., Sumida, Y., Nyui, N., Tamura, K., Kadota, T., Kishida, R., Murakami, K., Fukamizu, A., and Ishii, M.: Dietary salt loading decreases the expression of neuronal type nitric oxide synthase and renin in the juxtaglomerular apparatus of angiotensinogen gene-knockout mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 355-362 (1998)
- [3] Yoshida, E., Nakajima, T., Murakami, K., and Fukamizu, A.: Identification of N-terminal minimal transactivation domain of CBP, p300, and Caenorhabditis elegans homologues. *Gene* 208, 307-314 (1998)
- [4] Taniguchi, K., Sugiyama, F., Kakinuma, Y., Uehara, S., Nishijoh, N., Tanimoto, K., Murakami, K., Fukamizu, A., and Yagami, K.: Pathologic characterization of hypotensive C57BL/6J-agt: angiotensinogen-deficient

C57BL/6J mice. *Int. J. Mol. Med.* 1, 583-587 (1998)

[5] Umemura, S., Kihara, M., Sumida, Y., Yabana, M., Ishigami, T., Tamura, K., Nyui, N., Murakami, K., Fukamizu, A., and Ishii, M.: Endocrinological abnormalities in angiotensinogen-gene knockout mice: studies on hormonal responses to dietary salt loading. *J. Hypertens.* 16, 285-289 (1998)

[6] Kihara, M., Umemura, S., Sugaya, T., Toya, Y., Yabana, M., Kobayashi, S., Tamura, K., Kadota, T., Kishida, R., Murakami, K., Fukamizu, A., and Ishii, M.: Expression of neuronal type nitric oxide synthase and renin in the juxtaglomerular apparatus of angiotensin type-1a receptor gene-knockout mice. *Kidney Int.* 53, 1585-1593 (1998)

[7] Shiota, N., Fukamizu, A., Okunishi, H., Takai, S., Murakami, K., and Miyazaki, M.: Cloning of the gene and cDNA for hamster chymase 2, and expression of chymase 1, chymase 2 and angiotensin-converting enzyme in the terminal stage of cardiomyopathic hearts. *Biochem. J.* 333, 417-424 (1998)

[8] Tamura, K., Umemura, S., Nyui, N., Yabana, M., Toya, Y., Fukamizu, A., Murakami, K., and Ishii, M.: Possible role of c-Jun in transcription of the mouse renin gene. *Kidney Int.* 54, 382-393 (1998)

[9] Tamura, K., Umemura, S., Sumida, Y., Nyui, N., Kobayashi, S., Ishigami, T., Kihara, M., Sugaya, T., Fukamizu, A., Miyazaki, H., Murakami, K., and Ishii, M.: Effect of genetic deficiency of angiotensinogen on the renin-angiotensin system. *Hypertension* 32, 223-227 (1998)

[10] Kakinuma, Y., Hama, H., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Murakami, K., and Fukamizu, A.: Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nature Med.* 4, 1078-1080 (1998)

[11] Nishijo, N., Sugiyama, F., Kimoto, K., Taniguchi, K., Murakami, K., Suzuki, S., Fukamizu, A., and Yagami, K.: Salt-sensitive aortic aneurysm and rupture in hypertensive transgenic mice that overproduce angiotensin II. *Lab. Invest.* 78, 1059-1066 (1998)

[12] Ishida, J., Sugiyama, F., Tanimoto, K., Taniguchi, K., Syouji, M., Takimoto, E., Horiguchi, H., Murakami, K., Yagami, K., and Fukamizu, A.: Rescue of angiotensinogen-knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 610-616 (1998)

[13] Ohshima, T., Iwama, M., Ueno, Y., Sugiyama, F., Nakajima, T., Fukamizu, A., and Yagami, K.: Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection. *J. Gen. Virol.* 79, 3067-3071 (1998)

[14] Ishida, J., Asada, S., Daitoku, H., Fujiwara, K., Kon, Y., Sugaya, T., Murakami, K., Nakajima, T., Kasuya, Y., and Fukamizu, A.: Expression and characterization of mouse angiotensin II type 1a receptor tagging hemagglutinin epitope in cultured cells. *Int. J. Mol. Med.* 2, 263-270 (1999)

[15] Hisada, Y., Sugaya, T., Yamanouchi, M., Uchida, H., Fujimura, H., Sakurai, H., Fukamizu, A., and Murakami, K.: Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J. Clin.*

*Invest.* 103, 627-635 (1999)

[16] Walther, T., Voigt, J.P., Fukamizu, A., Fink, H., and Bader, M.: Learning and anxiety in angiotensin-deficient mice. *Behav. Brain Res.* 100, 1-4 (1999)

[17] Ishizuka, Y., Mochizuki, R., Yanai, K., Takatsuka, M., Nonomura, T., Niida, S., Horiguchi, H., Maeda, N., and Fukamizu, A.: Induction of hydroxyapatite resorptive activity in bone marrow cell populations resistant to bafilomycin A1 by a factor with restricted expression to bone and brain, neurochondrin. *Biochim. Biophys. Acta* 1450, 92-98 (1999)

[18] Mochizuki, R., Ishizuka, Y., Yanai, K., Koga, Y., and Fukamizu, A.: Molecular cloning and expression of human neurochondrin-1 and -2. *Biochim. Biophys. Acta* 1446, 397-402 (1999)

[19] Yanai, K., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Shigematsu, Y., Shimamoto, Y., Saito, T., Chowdhury, S., Takiguchi, M., Arakawa, M., Nibu, Y., Sugiyama, F., Yagami, K., and Fukamizu, A.: Regulated expression of human angiotensinogen gene by hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) and chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF). *J. Biol. Chem.* 274, 34605-34612 (1999)

[20] Yanai, K., Saito, T., Kakinuma, Y., Kon, Y., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Nishijo, N., Shigematsu, Y., Horiguchi, H., Kasuya, Y., Sugiyama, F., Yagami, K., Murakami, K., and Fukamizu, A.: Renin-dependent cardiovascular and -independent brain functions revealed by renin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 275, 5-8 (2000)

[21] Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T., and Fukamizu, A.: Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating  $\beta$ -catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* 275, 35170-35175 (2000)

[22] Zhou, J., Moroi, K., Nishiyama, M., Usui, H., Seki, N., Ishida, J., Fukamizu, A., and Kimura, S.: Characterization of RGS5 in regulation of G protein-coupled receptor signaling. *Life Sci.* 68, 1457-1469 (2001)

[23] Fujii, R., Okamoto, M., Aratani, S., Oishi, T., Ohshima, T., Taira, K., Baba, M., Fukamizu, A., and Nakajima, T.: A role of RNA helicase A in cis-acting transactivation response element-mediated transcriptional regulation of human. *J. Biol. Chem.* 276, 5445-5451 (2001)

[24] Daitoku, H., Ishida, J., Fujiwara, K., Nakajima, T., and Fukamizu, A.: Dimerization of a small GTPase Rab5. *Int. J. Mol. Med.* 4, in press (2001)