

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

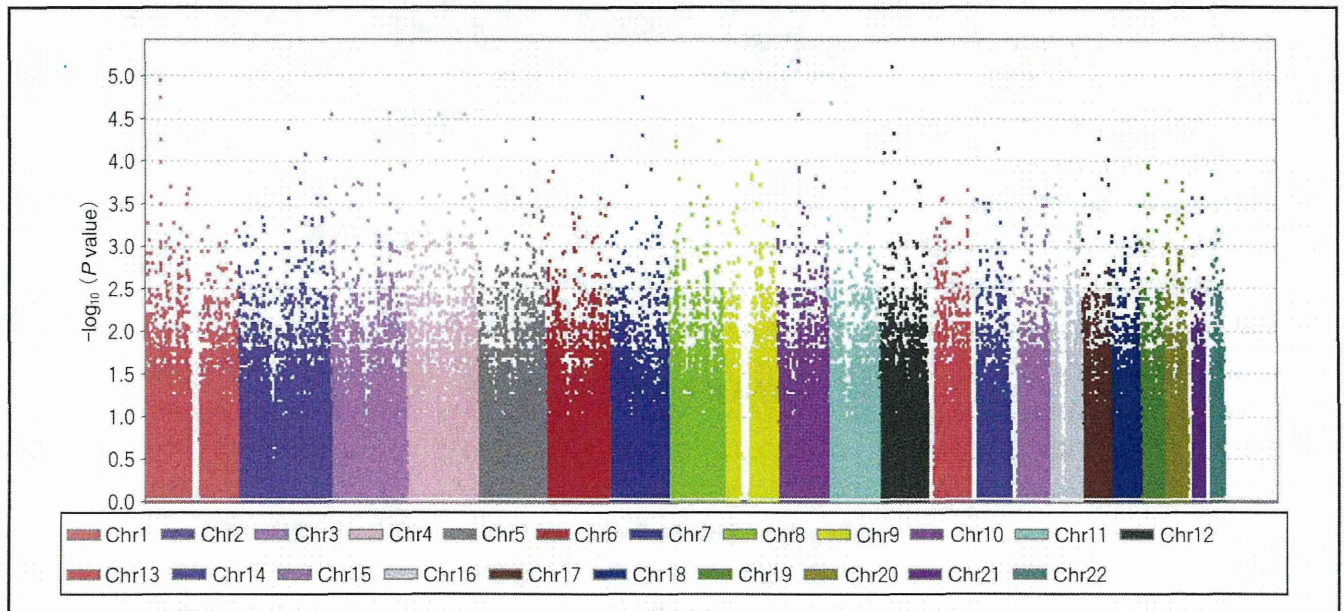


写真6 マンハッタンプロット

➔ 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 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。

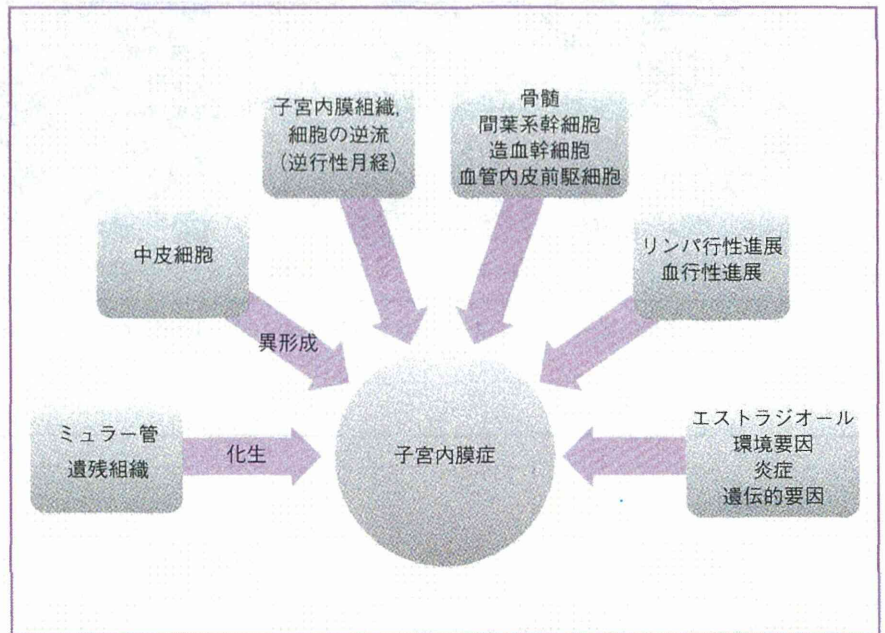


図 1 子宮内膜症発症機序仮説

(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

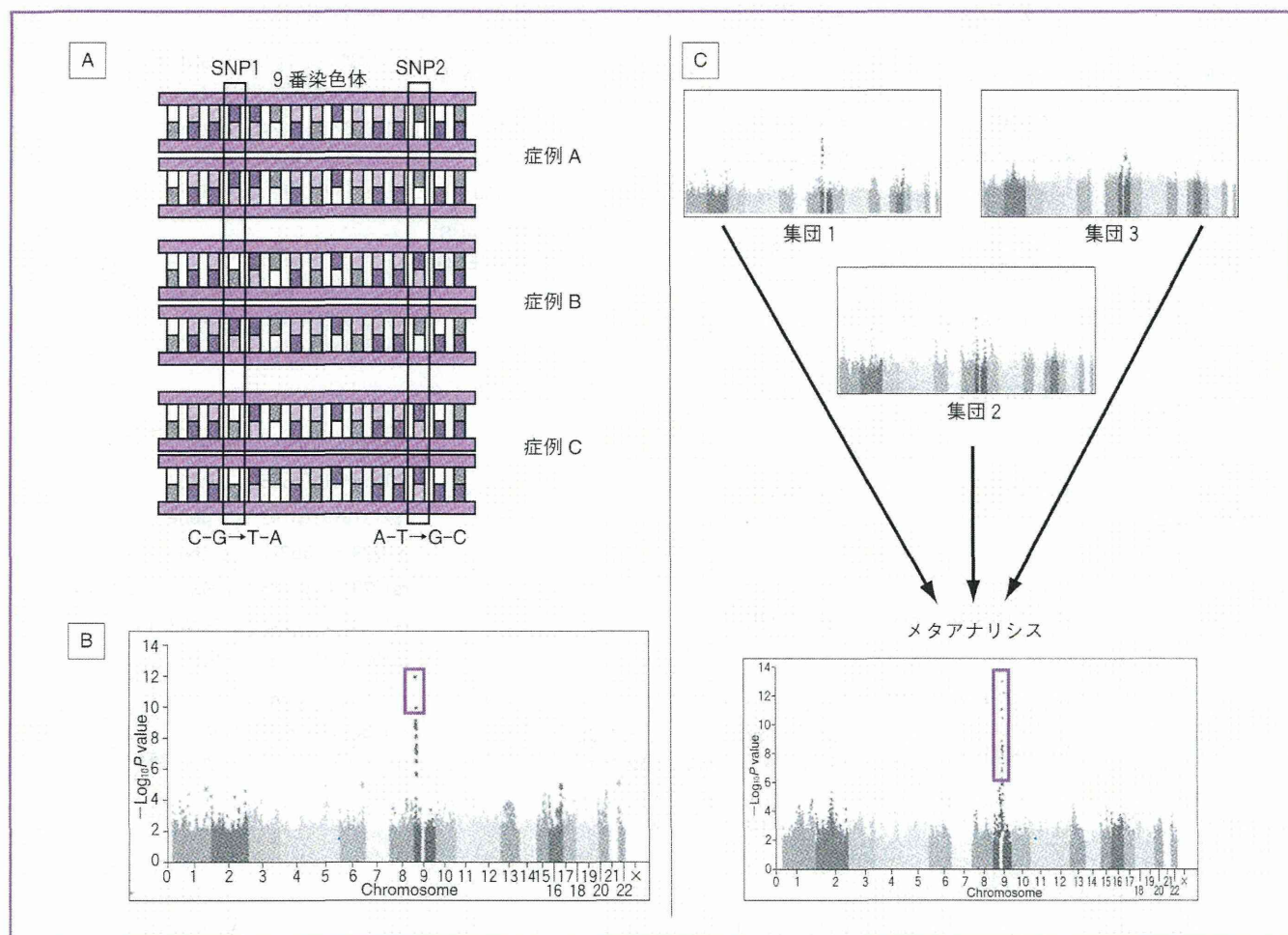


図2 GWASとメタアナリシス

- 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>FN1</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>FN1</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、现阶段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*, *FN1* 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

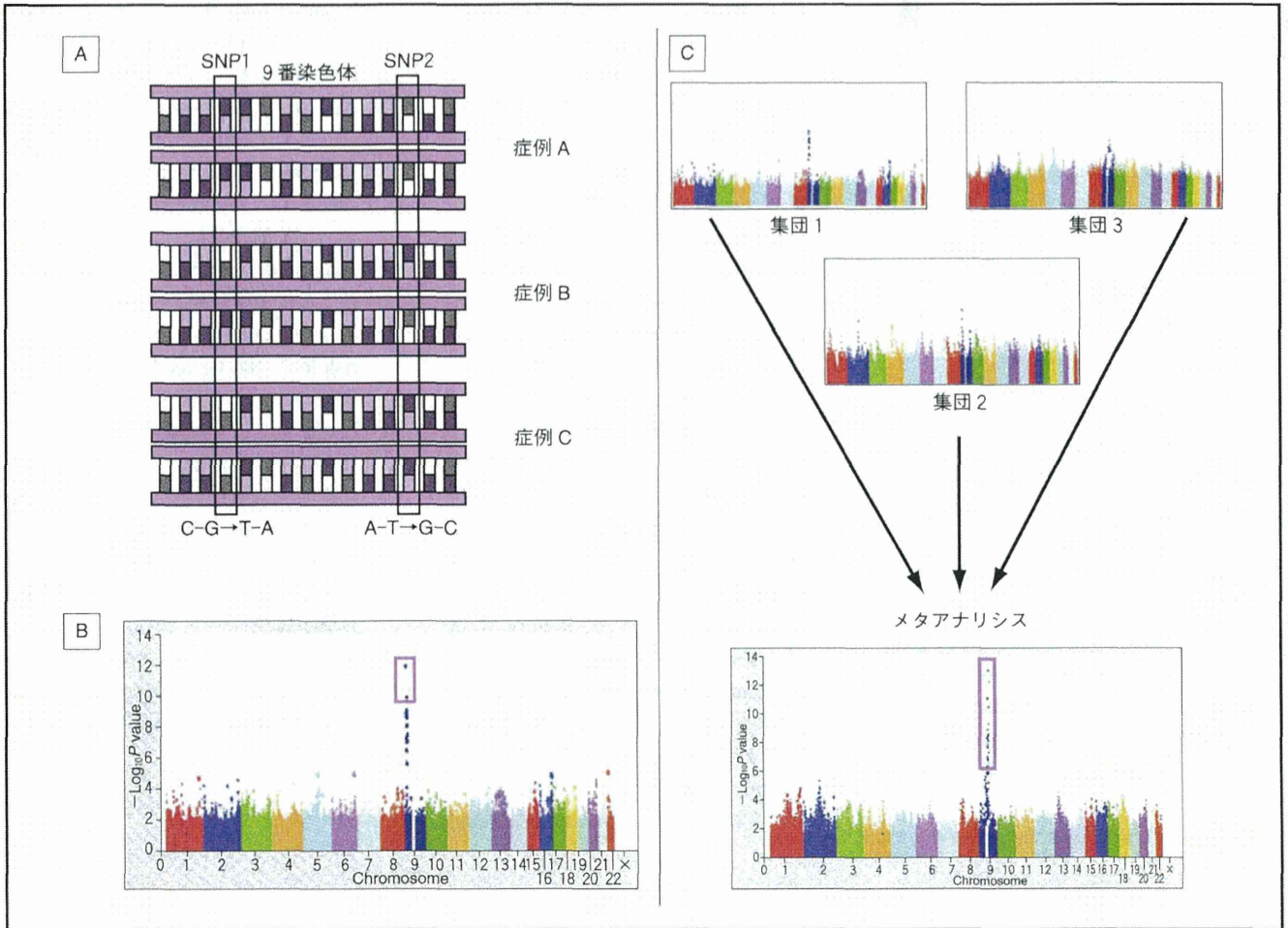


写真4 GWASとメタアナリシス

➔ 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

Surgery Frontier 20(2) : 66-71, 2013

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

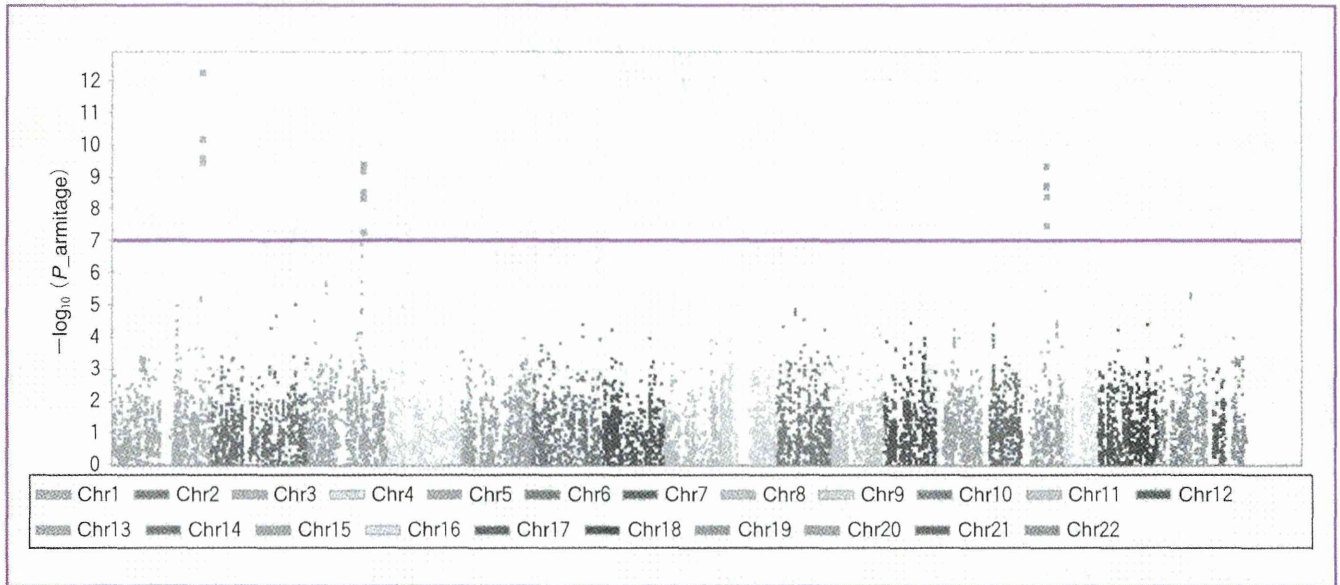


図1 ケロイドのゲノムワイド関連解析の結果

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	$1.61 \times 10^{-9}$	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)



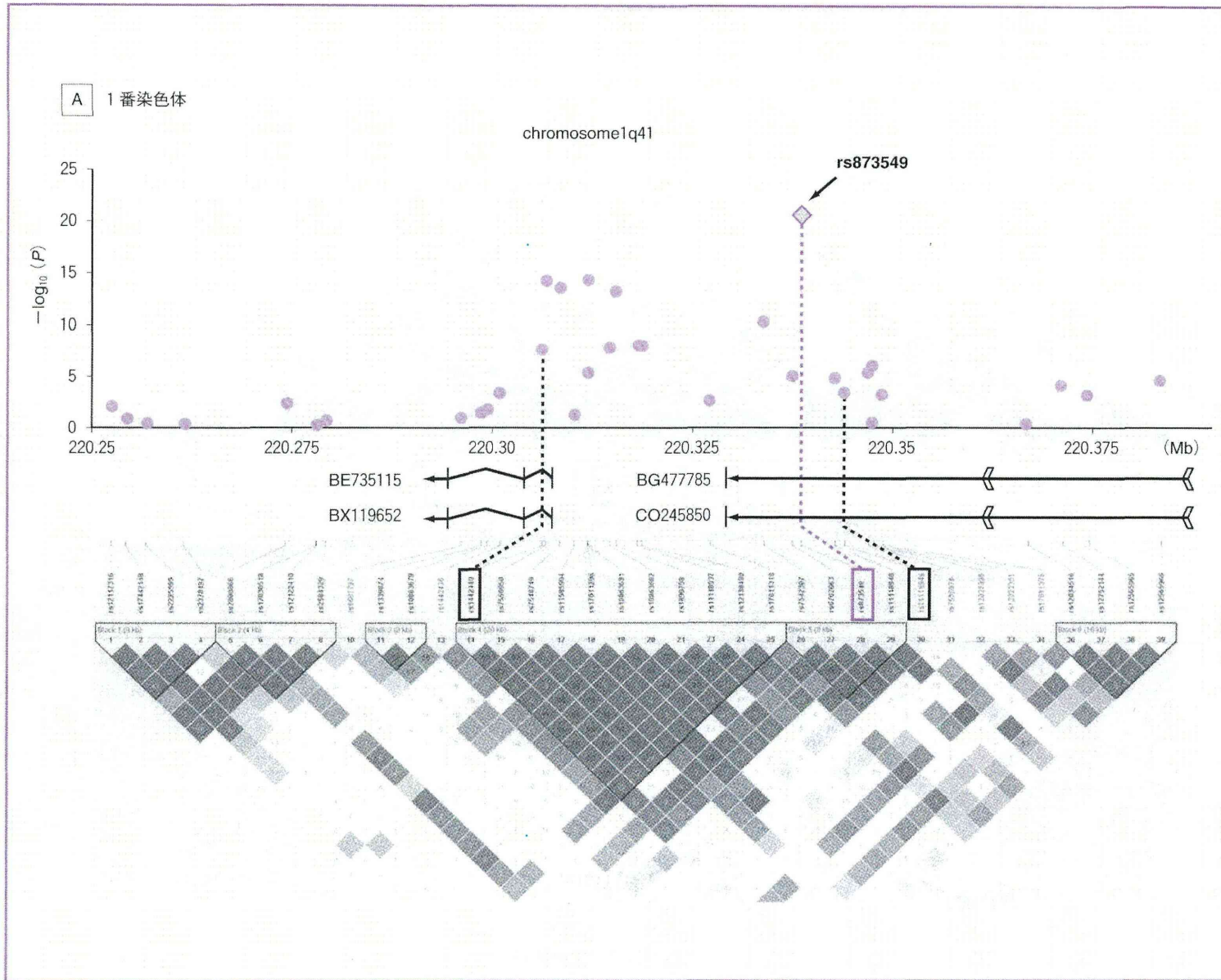


図2 ケロイドに関連する3領域

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)

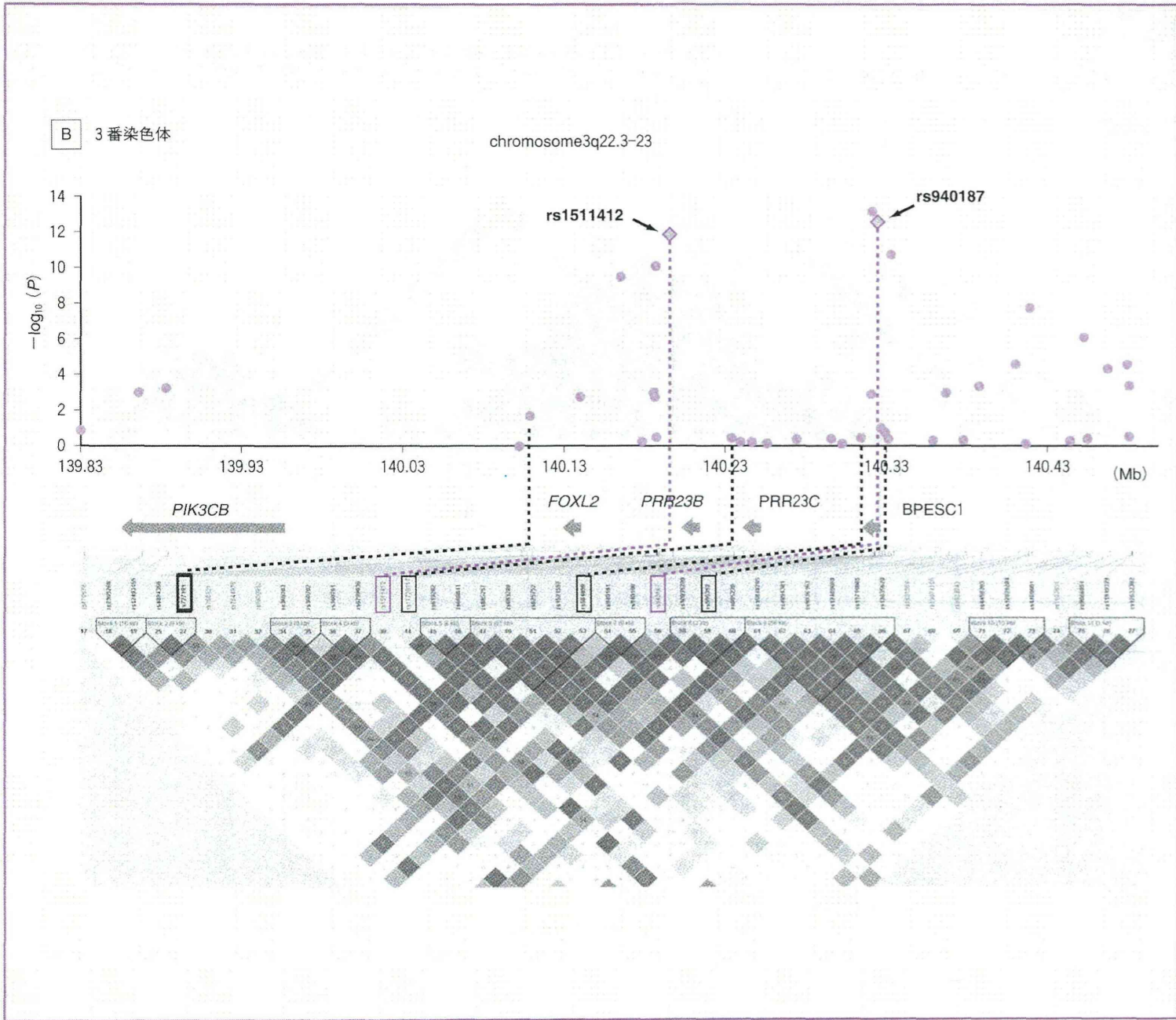


図2・ケロイドに関連する3領域