

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09279

研究課題名(和文) 妊娠高血圧腎症の発症を予知する尿中バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Investigational research of urine biomarkers for predicting preeclampsia

研究代表者

古田 伊都子 (Furuta, Itsuko)

北海道大学・医学研究院・助手

研究者番号：70238682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は妊娠高血圧腎症(preeclampsia:PE)発症を予知する尿中バイオマーカーを探索するために、妊娠中期の尿中バイオマーカー候補物質を測定し、PE発症群と非発症群における濃度を比較した。その結果、PE発症群ではPIGFが有意に低値であることが明らかになり、早発型PE発症予知において血中sFlit-1/PIGF比と同等の有用性を持つことが示された。また、尿中バイオマーカーとなりうる未知の物質を探索するために不死化ヒトpodocyte株細胞にPE発症妊婦血清を添加培養した培養上清をiTRAQ法で解析した結果、産生が大幅に増加あるいは減少するタンパクが同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PEは妊産婦死亡の主要な原因であり、一旦発症し重篤化すると「分娩」が唯一の治療法となるため、妊娠34週未満発症の早発型は胎児の予後に重大な影響を及ぼす。現在PE発症の確実な予知法はまだ確立されていない。我々は採取が容易である尿に着目し、PE発症前に変動する尿中バイオマーカーの探索を行った。本研究ではPIGFがPE発症予知に対して有用であることが示された。また、iTRAQ法による解析でpodocyteが産生するバイオマーカーとなりうるタンパクが同定された。これらのバイオマーカーが実用化され、尿検査でPE発症の予知が可能になればPEの早期発症や重症化の予防につながるため臨床的な有用性は大きい。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the potential for prediction of preeclampsia, several candidate biomarker concentrations of urine which obtained from 2nd trimester pregnant women, were measured. Urinary levels of PIGF were significantly lower among women who later developed preeclampsia than those among healthy pregnant women. Receiver operating characteristic (ROC) curves revealed that the predictive performance of urine PIGF for the prediction of early onset (<34 weeks) preeclampsia was around the same as serum sFlit/PIGF ratio (sensitivity:100%, specificity:79.5%, AUC:0.925). Also we tried to find unidentified new biomarkers in urine with proteomics technology. Immortal human podocytes were cultured with or without serum of pregnant women who later developed preeclampsia and conditioned medium were analysed by iTRAQ labeling coupled with 2-D LC-MS/MS. 1365 nonredundant proteins were identified, 294 of which were expressed differentially between serum-free media and patient serum supplemented media.

研究分野：産婦人科学

キーワード：妊娠高血圧腎症 尿中バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症(preeclampsia:PE)は、高血圧とタンパク尿を主たる病態とする疾患で、全妊娠の約5%に発症し妊産婦死亡の主要な原因となっている。PEは一旦発症し重篤化すると治療が難しく、「分娩」が唯一の治療法となるため、妊娠34週未満発症の早発型は胎児の予後に重大な影響を及ぼす。そのため、PEの発症を予知する様々なアプローチが試みられている。Levineら(文献1)は血中 soluble fms-like tyrosine kinase(sFlit-1)と Placenta growth factor(PIGF)の比がPE発症前に高値となることを報告し、血中 sFlit-1/PIGF がPE発症予知マーカーとして期待されているが、まだその有用性は限局的である。sFlit-1, PIGFはともに血管新生関連因子であり、PEの主病態である高血圧の発症に関連して変動していることが推測される。一方PEのもう一つの病態であるタンパク尿にも、その発症に関連して尿中において変動する物質があることが類推される。Podocyteは腎糸球体を覆う上皮細胞で、細胞から出る足突起が slit 膜を形成して糸球体濾過の際に血中タンパクが尿に漏出するのを防いでいるが、PE患者の尿中には podocyte が多数検出されることが報告されている(文献2)。我々は slit 膜を形成している podocyte 特異的タンパクである nephrin に着目し、nephrin が分解・断片化されることによってPE患者の尿中脱落 podocyte が増加しているのではないかと考えた。そこでPE患者の尿中 nephrin 濃度を発症前から発症後にかけて経時的に測定してみると、PE発症前から nephrin 濃度が上昇する傾向が認められた(文献3)。さらに、予備的なコホート研究として妊婦尿中 nephrin 濃度を測定した結果、後にPEを発症した妊婦ではタンパク尿の出現以前から nephrin 値が高値(正常妊婦の尿中 nephrin 値の95パーセンタイル以上)を示す尿中検体が多数認められた(文献4)。このようなPE発症前に尿中に増加(あるいは減少)してくる物質はPE発症の予知マーカーとしての利用が期待できる。尿は採取が容易な検体であるため、尿検査でPE発症の予知が可能になればPEの早期発症や重症化の予防につながるため臨床的な有用性は大きい。

2. 研究の目的

我々は、PE発症を予知する尿中バイオマーカーを探索し、そのマーカーを使った簡便なPE発症予知検査キットの開発を最終的な目標としているが、その準備段階である本研究では研究期間内に成果が得られるように以下の項目を目的とした。

- (1) コホート研究によりPE発症を予知する尿中バイオマーカーを探索する。
PE発症で血中動態が変動することが報告されているバイオマーカー候補物質を選択し、PE発症、非発症群における各バイオマーカーの尿中濃度を比較してPE発症予知の有効性を検討するとともに先行研究が進んでいる血中 sFlit-1/PIGF 比の有効性と比較する。
- (2) PE発症予知の可能性のある未知の podocyte 分泌タンパクの探索・同定を行う。
PE患者の血清中には podocyte を障害する因子が存在することが報告されている(文献5)。障害を受けた podocyte から分泌されたタンパク群は尿中に排泄されるので、これらのタンパク群はPE発症予知の尿中バイオマーカーとなる可能性を秘めている。不死化ヒト podocyte 株細胞をPE発症妊婦血清添加培養液で培養し、培養上清中に遊離してきたタンパクをプロテオミクス解析し、バイオマーカーとなりうる物質の探索・同定を行う。

3. 研究の方法

- (1) コホート研究によるPE発症を予知する尿中バイオマーカーの探索

対象および検体の採取

北海道大学病院産婦人科外来を受診した妊婦から、書面で同意を得た上で妊娠中期(24±3W)の尿と血液を採取した。高血圧、腎機能に影響を及ぼす合併症を有する症例は除外した。なお、本研究は北海道大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

尿中バイオマーカー候補の選択と測定

予備検討においてPE発症における尿中濃度の上昇が認められた nephrin 以外の候補として、podocyte を障害する作用があるとされる renin-angiotensin 系因子の angiotensinogen(AGT), angiotensin II (Ang II), angiotensin converting enzyme 2(ACE2), angiogenic factor である PIGF, soluble endoglin を選択した。測定は全てELISA法で行った。

ROC解析による尿中バイオマーカーの有用性の検討

PE発症群と非発症群で尿中濃度に差異が認められたバイオマーカーについてはROC解析を行い、血清 sFlit-1/PIGF 比と発症予知の感度、特異度、AUCを比較した。

- (2) PE発症予知の可能性のある未知の podocyte 分泌タンパクの探索・同定

PE発症妊婦血清の添加によって不死化ヒト podocyte 細胞からの分泌が変動するタンパク群を探索・同定するために、A. PE発症妊婦血清添加培養液、B. 無血清培養液で培養した不死化ヒト podocyte 細胞の培養上清、C. PE発症妊婦血清添加培養液で podocyte 細胞を培養した培養上清の3検体におけるタンパクを iTRAQ 試薬でラベルし LC-MS/MS で分析・同定した。分泌が変動したタンパクを調べるには検体B(細胞由来タンパクのみ)の iTRAQ 試薬の intensity

と検体 C (妊婦血清由来タンパク+細胞由来タンパク) の intensity とを比較することになるが、検体 C は妊婦血清由来タンパクも含まれるため、検体 A (妊婦血清由来タンパクのみ) の intensity を用いて妊婦血清由来タンパクの影響を除外した形のデータへ変換して検体 B と検体 C を比較した。

4. 研究成果

(1) コホート研究による PE 発症を予知する尿中バイオマーカーの探索

PE 発症群と非発症群における各バイオマーカー候補の尿中濃度
 妊娠転帰が判明し PE 発症例が 15 例に達したところで尿中バイオマーカー候補物質の中から、有望な物質を絞り込む検討を行った。その結果 renin-angiotensin 系因子の AGT, Ang II, ACE2 は PE 発症例と PE 非発症例(N=63)で差異が認められなかった。また、angiogenic factor である soluble endoglin は全ての検体で検出限界以下であった。一方、同じく angiogenic factor である PIGF は PE 非発症例に比べ PE 発症例では有意に低値を示し、Creatinine(Cr)で補正した濃度も有意に低値であった。この結果から、以降の検討は nephrin と PIGF、 について行うこととした。

PE 発症群と非発症群における尿中 nephrin, PIGF 濃度

研究期間中に採取できた尿検体は PE 発症妊婦 23 例, PE 非発症妊婦 214 例であった。双胎妊娠は PE 発症のリスク因子となるため双胎妊娠症例からも検体を採取したが、尿中 nephrin, PIGF 濃度において双胎であることの影響があるか否か PE 非発症妊婦 205 例について検討を行った。205 例の内単胎(S)は 190 例、一羊膜二絨毛膜双胎(MD)は 15 例、二羊膜二絨毛膜双胎(DD)は 9 例であった。Cr 補正を行った尿中 nephrin 濃度(中央値)は S:55.5, MD:56.9, DD:54.8 ng/mg Cr であり双胎妊娠による影響は認められなかった。尿中 PIGF 濃度(中央値)は S:234.6, MD:163.8, DD:552.6 pg/mg Cr であり、DD は S, MD より有意に尿中 PIGF 濃度が高かった。一方 S と MD との間に差は認められなかった。以上の結果から、PIGF は DD 群と S+MD 群とを分けて検討することとした。

PE 非発症例である control と PE 発症例(S:17 例, MD:1 例, DD:5 例)における尿中 nephrin 濃度を比較した(図 1)。control と PE の nephrin 濃度はそれぞれ 31.9, 66.5 ng/ml, Cr 補正濃度は 55.5, 106.1 ng/mg Cr であり、PE 発症例の nephrin 濃度は control より有意に高値を示した。

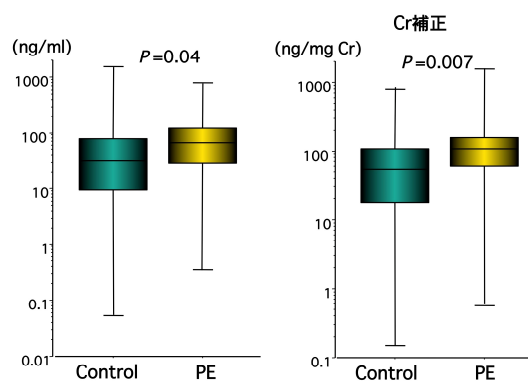


図 1 Control, PE 症例における尿中nephrin濃度

尿中 PIGF 濃度では DD 群において Cr 補正後の濃度では差異が認められなかったが、補正無しの濃度は control (N=9) に比べて PE (N=5) では有意に低値を示した (552.6 vs. 227.7 pg/ml) (図 2)。S+MD 群では、Cr 補正無し、有りのいずれも control (N=205) に比べて PE (N=18) では有意に低値を示した (Cr 補正無し:178.1 vs. 85.8 pg/ml, Cr 補正有り:226.9 vs. 160.0 pg/mg Cr) (図 3)。

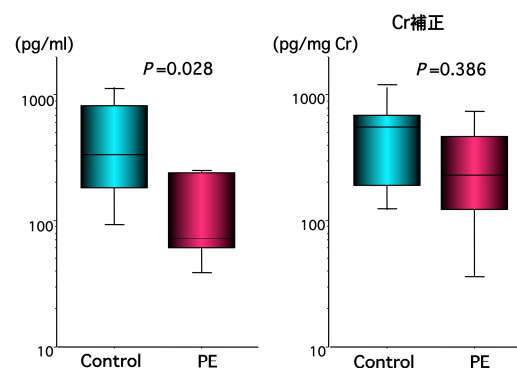


図 2 DD 双胎群: Control, PE 症例における尿中PIGF濃度

早発型 PE 発症群と control 群における尿中 nephrin, PIGF 濃度

次に胎児の予後に重大な影響を及ぼす妊娠 34 週未満発症の早発型 PE (N=7) における

尿中 nephrin, PIGF 濃度を検討した。Nephrin では Cr 補正無し、有りのいずれでも control と早発型 PE との間に差は認められなかった(図 4)。双胎症例には早発型 PE がいなかったので PIGF では S+MD 群において比較を行った。尿中 PIGF 濃度は、Cr 補正無し、有りのいずれにおいても control に比較して早発型 PE では有意に低値を示した (Cr 補正無し:178.1 vs. 12.6 pg/ml,

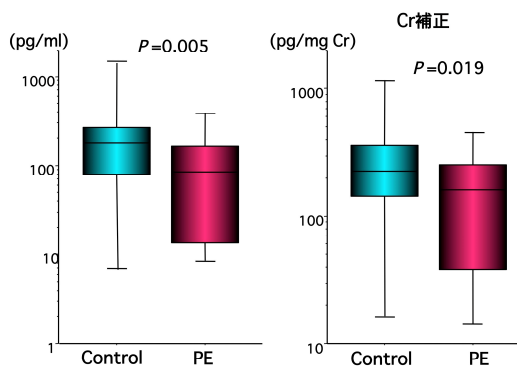


図 3 単胎+ MD 双胎群: Control, PE 症例における尿中PIGF濃度

Cr 補正有り:226.9 vs.30.2 pg/mg Cr) (図5) .

以上の結果から,尿中 PIGF の方が早発型 PE の予知マーカーとして優れていることが明らかになったので,以降の ROC による解析は PIGF について行うこととした .

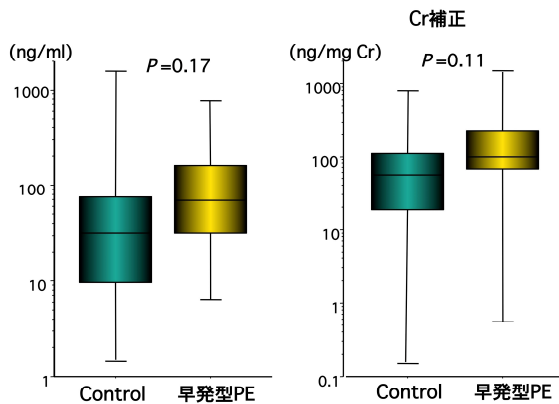


図4 Control,早発型PE群における尿中nephrin濃度

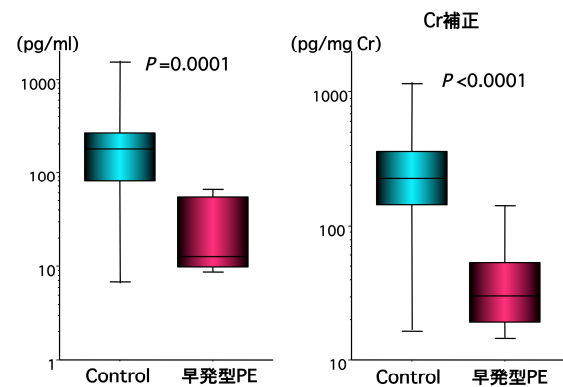


図5 Control,早発型PE群における尿中PIGF濃度

ROC 解析による尿中バイオマーカーの有用性の検討

ROC 解析を行って,先行研究が進んでいる血清 sFlit-1, PIGF, sFlit-1/PIGF 比と尿中 PIGF の早発型 PE 発症予知における感度,特異度, AUC を比較した(表1) .

尿中 PIGF, 尿中 PIGF/Cr の感度, 特異度, AUC はそれぞれ, 100 %, 79.5 %, 0.925, 87.5 %, 94.6 %, 0.948 であり, 血清 sFlit-1, PIGF, sFlit-1/PIGF 比よりも若干劣るものの早発型 PE の発症を予知するマーカーとして十分に有用であると思われた . また, Cr で補正無しの尿中 PIGF 濃度は, DD 群で control 群と差異を呈し(図2), 早発型 PE 発症予知に対して高い感度と AUC を持つことから, 外来診療における簡易尿検査で PE 発症を予知する診断キットに応用されることが期待される .

(2) PE 発症予知の可能性のある未知の podocyte 分泌タンパクの探索・同定

PE 発症妊婦血清の添加によって不死化ヒト podocyte 細胞からの分泌が変動するタンパク群を iTRAQ 標識と LC-MS/MS で分析・同定した . ヒト血清中には大量のタンパクが含まれるため, 血清タンパクの影響を極力減らし, 細胞が産生するタンパク量を最大限増やす培養条件を検討した結果, 添加血清量は 5%, 培養時間は 72 時間とした .

データから妊婦血清由来タンパクの影響を除外した後に解析を行った結果, 培養上清中に 1365 の非重複タンパクが検出され, そのうち妊婦血清添加, 非添加の培養上清中で差異が認められたタンパクは 294 であった . 産生に大きな変動が認められた主なタンパクを表2に示した . 産生の大幅な増加が認められた主なタンパクは 60S acidic ribosomal protein P2, Apolipoprotein A-I, Syndecan-4, Apolipoprotein F, 減少が認められた主なタンパクは Importin subunit beta-1, Exostosin-2 であった . これらのタンパクの中で測定法が確立されている物質については, 本研究で採

	Cut off	感度(%)	特異度(%)	AUC
尿中PIGF	66.2pg/ml	100	79.5	0.925
尿中PIGF/Cr	57.4pg/ml	87.5	94.6	0.948
血清PIGF	201.3pg/ml	100	98.9	0.998
血清sFlit-1	1716.9pg/ml	100	91.0	0.968
血清PIGF/sFlit-1	14.9	100	100	1.00

表1 早発型PE発症の予知における各マーカーのcut off, 感度, 特異度, AUC

Name	MW(kDa)	Ratio
60S acidic ribosomal protein P2	11.7	9.0
Apolipoprotein A-I	30.8	8.62
Syndecan-4	21.6	8.58
Apolipoprotein F	35.4	8.51
Histone H4	11.4	6.74
Platelet basic protein	13.9	4.31
Growth/differentiation factor 15	34.1	4.24
Importin subunit beta-1	97.1	0.006
Exostosin-2	82.2	0.024
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	62.2	0.04
Cystein-rich motor neuron 1 protein	113.7	0.05
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA binding protein	44.9	0.05
Cyclin-dependent kinase 6	36.9	0.06

表2 PE妊婦血清添加により培養上清中に増減するタンパク

取した PE 発症群と非発症群における尿中濃度を測定し，PE 発症予知の新規バイオマーカーとしての有用性を検討する予定である．

<引用文献>

Levine RJ et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004;350:672-83

Garovic VD et al. Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196:320.e1-7

Zhai T et al. Alteration of podocyte phenotype in the urine of women with preeclampsia. *Sci Rep.* 2016;6:24258.

Zhai T et al. Feasibility of nephrinuria as a screening tool for the risk of pre-eclampsia: prospective observational study. *BMJ Open.* 2016; 6, e011229.

Henao DE et al. Preeclamptic sera directly induce slit-diaphragm protein redistribution and alter podocyte barrier-forming capacity. *Nephron Exp Nephrol* 2008; 110:e73-e81

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Umazume Takeshi, Yamada Satoshi, Yamada Takahiro, Ishikawa Satoshi, Furuta Itsuko, Iwano Hiroyuki, Murai Daisuke, Hayashi Taichi, Okada Kazunori, Morikawa Mamoru, Tsutsui Hiroyuki, Minakami Hisanori	4. 巻 5
2. 論文標題 Association of peripartum troponin I levels with left ventricular relaxation in women with hypertensive disorders of pregnancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Open Heart	6. 最初と最後の頁 e000829 ~ e000829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/openhrt-2018-000829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Umazume Takeshi, Yamada Takahiro, Yamada Satoshi, Ishikawa Satoshi, Furuta Itsuko, Iwano Hiroyuki, Murai Daisuke, Hayashi Taichi, Okada Kazunori, Morikawa Mamoru, Yamada Takashi, Ono Kota, Tsutsui Hiroyuki, Minakami Hisanori	4. 巻 5
2. 論文標題 Morphofunctional cardiac changes in pregnant women: associations with biomarkers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Open Heart	6. 最初と最後の頁 e000850 ~ e000850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/openhrt-2018-000850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Umazume Takeshi, Yamada Takahiro, Furuta Itsuko, Iwano Hiroyuki, Morikawa Mamoru, Watari Hidemichi, Minakami Hisanori	4. 巻 20
2. 論文標題 Morphofunctional cardiac changes in singleton and twin pregnancies: a longitudinal cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Pregnancy and Childbirth	6. 最初と最後の頁 750-762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12884-020-03452-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 古田伊都子, 水上尚典, 渡利英道	4. 巻 47
2. 論文標題 妊娠高血圧腎症の発症を予知する尿中バイオマーカー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 38-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onda Tetsuo, Akimoto Takuma, Hayasaka Itaru, Ikeda Masahiko, Furuse Yuta, Ando Akiko, Nakamura Yuichi, Honjo Ryota, Manabe Atsushi, Furuta Itsuko, Cho Kazutoshi	4. 巻 155
2. 論文標題 Incidence of alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins in infants with unexplained severe pulmonary hypertension: The roles of clinical, pathological, and genetic testing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Early Human Development	6. 最初と最後の頁 105323 ~ 105323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.earlhumdev.2021.105323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 古田伊都子, 馬詰 武, 森川 守, 渡利英道, 水上尚典
2. 発表標題 尿中angiogenic factorによる妊娠高血圧腎症の発症予知
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古田伊都子, 馬詰 武, 森川 守, 水上尚典
2. 発表標題 妊娠経過に伴う尿中angiotensinogen排泄量の変動
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古田伊都子, 馬詰 武, 森川 守, 渡利英道, 水上尚典
2. 発表標題 尿中Placental growth factorによる妊娠高血圧腎症の発症予知
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	馬詰 武 (Umazume Takeshi) (00807935)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究 分担者	水上 尚典 (Minakami Hisanori) (40102256)	北海道大学・医学研究院・名誉教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------