

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

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田原 榮 一

平成17年(2005年)3月

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

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16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
I. 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	
II. 分担研究報告書	
1. 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	12
安井 弥	
2. 長期追跡集団におけるがん一次予防に関する疫学研究	17
児玉 和紀	
笠置 文善	
3. 長期追跡集団におけるがん三次予防に関する疫学研究	21
西 信雄	
児玉 和紀	
4. 保存血清を使った胃がんの検診の開発研究	26
鈴木 元	
5. 肝細胞がんへの進行促進要因に関するコホート内症例対照研究	30
藤原佐枝子	
大石 和佳	
6. 免疫学的発がん高危険群の同定	34
林 奉権	
7. 大腸がんにおけるBORIS/CTCFmRNA発現意義と直接核酸増幅法による リンパ節微小がん転移検出の有用性についての検討	40
谷山 清己	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	44

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 主席研究員/疫学部長
	笠置 文善	(財) 放射線影響研究所 疫学部副部長
	西 信雄	(財) 放射線影響研究所 疫学部腫瘍組織登録室長
	鈴木 元	(財) 放射線影響研究所 主席研究員
	藤原佐枝子	(財) 放射線影響研究所 臨床研究部長
	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	独立行政法人国立病院機構呉医療センター・中国 がんセンター 臨床研究部長/臨床検査科長
研究協力者	大石 和佳	(財) 放射線影響研究所 臨床研究部研究員
	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

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、1) 消化器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法により多くのがん特異的遺伝子を同定した。その内、MIAは昨年度同定したRegIVと同じく分泌蛋白であり、アポトーシスを抑制し、その発現は悪性度・予後と相関、ELISAによって胃がん患者血清中で検出されることが確認された。なお、新しいがん遺伝子BORISの発現は、大腸および肝がん組織のみならず、非がん部においても認められたが、がん細胞15株を用いての解析では、BORISの発現は抗がん剤耐株に高く、DNAメチル化がBORISの発現に関与している可能性が考えられた。また、直接核酸増幅法によるリンパ節微小がん転移検出は、HE標本による病理学的がん転移検出より検出率が高く、しかも短時間であることが示された。

2) 長期間追跡集団におけるがんの一次予防・二次予防・三次予防の基盤研究では、(1) 一次予防研究：食道がんや胃がんに対する果物や野菜摂取による抑制効果、喫煙の促進効果の時間的推移について検討した結果、毎日の果物摂取は、追跡経過後5年以上、あるいは、10年以上先の食道がん死亡リスクの有意な低下をもたらした。一方、喫煙は、いずれの経過年数においても、がんリスクへの促進効果が示されたが、禁煙は5年あるいは10年の年限を経て、禁煙者と同等になることが示唆された。

(2) 二次予防研究：胃がん発症前保存血清とゲノム遺伝子を用いて胃がんリスク因子の相対リスクを求めるため、成人健康調査コホート23,000人中、診断前に最低2回放射線影響研究所（放影研）で検診を受けた胃がん症例719名中から、実際に使用可能な保存血清を持つ445症例が選出。各症例に対し3倍数の性・年齢・血清保存時期・都市を合致させた対照者1,050名を選んだ。診断前1-4.5年および8-12年の保存血清および対照者の保存血清を用いてペプシノーゲンI, II、*H. pylori*抗体価、CagA抗体価の測定を終了した。胃がん症例719症例中379症例（53%）の病理組織標本を組織型と被曝線量との関係を性、被曝時年齢、都市を調整したロジスティック回帰分析で行った。その結果、被曝線量と非充実型低分化腺がんとの有意な相関が証明された ($p = 0.004$)。

(3) 放影研寿命調査集団（160,000）における1978年郵便調査の回答者（男性10,978人、女性18,334人）について、がんの予後規定因子を検討した。男女の胃がん・大腸がん、男の肺がん、女の乳がんのいずれにおいても、がんの進展度と予後との間に有意な相関があり、また女の胃がん・大腸がんにおいて、発症前の喫煙習慣が予後と有意に関連していた。

(4) 肝細胞がん(HCC)への進行促進要因を明らかにするために、成人健康調査集

団の保存血清を用いてコホート内症例・対照研究（HCC症例224例、対照は1症例に対して3人の対照者）を行った。HBs抗原陽性者、HCV抗体陽性者のHCC発症リスクは、陰性者の22-25倍であり、さらにHBs抗原陽性かつHCV抗体陽性者では、そのリスクは53倍であることが明らかになった。3) 免疫学的発がん高危険群の同定に関する研究では、本年度は、免疫関連遺伝子のうち、抗炎症性サイトカインとして重要な役割を担っている*IL-10*遺伝子の日本人集団で頻度が1%を超える多型部位をマーカーとしてハプロタイプ解析を行った。その結果、4つのhtSNPで形成される一つのハプロタイプブロックを見出した。このハプロタイプブロックの主要な二つのハプロタイプアレル(*IL10-ATTA*および*IL10-GGCG*)の頻度は対照群でそれぞれ67.7%および31.3%であった。一方、胃がん患者群では*IL10-ATTA* および*IL10-GGCG* の頻度はそれぞれ59.3%および40.7%であり、対照群の頻度と統計学的に有意の違いを示した($P=0.012$ および $P=0.002$)。また、*IL10-ATTA/IL10-ATTA*に比べ*IL10-GGCG/IL10-GGCG*は胃がん発症リスクが2.5倍高く($P=0.004$, 95%CI 1.33-4.69)、胃がん高危険群であることが示された。また、その*IL-10*ハプロタイプは血中*IL-10*の高いレベルを示した。

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 主席研究員/疫学部長), 笠置文善(放射線影響研究所 疫学部副部長), 西 信雄(放射線影響研究所 疫学部腫瘍登録室長), 鈴木 元(放射線影響研究所 主席研究員), 藤原佐枝子(放射線影響研究所 臨床研究部長), 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(独立行政法人国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター 臨床研究部長/臨床検査科長)

研究協力者

大石和佳(放射線影響研究所臨床研究部研究員), 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) 消化器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) 消化器がんの新規がん予防・早期発見システムの開発

(1) 新規がん特異的発現遺伝子の同定: 胃がんおよび食道がんについて SAGE 法で網羅的遺伝子発現解析を行い、正常臓器・組織の遺伝子発現プロファイルと比較し、特異的発現態度を示す遺伝子を抽出する。これらについて、定量的 RT-PCR 法により多数症例における発現解析を行う。代表的なものについて、遺伝子の機能解析を行い、分泌蛋白あるいは膜蛋白を抽出する。

(2) がん特異的遺伝子の発現解析と血清測定系の確立: がん特異的に発現し、

かつ、分泌蛋白あるいは膜蛋白と確認されたものについては、リコンビナント蛋白を合成、特異抗体を作成する。これを用いて免疫組織化学的に発現解析を行うと共に、ELISA系を構築し、非がんコントロールおよびがん患者血清ならびに腹水について、蛋白レベルを測定する。

(3) 新しいがん遺伝子マーカーとしてのBORIS/CTCFの発現：胃がん45例、大腸がん74例、肝がん41例の腫瘍組織におけるBORIS/CTCF mRNAの発現を検討し、臨床病理的諸因子との関連性を検討した。

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、その前身である原爆傷害調査委員会は、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を設定し、今日まで50年以上にわたって死因追跡調査が行われてきている。この放影研疫学調査における死因データは、死亡の99%以上が把握可能であるという点にその特徴がある。

加えて、この寿命調査対象者の身長・体重並びにその変動状況、喫煙や食習慣その他の生活習慣に関する情報、既往歴、家族歴、社会経済状況などに関する多くの情報が定期的な郵便調査によって入手されている。この郵便調査はこれまでに1965年、1969年、1979年、1991年の4回実施されている。

本分担研究は、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、1999年までの20年間の死亡追跡調査データに基づいている。消化器がんとして食道がんと胃がん死亡をエンドポイント事象とした。Cox比例ハ

ザードモデルを用い、郵便調査時の性、年齢、BMI、教育歴、放射線被曝線量などを調整して、食習慣特に果物や野菜摂取によるがん抑制効果あるいは喫煙の促進効果の時間的推移について検討した。時間的推移については、追跡期間を分割し、追跡開始後5年以内、5年以後、10年以後それぞれにおける要因と食道がんおよび胃がん死亡との関連を比較し検討した。

(2) 保存血清を使った胃がん検診の開発研究：放影研は、1958年より約2万人の成人健康調査コホート(AHS)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、液体窒素中に末梢単核球を保存してきた。胃がん症例か否かは、広島および長崎の腫瘍登録、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。

本研究では、血清試料が利用できる胃がん症357例およびこれらの症例と性、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1,071名を選び、コホート内症例対照研究を行う。修飾因子として、喫煙、*H. Pylori*感染、プロ炎症性サイトカインに関係する遺伝的多型を含める。

診断時2年前および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。またガストリンを測定する。*H. pylori* IgG抗体価、CagA抗体価をELISA法により測定する。

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/*

BATIハプロタイプ、およびTLR2第1エキソンの22bp欠失多型を調べる。TLRは、*H. pylori* 由来の内毒素あるいは混合感染菌体成分を識別する細胞側のレセプターをコードする。

(3) がん三次予防に関する研究：広島県の寿命調査集団のうち、1978年の郵便調査に回答した28,383人（原発がんの既往のあった1,025人を除く）の中から、男は1980年1月、女は1981年2月以降に原発がんを発症した者を対象とした。なお郵便調査回答者28,383人の内訳は、男10,705人（平均年齢53.8歳）、女17,678人（平均年齢58.2歳）であり、現在喫煙者、過去喫煙者、非喫煙者の割合は、男がそれぞれ63.1%、22.2%、14.7%、女がそれぞれ12.1%、4.9%、83.1%であった（喫煙習慣不明の924人を除く）。

がんの罹患は広島市医師会腫瘍統計事業と広島県腫瘍登録事業の資料ならびに総務省の認容を得て入手している人口動態調査調査票（死亡小票）の転記書類から2001年12月分まで把握した。死亡小票ではじめて把握したDCO (death certificate only)の割合は11.8%であった。このDCOの症例は通常生存率の分析には含まないが、喫煙習慣や学歴において女でDCO以外の症例と有意な差を認めたため、発症から死亡までの期間が死亡小票から得られる場合、男女とも対象に含めた。なお上皮内がんは今回の分析には含まなかった。

がん罹患者の死亡については2001年12月まで追跡を行い、死亡小票により死因を確認した。分析は、カプラン・マイヤー法による生存率曲線の比較ではログランク検定を用いた。また、コックスの比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行った。統計ソフトはSPSS13.0Jを用いた。

(4) 肝がんへの進行促進要因に関するコホート内症例対照研究：対象は、AHS集団から発症した肝細胞がん（HCC）症例224人（HCC診断直前の保存血清あり）を抽出し、非HCC症例から、出生年、性、都市を一致させ、放射線被曝の有無に基づき、コホート内層化抽出法により1症例に対し3人の対照者を選択した。

HCC診断直前と診断前10年前の保存血清を用いて以下の検討項目について測定を行った。

- ① 宿主側因子：肝線維化マーカー（ヒアルロン酸、IV型コラーゲン）、 γ -グロブリン、フェリチン
- ② ウイルス側因子：HBV感染（HBs抗原(Ag), HBc抗体(Ab), HBeAg/Ab, HBV genotype, HBV DNA定量など）、HCV感染（HCVAb, HCV genotype, HCV RNA定量/定性など）

HBV DNA量およびHCV RNA量については、それぞれ配列特異的なハイブリダイゼーションプローブを用いたreal time PCR法の開発を試みた。

放影研では、血清保存が、凍結法あるいは凍結乾燥法で行われていることから、両法で同時期に保存されている1993-1995年の時期の血清サンプルを用いて生化学的検査とウイルス学的検査の比較検討を行った。肝炎ウイルス、原爆放射線被曝がHCC発症に及ぼす影響は、過剰相対リスクモデルを使って解析した。

3) 免疫学的発がん高危険群の同定に関する研究

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)について免疫関連遺伝子のうち、抗炎症性サイトカインとして重要な役割を担っている*IL-10*遺伝子の日本人集団で頻度が1%

を超える多型部位をマーカーとしてハプロタイプ解析を行った。多型部位は、TaqMan 5' ヌクレアーゼ法(PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて遺伝子タイプを決定する。このアッセイは目的の多型部位での2つの対立遺伝子の一方に特異的な蛍光プローブを切断するTaqDNA polymeraseの5'-3'ヌクレアーゼ活性を利用している。蛍光の検出と genotyping は ABI Prism 9700HT sequence detector(PE Applied Biosystems)を用いて行った。血漿中IL-10レベルはEILSAアッセイキットを用いて測定した。

(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) 消化器がんの新規がん予防・早期発見システムの開発

(1) がんの特異的に発現する新規遺伝子の同定：がんの特異的に発現する新規遺伝子を同定する目的でわれわれが完成した世界最大の胃がんSAGEライブラリー(GEO accession no. GSE545)とNCBIデータベース中の主要な正常臓器のライブラリーを比較し、約200の候補遺伝子をリストアップした。これらについて、実際

の14の正常臓器と胃がんにおける遺伝子発現を定量的RT-PCR法により検討し、少なくとも8種類のがん特異的発現遺伝子を同定した。その内、MIA (melanoma inhibitory activity)は分泌蛋白であり、発現は悪性度・予後と相関し、ELISAによって進行胃がん患者血清中で検出されることを確認した。免疫染色でみたRegIVの発現は、胃がん、大腸がん、大腸カルチノイドに高頻度であることを確認し、ELISA系を構築した(安井)。

(2) BORIS/CTCFの発現：新しいがん遺伝子BORISの発現は、大腸および肝がん組織のみならず、非がん部においても認められたが、がん細胞15株を用いての解析では、BORISの発現は抗がん剤耐株に高く、DNAメチル化がBORISの発現に関与している可能性が考えられる(谷山、田原・吉田研究協力者)。また、直接核酸増幅法によるリンパ節微小がん転移検出は、HE標本による病理学的がん転移検出より検出率が高く、しかも短時間であることが示された(谷山)。

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：追跡開始時に把握された毎日の果物摂取は、追跡経過後5年以上、あるいは、10年以上先の食道がん死亡リスクの有意な低下をもたらし、この現象は、野菜摂取の胃がん死亡リスクに対する経年推移においても観察された。果物や野菜の摂取は、がんリスクに対する即効性の抑制要因ではなく、長期的時間経過を経た上での抑制要因となっている。

喫煙は、追跡後いずれの経過年数においても、がんリスクへの促進効果が認められた。禁煙者のリスクは、禁煙せざるを得なかった者が混在する初期の5年以内では高

いが、5年以後、あるいは10年先になると、非喫煙者のリスクと有意差はない。これは、食道がん、胃がんリスクにおいて共に認められ、禁煙は5年あるいは10年の年限を経て、非喫煙者と同等になることが示唆された。

これらの結果は、がんの一次予防法を確立する上で、抑制因子あるいは促進因子が持っているがんリスクへの時間的推移を考慮することの重要性を示唆している。(笠置、児玉)。

(2) 二次予防研究：1969年より2001年に放影研を2回以上受診した成人健康調査(AHS)対象者の中から発生した胃がん症例は719名の内379名の胃がん組織型と放射線被曝との相関を検討した。ロジスティックレグレッション解析で非充実型低分化腺がんと放射線被曝線量との相関が有意であった($p=0.004$)。診断前の保存血清が使用可能であった胃がん症例357例および都市(広島、長崎)、性、年齢、血清保存時期、および線量カテゴリー(線量に関してカウンターマッチング)により区分したAHS対象者集団より一症例当たり3名の対照者を選別し、ネステッドコントロール研究を組んだ。平成16年度は、全症例と対照者の*H. Pylori* IgG抗体価、CagA抗体価、ペプシノーゲンIおよびIIの測定、喫煙情報取得を終了した。最終年度中にガストリンおよび*IL1B, LTA/NFKBL1/BATI, TLR2*の遺伝子多型を決定する。今後、病理医によるレビューを継続し、ネステッドケースコントロールに選んだ胃がん症例の組織型を決定する(鈴木、田原)。

(3) 三次予防研究：原爆被曝者の寿命調査集団において、1978年の郵便調査以後にがん罹患した者について、予後に影響する因子を明らかにすることを目的

として研究を行った。胃、大腸、肺、乳房(女)の部位についてみると、男女とも診断時の年齢、臨床進行度が有意に予後に関連しており、診断時に高齢であるほど、またがんが進行しているほど予後が悪かった。がん罹患以前の郵便調査により情報が得られていた喫煙習慣別にみると、女の胃がん、大腸がん、肺がんで(1978年当時の)現在喫煙者は非喫煙者に比べて有意に予後が悪かった。今後は食事や飲酒などの生活習慣の影響を検討し、予後改善要因を明らかにする必要がある。(西、児玉)。

(4) 肝がんへの進行促進要因に関するコホート内症例対照研究：RNAの高感度定量系の確立、血清保存状態(凍結、凍結乾燥)による血清マーカーの比較、および肝炎ウイルス、原爆放射線被曝がHCC発症に及ぼす影響について過剰相対リスクモデルを使って予備的解析を行った。凍結と凍結乾燥血清サンプルにおける生化学的検査とウイルス学的検査の比較の結果は良好であり、研究に使用できることが分かった。HCC発症リスクは、HBs抗原陽性では22.4倍、HCV抗体陽性で25.5倍、HBs抗原陽性かつHCV抗体陽性で53.1倍であった。肝炎ウイルス感染を調整すると、原爆放射線被曝線量1 GyあたりHCCの相対リスクは1.5であった。予備的解析では、HBs抗原、HCV抗体、原爆放射線被曝はそれぞれ独立して、HCC発症リスクを増加させた。今後、喫煙、飲酒などその他の危険因子を考慮した解析を行う予定である(藤原、大石研究協力者)。

3) 免疫学的発がん高危険群の同定

抗炎症性サイトカインIL-10の遺伝子多型について解析した結果、4つのhtSNPで形成される一つのハプロタイプブロッ

クを見出した。このハプロタイプブロックの主要な二つのハプロタイプアリアル (*IL10-ATTA*および*IL10-GGCG*)の頻度は対照群でそれぞれ67.7%および31.3%であった。一方、胃癌患者群では*IL10-ATTA* および*IL10-GGCG* の頻度はそれぞれ59.3%および40.7%であり、対照群の頻度と統計学的に有意の違いを示した($P=0.012$ および $P=0.002$)。さらに、*IL10-GGCG/IL10-GGCG* のハプロタイプをもつ人は、*IL10-ATTA/IL10-ATTA*の人に比べ胃癌発症のオッズ比が2.5であった($P=0.004$, 95%CI 1.33-4.69)。このハプロタイプはIL-10遺伝子のプロモーター領域に存在し、遺伝子の発現と関連すると考えられることから、対照群で血漿中IL-10レベルを検討したところ、*IL10-GGCG/IL10-GGCG*は*IL10-ATTA/IL10-ATTA*に比べ約1.5倍高値($p=0.036$)であった(林)。

D. 考察

1) 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、少なくとも8種のがん特異的発現遺伝子を新規に同定した。その内、MIAおよびRegIVは、①生存に重要な正常臓器には発現は殆どないこと、②アポトーシスの抑制をはじめがん化の過程に関与する可能性のあること、③分泌蛋白をコードすること、などから新しいマーカー、治療標的と考えられた。さらに、ELISAによって保存されている被爆者の血清検体を検討することにより、臨床的意義を検証する予定である(図1)。なお、食道がんについてのSAGE法による遺伝子発現解析は次年度の課題であり、胃癌と同様に診断・予防に向けての研究を展開する計画である。

2) ISHにおいてBORIS mRNA発現は睾丸

精上皮の一部に認められたことは、従来の報告に一致したが、進行がんのがん細胞とその周囲線維芽細胞やリンパ球に発現が認められたことは他に報告がない新たな知見である。早期がんや腺腫の腫瘍細胞とその周囲線維芽細胞に発現が認められないことを併せ考えると、BORIS発現ががん細胞と間質の相互依存に関連し、がんの進展に強く関与している可能性が考えられた。他方、非がん部組織では、一部のリンパ球に発現が認められた。このことの意義については、今後の検討が必要であるが、BORIS mRNAは何らかの刺激によって随時発現する可能性を示唆している。

3) 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促進要因および抑制要因に関する解析を行った結果、喫煙は食道がん並びに胃癌の促進要因であり、禁煙は抑制要因であった。しかしながら、禁煙の抑制効果は、禁煙後中長期の年数経過後に現れると考えられる。果物の日常的摂取は食道がんの抑制要因であり、野菜の日常的摂取は胃癌の抑制要因であることが認められた。しかしながら、この抑制効果は追跡開始後5年先、あるいは10年先の中長期の年数を経た上での抑制効果であり、従って、果物や野菜の日常的な摂取を恒常的に維持することががん予防に繋がると考えられる。

4) 放射線被曝と胃癌の組織型との関係は、MatsuuraらおよびItoらがそれぞれ1984年と1989年に報告している。前者においては、低分化腺がん・印環細胞がんが、後者では、スキルスがんが高線量被曝群に増加していると報告されている。今回の我々の報告は、Matsuuraらの結果

と合致する。今後、*H. Pylori*の感染、萎縮性胃炎および3ヶ所ゲノム領域の遺伝子多型との関連について解析し、被爆者胃がんの発生機序を明らかにしたい。

5) がんの三次予防を目的として、今回はがん罹患者の生存率について分析を行ったが、年齢や喫煙習慣は、がんの罹患とも密接に関連するものである。がんの一次予防から三次予防までを包括的に視野に入れて、これらの要因ががんの罹患率、生存率、死亡率とどのように関連するかについて分析を進める必要がある(図1)。

6) 今回、我々の得た結果から、*IL10-GGCG/IL10-GGCG*を持つ集団は、血漿中IL-10レベルも他のハプロタイプに比べて高く、胃がん発症リスクも高いことから、胃がん高危険群であることが示唆された。今後、さらに、解析サンプル数を増やして、IL-10遺伝子多型について放射線被曝の胃がん発症リスクに及ぼす影響、IL-10蛋白レベルと遺伝子型解析、および胃がん組織型などを検討する予定である(図1)。

以上、本プロジェクトの三つの柱から得られた研究成果をお互いに連結させ、消化器がんの包括的ながん予防のモデルを確立したい(図1)。

E. 結論

1) 消化器がんの新規がん予防・早期発見システムの開発

SAGE法により多くのがん特異的発現遺伝子を同定した。MIAおよびRegIVは新しい診断・治療の標的となり得る。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。

また、BORISは、大腸がん、肝がんのみ

ならず非がん部にも発現している。加えて、OSNA法によるCK19 mRNA検出は、術中迅速に対応できる手技であり、術中診断に用いられることによって大腸がんの手術治療成績向上に寄与する可能性が考えられた。

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

食道がん並びに胃がんの一次予防には、まずは喫煙を避け禁煙を心がけ、果物や野菜の日常的な摂取を恒常的に努めることがその戦略であると思われる。また、胃がんに対する放射線のリスクは、非充実型低分化腺がん強く、その他の組織型には影響が認められなかった。

放影研の寿命調査集団における1978年郵便調査の回答者について、がんの予後規定因子を検討した結果、男女の胃がん・大腸がん・肺がん、女の乳がんのいずれにおいても、臨床進行度により予後に有意な差が認められた。また女の胃がん、大腸がん、肺がんにおいて、発症前の喫煙習慣が予後と有意に関連していた。今後は喫煙以外の生活習慣(例えば野菜や果物の摂取)とがんの生存率との関連について分析を行い、がんの罹患から死亡にいたる過程での生活習慣の関連について、包括的に検討を行う必要がある。

なお、保存血清を用いた肝細胞がんに関するコホート内症例対照研究では、HBs抗原陽性者、HCV抗体陽性者のHCC発症リスクは、陰性者の22-25倍であり、さらにHBs抗原陽性かつHCV抗体陽性者ではそのリスクは53倍であった。

3) 免疫学的発がん高危険群の同定

抗炎症性サイトカイン*IL-10*の遺伝子多型について解析した結果、*IL-10*の

promoter領域を含む4つの多型部位がハプロブロック *IL-10ATTA* と *IL-10GGCG* を形成し、*IL-10ATTA/IL-10ATTA* の対象者に比べ、*IL-10GGCG/IL-10GGCG* の血漿中 *IL-10* レベルが高い値を示し、胃がん発症リスクが有意に高かったことから、*IL10-GGCG/ IL10-GGCG* は胃がん高危険群である可能性が高いと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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: 1-31.
2. Tahara E, Lotan R. RUNX3 and Retinoic Acid Receptor β 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.

その他、分担研究報告書を参照。

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.
 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.
- 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

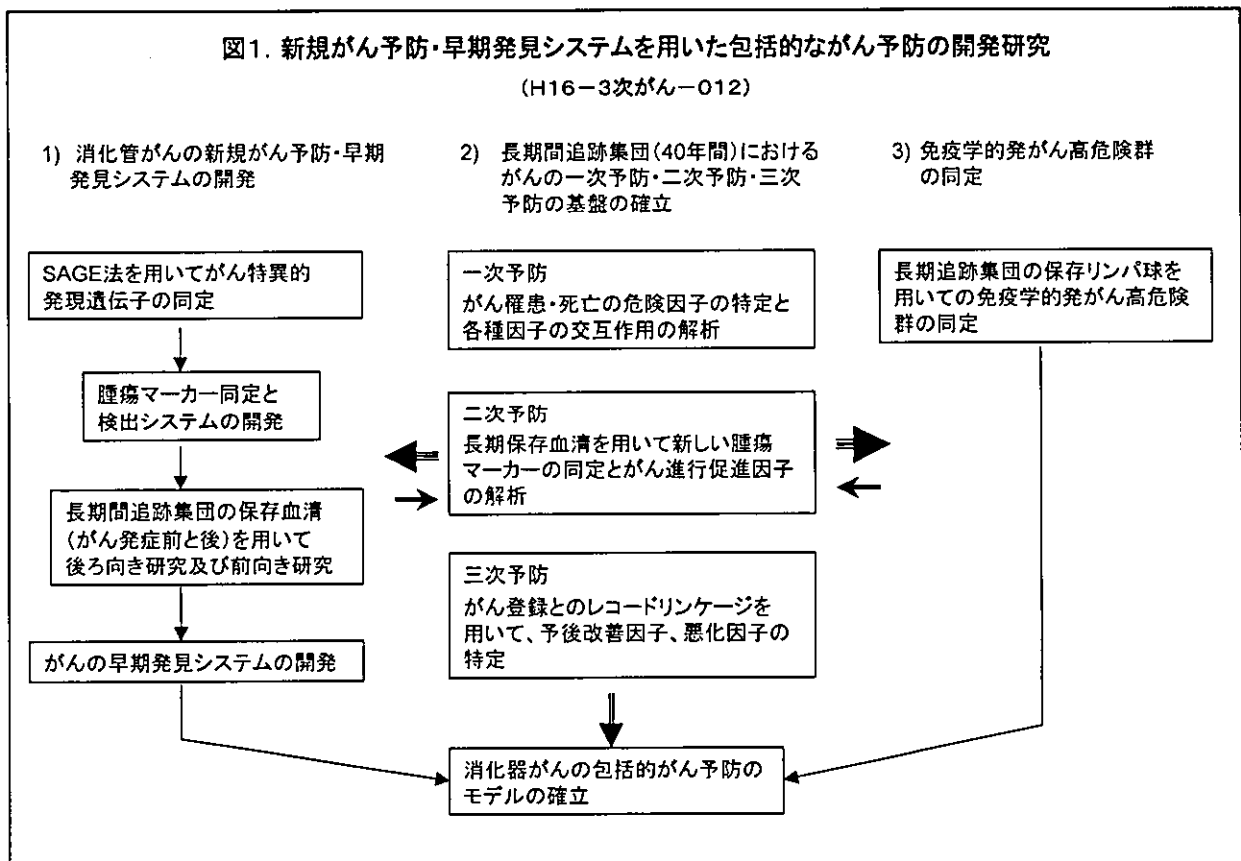
- ① 特許出願中 特願2004-363681「癌の新規診断法」（安井）
- ② HBV DNAの高感度定量系の開発（申請予定）（藤原）

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 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

がんに特異的に発現する新規遺伝子を同定する目的でわれわれが完成した世界最大の胃がん SAGE ライブラリー(GEO accession no. GSE545)と NCBI データベース中の主要な正常臓器のライブラリーを比較し、約 200 の候補遺伝子をリストアップした。これらについて、実際の 14 の正常臓器と胃がんにおける遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法により検討し、少なくとも 8 種類のがん特異的発現遺伝子を同定した。その内、MIA (melanoma inhibitory activity)は分泌蛋白であり、発現は悪性度・予後と相関し、ELISA によって進行胃がん患者血清中で検出されることを確認した。免疫染色でみた RegIV の発現は、胃がん、大腸がん、大腸カルチノイドに高頻度であることを確認し、ELISA 系を構築した。タイトジャンクションの構成蛋白の遺伝子 CLDN18 は 65%の胃がん組織で発現減弱していたが、この 5'UTR に G/A の SNP が存在することを新規に見出し、胃がんの発症リスクに影響を及ぼすことを見出した。

A. 研究目的

新規がん予防・早期発見法の開発のために、網羅的遺伝子発現解析法 SAGE (serial analysis of gene expression)によって食道・胃のがんおよび前がん性病変に特異的に発現する遺伝子を新規に同定する。それらがコードする蛋白に対する抗体あるいは aptamer を作成し、血中測定系を開発する。また、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) 新規がん特異的発現遺伝子の同定

胃がんおよび食道がんについて SAGE 法で網羅的遺伝子発現解析を行い、正常臓器・組織の遺伝子発現プロファイルと比較し、特異的発現態度を示す遺伝子を抽出する。これらについて、定量的 RT-PCR 法に

より多数症例における発現解析を行う。代表的なものについて、遺伝子の機能解析を行い、分泌蛋白あるいは膜蛋白を抽出する。
2) がん特異的遺伝子の発現解析と血清測定系の確立

がん特異的に発現し、かつ、分泌蛋白あるいは膜蛋白と確認されたものについては、リコンビナント蛋白を合成、特異抗体を作成する。これを用いて免疫組織化学的に発現解析を行うと共に、ELISA 系を構築し、非がんコントロールおよびがん患者血清ならびに腹水について、蛋白レベルを測定する。

3) がん特異的発現遺伝子の多型と発がんリスク

1) の検索で同定された新規がん特異的発現遺伝子の多型を探索し、症例・対照研究および症例・症例研究により、発がんリスクならびにがんの進展との関連を解析する。

(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している。

C. 研究結果

1) 新規がん特異的発現遺伝子の同定

進行度や組織型の異なる5種類の胃がん組織について、SAGE解析を行い、世界最大の胃がんSAGEライブラリー(GEO accession no. GSE545)を完成した。相互の発現プロファイルの比較および定量的RT-PCR法によって多くの胃がんを高頻度に過剰発現する遺伝子を同定し、CDH17をはじめいくつかはがんの悪性度と関連することを見出している。

がん化に関与し、かつ、がん特異的に発現し主要な正常臓器には発現のない遺伝子は、診断のみならず治療においても理想的な標的となり得る。そこで、本年度は、胃がんSAGEライブラリーとデータベース中の主要な12種類の正常臓器のライブラリーとを比較し約200種の候補遺伝子をリストアップした。

これらについて、9例の胃がんと実際の14種の正常臓器(心臓、肺、肝臓、脳など14臓器)における遺伝子発現を定量的RT-PCR法によって検討し、少なくとも8種類のがん特異的発現遺伝子を同定した。これらの内、機能が知られていないものについては、発現ベクターの調整などにより、機能解析を行っているが、そのいくつかはアポトーシスの抑制を介してがん化に関わる可能性を見出した。また、分泌蛋白あるいは膜蛋白をコードする可能性があり、文

献検索でがんに関係した論文のないものについては、リコンビナント蛋白を合成、モノクローナル抗体を作成することにより、組織診断系、血清診断系の構築を行っている。

2) MIA (melanoma inhibitory activity)の発現と血清値

1) において抽出したものの中には既知の遺伝子が含まれていたが、そのひとつはMIAであった。最初、メラノーマ細胞から分泌される蛋白として同定されたものである。MIAは細胞運動を亢進させ、アポトーシスを抑制する作用を持つことが知られている。定量的RT-PCRでみた胃がんにおけるMIAの過剰発現は、ステージI&IIに比較しステージIII&IVで有意に高頻度であった。免疫染色でも、陽性症例はステージI&IIに比較してステージIII&IVにおいて有意に多く、予後をステージIII&IV症例についてみた場合、MIA陽性例は有意に予後不良であった。さらに、ELISAにより血清中のMIAを測定したところ、ステージ4の症例において検出が可能であった。したがって、MIAはメラノーマのみならず、胃がんの悪性度マーカーとなることが明かとなった。

3) RegIVの発現と血清診断系の構築

昨年度、スキルス型胃がんと正常胃粘膜のSAGEライブラリーの比較から同定したRegIVが、分泌蛋白であること、アポトーシスを抑制すること、などを示した。本年度は、リコンビナントRegIVに対するポリクローナル抗体を作成し、種々のがんおよび非がん組織における発現を免疫組織化学的に検討した。RegIVの発現は、胃がんでは42/143例(29%)、大腸がんでは13/36

例 (36%)、大腸カルチノイドでは 14/15 例 (93%) に認められたが、肺がんおよび乳がんには発現は全く認められなかった。大腸がんにおいては、RegIV の発現とステージの進行との間に有意な相関が見出された。非がん組織では、胃の腸上皮化生および腸管の内分泌細胞に陽性であった。

一方、同抗体を用いた ELISA 系を構築した。RegIV 遺伝子導入胃がん細胞株の培養上清において RegIV 蛋白が定量的に測定できることを確認した。現在、非がんコントロールおよび胃がん患者血清ならびに腹水について、RegIV 蛋白レベルを検討中である。

4) Claudin-18 (CLDN18)の遺伝子多型と発がんリスク

個々の胃がんSAGEライブラリーとNCBIのSAGEmapデータベース中の正常胃粘膜のそれを比較し、胃がんにおいて発現が低下・消失している遺伝子をリストアップ、胃がんおよび大腸がん細胞株におけるRT-PCR法による発現解析から、多くのがん細胞株でCLDN18遺伝子が発現消失していることを見出した。さらに、定量的RT-PCR法にて65%の胃がん組織で発現減弱していることを確認した。CLDN18はタイトジャンクションの構成蛋白であることが知られている。われわれは転写抑制の解析過程で、CLDN18遺伝子の5'UTRにG/AのSNPが存在することを新規に見出した。そこで胃がん症例と健常対照症例におけるジェノタイプ解析を行ったところ、A/GおよびG/G型が胃がん症例で有意に高頻度であり (P=0.00005)、Odds ratio (OR) は5.17 (2.01-13.3)であった。

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、少なくとも8種のがん特異的発現遺伝子を新規に同定した。その内、MIAおよびRegIVは、1) 生存に重要な正常臓器には発現は殆どないこと、2) アポトーシスの抑制をはじめがん化の過程に関与する可能性のあること、3) 分泌蛋白をコードすること、などから新しいマーカー、治療標的と考えられた。さらに、ELISAによって多数の血清検体を検出することにより、臨床的意義を検証する予定である。一方、SAGE法で同定したがん発現が低下している遺伝子CLDN18には、遺伝子多型が存在し、胃がんの発生と深く関わっている可能性が示唆された。本年度に得られた成果は、新規のがんの発見、予防のシステムの標的を明らかにしたものである。尚、食道がんについてのSAGE法による遺伝子発現解析は次年度の課題であり、胃がんと同様に診断・予防に向けての研究を展開する計画である。

E. 結論

SAGE法により多くのがん特異的発現遺伝子を同定した。MIAおよびRegIVは新しい診断・治療の標的となり得る。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. Kondo T, Yasui W et al. Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma. *Cancer Res* 64:523-529, 2004
2. Nakayama H, Yasui W et al. Lack of vascular adventitial fibroblastic cells in tumor stroma of intestinal-type and

- solid-type gastric carcinomas. *J Clin Pathol* 57:183-185, 2004
3. 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* 64:2397-2405 2004
 4. Oshimo Y, Yasui W et al. Frequent epigenetic inactivation of RIZ1 by promoter hypermethylation in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 110:212-218, 2004
 5. Ito R, Yasui W et al. Expression of Cbl linking with the epidermal growth factor receptor system is associated with tumor progression and poor prognosis of human gastric carcinoma. *Virchow Arch* 444:324-331, 2004
 6. 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* 130:259-265, 2004
 7. Nakayama H, Yasui W et al. High molecular weight caldesmon positive stromal cells in the capsule of hepatocellular carcinomas. *J Clin Pathol* 57:776-777, 2004
 8. Nakayama H, Yasui W et al. Presence of vascular adventitial fibroblastic cells in diffuse-type gastric carcinomas. *J Clin Pathol* 57:970-972 2004
 9. Oshimo Y, Yasui W et al. Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 112:1003-1009, 2004
 10. Yasui W et al. Search for new biomarkers of gastric cancer through serial analysis of gene expression and its clinical implication (Review article). *Cancer Sci* 95:385-392, 2004
 11. Kondo T, Yasui W et al. Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Oncogene* 24:157-164, 2005
 12. Matsumura S, Yasui W et al. A single nucleotide polymorphism of the MMP9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 131:19-25, 2005
 13. Mitani Y, Yasui W et al. Histone H3 acetylation is associated with reduced p21^{WAF1/CIP1} expression in gastric carcinoma. *J Pathol* 205:65-73, 2005
 14. Ishikawa N, Yasui W et al. ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:8363-8370, 2004
 15. Kitadai Y, Yasui W et al. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer* (in press)
 16. Hamai Y, Yasui W et al. A single nucleotide polymorphism in the 5'untranslated region of EGF gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer. *Pathobiol* (in press)
2. 学会発表
 1. Matsumura 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
 2. 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

3. Yasui W et al. Identification of genes involved in invasion and metastasis of gastric cancer by serial analysis of gene expression. The 3rd International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, Symposium 3 "Invasion and Metastasis", Sapporo (Japan), August 19-20, 2004
4. Aung PP, Yasui W et al. Identification of genes potentially involved in gastric carcinogenesis through serial analysis of gene expression The 25th International Congress of the International Academy of Pathology, October 10-15, Brisbane (Australia), 2004
5. Yasui W et al. Identification of Novel Genes of Gastric Cancer through Serial Analysis of Gene Expression . The 10th US Japan Clinical Trial Summit Meeting "NEW Era of Gastric and Colorectal Cancer Treatment", Invited speaker, Maui, Hawaii (USA), February 10-13, 2005
6. 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
7. 安井 弥, 他. 胃がん関連遺伝子の分子病理学的探索研究と臨床応用. 第1回日本病理学会カンファレンス「がんの発生と病態をめぐるトピックス」, レクチャー, 7月30-31日, 広島, 2004
8. 大上直秀, 安井 弥, 他. ゲノム情報の臨床応用: SAGE法を用いた胃癌の網羅的遺伝子発現解析. 第15回日本消化器癌発生学会, シンポジウム1, 8月19-20日, 札幌, 2004
9. 安井 弥, 他. 胃癌の分子生物学的解析とその臨床的意義: 胃癌特異的遺伝子の探索とその病理診断への応用. 第63回日本癌学会総会, シンポジウムS44, 9月29日-10月1日, 福岡, 2004
10. 安井 弥, 他. 診断病理学の将来- 形

態診断と分子診断の統合: 上皮性腫瘍の遺伝子診断- 形態診断との関連を中心に-. 第50回日本病理学会秋期特別総会, シンポジウム, 12月2-3日, 名古屋, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特許出願中 特願2004-363681「癌の新規診断法」
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 笠置 文善 （財）放射線影響研究所 疫学部副部長
児玉 和紀 （財）放射線影響研究所 主席研究員/疫学部長

放射線影響研究所が長期にわたって追跡調査を行っている原爆被爆者（寿命調査）集団を対象として、がん一次予防の観点から生活習慣に関連する、食道がんおよび胃がんのリスク要因と予防要因に関する解析を行い、頻回な果物・野菜摂取は予防要因であり、喫煙がリスク要因であることが示唆された。そこで本年度では、食道がんや胃がんに対する果物や野菜摂取による抑制効果、喫煙の促進効果の時間的推移について検討した。

追跡開始時に把握された毎日の果物摂取は、追跡経過後5年以上、あるいは、10年以上先の食道がん死亡リスクの有意な低下をもたらし、この現象は、野菜摂取の胃がん死亡リスクに対する経年推移においても観察された。果物や野菜の摂取は、がんリスクに対する即効性の抑制要因ではなく、長期的時間経過を経た上での抑制要因となっている。

喫煙は、追跡後いずれの経過年数においても、がんリスクへの促進効果が認められた。禁煙者のリスクは、禁煙せざるを得なかった者が混在する初期の5年以内では高いが、5年以後、あるいは10年先になると、非喫煙者のリスクと有意差はない。これは、食道がん、胃がんリスクにおいて共に認められ、禁煙は5年あるいは10年の年限を経て、非喫煙者と同等になることが示唆された。

これらの結果は、がんの一次予防法を確立する上で、抑制因子あるいは促進因子が持っているがんリスクへの時間的推移を考慮することの重要性を示唆している。

A. 研究目的

がん予防には一次予防、二次予防、三次予防を包括した枠組みで、科学的根拠に基づいた予防法を開発する必要があり、それ故に、本研究班では、これら三つの立場を包括的にまた同時に研究開発するというユニークな研究体制をとっている。本分担研究は、がん一次予防の観点から、放射線影響研究所（放影研）が長期にわたって追跡調査を行っている原爆被爆者（寿命調査）集団を対象として、生活習慣に関連する、食道がんおよび胃がんの促進要因と予防要因の抽出を目的として

いる。

昨年度におけるがん一次予防の本分担研究から、果物や野菜の頻回な摂取は食道がんや胃がんに対して抑制的に働く予防要因であり、また、喫煙は食道がんおよび胃がんのリスクを高める促進要因であることが示唆された。

そこで、本年度は、これら要因のがん抑制効果あるいは促進効果の経時的な影響の推移について検討した。これは、抽出された要因が短期的な影響をもつ促進あるいは予防要因なのか、あるいは長期的にも影響をもち