

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26462507
研究課題名(和文) 不育症と妊娠高血圧症候群の遺伝的背景に関する研究

研究課題名(英文) Adverse pregnancy outcome

研究代表者
根木 玲子 (NEKI, REIKO)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・室長

研究者番号：90600594
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：不育症患者を対象に、日本人での静脈血栓塞栓症のリスク因子であるプロテインS K196E変異、及びプロテインS、プロテインC、アンチトロンビンの稀な変異を解析した。プロテインS K196E変異は不育症の遺伝的リスクとはならず、またその他の稀な変異も不育症の主な原因とはなりにくいと考えた。妊娠高血圧症候群と補体系因子の遺伝的背景を明らかにするため、補体関連6遺伝子を中心に候補115遺伝子の解析を施行。登録した6症例中、解析結果の出た4症例については、疾患に関連する遺伝子バリエーションは認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to reveal the frequency of the low-frequency thrombophilic protein S K196E mutation, as well as the frequency of very rare nonsynonymous mutations in protein S, protein C, and antithrombin genes, in patients with adverse pregnancy outcomes. Although the low-frequency protein S K196E mutation can increase the risk for venous thromboembolism, it did not increase the risk for adverse pregnancy outcomes even in Japanese. To reveal the possible genetic link between preeclampsia and complement system, genetic analysis was conducted including 6 major complement genes. Six patients were enrolled and 4 patients were so far analyzed. There were no genetic variations associated with preeclampsia.

研究分野：周産期医学

キーワード：不育症 先天性血栓性素因 妊娠合併症 妊娠高血圧症候群 妊娠高血圧腎症 補体因子 遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

凝固制御因子であるプロテイン S (protein S, PS)、プロテイン C (protein C, PC)、アンチトロンビン (antithrombin, AT)、の先天性の各欠乏症 (先天性血栓性素因) は、静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism, VTE) の素因であることが広く知られている。これら先天性血栓性素因と妊娠合併症との関係は、欧米では、先天性血栓性素因である凝固第 V 因子 Leiden 変異、プロトロンビン G20210A 変異、PS 欠乏症、PC 欠乏症、AT 欠乏症が不育症のリスク因子として報告された (Kujovich, Am J Obstet Gynecol, 2004, Bennett et al, Br J Haematol, 2012) が、その後の研究では追認できていない。また、国内での報告はない。このうち、凝固第 V 因子 Leiden 変異とプロトロンビン G20210A 変異は、白人にのみ認められ日本人には認められない。

研究分担者である宮田らは、日本人では PS K196E 変異が静脈血栓塞栓症のリスクとなることを報告した (Kimura et al, Blood, 2006)。本変異は日本人約 55 人に 1 人にみられ、血漿 PS 活性は約 17% 低下する (Kimura et al, JTH, 2007)。このように、日本人と白人では、血栓性素因に違いがある。また妊婦では、分娩時の出血に備えて、凝固制御因子である PS は低下し過凝固状態になる。従って PS 欠乏症は妊娠時の血栓症のリスクを上げ、習慣流産や子宮内胎児死亡、胎児発育不全などの不育症に関係することが考えられるが、不育症と PS K196E 変異の関連は明らかでなかった。

研究代表者らは、これまでに、大阪府立母子保健総合医療センターと共同で、妊娠合併症における血栓性素因の遺伝子研究を行ってきた。妊娠合併症患者 350 人を登録し、血栓性素因として PS、PC、AT の各遺伝子の全エクソンを、登録患者全員を対象に遺伝子シーケンシングを行った。2011 年、本研究の一部として、静脈血栓症の患者 18 名の解析結果を発表した (Neki et al, Int J Hematol, 2011)。18 名の妊娠時の静脈血栓症患者のうち、4 名に PS 遺伝子変異、1 名に PC 遺伝子変異を認めた。すなわち、28% の患者に遺伝子変異を同定した。このうち、2 名は

PS K196E 変異を保有していた。変異を保有する 5 名はいずれも妊娠初期および中期に静脈血栓症を発症しており、妊娠後期および産褥期の発症は認めなかった。この結果は、これまで欧米で報告されていた産褥期の静脈血栓症との関連に疑問を投げかける結果となった。この研究で登録した患者には、流産 (流産回数が 2 回の反復流産、および 3 回以上連続する習慣流産を含む。なお、以下に記載する流産はこの定義を用いることとする) 子宮内胎児死亡、胎児発育不全の症例が含まれているが、結果をまとめるまでに至っていなかった。

一方、妊娠合併症の一つである、妊娠高血圧症候群 (Pregnancy induced hypertension, PIH) は全妊婦の 7-10% に認め、母体血管のリモデリング障害が胎盤の低酸素をもたらし、その結果、産生されるケモカイン、soluble VEGF receptor 1 (sFlt1) などの様々な物質が母体循環に流入し、血管内皮障害を起こすことが本態とされている。臨床的には母体全身の血管内皮障害により高血圧を示し、蛋白尿を伴うものもある。さらに、近年、妊娠高血圧症候群の一分類である妊娠高血圧腎症には、免疫系の障害、特に補体系の破綻が関与することが示唆されている。2011 年に妊娠高血圧腎症患者の遺伝的背景を調べた研究によれば (Salmon et al, PLoS Med, 2011) 全身性エリテマトーデスおよび抗リン脂質抗体症候群を合併する妊婦 250 名のうち 40 名が妊娠高血圧腎症を示した。この 40 名を対象に補体制御因子である Membrane cofactor protein (MCP)、補体 I 因子 (CFI)、補体 H 因子 (CFH) の遺伝子の塩基配列解析を行い、7 名 (18%) にミスセンス変異を同定した。また、全身性エリテマトーデスおよび抗リン脂質抗体症候群を合併しない妊娠高血圧腎症 59 名を対象に塩基配列解析を行い、5 名 (8.5%) にミスセンス変異を同定した。このことは、妊娠高血圧腎症の一部は、補体因子の遺伝子異常が素因になる可能性を示している。しかし、国内での妊娠高血圧腎症の補体因子の遺伝子変異の研究は未だ行われておらず、我々の研究が初めてとなる。

最近の研究から、補体系遺伝子の変異により、補体が自己を攻撃し、加齢黄斑変性症や非典型溶血性尿毒症症候群(atypical HUS, aHUS)、膜性増殖性糸球体腎炎といった疾患を引き起こすことが明らかとなってきた。こういった研究の進展から、妊娠高血圧腎症の一部は、補体因子の遺伝子異常が素因になる可能性が考えられる。また、妊娠高血圧腎症を含む妊娠高血圧症候群の発症にも補体系遺伝子変異が関わる可能性がある。

私達の施設では、妊娠高血圧症候群の患者を多数診察している。先に示した様に、妊娠高血圧腎症患者の一部には、MCP、CFI、CF の遺伝子変異を認める。研究分担者である宮田は静脈血栓症の研究に加え、aHUS の遺伝子研究を行っている。aHUS の発症は、補体調節因子である CFH、MCP、CFI、THBD 遺伝子の機能喪失型変異、もしくは補体因子である C3 と CFB 遺伝子の機能獲得型変異が原因となる。遺伝子変異により、自己細胞が補体により攻撃を受け、腎の血管内皮細胞の傷害に繋がる。これまでに、宮田らは 10 家系の aHUS 患者の家系を対象に上記 6 遺伝子のシーケンスを行い、8 家系に責任変異と考えられる遺伝子変異を同定してきた。ごく最近、欧米では aHUS の治療に抗補体薬(エクリツマブ)が承認され、本邦でも承認に向けて本薬剤の治療方針の策定が、当時急がれており、遺伝子解析の結果は治療方針に大きな指針となっていた。宮田らが解析している遺伝子と妊娠高血圧腎症群は重複しているため、国立循環器病研究センターでは、妊娠高血圧腎症の遺伝子解析に必要な遺伝子解析の実績を持っていた。

これまで、妊娠高血圧症候群の治療方法は、妊娠の終了しかなかった。しかし、妊娠高血圧症候群の遺伝的背景として補体関連遺伝子の異常が明らかになれば、抗補体薬による治療・予防が可能となり、新たな治療方法を確立できる可能性が期待できる。

2. 研究の目的

「不育症患者を対象とした血栓性素因の研究」として、私達は不育症患者を対象に、日本人での VTE のリスク因子である PS K196E 変異、及びその他の

PS、PC、AT のまれな変異を解析し、それらが不育症のリスクになるかどうかを検討することを目的とした。

「妊娠高血圧症候群の補体系因子の研究」として、妊娠高血圧腎症を含む妊娠高血圧症候群と補体系因子との関連性に着目し、補体関連因子 6 遺伝子を含む、補体因子と凝固因子の 115 遺伝子の解析を行い、その関連性につき検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 不育症患者を対象とした血栓性素因の研究

流産、子宮内胎児死亡、胎児発育不全の不育症患者 330 人を対象に、日本人での VTE のリスク因子である PS K196E 変異、及びその他の PS、PC、AT のまれな変異を解析し、それらが不育症のリスクになるかどうかを検討した。不育症患者を 2 群に分類し、妊娠 22 週未満の 2 回以上連続する流産歴のある女性 233 人(A 群)、妊娠 22 週以降の、胎児発育不全および/または子宮内胎児死亡の既往のある女性 114 人(B 群)とした。17 人が両群に重複した。ただし、多胎妊娠、両親の染色体異常、抗リン脂質抗体症候群、糖尿病、甲状腺機能異常症、感染症、子宮の形態異常は除外した。PS、PC、AT の各遺伝子の蛋白質コード領域をシーケンスし変異を同定した。

血栓性素因の定義は、PS、PC、AT のいずれかの遺伝子に nonsynonymous 変異(ナンセンス変異、ミスセンス変異、フレームシフト変異、スプライス部位変異などのタンパク質に機能を喪失させる可能性のある変異)を認めたものとした。

日本人には PS K196E 変異が多い。PS K196E 変異の頻度を、不育症患者である、「妊娠 22 週未満の 2 回以上連続する流産歴のある女性 233 人(A 群)」および、「妊娠 22 週以降の胎児発育不全および/または子宮内胎児死亡の既往のある女性 114 人(B 群)」で求め、日本人一般集団で求められている頻度(約 55 名に 1 名)と比較検討した。遺伝子解析と患者臨床情報収集は終了しており、変異保有者・非保有者の間での関連を 1 年目に検討することとした。

研究 1 年次で、流産、子宮内胎児死亡、胎児発育

不全などの不育症と血栓性素因の研究の成果がまとまるので、次年度以降は、その成果を積極的に国内外に情報を発信することとした。

(2) 妊娠高血圧症候群の補体系因子の研究

施設内の倫理委員会で妊娠高血圧症候群の遺伝子解析に関する研究計画の承認を受けた。遺伝子解析は、補体関連因子 6 遺伝子を含む、補体因子と凝固因子の 115 遺伝子を次世代シーケンサーで日本補体学会が解析を行い、確認のためのサンガー法による解析を国立循環器病研究センターで行うこととした。

4. 研究成果

(1) 不育症患者を対象とした血栓性素因の研究

私達は 330 人の不育症患者を対象に、日本人での VTE のリスク因子である PS K196E 変異、及び PS、PC、AT のまれな変異を解析し、それらが不育症のリスクになるかどうかを検討した。不育症患者を 2 群に分類し、妊娠 22 週未満の 2 回以上連続する流産歴のある女性 233 人 (A 群)、妊娠 22 週以降の、胎児発育不全および/または子宮内胎児死亡の既往のある女性 114 人 (B 群) とした。17 人が両群に重複した。

PS、PC、AT の各遺伝子の蛋白質コード領域をシーケンシングし変異を同定した。その結果、PS、PC、AT のアミノ酸置換を伴う変異を A 群に 6 人、4 人、3 人、B 群に 3 人、1 人、0 人をそれぞれ認めた。プロテイン S K196E 変異は、A 群 4/233 人 (0.017)、B 群 2/114 人 (0.018) に認めた。これは、一般住民における変異の割合 77/4319 人 (0.018) と比べ、有意差は認めなかった (p 値: A 群 0.94、B 群 0.98)。まれな PS、PC、AT の変異は不育症のわずか 3.3% (330 人中 11 人) に認めただけであった。

これらの結果から、PS K196E 変異は不育症の遺伝的リスクにはならないと考えた。また、まれな変異は健常群での頻度がないため確定できないが、不育症の 3.3% にしか認めないので、不育症の主な原因とはなりにくいと考えた。

先天性血栓性素因と妊娠合併症との関連は海外では報告されたものの、その後、否定的な意見もあっ

た。2014 年のメタアナリシスでは、欧米人の先天性血栓性素因である凝固第 V 因子 Leiden 変異とプロトロンピン G20210A 変異は、当初の報告に見られるほど妊娠合併症との関連は強くないと考えられるようになった。2014 年に私たちは、日本人に特有の先天性血栓性素因である PS K196E 変異は不育症の遺伝的リスクにはならない事を報告した (Neki et al, Thromb Res, 2014)。これらの結果を原著論文 (Neki et al, Thromb Res, 2014) と 2 つの学会誌 (日本産婦人科・新生児血液学会誌 2015 年、日本血栓止血学会誌 2016 年) に総説として発表し、広く情報を発信した。

(2) 妊娠高血圧症候群の補体系因子の研究

「妊娠高血圧症候群の補体系因子の研究」として、妊娠高血圧腎症を含む妊娠高血圧症候群の遺伝的背景を明らかにするため、補体系と凝固系因子の 115 遺伝子の解析を行い、日本補体学会の協力の元に補体遺伝子変異と妊娠高血圧症候群の関連性の解析を行った。登録した 6 症例のうち、解析結果の出た 4 症例については、疾患に関連すると考えられる遺伝子バリエーションを認めなかった。115 遺伝子の中に、アレル頻度の非常に低いバリエーションが見つかり、今後さらに症例を集積し検討が必要であると考えた。

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 8 件)

1. Neki R, Miyata T, Fujita T, Kokame K, Fujita D, Isaka S, Ikeda T, Yoshimatsu J. Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. Thromb Res. 2014;133(5):914-8.
2. Konishi H, Miyoshi T, Neki R, Fukuda T, Ishibashi-Ueda H, Ogo T, Nakanishi N, Yoshimatsu J. Intrapartum temporary inferior vena cava filters are rarely indicated

in pregnant women with deep venous thromboses. J Vasc Surg Venous Lymphat Disord. 2015;3(4):370-5.

3. Mitsuguro M, Okamoto A, Shironouchi Y, Sano M, Miyata S, Neki R, Araki T, Hamamoto T, Yoshimatsu J, Miyata T. Effects of factor VIII levels on the APTT and anti-Xa activity under a therapeutic dose of heparin. Int J Hematol. 2015;101(2):119-25.
4. Miyata T, Maruyama K, Banno F, Neki R. Thrombophilia in East Asian countries: are there any genetic differences in these countries? Thromb J. 2016;14(Suppl 1):25.
5. 根木玲子, 宮田敏行「先天性プロテイン C 欠乏症、先天性アンチトロンピン欠乏症と妊娠」日本産婦人科・新生児血液学会誌. 2015;25(1):55-62.
6. 古賀将史, 辻明宏, 上田仁, 福井重文, 大郷剛, 大門篤史, 佐藤浩, 釣谷充弘, 岩永直子, 根木玲子, 吉松淳, 中西宜文「治療に難渋した妊娠合併静脈血栓塞栓症の 2 症例」心臓. 2016;48(7):878-82.
7. 根木玲子, 宮田敏行「不育症と先天性血栓性素因」日本血栓止血学会誌. 2016;27(3):339-48.
8. 三好剛一, 根木玲子「深部静脈血栓症合併妊娠における分娩時の一時的な大静脈フィルターの再評価」第 24 回真木賞受賞論文 日本産婦人科・新生児血液学会誌, 2017;26(2): 1-7.

(学会発表)(計 16 件)

1. 小西博巳, 根木玲子, 三好剛一, 澤田雅美, 丸岡寛, 田中佳世, 井出哲弥, 田中博明, 神谷千津子, 岩永直子, 山中薫, 吉松淳「深部静脈血栓症合併妊娠における分娩時の下大静脈フィルターの有用性について」第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 2014 年 4 月 18-20 日 東京
2. 三好剛一, 根木玲子, 小西博巳, 澤田雅美, 丸岡寛, 田中佳世, 井出哲弥, 田中博明, 吉田昌史, 神谷千津子, 岩永直子, 吉松淳, 福田哲也,

植田初江「深部静脈血栓症合併妊娠における分娩時の下大静脈フィルターは有用か?」第 36 回日本血栓止血学会学術集会 2014 年 5 月 29-31 日 大阪

3. 根木玲子, 光黒真菜, 小西博巳, 澤田雅美, 丸岡寛, 田中佳世, 井出哲弥, 三好剛一, 神谷千津子, 田中博明, 吉田昌史, 岩永直子, 山中薫, 岡本章, 城之内芳枝, 宮田茂樹, 佐野道孝, 宮田敏行, 吉松淳「妊娠中の長期ヘパリン投与による抗凝固療法のモニタリングについての検討」第 36 回日本血栓止血学会学術集会 2014 年 5 月 29-31 日 大阪
4. 光黒真菜, 根木玲子, 岡本章, 城之内芳枝, 宮田茂樹, 佐野道孝, 吉松淳, 宮田敏行「被験血漿中の VIII 因子活性が未分画ヘパリンのモニタリング法である APTT と抗 Xa 活性に及ぼす影響」第 36 回日本血栓止血学会学術集会 2014 年 5 月 29-31 日 大阪
5. 根木玲子「先天性プロテイン C 欠乏症、先天性アンチトロンピン欠乏症」第 24 回日本産婦人科・新生児血液学会 ワークショップ 2014 年 6 月 13-14 日 横浜
6. 三好剛一, 根木玲子, 小西博巳, 吉田昌史, 釣谷充弘, 神谷千津子, 田中博明, 岩永直子, 吉松淳「深部静脈血栓症合併妊娠における分娩時の一時下大静脈フィルターの再評価」第 24 回日本産婦人科・新生児血液学会 2014 年 6 月 13-14 日 横浜
7. 小西博巳, 三好剛一, 根木玲子, 澤田雅美, 丸岡寛, 田中佳世, 井出哲弥, 田中博明, 吉田昌史, 釣谷充弘, 岩永直子, 吉松淳「深部静脈血栓症合併妊娠における分娩時の一時下大静脈フィルターの再評価」第 50 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2014 年 7 月 13-15 日 千葉
8. 釣谷充弘, 根木玲子, 光黒真菜, 澤田雅美, 永易洋子, 天雲千晶, 田中佳世, 三好剛一, 神谷千津子, 田中博明, 吉田昌史, 岩永直子, 岡本

- 章、城ノ内芳枝、宮田茂樹、佐野道孝、宮田敏行、吉松淳 「妊娠中の未分画ヘパリン投与による抗凝固療法モニタリングについての検討」 第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2014年8月8-9日 大阪
9. 岩永直子、神谷千津子、大門篤史、澤田雅美、上田優輔、堀内縁、三好剛一、釣谷充弘、根木玲子、吉松淳 「妊娠高血圧症候群と心臓」 第26回腎と妊娠研究会 ワークショップ 2016年3月5日 大阪
10. 岩永直子、大門篤史、澤田雅美、井出哲弥、佐藤浩、堀内縁、三好剛一、神谷千津子、舟田里奈、釣谷充弘、根木玲子、吉松淳 「心疾患合併妊婦の妊娠高血圧症候群発症に関する検討」 第68回日本産科婦人科学会学術講演会 2016年4月21-24日 東京
11. 三好剛一、根木玲子、宮田敏行、城之内芳枝、光黒真菜、岡本章、吉松淳、奥久人、出田和久 「日本人女性における低用量ピルと凝固制御因子に関する検討」 第38回日本血栓止血学会学術集会 2016年6月16-18日 奈良
12. 舟田里奈、大門篤史、澤田雅美、上田優輔、堀内縁、三好剛一、釣谷充弘、岩永直子、根木玲子、吉松淳 「分娩前と産褥期でのHELLP症候群の発症経過について(当院で経験した15症例の検討)」 第52回日本周産期・新生児医学会学術集会 2016年7月16-18日 富山
13. 大門篤史、佐藤浩、澤田雅美、上田優輔、堀内縁、三好剛一、釣谷充弘、岩永直子、根木玲子、吉松淳 「未分画ヘパリン皮下注射による治療的抗凝固療法中に肺血栓塞栓症を発症した一例」 第52回日本周産期・新生児医学会学術集会 2016年7月16-18日 富山
14. 横内妙、太田沙緒里、上田優輔、中西篤史、中島文香、月永理恵、成富祥子、澤田雅美、塩野入規、井出哲弥、堀内縁、三好剛一、陌間亮一、神谷千津子、岩永直子、長澤真由美、根木玲子、吉松淳 「子宮型羊水塞栓症の一例」 第34回周産期医療研究会 2016年10月29日 奈良
15. 根木玲子、宮田敏行 「妊娠中の治療域ヘパリンによる抗凝固療法モニタリングに関する検討」 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「血液凝固異常症に関する調査研究」班班会議 2016年8月26日 東京
16. 根木玲子、宮田敏行 「産科領域における遺伝性血栓性素因の診療」 第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 血栓性素因部会 2017年1月21日 東京
- (図書)(計2件)
1. 根木玲子 「妊娠・分娩時における血栓の予防と治療」 止血・血栓ハンドブック. 鈴木重統, 後藤信哉, 松野一彦編. 西村書店. 2015:363-370.
2. 根木玲子 「心疾患合併妊娠管理で注意する点を教えてください」 産科診療 Q&A 一つ上を行く診療の実践. 板倉敦夫編, 中外医学社. 2015:207-211.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
根木玲子 (NEKI REIKO)
国立循環器病研究センター 周産期遺伝相談室長
研究者番号: 90600594
- (2)研究分担者
宮田敏行 (TOSHIYUKI MIYATA)
国立循環器病研究センター 脳血管内科シニア研究員
研究者番号: 90183970
- (3)研究分担者
吉松 淳 (YOSHIMATSU JUN)
国立循環器病研究センター 周産期・婦人科部長
研究者番号: 20221674