

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592478

研究課題名(和文) 不育症における遺伝学的原因の探索

研究課題名(英文) Genetic causes of recurrent pregnancy loss

研究代表者

杉浦 真弓 (Sugiura, Mayumi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30264740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ANXA5、凝固XII因子、凝固V因子の多型は患者群において高頻度であり、不育症の危険因子であることが判った。しかし、これらのrisk alleleの有無によって次回出産率に差を認めなかった。一方、Protein S徳島、凝固V因子奈良変異、HongKong変異は関係がみられなかった。ループスアンチコアグラントLAは凝固XII因子活性を低下させ、LAを除外するとXII活性低下、PS活性低下は次回流産率に影響を与えなかった。10回以上の習慣流産6家系のトリオエクソーム解析によってSIKE1, ZNF77, TDRD15, SLIT1, CHD3, MKL1, PITPNM1に新規変異を見つけた。

研究成果の概要(英文)：Six kinds of SNPs of ANXA5, CT genotype of coagulation factor XII (FXII) and GT and TT genotype of Ser156Ser of FV were found to be risk factors for recurrent pregnancy loss (RPL). The frequency of protein S (PS) Tokushima in patients was similar to that in controls. No case of Nara mutation and Hong Kong mutation were found in both patients and controls. There was no difference of subsequent live birth rate between with and without risk alleles of ANXA5, FXII, FV and PS Tokushima. There was no difference of subsequent live birth rate between low and normal levels of FXII activity, PS antigen, PS activity and PS specific activity after excluding cases with RPL caused by abnormal embryonic karyotype.

We found CT genotype of FXII as a risk factor for RPL at the first time. However, the genotyping of these risk alleles and testing for FXII activity and PS measurement were not necessary because of absence of clinical benefit.

研究分野：不育症

キーワード：不育症 習慣流産 凝固第XII因子 凝固第V因子 プロテインS ループスアンチコアグラント 抗リン脂質抗体 不育症易罹患者性遺伝子

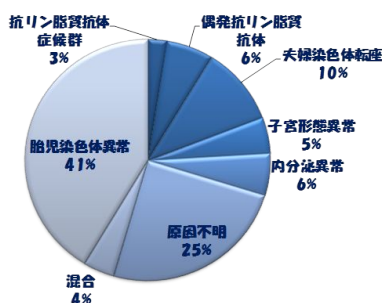
### 1. 研究開始当初の背景

名古屋近郊の岡崎市において疫学研究を実施し、我が国の不育症頻度は4.2%であり、習慣流産(3回以上の連続する流産)頻度は0.9%であることを私たちは明らかにした。不育症の明らかな原因は夫婦染色体均衡型転座4.5%、子宮奇形3.2%、抗リン脂質抗体10%である。均衡型転座、子宮奇形に対して着床前診断、子宮形成手術が実施されているがそれらを行わなくても68%、78%が出産に至ることを世界で初めて報告した。

一方、散発流産の70-80%は胎児染色体異常によることが知られているが、不育症においても1309妊娠の解析から51%に胎児染色体数的異常が存在することを報告した。胎児染色体異常による不育症患者は胎児染色体正常流産患者よりもその後の生児獲得率が高いことも明らかにした。一般的に不育症の半数以上が原因不明といわれているが、私たちは胎児染色体異常流産の存在を明らかにし、これを除く約20%が真の原因不明であることを突き止めた。

一般臨床において胎児の染色体検査は行われていないが、最近のN Engl J MedのClinical Practiceにおいても一般臨床家が行うべき検査として胎児染色体が推奨されている(Branch et al. N Engl J Med 2010; 363: 1740)。胎児染色体異常流産と正常の真の原因不明を区別することは重要である(図)。

2009年に染色体不分離に關与するSYCP3遺伝子変異が習慣流産患者26例中2例に発見されたと報告された(Bolor et al. Am J Hum Genet 2009;84:14)。もし本当であれば、7.7%



の高頻度の原因を占めることになる。私たちは原因不明習慣流産患者101例について追試を行った。患者1例、対照1例にexon8の657T>C変異を認めたが、患者の過去の流産の絨毛染色体は46,XYと46,XYであったことからこの変異は染色体異常流産と関係しない遺伝子多型と考えられた。

一方、原因不明不育症に關与する遺伝子多型が現在57種類報告されている(2011年当時)。XII因子、eNOS、MTHFR遺伝子多型については私たちが研究した結果、不育症との関係はみられなかった。否定的な報告も多く、現在危険因子であることが明確なのは凝固第V因子Leiden変異とProthrombin遺伝子変異のみであるが、これらはアジア人には報告されていない。また、これらの報告は胎児染色体異常を含めた原因不明であり、真の原因不明不育症における遺伝子多型の意義についての研究は全く行われていない。

### 2. 研究の目的

不育症において抗リン脂質抗体症候群に対する抗凝固療法が唯一の治療である。原因不明に対する確立された治療法はない。私たちは免疫療法、アスピリン療法、ヘパリン療法、ステロイド療法が薬物なしと比較して有効性がないことを多重解析によって証明した。真の原因不明不育症における遺伝子変異を調べて新たな治療法を確立することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### ANXA5

Annexin A5は絨毛膜表面に局在し、胎盤における凝固を抑制している。ANXA5遺伝子多型と習慣流産の関係が横断研究によって示されている。しかし、先行研究では胎児染色体の解析が行われていない。ANXA5 SNP1-6をTaqMan PCRを用いて調べ、原因不明不育症264人と流産歴がなく出産歴のある対照195人と比較した。前方視的にrisk alleleの有無によって次回の出産率に差があるかを

調べた。胎児染色体異常を除外して検討した。

### 凝固第 XII 因子 (FXII)

不育症の横断研究において患者群で FXII 活性低下がみられることが報告されている。私たちは FXII 活性でいかがその後の流産の予知因子であることを報告したが、症例数が少なく追試もなく、臨床的に FXII を測定意義は未確立なまま、多くの施設がこれを測定している現状であった。279 人の原因不明不育症患者と 100 人の対象について、FXII 活性と Lupus Anticoagulant (LA) の関係を調べた。

患者群と対照の多型頻度を比較した。患者群において多型、活性毎の次回妊娠の出産率を調べた。

### Protein S (PS)

PS は凝固抑制因子であり PS 欠乏症と死産との関係が報告されているが、初期流産については否定的である。それにもかかわらず 95% を初期流産が占める不育症患者に多くの施設が PS 抗原、活性を測定している現状がある。355 人の原因不明不育症患者と 100 人の対象について、PS 活性と LA の関係を調べた。患者群と対照の PS 徳島 (遺伝子多型) を比較した。患者群において PS 徳島、PS 抗原、PS 活性、PS 比活性 (活性/抗原) 毎の次回妊娠の出産率を調べた。

### 凝固第 V 因子 (FV)

Leiden 変異は凝固第 V 因子の Protein C 結合部位の変異であり、血栓症を起こすことが判っている。欧米では不育症原因の 5% 弱を占めるが、アジア人には見つかっていない。88 人の原因不明習慣流産患者と 95 人の対照について Nara 変異、Hong Kong 変異、FV R2 haplotype を含む 16SNPs と FV 活性を調べた。

## 染色体均衡型転座に起因する習慣流産に対する着床前診断は生児獲得に有効か？

1998 年から転座保因者に対する流産予防の着床前診断 PGD が始まったが、PGD が出産に貢献しているかは明らかになっていない。日本では倫理的な理由から日本産科婦人科学会が重篤な遺伝性疾患に対して臨床研究として実施することを承認している。2006 年に日本で開始した転座について、35 歳未満の PGD を選択した患者と 52 人の自然妊娠を選択した患者について次回妊娠帰結を調べて比較した。

### 10 回以上の難治性習慣流産患者のエクソーム解析

10 回以上流産を繰り返す患者 6 人とその両親にエクソーム解析を次世代シーケンサーを用いて行った。両親にない新規遺伝子変異であり、日本人のデータベースにみられない変異を各家系に毎に調べた。

### 4. 研究成果

#### ANXA5

SNP5 TG, GG 型の頻度は患者群で有意に高かった。日本人の先行研究とあわせて MAX 検定を用いると Dominant model において SNP1-6 すべて患者群で有意に高頻度であった。OR は 1.5 前後であった。

		SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6
Present study	dominant	1.132	1.568	1.346	1.568	3.887	2.230
	Recessive	1.317	2.177	2.177	1.317	0.002	2.177
	Log-additive	0.365	0.400	0.318	0.581	2.408	0.705
	MAX-statistic	1.317	2.177	2.177	1.568	3.887	2.230
	P-value	0.443	0.266	0.267	0.381	0.100	0.258
Combination of our data and previous data reported by Miyamura et al.	dominant	4.955	5.826	5.300	6.393	9.943	6.393
	Recessive	1.954	2.932	2.932	1.954	1.541	2.932
	Log-additive	2.696	2.860	2.565	3.615	9.058	3.177
	MAX-statistic	4.955	5.826	5.300	6.393	9.943	6.393
	P-value	0.056	0.035	0.046	0.025	0.003	0.025
OR obtained with selection of the dominant model in the combination data	OR (95% CI)	1.52 (1.05-2.22)	1.57 (1.09-2.31)	1.53 (1.06-2.23)	1.62 (1.11-2.39)	1.61 (1.20-2.18)	1.62 (1.11-2.39)

しかし、その後の妊娠において risk allele の有無による出産率の差は認められなかった。胎児染色体異常流産を除外しても差は認められなかった。

	with risk allele T/G or G/G	Without risk allele T/T
Subsequent live birth rate in 225 patients without treatment	70.0 % (63/90)	71.9 % (97/135)
Live birth rate after excluding cases with treatment or an abnormal embryonic karyotype (n=190)	84.0 % (63/75)	84.3 % (97/115)

ANXA5 遺伝子多型は不育症の危険因子であった。しかし、その後の出産に影響を与えるほどの臨床的な影響は小さいと思われた。

## 凝固第 XII 因子

LA は FXII 活性を約 30% 低下させることが明らかになった。患者群で CT 型が有意に高頻度であることが世界で初めて明らかになった(OR2.8, 95%CI1.4-5.9)。

	Genotype	Patients with RPL n=262 (%)	Control n=100 (%)	OR (95% CI)
Factor XII activity	Total XII activity	83.8 (29.1)	83.8 (28.6)	
	CC	126.1 (17.7)	123.1 (14.3)	
	CT	89.2 (25.8)	94.3 (18.5)	
	TT	65.8 (21.6)	60.0 (14.5)	
Genotypic Frequency	CC	22 (8.4)	17 (17)	reference
	CT	139 (53.1)	38 (38)	2.83 (1.37-5.85) 0.005
	TT	101 (38.5)	45 (45)	1.73 (0.84-3.58) 0.136
Allelic Frequency	C/T ratio	0.34/ 0.66	0.36/ 0.64	0.34/ 0.66

しかし、遺伝子型も FXII 活性もその後の妊娠において出産率に差を認めなかった。胎児染色体異常流産を除外しても差を認めなかった。

		Live birth rate excluding cases with abnormal embryonic karyotype	Multivariable Logistic regression OR (95%CI)
Genotype	CC	77.8% (7/9)	reference
	CT	80.4% (41/51)	2.0 (0.33-12.5)
	TT	79.4% (27/34)	1.47 (0.24-9.1)
FXII activity (10-90 <sup>th</sup> percentile)	Normal	79.2% (61/77)	reference
	High	71.4% (5/7)	0.54 (0.09-3.2)
	Low	90.0% (9/10)	2.0 (0.23-16.7)

FXII 活性は LA のサロゲートマーカーであり、FXII 活性の測定を臨床的に行う意義はないと考えられた。CT 型が不育症の危険因子であることを世界で初めて発見した。

## Protein S

PS 徳島の頻度は患者群、対照群で差を認めなかった。PS 徳島 8 人はヘパリン療法を受けることなく出産に至った。PS 徳島の一人はヘパリン療法を受けても流産となった。11 人の

LA 陽性患者のうち 2 人は PS 活性低下を認めた。PS 抗原、活性、比活性ともに次回の妊娠出産率に影響を認めなかった。

PS 徳島、抗原、活性を不育症患者に測定する臨床的意義はないものと思われた(論文投稿中)。

## 凝固第 V 因子

Nara 変異、Hong Kong 変異は患者、対照ともに見つからなかった。患者群において Ser156Ser GT, TT 型が有意に低頻度であった。また、Leu1288Leu の C allele が有意に高頻度であった。患者群において FV 活性の高値、低値のばらつきがあった(論文投稿中)。

## 染色体均衡型転座に起因する習慣流産に対する着床前診断は生児獲得に有効か？

累積生児獲得率は PGD67.6%、自然妊娠 65.4% と差を認めなかった。流産率は PGD 群で有意に低かった。妊娠委至らない頻度は PGD 群で有意に高かった。PGD 群は 2.46 回の採卵を要し、費用は約 95 万円かかった。これらの情報を PGD 希望者に遺伝カウンセリングすることが必要と思われた。

	着床前診断	自然妊娠	OR (95% CI)	p-value
診断後初回の出産率	37.8% (14/37)	53.8% (28/52)	0.52 (0.22-1.23)	0.10
累積生児獲得率	67.6% (25/37)	65.4% (34/52)	1.10 (0.45-2.70)	0.83
その後、妊娠しない確率	18.9% (7)	3.8% (2)	1.19 (1.00-1.40)	0.03
平均流産回数	0.24 ± 0.40	0.58 ± 0.78	-	0.02
平均採卵回数	2.46 (2.30)	-		
平均胚移植回数	2.16 (1.85)	-		
出産に至った妊娠までの月数	12.4 (13.95)	11.4 (10.9)	NS	
双胎の頻度	29.0% (9/31)	5.1% (2/39)	7.57 (1.50-38.26)	0.009
患者あたりの費用	\$7,956 U.S.	-		

## 10 回以上の難治性習慣流産患者のエクソーム解析

SIKE1, ZNF77, TDRD15, SLIT1, CHD3, MKL1, PITPNM1 に新規変異を見つけた。この研究は今後継続予定である。

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 34 件)  
英文原著 16 件(抜粋)

和文依頼原稿 18 件

1. Kitaori T, Sugiura-Ogasawara M, Oku K, Papisch W, Ebara T, Ozaki Y, Katano K, Atsumi T. Determination of clinically significant tests for antiphospholipid antibodies and cutoff levels for obstetric antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2015; 24: 1505-19. 査読有
2. Ikuma S, Sato T, Sugiura-Ogasawara M, Nagayoshi M, Tanaka A, Takeda S. Preimplantation Genetic Diagnosis and Natural Conception: A Comparison of Live Birth Rates in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Associated with Translocation. *PlosOne*. 2015;10(6):e0129958. doi: 10.1371/journal.pone.0129958. 査読有
3. Sugiura-Ogasawara M, Atsumi T, Yamada H, Kitaori H, Ozaki Y, Katano K, Murashima A. Real-world practice of obstetricians in respect of assays for antiphospholipid antibodies. *Modern Rheumatology* 2015; 30: 1-22. 査読有
4. Sugiura-Ogasawara M, Lin BL, Aoki K, Maruyama T, Nakatsuka M, Ozawa N, Sugi T, Takeshita T, Nishida M. Does surgery improve live birth rates in patients with recurrent miscarriage caused by uterine anomalies? *J Obstet Gynaecol* 2015 Feb;35(2):155-8. 査読有
5. Asano E, Ebara T, Yamada-Namikawa C, Kitaori T, Suzumori N, Katano K, Ozaki Y, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. Genotyping analysis for the 46 C/T polymorphism of coagulation factor XII and the involvement of factor XII activity in patients with recurrent pregnancy loss. *PlosOne* 2014; 9(12):e114452. doi: 10.1371/journal.pone.0114452. 査読有
6. Katano K, Suzuki S, Ozaki Y, Suzumori N, Kitaori T, Sugiura-Ogasawara M. Peripheral natural killer cell activity as a predictor of recurrent pregnancy loss: a large cohort study. *Fertil Steril* 2013; 100: 1629-34. 査読有
7. Sugiura-Ogasawara M, Nakano Y, Ozaki Y, Furukawa TA. Possible improvement of depression after systematic examination and explanation of live birth rates among women with recurrent miscarriage. *J Obstet Gynecol* 2013; 33(2): 171-4. 査読有
8. Sugiura-Ogasawara M, Suzuki S, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T. Frequency of recurrent spontaneous abortion and its influence on further marital relationship and illness: The Okazaki Cohort Study in Japan. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013; 39: 126-31. 査読有
9. Hayashi Y, Sasaki H, Suzuki S, Nishiyama T, Kitaori T, Mizutani E, Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genotyping analyses for polymorphisms of *ANXA5* gene in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2013; 100: 1018-1024. 査読有
10. Souri M, Sugiura-Ogasawara M, Saito S, Kemkes-Matthes B, Meijers JC, Ichinose A. Increase in the plasma levels of protein Z-dependent protease inhibitor in normal pregnancies but not in non-pregnant patients with unexplained recurrent miscarriage. *Thromb Haemost* 2012; 107: 507-512. (equal contribution) 査読有
11. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2012; 27: 2297-2303. 査読有

〔学会発表〕(計 122 件)

国際学会 27 件

1. Sugiura-Ogasawara M. Candidate genes associated with recurrent pregnancy loss. Concurrent invited session “Genetics of recurrent pregnancy loss” The 13<sup>th</sup> International Congress of Human genetics. 2016. 4. 4-7. Kyoto International Conference center. Kyoto. Conenor.

2. Sugiura-Ogasawara M., Kitaori T, Katano K, Ozaki Y. Keynote Lecture: Candidate genes associated with recurrent pregnancy loss. 1<sup>st</sup> World Congress on Recurrent Pregnancy Loss. 2016. 1. 14-17. Cannes ( France ). 組織委員

国内学会 95 件 (以下抜粋)

1. 杉浦真弓「不育症のエビデンスと共同研究拠点の目指すもの」名古屋市立大学開学 65 周年記念シンポジウム. 2015. 10. 31. 名古屋市立大学 (愛知県・名古屋市)

2. 杉浦真弓「分子標的治療薬のアニユアルエビデンスレビュー：産科抗リン脂質抗体症候群」第 43 回日本臨床免疫学会特別企画 2015. 10. 24. 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

3. 杉浦真弓「着床前診断と生殖医療の倫理的諸問題」第 42 回日本産婦人科医会学術集会解説講演. 2015. 10. 17-18. 新潟グランドホテル (新潟県・新潟市)

4. 杉浦真弓「不育症のエビデンス」第 34 回日本思春期学会教育講演. 2015. 8. 29. ピアザ淡海 (滋賀県・大津市)

〔図書〕(計 2 件)

1. Sugiura-Ogasawara M. Recurrent Pregnancy Loss: Current Evidence and Clinical Guideline In: Precision Medicine in Gynecology and Obstetrics ed. Konishi I.

Springer Japan, in press.

2. Sugiura-Ogasawara M., Ozaki Y, Katano K, Kitaori T. Contemporary prevention and treatment of recurrent pregnancy loss.

In: Recurrent pregnancy loss

ed. Bashiri A, Harlev A, Agarwal A.

Springer International Publishing, Switzerland 155-163p, 2016.

〔その他〕  
**ホームページ**  
習慣流産・不育症のみなさんへ

NHK, **新聞報道**  
2015 年 6 月 18 日 Ikuma らの論文 Plos One が NHK, 読売新聞、毎日新聞、朝日新聞各社に報道された。

2015年(平成27年)6月18日 木曜日 東京

### 着床前診断と自然妊娠 名市大調査

## 習慣流産の人では 出産確率変わらず

受精の一部を取り出して遺伝情報を調べる「着床前診断」をして子どもを得られる確率は、特定の染色体異常で流産を繰り返す患者については自然妊娠を試みた場合と変わらなかったとする調査結果を、名古屋市立大などのチームがまとめた。異常のない受精卵を運び出産の確率を上げよう

受精の一部を取り出して遺伝情報を調べる「着床前診断」をして子どもを得られる確率は、特定の染色体異常で流産を繰り返す患者については自然妊娠を試みた場合と変わらなかったとする調査結果を、名古屋市立大などのチームがまとめた。異常のない受精卵を運び出産の確率を上げよう

という手法だが、効果の限界を示す結果となった。調べたのは、夫婦の染色体異常と一方の染色体異常型胚座という種類の両方がある「正常な受精卵ができていない習慣流産の人たち。2008年12月以降、同大学ないしセントマザー産婦人科医院(北九州市)を受診したいずれも34

歳以下で、着床前診断を受けた女性37人、自然妊娠を試みた52人の経過を昨年7月まで追った。もともと流産の程度はどちらの側にも変わらなかった。

期間は12・4カ月と11・4カ月で、いずれも統計学的に差はなかった。ただ、出産までに流産をした回数 は、1人平均だと着床前診断を受けた側で0・24回

たのは、着床前診断を受けた側で25人(67・6%)、自然妊娠を試みた側で34人(65・4%)。妊娠までの期間は12・4カ月と11・4カ月で、いずれも統計学的に差はなかった。ただ、出産までに流産をした回数 は、1人平均だと着床前診断を受けた側で0・24回

と、自然妊娠の側の0・58回に比べて少なかった。受精卵を選んだことで流産が減った一方、妊娠のつなかりやすい受精卵がもともと限られていたため、出産の確率は高まらなかったとみられる。

研究チームの中心になった名古屋市の杉浦真弓教授は「流産が意味は決して小さくないが、着床前診断をしても確める確率が高まることは限らず、高額な費用もかかる。受けるかは施設の説明をよく聞いて、慎重に判断してほしい」と話す。結果は17日付の米科学誌で報告される。(田村雄一)

着床前診断の流れ

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
杉浦 真弓 (SUGIURA, Mayumi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30264740