

博士論文

胎盤機能評価に有用な新規指標の探索

西森 裕美子

目次

1. 目次	2
2. 概要	3
3. 略語一覽	4
4. 序文	6
5. 目的	23
6. 検討課題 1 方法	24
7. 検討課題 1 結果	29
8. 検討課題 2 方法	33
9. 検討課題 2 結果	41
10. 考察	61
11. 謝辞	70
12. 引用文献	71

概要

周産期予後を予測できる新たな指標の探索として、妊娠初期の子宮内腔体積、ATX-LPA シグナル経路に着目して研究を行った。子宮内腔体積は妊娠週数に応じた変化を示したが、周産期予後との関連性を確認することはできなかった。

血清 ATX 値は胎盤での産生を反映して妊娠中は週数の経過と共に上昇する。正常妊娠における妊娠中期の血清中の ATX 濃度は、分娩時の胎児胎盤重量比との間に負の相関関係を示した。一方で遅発型妊娠高血圧症候群の妊娠では妊娠後期に正の相関を認めた。また、血清 ATX 値は酸化ストレス度と相関しており、in-vitro 実験において ATX が酸化ストレス刺激で誘導されて、酸化ストレスの減弱に寄与することが示唆された。これらの結果から、血清 ATX 濃度は酸化ストレス集積に伴う胎盤機能障害を反映したバイオマーカーとして有用である可能性がある。

略語

ATP: adenosine tri phosphate

ATX: autotaxin

BAP: biological antioxidant potential

BMI: body mass index

BPR: birth weight/placental weight ratio

CRL: crown rump length

CT: cytotrophoblast

dROM: diacron reactive oxygen metabolites

EVT: extravillous trophoblast

FBS: fetal bovine serum

Flt-1: fms-like tyrosine kinase-1

sFlt-1: soluble fms-like tyrosine kinase-1

hCG: human chorionic gonadotropin

HDP: hypertensive disorders of pregnancy

hPL: human placental lactogen

IMDM: Iscoves modified dulbecco' s media

KDR: kinase insert domain receptor

LPA: lysophosphatidic acid

LPAR: LPA receptor

PlGF: placenta growth factor

ROS: reactive oxygen species

ROI: region of interest

SOD: superoxide dismutase

ST: syncytiotrophoblast

ULV: uterus Luminal Volume

VEGF: vascular endothelial growth factor

VOCAL: virtual organ computer-aided analysis

序文

1-1. 胎盤形成と胎児発育について

胎盤は、子宮内の胎児と母の間の栄養素およびガス交換を媒介する哺乳類に特有の特殊な臓器である。胎盤の形状に基づく分類として散在性胎盤(ブタ、クジラ、イルカなど)、帯状胎盤(犬、猫など)、多胎盤(反芻類)、盤状胎盤(齧歯類、霊長類)がある(1)。一方で解剖学的構造からは有胎盤哺乳類の胎盤は絨毛細胞の子宮内膜への侵入の程度に応じた分類がされる。絨毛細胞の浸潤がほとんどなく子宮内膜と接するだけの上皮絨毛性胎盤(epitheliochorial placenta)から、結合織絨毛性胎盤(syndesmochorial placenta)、内皮絨毛性胎盤(endotheliochorial placenta)の順番に絨毛細胞の侵入の程度が強まり、最も侵入の程度が強く子宮壁内の血管内まで絨毛細胞が侵入するものを血絨毛性胎盤(hemomonochorial placenta)と呼んでいる(1, 2)。ヒトを含む霊長類やげっ歯類の胎盤は血絨毛性胎盤である(1, 2)。血絨毛性胎盤では胎児側の絨毛細胞が母体側の上皮は間質組織を介することなく母親の血液と直接接触することにより、より効率的な物質交換が可能になる。妊娠期間中は胎児由来抗原に対する母体免疫系の反応が回避されて免疫寛容が誘導

され、絨毛細胞と母体細胞の間の調和的な相互的細胞間応答が生じていると考えられている(3)。そうした妊娠中の母児間の相互的分子機構の破綻は絨毛細胞機能および胎盤機能の障害を生じて様々な妊娠異常を誘発することとなる(3)。

ヒトにおいて受精後 4.5 日目に胚は外壁を形成する外細胞塊と内側の胚子極に形成された内細胞塊からなる胚盤胞という構造を取る。外細胞塊は栄養膜細胞 (trophoblast) へと分化しつつ胎盤を形成し、内細胞塊は胎芽・胎児へと変化する。この栄養膜細胞はさらに、合胞性栄養膜層 (Syncytiotrophoblast: ST) と細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast: CT) に機能分化を生じ、また、一部の絨毛外栄養膜細胞 (Extravillous trophoblast: EVT) と呼ばれる一群の細胞は子宮壁内に浸潤してゆく(3)。CT は増殖しつつ互いに融合して ST へと機能分化し絨毛と呼ばれる樹状の構造を形成する。絨毛表面は母体血との物質交換を行う ST により被覆されて、その内側に CT が配列された 2 層構造を形成する。また、同時に EVT が子宮壁の栄養血管であるらせん動脈内まで浸潤して血管構造を変化させることにより胎盤内への母体血の循環血液量が増加して、その後の胎児発育を支えるのに必要な能力を有する胎盤が形成される。胚盤胞が着床してからの 1 週間程度は胚子を取り囲んで全周性に絨毛が存在するが、その後 2 週間程度の間には子宮壁に浸潤して行く部分の絨毛が急速に樹状に発達して厚

みのある円盤状(Discoid type)構造となり、一方でそれ以外の部分は退縮して絨毛膜となる。妊娠 20 週頃までに解剖学的な胎盤構造が確立して、その後に胎児発育が加速して行く。正常な妊娠では妊娠満期には胎児重量は日本人では 2500-3500g 程度であり、胎盤重量は 400-600g 程度となる。そうした適切な胎児の発育となるように絨毛発育、胎盤のサイズおよび機能が調整される何らかのメカニズムがあることが示唆されるがその詳細な機序は未解明である。

1-2. 胎盤機能評価について

胎盤機能の評価を行うことは、医学的な妊娠管理において重要であり、胎児発育の予測、分娩時期の決定などに有用とされる。また、妊娠高血圧症候群、一部の胎児発育不全、流早産などでは胎盤の障害を病理背景として生じることが知られており、胎盤機能評価がそうした疾患の病態把握に必要となる。胎盤は母体-胎盤循環の調整、内分泌学的制御、ガス・物質交換、母児間の水分量調節、免疫学的バリア（感染防御、母児間の免疫応答）機構など多面的な役割を果たしている。これらの個々の役割が相互的に働くことで、胎盤にとって最も重要な機能である胎児発育の制御に寄与している。胎盤による胎児発育制御の状態を評価するための代表的なアプローチとして、超音波検査による計測、各種の生化学的バイオマーカー測定が挙げられる。

超音波検査では、Bモードによる胎児計測による胎児発育の評価、胎盤サイズの計測、羊水量評価、超音波ドップラー技術を応用した臍帯血管、子宮動脈の血流評価などが胎盤機能の推定に関係するとされている。中でも羊水量の計測は母体-胎児間の水分調整という胎盤の中核的機能を反映した重要な評価法とされる。主に妊娠後半期以降に羊水量の評価を行う事が多いが、正常妊娠で

も個人差が大きく、また胎児の先天的疾患により異常が生じる場合もあり、胎盤機能のみを純粹に反映しているわけではない。

胎盤機能評価のための生化学的バイオマーカーとしては、絨毛細胞から分泌されるホルモンであるヒト絨毛性ゴナドトロピン(human chorionic gonadotropin ; hCG)、ヒト胎盤性ラクトーゲン(human placental lactogen ; hPL)や、胎児の副腎や肝臓の働きを介して胎盤で産生されるエストリオール(estriol ; E3)があり母体末梢血中の濃度測定が行われてきた(4)。胎盤から母体血中に分泌された hPL は抗インスリン作用、血中脂肪酸の増加作用を有し、母体での糖・脂質代謝を修飾して胎児発育に寄与する因子とされる(5)。hPL は妊娠 6-8 週頃から検出され($1 \mu\text{g/ml}$)、その後緩やかに漸増し妊娠末期に最高値($7-15 \mu\text{g/ml}$)に達し、分娩後に検出以下まで低下する。妊娠末期に hPL が $4 \mu\text{g/ml}$ 以下であると、胎盤機能不全による胎児発育不全や子宮体胎児死亡の発生が高率になると考えられている(4)。しかし、hPL に基づいた評価・臨床的対応では母体・胎児の予後の改善には結びついていない。また、出生児体重と胎盤重量の比である birth weight/placental weight ratio(BPR)は胎盤機能を表す数値として、また Developmental Origins of Health and Disease(DOHaD)の観点でも重要な指標となる可能性があり再注目されている(6)。しかし、日本での標準値の報告はされていない。

Vascular endothelial growth factor (VEGF)は強力な血管新生因子であり、絨毛細胞が産生する VEGF およびその関連因子の働きが胎盤-子宮血管系の構築の制御に深く関与することが知られている。VEGF の類縁分子である Placenta growth factor (PlGF)は胎盤に特異的な産生が知られており、VEGF の働きを補助して胎盤血管形成を促進する因子と考えられている。VEGF および PlGF は血管内皮細胞上に発現する fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) および Kinase insert domain receptor (KDR) により作用を発揮するが、Flt-1 には同一の遺伝子の可変的スプライシングにより生じる可溶性の soluble Flt-1 (sFlt-1) が存在し、VEGF や PlGF と結合してそれらが膜型受容体に結合するのを阻害して生理的アンタゴニストとして作用する(7)。絨毛細胞からは PlGF および sFlt-1 が放出されて胎盤局所の胎盤-子宮血管系の発達が制御されている。後述のように近年、胎盤形成障害に伴う子宮-胎盤循環の異常が生じると、絨毛細胞における sFlt-1 産生上昇、PlGF 産生低下によって、結果として母体末梢血中の濃度として sFlt-1/PlGF 比が妊娠高血圧症候群 (Hypertensive Disorders of Pregnancy; HDP) では上昇していることが明らかとなっている(7)。そのため、sFlt-1 および PlGF を中心として VEGF 関連因子は胎盤機能評価のための重要なバイオマーカーとして認識されており、特に HDP の発症予知マーカーとしての意義が確立している。

1-3. 羊水量調節機構と胎盤機能

羊水は羊膜腔を満たしている液体の事であり、初期には無色透明であるが、中期以降は胎脂や胎児の皮膚上皮細胞を含むため、やや混濁している。妊娠後半期の羊水量は妊娠中の胎児、胎盤の状態を反映する指標として臨床上計測が行われてきた。最も広く行われる方法は Amniotic Fluid Index である。これは子宮を 4 分割した区域に分けてそれぞれの区域の羊水最大深度 (cm) の和を羊水量の指標として用いる (8)。5cm-24 cm が正常範囲であり、妊娠 20 週以降に用いられる。胎児尿は妊娠 8-10 週頃から産生が始まり、その産生量は妊娠 20 週以降になると胎児腎の成熟に伴って急激に増加し、妊娠末期には 1 日あたり 400-1200ml に達する。妊娠 20 週以降には胎児尿が羊水の中心的な産生源となる。また、同時期に胎児の羊水の嚥下量が増加するため、胎児の嚥下量と尿量のバランスが妊娠後半期の羊水量を規定する中心的な要素となり妊娠後半期の羊水量は胎児の羊水嚥下および尿量による影響が大きいことが知られている。妊娠中の羊水量は妊娠初期では個人差が小さいが、妊娠中期以降は個人差が大きく、妊娠 32 週期前後で羊水量はピークを迎え、以降は分娩時まで少しずつ減少していく事が知られている。(図 1) (9) 一方で、妊娠前半期には胎児のサイズが小さいこともあり、嚥下や尿量の過少による影響は乏しく、むしろ胎盤表

面や胎児皮膚を介した水分の移動が、子宮内腔の水分量の規定因子とされている(10)(図2)。しかし、妊娠前半期(20週未満)での子宮内腔の水分量推定のための確立した指標はなく、また、その時期の子宮内腔の水分量とその後の胎盤機能や周産期予後との関係については知見が乏しい。本研究では妊娠初期の子宮内の水分量調整の指標として3D超音波による子宮内腔体積測定値を選択した。妊娠初期(特に妊娠16週ごろまで)は卵膜の3層構造の中で羊膜と絨毛膜が互いに接着せず分離した状態にあり、子宮内腔を満たす水分は、胎児を含めた羊膜内の空間である羊水腔と羊膜外外で子宮壁の間の胚外体腔に分かれて存在する。そのため、子宮内腔体積は胎児、羊膜腔、胚外体腔を合わせた体積となる(図3)。胎盤血流量の状態および角化していない皮膚や臍帯・羊膜(胎盤表面)など、膜を介した羊水から胎児への水の移行の総称である intramembranous absorption の総合的な指標としては、羊水腔よりも胚外体腔も合わせた全体の水分量が適切と考えられる。そして、妊娠初期には胎児発育の個人差が少ないため胎児部分を包含した計測を行っても、子宮内水分量の推定への影響が乏しいと考えられる。さらに、羊膜は非常に薄く、妊娠初期に羊膜腔のみを測定することが困難であることから、子宮内腔体積の方が羊膜腔よりも臨床上簡便に計測できる指標としては望ましい。こうしたことを踏まえて本研究では子宮内腔体積を子宮内の水分量の指標として検討を行った。

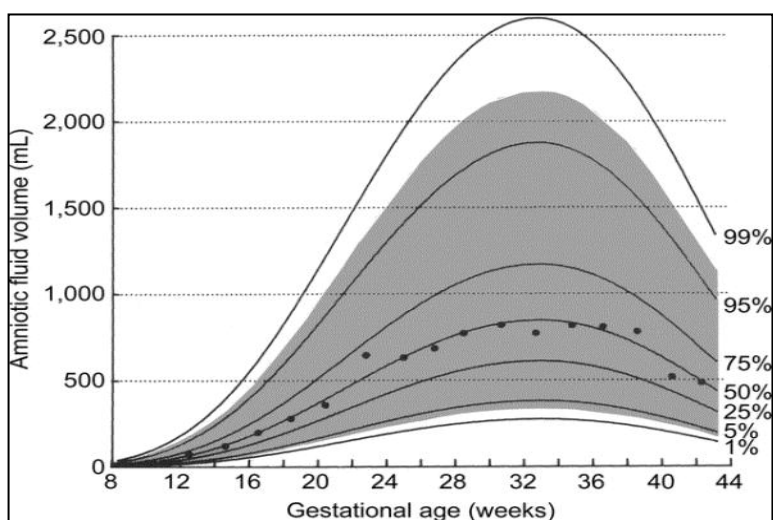


図1 妊娠週数と羊水量の推移 (Normal amniotic fluid volume changes throughout pregnancy Brace, R. A. Wolf, E. J.)

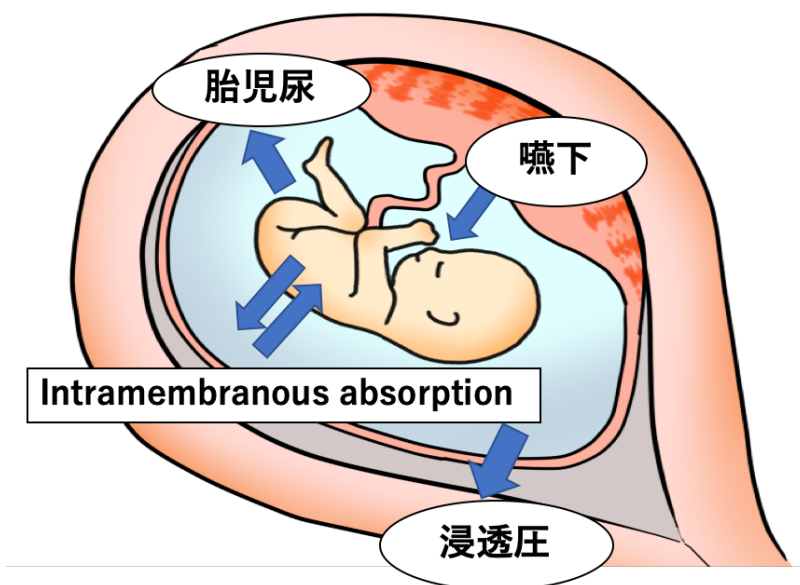


図 2 : 子宮内水分量の調整機構

子宮内の水分量(羊水量)を規定する因子を図に示す。

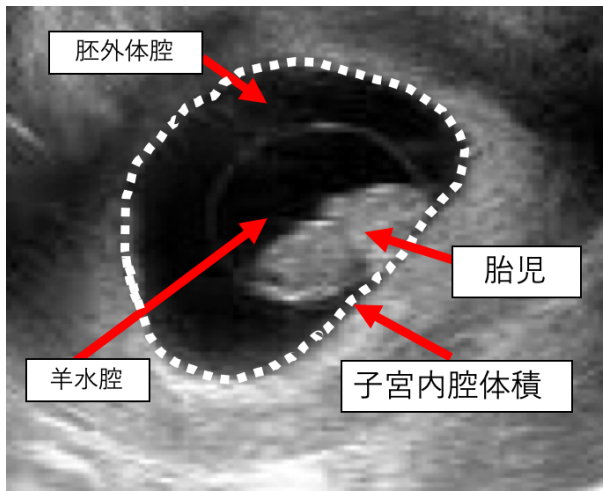


図3：妊娠8週の胎児の超音波画像

羊膜と絨毛膜が接着しておらず、胚外体腔と羊水腔が分かれており、二つを合計したエリアを子宮内腔体積と定義した。

1-4. 胎盤機能障害と妊娠高血圧症候群の関係

妊娠時期を問わず母体に高血圧を認めた場合を妊娠高血圧症候群 (Hypertensive disorders of pregnancy : HDP) と呼ぶ。HDP は全妊婦の約 6% ~11% に発生する頻度の高い周産期異常である。しばしば胎児発育不全を合併し、重症化すると、HELLP 症候群、子癇を含めた脳血管障害、腎不全、肺水腫など母体の全身的な臓器障害を続発して母児の生命に関わる状態を引き起こす (11)。HDP 発症の原因となる病理因子として、胎盤の形成障害と母体の血管内皮細胞障害の 2 つが重要とされる (12)。胎盤形成過程において、前述のように EVT と呼ばれる一群の絨毛細胞が子宮壁およびらせん動脈血管壁に侵入し、子宮壁血管構造を再構築して、ラセン動脈は拡張して子宮胎盤血流量が増加する。HDP では遺伝的要因、免疫学的異常、環境因子など様々な因子が誘因となり、EVT の浸潤が浅くらせん動脈の再構築が不十分となり、子宮-胎盤循環の障害が妊娠初期に発生しているとされる。その結果、妊娠中期以降になると、胎児側の需要に足るガス・物質交換が行われず、胎盤内で相対的な虚血・低酸素状態が引き起こされる。これにより、胎盤局所での酸化ストレスの増大、炎症性サイトカイン産生が生じて、細胞障害性物質が胎盤から母体循環へ放出されて母体の全身臓器において血管内皮細胞障害を引き起こす (12)。また前述のよ

うに HDP 胎盤では sFlt-1、PlGF を含めた VEGF 関連因子の産生異常が母体血管機能障害を増悪させる (7)。

1-5. オートタキシン-リゾホスファチジン酸シグナル経路

リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) は細胞膜のリン脂質の生合成の際に一過性に産生される代謝産物であり、グリセロール骨格に一本の脂肪酸とリン酸が結合した構造を有する。LPA は単なる脂質代謝の中間体ではなく脂質メディエーターとして様々な生理活性を発揮することが知られている (13)。

LPA の産生過程を図 5 に示す。活性化した細胞の細胞膜から遊離したグリセロリン脂質はホスホリパーゼ A の働きによりグリセロール骨格から 1 本の脂肪酸が切断されてリゾグリセロリン脂質が形成される、この時、活性化した細胞から分泌蛋白オートタキシン (autotaxin: ATX) が放出されている。この ATX はリゾホスホリパーゼ D 活性を有しておりリゾグリセロリン脂質の極性頭部を切断して、LPA が産生される (14)。LPA は細胞膜上に存在する特異的受容体を介して、シグナルを伝達して生理活性を発揮する (15)。

LPA の産生に関わる ATX は、別名 ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase2 (Enpp2) と呼ばれる 125kDa の蛋白酵素である。ATX は当初メラノーマ細胞の上清から分離され、オートクライン運動性促進因子として知られていた。その後、リゾホスホリパーゼ D 活性を有して LPA の産生酵素であることが知られるようになった。またオートタキシンの発現亢進は悪性腫瘍、動脈硬化、肝障害、肺線維症、糖尿病、神経因性疼痛など様々な疾患と関連すると言われている。

ATX のヘテロ欠損マウス (Enpp2^{+/-}) では、血漿中の LPA 濃度が半分になること、抗 ATX 抗体による血中の ATX の活性を阻害すると完全に LPA 産生抑制されるという事実から、細胞外の LPA 産生は完全に ATX に依存していることが知られている (16)。

LPA 受容体 (LPA receptor: LPAR) はこれまで LPAR1 から LPAR6 まで 6 種類の受容体が同定されておりいずれも G タンパク質共役型受容体の構造を有する (15)。各受容体の発現状態は臓器によって異なっている。発現している受容体の種類の違いにより LPA シグナルが発揮する影響が規定されている。中枢神経系では LPAR1 の発現が優位であり、LPAR1 欠損マウスでは中枢神経の発生異常が生じる (17) とされており、LPAR2 は白血球に高発現である (18)。LPAR3 は精巣、子宮内膜、胎盤など生殖臓器に比較的発現が特異的とされ、LPAR3 欠損マ

ウスは着床障害をきたすことが報告されている(19)。また LPAR6 は毛髪の発育に重要な役割を持つことが分かっている(20)。

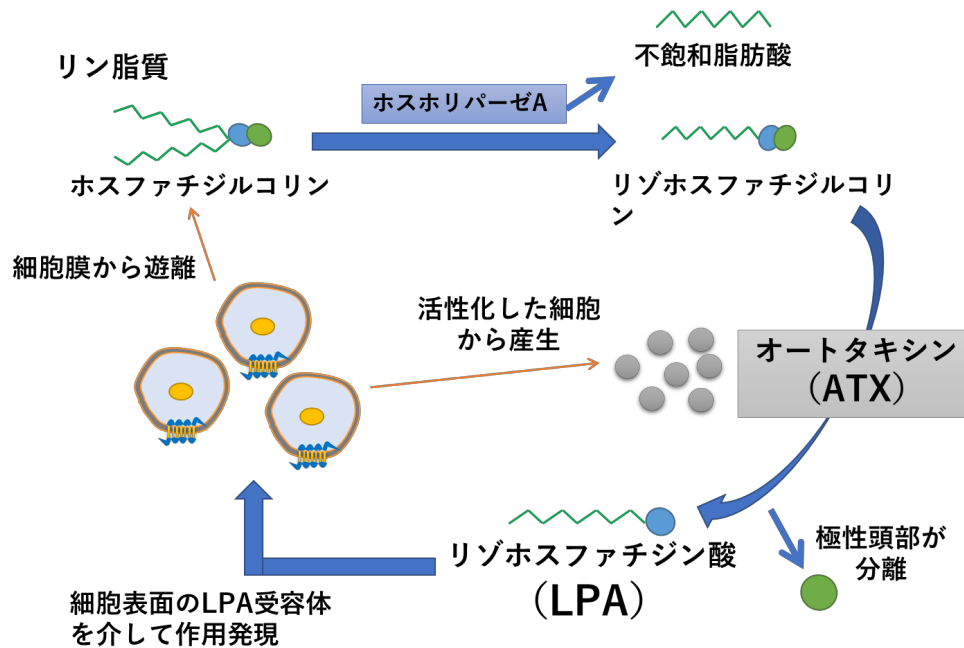


図 5: 組織局所での LPA の産生経路とシグナル伝達

細胞膜から遊離したリン脂質から ATX を介して LPA が産生され、細胞表面の特異的 LPA 受容体を介してシグナル伝達が生じる一連の流れを模式図に示す。

1-6. ATX-LPA シグナルと胎盤機能

本論文の筆者が所属する藤井知行教授の研究室における先行研究では、胎盤内では絨毛細胞を中心として豊富な ATX 産生が行われており、妊婦の末梢血中では非妊娠時と比較して非常に高濃度の LPA および ATX が検出されることを見

出している(21)。そして、絨毛細胞では LPAR1-6 がいずれも発現しており、CT から ST および EVT への機能分化に伴い発現が増強することを確認してきた。また、HDP を発症した妊婦の中で、妊娠 34 週未満での早発型の HDP 妊婦では、ATX の胎盤内での産生および末梢血中の濃度が低下していた(22)。またさらに、絨毛細胞における LPAR の発現について HDP 胎盤内では LPAR3 の発現が増加していることを見い出してきた。これらのことから、ATX-LPA シグナルは胎盤局所で絨毛細胞機能と深い関係があること、そしてそのシグナルシステムの異常が HDP 発症の背景機序に関わることが示唆されている。しかし、ATX-LPA シグナルが胎盤機能にいかなる影響を有するのかという点、絨毛細胞における ATX 産生の制御機構については不明である。

1-7. 酸化ストレスと胎盤機能

ミトコンドリアで酸素を利用して酸化的リン酸化反応により生体のエネルギー源となるアデノシン三リン酸(Adenosine tri phosphate: ATP)が産生される一連の反応過程において、消費される酸素の約 2%がスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過酸化水素、一重項酸素などの活性酸素種(reactive oxygen

species: ROS)へ変換される(23)。集積した ROS は膜脂質の過酸化反応、蛋白質の変性、DNA 損傷などを誘導して細胞機能の障害を引き起こして、老化を促進し、また脳卒中や動脈硬化(24, 25)、悪性腫瘍の発生(26, 27)など種々の疾患リスクの上昇につながることが知られている。生体には ROS を消去するための内因性の抗酸化物質 (superoxide dismutase;SOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオン、アスコルビン酸、トコフェロール、 β -カロテン、ポリフェノール類) が存在している(28)。酸化ストレスとは、ROS の産生と消去のバランスが産生側の過剰状態に傾いた状態である。また ROS の生成は、ミトコンドリア内のエネルギー産生過程での発生だけでなく、アレルギーや炎症、殺菌過程における好中球やマクロファージの活性化による NAD(P)H オキシダーゼやミエロペルオキシダーゼの活性化でも起こっており、大気汚染物質や紫外線、喫煙などによっても生成されている(29)。

胎盤では妊娠期間を通じて胎児-母体間の物質交換のための活発な細胞活動が行われそこでは多くの ATP 産生が必要となり、それに対応すべく活発な酸素消費と ROS の発生が生じている(30)。そのため、酸化ストレスの増大を回避して胎盤機能を維持する上で胎盤内の抗酸化システムは重要な働きを担うと考えられる。妊婦の全身的な酸化ストレスを見た研究によると、妊娠中は非妊娠時に比較して酸化ストレスの程度が上昇していることが知られている(30)。ま

た、HDP 胎盤では酸化ストレスの増大が生じていることが報告されており、その機序として、子宮-胎盤血管系の再構築異常に由来した、胎盤局所での虚血—再環流による ROS の増加が示唆されている (31, 32)。しかし、正常妊娠における胎盤内での ROS の制御機構、そしてその制御機構と HDP 胎盤内に生じている酸化ストレス増加との関連については未解明の点が多い。妊娠中の酸化ストレスと HDP 発症との関係図を以下に示す (図 4)。

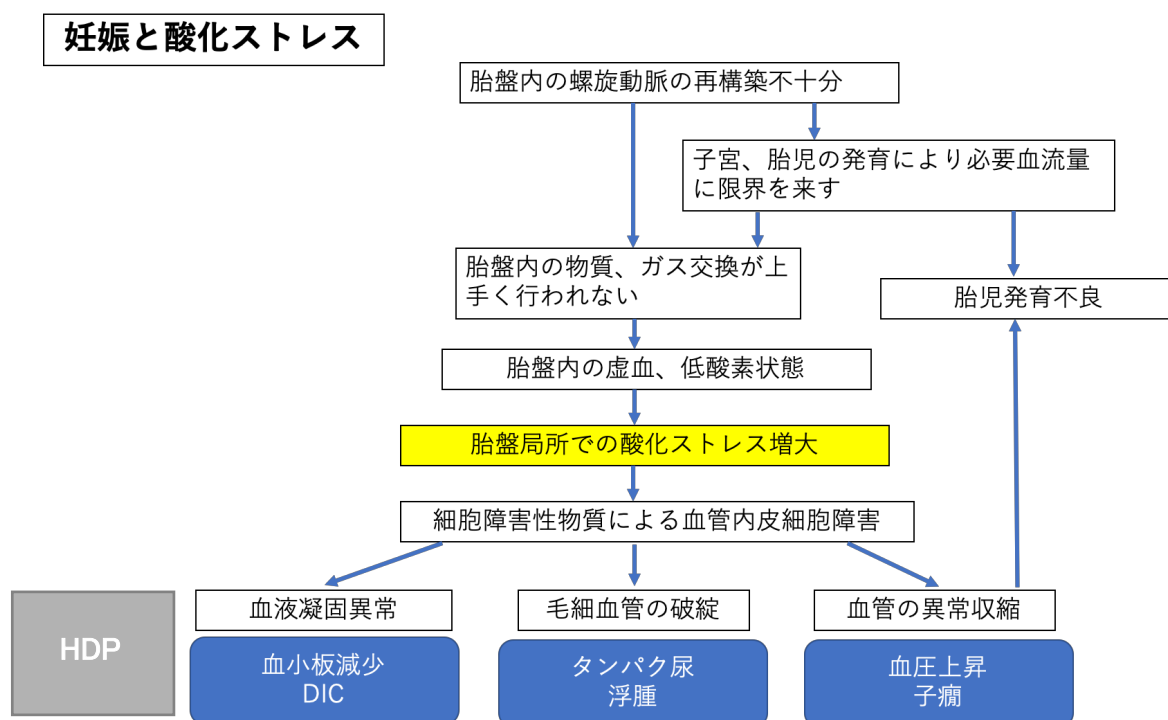


図 4 妊娠中の酸化ストレスと HDP 発症機序について

目的

本研究は胎児発育を支える胎盤機能の評価のために有用な新規の臨床的指標を見出すことを目的として下記の2つの課題について検討した。

検討課題1 妊娠初期の子宮内腔体積と周産期予後の関連についての検討

妊娠初期の子宮内水分量の推移とその後の母児の周産期予後との関係は不明である。本検討では子宮内腔体積が胎盤機能を反映した指標であるという仮説を設定した。その上で妊娠初期における子宮内腔体積の推移についての標準曲線を作成し、子宮内腔体積とその後の周産期予後との関連を探索した。その結果に基づいて上記の仮説について検証した。

検討課題2 血清 ATX 濃度と胎盤機能との相互的關係および ATX-LPA システムの胎盤内酸化ストレス調節への寄与に関する検討

妊婦の末梢血中に検出される ATX が主に胎盤由来であることを踏まえ、胎児・胎盤発育との関係を正常妊娠および Late-onset HDP 妊娠において調べることで、胎盤機能評価のバイオマーカーとしての意義を検証する。また、妊婦血清を用いた解析および in-vitro での実験により、ATX-LPA シグナルシステムの胎盤内酸化ストレスの制御への関与について解明する。

検討課題 1. 妊娠初期の子宮内腔体積と周産期予後の関連についての検討

方法

東京大学医学部研究倫理委員会の承認の下、患者の文書による説明同意を得て研究を行った。（研究倫理審査番号 10852）

対象

2015年8月から2016年2月の期間に東京大学医学部附属病院の妊婦健診外来に通院中の妊娠8週から妊娠19週の正常単胎妊娠の妊婦81人を対象として、述べ87回の子宮内腔体積の計測を行った。測定時点で多胎妊娠、胎児発育不全、胎児の先天性異常が疑われる妊婦は研究対象から除外した。各妊娠週数の計測サンプル数を表1-1に示す。対象患者の年齢、経産回数、Body mass index (BMI)、また出産後に分娩週数、出生体重、胎盤重量の臨床情報を周産期診療録より抽出した。経産婦の方が妊娠初期の子宮の伸展性が高く、妊娠初期の子宮内腔体積の推移に違いが生じる可能性を考え、初産婦と分けて解析を行った。分娩予定日は最終月経、排卵日あるいは体外受精の胚移植日を基準として決定した。ただし、分娩予定日から算出される妊娠週数が妊娠8週から妊娠10週の間を経膈超音波法による胎児頭殿長(crown rump length: CRL)の観

察値と7日以上のずれがある場合は、CRL値を基準として分娩予定日を修正した。

表 1-1. 妊娠週数毎の子宮内腔体積計測サンプル数

計測時の妊娠週数	全体サンプル数	初産サンプル数	経産サンプル数
8	1	1	0
9	1	1	0
10	6	5	1
11	5	4	1
12	15	8	7
13	20	10	10
14	14	10	4
15	11	8	3
16	8	4	4
17	4	3	1
18	1	1	0
19	1	1	0

子宮内腔体積の計測

妊婦健診時に湾曲アレイトランスデューサを備えた超音波装置 (Voluson S8 もしくは Voluson E8; GE Medical Systems、Austria) を用いて測定を行った。

観察モードを 3D モードに設定し、ROI (Region of interest) ボックスを子宮腔全体を含む位置に配置した。3D データをハードディスクドライブに保存して、妊婦健診後にオフラインで子宮内腔体積の算出作業を行った。子宮内部の羊水腔エリアと胎児の体積を合わせた部位を子宮内腔体積 (ULV ; Uterus Luminal Volume) と称して測定を行った。

子宮内腔の 3D データを、3 つの直交する垂直面としてモニタ上に表示させた (図 1-1) 上で、Virtual Organ Computer-aided Analysis (VOCAL™) 法により行った。VOCAL 法の具体的な手順として、子宮内腔領域をマニュアルトレースしたのち、30 度ごとの矢状断面内の中心軸での回転を行い、これを 6 回繰り返すことで、3 次元の輪郭がディスプレイに表示され、体積が自動的に計算される (図 1-1)。今回の測定は筆者一人で行った。また、VOCAL 法での体積算出は二回以上行い、測定間誤差は 5%以内であった。

周産期予後について

ここでは、妊娠経過中の周産期異常(早産、妊娠高血圧症候群、胎児発育不全)の有無や、分娩週数、出生児体重、胎盤重量の結果を指している。

統計

データ解析は全て JMP Pro14 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。初産婦と経産婦の臨床背景データの比較では t 検定もしくは Mann-Whitney U 検定を用いた。妊娠週数と ULV の相関の解析は最小 2 乗法により近似曲線を決定し、決定係数 (R^2) を求めた。ULV 計測値の近似曲線からのステューデント化残差と出生体重 SD 値、胎盤重量、BPR との間の相関関係の解析では Pearson の積率相関分析を用いた。相関係数の解釈は $0 < |r| < 0.3$ を相関なし、 $0.3 \leq |r| < 0.4$ を相関傾向あり、 $0.4 \leq |r| < 0.7$ を相関あり、 $0.7 \leq |r|$ を強い相関ありとした。また $P < 0.05$ を有意差ありとした。

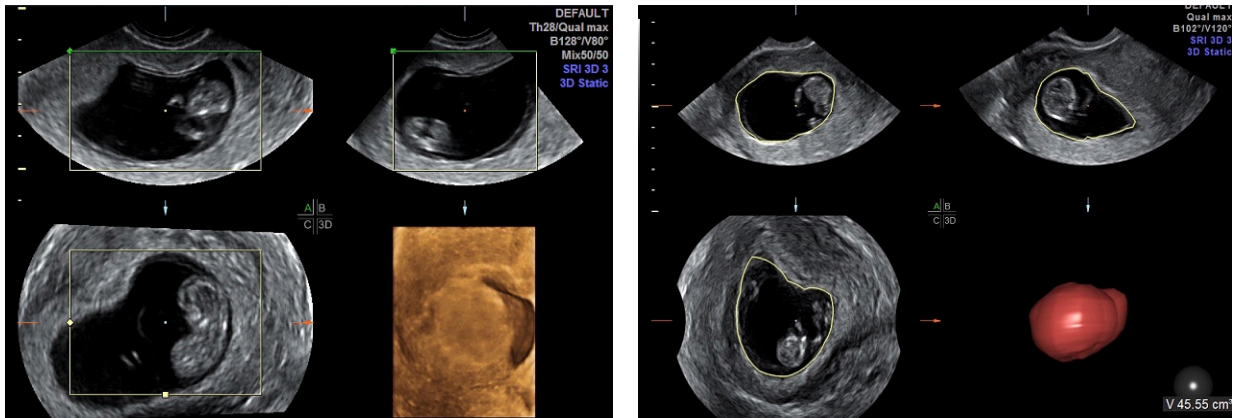


図 1-1. Vocal 法を用いた ULV 測定の様子

左側の図は妊娠 11 週 1 日の妊娠子宮において子宮内腔の 3D ボリュームデータの取り込みを行う様子を示す。矢状断面、前額断面、水平断面の全てで ROI ボックス内に子宮内腔の全体が入るように微調整を行っている。右側の図は保存した 3D データをもとに VOCAL 法により子宮内腔の辺縁をマニュアルトレースしている様子を示す。矢状断面を 30 度ずつ回転させてトレース作業を 6 回繰り返して算出した体積が右下に表示されている。

課題 1 の結果

1. 解析対象者の臨床背景

対象者の臨床背景を表 1-2 に示す。本研究では妊娠 8 週から妊娠 19 週の 81 人の妊婦に行った述べ 87 回の測定サンプルデータを解析対象とした。初産婦は 50 人、経産婦は 31 人であった。平均年齢は対象妊婦全体で 33.0 歳、初産婦で 32.5 歳、経産婦で 33.8 歳と経産婦の方がやや年齢が高かったが二群間に有意差は認めなかった。その他、BMI、分娩週数、出生児体重、出生児体重 SD 値、胎盤重量の 5 つの項目について初産婦、経産婦の間に有意な違いは認めなかった。

表 1-2. 解析対象妊婦の臨床背景

人数	81	50	31	P 値*
年齢(歳)	33.0 ± 6.0	32.5 ± 6.5	33.80 ± 5.0	0.3
BMI	21.1 ± 3.0	21.4 ± 2.8	20.6 ± 3.4	0.34
分娩週数	38.9 ± 2.5	39.0 ± 3.0	38.7 ± 1.4	0.49
出生児体重(g)	2815 ± 910	2821 ± 938	2806 ± 880	0.84
出生児体重 SD 値	0.27 ± 1.08	0.35 ± 1.14	0.13 ± 0.97	0.47
胎盤重量(g)	564 ± 114	557 ± 111	576 ± 120	0.77

* : 初産婦集団と経産婦集団の間の比較による P 値

2. 妊娠週数と ULV の関係

Vocal 法による測定した ULV データを用いて、妊娠週数と ULV の関係について散布図を作成した。図 2 に妊婦全体(A)、初産婦(B)、経産婦(C)のそれぞれの結果を示す。各妊娠時期に応じた ULV を示す 2 次近似曲線は、以下の通りである。

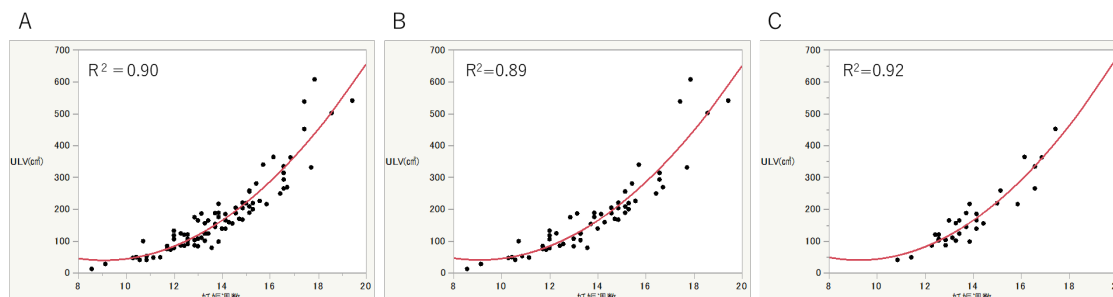
$$\text{妊婦全体 : ULV (cm}^3\text{)} = -527.1 + 49.4 \times \text{妊娠週数} + 5.2 \times (\text{妊娠週数} - 13.9)^2$$

$$\text{初産婦 : ULV (cm}^3\text{)} = -516.3 + 48.6 \times \text{妊娠週数} + 5.1 \times (\text{妊娠週数} - 13.8)^2$$

$$\text{経産婦 : ULV (cm}^3\text{)} = -556.9 + 51.5 \times \text{妊娠週数} + 5.5 \times (\text{妊娠週数} - 13.9)^2$$

さらに、上記の近似曲線の式から計算される各妊娠週数での ULV の値を表 3 に示す。初産婦と経産婦の間での ULV 値の違いは各妊娠週数で ±5%以内であった。以上の結果に加え、図 1 で示した妊娠後半期の正常羊水量の幅の大きさと比較しても、測定を行った期間の妊娠週数における正常妊娠の ULV は、比較的個人差が少ないことが分かった。また、初産婦と経産婦の間での ULV 値の違いは明らかではなかった。

図 1-2. 妊娠週数と ULV の相関



妊娠週数と ULV 測定データの関係の散布図を A. 妊婦全体 (n=87) および B. 初産婦 (n=56) と C. 経産婦 (n=31) に分けたものをそれぞれ示す。各図中の赤い曲線は近似曲線 (2 次) である。各図の左上に R^2 : 決定係数を示す。

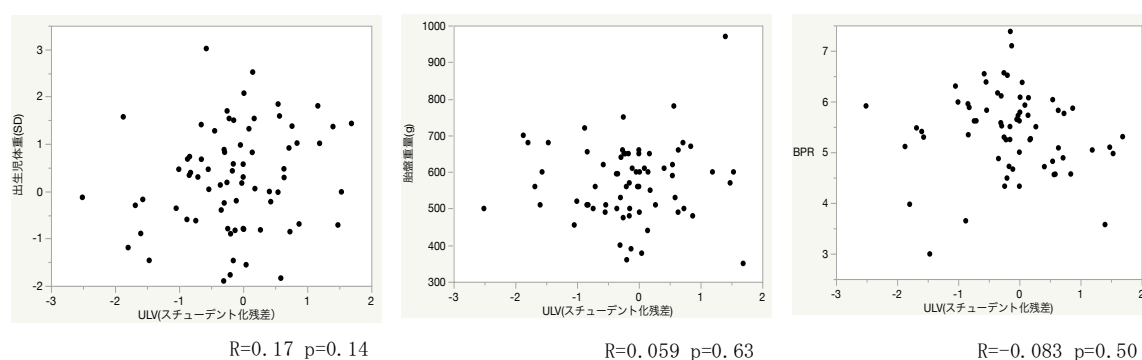
表 1-3. 近似曲線から求めた各妊娠週数の ULV

妊娠週数	全体ULV(cm ³)	初産ULV(cm ³)	経産ULV(cm ³)	初産ULV/経産ULV
8	47.8	44.7	47.2	95%
9	41.5	39.1	39.0	100%
10	45.5	43.8	42.0	104%
11	59.8	58.7	55.9	105%
12	84.4	83.8	80.9	104%
13	119.4	119.1	117.0	102%
14	164.7	164.6	164.1	100%
15	220.2	220.4	222.2	99%
16	286.2	286.3	291.3	98%
17	362.4	362.5	371.5	98%
18	448.9	448.9	462.8	97%
19	545.8	545.6	565.1	97%

3. 妊娠初期の ULV と胎児発育、胎盤重量との関連性

妊娠初期に正常妊娠経過であった妊婦における ULV 計測値の大小とその後の胎児、胎盤発育との関係を調べるため、各 ULV 計測データサンプルと近似曲線との差をステューデント化残差として算出して、このステューデント化残差と出生児体重 SD 値、胎盤重量、胎児胎盤重量比 (birth weight/placental weight ratio: BPR) の相関について検討した。各測定項目では出生体重あるいは胎盤重量に欠損値があるデータは除外している。結果を図 3 に示す。出生体重 SD 値、胎盤重量、BPR のいずれにおいても妊娠初期の ULV 計測値のステューデント化残差との間に明らかな相関は認められなかった。

図 1-3. 妊娠初期 ULV 計測値と分娩時の出生体重、胎盤重量との関係



ULV 計測データサンプルと近似曲線との差をステューデント化残差として算出して、このステューデント化残差と A. 出生児体重 SD 値 (n=75)、B. 胎盤重量 (n=69)、C. BPR (n=67) との関係を示した。各図の右下には R: 相関係数、p 値をそれぞれ記載している。

検討課題2 オートタキシンの胎盤機能調節因子としての意義と、胎盤酸化ス

トレス調節への寄与に関する検討

方法

本研究では、東京大学医学部研究倫理委員会の承認のもと、血清サンプルの収集は患者の文書による説明同意を得て行った。（研究倫理審査番号 10979）BPRの後方視的解析については東京大学医学部研究倫理委員会の承認のもと、アウトアウトによる研究内容の公表を行い実施した。（研究倫理審査番号 3053）

研究対象

血清 ATX 濃度の測定および dROM/BAP 測定では、2016 年 1 月から 2016 年 12 月までの間に東京大学医学部附属病院の妊婦健診で通院した正常単胎妊娠の女性（NP 群：102 人）および late-onset HDP を発症した患者（LH 群：13 人）を研究対象とした。研究室の先行研究で early-onset HDP についての検討があり、発生機序が異なると考えられる late-onset HDP に今回は着目した。双胎妊娠、34 週未満の早産、胎児に先天異常および胎児発育不全を認める妊婦は除外した。Late-onset HDP の診断は 2018 年に改定された日本産科婦人科学会の妊娠高血圧症候群診断基準（JSOG2018）に基づいて行った。

分娩時期と BPR の関係の解析では 2015 年から 2016 年の期間に東京大学医学部
附属病院で管理した 2149 例の単胎妊娠分娩を対象とし、周産期診療記録より
後方視的にデータを解析した。

血清サンプル収集

妊婦健診中に行った規定の採血で採取した検体の残血清を回収した。同一個人
で複数回の血清サンプル保存を行った妊婦が含まれる。本研究では妊娠 16 週
未満を妊娠初期群、16 週以降 34 週未満を妊娠中期群、34 週以降を後期群、分
娩後を産褥期群とした。一部の妊婦では複数回の時期に血清を収集したが、同
一時期中には 1 人 1 回の血清採取を行った。LH 群では妊娠中（妊娠 30 週以
降）から産褥 3 日までの間に 13 人の妊婦から 35 サンプルの血清(2ml)を収集
した。収集した血清サンプルは -80°C で凍結保存した。ATX 濃度測定および
dROM/BAP の測定は凍結サンプルを融解して実施した。

血清 ATX 濃度の測定

本研究における血清 ATX の濃度の測定は中村らが確立した自動化蛍光酵素免疫
測定法 (33) により行った。具体的には二種類の ATX 特異的モノクローナル抗体

(R10.21 および R10.23) を準備して、アルカリフォスファターゼ標識をした R10.21 とペプシン処理により Fc 部部位を除去した R10.23 F(ab) を磁気ビーズにコーティングしたものを作成した。その両者を緩衝液中に混注調整したアッセイ用試薬を作成した。反応カップ内で、血清サンプルをアッセイ試薬と反応させて全自動免疫アッセイ分析装置 (AIA-600II, 東ソー, 東京) を用いてサンプル中の ATX 濃度を測定した。この測定系における同一測定内および異なる測定間の誤差の信頼区間はそれぞれ 3.1-4.6% と 2.8-4.6% であり、非妊娠の健常女性の血清中 ATX 濃度の 95% 基準値は 0.625-1.323 mg/L と報告されている (33)。

dROM、BAP の測定法

凍結保存した血清サンプルを用いて酸化度の指標として dROM (Diacron reactive oxygen metabolites)、還元化力の指標として BAP (biological antioxidant potential) の測定を自動化フリーラジカル解析装置 (FREE Carrio duo: Diacron International 社, イタリア) を用いて行った。dROM 測定では 20 μ l の血清サンプルに pH4.8 の酢酸緩衝液を混合してフリーラジカルに戻し、そのフリーラジカルと反応する呈色液 (N,N-ジエチルパラフェニレン

ジアミン)を混合して発色強度を血清サンプルの酸化度の指標として測定した。BAP 測定では血清サンプル 10 μ l を三価鉄(Fe^{3+})イオン含有の試薬に添加して血清中の抗酸化物質の作用で三価鉄(Fe^{3+})イオンが二価鉄(Fe^{2+})イオンに還元される色の変化の程度を計測し、この血清サンプルの還元力を抗酸化力として評価した。また dROM と BAP の比である Oxidation Stress Index(OSI)を算出し、解析を行った。

絨毛細胞由来細胞株に対する酸化ストレス刺激

栄養膜細胞由来の細胞株である HTR-8/SVneo (以下 HTR と略記) 細胞を 10%FBS-IMDM GlutaMAX(Gibco™ Thermo Fisher Japan, 東京)を培地としてペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液 (和光純薬工業, 東京) を添加して継代培養を行った。酸化ストレス刺激実験に際しては、 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ の濃度に調整した細胞懸濁液を 12-well plate に 1ml/well で播種し、24 時間後に 80%-90%コンフルエントの状態となった時点で培養液を FBS 無添加の RPMI1640 培養液(Gibco™ Thermo Fisher Japan)に交換し、異なる濃度に調整した H_2O_2 を 10 μ l/well 添加した。陰性コントロールでは超純水を 10 μ l/well 添加した。

mRNA の抽出とリアルタイム PCR 法による ATX の発現解析

HTR 細胞に対する H₂O₂ 刺激の 3 時間後に培養液を除去し、Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit (FAVORGEN Biotech, Changzhi, China) を用いて、培養細胞から RNA を回収した。回収した RNA を RT-PCR kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて cDNA に逆転写し、Light Cycler thermal cycler system (Roche Diagnostics) を用いてリアルタイム PCR を行い、 Δ CT 法により目的遺伝子の mRNA 発現量の半定量解析を行った。ATX と SOD の遺伝子からの mRNA 発現量を調べ、内在性コントロール遺伝子として β actin を選択した。PCR 反応液の組成は、サンプル cDNA 3 μ L、SYBR Green Master10 μ L、プライマー f 50 μ M 0.2 μ L、プライマー R 50 μ M 0.2 μ L、Ultra Pure water 6.6 μ L の計 20 μ L/well とした。ATX、SOD、 β -actin のいずれにおいてもアニーリング温度は 58°C とした。全てのサンプルについて融解曲線解析を行い目的の PCR 産物の増幅を確認した。使用したプライマーペアの配列を表 2-1 に示す。

表 2-1 リアルタイム PCR に用いたプライマー配列

目的遺伝子	forward	reverse
ATX	5-GTTGCAAGGAAACCTTTGGA-3	5-CATGGTTGGCCTGAAGGTAT-3
SOD	5-GGTCCTCACTTTAATCCTCTATCCAG-3	5-CCAACATGCCTCTCTTCATCC-3
β -actin	5-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3	5-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3

フローサイトメトリー法による細胞内 ROS の測定

ROS detection assay kit (OZBiosciences, San Diego, CA)を用いて、細胞内の ROS 集積を評価した。その測定原理は、細胞浸透性蛍光プローブ DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) を利用し、細胞内のヒドロキシル、ペルオキシルもしくは他の活性酸素種 (ROS) を検出する。DCFH-DA プローブ は細胞内に散在して、細胞内エステラーゼにより脱アセチル化されて、非蛍光型 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) となった後、細胞内の ROS により酸化されて、2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) に変化して蛍光を発する。そして細胞ごとの蛍光強度をフローサイトメトリー法にて測定して細胞質の ROS レベルを評価した。

12-well plate 上で培養している HTR 細胞の培養液を RPMI1640 無血清培地に交換し、1 時間後に 50mM H₂O₂ 刺激を行い、その 1 時間後に 0.05% trypsin-EDTA

を用いて培養プレートから遊離し、FBS 入り PRMI を添加して trypsin を失活させた後、測定用 tube に回収した。回収した細胞を wash buffer (0.5% BSA を添加した PBS) に懸濁し、FACS Calibur HG フローサイトメーター (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) を用いて 485–535nm のフィルターで蛍光強度を検出した。データの解析は FlowJo™ ソフトウェア内 (Becton, Dickinson and Company) にて行った。

LPA シグナルの影響の確認実験では、LPA (10 μ M) を H₂O₂ 刺激の直前のタイミングで HTR 細胞の培養液中に添加した。LPAR3 を介したシグナルの影響の確認実験では、LPAR3 の特異的 agonist である (2S)-OMPT (1-oleoyl-2-methyl-sn-glycero-3-phosphothionate ammonium salt) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を 500 μ M 濃度となるように H₂O₂ 負荷直前に HTR 細胞の培養液中に添加した。

統計解析

データ解析は全て JMP Pro14 software (SAS Institute Inc.) を用いて行った。妊娠時期ごとの多群間の比較を分散分析で行い、有意差を認めた場合に個々の群間の比較を Tukey-Kramer の HSD 検定で行った。2 変数の相関の解析に

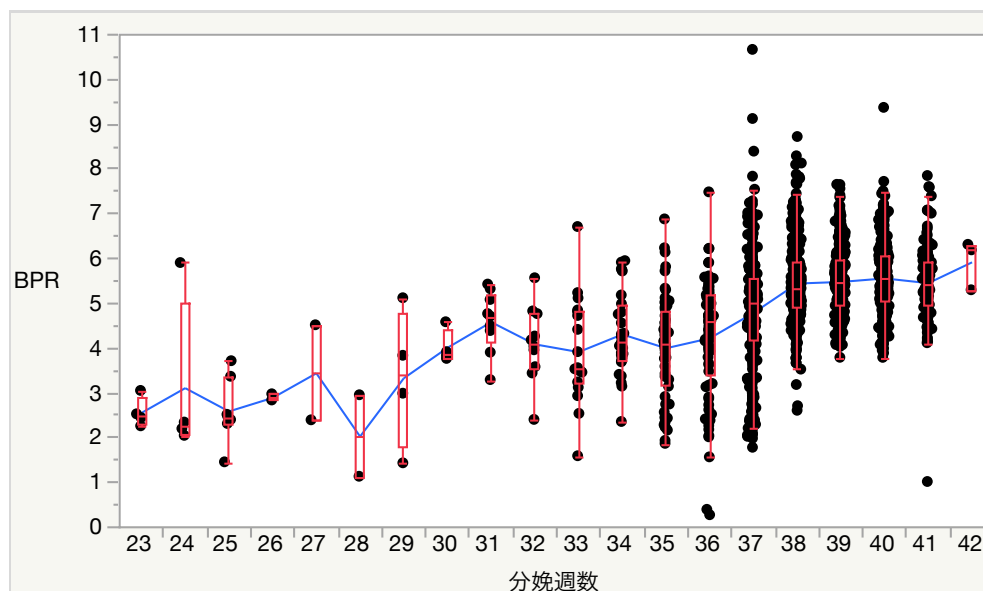
は Pearson の積率相関分析を用いた。HTR 細胞内の遺伝子発現解析ではコントロールと対応あるデータの比較を Wilcoxon の符号付き順位和検定を用いて行った。相関係数の解釈は $0 < |r| < 0.3$ を相関なし、 $0.3 \leq |r| < 0.4$ を相関傾向あり、 $0.4 \leq |r| < 0.7$ を相関あり、 $0.7 \leq |r|$ を強い相関ありとした。また $P < 0.05$ を有意差ありとした。

課題 2 の結果

1. 妊娠時期による BPR の変化

BPRは胎盤機能評価の指標となる。本研究では血清中のATX濃度とBPRとの関係の解析を予定した。そこで先行検討として、妊娠週数毎のBPRの変化について調べた。2149例の単胎分娩の出生体重と胎盤重量のデータを収集して、分娩週数別にBPRを解析した結果を図2-1に示す。サンプル数が比較的多い妊娠31週から41週の期間で見ると、BPRの平均値については、31週から35週の間では4前後で横ばいであるが、35週以降は38週まで緩やかに増加を認め、38週から41週までのBPRは5.5前後で横ばいであった（表2-2）。また、BPRの値は同じ週数であっても個人差によるばらつきが大きいことが確認された。

図 2-1. 分娩週数と BPR の関係



単胎妊娠2149例の診療録分娩データを収集して、分娩週数毎のBPRの散布図を作成した。各週数の赤い箱ひげの四角の中の横線が中央値、上下端が75、25パーセンタイル値、実線の上下端が90、10パーセンタイル値を示す。青い線は各週数のBPRの平均値を結んでいる。

表 2-2 妊娠 31 週から妊娠 41 週の BPR の中央値と平均値

分娩週数	中央値	平均値
31	4.69	4.58±0.68
32	4.09	4.09±0.87
33	3.53	3.91±1.18
34	4.11	4.31±0.94
35	4.08	4.00±1.15
36	4.56	4.22±1.32
37	4.99	4.79±1.33
38	5.33	5.44±0.82
39	5.44	5.48±0.70
40	5.54	5.56±0.73
41	5.43	5.45±0.81

2. 正常妊娠群の臨床背景

妊娠時期と血清 ATX 値の関係を調べるため、正常単胎妊娠から血清サンプルを収集した。妊娠 16 週未満で血清収集した妊婦集団を妊娠初期群、16 週以降 34 週未満で血清収集した集団を妊娠中期群、34 週以降を後期群とした。各妊婦群の臨床背景を表 2-3 に示す。ATX 産生が上昇する妊娠中期-後期にかけての血清 ATX 値がより周産期予後に関与している可能性が高いと考え、この期間の血清サンプルを主に集めたため、各妊娠時期の妊婦数に偏りが出ている。分散分析を用いて各パラメーターについて群間全体の違いを調べたところ、すべてのパラメーターについて群間全体の違いを認めなかった。

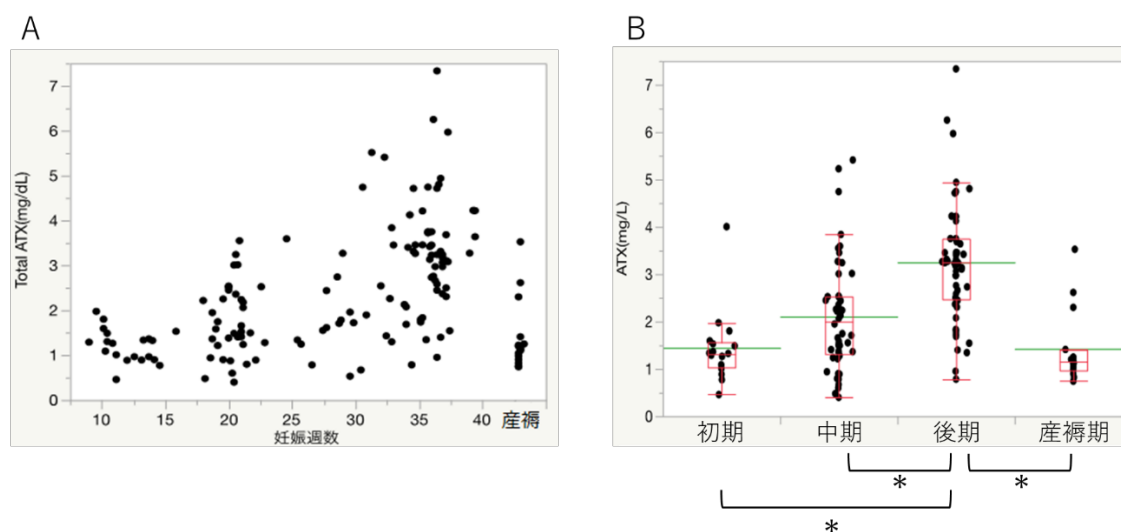
表 2-3 正常妊娠群の臨床背景

	妊娠初期 (妊娠16週未満)	妊娠中期 (妊娠16週以降34週未満)	妊娠後期 (妊娠34週以降)	産褥期
妊婦数	15	54	52	12
母体年齢	35.9 ± 4.6	36.3 ± 4.2	35.5 ± 4.3	34.0 ± 3.1
妊娠初期BMI	21.1 ± 3.7	21.0 ± 3.2	21.2 ± 2.7	19.8 ± 2.0
分娩週数	39.5 ± 1.1	38.0 ± 3.1	38.9 ± 1.4	38.8 ± 1.2
出生児体重(g)	3002 ± 273	2901 ± 515	2929 ± 297	2966 ± 379
出生児体重SD値	-0.036 ± 0.90	0.34 ± 0.76	0.013 ± 0.71	0.15 ± 0.95
胎盤重量(g)	562 ± 63	557 ± 95	554 ± 79	533 ± 45
BPR	5.37 ± 0.51	5.24 ± 0.77	5.35 ± 0.65	5.57 ± 0.66
サンプル採取時の 妊娠週数	11.8 ± 2.0	23.1 ± 4.6	36.3 ± 1.2	全例 産褥1-3日

3. 正常妊娠における妊娠週数と血清 ATX 濃度の関係

正常単胎妊娠から収集した血清サンプル中の ATX 濃度を測定した。妊娠経過と共に血清 ATX 濃度の上昇を認め、産褥期には妊娠初期と同等かそれ以下に低下していた。また妊娠経過と共に、血清 ATX 濃度の個人差のばらつきが大きくなることが確認された(図 2-2 A)。妊娠初期、中期、妊娠後期、産褥期の妊娠時期群別での血清 ATX 濃度の比較を行ったところ妊娠後期の比較において初期、中期、産褥期との間ではいずれも有意差($p < 0.001$)を認めたが、妊娠初期と中期($p = 0.19$)、妊娠中期と産褥期($p = 0.19$)、妊娠初期と産褥期($p = 1$)ではいずれも有意な違いを認めなかった。(図 2-2 B)

図 2-2. 正常妊娠における妊娠時期ごとの血清中 ATX の変化



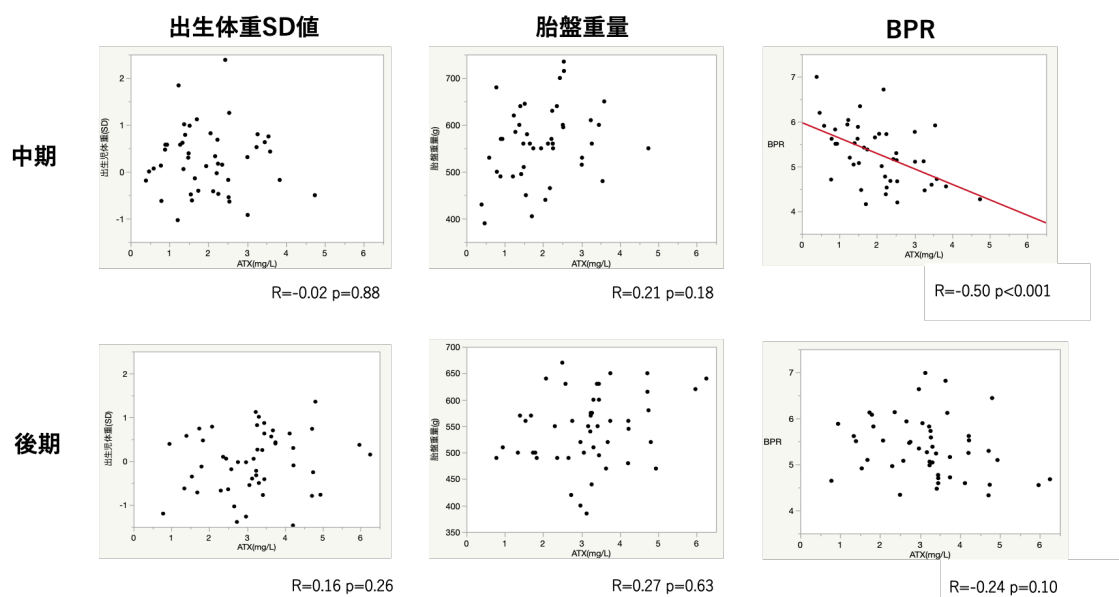
正常妊娠の血清サンプル中の ATX 濃度を方法に記載の方法にて測定して A. 妊娠週数別、B. 妊娠時期群別の結果を示す。測定したサンプル数はそれぞれ妊娠初期 (n=15)、妊娠中期 (n=54)、妊娠後期 (n=52)、産褥 (n=12) である。図 B 中の * : p<0.001。図 B の緑実線は各群の平均、各週数の赤い箱ひげの四角の中の横線が中央値、上下端が 75、25 パーセンタイル値、実線の上下端が 90、10 パーセンタイル値を示す。

4. 正常妊娠における血清 ATX 濃度と胎盤機能関連パラメーターとの関係

血清中の ATX 濃度と胎盤機能との関連を調べる目的で、正常妊娠の中期群 (n=44) と後期群 (n=49) の血清サンプルについてそれぞれ、血清 ATX 濃度と胎盤機能関連パラメーター (出生体重 SD 値、胎盤重量、BPR) との相関関係調べた。出生体重もしくは胎盤重量のデータ欠損がある血清サンプルデータは除外して解析した。妊娠中期、妊娠後期のいずれにおいても出生体重 SD 値および胎盤

重量と血清 ATX 濃度との相関は認めなかった。血清 ATX 濃度と BPR の相関については、妊娠中期群では血清 ATX 値と BPR の間に有意な負の相関を認め ($R=-0.50$ $p<0.001$)、後期群では有意な相関は認められなかった。このことは、正常妊娠においては妊娠中期 ATX 血清濃度が高い妊娠では分娩時の BPR が低い、つまり胎盤が大きい割には胎児発育が悪く、逆に妊娠中期で ATX 濃度が低い妊娠では分娩時の BPR が高く胎盤が小さい割に児発育がよいことを意味している。

図 2-3 血清中 ATX 濃度と出生体重、胎盤重量、BPR との関係



正常妊娠の中期群と後期群のそれぞれの血清サンプル中の ATX 濃度を測定し、出生体重 SD 値、胎盤重量、BPR との関係分布図に示す。各図の下に R: 相関係数と相関係数の p 値を示す。有意な相関が確認された分布図内に近似直線 (赤い実線) を示す。

5. Late-onset HDP 合併妊娠群の臨床背景および正常妊娠群との比較

血清サンプルを収集した 13 人の Late onset-HDP 合併妊婦からの臨床背景と前述の後期群の血清サンプルを収集した正常妊婦（NP(後期)群：n=52）の臨床背景との比較を表 2-4 に示す。BMI、分娩週数、胎盤重量に関して二群間の間に有意差を認めた。

表 2-4. LH 群の臨床背景および NP 群との比較

LH 群：Late-onset HDP 妊婦

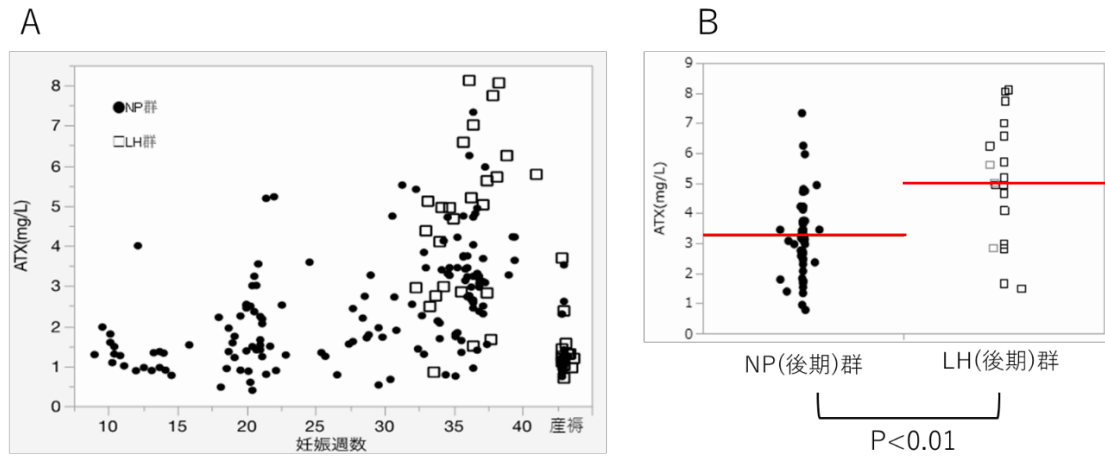
NP 群(後期)：正常妊娠の 34 週以降に血清サンプルを採取した妊婦

	LH群	NP(後期)群	P値
妊婦数	13	52	
母体年齢	37.0 ± 1.2	35.5 ± 4.3	0.30
妊娠初期BMI	23.4 ± 0.9	21.2 ± 2.7	0.03
分娩週数	37.3 ± 0.4	38.9 ± 1.4	<0.01
出生体重(g)	2560 ± 119	2929 ± 297	0.01
出生体重SD値	-0.21 ± 0.28	0.01 ± 0.71	0.47
胎盤重量	481.9 ± 25.1	553.8 ± 79.1	0.02
BPR	5.33 ± 0.20	5.35 ± 0.65	0.93

6. Late-onset HDP 合併妊娠の血清中 ATX 濃度と妊娠週数の関係

13 人の Late onset-HDP 合併妊婦の妊娠中から産褥 3 日までの期間に収集した血清サンプル (n=35) の ATX 濃度とサンプル採取を行った妊娠週数との関係を調べた。正常妊娠の ATX 濃度の結果とともに散布図 (図 2-4 A) に示す。さらに、後期の血清サンプルの ATX データのみで、LH (後期) 群 (n=19) と NP (後期) 群 (n=52) とで比較を行うと、LH (後期) 群 $5.04 \pm 2.02 \text{mg/L}$ 、NP (後期) 群 $3.25 \pm 1.27 \text{mg/L}$ であり LH (後期) 群の方が有意に ATX 濃度が高かった ($p < 0.01$)。

図 2-4. LH 群の血清中 ATX 濃度と妊娠週数の関係

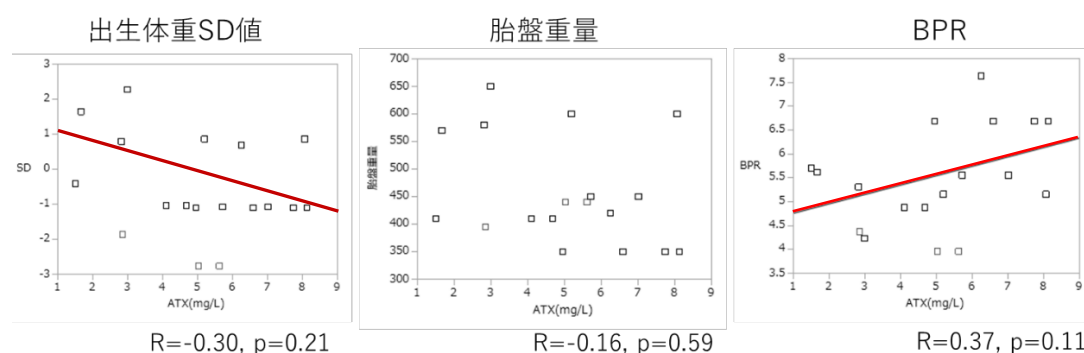


- A. LH 群 13 人の妊婦から HDP 発症から産褥 3 日までの期間に収集した血清サンプル(LH 群: $n=35$)および正常妊娠の初期、中期、後期、産褥に収集した血清サンプル(NP 群: $n=133$)の ATX 濃度と妊娠週数との関係を散布図に示した。●: NP 群、□: LH 群。
- B. 妊娠後期に採血した血清サンプルの ATX 濃度データのみを抽出して LH(後期)群($n=19$)と NP(後期)群($n=52$)で比較した。図中の緑実線は各群の平均値

7. Late-onset HDP 合併妊娠の分娩直前の血清中 ATX 濃度と胎盤機能パラメーターとの関係

前述の LH 群 13 人の血清で後期に収集したサンプル群の ATX 濃度と胎盤機能関連パラメーター(出生体重 SD 値、胎盤重量、BPR)との相関を調べた。LH(後期)群(n=19)と胎盤重量との間にはいずれも有意な相関は認めなかった。BPR、出生体重 SD 値との間には、有意ではないが弱い相関傾向が認められた。

図 2-5. Late-onset HDP 妊娠の後期血清中 ATX と胎盤機能パラメーターの関係

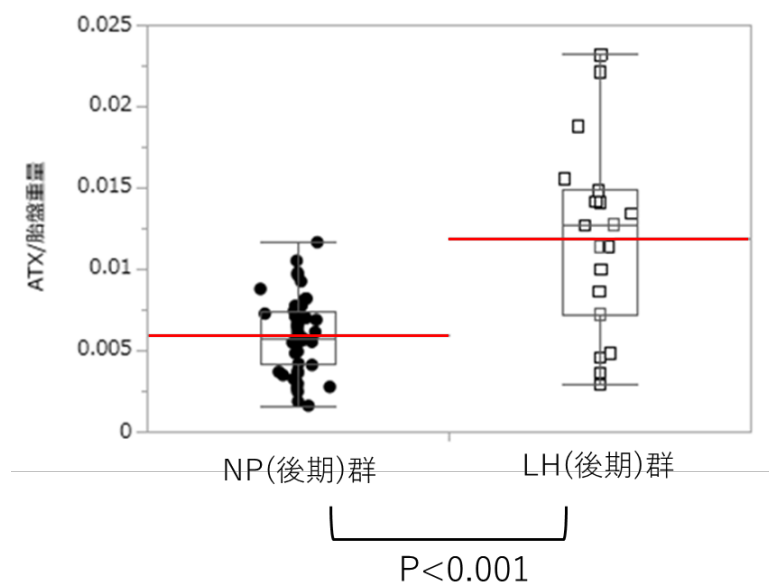


LH 群を対象として妊娠後期に採取した血清サンプル中の ATX 濃度を測定し、出生体重 SD 値、胎盤重量、BPR との相関を解析した。各グラフの右下に R: 相関係数とその p 値を示す。BPR の分布図内の赤い実線は近似直線である。

さらに、妊娠中の血清中の ATX 濃度上昇の大部分が胎盤における産生であることが知られていることから、胎盤重量当たりの ATX 産生量の推定値として胎盤

重量に対する血清 ATX 濃度の比 (ATX/胎盤重量比) を設定した。ATX/胎盤重量比を LH(後期)群と NP(後期)群の間で比較した。ATX(mg/L)/胎盤重量(g)比は LH(後期)群 : $11.9 \pm 5.7 \times 10^{-3}$ 、NP(後期)群 : $5.9 \pm 2.2 \times 10^{-3}$ であり LH(後期)群の方が有意に高値 ($p < 0.001$) を示した。以上の結果より Late-onset HDP の胎盤では正常妊娠と比較して、妊娠後期において ATX 産生が増加していることが示唆された。

図 2-6. 妊娠後期における正常妊娠と Late-onset HDP との血清 ATX/胎盤重量比の比較

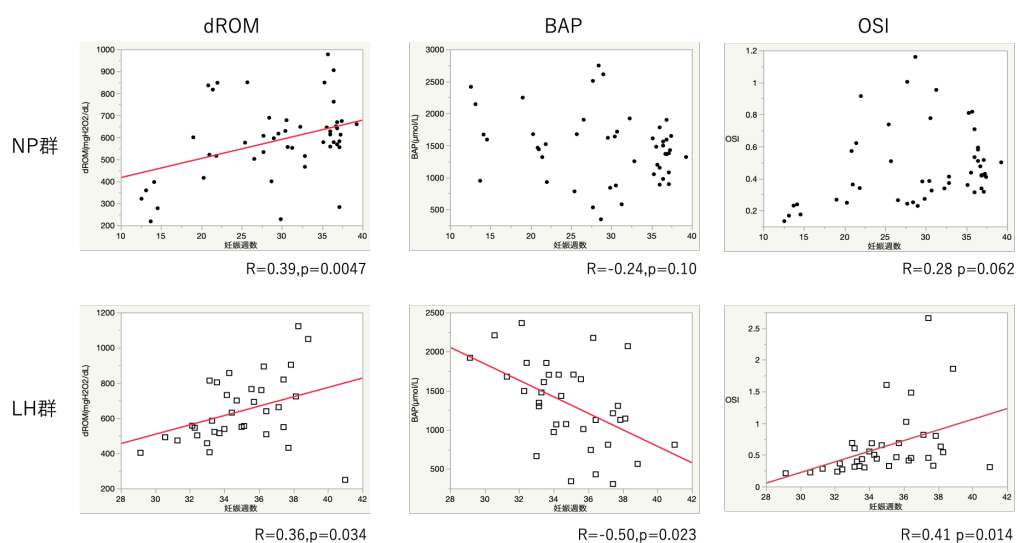


妊娠後期に採血した血清サンプルについて正常妊娠(NP 群)と LH 群に分けて血清 ATX 濃度胎盤重量比を比較した。図中の緑実線は各群の平均、各週数の赤い箱ひげの四角の中の横線が中央値、上下端が 75、25 パーセントイル値、実線の上下端が 90、10 パーセントイル値を示す。

8. 妊娠の進行に伴う血清中酸化ストレスマーカーの変化

妊娠期間中に収集した血清サンプルを用いて酸化ストレスマーカーである dROM (酸化度の指標) および BAP (抗酸化力) の測定を行った。NP 群 (40 人、51 サンプル)、および LH 群 (16 人、35 サンプル) についてそれぞれ、酸化ストレスマーカーと妊娠週数との関係を調べた。同一女性から異なる妊娠時期に複数回の血清サンプル収集したものを含めて全体を対象に解析した。NP 群では、妊娠週数の進行に対して dROM は正に弱く相関する傾向を認めた ($R=0.39$ $p=0.0047$)。一方で BAP は妊娠週数の進行に対し明らかな相関を認めなかった ($R=-0.23$ $p=0.11$)。LH 群では妊娠週数の進行に対して dROM は正の相関傾向を認め ($R=0.36$ $p=0.034$)、BAP は負の相関 ($R=-0.50$ $p=0.023$) を認めた。また OSI では NP 群では明らかな相関は認めず ($R=0.28$ $p=0.062$)、LH 群では正の相関 ($R=0.41$ $p=0.014$) を認めた。以上より、Late-onset HDP 合併妊娠においては妊娠週数と共に酸化ストレス上昇、抗酸化能低下を認め、正常妊娠においては、酸化ストレスの上昇のみを認める事が分かった。

図 2-7. 酸化ストレスマーカーと妊娠週数の関係



妊娠期間中に正常妊娠(NP群, 40人, n=51)およびLate-onset HDP(LH群, 16人, n=35)から血清サンプルを収集してdROMおよびBAPを測定した。NP群およびLH群のそれぞれで妊娠週数とdROM, BAPおよびOSIの測定値の関係を散布図に示す。各図において赤い実線は近似直線を示し、右下にR:相関係数、p値を示す。

9. 血清 ATX 濃度と酸化ストレスマーカーとの関係

NP 群と LH 群の違いに着目して、血清サンプル中の ATX 濃度と酸化ストレスマーカーの関係を解析した。NP 群では妊娠初期 (n=5)、中期 (n=16)、後期 (n=18) の血清サンプルを対象とし、LH 群では妊娠中期 (n=6)、妊娠後期 (n=19) を対象とした。

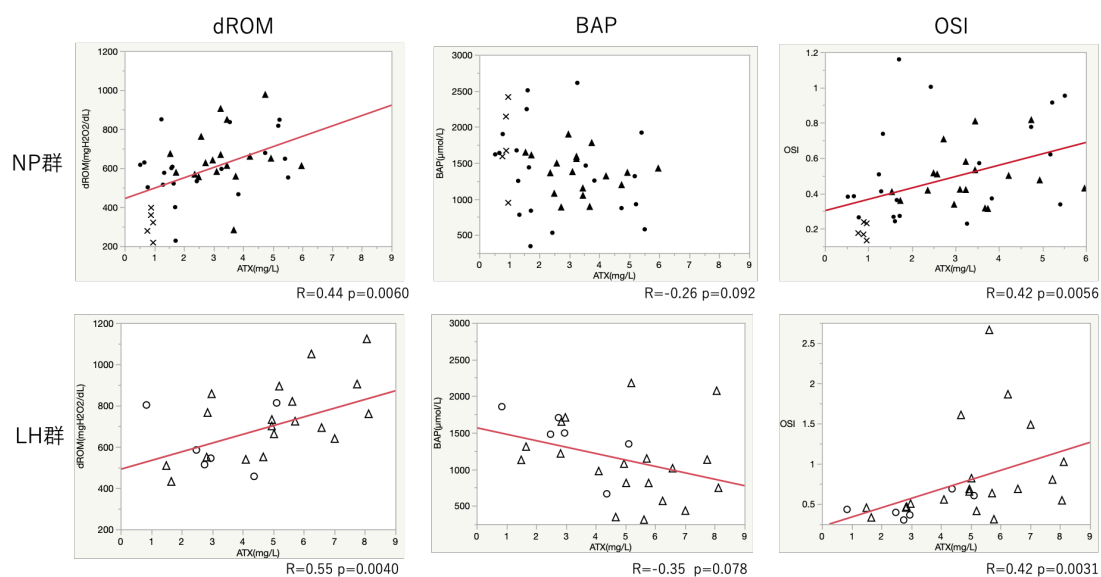
dROM については NP 群 ($R=0.44$, $p=0.0060$) および LH 群 ($R=0.55$, $p=0.0040$) ともに ATX 濃度との間に有意な正の相関を認めた。一方で、BAP については NP 群では相関は認めず ($R=0.23$ $p=0.17$)、LH 群については弱い負の相関傾向 ($R=-0.35$ $p=0.078$) を認めた。また OSI に関しては NP 群 ($R=0.42$ $p=0.0056$)、LH 群 ($R=0.42$ $p=0.0031$) 共に正の相関を認めた。(図 2-8)。前述の検討で ATX 濃度および酸化ストレスマーカーはいずれも妊娠週数との相関が認められていた。その結果を反映して、本解析の散布図上で妊娠時期別の分布を見ると進行した妊娠時期ほど計測点が dROM では右上方、LH 群での BAP では右下方に拡散する傾向があった。

次に同じ血清サンプルの測定データについて採血時期が妊娠中期と妊娠後期のものに分けて、散布図上に示して NP 群と LH 群の比較を行った。(図 2-9) 妊娠中期には dROM および BAP のいずれも NP 群と LH 群の間の分布の違いは明らか

ではなかった。一方で、妊娠後期には LH 群の分布は ATX 値が大きいサンプルでは、dROM 値が大きくなる領域、そして BAP 値が小さくなる領域に向かって拡散しており、NP 群と LH 群を合わせた状態では ATX 濃度と dROM は有意な正の相関 ($R=0.50$ $p=0.002$) を認めた。OSI では妊娠中期群は弱い正の相関傾向 ($R=0.36$ $p=0.070$) を、妊娠後期群は正の相関 ($R=0.46$ $p=0.0042$) を認めた。

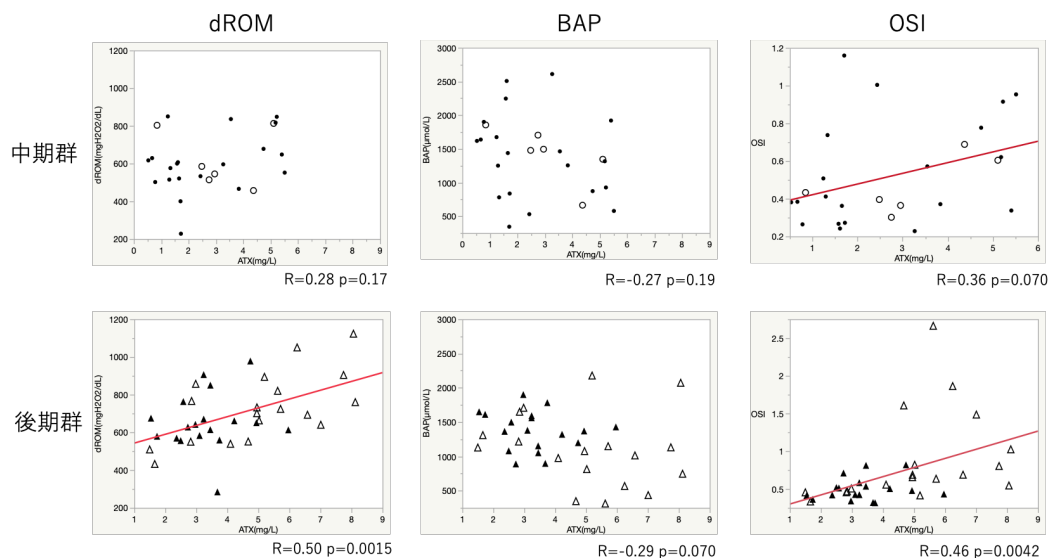
図 2-8. 酸化ストレスマーカーと血清 ATX 濃度の関係

(正常妊娠と Late-onset HDP)



NP 群では妊娠初期 ($n=5$)、中期 ($n=16$)、後期 ($n=18$) の血清サンプルを対象とし、LH 群では妊娠中期 ($n=6$)、妊娠後期 ($n=19$) を対象として、ATX 濃度および酸化ストレスマーカー (dROM 値、BAP 値、OSI) を測定した。NP 群と LH 群に分けてそれぞれのサンプルの測定値を分布図で示す。マーカー形状の違いは血液採取の妊娠時期の違いを反映している。× : NP 群初期、● : NP 群中期、▲ : NP 群後期、○ : LH 群中期、△ : LH 群後期。図中の赤い実線は近似直線である。各図の右下に、R: 相関係数、p 値を示す。

図 2-9. 酸化ストレスマーカーと血清 ATX 濃度の関係 (妊娠時期別)

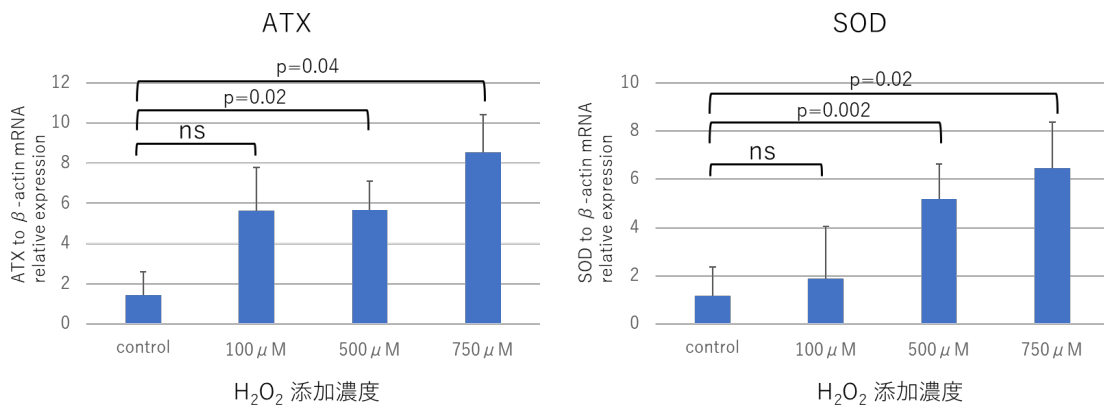


妊娠中期に採取した血清サンプル NP 群 (n=16)、LH 群 (n=6)、妊娠後期に採取した血清サンプル NP 群 (n=18)、LH 群 (n=19) を対象として、ATX 濃度および酸化ストレスマーカー (dROM 値、BAP 値、OSI) の測定値の分布を散布図に示す。マーカー形状の違いは NP 群と LH 群の違いを反映している。● : NP 群中期、○ : LH 群中期、▲ : NP 群後期、△ : LH 群後期。図中の赤い実線は近似直線である。各図の右下に、R: 相関係数、p 値を示す。

10. 酸化ストレスに対する絨毛細胞内での ATX 発現変化

妊娠中の血清中の ATX は胎盤に由来することが知られており、前述の解析により妊婦血清中の ATX 濃度と酸化ストレスマーカーの相関を認めたことを踏まえて、酸化ストレスに対する絨毛細胞の ATX 発現変化について検討を行った。絨毛細胞由来細胞株 HTR 細胞に対して、酸化ストレス刺激として H_2O_2 の添加を行い、ATX mRNA 発現量の変化を測定した。その上で、ATX 発現変化を調べると、 H_2O_2 の濃度依存性に mRNA 発現誘導が生じていることが確認された。SOD 遺伝子は酸化ストレス刺激に反応して発現誘導されることが知られている。ATX 発現増加と並行して H_2O_2 添加に対して SOD mRNA の発現増加が生じており、期待した酸化ストレス負荷が生じていることを確認した。(図 2-10)

図 2-10. H_2O_2 刺激に対する HRT 細胞内 mRNA 発現誘導



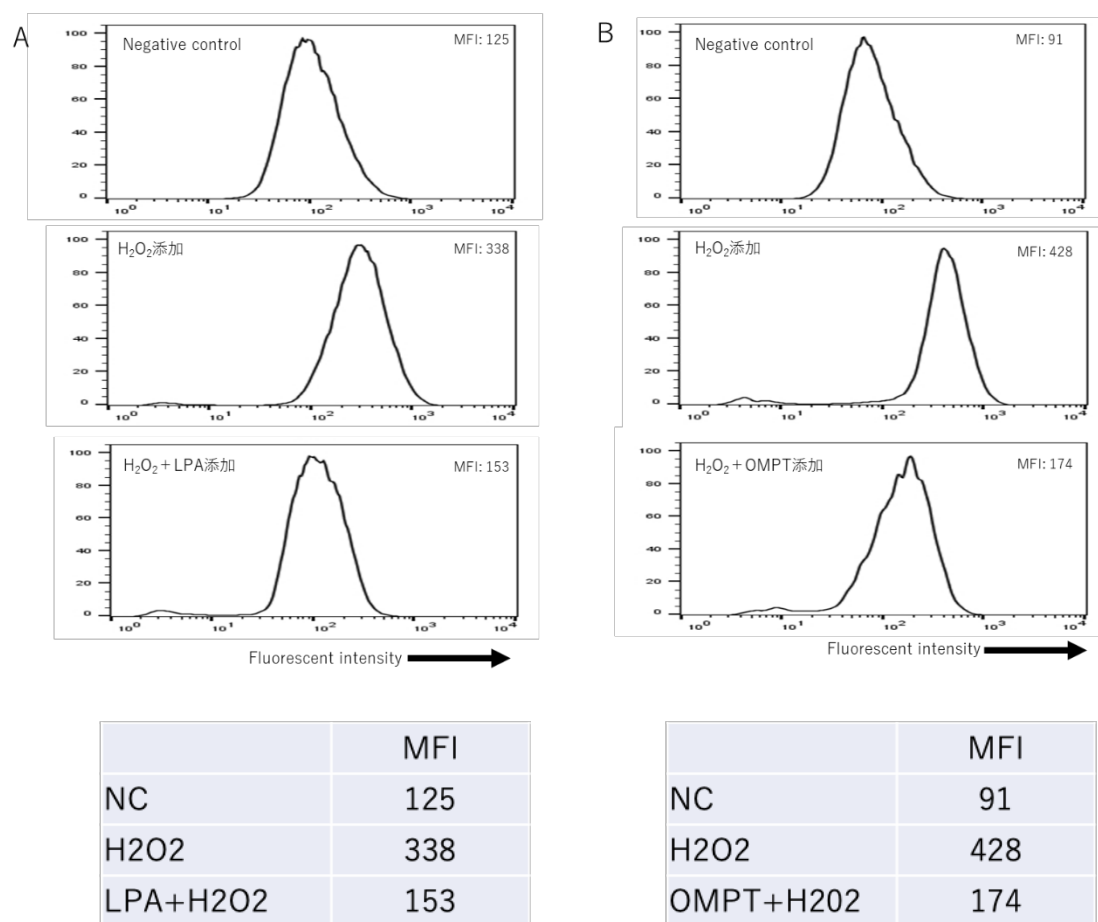
培養 HTR 細胞に異なる濃度の H_2O_2 を添加して、3 時間後に細胞内 RNA を回収し、ATX および SOD の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により半定量した。10 回の実験の繰り返しにより得られたデータの平均 \pm 標準誤差を示している。

ns: not significant

11. LPA シグナル刺激に伴う酸化ストレスの変化

前述の検討により絨毛細胞は酸化ストレスに反応して、ATX 発現を増加することが示された。このため、ATX により産生される LPA シグナルが絨毛細胞内で酸化ストレス調整に関与している可能性が想起された。この仮説を検証するため、HTR 細胞に対する H₂O₂ 負荷による細胞内 ROS 集積をフローサイトメトリー法により評価する測定系を確立して、HTR 細胞に LPA 自体もしくは LPA 受容体を介した刺激に伴う、細胞内 ROS 集積の変化について調べた。H₂O₂ 添加により HTR 細胞内 ROS の集積が生じて細胞内の蛍光強度の上昇が確認された。H₂O₂ 添加と同時に LPA 刺激を行うと H₂O₂ 添加による HTR 細胞内 ROS の集積が減弱した。(図 2-11 A) 次に、筆者の研究室では過去に HTR 細胞が LPA 特異的受容体の一つである LPAR3 を発現していることを確認している。そこで、LPAR3 の特異的アゴニストである (2S)-OMPT (1-oleoyl-2-methyl-sn-glycero-3-phosphothionate ammonium salt) を H₂O₂ と同時に添加して、LPAR3 を介したシグナルの影響を調べた。OMPT 添加においても、LPA 刺激と同様に H₂O₂ 添加による HTR 細胞内 ROS の集積が減弱することが確認された。(図 2-11 B)

図 2-11. LPA 刺激および LPAR3 刺激による ROS 集積の変化



培養 HRT 細胞に 50mM H₂O₂ 刺激単独もしくは H₂O₂ 刺激の直前に 10 μM もしくは OMPT 500 μM を添加して、細胞内の ROS 集積を DCF の蛍光強度としてフローサイトメトリーにて測定した。H₂O₂ 刺激を行わない HTR 細胞を negative control とした。A. LPA 添加による ROS 集積の変化、B. OMPT 添加による ROS 集積の変化。下にそれぞれの Mean Fluorescent Intensity (MFI) の値を示す。同じ条件での 3 回の実験を繰り返し、代表的な結果を示す。

考察

本研究では、課題 1 として、妊娠 20 週未満の羊水量が妊娠後半の胎盤機能を示すマーカーとなるかどうかについて検討した。VOCAL 法を用いた 3 次元計測による妊娠 10-17 週の時期における ULV の標準曲線を推測した。本研究の対象とした正常妊娠群の中では、その時期の ULV の平均近似値からの乖離の程度とその後の分娩時の出生体重の SD 値および BPR との相関は認められなかった。

課題 2 では、末梢血中の ATX 濃度と周産期予後との関係について特に遅発型 HDP 発症との関連に着目して検討した。妊娠中期および後期の血清中 ATX 濃度と出生体重 SD 値、胎盤重量との間には相関は認めなかったが、分娩時の BPR との間には、負の相関が確認された。遅発型 HDP 群では正常妊娠群と比較して胎盤重量が軽く、出生体重の SD 値が低い一方で BPR には有意差がなかった。妊娠中の ATX 産生は主に胎盤で行われる事が分かっているが、遅発型 HDP 群では、妊娠後期の血清 ATX 濃度が正常妊娠よりも高値を示し、さらに、妊娠後期の血清 ATX 濃度と BPR の間に正の相関を認め、正常妊娠群と対照的な逆の相関を示すことが明らかとなった。さらに、酸化ストレスと血清 ATX 濃度との関係を解析して、正常妊娠群および遅発型 HDP 群ではいずれも dROM は妊娠の進行とともに上昇し、遅発型 HDP 群では BAP も低下していた。OSI は遅発型 HDP 群

で妊娠の進行と共に上昇していた。血清 ATX 濃度との関係について、正常妊娠および遅発型 HDP のいずれも dROM と正の相関を示し、BAP は遅発型 HDP 群においてのみ負の相関が示唆された。OSI は正常妊娠群、遅発型 HDP 群共に血清 ATX 値との間に正の相関を認めた。そして、妊娠時期別に検討したところ、前述の血清 ATX 濃度と dROM、BAP および OSI との相関は後期において顕著であることが確認された。さらに、ATX と胎盤機能の関係の背景にある分子機構を解明するため、In-vitro での検討を行った。HTR 細胞に対する酸化ストレス刺激が ATX mRNA 発現を誘導することを確認した。HTR 細胞に対する LPA および LPAR3 アゴニストによる刺激は、細胞内の ROS 集積量を減弱した。これらの結果より ATX-LPA シグナルシステムが絨毛細胞の酸化ストレスの制御機構として機能している可能性が示された。

胎児の嚥下、尿量の増加に伴い妊娠後半期には胎児自体に起因した要因が羊水量の規定因子となり、羊水量の個体差が非常に大きいことが知られている。一方で、妊娠 20 週頃までは胎盤の胎児面や卵膜、胎児皮膚からの直接的な水分の交通 (intramembranous pathway) がその中心となっているとされる (34) が、その妊娠時期ごとの推移や個体差については知見が乏しかった。本研究の結果より、正常妊娠では妊娠 20 未満での子宮内水分量は妊娠後半期と比較し

て、個体差が少ないことが明らかとなった。ULV は胎児と子宮内水分量の合計体積であるが、妊娠 20 週未満での胎児発育の個体差も妊娠後半期と比較して小さいことを考えると、羊水量についても狭い個体差の範囲で推移していると考えられた。これは、正常妊娠では妊娠前半期の羊水量は適切な量となるような厳格な体積に調整されていることを示唆している。一方で、妊娠 20 週未満で計測した ULV と分娩時の出生体重 SD 値、BPR との相関は確認されなかったことから、胎盤機能を反映するパラメーターとしての ULV の有用性については否定的な結果となった。しかし、本研究の限界として妊娠初期の経過が順調な正常例を対象とした前方視的な検討であるため、研究参加妊婦の中での HDP や FGR を含めた周産期異常の発生が少なく病的妊娠における ULV の意義については未解決である。ただ、1 例ではあるが、ULV が明らかに高値を示した妊婦において、妊娠 23 週で胎児機能不全を生じて帝王切開分娩となった症例があった。この症例では胎児発育は正常範囲であったが、出生児に先天性異常はなく何らかの胎盤機能異常が胎児機能不全の誘因となったことが示唆された。一般的には妊娠後半期の胎盤機能異常では胎児の羊水量が減少するのに対して、本症例では ULV が増加したという点が特徴的である。過去の報告では、胎盤、卵膜を介した羊水量の調節には aquaporin という水分チャンネル蛋白が重要な働きを担っており、HDP 胎盤ではその発現量や機能の変化が生じていることが報

告されている(35)。これらのことから、ULV と胎盤機能異常の関係について異常妊娠を対象としてさらなる検討の余地があると考えられる。

課題 2 の中で、最初に正常妊娠における ATX-LPA システムと胎盤機能の関係性について解析を進めた。本研究において妊婦の血清 ATX 濃度は妊娠進行とともに増加し、産褥で急激に低下することを確認した。この結果はすでに筆者の研究室で過去に報告した内容(21)と一致したものであり、妊婦血清中に検出される ATX が主に胎盤での産生に由来していることを支持している。胎盤は胎児発育を目的とした臓器であるため、胎盤機能を評価するバイオマーカーとしての ATX の意義を考える上では、ATX と胎児発育の関係が重要となる。本研究では、出生児体重の SD 値との相関については妊娠中期、後期のいずれにおいても相関を認めなかったことは、血清 ATX 濃度は胎児発育を直接的には反映しないことを意味している。一方で、胎盤が胎児を発育させる効率を示す指標である BPR と血清 ATX 濃度の関係について、妊娠後期では相関がなかったのに対して、妊娠中期では有意な負の相関が確認された。つまり、妊娠中期に ATX の産生が高い胎盤では分娩時に最終的に確認される BPR が低いということを示している。ATX-LPA シグナルは癌細胞では細胞増殖や細胞遊走の促進に働き、また創傷治癒や血管形成促進の作用を有することが報告されてきた(36, 37)ことを

鑑みると、妊娠中期に ATX 濃度が高い妊婦では胎盤の増大や子宮-胎盤血管形成の促進を起こして胎盤機能を上昇させようという働きが生じている可能性がある。BPR が低い妊婦において妊娠中期に ATX 産生が高いことは、中期以降に胎児に比して胎盤サイズが増加して分娩時の BPR が低下していることを示している。一方で、妊娠中期の ATX 濃度と最終的な出生児 SD の間には相関がないことを考えると、妊娠中期の胎盤機能の状態に応じて ATX 産生量が変化して胎盤サイズの調整することでその後の胎児発育を正常範囲に保とうという代償機構の存在が示唆される。

本研究の解析対象となった遅発型 HDP 群では胎盤重量および出生体重 SD 値がいずれも正常妊娠群よりも有意に小さかったが、これは胎盤機能障害が HDP の中心的な病態因子であるという従来の概念(12)と一致した結果である。そして、本研究では遅発型 HDP 群では血清 ATX 濃度が正常妊娠よりも有意に高く、かつ胎盤重量当たりの血清 ATX 濃度が高いことから、遅発型 HDP 妊娠の胎盤では ATX 産生が正常妊娠と比較して亢進していることが示唆された。前述の胎盤内の ATX-LPA シグナルが胎児発育を正常に調整する役割を担うという正常妊娠における推測を前提として考えた場合、本研究で対象としている遅発型 HDP では胎児発育が不良で ATX の増加が生じているにも関わらず胎盤サイズ増加の反応が生じていないことを示している。そして、正常妊娠群と遅発型 HDP 群の間

でBPRの差がなかったことについては、遅発型HDP例では胎児発育不良があるにもかかわらずATXを介した胎盤サイズの変化による代償機構が働かず、正常妊娠群では低下が生じるBPRが変化しなかったと解釈できる。

胎盤におけるATX産生の制御機構やATX-LPAシグナルの役割については先行研究が乏しく未解明である。本研究では、酸化ストレスと胎盤ATX産生との関係に着目して、血清検体の測定およびin-vitroでの検討を進めた。HRT細胞を用いた細胞実験において、酸化ストレス刺激はATX mRNA発現が誘導されたこと、そしてLPAシグナル刺激はHTR細胞内のROS集積を減らす作用があることからATX-LPAシグナルは絨毛細胞において酸化ストレスに反応して誘導されてROSの除去に働く抗酸化システムとしての機能があることが示唆された。LPAシグナルと酸化ストレスの関係についての諸家の報告では、LPAR1欠損マウスでは慢性ストレスに対して酸化ストレスが増大することで海馬障害を増悪すること(17)、LPAシグナルは抗酸化作用発現に重要な役割をもつNrf2遺伝子の安定化を誘導して抗酸化遺伝子発現を増強することなどからATX-LPAシグナルは抗酸化遺伝子誘導を介して酸化ストレス低下に働くこと(38)が示されてきた。本研究の絨毛細胞における結果はそうした過去の知見を支持している。HDPでは胎盤内での酸化ストレスの増大が病態形成に関わる重要な因子とされている

(30)。本研究では、妊娠後期の血清において血清中 ATX 濃度が酸化ストレスと相関することを確認し、遅発型 HDP 群の血清では、ATX および酸化ストレスがいずれも高値を示すサンプルが多かった。本研究における妊婦血清のデータおよび細胞実験の知見を踏まえて考えると、妊娠中の酸化ストレス蓄積に反応して胎盤における ATX 産生が誘導されていること、そして、遅発型 HDP では胎盤内の酸化ストレスの病的な集積が生じており、その結果として ATX 産生が正常妊娠よりも亢進していることが推測された。

筆者の研究室では、早発型 HDP では胎盤での ATX 産生および血清 ATX 濃度が低下していることを報告してきた(22)。今回、遅発型 HDP において血清 ATX 濃度が正常妊娠よりも上昇していたことは、早発型と遅発型 HDP の病態機序の違いに起因している可能性がある。正常妊娠の血清 ATX 濃度と BPR の関係で示唆されるように胎盤の ATX-LPA シグナルは胎盤機能を胎児発育のために適切なレベルに調整する役割を担っていることが示唆される。一般的に胎児発育不全は早発型 HDP の方が遅発型 HDP よりも重度となる。早発型 HDP では胎盤障害の程度が重度で絨毛細胞における ATX 産生自体が減弱して、胎盤機能の低下が改善しないまま胎児発育不全の悪化と母体の全身症状の発症が早まるのかもしれない。一方で、遅発型 HDP では胎盤障害の程度が比較的軽度で ATX 産生増加による胎盤機能改善の代償機構がある程度奏功することにより、胎児発育不全の悪

化が抑制され、母体の全身症状の発症が遅延するという解釈が成り立つ。以上のことより妊娠中の胎盤内における ATX-LPA 回路の応答調整についての考察をチャート図にまとめた(図 3-1)。胎児発育や、胎盤発育が正常に比べ遅れた場合、ATX-LPA 回路の応答の有無、また回路の活性化に対する絨毛細胞の反応の違いが HDP 発症に大きく寄与している可能性が本研究結果より考えられた。本研究の遅発型 HDP 症例では胎児発育不全（出生体重が $-1.5SD$ を下回るもの）の割合は 3 例/14 例(21%)であり、母体の状態としては妊娠終了時期の平均が 37.2 週であり多くが正期産期まで妊娠継続が可能であった。この臨床背景からは対象となった遅発型 HDP の重症度はおおむね低く、前述の解釈に矛盾しないと考えられるが、今後、重症な早発型 HDP からの臨床検体の収集により遅発型との違いを確認する必要がある。

本研究では妊娠初期の子宮内腔体積と ATX-LPA シグナルシステムに着目して胎児発育・胎盤機能との関係を探索した。子宮内腔体積については妊娠後半期の胎児発育・胎盤機能との関連を見出すことはできなかった。ATX-LPA シグナルシステムについては、それが胎盤における酸化ストレスを調整機構として機能していること、遅発型 HDP の病態形成への関与が示唆された。そして血清中 ATX 濃度の測定は胎盤機能を評価するために有用なバイオマーカーの候補となりうると考えられた。

妊娠中の胎盤内におけるATX-LPA回路の応答調整

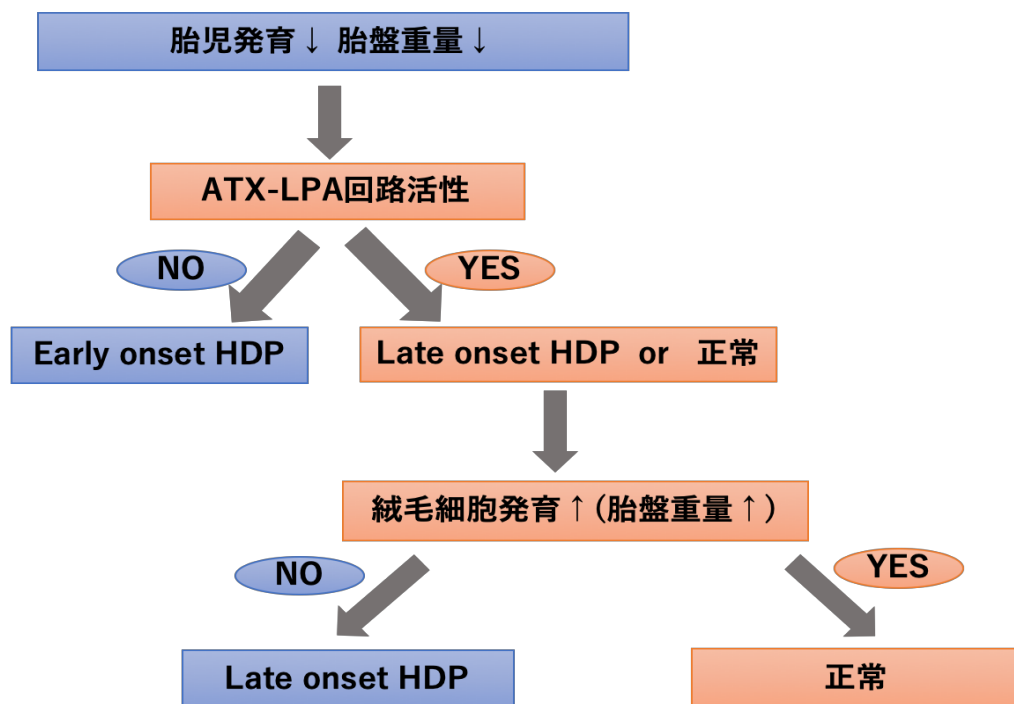


図 3-1. 妊娠中の胎盤内における ATX-LPA 回路の応答調整

謝辞

本研究の遂行、論文執筆において多くのご指導、ご尽力をいただいた生殖免疫グループ永松健准教授、オートタキシン測定において多大なご協力を頂いた検査部矢富裕教授、蔵野信講師、酸化ストレスマーカー分野にてご助言いただいた検査部安川恵子特任研究員に心より感謝を申し上げます。また多くのご支援、ご指導を賜りました女性診療科・産科/女性外科藤井知行教授に心から感謝致します。本研究に関してご助言・ご助力いただいた生殖免疫グループ各位、検査部各位に感謝の意を表明します。

引用文献

1. Burton GJ, Jauniaux E. What is the placenta? *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015;213(4 Suppl):S6.e1, S6-8.
2. Carter AM, Enders AC. Placentation in mammals once grouped as insectivores. *The International journal of developmental biology*. 2010;54(2-3):483-93.
3. Ji L, Brkic J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(5):981-1023.
4. Heazell AE, Whitworth M, Duley L, Thornton JG. Use of biochemical tests of placental function for improving pregnancy outcome. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2015(11):Cd011202.
5. Artenisio AC, Volpe A, Ragonese F, Maccarrone G, Forte F, Consolo F. Behaviour of HPL and GH plasmatic rate in pregnant women at different times of their pregnancy during dynamic tests. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 1980;12(5):205-8.
6. Hayward CE, Lean S, Sibley CP, Jones RL, Wareing M, Greenwood SL, et al. Placental Adaptation: What Can We Learn from Birthweight:Placental Weight Ratio? *Frontiers in physiology*. 2016;7:28.
7. Shibuya M. Involvement of Flt-1 (VEGF receptor-1) in cancer and preeclampsia. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2011;87(4):167-78.
8. Phelan JP, Smith CV, Broussard P, Small M. Amniotic fluid volume assessment with the four-quadrant technique at 36-42 weeks' gestation. *The Journal of reproductive medicine*. 1987;32(7):540-2.
9. Brace RA, Wolf EJ. Normal amniotic fluid volume changes throughout pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1989;161(2):382-8.
10. Komatsu A, Kozuma S, Hyodo H, Horikoshi T, Sakamaki K, Kikuchi A, et al. Changes in umbilical arterial blood flow by an intraamniotic distilled water infusion. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2006;13(3):166-73.
11. MacKay AP, Berg CJ, Atrash HK. Pregnancy-related mortality from

- preeclampsia and eclampsia. *Obstetrics and gynecology*. 2001;97(4):533-8.
12. Redman CW, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*. 2009;30 Suppl A:S38-42.
13. Okudaira S, Yukiura H, Aoki J. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie*. 2010;92(6):698-706.
14. Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, et al. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(50):48737-44.
15. van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*. 1989;59(1):45-54.
16. Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*. 2003;102(10):3665-7.
17. Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(24):13384-9.
18. An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(14):7906-10.
19. Ye X, Hama K, Contos JJA, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*. 2005;435(7038):104-8.
20. Pasternack SM, von Kugelgen I, Al Aboud K, Lee YA, Ruschendorf F, Voss K, et al. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature genetics*. 2008;40(3):329-34.
21. Iwasawa Y, Fujii T, Nagamatsu T, Kawana K, Okudaira S, Miura S, et al. Expression of autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2009;62(2):90-5.
22. Ichikawa M, Nagamatsu T, Schust DJ, Kawai-Iwasawa Y, Kawana K,

Yamashita T, et al. Placental autotaxin expression is diminished in women with pre-eclampsia. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2015;41(9):1406-11.

23. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*. 2014;24(10):R453-62.

24. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(1):29-38.

25. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet (London, England)*. 1994;344(8925):793-5.

26. Retraction notice to "Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research." [*Toxicology* 229 (2007) 1-10]. *Toxicology*. 2007;241(1-2):98.

27. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *The Biochemical journal*. 2007;401(1):1-11.

28. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*. 2006;141(2):312-22.

29. Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2017;120(4):713-35.

30. Wu F, Tian FJ, Lin Y, Xu WM. Oxidative Stress: Placenta Function and Dysfunction. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2016;76(4):258-71.

31. Nezu M, Souma T, Yu L, Sekine H, Takahashi N, Wei AZ, et al. Nrf2 inactivation enhances placental angiogenesis in a preeclampsia mouse model and improves maternal and fetal outcomes. *Science signaling*. 2017;10(479).

32. Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(5).

33. Nakamura K, Igarashi K, Ide K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, et al. Validation of an autotaxin enzyme immunoassay in human serum samples and its application to hypoalbuminemia differentiation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008;388(1-2):51-8.

34. Sha XY, Xiong ZF, Liu HS, Di XD, Ma TH. Maternal-fetal fluid balance and aquaporins: from molecule to physiology. *Acta pharmacologica Sinica*.

2011;32(6):716-20.

35. Damiano AE. Review: Water channel proteins in the human placenta and fetal membranes. *Placenta*. 2011;32 Suppl 2:S207-11.

36. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(13):5015-22.

37. Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Current opinion in pharmacology*. 2009;9(1):15-23.

38. Venkatraman G, Benesch MG, Tang X, Dewald J, McMullen TP, Brindley DN. Lysophosphatidate signaling stabilizes Nrf2 and increases the expression of genes involved in drug resistance and oxidative stress responses: implications for cancer treatment. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015;29(3):772-85.