

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592417

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群の発症予知と治療法の開発

研究課題名(英文) Prediction and prevention of preeclampsia

研究代表者

関沢 明彦 (Sekizawa, Akihiko)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：10245839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙妊婦と非喫煙妊婦の検討で、喫煙群で妊娠初期絨毛のVEGFA発現は非喫煙者と比較して有意に高かった。喫煙妊婦の妊娠初期の喫煙がVEGFA発現を増強させることが、妊娠高血圧症候群のリスク低下につながる可能性を示した。

次に、妊娠初期からの抗酸化剤投与が抗酸化力が低下した女性の妊娠高血圧症候群発症を抑制できるかについて検討した。妊娠高血圧腎症を発症率は投与群2.0%、非投与群14.5%であった($p=0.034$)。遺伝子発現レベルでは、FLT-1、endothelin-1、PGFに有意な発現変化を認めた。このように、妊娠初期からの抗酸化剤投与が妊娠高血圧症候群の発症予防につながる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the influence of maternal smoking on the early placental expression of genes related to angiogenesis and oxidative stress. As a result, we revealed that VEGFA placental expression was higher in smoking women at 10-11 weeks of gestation. Increased VEGFA expression in the early stages of pregnancy in smoking women might contribute to the decreased risk of developing preeclampsia.

Next, we investigated the benefit of antioxidant supplementation in a cohort of women with low antioxidant status. Pregnant women who had low antioxidant status treated with either antioxidants or control diets daily from 8-12 weeks. 110 women were enrolled, randomly assigned to the supplementation ($n=52$) and control group ($n=58$). There were significant differences ($P=0.034$) between the supplementation and control group in the incidence of pre-eclampsia (2.0% and 14.5%, respectively). We revealed supplementation of antioxidants during early gestation might reduce the risk of pre-eclampsia.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：胎児新生児

キーワード：妊娠高血圧症候群 胎盤 妊娠初期絨毛

1. 研究開始当初の背景

PIH では、絨毛細胞の脱落膜への侵入障害、ラセン動脈の血管壁への置換(remodeling)障害により、ラセン動脈の血管抵抗が十分に低下せず、絨毛間腔への母体血の流入が阻害され、絨毛が低酸素環境に曝されることが主要な発症要因となっている。また、子宮収縮の影響で絨毛間腔は酸素分圧の変動が大きく、絨毛は酸化ストレスを受けることにもなる。その結果、絨毛細胞は各種サイトカインを産生し、それが母体循環中に移行し、母体の血管内皮障害を引き起こし、それが高血圧・蛋白尿などの臨床症状に繋がると考えられている。近年、絨毛細胞が分泌する因子の中で特に注目されているのが、血管増殖因子の Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFA) や Placental Growth Factor (PlGF) の受容体である FLT1 と、同様に血管増殖因子である TGFβ1 の受容体の endoglin (ENG) である。PIH では、胎盤での FLT1 や ENG の産生増加に伴い、母体循環で soluble FLT1 濃度が増加することで free VEGFA や free PlGF 濃度は低下する。また、母体血中の soluble ENG 濃度が増加することもあり、母体の血管内皮障害が惹起される。事実、FLT1 濃度は、PIH の臨床症状発現の 5 週間前から、ENG は 2-3 ヶ月前から増加する。また、ラットに FLT1 遺伝子を導入して過発現にすると PIH の臨床症状が出現する。また、ENG 遺伝子を導入すると血管透過性亢進、高血圧が起こり、ENG と FLT1 の両者を過発現させると高度な血管障害、腎症、高度な高血圧、HELLP 症候群様の病態、胎子の発育障害が起こることが報告されている。このように、胎盤で産生される ENG と FLT1 の両者が、妊婦の血管内皮障害の原因となり、PIH の病態形成に中心的な役割を果たすと考えられる。

そこで、我々は、妊娠初期(11 週)に染色体検査の目的で絨毛採取を行った 90 例の症例

で、検査に用いなかった余剰絨毛を凍結保存し、その臨床経過を観察したところ 5 例がその後 PIH を発症した。そこで、その 5 例 (PIH 群) と、染色体異常なく正常に妊娠経過した 25 例とで血管増殖因子及び酸化ストレス関連の遺伝子発現量を比較した。その結果、妊娠 11 週の段階で既に絨毛細胞の VEGFA、FLT1、TGFβ1、ENG の遺伝子発現量が有意に高値を示すこと、及び、PlGF の遺伝子発現が有意に低値を示すこと、さらに、抗酸化ストレス因子である heme oxygenase (HO)-1, HO-2, superoxide dismutase (SOD) などの遺伝子発現が全て有意に低値を示すことが分かった。このことは、PIH 発症の 6-7 ヶ月前の妊娠 11 週の絨毛で、抗血管増殖因子の発現が有意に亢進し、また、抗酸化因子の発現が低下して酸化ストレスを受けやすい状況になっていることを示している。さらに、PIH の病態がこの時期の絨毛細胞で既に形成されていることを直接証明するものである (Prenat Diagn 2008)。

さらに、我々は、PIH 発症予知の可能性について検討した。一つは、インドネシア大学と共同で血液中の SOD 活性を定量し、活性値が 1102 U/gHb (164 U/mL) 以下の場合を酸化ストレスありと判断する方法で、その後の PIH 発症率を比較した。当該病院での PIH の発症率は 16.7% であるところ、低 SOD 症例では、29.0% が PIH を発症し、妊娠 8-12 週の妊婦で抗酸化能を定量化することで、PIH のハイリスクが抽出可能なことを確認した (Hyperten Pregn 2006)。

次に、妊娠 15-20 週の母体血を採取し、その cell-free RNA を用いて胎盤の遺伝子発現の変化を解析することで PIH の発症予知ができるかを検討した。測定したのは FLT1, ENG, VEGFA, PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), tissue-type PA などの計 7 遺伝子で、結果は、7 遺伝子全ての発現量はその後 PIH を発症する群で有意な

高値を示し、それらの組み合わせで、将来的にPIHの発症する症例を5%疑陽性率水準で、84%で同定できることを確認した。さらに、測定した遺伝子の中では、FLT1, ENG 発現量が最後の PIH の発症及び臨床の重症度と強く相関することも確認した。このように、妊娠初期の母体血中で酸化ストレスの程度を定量的に解析することや cell free RNA 発現を定量することで、精度の高いPIHの発症予知が可能なが示されるとともに、絨毛細胞の酸化ストレスと抗血管増殖因子の産生亢進が PIH の病態形成の主因であることを確認した(Am J Obstet Gynecol 2008, Clin Chem 2007, Prenat Diagn 2008)。

その上で、妊娠初期からの酸化ストレスに対して抗酸化剤を服用することで、PIHの発症予防が可能であるかを検討した。この検討はインドネシア大学との共同で行い、妊娠8週前後にSOD活性を測定し、低値であった妊婦を対象に、無作為に2群に分け、ビタミンC 1g/day、ビタミンE 400IU/dayを投与するビタミン群とプラセボ群で妊娠12週から陣痛発来まで薬剤投与を行い、妊娠予後を比較した。その結果、プラセボ群では軽症PIHの発症は30例(169例中)であったところが、ビタミン群では12例(160例中)であり、有意に発症率が低下した。また、ビタミン群での分娩前の収縮期血圧は126mmHg(プラセボ群:131mmHg)と低値を示した($p < 0.05$)。さらに、抗酸化剤投与開始4週後に母体血を採取し、血中SOD及びHO-1遺伝子発現を定量したところ、ビタミン群で有意に高値を示し、抗酸化剤投与で母体の抗酸化能は改善した。さらに、抗血管増殖因子のFLT1とENGも定量したところ、FLT1は有意でなかったものの、ENGは有意に低値を示した。このことは、妊娠初期から母体の抗酸化能を改善することで、PIHの病因の主体とも考えられる絨毛細胞での抗血管増殖因子の産生を減らすことが可能であり、この機序でPIH

の発症予防が可能であることを示す画期的な成果であった(論文投稿中)。

このように、妊娠高血圧腎症は胎盤における血管発生や酸化ストレスの異常と関連しているといわれている一方、母体喫煙が妊娠高血圧症候群のリスク低減に関連している。また、胎盤形成期の低酸素が絨毛の発育に重要な役割を担っていることが知られており、その形成過程の変化が、後の妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの病態形成に大きく関与していると考えられる。

2. 研究の目的

研究 目的：上記背景を踏まえ、胎盤形成期の絨毛における血管発生や酸化ストレスに関連する遺伝子発現への喫煙の影響を検討する。

研究 目的：低栄養とも関連する抗酸化力の弱い妊娠女性への抗酸化剤投与の妊娠高血圧症候群の発症予防効果について検討するとともに、cell-free RNAを用いた抗酸化因子の変化を検討する。

3. 研究の方法

研究 方法：妊娠6-7週、妊娠10-11週で胎児心拍が確認された後に妊娠中断を選択した妊婦に対し、手術後の絨毛の提供を倫理委員会承認の上で妊婦に説明し、研究への参加に同意した妊婦から、手術直後に絨毛細胞を採取した。対象は31件であった。

組織は、RNAlater[®]に漬けて核酸を安定化し、その上でRNA抽出を行い、RT-PCRで定量化した。定量した遺伝子発現はVEGFA, Flt-1, sEng, PlGF, HMOX-1, SODである。母体の喫煙状況は血清中コチニン濃度で評価した。

研究 方法：

この研究は、randomized, placebo-controlled trial であり (ClinicalTrial.gov, number NCT01232205)、8~12週の抗酸化状態の弱い妊婦に、抗酸化剤かプラセボを同時期から

産褥 2 週間まで服用させた。一次エンドポイントは妊娠高血圧症候群の発症、2 次エンドポイントは妊娠予後と関連した血管増殖関連遺伝子と抗酸化関連遺伝子の発現変化を評価した。

4 . 研究成果

研究 結果：喫煙群で絨毛の VEGFA 発現は妊娠 10-11 週に、非喫煙者と比較して有意に高かったが、6-7 週の絨毛においては有意差を認めなかった。他の遺伝子には喫煙状態による遺伝子発現変化はなかった。

絨毛の VEGFA 発現は妊娠 10-11 週に、喫煙群で非喫煙者と比較して有意に高かった。喫煙妊婦の妊娠初期の喫煙が VEGFA 発現を増強させることが、妊娠高血圧症候群のリスク低下につながる可能性を示した。

研究 結果：110 人が研究対象となり、52 人はサプリメント群、58 人はプラセボ群に振り分けられた。結果として 110 人中 9 人(8.7%)が妊娠高血圧腎症を発症し、両群の発症率はそれぞれ 2.0%、14.5%であり、有意に発症率は異なっていた($p = 0.034$)。

遺伝子発現レベルでは、SOD、HO-1、FLT-1、endoglin、PGF に有意な発現変化を認めた。

このように、妊娠初期の絨毛における酸化ストレスを抗酸化剤で減ずることが血管増殖因子の PGF 産生を増加させるとともに、抗血管増殖因子の FLT-1、Endoglin 産生を抑制すること、および、妊娠初期の喫煙に絨毛の VEGFA 産生を増加させる効果があることを示した。これらの事実は、妊娠初期の介入により絨毛環境を調節することで、妊娠高血圧症候群の発症を予防できる可能性を示すものであり、臨床的な意義は大きい。

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 10 件)

Maternal Smoking and Placental Expression of a Panel of Genes Related to Angiogenesis and Oxidative Stress in Early Pregnancy. Shinjo A, Ventura W, Koide K, Hori K, Yotsumoto J, Matsuoka R, Ichizuka K, Sekizawa A. **Fetal Diagn Ther.** 2014 Mar 8. (PMID:24642658)

Increased Levels of Cell-Free Human Placental Lactogen mRNA at 28-32 Gestational Weeks in Plasma of Pregnant Women With Placenta Previa and Invasive Placenta. Kawashima A, Sekizawa A, Ventura W, Koide K, Hori K, Okai T, Masashi Y, Furuya K, Mizumoto Y. **Reproductive Sciences**; 21(2) : 215-220, 2013

Physiological changes in the pattern of placental gene expression early in the first trimester. Miyagami S, Koide K, Sekizawa A, Ventura W, Yotsumoto J, Oishi S, Okai T. **Reproductive Sciences**; 20(6):710-714, 2012

Maternal cell-free messenger RNA in twin pregnancies: the effects of chorionicity and severe twin to twin transfusion syndrome (TTTS). Fox CE, Sekizawa A, Pretlove SJ, Chan BC, Okai T, Kilby MD. **Acta Obstet Gynecol Scand** 2012;91(10):1206-11

Antioxidant supplementation in pregnant women with low antioxidant status. Wibowo N, Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, Idriansyah L, Fitriana I. **J Obstet Gynaecol Res.** 2012;38(9):1152-61.

Vitamin B₆ supplementation in pregnant women with nausea and vomiting. Wibowo N, Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, Tambunan V, Bardosono S. **Int J Gynaecol Obstet.** 2012 Mar;116(3):206-10.

Role of epigenetics in the placenta: Alterations in DNA promoter methylation and imprinted genes. Koide K, Sekizawa A, Yotsumoto J, Miyagami S, Ichizuka K, Matsuoka R, Okai T. **J Mamm Ova Res** 28, 103-109, 2011

Quantitative RT-PCR gene expression analysis of a laser microdissected placenta: an approach to study preeclampsia. Purwosunu Y, Sekizawa A, Okai T, Tachikawa T. **Methods Mol Biol.** 2011;755:477-89.

Higher circulating mRNA levels of placental specific genes in a patient with placenta accreta. Simonazzi G, Farina A, Curti A, Pilu G, Santini D, Zucchini C, Sekizawa A, Rizzo N. **Prenat Diagn.** 2011 Aug;31(8):827-9.

Gene expression in chorionic villous samples at 11 weeks of gestation in women who develop pre-eclampsia later in pregnancy: implications for screening. Farina A, Zucchini C, De Sanctis P, Morano

D, Sekizawa A, Purwosunu Y, Okai T, Rizzo N. **Prenat Diagn.** 2011 Feb;31(2):181-5.

〔学会発表〕(計8件)

第64回日本産科婦人科学会学術講演会
2012年4月 神戸 妊娠高血圧症候群と胎盤のDNA methylationに関する研究. 小出馨子, 関沢明彦, 宮上哲, 四元淳子, 仲村将光, 大石親護, 岡井崇

第63回日本産科婦人科学会学術講演会
2011.8.31. 大阪 妊娠高血圧症候群における妊娠初期絨毛の病態評価とその発症予知への応用 関沢明彦, 小出馨子, 仲村将光, 清水華子, 新城梓, 岡井崇

第19回日本胎盤学会学術集会 H23.9.30.
東京 シンポジウム「血管増殖因子と胎盤」
妊娠高血圧症候群を発症する妊娠初期絨毛の病態評価とその発症予知への応用 関沢明彦, 小出馨子, 仲村将光, 宮上哲, 福田麻美, 岡井崇

22nd Asian and Oceanic Congress of
Obsterics and Gynecology, Taipei, Taiwan,
Sep 25, 2011 (Symposium) Prediction of
preeclampsia by an analysis of
placenta-derived cellular mRNA in the
blood of pregnant women. Sekizawa A,
Purwosunu Y, Farina A, Nakamura M,
Koide K, Okai T

22nd Asian and Oceanic Congress of
Obsterics and Gynecology, Taipei, Taiwan,
Sep 27, 2011 PHYSIOLOGICAL
ALTERATIONS OF GENE EXPRESSIONS
IN VILLOUS SAMPLES AT FIRST
TRIMESTER Satoshi Miyagami, Akihiko
Sekizawa, Keiko Koide, Masamitsu
Nakamura, Takashi Okai

22nd Asian and Oceanic Congress of
Obstetrics and Gynecology, Taipei, Taiwan,
Sep 27, 2011 DNA methylation patterns
which are related to placentation Keiko
Koide, Akihiko Sekizawa, Satoshi
Miyagami, Masamitu Nakamura, Takashi
Okai

第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会
平成 23 年 7 月 11/12 日 札幌 妊娠初期絨毛
における遺伝子発現量の妊娠週数に伴う変化
宮上哲、関沢明彦、小出馨子、仲村将光、四
元淳子、岡井崇

第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会
平成 23 年 7 月 11/12 日 札幌 胎盤形成期に
おける絨毛の DNA methylation に関する研
究 小出馨子、関沢明彦、宮上哲、仲村将光、
四元淳子、岡井崇

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 関沢 明彦

(Akihiko Sekizawa)

昭和大学医学部(教授)

研究者番号: 10245839

(2) 研究分担者 四元 淳子

(Jyunko Yotsumoto)

昭和大学医学部(特別研究生)

研究者番号: 30553648

(3) 連携研究者

()

研究者番号: