

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 浜松医科大学 梶村 春彦

研究成果の要旨

ヘテロサイクリックアミンの毛髪中の量が、詳細な食事歴からの推定値によく合致したため、喫煙量やCagAといった客観的な、あるいは従来から比較的信頼性があるとされている曝露指標の一部の非常に容易で非侵襲的な推定が十分科学的たり得ることがわかった。この数値を考慮して、遺伝的リスクとしての遺伝子多型評価ができることになった。このような環境要因や、生活習慣を考慮した症例対照研究をもちいて、DNA多型解析をおこなうことにより、今年度は、酸化 DNA 修復酵素 MYH の上流部の多型が大腸がんの、また CDH1 のプロモーター部位の多型が胃がんのリスクになることを明らかになった。やけこげなど食事中の変異原物質の探索に端を発したアミノフェニルノルハルマンも実際のヒトで検出され、酸化 DNA 障害の指標である 8-OH グアニン測定も生活習慣指標になるレベルにまで到達した。また過酸化脂質付加体 4-oxohectanal の生成を同定した。さらに、ヒト組織中に複数の DNA 付加体が存在することをしめし、アダクトームともいべき網羅的付加体検出へといった本分野の未来像を得た。

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
梶村 春彦	浜松医科大学 教授	DNA 付加体に関する検討および環境要因への遺伝的感受性に関する検討
池田 仁子	国立がんセンターがん予防・検診研究センター 研究員	環境化学発がん物質の生体内曝露を修飾する遺伝素因に関する研究
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
小林 実夏	昭和学院短期大学 助教授	ヘテロサイクリックアミンの曝露評価とその疫学研究への応用
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 助教授	酸化 DNA 付加体の検討

研究報告

1 研究目的

本研究は、環境中の発がん物質がヒトでどのような状況でさらにその遺伝的素因などとどのように相互作用しているかを明らかにすることにより、疫学応用可能な発がんリスク評価を行うことを目的とする。

2 研究方法

まず、ヘテロサイクリックアミンが実際の食事に含まれていることをもとに、食物摂取量の調査を行い、さらに毛髪中のヘテロサイクリックアミンの検出、定量を

おこなった。ブルーレーヨン法で抽出し、LC-MS により同定した。メラニン測定量による補正をおこなった。食生活習慣のアンケート表の項目を適宜一次式で推定式を与えると、実測した値と高い相関があり、そのグラフから、質問票データを曝露量値へ変換した。

さらに実生活で重要と思われるヘテロサイクリックアミンをヒト検体（尿など）での環境変異原とくにアミノフェニルノルハルマンのヒト体内における存在を確認するために、喫煙者を含むがん患者の尿から変異原を同定した。また、手術直後の食事摂取のない患者 24 時間尿のものも、ブルーレーヨン法、HPLC 精製、GC-NPD で定量した。

また、詳細な疫学情報とくに食事歴、喫煙歴をもった、消化器がんの症例対照 DNA を用いて、酸化的 DNA 障害修復酵素 MYH の多型、CDH1 の多型などを調べた。さらに、末梢肺組織などで生じる早期肺病編（過形成）に喫煙などの生活習慣が関与するか、染色体数の変化を調べることで検討した。また、食生活では緑茶成分のエピガロカテキン投与マウスでメチル化減少をメチル化感受性および非感受性制限酵素による切断後に PCR をかけることで半定量した。さらにヒトにおける global methylation を methylation sensitive amplification fragment length polymorphism 法を適用してみた。methylation sensitive な酵素で DNA を切断後、arbitrary primer に FITC ラベルしたもので PCR をおこない、島津シーケンサ DSQ600 でバンドの個体差を同定するものである。鈴木、Perucho らのがん部、非がん部の比較方法にならって、その hyper および hypomethylation の状況を評価した。酸化的 DNA 障害が実際の生活上どのように関わるかをさらに詳しく調べるため、今年度は、赤身肉にふくまれるヘムによって食品中の多価不飽和脂肪酸が酸化されることを想定し、常温でこれらと dGuo を混合することによって生じた化合物を質量分析などで解析した。

芳香族炭化水素の飲酒との相乗作用を検討するためにアルデヒド脱水素酵素欠損マウスのホモおよびヘテロ体にエタノールを投与して、さらに腹腔内にベンゾピレンを投与し、5 日後ポストラベル法により、BaP 不可体を測定した。

3 研究成果

毛髪をつかったヘテロサイクリックアミン (PhIP) の定量をおこなうと、食事質問票から、換算した焦げの食事情況と良好な相関関係がみられた。r 値は豚、鳥、総焼肉摂取量それぞれ、0.46、0.53、0.68 であった。

CDH1 のプロモーター部位を含むハプロタイプ解析により、胃リスクを有意に上昇させるハプロタイプを得た。単独 SNP で、環境要因を調整するとリスクは検出されない。さらに、修復酵素 MYH の上流部位の新多型を見いだし、変異型が、PXR/RXR と結合するコンセンサス配列にかかわることを見いだした。この部位は、喫煙などを調整した範囲で、2 弱の有意な大腸がんリスクの上昇をみとめ、PXR/RXR の上流にあるリガンド（食品中）との影響が推察され、現在機能解析中である。

高感度染色体数異常の検出により、非喫煙者の肺腺癌の前癌病変で、染色体の数的異常がすでに生じていることが明らかになった。男性に程度が強いが、喫煙歴や喫煙量との関連はなく、その原因探索が課題である。

ヒト組織中に複数の付加体を検出することができた。（論文審査中）

また、アミノフェニルノルハルマンは全尿中に 0.013-0.165ng 検出された。

酸化 DNA 付加体として、環境中の試料から、4-oxo-2-hexenal DNA 付加体の形成を確認でき、測定系を確立した。

乳がんの症例対照 DNA の設定をおこない、生活習慣情報などを含んだ 400 対を収集した。

4 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、遺伝子解析研究、および疫学研究に該当するものについては、指針にそって、各施設の関連委員会で承認済みである。付加体や epigenetic な変化の研究は上記にはあたらないものの、それに準ずる注意が必要な研究として、関連委員会のある場合はその承認を得ている。該当委員会がない場合も、連結不可能匿名化をおこない、情報管理を徹底して行っている。

5 研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Nakamura, R., Sugimura, H. et al. EPHA2/EFNA1 expression in human gastric cancer. *Cancer Sci.* 96: 42-47, 2005.
2. Yamada, H., Sugimura, H. et al. Detection by methylation sensitive restriction endonuclease digestion and PCR. *J. Food, Agriculture & Environment.* 3: 73-76, 2005.
3. Sano, T., Sugimura, H., et al. Chromosomal numerical abnormalities in early stage lung adenocarcinoma. *Pathol. Int.* 56:117-25, 2006.

4. Kobayashi, M., et al.
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) level in human hair as biomarkers for dietary grilled/stir-fried meat and fish intake. *Mutat Res.* 588:136-142, 2005.
5. Tsubono, Y., Kobayashi, M., et al. No association between fruit or vegetable consumption and the risk of colorectal cancer in Japan. *Br J Cancer.* 92:1782-4, 2005.
6. Iidaka, T., Totsuka, Y. Lack of elevated liver carcinogenicity of aminophenylnorharman in p53-deficient mice. *Cancer Lett.* 217: 149-159, 2005.
7. Kasai, H., Kawai, K., et al. Simultaneous determination of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative stress, and creatinine, a standardization compound, in urine. *Industrial Health*, 43, 333-336, 2005.
8. Imai, K., Kawai, K., et al. Induction of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 gene expression by HIV-1 Tat. *J Biol Chem*, 280: 26701-26713, 2005
9. Ikeda, S., et al. Functional analysis of four naturally occurring variants of human constitutive androstane receptor. *Mol. Genet. Metab.*, 86:314-9, 2005
10. Kurose, K., Ikeda, S., et al. 5' diversity of human hepatic PXR (NR1I2) transcripts and identification of the major transcription initiation site. *Mol. Cell. Biochem.*, 273:79-85, 2005.

日本語論文

1. 梶村春彦 肺癌の要因と個体特性 田島和雄監修
がん予防の最前線、昭和堂、2005.
2. 梶村春彦 遺伝子多型と発がんリスク 鶴尾隆、谷口
維紹編集、がん研究のいま 4 田島和雄。古野純典
編 がんの疫学、東京大学出版会、2006.