

# 厚生労働科学研究研究費補助金

(子ども家庭総合研究事業)

平成14～16年度 総合研究報告書

平成17年(2005年)3月

主任研究者 鈴 森 薫

(日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生予防効果に関する基礎的研究)

# 厚生労働科学研究研究費補助金

(子ども家庭総合研究事業)

平成14～16年度 総合研究報告書

平成17年(2005年)3月

主任研究者 鈴 森 薫

(日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生子防効果に関する基礎的研究)

# 目 次

## I. 総合研究報告書

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常  
(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生予防効果  
に関する基礎的研究

鈴森薫 ..... 1

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常  
(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生予防に  
関する基礎的研究

大橋博文 ..... 6

神経管形成異常・各種染色体異常等の症例の細胞集積と  
染色体構成及び遺伝子多型に関する研究

孫田信一 ..... 9

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常  
(神経管欠損症およびダウン症候群等)の発生予防効果  
に関する基礎的研究

羽田 明 ..... 14

葉酸による先天異常発生予防効果の検討と  
予防的葉酸投与の実施・現状調査・啓蒙

種村光代 ..... 17

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

## III. 研究成果の刊行物・別冊

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
総合研究報告書

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常  
（神経管欠損症およびダウン症候群等）の発生予防効果に関する基礎的研究

主任研究者 鈴森 薫 名古屋市立大学大学院医学研究科  
生殖・遺伝医学講座生殖・発生医学分野教授

分担研究者：羽田明（千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学）  
孫田信一（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所遺伝部）  
大橋博文（埼玉県立小児医療センター 内科）  
種村光代（名古屋市立大学大学院医学研究科生殖・発生医学分野）

### 研究要旨

欧米諸国では、母体への葉酸投与が神経管閉鎖障害を減少させることが疫学的調査により報告されている。大規模な randomized control study 試験によるデータは少ないが、ハンガリーで実施された 4000 人規模の投与試験の報告では、神経管欠損症の有意な減少を認めるとともに、有意ではないものの、先天性心疾患や口唇口蓋裂、ダウン症候群の発生の低下が観察されている。一方、葉酸投与がダウン症発症予防になることの裏付けとなる報告もおこなわれた。ダウン症候群を出産した母親の葉酸代謝に関連するふたつの酵素の遺伝子多型を解析したところ、ある多型頻度が対照群に比べて有意に高いというものである。葉酸代謝に関しては MTHFR 遺伝子などの多型が報告されているが、遺伝子多型には人種差が存在するため、その結果の解釈にはより多くの症例の蓄積と人種毎の検討が必須である。本研究事業では、神経管欠損症、ダウン症候群およびその他の先天異常児を出産した日本人女性の血中葉酸、葉酸代謝関連酵素群遺伝子多型を対照群と比較検討することにより、我が国で葉酸がこれらの先天異常の発症の一次予防薬となる可能性があるかを検討した。平成 14 年度は、ダウン症出産既往のある母親 68 人と対照の母親 175 人の協力を得て、葉酸代謝に関与する 3 酵素の遺伝子多型頻度を検討した。対象とした遺伝子多型は MTHFR C677T, MTRR A60G、Thymidylate synthase (TS) 5' UTR である。このうち症例群で MTRR 遺伝子の GG 型は対照群に比べ、有意に頻度が少ないことがわかった (P=0.03)。さらに、Methionine synthase (MTR) 遺伝子の 2756 番目の A が G に置換する多型が知られているが、この多型によりアスパラギン酸 (D) のコドンがグリシン (G) に代わる D アレルでは G アレルよりも血中ホモシステインレベルが高いことが報告されている。最近、ダウン症を持つ母親では DD に比べて DG+GG が有意に多いことがイタリアのシシリー島の集団で報告された。平成 15 年度はこの遺伝子多型について検討してみた結果、G アレルの頻度は症例で 22%、コントロールで 15%であり、同様の傾向が見られ、 $p=0.06$  と 5%水準では有意とはならなかったものの、症例数が増えれば有意になる可能性がある。神経管欠損症についても 17 家系のうち同意の得られた 12 名の母親の解析を実施したが有意差は認めなかった。平成 16 年度は、自然流産症例（染色体異常を検出できた 20 例、検

出できなかった 20 例の合計 40 例とその母親の検体) において、同様に葉酸関連酵素群遺伝子の多型について調査を実施した。その結果、染色体異常をもつ流産胎児の母親を対照の母親と比較したところ、MTHFR の 677T アレルの頻度が有意に高い事が分かった。他の遺伝子多型、および染色体異常を検出できなかった流産胎児の母親では有意な差を検出できなかった。677T アレルはホモシステインの高値とも関連している為、染色体異常発生に関与している可能性がある。日本人集団においても慢性的な葉酸欠乏状態が染色体異常の一要因となっている可能性を示唆するものである。染色体解析結果が判明している流産胎児例での検討はこれまで行われていないため、今回の結果は新規の知見である。神経管閉鎖障害のみならず、流産予防の見地からも有用性があることをふまえ、葉酸摂取啓蒙活動の推進をおし進める必要があり、そのためにも有用な基礎データであると考え。

#### A. 研究目的

欧米諸国では、母体への葉酸投与が神経管閉鎖障害を減少させることが疫学的調査により報告されている。本研究事業では、神経管閉鎖障害、ダウン症候群およびその他の先天異常児出産や、自然流産した日本人女性の血中葉酸、葉酸代謝関連酵素群遺伝子多型を対照群と比較検討することにより、わが国で葉酸がこれらの先天異常の発症の一次予防薬となる可能性があるかを検討する。

さらに、実際に予防的葉酸投与を施行して追跡調査を行うとともに、全国的なアンケート調査や教育啓蒙を行い、日本における葉酸摂取啓蒙活動の浸透度を明らかにして、その現状を医療行政に提言してゆく。

#### B. 研究方法

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針」を遵守し、さらに日本産科婦人科学会、人類遺伝学会をはじめとする日本医学会分科会、及び関連組織の倫理規定の元を実施される。研究計画、インフォームドコンセント書式については所属施設の倫理委員会の承認を得た書式を用い研究を実施する。

##### <対象>

##### 1. 神経管欠損症患児と両親の検体採取

神経管欠損症患児（出生児以外に流・死産児も含む）を分娩した症例の母親より検体を採取する（種村）。患者が解析結果の告知を希望する場合に備え、

検体、臨床情報は検体採取機関で連結可能匿名化し、ID 番号のみとする。母体の葉酸値は可能な限り測定する。神経管閉鎖障害の症例の遺伝カウンセリングと追跡調査は継続して、予防的葉酸投与の実施状況、次子における再発について検討する。

##### 2. ダウン症候群出産母体の検体採取

愛知県心身障害者コロニー（孫田）や、埼玉県立小児医療センターで経過をみているダウン症候群患児の母親（大橋）、名古屋市立大学病院産科婦人科でダウン症候群を出産した母親（鈴森、種村）を中心に検体を収集する。患者が解析結果の告知を希望する場合に備え、検体、臨床情報は血液採取機関で連結可能匿名化し、ID 番号のみとする。

##### 3. 葉酸代謝の関連が推定される先天異常児出産母体、および原因不明流産母体などからの検体採取

2. と同様に検体を採取・保存し、症例の集積につとめる（鈴森、種村、孫田）。

##### <試料>

血液は、EDTA 採血管で約 5.0 ml 採血、血清分離採血管に 2 ml 計 7 ml 採血し、冷凍保存して千葉大に送付する。対象 1. 3. に関しては染色体異常の有無の確認のために染色体分析にも対応するべく同意が得られればヘパリン採血も行い、細胞株の樹立を試みる（孫田、大橋）。

##### <解析方法>

まず詳細な染色体分析を実施し、次に遺伝子多型

の関連について検討した。解析した葉酸代謝関連遺伝子および多型は、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の C677T および A1298C 多型、Methionine synthase reductase (MTRR) の A66G 多型、Thymidylate synthase (TS) のプロモーター領域にある 28bp のリピート回数の多型 (2 回または 3 回)、Methionine synthase (MTR) 遺伝子の A2756G 多型 (D→G) の合計 5 種類である。

### 1. 葉酸代謝関連遺伝子の解析

葉酸代謝関連酵素である MTHFR の C677T 多型と MTRR の A66G 多型、TS 5' UTR 多型、MTR 遺伝子の 2756 番目の A が G に置換する多型を検出し、その遺伝子頻度と遺伝子型を決定し、疾患群と対照群と比較する (羽田)。

### 2. 血清葉酸、ビタミン B<sub>12</sub> 濃度の測定

血清葉酸、およびビタミン B<sub>12</sub> 濃度は、化学発光法にて測定する。その濃度分布を対照群と比較する (種村)。

### 3. 染色体分析と遺伝子多型

各種染色体異常及び神経管欠損症を示す症例で同意が得られた症例では自然流産の絨毛細胞及びその夫婦の末梢血細胞を集積する。細胞株化の必要な症例については、末梢血リンパ芽球細胞を EBV により形質転換で保存する。全症例について詳細に染色体解析を行い、反復自然流産の症例、及び染色体異常児を有する症例において葉酸関連酵素群遺伝子の多型を調査し、対照群と比較して多型の偏りを解析する。de novo 染色体構造異常等の切断点遺伝子と葉酸関連酵素遺伝子との関連についても検討する。(孫田)

#### <教育、啓蒙活動>

研究に協力したダウン症児をもつ母親 89 名 (3 年間合計) を対象に、研究協力を依頼する際に行った説明と同意の実効性を評価するためにアンケート調査を行った。さらに、平成 16 年、17 年には、研究成果の一部を、一般公開の講演会で説明した。(大橋、種村)

### C. 研究結果と D. 考察

我々は、神経管閉鎖障害やダウン症児を有する母

体症例、染色体異常の流産の母体や胎児由来の細胞について多数集積を図った。これらの各症例について染色体構成を詳細に解析し、さらに葉酸関連酵素群遺伝子の多型について検討した。

まずは無脳症を含む神経管閉鎖障害を伴う症例の中に de novo 染色体構造異常の発見に努めた。このような症例ではその切断点遺伝子の関与が考えられるからであるが、これまで共通する切断点を示す染色体構造異常は発見されなかった。流産症例では、トリソミーを伴う妊娠 (流産) を 3 回以上も反復する症例が含まれており、これらの症例に共通する多型や異常の検出を図り、異常発生に関わる因子の検出を図ることが期待され、これらの症例の中に片親性ダイソミーの異常が複数例発見された。片親性ダイソミーではインプリント遺伝子の関りだけが注目されているが、他の遺伝子の異常や多型が同型接合になる点からも検討していかなければならない。

神経管閉鎖障害に関しては 17 家系が集積され、同意の得られた 12 名の母親の葉酸代謝関連遺伝子多型解析を施行したが、有意な差は検出できなかった。なお、一例を除き母体の葉酸値は正常であった。いずれの母親も次子に向けて予防的葉酸内服を希望され追跡調査中であるが、既に分娩に至った症例から再発は認めなかった。

ダウン症の母親における解析では、MTHFR と TS の遺伝子多型頻度に有意差はなかったが、MTRR では症例群では GG 遺伝子型の頻度が有意に低かった ( $p=0.04$ )。しかし、この結果は Caucasian 集団の報告とは逆であった。MTR では G アレルの頻度は症例で 22%、コントロールで 15%であり ( $p=0.06$ )、遺伝子型 DD と DG+GG を比較したところ、DG+GG が症例群で多い傾向 ( $P=0.08$ ) にあったが、いずれも 5%水準では有意とはならなかった。

症例数は 20 例と少ないが、ダウン症を含めた染色体異常を持つ流産胎児の母親においては、MTHFR の 677T アレルの頻度が有意に高い事がわかった ( $P=0.0096$ )。677T アレルはホモシステインの高値とも関連している為、染色体異常発生に関与している可能性がある。いずれにしても、さらに検体を増やして確認するとともに、今後は流産症例に対して

も葉酸の予防的投与にて前方視的に経過観察して、臨床的有用性を実証してゆく必要があるだろう。

## E. 結論

### <達成度>

神経管閉鎖障害、ダウン症候群、染色体異常流産の母体についての葉酸代謝関連酵素遺伝子多型の解析と評価については十分に達成できたと思われる。前方視的な追跡調査は3年という研究期間ではなかなか困難であったが、以前から追跡調査を継続してきた神経管閉鎖障害の母体のうち、この研究期間内に分娩に至った予防的投与群の症例からは、再発は認めなかったことは評価できる。

### <研究成果の学術的・社会的意義>

ダウン症出産の母親群では、MTRR A66G 多型の GG 遺伝子型が対照に比べて有意に低頻度であった。しかし、Caucasian では GG 遺伝子型が有意に高頻度であると報告されており、逆の結果であった。一方、流産胎児の解析で、染色体異常をもった流産胎児の母親において、MTHFR 遺伝子多型の有意差が観察できたことは興味深い。日本人集団においても慢性的な葉酸欠乏状態が染色体異常の一要因となっている可能性を示唆するものである。これまで、染色体解析結果が判明している流産胎児例での検討は行われていないため、今回の結果は新規の知見である。

本研究は基礎的なものであり、まだ遺伝子検査の結果が直接検体提供者に利益還元される性質のものではないが、協力した母親への研究結果の還元を目的に結果報告研修会を企画し、患者および家族等が先天異常・出生前診断を理解する助けとなる情報提供を心がけた。依然としてわが国における予防的葉酸投与の実施状況はかんばしくないが、神経管閉鎖障害のみならず、流産予防の見地からも有用性があることをふまえ、葉酸摂取啓蒙活動の推進をおし進める必要がある。そのためにも有用な基礎データであると考える。

### <今後の展望>

臨床的有用性の証明には、葉酸を予防的に投与された症例の長期的な大規模追跡調査が必須であろう。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

鈴木 薫：流産・死産・先天異常の原因検索と遺伝カウンセリングに有用な Spectral karyotyping (SKY) 法について 特集/胎児・新生児医療'02 年のトピックス、産婦人科の世界 55: 31-38, 2003  
Kondo, Y., Tsukishiro, S., Tanemura, M., Sugiura-Ogasawara, M., Suzumori, K., Sonta, S.: Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of spontaneous abortion. J. Hum. Genet. 49, 177-181, 2004.

Tsukishiro S, Li QY, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Paternal uniparental disomy of chromosome 14 and unique exchange of chromosome 7 in cases of spontaneous abortion. J. Hum. Genet. (in press)

Li QY, Tsukishiro S, Nakagawa C, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Parental origin and cell stage of nondisjunction of double trisomy in spontaneous abortion. Congen. Anom 45, 27-32, 2005

### 2. 学会発表

月城沙美、近藤裕子、種村光代、杉浦真弓、鈴木 薫、孫田信一：自然流産に見られた片親性ダイソミーの2例。日本産婦人科学会、2002. 4. 9 (東京)。

孫田信一、月城沙美、近藤裕子、小野教夫、種村光代、杉浦真弓、千葉喜英、鈴木 薫：ヒトの発生異常に関わる片親性ダイソミー。日本先天異常学会、2002. 7. 12 (浜松)。

月城沙美、佐藤 剛、青山和史、種村光代、鈴木佳克、鈴木 薫、孫田信一：14 番染色体の paternal uniparental disomy の一例。日本人類遺伝学会、2002. 11. 13 (名古屋)。

孫田信一、月城沙美、近藤裕子、種村光代、杉浦真弓、千葉喜英、鈴木 薫：自然流産に発見された片親性ダイソミーの起源解析。日本人類遺伝学会、2002. 11. 13 (名古屋)。

船水真紀子, 蒔田芳男, 大森博之, 大橋博文, 小橋 元, 種村光代, 鈴木 薫, 羽田 明. 日本人集団におけるダウン症発生と葉酸代謝酵素遺伝子多型の関連. 第47回 日本人類遺伝学会, 2002. 11. 13 (名古屋). 孫田信一, 李 青英, 赤井美津代, 月野隆一<sup>3</sup>, 鈴木 薫, 中川千玲: 母由来の転座派生染色体と正常核型をもつ細胞のモザイクの形成機序. 日本人類遺伝学会 (長崎) 2003. 10. 24. 孫田信一, 月城沙美, 李 青英, 鈴木 薫, 中川千玲, 野村紀子: 原因不明の自然流産に見られた片親性ダイソミーとその発生機序. 染色体学会年会 (東京) 2003. 10. 11. 李 青英, 月城沙美, 中川千玲, 野村紀子, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木 薫, 孫田信一: 自然流産に見られたダブルトリソミーの起源と発生機序. 中部出生前医療研究会 (名古屋) 2004. 2. 28. 月城沙美, 李 青英, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木 薫,

孫田信一: マイクロサテライト多型解析により染色体の微細欠失が示唆される自然流産. 日本産婦人科学会 (東京) 2004. 4. 11.

Suzumori K, Kondo Y, Tsukishiro S, Tanemural M, Sugiura-Ogasawara M, Sonta S: Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of spontaneous abortion. Inter-national Congress on Prenatal Diagnosis and Therapy (Budapest, Hungary) 2004. 6. 25.

孫田信一, 中川千玲, 李 青英, 月城沙美, 千葉喜英, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木 薫: 典型的な染色体異常を伴わない自然流産における染色体構成異常及びエピジェネティックな異常の関与. 日本人類遺伝学会 (東京) 2004. 10. 13.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし



厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

（総合）研究報告書

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常（神経管欠損症およびダウン症候群等）の発生予防に関する基礎的研究

分担研究者 大橋 博文 埼玉県立小児医療センター遺伝科医長

研究要旨

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型とダウン症候群の発生の関連性をみるために、倫理委員会の承認を得た説明と同意の文書を用いて 89 名のダウン症児の母親から同意を得て採血を行い、匿名化した上で分析研究に供した。本研究は基礎的なものであり、遺伝子検査の結果が直接検体提供者に利益還元される性質のものではないが、協力した母親への結果報告研修会を開催して研究成果の還元の一つとした。さらに本研究で行った協力者への“説明と同意”の実効性を評価するために、協力者に対して郵送によるアンケート調査を行った。協力者 89 名中 42 名（47%）より有効回答を得た。研究説明の理解度では、“大体判った”以上が 29 名（69%）であり、“あまり判らなかつた”以下の不十分な理解が 13 名（31%）であった。対象が母親のみであったことについては、“母親だけはおかしい”が 6 名（14%）、“やはり自分に責任があると感じた”が 10 名（24%）あった。多数でないにしても、不十分な理解での研究協力や、協力にまつわる不安感の存在が示唆された。研究協力要請にあたっては、わかりやすい説明と協力の任意性の保証、並びに協力者への重大な不利益や不安を回避すべく、少なくとも研究推進に利害関係のない機関（倫理委員会等）による事前の検討が欠かせないと思われた。

A. 研究目的

葉酸の代謝経路に関わる遺伝子 MTHFR (methylene tetrahydrofolate reductase) あるいは MTRR (methionine synthase reductase) の多型と 21 トリソミー（ダウン症）の原因である染色体不分離の起こり易さとの関連性が示唆されているが結論が出ていない。この関連性の有無を検討するため、ダウン症児の母親と一般

女性の上記両遺伝子の多型分析を行い、遺伝子多型とダウン症の発生との関連性を検討する。そのために、分担研究者は分析研究に供する検体を得るために、ダウン症児の母親への説明文書を作成し倫理委員会の承認を得、その文書を用いて説明し同意を得た後に採血を行う。本研究は基礎的なものであり、遺伝子検査の結果が直接検体提供者に利益還元されるものではない。この

ような基礎的研究への協力にあたって行った“説明と同意”がどの程度実効性があったのかを評価するために協力者にアンケート調査も行う。

## B. 研究方法

血液検体を採取するにあたり、文書による説明と同意を得るために、説明文書と同意書を作成し、倫理委員会での承認を得る。その文書を用いて、外来健診時にダウン症児の母親に説明を行い、同意を得た後で母親から採血を行って検体を得る。その後連結可能匿名化を行って遺伝子多型解析施設へ検体を送付し解析に供する。さらに協力者に対して郵送によるアンケート調査を行う。アンケートの内容は、1) 研究内容説明の理解しやすさについて、2) 不十分な理解での協力者がそれでも協力をした理由、3) 母親のみを対象としていたことから受けた印象、とする。

## C. 研究結果

3年間でダウン症出児を出産経験のある89名から協力が得られた。アンケート調査では、そのうちの42名(47%)より有効回答を得た。その結果、研究説明の理解度では、“大体判った”以上が29名(69%)であり、“あまり判らなかった”以下の不十分な理解が13名(31%)であった。不十分な理解の群の協力理由(複数回答を含め計14件)は、“医学の発展のため”8件、“あまり深く考えなかった”2件、“通院している病院なので断りにくかった”1件、その他3件であった。対象が母親のみであったことについては、“抵抗なかった”23名(55%)、“母親だけはおかしい”6名(14%)、

“やはり自分に責任があると感じた”10名(24%)であった。

## D. 考察

本調査から、多数でないにしても、不十分な理解での研究協力や、協力にまつわる不安感の存在が示唆された。研究協力要請にあたっては、わかりやすい説明と協力の任意性の保証、並びに協力者への重大な不利益や不安を回避すべく、少なくとも研究推進に利害関係のない機関(倫理委員会等)による事前の検討が欠かせないと思われる。また、本研究は基礎的なものであり、遺伝子検査の結果が直接検体提供者に利益還元される性質のものではないが、協力した母親への研究結果の還元を目的に結果報告研修会も企画した。内容は、1) 研究結果の報告、2) 先天異常と出生前診断についての講演とし、本研究の意義のみならず、広く先天異常と出生前診断の現状と展望についての知識を得られる機会とした。

## E. 結論

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型とダウン症候群の発生の関連性を検討するために、ダウン症児出産経験のある89名の母親から説明と同意のもと採血を行い、解析に供した。また、協力者への事後のアンケート調査から、研究協力要請にあたっては、わかりやすい説明と協力の任意性の保証、並びに協力者への重大な不利益や不安を回避すべく、少なくとも研究推進に利害関係のない機関(倫理委員会等)による事前の検討が欠かせないと思われた。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

発表準備中。

2. 学会発表

志田裕子、大橋博文、大橋裕子、鈴木正二、坂下英明：ダウン症児の母親を対象とした基礎研究協力の説明と同意：アンケート調査による実効性の評価。平成17年度日本カウンセリング学会で発表予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

分担研究報告書

神経管形成異常・各種染色体異常等の症例の細胞集積と染色体構成及び  
遺伝子多型に関する研究

分担研究者 孫田信一 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所遺伝学部  
遺伝性疾患研究室長

研究要旨 神経管形成異常児を有する女性、トリソミー等の異常児を有する症例、及び染色体異常の流産を反復する症例由来の細胞について多数集積を図り、合わせて 123 家系について保存した。これらの各症例について染色体構成を詳細に解析し、葉酸関連酵素群遺伝子の多型とその偏りに関する調査のための基礎的な染色体情報を提供した。さらに、無脳症を含む神経管形成異常を伴う症例の中からこの疾患に関与する *de novo* 染色体構造異常の切断点遺伝子の発見を目指したが、共通する切断点を示す染色体構造異常は発見されなかった。一方、繰返し染色体異常を伴う自然流産を繰返す症例に、マイクロサテライト多型解析によって微細欠失の可能性を示す例が最近発見された。また、4 回目の流産の中に染色体 16 の母親性ダイソミーを発見した。また、無脳症を含む神経管形成異常を伴う核型正常の症例における片親性ダイソミーの関与について、マイクロサテライト多型解析によって調査したが、これまで解析した 4 例ではこの異常は認められなかった。

A. 研究目的

二分脊椎等を含む神経管形成異常や染色体異常の患児出産と葉酸代謝関連酵素遺伝子の多型の偏りとの関連について議論されてきた。しかし、これまで日本人における葉酸代謝関連遺伝子に関するデータはほとんどないため、本研究では神経管形成異常児及びダウン症候群児の出生歴のある日本人女性の葉酸代謝関連酵素群遺伝子の異常または多型との疾患との関連について調査を開始した。分担研究課題では、第一に神経管形成異常や染色体異常症例とその家族、染色体異常を反復する流産とその夫婦由来の細胞の集積を図った。次に、これらの症

例における詳細な染色体解析を実施し、葉酸関連酵素の遺伝子多型調査と合わせて、染色体異常及び神経管形成異常に関わる遺伝子の異常または多型を明らかにするための研究を実施した。

B. 研究方法・対象

以下の方法で各種解析を実施した。①各種染色体異常及び神経管形成異常を示す症例とその家族由来の細胞を集積した。②染色体異常を反復する自然流産の絨毛細胞及びその夫婦の末梢血細胞を集積した。細胞株化の必要な症例については、末梢血リンパ球細胞を EBV により形質転換して保存

した。③これら全症例についてバンド法等を用いて詳細に染色体解析を行った。④反復自然流産の症例、及び染色体異常児を有する症例において葉酸関連酵素群遺伝子の多型を他の研究者と共同で調査し、対照群と比較して多型の偏りを解析した。⑤de novo 染色体構造異常等の切断点遺伝子と葉酸関連酵素遺伝子との関連について検討した。⑥神経管形成異常や染色体異常症例とその家族、染色体異常を反復する流産とその夫婦由来の細胞を用いて、マイクロサテライト多型解析により片親性ダイソミーの関与及び微細欠失の有無を調査した。これらの研究をとおして染色体異常及び神経管形成異常に関わる遺伝子異常または多型を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究では三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針」を遵守し、日本医学会分科会等の倫理規定に準じて実施した。研究者は患者及びその家族の人権擁護に配慮し、患者及びその家族に対して本研究の目的を十分に説明しインフォームドコンセントを経て協力を得た。なお、本研究計画、実施要領等について所属機関の倫理委員会において承認を得て実施した。

### C. 研究結果

①細胞の集積：神経管形成異常及び染色体異常の患者及び自然流産の症例合わせて123症例とその家族由来細胞を集積した。細胞株化が必要な症例については、末梢血リンパ球細胞をEBV形質転換により株化して保存した。②染色体解析：全症例について詳細な染色体解析を実施した。これまで調査した無脳児等を含む神経管形成異常

症例については、特に染色体異常は認められなかった。一方、自然流産には各種のトリソミー（トリソミー9、16、18、21、22など）、ダブルトリソミー、トリプルトリソミー、三倍体、四倍体、Xモノソミーなどが含まれていた。またトリソミーを示す流産を反復する症例も多数含まれていた。

③遺伝子多型との関連解析：染色体異常症例において葉酸関連酵素群遺伝子の多型について系統的な調査を共同で実施したが、特定の偏りとの関連は明確でなかった。詳細については、他の研究者が報告する。④de novo 構造異常切断点遺伝子の検討：神経管形成異常や流産に関わる新たな遺伝子の解明を目指したが、今回集積した症例にはde novo 均衡型転座を有するものは含まれていなかった。文献において同様の多数の症例から共通する切断点の情報を収集したが、共通する座位には含まれていなかった。また、今回焦点を当てている遺伝子との関連性を検討したが、これと一致するものがなかった。

### D. 考察

神経管形成異常及び染色体異常患児の出産歴のある母親に葉酸代謝関連の酵素群遺伝子の多型パターンに高い偏りが見られるということが報告されたが、遺伝子多型には人種等により大きな偏りがある。実際には日本人におけるこれらの遺伝子に関する情報はこれまでほとんどなかった。したがって神経管形成異常児及び染色体異常児妊娠歴のある日本人女性において葉酸代謝関連酵素群遺伝子の多型を解析し、これら遺伝子の異常や変異と疾患原因との関連性を検討することは意義がある。

本研究期間内において、神経管形成異常及び染色体異常を示す症例とその家族由来の細胞の集積を進め、さらに多数の自然流産の症例を集積することができた。この中で特にトリソミーを反復する自然流産の症例は、染色体異常と葉酸関連酵素群遺伝子との関係などを明らかにするための貴重な研究対象になると思われる。これらを用いて染色体異常及び神経管形成異常に関わる遺伝子多型を解析したが、これについては他の分担研究者が詳細に報告しているように、特に関連は明らかではなかったようである。

各症例について詳細な染色体解析を実施したが、これまで調査した無脳児等を含む神経管閉鎖異常症例については染色体異常が認められなかった。特に *de novo* 均衡型構造異常を有する症例から、関連する切断店遺伝子の発見を期待したが、今回は発見することができなかった。また、マイクロサテライト多型などを用いて、通常の解析法では見つからない片親性ダイソミーの発見を目指したが、無脳児等を含む神経管閉鎖異常症例には発見できなかった。これらの症例はまだ数が少なく、関連についてはまだ結論は出すことはできない。最近、反復する自然流産の中に、染色体 14 の片親性（母親性）ダイソミーが発見された。この異常はダイソミー卵子形成が原因で成立したと考えられるが、片親性ダイソミーの反復性については今後の研究課題である。一方、無脳児等を含む神経管閉鎖異常と微細欠失等との関係について詳細な調査を実施してきたが、特定の領域の欠失は今のところ発見されていない。反復する自然流産の中に、X 染色体及び常染色体に微細欠失

を有すると思われる症例が発見された。今後、これらの欠失領域から、葉酸代謝関連酵素群遺伝子のみならず、他の代謝関連遺伝子や、染色体構築・細胞分裂等に関わる遺伝子等の検索についてもさらに検討が必要である。

## E. 結論

本研究では神経管形成異常及び各種染色体異常等の発生要因と葉酸代謝関連酵素群遺伝子の異常または多型との関連を明らかにするため、神経管形成異常症例、染色体異常症例及び自然流産由来の細胞を集積した。今後これらの症例の研究により、染色体異常及び神経管形成異常等に関わる遺伝子異常または多型との関係が明らかになると期待される。

## （謝 辞）

研究対象の症例の集積において多大な援助をいただいた名古屋市立大学医学部産婦人科、種村光代講師、杉浦真弓助教授、鈴木 薫教授、各種解析に援助頂いた愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所研究助手、中川千玲、野村紀子、名古屋市立大学大学院医学研究科、月城沙美、李 青英の各氏に深謝申し上げます。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kondo Y, Tsukishiro S, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a case of

- spontaneous abortion. *J. Hum. Genet.* 49:177-181, 2004.
- Mizunuma M, Yamada Y, Yamada K, Sonta S, Wakamatsu N, Kaneko K, Ogasawara N, Fujimori S: Disruption in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene caused by translocation in a patient with Lesch-Nyhan syndrome. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 23: 1173-1176, 2004.
- Tsukishiro S, Li QY, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Paternal uniparental disomy of chromosome 14 and unique exchange of chromosome 7 in cases of spontaneous abortion. *J. Hum. Genet.* (in press)
- Li QY, Tsukishiro S, Nakagawa C, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Parental origin and cell stage of nondisjunction of double trisomy in spontaneous abortion. *Congen. Anom.* 45:27-32, 2005.
2. 学会発表
- 月城沙美, 近藤裕子, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴木 薫, 孫田信一: 自然流産に見られた片親性ダイソミーの2例. 日本産婦人科学会 (東京) 2002. 4. 9.
- 孫田信一, 月城沙美, 近藤裕子, 小野教夫, 種村光代, 杉浦真弓, 千葉喜英, 鈴木 薫: ヒトの発生異常に関わる片親性ダイソミー. 日本先天異常学会 (浜松) 2002. 7. 12.
- Yamada K, Ono T, Ishihara N, Yamada Y, Ohki T, Miura K, Kumagai T, Sonta S, Wakamatsu N: A case of severe developmental delay with pharyngeal anomaly due to a de novo translocation [46,XY,t(6;12)(q16;p12)]. The American Society of Human Genetics, Annual Meeting (Baltimore, USA) 2002. 10. 16.
- 月城沙美, 佐藤 剛, 青山和史, 種村光代, 鈴木佳克, 鈴木 薫, 孫田信一: 14番染色体のpaternal uniparental disomyの一例. 日本人類遺伝学会 (名古屋) 2002. 11. 13.
- 孫田信一, 月城沙美, 近藤裕子, 李 青英, 小野教夫, 中川千玲, 種村光代, 杉浦真弓, 千葉喜英, 鈴木 薫: 自然流産に発見された片親性ダイソミーの起源解析. 日本人類遺伝学会 (名古屋) 2002. 11. 14.
- 月城沙美, 近藤裕子, 種村光代, 杉浦真弓, 松田義雄, 鈴木 薫, 孫田信一: 典型的な染色体異常を伴わない自然流産における片親性ダイソミーの検出. 日本産婦人科学会 (福岡) 2003. 4. 14.
- 孫田信一, 月城沙美, 李 青英, 鈴木 薫, 中川千玲, 野村紀子: 原因不明の自然流産に見られた片親性ダイソミーとその発生機序. 染色体学会年会 (東京) 2003. 10. 11.
- 孫田信一, 李 青英, 赤井美津代, 月野隆一, 鈴木 薫, 中川千玲: 母由来の転座派生染色体と正常核型をもつ細胞のモザイクの形成機序. 日本人類遺伝学会 (長崎) 2003. 10. 24.
- Tsukishiro S, Kondo Y, Tanemura M, Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K, Sonta S: Three cases of spontaneous abortions with uniparental disomy.

FIGO World Congress of Gynecology and  
Obstetrics (Santiago, Chile)

2003. 11. 5

Yamada K, Ono T, Sonta S, et al. :  
Identification and characterization  
of a causal gene responsible for  
severe developmental delay and a  
pharyngeal anomaly from a patient with  
a *de novo* translocation  
[46,XY,t(6;12)(q16;p12)]. Annual  
Meeting of The American Society of  
Human Genetics (Los Angeles, USA)  
2003. 11. 6.

李 青英, 月城沙美, 中川千玲, 野村紀  
子, 種村光代, 杉浦真弓, 鈴森 薫, 孫  
田信一: 自然流産に見られたダブルト  
リソミーの起源と発生機序. 中部出生  
前医療研究会 (名古屋) 2004. 2. 28.

月城沙美, 李 青英, 種村光代, 杉浦真  
弓, 鈴森 薫, 孫田信一: マイクロサ  
テライト多型解析により染色体の微細  
欠失が示唆される自然流産. 日本産婦  
人科学会 (東京) 2004. 4. 11.

Suzumori K, Kondo Y, Tsukishiro S,  
Tanemural M, Sugiura-Ogasawara M,  
Sonta S: Maternal uniparental disomy  
of chromosome 16 in a case of  
spontaneous abortion. Inter-  
national Congress on Prenatal  
Diagnosis and Therapy (Budapest,  
Hungary) 2004. 6. 25.

孫田信一, 中川千玲, 李 青英, 小野教  
夫, 月城沙美, 千葉喜英, 種村光代,  
鈴森 薫: 典型的な染色体異常を伴わ  
ない自然流産における染色体構造異常  
及びエピジェネティックな異常の関与

(シンポジウム). 日本先天異常学会  
(佐賀) 2004. 7. 15.

水野誠司, 田中修一, 新見教弘, 加藤  
純爾, 飯尾賢治, 長屋昌宏, 孫田信  
一: 四倍体 (92,XXYY) の生産児例.  
日本先天異常学会 (佐賀) 2004. 7. 16.

孫田信一, 中川千玲, 李 青英, 月  
城沙美, 千葉喜英, 種村光代, 杉浦  
真弓, 鈴森 薫: 典型的な染色体異  
常を伴わない自然流産における染色  
体構成異常及びエピジェネティック  
な異常の関与. 日本人類遺伝学会 (東  
京) 2004. 10. 13.

孫田信一, 李 青英, 月城沙美, 中川千  
玲, 鈴森 薫: 片親性ダイソミーの発  
生機序に関する検討. 染色体学会 (岡  
山) 2004. 11. 3.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)  
該当なし



（総合）研究報告書

日本人女性の葉酸代謝関連酵素遺伝子多型と先天異常  
（神経管欠損症およびダウン症候群等）の発生予防効果に関する基礎的研究

分担研究者 羽田 明 千葉大学大学院医学研究院教授

研究要旨

ダウン症出産経験のある72名の母親と、妊娠、分娩をとおして母子ともに特に問題の無かった年齢と経産回数をマッチさせた182例の母親を対象として遺伝子多型による関連解析をおこなった。さらに流産胎児の母親を対象として同様の関連解析をおこなった。流産胎児の内訳は染色体異常を検出した20例と、通常の方法では遺伝子異常を検出できなかった20例である。検討した遺伝子多型は、以下の葉酸代謝関連酵素遺伝子である。Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)のC677T多型, A1298C多型, Methionine synthase reductase (MTRR)のA66G多型, Thymidylate synthase (TS)のプロモーター領域にある28bpのリピート回数の多型(2回または3回), Methionine synthase (MTR)遺伝子多型の合計5種類。ダウン症出産の母親群では、MTRR A66G多型のGG遺伝子型が対照に比べて有意に低頻度であった( $p=0.04$ )。しかし、CaucasianではGG遺伝子型が有意に高頻度であると報告されており、逆の結果である。一方、染色体異常をもつ流産胎児の母親はMTHFR 677Tアレルの頻度が有意に高い事がわかった。Caucasian同様、日本人においても、慢性葉酸欠乏状態が染色体異常の原因となっている可能性がある。

A. 研究目的

トリソミー型ダウン症では、症例の93%において過剰21番染色体は母親由来である。卵子形成の減数分裂における染色体不分離が原因であるが、その発生メカニズムはよくわかっていない。また、ダウン症発生の危険因子として妊娠時の母親の高年齢がよく知られているが、他の要因は不明である。葉酸はDNAの前駆体生合成に必須のビタミンである。これまでのin vivoおよびin vitroの研究によると、葉酸の慢性的な欠乏状態では、DNAメチル化の異常、DNA鎖の破断、染色体組み換え異常、染色体分

離の異常などがおこることが知られている。James et al. (1999)は、母親の葉酸欠乏状態が染色体不分離の危険因子となりダウン症発生が増加するという仮説に基づき57人のダウン症出生の母親と対照50人を比較し、前者では血中ホモシステイン値の軽度上昇と葉酸代謝に関係するMethylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)酵素の遺伝子多型C677Tのうち677T遺伝子型頻度が有意に高いことを見いだした。その後、Hobbs et al. (2000), O'Leary et al. (2002)はMTHFRに加え、Methionine synthase reductase (MTRR)酵素の遺伝子多型(A66G)の66Gも

有意に高く、両者は独立の危険要因であると報告している。さらに、Bosco et al. (2003) は、シシリー島の集団で、Methionine synthase (MTR)の遺伝子多型(A2756G)を解析したところ、ダウン症の母親ではAG+GG遺伝子型の頻度が有意に高いと報告した。

本研究では、日本人集団において、葉酸投与による先天異常発生予防の可能性を探ることを目的として、葉酸関連酵素遺伝子の遺伝子多型との関連を研究した。

## B. 研究方法

倫理委員会の承認後、ダウン症出産の既往がある母親に研究の趣旨を説明したところ、72名の母親から同意が得られた。正常対照の母親として、同様に説明し収集した検体の中から年齢と経産回数をマッチさせた182例を使用した。さらに流産胎児の母親を対象として同様の関連解析をおこなった。流産胎児の内訳は染色体異常を検出した20例と、通常の方法では遺伝子異常を検出できなかった20例である。検討した遺伝子多型は、以下の4種類の葉酸代謝関連酵素遺伝子5多型である。Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)のC677T多型、A1298C多型、Methionine synthase reductase (MTRR)のA66G多型、Thymidylate synthase (TS)のプロモーター領域にある28bpのリピート回数の多型(2回または3回)、Methionine synthase (MTR)のA2756G多型。流産胎児自体の解析も併せて行った。流産胎児の染色体解析結果は20検体で染色体異常を検出、残りの20検体は正常核型であった。染色体異常の内訳は、45,Xが5例、ダウン症などトリソミーが9例、Triploidyが4例、Tetraploidyが2例であった。

## C. 研究結果

ダウン症出産の母親群では、MTRR A66G多型のGG遺伝子型が対照に比べて有意に

低頻度であった( $p=0.04$ )。しかし、CaucasianではGG遺伝子型が有意に高頻度であると報告されており、逆の結果である。流産胎児の母親において、染色体異常検出例と非検出例をそれぞれ、対照群の母親と比較し、検定を行った。その結果、染色体異常を検出した流産胎児の母親との比較で、MTHFR C677T多型頻度に有意差があった。具体的にはCC vs CT+TT ( $p=0.0190$ )、アレル( $p=0.0096$ )で有意にCT+TT遺伝子型、Tアレルの頻度が高かった。染色体異常非検出例の母親および流産胎児自身の多型頻度に有意差は認められなかった。MTR遺伝子に関して、有意ではなかったがBosco et al. (2003)と同様の傾向が認められた。

## D. 考察

ダウン症を出産した母親では有意差を検出できなかったが、染色体解析結果が判明している流産胎児例においてMTHFR C677Tのうち677T遺伝子型が有意に高いという結果を得た事は、日本人集団においても慢性的な葉酸欠乏状態が染色体異常の一要因となっている可能性を示唆するものである。これまで、染色体解析結果が判明している流産胎児例での検討は行われていないため、今回の結果は新規の知見である。ただ、流産胎児およびその母親の症例数は合計でも40例と少なく、染色体異常胎児例は20例であり、今回の結果は、症例収集は困難ではあるものの、例数を増やして確認する必要がある。

また、MTRRおよびMTR遺伝子の結果についても症例を増やして検討する必要がある。

## E. 結論

葉酸代謝関連酵素遺伝子多型のうち、慢性欠乏状態との関連が指摘されているMTHFR C677T多型の677Tアレルが、染色

体異常をもった流産胎児の母親に有意に多く、染色体異常発生との関連の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表

1. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata A. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet*, 47, 400-406, 2002
2. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Chiba S, Ohtani K, Suzuki Y, Wakamiya N, Hata A. Haplotype analysis of human collectin placenta 1 (hCH-P1) gene. *J Hum Genet*, 48, 82-85, 2003
3. Ohmori H, Ando Y, Makita Y, Onouchi Y, Nakajima T, Saraiva MJM, Terazaki H, Suhr O, Sobue G, Nakamura M, Yamaizumi M, Munar-Ques M, Inoue I, Uchino M, Hata A. Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Med Genet*, 41, e51, 2004
4. Kobashi G, Hata A, Ohta K, Yamada H, Hirayama E, Minakami H, Fujimoto S, Kondo K. A1166C variant of angiotensinogen II type 1 receptor gene is associated with severe hypertension in pregnancy independently of T235 variant of angiotensinogen gene. *J Hum Genet*, 49, 182-186, 2004
5. Onouchi Y, Onoue S, Tamari M, Wakui K, Fukushima Y, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H, Kishi F, Ouchi K, Terai M, Hamamoto K, Kudo F, Aotsuka H, Sato Y, Nariai A, Kaburagi Y, Miura M, Saji T, Kawasaki T, Nakamura Y, Hata A. CD40 ligand gene and Kawasaki disease. *Eur J Hum Genet*, 12, 1062-1068, 2004
6. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, Onouchi Y, Hata A, Nakamura Y. Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet*, 49, 664-668, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
総合・分担研究報告書

葉酸による先天異常発生予防効果の検討と  
予防的葉酸投与の実施・現状調査・啓蒙

分担研究者 種村光代 名古屋市立大学大学院医学研究科  
生殖・遺伝医学講座生殖・発生医学分野講師

研究要旨

葉酸による先天異常（神経管閉鎖障害、ダウン症候群、自然流産・死産など）の発生予防効果に関する検討を目的として、これらの症例の収集と正確な臨床診断、葉酸代謝関連酵素遺伝子多型の解析、予防的葉酸投与の実施・現状調査・啓蒙をおこなう。胎児の先天異常を主訴に受診した妊婦 53 名のうち頭部の形態異常を疑われたものは 13 例存在した。超音波検査および胎児 MRI 等による診断の結果、水頭症 3 例、全前脳胞症 3 例、無頭蓋症 2 例、滑脳症 1 例、クモ膜嚢胞 1 例、脳ヘルニア 1 例、脳梁低形成 1 例、正常 1 例であった。全前脳胞症については水頭症あるいは小頭症として、無頭蓋症については小頭症として紹介されたケースが大半であった。これらの症例のうち神経管閉鎖障害が原因と予想され、染色体異常や他の遺伝子異常が確認出来なかった症例と、既存の“遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワーク”システムを経由して他施設より遺伝子解析を目的として当施設へ送付された無頭蓋症と無脳症、あわせて 20 家系のうち、12 名の母親より同意を得て検体より DNA を採取して、Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) の C677T 多型、Methionine synthase reductase (MTRR) の A66G 多型、Thymidylate synthase (TS) のプロモーター領域にある 28bp のリピート回数の多型（2 回または 3 回）、Methionine synthase (MTR) の 2756 番目の A が G に置換する多型などを解析した。しかし、症例数がまだ少ないためか多型頻度の有意差は明らかでなかった。これまでに集積してきた自然流産症例（染色体異常を検出できた 20 例、検出できなかった 20 例の合計 40 例の流産絨毛とその母親の検体）についても、葉酸関連酵素群遺伝子の多型について検討した。染色体異常をもつ流産胎児の母親を対照の母親と比較したところ、MTHFR の 677T アレルの頻度が有意に高いことが分かった。他の遺伝子多型、および染色体異常を検出できなかった流産胎児の母親では有意な差を検出できなかった。677T アレルはホモシステインの高値とも関連しているため、染色体異常発生に関与している可能性がある。なお、追跡調査を継続してきた、神経管閉鎖障害の分娩既往母体の症例のうち、すでに葉酸内服を開始して、現在までに分娩に至った 6 症例の全例が健児を得ている。全国的にみれば葉酸の予防的投与はまだ十分に普及していないが、染色体異常流産の予防的効果の可能性も含めて教育・啓蒙活動をすすめてゆくことで、一般にもその有用性が浸透して実施効果が上がる可能性があると思われる。