

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293143

研究課題名(和文) エストロゲン関連遺伝子と喫煙との交互作用に関する肺がんのゲノム疫学研究

研究課題名(英文) Genome epidemiologic study on lung cancer and estrogen-related genes.

## 研究代表者

清原 千香子 (Kiyohara, Chikako)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00169963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：検討したエストロゲン関連遺伝子多型のうち肺がんとの有意な関連性が認められたのはCYP1A1 rs464690、CYP1A1 rs1048943、GSTP1 rs1695、NQO1 rs1800566、COMT rs4680、CYP2A6 欠損多型、CYP19A1 rs3764221及びGSTM1 欠損多型であり、それぞれの調整オッズ比は1.72、1.40、1.48、0.62、1.65、1.53、1.46及び1.38であった。rs1048943あるいはGSTM1 欠損多型と喫煙との間に有意な相乗的交互作用が認められた。さらに、rs1048943と喫煙との間に有意な相加作用も観察された。

研究成果の概要(英文)：Estrogen may be implicated in the development of lung cancer. The aims of this study were to evaluate the association between estrogen-related polymorphisms and lung cancer. We genotyped 19 polymorphisms in Japanese. The CYP1A1 rs464690 (adjusted odds ratio, 95% confidence interval: 1.72, 1.25 - 2.38), CYP1A1 rs1048943 (1.40, 1.02 - 1.92), GSTP1 rs1695 (1.48, 1.04 - 2.11), NQO1 rs1800566 (0.62, 0.45 - 0.86), COMT rs4680 (1.65, 1.18 - 2.30), CYP2A6 deletion (1.53, 1.05 - 2.25), CYP19A1 rs3764221 (1.46, 1.06 - 2.00) and GSTM1 deletion (1.38, 1.01 - 1.89) polymorphisms were significantly associated with lung cancer risk while other polymorphisms were not. The interactions between either the CYP1A1 rs1048943 (both multiplicative and additive interactions) or GSTM1 deletion (multiplicative interaction) polymorphism and smoking were significant. There were no significant interactions between smoking and either of the remaining polymorphisms.

研究分野：疫学

キーワード：肺がん ゲノム疫学 遺伝子多型 国際共同研究 交互作用 喫煙 エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer, IARC) の Paul Brennan 博士が中心になって、2004 年より開始された International Lung Cancer Consortium (ILCCO) 国際共同研究のメンバーである。ILCCO 国際共同研究には世界中の 42 の肺がんの疫学研究グループが参加している。ILCCO 国際共同研究においては、最終的に症例数は 12,000 人以上、対照はそれに対応する人数を人種のバランスよく収集することを予定している。ILCCO 国際共同研究は肺がんのゲノム疫学研究の中で世界最大規模の研究である。ILCCO 国際共同研究における薬物代謝酵素遺伝子多型や DNA 修復酵素遺伝子多型についての成果は既に報告している<sup>1,2)</sup>。

肺がんの中でも腺がんの割合が他の組織型と比較して相対的に増加していることが報告されている。近年では、腺がんは最も発生頻度が高く、男性では約 40%、女性では 70 - 80% を占めている。腺がん増加のおもな原因として、フィルター付きのたばこの普及やエストロゲン曝露増加が考えられる。生体内のエストロゲン濃度は、エストロゲン合成や代謝に関連する複数の遺伝子によって決定される。男性の場合は、血中エストロゲン量は年齢と共に漸減していくが、女性の場合は閉経後に急激にエストロゲンが減少し男性のエストロゲンよりも低い値を示すことが報告されている<sup>3,4)</sup>。

エストロゲンによる肺がん発症のメカニズムは、エストロゲンが核内に入り、エストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) と結合して核内受容体転写因子として細胞の分化や増殖を促進する場合がある。ER は男女ともに正常な肺でも発現している。

発がん性があるエストロゲンの代謝産物によって肺がんが発生する場合もある。図 1 に示すように、エストロゲン (E2 と E1) は cytochrome P450 (CYP)1B1, CYP1A1, CYP3A4 などによってカテコールエストロゲンに代謝され、セミキノンエストロゲンを経て発がん性があるキノンエストロゲンに代謝される。キノンエストロゲンはグルタチオン S 転移酵素 (glutathione S-transferase, GST) P1 によってグルタチオン抱合され解毒される。また、カテコールエストロゲンはカテコール-O-メチル基転移酵素 (catechol-O-methyltransferase, COMT) によってメトキシエストロゲンに代謝される経路や UDP-グルクロン酸転移酵素 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) によって解毒される経路もある。

喫煙による直接的な DNA 傷害の包括的なプロセスについての検討<sup>5)</sup>や喫煙による炎症を経由した肺がん発症についての検討<sup>6)</sup>は行った。エストロゲンの合成や代謝は複雑であり、いくつもの遺伝子が関与している。そのため、エストロゲンの複数の経路を考慮して肺がんリスクを検討した研究はこれまで国

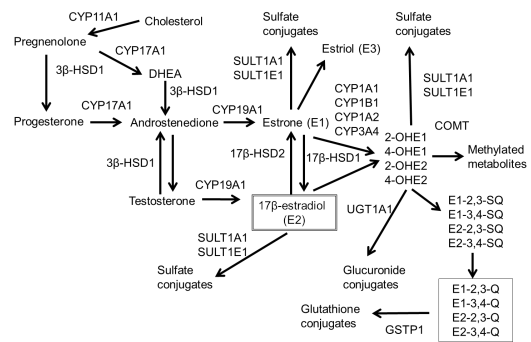


図1. エストロゲンの生合成と代謝

内外において行われていない。

2. 研究の目的

がんをはじめとする多くの生活習慣病は multifactorial disease であるので、複数の遺伝要因と複数の環境要因が複雑に絡み合って発症する。エストロゲンの代謝に関連する酵素の一つである CYP1B1 は喫煙によって誘導される。つまり、喫煙によって発がん性のあるエストロゲン代謝産物である estradiol-3,4,-quinone などが生成されやすくなる<sup>7)</sup>。

そこで、エストロゲンの生合成や代謝に関連する遺伝子やエストロゲン受容体遺伝子 (CYP19A1, CYP1B1, CYP3A4, CYP1A1, SULT1E1, GSTP1, COMT や ESR2 など) の遺伝子多型の肺がん発症における役割と喫煙とこれらの遺伝子の多型との交互作用を明らかにすることにした。

これまでの研究では解析する遺伝子 (多型) は系統的に選択されていない。本研究では、エストロゲン関連遺伝子を系統的に評価した上で、肺がんとの関連性を検討する遺伝子多型を選択する。また、予防医学的観点からの重要性のため、喫煙とエストロゲン関連の遺伝子多型との交互作用も検討する。肺がん予防のための禁煙指導を集団に対して行うポピュレーション・ストラテジー (集団アプローチ) はあまり功を奏してない。喫煙と遺伝要因との間に交互作用が存在することを明らかにすれば、高危険群に対するテーラード肺がん予防が可能になると考えた。

3. 研究の方法

喫煙-遺伝要因交互作用、遺伝要因-遺伝要因交互作用の検討や haplotype の解析のためには、かなりサンプル数が大きくないと不可能である。既存試料に加え、本研究において積極的に研究対象者を獲得する必要がある。また、ILCCO 国際共同研究におけるアジア人のサンプル数は白人のそれに比べて非常に少ないため、ゲノム疫学 (定義<sup>8)</sup>: 異なる人種において行われる分子疫学) の発展のためにもサンプル数の拡大に努めた。

【症例群】原発性肺がん入院患者で、福岡市と近郊 4 地域 (筑紫、粕屋、宗像および糸島) に居住する 30-89 歳の男女を対象とした。

このうち本研究の趣旨を十分に説明し、書面にて同意を得た者（研究対象者）について口腔粘膜細胞の採取を行った。同時に、これらの者に対して喫煙を中心としたライフスタイルを質問票により調査した。肺がん患者の収集は九州大学医学部附属病院呼吸器内科および関連病院において行った。

【対照群】症例発生施設の通院あるいは入院患者を対象とした。

研究代表者が参加している Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens (GSEC) 国際共同研究(研究代表者: Emanuela Taioli 博士、University of Pittsburgh Cancer Institute, USA)において、多くの薬物代謝酵素の遺伝子多型において、病院対照と住民対照で多型頻度に有意差がなかったことを確認している<sup>9)</sup>。また、住民対照にした場合の研究協力は約 50% (これまでの経験値あるいは文献値) であり、対照の選択にバイアスが生じている可能性がある。

症例 1 名に対して、癌、癌の既往歴、良性の気管支・肺疾患および虚血性心疾患を有する患者は除き、1 名の病院対照を通院患者あるいは入院患者 (内科、整形外科、耳鼻咽喉科、眼科および産婦人科など) から性別、年齢 (同一 5 歳階級) と施設をマッチングして選定し、問票によるライフスタイル調査を行った。

#### 【遺伝子多型解析】

侵襲性の低い口腔粘膜細胞より DNA を抽出し、遺伝子多型の解析を行った。遺伝子多型解析の再現性の検討は、各群の 5% のランダムサンプルの再解析により行った。妥当性の検討は、IARC より提供される HapMap あるいは SNP500 サンプルを用いた遺伝子解析により行った。1) マイナーアレルの頻度が少なくとも 5% であるもの、2) 多型の場所がコーディング領域、非翻訳領域あるいはプロモーター領域にあるもの、3) これまでホルモン関連疾患や肺がんとの関連性が報告されているもの、4) 発がんへの関与が生物学的にもっともらしいもの、の 4 つの基準を満たす遺伝子多型を系統的に評価し、*CYP1A1* rs464690、*CYP1A1* rs1048943、*GSTP1* rs1695、*NQO1* rs1800566、*CYP1A2* rs762551、*CYP19A1* rs10046、*SULT1A1* rs9282861、*COMT* rs4680、*CYP2A6* deletion、*CYP1A2* rs2069514、*CYP17A1* rs743572、*CYP19A1* rs3764221、*GSTM1* deletion、*GSTT1* deletion、*HSD17B1* rs605059、*CYP19A1* rs700519、*PLCH1* rs181696、*ERβ* rs1256049、*ERβ* rs4986938 の 19 の遺伝子多型を選択し、解析した。

#### 【統計解析】

平均値、比率、中央値の症例群と対照群の比較はそれぞれ t 検定、カイ二乗検定、順位和検定で行った。対照群の検体の genotype データが Hardy-Weinberg 平衡に達している否かは Pearson のカイ二乗検定で行った。この場合、 $P \geq 0.05$  の場合は平衡に達していないと判

定した。統計解析には unconditional logistic model を用い、odds ratio (OR) および 95% 信頼区間 (95% CI) を計算した。現在喫煙者は、肺がん患者の場合は診断日、対照の場合は調査票記入時より計算して 1 年以内に喫煙をやめた者を含んでいる (現在喫煙している、あるいは 1 年以内に禁煙した者)。生涯 1 本も喫煙していない者を非喫煙者とした。現在喫煙者でも非喫煙者でもない者を以前喫煙とした。

肺がんリスクにおける遺伝子型と喫煙との交互作用 (相乗的) は、遺伝子型と喫煙の積の項をロジスティック回帰モデルに入れた場合と入れ場合と入れない場合の比較を尤度比検定により行った。ロジスティック回帰モデルで算出される交互作用は相乗的作用である。Rothman は相加 (生物学的) 作用がより交互作用を評価するのに適していると論じた<sup>10)</sup>。3 つの生物学的交互作用、つまり交互作用に起因する過剰なリスク (relative excess risk due to interaction, RERI)、交互作用に起因するリスクの割合 (attributable proportion, AP) およびそれぞれのリスクの和と両者がある場合のリスクの比 (synergy index, SI) を Andersson らの方法により算出した<sup>11)</sup>。RERI と AP が 0 に等しく、SI が 1 に等しいならば、相加的交互作用は存在しない。全てのデータ解析は、統計解析パッケージ STATA ver. 14.2 (StataCorp., College Station, TX) を用いて行った。殆どの場合、危険率 5% 未満を統計学的に有意であると判定した。交互作用に関しては検出力が低いことが報告されているので<sup>12)</sup>、危険率 10% 未満を統計学的に有意であると判定した。

#### 4. 研究成果

検討したすべて遺伝子多型は、対照群において、Hardy-Weinberg 平衡からのずれは認められなかった。major アレル/major アレル型に対する少なくとも minor アレルを 1 つ有する性、年齢、喫煙、飲酒および教育歴を調整した OR (調整 OR) を表 1 に示す。肺がんとの有意な関連性が認められた遺伝子多型は、*CYP1A1* rs464690、*CYP1A1* rs1048943、*GSTP1* rs1695、*NQO1* rs1800566、*COMT* rs4680、*CYP2A6* deletion、*CYP19A1* rs3764221 および *GSTM1* deletion の 8 つであり、それぞれの調整 OR (95% CI) は 1.72 (1.25 - 2.38)、1.40 (1.02 - 1.92)、1.48 (1.04 - 2.11)、0.62 (0.45 - 0.86)、1.65 (1.18 - 2.30)、1.53 (1.05 - 2.25)、1.46 (1.06 - 2.00)、1.38 (1.01 - 1.89) であった。

性や組織型による層別解析においても同様な結果が得られた。

次に、これらの遺伝子多型と喫煙との交互作用について検討した。統計学的パワー 80% 以上を確保するために、喫煙に関しては喫煙経験者と非喫煙者に分類した。遺伝子多型に関しては、本研究において肺がんリスク上昇に関連するアレルをリスクアレルと定義した。喫煙者でリスクアレルを有する者は、非喫煙者でリスクアレルを保

表1 . エストロゲン関連遺伝子多型と肺がんリスク

遺伝子多型	調整オッズ比* (95%信頼区間)
CYP1A1 rs464690	1.72 (1.25 - 2.38)
CYP1A1 rs1048943	1.40 (1.02 - 1.92)
GSTP1 rs1695	1.48 (1.04 - 2.11)
NQO1 rs1800566	0.62 (0.45 - 0.86)
CYP1A2 rs762551	0.99 (0.71 - 1.38)
CYP19A1 rs10046	0.95 (0.68 - 1.35)
SULT1A1 rs9282861	0.99 (0.72 - 1.35)
COMT rs4680	1.65 (1.18 - 2.30)
CYP2A6 deletion	1.53 (1.05 - 2.25)
CYP1A2 rs2069514	1.35 (0.68 - 2.68)
CYP17A1 rs743572	1.21 (0.85 - 1.72)
CYP19A1 rs3764221	1.46 (1.06 - 2.00)
GSTM1 deletion	1.38 (1.01 - 1.89)
GSTT1 deletion	1.17 (0.86 - 1.61)
HSD17B1 rs605059	1.00 (0.71 - 1.39)
CYP19A1 rs700519	0.93 (0.68 - 1.27)
PLCH1 rs181696	1.26 (0.91 - 1.76)
ERβ rs1256049	1.11 (0.81 - 1.53)
ERβ rs4986938	1.22 (0.87 - 1.70)

\*性、年齢、喫煙、飲酒および教育歴を調整

有しない者に較べて、どの遺伝子多型においても肺がんリスクは最も高く、そして有意な上昇が認められた。しかしながら、この上昇は喫煙の影響によるところが大きいと考えられる。現在喫煙、過去喫煙、喫煙経験者の肺がんリスクはそれぞれ 4.42 (2.78 - 7.14)、2.73 (1.92 - 3.89) および 3.17 (2.28 - 4.40) であった。

表2 . エストロゲン関連遺伝子多型と喫煙の組み合わせによる肺がんリスク

遺伝子型	喫煙状態	調整オッズ比* (95%信頼区間)
CYP1A1 rs1048943 (Ile>Val)		
Ile carrier	非喫煙者	1.00 (基準)
Val/Val	非喫煙者	1.00 (0.62 - 1.95)
Ile carrier	喫煙経験者	2.46 (1.61 - 3.76)
Val/Val	喫煙経験者	4.60 (2.85 - 7.41)
交互作用		1.88 (0.99 - 3.57) P = 0.056
GSTM1 deletion		
非欠損型	非喫煙者	1.00 (基準)
欠損型	非喫煙者	2.00 (1.25 - 3.22)
非欠損型	喫煙経験者	4.49 (2.78 - 7.25)
欠損型	喫煙経験者	4.60 (2.92 - 7.25)
交互作用		0.51 (0.27 - 0.97) P = 0.039

\*性、年齢、飲酒および教育歴を調整

表2 にエストロゲン関連遺伝子多型と喫煙との組み合わせによる肺がんリスクを検討し、統計学的に有意であった遺伝子多型について結果のみ記す。喫煙と CYP1A1 rs104894 遺伝子多型 (P = 0.056) および GSTM1 deletion 遺伝子多型 (P = 0.039)。これらの遺伝子多型において、喫煙経験者でかつリスクアレルを有する場合にもっとも高い肺がんリスクの上昇が観察されたが、これは主に喫煙に起因するリスクと考えられる。

性や組織型による層別解析においても同様な結果が得られた。

表3 に肺がんリスクにおけるエストロゲン関連遺伝子多型と喫煙の相乗的交互作用が統計学的に有意であった遺伝子多型について、相乗的交互作用を検討した。CYP1A1 rs1048943 の場合、交互作用に起因するリスクの割合 46% (21% - 72%)、でありそれぞれのリスクの和と両者がある場合のリスクの比は 2.46 (1.15 - 5.26) であった。GSTM1 deletion の場合は、相加作用 (RERI、AP、SI) は統計学的に有意ではなかった。

性や組織型による層別解析においても同様な結果が得られた。

表3 . 肺がんリスクにおけるエストロゲン関連遺伝子多型と喫煙との相乗的交互作用

	交互作用* (95%信頼区間)
CYP1A1 rs1048943	
交互作用による起因する過剰なリスク (RERI)	2.13 (0.32 - 3.95)
交互作用に起因するリスクの割合 (AP)	0.46 (0.21 - 0.72)
それぞれのリスクの和と両者がある場合のリスクの比 (SI)	2.46 (1.15 - 5.26)
GSTM1 deletion	
交互作用による起因する過剰なリスク (RERI)	-0.89 (-3.03 - 1.24)
交互作用に起因するリスクの割合 (AP)	-0.19 (-0.68 - 2.90)
それぞれのリスクの和と両者がある場合のリスクの比 (SI)	0.80 (0.48 - 1.33)

\*性、年齢、飲酒および教育歴を調整

< 引用文献 >

- 1) Hung RJ, Christiani DC, Risch A, et al. International Lung Cancer Consortium: pooled analysis of sequence variants in DNA repair and cell cycle pathways. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 17:3081-3089, 2008.
- 2) Truong T, Sauter W, McKay JD, et al. International Lung Cancer Consortium: coordinated association study of 10 potential lung cancer susceptibility variants. Carcinogenesis, 31:625-633, 2010.

- 3) Khosla S, Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, et al. Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 2266-2274, 1998.
- 4) Khosla S, Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM. Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 3555-3561, 2001.
- 5) Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. Genetic polymorphisms involved in carcinogen metabolism and DNA repair and lung cancer risk in a Japanese population. *J Thorac Oncol*, 7: 954-962, 2012.
- 6) Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. IL1B rs1143634 polymorphism, cigarette smoking, alcohol use, and lung cancer risk in a Japanese population. *J Thorac Oncol*, 5: 299-304, 2010.
- 7) Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*, 227: 115-124, 2005.
- 8) Khoury MJ, Dorman JS. The Human Genome Epidemiology Network. *Am J Epidemiol*, 148: 1-3, 1998.
- 9) Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 1239-1248, 2001.
- 10) Rothman K 2002. Measuring interaction, New York, Oxford University Press.
- 11) Andersson T, Alfredsson L, Källberg H, et al. Calculating measures of biological interaction. *Eur J Epidemiol*, 20: 575-579, 2005.
- 12) Riegelman, R K. Interpretation. *Studying a Study and Testing a Test: How to Read the Medical Evidence* Fifth edition ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; pp. 50-57, 2004.

#### 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 6 件)

- 1) Yamamoto Y, Kiyohara C, Ogata S, Hamada N, Nakanishi Y. Association between genetic polymorphisms involved in the hypoxia-inducible factor pathway and lung cancer risk: a case-control study in Japan. *Asia Pac J Clin Oncol*, in press.
- 2) Yamamoto Y, Kiyohara C, Ogata S, Hamada N, Nakanishi Y. Effect modification by cigarette smoking on the association of genetic polymorphisms involved in inflammation and the risk of lung cancer: a case-control study in Japan. *Oncol Lett*, 13: 3873-3881, 2017.

- 3) Kakino K, Kiyohara C, Horiuchi T, Nakanishi Y. CYP2E1 rs2031920, COMT rs4680 polymorphisms, cigarette smoking, alcohol use, and lung cancer risk in a Japanese population. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17: 4063-4070, 2016.
- 4) Kim CH, Lee YC, Hung RJ, McNallan SR, Cote ML, Lim WY, Chang SC, Kim JH, Ugolini D, Chen Y, Liloglou T, Andrew AS, Onega T, Duell EJ, Field JK, Lazarus P, Marchand LL, Neri M, Vineis P, Kiyohara C, Hong YC, Morgenstern H, Matsuo K, Tajima K, Christiani DC, McLaughlin JR, Bencko V, Holcatova I, Boffetta P, Brennan P, Fabianova E, Foretova L, Janout V, Lissowska J, Mates D, Rudnai P, Szeszenia-Dabrowska N, Mukeria A, Zaridze D, Seow A, Schwartz AG, Yang P, Zhang ZF. Exposure to secondhand tobacco smoke and lung cancer by histological type: A pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Int J cancer*, 135: 1918-1930, 2014.
- 5) Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. Genetic polymorphisms involved in the inflammatory response and lung cancer risk: A case-control study in Japan. *Cytokine*, 65: 88-94, 2014.
- 6) 清原千香子. III 肺癌の疫学. 遺伝子多型. 最近肺癌学 - 基礎と臨床の最新研究動向 - . 中西洋一編. 日本臨床, 東京, pp.74-77, 2013.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

Kiyohara C, Yoshimasu K. Lung cancer and smoking habit. *Encyclopedia of Cancer*, 4th Edition, Schwab M (ed.), Springer-Verlag. NY, pp. 2088-2094, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

清原 千香子 (KIYOHARA CHIKAKO)  
九州大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：00016963

(2)研究分担者

中西 洋一 (NAKANISHI YOICHI)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：20172356

堀内 孝彦 (HORIUCHI TAKAHIKO)  
九州大学病院・教授  
研究者番号：90219212

高山 浩一 (TAKAYAMA KOICHI)  
九州大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：50274444  
(平成 25 年 4 月から平成 27 年 3 月まで)

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

なし ( )