

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18406005
 研究課題名(和文) アジアにおけるヒト胆道がんの発生・進展に関する遺伝子がん生物学的・分子疫学的研究
 研究課題名(英文) Genetic oncological and molecular epidemiological research on development and progression of human bile duct cancer in Asia
 研究代表者
 三輪 正直(MIWA MASANAO)
 長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授
 研究者番号：20012750

研究成果の概要：

胆道がんは難治がんであり、世界的に増加する傾向があるといわれている。タイ王国は、寄生虫感染が関連している肝内胆管がんのタイプの胆道がんの世界一多発地域である。この地区の住民について、生活習慣と遺伝的背景について分子疫学調査を行った。その結果、DNA修復酵素遺伝子の多型の一つがこの胆道がんの発症リスクと関連することが分かった。また、寄生虫の抽出物は、培養細胞の増殖を促進する活性があることが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態生化学

キーワード：胆道がん、肝内胆管がん、寄生虫感染、発がん過程、DNA修復酵素遺伝子多型、タイ王国、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

胆道(胆のう・胆管)がんは、予後の極めて不良な難治がんであり、その発生頻度は高齢化社会を迎えた我が国をはじめ、地球環境汚染の危惧が強いアジア諸国では発生(罹患率)が高い。わが国での2001年における部位別罹患率では、男性及び女性で胆のう・胆管がんは、10位である(2007年度国

立がんセンター「がんの統計」)によれば、2015年における胆道がんの罹患率は、男性では8位、女性では6位と予測されている。欧米諸国でも近年胆管がんの罹患率の上昇が指摘され(Wise C et al. World J Gastroenterol 14: 2986, 2008)、胆道がんの重要性は高い。

さらに、胆道がんの早期発見は困難で、医

療技術の進歩した我が国でも大多数は進行がんの状態で見られている。このため、切除困難症例が多い上に、胆道がんは間質成分や炎症性の浸潤リンパ球が多くがん細胞成分が少ないため、遺伝子生物学的研究に必要とされる純粋にがん細胞に由来する DNA やの RNA の調整が量的にも困難であった。また、従来胆道がんは西欧社会での罹患率が低いとみなされていて、分子生物学的解明の進んだ大腸がんや膵がんなどとは異なり、分子生物学をリードしている西欧諸国を含めこの方面の研究は少ない。

世界一胆道がん（肝内胆管がん）の罹患率が高いといわれるタイ王国東北部では、多くの住民が肝吸虫（*Opisthorchis viverrini*, OV）の寄生虫感染が原因とされてきた（IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 61 Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter Pylori*, 1994）。しかし、ハムスターを用いた動物実験では、寄生虫感染のみでは発がんしないが、発がん物質のジメチルニトロサミンの同時投与でヒトと同様な肝内胆管がんが起きるとの報告から、環境中の化学発がん物質への暴露も考えられる。さらに、寄生虫感染や食生活を含めて同じような環境にありながら、胆道がん（肝内胆管がん）を発生する人としない人が存在することから、我々は化学発がん物質の代謝、それによる DNA 変異の修復、長く続く炎症を調節している遺伝的な背景が関係している可能性を考えてきた。このため、これまで我々はタイ王国の国立がん研究所の Petcharin Srivatanakul 博士との共同で、肝内胆管がんの好発地域であるタイ王国の東北地区のナコンパノム県および最近ではウボンラチャタニ県をフィールドとして症例・対照研究を行ってきた。その結果、寄生虫感染の既往を示す良い指標が求められる現状において、共同研究者のコーンケン大学 Banchob Sripa 博士の寄生虫から精製した抗原を用いた抗体測定法（ELISA）により、肝内胆管がんのリスクが著明に上昇することを報告した。また、

飲酒が独立した危険因子であることも見出した。そして発がん剤の解毒に関与すると考えられる GSTM1 を持たない多型の寄生虫抗体陽性者においては、肝内胆管がんの発症リスクがさらに高くなることを見出した。

胆道がんの発がん機構を解明するいまひとつのアプローチとしてハムスターの実験モデル系を用いて、胆道がんでは特異的に発現が上昇している遺伝子を調べることもヒトの胆道がんの成り立ちや早期診断法の開発に結びつく可能性がある。すでにこのハムスターの実験発がん系でコーンケン大学の大学院生が来日して行った研究により、数種類の遺伝子の発現亢進が認められておりその一つを同定している。

2. 研究の目的

化学発がん剤などの薬物代謝酵素遺伝子（GSTM1, GSTT1, Cyp2E1）、DNA 修復酵素遺伝子（hOGG1, XRCC1）などに関しての遺伝的多型の解析を行いこれらの遺伝子多型と胆道がんリスクとの関連を調べるのがこの胆道がん発がん機構解明と個人レベルにおけるがん予防のために必要と考えこれを一つの目的とした。

また、寄生虫感染と細胞増殖との関連を調べるために、OV の分泌抗原をマウス NIH-3T3 の培養液に加えて調べる。また、NIH3T3 細胞に OV 抽出液を作用させた場合における遺伝子発現プロファイルを cDNA アレーを用いて調べた。

3. 研究の方法

共同研究者の Srivatanakul 博士の協力により、ウボンラチャタニ県のがんセンターにて肝内胆管がん診断された患者と性・年齢・居住地を同じくする健康診断受診者から血液サンプルを同意書も得て採取してもらった。ここから DNA を抽出し、遺伝子多型を調べた。

寄生虫の分泌する物質の細胞増殖に対する影響をみる実験においては、*Opisthorchis* のメタセルカリアをタイ王国コーンケン県の肝吸虫の自然感染魚の身をペプシンで分解して得た。それを6-8週齢のハムスターに感染させて1カ月後に成虫を得て分泌抗原を調整した。細胞増殖を促進する活性があることは、NIH-3T3細胞を用いて行った。マウスのcDNAアレーは、筑波大学の内田和彦博士の自作品を使用した。

4. 研究成果

(1) タイ王国国立がん研究所のSrivatanakul博士との共同で、以前にタイ王国の東北部のナコンパノム県より肝内胆管がん患者と性、年齢、居住地を同じくする対照者の血液DNAを用いて胆道がんのリスクとDNAの多型との関連についてGSTT1とGSTM1を中心とした解析を行った。今回は、同じく東北部のウボンラチャタニ県において同様の血液サンプルを集めることが出来た。

症例と対照の93組のペアについて薬物代謝酵素遺伝子のGSTM1とGSTT1を中心とした解析を行った。ペアを維持した解析で、GSTM1の欠失型変異をもつ場合は、オッズ比1.12(95%信頼区間0.45-1.74)($p=0.73$)であり、GSTT1の欠失型変異をもつ場合の肝内胆管がんのリスクは、オッズ比0.83(95%信頼区間0.66-2.22)($p=0.54$)であった。この結果は、以前に我々がタイ王国東北部のナコンパノムで行った結果とほぼ同様であり、この多型のみによりリスクは説明できないことが確認された。

(2) DNA修復酵素系の遺伝子として、

hOGG1およびXRCC1遺伝子多型についてしらべた。hOGG1の326番目のコドンの多型については、Ser/Serの通常型に対してSer/Cys, Cys/Cys, (Ser/Cys)+(Cys/Cys)の多型を持つ場合は、胆道がんのリスクを示すオッズ比は、それぞれ1.16($p=0.71$), 0.94($p=0.88$), 1.07($p=0.86$)と有意な差は見られなかった。一方、XRCC1の399番目のコドンの多型については、Arg/Argの通常型に対して、(Arg/Gln)+(Gln/Gln)の多型を持つ場合は、オッズ比が、0.55(95%信頼区間0.31-0.97, $p=0.04$)と有意にリスクが低下する結果を得た。これは予想とは反対の結果でありその意義について今後検討する必要がある。

(3) OVの寄生虫感染既往を示すと考えられる抗OV抗体価陽性が肝内胆管がんのリスクに与える影響は、オッズ比23.99(95%信頼区間3.24-177.4)と有意な上昇であった。これは、以前の我々のナコンパノムでの結果を確認するものである。この結果、ELISAによる抗体価は、OV感染の単なる既往を示すものかどうかの議論はあるにしても、タイ王国における肝内胆管がんのリスク評価として測定法が普及することが期待される。

(4) タイ王国の肝吸虫OV感染が肝内胆管がんの発生に関わっていることがこれまでの疫学調査で確認されている。しかし肝吸虫の感染がどのようにして発がんに結びついているかは不明である。我々は、肝吸虫が分泌する物質に細胞増殖の促進物質があるのではないかと仮説の元で、マウスNIH-3T3細胞に肝吸虫の分泌抗原が

どのように細胞の遺伝子発現をきたすのか、また、この抽出液が細胞増殖効果を持っていないかを調べた。15,000 遺伝子の検索の結果、239 個の細胞増殖に関連する遺伝子の発現が 2 倍以上発現増強していた。そして epidermal growth factor (EGF) と transforming growth factor- β (TGF- β) の下流遺伝子である *pkC*, *eps 8*, *tgf β 1*i*4* の発現が有意に上昇していた。この結果は、肝吸虫による細胞増殖促進効果は、TGF- β 及び EGF シグナル伝達経路に関連していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Nitta, T., Miwa, M. et al. (11 人中 11 番目) Reduction of human T-cell leukemia virus type-1 infection in mice lacking nuclear factor-kappaB-inducing kinase. *Cancer Sci.* 査読あり 99(5):872-878, 2008.
- ② Iemura, K., Kamemura, K. and Miwa, M. Assessment of the centrosome amplification by quantification of gamma-tubulin in western blotting. *Anal. Biochem.* 査読あり 371(2): 256-258, 2007.
- ③ Saito, S., Miwa, M. et al. (6 人中 5 番目) The genetic difference between gallbladder and bile duct cancer cell lines. *Oncology Reports*, 査読あり 16: 949-956, 2006.
- ④ Nitta, T., Miwa, M. et al. (9 人中 9 番目) Centrosome amplification in adult T-cell leukemia and human

T-cell leukemia virus type 1
Tax-induced human T-cells. *Cancer Sci.*
査読あり 97(9): 836-841, 2006.

- ⑤ Thuwajit, C., Miwa, M. et al. (7 人中 7 番目) Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. *World J. Gastroenterol.*, 査読あり 12(22): 3585-3592, 2006.
- ⑥ Liengswangwong, U., Miwa, M. et al. (7 人中 7 番目) Immunohistochemical expression of mismatch repair genes, a screening tool for predicting mutator phenotype in liver fluke infection-associated intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* 査読あり 12(23): 3740-3745, 2006.
- ⑦ Sugihara, E., Miwa, M. et al. (11 人中 11 番目) Suppression of centrosome amplification after DNA damage depends on p27 accumulation. 査読あり *Cancer Res.*, 66(8): 4020-4029, 2006.
- ⑧ Loilome, W., Miwa, M. et al. (8 人中 8 番目) Fluorescence differential display analysis of gene expression in *Opisthorchis viverrini* associated cholangiocarcinoma in hamster model. *Mol. Carcinog.*, 査読あり 45(5): 279-287, 2006.

[学会発表] (計 14 件)

- ① Lu Zeng, Miwa M. et al. (11 人中 11 番目) Genetic and environmental risks for cholangiocarcinoma in Ubon Ratchathani, northeast Thailand、第

67 回日本癌学会学術総会、2008. 10. 28—
30、名古屋国際会議場

- ② Ueda A, Miwa M. et al. (11 人中 11
番目) Genetic and environmental risks
for cholangiocarcinoma in northeast
Thailand. 第 8 回日韓がん老化シンポジ
ウム 2007. 8. 10-11, 岐阜グランドホテル
- ③ Loilome W., Miwa M., et al. (8 人中 6
番目) Effect of
N-nitrosodimethylamine and
Opithorchis viverrini infection on the
accumulation of 8-nitroguanine via iNOS
expression in cholangiocarcinoma
development
第 20 回国際生化学会、June 18-23 2006
Kyoto, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 正直 (MIWA MASANAO)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教
授
研究者番号：20012750

(2) 研究分担者

平野 隆 (HIRANO TAKASHI) 平成 18 年度の
み
産業技術創業研究所・総括研究員
研究者番号：90357864
正田 純一 (SHOUDA JUNICHI)
筑波大学大学院・人間総合科学研究科・准教
授
研究者番号：90241827

(3) 連携研究者

なし

(研究協力者)

本荘 哲 (HONJO SATOSHI)
国立病院機構福岡東医療センター医師