Association between genetic polymorphisms of the base excision repair gene MUTYH and increased colorectal cancer risk in a Japanese population

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 陶, 弘 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/87

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第　５１１号	学位授与年月日	平成２０年　３月１７日
氏　　名	陶　　弘		
論文題目	Association between genetic polymorphisms of the base excision repair gene MUTYH and increased colorectal cancer risk in a Japanese population (塩基除去修復遺伝子 MUTYH 多型の日本人大腸癌リスクとの相関)		

博士（医学）　陶　　弘

論文題目

Association between genetic polymorphisms of the base excision repair gene MUTYH and increased colorectal cancer risk in a Japanese population

（塩基除去修復遺伝子MUTYH多型の日本人大腸癌リスクとの相関）

論　文　の　内　容　の　要　旨

［はじめに］

細胞DNAは常に環境やそれ自身の代謝によって酸化的ストレスを受けている。酸化的化合物によって突然変異を起こし、その変異が修復されずに複製されると、遺伝情報が変わって、細胞の癌化につながると考えられている。細胞内にはこのような酸化的損傷を監視し修復する酵素が備わっている。その1つMutYヒト相同体（MUTYH）は変異原性を持つ酸化的化合物8-hydroxyguanineと誤って結合するadenineを切除修復する酵素である。この塩基除去修復遺伝子MUTYHにおける生殖細胞系ホモ接合性の突然変異は、多発性大腸腺腫や大腸癌と関連することが2003年に報告された。この症候群は、MUTYH関連ポリポーシス（MAP）と呼ばれている。しかし、MAPの原因となるMUTYHの2つの主要な変異型は、日本人を含む東アジア人では見つかっていない、また、MUTYHの一塩基多型（SNP）と大腸癌リスクとの関連は調べられていない。そこで、九州地方の福岡大腸癌症例対照研究を用いて、日本人に存在するMUTYHの多型から日本人に報告のあったSNPをターゲットに日本人散発性大腸癌リスクとの相関を検討した。

［対象ならびに方法］

対象は、福岡市とその周辺区域から文書同意を得た上で収集された大腸癌患者と、年齢合致健常人対照それぞれ685と778例の血液DNAである。NCBIのSNPのdatabase（dbSNP）や日本人に関する論文から報告のあった多型を選択し、予備実験として30例の健常人例を用いてPCR with confronting two-pair primers（PCR-CTPP）法を用いてgenotypingした。その結果、ハプロタイプ構築に4つのSNPを最終ターゲットとして選んだ。そして、全ての大腸癌患者と健常人対照においてgenotypingを行い、SASソフトウェアを用いて、それぞれのSNPや構築したハプロタイプの日本人大腸癌リスクとの関係を解析した。*P*値の有意基準は0.05以下に設定した。

また、欧米で知られている主な変異については、PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism（PCR-RFLP）法を用いて調べた。さらに、Reverse transcription-PCR（RT-PCR）法を用いて、変異型SNPによる遺伝子の異常転写があるかどうかを調べた。Dual-luciferase reporter assayを用いて、SNPによる転写の促進あるいは抑制があるかどうかも調べた。

本研究は九州大学医学部付属病院および関連施設、浜松医科大学遺伝子解析研究倫理委員会の許可を得た上で行っている。

［結果］

1. NCBIのdbSNPで登録されていたSNPのうち、日本人で見つかったものが6つあった。それ以外に、今まで論文で報告された日本人にあるSNPが2つあった。合わせて8つのSNPの中、2組（2つずつ）はそれぞれ100%リンクしていることが以前のdataで分かったので、6つのtargetに絞った。これらのSNPを30例の健常

対照者でgenotypingし, SNPAlyzeソフトウェアを用いてハプロタイプを構築してみた、そこで、構築に必要なSNPをさらに4つ（IVS1+11C>T, IVS6+35G>A, IVS10-2A>G, 972G>C）に絞った。

2. それぞれのgenotypeと大腸癌リスクの相関をSASソフトウェアを用いて推定した。各SNPの頻度はHardy-Weinberg平衡則を満たしていた。そして、IVS1+11C>T　SNPに関して、crude odds ratio（OR）が1.43、年齢、性別、区域で調整後のadjusted ORが1.46。いずれも、P値が0.05以下であった。さらに、発生部位別での調整で、遠位大腸に関してORは1.58になったが、*P*値は0.058であった。ほかの3つのSNPに関して、*P*値が0.05以上であった。これらの結果は多重検定に用いる偽陽性発見比率（False Discovery Rate: FDR）法で調整後も変わらなかった。

3. 4つのSNPによって頻度が1%以上のハプロタイプが5つ構築された。IVS1+11Tのalleleを有したハプロタイプ（IVS1+11T-IVS6+35G-IVS10-2A-972C）のcrude ORは1.43、adjusted ORは1.56、さらに発生部位別で調整し、遠位大腸に関してORは1.81だった。いずれも、*P*値が0.05以下であった。

4. 欧米で報告された主な変異G382Dを全例で調べたが、変異alleleを見つからなかった。RT-PCRの結果、IVS1+11C>T変異による異常なスプライスも見出されなかった。さらにその周辺部の配列を確認していたところ、IVS1+11C>Tはこれまで知られていなかったSNP -280G>Aとリンクしていた。

［考察］

この研究は遺伝子変異の人種差を考慮し日本人をベースにした初めてのMUTYHのSNPと大腸癌の関連を検討した症例対照研究である。日本人において初めて、MUTYHのSNPやハプロタイプの散発性大腸癌との相関が示唆された。そして、欧米人で報告のあった変異が、日本人を含めて、東アジア人で見つからないことから、アジア人種をベースにした研究の重要性が強調された。また、以前の論文で見つかったIVS10-2G alleleがリスク alleleと予想されたが、今回の解析では、*P*値が有意ではないが、大腸癌riskと逆相関の傾向があった。核酸除去修復遺伝子XRCC1のArg194Trp多型でも同様の現象が見られ、それと同じメカニズムの可能性があるが、更なる機能解析が必要である。今回大腸癌リスクとの相関を示したIVS1+11C>Tとそれを含めたハプロタイプに関して、スプライスへの影響や、プロモーター活性の差といった機能解析の結果がこれまでのところは陰性であるため、ほかにリンクしているSNPの存在や、特定の条件下での機能差の検出など、メカニズムの解明が今後の課題になる。

［結論］

本研究により日本人症例対照研究での塩基除去修復遺伝子MUTYH多型IVS1+11C>Tの日本人大腸癌リスクとの相関が示唆された。また、MUTYH多型によって構築されたハプロタイプと日本人大腸癌リスクとの相関も示された。部位別での解析では、そのハプロタイプと遠位大腸癌リスクとの相関が示唆された。将来日本人大腸癌ハイリスクグループの同定にMUTYH多型が有用になる可能性が考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

環境や自らの代謝により酸化ストレスが細胞のDNAを傷つける。酸化的反応により傷つけられたDNA変異が修復されずに複製されると、遺伝情報が変化し、ひいては細胞の癌化がおこる。細胞内にはこのようなDNAの酸化的損傷を修復する酵素が備わっている。その一つであるMutYヒト相同体MUTYHは酸化的化合物である8-hydroxyguanineの相補塩基として誤って取り込まれるadenineを切除修復する塩基修復

酵素である。2003年にMUTYH遺伝子の生殖細胞における突然変異が多発性大腸腺腫や大腸癌と関連することが報告され、MUTYH関連ポリポーシス（MAP）と呼ばれている。しかし、MAPの原因となるMUTYH2つの変異型は、日本人を含む東アジア人では見つかっていない。また、MUTYHの一塩基多型（SNP）と大腸癌リスクとの関連も調べられていない。そこで、申請者は九州地方の福岡大腸癌症例対照研究を用いて、日本人に存在するMUTYHの多型から日本人に報告のあったSNPをターゲットに日本人散発性大腸癌リスクとの相関を検討した。

対象は、大腸癌患者685例と健常人778例から得たDNAを使用した。予備実験として、30名の健常人例にPCR with confronting two-pair primers（PCR-CTPP）法を用いて遺伝子類型化を行った結果から4つのSNPで区別される5つのハプロタイプを選んだ。そして、全ての大腸癌患者と健常人対照において遺伝子型を決定し、SASソフトウェアでそれぞれのSNPおよび5つのハプロタイプの日本人大腸癌リスクとの関係を解析した。その結果、IVS1+11C>TというSNPは有意に大腸癌との関係が認められたが、IVS6+35G>A, IVS10-2A>G, 972G>CのSNPは有意な相関を認めなかった。この4つのSNPからなる5つのハプロタイプと大腸癌との関係では、順にT,G,A,Cであるハプロタイプのみが大腸癌と相関を示し、それも遠位大腸に発生する大腸癌との関係が明らかになった。

また、欧米で知られている変異G382DをPCR-Restriction Fragment Length Polymorphism法で調べたが、同じ変異は見つからなかった。また、IVS1+11C>T変異が-280G>Aとリンクしていることを見出した。

審査委員会は、日本人大腸癌患者と健常人対照合計1400余のサンプルの解析により、単独SNP としてはIVS1+11C>Tが、4つのSNPからなるハプロタイプT+G+A+Cが大腸癌と連関があること、欧米患者で知られる変異は日本人症例では認められなかったことを明らかにした点を大きく評価した。

審査会では、以下のことについて質問がなされた。

1）全体でいくらのPCRサンプルが泳動されたのか
2）PCR-CTPP法を使った理由は何か
3）近位大腸と遠位大腸の区別について
4）DNAのメチル化について調べたか
5）MUTYHの発現の組織特異性について
6）MUTYHタンパクの主な構造上の特徴は何か
7）以前の報告では有意だったIVS10-2A>Gが今回有意でなかったことはどう解釈するか
8）プロモーター活性測定時にH_2O_2を使用した理由は何か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　三　浦　直　行
副査　前　川　真　人　副査　中　村　利　夫