

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：34204
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009 ～ 2012
 課題番号：21406011
 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） Molecular oncological and epidemiological study on initiation and progression of human biliary tract cancer in Asia
 研究代表者 三輪 正直（MIWA MASANA0）
 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（和文）：

タイ王国における胆道がん罹患のリスクは、調べた DNA 修復酵素遺伝子、薬剤代謝酵素遺伝子、炎症関連酵素遺伝子多型いずれも単独の場合には有意な関係は認められなかった。しかしながら、DNA 修復酵素遺伝子 *hOGG1* Ser326Cys 多型と薬剤代謝酵素遺伝子 *GSTM1* 多型間には、胆道がん罹患リスクに関して有意な交互作用が認められた。また、薬剤代謝酵素遺伝子の *CYP2E1* c1/c2+c2/c2 型と *GSTT1* 多型間にも有意な交互作用が認められた。

研究成果の概要（英文）：

On the risk of biliary tract cancer in Thailand, significant interaction of genetic polymorphisms between DNA repair gene *hOGG1* Ser326Cys and drug metabolizing enzyme gene *GSTM1* polymorphisms were observed. Significant interaction of genetic polymorphisms between drug metabolizing enzyme genes *CYP2E1* c1/c2+c2/c2 and *GSTT1* polymorphisms were also observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2012 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
総計	9,900,000	2,970,000	12,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：HBV、HCV、MARCKS、タイ国、タイ王国、予後、寄生虫感染、肝吸虫、胆道がん、DNA 多型解析、遺伝子間多型相互作用

1. 研究開始当初の背景

肝吸虫 (*Opisthorchis viverrini* (OV)) がタイ王国での胆管がんのリスク要因であるにもかかわらず、すべての感染者が胆管がんになるわけではない。このことから我々は、遺伝的要因、特に炎症による DNA 障害に対しての塩基除去修復酵素遺伝子多型の影響があるのではないかと、また発がん剤の解毒酵素

としてのグルタチオン S 転移酵素 (GSTM1 及び GSTT1) を含む代謝酵素遺伝子多型がその効果を増大ないし減少させる可能性を考えた。また、OV 感染の指標として OV 抗体価を測定し、炎症が胆管がん発生に何らかの影響を与える可能性を考えて、炎症関連遺伝子の多型についても分析した。

2. 研究の目的

(1) 塩基除去修復酵素遺伝子多型、代謝酵素遺伝子多型を調べるために、*hOGG1* 遺伝子の Ser326Cys 多型、*XRCC1* 遺伝子の Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln の多型、および *PARP1* 遺伝子の Val1762Ala 多型について性、年齢 (±5 歳)、居住地 (タイ王国ウボン・ラチャタニ県) をマッチさせた 87-94 組の症例・対照者について多型解析をおこなった。また、

(2) OV 感染による炎症が及ぼす影響について、*CYP2E1* 遺伝子多型、*IL-6* 遺伝子多型、*IL-10* 遺伝子の -174 と -634 多型、*IL-10* 遺伝子の -819 多型、そして *NF-κB* 遺伝子の -94 多型について上記の性、年齢 (±5 歳)、居住地 (タイ王国ウボン・ラチャタニ県) をマッチさせた 110 組のサンプルについて多型解析を行った。

3. 研究の方法

方法は、ウボン・ラチャタニがんセンターにて超音波検査、血清中の CA19-9 値、AFP 値を考慮に入れて胆管がんと診断された症例を用いた。対照者は、同センターを健康診断で訪れ、超音波検査と血清診断で異常がなかった方とした。血液から DNA を抽出し、それぞれの遺伝子多型を調べることに出来るプライマーにて DNA 断片を増幅した後、電気泳動し予想された DNA 断片が存在するか、または、DNA 多型を検出できる制限酵素にて切断して、制限酵素断片長の長さを調べることにより決定した。また、生活習慣について質問票を用いて聞き取り調査を行った。遺伝子多型による胆管がん罹患のリスクをオッズ比を計算することにより推定した。遺伝子多型間の交互作用は、log-likelihood ratio test により行った。これら統計解析は、STATA を用いた。

4. 研究成果

(1) 上記 2. (1) の多型について調べた結果、いずれの多型もそれ単独で胆管がんのリスクを説明することは出来なかった。しかし、興味あることに、*GSTM1* 遺伝子多型を考慮すると、*hOGG1* 遺伝子の Ser326Cys 多型における Cys 型は、有意に胆管がん発がんリスクを低下させることが分かった。すなわち、*hOGG1* Ser/Ser で *GSTM1* wild 型を基準群 (オッズ比 1) とした時に、*hOGG1* Ser/Ser で *GSTM1* null 型は、オッズ比が 0.06 (95%信頼区間 0.01-0.53)、*hOGG1* Ser/Cys 又は Cys/Cys で *GSTM1* wild 型は、オッズ比が 0.06 (0.01 - 0.54)、*hOGG1* Ser/Cys または Cys/Cys で *GSTM1* null 型は、オッズ比が 0.14 (0.02 - 1.08) であり統計的に有意な交互作用が認められた (交互作用の p 値 < 0.01)。肝吸虫感染暴露の指標として用いた抗 OV 抗体価、喫煙、

飲酒による補正によっても結果は変わらなかった。その他の DNA 修復酵素遺伝子多型は *GSTT1* または *GSTM1* 多型との相互作用を検討しても胆管がんのリスクとの間に有意な関連は見出せなかった。この結果は、修復酵素遺伝子の *hOGG1* が変異した多型を持つヒトでは、発がん性の物質の暴露を受けた際には、その毒性で細胞死が起きるために悪性変換が起きない可能性を示唆している。また、*GSTM1* の変異型多型を持つヒトでは、予想では、発がんリスクが上昇することが期待できたが、実際には、発がんリスクが有意に低下した結果であった。これは、膀胱がんですでに報告があるが、アブラナ科野菜に含まれている発がん抑制に働くイソチオシアネートのような物質の代謝が遅くなりその蓄積による発がん抑制効果とその分働いたのではないかと考えている。

(2) 上記 2. (2) の多型について調べた結果も、いずれの単独の多型も胆管がんリスクを説明することが出来なかったのは残念であった。ところが、発がん剤の解毒に関わる *GSTT1* wild で *CYP2E1* c1/c1 型を基準群とした時に、*GSTT1* wild 型で *CYP2E1* c1/c2+c2/c2 型のヒトは、胆管がんになるリスクは 3 倍に高まっていた (オッズ比、3.33 (95% CI : 1.23-9.00) ($p < 0.02$) (交互作用の p 値 < 0.01)。その他 *CYP2E1* と *GSTM1* の遺伝子多型間の相互作用を調べたが、胆管細胞がんとの発症リスクを有意に変化させることはなかった。

CYP2E1 c1/c2+c2/c2 型でリスクが上昇した説明としては、*CYP2E1* c2/c2 型のプロモーター活性が、*CYP2E1* c1/c1 型に比べて約 10 倍高いという報告があることから nitrosamine の様な発がん物質の暴露を受けた際の代謝活性化が促進するためリスクが高くなることは説明がつくかもしれない。

いずれにしても、今回得られた遺伝子多型間の相互作用はタイの胆管がんに関して初めてのものであり、今後の発がんリスクを評価するための貴重なデータであると思われる。

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 12 件)

- (1) Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi E, Shoda J. : Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with

postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *J Gastroenterol* 2013, In press. 査読有

- (2) Shoda J, Ishige K, Sugiyama H, Kawamoto T: Biliary tract carcinoma: clinical perspective on molecular targeting strategies for therapeutic options. *JHBPS* 19:342-353, 2012. 査読有 DOI: 10.1007/s00534-012-0520-z
 - (3) Loilome W, Yooyuen S, Namwat N, Sithithaworn P, Puapairoj A, Kano J, Noguchi M, Miwa M, Yongvanit P.: PRKARIA overexpression is associated with increased ECPKA autoantibody in liver fluke-associated cholangiocarcinoma: application for assessment of the risk group. *Tumour Biol.* 2012 Dec; 33(6) 2289-2298. 2012 Aug 26. Epub ahead of print 33: 2289-2298 査読有 DOI: 10.1007/s13277-012-0491-3
 - (4) Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J.: Potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol* 46:779-789, 2011. 査読有 DOI: 10.1007/s00535-011-0380-3
 - (5) Techasen, A., Loilome, W., Namwat, N., Duengai, K., Cha'on, U., Thanan, R., Sithithaworn, P., Miwa, M., and Yongvanit, P.: *Opisthorchis viverrini*-antigen induces expression of MARCKS during inflammation-associated cholangiocarcinogenesis. *Parasitol Int.* 2012 Mar; 61(1): 140-144. Epub 2011 Jul8. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.07.004>
 - (6) Loilome, W., Wechagama, P., Namwat, N., Jusakul, A., Sripa, B., Miwa, M., Kuver, R., Yongvanit, P.: Expression of Oxysterol binding protein isoforms in opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma: A potential molecular marker for tumor metastasis. *Parasitol Int.*, 61(1), 2012 Mar, 136-139, 査読有
- <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.07.003>
- (7) Loilome, W., Juntana, S., Namwat, N., Bhudhisawasdi, V., Puapairoj, A., Sripa, B., Miwa, M., Saya, H., Riggins, G. J. and Yongvanit, P.: PRKARIA is overexpressed and represents a possible therapeutic target in human cholangiocarcinoma. *Int J Cancer.* 129(1), 2011 Jul 1, 34-44, 査読有 DOI: 10.1002/ijc.25646
 - (8) Sugihara, E., Shimizu, T., Kojima, K., Onishi, N., Kai, K., Ishizawa, J., Nagata, K., Hashimoto, N., Honda, H., Kanno, M., Miwa, M., Okada, S., Andreeff, M., Saya, H.: Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene.* 31(23), 2012 Jun, 2849-2861, 2011 Oct10, 査読有 doi:10.1038/onc.2011.462.
 - (9) Matsuda A, Kuno A, Kawamoto K, Matsuzaki H, Irimura T, Ikehara Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yamamoto M, Ohkohchi N, Shoda J, Hirabayashi J, Narimatsu H.: WFA-positive sialylated MUC1 is a high-sensitivity biliary marker for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 52:174-182, 2010. 査読有 DOI: 10.1002/hep.23654
 - (10) Srivatanakul, P., Honjo, S., Kittiwatanachot Pacharin, Jedpiyawongse, A., Khuhaprema, T. and Miwa, M.: Hepatitis viruses and risk of cholangiocarcinoma in Northeast Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 2010, 11(4), 985-988, 査読有 http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume11_No4/c%20985-8%20Srivatanakul.pdf
 - (11) Thanasai, J., Limpiboon, T., Jearanaikoon, P., Sripa, B., Pairojkul, C, Tantimavanich, S. and Miwa, M.: Effects of thymidine phosphorylase on tumor aggressiveness and 5-fluorouracil sensitivity in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol.*, 2010, 16(13), 1631-1638, 査読有, doi: 10.3748/wjg.v16.i13.1631.

- (12) Techasen, A., Loilome, W., Namwat, N., Takahashi, E., Sugihara, E., Paupairoj, A., Miwa, M., Saya, H. and Yongvanit, P.: Myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation promotes cholangiocarcinoma cell migration and metastasis via PKC-dependent pathway *Cancer Sci.*, 2010, 101(3), 658-665, 査読有
doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01427.x

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) M Miwa, G You, H Tanaka, S Taniguchi, T Fujii, K Kamemura, M Suzuki, T Isono, I Toyama, A Matsuda, A Kuno, H Narimatsu, Y Murakami, S Suleeporn, P Srivatanakul, C Viwatthanasittiphong, K Thiravud, Analysis of new biomarkers for cholangiocarcinoma, International Symposium on Cholangiocarcinoma Tokyo, 2013, Feb 8-9, Institute of Medical Science, The University of Tokyo
- (2) 岡田浩介, 蕨 栄治, 徳重克年, 石井哲郎, 橋本悦子, 正田純一. *Nrf2/p62* 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し, 肝腫瘍を発生する. 第 48 回日本肝臓学会総会 (東京), 2012.
- (3) 正田純一. 胆石の種類と成因. 日本胆道学会認定指導医養成講座 3. 第 48 回日本胆道学会学術集会 (東京), 2012.
- (4) 楊玉興、三輪正直, Role of genetic polymorphisms on risk of carcinogenesis of cholangiocarcinoma in Thailand, 第 23 回日本疫学会学術総会, 2012 年 01 月 24 日-26 日、大阪大学
- (5) Interaction between GSTs and DNA-repair genes in relation to cholangiocarcinoma in Thailand: a case-control study; 本荘哲、You Gyokuou, 田中秀明, Petcharin Srivatanakul, Viwatthanasittip Chutiwan, Mantana Matharit, Dhiraphol Chenvidhya, Adisorn Jedpiyawongse, 太田恵美、藤井貴弘、Banchob Sripa、三輪正直, 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3-5 日、名古屋会議センター
- (6) 楊玉興、本荘哲、曾路、田中秀明、太田恵美、藤井 貴弘、田中正和、三輪正直;

Genetic polymorphisms and environmental determinants on cancer risk of carcinogenesis of cholangiocarcinoma in Thailand, 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3-5 日、名古屋会議センター

- (7) Gyokukou You, S. Honjo, Lu Zeng, H. Tanaka, E. Ohta, T. Fujii, M. Tanaka, M. Miwa; Genetic polymorphisms and environmental determinants on cancer risk of carcinogenesis of cholangiocarcinoma in Thailand, 第 18 回日本がん予防学会、第 34 回日本がん疫学・分子疫学研究会, 2011 年 6 月 20-21 日、京都府立医科大学図書館ホール
- (8) 三輪正直、本荘哲、曾路、田中秀明、楊玉興、太田恵美、藤井貴弘、田中正和; タイ王国における胆管がんリスクの遺伝的及び環境要因, 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22-24 日、Osaka International Convention Center, RIHGA Royal Hotel Osaka
- (9) Anchalee Techasen, Watcharin Loilome, Nisana Namwata, E. Takahashi, E. Sugihara, Anucha Puapairoj, M. Miwa, H. Saya, Puangrat Yongvanit; MARCKS phosphorylation promotes cholangiocarcinoma cell migration and metastasis via PKC-dependent pathway, 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010 年 9 月 22-24 日、Osaka International Convention Center, RIHGA Royal Hotel Osaka
- (10) 曾路、太田恵美、藤井貴弘、田中正和、本荘哲、三輪正直; タイ王国での肝内胆管がんの発がんにおける遺伝的要因, 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月 1-3 日、パシフィコ横浜
- (11) 曾路、上田明弘、太田恵美、田中正和、三輪正直、本荘哲、Petcharin Srivatanakul, Adisorn Jedpiyawongse, Mantana Mathrit, Chutiwan Viwatthanasittiphong, Dhiraphol Cehnvidhya ; タイの肝吸虫感染関連胆管がん発がんにおける DNA 修復遺伝子 XRCC1 多型の予防効果, 第 16 回日本がん予防学会、第 32 回日本がん疫学研究会の合同大会, 2009 年 6 月 16-17 日、愛知県がんセンター国際医学交流センター
- (12) Lu Zeng, A. Ueda, E. Ohta, M. Tanaka,

S. Honjo, Petcharin Srivatanakul, Mantana Matharit, Chutiwan Viwatthanasittiphong, Dhiraphol Chenvidhya, Adisorn Jedpiyawongse, M. Miwa; Genetic and environmental risks for cholangiocarcinoma in Ubon Ratchathani, northeast Thailand, 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research, Mar 11-13, 2009, DamYang Resort, Korea

[図書] (計4件)

- (1) Shoda J & Yamamoto M: Gallbladder Cancer Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options. Horizons in Cancer Research. Volume 48. pp.1-24. NOVA Science, 2012.
- (2) 正田純一:胆石症・胆道炎・胆道がん 胆石症 概念・定義と疫学 最新医学社(大阪), pp.13-25 2011.
- (3) 正田純一:胆道癌発生の分子機序 Annual Review 消化器 2011 中外医学社(東京) pp.293-299, 2010.
- (4) 正田純一:胆道感染症 南江堂(東京), pp.366-369, 2010.

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

正田 純一 (SHODA JUNICHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 90241827

(3) 連携研究者

()

研究者番号: