

#### 4. 生活経験の乏しい家庭や社会環境

昨今の女性は少子化で過保護で育ち、家事を分担することは少なく、日常生活の多くを親に委ねて生活している。そのため家庭や地域における生活力は低下している。また、成長過程で近隣の乳児に触れ合うこともほとんどなく、身近に妊婦や育児中の女性に接することがないまま成人になっている。そこで自分が妊娠した場合、適切なマタニティライフを営む能力を習得しておらず、核家族化で相談相手も少なく不安の多い生活になる。このように少子社会は身近な出産の経験者を少なくし、妊婦の相談者をなくしてきた。主体的に自分の問題として妊娠を受け止め、出産に向けた心身の準備を進めていくことが以前にもまして妊婦に求められているが、その社会的サポート体制は逆に低下しているともいえる。

#### 今日の社会の求める妊健の意義

##### 1. リスク因子に目を向けた異常の早期発見

高齢やハイリスク妊婦の増加に伴い、今日の妊健は、異常の早期発見が第一の目的になっているともいえる。ハイリスク妊婦への必要性から行われる妊健内容は、ローリスク妊婦にも予防的に適用されている。産科での正常とは結果論であり、異常を否定することは不可能で、さらに訴訟の増加も相まって医療者はいつ異常に移行するかわからないリスクを包含していることを重視し、可能な限り個々の妊婦のリスク因子を明確にして厳重に管理していくことが必須となっている。

##### 2. 妊婦の不安を軽減し満足感を満たし母性意識を高める

妊健は不安を軽減し妊娠の満足感を満たす場でもある。妊娠は生理的な現象で、多くは日常生活を正調化することで順調に経過する。医療者は妊婦とのコミュニケーションを図り、不安を抱くことなく正常範囲を逸脱しないように予防的に対応することが大切である。また、妊娠経過に応じて自分の生活をコントロールでき、出産に向けて心身の準備を整えていけるように学習する機会となる。多くの妊婦は確実な胎児情報を求めており、

超音波画像で胎児の成長をみせることにより母性意識が高められる。

#### 妊健体制の問題点

##### 1. 妊健時間が短く聞きたいことが聞けない

平成15年に鈴木ら<sup>1)</sup>が行った病院164施設、診療所300施設、助産所105施設における妊健の実態調査によると、妊健時間は、10分以内が病院60%、診療所47%で、保健指導は10分以内が病院68%、診療所66%で、助産師も10分以内が病院33.1%、診療所16.8%であり病院や診療所では医師・助産師のいずれも妊婦とかかわる時間は短く、10分程度であることがわかる(図1~3)。

一方、助産所は30分以上が57%であった。このように短い時間では妊婦の生活を考慮したきめ細かな指導は困難な現状がうかがえる。病院や診療所では計測や超音波検査、内診など妊婦の移動が多く、医師に聞きたいことがあっても、言い出せないままに帰っている現状も報告されている。医療者と妊婦のコミュニケーションを図る体制の構築が必要である。

##### 2. 待ち時間が長くて疲れる

病院・診療所では妊健時間は短い半面、待ち時間が長く、河合<sup>2)</sup>の調査で待ち時間は平均49.9分で、長いところでは2時間も待つ施設があるという。待ち時間は60分以上になると負担感が強くなり、60分以上待った人では「妊健にいくと疲れる」という気持ちを75%が感じていた。そこで予約制により待ち時間を短くする工夫や、待ち時間を利用した個別相談やアロマセラピー、音楽セラピーなどのサービスを導入することを提案したい。

##### 3. 妊婦の主体性を育む場になっていない

医師の検診では妊娠経過に伴って発症が予測される異常を未然に防ぐことや、早期発見により問題を軽減し除去することが重視される。このことは妊婦に医療の受け手である「患者」としての意識をもたせることになる。そして「自分で産む」という自己責任意識を低下させ、「病院で産ませてもらう」という依存意識をうみ出している。病院で

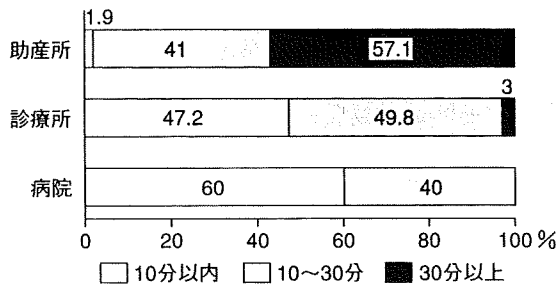


図1 妊婦健診の時間

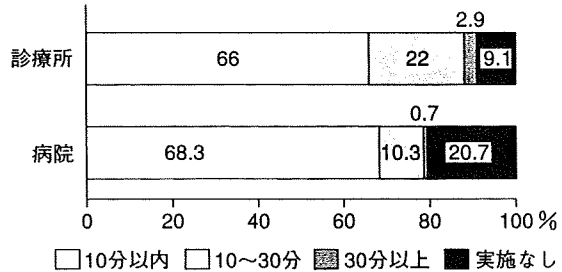


図2 医師の保健指導時間

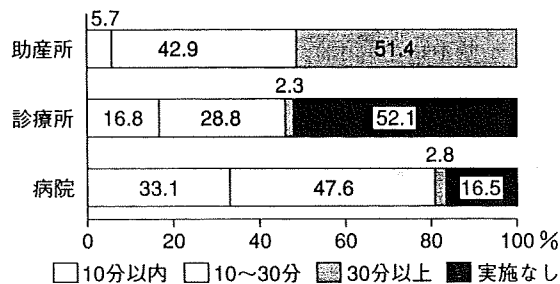


図3 助産師の保健指導時間

の出産は安全であるとの認識があり「無事に生まれて当たり前」と、医療者に「お任せ」で出産を迎える妊婦が多い。その結果、異常への移行は施設や医療者の責任として追及することになる。妊婦の中には自分の妊娠週数を把握していない者や、パンフレットを読むように勧められてもみていない妊婦もいて、自ら学びマタニティライフを管理する妊婦の主体性が育まれていない。安全で満足できる出産のためには、医療者による管理のみでなく、妊婦自らが妊娠経過を理解し、その変化に応じて生活できるように主体的に行動できる能力を育成することが大切である。

#### 4. 正常に経過することの予見の困難性

妊娠・出産は生理的な身体の営みであるが、短時間で異常に転じ、時には妊婦や胎児の死亡に直結することもある。そのため妊娠が正常に経過するであろうローリスク妊婦に対しても、いつでも異常に対応できる体制を整えることが求められる。妊婦とともにリスクスコアをチェックし、どのような状態でも対応でき、医療処置などの出来事をポジティブに受け止めることができる柔軟な

心をもたせることが大切である。しかし、リスクの予見は時に妊婦の不安を増強し、妊娠を躊躇することにもなりかねないので、医療者は丁寧に説明し納得させておく必要がある。

#### 5. 助産師の妊婦へのかかわりの希薄化

助産師は「助産及び妊産じょく婦の保健指導をなすことを業とする」と法に規定された専門職である。しかし、我が国の出産が施設分娩に移行してから、外来で妊健を助産師が行うことは少なく、妊健時の保健指導は弱体化している。河合<sup>2)</sup>の調査によると、病院・診療所で助産師と対話した者は、「助産外来・院内助産で話せた」15%、「診察後の保健指導で話せた」32.7%と約半数である。しかし、助産外来の印象は、「質問しやすい」93.6%、「信頼できる」93.6%、「励まされる」96.8%で、助産師が妊健にかかわることの有用性は明らかであり、妊娠中に少なくとも数回は助産師による個別的な保健指導の体制を作りたい(表1)。

診療所などで助産師が不足していれば、地域の助産師と連携して妊健を担当させ、保健指導を充実させることも一法である。産後うつや虐待の予防など妊娠期からの精神・心理的サポートの強化を、妊健の再構築として検討していく時期にあると考える。助産外来は全国的に普及しつつあるが、担当助産師には一定の能力(表2)が必要で<sup>3)</sup>、筆者らは平成20年より助産実践能力強化研修モデル事業<sup>4)</sup>を実施して育成のあり方を検討している。現在の医療システムでは、助産師が妊婦に継続してかかわることは困難である。まして、個別にかかわる時間は少なく、妊婦の生活や心理的

表1 助産師と話せる場はあったか(河合, 2008)<sup>2)</sup>

回答者	診察項目			
	助産外来で話せた	診察後保健指導で話せた	助産師はいたが話せなかった	助産師はいなかったようだ、いるかどうか分からない
2005年前の出産者(250人)	9.2%	36.4%	40.4%	14.0%
2006年出産者(239人)	14.6%	36.8%	35.6%	13.0%
2007年出産者(394人)	15.0%	32.7%	42.1%	10.2%
妊娠中の人(185人)	20.5%	22.2%	38.9%	18.4%

表2 助産師外来担当者の必須能力(中林, 2008)<sup>3)</sup>

- 確実な問診, 聴診, 触診技術
- 母体・胎児の健康状態のアセスメント
- スクリーニング能力
- 妊婦のニーズの把握と情報の選択
- 妊娠中のトラブルやリスクへの対応能力
- 異常発生時の対処能力
- 妊婦・家族とのコミュニケーション能力
- 関係者・部署との連携能力

な経過などを把握するのは困難で、断片的なかかわりになっている。今後、精神・心理的側面や社会・経済的支援をするための助産師の継続的なかわりができる体制作りが必要である。

## 6. 溢れる情報に戸惑う妊婦

インターネットや商業誌による情報は妊婦の情報源であるが、情報過多で漠然とした不安をもつ者もいる。例えば、情報の中から自分の生活や考えに近いものだけを選択したり、不安で眠れなくなったりなど、情報に振り回されている感もあり、マタニティライフの自己管理能力が乏しい傾向がある。情報の取捨選択を支援するために、個々の妊婦の成長やニーズを把握しながら保健指導することが有用である。筆者は、マタニティスイミングで週に約2時間、さまざまな妊娠週数の妊婦とかかわっている<sup>5)</sup>が、妊娠週数が進むにつれて彼女らが逞しく成長する姿は、まるで「青い柿が真っ赤に熟していくよう」であり、それは出産に向けて心と体が成熟していく過程になっている。ジャグジーと一緒に入り、妊娠・出産の具体的な経過や、心身の準備についてミニレクチャーをし、具体的な質問にも答えている。彼女らには漠

然とした不安は少なく、質問は具体的で問題発生時には一つずつ解決しながら、むしろ楽しみながら妊娠期を過ごしている者が多い。そして「分娩中に『マクロパーツの体位をとりましょうか』とって医師を驚かせてしまいました」など主体的に取り組んだ報告を受けている。

## 7. 医療介入を必要とする妊婦の増加とその影響

ハイリスク妊婦の増加は助産師の正常経過の妊婦へのかかわりや健康な妊娠経過を送るための保健指導の機会を減少させている。妊娠が順調であることが確認できれば、妊娠は数分で終了となり、マタニティライフを楽しく、妊娠の喜びを高め、体力をつけるなど、いわばウェルネスを志向した指導は省略される。事実、「妊娠は毎回数分で終わるものでした。その割には高額の費用がかかり、1回くらい受けなくても…と思うこともありました<sup>2)</sup>と語るローリスク妊婦の生の声も報告されている。本来の妊娠の目的は正常の経過をよりよいものにする支援であり、今後ローリスク妊婦へのかかわりを強化していく必要がある。

## おわりに

妊娠期は出産・育児に向けた準備期間として大切であり、その時期をどう過ごすかは出産後の育児においても重要である。まず、妊婦が主体的に心身の健康管理を行うことが大前提で、妊娠はそのための拠点場所として妊婦のセルフケア行動を育む場となっていくことが望まれる。そこでは医療者と妊婦が同じ目線で妊娠・出産を語り、よいお産を目指した目標を共有する必要がある。そのためのツールの一つとして母子健康手帳の活用を

勧めたい。母子健康手帳は妊娠届出時に交付されるので、これを妊婦は常に持参して医療者と情報を共有し、妊娠前には自己チェックして現在の心身状態を把握し不安・心配なことがあればあらかじめメモして準備し、医療者は妊婦の状態に応じて必要な情報を提供し、質問に答え、不安をなくすように対応する。そのように妊娠が医療者と妊婦の双方向の対話の時間となり、温かい関係性が醸成されれば、医療者と妊婦の信頼関係はさらに深まるものと考えられる。

文献

1) 鈴木江三子, 平岡敦子, 蔵本美代子, 他: 平成 15 年

- 11月1日～平成16年2月末日: 日本における妊婦健診の実態調査. 母性衛生 46(1): 2005
- 2) 河合 蘭: 聞いて下さい! 1,100人の妊婦母親の声. 助産雑誌 62(7): 612-619, 2008
- 3) 中林正雄: 助産師外来のあり方と意義. 母子保健情報 58: 30-32, 2008
- 4) 齋藤益子, 福島裕子, 遠藤俊子, 他: 「厚生労働科学研究費補助金 子ども家庭総合研究事業 分娩拠点の創設と産科二次医療圏の設定による産科医師の集中化モデル事業 助産師活用班モデル研修報告書」, 2008
- 5) 木村好秀, 齋藤益子: マタニティスイミング, よいお産に向けての活動, 未来にひろがる助産師活動, わたしたちだから, できること. ペリネイタルケア 351 2008年夏季増刊: 142-145, 2008

\* \* \*

小児内科

第42巻第1号 (2010年1月号) (定価 4,515円)

発行 東京医学社

特集 小児の発疹の診かた

小児の皮膚の特徴 .....	阿南 隆	魚鱗癬 .....	秋山真志
皮膚症状の見分け方, 記載法 .....	石川 治	ジベルバラ色秕糠疹 .....	高橋健造
皮膚症状から鑑別診断へ .....	新関寛徳	虫刺症・虫咬症 .....	夏秋 優
かゆみのメカニズム .....	生駒晃彦	伝染性膿痂疹 .....	西本周平
皮膚写真の撮り方 .....	堀口裕治	丹毒 .....	友野順章
発疹の特徴と病態生理, 治療		伝染性軟属腫 .....	八田尚人
湿疹 .....	相原道子	白癬, 皮膚カンジダ症 .....	田中壯一
アトピー性皮膚炎 .....	馬場直子	溶連菌感染症 .....	西 順一郎
蕁麻疹 .....	岩本和真	麻疹 .....	日野治子
多形滲出性紅斑 .....	二神綾子	風疹 .....	宮崎千明
結節性紅斑 .....	岡本祐之	伝染性紅斑 .....	五十嵐敦之
膠原病にみられる発疹 .....	山崎雄一	突発性発疹 .....	中井英剛
血管性紫斑病 .....	中原剛士	水痘, 帯状疱疹 .....	庵原俊昭
川崎病にみられる発疹 .....	古川福実	単純ヘルペスウイルス感染症 .....	菅田 健
薬疹 .....	塩原哲夫	エンテロウイルス感染症 .....	日野治子
汗疹 .....	嵯峨賢次	EBウイルス感染症 .....	脇口 宏
新生児瘡瘡 .....	赤松浩彦	Gianotti-Crosti 症候群 .....	藤澤知雄
尋常性瘡瘡 .....	宮地良樹		

## II. 分担研究報告書

産科合併症発症予知マーカーの開発

## 母体血漿遺伝子を用いた妊娠高血圧症候群の予知

研究分担者：関沢明彦 昭和大学医学部 産婦人科学教室 准教授

### 研究要旨

妊娠高血圧症候群の発症に、妊娠初期の絨毛細胞の酸化ストレス、それによる抗血管増殖因子の産生増加が重要な役割を果たしていると考えられているが、平成 20 年度は、母体血漿中 cell-free RNA を用いて抗血管増殖因子などの遺伝子発現量を定量することで妊娠高血圧症候群の発症予知が高精度に可能なことを示してきたが、今年度は、母体血細胞成分中の抗血管増殖因子や抗酸化因子の mRNA の発現を評価することで同様に、発症予知が高精度に可能なことを示した。さらに、母体血中には胎盤から剥脱した絨毛細胞が循環していて、母体血を用いて妊娠中の絨毛細胞の病態変化を無侵襲的に評価可能なことが明らかになった。この研究成果を実際の発症予知システム開発に結びつけるため、今回解析した遺伝子群に、さらに数種類の遺伝子を加え、約 50 遺伝子について microarray で一度に定量できるシステムを作成し、次年度の患者検体を用いた検討に備える予定である。

### A. 目的及び背景

妊娠高血圧症候群は、妊娠初期の絨毛細胞の母体脱落膜への侵入障害と関連している。正常妊娠では、絨毛が脱落膜のラセン動脈の血管内皮を置換することで血管抵抗が低下し、絨毛間腔に多量の母体血が流入する。しかし、絨毛細胞の侵入障害が起こると絨毛間腔の酸素分圧は十分に上昇せず、また変動も大きいため、絨毛は低酸素負荷及び酸化ストレスを受ける。この環境で絨毛細胞は抗血管増殖因子の産生を増加し、それらが母体血中を循環し血管内皮障害の原因になると考えられる。そこで今回、このような絨毛の病態変化を母体血の細胞成分中から抽出した RNA で評価可能なことを確認するため、まず、我々は、妊娠高血

圧症候群を発症した症例と妊娠週数が相応し、正常経過を呈した症例で、遺伝子発現の変化を検討した。検討した遺伝子は、血管増殖因子関連遺伝子である vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor 1 (VEGFR1, FLT-1), Endoglin (ENG), placenta growth factor (PlGF), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)と酸化ストレス関連遺伝子である heme oxygenase-1 (HO-1), HO-2, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT)である。

母体血から分離した細胞成分から RNA を抽出し、逆転写した後、real-time PCR 法でそれらの遺伝子発現量を定量し、それらの定量値とその患者の臨床症状を比較し

た。その結果、妊娠高血圧症候群の患者血中で、測定した全ての遺伝子発現が、正常に妊娠経過している妊婦と比較し、有意な変化を示した。また、妊娠高血圧症候群の重症化に伴いそれぞれの発現量が増強し、HELLP 症候群ではさらに大きな変化を示した(1-4)。そこで、臨床症状のない妊娠15-20週の妊婦でこの変化が同定できるかを検討するため、研究1を行った。つぎに、酸化ストレスが妊娠高血圧症候群の病態に重要な役割を果たしているとの仮説から、妊娠初期からの妊婦にビタミンC及びEの抗酸化剤を投与するランダム化比較試験(RCT)を行い、投与中の細胞成分RNA発現量をモニターし、その効果および効果発現のメカニズムの評価を研究2で行った。

## B. 対象・方法

**研究1**：妊娠15週から20週の臨床症状がない妊婦から末梢血を採取し(n=683)、その後妊娠高血圧症候群を発症した症例(n=62)としなかった症例で、上記の遺伝子発現量を定量し、発症予知の可能性を検討した。この研究は、インドネシア大学で倫理委員会承認の下、患者から同意を得て血液を採取した。血液は凍結保存し、日本に輸送後、昭和大学でヒトゲノム倫理委員会の承諾の下、RNA解析を行った。

**研究2**：インドネシア大学病院を妊娠のため受診した妊婦を対象に、妊娠10週以前の段階で末梢血を採取し、SOD活性を測定した。SOD活性が基準値より低い症例を酸化ストレスありと考え、研究対象にした。対象となった妊娠高血圧症候群のハイリスク妊婦は、妊娠週数をもとにランダム化し、プラセボ群とビタミン群(ビタミンC

1000mg/day+ビタミンE 400 単位/day)に振り分け、妊娠12週から分娩開始まで薬剤投与を継続し、両群の妊娠予後を比較した。また、薬剤投与から4週間以上経過した妊娠16週頃に採血を行い、遺伝子発現の変化を評価した。

この研究は、インドネシア大学で倫理委員会承認の下、患者から同意を得て検討を行った。血液は凍結保存し、日本に輸送後、昭和大学でヒトゲノム倫理委員会の承諾の下、RNA発現解析を行った。

## (倫理的な配慮)

本研究は、昭和大学とインドネシア大学の共同研究であり、両大学の倫理委員会の承諾の下、患者より文書による承諾を得て行っている。また、患者個人を識別できるデータは両大学間で共有されていない。

## C. 研究結果

**研究1**：妊娠15-20週の合併症のない683人の妊婦から血液を採取し、妊娠高血圧症候群をその後に発症した症例(n=62)と合併症なく正常に妊娠経過した症例のうち、統計学的に1:5マッチでランダムに選んだ310例で遺伝子発現量を定量した。

その結果、FLT1、ENG、P-selectin、PLAC1は妊娠高血圧症候群をその後に発症した群で高値を示し、逆に、PIGFとHO-1は低値を示した。TGF-β1、VEGF、SODには有意な変化は見られなかった。ROC curveを用いて妊娠高血圧症候群の発症予知の可能性について解析したところ、ENGが、次いで、FLT1が特に優れた妊娠高血圧症候群の予知マーカーであることが分かった。さらに、ENG、FLT1、PIGFと経産

か否かの4因子の組み合わせで、妊娠高血圧症候群の66%が、疑陽性率10%で予知可能であることがわかった(5)。

**研究2**：インドネシア大学と共同で妊娠10週以前にインドネシア大学を妊娠で初診した妊婦を対象に、妊婦血清中のSOD活性を測定し、その活性が低値で酸化ストレスがあると推定される妊婦324例を対象に、同様にビタミン群とプラセボ群に分けるRCTを行った。その結果、軽症妊娠高血圧症候群の発症がビタミン群でオッズ比0.372と有意に低下することを証明した。また、抗酸化剤投与後4-8週経過した時点で測定した母体血液中細胞成分由来mRNA発現の検討で、HO-1及びSOD発現は上昇し、抗血管増殖因子のENG発現は低下していた(論文投稿中)。

#### D. 結論

母体血漿中 cell-free RNA (6)や母体血細胞成分中 RNA を評価することで、いままで“Black Box”であった胎盤の機能的な変化が real-time にモニターできることが確認された。この方法により、妊娠高血圧症候群の発症予知のみではなく、その他の妊娠合併症の予知も可能と考えられる。さらに、妊娠高血圧症候群やその他の妊娠合併症の病態形成メカニズムの研究にも応用できると考えられる。この方法を用い、胎盤の機能解析の研究が進歩することで、妊娠中の各種合併症の病態が解明され、それらを基にそれらの新しい治療法や予防法の開発が期待される。

次に、妊娠高血圧症候群の発症予防の研究については、酸化ストレスがある妊娠高

血圧症候群のハイリスク妊娠において、抗酸化剤が胎盤局所の酸化ストレスを軽減し、その状態がENGの産生を増加させない方向で働いたことを確認した。

このことは、妊娠高血圧症候群のハイリスク妊娠において抗酸化剤が胎盤局所の酸化ストレスを軽減し、その状態がENGの産生に抑制的に働いたことを示している。さらに、この結果は妊娠高血圧症候群の病態に酸化ストレスが強く関与し、そのストレスがENG産生増加に関与し、それが血管内皮障害の発症につながっていることを直接証明する画期的なものであり、今後、妊娠高血圧症候群の発症予防に道を拓くものと考えられる。

#### 〈来年度の課題〉

上記研究1は、インドネシア大学との共同研究で、妊娠高血圧症候群の発症率の高いインドネシアでの結果である。平成20年度以降、日本人の妊娠初期から中期の血液をサンプリングしており(cell-free RNA と cellular RNA)、日本人のサンプルでも同様の結果が導き出せるかを検討していきたい。

さらに、現在は遺伝子発現の定量に real-time PCR 法を用いているが、多くの遺伝子の発現を定量するために、時間とコストがかかるため、その予知法としての臨床応用に限界がある。そこで、50種類程度の遺伝子発現量を同時に定量する microarray system を構築し、同一条件での遺伝子発現定量を行い、その値から妊娠高血圧症候群の発症のリスク値を実際に算出できるモデルシステムの開発を行いたいと考える。



G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura M, Sekizawa A, Purwosunu Y, Okazaki S, Farina A, Wibowo N, et al. Cellular mRNA expressions of anti-oxidant factors in the blood of preeclamptic women. *Prenat Diagn* 2009;29:691-699.
2. Purwosunu Y, Sekizawa A, Yoshimura S, Farina A, Wibowo N, Nakamura M, et al. Expression of Angiogenesis-Related Genes in the Cellular Component of the Blood of Preeclamptic Women. *Reprod Sci* 2009;16:857-64.
3. Sekizawa A, Purwosunu Y, Yoshimura S, Nakamura M, Shimizu H, Okai T, et al. PP13 mRNA expression in trophoblasts from preeclamptic placentas. *Reprod Sci* 2009;in press.
4. Shimizu H, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nakamura M, Farina A, Rizzo N, et al. PP13 mRNA expression in the cellular component of maternal blood as a marker for preeclampsia. *Prenat Diagn* 2009;29:1231-1236.
5. Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Shimizu H, Nakamura H, Wibowo N, et al. Prediction of preeclampsia by an analysis of placenta-derived cellular mRNA in the blood of pregnant women at 15-20 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 2010;in press.
6. Purwosunu Y, Sekizawa A, Okazaki S, Farina A, Wibowo N, Nakamura M, et al. Prediction of preeclampsia by

analysis of cell-free messenger RNA in maternal plasma. *Am J Obstet Gynecol* 2009;200:386.e1-386.e7.

2. 学会発表

1. 6<sup>th</sup> International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS-VI) Hong Kong Nov 9-11, 2009  
Prediction of preeclampsia by analysis of placenta-derived cellular mRNA in the blood of pregnant women at 15-20 weeks of gestation  
Nakamura M, Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Okai T
2. 3<sup>rd</sup> SGI International Summit 2009: Preeclampsia  
Nov 12, 2009 Sendai, Japan  
Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free mRNA in maternal plasma  
Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Saito H, Okai T
3. 3<sup>rd</sup> SGI International Summit 2009: Preeclampsia  
Nov 14, 2009 Sendai, Japan  
Antioxidant supplementation for prevention of preeclampsia in low-antioxidant status of pregnant women  
Purwosunu Y, Sekizawa A, Farina A, Wibowo N, Okai T
4. 59<sup>th</sup> Meeting of American Society of Human Genetics  
Oct 22, 2009 Honolulu, Hawaii  
Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free mRNA in maternal plasma  
Sekizawa A, Purwosunu Y, Farina A, Saito H, Okai T

H. 知的財産権の出願・登録状況

予定なし

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

**Prediction of preeclampsia by an analysis of  
placenta-derived cellular mRNA in the blood of  
pregnant women at 15-20 weeks of gestation**

Akihiko Sekizawa<sup>1</sup>, MD, Yuditiya Purwosunu<sup>1,2</sup>, MD, Antonio Farina<sup>1,3</sup>, MD,  
Hanako Shimizu<sup>1</sup>, MD, Masamitsu Nakamura<sup>1</sup>, MD, Noroyono  
Wibowo<sup>2</sup>, MD  
Nicola Rizzo<sup>3</sup>, MD, Takashi Okai<sup>1</sup>, MD

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of  
Medicine, Tokyo, Japan  
<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University of Indonesia, Cipto  
Mangunkusumo National Hospital, Jakarta, Indonesia  
<sup>3</sup>Department of Histology and Embryology Division of Prenatal Medicine,  
University of Bologna, Bologna, Italy

**Correspondence to:** Akihiko Sekizawa, MD, PhD  
Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of  
Medicine  
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666, Japan  
TEL: +81-33784-8551  
FAX: +81-33784-8355  
E-mail: [sekizawa@med.showa-u.ac.jp](mailto:sekizawa@med.showa-u.ac.jp)

**Running Title:**  
Cellular mRNA in maternal blood can predict the onset of preeclampsia

30 **ABSTRACT**

31 **Objective:** A panel of cellular mRNA markers was used to predict the  
32 occurrence of preeclampsia in pregnant women at week 15-20.

33 **Design:** Prospective cohort study

34 **Setting:** The Department of Obstetrics and Gynaecology, University of  
35 Indonesia, at Cipto Mangunkusumo National Hospital, Indonesia

36 **Samples:** Peripheral blood samples from asymptomatic pregnant women

37 **Methods:** Among 660 women, 62 cases developed preeclampsia at later  
38 gestation (preeclampsia group) and each case was matched with 5 controls.

39 Therefore, the RNA expressions in the cellular component of maternal blood  
40 in 62 cases of preeclampsia group were compared to those of 310 controls.

41 **Main outcome measures:** Cellular RNA expression levels of genes  
42 related with angiogenesis and oxidative stress were compared between  
43 preeclampsia and control groups. A Receiver Operating Characteristic (ROC)  
44 curve was used to analyze the sensitivity of each available marker. A logistic  
45 regression analysis was performed to calculate the odds for each patient to  
46 be classified as a case.

47 **Results:** The univariate ROC analysis identified soluble vascular  
48 endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1) and endoglin (ENG) as the  
49 markers with the highest sensitivity. The best multivariable model was  
50 obtained by combining Flt-1, Endoglin, placenta growth factor (PlGF) and  
51 parity. The relative ROC curve yielded a sensitivity of 66% at a 10%  
52 1-specificity rate with an area under the curve of 0.884 ( $p < 0.001$ ).

53 **Conclusion:** A panel of cellular mRNA in maternal blood can predict the  
54 development of preeclampsia long before clinical onset.

55

56 **Key words:** Cellular RNA; prediction; preeclampsia; Flt-1,  
57 endoglin

58

## 58 INTRODUCTION

59           Despite advances in perinatal care, preeclampsia (PE) is the most  
60 common cause of maternal and perinatal mortality and morbidity  
61 worldwide.<sup>1</sup> Recently, anti-angiogenic factors, such as soluble vascular  
62 endothelial growth factor receptor-1, which is known as sFlt-1, and soluble  
63 endoglin (sENG) are both produced in the placenta and have been shown to  
64 play important roles in the pathogenesis of PE<sup>2-5</sup>.

65           Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a pro-angiogenic factor  
66 and causes vasodilatation through the production of nitric oxide and  
67 prostacyclin<sup>6-8</sup>. Since Flt-1 combines with VEGF and placenta growth factor  
68 (PlGF) and the serum level of soluble Flt-1 increases in pregnant women who  
69 develop PE<sup>3</sup>, the free PlGF and free VEGF in the maternal serum thus  
70 decline prior to the development of PE<sup>4</sup>. Another anti-angiogenic factor is  
71 Endoglin (ENG), which regulates the endothelial nitric oxide synthase  
72 activity and local vascular tone<sup>9</sup>. Venkatesha *et al.* reported that the  
73 placenta is a major source of soluble ENG during pregnancy, and that ENG  
74 is up-regulated in the preeclamptic placenta, releasing soluble ENG into the  
75 maternal circulation, which correlates with the severity of PE<sup>5</sup>.

76           Although the molecular mechanism regulating the production of Flt-1  
77 and ENG in the placenta is unknown, it is suggested that hypoxia or  
78 oxidative stress of trophoblasts is associated with the production of these  
79 factors. Li *et al.* reported the up-regulation of Flt-1 to be associated with  
80 increased oxidative stress as a consequence of hypoxia in placental  
81 trophoblasts <sup>10</sup>. Heme oxygenase-1 (HO-1) is known to have antioxidant,  
82 anti-inflammatory and cytoprotective functions. HO-1 is an oxygen sensor  
83 and its expression is inducible under hypoxic conditions <sup>11</sup>. Although low  
84 HO-1 levels in the placenta results in an abortion<sup>12</sup>, the up-regulation of  
85 HO-1 by adenoviral administration works protectively during pregnancy<sup>13</sup>.  
86 Furthermore, PE is associated with diminished placental HO levels <sup>14</sup>.  
87 Moreover, the adenoviral overexpression of HO-1 inhibits the soluble ENG  
88 release in placental villous explants, while also inhibiting the Flt-1  
89 production in endothelial cells<sup>15</sup>.

90           Therefore, anti-angiogenic and anti-oxidative factors are considered to  
91 play a crucial role in the pathogenesis of PE. These placental alterations in  
92 women who develop PE in later gestation are thought to begin during the  
93 first trimester when extravillous trophoblasts remodel into the endothelial

94 cells of the spiral arteries. The *in vivo* alteration of gene expression has been  
95 observed in the 1<sup>st</sup> trimester-trophoblasts from pregnant women who  
96 destined to develop PE later to confirm this hypothesis <sup>16</sup>. This study  
97 prospectively collected tissue samples of villous trophoblasts at the time of  
98 fetal karyotype analysis through chorionic villous sampling (CVS), and  
99 assessed the mRNA expression of these genes. The results revealed that the  
100 expression levels of Flt-1, ENG, VEGF, and TGF- $\beta$ 1 were significantly higher  
101 in the CVS tissues from pregnant women who later developed PE whereas  
102 the levels of PlGF, HO-1, and superoxide dismutase (SOD) were lower<sup>16</sup>.  
103 These findings suggest that the expression of genes associated with  
104 angiogenesis and reduced anti-oxidant stress have crucial roles in the  
105 pathogenesis of PE, and that measurement of the expression of these factors  
106 in the maternal blood may enable the prediction of the onset of PE.

107 Fetal/placental RNA circulates in the maternal plasma and it has  
108 enabled the development of several promising approaches for non-invasive  
109 evaluation of placental function<sup>17,18</sup>. Subsequently, cell free RNA  
110 concentrations of VEGF, Flt-1 and ENG were assessed in the plasma of  
111 women with and without PE <sup>19</sup>. These transcripts increased in the plasma of

112 preeclamptic patients and correlated positively with disease severity. An  
113 additional study of postpartum samples found the mRNA transcripts to  
114 decrease rapidly after delivery, thus suggesting the majority of the  
115 transcripts to be derived from the placenta/fetus<sup>19</sup>. To prove the possibility of  
116 predicting PE by cell-free RNA, the expression of 7 genes including Flt-1,  
117 ENG and VEGF were assessed in the plasma of pregnant women between 15  
118 and 20 weeks, and found that this panel allows an 84% prediction rate for  
119 PE with a 5% false positive rate at gestational week 15-20 by means of a  
120 discriminant analysis model. This finding indicates that the analysis of  
121 cell-free RNA is a highly promising method to evaluate alterations in  
122 placental function<sup>20</sup>.

123       The expression of placenta-specific genes, such as hPL and hCG, has  
124 also been shown to be detectable in the cellular component of maternal blood,  
125 and the mRNA concentrations of hPL and hCG correlated with the protein  
126 assay<sup>17</sup>. Furthermore, the cellular mRNA concentration was approximately  
127 10-times greater than maternal plasma RNA<sup>17</sup>. These findings indicate that  
128 some trophoblasts and placental debris circulate in the blood of normal  
129 pregnant women and that analysis of the cellular component of maternal



130 blood may be more ideal for evaluating alterations in placental function  
131 than maternal plasma analysis. Therefore, because the gene expression of  
132 anti-angiogenic factors and anti-oxidant enzymes are associated with the  
133 pathogenesis of PE, the cellular RNA expression in the blood from  
134 asymptomatic pregnant women during the early second trimester were  
135 analyzed to compare the mRNA levels with the clinical outcomes.

136

136 **MATERIALS AND METHODS**137 ***Subjects***

138           This study was performed as part of a series along with previously  
139 reported studies <sup>19-22</sup>. The study was designed as a prospective cohort study  
140 in early pregnant women (gestational week 15-20) who visited the  
141 Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Indonesia, at Cipto  
142 Mangunkusumo National Hospital, Indonesia from mid-2005 to 2006.  
143 Singleton pregnant women without any pre-existing medical diseases at  
144 screening or antenatal complications at the time of blood drawing were  
145 invited to participate in the cohort. The pregnancies were dated by  
146 ultrasound which was performed during the first trimester. All women  
147 provided informed consent to participate in the study, which was approved  
148 by the Research Ethics Committee of both University of Indonesia and  
149 Showa University.

150           Of the 683 women enrolled, 23 who had incomplete information about  
151 the outcome, whose pregnancy ended before 20 weeks, or who experienced  
152 stillbirth were excluded. Among the remaining 660 women, 62 developed PE.  
153 Each case was matched with 5 controls of same gestational age at the time

154 of blood testing (within 1 week and ranging from 15-20 weeks), maternal  
155 weight and fetal gender. Therefore 62 women who developed PE and 310  
156 controls with a normal course of pregnancy were enrolled in the study. In the  
157 control group, we excluded cases with fetal growth restriction (below -1.5  
158 S.D.) based on Japanese fetal growth curve  
159 ([www.jsum.or.jp/committee/diagnostic/diagnostic](http://www.jsum.or.jp/committee/diagnostic/diagnostic)). No special management  
160 or treatment other than antenatal care was provided before the clinical signs  
161 of PE presented. If abnormalities of blood pressure and/or proteinuria were  
162 found, then the patients were recommended to admit themselves to the  
163 hospital.

164 Mild and severe PE and hemolysis, elevated liver enzymes, and low  
165 platelets (HELLP) syndrome were defined as described in a previous report  
166 <sup>22,23</sup>. In brief, preeclampsia was defined as gestational hypertension (systolic  
167 pressure  $\geq 140$  mmHg or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg on  $\geq 2$  occasions  
168 after gestational week 20) with proteinuria ( $\geq 0.3$  g/day). Severe  
169 preeclampsia was defined by the presence of  $\geq 1$  of the following: 1) severe  
170 gestational hypertension (systolic pressure  $\geq 160$  mmHg or diastolic blood  
171 pressure  $\geq 110$  mmHg on  $\geq 2$  occasions after gestational week 20); or 2) severe

172 proteinuria ( $\geq 5$  g protein in a 24-h urine specimen or  $\geq 3$  g in two random  
173 urine samples collected  $\geq 4$  h apart).

#### 174 ***Processing of blood samples***

175       The peripheral blood samples (2.5 mL) were collected in PAXgene  
176 blood RNA tubes (PreAnalytic, Hombrechtikon, Switzerland) and kept at  
177 room temperature for three hr, and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until they were  
178 transported to Japan at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The molecular analysis was performed in the  
179 Department of Obstetrics and Gynecology at Showa University School of  
180 Medicine, Tokyo, Japan. RNA extraction was performed according to  
181 protocols described elsewhere <sup>24</sup>. In brief, cellular component samples were  
182 centrifuged twice at 4,000 g for 10 min at room temperature in order to  
183 remove the entire supernatant and any mRNA present in residual plasma.  
184 The pellet was then washed, re-suspended, and incubated in optimized  
185 buffer solution containing proteinase K to digest protein. A second round of  
186 centrifugation was performed to remove any residual cell debris, and the  
187 resulting supernatant was transferred to a fresh microcentrifuge tube.  
188 Thereafter, 100% ethanol was added to the supernatant to adjust the  
189 binding conditions, and the resultant lysate was then applied to a PAXgene