

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19473

研究課題名（和文）分岐鎖アミノ酸のゲノムワイド関連解析とメンデル無作為化による膵がんの分子疫学研究

研究課題名（英文）Branched-chain amino acid level and cancer: Mendelian Randomization Study

研究代表者

片桐 諒子 (Katagiri, Ryoko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・がん対策研究所・室長

研究者番号：60813508

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：3種類の分岐鎖アミノ酸について、遺伝情報を利用して未知・未観察の交絡による影響を調整しうるメンデル無作為化という解析手法にて、健康アウトカムとの関連の検討を試みた。用いる操作変数には分岐鎖アミノ酸と関連する一塩基多型（SNP）を既報より抽出した。日本人における分岐鎖アミノ酸に対するゲノムワイド関連解析から効果の推定量を求めた。また、健康アウトカムには当初膵がんを想定したが、十分なサンプルサイズが集まらず、大腸がんの検討へ変更した。GWASの結果、選んだ操作変数による説明率が低く、MR解析を実施した結果の解釈が困難となることが予見され、MR解析の実施は本研究の枠組みでは困難という結論に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分岐鎖アミノ酸と糖尿病の関連が知られる中、疫学研究からがんとの関連の報告もあり、未観察交絡の影響を調整して関連の検討を行うメンデル無作為化解析は、分岐鎖アミノ酸とがん、特に糖尿病などの影響を調整することが難しい膵がんなどで有用であると考え研究を設定した。しかし、代謝物に対するGWAS解析の報告は、解析時点で少なく今回の手法では遺伝的な説明率が低くなり、メンデルランダム化解析の実施は難しいということが判明した。今後の代謝物に関するゲノム研究の増加や、罹患率の低いがんの研究を統合した研究プラットフォームの充実などが求められる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to examine the association of three branched-chain amino acids with health outcomes using a Mendelian Randomization approach, in which genetic information is used to adjust for unknown and unobserved confounding effects. Single nucleotide polymorphisms (SNPs as instrumental variables) associated with branched-chain amino acids were extracted from previous reports. The estimates were obtained from genome-wide association analysis (GWAS) of branched-chain amino acids in the Japanese population. In addition, although pancreatic cancer was initially assumed to examine as health outcome, the enough sample size could not be collected, so the study was changed to examine colorectal cancer. However, using the results of GWAS, the estimation of variance explained by selected SNPs would be low, making it difficult to interpret the results of MR analysis. As a result, I concluded that MR analysis would be difficult within the framework of this study.

研究分野：栄養疫学

キーワード：メンデルランダム化解析 疫学 分岐鎖アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

分岐鎖アミノ酸(BCAA)はイソロイシン、ロイシン、バリン三種類の必須アミノ酸であるが、近年、代謝物の網羅的な解析(メタボローム解析)技術により分岐鎖アミノ酸と疾患との関連が再注目されている。血中分岐鎖アミノ酸濃度は肥満、糖尿病やがんとの関連が報告されている。疫学分野では世界の大規模コホートからの報告が相次いでおり、アメリカからは膵がんとの関連も報告されている。日本においても大規模コホートにおいて分岐鎖アミノ酸血中濃度と膵がんの関連や大腸腺腫との関連も報告されている。このように新規のがん治療標的やマーカーとしても注目される分岐鎖アミノ酸であるが、統計学的に調整したモデルでの関連から、糖尿病を介さないメカニズムのほか、横断研究から分岐鎖アミノ酸濃度とアディポネクチンや C-peptide との関連の報告もあり、疫学的な糖尿病罹患の調整のみでは取り除けない糖尿病を介するメカニズムの可能性を否定できない。

残余交絡の可能性から、さらなる探求手法の一つに遺伝情報を利用して未知・未観察の交絡による影響を調整したメンデル無作為化(Mendelian Randomization:MR)による因果関係の検討が有用である可能性がある。MR解析は、観察疫学研究において遺伝子型情報を操作変数として、メンデルの法則を利用し、曝露因子と疾病との間の因果関係について推測する手法である。メンデルの法則により、リスクアレルを有するかは、受胎時にランダムに決定されるため、出生後の環境因子などの背景因子が両群ほぼ等しくなる。MR解析は、このメンデルの法則を利用し、交絡や因果の逆転の影響を受けにくくする手法として知られている。

メンデル無作為化を行うのに必要な分岐鎖アミノ酸濃度を規定する遺伝要因の報告は、ゲノム網羅的関連解析(GWAS)によりヨーロッパから報告があるが、特に、糖尿病発症や肥満度に関する人種差や、申請者の膵がんに関する報告においてもアメリカの先行研究との間に若干の違いがあり、日本人における検証が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、マーカーや治療に活用しうる可能性をもつ分岐鎖アミノ酸の遺伝要因の解明および疾患(特に膵がん)とのメンデル無作為化による因果関係の検証を行う。メンデル無作為化により遺伝情報を利用して交絡の影響を取り除いて、分岐鎖アミノ酸と膵がんなどの疾患との因果関係を検討することが目的である。

3. 研究の方法

以下の手順で、メンデル無作為化解析を実施する。メンデル無作為化解析はSNPsとBCAA濃度の関連 1(SNP-BCAA)、とSNPsとoutcomeの関連 2(SNP-outcome)の比としてのMR推定値(BCAA-outcome)を求める方法である。メンデルの法則によりアレルはランダムに選択されるため、SNP-BCAAとSNP-outcome推定値は交絡の影響を受けない真の推定値となることが想定される。さらに、曝露とアウトカムとの関連の真の推定値は $2/1$ で、逆分散推定法やMR-Egger推定法などで推定される。

(1) 操作変数となるBCAA濃度に関連する一塩基多型(SNP)の選定

National Human Genome Research Institute-European Bioinformatics Institute (NHGRI-EBI)の公開データベースであるGWAS CatalogのBCAA濃度に関するGWAS研究の論文からBCAA濃度に関連するSNPを選定する。この際に、形質除外、性染色体除外、Indel除外、 p 値 $<5.0 \times 10^{-8}$ 、マイナーアレル頻度 <0.01 、Clumpingといった手順で選定を実施した。

(2)BCAA濃度に関連するSNPと血中BCAA濃度の関連解析

(1)で選定したSNPに関して、日本人の集団における効果の推定量を求める。具体的には、東北メディカルメガバンクとの共同研究により約15000名の日本人成人を対象としたゲノムワイド関連解析(GWAS)を実施し、推定量を得る。この際BCAA濃度は対数変換し、性別、年齢、4つの主成分を共変量とする。

また、下記式から選定したSNPのBCAA濃度に対する説明率を計算する。

$$\frac{2(p_i)(1-p_i)\beta_i^2}{\text{Var}(X)}$$

(p =各SNPのeffect allele frequency, β =曝露に対する各SNPの効果 $\text{Var}(X)$ =曝露の分散)

(3)BCAA濃度に関連するSNPとOutcome(がん)の関連解析

(1)で選定したSNPに関して、膵がんとの関連を検討する。具体的には日本人を対象とした多目的コホート研究におけるケースコホートデザインや膵がんに関する研究連携などでの関連の検

討し効果の推定量を求める。性別、年齢、4つの主成分(多目的コホート研究の場合は地域を追加)を共変量とするロジスティック回帰分析を用いる。

(4)Two-sample アプローチによるメンデル無作為化解析

メンデルのランダム化解析の統合解析の方法として、これまでに複数の方法が提案されている。操作変数の数が多い場合、多層性の問題が懸念される。主解析として、全ての遺伝子多型の多層性がないことを前提とした逆分散(IVW)法を、よりロバストな結果を得るために、多層性を許容する手法であるMR-Egger法、median法の実施を予定した。

4. 研究成果

(1)GWAS Catalogの分岐鎖アミノ酸は個別のアミノ酸の結果を提示しているため、ロイシン、イソロイシン、バリン個別にSNPを検討した。2021年3月の時点でGWAS Catalogからはロイシン18SNP、イソロイシン19SNP、バリン11SNPが抽出された。このうちp値 $<5.0 \times 10^{-8}$ であったのは、ロイシン4SNP、イソロイシン5SNP、バリン4SNPであった。このうちロイシンとバリンの1SNPずつについてはマイナーアレル頻度 <0.01 、Clumpingにてバリンのうち1SNPが除外され、最終的にロイシン3SNP、イソロイシン5SNP、バリン2SNPがBCAA濃度と関連するSNPとして選定された。以下の表1にそのSNPの概要を記載する。

表1 操作変数として抽出された一塩基多型

SNP	Chromosome	Position	REF Allele	ALT Allele	Minor Allele	Effect Allele Frequency	p-value
Leucine							
rs117936590	chr3	161138859	C	T	T	0.1101	2×10^{-8}
rs1440581	chr4	89226422	T	C	C	0.5456	4×10^{-25}
rs10437868	chr12	77902318	T	C	C	0.1111	3×10^{-8}
Isoleucine							
rs1260326	chr2	27730940	T	C	C	0.5188	1×10^{-9}
rs7678928	chr4	89222827	C	T	T	0.374	6×10^{-19}
rs58101275	chr14	104008420	G	A	A	0.1091	3×10^{-8}
rs1420601	chr16	49085649	T	C	C	0.5079	4×10^{-8}
rs75950518	chr16	70378917	C	T	T	0.1706	2×10^{-8}
Valine							
rs9637599	chr4	89206230	A	C	C	0.3006	2×10^{-35}
rs10211524	chr2	65208074	G	A	A	0.8145	5×10^{-20}

(2)BCAA濃度に関連するSNPと血中BCAA濃度の関連解析による日本人における、上記対象SNPの効果量を得るために、東北メディカル・メガバンク機構との共同研究・スーパーコンピュータによる遠隔解析体制を構築した。東北メディカル・メガバンク機構長期健康調査の対象者のうち、20歳以上の成人で、ゲノム網羅的SNPチップの解析情報がありBCAAの測定が行われている成人約1.5万人を対象としたGWASを実施し、加えてその効果量やエフェクトアレル頻度を用いて方法に記載した計算式を用いて説明率を計算した。この結果、該当のSNPによる説明率は、各アミノ酸において1%未満であるという結果となった。

(3)BCAA濃度に関連するSNPとOutcome(がん)の関連解析については、膵がんにおける関連を検討すべく、実施可能な研究体制を検討した。多目的コホート研究においては、最長20年近い追跡期間であっても、膵がんは罹患数としては多くはないがん種のため、約45000人の集団から計166例の膵がんの発生であったことを確認した。このうちBCAAの測定値がある人数は、さらに限られるため単独コホート研究からの効果量では難しい可能性が考えられた。このため、国内の複数の研究が連携したデータによる解析についても検討したが実現は難しいと考えられた。このため、当初の目的は膵がんでの検討であったが、糖尿病発症や肥満度との関連なども考慮し

て広くアウトカムとするがん種を再度検討した。すでにデータの統合が実施されていることもあり全がんや大腸がんでの実施を検討した。この場合全がんでは4,543がん症例、大腸がんでは全がんとは含まれる研究データが異なるために7,936例の大腸がん症例を含めることが可能であった。これらについては、性別、年齢、4つの主成分を共変量とするロジスティック回帰分析を実施したものの、同時に並行して実施していた(2)の解析の結果説明率が低いということが判明し、メンデル無作為化解析を実施した結果の解釈が困難となることが予見され、実施は困難であると判断した。

(4)メンデル無作為化解析を実施するためには、操作変数法であり3つの仮定が満たされている必要がある。SNPは操作変数として曝露(この場合はBCAA濃度)と関連する。SNPは曝露とアウトカム(この場合はBCAA濃度とがん)の交絡因子に関連しない。SNPは直接アウトカムと関連せず、曝露を通じてのみアウトカムと関連する、の三つが必要である。今回SNPはこの3条件を満たしてはいるものの、説明率が低く、遺伝的に規定されるBCAA濃度とがんとの因果関係に迫ることが難しいと判断した。この原因として選定されたSNP数が少なかったことがあげられる。通常メンデル無作為化解析に用いられる操作変数としてのSNP数は数十個近いことが多いため、一つ一つのSNPの説明率が低くとも合計することにより数%の説明率となりうる。ところが、今回のBCAA濃度については、背景で述べた通りメタボローム解析などの進歩により、再度注目されることとなった背景もあり、選定当時GWASを実施している研究が限られていた。今後さらにメタボローム解析の対象物質を含めた日本人および世界でのGWASやメンデル無作為化解析が実施されることが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lu Long Wanshui Yang Li Liu Deirdre K. Tobias Ryoko Katagiri Kana Wu Lina Jin Fang Fang Zhang Xiao Luo Xing Liu Shuji Ogino Andrew T. Chan Jeffrey A. Meyerhardt Edward Giovannucci Xuehong Zhang	4. 巻 148
2. 論文標題 Dietary intake of branched-chain amino acids and survival after colorectal cancer diagnosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2471-2480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.33449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片桐 諒子
2. 発表標題 栄養疫学の活かし方：予防から臨床まで
3. 学会等名 日本臨床栄養代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------