

LTBI に対するリスク因子の一つであることを見いだした。一般的に HDL-cholesterol は腸や肝臓から生成された apoA-1 が、マクロファージや末梢組織から ABC トランスポーター (ABC) A1、ABCG1 やスカベンジャーレセプターB1 (SR-B1) を介し、余分なコレステロールを引き抜き、結合することで合成され、末梢組織における脂質除去に重要な役割を担うことで知られている。

さらに近年、HDL-cholesterol は上述のコレステロール除去能に加え、LDL-cholesterol と同様の抗炎症効果をもつことも過去に報告されている。そのため HDL-cholesterol は、病原体の侵入および感染後においても、宿主の免疫応答を抑制し、様々な病原体の感染成立および、感染後における病態経過に大きな影響を与える可能性が考えられた。しかし、病原体-宿主免疫応答に与える影響については不明である。

そこでそのメカニズムについて解析した結果、HDL-cholesterol は抗結核免疫において重要な役割を担うマクロファージの TNF- α 産生を著しく抑制することを確認した。TNF- α は炎症性サイトカインの一つで、病原体の感染など、宿主が病的状況下になると、感染部位のマクロファージ、樹状細胞、T 細胞や B 細胞から産生され、体内の TNF- α レベルは健常者と比較し、有意に上昇する。さらに産生された TNF- α は、結核菌に対する感受性を低下させるとともに、グラニューマ形成および形態維持の促進、ネクローシスによる結核菌の散布を抑制することから、抗酸菌の初感染および潜伏感染の両者における防御免疫において、中心的な役割を担うことが知られている。そのため本研究によって明らかにされた HDL-cholesterol による TNF- α 産生の抑制は、結核菌感染に対するリスク因子としてのみならず、発症のリスク因子としてもはたらき、感染後の病態に影響を与えることも示唆された。

7. MMP-I 抗原を使用したハンセン病の血清診断法の検討

M. leprae が発現する MMP-I 抗原に着目し、MMP-I 抗原を使用した血清診断法により高い感度での PB leprosy の診断が可能かどうか

を検討した。しかし、MB leprosy、PB leprosy いずれにおいても MMP-I 抗原による血清診断法が可能であることは明らかになったが、その感度については従来の MMP-II 抗原による血清診断法を上回るものではなかった。しかし、PB leprosy においては MMP-I 抗原による血清診断法で陽性と診断される群と MMP-II による血清診断法で陽性と診断される群が異なることが示唆された。したがって、MMP-II による血清診断法に MMP-I による血清診断法を組み合わせることで、MMP-II 血清診断法単独では偽陰性と判断された検体を陽性と評価し直すことができるのではないかと考えられる。MMP-II による血清診断法と MMP-I による血清診断法とを組み合わせることで PB leprosy の検出率は 53.8 %まで上昇した。このことは、MMP-I による血清診断法が MMP-II による血清診断法を補完する可能性を示し、MMP-I による血清診断法の有用性を示唆していると言える。

また、先行研究において、PGL-I による血清診断法では日本で採取された血清とベトナムで採取された血清との陽性率が大きく異なることが報告されている。この陽性率の差異について、その機構は不明である。今回の研究で使用した血清はすべて日本で採取されたものであることから、他国の血清を用いて MMP-I 抗原による血清診断法を行った場合には日本の血清とは異なる結果が得られる可能性がある。

8. ハンセン病のもう一つの病原菌 *M. lepromatosis* の簡易検出法に関する研究

ML、MLT および *M. haemophilum* の相同性の比較には、それぞれ 540bp、421bp、564bp と短鎖の塩基配列比較により行ったが、予想に反し *M. haemophilum* 同領域は、ML、MLT と非常に相同性が高いものであった。*M. haemophilum* は、培養時ヘミン要求性であり、生育至適温度が 31~32°C と他の抗酸菌と比較し低い。ヒトへの病原性としては、温度の低い皮膚領域にその主徴を見、報告のほとんどが、免疫抑制時の日和見感染である。ML も人工培地での培養はできないが、ヌードマウスにより増殖させた菌体の研究から生育至適温度は 32°C 付近とされ、かつ皮膚病変を大きな特徴としている。このよ

うに ML と *M. haemophilum* は、細菌学のおよび病原性に、他の抗酸菌と比較し非常に近似性があり、また今回の PCR の特異性検討、塩基配列解析からも *M. haemophilum*、ML および MLT の 3 種の細菌学的な特徴比較は、細菌学的にも興味深いものと考えられた。また、我が国においては *M. haemophilum* 感染症は稀な感染症であり、ハンセン病との遺伝子を用いた鑑別には十分な注意が必要と考えられた。

ML の高感度検出 PCR の標的遺伝子領域として RLEP が汎用されている。RLEP は、らい菌ゲノム内に 20 コピー前後存在するリピート配列のため、通常 1 コピーである他の標的遺伝子領域より高感度な検出が可能である。しかし、過去の RLEP PCR 陰性ハンセン病サンプルより MLT を検出した報告もあり RLEP は、MLT に存在していない可能性がある。一般細菌の同定と異なり、ML は、人工培地で分離培養ができず、かつ極微量の試料に存在する少ない菌体を用いるため高感度な PCR 法は必須の手法である。RLEP が存在しなければ、今後他の領域の検討が必要と考えられた。

MLT は、ハンセン病の重篤な病型である DLL 患者より同定されたため、その病原性が ML より強いことが示唆されている。しかし、現在世界的な疫学調査が行われていないため、その分布範囲、MLT 単独感染か、ML との重感染か、など不明な点が多く、早急な結論付けはできない。今回開発された簡易手法はその疫学調査に大きく寄与するものと考えられた。

9. アジアにおけるハンセン病早期病型診断法の開発

らい反応と関わりの深い多剤併用療法の効果を評価するには、患者由来生体試料に存在するらい菌の生存度を定量化する必要がある。そのためには、生存度の指標となり得るらい菌 RNA の正確な定量が一つの重要な手段となる。しかしながら、らい菌 RNA は非常に不安定であるため、これまで、現地の限られた研究設備・環境においては安定的に単離することは困難であった。今回、らい菌 RNA の単離精製に成功した要因としては、強固な細胞壁を持つ微生物から核酸を抽出することに特化したジルコニアビー

ズを使用したことが考えられる。従来のジルコニアビーズは、特殊な専用器材と組み合わせる使用することが求められるが、現地ではこのような器材を導入することが難しい面がある。しかし、今回使用したジルコニアビーズは特殊な加工がされているため、手作業の攪拌でも菌体を簡易的に破碎し、それに続く核酸抽出の効率が高まったと思われる。一方、16SrRNA 量が減少したことは、治療の進行に伴ってらい菌の生存率が低下し多剤併用療法が効果を発揮していることを示している。今後は、様々な治療段階におけるらい菌 RNA 量を評価することで、らい反応へ至る特徴的な動態を見出すことを目指す。

E. 結論

1. INH耐性に関わると予想される新規遺伝子変異を見出した。また、PZAやPOAの作用機序にNAD生合成経路が関わっていることが示唆された。これらの結果を用いて、薬剤耐性結核菌の検出法の改良や新規薬剤の開発に結びつけることによって、結核罹患率の高いアジアの国々で結核対策に役立つことが期待される。

2. 結核菌株の遺伝子解析によりミャンマーにおいて薬剤感受性試験法の精度管理に問題がある可能性を示唆するデータを得た。当該情報は、ミャンマーにおける薬剤感受性試験法の精度管理向上に役に立つものと考えられる。

3. BCG接種により誘導される抗原特異的T細胞機能の制御にはPD-1が重要な役割を果たしているが、それ以外にTim3、CD46あるいはI型IFN等を介した複数の機序が関与することが示された。抗ウイルス活性や抗腫瘍活性の制御ではPD-1が主体となることが示めされていることから、BCG接種で誘導される免疫制御機序はBCGに特徴的であると考えられる。今後、この機序の全体像を明らかにし、ワクチン効果を増強するための有益な情報を提供したい。

4. 本研究から、Peptide-25によるTEMの分化誘導にIL-17Fが必須であり、IL-17F産生

を効果的に誘導できるシステムを組み込むことで成人に有効な結核ワクチンの開発が可能になることが示唆された。

5. IL-12/IFN- γ 経路は、結核菌に対する免疫機構の中で重要な役割を果たしていることが知られており、*IL12RB2*発現の遺伝的背景の違いによる個体差が潜在性結核感染の成立に関与している可能性が示唆された。

6. ケニア共和国のビクロリア湖畔 Mbita 地区で LTBI に対するリスク因子の特定を試みた結果、HDL-cholesterol との間に有意な正の相関を確認し、HDL-cholesterol が LTBI に対するリスク因子の一つであることを明らかにした。さらにそのメカニズムについて、試験管内で解析したところ、HDL-cholesterol は抗結核免疫において重要な役割を担うマクロファージの TNF- α 産生を著しく抑制することを確認した。

7. MMP-I による血清診断法は MMP-II による血清診断法と同程度に MB leprosy、PB leprosy を検出した。また、MMP-I による血清診断法と MMP-II による血清診断法を組み合わせることでより高い感度で PB leprosy を検出できることが示唆された。

8. ハンセン病のもう一つの病原菌 *M. lepromatosis* と *M. leprae* の判別 PCR 法を確立し、これは疫学調査に有用と考えられた。

9. 簡易的ならい菌 RNA の単離法の確立した。さらに、多剤併用療法の進行に伴い、らい菌 RNA 量が減少する傾向が示された。

F. 健康危機情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
添付の表を参照

2. 学会発表
添付の表を参照

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

寄生虫疾患の研究・米側との専門協議に関する研究

担当責任者 平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所・教授

協力研究者 狩野繁之 国立国際医療研究センター研究所 部長
坪井敬文 愛媛大学無細胞研究センター 教授
野崎智義 国立感染症研究所 部長
北 潔 東京大学医学研究科 教授

研究要旨 アジア地域で問題となっている寄生虫疾患として、マラリア、住血吸虫症、赤痢アメーバ症、エキノコックス症を対象に、流行地の研究者および関連する米国の研究者と協力して、予防治療に寄与する研究を行った。

A. 研究目的

アジアに蔓延するマラリア（狩野、坪井）、アメーバ赤痢（野崎）、日本住血吸虫症（平山）、エキノコックス症（北）の制御に資する診断薬、医薬品、ワクチンの開発のための基礎研究を推進し、米国との共同研究推進のための計画立案のための情報を収集することを目的とした。この目的のため、マラリア原虫の薬剤耐性遺伝子の変異発生メカニズム（狩野）、三日熱マラリアワクチン候補抗原の探索（坪井）、赤痢アメーバの細胞質鉄イオウクラスター合成系 CIA の解析（野崎）、ナノボール DNA ワクチンを用いた日本住血吸虫症ワクチンの開発（平山）、抗エキノコックス薬開発に関する研究（北）のタイトルで研究を行い、結果を学術集会あるいは学術誌に発表し、米国側との協議を行った。

B. 研究方法

抗マラリア剤の遺伝子変異促進（狩野）に関しては、大腸菌のストレプトマイシン (Sm)感受性遺伝子 *rpsL* を、原虫／大腸菌の双方へ遺伝導入できるシャトルベクターに組み込み、それを原虫室内系統 FCR3 に外来遺伝導入した原虫株を確立した。その原虫株を遺伝的変異が生じうる条件下で

培養した後、シャトルベクターを回収し大腸菌に再び遺伝導入、*rpsL* 遺伝子座に変異が入り Sm 抵抗性を獲得した大腸菌コロニーを Sm 入り培地上で陽性選択することで、マラリア原虫内で中立的に生じた *rpsL* 上の突然変異を検出する系を用いた。三日熱マラリアワクチン抗原（坪井）については、マラリアゲノムデータベースの情報を元に、三日熱マラリアメロゾイト期に発現が予想されている遺伝子 152 種類を選択した。それらの組換えタンパク質をコムギ無細胞系で発現しプロテインアレイを作製した。このプロテインアレイを用いて、韓国において、22 名の患者血清および 10 名の健常人血清を用いて研究協力者とともに免疫スクリーニングした。赤痢アメーバの鉄イオウクラスター電子伝達系（野崎）は、光合成、遺伝子発現調節、酵素活性調節などに関与する重要な補欠分子属である。主要タンパク質である Cytosolic Fe-S cluster deficient 1 (Cfd1) protein および Nucleotide binding protein 35 (Nbp35)の解析を行った。In silico 構造解析により、Nbp35 の領域 (P33-K35, G131-V135 and I147-E151) と Cfd1 の領域 (G5-V6, M34-D39 and G46-A52) がヘテロ複合体をつくるタンパク質相互作用に関与していること、

Molecular dynamic (MD) シミュレーションにより Nbp35 と Cfd1 の間の疎水性相互作用が親水性相互作用を凌駕していること、安定複合体の形成にファンデルワールス相互作用が重要な役割を果たすことが示唆された。実際に Nbp35 と Cfd1 を大腸菌組換えタンパク質として発現・精製し、タンパク質相互作用をインビトロで確認した。日本住血吸虫症制御ワクチン開発 (平山) のため、すでに組換えタンパク質型のワクチン効果が報告されているグルタチオン S 転移酵素 (SjGST) の遺伝子 DNA を中国株からクローニングし、Vical 社のワクチンプラスミドベクター VR1020 に組み込み、SjGST-DNA ワクチンを調製した。これを佐々木らの開発した 2 重静電結合ナノボール (内層ポリエチレンジアミン、外層 γ ポリグルタミン酸) でコーティングし、東医歯大太田教授との共同研究としてマウスモデルに 3 回免疫し、3 週後にセルカリアのチャレンジ感染を行い、6 週後の門脈の虫体回収数および肝、腸管組織の虫卵数を指標にワクチン効果を判定した。エキノコックス NADH-フマル酸還元系をターゲットとした特異的な阻害効果を示すリード化合物探索 (北) では原頭節からミトコンドリアを調製し NADH-フマル酸還元系の中でも特に複合体 II を阻害する化合物から特異的かつ強い阻害活性をもつ薬剤の検定を行った。

(倫理面への配慮) 坪井の共同研究者である Eun-Taek Han, Department of Medical Environmental Biology and Tropical Medicine, School of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, Korea は、ヒト血清試料を使用したため、所属先である School of Medicine, Kangwon National University 倫理審査委員会にて承認されている。

C. 研究結果

マラリア遺伝子変異促進効果 (狩野) の検定については、ピリミサミンを用いる場合と比較して、ブラストサイジンを用いると大腸菌トランスポゾン等に起因する

バックグランド変異が低くなることが分かった。三日熱マラリアワクチン抗原 (坪井) の患者血清によるスクリーニングにより 5 種類の抗原性の高い原虫タンパク質を同定することが出来た (発表論文 1)。赤痢アメーバの鉄イオウクラスター (野崎) に関して細胞質における CIA システムの存在が確認され、Cfd1 と Nbp35 とが、同じく細胞質に存在する NIF システムの NifS と NifU とともにマイトソーム外での鉄イオウクラスタータンパク質の生産と成熟に関与することが示された (発表論文 2)。日本住血吸虫症ワクチン候補 (平山) NB-SjGST-DNA ワクチンの防御効果は、虫卵数を減少させるいわゆる抗産卵効果が顕著に認められたが、虫体数には全く変化はなかった (発表論文 3, 4)。抗エキノコックス剤の開発 (北) においてはキノン結合部位阻害剤のライブラリーをスクリーニングし、線虫複合体 II に有効であったシッカニン、フルトラニルなどが無効である事、一方新規のフェノール系阻害剤が nM オーダーで酵素を阻害し、しかも哺乳類酵素は全く阻害しない事を見出した (発表論文 5, 6)。予備的な実験からこの新規薬剤は培養系において幼虫を 3 日で全て殺滅する事が観察された。

D. 考察

抗マラリア剤の変異原性 (狩野) に関するアジア地域での調査をここで確立された方法を用いて行うことができる。三日熱マラリアワクチン (坪井) の開発に関する打ち合わせを平成 26 年 11 月に米国ニューオーリンズで開催された第 63 回米国熱帯医学会にて行い、Liwang Cui, Department of Entomology, College of Agricultural Sciences, Penn State University, Pennsylvania, USA と打ち合わせを行った。赤痢アメーバの鉄イオウクラスター (野崎) の主要なコンポーネントの分子性状が明らかとなり、今後の

機能解析の基盤ができた。日本住血吸虫 GST ワクチン (平山) の効果は産卵数にのみ影響したが、これは DNA ワクチンの Th1 タイプの免疫応答惹起傾向を反映しているものと考えられた。抗エキノコックス剤 (北) は、日本を含むアジア各地で必要とされており開発の優先度が高い薬剤である。低酸素環境下で機能するフマル酸呼吸は生活環を通してエキノコックスの生存に必須であり、化学療法の格好の標的と考えられる。今回見出した新規薬剤に関しては誘導体を約 200 種程合成したので、これらの中からより有望なリード化合物を見出して行きたい。

E. 結論

シャトルベクターを導入したマラリア原虫を用いた変異原薬剤のスクリーニング法 (狩野) を確立する準備ができた。プロテインアレイが新規三日熱マラリアワクチン (坪井) 候補抗原の探索システムとして有用である。アメーバ赤痢制御のための医薬品のターゲット候補を同定した。日本住血吸虫症ワクチン開発 (平山) にナノボール DNA ワクチンが有力なツールとなりうる。抗エキノコックス剤 (北) としてフマル酸還元酵素活性を持つ複合体 II を阻害する新規のキノン結合部位阻害剤が有望である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lu F, Li J, Wang B, Cheng Y, Kong DH, Cui L, Ha KS, Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET. Profiling the humoral immune responses to *Plasmodium vivax* infection and identification of candidate

immunogenic rho-try-associated membrane antigen (RAMA). *J Proteomics*. 2014, 102:66-82.

- 2) Anwar, S., Dikhit, M. R., Singh, K. P., Kar, R. K., Zaidi, A., Sahoo, G. C., Roy, A. K., Nozaki, T., Das, P., and Ali, V. Interaction between Nbp35 and Cfd1 proteins of cytosolic Fe-S cluster assembly reveals a stable complex formation in *Entamoeba histolytica*. *PLoS One* 9, e108971, 2014.
- 3) Mbanefo EC, Kumagai T, Kodama Y, Kurosaki T, Furushima-Shimogawara R, Cherif MS, Mizukami S, Kikuchi M, Huy NT, Ohta N, Sasaki H, Hirayama K. Immunogenicity and anti-fecundity effect of nanoparticle coated glutathione S-transferase (SjGST) DNA vaccine against murine *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Int*. 2015 Jan 17;64(4):24-31. doi: 10.1016/j.parint.2015.01.005. [Epub ahead of print]
- 4) Mbanefo EC, Huy NT, Wadagni AA, Eneanya CI, Nwaorgu O, Hirayama K. Host Determinants of Reinfection with Schistosomes in Humans: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Sep 11;8(9):e3164. doi: 10.1371/journal.pntd.0003164. eCollection 2014 Sep.
- 5) Young, L., May, B., Pendlebury-Watt, A., Shearman, J., Elliott, C. Albury, M. S., Shiba, T., Inaoka, D. K., Harada, S., Kita, K. and Moore, A. L. Probing the ubiquinol-binding site of recombinant *Sauromatum guttatum* alternative oxidase expressed in *E. coli* membranes through site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1837, 1219-1225.
- 6) Balogun, E. O., Inaoka, D. K., Shiba, T., Kido, Y., Tsuge, C., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. A.M., Kita, K. and Harada, S. Molecular basis for the reverse reaction of African human trypanosomes glycerol kinase. *Molecular Microbiol.*, 94, 1315-1329.

2. 学会発表

- 1) Tsuboi T, Takashima E, Ito D, Feng Lu, Cheng Y, Han ET. Wheat germ cell-free protein synthesis system (WGCFs): a breakthrough for the post-genome vivax malaria research. 13th International Congress of Parasitology, Mexico City, Mexico, 2014年8月10-15日.
- 2) Tsuboi T. Wheat germ cell-free protein synthesis system: an innovative technology for post-genome malaria vaccine candidate discovery.
第157回日本獣医学会学術集会、日本獣医寄生虫学会国際シンポジウム、札幌市、2014年9月9-12日。
- 3) Tsuboi T. Global Health Innovation through Partnership. 第55回日本熱帯医学会大会・第29回日本国際保健医療学会学術大会合同大会、東京都、2014年11月1-3日。
- 4) Hirayama, K, Kodama, Y, Cherif, MS, Mbanefo, EC, Kumagai, T, Furushima-Shimogawara, R, Kurosaki, T, Yanagi, T, Sasaki, H, Yui, K, Huy Tien, N, Karbwang, J, Ohta.
N.Nano-ball consisted of inner cationic Dendri-grafted poly L-lysines (DGL) or polyethyleneimine (PEI) and outer anionic γ -polyglutamic acid (γ -PGA) enhanced plasmid based DNA vaccines against experimental malaria and schistosomiasis.
第13回国際寄生虫学会(ICOPA)招待講演、2014年8月、メキシコシティ
- 5) 北 潔. ミトコンドリア呼吸鎖の多様性: 寄生虫からがん細胞まで. 札幌(第52回生物物理学会), 2014年9月26日.
- 6) 原田繁春、北 潔. 寄生虫の低酸素エネルギー代謝経路を標的にした構造生命科学による創薬. 京都(第87回日本生化学会大会), 2014年10月16日.
- 7) 北 潔. 低酸素適応におけるミトコンドリアの役割: 寄生虫からがん細胞まで. 福岡(第14回日本ミトコンドリア学会年会). 2014年12月4日

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

環境ゲノミクス・疾患の研究

担当責任者 中釜 斉 独立行政法人国立がん研究センター研究所・所長

研究要旨

アジア諸国に蔓延するがんを含む疾病の減少のために、アジア地域に特徴的な新規の環境要因を明らかにし、それらによるがんを含む疾病の発生機構を解明する。新規のがん予防法の開発や、アジア人に特徴的な遺伝的素因に基づく高危険度群の推定によるがん発生の減少を目指す。

中国での黄砂やPM2.5を含む大気汚染の各指標は日本よりも高く、又、日本で越境汚染が起きていることを示した。中国の食道がん多発地域の検体を用いて、adductome解析と主成分解析を組み合わせて候補を絞り込み、独自に構築したDNA付加体データベースから候補物質を特定した。膵がんリスクと生活習慣、食事との関連及び遺伝的要因を解析し、葉酸摂取量と負の相関を認めた。胆管の正常上皮由来3次元培養細胞に遺伝的再構成を用いて、ヒト胆管がんに変異が報告されたFGFR2融合遺伝子がドライバーがん遺伝子であることを確認し、*in vitro*胆管発がんモデルを確立した。

これらの手法は、他のアジア地域における大気汚染やその越境汚染の解析、がん高発地域に特有の環境要因の特定、アジア人に特徴的な遺伝的素因や環境要因の発がんへの影響の解析に応用可能である。本研究で解明される病因の除去による環境要因特異的ながん発生の低減化や、新規*in vitro*発がんモデルによるがんの本態解明は、日米両国にも資するものである。

A. 研究目的

がんを含むヒトの疾病発生には、環境要因と遺伝的要因、更にはそれらの相互作用が深く関与している。環境要因には外的（環境）要因と内的（環境）要因があり、外的要因としては、地域特有の因子に加え、近年の著しい経済成長による環境悪化に伴うもの（大気汚染等）がある。内的要因としては、自然突然変異に加え、慢性炎症、糖尿病等の影響がある。更に、アジア人と欧米人では遺伝的背景が異なり、アジア人に特徴的な遺伝的素因が地域特有な疾病の発症に影響すると考えられる。

アジア諸国に蔓延するがんを含む疾病の減少のために、アジア地域に特徴的な新規の環境要因を明らかにすると共に、環境要因によるがんを含む疾病の発生機構を解明

する。新規のがん予防法の開発や、アジア人に特徴的な遺伝的素因に基づく高危険度群の推定によるがん発生の減少を目指す。

加えて、日本以外のアジア地域で顕在化しているがんの病因も、日米両国では環境の違いから、主たる病因の陰に潜んでいる可能性があり、本研究で解明されるアジア地域特有な病因の除去により、環境要因特異的ながん発生の低減化を日米両国でも実現できることが期待される。

B. 研究方法

環境要因に関して、経済成長の著しいアジアで問題となっている大気汚染及びその越境汚染(1)と、アジアに多い胃・食道のがん発生の原因となるアジア地域に特徴的な環境要因の同定(2,3)、膵がんでの遺伝的要

因との交互作用の解析(4)を行った。候補要因の発がんへの影響を解析するための、正常上皮細胞を用いる *in vitro* 発がんモデルの開発として(5)を行った。

[]内に研究協力者を示した。

(1) 黄砂やPM2.5を含む長距離輸送性大気汚染及びそのヒト健康への影響

[渡辺徹志 京都薬科大学 教授]

2011年2月～5月(黄砂期)到北京で捕集した大気粉塵について、化学成分(発がん性金属を含む金属元素15種類、イオン類8種類、変異・がん性多環芳香族炭化水素類(PAH)を含むPAH10種類を定量した。また、大気粉塵のネズミチフス菌 YG1024 に対する変異原性を±S9 mix で解析した。これらの結果を2012年11月～2013年2月(冬季)到北京で捕集した大気粉塵の結果と比較した。又、同時期に名古屋で捕集した大気粉塵についても、同様の定量及び試験を行い、北京での結果と比較した。

2008年12月及び2009年3月に西日本及び東日本の10地点において捕集した大気粉塵について PAH と変異・がん原性ニトロ多環芳香族炭化水素 (NPAH) を定量分析した。空気塊の移動経路をアメリカ合衆国海洋大気庁の HYSPLIT を用いて後方流跡線解析により求めた。

(2) ユーラシア大陸の胃がんの分子病理
[梶村春彦 浜松医科大学 教授]

ユーラシア大陸で重要な疾患である胃がんの病因の解明のため、網羅的 DNA 付加体 (adductome) 解析を試みる。その条件検討 (検体の摘出部位、個人差等) を日本の症例を用いて行った。胃がん手術検体の胃粘膜より、腫瘍部からの距離に応じて 3-10 数箇所の検体を採取し、adductome 解析を行った。戸塚らが構築した DNA 付加体データベース (実験動物や DNA との *in vitro* 反応で測定した、DNA 付加体の *m/z* と liquid chromatography の移動度) を用い、255 種の DNA 付加体を一度に測定した。又、内視鏡検査時に胃粘膜の一部を採取して DNA を抽出し、adductome 解析が可能か検討した。

(3) Adductome 解析を用いた中国の食道がん多発地域の発がん要因の探索

[戸塚ゆ加里 (独) 国立がん研究センター ユニット長]

中国の食道がん多発地域 (磁県; n=7) 及び低発地域 (石家荘; n=8) の食道がんの手術検体 (非がん部) から DNA を抽出した。各種ヌクレアーゼにより DNA をモノヌクレオシドに分解し、DNA 付加体を質量分析機器により解析した。得られたデータを主成分解析 (PCA) により、高発地域住民に特徴的な付加体を抽出した。抽出した付加体の同定は、独自に構築した DNA 付加体データベースとの比較により行った。抽出した付加体の各検体中の存在量は、質量分析用の質量分析機器 (Waters Quattro Pt LC-MS/MS) により分析した。

(4) 膀胱がん発生への遺伝的要因の影響及び環境要因との交互作用の検討

[菊地正悟 愛知医科大学 教授]

2010年1月～2012年5月、多施設症例対象研究 (中部、関東、及び北海道にある5施設) を行った。症例は膀胱がん360例、対照は同時期に参加施設において悪性腫瘍以外で通院した400例を用いた。自記式質問票により飲酒や食事等の情報を収集すると共に、血液検体を採取した。食物摂取頻度調査票 (FFQ) を用いた食事調査により、1日当たり葉酸摂取量を推定した。

遺伝子多型と膀胱がんリスクとの関連では、アルコール代謝では、ADH1B (rs1229984)、ALDH2 (rs671) の他、アルコール代謝経路にある7個の遺伝子多型を、葉酸代謝に関する遺伝子は、MTHFR (rs1801133、rs1801131)、MTR (rs1805087)、MTRR (rs1801394) を調べた。Unconditional logistic regression model を用いて統計解析を行い、各項目と膀胱がんリスクの関連を評価した。更に、飲酒習慣や喫煙習慣と遺伝子型との交互作用についても検討した。

(5) 正常上皮細胞由来3次元培養細胞を用いた *in vitro* 発がんモデルの開発

マトリゲルを用いる3次元(3D)培養により樹立した、マウス肝内胆管由来上皮細胞のオルガノイドに、レンチウイルスを用いてがん抑制遺伝子の shRNA を導入し、遺伝的再構成を行った。Kras の活性化は、LSL-Kras^{G12D} マウス由来オルガノイドへ

の Cre recombinase の導入により行った。これらのオルガノイドをヌードマウス皮下に移植し、造腫瘍性を解析した。ヒト胆管がんでの遺伝子変異が報告された新規 FGFR2 融合遺伝子は、レトロウイルスを用いて B6 マウス由来のオルガノイドに導入し、発がんへの影響を解析した。又、最近、ヒト肝内胆管がん遺伝子変異が高頻度に報告されているクロマチンリモデリング遺伝子に関しても解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に際しては、各研究施設の動物実験倫理委員会の承認を得た後に行い、実験動物に対する動物愛護に関して十分配慮して行った。遺伝子組換え生物等を用いる実験については、実施機関の承認を得た。ヒト検体を用いる研究では、各研究施設の倫理委員会の承認を得た後に、各研究施設の指針に従って実験を実施した。対象者に対し研究目的、方法などを詳細に説明したうえで、同意者から書面によるインフォームド・コンセントを取得している。海外で得られた検体に関しては、当該国の共同研究者が所属機関の倫理的承認を得た。

C. 研究結果

(1)黄砂や PM2.5 を含む長距離輸送性大気汚染及びそのヒト健康への影響

大気粉塵濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) は、2011 年 2 月～5 月 (黄砂期) の北京で 87～1372 (平均 406)、2012 年 11 月～2013 年 2 月 (冬季) は 49～830 (平均 329) であり、名古屋より黄砂期は 8 倍、冬季は 10 倍高かった。大気粉塵中の硫酸イオン濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) は、黄砂期の北京で 2.6～78.9 (平均 18)、冬季は 2.4～96.3 (平均 27) であり、名古屋より 5 倍及び 8 倍高かった。大気粉塵中の総 PAHs 濃度 (ng/m^3) は、黄砂期の北京で 5～329 (平均 49)、冬季には 32～1407 (平均 322)、名古屋より 16 倍及び 107 倍高かった。また、大気粉塵抽出物の変異原性 (+S9 mix, revertants / m^3) は、黄砂期の北京で 131～5215 (平均 796)、冬季は 59～3058 (平均 1272)、名古屋より 10 倍及び 15 倍高かった。上述した以外の化学成分 (金属、イオン) の濃度は多くが

北京において名古屋市より数倍高かった。

2008 年 12 月と 2009 年 3 月に捕集した大気粉塵中の 1-ニトロピレン (NP) /ピレン (Pyr) 比は、長崎、鳥取県湯梨浜町、金沢など西日本の日本海沿岸地域では 0.01 以下であり、京都や大阪では 0.03～0.06 であった。埼玉県和光市では 12 月と 3 月でそれぞれ 0.1 と 0.05 であった。後方流跡線解析の結果、3 月の粉塵捕集日には空気塊が中国大陸から速い速度で直接、各捕集地点に流入したと予想された。

(2)ユーラシア大陸の胃がんの分子病理

手術検体 11 例で 255 種の DNA 付加体を解析した結果を、約 20 例の検体で 10 種の DNA 付加体を解析した以前の結果と比較すると、個人間及び部位間とも付加体量・種類数でばらつきが大きかった。

内視鏡検査時に採取した生検検体 3～4 部位から 20～30 μg の DNA を抽出でき、adductome 解析が可能になったことがわかった。

(3)Adductome 解析を用いた中国の食道がん多発地域の発がん要因の探索

食道がん多発地域及び低発地域の食道がんの手術検体 (非がん部) を用いて、adductome 解析を行なった結果、両地域で多量の DNA 付加体が検出された。各々の地域に特徴的な DNA 付加体を探索するために、主成分分析 (PCA) を行った。高発地域に特徴的な付加体として複数の付加体が選択され、これらの DNA 付加体の m/z 値を独自に構築した付加体データベースと比較し、その一つは、既知の付加体、N2-(3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)deoxyguanosine (THP-dG) と推測された。

次に、定量的な質量分析機器を用いて、解析に用いた検体からの THP-dG の検出を試みた。THP-dG の標準品を化学合成して分析条件を確立し、高発地域の手術検体、及び末梢血 DNA を解析した。その結果、標準品である THP-15N-dG と同じ保持時間に同じ m/z シグナルを持つピークが観察され、THP-dG が存在することが示された。

(4)膵がん発生への遺伝的要因の影響及び環境要因との交互作用の検討

症例と対照において、平均年齢 (歳) は 67.8、64.8、喫煙者 (%) は 59.7、49.5、1

日あたり葉酸摂取量(中央値、 μg)は338.9、359.2であった。

非飲酒者と比べた飲酒者のオッズ比は1.01、更に1日飲酒量23g未満、23g以上46g未満、46g以上と分類した場合、オッズ比は各々0.89、1.17、1.25であった。遺伝子多型との関連に関して、年齢、性別で調整後、アルコール代謝遺伝子ALDH2(rs671)では、GG遺伝子型と比較し、GA、AAのオッズ比は0.79、0.93だった。その他は、有意な関連を認めなかった。

葉酸摂取量により4群に分け、膵がんとの関連を検討した結果、最も低いグループと比べて、最も高いグループは、オッズ比が0.52と有意なリスク低下が認められた。葉酸代謝関連遺伝子の多型との関連は、*MTHFR*(rs1801133)について、年齢、性別、喫煙、体格指数、糖尿病歴で調整後、CC遺伝子型と比較し、CT、TTのオッズ比は0.87、0.99であった。その他は有意な関連が認められなかった。

MTHFR(rs1801133)の遺伝子型と喫煙、飲酒との交互作用を検討したが、いずれも有意な交互作用は観察されなかった。

(5) 正常上皮細胞由来3D培養細胞を用いた*in vitro*発がんモデルの開発

マウス肝内胆管由来オルガノイドは、*Kras*を活性化させ、ヌードマウス皮下に移植すると過形成性結節を形成し、更には種々のがん抑制遺伝子に対するshRNAの追加導入により、異形成結節や、がんの形質を示す腫瘤を形成する。新規FGFR2融合遺伝子を、B6マウス由来のオルガノイドに導入し、ヌードマウス皮下に移植したところ、単独では異形成結節を、がん抑制遺伝子のshRNAとの組み合わせでがんを形成した。この融合遺伝子が、胆管由来細胞でもドライバーがん遺伝子であることを確認した。

LSL-*Kras*^{G12D}マウス由来のオルガノイドで*Kras*を活性化させた後、クロマチンリモデリング遺伝子の1種のshRNAを導入し、ヌードマウス皮下に移植すると、*Kras*の活性化のみの皮下腫瘍に比べて、腫瘍の異型性が増す傾向が認められた。

D. 考察

中国での黄砂やPM_{2.5}を含む大気汚染が越境輸送され、日本で越境汚染が起きていることを示した。地域特異的な環境要因の解明では、adductome解析とPCAを組み合わせて絞り込み、独自に構築したDNA付加体データベースから候補物質を推定可能であった。膵がんリスクと生活習慣、食事との関連及び遺伝的要因の解析は、アジア人特異的な遺伝的要因を解明できる可能性がある。これらの解析手法は、他のアジア地域においても、経済発展に伴い、悪化する大気汚染の越境汚染の解析、がん高発地域に特有の環境要因の特定、アジア人に特徴的な遺伝的素因の発がんへの影響の解析に有用と考える。

正常上皮細胞由来3D培養細胞を用いて、遺伝的再構成による*in vitro*胆管発がんモデルを確立した。現在、このモデルと化学物質暴露を組合わせた、発がん性評価系を開発中である。新規の環境要因や遺伝的要因の発がんへの影響の解析や初期段階の発がん機構の解明に有用と考える。

(1) 黄砂やPM_{2.5}を含む長距離輸送性大気汚染及びそのヒト健康への影響

北京は、大都市であり重工業地域が隣接する名古屋と比べても、大気粉塵及び汚染物質の各濃度、変異原性が非常に高い値を示す日が多く存在した。

1-NP/Pyr比は石炭燃焼が多い中国では大気粉塵中の値が0.001~0.01であることが報告されている。西日本の日本海沿岸地域でみられた低い1-NP/Pyr比及び3月の和光市での1-NP/Pyrの低下は、中国からの越境汚染の影響によると考えられた。

中国には北京市以外にも同様の大気汚染が発生している地域が存在することが報告されている。中国において発生した大気汚染物質は冬季の季節風や春季の偏西風により日本に越境輸送される可能性がある。西日本では冬季にも越境汚染が起こっており、黄砂日には東日本でも越境汚染の影響が大きいと考えられた。

(2) ユーラシア大陸の胃がんの分子病理

胃がんのヒト手術検体だけでなく、生検検体でもadductome解析が可能なが

示された。胃以外でも、肝臓・肺・大腸等で付加体の解析をしており、特に、非喫煙者の肺がんの非腫瘍部の DNA 付加体に注目している。今後は、中国や東欧の症例を用いて、年齢・性・部位・組織像などの比較を行い、共通点、相違点を明らかにし、腫瘍部 DNA の変異 spectrum を解析して、本邦例や IARC のデータベースと比較する。又、aduuctome 解析も計画中である。

(3) Adductome 解析を用いた中国の食道がん多発地域の発がん要因の探索

THP-dG は N-ニトロソピペリジン (NPIP)由来の付加体であり、NPIP はラットに食道癌及び肝臓がんを誘発することが報告されている。また、NPIP は食品中(ある種の野菜、胡椒や加工肉等)に存在することや、生体内物質であるピペリジンのニトロソ化により生成することなどから、ヒトは NPIP に日常的に曝露していると考えられる。従って、今後は、中国の食道がん低発地域、高発地域で生活する別の集団を用いて THP-dG の解析を行い、NPIP の曝露と中国における食道がん高発地域の食道がん発症との関係を検討する必要がある。又、これら地域住民の食道がんにおける体細胞変異を解析し、NPIP による変異 spectrum と比較するなど、NPIP の食道がんへの関与について検証する必要がある。

(4) 膵がん発生への遺伝的要因の影響及び環境要因との交互作用の検討

飲酒と膵がんリスクとの間に有意な関連が認められず、又、アルコール代謝関連遺伝子の多型も有意な関連を示さなかった。

1日あたりの葉酸摂取量と膵がんリスクの関連では、摂取量が高いほど、リスク低下が認められたが、摂取量の推定でリコールバイアス等がかかりやすく、慎重に結果を解釈する必要がある。葉酸代謝関連遺伝子では、酵素代謝が低いと報告されている *MTHFR* の C667T を含め、多型と膵がんリスクに有意な関連は認められなかった。複数の遺伝子-遺伝子、遺伝子-環境要因の交互作用が存在し、それらを考慮しない場合、個々の多型と膵がんリスクとの間に有意な関連を見出すのが困難と考えられる。

今後さらに症例数を増やし交互作用を

検討する必要がある。

(5) 正常上皮細胞由来 3次元培養細胞を用いた *in vitro* 発がんモデルの開発

ヒト胆管がんでの遺伝子変異が報告された、新規 FGFR2 融合遺伝子を導入したオルガノイドはヌードマウスでの造腫瘍性が認められ、胆管由来細胞でもドライバーがん遺伝子であることを確認した。又、クロマチンリモデリング遺伝子の 1 種の shRNA の導入による、*Kras* 依存的な腫瘍形成への促進効果も認められた。以上より、遺伝的再構成による *in vitro* 胆管がんモデルは確立できたと考えられる。又、肺・大腸等他の臓器でも 3D 培養が可能であり、これらでも発がんモデルを開発中である。

近年、国内の印刷工場での職業性胆管がんが問題となっており、使用した有機溶剤による化学発がんが強く疑われている。このモデルとオルガノイドへの化学物質曝露を組み合わせた、化学物質の発がん性評価系を開発中である。特定した新規の環境要因や、各種の解析等で検出される遺伝的要因の発がんへの影響の解析に有用である。更に、正常上皮細胞由来の実験系であり、ごく初期段階の発がん機構の解明に役立つ。

E. 結論

中国での大気汚染や日本への越境汚染の解析、adductome 解析による地域特異的な環境要因の解明、アジア人に特徴的な遺伝的要因の解明は、新規の環境要因の同定やその曝露の解析による新規のがん予防法の開発や曝露の低減化、及びアジア人に特徴的な遺伝的素因に基づく高危険度群の推定などによるがん発生の減少への有効な手段となる。又、これらの手法は、他のアジア地域における、経済発展に伴い、悪化する大気汚染の解析、がん高発地域に特有の環境要因の特定、アジア人に特徴的な遺伝的素因や環境要因の発がんへの影響の解析に応用可能である。

正常上皮細胞由来 3D 培養細胞を用いた *in vitro* 発がんモデルと化学物質曝露と組み合わせた発がん性評価系を開発中である。*in vitro* 発がんモデルは、新規の環境要因や、各種の解析等で検出される遺伝的要因

の発がんへの影響の解析に有用であり、ごく初期段階の発がん機構の解明に役立つ。

本研究で解明される病因の除去による環境要因特異的ながん発生の低減化や、新規 *in vitro* 発がんモデルによるがんの本態解明は、日米両国にも資するものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ochiai M, Hippo Y, Izumiya M, Watanabe M, Nakagama H. Newly defined aberrant crypt foci as a marker for dysplasia in the rat colon. *Cancer Sci.* (2014) 105(8):943-950.
2. Goto M, Shinmura K, Matsushima Y, Ishino K, Yamada H, Totsuka Y, Matsuda T, Nakagama H, Sugimura H. Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with exocyclic etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med.* (2014) 76:136-46.
3. Watanabe T, Hasei T, Kokunai O, Coulibaly S, Nishimura S, Fukasawa M, Takahashi R, Mori Y, Fujita K, Yoshihara Y, Miyake Y, Kishi A, Matsui M, Ikemori F, Funasaka K, Toriba A, Hayakawa K, Arashidani K, Inaba Y, Sera N, Deguchi Y, Seiyama T, Yamaguchi T, Watanabe M, Honda N, Wakabayashi K, Totsuka Y. Air Pollution with Particulate Matter and Mutagens: Relevance of Asian Dust to Mutagenicity of Airborne Particles in Japan. *Genes and Environment* (2014) 36: 120-136.
4. Gurzu S, Kadar Z, Sugimura H, Bara T, Bara T Jr, Halmaciu I, Jung I. Gastric cancer in young vs old Romanian patients: immunoprofile with emphasis on maspin and mena protein reactivity. *APMIS.* 2014 Dec 31. doi: 10.1111/apm.12347
5. Du C, Kurabe N, Matsushima Y, Suzuki M, Kahyo T, Ohnishi I, Tanioka F, Tajima S, Goto M, Yamada H, Tao H, Shinmura K, Konno H, Sugimura H. Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2014 Aug 7. [Epub ahead of print]
6. Totsuka Y, Watanabe T, Coulibaly S, Kobayashi S, Nishizaki M, Okazaki M, Hasei T, Wakabayashi K, Nakagama H. In vivo genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and l-tryptophan. *Mutat Res.* 2014, 760:48-55.
7. Totsuka Y, Ishino K, Kato T, Goto S, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K. Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response. *Nanomaterials*, 2014, 4: 175-188.
8. Kochi T, Shimizu M, Totsuka Y, Shirakami Y, Nakanishi T, Watanabe T, Tanaka T, Nakagama H, Wakabayashi K, Moriwaki H. A novel aromatic mutagen, 5-amino-6-hydroxy-8*H*-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one (ABAQ), induces colonic preneoplastic lesions in mice. *Toxicology Reports* 2014, 1; 69–73.
9. Iwasaki M, Mukai T, Takachi R, Ishihara J, Totsuka Y, Tsugane S. Validity of a self-administered food frequency questionnaire in the estimation of heterocyclic aromatic amines. *Cancer Causes Control.* 2014, 8:1015-28.

2. 学会発表

1. 落合 雅子、折橋 郁、松浦 哲也、今井 俊夫、中釜 齊、筆宝 義隆、マウス肝臓初代培養細胞を用いた新規肝内胆管がん

- モデルの確立、第29回発癌病理研究会、いわき、2014年9月。
2. 中釜 斉、塩川 大介、落合 雅子、筆宝 義隆、岡本 康司、がん幹細胞研究のための動物モデル、第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月。
 3. 落合 雅子、折橋 郁、松浦 哲也、今井 俊夫、中釜 斉、筆宝 義隆、マウス肝臓初代培養細胞を用いた新規肝内胆管がんモデルの確立、第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月。
 4. 泉谷昌志、落合雅子、渡邊昌俊、中釜 斉、筆宝義隆、ラット大腸の異形成マーカーとしての新規 Aberrant Crypt Foci の確立、第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月。
 5. 折橋 郁、松浦 哲也、落合 雅子、今井 俊夫、中釜 斉、筆宝 義隆、腸管および胃における Kras 依存的発がんの in vitro 再構成、第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月。
 6. 松浦 哲也、折橋 郁、落合 雅子、今井 俊夫、中釜 斉、筆宝 義隆、マウス初代培養細胞からの膵管がんの誘導、第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014年9月。
 7. クウリバリ・スレイマン、貴志茜衣、坂本みずほ、松井元希、小野遼、南嘉輝、山田真裕、長谷井友尋、趙利霞、唐寧、鳥羽陽、早川和一、盛山哲郎、木戸瑞佳、世良暢之、船坂邦弘、浅川大地、渡部仁成、若林敬二、渡辺徹志、北京及び日本海沿岸地域における大気粉塵中の成分の比較及び中国大陸からの越境輸送の影響、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月。
 8. 松井元希、クウリバリ・スレイマン、藤田浩祐、貴志茜衣、坂本みずほ、小野遼、南嘉輝、山田真裕、長谷井友尋、盛山哲郎、木戸瑞佳、世良暢之、渡部仁成、若林敬二、渡辺徹志、日本海沿岸地域における大気環境の季節変動及びその比較、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月。
 9. クウリバリ・スレイマン、山田真裕、小野遼、南嘉輝、阿部真帆、貴志茜衣、松井元希、長谷井友尋、世良暢之、大呂忠司、木戸瑞佳、船坂邦弘、浅川大地、渡部仁成、若林敬二、渡辺徹志、日本海沿岸3県における冬季及び春季の越境大気汚染の解析、フォーラム 2014 衛生・環境トキシコロジー、つくば、2014年9月。
 10. 阿部真帆、クウリバリ・スレイマン、松井元希、貴志茜衣、坂本みずほ、小野遼、南嘉輝、山田真裕、長谷井友尋、世良暢之、大呂忠司、木戸瑞佳、船坂邦弘、浅川大地、渡辺徹志、2011年12月から2012年5月の日本海沿岸地域における越境大気汚染の解析、第64回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014年10月。
 11. クウリバリ・スレイマン、長谷井友尋、世良暢之、大呂忠司、木戸瑞佳、船坂邦弘、浅川大地、若林敬二、渡辺徹志、日本海沿岸3県における冬季及び春季の大気粉塵の変異原性及び越境輸送の影響、日本環境変異原学会第43回大会、東京、2014年12月。
 12. Sugimura H, Human DNA adductome: a clue to origin of human cancer? Asian Association of Environmental Mutagens Societies (AAEMS), Kolkata, Dec 12, 2014, Kolkata, India
 13. 戸塚ゆ加里、中釜 斉、質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析により発がんに関わる DNA 付加体を探索する Exploration of DNA adducts contributing to cancer development using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 41回毒性病理大会、2014年7月
 14. Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Shibata T, Matsushima Y, Nakagama H, A multidisciplinary approach to explore the etiology of esophageal cancer in China, 日本癌学会第73回大会、2014年9月
 15. 後藤正憲、戸塚ゆ加里、土原一哉、三牧幸代、尾島英知、柴田龍弘、落合淳志、中釜 斉、Analyses of genotoxicity

induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane, being responsible for occupational bile duct cancer, 日本癌学会第 73 回大会. 2014 年 9 月

16. 椎崎 一宏、後藤 正憲、荒井 康仁、濱 奈津子、柴田 龍弘、中釜 斉、戸塚 ゆ加里、Identification of the location of DNA adducts within the genome, 日本癌学会第 73 回大会. 2014 年 9 月
17. 池田 茜、加藤 護、柴田龍弘、黒坂 功、林 櫻松、松島芳隆、遠藤 治、中釜 斉、戸塚ゆ加里、中国における食道癌発症要因の集学的アプローチによる解明、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月
18. 後藤正憲、三牧幸代、久保正二、土原 一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里、職業性胆管癌及びジクロロプロパン曝露細胞の塩基置換シグネチャー解析、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月
19. 椎崎 一宏、後藤 正憲、濱 奈津子、荒井 康仁、柴田 龍弘、中釜 斉、戸塚 ゆ加里、ゲノム中の DNA 修飾の単分子検出方法の検討、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月
20. 秋元峻太郎、加藤 護、柴田龍弘、遠藤 治、魏 民、中釜 斉、鰐淵英機、福島昭治、戸塚ゆ加里、非遺伝毒性発がん物質、1,4-ジオキサン投与ラット肝臓における DNA 付加体の網羅解析、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
 1. 国際出願番号:PCT/JP2014/059780
国際出願日 : 平成26年4月2日
発明の名称 : L I X 1 L 高発現腫瘍細胞の増殖阻害方法、及び腫瘍細胞増殖抑制ペプチド
 2. 出願 発明の名称 : 染色バス

ケット

出願番号 : 特願2014-157406

出願日 : 平成26年8月1日

出願人 : 国立大学法人浜松医科大学

2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

栄養・代謝疾患の研究

担当責任者 稲垣 暢也

京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学 教授

研究要旨：近年、東アジア諸国では、経済成長による生活環境の変化に伴い、肥満や過体重、糖尿病などの生活習慣病の増加が問題となっている。本研究では、東アジア地域での臨床栄養学の現状を把握し、栄養学的介入による肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症抑制や改善効果を評価した。また今後東アジア諸国で増加すると予想される動脈硬化疾患のリスク予測を目的に生活様式が欧米化した経済成長後の日本人において動脈硬化に対する生化学マーカーの探索を行った。

近年発展の目覚ましいベトナムの調査では、国内に栄養士制度がなく、また病院内での食事提供がないため、栄養治療が必要な患者に対する介入や指導が十分に行えない状況にあることが判明した。そこで玄米からの発芽玄米の作成方法を指導し、主食として耐糖能障害を有する女性に4カ月間摂取させる介入研究と、食物繊維以外のエネルギーや栄養素の摂取量に変化がないものの、発芽玄米は体重や血圧、脂質、血糖値を食事導入前と比較して有意に低下させた。このように栄養介入は、ベトナムにおける生活習慣病改善に大きく貢献できる可能性が示唆された。現在、肥満や過体重が年々増加傾向にあるベトナムの中学生を対象として生活習慣介入プログラムを開発し指導介入を行っている。またベトナム国立栄養研究所と国立老年病院と協力し、ベトナムの栄養士制度の確立と栄養治療や指導などの臨床栄養が実施できるモデル病院の構築を計画している。

生活様式が欧米化した日本人に対してアポ B-48 や可溶性 LR11 などの生化学マーカーを測定したところ、アポ B-48 は腎障害を有する患者で高値であること、可溶性 LR11 は冠動脈形成術後の再狭窄患者で高値であることが判明した。今後は、ベトナムなどの東アジア人でも評価し、これらの生化学マーカーの動脈硬化性疾患発症の予測因子としての有用性や地域差を評価する計画である。

以上から経済成長による生活環境の急激な欧米化が進む東アジア諸国において栄養介入は生活習慣病や動脈硬化性疾患の発症予防に有効である。東アジア諸国と日本が栄養摂取と生活習慣病に関する研究を行い、情報を共有することで、欧米人とは異なるアジア人における生活習慣病の予防や治療法を確立できる可能性がある。

A. 研究目的

東アジア諸国では、経済成長による生活環境の急激な変化に伴い、都市部では肥満や過体重の割合が増加し、糖尿病をはじめとする生活習慣病患者数が増加している。一方、農村部ではエネルギーや栄養素不足に伴う低栄養がまだ問題となっている。このように東アジアの国々では、国内に過栄養と低栄養の地域が混在するため、地域に対応した栄養介入が必要となる。本研究では、東アジア地域での臨床栄養学の現状を把握し、栄養学的介入による肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症抑制や改善効果を評価した。また今後東アジア諸国で増加すると予想される動脈硬化疾患のリスク予測を目的に経済成長後の日本人において動脈硬化に対するバイオマーカーの探索を行った。

B. 研究方法

本研究遂行に当たり、ベトナムを中心に

- 1) ハノイ市にある国立栄養研究所(National Institute of Nutrition (NIN))と国立老年病院(National Geriatric Hospital (NGH))を訪問し、ベトナムにおける栄養学の現状把握
- 2) ハノイ市内の中学校4校 (Cat Linh school、Nguyen Cong Tru School、Phan Chu Trinh School、Dong Da school) の6年生を介入群2校と対照群2校に分け、肥満や生活習慣に対する介入を行い、その効果を肥満や過体重の有病率や発生率の低下や、食事コントロールや身体活動への影響、肥満や過体重に対する知識や対策についての知識について検討
- 3) 耐糖能異常を有する45から65歳のベトナム女性

を2群に分け、白米か発芽玄米のどちらかを4か月間与え、血液の糖・脂質濃度や体重に及ぼす影響の検討を行った。

そして日本人を対象に生活習慣病および動脈硬化性疾患に対するバイオマーカーを探索し、

4) 慢性腎臓病(Chronic kidney disease[CKD])を有する患者を対象としたカイロミクロンレムナント(CM-R)の定量的マーカー Apo B-48の測定

5) 冠動脈疾患を有する患者を対象とした血中可溶性 LR11の測定

を行った。

(倫理面への配慮)

研究にあたっては、研究対象者にインフォームドコンセントを行い、同意を得た。データは匿名化を行い、解析を行った。

C. 研究結果

1) ベトナムでは、臨床栄養学、食事衛生、栄養学教育のための研究機関として National Institute of Nutrition (NIN)が設立され、施設内での糖尿病、過体重、低体重、腎機能障害を有する患者の栄養指導や介入が行われている。しかしベトナムには栄養士養成の制度がないため、一般病院では患者に対してきめ細かい栄養指導を行うことできない状況であった。また一般病院では、入院患者に病院食を提供する行うシステムがないため、ペースト食やきざみ食など患者の病態に応じた食事提供や食事治療ができない状況であった。今後、NIN と National Geriatric Hospital (NGH)と協力してベトナムでの栄養士育成と病院での患者への栄養介入を予定している。

2) 介入期間は2年間で、介入対象者に対しての個別指導を、介入前及び介入後は1ヶ月、3ヶ月後に実施し、以後、介入後2年まで、3ヶ月毎に実施する。身体測定(身長、体重、腹囲)及び、血糖値、HbA1c、Total Cholesterol、Triglyceride (TG)、HDL-C、アディポネクチンを測定した。また、生徒および親に対してアンケートによって肥満や生活習慣病、運動、食事の実態や知識レベルの確認を行った。参加者数は821名で2013年12月及び2014年1月にかけて基礎調査を行った。全校的な説明ミーティングは4月から5月にかけて行ない、10月に介入群の2校で全員参加の講演会とクラブ活動を行った。基礎調査の結果は以下であった。[中央値(最大値-最低値)]

BMI (kg/m ²)	19.5 (12.5 - 36.0)
血糖値 (mg/dL)	4.8 (3.2 - 7.9)
HbA1c (%)	5.4 (4.2 - 6.2)
Insulin (μU/ml)	15.7 (1.5 - 251.6)
Total Cholesterol (mg/dL)	4.26 (2.05 - 7.68)

Triglyceride (TG) (mg/dL) 1.08 (0.33 - 5.73)

HDL-C (mg/dL) 1.49 (0.72 - 2.95)

LDL-C (mg/dL) 2.28 (0.57 - 6.10)

Adiponectin (μg/mL) 9.0 (2.58 - 30.69)

過体重或いは肥満と判定された生徒はそれぞれ17% (821名中139名)、19% (821名中158名)であった。多変量解析の結果、生徒の肥満/過体重は性差に関わらず両親の肥満/過体重と相関が強く、カットオフ値をBMI 25 kg/m²とすると、父親が肥満/過体重の場合にはオッズ比は2.02 (p=0.001)、母親が肥満/過体重の場合にはオッズ比は2.831 (p=0.001)、両親とも肥満/過体重の場合にはオッズ比は6.59(p=0.024)と上昇した。また、出生時に過体重(3500g以上)の場合のオッズ比は1.52 (p=0.02;対照: 2500kg以上3500kg未満)、短い睡眠時間(8時間未満)の場合のオッズ比は1.75 (p<0.001; 対照: 8時間以上11時間未満)、体重を減らすための身体活動の不足の場合のオッズ比は6.185 (p<0.001)、野菜の摂取不足の場合のオッズ比は3.908(p<0.001)であった。

3) 被験者 60 名を 2 群に分け、白米か発芽玄米のどちらかを 4 か月間与えた。最初の 2 週間は白米の 50%、次の 2 週間は 75%、2 か月目以後は 100% を発芽玄米に置き換えた。発芽玄米は、玄米からの作成方法を指導した。研究の開始前および終了時点で、身体計測、不連続 3 日間の 24 時間思い出し法による栄養調査、早朝空腹時に採血した血液の生化学検査を行った。食事内容については、エネルギーやたんぱく質、脂質、炭水化物摂取量には両軍で有意な差を認めなかったが、食物繊維量が白米群 6.8g/日に対して発芽玄米群 13.1g 日と高かった。発芽玄米群で体重や BMI、ウエスト/ヒップ比、血圧は食事導入前と比較して有意に低下し、また Total Cholesterol、Triglyceride (TG)、LDL-C、血糖値、HbA1c も有意に低下した。

4) 大阪大学医学部附属病院に通院・入院中の 264 症例に対して血中 apoB-48 濃度と eGFR の高低、尿蛋白の有無の関係について評価した。GFR 高値群(≥60ml/min/1.7m²)と低値群(<60)で全体を 2 群に分けた場合、apoB-48 血中の濃度は、eGFR 低値群で有意に高い値を示した。また eGFR は、年齢、nonHDL-C、log-apoB-48、log-apoB-48/TG のそれぞれと強い逆相関を認めた。次に尿定性検査の結果から尿蛋白なし群[(-)と(±)]と尿蛋白あり群[(+)、(2+)、(3+)]の 2 群に分け同様にアポ B-48 濃度を比較したところ、アポ B-48 濃度の分布は尿蛋白あり群がなし群より有意に高値に分布していた。

5) 順天堂大学循環器内科の冠動脈再建術(PCI)後の安定狭心症患者 102 名の可溶性 LR11 濃度を東邦大学医療センター佐倉病院で経時的に測定し、合併症の一つである冠動脈再狭窄との関連を統計的に検討した。患者年齢は平均 65 歳、男性 82%。BMI24.5、糖尿病は 49%と約半数が合併していた。平均空腹時血糖値 107.7 mg/dl、HbA1c 6.1%であつ

た。狭心症患者 PCI 後の可溶性 LR11 値は、術後 14 日、60 日で有意に増加した。また 240 日後の可溶性 LR11 値は冠動脈狭窄の指標である angiographic late loss index と正の相関を示した。

D. 考察

ベトナムの都市部であるハノイを中心とした調査では、急激な経済発展により、肥満や過体重の割合が増加し、糖尿病をはじめとする生活習慣病患者数が増加している。これまでベトナム地域における研究は、サーベイランスの研究が中心であったが、ベトナム人を対象として主食となる米についての介入研究を初めて行った。白米から比較的作成が容易な発芽玄米の変更によって明らかな肥満や過体重、耐糖能、脂質の改善を認めたことから、東アジア地域においてその国の食習慣に合わせた栄養介入は、生活習慣病の発症予防の観点から有用である。しかし、日本では栄養介入や指導において主要な役目を担う栄養士制度がベトナムではないことや病院食提供のシステムがないため、病院内では栄養治療や介入がほとんど不可能な現状にある。また近年若年者でも肥満や過体重の割合は年々増加傾向にあるが、学校内での栄養に観する指導や教育は行われていない。今後は、国立栄養研究所や国立老年病院との共同で栄養士育成システム、病院食提供や栄養治療が可能となるモデル病院の構築を行う予定である。また中学校での介入研究と並行して学校単位での生活習慣介入プログラムを開発、実施し、肥満や過体重の有病率や発生率や肥満や過体重に関する知識レベルの変化を評価する予定である。

日本人に対して測定した生化学マーカー アポ B-48 や可溶性 LR11 は、生活習慣病ばかりでなく、慢性腎臓病や PCI 後の冠動脈疾患を有する患者で高値になることが明らかとなった。今後は、日本人ばかりでなく他のアジア地域でも評価し、アジア人における意義と疾患発症の地域差を解明する。

E. 結論

経済成長による生活環境の急激な欧米化が進む東南アジア諸国と経済成長後の欧米化した日本において栄養摂取と生活習慣病に関する研究を行うこ

とで欧米人とは異なるアジア人での生活習慣病の予防や治療法を確立できる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saiko Shikanai, Vũ Thị Thu Hiền, Lê Danh Tuyên, Lê Thị Hợp, Bùi Thị Nhung, Emiko Suzuki, Shigeru Yamamoto Concentration of glucose, fructose, sucrose, lactose and maltose in Vietnamese snacks/beverages Vietnam. Journal of Food and Nutrition Science 9(4):75-79, 2014.
2. Shikanai S, Koung Ry Ly, Takeichi H, Suzuki E, Pann S, Sarukura N, Kamoshita S, Yamamoto S. Sugar Intake and Body Weight in Cambodian and Japanese Children. Journal of Medical Medical Investigation 61:72-78, 2014.
3. Shikanai S, Vu Thi Tu Hien, Yamamoto S. Sugar Intakes of Children in Vietnam, Cambodia and Japan. Vietnam Journal of Food and Nutrition Science 10(2):112-114, 2014
4. Ogita M, Miyauchi K, Jiang M, Kasai T, Tsuboi S, Naito R, Konishi H, Dohi T, Takayuki Y, Okazaki S, Shimada K, Bujo H, Daida H. Circulating soluble LR11, a novel marker of smooth muscle cell proliferation, is enhanced after coronary stenting in response to vascular injury, Atherosclerosis 237(1):374-8, 2014.
5. Okubo M, Hanada H, Matsui M, Hidaka Y, Masuda D, Yamashita S. Serum apolipoprotein B-48 levels are associated with reduced estimated glomerular filtration rate and increased proteinuria. J Atheroscler Thromb. 21(9):974-82, 2014.

2. 学会発表

European Atherosclerosis Society (H26)
Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (H26)
European Society of Cardiology Congress (H26)
日本動脈硬化学会学術集会 (H26)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

学会等発表実績

委託業務題目「アジア地域にまん延している疾病に関する研究」

機関名 国立大学法人北海道大学 大学院医学研究科

担当責任者 有川 二郎

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
野生のシカにおけるSFTSウイルス抗体調査（口頭）	森川茂、木村昌伸、堀田明豊、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、野口章、井上智、今岡浩一、前田健	第157回日本獣医学会学術集会、札幌	2014.9.9-12	国内
SFTSウイルスの生活環における野生のシカの役割（口頭）	森川茂、朴ウンシル、今岡浩一、前田健、宇田晶彦	第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜	2014.11.10-12	国内
Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in domestic and wild animals in Japan. (ポスター)	Shigeru Morikawa, Masanobu Kimura, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda.	XVth International Congress of Virology, Montreal, Canada	2014.7.27-8.1	国外
Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in animals and ticks in Japan. (口頭)	Shigeru Morikawa, Akihiko Uda, Masanobu Kimura, Kawabata, Hiroki, Shuetsu Fukushi, Aiko Fukuma, Yoshihiro Kaku, Unsil Paku, Hideki Tani, Tomoyuki Yoshikawa, Aya Niikura, Shuji Ando, Sawabe Kyoko, Hiromi Fujita, Koichi Imaoka, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, Ken Maeda	The 10th China-Japan International Conference of Virology, Changchun, China	2014.8.25-28	国外
Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Animals and Ticks in Japan. (口頭)	Shigeru Morikawa	17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Taipei, Taiwan	2015.1.25-29	国外
Molecular evolution of G2P[4] rotavirus strains at the whole genome level. (口頭)	Doan, Y.H., Nakagomi, T., Agbemabiese, C.A., Nakagomi, O.	The 11th International Rotavirus Symposium, New Delhi, India	2014.9.3-5	国外
ロタウイルスの分子疫学：マラウイにおけるG12P[6]株の突発出現の背景（口頭）	中込とよ子、中込治、団海燕	第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜	2014.11.10-12	国内
自己対照症例系列(SCCS)法によるロタウイルスワクチンの腸重積発症リスクの評価（口頭）	金子美穂、中込とよ子、中込治	第18回日本ワクチン学会学術集会、福岡	2014.12.6-7	国内
Analysis of intracellular localization of virus proteins of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. (ポスター)	Ito R, Tsuda Y, Nishio S, Shimizu K, Yoshimatsu K, Arikawa J	17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Taipei, Taiwan	2015.1.25-29	国外

Epidemiological study of rat hepatitis E virus infection in wild rodents in Vietnam. (ポスター)	Obana S, Shimizu K, Yoshimatsu K, Hasebe F, Hotta K, Isozumi R, Hoa NT, Mai LQ, Yamashiro T, Arikawa J	17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Taipei, Taiwan	2015. 1. 25-29	国外
Characterization of Hokkaido virus, Genus Hantavirus and generation of the reassortant virus with Puumala virus. (口頭)	Kariwa H, TSanada T, Iwasaki R, Yoshimatsu K, Arikawa J, Yoshii K, Takashima I	48th Joint Working Conference on Viral Diseases Panels, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Taipei, Taiwan	2015. 1. 28-29	国外
Effect of N-glycosylation on immunogenicity of the rabies virus glycoprotein. (口頭)	Yamada K, Noguchi K, Nishizono A.	48th Joint Working Conference on Viral Diseases Panels, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Taipei, Taiwan	2015. 1. 28-29	国外
ケニアインド洋沿岸におけるデング熱の発生報告 (口頭)	井上真吾, Allan ole Kwallah, Salame Ashur, Mulati Omuyundo, Missiani Ochwoto, Samson Muuo, Lucy Okubi, Matilu Mwau, 森田公一	第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口	2014. 5. 16-17	国内
Double stranded-RNA concealingによるデングウイルスのI型IFN誘導回避機構 (口頭)	内田玲麻, Espada-Murao Lyre Anni, 早坂大輔, 森田公一	第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口	2014. 5. 16-17	国内
わが国へ侵入が危惧されるフラビウイルス感染症 (口頭)	森田公一	第14回ヒトと動物の共通感染症研究会学術集会、東京、国立感染症研究所	2014. 11. 8	国内
デングウイルス感染の自然免疫系制御機構の解明 (口頭)	森田公一	第46回九州微生物研究会、福岡、	2014. 12. 22	国内
The function of Japanese encephalitis virus NS1' protein on pathogenicity in avian hosts. (口頭)	Kouichi Morita	48th Joint Working Conference on Viral Diseases Panels, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Taipei, Taiwan	2015. 1. 28-29	国外