

学 位 論 文 題 名

Maternal smoking during pregnancy
and genetic polymorphisms in the *Ah* receptor, *CYP1A1*
and *GSTM1* affect infant birth size in Japanese subjects

(日本人妊婦における胎児発育に及ぼす喫煙の影響と *Ah* レセプター,
CYP1A1 および *GSTM1* 遺伝子多型との関連)

学位論文内容の要旨

背景および目的

妊娠中の喫煙は胎盤剥離, 前置胎盤といった妊娠合併症あるいは早産や子宮内胎児発育遅延 (IUGR) などの高リスク要因であり, 喫煙妊婦の新生児は非喫煙妊婦に比べて低出生体重の割合が 2 倍になると報告されている. タバコ煙には 4000 種以上の化学物質が含まれており, 例えばニコチンはその薬理作用によって臍帯や胎児の血管が収縮し, 血流量の減少による酸素や栄養の供給低下がみられ, 高濃度の一酸化炭素が胎児血中へ移行すると胎児は酸素欠乏状態へと陥る. また, 遺伝毒性や発がん性を持つ多環芳香族炭化水素類 (PAHs) は細胞内 DNA に付加体を形成するが, 喫煙妊婦の白血球中 DNA 付加体量は非喫煙妊婦に比べると有意に多くなり, さらに DNA 付加体量和新生児体重, 身長や頭囲は反比例することが報告されている.

しかし, 胎児発育への影響には個体差がみられることから化学物質代謝に対する遺伝的感受性の関与が示唆されている. 本研究では外来異物と結合してシトクロム P450 (*CYP*) 1A, 1B などの遺伝子発現誘導に関与している *Ah* レセプター遺伝子, PAHs の代謝活性に関与している *CYP1A1* 遺伝子およびこれら化学物質の解毒に関与しているグルタチオン転移酵素 (GST) *M1*, *GSTT1* 遺伝子の多型について, タバコ煙中化学物質に対する遺伝的感受性の差異が胎児発育に及ぼす影響を明らかにすることを目的として日本人妊婦を対象に前向きコホート研究を行なった.

対象および方法

本研究は環境化学物質による次世代影響, 特に小児疾患発症のメカニズムの解明とリスク評価を目的とした前向きコホート研究の一部であり, 最も感受性が強い胎内曝露における個体の感受性と環境因子の寄与について喫煙の影響を検討した. 2002~2004 年に札幌市内の一般病院産科を受診した妊娠 23~35 週の妊婦を研究対象者として登録し, 自記式質問票を用いて妊娠中の喫煙習慣および飲酒習慣, 世帯収入などを, また, 診療録を閲覧して分娩時および出生時所見を記録した. 双胎妊娠, 糖尿病, 妊娠中毒症を除外した妊婦 373 名中, 妊娠判明時に喫煙していたものは 153 名 (41.0%) であり, うち 80 名 (21.4%) は妊娠初~中期で喫煙を中止したが, 残り 73 名 (19.6%) は妊娠後期にも喫煙を継続していた. 妊娠判明時に喫煙していなかった妊婦を「非喫煙群」(220

名) および妊娠後期にも喫煙を継続していた妊婦を「喫煙群」(73 名) として、計 293 名を解析した。文書による同意取得後に妊婦から採血を実施して DNA 抽出を行った。リアルタイム-PCR 法 (Allelic discrimination assay) で *AhR* 遺伝子多型 (Arg554Lys) および PCR-RFLP 法で *CYP1A1* 遺伝子 *MspI* 多型、また、PCR 法で *GSTM1* および *GSTT1* 遺伝子多型について解析を行なった。

統計解析は SPSS12.0J を使用して重回帰分析により新生児体重および身長を評価した。まず、喫煙習慣と遺伝子多型の各群で、次に喫煙習慣と遺伝子多型を組み合わせた群で、妊婦の年齢、身長、妊娠前体重、妊娠中飲酒量、出産歴、新生児性別、在胎週数及び世帯収入で調整した値を求めた。本研究は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会の承認を得た。

結 果

対象者の基本的属性については t -検定または χ^2 検定を実施し、非喫煙群と喫煙群では妊婦年齢 ($p<0.01$)、妊娠中に飲酒した者の飲酒量 ($p<0.01$)、新生児性別 ($p<0.05$) および世帯収入 ($p<0.05$) で有意な差がみられた。妊婦の年齢、身長、妊娠前体重、妊娠中飲酒量、出産歴、新生児性別、在胎週数及び世帯収入で調整した重回帰分析では、喫煙群を非喫煙群と比較すると新生児体重で $135\pm43\text{g}$ の減少 ($p<0.01$)、新生児身長で $0.5\pm0.2\text{cm}$ の減少 ($p<0.05$) を認めたが、遺伝子型の各分類では有意差を認めなかった。次に喫煙習慣と遺伝子型を組み合わせると、喫煙群の *AhR* 遺伝子 Arg/Arg 型は、非喫煙群の *AhR* 遺伝子 Arg/Lys+Lys/Lys 型に比べて新生児体重で $211\pm76\text{g}$ の減少 ($p<0.01$)、新生児身長で $1.2\pm0.4\text{cm}$ の減少 ($p<0.01$)、喫煙群の *CYP1A1* 遺伝子 m1/m2+m2/m2 型は、非喫煙群の *CYP1A1* 遺伝子 m1/m1 型に比べて新生児体重で $170\pm64\text{g}$ の減少 ($p<0.01$)、新生児身長で $0.8\pm0.3\text{cm}$ の減少 ($p<0.05$)、また、喫煙群の *GSTM1* 遺伝子欠損型は、非喫煙群の *GSTM1* 遺伝子型に比べて新生児体重で $171\pm58\text{g}$ の減少 ($p<0.01$)、新生児身長で $0.6\pm0.3\text{cm}$ の減少 ($p<0.05$) を認めたが、*GSTT1* 遺伝子多型では有意な関連は認めなかった。さらにこれらの遺伝子多型を組み合わせると、喫煙群の *AhR* 遺伝子 Arg/Arg 型で *CYP1A1* 遺伝子 m1/m2+m2/m2 型では、非喫煙群の *AhR* 遺伝子 Arg/Lys+Lys/Lys 型で *CYP1A1* 遺伝子 m1/m1 型に比べて新生児体重で $315\pm116\text{g}$ の減少 ($p<0.01$)、新生児身長で $1.7\pm0.6\text{cm}$ の減少 ($p<0.01$)、喫煙群の *CYP1A1* 遺伝子 m1/m2+m2/m2 型で *GSTM1* 遺伝子欠損型では、非喫煙群の *CYP1A1* 遺伝子 m1/m1 型で *GSTM1* 遺伝子型に比べて新生児体重で $237\pm92\text{g}$ の減少 ($p<0.05$)、新生児身長で $1.3\pm0.5\text{cm}$ の減少 ($p<0.01$) を認めた。

一方、非喫煙群では遺伝子多型による有意な関連を認めなかった。

考 察

本研究ではタバコ煙中の化学物質である PAHs の代謝や解毒に関与する *AhR* 遺伝子 Arg/Arg 型、*CYP1A1* 遺伝子 m1/m2+m2/m2 型および *GSTM1* 遺伝子欠損型を持つ喫煙妊婦では新生児体重および身長が有意に減少することが認められた。先行研究では *CYP1A1* 遺伝子 m1/m2+m2/m2 型では代謝活性能が上昇し、*GSTM1* 遺伝子欠損型では解毒能が欠損することが報告されているが、本研究から、これら遺伝子多型による化学物質代謝や解毒過程の違いが胎児発育遅延に関与していることが示唆された。

妊娠中の喫煙と遺伝子多型との関連を検討した先行研究としては Wang *et al.* (2002) および Nukui *et al.* (2004) が低出生体重に関与する *GSTT1* 遺伝子多型について報告しているが、いずれも対象集団は白人と黒人妊婦である。遺伝子多型頻度には人種間による差異があることから、これらの結果をそのまま日本人集団に適用することはできない。本研究では日本人妊婦を対象とし

て胎盤通過性の PAHs などタバコ煙中化学物質の代謝および解毒に関与している遺伝子多型が胎児発育に及ぼす影響を初めて明らかにした。また、これらの遺伝的感受性が新生児の体重のみならず身長の減少にも関与することが明らかになった。さらに、予防医学の観点からは遺伝的高リスク集団に焦点を当てた妊婦の禁煙指導の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正

副 査 教 授 水 上 尚 典

副 査 教 授 岸 玲 子

学 位 論 文 題 名

Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the *Ah* receptor, *CYP1A1* and *GSTM1* affect infant birth size in Japanese subjects

(日本人妊婦における胎児発育に及ぼす喫煙の影響と *Ah* レセプター,
CYP1A1 および *GSTM1* 遺伝子多型との関連)

妊娠中の喫煙は胎盤剥離、前置胎盤といった妊娠合併症あるいは早産や IUGR などの高リスク要因であるが、胎児発育への影響には個体差がみられることから化学物質代謝に対する遺伝的感受性の関与が示唆されている。本研究では PAHs の代謝、解毒に関与している *AhR* 遺伝子、*CYP1A1* 遺伝子、*GSTM1* および *GSTT1* 遺伝子の多型について、タバコ煙中化学物質に対する感受性の差異が胎児発育に及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。妊娠 23～35 週の日本人妊婦を前向きコホート研究の対象者として登録した。自記式質問票を用いて妊娠中の喫煙習慣および飲酒習慣、世帯収入などを、また、診療録を閲覧して分娩時および出生時所見を記録した。妊娠判明時に喫煙していなかった妊婦を「非喫煙群 (220 名)」および妊娠後期にも喫煙を継続していた妊婦を「喫煙群 (73 名)」として、計 293 名を解析した。採血後に DNA を抽出して *AhR* 遺伝子多型 (Arg554Lys, リアルタイム-PCR 法)、*CYP1A1* 遺伝子 *MspI* 多型 (PCR-RFLP 法)、*GSTM1* および *GSTT1* 遺伝子多型 (PCR 法) について解析を行なった。喫煙群を非喫煙群と比較すると新生児体重で $135 \pm 43\text{g}$ の減少 ($p < 0.01$)、新生児身長で $0.5 \pm 0.2\text{cm}$ の減少 ($p < 0.05$) を認めたが、遺伝子型の各分類では有意差を認めなかった。次に喫煙習慣と遺伝子型を組み合わせると、喫煙群の *AhR* 遺伝子 Arg/Arg 型は、非喫煙群の Arg/Lys+Lys/Lys 型に比べて新生児体重で $211 \pm 76\text{g}$ の減少 ($p < 0.01$)、新生児身長で $1.2 \pm 0.4\text{cm}$ の減少 ($p < 0.01$)、喫煙群の *CYP1A1* 遺伝子 m1/m2+m2/m2 型は、非喫煙群の m1/m1 型に比べて新生児体重で $170 \pm 64\text{g}$ の減少 ($p < 0.01$)、新生児身長で $0.8 \pm 0.3\text{cm}$ の減少 ($p < 0.05$)、また、喫煙群の *GSTM1* 遺伝子欠損型は、非喫煙群の遺伝子型に比べて新生児体重で $171 \pm 58\text{g}$ の減少 ($p < 0.01$)、新生児身長で $0.6 \pm 0.3\text{cm}$ の減少 ($p < 0.05$) を認めたが、*GSTT1* 遺伝子多型では有意な関連は認めなかった。さらにこれらの遺伝子多型を組み合わせると、喫煙群の *AhR* 遺

伝子 Arg/Arg 型で *CYP1A1* 遺伝子 m1/m2+m2/m2 型では、非喫煙群の Arg/Lys+Lys/Lys 型で m1/m1 型に比べて新生児体重で $315 \pm 116\text{g}$ の減少 ($p < 0.01$)、新生児身長で $1.7 \pm 0.6\text{cm}$ の減少 ($p < 0.01$)、喫煙群の *CYP1A1* 遺伝子 m1/m2+m2/m2 型で *GSTM1* 遺伝子欠損型では、非喫煙群の m1/m1 型で遺伝子型に比べて新生児体重で $237 \pm 92\text{g}$ の減少 ($p < 0.05$)、新生児身長で $1.3 \pm 0.5\text{cm}$ の減少 ($p < 0.01$) を認めた。一方、非喫煙群では遺伝子多型による有意な関連を認めなかった。本研究ではタバコ煙中の化学物質である PAHs の代謝や解毒に関与する *AhR* 遺伝子 Arg/Arg 型、*CYP1A1* 遺伝子 m1/m2+m2/m2 型および *GSTM1* 遺伝子欠損型を持つ喫煙妊婦では新生児体重および身長が有意に減少することを初めて示した報告である。審査において、副査 水上教授から本研究における喫煙群での SGA や IUGR の頻度、胎児発育と有意な関連が認められた *AhR* 遺伝子多型が他の疾患と関与するかを検討した研究報告の有無、低出生体重の児は成人後に糖尿病、高血圧症、心筋梗塞などの生活習慣病に罹患しやすいことが報告されているが、喫煙妊婦から出生した児を対象としたこのような研究報告の有無についての質問があった。次いで、主査 有賀教授から本研究で胎児発育と有意な関連が認められた *AhR* 遺伝子の多型による機能的な違いが化学物質への結合力の差に関与する可能性について検討した研究報告の有無、一般喫煙者を対象としてタバコ煙中化学物質の中間代謝物質測定と遺伝子多型との関連を検討した研究報告の有無についての質問があった。最後に、副査 岸教授から小児の神経発達に関与する頭囲について本研究対象者の結果、認知機能と喫煙および遺伝子多型について検討した研究報告の有無、今後さらに検討が必要な項目とそれに必要なサンプルサイズについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自身の研究結果や先行研究を引用し、おおむね妥当な回答をしていた。

この論文は、日本人妊婦を対象として胎盤通過性の PAHs などタバコ煙中化学物質の代謝および解毒に関与している遺伝子多型による代謝や解毒過程の違いが胎児発育遅延に関与していることを初めて明らかにしたことで高く評価され、今後、遺伝的高リスク集団である妊婦への予防医学的研究への発展が期待される。

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。