

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22501063

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNAの多型の数が飲酒、喫煙による食道がん発がんリスクに与える影響

研究課題名(英文)Relationship between a number of polymorphisms on D-loop region of mitochondrial DNA and risk of drinking and smoking for esophageal cancer

研究代表者

組本 博司(KUMIMOTO, Hiroshi)

愛知県がんセンター(研究所)・中央実験室・研究員

研究者番号：00291170

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)： mtDNA の変異の入りやすさの指標として mtDNA の多型の数を用い、食道がん発がんリスクの関連を解析するため、食道がん患者および非がん患者の症例対照研究を計画した。D-loop の多型を網羅的に調べ、mtDNA の多型の数の解析した。

食道がん患者、非がん患者それぞれについて、塩基配列の解析、多型の同定を行い、平均で食道がん患者で7.5多型/人、非がん患者で6.8多型/人の多型が検出された。主な、がん患者、非がん患者の主な違いは、塩基置換であり、がん患者、5.9多型/人、非がん患者5.4多型/人の多型が検出された。

研究成果の概要(英文)： Using a number of polymorphisms on D-loop region of mitochondrial DNA (mtDNA) as an index of somatic mutations on mtDNA, to analyze risk of drinking and smoking for esophageal cancer, case-control study were planned. Comprehensive analysis of D-loop region of mtDNA was done to find polymorphisms.

After DNA sequencing was done for esophageal cancer patients and non-cancer controls, polymorphisms were identified. We found 7.5 polymorphisms among esophageal cancer patients and 6.8 polymorphisms among non-cancer controls on average, respectively. Mainly the difference between cancer patients and non-cancer controls was base substitution. 5.9 base substitutions were identified among esophageal cancer patients and 5.4 among non-cancer controls.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA 多型

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、真核細胞内に存在する小器官である。エネルギーの産生だけでなく、アポトーシスなど様々な役割を果たしていることが明らかになってきている。エネルギーの産生は、酸化リン酸化によって ATP を作るが、この過程で電子が漏れ、活性酸素が作られる。この活性酸素が、DNA にダメージを与える原因となる。

ミトコンドリアは独自のゲノム DNA を持っており、一般に1細胞当たり10の3乗オーダーのコピーが存在するとされる(図1)。ミトコンドリア DNA (mtDNA) は 16,569 塩基対からなる、2本鎖環状 DNA である。

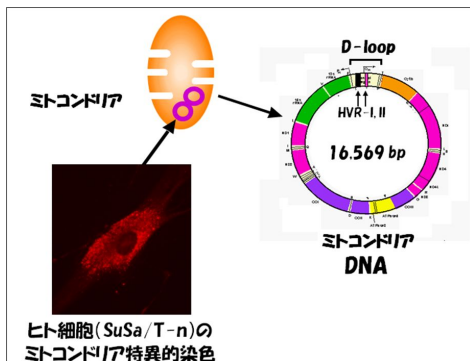


図1. ミトコンドリア DNA

また、mtDNA は、核ゲノムと比べ、ダメージを受けやすいと考えられている。それは、ヒストンが存在しないこと、修復酵素の活性が低いこと、それから、活性酸素が近くで生成されることなどが理由とされている。mtDNA を解析していて、ある位置に変異が入っている、または、多型が存在する、と言う事は、10の3乗オーダーで存在する mtDNA ゲノムの多くがその塩基に変異している事を示している。

ミトコンドリアでは、酸化リン酸化によって ATP を産生するが、その過程で、電子の漏れにより、活性酸素が生成する。酸化リン酸化を担うタンパク質をコードする mtDNA の多型により、電子の漏れやすさに個人差が生じる可能性がある。つまり、細胞内で、生成する活性酸素の

量が個人によって異なる可能性が考えられる。活性酸素の生成量が異なると、DNA の変異の生じる効率が異なり、発がんリスクが影響する可能性が考えられる。

D-loop の多型と乳がんの関連を解析した論文で、いくつかの多型が乳がん発がんリスクを予想するのに役立つという論文や、D-loop の多型と膀胱癌を解析した論文で、同様にいくつかの多型が腎臓がんリスクに関連していると結論している物や、D310, D16521 の多型は胃がんに関連していると結論されている論文が過去に報告されている。

2. 研究の目的

細胞内で生成する活性酸素量の指標としてミトコンドリア DNA の多型の数を用いて、食道がん発がんリスクとの関連を解析する事を目的とした。

D-loop 領域は、ミトコンドリア DNA 複製、翻訳の開始領域であり、多型と変異が多く見つかっている領域である。以前我々は、D-loop 内にある Hyper Variable Region -I, II を解析し、食道がんにおいて高頻度で体細胞変異を検出した。この D-loop 領域について、塩基配列を解析することによって多型を検出し、食道がん発がんリスクとの関連を解析することを計画した。

3. 研究の方法

がんセンター研究所疫学・予防部が収集している HARPAC II の食道がん症例、非がん症例から抽出された DNA を用いて、解析を行った。

図2は、ある1例について、D-loop 領域解析用リシーケンスプライマーセット9セットを用いた PCR の結果である。赤字で示した4つのプライマーセットは増幅したが、残り5つのプライマーセットは増幅しなかった。下の図は、PCR による

増幅、解析可能なアンプリコンの位置を示している。増幅可能であった4つのアンプリコンでD-loop 領域全域をカバーしていることから、今後この4つのアンプリコンを用いて解析する事とした。

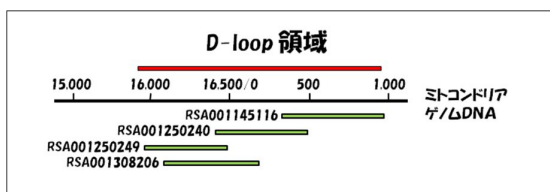
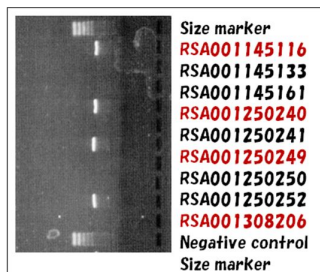


図2 . リシーケンスプライマーセットによる PCR の結果と D-loop 内での位置

それぞれの食道がん患者、非がん患者症例に対して、増幅可能プライマーセットを用いて、PCR を行った後、シーケンシングを行った。次に、多型解析ソフト、シークスケープを用いて多型の探索を行った(図3)。

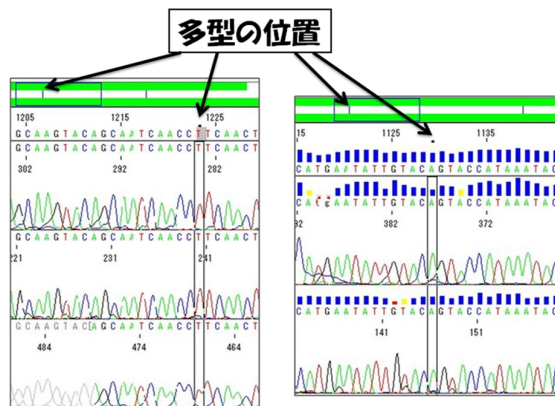
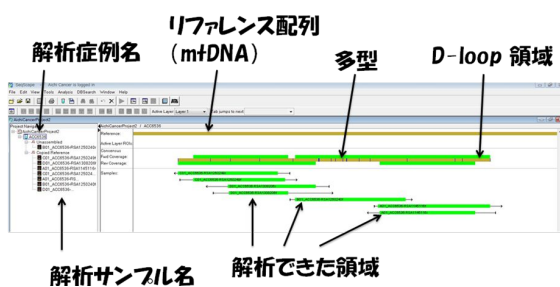
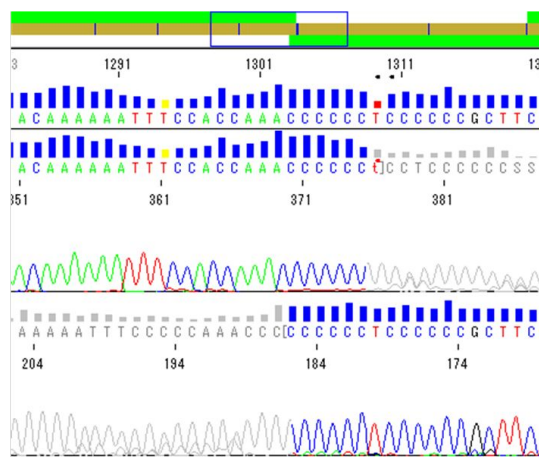


図3 . 多型解析ソフトを用いた解析例

mtDNA では、ある塩基がヘテロになっているとき、ヘテロプラスミーと言うが、今回の様な PCR 産物をシーケンシングする様な方法では、ほとんど見つからないとされている。しかしながら、D310 領域をはじめ3領域で、1 塩基挿入または、欠失でヘテロプラスミーが多く見つかった。ヘテロになった位置から後は、隣の塩基と重なって読めなかった(図4)。



↑
ヘテロの位置

図4 . ヘテロプラスミーのシーケンス例

4 . 研究成果

表1 . は、それぞれの症例について解析し、その結果を集めた表である。赤で示されているところがそれぞれ、塩基置換、挿入、欠失の多型を示

している。ケンブリッジリファレンスシーケンス(欧米人)をリファレンスに用いているため、全症例で塩基置換を示しているところがあるが、欧米人と、日本人の差であると考えられる。日本人では置換塩基の法が標準配列だと考えられる。この後の解析には、これらは多型としては含めずに解析を行った。

表1. 症例ごとの D-loop 領域の多型

見つかった全ての多型を表2. に示した。多型の見つかった位置は、135箇所、多型の種類は、151種類であった。黄色で示された所が、ケンブリッジ配列と異なった多型がコントロールで過半数を占めている所である。73は、ケンブリッジ配列とは異なった塩基が100%となっている。

表2. 見つかった D-loop 領域の多型

位置	標準配列	多型	cancer	control	
16.066	a	ε	1	0	
16.075	t	c	1	0	
16.092	t	c	0	1	
16.093	t	c	2	3	
16.111	c	t	1	1	
16.117	t	c	1	0	
16.129	ε	a	8	13	
16.136	t	c	1	1	
16.140	t	c	0	3	
16.145	ε	a	1	0	
16.157	t	c	1	0	
16.162	a	ε	1	4	
16.167	c	t	1	0	
16.172	t	c	3	6	
16.174	c	t	1	0	
16.182	a	c	3	1	
		hetero c/del	1	0	
16.183	a	c	7	5	
		ε	1	1	
16.184	c	t	1	0	
16.185	c	t	1	2	
16.187	c	t	4	8	
16.188	ins	c	0	1	
16.189	t	c	3	11	
		del	6	0	
16.192	c	t	1	1	
16.193	c	hetero- /c	7	9	
		ins	c	0	1
16.201	c	t	0	1	
16.203	a	ε	1	0	
16.209	t	c	4	5	
16.212	a	ε	2	0	
16.213	ε	a	1	0	
16.216	a	ε	0	1	
16.217	t	t	2	1	
16.223	t	c	12	9	
16.227	ins	hetero- /a	0	1	
16.232	c	a	2	0	
16.233	a	ε	0	1	
16.234	c	t	4	3	
16.241	a	t	0	1	
16.243	t	c	0	1	
16.245	c	t	3	3	
16.249	t	c	2	3	
16.257	c	a	3	3	
16.260	c	t	0	2	
16.261	c	t	3	3	
16.263	t	c	0	1	
16.266	c	t	1	1	
16.269	a	ε	1	0	
16.274	ε	a	3	4	
16.278	c	t	2	0	
16.284	a	ε	1	1	
16.290	c	t	6	10	
16.291	c	t	2	4	
		ε	0	1	
16.293	a	ε	0	1	
		t	0	1	
		hetero c/cc	0	1	
16.294	c	t	0	3	
16.295	c	t	1	2	
16.297	t	c	0	1	
16.298	t	c	0	5	
16.304	t	c	9	3	
16.309	a	ε	0	1	
16.311	t	c	5	3	
16.316	a	ε	0	1	
16.319	ε	a	6	13	
16.324	t	c	3	5	
16.325	t	c	1	1	
16.327	c	t	0	1	
16.328	c	t	1	0	
16.344	c	t	2	0	
16.352	t	c	0	1	
16.355	c	t	1	1	
16.356	t	c	0	1	
16.357	t	c	1	1	

位置	標準配列	多型	cancer	control
16.362	c	t	21	29
16.368	t	c	0	1
16.390	ε	a	2	2
16.399	a	ε	1	0
16.463	a	ε	0	1
16.497	a	ε	2	3
16.519	t	c	22	30
41	c	t	0	1
63	t	c	0	1
64	c	t	0	1
68	ε	a	1	0
73	ε	a	0	0
93	a	ε	0	2
94	ε	a	0	1
106	ε	a	0	1
131	t	c	0	1
141	c	t	0	1
143	ε	a	1	0
146	t	c	7	9
150	c	t	8	10
151	c	t	2	1
152	t	c	7	14
153	a	ε	0	1
182	c	t	1	2
183	a	ε	0	2
191	ins	c	0	2
194	c	t	2	5
195	t	c	5	3
196	c	t	1	0
199	t	c	2	7
200	a	ε	0	1
202	a	ε	1	1
204	t	c	2	1
		hetero t/c	0	2
205	ε	a	1	0
207	ε	a	3	3
210	a	ε	0	1
217	t	c	2	1
235	a	ε	5	9
248	a	del	7	6
252	t	c	0	1
260	ε	a	2	0
263	ε	a	1	2
290	c	t	0	1
	a	del	0	1
303-309	c8	del c1	17	23
		del c2	1	0
		hetero del c3/c4	0	1
		hetero ins-/c1	6	8
		hetero ins c1/c2	0	3
311-315	c6	del c1	0	1
408	t	a	1	0
456	c	t	0	3
489	c	t	18	21
493	a	c	0	1
499	ε	a	1	1
513-514	εc	del	0	2
523	a	hetero a/c	1	0
523-524	ac	del	17	23
		ins ac	0	1
		ins acac	1	0
546	a	ε	1	0
548	c	t	1	0
554	a	ε	1	0
568-573	c6	ins c	1	1
		ins c2	2	0
		ins hetero c2/c3	1	0
592	c	t	1	0
593	t	c	1	0
663	a	ε	5	9
681	t	c	0	3
709	ε	a	6	3
750	ε	a	1	0
752	c	t	1	0
801	a	ε	0	1
827	a	ε	3	1

それぞれの症例の多型の数をプロットしたものである(図5)。

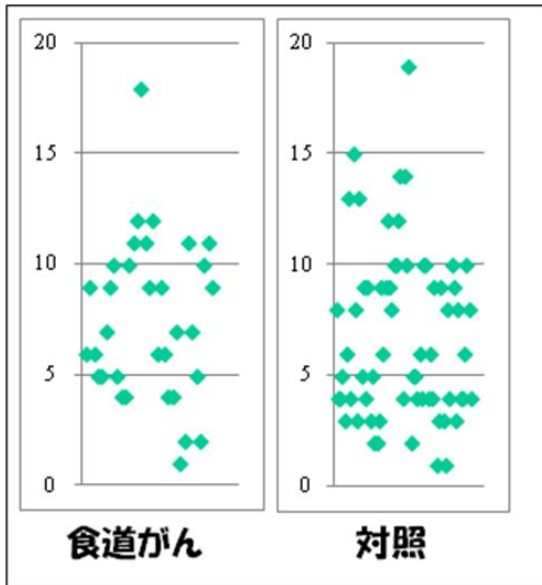


図5. 症例ごとの多型の数

1例当たりの多型の数を多型の種類ごとに表した(表3)。多型全体としては、食道がん症例で、7.9、対照群で6.9となっており、食道がん患者の方が多かった。また、ヘテロプラスミーの数は、食道がん症例、非がん例で違いは見られなかった。

表3. 一症例当たりの多型の数

多型の種類	多型全体	塩基挿入	塩基欠失	塩基置換 (SNP)	ヘテロ	解析数 (例)
食道がん患者	7.9	0.4	1.1	6.3	0.4	43
対照	6.9	0.4	0.9	5.6	0.4	64

今後、食道がん患者における D-loop 領域の多型に付いて、非がん患者と比較し、質的、量的な差異を解析し、多型の食道がんリスクとしての可能性を検討する。

さらに、喫煙などの生活習慣との関連を解析する。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔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：
出願年月日：
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

組本 博司 (KUMIMOTO, Hiroshi)

愛知県がんセンター(研究所)・中央実

験室・研究員

研究者番号：00291170

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：