

厚生労働科学研究費補助金
がん予防等健康科学総合研究事業

新規がん予防・早期発見システムを用いた
包括的ながん予防の開発研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田原 榮一

平成15年(2003年)3月

厚生労働科学研究費補助金
がん予防等健康科学総合研究事業

新規がん予防・早期発見システムを用いた
包括的ながん予防の開発研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田 原 榮 一

事務局

〒732-0815

広島市南区比治山公園5-2

(財)放射線影響研究所

TEL: 082-261-3134 FAX: 082-261-3252

目 次

研究班組織一覧	1
総括研究報告書「新規がん予防・早期発見システムを用いた 包括的ながん予防の開発研究」	2
田原 榮一	
分担研究者報告書「食道がん・胃がんの新規がん予防・早期発見 システムの開発」	8
安井 弥	
分担研究者報告書「長期追跡集団におけるがん一次予防に関する疫学研究」	12
児玉 和紀 笠置 文善	
分担研究者報告書「長期追跡集団におけるがん三次予防に関する疫学研究」	16
小山幸次郎	
分担研究者報告書「保存血清を使った胃がんの検診の開発研究」	19
鈴木 元 藤原佐枝子	
分担研究者報告書「免疫学的発がん高危険群の同定」	22
林 奉権	
分担研究者報告書「大腸がんにおけるBORIS/CTCF発現、COX2発現と 直接遺伝子増幅法によるリンパ節微小がん転移について」	27
谷山 清己	

研究班組織一覽

主任研究者	田原 榮一	(財) 放射線影響研究所 研究担当理事
分担研究者	安井 弥	広島大学大学院医歯薬学総合研究科探索医科学講座 分子病理学研究室 教授
	児玉 和紀	(財) 放射線影響研究所疫学部 部長
	笠置 文善	(財) 放射線影響研究所疫学部 副部長
	小山幸次郎	(財) 放射線影響研究所疫学部 腫瘍組織登録室 室長
	鈴木 元	(財) 放射線影響研究所臨床研究部 部長
	藤原佐枝子	(財) 放射線影響研究所臨床研究部 副部長
	林 奉権	(財) 放射線影響研究所放射線生物学/分子疫学部 主任研究員
	谷山 清己	国立病院呉医療センター・中国がんセンター 臨床検査科長・臨床研究部がん病理研究室長
研究協力者	田原 栄俊	広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態探究医科学 講座細胞分子生物学研究室 助教授
	吉田 和弘	広島大学原爆放射線医科学研究所腫瘍外科 講師

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合 研究事業）
総括研究報告書

新規がん予防・早期発見システムを用いた
包括的ながん予防の開発研究

主任研究者 田原 榮一（財）放射線影響研究所 研究担当理事

本プロジェクトは、三つの大きな柱から成り、本年度の研究成果は以下の如く要約される。即ち、胃がんの新規がん予防、早期発見システムの開発研究では、SAGE法による胃がんの網羅的遺伝子発現解析より、APOC1, CEACAM5, YF13H12, RegIVなど多くの胃がん特異的発現遺伝子を同定した。RegIVの機能解析から、分泌蛋白でありアポトーシスを抑制すること、かつ早期診断及び治療の新しい標的とみなされた。また、HER2, EGF, MMP-1, MMP-9のSNPなどの遺伝子多型と発がんリスクとの関連解析は、予防に関する重要な情報を与えるものである。長期間追跡集団におけるがんの一次予防に関する疫学研究では、放射線影響研究所（放影研）の長期追跡調査集団における郵便調査によって得られた生活習慣に関する情報を用いて、食道がん並びに胃がんの危険因子及び予防因子に関する解析を行った。その結果、食道がんの危険因子として喫煙、飲酒、熱い食べ物の摂取などが確認され、果物の摂取は逆に食道がん死亡の予防因子であることが認められた。しかしながら、喫煙と果物の摂取の間には交互作用は見られず、喫煙者においては果物の摂取に心がけても喫煙の影響を消し去ることは出来ず、禁煙がやはり予防上大切であることが再確認された。免疫学的発がん高危険群の同定に関する研究では、HLAクラスI (A, B, C)遺伝子多型と胃がん発症の関連と、それに及ぼす原爆放射線の影響について、胃がん症例150例と非がん300例について予備的検討を行った。その結果、HLA-A*2601が胃がんの低リスクと関連していること、放射線被曝によってHLA-A*2601のリスクが特に増加することが示唆された。なお、大腸がんにおけるBORIS/CTCF発現と臨床病理学的諸因子の検討の結果、BORIS発現が大腸がんの発生・進展・転移に関与するかどうかは今後の研究が必要である。

分担研究者

安井 弥（広島大学大学院医歯薬学総合研究科探索医科学講座分子病理学研究室・教授），児玉和紀（放射線影響研究所疫学部・部長），笠置文善（放射線影響研究所疫学部・副部長），小山幸次郎（放射線影響研究所疫学部腫瘍登録室・室長），鈴木元（放射線影響研究所臨床研究部・部長），藤原佐枝子（放射線影響研究所臨床研究部・副部長），林 奉権（放射線影響研究

所放射線生物学/分子疫学部・主任研究員），谷山清己（国立病院呉医療センター・中国がんセンター，臨床検査科長・臨床研究部がん病理研究室長）

研究協力者

田原栄俊（広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態探究医科学講座細胞分子生物学研究室・助教授），吉田和弘（広島大学原爆放射線医科学研究所腫瘍外科・講師）

A. 研究目的

本プロジェクトは、三つの大きな柱、1) 食道がん・胃がん・大腸がんの新規がん予防、早期発見システムの開発、2) 長期間追跡集団におけるがんの一次予防・二次予防・三次予防の基盤の確立、3) 免疫学的発がん高危険群の同定 からなり、3年間でユニークながん予防モデルと見做される放影研の長期追跡集団を用いて消化器がんの早期発見・予防システムを確立する。

B. 研究方法

1) 食道がん・胃がん・大腸がんの新規がん予防・早期発見システムの開発

(1) SAGE 法による新規食道・胃がん及び前がん性病変特異的遺伝子の同定と蛋白の発現・合成：食道異形成、胃腺腫、腸上皮化生及びがん組織から抽出した RNA について SAGE 法で網羅的遺伝子発現解析を行い、正常粘膜のプロファイルと比較し、特異的遺伝子を同定する。全長 cDNA を調整、recombinant 蛋白を合成する。

(2) SELEX 法による特異的 RNA aptamer の選択・増幅：recombinant 蛋白を標的とし、ランダムオリゴヌクレオチドライブラリーから SELEX 法によって特異的 RNA aptamer を選択・増幅する。

(3) 特異的抗体及び RNA aptamer を用いた測定系の確立：特異的抗体及び RNA aptamer を蛍光色素標識／酵素標識し、ELISA 測定系を確立する。

(4) 特異的発現遺伝子の多型と発がん・進展との関連解析：SAGE法及びRT-PCR法で同定したがん特異的新規遺伝子の多型を探索し、症例-対照研究及び症例-症例研究によって、発がんリスク、がんの進展との関連解析を行う。

(5) 大腸がんにおける新しいがん遺伝子マーカーとしての BORIS/CTCF の発現：

BORIS/CTCF特異的primerの発現を用いて、大腸がんの発現を検討し、臨床病理学的諸因子との関連性を追及する。

2) 長期追跡集団におけるがんの一次予防・二次予防・三次予防の基盤の確立

(1) がん一次予防に関するコホート研究

放影研では前身の原爆傷害調査委員会 (ABCC) により、1950年に原爆放射線健康影響調査を目的として約12万人からなる寿命調査集団が設定されている。この集団について今日まで50年以上にわたって死因調査並びに地域がん登録を利用したがん罹患調査が行われている。なお、この放影研疫学調査における死因データの特徴は、死亡の99%以上が把握可能であるという点にある。

この調査集団における身長・体重並びにその変動状況、喫煙その他の生活習慣に関する情報、既往歴、家族歴などは郵便調査により入手されており、その郵便調査はこれまでに1965年、1969年、1979年、1991年の4回行われた。本年度、1979年の郵便調査に回答した男性 15,350人、女性24,999人の合計40,349人を対象として1999年までの20年間追跡したデータを用いて、がん死亡に関与している危険因子並びに予防因子の定を試みた。そして今年度は消化器がんとして食道がんと胃がんを取り上げ、Cox比例ハザードモデルを用いて、郵便調査時の性、年齢、BMI、教育歴、放射線被ばく線量などを調整して喫煙、飲酒、食習慣などの因子の危険因子あるいは予防因子としての意義について解析し検討を行った。

(2) 保存血清を使った胃がん検診の開発

放影研は、1958年より約2万人の成人健康調査コホートを設定し、2年ごとに外来で診察してきた。1969年より血清保存を開始し、また全ての血球スミア標本はカバーグラスで封入され、暗所保存されてきた。

1990年からは、液体窒素中に末梢単核球を保存してきた。胃癌症例か否かは、広島及び長崎の腫瘍登録、組織登録から情報を得た。これらの情報は、全てデータベースとして整理されている。

血清試料が利用できる胃癌症例約450名、これらの症例と性、市、血清保存時期、年齢カテゴリーが合い、かつ被曝線量に関しては異なる線量カテゴリーに属する（カウンターマッチング）対照者900名を選び、コホート内症例対照研究を行う。診断時2年前及び10年前の保存血清でペプシノーゲン/Ⅱ比を測定し、萎縮性胃炎の診断を行う。*H. pylori* CagAに対するELISAにより感染を診断する。東アジア株に特有な抗CagA抗体が患者血清中にあるか否か、CagAの複数のペプチドを合成して、自験のELISAを設定し検討する。

一塩基多型により炎症応答性の個体差を合わせて検討する。既に胃酸分泌に関連性が証明されている*IL1B*遺伝子多型に加えて、*IL-1β*などのプロ炎症性サイトカインの発現を制御しているMHCクラスIII領域の*LTA/NFKBIL1/BAT1*ハプロタイプ、及び*H. pylori*由来の内毒素を識別する細胞側のレセプターをコードする*TLR4*遺伝子の多型を検討する。

(3) がん三次予防に関する研究

同じく放影研の追跡集団において、広島市がん登録とのレコードリンケージにより、各種がん罹患後の予後に及ぼす因子（予後改善因子、悪化因子）の特定を行い、がん罹患後の死亡率減少に寄与できる情報を求める。

3) 免疫学的発がん高危険群の同定

広島・長崎の成人健康調査受診者の胃がん発症群(150例)と対照群(300例)についてHLAクラスI (A, B, C)遺伝子多型を調べた。各HLA対立遺伝子間には非常によく保存

されている部分と多型に富む部分とが存在していることが知られている。それ故に、この対立遺伝子間のよく保存されている部分または特定のサブタイプに特異的な部分をプライマーとして用いPCR法により増幅した。得られたPCR産物を鋳型としてPCR直接塩基配列決定法により塩基配列を解析し、各HLA遺伝子のタイプを決定した。

(倫理面への配慮)

- 1) ヒト由来試料を用いた遺伝子発現解析では、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準じ、広島大学医学部ヒトゲノム研究倫理審査委員会の承認を受けている。
- 2) 寿命調査の実施については放影研の人権擁護委員会（倫理委員会）にて審査を受け承認されている。
- 3) 本研究に用いるリンパ球は、医学研究に関する同意文書に基づいて収集したもので、放影研の人権擁護委員会の承認を得たものである。

C. 研究結果

1) 胃がんの新規がん予防、早期発見システムの開発

SAGE法を用いて、胃がんの特異的に発現している新規遺伝子、APOC1, CEACAM6, Y13H12及びRegIVを同定した。その内、RegIVは胃スキルスに著しい高発現を示し、培養上清中に検出、現在、RegIVに特異的に結合するオリゴヌクレオチド（RNA aptamer）を調整中であり、血中測定系の確立と阻害実験等の機能を解析している。また、既知のがん関連遺伝子のSNPと発がんリスクを分子疫学的に検討した結果、HER2, EGF, MMP-1, MMP-9のSNPと胃がん発生あるいは進展、組織型との関連性が認められた（安井）。

2) 長期間追跡集団におけるがんの一次予防・二次予防・三次予防の基盤の確立

(1) 一次予防研究：原爆放射線の後影響を究明するために、1950年以来、放影研は固定集団の死亡追跡調査（広島・長崎の原爆被爆者93,000人及び非被爆者27,000人に関する寿命調査）を実施してきた。1998年時点で、調査対象者の50%以上が死亡し、その約22%が、がんで死亡。

本年度では、1999年までに得られた死亡データに基づき、食道がん88例及び胃がん720例のリスク因子と予防因子に関する解析をした。その結果から、食道がんの予防には、喫煙及び熱い食品の頻繁な摂取を避け、果物を頻繁に摂取すること、胃がんの予防には、喫煙を避け、かつ頻繁な野菜の摂取が効果的と結論づけられた（児玉、笠置）。

(2) 二次予防としては、20年以上にわたって長期保存している血清を用い、胃がん発生に高危険度である胃炎の新しい血清マーカーを確立するために、利用可能な保存血清500名の胃がん症例と1,000名の対照者を同定、現在、*H. pylori cagA*配列（東アジア株）の多型を識別する新規ELISA法を検討中である。（鈴木、藤原）。

(3) 三次予防研究としては、同じく放影研の追跡集団において、広島市がん登録とのレコードリンケージにより、各種がん罹患後の予後に及ぼす因子（予後改善因子、悪化因子）の特定を行い、がん罹患後の死亡率減少に寄与できる情報を求める。本年度は、生存者に大きな影響を与えるがん進行度や治療方法情報をコード化、入力作業が終了した（小山）。

3) 免疫学的発がん高危険群の同定

発がんに対する生体防御において重要な役割を担っているHLAクラスI (A, B, C)遺伝子多型と胃がん発症の関係とそれに及ぼ

す原爆放射線の影響について、胃がん150例と非がん300例について予備的検討を行った。非被爆者中の非がん例の各HLAクラスIの対立遺伝子頻度分布は、これまで報告されている日本人とほぼ同様の頻度分布を示した。その非被爆者中の胃がん例と非がん例とのHLA-B及びHLA-Cの遺伝子タイプ頻度分布の比較においては有意な差は認めなかったが、HLA-A遺伝子において、特に、A*2601を有する対象者における胃がん発症頻度がそれ以外の対象者に比較して、胃がん頻度は1.9%と明らかに低かった（ $p=0.005$ ）。これに対して、被爆者（平均被ばく線量0.8 Gy）におけるA*2601の胃がん発症率を調べると、被爆者の胃がん頻度は9.9%で非被爆者の頻度に比べ有意な発症率の増加が認められた（ $p=0.008$ ）。これらの結果は、HLA-A*2601を有する対象者が胃がん抵抗性群である可能性があり、更に被ばくによる胃がん発症頻度の上昇は被ばくによる免疫機能異常に基づく可能性を示唆している。（林）

4) 大腸がんの発育進展におけるBORIS/CTCF及びCOX2の発現

大腸がん及び非がん部大腸粘膜でのBORISmRNA発現は、微量であるが高頻度に認められた。BORISmRNA発現が非がん部粘膜よりがん部で高い症例では、がん深部浸潤部で粘液がんや多数の低分化腺がん細胞が出現する傾向が伺われた。CTCFmRNAは、すべての大腸がん及び非がん部粘膜で認められ、その発現程度と臨床病理学的諸因子に関連は見られなかった。大腸がんのCOX2蛋白発現は、高分化腺がん強く認められ、中等度発現時に微小血管新生に関連する傾向が伺われた。（谷山、田原・吉田研究協力者）。

D. 考察

1) SAGE法により新規に同定した胃癌関連遺伝子の内、蛋白として血中に分泌される可能性のある RegI V 蛋白に対する aptamer を SELEX 法を用いて作成し、血中測定系を開発する。これは、新しい胃癌予防に関する情報提供やがんの超早期発見の検診に直結するものである。次年度には、ELISA 法による血清診断系の確立とそれを応用した臨床検体における検討を行う予定である。一方、様々な既知のがん関連遺伝子の多型と発がんリスク、がんの進展との関連が明かとなった。SAGE 法で同定された特異的発現態度を示す遺伝子の多型は、胃癌の発生と深く関わっている可能性があり、今後の遺伝子多型の探索と関連解析は、がん予防にとって極めて重要な課題である。なお、食道がんについて、SAGE 法による遺伝子発現解析を既に開始しており、胃癌と同様のストラテジーで研究を展開する計画である。

2) 被ばくによる胃癌発症と HLA-A*2601 との関連性を明らかにしたことは、免疫機能に関連した胃癌抵抗性が被ばくの影響を受けている重要な証拠を示しており、今後長年蓄積してきた被爆者の免疫データ、HLA-II などの免疫関連遺伝子との関係を解析し、免疫学的発がん高危険群を同定する。さらに、医療放射線あるいは放射線への職業的曝露の健康影響を考える上で、放射線感受性の高い集団を同定することは重要である。

E. 結論

1) 胃癌の新規がん予防、早期発見システムの開発

SAGE 法による胃癌の網羅的遺伝子発現解析より、APOC1, CEACAM5, YF13H12, RegIV など多くの胃癌特異的発現遺伝子

を同定した。RegIV の機能解析から、分泌蛋白でありアポトーシスを抑制すること、かつ早期診断及び治療の新しい標的とみなされた。また、HER2, EGF, MMP-1, MMP-9 の SNP などの遺伝子多型と発がんリスクとの関連解析は、予防に関する重要な情報を与えるものである。

2) 長期間追跡集団におけるがんの一次予防・二次予防・三次予防の基盤の確立

放影研において長期間追跡調査されている集団において、郵便調査によって得られた生活習慣に関する情報を用いて、食道がん並びに胃癌の危険因子及び予防因子に関する解析を行った。その結果、食道がんの危険因子として喫煙、飲酒、熱い食べ物の摂取などが確認され、果物の摂取は逆に食道がん死亡の予防因子であることが認められた。しかしながら、喫煙と果物の摂取の間には交互作用は見られず、喫煙者においては果物の摂取に心がけても喫煙の影響を消し去ることは出来ず、禁煙がやはり予防上大切であることが再確認された。

3) 免疫学的発がん高危険群の同定

HLA-A*2601 を持つ集団は、放射線被曝の無い状況では胃癌の低危険群であることが示唆された。この HLA-A*2601 の集団は放射線被曝によって誘発される胃癌の高感受性群である可能性がある。即ち、HLA-A*2601 が胃癌の低リスクと関連していること、放射線被曝によって HLA-A*2601 のリスクが特に増加することが示唆された。これらの結果は HLA-A*2601 が放射線被曝による胃癌発症の高感受性群である可能性を示す。

4) 大腸がんの発育進展における BORIS/CTCF 及び COX2 の発現

大腸がんにおける BORIS/CTCF 発現と臨床病理学的諸因子の検討の結果、BORIS 発現が大腸がんの発生・進展・転移に関与す

るかどうかは今後の研究が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tahara E. Molecular Biology of Gastric Cancer. *Gastrointestinal Oncology*, pp.268-280, Oxford University Press, Inc., New York, New York, U.S.A., 2003

その他、分担研究報告書を参照。

2. 学会発表

1. Kasagi F, Kodama K, Sauvaget C, Koyama K, Tahara E. Risk Factors and protective factors of cancers of esophagus and stomach observed among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, The 6th Joint Conference of the American Association of Cancer Research and Japanese Cancer Association, Hawaii, U.S.A., January 25-29, 2004.

その他、分担研究報告書を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

食道がん・胃がんの新規がん予防・早期発見システムの開発

分担研究者 安井 弥 広島大学大学院 教授

SAGE法による胃がんの網羅的遺伝子発現解析より、APOC1、CEACAM5、YF13H12、RegIVをはじめとする多数の胃がん特異的発現遺伝子を 同定した。RegIVの機能解析から、分泌蛋白であること、アポトーシスを抑制することが明かとなり、診断の新規標的とみなされた。RegIVに対して、特異抗体及びSELEX法によるRNA aptamerを作成中である。既知のがん関連遺伝子のSNPと発がんリスクを分子疫学的に検討したところ、HER2、EGF、MMP-1、MMP-9のSNPと胃がんの発生あるいは進展、組織型との関連が認められた。

A. 研究目的

新規がん予防・早期発見法の開発のために、SAGE (serial analysis of gene expression) 法によって新規に同定した食道・胃のがん及び前がん性病変に特異的に発現する遺伝子がコードする蛋白に対するRNA aptamerあるいは抗体を作成し、血中測定系を開発する。がん関連遺伝子の多型と発がんリスク解析を行う。これらは、新しいがん予防に関する情報提供やがんの超早期発見に直結するものである。

B. 研究方法

1) SAGE 法による新規食道・胃がん及び前がん性病変特異的遺伝子の同定と蛋白の発現・合成

食道異形成、胃腺腫、腸上皮化生及びがん組織から抽出した RNA について SAGE 法で網羅的遺伝子発現解析を行い、正常粘膜のプロファイルと比較し、特異的遺伝子を同定する。全長 cDNA を調整、recombinant 蛋白を合成する。

2) SELEX 法による特異的 RNA aptamer の選択・増幅

recombinant 蛋白を標的とし、ランダムオリゴヌクレオチドライブラリーから SELEX 法によって特異的 RNA aptamer を選択・増幅する。

3) 特異的抗体及び RNA aptamer を用いた測定系の確立

特異的抗体及び RNA aptamer を蛍光色素標識/酵素標識し、ELISA 測定系を確立する。

4) 特異的発現遺伝子の多型と発がん・進展との関連解析

SAGE法及びRT-PCR法で同定したがん特異的新規遺伝子の多型を探索し、症例-対照研究及び症例-症例研究によって、発がんリスク、がんの進展との関連解析を行う。

（倫理面への配慮）

ヒト由来試料を用いた遺伝子発現解析では、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に準じ、広島大学医学部ヒトゲノム研究倫理審査委員会の承認の下に実施する。

C. 研究結果

1) SAGE 法による胃がん特異的遺伝子の探索

組織型や進行度の異なる5種類の胃がん組織における遺伝子発現をSAGE法にて網羅的に検討し、38903個のunique tagを同定した。その結果は、NCBIのGene Expression OmnibusにSAGE Hiroshima Gastric Cancer Tissue (GEO accession no. GSE545)として登録・公開した。得られた5個の胃がんSAGE library及びNCBI database中の2個の胃がんlibraryと正常胃粘膜との比較から、特に発現の異なる128 tagについてクラスター解析を行い、すべての胃がんで共通して発現が亢進している15 tagを抽出した。これらに対応する16遺伝子の発現を定量的RT-PCRで胃がん症例46例について検討したところ、APOC1では67.4%、CEACAM6では50.0%、YF13H12では47.8%と高率に、がん部における過剰発現(T/N比>2)が確認された。胃がん診断の新しい標的と考えられる。

2) RegIVの発現と機能解析

スキルス型胃がんと正常胃粘膜のSAGE libraryの比較から、スキルス型胃がんに著しい高発現を示す遺伝子としてRegIVを同定した。RegIVはカルシウム依存性レクチンスーパーファミリーに属し、炎症性腸疾患及び大腸がんでの発現は確認されているが、その生物学的機能は不明である。定量的RT-PCRにおいて、胃がんの大部分で発現が確認され、46.7%の胃がんで正常に比べて5倍以上の発現レベルを示した。乳がん、肺がん、食道がんでは発現は殆どなかった。次に、生物学的機能を明らかにするために、RegIVの発現レベルの低い胃がん細胞株にRegIV発現ベクターを導入した。RegIVは、培養上清中に検出され、細胞外

に分泌されることが確認された。RegIVの遺伝子導入による細胞増殖促進効果は軽度であったが、Invasion assayにより最大で2倍の浸潤能の促進を示した。さらに、RegIVは、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(TSA)及び5-FUによるアポトーシスを抑制し、同時に、p85^{PARP}及びp21^{WAF1}の発現を抑制した。以上より、RegIVは、胃がんの診断のみならず治療の標的ともなると考えられた。現在、RegIVに対するポリクローナル抗体を作成するとともに、RegIVに特異的に結合するオリゴヌクレオチド(RNA aptamer)を調整中であり、血中測定系の確立と阻害実験等の機能解析を計画している。

3) 遺伝子多型と胃がんの発生・進展

SAGE法で同定した胃がん特異的発現遺伝子の多型と発がんリスクとの相関解析を計画しているが、本年度はその前段階として、既知のがん関連遺伝子のsingle nucleotide polymorphism (SNP)に関する症例-対照研究を行った。HER2/c-erbB2の膜貫通ドメインのSNP(A655G: Ile/Val)ジェノタイプは、胃がん症例(212例)と健常対照症例(287例)で有意に異なっており、さらに、深達度、リンパ節転移、ステージとの間にも有意な相関を認めた。EGFの5'非翻訳領域(61)のSNP(A/G)については、胃がん症例と対照症例との間にジェノタイプの有意差がみられ、特にH. Pylori非感染者のその傾向は顕著であった(P=0.004, OR=4.08)。matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)及びMMP-9のプロモーターのSNPでは、症例-対照間にジェノタイプの差はなかった。

D. 考察

SAGE法は特異的な発現態度を示す遺伝子の抽出に極めて有用であり、また、NCBI

のデータベース中の他のSAGEライブラリーと直接に発現を比較できる利点を有している。今回、多くの胃がん特異的発現遺伝子を同定したが、その内、RegIVは分泌蛋白であり、かつアポトーシスの抑制や浸潤能の促進作用を持つことから、診断のみならず治療の標的となるものと考えられた。さらに、早期がんにおいても過剰発現が認められ、早期診断マーカーとなり得る。次年度には、ELISA法による血清診断系の確立とそれを応用した臨床検体における検討を行う予定である。一方、様々な既知のがん関連遺伝子の多型と発がんリスク、がんの進展との関連が明かとなった。SAGE法で同定された特異的発現態度を示す遺伝子の多型は、胃がんの発生と深く関わっている可能性があり、今後の遺伝子多型の探索と関連解析は、がん予防にとって極めて重要な課題である。なお、食道がんについて、SAGE法による遺伝子発現解析を既に開始しており、胃がんと同様のストラテジーで研究を展開する計画である。

E. 結論

SAGE法により多くの胃がん特異的発現遺伝子を同定し、特にRegIVは早期診断及び治療の新しい標的と見なされた。また、遺伝子多型と発がんリスクとの関連解析は、予防に関する重要な情報を与えるものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oue N, Yasui W et al. Gene expression profile of gastric carcinoma: Identification of genes and tags

potentially involved in invasion, metastasis and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Res* 2004 in press.

2. Oshimo Y, Yasui W et al. Frequent epigenetic inactivation of RIZ1 by promoter hypermethylation in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004 in press.
3. Matsumura S, Yasui W et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter is correlated with histological differentiation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004 in press.
4. Kondo T, Yasui W et al. Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma. *Cancer Res* 2004 64:523-529.
5. Yasui W, et al. Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 2003 983:220-231.
6. Ohgaki H, Yasui W et al. Chapter 3: Genetic pathways to human cancer. *Handbook of Experimental Pharmacology. Mechanisms in Carcinogenesis and Cancer Research*, ed. by Harri Vainio and Eino Hietanen, Springer-Verlag, pp25-39, 2003
7. Kitadai Y, Yasui W et al. Helicobacter Pylori infection influences expression of genes related to angiogenesis and invasion in human gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 311:809-814.
8. Tanimoto K, Yasui W et al. Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis* 2003

24:1779-1783.

9. Oue N, Yasui W et al. Expression of the TSP-1 gene and its association with promoter hypermethylation in gastric carcinomas. *Oncology* 2003 64:423-429.
10. Kuraoka K, Yasui W et al. A single nucleotide polymorphism in the transmembrane domain coding region of HER-2 is associated with development and malignant phenotype of gastric cancer. *Int J Cancer* 2003 107:593-596.
11. Kuniyasu H, Yasui W et al. Helicobacter pylori infection is closely associated with telomere reduction in gastric mucosa. *Oncology* 2003 65:275-282.

2. 学会発表

1. Yasui W et al. Search for new biomarkers of gastric cancer through serial analysis of gene expression. The 13th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "New approach to identification of biomarkers for early cancer detection", Symposium, Hiroshima (Japan), October 26, 2003
 2. Oue N, Yasui W et al. Identification of regenerating gene type IV (Reg IV), strongly expressed in gastric carcinoma, using serial analysis of gene expression. The 13th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "New approach to identification of biomarkers for early cancer detection", poster session, Hiroshima (Japan), October 26, 2003
 3. Mastumura S, Yasui W et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter is correlated with tumor progression and malignant phenotype of gastric cancer. The 95th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orlando, Florida (USA), March 27-31, 2004
 4. Oue N, Yasui W et al. Gene expression profile of gastric carcinoma: Identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis using serial analysis of gene expression. The 95th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orlando, Florida (USA), March 27-31, 2004
 5. 安井 弥, 他. 遺伝子診断・DNAチップはHEに勝てるのか? : 研究病理の立場から「がんの生物学的特性と形態像の分子病理学的探索」 第92回日本病理学会総会, 公開シンポジウム (吉田富三生誕100年記念シンポジウム), 4月23-25日, 福岡, 2003
 6. 安井 弥. モーニングセッション臓器がんシリーズ: 胃癌の病因・病態の分子病理学的探索と臨床応用. 第62回日本癌学会総会, モーニングレクチャーM9, 9月25-27日, 東京, 2003
 7. 大上直秀, 安井 弥, 他. 分子生物学からみた胃癌診療: SAGE法により同定された胃癌高発現遺伝子RegIVの解析. 第76回日本胃癌学会総会, シンポジウム-S1, 3月4-6日, 米子, 2004
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合 研究事業）
分担研究報告書

長期追跡集団におけるがん一次予防に関する疫学研究

分担研究者 児玉 和紀 （財）放射線影響研究所 疫学部長
笠置 文善 （財）放射線影響研究所 疫学部副部長

放射線影響研究所（放影研）において長期間追跡調査されている集団において、郵便調査によって得られた生活習慣に関する情報を用いて、食道がん並びに胃がんの危険因子及び予防因子に関する解析を行った。その結果、食道がんの危険因子として喫煙、飲酒、熱い食べ物の摂取などが確認され、果物の摂取は逆に食道がん死亡の予防因子であることが認められた。しかしながら、喫煙と果物の摂取の間には交互作用は見られず、喫煙者においては果物の摂取に心がけても喫煙の影響を消し去ることは出来ず、禁煙がやはり予防上大切であることが再確認された。胃がんの危険因子としては喫煙が特に重要で、野菜摂取が予防要因となり得る可能性も考えられた。

以上より、食道がんの一次予防には喫煙や熱い食べ物の頻回の摂取を避け、果物の頻回の摂取に努めることが重要と考えられた。胃がんの一次予防には、喫煙を避けることが特に重要で、野菜の摂取に努めることも意味があると示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、21世紀におけるがんの罹患率、死亡率並びに生存率の改善を目指して科学的根拠に基づいた包括的ながん予防法の開発を行うことにあり、そのために放影研の長期追跡集団を用いて消化器がんの予防システムの確立を目指すものである。

我国では、がん予防に関するコホート研究として古くは平山らによる計画調査が、また最近では厚生労働省コホート研究や文部科学省コホート研究があげられる。それらは、いずれも10万人以上の大規模コホートではあるが、いまだ追跡期間が比較的短く、危険因子に関する詳細な情報の収集は今後の調査継続にかかっているといえる。これに対して、放影研の調査集団は規模が12万人であることに加えて、調査が1950年から継続されている。本コホート研究は調査集団の規模、追跡期間の長さ、追

跡方法の多彩さ、がん死亡や罹患の把握の精度等では世界に他に類をみないコホート研究となっている。今回の研究で、がんの危険因子や予防因子の解析を行い、特に消化器がんの一次予防に有用な危険因子並びに予防因子の特定に努めた。

B. 研究方法

放影研では前身の原爆傷害調査委員会（ABCC）により、1950年に原爆放射線健康影響調査を目的として約12万人からなる寿命調査集団が設定されている。そして、この集団について今日まで50年以上にわたって死因調査並びに地域がん登録を利用したがん罹患調査が行われている。なお、この放影研疫学調査における死因データの特徴は、死亡の99%以上が把握可能であるという点にある。

この調査集団における身長・体重並びに

その変動状況、喫煙その他の生活習慣に関する情報、既往歴、家族歴などは郵便調査により入手されており、その郵便調査はこれまでに1965年、1969年、1979年、1991年の4回行われた。

本研究では、1979年の郵便調査に回答した男性15,350人、女性24,999人の合計40,349人を対象として1999年までの20年間追跡したデータを用いて、がん死亡に関与している危険因子並びに予防因子の定を試みた。そして今年度は消化器がんとして食道がんと胃がんを取り上げ、Cox比例ハザードモデルを用いて、郵便調査時の性、年齢、BMI、教育歴、放射線被ばく線量などを調整して喫煙、飲酒、食習慣などの因子の危険因子あるいは予防因子としての意義について解析し検討を行った。

(倫理面への配慮)

本調査の実施については放影研の人権擁護委員会(倫理委員会)にて審査を受け承認されている。解析にあたってはグループ化を行い個人を特定できないよう配慮している。また、本調査の実施については放影研のホームページ上で公開している。

C. 研究結果

20年の追跡期間中に13,351人の死亡が確認された。その内、がん死亡は3,459人で、食道がんは88人、胃がんは720人認められた。

がん死亡と危険因子並びに予防因子の解析では、表1に示したように、食道がん死亡と喫煙及び熱い食べ物や味噌汁の摂取との間に正の相関が、果物の摂取との間に負の相関が認められた。喫煙者においては、非喫煙者に対する相対リスクは2.94(95%CI: 1.29-7.18)であった。飲酒習慣の有る者はそうでない者に比べて相対リスクは3.44(95%CI: 1.92-6.57)、熱い食べ物を好む

者はそうでない者に比べて相対リスクは3.45(95%CI: 1.90-5.96)であった。また、味噌汁を毎日摂取する者ではそうでない者に対して相対リスクは2.01(95%CI: 1.06-3.99)であった。これに対し、果物を毎日摂取する者ではあまり摂取しない者に比べて相対リスクは0.48(95%CI: 0.24-0.95)であった(表1)。果物の摂取に関しては更に喫煙者と非喫煙者に分けて同様の解析も行ったが、結果に差を認めず、喫煙と果物摂取との間には交互作用が無いものと考えられた。

胃がんについての解析は表2に示した。胃がん死亡と喫煙との間に正の相関が、野菜の摂取との間に負の相関が認められた。喫煙者においては、非喫煙者に対する相対リスクは1.72(95%CI: 1.37-2.14)であった。飲酒習慣の有る者はそうでない者に比べて相対リスクは1.02(95%CI: 0.86-1.21)で有意とはならなかった。熱い食べ物を好む者はそうでない者に比べて相対リスクは1.11(95%CI: 0.84-1.45)でこれも有意とはならなかった。また、味噌汁を毎日摂取する者ではそうでない者に対して相対リスクは1.07(95%CI: 0.88-1.30)であり、同じく有意とはならなかった。これに対し、野菜を毎日摂取する者ではあまり摂取しない者に比べて相対リスクは0.81(95%CI: 0.65-1.00)で、有意性があることが示唆された(表2)。野菜の摂取に関しては更に喫煙者と非喫煙者に分けて同様の解析も行ったが、結果に差を認めず、喫煙と野菜摂取との間には交互作用が無いものと考えられた。

D. 考察

先に述べたように、日本人におけるがん予防に関するコホート研究として結果が得られているものとしては、平山らによる計画調査がある。それによると、食道がんにおける喫煙の影響は既に明らかとなってい

る。今回の我々の解析でも、喫煙者においては非喫煙者に対する相対リスクは2.94 (95%CI: 1.29-7.18)と、喫煙により食道がん死亡リスクが約3倍に上昇することが明らかとなった。

計画調査では、飲酒についても影響が判明しており、相対リスクはビールで1.1、日本酒で1.2、ウイスキーで1.7、焼酎で2.0と報告されている。今回の我々の解析では、飲酒の種類別の解析はできなかったものの、飲酒習慣のある者はそうでない者に比べて相対リスクは3.44 (95%CI: 1.92-6.57)で、飲酒により食道がん死亡リスクが3倍以上に上昇することが明らかとなった。

熱い食べ物や塩分の多い食べ物の摂取が食道がんに関連していることもこれまで言われてきているが、今回の解析で熱い食べ物を頻回に摂取する者はそうでない者に比べて相対リスクは3.45 (95%CI: 1.90-5.96)と上昇していた。また、味噌汁を毎日摂取する者ではそうでない者に対して相対リスクは2.01 (95%CI: 1.06-3.99)であった。味噌汁の摂取に関しては、それが熱い食べ物であるのと同時に塩分の多い食べ物でもあり、リスクとして塩分の関与も考えられる。

これに対し、果物を毎日摂取する者ではあまり摂取しない者に比べて相対リスクは0.48 (95%CI: 0.24-0.95)と有意に低値を示し、果物の摂取が食道がんに対し予防的に作用していることが明らかとなった。これは平山らの報告とも一致している。ただし、喫煙者と非喫煙者に分けて同様の解析も行ったが、結果に差を認めず、喫煙と果物摂取との間には交互作用が無いものと考えられた。つまり、喫煙者においては果物の摂取に心がけても喫煙の影響を消し去ることは出来ず、禁煙がやはり予防上大切であることが再確認された。

平山らによる計画調査では、胃がんにおける喫煙の影響も既に明らかとなっている。今回の我々の解析でも、喫煙者においては非喫煙者に対する相対リスクは1.72 (95%CI: 1.37-2.14)であり、喫煙により胃がん死亡リスクが約2倍に上昇することが明らかとなった。

飲酒並びに熱い食べ物の摂取は胃がんに対しては有意な危険因子とはなっていなかった。

野菜を毎日摂取する者ではあまり摂取しない者に比べて相対リスクは0.81 (95%CI: 0.65-1.00)で、野菜によって胃がんリスクが低下する可能性は示唆されたが、有意性はボーダーラインであり、予防因子として確定するにはいたらなかった。また、野菜の摂取に関しては更に喫煙者と非喫煙者に分けて同様の解析も行ったが、結果に差を認めず、喫煙と野菜摂取の間には交互作用が無いものと考えられた。食道がんにおける果物摂取の場合と同じく、喫煙者においては野菜の摂取に心がけても喫煙の影響を消し去ることは出来ず、禁煙がやはり予防上大切であると考えられた。

以上より、食道がんの一次予防には喫煙や熱い食べ物の頻回の摂取を避け、果物の頻回の摂取に努めることが重要と考えられた。胃がんの一次予防には、喫煙を避けることが特に重要で、野菜の摂取に努めることも意味があると示唆された。

E. 結論

放影研において長期間追跡調査されている集団において、郵便調査によって得られた生活習慣に関する情報を用いて、食道がん並びに胃がんの危険因子及び予防因子に関する解析を行った。その結果、食道がんの危険因子として喫煙、飲酒、熱い食べ物の摂取などが確認され、果物の摂取は逆に

食道がん死亡の予防因子であることが認められた。しかしながら、喫煙と果物の摂取の間には交互作用は見られず、喫煙者においては果物の摂取に心がけても喫煙の影響を消し去ることは出来ず、禁煙がやはり予防上大切であることが再確認された。

胃がんの危険因子としては喫煙が特に重要で、野菜摂取が予防要因となり得る可能性も考えられた。

以上より、食道がんの一次予防には喫煙や熱い食べ物の頻回の摂取を避け、果物の頻回の摂取に努めることが重要と考えられた。胃がんの一次予防には、喫煙を避けることが特に重要で、野菜の摂取に努めることも意味があると示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sauvaget C, Kasagi F, Waldren C. Dietary factors and cancer mortality among atomic bomb survivors. *Mutat Res* 2004 in print.

2. 学会発表

Kasagi F, Kodama K, Sauvaget C, Koyama K, Tahara E. Risk Factors and protective factors of cancers of esophagus and stomach observed among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, The 6th Joint Conference of the American Association of Cancer Research and Japanese Cancer Association, Hawaii, U.S.A., January 25-29, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 食道がん死亡における相対リスクと95%信頼区間

因子	単位	相対リスク	95% 信頼区間
喫煙	禁煙/喫煙なし	2.10	(0.78, 5.72)
	喫煙/喫煙なし	2.94	(1.29, 7.18)
飲酒	あり/なし	3.44	(1.92, 6.57)
果物摂取	時々/ほとんどない	0.81	(0.46, 1.44)
	毎日/ほとんどない	0.48	(0.24, 0.95)
味噌汁摂取	時々/ほとんどない	1.76	(0.88, 3.59)
	毎日/ほとんどない	2.01	(1.06, 3.99)
熱い食べ物	好む/好まない	3.45	(1.90, 5.96)

相対リスクは性、年齢、BMI、教育レベル、放射線被ばく線量で調整

表2. 胃がん死亡における相対リスクと95%信頼区間

因子	単位	相対リスク	95% 信頼区間
喫煙	禁煙/喫煙なし	1.58	(1.22, 2.04)
	喫煙/喫煙なし	1.72	(1.37, 2.14)
飲酒	あり/なし	1.02	(0.86, 1.21)
野菜摂取	時々/ほとんどない	0.88	(0.73, 1.05)
	毎日/ほとんどない	0.81	(0.65, 1.00)
味噌汁摂取	時々/ほとんどない	0.95	(0.78, 1.17)
	毎日/ほとんどない	1.07	(0.88, 1.30)
熱い食べ物	好む/好まない	1.11	(0.84, 1.45)

相対リスクは性、年齢、BMI、教育レベル、放射線被ばく線量で調整

厚生労働科学研究費補助金（がん予防等健康科学総合 研究事業）
分担研究報告書

長期追跡集団におけるがん三次予防に関する疫学研究

分担研究者 小山幸次郎 （財）放射線影響研究所 疫学部室長

本研究では、がん罹患より前に回答した生活習慣に関する郵便調査情報を用いて、がん罹患後の予後に影響する因子（予後改善因子、悪化因子）を特定し、がん罹患後の予後改善の方法を追求することを目的とする。放射線影響研究所（放影研）で行われた1978年郵便調査に回答し、1980～1998年の間に何らかのがんに罹患した5,227名を対象として、生活習慣の違いによって生存率に差が生じるかどうか検討する。本年度は、生存率に大きな影響を与えるがん進行度や治療方法情報をコード化、入力作業が終了した。次年度には、生存率を算出し、生活習慣情報を用いて、予後影響因子の特定を行う予定である。本研究で用いられる郵便調査情報はがん罹患以前の情報であり、通常解析で行われるがん罹患時の情報を元に予後規定因子を解析する方法とは本質的に異なる。本研究は、がん罹患以前の情報を用いることで、がん罹患により予後を規定する可能性のある要因がすでに変容している可能性を排除できないといったバイアスが否定され、再発防止や死亡率低下に有用な情報を得ることができると考えられる。

A. 研究目的

本研究は、各種がん罹患後の予後に影響を及ぼす因子（予後改善因子、悪化因子）の特定を行い、がん罹患後の予後改善の方法を追及することを目的とする。がん罹患が避けられなかった患者の予後を改善し、死亡率を低下させることはがん予防対策の大きな要素であり、がんの再発因子や予後改善要因を特定することにより、がん死亡低下に貢献できるものと期待される。

B. 研究方法

放影研では、前身の原爆傷害調査委員会（ABCC）により、1950年に原爆放射線影響調査を目的として、約12万人から成る寿命調査集団が設定されている。この集団については、今日まで50年以上にわたって死因調査並びに地域がん登録データを利用した

がん罹患調査が行われている。なお、この集団における死因調査で特記すべきことは、対象者の死亡原因の99%が把握できることにある。

また、この調査集団では、1965年、1969年、1978年、1991年の4回にわたって郵便調査を実施し、身長・体重並びにその変動状況、喫煙・飲酒その他の生活習慣に関する情報を郵便調査によって入手してきた。

本研究では寿命調査集団対象者の内、1978年郵便調査に回答し、かつ1980年1月1日から1998年12月31日までの期間に広島及び長崎の地域がん登録データベースに登録された症例（中枢神経系の良性腫瘍を含む）を解析対象とする。罹患したがんの進行度や治療方法、受診動機別に生存曲線をKaplan-Meyer法により求めるが、この時郵便調査で得られた情報を用いて、生活習慣

の違いによって生存率に差が生じるか否かを解析する。

本研究では、まず寿命調査集団対象者に発生したがんについて、進行度、治療方法、受診動機などの情報を地域がん登録データベースに取り込むことを第一段階とした。これらのがん情報は、放影研職員が地域のがん拠点病院を訪問、医療記録の閲覧・転記することによって収集されている。転記されたがん情報はコーディングされ、その後データベースへ入力される。

解析対象とするがんを第一がん (first primary cancer) に特定し、死亡情報のみでがんと判明したがん (Death Certificate Only: DCO case) を除外したので、解析対象例の総数は、最終的に5,227例となった。次年度には、郵便調査で得られた生活習慣情報とがん患者 (全がんと可能な限り多くの部位別がん) の生存率から、予後影響因子の特定を行う予定である。

(倫理面への配慮)

寿命調査の実施については放影研の人権擁護委員会で承認済みである。解析にあたっては、グループ化により個人を特定できないよう配慮している。得られた結果も個人別のものとはなり得ず、がん予防に有用な情報が得られると予想されることにより、利益の還元は考えられるにしても、対象者が不利益を蒙る可能性は低いと考えられる。

C. 研究結果

平成15年度は、寿命調査集団対象者が、1980年から1998年までに罹患したがん及び中枢神経系の良性腫瘍について、進行度や治療方法、受診動機などをコード化し、入力作業を終了した。解析対象者5,227名の背景を表1に示す。性別は男性2,485名、女性2,742名で、男女差はなかった。がん罹患時

の年齢は、65-69歳をピークに70-74歳、75-79歳、60-64歳の順であった。がん診断年を1980年から5年毎にグループ化した (最終グループは1995-98年の4年間)、がん罹患数にグループ間で大きな差はみられなかった。がん罹患部位は、胃が最も多く約5分の1を占めた。次いで、結腸、肝臓、乳房の順であった。対象者の被曝線量は、およそ3分の1が0-5 mSvの被曝を受け、30%が5-99mSv、20%が100-999mSvであり、1Sv以上の被曝を受けたのは5%であった。がん症例のうちの7割が2003年までに死亡した。

D. 考察 と E. 結論

本研究で用いられる郵便調査情報はがん罹患以前の情報であり、通常解析で行われるがん罹患時の情報を元に予後規定因子を解析する方法とは本質的に異なる。がん罹患以前の情報を用いることで、がん罹患により予後を規定する可能性のある要因がすでに変容している可能性を排除できないといったバイアスが否定され、再発防止や死亡率低下に有用な情報を得ることができる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし