

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、
膀胱がん・肺がん等の高危険度群の捕捉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24年度 総括研究報告書

研究代表者 吉田 輝彦

平成25(2013年)年 5月

研究報告書目次

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	8
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	10
土屋 直人	
3. 遺伝素因と生活習慣等の相互作用の検討、コホート試料等解析	11
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	15
伊藤 秀美	
5. プロテオーム解析に関する研究	20
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	23
本田一文	
鄭 基晩	
金田 隆	
加藤仁夫	
7. 膵がんバイオマーカーの定量質量分析	26
寺崎哲也	
大槻純男	
立川正憲	
内田康雄	
8. 膵臓がん患者における血清メタボローム解析	28
吉田 優	
9. 水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン α の測定キット開発に関する研究	29
宮本顕友	
品川真吾	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	32
IV. 研究成果の刊行物・別刷	別紙

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)
(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 国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 難治がんに完治が期待できる治療法である外科切除には早期診断が必須である。本研究の目的は、バイオマーカー測定用検体として優れる末梢血に対して各種オミックス解析を行い、発がん高危険度群を適格に捕捉する上で有用な情報を探索、的確な指標を確立することである。それにより持続的な一次・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。本年度の主な成果は下記の通り：①ゲノム解析では、バイオバンクジャパン等の症例・対照群を用いたゲノム網羅的関連解析から、日本人肺腺がん新規易罹患性遺伝子 2 種を同定・報告した。未分化型胃がんの易罹患性に関わる分子経路解明を継続するとともに、複数の遺伝素因から累積リスクを推定する方法を確立した。②エピゲノム解析では、血中葉酸・ホモシステイン・ピロリ菌抗体・炎症マーカー・インスリン抵抗性マーカー・肥満関連マーカーと、末梢血 DNA 全体のメチル化レベルとの関連を検討した。血清中 CRP・c-peptide・IGFBP-3 レベルとメチル化レベルの間に正の関連が見られた。③トランスクリプトーム解析では、肺腺がん・肺小細胞がん・膵臓がん・大腸がん・大腸腺腫・健常人の血漿検体を用いて、exosome miRNA のプロファイルを取得、がん種特異性が低くスクリーニングに適した miRNA と、がん種特異性が高く、診断価値のある miRNA 同定の可能性が示された。④プロテオーム解析では、膵がんの新規マーカーApoAIIIC 末端のサンドイッチ ELISA が、ROC 解析で AUC 0.87 の性能を示した。同じく膵がんの新規バイオマーカー候補である水酸化プロリン α -フィブリノーゲンと同様、厚労省多目的コホート研究の前向き検体を用いての評価・検証を進めた。⑤メタボローム解析では、膵臓がん患者血清・健常者血清・慢性膵炎患者血清において、ガスクロマトグラフ質量分析計による水溶性代謝物の網羅的解析を実施し、複数の血中代謝物が 2 群間で有意な変動を示すことを明らかにした。さらに、膵臓がん診断のための予測式構築に成功し、検証セットによる評価・検証を行った。

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 インプレ
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

3年間を通しての研究事業全体の構想・目的は前年度と同様である。すなわち、難治がんに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ことから、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。それにより継続的な一次・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着実な橋渡しを目指す。

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、A) ゲノム系と、B) プロテオーム系に大別し、A) 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。B) 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相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・公衆衛生学的観点から随時、研究内容や戦略の見直しを行う。

各オミックス解析の3年間を通しての研究方法の概要は前年度から大きな変更は無く、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・環境要因等との相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 1,000 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、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) の絞り込みと 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康者、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。

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、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。

また、必ずしも特異抗体が得られないタンパク質に対する方法として、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、肺腺がんの新規遺伝素因の同定を目的として、国立がん研究センター並びにバイオバンクジャパンからなる肺腺がん症例 6,029 例と非がん対照 13,535 例を用いた三段階スクリーニングにより、既知の TERT・TP63 の他に新規感受性遺伝子として BPTF・BTNL2 を同定し、Nature Genetics 誌に報告した。さらに層別化解析や、肺腺腫関連解析にも着手した。

未分化型胃腺がんについては前年度に引き続き PSCA の機能的意義の解析を進めるとともに、MUC1 多型との組み合わせ遺伝子型による高危険度群捕捉のための累積リスクの推計に取り組んだ。具体的にはまず、多くのゲノム網羅的関連解析 (GWAS) が行われている乳がんをモデルとして、文献報告のある 7 遺伝子多型を用いて検討したところ、既知のリスク要因と合わせて正確に予測できること、遺伝的リスクグループにより累積リスクが大きく異なること等を見出した。

②エピゲノム解析では、乳がんの症例対照研究の対照群のデータを用いて、末梢血白血球 DNA 中のゲノム全体のメチル化レベルの規定要因候補と考えられる各種血清バイオマーカーとの関連について検討したところ、血清中葉酸・HP 抗体・PG・IGF-1・IGFBP-1 との間には関連が見られなかったが、血清中 CRP・c-peptide・IGFBP-3 レベルとメチル化レベルの間に正の関連が見られた。

ついで HumanMethylation450 アレイを用いた膵がんのゲノム網羅的メチル化レベルのコホート内症例対照研究を開始した。そのために必要な SNP アレイによる品質検査を行い、約 170 人の症例と、マッチングされた約 340 人の対照群を構築した。

③トランスクリプトーム解析では、がん種に特異的な exosome miRNA の候補を選別した、膵臓がん・肺がん・大腸がん (早期)・大腸腺腫及び健常人の血漿検体を用いて、マイクロアレイにより exosome miRNA のプロファイルを作成した。全てのがん種に共通に検出される miRNA が 9 種類存在した。一方、大腸がん・膵臓がん・肺がんに特異的な exosome miRNA は、それぞれ、13、6 及び 33 種類存在することが示唆された。肺がんの血漿 exosome 画分には、他のがん種と比べて miRNA の含有量が多い傾向があった。

④プロテオーム解析では、前年度開発した膵がんの新規マーカー ApoAIIIC 末端のサンドイッチ ELISA キットを開発し、健常者・膵がん・その他の消化器がんを含む血漿 (n=804) で測定したところ、膵がんを健常者から AUC 値 0.87 以上で判

別する検査系構築に成功した。

サンドイッチ ELISA 測定キットを用いて水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質濃度測定を行うために、6 万人コホートより発症した膵がん症例と年齢、性別を一致させた対照症例、計 540 例の血液サンプルを準備した。日本大学松戸歯学部血液収集プロトコルを最適化し、収集を開始、70 例の健常者血漿・血清の登録を行った。

標的絶対定量プロテオミクスの手法を用いて、24 種の膵がんマーカー候補タンパク質に対して、定量系を確立した。膵がん患者由来血漿検体 24 例および健常者由来血漿検体 18 例に対して定量解析を行った結果、膵がん有意に高値を示す 2 タンパク質を有用な膵がんマーカーとして絞り込んだ。さらに、1 候補タンパク質については、活性経路によって 2 つの断片が精製されることが報告されており、血漿中の断片ごとの存在量に部位差が存在することが明らかとなった。

α -アクチニン-4 タンパク質の新規スプライスバリエーション (ACTN4-Va) は、高悪性度肺神経内分泌腫瘍である小細胞性肺がんと大細胞神経内分泌がんの診断に有用なマーカーとして期待されている。今回、血中 ACTN4-Va のサンドイッチ ELISA 測定系を確立するための抗体を作製し、ELISA 測定キットの完成に至った。これにより、血中における ACTN4-Va の存在を確認するツールが揃った。

プロテオーム解析の基本技術である 2DICAL をバージョンアップしたが、ピーク認識で誤差が生じる不具合を見出し、対応を開始した。

⑤メタボローム解析では、本研究において収集した検体のうち、膵がん患者 43 例と健常者 42 例を学習セットとし、膵がん患者 42 例・慢性膵炎患者 23 例・健常者 41 例を検証セットとした。学習セットにおいて膵がん患者と健常者との比較検定を行い、膵がん患者血清では、18 個の代謝物に有意な変動があることが確認できた。さらに、ステップワイズ変数選択・多重ロジスティック回帰分析を用いて Xylitol・1,5-Anhydro-D-glucitol・Histidine・Inositol に基づいた膵がん予測式の作成に成功した。この予測式は、検証セットにおいても感度 71.4%、特異度 78.1%と良好な性能を示した。特に、ステージ II までの膵がん患者に対する感度は 77.8%、慢性膵炎患者における偽陽性率は 17.4%であり、CA19-9 におけるそれぞれ 55.6%、30.4%と比較して明らかに優れていた。これらの結果から、血清メタボロミクスを用いた診断的手法は、膵がん患者をより正確かつ早期に発見できる可能性を持つ有用な方法であることが示された。

D. 考察

①肺腺がんについては、本研究によって同定された 4 つの肺腺がん感受性遺伝子 (TERT・TP63・BPTF・BTNL2) の組み合わせ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。

一方、未分化型胃腺がんの高危険度群捕捉のための固定リスクマーカーとして、PSCA 遺伝子多型は多くの研究グループによる追試がなされるなど、高い信頼性があると考えられるが、さらに積極的な予防の分子標的探索のためには、発がん過程における機能の解明が必須である。これは難易度の高い課題となっているが、胃粘膜以外の細胞におけるがん抑制遺伝子の機能を見出しており、その観点からの研究をさらに粘り強く継続する。

また、本年度に乳がんを例として検討した遺伝的がんリスク予測モデル構築と累積リスク算出方法の有用性が確認されたので、本研究における肺腺がん、びまん型胃がん、膵がん等の遺伝的リスク予測マーカーの同定や高危険度群の捕捉に進む。

②末梢白血球の global methylation level と各種血清バイオマーカーとの関連の解析から、慢性炎症状態およびインスリン抵抗性が高メチル化に関連していることを示唆する結果が得られた。炎症とメチル化の関係は、がんや前がん病変等でも示唆されており、生物学的に合理的なバイオマーカーとなりうる一つの傍証が得られたと考えられる。今後、国際学術雑誌に掲載するとともに、その内容はホームページ (<http://epi.ncc.go.jp/>) にて国民向けにもわかりやすく公表する予定である。

③大腸がん膵臓がんの血液中 exosome miRNA に関しては、検出系の最適化とキット化をめざし国内製薬企業と共同研究を実施中である。既に開発候補となる miRNA の選別は終了し、試料調整と検出系の最適化を進めている。肺がんに関しても、他の国内企業と exosome 単離法の開発及び候補 miRNA の評価について共同研究契約を締結し、H25 年度から共同研究を開始する。早期臨床病期におけるがん存在診断マーカーとして実用化につながる可能性がある。特に、大腸腺腫症例の血液検体 exosome miRNA プロファイルは、健常人と層別できないことから、がん特異的バイオマーカーの確立が期待される。がん種に依存しない、担がん状態を広く検出可能なマーカーと、特定がん種を検出するバイオマーカーの両者が確立できる可能性を示し、がん検診などのスクリーニングから、診断までを対象としたバイオマーカーとして有用であると期待される。

④本年度までに膵がん血漿バイオマーカー候補として、apolipoprotein AII C 末端と、水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質に対する ELISA キットを開発した。今後、膵臓がん高危険度群の検出への有用性を、国立がん研究センター予防検診センターが所有する「多目的コホートにおける膵がんのコホート内症例・対照研究」で検証する予定である。膵臓がん早期診断血漿マーカーとして、実臨床での使用を念頭に、体外診断医薬品への承認に向けた開発と整備を行う。本キットの利用により、膵がんのスクリーニングや高危険度群の絞り込みに利用できる可能性がある。

また、本研究における標的絶対定量プロテオミク

ス解析に基づき、早期診断マーカーとしての有用性が定量的に解明された 2 分子に加え、膵がんマーカー候補タンパク質として期待できる複数のタンパク質を同時に組み合わせで一斉定量することによって、より高い精度で膵がんを早期に識別診断できる可能性がある。

⑤メタボローム解析では、膵臓がん患者血清、健常者血清、慢性膵炎患者血清においてガスクロマトグラフ質量分析計による水溶性代謝物の網羅的解析を実施し、複数の血中代謝物が 2 群間で有意な変動を示すことを明らかにした。さらに、膵臓がん診断のための予測式を構築し、検証セットによる評価も実施できた。今後、同様の膵臓がん患者血清、健常者血清、慢性膵炎患者血清において、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた脂溶性代謝物の分析を進めていき、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

末梢血検体を用いて、各種オミックス解析を行い、早期診断に基づく適切な早期治療の実現に資するリスク層別化と、がん存在診断のためのスクリーニングに有用なバイオマーカーの開発を進めた。各オミックス毎の本年度の結論は下記の通り：①ゲノム解析では、バイオバンクジャパン等の症例・対照群を用いたゲノム網羅的関連解析から、日本人肺腺がん新規易罹患性遺伝子 2 種を同定・報告した。未分化型胃がんの易罹患性に関わる分子経路解明を継続するとともに、複数の遺伝素因から累積リスクを推定する方法を確立した。

②エピゲノム解析では、血中葉酸・ホモシステイン・ピロリ菌抗体・炎症マーカー・インスリン抵抗性マーカー・肥満関連マーカーと、末梢血 DNA 全体のメチル化レベルとの関連を検討した。血清中 CRP・c-peptide・IGFBP-3 レベルとメチル化レベルの間に正の関連が見られた。

③トランスクリプトーム解析では、肺腺がん・肺小細胞がん・膵臓がん・大腸がん・大腸腺腫・健常人の血漿検体を用いて、exosome miRNA のプロファイルを取得、がん種特異性が低くスクリーニングに適した miRNA と、がん種特異性が高く、診断価値のある miRNA 同定の可能性が示された。

④プロテオーム解析では、膵がんの新規マーカー ApoAII C 末端のサンドイッチ ELISA が、ROC 解析で AUC 0.87 と、優れた性能を示した。同じく膵がんの新規バイオマーカー候補である水酸化プロリン α -フィブリノーゲンと同様、厚労省多目的コホート研究の前向き検体を用いての評価・検証の準備を進めた。

⑤メタボローム解析では、膵臓がん患者血清・健常者血清・慢性膵炎患者血清において、ガスクロマトグラフ質量分析計による水溶性代謝物の網羅的解析を実施し、複数の血中代謝物が 2 群間で有意な変動を示すことを明らかにした。さらに、膵

臓がん診断のための予測式構築に成功し、検証セットによる評価・検証を行った。

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. Yunokawa M, Yoshida T, et al. Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells. *Cancer Sci.* 103(9): 1665-71, 2012 Sep.
2. Shiraishi K, Yoshida T, et al. A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nat Genet.* 44(8): 900-3, 2012 Jul.
3. Iwasaki M, Yoshida T, et al. Association of postmenopausal endogenous sex hormones with global methylation level of leukocyte DNA among Japanese women. *BMC Cancer.* 12(1): 323, 2012 Jul.
4. Tada M, Yoshida T, et al. Genetic polymorphisms of FCGR2A encoding Fcγ receptor IIa in a Japanese population and functional analysis of the L273P variant. *Immunogenetics.* 64(12): 869-77, 2012 Dec.
5. Ono H, Yoshida T, et al. Association of dietary and genetic factors related to one-carbon metabolism with global methylation level of leukocyte DNA. *Cancer Sci.* 103(12): 2159-64, 2012 Dec.
6. Ono H, Yoshida T, et al. Prostate stem cell antigen gene is expressed in islets of pancreas. *Anat Cell Biol.* 45(3): 149-54, 2012 Sep.
7. Saeki N, Yoshida T, et al. Genetic factors related to gastric cancer susceptibility identified using a genome-wide association study. *Cancer Sci.* 2012 Oct 12. 104,1-8
8. Fujita T, Yoshida T, et al. Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice. *Cancer Sci.* 2012 Oct 27. 104,214-222
9. Lan Q, Hsiung CA, ..., Kohno T, ..., Rothman N. Genome-wide association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci in never-smoking women in Asia. *Nature Genetics.* 2012; 44(12):1330-5.
10. Okamoto K. et al. miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. *EMBO J.* 31, 1752-63, 2012
11. Yamanoi K, Katai H, et al. Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer. *Pathol Int* 63(1) 13-19, 2013
12. Terashima M, Katai H, et al. Impact of overexpression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. *Clin Cancer Res* 18(21):5992-6000 2012
13. Kusaka Y, Katai H, et al. Clinical significance of molecular detection of matrix metalloproteinase-1 in bone marrow and peripheral blood in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 19 430-437 2012
14. Ishida M, Katai H, et al. Metachronous liver metastasis from early gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 16(4) 837-841 2012
15. Long J, Iwasaki M, et al. 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.
16. Ma X, Iwasaki M, et al. Long J, Zhang B, Ji BT, Zheng Y, Wang W, Hu Z, Liu Y, Wu PE, Shieh YL, Wang S, Xie X, Ito H, Kasuga Y, Chan KY, Iwata H, Tsugane S, Gao YT, Shu XO, Moses HL, Zheng W. Pathway analyses identify TGFBR2 as potential breast cancer susceptibility gene: results from a consortium study among Asians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21:1176-84.
17. Pandey JP, Iwasaki M, et al. Bu S, Deepe R, Black L, Kasuga Y, Hamada GS, Tsugane S. Genetic markers of immunoglobulin G and susceptibility to breast cancer. *Hum Immunol.* 2012;73:1155-8.
18. Pandey JP, Iwasaki M, et al. Kasuga Y, Hamada GS, Tsugane S. Racially restricted contribution of immunoglobulin Fcγ and Fcγ receptor genotypes to humoral immunity to human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer. *Clin Exp Immunol.* 2013;171:273-7.
19. Sueta A, Ito H, Kawase T, Hirose K, Hosono S, Yatabe Y, Tajima K, Tanaka H, Iwata H, Iwase H et al. A genetic risk predictor for breast cancer using a combination of low-penetrance polymorphisms in a Japanese population. *Breast*

- cancer research and treatment 2012, 132(2):711-721.
20. Yokomizo, Ono, M., et.al Use of quantitative shotgun proteomics to identify fibronectin 1 as a potential plasma biomarker for clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Biomark* 10, 175-83 (2012).
 21. Miyamoto, Ono, M., et.al Identification of 14-3-3gamma as a Micap-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Sci Rep* 2,379 (2012).
 22. Ono, M., Honda, K., et.al Biomarker Discovery of Pancreatic and Gastrointestinal Cancer by 2DICAL: 2-Dimensional Image-Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *Int J Proteomics* 2012, Article ID 897412 (2012).
 23. Fukawa, T, Ono, M., et.al DDX31 regulates the p53-HDM2 pathway and rRNA gene transcription through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas. *Cancer Res* 72, 5867-77 (2012).
 24. Takakura, M, Honda, K., Ono, M. et.al Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol* 2012, Article ID 768190 (2012).
 25. Nakano, T, Ono, M. et.al ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*. *Toxicon* 63, 55-63 (2013).
 26. Honda, K., Ono, M., et.al Proteomic Approaches to the Discovery of Cancer Biomarkers for Early Detection and Personalized Medicine *Jpn J Clin Oncol* 43, 103-9 (2013).
 27. Yoneyama, T, Ono, M. et.al Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated alpha-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. *J Proteome Res* 12, 753-62 (2013).
 28. Honda, K., et.al Altered plasma apolipoprotein modifications in patients with pancreatic cancer: protein characterization and multi-institutional validation. *PLoS ONE* 7:e46908, 2012.
 29. Makuuchi M, Honda, K., et.al Soluble interleukin-6 receptor predicts oesophageal carcinoma response to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Sci* (in press).
 30. Miyanaga A, Honda, K., et.al Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours. *Ann Oncol* 24:84-90, 2013.
 31. Sakane A, Honda, K., et.al Rab13-binding protein (JRAB) orchestrate actin cytoskeletal organization during epithelial junctional development. *J Biol Chem* 287:42455-68, 2012.
 32. Kobayashi T. et al., A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, in press.
2. 学会発表
 1. 吉田輝彦. ゲノム系情報に基づくがんの個別化医療開発・創薬に関する総論的考察. *がんプロシンポジウム「基礎研究を先進がん医療に活かす」*. 東京理科大学野田校舎. 11/30/2012. (基調講演)
 2. 藤田剛、高橋陸宇、千脇史子、柳原五吉、青柳一彦、坂本裕美、深川剛生、片井均、落谷孝広、今野弘之、吉田輝彦、佐々木博己. 腹膜播種におけるびまん性胃癌幹細胞に対するTGF-betaの二元的機能. 第71回日本癌学会学術総会. ロイトン札幌・札幌市教育文化会館・さっぽろ芸文館. (口演 E-1130) 9/19/2012.
 3. 前佛均、口羽文、Siew-Kee Low、清谷一馬、宇野智子、蒔田泰誠、久保充明、平田公一、木村康利、山上裕機、吉田輝彦、坂本裕美、中村祐輔. ゲノムワイド関連解析による膀胱癌発症関連遺伝子およびジェムシタピン副作用関連遺伝子の同定. 第71回日本癌学会学術総会. ロイトン札幌・札幌市教育文化会館・さっぽろ芸文館. (シンポジウム SST3-7) 9/20/2012.
 4. 白石航也、國頭英夫、醍醐弥太郎、後藤功一、坂本裕美、吉田輝彦、中村祐輔、横田淳、河野隆志. 全ゲノム関連解析による肺腺がん感受性遺伝子座の同定. 第71回日本癌学会学術総会. ロイトン札幌・札幌市教育文化会館・さっぽろ芸文館. (口演 J-3124) 9/21/2012.
 5. 土屋直人 他 日本癌学会総会 (2012、札幌)
 6. 緒方広子 他 日本癌学会総会 (2012、札幌)
 7. 栗岡大輔 他 日本分子生物学会 (2012、福岡)
 8. 西田百代 他 日本分子生物学会 (2012、福岡)
 9. 小林知代 他 日本分子生物学会 (2012、福岡)
 10. 木村雄亮 他 日本分子生物学会 (2012、福岡)
 11. Tsuchiya N. *Cell Symposia, Hall Marks of Cancer*. 2012, Sep. San Francisco Tsuchiya N. *Seminar in NCI*. 2012 Oct Bethesda.
 12. 岩崎基、津金昌一郎. 国立がん研究センターにおける分子疫学コホート研究の現状. 第71回日本癌学会学術総会、北海道札幌市、2012年
 13. 山地太樹、岩崎基、笹月静、津金昌一郎. 血中のインスリン関連マーカーと大腸腺腫との関連にみられた性差. 第71回日本癌学会学術総会、北海道札幌市、2012年
 14. 道川武紘、井上真奈美、澤田典絵、岩崎基、田中靖人、島津太一、山地太樹、笹月静、溝上雅史、津金昌一郎. 肝炎ウイルス感染と生活習慣による肝がん発生の予測:多目的コホート研究. 第23回日本疫学会学術総会、大阪府吹田市、2013年

15. 60th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics
平成24年5月22日 (Vancouver Convention Center, Vancouver, Canada)
Sakuma T, Ono M, Kuwabara H, Banno M, Kamita M, Yamada T
Wonder 3: A new computer algorithm for modified protein identification utilizing MS3 multi-tandem mass spectrum
16. 日本プロテオーム学会 2012 年大会
平成24年7月27日 (日本科学未来館、東京都) 紙田正博、きょう建生、酒井義人、伊藤研悠、渡邊研、原田敦、新飯田俊平、山田哲司、尾野雅哉 2DICALを用いた腰部脊柱管狭窄症のプロテオーム解析
17. Hupo 2012 11th Annual World Congress
平成24年9月9日 (Hynes Convention Center, Boston, USA) Kamita M, Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Sakuma T, Honda K, Yamada T, Naito S, Ono M
A New Diagnostic Biomarker for Prostate Cancer Patients Detected by 2DICAL
18. 第71回日本癌学会学術総会
平成24年9月21日 (ホテルロイトン札幌、札幌市)
高倉美智子、横溝晃、紙田正博、宮永晃彦、渡辺隆文、鄭基晩、山田哲司、内藤誠二、尾野雅哉
PSA グレーゾーン値前立腺癌患者の新規診断マーカー。
19. 生命医薬情報学連合大会
平成24年10月17日 (タワーホール船堀、東京都)
尾野雅哉
プロテオームのがん診断と治療への応用
20. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会
平成23年10月26日 (名古屋国際会議場、名古屋市)
きょう建生、紙田正博、東祥子、伊藤研悠、酒井義人、五十嵐文子、渡辺研、山田哲司、尾野雅哉、原田敦、新飯田俊平
プロテオミクスを基盤とした脊柱管狭窄症肥厚靭帯のタンパク質局在
21. 9th AACR-JCA Joint Conferences
平成25年2月22日 (Hyatt Regency Maui, Maui, USA)
Ono M, Kamita M, Yamada T
A new diagnostic biomarker for prostate cancer patients revealed by 2DICAL
22. Honda K, Yamada T. Rapid biomarker validation by high-density plasma protein array. 2nd Reverse Phase Protein Array Global Meeting Nov. 2012, Edinburg.
23. Miyanaga A, Honda K, Masuda M, Watabe Y, Watanabe T, Shinagawa S, Asamura H, Gemma A, Yamada T. Prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumors (poster presentation). 第71回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
24. Honda K, Yamamoto S, Tsuda S, Yamada T. Prognostic and predictive biomarker discovery for advanced ovarian cancer by high-throughput tissue microarray screen. (English Oral session). 第71回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
25. Masuda M, Honda K, Yamada T. Phosphoproteomics with reverse phase protein microarrays: Identification of a potential response predictor to Sorafenib. (English Oral Session). 第71回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
26. Miyanaga A, Honda K, Tsuta K, Masuda M, Tsuda H, Gemma A, Yamada T. Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumors. ESMO congress 2012, Sep. 2012 Vienna.
27. Honda K, Noro R, Miura N, Tsuta K, Ishi G, Tsuda H, Gemma A, Asamura H, Nagai K, Yamada T. GENE Amplification of ACTN4 in lung cancer: a novel prognostic indicator for stage-I adenocarcinoma of the lung. ESMO congress 2012, Sep. 2012 Vienna.
28. 大槻純男: 定量とくすりからアプローチする疾患プロテオーム解析、北里疾患プロテオーム研究会、2012年8月23日、神奈川
29. 大槻純男: 定量的標的プロテオミクスから切り拓くがん診断と個別化治療、臨床応用を目指した最前線セミナー、2012年9月28日、東京
30. 米山敏広、大槻純男、尾野雅哉、大峰健、内田康雄、立川正憲、寺崎哲也: LC-MS/MS-based Quantification of proline-hydroxylated α -Fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis、第6回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2012年11月23日、京都
- 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（研究事業）
（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

肺腺がんの新規遺伝素因の同定を目的として、国立がん研究センター並びにバイオバンクジャパンからなる肺腺がん症例 6,029 例と非がん対照 13,535 例を用いた三段階スクリーニングにより、既知の TERT 座、TP63 座の他に新規座として BPTF 座、BTNL2 座を同定するに至った。今後これらを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いただきます。

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

肺発がんの新規遺伝素因を同定し、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

当センター（NCC）肺腺がん 1,695 例と文科省バイオバンクジャパン（BBJ）非がん対照 5,333 例の血液由来 DNA を用いて、約 100 万多型に関する全ゲノム関連解析を行った。上位 125SNPs について、NCC 及び BBJ 肺腺がん症例 2,955 例と BBJ 非がん対照 7,053 例を用いて、検証研究を行った。さらに有意な差が認められた 8SNPs について、NCC 肺腺がん症例 1,379 例と非がん対照 1,166 例を用いて、検証研究を行った。

その結果、既知遺伝子座である 5p15.33 (TERT: rs2736100)、3q28 (TP63: rs10937405)座の他に、新規感受性遺伝子座として、17q24.3 (BPTF: rs7216064, $P=7.4 \times 10^{-11}$, OR = 1.20)、6p21.3 (BTNL2: rs3817963, $P=2.7 \times 10^{-10}$, OR = 1.18) を同定した。一方で、我々は非喫煙者で女性アジア人を対象とした 6 カ国からなる国際 GWAS に参画し、10q25.2 (VTI1A)、6q22.2 (ROS1-DCBLD1)、6p21.32 (HLA-class II region) を新規肺がん感受性遺伝子として同定した。また、全ゲノムレベルでの有意差には至らないものの、上記新規座についてもリスクと関連していることが確認された。

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、8 割強の DNA サンプルの収集を完了した。現在、残りの検体からの DNA 抽出と、喫煙歴といった診療情報の収集を行い、関連解析を行うための準備を進めている。

D. 考察

我々が同定した感受性遺伝子の多型は少なくともアジア人において肺がんリスクと関連すると考えられ、また女性非喫煙者アジア人を対象とした GWAS の結果からもさらなる感受性座位も存在すること

が示唆された。今後は、発がん経路別の解析や、他施設症例を含めた国内・国際 GWAS に参画することで、肺がんの遺伝要因の解明を目指すとともに、個別化予防の実現へ向け、研究を進展させたい。

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 4 遺伝子座を得た。今後は複数の感受性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、高危険度群の捕捉を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入する。

G. 研究発表

論文発表

1. Shiraishi K, Kunitoh H, ..., Kohno T. A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nature Genetics*. 2012;44(8):900-3.

2. Lan Q, Hsiung CA, ..., Kohno T, ..., Rothman N. Genome-wide association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci in never-smoking women in Asia. *Nature Genetics*. 2012; 44(12):1330-5.

学会発表

なし

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（研究事業）
（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

研究要旨 膵臓がん、肺がん、大腸がん患者血漿エクソソーム中に含まれる miRNA を網羅的に解析し、がん種に共通して高値を示す miRNA を複数同定した。また、各がん種に特異的に高値を示す miRNA に関しても同定することに成功した。

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

がん患者血漿検体から超遠心法でエクソソーム画分を濃縮し、RNAを調製した後、miRNAマイクロアレイを用いて、プロファイルを作成し、各々を健常人と比較検討した

（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

マイクロアレイによるプロファイリングの結果、すべてのがん種に共通して高値を示す血漿エクソソームmiRNAを9種類同定した。また、膵がん、肺がん、大腸がんの特異的なエクソソームmiRNAを、それぞれ、13、6、及び9種類同定することに成功した。

D. 考察

すべてのがん種に共通する9種類のmiRNAは担癌状態をスクリーニングするバイオマーカーとして有用である可能性がある。がん種に特異的なmiRNAは、がん原発臓器の特定に有効なバイオマーカーとして応用可能であることが期待できる。また、両者を用いてがんの検診から診断まで広範囲を網羅する有効なバイオマーカーの開発が期待できる。

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し、膵臓がん、大腸がん、肺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

G. 研究発表

1. 論文発表

Okamoto K. et al. EMBO J. 31, 1752-63, 2012

緒方広子、土屋直人 細胞工学 32 2013

2. 学会発表

土屋直人 他 日本癌学会総会 (2012、札幌)
緒方広子 他 日本癌学会総会 (2012、札幌)
栗岡大輔 他 日本分子生物学会 (2012、福岡)
西田百代 他 日本分子生物学会 (2012、福岡)
小林知代 他 日本分子生物学会 (2012、福岡)
木村雄亮 他 日本分子生物学会 (2012、福岡)
Tsuchiya N. Cell Symposia, Hall Marks of Cancer. 2012, Sep. San Francisco
Tsuchiya N. Seminar in NCI. 2012 Oct Bethesda.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明名称：膵臓癌の検査方法及び検査キット

発明者：土屋直人他

出願番号：特願2012-144524

出願人：（独）国立がん研究センター

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）
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対照群のデータを用いて、メチル化レベルの規定要因として血清バイオマーカー（葉酸、高感度 C-reactive protein (CRP)、Helicobacter pylori (HP)抗体、pepsinogen (PG)、c-peptide、insulin-like growth factor-I (IGF-I)、insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1、IGFBP-3）との関連について検討した。その結果、血清中 CRP および IGFBP-3 レベルとメチル化レベルの間に有意な正の関連が見られた。また血清中 c-peptide レベルとの間に正の関連が観察されたが、統計学的に有意な結果ではなかった。その他、血清中葉酸、HP 抗体、PG、IGF-I、IGFBP-1 との間には関連が見られなかった。これらの結果は、慢性炎症状態およびインスリン抵抗性は高メチル化に関連していることを示唆するものである。また、前向きコホート研究のデータを用いて膵がんのコホート内症例対照研究のデータセットを構築し、末梢血白血球 DNA 中の網羅的メチル化解析およびゲノム網羅的 SNP 解析を開始した。さらに血漿検体について、プロテオーム解析およびメタボローム解析用に分注作業を開始した。

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対照群のデータを用いて、ゲノム全体のメチル化レベルの規定要因として血清バイオマーカーとの関連について検討した（研究①）。さらに前向きコホート研究のデータを用いて末梢血白血球 DNA 中のメチル化レベルおよび遺伝要因と膵がん罹患リスクとの関連を明らかにするために、膵がんのコホート内症例対照研究のデータセットを構築し、生体試料の分析を開始した（研究②）。

B. 研究方法

【研究①】

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。本研究では、この症例対照のセットのうち、対照群を解析対象とした。

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 (DNA抽出用)、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。

血清バイオマーカーとして、葉酸、高感度C-reactive protein (CRP)、Helicobacter pylori (HP)抗体、pepsinogen (PG)、c-peptide、insulin-like growth factor-I (IGF-I)、insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1、IGFBP-3を対象とした。葉酸とc-peptideは化学発光酵素免疫測定法、CRPはラテックス粒子を用いた免疫比濁法、HP抗体とPGは酵素免疫測定法、IGF-I、IGFBP-1、IGFBP-3は免疫放射定量法により分析した。

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人を対象とした。

回帰分析を用いて、血清中レベルの4分位カテゴリまたはIndexカテゴリごとに、年齢、body mass index、喫煙、飲酒、身体活動、エネルギー調整葉酸摂取量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。

【研究②】

1. 対象者

岩手県二戸、秋田県横手、長野県佐久、沖縄県中部(以上、1990年開始のコホートI)、茨

城県水戸、新潟県柏崎、高知県中央東、長崎県上五島、沖縄県宮古、大阪府吹田市(以上、1993年開始のコホートII)の10保健所管内に研究開始時点で在住していた地域住民約14万人(40~69歳)のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった者から、追跡開始後に判明した不適格者(外国人、調査開始前の転出者、対象年齢外の者、重複登録者)、膵がんの既往がある者を除外した対象者をサンプリング対象とした。

症例はベースライン調査後から2009年12月31日までの追跡期間中に診断された初発の膵がん患者のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった170人である。対照は、症例の膵がん発症日(診断日)の時点で膵がんにかかっていない者から、症例と性、年齢(5歳階級)、保健所、空腹時間(7時間未満か以上か)の条件でマッチングし、条件にあう対象者の中からさらに無作為に2名を選び対照とした。

血漿検体の分析は、症例群170例、対照群340例のデータが利用可能であるが、大阪吹田地域はDNA検体が利用できないため、メチル化解析およびSNP解析は症例群150例、対照群300例が解析対象者である。

2. 調査方法

ベースライン調査(生活習慣アンケート調査、血液の採取・保存)およびフォローアップ調査(異動、死亡、疾病罹患の把握)は、「厚生省コホート研究班コホートI実施要綱」「厚生省コホート研究班コホートII実施要綱」「多目的コホートに基づくがん予防など健康の維持・増進に役立つエビデンスの構築に関する研究研究計画書—平成22年度改訂・平成24年度修正版—」(国立がん研究センター倫理審査委員会平成22年11月改訂版承認、平成24年8月修正版承認)に基づいて実施してきた。

3. 生体試料の分析

ベースライン調査にて採取したbuffy coat検体よりDNAを抽出し、イルミナ社 Infinium HumanMethylation450 ビーズチップを用いてゲノム網羅的なメチル化レベルの解析を行う。同時にイルミナ社 Human Omni Express によるゲノム網羅的SNP解析も行う。

(倫理面への配慮)

長野における乳がん症例対照研究および多目的コホート研究は、国立がん研究センター研究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

【研究①】

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。

血清中葉酸レベルとメチル化レベルの間には有意な関連は観察されなかった。葉酸レベルの 10 分位でカテゴリ化した場合でも関連は見られなかった。また葉酸代謝に関連する栄養素および遺伝子多型によるサブグループ解析でも結果は同じであった。

血清中 CRP レベルの 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% ずつ高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、HP 抗体および PG との間に有意な関連は見られなかった。

血清中 c-peptide レベルの 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 0.29% ずつ高くなる傾向が見られたが、これは統計学的には有意な関連ではなかった ($p = 0.08$)。

IGF ホルモンについては、血清中 IGFBP-3 レベルの 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% ずつ高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、IGF-I および IGFBP-1 との間には有意な関連は観察されなかった。

【研究②】

症例群 150 例、対照群 300 例について、buffy coat 検体より DNA を抽出し、イルミナ社 Infinium Human Methylation 450 ビーズチップを用いたゲノム網羅的なメチル化レベルの解析、イルミナ社 Human Omni Express を用いたゲノム網羅的 SNP 解析を開始した。

また症例群 170 例、対照群 340 例について、血漿検体 (1mL) をプロテオーム解析およびメタボローム解析用に分注を開始した。

D. 考察

【研究①】

同じ対照群を用いて葉酸摂取量とメチル化レベルの関連を検討し、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とを報告している。一方、今回は血清中葉酸レベルとメチル化レベルの間に関連は観察されず、我々の先行研究の結果に矛盾する結果であった。曝露評価の特徴として、食物摂取頻度調査票から推定した葉酸摂取量は、比較的長期の曝露を反映する指標であるが、血清中葉酸レベルは直前の食事の影響を受けやすく、比較的短期の曝露を反映する指標であり、このような曝露評価方法の違いが結果の違いに影響した可能性が考えられ

る。一方、今回の結果は、一般健常人における葉酸摂取量および血中葉酸レベルとは関連は見られないという先行研究に一致するものであった。

血清中 CRP レベルとメチル化レベルの間には有意な正の関連が見られた。また統計学的には有意な結果ではないが、血清中 c-peptide レベルとの間にも正の関連が観察された。慢性炎症状態およびインスリン抵抗性は高メチル化に関連していることを示唆する結果と考えられる。先行研究はごくわずかであるが、同様の結果を報告した研究が 1 件ずつある。

本研究の方法論上の問題点は、断面研究であるため、原因か結果かの区別ができないことである。つまり血清中 CRP レベルが高い結果としてメチル化レベルが高くなるのか、メチル化レベルが高い結果として血清中 CRP レベルが高くなるのかは、研究デザイン上、区別することはできない。また本研究では、末梢血白血球中 DNA のメチル化レベルを測定しているが、白血球の分画の情報はなく、構成される細胞の割合による影響は考慮できていない。

【研究②】

1990 年台に採取された buffy coat 検体からもメチル化解析および SNP 解析に必要な量と質の DNA が抽出できた。現在、メチル化解析および SNP 解析を行っているが、特に大きな問題もなく、順調に進捗している。

分注を開始した血漿検体については、本研究班の分担研究者らによりプロテオーム解析およびメタボローム解析を行なう予定である。

E. 結論

今年度は乳がんの症例対照研究の対照群のデータを用いて、末梢血白血球 DNA 中のゲノム全体のメチル化レベルの規定要因として血清バイオマーカーとの関連について検討したところ、血清中葉酸、HP 抗体、PG、IGF-I、IGFBP-1 との間には関連が見られなかったが、血清中 CRP、c-peptide、IGFBP-3 レベルとメチル化レベルの間に正の関連が見られ、慢性炎症状態およびインスリン抵抗性は高メチル化に関連していることを示唆する結果が得られた。また、前向きコホート研究のデータを用いて膵がんのコホート内症例対照研究のデータセットを構築し、末梢血白血球 DNA 中の網羅的メチル化解析およびゲノム網羅的 SNP 解析を開始した。

F. 研究発表

1. Iwasaki M, Ono H, Kuchiba A, Kasuga Y,

- Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Yoshida T, Tsugane S. Association of postmenopausal endogenous sex hormones with global methylation level of leukocyte DNA among Japanese women. *BMC Cancer*. 2012;12:323.
2. 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.
 3. Ma X, Beeghly-Fadiel A, Lu W, Shi J, Xiang YB, Cai Q, Shen H, Shen CY, Ren Z, Matsuo K, Khoo US, Iwasaki M, Long J, Zhang B, Ji BT, Zheng Y, Wang W, Hu Z, Liu Y, Wu PE, Shieh YL, Wang S, Xie X, Ito H, Kasuga Y, Chan KY, Iwata H, Tsugane S, Gao YT, Shu XO, Moses HL, Zheng W. Pathway analyses identify TGFBR2 as potential breast cancer susceptibility gene: results from a consortium study among Asians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21:1176-84.
 4. Ono H, Iwasaki M, Kuchiba A, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Ohnami S, Sakamoto H, Yoshida T, Tsugane S. Association of dietary and genetic factors related to one-carbon metabolism with global methylation level of leukocyte DNA. *Cancer Sci*. 2012;103:2159-64.
 5. Pandey JP, Kistner-Griffin E, Iwasaki M, Bu S, Deepe R, Black L, Kasuga Y, Hamada GS, Tsugane S. Genetic markers of immunoglobulin G and susceptibility to breast cancer. *Hum Immunol*. 2012;73:1155-8.
 6. Pandey JP, Namboodiri AM, Kistner-Griffin E, Iwasaki M, Kasuga Y, Hamada GS, Tsugane S. Racially restricted contribution of immunoglobulin Fcγ1 and Fcγ2 receptor genotypes to humoral immunity to human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer. *Clin Exp Immunol*. 2013;171:273-7.
 7. Zheng W, Zhang B, Cai Q, Sung H, Michailidou K, Shi J, Choi JY, Long J, Dennis J, Humphreys MK, Wang Q, Lu W, Gao YT, Li C, Cai H, Park SK, Yoo KY, Noh DY, Han W, Dunning AM, Benitez J, Vincent D, Bacot F, Tessier D, Kim SW, Lee MH, Lee JW, Lee JY, Xiang YB, Zheng Y, Wang W, Ji BT, Matsuo K, Ito H, Iwata H, Tanaka H, Wu AH, Tseng CC, Van Den Berg D, Stram DO, Teo SH, Yip CH, Kang IN, Wong TY, Shen CY, Yu JC, Huang CS, Hou MF, Hartman M, Miao H, Lee SC, Putti TC, Muir K, Lophatananon A, Stewart-Brown S, Siriwanarangsarn P, Sangrajrang S, Shen H, Chen K, Wu PE, Ren Z, Haiman CA, Sueta A, Kim MK, Khoo US, Iwasaki M, Pharoah PD, Wen W, Hall P, Shu XO, Easton DF, Kang D. Common genetic determinants of breast-cancer risk in East Asian women: a collaborative study of 23 637 breast cancer cases and 25 579 controls. *Human molecular genetics*. 2013.
2. 学会発表
 1. 岩崎基、津金昌一郎. 国立がん研究センターにおける分子疫学コホート研究の現状. 第71回日本癌学会学術総会、北海道札幌市、2012年
 2. 山地太樹、岩崎基、笹月静、津金昌一郎. 血中のインスリン関連マーカーと大腸腺腫との関連にみられた性差. 第71回日本癌学会学術総会、北海道札幌市、2012年
 3. 道川武紘、井上真奈美、澤田典絵、岩崎基、田中靖人、島津太一、山地太樹、笹月静、溝上雅史、津金昌一郎. 肝炎ウイルス感染と生活習慣による肝がん発生の予測:多目的コホート研究. 第23回日本疫学会学術総会、大阪府吹田市、2013年
- G. 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
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

複数の乳がんリスク関連遺伝子多型を用いた遺伝的乳がんリスク予測モデルの構築と遺伝的リスク別の乳がん累積リスク

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

欧米人の Genome-wide association studies (GWASs) で乳がんリスクとの関連を示す複数の遺伝子多型が見出されている。我々は、愛知県がんセンター病院疫学プログラムに参加した女性を対象とした症例対照研究により、これらの遺伝子多型と乳がんリスクの関連を検討し、遺伝的リスクモデルを構築した。さらに、これらの結果を基に、遺伝的リスク別の乳がん累積リスクを算出した。

2001-2005 年に愛知県がんセンター疫学研究プログラムに参加した乳がん症例 697 例と非がん対照者 1394 例を対象とした症例対照研究により、GWAS で見出された 7 つの遺伝子多型 (rs10931936 rs4973768 rs2046210 rs1251615 rs2981579 rs3818198 rs3803662) による乳がんの遺伝的リスクを、条件付きロジスティックモデルから算出されるオッズ比と 95%信頼区間 (CI) で評価した。上記で得られたオッズ比と 95%信頼区間、対照群の遺伝的リスクグループ (低、中、高、超高) の頻度分布、地域がん登録データから得られる乳がんの年齢階級別罹患率と日本人の年齢分布 (2003 年、国立がん研究センターがん対策情報センター提供) を用い、Peto らの方法 (BMJ 2000) により、累積リスクと 95%CI を算出した。

対照群において、7 つの遺伝子多型を組み合わせた時のリスクアレルの数が 0-3 (低リスク)、4-5 (中リスク)、6-7 (高リスク)、8-14 (超高リスク) グループの頻度は、それぞれ、18.7%、44.3%、30.9%、6.1%であった。低リスクグループに比べて、中、高、超高リスクグループのオッズ比は、それぞれ、1.35 (95%CI 1.01-1.83)、1.71 (1.27-2.31)、3.41 (2.26-5.17) であった。低、中、高、超高リスクグループの 75 歳までの乳がん累積罹患リスクは、それぞれ、6.5% (4.9-8.5)、8.8% (8.6-9.5)、10.9% (10.6-11.3)、20.6% (18.1-23.1) であった。

遺伝的リスクグループ毎の乳がん罹患の累積リスクを算出した本研究成果は、遺伝的要因が乳がんリスクに及ぼす影響の大きさを効果的に示すものであるとともに、個別化乳がん予防の重要性を示唆するものであった。

A. 研究目的

いくつかのGenome-wide association study (GWAS)において、乳がんリスクと関連する遺伝子多型が同定されている。しかし、これらのGWASは欧米人を対象として実施されており、同定された遺伝子多型が日本人の乳がんリスク予測因子として機能するかの検討は十分に行われていない。

本研究では、GWASで同定された23の遺伝子多型と乳がんリスクとの関連を検討し、日本人における乳がんリスク予測モデルの構築を目的として症例対照研究を行った。さらに、本研究の結果を基に、遺伝的リスク別の乳がん累積リスクを算出した。

B. 研究方法

対象は、2001年から2005年に愛知県がんセンター中央病院で実施されている病院疫学研究に参加した対象者の中から選択した。参加のうち、697名の初発乳がん患者と、同時期に受診し、年齢を適合させた1,394名の非がん対照者を用いた症例対照研究を実施した。

受診時に自記式の質問票により、喫煙状況、飲酒状況、BMI、運動習慣、胃がんの家族歴等、第一子の出産年齢等生殖要因の交絡要因を参加者より聴取している。また同時に提供を受けた血液検体よりDNAを抽出し、23遺伝子多型

(FGFR2-rs11200014, rs2981579, rs2981578, rs1219648, rs2420946, rs2981582, TOX3/TNRC9-rs12443621, rs8051542, rs3803662, MAP3K1-rs889312, LOC643714-rs4784227, MRPS30-rs10941679, C6orf97-rs2046210, rs3757318, RNF146-rs2180341, LSP1-rs3817198, CASP8-rs10931936, RAD51L1-rs8009944, EMBP1-rs11249433, SLC4A7-rs4973768, 5p12-rs9790879, 8q24-rs1328615, 2q35-rs13387042)の測定に用いた。遺伝子多型の決定には、TaqMan法を用いた。

遺伝子多型と乳がんリスクとの関連の指標として、条件付き多変量ロジスティック回帰モデルを用いたオッズ比とその95%信頼区間を用いた。多変量解析モデルには、既知の交絡要因を調整因子として投入した。対照群において、各遺伝子座のHardy-Weinberg連鎖不平衡からの乖離を検討し、東海遺伝子座が統計学的に有意に乖離している場合には検討項目から除外した。

乳がんリスク予測モデルに含める遺伝子多型は、3つのロジスティックモデル(per allele, dominant, recessive model)のいずれかにおいて $p < 0.15$ の基準で選定した。同一遺伝子より複数の多型が選択され、それらが強い連鎖不平衡にあった場合には、 p 値の最も低いものを選択した。選定された遺伝子多型のリスクアレル数を合算し、遺伝的リスクとした。リスクアレル数により4つの遺伝的リスクグループに対象を分類した。

構築されたリスク予測モデルの正確性について、ROC解析で遺伝的リスク要因のみ、年齢、初産年齢、乳がん家族歴、BMI、運動からなる既知のリスク要因のみ、遺伝的+既知のリスク要因に

よる3つのモデルの曲線下面積(AUC)を比較することで、検討した。

遺伝的リスク別の累積リスクについては、Petoらの方法(BMJ 2000)により、遺伝的リスクグループのオッズ比、対照群における遺伝的リスクグループの頻度分布、2003年日本人女性人口、2003年乳がん5歳階級別罹患率(国立がん研究センター提供)を用いて算出した。

(倫理面への配慮)

この研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき計画され、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて「初診患者を対象とした癌遺伝子多型と環境要因の交互作用の研究」として承認を受けている。実施においては、研究対象者よりインフォームドコンセントを行った上で安全に実施された。

C. 研究結果

23の遺伝子多型から、選定基準により7つの遺伝子多型を選定した。選定された7つの遺伝子多型と乳がんリスクとの関連は、表1に示すとおりである。対照群における低リスク、中リスク、高リスク、超高リスクの頻度は、それぞれ、18.7%、44.3%、30.9%、6.1%であった(表2)。低リスクグループと比較して、中リスク、高リスク、超高リスクグループのオッズ比は、それぞれ1.36(95%信頼区間:1.01-1.83)1.71(1.26-2.31)、3.41(2.25-5.16)(傾向性 p 値 7.1×10^{-9})であった(表2)。

次に、遺伝的リスク要因、既知のリスク要因、遺伝的要因と既知のリスク要因による3つの乳がんリスク予測モデルについて、ROC解析を行った。遺伝的リスク要因のみのリスク予測モデルのAUCは0.5943と、既知のリスク要因によるモデル、両要因を服モデルのAUC(0.6752, 0.7027)に比べて、統計学的有意に低く、乳がんリスク予測能は不十分であった($p=4.0 \times 10^{-38}$, 図1)。また、両要因によるモデルは、既知のリスク要因によるモデルより、統計学的有意にリスク予測能が高かった($p=6.5 \times 10^{-5}$)。

最後に、遺伝的リスクグループ毎の乳がん累積リスクを算出した(図2)。低、中、高、超高リスクグループの75歳までの乳がん累積リスクは、6.5%(4.9-8.5%)、8.8%(8.6-9.5%)、10.9%(10.6-11.3%)、20.6%(18.1-23.1%)と、遺伝的リスクによって、累積リスクは大きく異なっていた。

D. 考察

乳がんの遺伝的リスク予測モデルを構築した。本研究の結果より、乳がんリスク予測には、遺伝的要因のみでは不十分で、環境要因や生殖要因といった既知のリスク要因と合わせて予測する必要があることが分かった。

また、遺伝的リスクによって、乳がん罹患累積リスクが大きくなったことから、遺伝的リスクごとに個別化された一次予防(リスク評価とリスク変容)や二次予防(検診頻度や強度

等)の重要性が示唆された。

本研究で用いた遺伝的がんリスク予測モデル構築やがん罹患累積リスク算出の手法は、びまん型胃癌、肺癌、膵臓がん等の難治性のがんにも適用することができ、これらのがんにおける遺伝的リスク予測マーカーの同定や高危険群の捕捉に役立つものと考えられた。

E. 結論

乳がんの遺伝的リスク予測モデルを構築し遺伝的リスクグループ別の乳がん罹患累積リスクを算出した本研究は、遺伝的要因が乳がんリスクに及ぼす影響の大きさを効果的に示すものであるとともに、個別化乳がん予防の重要性を示唆するものであった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sueta A, Ito H, Kawase T, Hirose K, Hosono S, Yatabe Y, Tajima K, Tanaka H, Iwata H, Iwase H et al: A genetic risk predictor for breast cancer using a combination of low-penetrance polymorphisms in a Japanese population. Breast cancer research and treatment 2012, 132(2):711-721.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 遺伝的リスクモデルに含まれる 7 遺伝子多型と乳がんリスク

Chr	Gene in/ Near region	Variant	Risk allele frequency ^a	Adjusted Odds Ratio ^b (95% Confidence interval) p-value		
				Per allele	Dominant	Recessive
2q33-34	CASP8	rs1093193	T 32.6	1.09 (0.94-1.25) 0.253	1.05 (0.87-1.27) 0.614	1.28 (0.95-1.72) 0.106
3p22	SLC4A7	rs4973768	T 17.1	1.27 (1.06-1.52) 0.008	1.29 (1.05-1.59) 0.014	1.52 (0.89-2.58) 0.125
6q25	C6orf97/ESR1	rs2046210	T 28.3	1.29 (1.11-1.48) 0.001	1.44 (1.18-1.74) 0.00022	1.25 (0.92-1.71) 0.154
8q24	FAM84B/cMYC	rs13281615	G 58.2	1.20 (1.04-1.39) 0.010	1.16 (0.88-1.52) 0.290	1.34 (1.10-1.63) 0.004
10q26	FGFR2	rs2981579	T 42.2	1.20 (1.04-1.37) 0.011	1.24 (1.01-1.52) 0.042	1.31 (1.02-1.66) 0.032
11p15	LSP1	rs3817198	T 14.9	1.16 (0.97-1.39) 0.105	1.16 (0.94-1.43) 0.158	1.45 (0.81-2.57) 0.208
16q12	TOX3	rs3803662	T 53.0	1.32 (1.15-1.52) 0.000061	1.41 (1.10-1.80) 0.007	1.50 (1.22-1.84) 0.00012

a Risk allele frequency in controls

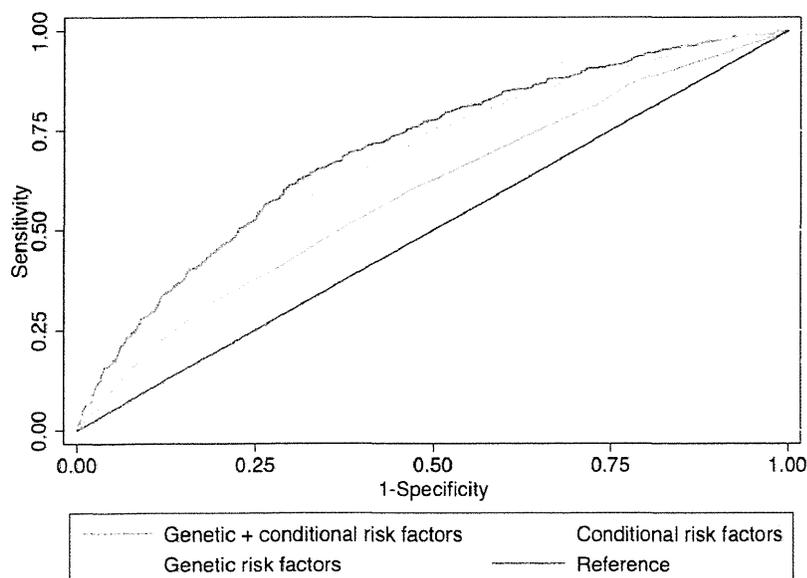
b Odds ratio adjusted for age, age at first live, family history of breast cancer, BMI and regular exercise

表 2. 7 遺伝子多型による遺伝的リスク要因と乳がんリスク

Risk group	Number of risk alleles	Frequency		Adjusted Odds ratio* (95% Confidence interval)	p for trend
		Controls	Cases		
Low	0-3	18.7	13.1	1.00 (Reference)	7.09 x 10 ⁻⁹
Intermediate	4-5	44.3	39.7	1.36 (1.01 – 1.83)	
High	6-7	30.9	35.1	1.71 (1.26 – 2.31)	
Very High	8-11	6.1	12.1	3.41 (2.25-5.16)	

* Odds ratio adjusted for age, age at first live, family history of breast cancer, BMI and regular exercise

図 1. 乳がんにおける遺伝的リスク予測モデル



Model	ROC area (95% confidence Interval)	p value
Genetic+ conditional risk factor	0.7027 (0.6792-0.7262)	4.0 x 10 ⁻³⁸
Conditional factors	0.6752 (0.6511-0.6993)	
Genetic risk factor	0.5943 (0.5685-0.6202)	