

学 位 論 文 題 名

妊娠高血圧症の遺伝的要因に関する症例対照研究

—日本人女性におけるアンジオテンシノーゲン遺伝子多型の関連—

学位論文内容の要旨

緒 言

妊娠高血圧症（pregnancy induced hypertension : PIH）の素因遺伝子はこれまで解明されていなかったが、1993 年、アンジオテンシノーゲン（AGT）遺伝子多型が、本症の発症に関与していることが、Caucasian および日本人女性において報告された。すなわち AGT の 235 番目のアミノ酸はメチオニン（M235）またはスレオニン（T235）であるが、Caucasian（ $n = 149$ ）では T235 のホモ接合（TT）の頻度が、PIH の中でも初産で浮腫や蛋白尿をともなった群（preeclamptic primipara : PE-PP）で 37 % と最も高く、対照群および他の PIH の約 20 % に比べ有意（ $p < 0.001$ ）に高率であった。日本人（ $n = 41$ ）では、PIH 全体で 80 % と、対照の 45 % に比べて有意（ $p < 0.01$ ）に高いと報告された。しかし、症例数が少なかったため、PE-PP についての検討は行われていない。

本研究では、Caucasian で認められた PE-PP 群における AGT 遺伝子の関連が、日本人でも認められるかどうかを確かめるために、症例数を増やして症例対照研究を行った。新たに開発した、遺伝子増幅法（polymerase chain reaction : PCR）による遺伝子タイピングを用い、日本人女性の PIH および PE-PP、さらにその重症度と AGT 遺伝子多型との関連を究明することを目的とした。

方 法

1. 対象と病型分類

北海道大学医学部附属病院産科婦人科およびその関連病院（24 施設）において 1993 年 1 月から 1994 年 9 月までの期間に妊娠・分娩管理を受けた、他の既往歴、合併症のない単胎妊娠の PIH 症例 139 例（PE-PP 68 例を含む）を疾患群とした。少なくとも妊娠 20 週未満から分娩後 1 ヶ月までの間に、一度も高血圧、浮腫、蛋白尿を認めなかった正常女性のうちから、PIH 1 例に対し対照として 2 例を抽出し、初産経産別に分娩時の年齢を ± 3 歳の

範囲でマッチさせた。すなわち 278 例を対照群とした。

診断と分類は、アメリカ合同委員会の基準に従った。PIH は妊娠 20 週未満および分娩後 1 ヶ月以降の高血圧の有無と、浮腫、蛋白尿の有無で Transient hypertension (TH), Preeclampsia - eclampsia (PE - E), Chronic hypertension (CHT), PE superimposed on CHT (CHT + PE) の 4 群に分類されるが、Caucasian における報告と同様に PE - E と CHT + PE, すなわち CHT の有無にかかわらず浮腫、蛋白尿のあった初産のものをあわせて preeclamptic primipara (PE - PP) と規定した。

2. アンジオテンシノーゲン遺伝子のタイピング

全血の約 100 - 200 μ l 中の白血球より抽出した DNA を鋳型とし、M235, T235 に特異的なプライマーを使用した遺伝子増幅法 (PCR) によるタイピングを行った。すなわち、M235 または T235 はエクソン 2 に含まれるので、エクソン 2 の一部に相補的な 20 塩基の sense primer 1 (5'-GAT GCG CAC AAG GTC CTG TC-3') とイントロン 2 の一部に相補的な 20 塩基の antisense primer 2 (5'-GCC AGC AGA GAG GTT TGC CT-3') を作成し、30 サイクルの PCR を行い、増幅された産物を 354 bp のバンドの検出で確認した後、エクソン 2 の M235 を含む部分に相補的な 14 塩基の antisense primer 3 (5'-CAC ACT GGC TCC CA-3') , T235 を含む部分に相補的な 14 塩基の antisense primer 4 (5'-CAC ACT GGC TCC CG-3') を作成し、先の PCR 産物を鋳型として、primer 1 と primer 3 または primer 4 を用いて、15 サイクルの PCR を行った。

この 2 回目の PCR により増幅された 291 bp の産物の有無を確認することにより AGT 遺伝子のタイピングを行った。すなわち、M235, T235 のどちらか一方が増幅・検出されたときはそれぞれ M235, T235 のホモ接合 (MM, TT), 両方が同時に増幅・検出されたときはヘテロ接合 (MT) と判定した。

PCR の増幅不良などによるミスタイピングを避けるため、ハイブリダイゼーションまたは制限酵素 Tth 111 I の切断による方法を併用して結果の確認を行った。

3. 有意差検定

TT 群と MM, MT を合計した群の 2 区に分けて、chi - square test により行った。

結 果

1. 日本人 PIH と AGT 遺伝子多型との関連

TT の頻度は PIH (n = 139) で 80 % と、対照 (n = 278) の 56 % に比べて有意 ($p < 0.001$) に高かった。

2. 日本人 PIH における PE - PP と AGT 遺伝子多型との関連

PIH 139 例を PE - PP 68 例とその他の PIH 71 例に分けて検討すると、TT の頻度は、PE - PP 87 %, その他の PIH 73 %, 対照 56 % であった。PE - PP では、その他の PIH, 対照に比べて TT の頻度がそれぞれ有意 ($p < 0.05$, $p < 0.001$) に高かった。また、その他

の PIH と対照との間にも有意差 ($p < 0.01$) を認めた。

3. PE - PP の重症度と AGT 遺伝子多型との関連

PE - PP とその他の PIH をそれぞれ重症、軽症に型分類して検討した。TT の頻度は、PE - PP においては重症 92 % ($n = 49$)、軽症 74 % ($n = 19$)、その他の PIH では重症 71 % ($n = 49$)、軽症 77 % ($n = 22$) と、有意な関連は認められなかった。

考 察

日本人と Caucasian は、一般集団の TT の頻度を含めた遺伝的背景のみならず、食事、就業状況、妊娠年齢などの生活習慣および産科臨床における妊娠・分娩の管理方針も異なると考えられ、PIH の発症およびその病態が兩人種において異なっている可能性もある。しかし、異なった人種で PE - PP における TT の頻度が他の PIH に比べて高かったことは、同群の病態が PIH の中でも特に AGT の関与を強く受けていることを示唆している。

今のところ、AGT 遺伝子がどのような機構で PIH 発症に関与しているかは解明されていない。しかし、素因遺伝子を用いたアプローチは、遺伝的背景を正確に評価できる利点があり、病因、病態の解明ならびに予防・管理に有用な手段と思われる。PIH の素因遺伝子は AGT 以外にも存在すると考えられるが、今後はこれらの素因遺伝子を同定し、さらに環境因子との交絡を検討することが課題と考えられる。

結 語

妊娠高血圧症 (PIH) の症例対照研究を行い、日本人女性におけるその発症とアンジオテンシノーゲン (AGT) 遺伝子多型との関連を検討し、以下の結論を得た。

1. T235 をホモで持つもの (TT) の頻度は、PIH 全体で対照に比べて有意に高率であった。
2. 日本人女性においても、初産の preeclampsia (PE - PP) で特異的に TT の頻度が高く、PIH の中でもこの群において AGT の関与が特に強いことがはじめて示唆された。
3. PE - PP の重症度と TT の頻度との間には、有意な関連を認めなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征一郎

副 査 教 授 近藤 喜代太郎

副 査 教 授 大 浦 武 彦

学 位 論 文 題 名

妊娠高血圧症の遺伝的要因に関する症例対照研究

—日本人女性におけるアンジオテンシノーゲン遺伝子多型の関連—

妊娠高血圧症(pregnancy induced hypertension : PIH)の素因遺伝子はこれまで解明されていなかった。アンジオテンシノーゲン (AGT)遺伝子の 235番目のアミノ酸はメチオニン (M235) またはスレオニン (T235) であるが, Caucasian (n = 149) では T235 のホモ接合 (TT) の頻度が, PIH の中でも初産で浮腫や蛋白尿をともなった群 (preeclamptic primipara : PE - PP) で最も高く, 対照群および他の PIHに比べ有意に高率であったことが1993年米国において報告された。

本研究では, Caucasian で認められた PE - PP群における AGT遺伝子の関連が, 日本人でも認められるかどうかを確かめるために, 症例対照研究を行った。遺伝子増幅法 (polymerase chain reaction : PCR) による遺伝子タイピングを用い, 日本人の PIHおよび PE - PP, さらにその重症度とAGT 遺伝子多型との関連を究明することを目的とした。

北海道大学医学部附属病院産科婦人科およびその関連病院において1993年 1月から 1994 年 9月までの期間に妊娠・分娩管理を受けた, 他の既往歴, 合併症のない単胎妊娠の PIH症例 139例 (PE - PP 68例を含む) を疾患群とした。少なくとも妊娠 20 週未満から分娩後 1ヵ月までの間に, 一度も高血圧, 浮腫, 蛋白尿を認めなかった正常女性のうちから, PIH 1 例に対し対照として 2例を抽出し, 初産経産別に分娩時の年齢を± 3歳の範囲でマッチさせた。すなわち 278 例を対照群とした。

診断と分類は, アメリカ合同委員会の基準に従った。PIH は妊娠 20 週未満および分娩後 1 ヶ月以降の高血圧の有無と, 浮腫, 蛋白尿の有無で Transient hypertension (TH), Preeclampsia - eclampsia (PE - E) , Chronic hypertension (CHT), PE superimposed on CHT (CHT + PE) の 4 群に分類されるが, PE - E と CHT + PE , すなわち CHT の有無にかかわらず浮腫, 蛋白尿のあった初産をあわせて preeclamptic primipara (PE - PP) と規定した。

全血の約 100 - 200 μ l 中の白血球より抽出した DNA を鋳型とし, M235, T235 に特異的なプライマーを使用した遺伝子増幅法 (PCR) によるタイピングを行った。すなわち, M235 または T235 はエクソン 2 に含まれるので, エクソン 2 の一部に相補的な 20 塩基の sense primer 1 (5'-GAT GCG CAC AAG GTC CTG TC-3') とイントロン 2 の一部に相補的な 20 塩基の antisense primer 2 (5'-GCC AGC AGA GAG GTT TGC CT-3') を作成し, 30 サイクルの PCR を行い, 増幅された産

物を 354 bp のバンドの検出で確認した後、エクソン 2 の M235 を含む部分に相補的な14塩基の antisense primer 3 (5'-CAC ACT GGC TCC CA-3') , T235 を含む部分に相補的な14塩基の antisense primer 4 (5'-CAC ACT GGC TCC CG-3') を作成し、先の PCR産物を鋳型として、primer 1 と primer 3 または primer 4 を用いて、15 サイクルの PCR を行った。この 2 回目の PCRにより増幅された 291 bp の産物の有無を確認することによりAGT 遺伝子のタイピングを行った。すなわち、M235 , T235 のどちらか一方が増幅・検出されたときはそれぞれ M235 , T235 のホモ接合 (MM, TT) , 両方が同時に増幅・検出されたときはヘテロ接合 (MT) と判定した。

1. 日本人 PIH と AGT 遺伝子多型との関連

TTの頻度は PIH (n = 139) で 80 %と、対照 (n = 278) の 56 %に比べて有意 (p <0.001) に高かった。

2. 日本人 PIH における PE - PP と AGT 遺伝子多型との関連

PIH 139 例を PE - PP 68例とその他の PIH 71 例とに分けて検討すると、TT の頻度は、PE - PP 87%, その他の PIH 73 % , 対照 56 %であった。PE - PP では、その他の PIH, 対照に比べてTTの頻度がそれぞれ有意 (p <0.05, p <0.001) に高かった。また、その他の PIH と対照との間にも有意差 (p <0.01) を認めた。

3. PE - PP の重症度と AGT 遺伝子多型との関連

PE - PP とその他の PIH をそれぞれ重症、軽症に型分類して検討した。TT の頻度は、PE - PPにおいては重症 92 % (n = 49) , 軽症 74 % (n = 19) , その他の PIH では重症 71 % (n = 49) , 軽症 77 % (n = 22) と、有意な関連は認められなかった。

以上の研究結果を要約すると、以下の結論が得られた。

1. T235 をホモで持つもの (TT) の頻度は、PIH 全体で対照に比べて有意に高率であった。
2. 日本人においても、初産の preeclampsia (PE - PP) で特異的に TT の頻度が高く、PIH の中でもこの群において AGTの関与が特に強いことがはじめて示唆された。
3. PE - PP の重症度と TT の頻度との間には、有意な関連を認めなかった。

口頭発表に際し、近藤教授からCaucasian と日本人での妊娠中毒症の発症率にAGT遺伝子多型の人種差が関係しているかどうか、本態性高血圧におけるAGT遺伝子多型の関与について、またPIH発症に関連する他の要因についての質問があったが、申請者は概ね適切に解答した。

近藤教授、大浦教授から、発表後に個別に諮問を受け審査の上、合格の判定を下された。

以上、本研究はPIH発症とAGT遺伝子多型との関連を本邦においてはじめて明確にしえた症例対照研究であり、博士 (医学) の授与に価すると判断された。