

201438123A

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

胃がんにおける遺伝子変異・エピジェネティック異常と
生活習慣などリスク要因との関連：前向きコホート研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 島津 太一

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立がん研究センターが実施した平成26年度「胃がんにおける遺伝子変異・エピジェネティック異常と生活習慣などリスク要因との関連：前向きコホート研究（契約書第1条で定めた委託業務題目）」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

胃がんにおける遺伝子変異・エピジェネティック異常と生活習慣などリスク要因との関連：前向きコホート研究

1. 研究の総括、コホートデータの整理 a. プロジェクトの総合推進 --- 1
島津太一

I I. 委託業務成果報告（業務項目）

1. 研究の総括、コホートデータの整理 b. コホートデータ抽出 ----- 4
島津太一

2. 遺伝子突然変異解析及びエピゲノム解析 ----- 6
竹島秀幸

3. 病理試料の収集 ----- 9
齊藤昌宏

I I I. 学会等発表実績（様式19） ----- 11

I V. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 13

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

胃がんにおける遺伝子変異・エピジェネティック異常と
生活習慣などリスク要因との関連：前向きコホート研究

業務主任者 島津 太一 （独）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 島津 太一

研究要旨

秋田県横手地域における 40 から 59 歳のコホート研究対象者 15,781 人のうち、アンケートに回答し、がんの既往のない、11,707 名が本研究の対象者であった。胃がんの診断根拠が病理組織を用いたものであった 514 例のうち 497 例（97.0%）が、コホート研究対象地域内の 2 医療機関において診断された症例であった。これらの症例のうち、平鹿総合病院で診断された 48 例の病理標本から作成した未染スライドを用い、遺伝子突然変異・エピジェネティック解析が可能か検討を行った。その結果、解析に十分な品質の DNA が抽出可能であり、遺伝子突然変異解析まで可能であることが確認できた。

1. 研究の総括、コホートデータの整理

a. プロジェクトの総合推進

国立がん研究センター 室長 島津太一

b. コホートデータの抽出

国立がん研究センター 室長 島津太一

2. 遺伝子突然変異解析及びエピゲノム解析

国立がん研究センター 研究員 竹島秀幸

3. 病理試料の収集

JA 秋田厚生連平鹿総合病院 診療部長 齊藤昌宏

A. 研究目的

本研究全体の目的は、前向きコホート研究において、既知の胃がんリスク・予防要因と胃がんとの関連性が、遺伝子突然変異・エピジェネティック異常による

胃がんサブタイプで異なるか検討することである。

今年度の目的は、多目的コホート研究参加者において罹患が把握されている胃がんのホルマリン固定・パラフィン包埋（FFPE）標本の一部を特定し、遺伝子突然変異・エピジェネティック解析が可能か検討することである。

B. 研究方法

多目的コホート研究実施地域のうち秋田県横手地域において、1990 年の生活習慣アンケートに答えた 40 から 59 歳の研究参加者を対象とする。胃がん組織収集については、共同研究機関において胃がんの FFPE 標本から未染スライド作成を行う。遺伝子

突然変異・エピジェネティック異常の解析については、未染スライドから抽出した DNA により、癌遺伝子または癌抑制遺伝子の突然変異の有無、CpG アイランドメチル化形質の有無などの解析が可能かどうか検討を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立がん研究センター研究倫理審査委員会にて承認、研究許可が得られている。

C. 研究結果

秋田県横手地域における 40 から 59 歳のコホート研究対象者 15,781 人のうち、アンケートに回答し、かつがんの既往のない、11,707 名が本研究の対象者であった。胃がん症例の把握を行い、胃がん組織収集の対象となる医療機関を特定した。胃がんの診断根拠が病理組織を用いたものであった 514 例のうち 497 例 (97.0%) が、コホート研究対象地域内の平鹿総合病院と他の 1 医療機関において診断された症例であった。

本研究対象者における平鹿総合病院での胃がん症例のリストをもとに、2005 年～2010 年の 48 例の病理標本の腫瘍細胞域を確認し、充分量の腫瘍細胞と非腫瘍組織の含まれたガラススライドを作成した。

胃がん検体 48 症例の FFPE サンプルから DNA を抽出し、その品質評価及び一部の症例について突然変異解析を行った。その結果、FFPE サンプルから抽出した DNA の全てにおいて遺伝子突然変異解析が可能な量の二本鎖 DNA が得られた。また、そのうち約 80% においては、10% の突然変異が 95% の確率で検出できる量の、PCR の鋳型となり得る DNA が含まれることが明らかになった。

D. 考察

今回検討した胃がん症例の病理標本においては DNA 保持が優れ、遺伝子突然変異解析・エピジェネティック異常解析が可能であると考えられた。当該地域においては、平鹿総合病院と、他の 1 医療機関ではほぼすべてのコホート対象者の胃がん症例が診断されているため、もう一つの医療機関においても同様の検討が必要である。

E. 結論

多目的コホート研究参加者において罹患が把握されている胃がんの FFPE 標本の一部を特定し、遺伝子突然変異・エピジェネティック解析が可能な DNA が抽出可能であり、遺伝子突然変異解析まで進めることができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの
該当なし

本研究費に密接に関係するもの

1. Hidaka A, Sasazuki S, Matsuo K, Ito H, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group. Genetic polymorphisms of ADH1B, ADH1C and ALDH2, alcohol consumption, and the risk of gastric cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Carcinogenesis*. 2015;36:223-31.
2. Hidaka A, Sasazuki S, Goto A, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Inoue M, Noda M, Tajiri H, Tsugane S; JPHC Study Group. Plasma insulin, C-peptide and blood glucose and the risk of

gastric cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Int J Cancer*. 2015;136:1402-10.

3. Asada K, Nakajima T, Shimazu T, Yamamichi N, Maekita T, Yokoi C, Oda I, Ando T, Yoshida T, Nanjo S, Fujishiro M, Gotoda T, Ichinose M, Ushijima T. Demonstration of the usefulness of epigenetic cancer risk prediction by a multicentre prospective cohort study. *Gut*. 2015;64:388-96.
4. Takeshima H, Niwa T, Takahashi T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ando T, Inagawa Y, Taniguchi H, Katai H, Sugiyama T, Kiyono T, Ushijima T. Frequent involvement of chromatin remodeler alterations in gastric field cancerization. *Cancer Lett*. 2015;357:328-38.

2. 学会発表

1. 島津太一, 若井建志, 玉腰暁子, 辻一

郎, 田中恵太郎, 松尾恵太郎, 永田知里, 井上真奈美, 津金昌一郎, 笹月静. Association of vegetable and fruit intake with gastric cancer risk: A pooled analysis of four cohort studies. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月(ポスター).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

胃がんにおける遺伝子変異・エピジェネティック異常と
生活習慣などリスク要因との関連：前向きコホート研究
（コホートデータ抽出）

担当責任者 島津 太一 （独）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 島津 太一

研究要旨

秋田県横手地域における 40 から 59 歳のコホート研究対象者 15,781 人のうち、アンケートに回答し、かつがんの既往のない、11,707 名が本研究の対象者であった。多目的コホート研究のデータベースから胃がん症例の把握を行い、胃がん組織収集の対象となる医療機関を特定した。胃がんの診断根拠が病理組織を用いたものであった 514 例のうち 497 例（97.0%）が、コホート研究対象地域内の平鹿総合病院と他の 1 医療機関において診断された症例であった。

A. 研究目的

前向きコホート研究において、既知の胃がんリスク・予防要因と胃がんとの関連性が、遺伝子突然変異・エピジェネティック異常による胃がんサブタイプで異なるか検討するため、コホート研究のデータベースから胃がん症例の把握を行う。

B. 研究方法

多目的コホート研究で構築されているデータベースを用い、秋田県横手地域における対象者で、1990 年の生活習慣アンケートに答えた 40 から 59 歳の研究参加者ならびに、研究参加者において 2014 年 8 月まで発生した胃がん症例を、医療機関別に把握した。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立がん研究センター研究倫理審査委員会にて承認、研究許可が得られている。

C. 研究結果

多目的コホート研究の秋田県横手地域における対象者 15,781 人のうち、1990 年の生活習慣アンケートに答えた 40 から 59 歳の研究参加者は 11,989 名であり、そのうちがんの既往のある 282 名を除外した、11,707 名が本研究の対象者であった。2014 年 8 月までに発生した胃がんは 531 例でそのうち、診断根拠が病理組織を用いたものであったのは、514 例（生検 168 例、術後

病理診断 345 例、剖検 1 例) であった。514 例のうち、497 例 (97.0%) が、コホート研究対象地域内の平鹿総合病院と他の 1 医療機関において診断された症例であった。

D. 考察

秋田県横手地域の多目的コホート研究対象者の胃がん発生に関する情報は、地域内の 2 医療機関において 97.0% が把握可能であった。胃がん組織検体の収集に当たっては、この 2 医療機関に協力を依頼することで、地域の胃がん症例をほぼ把握できることが可能と考えられた。

E. 結論

秋田県横手地域の多目的コホート研究対象者における胃がん組織検体の収集に当たっては、2 医療機関に協力を依頼しながら進めていくこととした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの
なし

本研究費に密接に関係するもの

1. Hidaka A, Sasazuki S, Matsuo K, Ito H, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group. Genetic polymorphisms of ADH1B, ADH1C and ALDH2, alcohol consumption, and the risk of gastric cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Carcinogenesis*. 2015;36:223-31.

2. Hidaka A, Sasazuki S, Goto A, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Inoue M, Noda M, Tajiri H, Tsugane S; JPHC Study Group. Plasma insulin, C-peptide and blood glucose and the risk of gastric cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Int J Cancer*. 2015;136:1402-10.
3. Asada K, Nakajima T, Shimazu T, Yamamichi N, Maekita T, Yokoi C, Oda I, Ando T, Yoshida T, Nanjo S, Fujishiro M, Gotoda T, Ichinose M, Ushijima T. Demonstration of the usefulness of epigenetic cancer risk prediction by a multicentre prospective cohort study. *Gut*. 2015;64:388-96.

2. 学会発表

1. 島津太一, 若井建志, 玉腰暁子, 辻一郎, 田中恵太郎, 松尾恵太郎, 永田知里, 井上真奈美, 津金昌一郎, 笹月静. Association of vegetable and fruit intake with gastric cancer risk: A pooled analysis of four cohort studies. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 (ポスター) .

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

胃がんにおける遺伝子変異・エピジェネティック異常と
生活習慣などリスク要因との関連：前向きコホート研究
（遺伝子突然変異解析及びエピゲノム解析）

担当責任者 竹島 秀幸 （独）国立がん研究センター研究所
エピゲノム解析分野 研究員

研究要旨

既知の胃がんリスク要因がどのような分子異常を介して発がんに影響しているかを明らかにすることは、胃がん発生のメカニズムを考える上で非常に重要である。本研究では、多目的コホート研究において登録されている胃がん症例を、がん遺伝子の活性化、がん抑制遺伝子の不活化、CpG アイランドメチル化形質（CIMP）などによりサブタイプに分類することを目的とする。本年度は、胃がん検体 48 症例の FFPE サンプルから DNA を抽出し、その品質評価及び一部の症例について突然変異解析を行った。その結果、FFPE サンプルから抽出した DNA の全てにおいて遺伝子突然変異解析が可能な量の二本鎖 DNA が得られた。また、そのうち約 80%においては、10%の突然変異が 95%の確率で検出できる量の、PCR の鋳型となり得る DNA が含まれることが明らかになった。

A. 研究目的

多目的コホート研究において登録されている胃がん症例を、がん遺伝子の活性化、がん抑制遺伝子の不活化、CpG アイランドメチル化形質（CIMP）などによりサブタイプに分類する。

得られた DNA 溶液に含まれる二本鎖 DNA の濃度を PicoGreen により定量した。また、1 μ l の DNA を鋳型とし、*TERT* 遺伝子のコピー数を定量的リアルタイム PCR 法により測定し、DNA 10 ng あたり 32 コピー以上が検出された検体を選別した。

B. 研究方法

1) FFPE 検体から抽出した DNA の品質評価
胃がん検体 48 症例の FFPE サンプルから DNA を抽出し、15 μ l の 1 x TE に溶解した。

2) がん関連遺伝子の突然変異解析

1) の品質評価において基準を満たした胃がん 38 検体のうち 29 検体について、がん

関連遺伝子変異解析パネル（55 遺伝子における 291 領域）を用いて、マルチプレックス PCR によりライブラリー DNA を調製した。調製したライブラリー DNA を Ion Proton シークエンサーを用いて解析した。50 以上の深度で 20%以上の塩基置換頻度を検出したもののうち、対となる非がん部検体では塩基置換が検出されなかったものを突然変異として同定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い実施した。また、本研究計画は、国立がん研究センター研究倫理審査委員会にて承認され、研究許可が得られている。

C. 研究結果

1) FFPE 検体から抽出した DNA の品質評価

48 検体の FFPE サンプルから得られた DNA 量は、がん部が 28-1,019 ng (平均 172 ng)、非がん部が 10-321 ng (平均 76 ng) であった。また、DNA 10 ng あたりに含まれる *TERT* 遺伝子のコピー数を測定した結果、がん部 48 検体のうち 38 検体 (79.2%) において、非がん部 48 検体のうち 41 検体 (85.4%) において 32 コピー以上が検出された。38 検体においては、がん部・非がん部共に 32 コピー以上が検出された。

2) がん関連遺伝子の突然変異解析

1) の品質評価において基準を満たした胃がん 38 検体のうち、29 検体を用いてライブラリー DNA を調製した結果、17 検体 (58.6%) について、変異解析が可能な量の

ライブラリー DNA を調製することができた。

これらの 17 検体のライブラリー DNA を Ion Proton シークエンサーで解析したところ、得られた平均リード長は、59-144 bp (平均 105 bp) であった。遺伝子突然変異解析の結果、9 検体において 9 個の突然変異が認められた。*ATM* 遺伝子の変異が 1 検体、*FGFR3* 遺伝子の変異が 2 検体、*HNFI1A* 遺伝子の変異が 1 検体、*NOTCH1* 遺伝子の変異が 2 検体、*SMARCB1* 遺伝子の変異が 1 検体、*TP53* 遺伝子の変異が 2 検体において認められた。これらの突然変異のうちアミノ酸置換を引き起こすものは 5 個であった。一方で、5 検体においては既知がん関連遺伝子の突然変異が全く認められなかった。

また、3 検体については、FFPE サンプルにおけるシトシンの脱アミノ化に由来すると考えられる C>T 置換が非常に高頻度に認められた。

D. 考察

FFPE サンプルから抽出した DNA の約 80% が、32 コピー以上/10 ng DNA であり、10% の突然変異を 95%の確率で検出可能な品質であった。このことから、当初の計画通りの遺伝子突然変異解析・エピジェネティック異常解析が可能であると考えられる。

一方で、がん関連遺伝子変異解析パネルに含まれるアンプリコンのうち、130-190 bp 程度の DNA 断片の増幅は効率が悪かった。このことから、アンプリコンの長さがより短い (100 bp 前後) 変異解析パネルを用いることで、より効率の良い解析の実施が期待できる。

E. 結論

FFPE サンプルから抽出した DNA の全てにおいて遺伝子突然変異解析が可能な量の二本鎖 DNA が得られた。また、そのうち約 80% においては、10% の突然変異が 95% の確率で検出できる量の、PCR の鋳型となり得る DNA が含まれることが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究費に謝辞があるもの

該当なし

謝辞はないが本研究費に密接に関係するもの

1) Takeshima H, Niwa T, Takahashi T,

Wakabayashi M, Yamashita S, Ando T, Inagawa Y, Taniguchi H, Katai H, Sugiyama T, Kiyono T, Ushijima T. Frequent involvement of chromatin remodeler alterations in gastric field cancerization. **Cancer Lett.** 2015;357:328-38.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

胃がんにおける遺伝子変異・エピジェネティック異常と
生活習慣などリスク要因との関連：前向きコホート研究
（病理試料の収集）

担当責任者 齊藤 昌宏 JA 秋田厚生連平鹿総合病院
病理診断科 診療部長

研究要旨

国立がん研究センターから提供された、コホート対象者平鹿総合病院胃がん症例のリストをもとに、2005年～2010年の48例の病理標本の腫瘍細胞域を確認し、充分量の腫瘍細胞と非腫瘍組織の含まれたガラススライドを作成した。平鹿総合病院胃癌症例の病理標本においてはDNA保持が優れ、変異解析、メチル化解析についてそれぞれ10ミクロン厚未染スライド1枚で充分可能であることが示された。

A. 研究目的

前向きコホート研究において、既知の胃がんリスク・予防要因と胃がんとの関連性が、遺伝子突然変異・エピジェネティック異常による胃がんサブタイプで異なるか検討するため、コホート内で発生した胃がん症例の病理試料収集が可能か検討を行う。

B. 研究方法

国立がん研究センターから提供された、コホート対象者平鹿総合病院胃がん症例のリストをもとに、2000年～2010年の100例の病理標本を検索した。

その中で保存期間のより短い例から検索を始める目的にて、2005年～2010年の48例を選択した。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立がん研究センターおよび平鹿総合病院倫理審査委員会にて承認、研究許可が得られている。

C. 研究結果

1) 保存病理組織標本の確認と選別

各例の手術材料・粘膜下切除材料からの病理組織標本において、腫瘍病変部を顕微鏡的に確認した。その中で充分量の腫瘍細胞と非腫瘍組織の含まれた1枚の病理標本プレパラートを選別した。

2) ガラススライド作成

48例選別病理標本パラフィンブロックより各々10枚のガラススライドを作成した。うち1枚は5ミクロン厚に薄切し、腫瘍細胞存在域確認用にHE染色を施した。DNA

抽出範囲の正確な位置決定に対応させるため、HE標本のルーペ画像を撮影し、腫瘍細胞存在域にマーキングを加えた。

残り未染スライド9枚は、免疫染色用4枚とDNA抽出用5枚で、10ミクロン厚に薄切した。

3) ガラススライドの提供

作成したガラススライドを用いて共同研究者が実施したDNA抽出トライアルでは、変異解析、メチル化解析についてそれぞれ10ミクロン厚未染スライド1枚で充分量のDNAが得られたとのことであった。

平鹿総合病院胃癌症例においては、変異解析、メチル化解析についてそれぞれ10ミクロン厚未染スライド1枚で充分可能であることが示された。

4) HE標本のバーチャルスライド化

なお、HE標本については、バーチャルスライド化を行いデジタルデータとしても保存した。PC上での閲覧も可能となり、腫瘍細胞の分布・位置・細胞像など顕微鏡像を含めた今後のディスカッションにおいて容易に利用可能となった。

D. 考察

当院では従来から、組織材料からパラフィンブロックを作成する際、DNAを含む細胞・組織成分の保持に細心の注意を払って来た。即ち、摘出から固定までの時間短縮、固定時間の適正化、充分量アルコールによ

る脱水・脱脂とその適正時間の確保（脱水・脱脂時間の短縮を目的とした組織収縮・破壊の強いキシレンなど有機溶剤は用いていない）。

このように作成された平鹿総合病院胃癌症例の病理標本においてはDNA保持が優れ、変異解析、メチル化解析についてそれぞれ10ミクロン厚未染スライド1枚で充分可能であることが示された。

E. 結論

変異解析、メチル化解析について、収集した病理10ミクロン厚未染スライド1枚で充分可能であることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「胃がんにおける遺伝子変異・エピジェネティック異常と生活習慣などリスク要因との関連：前向きコホート研究」

機関名 独立行政法人国立がん研究センター、JA秋田厚生連平鹿総合病院

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
Association of vegetable and fruit intake with gastric cancer risk: A pooled analysis of four cohort studies.	島津太一, 若井建志, 玉腰暁子, 辻一郎, 田中恵太郎, 松尾恵太郎, 永田知里, 井上真奈美, 津金昌一郎, 笹月静.	第73回日本癌学会学術総会	2014年9月	国内

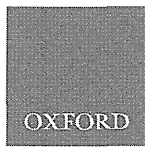
2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Genetic polymorphisms of ADH1B, ADH1C and ALDH2, alcohol consumption, and the risk of gastric cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study.	Hidaka A, Sasazuki S, Matsuo K, Ito H, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Inoue M, Tsugane S; JPHC Study Group.	Carcinogenesis.	2015年2月	国外
Plasma insulin, C-peptide and blood glucose and the risk of gastric cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study.	Hidaka A, Sasazuki S, Goto A, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, Inoue M, Noda M, Tajiri H, Tsugane S; JPHC Study Group.	Int J Cancer.	2015年3月	国外

Demonstration of the usefulness of epigenetic cancer risk prediction by a multicentre prospective cohort study.	Asada K, Nakajima T, Shimazu T, Yamamichi N, Maekita T, Yokoi C, Oda I, Ando T, Yoshida T, Nanjo S, Fujishiro M, Gotoda T, Ichinose M, Ushijima T.	Gut. 2015;64:388-96.	2015年3月	国外
Frequent involvement of chromatin remodeler alterations in gastric field cancerization.	Takeshima H, Niwa T, Takahashi T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ando T, Inagawa Y, Taniguchi H, Katai H, Sugiyama T, Kiyono T, Ushijima T.	Cancer Lett.	2015年2月	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。



ORIGINAL MANUSCRIPT

Genetic polymorphisms of ADH1B, ADH1C and ALDH2, alcohol consumption, and the risk of gastric cancer: the Japan Public Health Center-based prospective study

Akihisa Hidaka¹, Shizuka Sasazuki^{1,*}, Keitaro Matsuo², Hidemi Ito³, Norie Sawada¹, Taichi Shimazu¹, Taiki Yamaji¹, Motoki Iwasaki¹, Manami Inoue^{1,4}, Shoichiro Tsugane¹, and for the JPHC Study Group[†]

¹Epidemiology and Prevention Group, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center, Tokyo 104-0045, Japan,

² Department of Preventive Medicine, Kyushu University Faculty of Medical Sciences, Fukuoka 812-8582, Japan, ³ Division of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya 464-8681, Japan, and ⁴ Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 3 3542 2511; Fax: +81 3 3547 8578; Email: ssasazuk@ncc.go.jp

[†]The members of JPHC Study Group are listed under Appendix.

Abstract

The association between alcohol consumption, genetic polymorphisms of alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) and gastric cancer risk is not completely understood. We investigated the association between ADH1B (rs1229984), ADH1C (rs698) and ALDH2 (rs671) polymorphisms, alcohol consumption and the risk of gastric cancer among Japanese subjects in a population-based, nested, case-control study (1990–2004). Among 36 745 subjects who answered the baseline questionnaire and provided blood samples, 457 new gastric cancer cases matched to 457 controls were used in the analysis. The odds ratios (OR) and corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated using logistic regression models. No association was observed between alcohol consumption, ADH1B (rs1229984), ADH1C (rs698) and ALDH2 (rs671) polymorphisms and gastric cancer risk. However, considering gene-environmental interaction, ADH1C G allele carriers who drink ≥ 150 g/week of ethanol had a 2.5-fold increased risk of gastric cancer (OR = 2.54, 95% CI = 1.05–6.17) relative to AA genotype carriers who drink 0 to < 150 g/week (P for interaction = 0.02). ALDH2 A allele carriers who drink ≥ 150 g/week also had an increased risk (OR = 2.08, 95% CI = 1.05–4.12) relative to GG genotype carriers who drink 0 to < 150 g/week (P for interaction = 0.08). To find the relation between alcohol consumption and gastric cancer risk, it is important to consider both alcohol consumption level and ADH1C and ALDH2 polymorphisms.

Introduction

Alcohol consumption is a strong risk factor for some cancers of the head and neck, liver, breast and colon and rectum (1). However, based on many epidemiological studies, the association between alcohol consumption and gastric cancer risk was reported as inconsistent by the World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2).

In general, the metabolism of ethanol (alcohol) by alcohol dehydrogenases (ADH) is converted into the generation of acetaldehyde, and acetaldehyde is oxidized into nontoxic acetate by aldehyde dehydrogenases (ALDH (3)). Among all classes of ADH and ALDH isoenzymes, ADH1B, ADH1C and ALDH2 are the main ethanol-metabolizing enzymes (4,5). It has been suggested that

Abbreviations

ADH	alcohol dehydrogenases
ALDH	aldehyde dehydrogenases
BMI	body mass index
CagA	cytotoxin-associated gene A
CI	confidence interval
DM	diabetes mellitus
DR	dietary records
FFQ	food frequency questionnaire
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
JPHC study	Japan Public Health Center-based prospective study
OR	odds ratio
PHC	public health center.

the metabolism of ethanol leads to accumulation of acetaldehyde (acetaldehyde associated with alcoholic beverages) that is toxic and classified as a group 1 carcinogen in humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC (6)). Accumulation of acetaldehyde differs according to functional enzymatic *ADH1B*, *ADH1C* and *ALDH2* genetic polymorphisms. In previous studies, active *ADH1B* allele metabolizes ethanol into acetaldehyde ~40 times more than inactive allele, and active *ADH1C* allele metabolizes ~2.5 times more than inactive allele (5). Furthermore, light drinkers with inactive homozygote *ALDH2* genotype and with heterozygote genotype have 18 times and 5 times higher, respectively, average peaks of acetaldehyde concentrations in blood than moderate drinkers with active homozygote genotypes (7). Therefore, it is important to consider alcohol consumption level and functional genetic polymorphisms of ethanol-metabolizing enzymes to clarify the association between alcohol consumption and gastric cancer risk.

The genotype frequencies of *ADH1B*, *ADH1C* and *ALDH2* polymorphisms differ according to race. The genotype frequencies of *ADH1B* and *ALDH2* polymorphisms are unevenly distributed in Caucasians, but not in Asians (8). Thus, we suggest that it is necessary to evaluate the association of *ADH1B* and *ALDH2* polymorphisms in Asians. In contrast, the genotype frequencies of the *ADH1C* polymorphism are unevenly distributed in Asians, but not in Caucasians (8). However, this polymorphism is also an important gene in alcohol metabolism, and there is no published study regarding the association between the *ADH1C* polymorphism and gastric cancer risk in Asians.

In our study, we selected genetic polymorphisms *ADH1B* (rs1229984), *ADH1C* (rs698) and *ALDH2* (rs671), which are functionally established single nucleotide polymorphisms, and aimed to clarify the association between these genetic polymorphisms, alcohol consumption and gastric cancer risk in a large-scale Japanese population-based study. Our hypothesis was that drinkers with inactive *ADH1B* and *ADH1C* G alleles would have an increased risk for gastric cancer compared with those with active A alleles. Because inactive allele carriers cannot metabolize ethanol into acetaldehyde, they are less prone to the effects of acetaldehyde such as nausea, increased heart rate and flushing (9). International Agency for Research on Cancer classifies ethanol in alcoholic beverages as a group 1 carcinogen in humans, the same classification as acetaldehyde (6). In addition, drinkers with inactive *ALDH2* A alleles would be at increased risk compared with those with active G alleles because inactive allele carriers cannot oxidize acetaldehyde.

Materials and methods

Study population

The Japan Public Health Center-based prospective study (JPHC study) was launched in 1990 for cohort I (subject age range, 40–59 years) and in

1993 for cohort II (subject age range, 40–69 years) and investigated cancer, cardiovascular disease and other lifestyle-related diseases (10). The JPHC study consisted of 11 public health centers (PHCs) throughout Japan with a total of 140 420 subjects (68 722 men and 71 698 women). Among study subjects, those who registered at two PHC areas (Tokyo and Osaka) were excluded from this study because data regarding cancer incidence was not available or selection of subjects was defined differently from that of other cohort subjects. A population-based cohort of 123 576 subjects (61 009 men and 62 567 women) was established. This study was approved by the Institutional Review Board of the National Cancer Center, Tokyo, Japan.

Baseline survey

In the baseline survey, the study subjects were asked to reply to a self-administered questionnaire about various lifestyle factors, such as sociodemographic characteristics, personal medical history, family history, smoking and drinking habits, dietary habits and physical activity. A total of 99 808 subjects (47 525 men and 52 283 women) responded, giving a response rate of 80.8%.

We excluded subjects who self-reported cancer at baseline ($n = 2136$), who were not Japanese ($n = 18$) and who did not live in the area at the baseline ($n = 11$), which left 97 644 eligible subjects (46 803 men and 50 841 women). One subject reported having cancer at baseline and was also not Japanese. Among the eligible subjects, 36 745 subjects (13 467 men and 23 278 women) provided a 10-ml blood sample at the time of the health check-up conducted by each PHC area. These blood samples were stored at -80°C until analysis. Blood samples were collected from 1990 to 1992 for cohort I and from 1993 to 1995 for cohort II. Following the standard protocol, subjects were asked to avoid having a meal after 21:00 hours on the day before the health check-up and they recorded the last time of caloric intake (including a meal and/or drinking).

Follow-up and cancer registry for JPHC Study

Subjects were observed until 31 December 2004. In Japan, residence and death registration are required by law, and residence status, survival and death were identified annually through residential registries in each area. Among the 36 745 subjects, 3.9% moved outside the study area, 4.4% died and 0.03% were lost to follow-up during the study period, which left 33 701 subjects.

Incidence data regarding gastric cancer cases were identified from two major sources: local major hospitals in the study area and population-based cancer registries. Death certificate information was also used as an information source. In our cancer registry system, 7.6% of gastric cancer cases were based on information first notified via death certificate and 2.1% were registered based on information from the death certificate alone.

Selection of cases and controls

The anatomic site of each case was coded according to the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O), 3rd edition, codes C16.0–16.9 (11). A tumor located in the upper third of the stomach was classified as proximal gastric cancer 'cardia site' (ICD-O code C16.0–16.1), and that in the lower position of the stomach was classified as distal gastric cancer 'noncardia site' (ICD-O code C16.2–16.7). The other cases were tumors that could not be classified because of overlapping lesions (ICD-O code C16.8) or no information (ICD-O code C16.9). The subdivisions by histological type were based on classification derived by Lauren (12). For each case, we selected one control subject who had no history of gastric cancer when the case was diagnosed. Each control was matched to the case for age (± 3 years), sex, PHC area, fasting time at blood donation (± 5 h) and blood donation date (± 2 months). Among 1681 cases diagnosed histologically and registered in cohort I or cohort II (study period from 1990 to 2004), 512 cases replied to a self-administered questionnaire and provided blood. Furthermore, among the 512 new gastric cancer cases, one case was excluded because of a technical error in the measurement of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) and 45 cases for one PHC area in Osaka were excluded because buffy coat was not available. Another nine cases were excluded because of an inadequate concentration of buffy coat for DNA extraction. The final analysis included 457 matched sets of cases and controls. A flowchart of the study subjects is presented in Figure 1.

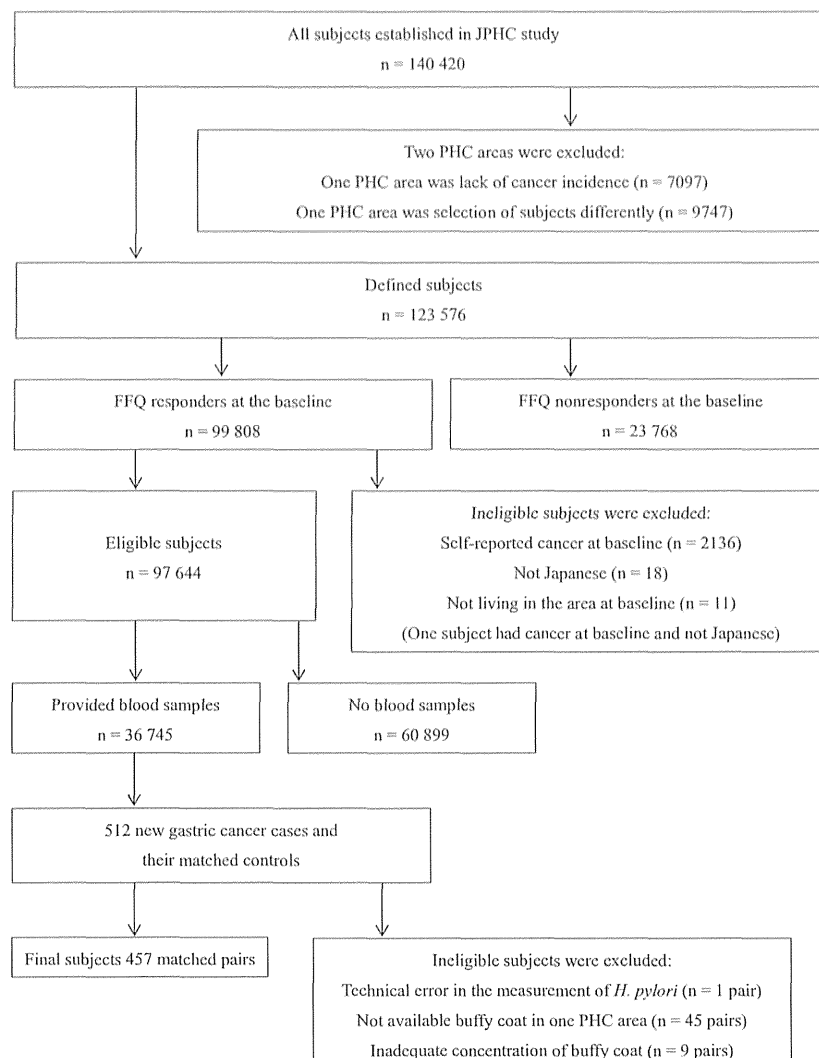


Figure 1. Flowchart of the study subjects.

Assessment of alcohol consumption

Information regarding alcohol consumption was assessed based on the frequency and amount using a validated self-administered food frequency questionnaire (FFQ). During the baseline survey, cohort I and cohort II used slightly different FFQ. In cohort I, the average frequency of alcohol consumption was reported in six categories (almost never, 1–3 days per month, 1–2 days per week, 3–4 days per week, 5–6 days per week and every day). Subjects who drank at least once per week were also asked about the average amount and types of drinks. In cohort II, alcohol consumption status (never, former and current drinkers) was asked first, and then former and current drinkers were asked for more information, similar to cohort I. We then assigned a score to each category of the average frequency of consumption as follows: 1.5 for 1–2 days per week, 3.5 for 3–4 days per week, 5.5 for 5–6 days per week and 7 for every day in cohort I; and 1.5 for 1–2 days per week, 3.5 for 3–4 days per week and 6 for almost every day in cohort II. The amount of alcohol consumption was quantified in grams of ethanol by each type of beverage as follows: 180 ml of sake classified as 23 g of ethanol, 180 ml of shochu or awamori classified as 36 g, 633 ml of beer classified as 23 g, 30 ml of whiskey or brandy classified as 10 g and 60 ml wine classified as 6 g. Finally, we calculated the weekly ethanol intake, which was estimated by multiplying the quantity by the score. In our study, alcohol consumption was classified into three groups: never or occasional drinker; ethanol <150 g per week and ethanol

≥150 g per week. Alcohol consumption levels were defined by the unit *go*, the standard measure of ethanol content of alcoholic beverages in Japan. This unit equals 23 g of alcohol, the amount contained in 180 ml of sake. If a subject drinks 1 *go* every day, he or she is consuming ~150 g of ethanol per week. Validity of this FFQ-based estimated alcohol consumption was evaluated in a subsample of the JPHC study subjects who completed 28-day dietary records (DR). In cohort I, Spearman rank correlation coefficients between the FFQ and DR were 0.79 ($n = 94$) for men and 0.44 ($n = 107$) for women, respectively (13). In cohort II, these results were 0.59 ($n = 176$) for men and 0.40 ($n = 178$) for women, respectively (14).

Assessment of other potential confounding factors

Smoking status was divided into four groups: never smoker, former smoker, current smoker using ≤20 cigarettes per day and current smoker using ≥21 cigarettes per day. Body mass index (BMI) status was divided into three groups: BMI <22 kg/m², 22 kg/m² ≤ BMI <25 kg/m² and BMI ≥25 kg/m². According to a previous prospective study of the association with gastric cancer risk in Japan (15), the classifications for smoking status and BMI are reasonable. Total calorie intake and salt intake were treated as continuous variables. Family history of gastric cancer was considered positive if at least one parent or sibling had gastric cancer. The *H. pylori* infection status was regarded as positive if subjects had either *H. pylori* antibody ≥10 U/ml or cytotoxin-associated gene A (CagA) antibody >10. Atrophy was regarded

as positive if pepsinogen I was ≤ 70 ng/ml and pepsinogen I:pepsinogen II ratio was ≤ 3 (16). History of diabetes mellitus (DM) was considered positive if subjects reported a history of DM and/or drug use for DM at baseline.

Genotyping of ADH1B, ADH1C and ALDH2 polymorphisms

DNA of each subject was extracted from white blood cells in the buffy coat using a FlexiGene DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genotyping of ADH1B (rs1229984), ADH1C (rs698) and ALDH2 (rs671) polymorphisms was analyzed by using TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping assays (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA). In this assay, fluorescently labeled sequence-specific primers were used in polymerase chain reaction. These measurements were performed with blinding of case and control status. The genotype distributions of ADH1B, ADH1C and ALDH2 polymorphisms among controls were all in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$).

Statistical analysis

The chi-square test was used to compare baseline characteristics between cases and controls. Matched odds ratios (OR) and their corresponding 95% confidence intervals (CIs) were calculated to indicate the association between alcohol consumption, ADH1B, ADH1C and ALDH2 polymorphisms, and gastric cancer risk using conditional logistic regression models. OR1 was matched for age (± 3 years), sex, PHC area, blood donation date (± 2 months) and fasting time at blood donation (± 5 h). OR2 was further adjusted for potential confounding factors such as smoking status, alcohol consumption, total calorie intake, salt intake, BMI, family history of gastric cancer, *H. pylori* infection status, atrophy and history of DM. Data for subjects who were missing values for BMI ($n = 8$), total calorie intake ($n = 1$) and salt intake ($n = 1$) were deleted from the study when adjusting for these confounding factors. When we calculated the effect modification of ADH1B, ADH1C and ALDH2 polymorphisms on gastric cancer risk associated with alcohol consumption, and that of these polymorphisms combined, unconditional logistic regression models were used. We conducted the effect modification of ADH1B, ADH1C and ALDH2 polymorphisms associated with alcohol consumption with further adjustment for these polymorphisms mutually. Reported P values were two-sided, and $P < 0.05$ was defined as statistically significant. All statistical analyses were performed with SAS software version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

Baseline characteristics of cases and controls are shown in Table 1. Higher BMI was more frequently distributed among controls than patients with gastric cancer. In contrast, history of DM, family history of gastric cancer, *H. pylori*, CagA positivity and atrophy were more frequently distributed among patients. These results generally agree with previous reports, including the JPHC study (15,17–19).

Table 2 presents the association between alcohol consumption, ADH1B, ADH1C and ALDH2 polymorphisms and gastric cancer risk. Alcohol consumption was marginally associated with an increased risk of gastric cancer in the OR1 group compared with never to occasional drinkers; drinkers with ethanol < 150 g/week had OR of 0.89 and with ≥ 150 g/week had OR of 1.29 (P for trend = 0.15). However, after further adjustment for potential confounding factors, the association became null (OR2 group). Compared with ALDH2 GG genotype, GA and AA genotypes were marginally associated with an increased risk, with OR2 values of 1.09 (95% CI = 0.77–1.54) and 2.01 (95% CI = 0.91–4.48), respectively (P for trend = 0.18). However, ALDH2 A allele carriers had no risk association compared with GG genotype carriers. We found no association between alcohol consumption and ADH1B and ADH1C polymorphisms. ADH1C GG genotype was rare in this Japanese population.

Table 3 shows the effect modification of ADH1B, ADH1C and ALDH2 polymorphisms on gastric cancer risk associated

with alcohol consumption (gene–environmental interaction). Compared with ADH1C AA genotype carriers who drink 0 to < 150 g/week, G allele carriers who drink ≥ 150 g/week had an increased risk, with OR2 value of 2.54 (95% CI = 1.05–6.17); the interaction between alcohol consumption and G allele carriers was statistically significant (P for interaction = 0.02). ALDH2 A allele carriers who drink ≥ 150 g/week had an increased risk compared with GG genotype carriers who drink 0 to < 150 g/week, with OR2 value of 2.08 (95% CI = 1.05–4.12). A trend toward a positive interaction between alcohol consumption and A allele carrier status was shown (P for interaction = 0.08). No association was shown for ADH1B polymorphism and alcohol consumption.

We further examined the effect modification of the combination of ADH1B, ADH1C and ALDH2 polymorphisms on gastric cancer risk associated with alcohol consumption (gene–environmental interaction) in Table 4. Compared with the combination of ADH1B AA and ALDH2 GG genotype carriers who drink 0 to < 150 g/week, each combination of ADH1B AA genotype and ALDH2 A allele, ADH1B G allele and ALDH2 A allele carriers who drink ≥ 150 g/week showed a trend toward an increased risk for gastric cancer, with OR2 values of 2.16 (95% CI = 0.83–5.63) and 1.66 (95% CI = 0.66–4.16), respectively. However, the interaction between ADH1B G allele and ALDH2 A allele and alcohol consumption was not statistically significant (P for interaction = 0.40). In addition, compared with the combination of ADH1C AA and ALDH2 GG genotype carriers who drink 0 to < 150 g/week, the combination of ADH1C G and ALDH2 A alleles in carriers who drink 0 to < 150 g/week showed a statistically significant decreased risk (OR = 0.43, 95% CI = 0.21–0.91). Each combination of ADH1C AA genotype and ALDH2 A, ADH1C G and ALDH2 A alleles in carriers who drink ≥ 150 g/week showed a marginally increased risk, with OR2 values 1.92 (95% CI = 0.95–3.87) and 8.95 (95% CI = 0.62–129.25), respectively. Moreover, the interaction between ADH1C G allele and ALDH2 A allele and alcohol consumption seemed to be marginally statistically significant (P for interaction = 0.13).

We performed stratified analyses by sex regarding the association of each polymorphism with gastric cancer risk and observed no differences by stratification (data not shown). In addition, the gene–environmental interaction analysis was repeated with stratification by gastric atrophy. Among the subjects with gastric atrophy, ALDH2 A allele carriers who drink ≥ 150 g/week had an increased risk of gastric cancer compared with those with GG genotype who drink 0 to < 150 g/week (OR2 = 2.71, 95% CI = 1.18–6.27). An interaction between alcohol consumption and A allele was shown (P for interaction = 0.02). However, the subjects without gastric atrophy and ALDH2 polymorphism did not show a positive association with risk. ADH1B and ADH1C polymorphisms also did not show any positive association with risk when stratified by atrophy. We also evaluated the combination effects of ADH1B, ADH1C and ALDH2 polymorphisms on gastric cancer risk. Compared with ADH1B AA, ADH1C AA and ALDH2 GG genotype carriers, OR2s were 1.15 (95% CI = 0.75–1.76) (P for interaction = 0.13) for ADH1B G and ALDH2 A allele carriers and 0.59 (95% CI = 0.30–1.15) (P for interaction = 0.02) for ADH1C G and ALDH2 A allele carriers. Although the interaction between ADH1C and ALDH2 polymorphisms was statistically significant, a chance finding cannot be ruled out because ADH1C GG genotype was rare among our study subjects. Analyses considering anatomic site and histological type of gastric cancer were also performed. Cardia site ($n = 76$) was not robustly evaluated because of the small number of subjects. When limited to distal site and intestinal or diffuse type of gastric cancer, ADH1C G allele and ALDH2 A allele carriers who drink ≥ 150 g/week showed a trend

Table 1. Baseline characteristics of cases and controls

Characteristics	Cases	Controls	P value ^a
n	457	457	
Age, mean (SD)	56.9 (7.10)	56.9 (7.12)	Matching value
Men (%)	307(67.2)	307 (67.2)	Matching value
Smoking status			
Never (%)	209 (45.7)	229 (50.1)	
Former (%)	81 (17.7)	88 (19.3)	
Current: ≤20 cigarettes/day (%)	130 (28.5)	101 (22.1)	
Current: ≥21 cigarettes/day (%)	37 (8.1)	39 (8.5)	0.18
Alcohol consumption			
Never to occasional (%)	222 (48.6)	228 (49.9)	
1+ per day and <150 g/week (%)	86 (18.8)	105 (23.0)	
1+ per day and ≥150 g/week (%)	149 (32.6)	124 (27.1)	0.12
BMI (kg/m ²) ^b			
BMI <22 (%)	168 (37.1)	141 (31.1)	
22≤ BMI <25 (%)	193 (42.6)	191 (42.2)	
25≤ BMI (%)	92 (20.3)	121 (26.8)	0.04
History of DM (%)	41 (9.0)	19 (4.2)	0.005
Family history of gastric cancer (%)	53 (11.6)	31 (6.8)	0.02
<i>Helicobacter pylori</i> -positive (%) ^c	428 (93.7)	341 (74.6)	<0.001
CagA-positive (%)	349 (76.4)	318 (69.6)	0.03
Atrophy (%) ^d	375 (82.1)	261 (57.1)	<0.001

^aBased on chi-square test.

^bSubject data without calculated BMI data because of missing values for height or weight in four cases and four controls were deleted.

^cBased on immunoglobulin G antibody.

^dAtrophy: positive if pepsinogen I ≤70 ng/ml and pepsinogen I:pepsinogen II ratio ≤3.

Table 2. Association between alcohol consumption, *ADH1B*, *ADH1C* and *ALDH2* polymorphisms, and gastric cancer risk

	Genotype frequency (%) ^a	Cases (n)/controls (n)	OR1 (95% CI) ^b	OR2 (95% CI) ^c
Alcohol consumption ^d				
Never to occasional		222/228	1.00 (reference)	1.00 (reference)
1+ per day and <150 g/week		86/105	0.89 (0.60–1.33)	0.73 (0.46–1.17)
1+ per day and ≥150 g/week		149/124	1.29 (0.88–1.89)	1.09 (0.68–1.74)
P for trend			0.15	0.64
<i>ADH1B</i> (rs1229984)				
AA	55.6	252/254	1.00 (reference)	1.00 (reference)
AG	36.8	173/168	1.03 (0.78–1.36)	0.93 (0.67–1.29)
GG	7.6	32/35	0.92 (0.56–1.51)	0.88 (0.50–1.54)
P for trend			0.92	0.56
AG+GG	44.4	205/203	1.01 (0.78–1.31)	0.91 (0.67–1.24)
<i>ADH1C</i> (rs698)				
AA	85.6	396/391	1.00 (reference)	1.00 (reference)
AG	14.2	60/65	0.91 (0.63–1.33)	0.79 (0.51–1.21)
GG	0.2	1/1	1.00 (0.06–15.99)	1.51 (0.02–97.99)
P for trend			0.65	0.26
AG+GG	14.4	61/66	0.90 (0.62–1.30)	0.79 (0.51–1.22)
<i>ALDH2</i> (rs671)				
GG	63.9	287/292	1.00 (reference)	1.00 (reference)
GA	32.8	149/150	0.99 (0.74–1.32)	1.09 (0.77–1.54)
AA	3.3	21/15	1.33 (0.67–2.61)	2.01 (0.91–4.48)
P for trend			0.68	0.18
GA+AA	36.1	170/165	1.02 (0.77–1.34)	1.16 (0.83–1.62)

Based on conditional logistic regression model.

^aAmong controls.

^bMatched for age (±3 years), sex, area, blood donation date (±2 months) and fasting time at blood donation (±5 h).

^cFurther adjusted for smoking status, alcohol consumption, body mass index, total calorie, salt intake, family history of gastric cancer, *Helicobacter pylori* infection status, atrophy and history of DM.

^dNot adjusted for alcohol consumption.

toward having an increased risk relative to those who drink 0 to <150 g/week (data not shown). When we evaluated heavy drinkers who drink ≥300 or ≥450 g/week, similar associations were observed (data not shown).

Discussion

In our population-based, nested, case-control study, we observed no association between alcohol consumption, *ADH1B*