

機関番号：17301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791565

研究課題名 (和文)

原因不明習慣流産の妊娠産物およびカップルを対象とした原因遺伝子の探索

研究課題名 (英文)

Identification of the genes for abortus habitus

研究代表者

霜川 修 (SHIMOKAWA OSAMU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号：50513321

研究成果の概要 (和文)：原因不明の難治性習慣流産の患者とその両親の6家系を解析対象としてアレイ解析を実施し、コピー数変化(10kb以下)を49箇所検出した(表1)。このうち流産の原因となり得るような遺伝子が位置している6箇所を選別して(表2)、リアルタイムPCRによりコピー数変化を再検証した。その結果6箇所中2箇所について真のコピー数変化であることが明らかになった(図1-6)。ひとつは家系3で検出した8p23.1上における47kbの欠失であった。この領域は複数の論文でCNV(Copy Number Variation)領域の報告があり、難治性習慣流産とは関係がないと判断した。

またもうひとつは家系6で検出した4q22.2上における100kbの欠失であった。この領域にはglutamate receptor delta-2 (GRID2)という遺伝子が位置しているが、この遺伝子は興奮性神経伝達に関与しているものの、発生には関与しておらず、この領域のコピー数減少についても難治性習慣流産とは関係がないと結論づけた。

研究成果の概要 (英文)：We purposed to identify the genes for habitual abortion. We performed array analyses for 6 couples and their parents, and identified 49 loci with copy number change less than 10 kb (Table 1). We focused six loci among them because of existence of candidate genes and reevaluate the copy number using real time PCR. Two loci, locus1: 47 kb deletion on 8p23.1 and locus2: 100 kb deletion on 4q22.2, were confirmed as deletion. Because the locus1 found in family3 have been reported as copy number variant, we judged locus1 was not responsible for habitual abortion. Locus2 found in family6 contains glutamate receptor delta-2 (GRID2). The GRID2 could related to the neuronal function, but not to fetal or to placental development. We also judged locus2 was not responsible for habitual abortion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 22 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
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：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：習慣性流産

1. 研究開始当初の背景

(1) 習慣流産は一般集団中において 1-2%の頻度であり、抗リン脂質抗体症候群 5%、夫婦どちらかの染色体異常 4.5%、子宮奇形 3%などが原因であるが、半数以上は原因不明である。

(2) 流産の 70%に胎児染色体数的異常がみられ、習慣流産の中にも胎児染色体異常を繰り返している症例が存在することが明らかになっている。

(3) これらの胎児染色体異常流産経験者はその後の生児獲得率は胎児染色体正常の症例よりも良好であることが報告されている。

(4) 胎児染色体異常が原因の場合は確率の問題であることを説明する精神的援助が大切であり、そのことが児獲得につながっている。

(5) 一方、原因不明胎児染色体正常流産を繰り返す症例は予後不良であるが、現時点で難治性原因不明習慣流産患者の原因遺伝子は特定されていない。

2. 研究の目的

本研究では染色体検査では検出困難なゲノムコピー数変異領域内に存在する流産の原因遺伝子を同定することを目的とする。原因不明の習慣流産のカップル（両親）と流産物（児）を解析対象として、研究を行う予定であったが、難治性習慣流産の原因として、母親に原因を求めて以下のように目的を設定した。

既知の習慣流産原因（夫婦の染色体検査、子宮形態、抗リン脂質抗体検査、内分泌検査で異常なし）でなく、9回以上もの原因不明の難治性習慣流産の患者とその両親の6家系を解析対象として、

(1) 患者およびその両親の末梢血白血球より抽出した DNA を対象として、ゲノムコピー数解析を実施する。

(2) GeneChip 解析により検出されたコピー数変異（10kb 以下）内にマップされる遺伝子のうち、胎生初期に高発現し、流産の原因となり得る遺伝子を選別する。

(3) 選別したコピー数異常領域については FISH および定量 PCR (リアルタイム PCR) 法によりコピー数変化の検証を行う。

3. 研究の方法

名古屋市立大学医学部産婦人科において本研究についての説明を行い、協力に同意した難治性習慣流産患者およびその両親を解析対象とし、同医局内で連結可能匿名

化した後、以降の手順で研究を実施する。

(1) 難治性習慣流産の患者、およびその両親の匿名化血液試料を受領後、一部を培養して染色体標本を作製する。残りの血液からは DNA を抽出する。

(2) 患者およびその両親の DNA 試料を対象として、Affymetrix 社 GeneChip マイクロアレイを使用したゲノムコピー数解析を実施する。その際、患者で de novo および父由来のコピー数変化を同定する。

(3) アレイ解析で検出したゲノムコピー数変異を患者・その両親を対象として FISH 解析、および定量 PCR 法を実施して検証する。

4. 研究成果

難治性習慣性流産をおこす母親とその両親の6家系について末梢血白血球より抽出した DNA を対象として、Affymetrix 社 Genome-Wide Human SNP 6.0 アレイを用いて（平均プローブ間距離約 3kb）ゲノムコピー数を解析した。なお、解析は Genotyping console ソフトウェアを使用し、reference として日本人正常コントロール 45 人を用いた。我々は独自のデータベースを作成しており使用アレイで特異に検出される false positive が除外可能であり、かつ微細なコピー数異常を検出するために最低 5 つ以上のプローブが含まれる 10kb 以上のコピー数変化を解析対象領域とし、各症例の母親で約 40~600 箇所のコピー数変化を検出した。このうち正常人でコピー数変化が報告されている既知のコピー数多型を除外し、かつ de novo のコピー数変化または父由来コピー数変化に限定して候補領域を検索すると約 49 箇所検出できた（表 1 参照）。

	Copy数 Gain			Copy数 Loss			
	Gain 総数	de novo	父由来	Loss 総数	de novo	父由来	
家系1	5	1	4	10	5	5	
家系2	12	2	10	5	2	3	
家系3	2	0	2	5	2	3	
家系4	0	0	0	3	1	2	
家系5	1	0	1	0	0	0	
家系6	0	0	0	6	2	4	
	20			29			合計 49

表 1. アレイ解析によるコピー数変化内訳

父由来のコピー数変化を解析対象とした理由は、男性の場合には何ら問題ないが、女性でこれを受け継いだ場合に、このコピー数変化が原因で妊娠継続が困難になる可能性を考慮する必要があるからである。さらに我々は検出した 49 箇所より遺伝子機能等が個体発生に関連する可能性があると推測される 6 箇所に選別した（表 2）。

家系	gain/loss	染色体	染色体バンド	ゲノム開始点	サイズ (kb)	遺伝子	由来
家系1	loss	2	q33.3	206688064	16	NDUFS1	de novo
家系2	gain	1	p22.1	94090259	25	DNTTIP2	pat
	gain	3	q27.3	188417594	10	MASP1	pat
家系3	gain	4	q31.21	144510413	20	GAB1	pat
	loss	8	p23.1	12025123	47	DUB3	pat
家系6	loss	4	q22.2	94100376	100	GRID2	pat

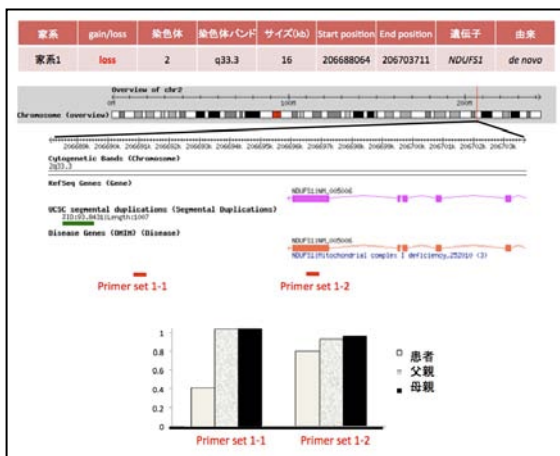
表 2. リアルタイム PCR による
検証対象領域

上記 6 箇所についてアレイで検出されたコピー数変化領域が擬陽性ではなく、真のコピー数変化であることを検証するためにリアルタイム PCR を実施した。
リアルタイム PCR はアレイで検出した欠失・重複領域内にプライマーを 2 箇所デザインしてその両方でアレイのコピー数変化と一致したものを真のコピー数変化とする。

図の見方について

- ・ 1 段目表：アレイ解析の結果
- ・ 2 段目図：欠失・重複領域を DGV 上 (Database of Genomic Variant <http://projects.tcag.ca/variation/>) で表示し、遺伝子と CNV, またリアルタイム PCR のプライマーの位置関係を示す。
[ピンク→RefSeq Gene][オレンジ→Disease Gene][レッド→CNV loss] [ブルー→CNV gain]
- ・ 3 段目グラフ：リアルタイム PCR 結果、コピー数変化を検出していない母親の値を 1 として、患者および父親の値を表示する。
棒グラフ左：患者，中：父親，右：母親

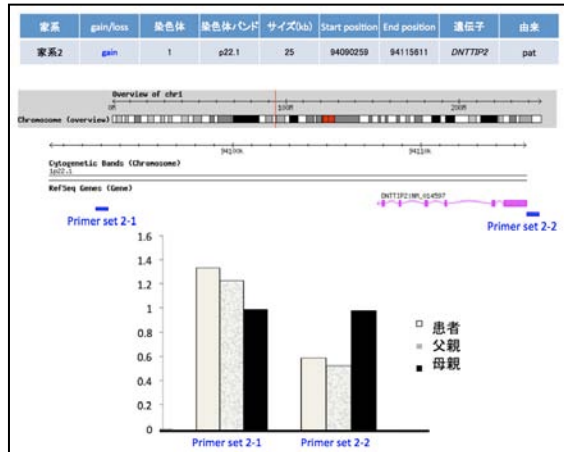
図 1. 家系 1 2q33.3 におけるアレイ解析とリアルタイム PCR による検証結果



アレイ解析により家系 1 の 2q33.3 において 16kb のコピー数減少を検出したためにリア

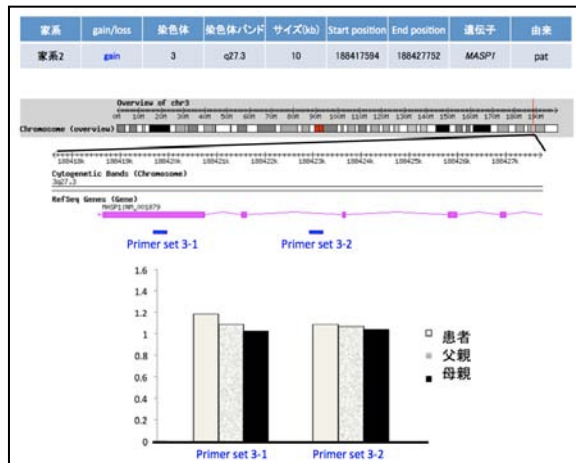
ルタイム PCR (Primer set 1-1, 1-2) 解析を行ったが、設定した 2 箇所のうち片方のみでしか患者で明らかなコピー数低下の結果は得ることができず、アレイ解析の結果は擬陽性と判断した。

図 2. 家系 2 1p22.1 におけるアレイ解析とリアルタイム PCR による検証結果



アレイ解析により家系 2 の 1p22.1 上の 25kb のコピー数 gain を検出したためにリアルタイム PCR (Primer set 2-1, 2-2) 解析を行ったが、設定した 2 箇所のうち片方は増加、もう一方は減少であり、両方の結果で矛盾を生じたために、アレイ解析の結果は擬陽性と判断した。

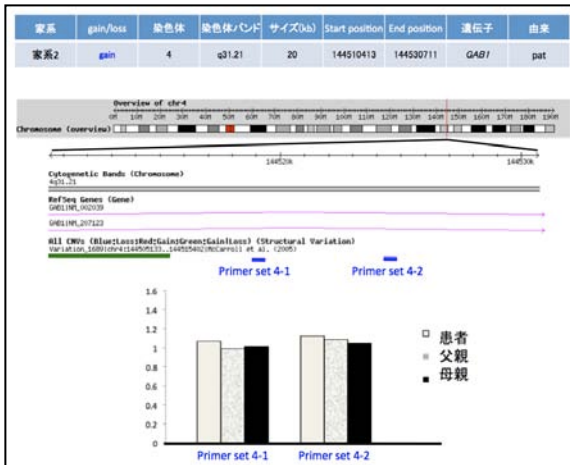
図 3. 家系 2 3q27.3 におけるアレイ解析とリアルタイム PCR による検証結果



アレイ解析により家系 2 の 3q27.3 において 10kb のコピー数増加を検出したためにリアルタイム PCR (Primer set 3-1, 3-2) 解析を行ったが、設定した 2 箇所のうち両方で患者・父親・母親間で明らかなコピー数の差異がな

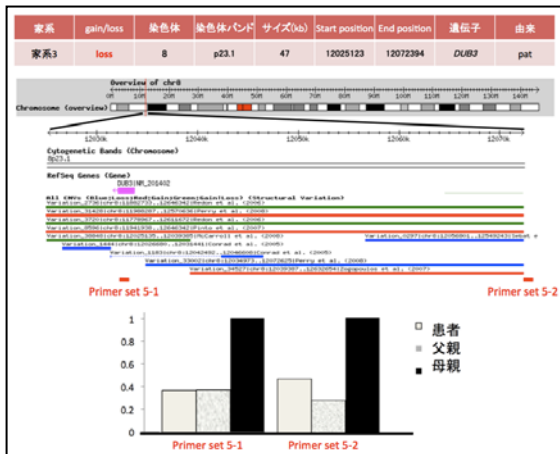
く、アレイ解析の結果は擬陽性と判断した。

図 4. 家系 2 4q31.21 におけるアレイ解析とリアルタイム PCR による検証結果



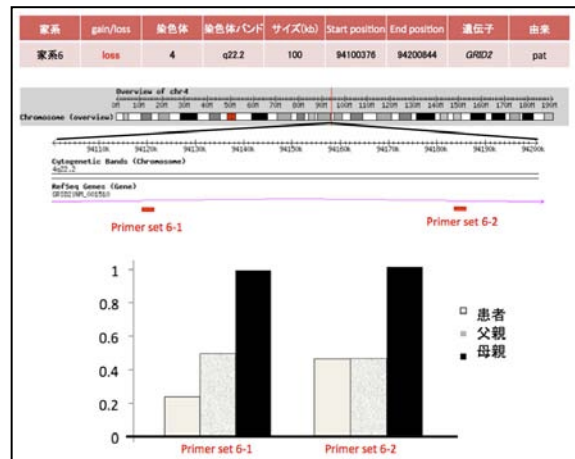
アレイ解析により家系 2 の 4q31.21 において 20kb のコピー数増加を検出したためにリアルタイム PCR (Primer set 4-1, 4-2) 解析を行ったが、設定した 2 箇所のうち両方で患者・父親・母親間で明らかなコピー数の差異がなく、アレイ解析の結果は擬陽性と判断した。

図 5. 家系 3 8p23.1 におけるアレイ解析とリアルタイム PCR による検証結果



アレイ解析により家系 3 の 8p23.1 上の 47kb のコピー数減少を検出したためにリアルタイム PCR (Primer set 5-1, 5-2) 解析を行った。患者と父親で設定した 2 箇所のうち両方に共通してコピー数 loss の結果が得られ、アレイの結果と同一のものであるために真のコピー数減少と判断した。

図 6. 家系 6 4q22.2 におけるアレイ解析とリアルタイム PCR による検証結果



アレイ解析により家系 6 の 4q22.2 上の 100kb のコピー数 loss を検出したためにリアルタイム PCR (Primer set 6-1, 6-2) 解析を行った。患者と父親で設定した 2 箇所のうち両方に共通してコピー数減少の結果が得られ、アレイの結果と同一のものであるために真のコピー数減少と判断した。

アレイ解析およびリアルタイム PCR 解析の結果より家系 3 で検出した 8p23.1 上における 47kb のコピー数減少だがこの領域は複数の論文でコピー数が増加または減少する領域と報告があり、今回の患者と父親で検出したコピー数異常は児の発生に関係がないと我々は判断した。

もう一つの家系 6 で検出した 4q22.2 上の 100kb のコピー数 loss だがその領域に含まれている *GRID2* 遺伝子は、興奮性神経伝達物質受容体のイオンチャンネル型のグルタミン酸受容体 family の一つであり、小脳プルキンエ細胞の樹状突起で局所的に発現がみられるものである。*GRID2* 遺伝子の null allele のノックアウトマウスでは小脳長期抑圧のための機能障害や重篤な運動失調が起きるものの、発生の段階には関与しておらず今回の研究の目的である、難治性原因不明習慣流産の原因遺伝子とは関係ないと結論づけた。

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 3 件)

① Kuniba H, Pooh RK, Sasaki K, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Egashira M, Moriuchi H, Yoshiura K, Niikawa N. Prenatal diagnosis of Costello syndrome using 3D ultrasonography amniocentesis confirmation of the rare HRAS mutation G12D. American Journal of Medical Genetics Part A. 査読有, Vol. 149(A), 2009, 785-787.

② Sasaki K, Okamoto N, Kosaki K, Yorifuji T, Shimokawa O, Mishima H, Yoshiura K, Harada N. Maternal uniparental isodisomy and heterodisomy on chromosome 6 encompassing a CUL7 gene mutation causing 3M syndrome. Clinical genetics 査読有, Vol. 20, 2010, 1399-1404.

③ Horikoshi T, Kikuchi A, Tamaru S, Ono K, Kita M, Takagi K, Miyashita S, Kawame H, Shimokawa O, Harada N. Prenatal findings in a fetus with contiguous gene syndrome caused by deletion of Xp22.3 that includes locus for X-linked recessive type of chondrodysplasia punctata (CDPX1). 査読有, Vol. 36(3), 2010, 671-675.

[学会発表] (計 3 件)

① 「 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法による胎児異数性染色体異常のスクリーニング検査の検討」、第 9 回 東北出生前医学研究会, 平成 22 年 1 月 30 日(土), 仙台市江陽グランドホテル

② 「9q13-q21 領域の重複バリエントの報告」「染色体片親ダイソミーより発症した常染色体劣性遺伝性疾患の 2 例」、第 11 回 北海道出生前診断研究会, 平成 22 年 12 月 4 日(土), 札幌医科大学 記念ホール

③ 「9q13-q21 領域の重複バリエントの報告」「染色体片親ダイソミーより発症した常染色体劣性遺伝性疾患の 2 例」、第 8 回 中国四国出生前医学研究会, 平成 23 年 1 月 29 日(土), 愛媛県民文化会館 3 階

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

霜川 修 (SHIMOKAWA OSAMU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号 : 50513321

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉浦孝一郎 (YOSHIURA KOICHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 00304931