

機関番号：14501  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591946  
 研究課題名(和文) TDT 解析を用いた日本人子宮内膜症発症関連遺伝子の解明  
 研究課題名(英文) Analysis of endometriosis related candidate genes using transmission disequilibrium test in a Japanese population  
 研究代表者 吉田 茂樹 (YOSHIDA SHIGEKI)  
 神戸大学・医学研究科・准教授  
 研究者番号：70294212

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまで、子宮内膜症との関連が疑われる多数の遺伝子(TNF-beta、E-cadherin、Transforming growth factor beta、CYP1B1、tumor necrosis factors-beta、Interleukin-10 の特にプロモーター領域)上における遺伝子多型と子宮内膜症発症との関連について、日本人検体を用いて患者対照研究(case control study)を行い、これら遺伝子における多数の遺伝子多型を子宮内膜症患者ならびに正常対照者群において解析してきた。これら遺伝子領域における遺伝子多型の出現頻度を対照群と比較した相関解析を行った。その結果、健常コントロール群と患者群の間にアレル頻度、遺伝子多型分布とも有意な差を認めなかった。子宮内膜症 rAFS IV 期[重症群]と健常者群との間でも同様に解析を行ったが、有意差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：

In this project, we investigated whether polymorphisms in several endometriosis candidate genes including TNF-beta, E-cadherin, Transforming growth factor beta, CYP1B1, tumor necrosis factors-beta, Interleukin-10, were associated with endometriosis in a Japanese population. Genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) were performed in endometriosis cases diagnosed by laparoscopy at a university hospitals and controls, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. We compared the genotype distributions and allele frequency of these polymorphisms between endometriosis patients and controls.

However, no significant differences in the frequency and genotype distributions of all of these polymorphisms were found between the endometriosis patients and controls. Moreover, stratification by disease stage also revealed that there were no significant differences between endometriosis cases and controls in all of these SNPs studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	100,000	30,000	130,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：婦人科学

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの子宮内膜症に関する研究から、本疾患の遺伝的素因の存在の可能性が報告され、子宮内膜症に関連する複数の遺伝子が相互に干渉して子宮内膜症が発症するという仮説が提唱されている。

申請者等は、1997年より、Oxford大学医学部産婦人科が、子宮内膜症関連遺伝子の解明のために企画した世界規模のプロジェクトであるOXAGENE Studyに参加し、同大学産婦人科学教室ならびに、英国における中心的な遺伝研究センターであるThe Wellcome Trust Centre for Human Geneticsとの共同研究により、主に英国を中心とした白人系サンプルを用いた子宮内膜症の遺伝疫学的研究に従事してきた。

具体的には、内膜症患者ならびに正常対照群を用いた相関解析(case control study)を行い、白人系においてN-acetyl transferase (NAT)-2遺伝子と子宮内膜症との間に有意な関連を見出すと同時に、本疾患発症に家族性のものと非家族性のものが存在する可能性を示す興味深い研究成果を上げている(Mol Hum Reprod, 2001, 7:1079-83)。

申請者等は、さらに、1100検体に及ぶ白人患者とその両親ならびに姉妹の検体を利用し、マイクロサテライトマーカーを用いた手法でnon parametric linkage analysisを行い、さらに同サンプルを用いたTransmission Disequilibrium Test (TDT)解析とその発展型であるExtended TDT解析ならびにPedigree TDT解析を行い、本遺伝子座と子宮内膜症の間に連鎖があることを証明し、NAT2遺伝子そのもの、あるいは本遺伝子近傍に、子宮内膜症関連遺伝子が高い可能性で存在することを示す興味深い成績

を得た。しかし、個々の遺伝子多型の発現頻度は人種間で大きく異なっており、「集団の構造化」の問題から、欧州圏で得られた成績を直ちに日本における子宮内膜症にあてはめることはできない。

## 2 研究の目的

日本における子宮内膜症症例ならびに健康者を対象とし、子宮内膜症との関連が予想される複数の遺伝子、TNF-beta、E-cadherin、Transforming growth factor beta1、CYP1B1、tumor necrosis factors-beta、Interleukin-10の特にプロモーター領域の遺伝子多型を解析し、その出現頻度を対照群と比較した相関解析を行う。次いで、関連を認めた遺伝子領域において、各々20-30のマイクロサテライトマーカーを設定し、患者ならびにその両親、兄弟の検体を用いたTransmission disequilibrium test (TDT)解析を行い、連鎖と連鎖不平衡を証明する。以上に示す遺伝疫学的手法を用いて子宮内膜症関連遺伝子の解明、同定を図る。

日本における子宮内膜症の発症機序を多数の家系サンプルを用いて遺伝疫学的手法により解明しようとした研究はこれまでに前例がなく、本研究の成果は子宮内膜症の発症機序に基づいた新しい治療薬の開発を可能とし、QOLの高い治療の確立する基盤を構築するための基礎データになるのみならず、子宮内膜症の疾患易罹患性リスク判定、疾患の予防、早期発見、早期治療などエビデンスにも基づいた個別化治療が可能となり、医療のオーダーメイド化が可能となる。

## 3. 研究の方法

### (1) 検体の収集

子宮内膜症群として、神戸大学医学部付属

病院・産科婦人科で、開腹術あるいは腹腔鏡を施行され子宮内膜症（RAFS分類—I・II・III・IV期）と診断された500例、また正常対照群としては、population controlとして同病院で正常分娩により出生した女兒臍帯血、ならびにunaffected controlとして同病院で手術を行い子宮内膜症がないことが確認された症例を対象とした。

(2) TNF-beta、E-cadherin、Transforming growth factor beta1、CYP1B1、Tumor necrosis factors-beta、Interleukin-10の特にプロモーター領域の遺伝子多型解析

子宮内膜症との関連が疑われる上記複数の遺伝子にみられる遺伝子多型を、各遺伝子領域に特異的なprimerを作成し、Polymerase Chain Reaction (PCR) を用いて分析する。具体的には、PCR産物を各種制限酵素(KpnI, DdeI, BamHI, TaqI, MboII, AvaII, etc)で切断し、断片長をアガロースゲル電気泳動で分析する(PCR-RFLP法)。

そのうちのPCR-RFLP法で分析できない一部の遺伝子多型についてはAllele特異的PCR法ならびにDNA sequence法を用いて分析した。子宮内膜症群と正常対照群における、各Single nucleotide polymorphism (SNP) がHardy Weinberg平衡 (HWD) 状態にあるかを検定した後、子宮内膜症群と正常対照群間における遺伝子多型の出現頻度の差を $\chi^2$ 検定により検定する。

#### 4. 研究成果

申請者はこれまで、子宮内膜症との関連が疑われる多数の遺伝子 (TNF-beta、E-cadherin、Transforming growth factor

beta1、CYP1B1、tumor necrosis factors-beta、Interleukin-10の特にプロモーター領域) 上における遺伝子多型と子宮内膜症発症との関連について、日本人検体を用いて患者対照研究 (case control study) を行い、これら遺伝子における多数の遺伝子多型を子宮内膜症患者ならびに正常対照者群において解析してきた。これら遺伝子領域における遺伝子多型の出現頻度を対照群と比較した相関解析を行った。その結果、健常コントロール群と患者群の間にアレル頻度、遺伝子多型分布とも有意な差を認めなかった。子宮内膜症rAFS IV期 [重症群] と健常者群との間でも同様に解析を行ったが、有意差を認めなかった。

#### 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 15 件)

- ① Morikawa J, Yoshida S, Kennedy S, Takemura N, Sugimoto M, Kitao K, Deguchi M, Ohara N, Maruo T, Association study between catechol-O-methyltransferase polymorphisms and uterine leiomyoma in a Japanese population, Clin Exp Obstet Gynecol, 査読有, Vol 35, 2008, 35-40
- ② Morikawa A, Ohara N, Xu Q, Nakabayashi K, DeManno DA, Chwalisz K, Yoshida S, Maruo T, Selective progesterone receptor modulator asoprisnil down-regulates collagen synthesis in cultured human uterine leiomyoma cells through up-regulating extracellular matrix metalloproteinase inducer, Hum Reprod, 査読有, Vol 23, 2008, 944-951
- ③ Yata A, Nakabayashi K, Wakahashi S,

- Maruo N, Ohara N, Maruo T, Suppression of progesterone production by stresscopin/urocortin 3 in cultured human granulosa-lutein cells. 査読有, Vol 24, 2009, 1748-1753
- ④ Kitao K, Makihara N, Morita H, Yamasaki M, Matsuoka S, Ohara N, Maruo T, The development of placenta increta following pelvic transcatheter artery embolization for postpartum hemorrhage, Clin Exp Obstet Gynecol, 査読有, Vol 36, 2009, 53-54
- ⑤ Ohara N, 査読有, Sex steroidal modulation of collagen metabolism in uterine leiomyomas, Clin Exp Obstet Gynecol, 査読有, Vol 36, 2009, 10-11
- ⑥ Ohara N, 査読有, A putative role of versican in uterine leiomyomas, Clin Exp Obstet Gynecol, 査読有, Vol 36, 2009, 74-75
- ⑦ Takei T, Matsuoka S, Ashitani N, Makihara N, Morizane M, Ohara N, Ruptured cornual pregnancy: case report, Clin Exp Obstet Gynecol, 査読有, Vol 36, 2009, 130-132
- ⑧ 丸尾 猛、小原範之、子宮筋腫をめぐる最近の話題、産婦人科治療、査読無、99巻、2009、1-9
- ⑨ Yoshida S, Ohara N, Xu Q, Chen W, Wang J, Nakabayashi K, Sasaki H, Morikawa A, Maruo T, Cell-type specific actions of progesterone receptor modulators in the regulation of uterine leiomyoma growth, Semin Reprod Med, 査読有, Vol 28, 2010, 260-273
- ⑩ Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi K, Sasaki H, Xu Q, Chen W, Yamada H, Translational research with progesterone receptor modulator motivated by the use of levonorgestrel-releasing intrauterine system, Contraception, 査読無, Vol 82, 2010, 435-441
- ⑪ Yamada H, Ohara N, Amano M, Current concepts on immunological etiologies in recurrent spontaneous abortion and intravenous immunoglobulin therapy, Recent advances in reproductive immunology, 査読無, Vol 1, 2010, 1-21
- ⑫ Yoshida S, Ohara N, Xu Q, Chen W, Wang J, Nakabayashi K, Sasaki H, Morikawa A, Maruo T, Cell-type specific actions of progesterone receptor modulators in the regulation of uterine leiomyoma growth, Semin Reprod Med, 査読有, Vol 28, 2010, 260-273
- ⑬ Translational research with progesterone receptor modulator motivated by the use of levonorgestrel-releasing intrauterine system, Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi K, Sasaki H, Xu Q, Chen W, Yamada H, Contraception, 査読無, Vol 82, 2010, 435-441
- ⑭ 吉田茂樹、子宮内膜症に対する第四世代プロゲステロンの薬理作用、産婦人科の進歩、査読無、62巻、2010、308-310
- ⑮ 吉田茂樹、婦人科腫瘍の化学療法、産婦人科の進歩、査読無、63巻、2010、134-138 [学会発表] (計 12 件)
- ① Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi K, Xu Q, Chen W, Yamada H, Translational research with progesterone receptor modulator motivated by the use of levonorgestrel-releasing

- Intrauterine System, International Symposium on Contraceptive Research and Development: Present and Future, October 20-21, 2009, New York, USA
- ② Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi N, Xu Q, Chen W, Plenary Session on Uterine Fibroids: Cell-type specific attack on uterine fibroids by progesterone receptor modulators, The 14th World Congress of Gynecological Endocrinology, March 4-7, 2010, Florence, Italy
- ③ Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi K, Xu Q, Chen W, Matsuo H, Yamada H, Progesterone and progesterone receptor modulators in uterine myoma cell growth : Its implication in women's health, The 20th World Congress on International Federation of Fertility and Sterility (IFFS), September 12-16, 2010, Munich, Germany
- ④ Yoshida S, Miyahara Y, Amano M, Hazama R, Deguchi M, Morita H, Yamada H, Matrix metalloproteinase-1 and -9 promoter polymorphisms and endometrial carcinoma risk in a Japanese population, 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS2010), October 23-26, 2010, Prague, Czech Republic
- ⑤ Miyahara Y, Yoshida S, Hazama R, Amano M, Deguchi M, Morita H, Ohara N, Yamada H, Never-sparing radical hysterectomy for uterine cervical cancer, 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS2010), October 23-26, 2010, Prague, Czech Republic
- ⑥ Hazama R, Miyahara Y, Makihara N, Nakabayashi K, Niiya K, Ebina Y, Yoshida S, Yamada H, A case of cervical cancer metastatic to the small intestine 4 months after initial surgery, 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS2010), October 23-26, 2010, Prague, Czech Republic
- ⑦ Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi K, Xu Q, Matsuo H, Yamada H, Attack on uterine leiomyomas by progesterone receptor modulators in a cell-type specific manner, The 3rd NIH International Congress on Advances in Uterine Leiomyoma Research, November 22-23, 2010, Bethesda, USA
- ⑧ 吉田茂樹、婦人科のがん—子宮頸癌の疫学、予防とHPV、第二十五回人間ドック認定医・専門医研修会、平成二十二年六月十二日、神戸・神戸ポートピアホール
- ⑨ 吉田茂樹、子宮頸がんの疫学・予防とワクチン、三木市医師会学術講演会（招待講演）、平成二十二年七月八日、三木市・総合福祉センター
- ⑩ 吉田茂樹、子宮頸癌：疫学・予防とワクチン、大阪位育会、平成二十二年九月二十五日、大阪・ホテルニューオータニ大阪
- ⑪ 吉田茂樹、子宮頸癌・子宮体癌の基礎とがん化学療法について、がん専門薬剤師研修における講義研修、平成二十二年十月八日、神戸・神戸大学病院
- ⑫ 吉田茂樹、婦人科腫瘍の化学療法、第一二三回近畿産科婦人科学会総会・学術集会、平成二十二年十一月七日、京都・国立京都国際会館

〔図書〕（計2件）

- ① Maruo T, Ohara N, Yoshida S, Nakabayashi K, Xu Q, Chen W, Matsuo H, Yamada H, LUKON-Verlagsgesellschaft mbH, Munich, Germany, Proceedings of the IFFS 20th World Congress on Fertility & Sterility 2010, 2010, 118.
- ② 吉田茂樹、山田秀人、永井書店 大阪、産婦人科救急のすべて 産婦人科救急に必要の基本手技—交換輸血、2010、872

〔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

吉田茂樹 (YOSHIDA SHIGEKI)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：70294212

### (2) 研究分担者

小原範之 (OHARA NORIYUKI)  
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員  
研究者番号：70214210

### (3) 連携研究者

該当なし