

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 地球規模保健課題解決推進のための研究事業 日米医学協力計画
(英語) Research Program on the Challenges of Global Health Issues: U.S.-Japan
Cooperative Medical Sciences Program

研究開発課題名：(日本語) 日米医学協力計画を基軸とした感染関連がんに関する疾患研究
(英語) Research on infection-related cancer through U.S.-Japan
Cooperative Medical Sciences Program

研究開発担当者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 発がん・予防研究分野 分野長 清野 透
(英語) Chief, Division of Carcinogenesis and Cancer Prevention, National Cancer Center
Research Institute, Tohru Kiyono

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)

- ① 感染症関連がんに対する遺伝的及び環境要因の評価
- ② 子宮頸がん起源細胞を用いた CIN~子宮頸がん進展モデルに基づく子宮頸がんの予防・治療法の開発
- ③ 正常上皮細胞由来 3 次元培養細胞を用いた *in vitro* の炎症関連発がんモデル系の開発
- ④ ヒト腫瘍例における網羅的 DNA 付加体 (アダクトーム) 解析
- ⑤ DNA アダクトーム法を用いたヒト発がん要因の探索
- ⑥ 大腸がん関連腸内フローラの同定に関する日米共同研究
- ⑦ 日本人における肥満と膵がんリスクの関連
- ⑧ 大気中の微生物由来炎症関連物質に関する研究

開発課題名：(英語)

- ① Evaluation of genetic and environmental factors in infection-associated cancer
- ② Development of a method to prevent and treat cervical cancer based on a cervical cancer development model through CIN by using normal cells-of-origin
- ③ Development of *in vitro* model for inflammation related carcinogenesis using normal epithelial cells in 3D-culture.
- ④ DNA adducts in human tissue

- ⑤ Exploration of cancer etiology using DNA adductome analysis
- ⑥ Japan-U.S. joint research on colorectal cancer-associated changes of gut microbiota
- ⑦ Association between obesity and pancreatic cancer in Japanese
- ⑧ Inflammatory related materials originated from atmospheric microorganisms

研究開発分担者 (日本語)

- ① 国立がん研究センター がんゲノミクス研究分野 分野長 柴田 龍弘
- ② 国立研究開発法人国立がん研究センター 発がん・予防研究分野 分野長 清野 透
- ③ 国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 動物実験部門 主任研究員 落合雅子
- ④ 浜松医科大学 教授 梶村春彦
- ⑤ 国立研究開発法人国立がん研究センター 発がん・予防研究分野 ユニット長 戸塚ゆかり
- ⑥ 国立がん研究センター研究所 がんゲノミクス研究分野 ユニット長 谷内田真一
- ⑦ 愛知医科大学医学部公衆衛生学 教授 菊地正悟
- ⑧ 京都薬科大学 公衆衛生学分野 教授 渡辺徹志

所属 役職 氏名: (英語)

- ① Chief, Division of Cancer Genomics, National Cancer Center Research Institute, TATSUHIRO SHIBATA
- ② Chief, Division of Carcinogenesis and Cancer Prevention, National Cancer Center Research Institute, Tohru Kiyono
- ③ Senior Staff Scientist, Department of Animal Experimentation, National Cancer Center Research Institute, Masako Ochiai
- ④ Hamamatsu University School of Medicine, Professor, SUGIMURA Haruhiko
- ⑤ Laboratory Head, Division of Carcinogenesis and Cancer Prevention, National Cancer Center Research Institute, Yukari Totsuka
- ⑥ Laboratory Head, Division of Cancer Genomics, National Cancer Center Research Institute, Shinichi Yachida
- ⑦ Professor, Department of Public Health, Aichi Medical University School of Medicine, Shogo Kikuchi
- ⑧ Kyoto Pharmaceutical University, Department of Public Health, Professor, Tetsushi Watanabe

II. 成果の概要 (総括研究報告)

第19回 EID 会議に向け Cancer Panel からの3つのテーマ(ピロリ菌と胃がん、肝吸虫と胆管癌、マイクロバイオーームとがん)と4人の演者を NCI のプログラム委員らと決定し2017年2月8日の Session 6 で発表した。2月9日には Cancer Panel 会議では8人の口演を設けた。後に韓国がんセンター研究所所長の Joo-Young Kim 博士と HPV 陽性がんの放射線感受性につき討論する機会を得た。

各研究項目の概要を以下に示す。

- ① 感染症関連がんに対する遺伝的及び環境要因の評価では、胃がん・肝臓がんといった感染関連がんにおいても、これまでのゲノム解析の結果から人種間、あるいは生活習慣によって異なった環境要因の関与が示唆されている。本研究では日米共同研究によって、こうした感染関連がんにおける環境及び遺伝的要因の関連について評価を行い、さらなる病因解明と予防研究への展開を目的とする。米国 TCGA と連携して、米国における肝臓がんゲノム・エピゲノムデータと日本人肝臓がんゲノ

ム・エピゲノムデータを比較し、とりわけ特徴的な変異シグネチャーやエピゲノムサブタイプの有無について検討を進めた。

- ② 子宮頸がん起源細胞を用いた CIN~子宮頸がん進展モデルに基づく子宮頸がんの予防・治療法の開発に関しては、正常子宮頸部由来の不死化上皮細胞株 (HCK1T)は CK7 陽性で子宮頸がん起源細胞としての SCJ 細胞の性質を有しており、この細胞に HPV16 ゲノムをトランスフェクションすることで HPV16 ゲノムを安定に約 50 コピー維持する細胞を樹立した。今後、この細胞を CIN 細胞のモデルとしてがん化に至る過程を再現する一方、HPV ゲノム複製や維持機構を解析し、それを破綻させることで HPV を排除する子宮頸がん予防法の開発を進めている。
- ③ 正常上皮細胞由来 3 次元培養細胞(organoids)を用いた *in vitro* の炎症関連発がんモデル系の開発に関しては、マウス正常大腸 organoids は、遺伝的再構成により、ヌードマウス皮下で腫瘍形成する。また、特殊な培養条件 (ストレス負荷の状態) では、ヌードマウス皮下腫瘍の異型度が増悪する知見を得ており、炎症にも関連するストレス負荷特有の遺伝子発現変化を、organoids での遺伝子発現解析から進めている。
- ④ ヒト腫瘍例における網羅的 DNA 付加体 (アダクトーム) 解析に関しては、予備的な結果であるが、ヒト肺組織にいくつかのたばこ関連と推定される DNA 付加体、また、never smoker に特有の付加体などが検出されている。また、アルコールなどの代謝に関連すると思われるものなども、腫瘍に近い消化管粘膜などにみられている。
- ⑤ DNA アダクトーム法を用いたヒト発がん要因の探索に関しては、日本人男性の肝細胞がんの特徴的な Signature A を強く示す症例とそうでない症例の非腫瘍部からゲノム DNA を抽出し、アダクトーム解析により得られた情報を主成分解析してみたところ、Signature A を強く示す症例群に特徴的な付加体を幾つかスクリーニングすることができた。現在、この付加体の同定を試みているところである。
- ⑥ 大腸がん関連腸内フローラの同定に関する日米共同研究においては、国立がん研究センターと共同研究施設である東京工業大学は、米国・HMP (Human Microbiome Project) や欧州を中心とした MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract consortium) の関係者と電話会議で打ち合わせを行ない、大腸がん患者における糞便由来試料のシーケンス解析のデータを共有することを確認し、研究体制の整備を開始した。さらに、腸内細菌叢のメタゲノム解析のパイプラインを協議した。メタゲノム解析の最初のステップであるサンプリング法に関して、室温保存する場合、本邦ではグアニジン・チオシアン酸塩溶液が広く使用されている。北米では OMNIgene・GUT が使用されており、その比較解析を開始した。
- ⑦ 日本人における肥満と膵がんリスクの関連においては、欧米人では肥満が膵がんの独立した危険因子であることは確定しているが、日本を含むアジア人では、エビデンスが不十分なため、その関連性は必ずしも明らかとは言えない。そこで、110,585 人を対象とした文部省大規模前向きコホート研究 (追跡期間 1988 年から 2009 年末まで) のデータを用いて、ベースライン時及び 20 歳時の BMI と膵がん死亡リスクの関連を検討した。女性ではベースライン時の BMI は膵がん死亡リスクと有意な関連が認められた。男性では 20 歳時の肥満がその後の膵がん死亡リスクの上昇と有意に関連していた (ハザード比 3.68、95%信頼区間 1.60-8.47)。
- ⑧ 大気中の微生物由来炎症関連物質に関する研究に関しては、2016 年 3 月から 2017 年 2 月までの 1 年間にわたり、九州北部地方及び近畿地方において大気粉塵を捕集し、大気粉塵中のエンドトキシンを測定した。その結果、大気中のエンドトキシン濃度がいずれの地方においても 5、9、10 月

に高く、特に九州北部地方では10月に、近畿地方は9月に高く、それぞれ他の月の約10倍に達することが明らかになった。また、各大気粉塵について黄砂の指標であるCa²⁺濃度を測定した結果、エンドトキシン濃度の上昇に黄砂の飛散が関与する可能性が高いことが明らかになった。TNF- α 遺伝子プロモーター領域の発現を検出するヒト細胞試験系を用い、大気粉塵抽出物の活性を試験した結果、エンドトキシン濃度の高い抽出物にTNF- α プロモーター活性が検出された。今後、秋季におけるエンドトキシン濃度の上昇のヒト健康への影響について検討する必要があると考えられた。また、大気粉塵中の β -グルカンの分析法を確立した。

We selected three topics, helicobacter Pylori and gastric cancer, liver flukes and cholangiocarcinoma and microbiome and cancer, and 4 speakers for the 19th EID meeting and they presented in Session 6 on Feb 8, 2017. On Feb 9, eight speakers were invited in the Cancer Panel meeting. After the 19th EID meeting, I had a chance to have a discussion with Dr. Joo-Young Kim about radio-sensitivity of HPV-positive cancer.

- ① Evaluation of genetic and environmental factors in infection-associated cancer ; Previous studies including our report suggest different contribution of environmental factors associated with ethnicity or life-style even in infection-associated cancers such as liver and gastric cancers. By international collaboration between Japan and US, we aim to evaluate environmental and genetic factors in these cancers, and will utilize such information to understanding unique cancer causes and effective cancer prevention. We collaborated with The Cancer Genome Atlas project in US and compare somatic mutational features including mutational signatures of virus associated liver cancers between Japan and US.
- ② Development of a method to prevent and treat cervical cancer based on a cervical cancer development model through CIN by using normal cells-of-origin.; An immortalized cervical keratinocyte cell line, HCK1T, expresses CK7 and maintain characteristics of SCJ cells. By transfection HPV16 genome into this cell line, we established a cell line which stably maintains about 50 episomal copies of HPV16 genome. By using this cell line as a model of CIN, we will make an in vitro carcinogenesis model for cervical cancer. We will examine the mechanism how HPV genomes are stably replicated and maintained in this cell line and find a method to eradicate HPV genomes, which should lead to prevention of cervical cancer. Adductome analysis was performed using human tissues, especially lung and gastrointestinal (GI) non-tumor tissue resected for lung and GI tract cancers.
- ③ Development of *in vitro* model for inflammation related carcinogenesis using normal epithelial cells in 3D-culture(organoids): By genetic reconstitution, mouse colonic organoids formed tumors in nude mice subcutaneously. In a culture condition with stress to organoids, tumors formed in nude mice were affected to dysplastic features. The analysis of gene expression in colonic organoids is in progress, to evaluate changes in gene expression specific to stress associated with inflammation.
- ④ DNA adducts in human tissue ; Preliminary results include some PAH related in smokers' lung and previously unrecognized adducts in never-smokers' lung (of lung cancer patients). We also intended to take the sample form the point each distant from the tumor of the GI tract, having

“filed cancerization” theory in mind. The increased existence of a particular DNA adduct in the nearest neighborhood of the tumor may imply the causative significance of that adduct for human carcinogenesis.

- ⑤ Exploration of cancer etiology using DNA adductome analysis ; In order to screen DNA adducts characteristic for Signature A, we examined DNA adductome analysis using Japanese liver cancer patients revealing those highly- or rarely-contributing to Signature A. Several DNA adducts were screened by principal component analysis, and we are now investigating the chemical structure of these DNA adducts.
- ⑥ Japan-U.S. joint research on colorectal cancer-associated changes of gut microbiota ; National Cancer Center and its collaborating institution, Tokyo Institute of Technology held the telephone conference with the scientists concerned in HMP (Human Microbiome Project) and MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract consortium). We have confirmed the establishment of the multinational researches and the sharing system of sequencing-data to investigate the relationships between colorectal cancer and gut microbiota. In addition, we have discussed the pipeline of the metagenomic analysis. As for fecal sampling at room temperature, which is the first step of the pipeline, we started to make a comparison of storage solution between 4M guanidine thiocyanate (which is widely used in Japan) and OMNIgene • GUT (which is widely used in North America).
- ⑦ Association between obesity and pancreatic cancer in Japanese ; The association between obesity and pancreatic cancer in Japanese remains obscure, with few large cohort studies and mixed results. We analyzed the associations of pancreatic cancer with body mass index (BMI) at baseline and BMI at age 20 using data from a large cohort study of 110585 middle-aged and elderly Japanese. Cox proportional hazards model was used to estimate hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs). A positive association between baseline BMI and the risk of death from pancreatic cancer was noted in women but not in men. Another notable finding is that men with a BMI of 30 or more at age 20 had a 3.7-fold significantly increased risk compared with those with a BMI of 20.0-22.5. These results suggest that BMI-pancreatic cancer associations may differ by sex and the period over which weight was measured.
- ⑧ Inflammatory related materials originated from atmospheric microorganisms ; We collected airborne particles in northern Kyushu and Kinki regions from March, 2016, to February, 2017, and analyzed endotoxin in the airborne particles. Endotoxin levels were high in May, September, and October in both regions, and the levels of endotoxin in October in northern Kyushu and in September in Kinki were especially high. The concentration of Ca²⁺, which is an index of the amount of Asian dust, implied that the increases of endotoxin levels were associated with Asian dust events. Airborne particles that include high levels of endotoxin showed TNF- α promoter activity in the test that detect expression of TNF- α promoter domain in human cells. These results suggest the importance of further investigation of the health effect by the high levels of atmospheric endotoxin in autumn. In addition, we confirmed a method to analyze atmospheric β -glucan.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 7 件）

1. Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Yugawa T, Kiyono T, Nishina H, Kukimoto I. Human Papillomavirus 16 E6 Upregulates APOBEC3B via the TEAD Transcription Factor. *J Virol.* 2017, 91(6), e02413-16
2. Chopjitt P, Pientong C, Sunthamala N, Kongyingyoes B, Haanon O, Boonmars T, Kikawa, S, Nakahara T, Kiyono T, Ekalaksananan, T. E6D25E, HPV16 Asian variant shows specific proteomic pattern correlating in cells transformation and suppressive innate immune response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 478 (1), 417-23.
3. Yoshimura K, Sugimura H et al. Successful crizotinib monotherapy in EGFR-mutant lung adenocarcinoma with acquired MET amplification after erlotinib therapy. *Respir Med Case Rep*, 10.1016/j.rmcr.2017.02.009. eCollection
4. Inoue Y, Sugimura H et al. Prognostic impact of CD73 and A2A adenosine receptor expression in non-small-cell carcinoma lung cancer. *Oncotarget* 8:8738-8751, 2017
5. Zhang W, Sugimura H et al. High expression of WIs is associated with lymph node metastasis and advanced TNM stage in gastric carcinoma. *Pathology International* 67:141-146, 2017
6. Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis* 2016 37:817-26.
7. Nishimoto Y, Mizutani S, Nakajima T, Hosoda F, Watanabe H, Saito Y, Shibata T, Yachida S, Yamada T. High stability of faecal microbiome composition in guanidine thiocyanate solution at room temperature and robustness during colonoscopy. *Gut.* 2016, 65, 1574-5.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. E3 ubiquitin ligase that mediates NFκB dependent degradation of the HPV16 E1. ポスター, Tomomi Nakahara, Katsuyuki Tanaka, Takashi Yugawa, Tohru Kiyono, ポスター、国際パピローマウイルス会議, 2017/3/4, 国外.
2. Mechanism for degradation of human papillomavirus E1 protein. 口頭, 中原知美、温川恭至、清野透, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/25, 国内.
3. Mechanisms the E1 helicase degradation involved in the viral persistence of human papillomavirus. 口頭, Tomomi Nakahara, Takashi Yugawa, Tohru Kiyono, ポスター、第 75 回日本癌学会学術総会 2016/10/8, 国内.
4. 落合雅子、松浦哲也、中釜 齊、筆宝義隆、今井俊夫：マウス正常大腸上皮細胞の 3 次元培養による in vitro 発がんモデルの開発 第 75 回日本癌学会学術総会（2016 年 10 月、ポスター、国内）
5. ヒト組織中の DNA 付加体について（招待講演） 梶村春彦 平成 28 年度 日本環境変異学会 公開シンポジウム 2016/5/18 国内
6. Updates of immunotherapy of lung cancer (Invited) Haruhiko Sugimura, Internal conference

- of update of cancer prevention and research. 2017/2/14, 国外 (Lucknow, India)
7. Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Matsushima Y, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 50th Anniversary Conference IARC (2016年6月、ポスター、国外)
 8. 戸塚ゆ加里、林 櫻松、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、松島芳隆、中釜 斉: DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する 第75回日本癌学会学術総会 (2016年10月、ポスター、国内)
 9. 三牧幸代、中森正二、久保正二、木下正彦、戸塚ゆ加里、中釜 斉、落合淳志、江角浩安、土原一哉: 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較 第75回日本癌学会学術総会 (2016年10月、ポスター、国内)
 10. 戸塚ゆ加里: ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索 第59回日本放射線影響学会. (2016年10月、口頭、国内)
 11. 戸塚ゆ加里、善家 茜、古川 英作、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉: 次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第45回日本環境変異原学会 (2016年11月、ポスター、国内)
 12. Seasonal Fluctuation of Lipopolysaccharide on Airborne Particles and Relation with Asian Dust, ポスター, KHAN S, ABEM, FURUKAWAN, KUBO Y, KITAMURAS, NAKAOJI Y, KAWASE Y, HASEI T, MATSUMOTO T, DEGUCHI Y, YAMAGISHI N, WATANABE T, フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2016/9/10

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願