

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09473

研究課題名（和文）メタボローム解析を用いた早発、遅発型妊娠高血圧症候群の病態解明

研究課題名（英文）Metabolome analysis for Early and Late onset hypertension disorders of pregnancy

研究代表者

経塚 標（Kyozyuka, Hyo）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00644113

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は最終的にLo-PEを発症した妊婦に対し、妊娠初期清の代謝産物の網羅的解析を行うことで、HDPの病態解明となるバイオマーカーの探索を行うことを目的とした。本研究は、Lo-PEの患者12名と、正常経過となった対照群12名を対象とした。妊娠初期の母体血清サンプルに対して、キャピラリー電気泳動-質量分析法に基づく代謝産物の定量分析が行われ、合計183種類の代謝物が同定された。Lo-PE患者の妊娠初期血清におけるグルコサミンのピーク面積は、対照群に比べて有意に高く、Lo-PE患者の血清におけるセロトニンのピーク面積は有意に減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lo-PEの発症には様々な環境要因の関与が示唆されているが、正確なメカニズムは未解明である。今回の研究成果を介して妊娠初期の栄養摂取と、妊娠前の食生活や精神的健康を反映するセロトニン状態がLo-PE発症に関与している可能性があり、Lo-PE発症予防には、妊娠前の食事状態や精神健康状態を管理するプレコンセプションケアが重要となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Late-onset preeclampsia (Lo-PE) is characterized by the onset of hypertension with organ damage after 34 weeks of pregnancy. Identifying the mechanisms behind Lo-PE is crucial for prevention before symptoms appear. This study aimed to identify first-trimester maternal serum metabolites associated with Lo-PE using targeted metabolomic analysis. Conducted at Fukushima Regional Center as part of the Japan Environment and Children Study, it involved 12 patients with Lo-PE and 12 matched controls. Capillary electrophoresis-mass spectrometry was used to analyze charged metabolites in first-trimester serum samples, identifying 183 metabolites. Results showed significantly higher glucosamine and lower serotonin levels in Lo-PE patients compared to controls. While the exact mechanism of Lo-PE remains unclear, early pregnancy nutrition and serotonin levels, reflecting pre-pregnancy diet and mental health, are crucial. Preconception care may help prevent Lo-PE onset.

研究分野：周産期医学

キーワード：妊娠高血圧症候群 メタボローム解析 バイオマーカー プレコンセプションケア 予防医療

1. 研究開始当初の背景

Preeclampsia (PE) は本邦では妊娠全体の約 2.5% に発症し、妊娠 20 週以降に新たに高血圧を発症し、何かしらの臓器疾患をきたす疾患である。PE は母児ともに重篤な合併症を引き起こすため、早期発見し早期治療介入することが望まれる。一方で PE は妊娠 34 週未満に発症する早発型 (Early onset: Eo) PE と 34 週以降に発症する遅発型 (Late onset: Lo) PE に分類される。それゆえ PE のさらなる詳細な病態解明、早期発見、早期介入、治療の確立にあたっては、Eo 型と Lo 型が異なる発症メカニズムと想定されるため、それぞれ個別に戦略を立てる必要がある。ヒトゲノムをはじめさまざまな生物種のゲノム解析結果が報告され、生命科学はポストゲノムといわれる次の段階に入っている。ポストゲノム研究は 1) ゲノムレベルの全遺伝子、2) それらの遺伝子が最初に細胞内で発現する形態である mRNA の総体、3) 2) によって生産されるタンパク質の総体の研究解明であり、現在これらの研究を行うための方法論の開発におおきな力がそそがれてきた。細胞活動の維持に必要な物質と化学エネルギーは、代謝活動により生産され、これらの代謝物質は、遺伝子と酵素の発現量に基づいて生産される一方、代謝産物の変動が遺伝子発現を制御している事実が明らかになっている。これらの細胞機能を解明するには、遺伝子やタンパク質の発現のみならず、酵素タンパク質が生産する総代謝物質 (メタボローム) を網羅的に測定し、遺伝子発現や酵素活性との関係を明確にする必要がある。それゆえ、メタボローム解析を行うことは代謝メカニズムの解明に役立つことが期待されているが、疾病診断や予後予測、治療効果などを推定する各種のバイオマーカーの探索、また培養細胞や遺伝子改変動物を用いた新規代謝経路の探索への応用も期待されている。これまで非常に困難といわれて代謝物質の網羅的測定だが、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) の開発により、主要な代謝産物のほとんどを占めるといわれるイオン性代謝物質の網羅的な定量分析が可能となった。

2. 研究の目的

2003 年のヒトゲノム計画の完了以降、ゲノムの表現型とされるプロテオーム、メタボロームの解析研究には大きな関心がよせられてきた。これらの解析により疾患の原因解明、治療方法、早期発見のための新規バイオマーカーの発見が可能とされているからである。研究は Lo-PE を発症した妊婦に対し、妊娠初期血清の代謝産物の網羅的解析を行うことで、Lo-PE の病態解明または発症予知となるバイオマーカーの探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

研究デザイン

本研究では、エコチル調査のデータと生体サンプルを利用した。エコチルは、さまざまな環境要因が子どもの健康に与える影響を調査することを目的として、2011 年 1 月に開始された出生コホート研究です。今回の研究はエコチル調査の追加調査として実施された。本研究は、環境省の疫学研究倫理審査委員会 (No. 1305151) および福島県立医科大学の倫理委員会 (No. 1603) により審査・承認され、すべての手順は、ヘルシンキ宣言およびその他の関連する国内ガイドラインに従って実施された。

生体サンプル

妊娠約 12 週の時点で、エコチル福島ユニットセンターにおいて書面によるインフォームド・コンセントを得た妊婦から血清サンプルを前向きに収集しました。合計 5070 の母体血清サンプルが収集され、そのうち 96 名の患者 (1.9%) が遅発性妊娠高血圧症候群を発症し、その中の 13 名が Lo-PE を発症しました。新生児に関する情報が得られなかった 1 名の患者は除外し、Lo-PE を発症した患者の 12 サンプルを、1:1 の傾向スコアを用いて、基本的な特性が一致する無合併症妊娠の女性の 12 サンプルと一致させた。血清サンプルは代謝物解析のために -80°C で保存した。

周産期情報

妊娠年齢、出生体重、胎盤の重さを考慮した出生体重の標準偏差 (SD) を含む産科アウトカムを評価した。SD は日本の新生児身体計測チャートに基づいて計算され、妊娠年齢、性別、および出産回数を含み、値が -1.5SD 未満の児は small for gestational age (SGA) と診断した。PE は、新たに発症した高血圧 ($140/90\text{ mmHg}$ 以上) と SGA を伴うものと定義され、Lo-PE は妊娠 34 週以降に発症した PE と定義した。胎盤の重さは出産直後に測定した値を用いた。妊娠前の身長と体重、出産時の母体年齢、過去の出産回数、HbA1c レベル、および妊娠 12 週時の収縮期および拡張期血圧を比較した。妊娠前の炭水化物 (またはナトリウム/カルシウム) 摂取量は、First trimester に記入された食品頻度質問票 (FFQ) を使用して決定された。

メタボローム解析

血清サンプルのメタボローム解析は、Human Metabolome Technologies, Inc. (山形、日本) によって実施された。酵素の不活性化は、内部標準を含むメタノール ($450\mu\text{L}$; ソリューション ID: H3304-1002) で血清 $50\mu\text{L}$ を 0°C で処理することで行われた。抽出物はクロロホルム ($500\mu\text{L}$)

と Milli-Q 水 (200 μ L) と混合され、4 °C で 2300 \times g で 5 分間遠心した。上層の水層 (400 μ L) は、タンパク質を除去するために Millipore 5kDa カットオフフィルターでろ過した。濾液は濃縮され、Milli-Q 水 (50 μ L) に再懸濁され、キャピラリー電気泳動-質量分析 (CE-MS) 解析のために使用した。この解析は Human Metabolome Technologies Inc. によって外部委託として実施した。CE-TOF-MS は、Agilent CE System に 6210 TOF-MS と 1100 等度高性能液体クロマトグラフィープンプを装備して行われ、代謝産物は、電解質として商用電気泳動バッファーを使用した 50 μ m i.d. \times 80 cm 全長の融着シリカキャピラリーで分離された。ピーク情報 (m/z、移動時間 (MT)、およびピーク面積) は、Keio University の自動統合ソフトウェア MasterHands を使用した。既知の代謝物の同位体、付加イオン、およびその他の生成イオンに対応するシグナルピークは除外され、残りのピークは Human Metabolome Technologies の代謝物データベースからの MT と m/z 値に基づいて推定代謝産物とした。MT の許容値は \pm 0.5 分、m/z の許容値は \pm 10 ppm とし、ピーク面積は内部標準のものに対して正規化され、結果として得られた相対面積値はサンプル量に対して標準化した。

4. 研究成果

母体の背景および産科予後について、Lo-PE 群と対照群の比較結果を表 1 に示す。対照群は傾向スコアマッチングにより選定されたため、両群間で母体の背景に有意な差は認めなかった。いずれの群にも喫煙者はいなかった。妊娠前の食事パターンにおいては、1 日のカルシウムおよびナトリウム摂取量には有意差は認めなかった ($p = 0.38$ および $p = 0.32$)。しかし、Lo-PE 群の妊娠前の 1 日の炭水化物摂取量は対照群よりも有意に高かった (250g vs 187g, $p < 0.05$)。産科転帰については、分娩時の妊娠週数の中央値が両群間で有意に異なり (38 週 vs 39 週, $p < 0.01$)。出生体重の中央値 (2143g vs 3018g, $p < 0.01$) および胎盤重量の中央値 (408g vs 548g, $p < 0.01$) に有意差を認めた。出生体重は通常、分娩時の妊娠週数に影響されるため、分娩時の妊娠週数に影響されない出生体重の中央値 SD およびその割合も有意差を認めた (-1.9SD vs 0.0SD, $p < 0.01$)。合計 183 種類の電荷を持つ代謝物が特定され、その中でグルコサミンのピーク面積が Lo-PE 群の初期血清で対照群よりも有意に高く ($p < 0.01$)、セロトニンのピーク面積は Lo-PE 患者の血清で有意に低下していた ($p < 0.05$)。図 1 および図 2 は、グルコサミンを含む炭水化物代謝およびセロトニンを含む芳香族アミノ酸代謝に関与する代謝物の経路図を示す。

図 3 は PCA (主成分分析) の結果を示しており、PCA では Lo-PE 患者を健康な対照から明確に区別することは困難であった。主成分 (PC)1 および PC2 の累積分散はそれぞれ 17.4% および 12.1% であった。

図 4 は HCA (階層的クラスタリング分析) の結果を示しており、メタボロームデータは代謝物群およびサンプル群に階層的にクラスタリングされ、ヒートマップを生成した。Lo-PE 群とコントロール群の間で代謝プロファイルに明確な違いは認めなかった。

PE は母児の重大な合併症の原因であるにもかかわらず、その病因は明らかではない。今回のメタボローム解析では、妊娠初期段階で Lo-PE を予測できる新しいバイオマーカーを特定するには至らなかったが、グルコサミンの摂取、炭水化物の摂取、またはセロトニンレベルの低下が PE の病因に関与している可能性が示唆された。妊娠前の健康状態を管理することで周産期予後を改善することを目的としたプレコンセプションケアは、近年その重要性が増している。妊娠初期の栄養摂取や、妊娠前の食生活やメンタルヘルスを反映する体内のセロトニンレベルは重要であるが、今回の結果をもとに適切なプレコンセプションケアが Lo-PE の発症を予防する可能性が示唆される。

表 1 患者背景の比較

	Lo-PE (n = 12)	Control (n = 12)	p-value
Maternal background			
Gestational age at examination (weeks)	12.0 (11.0-13.0)	12.0 (12.0-12.3)	0.61
Maternal age (years)	29 (27-36)	31 (26-34)	0.59
Height before pregnancy (cm)	159 (152-162)	157 (149-160)	0.35
Weight before pregnancy (kg)	53.3 (47.3-66.8)	50.0 (44.5-57.7)	0.29

BMI before pregnancy (kg/cm ²)	22.0 (18.8-26.5)	20.8 (19.4-24.5)	0.67
Nulliparous, n (%)	4 (33.3)	3 (25.0)	1.00
Systolic blood pressure in the first trimester (mmHg)	111 (106-127)	117 (107-122)	0.86
Diastolic blood pressure in the first trimester (mmHg)	64 (59-76)	61 (60-73)	0.76
HbA1c in the first trimester (mg/dL)	5.8 (5.6-5.9)	5.7 (5.5-5.8)	0.24
Preconception carbohydrates intake (g/day)	250 (211-281)	187 (121-240)	<0.05
Preconception Sodium intake, mg	2504 (1776-3886)	2217 (1511-3437)	0.32
Preconception Calcium intake, mg	344 (208-487)	278 (148-408)	0.38
Obstetrics outcomes			
Gestational age at delivery (weeks)	38 (37-39)	39 (39-40)	<0.01
Birth weight (g)	2143 (1929-2371)	3018 (2903-3186)	<0.01
SD of birth weight	-1.9 (-2.5 to -1.8)	-0.0 (-0.6-0.4)	<0.01
SGA, n (%)	12 (100)	0 (0)	<0.05
Weight of placenta (g)	408 (389-440)	548 (470-608)	<0.01

Lo, early onset; PE, preeclampsia; SD, standard deviation; BMI, body mass index; SGA, small for gestational age.

図1 炭水化物代謝関与する代謝物の経路図

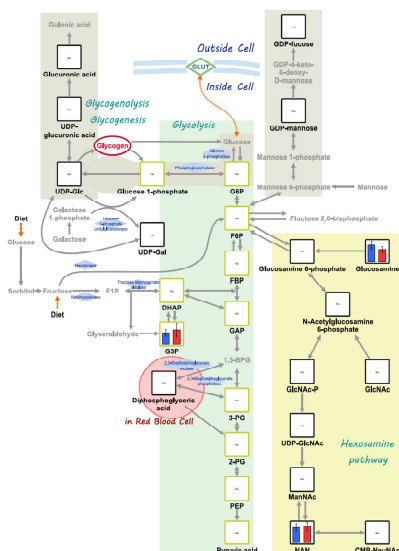


図2 芳香族アミノ酸代謝に関する代謝物の経路図

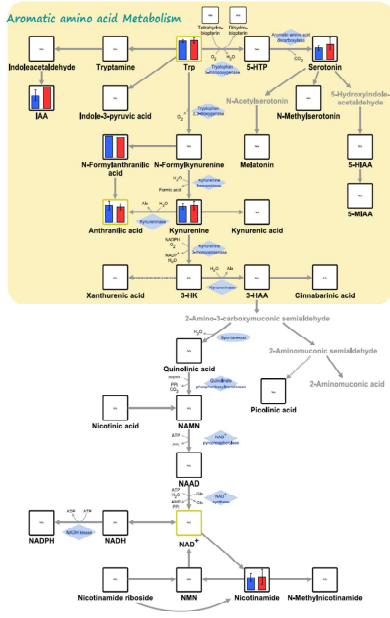


図3 主成分分析の結果

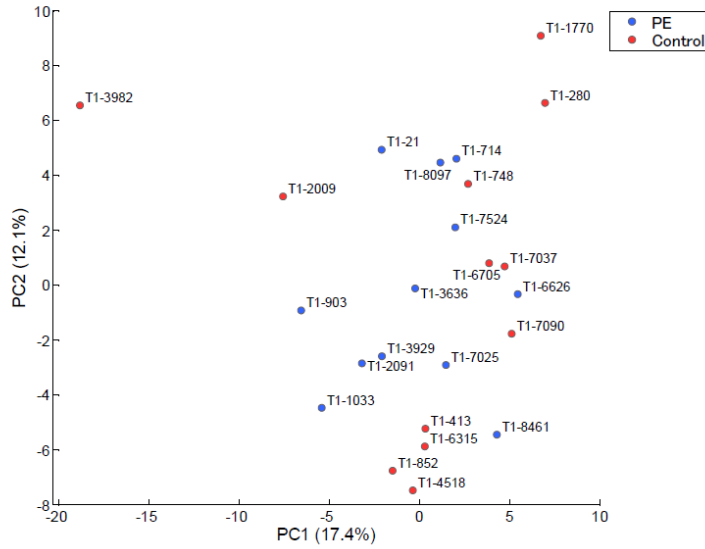
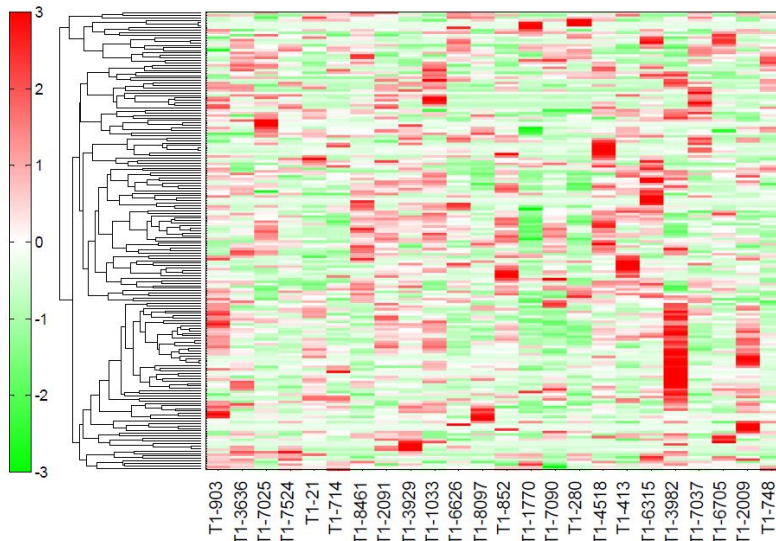


図4 階層的クラスタリング分析の結果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hyo Kyozyuka	4. 巻 48
2. 論文標題 Effect of gestational weight gain on preeclampsia among underweight women: A single tertiary referral center study in Japanese women	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 1141-1148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15200	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 Hyo Kyozyuka	4. 巻 48
2. 論文標題 Association of placenta previa with placental size in Japanese women: A study from a single tertiary referral center	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 379-384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15113	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 Misa Sugeno and Hyo Kyozyuka	4. 巻 48
2. 論文標題 Optimal gestational weight gain to reduce the risk of hypertension disorders of pregnancy among women with obesity: A single tertiary referral center study in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2766-2773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15372	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 Hyo Kyozyuka	4. 巻 22
2. 論文標題 Gestational weight gain as a risk factor for dystocia during first delivery: a multicenter retrospective cohort study in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC pregnancy and childbirth	6. 最初と最後の頁 728
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12884-022-05055-6	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 Hyo Kyozuka	4. 巻 68
2. 論文標題 Introduction and utility of resuscitative endovascular balloon occlusion of the aorta for cases with a potential high risk of postpartum hemorrhage: A single tertiary care center experience of two cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fukushima journal of medical science	6. 最初と最後の頁 117-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5387/fms.2022-01	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 経塚標
2. 発表標題 シンポジウム 食事由来母体炎症の胎児・胎盤機能不全への影響と長期予後改善を目指した治療・予防戦略 ビッグデータならびに羊胎仔慢性実験モデルから
3. 学会等名 第74回日本産婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022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	山口 明子 (Yamaguchi Akiko) (00457764)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	安田 俊 (Yasuda Shun) (50566817)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	藤森 敬也 (Fujimori Keiya) (80285030)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

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
---------	---------