



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1461号
学位記番号	第1047号
氏名	林 裕子
授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位論文の題名	Genotyping analyses for polymorphisms of <i>ANXA5</i> gene in patients with recurrent pregnancy loss (不育症における ANXA5 遺伝子多型に関する検討)  Fertil Steril. 100(4):1018-1024, 2013
論文審査担当者	主査： 鈴木 貞夫 副査： 齋藤 伸治, 杉浦 真弓

# 論文内容の要旨

## 1 背景

不育症とは妊娠はするが流産を繰り返し生児を得られない疾患である。不育症の原因として抗リン脂質抗体症候群や子宮奇形、夫婦の染色体異常、胎児染色体異常など様々な要因が指摘されている。AnnexinA5 (ANXA5) は胎盤や腎臓、肝臓などの各種臓器や血液、尿、唾液などの体液中に発現するタンパク質で、胎盤の Trophoblast 表面のリン脂質に結合し抗凝固性のシールドを形成し絨毛間腔での抗凝固作用を示す。この ANXA5 のプロモーター領域の変化によりプロモーター活性が低下し ANXA5 遺伝子の発現が低下することが報告されている。今回我々は日本人女性における ANXA5 の遺伝子多型と不育症の関連について検討した。

## 2 方法

ANXA5 のプロモーター領域の既知の 6 つの SNP について不育症患者群と正常コントロール群とで case-control study を行った。次に患者群において ANXA5 の SNP を含む複数の因子と次回妊娠帰結の関連を調べる cohort study (nested case-control study) を行った。患者群は 2 回以上の流産歴があり、抗リン脂質抗体症候群、子宮奇形、夫婦染色体異常、内分泌異常の指摘のない当院患者 264 人、正常コントロール群は 1 回以上の分娩歴があり、流産歴のない女性 195 人とした。患者群においては血液検査、子宮卵管造影によって抗リン脂質抗体症候群や内分泌疾患、本人とパートナーの染色体異常、子宮奇形がないことを事前に確認した。

施設内倫理委員会の承認の下、2007 年 5 月から 2013 年 4 月までに本研究に同意された対象の末梢血から DNA を抽出し、TaqManPCR 法によりこれまでに報告されている ANXA5 のプロモーター領域の 6 つの SNP を検出した。各 SNP の詳細は以下に示す。 rs112782763 (-467G > A, SNP1), rs28717001 (-448A > C, SNP2), rs28651243 (-422T > C, SNP3), rs113588187 (-373G > A, SNP4), rs1050606 (-302T > G, SNP5), rs11538099 (-1C > T, SNP6)

## 3 結果

SNP5 は dominant model において患者群では T/T n=155 (58.7%)、T/G, G/G n=109 (41.3%) であったのに対し正常コントロール群では T/T n=132 (67.7%)、T/G, G/G n=63 (32.3%) と患者群では G が有意に多かった。(p=0.049, OR 1.47, 95%CI 1.00-2.17) また 6 つの SNP 間で強い連鎖不平衡と有意な相関を認めた。(r=0.962~0.995) 次に先行研究と本研究のデータを統合し MAX 検定を行った結果、すべての SNP で dominant model が選択された。ハプロタイプ解析では G-A-T-G-T-C (patients vs controls: 75.9% vs 80.3%) が最も多く次いで G-A-T-G-G-C (12.1% vs 8.7%) が多く認められた。すべてがマイナーアレルである A-C-C-A-G-T は 3 番目に多く認められたがこれら 3 つのハプロタイプは dominant model では患者群と正常コントロール群との間で有意差を認めなかった。

続いて患者群において、患者年齢、既往流産回数、既往分娩回数、SNP5 を因子として次回妊娠帰結との関連を検討する多変量解析を行った結果、5 回以上の流産回数は有意な関連を示したが (p=0.05, OR=6.0, 95%CI: 0.98-37.0)、その他は有意差を認めなかった。

さらに SNP5 の変異の有無と次回妊娠帰結について検討した。抗凝固療法を行わずに妊娠帰結を得た場合、SNP5 の変異を有する患者群では妊娠成功率が 70.0% (63/90)、変異をもたない患者群で 71.9% (97/135) であり、抗凝固療法を行って妊娠帰結を得た 39 人の患者における次回妊娠成功率は SNP5 の変異を有する患者で 63.2% (12/19)、変異を有さない患者で

65% (13/20)であった。さらに、抗凝固療法を行わず妊娠帰結を得た患者で、妊娠帰結が化学流産および胎児染色体異常であった症例を除いた場合の妊娠成功率は、SNP5 変異を有する患者で 84.0% (63/75)、変異を有さない患者で 84.3% (97/115)であった。

#### 4 考察

ANXA5 の SNP5 は正常コントロール群と比較し不育症患者群では有意に多く認められ、これは先行研究と合致する結果であった。また、これらの SNP の遺伝形式が dominant model であることが統計学的に確認され、リスクアレルが一つでもあれば流産のリスクとなることが判明した。また、6 つの SNP は連鎖不平衡にあり強い相関関係が認められた。しかし、コホート研究の結果からは SNP5 のリスクアレルと次回妊娠帰結には有意な関連を認められなかった。

当院での不育症患者の原因検索の結果、これまで約 66%が原因不明といわれてきたが、実際には 41%が胎児の染色体異常であることが判明している。したがって真の原因不明流産は 25%であり、これらの原因不明に多数の遺伝子多型が含まれると考えられる。

本研究によって ANXA5 が不育症の易罹患性に関する遺伝子であることは確認されたが、これは多数の易罹患性に関する遺伝子の一つであり、ANXA5 の遺伝子変異を有することが必ずしも次回妊娠帰結を予測し得るものではないことが明らかになった。ANXA5 以外の複数の遺伝子変異の関連については今後の検討事項であるが、単独では臨床的な影響を及ぼさないものでも複数の変異の組み合わせにより大きな影響を及ぼす可能性は否定できない。

本研究結果より、不育症の診断および治療においては ANXA5 の遺伝子変異の測定意義は現時点では認められず、また ANXA5 の遺伝子変異を有する患者への抗凝固療法を行う科学的根拠は乏しいと考えられた。

論文審査の結果の要旨

【目的】 不育症とは妊娠はするが流産を繰り返し、生児が得られない疾患である。不育症の原因として抗リン脂質抗体症候群や子宮奇形、夫婦の染色体異常、胎児染色体異常など様々な要因が指摘されている。AnnexinA 5 (ANXA5) は胎盤や腎臓、肝臓などの各種臓器や血液、尿、唾液などの体液中に発現するタンパク質で、胎盤の Trophoblast 表面のリン脂質に結合し抗凝固性のシールドを形成し絨毛間腔での抗凝固作用を示す。この ANXA5 のプロモーター領域の変化によりプロモーター活性が低下し ANXA5 遺伝子の発現が低下することが報告されている。今回我々は日本人女性における ANXA5 の遺伝子多型と不育症の関連について検討した。

【方法】 ANXA5 のプロモーター領域の既知の 6 つの SNP について 264 人の原因不明不育症患者群と 195 人の対照群とで横断研究を行った。次に患者群において ANXA5 の SNP を含む複数の因子と次回妊娠帰結の関連を調べるコホート研究を行った。TaqManPCR 法により 6 つの SNP を検出した。各 SNP の詳細は以下に示す。rs112782763 (-467G > A, SNP1), rs28717001 (-448A > C, SNP2), rs28651243 (-422T > C, SNP3), rs113588187 (-373G > A, SNP4), rs1050606 (-302T > G, SNP5), rs11538099 (-1C > T, SNP6)

【結果】 SNP5 は dominant model において患者群では G が有意に高頻度であった (OR 1.47,  $p=0.049$ , 95%CI 1.00-2.17)。また 6 つの SNP 間で強い連鎖不平衡と有意な相関を認めた ( $r=0.962\sim 0.995$ )。次に先行研究と本研究のデータを統合し MAX 検定を行った結果、すべての SNP で dominant model が選択された。ハプロタイプ解析では G-A-T-G-T-C (patients vs controls: 75.9 % vs 80.3 %) が最も多く次いで G-A-T-G-G-C (12.1% vs 8.7 %) が多く認められた。すべてがマイナーアレルである A-C-C-A-G-T は 3 番目に多く認められたがこれら 3 つのハプロタイプは dominant model では患者群と正常コントロール群との間で有意差を認めなかった。

続いて患者群において、患者年齢、既往流産回数、既往分娩回数、SNP5 を因子として次回妊娠帰結との関連を検討する多変量解析を行った結果、5 回以上の流産回数は有意な関連を示したが (OR=6.0,  $p=0.05$ , 95%CI: 0.98-37.0)、その他は有意差を認めなかった。

さらに SNP5 の変異の有無と次回妊娠帰結について検討した。妊娠帰結が化学流産および胎児染色体異常であった症例を除いた場合の妊娠成功率は、SNP5 変異を有する患者で 84.0% (63/75)、変異を有さない患者で 84.3% (97/115) であった。

【考察】 ANXA5 の SNP5 は正常コントロール群と比較し、不育症患者群では有意に多く認められ、先行研究と合致する結果であった。また、これらの SNP の遺伝形式が dominant model であることが統計学的に確認され、リスクアレルが一つでもあれば流産のリスクとなることが判明した。しかし、コホート研究の結果からは SNP5 のリスクアレルと次回妊娠帰結には有意な関連を認められなかった。

本研究によって ANXA5 が不育症の易罹患性に関する遺伝子であることは確認されたが、これは多数の易罹患性に関する遺伝子の一つであり、ANXA5 のリスクアレルを有することが必ずしも次回妊娠帰結を予測し得るものではないことが明らかになった。

【審査の内容】 主査の鈴木から、横断研究のバイアス、その遺伝子の特殊性、dominant model とそれ以外の model の説明、横断研究とコホート研究の結果の違いの解釈、原因、今後の管理についてなど 4 項目、第一副査齋藤教授からは多型の機能、本研究と日本人のデータベースとの比較、臨床的に有用なプラットフォーム等 10 項目、第二副査の杉浦教授からは不育症と不妊症の臨床的管理についての質問があり、良好な回答が得られた。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。本研究結果より、不育症患者に対して ANXA5 の遺伝子多型を調べる意義は現時点では認められず、また ANXA5 のリスクアレルを有する患者への抗凝固療法を行う科学的根拠は乏しいと考えられた。本研究は「習慣流産遺伝子多型」の臨床的意味を明確にでき、患者らを安心させることができた点で意義のある研究といえる。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。