

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野)

血液検体のゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム解析に基づく、  
膵がん・肺がん等の高危険度群の補足のためのバイオマーカーの同定  
(H23-実用化(がん) 一般-002)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 吉田 輝彦  
(2012. 3月)

## 目 次

I. 総括研究報告	
全ゲノム関連 解析、エピゲノム解析、研究総括-----	1
吉田 輝彦	
II. 分担研究報告	
1. 血液検体のゲノム解析に基づく、肺がん高危険度群の補足のための バイオマーカーの同定に関する研究-----	7
河野 隆志	
軒原 浩	
渡辺 俊一	
2. 血中エクソソームmiRNAに関する研究-----	9
土屋 直人	
3. 遺伝素因と生活習慣等の交互作用の検討、コホート試料等解析-----	10
岩崎 基	
4. IGF-1遺伝子多型群の胃がん発生と予後への影響を明らかにする研究-----	16
伊藤 秀美	
5. プロテオーム解析に関する研究-----	22
尾野 雅哉	
6. 逆相血漿マイクロアレイによる膵がん血漿診断マーカーの開発- -ApoAII ホモダイマーC末端修飾体早期膵がん診断マーカーキットの開発- -血漿・血清診断マーカーのためのバイオバンク構築-----	26
本田一文	
鄭 基晩	
金田 隆	
加藤仁夫	
7. 血清・血漿検体収集・管理-----	30
井上真奈美	
8. 膵がんバイオマーカーの定量質量分析-----	32
寺崎哲也	
大槻純男	
立川正憲	
内田康雄	
9. 膵臓がん患者における血清メタボローム解析-----	35
吉田 優	
10. 水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン $\alpha$ の測定キット開発に関する研究-----	36
宮本顕友	
品川真吾	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	38
IV. 研究成果の刊行物・別刷	別添

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)  
(総括) 研究報告書

血液検体のゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム解析に基づく、  
膵がん・肺がん等の高危険度群の補足のためのバイオマーカーの同定

研究代表者 吉田 輝彦 立がん研究センター 研究所 遺伝医学研究分野 分野長

研究要旨 難治がんに完治を期待するためには早期診断が必須である。本研究の目的は、末梢血検体のオミックス情報を用いて発がん高危険度群を適格に捕捉する指標の確立である。それにより適格な一次・二次予防行動を導き、生涯持続型個別化予防医療を目指す。①ゲノム解析では、肺がんの先行 GWAS の検証を終え、バイオバンクジャパン症例等を用いた2次スクリーニングを開始した。未分化型胃腺がん GWAS で得られた候補遺伝子の生物学的意義の解析を進めた。②エピゲノム解析では、末梢血白血球の global methylation level と、膵がんのリスク要因と考えられる葉酸摂取、性ホルモンレベル等との関連を解析し、いずれも単独では主要な交絡因子にはならないことを示唆した。③トランスクリプトーム解析では、膵臓がん患者血漿で有意に高値を示すエクソソーム miRNA を複数同定した。④プロテオーム解析では、対照群として重要な健常者血清・血漿検体バンキングを開始した。膵がんの新規マーカーとして、ApoAIIIC 末端グルタミン欠失体と非欠失体に対する特異抗体、並びにプロリン水酸化修飾  $\alpha$ -フィブリノーゲンに対する抗体を用いたサンドイッチ ELISA をそれぞれ開発し、後者については体外診断薬化の前段階として研究用試薬をキット化した。⑤メタボローム解析では、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた血清中水溶性代謝物の網羅的解析システムを確立し、乳酸や 2-ヒドロキシ酪酸などが、膵臓がん患者群で、健常人群と比較し有意に上昇することを明らかにした。

研究分担者

河野 隆志 国立がん研究センター 研究所

ゲノム生物学研究分野 分野長

軒原 浩 同中央病院・呼吸器腫瘍科 外来医長

渡辺 俊一 同中央病院・呼吸器腫瘍科 医長

久保 充明 理化学研究所ゲノム医科学研究センター

副センター長

土屋 直人 国立がん研究センター・研究所

発がんシステム研究分野 ユニット長

岩崎 基 国立がん研究センター研究所

がん予防・検診研究センター予防研究部 室長

伊藤 秀美 愛知がんセンター研究所

免学予防部・がん免疫 室長

尾野雅哉 国立がん研究センター研究所・創薬臨床研

究分野 ユニット長

本田一文 国立がん研究センター研究所

創薬臨床研究分野 ユニット長

鄭基晩 東レ株式会社先端融合研究所

金田 隆 日本大学松戸歯学部 放射線学講座 教授

加藤仁夫 日本大学松戸歯学部 インプ

ラント学講座 准教授

井上 真奈美 国立がん研究センター

がん予防・検診研究センター 予防研究部 室長

寺崎哲也 東北大学大学院薬学研究科 教授

大槻純男 熊本大学大学院生命科学研究部 教授

(前)東北大学大学院薬学研究科 准教授

立川正憲 東北大学大学院薬学研究科 准教授

内田康雄 東北大学大学院薬学研究科 助教

吉田 優 神戸大学大学院医学研究科病因病態解析学

野・准教授

宮本 顕友 株式会社トランスジェニック・グループリーダー

品川 真吾 株式会社トランスジェニック・研究員

## A. 研究目的

難治がんにて完治が期待できる治療法の外科切除には早期診断が必須である。末梢血検体に焦点を絞ったオミックス情報と生活習慣情報等との統合解析により精密検査が必要となる高危険度群捕捉指標を確立する。それにより個人に最適化された一次・二次予防行動を導くための発がん高危険度群を捕捉し、生涯持続型個別化予防医療を目指す。具体的には、スクリーニングに適している末梢血検体に焦点を当て、多層的オミックス解析により複合的な情報を引き出す。我が国を代表する全国型疫学コホート研究、大規模受診者・検診受検者コホートバイオバンクの協力を得るとともに、基礎及び臨床系研究者と疫学・公衆衛生研究者の協同により予防医学への橋渡しを目指す。

本研究が対象とする難治がんとしては、膵がん・肺がん・スキルス胃がんを含む未分化型胃腺がん等を選択する。末梢血の多層的オミックス解析を、ゲノム系と、非ゲノム系に大別し、前者をさらに①ゲノム(個人の固定発がんリスクとしての多型)、②エピゲノム(ゲノムへの加齢・生活習慣等の影響を反映する指標としての末梢血 DNA の global メチル化レベル)、③トランスクリプトーム(がんの存在指標としての血中 exosome miRNA プロファイル))に分ける。ゲノム系以外では、④プロテオームと⑤メタボロームに分ける。これらの分子情報と生活習慣情報等との統合的解析により高危険度群を捕捉し、画像診断等による精密検査を組み入れた検診プログラム等の有効な予防手段を、それを必要とする人々に生涯を通して継続的・重点的に届ける次世代型個別化がん予防医療技術を提案する。

## B. 研究方法

上記①～⑤の各種オミックスバイオマーカー情報と、コホート研究による生活習慣因子等との交互作用の解析結果等を勘案することで、高危険度群を定量的に捕捉するオミックス及び生活習慣情報の複合的な指標(スコア等)を考案する。

網羅的解析から抽出される複合診断指標は前向き研究による検証と、指標の生物学的意義の解明・説明が

重要である。国立がん研究センター及び愛知県がんセンターでは施設の組織的取り組みとして全初診患者の末梢血試料のゲノムコホートバンキングを進めており、これをさらなる検証セットとして本研究成果の改訂を重ねていく。

また、研究全体を通して、適切な層別化を行うなど試料に付随する臨床情報の収集・活用に努めるとともに、実用化可能な成果導出のため臨床的・公衆衛生的観点から随時、研究内容や戦略の見直しを行う。

各オミックス解析の方法の概要は以下の通り:

①先行 GWAS の検証を行い(H23-24)、発がんの遺伝素因及び生活習慣・環境要因等との交互作用を明らかにする(H24-25)。具体的には肺がん・胃がん等の先行 GWAS の多段階スクリーニングを進め、遺伝子型オッズ比 1.2 以上、P 値  $10^{-5}$  以下、リスクアレル頻度 0.2 以上の遺伝素因を各がん 3 個程度同定し、組合せオッズ比を計算する。バイオバンクジャパンや愛知県がんセンター受診者コホートの解析、女性非喫煙者肺がん・EGFR 変異肺腺がん等の層別化解析、CT 検診すりガラス陰影(GGO)を指標とした肺腺腫リスクに関する関連解析を行い、遺伝素因の検証を行う。

②約 1000 例に対して末梢血 DNA の global メチル化レベルを定量してがん罹患や生活習慣要因等との関連を解析、ゲノムストレス指標としての評価を行う(H23-24)。具体的にはがん罹患のない対照群について、LUMA 法、あるいはアレイ技術を用いて末梢血 DNA の global メチル化レベルを定量し、年齢や生活習慣因子等との関連を調べる。ついで、適切な症例対照セットを用いて、がん罹患との関連を解析する

③血漿・血清中 exosome に含まれる miRNA のプロファイリング並びに候補 miRNA の定量を行い、早期がん存在指標としての有用性等を評価する(H23-25)。具体的には膵がんと肺がん等の培養細胞株と臨床検体を用いて miRNA アレイ等により exosome miRNA をプロファイリングし、がん種特異的な miRNA セット(約 10 miRNA)の絞込みと multiplex qRT-PCR による検出特異性・感度の検証・最適化を行う。

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)  
(総活) 研究報告書

血液検体のゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム解析に基づく、  
膵がん・肺がん等の高危険度群の補足のためのバイオマーカーの同定

研究代表者 吉田 輝彦 立がん研究センター 研究所 遺伝医学研究分野 分野長

研究要旨 難治がんに完治を期待するためには早期診断が必須である。本研究の目的は、末梢血検体のオミックス情報を用いて発がん高危険度群を適格に捕捉する指標の確立である。それにより適格な一次・二次予防行動を導き、生涯持続型個別化予防医療を目指す。①ゲノム解析では、肺がんの先行 GWAS の検証を終え、バイオバンクジャパン症例等を用いた2次スクリーニングを開始した。未分化型胃腺がん GWAS で得られた候補遺伝子の生物学的意義の解析を進めた。②エピゲノム解析では、末梢血白血球の global methylation level と、膵がんのリスク要因と考えられる葉酸摂取、性ホルモンレベル等との関連を解析し、いずれも単独では主要な交絡因子にはならないことを示唆した。③トランスクリプトーム解析では、膵臓がん患者血漿で有意に高値を示すエクソソーム miRNA を複数同定した。④プロテオーム解析では、対照群として重要な健常者血清・血漿検体バンキングを開始した。膵がんの新規マーカーとして、ApoAIIIC 末端グルタミン欠失体と非欠失体に対する特異抗体、並びにプロリン水酸化修飾  $\alpha$ -フィブリノーゲンに対する抗体を用いたサンドイッチ ELISA をそれぞれ開発し、後者については体外診断薬化の前段階として研究用試薬をキット化した。⑤メタボローム解析では、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた血清中水溶性代謝物の網羅的解析システムを確立し、乳酸や 2-ヒドロキシ酪酸などが、膵臓がん患者群で、健常人群と比較し有意に上昇することを明らかにした。

研究分担者

河野 隆志 国立がん研究センター 研究所  
ゲノム生物学研究分野 分野長  
軒原 浩 同中央病院・呼吸器腫瘍科 外来医長  
渡辺 俊一 同中央病院・呼吸器腫瘍科 医長  
久保 充明 理化学研究所ゲノム医科学研究センター  
副センター長  
土屋 直人 国立がん研究センター・研究所  
発がんシステム研究分野 ユニット長  
岩崎 基 国立がん研究センター研究所  
がん予防・検診研究センター予防研究部 室長  
伊藤 秀美 愛知がんセンター研究所  
免疫予防部・がん免疫 室長  
尾野雅哉 国立がん研究センター研究所・創薬臨床研  
究分野 ユニット長  
本田一文 国立がん研究センター研究所  
創薬臨床研究分野 ユニット長

鄭基晩 東レ株式会社先端融合研究所  
金田 隆 日本大学松戸歯学部 放射線学講座 教授  
加藤仁夫 日本大学松戸歯学部 イン  
ラント学講座 准教授  
井上 真奈美 国立がん研究センター  
がん予防・検診研究センター 予防研究部 室長  
寺崎哲也 東北大学大学院薬学研究科 教授  
大槻純男 熊本大学大学院生命科学研究部 教授  
(前)東北大学大学院薬学研究科 准教授  
立川正憲 東北大学大学院薬学研究科 准教授  
内田康雄 東北大学大学院薬学研究科 助教  
吉田 優 神戸大学大学院医学研究科病因病態解析学  
分野・准教授  
宮本 顕友 株式会社トランスジェニック・グループリーダ  
品川 真吾 株式会社トランスジェニック・研究員

## A. 研究目的

難治がんにて完治が期待できる治療法の外科切除には早期診断が必須である。末梢血検体に焦点を絞ったオミックス情報と生活習慣情報等との統合解析により精密検査が必要となる高危険度群捕捉指標を確立する。それにより個人に最適化された一次・二次予防行動を導くための発がん高危険度群を捕捉し、生涯持続型個別化予防医療を目指す。具体的には、スクリーニングに適している末梢血検体に焦点を当て、多層的オミックス解析により複合的な情報を引き出す。我が国を代表する全国型疫学コホート研究、大規模受診者・検診受検者コホートバイオバンクの協力を得るとともに、基礎及び臨床系研究者と疫学・公衆衛生研究者の協同により予防医学への橋渡しを目指す。

本研究が対象とする難治がんとしては、膵がん・肺がん・スキルス胃がんを含む未分化型胃腺がん等を選択する。末梢血の多層的オミックス解析を、ゲノム系と、非ゲノム系に大別し、前者をさらに①ゲノム(個人の固定発がんリスクとしての多型)、②エピゲノム(ゲノムへの加齢・生活習慣等の影響を反映する指標としての末梢血 DNA の global メチル化レベル)、③トランスクリプトーム(がんの存在指標としての血中 exosome miRNA プロファイル))に分ける。ゲノム系以外では、④プロテオームと⑤メタボロームに分ける。これらの分子情報と生活習慣情報等との統合的解析により高危険度群を捕捉し、画像診断等による精密検査を組み入れた検診プログラム等の有効な予防手段を、それを必要とする人々に生涯を通して継続的・重点的に届ける次世代型個別化がん予防医療技術を提案する。

## B. 研究方法

上記①～⑤の各種オミックスバイオマーカー情報と、コホート研究による生活習慣因子等との交互作用の解析結果等を勘案することで、高危険度群を定量的に捕捉するオミックス及び生活習慣情報の複合的な指標(スコア等)を考案する。

網羅的解析から抽出される複合診断指標は前向き研究による検証と、指標の生物学的意義の解明・説明が

重要である。国立がん研究センター及び愛知県がんセンターでは施設の組織的取り組みとして全初診患者の末梢血試料のゲノムコホートバンキングを進めており、これをさらなる検証セットとして本研究成果の改訂を重ねていく。

また、研究全体を通して、適切な層別化を行うなど試料に付随する臨床情報の収集・活用に努めるとともに、実用化可能な成果導出のため臨床的・公衆衛生的観点から随時、研究内容や戦略の見直しを行う。

各オミックス解析の方法の概要は以下の通り:

①先行 GWAS の検証を行い(H23-24)、発がんの遺伝素因及び生活習慣・環境要因等との交互作用を明らかにする(H24-25)。具体的には肺がん・胃がん等の先行 GWAS の多段階スクリーニングを進め、遺伝子型オッズ比 1.2 以上、P 値 10<sup>-5</sup> 以下、リスクアレル頻度 0.2 以上の遺伝素因を各がん 3 個程度同定し、組合せオッズ比を計算する。バイオバンクジャパンや愛知県がんセンター受診者コホートの解析、女性非喫煙者肺がん・EGFR 変異肺腺がん等の層別化解析、CT 検診すりガラス陰影(GGO)を指標とした肺腺腫リスクに関する関連解析を行い、遺伝素因の検証を行う。

②約 1000 例に対して末梢血 DNA の global メチル化レベルを定量してがん罹患や生活習慣要因等との関連を解析、ゲノムストレス指標としての評価を行う(H23-24)。具体的にはがん罹患のない対照群について、LUMA 法、あるいはアレイ技術を用いて末梢血 DNA の global メチル化レベルを定量し、年齢や生活習慣因子等との関連を調べる。ついで、適切な症例対照セットを用いて、がん罹患との関連を解析する

③血漿・血清中 exosome に含まれる miRNA のプロファイリング並びに候補 miRNA の定量を行い、早期がん存在指標としての有用性等を評価する(H23-25)。具体的には膵がんと肺がん等の培養細胞株と臨床検体を用いて miRNA アレイ等により exosome miRNA をプロファイリングし、がん種特異的な miRNA セット(約 10 miRNA)の絞込みと multiplex qRT-PCR による検出特異性・感度の検証・最適化を行う。

④多目的コホート研究等で大規模に蓄積してきた血漿試料に加え、新規に非がん患者等の血清・血漿バンクを構築し(H23-24)、定量質量分析及びプロテオームバイオマーカー候補分子に対する特異的抗体作成・測定系構築等を行う(H24-25)。具体的には約6万人のコホートより発症している約140例の膵がん症例の発症前検体の解析を行う。採血・保存方法を標準化し、膵がん患者および対照として人間ドックや歯科を受診する健常者、慢性膵炎患者等の検体を収集し、プロテオーム解析を行う。

また、2D-Mapping法によって膵がん特異的の自己抗体を同定し、酵素免疫測定法を確立、早期診断バイオマーカーとしての有用性を評価する。

修飾アポリポ A2 及びフィブリノーゲンタンパク質に対して、適宜特異的抗体の工業的作成やサンドイッチアッセイ構築を行い、測定系を確立し、体外薬診断薬として承認申請の準備を行う。

特異抗体が得られないタンパク質に対しては MRM (Multiple Reaction Monitoring) による絶対定量系を構築、血液検体の前処理方法及び分離条件を最適化し、バイオマーカーの2次スクリーニングを行う。

⑤多目的コホート研究等で大規模に蓄積してきた血漿試料に加え、新規に非がん患者等の血清・血漿バンクを構築し(H23-24)、メタボローム解析や測定系の検討を行う(H24-25)。具体的には血清からメタノール・クロロホルムを用いて水溶性代謝物を抽出し、各種質量分析計を用いた独自開発の血清中の水溶性・脂溶性代謝物の網羅的解析技術・統計解析手法を用いて、がん患者特異的な変動を明らかにする。

## C. 研究結果

①ゲノム解析では、肺腺がんリスクに関する GWAS (1次)スクリーニングデータに基づき、バイオバンクジャパン症例等を用いた2次スクリーニングを行い、候補8座を得た。現在、国立がんセンター症例を用いた3次スクリーニングを進めている。また、計画通り、肺腺腫関連解析に用いる予防検診研究センター検診例を決

定した。未分化型胃腺がんについては先行する GWAS で見出した候補遺伝子である PSCA 及び MUC1 の機能的意義の解明・解釈を進め、コホート検体等を用いた生活習慣・環境要因の交互作用の解析にあたって適切な仮説の設定の検討を行った。

②エピゲノム解析では乳がんの症例対照研究のデータを用いて、末梢血白血球 DNA の global methylation level と、対照群における葉酸代謝に関与する栄養素および遺伝子多型との関連、対照群の閉経後女性における血清中性ホルモンレベルとの関連、乳がんリスクとの関連、について検討した。その結果、葉酸摂取量が多い人でメチル化レベルが低い傾向が見られたが、その他の食事要因、遺伝要因、性ホルモンレベルとの間に関連は見られず、これらの要因はメチル化レベルの主要な規定要因ではないことが示唆された。さらに乳がんリスクとの関連では、メチル化レベルが低い群において有意なリスク上昇を観察した。

③トランスクリプトーム解析では、膵がん・肺がん細胞株を用いてエクソソーム miRNA のプロファイルを作成したところ、両がん種ともに正常細胞と比べて著しく異なるパターンを示した。膵臓がん患者血漿において、健常人血漿と比べて、有意に高値で検出されるエクソソーム miRNA を複数同定した。それらのプロファイルは大腸がんとは異なっており、がん種特異的な miRNA が存在し、検出可能でアルことが示唆された。

④プロテオーム解析では、日本大学松戸歯学部と協力してプロテオーム解析に適した血漿・血清バイオバンクの基盤整備を行った。膵がん組織のトランスクリプトームデータから、膵臓がんにとくに発現する mRNA を抽出し、独自に開発した逆相血漿マイクロアレイ(reverse phase plasma microarray, RPPA)と抗体ライブラリーを用いて、24種類の血漿診断マーカー候補を選択、そのうち2種類の抗原に対してサンドイッチ enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA)を構築した。ApoAII ホモダイマーC末端が膵がん患者の血液の中で特殊な修飾を受けることを見出し、診断キットの開発を行った。水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質に対してサンドイッチアッセイ系を構築し、膵

管がん 222 例を含む各種がん、他疾患および、健常者計 1,006 例の血漿水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンの濃度を測定した。膵臓がん患者では健常者に比べ有意に濃度が増加していたが、慢性膵炎、良性膵腫瘍患者は健常者と比べ有意差を認めなかった。一方、水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質で特異抗体が得られなかったペプチド部位を MRM で定量した。簡便な前処理法を確立し、Ultra-high-Performance Liquid Chromatography (UPLC) を用いることで、迅速にかつ修飾体と非修飾体を同時に定量する方法を確立、膵臓がん患者検体 70 例および健常者検体 27 例の血清を定量した結果、健常者と早期膵臓がん症例間での修飾体タンパク量に有意差が認められた。さらに、CA19-9 陰性早期患者 8 例のうち、6 例は修飾体 $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質が陽性であった。

⑤メタボローム解析では、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた血清中代謝物の網羅的解析システムを確立した。膵臓がん患者血清(20 例)、並びに健常人血清(19 例)中に存在する水溶性代謝物を網羅的に解析し、乳酸や 2-ヒドロキシ酪酸などが膵臓がん患者群で、健常人群と比較して有意に上昇することを明らかにした。膵臓がん患者血清や健常人血清の収集を進め、平成 23 年度末時点で膵臓がん患者血清約 80 例、健常人血清約 200 例を確保した。

#### D. 考察

①肺腺がんについては 2 次スクリーニングが終了し、3 次スクリーニングを進行中であるので、本年度内に新規感受性遺伝子座が同定できる見込みである。また、新規座を含めた肺腺腫関連解析の遺伝子解析も本年度中に開始できる予定であり、計画は順調に進行している。2 次スクリーニングで得られた候補 8 座には新規肺腺がん感受性遺伝子が含まれる可能性が高い。新規遺伝子座が同定できれば、既知の TERT 遺伝子、TP63 遺伝子と組み合わせることにより、遺伝子による個人の固定発がんリスクの評価、高危険度群の捕捉が可能となると期待できる。未分化型胃腺がんに関しては、PSCA の機能解析からは現在のところ、積極的な生活習慣・環境要因との交互作用の仮説を設

定できるエビデンスは見出されておらず、純粋に遺伝的なリスクを基礎確率として与える可能性がある。一方、MUC1 は H. pylori を初め、生活習慣・環境要因との交互作用を検討する必要があると考えられる。

②末梢血白血球の global methylation level と、膵がんのリスク要因と考えられる葉酸摂取との関連や、性ホルモンレベルとの関連を解析した結果、いずれも少なくとも単独では主要な交絡因子にはならないことが示唆された。今後、末梢血を全身の諸臓器の代替組織として、global methylation を発がんリスク指標として評価する段階に進むための症例対照研究における交絡因子の考え方の基礎的情報が提供された。乳がん症例対照研究におけるメチル化レベルの検討結果は、国際学術雑誌に投稿中である。国際学術雑誌に掲載された成果はホームページ(<http://epi.ncc.go.jp/>)にて概要をわかりやすく公表する予定である。

③現在、血漿検体の確保並びにプロファイリングを行っており、研究計画通りに進行している。定量的 RT-PCR 法による増幅も、一部の miRNA に関して検証を実施し、プロトコル確立が期待できる。膵臓がん患者検体数を増やし、さらに詳細に解析を進める。同時に、血漿エクソソーム画分から、定量的 RT-PCR により、候補 miRNA を増幅する検出系の確立を行う。肺がんの臨床血液検体を用いてエクソソーム miRNA のプロファイリングを行い、肺がん特異的な血中エクソソーム miRNA を同定する。候補 miRNA の絞込みが終了したら、それらの検証を RT-PCR 法で行う。検出感度を検証すると共に、他のがん種(大腸がんなど)と比較し、がん種特異性の検討も実施する。

④バイオマーカー開発において必須の要素である健常者の血液検体のバンキングが、日本大学松戸歯学部に参加により立ち上げられたことは重要な成果であり、多数の検体での検証研究が容易になる。血漿・血清バイオバンクの検体を使って、サンドイッチ ELISA の診断学的有用性を確認し、診断キット開発を目指す。今回開発した水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質に対するサンドイッチ ELISA キットにより、血漿水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンの濃度を多数検



体で測定した結果、膵がん患者では健常者と比較して有意な濃度上昇が認められた。一方、慢性膵炎、良性膵腫瘍、胆嚢炎患者では、健常者との有意差が認められなかったことから、膵がん特異的な診断用キット開発の可能性が示されたと考える。また、MRMにより水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質の翻訳後修飾体を少量の血漿から同時にかつ特異的に測定することが可能であった。本研究によって、タンパク質の翻訳後修飾体を非標識体と区別して、少量の血清から多検体を同時に、かつ特異的に測定することが可能となり、今後の質量分析装置を用いた臨床診断への基盤を築いた。水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質を他の複数のタンパク質と組み合わせて測定することで、より正確に膵臓がんを診断できる可能性がある。

⑤血清メタボローム解析の結果、膵臓がんの発症により、様々な代謝物が変動することが明らかとなった。早期の膵臓がん患者においても、いくつかの代謝物が有意に変動したことから、がん細胞から代謝物が分泌されているのではなく、膵臓がんが生体に存在するという状態が血清中代謝物プロファイルを変動させた可能性が考えられる。今後は、症例数を増やして、膵臓がん診断のための予測式を構築する。また、本研究にて収集した血清を用いて、脂溶性代謝物の分析も実施し、脂溶性代謝物データを用いた予測式の構築を行うとともに、水溶性代謝物と脂溶性代謝物のデータを統合的に評価し、より感度、特異度の高い診断予測式の構築を試みる。

## E. 結論

①ゲノム解析では、肺腺がんリスクに関する GWAS (1次)スクリーニングデータに基づき、バイオバンクジャパン症例等を用いた2次スクリーニングを行い、候補8座を得た。現在、国立がんセンター症例を用いた3次スクリーニングを進めた。未分化型胃腺がんの先行 GWAS から抽出された候補遺伝子の機能解析を進め、コホート研究での仮説設定に関する検討を行った。

②エピゲノム解析では、末梢血白血球 DNA 中のゲノ

ム全体のメチル化レベルに注目し、症例対照研究およびコホート内症例対照研究のデータを用いて、規定要因としての環境および遺伝要因の意義の検討、発がんリスクとの関連の検討を進めた。今後は、メチル化レベルの規定要因について、炎症や感染などのバイオマーカーなどを中心に幅広く探索するとともに、他のがん腫やコホート研究においてもメチル化レベルとの関連を検討する。

③トランスクリプトーム解析では、膵臓がん・肺がん細胞株を用いて、エクソソーム miRNA のプロファイルを作成したところ、両がん種ともに、正常細胞と比べて著しく異なるパターンを示した。膵臓がん患者血漿を用いて、エクソソーム miRNA のプロファイリングを行い、健常人血漿と比べて、有意に高値で検出されるエクソソーム miRNA を複数同定した。

④プロテオーム解析では、日本大学松戸歯学部による健常者血清・血漿検体バンキングの共同研究計画を進めた。膵臓がんの新規バイオマーカーの探索を進めるとともに、ApoAIIIC 末端グルタミン欠失体と非欠失体に対する特異抗体を作成してサンドイッチ ELISA を構築した。水酸化プロリン $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質に対してもサンドイッチ ELISA 測定キットを作成するとともに、MRM による絶対定量系により血清中の $\alpha$ -フィブリノーゲンタンパク質のヒドロキシル修飾体の絶対濃度を高感度・高精度・迅速に定量する方法を開発し、膵臓がん早期診断マーカーとしての有用性を定量的に明らかにした。

⑤メタボローム解析では、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた血清中水溶性代謝物の網羅的解析システムを確立し、乳酸や2-ヒドロキシ酪酸などが、膵臓がん患者群で、健常人群と比較し有意に上昇することを明らかにした。膵臓がんが生体に存在するという状態が血清中代謝物プロファイルを変動させたと考えられる。水溶性代謝物のみならず、脂溶性代謝物を分析することで、メタボローム解析による早期発見可能な新規診断法の確立を期待できる。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Totoki Y, Yoshida T, et al High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* 43:464-9, 2011.

2) Shibata K,...Yoshida T, et al Relationship of detection rate of PET cancer screening examinees and risk factors: analysis of background of examinees. *Ann Nucl Med*. 25(4): 261-7, 2011.

3) Aoyagi K, ...Yoshida T, et al. Artificially induced epithelial-mesenchymal transition in surgical subjects: its implications in clinical and basic cancer research. *PLoS ONE*. 6(4): e18196, 2011.

4) Katori N, ...Yoshida T, et al. Genetic variations of orosomucoid genes associated with serum alpha-1-acid glycoprotein level and the pharmacokinetics of paclitaxel in Japanese cancer patients" to the *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 100(10): 4546-59, 2011.

5) Ono H, ...Yoshida T, et al. Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 51(1): 30-41, 2012.

6) Kohno T, ...Yoshida T et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 18(3): 375-7, 2012.

### 2. 学会発表

4) 河野隆志、白石航也、坂本裕美、久保充明、醍醐弥太郎、中村祐輔、吉田輝彦、横田淳. 肺腺がん感受性を規定する遺伝的要因の解明に向けた全ゲノム関連解析. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (Symposia S18-1) 10/5/2011.

5) 吉田輝彦、佐伯宣久、斎藤聡、松尾恵太郎、佐々

木博己、大浪澄子、小野弘恵、坂本裕美、片井均. 胃がんのゲノム網羅的関連解析. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (Symposia S18-3) 10/5/2011.

6) Siew-Kee Low, Aya Kuchiba, Hitoshi Zembutsu, Akira Saito, Atsushi Takahashi, Michiaki Kubo, Naoyuki Kamatani, Takuji Okusaka, Teruhiko Yoshida, Yusuke Nakamura, Hiromi Sakamoto. Genome-wide association study of pancreatic cancer in Japanese population. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (Symposia S18-4) 10/5/2011.

7) 小野弘恵、岩崎基、口羽文、大浪澄子、坂本裕美、吉田輝彦、津金昌一郎. 白血球由来 DNA のグローバルなメチル化レベルと葉酸代謝に関わる食事・遺伝的要因の関連. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場 (Japanese Oral Sessions J-3056) 10/5/2011.

8) 牛尼美年子、菅野康吉、鈴木茂伸、坂本裕美、吉田輝彦. 網膜芽細胞腫の遺伝子診断-臨床導入の現状-. 日本人類遺伝学会第56回大会第11回東アジア人類遺伝学会 幕張メッセ(シンポジウム12 家族性腫瘍 SY12-7) 11/12/2011.

9) 吉田輝彦. オミックス時代のがん研究を支える包括的同意に基づくバイオバンク戦略. オミックス医療研究会シンポジウム「先制医療と個別化医療が開く未来」. 理化学研究所 横浜研究所 12/26/2011. (講演)

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）  
（分担）研究報告書

血液検体のゲノム解析に基づく、肺がん高危険度群の補足のための  
バイオマーカーの同定に関する研究

研究分担者 河野 隆志 国立がん研究センター・研究所ゲノム生物学研究分野 分野長

研究要旨 肺がんの新規遺伝素因の同定を目的として、GWASに次ぐバイオバンクジャパン症例等を用いた2次スクリーニングを施行し、候補8座を得た。現在、3次スクリーニングによる感受性遺伝子座の確定を進めている。新規座が同定できれば、既知のTERT座、TP63座と組み合わせることにより、遺伝子による個人の固定発がんリスクの評価、高危険度群の捕捉が可能となる。

上記研究分担者は以下3名の分担研究者と共同で一つの研究を行ったので、本報告書にて共同で報告させて頂く。

軒原 浩  
同中央病院・呼吸器腫瘍科 外来医長  
渡辺 俊一  
同中央病院・呼吸器腫瘍科 医長  
久保 充明  
理化学研究所ゲノム医科学研究センター  
副センター長

#### A. 研究目的

肺がんの新規遺伝素因の同定を同定し、肺がん、特に肺腺がんに関して、個々人の固定発がんリスクの評価、高危険度群の捕捉のための基盤情報を得ることを目的とする。また、肺腺腫へのリスクについても合わせて検討する。

#### B. 研究方法

肺がん患者及び非がん対照群の末梢血等、正常組織由来のゲノムDNAを用い、ゲノム網羅的な遺伝子多型関連解析(GWAS)を行い、肺発がんリスクと関連する遺伝子多型を同定する。また、CT検診受診者の肺野擦りガラス用陰影(GGO)の有無に関する関連解析を行い、肺腺がん感受性遺伝子の肺腺腫発生リスクへの影響を合わせて調べる。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、倫理審査委員会の承認を得て研究を進めることにより、試料等提供者の人権とプライバシーを十分に擁護する。

#### C. 研究結果

国立がん研究センター中央病院において病理学的に肺腺がんと診断された1,695例とバイオバンクジャパンの非がん対照5,333例について、イルミナ社OMNIチップを用いて、約100万個のSNPの遺伝子型を決定し、全ゲノム多型関連解析(GWAS)を行った。

その結果、既知遺伝子座である5p15.33 (TERT: rs2736100)、3q28 (TP63: rs10937405)座においてのみ、全ゲノムレベルの関連が認められた( $P < 5 \times 10^{-8}$ )。そこで、新規感受性遺伝子座の同定を目的として、 $P$ 値 $< 10^{-4}$ を示した125SNPsについて2次スクリーニング解析を進めた。同一性の高いSNP( $r^2 > 0.8$ )群からは1つのSNPを選択し、さらに既知遺伝子座を除いた78SNPsについて、国立がん研究センター及びバイオバンクジャパンの肺腺がん症例2,955例とバイオバンクジャパンの非がん対照7,036例に対して検証研究を行った。その結果、8SNPがボンフェローニ補正下で統計学的な有意性を示した。

現在、8SNPについて1,379例の症例及び1,166例の対照を用いた3次スクリーニングを行うことにより、感受性遺伝子座の確定を進めている。

また、肺腺腫関連解析に用いる予防検診研究センター検診例1,500例を決定した。このうち、500例は最大径5mm以上のGGO保有者であり、これを症例とし、残りを対照として関連解析を行う予定である。

#### D. 考察

2次スクリーニングで得られた候補8座には新規肺腺がん感受性遺伝子が含まれる可能性が高い。新規遺伝子が同定できれば、既知のTERT遺伝子、TP63遺伝子と組み合わせることにより、個人の固定発がんリスクの評価、高危険度群の捕捉が可能となると期待で

きる。また、肺腺腫リスクとの関連を明らかにすることで、  
遺伝要因の病因的意義の理解が深まると期待できる。

#### E. 結論

肺腺がん感受性を規定すると考えられる候補 8 遺伝子座を得た。3 次スクリーニングにより、新規座が同定できれば、既知遺伝子座と組み合わせることにより、遺伝子に基づく固定発がんリスクの評価、高危険度群の捕捉が可能となるであろう。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kohno T., Shiraishi K. Genetic polymorphisms underlying lung cancer susceptibility and therapeutic response. *Genes and Environment*, 34, 2012, in press.

##### 2. 学会発表

Kohno T. Genetic polymorphisms underlying susceptibility to and therapeutic Response of lung adenocarcinoma. France-Japan Symposium on Cancer Research, 2011.

Kohno T. GWAS to identify genetic factors underlying lung adenocarcinoma risk. 第 70 回日本癌学会総会, 2011.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）  
（分担）研究報告書

血中エクソソームmiRNAに関する研究

研究分担者 土屋 直人 国立がん研究センター・研究所発がんシステム研究分野ユニット長

研究要旨 膵臓がん・肺がん細胞から、エクソソームを介して、特異的に分泌されるmiRNAを同定し、診断バイオマーカーとして応用することをめざし、がん細胞株並びに臨床血液検体を用いてエクソソームmiRNAのプロファイルを作成し、がん種に特異的な候補miRNAを複数同定した。

**A. 研究目的**

難治性固形がんの代表である膵臓がん・肺がんに関して、非侵襲かつ高感度な革新的新断方法の確立をめざし、がん種に特異的な血中エクソソームmiRNAを同定しバイオマーカーとして実用化することを目的とする。

**B. 研究方法**

複数のがん細胞株の培養上清からエクソソームを回収し、miRNAのプロファイルを作成する。同様に、臨床検体からも、エクソソームmiRNAのプロファイルを作成し候補を選別する。

（倫理面への配慮）

当センターの倫理委員会の承認を受け実施。

**C. 研究結果**

がん細胞株で膵臓がん特異的なエクソソームmiRNAの候補は、臨床検体においても有意に高値で検出されることが判明した。また、それらのプロファイルは大腸がんとは異なり、がん種に特異的であると考えられた。

**D. 考察**

血中エクソソームmiRNAは、健常人と担がん患者では著しく異なることが判明し、がん細胞がある種のmiRNAが特異的に分泌されていると考えられた。また、当研究グループで作成した大腸がん患者の血漿エクソソームプロファイルと膵臓がん患者では、異なるプロファイルを示す事も判明し、がん種に特異的なバイオマーカーの単離が期待できる。

**E. 結論**

エクソソームmiRNAは、がん種に特異的なプロファイルを示す。膵臓がん、大腸がんは血中エクソソ-

ームを用いて選別することが可能である。

**F. 健康危険情報**

特記すべき事項無し

**G. 研究発表**

1.論文発表

Tsuchiya N. et. al. Cancer Res. 71, 4628-39, 2011  
Izumiya M. et. al. Cancer Sci. 102, 1615-21, 2011  
Okamoto K. et al. EMBO J. 31, 1752-63, 2012

2.学会発表

土屋直人 他 日本癌学会総会(2011、名古屋)  
緒方広子 他 日本癌学会総会(2011、名古屋)  
栗岡大輔 他 日本分子生物学会(2011、横浜)

Tsuchiya N. France-Japan Symposium on  
CancerResearch, 2011 Nov. Tokyo

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

（予定を含む。）

1.特許取得

膵臓癌診断マーカー・診断法

土屋 直人他(出願準備中)

2.実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）  
（分担）研究報告書

「遺伝素因と生活習慣等の交互作用の検討、コホート試料等解析」

研究分担者 岩崎 基 国立がん研究センターがん予防・検診研究センター予防研究部 室長

研究要旨 ゲノムへの加齢・生活習慣等の影響を反映する指標として、末梢血白血球 DNA 中のゲノム全体のメチル化レベルに注目し、症例対照研究およびコホート内症例対照研究のデータを用いて、規定要因としての環境および遺伝要因の意義を検討し、発がんリスクとの関連を明らかにすることが目的である。今年度は、乳がんの症例対照研究のデータを用いて、①対照群における葉酸代謝に関与する栄養素および遺伝子多型との関連、②対照群の閉経後女性における血清中性ホルモンレベルとの関連、③乳がんリスクとの関連、について検討した。その結果、葉酸摂取量が多い人でメチル化レベルが低い傾向が見られた。この関連は特に非飲酒者で顕著であり、飲酒者では関連が見られなかった。一方、その他の食事要因、遺伝要因、性ホルモンレベルとの間に関連は見られず、これらの要因はメチル化レベルの主要な規定要因ではないことが示唆された。さらに乳がんリスクとの関連では、メチル化レベルが低い群において有意なリスク上昇を観察した。この関連は、ホルモンレセプターの発現の有無によるサブタイプによらず同様の結果であり、また葉酸代謝に関与する栄養素および遺伝子多型による層別解析においても有意な交互作用は観察されなかった。今後は、メチル化レベルの規定要因について、さらに幅広く探索するとともに、他のがん腫やコホート研究においてもメチル化レベルとの関連を検討する予定である。

#### A. 研究目的

がんの発生と進展においてエピジェネティック異常が重要な役割を果たしていることが指摘されている。がん細胞には、ゲノム全体の低メチル化と局所的な高メチル化と言われる DNA メチル化状態の変化が存在する。特に後者は、癌抑制遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドがメチル化された場合、染色体欠失・点突然変異などと同様に、癌抑制遺伝子の不活化の重要な

機構と考えられている。またゲノム全体の低メチル化は染色体不安定性を誘発し発がんに関与すると考えられている。

これまでのメチル化に関する研究は、腫瘍組織と非腫瘍組織の間でメチル化レベルの違いを検討したものが主であったが、最近では、末梢血白血球 DNA 中のゲノム全体のメチル化レベルと腫瘍の発生リスクとの関連が報告されている。これまでに大腸腺腫、胃がん、頭

頸部がん、乳がん、膀胱がんとの関連が検討され、低メチル化状態がリスク上昇に関連するとの報告がある。

加齢や生活習慣因子はゲノム異常に加え、エピゲノム修飾を通して遺伝子発現や染色体不安定性に影響し、ゲノムストレスを構成する。その多臓器の代替指標として末梢血白血球 DNA 中のゲノム全体のメチル化レベルに注目し、症例対照研究およびコホート内症例対照研究のデータを用いて、メチル化レベルの規定要因としての環境および遺伝要因の意義を検討し、さらに発がんリスクとの関連を明らかにすることが目的である。

今年度は、特に乳がんの症例対照研究のデータを用いて、①対照群における葉酸代謝に関与する栄養素および遺伝子多型との関連、②対照群の閉経後女性における血清中性ホルモンレベルとの関連、③乳がんリスクとの関連、について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 研究デザイン

長野県内の4病院(長野松代総合病院、長野赤十字病院、長野市民病院、北信総合病院)において多施設症例対照研究を行った。

### 2. 対象者

初発の乳がんと診断され、上記の4病院に入院した20歳以上75歳未満の女性患者全員を症例とし、400症例を目標に収集した。対照は長野松代総合病院と北信総合病院の人間ドック受診予定者の女性で上記症例に対して年齢(±3歳)と居住地域が一致する者のうち最も年齢に近い1名とした。最終的に症例405例と同数の対照を収集した。

### 3. 調査方法

対象者本人による自記式の質問票調査を行った。質

問票は、生理・生殖関連、既往歴、職業、居住地、飲酒、喫煙などに関する質問票と食物摂取頻度調査票の2つを用いた。がんの部位、進行度、ホルモンレセプターなどの臨床情報の記載を担当医師に依頼した。また生体試料として7ml EDTA2Na 採血管1本、および血清9ml用採血管2本分の血液検体を収集した。

### 4. 栄養素摂取量の計算

食物摂取頻度調査票(138の食品項目で構成)の回答(摂取頻度と1回あたりの目安量)から各食品の1日当たりの摂取量を計算し、食品成分表の成分値を用いて各栄養素の摂取量を算出した。

### 5. 生体試料の分析

Genomic DNAは、末梢白血球から QIAGEN FlexiGene® DNA Kits を使って抽出した。末梢血白血球 DNA 中のゲノム全体のメチル化レベルは、Luminometric Methylation Assay (LUMA 法)により定量した。葉酸代謝に関連する遺伝子多型として、metylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) (rs1801133, rs1801131)、methionine synthase (*MTR*) (rs1801394)、methionine synthase reductase (*MTRR*) (rs10380, rs162049)について TaqMan SNP Genotyping Assay によりタイピングを行った。

血清中の性ホルモンの分析は、estradiol, estrone, androstenedione, dehydroepiandrosterone sulfate, testosterone は radioimmunoassay、bioavailable estradiol は、ammonium sulfate precipitation method、sex-hormone binding globulin は immunoradiometric assay にて分析を行った。

### 5. 解析方法

統計解析は、エネルギー摂取量が極端な者(500kcal未満または4000kcal以上)、血液検体のない者を除外

した 384 ペアを対象とした。

### ①対照群における葉酸代謝に関与する栄養素および遺伝子多型との関連

回帰分析を用いて、栄養素摂取量の 4 分位カテゴリおよび遺伝子多型ごとに、年齢、body mass index、喫煙、飲酒、身体活動で調整したメチル化レベルの平均値を算出した。また、傾向性の検定として回帰係数を算出した。交互作用の検討は、交互作用を含むモデルと含まないモデルの間のモデルカイ2乗値の差を用いて p 値を算出した。

### ②対照群の閉経後女性における血清中性ホルモンレベルとの関連

回帰分析を用いて、ホルモンレベルの 4 分位カテゴリごとに、年齢、乳がん家族歴、良性乳腺疾患既往、初経年齢、閉経年齢、出産数、初産年齢、身長、body mass index、喫煙、飲酒、身体活動、葉酸摂取で調整したメチル化レベルの平均値を算出した。また、傾向性の検定として回帰係数を算出した。

### ③乳がんリスクとの関連

対照群のメチル化レベルの分布をもとに 3 分位をとり、メチル化レベルの高い群を基準にロジスティック回帰分析でオッズ比を算出した。オッズ比は、乳がん家族歴、喫煙、飲酒、身体活動、閉経状況、出産数、ビタミン剤の使用、葉酸摂取で調整した。また、乳がんはホルモンレセプター陽性・陰性でリスク因子が異なることが考えられるため、一般化ロジットモデルを用いて多項ロジスティック回帰分析を行い、ホルモンレセプター別にオッズ比を計算すると同時に効果の差を検定した。交互作用の検討は、交互作用を含むモデルと含まないモデルの間のモデルカイ2乗値の差を用いて p 値を算出した。

(倫理面への配慮)

長野における乳がん症例対照研究は、国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得ている。なお、各研究集団の取り扱いについては、関連する倫理指針を遵守し、個人情報保護に関して細心の注意を払いながら研究を実施している。

## C. 研究結果

### ①対照群における葉酸代謝に関与する栄養素および遺伝子多型との関連

対照群のメチル化レベルの平均値は 70.2%で、範囲は 59.0%から 81.2%であった。

葉酸摂取の 4 分位カテゴリが一つ増加するごとにメチル化レベルは 0.36%ずつ低くなる傾向が見られ、これは統計学的にも有意な関連であった。一方、ビタミン B2、ビタミン B6、ビタミン B12、飲酒、*MTHFR*(rs1801133, rs1801131)、*MTR* (rs1801394)、*MTRR* (rs10380, rs162049)については、有意な関連は観察されなかった。

葉酸摂取とメチル化レベルの関連について、ビタミン B2、ビタミン B6、ビタミン B12、飲酒、*MTHFR*(rs1801133, rs1801131)、*MTR* (rs1801394)、*MTRR* (rs10380, rs162049)で層別解析を行ったところ、飲酒についてのみ有意な交互作用が見られた。具体的には、非飲酒者でのみ葉酸摂取量が多い人でメチル化レベルが低い傾向が見られ、飲酒者では関連は観察されなかった。

### ②対照群の閉経後女性における血清中性ホルモンレベルとの関連

対照群の 384 人のうち、55 歳以上かつ閉経後の女性は 185 人であった。



Estradiol の 4 分位カテゴリが一つ増加するごとにメチル化レベルは、0.27%ずつ低くなる傾向が見られた。同様に estron の 4 分位カテゴリが一つ増加するごとにメチル化レベルは、0.39%ずつ低くなる傾向であった。一方、bioavailable estradiol は 4 分位カテゴリの増加に伴いメチル化レベルが 0.41%ずつ高くなる傾向が見られた。しかし、これらの結果を含め、今回検討した性ホルモンについてはいずれも統計学的に有意な関連は観察されなかった。

### ③乳がんリスクとの関連

メチル化レベルが最も高い群を基準にしたとき、2 番目の群のオッズ比 (95%信頼区間) は 1.87 (1.20-2.91)、最も低い群では 2.86 (1.85-4.44) であった。エストロゲンレセプターとプロゲステロンレセプターの発現の有無で乳がんを分類して同様の検討を行ったところ、いずれのサブタイプにおいてもメチル化レベルが低い群において有意なリスク上昇が観察された。さらに、閉経状況、喫煙状況、葉酸、ビタミン B2、ビタミン B6、ビタミン B12、飲酒、*MTHFR*(rs1801133, rs1801131)、*MTR*(rs1801394)、*MTRR*(rs10380, rs162049)で層別解析を行ったが、いずれの層でもメチル化レベルが低い群でリスク上昇が見られ、有意な交互作用は観察されなかった。

## D. 考察

### ①対照群における葉酸代謝に関与する栄養素および遺伝子多型との関連

葉酸摂取量が多い人でメチル化レベルが低い傾向が見られたが、断面研究であるため、葉酸摂取量が多いことにより低メチル化状態になったとは言えない。

今回の結果は先行研究とは異なるものであった。葉酸欠乏状態になるように食事制限をする介入研究では、メチル化レベルが低下すること、葉酸をサプリメントに

て投与した場合、メチル化レベルが上昇するないしは変わらないという介入研究の結果がある。また研究数は少ないが、観察研究においては関連なしという報告が主流である。このように結果が一致しない背景には、葉酸曝露とメチル化レベルの間には多くの要因が関与し、その量反応関係は単純でないことが想定される。

今回は、葉酸摂取が多い群でメチル化レベルが低いという関連が観察されたが、一方、葉酸レベルに違いが出る *MTHFR* 遺伝子多型では関連がみられなかった。このような結果の不一致は、検定の多重性による偶然の可能性や、検出力不足による可能性が考えられる。

葉酸摂取が多い群でメチル化レベルが低いという関連は、非飲酒者で顕著であり、飲酒者では観察されなかった。この飲酒者の結果は、アルコールが葉酸の吸収・代謝に影響することによる誤分類の可能性が考えられる。

### ②対照群の閉経後女性における血清中性ホルモンレベルとの関連

性ホルモン、特にエストロゲンは乳がんの発生において重要な役割を果たしているが、メチル化レベルとの間に有意な関連は見られず、性ホルモンは主要な規定要因ではないことが示唆された。

関連が見られなかった理由の 1 つとしては測定誤差の問題がある。LUMA 法によるメチル化レベルや血清中性ホルモンレベルの再現性は比較的よいため、分析時に測定誤差の影響はそれほど大きなものでなかったと考えられる。しかし、白血球中の細胞の構成成分の違いによりメチル化レベルも異なる可能性が指摘されており、その影響は否定できない。その他、一時点の血清中ホルモンレベルが生涯のホルモン曝露をど

の程度反映しているかという問題、サンプルサイズが小さいために関連が検出できなかった可能性などが考えられる。

### ③乳がんリスクとの関連

メチル化レベルが低い群で乳がんリスクの上昇に関連していたという今回の結果は、先行する症例対照研究の結果に一致するものであった。ホルモンレセプターの発現によらずリスク上昇が観察されたこと、また、前述のように性ホルモンレベルとメチル化レベルに関連が見られないことから、ホルモン関連要因以外のメカニズムが想定される。

本研究の結果は症例対照研究のデザインに基づくものであり、症例群では乳がん罹患後のサンプルにおけるメチル化レベルであるため、その解釈には注意が必要である。つまり、メチル化レベル低値が原因となって乳がんリスクが上昇しているかどうかを判断することはできない。また、症例群では *circulating tumor cells* が存在することによる影響は否定できない。

今回の結果は、LUMA 法によるメチル化レベルが乳がんリスクを反映するよいバイオマーカーである可能性を示唆するものである。今後は、さらにコホート研究などのエビデンスの蓄積が必要である。

## E. 結論

今年度は乳がんの症例対照研究のデータを用いて、

①対照群における葉酸代謝に関与する栄養素および遺伝子多型との関連、②対照群の閉経後女性における血清中性ホルモンレベルとの関連、③乳がんリスクとの関連、について検討した。その結果、葉酸摂取量が多い人でメチル化レベルが低い傾向が見られたが、その他の食事要因、遺伝要因、性ホルモンレベルとの間に関連は見られず、これらの要因はメチル化レベルの主要な規定要因ではないことが示唆された。さらに乳

がんリスクとの関連では、メチル化レベルが低い群において有意なリスク上昇を観察した。今後は、メチル化レベルの規定要因について、さらに幅広く探索するとともに、他のがん腫やコホート研究においてもメチル化レベルとの関連を検討する予定である。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項無し。

## G. 研究発表

1. Cai Q, Long J, Lu W, Qu S, Wen W, Kang D, Lee JY, Chen K, Shen H, Shen CY, Sung H, Matsuo K, Haiman CA, Khoo US, Ren Z, Iwasaki M, Gu K, Xiang YB, Choi JY, Park SK, Zhang L, Hu Z, Wu PE, Noh DY, Tajima K, Henderson BE, Chan KY, Su F, Kasuga Y, Wang W, Cheng JR, Yoo KY, Zheng H, Liu Y, Shieh YL, Kim SW, Lee JW, Iwata H, Le Marchand L, Chan SY, Xie X, Tsugane S, Lee MH, Wang S, Li G, Levy S, Huang B, Shi J, Delahanty R, Zheng Y, Li C, Gao YT, Shu XO, Zheng W. Genome-wide association study identifies breast cancer risk variant at 10q21.2: results from the Asia Breast Cancer Consortium. *Hum Mol Genet.* 2011;20:4991-9.
2. Cai Q, Wen W, Qu S, Li G, Egan KM, Chen K, Deming SL, Shen H, Shen CY, Gammon MD, Blot WJ, Matsuo K, Haiman CA, Khoo US, Iwasaki M, Santella RM, Zhang L, Fair AM, Hu Z, Wu PE, Signorello LB, Titus-Ernstoff L, Tajima K, Henderson BE, Chan KY, Kasuga Y, Newcomb PA, Zheng H, Cui Y, Wang F, Shieh YL, Iwata H, Le Marchand L, Chan SY, Shrubsole MJ, Trentham-Dietz A, Tsugane S, Garcia-Closas M, Long J, Li C, Shi J, Huang B, Xiang YB, Gao YT, Lu W, Shu XO, Zheng W. Replication and Functional Genomic Analyses of the Breast Cancer Susceptibility Locus at 6q25.1 Generalize Its Importance in Women of Chinese, Japanese, and European Ancestry. *Cancer Res.* 2011;71:1344-55.
3. Inoue M, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S. Validity of self-reported cancer among a Japanese population: recent results from a population-based prospective study in Japan (JPHC Study). *Cancer epidemiology.* 2011;35:250-3.
4. Iwasaki M, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Hamada GS, Nishimoto IN, Maciel Mdo S, Motola J, Jr., Laginha FM, Anzai R, Tsugane S. Comparison of postmenopausal endogenous sex hormones among Japanese, Japanese Brazilians, and non-Japanese Brazilians. *BMC Med.* 2011;9:16.

5. Iwasaki M, Shimada N, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Hamada GS, Nishimoto IN, Iyeyasu H, Motola J, Jr., Laginha FM, Anzai R, Tsugane S. Fragment c gamma receptor gene polymorphisms and breast cancer risk in case-control studies in Japanese, Japanese Brazilians, and non-Japanese Brazilians. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;126:497-505.

6. Iwasaki M, Tsugane S. Risk factors for breast cancer: epidemiological evidence from Japanese studies. *Cancer Sci.* 2011;102:1607-14.

7. Shimazu T, Inoue M, Sasazuki S, Iwasaki M, Sawada N, Yamaji T, Tsugane S. Plasma Isoflavones and the Risk of Lung Cancer in Women: A Nested Case-Control Study in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20:419-27.

8. Takachi R, Ishihara J, Iwasaki M, Hosoi S, Ishii Y, Sasazuki S, Sawada N, Yamaji T, Shimazu T, Inoue M, Tsugane S. Validity of a self-administered food frequency questionnaire for middle-aged urban cancer screenees: comparison with 4-day weighed dietary records. *Journal of epidemiology.* 2011;21:447-58.

9. Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S. Gender difference in the association of insulin and the insulin-like growth factor axis with colorectal neoplasia. *Int J Obes (Lond).* 2012;36:440-47.

10. Long J, Cai Q, Sung H, Shi J, Zhang B, Choi JY, Wen W, Delahanty RJ, Lu W, Gao YT, Shen H, Park SK, Chen K, Shen CY, Ren Z, Haiman CA, Matsuo K, Kim MK, Khoo US, Iwasaki M, Zheng Y, Xiang YB, Gu K, Rothman N, Wang W, Hu Z, Liu Y, Yoo KY, Noh DY, Han BG, Lee MH, Zheng H, Zhang L, Wu PE, Shieh YL, Chan SY, Wang S, Xie X, Kim SW, Henderson BE, Le Marchand L, Ito H, Kasuga Y, Ahn SH, Kang HS, Chan KY, Iwata H, Tsugane S, Li C, Shu XO, Kang DH, Zheng W. Genome-wide association study in East Asians identifies novel susceptibility Loci for breast cancer. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002532.

11. Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, Takashi R, Tanaka Y, Mizokami M, Tsugane S. Consumption of n-3 Fatty Acids and Fish Reduces Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2012.

12. Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Sakamoto H, Yoshida T, Tsugane S. Association between plasma 25-hydroxyvitamin D and colorectal adenoma according to dietary calcium intake and vitamin D receptor polymorphism. *Am J Epidemiol.* 2012;175:236-44.

## 2. 学会発表

1. Iwasaki M, Kasuga Y, Hamada GS, Tsugane S. Comparison of postmenopausal endogenous sex hormones among Japanese, Japanese Brazilians, and non-Japanese Brazilians. XIX IEA World Congress of Epidemiology, Scotland, August 2011.

2. 山地太樹、岩崎 基、笹月静、坂本裕美、吉田輝彦、津金昌一郎。血漿ビタミンD濃度およびビタミンDレセプター遺伝子多型と大腸腺腫との関連。第70回日本癌学会学術総会、名古屋。2011年10月

3. 小野弘恵、岩崎 基、口羽文、大浪澄子、坂本裕美、吉田輝彦、津金昌一郎。白血球由来DNAのグローバルなメチル化レベルと葉酸代謝に関わる食事・遺伝的要因の関連。第70回日本癌学会学術総会、名古屋。2011年10月

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野))  
分担研究報告書

IGF-1 遺伝子多型群の胃がん発生と予後への影響を明らかにする研究

研究分担者 伊藤 秀美  
愛知県がんセンター研究所 疫学・予防部 室長

研究要旨 胃がんは、現在においても最も多くの日本人が罹患する悪性疾患である。ヘリコバクターピロリ感染、塩分摂取過多、喫煙などの環境的な要因が明らかになっているが、遺伝的要因の検討は十分に行われていない。

本研究では、1) 様々な部位のがんの罹患、進展に関連していることが分かっている **Insulin-like growth factor (IGF)-1** 遺伝子多型と日本人における胃がんリスクとの関連を検討するため、初発胃がん患者 703 名と性・年齢を適合させた 1462 名の非がん対照者による症例対照研究を実施した。IGF-1 遺伝子上の 10 遺伝子多型を Taqman 法にて決定した。胃がんリスクとの関連は、交絡要因で調整した条件付きロジスティックモデルを用いオッズ比と 95% 信頼区間で評価した。さらに、2) 初発胃がん患者 430 名を対象に、無再発生存をエンドポイントとし、多変量比例ハザードモデルならびに Kaplan-Meier 曲線により、IGF-1 上の 10 遺伝子多型の胃がん予後への影響を検討した。

胃がんリスクと統計学的に有意な関連を示したのは、rs1520220, rs4764887 の 2 座であった。両遺伝子座の間には強い連鎖不平衡が認められた。アレル毎モデルにおいて rs1520220 はオッズ比が 1.14 (95%信頼区間: 1.00-1.30)、rs4764887 は 1.18 (1.02-1.36) であった。胃がん予後に関して、rs1520220, rs2195239 の 2 座が統計学的に有意な関連を示した。比例ハザードモデルによる多変量調整のハザードは、rs1520220 が 0.65 (0.44-0.98)、rs2195239 が 0.64 (0.44-0.94) であった。両遺伝子座の間には強い連鎖不平衡が認められた。また、胃がん予後において、rs1520220 と臨床病期との間に統計学的有意な交互作用を示した。

本研究では、IGF-1 遺伝子多型 rs1520220 が、胃がん罹患、胃がん治療後の予後いずれにも関連を示していて、胃がんの高危険群の捕捉のための遺伝的マーカーのひとつの候補となる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

胃がんは、現在においても最も多くの日本人が罹患する悪性疾患である。その罹患の要因には、ヘリコバクターピロリ感染、塩分摂取過多、喫煙などの環境的な要因が存在することがこれまでの疫学的な検討により明らかにされている。環境的な要因が明らかになる一方、遺伝的な要因に関しては胃がんの家族歴に関する検討がなされているが、生殖細胞系統の遺伝子多型のレベルでの検討は、適切な疫学研究デザインに基づく研究が殆ど実施されていないため十分に行われていない。

本研究では、様々な部位のがんの罹患、進展に

関連していることが分かっている **Insulin-like growth factor (IGF)-1** の遺伝子多型を検討することにより、日本人における 1) 胃がんの罹患、2) 胃がんの予後への IGF-1 の生殖細胞系遺伝子の差異の影響を明らかにすることを目的としている。

#### B. 研究方法

1) 胃がんの罹患リスクに対する IGF-1 遺伝子多型の影響を検討する研究

対象は 2001～2005 年に愛知県がんセンター中央病院で実施されている大規模病院疫学研究に参加した対象者の中から選択した。参加者のうち 703 名