

令和元年6月1日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09080

研究課題名(和文)北インドにおける胆嚢がん多発要因の疫学的解明と早期発見のための特異蛋白の有用性

研究課題名(英文) Factors for the development of gallbladder cancer in North Indians and an evaluation of specific proteins for the early detection

研究代表者

生駒 俊和 (Ikoma, Toshikazu)

北陸大学・医療保健学部・准教授

研究者番号：60612744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々の結果は、高齢、低学歴、社会経済的地位の低さ、1日1回以下の排便習慣、非菜食主義、水道水及び井戸水の使用、薪で調理することが北インド人の胆嚢がんリスクの増加と関係していることを示している。一方、野菜や果物の摂取は胆嚢がんリスクを低下させた。これらのリスク要因を改善することによって胆嚢がん罹患率が減少するかどうかの確認を必要とするが、我々の知見は、野菜や果物の摂取不足と安全でない飲料水の供給が北インド人の胆嚢がん発症のためのコントロール可能な危険因子であることを示している。

遺伝要因として、胆嚢がん発症過程においてTP53 rs1042522遺伝子多型が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果をもとに、インド胆嚢がんの発症メカニズムは、非菜食主義による食物繊維の摂取不足がもたらす糞便の腸内停滞、胆汁中の二次胆汁酸濃度の増加、肝臓から胆汁へのコレステロール過剰分泌が誘導され、コレステロール胆石形成の促進、腸チフス菌慢性感染によりコレステロール胆石表面にバイオフィルムを形成し、生体防御系から隠れて治療に対する抵抗性を獲得、異形成や前がん病変への進行促進、胆嚢がん発症、という過程が考えられた。もし、腸チフス菌が胆嚢がん発症の因果的役割を果たしていることが他の研究で証明されれば、その対策を講じることにより胆嚢がんは予防可能な疾患となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our findings show that older age, low education level, low socioeconomic status, bowel habits once a day or less, non-vegetarian, access to tap water, use of well water, cooking with firewood are associated with increased risk of gallbladder cancer. Although our findings need confirmation whether incidence of gallbladder cancer would be reduced by preventing these factors, our data show that lack of vegetables and fruits intake and supply of unsafe drinking water are modifiable risk factors for the development of gallbladder cancer in north Indians.

We also found that the CC genotype of TP53 rs1042522 polymorphism is associated with an increased risk of gallbladder cancer. The GG genotype of the TP53 polymorphism was previously shown to have a more potent apoptosis-inducing activity than the CC genotype. Carriers with the CC genotype among North Indians appear to show an increased risk of developing gallbladder cancer, which may be due to the lower apoptosis-inducing activity.

研究分野：環境予防医学

キーワード：胆嚢がん インド 環境要因 遺伝要因 特異蛋白質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆嚢がん罹患率には顕著な地域・民族的集積性が認められている。胆嚢がんは、南米のアンデス山脈の西側の国(チリ、ボリビア、ペルーなど)やアジア(インド、韓国など)で多発しており、さらに、同じ国内でも地域差(チリの南部やインドの北部で高率)が認められている。これまでに、胆嚢がん多発国においていくつかの本症発生に関わる環境要因や遺伝的要因が報告されているが、それらの要因だけでは胆嚢がんの発生メカニズムを完全に説明できるまでには至っていない。

インドでは、胆嚢がんは北部・北西部地域で多発しており、これらの地域での年齢調整した罹患率は南部に比べ男女とも約 10 倍高い値を示している。多発地域特有の環境、遺伝的要因の存在が示唆されるが、報告のあった要因によって本症の発生メカニズムを説明できるまでには至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、胆嚢がん多発国のインドにおいて北部地域に本症が多発している要因を環境、遺伝疫学調査で明らかにし、本症発生のメカニズムを解明することを目的としている。さらに、先の研究でチリ胆嚢がん患者の癌組織中から得た胆嚢がん特異蛋白がインド胆嚢がん患者の血清中から検出できるかどうかの検証を行うことを目的としている。

南米の胆嚢がん多発国、チリでは赤唐辛子の高頻度摂取が胆嚢がん発症のリスク要因とされている。我々のこれまでの研究で、チリ、ボリビア、及びペルーで消費されている赤唐辛子はアフラトキシン類やオクラトキシン A に汚染されていることを明らかにした。インドでも赤唐辛子は日常的に摂取されており、赤唐辛子がこれらのカビ毒に汚染されている可能性がある。そこで、インドにおける胆嚢がんの低罹患率地域(南部)、中罹患率地域(中部)、及び高罹患率地域(北部)で消費されている赤唐辛子中のアフラトキシン類とオクラトキシン A 濃度を調べ、両者の関係を明らかにする。

がん抑制遺伝子 *p53* (*TP53*) の変異部位や変異様式は各臓器、発癌物質により異なることが報告されている。この *TP53* 遺伝子の塩基置換様式から発がん要因(内的、外的、及び両者)が推測可能といわれていることから、*TP53* 及びがん遺伝子 *K-ras* の遺伝子変異解析を行う。

また、チリ胆嚢がん患者の癌部位から検出した 8 種類の胆嚢がん特異蛋白がインド胆嚢がん患者の血清中から検出されるかどうかの検証を行う。

これらの検討によって、インド北部で多発している胆嚢がんの成因を明らかにし、本症発生のメカニズム解明に迫ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 赤唐辛子のカビ毒汚染と胆嚢がん発症の関係

南米で行われた我々の最近の研究は、赤唐辛子のカビ毒(マイコトキシン)汚染が胆嚢がんのリスク増加と関連している可能性があることを明らかにした。しかし、この関係は、胆嚢がんの罹患率が高く、かつ赤唐辛子の消費量が多いインドでは調査されていない。インドの胆嚢がん罹患率が低、中、および高い地域で消費されている赤唐辛子中のアフラトキシン類(*B1*、*B2*、*G1*、*G2*)とオクラトキシン A の濃度を測定し、得られた結果を胆嚢がん罹患率と比較した。

試料として 9 つの都市から合計 21 種類の赤唐辛子を収集した(低罹患率地域、8 種類; 中罹患率地域、5 種類; 高罹患率地域、8 種類)。各試料からアフラトキシン類やオクラトキシン A を抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いてそれぞれの濃度を測定した。

(2) インド胆嚢がん患者における *TP53* と *K-ras* 遺伝子変異の解析

インド北部の胆嚢がん患者における *TP53* および *K-ras* 遺伝子の突然変異の頻度を調べた。当初入手できた胆嚢がん患者 100 例の凍結胆嚢組織標本からの DNA 抽出は不可能であった。これは、DNA 抽出のために室温に戻した時点で自己融解がおこり、蛋白質、DNA は破壊されていたことがその一因と考えられた。しかし、10 例の胆嚢がん患者のホルマリン固定パラフィン包埋胆嚢組織切片からは DNA が全て抽出された。抽出された DNA を用い、*TP53* 遺伝子のエクソン 5~8 および *K-ras* 遺伝子のコドン 12、13、および 61 の突然変異を PCR-直接塩基配列決定法を用いて調べた。

(3) インド胆嚢がん発症に関わる環境要因

病院ベースの症例対照研究がサンジャイ ガンジー医科大学大学院附属病院で行われた。症例群は 99 人の胆石を有する胆嚢がん患者(男性 33 人、女性 66 人、平均年齢 51.4 歳)で、対照群は 99 人の胆石症患者(男性 40 人、女性 59 人、平均年齢 45.7 歳)であった。すべての参加者は、病歴、家族歴や 105 品目の食物摂取頻度を含むアンケートに回答するためにインド研究者からインタビューを受けた。リスク評価は、性別および年齢階級を制御変数とした多重ロジスティック回帰分析を用いて行った。

(4) インド胆嚢がん発症に関わる遺伝的要因

第 1 相薬物代謝酵素、チトクローム P450 1A1 (*CYP1A1*) と第 2 相薬物代謝抱合系酵素、グルタチオン S-トランスフェラーゼ クラス - ミュー 1 (*GSTM1*) と同クラス - テラ 1 (*GSTT1*)

及び *TP53* の遺伝子多型が北インド人における胆嚢がんのリスク増加と関連しているかどうかを調べた。この症例対照研究は、2014年7月から2017年5月まで、インドのラクナウにあるサンジャイ ガンジー医科学大学院の附属病院で胆石を有する96人の胆嚢がん患者（症例）と93人の胆石症患者（対照）を対象として実施された。

CYP1A1 rs4646903、*CYP1A1* rs1048943、*TP53* rs1042522 遺伝子多型の頻度はTaqMan® SNP 遺伝子型決定アッセイを、*GSTM1* と *GSTT1* 多型はマルチプレックス PCR 法を用いて解析した。

(5) チリ胆嚢がん患者の癌組織中から検出された8種類の特異蛋白の検出

我々は、先の研究でチリ胆嚢がん患者のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を試料として、胆嚢がん組織中に特異的に存在する8種類の蛋白質を検出した。これらの蛋白質が、インド胆嚢がん患者の血清中から検出できるかどうか液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法を用いて検討した。

解析は以下の手順で行った。血清中の高濃度蛋白質の除去、得られた溶液を凍結乾燥、システイン残基の還元アルキル化、トリプシン消化、トリプシン反応溶液のペプチド精製、トリプシン消化物の解析、蛋白質の同定

4. 研究成果

(1) 赤唐辛子のカビ毒汚染

インド胆嚢がんの低、中、及び高罹患率地域で採取した赤唐辛子中のアフラトキシン B1 濃度と胆嚢がん罹患率の関係を表1に示す。

表1 インドにおける赤唐辛子中のアフラトキシン B1 濃度と胆嚢がん罹患率の関係

	低罹患率地域	中罹患率地域	高罹患率地域
試料 1	<0.1	0.6	0.7
試料 2	0.6	0.7	2.9
試料 3	4.4	1.1	3.5
試料 4	4.7	4.9	3.6
試料 5	9.4	5.1	10.5
試料 6	19.7		16.4
試料 7	20.7		25.2
試料 8	26.9		33.2
平均(標準偏差)	10.8 (10.3)	2.5 (2.3)	12.0 (11.9)

濃度単位: µg/kg

これら3群間における赤唐辛子中のアフラトキシン類とオクラトキシン A の平均濃度に有意差は見られなかった。しかし低罹患率地域 (10.8 µg/kg) および高罹患率地域 (12.0 µg/kg) のアフラトキシン B1 濃度の平均値は、欧州共同体委員会によるスパイスの許容最大レベル (5.0 µg/kg) 及びチリの赤唐辛子中の濃度 (4.4 µg/kg) と比較し各々2.1 および 2.4 倍以上高かった。我々の結果は、インドの胆嚢がん罹患率が異なる地域において消費されている赤唐辛子中のアフラトキシン B1 の平均濃度には有意差が認められないことを示している。しかし、検討した21試料中9試料(43%)は欧州共同体委員会によるスパイスの許容最大レベル(5.0 µg/kg)より高濃度であった。今後、アフラトキシン B1 と胆嚢がんの関連性を評価するには、ヒトを対象として血清中アフラトキシン B1 濃度を測定するなどのさらなる研究が必要である。

(2) 遺伝子変異

インドの胆嚢がん患者10例の内、*TP53* 遺伝子変異は4例に認められ、変異の頻度は40%と我々がこれまでチリ、ポリビア、ペルー、ハンガリー、及び日本で調べた頻度と近似していた。検出された4例の変異は、トランジション変異が3例、トランスバージョン変異が1例であった。一方、*K-ras* 遺伝子変異を有する胆嚢がん患者は認められなかった。

本研究で検討した例数は少なかったことから、今後、インドにおける胆嚢がんの発がん要因を推測するためには、100例程度の患者のホルマリン固定パラフィン包埋胆嚢組織切片から抽出したDNAを用いた追加の検討が必要であると考えられた。

(3) 環境要因

表2に、胆嚢がん患者と胆石症患者を対象としたアンケート調査で有意差が認められた項目の内、コントロール可能な項目の結果を示す。

年齢 (50歳)、低教育年数、低経済的地位に加えて、コントロール可能なリスク要因として排便習慣 (1回/日)、非菜食主義者、料理に薪使用、水道水飲用、および汲み上げポンプ水飲用が胆嚢がんリスクの増加と関連していた。女性では、初潮 (13歳未満)、妊娠回数 (3回以上) および分娩回数 (3回以上) が胆嚢がんのリスク増加と関係していた。

一方、豆乳、キュウリ、レモン、コーヒー、紅茶、チーズ、クリームチーズ、お菓子、およびチョコレートの摂取は、胆嚢がんリスクの低下と関係していた。

我々の結果は、水道水または井戸水の使用、1日1回以下の排便習慣、および非肉食主義者は、胆嚢がんのコントロール可能な危険因子であることを示している。これらの要因を改善することによって胆嚢がん罹患率が減少するかどうかを確認するためのさらなる研究が必要であると考えられた。

表2 インド胆嚢がん発症に関わるコントロール可能なリスク要因

	症例群	対照群	オッズ比(95% 信頼区間)	P 値
便通				
>1 回/日	24	53	1.0	
≤1 回/日	56	27	5.1 (2.5 - 10.2)	<0.001
非肉食主義者				
いいえ	84	96	1.0	
はい	15	3	4.8 (1.3 - 17.7)	0.02
料理に薪使用				
いいえ	21	39	1.0	
はい	78	60	2.0 (1.1 - 4.0)	0.04
水道水を飲む				
いいえ	10	25	1.0	
はい	89	74	4.1 (1.8 - 9.6)	<0.001
汲み上げポンプ水を飲む				
いいえ	24	43	1.0	
はい	75	56	2.2 (1.2 - 4.2)	0.01

(4) 遺伝的要因

TP53 rs1042522 遺伝子多型の遺伝子型と対立遺伝子の頻度を表3に示す

表3 *TP53* rs1042522 遺伝子多型と胆嚢がんリスクとの関係

	症例群	対照群	オッズ比(95% 信頼区間)	P 値
遺伝子型				
GG	29	35	1.0	
CG	41	46	1.1 (0.6 - 2.1)	0.80
CC	26	12	2.8 (1.2 - 6.6)	0.02
CG + CC	67	58	1.4 (0.8 - 2.7)	0.25
対立遺伝子				
G	99	116	1.0	
C	93	70	1.6 (1.04-2.4)	0.03

CC 遺伝子型は、症例群で 27.1% (26/96)、対照群で 12.9% (12/93) と症例群の方が有意に高かった。同様に、症例群における対立遺伝子 C の頻度 (48.4%、93/192) は対照群のそれ (37.6%、70/186) に比べ有意に高かった。しかし、CG と CC を合わせた遺伝子型の頻度には症例群 (69.8%、67/96) と対照群 (62.4%、58/93) 間に有意差は認められなかった。CC 遺伝子型は、北インドの胆嚢がんのリスク増加と関連していた (性及び年齢調整オッズ比、2.8; 95% 信頼区間、1.2~6.6; P = 0.02)。一方、*TP53* 遺伝子以外の *CYP1A1*、*GSTM1*、*GSTT1* 遺伝子多型の頻度には症例群と対照群の間で有意差は認められなかった。

我々の結果は、*TP53* rs1042522 遺伝子多型の CC 遺伝子型が北インド人における胆嚢がんのリスク増加と関係している可能性があることを示している。

(5) 特異蛋白

インド人の血清蛋白濃度は、健常者 $46.8 \pm 3.9 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、胆嚢がん患者 $42.1 \pm 10.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ であり、これらの値は日本人健常者の平均値 $67.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ より低かった。

胆嚢がん患者の血清を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計で解析したが、カラムに試料が詰まり、解析は不可能であった。胆嚢がん患者の血清中には脂質成分が多く含まれており、試料中の脂溶性画分がカラム中で不溶性物質として析出したことがその一因であると考えられた。今後、胆嚢がん患者の血清中からアセトン沈殿等により脂質成分を除去した後、質量分析を行う必要があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Vidaurre T, Casavilca S, Montenegro P, Gomez H, Calderón M, Navarro J, Aramburu J, Poquioma E, Tsuchiya Y, Asai T, Ajioka Y, Sato A, Ikoma T, Nakamura K. Tumor protein p53 and K-ras gene mutations in Peruvian patients with gallbladder cancer. Asian Pac J Cancer Prev, 査読有, 201, 20, 289-294.

生駒俊和, 浅井孝夫, 遠藤和男, 土屋康雄. インドの胆嚢がん多発地域におけるリスク要因解明のための飲料水分析. 医学検査, 査読有, 2018, 67, 760-765.

Tsuchiya Y, Mishra K, Kapoor VK, Vishwakarma R, Behari A, Ikoma T, Asai T, Endoh K, Nakamura K. Plasma Helicobacter pylori antibody titers and Helicobacter pylori infection positivity rates in patients with gallbladder cancer or cholelithiasis: a hospital-based case-control study. Asian Pac J Cancer Prev, 査読有, 2018, 19, 1911-1915.

Tsuchiya Y, Loza E, Villa-Gomez G, Trujillo CC, Baez S, Asai T, Ikoma T, Endoh K, Nakamura K. Metagenomics of microbial communities in gallbladder bile from patients with gallbladder cancer or cholelithiasis. Asian Pac J Cancer Prev, 査読有, 2018, 19, 961-967.

Ikoma T, Kapoor VK, Behari A, Mishra K, Tsuchiya Y, Asai T, Endoh K, Okano K, Nakamura K. Lack of an apparent association between mycotoxin concentrations in red chili peppers and incidence of gallbladder cancer in India: an ecological study. Asian Pac J Cancer Prev, 査読有, 2016, 17, 3499-3503.

〔学会発表〕(計 2 件)

(Ikoma T), Tsuchiya Y, Asai T, Endoh K, Puneet. Drinking water pollution and gallbladder cancer risk in northern India. APCON 2018, 2018年12月1日, Bareilly, India.

(Tsuchiya Y), Mishra K, Behari A, Ikoma T, Kapoor VK. Polymorphism of DNA repair pathway gene and gallbladder cancer risk. APCON 2018, 2018年12月1日, Bareilly, India.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：土屋 康雄

ローマ字氏名：TSUCHIYA YASUO

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：客員研究員

研究者番号(8桁)：60334679

研究分担者氏名：浅井 孝夫

ローマ字氏名：ASAI TAKAO

所属研究機関名：新潟医療福祉大学

部局名：医療技術学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：60612736

研究分担者氏名：遠藤 和男

ローマ字氏名：ENDO KAZUO

所属研究機関名：新潟医療福祉大学

部局名：健康科学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：60176790

(2)研究協力者

研究協力者氏名：カプール ヴィナイ

ローマ字氏名：Kapoor Vinay

研究協力者氏名：ミシュラ クムデッシュ
ローマ字氏名：Mishra Kumudesh

研究協力者氏名：ベハリ アヌ
ローマ字氏名：Behari Anu

研究協力者氏名：シュクラ プージャ
ローマ字氏名：Shukla Pooja

研究協力者氏名：ヴィシュワカルマ ルチラ
ローマ字氏名：Vishwakarma Ruchira

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。