

FIGURE 4. ACOSOG Z0011: overall survival. Adapted from [33].

performed additional non-SNB (ADD), which was enlarged at the lower axilla. Twenty-seven patients with positive scans underwent complete AND as a primary procedure, and 110 patients with negative scans underwent SNB and ADD. There were eight cases of false-negative scans, and no case of false-positive scan. Among 110 SNB and ADD cases, there were only eight cases (7.3%) of positive axillary basins in permanent biopsy, including two cases of late positives that had micrometastases in the sentinel node only. On the basis of an FDG-PET/CT, 27 unnecessary SNBs (true positive scans) have been eliminated. They concluded that an FDG-PET/CT reduced both unnecessary SNBs and positive

axillary basins, enhancing the identification rates of sentinel node and the accuracy of SNB.

The After Mapping of the Axilla: Radiotherapy Or Surgery (AMAROS) study has been conducted in The European Organisation for Research and Treatment of Cancer. The main endpoint of this study is axillary recurrence rate (Fig. 5) [30] and secondary endpoints are axillary recurrence free survival, disease-free survival, overall survival, quality of life, shoulder function analysis, and economic evaluation. Four thousand seven hundred and sixty seven patients had already been recruited (Feb 2001~2010). This study is comparing ALND to axillary radiation and will be available in a couple of years.

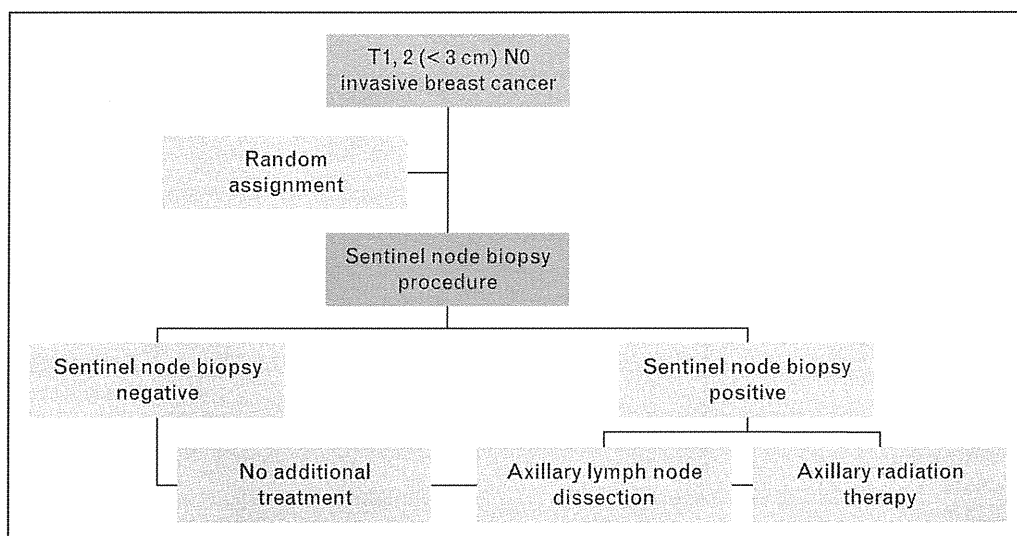
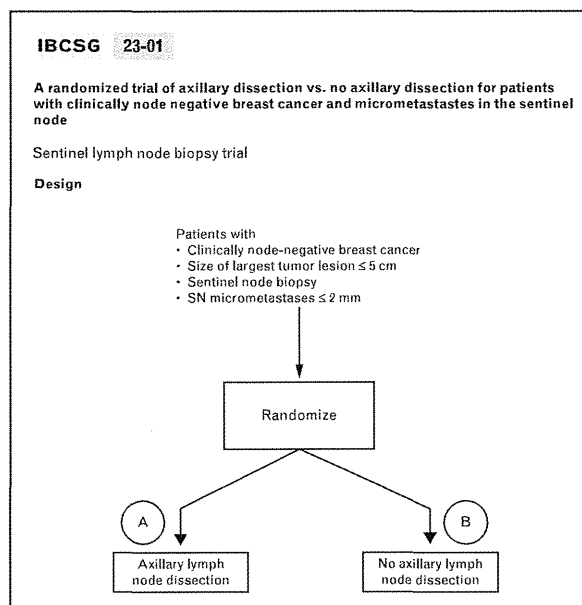


FIGURE 5. AMAROS study design. American Society of Clinical Oncology.



**FIGURE 6.** IBCSG23-01 study design. [http://www.ibcsg.org/Public/Health\\_Professionals/Closed\\_Trials/IBCSG%2023-01/Pages/IBCSG23-01.aspx](http://www.ibcsg.org/Public/Health_Professionals/Closed_Trials/IBCSG%2023-01/Pages/IBCSG23-01.aspx).

The International Breast Cancer Study Group trial 23–01 study was conducted at the European institute of Oncology in Milan (Fig. 6) [31]. The study included patients with disease limited to a relatively small primary tumor treated with initial SNB. Those who have micrometastasis ( $\leq 2$  mm) are randomized to axillary dissection or no further treatment. The result of this study is also awaited.

## CONCLUSION

This result of ACOSOG Z0011 has profoundly impacted our understanding of axillary management in women with clinically node-negative breast cancer. The results of this study suggest that AND may safely be omitted in breast conservation patients whose tumor size is 5 cm or less with clinically node negative and who will have whole breast radiation and appropriate systemic adjuvant therapy [32,33]. But there are several critiques of the study, and further study is required. In patients for whom axillary dissection is eliminated, careful follow of their axillary is required, and we must also await the results of other similar studies (AMAROS study and International Breast Cancer Study Group 23–01.)

## Acknowledgements

None.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

■ of special interest

■ ■ of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (pp. 000–000).

1. Giuliano AE, Dale PS, Turner RR, *et al.* Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg* 1995; 222:394–399.
2. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, *et al.* Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994; 220:391–398.
3. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, *et al.* A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:546–553.
4. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, *et al.* Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:599–609.
5. Kell MR, Burke JP, Barry M, *et al.* Outcome of axillary staging in early breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120:441–447.
6. McLaughlin SA, Wright MJ, Morris KT, *et al.* Prevalence of lymphedema in women with breast cancer 5 years after sentinel lymph node biopsy or axillary dissection: objective measurements. *J Clin Oncol* 2008; 26:5213–5219.
7. Erickson VS, Pearson ML, Ganz PA, *et al.* Arm edema in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:96–111.
8. Giuliano AE, Haigh PI, Brennan MB, *et al.* Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:2553–2559.
9. Goyal A, Newcombe RG, Chhabra A, Mansel RE. Morbidity in breast cancer patients with sentinel node metastases undergoing delayed axillary lymph node dissection (ALND) compared with immediate ALND. *Ann Surg Oncol* 2008; 15:262–267.
10. Bear HD. Completion axillary lymph node dissection for breast cancer: immediate versus delayed versus none. *J Clin Oncol* 2008; 26:3483–3484.
11. Krag DN, Julian TB, Harlow SP, *et al.* NSABP-32: phase III, randomized trial comparing axillary resection with sentinel lymph node dissection: a description of the trial. *Ann Surg Oncol* 2004; 11:208S–210S.
12. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, *et al.* Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11:927–933.
13. Chu KU, Turner RR, Hansen NM, *et al.* Do all patients with sentinel node metastasis from breast carcinoma need complete axillary node dissection? *Ann Surg* 1999; 229:536–541.
14. Chu KU, Turner RR, Hansen NM, *et al.* Sentinel node metastasis in patients with breast carcinoma accurately predicts immunohistochemically detectable nonsentinel node metastasis. *Ann Surg Oncol* 1999; 8:756–761.
15. Grube BJ, Giuliano AE. Observation of the breast cancer patient with a tumor-positive sentinel node: implications of the ACOSOG Z0011 trial. *Semin Surg Oncol* 2001; 20:230–237.
16. Park J, Fey JV, Naik AM, *et al.* A declining rate of completion axillary dissection in sentinel lymph node-positive breast cancer patients is associated with the use of a multivariate nomogram. *Ann Surg* 2007; 245:462–468.
17. Van Zee KJ, Manasseh DM, Bevilacqua JL, *et al.* A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2003; 10:1140–1151.
18. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, *et al.* American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:7703–7720.
19. Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, *et al.* Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann Surg* 2010; 252:426–432.
20. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, *et al.* Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011; 305:569–575.

Among patients with limited SLN metastatic breast cancer treated with breast conservation and systemic therapy, the use of SLND alone compared with ALND did not result in inferior survival.

21. Caudle AS, Hunt KK, Kuerer HM, *et al*. Multidisciplinary considerations in the implementation of the findings from the American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) Z0011 Study: a Practice-Changing Trial. *Ann Surg Oncol* 2011; 18:2407–2412.

The omission of cALND according to ACOSOG Z0011 in selected patients has become part of the national practice pattern including MD Anderson Cancer Center.

22. Tan LK, Giri D, Hummer AJ, *et al*. Occult axillary node metastases in breast cancer are prognostically significant: results in 368 node-negative patients with 20-year follow-up. *J Clin Oncol* 2008; 26:1803–1809.
23. de Boer M, van Dijk JA, Bult P, *et al*. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102:410–425.
24. Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, *et al*. N. Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2011; 364:412–421.
25. Mamounas EP, Wolmark N. Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2011; 364:412–421.
26. Veronesi U, Viale G, Paganelli G, *et al*. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study. *Ann Surg* 2010; 251:595–600.
27. Spiguel L, Yao K, Winchester DJ, *et al*. Sentinel node biopsy alone for node-positive breast cancer: 12-year experience at a single institution. *J Am Coll Surg* 2011; 213:122–128.

Axillary recurrence is rare after SNB alone. This might be related to favorable tumor and patient characteristics and frequent use of adjuvant therapy.

28. Schem C, Jonat W, Ostertag H, *et al*. Observation or standard axillary dissection after sentinel-node biopsy in breast cancer: Final results from the German KISS study. *J Clin Oncol* 2011; 29 (suppl; abstr 1012). [http://www.asco.org/ASCOv2/Meetings/Abstracts?&vmview=abst\\_detail\\_view&confID=102&abstractID=83261](http://www.asco.org/ASCOv2/Meetings/Abstracts?&vmview=abst_detail_view&confID=102&abstractID=83261)

No significant differences in DFS and OS between the SAD group and the observation group.

29. Kim J, Lee J, Chang E, *et al*. Selective sentinel node plus additional non-sentinel node biopsy based on an FDG-PET/CT scan in early breast cancer patients: single institutional experience. *World J Surg* 2009; 33:943–949.
30. Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, *et al*. Role of axillary clearance after a tumor-positive sentinel node in the administration of adjuvant therapy in early breast cancer. *JCO* 2010; 28:731–737.
31. Galimberti V, Botteri E, Chifu C, *et al*. Can we avoid axillary dissection in the micrometastatic sentinel node in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 2012; 131:819–825.
32. Giuliano AE, JcCall L, Beistsch P, *et al*. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. *Ann Surg* 2010; 252:426–432.
33. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, *et al*. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011; 305:569–575.

## (2) 有害事象 —ゲノムワイド関連解析による ゲムシタビン副作用関連遺伝子の同定

1. 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター
2. 理化学研究所ゲノム医科学研究センター
3. 札幌医科大学医学部外科学第一講座
4. 呉共済病院泌尿器科
5. 和歌山県立医科大学外科学第二講座

前佛 均<sup>1</sup>・清谷 一馬<sup>2</sup>・宇野 智子<sup>3</sup>・木村 康利<sup>3</sup>

*Hirosi Zembutsu*

*Kazuma Kiyotani*

*Satoko Uno*

*Yasutoshi Kimura*  
(講師)

薙田 泰誠<sup>2</sup>・光畑 直喜<sup>4</sup>・伊奈志乃美<sup>5</sup>・鬼原 史<sup>3</sup>

*Taisei Mushiroda*

*Naoki Mitsuhashi*

*Shinomi Ina*

*Chikashi Kihara*

(診療部長)

山上 裕機<sup>5</sup>・平田 公一<sup>3</sup>・中村 祐輔<sup>1</sup>

*Hiroki Yamate*

*Koichi Hirata*

*Yusuke Nakamura*

(教授)

(教授)

(センター長)

### はじめに

現在、多くの悪性腫瘍に対する治療薬として適応となっているゲムシタビンは骨髄抑制をはじめ、有害事象の発生頻度が決して少なくない薬剤であるが、その副作用の発現を規定する遺伝的要因についてはいまだ十分に解明されていない。生命の設計図ともいわれるヒトの遺伝情報(ゲノム配列)は個人間でわずかな違いが存在することが知られており、遺伝子多型(一塩基多型)と呼ばれる塩基配列の個人差を比較することで、副作用の発現と関係する遺伝子を同定しようとする解析が進んできており、一部は日常臨床に応用されている<sup>1)~4)</sup>。近年、ゲノム全体にわたり一塩基多型を genotyping する技術が進歩し、ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study :

Surgery Frontier 20(2) : 86-89, 2013

GWAS :「ジーワス」と呼ばれることが多い)という方法により、これまで副作用との関連が全く知られていなかった新たな副作用関連遺伝子を発見する試みがなされるようになってきた<sup>5)</sup>。

### ゲノムワイド関連解析による ゲムシタビン骨髄抑制関連 候補遺伝子の同定

ゲムシタビン投与により骨髄抑制(> grade 3)が認められた21例と、投与により有害事象を認めなかった58例を用いて、ゲノム全体にわたり610,000個の遺伝子多型(single nucleotide polymorphism : SNP)を genotyping した。得られた各症例の610,000 SNPの genotype 情報を用いて case-control 関連解析を行った結果、最も副作用と強い関連を示した SNP は  $P = 0.000006690$  を示した。図1に

ゲノム全体にわたるマーカー SNP とゲムシタビン骨髄抑制との関連の強さをグラフで表したものの(マンハッタンプロット)を示すが、ゲムシタビンの副作用と関係する SNP は、ゲノム全体にわたり散在している可能性を示している。

### ゲムシタビンによる 骨髄抑制関連候補遺伝子の replication study

ゲノムワイド関連解析の結果の再現性を確認するために、有意差上位100 SNP について33例の case および62例の control を用いて関連解析を行った。100 SNP に対する replication study の結果  $P < 0.05$  を示す4 SNP が同定された(表1)。4 SNP とゲムシタビンによる骨髄抑制との関連はそれぞれ9番染色体上の rs11141915 が  $P = 2.77 \times 10^{-3}$ 、2番染色体上の



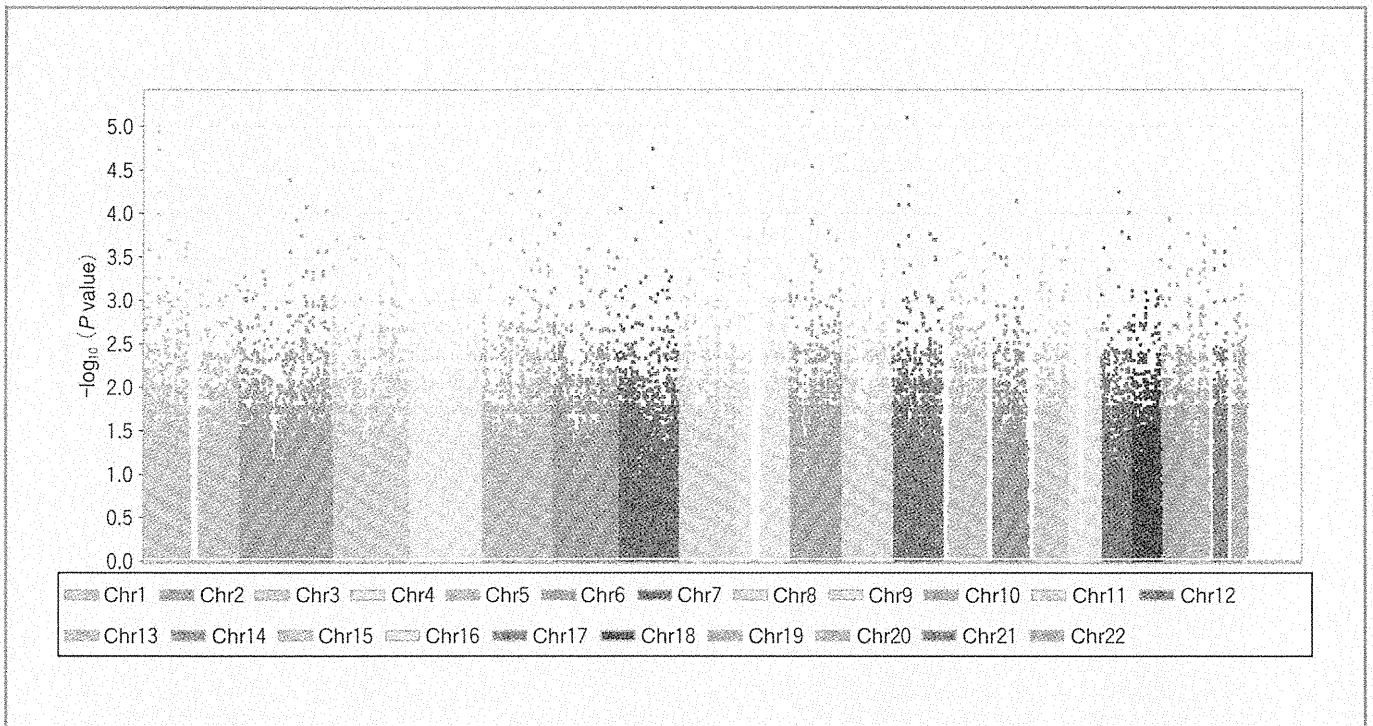


図1 マンハッタンプロット

ゲノム全体のマーカー SNP (点) について各染色体を横軸に、ゲムシタピンによる骨髄抑制との関連の強さを縦軸に表示している。ほとんどの SNP (点) が下方に位置し関連が認められない一方で、いくつかの SNP は強い関連がある可能性が示されている。

(カラーグラビア p7 写真 6 参照)

表1 ゲムシタピン副作用遺伝子の関連解析の結果

SNP	染色体	遺伝子	アレルの定義 1/2 (リスク)	ステージ	骨髄抑制群			コントロール群			P値			オッズ比 (95%CI)		
					11	12	22	リスクアレル頻度	11	12	22	リスクアレル頻度	アレルモデル		優性モデル	劣性モデル
rs11141915	9	DAPK1	T/G (T)	GWAS	18	3	0	0.93	21	30	7	0.62	$1.27 \times 10^{-4}$	$1.04 \times 10^{-4}$	$1.80 \times 10^{-1}$	7.94(2.32-27.25)
				replication	22	11	0	0.83	23	31	8	0.62	$2.77 \times 10^{-3}$	$9.23 \times 10^{-3}$	$4.73 \times 10^{-2}$	3.05(1.45-6.41)
				Combined	40	14	0	0.87	44	61	15	0.62	$1.27 \times 10^{-5}$	$6.91 \times 10^{-6}$	$6.11 \times 10^{-5}$	4.10(2.21-7.62)
rs1901440	2	No gene	A/C (C)	GWAS	11	3	7	0.40	31	27	0	0.23	$4.42 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^{-0}$	$4.01 \times 10^{-5}$	60.52(5.45-632.87)
				replication	20	8	5	0.27	42	19	1	0.17	$1.30 \times 10^{-1}$	$5.05 \times 10^{-1}$	$1.82 \times 10^{-2}$	10.89(1.22-97.64)
				Combined	31	11	12	0.32	73	46	1	0.20	$1.44 \times 10^{-2}$	$7.39 \times 10^{-1}$	$3.11 \times 10^{-6}$	34.00(4.29-269.48)
rs12046844	1	PDE4B	T/C (C)	GWAS	1	5	15	0.83	12	32	14	0.52	$3.93 \times 10^{-4}$	$1.95 \times 10^{-4}$	$1.67 \times 10^{-1}$	7.86(2.56-24.12)
				replication	4	10	19	0.73	7	34	21	0.61	$1.50 \times 10^{-1}$	$3.09 \times 10^{-2}$	$1.00 \times 10^{-0}$	2.65(1.11-6.31)
				Combined	5	15	34	0.77	19	66	35	0.57	$3.05 \times 10^{-4}$	$4.56 \times 10^{-5}$	$3.43 \times 10^{-1}$	4.13(2.10-8.14)
rs11719165	3	No gene	C/T (C)	GWAS	9	10	2	0.67	5	27	26	0.32	$1.15 \times 10^{-4}$	$3.49 \times 10^{-3}$	$1.21 \times 10^{-2}$	4.27(2.01-9.05)
				replication	9	16	8	0.52	7	31	24	0.36	$4.61 \times 10^{-2}$	$1.78 \times 10^{-1}$	$8.12 \times 10^{-2}$	1.87(1.02-3.42)
				Combined	18	26	10	0.57	12	58	50	0.34	$5.98 \times 10^{-5}$	$3.26 \times 10^{-3}$	$3.66 \times 10^{-4}$	2.60(1.63-4.14)

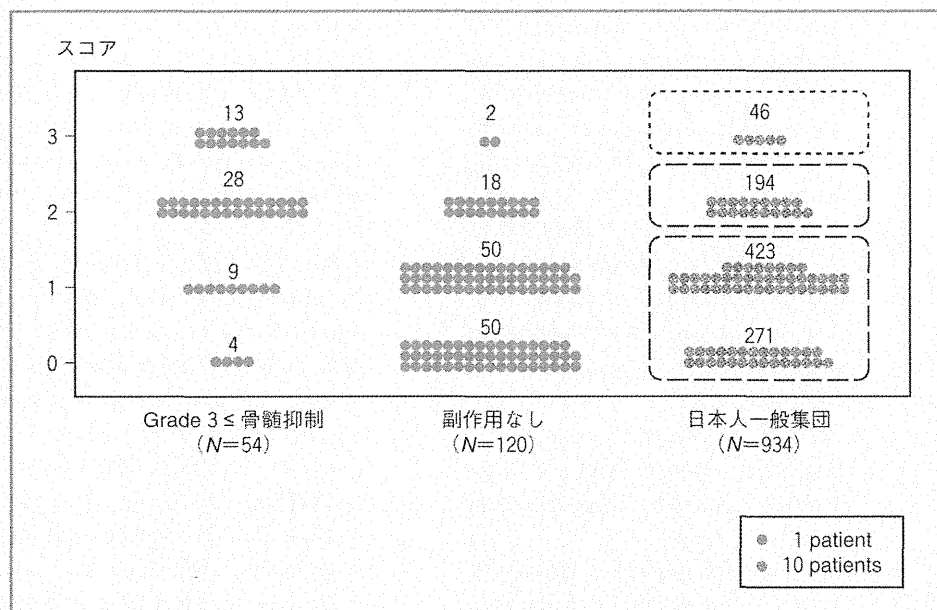


図2 4つの遺伝情報を用いたゲムシタピン骨髄抑制予測診断システム  
4つのSNPについて骨髄抑制リスクジェノタイプの合計数に応じて各症例をスコアリングした場合の分布図。

rs1901440は $P = 1.82 \times 10^{-2}$ 、1番染色体上のrs12046844は $P = 3.09 \times 10^{-2}$ 、3番染色体上のrs11719165は $P = 4.61 \times 10^{-2}$ を示した。さらに、この4 SNPについてGWASで用いたcaseおよびcontrol症例をそれぞれ加えて解析した結果、9番染色体上のrs11141915は $P = 1.27 \times 10^{-6}$ 、オッズ比4.10 (95% CI : 2.21-7.62)、2番染色体上のrs1901440は $P = 3.11 \times 10^{-6}$ 、オッズ比34.00 (95% CI : 4.29-269.48)、1番染色体上のrs12046844は $P = 4.56 \times 10^{-5}$ 、オッズ比4.13 (95% CI : 2.10-8.14)、3番染色体上のrs11719165は $P = 5.98 \times 10^{-5}$ 、オッズ比2.60 (95% CI : 1.63-4.14)を示し、この4 SNPを含む遺伝領域はゲムシタピンによる骨髄抑制となんらかの関連を示す結果となった。また、4遺伝領域のなかで9番染色体につい

てはdeath-associated protein kinase 1 (DAPK1)、1番染色体上の領域についてはphosphodiesterase 4B (PDE4B)という既知の遺伝子を含んでいた。

### 遺伝子多型情報を用いた ゲムシタピンによる 骨髄抑制予測診断モデル

ゲムシタピンによる骨髄抑制と関連が示唆された4SNPを用いた骨髄抑制予測診断システムについて検討を行った。4つのSNPについて骨髄抑制リスクに働くと考えられるgenotypeを有するSNPに各1点を与え、各症例合計点数別に骨髄抑制発現群(case)と副作用を認めなかった群(control)で分布を調べた結果が図2である。スコア0または1を示した113例中骨髄抑制群は11.5%、スコア2については

60.9%、スコア3については86.7%が骨髄抑制発現群であり、コントロール群に比べ有意に高いスコアを示すことが確認された(trend test  $P = 1.31 \times 10^{-11}$ )。さらに日本人一般集団をこのスコアリングシステムに当てはめた場合の分布を検討した結果、0点が29.0%、1点が45.3%、2点が20.8%、3点が4.9%になることが示され、このスコアリングシステムをゲムシタピン治療開始前に応用することで、骨髄抑制の危険性が少なく、より安全かつ適切な治療選択に有用となる可能性が示された(図2)。

### おわりに

最後に、今回同定された4つの遺伝子多型を含む遺伝領域はゲムシタピンによる骨髄抑制となんらかの関連があ

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

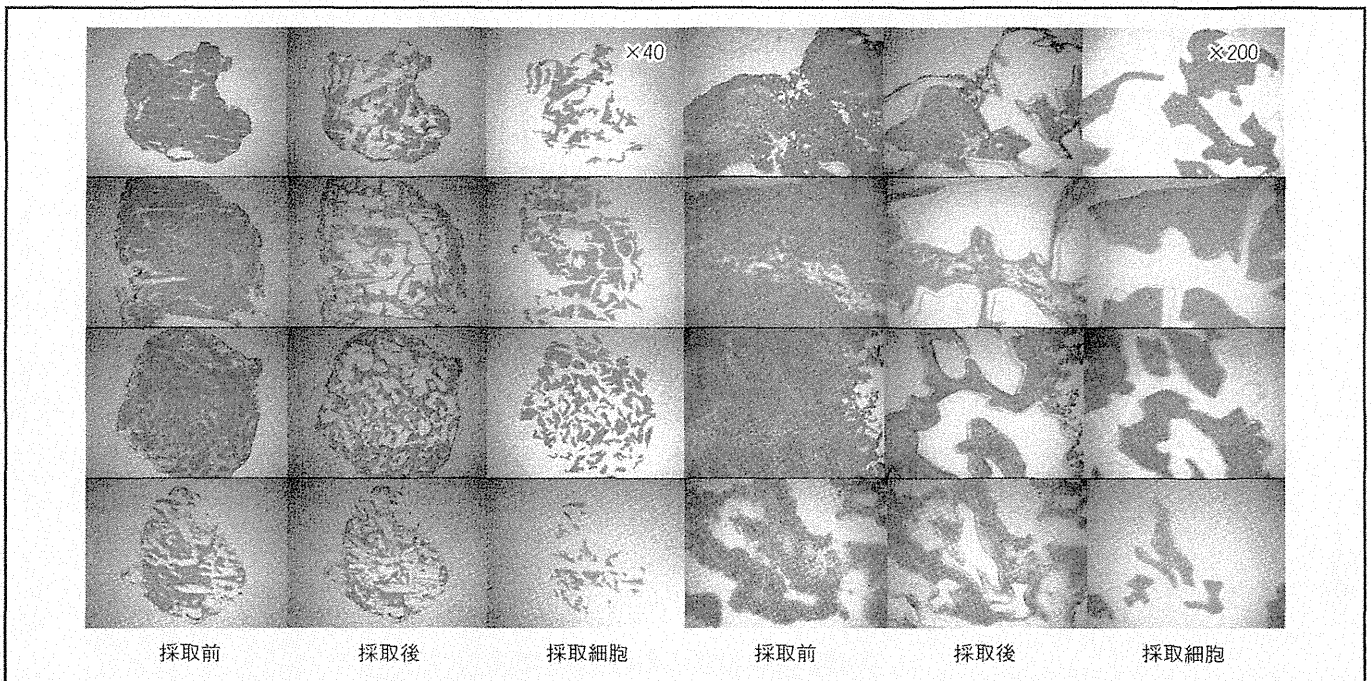


写真5 レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法による膀胱癌細胞の選択的採取  
 ⇒ p83

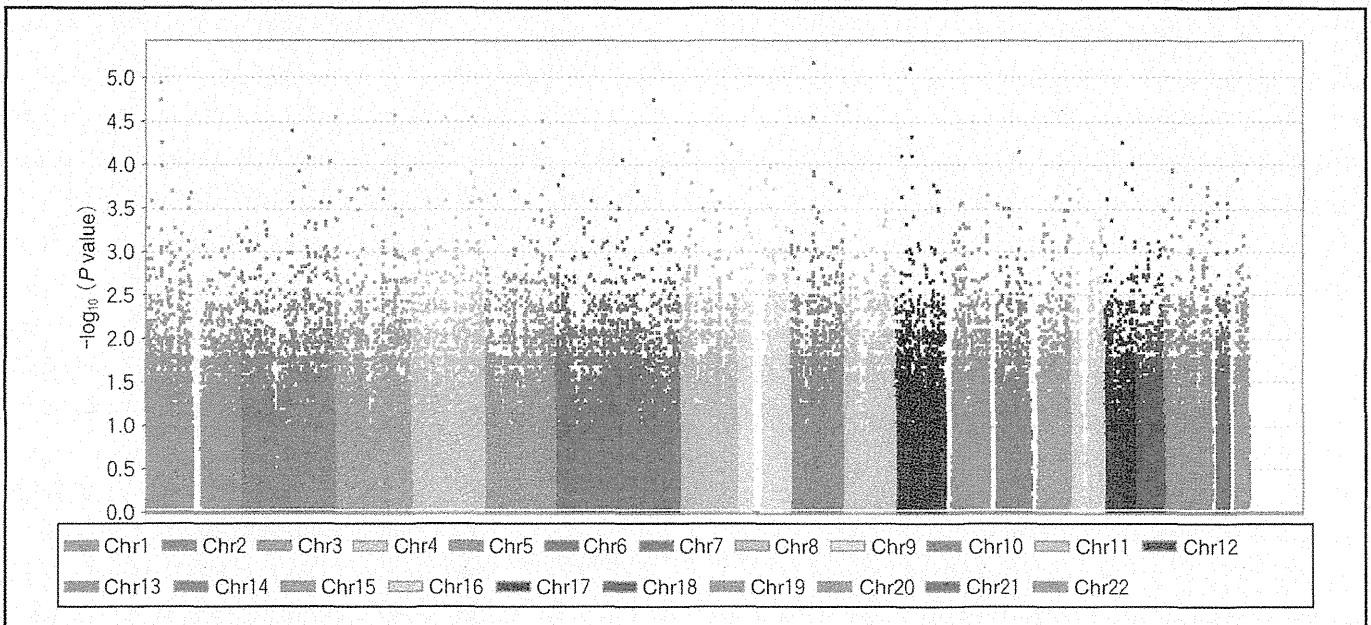


写真6 マンハッタンプロット

⇒ 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

Hiroshi 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> 3'UT 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



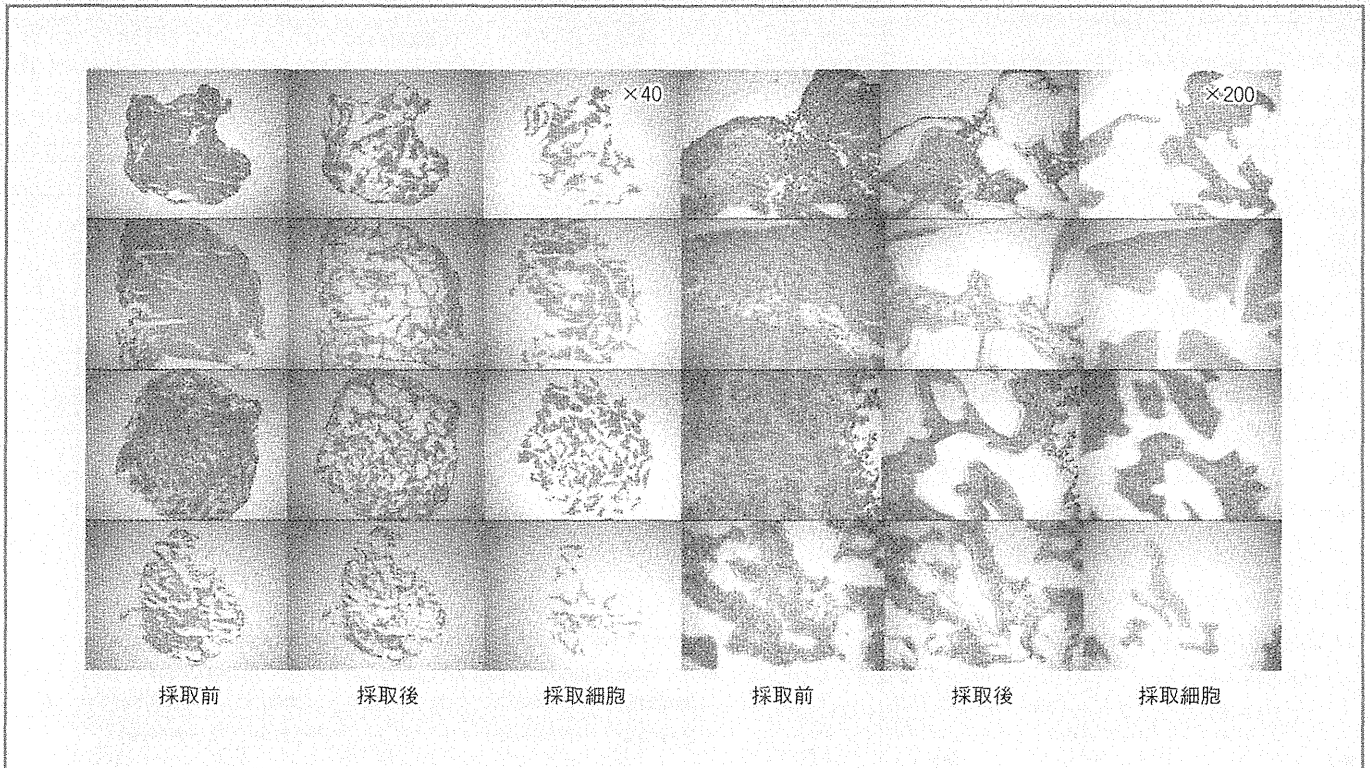


図1 レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法による膀胱癌細胞の選択的採取  
各症例に対して癌組織を生検しているが、ほぼ同じ大きさの生検組織でも癌細胞数が症例ごとで大きく異なっていることが認められる。  
(カラーグラビア p7 写真5参照)

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>2)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の中率が100% (10/10例)、陰性反応の中率は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ビ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ビンへの抵抗性

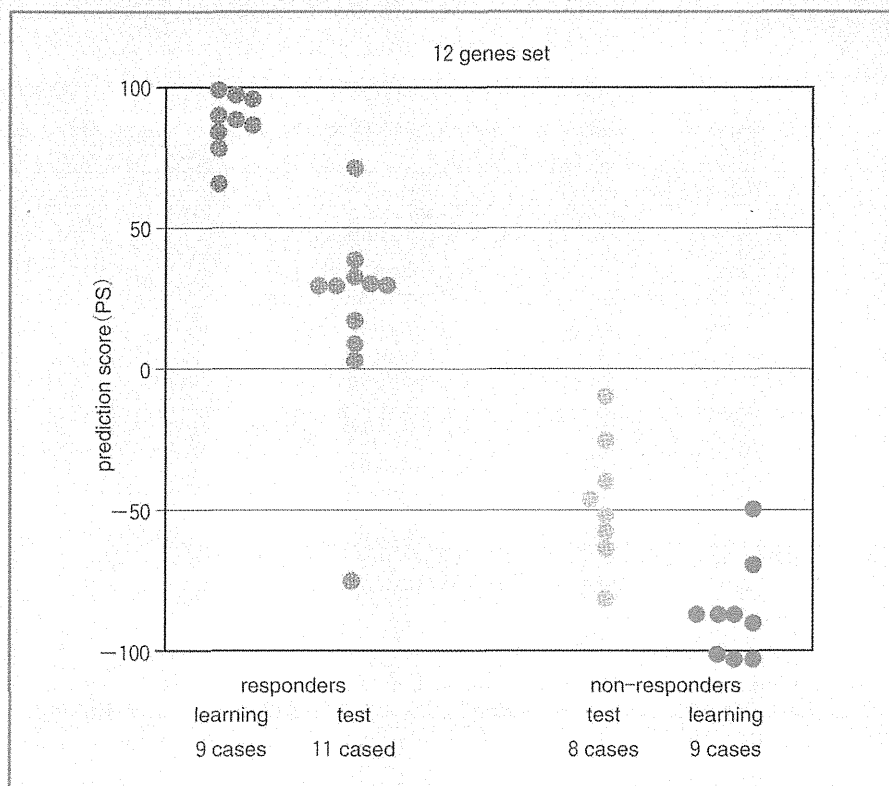


図2 学習症例・テスト症例におけるそれぞれの感受性予測スコア  
予測スコア (PS) が0以上の症例を感受性症例、未満を非感受性症例で示している。19例のテスト症例については感受性と予測された1例を除き、18例が正しく治療反応性に応じた予測スコアを示した。

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



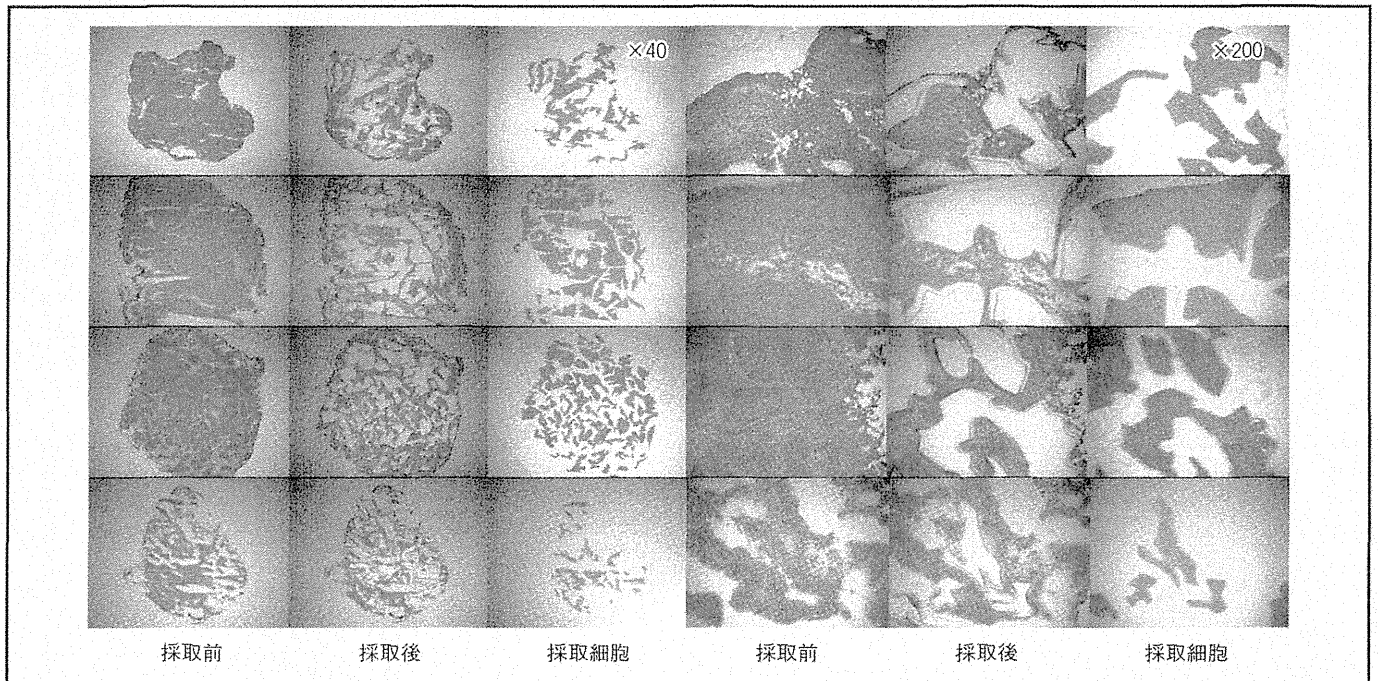


写真5 レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法による膀胱癌細胞の選択的採取  
 ⇒ p83

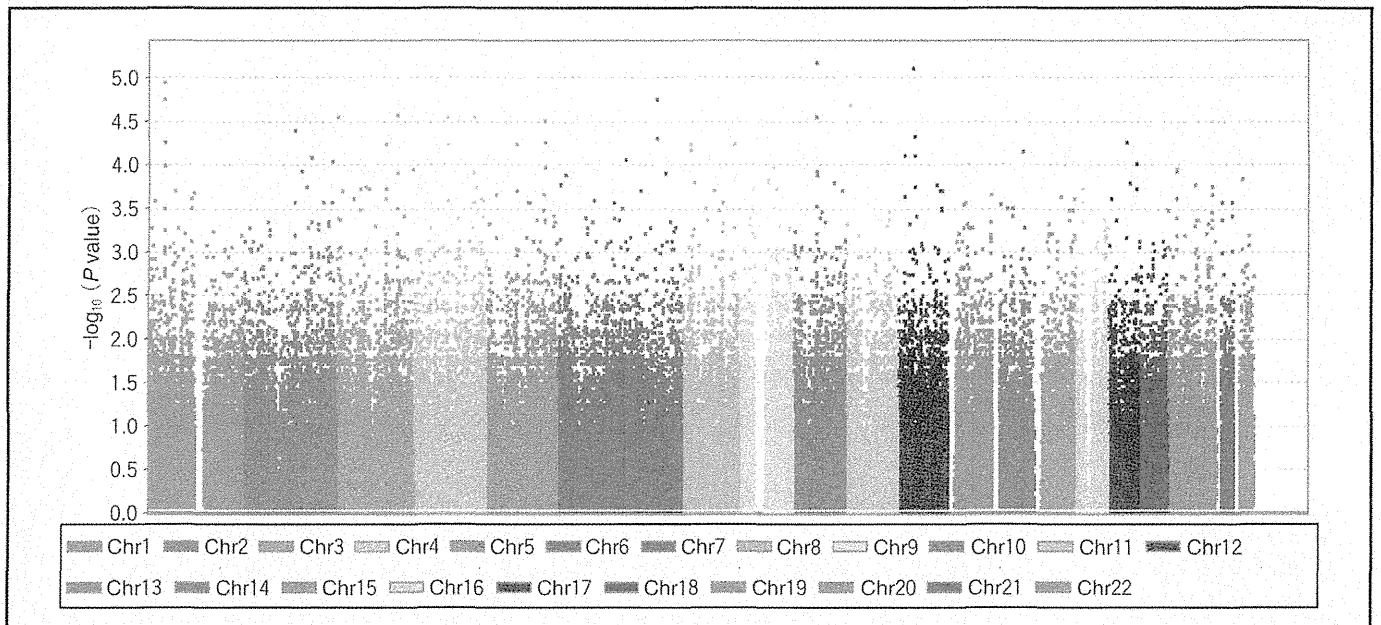


写真6 マンハッタンプロット

⇒ p87

# 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 Hitoshi Zembutsu Yusuke 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、卵巣癌をはじめとする骨盤内腫瘍の発生源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。

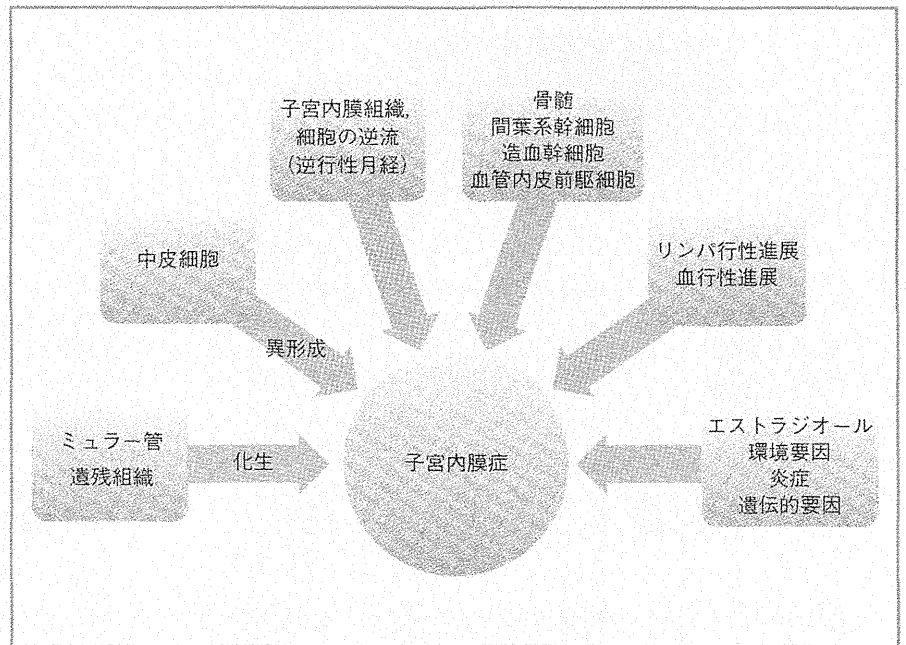


図1 子宮内膜症発症機序仮説

(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

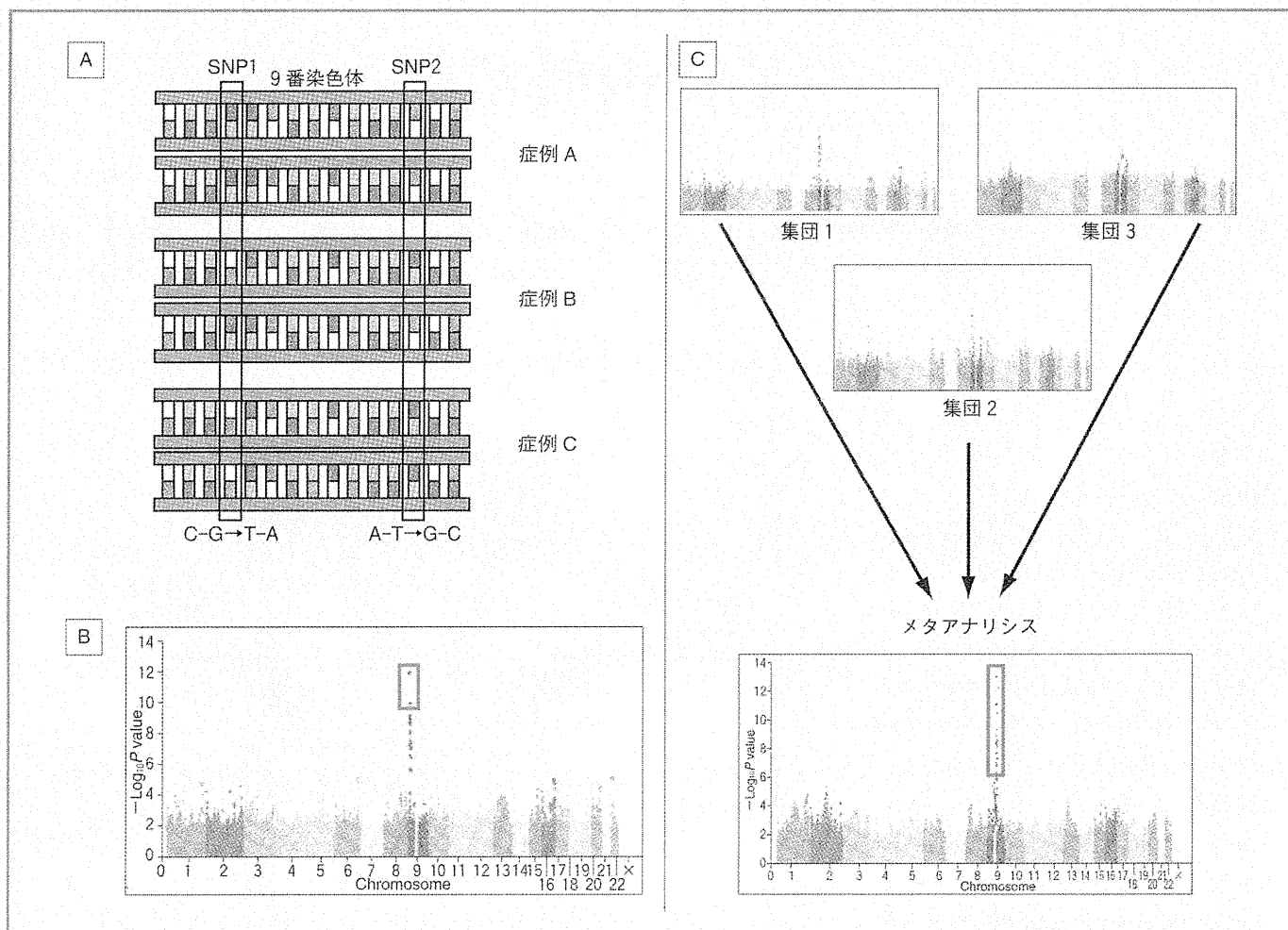


図2 GWASとメタアナリシス

- 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>3)</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>4)</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, Viganò 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



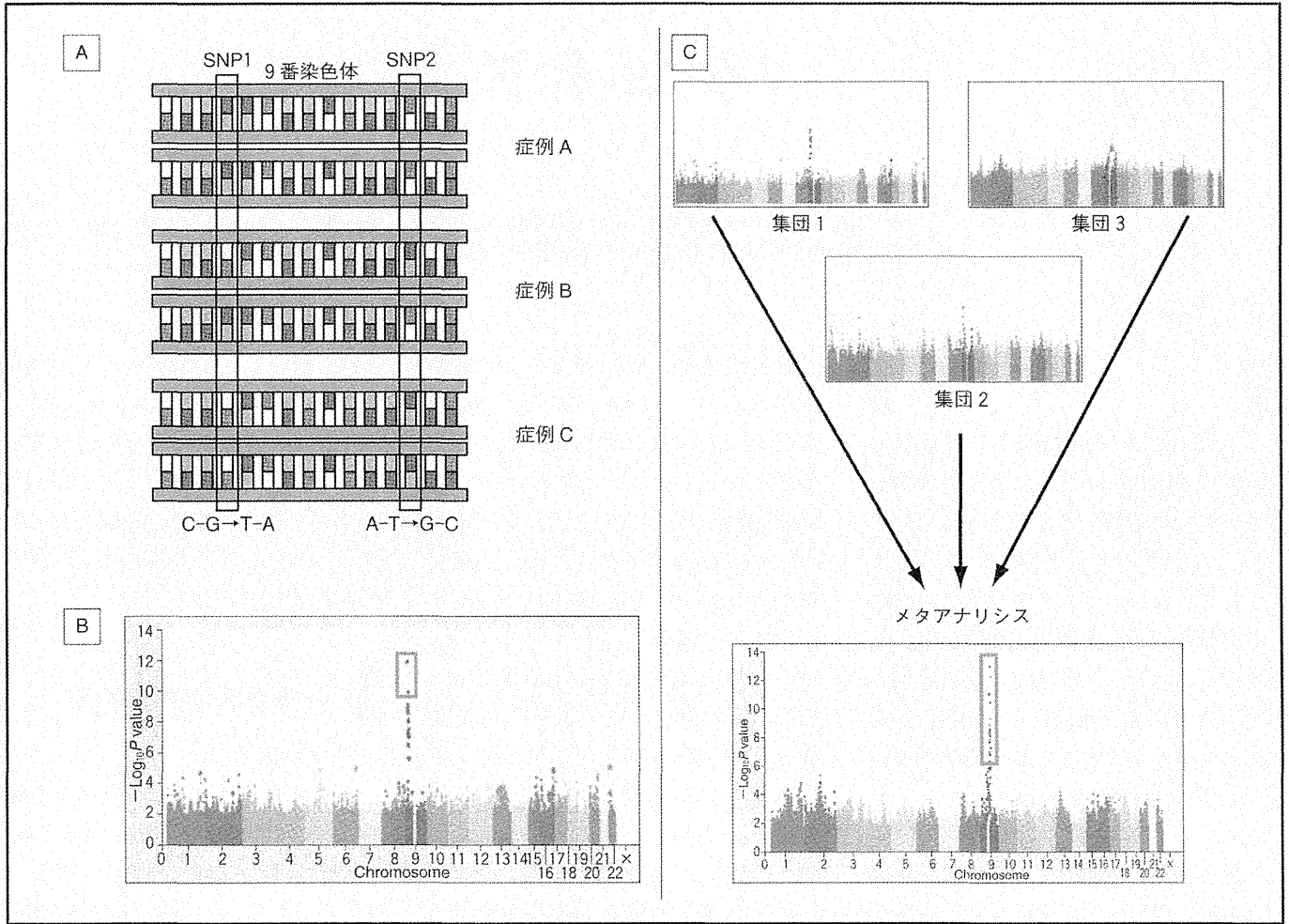


写真4 GWASとメタアナリシス

⇒ 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 について関連解析を行い、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た結果から、 $P$  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

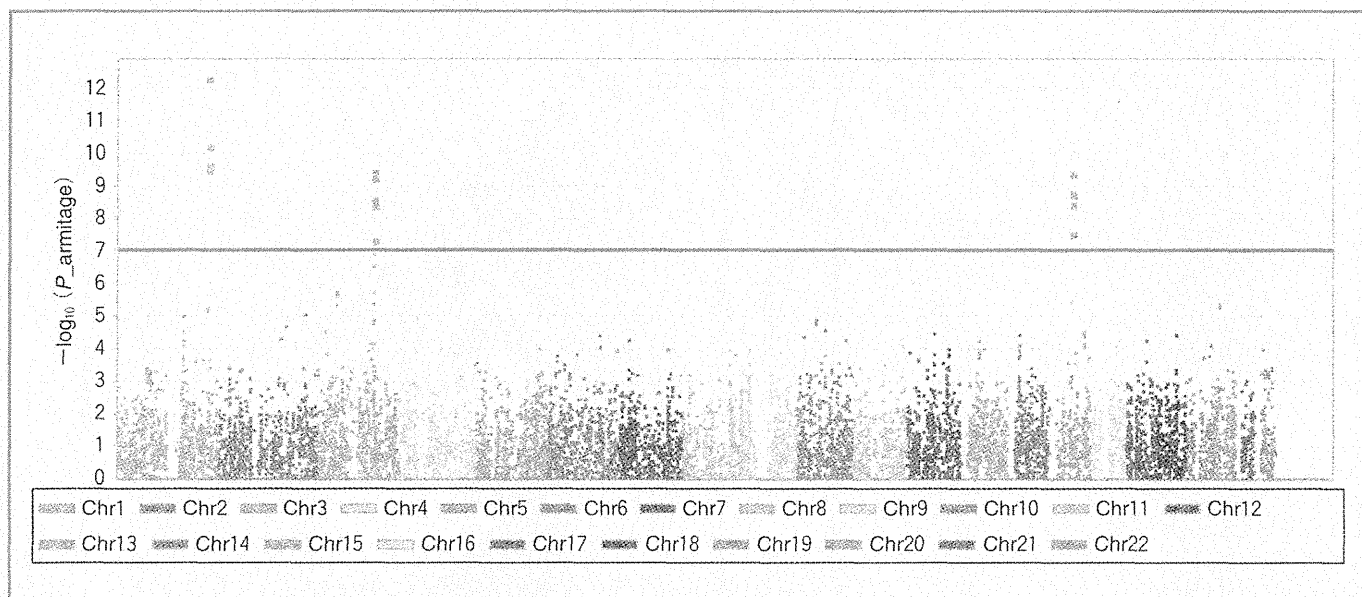


図1 ケロイドのゲノムワイド関連解析の結果

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	$2.48 \times 10^{-6}$	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	BPESC1	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	$1.80 \times 10^{-15}$	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)