

# 胎児発育不全の改善に果たすタダラフィルの作用機序の解明

三重大学大学院医学系研究科 産科婦人科学 田中 佳世

## 要 約

＜緒言＞胎児発育不全(以下、FGR)は周産期予後不良因子として重要な疾患である。また、FGRは周産期の問題にとどまらず、小児期の神経学的予後不良や成人期の生活習慣病のリスクであることが知られているが、現時点で有効な子宮内での治療法はない。我々は、FGRに対する新規治療法として、タダラフィルを用いた治療法の開発を行ってきた。本研究は、FGRに対するタダラフィルの治療効果についての作用機序を解明することを目的とした。＜方法＞三重大学動物実験委員会の承認の下、動物実験を行った。C57BL/6妊娠マウスにNG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩を投与し、FGRモデルマウスを作製した。妊娠13日目からタダラフィル治療を行い、無治療群ならびにFGRでない対照群と胎盤のmechanistic target of rapamycin(以下、mTOR)シグナリングの比較検討を行った。＜結果＞胎盤の蛍光免疫組織化学染色では、妊娠13日目、17日目の胎盤において、無治療群では有意にリン酸化mTOR発現が有意に低下していたが、タダラフィル治療により対照群と同程度まで回復していた。mTOR下流の蛋白発現はウエスタンブロット法で解析し、リン酸化4E結合蛋白質1とリン酸化S6リボソーム蛋白質がFGRモデル胎盤で発現低下するのに対し、タダラフィル治療を行うと、両蛋白発現は対照群と同程度であった。＜考察＞本研究では、FGR胎盤で抑制されたmTORシグナリングがタダラフィル治療により改善することが示された。mTORシグナリングの改善は胎児発育効果の作用機序の1つであると考えられる。

## 緒 言

胎児発育不全(fetal growth restriction; 以下、FGR)は、周産期予後不良の因子として重要な疾患である。FGRの原因として、妊娠初期の胎盤形成不全が関与している。妊娠初期に生じる子宮らせん動脈のremodeling不全により、妊娠に伴って生理的に生じる子宮らせん動脈の拡張が阻害され、その結果として胎盤の低酸素・虚血が生じ、FGRを発症する。

FGRは、胎児発育が抑制され低体重で出生し、胎内環境の悪化から早産領域での出生も多いため、新生児死亡率は上昇し、脳性麻痺と精神発達遅滞の発症率も増加する。さらに、FGRで出生した児は、将来的な広汎性発達障害や高血圧、2型糖尿病などの生活習慣病のハイリスク群となることが判明しているが、有効な子宮内での治療法がないのが現状である。

我々は、新規の子宮内治療法を開発するため、PDE5阻害薬であるタダラフィルに着目し、基礎研究・臨床研究を行ってきた。タダラフィルは長時間型のPDE5阻害薬であり、血管平滑筋内のPDE5を阻害することで、平滑筋細胞内のサイクリックGMP

(cyclic guanosine monophosphate;以下、cGMP)を維持し、血管拡張作用を有する。PDE5は、肺・性器(子宮など)に多く発現しており、この血管拡張作用を応用した胎児胎盤循環の改善によるFGRの治療を目指した。日本では、肺動脈性肺高血圧症や前立腺肥大、勃起不全などに保険適応されている。

我々は過去に、FGRマウスモデルにタダラフィル投与を行うことで、胎児発育が改善することを報告した1),2)。また、臨床研究において、胎児発育不全に対するタダラフィル治療の安全性を報告3)し、タダラフィル投与後2週間で有意に胎児発育が増加することも示した4)。

本研究は、次の段階として、タダラフィルの作用機序の解明を目的とし、FGRモデルマウスにタダラフィルを投与する基礎研究を実施した。本研究では、胎盤の栄養応答シグナル調整経路の1つであるmechanistic target of rapamycin(以下、mTOR)シグナリングに着目し、検討を行った。

## 方法

本研究は、三重大学動物実験委員会の審査・承認の下で実施した。

### ・FGRモデルマウス作製と実験プロトコール

当科では、一酸化窒素合成酵素阻害薬であるNG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩(NG-Nitro-L-arginine methylester;以下、L-NAME)を妊娠母獣に投与することで、母獣は高血圧と蛋白尿を呈し、胎仔は発育不全を呈する妊娠高血圧腎症・胎児発育不全モデルマウスを確立した<sup>1)</sup>。C57BL/6妊娠マウスを用いて、母獣に妊娠11日目より、1mg/mlの濃度のL-NAME溶液を自由飲水とし、L-NAME投与による薬剤誘導性のFGRモデルマウスとした。

本研究では、L-NAME投与によるFGRモデルマウスの胎盤のmTORシグナリングの変化ならびにFGRモデルマウスに対するタダラフィル治療によるmTORシグナリングの変化を検討した。実験プロトコールは以下の通りである。

C57BL/6の妊娠母獣を妊娠9日目に搬入し、搬入時の母獣体重と血圧で対照群(以下、C群)とL-NAME投与群(以下、L群)の2群に割付を行った。妊娠11日目より、L群ではL-NAME投与を開始した。L群

の母獣血圧が上昇していることを確認し、L群をさらに2群に割付けた。1群はL-NAME投与のみを継続する無治療群(L群)ともう1群はL-NAME投与に加え妊娠13日目よりタダラフィル治療を開始するタダラフィル治療群(以下、LT群)とした。タダラフィルは自由飲水による投与(0.08mg/ml)を行った。L-NAMEおよびタダラフィルの溶媒は0.5%カルボキシメチルセルロース(carboxymethylcellulose;以下CMC)を用い、C群には妊娠11日目以降、溶媒である0.5%CMCを自由飲水とした。(図1)

妊娠17日目に犠牲剖検を行い、胎盤を採取した。また、L-NAME投与に伴う胎盤のmTORシグナリング評価のために妊娠13日目で犠牲剖検し、胎盤を採取するプロトコールも実施した。組織学的評価のための胎盤は4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋を行った。蛋白発現評価のための胎盤は採取後ただちに液体窒素で凍結したのちに、解析まで-80℃で保管した。

### ・蛍光免疫組織化学染色

パラフィン包埋したブロックを5μmで薄切し、染色に用いた。リン酸化mTOR(p-mTOR)の評価のため、一次抗体はAnti-mTOR(phospho Ser2448) antibody(1:100, Abcam)を用い、核染色にはDAPI

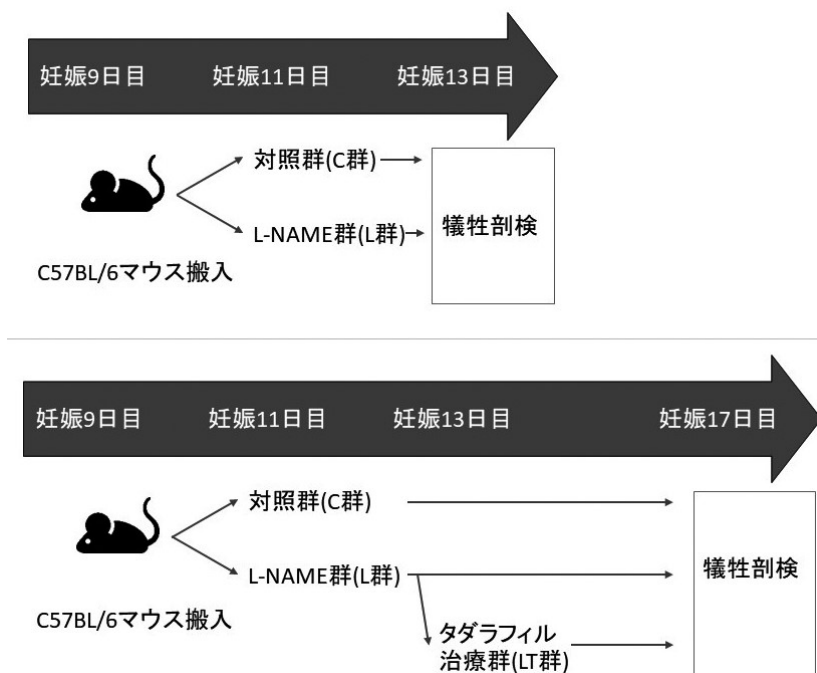


図1. 実験プロトコール

L-NAME、タダラフィルは自由飲水で経口投与した。妊娠9日目のC57BL/6マウスを搬入し、母獣体重と血圧で2群に割付けた。妊娠11日目よりC群はCMC、L群はL-NAMEを自由飲水した。タダラフィルの投与は妊娠13日目より行った。(CMC; 0.5%カルボキシメチルセルロース、L-NAME; 1mg/ml L-NAME溶液 (溶媒0.5% CMC)、タダラフィル; L-NAME溶液に0.08mg/mlとなるようタダラフィルを溶解した。)

を用いた。共焦点レーザー走査型顕微鏡で撮影した蛍光画像をImage Jを使用し、マウス胎盤のラビリンズゾーンにおけるp-mTOR陽性面積割合を測定した。

#### ・ウェスタンブロット法

凍結保管したマウス胎盤をリン酸緩衝食塩水で洗浄した後に破碎し、RIPA Buffer(ナカライテスク)を用いて、蛋白抽出したものをウェスタンブロットに用いた。蛋白定量はProtein Assay BCA kit(ナカライテスク)を用いてBCA法で実施した。ポリアクリルアミドゲルに総蛋白量が20 $\mu$ gになるよう、ウェルに各サンプルをアプライし、電気泳動を行った。転写にはポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜を使用し、mTORシグナリングの下流の評価のため、4E結合蛋白質1(以下、4E-BP1)とS6リボソーム蛋白質(以下、S6R)を一次抗体として評価した。リン酸化については、既報告より、4E-BP1はThr37/46(1:5000, Cell Signaling Technology), Thr70(1:5000,

Cell Signaling Technology)を、S6RはSer235/236(1:5000, Cell Signaling Technology)をそれぞれ使用した。HRP標識二次抗体で化学発光検出し、得られた画像をImage Jで定量した。データノーマライズにはローディングコントロールとして $\beta$ アクチンを用いた。

#### ・統計解析

数値は平均 $\pm$ 標準偏差(SD)とし、統計解析はGraphPad Prism7を使用した。2群比較にはt検定を用い、3群比較には1-way ANOVAを用いた。P<0.05を統計学的有意差ありとした。

## 結果

### 1. マウス胎盤におけるリン酸化mTOR(p-mTOR)発現

#### ・妊娠13日目胎盤のp-mTOR

結果を(図2)に示す。マウス胎盤のラビリンズゾーンにおけるp-mTOR(Ser2448)の陽性面積割合はC

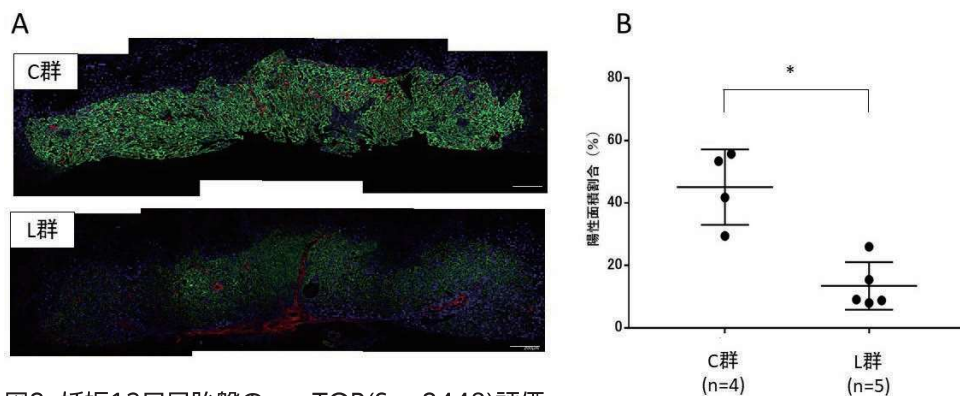


図2. 妊娠13日目胎盤のp-mTOR(Ser 2448)評価

A. 蛍光免疫化学組織染色写真 bar: 200 $\mu$ m, 緑: p-mTOR(Ser2448)、赤:  $\alpha$ SMA、青: DAPI

B. ラビリンズゾーンにおけるp-mTOR陽性面積割合、\*p<0,05

FGRモデルであるL群では有意にp-mTOR陽性面積割合が低下していた。

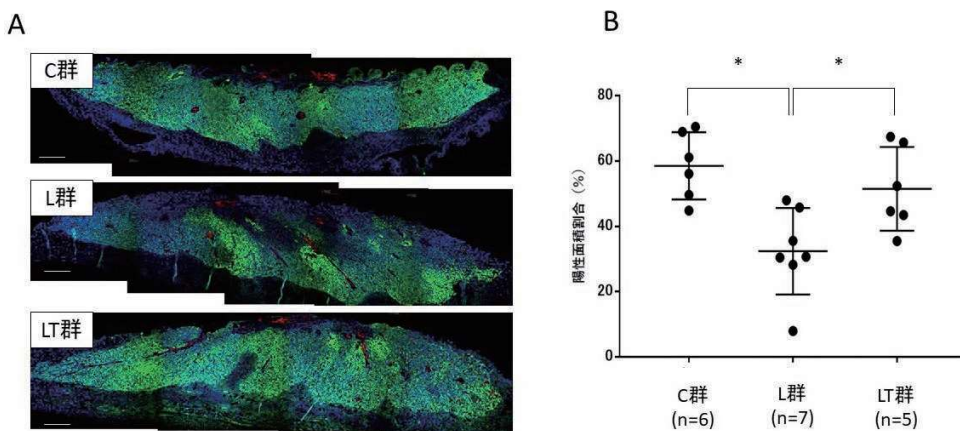


図3. 妊娠17日目胎盤のp-mTOR(Ser2448)評価

A. 蛍光免疫化学組織染色写真 bar: 200 $\mu$ m, 緑: p-mTOR(Ser2448)、赤:  $\alpha$ SMA、青: DAPI

B. ラビリンズゾーンにおけるp-mTOR陽性面積割合、\*p<0,05

FGRモデルであるL群では有意にp-mTOR陽性面積割合が低下していたが、タダラフィル治療により有意に増加した。C群とLT群では有意差を認めなかった。

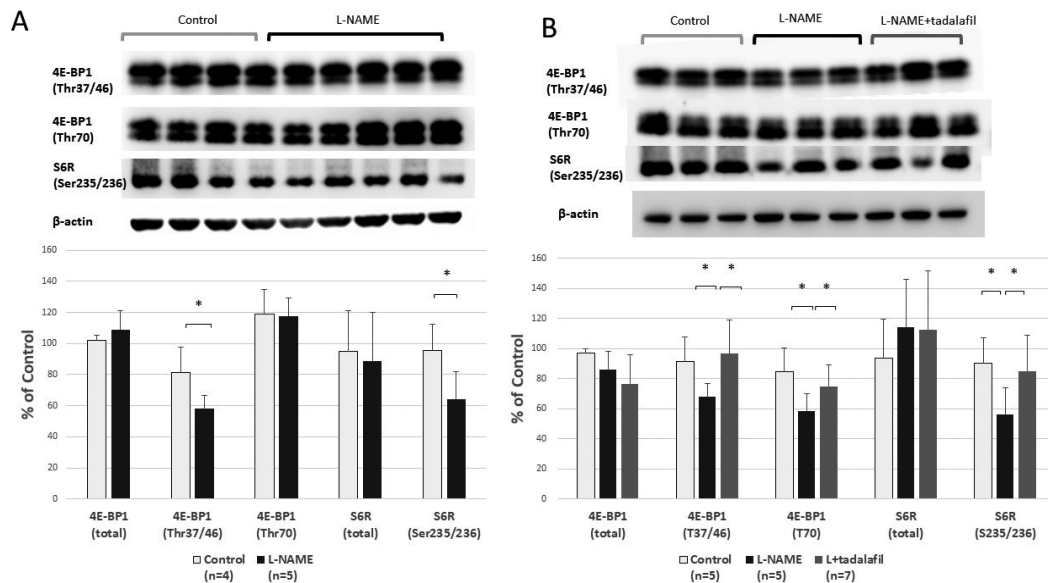


図4. 妊娠13日目、17日目胎盤のmTOR下流蛋白質(4E-BP1, S6R)の発現評価

A. 妊娠13日目胎盤のウエスタンブロット法での解析: mTORシグナリング活性を示すp-4E-BP1(Thr37/46), p-S6R(Ser 235/236)はL群で有意に低下していた。  
 B. 妊娠17日目胎盤のウエスタンブロット法での解析: mTORシグナリング活性を示すp-4E-BP1(Thr37/46), p-S6R(Ser 235/236)は13日目胎盤と同様にL群で有意に低下していた。一方でタダラフィル治療を行ったLT群では、L群と比較し有意にp-4E-BP1(Thr37/46), p-4E-BP1(Thr70), p-S6R(Ser 235/236)の発現が増加しており、C群と有意差は認めなかった。

群  $45.1 \pm 12.1\%$ 、L群  $13.4 \pm 7.6\%$ とL群で有意に低下していた( $p < 0.05$ )。

#### ・妊娠17日目胎盤のp-mTOR

結果を(図3)に示す。マウス胎盤のラビリンスゾーンにおけるp-mTOR(Ser2448)の陽性面積割合はそれぞれ、C群  $62.6 \pm 7.3\%$ 、L群  $35.6 \pm 8.8\%$ 、LT群  $51.8 \pm 16.0\%$ であった。妊娠13日目と同様、L群はC群よりも有意に低下( $p < 0.01$ )していたが、タダラフィル治療を行ったLT群はC群と有意差を認めなかった。また、無治療のL群とタダラフィル治療のLT群で比較するとLT群ではp-mTOR陽性面積割合が有意に増加していた( $p < 0.05$ )。

## 2. マウス胎盤におけるリン酸化4E-BP1(p-4E-BP1)、リン酸化S6R(p-S6R)発現

ウエスタンブロット法によるmTORシグナリング下流の蛋白発現結果を(図4)に示す。

#### ・妊娠13日目胎盤の4E-BP1とS6R

4E-BP1(total)は2群間で有意差を認めなかった(C群  $102.2 \pm 2.9\%$ 、L群  $109.0 \pm 12.1\%$ )が、p-4E-BP1のうち、Thr37/46はL群に有意に低下していた(C群  $81.1 \pm 16.4\%$ 、L群  $58.1 \pm 8.6\%$ ,  $p < 0.05$ )。

S6R(total)も2群間で有意差は認めなかった(C群  $95.1 \pm 26.0\%$ 、L群  $88.4 \pm 31.6\%$ )。p-S6R(Ser235/236)はL群で有意に低下していた(C群  $81.1 \pm 16.4\%$ 、L群

$58.1 \pm 8.6\%$ ,  $p < 0.05$ )。

#### ・妊娠17日目胎盤の4E-BP1とS6R

妊娠13日目と同様に4E-BP1(total)とS6R(total)は、C群とL群に有意差はなく、LT群においても他の2群と有意差を認めなかった。しかし、p-4E-BP1とp-S6Rについては、C群と比較し、L群では有意に低下し、LT群ではC群と有意差を認めなかった。それぞれの% of controlの平均 $\pm$ SDは以下の通りである。p-4E-BP1(Thr37/46):C群  $91.6 \pm 10.4\%$ 、L群  $68.1 \pm 15.3\%$ 、LT群  $97.0 \pm 22.2\%$ 、p-4E-BP1(Thr70):C群  $84.5 \pm 19.5\%$ 、L群  $58.4 \pm 9.6\%$ 、LT群  $75.0 \pm 14.1\%$ 、p-S6R(Ser235/236):C群  $90.6 \pm 18.3\%$ 、L群  $56.3 \pm 10.7\%$ 、LT群  $85.0 \pm 24.0\%$

## 考察

今回、L-NAME誘導FGRモデルマウスの胎盤を用いてmTORシグナリングについて検討を行った。胎盤では、mTORは合胞体栄養膜細胞に多く発現してしている。mTORは細胞内で複数の蛋白と複合体(complex)を形成し、mTORCと呼ばれ、mTORC1とmTORC2が存在する。本研究で検討した4E-BP1とS6RはmTORC1の下流の蛋白である。mTORC1はインスリンやインスリン様成長因子(IGF-1)などの成長因子や細胞内のATPレベル、低酸素、DNA損傷、アミノ酸、糖、脂肪酸などの栄養状態など、

細胞内外の状況に応じて、代謝、成長、細胞分裂、細胞死などの調整に中心的な役割を果たしている。また、胎盤でのmTORC1は、アミノ酸トランスポーター発現の調整や、ミトコンドリア機能にも影響を与えていると報告されている。そのため、胎児発育にはmTORシグナリングが深く関与している。

本研究では、妊娠13日目の時点で、L-NAME投与によって胎盤のp-mTOR,(Ser2448), p-4E-BP1(Thr37/47), p-S6R(Ser235/236)発現は有意に低下しており、mTORシグナリングが抑制されていた。妊娠17日目胎盤でも、L-NAME投与でmTORシグナリングの抑制は認められたが、タダラフィル治療を行うことで、対照群と同程度の蛋白発現であった。以上のことから、FGR胎盤で抑制されたmTORシグナリングはタダラフィル投与により改善したと判断した。

FGRモデルマウスにおいて、mTORシグナリングが抑制されるという結果は、胎盤のmTORシグナリングに関して多くの報告を行っているJanssonらの報告<sup>5),6)</sup>と同様であり、mTORシグナリングに関するタダラフィルの作用を検討するのに、L-NAME誘導FGRモデルは適したモデルであると考えられる。我々は、L-NAME誘導FGRモデルマウスにタダラフィルを投与することで、胎仔発育効果があることを過去に報告している<sup>1)</sup>。既報告では、胎盤に対するタダラフィルの作用として、胎盤の低酸素の改善を示した。タダラフィルは、血管平滑筋細胞内のcGMPを維持することで血管拡張作用を有していることから、子宮動脈の拡張により、胎児胎盤循環改善効果を期待し、胎児発育不全の治療への応用に着目し研究を進めてきた。タダラフィルによるmTORシグナリングの改善は、子宮動脈拡張による胎児胎盤循環改善効果とそれに引き続く低酸素状態改善効果によってもたらされた可能性がある。一方で、タダラフィルの作用起点は、子宮動脈拡張作用のみではない可能性も示唆されている。東北大学大学院薬学研究科の高橋信行教授らの協力の下、子宮灌流圧低下(Reduced Uterine Perfusion Pressure; 以下、RUPP)モデルにタダラフィルを投与した実験において、胎仔発育効果を認めることが明らかとなった<sup>2)</sup>。RUPPモデルは、卵巣動静脈と子宮動静脈にナイロン糸を挟んで結紮したのちにナイロン糸を除去することで、母獣の妊娠高血圧腎症とFGRを呈するマウスモデルである。本RUPPモデ

ルでは、子宮動脈径は変化しないが、FGRに効果があり、子宮動脈拡張による効果以外のタダラフィルの直接的作用の可能性が示唆された。タダラフィルは、血管内皮障害の改善効果、抗炎症作用、抗酸化作用<sup>2),7),8)</sup>も有していることから、本研究のmTORシグナリングの改善も前述のタダラフィルの直接的作用によってもたらされている可能性もある。

本研究はL-NAME誘導FGRモデル胎盤の単一モデルであること、妊娠高血圧腎症合併のFGRモデルであることに制限がある。しかし、胎盤での胎児発育機序や胎児胎盤循環改善効果として、mTORシグナリングに変化をもたらしたことを示したことは、作用機序を解明する上で、意義がある。今回、FGRに対するタダラフィルの作用機序解明として、胎盤のmTORシグナリングを改善することを明らかにした。さらにタダラフィルの作用機序の解明を進める。

## 謝 辞

本研究に助成いただきました公益財団法人神澤医学研究振興財団に深謝いたします。また、本研究をともに行った三重大学大学院医学系研究科産科婦人科学講座メンバーならびに共同研究を行っていただいた東北大学大学院薬学研究科臨床薬学分野 高橋信行教授、堰本晃代先生はじめ同分野の皆様には感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Yoshikawa K, Umekawa T, Ikeda T et al. Tadalafil Improves L-NG-Nitroarginine Methyl Ester-Induced Preeclampsia With Fetal Growth Restriction-Like Symptoms in Pregnant Mice. *Am J Hypertens.* 2017; 31(1): 89-96.
2. Sekimoto A, Tanaka K, Takahashi N et al. Tadalafil alleviates preeclampsia and fetal growth restriction in RUPP model of preeclampsia in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 521(3):769-774.
3. Kubo M, Tanaka H, Maki S, Nii M, Murabayashi N, Osato K, Kamimoto Y, Umekawa T, Kondo E, Ikeda T. Safety and dose-finding trial of tadalafil administered for fetal growth restriction: A phase-1 clinical study. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017;43(7):1159-1168.
4. Maki S, Tanaka H, Ikeda T et al. Safety Evaluation of Tadalafil Treatment for Fetuses with Early-Onset Growth Restriction (TADAFER): Results from the Phase II Trial. *J Clin Med.* 2019;8(6):856.

5. Rosario FJ, Schumacher MA, Jansson T et al. Chronic maternal infusion of full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity and expression and decreases fetal growth. *J Physiol.* 2012; 590(6):1495-509.
6. Dimasuay KG, Boeuf P, Jansson T et al. Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth. *Front Physiol.* 2016; 7:12.
7. Franca MER, Ramos RKL, Peixoto CA et al. Tadalafil restores long-term memory and synaptic plasticity in mice with hepatic encephalopathy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019; 379: 114673.
8. Rotella DP. Phosphodiesterase 5 inhibitors: current status and potential applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1(9): 674-82.

## **Abstract**

Fetal growth restriction (FGR) is an important condition causing poor perinatal prognosis. FGR is associated with a high perinatal mortality rate. In addition, if it does not lead to fetal mortality, children born with FGR are at a high risk for poor neurological outcomes. We have previously reported the safety and efficacy of tadalafil treatment for FGR. However, the mechanism of action of tadalafil in FGR remains unclear. In this study, we focused on the signaling of the placental mechanistic target of rapamycin (mTOR) and investigated the change in phospho-4E-BP1 and phospho-S6R levels, which are downstream of mTOR signaling pathway in the placenta, after tadalafil administration during FGR. This study was carried out using a previously established NG-Nitro-L-arginine methylester (L-NAME)-induced FGR mouse model, generated using L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. In this study, phospho-4E-BP1 and phospho-S6R expression in the placentas of L-NAME induced FGR mice were analyzed using western blotting. In FGR mice placentas, the protein expression of phospho-4E-BP1 and phospho-S6R was significantly lower than in the control mice without FGR at 13 days post-coitum (d.p.c.) but was comparable to the control with tadalafil treatment at 17 d.p.c. Therefore, it can be inferred that tadalafil may possess the potential to treat fetal growth restriction by improving placental mTOR signaling.