

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 15 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591842

研究課題名（和文） 妊娠高血圧症候群の病因・病態および遺伝・環境交互作用の解明と遺伝子型別介入研究

研究課題名（英文） Study for elucidation of gene-environment interaction in the manifestation of pregnancy-induced hypertension

研究代表者

小橋 元 (KOBASHI GEN)

独立行政法人放射線医学総合研究所・企画部研究倫理企画支援室・室長

研究者番号：60270782

研究成果の概要（和文）：複数の候補遺伝子多型のタイピングを行った結果、*TNF-A* G-308A 多型と PIH との関連が示唆された。PIH 予防のための高エビデンスの疫学研究としては、RCT の代替として、必要な要因の揃った多数の症例を対象とした傾向スコア（PS）解析の導入が必要と考えられた。子癇の予知には、従来いわれてきた高血圧に加えて、母体年齢（若年妊娠）、初産を組み合わせる用いることの必要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Performing genotyping of some kinds of candidate genetic variants for PIH, G-308A polymorphism of *TNF-A* was associated with PIH. Propensity score analysis was needed to carry out epidemiological study of PIH in the future. A retrospective analysis using the registry system suggested that more intensified monitoring of nulliparous women and teenaged girls besides hypertension is needed in order to prevent eclampsia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：産科学

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群（PIH）の発症には、遺伝・環境交互作用により起こる複数の多因子病態が関与している。遺伝要因としては、1993 年の羽田らの報告（PIH と *AGT* TT 型の関連）を皮切りに、遺伝子 DNA 上の一塩基の置換、挿入および欠失による配列の違いである SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) の本症への関連が注目された。

申請者らは、PIH における遺伝・環境交互

作用を明らかにするために、今までに北海道内の PIH の症例約 200 例と、正常妊娠の対照約 800 例の DNA を解析し、*AGT* M235T 多型、アンジオテンシン II 受容体遺伝子 (*AT1*) A1166C 多型、一酸化窒素合成酵素遺伝子 (*NOS3*) Glu298Asp 多型が、それぞれ独立に PIH 発症に関連することを見出した。また、アンジオテンシン変換酵素遺伝子 (*ACE*) Insertion/Deletion 多型、*F5* Leiden 変異、*MTHFR* C677T 多型は日本人の PIH には

関連しないとの結果を得た。また、*AGTTT* 型、*NOS3* GA+AA 型、高血圧の家族歴、妊娠前の肥満はそれぞれ独立に *PIH* に関連し、*PAI-1* の 4G/4G 型は *AGT* に関連した病因・病態に、*GSTP1* の IV+VV 型は *NOS3* に関連した病因・病態に、それぞれ何らかの関与をしていることも明らかになった。

さらに、初産 *PIH* 71 例に対して、年齢をマッチさせた初産正常妊娠分娩 213 例を対照として抽出し、*AGT* 遺伝子型とともに、臨床データおよびライフスタイル・ストレスなどを同時に解析した。その結果、単変量解析では「*AGTTT* 型」「妊娠前の BMI \geq 24」を含む 9 項目が *PIH* 発症に有意に関連した。多変量解析では、それらのうち「*AGT* TT 型」「妊娠前の BMI \geq 24」「高血圧の家族歴」「妊娠中濃い味付けを好んだ」「妊娠中の精神的ストレス」の 5 項目が独立な危険要因として検出された。対象集団を *AGT* 遺伝子型により 2 群に分けて解析すると、*AGT* TT 型の群には、「妊娠前の BMI \geq 24」「*NOS3* GA+AA 型」「高血圧の家族歴」「妊娠前に夫の実家との関係が悪かった」「妊娠中の精神的ストレス」「妊娠中夫との関係が悪い」「妊娠中濃い味付けを好んだ」の 7 項目が有意に *PIH* に関連し、多変量解析では「妊娠前の BMI \geq 24」「*NOS3* GA+AA 型」「高血圧の家族歴」「妊娠中の精神的ストレス」が検出された。一方、それ以外の群では、単変量解析で「妊娠前の BMI \geq 24」「妊娠中濃い味付けを好んだ」の 2 項目が関連し、多変量解析では「妊娠前の BMI \geq 24」が検出された。

一方、*PIH* の病因・病態に関しては、*AGT* の TT 型は妊娠初期のトロホプラスト不完全侵入およびらせん動脈狭小化を引き起こすことに関連するが、上記の研究結果に照らせば、この素因を持つ妊婦に精神的あるいは身体的ストレスが加わると、胎盤血流の低下と線溶抑制による過凝固状態を招き、これが *PIH* 発症の引き金となるという仮説が成り立つ。近年、当該分野の *PIH* 関連 SNPs のアソシエーション・スタディでは、Caucasians においては上記の *AGT* 以外に、血液凝固第 V 因子 (*F5*) や methylenetetrahydrofolate reductase 遺伝子 (*MTHFR*) に関する報告がある。また、日本人では申請者らの報告の他に Sohda らの *MTHFR*、Yoshimura らの *NOS3*、Yamada らの *PAI-1* に関する報告があるが、現在はまだまだ数が少ない。また、*PIH* において SNPs とライフスタイル・ストレス・ソーシャルサポートを同時に解析し、それらの相互作用を検討する研究は世界的にもまったく見られない。

2. 研究の目的

本研究の全体の最終的なゴールは、*PIH* の複数の病因・病態における遺伝・環境相互作用の解明、および、遺伝子型別予防医学の実現である。

3. 研究の方法

- (1) *PIH* に関連する新しい SNPs 探索の継続と *AGT*、*NOS3* との共同解析：現在すでに協力体制ができている産科施設において、文書を用いた十分な説明により同意の得られた妊婦に、妊娠前・妊娠中の生活習慣（食生活、飲酒・喫煙、運動、睡眠、休養、精神社会活動）、ストレス、ソーシャルサポート、エゴグラムなどの質問紙調査を行い、同時に母体採血を行う。各妊婦を妊娠判明時から分娩時まで前方視的に観察する。血液から遺伝子 DNA を抽出し、*PIH* との関連が推測される新たな候補遺伝子多型 (SNPs) の遺伝子タイピングは、全血 1ml より抽出した遺伝子 DNA を鋳型として、各遺伝子多型領域を挟むプライマーを使用して遺伝子増幅および制限酵素による切断 (PCR-RFLP) などを行い、それぞれの断片を 1.5% アガロース電気泳動法あるいは 10% アクリルアミド電気泳動法で確認した。
- (2) *AGT* 遺伝子タイピング結果を用いた介入研究：20~34 歳までの初産婦を対象に、妊婦検診初診時の BMI24 未満、単胎妊娠、内科外科の合併症がなく、インフォームドコンセントが得られた者とする。介入群の *AGT* 遺伝子 TT 群にはストレス解消、MM+MT 群には栄養指導を中心とした強い保健指導を行う。
- (3) *PIH* の疫学研究のための周産期情報登録システムの開発：特定地域における一定期間の病気の発症率あるいは有病率を正確に把握するために、病院間で共通な登録フォーマットを作成する。

4. 研究成果

- (1) *PIH* に関連する新しい SNPs 探索：プロトロンビン遺伝子 (*F2*) G20210A 多型のタイピングした結果、すべて G20210 のホモ接合 (GG) であり、ヘテロ接合 (GA) および A20210 のホモ接合 (AA) は認められなかった。 *β 2GPI* Val1247Leu 多型、Sapporo 多型のタイピングを行い、分布をそれぞれ検討した結果、それぞれ *PIH* との有意

な関連は認められなかった（表 1、2）。*TNF-AG-308A* 多型の GA+AA の頻度は、PIH 群で 18%に対して対照群で 4%と、有意に PIH 群で高かった ($p < 0.05$) (論文執筆中)。上記に関してはすでに明らかになっている *AGT*、*NOS3*、生活習慣要因との交互作用を解析して、今後の発症予防に役立つ候補因子としての性質を明らかにしたい。

- (2) *AGT* 遺伝子タイピング結果を用いた介入研究：妊娠女性の精神的ストレスの評価とともに妊産婦のリクルートを試みたが、ランダム化や倫理面での問題点が明らかとなり、十分な遂行が叶わなかった。介入研究ではランダム化比較試験 (RCT) が求められる。RCT においては、①ランダム割り付けと、②二重盲検が、重要な意味を持つ。しかし、薬剤以外の介入研究では、これらの処理が難しく遂行が困難な場合が少なくない。疫学研究における保健指導などを用いた介入研究では、ランダム割り付けの困難さや倫理面での問題を補うために、時期によって介入の有無を変えた 2 群を設定するクロスオーバー法などが用いられるが、短期間に母体が劇的に変化する妊娠中においてクロスオーバー法は使えない。そのため、参加者のリクルートが難しかった。

表 1 B2GPI Val1247Leu 多型の分布

	n	Val		Leu		Leu	
		Val	(%)	Leu	(%)	Leu	(%)
PIH	136	11	8.1	43	31.6	82	60.3
重症 PIH	111	9	8.1	34	30.6	68	61.3
PE	102	7	6.9	35	34.3	60	58.8
対照	349	23	6.6	114	32.7	212	60.7

PE: preeclampsia

日本人の一般集団の分布は VV4%、VL40%、LL56%

表 2 B2GPI Sapporo 多型の分布

	n	wild		sap		sap	
		wild	(%)	wild	(%)	sap	(%)
PIH	136	129	95	7	5.2	0	0
重症 PIH	111	105	95	6	5.4	0	0
PE	102	96	94	6	5.9	0	0
対照	349	329	94	20	5.7	0	0

PE: preeclampsia

日本人の一般集団の分布は VV4%、VL40%、LL56%

RCT の弱点を補うための方法として、傾向スコア (Propensity Score : PS) 解析が、RCT 並みの精度を持ち、RCT に匹敵する高いエビデンスレベルが得られる方法として、循環器病研究の分野を中心に、近年高く評価されている。しかしながら、この解析方法を用いるためには、妊娠中のストレス評価がなされ、ストレス回避行動もしくは治療を行った者とそうではない者として、PS がマッチしたペアを作り (あるいは多変量解析を行い)、各群における PIH 発症率を比較する必要がある、そして、その枠組みの中で各遺伝子多型の関連解析を行わねばならない。この解析を遂行するには、きめの細かい前方視的研究をベースにして、数千件の妊婦をリクルートする必要があるが、これを今後の課題としたい。

- (3) PIH の疫学研究のための周産期情報登録システムの開発：今回は病院間で共通のフォーマットの開発を行った。地域ベースの産科コホート調査への使用を検討中である。また、既存の PIH の登録システムを用いた疫学研究 (後方視的解析) も行った。日本産科婦人科学会の登録システムから 2005 年から 2009 年までの子癩について検討した結果、母体年齢が 1 歳下がるごとに 3%発症率が上昇し、発症リスクは初産で 2.6 倍、PIH で 35.6 倍となり、特に 10 代の高血圧合併妊娠においては 28 例に 1 例と高率に子癩を発症する可能性が明らかになった。しかしながら、検討した 225 例中 75 例 (33%) が高血圧を認めずに子癩を発症しており、子癩の予防には、高血圧単独ではなく母体年齢や経産回数を組み合わせて発症予知に役立てる必要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Yamada T, Koyama T, Furuta I, Morikawa M, Yamada T, Minakami H. Association of antithrombin activity with plasma aldosterone concentration and plasma Renin activity in pregnant women. *Hypertens Pregnancy*. 査読有、32: 96-103, 2013, PMID: 23273069
- ② Yamada T, Morikawa M, Yamada T, Kishi R, Sengoku K, Endo T, Saito T, Cho K, Minakami H. First-trimester serum

- folate levels and subsequent risk of abortion and preterm birth among Japanese women with singleton pregnancies. Arch Gynecol Obstet, 査読有、287, 9-13, 2013, PMID: 22875049
- ③ 小橋 元. 橋渡しと連携のための疫学 (その1) 疫学の定義と方法について. 放射線科学、査読無、56, 35-38, 2013
- ④ Takahashi H, Washio M, Kiyohara C, Tada Y, Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G, Yamamoto M, Horiuchi T, the Kyushu Sapporo SLE (KYSS) Study Group. Psychological stress in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: Finding from KYSS study. Modern Rheumatology Modern Rheumatol, 査読有、(in press)
- ⑤ Yamada T, Kuwata T, Matsuda H, Deguchi K, Morikawa M, Yamada T, Furuya K, Matsubara S, Minakami H. Risk factors of eclampsia other than hypertension: pregnancy-induced antithrombin deficiency and extraordinary weight gain. Hypertens Pregnancy. 査読有、31: 268-277, 2012, PMID: 22149018
- ⑥ Yila TA, Sasaki S, Miyashita C, Braimoh TS, Kashino I, Kobayashi S, Okada E, Baba T, Yoshioka E, Minakami H, Endo T, Sengoku K, Kishi R. Effects of maternal 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and tobacco smoking on infant birth weight in a Japanese population. J Epidemiol. 査読有、22: 91-102, 2012, PMID: 22277790
- ⑦ Morikawa M, Cho K, Yamada T, Yamada T, Sato S, Minakami H. Risk factors for eclampsia in Japan between 2005 and 2009. Int J Gynaecol Obstet. 査読有、117: 66-68, 2012, PMID: 22257769
- ⑧ Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. Anti- β 2 glycoprotein-I antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case control study. J Reprod Immunol, 査読有、84: 95-99, 2010, PMID: 20004024
- ⑨ 鷺尾昌一、尾島俊之、玉腰暁子、酒井美知、武藤香織、小橋 元、石川鎮清、大神英一、太田薫里、佐藤恵子、鈴木美香、杉森裕樹、内藤真理子、中山健夫、丸山英二、山縣然太郎. 社会医学実習での疫学調査を行う際の倫理に関する教育の実態. 臨床と研究、査読有、87: 1473-1481、2010
- ⑩ 山田秀人, 小橋 元, 渥美達也. 抗リン脂質抗体は産科異常, 特に妊娠高血圧症候群と関連する. 産婦人科の実際、査読無 59, 789-794, 2010
- ⑪ 小橋 元, 水上尚典, 山田秀人. 妊娠高血圧症候群と遺伝因子. 産婦人科の実際、査読無 59, 2001-2007, 2010
- ⑫ 福島芳子、末竹弘樹、石田有香、伊藤浩、石川顕一、上田順市、小橋 元、吉本泰彦、佐藤眞一郎. 臨床研究管理支援体制の整備. 放射線科学、査読無、53, 51-53, 2010
- [学会発表] (計1件)
- ① 小橋 元. 放射線と遺伝 ~ 疫学・公衆衛生学の立場から. 日本人類遺伝学会第56回大会 (シンポジウム「放射線被曝と遺伝学」) (千葉・平成23年11月12日)
- [図書] (計6件)
- ① Kobashi G. Confounding of Genetic and Environmental factors in Pregnancy-Induced Hypertension. Nova Science Publishers, Inc. (in press)
- ② 小橋 元. 第7章 環境と健康、1. 生態系と人間、5) 電離放射線、6) 非電離放射線、第8章 産業保健 (労働衛生)、9. 職業性疾病とその予防対策、5) 電離放射線障害とその防止対策. これからの公衆衛生学. 田中平三編. 南江堂、pp185-187、pp230-232、2013
- ③ 小橋 元. 第5章 危機管理計画、第6章 リスク評価とリスク管理. 最悪に備えよー医薬品および他の医療関連危機を予測し回避または管理する. ブルース・ハグマン、ジェリー・ラバディック著. 杉森裕樹、大神英一、山本美智子、折井孝男、中山健夫監訳. じほう、pp55-96、2013
- ④ 小橋 元、岡本悦司他監修. Subnote 保健医療論・公衆衛生学 2013. メディックメディア編・発行、pp204-229、2012
- ⑤ 小橋 元. 頻度の測定、頻度の比較. はじめて学ぶやさしい疫学 一疫学への招待一 (第2版). 田中平三、能勢隆之編. 南江堂、pp.13-24, 2010
- ⑥ 小橋 元. 疫学. NEXT 公衆衛生学 (第3版). 村松 宰, 中山健夫編. 講談社サイエンティフィク、pp.26-36, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小橋 元 (KOBASHI GEN)

独立行政法人放射線医学総合研究所・企画
部研究倫理企画支援室・室長

研究者番号：60270782

(2) 研究分担者

羽田 明 (HATA AKIRA)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00244541

水上 尚典 (MINAKAMI HISANORI)

北海道大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40102256

山田 秀人 (YAMADA HIDETO)

神戸大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40220397

杉森 裕樹 (SUGIMORIHIOKI)

大東文化大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：20276554