



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1549号
学位記番号	第1106号
氏名	森川 麻里
授与年月日	平成 28年 11月 30日
学位論文の題名	<p>Genotyping analysis of the factor V Nara mutation, Hong Kong mutation, and 16 SNPs including the R2 haplotype, and the involvement of factor V activity in patients with recurrent miscarriage</p> <p>(習慣流産と Factor V Nara/Hong Kong 変異、FV R2 ハプロタイプと FV 活性値の関連性)</p> <p>Blood Coagulation &amp; Fibrinolysis. Accepted August 10, 2016</p>
論文審査担当者	主査： 齋藤 伸治 副査： 飯田 真介, 杉浦 真弓

## 論文内容の要旨

### 【目的】

不育症とは妊娠はするものの流産や死産を繰り返し生児が得られない状態をいい、習慣流産とは3回以上流産を繰り返した状態と定義される。厚生労働省研究班の調査では、習慣流産は妊娠経験者の0.9%で発生すると報告されている。初期流産の原因の約80%は胎児の偶発的な染色体異常であるが、その他リスク因子として夫婦染色体異常、子宮形態異常、内分泌異常、凝固異常がある。近年、血栓症のリスク因子である遺伝子変異や多型が流産に関与することが報告され、第V因子 Leiden 変異は最も頻度の高い習慣流産の原因とされているが、日本人にはこの変異はみつかっていない。

2009年、深部静脈血栓症と第V因子活性低下を認めた日本人男性から、FV W1920R が同定、第V因子 Nara 変異と命名された。今回、Nara 変異と中国人の深部静脈血栓症患者から発見された第V因子 Hong Kong 変異 (FV R306G)、血栓症患者で第V因子活性低下に関与する His1299Arg を中心とした第V因子遺伝子多型 (SNPs) : 第V因子 R2 ハプロタイプについて、習慣流産患者におけるこれらの変異と第V因子活性値について検討した。

### 【方法】

- (1) 対象：習慣流産患者群 (n = 88) は40歳未満の3回以上の流産歴既往のある習慣流産患者で不育症の原因検索にてリスク因子ない人とした。コントロール群 (n = 95) は50歳未満の流産歴のない、出産歴あり、特に基礎疾患のない人とした。
  - (2) FV 遺伝子解析：白血球からDNA抽出し、FV exon 4,7,8,13,16,20,25 をPCR法で増幅した。精製PCR産物は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) で反応させ、3730 DNA analyzer による direct sequence 法にて決定した。塩基配列は GenBank no. Z99572 と比較した。
  - (3) FV 活性測定：FV 欠乏血漿 (George King) と PT 試薬 (RecombiPlasTin2G) を用いた凝固一段法で ACL9000 (IL社) にて測定した。
  - (4) 統計解析は SPSS, version 21 ソフトウェアを使用した。
- 上記、臨床検体は全て対象者の同意のもとに実験に供した。

### 【結果】

- (1) 習慣流産患者群、コントロール群ともに FV Nara 変異、FV Hong Kong 変異は認められなかった。
- (2) FV R2 ハプロタイプに関連する16のSNPsのうち Ser156Ser では患者群で G/T と T/T の割合が有意に低く (OR 0.45, 95%CI 0.22-0.91, OR 0.32, 95%CI 0.14-0.72)、G allele の割合が有意に高かった (OR 1.87, 95%CI 1.23-2.83)。Leu1288Leu では患者群で C allele の割合が有意に高かった (OR 1.66, 95%CI 1.02-2.71)。
- (3) FV 活性値は患者群、コントロール群で有意差は認められなかった。しかし患者群で活性値の分布がコントロール群に比較して広がった (>95<sup>th</sup> or <5<sup>th</sup> percentile: OR 3.59, 95%CI 1.11-11.60: OR 3.94, 95% CI 1.23-12.60)。
- (4) FV 活性値は16のSNPsのうち7のSNPsで有意に低下を認めた。

### 【結論】

今回の研究では **FV Nara** 変異、**FV Hong Kong** 変異は一例も認めず、日本人では非常に稀な変異であると考えられた。また **FV R2** ハプロタイプの **SNPs (Ser156Ser、Leu1288Leu)**、**FV** 活性値の高値、低値が習慣流産に関連する可能性が示唆されたが、これらの **SNPs** と **FV** 活性値の関連性は認めず、メカニズムは不明である。今後も習慣流産に関連する遺伝子多型について、更なる研究が必要であると考えられた。

(注) 和文で2,000字以内でまとめる

## 論文審査の結果の要旨

### 【目的】

不育症とは妊娠はするものの流産や死産を繰り返し生児が得られない状態をいい、習慣流産とは3回以上流産を繰り返した状態と定義される。近年、血栓性素因に関する遺伝子変異や多型と不育症の関与が報告され、凝固第V因子(FV) Leiden 変異はその代表的なものだが、日本人にはこの変異はみつかっていない。2009年、深部静脈血栓症とFV活性低下を認めた日本人男性から、FV W1920R が同定、FV Nara 変異と命名された。今回、Nara 変異と中国人の深部静脈血栓症患者から発見されたFV Hong Kong 変異 (FV R306G)、血栓症患者でFV活性低下に関与するHis1299Arg を中心としたFV 遺伝子多型 (SNPs) : FV R2 ハプロタイプについて、習慣流産患者におけるこれらの変異とFV活性値について検討した。

### 【方法】

- (1) 習慣流産患者88人を対象とし、流産歴がなく出産歴のある女性95人を対照とした。
- (2) FV 遺伝子解析：白血球からDNA抽出し、FV exon 4,7,8,13,16,20,25をPCR法で増幅した。精製PCR産物はBigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) で反応させ、3730 DNA analyzer による direct sequence 法にて決定した。塩基配列は GenBank no. Z99572 と比較した。
- (3) FV 活性測定：FV 欠乏血漿 (George King) と PT 試薬 (RecombiPlasTin2G) を用いた凝固一段法で ACL9000 (IL 社) にて測定した。

### 【結果】

- (1) 習慣流産、コントロール群ともにFV Nara 変異、FV Hong Kong 変異は認められなかった。
- (2) FV R2 ハプロタイプに関連する16のSNPsのうちSer156Serでは患者群でG/TとT/Tの割合が有意に低く (OR 0.45, 95%CI 0.22-0.91, OR 0.32, 95%CI 0.14-0.72)、G allele の割合が有意に高かった (OR 1.87, 95%CI 1.23-2.83)。Leu1288Leuでは患者群でC allele の割合が有意に高かった (OR 1.66, 95%CI 1.02-2.71)。
- (3) FV 活性値は患者群、コントロール群で有意差は認められなかった。しかし患者群で活性値の分布がコントロール群に比較して広がった (>95<sup>th</sup> or <5<sup>th</sup> percentile: OR 3.59, 95%CI 1.11-11.60; OR 3.94, 95% CI 1.23-12.60)。
- (4) FV 活性値は16のSNPsのうち7のSNPsで有意に低下を認めた。

【結論】 今回の研究ではFV Nara 変異、FV Hong Kong 変異は一例も認めず、日本人では非常に稀な変異であると考えられた。またFV R2 ハプロタイプのSNPs (Ser156Ser、Leu1288Leu)、FV 活性値の高値、低値が習慣流産に関連する可能性が示唆されたが、これらのSNPsとFV活性値の関連性は認めず、メカニズムは不明である。

【審査の内容】 主査の齋藤教授から、活性化protein C resistance (APCR)の測定方法、APCRとFVの関係、major allele 頻度が高いことに臨床的意味がありうるか、一般集団における頻度の検索結果は、FV 遺伝子の近くに存在する遺伝子は何があるか、など9項目、第一副査飯田教授からは、血栓性素因であるAntithrombin, Protein C/S 欠乏症と不育症の関係、関連のみられた多型がmRNAの安定性に影響するか、FV活性値と流産回数との関連、など5項目、第二副査の杉浦教授からは不妊症の原因と治療、抗リン脂質抗体症候群の診断基準についての質問があり、概ね適切な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、産婦人科学に関する知識を有していると考えられた。原因不明習慣流産関連遺伝子がいくつか報告されており、FV 遺伝子もその一つである可能性が示された。以上を持って本論文の筆者は博士(医学)の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 齋藤 伸治 副査 飯田 真介 杉浦 真弓