HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	妊娠女性におけるポドサイト尿ならびにネフリン尿に関する研究
Author(s)	翟, 天玥
Description	配架番号：2379
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13000号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13000
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70278
Type	doctoral thesis
File Information	Tianyue_Zhai.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

妊娠女性におけるポドサイト尿ならびにネフリン尿に関する研究

（Studies on podocyturia and nephrinuria in pregnant women）

2018 年 3 月

北海道大学

翟　天玥

TIANYUE ZHAI

目　　次

妊娠女性におけるポドサイト尿ならびにネフリン尿に関する研究

発表論文目録および学会発表目録・・ 1 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 頁

方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6 頁

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・ 24 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・ 26 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Zhai, T. Y., Furuta, I., Akaishi, R., Ishikawa, S., Morikawa, M., Yamada, T., Koyama, T., & Minakami, H. Alteration of podocyte phenotype in the urine of women with preeclampsia. *Sci. Rep*. **6**, 24258 (2016).
2. Zhai, T. Y., Furuta, I., Akaishi, R., Kawabata, K., Chiba, K., Umazume, T., Ishikawa, S., Yamada, T., Morikawa, M., & Minakami, H. Feasibility of nephrinuria as a screening tool for the risk of pre-eclampsia: prospective observational study. *BMJ. Open*. **6**, e011229 (2016).
3. Zhai, T. Y., Furuta, I., Nakagawa, K., Kojima, T., Umazume, T., Ishikawa, S., Yamada, T., Morikawa, M., & Minakami, H. Second-trimester urine nephrin:creatinine ratio versus soluble fms-like tyrosine kinase-1:placental growth factor ratio for prediction of preeclampsia among asymptomatic women. *Sci. Rep*. **6**, 37442 (2016).
4. Furuta, I., Zhai, T. Y., Ishikawa, S., Umazume, T., Nakagawa, K., Yamada, T., Morikawa, M., & Minakami, H. Association between nephrinuria, podocyturia, and proteinuria in women with pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res*. **43**, 34 – 41 (2016).
5. Furuta, I., Zhai, T. Y., Ishikawa, S., Umazume, T., Nakagawa, K., Akaishi, R., Yamada, T., Morikawa, M., & Minakami, H. Increased podocyturia in pregnant women compared to non-pregnant women. *J. Obstet. Gynaecol. Res*.**43**, 873 – 879 (2017).
6. Furuta, I., Zhai, T. Y., Umazume, T., Ishikawa, S., Hosokawa, A., Kojima, T., Chiba, K., Yamada, T., Morikawa, M., & Minakami, H. Postpartum podocyturia following preeclamptic pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res*. **43**, 1008 – 1013 (2017).
7. Furuta, I., Zhai, T. Y., Umazume, T., Ishikawa, S., Nakagawa, K., Kojima, T., Yamada, T., Morikawa, M., & Minakami, M. Effects of childbirth on podocyturia in women with normotensive uncomplicated pregnancies. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. **312**, F1112 – F1119 (2017).
8. Baba, Y., Furuta, I., Zhai, T. Y., Ohkuchi, A., Yamada, T., Takahashi, K., Matsubara, S., & Minakami, H. Effect of urine creatinine level during pregnancy on dipstick test. *J. Obstet. Gynaecol. Res*. **43**, 967 – 973 (2017).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 翟 天玥, 赤石 理奈, 古田 伊都子, 森川 守, 山田 崇弘, 石川 聡司, 小山 貴弘, & 水上 尚典　妊娠高血圧腎症:尿中ポドサイト検出の臨床的意義の解析, 第 36 回日本妊娠高血圧学会学術集会 2015.9.11 (札幌)

2. 翟 天玥, 古田 伊都子, 赤石 理奈, 石川 聡司, 森川 守, 山田 崇弘, 小山 貴弘, & 水上 尚典　妊娠高血圧腎症妊婦における尿中ポドサイトの量的ならびに質的変化, 第 37 回日本妊娠高血圧学会学術集会 2016.10.7 (埼玉)

緒　　言

妊娠高血圧腎症（preeclampsia, 以下 PE）は全妊娠の約 3〜5%に合併し、母児生命を脅かす重篤な産科固有合併症である[1]。高齢妊娠、初産、PE 既往、家族歴、多胎、糖尿病、高血圧、腎疾患、自己免疫疾患などが危険因子とされている[1]。その成因として胎盤形成障害、血管内皮障害、免疫、遺伝的因子などによる機序が考えられているが[2]、病態は極めて多彩であり、本態はいまだに不明である。近年、有力な機序の一つとして抗血管新生因子による血管内皮障害が報告されている[3]。PE では妊娠初期から螺旋動脈の remodeling 不全が生じ、絨毛細胞から抗血管新生因子が産生され、胎児胎盤循環系で血管内皮障害を起こし[4]、同時に、これらの因子は胎盤を通過して母体循環系にも移行し、母体の血管内皮障害を起こす[5]。

PE は高血圧に蛋白尿を伴い、高血圧のみを認める妊娠高血圧（Gestational hypertension : GH）に比して母児の予後は不良である[6,7]。PE を経験した女性は、将来の心血管系疾患や末期腎不全リスクが PE 非経験女性に比して 6 倍高い[8]。加重型 PE は腎疾患あるいは高血圧合併女性が PE を発症した場合に診断されるが、腎疾患合併女性は腎疾患非合併女性に比して PE 発症リスクが高い。また PE は腎機能増悪因子であり、妊婦高度腎機能障害は将来の末期腎不全危険因子である[8]。

Podocytes は腎糸球体基底膜最外層を覆う最終分化細胞であり、その足突起は密な結合をして血中蛋白等漏出を防止している[9]。Podocytes は高血圧や hyperfiltration 等のストレス、あるいは腎糸球体における血管内皮障害により腎糸球体基底膜より脱落し[10-12]尿中にポドサイト尿（podocyturia）として出現する。Podocytes は最終分化細胞なので、腎糸球体より脱落しても腎糸球体では補充はされないと考えられているため、podocyturia が顕著な例では glomerular podocytes 数は減少する[13]。ポドサイト尿と腎疾患重症度との関連については多数の報告がなされている[5]。動物実験では原因を問わず glomerular podocytes 数減少は末期腎不全につながることが示されている[14,15]。加齢により glomerular podocytes 数は減少し[16]、加齢は末期腎不全の危険因子である[17]。

Podocyturia は蛋白尿を伴う疾患で顕著であるが、臨床的蛋白尿に先行することが示唆されており[11,12]、正常成人や正常妊婦においても認められる[13,18]。PE 合

併妊婦では徐々に蛋白尿が増加することが知られており[18]、顕著な podocyturia が認められる[19-21]。しかし、PE 合併妊婦での podocyturia 程度の推移については研究されていない。

Podoctyuria 定量法には尿中細胞培養と引き続く免疫組織化学染色法があるが[11,12,19,20]、時間と経験が要求され、判断に主観的要素が含まれるため、定量や多検体間での podoctyuria 比較には適していない。また、尿から細胞を分離するため細菌混入等により一定の培養効果が得られない場合がある。Podocin や nephrin は podocyte 特異的蛋白であるため、podocyte 同定に有用である[22,23]。そのため、近年、尿中 podocin mRNA 定量や尿中 nephrin mRNA 定量が podocyturia を反映することが報告された[24]。

PE は重篤な合併症のため、発症予測のためのバイオマーカーが精力的に研究されている。現時点で最も有力な PE 発症予測のためのバイオマーカーは serum soluble fms-like tyrosine kinase-1（sFlt-1）:serum placental growth factor（PlGF）ratio（FPR）である[2-5,25-28]。Nephrin は podocyte に特異的に発現している蛋白[29]であり、glomerular podocytes より剥離し、尿中に検出され得る（nephrinuria）。特に PE のような proteinuric disease では nephrinuria が高度となることが知られている[30-33]。PE のために死亡した妊婦や PE 妊婦では腎臓における nephrin 発現は減少している[34,35]。また、ヒトや動物実験において、glomerular podocytes 数減少は、尿中 podocytes の nephrin mRNA 減少と関連がある[14,15]。このため、Nephrin 発現が少なくなった glomerular podocytes は glomerular basement membrane（GBM）から剥奪しやすくなり、podocyturia となることが推測される。これらは、妊婦の nephrinuria は PE 発症予測に有用である可能性がある。また、妊婦尿中 podocytes の nephrin mRNA 発現は減少している可能性がある。しかし、これらの点については十分には研究されていない。

本研究は以下 3 点を明らかにする目的で行った。

1) 正常血圧妊婦ならびに PE 合併妊婦における podocyturia（尿中 podocin mRNA 発現量により評価）の推移。
2) PE 合併妊婦での尿中 podocytes では nephrin mRNA 発現が減少しているか？
3) Nephrinuria は PE 発症を予知するか？

略　語　表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

FPR	serum soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1): placental growth factor (PlGF) ratio
GBM	glomerular basement membrane
GH	gestational hypertension
GW	gestational week
NA	not applicable
NCR	nephrin:creatinine ratio
PCR	protein: creatinine ratio
PE	preeclampsia
PlGF	placental growth factor
PNR	podocin:nephrin mRNA ratio
PSR	podocin:synaptopodin mRNA ratio
ROC	receiver operating characteristic curve
sEng	soluble endoglin
sFlt-1	serum soluble fms-like tyrosin kinase-1
SNR	synaptopodin:nephrin mRNA ratio
SPIP	significant proteinuria in pregnancy defined as protein-to-creatinine ratio (mg/mg) ≥ 0.27 in the spot urine specimen

方　　法

本臨床研究に関しては，北海道大学病院の自主臨床研究審査委員会の承認（2014 年 4 月 30 日：013-3999）を得て実施された。

1. 研究参加者

北海道大学病院で健診を受け、本研究参加に書面で同意した妊婦から尿検体提供を受けた。これら女性は 2014 年 5 月から 2016 年 9 月までの研究期間中、北海道大学病院で出産し、妊娠中に数回尿検体を提供した。妊娠中の有意の蛋白尿（significant proteinuria in pregnancy, 以下 SPIP）は、随時尿検体で PCR ≥0.27 と定義した [36]。高血圧は、12 時間以上の間隔を空けて行われた血圧測定で、少なくとも 2 回収縮期血圧≥140mmHg および/または拡張期血圧≥90mmHg が認められた場合と定義した [36]。高血圧ならびに SPIP を発症した場合、PE と診断した [36]。

本研究に参加した妊婦の一部は妊娠中期ならび後期での血液提供にも同意し、採尿後 5.0 mL の血液を提供した。分娩中妊婦ならびに帝王切開直後の採尿にはカテーテルを用いた。最終的に研究に参加した妊婦 383 名は全員北海道大学で分娩した。血液提供は 254 名から受けた。

2. 尿検体の処理ならび尿中物質測定

回収した尿は匿名コード化し採取後 2 時間以内に 700×g、5 分間遠心分離し上清はタンパク、creatinine ならびに nephrin 濃度測定まで-20℃で保存した。タンパク質ならびに creatinine 濃度は、それぞれ、Protein Assay Rapid Kit Wako および Laboassay Creatinine（和光純薬工業株式会社、大阪、日本）を用いて測定した。Nephrin 濃度は ELISA Kit（Funakoshi Co.、Tokyo、Japan、カタログ番号：1035、Excell、Philadelphia、Pennsylvania、USA 製）を用いて測定した。ペレット化した尿沈渣はリン酸緩衝液で 2 回洗浄（700×g、5 分間遠心分離）後、RNAlater（Life Technologies、Carlsbad、CA、USA）に懸濁し RNA 抽出まで−20℃で保存した。Nephrinuria ならびに proteinuria は尿中 creatinine で補正した。

なお、尿検体は臨床業務で使用した検体の残りを用いたため、臨床業務で追加検査が必要になる検体を誤って先に研究用に回収してしまい、臨床業務に迷惑

をかけてしまうことも多々あった。そのため、外来看護師や中央検査室の検査技師の方々にお願いし、臨床業務に支障が出ないように、かつ回収の漏れがないように様々な方面に調整し本研究を遂行した。

3. 尿沈渣中の mRNA 発現量の定量化

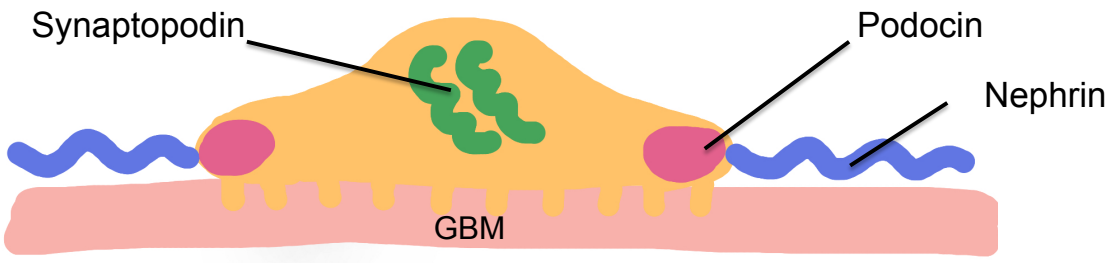
TRIzol 法を用いて RNA を抽出した。RNAlater 中の細胞懸濁液を 20000×g で 3 分間遠心分離した。次いで、ペレットを TRIzol（Life Technologies）で溶解し、RNeasy mini kits（Qiagen、Hilden、Germany）を用いて製造業者のプロトコールに従って全RNAを抽出した。混入しているゲノムDNAをDNaseで除去した後、RNeasy MinElute clean-up kit（Qiagen）を用いて全 RNA を精製した。NanoDrop 1000 分光光度計（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA）を用いて全 RNA を定量した。 260/280nm における吸光度の比を用いて RNA 純度を評価した。全 RNA の逆転写は、PrimeScript RT Reagent kit（Takara Bio, Otsu, Japan）を使用して、製造者の指示に従って行った。

Podocin-mRNA、Nephrin-mRNA、Synaptopodin-mRNA、ならびに Aquaporin-2-mRNA の尿中発現量評価のために、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）を行った。これらはハウスキーピング遺伝子 GAPDH あるいは尿中 creatinine を用いて各標的遺伝子 mRNA 発現量を標準化した。以下のオリゴヌクレオチドプライマー配列を使用した：

podocin、	forward 5'-AAGAGTAATTATATTCCGACTGGGACAT-3'.
	reverse 5'-TGGTCACGATCTCATGAAAAGG-3'.
nephrin、	forward 5'-CAACTGGGAGAGACTGGGAGAA-3'.
	reverse 5'-AATCTGACAACAAGACGGAGCA-3'.
synaptopodin、	forward 5'-AAGTCACATCCAGCTCCTTC-3'.
	reverse 5'-CTTCTCCGTGAGGCTAGTG-3'.
GAPDH、	forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'.
	reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'.
aquaporin-2、	forward 5'-TGGGCCATATGTGCTATGGAGA-3'.
	reverse 5'-AAGGACACTCAGGTGCCAGGA-3'.

Real-time PCR は、Power SYBR Green Master Mix（Invitrogen）を用いて行った。データは、ABI Prism 7300 配列検出システム（Applied Biosystems、Foster City、CA、USA）を用いて収集した。熱サイクリング条件は 95℃で 10 分間、続いて 95℃で 15 秒間、60℃で 1 分間を 40 サイクル行った。標的遺伝子発現の相対的

定量は、$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて行った。有意な検出可能な蛍光の増加が検体中に生じなかった場合、その検体において標的遺伝子が検出不能であると判断した。



上の図のように、nephrin は podocyte から作られた濾過障壁のスリット膜を構成するタンパクである。Podocin はスリット膜基部に存在するタンパクである。そして、synaptopodin は細胞内骨格タンパクである。

4. 血液採取の方法と血中物質測定

上腕を駆血し、23G 翼状針で正中皮静脈を穿刺し、真空採血管を用いて 5.0 mL 採血した。可及的速やかに、300×g で 15 分間の遠心分離を行い、血清は血清中 sFlt-1 と PlGF 濃度測定まで－20℃で冷凍保存した。これらの測定は ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いて実施したが、sFlt-1 測定時には血清を 1:10–1:100 に、PlGF 測定時には 1:1–1:10 に希釈して測定に供した。

5. 統計分析

データは中央値（範囲）として提示した。解析は、JMP Pro10© statistical software package (SAS, Cary, NC, USA)を使用して行った。中央値の比較には Wilcoxon / Kruskal-Wallis 法を用いた。3 群以上の群間比較には Bonferroni 補正を用いた Mann-Whitney U 検定を用いた。Spearman’s rank-order correlation は、2 つの変数間の関連性を検討するために使用した。バイオマーカーのスクリーニング特性検定については、Receiver operating characteristic curves (ROC)を用いた。P <0.05 の場合、統計的有意差ありとした。

結　　果

1. 正常妊婦と PE 合併妊婦の podocyturia 比較

終始正常血圧であった妊婦 38 名からの尿 77 検体と PE を後に発症した妊婦 18 名からの PE 発症前後尿検体 116 検体を比較した（Table 1）。

Table 1. Demographic characteristics of 56 women.

	Normotensive	Preeclampsia
Number of women	38	18
Maternal age (year)	34 (24 – 42)	36 (19 – 43)
Primiparous	22 (58%)	15 (83%)*
At the enrollment		
GW	13.6 (11 - 39)	25.8 (15 - 36) *
Hypertension alone	None	3
Preeclampsia (PE)	None	6
Asymptomatic	38	9
Onset (GW)		
Hypertension	NA	30.5 (24 – 40)
SPIP	NA	30.5 (24 – 39)
GW at delivery	38 (36 – 41)	31.5 (26 – 40) *
< 37	1 (2.6%)	12 (67%)*
Infant birthweight (kg)	3.00 (2.36 – 3.90)	1.47 (0.70 – 3.28) *
Total no. of urine samples	77	116
No. of samples/person	2 (1 – 3)	6.5 (2 – 12) *
Timing of urine sampling		
First trimester (5 – 13)	22 (28%)	0 (0%)
Second trimester (14 – 27)	26 (34%)	30 (26%)
Third trimester (28 – 40)	29 (38%)	45 (39%)
Postpartum	0 (0%)	41 (35%)

数値は中央値 (範囲); GW, gestational week; PE, preeclampsia; SPIP, significant proteinuria in pregnancy defined as protein-to-creatinine ratio (mg/mg) ≥ 0.27; *, $P < 0.05$ vs normotensive pregnant women.

本研究で解析した妊婦 56 名のうち、38 人は妊娠期間を通じて正常血圧のままであった。登録時（最初の尿採取時）の妊娠週数は、PE 女性の方が正常血圧女性より有意に遅かった。PE を発症した 18 名中、3 名は登録時に高血圧のみを認め、6 名は既に PE を発症しており、残り 9 名は高血圧も蛋白尿も認めなかった。したがって、PE を発症した 18 名中 9 名は、最初の尿採取時には無症状であった。初産女性の割合、37 週未満の早産率、女性 1 人当たりの尿サンプル数は PE 群で有意に多かった。

正常血圧妊婦では妊娠中 podocin-mRNA 発現量は有意の変化を示さなかった（Figure 1）が、PE 発症妊婦では Figure 2 に示すように分娩に向けて増加を示し、分娩後は減少に転じた。すなわち、PE 妊婦において podocyturia は正常妊婦に比して高度であり、その程度は分娩まで増加し続けることが示された。また、Figure 3 に示すように PE 妊婦の蛋白尿と尿中 podocin-mRNA 発現量によりモニターされた podocyturia は正の相関を示した。また蛋白尿が増加するにつれ podocin:nephrin mRNA ratio (PNR)が増加した（Figure 3 下段最左側）。これは蛋白尿が増加するにつれ、尿中に落下した個々podocyte 中の nephrin-mRNA 発現量は減少することを示唆した。すなわち、蛋白尿が顕著な PE では glomerular podocytes の phenotype は変化し（nephrin 発現量の減少）、それらが GBM より脱落しやすいことを示唆した。

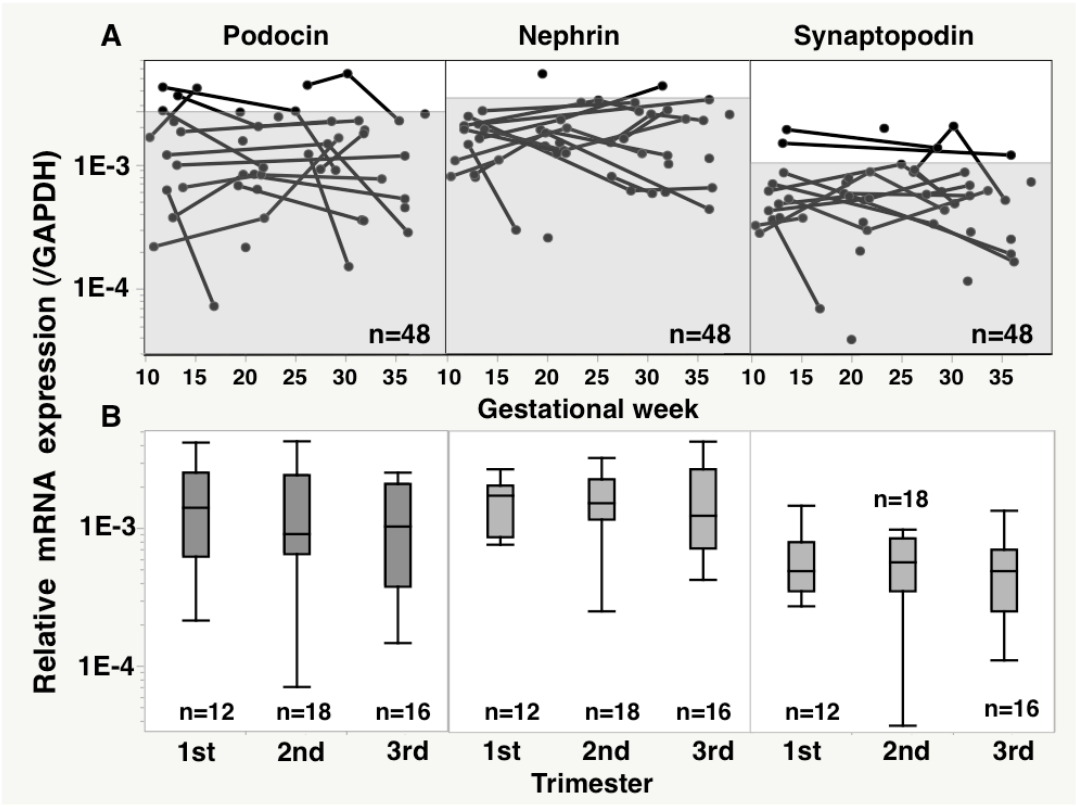


Figure 1. Changes in Podocin-mRNA, Nephrin-mRNA, and Synaptopodin-mRNA expression levels in normtensive control pregnancies.
A：3 種の mRNA がすべて検出可能な 48 検体の変化。網掛け部分はそれぞれの mRNA の 90th percentile 以下を示す。
B：3 種の mRNA の妊娠各時期での変化。健常妊婦では妊娠中に有意な変化を示さなかった。各妊娠 trimester 中、同一女性から複数尿検体があった場合、最高値を示した検体の値を代表値とした。

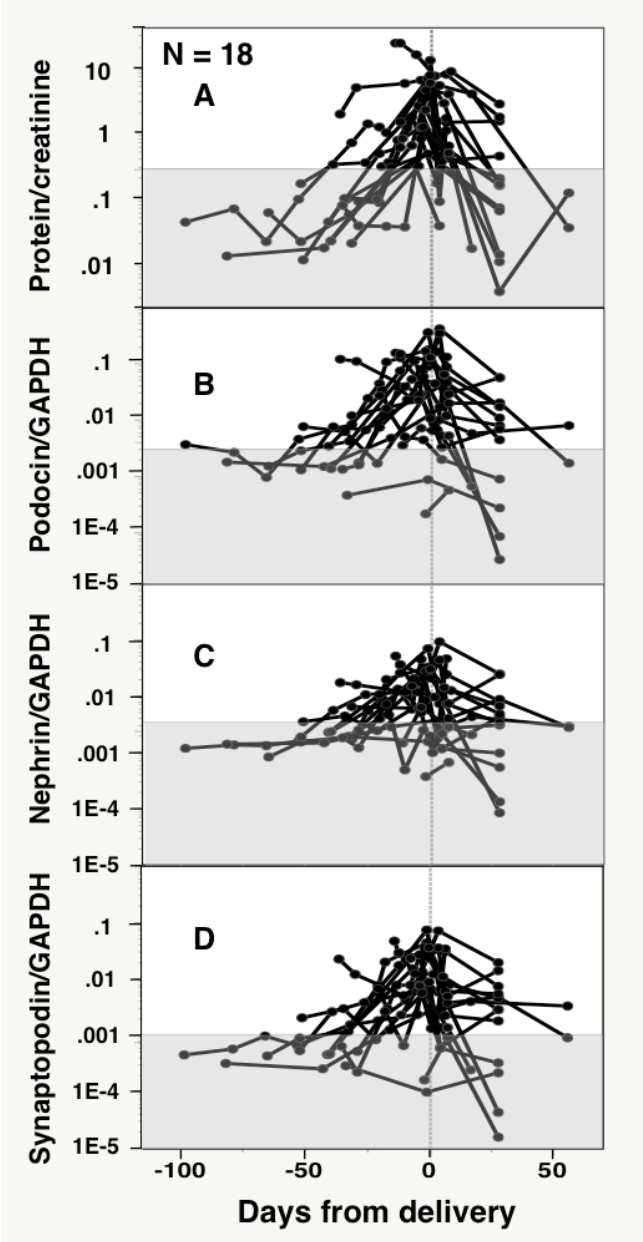


Figure 2. Perinatal changes in P/Cr level and mRNA expression in 18 PE women.

3種のmRNAすべてが検出可能なPEの104検体を解析した。それぞれのmRNA発現量は90th percentileを超えて分娩まで急激に増加し、分娩後には速やかに減少した。
網掛け部分はA：P/Cr＜0.27、B-D：mRNAの90th percentile以下を示す。

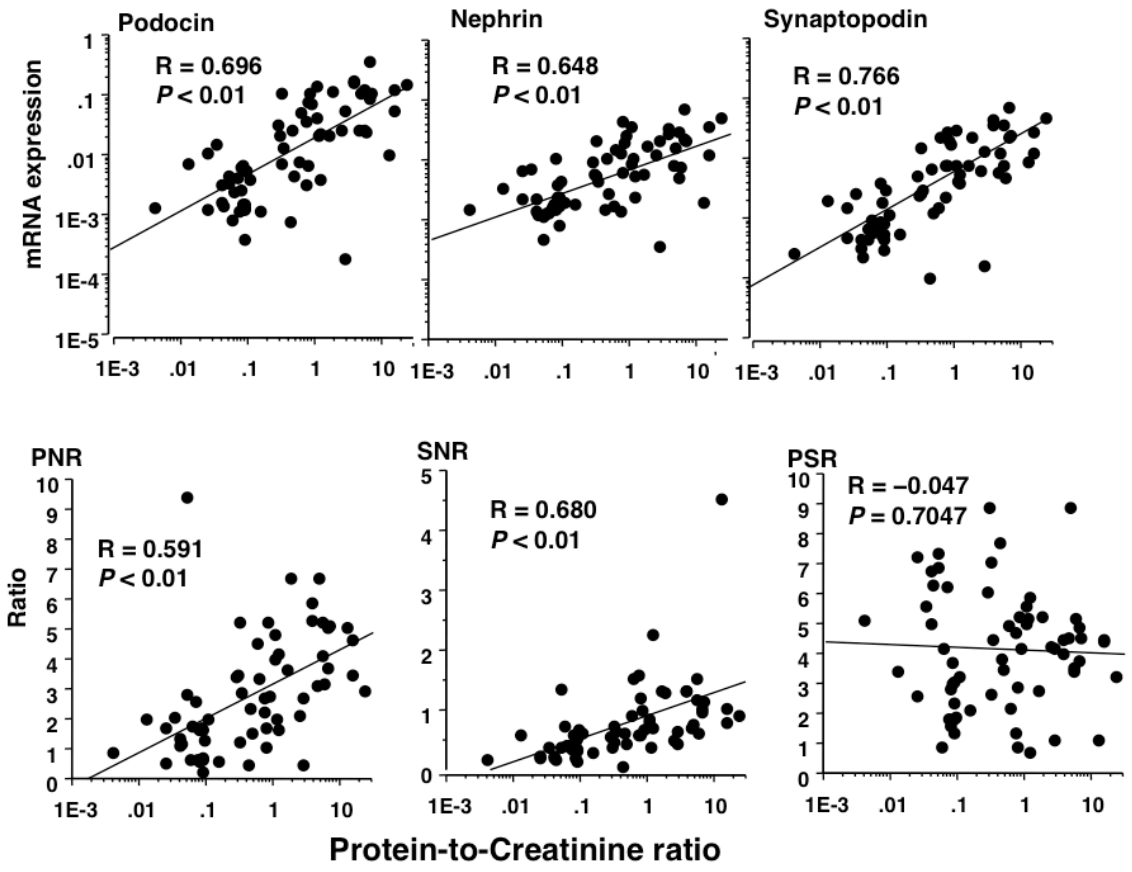
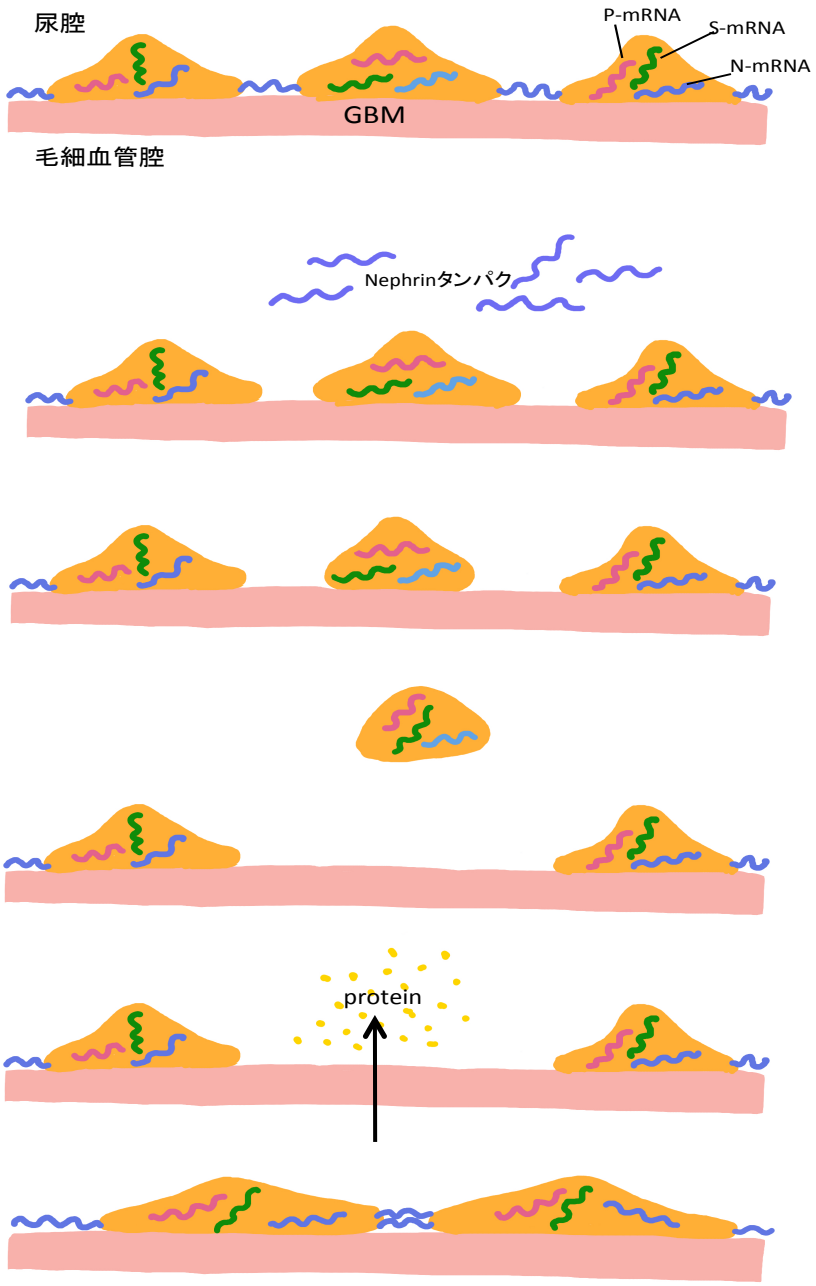


Figure 3. Association of protein:creatinine ratio with three mRNA expression levels, podocin:nephrin mRNA expression ratio (PNR), synaptopodin:nephrin mRNA expression ratio (SNR), and podocin: synaptopodin mRNA expression ratio (PSR) in antenatal urine samples from PE women.

PE を発症した女性の分娩前の 65 検体の解析。GAPDH で補正した mRNA 発現量（Podocin-mRNA, Nephrin-mRNA, and Synaptopodin-mRNA）は Protein/Creatinin Ratio（PCR）と有意な正の相関を示した。PNR と SNR は PCR と正の相関を示したが、PSR は PCR と相関しなかった。



これらの結果から、PE 患者における podocyte が尿中に脱落するメカニズムを考察した。上図のように、腎糸球体の podocyte では podocin、nephrin、synaptopodin の mRNA が発現している。PE が発症すると何らかの因子によって nephrin 遺伝子の発現が減少することを確認した。それによって新しい nephrin タンパクが補充されなくなり、nephrin タンパクがはがれ落ちる。続いて、糸球体に付着している podocyte の足突起が消失し、支えを失った podocyte は尿中に脱落する。Podocyte 脱落によって生じた隙間からタンパクが漏出して、タンパク尿が発症する。分娩後は脱落を免れた podocyte から足突起が伸長してきてこの隙間を埋めてタンパクが止まる。

2. Nephrinuria ならびに proteinuria による PE 発症予測予備研究

終始正常血圧であった妊婦 75 名からの尿 134 検体と PE を後に発症した妊婦 14 名からの発症前後尿検体 115 検体（Table 2）を用いて nephrinuria ならびに proteinuria による PE 発症予測について検討した。PE 妊婦 14 名からの尿 114 検体採取時の clinical phase は 73 検体が latent phase（SPIP, 高血圧いずれも発症してない状態）時、16 検体が SPIP のみの時期、4 検体が高血圧のみの時期、22 検体が PE 発症後であった（Table 2）。

Table 2. Demographic characteristics of 89 women.

	Control	Preeclampsia	*P*-value
No. of women	75	14	
Maternal age (years)	34 (20 – 43)	38 (19 – 43)	0.6216
≥ 35	36 (48%)	8 (57%)	0.5299
≥ 40	8 (11%)	6 (43%)	0.0024
Nulliparous	39 (52%)	13 (93%)	0.0018
Twin pregnancy	0 (0.0%)	4 (29%)	< 0.0001
Body height (m)	1.58 (1.45 – 1.68)	1.58 (1.48 – 1.66)	0.7290
Pre-pregnancy weight (kg)	51 (40 – 100)	54 (34 – 67)	0.7670
Body mass index (kg/m^2)	20.2 (16.8 – 38.1)	21.8 (14.9 – 27.9)	0.6332
≥ 25	9 (12%)	2 (14%)	0.8115
Complications	56 (75%)¶	8 (57%)†	0.1805
GW at onset			
Hypertension	NA	34 (27 – 40)	
SPIP	NA	32.5 (26 – 39)	
GW at delivery	38 (36-41)	36 (30 – 40)	< 0.0001
< 37	3 (4.0%)	9 (64%)	< 0.0001
Infant birthweight (kg)	2.91 (2.22 – 3.86)	2.29 (1.08 – 2.86)	< 0.0001
Total no. of urine samples	134	115	
No. of samples/person	2 (1 – 3)	7 (4 – 13)	
Timing of urine sampling			
1st trimester (5 – 13)	23/[23] *	8/[7] *	
2nd trimester (14 – 27)	75/[75] *	50/[14] *	
3rd trimester (28 – 38)	36/[36] *	57/[14] *	
Latent phase	NA	73/[14] *	
SPIP alone phase	NA	16/[6] *	
Hypertension alone phase	NA	4/[2] *	
Preeclampsia phase	NA	22/[14] *	

数字は中央値(範囲)。[角括弧]は尿検体を提供した女性の人数が示されている。
GW, gestational week; SPIP, significant proteinuria in pregnancy defined as protein-to-creatinine ratio (mg/mg) ≥ 0.27; *, $P < 0.05$ vs normotensive pregnant women.
¶：甲状腺疾患 9 例、子宮筋腫 7 例、先天性心疾患 6 例、糖尿病/妊娠糖尿病 4 例、自己免疫疾患 4 例（シェーグレン症候群、免疫性血小板減少性紫斑病、抗

リン脂質症候群、慢性関節リウマチ）、うつ病 4 例、悪性腫傷 4 例（治療後）、先天性プロテイン S 欠損症 3 例、死産既往 3 例。以下の症例は各 1 例：ウィルソン病、脳動脈瘤、モヤモヤ病、クッシング症候群、リンパ管炎症、原発性免疫不全症候群、再発性腎盂腎炎、癲癇、肺サルコイドーシス、脊椎側彎症、不整脈および喘息。これら 56 名は登録時に PCR level 0.026 (0.001 – 0.111) (mg/mg, median [range])を示した。
†：自己免疫疾患 3 例（全身性エリテマトーデス 2 例とシェーグレン症候群 1 例）、泌尿生殖器奇形 3 例（片側腎不全、重複子宮、双極子宮）、糖尿病 1 例と慢性甲状腺炎 1 例。これら 8 名は登録時に PCR level 0.047 (0.002 – 0.065)を示した。

Figure 4 に正常妊娠女性の尿中 nephrin:creatinine ratio（NCR）ならびに protein:creatinine ratio（PCR）を示した。NCR は正常妊娠女性では妊娠中に有意な変動を示さなかった（Figure 4A および 4B の上段）。しかし PCR は妊娠週数進行につれ増加した（Figure 4A および 4B の下段）。

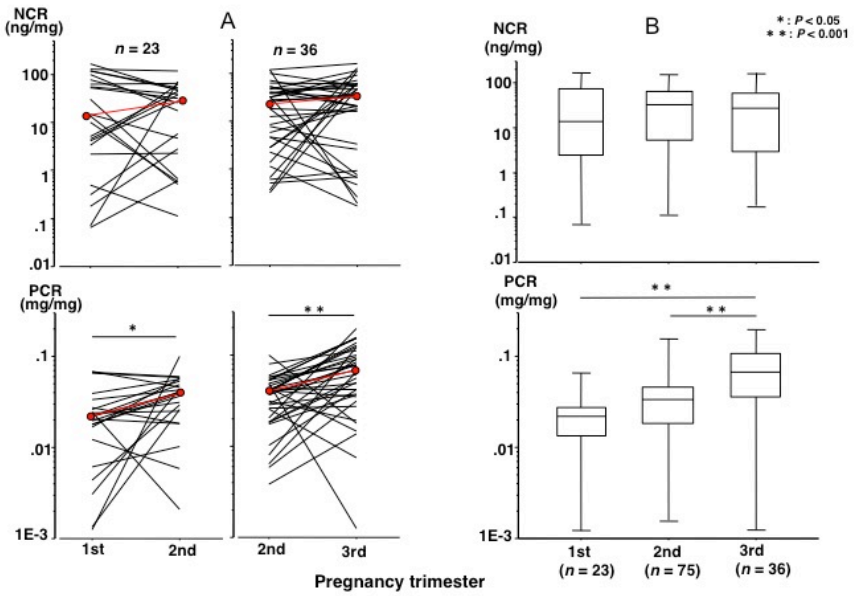


Figure 4. Changes in NCR and PCR in normotensive control women.

NCR, nephrin:creatinine ratio; PCR, protein:creatinine ratio.
A: 赤線は中央値の変動。23 名が 1st and 2nd trimesters の longitudinal 検体を提供しており、NCR (ng/mg)の中央値は各々13.8 と 23.8 であった(P=0.2735)。36 名が 2nd and 3rd trimesters の longitudinal 検体を提供しており、NCR (ng/mg)の中央値は各々22.1 と 26.6 であった(P=0.2264)。PCR(mg/mg)の中央値は 1st and 2nd trimesters について 0.022 と 0.040 であった(P=0.0126)。2nd and 3rd trimesters については 0.040 と 0.068 であった(P<0.0001)。
B: 34 名が 2nd-trimester 検体のみを提供した。PCR は妊娠経過につれ上昇したが、NCR は変動しなかった。

一方、PE 妊娠では妊娠週数進行につれ NCR, PCR いずれも徐々に増加した（Figure 5）。NCR は SPIP 発症前に有意の上昇を示しており、PE 妊娠と正常妊娠を識別する可能性が示唆された。一方、PCR は正常妊娠においても妊娠週数増加につれ上昇しており（Figure 4）、NCR は PCR より PE 発症予測において優れている可能性を示唆した。

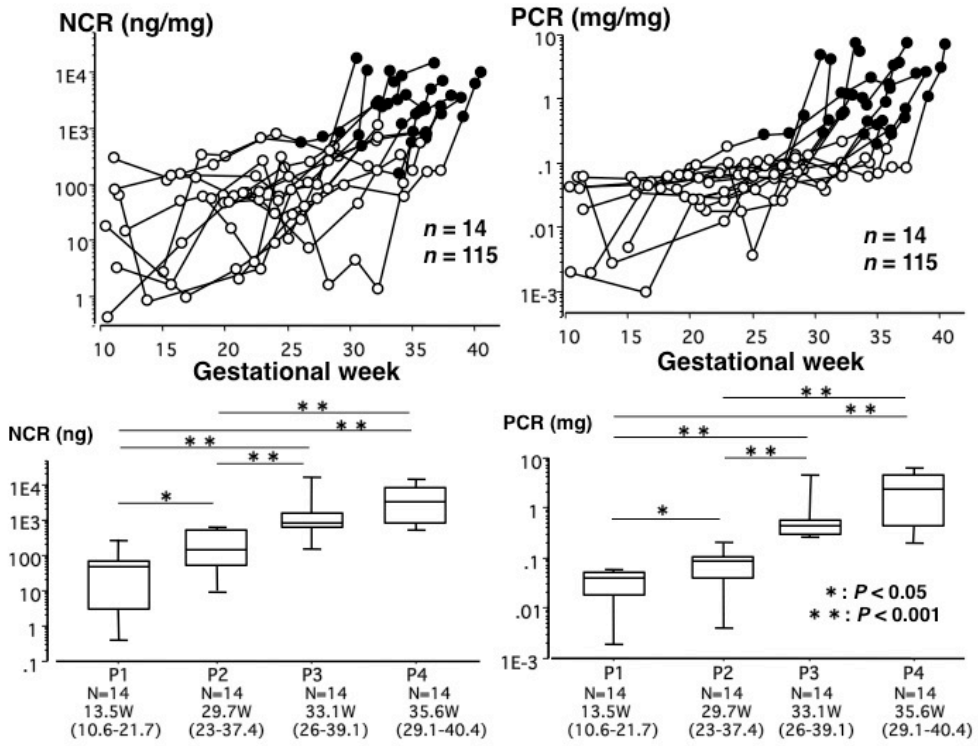


Figure 5. Changes in NCR and PCR in 14 PE women.

14 名 PE 女性が合計 115 尿検体を提供した。上段パネルの白丸と黒丸それぞれは SPIP 発症前と発症後の尿検体を示している。下段パネルでは PE 発症時期によって 4 群に分けている。Phase 1 (P1), 初回採取時(Gestational week, GW) 13.5 (10.6 – 21.7); phase 2 (P2), SPIP 発症前 GW 29.7 (23.0 – 37.4); phase 3 (P3), SPIP 発症後 GW 34.0 (26.0 – 39.1); phase 4 (P4), 分娩前 GW 35.6 (29.1 – 40.4)。P1, P2, P3 および P4 について NCR (ng/mg)それぞれの中央値は 49.2, 142.1, 851.4 および 3368.7 であった。P1, P2, P3 および P4 について PCR (mg/mg)それぞれの中央値は 0.041, 0.087, 0.436 および 2.360 であった。P2 について NCR の中央値(142.1)は血圧正常女性より有意に高かった(14.3, 32.3 and 26.6 for the 1st, 2nd and 3rd trimester, respectively)。P1, P2, P3 および P4 について protein concentrations (μg/mL)それぞれの中央値は 26.3, 56.4, 301.4 および 1237.8 であった。

Figure 6 上段に終始正常血圧であった妊婦 75 名からの尿 134 検体の妊娠週数別 NCR ならびに PCR を示した。NCR は妊娠週数に伴う変化がないので、95th percentile 値も一定値 122ng/mg に設定してある。PCR は妊娠週数と伴い上昇するので、95th percentile line は曲線で示した。縦線は妊娠 trimester の境界を示している。Figure 6 下段には採尿時には高血圧、SPIP いずれもなかったが、後に PE を発症した 14 名からの尿 28 検体中（各 trimester1名について1検体）の値を赤丸で示した。各 trimester 95th percentile line を超えた検体は 1st trimester: NCR は 1 人、PCR は 0 人；2nd trimester: NCR は 6 人、PCR は 4 人；3rd trimester: NCR は 6 人、PCR は 1 人であった。これらは、NCR が有望な PE バイオマーカーとなり得ることを示した（legend for Figure 6）。

Table 3. Relative risks of PE women onset when 95th percentile of normotensive pregnant women as cut-offs.

		Relative risks(RR)	(95% CI)
NCR	2nd trimester	5.93	(2.59-13.6)
	3rd trimester	13.5	(3.31-55.0)
PCR	2nd trimester	4.06	(1.64-10.0)
	3rd trimester	1.95	(0.34-11.1)

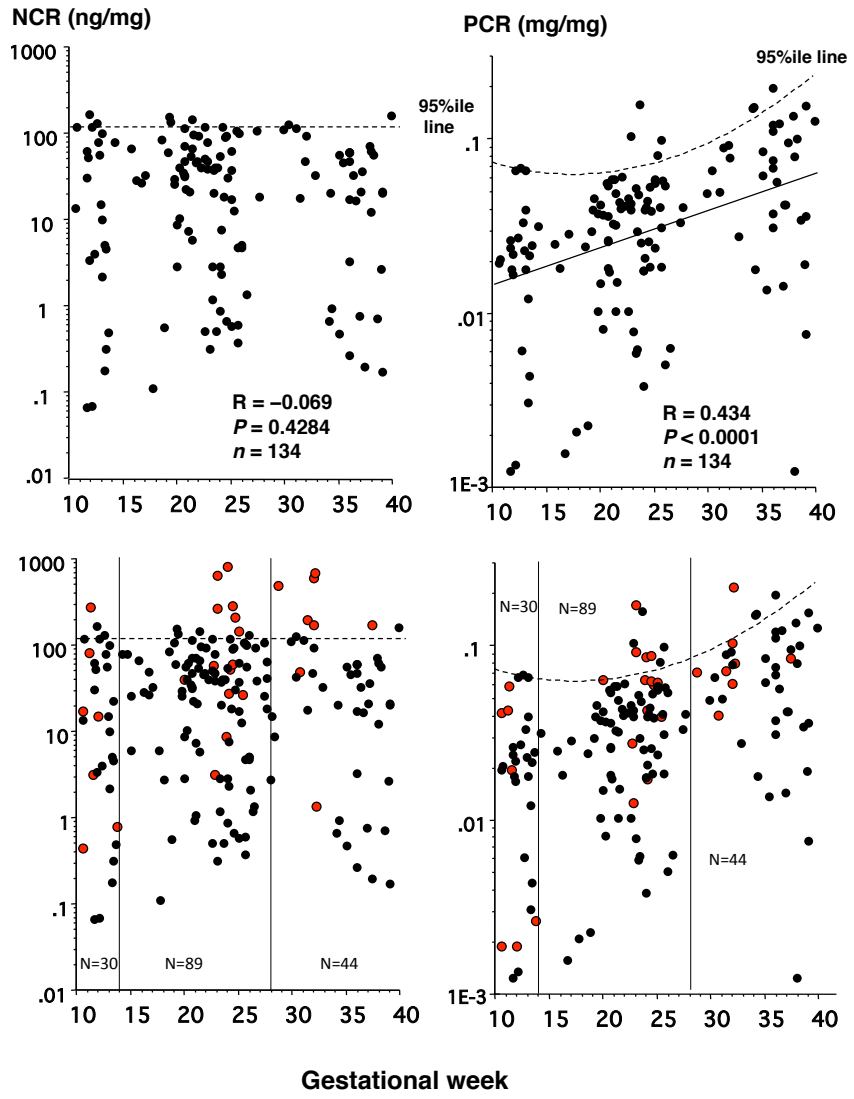


Figure 6. Correlation of NCR and PCR with gestational week in normotensive control women and possibility of NCR as a screening tool for prediction of PE onset.

上段パネル : 正常血圧であった妊婦 75 名からの尿 134 検体の妊娠週数別 NCR ならびに PCR を示した。NCR は妊娠週数との間に有意な相関は認められない (R=-0.069,P=0.4284)。95th percentile 値は 122ng/mg であった。PCR は妊娠週数と有意な相関を示した(R=0.434,P<0.0001)。95th percentile line を曲線で示した。
下段パネル：採尿時には高血圧、SPIP いずれもなかったが後に PE を発症した 14 名からの 28 尿検体(各 trimester 一人一検体)を上段パネル上に赤丸で示した。PE 女性各 trimester 内で複数の尿検体がある場合、1st and 3rd trimester 検体は最も進んだ妊娠週数で採取した検体を、2nd trimester 検体は妊娠 24 週に最も近い日に採取された尿検体を選択した。

3. 妊娠 2nd trimesterによる PE 発症予知: sFlt-1, PlGF, ならびに sFlt-1/PlGF ratio (FPR)との比較。

高血圧、SPIP いずれもない 2nd trimester 妊婦 254 名から尿ならびに血液を同時に採取した（Table 4）。254 名中 15 名がその後（採尿/採血後）PE を発症した（Table 4）。2nd trimester での NCR, PCR, sFlt-1:PlGF ratio（FPR）, sFlt-1, ならびに PlGF がその後の PE 発症をどの程度予知するかについて検討した。なお、FPR は PE のバイオマーカーとして現在、最も有力視されている [2-5,25-27]。

Table 4. Demographic characteristics of 254 women.

	Normotensive	Preeclampsia	*P*-value
No. of women	239	15	
Maternal age (years)	34 (20 – 53)	37 (27 – 43)	0.0978
≥ 35	102 (43%)	9 (60%)	0.1895
≥ 40	29 (12%)	7 (47%)	0.0002
Nulliparous	128 (53%)	15 (100%)	0.0004
Twin pregnancy	27 (11%)	5 (33%)	0.0126
Body height (m)	1.58 (1.38 – 1.77)	1.60 (1.53 – 1.66)	0.6685
Pre-pregnancy weight (kg)	52 (37 – 132)	52 (46 – 67)	0.8940
Body mass index (kg/m^2)	20.4 (14.7 – 50.5)	20.5 (17.8 – 27.9)	0.9858
≥ 25	29 (12%)	2 (13%)	0.8905
Complications			
Diabetes mellitus (DM)	5 (2.1%)	1 (6.7%)	0.2578
Gestational DM	32 (13%)	2 (13%)	0.9951
Connective tissue diseases*	12 (5%)	3 (20%)	0.0170
GW at blood/urine sampling	25 (22 – 27)	24 (23 – 25)	0.0832
GW at onset			
Hypertension	NA	35.3 (27.6 – 38.6)	
SPIP	NA	34.0 (26.0 – 38.6)	
Preeclampsia	NA	35.7 (27.6 – 38.6)	
GW at delivery	38.4 (24.3 – 41.9)	36.9 (27.6 – 39.0)	< 0.0001
< 37	20 (8.4%)	8 (53%)	< 0.0001
Infant birthweight (kg)	2.89 (0.48 – 4.23)	2.32 (0.70 – 2.86)	< 0.0001

数字は中央値(範囲); [角括弧]は尿検体を提供した女性の人数が示されている。
GW, gestational week; SPIP, significant proteinuria in pregnancy defined as protein-to-creatinine ratio (mg/mg) ≥ 0.27.
*, 膠原病には、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、関節リウマチおよび抗リン脂質症候群が含まれる。

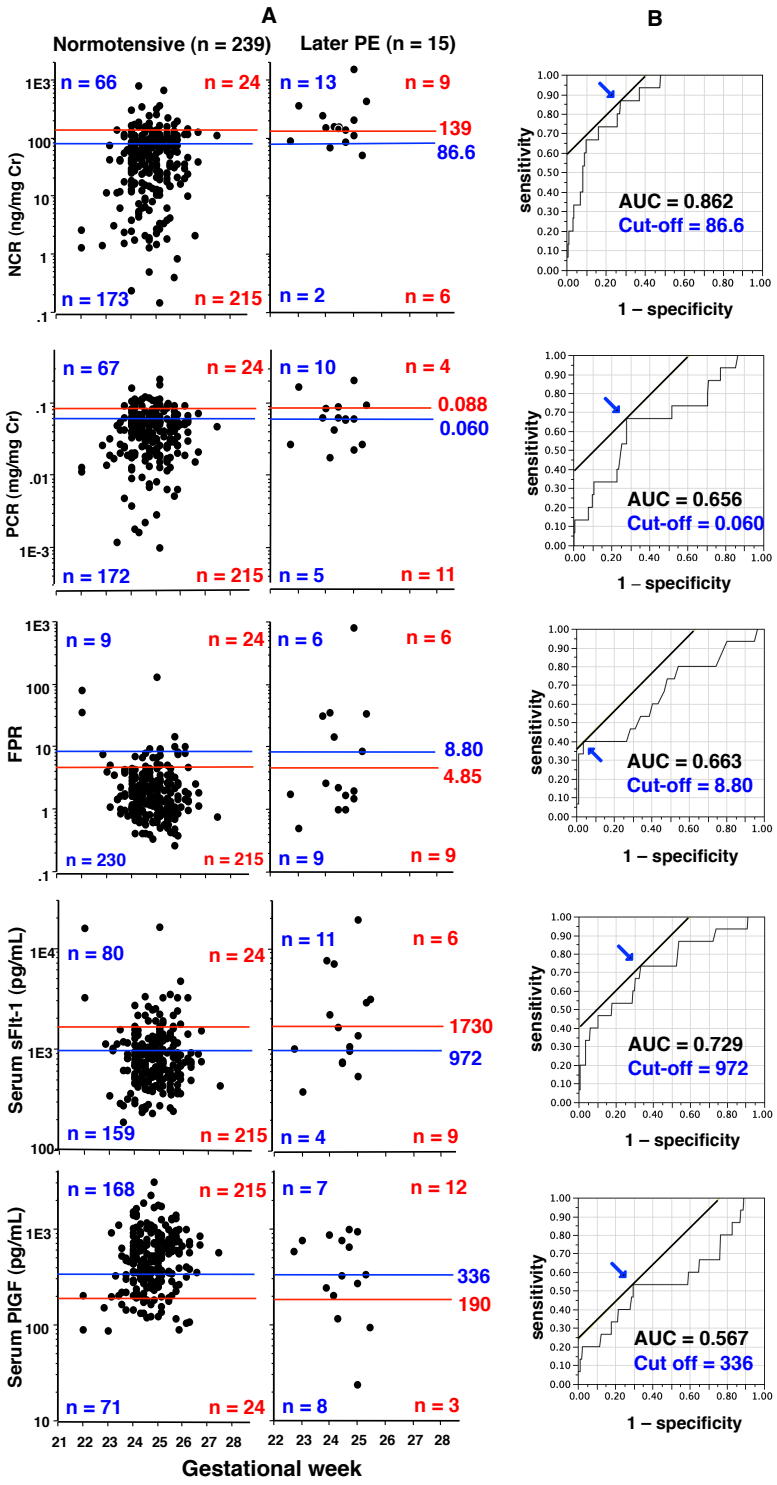


Figure 7. The 2nd trimester nephrin:creatinine ration (NCR), protein:creatinine ratio (PCR), sFlt-1:PlGF ratio (FPR), sFlt-1, and PlGF tests as screening tools for detection of women at higher risk of PE.

Figure 7A には終始正常血圧であった 239 名とこれら測定後 PE を発症した 15 名の各バイオマーカーの値が丸として示されている。赤線は正常血圧であった婦人 239 名の 90th percentile 値（NCR, PCR, FPR, sFlt-1）あるいは 10th percentile 値（PlGF のみ）を示している。青線は、Figure 7B に示されている ROC により得られた cut-off 値を示している。図内に赤色ならびに青色で示された数字はそれぞれ同色の線で示された cut-off 値より高値（以上）あるいは cut-off 値未満を示した検体数を示している。赤線は正常血圧であった婦人 239 名の 90th percentile 値（NCR, PCR, FPR, sFlt-1）あるいは 10th percentile 値（PlGF のみ）を示している。青線は、Figure 7B に示されている ROC により得られた cut-off 値を示している。

これら cut-off 値の PE 発症予測に関するスクリーニング特性について Table 5 に示した。Table 5 に示すように 2nd trimester NCR は 2nd trimester FPR に比して、PE 発症予測に関してより優れたスクリーニング特性を示した。

Table 5. Screening characteristics of various parameters.

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
*90th %tile values as cut-offs (10th %tile for PlGF)**				
NCR [139 ng/mg]	60% (9/15)	90% (215/239)	27% (9/33)	97% (215/221)
FPR [4.85]	40% (6/15)	90% (215/239)	20% (6/30)	96% (215/224)
sFlit-1 [1730 pg/mL]	40% (6/15)	90% (215/239)	20% (6/30)	96% (215/224)
PlGF [190 pg/mL]	20% (3/15)	90% (215/239)	11% (3/27)	95% (215/227)
PCR [0.088]	27% (4/15)	90% (215/239)	14% (4/28)	95% (215/226)
Cut-offs suggested by ROC curves†				
NCR [86.6 ng/mg]	87% (13/15)	72% (173/239)	17% (13/79)	99% (173/175)
FPR [8.80]	40% (6/15)	96% (230/239)	40% (6/15)	96% (230/239)
sFlit-1 [972 pg/mL]	73% (11/15)	67% (159/239)	12% (11/91)	98% (159/163)
PlGF [336 pg/mL]	53% (8/15)	70% (168/239)	10% (8/79)	96% (168/175)
PCR [0.060]	67% (10/15)	72% (172/239)	13% (10/77)	97% (172/177)

PPV と NPV それぞれは positive and negative predictive values の略語である。Cut-off 値は[角括弧]で示される。*, Figure 7A には終始正常血圧であった 239 名とこれら測定後 PE を発症した 15 名の各 biomarker の値が dots として示されている。赤線は正常血圧であった婦人 239 名の 90th percentile 値（NCR, PCR, FPR, sFlt-1）あるいは 10th percentile 値（PlGF のみ）を示している。†, 青線は、Figure 7B に示されている ROC により得られた cut-off 値を示している

考　　察

本研究は以下 4 点について追認あるいは初めて明らかにした。

1) 尿中 podocin mRNA 発現量によって評価された podocyturia は PE においてはタンパク尿量と有意の正の相関を示し、分娩まで増加しつづける。しかし、分娩後は減少に転じる。
2) PE 合併妊婦においては Podocyturia 増加につれ、尿中 podoctyes 中の nephrin mRNA 発現量は podocin mRNA 発現量に比して少なくなる。
3) 尿中 nephrin は PE 発症に先行して高値となる。
4) 2nd trimester urine nephrin は PE 発症予測に関して血清バイオマーカーである sFlt-1:PlGF (FPR)より優れている可能性が高い。

今回、podocyturia の評価は尿中 podocin mRNA 発現量で評価した。したがって、podocyturia を尿中細胞培養で評価したわけではない。しかし、我々は、一連の研究中に尿培養による podocyturia 程度と尿中 podocin mRNA 発現量が有意の正の相関を示すことを明らかにした[37]。したがって、今回の研究で用いた podocyturia 評価法は実際の podocyturia を反映していると推測される。

PE 妊婦では podocyturia が増加することが知られていた[11,12,19-21]。しかし、今回の研究のように各妊婦から時期をずらした複数検体提供を受ける longitudinal study は少なかったため、podcyturia が分娩まで増加し続けることまでは知られていなかった。また、今回の知見、「PE 妊婦において、蛋白量増加につれ、urine sediment PNR は増大する（Figure 3 下段最左側）」は、妊婦では初めて確認されたことである。これは刺激を受けた glomerular podocytes は phenotype alteration（nephrin 発現が少なくなるという）が起こりやすくなること、そしてそれら phenotype alteration を起こした glumerular podocytes は GBM から脱落しやすくなりやすいことを示唆している。これは、我々の観察「妊娠中の nephrinuria は podocyturia と正の相関を示す」によっても支持される[38]。すなわち、glomerular podocytes は刺激を受けると、nephrin を分離し nephrinuria の原因となる。また、刺激を受けた glomerular podocytes は nephrin mRNA 発現低下が起こり、GBM から剥奪しやすくなることを強く示唆している。

「蛋白尿とpodocyturiaは正の相関を示す（Figure 3上段最左側）」は「蛋白尿が増加している間はpodocyturiaは増加し続ける」ことを意味している。Podocyturia はglomerular podocytes 数減少につながるので、これらは臨床上重要な知見であ

る。早期発症PEについては「妊娠継続を図り（胎児成熟を待つ）血圧を下げる等の対処療法を行い、母体に重篤な合併症（脳出血、DIC、腎不全、肝機能障害等）出現前に分娩（妊娠終了）とする」という方針が世界的に一般的である。すなわち、妊娠終了のための条件が種々提唱されている[39-41]。しかし、proteinuriaの多寡についての妊娠終了の基準は示されていない。PE妊婦においては今回示されたようにproteinuria並びにpodocyturiaは妊娠が継続している間、増加し続ける。また産後にproteinuriaが正常化してもpodocyturiaは持続している[42]。これは結果としてglomerular podocytes数減少につながるので、PE妊娠の継続は腎寿命（末期腎不全までの時間）を短縮させる可能性がある。実際、PEは末期腎不全のリスクfactorである[25]。3回以上妊娠分娩経験のある女性中、PE既往が 1 回であった婦人ならびに2回以上あった婦人が将来末期腎不全となる確率はPEを一度も合併しなかった婦人に比してそれぞれ6.3倍ならびに15.5倍と報告されている[43]。今回の研究結果はproteinuriaの多寡についても妊娠終了基準の1つに加える必要性を強く示唆している。

健常人においても podocyturia は認められるが、尿 1.0 mg creatinine 中に含まれる podocytes 数は 1 以下であり、活動期腎疾患では 100/mg creatinine 以上認められる場合がある [13]。これまで、妊娠により podocyturia が増加するか否かについて知られていなかったが、我々の一連の研究は「妊娠により podocyturia は増加する [43]」ことを示した。Podocyturia の増加は glomerular podocytes 数減少と同義語と考えられており、我々の知見は「腎臓は glomerular podocytes 数を減少させることによって妊娠分娩を記憶する」ことを意味している。しかし、私どもが知る限り、「妊娠分娩経験者は非経験者に比して末期腎不全になりやすい」という報告はまだないが、これに焦点を当てた研究が将来行われる可能性がある。しかし、今回の対象人数は 254 名と少なく、また PE 発症率も 5.9% (15/254) と general population でのそれ [1] と比較すると約 2 倍であった。したがって、Table 4 に示されたスクリーニング検査特性は general population で得られる検査特性とは乖離している可能性があった。

今回の研究で urine nephrin は有力な PE の biomarker 候補であることが示された。2nd trimester urine nephrin は既知の PE biomarker である 2nd trimester serum sFlt-1:PlGF ratio（FPR）[2-5,25-28] よりも PE 発症予測に関して優れていた。

総括および結論

本研究により以下の知見を得た。

1）PE 合併妊婦における podocyturia は proeinuria と正の相関を示し、分娩まで増加し続ける。

2）Podocyturia 増加につれ、尿中 podoctyes 中の nephrin mRNA 発現量は podocin mRNA 発現量に比して少なくなる。

3）Nephrinuria は PE 発症に先行して上昇する。

4）2^{nd} trimester urine nephrin は PE 発症予測に関して血清 biomarker である sFlt-1:PlGF (FPR)より優れている。

PE は腎臓の寿命という観点から極めて危険な合併症であることが再確認された。今後、分娩時点の proteinuria 程度と腎臓の長期予後の研究が必要となる。それら結果は PE 妊婦における妊娠終了の条件に proteinuria 多寡を加えることにつながる可能性がある。

謝　　辞

本研究にあたりご指導頂きました、北海道大学大学院医学研究院 生殖発達医学講座 産科・生殖医学分野 教授 水上 尚典 先生ならびに北海道大学大学院医学研究院 生殖発達医学講座 産科・生殖医学分野 助手 古田 伊都子 博士に深謝いたします。また、本研究遂行にあたり多大な援助を惜しむことなく提供して下さった、国立成育医療研究センター 赤石 理奈博士に深謝致します。また、本研究の遂行にあたりご協力いただきました北海道大学大学院医学研究院生殖発達医学講座 産科・生殖医学分野 准教授 森川 守 先生、北海道大学大学院医学研究院 総合女性医療システム学講座 特任准教授 山田 崇弘 先生、北海道大学病院産科 助教 石川 聡司 先生、同助教 小島 崇史 先生、同助教 千葉 健太郎 先生、同助教 荒木 直人 先生、同医員 中川 絹子 先生、同医員 細川 亜美 先生、ならびに北海道大学病院 4 の 1 病棟助産師や看護師の方々に心より御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、研究費に関して支援して下さった日本妊娠高血圧学会ならびに日本滞在費用の一部を支援して下さった大塚敏美育英奨学財団に心より御礼申し上げます。

引 用 文 献

1. Morikawa, M., Kazutoshi, C., Takashi, Y., Takahiro, Y., Shoji, S. & Hisanori, M. Risk factors for eclampsia in Japan between 2005 and 2009. *Inter. J. Gynaecol. Obstet.* **117**, 66 – 68 (2012).

2. Levine, R. J., Maynard, S. E., Qian, C., Lim, K. H., England, L. J., Yu, K. F., Schisterman, E. F., Thadhani, R., Sachs, B. P., Epstein, F. H., Sibai, B. M., Sukhatme, V. P. & Karumanchi, S. A. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* **350**, 672 – 683 (2004).

3. Levine, R. J., Lam, C., Qian, C., Yu, K. F., Maynard, S. E., Sachs, B. P., Sibai, B. P., Sibai, B. M., Epstein, F. H., Romero, R., Thadhani, R., Karumanchi, S. A. & CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* **355**, 992 – 1005 (2006).

4. Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondai, S., Libermann, T. A., Morgan, J.P., Sellke, F. W., Stillman, I. E., Epstein, F. H., Sukhatme, V. P. & Karumanchi, S. A. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* **111**, 649 – 658 (2003).

5. Vatten, L. J., Eskild, A., Nilsen, T. I., Jeansson, S., Jenum, P. A. & Staff, A. C. Changes in circulating level of angiogenic factors from the first to second trimester as predictors of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **196**, 239. e1 – e6 (2007).

6. Cohen, J.,Vaiman, D.,Sibai, BM. & Haddad, B. Blood pressure changes during the first stage of labor and for the prediction of early postpartum preeclampsia: a prospective study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **184,** 103 – 107 (2015).

7. Ohno, Y., Terauchi, M., Tamakoshi, K., Shiozaki, A. & Saito, S. The risk factors for labor onset hypertension. *Hypertens Res.* **39**, 260 – 265 (2016).

8. Vikse, B.E., Irgens, L. M., Leivestad, T., Skjaerven, R. & Iversen, B. M. Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease. *N. Engl. J. Med.* **359**, 800 – 809 (2008).

9. Mundel, P. & Shankland, S. J. Podocyte biology and response to injury. *J. Am. Soc. Nephrol*. **13**, 3005 – 3015 (2002).

10. Petermann, A.T., Krofft, R., Bionski, M., Hiromura, K., Vaughn, M., Pichier, R., Griffin, S., Wada, T., Pippin, J. Durvasula, R. & Shankland, S. J. Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. *Kidney Inter.*

64, 1222 – 1231 (2003).

11. Garovic, V.D., Wagner, S. J., Turner, S. T., Rosenthal, D. W., Watson, W. J., Brost, B. C., Rose C.H., Gavrilova, L., Craigo, P., Bailey, K. R., Achenbach, J., Schiffer, M. & Grande, J. P. Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **196**, 320.e1 – 320.e7 (2007).

12. Konieczny, A., Ryba, M., Wartacz, J., Czyżewska-Buczyńska, A., Hruby, Z. & Witkiewicz, W. Podocytes in urine, a novel biomarker of preeclampsia?. *Adv. Clin. Exp. Med.* **22**, 145 – 149 (2013).

13. Vogelmann, S.U., Nelson, W.J., Myers, B.D. & Lemley, K.V. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **285**, F40 – F48 (2003).

14. Fukuda, A., Wickman, L. T., Venkatareddy, M. P., Wang S. Q., Chowdhury, M. A., Wiggins, J. E., Shedden, K. A. & Wiggins, R. C. Urine podocin:nephrin mRNA ratio (PNR) as a podocyte stress biomarker. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 4079 – 4087 (2012).

15. Sato, Y., Wharram, B. L., Lee, S. K., Wickman, L., Goyal, M., Venkatareddy, M., Chang, J. W., Wiggins, J. E., Lienczewski, C., Kretzler, M. & Wiggins, R. C. Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20,** 1041 – 1052 (2009).

16. Hodgin, J.B., Bitzer, M., Wickman, L., Afshinnia, F., Wang, S. Q., O'Connor, C., Yang, Y., Meadowbrooke, C., Chowdhury, M., Kikuchi, M., Wiggins, J. E. & Wiggins, R. C. Glomerular aging and focal global glomerulosclerosis: a podometric perspective. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 3162 – 3178 (2015).

17. Tonelli, M. & Riella, M. Chronic kidney disease and the aging population. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 221 – 224 (2014).

18. Akaishi, R., Yamada, T., Morikawa, M., Nishida, R. & Minakami, H. Clinical features of isolated gestational proteinuria progressing to pre-eclampsia: retrospective observational study. *BMJ. Open.* **4**, e004870 (2014).

19. Craici, I.M., Wagner, S. J., Bailey, K. R., Fitz-Gibbon, P. D., Wood-Wentz, C. M., Turner, S. T., Hayman, S. R., White, W. M., Brost, B. C., Rose, C. H., Grande, J. P. & Garovic, V. D. Podocyturia predates proteinuria and clinical features of preeclampsia: longitudinal prospective study. *Hypertension*. **61**, 1289 – 1296 (2013).

20. Jim, B., Jean-Louis, P., Qipo, A., Garry, D., Mian, S., Matos, T., Provenzano, C. & Acharya, A. Podocyturia as a diagnostic marker for preeclampsia amongst high-risk pregnant patients. *J. Pregnancy.* **2012**, 984630 (2012).

21. Facca, T.A., Kirsztajn, G. M., Pereira, A. R., Moreira, S. R., Teixeira, V. P.,

Nishida, S. K. & Sass, N. Renal evaluation in women with preeclampsia. *Nephron Extra.* **2**,125 – 132 (2012).

22. Hauser, P.V., Collino, F., Bussolati, B. & Camussi, G. Nephrin and endothelial injury. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **18**, 3 – 8 (2009).

23. Srivastava, T., Garola, R.E., Whiting, J.M. & Alon, U.S. Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int.* **59**, 118 – 125 (2001).

24. Kelder, T.P., Penning, M. E., Uh, H. W., Cohen, D., Bloemenkamp, K. W., Bruijn, J. A., Scherjon, S. A. & Baelde, H. J. Quantitative polymerase chain reaction-based analysis of podocyturia is a feasible diagnostic tool in preeclampsia. *Hypertension*. **60**, 1538 – 1544 (2012).

25. Verlohren, S., Galindo, A., Schlembach, D., Zeisler, H., Herraiz, I., Moertl, M. G., Pape, J., Dudenhausen, J. W., Denk, B. & Stepan, H. An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am. J. Obste.t Gynecol.* **202**, 161.e1 – 11 (2010).

26. Ohkuchi, A., Hirashima, C., Matsubara, S., Takahashi, K., Matsuda, Y. & Suzuki, M. Threshold of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio for the imminent onset of preeclampsia. *Hypertension*. **58**, 859 – 866 (2011).

27. Verlohren, S., Herraiz, I., Lapaire, O., Schlembach, D., Moertl, M., Zeisler, H., Calda, P., Holzgreve, W., Galindo, A., Engels, T., Denk, B. & Stepan, H. The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **206**, 58.e1 – e8 (2012).

28. Rana, S., Powe, C. E., Salahuddin, S., Verlohren, S., Perschel, F. H., Levine, R. J., Lim, K. H., Wenger, J. B., Thadhani, R. & Karumanchi, S. A. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation.* **125**, 911 – 919 (2012).

29. Ruotsalainen, V., Ljungberg, P., Wartiovaara, J., Lenkkeri, U., Kestilä, M., Jalanko, H., Holmberg, C. & Tryggvason, K. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **96**, 7962 – 7967 (1999).

30. Wang, Y., Zhao, S., Loyd, S. & Groome, L. J. Increased urinary excretion of nephrin, podocalyxin, and βig-h3 in women with preeclampsia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **302**, F1084 – F1089. (2012).

31. Yang, GY., Lee, K. A., Park, H. M., Park, H. S., Ha, E. H., Chun, S. H. & Kim, Y. J. Urinary nephrin: a new predictive marker for pregnancies with preeclampsia and small-for-gestational age infants. *Obstet. Gynecol. Sci.* **56**, 22

– 28 (2013).

32. Son, GH., Kwon, J. Y., Lee, S., Park, J., Kim, Y. J., Yun, B. & Park, J. H. Comparison of serum and urinary nephrin levels between normal pregnancies and severe preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod Biol.* **166**, 139 – 144 (2013).

33. Jim, B., Mehta, S., Qipo, A., Kim, K., Cohen, H. W., Moore, R. M., He, J. C. & Sharma, S. A comparison of podocyturia, albuminuria and nephrinuria in predicting the development of preeclampsia: a prospective study. *PLoS ONE.* **9**, e101445. (2014).

34. Garovic, V.D., Wagner, S. J., Petrovic, L. M., Gray, C. E., Hall, P., Sugimoto, H., Kalluri, R. & Grande, J. P. Glomerular expression of nephrin and synaptopodin, but not podocin, is decreased in kidney sections from women with preeclampsia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22**, 1136 – 1143 (2007).

35. Zhao, S., Gu, X., Groome, L.J. & Wang, Y. Decreased nephrin and GLEPP-1, but increased VEGF, Flt-1, and nitrotyrosine, expressions in kidney tissue sections from women with preeclampsia. *Reprod Sci*. **16**, 970 – 979 (2009).

36. 日本産科婦人科学会／日本産婦人科医会監修「産婦人科診療ガイドライン—産科編 2014」杏林社、(2014)。

37. Furuta, I., Zhai, T. Y., Umazume, T., Ishikawa, S., Nakagawa, K., Kojima, T., Yamada, T., Morikawa, M. & Minakami, H. Effects of childbirth on podocyturia in women with normotensive uncomplicated pregnancies. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. **312**, F1112 – F1119 (2017).

38. Furuta, I., Zhai, T. Y., Ishikawa, S., Umazume, T., Nakagawa, K., Yamada, T., Morikawa, M. & Minakami, H. Association between nephrinuria, podocyturia, and proteinuria in women with pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res*. **43**, 34 – 41 (2016).

39. NICE Clinical Guideline 107. Hypertension in Pregnancy; The Management of Hypertensive Disorders During Pregnancy. Issued 2010, last modified: January 2011. Accessed on September 26, 2015 available from the following URL: https://www.nice.org.uk/guidance/cg107/resources/guidance-hypertension-in-pregnancy-pdf.

40. American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet. Gynecol*. **122**, 1122 – 1131 (2013).

41. Magee, LA., Pels, A., Helewa, M., Rey, E., von Dadelszen, P. & SOGC Hypertension Guideline Committee. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy: executive summary. *J. Obstet.*

Gynaecol. Can. **36**, 416 – 438 (2014).

42. Furuta, I., Zhai, T. Y., Umazume, T., Ishikawa, S., Hosokawa, A., Kojima, T., Chiba, K., Yamada, T., Morikawa, M. & Minakami, H. Post-partum podocyturia following preeclamptic pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res*. **43**, 1008 – 1013 (2017).

43. Furuta, I., Zhai, T. Y., Umazume, T., Ishikawa, S., Nakagawa, K., Akaishi, R., Yamada, T., Morikawa, M. & Minakami, H. Increased podocyturia in pregnant women compared to non-pregnant women. *J. Obstet. Gynaecol. Res*. **43**, 873 – 879 (2017).