

平成 21 年 3 月 31 現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005 年～2008 年

課題番号：17390175

研究課題名（和文）肺がんにおける喫煙と遺伝要因の交互作用に関する分子疫学的研究

研究課題名（英文）Molecular epidemiologic study of lung cancer on interaction between smoking and genetic factors

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：00169963

研究成果の概要：

本研究は International Lung Cancer Consortium (ILCCO) 国際共同研究の一環として行われるものである。本学医学研究院等倫理委員会およびヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の承認を得た後、本研究を開始した。症例と対照の DNA の収集も続けているが、医療情報部において連結匿名化を終えた対象者の DNA についての遺伝子解析を行った。網羅的な遺伝子解析は時間と費用を浪費するので、遺伝子解析の優先順位をつけるために、先に文献的な検討を行った。肺がん DNA 修復酵素の遺伝子多型、特にヌクレオチド除去修復遺伝子についてのメタ分析を行い（Kiyohara C, Yoshimasu K. Int J Med Sci 2007; 4: 59-71）、ERCC2 が肺がん発症感受性に重要な役割をしている事が分かった。また、肺がん発症高感受性群を特定できるかを検討した（Kiyohara C, et al. Future Oncol. 2007; 3: 617-627）。その結果、第一相薬物代謝に関わる遺伝子である CYP1A1 T3801C 多型、第二相薬物代謝に関わる遺伝子である GSTM1 deletion 多型と DNA 除去修復に関わる ERCC2 Lys751Gln 多型の 3 つを組み合わせることにより、肺がん発症高感受性者を効率よく同定できる可能性が示された。事実、いずれか 1 つのリスクアレル遺伝子型を持つ場合のオッズ比は、単独効果とほぼ同じで 1.61 - 2.02 の範囲にあった。いずれか 2 つのリスクアレル遺伝子型を持つ場合のオッズ比は 2.27 - 2.57 の範囲にあった。3 つのリスクアレル遺伝子型を持つ場合のオッズ比は 5.94 (95%信頼区間 = 2.77 - 12.7) であり、リスクアレルの累積により顕著な肺がんリスクの高まりが観察された。本研究の結果の一部（MTHFR 遺伝子多型と肺がん）を筆頭発表者として第 14 回欧州がん会議（2007）において、また、分担発表者として 2007 年度アメリカがん学会のミニシンポジウムにおいて DNA 修復酵素遺伝子多型についての国際共同研究の成果（プール解析）を発表した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	5,400,000	0	5,400,000
2006 年度	3,100,000	0	3,100,000
2007 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
総計	14,200,000	1,710,000	15,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学（7101）

キーワード：社会医学、分子疫学、肺がん、交互作用、国際共同研究

1. 研究開始当初の背景

わが国の肺がん死亡率は、男性では 1993 年に胃がん死亡率を抜いて以来、悪性新生物死亡率の第 1 位を占めている。女性でも、肺がんの死亡率は胃がん、大腸がんについて第 3 位となっている。肺がんの原因は喫煙が最も重要である。しかし、喫煙者の 10 人に 1 人が肺がん罹患すると推定されている (Doll & Peto, J Natl Cancer Inst, 66: 1191-308, 1981)。これは、個体によって喫煙による肺がんの遺伝的感受性 (遺伝要因) が異なることを示している。喫煙による肺がんリスクには、DNA 付加体の原因となる中間活性体の生成量を決定する薬物代謝酵素と DNA 付加体の除去修復に関与する酵素の遺伝子多型が関与していると考えられる。

2. 研究の目的

肺がんは、喫煙と薬物代謝酵素の遺伝子型の組み合わせによって、発症リスクが異なることが示唆されている。がんは multifactorial disease であるので、単一の要因では説明できない。肺がんでは喫煙は確立された環境要因であるが、遺伝要因については個々の遺伝子の遺伝子多型の関与は調べられているもの、いくつかの生物学的にもっともらしいプロセスをまとめた発症に至る包括的な遺伝子の組み合わせによるリスクとの関連性は殆ど検討されていない。喫煙による肺がんリスクには、DNA 付加体の原因となる中間活性体の生成量を決定する薬物代謝酵素と DNA 付加体の除去修復に関与する酵素の遺伝子多型が関与していると考えられる。そこで、肺がんにおける喫煙と薬物代謝酵素遺伝子多型、喫煙と DNA 修復酵素遺伝子多型および薬物代謝酵素遺伝子多型と DNA 修復酵素遺伝子多型の交互作用を明らかにすることにした。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し、ハイリスク・ストラテジー (高リスクアプローチ) である個人の遺伝的素因を加味した肺がん予防に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

【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) について採血を行った (担当: 高山・中西)。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 (担当: 清原)。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 (国立病院機構福岡病院、国家公務員共済組合連合会浜の町病院、国立病院機構福岡東医療センターなど) 等において行った。

【対照群】研究代表者が以前参加した Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens (GSEC) 国際共同研究 (期間: 1996-2003 年、研究代表者: Emanuela Taioli 博士、Ospedale Maggiore IRCCS of Milano, Genetic Research Institute of Milano) 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 (Garte et al., Cancer Epidemiol Biomark Prev, 10: 1239-1248, 2001)。また、住民対照にした場合の研究協力率は約 50% (これまでの経験値) 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、1 名の病院対照を入院患者 (整形外科、耳鼻咽喉科、眼科および産婦人科など) から性別、生年 (同一 5 歳階級) と病院を合わせて選んだ。

【遺伝子多型解析】血液よりパuffyコート (buffy coat) を分離後、DNA を抽出し、主に PCR (polymerase chain reaction) 法にて遺伝子多型の解析を行った (担当: 清原)。遺伝子多型解析の quality of control として、各群の 5% のランダムサンプルについて再解析を行った。遺伝子 (多型) は、非野生型アレルの頻度がある程度ある (0.2 以上) 遺伝子型の生物学的な意義が明確であるもの、遺伝子の発がんへの関与が生物学的にもっともらしいものを選択する。上記の基準を満たす解析の候補遺伝子として、

薬物代謝酵素: CYP1A1、MPO、mEH3、mEH4、GSTM1、GSTT1、GSTP1、NQO1
DNA 修復酵素: ERCC2、XRCC3、XRCC1 を測定した。

【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。全てのデータ解析は、統計解析パッケージ STATA ver. 10.1 (StataCorp., College Station, TX)を用いて行った。危険率5%未満を統計学的に有意であると判定した。

4. 研究成果

本研究は International Lung Cancer Consortium (ILCCO)国際共同研究の一環として行われるものである。網羅的な遺伝子解析は時間と費用を浪費するので、遺伝子解析の優先順位をつけるために、まず文献的な検討を行った。DNA 除去修復には塩基除去修復 (base-excision repair, BER) 、ヌクレオチド(塩基、糖とリン酸が結合したもの)除去修復 (nucleotide-excision repair, NER) 、ミスマッチ修復 (mismatch repair, MMR) と二本鎖切断修復 (double-strand break repair) がある。BER は比較的小さな塩基損傷を修復し (1 個あるいは2 個の塩基の交換、short patch repair) 、NER は比較的大きな塩基損傷を修復 (~30 個の塩基の交換、long patch repair) する。MMR は、1 個の塩基のミスペアや4 個あるいはそれ以上の塩基からなるループを形成する小さな挿入/欠損ミスペアを修復する。二重鎖切断 (DNA 鎖2本が同時に切れてしまう切断) 修復は、相同染色体組換修復 (切断部位と同じ塩基配列を無傷の染色体の中から見つけて、二分子の染色体の間で DNA を組み換える) と非同源末端結合修復 (末端同士をそのまま結合させる) がある。肺がんは BER についてのメタ分析を行った (雑誌論文 1) 。OGG1 Ser326Cys、XRCC1 Arg194Trp、XRCC1 Arg280His、APEX1 Asp148Glu 遺伝子多型は肺がんリスクと関連していなかった。XRCC1 Arg399Gln 遺伝子多型の Gln/Gln 多型は肺がんリスクが有意に上昇していた (OR=1.34、95% CI = 1.16 - 1.54) 。次に、肺がんは NER についてのメタ分析を行った (雑誌論文 2) 。ERCC1 T19007C と ERCC2 Asp312Asn、遺伝子多型は肺がんリスクと関連していなかった。ただし、白人では XPA G23A の GG 多型 (OR = 0.75、95% CI = 0.59 - 0.95) と ERCC2 Lys751Gln の Gln/Gln 多型 (OR = 1.30、95% CI = 1.14 - 1.49) は肺がんとの有意な関連性が認められた。一方、アジア人では有意な関連性は認められなかった。これではアジア人についての研究数が少ないことが一因となっていると考えられる。今後アジア人での研究報告が待たれる。タバコ煙中に存在する benzo(a)pyrene (BP) などの発がん性物質は、薬物代謝の第1相において活性化され、引き続

いて起こる第2相において解毒される。第1相の薬物代謝酵素活性が高く第2相の薬物代謝酵素活性が低い遺伝子多型の組み合わせを有する者が喫煙すると肺がん発症リスクが高まることが報告されている。この場合、より多くの中間活性体が生成され、それが DNA に損傷を与える (付加体を形成する) ためと考えられている。しかし、DNA 付加体は除去修復酵素によって除去される。それぞれの遺伝子単独での肺がんリスクへの関与はあまり大きくないので、第1相薬物代謝酵素と第2相薬物代謝酵素に加えて、DNA 修復に関与する酵素の遺伝子多型の組み合わせることによって、より効率的に肺がん発症感受性者を検出できると考えられる (Figure 1)。

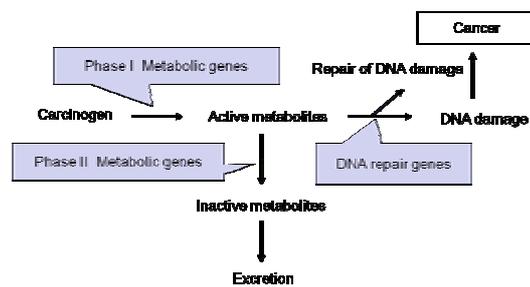


Figure 1. Simplified chemical carcinogenesis pathway

第一相薬物代謝に関わる遺伝子である CYP1A1 T3801C 遺伝子多型、第二相薬物代謝に関わる遺伝子である GSTM1 deletion 多型と DNA 除去修復に関わる ERCC2 Lys751Gln 遺伝子多型の3つを組み合わせることにより、肺がん発症高感受性者を効率よく同定できると考えた (Figure 2、雑誌論文 3)。

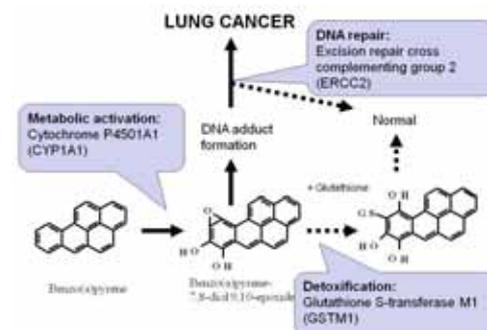


Figure 2. Possible role of benzo(a)pyrene, a major constituent of tobacco smoke, in lung carcinogenesis

本研究においては、CYP1A1 T3801C 遺伝子多型、GSTM1 deletion 多型および ERCC2 Lys751Gln 遺伝子多型におけるリスクアレルを含まない多型に対するリスクアレルを含む多型 (リスク遺伝子型) の性・年齢・喫煙・飲酒を調整した OR (95% CI) はそれぞれ 1.72 (95% CI = 1.25 - 2.38)、1.38 (95% CI = 1.01

- 1.89)および1.89 (95% CI = 1.28 - 2.78)であった。

次に、これらの3つの遺伝子多型を組み合わせて肺がんリスクを検討した (Figure 3)。いずれか1つのリスクアレル遺伝子型を持つ場合のオッズ比は、単独効果とほぼ同じであった。リスクアレル遺伝子型がある場合を(+), ない場合を(-)で示す。CYP1A1 T3801C (-)、GSTM1 (-)、ERCC2 Lys751Gln (-)の場合を基準 (OR = 1.0) とした。CYP1A1 T3801C (+)、GSTM1 (-)、ERCC2 Lys751Gln (-)の場合のオッズ比は 1.87 (95% CI = 1.09 - 3.20) であった。CYP1A1 T3801C (-)、GSTM1 (+)、ERCC2 Lys751Gln (-)の場合のオッズ比は 1.40 (95% CI = 0.79 - 2.48) であった。CYP1A1 T3801C (-)、GSTM1 (-)、ERCC2 Lys751Gln (+)の場合のオッズ比は 1.96 (95% CI = 0.73 - 5.26) であった。1つの遺伝子多型のみリスクアレル遺伝子型がある場合のオッズ比は 1.61 - 2.02 の範囲にあった。CYP1A1 T3801C (+)、GSTM1 (+)、ERCC2 Lys751Gln (-)の場合のオッズ比は 2.16 (95% CI = 1.27 - 3.66) であった。CYP1A1 T3801C (+)、GSTM1 (-)、ERCC2 Lys751Gln (+)の場合のオッズ比は 2.22 (95% CI = 1.07 - 4.62) であった。CYP1A1 T3801C (-)、GSTM1 (+)、ERCC2 Lys751Gln (+)の場合のオッズ比は 2.42 (95% CI = 1.00 - 5.87) であった。いずれか2つのリスクアレル遺伝子型を持つ場合のオッズ比は 2.27 - 2.57 の範囲にあった。3つのリスクアレル遺伝子型を持つ場合のオッズ比は 5.94 (95% CI = 2.77 - 12.7)であり、リスクアレルの累積により顕著で有意な肺がんリスクの高まりが観察された。予想通りに、これらの3の遺伝子の組み合わせにより肺がん高感受性者を同定できることが示された。

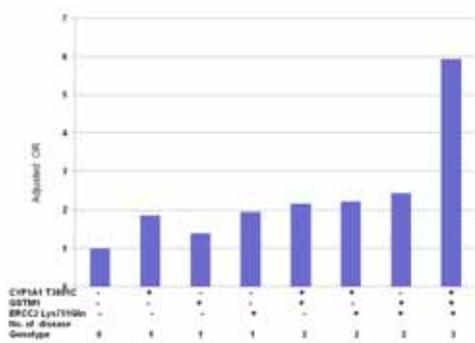


Figure 3. Cumulative effect of disease genotypes; score as sum of genotypes, including CYP1A1 T3801C (-) = TT, + = TC+CC; GSTM1 (-) = gene present, + = gene deleted; and ERCC2 Lys751Gln (-) = Lys/Lys, + = Lys/Gln + Gln/Gln

組織型ごとのリスクアレルの累積と肺がんリスクとの関連性について CYP1A1 T3801C 遺伝子多型と GSTM1 deletion 多型に CYP1A1 Ile-Val 遺伝子多型を加えて検討した (Figure 4)。3つの遺伝子多型の累積による肺がんリスクの上昇は 1.8 倍 (95% CI = 1.10 -

2.90)であった。これは Figure 3 に示されている ERCC2 Lys751Gln 遺伝子多型を加えたリスクの上昇の 1/3 以下であった。扁平上皮がんの場合、リスクアレルの累積効果が最も顕著であった。3つの遺伝子多型の累積によるリスクの上昇は 3.1 倍 (95% CI = 1.50 - 6.54) であった。同じ役割を持つ遺伝子多型を組み合わせるよりも (2つの第1相薬物代謝酵素と1つの第2相薬物代謝酵素) 生物学的にもっともらしい発がんに至るプロセスをまとめた包括的な遺伝子の組み合わせ (1つ第1相薬物代謝酵素、1つの第2相薬物代謝酵素と1つのDNA除去修復酵素)の方が、より肺がん高感受性者を同定するのに効率的であることが示された。

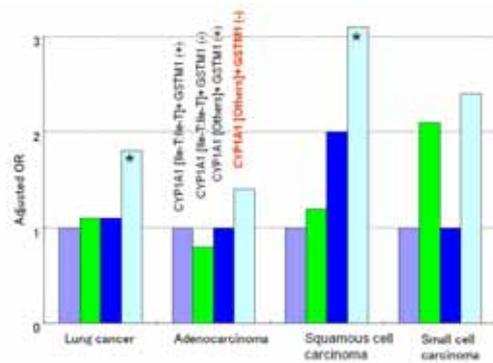


Figure 4. Combined genotypes of CYP1A1 and GSTM1, and lung cancer risk among smokers. Among smoking subjects, combined genotypes of CYP1A1 other than [Ile-T3801C] diplotype and GSTM1 null genotype significantly increased all lung cancer risk by 1.8-fold (95% CI=1.10-2.90) and especially squamous cell lung cancer risk by 3.1-fold (95% CI=1.50-6.54).

本研究は日本人についての研究であるが、2004年より開始された International Lung Cancer Consortium (ILCCO)国際共同研究の一環として行われるものである。このILCCO国際共同研究は国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer, IARC) の Rayjean Hung, Paul Brennan, Paolo Boffetta 博士が中心になって、世界中の42の肺がんの疫学研究グループの参加により行う研究である。この共同研究においては5つのワーキンググループ[1)若年肺がん、2)非喫煙者の肺がん、3)DNA修復酵素と肺がん、4)まれな組織型(気管支肺胞上皮がん)、5)遺伝-環境要因交互作用]があるが、研究代表者らはこのうち3)と5)のワーキンググループに属している。最終的には、3)や5)のグループで症例数は各々12,000人、対照はそれに対応する人数の収集を予定している。肺がんにおいて、薬物代謝酵素とDNA修復酵素遺伝子多型を同時に検討した研究は殆どない。また、この国際共同研究は肺がんのゲノム(分子)疫学研究ではこれまで行われた研究の中で最大規模のものである。

ILCCOの成果としては XRCC3 Thr241Met

(OR = 0.89、95% CI = 0.79 - 0.99)、ERCC2 Lys751Gln (OR = 1.19、95% CI = 1.02 - 1.39)、TP53 Arg72Pro (OR = 1.20、95% CI = 1.02 - 1.42) および OGG1 Ser326Cys (OR = 1.34、95% CI = 1.01 - 1.79) 遺伝子多型で統計学的に有意な関連性が認められた(雑誌論文4)。

喫煙による肺がんのリスクの上昇は多くの研究で実証されている。喫煙は発がん物質として直接的に、または肺胞マクロファージ、多核白血球、好酸球などの細胞から活性酸素などのフリーラジカルを産生させ間接的にDNA傷害を引き起こす。さらに喫煙は炎症を経由した発がんにも関与している。たばこの煙に含まれる有害物質によって組織が損傷を受けると、マクロファージなどの自然免疫系の細胞が活性化される。活性化されたマクロファージは、フリーラジカルや炎症性サイトカインの一種である tumor necrosis factor (TNFA)を産生する。TNFAは、Inhibitor kB (IkB)と結合した状態で細胞質に存在する不活性型 nuclear factor-kappa B (NF-kB)をIkBと分離させることにより活性化する。活性化されたNF-kBは核内へと移行し、DNAに結合し、炎症応答に関与する遺伝子の転写が活性化される。さらに、NF-kBによりNitric oxide synthase (iNOS)とcyclooxygenase (COX)-2が活性化される。これらはそれぞれ、一酸化窒素(NO)とプロスタグランジンE2を産生させ、炎症反応を増悪させる。これらの炎症反応は生体防御における生理的な応答であるが、これらの反応が遷延化すると慢性炎症に至る。慢性炎症では、組織に炎症細胞やフリーラジカルが豊富に存在し、DNAの損傷が起りやすくなっており、さらにTNFAは細胞増殖因子としても働き(発がんイニシエーションを受けた細胞はTNFAによって増殖する)そのため肺がんが誘発されたと考えられている。今後は炎症関連遺伝子を含めた解析も必要であると考えられる。

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4件)

1) Kiyohara C, Takayama K, Nakanishi Y. Association of genetic polymorphisms in the base excision repair pathway with lung cancer risk: A meta-analysis. Lung Cancer, 54: 267-283, 2006.

2) Kiyohara C, Yoshimasu K. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: A meta-analysis. Int J Med Sci, 4: 59-71, 2007.

3) Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K, Nakanishi Y. Lung cancer susceptibility: are we on our way to identifying a high-risk group?

Future Oncol, 3: 617-627, 2007.

4) Hung RJ, Kiyohara C et al., International Lung Cancer Consortium: Pooled analysis of sequence variants in DNA repair and cell cycle control pathways. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 17: 3081-3089, 2008. (International Lung Cancer Consortium).

[学会発表](計2件)

1) Hung RJ, Kiyohara C et al., International Lung Cancer Consortium Investigators. International Lung Cancer Consortium: Pooled analysis of Sequence Variants in DNA Repair Pathway. In: American Association for Cancer Research Annual Meeting 2007, Los Angeles, USA, April 14-18, 2007.

2) Kiyohara C, Takayama K, Nakanishi Y. MTHFR polymorphisms and lung cancer risk in a Japanese population. In: The 14th European Cancer Conference, Barcelona, Spain, September 23-27, 2008.

[図書](計3件)

1) Kiyohara C, Inoue H, Nakanishi Y. Chapter 1. Environmental tobacco smoke and respiratory disease. In: Passive Smoking and Health Research. Nivek A. Joergensen (ed.), Nova Science Publishers Inc. NY, Chapter 1, pp1-41, 2006.

2) Kiyohara C, Takayama K, Nakanishi Y. Chapter 2. DNA repair and lung cancer. In: New Research on DNA Repair. Breehn R. Landseer (ed.), Nova Science Publishers Inc. NY, Chapter II, pp39-84, 2007.

3) Kiyohara C, Yoshimasu, Takayama K, Nakanishi Y. Chapter 1. Genetic predisposition to lung cancer. In: Genetic Predisposition to Disease: New Research. Bernard LE, Laurent MB (eds.), Nova Science Publishers Inc. NY, pp. 1-37, 2008.

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: 00169963

(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

高山 浩一 (TAKAYAMA KOICHI)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：50274444

堀内 孝彦 (HORIUCHI TAKAHIKO)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：90219212

三宅 吉博 (MIYAKE YOSHIHIRO)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号：50330246

(3)連携研究者
なし ()
研究者番号：