

20030149

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 (0120012)

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田中 憲一

平成 16 (2004) 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

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。本年度は、その候補領域から候補遺伝子を限定するために日本検体 101 家系患者 200 人、米国検体 148 家系患者 174 人を対象に以下の解析を行った。

1) 米国検体による解析：日本検体を用いた罹患同胞対解析、相関解析により得られた 3p22-p25 内の 7 候補領域に関して、BRCA1、2 に変異を認める米国卵巣癌家系 77 家系、228 人、変異を認めない 117 家系 401 人を対象に TDT 相関解析を行った。その結果、D3S3589 では  $P=0.045$ 、AC066583 では  $P=0.023$ 、AC078780 では  $P=0.023$  と疾患との間に相関を認めた。

2) 日本検体による解析：本年度は 5 家系の家族性卵巣癌家系を新たに集積し、うち 2 家系に BRCA1 の変異を認め、累計では 101 家系中 47 家系に BRCA1 (46.5%)、7 家系に BRCA2 (6.9%) の変異を認めた。BRCA1、2 遺伝子に変異のない本邦の家族性卵巣癌 31 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 NPL score = 2.56 と、依然として連鎖の存在が確認されている。

3) 候補遺伝子の検索：米国 TDT 解析で相関を示した 3 マーカーのうち、AC078780 では、日本人での BRCA 変異陽性患者をコントロールとした相関解析でも  $p=0.000019$  と強い相関を認め、最有力候補領域と考えられた。同マーカーの 50kb 近傍には PDCD6IP 遺伝子が存在することより、その近傍に 5 つの SNP マーカーを設定し TDT および case-control study を行ったところ、そのうち 3 マーカーで 0.05 を下回る有意差が得られた。今後は日米両検体にて、上記有力候補遺伝子の SNP ハプロタイプ相関解析、シーケンスを行い、疾患に直接関連する変異の検索を行う方針である。

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、直接シーケンシング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) 日米検体による罹患同胞対解析

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、BRCA1、2 に変異を認める米国卵巣癌家系 54 家系、228 人、変異を認めない 94 家系 401 人を対象に TDT 相関解析を行った。TDT 相関解析には、FBAT ソフトウェアを用いた。

#### (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。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) 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、101 家系中 47 家系に BRCA1 (46.5%)、7 家系に BRCA2 (6.9%) の変異を認めた（図 1）。

2) BRCA1、2 に異常を認めない家族性卵巣癌 31 家系の患者対を対象に、ノンパラメトリック連鎖解析を行った結果、3p22-p25 領域において LOD score = 2.38, NPL score = 2.56 を示し、連鎖が確認された（図 2）。

#### 3) 米国検体による罹患同胞対解析、相関解析

日本検体を用いた罹患同胞対解析、相関解析により得られた 3p22-p25 内の 7 候補領域に関して、BRCA1、2 に変異を認める米国卵巣癌家系 54 家系、228 人、変異を認めない 94 家系 401 人を対象に TDT 相関解析を行った。その結果、D3S3589 では  $P=0.045$ 、AC066583 で

は  $P=0.023$ 、AC078780 では  $P=0.023$  と疾患との間に相関を認めた (表 1)。BRCA1、2 遺伝子に変異のない米国の家族性卵巣癌 7 家系 29 人を対象に、ゲノム全域 410 マーカー (9.0cM 間隔) にて Genehunter によるノンパラメトリック連鎖解析を行った結果、3q26-q27 (NPL=1.60)、6q21 (NPL=1.66)、10q21 (NPL=1.55)、12p13 (NPL=1.64)、14q24 (NPL=1.66)、17q12 (NPL=1.80)、Xq27 (NPL=1.51) の 7 領域で NPL score 1.5 以上を示している (図 2)。

#### 4) 候補遺伝子の検索

米国 TDT 解析で相関を示した 3 マーカーのうち、AC078780 では、日本人での BRCA 変異陽性患者をコントロールとした相関解析でも  $p=0.000019$  と強い相関を認め、最有力候補領域と考えられた (表 1)。同マーカーの 50kb 近傍には PDCD6IP 遺伝子が存在することより、その近傍に 5 つの SNP マーカーを設定し TDT および case-control study を行ったところ、そのうち 3 マーカーで 0.05 を下回る有意差が得られた (図 3)。

#### 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。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. 新規追加した検体の罹患同胞対解析にて、3p22-p25 領域が新規原因遺伝子の候補領域であることの信頼性が確認された。
2. 米国との共同研究により、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、相関解析にて PDCD6IP 遺伝子が有力候補遺伝子として選定された。

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、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、日米合わせ計 100 家系以上を解析対象と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。

現在、米国検体を合わせ 249 家系の家族性卵巣癌検体の解析が可能となり、そのうち BRCA1、2 遺伝子に変異を認めない家系は 141 家系存在し、第 3 の新規遺伝子に強く関与すると考えられる。TDT 相関解析は母娘発症家系を対象にすることが可能で、家系内に卵巣癌患者が 1 名のみの家系でも解析できる点から、罹患同胞対解析の欠点である解析家系の少なさを補うことが可能であると同時に、家系内の内部コントロールを用いた解析であることからバイアスの少ない正確な相関関係を求めることが可能である。日米の卵巣癌家系を用い、罹患同胞対解析で連鎖を確認できた領域から、164 家系を対象とした TDT 相関解析を組み合わせ行うことにより、今後の原因遺伝子の同定に大きな期待がもたれる。

#### 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、その候補領域から候補遺伝子を限定するために日本検体 101 家系患者 200 人、米国検体 148 家系患者 174 人を対象に以下の解析を行った。

1) 米国検体による解析：日本検体を用いた罹患同胞対解析、相関解析により得られた 3p22-p25 内の 7 候補領域に関して、BRCA1、2 に変異を認める米国卵巣癌家系 77 家系、228 人、変異を認めない 117 家系 401 人を対象に TDT 相関解析を行った。その結果、D3S3589 では  $P=0.045$ 、AC066583 では  $P=0.023$ 、AC078780 では  $P=0.023$  と疾患との間に相関を認めた。

2) 日本検体による解析：本年度は 5 家系の家

族性卵巣癌家系を新たに集積し、うち2家系にBRCA1の変異を認め、累計では101家系中47家系にBRCA1(46.5%)、7家系にBRCA2(6.9%)の変異を認めた。BRCA1、2遺伝子に変異のない本邦の家族性卵巣癌31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NPL score = 2.56と、依然として連鎖の存在が確認されている。

3) 候補遺伝子の検索：米国TDT解析で相関を示した3マーカーのうち、AC078780では、日本人でのBRCA変異陽性患者をコントロールとした相関解析でも $p=0.000019$ と強い相関を認め、最有力候補領域と考えられた。同マーカーの50kb近傍にはPDCD6IP遺伝子が存在することより、その近傍に5つのSNPマーカーを設定しTDTおよびcase-control studyを行ったところ、そのうち3マーカーで0.05を下回る有意差が得られた。今後は日米両検体にて、上記有力候補遺伝子のSNPハプロタイプ相関解析、シーケンスを行い、疾患に直接関連する変異の検索を行う方針である。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1 Kurata H, Aoki Y, Tanaka K. Delayed, massive bleeding as an unusual complication of laser conization. A case report. *J Reprod Med.* 2003 Aug;48(8):659-60.
- 2 Watanabe M, Aoki Y, Kase H, Tanaka K. Heparanase expression and angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol Obstet Invest.* 2003;56(2):77-82. Epub 2003 Aug 08.
- 3 Itsukaichi M, Kurata H, Matsushita M, Watanabe M, Sekine M, Aoki Y, Tanaka K. Stage 1a1 cervical squamous cell carcinoma: conservative management after laser conization with positive margins. *Gynecol Oncol.* 2003 Aug;90(2):387-9.
- 4 Kase H, Aoki Y, Tanaka K. Fas ligand expression in cervical adenocarcinoma:

relevance to lymph node metastasis and tumor progression. *Gynecol Oncol.* 2003 Jul;90(1):70-4. 1.

- 5 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.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 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.
- 12 Aoki Y, Sato T, Tsuneki I, Watanabe M, Kase H, Fujita K, Kurata H, Tanaka K. Docetaxel in combination with carboplatin for chemo-naïve patients with epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2002 Nov-Dec;12(6):704-9.
- 13 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.
- 14 Aoki Y, Tanaka K. Current approaches of neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2002 Feb;2(1):73-82. Review.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 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.
- 22 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.
- 23 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.
- 24 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]
- 25 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.
- 26. 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.
- 27. 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
- 28. Hiroshi Nagata, Masayuki Sekine, Shoji Tsuji, Yasuo Hirai, Seijichiro 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*
29. Kurabayashi T, Tomita M, Matsushita H, Honda A, Takakuwa K, Tanaka K. Effects of a  $\beta$ 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
- 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 第55回日本産科婦人科学会, 2003年4月
  - 2 西野幸治、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 FANCD2 遺伝子変異は家族性卵巣癌の発症に関与するか 第55回日本産科婦人科学会, 2003年4月
  - 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 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
  - 4 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
  - 5 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 6-10<sup>th</sup> 2002
  - 6 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 24-28<sup>th</sup> 2001
  - 7 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



- 8 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
- 9 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

図 1 日本検体におけるBRCA1、BRCA2変異家系の頻度

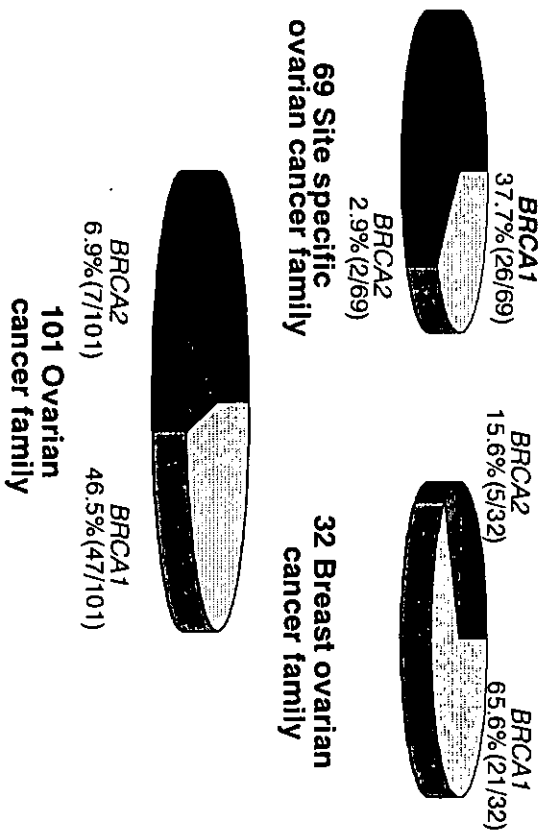


表 1

3p22-p25内の7候補領域における日本・米国検体の相関解析

Loci	Position (kb)	JPN		USA		
		Case-control Pc-value	BRCA+ vs - Pc-value	Case-control Pc-value	TDT P-value	BRCA+ vs - Pc-value
AC066583	11448	0.0011	0.99	0.0027	0.023	0.99
D3S3589	16123	0.00165	0.99	0.00041	0.045	0.0078
D3S3680	17393	0.0066	0.44	0.0000001	0.059	0.14
AC026051	17433	0.00099	0.21	0.31	0.43	0.96
AC087858	23870	0.0016	0.031	0.0217	0.7	0.99
AC025612	35207	0.0042	0.99	0.46	0.51	0.99
AC078780	41049	0.0009	0.000019	0.0154	0.023	0.91

図 2 日米検体による罹患同胞対解析-Chromosome 3-

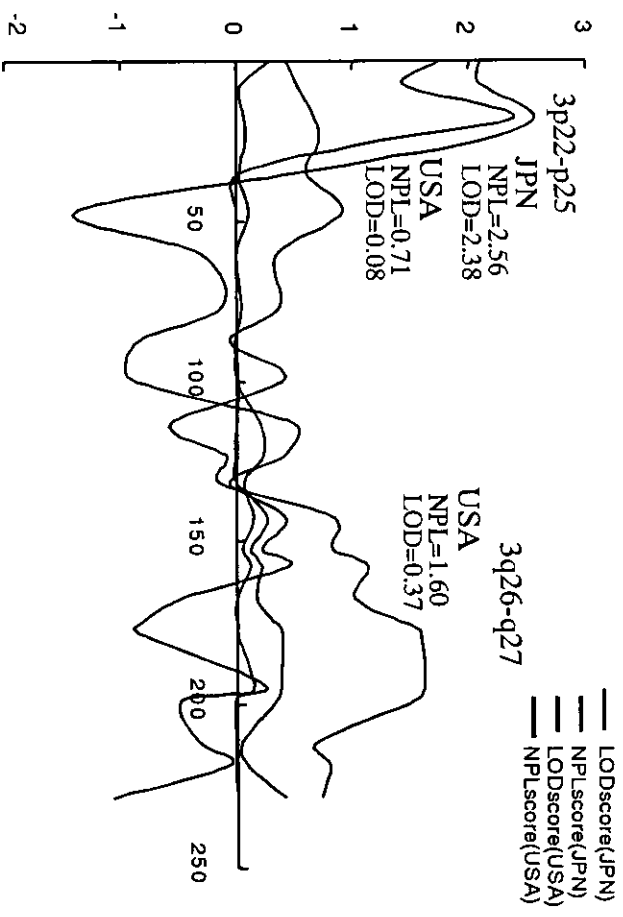
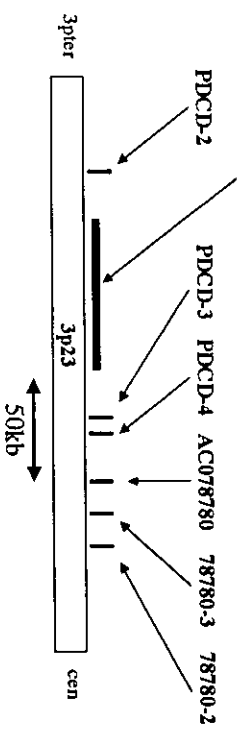


図 3 AC078780近傍に位置する候補遺伝子の検索

PDCD6IP (programmed cell death 6 interacting protein)



Loci	Position (kb)	JPN		USA	
		Case-control Pc-value	TDT P-value	BRCA+ vs - Pc-value	
PDCD-2	-70kb	0.99	0.048	0.99	
PDCD-3	-25kb	0.99	0.63	0.99	
PDCD-4	-20kb	0.049	0.25	0.45	
AC078780	41049	0.0009	0.023	0.91	
78780-3	+15kb	0.99	0.043	0.91	
78780-2	+30kb	0.99	0.11	0.12	

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、association study（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 SNP マーカーを JSNP、ABI 社 Website、dbSNP を組合せ検索を行った。

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 および TDT association study（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、および SNP 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。

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、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 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。
- 6 SNP マーカーに関しては、マイクロサテライトマーカーの位置情報をもとに、JSNP データベース、ABI 社 Website、NCBI（National Center for Biotechnology Information）の dbSNP より、日本人に多型の存在が確認されているマーカーを優先的にピックアップし、周辺塩基配列とともに検索を行う。

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。

#### 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目指す予定である。

#### 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SNPマーカーをJSNPデータベース、ABI社Website、NCBI (National Center for Biotechnology Information)のdbSNPより検索を行った。

#### 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