[シンポジウム 2 生活習慣病の臨床検査—技術の進歩による新しい展開]

癌と遺伝子多型—臨床検査への応用の可能性

日 野 田 裕 治

SUMMARY

It has been shown that the matrix metalloproteinase (MMP)-1 promoter polymorphism 1G/2G is associated with an increased risk of developing various cancers including renal cell carcinoma (RCC), and is in linkage disequilibrium (LD) with the MMP-3 promoter polymorphism 5A/6A. However, the relationship between the MMP-3 5A/6A polymorphism and susceptibility to cancer remains ambiguous. In this study, we genotyped eight polymorphisms over the region of the MMP-1 and MMP-3 genes in 177 healthy subjects, and explored the relationships between RCC and these polymorphisms or haplotypes in 156 cases and 230 age- and gender-matched controls. There were three polymorphisms that showed stronger LD with the MMP-1 1G/2G than with the MMP-3 promoter 5A/6A variant. One of these three polymorphisms was found to be present in the second exon of the MMP-3 gene and to cause an amino acid change, Glu45Lys (G/A). When the genotype distribution of Glu45Lys was compared between RCC patients and controls, the frequency of the G/G genotype was significantly higher in the patients (age- and gender-adjusted odds ratio [OR]=1.81). A significant increase in the frequency of the 2G/2G genotype of MMP-1 1G/2G polymorphism was also observed in the patients (age- and gender-adjusted OR=1.86). The frequency of the 2G-G haplotype of MMP-1 1G/2G and MMP-3 Glu45Lys polymorphisms was significantly higher in the patients compared to controls (crude OR=1.95, CI=1.31–2.91). These findings suggest that a haplotype of MMP-1 and MMP-3 variants may be associated with the risk of developing RCC.

Key words: matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3, renal cell carcinoma, single nucleotide polymorphism, linkage disequilibrium.

はじめに

生活習慣病の遺伝子検査として現在最も期待されているのは、遺伝子多型による疾患感受性予測であろう。我々はこれまで matrix metalloproteinase (MMP)-1 および MMP-3 遺伝子のプロモーター領域多型について数種の癌との関連を明らかにし^{1~3)}、一部は本誌においても報告してきた⁴⁾。MMP-1 および MMP-3 遺伝子は chromosome 11q22.2 に並んで位置し、間質細胞、マクロファージ、内皮細胞、上皮細胞などの正常細胞と同様に様々な癌細胞で発現される間質性コラゲナーゼの一つである。特に MMP-1 は幾つかの癌でその発現が予後不良因子であることが明らかにされ、

癌の感受性遺伝子候補として注目されている。しかし、これらのプロモーター多型が疾患感受性遺伝子そのものなのか、あるいは未知の疾患感受性遺伝子のマーカーにすぎないのかは未だ不明である。この点を明らかにするためには、両遺伝子領域における他の多型について癌との関連を調べて行く必要がある。

今回は MMP-1 と MMP-3 遺伝子を含む 54 Kb の領域における 8 つの多型について、腎細胞癌との関連を検討した(図 1)。MMP-1 遺伝子領域では promoter -1607 1G/2G (1G/2G), rs470206 A/G (以下 NCBI データベースより), rs491152 G/A, rs2071231 A/G の 4 多型を、MMP-3 領域では promoter-1171 5A/6A (5A/6A), rs679620 G/A, rs650108 A/G の 3 多

Cancer and single nucleotide polymorphism—perspective on application to laboratory test—.

Yuji Hinoda; 山口大学医学部臨床検査医学

Correspondence address: Yuji Hinoda; Department of Clinical Laboratory Science, Minami-kogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan.

第 54 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

(受付 2004 年 7 月 29 日, 受理 2004 年 10 月 25 日, 刊行 2004 年 12 月 15 日)

型を、さらに両遺伝子の間に存在する Casein kinase 1 pseudogene (CK1P) 上の rs1144396 G/T の 1 多型を対象とした。

遺伝子型頻度と連鎖不平衡解析

先ず 177 名の健康成人について 8 遺伝子多型の genotyping を行い、遺伝子型頻度を明らかにした (表 1)。方法は既報⁵⁾の PCR-RFLP 法と Tetra-prime ARMS-PCR 法によった。代表的電気泳動像として、MMP-1-1G/2G 遺伝子多型の結果を図 2 に示す。Tetra-prime ARMS-PCR 法 (以下 Tetra 法) では、outer primers により共通バンドとして 430 bp が、1G アレルに特異的に 200 bp、2G アレルに特異的に 282 bp

図 1. MMP-1 および MMP-3 遺伝子領域における遺伝子多型

のバンドが増幅された (図 2 左)。また、制限酵素 *Bsl* I に認識するようにミスマッチを導入した PCR-RFLP 法 (以下 RFLP 法) では、1G アレルに特異的に消化されない 129 bp が、2G アレルに特異的に 103 bp と 27 bp のバンドが観察された (図 3 右)。

次いで、健常者 177 名における 8 多型の健常者における遺伝子型を用いて連鎖不平衡解析を行った (表 2)。以前我々は MMP-1 1G/2G 遺伝子型が MMP-3 5A/6A 遺伝子型と連鎖不平衡にあることを報告した (1)。さらに今回の解析の結果、3 種の多型が MMP-3 5A/6A 遺伝子型に比較して MMP-1 1G/2G 遺伝子型と強く連鎖不平衡状態を示していた (rs1144396; 0.17574, rs650108; 0.15076, rs679620; 0.16108)。とくに、rs679620 は MMP-3 遺伝子の第 2 exon に存在し、アミノ酸置換 [Glu45Lys (G/A)] を伴うため注目した。

腎細胞癌との関連

腎細胞癌患者 (n=156) と健康対照 (n=230) において、MMP-1 1G/2G および MMP-3-5A/6A に加えて、アミノ酸置換を伴う rs67962 について遺伝子型頻度を調べた (表 3)。MMP-3 Glu45Lys (G/A) (=rs67962) 遺伝子型について、患者群と健康対照群で遺伝子型頻度を比較したところ、腎細胞癌患者群の G/G 型頻度が健常対照者群に比較して有意に高かった ($P=0.0042$; OR,1.82; 95%CI, 1.21-2.75)。MMP-

表 1. 健康成人における遺伝子型頻度

Gene	Variant	Genotype	Frequency (%)	Gene	Variant	Genotype	Frequency (%)
MMP-1	1G/2G	1G/1G	73 (41.2)	MMP-3	5A/6A	6A/6A	116 (65.5)
		1G/2G	91 (51.5)			6A/5A	57 (32.2)
		2G/2G	13 (7.3)			5A/5A	4 (2.3)
	rs470206	C/C	128 (72.3)		rs679620	G/G	75 (42.4)
		C/T	45 (25.4)			G/A	91 (51.4)
		T/T	4 (2.3)			A/A	11 (6.2)
	rs491152	G/G	141 (79.7)	rs650108	A/A	61 (34.5)	
		G/A	33 (18.6)		A/G	91 (51.4)	
		A/A	3 (1.7)		G/G	25 (14.1)	
	rs2071231	A/A	113 (63.8)	CK1 pseudogene rs1144396	G/G	72 (40.7)	
		A/G	54 (30.5)		G/T	93 (52.5)	
		G/G	10 (5.7)		T/T	12 (6.8)

図 2. Tetra-prime ARMS-PCR 法による MMP-1 1G/2G 遺伝子多型解析 (左)
PCR-RFLP 法による MMP-1 1G/2G 遺伝子多型解析 (右)

表 2. MMP-1 および MMP-3 領域における 8 多型の連鎖不平衡解析^a

	1G/2G	rs2071231	rs491152	rs470206	rs1144396	5A/6A	rs650108	rs679620
1G/2G		0.00614	-0.00229	-0.03393	0.17574	0.08543	0.15076	0.16108
rs2071231			-0.0252	0.01019	0.00073	-0.0378	0.01278	0.0046
rs491152				0.05468	-0.0384	-0.01397	0.02641	-0.036
rs470206					-0.03393	-0.0252	0.01327	-0.03148
rs1144396						0.1224	0.18498	0.204
5A/6A							0.1161	0.126
rs650108								0.18811
rs679620								

^a D 値で示す.

表 3. 腎細胞癌群と健康対照群における rs67962, MMP-1 1G/2G および MMP-3 5A/6A 遺伝子型頻度の比較

Variant	Genotype	Cases ^a (n=156)	Controls ^a (n=230)	P	OR	95%CI
MMP-3	A/A	13 (8.3)	24 (10.4)			
rs679620	A/G	50 (32.1)	103 (44.8)			
	G/G	93 (59.6)	103 (44.8)	0.0042	1.82	1.21-2.75
MMP-1	1G/1G	14 (9.0)	25 (10.9)			
1G/2G	1G/2G	52 (33.3)	107 (46.5)			
	2G/2G	90 (57.7)	98 (42.6)	0.0036	1.84	1.22-2.77
MMP-3	5A/5A	3 (1.9)	4 (1.7)			
5A/6A	5A/6A	38 (24.4)	67 (29.1)			
	6A/6A	115 (73.7)	159 (69.1)	0.3298	1.25	0.80-1.97

^a 値は n 数 (%).

1 1G/2G 遺伝子型においても既報 (2) のとおり, 健康対照者群に比較して患者群で 2G/2G 型頻度が有意に高かった ($P=0.0036$; OR,1.84; 95%CI, 1.22-2.77). しかし, MMP-3 5A/6A 遺伝子型においては, 6A/6A 遺伝子型頻度に 2 群間の有意差を認めなかった.

腎細胞癌患者と健康対照において, MMP-1 1G/2G 遺伝子型と MMP-3 Glu45Lys (G/A) 遺伝子型のハプロタイプ解析を表 4 に示した. 最もハプロタイプ頻度の高かった 2G-G 型において, 腎細胞癌患者群と健常対照者群で比較したところ, 腎細胞癌患者群の 2G-G 型頻度が有意に高かった ($P=0.0098$; OR,1.95; 95%CI,1.31-2.91).

腎細胞癌患者の臨床的背景と MMP-3 Glu45Lys (G/A) 遺伝子型の関連性について Fisher's 解析で検索した. しかしながら, 性, 年齢, 癌の進行度, 病理期において遺伝子型

および表現型との関連性は認められなかった.

以上の結果は, MMP-1 1G/2G と強い連鎖不平衡にある新しい多型 MMP-3 Glu45Lys (G/A) が MMP-1 1G/2G とのハプロタイプで腎細胞癌と関連することを示唆する. MMP-3 Glu45Lys の機能的意義については現在解析中であり, MMP-1 1G/2G と共同して働くのか, あるいは単なるマーカーなのかは明らかでない.

おわりに

遺伝子多型の臨床応用について, 1つの手がかりになると思われるのが米国の Your cancer risk というホームページである. Harvard center for cancer prevention が作成しており, 非常に簡単に自分の癌種別のリスクを知ることができる. 最初に癌の種類を選択し, 順に質問に答えていくと,

表 4. 腎細胞癌患者群と健常対照者群におけるハプロタイプ解析

Haplotype	Cases ^a (n=312)	Controls ^a (n=460)	P	OR	95%CI
1G-A	63 (20.3)	134 (29.2)			
1G-G	16 (5.3)	23 (5.0)			
2G-A	11 (3.4)	17 (3.7)			
2G-G	222 (71.0)	286 (62.2)	0.0098	1.949	1.31-2.91

^a 値は n 数 (%)

最後に自分のリスクがどの程度平均から離れているのかが図示され、必要な予防策も示される。それに従った場合、どの程度リスクが下がるかも図示されている。これは米国の疫学データに基いたものである⁶⁾ので、残念ながら日本人にはそのまま当てはまらない。疾患感受性遺伝子もこのようなリスクファクターと同様なデータが揃ってくれば、少なくとも予防策があるものについては同様な形でリスク評価に使うことが可能になる。

我国において、しっかりとした疫学的データに加えて疾患感受性遺伝子のデータがある程度揃うのにはもう少し時間がかかりそうであるが、並行して予防法の開発を考える必要がある。例えば、遺伝子の発現を増加させるプロモーター SNP であれば、それを抑制する予防薬が必要である。その予防薬の安全性と有効性を臨床試験を通じて明らかにして、はじめて1つの疾患感受性 SNP の臨床応用が可能になろう。

文 献

- 1) Hinoda Y, Okayama N, Takano N, Fujimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hazama S, Kitamura Y, Kamatani N, Oka M. Association of functional polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 genes with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002;102:526-529.
- 2) Hirata H, Naito K, Yoshihiro S, Matsuyama H, Suehiro Y, Hinoda Y. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with conventional renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003;106:372-374.
- 3) Hashimoto T, Uchida K, Okayama N, Imate Y, Suehiro Y, Hamanaka Y, Ueyama Y, Shinozaki F, Yamashita H, Hinoda Y. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1 promoter polymorphism with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2004;211:19-24.
- 4) 日野田裕治, 丸田雄一, 末広 寛. 疾病予防を目指した遺伝子多型解析. *生物物理化学* 2002;46:75-78.
- 5) Okayama N, Fujimura K, Nakamura J, Suehiro Y, Hamanaka Y, Hinoda Y. Evaluation of a new efficient procedure for single-nucleotide polymorphism genotyping: tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:13-16.
- 6) Colditz GA, Atwood KA, Emmons K, Monson RR, Willett WC, Trichopoulos D, Hunter DJ. Harvard report on cancer prevention volume 4: Harvard Cancer Risk Index. Risk Index Working Group, Harvard Center for Cancer Prevention. *Cancer Causes Control* 2000;11:477-488.