

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791223
 研究課題名（和文）ヒト未熟児網膜症発症における神経軸索誘導分子群の
 遺伝子変異に関する研究
 研究課題名（英文）Genetic mutations and polymorphisms of axon guidance factors
 in the development of human retinopathy of prematurity
 研究代表者
 三輪 明弘（MIWA AKIHIRO）
 神戸大学・医学部附属病院・特定助教
 研究者番号：70457076

研究成果の概要（和文）：

神経軸索誘導分子のうち、エリスロポイエチン（EPO）に着目し、*EPO* 遺伝子プロモーター領域の一塩基多型である rs1617640（C/A）アレル A 頻度の増加と未熟児網膜症（ROP）の発症の関連を検討した。在胎週数 32 週未満の ROP 44 例と非 ROP 62 例の 2 群間でアレル A 頻度、ジェノタイプ頻度ともに有意差は認めなかった。対象となった児の臨床背景を多変量解析したところ、ヒト遺伝子組み換え（hr-）EPO 投与が ROP 発症の独立したリスク因子として抽出された。ROP 発症には内因性に EPO 濃度を上昇させる *EPO* 遺伝子多型ではなく、未熟児貧血の治療薬として外因性に投与された hr-EPO と関連があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Among axon guidance factors, we focused on erythropoietin (EPO), and investigated correlation between the development of retinopathy of prematurity (ROP) and allele A frequency of rs1617640, which was a single nucleotide polymorphism in the promoter area of *EPO* gene. Forty-four neonates with ROP and 62 non-ROP neonates born before 32 weeks of gestations were examined. There were no significant differences in allele A frequency and genotype frequency between the groups. A logistic multiple regression analysis revealed that supplementation of human recombinant EPO was a risk factor for the development of ROP. Exogenous EPO, not endogenous EPO seems to be a risk factor for the development of ROP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：未熟児網膜症、エリスロポイエチン、一塩基多型

1. 研究開始当初の背景

未熟児網膜症 (retinopathy of

pre-maturity : ROP) は早産児特有の疾患で、重症例は失明に至る。

周産期医療の発展により、より未熟な超低出生体重児の救命率が向上し、それに伴いROPの発症数は増加し、より重症化する傾向にある。それゆえ、積極的なROPの発症・重症化の予防及び効果的な治療方法の開発が望まれている。

ROPは発達途中の未熟な網膜血管の異常により発症する。近年、発達期網膜における網膜新生血管の伸長に関与する因子として、新生血管に作用するシグナル分子群が次々と解明されてきている。その主要な分子は血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) である。このVEGFの過剰産生がROPの主要な病因と考えられ、ROPの発症・重症化とVEGFの遺伝子多型について検討する報告が相次いでいる。しかし、その結果は肯定・否定相反するものであり一定の見解は得られていない。一方、動物実験でVEGFとは逆に血管新生の伸長を阻害するような負のシグナルの存在が明らかになってきた。特に神経発生における軸策誘導を制御するシグナル分子群が、未熟な網膜血管の異常に関与することが明らかになってきている。

2. 研究の目的

ROPの発症・重症化に、VEGFのみならず、神経軸策誘導分子群が関与している可能性があり、我々はヒトROPの発症・重症化と神経軸策誘導分子群の遺伝子変異・多型についての関連を明らかにすることを目的に研究を行った。神経軸策誘導分子群の中でエリスロポイエチン (EPO) に着目した。EPO遺伝子プロモーター領域の一塩基多型である rs1617640 (C/A) アレル A 頻度の増加が、成人糖尿病性網膜症において水晶体内 EPO 濃度を上昇させ、発症のリスク因子であることが同定されており、このEPO遺伝子多型とROPの発症との関連を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 対象

神戸大学医学部附属病院周産母子センターで出生した正常新生児69名及び32週以前に出生となった早産児106名を対象とした。出生後に臍帯、臍帯血、児血、口腔

粘膜より検体を採取し、市販のDNA抽出キットを使用しゲノムDNAを抽出した。事前に施設倫理委員会の承認を得て、家族に対して研究の主旨を十分に説明し、同意を得られた児を対象とした。

(2) 遺伝子解析および方法

日本人正常新生児69名、ROPを発症しなかった在胎32週未満の早産児 (非ROP群) 62名、ROPを発症した早産児 (ROP群) 44名について、rs1617640の遺伝子配列解析をPCR法・restriction fragment length polymorphism法・ダイレクトシーケンス法を用いて行った。2群間のアレルA頻度、ジェノタイプ頻度を比較した。ROPは光凝固療法を要した症例と定義した。

(3) 臨床データ解析

対象となった早産児の臨床背景を、母体要因、児の出生時要因および出生後要因に分け、評価を行った。母体要因として、母体年齢、多胎の有無、母体の喫煙の有無、妊娠高血圧症の有無、切迫早産の有無、前期破水の有無、不妊治療の有無について、出生時要因として性別、在胎週数、出生体重、子宮内胎児発育不全の有無、アプガースコア1分値・5分値について、出生後要因として新生児呼吸窮迫症候群の有無、人工呼吸管理期間、酸素投与期間、慢性肺疾患の有無、ステロイド投与の有無、輸血の有無、エリスロポエチン投与の有無、脳室内出血の有無を臨床記録より後方視的に抽出し、単変量・多変量解析を行った。

(4) 統計学的解析

統計学的検討は、2群の連続変数の比較にはMann-Whitney U-testを、2群の名義変数の比較にはFisherの直接確率計算法を用いて行い、多変量解析には、Excel Statistics (Statcel 3; Social Survey Research Information Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用いてロジスティック回帰分析にて施行した。p値<0.05を有意差ありとした。

4. 研究成果

ROP群の中央値は、在胎27週、出生体重838g、非ROP群の中央値は、在胎29週、出生体重1,158g

であった。
日本人正常新生児のアレル頻度はアレル C:19.4%、アレル A:80.6%であり既存の報告と差はなかった(図1)。

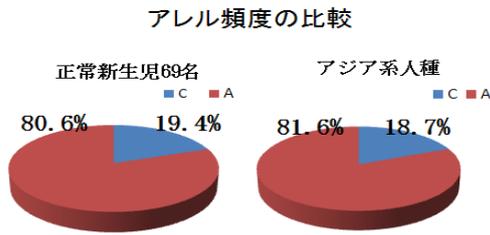


図1 日本人正常新生児の EPO 遺伝子 rs1617640 (C/A) アレル頻度

ROP 群と非 ROP 群の 2 群間でアレル A 頻度およびジェノタイプ頻度に有意な差はなかった(表1、2)。

表1 アレル頻度

アレル	ROP, n=88	non ROP, n=124	P value
C / A	19 / 69	23 / 101	0.58

表2 ジェノタイプ頻度

アレル	ROP, n=44	non ROP, n=62	P value
CC/CA/AA	4 / 11 / 29	2 / 19 / 41	>0.05

ROP 群と非 ROP 群の臨床背景では、単変量解析にて、妊娠高血圧症候群、在胎週、出生体重、アプガースコア、呼吸窮迫症候群(RDS)、赤血球輸血、ヒト遺伝子組み換え(hr-)EPO投与、酸素投与日数、慢性肺疾患(CLD)がROP群で有意に多い結果であった(表3)。

表3 臨床背景の比較

	ROP, n=44	非ROP, n=62	P value
出生体重(g)	831(498-1498)	1111(430-1810)	<0.01
SD(出生体重)	-0.6(-3.8-2.6)	-1.0(-3.7-0.9)	0.36
在胎週数	27(23-31)	29(24-31)	<0.01
Apgar スコア 1分値	4(1-9)	7(0-9)	<0.01
Apgar スコア 5分値	7(1-10)	9(3-10)	<0.01
男児	21/44(47.7%)	35/62(56.5%)	0.38
多胎	11/44(25%)	17/62(27.4%)	0.78
切迫早産	27/44(61.4%)	21/62(33.9%)	0.06
前置検本	12/44(27.3%)	10/62(16.1%)	0.07
妊娠高血圧症候群	5/44(11.4%)	19/62(30.6%)	<0.01
母体年齢	32(21-40)	33(19-43)	0.15
母体喫煙	5/43(11.6%)	13/61(21.3%)	0.18
生後補助医療	9/44(20.5%)	20/61(32.8%)	0.16
出生前ステロイド	19/44(43.2%)	31/62(50.0%)	0.48
RDS	42/44(95.5%)	51/62(82.3%)	0.04
IVH	7/44(15.9%)	4/62(6.5%)	0.19
PDA	18/44(40.9%)	12/62(19.4%)	0.02
赤血球輸血	25/44(56.8%)	10/62(16.1%)	<0.01
hr-EPO	42/44(95.5%)	47/62(75.8%)	<0.01
酸素投与(日数)	74(25-186)	46(7-132)	<0.01
CLD	36/44(81.8%)	31/62(50.0%)	<0.01

RDS:呼吸窮迫症候群、IVH:脳室内出血、PDA:動脈管開存症、hr-EPO:ヒト遺伝子組み換えエリスロポイエチン、CLD:慢性肺疾患

多変量解析を行ったところ hr-EPO 投与が ROP 発症の独立したリスク因子の一つとして抽出された(表4)。

表4 ロジスティック回帰分析

	P value
Apgar スコア 1 分値	0.04
切迫早産	< 0.01
IVH	0.01
赤血球輸血	< 0.01
hr-EPO	< 0.01

得られた成果の国内外での位置づけとインパクト

今回の研究で、内因性に EPO 濃度を上昇させる EPO 遺伝子多型(rs1617640)と ROP 発症は関連がないことを世界で初めて証明した。また、ROP の発症に未熟児貧血の治療薬として外因性に投与される hr-EPO を含む種々の因子と関連があることが示された。今回の検討から、ROP の発症には、EPO 遺伝子の遺伝的な関与よりもヒト組み換え型の外因 EPO の方が ROP の発症に関与している可能性がある。それゆえ、どのような EPO 遺伝子の背景をもつ患者さんでも、実際の臨床現場においてヒト組み換え型 EPO や赤血球輸血を使用する際は、ROP を評価するための眼底検査を定期的にモニタリングしながら使用することが肝要である。

今後の展望

ROP の発症において、内因性の EPO と外因性の hr-EPO で異なることから、今後、まずこの両者の分子構造や体内分布の差異を評価する必要がある。分子構造、組織親和性や水晶体内濃度などの解析により、EPO と ROP 発症の関連が解明される可能性がある。

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)

[学会発表](計1件)

松尾希世美、長坂美和子、香田 翼、

横田知之、森川 悟、三輪明弘、
柴田暁男、森岡一朗、飯島一誠、
未熟児網膜症の発症におけるエリ
スロポエチン遺伝子多型の関与に
関する検討、第57回日本未熟児新
生児学会、2012年11月25日～2012
年11月27日、熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 明弘 (MIWA AKIHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・特定
助教

研究者番号：70457076