

# SNP 相関解析による子宮内膜症の疾患感受性に関与する 遺伝子群の検索

生 野 寿 史

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
生殖器官制御分野（産科婦人科学）  
（主任：田中憲一教授）

## Association Analysis of Susceptibility Genes for Endometriosis Using Dense SNP Markers

Kazufumi HAINO

*Department of Obstetrics and Gynecology,  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences  
(Director: Prof. Kenichi TANAKA)*

### 要 旨

#### 【目的】

子宮内膜症は比較的頻度の高い疾患であるが、その発症機序はいまだ明らかにされていない。これまでにわれわれは、27039 個の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 9 つの候補領域を限定した。今回、これらの候補領域から子宮内膜症の疾患感受性に関与する遺伝子群の検索を目的として SNP 相関解析を行った。

#### 【対象と方法】

疾患群として子宮内膜症症例 600 例、対照群として臨床所見により子宮内膜症が否定された一般女性 600 例より得られたゲノム DNA を対象とした。方法は、マイクロサテライトの前後約 200kb を候補領域として SNP を約 10kb 間隔に設定。TaqMan 法あるいは Direct Sequence 法にて多型判定を施行し、疾患群・対照群にてアレル頻度差異を  $\chi^2$  検定により検定した。統計解析は、 $p < 0.05$  を有意基準とした。

#### 【結果】

9 つの候補領域のうち SNP 相関解析にて有意差を認めた領域は 5 領域（4q28.1/ 6p21.32/ 9p21.3/ 10p14/ 10q11.21）であった。これら 5 領域のうち候補遺伝子が存在する 3 領域においては、CDKN2B（9p21.3）、ALOX5（10q11.21）、HLA-DQA2/ DQB2（6p21.32）の 4 遺伝子が候補遺伝子として存在し、それぞれ CDKN2B;  $p = 0.0025$ （case 25.8 % vs control 20.3 %）、ALOX5;  $p = 0.0093$ （case 16.3 % vs control 20.8 %）、HLA-DQA2;  $p = 0.019$ （case 18.7 % vs control 22.7 %）、HLA-DQB2;  $p = 0.0034$ （case 29.5 % vs control 35.4 %）と有意なアレル頻度差を認めた。

Reprint requests to: Kazufumi HAINO  
Department of Obstetrics and Gynecology  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences  
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 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  
生野寿史

## 【結論】

9つの候補領域を対象としたSNP相関解析によりCDKN2B, ALOX5, HLA-DQA2, HLA-DQB2の4遺伝子が子宮内膜症との関連が推測される候補遺伝子として同定された。

キーワード：子宮内膜症, SNP相関解析

## 緒 言

子宮内膜症とは、子宮内膜組織またはその類似組織が子宮以外の部位に存在するものとして定義されており、様々な疼痛の原因および不妊とも関連した慢性の婦人科疾患である。子宮内膜症は生殖年齢女性の6-10%にみられる比較的頻度の高い疾患<sup>1)2)</sup>であるが、その発症機序についてはいまだ明らかにされていない。月経血逆流が根源にあるとする説が広く受け入れられているが、生殖年齢にある女性の90%程度に腹腔内への月経血逆流が認められるにも関わらず、子宮内膜症の罹患率が低いことから、子宮内膜症の発症には複雑な多因子的病因が存在することが推測される。これまでに子宮内膜症を有する女性では、一般女性に比べて自己免疫疾患を合併する頻度が有意に高いとして免疫異常が関与しているとする報告<sup>3)</sup>や内膜症家系での全ゲノム領域を対象としたポジショナルクローニングを用いた解析により染色体領域(10q26)が同定されたとする報告<sup>4)</sup>がなされているが、候補遺伝子の同定までには至っていない。

われわれは、これまでに子宮内膜症の発症に関与する遺伝子領域を全ゲノム領域から限定するために、27039個の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を行い、候補領域を9つの領域(4p15.2/4q28.1/6p21.32/9p21.3/9q21.31/10p14/10q11.21/10q21.1/13q12.3)を限定した(投稿中)。今回、同領域において一塩基多型(SNP)による相関解析を施行し、子宮内膜症疾患感受性遺伝子の検索を行った。

## 対象と方法

## 対象

疾患群としてr-ASRM分類<sup>5)</sup>(revised American Society for Reproductive Medicine classification of

endometriosis)にてⅢ期、Ⅳ期の子宮内膜症あるいは画像診断(CT, MRI, 超音波断層法のいずれか2つ)により3cm以上の内膜症性嚢胞を認めた子宮内膜症症例600例を用いた。対照群としては、手術所見にて子宮内膜症が否定された方あるいは月経困難症・不妊治療歴がない経産婦人600例とし、いずれも新潟大学遺伝子倫理委員会の承認のもとにインフォームドコンセントにより同意が得られた方を対象とした。

## 方法

## DNAの抽出

全ての対象症例より血液あるいは唾液を採取し、QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood maxi Kit (Qiagen)あるいはフェノール・クロロホルム法によりゲノムDNAの抽出を行った。

## SNPの選定と遺伝子型判定

SNPマーカーの選定は、NCBI dbSNP, JSNP DATABASE, HapMapProjectの3つの公共データベースより行い、マイクロサテライトマーカーの前後約200kbを対象として約10kb間隔にてSNPの設定を行った。設定したSNPマーカーの多型解析は、ABI PRISM7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いてTaqMan法により施行した。TaqMan Probeの設定部位に多型を認めprobeの設定が困難なSNPマーカーでは、ABI PRISM3700 DNA analyzer (Applied Biosystems)を用いてDirect Sequence法にて解析を行った。

## 統計学的解析

個々のSNPに関しては、ハーディーワインベルグ平衡検定により適正な集団が選択されていることを確認した後、疾患群・対照群でのアレル頻度差異を $\chi^2$ 検定により解析。p < 0.05を統計学的に有意であると判定した。なおハーディーワインベルグ平衡検定には、SNPAlyze ver. 3.2.3 soft-

ware (DYNACOM) を用いて行った。

## 結 果

マイクロサテライトマーカーによる相関解析から同定された9つの候補領域において、SNP相関解析により有意差を認めたのは5領域であった(表1に各領域において最も強い有意差を認めたSNPを示す)。遺伝子の存在しない3領域でのSNP相関解析では、DS10S0645i(図1-1)にて設定を行った52SNP中11SNP, D4S0348i(図1-6)で18SNP中2SNPにおいて有意差を認め、いずれも内膜症群にてマイナーアレル頻度が有意に高いという結果であった。D9S0792i(図1-2)領域では、31SNPの解析を行ったが、有意なSNPは認めなかった。遺伝子が存在した領域では、候補遺伝子として6領域に計10遺伝子が存在した。D13S0235i(図1-7), D4S0139i(図1-8)領域に存在したUBL3, SLC34A2, KIAA0746の3遺伝子では、計19SNPについて解析を行ったが有意差のあるSNPは存在しなかった。D10S0247i(図1-9)領域のPCDH15においては、設定した6SNPのうち3SNPにて有意差を認めたが、マイナーアレル頻度が5%以下のSNPであった。D9S0115(図1-3)領域にはCDKN2A, CDKN2Bの2遺伝子が存在し、12SNPでの解析においてCDKN2B遺伝子内の2SNPで有意差を認めた。D10S0203i(図1-4)領域のALOX5では、14SNPを設定しイントロン内に存在する3SNPにて有意差を認め、いずれも内膜症群にてマイナーアレル頻度が有意に低いという結果であった。またD6S0067i(図1-5)領域にはMHCクラスIIのHLA-DQA2, DQB2およびTAP2の3遺伝子が存在した。DQA2, DQB2では14SNPにて解析を行い、8SNPにおいて有意差を認めた。TAP2におけるSNP解析では、有意なSNPは観察されなかった。

## 考 察

マイクロサテライトマーカーおよびSNPを用

いた相関解析により、子宮内膜症との疾患感受性が疑われた領域は5領域(表1)であり、このうちSNP相関解析にて有意差が確認された遺伝子はCDKN2B, ALOX5, HLA-DQA2およびDQB2の4遺伝子であった。

CDKN2B遺伝子は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)であるCDK4/6と結合することでその機能を阻害するCDKインヒビターであり、p16(CDKN2A)などと同じくINK4ファミリーに属する遺伝子とされている<sup>6)</sup>。G1-S期にかけての細胞周期休止に関与し、悪性黒色腫や造血器系腫瘍においては欠失変異などにより癌抑制遺伝子としての機能を失うことで腫瘍発生に関与するとの報告がなされている<sup>7)8)</sup>。今回の解析にて最も強い有意差を認めたSNPは、エキソン内の非翻訳領域(UTR)に存在する。エキソンの非翻訳領域はmRNAの安定性や翻訳効率に影響を与えると報告がなされており<sup>9)10)</sup>、UTRに存在するSNPがCDKN2BのmRNAあるいはタンパク発現に何らかの影響を与えることで子宮内膜症の進展に関与する可能性が推測される。

アラキドン酸カスケードにおけるロイコトリエン産生に関わる触媒酵素であるALOX5(5-lipoxygenase)は、気管支喘息・アレルギー疾患・心血管疾患に関与することが知られている。ALOX5は肥満細胞やマクロファージに発現し、子宮内膜症における腹膜病変や間質細胞に肥満細胞の存在も確認されており<sup>11)12)</sup>、局所での炎症等にロイコトリエンの関与が示唆されている。しかし今回の検討では、ALOX5で有意差を認めたSNPはいずれもイントロン内に存在するものであり、かつマイナーアレル頻度が疾患群にて低いSNPであった。ゆえにALOX5におけるSNPが疾患抵抗性を有する点で子宮内膜症の発症に関わる可能性が推測される。

子宮内膜症とHLA class IIとの関連については、HLA-DQB1\*0301のアレル頻度の比較にて内膜症との関連を示唆する報告がなされている<sup>13)</sup>。加えてSinaiらはアメリカ内膜症協会における疫学調査にて、子宮内膜症罹患者は甲状腺機能低下症、SLE等の自己免疫疾患、喘息、アレルギーの

合併が一般女性に比べて有意に多いとし、内膜症と免疫異常の関連について報告している<sup>3)</sup>。われわれの解析にて有意差を認めた HLA-DQA2 お

よび DQB2 は、いずれも機能不明な偽遺伝子とされているため現状では有力な候補とは考えにくく、機能面での子宮内膜症との関連を検討するた

表1 候補領域における SNP 相関解析結果  
(SNP解析にて有意差を認めた領域)

| 染色体座位    | マイナーアレル頻度 (%) |         | P-value* | 候補遺伝子    |
|----------|---------------|---------|----------|----------|
|          | Case          | Control |          |          |
| 9p21.3   | 25.8%         | 20.3%   | 0.0025   | CDKN2B   |
| 10q11.21 | 16.3%         | 20.8%   | 0.0093   | ALOX5    |
| 6p21.32  | 18.7%         | 22.7%   | 0.019    | HLA-DQA2 |
|          | 29.5%         | 35.4%   | 0.0034   | HLA-DQB2 |
| 10p14    | 36.3%         | 31.3%   | 0.0135   | なし       |
| 4q28.1   | 18.3%         | 13.9%   | 0.0048   | なし       |

\* $\chi^2$ 検定

図1 各マイクロサテライトマーカー領域における SNP 相関解析結果

図 1-1. D10S0645i領域 (10p14)

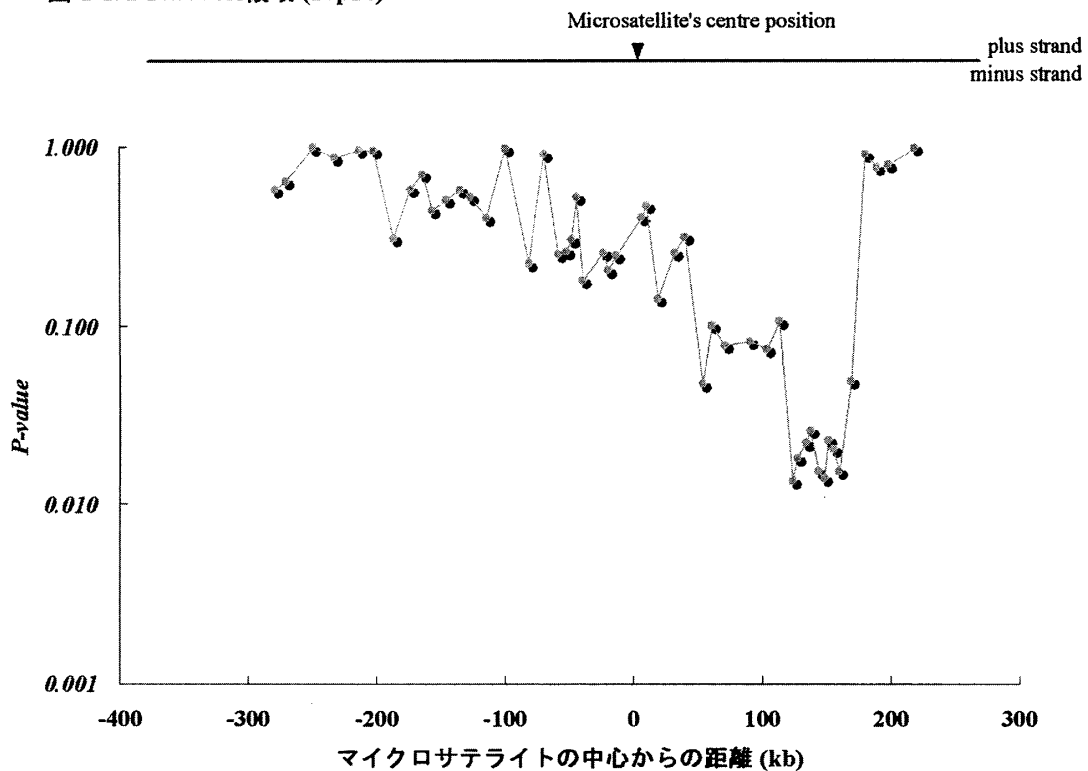


図1-2. D9S0792領域 (9q21.31)

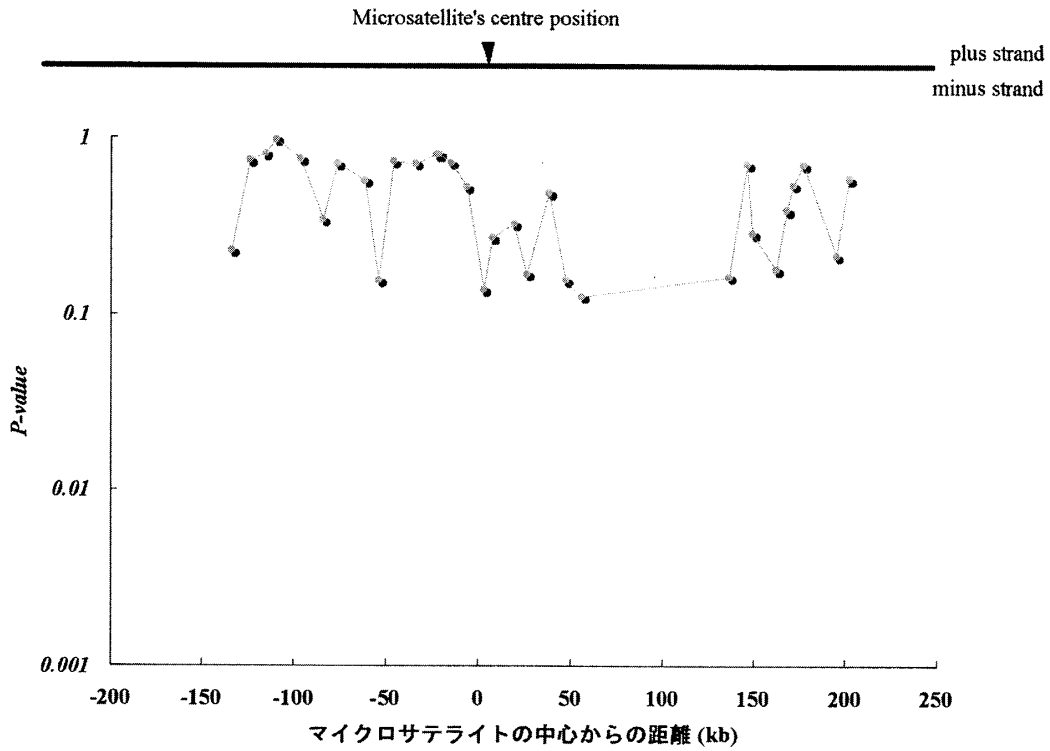


図 1-3. D9S0115領域 (9p21.3)

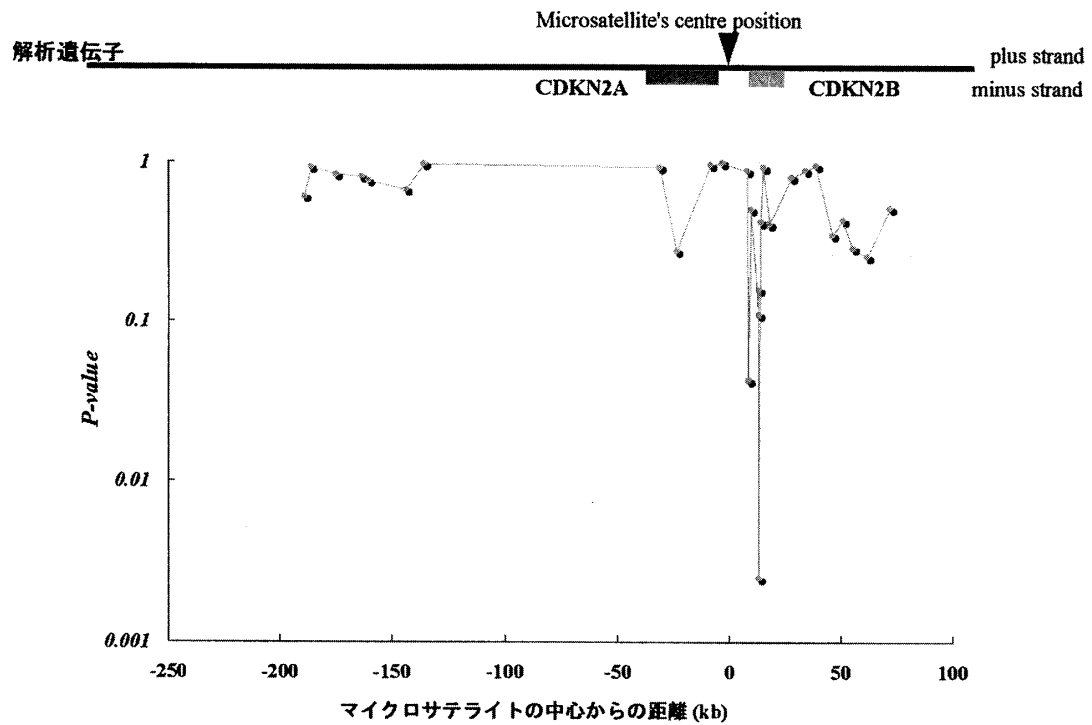


図 1-4. D10S0203領域 (10q11.21)

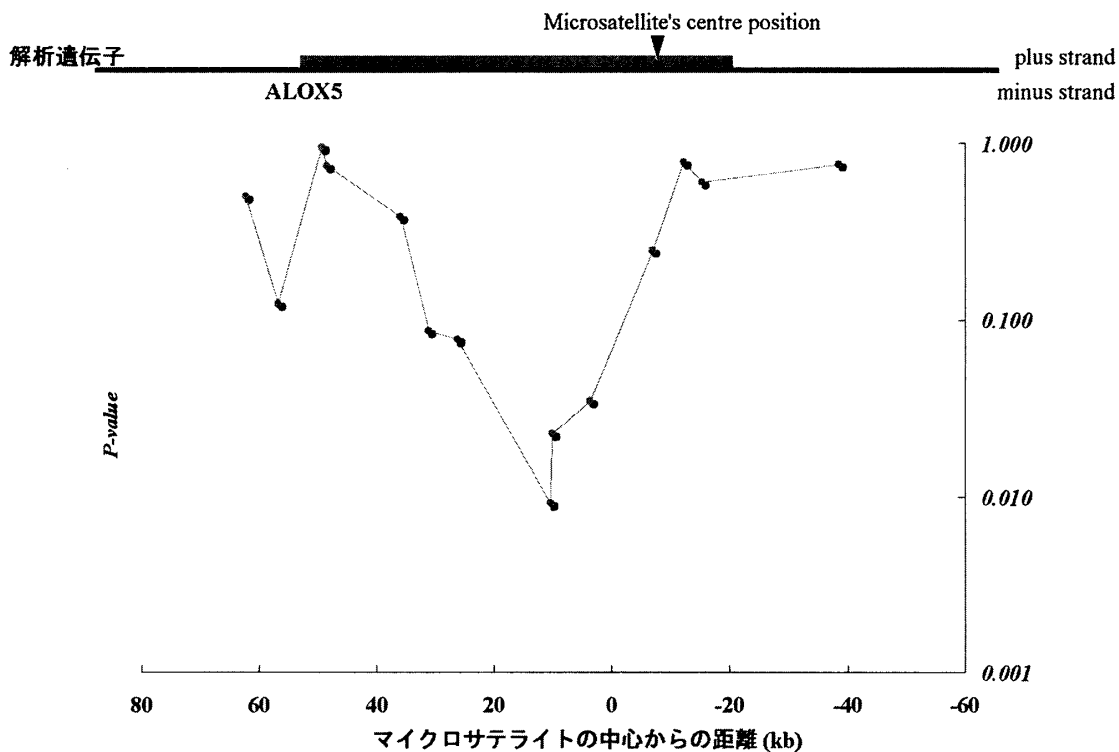


図 1-5. D6S0067i領域 (6p21.32)

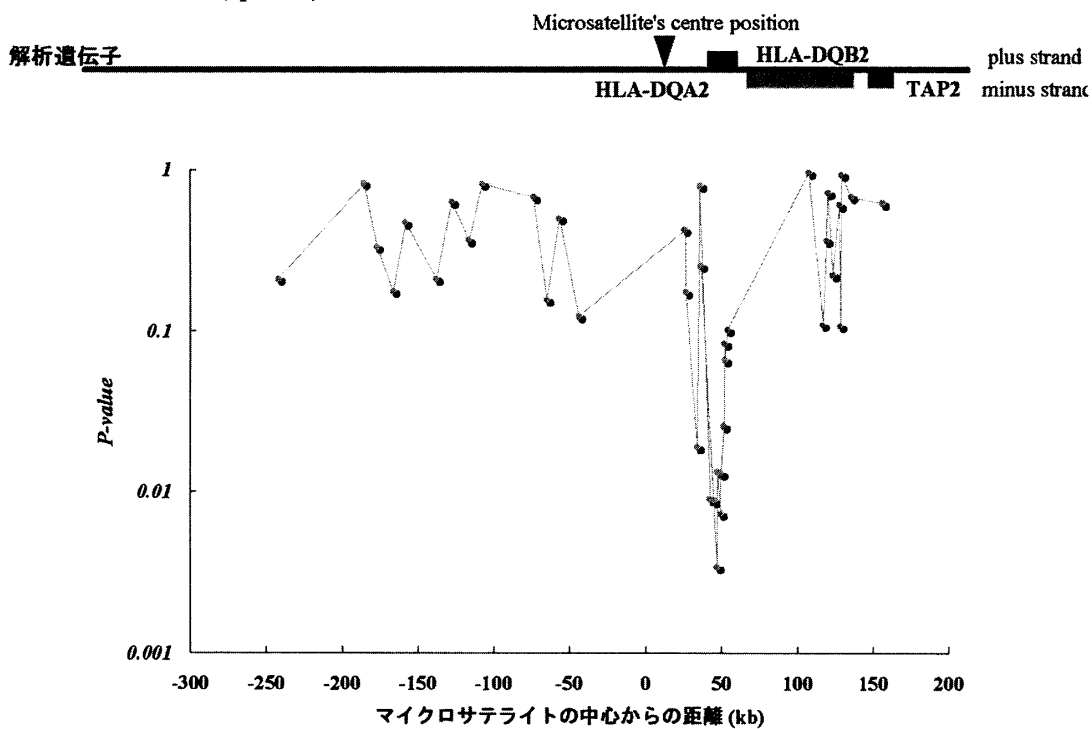


図 1-6. D4S0348領域 (4q28.1)

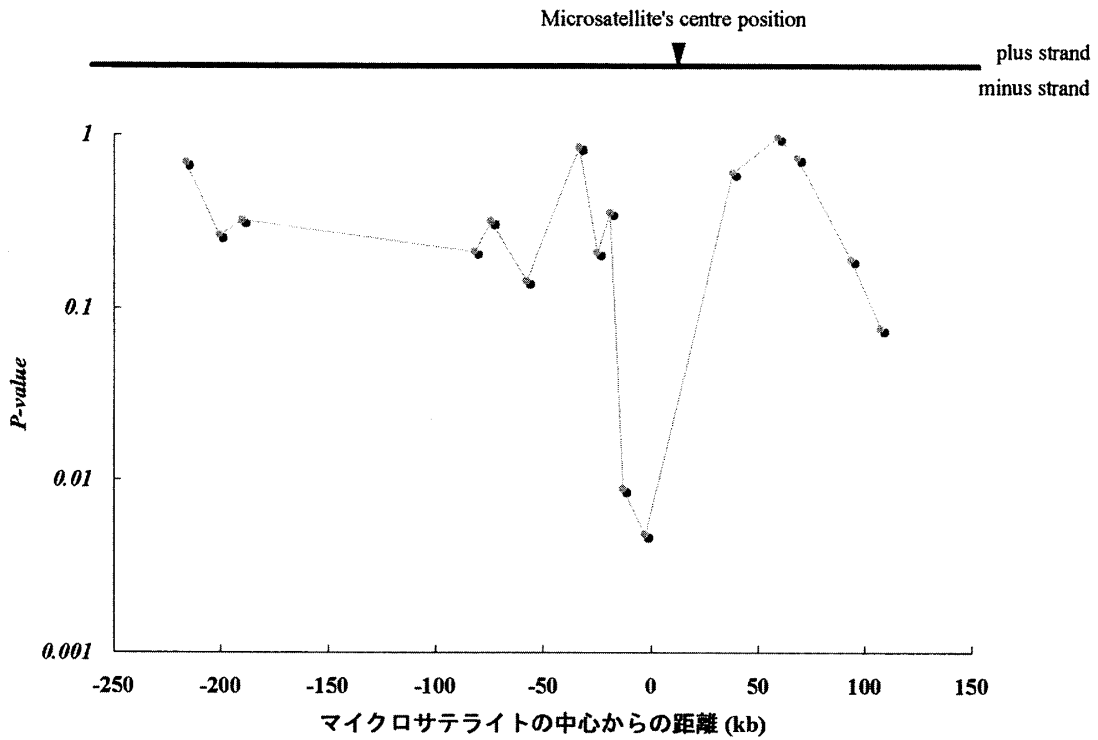


図 1-7. D13S0235領域 (13q12.3)

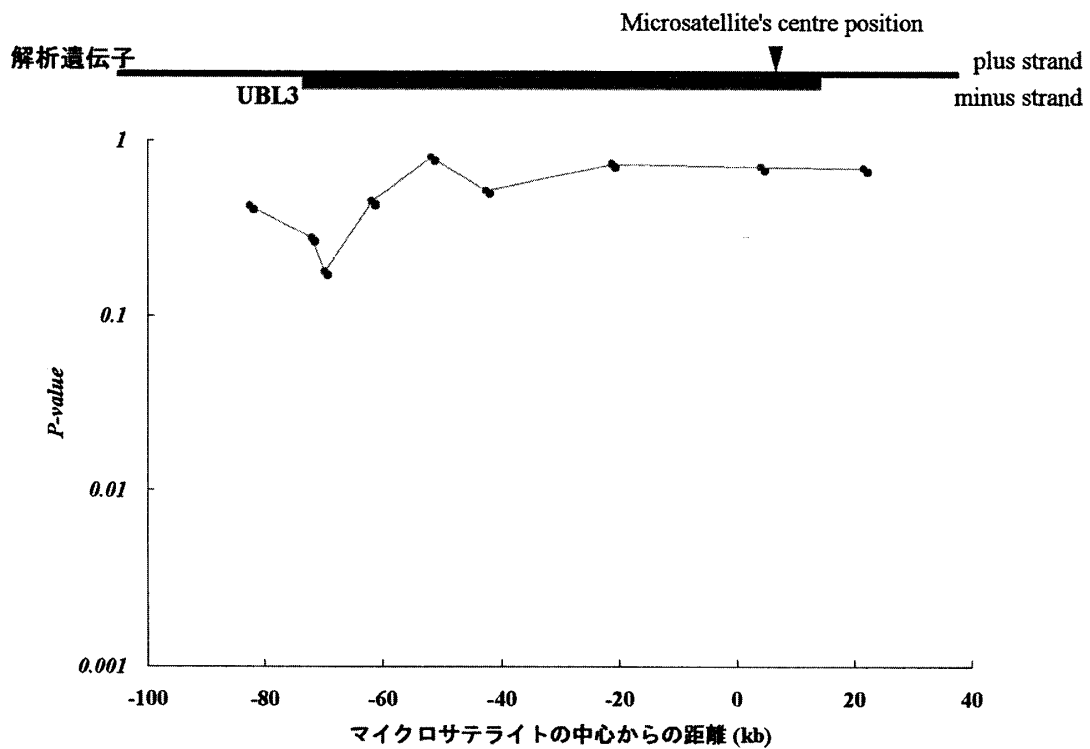


図 1-8. D4S0139領域 (4p15.2)

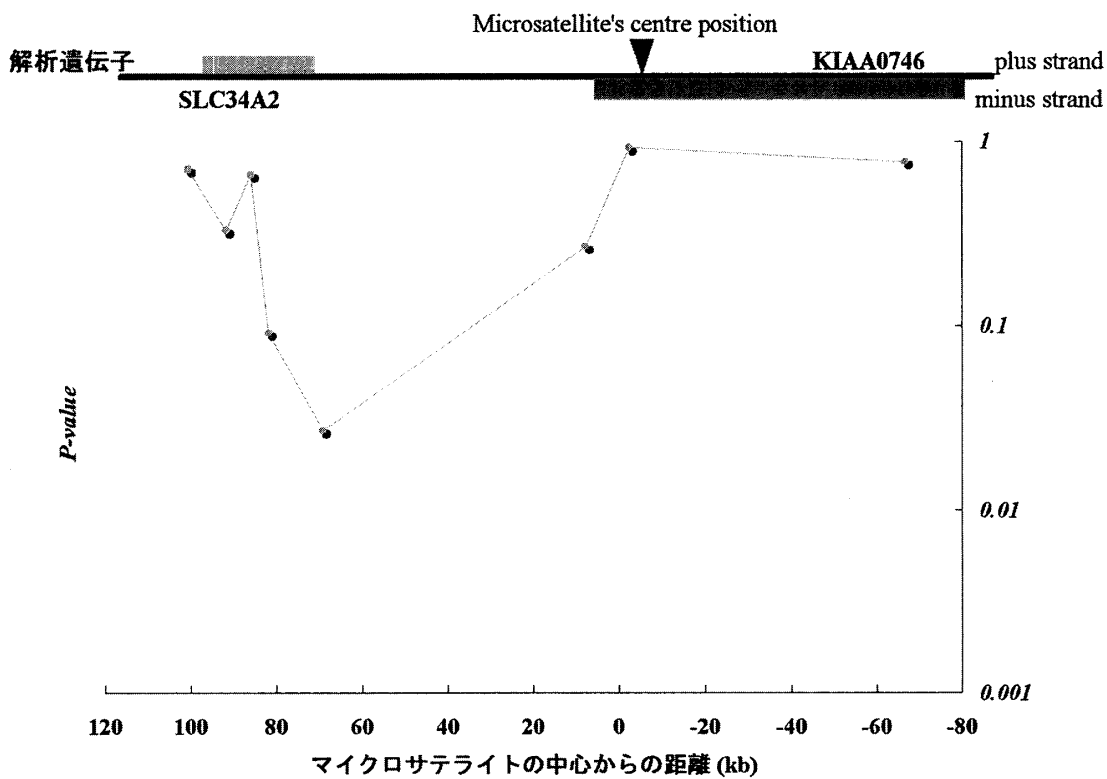
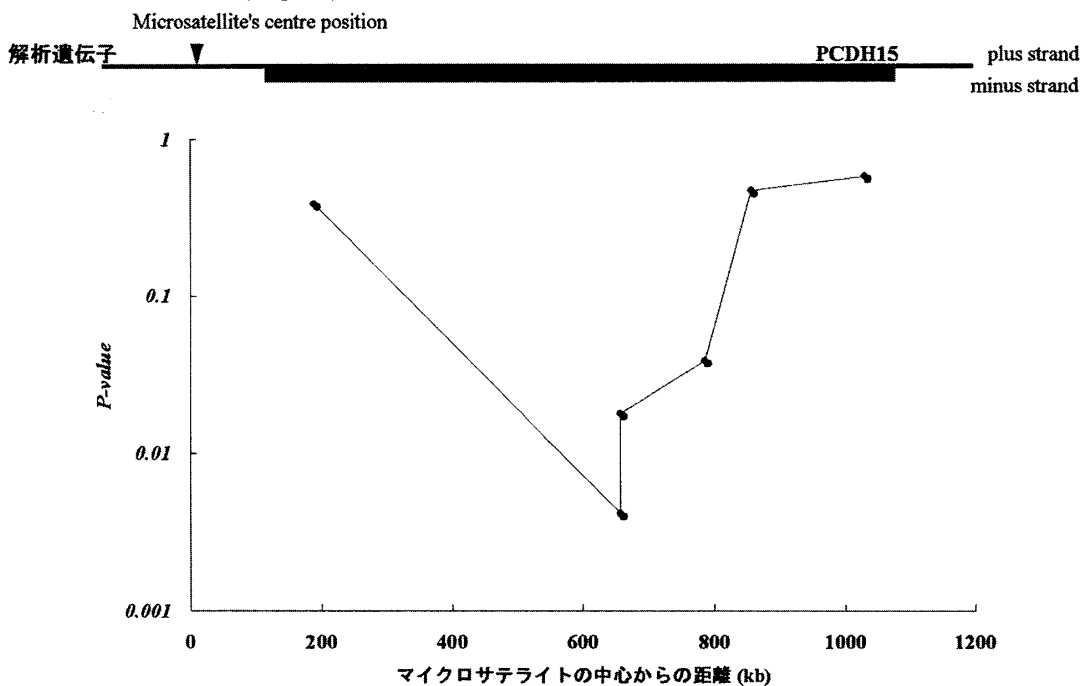


図 1-9. D10S0247i領域 (10q21.1)





めにはさらなる解析が必要である。今後は、各遺伝子における mRNA およびタンパク質発現解析や SNP での機能解析等を行い、ゲノム多型とタンパク質発現との相関、ひいては疾患発症に関わる遺伝子群のパスウェイを解明することが最終目標である。

## 結 語

今回のマイクロサテライトおよび SNP マーカーを用いた相関解析により子宮内膜症との関連が推測される 4 つの遺伝子が同定された。機能面からみた子宮内膜症の発症および進展の関与については、今後さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

## 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、同・井ノ上逸朗教授、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) Olive DL and Schwartz LB: Endometriosis. *New Engl J Med* 328: 1759 - 1769, 1993.
- 2) Houston DE: Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race, and socioeconomic status. *Epidemiol Rev* 6: 167 - 191, 1984.
- 3) Sinaii N, Cleary SD, Ballweg ML, Nieman LK and Stratton P: High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis. *Hum Reprod* 17: 2715 - 2724, 2002.
- 4) Treloar SA, Wicks J, Nyholt DR, Montgomery GW, Bahlo M, Smith V, Dawson G, Mackay IJ, Weeks DE, Bennett ST, Carey A, Ewen - White KR, Duffy DL, O'connor DT, Barlow DH, Martin NG and Kennedy SH: Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet* 77: 365 - 376, 2005.
- 5) The American fertility society: Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985. *Fertil Steril* 43: 351 - 352, 1985.
- 6) Hannon GJ and Beach D: p15INK4B is a potential effector of TGF - beta - induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257 - 261, 1994.
- 7) Soto Martinez JL, Cabrera Morales CM, Serrano Ortega S, López - Nevot MA: Mutation and homozygous deletion analyses of genes that control the G1/S transition of the cell cycle in skin melanoma: p53, p21, p16 and p15. *Clin Transl Oncol* 7: 156 - 164, 2005.
- 8) Drexler HG: Review of alterations of the cyclin - dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia - lymphoma cells. *Leukemia* 12: 845 - 859, 1998.
- 9) Wickens M, Anderson P and Jackson RJ: Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr Opin Genet Dev* 7: 220 - 232, 1997.
- 10) Hughes TA: Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet*. 22: 119 - 122, 2006.
- 11) Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Fukaya T, Yajima A and Bruhat MA: Increased mast cell density in peritoneal endometriosis compared with eutopic endometrium with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 40: 291 - 294, 1998.
- 12) Sugamata M, Ihara T and Uchiide I: Increase of activated mast cells in human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 53: 120 - 125, 2005.
- 13) Ishii K, Takakuwa K, Kashima K, Tamura M and Tanaka K: Associations between patients with endometriosis and HLA class II ; the analysis of HLA - DQB1 and HLA - DPB1 genotypes. *Hum Reprod* 18: 985 - 989, 2003.

(平成 18 年 12 月 21 日受付)