

平成 21年 5月 28日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790972
 研究課題名（和文）クロム工場労働者における肺癌の危険性因子の探索の研究
 研究課題名（英文）Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer in industrial workers with chromate exposure.
 研究代表者
 長尾 妙子（NAGAO TAEKO）
 徳島大学・大学院ヘルパバイオサイエンス研究部・助教
 研究者番号：90448316

研究成果の概要：クロム酸塩に暴露した工場労働者で肺癌に罹患した症例と罹患しない症例で DNA 修復に関連する遺伝子（nucleotide excision repair の DNA 修復遺伝子 XPD, base excision repair の DNA 修復遺伝子 XRCC1）の 5カ所の polymorphism を解析した。各 polymorphism で肺癌に罹患した症例と罹患しない症例で有意な差を認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：呼吸器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：クロム酸塩、肺癌、DNA 修復遺伝子、遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

(1)最近、石綿（アスベスト）の吸入による肺癌および悪性中皮腫の発生が社会的に問題となっている。また、喫煙（タバコの煙の吸入）が主たる原因である肺癌は、現在、日本を含む先進諸国では、罹患率が上昇し、死亡率も高く、難治性の癌として問題となっている。アスベストやタバコは吸入発癌物質であり、呼吸器の悪性腫瘍の発生に大きな影響を及ぼしている。アスベストやタバコは様々な発癌物質の混合体であり、複雑な発癌過程を示し、その解明を困難にしている。クロム酸塩は肺癌の吸入発癌物質として有名で、その発生は、クロム工場の労働者に限られる特殊な肺癌（職業性肺癌）

として認識されていたが、以下の理由で、吸入発癌物質による肺癌発生の一つのモデルとしてとらえることができる。

- 1) 単一の発癌物質なのでアスベストやタバコの発癌過程ほど複雑でない。
- 2) 今までの多くの in vitro 実験および動物実験により、発癌の基礎的データが揃っている。
- 3) 職業性肺癌なので、臨床データ（暴露期間、鼻中隔欠損の有無、喫煙係数など）が揃っている。
- 4) アスベストやタバコの肺癌と類似した特徴がある（癌発生までの潜在期間、暴露量と癌の発生の関連）。

クロム工場の労働者の肺癌（クロム肺癌）

および前癌病変を含む気管支組織を分子生物学的に研究することで、吸入発癌物質の発癌過程を解明するための重要な手がかりとなる。しかし、クロム肺癌は、その発生がクロム工場の労働者に限られる特殊な肺癌であるため、ヒトクロム肺癌の材料を用いた研究は少ない。私たちは、県内にクロム工場を有し、約100名のクロム労働者のデータとともに、検診材料（喀痰細胞診および気管支鏡生検）を所持している。また、岩見沢労災病院、北海道大学および国立がんセンター東病院の協力でヒトクロム肺癌35症例と肺癌材料52サンプルを所有しているので、クロムの発癌過程を精力的に研究することができる。

(2) 吸入発癌物質の発癌におけるもう一つの問題として、宿主の肺癌に対する感受性 (genetic susceptibility) が存在する。個人の遺伝的素因 (発癌物質の解毒作用や吸入物質に対する防御機構、DNA修復、アポトーシスなど) は肺癌の危険性に多く影響している。喫煙者の11%のみが肺癌に罹患する (Recent Results Cancer Res 1999;151:3-)。最近のmolecular epidemiologyの発達によって、肺癌のgenetic susceptibilityの因子を探索する研究も多く行われている。しかし、タバコは様々な発癌物質の混合体であり、複雑な発癌過程を示し、その因子を解明することを困難にしている。クロム酸塩は、単一で強い発癌物質であり、その暴露は人体に特異的で強く影響している。さらに、職業性肺癌なので、臨床データ (暴露期間、鼻中隔欠損の有無、喫煙係数など) が揃っている。

以上のことより、クロム工場の労働者の肺癌罹患率 (35例) と非罹患率 (100例) の正常組織からのDNAを解析することで、クロム肺癌のgenetic susceptibilityの因子を探索することが可能であると思われる。クロム酸塩の暴露によって、宿主は様々なDNA損傷を受けることは今までの多くの研究成果として知られている (Mutation Res 1990: 238, 99-)。DNA修復遺伝子のpolymorphismはクロム酸塩によるDNA損傷の修復機能を障害し、発癌を促す可能性がある。XPAやXPD (xeroderma pigmentosum group D) はnucleotide excision repairの、XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1) はbase excision repairのDNA修復遺伝子でpolymorphismを有している。クロムに暴露した肺癌患者は、肺癌に罹患していないクロム工場の従事者と比べて、高率にDNA修復遺伝子のvariationを認めることが予想される。

2. 研究の目的

この研究ではクロムの暴露による発癌とDNA修復遺伝子の遺伝的 variant の関連につ

いて検討する。クロム肺癌で手術を受けた35名の切除材料の転移のないリンパ節材料とクロム暴露した肺癌非罹患率100名の喀痰細胞診材料及び気管支鏡下生検材料からDNAを抽出し、DNA修復に関連する遺伝子 (XPA, XPD, XRCC1, APE1, XRCC3) のpolymorphismを解析し、クロム工場従事者において、DNA修復に関連する遺伝子のpolymorphismとcancer susceptibilityの関連性を検討する。

3. 研究の方法

(1) サンプルからのDNAの抽出

- クロム肺癌患者の転移のないリンパ節材料 (n=35)
- 肺癌に罹患していないクロム工場従事者の喀痰細胞診および気管支鏡生検材料 (n=100)

(2) DNA修復遺伝子のpolymorphismの同定

各々のDNA修復遺伝子のpolymorphism領域に特異的なprimerにて、PCRを施行する。

PCR条件 (total volume 30 ml)

94°C 4 min

94°C 30s (denaturation)

55-64°C 30s (primer annealing)

72°C 30s (primer extension)

35-40 cycles

PCR product (5 ml) を3% agarose gelにて電気泳動し、増幅していることを確認する。

PCR product (15 ml) をpolymorphism領域に特異的な制限酵素にて切断し、3% agarose gelにて電気泳動し、polymorphismを判定する。

DNA修復遺伝子のvariant率を解析し、健康者とクロム暴露した非肺癌罹患率でvariant率がほぼ同率でクロム肺癌患者で高率のDNA修復遺伝子を同定する。

<各々のDNA修復遺伝子のpolymorphism領域に特異的なprimerと制限酵素>

以下に肺癌 (特に喫煙 (inhalation carcinogen) との関連性が示唆されているDNA修復遺伝子のpolymorphismの部位、アミノ酸置換、制限酵素、PCRのprimerを列挙する。

① nucleotide excision repairのDNA修復遺伝子XPD (xeroderma pigmentosum group D)

Lys751Gln

特異的なprimer: 5' -ATCTGTCCCTACTGGCCA TTC-3' 5' -TGGACGTGACAGTGAGAAAT-3'

制限酵素: PstI (10U)

Asp312Asn

特異的なprimer: 5' -ACCTGGCCAACCCCGTGCT GCTC-3' 5' -ACTTCACGTACTCCAGCAG-3'

制限酵素: TaqI (10U)

Ile199Met

特異的なprimer: 5' -CTGCTCGTCTGTCTCTTTG A-3' 5' -GGCCTGTGTGGGAGTGACGG-3'

制限酵素: NlaIII (5U)

②base excision repairのDNA修復遺伝子 XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1)

Arg399Gln

特異的なprimer : 5' -TAAGGAGTGGGTGCCGGACT GTC-3' 5' -AGTAGTCTGCTGGCTCTGG-3'

制限酵素 : MspI (10U)

Arg194Trp

特異的なprimer : 5' -TACCCTCAGACCCACGAGT-3' 5' -GCCAGGGCCCTCCTCAA-3'

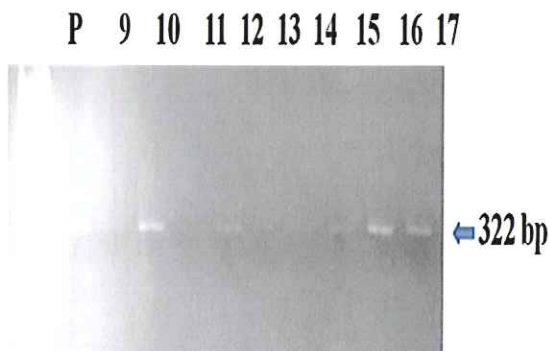
制限酵素 : MspI (10U)

4. 研究成果

クロム肺癌患者の転移のないリンパ節材料 (n=34) と肺癌に罹患していないクロム工場従事者の喀痰細胞診および気管支鏡生検材料 (n=78) より DNA を抽出した。

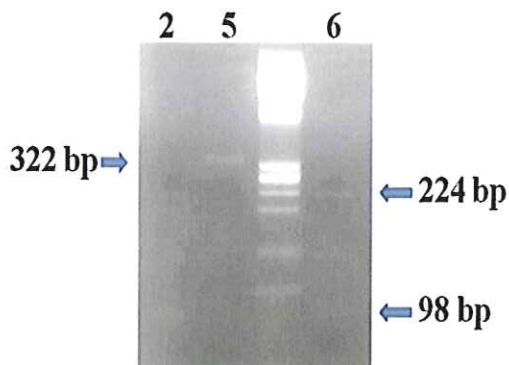
nucleotide excision repair の DNA 修復遺伝子の XPD (xeroderma pigmentosum group D) の3箇所の polymorphism (Lys751Gln と Asp312Asn と Ile199Met) を PCR と制限酵素で検討した。

図1 : Lys751Gln 領域の PCR 後の電気泳動所見



P は凍結材料より DNA を抽出した positive control で、クロム肺癌のサンプルにおいても、target band である 322 の PCR product が認められる。

図2 : Lys751Gln領域のPCR productを制限酵素PstIで切断し電気泳動所見



Sample 5 は制限酵素 PstI で切断されないの
で、AAG (Lys リジン) と判定できる。Sample
2, 6 は、制限酵素 PstI で切断されるので、
CAG (Gln グルタミン) と判定できる。

クロム肺癌患者群では、Gln-751 を 23%、
Asn-312 を 19%、Met-199 を 10% に認めた。肺
癌に罹患していないクロム工場従事者群で
は、Gln-751 を 31%、Asn-312 を 15%、Met-199
を 8% に認めた。両群間で polymorphism の頻
度に有意な差を認めなかった。xeroderma
pigmentosum group D の polymorphism は、ク
ロム酸塩に暴露した労働者の肺癌のリスク
に関連を認めなかった。

クロム肺癌患者の転移のないリンパ節材
料 (n=32) と肺癌に罹患していないクロム工
場従事者の喀痰細胞診および気管支鏡生検
材料 (n=47) のDNA に対して、base excision
repair のDNA 修復遺伝子であるXRCC1 (X-ray
repair cross-complementing group 1) の3箇
所の polymorphism (rs25487, rs1799782,
rs25489) について、制限酵素による切断法
(PCR-RFLP) にて検討した。

ホルマリン固定パラフィン包埋材料から
抽出したDNA なので、PCR にて増幅できないサ
ンプルがあり、解析から除外した。

クロム肺癌患者群では、XRCC1 遺伝子の
exon 10 の Arg399Gln (rs25487) 部位では、
Arg/Arg が 61%、Arg/Gln または Gln/Gln が
39% であった。XRCC1 遺伝子の exon 6 の
Arg194Trp (rs1799782) 部位では、Arg/Arg が
45%、Arg/Trp または Trp/Trp が 55% であ
った。

一方、肺癌に罹患していないクロム工場従
事者群では、XRCC1 遺伝子の exon 10 の
Arg399Gln (rs25487) 部位では、Arg/Arg が
65%、Arg/Gln または Gln/Gln が 35% であ
った。

XRCC1 遺伝子の exon 6 の Arg194Trp
(rs1799782) 部位では、Arg/Arg が 42%、
Arg/Trp または Trp/Trp が 58% であ
った。両群間で polymorphism の頻度に有意な差を
認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 妙子(NAGAO TAEKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：19790972