

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305026

研究課題名(和文) DNA付加体の網羅解析を用いた中国の食道・噴門部胃がん多発地域の発がん要因の探索

研究課題名(英文) Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis)

研究代表者

戸塚 ゆかり (Totsuka, Yukari)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：40373401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,300,000円

研究成果の概要(和文)：食道がん・噴門部胃がん多発地域(磁県；n=7)及び低発地域(石家荘；n=8)の食道がんの手術検体(非癌部)から抽出したDNAを用いて、アダクトーム解析を行なった結果、高発地域に特徴的である付加体のうちのひとつがTHP-dGであることが推測された。この付加体はN-ニトロソピペリジン(NPIP)由来の付加体であり、ラットに食道癌及び肝臓がんを誘発することが報告されている。NPIPの食道癌発症との関係調べるため、THP-dGの分析を行なった結果、両地域住民からTHP-dG付加体が検出されたが、その陽性頻度及び曝露レベルともに高発地域住民で高い傾向があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Ci Xian, one of the high-risk areas in China, demonstrates a much higher incidence when compared with other urban areas in China. To address the etiology of esophageal cancer in Ci Xian, we carried out a comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome) using surgical specimens collected from esophageal cancer patients living in high- and low-risk areas. The results of principal component analysis showed that THP-dG, which was derived from N-nitrosopiperidine (NPIP), emerged as a major DNA adduct. In order to confirm the relationship between NPIP and esophageal cancer development, the THP-dG levels using biological samples collected from subjects residing in both high- and low-risk areas were analyzed. Levels and detection rates of THP-dG seemed higher in the high-risk area compared to those of the low-risk area.

研究分野：化学発がん

キーワード：アダクトーム

### 1. 研究開始当初の背景

中国河北省南部の磁県は食道がんの多発地域として知られている。この地域では、この30年で食道がんの罹患率は減少傾向を示しているとは言え、他の地域や日本と比較すると未だに高い。また、この地域では噴門部胃がんの罹患数も多いことが特徴的であり、噴門部胃がんの罹患数に関してはこの20年で5倍程度増加している。これまでの調査結果から、硝酸塩の摂取、低栄養、家族歴等が食道がんの発生に関係しそうなことが報告されている。しかしながら、これらの地域における食道がん、噴門部胃がんの要因は未だに不明である。

一方、最近、DNA付加体を網羅的に解析しカタログ化する方法(アダクトーム法)が確立された。この方法は、genome DNAを酵素消化した後にLCで分離し、Q-ToFMSで解析することによりDNA付加体の全体像を把握することを可能とした方法である。更に、本解析に用いるQ-ToFMSでは、個々の付加体の精密質量及び解離パターン等も併せて解析可能であることから、既知付加体の解析だけでなく、未知付加体の化学構造の同定も可能となる。

アダクトーム法で食道がん多発地域住民に特異的なDNA付加体の同定が出来れば、これら地域の発がん要因の本体が解明されると思われる。

### 2. 研究の目的

中国の食道がん多発及び低発地域住民のDNA付加体を網羅的に解析することにより各地域の曝露の実態を明らかにし、食道がん多発地域に特異的なDNA付加体を見出し、その付加体の起源から、がんの発症要因を探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

食道がん・噴門部胃がん多発地域(磁県; n=7)及び低発地域(石家荘; n=8)において、食道がん及び噴門部胃がんの手術検体からgenome DNAを抽出し、酵素を用いてモノヌクレオシドに分解する。得られた試料を高速液体クロマトグラフィーで分離後にESI/Q-TOF-MSで分析する。データの解析はソフトウェアを用い、多発地域で生成量が多いあるいは特異的に観察されるDNA付加体のスクリーニングを行なった。候補となるDNA付加体の精密質量から推定された分子式データ、DNA付加体のMS/MS解析によるフラグメントパターン及び構築したデータベース、または既存のメタボローム解析用のデータベース等の情報を組み合わせて、DNA付加体の化学構造式を推定する。付加体の構造が推定出来た場合には、そのDNA付加体を別途合成し、各種データ(LCの保持時間、精密質量数、フラグメントパターン等)が一致するかどうかを確認する。さらに、付加体の起源が推測できた場合、実際にヒト発がんに関与

するかどうかを実験動物などを用いて検証する。

### 4. 研究成果

食道がん・噴門部胃がん多発地域(磁県; n=7)及び低発地域(石家荘; n=8)の食道がんの手術検体(非癌部)から抽出したDNAを用いて、アダクトーム解析を行なった結果を図1に示す。両地域において多量なDNA付加体が検出されていることがわかった。この多量に観察されているDNA付加体の中から、それぞれの地域に特徴的な付加体を探索するために、PCA分析をおこなった(図2)。最終的に、高発地域に特徴的な付加体として4種(A10, A11, A15, A45)、低発地域に特異的な付加体として2種(A130, A410)がスクリーニングされた。次に、スクリーニングされたDNA付加体のm/z値を昨年度構築した付加体データベースと比較し、同定を試みたところ、高発地域に特徴的である付加体A10[m/z; M+1: 352.18]が既知付加体であるN<sup>2</sup>-(3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-2-yl) deoxyguanosine (THP-dG, m/z; 351.16)であることが推測された。この付加体はN-ニトロソピペリジン(NPIP)由来の付加体であり、ラットに食道癌及び肝臓がんを誘発することが報告されていることがわかった。有機化学的にTHP-15N-dG標準品を合成し、定量的質量分析機器を用いて、アダクトーム解析を行った高発地域の手術検体を分析した。その結果、THP-15N-dGと同じ保持時間にm/z: 352.2→236.1のシグナルを持つピークが観察され、これら試料中にTHP-dGが存在することがわかった(図3)。

また、THP-dGの曝露レベルを調べるため、中国の食道癌高発および低発地域住民の血液サンプル(磁県; n=10, 石家荘; n=5)の分析を行なった結果、両地域住民からTHP-dG付加体が検出されたが、その陽性頻度及び曝露レベルともに高発地域住民で高い傾向があることがわかった。更に、NPIPの変異原性についてバクテリアを用いた*in vitro* 遺伝毒性試験により検討した結果、代謝活性化酵素の存在下で高い変異原性を示した。変異スペクトラム解析の結果、NPIPはC→Tのトランジションを顕著に誘発することがわかった(図4)。

NPIPを0.0075及び0.015%の濃度で22週間、ラットに飲水投与したところ、60%~100%に乳頭腫瘍が、13~33%に扁平上皮癌を形成した。現在、これら腫瘍の全ゲノム解析を行っており、NPIPに由来する変異パターンの解析を行っている。

更に、中国の食道癌高発および低発地域住民の食道癌の全エクソン解析も行っており、今後、NPIPに暴露したバクテリア、実験動物腫瘍及びヒト食道癌における変異のパターンを相互に比較し、NPIPがこの地域の食道癌発生に寄与しているかどうかを検証する予定である。

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 1 件)

1. Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H. Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China. J Epidemiol. 2013, 23:233-42. 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

1. 戸塚ゆ加里、中釜 斉: 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明 第 42 回日本毒性学会学術大会. 2015 年 7 月
2. Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiko Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama : Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月
3. 戸塚ゆ加里: ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索, 第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 12 月
4. 戸塚ゆ加里、中釜 斉, 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析により発がんに関わる DNA 付加体を探索する Exploration of DNA adducts contributing to cancer development using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 41 回毒性病理大会. 2014 年 7 月
5. 池田 茜、加藤 護、柴田龍弘、黒坂 功、林 櫻松、松島芳隆、遠藤 治、中釜 斉、戸塚ゆ加里、中国における食道癌発症要因の集学的アプローチによる解明、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月

[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  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸塚 ゆ加里 (TOTSUKA Yukari)

研究開発法人 国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野・ユニット長  
研究者番号 : 40373401

(2) 研究分担者

林 櫻松 (Lin Yingsong)

愛知医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 50340302

図1 中国食道がん手術検体のアダクトームマップ

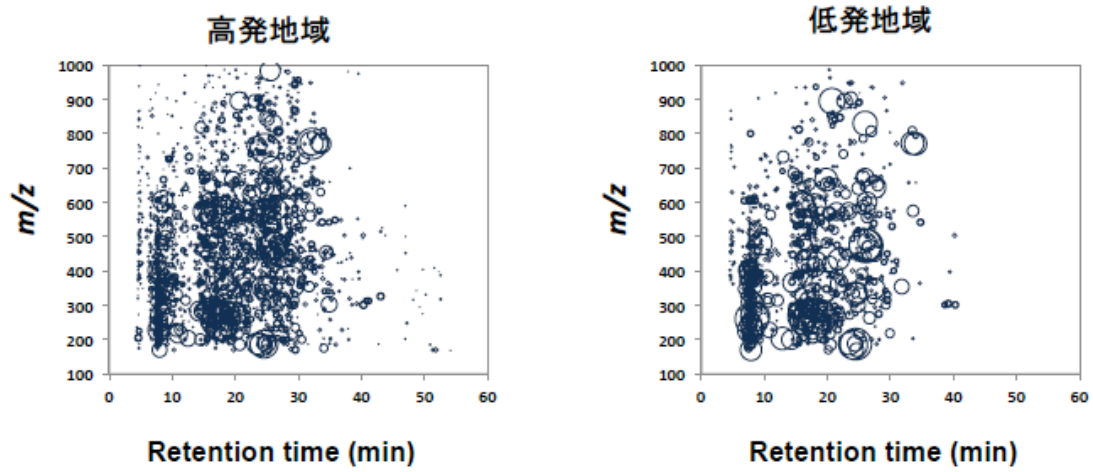


図2 PCA分析によるスクリーニング

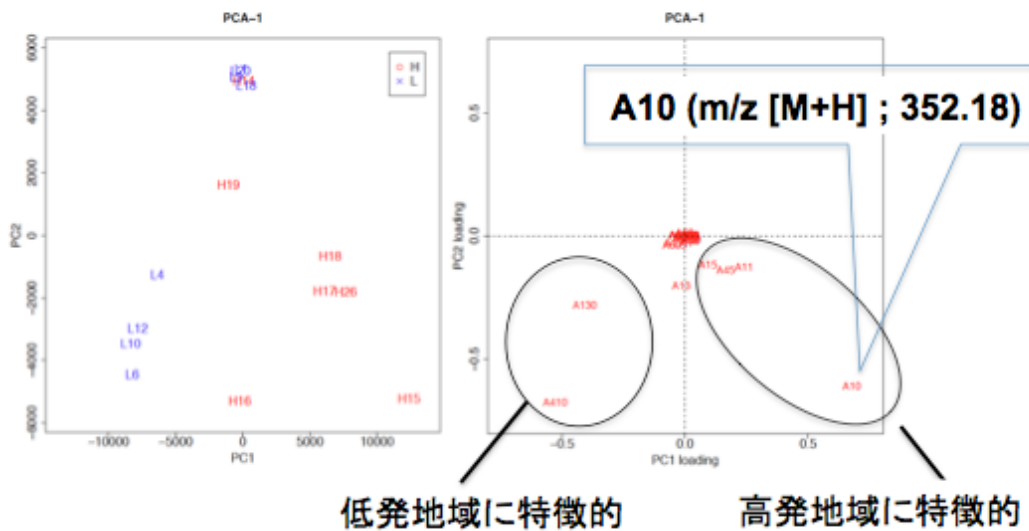


図3 食道がん高発地域の手術検体からのTHP-dGの検出

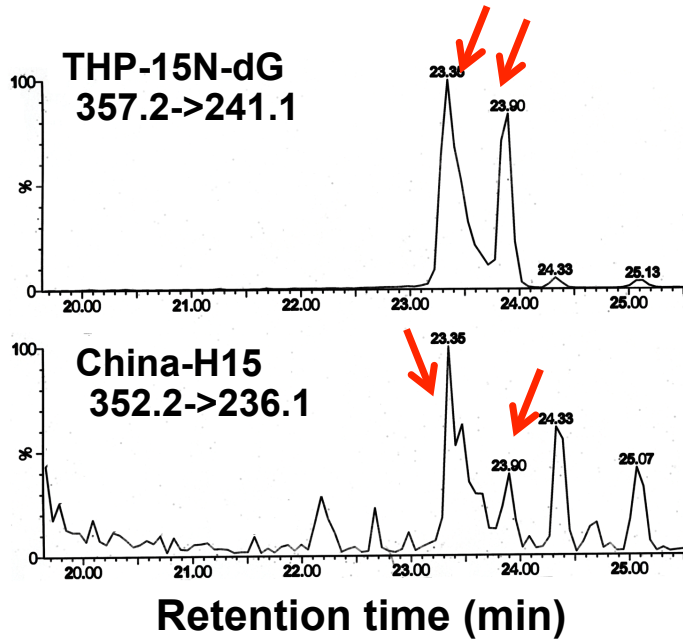


図4 NPIPの変異原性と変異プロファイルの解析

