

# 妊娠高血圧症候群による児の神経学的後障害の病態解明と先制医療への戦略

名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科学教室 講師 牛田 貴文

## 要約

妊娠高血圧症候群 (Hypertensive disorders of pregnancy 以下 HDP) は妊婦の5~10%に発症し、高血圧や蛋白尿を特徴とする疾患であり、早産の主要な要因の一つである。HDPを発症した母から出生した児は、脳性麻痺や運動障害のみならず、自閉症スペクトラム障害、注意欠陥多動性障害、学習障害などの神経学的後障害のリスクが上昇することが報告されているが、そのメカニズムは未だ十分には解明されていない。本検討では動物モデルを用いて、HDPによる仔の神経学的影響を解析し、将来的な神経学的後障害のメカニズム解明を目的とした。8~12週齢のSDラット、妊娠15~20日にL-NAME (250mg/kg/day) および生理食塩水 (250mg/kg/day) を腹腔内投与しHDP動物モデルとコントロールを作成した。生後8~49日目に各種行動実験を行い、HDP群における神経発達遅延(negative geotaxisテスト)、平衡感覚や協調運動の障害 (Rotarod treadmillテスト)、学習や記憶の障害 (Shuttle avoidanceテスト) を認めた。脳組織 (生後70日目) でのNeuN (神経細胞のマーカー) による免疫染色では、海馬および皮質の陽性細胞の減少を認めた。生後5日目における髄液を用いたプロテオーム解析では、各群間における蛋白群のプロファイリングに有意な違いを認めることが明らかになり、Gene Ontology解析によりER translocationやRab GTPaseの機能異常が児の神経学的後障害の原因の一つなのではないかという新たな仮説が提示された。一方、HDPなどを含めた妊娠合併症に関連し、産科臨床において直面している新たな課題として、児の救命率や新生児合併症の発症リスクを正確に評価する必要性や神経学的ハイリスク児を早期に抽出するアルゴリズムの開発が期待されている。我々は、在胎32週未満の早産児における様々な合併症を出生前に予測するプログラムを開発し、産婦人科医や新生児科医が、出生前に妊婦やその家族に対して説明する際の補助として使用してもらえるようにWebツールを名古屋大学産婦人科学教室のHPに一般公開した。

## 緒言

妊娠高血圧症候群 (Hypertensive disorders of pregnancy 以下 HDP) は妊婦の5~10%に発症し、高血圧や蛋白尿を特徴とする疾患である。後進国などでは母体死亡の主要な原因疾患となっているにも関わらず、現時点では有効な治療法が確立していない。そのため、母体重症化の回避のためには、未熟児であつても妊娠終結を選択するしかなく、早産の原因のうち約2~3割はHDPによるものと言われている。さらに子宮内胎児発育不全を合併することも多く、児の予後に重大な影響を及ぼしうる。

近年の長期的な疫学調査では、HDPを発症した母から出生した児は、脳性麻痺や運動障害のみならず、自閉症スペクトラム障害、注意欠陥多動性障害、学習障害などの神経学的後障害のリスクが上昇することが報告されている<sup>1</sup>。これまでに我々はHDPを発症した母から生まれた児の出生後の頭部MRI画像解

析 (Voxel-based morphometry: 脳体積解析、MRスベクトロスコーピー: 代謝解析) を用いて、HDPによる児の神経学的後障害のメカニズム解明に寄与してきた<sup>2,3</sup>。これまでの我々のMRI研究の知見や既報からは、すでに胎内にいる間にHDPおよびそれに付随する胎内環境の悪化により神経細胞や免疫系細胞が何らかの影響を受けることで、神経学的後障害が起きている可能性が示唆された。本検討では我々はHDP動物モデルを用いて、HDPによる仔の神経学的影響を解析することで、将来的な神経学的後障害のメカニズム解明を目的とした。

また、HDPなどを含めた妊娠合併症に関連し、産科臨床において直面している新たな課題として、(1) 児の救命率や新生児合併症の発症リスクを出生前に正確に評価し、妊婦・家族に対してより正確な出生前カウンセリングをどのように実現していくか、(2) 生まれた児のうち、神経学的後障害ハイリスク児を

いかに早期に抽出し、先制医療を実現していくか、が挙げられる。(1)に関して、我々は新生児臨床研究ネットワーク (Neonatal research network Japan: NRNJ) に参加する日本全国約200施設の新生児集中治療室に入院した約4万名の早産児の臨床データを用いて、早産児の神経学的予後を予測するプログラムを作成した<sup>4</sup>。しかしながら、全国の産科施設においてこのプログラムの周知は未だ不十分な状況であり、本研究の第2の目的として、このプログラムに基づくWebツールを作成し、より日常臨床で使いやすい形式で一般公開することとした。これにより全国の産婦人科医・新生児科医へ普及した場合、妊婦およびその家族への出生前カウンセリングをより具体的に、より精確に行うことができる可能性がある。(2)に関して、本研究の第3の目的として、新生児臨床研究ネットワークの臨床データをもとに、機械学習を用いた手法で神経学的ハイリスク児を抽出するアルゴリズムの開発を目指す。

## 方法

### 1. HDPによる児の神経学的後障害のメカニズム解明

HDPモデル動物はSDラット (8~12週齢)、妊娠15~20日にL-NAME (250mg/kg/day) を腹腔内投与し作成した。コントロール群は同期間に生理食塩水 (250mg/kg/day) を腹腔内投与した。母獣から生まれた仔は8匹 (雄4匹と雌4匹) に間引きし、生後21日目に離乳させた。その後の実験は雄のみで行った。生後8~11日目にnegative geotaxisテスト、生後35日目にopen fieldテスト、生後42~43日目にRotarod treadmillテスト、生後49日目にShuttle avoidanceテストを施行した。生後70日目に脳組織を還流固定した。一部の雄仔は生後5日目に髄液を採取したのち、安楽死させた。脳組織はNeuNによる免疫染色を施行し、海馬および皮質の陽性細胞数を評価した。髄液はプロテオーム解析を行い、各群で得られた蛋白による主成分分析を行い、またHeatmapを作成した。差次的蛋白群 ( $|\log_2 \text{fold change (HDP群/コントロール群)}| > 0.8$ ,  $q < 0.05$ ) を抽出し、MetascapeによるGene Ontology解析を施行した。なお、本研究の動物実験プロトコルは、Institutional Animal Care Committeeの承認を受けている (承認番号: M210424)。

### 2. 新生児合併症予測プログラムに基づく、Webツールの作成

新生児臨床研究ネットワークに参加する約200施設の周産期センターに入院した在胎32週未満、体重1500g以下の約4万名の早産児の臨床データを用いて、児の神経学的予後を予測するプログラムを2021年に作成した<sup>4</sup>。本プログラムはエクセル上に出生前の母体・胎児情報を入力することで新生児の短期・長期 (3歳時) 合併症のリスクやインタクトサバイバルを確率表示するプログラムであり、日本の標準的な周産期施設における児の予後を表す。エクセル上での使用は日常臨床では扱いにくいいため、Webツールを作成し、Online上に公開することで周産期施設での使用が促進されることが期待される。本研究は、当院倫理委員会の承認を受けている (承認番号2018-0026)。

### 3. 機械学習を用いた神経学的ハイリスク児抽出アルゴリズムの開発

上記の新生児臨床研究ネットワークの臨床データをもとに、機械学習を用いて神経学的ハイリスク児の抽出を目指す。その第1歩として、同臨床データを用いて機械学習に基づく早産児合併症予測モデルを作成した。在胎32週未満、体重1500g以下の31,157症例を対象として、ロジスティックモデルと6つの機械学習を用いたモデル (ridge regression [RR]、fully connected neural networks [FCNN]、support vector machine [SVM]、random forest [RF]、adaptive boosting [AdaBoost]、gradient boosting decision tree [GBDT]) を用いて、新生児アウトカム (新生児死亡、脳室内出血 [III/IV度]、脳室周囲白質軟化症、短期複合併症、長期複合併症) の予測精度をAUROCを用いて評価した。また、それぞれのアウトカムに影響を与える周産期因子をSHAP (SHapley Additive exPlanations) valueを用いて評価した。本研究は、当院倫理委員会の承認を受けている (承認番号2018-0026)。

## 結果

### 1. HDPによる児の神経学的後障害のメカニズム解明

HDP群はコントロール群と比較し、妊娠17、20日目に平均血圧の有意な上昇および出生仔の発育不全 (52.5% vs. 10.0%) を認め、HDPモデルとして成立することを確認した。HDP群から生まれた仔は出生時有意に小さかったが、生後14日目までにcatch-up growthを認めた。Negative geotaxisテスト (運動機

能や前庭機能を評価し、脳障害や発達の指標となる)では、HDP群では有意に悪化を認めた。Open fieldテストでは2群間に有意な違いを認めなかった。Rotarod treadmillテスト(平衡感覚、協調運動を評価)では、HDP群で有意に悪化を認めた(図1A)。またShuttle avoidanceテスト(学習と記憶の評価)では、HDP群で悪化を認めた(図1B)。生後70日におけるNeuN陽性細胞は海馬および皮質において有

意に減少を認めた(図1C・D)。生後5日目における髄液を用いたプロテオーム解析では、検出された蛋白群は2群間で違いがあることが主成分分析およびHeatmapにて明らかになった。また差次的発現蛋白におけるGene ontology解析(Metascape)ではsignal recognition particle (SRP)-dependent cotranslational proteins targeting the membrane と RAB geranylgeranylationが上位に入った(図1E)。

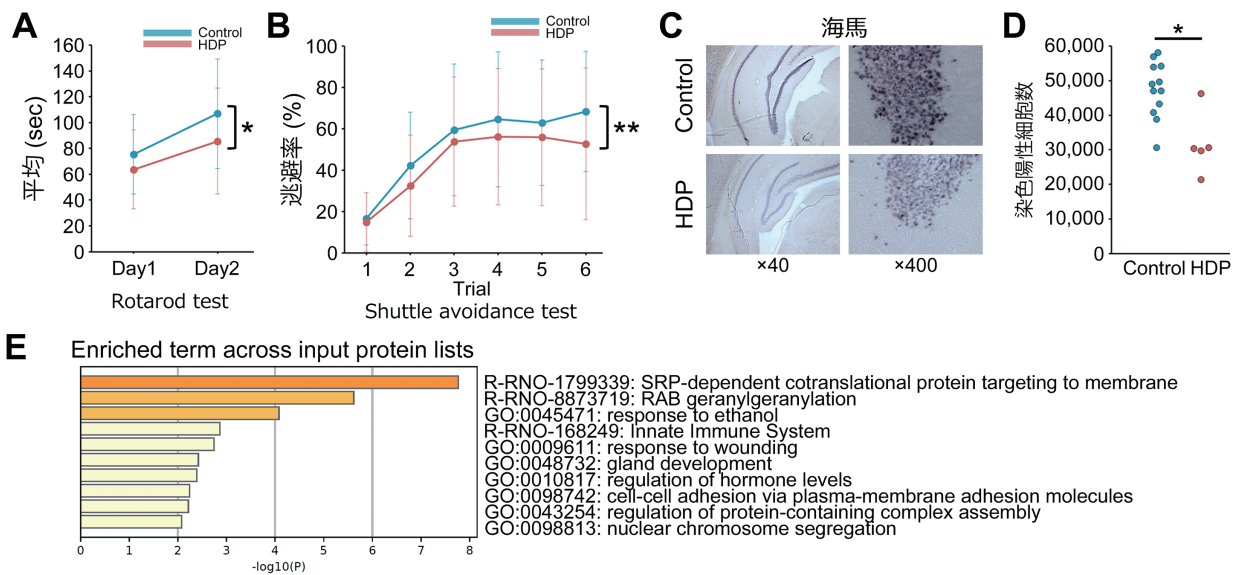


図1. HDPモデルラットにおける神経学的後障害の検討

## 2. 早産児合併症予測プログラムに基づく、Webツールの作成

エクセルで作成していた早産児合併症予測ツールをWebツールとして名古屋大学産婦人科学教室のHPに公開した(2023年2月8日)。産婦人科医や新生

児科医が、出生前に妊婦やその家族に対して説明する際の補助として、このツールを使用してもらえるように一般公開した。

([https://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/research/obstetrics/prediction\\_index.html](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/research/obstetrics/prediction_index.html))



図2. 名古屋大学産婦人科HPに公開した早産児合併症予測ツール

### 3. 機械学習を用いた神経学的ハイリスク児抽出アルゴリズムの開発

本検討により、新生児死亡、脳室周囲白質軟化症、短期複合合併症において、機械学習のうちGBDTで最もAUROCが高値となり、予測精度が高いことが明らかになった(表1)<sup>5</sup>。また新生児死亡や短期複合合併症においては、ロジスティックモデルと比較して、有意に予測精度が高いことが明らかになった。

また、SHAP valueを用いた解析では、新生児死亡に影響する因子として、1出生体重、2在胎週数、3出生前ステロイド投与、4 HDPが抽出された。また、短期複合合併症についても、1在胎週数、2出生前ステロイド投与、3出生体重、4 HDPが抽出され、重症合併症予防に対する出生前ステロイドの重要性が示唆された。またHDPは新生児死亡や短期複合合併症を軽減する方向に働くことが示された。

表1：新生児アウトカムと各モデルにおける予測精度

Outcomes	AUROC							AUROC 比較 (vs. LR)
	LR	RR	FCNN	SVM	RF	AdaBoost	GBDT	p-value
新生児死亡	0.849	0.852	0.852	0.852	0.853	0.855	<b>0.855</b>	0.015
脳室内出血 (III/IV 度)	0.774	0.773	<b>0.774</b>	0.772	0.765	0.771	0.771	0.195
脳室周囲白質軟化症	0.575	0.572	0.580	0.552	0.579	0.572	<b>0.586</b>	0.233
短期複合合併症	0.743	0.744	0.743	0.744	0.747	0.749	<b>0.750</b>	0.002
長期複合合併症 (3 歳)	0.701	<b>0.703</b>	0.700	0.695	0.703	0.702	0.701	0.977

### 考 察

HDPによる児の長期的な神経学的後障害のメカニズムとして、(1) 中枢神経系における神経解剖学的変化(大脳新皮質、尾状核、後頭葉などの体積減少)や脳血管形成の変化、(2) ミクログリアなど免疫細胞の数的および局在の変化や炎症性サイトカインの増加(3) 神経新生、グリオシス、髄鞘化などの異常、(4) 様々な蛋白、micro RNA、エクソソームなどの発現変化などが知られている<sup>1,6</sup>。しかしながら、現時点では詳細は明らかになっていない。本研究では、HDP動物モデルを使用し、生後5日目における髄液を用いてプロテオーム解析を行った。髄液の採取は手技的に難しい点や、さらにそれが生後5日目という生後早期という点が他の研究にはない点である。髄液は脳室の脈絡叢から産生され、各種神経細胞とも隣接するため、血液などよりもより詳細に脳における変化を鋭敏に捉えることができる可能性があり、様々な神経学的疾患における病態解明に使用されている。

本研究では、Gene Ontology解析によりER translocationやRab GTPaseの機能異常が児の神経学的後障害の原因の一つなのではないかという仮説を新たに提示できた点に新規性がある。しかしながら、その妥当性の検証やその機能異常が実際にどのように脳神経

に影響を及ぼすかなどの検討はできておらず、今後もさらなる研究が必要である。

一方、本研究により、早産児合併症予測ツールを当科のHPに公開することができたため、周産期医療に携わる産科医・新生児科医による積極的な利用を期待したい。今回、公開した予測ツールはロジスティックモデルを元に作成したが、機械学習を用いたモデル(GBDT)が最も予測精度が高いことが明らかになった。そのため、今後は機械学習を用いたモデルにおける予測結果を提示したり、利便性という点ではwebアプリのような形式で産科医・新生児科医が使用できるように改良が必要と思われる。また、本検討では神経学的ハイリスク児の抽出が可能となるアルゴリズムの開発は十分には実現できていない。我々は、当院で出生した早産児を対象として、新生児集中治療室に入院中の修正在胎40週における先進的な頭部MRI画像解析(脳体積解析、代謝解析など)により、母体HDPによる児の神経学的後障害のメカニズム解明に寄与してきた。これらの成果と予測モデルとの融合により、神経学的後障害ハイリスク児を早期に抽出し、先制医療を実現できるようにさらなる研究が必要である。

## 謝 辞

本研究に助成いただきました公益財団法人神澤医学研究振興財団に深謝致します。

## 参考文献

1. Dachew BA, Mamun A, Maravilla JC, et al. Pre-eclampsia and the risk of autism-spectrum disorder in offspring: meta-analysis. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 2018;212(3):142-7.
2. Ushida T, Kidokoro H, Nakamura N, et al. Impact of maternal hypertensive disorders of pregnancy on brain volumes at term-equivalent age in preterm infants: A voxel-based morphometry study. *Pregnancy Hypertens*. 2021;25:143-9.
3. Katsuki S, Ushida T, Kidokoro H, et al. Hypertensive disorders of pregnancy and alterations in brain metabolites in preterm infants: A multi-voxel proton MR spectroscopy study. *Early human development*. 2021;163:105479.
4. Ushida T, Moriyama Y, Nakatochi M, et al. Antenatal prediction models for short- and medium-term outcomes in preterm infants. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2021;100(6):1089-96.
5. Ushida T, Kotani T, Baba J, et al. Antenatal prediction models for outcomes of extremely and very preterm infants based on machine learning. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2022.
6. Gumusoglu SB, Chilukuri ASS, Santillan DA, et al. Neurodevelopmental Outcomes of Prenatal Preeclampsia Exposure. *Trends in neurosciences*. 2020;43(4):253-68.

## Abstract

Hypertensive disorders of pregnancy (HDP), characterized by hypertension and proteinuria, is a major cause of preterm birth. Accumulated evidence has shown that various neurological and neurodevelopmental disorders in offspring born to mothers with HDP, however, the pathogenesis of the increased risk of such disorders in offspring remains unclear. In this study, we sought to evaluate whether altered neurodevelopment in offspring is observed in HDP rat model induced by L-NAME. Pregnant Sprague-Dawley rats in the HDP group received an intraperitoneal injection of L-NAME (250 mg/kg/day) during gestational days 15–20. Various behavioral experiments were conducted on postnatal days 8–49. Delayed neurodevelopment (negative geotaxis test), impaired balance and motor coordination (Rotarod treadmill test), and abnormal learning and memory (Shuttle avoidance test) were observed in the HDP group. Immunostaining of brain tissue (postnatal day 70) with NeuN, a marker of neurons, showed decreased number of positive cells in the hippocampus and cortex. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid on postnatal day 5 revealed significant differences in protein profiling between the two groups, and Gene Ontology analysis suggested a new hypothesis that ER translocation and Rab GTPase dysfunction may be one of the causes of subsequent neurological disorders in offspring. Previously, we developed a program to predict various complications in preterm infants born at less than 32 weeks' gestation. In this study, we published a web tool to assist obstetricians and neonatologists in providing accurate information on infant survival and risk of neonatal complications to pregnant women and their families.