

200200161A

厚生科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

3p22 - p25 領域における SNPs 相関解析を用いた家族性卵巣癌関
連遺伝子の単離と解析 (12040101)

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田中 憲一

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

3p22 - p25 領域における SNPs 相関解析を用いた家族性 卵巣癌関連遺伝子の単離と解析	— 1
田中憲一	

II. 分担研究報告

3p22 - p25 領域における SNPs 相関解析を用いた家族性 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)	— 9
谷上 信	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	— 11
---------------------	------

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

3p22-p25 領域における SNPs 相関解析を用いた家族性卵巣癌関連
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 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。昨年度は新たに米国 Rosewell park cancer institute : DiCioccio 博士との共同研究を実施することにより、米国における家族性卵巣癌 148 家系を含む卵巣癌検体 630 例の提供を受けた。一方、我々より日本人の家族性卵巣癌 90 家系の発症年齢、既往歴、健常人の有無等の家系情報を送付し、BRCA1、2 に次ぐ第 3 の新規原因遺伝子に関する集団遺伝学的手法による遺伝様式、遺伝子頻度、浸透率等の解析を依頼した。米国の家系においては 148 家系中 39 家系に BRCA1 (26.4%)、15 家系に BRCA2 (10.1%) の変異を、日本におけるこれまでの累計では、96 家系中 46 家系に BRCA1 (47.9%)、7 家系に BRCA2 (7.3%) の変異を認めた。米国検体での解析では、日本人での相関解析の結果 Pc-value が 0.01 以下を示した 7 マーカーにおいて、米国卵巣癌患者 630 人、米国コントロール検体 450 人を対象に相関解析を行った結果、4 マーカーで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。目的とする家族性卵巣癌原因遺伝子は癌抑制遺伝子を代表とする Major gene が想定されるため、人種を越えて卵巣癌発症への関与が強く疑われる。卵巣癌の同胞発症危険率は約 5 倍と報告されていることから、現在の対象家系（日米合わせ計 100 家系以上）を解析することにより遺伝子単離への期待は大いに強くなったと考える。今後は、日米卵巣癌検体における SNP 相関解析、ゲノムワイド罹患同胞対解析による 3p 連鎖の確認、さらに 3p に続く候補領域の限定を行う方針である。

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。

本年度は新たに米国 Rosewell park cancer institute との共同研究を実施することにより、米国における家族性卵巣癌検体の提供を受け、本邦の卵巣癌検体での解析結果と総合した相関解析により、候補遺伝子の限定を行う。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) 米国検体での相関解析による候補領域の

限定：連鎖解析により得られた候補領域 3p22-p25 の 30Mb 内にて、日本人の家族性患者群および健常群での case-control study の結果 Pc-value が 0.01 以下を示した 7 マーカーにおいて、米国卵巣癌患者 630 人、米国コントロール検体 450 人を対象に同マーカーによる相関解析を行い、各マーカーにおけるアレル頻度を χ^2 検定し、アレル数で補正した後の p-value の算出を行う。

（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。本研究に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守する。

C. 研究結果

(1) BRCA1、2 の変異解析

本年度は 5 家系の家族性卵巣癌家系を新たに集積し、96 家系中 46 家系に BRCA1 (47.9%)、7 家系に BRCA2 (7.3%) の変異を認めた（表 1、2）。米国の家系においては 148 家系中 39 家系に BRCA1 (26.4%)、15 家系に BRCA2 (10.1%) の変異を認めた（表 3）

(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 2）。

(3) 米国検体での相関解析による候補領域の限定：BRCA1、2 遺伝子に突然変異の認められない家族性卵巣癌 29 家系を対象にした罹患同胞対解析により得られた候補領域 3p22-p25 の

30Mb 内にて、日本人の家族性患者群および健常群での case-control study の結果 Pc-value が 0.01 以下を示した 7 マーカーにおいて、米国卵巣癌患者 630 人、米国コントロール検体 450 人を対象に同マーカーによる相関解析を行った。その結果、D3S3589 ではアレル 145 において $P_c=1.5 \times 10^{-9}$ (OR=1.84)、D3S3680 ではアレル 132 において $P_c=1.0 \times 10^{-8}$ (OR=1.89)、AC025612 ではアレル 110 において $P_c=0.0021$ (OR=2.12)、AC078780 ではアレル 159 において $P_c=5.3 \times 10^{-5}$ (OR=0) と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、図 1)。

(4) 日米卵巣癌家系の集団遺伝学的解析

日本人の家族性卵巣癌 90 家系の発症年齢、既往歴、健常人の有無等の家系情報を米国に送付し、BRCA1、2 に次ぐ第 3 の新規原因遺伝子に関する集団遺伝学的手法による遺伝様式、遺伝子頻度、浸透率等の解析を依頼した。

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. BRCA1、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、候補遺伝子の選定が可能となった。
2. 米国との共同研究を実施することにより、

100 家系を超える BRCA1、2 に変異を認めない家族性卵巣癌検体が解析可能となり、原因遺伝子同定の展望が確実なものとなった。

米国 Rosewell park cancer institute との共同研究の開始により、100 家系を超える家族性卵巣癌検体の解析が可能となったが、目的とする家族性卵巣癌原因遺伝子は癌抑制遺伝子を代表とする Major gene が想定されるため、人種を越えて卵巣癌発症への関与が強く疑われる。卵巣癌の同胞発症危険率は約 5 倍と報告されていることから、現在の対象家系 (日米合わせ計 100 家系以上) を解析することにより遺伝子単離への期待は大いに強くなったと考える。今後は、3p 領域での SNP を用いた相関解析による候補遺伝子の同定と、ゲノムワイドの罹患同胞対解析による 3p 連鎖の確認、さらに 3p に続く候補領域の限定を行う方針である。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。詳細な方法を以下に示す。

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クエンスデータより、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 600 例、健常対照症例 600 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。

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

においてエクソン内に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

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。本年度は新たに米国 Rosewell park cancer institute: DiCioccio 博士との共同研究を実施することにより、米国における家族性卵巣癌148家系を含む卵巣癌検体630例の提供を受けた。一方、我々より日本人の家族性卵巣癌90家系の発症年齢、既往歴、健常人の有無等の家系情報を送付し、BRCA1、2に次ぐ第3の新規原因遺伝子に関する集団遺伝学的手法による遺伝様式、遺伝子頻度、浸透率等の解析を依頼した。米国の家系においては148家系中39家系にBRCA1(26.4%)、15家系にBRCA2(10.1%)の変異を、日本におけるこれまでの累計では、96家系中46家系にBRCA1(47.9%)、7家系にBRCA2(7.3%)の変異を認めた。米国検体での解析では、日本人での相関解析の結果Pc-valueが0.01以下を示した7マーカーにおいて、米国卵巣癌患者630人、米国コントロール検体450人を対象に相関解析を行った結果、D3S3589、D3S3680、AC025612、AC078780マーカーで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。米国 Rosewell park cancer instituteとの共同研究の開始により、100家系を超える家族性卵巣癌検体の解析が可能となった。目的とする家族性卵巣癌原因

遺伝子は癌抑制遺伝子を代表とする Major gene が想定されるため、人種を越えて卵巣癌発症への関与が強く疑われる。卵巣癌の同胞発症危険率は約5倍と報告されていることから、現在の対象家系(日米合わせ計100家系以上)を解析することにより遺伝子単離への期待は大いに強くなったと考える。今後は、日米卵巣癌検体におけるSNP相関解析、ゲノムワイド罹患同胞対解析による3p連鎖の確認、さらに3pに続く候補領域の限定を行う方針である。

F. 健康危険情報 特になし

表1 日本人の卵巣癌家系におけるBRCA1、2の関与

	家系数(%)		
	BRCA1	BRCA2	計
卵巣癌家系	26(40.0)	2(3.1)	65
乳癌卵巣癌家系	20(64.5)	5(16.1)	31
計	46(47.9)	7(7.3)	96

表2 家族性卵巣癌におけるBRCA1、BRCA2変異家系の頻度

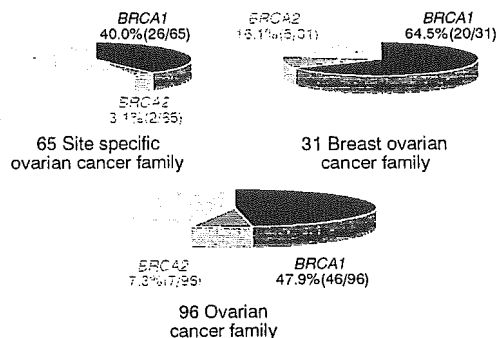


表3 米国の卵巣癌家系における BRCA1、2 の関与

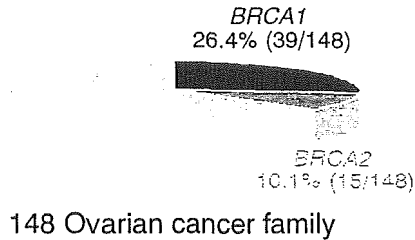
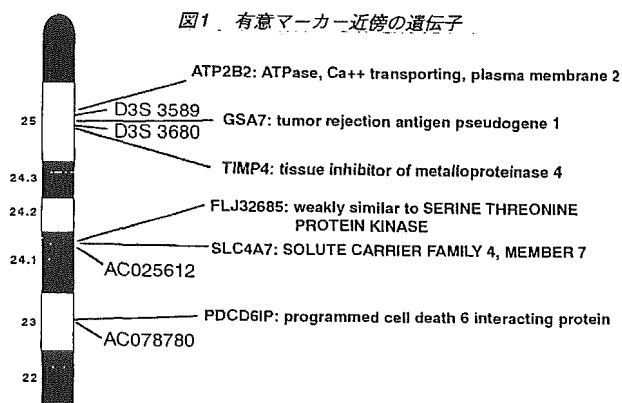


表4 米国卵巣癌患者を用いた相関解析による候補領域の限定

Locus	Position (kb)	No. of alleles	Allele	Pc-value	Odds ratio
AC066583	11448	-	-	NS	-
D3S3589	16123	15	145	1.5×10^{-9}	1.84
D3S3680	17393	13	132	1.0×10^{-8}	1.89
AC026051	17433	-	-	NS	-
AC087858	23870	-	-	NS	-
AC025612	35207	16	110	0.0021	2.12
AC078780	41049	14	159	5.3×10^{-5}	0

Pc-value=(No. of alleles) × (P-value)



G. 研究発表

1. 論文発表

1.Watanabe M, Aoki Y, Kase H, Fujita K, Tanaka K.Low risk endometrial cancer: A study of pelvic lymph node metastasis.Int J Gynecol Cancer. 2003 Jan-Feb;13(1):38-41.

2:Aoki Y, Kase H, Fujita K, Tanaka K.Dysgerminoma with a Slightly Elevated alpha-Fetoprotein Level Diagnosed as a Mixed Germ Cell Tumor after Recurrence.Gynecol Obstet Invest. 2003;55(1):58-60.

3:Obata H, Aoki Y, Watanabe M, Matsushita H, Yahata T, Fujita K, Kurata H, Tanaka K. Docetaxel and carboplatin combination chemotherapy for recurrent endometrial cancer.Int J Clin Oncol. 2003 Feb;8(1):53-5.

4:Kurata H, Takakuwa K, Tsuneki I, Aoki Y, Tanaka K.Circulating highly fluorescent reticulocytes to predict the adequate harvesting of peripheral blood progenitor cells in platinum-based chemotherapy.Transfus Apheresis Sci. 2002 Dec;27(3):199-202.

5:Watanabe M, Aoki Y, Kurata H, Tanaka K.Pneumocystis carinii pneumonia in a patient with stage IV ovarian cancer.Gynecol Oncol. 2002 Nov;87(2):225-7.

6:Kurata H, Aoki Y, Tanaka K.Simple one-step catheter placement for the treatment of infected lymphocele.Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003 Jan 10;106(1):69-71.

7:Ishii K, Aoki Y, Sasaki M, Tanaka K.Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone induced by intraarterial cisplatin chemotherapy.Gynecol Oncol. 2002 Oct;87(1):150-1.

○8:Aoki Y, Sato T, Tsuneki I, Watanabe M, Kase H, Fujita K, Kurata H, Tanaka K.Docetaxel in combination with carboplatin for chemo-naive patients with epithelial ovarian cancer.Int J Gynecol Cancer. 2002 Nov-Dec;12(6):704-9.

○9:Kurata H, Sasaki M, Kase H, Yamamoto Y, Aoki Y, Tanaka K.Elevated serum CA125 and CA19-9 due to the spontaneous rupture of ovarian endometrioma.Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.

- 2002 Oct 10;105(1):75-6.
- 10:Aoki Y, Tanaka K. Current approaches of neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2002 Feb;2(1):73-82. Review.
- 11:Kurata H, Takakuwa K, Tsuneki I, Aoki Y, Tanaka K. Ovarian tumor cell detection in peripheral blood progenitor cells harvests by RT-PCR. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002 Jun;81(6):555-9.
- 12:Kurata H, Takakuwa K, Tsuneki I, Aoki Y, Tanaka K. Circulating CD34+ cells to predict the adequate harvest of peripheral blood progenitor cells in platinum-based chemotherapy. *Arch Gynecol Obstet.* 2002 Jan;266(1):34-7.
- 13:Amikura T, Aoki Y, Kase H, Watanabe M, Sato T, Fujita K, Kurata H, Tanaka K. Survival of patients with advanced ovarian cancer treated with intermittent chemotherapy following cytoreductive surgery and adjuvant chemotherapy. *Int J Clin Oncol.* 2002 Feb;7(1):45-50.
- 14:Watanabe M, Aoki Y, Tomita M, Sato T, Takaki Y, Kato N, Kikuchi M, Kase H, Tanaka K. Paclitaxel and carboplatin combination chemotherapy in a hemodialysis patient with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2002 Feb;84(2):335-8.
- 15:Mitsui T, Aoki Y, Nagata Y, Kojima Y, Tanaka K. Patent foramen ovale complicated by paradoxical embolism and brain infarct in a patient with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2001 Dec;83:608-9.
- 16:Takakuwa K, Adachi H, Hataya I, Ishii K, Tamura M, Tanaka K. Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population. *Hum Reprod.* 2003 Apr;18(4):728-33.
- 17:Ishii K, Takakuwa K, Adachi H, Higashino M, Hataya I, Tanaka K. Studies on the human leukocyte antigen class I antigens in Japanese patients with macroscopically diagnosed endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 2002;54(3):150-3.
- 18:Matsushita H, Higashino M, Sekizuka N, Kurabayashi T, Takakuwa K, Tanaka K. Successful prenatal treatment of congenital heart block with ritodrine administered transplacentally. *Arch Gynecol Obstet.* 2002 Nov;267(1):51-3.
- 19:Matsushita H, Kurabayashi T, Tomita M, Honda A, Takakuwa K, Tanaka K. The effect of multiple pregnancies on lumbar bone mineral density in Japanese women. *Calcif Tissue Int.* 2002 Jul;71(1):10-3.
- 20:Matsushita H, Kurabayashi T, Tomita M, Honda A, Takakuwa K, Tanaka K. The Effect of Multiple Pregnancies on Lumbar Bone Mineral Density in Japanese Women. *Calcif Tissue Int.* 2002 Jun 19 [epub ahead of print]
- 21:Ishii K, Takakuwa K, Mitsui T, Tanaka K. Studies on the human leukocyte antigen-DR in patients with endometriosis: genotyping of HLA-DRB1 alleles. *Hum Reprod.* 2002 Mar;17:560-3.
- 22. 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, Umesaki 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.
- 23. 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 Umesaki, 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
- 24. 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 Umesaki,

- 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
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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)
- 32. 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
- 33. 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
34. 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
35. 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
36. 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
- 37. 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,

Biochimica et Biophysica Acta, 1467 (2) : P419-430, 2000

○38. 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

39. 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

○40. 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

41. 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

2 学会発表

- 1 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 家族性上皮性卵巣癌の発症に関連する候補遺伝子の同定と変異の検索 第54回日本産科婦人科学会, 2002年4月
- 2 網倉貴之, 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 BRCA1 変異キャリアの卵巣癌発症における p53、p21 の関与に関する検討 第54回日本産科婦人科学会, 2002年4月
- 3 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
- 4 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

- 5 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
- 6 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
- 7 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

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

3p22-p25 領域における SNPs 相関解析を用いた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、有意差を認めたマーカーに関しては、その近傍の遺伝子を UCSC Genome Browser の BLAT search にて検索を行った。

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、さらに有意差を認めたマーカーに関してはその近傍の遺伝子を同定することを目的とした。

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 有意差を認めたマーカーに関しては、その近傍の遺伝子を UCSC Genome Browser の BLAT search にて検索を行う。

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

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、有意差を認めた 4 マーカーについてその近傍の候補遺伝子を限定した（図 1）。

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、さらなる候補遺伝子限定のため、陽性マーカー近傍の遺伝子同定を担当した。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、陽性マーカー近傍の候補遺伝子に関しては、遺伝子内に SNP の同定を行い、さらなる遺伝子の限定を行う予定である。

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、有意差を認めたマーカーに関しては、その近傍の遺伝子を UCSC Genome Browser の BLAT search にて検索を行った。

F. 健康危険情報

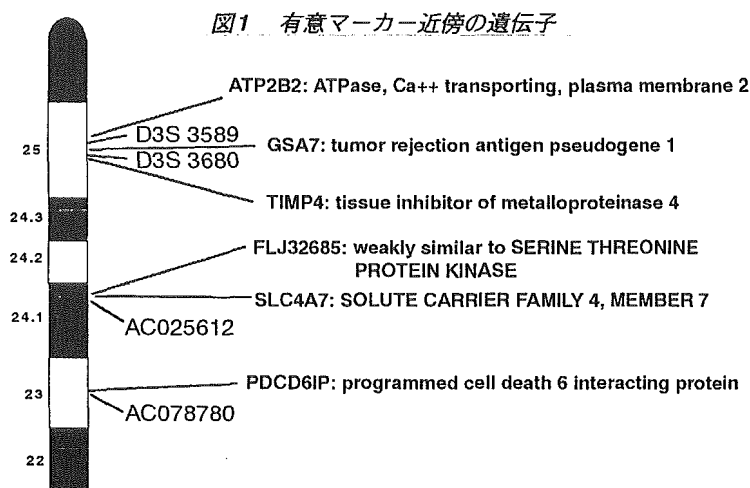
特になし

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
なし