

シンポジウム 1 妊娠中毒症の病因—分子細胞生物学的視点から—

妊娠中毒症における絨毛傷害の証明とその機序の遺伝子学的解明

昭和大学医学部産婦人科学教室

関 沢 明 彦

Detection of the Damage of Placental Villous Trophoblasts and the Possible Pathogenesis of Preeclampsia

Akihiko SEKIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine, Tokyo

Key words : Preeclampsia · Maternal blood · Fetal DNA · Apoptosis · Damage of trophoblasts

要旨 妊娠中毒症(中毒症)の病態形成において胎盤の果たす役割が大きいと考え、中毒症胎盤で起こっている変化を明らかにすることで中毒症の病態解明を試みた。

まず、GeneChip (Affymetrix)を用いて妊娠中毒症胎盤における遺伝子発現の変化を解析した。その結果、中毒症胎盤では低酸素によって誘導される HIF-1 の遺伝子発現が有意に亢進し、それが転写因子となって誘導する erythropoietin, PAI-1, p21, IGF-II, IGFBP-1, heme oxygenase-1 などの遺伝子発現が亢進していた。また、中毒症胎盤で bax, bak, bim などの pro-apoptotic な遺伝子が anti-apoptotic な遺伝子に比較して優位に発現していた。これらのことから、低酸素・アポトーシスが中毒症胎盤を特徴づける重要な因子であると考えられた。次に、Laser Microdissection 法で胎盤から純粋に Syncytiotrophoblasts (S-cell) を分離し、BD Atlas human 1.2K array I (Clontech)にてその遺伝子発現の変化を検討したところ、中毒症症例で PAI-1, Heme Oxygenase-1 の hypoxia 関連遺伝子, Caspase-3, 4, 8 のアポトーシス関連の遺伝子, Heat shock protein 70, 90 などの遺伝子の発現が亢進していた。

また、胎盤より精製した絨毛細胞を *in vitro* に低酸素培養した結果、時間依存性に TUNEL 陽性細胞数が増加した。また、HIF-1, PAI-1, TNF alpha の遺伝子発現は増加していた。さらに、アポトーシス関連の p53, bax の発現も増強した。細胞周期関連の PCNA の発現は著しく抑制された。免疫染色でも中毒症胎盤の Cytotrophoblasts 優位に p53, p21, PAI-1, bax が発現していた。また、Caspase 3 染色, TUNEL 陽性細胞は S-cell 優位であり、中毒症胎盤の S-cell にアポトーシスが頻発していると考えられた。

次に、胎盤で起こっている絨毛傷害を *in vivo* に評価する目的で母体血中の胎児 DNA を測定した。中毒症患者母体血中には絨毛由来の浮遊 DNA が高濃度で循環しており、絨毛傷害の強いことが証明された。この変化は中毒症が顕症化する以前から認められ、絨毛傷害が、妊娠の早い時期にすでに起こっていることを確認した。

以上のことから、中毒症では絨毛細胞が慢性的な低酸素環境に曝されることにより、絨毛細胞にアポトーシスが起こればと考えられ、絨毛細胞の低酸素およびその傷害が中毒症病態形成の重要なステップであると考えられた。

目 的

妊娠中毒症(中毒症)には母児間の免疫応答異常、遺伝的な背景、環境因子が病態形成の first

step として関与していると考えられる^{1)~3)}。それらが絨毛細胞の脱落膜への侵入を阻害し、さらに、絨毛細胞のラセン動脈の血管壁への置換(remod-

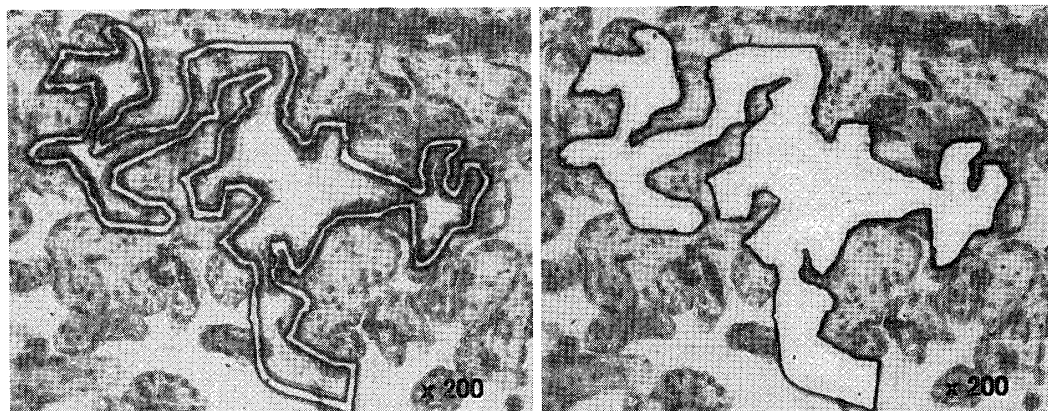


図1 Laser Microdissection (LMD) を用いた villous trophoblasts の分離

eling)も阻害するため、結果として、ラセン動脈の血管抵抗が低下せず、絨毛間腔への血流が障害され、胎盤循環障害と呼べるような病態が形成されることが考えられる¹⁾⁴⁾⁵⁾。この胎盤における変化が中毒症の病態形成に重要な影響を及ぼしていると考え、中毒症胎盤における変化を遺伝子レベルで解明することを本研究の課題とした。

方 法

1) GeneChip および RT-PCR による遺伝子発現の評価

重症中毒症でその重症化により妊娠中断を要した3症例(HpE; 36週, H; 36週, Hp; 30週)と正常コントロール3例(陣痛未発来を選択帝王切開症例: median 37週, range: 37~38週)を対象に胎盤からtotal RNAを抽出し, mRNAを精製した後, mRNA量を定量し, 各症例1.5 μ gずつをとって各群で3症例分のmRNAを混和した。mRNAは逆転写した後, cRNAを再合成してGeneChip (Affymetrix U95A array)にhybridizationを行った。Hybridization後, GeneChipを洗浄し, Affymetrix[®]428[™] Array Scannerにて約12,000種類の遺伝子発現量の解析を行い, 中毒症胎盤と正常胎盤との遺伝子発現の変化を比較した。発現変化のあった遺伝子についてはTaqMan probeを用いた定量的RT-PCR(ABI prism 7900T, PE Biosystems)を行った。

2) Laser Microdissection(LMD)を用いた villous trophoblasts(VT)の分離, および遺伝子発現の検討

(1) Macroarray による遺伝子発現の検討

正常妊娠(n=4, 37~38週)および重症中毒症(n=5, 27~38週)の胎盤を対象とし, 帝王切開後ただちに胎盤の凍結包埋組織を作成し, -80℃にて凍結保存した。LMDの当日に凍結包埋組織より8 μ mの厚さの薄切標本を作成し, メタノール固定, トルイジンブルー染色の後, LMDを行いVTを回収した。LMDはCell Robotics社製の装置を使用し, 切断した細胞は, Laser pressure cell transfer methodでマイクロチューブに回収し(図1), そこから直接, フェノール・クロロフォルムを用いる古典的な核酸抽出法でRNA抽出を行った。mRNAはBD Atlas Smart cDNA synthesis kit (Clontech)にて逆転写し, Atlas Smart DNA amplification Kit(Clontech)で36サイクルのDNA増幅を行った後, 吸光度計にてDNA量を定量した。正常群は4例から等量ずつDNAを混和し, それをコントロールとして5例の中毒症症例それぞれの遺伝子発現の変化を検討した。MacroarrayはBD Atlas human 1.2K array I(Clontech)を使用した。Macroarrayの結果, 中毒症の5症例全例で2倍以上発現が増強した遺伝子を抽出し, real-time PCRを行った。

(2) real-time PCR による遺伝子発現の検討

上記検討で変化を確認した遺伝子について中毒症(n=6, 27~38週)および正常妊娠(n=10, 36~40週)の胎盤から同様にLMDを用いてVTを回収し, mRNAを抽出した後, 定量的RT-PCR法(ABI prism 7900T)で, その遺伝子発現を測定

し、Macroarray の結果を確認した。各遺伝子の定量には Assay-on-Demand gene expression products (Applied Biosystems) を用いた。

3) VT での低酸素負荷による遺伝子発現の評価

選択帝王切開時に無菌的に採取した胎盤を用い、Kliman et al. の方法 (一部改変) に準じて VT の分離を行った⁶⁾。具体的には胎盤を採取後、卵膜、血管、胎盤母体面を切除し、残った胎盤組織を生理食塩水で十分に洗浄した後、ミンスし、それに collagenase を加え、4 時間培養し、細胞を分離した。その後、磁気ビーズで標識した抗 CD9 抗体、抗 MHC class I, II 抗体 (Miltenyi Biotec) と反応させ、magnetic activated cell sorter (MACS: Miltenyi Biotec) にて negative selection 法で上記の陰性細胞を回収し、VT として以下の培養実験に供した。

VT は 2 分して低酸素環境下 (2% O₂, 5% CO₂, 93% N₂) および CO₂ インキュベーターでの標準環境下で培養し、低酸素負荷による遺伝子発現量の変化および DNA の断片化 (TUNEL 染色, Intergen Company) について検討を行った。

4) 胎盤の免疫組織化学染色

免疫組織学的に中毒症および正常胎盤で低酸素により誘導される HIF-1 (Novus Biologicals), PAI-1 (Biogenesis) の発現局在を検討した。また、アポトーシスに関連して、bcl-2 (Novocastra Laboratories), bax (DAKO), caspase 3 (Novo Castra Laboratories) の発現局在および DNA 断片化を TUNEL 法 (Intergen Company) で評価した。さらに、細胞周期調節遺伝子である p53 (Nichirei), p21 (BD Bioscience Pharmingen) についても同様に検討した。

5) 母体血漿中絨毛 DNA の定量

中毒症を合併した妊婦 82 例の中に、男児を妊娠していた症例が 34 例 (31.0 ± 7.12 週) あり、それと採血時、および妊娠分娩経過中に異常を認めなかった正常妊婦 164 例 (35.8 ± 2.72 週) を対象に、informed consent のもと採血を行った。母体血は EDTA 加で採取し、3 時間以内に 3,000rpm で血漿成分を分離し、凍結保存した。1.5ml の血漿から QIAamp DNA blood mini kit (Quiagen) を用いプロ

トコールに準じて (一部改変) DNA を抽出し、最終的にカラムから 50μl の精製水に DNA を溶出した⁷⁾⁸⁾。Y 染色体特異的な DYS14 遺伝子をマーカーとして定量的 PCR (LightCycler, Roche Diagnostics) を用い、母体血漿中胎児 DNA 量を定量した⁷⁾⁸⁾。また、絨毛 DNA 濃度と中毒症の主要な症状である蛋白尿および高血圧との関係を多変量解析 (General Linear Model 解析) を用いて検討した。

さらに、臨床症状のない妊娠中期に、その後中毒症を発症する症例で絨毛傷害が起こっているかどうかを検討する目的で、妊娠 17~24 週の男児を妊娠した妊婦 (n = 164) から採血を行い、同様に胎児 DNA 量を定量した。

本研究は当大学倫理委員会の承認のもと、informed consent を得たうえで行った。

成 績

1) GeneChip による遺伝子発現の評価

中毒症胎盤では 3,418 種類の遺伝子発現が正常胎盤に比べ、2 倍以上増加もしくは減少していた (図 2)。それらの発現変化のみられた遺伝子の中で、hypoxia によって増加するとされる HIF-1 遺伝子の発現は 2.8 倍に増加し、HIF-1 が転写因子となって発現誘導する erythropoietin, PAI-1, p21, IGF-Ⅱ, IGFBP-1, heme oxygenase-1 などの遺伝子発現が亢進していた。細胞周期調節遺伝子では p27, cyclin D1 の発現が低下し、checkpoint suppressor 1 発現が亢進するなど細胞周期を停止する方向で変化していた。アポトーシス関連遺伝子では pro-apoptotic な bax, bak, bim, Apoptosis inducing factor などの発現が上昇傾向を示す一方で、anti-apoptotic な bcl-2, bcl-X_L, FLAME, IGF-1 などの発現量の変化は小さかった。RT-PCR の結果、HIF-1, PAI-1, TNF alpha の遺伝子発現は正常胎盤に比較し有意に増加 (p < 0.05, Mann-Whitney U-test) し、GeneChip での結果を裏づけた。

2) LMD を用いた VT の分離、および遺伝子発現の検討

LMD で純粹に分離した VT における遺伝子発現を Macroarray で評価した (図 3)。正常妊娠 4 例

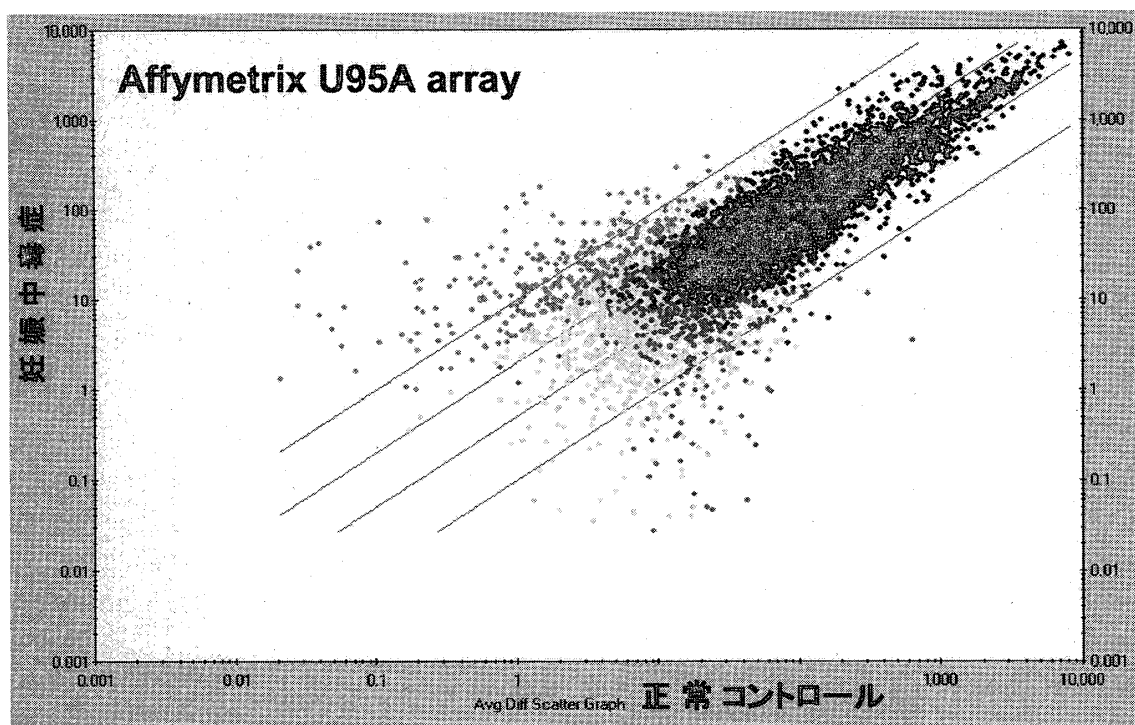
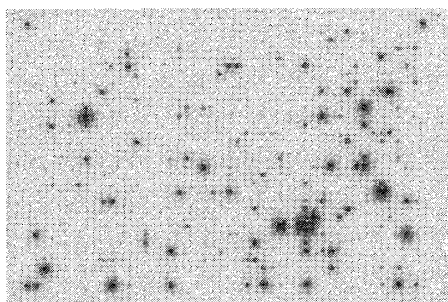


図2 GeneChipにて解析した妊娠中毒症胎盤での遺伝子発現の変化

正常妊娠



妊娠中毒症

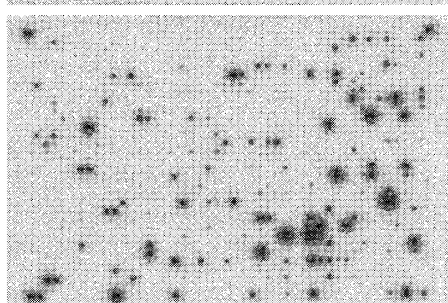


図3 Laser microdissection-microarray 解析による妊娠中毒症絨毛細胞の遺伝子発現の変化

から分離した絨毛をコントロールとして、中毒症5例の絨毛で発現が増強していたのは、PAI-1, heme oxygenase-1 の hypoxia 関 連 遺 伝 子, Caspase-3, 4, 8 のアポトーシス関連の遺伝子, Heat shock protein 70, 90 などの遺伝子であっ

た。この結果を、RT-PCR 法で確認した結果、PAI-1, Heme Oxygenase-1 の遺伝子発現は中毒症で高い傾向を認めた。また、Heat shock protein 70 は有意に発現が亢進していた($p < 0.05$, Mann-Whitney U-test)。

3) VTでの低酸素負荷による遺伝子発現の評価

胎盤から分離精製したVTに低酸素負荷した結果、低酸素によって誘導されるHIF-1, PAI-1の遺伝子発現は増加していた。また、炎症性サイトカインであるTNF alphaの発現も増強した。p53, baxも発現が増強した。PCNA発現は低酸素培養で著しく抑制され、細胞周期は停止していると考えられた。培養細胞のTUNEL陽性率は低酸素培養した群で高く、その陽性率は経時的に増加した。また、DNA ladderingも経時的に増強した。

4) 胎盤の免疫組織化学染色

正常の妊娠後期の胎盤の絨毛にはCytotrophoblasts(C-cell)がほとんど消失しているにもかかわらず中毒症胎盤では多くのC-cellが存在していた。また、中毒症胎盤にはSyncytial knotsを多く認めた。免疫染色の結果、低酸素によって誘導されるPAI-1, p21の発現は中毒症のC-cellに優

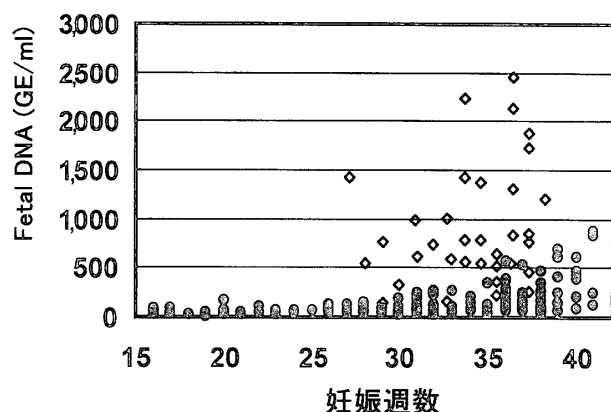


図4 妊娠中毒症の母体血漿中絨毛 DNA 濃度
男児を妊娠した妊婦血漿中で DYS14 遺伝子を定量した。黒丸は正常妊婦、白ぬきは中毒症妊婦を表す。

位に認められた。また、bax, p53 も C-cell 優位に発現していた。Caspase-3 は中毒症の Syncytiotrophoblasts (S-cell) 優位に発現していた。さらに、中毒症の S-cell, 特に Syncytial knots の部分に多くの TUNEL 陽性細胞を認めた。

5) 母体血漿中絨毛 DNA の定量

図4に正常妊婦164例および中毒症34例の絨毛 DNA 濃度の妊娠経過に伴う変化を示す。母体血漿中絨毛 DNA 濃度は妊娠経過に伴い増加することから、その影響を除くため、その濃度分布が Kolmogorov-Smirnov test で正規分布していることを確認したうえで Multiple of Median (MoM) 値に変換し、絨毛 DNA 濃度を比較した。妊娠中毒症を高血圧のみの中毒症と高血圧と蛋白尿を合併する中毒症に分けて絨毛 DNA 濃度を比較した結果、コントロール群の MoM 値は1であり、高血圧のみの中毒症は2.9、高血圧と蛋白尿を合併する中毒症は4.3であり、コントロール群に比し高血圧と蛋白尿を合併する中毒症群は有意に絨毛 DNA 濃度が上昇した ($p < 0.001$, ANOVA and Bonferroni post hoc test)。さらに、General Linear Model 解析を行った結果、絨毛 DNA 濃度に対し、蛋白尿 ($p = 0.001$)、高血圧 ($p = 0.002$) はそれぞれ独立した因子として相関しており、それぞれが絨毛 DNA の上昇に及ぼす影響は蛋白尿で2.38、高血圧で1.97であった。このことは蛋白尿がある場合に絨毛 DNA 濃度は2.38倍に、高血圧がある場合には

1.97倍に上昇すること、および、蛋白尿が絨毛 DNA 濃度の上昇に深くかかわっていることを示している。さらに、蛋白尿と高血圧を合併した場合、DNA 濃度は両者の和の4.35倍に増加することを示している。

次に、妊娠中期(18~22週)に臨床症状を認めなかった164例を対象に採血を行い、絨毛 DNA 濃度を定量した。この164例中にその後中毒症を発症した症例は6例あり、その6例中3例で絨毛 DNA 濃度が2MoM以上に上昇していた。

考 察

中毒症は一次的な病因として免疫学的因子、遺伝的因子、環境因子などが関与し、その結果、絨毛細胞の脱落膜への侵入障害やラセン動脈の血管内皮の remodeling の障害が起こることが知られている⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾。その結果、胎盤の血液循環は障害され、胎盤にいろいろな病態変化が起こり、その変化が中毒症の発症に関与すると考えられる。今回、中毒症の病態形成に胎盤が深く関与すると考え、中毒症胎盤における変化を分子生物学的に解析した。

最初に、GeneChip を用い、中毒症胎盤における12,000種類の遺伝子発現の変化をプロファイリングした結果、hypoxiaによって誘導される HIF-1 遺伝子発現が有意に亢進し、それが転写因子となって誘導する PAI-1, p21, Erythropoietin などの hypoxia 関連遺伝子群が高発現であったことから hypoxia が妊娠中毒症胎盤を特徴づける重要な因子であると考えられた。また、pro-apoptotic な遺伝子が anti-apoptotic な遺伝子に比較して優位に発現していたことから、胎盤にアポトーシスが起きていることが示唆された。また、細胞周期関連遺伝子も細胞周期を停止する方向に発現変化していた。

しかしながら、胎盤はいろいろな種類の細胞によって構成されており、GeneChipでの結果がどの細胞の変化によるものかは不明確である。そこで、LMD法を用いて絨毛細胞(S-cell)を純粋に回収し、その遺伝子発現の評価を行った。その結果、PAI-1や heme oxygenase-1の hypoxiaによって誘導される遺伝子の発現が増強していた。また、

アポトーシス関連の Caspase 遺伝子 (Caspase-3, 4, 8), Heat shock protein 遺伝子 (Hsp70, Hsp90) などの発現が増強しており, 中毒症胎盤の絨毛が hypoxia の影響を受けていること, アポトーシスを起こしていることが示された。

次に, 低酸素による絨毛細胞の影響を評価する目的で胎盤から分離した絨毛細胞を *in vitro* に低酸素環境下で培養し, その影響を検討した。低酸素培養により低酸素が誘導する HIF-1, PAI-1 の発現や炎症性サイトカインである TNF alpha の発現は増強した。さらに, p53 や Bax の発現も誘導されたが, PCNA 発現は著しく抑制され, 低酸素培養では細胞周期は停止していると考えられた。また, TUNEL 法で評価すると低酸素培養ではその陽性細胞数が多く, 経時的に増加したことから, 低酸素環境が p53 や bax の遺伝子発現を介して絨毛細胞にアポトーシスを誘導すると考えられた。

免疫染色により蛋白発現の局在についても検討を行った。PAI-1, p21, p53, bax はともに中毒症の C-cell に優位に発現していた。S-cell には caspase-3 の発現を強く認め, TUNEL 陽性細胞も中毒症の S-cell に多く認めたことから, 中毒症では絨毛の S-cell にアポトーシスの頻発していることが確認された。p53, bax の遺伝子が C-cell 優位に発現している理由については不明である。S-cell に比べ, C-cell は低酸素環境下にあるため, C-cell でこれらの遺伝子発現が亢進している可能性がある。また, それらの発現が C-cell から S-cell への細胞分化・誘導に関与しているという報告もある⁹⁾。

最後に, 絨毛細胞が低酸素環境下で傷害され, アポトーシスを起こしていることを *in vivo* に母体血中で証明するため, 母体血中胎児 DNA の測定を行った。母体血中胎児 DNA は妊娠中の各種病態に深く関与していると考えられている^{10)~13)}。胎児 DNA の origin としては, 現在, 胎児由来の絨毛細胞が母体血の流れる絨毛間腔に広く接しているという解剖学的な特徴から, その大部分は絨毛細胞由来であり, それは, 母体血漿中絨毛 DNA と換言できると考えられている⁸⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。

表 1 妊娠中毒症の臨床症状と絨毛 DNA 量の関係

		Proteinuria		
		absent	mild	severe
Hypertension	absent	1.00	2.03	3.52
	mild	1.74	3.04	4.20
	severe	2.88	4.08	4.77

胎児 DNA 量は MoM 値にて表示, n = 188

今回の検討では, 絨毛 DNA 濃度は, 高血圧のみの妊娠中毒症では 2.9 倍に増加し, 高血圧と蛋白尿を合併する症例においては 4.3 倍に増加した。さらに, 個々の臨床症状の重症化に伴っても絨毛 DNA 濃度は漸次増加を示した(表 1)。このことは, 臨床症状の重症化に伴って絨毛傷害が進行していることを *in vivo* に証明する結果である。General Linear Model 解析の結果, 蛋白尿, 高血圧は絨毛 DNA 濃度に対し独立した因子として影響しており, その影響は蛋白尿でより強いことがわかった。また, 中毒症における絨毛傷害は蛋白尿の病因と関連が深いこと, 中毒症での高血圧と蛋白尿の発症機転が異なることが初めて示された。

さらに, 妊娠中期の母体血中絨毛 DNA 濃度を検討したところ, その後中毒症を発症する症例で既に絨毛 DNA 濃度が上昇していることを見出した。このことは, 中毒症では臨床症状の出現するかなり前から絨毛傷害が既に起こっていることを証明する結果である。

結 論

中毒症では妊娠初期に絨毛細胞の脱落膜への侵入傷害が起こり, その結果, 絨毛間腔が慢性的に hypoxic な状態になっていると考えられる。中毒症胎盤における遺伝子プロファイリングの結果と低酸素培養された絨毛細胞のそれが類似していたことは, 低酸素が中毒症胎盤を特徴づける因子であることを示唆する。また, 低酸素培養により絨毛細胞は細胞周期停止やアポトーシスを起こしており, 低酸素による絨毛傷害が妊娠中毒症の病態形成の重要なステップであると考えられた。また, その絨毛傷害は, 母体血中絨毛 DNA が, 妊娠中毒症で著しく増加することからも証明された。

謝 辞

第55回日本産科婦人科学会のシンポジウムにおいて発表の機会をお与え下さいました会長の中野仁雄教授および座長の労をお取り頂きました森川 肇教授、木下勝之教授に深謝いたします。

また、本研究をご指導頂きました岡井 崇教授および昭和大学医学部産婦人科学教室員各位に深く感謝いたします。

共同研究者

昭和大学産婦人科学教室：市塚清健，矢内原敦，松岡隆，杉藤祐美，横川 香，千葉 博，岩崎万理子，赤羽智子

昭和大学藤が丘病院：齊藤 裕

千葉西総合病院：森山修一，神保正利，星 真一

昭和大学歯学部口腔病理学教室：立川哲彦，入江太郎，相田忠輝

昭和大学医学部第二病理学教室：九島巳樹

University of Bologna：Antonio Farina

Tufts-New England Med Ctr：Diana W Bianchi

文 献

1. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001 ; 357 : 53—56
2. Loke YW, King A. Immunology of human placental implantation : clinical implications of our current understanding. *Mol Med Today* 1997 ; 3 : 153—159
3. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990 ; 248 : 220—223
4. Redman CW. Current topic : pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 1991 ; 12 : 301—308
5. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997 ; 37 : 240—249
6. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF. 3rd. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986 ; 118 : 1567—1582
7. Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H, et al. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 1856—1858
8. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuo R, Okai T, et al. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2003 ; 188 : 480—484
9. Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast : analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 1999 ; 79 : 1687—1702
10. Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, et al. Cell-free fetal DNA in increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 2164—2165
11. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 2002 ; 48 : 353—354
12. Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S. High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios : case report. *Prenat Diagn* 2000 ; 20 : 838—841
13. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Prenatal detection of fetal Down's syndrome from maternal plasma. *Lancet* 2000 ; 356 : 1819—1820
14. Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, Iwasaki M, Yukimoto Y, Ichizuka K, et al. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta : The origin of cell-free DNA in the plasma of pregnant women. *Hum Genet* 2003 (submitted)
15. Kondo T, Sekizawa A, Saito H, Jimbo M, Sugito Y, Okai T. Fate of fetal uncleated erythrocytes circulating in maternal blood : apoptosis is induced by maternal oxygen concentration. *Clin Chem* 2002 ; 48 : 1618—1620

Abstract

We hypothesized that the modifications of placenta have a strong effect on the pathogenesis of preeclampsia. The Aim of this study is to clarify which modifications occur in preeclamptic placenta and to give a contribution to clarify the pathogenesis of preeclampsia. First, we assessed gene expressions by GeneChip (Affymetrix). As results, HIF-1 regulated genes, such as erythropoietin, PAI-1, p21, IGF- II, IGFBP-1, heme oxygenase-1, were up-regulated. Furthermore pro-apoptotic genes such as bax, bak, bim were also up-regulated when compared to the anti-apoptotic genes. These findings indicate that hypoxia and apoptosis are specific to preeclamptic placentas. Second, we used laser microdissection to recover pure syncytiotrophoblasts (S-cell) from the section of frozen placenta. In the S-cell of preeclamptic placentas, PAI-1, heme oxygenase-1 (hypoxia related genes), caspase-3, 4, 8 (apoptosis related genes), and heat shock protein 70 were up-regulated. Third, *in vitro* culture of isolated cytotrophoblasts (C-cell), gene expression of HIF-1, PAI-1, p21, and p53 in C-cell was enhanced by hypoxic culture. In the immunostaining of placenta, a higher expression of p21, p53, bax, PAI-1 was observed in the C-cell of preeclamptic placenta when compared to controls. Caspase 3 was dominant in the S-cell of preeclampsia. TUNEL staining was also observed in the S-cell in preeclampsia. These results suggest that the characteristic pattern of gene expression in preeclamptic placentas may be caused by hypoxic condition. Finally, we measured fetal (placental) DNA concentrations in maternal plasma to evaluate the damage of trophoblasts *in vivo*. We revealed that fetal DNA concentrations in maternal plasma increase according to the presence of gestational hypertension and preeclampsia. Since fetal DNA was considered to be derived from villous trophoblasts, we confirmed the presence of a damage of trophoblasts through the analysis of fetal DNA in maternal plasma. In conclusion, these results confirm the hypothesis that pathogenesis of preeclampsia is due to a hypoxic damage of trophoblasts.
