

B. 研究方法

北海道大学医学部附属病院泌尿器科で経過観察中の尿道下裂症例39人、泌尿器科疾患歴のない健康男子ボランティア99人を対象とした。インフォームドコンセントを経て、採血を行い、白血球からDNAを抽出し、SRD5A2（L89V、TA繰返し）多型とHSD17B3（G289S）多型を各々制限酵素RsaIによるPCR-RFLP法、PCR法、TaqMan法により判定し、尿道下裂との関連をロジスティック回帰分析により検討した。

（倫理面への配慮）

疫学調査は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。

C. 研究結果

SRD5A2遺伝子のL89V多型、TA繰返し多型およびHSD17B3遺伝子のG289S多型における各遺伝子型のオッズ比と95%信頼区間を表1に示した。SRD5A2遺伝子のL89V多型のL/L型に対するL/V型、V/V型のオッズ比（95%信頼区間）は、各々0.85（0.31-2.33）、0.65（0.18-2.33）であり、有意ではないがVアリルを多く持つ程、低下傾向が認められた。TA繰返し多型の0/0型に対する0/9型のオッズ比（95%信頼区間）は、1.08（0.48-2.43）であった。なお、9/9型は症例に存在しなかった。一方、HSD17B3遺伝子のG289S多型のG/G型に対するG/S型、S/S型のオッズ比（95%信頼区間）は、各々1.87（0.86-4.09）、3.91（1.16-13.2）であり、Sアリルを多く持つ程、増加傾向を示し、S/S型では有意のリスク上昇が認められた。

表1 スteroid代謝酵素遺伝子多型と尿道下裂リスク

遺伝子多型	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比* (95%信頼区間)
<i>SRD5A2 (L89V)</i>			
L/L	19.4	16.2	1.00
L/V	63.9	62.6	0.85(0.31-2.33)
V/V	16.7	21.2	0.65(0.18-2.33)
<i>SRD5A2 (TArepeat)</i>			
0/0	69.2	70.1	1.00
0/9	30.8	28.9	1.08(0.48-2.43)
<i>HSD17B3 (G289S)</i>			
G/G	39.5	58.8	1.00
G/S	44.2	35.1	1.87(0.86-4.09)
S/S	16.3	6.2	3.91(1.16-13.2)

*ロジスティック回帰分析

尿道下裂の症例をpenile type以下の軽症型で、停留精巣や他の奇形を合併しない症例（15例）と penoscrotal type以上の重症型あるいは、停留精巣や他の奇形を合併する症例（22例）に分け、同様の解析をしたものを表2、表3に示した。軽症型では、SRD5A2遺伝子のL89V多型のL/L型に対するL/V型、V/V型のオッズ比（95%信頼区間）は、各々0.36（0.10-1.29）、0.46（0.10-2.20）となり、全症例の場合よりもリスクの低下傾向が強まった。TA繰返し多型の0/0型に対する0/9型のオッズ比（95%信頼区間）は、1.21（0.38-3.87）であり、多少リスクの上昇傾向が強まった。一方、HSD17B3遺伝子のG289S多型のG/G型に対するG/S型、S/S型のオッズ比（95%信頼区間）は、各々3.77（1.08-13.2）、9.50（1.88-48.0）であり、全症例の場合よりもリスクの上昇の程度が強まり、G/S型、S/S型ともに有意のリスク上昇が認められた。重症および合併型尿道下裂症例では、いずれの遺伝子多型においても、有意な関連はみられなかった。

表2 ステロイド代謝酵素遺伝子多型と軽症型尿道下裂リスク

遺伝子多型	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比* (95%信頼区間)
<i>SRD5A2 (L89V)</i>			
L/L	33.3	16.2	1.00
L/V	46.7	62.6	0.36(0.10-1.29)
V/V	20.0	21.2	0.46(0.10-2.20)
<i>SRD5A2 (TArepeat)</i>			
0/0	66.7	70.1	1.00
0/9	33.3	28.9	1.21(0.38-3.87)
<i>HSD17B3 (G289S)</i>			
G/G	23.5	58.8	1.00
G/S	52.9	35.1	3.77(1.08-13.2)
S/S	23.5	6.2	9.50(1.88-48.0)

*ロジスティック回帰分析

表3 ステロイド代謝酵素遺伝子多型と重症および合併型尿道下裂リスク

遺伝子多型	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比* (95%信頼区間)
<i>SRD5A2 (L89V)</i>			
L/L	10.5	16.2	1.00
L/V	78.9	62.6	1.94(0.40-9.35)
V/V	10.5	21.2	0.76(0.10-6.01)
<i>SRD5A2 (TArepeat)</i>			
0/0	68.2	70.1	1.00
0/9	31.8	28.9	1.13(0.42-3.08)
<i>HSD17B3 (G289S)</i>			
G/G	50.0	58.8	1.00
G/S	36.4	35.1	1.22(0.45-3.33)
S/S	13.6	6.2	2.59(0.56-11.9)

*ロジスティック回帰分析

D. 考 察

性の分化と発達にはステロイド代謝酵素が大きい

な役割を果たしている。男性外性器の発達には、妊娠10週頃からのテストステロンの分泌とSRD5A2による5 α -ジヒドロテストステロン(DHT)の合成開始が必須である⁴。非常に稀なSRD5A2遺伝子とHSD17B3遺伝子の機能欠損型の変異では、DHTやテストステロンが合成されないため、ともに外性器は男性型外性器として発達できず、出生時には女性型を呈する⁵。一方、比較的高頻度にみられ、せいぜい軽微な機能変化しか伴わないSRD5A2遺伝子のAla49Thr、Leu89Val、TA繰返し多型とHSD17B3遺伝子のGry289Ser多型は、前立腺がんなどのリスク要因となることが知られている^{6,7}。このような多型を持つ胎児では、男性外性器の発達に十分なDHTやテストステロンは分泌されるが、泌尿生殖器系疾患の感受性素因となる可能性は考えられる。

米国で行われた81名の非家族性の尿道下裂症例を対象とした研究では、患児のうち7名(8.6%)にSRD5A2の変異が認められた⁸。これらのうち、Ala49Thrの変異が5名(6.2%)に認められ、Thrアリルの頻度は4.3%であった。Ala49Thrは一般集団でも存在する変異で、前立腺がんのリスク要因であるという報告もあるが、Thrアリルは健常人では0~3.0%の頻度なので⁶、尿道下裂でもリスク要因となる可能性は考えられる。しかし、日本人を含むアジア系人種では、この変異の存在は報告されていない⁶。SRD5A2遺伝子のL89V多型と尿道下裂との関連を示した報告はないが、Vアリルを持つ場合、酵素活性が上昇し、前立腺がんのリスクが高くなるのは、アンドロゲン優位の影響と考えられている⁹。尿道下裂の場合、有意ではないが逆にリスクの低下傾向が認められた。一方、HSD17B3遺伝子のG289S多型と尿道下裂、特に軽症型のリスクとの関連が示され、Sアリルを持つ場合、胎生期にアンドロゲン環境の変化をもたらすことが示唆された。

本研究では、HSD17B3遺伝子のG289S多型は、軽症型尿道下裂と強い関連がみられ、SRD5A2遺伝子のL89V多型でも、軽症型でリスクの低下傾向が強く、このようなステロイド代謝酵素遺伝子

多型は軽症型尿道下裂と密接な関連があることが示唆された。今後症例を増やし、さらに検討する必要があると考えられた。

E. 結 論

HSD17B3遺伝子のG289S多型では、Sアリルを多く持つ程、増加傾向を示し、S/S型（軽症型ではG/S型も）では有意のリスク上昇が認められ、Sアリルを持つ場合、胎生期にアンドロゲン環境の変化をもたらすことが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

笠井世津子、佐田文宏、倉橋典絵、川口真未、村雲雅志、柴田隆、柿崎秀宏、野々村克也、小柳知彦、岸玲子：「ステロイド代謝酵素遺伝子多型と尿道下裂リスク」、第74回日本衛生学会総会、東京（2004.3.24-27）

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. Feyaerts A, Forest MG, Morel Y, Mure PY, Morel-Journel N, Mallet D, Nicolino M, Chatelain P, David M, Mouriquand P. Endocrine screening in 32 consecutive patients with hypospadias. *J Urol* 168(2): 720-725, 2002.
2. Aaronson I, Cakmak MA, Key LL. Defects of the Testosterone Biosynthetic Pathway in Boys With Hypospadias. *Journal of Urology* 157(5):1884-1888, 1997.
3. 岸 玲子、小柳知彦、佐田文宏、笠井世津子、

倉橋典絵、野々村克也、柿崎秀宏、村雲雅志。尿道下裂患者のステロイド合成関連酵素 CYP17 遺伝子多型。厚生労働科学研究費補助金食品・化学物質安全総合研究事業「前向きコホート研究による先天異常モニタリング、特に尿道下裂、停留精巣のリスク要因と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明」平成 14 年度総括・分担研究報告書, 36-41, 2003.

4. Sultan C, Paris F, Terouanne B, Balaguer P, Georget V, Poujol N, Jeandel C, Lumbroso S, Nicolas JC. Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Hum Reprod Update* 7(3): 314- 322, 2001.
5. Wilson JD. Androgens, androgen receptors, and male gender role behavior. *Horm Behav* 40(2): 358-366, 2001.
6. Ntais C, Polycarpou A, Ioannidis JP. SRD5A2 gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12(7): 618- 624, 2003.
7. Margiotti K, Kim E, Pearce CL, Spera E, Novelli G, Reichardt JK. Association of the G289S single nucleotide polymorphism in the HSD17B3 gene with prostate cancer in Italian men. *Prostate* 53(1):65-68, 2002.
8. Silver RI, Russell DW. 5alpha-reductase type 2 mutations are present in some boys with isolated hypospadias. *J Urol*. 162(3 Pt 2):1142-5, 1999.
9. Li Z, Habuchi T, Mitsumori K, Kamoto T, Kinoshita H, Segawa T, Ogawa O, Kato T. Association of V89L SRD5A2 polymorphism with prostate cancer development in a Japanese population. *J Urol* 169(6):2378-2381, 2003.

尿道下裂術後長期例における精巣容積に関する研究

分担研究者 野々村克也 北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野教授

研究要旨

われわれはこれまでに尿道下裂患児の内分泌環境に関する症例対照研究を行い、尿道下裂症例では思春期前の段階から既に何らかの程度の精巣機能障害が存在することを明らかにしてきた。今回は尿道下裂術後長期例の精巣容積について検討し、本邦における精巣容積曲線と比較した。

1983年以後の20年間に当科で尿道形成術を施行した447例中、術後7～17年経過した14例（術後平均11.8年）において精巣容積を計測した。精巣容積評価時の年齢は11～22歳で、精巣容積は9～20 mlであった。本邦における精巣容積曲線の-2SD以下の萎縮精巣が14例中1例、28精巣中2精巣（7.1%）で認められた。今後は尿道下裂術後の成人例を対象として、精巣機能や射精機能について調査し、尿道下裂における男性機能の長期予後を検討して行く必要があると思われる。

研究協力者

柿崎秀宏

北海道大学腎泌尿器外科 助教授

柴田 隆

北海道大学病院泌尿器科 講師

古野剛史

北海道大学腎泌尿器外科大学院生

とともに、術後長期での観察を呼び掛ける手紙を郵送し、外来受診を促した。

精巣容積の測定は、オルキオメーターを用いて行った。本邦における精巣容積曲線[1]を用いて、-2SD以下を萎縮精巣と判定した。

（倫理面への配慮）

精巣容積の計測は、精巣機能評価の点から重要な診察項目のひとつであることを十分に説明した。その上で本研究への参加は本人の自由意思、あるいは患者が未成年者の場合には両親の自由意思によるものであること、もし研究への参加に同意しない場合でも、今後診療上のいかなる不利益も受けないこと、を外来担当医から十分に説明し、インフォームドコンセントを得てから診察を行った。

A. 研究目的

尿道下裂は男子外性器異常の中で頻度が高い疾患のひとつである。尿道下裂の成因については未だ不明の点が多く、近年では内分泌かく乱物質の関与も推測されている。尿道下裂発生の背景因子を解析する目的で、われわれはこれまでに尿道下裂患児の内分泌環境に関する症例対照研究を行い、尿道下裂症例では思春期前の段階から既に何らかの程度の精巣機能障害が存在することを明らかにしてきた。今回は尿道下裂術後長期例の精巣容積を計測し、本邦における精巣容積曲線と比較することで、精巣の発育に関する長期経過について検討した。

B. 研究方法

1983年以降当科で尿道形成術を施行された447名の患者のリストを作成した。患者カルテの調査

C. 研究結果

術後7～17年経過した14例（術後平均11.8年、中央値11年）において精巣容積を計測した。この14例における尿道下裂の程度は、近位型7例、遠位型7例であった。14例中2例において合併する停留精巣に対し、精巣固定術が施行されていた（両側1例、片側1例）。精巣容積評価時の年齢は11～22歳（平均15.3歳、中央値14歳）で、精巣容積は9～20 mlであった。本邦における精巣容積曲線の-2SD以下の萎縮精巣が14例中1例、28精巣中

2精巣（7.1%）で認められた。萎縮精巣を認めた1例は近位型尿道下裂例で、片側停留精巣に対し精巣固定術の既往があり、22歳時で患側精巣は10 ml、対側精巣は9 mlであった。

D. 考 察

陰茎勃起時の陰茎索変形、立位排尿困難などの尿道下裂に伴う諸問題は、尿道下裂に対する尿道形成術の進歩により1回の手術で高率に解決されるようになり、外見的にも満足のいく外陰が形成可能となった。しかし幼小児期の尿道下裂例では、精巣機能に何らかの障害、特にテストステロン分泌に関係するライディヒ細胞の機能障害が存在することが指摘されており、これらの精巣機能障害は尿道下裂の程度が高いものほど顕著であるとされている。一方、尿道下裂症例の思春期後の内分泌環境については国内外を問わず報告がなく、尿道下裂症例の術後長期経過観察が現実的に極めて困難であることを物語っている。尿道下裂に伴う潜在的男性機能障害の長期予後については、術後の特に成人例を対象とした調査により明らかにされる必要がある。今後は、手術時に長期経過観察の必要性を両親によく説明し、思春期以降は本人にもその重要性を理解させて、前向きに術後長期経過を調査する必要があると考えられる。

尿道下裂症例の約27%に未熟児あるいは低出生体重児が認められるが、出生後の発育・成長という面から尿道下裂症例を観察すると、手術時には年齢相当の健常児と比較し、身長、体重とも有意差を認めないことから、尿道下裂症例は全身的発育という面では基本的に障害が無いことが確認されている。これが精巣機能を含めた男性機能にもあてはまるかどうかは不明であり、今回は術後長期での段階における精巣容積に関する検討を行った。長期経過観察の困難性を反映して、調査しえた症例は14例に過ぎなかったが、14例中13例、93%では精巣容積の明らかな減少は観察されなかった。しかし精巣容積の減少がないということは精巣機能障害がないことを保障しないため、精巣機能の評価のためには、血中テストステロン濃

度、hCG刺激に対するテストステロンの反応性、造精能など詳細な検査が必須である。今後は、前向きに研究を重ね、尿道下裂症例における男性機能の長期予後を明らかにする必要があると思われる。

一方、今回の検討で精巣萎縮が観察された1例はもともと高度の尿道下裂があり、かつ片側ながら停留精巣を合併した例であった。このような精巣機能障害のリスクの高い症例においては、陰茎の発育自体も影響を受ける可能性も憂慮される。精巣機能障害のハイリスク例に対しては、思春期前後を通じて経過をよく観察し、必要に応じてホルモン補充を行うなど治療面でも配慮することが重要であろう。

E. 結 論

過去20年間に当科で尿道形成術を施行した447例中、術後7～17年経過した14例において精巣容積を計測した。本邦における精巣容積曲線の-2SD以下の萎縮精巣が14例中1例、28精巣中2精巣（7.1%）で認められた。今後は尿道下裂術後の成人例を対象として、精巣機能や射精機能について調査し、尿道下裂における男性機能の長期予後を検討して行く必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

野々村克也、柿崎秀宏、柴田 隆、守屋仁彦：混合型生殖腺形成異常症，日本臨床 62(2): 313, 2004

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

なし

H. 参考文献

[1] 中村 享：日本人男子の性器系の発育と成熟.

日泌尿会誌 52: 172, 1961

カフェイン摂取、異物代謝酵素遺伝子多型と不育症リスク

分担研究者 佐田 文宏 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野助教授
水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野教授
主任研究者 岸 玲子 北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授

研究要旨

カフェイン摂取・CYP1A2遺伝子多型と不育症との関連を明らかにすることを目的に本研究を行った。北大附属病院産科を受診した不育症患者81人、健常経産婦226人に、生活習慣、食事、職業、居住環境などに関する質問紙調査票を郵送し、各々53人（回答率65.4%）、144人（回答率63.7%）から回答を得た。また、受診時に、採血を行い、白血球よりDNAを抽出し、PCR-RFLP法により、CYP1A2遺伝子型を判定した。不育症例では、対照に比べカフェインを多く摂取する傾向がみられた。CYP1A2遺伝子のCYP1A2遺伝子のCYP1A2*1F(C731A)多型のAA型（活性上昇型）において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不育症のリスクの上昇がみられ、1日当たりの平均カフェイン摂取量が300mg以上で、オッズ比5.22（95%信頼区間1.02-26.2）の有意のリスクの上昇がみられた。これまでのカフェイン摂取と不育症に関する報告を支持するとともに遺伝要因と環境要因の交互作用とCYP1A2酵素の代謝産物が不育症の発症に関連があることが示唆された。

研究協力者

山田 秀人

北海道大学大学院医学研究科
生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野
助教授

西條 泰明、鈴木 佳奈

北海道大学大学院医学研究科
予防医学講座公衆衛生学分野

平山 恵美

北海道大学医学部附属病院
周産母子センター

ると考えられている⁶。CYP1A2はカフェインの代謝に関与する酵素の一種であり、CYP1A2活性と不育症リスクとの関連を示した報告もある⁷。本研究では、カフェイン摂取・CYP1A2遺伝子多型と不育症との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

北大附属病院産科を受診した不育症患者81人、健常経産婦226人に、生活習慣、食事、職業、居住環境などに関する質問紙調査票を郵送し、各々53人（回答率65.4%）、144人（回答率63.7%）から回答を得た。また、受診時に、採血を行い、白血球よりDNAを抽出し、PCR-RFLP法により、CYP1A2遺伝子型を判定した。ロジスティック回帰分析により、オッズ比と95%信頼区間を求めた。統計解析にはSPSSウィンドウズ版を用いた。

（倫理面への配慮）

疫学調査は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究

A. 研究目的

これまでに行われた疫学研究の結果から、カフェインの摂取と不育症発症との有意な関連が示唆されている^{1,4}。CYP1A2遺伝子にはいくつかの遺伝子多型が知られており、その中には機能に影響を及ぼすものも含まれている^{5,6}。5' -上流プロモーター領域にあるCYP1A2*1C (G-2964A) は誘導性の低下と関連し⁵、イントロン1にあるCYP1A2*1F (C731A) は誘導性の増大と関係す

究に関する倫理指針」に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮した。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。

C. 研究結果

不育症例では、対照に比べ、カフェインを多く摂取する傾向がみられ、1日当たりカフェインを300mg以上摂取する場合、不育症に対するオッズ比は2.61と上昇するが、有意ではなかった(表1)。CYP1A2遺伝子のCYP1A2*1C多型のAA型(活性低下型)は不育症例にはみられず、他の遺伝子型には、有意なリスクの変化はみられなかった(表2)。CYP1A2遺伝子のCYP1A2*1F多型のAA型(活性上昇型)において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不育症のリスクの上昇がみられ、1日当たりの平均カフェイン摂取量が300mg以上で、オッズ比5.22(95%信頼区間1.02-26.2)の有意のリスクの上昇がみられた(表3)。

表1 不育症例と対照における1日当たりの平均カフェイン摂取量

カフェイン摂取量(mg/day)	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比* (95%信頼区間)
0-99	35.8	47.2	1.00
100-299	47.2	43.8	1.40(0.69-2.84)
≥300	17.0	9.0	2.61(0.94-7.25)
			P for trend 0.07

*年齢調整ロジスティック回帰分析

表2 不育症例と対照におけるCYP1A2遺伝子型

CYP1A2 遺伝子型	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比* (95%信頼区間)
<i>CYP1A2*1C</i>			
GG	53.1	64.7	1.00
GA	46.9	31.7	1.88(0.95-3.71)
AA	0	3.6	—
<i>CYP1A2*1F</i>			
CC	7.8	8.3	1.00
CA	51.0	43.1	1.21(0.35-4.14)
AA	41.2	48.6	0.99(0.28-3.43)

*年齢調整ロジスティック回帰分析

表3 CYP1A2*1F多型の1日当たりの平均カフェイン摂取量

CYP1A2*1F多型のカフェイン摂取量(mg/day)	症例 (%)	対照 (%)	オッズ比* (95%信頼区間)
CC/CA (低活性)			
0-99	43.3	44.6	1.00
100-299	40.0	45.9	0.87(0.34-2.23)
≥300	16.7	9.5	1.68(0.44-6.43)
AA (高活性)			
0-99	25.0	50.0	1.00
100-299	55.0	41.4	2.63(0.81-8.52)
≥300	10.0	8.6	5.22(1.02-26.7)
			P for trend 0.03

*年齢調整ロジスティック回帰分析

D. 考察

これまでの疫学研究から、カフェイン摂取量が多い程、カフェイン代謝酵素CYP1A2の活性が高いほど、不育症のリスクが高くなることが報告されていたが、本研究では、酵素活性が高いと考えられている遺伝子型(CYP1A2*1F多型AA型)で、カフェイン摂取量が多くなると不育症のリスクが高くなることを示した。これらの結果はこれまでの報告を支持するとともに遺伝要因と環境要因の

交互作用とCYP1A2の代謝産物が不育症の発症に関連があることが示唆された。

E. 結 論

不育症例では、対照に比べカフェインを多く摂取する傾向がみられた。CYP1A2遺伝子のCYP1A2遺伝子のCYP1A2*1F(C731A)多型のAA型（活性上昇型）において、カフェイン摂取量が多くなるにつれて、不育症のリスクの上昇がみられ、1日当たりの平均カフェイン摂取量が300mg以上で、オッズ比5.22（95%信頼区間1.02-26.2）の有意のリスクの上昇がみられた。これらにより遺伝要因と環境要因の交互作用とCYP1A2酵素の代謝産物が不育症の発症に関連があることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sata F, Yamada H, Yamada A, Kato EH, Kataoka S, Saijo Y, Kondo T, Tamaki J, Minakami H, Kishi R. A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 9(11):725-728, 2003.
2. Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Yamada T, Kishi R, Minakami H. A polymorphism in the CYP17 gene and intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod* 10(1):49-53, 2004.
3. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kishi R. Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the interleukin-6 gene and the risk of recurrent pregnancy loss in Japanese women. *Fertil Steril* 81(2):374-378, 2004.

4. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kataoka S, Shimada S, Morikawa M, Minakami H, Kishi R. Interleukin-4 gene polymorphism is not involved in the risk of recurrent pregnancy loss, submitted.

2. 学会発表

1. Sata F, Yamada H, Yamada A, Kato EH, Kataoka S, Saijo Y, Kondo T, Minakami H, and Kishi R: A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss. 15th Conference of the International Society for Environmental Epidemiology, Perth (2003.9.23-26)
2. 山田秀人, 佐田文宏, 西條泰明, 平山恵美, 島田茂樹, 森川 守, 岸 玲子, 水上尚典: 「習慣流産と遺伝子多型: GSTM1, IL-6, CYP17」、第 18 回日本生殖免疫学会、山口 (2003.11.28)
3. 佐田文宏, 鈴木佳奈, 近藤朋子, 西條泰明, 平山恵美, 山田秀人, 水上尚典, 岸玲子: 「カフェイン摂取、CYP1A2 遺伝子多型と不育症リスク」、第 74 回日本衛生学会総会、東京 (2004.3.24-27)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. Cnattingius S, Signorello LB, Anneren G, Clausson B, Ekblom A, Ljunger E, Blot WJ, McLaughlin JK, Petersson G, Rane A, Granath F. Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 2000;343(25):1839-45.
2. Dlugosz L, Belanger K, Hellenbrand K, Holford TR, Leaderer B, Bracken MB. Maternal caffeine consumption and spontaneous abortion: a prospective cohort study. *Epidemiology*. 1996;7(3):250-5.
3. Infante-Rivard C, Fernandez A, Gauthier R,

- David M, Rivard GE. Fetal loss associated with caffeine intake before and during pregnancy. *JAMA*. 1993;270(24):2940-3.
4. Armstrong BG, McDonald AD, Sloan M. Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Public Health*. 1992;82(1):85-7.
 5. Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem (Tokyo)*. 1999;125(4):803-8.
 6. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47(4):445-9.
 7. Signorello LB, Nordmark A, Granath F, Blot WJ, McLaughlin JK, Anneren G, Lundgren S, Ekbohm A, Rane A, Cnattingius S. Caffeine metabolism and the risk of spontaneous abortion of normal karyotype fetuses. *Obstet Gynecol*. 2001;98(6):1059-66.

前向きコホート研究による先天異常モニタリング, 特に尿道下裂, 停留精巣の リスク要因と内分泌かく乱物質に対する感受性の解明 不育症に関わる免疫学的異常と子宮内胎児発育遅延に関わる遺伝学的因子の解明

分担研究者 水上 尚典 北海道大学大学院医学研究科 教授（生殖・発達医学講座産科・生殖医学分野）

研究要旨

正常の生殖機構および免疫学的生殖不全, 特に習慣流産における, NK細胞, NKT細胞, Th1/Th2サイトカインバランスの役割を解明することを目的とした。また, 子宮内胎児発育遅延の遺伝学的因子の解明を目的に各種遺伝子多型を解析した。

子宮内膜中NK細胞数, NKT細胞比率には差異を認めなかったが, 習慣流産女性 (n=20) では, コントロール (n=17) に比較して子宮内膜中CD3+ 細胞, CD4+IFN- γ +細胞, CD4+TNF- α +細胞比率が有意に低値であった。Th1/Th2バランスは両群間で差異を認めなかった。

染色体正常流産ないし化学妊娠に至った17人の非妊娠時NK細胞活性/細胞比率は, 生産に至った59人に比較し有意に高く, 染色体異常流産に至った9人と同レベルであった。非妊娠時の高NK細胞活性 (>46%) /高細胞比率 (>16.4%) は, その後の妊娠における染色体正常流産ないし化学妊娠の予知因子 (相対危険率3.6/4.9) であることを明らかにした。

習慣流産患者のNK細胞におけるCD158a発現は, コントロールに比較して有意に低値を示した。perforin, CD94, CD161, CD158b, CD244発現は両群間で差異はなかった。NK細胞で抑制型レセプターであるKIR2DL1 (CD158a) の発現低下が認められ, 習慣流産の病因に関連していると考えられる。

CYP17A1 alleleホモ型 (n=44) のIUGR頻度は, A2 allele キャリア (n=90) の頻度に比較して有意に高かった (OR =3.41)。また, GSTM1 null型 (n=67) の分娩週数は, GSTM1 presence (n=67) に比較して有意に早かった。Cytochrome P450c17 α enzymeをコードするCYP17遺伝子多型がIUGRの病因に関連することを解明した。

研究協力者

山田 秀人

北海道大学大学院医学研究科

して, 内分泌攪乱物質が注目されている。

また, 子宮内胎児発育遅延では, その成因に遺伝学的因子および内分泌攪乱物質を含めた生活環境因子が関与するものと考えられている。

本研究の目的は, 正常の生殖機構および免疫学的生殖不全, 特に習慣流産における, NK細胞, NKT細胞, Th1/Th2サイトカインバランスの役割を解明することを目的とした。また, 子宮内胎児発育遅延の遺伝学的因子の解明を目的に各種遺伝子多型を解析した。

A. 研究目的

生殖医学領域において, 遺伝的要因と後天的環境要因が交絡して発症する生活習慣病が存在する。特に不育症 (習慣流産) は, その発症機構に遺伝的因子, 環境因子が関与し, さらに何らかの免疫学的異常が強く関与することが強く示唆されている。また近年, 各種サイトカインやTh1/Th2細胞, NK・NKT細胞などの異常が習慣流産など免疫学的生殖不全に関与することが明らかになりつつある。これらの免疫学的異常を惹起する環境因子と

B. 研究方法

1) 習慣流産 20 人と正常女性 17 人における黄体期中期の子宮内膜中 CD56+NK 細胞数,

CD3+CD4-CD8-TCRV α 24+V β 11+NKT 細胞数, CD4+細胞における細胞内 IFN- γ , IL-4, TNF- α 発現をフローサイトメーター法 (FCM) で調べ比較した。

- 2) 習慣流産患者 113 人における非妊娠時末梢血中の NK 細胞活性 (Cr 遊離法), 細胞比率 (FCM) とその後の妊娠の帰結との関連を前方視的に検討した。
- 3) 習慣流産 20 人と正常女性 15 人における末梢血 CD3-CD56+NK 細胞マーカー, perforin, CD94, CD161, CD158a, CD158b, CD244 を解析 (FCM) した。
- 4) コホート研究として, 北大で 24 週をこえて出産した 134 女性から末梢血 DNA を採取し, PCR/PCR-RFLP 法による各種遺伝子多型: CYP1A1 (MspI), CYP17 (MspAI), GSTP1 (BsmAI), GSTM1 (presence/null), GSTT1 (presence/null) と出生体重, 分娩週数, 子宮内胎児発育遅延 (IUGR) 頻度, 早産頻度, 妊娠中毒症頻度との関係を調べた。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントは, 研究実施時点で北海道大学で通例行われている方法に則り, 患者または家族が研究への参加を自発的に中止しても不利益にならないよう配慮する。対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払い, 対象者が研究に参加することによって不利益を被ることがないよう配慮する。

C. 結 果

- 1) 子宮内膜中 NK 細胞数, NKT 細胞比率には差異を認めなかった。習慣流産女性では, コントロールに比較して CD3+ 細胞 (平均 40.3 vs. 56.5%), CD4+IFN- γ +細胞 (28.4 vs. 39.5%), および CD4+TNF- α +細胞 (32.9 vs. 45.8%) 比率が有意に低値であった。Th1/Th2 バランスは両群間で差異を認めなかった。習慣流産患者の子宮内膜では, Th1 優位, NK 細胞, NKT 細胞異常などは認められず, これは従来

の仮説と異なり, Th 細胞の減少, つまり immunodystrophism が病因に関連していることが初めて示された。(Shimada et al., Hum Reprod, 2004)

- 2) 習慣流産患者 85 人がその後妊娠した。染色体正常流産ないし化学妊娠に至った 17 人の非妊娠時 NK 細胞活性/細胞比率 (平均 47%/17.1%) は, 生産に至った 59 人の 33%/13.1% に比較し有意に高く, 染色体異常流産に至った 9 人の 27%/15.7% は生産群と同レベルであった。ROC 解析からカットオフ値をそれぞれ設定した。非妊娠時の高 NK 細胞活性 (>46%) /高細胞比率 (>16.4%) は, その後の妊娠における染色体正常流産ないし化学妊娠の予知因子 (相対危険率 3.6, 95%CI 1.6-8.0/4.9, 1.7-13.8) であることが初めて明らかとなった。(Yamada et al., Am J Reprod Immunol, 2003)。
- 3) 習慣流産患者の NK 細胞における CD158a 発現は, コントロールに比較して有意に低値 (平均 22.9% vs. 33.6%) を示した。perforin, CD94, CD161, CD158b, CD244 発現は両群間で差異はなかった。NK 細胞で抑制型レセプターである KIR2DL1 (CD158a) の発現低下が認められ, 習慣流産の病因に関連していることが初めて示唆された。(Yamada et al., Am J Reprod Immunol, 2004)。
- 4) CYP17 A1 allele ホモ型 (A1A1) (n=44) の IUGR 頻度 (<10th percentile/< -1.5 SD; 22.7%/11.4%) は, A2 allele キャリア (A1A2/A2A2) (n=90) の頻度 (7.8%/2.2%) に比較して有意に高かった (OR =3.41, 95% CI = 1.18-9.84)。また, GSTM1 null 型 (n=67) の分娩週数 (Mean \pm SD, 37.5 \pm 3.1 週) は, GSTM1 presence (n=67) の週数 (38.5 \pm 2.4 週) に比較して有意に早かった。Cytochrome P450c17 α enzyme をコードする CYP17 遺伝子多型が IUGR の病因に関連していることが初めて明らかとなった。(Yamada et al., Mol Hum Reprod, 2004; Yamada et al., Semin

Thromb Hemost, 2004).

D. 考 案

現在、習慣流産の発症機構に種々の免疫学的異常が関与していることが明らかとなりつつある。非妊娠時に比べて、妊娠中にTh2優位になることが、通常の妊娠維持に重要であると仮説されてきた。この仮説に従い、習慣流産女性ではTh1優位の病態が存在すると推察されてきた。我々は、14年度の研究により習慣流産女性では非妊娠時の末梢血レベルでTh2, Tc2優位であることを明らかにし、今回15年度の研究では、子宮内膜レベルで、Th細胞の減少（immunodystrophism）が病因に関連していることを解明した。これらの成果は、従来の仮説を覆すものであり、生殖免疫学領域の学究に与えた影響は大きい。一方、非妊娠時のNK細胞高活性／高比率がその後の染色体正常流産と関連し、染色体異常流産とは関連しなかったことから、このNK細胞異常が流産の原因として強く示唆された。あわせてNK細胞上の抑制型レセプターの減弱が高活性を惹起するものと推察される。今後は脱着膜内でのTh細胞、NK細胞と表面マーカーを解析して、さらに論拠を固めたい。

これまで、IUGRの病因には遺伝学的因子と生活環境因子が交絡して関与していると推察されていた。Thrombophilia (FV Leiden, プロトロンビン, MTHFR), 毒物代謝酵素 (CYP1A1), 成長因子 (IGF-1), アンジオテンシノーゲンなどの変異や多型がIUGRと関連することが2001~2003年にかけて相次いで報告された。今回我々は、cytochrome P450c17aenzymeをコードするCYP17遺伝子多型がIUGRの病因に関連していることを初めて明らかにした。P450c17aenzymeは17 α -hydroxylaseと17,20-lyase活性をもち、pregnenoloneから17 α -OH-pregnenolon, dehydroepiandrosterone (DHEA)を誘導する。DHEAはandrostenedione, estroneの前駆体である。CYP17 A1 alleleホモ型ではestrogen産生が低下すると推察されており、妊娠中の低estrogenレベルが胎盤を介してIUGRを惹起するものと考えられる。

E. 結 論

習慣流産の発症機構に、末梢血レベルでのTh2/Tc2優位、NK細胞高活性／高比率とKIR2DL1発現の減弱、子宮内膜レベルでのTh細胞の減少（immunodystrophism）が関連することを解明した。Cytochrome P450c17 α enzymeをコードするCYP17遺伝子多型がIUGRの病因に関連していることを初めて明らかにした。今後は、習慣流産、IUGR発症に関わる環境因子として内分泌攪乱物質と免疫学的異常との関連をさらに解明する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Iwabuchi K, Minakami H: Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: Increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. Am J Reprod Immunol 2003; 49: 84-89.

Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Shimada S, Sakuragi N, Fujimoto S, Minakami H: Live birth rate varies with gestational history and etiology in women experiencing recurrent spontaneous abortion. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2003; 109: 21-26.

Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Saito H, Watari M, Minakami H, Nishihira J: Decreased serum levels of macrophage migration inhibition factor in miscarriages with normal chromosome karyotype. Hum Reprod 2003; 18: 616-620.

Ohta K, Kobashi G, Hata A, Yamada H, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K, Tamashiro H: Association between a variant of the glutathion S-transferase P1 (GSTP1) gene and hypertension in pregnancy in Japanese: Interaction with parity, age and genetic factors. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 653-660.

Shimada S, Iwabuchi K, Watano K, Shimizu H, Yamada H, Minakami H, Onoe K: Expression of allograft inflammatory factor-1 in mouse uterus and poly (I:C)-induced fetal resorption. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 104-112.

Shimada S, Iwabuchi K, Kato EH, Morikawa M, Sakuragi N, Onoe K, Minakami H, Yamada H: No difference in natural-killer-T cell population, but Th2/Tc2 predominance in peripheral blood of recurrent aborters. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 334-339.

Morikawa M, Yamada H, Okuyama K, Kato EH, Watari M, Kataoka S, Cho K, Minakami H: Prenatal diagnosis and fetal therapy of congenital cystic adenomatoid malformation of the lung: a report of five cases. *Congenital Anomalies* 2003; 43: 72-78.

Yamada H, Atsumi T, Kato EH, Shimada S, Morikawa M, Minakami H: Prevalence of diverse anti-phospholipid antibodies in women with recurrent abortion. *Fertil Steril* 2003; 80: 1276-1278.

Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H: Preconceptional natural-killer-cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50:

351-354.

Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Yamada T, Kishi R, Minakami H: A polymorphism in the CYP17 gene and intrauterine fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 49-53.

Yamada H, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Ebina Y, Sakuragi N, Suzuki S, Minakami H: Anti-cardiolipin β 2-glycoprotein I antibody: Is a high titer related to pregnancy complication? *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 639-644.

Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Sata F, Kishi R, Minakami H: Circulating cytokines during early pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2004; 79

Yamada H, Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoe K, Minakami H: Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology. *Am J Reprod Immunol* (2004, in press)

Shimada S, Kato EH, Morikawa M, Iwabuchi K, Nishida R, Kishi R, Onoe K, Minakami H, Yamada H: No difference in natural-killer or natural-killer-T cell population, but aberrant T helper population in the endometrium of women with repeated miscarriage. *Hum Reprod* (2004, in press)

Kobashi G, Hata A, Ohta K, Yamada H, Kato EH, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K: A1166C variant of angiotensin II type 1 receptor gene is associated with severe

hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. *J Hum Genet* (2004, in press)

Kataoka S, Sawai H, Yamada H, Kanazawa N, Koyama K, Nishimura G, Morikawa M, Sakuragi N, Minakami H: Radiographic and genetic diagnosis of sporadic hypochondroplasia early in the neonatal period. *Prenatal Diag* (2004, in press)

Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H: Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost* (2004, in press)

山田秀人, 森川 守, 島田茂樹:
免疫グロブリン大量療法, 今日の生殖医療,
産婦人科治療, 増刊号88(3), 101-104, 2004

2. 学会発表

Yamada H, Sata F, Kato EH, Saijo Y, Kataoka S, Morikawa M, Shimada S, Kishi R, Minakami H:
A polymorphism in the CYP17 gene and fetal growth restriction.
6th World Congress of Perinatal Medicine,
(September 13-16, Osaka) 2003

山田秀人:
自己免疫疾患合併妊娠の管理,
北海道産婦人科医会学術研修会, 学術研修講演(札幌, 6月14日) 2003年

山田秀人, 佐田文宏, 西條泰明, 平山恵美, 島田茂樹, 森川 守, 岸 玲子, 水上尚典:
習慣流産と遺伝子多型: GSTM1, CYP17, IL-6,
第18回日本生殖免疫学会, (山口, 11月28-29日)
2003年

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

妊娠中毒症の病態解析に関する研究

分担研究者 工藤 隆一 札幌医科大学医学部産婦人科

研究要旨

妊娠中毒症は、臨床的には妊娠中に高血圧・蛋白尿・浮腫の1つもしくは2つ以上の症状が見られ、かつこれらの症状が単なる妊娠偶発合併症によるものではないものと定義されている。妊娠中毒症の病態を研究するにあたり、我々は胎盤の詳細な検討、胎盤絨毛細胞培養および絨毛細胞モデルを用いて、低酸素条件下においての変化が予想される老化抑制遺伝子*klotho*と、aromatases P450 (CYP19)の発現様式について検討する。

研究協力者

林 卓宏、遠藤俊明、北島義盛、林 巧
札幌医科大学医学部産婦人科

A. 研究目的

妊娠中毒症は、臨床的には妊娠中に高血圧・蛋白尿・浮腫の1つもしくは2つ以上の症状が見られ、かつこれらの症状が単なる妊娠偶発合併症によるものではないものと定義されている。これら症状は、一般的に胎盤が子宮内に存在することによって生じ、胎盤が娩出された分娩後に軽快する疾患と解釈され、病態生理学的には「placental trigger」と考えられている。また、胎児の存在しない絨毛性疾患においても妊娠中毒症が観察されることより、胎盤と妊娠中毒症の密接な関連が容易に推測される。従って、妊娠中毒症を理解するためのひとつの手法として、胎盤あるいは絨毛細胞を用いた基礎的研究が非常に重要であると考えられる。

胎盤を構成している細胞のうち、特にcytotrophoblast(CT)から分化したsyncytiotrophoblast(ST)は直接母体血と接することより、母体とのガス交換や物質交換にとって非常に重要であり、このことは血管内皮細胞と同様の役割を果たしていると考えられる。また、ST細胞は、胎児の成長に必要な不可欠なホルモン産生や妊娠維持のために重要な物質の産生を行っている。妊娠中毒症胎盤では胎盤に還流する母体血流の低下により低酸素もし

くはhypoxia-reoxygenationがもたらされることから、これら胎盤絨毛細胞の分化異常それに伴うステロイドホルモンや種々の遺伝子発現変化が報告されている。今回我々は、ST細胞から分泌される内皮細胞保護作用を有する老化抑制遺伝子*klotho*と、C₁₉ステロイドをエストロゲンに変換するaromatases P450(CYP19)の発現様式を中心に検討する。

B. 研究方法

B-1)妊娠中毒症および正常胎盤の採取

全例、帝王切開による分娩時に、無菌的に胎盤を採取し、採取より15分以内に液体窒素下に凍結・保存もしくは直ちに絨毛細胞培養のためKlimanらの方法に準じた処理を行う。一部は組織学的検討のため、凍結およびパラフィン包埋に供する。

B-2)細胞培養法

培養実験として、上記絨毛細胞のほかに絨毛モデルとして絨毛癌細胞株(BeWo)を用いる。培養条件は低酸素培養(酸素濃度5%以下)下での培養とair condition下での培養を比較検討する。また、hypoxic-reoxygenation条件での培養も行う。

B-3)遺伝子解析

摘出物および培養細胞のCYP19および*klotho* mRNA発現をNorthern blot、in situ

hybridizationおよびreal time RT-PCR法を用いて定量・局在に関し検索する。

B-4)関連蛋白解析

*CYP19*発現を抑制する human Mash-2 (mammalian achaete/scute homologue 2)と2種類のKlotho蛋白発現・局在につき、Western blottおよび免疫組織染色を施行する。

B-5)機能評価実験

それぞれの遺伝子につきアンチセンス実験や他の抑制遺伝子発現により、細胞の生存率や分化状況・ホルモン産生能の変化を解析する。また、これとは反対に、過剰発現させた場合の機能変化についても検討する。

(倫理面への配慮)

胎盤採取の際、本人および家族からの了解を文書あるいは口頭にて得ている。

C. 研究結果

現在までの予備実験で、2種類の*klotho*遺伝子(membrane-bound formとsecreted form)発現において、どちらのタイプにおいても正常胎盤と妊娠中毒症胎盤との間にm-RNAレベルでの差はなく、どちらもsecreted formが有意に発現していることが判明した。Klotho蛋白もこれらm-RNAがコードする2種類membrane formとsecreted formの存在が確認されており、これらはさらに2種類のdomein(hKL1とhKL2)により構成されている。membrane formはhKL1とhKL2両者により、またsecreted formはhKL1のみで構成されており、膜と結合しているdomeinはhKL2である。予備実験ではhKL2が妊娠中毒症胎盤で有意に発現しており、一方でhKL1の発現は正常・妊娠中毒症胎盤においても認められなかった。免疫組織学的検討ではhKL2が妊娠中毒症胎盤syncytiotrophoblastに強い染色を認めた。

D. 考 察

*klotho*遺伝子解析で、胎盤全体でsecreted form

が有意に発現していることは、ほかの組織においてもsecreted formが有意に発現しているとされている報告に一致した。また、慢性腎不全・高血圧症・糖尿病などの循環不全が慢性的に経過する疾患において、腎臓などの臓器で*klotho*遺伝子発現が著明に減少していることとする報告から、妊娠中毒症の病態は急性の循環不全であると考えられた。

蛋白の検索では、hKL2が妊娠中毒症胎盤で有意に発現しており、一方でhKL1の発現は正常・妊娠中毒症胎盤においても認められなかったことから、妊娠中毒症胎盤においてmembrane formがhKL1とhKL2とに切断され、hKL1(secreted form)が母体血中に遊離されている可能性が示唆された。さらに、hKL2の発現は、妊娠中毒症胎盤STに、より強い染色を認めたことから、①妊娠中毒症というストレスは、胎盤絨毛細胞に内皮細胞障害保護作用のあるKlotho蛋白を誘導し、いわゆるストレス抵抗性を示している可能性が示唆された、②母体血中のKlotho蛋白を測定することにより妊娠中毒症マーカーとして応用することが可能であると考えられた。

E. 結 論

今後、引き続き上記実験系を妊娠中毒症モデルを用いて*in vitro*においても検討し、同時に臨床的には年齢別正常非妊婦と合併症を有さない正常妊婦の血清*klotho*蛋白濃度を基準として、中毒症に罹患した妊婦の同蛋白濃度を妊娠週数ごとに測定し、妊娠中毒症の早期診断さらにはその重傷度を推測するマーカーとなり得ないか明らかにする。また、Klotho蛋白secreted formを過剰発現もしくは投与したときに妊娠中毒症病態の回避もしくは改善を認めないか、マウスを用いた*in vivo*実験系で明らかにすることを計画している。また、妊娠中毒症胎盤および低酸素モデルにおける*CYP19*発現に関する研究も同時に施行する予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Hayashi T, Endo T, Yamazaki K, Kitajima T, Hayashi T, Kudo R. The expression of klotho gene and protein in the placenta of preeclampsia. Placenta 2003, 24: A. 42.

2) 林 卓宏、北島義盛、山崎清大、遠藤俊明、工藤隆一：妊娠中毒症胎盤における老化抑制遺伝子(klotho gene)の発現について、第 55 回日本産婦人科学会、福岡、2003 年 4 月 12～15 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新たなヒト無精子症の原因遺伝子であるヒトSYCP3遺伝子同定に関する研究

分担研究者 石川 睦男 旭川医科大学医学部附属病院長

研究要旨

近年、女性の社会進出に代表される結婚年齢の高齢化等の社会的な要因に伴い、不妊に悩む夫婦の割合が増加の一途をたどっている。今日までの不妊治療のめざましい進歩により、不妊治療の成果は着実に進歩しているものの、男性不妊症、特に成熟精子を全く有してない、いわゆる無精子症は現在でも不妊治療の大きな壁となっている。男性不妊症は社会の高度化等による現代人のストレス、また化学物質等により精子数が減少する等の報告により、今後ますます増加することが推定されている。ヒト無精子症の原因として以前より、Y染色体上の部分的欠失ことにAZF (azoospermia factor) 領域の欠失が報告されているが、今日までこのAZF領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として明らかとされたのは、わずか3つにすぎない。今回我々はヒト12番染色体上に新たな無精子症原因遺伝子SYCP3の同定に成功した。

研究協力者

宮本敏伸

旭川医科大学産婦人科 助手

田熊直之

旭川医科大学附属病院 助教授

山下 剛

旭川医科大学産婦人科 講師

ンバー化)され、個人が特定できないようにデータファイルされた。

C. 研究結果

ヒトSYCP3遺伝子は減数分裂異常により無精子症を呈している不妊症患者19名中2名の患者に1塩基のみの欠失を認め、これが蛋白レベルでの機能異常を呈していることを明らかにした。

A. 研究目的

Sycp3遺伝子のノックアウトマウスは発達上正常である。しかしながら、精子形成過程における減数分裂異常により、無精子症を示すとの報告をもとに、ヒトSYCP3遺伝子の同定及びヒト無精子症での解析を行う。

B. 研究方法

マウスSycp3 cDNAをもとに、ヒト精巣cDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒトSYCP3 cDNAを単離し、その後減数分裂異常により、無精子症を呈している不妊症患者19名から文章による同意をもとに遺伝子異常の検索を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、全てのサンプルは匿名化(ナ

D. 考 察

我々はヒトSYCP3遺伝子はその点突然変異により、無精子症を呈することを明らかにしたが、特筆すべき点はヒトSYCP3遺伝子は常染色体であるヒト12番染色体に位置している点である。今日まで世界的に報告されてきたヒト無精子症の原因遺伝子3つは全てY染色体上のAZF領域に存在する。ヒトSYCP3遺伝子はAZF領域以外で証明された最初の無精子症原因遺伝子である。

E. 結 論

我々は新たなヒト無精子症の原因遺伝子SYCP3を同定した。またAZF領域以外にもさらに無精子症原因遺伝子が存在することを示唆した。今後は化学物質と無精子症との関連についても解析を進めて行く予定である。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, Maduro MR,
Ishikawa M, Westphal H, Lamb DJ.
Azoospermia in patients heterozygous for a
mutation in SYCP3. Lancet 362: 1714-1719.
2003

2. 学会発表

第55回日本産婦人科学会

福岡（04/12-15/03）

ヒトSYCP3遺伝子の単離およびその機能解析

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

なし。