

1. 論文発表

1. Tahara E. Growth Factors and Oncogenes in Gastrointestinal Cancer, In: Henheik P, et. al. (Eds.) Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Vol.16, Wiley-VCH, Weinheim, Volume 6: 3-527-30548-3.
2. Tahara E., Lotan R. RUNX3 and Retinoic Acid Receptor _ DNA Methylation as Novel Targets for Gastric Cancer Therapy. Current Cancer Therapy Reviews, Vol. 1, 2005 (in press)
3. Tahara E. Jr, Tahara H, Kanno M, Naka K, Takeda Y, Ishihara H, Yasui W, Barrett J, Ide T, Tahara E. G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell. Cancer Immunology Immunotherapy, Feb. 1 (online).
4. Tahara E. Genetic Pathways of Two Types of Gastric Cancer, In: Buffler P, et al. (Eds.) Mechanisms of Carcinogenesis: Contributions of Molecular epidemiology, IARC Scientific Publications No. 157, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2004; pp.327-349.
2. 谷山清己, 田原栄俊, 本下潤一, 小関万里, 田原榮一. 大腸がんにおけるBORIS mRNA発現の検討, 第63回日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日-10月1日.
3. 竹田弥生, 田原栄俊, 谷山清己, 吉田和弘, 田原榮一, 井出利憲. 胃がん, 肝臓がんにおけるBORIS/CTCFおよびMeninの発現, 第63回日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日-10月1日.
4. 林奉権, 今井一枝, 楠洋一郎, 田原榮一, 中地 敬. 原爆被爆者における免疫学的胃がん発症高危険群の同定, 第63回日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日-10月1日.
5. 田原榮一, 児玉和紀. 原爆被爆者長期追跡集団における生活習慣と食道がん死亡との関連性に関する疫学研究, 第63回日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日-10月1日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究協力者

西 信雄 (放射線影響研究所疫学部腫瘍組織登録室長)

2. 学会発表

1. Tahara E. Molecular aspects of invasion and metastasis of gastric cancer, 3rd International conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy and Prevention, Prague, 12-16 October 2004.

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略 研究事業）

分担研究報告書

ハプロタイプ解析に基づく固形がんリスクの評価：
発がんに対する免疫学的防御の遺伝的要因

分担研究者 中地 敬 放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部

研究要旨 埼玉コーホート研究で発がんとの関連が見出された免疫マーカーに關与する遺伝的要因を明らかにする。次に、これらの遺伝的要因と放射線発がんとの関係を放射線影響研究所免疫コーホート研究のゲノム解析により検討するという2段階の研究戦略をとる。今年度は、埼玉コーホート研究でがんとの関係が示されたNK活性の遺伝的要因を明らかにした。すなわち、NK高活性と低活性の2つの群をさまざまな遺伝子多型について比較し、1) HLAクラスIの遺伝子型うちB*1301、B*4403、B*5401、Cw*0401、Cw*0702がNK活性と關連していること(P<0.05)、2) NK細胞の主要な活性型受容体であるNKG2Dの遺伝子領域にあるハプロタイプがNK活性の主な遺伝的要因であることを見いだした(P<0.0001)。さらにNK活性だけでなく、CD4、CD8、リンパ球幼若化反応、炎症關連血清タンパクなど埼玉コーホート研究で測定された免疫マーカーについても高値群と低値群を比較するゲノムスクリーニング系を作製し今後の解析に備えた。

A. 研究目的

体内に發生する異常な細胞を恒常的に排除する免疫監視機構は、多段階発がんにおける最後の防御であると考えられ、その仕組みと制御を理解することは新しいがん予防につながる。一方、長年にわたる原爆被爆者の免疫学的研究により、放射線被曝は被爆者の免疫系に大きな影響を与えていることが見いだされている。本研究は、免疫關連遺伝子のゲノム解析に基づいて発がんのリスクを評価し、さらに免疫学的発がん高危険群に及ぼす放射線被曝の影響を明らかにする。

B. 研究方法

埼玉コーホート(3,600名)と放射線影響研究所免疫コーホート(成人健康調査AHS

のうち免疫学的調査の対象となった7,000名、非被曝者(≤5 mSv) 2,400名を含む)はさまざまな免疫マーカーを測定した世界でも類を見ないコーホート研究である。これらの2つのコーホート集団を用いて2段階の戦略で研究を進める。すなわち、埼玉コーホートで免疫マーカーと発がんとの関連を検討し、それに関与する遺伝的要因を明らかにする。なぜなら、非被曝者での解析は埼玉コーホートが先行しており、放射線影響研究所の免疫コーホートで測定していないNK活性、リンパ球幼若化反応などの免疫マーカーを測定しているからである。また非被曝者での研究を行う場合、2つのコーホートを合わせることにより解析対象となる非被曝者、埼玉住民の計を6千名とすることができる。次に、見出した遺伝的要因

と放射線発がんとの関係を放射線影響研究所免疫コホートのゲノム解析により検討する。我々はすでに埼玉コホートの11年間の追跡調査により、末梢血リンパ球のNK活性が低活性の群は、高・中活性群に比べて発がんリスクが1.7倍高いことを見いだしている。NK活性の大きな個人差の背景となる遺伝要因を明らかにするため、埼玉コホート研究に基づくNK活性に関わる遺伝的要因の検討を平成16年度に行った。

(倫理面への配慮)

埼玉コホート研究及び放射線影響研究所免疫コホート研究、コホート研究で収集した末梢血リンパ球DNAを用いた遺伝子解析研究は、放射線影響研究所「遺伝子研究に関する倫理委員会」及び「人権擁護委員会」の承認を受けて行われている(埼玉コホート研究は1986年に開始され、当時収集した末梢血リンパ球DNAは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」施行前に提供され、すでに匿名化されているB群試料にあたる)。

C. 研究結果

コホート研究で見いだされたがん罹患者のうちリンパ球DNAの研究使用が可能な症例102名、及び性・年齢を一致させたコホート内対照者をNK活性の高・中・低活性の3群からそれぞれ204名、計612名選んだ。つぎに、NK高活性と低活性の2つの群をさまざまな遺伝子多型について比較したところ、HLAクラスIの遺伝子型うちB*1301、B*4403、B*5401、Cw*0401、Cw*0702にNK活性と関連が見られた($P<0.05$)。これはNK細胞の恒常性の維持にHLAクラスI分子が関与していることを示唆する。2群の比較によりNK活性の遺伝的要因を検討するこのゲノムスクリーニング系 (phenotype-

genotype association analysis) を用いて、NKG2D受容体遺伝子のハプロタイプがNK活性の主要な遺伝的要因であることを見いだした。すなわち、NK細胞に発現する活性型受容体NKG2Dの遺伝子領域にあるマーカーSNPのうち7つがNK活性と強い関連を示した ($P<0.001$)。連鎖不平衡解析により、2つのハプロタイプブロックが同定され、それぞれにNK高活性及び低活性を表現型とする主要なハプロタイプアリアルが見いだされた ($P<0.0001$)。

さらに、NK活性だけでなく、リンパ球サブセット (CD4、CD8)、リンパ球幼若化反応、炎症関連血清タンパク画分など埼玉コホート研究で測定された免疫関連生体指標についても高値群と低値群を比較するゲノムスクリーニング系を作製し今後の解析に備えた。この系はWGA法で増幅した2、500人のDNAからなり、免疫マーカーを指定して高値群・低値群の定義と照合条件を与えることにより、ゲノム解析の検索対象となるDNA検体が選択される。

D. 考察

原爆放射線への曝露により、被爆者の免疫系、特に細胞性免疫はさまざまな影響を受け、その影響は現在にいたるまで継続して観察されている。一方、被爆者ではいくつかのがんのリスクが被曝線量に応じて高くなることが観察されている。我々は「被爆者に見られる放射線による発がんリスクの修飾には免疫系、特に放射線被曝による免疫系の減衰が関係している」という仮説を検討するため、埼玉及び放射線影響研究所の2つの免疫コホート研究で測定した免疫マーカー、がん罹患データ、生活習慣データ、被曝線量 (放影研コホート)、収集したDNA試料を用いた解析を行う。まず、免疫学的発がん高危険群を同定し、その群

の発がんリスクが放射線曝露によって変動するかどうか、変動するとすればどのような変動かを明らかにする必要がある。我々は今回免疫的発がん防御の一つであるNK活性の遺伝的要因を見出した。今後、この結果をもとに、NKG2Dハプロタイプに基づく発がんリスクの評価及び放射線被曝の発がんリスクに及ぼす影響を検討する。また、放射線被曝はCD4陽性T細胞の恒常性に大きな影響を与えることがこれまでの研究で示されているので、CD4陽性T細胞と発がんの関係を2つのコーホートで検討するとともに、その遺伝的要因を明らかにする。

E. 結論

発がんに対する免疫的宿主防御であるNK活性には大きな個人差が存在するが、その遺伝的要因が示された。特に、NK細胞に発現するNKG2D受容体の遺伝子領域のハプロタイプブロックに見出されたハプロタイプアレルはNK活性と非常に強い関連を示した。放射線被曝による発がんリスクの修飾には遺伝的（発がんあるいは放射線）感受性の個人差が関与すると考えられるが、今回同定したNKG2Dハプロタイプはその遺伝的要因の有力な候補である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto, H., Hanafusa, H., Ouchida, M., Yano, M., Suzuki, H., Murakami, M., Aoe, M., Shimizu, N., Nakachi, K., Shimizu, K.: Single nucleotide polymorphisms in the EXO1 gene and risk of colorectal cancer in a Japanese population. *Carcinogenesis*, 26: 411-416, 2005.
2. Yuasa, Y., Nagasaki, H., Akiyama, Y., Sakai, H., Nakajima, T., Ohkura, Y.,

Takizawa, T., Koike, M., Tani, M., Iwai, T., Sugihara, K., Imai, K., Nakachi, K.: Relationship between CDX2 gene methylation and dietary factors in gastric cancer patients. *Carcinogenesis*, 26: 193-200, 2005

3. Hayashi, T., Morishita, Y., Kubo, Y., Kusunoki, Y., Hayashi, I., Kasagi, F., Hakoda, M., Kyoizumi, S., and Nakachi, K.: Long-term effects of radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors. *Am. J. Med.*, 118: 83-86, 2005.
4. Matsumura, S., Oue, N., Nakayama, H., Kitadai, Y., Yoshida, K., Yamaguchi, Y., Imai, K., Nakachi, K., Matsusaki, K., Chayama, K., and Yasui, W.: A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J. Cancer Res., Clin., Oncol.*, 131:19-25, 2005.
5. Nakachi, K., Hayashi, T., Imai, K., Kusunoki, Y.: Perspectives on cancer immuno-epidemiology. *Cancer Sci.*, 95: 921-929, 2004.
6. Hayashi, T., Imai, K., Kusunoki, Y., Hayashi, I., Kyoizumi, S., Tahara, E., and Nakachi, K. HLA genotyping is involved inter-individual variations of NK activity. *Immunology 2004* (Skamene, E., ed.), Medimond Sr.l., Bologna, pp.21-25, 2004.
7. Hayashi, T., Hayashi, I., Shinohara, T., Morishita, Y., Nagamura, H., Yoichiro Kusunoki, Y., Kyoizumi, K., Seyama, T., and Nakachi, K.: Radiation-induced apoptosis of stem/progenitor cells in human umbilical cord blood is associated with alterations in reactive oxygen and intracellular pH. *Mutat. Res.*, 556: 83-91, 2004.
8. Shimada, H., Shimizu, K., Mimaki, S., Sakiyama, T., Mori, T., Shimasaki, N., Yokota, J., Nakachi, K., Ohta, T., and Ohki, M.: First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Hum. Genet.*, 115: 372-376, 2004.
9. Izumi, S., Imai, K., and Nakachi, K.: Excess concordance of cancer incidence and lifestyles in married couples (Japan):

- survival analysis of paired rate data. *Cancer Causes and Control*, 15: 551-558, 2004.
10. Yoshida, N., Omoto, Y., Inoue, A., Eguchi, H., Kobayashi, Y., Kurosumi, M., Saji, S., Suemasu, K., Okazaki, T., Nakachi, K., Fujita, T., and Hayashi, S-I.: Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. *Cancer Sci.*, 95: 496-502, 2004.
 11. Buerger, H., Packeisen, J., Boecker, A., Tidow, N, Kersting, C., Isola, J., Yatabe, Y., Nakachi, K., Bielawski, K., Boecker, W., and Brandt, B.: Allelic length of a CA dinucleotide repeat in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of this sequence – First results of an interethnic breast cancer study. *J. Pathol.*, 203:545-550, 2004.
 12. Matsumura, S., Oue, N, Kitadai, Y., Chayama, K., Yoshida, K., Yamaguchi, Y., Toge, T., Imai, K., Nakachi, K., and Yasui, W.: A single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter is correlated with histological differentiation of gastric cancer. *J. Cancer Res., Clin., Oncol.*, 130:259-265, 2004.
 13. Cologne, J.B., Sharp, G.B., Neriishi, K., Verkasalo, P.K., Land, C.E., and Nakachi, K.: Improving the efficiency of nested case-control studies of interaction by selecting controls using counter matching on exposure. *Int. J. Epidemiol.*, 33:485-492, 2004.
 14. Ogawa, T., Tomonori Hayashi, T., Kyoizumi, S., Kusunoki, Y., Nakachi, K., MacPhee, D.G., Trosko, J.E., Kataoka, K., and Noriaki Yorioka, Y.: Anisomycin downregulates gap junctional intercellular communication via the p38 MAP kinase pathway. *J. Cell Science*, 117:2087-2096, 2004.
 15. Yamaoka, M., Kusunoki, Y., Kasagi, F., Hayashi, T., Nakachi, K., and Kyoizumi, S.: Decreases in percentages of naïve 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.*, 161:290-298, 2004.
2. 学会発表
 1. Nakachi K: Individual variations in innate immune response. RERF International Workshop: Regulation of Immunological Homeostasis in Inflammatory Response and Disease Development, 16-17 January 2004, Hiroshima
 2. Eguchi H, Imai K, Nakachi K: Phenotype-genotype association analysis of genetic background of tobacco-related cancers in the Saitama cohort study. The US-Japan Cooperative Cancer Reserch Seminar: Large Cohort Studies for Molecular Epidemiology, 4 -9 February 2004, San Diego, California, USA
 3. 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 -9 February 2004, San Diego, California, USA
 4. 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 Research Seminar: Large Cohort Studies for Molecular Epidemiology, 4 -9 February 2004, San Diego, California, USA
 5. Eguchi H, Imai K, Nakachi K: Genetic background of a biomarker associated with cancer risk among smokers in the Saitama cohort study -- significance in cancer prevention. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Cancer Molecular Epidemiology, 20-21 May 2004, Sapporo
 6. Nakachi K: What cohort studies can contribute to genome study -- Taking an example of cohort study on immunological defense against cancer. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Cancer Molecular Epidemiology, 20-21 May 2004, Sapporo
 7. Hayashi T, Morishita Y, Kubo Y, Mukai M, Maki M, Imai K, Kusunoki Y, Kasagi

- F, Kyoizumi S, Nakachi K: Atomic bomb radiation effects on immunological aging and acceleration of inflammatory status. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Cancer Molecular Epidemiology, 20-21 May 2004, Sapporo
8. Nagamura H, Hayashi T, Morishita Y, Neriishi K, Nakashima E, Kusunoki Y, Kyoizumi S, Nakachi K: Relationship between persistent inflammation and HLA genotypes in A-bomb survivors. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Cancer Molecular Epidemiology, 20-21 May 2004, Sapporo
 9. Morishita Y, Hayashi T, Nagamura H, Fujiwara S, Nakashima E, Kusunoki Y, Suzuki G, Kyoizumi S, Nakachi K: Risk of diabetes in A-bomb survivors in relation to HLA genotype and inflammatory markers. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Cancer Molecular Epidemiology, 20-21 May 2004, Sapporo
 10. Kurushima A, Hayashi T, Maki M, Morishita Y, Imai K, Nagamura H, Kusunoki Y, Eguchi H, Kyoizumi S, Nakachi K: Relationship between NK activity and NKG2D gene polymorphism. The 5th Annual Meeting of Japanese Society of Cancer Molecular Epidemiology, 20-21 May 2004, Sapporo
 11. Yamaoka M, Kusunoki Y, Kasagi F, Hayashi T, Nakachi K, Kyoizumi S: Effects of atomic-bomb radiation on human immune responses. Report 21: Long-term effects of radiation exposure on naive and memory CD8 T-cell subsets. The 45th Late A-bomb Effects Research Meeting, 6 June 2004, Nagasaki
 12. Hamatani K, Yano S, Hamasaki K, Hirai Y, Hayashi Y, Nakachi K: Application of a new cDNA amplification method to the analysis of ret rearrangements in archival paraffin-embedded thyroid. The 45th Late A-bomb Effects Research Meeting, 6 June 2004, Nagasaki
 13. Nakachi K, Imai K, Eguchi H: Molecular epidemiology of cancer and cardiovascular disease with special reference to cigarette smoking, based on a prospective cohort study--Cigarette smokers: physiological characteristics and cancer risk. FY 2003 Research Meeting of the Smoking Research Foundation, 15 July 2004, Tokyo
 14. Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y, Hayashi I, Kyoizumi S, Nakachi K: Immunogenetic significance of individually-differing NK activity. The 12th International Congress of Immunology, 18 -23 July 2004, Montreal, Canada
 15. Ito R, Oue N, Yoshida K, Nakachi K, Yasui W: Expression of Cadherin-17 is associated with prognosis of gastric carcinoma. The 1st Conference of Japanese Society of Pathology, 30-31 July 2004, Hiroshima
 16. Ito R, Oue N, Yoshida K, Nakachi K, Yasui W: Caveolin-1 is specifically expressed in gastric carcinomas. The 3rd International Conference on Gastroenterological carcinogenesis, 19-20 August 2004, Sapporo
 17. Ito R, Oue N, Yoshida K, Nakachi K, Yasui W: Expression of Cadherin 17 in gastric carcinomas correlates with prognosis. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 29 September 2004-1 October 2004, Fukuoka
 18. Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y, Tahara E, Nakachi K: Identification of groups at immunologically high risk for stomach cancer among atomic-bomb survivors. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 29 September-1 October 2004, Fukuoka
 19. Eguchi H, Imai K, Nakachi K: Genetic background of alpha2-globulin associated with cancer risk among smokers and significance thereof in terms of cancer prevention -- A nested case-control study on Saitama cohort. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 29 September -1 October 2004, Fukuoka
 20. Imai K, Eguchi H, Hayashi T, Nakachi K: Environmental and genetic factors involved in inter-individual variation of NK activity. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 29 September -1 October 2004, Fukuoka
 21. Nakachi K, Imai K, Eguchi H, Hayashi T:

- Genetic background of NK activity and its relation to cancer incidence. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 29 September -1 October 2004, Fukuoka
22. Nakachi K, Hayashi T, Kusunoki Y, Imai K: Molecular epidemiology of immunological host defence against cancer. The 2nd Asian Pacific Organization of Cancer Prevention General Assembly Conference, 1-3 November 2004, Seoul, Korea
 23. Kusunoki Y, Yamaoka M, Kubo Y, Hamasaki K, Hayashi T, Kyoizumi S, Nakachi K: Long-term effects of A-bomb radiation on human naive and memory T cell population. The 47th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society, 25-27 November 2004, Nagasaki
 24. Kusunoki Y, Yamaoka M, Kubo Y, Hamasaki K, Hayashi T, Nakachi K: Shortening of telomere lengths in human peripheral blood memory CD4 T-cell populations as a consequence of radiation exposure. The 27th Annual Meeting of Japanese Society for Hematopoietic Cell Transplantation, 16-17 December 2004, Okayama
 25. Nakachi K: Green tea and cancer prevention--Prevention that delays cancer onset. "The Forefront of Cancer Epidemiology·Prevention" Open Symposium, 18 December 2004, Sapporo

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

発癌及び放射線感受性に関する遺伝子多型の同定と 発癌高危険群の分子疫学的研究

分担研究者 江口英孝（放射線影響研究所）

研究要旨 コーホート研究の基礎調査時に多様なバイオマーカーを測定した3625名の対象者の14年間の追跡調査により、炎症マーカーである血清 α 2-グロブリン (A2G)高値の喫煙者が、中・低値群喫煙者に比べ約2倍高い全がんリスクを持つことを明らかにした。このA2Gの個人間変動に関与する蛋白質画分を明らかにするため40人の健常喫煙者で解析を行い、ハプトグロビン (HP) が個人間変動に主として寄与することを見出した。HP遺伝子には、機能に差異を生じる多型が知られている。そこで、がんを発生した42人の喫煙者と252人の健常喫煙者によるコーホート内症例対照研究を行った。Hpl-1あるいはHpl-2遺伝子型を持つ喫煙者では、A2G高値群の発がんリスクがさらに増加した(オッズ比5.5)。一方、Hpl-2では有意の違いは認められなかった。以上より、喫煙を背景とした炎症と発がんの関係にHPの遺伝的背景が関与すること、及びA2G(HP)の発現は環境により変動するので、A2GはHpl-1およびHpl-2遺伝子型の喫煙者および禁煙者のがん予防代理指標となる可能性が示された。

A. 研究目的

原爆被爆者の固形がん発症の過剰相対リスクは、被曝後50年以上経過してもなお、高いレベルが維持されており、放射線被曝が標的臓器の遺伝子の切断や変異などを直接的に引き起こす以外に、別のメカニズムでも固形がんの発生に関与することが示唆される。一方、原爆被爆者において、被曝後50年経過してもなお、炎症マーカーCRPおよび炎症性サイトカインIL6およびTNF α が放射線被曝量と正の相関を示すことが林らによって報告されている (Hayashi T et al. Am J Med 2005)。全ての固形がん発生の約20%には持続的炎症が関与していると言われており、このような原爆被爆者における持続的炎症が固形がんの発生に関与している可能性が考えられる。一方、原爆被爆者の肺発がんリスクにおいて、喫煙と放射線被曝が相加的効果を示すことが報

告されている(Pierce DA et al. Radiat Res 2003)。喫煙が呼吸器などの直接暴露する臓器以外にも数多くの固形がんのリスク因子であり、全身的かつ持続的な炎症をもたらす事が知られている。以上より、放射線による発がんを考える上で、喫煙を考慮にいたれた持続的な炎症の評価を行うことが重要であると考えられる。本研究は喫煙による持続的な炎症が全がんのリスクに与える影響およびその遺伝的背景について明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1986年に埼玉県内のある町の地域住民3,625名を対象としたコーホート研究を開始した。基礎調査時に自記式の質問票により生活習慣の調査を行った。さらに採血を行い、さまざまな血液成分の測定をした。一部の参加者からは末梢血リンパ球DNAを抽出し保管した。がんなどのり患・死亡情

報の追跡調査を14年間行った。252名ががんを発症し、そのうち122名についてはリンパ球DNAが入手可能であった。基礎調査時に喫煙者で追跡期間中にがんをり患したもののうち、担がんの影響を除くため採血時から2年以内に発症した症例を除く42名の全がん症例に対し、性・年齢を一致させた84名の対照群をA2Gのレベル3分位の高値・中値・低値の各群から無作為抽出を行い、計252名の対照群としたコーホート内症例対照研究を行った。A2Gレベルは分離血清の蛋白質画分の測定により決定した。エクソン3と4の遺伝子重複によるハプトグロビンの遺伝子多型、重複なし(*Hp-1*)、重複あり (*Hp-2*)の決定はリンパ球DNAを鋳型としてKochらの方法に従い、PCRでエクソン3と4を含むHP遺伝子領域断片を増幅し、1.5%アガロースゲル電気泳動で分離を行い、増幅断片鎖長により遺伝子内重複の有無を決定した。健常人男性喫煙者の血清は埼玉県内の地域住民から採血・分離し、ハプトグロビン(HP)、 α 2-マクログロブリン(A2M)、セルロプラスミン(CP)蛋白質量の測定はネフィロメトリー法によって行った。統計解析はSPSS Ver11.0を用いて行った。

(倫理面への配慮)

コーホート研究で収集した末梢血リンパ球DNAを用いた遺伝子解析研究は、放射線影響研究所の「遺伝子研究に関する倫理委員会」および「人権擁護委員会」の承認を受けて行われている。(埼玉コーホート研究は1986年に開始され、当時収集した末梢血リンパ球DNAは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」施行前に提供され、すでに匿名化されているB群試料にあたる。)

C. 研究結果

喫煙者は非喫煙者に比べ各年代において有意に炎症マーカーであるA2Gが高値を示し、喫煙者においては持続的な炎症が保たれていることが示された。このA2Gのレベルとがん発症との関連を調べたところ、喫煙者でのみ優位な相関が認められた。コックスハザード分析により、A2G高値の男性喫煙者は低・中値の喫煙者に比べ、約2倍全

がんの発症リスクが高いことが明らかになった(図1)。

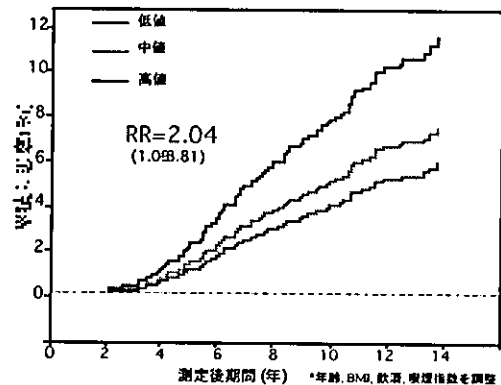


図1 男性喫煙者における血清A2Gレベルによるがんの累積り患率

A2G分画に含まれる構成蛋白質成分のいずれがA2Gの個人間変動に寄与するかを明らかにするために、40名の健常人男性コントロール血清を用いて、血清中のA2Gレベルと、主要な構成蛋白質であるHP、A2M、CPとの相関について検討したところ、HPが最も強くA2Gレベルと相関していた($r=0.84$, $P<0.001$) (図2)。

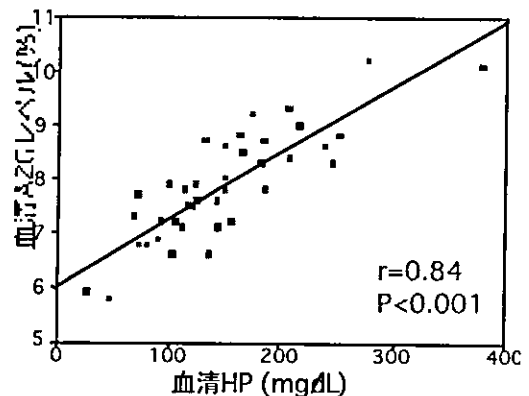


図2 40名の健常男性喫煙者血清中のA2GとHPの相関

このことから喫煙者におけるA2Gレベルの個人間変動においてHPが主要な蛋白質成分であることが示された。コーホート内症例対照研究において、A2Gのレベルを全がん症例と対照群を比較したところ、統計学的に有意にがん症例で高値を示した($P=0.02$) (図3)。

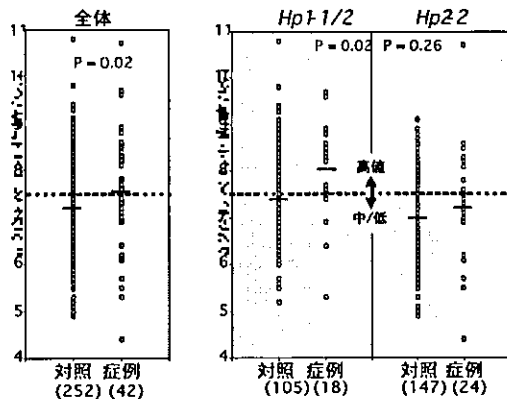


図3 HP遺伝子型を考慮した症例対照間におけるA2Gレベルの比較

症例および対照をHPの遺伝子型で分けたところ、*Hp1*アリルを少なくとも1本持つものでは対照群と比べ、A2Gのレベルが統計学的に有意にがん症例で高値を示した ($P=0.02$) (図3)。一方、*Hp2*アリルをホモで有するものでは有意な差は認められなかった ($P=0.26$) (図3)。また、がん症例と対照群間におけるHP遺伝子型の頻度分布について解析を行ったが、有意な差は認められなかった。

次にHP遺伝子型を考慮に入れて、A2Gレベルによる全がんのリスクの検討を行った。

図1に示したようにA2Gの低値と中値群では発がんリスクに大きな差はみられないため、A2Gレベルを低・中値群と高値群の2群に分けた。また、リスクの評価には、A2Gと相関が見られた性・年齢、喫煙量、飲酒量、血清総コレステロール、中性脂肪、過酸化脂質、アルブミン・グロブリン比、 γ グロブリン、セレンウム、リンパ球CD4/CD8陽性細胞比を共変量としたロジスティック回帰分析を行った。遺伝子型を分けない場合、A2G高値群のリスクは、低・中値群に比べ3.2倍高い。次にHP遺伝子型を考慮に入れ、A2Gが低・中値で*Hp1*アリルを持つ喫煙者のリスクを1.0とすると、*Hp1*アリルを持ちA2Gが高値の喫煙者は5.5倍とさらにリスクが高くなることが示された。一方、*Hp2*アリルをホモに持つ喫煙者ではA2G低・中値群と高値群の間に有意な差は認められなかった。(図4)。

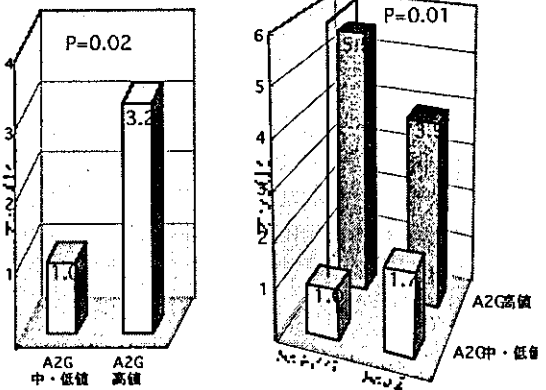


図4 A2GレベルとHP遺伝子型によるがんのオッズ比

D. 考察

喫煙者において炎症マーカーである血清A2GレベルとHP遺伝子型を組み合わせることにより、発がんリスクの非常に高い群の同定が可能であると考えられる。さらにHPあるいはA2Gのレベルは環境により変動することから、喫煙者の発がん予防の代理マーカーとしても有用であると思われる。

また、これらの炎症マーカー及び遺伝的背景を考慮に入れた原爆被爆者における発がんリスクの評価を行うことの重要性が示唆される。被爆者におけるがん予防を考える上でも重要な鍵となることが期待される。

E. 結論

喫煙者において血清A2G高値群の発がんリスクが低・中値群に比べ、有意に高いことが明らかとなった。さらにA2GのレベルとHPの遺伝子型と組み合わせることにより、さらに高危険群を絞り込むことが可能と考えられる。原爆被爆者における放射線による発がんリスクを明らかにする上で、A2Gなどの炎症マーカーとHP遺伝子などの遺伝的背景を考慮に入れることが重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshida N, Omoto Y, Inoue A, Eguchi H, Kobayashi Y, Kurosumi M, Saji S, Suemasu K, Okazaki T, Nakachi K, Fujita T, Hayashi S-I "Prediction of prognosis of estrogen

receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes" Cancer Sci 95:496-502 (2004)

2. 学会発表

江口英孝, 今井一枝, 中地 敬「喫煙者の発がんにおける炎症マーカーの関与と予防代理マーカーとしての可能性」

第2回 日本癌学会カンファレンス (2005)

江口英孝, 今井一枝, 中地 敬

「埼玉コーホート研究で見出した喫煙者の発がんリスクに関連する生体マーカーの遺伝的背景と予防的意義」第5回日本がん分子疫学研究会学術集会 (2004)

江口英孝, 今井一枝, 中地 敬

「喫煙者の発がんリスクに関連するE α 2-グロブリンの遺伝的背景と予防的意義ー埼玉コーホート内症例対照研究」第63回日本癌学会総会 (2004)

荘厳哲哉, 江口英孝, 中地 敬, 林 慎一, 正村 滋「エストロゲン枯渇耐性乳がん細胞株におけるエストロゲン受容体 α の機能・発現制御」第27回日本分子生物学会年会 (2004)

Tetsuya Sogon, Hidetaka Eguchi, Shin-ichi Hayashi, Shigeru Masamura, Kei Nakachi "Regulation of the expression and function of ER α in estrogen- ablation resistant breast cancer cells" Joint Meeting of the Fourteenth International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar and the Eighth Meeting of the Tottori Bioscience Promotion Foundation "Cancer and Epigenetics - Basic Research and Clinical Implication" (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

固形癌発生の遺伝的リスクの評価と 放射線被曝の相互作用の分子疫学的研究

分担研究者 楠 洋一郎（財）放射線影響研究所

放射線生物学/分子疫学部 免疫学研究室長

研究要旨 個体の放射線誘発遺伝子障害の感受性と放射線によるヒト固形癌発がんリスクの関係を調べる目的で、原爆被爆者集団における赤血球グリコフォリンA（GPA）遺伝子座突然変異体頻度(Mf)と癌発生の関係を前向き調査によって調べた。1988年から1996年の間にGPA Mfを測定した癌既往歴のない1723名の対象者から新たな固形癌の発生を追跡調査し、2000年までに187名に癌発生を同定した。この追跡期間に発生した癌の頻度にも有意な線量効果関係が確認された。年齢、性、市を補正因子とした多変量回帰分析により癌グループと非癌グループのGPA Mfの線量効果を比較したところ、広島の対象者においてGPA Mfの線量効果の傾きは癌グループの方が非癌グループよりも有意に高かった。同じ結論が事象-時間（Cox回帰）分析を用いた解析でも得られた。これらの知見は放射線被曝後の体細胞遺伝子の変異性には個人差が存在し、より高い変異性を有する者には放射線に関連した癌の発生するリスクが高い可能性を示唆している。この個人差は遺伝的背景の差異と関係していると考えられるので、これらの推論の正当性を明らかにするために修復関連遺伝子の機能や多型性の解析などの分子疫学的研究を進めている。

A. 研究目的

放射線被曝がヒト固形癌発生のリスクファクターであることは永年に渡る原爆被爆者の追跡調査から明らかにされているが、個体の遺伝的背景の違いが放射線発がんのリスクに関係するかは十分に検討されていない。また、放射線被曝による遺伝子障害の程度は個体によって異なり、遺伝的背景の差異がそれに関与していると考えられているが、放射線誘発遺伝子障害の感受性と放射線発がんリスクの関係も明らかにされていない。本研究では、放影研の原爆被爆者成人健康調査コーホートにおいて、放射線被曝による遺伝子障害に高感受性を示す遺伝子型を有する個体は放射線発がんのリスクが高いという仮定を検討する。

これまでの研究で、赤血球グリコフォリンA（GPA）遺伝子座ヘテロ接合性の原爆被爆者におけるヘミ接合性突然変異体頻度（Mf）が放射線量とともに上昇することが明らかにされている。しかしながら、GPA Mfには同等の線量を受けたと推定される被爆者の間でも大きな個人差があり、それは個体の放射線感受性と関係すると考えられた。今年度は、放射線誘発遺伝子障害の感受性と発癌リスクの関係を調べる目的で、GPA Mfと固形癌発生の関係を前向き調査によって調べた。

B. 研究方法

1) GPA Mfの測定

GPAは赤血球特異的に発現される膜糖タンパクで、MN式血液型の抗原決定基として知られている。MNヘテロの血液型を持つ人は日本人の約50%存在するが、MNヘテロの血液をM型GPAとN型GPAをそれぞれ認識する抗体を用いて、MあるいはNのいずれかの抗原決定基の発現を失った変異赤血球をセルソーターで検出する。GPA Mfは、それぞれのアリルの突然変異細胞頻度を平均してアリル当り値として算出する。

2) GPA Mfと固形癌発生の前向き調査

GPA Mfのデータは1988-1996年の約8年間で放影研成人健康調査対象者1,902名について測定したのを用いる。その中から測定前に癌と診断されていた179名を除いた1,723名(広島1,117名、長崎606名)を2000年まで追跡調査し、固形癌の発生が認められた187名と固形癌の発生が認められなかった1,536名について、GPA Mfに対する線量効果関係を統計学的に比較する。

3) 遺伝子型とGPA Mfおよび固形癌発生の関係 放射線による遺伝子障害の個人差に関係する

と考えられるDNA修復、薬物代謝、ならびにがん免疫に関連する遺伝子の多型を探索し、GPA Mfならびに固形癌発生との関連解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、放射線影響研究所の研究計画審査委員会、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承認を得ており、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を遵守している。

C. 研究結果

GPA Mfを測定した1723名(広島1117名、長崎606名)の原爆被爆者において、2000年までに187名に最初の癌発生を同定した。この追跡期間に発生した癌の頻度にも有意な線量効果関係があり、被爆後50年以上を経ても放射線による固形癌の過剰発生のあることが今回の研究対象集団においても確認された。

GPA Mfが例外的に高い値を示した例を除き、年齢、性、市を補正因子とした多変量回帰分析により線形および線形二次関数モデルを用いて癌グループと非癌グループのGPA Mfの線量効果を比較した(Table 1)。線形、線形二次関数モデル、いずれにおいても基本的に同じ結果が得られた。すなわち、GPA Mfは長崎の被爆者で低く、女性が男性よりも低い。また、線量の増加にしたがってGPA Mfは高くなるが、線形二次関数モデルの2次の係数は負で、高線量で頭打ちになる傾向が伺える。線量効果関係には癌発生とのinteractionが有意に認められ、長崎では癌発生とのinteractionが低いことが示唆された。つまり、広島の対象者においてGPA Mfの線量効果の傾きは癌グループの方が非癌グループよりも有意に高いが、長崎の対象者においてはGPA Mfの線量効果と癌の間に有意な相関は認められなかった。なお、非癌グループの線量効果には両市の間で差はなかった。

次に、非被曝対照群と1.5Sv以上の高線量被曝群で、それぞれ、癌グループと非癌グループのGPA Mfの線量効果を比較した(Table 2)。非被曝対照群では、癌発生と非発生で有意差はなかったが、広島の高線量被曝群で癌発生を認めた被爆者のGPA Mfは癌発生を認めなかった被爆者に比べて有意に高かった。一方長崎の被爆者では、非被曝対照群、1.5Sv以上の高線量曝群いずれにおいても、固形癌発生の有無でGPA Mfに有意差はなかった。同じ結論がCox回帰分析を用いた解析でも得られた。

D. 考察

放射線など遺伝毒性を有するものに暴露され、体細胞遺伝子に突然変異を生じた細胞が発生し体内で維持される程度には個人差が存在すると考えられている。また、突然変異細胞が数多く長期間存在するほど、癌の発生する確率が高くなると考えられている。今回得られた知見は、放射線被曝後数十年を経ても突然変異細胞頻度に高値を示す例では、放射線に関連した癌がより高い確率で発生することを示唆している。

体細胞突然変異の発生は、主にDNA修復ならびに薬物代謝に関与する分子によって制御される。また、変異細胞の生体内での消長は、アポトーシスや免疫の影響を受ける。したがって、今回観察された原爆被爆者GPA Mfの個体差や、発がんリスクの差は、これら生体反応の遺伝的背景の違いと関係していると推察される。また、長崎の被爆者では固形癌発生の有無でGPA Mfに有意差が認められず、それは主に高線量曝者の数が少ないためと考えられるが、遺伝的背景が両市で多少異なっているためである可能性も残っている。これらの推論の正当性を明らかにするために、DNA修復、薬物代謝、ならびにがん免疫に関連する遺伝子の機能や多型の分析など、分子疫学的研究を行う必要がある。

E. 結論

広島原爆被爆者においてGPA Mfの線量効果曲線の傾きは癌罹患群の方が非癌罹患群より有意に大きいことが前向き調査により明らかになった。一方、非被曝群においてGPA Mfに癌罹患の影響みられなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Hayashi T, Morishita Y, Kubo Y, Kusunoki Y, Hayashi I, Kasagi F, Hakoda M, Kyoizumi S, Nakachi K. Long-term effects of radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors. *Am J Med*. 2005;118:83-6.
- 2 Nakachi K, Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y. Perspectives on cancer immuno-epidemiology. *Cancer Sci*. 2004;95:921-9.
- 3 Kyoizumi S, Kusunoki Y, Hayashi T. Flow cytometric measurement of mutant T cells with altered expression of TCR: Detecting somatic mutations in humans and mice. *Methods Mol Biol*. 2004;291:197-204.
- 4 Hayashi T, Hayashi I, Shinohara T, Morishita Y, Nagamura H, Kusunoki Y, Kyoizumi S,

- Seyama T, Nakachi K. Radiation-induced apoptosis of stem/progenitor cells in human umbilical cord blood is associated with alterations in reactive oxygen and intracellular pH. *Mutat Res.* 2004;556:83-91.
- 5 Nakanishi S, Suzuki G, Kusunoki Y, Yamane K, Egusa G, Kohno N. Increasing of oxidative stress from mitochondria in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004;20:399-404.
 - 6 Kyoizumi S, Ohara T, Kusunoki Y, Hayashi T, Koyama K, Tsuyama N. Expression characteristics and stimulatory functions of CD43 in human CD4+ memory T Cells: Analysis using a monoclonal antibody to CD43 that has a novel lineage specificity. *J Immunol.* 2004;172:7246-53.
 - 7 Suzuki G, Shimada Y, Hayashi T, Akashi M, Hirama T, Kusunoki Y. An Association between Oxidative Stress and Radiation-Induced Lymphomagenesis. *Radiat Res.* 2004;161:642-7.
 - 8 Ogawa T, Hayashi T, Kyoizumi S, Kusunoki Y, Nakachi K, MacPhee DG, Trosko JE, Kataoka K, Yorioka N. Anisomycin downregulates gap-junctional intercellular communication via the p38 MAP-kinase pathway. *J Cell Sci.* 2004;117:2087-96.
 - 9 Nakano M, Kodama Y, Ohtaki K, Itoh M, Awa AA, Cologne J, Kusunoki Y, Nakamura N. Estimating the number of hematopoietic or lymphoid stem cells giving rise to clonal chromosome aberrations in blood T lymphocytes. *Radiat Res.* 2004;161:273-81.
 - 10 Yamaoka M, Kusunoki Y, Kasagi F, Hayashi T, Nakachi K, Kyoizumi S. Decreases in percentages of naïve 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.* 2004;161:290-8.
 - 11 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.* 2004;72:871-879.
2. 学会発表
 1. Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y, Hayashi I, Kyoizumi S, Nakachi K. Immunogenetic significance of individually-differing NK activity. The 12th International Congress of Immunology, 18-23 July 2004, Montreal, Canada
 2. 山岡美佳, 楠 洋一郎, 笠置文善, 林 奉権, 中地 敬, 京泉誠之. 原爆放射線のヒト免疫応答に及ぼす影響. 第 21 報: 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 45 回原子爆弾後障害研究会 2004 年 6 月 6 日, 長崎
 3. 楠 洋一郎. Flow FISH 法による原爆被爆者末梢血ナイーブおよびメモリーCD4 T 細胞集団のテロメア長測定. 第 14 回日本サイトメトリー学会学術集会 2004 年 6 月 25-26 日, 高崎
 4. 林 奉権, 今井一枝, 楠 洋一郎, 田原榮一, 中地 敬. 原爆被爆者における免疫学的胃がん発症高危険群の同定. 第 63 回日本癌学会総会 2004 年 9 月 29-10 月 1 日, 福岡
 5. 鈴木 元, 林 奉権, 楠 洋一郎. 放射線誘発リンホーマ発生過程における酸化ストレスの役割. 第 63 回日本癌学会総会 2004 年 9 月 29-10 月 1 日, 福岡
 6. 楠 洋一郎, 山岡美佳, 久保美子, 濱崎幹也, 林 奉権, 京泉誠之, 中地 敬. 原爆放射線のヒトナイーブおよびメモリーT細胞集団に及ぼす長期的影響. 第 47 回日本放射線影響学会 2004 年 11 月 25-27 日, 長崎
 7. 楠 洋一郎, 山岡美佳, 久保美子, 濱崎幹也, 林 奉権, 中地 敬. 放射線被ばくによるヒト末梢血メモリーCD4 T 細胞集団のテロメア長の短縮. 27 回日本造血細胞移植学会総会 2004 年 12 月 16-17 日, 岡山
 - 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. Regression analysis of GPA Mf using linear and linear-quadratic dose response models

Term	Estimated value \pm SE [$\times 10^{-6}$] (p-value)	
	Linear model	Linear-quadratic model
City (Nagasaki)	- 7.1 \pm 3.0 (0.018)	-7.5 \pm 3.0 (0.013)
Sex (female)	- 6.5 \pm 2.1 (0.0016)	- 6.4 \pm 2.1 (0.0020)
Age at exam (per year)	0.13 \pm 0.076 (0.078)	0.13 \pm 0.076 (0.099)
Dose (initial slope, per SV)	26 \pm 2.0 (<0.0001)	32 \pm 3.5 (<0.0001)
Dose (quadratic term)	—	- 3.6 \pm 1.7 (0.033)
Cancer (present)	5.7 \pm 4.6 (0.21)	5.5 \pm 4.6 (0.23)
Sex-cancer interaction	- 12 \pm 4.8 (0.013)	- 12 \pm 4.8 (0.012)
City-dose interaction	- 5.5 \pm 3.1 (0.071)	- 5.0 \pm 3.1 (0.10)
Cancer-dose interaction	15 \pm 5.3 (0.0049)	15 \pm 5.3 (0.0038)
City-dose-cancer interaction	- 21 \pm 7.9 (0.0068)	-21 \pm 7.9 (0.0081)

^aPersons with GPA Mf > 400 $\times 10^{-6}$ excluded

Table 2. Relationship between log GPA Mf and cancer status in high dose-exposed survivors^a

City	Term	Estimated difference in log GPA Mf	Standard error	P value
Hiroshima	Exposed	0.503	0.0477	<.0001
	Cancer	0.0368	0.0495	0.46
	Exposure-cancer interaction	0.342	0.123	0.0057
Nagasaki	Exposed	0.365	0.0670	<.0001
	Cancer	- 0.0622	0.0634	0.33
	Exposure-cancer interaction	0.177	0.141	0.21

^aResults of fitting log GPA Mf, comparing high dose (>1.5 Sv) to non-exposed with adjustment for sex and age at examination.

損傷乗り越えDNA合成蛋白REV1の機能解析と 放射線発がんでの役割

分担研究者 神谷 研二（広島大学原爆放射線医科学研究所）

研究要旨 ヒトREV1は、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼYファミリーの一つで、鋳型塩基に対してdCMPを取り込むdCMP transferase活性を持つ。Yファミリーの一つであるXPVが色素性乾皮症の原因遺伝子として同定されたことから、損傷乗り越えDNA合成の機能変化と発癌との関連が注目されている。REV1遺伝子は、error-proneのDNA修復に関与し、突然変異の誘発に重要な役割を担っている。我々は、損傷乗り越えDNA合成に関与するREV1遺伝子の機能と放射線発がんの関連を調べるために、REV1の生化学的解析を行った。その結果、ヒトREV1タンパク質のdCMP転移活性は、鋳型Gと脱塩基部位に対して効率が高いことから、REV1が脱塩基部位の損傷乗り越えDNA合成に重要な役割を担い、点突然変異を誘発する可能性が高いことが示唆された。このことから、REV1の機能亢進は、点突然変異を生成し易い遺伝的不安性を誘導し、放射線発がんに関与する可能性が考えられた。一方、Rev1が相互作用する蛋白質を解析した結果、Rev7とPolkがRev1のC末端100アミノ酸残基に競合的に結合する事を生化学的に証明した。さらに、Polη、Polιも同じくRev1のC末端に結合することを見だし、Rev1が他の損傷乗り越えDNAポリメラーゼと複合体を形成する一端を明らかにした。さらに、Rev1トランスジェニックマウスの作製を進め、7系の独立した系統を樹立した。このマウスでは、放射線誘発のTCR突然変異頻度が高い傾向を認めた。

A.研究目的

放射線誘発がんの遺伝子変異の解析から、突然変異が遺伝子変異の生成に重要であることが明らかとなった。細菌では、この突然変異の発生は*umuC*、*umuD*等の遺伝子群による「誤りがちなDNA合成」に起因する。即ち、突然変異誘発には特殊なDNA複製装置が必要で、この複製装置は損傷DNAを鋳型としてDNA鎖を伸長するtranslesion DNA合成活性をもつ。しかし、この複製装置はその忠実度が低いために、突然変異誘発の原因となる。最近の研究からこの様な突然変異を制御する遺伝子群は、酵母から哺乳類まで広く保存されており、花岡らにより同定された色素性乾皮症variant(XPV)の原因遺

伝子産物は、この様なtranslesion DNA polymeraseの一種でUVによるDNA損傷(チミンダイマー)を鋳型としてDNA合成を行うことができる。XPVでは、原因遺伝子の機能不全により癌の頻度が上昇する事から、「translesion DNA合成」は、突然変異を介してがんの発症に深く関与すると考えられる。そこで、放射線によるゲノム障害により「translesion DNA合成」装置を構成する遺伝子群が誘導され、「誤りがちなDNA合成」が行われる。これにより突然変異や遺伝的不安定性が誘導され、放射線によるがん発症に繋がると考え以下の研究を行う。

(1)ヒトREV1タンパク質の機能解析：
Rev1タンパク質と相互作用をする蛋白

質の検索

(2) *Rev1* トランスジェニックマウス (*Rev1* マウス) の作製と突然変異の解析

B.研究方法

(1) ヒト *REV1* タンパク質及び関連蛋白質の精製と機能解析

ヒト *REV1*, *REV7* やマウス *Rev1*, *Rev7*, *Polk*, *Polη*, *Polι* の詳細な生化学的解析を行うためには高純度の精製標品が必要である。大腸菌で各遺伝子を過剰発現させタンパク質を含む粗抽出液をニッケル親和性カラムクロマトグラフィー、続いてヘパリン親和性カラムクロマトグラフィーにより分画後、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し精製標品を得た。精製したタンパク質の dNMP 転移活性は、dNTP と二価イオンの存在下でのプライマー伸長反応として検出した。

(2) *Rev1* タンパク質と相互作用をする蛋白質の検索

マウス *Rev1* と *Rev7*, *Polk*, *Polη*, 及び *Polι* の相互関係は、Two-hybrid 法を用いて検討した。蛋白質相互作用の解析は、Cos7 細胞に目的蛋白質を強制発現させ、免疫沈降法と western blotting 法により両者が生理的に結合するか否かにより検討した。さらに、*in vitro* の系では、蛋白質の結合状態を目的蛋白質の GST 融合蛋白質を作成し、グルタチオン・ビーズを用いた GST pull-down 法でも検討した。

(3) *Rev1* 遺伝子操作マウスの作製：

遺伝子発現の制御が可能なプロモーターを用いたトランスジェニックマウスの作成を試みた。トランスジェニックマウス作成用のトランスジーンはメタロチオネインプロモーターの下流に *mRev1* 遺伝子を組み込んだ MT-1 プラスミドをベクターとして作成した。マウス受精卵は近交型マウス C57BL/6NJcl から調整し、トランスジーンを注入を行った。この作業はナリシゲ社のマイクロマニピュレータとオリンパス社の倒立顕微鏡を組み合わせ

せたシステムと、デフロンブラウン社のマイクロフォーgerを利用して行った。

(4) *Rev1* マウスでの突然変異の検出

1) T cell receptor(TCR)突然変異の検出

C57BL/6 および *Rev1* トランスジェニックマウス (週齢 8~12) に 0,1,2,4Gy の X 線をそれぞれ照射した。2 週間飼育後、頸椎脱臼により屠殺し、T 細胞を多く含む脾臓およびリンパ節を摘出し培地中ですり潰して細胞を分離した。これをナイロンウールで処理することにより T 細胞を分離した。2×10⁶ 個の細胞を 1%ウシ血清アルブミン、0.01%NaN₃ を含む PBS で洗浄後、PE 標識抗 CD3 ε 抗体、FITC 標識抗 CD4 抗体を添加、4℃で 30 分反応後、PBS で洗浄、PI(propidium iodide)を含むバッファーに浮遊させ、FACScan で解析した。

(倫理面への配慮)

本申請研究には組換え DNA 実験が含まれているため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（平成十五年法律第九十七号）」に基づき、広島大学組換え DNA 実験安全管理規定に従って承認手続きを行い、機関承認実験として承認された。

C.研究結果

(1) ヒト *REV1* タンパク質の機能解析：

Rev1 タンパク質と相互作用をする蛋白質の検索

Rev1 と相互作用する蛋白質を Two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、*Rev1* は、同じく Y ファミリーの損傷乗り越え DNA 合成ポリメラーゼ *Polk* と結合することを見いだした。さらに、Cos7 細胞に *Rev1* と *Polk* を強制発現させ、免疫沈降法と western blotting 法により両者が生理的に結合することを証明した。*Rev1* と *Polk* の結合領域を同定する目的で、*Rev1* の欠失変異蛋白質を作成し、*Polk* との結

合を Two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、Polkは、Rev1 のC末端から 100 アミノ酸残基(1150-1249)の領域に結合することが判明した。同様に、Polkの欠失変異蛋白質を作成し、Rev1 との結合を Two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、Rev1 は、Polkの中央部 230-616 アミノ酸残基の領域に結合することが判明した。同様の Two-hybrid 法を用いて、Rev1 のC末端と他の損傷乗り越え DNA 合成ポリメラーゼである Polη 及び Polιとの結合を検討した。両者とも Rev1 の同じ C末端領域に結合することを明らかにした。

(2) *Rev1* トランスジェニックマウスの作製と突然変異の解析：

遺伝子発現の制御が可能なメタロチオネインプロモーターの下流に *mRev1* 遺伝子を組み込んだ MT-1 プラスミドをベクターとしたトランスジェニックマウスを作成した。その結果、現在までに7系の独立した *Rev1* トランスジェニックマウスを得た。これらマウスの各臓器より mRNA を取り出し、*mRev1* トランスジーン発現を RT-PCR 法で確認した。その結果、各臓器でのユビキタスな発現を認めた。また、蛋白質の発現を Western 法、及び免疫組織化学で検討した。その結果、小腸では Zn で誘導可能な蛋白質の発現を認めた。

一方、*Rev1* トランスジェニックマウスの T 細胞を用いた放射線誘発の TCR 突然変異頻度は、対照群に比べ高い傾向を認めた。

考察

高発がん性の色素性乾皮症バリエント (XPV) の原因遺伝子が「損傷乗り越え DNA 合成」(translesion DNA 合成) をする特殊な DNA polymerase である事が明らかにされ、「損傷乗り越え DNA 合成」とがん化との関係が世界中で注目されている。本研究は、translesion DNA 複製装置のうち「誤りがちな DNA 合成」に関

与する Rev1 の機能と発がんとの関係を

(1) ヒト REV1 蛋白質複合体の生化学的な機能解析、(2) *Rev1* 遺伝子改変マウス、によって解明することを目的とした。解析の結果、ヒト REV1 タンパク質の dCMP 転移活性は、鋳型 G と脱塩基部位に対して効率の高いものであることが明らかとなった。この結果は、REV1 タンパク質が脱塩基部位の損傷乗り越え DNA 合成に重要な機能を担い、点突然変異を生成する可能性が高いことを示している。我々は、既に放射線照射により *mRev1* が誘導される事を確認している。従って、*REV1* が放射線によるゲノム障害などで誘導されることで点突然変異の生成が蓄積されれば、やがて細胞は癌性突然変異を起こすと考えられる。即ち、REV1 の機能亢進は、ゲノムに点突然変異を起こし易い遺伝的不安定性を誘導することになり、放射線発がんにおける遺伝的不安定性の新たな分子機構となる可能性がある。実際、牛島らは、6株のヒト乳癌細胞株を用いて *hprt* 遺伝子の突然変異生成頻度を測定した結果、これら全ての細胞株は、対照群に比べ有意に高頻度の点突然変異を起こす事を見出した。即ち、これら乳癌細胞株には、点突然変異を起こし易い遺伝的不安定性が誘導されていることを示した。この原因は不明であるが、我々の研究結果も加味して考えると、がんに於ける新しい遺伝的不安定の誘導として注目される。

これらの点をより明確にする為には、*Rev1* トランスジェニックマウスの作製は不可欠である。そこで、遺伝子発現の制御が可能なプロモーターであるメタロチオネインを用いたベクターを用いて、7系の独立したトランスジェニックマウスを作成した。今回の実験で *Rev1* トランスジェニックマウスの放射線誘発の TCR 突然変異頻度は、対照群に比べ高い傾向を認めた。今後、このマウスの放射線による発がん性や細胞生物学的解析を進め

る予定である。一方、環境変異原を検定するエイムス試験は、この様な遺伝子の機能を亢進することで突然変異の検出感度を上げたものである。従って、作製したトランスジェニックマウスが、環境変異原に対して発癌性、突然変異性等で高感受性モニターマウスに成り得る可能性がありこの点についても検討する予定である。

現在、世界的にも損傷乗り越え修復における REV1 の機能と作用機構の解析が行われているが、その全体像は、殆ど解明されていない。その解明の為には、RAD6 epistasis group に属する REV3, REV7, RAD6, RAD18 や他の損傷乗り越え DNA ポリメラーゼと REV1 の結合様式、相互作用や酵素活性、さらには他の修復系との関連を解明する必要がある。我々は、既に REV1 と REV7 がヘテロダイマーを形成することを生化学的に証明している。今回の研究で Rev1 は、Polk, Pol η 及び Pol ϵ と結合することが明らかとなった。その結合領域は、Rev7 と同じ Rev1 の C 末端 100 アミノ酸残基であり、Polk は Rev7 と競合的に結合することも明らかになった。Polk, Pol η 及び Pol ϵ は、PCNA と結合することが報告されている。このことは、fidelity の高いポリメラーゼ δ 等が損傷塩基部位で DNA 合成出来ないとき、損傷乗り越え型のポリメラーゼと入れ替わり DNA 合成を継続するポリメラーゼスイッチ機構が存在する可能性を示唆している。一方、Polk は、benzo[a]pyrene-G adducts や thymine glycol を、Pol η は thymine-thymine dimer を乗り越えて DNA 合成が出来る様に、損傷塩基の種類によって使用されるポリメラーゼが選択される可能性がある。さらに、Pol η や Pol ϵ の損傷乗り越え DNA 合成は、RAD6 による PCNA のモノユビキチン化により活性化されることが報告された。この様に、損傷乗り越え DNA 合成は、複雑な蛋白質相互作用により高度

に制御されており、複製フォークの進行を支えているものと考えられる。Rev1 は、これらポリメラーゼ群と競合的に結合することから、損傷乗り越え DNA 合成の中心的役割をなすものと推定される。Rev1 は、thymine-thymine dimer を乗り越えて DNA 合成が出来ないが、thymine-thymine dimer の損傷乗り越え DNA 合成に Rev1 が必要な事は、Rev1 が広く損傷乗り越え DNA 合成に関与していることを示している。

我々は、「誤りがちな DNA 合成」機構に関連する蛋白質因子の多くを既に精製しており、その準備状況は世界の最先端にある。今後、Rev1 を含め「誤りがちな DNA 合成」機構の解明を進め、放射線発がんに於ける役割を明らかにしたい。

E. 結論

REV1 は、脱塩基部位の損傷乗り越え DNA 合成に重要な役割を担い、その部位に dCMP を挿入した場合は、点突然変異を誘発する可能性が高いことが判明した。この事から、REV1 の機能亢進は、点突然変異を生成し易い遺伝的不安性を誘導し、放射線発がんに関与する可能性が示唆された。一方、Rev1 の C 末端 100 アミノ酸残基には、Rev7 と Polk が競合的に結合し、さらにこの部位には Pol η 、及び Pol ϵ も結合する事を証明し、Rev1 が他の損傷乗り越え型ポリメラーゼと複合体を形成する一端を明らかにした。さらに、Rev1 トランスジェニックマウスの作製を進め、7 系の独立した系統を樹立した。このマウスでは、放射線誘発の TCR 突然変異頻度が高い傾向を認めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kashiwabara, S., Kashimoto, N., Uesaka, T., Wakabayashi, K., Kamiya, K., Watanabe, H.: Tumor Induction by

- Azoxymethane (AOM) and 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in F344 Rat Gastric Mucosa Featuring Intestinal Metaplasia Caused by X-irradiation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, in press.
2. Kubo, N., Myojin, Y., Shimamoto, F., Kashimoto, N., Kyo, E., Kamiya, K., Watanabe, H.: Protective Effects of a Water-soluble Extract from Cultured Medium of *Ganoderma Lucidum* (Reishi) Mycelia and *Agaricus blazei* Murill Against X-irradiation in B6C3F1 Mice: Increased Small Intestinal Crypt Survival and Prolongation of Average Time to Animal Death. *Int. J. Mol. Med.*, Mar;15(3):401-406, 2005.
 3. 神谷研二：広島大学 21 世紀 COE プログラム「放射線災害医療開発の先端的研究教育拠点－ゲノム障害科学に基づく学術基盤の確立と医療展開－」の概要。長崎医学会雑誌，79 別冊，p.10-14, 2004.9.)
 4. 増田雄司，神谷研二：損傷乗り越え DNA 合成に関与するヒト REV1 を阻害する DNA 構造の解析。長崎医学会雑誌，79 別冊，p.139-141, 2004.9.)
 5. Mochizuki, H., Matsubara, A., Teishima, J., Mutaguchi, K., Yasumoto, H., Dahiya, R., Usui, T., Kamiya, K.: Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Jul 30; 320(3):656-663, 2004.
 6. 増田雄司，増田憲治，神谷研二：損傷乗り越え DNA 合成に関与するヒト REV1-REV7 複合体の生化学的解析。広島医学，57(4 Suppl.), p.432-434, 2004.4.
 7. 井倉毅，白石貴博，神谷研二：DNA 損傷におけるヒストンアセチル化酵素複合体のダイナミクス。広島医学，57(4 Suppl.), p.430-431, 2004.4.
2. 学会発表
 1. 増田雄司，神谷研二：損傷乗り越え DNA 合成に関与するヒト REV1 を阻害する DNA 構造の解析。第 45 回原子爆弾後障害研究会，長崎，2004.6.6. (講演抄録，p.32, 2004)
 2. 増田雄司，神谷研二：哺乳類の突然変異誘発の分子機構－REV タンパク質による試験管内再構成の現状。平成 16 年度変異・発癌抑制機構研究会，名古屋，2004.6.26-27.
 3. 神谷研二：高い発がん initiation 頻度と正常細胞による発がん抑制。第 34 回放射線による制癌シンポジウム－基礎と臨床の対話－。京都，2004.7.16.
 4. 井倉毅，田代聡，倉岡功，神谷研二：DNA 修復におけるヒストン H2AX のダイナミクス。第 29 回中国地区放射線影響研究会，広島，2004.7.30.
 5. 増田雄司，神谷研二：損傷乗り越え DNA 合成に関与するヒト REV1 タンパク質と DNA の相互作用。第 29 回中国地区放射線影響研究会，広島，2004.7.30.
 6. 井倉毅，神谷研二，田代聡：DNA 損傷修復における TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体とヒストン H2AX のダイナミクス。第 63 回日本癌学会学術総会，福岡，2004.9.29-10.1.
 7. 増田雄司，神谷研二：損傷乗り越え DNA 合成に関与するヒト REV1 を阻害する DNA 構造。第 63 回日本癌学会学術総会，福岡，2004.9.29-10.1.
 8. 神谷研二，増田雄司：Rev1 による突然変異の誘発機構と放射線発がん。第 63 回日本癌学会学術総会，福岡，2004.9.29-10.1.
 9. 井倉毅，田代聡，垣野明美，中川武