

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09829

研究課題名(和文) Danger Signal抑制によるHDP悪化遅延と新生児周産期予後の改善

研究課題名(英文) Prevention of hypertensive disorders of pregnancy and improvement of neonatal outcome by Danger Signal suppression

研究代表者

成瀬 勝彦 (NARUSE, Katsuhiko)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70453165

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)：研究分担者による脂肪組織培養における炎症惹起と抑制、かつそこにDanger Signalが関与していることを証明した論文が期間中に発表されたほか、代表者は期間中にその背景となる妊娠高血圧症候群の病型と常位胎盤早期剥離との関連についてビッグデータを用いて証明し、また日本腎臓学会での教育講演の機会も得た。一方、基礎的研究についてはCOVID禍による臨床のエフォートにより進捗が遅れており、2022年4月より代表者が異動した先でも研究が続行される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧症候群が妊娠初期の胎盤着床不全に端を発することが明らかとなり、児に対して胎児発育不全や常位胎盤早期剥離といった重篤な異常をもたらす原因として脂肪組織の炎症が関わる可能性を示し、そこにDanger Signalが関与していることが事前の仮説通り証明された。他方、本研究期間では発症予知やハイリスク群の発症予防、児の周産期予後改善につながる方策までは開発することが出来なかった。今後の研究にて証明していくための基礎的な知見を提示することができたと思う。

研究成果の概要(英文)：A manuscript on inflammatory upregulation and suppression by Danger Signal in adipose tissue by tissue culture written by Juria Akasaka, a member, was published during this period. The principal investigator proved the association between the existing background pathology between different phenotypes of hypertensive disorders of pregnancy and placental abruption using big data during this period. And also Naruse had the opportunity to give an educational lecture at the Japanese Society of Nephrology. On the other hand, progress in basic research has been delayed due to the clinical effort caused by the COVID disaster, and will continue in April 2022 when the representative moves to a new location.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠高血圧腎症 妊娠高血圧症候群 Danger Signal 常位胎盤早期剥離

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (HDP : Hypertensive Disorders in Pregnancy もしくは Preeclampsia、かつての子癩前症・妊娠中毒症) は妊娠後半での高血圧を中心に全身の炎症性病態を惹起し、母体の脳卒中や子癩発作、肝障害と DIC (HELLP 症候群)、腎不全や生涯にわたるメタボリックシンドロームの遷延といった重篤な結果をもたらす。現在は妊婦健診と管理が進んだため直接の母体死亡原因となることは減ったが、有史以来人類の分娩において、出血・感染と並んで最も多くの母親の命を奪ってきた疾患である。

更に問題になるのは HDP における新生児の予後である。多くの例で重篤な胎児発育不全 (FGR : Fetal Growth Restriction) を惹き起こすほか、常位胎盤早期剥離の発症も多く、児にとって過酷な子宮内環境となる。また母体の高血圧に対する治療法に乏しいため、ひとたび発症しコントロール不能となれば母体死亡を防ぐためにも人工的な早産 (緊急帝王切開) を行わざるをえないが、こうして出生した早産児が他の早産児に比べ、より脳性麻痺発症のリスクが高いことが近年の疫学研究で明らかになってきている。

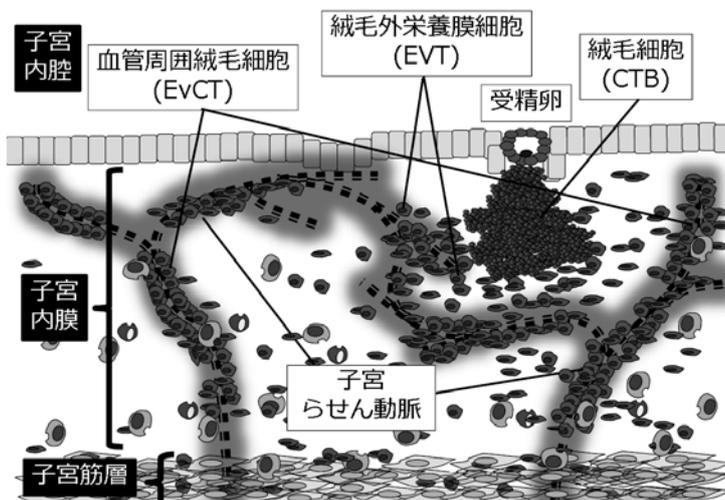
HDP の発症原因については長らく謎のままとされており、現在でも生理的・免疫学的・遺伝子要因が複合して関与する疾患であると考えられているが、今世紀に入って HDP の大部分に関与する因子が、申請者が後に加わるチームの検討 (Bulmer JN, Lash GE. *Mol Immunol.* 2005) も含め明らかになった。それは妊娠 10~15 週での子宮内膜らせん動脈分解不全である。高等猿類 (と、げっ歯類) のみに存在するこの

機構は、脳の胎内での高度な発達という困難なプロセスを可能にするため、より多量の血液を母体から得るためにある独特の機構 (図) であり、この機構があるからこそ産後に子宮収縮と止血に失敗すれば母体は出血で死ぬ (世界の母体死亡の第一位)。一方、この分解が不全であれば児は十分な血流を得られず、発育不全や脳血流の不足に陥ることは容易に想像されていたが、HDP 患者検体の検討から、母体においてもこの低酸素にさらされた胎盤 (絨毛細胞) がもたらす高サイトカイン環境が多くの炎症性病態、とくに高血圧や腎障害に強く関与することが分かってきたのである。

これら炎症性因子の研究でもっとも進んでいるのは血管増殖因子 (VEGF) とその受容体に関するものであり、既に初期の HDP 発症予知スクリーニングについて臨床応用が進められている。しかし、実際に妊娠初期にスクリーニングを全ての妊婦に行うことは未だ現実的ではない。またスクリーニング陰性例でも HDP は発症することがある。いざ発症してしまった時にどのようにその悪化を遅らせて、しかも母児の予後、とくに早産に至ってしまった児の予後を改善させることができるのだろうか。本研究のチームメンバーは全員が産科を専門としており、産科臨床の現場で HDP による辛い予後不良の現場を経験してきている。その予後を少しでも改善したいという想いが研究の動機であり、かつ産科医達に課せられた重い課題とも言える。

申請者は臨床での経験から HDP の病態が炎症を主体とすることを予測し、実際に HDP 患者血清や胎盤を用いて可溶性 TNF レセプターや脂肪細胞が分泌するサイトカイン (アディポサイトカイン) の有意な変動・発現を証明してきた (成瀬ら、*産婦人科の実際*, 2004 ; Naruse K, *et al. J Reprod Immunol* 2005)。続いて英国での研究でヒト妊娠由来の絨毛細胞を安定して分離する方法を確立し、初期浸潤型・後期シンシチウム化の双方を再現できる手法を開発して多くの研究をもたらした。

これらの研究の中で、絨毛細胞の浸潤とその表面に発現して低酸素などのストレス環境下で母体血中に流入する「初期の胎盤形成異常と後期の HDP 発症をつなげる物質」としての Danger Signal に初めて着目した。多くの候補の中から、脂肪組織において炎症を惹起する遊離脂肪酸 (Free Fatty Acid, FFA) や、絨毛細胞での発現が示唆されている RAGE リガンド (S100、HMGB1 など) が早発型・重症妊娠高血圧腎症において血清中で上昇することを初めて証明し (Naruse K, *et al. Mediators Inflamm* 2012; Naruse K *et al. J Reprod Immunol* 2012)、Danger Signal がもたらす炎症と疾患の強い関連 (とくに初期の胎盤着床不全が後期の HDP 発症に与える影響) を裏付けてきた。



2. 研究の目的

HDP 発症のより確実な早期予知と病態の解明はまだ不十分であり、申請者らのチームでもさらに検討を進めているが、本研究では異なった視点で研究を行うことを目的としていた。すなわち「HDP 既発症例での周産期予後の改善」であり、最大の目的は母児の予後の改善、とくに母体が HDP を発症してしまった例で、児の脳性麻痺発症を減少することである。HDP の発症後の母体病態と新生児の予後を規定する因子として、マクロファージ～Toll Like Receptor 系を中心に強い炎症作用をもたらす Danger Signal の関与を考える仮説を立てた。母児の検体を用いたその証明に加え、それらを抑制する因子を見出すことで、HDP 発症後の悪化を抑制し、児にとって不利な早産を少しでも遅らせることと直接的な Danger Signal の影響を減弱させることを目指した。

絨毛細胞に由来する液性因子として近年世界的に検討されている血管増殖因子は HDP の早期発症予知には有用であるものの、実際に発症した例での劇的な炎症（アジア人に多い、肥満を伴わない早発・重症型の HDP では数時間単位で病態が悪化することが多い）での変動が特別に大きいわけではない。HDP の発症に関わる他の Danger Signal についてより明らかにした後、基礎研究や児の検体も用いながら、多くの Danger Signal (表) のいずれかが HDP の予後に関与するかを検討し、さらにそれらを抑制できる治療法について展望を示すことを目指した。

Danger Signal (RAGEリガンド、DAMPsとも)

- ✓ S100 protein family
- ✓ High-mobility Group Box (HMGB)-1
- ✓ DNA / RNA / プリン代謝体
[ATP, adenosine, uric acid] など

3. 研究の方法

- 妊娠初期絨毛由来の浸潤型絨毛細胞と満期胎盤（正常・異常の双方）由来の絨毛膜化（シンシチウム化）絨毛細胞を用いて、低酸素環境などのストレス条件下で培養を行い、亢進する Danger Signal を証明する。また絨毛細胞と子宮内膜を模したマトリックス（Matrigel、Fibronectin、Vitronectin などを含む）との共培養系、また患者由来血清添加下において酸素濃度を変化させることにより、Danger Signal の変動を示す。
- これまでに当科にストックされた妊娠高血圧症候群および正常妊娠の母体血清検体、ならびに新生児科の保存する臍帯血検体を用いて、ELISA 法・Western Blot により各種 Danger Signal およびサイトカイン（アディポサイトカイン）・プロテアーゼ・関連因子の測定を行う。
- これらのストレス下にある細胞から RNA を抽出し、そのエピジェネティックな変化（主にメチル化アレイを用いた解析）を行ってその変動を検討し、パスウェイ解析によって疾患の病態発現の鍵となる下流の因子（Danger Signal であると予測する）を見出す。
- 見出された Danger Signal については我々の確立した脂肪組織培養系にも添加し、その炎症性因子が惹起されるかどうかについても検討する。
- 研究の後半期においては、これら Danger Signal を抑制できる因子・薬剤をデータベースから見出す。候補となる薬剤について上記の実験系に添加し炎症の抑制につなげられるかどうかを検討するほか、その作用・副作用の確認について必要であれば胎児の検討が可能な動物実験も行う。他方、ヒト妊婦で安全性が確認されていて常用される薬剤であれば直ちに大きなベネフィットがあるため、実際に発症した妊婦に（医の倫理委員会の承認と母体からの説明と同意を得て）投与する Pilot study を行う。

4. 研究成果

研究計画については COVID-19 感染症の流行により、研究代表者・研究分担者とも臨床業務に極めて多くの時間を費やさざるを得なかった（特に研究分担者の赤坂は奈良県唯一の総合周産期母子医療センターで産科医長を勤め、県下の感染妊婦の対応のためほぼ二年間病棟を離れることができないほどの活躍であった）ため、基礎的実験により成果を挙げるだけの時間を得ることが不可能であった。一方で、申請以前から行っていた実験と、ビッグデータをもちいた解析により、これらの研究を今後続けていくための基礎となる知見を与えることができた。以下に述べる。

1) 脂肪組織培養における炎症惹起と抑制、かつそこに Danger Signal が関与していること

ヒト初代培養脂肪細胞に HDP と健常対照者の血清を 24 時間曝露し、いくつかのアディポカイン、サイトカイン、先進糖化産物受容体 (RAGE) のリガンドの mRNA 発現を分析した。その結果、interleukin-6 (IL-6)、C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2)のほか、Danger Signal である high mobility group box 1 (HMGB1) と RAGE の mRNA レベルは HDP 血清添加により有意に増加した。RAGE リガンドのうち、advanced glycation endproducts (AGE) と HMGB1 は、SW872 ヒト脂肪細胞およびマウス 3T3-L1 細胞の IL-6 と CCL2 の mRNA レベルを上昇させた。RAGE の small interfering RNA (siRAGE) を SW872 細胞に導入すると、AGE と HMGB1 による IL-6 と CCL2 の上昇を抑制した。また、RAGE のリガンドであるリポポリサッカライド (LPS) は、IL-6 と CCL2 の発現を上昇させ、siRAGE は LPS による IL-6 と CCL2 の発現を

減弱させた。これらの結果は、妊婦の AGE、HMGB1、LPS の上昇が RAGE 系を介して IL-6、CCL2 の発現を上昇させ、HDP などの全身性炎症に至ることを強く示唆した。

2) 妊娠高血圧症候群の病型と常位胎盤早期剥離との関連に関するビッグデータを用いた証明

日本の急性期入院患者の全国入院データベースである Diagnosis Procedure Combination (DPC) データベースを用いて、妊娠高血圧症候群 (HDP) の表現型、疾患の特徴が胎盤剥離の予測因子として有用か、他のリスク因子が胎盤剥離の発症と関連するかどうかを検証するために、後ろ向きコホート研究を計画した。2010 年 7 月から 2018 年 3 月の間に入院中に出産した HDP と診断された入院患者 85,858 人を本研究の対象とした。入院後の胎盤剥離の発生と、胎盤剥離発症時の妊娠年齢 (GA)、HDP サブタイプ、入院時の GA、母体年齢、肥満度、喫煙、多胎妊娠、産前膜破裂、糖尿病、救急車で緊急入院、意識などいくつかの因子との関連性を多変量ロジスティック回帰分析により検討した。胎盤剥離は入院後 541 例 (0.63%) で発生し、妊娠 32 週を境に急激に発生が増加していた。胎盤剥離の減少は、入院時の母親の BMI ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$, オッズ比 [OR], 0.54, 95%信頼区間 [CI], 0.41~0.70) および多胎妊娠 (OR, 0.29, 95%CI, 0.18~0.46) と有意に関連した。剥離の増加は、入院時の妊娠週数が早いこと (<34 週; OR, 3.77; 95% CI, 3.13-4.53) および救急車による緊急入院 (OR, 1.34; 95% CI, 1.09-1.65) と関連していた。重度妊娠高血圧腎症の個々の重症徴候は、剥離の発生と有意な関連を示さなかった。結論として、早い妊娠週数における HDP が胎盤剥離の最大の危険因子であることが示唆され、妊娠初期の胎盤形成不全がそのまま妊娠中期以降の妊娠高血圧症候群と胎盤早期剥離に影響を与えることがより明らかとなった。

3) 現在進行中の研究計画

絨毛細胞を用いた研究、新生児検体を用いた研究については、マトリックスとの関連性に関する研究が進行中である。

ただ期間中に所属施設理事長が外部からの部長を招請することを決定し、友好的にはあるが研究代表者が 2022 年度より新たな施設に異動することとなったため、そのような施設側の方針転換に伴って研究については一時中断中である。本研究の継続した科研費についても拝受することが決まっており、引き続き異動先施設で体制が整い次第研究が継続される予定であるので、本研究の内容についても今後遅ればせながら展開されていく見込みである。

参考文献

- 1) [Akasaka J, Naruse K, Sado T, Uchiyama T, Makino M, Yamauchi A, Ota H, Sakuramoto-Tsuchida S, Itaya-Hironaka A, Takasawa S, Kobayashi H](#): Involvement of receptor for advanced glycation endproducts in hypertensive disorders of pregnancy. *Int J Mol Sci.* 20: pii: E5462, 2019. * I F 5.923
- 2) [Naruse K, Shigemi D, Hashiguchi M, Imamura M, Yasunaga H, Arai T, for the Advanced Life Support in Obstetrics \(ALSO\)-Japan Research Group](#): Placental abruption in each hypertensive disorders of pregnancy phenotype : a retrospective cohort study using a national inpatient database in Japan. *Hypertens Res.* 44: 232-238, 2021. * I F 3.872
- 3) 日本妊娠高血圧学会(編著): 妊娠高血圧症候群の診療指針 2021 Best Practice Guide. 担当部分非公開, メジカルビュー, 2021. (研究代表者=作成委員、分担執筆)
- 4) [成瀬勝彦](#): 妊娠高血圧症候群(HDP)と胎盤 —着床・胎盤形成の異常から疾患発症まで, 週刊医学のあゆみ, 269 : 789-794, 2019.
- 5) [成瀬勝彦, 赤坂珠理晃](#): 特集 妊娠高血圧症候群 update 病態<トピックス> RAGE (receptor for advanced glycation end products), 周産期医学, 49 : 1354-1355, 2019.
- 6) [成瀬勝彦](#): 質疑応答 Pro⇔Pro 早発型 HDP の妊婦における分娩のタイミングを決める基準は?, 週刊日本医事新報, 4999 : 52-53, 2020.
- 7) [成瀬勝彦](#): 私の治療 / 妊娠高血圧症候群, 週刊日本医事新報, 5015 : 52-53, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naruse K	4. 巻 49
2. 論文標題 Ultrasound screening in gynecological examinations: can we overcome the criticism that it is insufficient and harmful?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 1~2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10396-021-01174-3	査読の有無 有
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 成瀬勝彦	4. 巻 70
2. 論文標題 特集 症例にマッチする分娩誘発アプローチ HDPに対する分娩誘発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 産婦人科の実際	6. 最初と最後の頁 391-395
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 Naruse K, Shigemi D, Hashiguchi M, Imamura M, Yasunaga H, Arai T, for the Advanced Life Support in Obstetrics (ALSO)-Japan Research Group	4. 巻 44
2. 論文標題 Placental abruption in each hypertensive disorders of pregnancy phenotype: a retrospective cohort study using a national inpatient database in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 232~238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-020-00537-6	査読の有無 有
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 Akasaka J, Naruse K, Sado T, Uchiyama T, Makino M, Yamauchi A, Ota H, Sakuramoto- Tsuchida S, Itaya-Hironaka A, Takasawa S, Kobayashi H	4. 巻 20
2. 論文標題 Involvement of Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Hypertensive Disorders of Pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5462~5462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20215462	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5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naruse K, Akasaka J, Ichikawa M
2. 発表標題 Adipokine / Lipokine and inflammatory process in preeclampsia.
3. 学会等名 22th World Congress meeting of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naruse K, Shigemi D, Hashiguchi M, Imamura M, Yasunaga H, Arai T, for the Advanced Life Support in Obstetrics (ALSO)-Japan Research Group
2. 発表標題 Early onset hypertensive disorders of pregnancy is a high risk phenotype for placental abruption: A Japanese nationwide cohort study.
3. 学会等名 22th World Congress meeting of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成瀬勝彦
2. 発表標題 特別連続企画 胎生期からのライフステージによる病態リスクと対策 妊娠高血圧症候群と腎臓～生涯にわたる影響～
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成瀬勝彦, 赤坂珠理晃, 市川麻祐子, 三宅龍太, 長安実加, 大西俊介, 竹田善紀, 山中彰一郎, 木村文則
2. 発表標題 臓器温存戦略における超音波：産婦人科、主に周産期救急の視点から。
3. 学会等名 日本超音波医学会第48回関西地方会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成瀬勝彦
2. 発表標題 妊娠高血圧症候群と薬物療法
3. 学会等名 第9回関西妊産婦薬物療法支援講習会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本妊娠高血圧学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 264
3. 書名 妊娠高血圧症候群の診療指針2021	

1. 著者名 藤井知行、永松健（編）、成瀬勝彦（各章分担執筆）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 392
3. 書名 妊娠期の正常と異常	

〔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	常見 泰平	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員	
	(TSUNEMI Taihei)		
	(20599831)	(24601)	

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
研究分担者	竹田 善紀 (TAKEDA Yoshinori) (50825239)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	
研究分担者	中野 和俊 (NAKANO Kazutoshi) (70805879)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	
研究分担者	赤坂 珠理晃 (AKASAKA Juria) (90526724)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	

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