

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24592482

研究課題名(和文) 血漿 sFlt-1 / PlGF 比の妊娠高血圧腎症発症域値を用いた予知法の開発

研究課題名(英文) Validation of the prediction of preeclampsia within 4 weeks using the onset threshold of plasma sFlt-1/PlGF ratio

研究代表者

大口 昭英 (Ohkuchi, Akihide)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10306136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊婦コホート480例中、ハイリスク妊婦127例(26%)に、妊娠19-25週、26-31週に採血し、sFlt-1、PlGF、及びsFlt-1/PlGF比をECLIA法で測定した。採血後4週間以内の妊娠高血圧腎症(PE)を primary outcomeとした。妊娠19-25週では、onset threshold (OT)の感度は0/1(0%)であり、特異度は120/120(100%)であった。妊娠26-31週では、OTの感度は1/1(100%)であり、特異度は80/80(100%)であった。このように、OT値によるPE予知は、特異度が非常に高く、PEのルールアウトに有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study is a validation study for our previous predictive study using onset threshold (Ohkuchi A, et al. Hypertens Res 2013; 36: 1073). We measured plasma levels of sFlt-1, PlGF, and the sFlt-1/PlGF ratio at 19-25, and 26-31 weeks of gestation in 127 high risk women, using ECLIA method. The primary outcome was the subsequent onset of preeclampsia (PE) after the blood sampling. As for the blood sampling at 19-25 weeks of gestation, the onset threshold (OT) of plasma level of sFlt-1/PlGF ratio yielded the sensitivity of 0/1 (0%), and specificity of 120/120 (100%). As for the blood sampling at 26-31 weeks of gestation, the OT yielded the sensitivity of 1/1 (100%), and specificity of 80/80 (100%). Thus, the usage of onset threshold of sFlt-1/PlGF ratio at 19-31 weeks of gestation may be clinically useful to rule out the imminent onset of PE within 4 weeks after the blood sampling.

研究分野：産科

キーワード：妊娠高血圧腎症 発症予知 sFlt-1/PlGF比

1. 研究開始当初の背景

2003年に、soluble fms-like tyrosine kinase 1(sFlt-1)が、血中のvascular endothelial growth factor (VEGF)とplacental growth factor (PlGF)を低下させることにより、ラットにPE様病態を発生させることが発見され(Maynard SE, et al. J Clin Invest 2003;111:649-658)、2006年には、soluble endoglin (sEng)とsFlt-1をともにラットに投与するとPE様病態が更に悪化し、HELLP症候群(血小板減少、肝機能障害、溶血)様の病態が発生することが発見された(Venkatesha S, et al. Nat Med 2006;12:642-649)。その後、血中のPlGF、sFlt-1、sEngあるいは、sFlt-1/PlGF比がPE発症前に正常域を逸脱するため、PEの発症予知が可能であることが報告されてきた(Levine RJ, et al. N Engl J Med 2004;350:672-683; Levine RJ, et al. N Engl J Med 2006;355:992-1005など)。一方、早発型PEでは、PlGF、sFlt-1、sEngおよびsFlt-1/PlGF比が疾患発症後正常域から大きく逸脱するのに対し、遅発型PEではその変化が小さいかあるいは正常域に留まることが知られてきた(Hirashima C, et al. Hypertens Res 2005;28:727-732; Ohkuchi A, et al. Hypertens Res 2007;30:151-159;など)。このため、我々は、PlGF、sFlt-1、sEng、sFlt-1/PlGF比を用いればPEの発症域値を設定できるのではないかと考え、PE発症妊婦におけるこれらの値とその発症週数との関連から、「sFlt-1/PlGF比のPE発症域値」が存在することを見つけた(Ohkuchi A et al, Hypertension 2011, in press)。実際、妊娠26~31週でこの閾値を適用すると、妊娠36週未満発症のPEを予測する際の陽性尤度比が38倍と非常に高く、また、妊娠26~31週時点で、域値を超えた場合のPE発症までの週数は、 2.2 ± 0.6 週とPE発症までの週数が非常に短かった。

これまでのsFlt-1、PlGFに関する研究のほとんどは、R&D社のELISA法で使用されていた。このELISA法は測定に約6時間かかること、また、1検体だけの測定には向いておらず、複数検体を同時に検査しないとコストが高くなるのが欠点であった。最近、Roche Diagnostics社は、このsFlt-1とPlGFを通常の臨床検査室で20分以内に測定でき、1検体のみでの処理も可能なキット(Elecsys sFlt-1, Elecsys PlGF)を開発した。我々は、この電気化学発光免疫測定法(ECLIA法)でsFlt-1/PlGF比を測定しても、「PE発症閾値」を設定できるのではないかと仮説を立てた。新しいPEハイリスク妊婦管理システムでは、まず、妊娠16~23週の妊婦健診で、

血圧120/80mmHg以上・未満、既往妊娠高血圧症候群の有無からPE発症リスクを低リスク、高リスクの2群に区分する。次に、妊婦に、研究説明を行い、同意が得られた場合、高リスク妊婦は妊娠20週以降妊娠36週まで4週ごとに採血し、低リスク妊婦は、妊娠20~23週と妊娠28~29週の2回採血し、後日sFlt-1/PlGF比を測定する。最終年度には、ECLIA法を用いたPE発症閾値を用いたPE予知法について、validation研究を行う。

2. 研究の目的

先行研究で集積した試料を用いて、妊娠19~25週、及び妊娠26~31週におけるPE発症閾値が、採血後4週以内に発生するPEの発症を予知するか否かを検討すること。

新たに、集積した妊婦コホートから、ハイリスク妊婦についてsFlt-1、PlGFを測定し、先行研究についてValidation研究を行うこと。

3. 研究の方法

2004~2008年にかけて、妊娠19~25週に1199例、妊娠26~31週に798例の妊婦にECLIA法で血漿sFlt-1/PlGF比を測定した。疾患発症後のsFlt-1/PlGFからOnset threshold (OT)を求めた。

2012~2015年にかけて妊婦コホート480例を集積し、その内ハイリスク妊婦127例(26%)に、妊娠19-25週、26-31週に採血し、sFlt-1、PlGF、及びsFlt-1/PlGF比をECLIA法で測定した。

4. 研究成果

19~25週では、2例にPEが発症し、26~31週では6例にPEが発症した。妊娠19~25週のOTの感度は1.00、特異度は1.00であった。妊娠26~31週のOTの感度は0.83、特異度は0.994であった。このように、妊娠19~31週の血漿sFlt-1/PlGF比のOTは、採血後4週以内に発生するPEの発症予知に臨床的に有用と考えられた。

採血後4週間以内の妊娠高血圧腎症(PE)をprimary outcomeとした。妊娠19-25週では、onset threshold (OT)の感度は0/1(0%)であり、特異度は120/120(100%)であった。妊娠26-31週では、OTの感度は1/1(100%)であり、特異度は80/80(100%)であった。このように、OT値によるPE予知は、特異度が非常に高く、PEのルールアウトに有用と考えられた。

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)

1. Eguchi K, Ohmaru T, Ohkuchi A, Hirashima C, Takahashi K, Suzuki H, Kario K, Matsubara S, Suzuki M. Ambulatory BP monitoring and clinic BP in predicting small-for-gestational-age infants during pregnancy. *J Hum Hypertens*. 2016 Jan;30(1):62-7. doi: 10.1038/jhh.2015.20. Epub 2015 Mar 19.
2. Fukushima T, Eguchi K, Ohkuchi A, Miyashita H, Kario K. Changes in Central Hemodynamics in Women With Hypertensive Pregnancy Between Before and After Delivery. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2016 Apr;18(4):329-36. doi: 10.1111/jch.12670. Epub 2015 Sep 23.
3. Baba Y, Ohkuchi A, Usui R, Takahashi H, Matsubara S. Urinary protein-to-creatinine ratio indicative of significant proteinuria in normotensive pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016 Jul;42(7):784-8. doi: 10.1111/jog.13000. Epub 2016 Apr 20.
4. Yamada T, Obata-Yasuoka M, Hamada H, Baba Y, Ohkuchi A, Yasuda S, Kawabata K, Minakawa S, Hirai C, Kusaka H, Murabayashi N, Inde Y, Nagura M, Umazume T, Itakura A, Maeda M, Sagawa N, Ohno Y, Kataoka S, Fujimori K, Kudo Y, Ikeda T, Nakai A, Minakami H. Isolated gestational proteinuria preceding the diagnosis of preeclampsia - an observational study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2016 Sep;95(9):1048-54. doi: 10.1111/aogs.12915. Epub 2016 May 23.
5. Ohkuchi A, Hirashima C, Takahashi K, Suzuki H, Matsubara S. Prediction and prevention of hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res*. 2017 Jan;40(1):5-14. doi: 10.1038/hr.2016.107. Epub 2016 Aug 18.
6. Takahashi H, Ohkuchi A, Kuwata T, Usui R, Baba Y, Suzuki H, Chaw Kyi TT, Matsubara S, Saito S, Takizawa T. Endogenous and exogenous miR-520c-3p modulates CD44-mediated extravillous trophoblast invasion. *Placenta*. 2017 Feb;50:25-31. doi: 10.1016/j.placenta.2016.12.016. Epub 2016 Dec 14.
7. Shirasuna K, Seno K, Ohtsu A, Shiratsuki S, Ohkuchi A, Suzuki H, Matsubara S, Nagayama S, Iwata H, Kuwayama T. AGEs and HMGB1 Increase Inflammatory Cytokine Production from Human Placental Cells, Resulting in an Enhancement of Monocyte Migration. *Am J Reprod Immunol*. 2016 May;75(5):557-68. doi: 10.1111/aji.12506. Epub 2016 Mar 9.
8. Nagayama S, Ohkuchi A, Shirasuna K, Takahashi K, Suzuki H, Hirashima C, Sakata A, Nishimura S, Takahashi M, Matsubara S. The Frequency of Peripheral Blood CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells in Women With Pre-eclampsia and Those With High-risk Factors for Pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2015 Nov;34(4):443-455. Epub 2015 Sep 11.
9. Shirasuna K, Karasawa T, Usui F, Kobayashi M, Komada T, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Taniguchi S, Takahashi M. NLRP3 Deficiency Improves Angiotensin II-Induced Hypertension But Not Fetal Growth Restriction During Pregnancy. *Endocrinology*. 2015 Nov;156(11):4281-92. doi: 10.1210/en.2015-1408. Epub 2015 Sep 10.
10. Shirasuna K, Shimamura N, Seno K, Ohtsu A, Shiratsuki S, Ohkuchi A, Suzuki H, Matsubara S, Nagayama S, Iwata H, Kuwayama T. Moderate Hypoxia Down-Regulates Interleukin-6 Secretion and TLR4 Expression in Human Sw.71 Placental Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(6):2149-60. doi: 10.1159/000430181. Epub 2015 Jul 21.
11. Ishida Y, Zhao D, Ohkuchi A, Kuwata T, Yoshitake H, Yuge K, Takizawa T, Matsubara S, Suzuki M, Saito S, Takizawa T. Maternal peripheral blood natural killer cells incorporate placenta-associated microRNAs during pregnancy. *Int J Mol Med*. 2015

- Jun;35(6):1511-24. doi:
10.3892/ijmm.2015.2157. Epub 2015 Mar 27.
12. Ohkuchi A, Hirashima C, Takahashi K, Shirasuna K, Suzuki H, Ariga H, Kobayashi M, Hirose N, Matsubara S, Suzuki M. A trio of risk factors for the onset of preeclampsia in the second and early third trimesters. *Pregnancy Hypertens.* 2014 Jul;4(3):224-30. doi:
10.1016/j.preghy.2014.04.024. Epub 2014 May 29.
 13. Hara K, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Mizushina Y, Kimura H, Kawashima A, Ohkuchi A, Matsuyama S, Kimura K, Takahashi M. Interferon-tau attenuates uptake of nanoparticles and secretion of interleukin-1 in macrophages. *PLoS One.* 2014 Dec 8;9(12):e113974. doi:
10.1371/journal.pone.0113974. eCollection 2014.
 14. Kambe S, Yoshitake H, Yuge K, Ishida Y, Ali MM, Takizawa T, Kuwata T, Ohkuchi A, Matsubara S, Suzuki M, Takeshita T, Saito S, Takizawa T. Human exosomal placenta-associated miR-517a-3p modulates the expression of PRKG1 mRNA in Jurkat cells. *Biol Reprod.* 2014 Nov;91(5):129. doi:
10.1095/biolreprod.114.121616. Epub 2014 Oct 1.
 15. Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kimura H, Kawashima A, Mizukami H, Ohkuchi A, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Ozawa K, Taniguchi S, Takahashi M. Nanosilica-induced placental inflammation and pregnancy complications: Different roles of the inflammasome components NLRP3 and ASC. *Nanotoxicology.* 2015;9(5):554-67. doi: 10.3109/17435390.2014.956156. Epub 2014 Sep 11.
 16. Takahashi H, Yuge K, Matsubara S, Ohkuchi A, Kuwata T, Usui R, Suzuki M, Takizawa T. Differential expression of ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) genes between human first trimester villous and extravillous trophoblast cells. *J Nippon Med Sch.* 2014;81(3):122-9.
 17. Minakami H, Maeda T, Fujii T, Hamada H, Iitsuka Y, Itakura A, Itoh H, Iwashita M, Kanagawa T, Kanai M, Kasuga Y, Kawabata M, Kobayashi K, Kotani T, Kudo Y, Makino Y, Matsubara S, Matsuda H, Miura K, Murakoshi T, Murotsuki J, Ohkuchi A, Ohno Y, Ohshiba Y, Satoh S, Sekizawa A, Sugiura M, Suzuki S, Takahashi T, Tsukahara Y, Unno N, Yoshikawa H. Guidelines for obstetrical practice in Japan: Japan Society of Obstetrics and Gynecology (JSOG) and Japan Association of Obstetricians and Gynecologists (JAOG) 2014 edition. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 Jun;40(6):1469-99. doi:
10.1111/jog.12419.
 18. Ohmaru T, Ohkuchi A, Muto S, Hirashima C, Matsubara S, Suzuki M. Increased antiangiogenic factors in severe proteinuria without hypertension in pregnancy: is kidney biopsy necessary? *CEN Case Rep.* 2014 May;3(1):86-89. doi:
10.1007/s13730-013-0092-z. Epub 2013 Aug 23.
 19. Hirashima C, Ohkuchi A, Takahashi K, Suzuki H, Matsubara S, Suzuki M. A novel three-step approach for predicting the imminent onset of preeclampsia within 4 weeks after blood sampling at 19-31 weeks of gestation. *Hypertens Res.* 2014 Jun;37(6):519-25. doi:
10.1038/hr.2014.31. Epub 2014 Mar 6.
 20. Takahashi H, Takizawa T, Matsubara S, Ohkuchi A, Kuwata T, Usui R, Matsumoto H, Sato Y, Fujiwara H, Okamoto A, Suzuki M, Takizawa T. Extravillous trophoblast cell invasion is promoted by the CD44-hyaluronic acid interaction. *Placenta.* 2014 Mar;35(3):163-70. doi:
10.1016/j.placenta.2013.12.009. Epub 2013 Dec 30.
 21. Takahashi H, Matsubara S, Kuwata T, Ohkuchi A, Mukoda Y, Saito K, Usui R, Suzuki M. Maternal manifestation of Ballantyne's syndrome occurring concomitantly with the development of fetal congenital mesoblastic nephroma.

- J Obstet Gynaecol Res. 2014 Apr;40(4):1114-7. doi: 10.1111/jog.12286. Epub 2014 Jan 15.
22. Takahashi K, Ohkuchi A, Suzuki H, Usui R, Kuwata T, Shirasuna K, Matsubara S, Suzuki M. Biophysical interaction between blood pressure and uterine artery Doppler for the occurrence of early-onset preeclampsia: A prospective cohort study. *Pregnancy Hypertens*. 2013 Oct;3(4):270-7. doi: 10.1016/j.preghy.2013.07.006. Epub 2013 Aug 6.
 23. Ohkuchi A, Hirashima C, Takahashi K, Suzuki H, Matsubara S, Suzuki M. Onset threshold of the plasma levels of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio for predicting the imminent onset of preeclampsia within 4 weeks after blood sampling at 19-31 weeks of gestation. *Hypertens Res*. 2013 Dec;36(12):1073-80. doi: 10.1038/hr.2013.95. Epub 2013 Aug 22.
 24. Hirashima C, Ohkuchi A, Takahashi K, Suzuki H, Matsuda Y, Matsubara S, Suzuki M. Additive effects of mean blood pressure and bilateral notching in the second trimester on subsequent angiogenesis-related factors. *Hypertens Res*. 2014 Jan;37(1):76-81. doi: 10.1038/hr.2013.88. Epub 2013 Aug 15.
 25. Kleinrouweler CE, Bossuyt PM, Thilaganathan B, Vollebregt KC, Arenas Ramirez J, Ohkuchi A, Deurloo KL, Macleod M, Diab AE, Wolf H, van der Post JA, Mol BW, Pajkrt E. Value of adding second-trimester uterine artery Doppler to patient characteristics in identification of nulliparous women at increased risk for pre-eclampsia: an individual patient data meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 Sep;42(3):257-67. doi: 10.1002/uog.12435. Epub 2013 Aug 6.
 26. Ohkuchi A, Ishibashi O, Hirashima C, Takahashi K, Matsubara S, Takizawa T, Suzuki M. Plasma level of hydroxysteroid (17-) dehydrogenase 1 in the second trimester is an independent risk factor for predicting preeclampsia after adjusting for the effects of mean blood pressure, bilateral notching and plasma level of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio. *Hypertens Res*. 2012 Dec;35(12):1152-8. doi: 10.1038/hr.2012.109. Epub 2012 Jul 12.
 27. Takahashi K, Ohkuchi A, Hirashima C, Matsubara S, Suzuki M. Establishing reference values for mean notch depth index, pulsatility index and resistance index in the uterine artery at 16-23 weeks' gestation. *J Obstet Gynaecol Res*. 2012 Nov;38(11):1275-85. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01864.x. Epub 2012 May 8.
 28. Takahashi K, Ohkuchi A, Kobayashi M, Matsubara S, Suzuki M. Recurrence Risk of Hypertensive Disease in Pregnancy. *Med J Obstet Gynecol*.2014;2:1023
 29. Hirashima C, Ohkuchi A, Takahashi K, Usui R, Matsubara S, Suzuki M. Prediction of Early-Onset Preeclampsia Using Angiogenesis-Related Factors. *Med J Obstet Gynecol*.2014;2:1025
 30. Ohkuchi A, Takahashi K, Hirashima C, Usui R, Matsubara S, Suzuki M. Prediction of Early-Onset Preeclampsia Using Uterine Artery Doppler. *Med J Obstet Gynecol*.2014;2:1026
 31. Ohkuchi A. Risk Factors Associated with the Occurrence of Preeclampsia in Women with Twin Pregnancies: Mini-Review. *Med J Obstet Gynecol*.2014;2:1027
 32. Hirose N, Ohkuchi A, Usui R, Matsubara S, Suzuki M. Risk of Preeclampsia in Women with CKD, Dialysis or Kidney Transplantation. *Med J Obstet Gynecol*.2014;2:1028
 33. Nagayama S, Ohkuchi A, Usui R, Matsubara S, Suzuki M. The Role of the Father in the Occurrence of Preeclampsia. *Med J Obstet Gynecol*.2014;2:1029
 34. Suzuki H, Ohkuchi A, Shirasuna K,

Takahashi H, Usui R, Matsubara S, Suzuki M. Animal Models of Preeclampsia: Insight into Possible Biomarker Candidates for Predicting Preeclampsia. Med J Obstet Gynecol.2014;2:1031

35. Takahashi H, Ohkuchi A, Usui R, Takizawa T, Matsubara S, Suzuki M. Importance of Chromosome 19 miRNA Cluster in Pregnancy. Med J Obstet Gynecol.2014;2:1032

〔雑誌論文〕(計 35 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

〔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

大口昭英(OHKUCHI AKIHIDE)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：10306136

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

平嶋周子(HIRASHIMA CHIKAKO)

研究者番号：90348011

高橋佳代(TAKAHASHI KAYO)

研究者番号：00448854