

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09810

研究課題名（和文）母体血中の細胞外小胞による妊娠高血圧腎症の予知法と発症関連蛋白に関する研究

研究課題名（英文）Research on prediction of preeclampsia by extracellular vesicles in maternal plasma

研究代表者

鈴木 寛正（Suzuki, Hirotada）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90406116

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）：血液からエクソソームを市販の3種のエクソソーム精製キットで精製したところ、exoEasy Maxi Kit（QIAGEN社）の回収率が一番高かった。各精製方法による総エクソソームの濃度を測定したが、3種のキットはいずれも超遠心法との相関が十分でなかった。

このため、スタンダードな方法である超遠心法で精製し、正常妊娠期間別の総エクソソームを測定した。総エクソソームはいずれの妊娠期間（妊娠初期、中期、末期）でも同じ濃度であった。また、総エクソソーム内に含まれる胎盤由来エクソソームの発現量を確認したが、その発現がかなり少ないことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

市販の3種のエクソソーム精製キットと超遠心法とで相関が十分でなかったことは、超遠心法がやはりスタンダードな精製法であることを示している。

総エクソソームがいずれの妊娠期間でも同じ濃度であったが、これを基準に妊娠高血圧腎症妊婦の総エクソソームの多寡を調べることで、総エクソソームが妊娠高血圧腎症の発症予知として使えるか検討することができる。総エクソソーム内の胎盤由来エクソソームの発現が少なかったことは、胎盤から血液に多くのエクソソームが流れ込んでいないことを示している。今後、これが事実か確認するため、他の方法で検証する必要がある。

研究成果の概要（英文）：When exosomes were purified from blood using three commercially available exosome purification kits, exoEasy Maxi Kit (QIAGEN) had the highest purification rate. The concentration of total exosomes was measured by the specific antigen CD9 ELISA method, but none of the three kits correlated well with the ultracentrifugation method. Therefore, we purified exosomes by ultracentrifugation method and measured total exosomes by trimester in normal pregnant women. The concentration of total exosome was the same at any trimester (the first, the second, the third). Protein analysis of the expression of placenta-derived exosome in total exosome was performed using the placenta-specific antigen PLAP, and it was found that the expression of PLAP was considerably low.

研究分野：産科学

キーワード：妊娠高血圧腎症 細胞外小胞 エクソソーム 発症予知 超遠心法 血漿

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞は、10~3000nmのサイズの様々な細胞から分泌される粒子で、近位や遠位の細胞の活性、翻訳、血管新生、増殖、代謝、細胞死などを調節している。がんや慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病、関節リウマチなど様々な疾患の病態に関与している。特に、100nm前後のエクソソームは脂質二重膜をもつリソソーム経路の産物で、mRNAやmiRNAなどが含まれる。

妊娠高血圧腎症(preeclampsia: PE)においてもエクソソームの研究が報告されるようになった。妊娠マウスに細胞外小胞を投与すると血圧上昇、尿蛋白、胎児発育不全を示すPEモデルが作成できたり、血中のすべての総エクソソームが妊娠末期の疾患発症時に増加し、血中胎盤由来エクソソームでは、早発型PE妊婦は正常妊婦に比して高値を示すが、遅発型PE妊婦は正常妊婦に比してむしろ低値を示すという特徴がみられた。これらの結果は、妊娠末期において血中の総エクソソームと胎盤由来のエクソソームの血中濃度が早発型PE、遅発型PEを予知するバイオマーカーになり得る可能性を示唆している。

一方、申請者らは、妊娠20週以降の血漿中sFlt-1値、PlGF値、sFlt-1/PlGF比がPEの予知マーカーになることを報告してきたが、sFlt-1/PlGF比は妊娠20週以前ではPE予知に役立たないため、妊娠16週以前にPE発症のハイリスク妊婦を同定する新たな手法の開発が喫緊の課題であった。

妊娠高血圧腎症では妊娠初期に胎盤形成に障害があり、細胞死から様々な粒子が初期の絨毛(胎盤)から分泌されている可能性が高い。申請者らは、妊娠初期の血中の総エクソソームと胎盤由来エクソソームは、妊娠高血圧腎症妊婦(特に早発型)では妊娠初期から高値を示し、妊娠初期におけるPE発症の予知マーカーになりうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)エクソソーム精製のスタンダードである超遠心法に比べて、より短時間で、最も胎盤由来のエクソソームを効率的に精製できる手法を探索すること、(2)妊娠中期、妊娠後期前半において、血中総エクソソーム、胎盤由来エクソソーム濃度が、その後のPE発症を予知するかどうかを検討すること、(3)最後に、妊娠初期において、血漿総エクソソーム、胎盤由来エクソソーム濃度が、その後のPE発症を予知するかどうかを検討することである。

本研究は、従来エクソソームの抽出には超遠心法しか存在せず、抽出に多大な時間を必要としたが、新しいエクソソームの迅速抽出法が数種類出現したことから、胎盤由来のエクソソームの早期抽出法として何れの検査キットが最適かを調べる点が第1の独創である。エクソソームとそれ以外の母体因子や血管新生関連因子を組み合わせることで、妊娠中期以降のPE予知精度を向上させようとする点が第2の独創点である。さらに、これまで明らかにされていない妊娠初期におけるエクソソームを用いたPE予知のスクリーニング特性を明らかにしようとする点が第3の独創点である。

3. 研究の方法

(1)3種類のエクソソーム精製キットを用いた、エクソソームの分離精製

妊娠初期、中期、末期前半、末期後半の正常妊婦各10例の保存試料を用いて、超遠心法とカラム法(A. 血漿/血清用エクソソーム精製キット、Norgen Biotek Corp.、B. exoquick ULTRA EV isolation kit、System Bioscience社、C. exoEasy Maxi Kit、QIAGEN社)を用いて血漿からエクソソームの分離精製を行い、再度冷凍保存する。

(2)総エクソソームと胎盤由来エクソソームの確認、定量化

精製した総エクソソームをエクソソーム特異的マーカーであるCD63を用いてWestern blotting法で確認する。総エクソソームをnano tracking analysisを用いたMalvern CompanyのNanoSightで粒子の大きさと粒子数を測定し、濃度はCD63 ELISAキットを用いて定量化する。また胎盤由来エクソソームは胎盤由来であることを示す為、胎盤アルカリホスファターゼ(placenta alkaline phosphatase: PLAP)をマーカーとし、その濃度をELISAキットを用いて定量化する。超遠心法と比較し、3種類のキットの内、エクソソームを最も効率に精製回収でき、超遠心法と相関がある方法を検討する。

(3)妊娠中の総エクソソーム、胎盤由来エクソソームの基準値の設定

最もエクソソームの回収に効率の良いキットを用いて、正常妊婦:妊娠初期100例、妊娠中期

100例、妊娠末期前半100例、及び、妊娠末期後半100例を測定し、総エクソソーム、胎盤由来エクソソームが妊娠初期から後期にかけて増加するかどうかを確認する。また、正常妊婦から週数別の基準値を作成する。

(4)早発型PE、遅発型PE妊婦での総エクソソーム、胎盤エクソソームの検討

まず、早発型PE、遅発型PE妊婦において、妊娠中期と末期に発症した後の総エクソソームと胎盤由来エクソソームを測定し、正常妊婦と比較し、早発型PE、遅発型PEを区別するバイオマーカーになり得るかどうかを検討する。また、エクソソームとそれ以外の母体因子や血管新生関連因子を組み合わせることで、妊娠中期以降のPE予知精度が向上するか検討する。次に、後にPE発症した妊婦の妊娠初期の血液と、結果的にPEを発症しなかった正常妊婦の初期の血液を用いて、総エクソソームと胎盤由来エクソソームを測定し、妊娠初期の段階でPEの発症予知に使えるか検討する。さらにエクソソームとそれ以外の母体因子や血管新生関連因子を組み合わせて、妊娠初期の段階でPEの発症予知に使えるか検討する。

4. 研究成果

まず、エクソソーム精製方法のスタンダードである超遠心法で血漿保存試料から総エクソソームを精製し、エクソソームの特異的抗原であるCD63のELISA法を用いて総エクソソーム濃度を測定し感度以下で測定ができなかった。この結果は精製されたエクソソーム量が少ないためと考え、各血漿保存試料の量を増やし、タンパク質抽出溶液を変更したりなどして再検討したところ、エクソソームの別の特異抗原であるCD9が他の特異的抗原と比べても高発現であることが判明した。このため、血漿保存試料の量を1mLから2mLへ増量し、CD9のELISA法で測定したところ、測定感度以上であり、総エクソソームの測定ができることが判明した。

市販の3種のエクソソーム精製キットを用いて、血漿保存試料から総エクソソームを精製したところ、exoEasy Maxi Kit (QIAGEN社)が一番エクソソームの精製回収率がよかった。CD9のELISA法で総エクソソームを測定し、3種のエクソソーム精製キットと超遠心法と比較したところ、いずれも相関が十分でなかった。

このため、エクソソーム精製キットではなく、超遠心法で精製し、正常妊婦とPE妊婦とにおける総エクソソームの量を比較することとした。

現在CD9のELISA法を用いて、血漿保存試料の正常妊婦の妊娠週数別の総エクソソームの正常値(曲線)を作成するとともに、妊娠高血圧腎症妊婦の発症後の総エクソソーム濃度が異なるのか現在検討中である。正常妊婦：妊娠初期10例、妊娠中期10例、及び、妊娠末期10例の検討では、妊娠中の総エクソソーム量はほぼ同じ濃度であり、妊娠期間別に比較しても差はなかった。現在、妊娠高血圧腎症妊婦の発症後の総エクソソーム量を測定中であり、正常妊婦と差があるか検討中である。

また別に、総エクソソーム内の胎盤由来エクソソームの発現を確認するため、胎盤特異的抗原であるPLAPの発現が、超遠心法で血漿保存試料から精製した総エクソソームで認められるか蛋白解析を行ったが、このPLAPの発現がかなり少ないことが判明した。超遠心法で精製した総エクソソームでは、PLAPのELISA法での測定は難しいと考えている。このため、抗原量がより少量でも感度がいいと思われるフローサイトメトリー法での胎盤由来エクソソームの量の測定を検討している。絶対値的測定ではなく、相対値的測定となるが、総エクソソーム中の胎盤由来エクソソームの割合を測定する方針とし、現在測定系の確立を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 成見莉紗
2. 発表標題 血中のエクソソーム濃度：正常妊婦の週数別推移と妊娠高血圧腎症妊婦との比較
3. 学会等名 第31回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2023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	大口 昭英 (Ohkuchi Akihide) (10306136)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

	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
研究協力者	高橋 宏典 (Takahashi Hironori)		
研究協力者	成見 莉紗 (Narumi Risa)		
研究協力者	小古山 学 (Ogoyama Manabu)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	田村 昂平 (Tamura Kouhei)		

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