

機関番号：17301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791566

研究課題名 (和文) ディフェンシン遺伝子群ゲノム構造多型に注目した
子宮頸癌感受性個体差の解明研究課題名 (英文) Individual cervical cancer susceptibility and genomic structural
variations of the defensin genes

研究代表者

三嶋 博之 (MISHIMA HIROYUKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・COE 研究員

研究者番号：10513319

研究成果の概要 (和文)：

ディフェンシン遺伝子群ゲノム構造多型が子宮頸癌感受性個体差に関与するとの仮説に基づき、子宮頸癌患者 (HPV 持続感染群) 200 人および妊娠女性 (コントロール群) 200 人を対象とし、患者群とコントロール群におけるゲノム DNA 上のディフェンシン遺伝子群のコピー数分布を比較した。その結果、ディフェンシン遺伝子群の一部において患者群でコピー数が小さくなる傾向が認められた。

研究成果の概要 (英文)：

We hypothesized that the genomic structural variation of the defensin genes affects the individual variation of the cervical cancer susceptibility. Two groups, 200 patients with cervical cancer with persistent HPV infection and 200 control pregnant women, were compared in the distribution of genomic copy-number of the defensin genes. The results showed that the case samples have a tendency to be smaller in the copy-number of several defensin genes.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：人類遺伝学

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：婦人科腫瘍学，ヒトパピローマウイルス

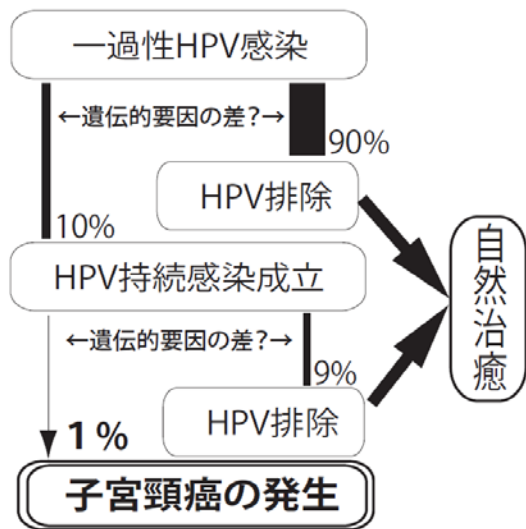
1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌によって、全世界では年間約24万人が死亡するとされている。わが国においては、子宮頸癌患者が27,000人(2002年厚生労働省患者情報)、年間死亡者数が2,378人(2003年厚生労働省人口動態統計)と報告されている。また、わが国においては25～45歳の労働年齢における子宮頸癌の発症件数が増加傾向にあり、社会的損失を大き

くしている。

子宮頸癌の99.7%からHPVが確認されること(Walboomers et al., 1999)から、HPVは子宮頸癌発症必要因子であると考えられている。しかし、HPVにいったん感染しても、感染者の90%以上では感染が持続せず、HPVが2年以内に消失することが報告されており(Moscicki et al., 2006)、HPV感染だけでは子宮癌の発症に十分とはいえない。感染者の10%弱においてHPVが消失せず、子宮頸癌発

症に至るのには、HPV 感染以外の環境要因と宿主の遺伝的要因のどちらか、あるいは両方

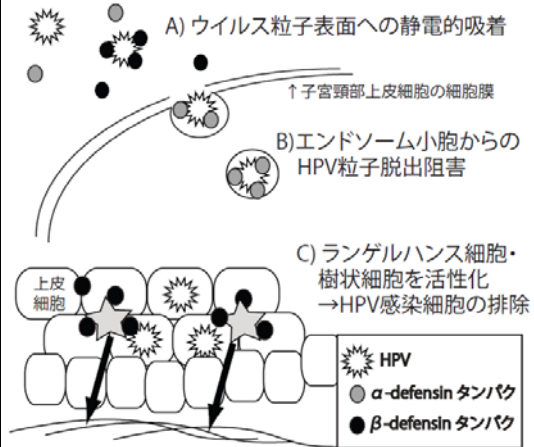


の存在が考えられる。これまで報告された環境・遺伝的要因としては喫煙、妊娠/出産、経口避妊薬、クラミジア感染、HLA 型との比較的弱い相関が報告されているのみである。

ディフェンシンタンパクは、自然免疫による感染防御タンパクのひとつであり、その構造により α および β ディフェンシンに大別される。 α ディフェンシンタンパクは、広く体表に発現しており、婦人科領域では、卵巣、子宮、子宮頸部、膣粘膜、皮膚で発現している。 α および β ディフェンシンタンパクの抗ウイルス能として、すでにHIV に対するものが報告されているが (Quinones-Mateu et al., 2003; Wang et al., 2004; Sun et al., 2005), 近年さらに抗HPV能についても報告されている (Buck et al., 2006)。この報告によると、 α ディフェンシンタンパクによるHPV 感染抑制機序は、その静電的性質によるウイルス粒子表面への吸着だけではなく、エンドサイトーシスの過程における小胞から細胞質へのHPV 粒子の脱出の抑制にあるとされる。また、 β ディフェンシンタンパクはHPV 陽性培養細胞において、樹状細胞増殖の上皮深層への遊走を誘導することが報告されている (Hubert et al., 2007)。この作用は、他のタンパクの樹状細胞遊走能より強く、 α ディフェンシンタンパクが、初期感染防御に加え、HPV 感染細胞の排除に重要である細胞性免疫の賦活の双方に重要な役割を果たしていることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、「ディフェンシン遺伝子群のコピー数が多いほど、ディフェンシンタンパク産生能が向上し、その結果、HPV 初期感染防御能と HPV 感染細胞排除能が高まり、子宮頸癌発症阻害をもたらす」との仮説に基づき、検体における末梢血由来ゲノム DNA 上



のディフェンシン遺伝子群のコピー数、子宮頸癌進展度および HPV 遺伝子型との相関を明らかにすることを目的とした。本研究は、これまで不明であった HPV による子宮頸癌発症感受性の個体差が生じるメカニズム (遺伝学的要因) を、分子遺伝学的・ゲノム構造学的に明らかにすることを試みた。本研究の成果は、定量的な個々人の子宮頸癌リスク診断可能にし、これに基づいた子宮頸癌の予防—テラーメイド予防医学への道を開くものである。

3. 研究の方法

(1) 研究対象集団

2006年8月から2010年3月の間に、長崎大学病院とその協力病院 (長崎市民病院、長崎済生会病院、日本赤十字長崎原爆病院、佐世保市立総合病院) を受診した子宮頸癌患者 (HPV 持続感染群) 200例および妊娠女性 200例 (コントロール群) を対象とした。HPV 持続感染は子宮頸癌の主要要因であり、子宮頸癌患者 200例を HPV 持続感染群とした。また、HPV 感染の機会が一定の集団と考え、妊娠女性 200例をコントロール群として設定した。

(2) 試料 DNA の調製

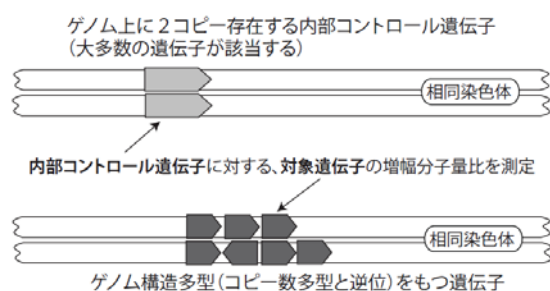
対象者の末梢血よりを採取し、DNA Purification Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA は NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 5ng/ μ l に濃度調節を行い、実験に用いた。

| シンボル | 遺伝子名 | 座位 | コピー数 | 婦人科領域でのタンパク発現部位 |
|---------|-----------------------|--------------|------|-----------------|
| DEFA1 | α -defensin 1 | 8p23.1 | 2-14 | 腔粘膜 |
| DEFA3 | α -defensin 3 | 8p23.1 | 2-14 | 腔粘膜 |
| DEFA5 | α -defensin 5 | 8p23.1 | 2 | 腔粘膜 |
| DEFB1 | β -defensin 1 | 8p23.2-p23.1 | 2 | 子宮頸内膜/腔部・子宮・腔粘膜 |
| DEFB103 | β -defensin 103 | 8p23.1-p22 | 2-8 | 胎盤・泌尿器上皮・皮膚 |
| DEFB4 | β -defensin 2 | 8p23.1-p22 | 2-8 | 皮膚 |
| DEFB104 | β -defensin 104 | 8p23 | 未報告 | 子宮 |
| DEFB109 | β -defensin 109 | 8p23-p22 | 未報告 | 卵巣 |

(3) TaqMan 定量 PCR

表に示すとおり、 α および β ディフェンシンタンパクの一部は、婦人科領域において発現していることがすでに報告されている (Shaw JL et al., 2007; Ghosh et al., 2007; Quayle et al., 1998; Valore et al., 1998)。さらに、これらをコードする遺伝子群に目を向けると、健常者でコピー数多型が認められる遺伝子があることも報告されている。本研究においては、より正確なコピー数測定を行うため、定量 PCR 法のひとつである、TaqMan リアルタイム PCR 法を選択した。

図に示すとおり、アルブミン (*ALB*) 遺伝



子をコピー数2である内部コントロールとみなし、そして、内部コントロールと対象遺伝子 (各ディフェンシン遺伝子) との間で、PCR 増幅分子量の比を検出し、対象遺伝子のコピー数を算出する。本方法は、コントロールと対象を、ひとつの試験管内で同時に検出することができるため、試験管間の PCR 反応誤差を排除でき、より高精度な測定が可能であるのが特徴である。この特徴は、DEFA1/A3 遺伝子や DEFB103/B4 遺伝子など、コピー数が大きく、検出できる比の差が微妙になることが予想される遺伝子においては、特に重要である。また、TaqMan 法により正確な結果を得るためには、使用する TaqMan プローブ/プライマーの DNA 配列の最適化が必要である。コンピュータソフトウェアによる設計が可能ではあるものの、実際には、若干のプライマー設計の試行錯誤が必要であった。

ALB 遺伝子および対象遺伝子に対して、TaqMan 定量 PCR のためのプライマー/プローブを設計した。*ALB* 遺伝子に関する設計は

以下のとおりである。

フォワードプライマー:

TGGAAAATGATGAGATGCCTG

リバースプライマー:

CATAGTTTTTGCAAACATCC

TaqMan プローブ:

CTTTCACAAAATCAGCAGCTAATGAAG
GC

TaqMan 定量 PCR 混合液の調製(100 μ l):

| | |
|--------------------------|--------------|
| フォワードプライマー (100 μ M) | 2.5 μ l |
| リバースプライマー (100 μ M) | 2.5 μ l |
| TaqMan プローブ (10 μ M) | 12.5 μ l |
| RNase-free Water | 82.5 μ l |

作成した Primer Mix は、小分けにして-20 $^{\circ}$ C に保存し、実験系に使用する度に解凍し使い切りとした。

Groth et al. (2010)の報告に基づき、*ALB* 遺伝子とディフェンシン遺伝子群とのコピー数比が既知であるサンプルが公共リポジトリから入手可能になった。このサンプルをもとに検量線を作成し、対象遺伝子コピー数の絶対定量を行った。

定量 PCR 反応には Light Cycler 450(Roche)を用いた。反応試薬には、Multiplex PCR kit(QIAGEN 社)を用いた。

TaqMan 定量 PCR 反応液の調製 (10 μ l):

| | |
|---------------------------------|-------------|
| 鋳型ヒトゲノム DNA (5ng/ μ l) | 2.0 μ l |
| Quanti-Tect Multiplex PCR NoROX | 5.0 μ l |
| TaqMan 定量 PCR 混合液 | 0.1 μ l |
| RNase-free Water | 2.8 μ l |

各検体はそれぞれ3ウェルずつ使用し、各wellのコピー数の中央値から *ALB* と対象遺伝子のコピー数の比を算出した。

TaqMan 定量 PCR 反応条件:

| | |
|-----------------|--|
| 95 $^{\circ}$ C | 10 分間 |
| x1 | (initial Taq polymerase activation step) |
| 95 $^{\circ}$ C | 15 秒間, |
| 60 $^{\circ}$ C | 1 分間, |
| x40 | サイクル (定量 step) |

standard として、対象遺伝子コピー数が2

コピーから5コピーであるヒトゲノムDNAを10 ng/μl, 5 ng/μl, 2.5 ng/μl, 1.25ng/μlにそれぞれ濃度調節し検量線を作成した。

なお、マイクロタイタープレートへの分注には、自動分注装置であるQIAgility (QIAGEN)を用いて、ウェル間の条件を極力均一化した。

4. 研究成果

患者群 (HPV 持続感染群) とコントロール群におけるディフェンシン遺伝子群のコピー数分布を比較したところ、その一部において患者群でコピー数が小さくなる傾向が認められた。

ディフェンシン遺伝子のいくつかについてはそのコピー数多型と発現量の関係について、正の相関を示すことが明らかになっている。また、正常子宮頸部組織および、low-grade squamous intraepithelial lesions (LSILs) に対して、high-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs), Squamous cell carcinoma (SCC) でのディフェンシンタンパクと mRNA の発現量が低下していることが報告されている。

本研究結果は、HPV 持続感染群 (子宮頸癌発症群) ではコントロール群と比較して一部のディフェンシン遺伝子でコピー数が低い可能性が示唆された。本結果は、HPV 感染防御に働くディフェンシン遺伝子群のコピー数が小さく、コードするタンパクの発現量が低下し、宿主の HPV 感染防御機能が低下するとの仮説を支持する。

今回見つかったディフェンシン遺伝子群のコピー数多型という新たな宿主側要因を加えることは、HPV 持続感染のリスクを推定への道をひらくものである。また、以前からある共因子と今回発見したコピー数因子、さらに今後見つかるであろう他の指標を加味することで、HPV 持続感染に始まる子宮頸癌の癌化メカニズムの解明がさらに進展する可能性がある。近年本邦でも HPV 予防ワクチンが認可されているが、未だ費用の面から若年女性の全例接種には至っていない。子宮頸癌の癌化メカニズムに関連する遺伝的要因を確定することができれば、将来ワクチンの優先接種対象者を絞り込み、若年層の子宮頸癌発生の減少へ貢献することが期待できる。

以上の研究成果は、現在論文投稿中である。

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0件)

[学会発表] (計5件)

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学学会大会合同大会、平成22年12月9日、神戸市: Key-value store を用いた大規模ゲノムデータ処理の高速化. 三嶋博之, 吉浦 孝一郎

第55回日本人類遺伝学会 2010年10月27日(水)～30日(土), 大宮ソニックシティ, 大宮 OP15-075: 唇裂口蓋裂の Genome-wide association study. 引田正宣, 津田雅由, 佐々木健作, 三嶋博之, 吉田和加, 夏目長門, 内山健志, 平野明喜, 木下晃, 吉浦孝一郎

The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010/12/3-5, Wakayama Prefectural Cultural Hall (和歌山県民文化会館)

P02-05: A mutation of the immunoproteasome subunit gene causes a novel autoinflammatory disorder Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever). Kanazawa Nobuo, Takehiko Sugihara, Hiroyuki Mishima, Fukumi Furukawa, Hiroaki Ida, and Koh-ichiro Yoshiura.

C01-02: A mutation of the immunoproteasome subunit gene causes a novel autoinflammatory disorder Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever). Kanazawa Nobuo, Kazuhiro Arima, Hiroyuki Mishima, Fukumi Furukawa, Hiroaki Ida, and Koh-ichiro Yoshiura.

[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

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

① 三嶋 博之 (MISHIMA HIROYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科
COE 研究員
研究者番号: 10513319

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

① 三浦 清徳 (MIURA KIYONORI)
長崎大学病院・講師

研究者番号：00363490

②阿部 修平

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50549590