

---



---

原 著

---



---

## マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド相関解析 による子宮内膜症感受性遺伝子領域の検索

山 口 雅 幸

新潟大学大学院医歯学総合研究科

生殖器官制御分野（産科婦人科）

（主任：田中憲一教授）

### Genome - Wide Association Study for Susceptibility Loci of Endometriosis Using Microsatellite Markers

Masayuki YAMAGUCHI

*Department of Obstetrics and Gynecology,*

*Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University*

*(Director: Prof. Kenichi TANAKA)*

#### 要 旨

【目的】子宮内膜症は生殖年齢女性の約6-10%に認められる、比較的頻度の高い疾患であり、遺伝的要因の関与が推察されている。そこで、子宮内膜症発症に関与する疾患感受性遺伝子領域を全ゲノム領域から同定することを目的に以下の解析を行った。

【方法】患者群は腹腔鏡あるいは開腹術下でr-AFS分類（revised American fertility society）Ⅲ期、Ⅳ期の子宮内膜症症例、または画像診断にて卵巣子宮内膜症性嚢胞を認める臨床的子宫内膜症症例の計600例、対照群は、手術所見で子宮内膜症病変を認めなかった症例、および月経困難症状および不妊治療歴のない2回経産以上の健常婦人の計600例とした。全ゲノム領域を約100kb間隔に網羅した27039個のマイクロサテライトマーカーを用い、600人を3つの集団に分割し、それぞれ200検体のDNAを等量混合したPooled DNAを鋳型としてPCR反応によるタイピングを行い、患者・対照相関解析を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【成績】1次スクリーニングでは27039マーカーのうち1394マーカー（5.2%）が有意差を示し、さらに2次スクリーニングでは1394マーカーのうち360マーカー（25.8%）が、さらに3次スクリーニングでは360マーカーのうち83マーカー（23.1%）が有意差を示した。限定された83マーカーにて、600人それぞれの個人DNAを用いたIndividual Genotypingを行ったとこ

Reprint requests to: Masayuki YAMAGUCHI  
Department of Obstetrics and Gynecology  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences  
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,  
Niigata 951 - 8122 Japan

別刷請求先：〒951-8122 新潟市中央区旭町通1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科産科婦人科学教室  
山口雅幸

ろ、32マーカーで有意差が確認され、さらにマーカーの順位付けによる信頼性の検討を行った結果、9マーカー(10p14, 9q21.31, 6p21.32, 10q11.21, 9p21.3, 4q28.1, 5q23.1, 10q21.1, 4p15.2)を有力候補として選出した。

【結論】マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド相関解析により、子宮内膜症感受性遺伝子領域が9領域に限定された。

キーワード：子宮内膜症, マイクロサテライトマーカー, Pooled DNA, 相関解析

## 緒 言

子宮内膜症は生殖可能年齢にある女性の約6-10%に存在するとされる、比較的頻度の高い疾患である<sup>1)2)</sup>。本邦の推定受療患者数は約128000人(平成9年度)とされ、生活様式の変化、診断法の進化および腹腔鏡検査の発展などにより、近年増加傾向にある。子宮内膜症は、長期にわたる頑強な月経困難症、性交痛、慢性骨盤痛を呈し、不妊症の主たる原因、悪性病変への二次的変化の可能性など、現在の女性の健康を脅かす最も重大な疾患の一つであると考えられる。しかし本疾患の発症要因は未だ明らかではなく、対症的に鎮痛剤の投与あるいは偽閉経療法が用いられているのみで根本的な治療法は確立されていないのが現状である。

一方、欧米では本疾患の家系内集積が多数報告<sup>3)-5)</sup>されており、母親もしくは姉妹に子宮内膜症を認める場合、発症リスクが約2~8倍に上昇するとされる。また双胎研究において一卵性双胎は二卵性双胎に比べ発症一致率が高いという報告<sup>6)</sup>も見られ、子宮内膜症発症に何らかの遺伝的要因が関与しているものと強く推察される。

そこで、子宮内膜症発症に関与する疾患感受性遺伝子領域を同定するために、患者・対照群各600例を対象として、ゲノムワイドに設定された約27000マーカーを用いた患者・対照群相関解析を行った。

## 対象と方法

### 対象

2000年から2003年の間に研究参加施設において、インフォームドコンセントにより同意を得た

患者群600例と対照群600例を対象とした。患者群は、腹腔鏡あるいは開腹術下でr-AFS分類(revised American fertility society)Ⅲ期、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とした。対照群は、手術で子宮内膜症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とした。これら対象より採取した全血から抽出したゲノムDNAを検体として用いた。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済みである。

### 方法

#### ゲノムDNAの抽出

全ての対象症例より血液を採取し、QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen)あるいはフェノール・クロロホルム法を用いてゲノムDNAを抽出した。

#### Pooled DNAの作成

患者群・対照群各600例のゲノムDNAをそれぞれ200例ずつ1次・2次・3次スクリーニングの3群に分け、Collinsらの方法<sup>7)</sup>によりPooled DNAを作成した。微量DNAの定量にはPicoGreen dsDNA Quantification Reagent and Kit (Molecular Probes)を用いて、等量である200検体分のDNA溶液を作成し、最終濃度8ng/ $\mu$ Lとなるように調製した。

#### マイクロサテライトマーカーによる多型解析

解析に用いたゲノムワイドのマイクロサテライ

トマーカーおよびプライマーセットは、Tamiyara<sup>8)</sup>と同様に、遺伝子多様性データベース公開システム (Gene Diversity DataBase System, GDBS) で公開されている 27039 マーカーを用い、forward primer は蛍光色素の HEX もしくは 6-FAM でラベリングした。PCR 反応は GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いて、以下の条件で行った。96 穴プレート 1well あたり計 20  $\mu$ L (8ng/ $\mu$ L Pooled DNA 6  $\mu$ L, 蒸留水 7.9  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer 2.0  $\mu$ L, 250nM dNTP mixture 2.0  $\mu$ L, 5U/ $\mu$ L Amplitaq 0.1  $\mu$ L, 1  $\mu$ M Primer Mix 2.0  $\mu$ L) に調製し、PCR サイクルは① 96  $^{\circ}$ C 5 分, ② 57  $^{\circ}$ C 1 分, ③ 72  $^{\circ}$ C 1 分, ④ 96  $^{\circ}$ C 45 秒, 57  $^{\circ}$ C 45 秒, 72  $^{\circ}$ C 1 分を 40 サイクルとした。つづいて 2 倍希釈 PCR product 0.5  $\mu$ L, HiDi formamide 19.1  $\mu$ L, GS500 ROX (いずれも Applied Biosystems) 0.4  $\mu$ L に調製し、96  $^{\circ}$ C 5 分で denature したのち、3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) を用いて電気泳動を行った。得られた波形は GeneScan (Applied Biosystems) および PickPeak (東海大学) にて解析し、各マイクロサテライトマーカーでのアレル頻度を推定し、後述のように有意差検定を施行した。推定アレル頻度の算出は、解析により得られた波形パターンから全てのピークの高さの総和を求め、その値に対してそれぞれのピークの高さの割合を求めることで算出した。1 次スクリーニングで有意差を示した陽性マーカーについては 2 次スクリーニングを施行、さらに 2 次スクリーニングでの陽性マーカーについては 3 次スクリーニングを施行した。最後に 3 次スクリーニング陽性マーカーについて、患者群・対照群各 600 例それぞれの個人 DNA を用いたジェノタイピング (Individual Genotyping) を施行した。

#### 統計学的解析

有意差検定には、患者・対照間での 2  $\times$  2 表ならびに 2  $\times$  m 表による Fisher の直接確率法を用いた。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 結 果

### Pooled DNA を用いたゲノムワイドスクリーニング

一次スクリーニングにて用いた 27039 マーカーのうち、有意差を示したマーカーは 1394 マーカー ( $1394/27039 = 5.2\%$ ) であった。それら陽性マーカーを用いて二次スクリーニングを行ったところ、有意差を示したマーカーは 360 マーカー ( $360/1394 = 25.8\%$ ) であった。同様に三次スクリーニングを行った結果、有意差を示したマーカーは 83 マーカー ( $83/360 = 23.1\%$ ) であった (表 1)。

### Individual Genotyping

限定された 83 マーカーから、さらに有力な候補領域を選定するために、患者群 600 例・対照群 600 例の Individual Genotyping の結果をもとに、下記に示す条件に従ってマーカーの順位付けを行った。(1) 患者・対照群各 600 例で  $p < 0.05$ , (2) オッズ比を計算し 95% 信頼区間 (confidence interval) が 1 をまたがない, (3) 1 次, 2 次, 3 次スクリーニング集団の患者群 200 例, 対照群 200 例のそれぞれでアレル頻度を比較した場合いずれも有意差がある, (4) 有意差を示すアレルが, 1 次, 2 次, 3 次スクリーニングで同様に継承されている, について検討した。その結果、患者・対照群各 600 例の Individual Genotyping で有意差が確認されたマーカーは 32 マーカーであり、上記を考慮した順位付けの結果、9 マーカー (10p14, 9q21.31, 6p21.32, 10q11.21, 9p21.3, 4q28.1, 5q23.1, 10q21.1, 4p15.2) を有力な候補領域として選定した。選定された 9 マーカー近傍には、約 20 個の遺伝子が存在し、候補遺伝子と考えられた (表 2)。

## 考 察

子宮内膜症は生殖可能年齢にある女性の約 6-10% に存在し、婦人科領域における common disease である。common disease は、遺伝要因と



表2 有力な候補領域と考えられた上位9マーカー

Markers	Cytobands	Candidate genes	Number of allele	Susceptible allele frequencies		Fisher's exact tests		Odds Ratio	95%CI
				Control	Case	2 × 2	2 × m		
D10S0645i	10p14		9	0.027	0.006	0.000064	0.0010	0.22	0.09-0.49
D9S0792i	9q21.31		8	0.358	0.433	0.00031	0.00058	1.32	1.09-1.61
D6S0067i	6p21.32	HLA classII, TAP2, PSMB8, TAP1, PSMB9	17	0.015	0.038	0.0020	0.0020	2.14	1.43-4.94
D10S0203i	10q11.21	ALOX5, MARCH8	6	0.034	0.014	0.0020	0.0060	0.39	0.22-0.71
D9S0115i	9p21.3	MTAP, CDKN2A, CDKN2B	27	0.090	0.130	0.0022	0.0000073	1.51	1.16-1.97
D4S0348i	4q28.1	ANKRD50	24	0.051	0.077	0.014	0.0020	1.56	1.09-2.22
D5S0256i	5q23.1	SEMA6A	9	0.019	0.034	0.023	0.0070	1.89	1.09-3.27
D10S0247i	10q21.1	PCDH15	6	0.495	0.450	0.032	0.024	0.83	0.71-0.98
D4S0139i	4p15.2	KIAA0746, SLC34A2	4	0.306	0.350	0.033	0.017	1.22	1.02-1.47

環境要因の相互作用により発症する多因子性疾患とされ、疾患感受性を規定する複数の遺伝子多型の蓄積が発症リスクを高めるとされる。従って、ある特定の遺伝子多型を持っていれば必ず発症したり、逆に持っていなければ発症しないというような明確な関係がみられないため、一般に多因子性疾患の感受性遺伝子同定は困難とされる<sup>9)10)</sup>。

従来、単一遺伝子疾患を対象としたポジショナルクローニングにおいて、罹患同胞対解析が成果を上げてきた。しかしながら、罹患同胞対解析は、数百個のマーカーで解析可能である反面、同胞対が数十ペア必要であることと、候補領域の限定が10Mb以上とかなり広い範囲でしか行えない欠点がある<sup>11)–13)</sup>。一方相関解析では、10kb以下まで候補領域を限定することが可能であるが、患者・対照群とも数百人のサンプルを必要とすること、ゲノム全領域を網羅するためにはマイクロサテライトマーカーにして約3万個必要であることが困難な点であった<sup>14)</sup>。猪子らは、全ゲノム領域を対象としたマイクロサテライト相関解析を行うために全ゲノム領域を網羅した約100kb間隔のマイクロサテライトマーカーを設定し、利用可能となった。

一方、多数の検体を用いてゲノムワイドなマイクロサテライトタイピングを行う場合、大量のPCR反応が必要となり、労力・時間・Taqポリメラーゼのコストの面で大きな問題があった。しかし最近では100～200人程度のゲノムDNAを等量混合し調整したPooled DNAを用いるタイプ

ング法が開発され、コスト・時間の大幅な軽減が可能となった<sup>14)</sup>。

実際にTamiyaらは関節リウマチにおける疾患感受性遺伝子の検索を行い、1次～3次スクリーニングならびにIndividual Genotypingの結果、27039マーカーから47マーカー(47/27039 = 0.17%)の限定が可能であったとしている<sup>8)</sup>。またKawashimaらはナルコレプシーにおける疾患感受性遺伝子の検索を行い、1次～2次スクリーニングならびにIndividual Genotypingの結果、23244マーカー中30マーカー(30/23244 = 0.13%)が感受性領域として同定されている<sup>15)</sup>。今回の子宮内膜症における解析では、1次～3次スクリーニングならびにIndividual Genotypingの結果、27039マーカーから32マーカー(32/27039 = 0.12%)に感受性領域が限定され、有意差を示した陽性マーカーの頻度は前2者の解析とほぼ同等であった。

今後は、候補領域内より疾患感受性遺伝子を同定するために、遺伝子内のSNP(single nucleotide polymorphism)相関解析から責任遺伝子の同定、機能解析へと解析を進めていく予定である。

## 結 語

患者・対照群各600例を対象に、全ゲノム領域に設定された27039個のマイクロサテライトマーカーを用いた相関解析を行った。Pooled DNAに

よる1次, 2次, 3次スクリーニングならびに Individual Genotyping の結果, 子宮内膜症感受性遺伝子領域が9マーカー領域に限定され, 約20個の候補遺伝子が選定された。

#### 謝 辞

この研究を行うにあたり御指導賜りました東海大学医学部基礎医学系分子生命科学分野・猪子英俊教授, 新潟大学大学院医歯学総合研究科生殖器官制御学分野・田中憲一教授に心から御礼申し上げます。

#### 参 考 文 献

- 1) Giudice LC and Kao LC: Endometriosis. *Lancet* 364: 1789 - 1799, 2004.
- 2) Eskenazi B and Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 24: 235 - 258, 1997.
- 3) Moen MH and Magnus P: The familial risk of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 72: 560 - 564, 1993.
- 4) Simpson JL, Elias S, Malinak LR and Buttram VC Jr: Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 137: 327 - 331, 1980.
- 5) Lamb K, Hoffmann RG and Nichols TR: Family trait analysis: a case - control study of 43 women with endometriosis and their best friends. *Am J Obstet Gynecol* 154: 596 - 601, 1986.
- 6) Treloar SA, O' Connor DT, O' Connor VM and Martin NG: Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *Fertil Steril* 71: 701 - 710, 1999.
- 7) Collins HE, Li H, Inda SE, Anderson J, Laiho K, Tuomilehto J and Seldin MF: A simple and accurate method for determination of microsatellite total allele content differences between DNA pools. *Hum Genet* 106: 218 - 226, 2000.
- 8) Tamiya G, Shinya M, Imanishi T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, Furugaki K, Matsumoto T, Mano S, Ando S, Nozaki Y, Yukawa W, Nakashige R, Yamaguchi D, Ishibashi H, Yonekura M, Nakami Y, Takayama S, Endo T, Saruwatari T, Yagura M, Yoshikawa Y, Fujimoto K, Oka A, Chiku S, Linsen SE, Giphart MJ, Kulski JK, Fukazawa T, Hashimoto H, Kimura M, Hoshina Y, Suzuki Y, Hotta T, Mochida J, Minezaki T, Komai K, Shiozawa S, Taniguchi A, Yamanaka H, Kamatani N, Gojobori T, Bahram S and Inoko H: Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum Mol Genet* 14: 2305 - 2321, 2005.
- 9) Newton - Cheh C and Hirschhorn JN: Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res* 573: 54 - 69, 2005.
- 10) Weiss KM and Terwilliger JD: How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nat Genet* 26: 151 - 157, 2000.
- 11) Risch N and Merikangas K: The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516 - 1517, 1996.
- 12) Weeks DE and Lathrop GM: Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits. *Trends Genet* 11: 513 - 519, 1995.
- 13) 井ノ上逸朗: クモ膜下出血の SNP 解析. *J Nippon Med Sch* 68: 422 - 425, 2001.
- 14) 谷津圭介, 平和伸仁, 岡 晃, 猪子英俊, 梅村敏: マイクロサテライトによる網羅的解析. *血圧* 12: 825 - 828, 2005.
- 15) Kawashima M, Tamiya G, Oka A, Hohjoh H, Juji T, Ebisawa T, Honda Y, Inoko H and Tokunaga K: Genomewide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Am J Hum Genet* 79: 252 - 263, 2006.

(平成19年1月10日受付)