

## 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 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790554

研究課題名（和文）血中ポリフェノール類濃度と胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連に関する研究

研究課題名（英文） The association between blood polyphenol levels and DNA methylation levels in gastric mucosa

研究代表者

島津 太一（SHIMAZU TAICHI）

独立行政法人国立がん研究センター・がん予防・検診研究センター・研究員

研究者番号：00466202

研究成果の概要（和文）：上部消化管内視鏡によるがん検診受診者（n=300）を対象に血中ポリフェノール濃度と胃粘膜の DNA メチル化レベルとの関連を横断的に検討した。胃がんリスクとの関連性がしめされたマーカー遺伝子について血清ダイゼイン、ゲニステイン、エピカテキン、エピカテキン3ガレート、エピガロカテキン、エピガロカテキン3ガレートのいずれにおいても、血清濃度と検討した3遺伝子マーカーのメチル化レベルとの間に、全体としては関連性を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：We conducted a cross-sectional study to investigate the association between blood polyphenol levels and DNA methylation levels in gastric mucosa of participants (n=300) who underwent upper gastrointestinal endoscopy as part of the cancer screening program. We found no association between serum polyphenol levels (daidzein, genistein, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin, and (-)-epigallocatechin-3-gallate) and DNA methylation levels of three markers which were associated with gastric cancer risk.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：がん疫学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：エピジェネティクス、胃がん、食事、疫学

## 1. 研究開始当初の背景

発がんの原因としてエピジェネティックな異常が認識されるようになってきている。がんの組織では癌抑制遺伝子プロモーター領域の CpG アイランド (CGI) がメチル化されていることが報告され (Jones PA, 2007)、染色体欠失・点突然変異などと同様に、DNA メチル化は癌抑制遺伝子不活化の重要な機

構と認識されている。とくに胃がんでは、染色体欠失・点突然変異よりも異常メチル化の方が高頻度に認められる (Ushijima T, 2004)。

一方、非がん部組織においても、DNA メチル化異常が存在することが報告されている。胃がんでは発がんにもっとも強く関連するヘリコバクター・ピロリ菌 (HP) 感染と胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連が報告されて

いる。HP 現感染陰性者において、*FLNc* 遺伝子、*HAND1* 遺伝子の非がん部胃粘膜の DNA メチル化レベルは、健常者、単発胃癌患者、多発胃癌患者の順に高くなることが認められている (Nakajima T, 2006)。また、HP 現感染陽性者においては、除菌後 DNA メチル化レベルが6週間で低下するものの、HP 現感染陰性の健常者よりも高いことが報告されている (Nakajima T, 2009)。このような観察から、非がん部組織において発がん因子への曝露によるエピジェネティックな発がんの素地が形成されていると考えられている (Ushijima T, 2007)。

しかしながら、HP 以外の胃癌のリスク・予防要因と胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連については疫学的な検討がほとんどなされていない (Perri F, 2007)。In vitro の実験では、緑茶に含まれるエピガロカテキン 3 ガレート ((-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG) や大豆に含まれるゲニステインなどのポリフェノールが、DNA メチル基転位酵素 (DNMT) の働きを抑制することが報告されている (Fang M, 2007)。DNMT はメチル化によってサイレンシングされた遺伝子の CGI の脱メチル化、再活性化に関与しているため、ポリフェノール類が癌抑制遺伝子の不活化を抑制する働きがあるかもしれない。最近の日本の大規模コホート研究におけるプール分析においては、緑茶による胃癌リスクの低下が示唆されており (Inoue M, 2009)、この仮説と矛盾しない。

本研究の目的は検診受診者を対象に、血中ポリフェノール濃度と胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連を横断的に検討することである。EGCG を含めたポリフェノール類と胃粘膜 DNA メチル化レベルを検討することにより、ポリフェノール類が胃粘膜におけるエピジェネティックな異常の蓄積に寄与する可能性があるのかどうか考察することができる。本研究により血中ポリフェノール類濃度と胃粘膜 DNA メチル化レベルに負の関連が見られれば、DNA メチル化レベルを中間マーカーとした介入研究の実施へとつながる可能性も今後期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は検診受診者を対象に、血中ポリフェノール類濃度と胃粘膜 DNA メチル化レベルとの関連を横断的に検討することである。

## 3. 研究の方法

対象者の適格基準は、がん予防・検診研究センターで実施している検診 (対象者 40 歳以上) において上部消化管内視鏡検査を受け

た日本人である。除外基準は、70 歳以上、HP の除菌歴あり、30 日以内のアスピリン・NSAID の服用歴あり、1 年以内に上部消化管内視鏡検査を受診、胃癌の既往あり、胃切除術の既往あり、胃粘膜の生検などが不相当と医師が判断した者、研究参加への同意が得られなかった者である。

研究参加への同意が得られた者には、通常の検診に加えて本研究用の問診票への回答、検診時の上部消化管内視鏡検査施行時に 7 ヶ所の胃粘膜生検をおこなう。これにより、胃粘膜の DNA メチル化レベル・病理組織学的評価と HP 現感染の判定をおこなう。

### (1) 内視鏡検査実施方法

DNA メチル化測定用の組織は、胃前庭部小弯 (幽門輪より 1 cm 口側) から 2 切片採取する。組織検査用の定点生検は Dixon らの提唱する 4 ヶ所より採取する。

### (2) 病理組織学的検索

改訂シドニー分類により胃炎・HP 感染の評価をおこなう。

### (3) 血清測定

高速液体クロマトグラフィーによりダイゼイン (Daidzein)、ゲニステイン (Genistein)、エピカテキン ((-)-epicatechin)、エピカテキン 3 ガレート ((-)-epicatechin-3-gallate)、エピガロカテキン ((-)-epigallocatechin)、EGCG の血清濃度を測定した。検出限界値以下の対象者は、ダイゼイン、ゲニステイン、エピカテキン、エピカテキン 3 ガレート、エピガロカテキン、EGCG でそれぞれ、31%、10%、55%、60%、44%、33%であった。また、血清抗 HP 抗体価、抗 CagA 抗体価、ペプシノーゲン I・II の測定も行った。

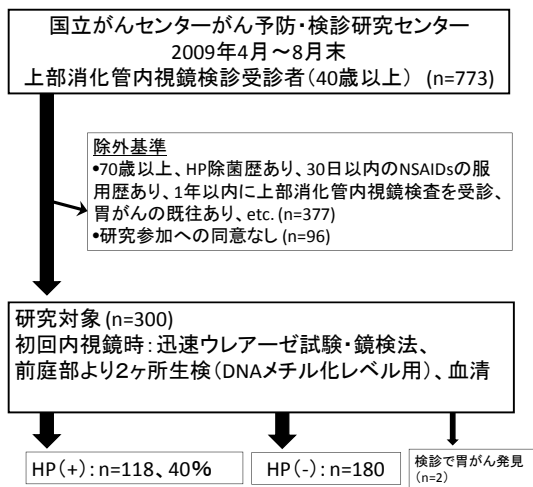
### (4) 胃粘膜 DNA メチル化レベルの解析

採取した検体は RNA later 保存液中に保存し、連結可能匿名化ののち、凍結保存される。検体から DNA を抽出し、bisulfite 処理後、胃癌リスクとの相関がしめされているマーカー遺伝子について定量的メチル化特異的 PCR 法によりメチル化された DNA 分子と、メチル化されていない DNA 分子数の絶対数を測定した。全 DNA 分子に対するメチル化された分子数を求めることにより、胃粘膜の DNA メチル化レベルを算出、蓄積した DNA メチル化異常の量の指標とした。当初の計画では *FLNc*、*HAND1*、*LOX*、及び *THBD*などをマーカー遺伝子として DNA メチル化レベルの測定を行う予定であったが、その後の新規胃癌リスクマーカーの探索を行い、有用であると考えられた *miR124a-3*、*EMX1*、*NKX6-1* につい

て解析することとした。

#### (5) 統計解析

HP 現感染の有無別に、年齢、喫煙習慣、総エネルギー摂取量を調整した上で、血清ポリフェノール類濃度（3分位）毎の胃粘膜 DNA メチル化レベルの調整済み平均値を共分散分析により算出した。血清ポリフェノール類濃度最低群に対する各群の調整した DNA メチル化レベルの平均値について Dunnett の多重比較を行った。すべての統計解析には、SAS Version 9.1 (SAS Inc, Cary, NC) を用い、 $p < 0.05$  (両側検定) を統計学的有意水準とした。



#### 年齢別HP現感染割合 (n=298)

年齢 (歳)	男性 (n=176)	女性 (n=122)
40-49 (n=49)	19%	9%
50-59 (n=89)	41%	39%
60-64 (n=86)	48%	38%
65-69 (n=74)	43%	61%

#### 4. 研究成果

適格基準を満たした 773 名のうち、除外基準に該当した 377 名、研究参加への同意が得られなかった 96 名、研究参加時の上部消化管内視鏡で胃がんが発見された 2 名を除外した 298 名が本研究の対象者となった。迅速ウレアーゼ試験、鏡検法で HP 現感染陽性となった割合を表に示す。

血清抗 HP 抗体陽性 ( $\geq 10\text{U/ml}$ ) は 40%、ペプシノーゲン陽性 (ペプシノーゲン I  $\leq$

70ng/ml かつペプシノーゲン I/II 比  $\leq 3$ ) は 14%であった。抗 CagA 抗体陽性 ( $\geq 10\text{U/ml}$ ) は、抗 HP 抗体陽性者において、69%、陰性者において 31%であった。

血清ポリフェノール測定が可能であった 261 名において、血清ポリフェノール濃度の中央値 (四分位範囲) は以下の通りであった。ダイゼイン: 5.3 (0.0-11) ng/ml、ゲニステイン: 22 (11-51) ng/ml、エピカテキン: 0.0 (0.0-4.5) ng/ml、エピカテキン 3 ガレート: 0.0 (0.0-2.8) ng/ml、エピガロカテキン: 3.1 (0.0-15) ng/ml、EGCG: 2.5 (0.0-9.8) ng/ml であった (検出限界値以下は 0 とした)。

HP 現感染陽性者、陰性者における *miR124a-3* の DNA メチル化レベルはそれぞれ 48%、4% ( $p < 0.001$ )、*EMX1* では 40%、3% ( $p < 0.001$ )、*MX6-1* では 52%、24% ( $p < 0.001$ ) と HP 現感染陽性者において DNA メチル化レベルが高いため、HP 現感染の有無別に血清ポリフェノール類と DNA メチル化レベルとの関連を検討した。

血清ダイゼイン、ゲニステイン、エピカテキン、エピカテキン 3 ガレート、エピガロカテキン、EGCG のいずれにおいても、血清濃度が最も低いグループに比べて、最も高いグループで、検討した 3 遺伝子マーカーのメチル化レベルの有意な低下を認めなかった。

本研究では胃がんの中間マーカーとして期待される DNA メチル化レベルが血清ポリフェノール類と関連しているかどうかを検討したが、統計学的に有意な関連性は認められなかった。今回の分析では、カテキン類において検出限界値以下の割合が 33~60%と高かった。カテキン類は摂取からの半減期が短いので日常的な摂取状況を反映できていない可能性や、分析に伴う誤差から関連性が考えられた。一方、ダイゼイン、ゲニステインについては半減期が比較的長く、ある程度は日常の摂取量を反映できていると考えられる。

#### 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 2 件)

- ① Takeshima H, Yamashita S, Shimazu T, Ushijima T. Effects of genome architecture and epigenetic factors on susceptibility of promoter CpG islands to aberrant DNA methylation induction. *Genomics* 2011;98:182-8. doi: 10.1016/j.ygeno.2011.06.003. 査読あり
- ② Hara A, Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, Shimazu T. et al. Isoflavone intake and risk of gastric cancer: a

population-based prospective cohort  
study in Japan. Am J Clin Nutr  
2012;95:147-54. doi: ajcn.111.020479  
査読あり

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島津 太一 (SHIMAZU TAICHI)

独立行政法人国立がん研究センター・がん  
予防・検診研究センター・研究員

研究者番号：00466202

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：