

ることが示唆され、さらにこの4つの遺伝子多型情報を用いた骨髄抑制予測システムにより、ゲムシタビン治療を行う前に骨髄抑制のリスクを回避できる可能性が考えられる。このようなゲノム情報に基づいた適切かつ安全な治療は今後ゲムシタビンに限らず、多くの薬剤についても応用されていくものと考えられる<sup>(6-8)</sup>。

## 文 献

- 1) Mackey JR, Yao SY, Smith KM, et al : Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J Natl Cancer Inst* 91 : 1876-1881, 1999
- 2) Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, et al : Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside co-transporter proteins (hCNT<sub>3</sub> and mCNT<sub>3</sub>) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system *cib*). *J Biol Chem* 276 : 2914-2927, 2001
- 3) Mackey JR, Mani RS, Selner M, et al : Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 58 : 4349-4357, 1998
- 4) Plunkett W, Huang P, Gandhi V : Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs* 6 (Suppl 6) : 7-13, 1995
- 5) Kiyotani K, Mushiroda T, Tsunoda T, et al : A genome-wide association study identifies locus at 10q22 associated with clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients in Japanese. *Hum Mol Genet* 21 : 1665-1672, 2010
- 6) Okazaki T, Javle M, Tanaka M, et al : Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin Cancer Res* 16 : 320-329, 2010
- 7) Yonemori K, Ueno H, Okusaka T, et al : Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patient treated with gemcitabine plus cisplatin. *Clin Cancer Res* 11 : 2620-2624, 2005
- 8) Soo RA, Wang LZ, Ng SS, et al : Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 63 : 121-127, 2009

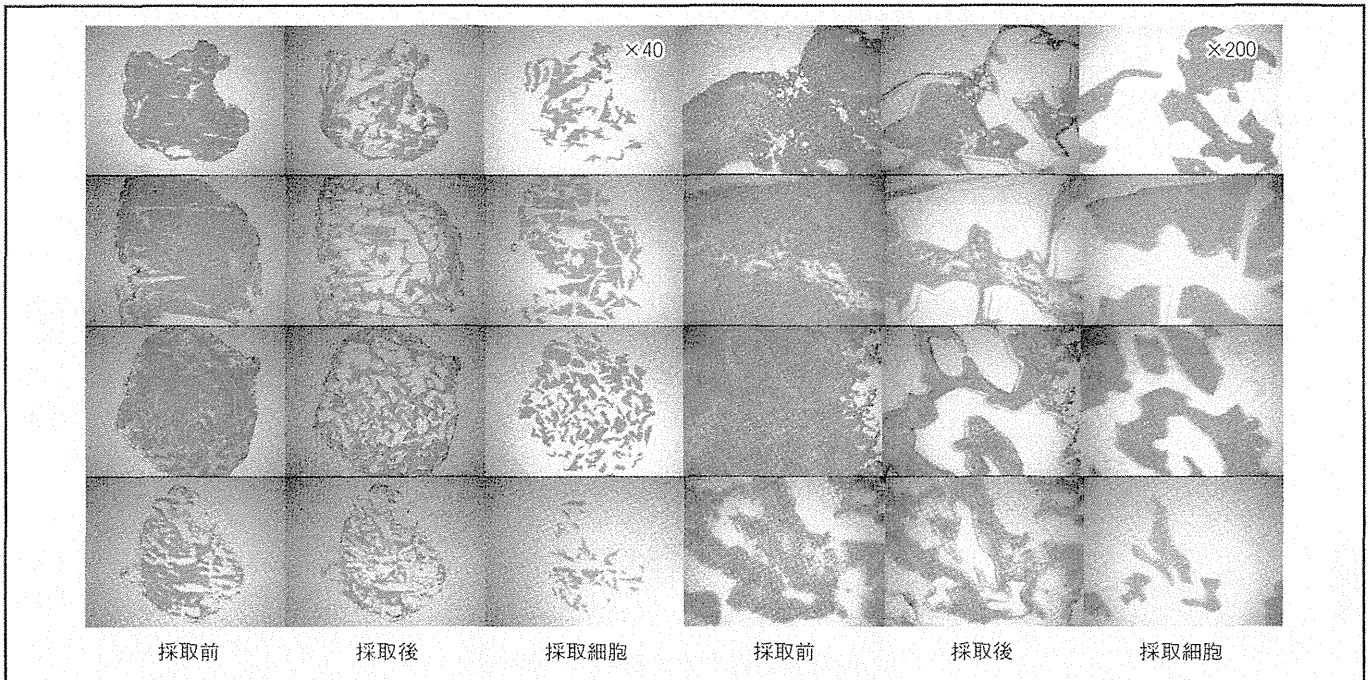


写真5 レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法による膀胱癌細胞の選択的採取 ➔ p83

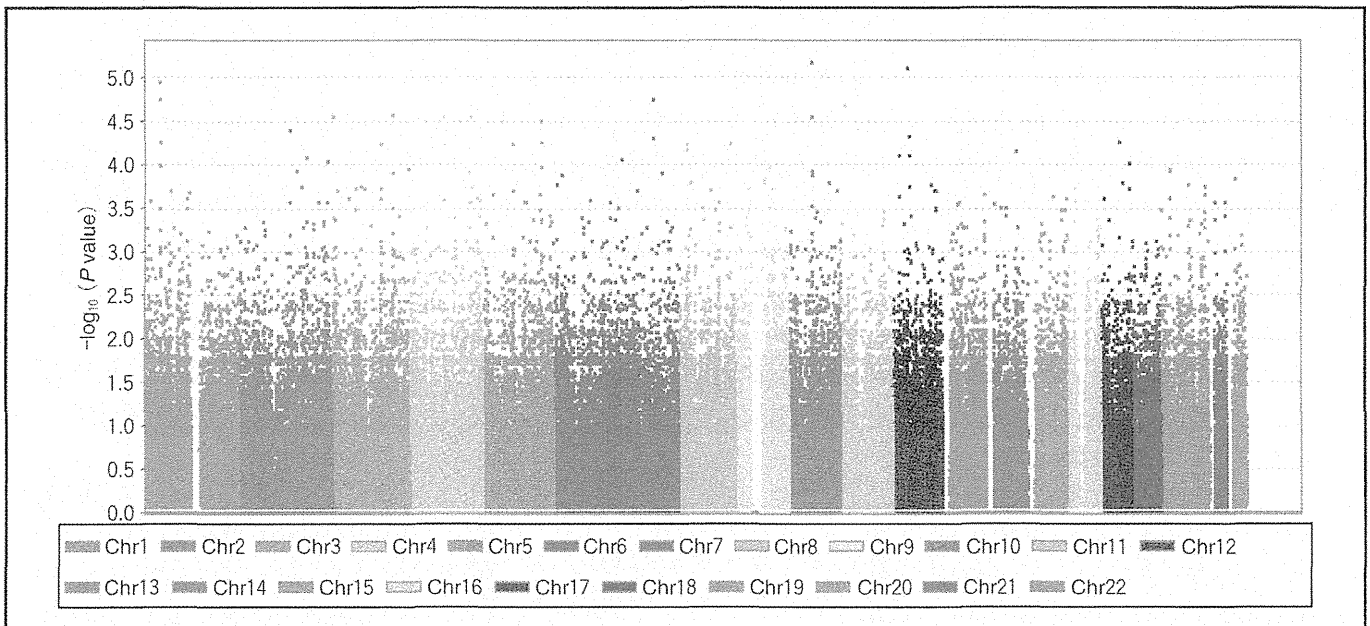


写真6 マンハッタンプロット

➔ p87

# (1) 抗腫瘍効果 —浸潤性膀胱癌に対する術前化学療法 感受性予測システムの構築

1. 岩手医科大学泌尿器科学講座  
2. 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター

加藤陽一郎<sup>1</sup>・高田 亮<sup>1</sup>・岩崎 一洋<sup>1</sup>  
Yoichiro Kato Ryo Takata Kazuhiro Iwasaki  
(講師) (講師)

小原 航<sup>1</sup>・藤岡 知昭<sup>1</sup>・前佛 均<sup>2</sup>・中村 祐輔<sup>2</sup>  
Wataru Obara Tomoaki Fujioka Hitoshi Zembutsu Yusuke Nakamura  
(講師) (教授) (センター長)

## はじめに

局所浸潤性膀胱癌に対する術前化学療法は局所の癌細胞数を死滅させ、腫瘍量を減少させるのみならず、画像上明らかでない微小転移を抑制することが報告されている<sup>1)</sup>。

しかし、化学療法が施行された患者のなかには著効を示す患者もいる一方で、何ひとつ効果を示さず重篤な副作用にのみ苦しむ患者もいる。そこで、治療前に感受性を予測することが可能であれば、個々の患者に適切な治療を提供することが可能となる。

岩手医科大学では 2005 年より東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターとの共同研究により、網羅的遺伝子発現解析に基づく化学療法の感受性を予測し、化学療法における奏効率を高めるべく、予測システムの開発・研究を行っている。ここでは、局所筋層浸潤性膀胱癌を対象とした薬剤反応性

の研究について概説する。

## 膀胱癌に対する術前 CaG 療法

局所浸潤性膀胱癌患者 (Stage2-3) 37 例を用いた。全例に対し術前化学療法としてゲムシタビン、カルボプラチン (CaG) 療法 2 コースを施行し、施行後の画像所見から腫瘍縮小率 60% をカットオフラインとして、感受性群・非感受性群の 2 群に分類した。この 2 群から CaG 療法に対して感受性を予測する遺伝子を同定するために、それぞれ 9 例ずつ計 18 例を学習症例として解析に用い、残りの 19 例は予測システムが正確に機能するかどうかを検証するためのテスト症例として用いた。

## レーザーマイクロビーム マイクロダイセクション

解析に用いた 37 例全例から化学療法開始前に膀胱鏡下で生検を施行した。

得られた癌組織から、間質や炎症性細胞といった癌細胞以外の組織による組織学的不均一性を回避することが可能となる。レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法を施行した。この操作によって、癌細胞の正確な遺伝子発現プロファイリングを得ることが可能となる (図 1)。LMM によって得られた癌細胞から total RNA を抽出し T7 増幅法 (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> 3IVT Express Kit 使用) を用いて mRNA を増幅させ、マイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays 使用) を全 37 例に行い、38,500 遺伝子における体系的遺伝子発現プロファイルを作成した。

次に、感受性群 9 例・非感受性群 9 例の学習症例を用いて、マイクロアレイから得られた遺伝子発現情報を用いて、2 群間で有意に異なる遺伝子を random permutation test を用いてスクリーニングした。このスクリーニング

Surgery Frontier 20(2) : 82-85, 2013

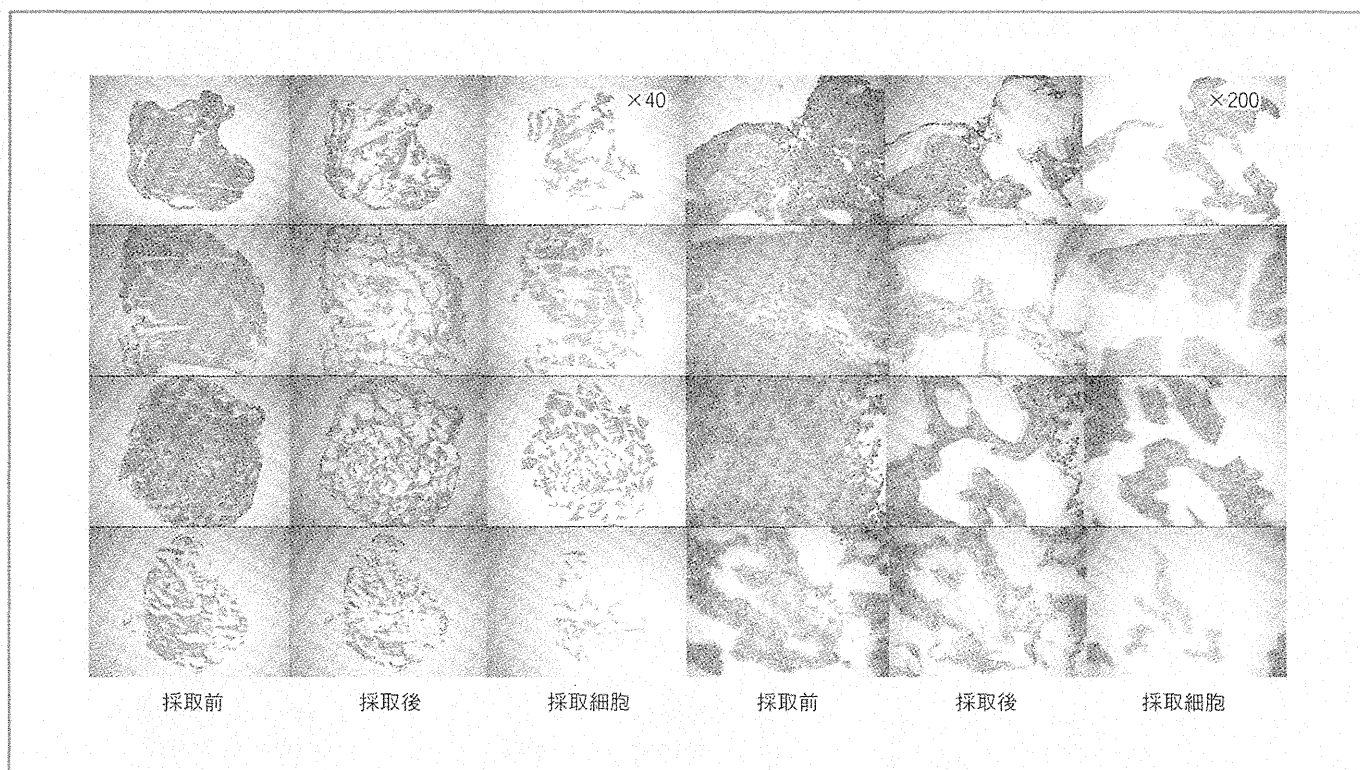


図1 レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法による膀胱癌細胞の選択的採取  
各症例に対して癌組織を生検しているが、ほぼ同じ大きさの生検組織でも癌細胞数が症例ごとで大きく異なっていることが認められる。  
(カラーグラビア p7 写真5参照)

表1 感受性予測 12 遺伝子

No.	Gene Symbol	Gene Title	group	p-value
1	IPO7	importin 7	(-)	3.96E-07
2	LOC613266	hypothetical LOC613266	(+)	8.38E-07
3	SPRY1	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)	(-)	5.34E-06
4	OSBPL11	oxysterol binding protein-like 11	(+)	1.81E-05
5	ZNF107	zinc finger protein 107	(+)	1.96E-05
6	AI025829	CDNA clone IMAGE : 5287121	(-)	2.45E-05
7	AF090916	Clone HQ0312	(+)	2.90E-05
8	LIN7C	lin-7 homolog C ( <i>C. elegans</i> )	(-)	3.18E-05
9	WDR90	WD repeat domain 90	(+)	3.19E-05
10	SLC22A18	solute carrier family 22, member 18	(-)	3.30E-05
11	PNPO	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	(-)	4.75E-05
12	CRKL	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	(+)	6.92E-05

group : (+) 感受性群で上昇している遺伝子, (-) 非感受性群で上昇している遺伝子。  
12 遺伝子のうち感受性群・非感受性群で発現量の高い遺伝子はそれぞれ6 遺伝子認められた。

結果から感受性予測遺伝子を抽出するために、leave-one-out cross validation testにより感受性予測遺伝子として12遺伝子を抽出した<sup>21,3)</sup>(表1)。

## CaG 感受性予測遺伝子

抽出された感受性予測遺伝子12遺伝子を用いて、19例のテスト症例の薬剤感受性を予測した。その結果、実際に非感受性と判定され薬剤感受性を示した1例を除いた18例は、薬剤感受性を正しく予測することができた。これにより本予測システムの精度は陽性反応的中率が100% (10/10例)、陰性反応的中率は88.9% (8/9例)であった(図2)。

## CaG 感受性・耐性メカニズムとオーダーメイド医療への応用

われわれは浸潤性膀胱癌症例における術前CaG療法感受性予測システムを、マイクロアレイの手法を用いて網羅的遺伝子解析により構築した。CaG療法感受性予測12遺伝子のなかのいくつかの遺伝子においては、すでに薬剤の耐性にかかわる報告のある遺伝子も認められた。たとえば、IPO7 (importin 7) がコードする蛋白はextracellular signal-regulated kinase (ERK) を核内に輸送することが知られており、ERKのシグナル伝達経路は肝臓癌、膵癌、胆嚢癌におけるゲムシタピンへの治療抵抗性に関係していることが報告されている。これより膀胱癌に対するゲムシタピンへの抵抗性

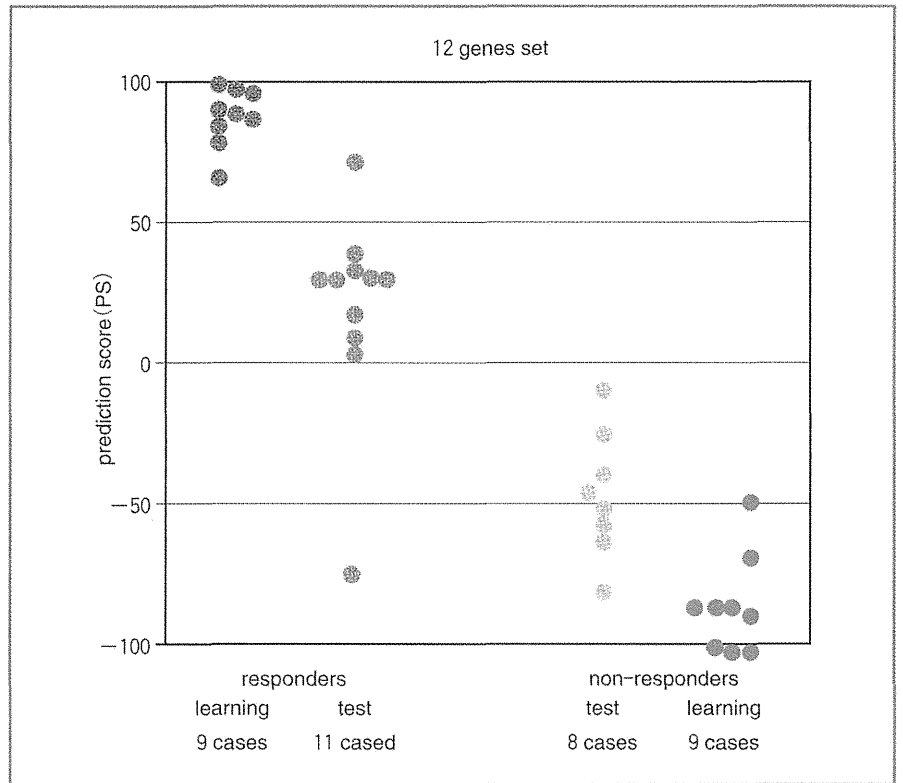


図2 学習症例・テスト症例におけるそれぞれの感受性予測スコア  
予測スコア (PS) が0以上の症例を感受性症例、未満を非感受性症例で示している。19例のテスト症例については感受性と予測された1例を除き、18例が正しく治療反応性に応じた予測スコアを示した。

が推測される<sup>4),5)</sup>。

しかしながら、そのほとんどの遺伝子はいまだその機能が解明されていない。今後、残りの遺伝子についてはCaG治療抵抗性との関連を調べる機能解析の研究が行われることが期待される。

癌細胞のみを抽出するLMMの技術を用いた網羅的遺伝子解析に基づき、構築された薬剤感受性予測システムによって、CaG薬剤感受性を比較的高い精度で予測することが可能であった(図2)。

今回のCaG感受性予測診断システ

ムが比較的高い予測精度を有した原因のひとつとして、LMMにより正確な膀胱癌遺伝子発現情報を用いた解析がなされた点が挙げられる。

またこの結果は、われわれが以前に構築したM-VAC感受性予測システムとほぼ同程度の精度であったことから<sup>2)</sup>、この手法によって精度の高い薬剤感受性予測システムが構築可能であることが示唆された。

現在、M-VACとCaGの予測システムを併用することにより、予測結果に応じてその患者にあった治療法の使い分けを可能とすることで、われわれ

の目指すオーダーメイド医療の実現を目標としている。

### 文 献

- 1) Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, et al : Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med* 349 : 859-866, 2003
- 2) Takata R, Katagiri T, Kanehira M, et al : Predicting response to methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for bladder cancers through genome-wide gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11 : 2625-2636, 2005
- 3) Kato Y, Zembutsu H, Takata R, et al : Predicting response of bladder cancers to gemcitabine and carboplatin neoadjuvant chemotherapy through genome-wide gene expression profiling. *Exp Ther Med* 2 : 47-56, 2011
- 4) Matsumoto K, Nagahara T, Okano J, Murawaki Y : The growth inhibition of hepatocellular and cholangiocellular carcinoma cells by gemcitabine and the roles of extracellular signal-regulated and checkpoint kinases. *Oncol Rep* 20 : 863-872, 2008
- 5) Yokoi K, Fidler IJ : Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine. *Clin Cancer Res* 10 : 2299-2306, 2004

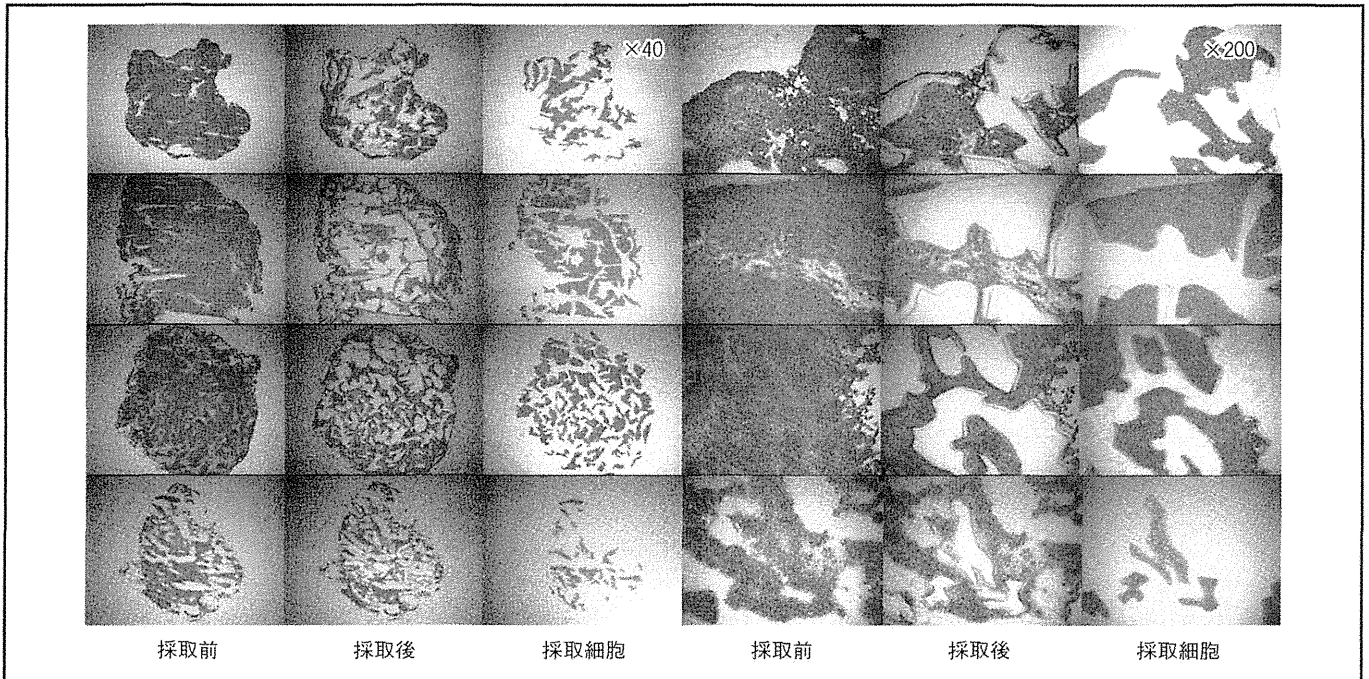


写真5 レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法による膀胱癌細胞の選択的採取

➡ p83

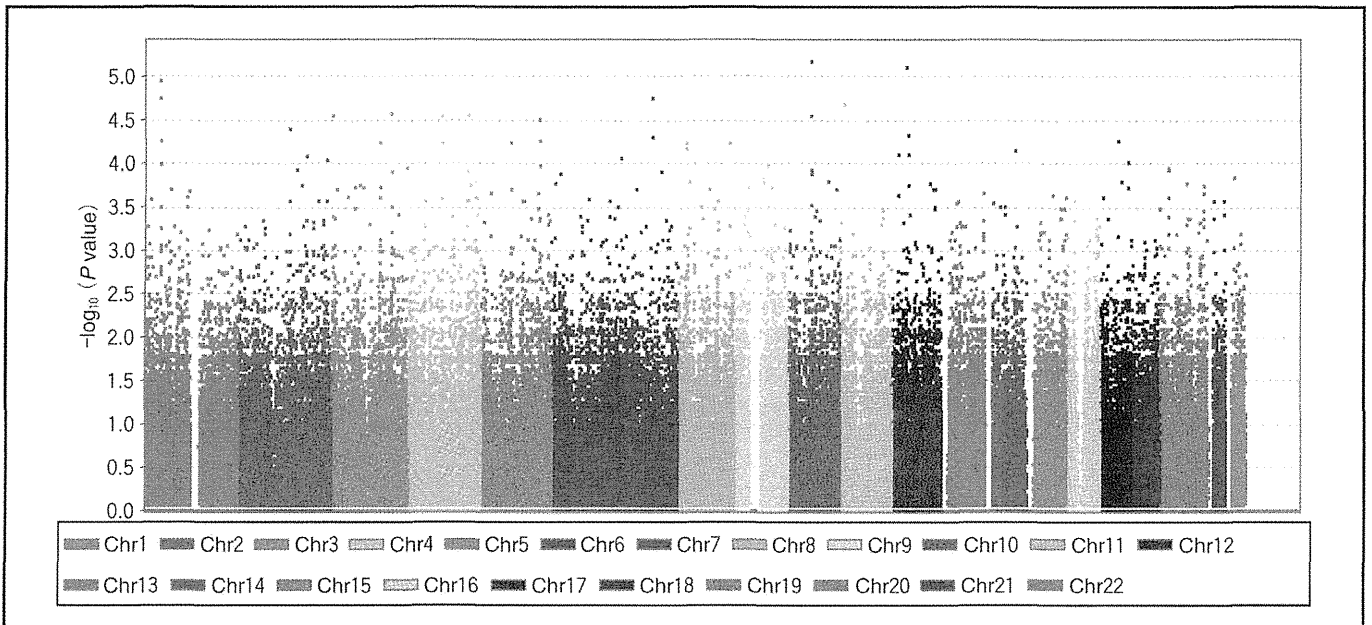


写真6 マンハッタンプロット

➡ p87

第 77 回 ゲノム医学の新情報②

1. ゲノムワイド関連解析による疾病関連遺伝子の同定

# 子宮内膜症

1. 札幌医科大学医学部外科学第一講座  
2. 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター

宇野 智子<sup>1</sup>・前佛 均<sup>2</sup>・中村 祐輔<sup>2</sup>  
Satoko Uno Hiroshi Zembutsu Yasuke Nakamura  
(センター長)

## はじめに

近年、ゲノムワイド関連解析 (genome wide association study : GWAS) により、さまざまな疾病で新たな疾病関連遺伝子が同定されている。子宮内膜症においても、GWAS およびそのメタアナリシスが行われている。

子宮内膜症は妊娠可能年齢女性の 5 ~ 10% に認められ、子宮内膜様組織が子宮内膜外で増殖する疾患である<sup>1)</sup>。疼痛をとまなうことより QOL (quality of life) は著しく低下し、不妊の一因にもなる。また、卵巣痛をはじめとする骨盤内腫瘍の発生母組織のひとつとも考えられている。発症機序には複合的要因の関与が考えられているが (図 1)<sup>2)</sup>、不明瞭な部分が多く、診断法、治療法向上のために早急な解明が望まれ、疾病関連遺伝子の同定により、解明の突破口となる可能性を期待したい。本稿では、GWAS による子宮内膜症関連遺伝子の同定について概説する。

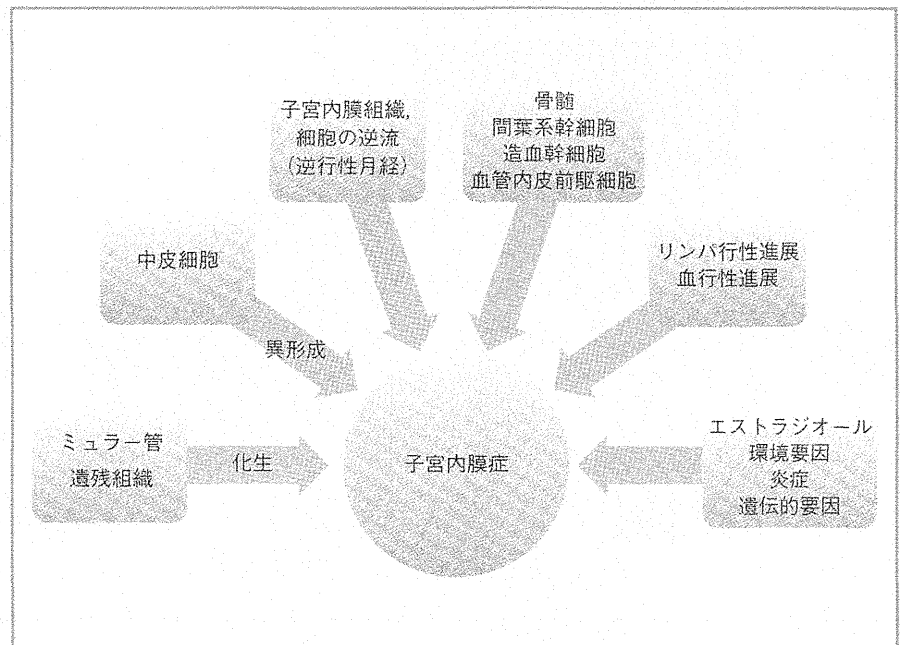


図 1 子宮内膜症発症機序仮説

(文献 2 より改変引用)

## GWAS とメタアナリシス

GWAS とは、患者群、非患者群の DNA に存在する SNP (single nucleotide polymorphism) を網羅的に解析し、2 群間で遺伝子型の頻度が異なる SNP を明らかにする研究方法である。たとえば、図 2A には 9 番染色体領域の一部を示しており、症例により 2 カ所で塩

基の違いがみられる。この 2 つの SNP は図 2B に示すマンハッタンプロットでゲノムワイド有意水準を満たした枠内に位置し、疾病と関連する可能性が示唆される。

メタアナリシスでは、複数の集団で行われた GWAS 結果を統合することにより検出力を上げることができる。図 2C では、9 番染色体領域に低い P

Surgery Frontier 20(2) : 72-75, 2013



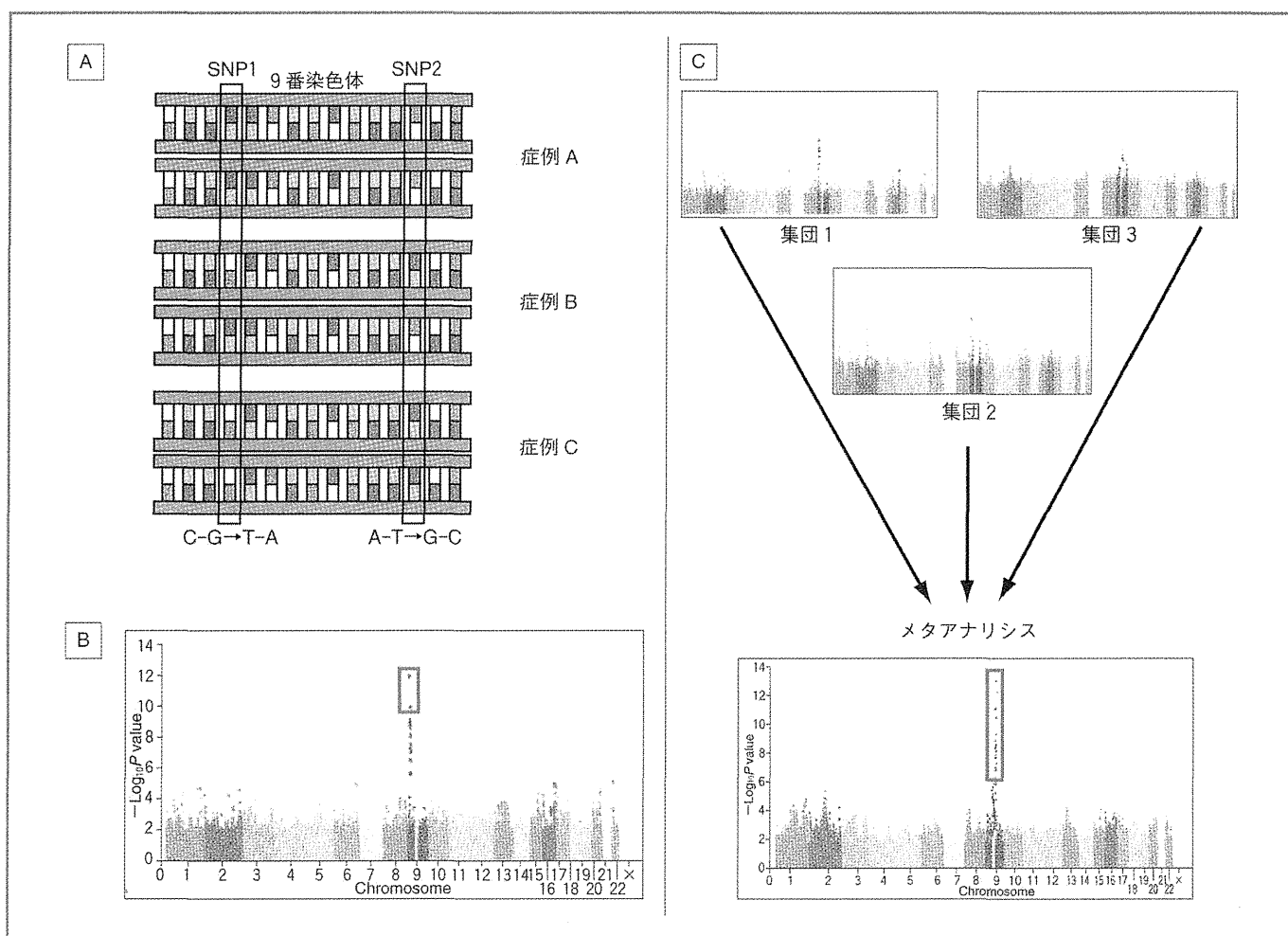


図2 GWASとメタアナリシス

- A : 9番染色体領域に位置する2つのSNP (single nucleotide polymorphism)。症例Aは common homozygote, 症例Bは heterozygote, 症例Cは variant homozygote。
- B : GWAS結果を示すマンハッタンプロット。染色体位置を横軸に、 $-\log_{10} P$  valueを縦軸に取り、解析したSNPをドットでプロットしたもの。染色体ごとに色分けしている。
- C : 複数のGWAS結果を統合したメタアナリシス。

(文献13より改変引用)  
(カラーグラビア p6 写真4参照)

値を示すSNPを認めるものの、ゲノムワイド有意水準までは達しない3件のstudyを統合することにより、統計学的有意差をもって枠内に示す同領域に、疾病と関連する複数のSNPを認めている。

## 子宮内膜症における研究成果

2013年1月現在までに報告されている子宮内膜症大規模GWAS、メタアナリシス概要を表1に示す。初の子宮内膜症GWASについては、日本人

を対象に行われ、2010年に筆者らが報告した<sup>31</sup>。データの再現性確認 (Replication study) にて、9p21領域に存在する *CDKN2BAS* 遺伝子内のSNPのひとつである rs10965235 が子宮内膜症と関連を示す可能性が示唆された。

# What's New in SURGERY FRONTIER

表1 子宮内膜症大規模 GWAS およびメタアナリシスの報告 (2013年1月現在)

対象人種	研究デザイン	解析サンプル数	解析 SNP 数	関連が示唆される SNP および 疾患関連候補遺伝子	文献 番号
日本人	GWAS	case : 1423, control : 1318	460945	rs10965235(9p21) : <i>CDKN2BAS</i>	3)
	Replication study	case : 484, control : 3974	100	rs16826658(1p36) : <i>WNT4</i>	
	Meta-analysis	case : 1907, control : 5292	100	rs13271465(8p22) : no gene	
ヨーロッパ人 (ENG + AUS)	GWAS	case : 3194, control : 7060	454193 (AUS) 453663 (ENG)	rs12700667(7p15) : <i>NFE2L3, HOXA10</i>	10)
ヨーロッパ人 (ENG)	Replication study	case : 2392, control : 2271	73	rs7521902(1p36) : <i>WNT4</i>	
ヨーロッパ人 (ENG + AUS)	Meta-analysis	case : 5586, control : 9331	73	rs1250248(2q35) : <i>FNI</i>	
日本人 ヨーロッパ人 (ENG + AUS)	Meta-analysis	case : 4604, control : 9393	407632	rs7521902(1p36) : <i>WNT4</i> rs13394619(2p25) : <i>GREB1</i> rs4141819(2p14) : no gene rs7739264(6p22) : no gene	11)
日本人	Replication study	case : 1044, control : 4017	7	rs12700667(7p15) : <i>NFE2L3, HOXA10</i> rs1537377(9p21) : <i>CDKN2BAS</i> rs10859871(12q22) : <i>VEZT</i>	12)
ヨーロッパ人 (ITL)	Replication study	case : 305, control : 2710	4	rs7521902(1p36) : <i>WNT4</i>	
	Meta-analysis	case : 7798, control : 17333 (rs7521902) case : 5891, control : 12041 (rs1250248)	2	rs1250248(2q35) : <i>FNI</i> * rs1333049(9p21) : <i>CDKN2BAS</i>	

統計学的有意差を示した SNP および候補遺伝子は太字で表示。ENG : イギリス人, AUS : オーストラリア人, ITL : イタリア人。

\* : サブグループ解析にて疾患群を卵巣子宮内膜症に限定したときのみ有意水準を満たした。

さらにメタアナリシスにて、この SNP はゲノムワイド有意水準 ( $P < 10^{-7}$ ) を満たし、子宮内膜症と非常に強い関連を示す可能性が示唆された ( $P = 5.57 \times 10^{-12}$ , odds ratio (OR) = 1.44)。CDKN2BAS は 19 exon からなる遺伝子で、3834bp の長鎖 non-coding RNA である。rs10965235 は CDKN2BAS の intron16 に存在するが、現段階ではどのような機序で子宮内膜症発症に関与するかは定かではなく、今後の機能解析がまたれる。近年の研究により、この遺伝子は癌抑制遺伝子 p14, p15, p16 の制御をつかさどる可

能性が報告されており<sup>1)</sup>、冠動脈疾患<sup>5)</sup>、2型糖尿病<sup>6)</sup>、グリオーマ<sup>7)</sup>、脳動脈瘤<sup>8)</sup>など、さまざまな疾病との関連も示唆されている。また、有意水準には達しないものの、関連が示唆される領域として、8p22 領域および 1p36 領域が同定された。1p36 領域には WNT 遺伝子ファミリーに属する WNT4 遺伝子が位置している。この遺伝子は生殖器官の形成に関与している<sup>9)</sup>ことが知られており、今後子宮内膜症発症機序との関連解明が期待される。

2011年には Painter らによりオース

トラリア人、イギリス人を対象とした GWAS が報告され、7p15.2 領域に存在する SNP (rs12700667) が統計学的有意水準を満たし、候補遺伝子として NFE2L3, HOXA10 が挙げられた<sup>10)</sup>。2012年には前述2つの GWAS によるメタアナリシス結果が報告され、前述の領域を含む計7領域が統計学的有意差を示した<sup>11)</sup>。

さらに2013年、Pagliardini らによりイタリア人を対象とした Replication study にて、WNT4, CDKN2BAS, FNI 遺伝子との関連が示唆され、再現性が確認されている<sup>12)</sup>。

## おわりに

子宮内膜症における GWAS により、疾病関連遺伝子の同定が進んでいる。それぞれの遺伝子が疾病発症に担う役割については、これからの機能解析結果がまたれるところであり、今後新たな診断法、治療法の解明へとつながることが期待される。

## 文 献

- 1) Bulun SE : Endometriosis. *N Engl J Med* 360 : 268-279, 2009
- 2) Burney RO, Giudice LC : Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 98 : 511-519, 2012
- 3) Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, et al : A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet* 42 : 707-710, 2010
- 4) Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al : Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 357 : 443-453, 2007
- 5) Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, et al : Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316 : 1336-1341, 2007
- 6) Rajaraman P, Melin BS, Wang Z, et al : Genome-wide association study of glioma and meta-analysis. *Hum Genet* 131 : 1877-1888, 2012
- 7) Low SK, Takahashi A, Cha PC, et al : Genome-wide association study for intracranial aneurysm in the Japanese population identifies three candidate susceptible loci and a functional genetic variant at EDNRA. *Hum Mol Genet* 21 : 2102-2110, 2012
- 8) Jarinova O, Stewart AF, Roberts R, et al : Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 : 1671-1677, 2009
- 9) Gaetje R, Holtrich U, Engels K, et al : Endometriosis may be generated by mimicking the ontogenetic development of the female genital tract. *Fertil Steril* 87 : 651-656, 2007
- 10) Painter JN, Anderson CA, Nyholt DR, et al : Genome-wide association study identifies a locus at 7p15.2 associated with endometriosis. *Nat Genet* 43 : 51-54, 2011
- 11) Nyholt DR, Low SK, Anderson CA, et al : Genome-wide association meta-analysis identifies new endometriosis risk loci. *Nat Genet* 44 : 1355-1359, 2012
- 12) Pagliardini L, Gentilini D, Vigano' P, et al : An Italian association study and meta-analysis with previous GWAS confirm WNT4, CDKN2BAS and FN1 as the first identified susceptibility loci for endometriosis. *J Med Genet* 50 : 43-46, 2013
- 13) Manolio TA : Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 363 : 166-176, 2010

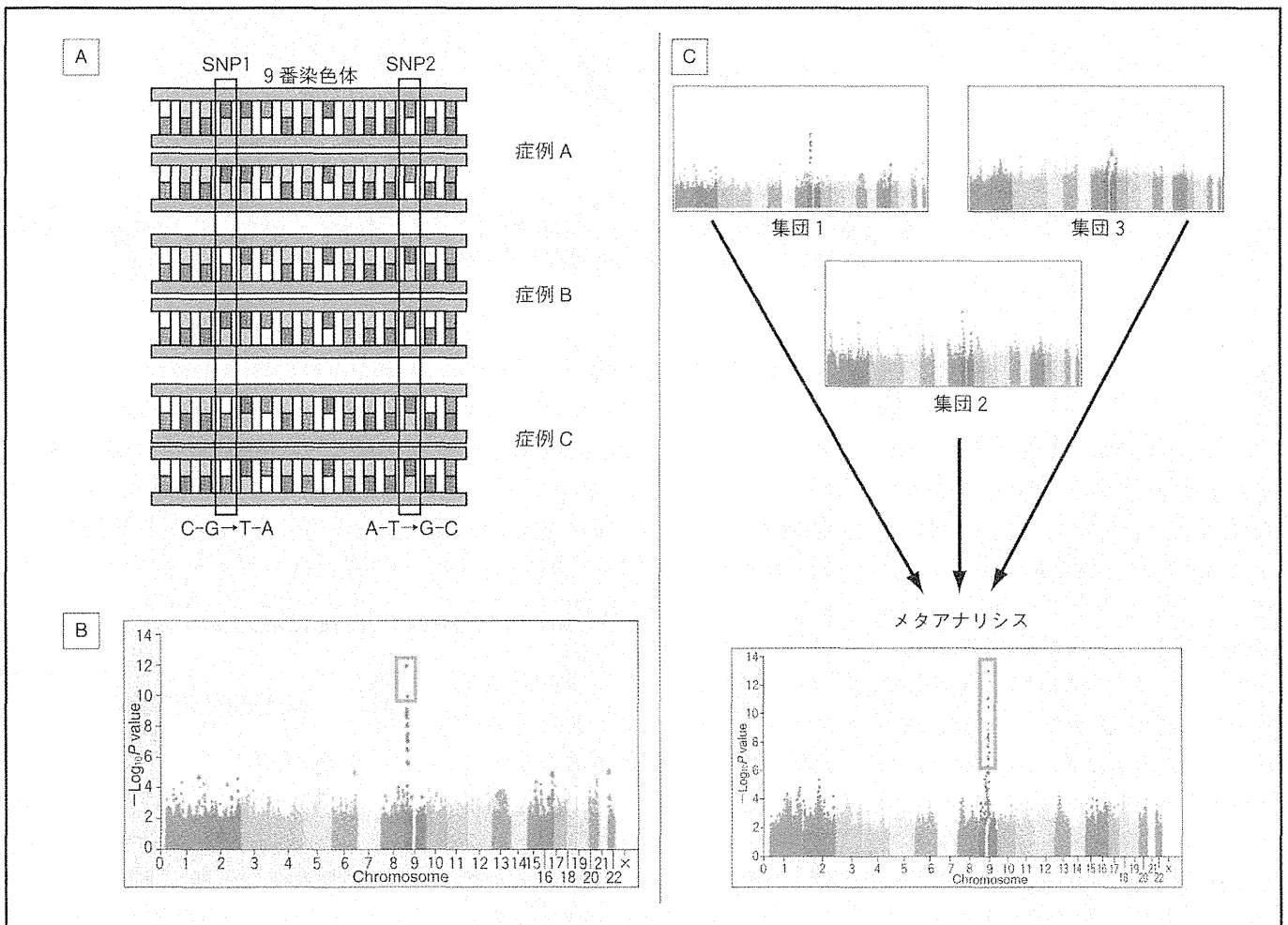


写真4 GWASとメタアナリシス

⇒ p73

## ケロイド

1. 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター
2. 横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学

中島 光子<sup>1,2</sup>・前佛 均<sup>1</sup>

Mitsuko Nakashima

Hitoshi Zembutsu

### はじめに

ケロイドは外傷を契機に発生する増殖性皮膚病変であり、外傷後の創傷治癒の障害に起因すると考えられているが、いまだその発生機序は明らかとなっていない。ケロイドは局所の感染や機械的刺激などの環境要因が誘因となるとともに、人種間での発症頻度差や家系発症例の報告などから遺伝的要因が大きく関連している可能性が高い多因子疾患 (multifactorial disease) であると考えられている<sup>1)</sup>。ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study : GWAS) は多数の遺伝的多型の組み合わせによって引き起こされる多因子疾患の解析に非常に有用である<sup>2)</sup>。本稿ではケロイドの GWAS の結果について概説する<sup>3)</sup>。

### ケロイドの GWAS

本解析では、バイオバンクジャパン<sup>4)</sup> から提供された日本人ケロイド症例 (case) 824 例と日本人非ケロイド症例 (control) 3,212 例の DNA を用い

て GWAS を行った。まず、1 次スクリーニングでは case 188 例、control 934 例を illumina 社の HumanHap 550 BeadArray を用いて 568,366 個の tag SNPs 解析を行った。タイピング結果の quality control として、call rate (実際にタイピングできた検体の割合) が 99% 以下の SNP、ハーディーワインバーグ平衡から著しく逸脱する ( $\geq 1.0 \times 10^{-6}$ ) SNP、マイナーアレル頻度が著しく低い SNP を除外した。次に主成分分析の結果をもとに集団の階層化を示す検体 (case 8 例、control 28 例) を解析から除外した。その結果、1 次では case 178 例、control 906 例、452,038 SNPs について相関解析を行い、そのなかから有意差上位 12,000 SNPs について 2 次スクリーニングを行った。2 次スクリーニングでは case 329 例、control 1,451 例を Affymetrix 社の GeneChip<sup>®</sup> を用いて解析を行った。2 次スクリーニングにおいても 1 次と同様の quality control を行い、条件を満たした 9,838 SNPs に関して解析を行った。1 次および 2 次スクリーニングを組み合わせる結果から、 $P$  値が  $1.0 \times 10^{-7}$  未満を示す 15 SNPs が 1q41.3q22.3、15q21.3 の 3 つの染色体領域

上に存在していた (図 1)。この 15 SNPs に関し、case 307 例、control 820 例を用いて 3 次試験を行い再現性の確認を行ったところ、1 次、2 次、3 次試験のすべての段階において多重検定補正後もケロイドと有意な相関を示す 4 SNPs が認められた (表 1)。

### 疾患感受性候補領域

#### 1 1 番染色体

最も強い相関を示したのは 1 番染色体上の rs873549 を含む 40 kb の連鎖不平衡領域 (220.30 ~ 220.34 Mb : 図 2A) であった。同領域内には既知の遺伝子の報告はなかったが、皮膚組織での発現が認められる数種の EST (expressed sequence tag) の存在が報告されている。

#### 2 3 番染色体

3 番染色体上には rs940187 と rs1511412 の 2 つのマーカー SNP があり、rs940187 を含む 14 kb の連鎖不平衡領域 (140.321 ~ 140.325 Mb) と rs1511412 を含む 125 kb の連鎖不平衡領域 (140.11 ~ 140.23 Mb) に強い相関が認められた (図 2B)。rs940187 と

# What's New in SURGERY FRONTIER

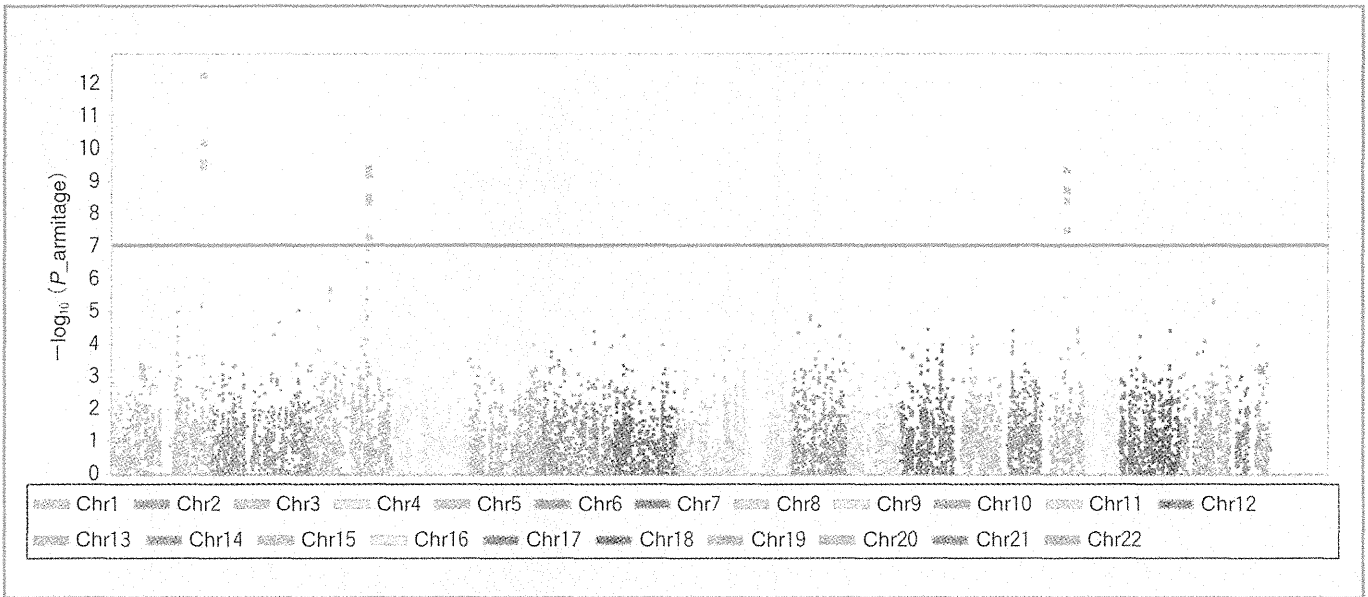


図1 ケロイドのゲノムワイド関連解析の結果

各点は SNPs, 横軸は染色体の位置, 縦軸は  $P$  値の  $-\log$  値をそれぞれ表す。紫の線は GWAS 有意水準 ( $P = 1.0 \times 10^{-7}$ ) の境界を示す。

(文献 3 より引用)

(カラーグラビア p2 写真 2 参照)

表 1 GWAS および追加試験の結果

SNP	chr	position	gene	allele (risk allele)	stage	sample size		$P$	odds ratio	(95% CI)
						case	control			
rs873549	1	220,338,390	No Gene	T/C (C)	1st	178	906	$4.98 \times 10^{-5}$	1.64	1.30-2.07
					2nd	311	1,451	$1.61 \times 10^{-6}$	1.71	1.44-2.04
					3rd	307	820	$8.40 \times 10^{-12}$	1.92	1.62-2.33
					Total	796	3,177	$5.89 \times 10^{-23}$	1.77	1.58-1.99
rs1511412	3	140,196,394	PRR23B FOXL2	A/G (A)	1st	178	906	$2.20 \times 10^{-4}$	1.92	1.36-2.72
					2nd	314	1,451	$2.32 \times 10^{-6}$	1.85	1.43-2.40
					3rd	306	820	$2.48 \times 10^{-5}$	1.86	1.39-2.48
					Total	798	3,177	$2.31 \times 10^{-13}$	1.87	1.58-2.21
rs940187	3	140,324,283	BPESCI	T/C (T)	1st	178	906	$4.72 \times 10^{-3}$	1.73	1.17-2.55
					2nd	313	1,451	$8.66 \times 10^{-8}$	2.15	1.62-2.85
					3rd	306	820	$1.68 \times 10^{-5}$	1.97	1.44-2.69
					Total	797	3,177	$1.80 \times 10^{-13}$	1.98	1.65-2.39
rs8032158	15	53,982,169	NEDD4	T/C (C)	1st	178	906	$3.35 \times 10^{-4}$	1.52	1.21-1.92
					2nd	311	1,451	$2.07 \times 10^{-7}$	1.60	1.35-1.91
					3rd	307	820	$5.61 \times 10^{-4}$	1.40	1.16-1.69
					Total	796	3,177	$5.96 \times 10^{-13}$	1.51	1.35-1.69

(文献 3 より引用)

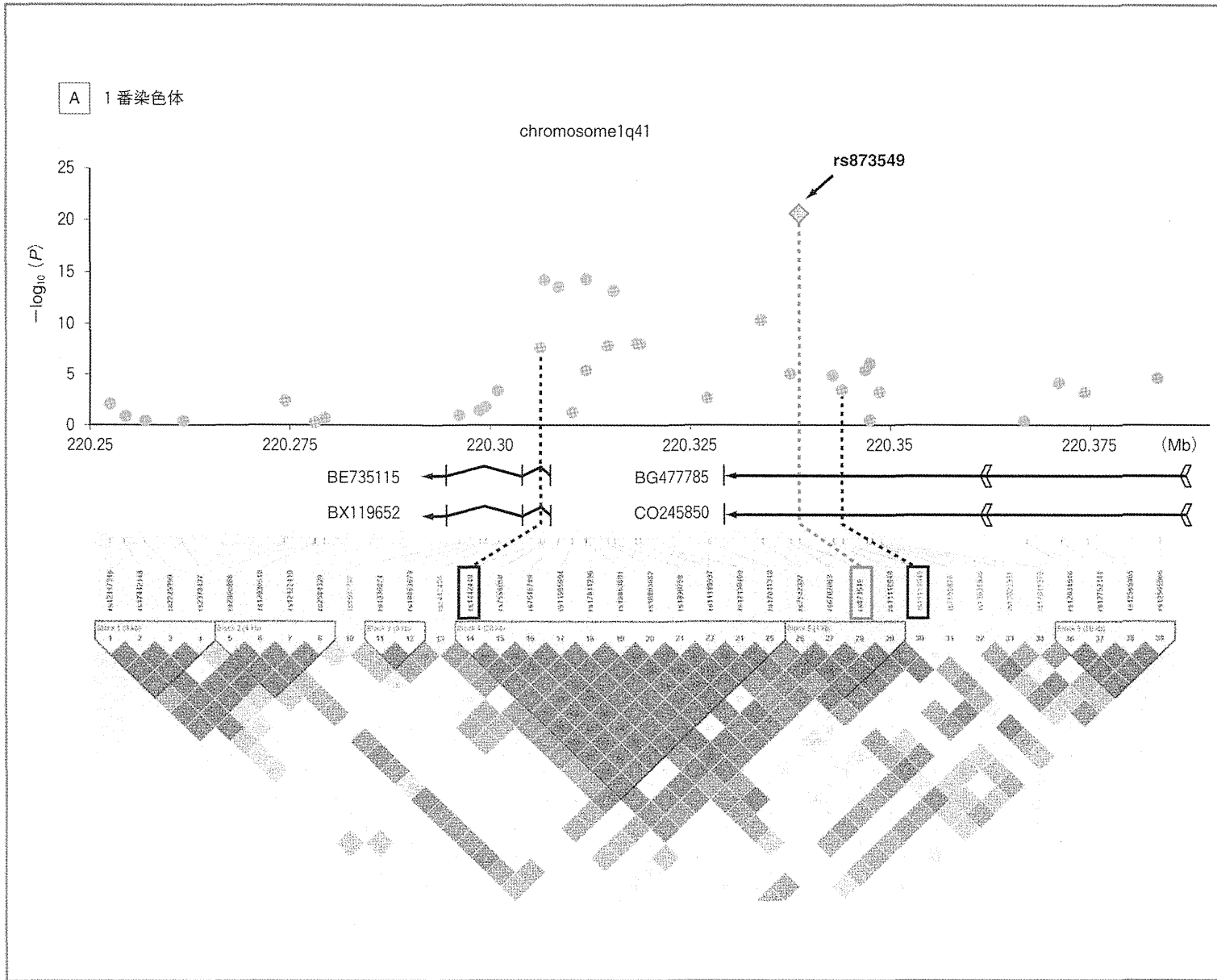


図2 ケロイドに関連する3領域

菱形の点はマーカー SNP, 丸点は Tag SNPs, 横軸はゲノム上の位置, 縦軸は P 値の  $-\log$  値を表す。下段は D' に基づく LD (連鎖不平衡) ブロックを示し, 紫の点線はマーカー SNP の位置, 黒い点線は疾患感受性領域の境界を表す。矢印は各領域内に存在する EST あるいは遺伝子を表す。

(文献 3 より改変引用)  
(カラーグラビア p3-5 写真 3 参照)

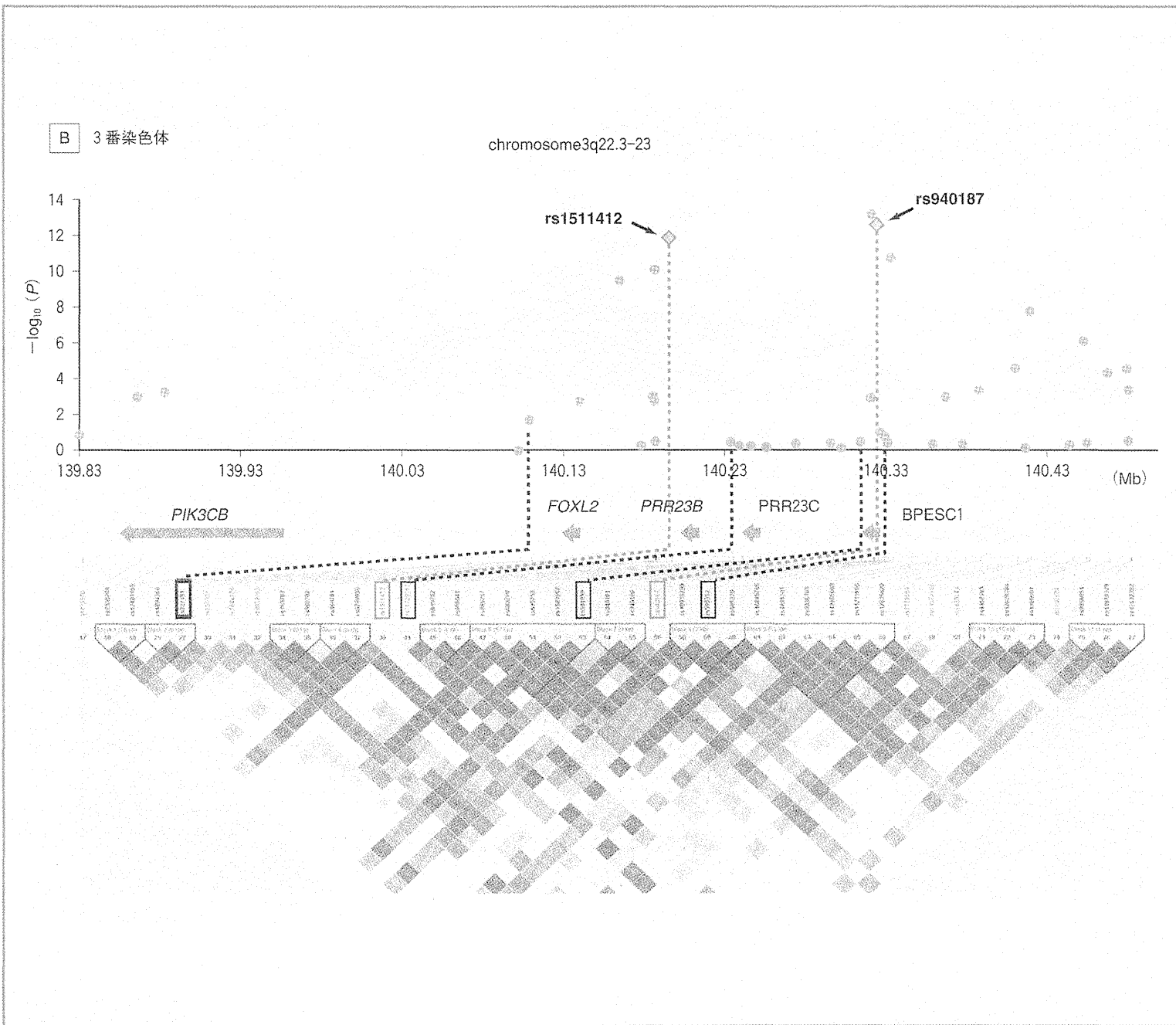


図2 ケロイドに関連する3領域



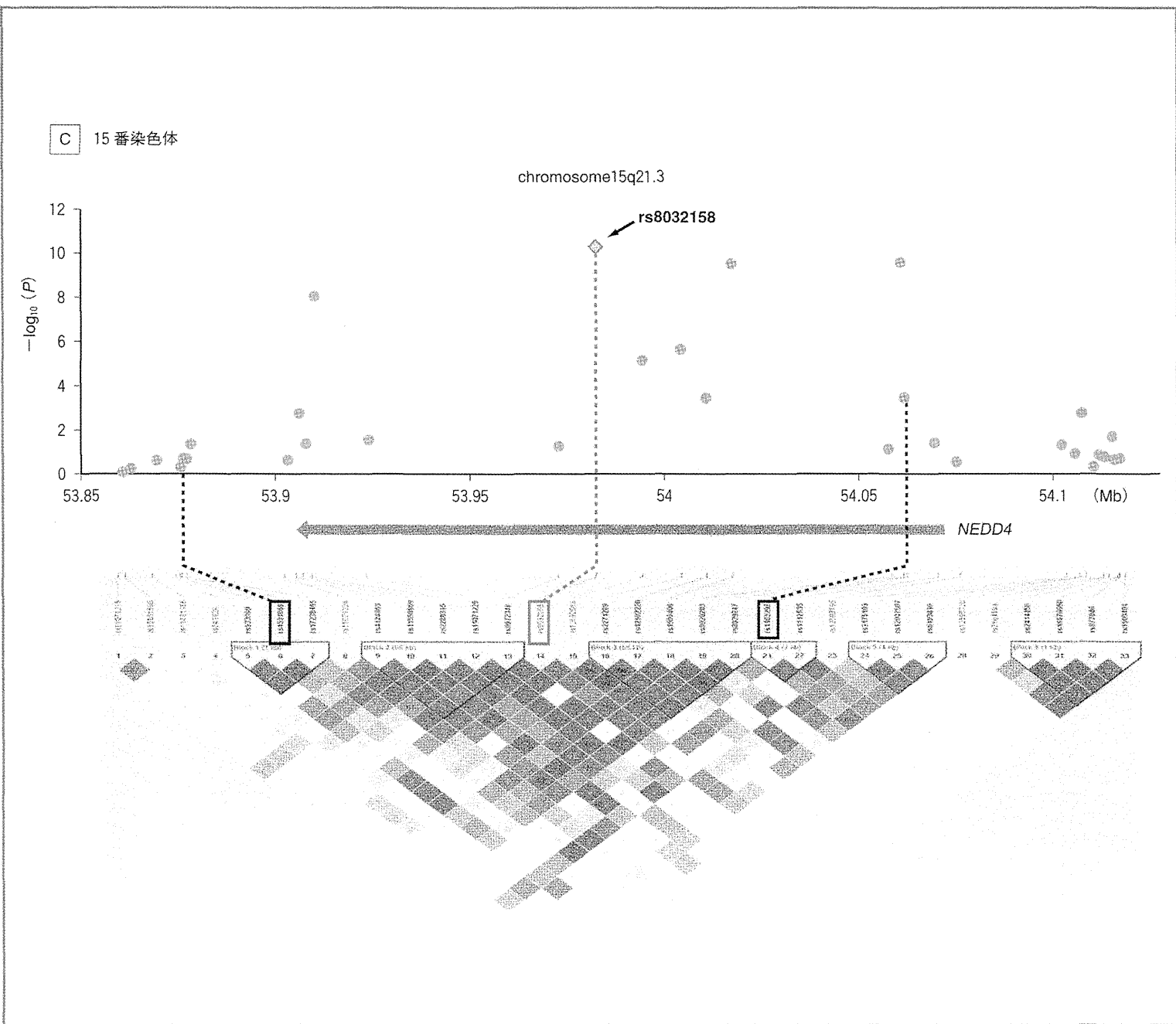


図2 ケロイドに関連する3領域

rs1511412 のあいだには中等度の連鎖不平衡が認められるが ( $D' = 0.89$ ,  $r^2 = 0.56$ )、両 SNP 間の効果をロジスティック回帰分析 (logistic regression analysis) にて検討した結果、この 2 つの SNPs はそれぞれ独立した 2 つの領域に存在しているものと考えられた。rs940187 を含む領域には blepharophimosis, epicanthus inversus and ptosis, candidate 1 (*BPESCI*) という non-coding RNA の存在が<sup>7)</sup>、rs1511412 を含む領域には forkhead box L2 (*FOXL2*) 遺伝子と proline rich 23B (*PRR23B*) 遺伝子という 2 つの遺伝子が報告されている。*FOXL2* は性腺ホルモン産生に深く関与していることが知られており<sup>67)</sup>、ケロイドは思春期に発症あるいは増悪すること、閉経後に消退するといった報告<sup>8)</sup>があることから、*FOXL2* が女性ホルモンの産生を上昇させ、ケロイドの形成に関与している可能性が考えられる。

### 3 15 番染色体

15 番染色体は rs8032158 を含む 185 kb の連鎖不平衡領域 (53.87-54.06 Mb) との相関があり、同領域内には neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4 (*NEDD4*) 遺伝子の存在が報告されている (図 2C)。*NEDD4* 遺伝子は E3 ユビキチンリガーゼの一種であり、PTEN や p27 のユビキチン化を行うことで、その安定性を制御していることが報告されており<sup>9)-11)</sup>、細胞増殖促進

や接触阻害の異常を引き起こし、また、細胞外マトリックスであるフィブロネクチンや I 型コラーゲンの産生促進に働く可能性が示唆されている。

### おわりに

GWAS を用いることで新規のケロイド疾患感受性候補遺伝子の同定に成功した。今回の結果は、ケロイドのリスク予測システムの構築やケロイド発生機序の解明への寄与が期待できる。しかし、感受性遺伝子の機能とケロイドへの関与を解明し、新たな治療標的として臨床応用するためには、これらの遺伝子のさらなる機能解析が必要と考えられる。

### 文 献

- 1) Shih B, Bayat A : Genetics of keloid scarring. Arch Dermatol Res 302 : 319-339, 2010
- 2) Kruglyak L : Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. Nat Genet 22 : 139-144, 1999
- 3) Nakashima M, Chung S, Takahashi A, et al : A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population. Nat Genet 42 : 768-771, 2010
- 4) Nakamura Y : The BioBank Japan Project. Clin Adv Hematol Oncol 5 : 696-697, 2007
- 5) De Baere E, Fukushima Y, Small K, et al : Identification of BPESCI, a novel gene disrupted by a balanced chromosomal translocation, t(3;4)

(q23;p15.2), in a patient with BPES. Genomics 68 : 296-304, 2000

- 6) Ellsworth BS, Burns AT, Escudero KW, et al : The gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor activating sequence (GRAS) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including Smads, AP-1 and a forkhead DNA binding protein. Mol Cell Endocrinol 206 : 93-111, 2003
- 7) Pisarska MD, Bae J, Klein C, Hsueh AJ : Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. Endocrinology 145 : 3424-3433, 2004
- 8) Moustafa MF, Abdel-Fattah MA, Abdel-Fattah DC : Presumptive evidence of the effect of pregnancy estrogens on keloid growth. Case report. Plast Reconstr Surg 56 : 450-453, 1975
- 9) Wang, X, Trotman LC, Koppie T, et al : NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. Cell 128 : 129-139, 2007
- 10) Fouladkou F, Landry T, Kawabe H, et al : The ubiquitin ligase Nedd4-1 is dispensable for the regulation of PTEN stability and localization. Proc Natl Acad Sci USA 105 : 8585-8590, 2008
- 11) Chung S, Nakashima M, Zembutsu H, Nakamura Y : Possible involvement of NEDD4 in keloid formation : its critical role in fibroblast proliferation and collagen production. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 87 : 563-573, 2011

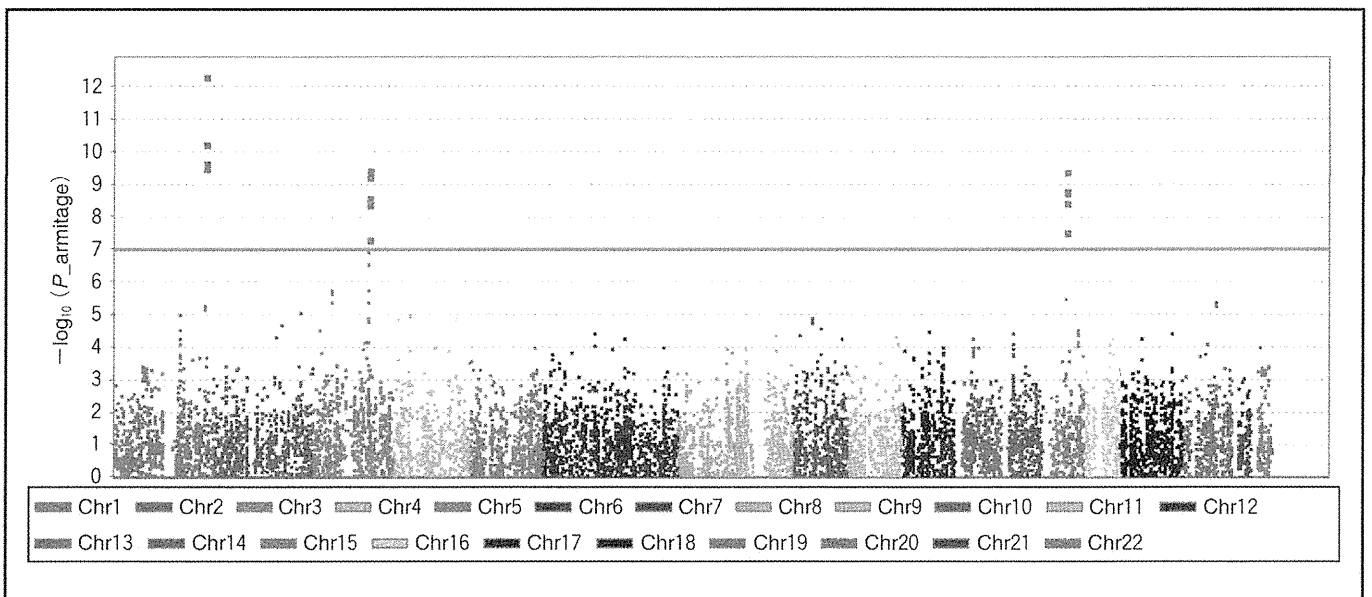


写真 2 ケロイドのゲノムワイド関連解析の結果

➡ p67

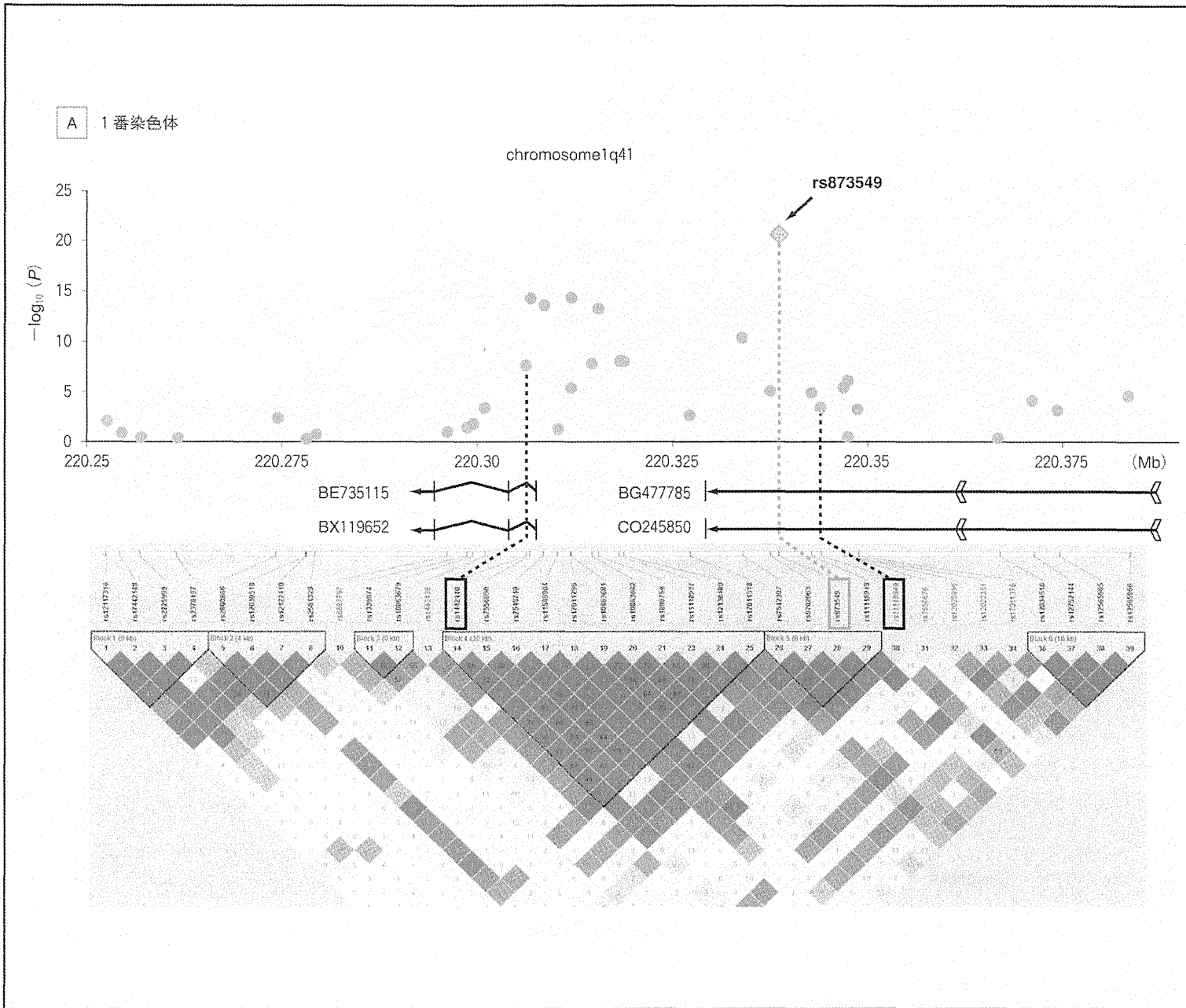


写真3 ケロイドに関連する3領域

➔ p68-70