

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

子宮内膜症病態解明を目的とした罹患同胞対連鎖及び
患者・対照群相関解析を用いた遺伝学的要因の関与に
関する研究

平成 14 年度 総括研究報告書

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

子宮内膜症病態解明を目的とした罹患同胞対連鎖及び患者・対照群相関解析を用いた遺伝学的要因の関与に関する研究

 1

田中 憲一

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

子宮内膜症病態解明を目的とした罹患同胞対連鎖及び患者・対照群相関解析を用いた
遺伝学的要因の関与に関する研究

主任研究者 田中 憲一 新潟大学医学部産科学婦人科学教室教授

研究要旨

本研究は、ゲノムワイドでの候補遺伝子限定が可能な 3 万マイクロサテライトマーカーを用いた患者・対照群相関解析および DNA chip を用いての 12000 遺伝子の発現解析を同時に行うことで、子宮内膜症発症に関与する疾患感受性遺伝子を同定し、発症メカニズムの解明、発症予防、また新たな治療法の開発に貢献することを目的とする。まず、ゲノムワイドに 100kb 間隔、約 3 万個のマーカー設定を行い、末梢血リンパ球より DNA を抽出後、患者群・対照群各 200 例の DNA を等量ずつ微量混合した Pooled DNA を作成。PCR、電気泳動にて多型アリル頻度を求め、患者・対照群間でその各頻度を比較し、 $P < 0.05$ を有意基準として陽性マーカーの限定を行う。陽性マーカーにおいては、別の患者・対照群集団で作成した Pooled DNA を用いて同様に 2 次スクリーニングを行う。現在までに 23,277 マーカーの設定が完了、20,271 マーカーにつき 1 次スクリーニングの解析が終了し、うち 1,434 マーカーが陽性を示した。2 次スクリーニングでは、そのうち 349 マーカーが陽性を示し、同マーカー近傍に疾患感受性遺伝子の存在が示唆されている。現在、さらに候補領域を限定するため 3 次スクリーニングを行っており、また、DNA chip での発現解析では、性周期の影響を除外した正常子宮内膜と内膜症組織の比較で 294 遺伝子が 3 倍以上の発現差を認めている。今後は、相関解析を用いたポジショナルクローニングで限定された候補領域と DNA chip を用いた発現解析の結果を照らし合わせるにより、候補領域から真の候補遺伝子の選定を行い、遺伝子内の SNPs (single nucleotide polymorphisms) マーカーを用いて患者・対照群相関解析を行うとともに、親子ペアを用いた TDT を行い、疾患感受性遺伝子の同定と発症への関与の確認を行う方針である。

(分担研究者)

谷上 信 : 大塚製薬株式会社藤井記念
研究所所長
岡村 均 : 熊本大学医学部産科婦人科
学教室教授
伊熊健一郎 : 宝塚市立病院産婦人科部長

杉並 洋 : 国立京都病院産婦人科
副院長

(研究協力者)

石丸 忠之 : 長崎大学医学部産科婦人科
学教室教授

A. 研究目的

子宮内膜症は、生殖年齢女性の3~10%に認められる頻度の高い疾患であり、平成9年の本邦の受療患者数は12万人以上にものぼり近年増加傾向にある。また本疾患は、月経困難症のため患者の日常生活に著しく支障を来すばかりでなく、不妊症や卵巣癌発生との関与も知られており、現代女性の健康を脅かす重要疾患の一つである。その病因については未だ不明な点が多いが、家族内発生を認めること、患者の第一度近親者における罹患率が一般人口の6~9倍であることなどから遺伝的要因の存在が推定されている。欧米では、罹患同胞対解析や、病態のみから推測した候補遺伝子の解析などが行われているが、未だ感受性遺伝子の同定には至っていない。

本研究は、1) 家系集積の必要がなくゲノムワイドでの候補遺伝子限定が可能な3万マイクロサテライトマーカーを用いた患者・対照群相関解析、および2) 正常子宮内膜と子宮内膜症組織を対象としたDNA chipでの12,000遺伝子の発現解析を同時に行うことで、子宮内膜症発症に関与する疾患感受性遺伝子を同定し、発症メカニズムの解明、発症予防、新たな治療法の開発に貢献することを目的とする。

研究方法

検体収集

研究参加施設において、下記対象となる患者及びその両親に文書による同意を取得、検体収集を行う。

(患者群) 腹腔鏡検査あるいは開腹手術下にてr-AFS分類(revised American fertility society) III、IV期の子宮内膜症症例または画像診断にて測定可能な2あるいは3方向の平均値が3cm以上の卵巣子宮内膜症性嚢胞を認める臨床的子宮内膜症症例。

(対照群) 手術にて子宮内膜症病変を認めなかった症例または月経困難症状および不妊治療の既往のない2回経産以上の健常婦人。

2. 実験・解析方法

1) 患者・対照群相関解析

全染色体にわたり100kb間隔、3万個のマイクロサテライトマーカー設定を行う。末梢リンパ球よりDNAを抽出し、PicoGreen定量キットを用いてDNA濃度の微量測定し、患者群・対照群各200例のDNAが等量ずつ混合したPooled DNAを作成する。Pooled DNAを鋳型にPCRを行った後、キャピラリーシーケンサー(ABI3100)にて電気泳動を行い、GeneScan(ABI)で得られた波形データからアリル頻度を求める。患者・対照間でFisherの直接確率で検定し $P < 0.05$ を有意基準として陽性マーカーの限定を行う。陽性マーカーにおいては、別の患者・対照群各200例で作成したPooled DNAを用いて同様に2次スクリーニングを行う。さらに2次スクリーニングで陽性を示したマーカーについて3次スクリーニングを行い、陽性を示したマーカーの近傍を候補領域と考え、データベース上から候補遺伝子の選定を行う。候補遺伝子内のSNPs(single nucleotide polymorphisms)マーカーを用いて患者・対照群相関解析を行うとともに、TDTを行い、疾患感受性遺伝子の同定を行う。

2) DNA chip

卵巣子宮内膜症性嚢胞組織と正常子宮内膜組織各9例よりRNAを抽出し、Affymetrix社のgene chip(U95A)を用いて、12,000遺伝子の発現量の比較検討を行う。T検定を行い、両群の各遺伝子で3倍以上の発現量差を有意とする。有意差をみとめた癌関連遺伝子につき、RT-PCRにて確認実験をする。

(倫理面への配慮)

検体収集にあたっては、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、患者あるいは家族の同意を文書で得て行う。なお、本研究は平成13年6月19日に新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会において承認されている。

C. 研究結果

1) 患者・対照群相関解析

現在までに 23,277 マイクロサテライトマーカーの設定が終了し、その内の 20,271 マーカーにつき 1 次、2 次スクリーニングの解析が終了した。1 次スクリーニングでは 1,434 マーカー (7.1%) が $P < 0.05$ を示した (図 1-図 8)。その 1,434 マーカーにて 2 次スクリーニングを行った結果、349 マーカー (24.3%) がさらに陽性を示した (図 1-図 8)。

2) DNA chip による発現解析

12000 遺伝子の内、増殖期と分泌期の比較では、正常内膜組織で 133 遺伝子に、内膜症組織では 47 遺伝子の発現差を認めた。両者に共通した遺伝子は 3 遺伝子のみであった。また、正常内膜組織と内膜症組織の比較では、増殖期で 262 遺伝子、分泌期で 330 遺伝子の発現差を認めた。性周期の影響を除外して正常内膜組織と内膜症組織の比較をしたところ、294 遺伝子の発現量の変化を認めた。

D. 考察

ゲノムワイドに設定された 20271 マーカーでの 1 次スクリーニングでは、1,434 マーカー (7.1%) が Fisher の直接確率で $P < 0.05$ を示した。この実験結果より、本解析法により、全染色体領域から理論上と相違ないマーカーの限定が可能であること

が示され、Pooled DNA 法を用いた本解析法の方法論が確立されたことより、今後の遺伝子単離に大いに期待を抱かせるものであると考える。

DNA chip を用いた 12000 遺伝子の発現解析では、性周期の影響を除外した解析で、294 遺伝子の発現量の変化を認めた。これらの遺伝子を機能別に分類すると、細胞増殖因子やアポトーシス関連因子、癌関連因子など癌化に関係する因子の発現が 38 遺伝子 (12.9%) 認められていた。これらの癌関連遺伝子につき、RT-PCR による確認実験を行い、うち 5 遺伝子につき有意な発現差が確認された。子宮内膜症組織は、その転移遊走能や癌への 2 次的変化から類腫瘍としての性質を有する可能性が示唆され、以上の実験結果はポジショナルクローニングで候補遺伝子を同定する際の重要な手がかりとなることが期待される。

また、相関解析で限定された候補領域内からの候補遺伝子の選定には、東海大学で開発された egMAP を利用することで、相関解析で陽性を示したマーカーと DNA chip で発現差を認めた遺伝子 (図 9) との染色体上の位置関係を把握することが可能となり、発現差を認めた 294 遺伝子のうち、11 遺伝子が 2 次スクリーニング陽性マーカーの近傍 100kb 以内に位置することが示され、これらの遺伝子が疾患感受性遺伝子である可能性が示唆された。

E. 結論

現在までに 23,277 マーカーの設定が完了、20,271 マーカーにつき 1 次スクリーニングの解析が終了し、うち 1,434 マーカーが陽性を示した。2 次スクリーニングでは、そのうち 349 マーカーが陽性を示し、同マーカー近傍に疾患感受性遺伝子の存在が示唆されている。現在、さらに候補

領域を限定するため 3 次スクリーニングを行っており、また、DNA chip での発現解析では、正常子宮内膜と内膜症組織の比較で 294 遺伝子が 3 倍以上の発現差を認めている。今後は、相関解析で限定された候補領域と DNA chip を用いた発現解析の結果を照らし合わせるにより、候補領域から真の候補遺伝子の選定を行い、遺伝子内の SNPs マーカーを用いて患者・対照群相関解析を行うとともに、親子ペアを用いた TDT を行い、疾患感受性遺伝子の同定と発症への関与の確認を行う方針である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kashima K et. al, Familial risk among Japanese patients with endometriosis. (submitted)

2. 学会発表

加嶋克則、西川伸道、藤下 晃、石丸忠之、田中信幸、岡村 均、田中憲一。子宮内膜症病態解明を目的とした患者・対照群相関解析を用いた遺伝学的要因の検討。第 54 回日本産科婦人科学会。

福井直樹、田宮 元、伊熊健一郎、杉並洋、藤下 晃、石丸忠之、田中信幸、岡村 均、西川伸道、加嶋克則、猪子英俊、田中憲一。ゲノムワイド相関解析による子宮内膜症感受性遺伝子の検索。第 55 回日本産科婦人科学会。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1

◎ 2次でも陽性

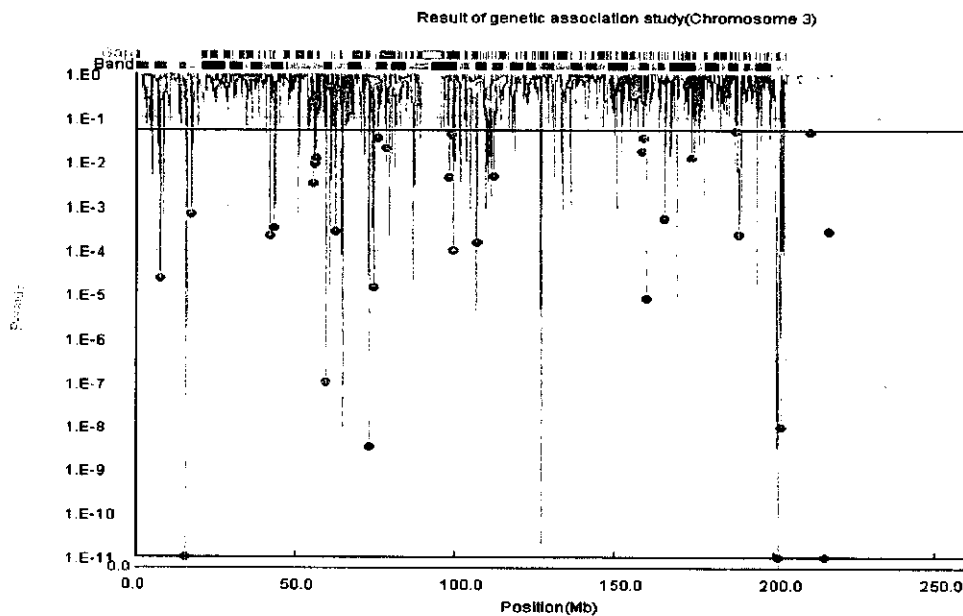
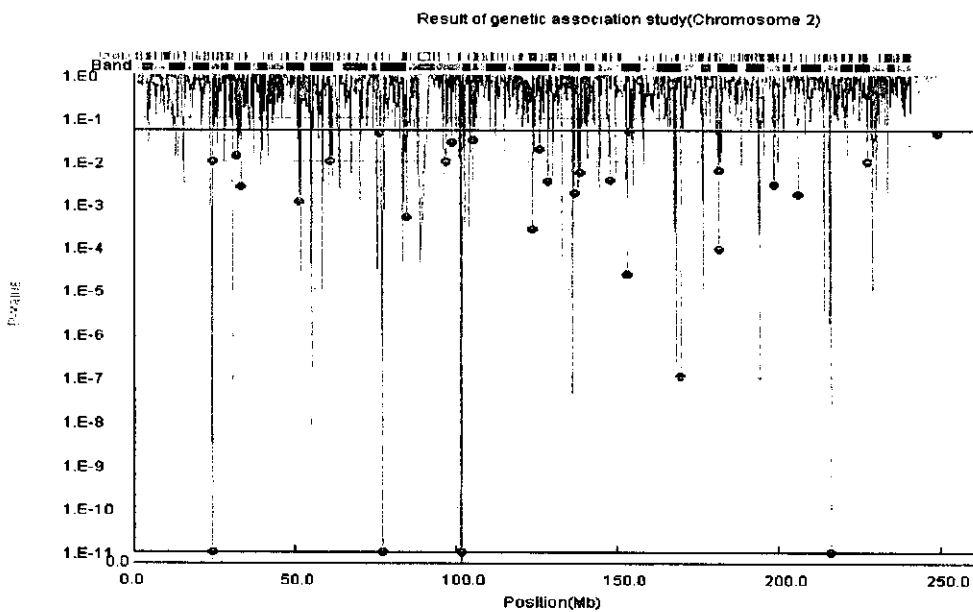
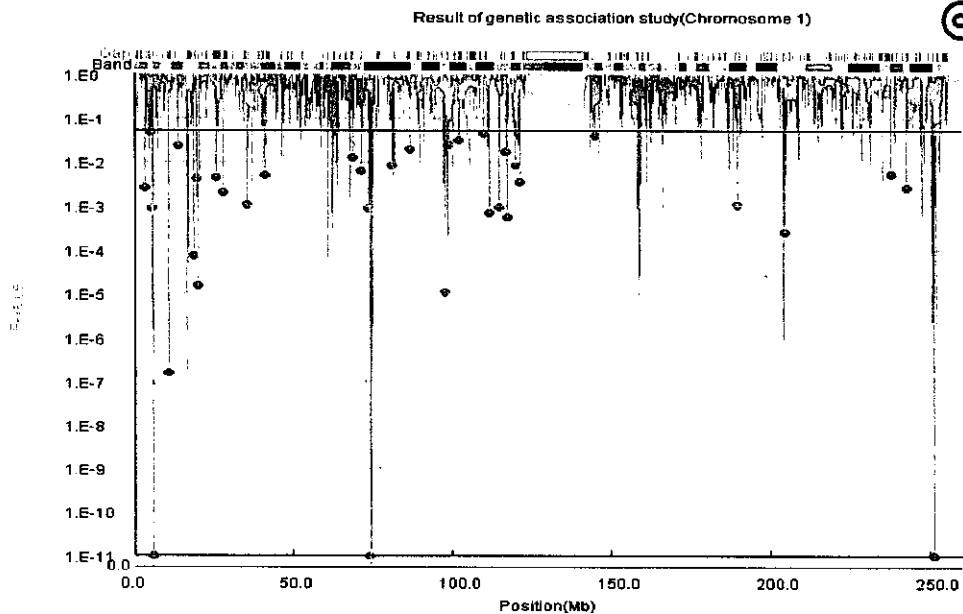


図2

◎ 2次でも陽性

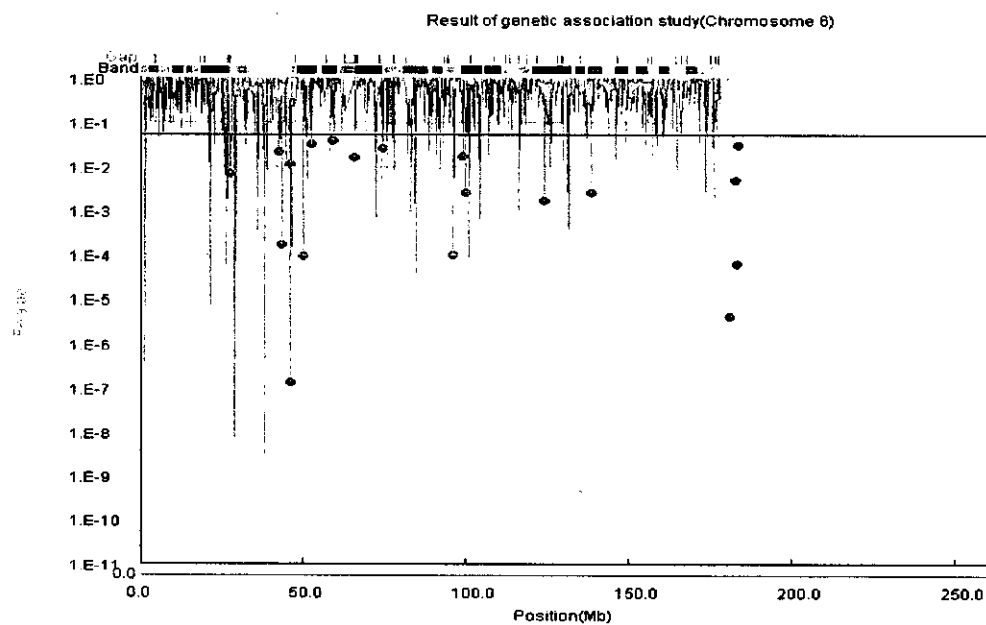
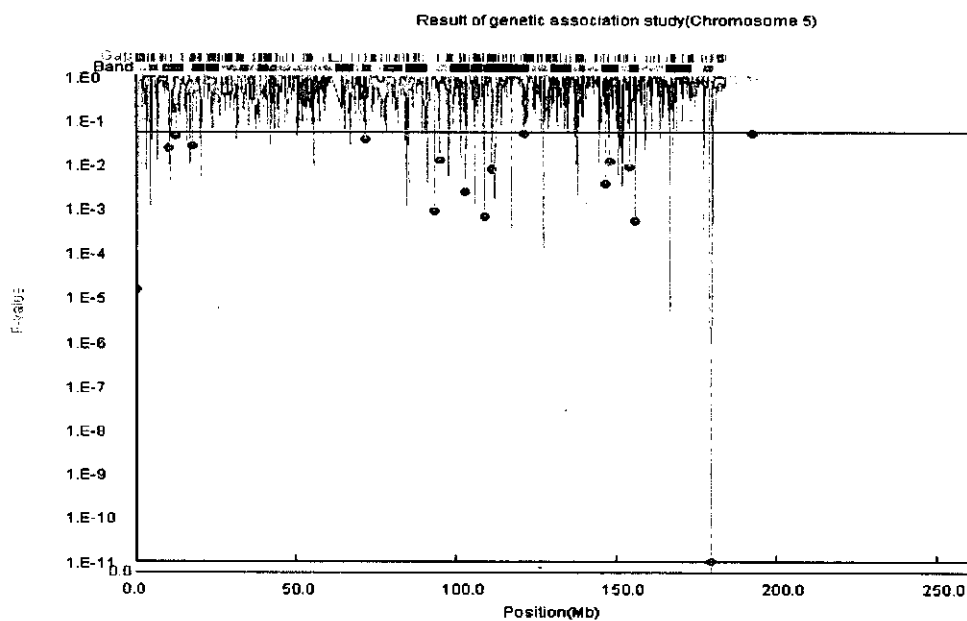
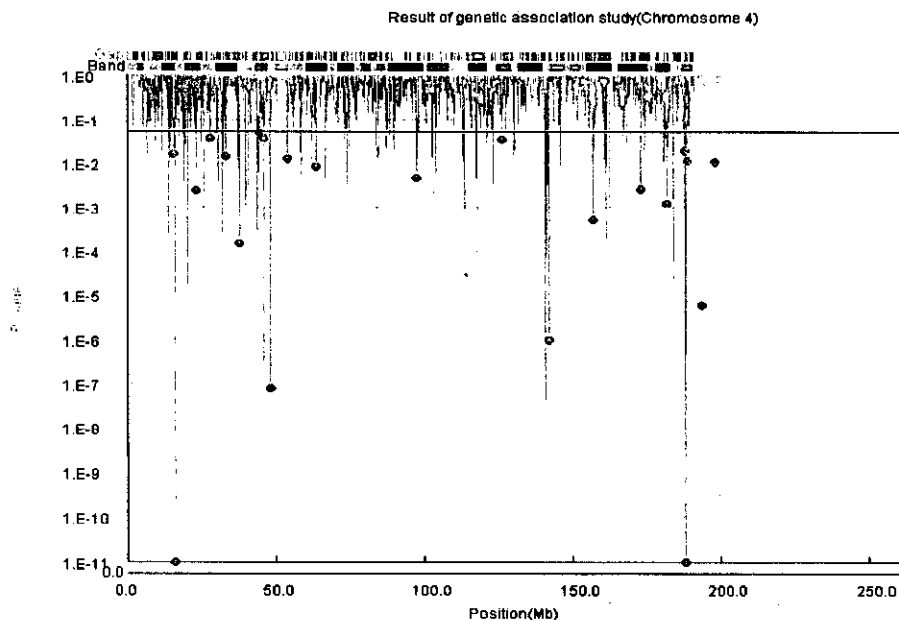


図3

◎ 2次でも陽性

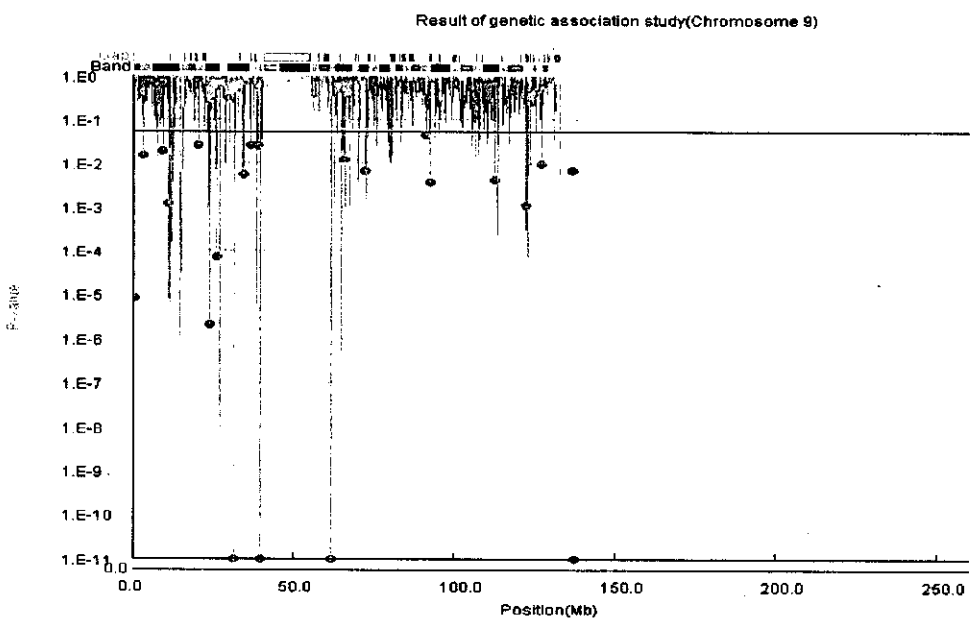
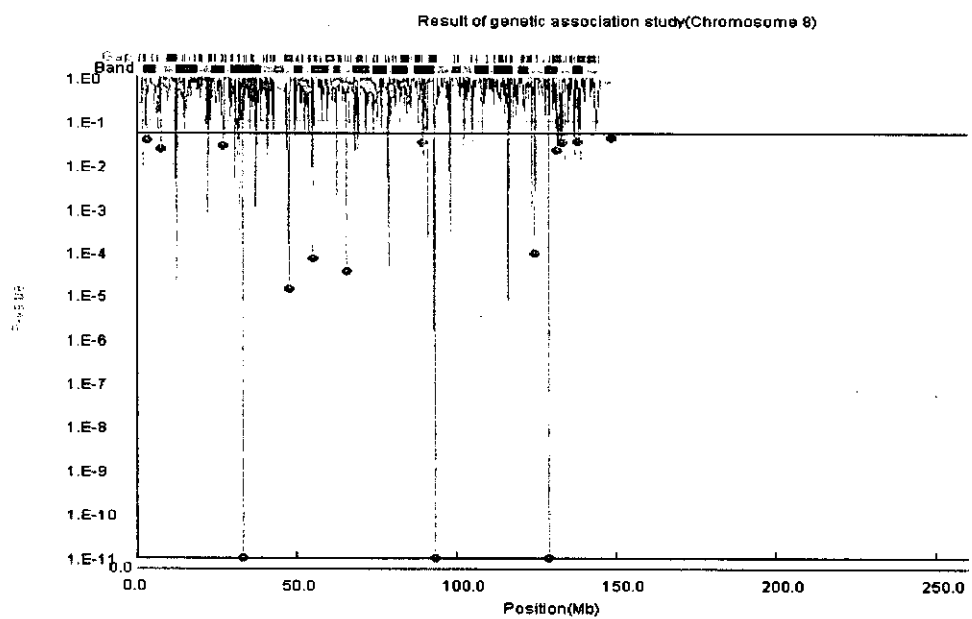
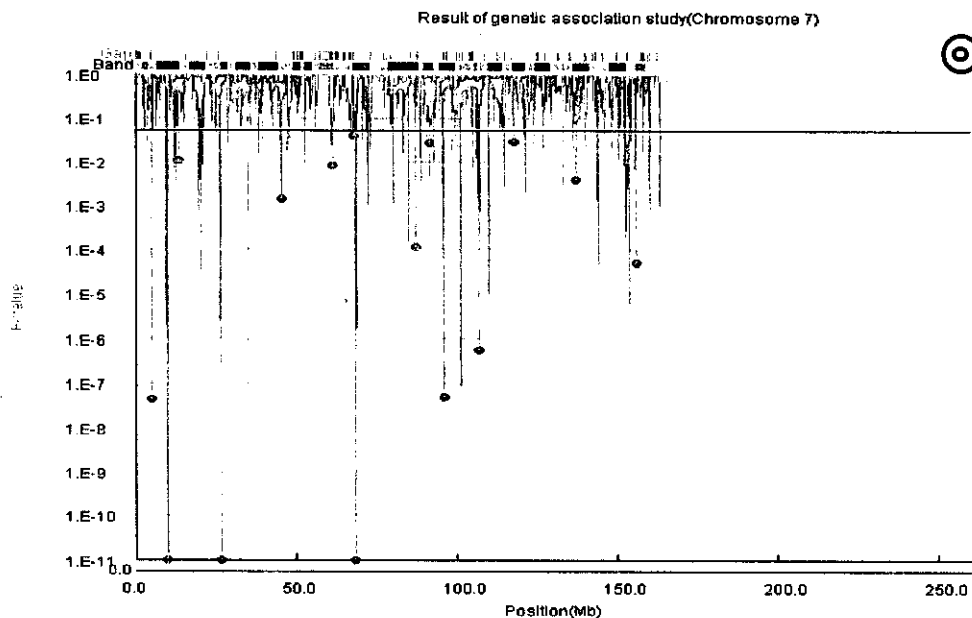


図4

◎ 2次でも陽性

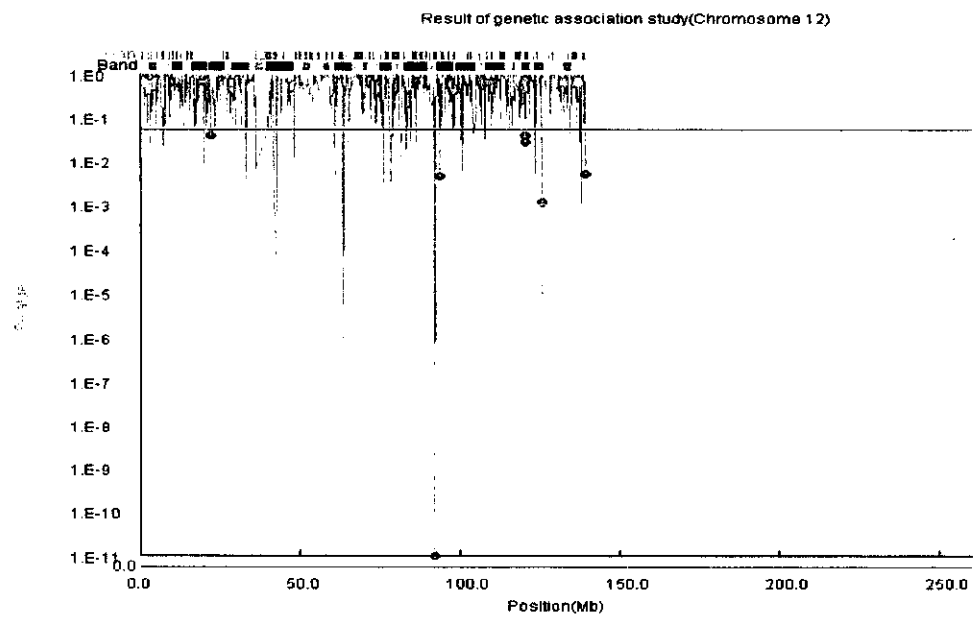
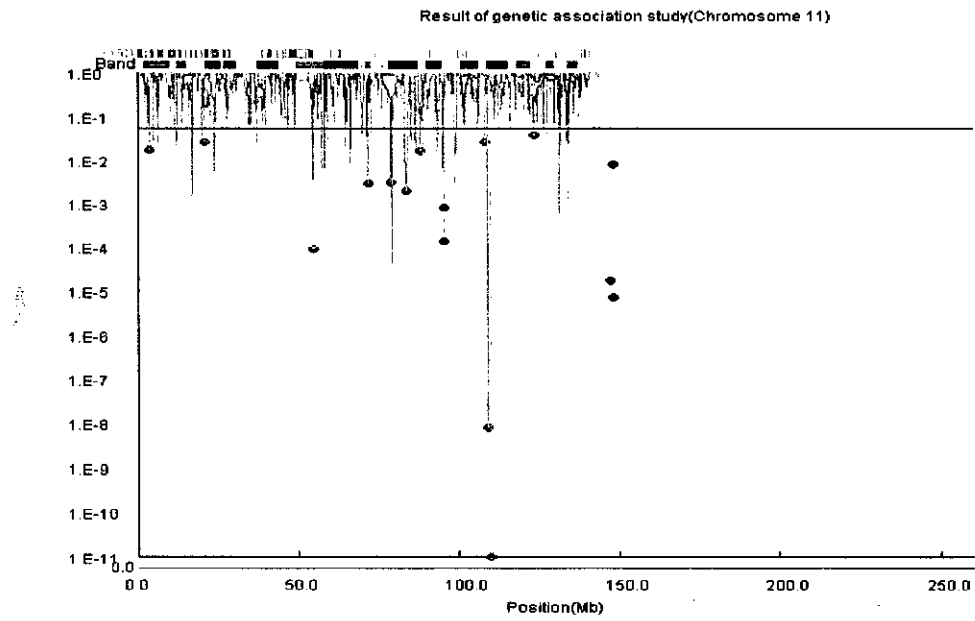
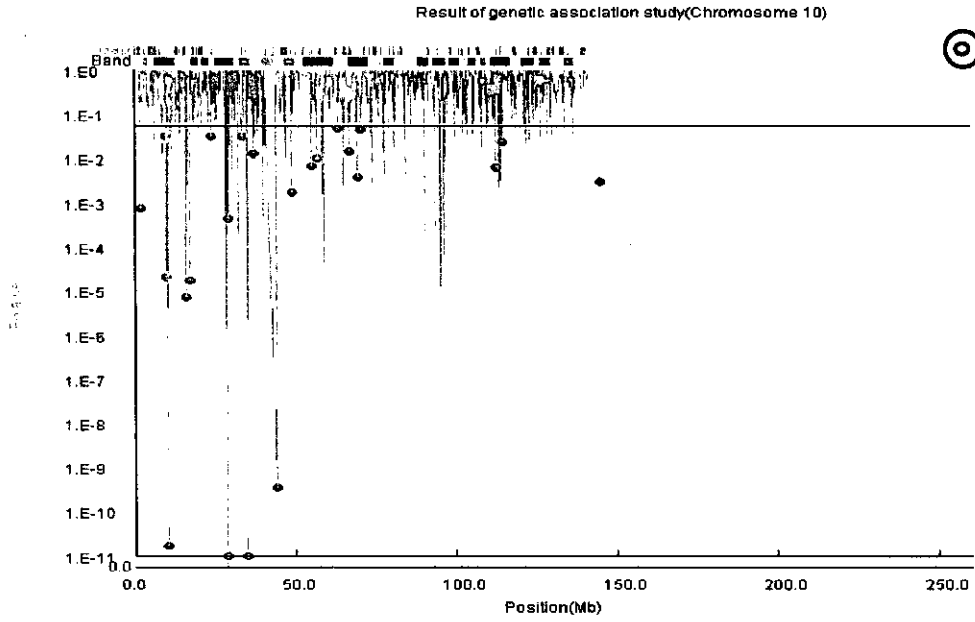


図5

◎ 2次でも陽性

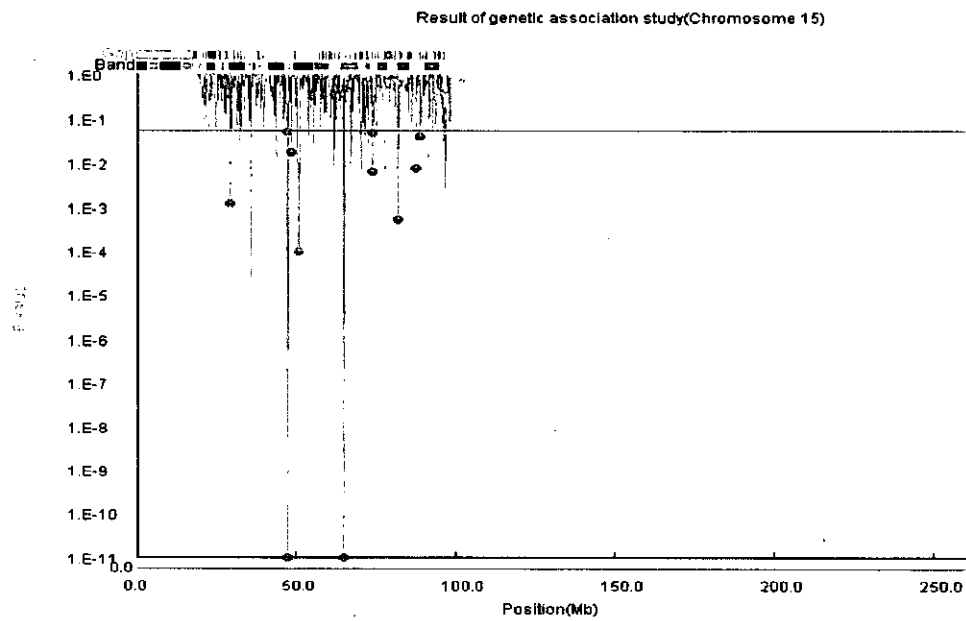
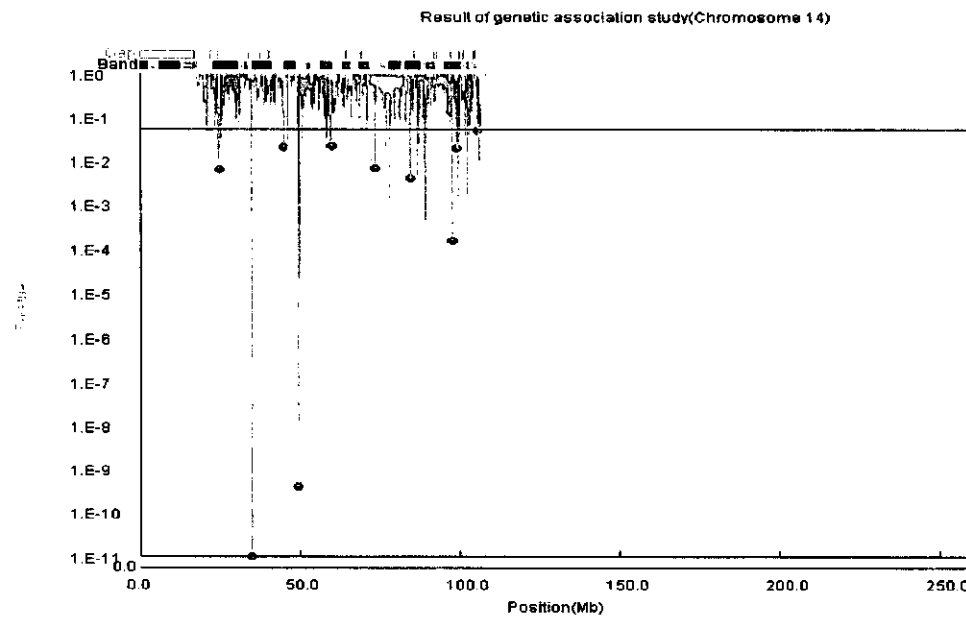
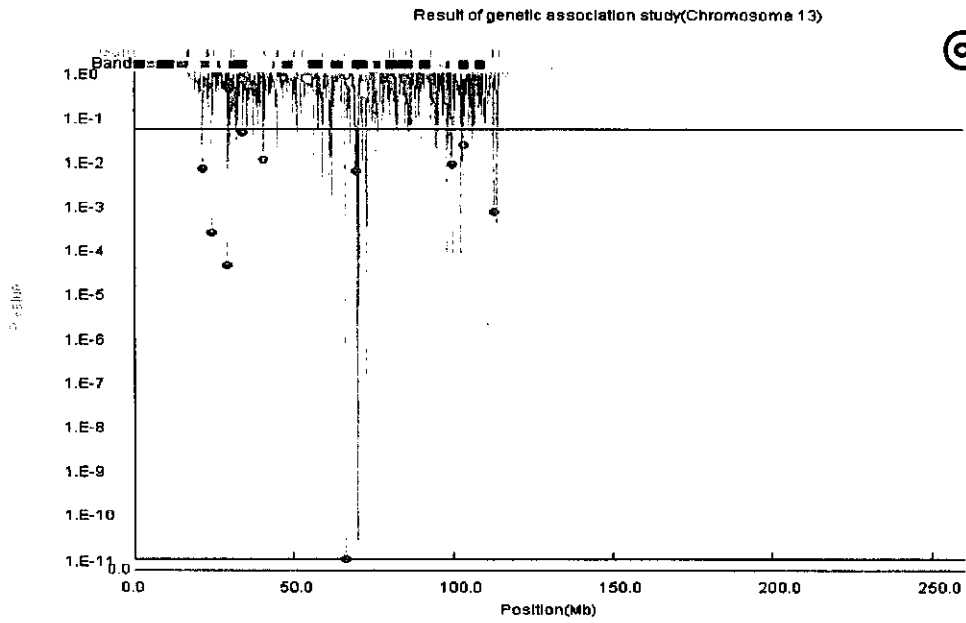
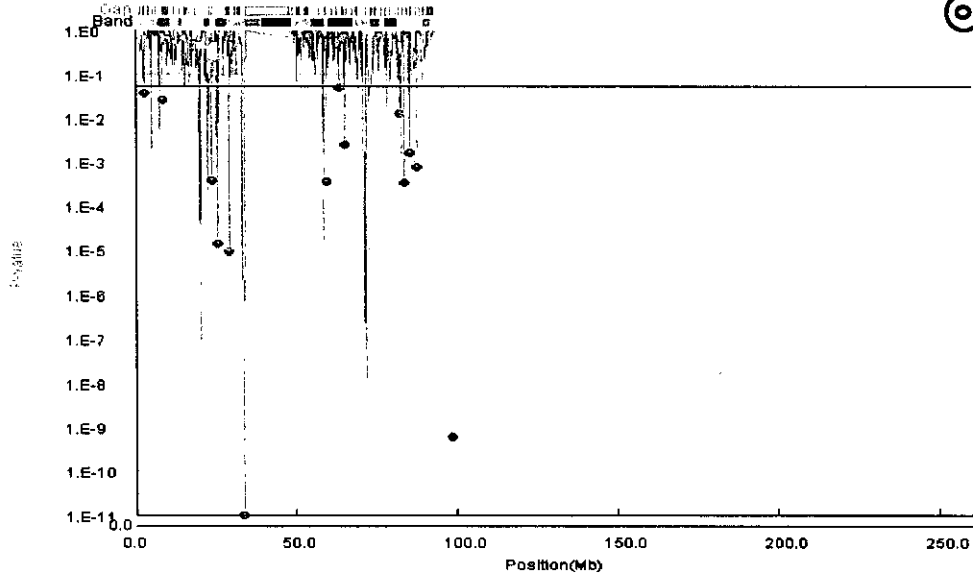


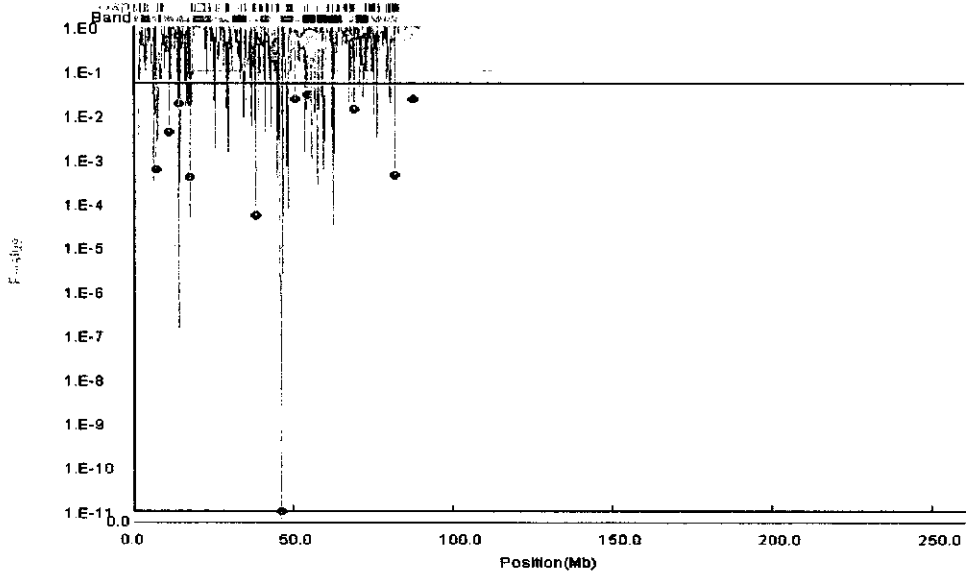
図6

Result of genetic association study(Chromosome 16)

◎ 2次でも陽性



Result of genetic association study(Chromosome 17)



Result of genetic association study(Chromosome 18)

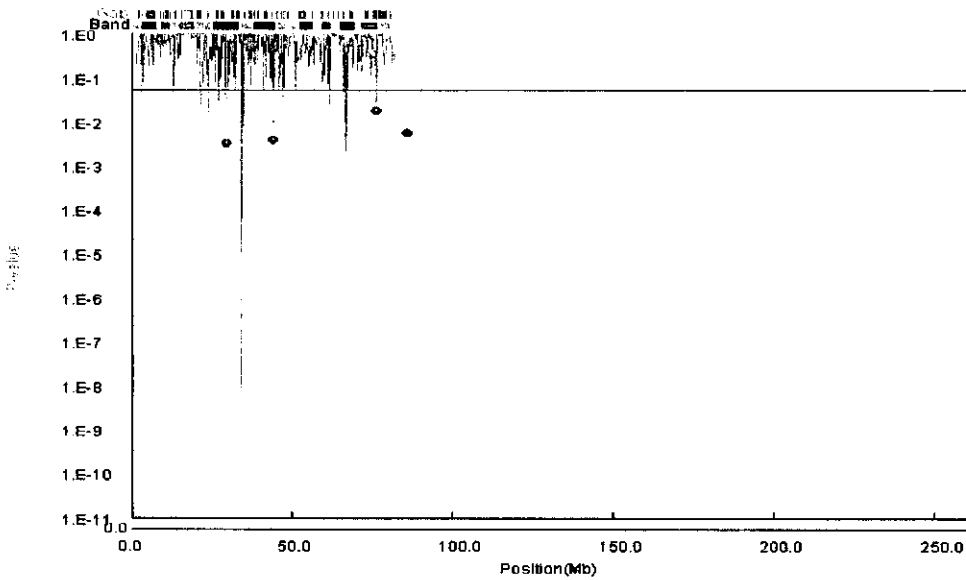
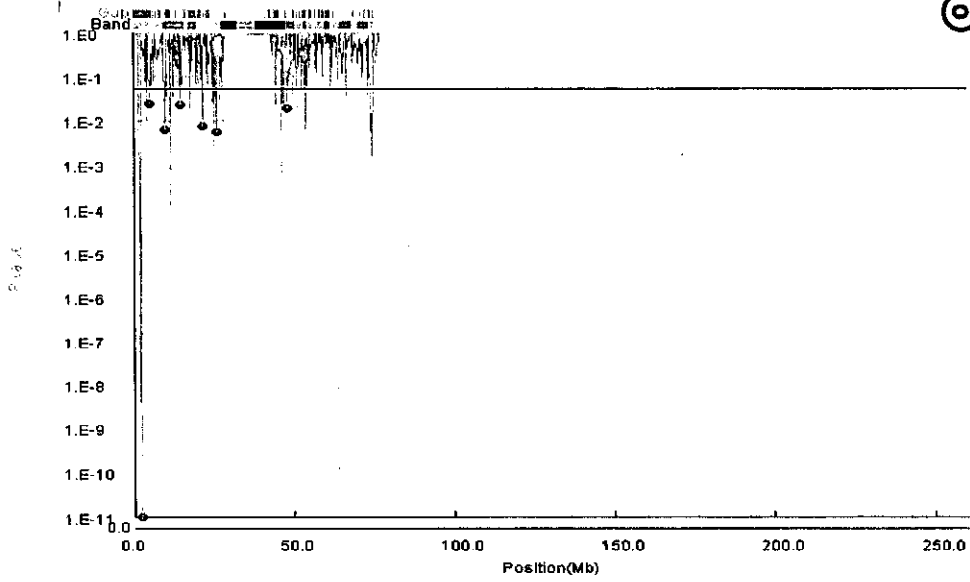


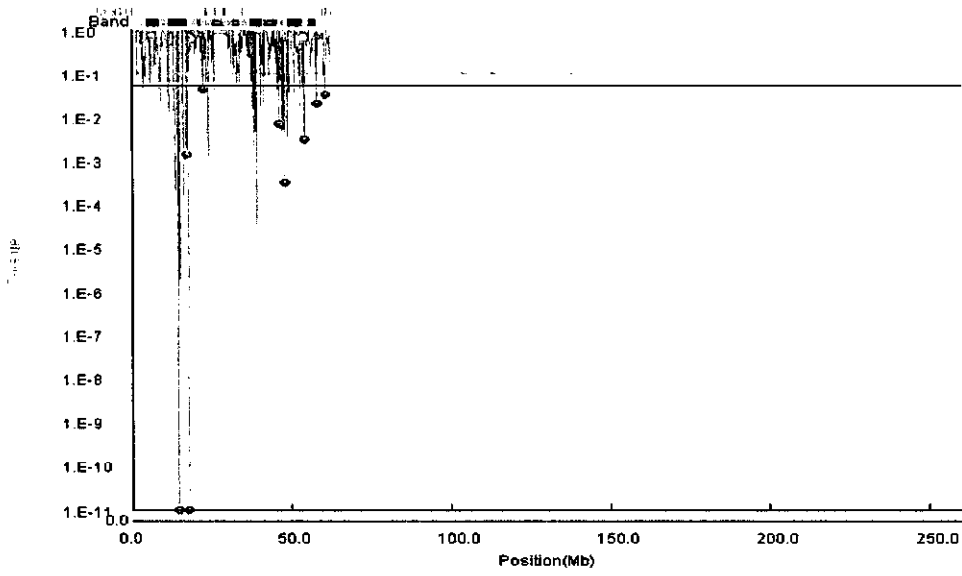
図7

Result of genetic association study(Chromosome 19)

◎ 2次でも陽性



Result of genetic association study(Chromosome 20)



Result of genetic association study(Chromosome 21)

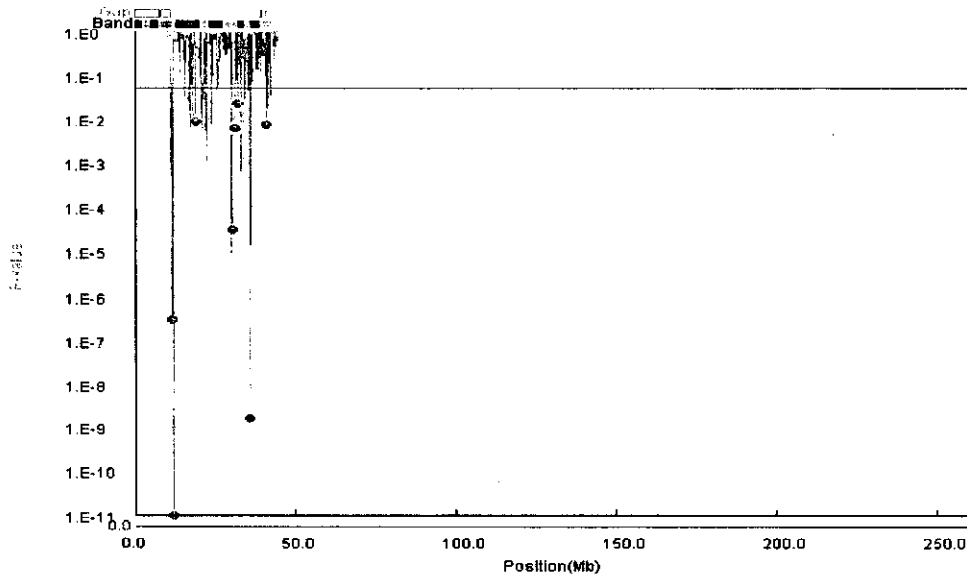
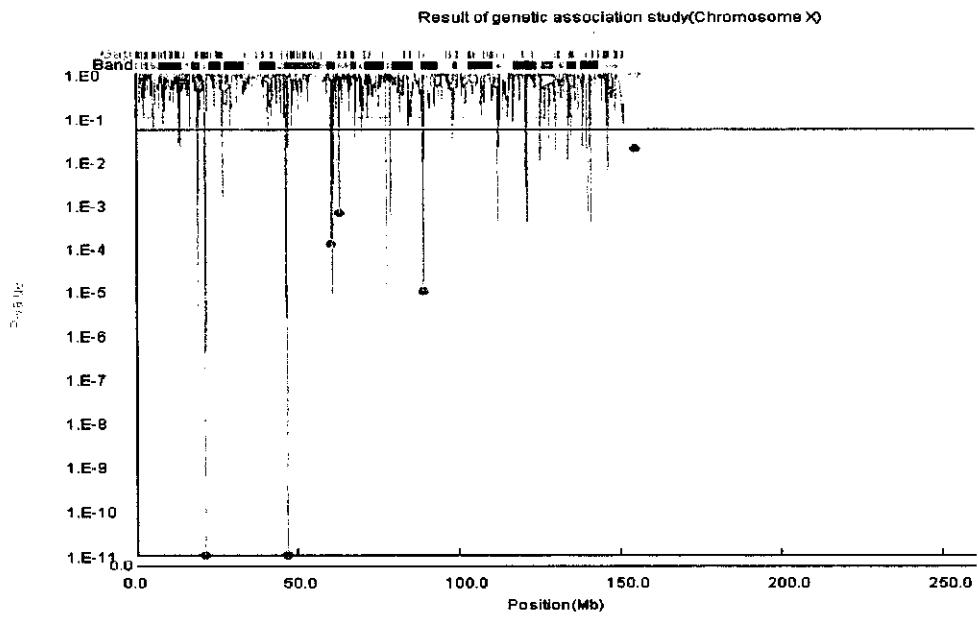
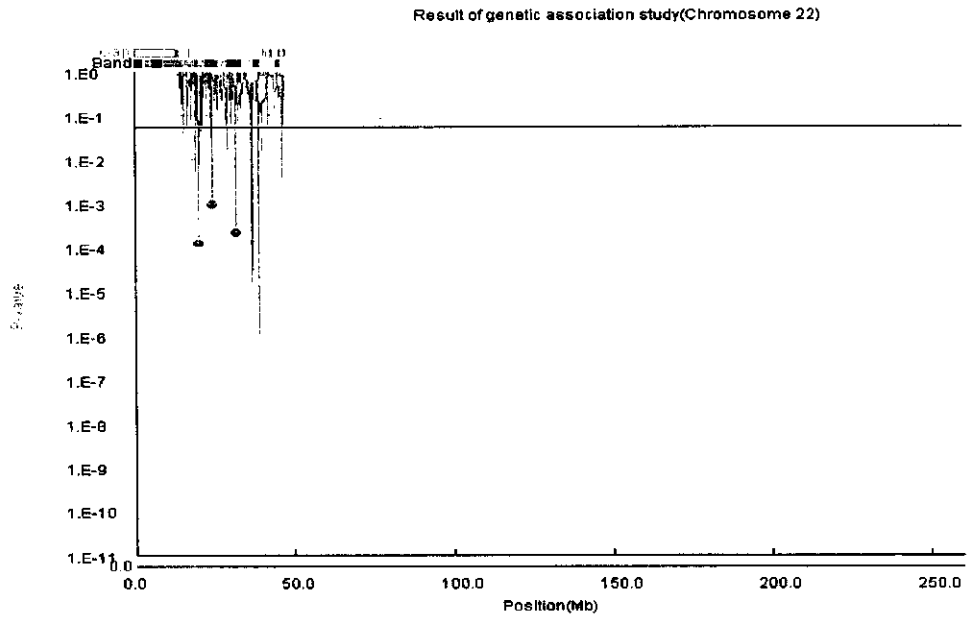


図8

◎ 2次でも陽性



☒9 Physical mapping of the genes expressed

