

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591903

研究課題名（和文） 子宮内膜症の発生に関するサイトカインおよびそのレセプター遺伝子の遺伝子多型解析

研究課題名（英文） Genetic polymorphisms of cytokines and their receptors with Susceptibility to endometriosis

研究代表者

北脇 城 (KITAWAKI JO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00204925

研究成果の概要：

子宮内膜症は、多遺伝子性の素因のもとに環境因子が加わって発生する慢性炎症性疾患である。natural killer (NK) 細胞の機能低下が本疾患の病態と関連する。killer immunoglobulin-like receptor (KIR) は NK 細胞表面に発現し、標的細胞の HLA クラス I 分子を認識する。KIR と対応する HLA リガンドとの組み合わせで分析すると、活性化遺伝子型群の頻度が対照と比較して内膜症群で有意に少なく、かつ抑制性遺伝子型群の頻度が内膜症群で有意に多かった。KIR の遺伝子多型が子宮内膜症の疾患感受性に関連している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：子宮内膜症、遺伝子多型、サイトカイン、HLA、Killer immunoglobulin-like receptor

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症の有病率は性成熟期女性の約 10%、有病者数は国内で 130 万人、受療者数は 12.8 万人と推定され、少子少産化に伴って増加傾向にある疾患である。病因は未だ不明であるが、遺伝的要因も一部ではあるがその発生に関与していることが次第に明らかにされている。高血圧症、2 型糖尿病などのいわゆる common disease において、その関連候補遺伝子上の遺伝子多型と疾患感受性すなわち「病気のかかりやすさ」とが密接に関連することが次第に明らかにされつつあ

り、様々な疾患において遺伝子多型の解析が近年急速に進んできている。一部の疾患では確定診断、予防およびオーダーメイド治療への展開が計られている。

子宮内膜症の遺伝的素因の関与については、家族発生や双子研究により第一親等における発生が 5～8% であることが知られている。他の common disease と同様に多因子疾患であり、遺伝的素因をもつ個体に後天的な環境要因が加わって疾患が発生すると考えられている。

疾患感受性遺伝子の検索は 1990 年代後半

より始められた。そのひとつの手法はゲノム全体の中から偏位のある部分を見出そうとするゲノムワイドスクリーニングであり、現在イギリスとオーストラリアの大規模な共同プロジェクトが行われており、ごく最近、姉妹発生の全ゲノムの解析から、いくつかの候補となる染色体の部位が提示されている。

もうひとつの手法は、遺伝子多型の解析による疾患感受性遺伝子の検索であり、この数年間に世界中で急速に発表論文数が増加している。現在、原因不明の子宮内膜症の基礎的研究で、最も活発に行われている競争の激しい分野のひとつである。この研究方法では、患者一対照研究による統計的な解析を用いて子宮内膜症の発生リスクに関与する遺伝子を見出すことを行っている。この手法により現在までに 10 数個の候補遺伝子が報告されている。

しかし、本疾患において検討された遺伝子多型は未だ数少ない。研究が困難な理由として、この検討には患者一対照研究による統計的な解析が必要であるが、患者群あるいは対照群の診断には腹腔鏡などによる腹腔内所見が必須であるために、症例数が集まりにくいことが挙げられる。

このような背景下、我々はいち早くこの研究テーマに着手し、学内倫理委員会の承認を得て患者の末梢血 DNA の採取を 8 年前から開始し、既に 700 名以上のデータベースを得ている。対象者は必ず腹腔内所見を確認した患者とし、子宮内膜症の他、子宮腺筋症、子宮筋腫なども詳細に診断している。そして、子宮頸部上皮内癌の患者で他の婦人科疾患がない者だけを「正常群」とした。このような詳細な分類は世界に類をみない。

ステロイド・レセプターおよび代謝酵素についても調べられており、エストロゲン関連遺伝子として、エストロゲン・レセプター $\alpha$ 、CYP19 の関与を我々がいち早く報告している。その他、アンドロゲン・レセプター、プロゲステロン・レセプターの関与も示唆されている。最近、PPAR- $\gamma$  の関与も報告した。

さらに我々は、免疫関連遺伝子として、IL-10、HLA-Class I (-A, B, -Cw) および Class II (-DR, -DQB) 遺伝子、TNF- $\alpha$ 、interferon- $\gamma$ 、IL-6 と ICAM-1 との相乗効果の各遺伝子多型が子宮内膜症と関連することを相次いで見だし、報告している。

このように、見つかっている候補遺伝子は多岐にわたっており、我々は、世界に先駆けて論文報告している。この領域での発表数は世界でも最多の 1 つであり、我々は先端的な研究チームの 1 つとして確固たる地位を築いてきた。

## 2. 研究の目的

子宮内膜症の発生・進展に関連することが示されているサイトカインおよびそのレセプター遺伝子の遺伝子多型を、800 名規模の患者一対照研究により集中的に解析することによって、子宮内膜症の発生・進展に関与する遺伝子群を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA 試料の追加収集

我々は、現在までに腹腔内所見をもとに疾患の有無、合併症、進行度等を詳細に記載した 700 名分の末梢血 DNA 検体を得てきた。本研究期間にはさらに 100 名以上の検体を追加採取した。

### (2) 遺伝子多型の解析

遺伝子多型は、主としてプロモーター領域に存在し他の疾患等でその意義が報告されているものを優先して解析した。遺伝子多型の解析は、我々がすでに他の遺伝子に用いて報告してきた方法によって行った。1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) の場合には、restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法 (Kitawaki J et al, Hum Reprod, 2001) を用いた。2~4 塩基繰り返し多型 (マイクロサテライト多型) および挿入/欠失多型の場合には、該当する領域を含む部位を蛍光標識 PCR により増幅し、本学中央研究施設に設置している ABI Prism DNA Sequencing System および Genescan によりその遺伝子産物の配列を既報の方法で解読した。

KIR 遺伝子型は、配列に特異的なプライマーを用いた PCR によって決定した。HLA-B、-C のタイピングは、PCR-microtiter plate hybridization 法により行った。

## 4. 研究成果

子宮内膜症では natural killer (NK) 細胞の機能低下と本疾患の病態とを関連づける多くの証拠が提示されている。HLA クラス I、クラス II 遺伝子は免疫応答機構に重要な役割を果し、自己免疫疾患の最も重要な遺伝因子である。NK 細胞は HLA クラス I 分子を認識し、その細胞障害活性が抑制される。一方、killer immunoglobulin-like receptor (KIR) は NK 細胞表面に発現し、標的細胞の HLA クラス I 分子を認識する。そこで、KIR の遺伝子多型および HLA タイピングと内膜症の疾患感受性との関連について検討した。

KIR3DS1 の頻度は、対照と比較して内膜症群で有意に少なかった (32% vs 44%,  $P=0.028$ ,  $OR=0.62$ , 95%  $CI=0.40-0.95$ )。

KIR と対応する HLA リガンドとの組み合わせで分析すると、抑制性遺伝子型である KIR3DL1<sup>+</sup>/3DS1<sup>-</sup>/HLABw4<sup>+</sup> は、内膜症群で有意に多かった (39% vs 29%,  $P=0.043$ ,  $OR=1.59$ ,

95% CI=1.01-2.48)。

さらに、KIR3DS1、KIR3DL1/HLABw4、および KIR2DL1/HLA-C グループ 2 の有無により 8 群に分類し、これを活性化、中立性、抑制性の 3 群の遺伝子型に大別したところ、活性化遺伝子型群の頻度が内膜症群で有意に少なく (31% vs 42%, P=0.038, OR=0.63, 95% CI=0.41-0.91)、かつ抑制性遺伝子型群の頻度が内膜症群で有意に多かった (42% vs 30%, P=0.024, OR=1.66, 95% CI=1.07-2.58)。

HLA のタイピングでは、B7 (OR=2.7, 95% CI=1.5-5.1, P=0.044), Cw\*0702 (OR=2.1, 95% CI=1.2-3.3, P=0.0398) が内膜症群で有意に高頻度であった。また、DRB1\*0101 と A24 はやや多かった。B7 は A24、Cw\*0702、DRB1\*0101 と強い連鎖不平衡が確認されており、A24、Cw\*0702、DRB1\*0101 の頻度増加は B7 の増加に伴う HLA-A24-B7-Cw\*0702-DRB1\*0101 ハプロタイプを反映した結果であった。

以上の結果より、抑制性 KIR/HLA-クラス I 遺伝子型、および HLA-B7 の頻度が子宮内膜症患者で有意に高いことが明らかとなった。これらが NK 活性を抑制することから、KIR および HLA の遺伝子多型が子宮内膜症の疾患感受性に関連している可能性が示唆された。

#### 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 29 件)

- ① 徐 冰, 北脇 城, 石原広章, 濱田新七, 楠木 泉, 伊藤良治, 中田好則, 本庄英雄. 子宮内膜症性嚢胞由来卵巣癌における PTEN 遺伝子の loss of heterozygosity (LOH), 癌関連遺伝子変異, およびタンパク発現. エンドメトリオーシス研究会会誌 29: 94-96, 2008、査読無
- ② Kitawaki J, Ishihara H, Kiyomizu M, Honjo H. Maintenance therapy involving a tapering dose of danazol or mid/low doses of oral contraceptive after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for endometriosis-associated pelvic pain. Fertil Steril 89: 1831-1835, 2008、査読有
- ③ Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2

diabetes or impaired glucose tolerance. Nutr Res 28: 137-143, 2008.

- ④ Kitawaki J, Xu B, Ishihara H, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Mizuno S, Ohta M, Obayashi O, Honjo H. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes with susceptibility to endometriosis. Am J Reprod Immunol 58: 481-486, 2007、査読有
- ⑤ Yamamoto H, Kitawaki J, Kikuchi N, Okubo T, Iwasa K, Kawata M, Honjo H. Effects of estrogens on cholinergic neurons in the rat basal nucleus. J Steroid Biochem Mol Biol 107:70-79, 2007、査読有
- ⑥ Xu B, Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, Kiyomizu M, Teramoto M, Kitaoka Y, Honjo H. Differential effects of progestogens, by type and regimen, on estrogen-metabolizing enzymes in human breast cancer cells. Maturitas 56: 142-152, 2007、査読有

[学会発表] (計 39 件)

- ① Kitawaki J. Management of endometriosis: Surgical treatment? Medical therapy? 110th Anniversary of the Affiliated Hospital of the Medical College of Qingdao University 2008. 10. 15、中国、青島市
- ② Kitawaki J, Xu B, Honjo H. Killer cell immunoglobulin-like receptor genotypes and human leukocyte antigen class I/II alleles in endometriosis susceptibility. 10th World Congress on Endometriosis. 2008. 3. 12、オーストラリア、メルボルン
- ③ Kusuki I, Kitawaki J, Kiyomizu M, Ishihara H, Itoh R, Nakata Y, Honjo H. Changes in the expression of steroid-associated and apoptosis-associated proteins during malignant transformation of ovarian endometriosis. The XXth Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology. 2007. 9. 24, Tokyo
- ④ Kiyomizu M, Kitawaki J, Ishihara H, Honjo H. IL-6 -634C/G and ICAM-1 469K/E polymorphisms on the susceptibility for endometriosis in Japanese women. The XXth Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology. 2007. 9. 22, Tokyo

[図書] (計 2件)

- ① Maruya E, Sasaki N, El-Awar N, Akaza T, Kitawaki J, Saji H, Terasaki PI. Chapter 7: Immunogenic HLA class I epitopes identified by humoral response to pregnancies. In: Terasaki PI, editor. Clinical Transplants 2008. Terasaki Foundation Laboratory, Los Angeles: pp 215-227, 2008.
- ② Akaza T, El-Awar N, Nguyen A, Kitawaki J, Terasaki PI. Chapter 7: HLA class I epitopes: C-locus. In: Terasaki PI, editor. Clinical Transplants 2006. Terasaki Foundation Laboratory, Los Angeles: pp 95-102, 2007.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北脇 城 (KITAWAKI JO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00204925

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者