

純粋型重症妊娠中毒症における血管内皮型 一酸化窒素合成酵素遺伝子変異 Glu298Asp の関与 Association of the Missense Glu298Asp Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene with Severe Preeclampsia

熊本大学医学部産科婦人科学教室

吉村寿博、田畑 愛、岡村 均

Dept. of Obstet. Gynecol., Kumamoto Univ. Sch. of Med.

T. Yoshimura, A. Tabata, H. Okamura

目 的

妊娠中毒症は複数の遺伝要因と環境要因が複雑に関与して発症するものと考えられ、いままでに幾つかの候補遺伝子が検討されている。

血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)遺伝子は3種類の NOS 遺伝子のひとつであり、第7染色体(7q35-36)に存在し、26 個のエクソンを持つ。最近 eNOS 遺伝子の第7エクソン領域の 894 番目の塩基である G が T に置き換わる変異が見いだされた。この変異は 298 番目のグルタミン酸(Glu)がアスパラギン酸(Asp)に変わるミスセンス変異である。日本人の Glu298Asp 変異の頻度は 10-14%であり、冠攣縮症候群(21%)・心筋梗塞(21%)・本態性高血圧(20%)患者では有意に頻度が高い。

今回 eNOS 遺伝子変異 Glu298Asp が妊娠中毒症発症と関連があるのかを検討した。

方 法

152 名の妊娠中毒症患者(軽症 35 名、重症 80 名、混合型 37 名)と 170 名の正常妊婦の単胎妊娠例を対象とした。本研究では、妊娠中毒症の診断・病型分類は、National High Blood Pressure Education Program Working Group report (1990) により行った。即ち血圧上昇(妊娠前半期より収縮期血圧 30mmHg あるいは拡張期血圧 15

mmHg 以上の上昇)あるいは妊娠後期の高血圧($\geq 140/90$ mmHg)に蛋白尿(≥ 30 mg/dl)を伴うものとした。重症妊娠中毒症の診断は、血圧 $\geq 160/110$ mmHg、蛋白尿 ≥ 2 g/24hours、血小板数 $<100,000/\text{mm}^3$ 、あるいは肝酵素の上昇とした。混合型妊娠中毒症の診断は、妊娠前に既に高血圧を呈した患者で、血圧の上昇(妊娠前半期と比して、収縮期血圧 30 mmHg あるいは拡張期血圧 15 mmHg 以上の上昇)に蛋白尿の出現をみたものとした。対照群患者には、今回および過去の妊娠において妊娠中毒症徴候を呈さなかった妊婦とした。既往に糖尿病、SLE、腎疾患心疾患のある患者は除外した。

白血球から DNA を抽出した。Glu298Asp の解析は polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism 法を用いた。用いたプライマーは missense Glu298Asp 変異の部位を含んで 248 base pair を増幅するように作成した(sense primer: 5'-AAGGCAGGA-GACAGTGGATGGA-3', anti-sense primer: 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3')。PCR 後、制限酵素 *Ban II* により処理し、電気泳動法にて分離し、ethidium bromide 染色した。変異 allele (T) は *Ban II* 切断部位を持たない。

Unpaired student's t test を用いて、両群間の

妊娠継続期間と出生時体重を比較した。中毒症群と正常群の Glu298Asp 変異の頻度の比較は χ^2 法を用いた。

結果

妊娠継続期間は、軽症 (38.0 ± 2.7 週)・重症 (35.2 ± 4.6 週)・混合型 (36.0 ± 3.7 週) で対照群 (39.4 ± 1.8 週) と比して有意 ($p < 0.05$) に短縮していた。児の出生時体重は、重症 (2167 ± 857 g)・混合型 (2356 ± 767 g) において対照群 (3034 ± 522 g) と比して有意 ($p < 0.05$) に小さかった。

eNOS/TT (Glu298Asp homozygote)、eNOS/TG (Glu298Asp heterozygote) と GG (homozygote; wild) genotype の遺伝子頻度を分析した。Glu298Asp 遺伝子変異 (Glu298Asp homozygote + Glu298Asp heterozygote) は重症妊娠中毒症群 (28.8%) で対照群 (14.1%) と比して有意に ($p < 0.01$) 高頻度であった。混合型 (8.1%)・純粋型軽症 (11.4%) では対照群と頻度に差がなかった。eNOS/T の allele 頻度は、対照群・混合型・軽症・重症で各々 7.6%、4.1%、5.7%、15.0% と、重症群で対照群と比し有意に ($p = 0.011$) 頻度が高かった。

考察

妊娠中毒症の候補遺伝子として、angiotensinogen 遺伝子多型が提唱されたが追試できないという報告もある。Mitochondrial DNA の変異は有意差が認められていない。Factor V Leiden 変異は日本人ではまだ見いだされていない。apolipoprotein E 遺伝子多型、tumor necrosis factor- α 変異、methylenetetrahydrofolate reductase 遺伝子多型も候補として挙げられているが、追試はなされていない。

我々は候補遺伝子として eNOS 遺伝子多型に関して検討した。その理由として、1) 妊娠動物子宮における eNOS 発現、可溶性 guanylate cyclase

活性亢進、cyclic GMP 産生亢進、2) eNOS 阻害剤が妊娠ラットに妊娠中毒症類似徴候を作り出す、3) NOS 阻害剤がラットの昇圧反応性を亢進させることから、妊娠中毒症の病態に NO の産生・放出の低下が関与していることが推察されたためである。その推察通り、今回我々は eNOS 遺伝子変異と重症妊娠中毒症との間の関連性を見いだした。

家族性の妊娠中毒症患者で susceptibility locus は染色体 7q36、即ち eNOS 遺伝子を encode する部位に見いだされており、本研究成果を支持するものである。この eNOS 遺伝子変異は、他の部位の変異と連鎖しており、それが eNOS 活性の低下につながり、妊娠中毒症の発症に関与している可能性も否定できない。いずれにせよ本遺伝子変異は純粋型重症妊娠中毒症発症のマーカーと言える。

最近、感染ヒト内皮培養細胞系および心筋組織を用いた実験で、eNOS 遺伝子の Glu298Asp 変異による protein product は生理的に cleavage を受けやすいという報告が出された。これらのことは、eNOS 遺伝子のこの変異が機能的にも重要であり、重症妊娠中毒症の遺伝的素因になっていることを示唆するものと考えられる。

参考文献

1. Miyamoto Y, et al. *Hypertension* 1998;2:3-8.
2. National high blood pressure education program working group report on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:1689-712.
3. Shimasaki Y, et al. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1506-10.
4. Yoshimura M, et al. *Hum Genet* 1998; 103:65-9.
5. Yoshimura T. et al. *J Soc Gynecol Investig* 2000;7:238-41.