

厚生労働科学研究研究費補助金  
第3次対がん総合戦略研究事業

放射線障害に基づく発がんの分子機構の解明とその予防・  
治療への応用

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安井 弥  
平成18年(2006年)年4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
放射線障害に基づく発がんの分子機構の解明とその予防・治療への応用	
安井 弥 -----	1
II. 分担研究報告	
1. 遺伝子発現解析による放射線関連固形がんの特異的な遺伝子の同定	
安井 弥 -----	13
2. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析	
西 信雄 -----	19
3. 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	
中地 敬 -----	23
4. 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	
江口英孝 -----	28
5. 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	
楠 洋一郎 -----	32
6. 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	
神谷研二 -----	36
7. 放射線による染色体不安定化の分子機構	
宮川 清 -----	44
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	48
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	52

放射線障害に基づく発がんの分子機構の解明とその予防・治療への応用

主任研究者 安井 弥 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨 SAGEで抽出した特異的発現遺伝子に加えて、DNA障害・修復関連遺伝子を含むオリゴDNAカスタムアレイを作成し、被爆者胃がん（放射線影響研究所の寿命調査集団 Life Span Study LSS A群：>0 dose）4例と対照胃がん19例の新鮮凍結組織について遺伝子発現解析を行ったところ、LSS A群と対照群で有意に発現レベルの異なる10遺伝子が抽出された。甲状腺乳頭がんの*BRAF*<sup>V600E</sup>変異を被爆者と対照群で比較し、高線量被曝あるいは被爆後の潜伏期間が短い成人例では非被曝例とは発がん初期の事象が異なることを示唆する結果が得られた。胃がんについての疫学的分析では、放射線被曝が年齢、性別、喫煙習慣などとは独立したリスク因子で量反応関係を示すことが明らかとなった。埼玉コーホート研究でがんとの関係が示されたNK活性の主な遺伝的要因である活性型受容体NKG2Dのハプロタイプの発がんリスクを評価したところ、NK活性は遺伝的要因と環境要因の両者の影響を受けるが、環境因子がNK活性に与える影響の程度は個人個人のNKG2Dハプロタイプによって異なることが明かとなった。放射線被曝後の体細胞遺伝子変異性の個人差と遺伝的背景の関係を明らかにするために、ATM遺伝子多型を解析し、ハプロタイプ別に赤血球glycophorin A突然変異体頻度GPAMfの線量効果を解析したが、有意な差はなかった。放射線被曝によるゲノム障害の修復からみた発がん機構の解明については、損傷乗り越えDNA合成蛋白REV1がssDNA結合活性を有し、ssDNAに結合したREV1はそのssDNA上にあるプライマー末端だけに特異的にターゲティングされることが明かとなった。また、相同組換え修復における中間体解消に働くMus81-Eme1複合体を欠損した細胞においては、染色体倍加が認められるとともに、S期およびG2期のチェックポイントの活性化が観察された。持続的なDNA損傷に応答したS期からG2期における細胞周期調節機構の作動が染色体数異常の原因となることを示唆するものである。

分担研究者

西 信雄

（財）放射線影響研究所

室長

中地 敬

（財）放射線影響研究所

部長

江口 英孝

（財）放射線影響研究所

研究員

楠 洋一郎

（財）放射線影響研究所

室長

神谷 研二

広島大学原爆放射線医科学研究所

教授

宮川 清

東京大学大学院

教授

A. 研究目的

放射線による発がん機構の解明とそれに

基づく治療法の開発やリスク評価は、被爆者医療の向上のみならず、職業被曝における健康管理や医療被曝での患者の防護の観点からも極めて重要である。本研究は、分子病理学的、分子疫学的、分子生物学的アプローチによる以下の3つの柱から構成されている。1) 遺伝子解析による放射線関連固形がんの特異的な遺伝子の同定、2) 放射線被曝による固形がん発生と遺伝的発がん感受性との関連、3) 放射線被曝によるゲノム障害の修復からみた発がん機構の解明。これらを通じて、放射線障害に基づく発がんの分子機構を解明し、それを予防・治療に応用することを目的とする。

## B. 研究方法

### 1) 遺伝子発現・変異解析による放射線関連固形がん特異的遺伝子の同定

#### 1. 遺伝子発現解析による放射線関連固形がんの特異的な遺伝子の同定 (安井)

胃がんにおける SAGE (serial analysis of gene expression) 解析で抽出した特異的発現遺伝子に加えて、DNA 障害・修復関連遺伝子を含むオリゴ DNA カスタムアレイを準備した。被爆者 (放射線影響研究所の寿命調査集団 Life Span Study LSSA 群: >0 dose) および対照者の胃がん新鮮凍結試料から RNA を抽出し遺伝子発現解析を行い、両群間の発現プロファイルの比較から、被爆者群に特異的に発現する遺伝子を抽出した。また、DNA 傷害レスポンス・DNA 修復関連遺伝子の被爆者固形がんにおける発現解析として、REV1 蛋白および  $\gamma$ H2AX (リン酸化型) の発現を被爆者 (LSSA 群) および対照者の胃がんパラフィン切片について免疫染色にて検討した。

#### 2. 遺伝子変異解析による放射線関連固形がん特異的遺伝子の同定 (江口)

*RET/PTC* 遺伝子再配列、*BRAF* 遺伝子変異等による MAP キナーゼ系の活性化は、甲状腺乳頭がん発生初期の重要な事象と考えられている。そこで広島原爆被爆者に発生した成人甲状腺乳頭がん 64 症例のパラフィン包埋組織から DNA を抽出し、RFLP

法および直接シーケンスによって

*BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を調べ、この変異と臨床病理学的・疫学的因子との関連について検討した。

### 2) 放射線被曝による固形がん発生と遺伝的発がん感受性との関連

#### 1. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析 (西)

放射線影響研究所の寿命調査集団の男性 45,880 人を対象とし、1958 年から 1998 年に発生した乳がん症例について分析した。線量体系は DS02 (Dosimetry System 2002) を用いた。また、原爆被爆者における生活習慣、被曝と胃がんの発生について解析した。線量体系は DS86 (Dosimetry System 1986) を用いた。さらに寿命調査集団の 112,305 人を対象とし、1958 年から 1987 年までの期間に発生した皮膚がん症例について組織学的特徴との関連を解析した。線量体系は DS86 を用いた。

#### 2. 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 (中地)

免疫関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ために、埼玉コーホート研究でがんとの関係が示された NK 活性の主な遺伝的要因が、活性型受容体 NKG2D の遺伝子領域のハプロタイプであることを明らかにし、コーホート内症例対照研究により NKG2D ハプロタイプの発がんリスクを評価した。さらに、遺伝的要因別の NK 活性への環境因子の影響を検討した。

#### 2. 固形がん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 (楠)

放射線被曝後の体細胞遺伝子変異性の個人差と遺伝的背景の関係を明らかにするために、放射線による DNA の二重鎖切断修復に中心的な役割を果たすと考えられる ATM 遺伝子の多型について解析し、被爆者の赤血球 glycophorin A 突

然変異体頻度 (GPAMf) との関係調べた。NCBIのデータベースより検索したATM遺伝子のSNPを検討し、ハプロタイプブロックは linkage disequilibrium coefficients に基づいて決定した。また、培養T細胞を用いた試験管内放射線感受性を $\gamma$ H2AXの細胞内残留を指標としてフローサイトメトリーにて評価する方法を検討した。培養Tリンパ球に種々の線量のX線を照射した後、さらに培養して経時的に $\gamma$ H2AXの発現量をFACSscanで測定した。

### 3) 放射線被曝によるゲノム障害の修復からみた発がん機構の解明

#### 1. 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 (神谷)

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。大腸菌で各遺伝子を過剰発現させ粗抽出液をニッケル親和性カラムクロマトグラフィー、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. 放射線による染色体不安定化の分子機構 (宮川)

Endonuclease 活性を有する Mus81-Eme1 複合体は異常複製フォークのみならず相同組換え修復における組換え中間体の解消に重要な役割を果たすことが知られており、複製期における染色体安定化に関与すると考えられる。そこで放射線被曝によるS期の染色体安定化機構を解明するために、これら遺伝子をジーン・ターゲティング法で欠損させた大腸がん由来HCT116細胞において、FACSにより細胞周期を解析し、種々のチェックポイント関連分子の活性化、染色体の数的異常を指標とした染色体不

安定性を検討した。

#### (倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」、「組換えDNA実験指針」に該当する研究はそれに従い、各研究機関の倫理委員会の承認の下に実施した。上記に加えて、放射線影響研究所における被曝者に関する研究では、同研究所の「人権擁護委員会」他、当該委員会の承認の下に実施した。

### C. 研究結果

#### 1) 遺伝子発現・変異解析による放射線関連固形がん特異的遺伝子の同定

##### 1. 遺伝子発現解析による放射線関連固形がんの特異的な遺伝子の同定 (安井)

SAGE解析で抽出した特異的発現遺伝子、DNA障害・修復関連遺伝子を含むオリゴDNAカスタムアレイを用い、被曝者胃がん (LSS A群) 4例と対照胃がん19例の新鮮凍結組織について遺伝子発現解析を行ったところ、LSS A群と対照群で有意に発現レベルの異なる10遺伝子が抽出された。これらには、SAGEで抽出した遺伝子2個とDNA障害・修復に関連する遺伝子1個が含まれていた。放射線関連がんのマーカー遺伝子となる可能性がある。REV1蛋白の免疫染色では、LSS A群、対照群で、それぞれ40.0% (8/20)、31.6% (12/38) において発現低下が認められ両者間には明らかな差はなかった。DNA二本鎖切断部位に集積することが知られている $\gamma$ H2AXは、LSS A群の非がん部胃粘膜において対照群と比較して高頻度に発現していた。尚、被曝者に新規に発生する固形がんの新鮮組織は、これまでに食道がん、胃がん、大腸がん、肺がん、乳がん、を合わせて483症例を収集し、LSS A群は21例含まれていた。

##### 2. 遺伝子変異解析による放射線関連固形がん特異的遺伝子の同定 (江口)

*BRAF*<sup>V600E</sup>変異を持つ乳頭がんの被曝線量の中央値は変異を持たないものに比べ有意に低かった (18.5 vs. 156.9 mGy、

$P=0.022$ )。また、被爆から発症までの潜伏期間の中央値にも有意な差が認められた(29 vs 21年、 $P=0.014$ )。これらの結果は、因子間の相互作用を考慮に入れ、*BRAF*<sup>V600E</sup>変異の有無を目的変数とするロジスティック回帰分析によって確認された。対数変換した被曝線量および潜伏期間はそれぞれ独立に*BRAF*<sup>V600E</sup>変異の有無と関連していた( $P=0.028$ および $P=0.010$ )。

## 2)放射線被曝による固形がん発生と遺伝的発がん感受性との関連

### 1.放射線被曝による固形がんの疫学的解析(西)

男性乳がん症例の検討により、男性乳がん発生と放射線被曝の間に有意な関連が認められ、1Sv被曝当たりの過剰相対リスクは8であった。胃がん発生率については、喫煙やその他の因子を調整しても放射線の影響は変化しなかった。放射線被曝が年齢、性別、喫煙習慣などは独立したリスク因子で量反応関係を示すことが明らかとなった。病理調査に基づいた皮膚がんの解析により、基底細胞がんにおいては紫外線曝露部分と非曝露部分からの発生に放射線影響に差を認めず、放射線と紫外線との間には相加作用の存在が示唆された。

### 2.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(中地)

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8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(NKG2Dhb-1、NKG2Dhb-2)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レル(*HNK1*、*LNK1*および*HNK2*、*LNK2*)を見いだした( $P<0.0001$ )。全がんリスクの検討では、低NK活性に関連した*LNK1*のホモ接合*LNK1/LNK1*を持つ人に比べて、高NK活性に関連した*HNK1/HNK1*を持つ人のオッズ比は0.47(95%CI、0.233-0.952)であった。さらに、

喫煙、飲酒、食事等の環境因子がNK活性に与える影響の程度は個人個人のNKG2Dハプロタイプによって異なることを示唆する結果を得た。

### 2.固形がん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(楠)

ATM遺伝子の7箇所のSNPから2つのハプロタイプ、AGCGAAG(ATM-h1)とGATAGGA(ATM-h2)を同定、そのアレル頻度は、それぞれ0.502および0.455であった。ハプロタイプ別にGPAMfの線量効果関係を調べたが、GPAMfの線量効果曲線の傾きにハプロタイプ間の有意な差はみられなかった。一方、培養T細胞を用いた試験管内放射線感受性の $\gamma$ H2AXの細胞内残留を指標とするフローサイトメトリーによる予備的検討では、線量効果に1.5倍程度の明らかな個体差が良好な再現性で確認された。放射線感受性の個人差を評価するのに有用であると考えられる。

### 3)放射線被曝によるゲノム障害の修復からみた発がん機構の解明

#### 1.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(神谷)

REV1タンパク質はssDNA結合活性を有し、ssDNAに結合したREV1はそのssDNA上にあるプライマー末端だけに特異的にターゲティングされることが明らかとなった。この過程でREV1タンパク質はssDNA上をスライディングしていると考えられた。この性質は他のDNAポリメラーゼには観察されず、一部欠失型のREV1では消失することから、REV1に特異的に備わっている性質と見なされた。この結果は、REV1の最初のターゲットがプライマー末端というよりはssDNAであることを示唆するものである。

#### 2.放射線による染色体不安定化の分子機構(宮川)

Mus81欠損細胞では、ATM-Chk1/Chk2-

Cdc25A-Cdkを介するS期チェックポイントに加えて、ATM-Chk1-Cdc25C-CdkによるG2期のチェックポイントも活性化することが明らかとなった。さらに、これらの欠損細胞において増加している染色体倍加の原因となるDNA再複製は、チェックポイントの活性化によって低下したCdk1活性を強制的に元に戻すことによって減少した。このS期からG2期におけるチェックポイントの活性化は、Mus81のホモ接合性変異細胞、ヘテロ接合性細胞、Eme1のヘテロ接合性変異細胞においても同様に認められた。持続的なDNA損傷に応答したS期からG2期における細胞周期調節機構の作動は染色体数異常の原因となることが示唆された。

#### D. 考察

体系的遺伝子発現解析から放射線発がんに関連する特異的遺伝子を同定することは、放射線関連がんの診断標的になるのみならず、その機能を明らかにすることによって治療法・予防法の開発に繋がる。カスタムアレイを用いた遺伝子発現解析において、被爆者胃がんにて特異的な発現態度を示す10遺伝子が同定された。被爆者に発生した新鮮凍結試料が収集されたことによって漸くなされた世界ではじめての被爆者胃がんにおける体系的遺伝子発現解析データである。これら10遺伝子は放射線発がんに関与する可能性とともに、放射線関連がんを同定するマーカー遺伝子の候補と考えられる。放射線関連固形がん発生の過剰リスクは臓器がんによって異なることが知られており、上記のストラテジーで他の臓器がんを解析する必要がある。また、DNA障害・修復関連遺伝子以外のものについては、機能解析によって放射線障害、反応との因果関係を明らかにしなければならない。成人甲状腺乳頭がんの*BRAF*<sup>V600E</sup>突然変異解析からは、被爆者と対照群で発がん初期の事象が異なることを示唆されたが、MAPキナーゼ系の恒常的な活性化につながる*RET/PTC*遺伝子再配列などの他の遺伝子異常についても検討する必要がある。

免疫監視は、多段階発がんにおける最後の防御機構である。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。本年度の研究において、NK活性が低いパプロタイプ*LNK1/LNK1*を持つ人は一般集団の32%を占め、発がんのリスクも全がんで約2倍高いことになり、発がん全体への大きな寄与危険を示した。これらは、免疫学的がん予防につながるものである。また、免疫学的発がん高危険群に対する放射線の影響を放射線影響研究所の免疫コホート研究で検討することは今後の重要な課題である。また、GPA Mfの検討から、放射線被曝に起因する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がんの発生するリスクが高いことが示唆されている。今回の検討では、修復関連遺伝子の中で中軸的役割を果たすと考えられているATM遺伝子のハプロタイプの違いはGPAMfの線量効果とは有意な関係を示さず、原爆被爆者の放射線誘発GPAMfの個人差にATM遺伝子の多型が関係する可能性は低いと考えられた。この個人差の遺伝的背景を明らかにするためには、ATM以外のDNA二重鎖切断修復関連遺伝子の多型とGPAMfとの関連解析を行う必要がある。放射線影響研究所の寿命調査集団は、放射線被曝により誘発される発がん研究の貴重なモデルである。今後も放射線発がんのメカニズム解明において有用な疫学・分子疫学情報が得られるものと期待される。

「損傷乗り越えDNA合成」とがん化との関係が注目されている。放射線被曝によるゲノム障害の修復からみた発がん機構の解明についての研究は、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明らかにするものである。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。一方、「損傷乗り越

えDNA合成」におけるREV1タンパク質のdCMP転移活性以外の役割が注目されており、本研究において、REV1がssDNA結合活性をもち、ssDNAに結合したREV1はそのssDNA上にあるプライマー末端だけに特異的にターゲティングされることがわかった。今後、REV1を含む「誤りがちなDNA合成」機構の解明を進めることにより、放射線発がんにおける役割が明らかとなることが期待される。また、Mus81-Eme1欠損細胞における機能解析によって、これらの分子の機能低下は正常のS期およびG2期の複数のチェックポイントを活性化して細胞周期を制御することが明らかとなった。その結果、Cdkの活性低下が誘導されるが、その一つの表現型として染色体数異常が存在する。それだけでは発がんに至らないが、疾患発症の基盤としての染色体不安定性を誘導するために、一生涯における健康影響を評価する上では被ばく情報と染色体の情報は重要である。がん発症に関して、別のどのようなイベントが必要であるかを解明することは今後の課題である。

#### E. 結論

放射線障害に基づく発がんの分子機構を解明し、それを予防・治療に応用することを目的として、遺伝子発現・変異解析による放射線関連固形がんの特異的な遺伝子の同定、放射線被曝による固形がん発生と遺伝的発がん感受性との関連、放射線被曝によるゲノム障害の修復からみた発がん機構の解明、に関する研究から多くの成果を得た。さらに研究を推進することにより、放射線発がん機構の解明が進み、医療放射線や職業的放射線の曝露などにおける個々の発がんリスクの評価及び予防対策の効果的な取り組みが可能となるに違いない。

#### F. 健康危険情報

低線量の放射線でもDNA損傷によって細胞周期の遅延をおこすために染色体の数的異常は誘発される可能性があるが、これのみでは発がんには至らない。

#### G. 研究発表

- 論文発表
- 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
- 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
- Mitani Y, Yasui W, et al. Histone H3 acetylation is associated with reduced p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in gastric carcinoma. *J Pathol* 205: 65-73, 2005
- Kitadai Y, Yasui W, et al. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer* 115: 388-392, 2005
- 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* 72: 133-138, 2005
- Ito R, Yasui W, et al. Clinicopathological significance and prognostic influence of cadherin-17 expression in gastric cancer. *Virchow Arch* 447: 717-722, 2005
- Motoshita J, Yasui W, et al. DNA methylation profile in differentiated type gastric carcinoma with distinct mucin phenotypes. *Cancer Sci* 96: 474-479, 2005
- Oue N, Yasui W, et al. Expression and localization of RegIV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: RegIV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma.



- J Pathol 207: 185-198, 2005
9. Shutoh M, Yasui W, et al. DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric cancer: expression of retinoic acid receptor  $\beta$ , cellular retinol binding protein 1 and tazarotene-induced gene 1 is associated with DNA methylation. *Cancer* 104: 1609-1619, 2005
  10. Tahara E Jr, Yasui W, et al. 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 Immunol Immunother* 54: 729-740, 2005
  11. Mizuiri H, Yasui W, et al. DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in squamous cell carcinoma of the sophagus: DNA methylation of RBP1 and TIG1 is associated with tumor stage. *Cancer Sci* 96: 571-577, 2005
  12. Kose K, Yasui W, et al. Somatic mutations of mitochondrial DNA in digestive tract cancers. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 1679-1684, 2005
  13. Oue N, Yasui W, et al. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer* 106: 1250-1259, 2006
  14. Sanada Y, Yasui W, et al. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in intestinal phenotype of gastric cancer. *J Pathol* 208: 633-642, 2006
  15. Kobayashi T, Yasui W, et al. Glycogen synthase kinase-3 and H-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions. *Mol Cell Biol* 26: 898-911, 2006
  16. Aung PP, Yasui W, et al. Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. *Virchow Archiv* (in press, 2006)
  17. Aung PP, Yasui W, et al. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene* (in press, 2006)
  18. Motoshita J, Yasui W, et al. Molecular characteristics of differentiated type gastric carcinoma with distinct mucin phenotype: LI-cadherin is associated with intestinal. phenotype. *Pathol Int* (in press, 2006)
  19. Ogawa T, Nakachi K, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid enhances gap junctional intercellular communication *via* acetylation of histone containing connexin 43 gene locus. *Cancer Res* 65: 9771-9778, 2005
  20. Packeisen J, Nakachi K, et al. Cytogenetic differences in breast cancer samples between German and Japanese patients. *J Clin Pathol* 58: 1101-110, 2005
  21. Ito Y, Nakachi K, et al. JACC Study Group: Stability of frozen serum levels of insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, insulin-like growth factor binding protein-3, transforming growth factor beta, soluble Fas, and superoxide dismutase activity for the JACC study. *J Epidemiol* 15: S67-73, 2005
  22. Sueoka E, Nakachi K, et al. Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time Polymerase Chain Reaction. *Lung Cancer* 48: 77-83, 2005
  23. Yamamoto H, Nakachi K et al. Single nucleotide polymorphisms in the EXO1 gene and risk of colorectal cancer in a Japanese population. *Carcinogenesis* 26: 411-416, 2005
  24. Yuasa Y, Nakachi K, et al. Relationship between CDX2 gene methylation and

- dietary factors in gastric cancer patients. *Carcinogenesis* 26: 193-200, 2005
25. Hayashi T, Nakachi K, et al. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res* 66: 563-570, 2006
  26. Hayashi T, Nakachi K, et al. Perspectives on cancer immuno-epidemiology *Cancer Sci* 66: 563-570, 2006
  27. Sugiyama H, Nishi N, et al. Current situation and challenge for cancer registries in Hiroshima City and Hiroshima Prefecture. *JACR Monograph*. (in press, 2006)
  28. Hamajima N, Eguchi H, et al. Minimal sizes of cases with a susceptible genotype and minimal odds ratios among susceptible individuals in case-control studies A single nucleotide. *Asian Pac J Cancer Prev* 6: 165-169, 2005
  29. Hayashi T, Kusunoki Y et al. Long-term effects of radiation dose on inflammatory markers in atomic bomb survivors *Am J Med* 118: 83-86, 2005
  30. Kyoizumi S, Kusunoki Y, et al. Individual variation of somatic gene mutability in relation to cancer susceptibility: Prospective study on erythrocyte glycophorin A gene mutations of atomic bomb survivors. *Cancer Res* 65: 5462-5469, 2005
  31. Kubo Y, Kusunoki Y, et al. A preliminary study measuring the number of T-cell receptor-rearrangement excision circles (TRECs) in peripheral blood T-cell populations of A-bomb survivors and control populations. *Cytometry Res* (in press, 2006)
  32. Kashiwabara S, Kamiya K, et al. 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* 24: 305-312, 2005
  33. Kubo N, Kamiya K, et al. Protective Effects of a Water-soluble Extract from Cultured Medium of *Ganoderma Lucidum* (Rei-shi) 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* 15: 401-406, 2005
  34. Adachi N, Miyagawa K, et al. The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. *DNA Cell Biol* (in press, 2006)
  35. Nobukuni Y, Miyagawa K, et al. Gene trap mutagenesis-based forward genetic approach reveals that the tumor suppressor *OVCA1* is a component of the biosynthetic pathway of diphthamide on elongation factor 2. *J Biol Chem* 280: 10572-10577, 2005
  36. Hamatani K, Eguchi H, et al. Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J Histochem Cytochem* (in press, 2006)
2. 学会発表
1. Aung PP, Yasui W, et al. Screening of cancer specific gene and identification of MIA as a cancer specific gene and prognostic indicator in gastric cancer. The 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, California (USA), April 16-20, 2005
  2. Aung PP, Yasui W, et al. Identification of MIA as a cancer specific gene and prognostic indicator in gastric cancer. The 6<sup>th</sup> International Gastric Cancer

- Congress, Yokohama (Japan), May 4-7, 2005
3. Sanada Y, Yasui W, et al. Down-regulation of claudin-18 and its prognostic impact in gastric cancer. The 15th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar " Current Progress of Cancer Chemotherapy", Hiroshima (Japan), October 30, 2005
  4. Oue N, Yasui W, et al. MAGE gene expression is correlated with resistance to taxan in gastric cancer. The 15th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar " Current Progress of Cancer Chemotherapy", Hiroshima (Japan), October 30, 2005
  5. Nakachi K. Immunity and cancer development: a crossroad of epidemiology, genome science and cancer prevention. 2005 Korean Society of Epidemiology. pp7-13, 2005
  6. Nakachi K. Immnogenome study on host defense against cancer development: Genetic factors involved in natural cytotoxic activity. The 7<sup>th</sup> Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research. pp49, 2005
  7. Nakachi K. Molecular epidemiology on immune defense against cancer. The Thirty-sixth International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund. pp26-27, 2005
  8. Nishi N, et al. Relationship between site-specific cancer mortality and survival and socioeconomic status. XVIIth International Epidemiological Association (IEA) World Congress of Epidemiology, Bangkok (Thailand), August 21-25, 2005
  9. Nishi N, et al. Relationship between site-specific cancer incidence and socioeconomic status in the Life Span Study. Fourth Regional Asian Pacific Organization for Cancer Prevention Conference, Nagoya (Japan), January 20-21, 2006
  10. Eguchi H, Nakachi K, Yasui W, et al. Molecular analysis on colorectal cancer in atomic bomb survivors. The workshop on US-Japan cooperative cancer research program. Molecular epidemiological characteristics of lung and colon cancer development among atomic bomb survivors, Washington (USA), February, 2006
  11. Hamatani K, Eguchi H, Nakachi K, et al. Radiation-associated thyroid carcinogenesis in atomic bomb survivors. The workshop on US-Japan cooperative cancer research program. Molecular epideiological characteristics of lung and colon cancer development among atomic bomb survivors, Washington (USA) , February, 2006
  12. Taga M, Eguchi H, Nakachi K, Yasui W, et al. *p53*, *EGFR* and *K-ras* mutations in lung cancer among atomic bomb survivors. The workshop on U.S.-Japan cooperative cancer research program. Molecular Epidemiological characteristics of lung and colon cancer development among atomic bomb survivors, Washington (USA), February, 2006
  13. Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Radiation exposure affects immunogenetical risk of stomach cancer among atomic bomb survivors. The 96th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Anaheim, California (USA), April 16-20, 2005
  14. Hamasaki K, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Evaluation of human radiation sensitivity using flow cytometry of phosphorylated histone H2AX in cultured T lymphocytes. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, California (USA), September 3-8, 2005

15. Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Prospective study on the relationship between erythrocyte glycoprotein a gene mutations and cancer development among atomic-bomb survivors. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco, California (USA), September 3-8, 2005
16. Kusunoki Y, Nakachi K, et al. T-cell homeostasis and inflammatory response among atomic-bomb survivors. International Symposium on Low-Dose Radiation Exposures and Bio-Defense System, Aomori (Japan), September 28-30, 2005
17. Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Risk of radiation-related stomach cancer differs among atomic-bomb survivors due to different HLA class I genotypes. The 14th International HLA and Immunogenetics Workshop, Melbourne (Australia), November 29-December 3, 2005
18. Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Effects of atomic-bomb radiation on human immunological response. Long-term elevation of inflammatory markers. The International Cytokine Society Conference 2005, Seoul (Korea), October 27-31, 2005
19. Hamasaki K, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Individual variation in the levels of phosphorylated histone H2AX in cultured T-lymphocytes following in vitro X-irradiation. The 22nd Radiation Biology Center International Symposium, Kyoto (Japan), November 21-22, 2005
20. 安井 弥, 他. 分子病理診断：ゲノム・形態・臨床の架け橋：ゲノム医療時代において分子病理診断が果たす役割. 第94回日本病理学会総会，シンポジウム，4月14-16日，横浜，2005
21. 大上直秀，安井 弥，他. 新規転移遺伝子：ヒト悪性腫瘍におけるRegIVの発現プロファイル—RegIVは大腸癌の転移，ステージと関連している—。第14回日本がん転移学会総会，ワークショップ6，6月2-3日，大阪，2005
22. Aung PP, 安井 弥，他. マイクロアレイ・遺伝子診断：MIAは胃癌の新規予後因子である。第14回日本がん転移学会総会，ワークショップ3，6月2-3日，大阪，2005
23. 三谷佳嗣，安井 弥，他. 薬剤感受性（3）：胃癌におけるRegIVの発現と5FU耐性との関連。第64回日本癌学会総会，ワークショップW17-3，9月14-16日，札幌，2005
24. 真田雄市，安井 弥，他. 発がん感受性関連遺伝子(SNPs)：胃癌におけるclaudin-18の発現低下およびプロモーター領域における新規SNPの同定。第64回日本癌学会総会，ワークショップW7-5，9月14-16日，札幌，2005
25. Aung PP, 安井 弥，他. 発現プロファイルによるがん診断：SAGEデータに基づく癌（胃癌）特異的遺伝子の網羅的解析。第64回日本癌学会総会，ワークショップW15-3，9月14-16日，札幌，2005
26. 大上直秀，安井 弥，他. 消化器癌の発生—病理，分子生物，遺伝子の知見を臨床へ：RegIVは胃癌，大腸癌の新規血清腫瘍マーカーである。第16回日本消化器癌発生学会，シンポジウム1，10月13-14日，鹿児島，2005
27. 真田雄市，安井 弥，他. 消化器癌の転移形成—病理，分子生物，遺伝子の異常と臨床応用—：Claudin-18は胃癌の新規予後因子である。第16回日本消化器癌発生学会，シンポジウム2，10月13-14日，鹿児島，2005
28. 西 信雄，他. 部位別にみたがんの死亡率・生存率と社会経済状態の関連。第28回日本がん疫学研究会，岐阜，7月14-15日，2005
29. 西 信雄，他. 組織登録からみた広島県における前立腺腫瘍登録数の推移。地

- 域がん登録全国協議会第14回総会研究会, 東京, 9月2-3日, 2005
30. 西 信雄, 他. がん罹患者の予後と診断前の喫煙習慣の関連. 第64回日本癌学会学術総会, 札幌, 9月14-16日, 2005
  31. 高橋恵子, 江口英孝, 他. 放射線関連甲状腺乳頭がんの分子疫学的特徴. 第6回日本がん分子疫学研究会学術集会, 名古屋, 5月21日, 2005
  32. 江口英孝, 他. 原爆被爆者に発生した肺がん・大腸がんの分子疫学的解析. 第64回日本癌学会総会, 札幌, 9月14-16日, 2005
  33. 濱谷清裕, 江口英孝, 他. 放射線関連がんとしての甲状腺乳頭がんの分子疫学的特徴. 64回日本癌学会総会, 札幌, 9月14-16日, 2005
  34. 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. がんに対する免疫防御の分子疫学. 第36回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム, 11月15-17日, 東京, 2005
  35. 楠 洋一郎, 他. 原爆被爆者末梢血 T 細胞集団の T-cell receptor-rearrangement excision circles (TREC) の測定. 第15回日本サイトメトリー学会学術集会, 名古屋, 7月1-2日, 2005
  36. 濱崎幹也, 楠 洋一郎, 他. ヒトリンパ球を用いたリン酸化ヒストン H2AX フローサイトメトリーによる放射線感受性の評価の試み. 第50回日本人類遺伝学会, 倉敷, 9月19-22日, 2005
  37. 楠 洋一郎, 他. フローサイトメトリーを用いたヒト T リンパ球における DNA 二重鎖切断と修復の評価. 第35回日本免疫学会総会, 横浜, 12月13-15日, 2005
  38. 楠 洋一郎, 他. 放射線被ばく後のがんリスクと体細胞突然変異: 原爆被爆者における赤血球グリコフォリン A 遺伝子突然変異と癌発生の関係に関する前向き調査. 第28回日本造血細胞移植学会総会, 東京, 2月24-25日, 2006
  39. 樫本尚樹, 神谷研二, 他. BHP 誘発肺癌の霊芝菌糸体培養基熱水抽出物によるがん予防効果. ISCap Symposium in Kyoto, 京都, 5月20-21日, 2005
  40. 神谷研二. 放射線発がんのメカニズム. 第46回原子爆弾後障害研究会, 広島, 6月4日, 2005
  41. 増田雄司, 神谷研二, 他. 損傷乗り越え DNA 合成に参与するヒト REV1 と DNA との相互作用. 第46回原子爆弾後障害研究会, 広島, 6月4日, 2005
  42. 明神有紀, 神谷研二, 他. 小腸腺窩再生と生存率を用いたマウスにおける発酵乳の放射線防御作用. 第46回原子爆弾後障害研究会, 広島, 6月4日, 2005
  43. 増田雄司, 神谷研二, 他. ヒト REV1 と DNA との相互作用. 平成17年度変異・発癌抑制機構研究会, 愛知県瀬戸市, 7月15-16日, 2005
  44. 増田雄司, 神谷研二, 他. 損傷乗り越え DNA 合成因子 REV1 タンパク質の損傷部位へのターゲティング機構. 第30回中国地区放射線影響研究会, 広島, 8月30日, 2005
  45. 増田雄司, 神谷研二. 損傷乗り越え DNA 合成に参与するヒト REV1 と DNA との相互作用. 第64回日本癌学会学術総会, 札幌, 9月14-16日, 2005
  46. 増田雄司. ヒト REV1 タンパク質と DNA との相互作用. 国立遺伝学研究所研究集会 ユビキチンを介した DNA 修復応答のメカニズム. 三島, 9月21-22日, 2005
  47. 増田雄司, 神谷研二. 放射線による突然変異誘発機構の生化学的解析. 日本放射線影響学会第48回大会・第1回アジア放射線研究会議, 広島, 11月15-17日, 2005
  48. 顧永清, 神谷研二, 他. Cloning of human RRM3 cDNA. 日本放射線影響学会第48回大会・第1回アジア放射線研究会議, 広島, 11月15-17日, 2005
  49. 増田雄司, 神谷研二. Biochemical analysis of post-replication repair pathway by human REV1 protein. 第22回放生研国際シンポジウム, 京都, 11月21-22日, 2005

50. 顧永清, 神谷研二, 他. Cloning and Overexpression of a Novel Human Helicase. 第22回放生研国際シンポジウム, 京都, 11月21-22日, 2005
51. 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のDNA結合活性の解析. 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月7-10日, 2005
52. 橘 典子, 神谷研二, 他. ネイティブREV1の精製方法の検討. 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 12月7-10日, 2005
53. Masuda Y, Kamiya K. Function of human REV1 protein on the post-replication repair pathway. 広島大学21世紀COEプログラムー放射線災害医療界発の先端的研究教育拠点ー第3回国際シンポジウム, 広島, 2月1-2日, 2006
54. Tachibana N, Kamiya K, et al. Examination of purification method for native REV1. 広島大学21世紀COEプログラムー放射線災害医療界発の先端的研究教育拠点ー第3回国際シンポジウム, 広島, 2月1-2日, 2006
55. Piao JL, Kamiya K, et al. Over production and purification of the recombinant human REV3 protein. 広島大学21世紀COEプログラムー放射線災害医療界発の先端的研究教育拠点ー第3回国際シンポジウム, 広島, 2月1-2日, 2006
56. Gu YQ, Kamiya K, et al. Cloning and Characterization of hRRM3: a human DNA helicase. 広島大学21世紀COEプログラムー放射線災害医療界発の先端的研究教育拠点ー第3回国際シンポジウム, 広島, 2月1-2日, 2006

3. その他  
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

## 遺伝子発現解析による放射線関連固形がんの特異的な遺伝子の同定

主任研究者 安井 弥 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨 SAGEで抽出した特異的発現遺伝子に加えて、DNA障害・修復関連遺伝子を含むオリゴDNAカスタムアレイを作成し、被爆者胃がん（放射線影響研究所のコホート研究Life Span Study LSS A群：>0 dose）4例と対照胃がん19例の新鮮凍結組織について遺伝子発現解析を行ったところ、LSS A群と対照群で有意に発現レベルの異なる10遺伝子が抽出された。これらには、SAGEで抽出した遺伝子2個とDNA障害・修復に関連する遺伝子1個が含まれていた。放射線関連がんのマーカー遺伝子となる可能性がある。また、DNA二本鎖切断部位に集積することが知られているヒストンH2AXのリン酸化型（ $\gamma$ H2AX）は、LSS A群の非がん部胃粘膜において対照群と比較して高頻度に発現していた。症例数を増やすとともに、これら遺伝子・分子の発現の意義について機能解析を含めて検討する必要がある。尚、被爆者に新規に発生する固形がんの新鮮組織は、これまでに食道がん、胃がん、大腸がん、肺がん、乳がん、を合わせて483症例を収集し、LSS A群は21例含まれていた。

### A. 研究目的

固形がんの分子発生機構には、様々なジエネティック・エピジエネティックな異常が関与するが、放射線関連固形がんの分子生物学的解析は、その新鮮凍結試料が殆どないためにあまり進展していないのが現状である。現在、(財)日本公衆衛生協会（厚生労働省）の「原爆症に関する調査研究」班により、被爆者に新規に発生する固形がんの新鮮組織収集が行われている。本研究では、主にそこで収集された組織試料を用いて、遺伝子発現プロファイル解析を行い、放射線発がんに関連する特異的遺伝子を同定し、それを標的とした診断法・治療法・予防法の開発を目的とするものである。

### B. 研究方法

#### 1) 遺伝子発現による放射線関連固形が

#### んに特異的な遺伝子の同定

これまでに、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（serial analysis of gene expression）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、相互の SAGE ライブラリーの比較および定量的 RT-PCR 法によって多くの胃がん特異的発現遺伝子、がんの進展・悪性度に関連する遺伝子を新規に同定してきた。本年度は、上記で抽出した特異的発現遺伝子に加えて、DNA 障害・修復関連遺伝子を含むオリゴ DNA カスタムアレイを準備する。尚、前年度の検討も踏まえて、定量性、再現性に優れた三次元アレイを作成する。

新鮮凍結がん試料について、T7-based RNA amplification を併用し、オリゴ DNA カスタムアレイを用いて、遺伝子発現プロ

ファイル解析し、放射線関連がんの特異的な遺伝子群を抽出する。遺伝子発現は、定量的 RT-PCR 法によっても確認する。放射線との関連性は、がん細胞株を用いた系で放射線による誘導の有無を検討する。また、がんあるいは放射線/DNA 修復との関連の明らかでない遺伝子については機能解析を行う。

また、食道がんについても胃がんと同様の検討を行うために食道がん組織を用いて SAGE 解析を開始する。

## 2) DNA 傷害レスポンス・DNA 修復関連遺伝子の被爆者固形がんにおける発現

REV1 は、損傷乗り越え DNA 合成に関与する遺伝子であり、REVI トランスジェニックマウスでは、発がんリスクが変化する可能性が指摘されている。一方、ヒストン H2AX は DNA 損傷レスポンスに関連し、そのリン酸化型 ( $\gamma$ H2AX) は DNA 二本鎖切断部位に集積すること、培養 T リンパ球を用いたフローサイトメトリーによる  $\gamma$ H2AX 測定において放射線量と相関することが知られている。そこで、REV1 蛋白および  $\gamma$ H2AX の発現をそれぞれに対する特異抗体を用いて免疫組織化学的に検討する。放射線影響研究所の Life Span Study

(LSS) A 群 (>0 dose) および非被爆対照群に発生した胃がん症例のがん部と非がん部のホルマリン固定パラフィン切片を用い、酵素抗体法で染色した。 $\gamma$ H2AX に関しては、活性化型カスパー 3 との二重染色を行い、Con-focal microscopy によってアポトーシスとの関係を検討した。尚、抗 REV1 モノクローナル抗体は神谷研二教授（広島大学原爆放射線医科学研究所）から供与いただいた。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料を用いた遺伝子解析では、「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：平成16年全部改定）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) 遺伝子発現による放射線関連固形がんの特異的な遺伝子の同定

SAGE法で抽出した遺伝子、DNA障害・修復に関連する遺伝子を含む約200遺伝子を搭載するオリゴDNAカスタムアレイ (Ex-3DCHIP, ver. 2) を新規に作成した。尚、DNA障害・修復関連遺伝子の選定には、神谷研二教授および宮川 清教授（東京大学大学院医学系研究科）の協力を得た。被爆者胃がん (LSS A群) 4例と対照胃がん19例の新鮮凍結組織からRNAを調整し、ラポチップによるRNAの質の確認でRINが6.0以上のものについてアレイ解析を行った。全遺伝子の発現情報を対象としたクラスターでは、LSS A群と対照群を判別できなかったが、GeneSpringのANOVAを用いての解析では、LSS A群と対照群で有意に発現レベルの異なる10遺伝子が抽出された。これらには、SAGEで抽出した遺伝子2個とDNA障害・修復に関連する遺伝子1個が含まれていた。

尚、同様の方法で食道がんの検討を行うために、SAGE法により食道扁平上皮がんにおける遺伝子発現プロファイルの解析を開始し、SAGEmapデータベース中の正常食道粘膜のSAGEライブラリーとの比較から様々な特異的発現遺伝子を抽出した。

### 2) DNA 傷害レスポンス・DNA 修復関連遺伝子の被爆者固形がんにおける発現



REV1蛋白の発現をLSS A群と対照群の胃癌のパラフィン切片について免疫組織化学的に検討した結果、胃癌における発現低下は、LSS A群では40.0% (8/20)、対照群では31.6% (12/38) に認められ、両者には明らかな差は認められなかった。対照群では、ステージの進んだ症例においてREV1蛋白の発現低下がやや多く、組織型との関連では、未分化型がん（低分化腺がん非充実型、印環細胞がん、粘液がん）に発現低下が多い傾向にあった ( $P=0.059$ )。

抗 $\gamma$ H2AX抗体を用いた免疫染色にて、胃癌と非がん部胃粘膜における $\gamma$ H2AXの発現をLSS A群および対照群において検討した。胃癌における $\gamma$ H2AXの発現は、LSS A群で60.0% (12/20)、対照群で33.3% (3/9) の症例に認められ、LSS A群で高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。 $\gamma$ H2AX陽性像は癌細胞の核内にドット状に認められた。一方、非がん部胃粘膜における $\gamma$ H2AXの発現は、LSS A群で52.6% (10/19)、対照群で11.1% (1/9) に認められ、LSS A群に有意に高頻度であった ( $P=0.0491$ )。 $\gamma$ H2AX陽性細胞は、粘膜表層部のみ存在し、二重染色による検討において活性化型カススペース3と共染色されるものもあり、一部はアポトーシスによるものと見なされた。

### 3) 被爆者固形がん新鮮組織の収集

被爆者に新規に発生する固形がんの新鮮組織は、これまでに、食道がん、胃癌、大腸がん、肺がん、乳がん、を合わせて483症例を収集した。その内、LSS A群 (>0 dose)は21例、B群 (dose=0) は9例、C群 (not in city) は6例、D群 (dose unknown) は5例、LSS外は425例であった。

## D. 考察

遺伝子発現プロファイルから放射線発が

んに関連する特異的遺伝子を同定することは、放射線関連がんの診断標的になるのみならず、その機能を明らかにすることによって治療法・予防法の開発に繋がる。本年度のカスタムアレイを用いた胃癌に対する遺伝子発現解析において、LSS A群に特異的な発現態度を示すものとして10遺伝子が同定された。被爆者に発生した新鮮凍結試料が収集されたことによって漸くなされた世界ではじめての被爆者胃癌における体系的遺伝子発現解析データである。得られた10遺伝子は放射線発がんに関与する可能性とともに、放射線関連がんを同定するマーカー遺伝子の候補と考えられた。原爆被爆者のデータから、固形がん発生の過剰リスクは臓器がんによって異なることが知られており、上記のストラテジーで他の臓器がんを解析する必要がある。また、DNA障害・修復関連遺伝子以外のものについては、機能解析によって放射線障害、反応との因果関係を明らかにしなければならない。

$\gamma$ H2AXの発現は放射線量と相関することが培養Tリンパ球を用いた検討から明らかになり、リスク評価のよい指標となる可能性が指摘されている。さらに、最近、 $\gamma$ H2AXを含むDNA傷害レスポンス遺伝子が、様々なヒト腫瘍（乳がん、肺がん、大腸がんなど）の発生早期および前がん性病変で発現亢進することが報告された。今回の胃における検討では、腺腫や早期がんにおける解析は十分でなく、発がん早期での発現亢進は確認できていない。しかしながら、LSS A群では、背景粘膜において $\gamma$ H2AX陽性細胞が多く観察された。活性化型カススペース3の発現によって確認されたアポトーシスの存在以外にも、DNA二本鎖切断および染色体不安定性が高い状態にある可能性も考えられる。症例数を増やし詳細に検討する必要がある。

## E. 結論

被爆者に新規に発生した胃がんと対照群の新鮮凍結試料についてオリゴDNAカスタムアレイ (Ex-3DCHIP, ver. 2) を用いた遺伝子発現解析により、被爆者胃がんにおいて有意に発現態度の異なる10遺伝子を同定した。放射線関連胃がんのマーカーの有力な候補として注目される。症例を蓄積するとともに、機能解析を進める予定である。また、DNA二本鎖切断部位に集積することが知られている $\gamma$ H2AXは、被爆者胃がん患者の非がん部胃粘膜において対照群と比較して高頻度に発現していた。

## 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. Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Oncogene* 24:157-164, 2005
2. 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
3. Mitani Y, Yasui W et al. Histone H3 acetylation is associated with reduced p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in gastric carcinoma. *J Pathol* 205:65-73, 2005
4. Kitadai Y, Yasui W et al. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer* 115:388-392, 2005
5. 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* 72:133-138, 2005
6. Oue N, Yasui W et al. Genes involved in invasion and metastasis of gastric cancer identified by array-based hybridization and serial analysis of gene expression. *Oncology* 69S1:17-22, 2005
7. Ito R, Yasui W et al. Clinicopathological significance and prognostic influence of cadherin-17 expression in gastric cancer. *Virchow Arch* 447:717-722, 2005
8. Motoshita J, Yasui W et al. DNA methylation profile in differentiated type gastric carcinoma with distinct mucin phenotypes. *Cancer Sci* 96:474-479, 2005
9. Oue N, Yasui W et al. Expression and localization of RegIV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: RegIV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma. *J Pathol* 207:185-198, 2005
10. Shutoh M, Yasui W et al. DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in gastric cancer: expression of retinoic acid receptor  $\beta$ , cellular retinol binding protein 1 and tazarotene-induced gene 1 is associated with DNA methylation. *Cancer* 104:1609-1619, 2005
11. Tahara E Jr, Yasui W et al. G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in cancer cell line TMK-1 cell. *Cancer Immunol Immunother* 54: 729-740, 2005
12. Mizuiri H, Yasui W et al. DNA methylation of genes linked with retinoid in squamous cell carcinoma of the esophagus: DNA methylation of RBP1 and TIG1 is associated with tumor stage. *Cancer Sci* 96:571-577, 2005
13. Kose K, Yasui W et al. Somatic of mitochondrial DNA in digestive tract cancers. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 1679-1684, 2005
14. Yasui W et al. Molecular-pathological factor of gastric cancer: a review. *Gastric*

- Cancer 8:86-94, 2005
15. Oue N, Yasui W et al. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer* 106:1250-1259, 2006
  16. Sanada Y, Yasui W et al. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in intestinal phenotype of gastric cancer. *J Pathol* 208:633-642, 2006
  17. Kobayashi T, Yasui W et al. Glycogen synthase kinase-3 and H-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions. *Mol Cell Biol* 26:898-911, 2006
  18. Aung PP, Yasui W et al. Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. *Virchow Archiv* (in press, 2006)
  19. Aung PP, Yasui W et al. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene* (in press, 2006)
  20. Motoshita J, Yasui W et al. Molecular characteristics of differentiated type gastric carcinoma with distinct mucin phenotype: LI-cadherin is associated with intestinal phenotype. *Pathol Int* (in press, 2006)
2. 学会発表
1. Aung PP, Yasui W et al. Screening of cancer specific gene and identification of MIA as a cancer specific gene and prognostic indicator in gastric cancer. The 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, California (USA), April 16-20, 2005
  2. Aung PP, Yasui W et al. Identification of MIA as a cancer specific gene and prognostic indicator in gastric cancer. The 6<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress, Yokohama (Japan), May 4-7, 2005
  3. Sanada Y, Yasui W et al. Down-regulation of claudin-18 and its prognostic impact in gastric cancer. The 15th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar " Current Progress of Cancer Chemotherapy", Hiroshima (Japan), October 30, 2005
  4. Oue N, Yasui W et al. MAGE gene expression is correlated with resistance to taxan in gastric cancer. The 15th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar " Current Progress of Cancer Chemotherapy", Hiroshima (Japan), October 30, 2005
  5. 安井 弥, 他. 分子病理診断:ゲノム・形態・臨床の架け橋:ゲノム医療時代において分子病理診断が果たす役割. 第94回日本病理学会総会, シンポジウム, 4月14-16日, 横浜, 2005
  6. 大上直秀, 安井 弥, 他. 新規転移遺伝子:ヒト悪性腫瘍におけるRegIVの発現プロファイル-RegIVは大腸癌の転移, ステージと関連している-. 第14回日本がん転移学会総会, ワークショップ6, 6月2-3日, 大阪, 2005
  7. Aung PP, 安井 弥, 他. マイクロアレイ・遺伝子診断:MIAは胃癌の新規予後因子である. 第14回日本がん転移学会総会, ワークショップ3, 6月2-3日, 大阪, 2005
  8. 三谷佳嗣, 安井 弥, 他. 薬剤感受性(3):胃癌におけるRegIVの発現と5FU耐性との関連. 第64回日本癌学会総会, ワークショップW17-3, 9月14-16日, 札幌, 2005
  9. 真田雄市, 安井 弥, 他. 発がん感受性関連遺伝子(SNPs):胃癌におけるclaudin-18の発現低下およびプロモーター領域における新規SNPの同定. 第64回日本癌学会総会, ワークショップW7-5, 9月14-16日, 札幌, 2005
  10. Aung PP, 安井 弥, 他. 発現プロファイルによるがん診断:SAGEデータ

に基づく癌（胃癌）特異的遺伝子の網羅的解析．第64回日本癌学会総会，ワークショップW15-3，9月14-16日，札幌，2005

11. 大上直秀，安井 弥，他．消化器癌の発生－病理，分子生物，遺伝子の知見を臨床へ：RegIVは胃癌，大腸癌の新規血清腫瘍マーカーである．第16回日本消化器癌発生学会，シンポジウム1，10月13-14日，鹿児島，2005
12. 真田雄市，安井 弥，他．消化器癌の転移形成－病理，分子生物，遺伝子の異常と臨床応用－：Claudin-18は胃癌の新規予後因子である．第16回日本消化器癌発生学会，シンポジウム2，10月13-14日，鹿児島，2005

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