

200/0/53

厚生科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) を用いた相関解析による
家族性卵巣癌関連遺伝子の単離と解析

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田中 憲一

平成 14 (2002) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) を用いた 相関解析による家族性卵巣癌関連遺伝子の単離と解析 田中憲一	— 1
II. 分担研究報告	
SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) を用いた 相関解析による家族性卵巣癌関連遺伝子の単離と解析 (相関解析に用いる高密度マーカーの同定に関する研究) 谷上 信	— 10
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	— 12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	— 13

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

総括研究報告書

SNPs(Single Nucleotide Polymorphism) を用いた相関解析による

家族性卵巣癌関連遺伝子の単離と解析

主任研究者 田中 憲一 新潟大学医学部教授

研究要旨 昨年までにノンパラメトリック連鎖解析と LOH(Loss of Heterozygosity) 解析にて 3p22-p25 が家族性卵巣癌の発症に関わる原因遺伝子の候補領域であることを報告した。昨年度は新たに 10 家系の家族性卵巣癌家系を集積し、BRCA1、2 遺伝子に突然変異の認められない家族性卵巣癌 29 家系を対象に、ゲノム全域についてノンパラメトリック連鎖解析を行った結果、3p22-p25 領域では (LOD score = 3.5, NPL score = 2.8) と、依然として連鎖の存在が確認された。そこで候補遺伝子の限定を目的に、家族性患者群 110 人、健常群 170 人を対象に高密度に設定したマイクロサテライトマーカー (150kb 間隔) による相関解析を行った結果、解析した 180 マーカーのうち 7 マーカーにおいて Pc-value が 0.01 以下と有意差を認め、その近傍約 200cM に RAD18 遺伝子の存在が確認された。また、候補領域に位置する既知遺伝子のうち癌化に関連すると予想される 9 遺伝子を対象に SNPs を用いた一塩基伸長法による相関解析を行った結果、FANCD2、CTNNB1 遺伝子において疾患との間に有意な相関を認めた。以上より上記 3 遺伝子において家族性卵巣癌患者 15 人を対象にダイレクトシーケンスによる変異解析を行った結果、FANCD2 では 4 家系、CTNNB1 では 1 家系、RAD18 では 6 家系にミスセンス変化を認めた。以上の結果をふまえ、本年度は高密度の SNPs マーカーを用いた複数マーカーでのハプロタイプ相関解析により 3p22-p25 よりの原因遺伝子同定を目指す方針である。

谷上 信 大塚藤井記念研究所所長

A. 研究目的

卵巣癌は、非常に予後が悪い疾患であると同時に近年増加傾向にあり、本疾患の原因究明、予防法の確立、治療成績の向上は、本症患者のみならず国民的な課題となっている。近年、家族性乳癌卵巣癌の原因遺伝子として BRCA1、BRCA2 が分離されたが、家族性卵巣癌家系への関与は約半数程度の家系に認められるのみであり、残りの卵巣癌家系における原因遺伝子の究明が強く求められている。本研究の最終目標は BRCA1、BRCA2 以外の家族性卵巣癌原因遺伝子を新規に単離、同定することであり、また同時に、本邦における BRCA1、BRCA2 両遺伝子の卵巣癌への関与を解明することも目的として研究を行ってきた。これまでにノンパラメトリック連鎖解析と LOH(Loss of Heterozygosity) 解析にて 3p22-p25 が家族性卵巣癌の発症に関わる原因遺伝子の候補領域と考えられることを報告した。本年度は新規

原因遺伝子単離に向けて確実な候補領域の限定を行い、その領域内から候補遺伝子を限定するために以下のことを目的とした。

引き続き家系調査を行い、全国より集積した卵巣癌家系を対象にノンパラメトリック連鎖解析を行い、全染色体領域から新規遺伝子単離に向けての確実な候補領域を限定する。さらに候補遺伝子を選定するため、連鎖解析で得られた候補領域に約 150kb ごとのマイクロサテライトマーカーを設定し、case-control association study (患者-対照相関解析) による詳細な原因遺伝子領域の限定を行う。また、候補領域に位置する既知遺伝子のうち癌化に関連すると予想される遺伝子を対象に SNPs を用いた相関解析を行う。以上より限定された候補遺伝子において家族性卵巣癌患者を対象に変異解析を行い、原因遺伝子を同定する。

本研究の成果は、家族性症例における遺伝子診断、発症予防、早期発見に寄与するだけでなく、悪性腫瘍における発症メカニズムの解明、治療モデル、発症予防システムの確立に重要な

知見をもたらし、さらに疾患原因遺伝子を単離するポジショナルクローニングの方法論確立においても大きく貢献するものと考える。

B. 研究方法

(1) 家系集積と BRCA1、2 遺伝子異常の解析
姉妹・叔母姪など家系内に 2 名以上の上皮性卵巣癌患者が存在する家系を全国的に集積し、患者を含め同意の得られた家系構成員（両親、同胞）の末梢血もしくは唾液、および腫瘍組織より DNA を抽出。死亡症例の場合は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片の正常組織、および腫瘍組織より DNA を抽出した。このうち末梢血あるいは唾液を採取した患者については BRCA1 および BRCA2 遺伝子の変異を解析するために、抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、直接シーケンス法により変異解析を行った。BRCA1 は 23 の exon（約 5,500 塩基対）及び intron（約 800 塩基対）を 35 領域に分け、BRCA2 は 26 の exon（約 10,200 塩基対）及び intron（約 900 塩基対）を 47 領域に分けて PCR を行った。Intron は少なくとも各 exon の 5'側上流の 20 塩基対、3'側下流の 10 塩基対を解析出来る設計で PCR を行った。PCR 増幅産物は蛍光色素標識 sequencing primer を用い、forward、reverse 両方向の塩基配列解析を ALF express 自動シーケンサー（Pharmacia Biotech）にて行った。

(2) 連鎖解析

BRCA1、2 遺伝子に異常が認められなかった家系のうち母娘発症を除く家系を対象に、X 染色体を含む全染色体領域を網羅した 410 個のマイクロサテライトマーカー（平均距離 9.0cM）を用いて、PCR(Polymerase Chain Reaction) を施行。その PCR 産物の長さの多型をオートシーケンサーにて検出した。この多型を示す対立遺伝子の家系内患者間での共有度をもとに、multipoint analysis の GENEHUNTER、および twopoint analysis の SIBPAL の 2 つのプログラムによりノンパラメトリック連鎖解析を行い、Non-parametric linkage(NPL) score、Logarithm of Odds (LOD) score、p-value を計算した。

(3) マイクロサテライトによる相関解析

ノンパラメトリック連鎖解析における候補領域 3p22-p25 の 30Mb 内に、国際コンソーシアムのシーケンスデータベースから約 150kb ごとのマイクロサテライトマーカーを設定し（共同研究）、それらのマーカーを用いて、家族性卵巣癌症例（親子発症も含む）110 例、健常対照症例 170 例の多型解析による Case-control association study を行い、各マーカーにおけるアレル頻度を $\times 2$ 検定し、アレル数で補正した後の p-value=0.05 以下を有意基準として、家族性卵巣癌発症との間に強い相関の認められるマーカーを限定する。

(4) SNPs による候補遺伝子の相関解析

3p22-p25 領域に位置する既知遺伝子のうち、その機能から癌化に関連すると予想される 10 遺伝子（FANCD、VHL、OGG1、RAF1、RAD18、PCAF、TOP2B、RAB5A、TGFB2、CTNNB1）を選定し、SNP データベースより各遺伝子につき 2~3 個の SNP を同定し、BRCA1、2 変異なしの家族性卵巣癌患者 110 人と健常女性 170 人・BRCA1、2 変異ありの家族性卵巣癌患者 90 人にて SNP を用いた一塩基伸長法による Case-control association study を行った。

(5) 家族性卵巣癌発症に関与する突然変異の検索

BRCA1、2 に変異を認めない家族性卵巣癌 15 家系の患者 15 人を対象に、相関解析より得られた候補遺伝子について全 exon のダイレクトシーケンスを行い、胚細胞性突然変異を検索した。

(倫理面への配慮)

患者よりの採血、パラフィン包埋切片よりの DNA 抽出等の検体収集にあたっては、新潟大学倫理委員会の認可に基づき、主治医により研究の目的、プライバシーの保護、期待される結果、患者へのメリット、デメリット、危険性の有無についてインフォームドコンセントを実施し、患者および家族の同意を得て行っている。患者および家族が希望した場合、あるいは主治医が必要と判断した場合、申請者の経済的負担にて専門家によるカウンセリングを実施する。

C. 研究結果

C. 研究結果

1 BRCA1、2 の変異解析

本年度は 10 家系の家族性卵巣癌家系を新たに集積し、ダイレクトシーケンスにて BRCA1 および BRCA2 遺伝子の異常を調べた結果、4 家系に BRCA1、2 家系に BRCA2 の突然変異を認め、累計では、91 家系中 45 家系に BRCA1 (49.5%)、7 家系に BRCA2 (7.7%) の突然変異を認めた (表 1)。BRCA1 変異 45 家系のうち、41 家系は Protein truncation をきたすような変異であり、3 家系はミスセンス変異、1 家系は非翻訳領域におけるスプライス変異であった。BRCA1 変異型では 26 種の変異型を認め、そのうち L63X を 8 家系 (17.8%)、Q934X (17.8%) を 8 家系に認め、ハプロタイプ解析からも本邦の common founder mutation と考えられた (表 2)。

2 連鎖解析

BRCA1、2 遺伝子に突然変異の認められない家族性卵巣癌 29 家系を対象に、ゲノム全域についてノンパラメトリック連鎖解析を行った結果、3p22-p25 領域では (LOD score = 3.5, NPL score = 2.8) と、依然として連鎖の存在が確認された (表 3)。

3 マイクロサテライトによる相関解析

3p22-p25 領域の 30Mb 内に約 150kb ほどのマイクロサテライトマーカーを設定し (分担研究) case-control association study を行った結果、解析した 180 マーカーのうち 7 マーカーにおいてアレル数で補正後の Pc-value が 0.01 以下を示し、疾患との間に強い相関を認め、同マーカー近傍に新規原因遺伝子の存在する可能性が示唆された (表 4)。

4 SNPs による候補遺伝子の相関解析

3p22-p25 領域に位置する既知遺伝子のうち、その機能から癌化に関連すると予想される 10 遺伝子において遺伝子内、あるいは遺伝子近傍領域に SNP マーカーを設定し (共同研究)、case-control association study を行った結果、FANCD2、CTNBN1 において Pc-value が 0.05 以下を示し疾患との間に相関を認めた (表 5)。

5) 患者群における変異解析

以上の結果を総合し、RAD18 (陽性マイクロ

サテライトマーカーの近傍 200kb に位置)、FANCD2、CTNBN1 (遺伝子内の SNPs において有意な相関) を有力な候補遺伝子と考え、家族性卵巣癌患者 15 人を対象にダイレクトシーケンスによる変異解析を行った結果、FANCD2 では 4 家系、CTNBN1 では 1 家系、RAD18 では 6 家系にミスセンス変化を認めた (表 6)。

D. 考察

これまでに家族性乳癌卵巣癌の原因遺伝子として BRCA1、2 が単離されているが、家族性卵巣癌家系への関与は約半数程度の家系に認められるのみであり、残りの卵巣癌家系における原因遺伝子究明が強く求められている。国外の study でも、英国において 112 例の家族性卵巣癌の 57% にあたる家系では BRCA1、2 に異常を認めなかったと報告されているが、未だ新規原因遺伝子の単離には至っていない。本研究の最終到達目標は BRCA1、2 以外の家族性卵巣癌原因遺伝子を新規に単離、同定することである。また、既に単離、同定された BRCA1、2 に関しても、遺伝子異常の検索を行い、卵巣癌発症への関与、治療に対する反応性、予後などの臨床的特徴を明らかにし、発症機構の解明、発症予防、早期発見および治療成績向上を目指すものである。本年度における我々の研究成果は次の 2 点に要約される。

①我が国の家族性卵巣癌における BRCA1、2 異常の関与を明らかにし、我が国に特有で頻度の高い創始者変異 (common founder mutation) を同定した。②BRCA1、2 以外の新規原因遺伝子が存在する候補領域を 3p22-p25 領域に限定し、候補遺伝子の限定を行った。

新規原因遺伝子単離に向けた具体的方針としては、ノンパラメトリック連鎖解析、相関解析、LOH 解析の結果を総合し、新規原因遺伝子の候補領域を数 100kb の範囲まで限定し、さらにその候補領域内から候補遺伝子を選定し、家族性卵巣癌患者において変異の検索を行う予定である。詳細な方法は以下の通りである。
1) 陽性マイクロサテライトマーカー近傍の SNP 相関解析: 7 つの陽性マイクロサテライトマーカー近傍のシーケンスデータより、当該

領域に 5-10kb 間隔の SNP マーカーの設定を行う (大塚との共同研究)。それらのマーカーを用いて、家族性卵巣癌症例 (親子発症も含む) 200 例、健常対照症例 200 例の多型解析による Case-control association study を行い、ハプロタイプ推定プログラムよりハプロタイプを構築し、 p -value=0.05 以下を有意基準として、家族性卵巣癌発症との間に強い相関の認められるマーカー (ハプロタイプ) を限定する。SNP のタイピングは、非蛍光オリゴヌクレオチドプライマーと蛍光ラベル ddNTP を用いた一塩基伸長反応法にて行う。

2) 候補遺伝子の限定: 候補遺伝子の限定には、上記の相関解析で得られた候補領域近傍より、機能の判明している既知遺伝子だけでなく未知遺伝子に関しても、塩基配列からの位置予測やアミノ酸配列からの機能予測などゲノムデータベースの遺伝子予測情報を駆使し (大塚との共同研究)、限定された候補領域に位置する未知の癌関連候補遺伝子をピックアップする。同時に、候補遺伝子 (未知遺伝子も含む) においてエキソン内に 5~10kb ごとの SNP を設定し、ハプロタイプ相関解析にてさらに候補遺伝子を限定する。さらなる association study を行い、相関の確認を行う。

3) 候補遺伝子の変異検索から原因遺伝子の同定: 家族性卵巣癌患者 16 人を対象に、得られた候補遺伝子の全エクソンについてダイレクトシーケンス法により遺伝子変異の検索を行う。確認された遺伝子変化に関しては、家系内での疾患発症との関連 (健常人での遺伝子解析)、健常コントロール集団における頻度の確認、卵巣癌腫瘍組織での発現解析により、家族性卵巣癌の発症への関与を検討する。

E. 結論

家族性卵巣癌家系において BRCA1,2 以外の新規原因遺伝子を同定することを目的に、これまでにノンパラメトリック連鎖解析と LOH (Loss of Heterozygosity) 解析にて 3p22-p25 が家族性卵巣癌の発症に関わる原因遺伝子の候補領域と考えられることを報告した。

今年度は新たに 10 家系の家族性卵巣癌家系

を集積し、BRCA1,2 遺伝子に突然変異の認められない家族性卵巣癌 29 家系を対象に、ゲノム全域についてノンパラメトリック連鎖解析を行った結果、3p22-p25 領域では (LOD score = 3.5, NPL score = 2.8) と、依然として連鎖の存在が確認された。そこで候補遺伝子の限定を目的に、家族性患者群 110 人、健常群 170 人を対象に高密度に設定したマイクロサテライト (150kb 間隔) による相関解析を行った結果、解析した 180 マイクロサテライトマーカーのうち 7 マーカーにおいて P -value が 0.01 以下と有意差を認め、その近傍 200kb に位置する RAD18 遺伝子を選定した。また、候補領域に位置する既知遺伝子のうち癌化に関連すると予想される 9 遺伝子を対象に SNPs を用いた一塩基伸長法による相関解析を行った結果、FANCD2、CTNNB1 遺伝子において疾患との間に有意な相関を認めた。以上より上記 3 遺伝子において家族性卵巣癌患者 15 人を対象にダイレクトシーケンスによる変異解析を行った結果、FANCD2 では 4 家系、CTNNB1 では 1 家系、RAD18 では 6 家系にミスセンス変化を認めた。以上の結果をふまえ、来年度は高密度の SNPs マーカーを用いた複数マーカーでのハプロタイプ相関解析により 3p22-p25 域の原因遺伝子同定を目指す方針である。

1 健康危険情報 特になし

表1 家族性卵巣癌におけるBRCA1、BRCA2 変異家系の頻度

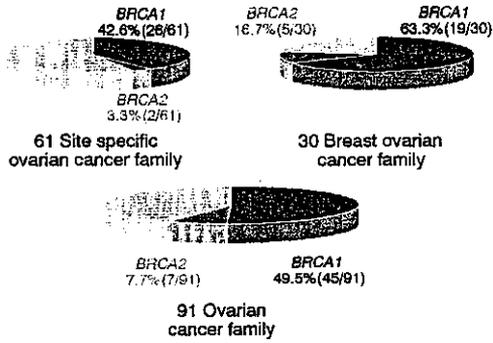


表3 Chromosome 3 におけるノンパラメトリック連鎖解析

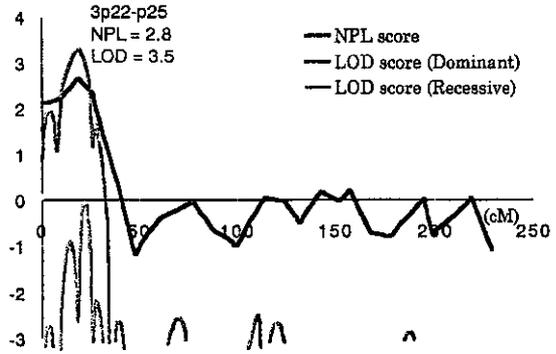


表2 家族性卵巣癌におけるBRCA1、2変異子の変異解析

No	Family	Designation	Exon	Nucleotide	Codon	AA change	Predicted effect
BRCA1							
1	Ov	M1R*	2	121	1	Met to Arg	Disrupt start codon
2	Ov	241delA*	3	241	41	Frameshift	PT
3	Br/Ov	C61G	5	300	61	Cys to Gly	Loss zinc-binding motif
4	Ov	L63X**	5	307	63	Leu to stop	PT
5	Br/Ov	L63X**	5	307	63	Leu to stop	PT
6	Ov	L63X**	5	307	63	Leu to stop	PT
7	Ov	L63X**	5	307	63	Leu to stop	PT
8	Ov	L63X**	5	307	63	Leu to stop	PT
9	Br/Ov	L63X**	5	307	63	Leu to stop	PT
10	Br/Ov	L63X**	5	307	63	Leu to stop	PT
11	Ov	L63X**	5	307	63	Leu to stop	PT
12	Br/Ov	Q169X**	8	624	169	Gln to stop	PT
13	Ov	Q517X*	11	1068	317	Gln to stop	PT
14	Ov	E532X*	11	1173	332	Gln to stop	PT
15	Ov	2080delA	11	2080	654	Frameshift	PT
16	Ov	2080delA	11	2080	654	Frameshift	PT
17	Ov	2080delA	11	2080	654	Frameshift	PT
18	Br/Ov	2194-2195delATT*	11	2194-2195	692	Frameshift	PT
19	Br/Ov	2307-2308delAAG*	11	2307-2308	796	Frameshift	PT
20	Br/Ov	2307-2308delAAG*	11	2307-2308	796	Frameshift	PT
21	Br/Ov	2730-2731delCC*	11	2730-2731	871	Frameshift	PT
22	Ov	Q934X**	11	2919	934	Gln to stop	PT
23	Ov	Q934X**	11	2919	934	Gln to stop	PT
24	Br/Ov	Q934X**	11	2919	934	Gln to stop	PT
25	Ov	Q934X**	11	2919	934	Gln to stop	PT
26	Br/Ov	Q934X**	11	2919	934	Gln to stop	PT
27	Ov	Q934X**	11	2919	934	Gln to stop	PT
28	Ov	Q934X**	11	2919	934	Gln to stop	PT
29	Br/Ov	Q934X**	11	2919	934	Gln to stop	PT
30	Br/Ov	3226-3231delTTAAAG*	11	3226-3231	1056	Frameshift	PT
31	Ov	3376-3377delTT*	11	3376-3377	1086	Frameshift	PT
32	Br/Ov	3493-3494delACT**	11	3493-3494	1125	Frameshift	PT
33	Ov	3516-3517delTTT*	11	3516-3517	1133	Frameshift	PT
34	Ov	3516-3517delTTT*	11	3516-3517	1133	Frameshift	PT
35	Ov	3532delG*	11	3532	1138	Frameshift	PT
36	Br/Ov	E1214X	11	3739	1214	Gln to stop	PT
37	Br/Ov	L1216X**	11	3766	1216	Leu to stop	PT
38	Ov	3834-3836delTTC*	11	3834-3836	1239	Frameshift	PT
39	Br/Ov	4046-4049delTTACA*	11	4046-4049	1309	Frameshift	PT
40	Br/Ov	4237-4238delAAG*	12	4237-4238	1373	Frameshift	PT
41	Ov	4237-4238delAAG*	12	4237-4238	1373	Frameshift	PT
42	Ov	IVS14-2A>G*	15	-	IVS	-	Splice aberration
43	Br/Ov	5275-5276 del AG*	19	-	-	-	Frameshift
44	Ov	5326 del T*	20	5326	1736	Frameshift	PT
45	Ov	D1778Y*	21	5451	1778	Asp to Tyr	Splice aberration
BRCA2							
1	Br/Ov	IVS5-1G>A	5	9504	3026	-	Splice aberration
2	Ov	4563delC*	11	4567	1447	Frame shift	PT
3	Ov	5804-5807delTTAA	11	5804-5807	1859	Frame shift	PT
4	Br/Ov	R21 (K>X)**	13	7180	2318	Arg to stop	PT
5	Br/Ov	7384-7385delT*	14	7384-7385	2386	Frame shift	PT
6	Br/Ov	8941-8944delTTATG*	21	8941-8944	2905	Frame shift	PT
7	Br/Ov	Q3226X**	23	9304	3026	Gln to stop	PT

* novel and unique mutation in Japan
** unique mutation in Japan

PT: protein truncation
IVS: a non-coding intervening sequence

表4 マイクロサテライト相関解析による候補領域の限定

Locus	Position (kb)	No. of alleles	Allele	P-value	Pc-value	Odds ratio
AC066583	11448*	12	189	0.00049	0.0059	3.40
D3S3589	16123	11	243	0.00015	0.0017	0.15
D3S3680	17393	10	126	0.00068	0.0068	2.19
AC026051	17433	9	135	0.00011	0.00099	3.90
ACO87858	23870	10	119	0.00016	0.0016	0.095
AC025612	35207	15	114	0.00028	0.0042	3.54
AC078780	41049	6	148	0.00015	0.0009	∞

* RAD18の近傍 約200kb
Pc-value=(No. of alleles) × (P-value)

表5 候補遺伝子におけるSNP相関解析

FANCD1 intron 2 (G→A)			
	健常女性	BRCA(+)	BRCA(-)
G/G	165	88	110
G/A	0	0	2
A/A	0	0	0
allele G	330	176	222
allele A	0	0	2
allele A = 0.27%			

CTNBN1 exon 3 (C→T)			
	健常女性	BRCA(+)	BRCA(-)
C/C	135	69	93
C/T	27	25	15
T/T	2	1	1
allele C	297	163	201
allele T	31	27	17
p=0.020			
p=0.027			

表6 有力候補遺伝子における変異解析

	Nucleic acid	Amino acid	Pt.
FANCD2			
exon3	C→T	Thr→Met	73-2
exon9	G→A	Ala→Thr	27-1
exon12	G→T	Ala→Ser	95-1
exon23	C→T	Pro→Leu	90-1
CTNNB1			
exon3	A→C	His→Pro	92-1
RAD18			
exon8	A→G	Arg→Ala	96-2, 92-1, 72, 61-1, 50-1, 250

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekine M, Nagata H, Tsuji S, Hirai Y, Fujimoto S, Hatae M, Kobayashi I, Fujii T, Nagata I, Ushijima K, Obata K, Suzuki M, Yoshinaga M, Umetsaki N, Satoh S, Enomoto T, Motoyama S, Tanaka K, and The Japanese Familial Ovarian Cancer Study Group. Localization of a novel susceptibility gene for familial ovarian cancer to chromosome 3p22-p25. *Human Molecular Genetics*. 10: 1421-1429, 2001.
2. Masayuki Sekine, Hiroshi Nagata, Shoji Tsuji, Yasuo Hirai, Seiichiro Fujimoto, Masayuki Hatae, Iwao Kobayashi, Tsuneo Fujii, Ichiro Nagata, Kimio Ushijima, Koshiro Obata, Mitsuaki Suzuki, Mitsuhiro Yoshinaga, Naohiko Umetsaki, Shinji Satoh, Takayuki Enomoto, Satoru Motoyama, Kenichi Tanaka and The Japanese Familial Ovarian Cancer Study Group: Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 and clinicopathologic analysis of ovarian cancer in 82 ovarian cancer families: two common founder mutations of BRCA1 in Japanese population. *Clinical Cancer Research* 7: 3144-50, 2001
3. Hiroshi Nagata, Masayuki Sekine, Shoji Tsuji, Yasuo Hirai, Seiichiro Fujimoto, Masayuki Hatae, Iwao Kobayashi, Tsuneo Fujii, Ichiro

Nagata, Kimio Ushijima, Koshiro Obata, Mitsuaki Suzuki, Mitsuhiro Yoshinaga, Naohiko Umetsaki, Shinji Satoh, Takayuki Enomoto, Satoru Motoyama, Kenichi Tanaka and The Japanese Familial Ovarian Cancer Study Group: Haplotypes of BRCA1 Mutation Alleles in Japanese Ovarian and Breast-Ovarian Cancer Families: A Novel Method to Find BRCA1 Associated Ovarian Cancer. *ACTA MEDICA et BIOLOGICA* in press.

4. Kurabayashi T, Tomita M, Matsushita H, Honda A, Takakuwa K, Tanaka K. Effects of a β 3 Adrenergic Receptor Agonist on Bone and Bone Marrow Adipocytes in the Tibia and Lumbar Spine of the Ovariectomized Rat. *Calcif Tissue Int*. 68 : 248-254, 2001.
5. Aoki Y, Sato T, Watanabe M, Sasaki M, Tsuneki I, Tanaka K. Neoadjuvant Chemotherapy Using Low-Dose Consecutive Intraarterial Infusions of Cisplatin Combined with 5-Fluorouracil for Locally Advanced Cervical Adenocarcinoma. *Gynecologic Oncology*. 81: 496-499 , 2001.
6. Matsushita H, Kurabayashi T, Tomita M, Yamamoto Y, Aoki Y, Tanaka K. Disseminated Intravascular Coagulation Associated with Intratumoral Hemorrhage of Ovarian Cancer. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 51: 274-276, 2001.
7. Matsushita M, Kurata H, Kase H, Arakawa M, Aoki Y, Tanaka K. MR imaging underestimates stromal invasion in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix. *Eur. J. Gynaec. Oncol*. 22: 201-203, 2001.
8. Tomita M, Kurata H, Aoki Y, Tanaka K, Kazama J. Case report : Pharmacokinetics of paclitaxel and cisplatin in a hemodialysis patient with recurrent ovarian cancer. *Anti - Cancer Drugs*. 12: 485-487, 2001.
9. Ishii K, Aoki Y, Takakuwa K, Tanaka K. Ovarian Function After Radical Hysterectomy with Ovarian Preservation for Cervical Cancer. *The Journal of Reproductive Medicine*. 46: 347-352, 2001.

10. Yoichi Aoki, Nobuaki Kawada, and Kenichi Tanaka : Early form of ovarian cancer originating in inclusion cysts a case report, *The Journal of Reproductive Medicine*, 45 (2) : P159-160, 2000
11. Yoichi Aoki, Masaru Sasaki, Minoru Watanabe, Takaaki Sato, Ikunosuke Tsuneki, Hiroshi Aida and Kenichi Tanaka : High-risk group in node-positive patients with stage IB, A, and B cervical carcinoma after radical hysterectomy and postoperative pelvic irradiation, *Gynecologic Oncology*, 77 : P305-309, 2000
12. Katsunori Kashima, Takashi Oite, Yoichi Aoki, Koichi Takakuwa, Hiroshi Aida, Hiroshi Nagata, Masayuki Sekine, Hong Jun Wu, Yasuo Hirai, Yuichi Wada, Kaichiro Yamamoto, Kazuo Hasegawa, Takahiko Sonoda, Takeshi Maruo, Ichiro Nagata, Masayuki Ohno, Mitsuaki Suzuki, Iwao Kobayashi, Kazuo Kuzuya, Takeshi Takahashi, Yuichi Torii, and Kenichi Tanaka: Screening of BRCA1 mutation using immunohistochemical staining with C-terminal and N-terminal antibodies in familial ovarian cancers, *Jpn. J. Cancer Res*, 91 : P399-409, 2000
13. Nobumichi Nishikawa, Takumi Kurabayashi, Masatoshi Tomita, Hiroshi Matsushita, Yoichi Aoki, Kenichi Tanaka : Use of the abdominal wall fat index determined ultrasonographically for assessing the risk of post-operative pulmonary embolism, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 68 : P241-247, 2000
14. Takumi Kurabayashi, Koichi Takakuwa, Kenichi Tanaka, and Niigata Nafarelin Study Group : Treatment with nafarelin for endometriosis in young women : Efficacy, Safety and lipid metabolism, *Journal of Reproductive Medicine*, 45 (6) : P454-460, 2000
15. Keisuke Honda, Koichi Takakuwa, Isao Hataya, Masako Yasuda, Takumi Kurabayashi, Kenichi Tanaka : HLA-DQB1 and HLA-DPB1 genotypes in severe preeclampsia, *Obstetrics & Gynecology*, 96 (3) : P385-389, 2000
16. Takehiro Serikawa, Norio Suzuki, Hiroshi Kikuchi, Kenichi Tanaka, Takayuki Kitagawa : A new cationic liposome for efficient gene delivery with serum cultured human cells : a quantitative analysis using two independent fluorescent probes, *Biochemical et Biophysica Acta*, 1467 (2) : P419-430, 2000
17. Toru Sugiyama, Michiaki Yakushiji, Yoichi Aoki, Kenichi Tanaka, Ryuichiro Nishimura, Kazuo Hasegawa, Masanori Ikeda, Kiichiro Noda, BMS-181339 Ovarian Cancer Study Group : Paclitaxel-cisplatin combination in advanced ovarian cancer : a phase study, *Int J Clin Oncol*, 5 : P85-88, 2000
18. Takeshi Takayanagi, Yoichi Aoki, Kenichi Tanaka : Expression of constitutively active c-MET receptor in human choriocarcinoma, *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 50 (3) : P198-202, 2000
19. Yoichi Aoki, Ikunosuke Tsuneki, Masaru Sasaki, Minoru Watanabe, Takaaki Sato, Hiroshi Aida, Kenichi Tanaka: Analysis of TH1 and TH2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry in patients with ovarian cancer, *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 50 (3) : P207-211, 2000
20. Takumi Kurabayashi, Masahiko Okada, and Kenichi Tanaka, for the Niigata Epadel Study Group : Eicosapentaenoic acid effect on hyperlipidemia in menopausal Japanese women, *Obstet Gynecol*, 96 (4) : P521-528, 2000
21. Shibuya S, Aoki, Y. Aida H, Kurabayashi T, Takakuwa K, Nagata H, Sekine M, Kashima K, Wu H J, Tanaka K : Mutation analysis of the BRCA1 gene in Japanese patients with sporadic ovarian cancer. 4, 348-352, *Int J Clin Oncol*, 1999
22. Aoki Y, Kodama S, Kurata H, Kase H, Tanaka K: Failure of high-dose chemotherapy with peripheral blood stem cell support for refractory placental site trophoblastic tumor. 47, 214- 216, *Gynecol Obstet Invest*, 1999
23. Hasegawa I, Murakawa H, Suzuki M,

- Yamamoto Y, Kurabayashi T, and Tanaka K : Effect of troglitazone on endocrine and ovulatory performance in woman with insulin resistance-related polycystic ovary syndrome. 71, 323-327, *Fertil Steril*, 1999
24. Kikuchi A, Aoki Y, Sugaya S, Serikawa T, Takakuwa K, Tanaka K, Suzuki N, and Kikuchi H : Development of novel cationic liposomes for efficient gene transfer into peritoneal disseminated tumor. 10, 947-955, *HUMAN GENE THERAPY*, 1999
25. Kurabayashi T, Tomita M, Matsushita H, Yahata T, Honda A, Takakuwa K and Tanaka K: Association of vitamin D and estrogen receptor gene Polymorphism with the effect of hormone replacement therapy on bone mineral density in Japanese women. 180, 1115-1120, *Am J Obstet Gynecol*, 1999
26. Arinami Y, Hasegawa I, Takakuwa K, Tanaka K : Prediction of preterm delivery by combined use of simple clinical test. 8, 70-73, *The Journal of Maternal-Fetal Medicine*, 1999
27. Arakawa M, Takakuwa K, Honda K, Tamura M, Kurabayashi T, Tanaka K: Suppressive effect of anticardiolipin antibody on the proliferation of human umbilical vein endothelial cells. 71, 1103-1107, 6, *Fertility and Sterility*, 1999
28. Kase H, Kodama S, Tanaka K: Observations of high iron diamine-alcian blue stain in uterine cervical glandular lesions. 48, 56-60, *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 1999
29. Murakawa H, Hasegawa I, Kurabayashi T, Tanaka K: Polycystic ovary syndrome Insulin resistance and ovulatory responses to clomiphene citrate. 44, 23-27, 1, *J. Reproductive Medicine*, 1999
30. Natsume N, Aoki Y, Kase H, Kashima K, Sugaya S and Tanaka K: Ovarian metastasis in stage b and cervical adenocarcinoma. 74, 255-258, *Gynecologic Oncology*, 1999
31. Takakuwa K, Hataya I, Arakawa M, Kikuchi A, Higashino M, Yasuda M, Kurabayashi T, Tanaka K : Possible susceptibility of the HLA-DPB1*0402 and HLA-DPB1*04 alleles to unexplained recurrent abortion. Analysis by means of polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism method. 42, 233-239, *American Journal of Reproductive Immunology*, 1999
32. Kikuchi H, Norio S, Ebihara K, Morita H, Ishii Y, Kikuchi A, Sugaya S, Serikawa T, Tanaka K : Gene delivery using liposome technology. 62, 269-277, *J. Controlled Release*, 1999
33. Takakuwa K, Honda K, Ishii K, Hataya I, Yasuda M, Tanaka K: Studies on the HLA-DRB1 genotypes in Japanese women with severe pre-eclampsia positive and negative for anticardiolipin antibody using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. 14, 2980-2986, *Human Reproduction*, 1999
34. Kodama S, Kase H, Tanaka K, Tokunaga A, Sudo N, Takahashi T, Honma S: Multivariate analysis of prognostic factors in stage I ovarian cancer. 4, 90-95, *Int J Clin Oncol*, 1999

5 学会発表

- 1 Masayuki Sekine, Hiroshi Nagata, Hiroshi Aida, Katsunori Kashima, Kenichi Tanaka. Candidate genes in 3p22-p25 of familial ovarian cancer other than BRCA1 and BRCA2. American Association for Cancer Research 93rd Annual Meeting. April 6-10th 2002
- 2 Masayuki Sekine, Hiroshi Nagata, Hiroshi Aida, Katsunori Kashima, Hong-Jun Wu, Kenichi Tanaka. Genome-wide linkage analysis for familial ovarian cancer. American Association for Cancer Research 92nd Annual Meeting. March 24-28th 2001
- 3 関根正幸, 小林巖, 波多江正紀, 平井康夫, 藤井恒夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕, 田中憲一
Genome-wide linkage analysis および Association study による家族性上皮性卵巣癌に関連する原因遺伝子領域の同定。第53回日本産科婦人科学会, 2001年5月
- 4 加嶋克則, 小林巖, 波多江正紀, 平井康夫, 藤井恒夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕, 田中憲一

- 家族性上皮性卵巣癌症例の LOH法を用いた遺伝子変化の解析。第 53 回日本産科婦人科学会，2001 年 5 月
- 5 永田寛, 小林巖, 波多江正紀, 平井康夫, 藤井恒夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕, 田中憲一
LOH からのハプロタイプ推定による孤発性卵巣癌における BRCA1 変異症例の検索。第 53 回日本産科婦人科学会，2001 年 5 月
 - 6 呉洪軍, 金沢浩二, 小林巖, 永田一郎, 波多江正紀, 田中憲一。家族性上皮性卵巣癌患者におけるエストロゲンレセプター遺伝子の解析。第 59 回日本癌学会。2000 年 10 月。
 - 7 加嶋克則, 北井啓勝, 小林巖, 鈴木光明, 永田一郎, 波多江正紀, 平井康夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕。家族性上皮性卵巣癌における Comparative Genomic Hybridization (CGH) 解析。第 59 回日本癌学会。2000 年 10 月。
 - 8 関根正幸, 小林巖, 波多江正紀, 平井康夫, 藤井恒夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕, 田中憲一
genomewide linkage analysis による家族性上皮性卵巣癌に関連する新規原因遺伝子領域の同定第 52 回日本産科婦人科学会，2000 年 4 月
 - 9 加嶋克則, 小林巖, 波多江正紀, 平井康夫, 藤井恒夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕, 田中憲一
家族性上皮性卵巣癌症例の CGH 法を用いた遺伝子変化の解析。第 52 回日本産科婦人科学会，2000 年 4 月
 - 10 永田寛, 小林巖, 波多江正紀, 平井康夫, 藤井恒夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕, 田中憲一
本邦の家族性卵巣癌家系で多く認められた BRCA1 遺伝子変異。第 52 回日本産科婦人科学会，2000 年 4 月
 - 11 呉洪軍, 小林巖, 波多江正紀, 平井康夫, 藤井恒夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕, 田中憲一
家族性上皮性卵巣癌患者におけるエストロゲンレセプター遺伝子の解析。第 52 回日本産科婦人科学会，2000 年 4 月
 - 12 加嶋克則, 北井啓勝, 小林巖, 鈴木光明, 永田一郎, 波多江正紀, 平井康夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕。BRCA1 蛋白の局在解析による BRCA1 遺伝子の突然変異検出に関する検討。第 51 回日本産科婦人科学会，1999 年 4 月
 - 13 関根正幸, 北井啓勝, 小林巖, 鈴木光明, 永田一郎, 波多江正紀, 平井康夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕。家族性上皮性卵巣癌に関する原因遺伝子領域の同定。第 51 回日本産科婦人科学会，1999 年 4 月
 - 14 永田寛, 北井啓勝, 小林巖, 鈴木光明, 永田一郎, 波多江正紀, 平井康夫, 藤本征一郎, 星合昊, 吉永光裕。家族性卵巣癌における LOH 解析による癌抑制遺伝子の検索。第 51 回日本産科婦人科学会，1999 年 4 月
 - 15 呉洪軍, 金沢浩二, 小林巖, 永田一郎, 波多江正紀, 田中憲一。家族性上皮性卵巣癌患者におけるエストロゲンレセプター遺伝子の解析。第 51 回日本産科婦人科学会，1999 年 4 月
 - 16 関根正幸, 山本嘉一郎, 平井康夫, 吉永光裕, 藤井恒夫, 波多江正紀。家族性上皮性卵巣癌に関連する原因遺伝子領域の同定。第 58 回日本癌学会，1999 年 9 月
 - 17 加嶋克則, 山本嘉一郎, 平井康夫, 吉永光裕, 藤井恒夫, 竹原和宏, 波多江正紀。BRCA1 蛋白の細胞内局在解析による家族性卵巣癌症例における BRCA1 遺伝子の突然変異検出に関する検討。第 58 回日本癌学会，1999 年 9 月
 - 18 呉洪軍, 山本嘉一郎, 平井康夫, 吉永光裕, 藤井恒夫, 波多江正紀。家族性上皮性卵巣癌患者におけるエストロゲンレセプター (ER) 遺伝子の解析。第 58 回日本癌学会，1999 年 9 月
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

SNPs(Single Nucleotide Polymorphism) を用いた相関解析による
家族性卵巣癌関連遺伝子の単離と解析

分担研究者 谷上 信 大塚藤井記念研究所長

研究要旨 家族性卵巣癌において新規原因遺伝子を同定するためのさらなる候補領域限定に向けて、case-control association study（患者-対照相関解析）を行うために、高密度のマーカー設定を行うことを目的とした。NCBI（National Center for Biotechnology Information）データベースの Goldenpath より、ノンパラメトリック連鎖解析によって得られた候補領域 3p22-p25 領域約 30Mb 内に位置する新規マイクロサテライトマーカーを約 150kb ごとに同定した。また、3p22-p25 領域に位置する既知遺伝子のうち、その機能から癌化に関連すると予想される 10 遺伝子（FANCD、VHL、OGG1、RAF1、RAD18、PCAF、TOP2B、RAB5A、TGFB2、CTNNA1）を選定し、SNP データベースより各遺伝子につき 2～3 個の SNP を同定した。

A. 研究目的

主任研究者のノンパラメトリック連鎖解析によって得られた候補領域 3p22-25 領域の約 30Mb において、case-control association study（患者-対照相関解析）にて、さらなる候補領域の限定を行うため、約 150kb ごと的高密度に分布するマイクロサテライトマーカーを設定し、さらに 3p22-p25 領域に位置する既知遺伝子のうち、その機能から癌化に関連すると予想される 10 遺伝子（FANCD、VHL、OGG1、RAF1、RAD18、PCAF、TOP2B、RAB5A、TGFB2、CTNNA1）内に、各遺伝子につき 2～3 個の SNP を同定することを目的とした。

B. 研究方法

- 1 Genethon より公表されているマイクロサテライトマーカーの位置情報を目印にして（図 1）、NCBI（National Center for Biotechnology Information）の Goldenpath より、ノンパラメトリック連鎖解析によって得られた候補領域 3p22-25 領域の約 30Mb 内に位置することが確認されたコンティグのシーケンスをダウンロードする。
- 2 得られたシーケンスより、CACACA...、TGTGTG...等 10 回以上の 2 塩基リピート領域をピックアップし、約 150kb ごとに設定されるよう、できるだけリピート回数の多

い領域を優先的に選定する。

- 3 選定したマイクロサテライト領域を、BLAST サーチし、これまでに解析の済んでいる領域と重複していない事を確認する。重複している場合は、他の領域と入れ替えを行う。
- 4 選定したマイクロサテライト領域より、PCR 増幅断片が約 200bp 以下になるように、Primer3 プログラムを用いてプライマーの選定を行う。
- 5 10 遺伝子（FANCD、VHL、OGG1、RAF1、RAD18、PCAF、TOP2B、RAB5A、TGFB2、CTNNA1）内の SNP については、東大医科学研究所の JSNP データベースより各遺伝子につき 2～3 個の SNP を同定し、一塩基伸長法により多型の確認を行った。

C. 研究成果

ノンパラメトリック連鎖解析によって得られた候補領域 3p22-25 領域の約 30Mb において、約 150kb ごとに 200 個の新規マイクロサテライトマーカーを同定した。また、10 遺伝子（FANCD、VHL、OGG1、RAF1、RAD18、PCAF、TOP2B、RAB5A、TGFB2、CTNNA1）内に、JSNP データベースより各遺伝子につき 2～3 個の SNP を同定し、日本人集団健康常人 16 人において多型が認められることを確認した。

D. 考察

家族性卵巣癌家系の新規原因遺伝子を同定することを目的に、ゲノム全域に対するノンパラメトリック連鎖解析を行った結果、3p22-25 領域が候補領域として最有力であると考えられ、さらなる候補領域限定のため、相関解析に用いる高密度のマイクロサテライトマーカー、SNPs の設定を担当した。マイクロサテライトマーカーは連鎖不平衡の保たれる距離が約 200kb と SNP マーカーに比べ長いと考えられており、今回、SNP マーカーに先立ち、約 30Mb の候補領域をマイクロサテライトマーカーを用いてスクリーニングする方針とした。Genethon 等の既知のマイクロサテライトマーカーでは、平均距離が約 400kb と間隔が長く、領域によって密度の差が大きいため、今回はゲノムプロジェクトの公共シーケンスデータを利用し、高密度のマイクロサテライトマーカーの設定を行った。

患者 DNA の中にはパラフィンブロックから抽出したために断片化の起こった DNA も含まれるため、PCR 増幅領域が約 200bp 以下になるようにプライマーの選定を行った。

また、候補領域内の 10 遺伝子に関しては遺伝子内に SNP の同定を行った。解析に用いるためには日本人集団で多型を認めることが必要であるため、東大医科学研究所の JSNP データベースを使用し、日本人の健常人 16 人において多型の確認を行った。

E. 結論

case-control association study に用いるマーカーとして、NCBI (National Center for Biotechnology Information) データベースの Goldenpath より、ノンパラメトリック連鎖解析によって得られた候補領域 3p22-p25 の約 30Mb 内に位置する新規マイクロサテライトマーカーを約 150kb ごとに同定した。また、3p22-p25 領域に位置する既知遺伝子のうち、その機能から癌化に関連すると予想される 10 遺伝子 (FANCD、VHL、OGG1、RAF1、RAD18、PCAF、TOP2B、RAB5A、TGFB2、CTNNB1) を選定し、SNP データベースより各遺伝子につき 2~3 個の SNP を同定した。

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
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
関根正幸	Localization of a novel susceptibility gene for familial ovarian cancer to chromosome 3p22-p25.	Human Molecular Genetics.	10	1421-1429	2001
関根正幸	Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 and clinicopathologic analysis of ovarian cancer in 82 ovarian cancer families: two common founder mutations of BRCA1 in Japanese population.	Clinical Cancer Research	7	3144-3150	2001
関根正幸	家族性卵巣癌	産婦人科の実際	50	1827-1833	2001

20010153

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので P.12 の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。