

表1 解析対象者の背景

性別	例数	(%)
男	2,485	(47.5)
女	2,742	(52.5)

年齢	例数	(%)
-44	99	(1.9)
45-49	160	(3.1)
50-54	384	(7.3)
55-59	599	(11.5)
60-64	705	(13.5)
65-69	854	(16.3)
70-74	780	(14.9)
75-79	708	(13.5)
80-84	568	(10.9)
85-	370	(7.1)

線量(mSv)	例数	(%)
0-5	1,737	(33.2)
5-99	1,630	(31.2)
100-999	1,067	(20.4)
1000-	244	(4.7)
不詳	549	(10.5)

転帰(1980-2003年)		
生存	1,598	(30.6)
死亡	3,629	(69.4)

診断年	例数	(%)
1980-84	1,235	(23.6)
1985-89	1,345	(25.7)
1990-94	1,457	(27.9)
1995-98	1,190	(22.8)

部位	例数	(%)
食道	91	(1.7)
胃	1,154	(22.1)
結腸	630	(12.1)
直腸	266	(5.1)
肝臓	472	(9.0)
乳房	381	(7.3)
前立腺	139	(2.7)
子宮	198	(3.8)
膀胱	153	(2.9)
悪性リンパ腫	116	(2.2)
白血病	72	(1.4)
その他	1,555	(29.7)

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

保存血清を使った胃がんの検診の開発研究

分担研究者 鈴木 元 （財）放射線影響研究所 臨床研究部長  
藤原 佐枝子 （財）放射線影響研究所 臨床研究部副部長

保存血清及び血球（ゲノムDNA）を用いて、胃がん高リスク群に相関する新規バイオマーカー及び遺伝子多型の同定を行う。平成15年度は、保存血清利用可能胃がん症例約450症例とその対照者900症例を同定し、所内の研究計画書審査委員会、人権擁護委員会、遺伝子研究に関する倫理委員会、生物学的試料委員会の審査を受け研究計画は了承された。並行して、東アジア株の *H. pylori* CagA配列に特異的な抗原を認識するELISA法の開発を試みた。また、*IL1B, LTA/NFKBL1/BAT1, TLR4*の遺伝子多型の測定法を確立、ないし試験中である。

A. 研究目的

萎縮性胃炎及び組織型が腸型ないし、びまん型の胃がんは、*H. pylori* 感染と因果関係が深い。感染個体の炎症応答に係わる遺伝子多型がこれらの疾患の発症に与える影響を検討する。また、*H. pylori* CagA 配列に特異的な免疫応答の強弱がこれらの疾患発症に関係するか否か検討する。これらの研究によって、胃がんの高リスク群を遺伝的に同定する事を研究目的とする。

また、安井先生のグループで新規バイオマーカーが発見された場合は、本グループの保存血清を用いてリスク評価に有用か否か検討する。

B. 研究方法

放射線影響研究所は、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ガラスで封入され、暗所保存されてきた。1990年からは、液体窒素中に未

梢単核球を保存してきた。胃がん症例か否かは、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がん症例約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I/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/NFKBILI/BATI*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。

#### (倫理面への配慮)

本研究計画は、所内の研究計画書審査委員会、人権擁護委員会、遺伝子研究に関する倫理委員会、生物学的試料委員会の審査を受け研究計画は了承されており、国の疫学研究のガイドライン、ゲノム・遺伝子研究のガイドラインに従って行われている。

#### C. 研究結果

平成15年度は、症例と対照者の同定作業、及び上記所内審査に費やされたため、症例や対照の血清やDNAは未だ扱っていない。

予備実験として、*IL1B* C-31Tアリアル、*LTA/NFKBILI/BATI*ハプロタイプを蛍光共鳴エネルギー移転PCR法(FRET-PCR)で測定する手技を確立した。直接シーケンス法と比較することによって精度は確認した。*TLR4*の一塩基多型に関しては、現在プライマーとプローブを設定して検討中である。

東アジア株に特有なCagA配列に関するELISA法の開発に関しては、所内のボランティア100名よりインフォームドコンセントを取得後、呼気テスト、*H. pylori* IgG抗体価、CagA、IgG抗体価、東アジア株に特有な配列をカバーする四種類のペプチドを用いたELISAを行う予定である。途中段階ではあるが、東アジア株に特有なペプチドに対するELISAは、擬陽性が多く、さらに検討を加えている。

#### D. 考察

研究計画は順調に進んでいる。*H. pylori* は、内毒素と細胞側のTLR-4レセプターの相互作用により転写因子NFkBを活性化し

炎症を惹起する。さらにCagA産物を上皮細胞に移入することにより、炎症応答に関するシグナルをかく乱すると考えられる。El-Omarらは、*IL1B* 遺伝子多型が萎縮性胃炎及び胃がんと相関することを報告している。TLR-4には、内毒素と結合力の低い多型が知られており、またIL1-βを含めた炎症応答性を制御するハプロタイプがMHCクラスIII領域にあることが近年明らかになってきた。本研究は、これらの三箇所のゲノム領域の相互作用と萎縮性胃炎及び胃がんととの相関を調べる初めての研究である。

#### E. 結論

順調に進んでいる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Suzuki G, Izumi S, Hakoda M, Takahashi N. *LTA252G* allele containing haplotype block is associated with high serum C-reactive protein levels. *Atherosclerosis* 2004 in press.
2. Suzuki G, Shimada Y, Hayashi T, Akashi M, Hiramata T, Kusunoki Y. An Association Between Oxidative Stress and Radiation-induced Lymphomagenesis. *Rad Res* 2004 in press.
3. Nishimura M, Kakinuma S, Yamamoto D, Kobayashi Y, Suzuki G, Sado T, Shimada Y. Elevated Interleukin-9 Receptor Expression and Response to Interleukins-9 and -7 in Thymocytes during Radiation-Induced T-Cell Lymphomagenesis in B6C3F1 Mice, *J Cell. Physiol* 2003 198: 82-90.
4. Fujiwara S, Sharp GD, Cologne J, Kusumi S, Akahoshi M, Kodama K, Suzuki G,

- Yoshizawa H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection among Atomic-Bomb Survivors. *Radiat Res* 2003 159:780-786.
5. Sharp GB, Mizuno T, Cologne JB, Fukuhara T, Fujiwara S, Tokuoka S, Mabuchi K. Hepatocellular carcinoma among atomic bomb survivors: Significant interaction of radiation with hepatitis V virus infections. *Int J Cancer* 2003 103:531-527.
6. Hayashi T, Fujiwara S, Morishita Y, Kusunoki Y, Nakashima E, Nakanishi S, Suzuki G, Nakachi K, Kyoizumi S. HLA haplotype is associated with diabetes among atomic bomb survivors. *Hum Immunol* 2003 64: 910-916.

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

## 免疫学的発がん高危険群の同定

分担研究者 林 奉権（財）放射線影響研究所  
放射線生物学/分子疫学部 主任研究者

免疫的宿主防御は、ウイルス関連がんだけでなく発がん全体に重要な役割を果たすと考えられる。本研究の目的は、発がん感受性の個人差を免疫的宿主防御に関与する遺伝子の多型によって明らかにすることである。一方、放射線被曝は宿主の免疫系に大きな影響を与えることから、原爆被曝者を対象とした発がん研究は発がん感受性と放射線感受性の交点としての意義を持つ。我々はまず被曝者コホート研究で放射線被曝との関連が報告されている胃癌について、免疫関連遺伝子として重要な役割を担っているHLAクラスI (A,B,C) 遺伝子多型による発がん感受性及びそれに及ぼす放射線被曝の影響について予備的検討を行った。被曝者を対象として放射線影響研究所（放影研）で行っている成人健康調査研究に基づき、胃癌発症群(150例)と対照群(300例)について予備的検討を行った。非被曝者中の対照群の各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の分布とほぼ同様であった。症例・対照群を放射線被曝の有無によって分けて比較したところ、被曝の無い集団では、HLA-A遺伝子、特に、A\*2601の頻度が胃癌群(1.9%)で対照群(10.6%)より有意に低かった。一方、被曝のあった集団(平均被曝線量0.8 Gy)では、胃癌群(9.9%)ではA\*2601の頻度が増加し、被曝対照群(8.4%)と差がなくなった。すなわち、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。

### A. 研究目的

本研究は、HLAクラスター領域に存在する免疫関連遺伝子多型に基づいて発がん高危険群を同定するとともに、放射線被曝による発がんの危険が高い集団を同定することを目的とする。HLAクラスター領域には、ヒトがんの6割で発現し免疫細胞の標的認識に重要な役割を果たすMICA・MICB、及びTNFAが存在する。特に、HLA分子は抗原ペプチドに対する受容体であり、抗原ペプチドとの複合体形成により、それと適合性の

ある特定のT細胞受容体 (TCR) 分子と結合する。したがって、HLA遺伝子の多型はHLA分子上に表現される抗原ペプチドのレパートリーだけでなく、Tリンパ球の認識のレパートリーにも異なった作用を及ぼすと考えられる。ヒトの免疫応答の中心的な役割を担うHLA遺伝子の多型が、標的分子の認識に個人差をもたらし、このため、ある特定のHLAハプロタイプの集団でがんの発生が多いということが考えられる。被曝者の免疫能の低下および炎症の亢進がすでに報

告されており、その中のある特定のハプロタイプを有する集団に特定のがんの発生率が非被爆者に比べて顕著に高いという可能性は充分考えられる。

本研究により、従来の薬物代謝・DNA修復とは異なる視点から、新規の免疫学的発がん高危険群が見出されると期待される。また、医療放射線への曝露による発がんの予防に資する知見が得られると期待される。

本年度は、まず被爆者コーホート研究で放射線被曝との関連が報告されている胃がんについて、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ことがすでに報告されているHLAクラスI (A, B, C)遺伝子多型による発がん感受性及びそれに及ぼす放射線被曝の影響について予備的検討を行った。

## B. 研究方法

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。それゆえに、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)

本研究に用いる試料は、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。研究においては、すべての検体は匿名化されて解析され、「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」を厳守した。

## C. 研究結果

被曝の無い集団での対照群の各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集団のものとほぼ同様であった。HLA-B及びHLA-Cの遺伝子タイプ頻度分布の比較では、被曝の有無によらず胃がん発症群と対照群の間に有意な差は認められなかった。被曝の無い集団では、HLA-A遺伝子、特に、A\*2601の頻度が胃がん群(1.9%)で対照群(10.6%)より有意に低かった。

一方、被曝のあった集団(平均被曝線量0.8 Gy)では、胃がん群(9.9%)ではA\*2601の頻度が増加し、被曝対照群(8.4%)と差がなくなった(表1)。これをオッズ比で比べると、被曝していない集団でA\*2601を持っている人に比べて、A\*2601を持っている人の胃がんリスクは0.14 (95%CI, 0.03 – 0.64)と低い。被曝した集団では0.91 (0.47 – 1.77)と放射線被曝によってHLA-A\*2601の胃がんリスクが特に増加することが示唆された(図1)。

## D. 考察

今回、我々の得た結果から、HLA-A\*2601を持つ集団は、放射線被曝の無い状況では胃がん低危険群であることが示唆された。さらに、放射線被曝のあったHLA-A\*2601の集団では胃がんリスクが被曝の無い集団でのリスクの約6倍に増加することから、HLA-A\*2601は放射線被曝によって誘発される胃がんの高感受性群である可能性がある。原爆被爆者では被曝線量に依存した免疫系の変化、特にT細胞機能の変化、ナイーブCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞及びナイーブCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞の割合の減少がすでに見出されている。放射線被曝によるT細胞と抗原提示細胞の機能変化が、腫瘍抗原の認識とそれに続く免疫反応に影響を及ぼし、

特定のHLA遺伝子タイプと胃がんの関係を  
変容させている可能性が考えられる。今後、  
さらに研究対象者を増やして検討すると  
ともに、HLAクラスII及びHLA以外の免疫関  
連遺伝子の多型についても、胃がんとの関  
係を調べる予定である。

これらの研究と並行して、これまで長年  
蓄積してきた、原爆被爆者の免疫データと  
HLAやその他の免疫関連遺伝子との関係を  
調べることにより、発がんにおける炎症・  
免疫の役割を表現型・遺伝型マーカーの両  
者に基づき多面的に検討する予定である。

#### E. 結論

HLA-A\*2601を持つ集団は、放射線被曝の  
無い状況では胃がん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がんの高感  
受性群である可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hayashi T, Kusunoki Y, Hakoda M,  
Morishita Y, Kubo Y, Maki M, Kasagi F,  
Kodama K, MacPhee DG, Kyoizumi S:  
Radiation dose-depen- dent increases in  
inflammatory response markers in A-bomb  
survivors. *Int J Radiat Biol* 79: 129-36,  
2003.
2. Hayashi T, Fujiwara S, Morishita Y,  
Kusunoki Y, Nakashima E, Nakanishi S,  
Suzuki G, Nakachi K, Kyoizumi S: HLA  
haplotype is associated with diabetes  
among atomic bomb survivors. *Hum  
Immunol* 64: 910-6, 2003.
3. Kusunoki Y, Yamaoka M, Kasagi F,

Hayashi T, MacPhee DG, Kyoizumi S:  
Long-lasting changes in the T-cell receptor  
V beta repertoires of CD4 memory T-cell  
populations in the peripheral blood of  
radiation-exposed people. *Br J Haematol*  
122: 975-84, 2003.

4. Yamaoka M, Kusunoki Y, Kasagi F,  
Hayashi T, Nakachi K, Kyoizumi S:  
Decreases in percentages of naive CD4 and  
CD8 T cells and increases in percentages  
of memory CD8 T-cell subsets in the  
peripheral blood lymphocyte populations  
of a-bomb survivors. *Radiat Res* 161:  
290-8, 2004.
  5. Ohara M, Hayashi T, Kusunoki Y,  
Miyauchi M, Takata T, Sugai M: Caspase-2  
and caspase-7 are involved in cytolethal  
distending toxin-induced apoptosis in  
Jurkat and MOLT-4 T-cell lines. *Infect  
Immun* 72: 871-9, 2004.
  6. Ogawa T, Hayashi T, Kyoizumi S,  
Kusunoki Y, Nakachi K, MacPhee DG,  
Trosko JE, Kataoka K, Yorioka N:  
Anisomycin Downregulates Gap Junctional  
Intercellular Communica- tion via p38  
MAP Kinase Pathway. *J Cell Sci* 2004 in  
press.
- ##### 2. 学会発表
1. 林 奉権, 今井一枝, 中地 敬. NK活性  
とHLA遺伝子多型. 第4回日本がん  
分子疫学研究会学術集会 2003年5月  
16日, 浜松
  2. Kyoizumi S, Hayashi T, Morishita Y,  
Fujiwara S, Kusunoki Y, Nakashima E,  
Suzuki G, Nakachi K. Risks of  
radiation-related diabetes mellitus differ  
among atomic-bomb survivors with  
different HLA class II haplotypes.

International Symposium: Functional Genomics of Infectious Disease and Inflammation, 18-20 September 2003, Tuebingen, Germany

3. 江口英孝, 今井一枝, 林 奉権, 中地 敬. 乳癌患者末梢血リンパ球におけるミトコンドリアDNA多型の解析. 第62回日本癌学会総会 2003年9月25-27日, 名古屋
4. 林 奉権, 今井一枝, 楠 洋一郎, 江口英孝, 京泉誠之, 中地 敬. 発がんの免疫学的宿主防御に影響を与える遺伝的要因. 第62回日本癌学会総会 2003年9月25-27日, 名古屋
5. 楠 洋一郎, 林 奉権, 箱田雅之, 中地 敬, 京泉誠之. 原爆被爆者コホートの体細胞突然変異体頻度と発癌リスク. 第62回日本癌学会総会 2003年9月25-27日, 名古屋
6. Sharp GB, 江口英孝, Cologne JB, 林 奉権, 田原栄一, 中地 敬. 被爆者コホート研究による乳がんの血清リスクファクター. 第62回日本癌学会総会 2003年9月25-27日, 名古屋
7. 林 奉権, 森下ゆかり, 久保美子, 向井真弓, 楠 洋一郎, 笠置文善, 京泉誠之, 中地 敬. 血漿中炎症性サイトカインレベルに及ぼす原爆放射線の後影響. 第46回日本放射線影響学会 2003年10月6-8日, 京都
8. 中地 敬, 今井一枝, 江口英孝, 林 奉権. ヒト集団の長期追跡で見出された発がんの免疫的防御とその応用. 第41回日本癌治療学会総会・学術集会 2003年10月21-23日, 札幌
9. 林 奉権, 楠 洋一郎, 京泉誠之. NK活性に影響を与える遺伝的要因. 2003年12月8-10日, 福岡
10. 京泉誠之, 楠 洋一郎, 林 奉権, 大原

高秋. ヒトCD4メモリーT細胞活性化におけるCD43の機能. 第33回日本免疫学会総会 2003年12月8-10日, 福岡

11. 楠 洋一郎, 山岡美佳, 笠置文善, 林 奉権, 中地 敬, 京泉誠之. 放射線被曝のヒト末梢血ナイーブおよびメモリーCD8 T細胞サブセットに及ぼす長期的影響. 第26回日本造血細胞移植学会総会 2003年12月19-20日, 横浜
12. Hayashi T, Nakachi K. Immunological evidence and immunogenetic approach to the late effects of atomic radiation. The US-Japan Cooperative Cancer Reserch Seminar: Large Cohort Studies for Molecular Epidemiology, 4 February 2004-9 February 2004, San Diego, California, US
13. Nakachi K, Hayashi T, Eguchi H, Imai K. A cohort-based phenotype-genotype association analysis of genetic background of natural immunological cancer-defense in the Saitama cohort study. The US-Japan Cooperative Cancer Reserch Seminar: Large Cohort Studies for Molecular Epidemiology, 4 February 2004-9 February 2004, San Diego, California, USA

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



**Table 1 HLA-A genotyping of stomach cancer patients and controls**

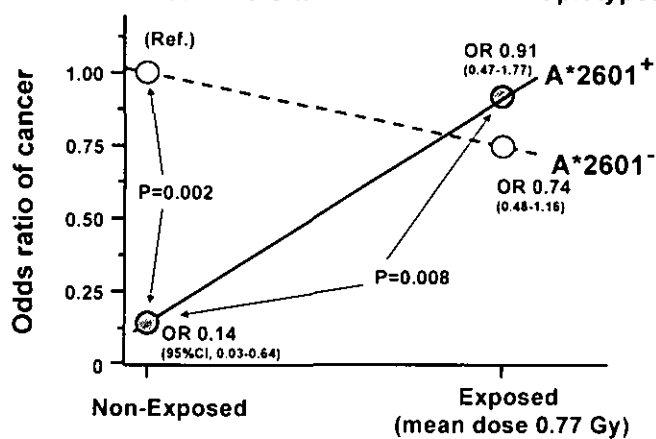
	Non-exposed*		Exposed**	
	Controls n (%)	Patients n (%)	Controls n (%)	Patients n (%)
A*02	36 (17.3)	21 (19.4)	90 (23.0)	41 (21.4)
A*1101	19 (9.1)	16 (14.8)	39 (9.9)	14 (7.3)
A*2402	89 (42.8)	40 (37.0)	147 (37.5)	63 (32.8)
A*26	29 (13.9)	9 (8.3)	45 (11.5)	29 (15.1)
A*2601	22 (10.6)	2 (1.9)	33 (8.4)	19 (9.9)***
A*2603	7 (3.4)	7 (6.5)	8 (2.0)	9 (4.7)
A*31	21 (10.1)	13 (12.0)	41 (10.5)	23 (12.0)
A*33	10 (4.8)	7 (6.5)	26 (6.6)	19 (9.9)

\*Total n = 316 chromosomes (54 patients, 104 controls)

\*\*Total n = 584 chromosomes (96 patients, 196 controls)

\*\*\*P=0.005

**Fig. 1 Relative risk of stomach cancer among A-bomb survivors with different HLA haplotypes**



## 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

分担研究者 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

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。直接遺伝子増幅法による定量的CK19mRNA解析結果は、従来の定量的RTPCR法による解析結果とほぼ一致した。がん部mRNAは、非がん部粘膜より安定していた。

### A. 研究目的

生活習慣の欧米化に伴って近年増加している大腸がんの発生、進展、転移のメカニズムを知るために、1) 大腸がん/非がん部粘膜でのBORIS/CTCFmRNA発現と臨床病理学的諸因子の関連性、2) 大腸がんでのCOX2蛋白発現と微小血管密度やリンパ節転移との関連性、3) 直接遺伝子増幅法によるリンパ節微小がん転移迅速検出法、について検討を行った。

### B. 研究方法

1) BORIS/CTCFmRNA; 切除直後に凍結保存された大腸がん76例のがん部、非がん部粘膜からtotal RNAを精製し、BORIS/CTCF特異的primerを用いたRTPCRを行った。その結果と各症例の臨床病理学的諸因子との関連性を検討した。

2) COX2蛋白; 切除後ホルマリン固定パラフィン包埋されていた大腸がん28例の代表的ブロックを用い、抗COX2抗体と

抗CD34抗体を用いた免疫染色を行った。抗CD34抗体を用いた免疫染色からがん深部浸潤部での微小血管密度、微小血管平均面積および計測範囲内の微小血管総面積を算出した。がん細胞のCOX2発現程度と、がん分化度、前述微小血管値やリンパ節転移を比較検討した。

3) 直接遺伝子増幅法によるリンパ節微小がん転移迅速検出法; 切除直後、1時間後、3時間後に凍結保存された大腸がん2症例のがんと非がん部粘膜を対象としてOne step nucleic acid amplification (OSNA)法を用いた直接遺伝子増幅により、CK19mRNAを定量的に計測した。OSNA法で使用された同一溶液からtotal RNAを精製し、従来法による定量的RTPCRから得られたCK19mRNA値とOSNA法によるCK19mRNA値を比較した。大腸がん培養細胞(LOVO)を用いてOSNA法によるCK19mRNA測定を行い、リンパ節内で検出される最低がん細胞個数を想定した。

### (倫理面への配慮)

全症例で術前に、研究に対する承諾書を書面で得た。

## C. 研究結果

1) BORIS/CTCFmRNA発現; 大腸がん12症例のがん(T)、非がん部粘膜(N)から得られたtotal RNA24検体のうち23検体から、RTPCRによりG3PDHが認められた。G3PDHが認められなかった1検体はがん由来total RNAであり、同検体を含む1症例は検討対象から除外した。残りの11症例(22検体)中10症例では、微量なBORISmRNAが認められた。その内、T>Nは4症例、T=Nは4症例、T<Nは2症例であった。T>N4症例はpT3又はpT4であり、T<N2症例はpT1又はpT2であった。また、T>N症例では、深部浸潤部で粘液がんや多数の低分化腺がんが出現する傾向が伺われた。

2) COX2蛋白発現; 高分化腺がんでは、中分化腺がんよりCOX2蛋白発現が強く認められた。がん細胞のCOX2蛋白発現とリンパ節転移の相関は認められなかったが、リンパ節転移に関連する微小血管密度が最も高く、その面積が最も小さくなるのはがん細胞のCOX2発現が中等度の時であった。

3) OSNA法による定量的CK19mRNA測定; 従来法による定量的RTPCRで計測されたmRNA量とOSNA法により計測されたmRNA量はほぼ同等であったが、非がん部粘膜mRNAには変性傾向が見られた。1個のLOVO培養細胞にはCK19mRNAが約300コピー含まれていることが算出され、同様ながん細胞の場合、リンパ節中に7万個以上存在する場合は容易に検出されることが明らかとなった。更に7千個でも検出できる可能性が示唆された。がん細胞が1個

10 $\mu$ m程度の大きさで立方体を形成すると仮定すると、前者は1辺約0.4mm以上、後者は1辺約0.2mm程度の塊に相当する。

## D. 考察

Loss of imprinting(LOI)は、親由来Imprint遺伝子の発現低下を通して、がんの発生に関わるepigeneticな変化である。大腸では、がん及び非がん部粘膜において、Insulin-like growth factor-II (IGF2)のLOIが約44%に認められること、LOIの多くがmicrosatellite instabilityを伴うことが報告され、非がん部組織におけるLOI検索は大腸がん発生に対するepigeneticなマーカーになると考えられている。BORISは、正常では睾丸で発現し、脱メチル化作用を有してCTCFと共にImprint部位の調節因子と考えられている。CTCFは広く発現しているが、大腸がん/非がん部粘膜でのBORISmRNA発現の報告は未だない。今回、非がん部よりがん部でBORISmRNAが高かった症例はpT3又は4の進行がんであり、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見られたことから、BORISは大腸がん発生のみならずその進展や形態変化にも関わるepigeneticなLOI関連因子である可能性が示唆された。今後さらに症例を増して検討していく予定である。

COX2は、正常では発現していないが、種々の増殖因子や炎症性サイトカインにより発現することが知られている。COX2発現による微小血管新生は、がんリンパ節転移よりがんの腫瘍増大に関連する可能性が示唆された。

OSNA法による定量的mRNA解析は、従来法による定量的RTPCRと同様な精度を有していることが明らかとなった。従来法に比べて極めて短時間で作業が終了する

OSNA法では、術中リンパ節がん転移診断などの迅速な定量的解析が運用可能である。また、術後3時間後でもがん細胞mRNAは殆ど変性しないことから、術後外科医が時間をかけて区分したリンパ節を対象とした検討も可能である。従来のRTPCR法では解明されなかったリンパ節内転移がん細胞量の検討や跳躍転移の詳細な検討が、OSNA法により容易となることが予測される。今後は、実際のリンパ節を用いた解析を行う予定である。

なし

#### E. 結論

BORIS/CTCF発現と臨床病理学的諸因子の検討、COX2発現と微小血管の検討、OSNA法によるリンパ節微小がん転移の検討は、大腸がんの発生・進展・転移に関連する研究であり、従来にはない観点から大腸がんの本態究明に寄与すると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

谷山禮己, 佐々木なおみ, 小関万里 大腸がんにおけるCOX2発現, 微小血管とリンパ節転移 第62回日本癌学会総会 2003年9月26日 名古屋市

#### 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

発行者 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班  
主任研究者 田原 榮一  
平成 16 年 3 月 31 日発行

研究班事務局

〒732-0815 広島市南区比治山公園 5-2

(財)放射線影響研究所 事務局役員室

担当者 池田 映子

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