

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462571

研究課題名(和文)胎児染色体異常症の脱落膜における母児間免疫応答と新生血管制御因子の関与

研究課題名(英文)Fetal chromosomal abnormalities and early pregnancy loss in fetus-maternal translation

研究代表者

鈴森 伸宏 (Suzumori, Nobuhiro)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70326148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵子の老化、高齢による流産率の上昇や胎児染色体異常症の増加は、近い将来の超高齢化社会や労働人口の減少を考えると、大きな社会問題になっている。今回、妊娠維持に関する因子のうち第XII因子、第V因子、Protein Sなどについて検討した。SYCP3変異は胎児染色体異常症を起こす原因遺伝子であることは確認できず、FXIIa遺伝子多型についてCT多型は不育症のリスク因子であったが、FXII活性値低下もCT多型も次回流産のリスク因子ではなく第V因子変異は明らかになっていない。また、Protein S Tokushima変異、Protein S 欠乏症についても流産のリスク因子ではないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：As for embryonic factors, the frequency of normal embryonic karyotypes significantly increases with the number of previous abortions and a normal karyotype in a previous pregnancy is a predictor of subsequent miscarriage. Although a currently prevailing hypothesis is that recurrent miscarriage may be a polygenetic disorder associated with both genetic and environmental determinants, it may be possible that the condition develops as a single-gene disorder. We found that the c.657T>C mutation of human SYCP3 gene may not be associated with recurrent miscarriage in Japanese. The FXII gene was found to be one of the significant susceptibility genes for miscarriage. However, the clinical influence of the FXII CT genotype or Protein S deficiency/Tokushima mutation data might be relatively small, because the presence/absence of this genotype did not have any predictive value for the subsequent pregnancy outcome.

研究分野：生殖遺伝学

キーワード：染色体 流産 遺伝子多型 出生前検査 リスク因子 メンタルストレス 高齢妊娠 不育症

1. 研究開始当初の背景

先進国では利便を重視した生活環境、少産少子化が社会に広がり、近年では結婚年齢の上昇、出産年齢の高齢化が次第に進んでおり、生殖補助医療は広く普及して40歳以上で初めて出産する妊婦も珍しくはなくなっている。しかし、卵子の老化、高齢による流産率の上昇や胎児染色体異常症の増加は、近い将来の超高齢化社会や労働人口の減少を考えると、大きな社会問題になっている。ヒト卵子・精子は、加齢により減数分裂時の染色体不分離が明らかに増え、胎児染色体異常症やそれに伴う流産も増加の一途を辿っている。

2. 研究の目的

妊娠初期の自然流産の約70%に胎児染色体数的異常がみられ、ギムザ分染法で染色体数的異常が見つからない症例に比較ゲノムハイブリダイゼーションを行うことでさらに約10%の微細欠失・重複などの染色体構造異常がみられると報告されている。つまり、散発流産の約80%が胎児染色体異常症である。血管新生は、胚発生、創傷治癒、妊娠といった生理的過程における現象であるが、炎症、低酸素、がん、糖尿病に関連した病的状態により誘引される一方で、胚発生のときは血管新生が促進されて胎児発育が促される。本研究は、胎児染色体異常症と母児間免疫応答からみた脱落膜での新生血管調節因子の制御機構の解明を目的とし、妊婦のメンタルストレスと流産や出生前検査などとの関連を含めて検討した。

3. 研究の方法

妊娠初期の自然流産の約70%に胎児染色体数的異常がみられ、今回自然流産の絨毛・脱落膜の染色体分析を行い、正常核型と異常核型を区別して検討を行った。一方、自然流産の絨毛・脱落膜の染色体分析を行い、正常核型と異常核型を区別して検討を行った。第

XII因子、第V因子、プロテインS(PS)について遺伝子多型と流産の関連について検討し、遺伝学および統計学的解析をした。

一方、うつ病の生涯有病率は、国内では女性より高く、約6-15%と推定されている。今回当院において無侵襲的出生前検査(NIPT)を受検した妊婦において、その背景と妊娠初期と産後のメンタルストレスの変化について検討した。

4. 研究成果

妊娠初期の自然流産の約70%に胎児染色体数的異常がみられ、今回自然流産の絨毛・脱落膜の染色体分析を行い、正常核型と異常核型を区別して検討を行った。SYCP3遺伝子は染色体不分離に関与する遺伝子で、遺伝子変異について、原因不明不妊症39名、卵巣性不妊症・早発閉経12名、卵管性不妊症13名と出産歴のある対象82名でシーケンス解析した。原因不明不妊症(難治性)1名でSYCP3 IVS7-16_19 delACTT変異が確認されたが、その被検者ではSYCP3変異は、エクソン7からエクソン9で変異はみられず、胎児染色体異常症を起こす原因遺伝子であることは証明できなかった。

新生血管調節因子として凝固第XII因子が関与するかどうかについて検討した。第XII因子46C/T遺伝子多型のTアレルはFXIIa低下と血栓症の危険因子と考えられ、原因不明反復流産患者279人と分娩経験のある100人を対照としてFXIIaと46C/T遺伝子多型頻度を比較した。患者群においてFXIIa低下とTアレルが次回流産の危険因子であるかを調べるために年齢、流産回数による多変量解析を行った。横断研究でCT多型は反復流産の危険因子であったが、コホート研究ではFXIIa低下もCT多型も次回流産の危険因子ではなかった。しかし、4分位解析において、中間位であるFXIIaが88-113%の群は、次回流産の危険因子であった。

一方、自然流産の絨毛・脱落膜の染色体分析を行い、正常核型と異常核型を区別して検討を行った。原因不明不育症患者 262 人と分娩経験のある 100 人を対照として FXIIa と 46C/T 遺伝子多型頻度を比較した。PCR 産物を CseI で切断し多型の判別を行った。FXII 活性は凝固法を用いた。患者群において FXIIa 低下と T allele が次回流産の危険因子であるかを調べるため、年齢、流産回数による多変量解析を行った。LA 陽性患者は陰性患者より FXII 活性値が有意に低下していた ($60.7 \pm 17.9\%$ vs. $83.4 \pm 29.3\%$; $p=0.005$)。横断研究において、CT 多型は不育症の危険因子であったが、コホート研究では FXII 活性値低下も CT 多型も次回流産の危険因子ではなかった。結論として FXII に関する本研究で FXIIa 低下、遺伝子多型ともに不育症の危険因子ではないことが明らかになった。

深部静脈血栓症と第 V 因子活性低下を認められた日本人患者から同定された第 V 因子 Nara 変異 (FV W1920R) と、中国人患者から発見された第 V 因子 Hong Kong 変異 (FV R306G) について、原因不明反復流産患者群と出産歴があり流産歴のない対照群を研究の対象とした。凝固第 V 因子活性は、第 V 因子欠乏血漿と PT 試薬を用いた凝固一段法で測定しており、現段階までに第 V 因子変異は明らかになっていない。

プロテイン S (PS) 欠乏症は、後期流産・死産の危険因子であることが明らかとなっている。また、PS 徳島は日本人に特有の遺伝子変異であり、静脈血栓症の危険因子であることが示唆されている。今回我々は不育症患者における PS 欠乏症と PS 徳島について検討した。倫理委員会の承認と患者の同意を得て、原因不明不育症患者 355 人と出産歴があり流産歴のない女性 101 人を対照として、PS 欠乏症と PS 徳島の頻度を比較した。さらに PS 抗原、活性、比活性 (活性/抗原) 低下 (PS 欠乏症) と PS 徳島が次回流産の予知因子であ

るかを調べた。ダイレクトシーケンス法を行い PS 徳島の判別を行った。PS 活性は比色法、抗原量はラテックス凝集法を用いた。10 人の患者が抗リン脂質抗体陽性であり検討から除外した。PS 徳島は患者群 9 人 (2.5%)、対照群 1 人 (1.0%) であり有意差は認められなかった。PS 活性は患者群 ($21.08 \pm 4.34 \mu\text{g/ml}$ 当量) と対照群 (21.59 ± 3.97) の間に有意差は認められなかった。また、次回妊娠成功率はヘパリン療法なしで PS 徳島 8 人を含む PS 欠乏症で 100% (8/8) だった。絨毛染色体異常を除外して多変量解析した結果、PS 活性低下群で 89.7% (26/29) と正常群 73.1% (106/145) より有意に良好だった。PS 徳島、PS 欠乏症は不育症の危険因子ではないと考えられた。我が国の多くの施設で PS 測定、PS 欠乏症に対する抗凝固療法が行われており、本研究成果を周知する必要があると考えられる。

うつ病の生涯有病率は、国内では女性は男性より高く、約 6-15% と推定されている。今回当院において無侵襲的出生前検査 (NIPT) を受検した妊婦において、その背景と妊娠初期と産後のメンタルストレスの変化について検討した。2013 年 10 月から 2014 年 10 月までに NIPT を希望され当科を受診された人に対し、本人、夫の年齢、適応、検査時妊娠週数を調べ、妊娠初期及び出産後アンケートのストレススコア (K6) について検討した。遺伝カウンセリングを施行し、NIPT を実施した 1388 人のうち NIPT 実施前の有効なアンケートを得られたのは 1156 名であった。母体平均年齢は 38.1 歳、高齢妊娠のため受検したのは 97.5% で、113 名 (8.1%) は妊娠初期の K6 スコア高値 (10 点以上) でメンタルストレスが高いと考えられた。K6 スコア高値の割合は初産婦と経産婦では有意差は認めなかったが、K6 スコア高値の割合を年齢層別にみると 35 歳未満で 16.5%、35 歳から 39 歳で 7.6%、40 歳以上で 7.6% と 34 歳以下で高い傾

向にあった。産後 1 か月アンケートで K6 スコア値が得られたのは 387 人で、妊娠初期の K6 スコアが高値であった群は全体に出産後 K6 スコアは減少したが、妊娠初期の K6 スコアが低値であった群のうち 3.7%では平均 6 ポイント上昇を認め、産後の K6 スコアが高値となった。妊娠初期の K6 スコア高値群において妊娠中に母体のメンタルストレスを把握することは大切であるが、妊娠初期の K6 スコア低値群の中でも産後 K6 スコアが高値となる群があり、この場合 K6 スコアの上昇率はより高くなるため、このような群では産後のメンタルケアを十分に行うことが必要と考えられた。

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 24 件)

1. Takeda E, Suzumori N, Kumagai K, Oseto K, Ebara T, Yotsumoto J, Numabe H, Sugiura-Ogasawara M. Background of couples undergoing non-invasive prenatal testing (NIPT) in Japan. *J Obstet Gynecol Res* (in press). 査読有
2. Suzumori N, Ebara T, Yamada T, Samura O, Yotsumoto J, Nishiyama M, Miura K, Sawai H, Murotsuki J, Kitagawa M, Kamei Y, Masuzaki H, Hirahara F, Saldivar J-S, Dharajiyi N, Sago H, Sekizawa A and Japan NIPT consortium. Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. *J Hum Genet* (in press). 査読有
3. Obayashi Y, Ozaki Y, Goto S, Obayashi S, Suzumori N, Ohyama F, Tone S, Sugiura-Ogasawara M. Role of Indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in patients with recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 75, 69-77, 2016. 査読有
4. Suzumori N, Kagami M, Kumagai K, Goto S, Matsubara K, Sano S, Sugiura-Ogasawara M. Clinical and molecular findings in a patient with 46,XX/47,XX,+14 mosaicism caused by postzygotic duplication of a paternally derived chromosome 14. *Am J Med Genet A* 167, 2474-2477, 2015. 査読有
5. Hayashi Y, Suzumori N, Sugiura T, Sugiura-Ogasawara M. Prenatal findings of holoprosencephaly. *Cong Anomal* 55, 161-163, 2015. 査読有
6. Sago H, Sekizawa A, Yamada T, Endo T, Murotsuki J, Suzumori N, et al. Nationwide demonstration project of next-generation sequencing of cell-free DNA in maternal plasma in Japan: 1-year experience. *Prenat Diagn* 35, 331-336, 2015. 査読有
7. Suzumori N, Kumagai K, Goto S, Nakamura A, Sugiura-Ogasawara M. Parental decisions following prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities: Implications for genetic counseling practice in Japan. *J Genet Counsel* 24, 117-121, 2015. 査読有
8. Asano E, Ebara T, 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. *PLoS One* 9, e114452. doi: 10.1371/journal.pone.0114452, 2014. 査読有
9. Suzumori N, Ebara T, Kumagai K, Goto S, Yamada Y, Kamijima M, Sugiura-Ogasawara M. Non-specific psychological distress in women undergoing noninvasive prenatal testing because of advanced maternal age. *Prenat Diagn* 34, 1055-1060, 2014. 査読有
10. Goto S, Ozaki Y, Suzumori N, Yasukochi A,

- Kawakubo T, Furuno T, Nakanishi M, Yamamoto K, Sugiura-Ogasawara M. Role of Cathepsin E from decidual macrophages in patients with recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 20, 454-462, 2014. 査読有
11. Oseto K, Suzumori N, Nishikawa R, Nishikawa H, Arakawa A, Ozaki Y, Asai H, Kawai M, Mizuno K, Takahashi S, Shirai T, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Kajiya H, Kikkawa F, Sugiura-Ogasawara M. Mutational analysis of *FOXL2* p.C134W and expression of BMP2 in the Japanese patients with granulosa cell tumor of ovary. *J Obstet Gynecol Res* 40, 1197-1204, 2014. 査読有
12. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N. Management of recurrent miscarriage. *J Obstet Gynecol Res* 40, 1174-1179, 2014. 査読有
13. 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*. 100, 1629-1634, 2013. 査読有
14. Hayashi Y, Sasaki H, Nishiyama T, Mizutani E, Kitaori T, Ozaki Y, Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Genotyping analyses for polymorphisms of *ANXA5* gene in patients with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 100, 1018-1024, 2013. 査読有
15. Suzumori N, Kaname T, Muramatsu Y, Yanagi K, Kumagai K, Mizuno S, Naritomi K, Saitoh S, Sugiura-Ogasawara M. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstet Gynecol Res* 39, 1545-1547, 2013. 査読有
16. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Suzumori N. Müllerian anomalies and recurrent miscarriage. *Curr Opin Obstet Gynecol* 25, 293-298, 2013. 査読有
17. Goto S, Suzumori N, Obayashi S, Ozaki Y, Sugiura-Ogasawara M. Two cases of prenatally diagnosed sacrococcygeal teratoma type I with different clinical features. *Cong Anomal* 53, 92-94, 2013. 査読有
18. 鈴森伸宏 出生前診断と生命倫理～染色体異常を中心として～「羊水・絨毛検査」*周産期医学* 45, 679-682, 2015. 査読無
19. 鈴森伸宏 新たな出生前診断・着床前診断の幕開け NIPT技術の発展 産婦人科の実際 63, 1191-1194, 2014. 査読無
20. 鈴森伸宏、杉浦真弓 不育症の遺伝カウンセリング 産科と婦人科 80, 1439-1444, 2013. 査読無
21. 鈴森伸宏 胎児診断について *Nagoya Medical Journal* 53, 35-38, 2013. 査読無
22. 鈴森伸宏 出生前診断の現状 明日の臨床 72, 27-32, 2013. 査読無
- {学会発表}(計 28件)
<2015年>
1. 鈴森伸宏 出生前診断と遺伝カウンセリング 第7回阪大遺伝セミナー(2月6日、大阪大学医学部、大阪府吹田市)
2. 鈴森伸宏 遺伝カウンセリングの実際 第6回遺伝医学セミナー入門コース(2月7日~8日、ホテル阪急エキスポパーク、大阪府吹田市)
3. 鈴森伸宏 専攻医教育プログラム 出生前診断の遺伝カウンセリング 第135回東海産科婦人科学会(2月21日~22日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
4. 鈴森伸宏、熊谷恭子、後藤志信、橋本恵理子、倉兼さとみ、大瀬戸久美子、杉浦真弓 高齢妊婦におけるメンタルストレスとNIPTの遺伝カウンセリングについて 第67回日本産科婦人科学会学術講演会(4月10日~12日、パシフィコ横浜、

- 神奈川県横浜市)
5. 鈴木伸宏 産科婦人科領域の遺伝カウンセリング 平成 27 年 5 月度岐阜産科婦人科研究会 (5 月 30 日、岐阜都ホテル、岐阜県岐阜市)
 6. 鈴木伸宏 教育セミナー 出生前検査の遺伝カウンセリング 第 51 回日本周産期・新生児医学会学術集会(7 月 10 日-12 日、ヒルトン福岡シーホーク、福岡県福岡市)
 7. 鈴木伸宏、鏡雅代、熊谷恭子、後藤志信、松原圭子、佐野伸一郎、杉浦真弓 14 トリソミーモザイクの一例 第 55 回日本先天異常学会・日本小児遺伝学会合同学術講演会(7 月 25 日~27 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)
 8. 鈴木伸宏 高齢妊娠 遺伝カウンセリングロールプレイ 第 25 回 遺伝医学セミナー(9 月 4 日-6 日、三井ガーデンホテル千葉、千葉県千葉市)
- <2014 年>
9. 鈴木伸宏、熊谷恭子、後藤志信、大瀬戸久美子、片野衣江、荒川敦志、尾崎康彦、杉浦真弓 胎児染色体数的異常症と妊娠帰結に関する検討 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会(4 月 18 日~20 日、東京国際フォーラム、東京都千代田区)
 10. 鈴木伸宏 遺伝カウンセリング SGM 「不育症」第 24 回遺伝医学セミナー(9 月 5 日~7 日、ホテル阪急エキスポパーク、大阪府吹田市)
 11. 鈴木伸宏、熊谷恭子、後藤志信、杉浦真弓、鏡雅代、松原圭子、佐野伸一郎 胎児 14 トリソミーモザイクの 1 例 第 37 回日本母体胎児医学会学術集会(11 月 7 日~8 日、ハウステンボス、長崎県佐世保市)
 12. 鈴木伸宏 シンポジウム 出生前診断の将来 「無侵襲的出生前検査(NIPT)技術の発展」日本人類遺伝学会第 59 回大会

- (11 月 20 日~22 日、タワーホール船堀、東京都江戸川区)
- <2013 年>
13. 鈴木伸宏 「遺伝カウンセリング」第 23 回遺伝医学セミナー(9 月 6 日~8 日、三井ガーデンホテル千葉、千葉県千葉市)

〔図書〕(計 2 件)

1. 鈴木伸宏、杉浦真弓 母体血を用いた新しい出生前遺伝学的検査・羊水検査 産科婦人科研修ノート 改訂第 2 版(診断と治療社) 123 - 125, 2014
2. 鈴木伸宏 出生前診断を考慮する際、留意すべきこと 今日の小児治療指針 第 16 版(医学書院)197-199, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/obgyne.dir/group_sen.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木伸宏 (SUZUMORI NOBUHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70326148

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし