

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590767

研究課題名(和文)ペルーの地域住民を対象にした胆嚢がん発生に関する環境・遺伝疫学研究

研究課題名(英文)Environmental and genetic factors for the development of gallbladder cancer in Peruvians

研究代表者

山本 正治 (Yamamoto, Masaharu)

新潟医療福祉大学・健康科学部・教授

研究者番号：40018693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ペルー産赤唐辛子からアフラトキシンB1とオクラトキシンA(OTA)が検出された。汚染レベルは低かったが、OTAの平均濃度はチリ、ボリビア、ペルーの順に高く、胆嚢がん発生率と並行であったことから胆嚢がんとマイコトキシンの関係は否定できなかった。胆嚢がん患者のがん部組織からDNAを抽出し、TP53とK-ras遺伝子変異解析を行った。TP53変異率は39%(7/18)で、転移型4例(57%)、転換型2例(29%)、挿入型1例(14%)であった。外因性物質の関与を示唆するG/C→T/A転換及びK-ras遺伝子変異は認められなかった。ペルーにおける本症発生は内因がより強く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The concentrations of aflatoxin (AF) B1, B2, G1, G2 or ochratoxin A (OTA) in red chili peppers from Peru were measured using HPLC methods, and AFB1 and OTA were detected. The mean concentrations of OTA in red chili peppers from Chile, Bolivia, and Peru were higher in the order of the incidence of gallbladder cancer (GBC) among the three countries. These findings suggest the possibility that mycotoxin contamination of red chili peppers are associated with developing GBC. The frequency of TP53 and K-ras mutations in DNA extracted from paraffin embedded tissues of GBC patients were examined. TP53 mutations were found in 7 patients (7/18, 39%), namely 4 of transition type, 2 of transversion type, and 1 of insertion type. However, G:C to T:A transversion suggesting the presence of exogenous carcinogens, and K-ras mutation were not found. Our findings suggest that the development of GBC in Peruvians is more strongly associated with endogenous mechanisms rather than exogenous carcinogens.

研究分野：疫学

キーワード：胆嚢がん 環境要因 遺伝要因 ペルー

1. 研究開始当初の背景

(1) 胆嚢がんは世界的に比較的稀な悪性腫瘍であるが、特定の国(アンデス山脈西側の国、チリ、ボリビア、ペルーなど)や地域(チリ南部、インド北部)で多発しており、発生率に顕著な地域、民族的集積性を示すことが特徴である。

南米では、チリ以外では本症の成因解明研究は進んでいない。ペルーは、胆嚢がん多発国の一つとされており、女性では世界第4位であることが報告されているが、これまでに本症発症に関する環境要因や遺伝的要因に関する報告は少ない。

2. 研究の目的

(1) ペルーにおける胆嚢がん発症に関する環境要因を明らかにするため、トルヒーヨ(胆嚢がん高頻度発生地)、クスコ(同中等度発生地)、リマ(同低頻度発生地)で販売されている赤唐辛子中のアフラトキシン類(アフラトキシン B1、AFB1; アフラトキシン B2、AFB2; アフラトキシン G1、AFG1; アフラトキシン G2、AFG2)の濃度を調べ、各濃度における地域間差の有無を調べた。

さらに、ペルー産赤唐辛子中のオクラトキシン A (OTA) の濃度を調べ、チリ産(サンティアゴで採取、4 種)とボリビア産(ラパスで採取、4 種)赤唐辛子中の OTA 濃度と比較した。

(2) ペルーにおける胆嚢がん発生の分子メカニズムに関する新たな知見を得るため、患者の TP53 及び K-ras 遺伝子変異の出現頻度を調べ、これまでに他の国の患者を対象として得られた結果と比較してペルー特有の遺伝子変異パターンを示すか否かを調べた。本研究結果から、ペルーにおける胆嚢がんの発がん要因や発がん機序の地理的な相違を明らかにし、ペルーにおける胆嚢がん患者の遺伝的特性を評価した。

3. 研究の方法

(1) 赤唐辛子中のマイコトキシン濃度測定

試料: ペルーのクスコで 2 種、リマで 5 種の計 7 種の唐辛子を各都市の中央市場で購入した。トルヒーヨでは乾燥赤唐辛子の入手が不可能であった。乾燥試料は購入後、粉砕機で粉砕して測定に供した。

アフラトキシン類の分離、抽出: 食安監発第 0728004 号に準拠して行った。

アフラトキシン類の濃度測定: HPLC (日立 D-2000 Elite system) を用いて行った。本装置を用いた測定の回収率は、2.5 µg/kg の濃度で AFB1 は 85%、AFB2 は 86%、AFG1 は 90%、AFG2 は 90% であった。また、検出限界は各々 0.1 µg/kg であった。

オクラトキシン A の抽出、濃度測定: 赤唐辛子からの OTA の抽出は Sugita-Konishi et al. の方法 (Talanta, 69, 650-655, 2006) に基づき、メタノール/水と 1% NaHCO₃ (70:30, v/v)

で行い、測定はアフラトキシン類と同様に HPLC 法により行った。本法による 10 µg/kg の回収率は 87%、検出限界は 0.1 µg/kg であった。

(2) TP53、K-ras 遺伝子変異解析

検体: ペルーの首都、リマにある国立がん研究所で 2001 年 5 月から 2015 年 1 月までに胆嚢がんと診断された患者 33 例を対象とした。切除された胆嚢組織はホルマリン固定し、パラフィン包埋された。病理組織学的な診断と DNA 抽出はその代表的な切片を用いて行った。

病理組織学的解析: TNM 分類に準じて組織型を分類した。

DNA 抽出: パラフィン包埋ブロックから切り出した厚さ 10 µm の切片を、キシロールに 10 分間、3 回浸漬したのち 100% エタノールに 7 分間、3 回浸漬することで脱パラフィンを行った。次に、切片からがん部組織を選択的に切り出し、回収した。回収した組織は DNA Isolator PS Kit (和光純薬、大阪) を用いてメーカーの使用説明書に従い、次の手順で DNA を抽出した。組織は 18 µL の酵素反応液とともに 0.5 mL マイクロチューブに入れ、90 で 10 分間加熱した。その後、室温で 10 分間放置したのち、酵素反応促進剤を 2 µL、タンパク質分解酵素を 2 µL を加えて 50 で 60 分間加温した。さらに、酵素反応促進剤 2 µL、タンパク質分解酵素 2 µL を加えたのち、50 で 24 時間加温した。ここで使用した酵素反応液、酵素反応促進剤、タンパク質分解酵素は何れも DNA isolator kit の構成物である。反応溶液からはエタノール沈殿法により DNA を回収し、TE 緩衝液に溶解した。

TP53 遺伝子変異解析: TP53 遺伝子の exon 5~8 における変異を Direct sequence 法で検索した。用いたプライマーの配列は、次の通りである。

exon 5-1: 5'-GACTTTCAACTCTGTCTCCTT C-3'、5'-TGACTGCTTGTAGATGGCCA-3'、
exon 5-2: 5'-CCTGTGCAGCTGTGGGTTGA TT-3'、5'-CAGCTGCTCACCATCGCTATCT-3'、
exon 6: 5'-GCCTCTGATTCCTCACTGAT-3'、
5'-TCCCAGAGACCCCAGTTGCAAA-3'、
exon 7: 5'-CTCATCTTGGGCCTGTGTTAT-3'、
5'-AGTGTGCAGGGTGGCAAG-3'、
exon 8-1: 5'-ACTGCCTCTTGCTTCTCTTTTC -3'、5'-AGGCTCCCCTTTCTTGCGGAGATT-3'、
exon 8-2: 5'-ACGGAACAGCTTTGAGGTGC GT-3'、5'-TTGGTCTCCTCCACCGCTTCTT-3'、

サイクルシーケンス反応は Big Dye Terminator ver.1.1 を用いて、96、10 分を 1 サイクル、96、10 秒、50、5 秒、60、4 分を 25 サイクルのプログラムで行った。シーケンス解析には ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いた。

K-ras 遺伝子変異解析: K-ras 遺伝子の codon 12、13、61 における変異を Direct sequence 法で検索した。プライマーは、codon

12/13 が 5'-GCCTGCTGAAAATGACTGAA-3', 5'-AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3', codon 61 が 5'-TTCCTACAGGAAGCAAGTAG-3', 5'-CACAAAGAAAGCCCTCCCA-3' を用いた。

サイクルシーケンス反応条件および解析機器は TP53 遺伝子変異解析と同様である。

データ解析：TP53 と K-ras 遺伝子変異解析結果からボリビアの胆嚢がん患者の遺伝的特性を評価した。

4. 研究成果

(1) 赤唐辛子中のマイコトキシン濃度

表 1 にペルー産赤唐辛子のアフラトキシン類とオクラトキシン A の濃度を示す。

表 1 ペルー産赤唐辛子のマイコトキシン汚染

試料	アフラトキシン				オクラトキシン	
	B1	B2	G1	G2	A	
クスコ	1	0.9	N.D.	N.D.	N.D.	11.5
	2	1.6	N.D.	N.D.	N.D.	47.1
リマ	1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.8
	4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.6
	5	1.5	N.D.	N.D.	N.D.	32.3

N.D. : 検出限界 (0.1 µg/Kg) 以下

AFB1 が、クスコで購入した 2 試料 (2/2、100%)、リマで購入した 1 試料 (1/5、20%) の計 3 試料から検出された。しかし、AFB2、AFG1、AFG2 は検討した全ての試料から検出されなかった。検出された AFB1 濃度は何れも EC によって提案されている許容濃度 5 µg/Kg 以下を示し、濃度も近似していたことから明らかな地域間差は認められなかった。

OTA は、クスコの 2 試料 (2/2、100%)、リマの 3 試料 (3/5、60%) から検出された。検出された OTA 濃度を EU の基準値 (15 µg/kg) と比較すると、クスコの 1 試料 (1/2、50%)、リマの 1 試料 (1/5、20%) が基準値を超えていた。OTA の平均濃度はリマに比べクスコの方がやや高かったが、OTA にも明らかな地域間差は認められなかった。

表 2 にチリ、ボリビア、ペルーで採取した赤唐辛子中の OTA 濃度を示す。

チリ産では、4 試料中 3 試料から OTA が検出され、その濃度範囲は 163.4 ~ 1059.1 µg/kg であった。ボリビア産では、4 試料すべてから OTA が検出され、その濃度範囲は 0.8 ~ 628.3 µg/Kg であった。ペルー産では 7 試料中 5 試料から OTA が検出され、その濃度範囲は 0.6 ~ 47.1 µg/Kg であった。検出された OTA 濃度を EU の基準値 (15 µg/Kg 以下) と比較すると、チリ産では 3 試料 (3/4、75%)、ボリビア産では 2 試料 (2/4、50%)、ペルー産では 2 試料 (2/7、28.6%) が基準値を超えていた。赤唐辛子中の OTA の平均濃度 (チリ > ボリビア > ペルー) は、各々の国における

表 2 ペルー産赤唐辛子の OTA 汚染

試料	試料採取国		
	チリ	ボリビア	ペルー
1	198.8	1.9	11.5
2	1059.1	0.8	47.1
3	163.4	196.3	N.D.
4	N.D.	628.3	N.D.
5			2.8
6			0.6
7			32.3
平均	355.4	206.8	13.5

N.D. : 検出限界 (0.1 µg/Kg) 以下

N.D. の試料を有する国の平均は、N.D. を 0.1 µg/Kg として計算

胆嚢がんの発生頻度 (チリ > ボリビア > ペルー) と一致していた。

さらに、チリにおける胆嚢がん発症にアフラトキシン B1 が関与している可能性が報告されたことから、ペルー産の生鮮赤唐辛子中のアフラトキシン類とオクラトキシン A 濃度を調べた。トルヒーヨ (胆嚢がん高頻度発生地)、クスコ (同中等度発生地)、リマ (同低頻度発生地) の中央市場で販売されている生鮮赤唐辛子を試料として AFB1、AFB2、AFG1、AFG2 及び OTA 濃度を調べた結果、販売されている生鮮赤唐辛子中からはマイコトキシンは検出されなかった。収穫後の乾燥、包装、輸送、販売での過程でマイコトキシン汚染が拡大していったと考えられ、これらの過程を衛生的かつ確実にを行うことでマイコトキシン汚染の拡大は防止できると考えられた。

(2) TP53、K-ras 遺伝子変異解析結果

病理組織診断の結果、33 例中の 8 例は胆嚢がんと診断されず、7 例は癌の量が少量であったために解析が不能となり、残りの 18 例の解析を行った。

表 3 に本研究で得られた TP 53 遺伝子変異解析結果とこれまでにチリ、日本、ハンガリー、ボリビア患者を対象として得られた結果を示す。

表 3 ペルーにおける TP53 遺伝子変異解析結果

調査国 (都市)	調査年	試料数	変異 (n, %)	変異の内訳 (n, %)			
				転移型	転換型	欠失型	挿入型
ペルー (リマ)	2015	18	7 (38.9)	4 (57.1)	2 (28.6)	0	1 (14.3)
ボリビア (ラパス)	2013	36	18 (50.0)	12 (60.0)	6 (30.0)	2 (10.0)	0
ハンガリー (ブダペスト)	2008	18	6 (33.3)	9 (90.0)	1 (10.0)	0	0
日本 (新潟)	1998	22	11 (50.0)	9 (69.2)	4 (30.8)	0	0
チリ (サンチアゴ)	1998	20	11 (55.0)	12 (100)	0	0	0

ペルー以外の国の患者には、複数の変異を有している患者を含む

ペルー胆嚢がん患者の TP53 遺伝子変異率は 38.9% (7/18) で、ボリビアの 50.0%、ハンガリーの 33.3%、日本の 50.0%、チリの 55.0%と比較しても明らかな差は認められなかった。

変異の内訳は、ミスセンス変異が 5 例 (5/7, 71.4%) サイレント変異とフレームシフト変異 (挿入型) が各々 1 例 (1/7, 14.3%) であった。さらに、転移型変異は C→T 型 2 例、G→A 型 2 例の 4 例 (4/7, 57.1%) 転換型変異は G→C 型 2 例 (2/7, 28.6%) であった。また、挿入型の 1 例 (14.3%) では 1 塩基 (T) 挿入であった。また、CpG サイト転移は 1 例 (14.3%) 認められた。

これらの結果をこれまでに報告されている他の国での結果と比較すると、転移型の頻度 57.1% は、隣国のボリビア患者における頻度 60.0% と最も近似していた。CpG サイト内転移の頻度 14.3% は、ボリビア患者における 15.0% (3/20) と近似していた。さらに、転換型の頻度 28.6% はボリビア患者における 30.0% と最も近似していた。ペルー患者の特徴として、挿入型変異が 1 例 (14.3%) 認められた。

外因性発癌物質の関与を示唆する G/C→T/A 転換はペルー患者では認められなかった。一方、CpG サイト内転移は内因性発癌過程の関与を示唆するものであり、ペルー、ボリビア、チリ、ハンガリーの患者で認められた。

一方、ハンガリーとボリビア患者認められた K-ras 遺伝子変異は、ペルー患者では認められなかった。

ペルー胆嚢がん患者における TP53 遺伝子変異の頻度は他の胆嚢がん多発国、チリ、日本、ハンガリー、ボリビアで得られた結果と近似していたが、転移型の割合、転換型の割合、CpG サイト内転移の頻度はボリビア患者と類似していた。これらの結果から、ペルーにおける胆嚢がん発生には外因よりも内因がより強く関与していることが示唆された。

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)

Ikoma T, Tsuchiya Y, Asai T, Okano K, Ito N, Endoh K, Yamamoto M, Nakamura K. Ochratoxin A concentration of red chili peppers from Chile, Bolivia, and Peru, countries with a high incidence of gallbladder cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 査読有, 2015, 16, 5987-91.

Asai T, Tsuchiya Y, Okano K, Piscocoya A, Nishi CY, Ikoma T, Oyama T, Ikegami K, Yamamoto M. Aflatoxin contamination of red chili pepper from Bolivia and Peru, countries with high gallbladder cancer incidence rates. Asian Pac J Cancer Prev.

査読有, 13, 2012, 5167-70.

〔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：
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

山本 正治 (YAMAMOTO, Masaharu)
新潟医療福祉大学・健康栄養学科・教授
研究者番号：40018693

(2)研究分担者

遠藤 和男 (ENDO, Kazuo)
新潟医療福祉大学・健康栄養学科・教授
研究者番号：60176790

土屋 康雄 (TSUCHIYA, Yasuo)
新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：60334679

浅井 孝夫 (ASAI, Takao)
新潟医療福祉大学・臨床技術学科・助教 研
究者番号：60612736