

学位論文題名

Association Between a Variant of the Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene and Hypertension in Pregnancy in Japanese; Interaction with Parity, Age and Genetic Factors.

(日本人におけるグルタチオンS-トランスフェラーゼ P1 (GSTP1) 遺伝子多型と妊娠高血圧症の関連；経産回数、年齢、遺伝的要因との交絡)

学位論文内容の要旨

妊娠中毒症は、妊娠中に高血圧、蛋白尿、浮腫のいずれか1つあるいは2つ以上を発症する、周産期医学・母子保健学における主要な対策疾患である。近年、その症状の中でも高血圧の母児に与える影響が大きいため、高血圧を主症状とした妊娠高血圧症 (HP) の概念が提唱されている。HP は、複数の遺伝的要因と環境要因が絡み合って発症する「多因子疾患」である。すなわち、母体の妊娠に対する適応性、胎盤の生理、母児間応答、免疫系などの妊娠時に特有な因子が、昇圧系、降圧系、脂質代謝、薬物代謝、血管内皮系、凝固系などに複雑に修飾を加えた結果発症すると考えられている。

日本人の HP に関連する遺伝的要因としては、近年の分子生物学の進歩により、Angiotensinogen (AGT) 遺伝子 Met235Thr 多型、Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS3) 遺伝子多型 Glu298Asp 多型が報告され、病因・病態の解明、予防医学への応用が期待されている。一方、最近オランダにおいて Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) 遺伝子 Ile105Val 多型と preeclampsia との関連が報告された。Val105 のホモ (Val/Val) の頻度が、対照の 5% に対して preeclampsia では 14% と有意 ($p < 0.05$) に高かった。GSTP1 遺伝子 Ile105Val 多型では、Val105 アリルを持つ者は解毒能力が弱いことが報告されている。しかし、日本人においては、今までに本症と薬物代謝酵素遺伝子多型との関連は報告されていない。本研究では、(1) 日本人の HP と GSTP1 遺伝子 Ile105Val 多型との関連、および (2) 初産重症 HP における GSTP1 遺伝子多型と他の要因との交絡・共同作用を検討することを目的とした。

対象は、1995-2001 年までの間に、北海道大学医学部附属病院及びその関連病院において妊娠・分娩管理を受けた HP131 例 (初産 80 例/経産 51 例、母体年齢：29.9±0.5 歳)、(重症 HP110 例 (初産 69 例/経産 41 例、母体年齢：29.9±0.5 歳) を含む)、正常妊娠対照 327 例 (初産 191 例/経産 136 例、母体年齢：29.1±0.3 歳) であった。腎疾患、糖尿病、羊水量異常、先在する高血圧、胎児奇形合併例は除外した。HP の診断は、National High Blood Pressure Education Program Working Group (1990) の基準に従い、高血圧は①妊娠により収縮期血圧が 30mmHg 以上上昇、②拡張期血圧が 15mmHg 以上上昇、③妊娠 20 週以後 140/90mmHg 以上を示した場合とし、蛋白尿は 24 時間尿で 0.3 g (随時尿で

30mg/dl) 以上、浮腫は体重増加が 500g/週以上とした。

遺伝子タイピングは、PCR-RFLP 法を用いて行った。すなわち、全血 1ml から遺伝子 DNA を抽出した後、GSTP1 遺伝子多型は、forward primer (5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3')、reverse primer (5'-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3') を用いて、denaturation を 94°C で 30 秒、annealing を 56°C で 30 秒、polymerization を 72°C で 30 秒として、40 サイクルの PCR を行い、その産物を制限酵素 *BsmA1* で 55°C、4 時間の反応の後、切断の有無 (Ile は 176bp、Val は 85bp と 91bp のバンドの出現) を 10% アクリルアミド電気泳動法で確認した。AGT 遺伝子多型、NOS3 遺伝子多型の遺伝子タイピングも、従来報告されている PCR-RFLP 法、すなわちそれぞれの多型部位を挟むプライマーを設計し、AGT 遺伝子多型は *Tth111 I*、NOS3 遺伝子多型は *Ban II* による酵素反応の結果により行った。

統計解析方法は、HP と対照における GSTP1 遺伝子 Ile105Val 多型の頻度をそれぞれ Ile/Ile と Ile/Val+Val/Val の 2 群に分け、 χ^2 検定 (自由度 1) を用いて行った。また、初産重症 HP と GSTP1 遺伝子多型との関連を、高年妊娠、高血圧の家族歴、妊娠前の BMI ≥ 24 、AGT 遺伝子 TT 型、NOS3 遺伝子 GA+AA 型の有無ごとに検討した。

HP と対照における GSTP1 遺伝子 Ile/Val+Val/Val 型の頻度は、HP 26%、重症 HP 28%、対照 28% と、有意差はみられなかった。初産重症 HP と初産対照における検討では、母体年齢が 35 歳以上では、初産重症 HP 63%、初産対照 18%、AGT 遺伝子 MM+MT 型では、初産重症 HP 50%、初産対照 26%、NOS3 遺伝子 GA+AA 型では、初産重症 HP 42%、初産対照 13% と、GSTP1 遺伝子 Ile/Val+Val/Val 型の頻度にそれぞれ有意差 ($p < 0.05$) がみられた。

今回の結果から、日本人の HP および preeclampsia と GSTP1 遺伝子 Ile105Val 多型との間には、全体としては関連がみられなかったが、初産の重症 HP においては、GSTP1 遺伝子 Ile/Val+Val/Val 型が、AGT 遺伝子 TT 型とは独立に、また NOS3 遺伝子 GA+AA 型とは共同作用により関連することが初めて明らかになった。GSTP1 遺伝子 Val105 型は薬物代謝系における NO₂ から NO への代謝能力を弱め、NOS3 遺伝子 Asp298 型は NO 産生を低下させることから、両者は共同して NO 産生を低下させることを通じて HP の発症に関わっている可能性がある。また、AGT 遺伝子 T235 型は、妊娠初期のトロホプラスト不完全侵入およびらせん動脈狭小化など、NO 産生低下とは異なった病態で発症に関わることが推測される。

今後は、このように、疾病の発症における複数の遺伝子多型の交絡・共同作用および関連の独立性を詳細に検討していくこと、さらには、これらの遺伝要因と環境要因の交絡・共同作用の検討が課題と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 櫻 木 範 明
副 査 教 授 玉 城 英 彦
副 査 教 授 藤 田 博 美
副 査 教 授 水 上 尚 典

学位論文題名

Association Between a Variant of the Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene and Hypertension in Pregnancy in Japanese; Interaction with Parity, Age and Genetic Factors.

(日本人におけるグルタチオンS-トランスフェラーゼP1 (GSTP1) 遺伝子多型と妊娠高血圧症の関連；経産回数、年齢、遺伝的要因との交絡)

日本人の妊娠高血圧症 (HP) に関連する遺伝的要因としては、近年の分子生物学の進歩により、Angiotensinogen (AGT) 遺伝子 Met235Thr 多型、Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS3) 遺伝子多型 Glu298Asp 多型が報告され、病因・病態の解明、予防医学への応用が期待されている。一方、最近オランダにおいて Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) 遺伝子 Ile105Val 多型と preeclampsia との関連が報告された。Val105 のホモ (Val/Val) の頻度が、対照の 5% に対して preeclampsia では 14% と有意 ($p < 0.05$) に高かった。GSTP1 遺伝子 Ile105Val 多型では、Val105 アリルを持つ者は解毒能力が弱いことが報告されている。しかし、日本人においては、今までに本症と薬物代謝酵素遺伝子多型との関連は報告されていない。本研究では、(1) 日本人の HP と GSTP1 遺伝子 Ile105Val 多型との関連、および (2) 初産重症 HP における GSTP1 遺伝子多型と他の要因との交絡・共同作用を検討することを目的とした。

対象は、1995-2001 年までの間に、北海道大学医学部附属病院及びその関連病院において妊娠・分娩管理を受けた HP131 例 (初産 80 例/経産 51 例、母体年齢： 29.9 ± 0.5 歳)、(重症 HP110 例 (初産 69 例/経産 41 例、母体年齢： 29.9 ± 0.5 歳) を含む)、正常妊娠対照 327 例 (初産 191 例/経産 136 例、母体年齢： 29.1 ± 0.3 歳) であった。腎疾患、糖尿病、羊水量異常、先在する高血圧、胎児奇形合併例は除外した。HP の診断は、National High Blood Pressure Education Program Working Group (1990) の基準に従い、高血圧は①妊娠により収縮期血圧が 30mmHg 以上上昇、②拡張期血圧が 15mmHg 以上上昇、③妊娠 20 週以後 140/90mmHg 以上を示した場合とし、蛋白尿は 24 時間尿で 0.3g (随時尿で 30mg/dl) 以上、浮腫は体重増加が 500g/週以上とした。

遺伝子タイピングは、PCR-RFLP 法を用いて行った。すなわち、全血 1ml から遺伝子

DNAを抽出した後、GSTP1 遺伝子多型は、forward primer (5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3'), reverse primer (5'-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3') を用いて、denaturation を 94℃で 30 秒、annealing を 56℃で 30 秒、polymerization を 72℃で 30 秒として、40 サイクルの PCR を行い、その産物を制限酵素 *BsmA1* で 55℃、4 時間の反応の後、切断の有無 (Ile は 176bp、Val は 85bp と 91bp のバンドの出現) を 10% アクリルアミド電気泳動法で確認した。AGT 遺伝子多型、NOS3 遺伝子多型の遺伝子タイピングも、従来報告されている PCR-RFLP 法、すなわちそれぞれの多型部位を挟むプライマーを設計し、AGT 遺伝子多型は *Tth111 I*、NOS3 遺伝子多型は *Ban II* による酵素反応の結果により行った。

統計解析方法は、HP と対照における GSTP1 遺伝子 Ile105Val 多型の頻度をそれぞれ Ile/Ile と Ile/Val+Val/Val の 2 群に分け、 χ^2 検定 (自由度 1) を用いて行った。また、初産重症 HP と GSTP1 遺伝子多型との関連を、高年妊娠、高血圧の家族歴、妊娠前の BMI ≥ 24 、AGT 遺伝子 TT 型、NOS3 遺伝子 GA+AA 型の有無ごとに検討した。

HP と対照における GSTP1 遺伝子 Ile/Val+Val/Val 型の頻度は、HP 26%、重症 HP 28%、対照 28% と、有意差はみられなかった。初産重症 HP と初産対照における検討では、母体年齢が 35 歳以上では、初産重症 HP 63%、初産対照 18%、AGT 遺伝子 MM+MT 型では、初産重症 HP 50%、初産対照 26%、NOS3 遺伝子 GA+AA 型では、初産重症 HP 42%、初産対照 13% と、GSTP1 遺伝子 Ile/Val+Val/Val 型の頻度にそれぞれ有意差 ($p < 0.05$) がみられた。

今回の結果から、日本人の HP および preeclampsia と GSTP1 遺伝子 Ile105Val 多型との間には、全体としては関連がみられなかったが、初産の重症 HP においては、GSTP1 遺伝子 Ile/Val+Val/Val 型が、AGT 遺伝子 TT 型とは独立に、また NOS3 遺伝子 GA+AA 型とは共同作用により関連することが初めて明らかになった。GSTP1 遺伝子 Val105 型は薬物代謝系における NO₂ から NO への代謝能力を弱め、NOS3 遺伝子 Asp298 型は NO 産生を低下させることから、両者は共同して NO 産生を低下させることを通じて HP の発症に関わっている可能性がある。また、AGT 遺伝子 T235 型は、妊娠初期のトロホプラスト不完全侵入およびらせん動脈狭小化など、NO 産生低下とは異なった病態で発症に関わることが推測される。

公開発表に際し、副査の藤田教授から、GSTP1 遺伝子多型が GSTP1 蛋白の構造に及ぼす影響とそれによる基質結合能や活性の変化について質問があった。副査の水上教授からは、preeclampsia における血中 NO レベルの上昇に関する従来の報告と今回の研究結果との関係、早期発症型および妊娠 33 週未満でターミネーションとなったものの例数と各群における遺伝子型の分布、研究結果の今後の臨床応用の可能性について質問があった。副査の玉城教授からは、症例・対照の集め方と今後の調査研究の方向性についての質問があった。主査の櫻木教授からは、ロジスティック回帰分析を用いなかった理由、研究結果から算出される GSTP1 遺伝子多型と初産重症妊娠高血圧発症のオッズ比について質問があった。これらの質問に対して、申請者は自身のこれまでの研究成績や文献的情報をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。