

15 - 22 環境化学発がん物質の曝露評価法の開発及び疫学研究への応用による発がんリスク評価に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 花岡 知之

研究成果の要旨

LC/MS/MS を用いた DNA 付加体の網羅的分析法の開発に着手した。尿中 8-OH-dG/Cre 値または 8-OH-dG/7-MG 値を迅速に評価できる分析法を開発した。アミノフェニルノルハルマンは全ての 24 時間尿サンプルから検出され、喫煙者で 49-449 pg、非喫煙者で 21-594 pg であった。DNA 付加体量の体内分布の検討のために解剖遺体の臓器各部位を系統的に保存し DNA を採取した。尿中 8-OH-dG と尿中エテノ dA との間に弱いながら相関がみられた。毛髪中 PhIP 量と食事調査から把握した焦げの摂取とは良く相関していた。喫煙習慣と OGG1、SLC6A4、EPHX1、ESR1、CYP17A1、飲酒習慣と ALDH2、NUDT1 の SNPs とに関連がみられた。OGG1 遺伝子の Ser326Cys 多型が胃炎と胃癌との関連を修飾することを観察した。MYH の新たなスプライス部位の多型 IVS10-2A>G を発見した。Eph-Ephrin 系を対象として、種々の外部因子あるいは内部因子による影響および機構を解析し、腫瘍の生物学的多様性を検討した。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
花岡 知之	国立がんセンターがん予防・検診研究センター 室長	多環芳香族炭化水素曝露の体内曝露指標および DNA 付加体による評価
市場 正良	佐賀大学医学部 助教授	多環芳香族炭化水素 DNA 付加体の検討
河井 一明	産業医科大学産業生態科学研究所 助教授	酸化 DNA 付加体の検討
戸塚 ゆ加里	国立がんセンター研究所 研究員	生体試料中のヘテロサイクリックアミンの定量
梶村 春彦	浜松医科大学 教授	環境発がん物質の内部曝露を修飾する感受性要因の検討

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、多環芳香族炭化水素、ヘテロサイクリックアミン、酸素ラジカルなど重要な化学発がん物質・要因について、体内内部曝露量や DNA 付加体量を指標とする曝露評価の妥当性を検討し、がん疫学への応用可能性をさぐることである。がん疫学研究において環境要因と発癌との関係をみえにくくしている代謝活性化・解毒・DNA 修復などの酵素活性の個人差を、このよ

うな曝露評価のアプローチで克服できるかどうかを確認するために、酵素活性などの個人差についても考慮しながら検討を行う。今年度は、昨年度に引き続き、内部曝露量や DNA 付加体量について、分析法の妥当性の検討、体内の曝露量分布、曝露指標間の相互関係、複合曝露の影響、個人差に関する要因、について多面的に検討する。

2 研究成果

本年度の成果は、以下の通りである。

分析法については、DNA 付加体についてより信頼性の高い分析方法を確立するために、高感度分析法に関する検討を昨年度から継続して行なった。今年度新たに LC/MS/MS を用いた DNA 付加体の網羅的分析法の開発に着手した。LC/MS/MS によってデオキシヌクレオシドの分析を行なうと、コリジョンセルでデオキシリボースと塩基間のグリコシド結合が開裂し塩基部分の娘イオン (DNA 付加体) が検出されるという特徴を利用して、分析できる分子量の範囲の全ての付加体を検出するという方法である。この方法で肝臓から抽出した DNA を分析すると、数多くの DNA 付加体ピークを検出することができた。今後、この方法を確立し、最終的にはヒト体内における付加体データベースの作成をめざす。また、この方法を利用して、付加体の出来方を総合的にとらえて癌との関係を検討することが可能かどうかについても検討を行なう (花岡、研究協力者: 京都大学松田)。

昨年度に引き続いて、多検体を処理できる、多環芳香族炭化水素 DNA 付加体の化学発光を利用した高感度検出法について検討を行なったが、再現性に問題があり応用に耐え得るような結果は得られなかった (花岡)。

尿中 8-OH-dG を測定する場合、通常クレアチニン (Cre) 等の濃度補正物質を別途測定し 8-OH-dG/Cre を算出するため、試料の採取、保存、分析、データの解析において煩雑な手続きが必要であった。今年度、8-OH-dG と同時に Cre および RNA の分解物である 7-メチルグアニン (7-MG) を分析することに成功した。HPLC による Cre 測定値と従来の Jaffe 法による測定値は良い相関を示した。また、ラット尿中 Cre 量と 7-MG 量の相関係数は 0.9 であり、ヒトとマウス尿における Cre 量と 7-MG 量の相関係数は 0.8 と良い相関を示したことから、8-OH-dG/Cre 値または 8-OH-dG/7-MG 値を迅速に評価することが可能となった。またマウス、ラットにおける 7-MG/Cre 値はヒトのそれよりも数倍高く、7-MG/Cre 値と静止代謝率との関係が明らかとなった (河井)。

18 名のボランティア (喫煙者 9 例、非喫煙者 9 例) について 24 時間蓄尿サンプルを用い、アミノフェニルノルハルマン (APNH) ならびに、その前駆体であるノルハルマンおよびアニリンの定量を行った。APNH およびノルハルマンは、ブルーレーヨンで尿サンプルから抽出後、HPLC で精製を行い、APNH は LC/ESI/MS/MS を用い、ノルハルマンは HPLC 蛍光検出器を用いて定量を行った。一方、アニリンは誘導体化処理をした後、GC-NPD を用いて定量を行った。その結果、全てのサンプルから APNH が検出された。24 時間尿あたりの APNH の量は、喫煙者

で 49 - 449 pg、非喫煙者で 21 - 594 pg であり、喫煙者と非喫煙者の間における明確な差異は認められなかった。一方、APNH の前駆体であるノルハルマンおよびアニリンも全てのサンプルから検出され、その 24 時間尿あたりの量は、ノルハルマンは喫煙者で 46 - 185 ng 及び非喫煙者で 52 - 447 ng、アニリンは喫煙者で 0.7 - 8.1 mg 及び非喫煙者で 0.5 - 5.7 mg であった。APNH の場合と同様に、喫煙者と非喫煙者の間に差は認められなかった。喫煙以外に食事や生体内生成の影響があることが示唆された。今後、APNH の生成に対する食事の影響を詳細に調べるために、術後絶食期間中に栄養点滴をうけている患者の尿中 APNH、ノルハルマン、アニリンについて検討を行なう (戸塚)。

DNA 付加体量の体内分布の検討のために、解剖遺体 25 体の肺、食道、胃、脾臓、結腸、直腸、肝臓、腎臓、膀胱、乳腺、前立腺、血液の各臓器各部位を系統的に保存しそれらの臓器から DNA を採取し保存した (花岡、研究協力者: 東京医科大学中村)。これらの臓器について、ボストラベリング法で芳香族付加体の分析を開始した (市場)。

複合曝露の影響については、ベンゾピレン (BaP) DNA 付加体形成へのエタノール同時曝露の影響を、アセトアルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスを用いて検討している。マウスに 2 % エタノールを 8 週間自由飲水させ人の飲酒状態と仮定し、対照群マウスには水を自由引水させ、両群にベンゾピレン 100mg/kg 体重を腹腔投与し、5 日後に肺と胃の BaP-DNA 付加体を測定した。この投与レベルで明らかな DNA 付加体を検出できることは前年度に確認している。飲酒群で高い傾向はあるが有意差はなかった。投与するエタノールとベンゾピレンの投与レベルの組み合わせおよび ALDH2 遺伝子欠損マウスでの影響について検討を継続している (市場)。

DNA 付加体間の相互関係については、閉経後非喫煙女性 30 名について尿中 8-OH-dG と尿中エテノ dA との関係を観察したところ、多変量解析で弱いながら相関がみられた (河井)。

実際に進行中の疫学研究へのこのような曝露指標の応用については、前年度に毛髪中 PhIP の LC-MS による分析を確立したので、本年度は食事調査のデータとの関係について検討を行なった。毛髪中 PhIP は魚と肉の焦げの摂取とよく相関しており、日常的なヘテロサイクリックアミン曝露のバイオマーカーとなると考えられた。毛髪中ヘテロサイクリックアミンを指標として、大規模疫学研究の食品摂取頻度調査票からの推定摂取量の妥当性の

検討を開始した。来年度には推定摂取量と大腸癌などの関連を調べる疫学研究にこの結果を応用できる予定である（花岡、研究協力者：昭和学院短大小林）。

個人差の影響については、昨年度、日本人での頻度を確認した、曝露評価における個人差を生じる要因として今後の妥当性研究で考慮する予定である代謝酵素の遺伝子など 47 の遺伝子の 284SNPs について基本的な環境要因である喫煙、飲酒との関連を検討した。喫煙習慣と OGG1、SLC6A4、EPHX1、ESR1、CYP17A1 の SNPs、飲酒習慣と ALDH2、NUDT1 の SNPs とに統計学的に有意な関連がみられ、これらの SNPs を疫学研究に利用する場合には曝露指標との交互作用を算出できないことが示された（花岡）。

胃癌の症例対照研究において、OGG1 遺伝子の Ser326Cys 多型が胃炎と胃癌との関連を修飾していることを観察した。DNA 酸化損傷のマーカーのレベルがこの SNP で修飾される可能性が示された（花岡）。

スプライス異常をおこす多型遺伝子多型のうち、KLK12、MYH、Neil1 について、異常タンパクの産生や、局在の異常、機能の異常を検索した（梶村）。

MYH の新たなスプライス部位の多型 IVS10-2A > G がみつかった。これは家族集積性胃癌の発端者 20 名中 2 例にみとめられた。この多型を、胃癌の症例対照研究のサンプルを使用して検討したところ、ヘテロ型においてはリスクの上昇はみられなかったが、症例群にホモ型（MYH 修復能が欠損）が 1 例みられた。大腸がんにおいて検討中である（梶村）。

Eph-Ephrin 系を対象として、種々の外部あるいは内部の因子、たとえばリガンドなどによる影響および機構を解析し、腫瘍の生物学的多様性を検討した（梶村）。

発癌曝露要因を定量できるかどうかの準備段階として、ベンツピレンを高濃度曝露した動物組織を microdissection してからの DNA 解析の可能性、さらに、化学発癌物質がゲノムに及ぼす影響をゲノムワイドに考察する方法について検討中である。（梶村）。

3 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、曝露要因に関する研究については疫学研究倫理指針、遺伝子多型の解析については遺伝子解析倫理指針に従って行っている。研究対象者からの新規のサンプル採取に際しては、同意を取得し、データは各研究の担当者が厳重に管理する。必要に応じて動物実験を行うが、各所属施設の動物実験倫理指針に従い、最小限の犠牲で合理的な実験を行

うよう配慮している。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Hashimoto, H., Hanaoka, T., et al., Analytical method of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in human hair by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B, 803:209-213, 2004.
2. Tsukino, H., Hanaoka, T., et al., hOGG1 Ser326Cys Polymorphism, Interaction with Environmental Exposures, and Gastric Cancer Risk in Japanese Populations. Cancer Sci., 95:977-83, 2004.
3. Tao, H., Hanaoka, T., Sugimura, H., et al., A novel splice-site variant of the base excision repair gene MYH is associated with production of an aberrant mRNA transcript encoding a truncated MYH protein not localized in the nucleus. Carcinogenesis, 25:1859-1866, 2004.
4. Liu, Y., Hanaoka, T., et al., Association of habitual smoking and drinking with single nucleotide polymorphism (SNP) in 40 candidate genes: data from random population-based Japanese samples. J. Hum. Genet., in press.
5. Tyurina, Y., Kawai, K., et al., The plasma membrane is the site of selective phosphatidylserine oxidation during apoptosis: role of cytochrome C. Antioxidants redox signalling, 6:209-25, 2004.
6. Hirano, T., Kawai, K., Detection of a mouse OGG1 fragment during caspase-dependent apoptosis: Oxidative DNA damage and apoptosis. Cancer Sci., 95:634-638, 2004.
7. Totsuka, Y., et al., Mutagens formed from b-carboline with aromatic amines. J. Chromatogr. B, 802:135-141, 2004.
8. Nishigaki, R., Totsuka, Y., et al., Identification of cytochrome P-450s involved in the formation of APNH from norharman with aniline. Mutat. Res., 562:19-25, 2004.
9. Kawamori, T., Totsuka, Y., et al. Carcinogenicity of aminophenylnorharman, a possible novel endogenous mutagen, formed from norharman and aniline, in F344 rats. Carcinogenesis, 25:1967-1972, 2004.
10. Furuta, T., Sugimura, H., et al., Polymorphism of Interleukin-1b affects the eradication rates of helicobacter pylori by triple therapy. Clin. Gastroenterol. Hepatol., 2:22-30, 2004.
11. Kataoka, H., Sugimura, H., et al., Correlation of EPHA2

Overexpression with High Microvessel Count in Human Primary Colorectal Cancer. *Cancer Sci.*, 95:136-141, 2004.

12. Smits, K., Sugimura, H., et al., Association of metabolic gene polymorphisms with tobacco consumption in healthy controls. *Int. J. Cancer*, 110:266-70, 2004.
13. Tao, H., Sugimura, H., et al., A novel splice-site variant of the base excision repair gene MYH is associated with production of an aberrant mRNA transcript encoding a truncated MYH protein not localized in the nucleus. *Carcinogenesis*, 25:1859-1866, 2004.
14. Shinmura, K., Sugimura, H., et al., Splice-Site Genetic Polymorphism of the Human Kallikrein 12 (KLK12) Gene Correlates with No Substantial Expression of KLK12 Protein Having Serine Protease Activity. *Hum. Mutat.*, 24:273-274, 2004.
15. Watabnabe, Y., Sugimura, H., et al., Amplicons on human chromosome 11q are located in the early/late-switch regions of replication timing. *Genomics*, 84:796-805, 2004.
16. Shinmura, K., Sugimura, H., et al., Inactivating mutations of the human base excision repair gene NEIL1 in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 25:2311-2317, 2004.

日本語論文

1. 市場正良、白血球 DNA 付加体を指標とした環境発がんのリスク評価、*日本衛生学雑誌*、59 : 311 - 316、2004.
2. 河井一明、他、酸化ストレスによる 8-OH-dG の生成と修復酵素の応答、*環境変異原研究*、26 : 143 - 148、2004
3. 戸塚ゆ加里、Norharman の co-mutagenic 作用機構に関する研究、*環境変異原研究*、26 : 45 - 50、2004.