

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791133  
 研究課題名 (和文) 高密度 DNA チップを用いた雄核発生胎状奇胎ゲノムのコピー数変化解析  
 研究課題名 (英文) The copy number variation analysis of androgenetic hydatidiform mole with high density SNPs array

研究代表者  
 加来 博志 (KAKU HIROSHI)  
 千葉大学・大学院医学研究院・協力研究員  
 研究者番号：40456059

研究成果の概要 (和文)：胎状奇胎妊娠は日本ではおよそ 400 妊娠に 1 回の頻度で生ずる。通常の妊娠は両親由来 2 倍体であるのに対して、全胎状奇胎は父方由来 2 倍体 (雄核発生奇胎)、部分胎状奇胎は両親由来 3 倍体の遺伝学的構成を取ることが知られている。全胎状奇胎、すなわち雄核発生奇胎は奇胎妊娠の終了後に約 10-30% で続発症 (侵入奇胎) が生じるため、妊娠終了後には厳重な奇胎後管理を要する。続発症である侵入奇胎は、発症時期・hCG 産生能・化学療法に対する感受性・転移の好発部位などの点で、生物学的に均一な特徴を有する。また 10-30% と一般の newborn に比べ高頻度で発症することから、侵入奇胎と経過順調型全胎状奇胎との間には妊娠成立時から何らかの生物学的差異があると推定している。現時点では、全胎状奇胎のどの症例が続発症になるのかを予測する方法はない。そこで、経過順調型全胎状奇胎と続発症となった胎状奇胎ゲノムに対して、Affymetrix 社高密度 SNPs アレイを適用しその差を比較した。現在までに、①従来の STR 多型により雄核発生 1 精子受精と判定していた全奇胎が、全ゲノムレベルで 1 精子受精であることが明らかになった。②胎状奇胎例とコントロールゲノムデータ (270HapMap Reference) の比較により、胎状奇胎で特異的に遺伝子増幅が見られる領域を認めた。③続発症例と経過順調型との比較で、続発症例で特異的に遺伝子増幅が見られる領域が全ゲノム中に 2 箇所あった。現在、②と③の解析で見つかった特異的遺伝子増幅領域をリアルタイム PCR 法で確認している。

研究成果の概要 (英文)：Hydatidiform mole (HM) occurs in about 1 in 400 pregnancies in Japan. There are two different HM entities: androgenetic diploid 'complete' hydatidiform mole (CHM) and triploid 'partial' hydatidiform mole (PHM). CHM has a higher risk of GTN than PHM. It has been estimated that 10-30% of CHM develops GTN. However, we cannot predict which cases develop to gestational trophoblastic neoplasia. We applied 8 cases complete moles (CHM) to high density SNPs array of Affymetrix, and analyzed the array data with Affymetrix Genotyping Console and Microsoft Excel. 1) Homozygous CHM assessed with STR polymorphism analysis were confirmed the homozygosity in whole genome level. 2) We found specific regions in CHM. 3) We found two GTN specific region in chromosome 2 and 22.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：胞状奇胎、侵入奇胎、雄核発生奇胎、SNPs アレイ、遺伝子増幅、LOH、コピー数変化

## 1. 研究開始当初の背景

胞状奇胎妊娠は日本ではおよそ 400 妊娠に 1 回の頻度で生ずる。通常の妊娠は両親由来 2 倍体であるのに対して、全胞状奇胎は父方由来 2 倍体（雄核発生奇胎）、部分胞状奇胎は両親由来 3 倍体の遺伝学的構成を取ることが知られている。全胞状奇胎、すなわち雄核発生奇胎は奇胎妊娠の終了後に約 10-30% で続発症（侵入奇胎）が生じるため、妊娠終了後には厳重な奇胎後管理を要する。現時点では、全胞状奇胎のどの症例が続発症になるのかを予測する方法はない。胞状奇胎の組織の解析から、続発症をきたす患者と、経過順調型となる患者が区別できれば、臨床上大変有益である。現在は、奇胎後の管理として、hCG の測定のために週 1 回の通院が必要であるが、リスクが低いことが判った患者では通院回数を減らすことが可能になる。反対に、リスクの高い患者では予防的な化学療法を行うことで、抗癌剤の投与量を減らすことができる可能性がある。

続発症である侵入奇胎は、発症時期・hCG 産生能・化学療法に対する感受性・転移の好発部位などの点で、生物学的に均一な特徴を有する。また 10-30% と一般の新生物に比べ高頻度で発症することから、侵入奇胎と経過順調型全胞状奇胎との間には妊娠成立時から何らかの生物学的差異があると推定された。そこで、経過順調型全胞状奇胎と続発症となった胞状奇胎ゲノムに対して、最新の Affymetrix 社高密度 SNPs アレイを適用し、遺伝子増幅、遺伝子欠失(LOH)、SNPs、コピー数変化の差を比較して、マーカーとなるゲノム変化を同定することを企画した。

## 2. 研究の目的

雄核発生奇胎に特徴的な、遺伝子増幅、LOH、SNPs、コピー数変化があるか検索する。また経過順調型と続発症に特異的な遺伝子増幅、LOH、SNPs、コピー数変化があるか検索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 肉眼的に胞状奇胎と診断された症例の

奇胎組織・本人リンパ球からゲノム DNA を抽出・精製した。

- (2) 奇胎・リンパ球の Short tandem repeat (STR) 多型の比較を、プロメガ社 Powerplex16 system を用いて行った。
- (3) STR 多型解析から、雄核発生奇胎例を抽出した。
- (4) 雄核発生奇胎ゲノムを Affymetrix 社高密度 SNPs アレイで解析し、続発症例と経過順調型例の比較を行う。Affymetrix Genotyping Console ソフトウェアと Microsoft Excel を使用し解析を行った。

## 4. 研究成果

- (1) 肉眼診断で全胞状奇胎であった症例に対して、STR 多型解析を行い、27 例の雄核発生奇胎を抽出した(図 1: 雄核発生 1 精子受精例、図 2: 雄核発生 2 精子受精例)。

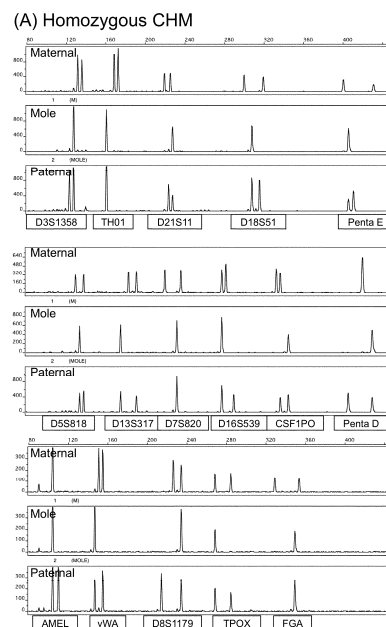


図 1

(B) Heterozygous CHM

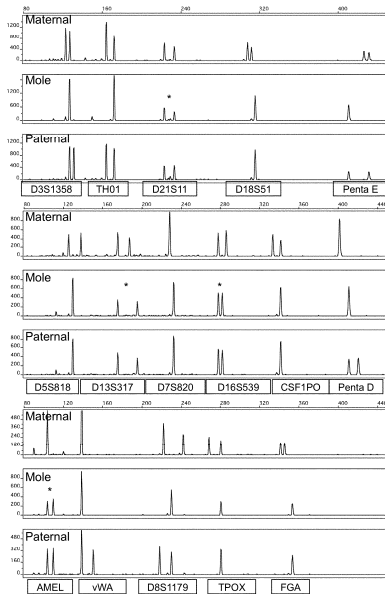


図 2

(2) 雄核発生 1 精子受精奇胎では、理論的には全ゲノムレベルでモノハプロタイプを取ることが予想されるが、これまでに使われている核染法・HLA 多型・酵素多型・STR 多型のいずれの method でも方法論的には十分ではない。STR 多型解析により雄核発生 1 精子受精と

表 1 雄核発生奇胎の全ゲノム genotyping 結果

	call_rate	het_rate	hom_rate	
雄核発生奇胎	1	100.0	0.7	99.3
	2	100.0	1.5	98.5
	3	100.0	0.7	99.3
	4	100.0	0.8	99.2
	5	100.0	2.0	98.0
	6	100.0	3.9	96.0
	7	100.0	2.8	97.2
	8	100.0	1.9	98.1
コントロール	1	98.6	25.9	72.7
	2	98.7	27.1	71.7
	3	98.8	28.2	70.6
	4	98.9	26.6	72.3
	5	97.9	24.5	73.5
	6	98.7	24.2	74.5
	7	98.0	24.4	73.6
	8	98.6	28.9	69.8

判定していた全奇胎 8 例のゲノムを、高密度 SNPs アレイにより、whole genome レベルで解析を行った。

コントロール DNA の場合、SNPs がヘテロである割合は通常 25%~30%程度である。これに対して、雄核発生 1 精子受精奇胎 8 例では、いずれも 4%以

下であり、約 500,000 箇所 of SNPs の大部分の遺伝子型はホモである、すなわち全ゲノムレベルでモノハプロタイプであることが示された。(表 1)。

(3) 胞状奇胎例とコントロールゲノムデータ (270HapMap Reference) の SNPs アレイデータの比較により、胞状奇胎で特異的に遺伝子増幅が見られる領域を 2 番染色体と 5 番染色体上に上に見出した (図 3)。

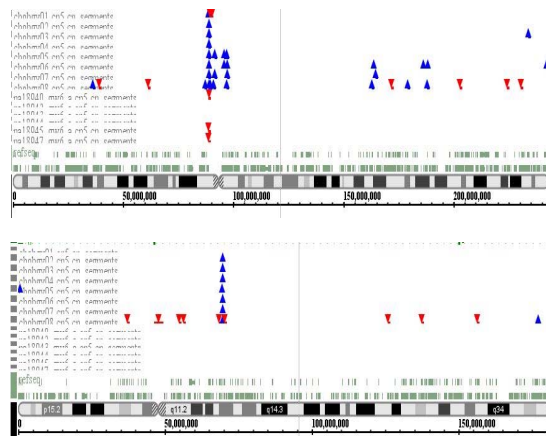


図 3

(4) 続発症例と経過順調型との SNPs アレイデータの比較により、続発症例で特異的に遺伝子増幅が見られる領域が全ゲノム中に 2 箇所あった (図 4)。

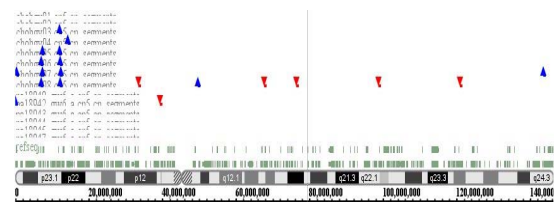


図 4

(5) 現在、高密度 SNPs アレイでの解析を行っていない約 20 例の雄核発生奇胎のゲノムで胞状奇胎特異的な遺伝子領域、続発症特異的な遺伝子領域について、それぞれ、4 個ずつのプロープを作成して、リアルタイム PCR 法により、遺伝子増幅が生じているかを確認中である。また、胞状奇胎特異的な遺伝子増幅領域には、胎盤特異的に発現する遺伝子が存在することが含まれているこ

とが判明しているので、正常絨毛、胞状奇胎におけるその遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により、検討している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Baasanjav B, Usui H, Kihara M, Kaku H, Nakada E, Tate S, Mitsuhashi A, Matsui H, Shozu M.

The risk of post-molar gestational trophoblastic neoplasia is higher in heterozygous than in homozygous complete hydatidiform moles

Hum Reprod (25)1182-1191 (2010) (査読あり)

- ②加来博志, 尾本暁子, 生水真紀夫  
臨床的癒着胎盤の待機療法産  
婦人科の実際 (58)2035-2041 (2009) (査読なし)

[学会発表] (計 4 件)

- ①第 45 回日本周産期・新生児医学会  
田中宏一, 尾本暁子, 鶴岡信栄, 尾崎江都子, 加来博志, 長田久夫, 生水真紀夫  
出生前羊水染色体検査にて complete trisomy 9 と診断された trisomy 9 mosaicism の 1 例  
2009 年 7 月 14 日 名古屋国際会議場
- ②第 45 回日本周産期・新生児医学会  
長田久夫, 尾本暁子, 尾崎江都子, 加来博志, 鶴岡信栄, 田中宏一, 生水真紀夫  
22q11.2 deletion 症候群合併妊娠の 1 例  
2009 年 7 月 14 日 名古屋国際会議場
- ③第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会  
碓井宏和, 木原真紀, 中田恵美里, 鶴岡信栄, 加来博志, 平敷好一郎, 楯真一, 加藤一喜, 田中宏一, 三橋暁, 松井英雄, 生水真紀夫  
雄核発生胞状奇胎および絨毛癌培養細胞における KvDMR のメチル化状態の解析  
2009 年 4 月 4 日 国立京都国際会館
- ④第 60 回日本産科婦人科学会学術講演会  
加来博志ら  
癒着胎盤症例に対する子宮動脈塞栓術を用いた待機的治療の有用性

2008 年 4 月 12 日

パシフィコ横浜

[その他]  
ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/gyne/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

加来 博志 (KAKU HIROSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・協力研究員

研究者番号：40456059

##### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし