

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

放射線被曝による固形がんの疫学的解析

分担研究者 西 信雄（財）放射線影響研究所 疫学部

放射線影響研究所にて長期間追跡されている原爆被爆者集団（寿命調査集団）において、以下の結果が得られた。

- (1) 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。
- (2) 胃がん発生率について、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。
- (3) 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。

A. 研究目的

放射線影響研究所（以下、放影研）では原爆放射線の健康影響調査を目的として、約12万人の原爆被爆生存者（9万3千人の被爆者と2万7千人の対照群）からなる寿命調査集団を設定して1950年から死亡追跡調査を行っている。本調査集団は、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り、がんの罹患については、広島においては1957年から、長崎においては1958年から実施され、高い精度を誇る腫瘍登録により把握している。

調査結果はこれまで定期的に報告されているが、現在1958年から1998年までの罹患について最新の報告を準備中である。今年度の研究成果として、以下の3つについて報告する。

- (1) 原爆被爆者における男性乳がんの発生(Ron E, et al. JNCI 2005; 97: 603-605)
- (2) 原爆被爆者における生活習慣、被曝と胃がん(Sauvaget C, et al. Cancer Causes Control 2005; 16: 773-780)

- (3) 広島・長崎における皮膚がんの組織学的特徴：自然発生と放射線の影響 (Kishikawa, et al. Int J Cancer 2005; 117: 363-369)

B. 研究方法

- (1) 原爆被爆者における男性乳がんの発生  
寿命調査集団の男性45,880人を対象とし、1958年1月1日から1998年12月31日までの期間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。
- (2) 原爆被爆者における生活習慣、被曝と胃がん  
1978年の郵便調査に回答した者のうち、がんの既往のない38,576人（男14,885人、女23,691人）を対象とした。胃がんの症例は、男は1980年1月1日から1999年12月31日まで、女は1981年2月1日から1999年12月31日までの期間に発生したもの分析対象とした。線量体系はDS86 (Dosimetry System 1986)を用いた。

(3) 広島・長崎における皮膚がんの組織学的特徴：自然発生と放射線の影響

寿命調査集団の112,305人を対象とし、1958年1月1日から1987年12月31日までの期間に発生した皮膚がん症例について分析した。線量体系はDS86を用いた。

(倫理面への配慮)

寿命調査の実施については、放影研の倫理審査委員会（人権擁護委員会）にて審査を受け承認されている。またがんの罹患に関する情報は、広島市医師会腫瘍統計事業（2005年4月から広島市地域がん登録事業）および広島県腫瘍登録事業の審査委員会に対して資料利用の手続きを行い、承認を得ている。死亡に関する情報は、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）の転記書類から把握している。

### C. 研究結果

寿命調査集団におけるがん罹患については最新の報告書を準備中であるが、その中から1998年末時点での生死状況を表1に示す。被曝時年齢が50歳以上の者では生存者の割合は0%であったが、10歳未満の者では男が89%、女が94%であった。

表1 被曝時年齢別の生死状況

被曝時 年齢 (歳)	男		女	
	人数	生存者の割合	人数	生存者の割合
0-9	11,614	89%	11,913	94%
10-19	11,205	73%	14,245	87%
20-29	3,684	47%	11,679	72%
30-39	5,719	17%	10,927	36%
40-49	7,421	2%	9,473	5%
50-	6,237	0%	7,835	0%
総数	45,880	46%	66,072	55%

1958年1月時点でがんの既往のなかった者の1998年末までの生死状況

(1) 原爆被曝者における男性乳がんの発生  
被曝者における罹患数は9例、非被曝者（被曝線量が0.005Sv未満の者）における罹患数は3例で、粗罹患率は10万人年あたり、それぞれ1.8と0.5であった（表2）。

被曝1Svあたりの過剰相対リスク(excess relative risk: ERR)は8（95%信頼区間：0.8-48）であった。

男性乳がん罹患者の診断時年齢は42歳から88歳の範囲にあり、平均で67歳であった。組織型をみると粘液癌の1例以外はすべて浸潤性乳管癌であった。

表2 被曝線量（乳腺）別にみた粗罹患率

乳腺 線量(Sv)	観察 人年	罹患 数	罹患率 (対10万人 年)
<0.005	604,097	3	0.5
0.005-0.5	375,668	5	1.3
0.5-1	27,119	1	3.7
>1	33,394	1	3.0
不明*	71,213	2	2.8

\*被曝者のうち線量推定が困難であった者

(2) 原爆被曝者における生活習慣、被曝と胃がん

観察期間（485,575人年）中、胃がんは1,280例発生した。診断時年齢は36歳から97歳の範囲にあり、平均で69歳であった。局在を細分類別にみると、幽門・幽門前部が33%、胃体部が27%、噴門部が6%、胃小弯が5%、胃底部が2%、詳細不明が27%であった。

胃がんのリスク因子は、放射線被曝、男性、高齢、喫煙であった。被曝線量（胃加重線量）別に罹患率比をみると、0-4mGyの

群に対して1000mGyの群では1.71(95%信頼区間1.27-2.30)であり、傾きの検定結果は $p=0.009$ で有意であった(表3)。食習慣のうち果物、野菜、緑茶、大豆製品の摂取頻度と胃がんの罹患率の関連はみられなかった。

表3 被曝線量(胃)別にみた罹患率比

胃加重線量 (mGy)	罹患 数	罹患 率比	(95%信頼 区間)
0-4	412	1.00	
5-199	519	0.97	(0.85-1.10)
200-499	104	1.16	(0.94-1.44)
500-999	54	1.11	(0.83-1.47)
1000-	50	1.71	(1.27-2.30)

\*到達年齢、性、出生年で層化し、都市、喫煙習慣、学歴で補正

(3) 広島・長崎における皮膚がんの組織学的特徴：自然発生と放射線の影響

皮膚がんは、第1原発がんとして観察期間中274例発生した。組織型別の内訳は、基底細胞癌が106例、扁平上皮癌が81例、悪性黒色腫が14例であった。自然罹患率(background incidence rate)は、基底細胞癌、扁平上皮癌とも10万人年当たり3であった。基底細胞癌の発生部位は頭頸部が81%で多く、扁平上皮癌の発生部位は四肢が45%と頭頸部が29%であった。組織型別に年次推移をみると、基底細胞癌は増加していたが、扁平上皮癌は増加の傾向を示さなかった。

表4 紫外線曝露の有無別にみた基底細胞癌における放射線の影響に関する推定値

部位 (表面積)	ERR/Sv <sup>1</sup> (95%信頼区間)	EAR/10 <sup>5</sup> m <sup>2</sup> 年 Sv <sup>1</sup> (95%信頼区間)
全身(1.6m <sup>2</sup> )	1.9 (0.8-8.9)	5.7 (2.4-10)
紫外線曝露 部位(顔と 手、0.12 m <sup>2</sup> )	0.6 (<0-2.4)	9.1 (<0-42)

紫外線非曝 露部位(残 り、1.48 m <sup>2</sup> )	3.9 (1.4-9.3)	5.6 (2.4-10)
---	------------------	-----------------

<sup>1</sup>1980年に60歳の者の推定値(性別、都市、成人健康調査への参加の有無で補正)

基底細胞癌における体表面積1平方メートル当たり被曝線量1Sv当たりの過剰絶対リスク(excess absolute risk: EAR)を紫外線曝露の有無別にみると有意な差はみられなかった(表4)。

#### D. 考察

男性乳がん12例の分析により、女性乳がんと同様被曝線量との量反応関係が認められた。ただ診断時年齢の平均は67歳で、女性における平均診断時年齢より7歳高齢であった。男性乳がんは少数での分析であるが、50歳未満の症例は1例で、一般的に閉経の前後で2峰性の分布を示す女性乳がんとは異なる傾向を示した。

胃がんについての分析では、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認めることが明らかとなった。

皮膚がんは日本人においてはまれな部位のがんであるが、今回約12万人の寿命調査集団において組織型別に疫学的な検討を加えることができた。紫外線に曝露しやすい部位に基底細胞癌、扁平上皮癌が多かったことから、悪性黒色腫以外の皮膚がんでは紫外線が主要なリスク因子となることが明らかとなった。

#### E. 結論

放影研の寿命調査集団は、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。最新の報告では新被曝線量体系であるDS02を用いて原爆放射線被曝と関連した発がんリスクの部位による違い、線量

応答曲線の形、被爆時年齢の影響等について詳しく解析している。前回の1994年の報告では1987年までの罹患を対象としていたが、今回は観察期間を11年延長し、より多くのがん罹患を対象に含めている。

がん罹患数は依然増加している。今後も放射線発がんのメカニズム解明において貴重な疫学情報が得られると期待される。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ron E, Preston DL, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, Soda M, Mabuchi K, Kodama K. Solid cancer incidence among atomic bomb survivors: preliminary data from a second follow-up. Acta Med Nagasaki 2005; 50: 23-25.

2. 西 信雄, 杉山裕美, 笠置文善, 片山博昭, 児玉和紀, 桑原正雄, 有田健一, 安井 弥. 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. JACR Monograph 2006; 11: 60-64.

### 2. 学会発表

1. Nishi N, Sugiyama H, Kasagi F, Shimizu Y, Kodama K. Relationship between site-specific cancer mortality and survival and socioeconomic status. XVIIth International Epidemiological Association (IEA) World Congress of Epidemiology, Bangkok, 21-25 August 2005.

2. Nishi N, Sugiyama H, Kasagi F, Shimizu Y, Kodama K. Relationship between site-specific cancer incidence and socioeconomic status in the Life Span Study. Fourth Regional Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP) Conference, Nagoya, 20-21 January 2006.

2. 西 信雄, 杉山裕美, 笠置文善, 清水由紀子, 児玉和紀. 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, 2005年7月14日-15日.

4. 西 信雄, 杉山裕美, 笠置文善, 片山博昭, 児玉和紀, 桑原正雄, 有田健一, 安井 弥. 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, 2005年9月2日-3日.

5. 西 信雄, 児玉和紀, 田原榮一. がん罹患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, 2005年9月14日-16日, 札幌.

## 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

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 放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部 中地 敬

(研究要旨)

埼玉コ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関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。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を示唆する結果を得た。

A. 研究目的

体内に発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。

B. 研究方法

埼玉コホート（3,600名）と放射線影響研究所免疫コホート（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未満)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ホート研究である。本研究の第一の目標は、埼玉コ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ことである。なぜなら、埼玉コホート研究では放射線影響研究所の免疫コ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、発がんとの関係をすでに明らかにしているからである。埼玉コーホート研究での成果は、免疫遺伝学的発がんリスクへの放射線被曝の影響を明らかにしようとする放射線影響研究所免疫コーホートのゲノム解析に大きな寄与をすると考える。我々はすでに埼玉コーホートの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。前年度に引き続き、NK活性の遺伝的要因を埼玉コーホート研究に基づいて検討した。すなわち、NK活性の遺伝的要因と発がんリスクの関係を明らかにし、遺伝的要因別のNK活性への環境因子の影響を検討した。

(倫理面への配慮)

埼玉コーホート研究及び放射線影響研究所免疫コーホート研究、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「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

コーホート研究で見いだされたがん罹患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ーホート内対照者を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つの群のゲノム特性を比較して(phenotype-genotype association analysis)、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( $P<0.0001$ )。

さらに、コーホート内症例対照研究を行い、上記のハプロタイプの全がんリスクを検討した。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、対照者 612 名を *LNK1/LNK1*、*LNK1/HNK1*、*HNK1/HNK1* のハプロタイプに分け、喫煙など NK 活性に影響を与えると考えられる生活習慣の有無による NK 活性の違いを検討した。その結果、喫煙は *HNK1/HNK1* を持つ人の NK 活性を顕著に低下させ、適度の飲酒はハプロタイプに関わらず NK 活性を増加させ、緑色野菜や乳・乳製品の摂取は *LNK1/LNK1* を持つ人の NK 活性を増加されるなど、NK 活性に及ぼす生活習慣の効果の程度がハプロタイプによって異なることが示唆された。

#### D. 考察

NK 活性が低いハプロタイプ *LNK1/LNK1* を持つ人は一般集団の 32% を占め、かつ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。こうした人々を対象とした免疫学的がん予防は、がん以外の免疫疾患の予防とも重複した効果を期待でき、今後の重要な研究課題と考える。また、免疫学的発がん高危険群に対する原爆放射線の影響を放射線影響研究所の免疫コーホート研究で検討することも将来の重要な課題である。

#### 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、その主たる遺伝的要因が NKG2D 受容体遺伝子領域に存在するハプロタイプであることを見出した。低 NK 活性に関連したハプロタイプを持つ人の発がんリスクは、高 NK 活性に関連したハプロタイプの人に比べ約 2 倍高かった。さらに、生活習慣の NK 活性に及ぼす影響はハプロタイプによって異なることが示唆された。これらの知見は、免疫学的がん予防を進める上で重要な基盤を与えるものと期待される。また、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

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hamatani, K., Eguchi, H., Takahashi, K., Koyama, K., Mukai, M., Ito, R., Taga, M., Yasui, W., Nakachi, K.: Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *J. Histochem. Cytochem.*, in press.

Kanzaki, H., Hanafusa, H., Yamamoto, H., Yasuda, Y., Imai, K., Yano, M., Aoe, M., Shimizu, N., Nakachi, K.

- Ouchida, M., Shimizu, K.: Single nucleotide polymorphism at codon 133 of the RASSF1 gene is preferentially associated with human lung adenocarcinoma risk. *Cancer Lett.*, in press.
- Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., Nakachi, K.: Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res.*, 66: 563-570, 2006.
- Ogawa, T., Hayashi, T., Tokunou, M., Nakachi, K., Trosko, J.E., Chang, C-C., Yorioka, N.: Suberoylanilide hydroxamic acid enhances gap junctional intercellular communication *via* acetylation of histone containing connexin 43 gene locus. *Cancer Res.*, 65: 9771-9778, 2005.
- Kyoizumi, S., Kusunoki, Y., Hayashi, T., Hakoda, M., Cologne, J.B., Nakachi, K.: 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.
- Packeisen, J., Nakachi, K., Boecker, W., Brandt, B., Buerger, H.: Cytogenetic differences in breast cancer samples between German and Japanese patients. *J. Clin. Pathol.*, 58: 1101-1103, 2005.
- Ito, R., Oue, N., Yoshida, K., Kunimitsu, K., Nakayama, H., Nakachi, K., Yasui, W.: Clinicopathological significant and prognostic influence of cadherin-17 expression in gastric cancer. *Virchows Archiv.*, 447: 717-722, 2005.
- Kuraoka, K., Matsumura, S., Sanada, Y., Nakachi, K., Imai, K., Eguchi, H., Matsusaki, K., Oue, N., Nakayama, H., Yasui, W.: A single nucleotide polymorphism in the extracellular domain of TRAIL receptor DR4 at nucleotide 626 in gastric cancer patients in Japan. *Oncol. Rep.*, 14: 465-470, 2005.
- Ito, Y., Nakachi, K., Imai, K., Hashimoto, S., Watanabe, Y., Inaba, Y., Tamakoshi, A., Yoshimura, T.: 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 (Suppl. 1); S67-73, 2005.
- Hamai, Y., Matsumura, S., Matsusaki, K., Kitadai, Y., Yoshida, K., Yamaguchi, Y., Imai, K., Nakachi, K., Toge, T., Yasui, W.: A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the EGF gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer. *Pathobiology*, 72: 133-138, 2005.
- Sueoka, E., Sueoka, N., Iwanaga, K., Sato, A., Suga, K., Hayashi, S-I., Nagasawa, K., Nakachi, K.: 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.
- 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.
- 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.
- 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.*, 118: 83-86, 2005.
- Matsumura, S., Oue, N., Nakayama, H., Kitadai, Y., Yoshida, K., Yamaguchi, Y., Imai, K., Nakachi, K., Matsusaki, K., Chayama, K., 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.
- development: a crossroad of epidemiology, genome science and cancer prevention. 2005 Korean Society of Epidemiology. pp7-13, 2005.
- Nakachi, K. :Immno genome 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.
- Nakachi K. :Molecular epidemiology on immune defense against cancer. The Thirty-sixth International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund. pp26-27, 2005

## 2. 学会発表

Nakachi, K.:Immunity and cancer

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）*RET/PTC*遺伝子再配列あるいは*RAS*および*BRAF*遺伝子の点突然変異のような遺伝子変化によって生じるMAPキナーゼシグナル系の恒常的な活性化は、甲状腺乳頭発癌の初期の重要な事象として考えられている。これらのうち最近同定された*BRAF*<sup>V600E</sup>変異が、甲状腺乳頭癌の成人患者において高頻度で見つかっている。しかしながら、この変異と成人乳頭癌における放射線被曝との関連については未だ明らかでない。本研究では広島原爆被曝者で発生した成人甲状腺乳頭癌64症例の*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。*BRAF*<sup>V600E</sup>変異を持つ乳頭癌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、Wilcoxon rank-sum test,  $P=0.022$ ）。また、被曝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、Wilcoxon rank-sum test,  $P=0.014$ ）。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 $P=0.010$ ）。これらの結果は高線量を被曝した、あるいは被曝後の潜伏期間が短い成人甲状腺乳頭癌では放射線被曝を受けていない乳頭癌と発がん初期の事象が異なっていることを示唆する。

### A. 研究目的

甲状腺癌は原爆被曝者やチェルノブイリ原発事故で放射線被曝をした人で発生する放射線関連固形癌として最も良く知られているものの一つである。成人甲状腺乳頭癌において、MAPキナーゼシグナル系の恒常的な活性化を担う*BRAF*<sup>V600E</sup>突然変異が高頻度（約60%）で認められており、またトランスジェニックマウスの結果などから、*BRAF*<sup>V600E</sup>突然変異が成人甲状腺乳頭癌の初期に起きる事象の重要なものであることが示されている。一方、小児甲状腺乳頭癌では、放射線被曝歴の有無に関わらず、この変異が低頻度であることが報告されている。しかしながら、この*BRAF*<sup>V600E</sup>突然変異と成人乳頭癌における放射線被曝との関連については未だ明らかでない。本研究の目的は原爆被曝者で発生した成人甲状腺乳頭癌における*BRAF*<sup>V600E</sup>突然変異を調べ、この

変異と放射線被曝との関連を明らかにすることである。

### B. 研究方法

広島県内の原爆被曝者（寿命調査集団の対象者）で発生した成人甲状腺乳頭癌64症例（被曝線量=0 mGyの非被曝者17名、被曝線量>0 mGyの被曝者47名）を対象とする。研究試料は、1956年から1993年までに外科手術で摘出された組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックであり、2003年から2005年の間に入手した。病理組織型の分類はWHO分類に従って行った。DNAはレーザーあるいはマニュアルでマイクロダイセクションを行ない、回収した癌部あるいは非癌部組織から抽出した。*BRAF*<sup>V600E</sup>突然変異部位を含む領域をPCR法により増幅した後、まず制限酵素*TspRI*を用いたRFLP法によりスクリーニングを行い、変異候補について

蛍光シークエンサーを用いた直接シークエンスにより確認を行った。原爆放射線の被曝線量は最近導入されたDS02システムによって推定した。全ての統計解析はSPSSソフトVer12.0を用いて行った。

(倫理面への配慮)

放射線影響研究所の人権擁護委員会ならびに遺伝子に関する倫理委員会の承認を受けて行っている。個人を特定する情報は放射線影響研究所の個人情報管理者によって管理され、連結不可能匿名化の後、試料ならびに臨床疫学情報を用いた解析を行っている。

C. 研究結果

性、被爆時年齢、診断時年齢、潜伏期間(原爆投下時から、診断までの期間であり、被爆者のみに定義する)、病理組織型、分化度などの患者の特性を表1に要約する。

表1 放射線被曝の有無による患者の臨床病理学的・疫学的特性

	非被爆患者 <sup>‡</sup> (n=17)	被爆患者 (n=47)	P 値
<b>BRAF</b> 変異			
変異有り (n)	12	26	0.4 <sup>†</sup>
変異なし (n)	5	21	
頻度(%)	70	55	
被曝線量中央値 (mGy, 範囲)	0	150.7 (0.4-2,758)	
潜伏期間中央値(年, 範囲)	-	26.0 (11-46)	
被爆時年齢中央値 (年, 範囲)	21.0 (5-52)	25.0 (1-49)	0.4*
診断時年齢中央値 (年, 範囲)	48.0 (34-84)	54.0 (20-89)	0.6*
<b>病理組織型</b>			
乳頭癌 (n)	17	44	0.6 <sup>†</sup>
濾胞型乳頭癌 (n)	0	3	
<b>分化度</b>			
高分化 (n)	11	16	0.028 <sup>‡</sup>
中分化 (n)	6	31	
<b>性</b>			
男性 (n)	1	5	1.0 <sup>†</sup>
女性 (n)	16	42	

<sup>‡</sup> 非被爆者は推定線量が0あるいは原爆投下時に広島市外にいたものとする。  
<sup>○</sup> 潜伏期間: 原爆投下から診断までの期間。  
<sup>†</sup> Fisher's exact test. \*Wilcoxon rank-sum test. <sup>‡</sup>chi-square test.

非被爆患者におけるBRAF<sup>V600E</sup>突然変異の頻度は70%で、既報の成人乳頭癌における頻度と良く一致していた。

次に我々はBRAF<sup>V600E</sup>突然変異の有無と臨床病理学的・疫学的因子とに関連が見られるかについて検討を行った。その結果を表2に要約する。

表2. BRAF<sup>V600E</sup> 変異の有無による患者の病理組織学的・疫学的特性

	BRAF <sup>V600E</sup> 変異		P 値
	あり (n=38)	なし (n=26)	
被曝線量中央値 (mGy, 範囲)	18.5 (0-2,758)	156.9 (0-2,304)	0.022 <sup>‡</sup>
被爆時年齢中央値 (年, 範囲)	24.0 (1-52)	22.5 (3-49)	0.8 <sup>*</sup>
診断時年齢中央値 (年, 範囲)	54.0 (20-89)	51.0 (29-70)	0.2 <sup>*</sup>
<b>病理組織型</b>			
乳頭癌 (n)	38	23	0.062 <sup>†</sup>
濾胞型乳頭癌 (n)	0	3	
<b>分化度</b>			
高分化 (n)	14	13	0.3 <sup>‡</sup>
中分化 (n)	24	13	
<b>性</b>			
男性 (n)	3	3	0.7 <sup>†</sup>
女性 (n)	35	23	

<sup>\*</sup>Wilcoxon rank-sum test. <sup>†</sup>Fisher's exact test. <sup>‡</sup>chi-square test

BRAF<sup>V600E</sup>突然変異を有する乳頭癌の被曝線量中央値は、変異を持たない乳頭癌に比べ有意に低かった(P=0.022)。また、BRAF<sup>V600E</sup>突然変異の有無と病理組織型との間に関連が見られた。濾胞乳頭癌3症例は全てBRAF遺伝子は野生型であり、この結果は既報における濾胞乳頭癌での変異の低頻度(12%)と一致していた。BRAF<sup>V600E</sup>突然変異の有無と、被爆時年齢、術時年齢、性、分化度との間には単変量解析では有意な差が認められなかった。

さらに、被爆患者47症例における被曝線量と潜伏期間について、BRAF<sup>V600E</sup>突然変異の有無との関連を調べた。BRAF<sup>V600E</sup>突然変異を有する乳頭癌患者の被曝線量は野生型の患者に比べ低い傾向を示した(図1)(Mann-Whitney's U-test, P=0.025)。

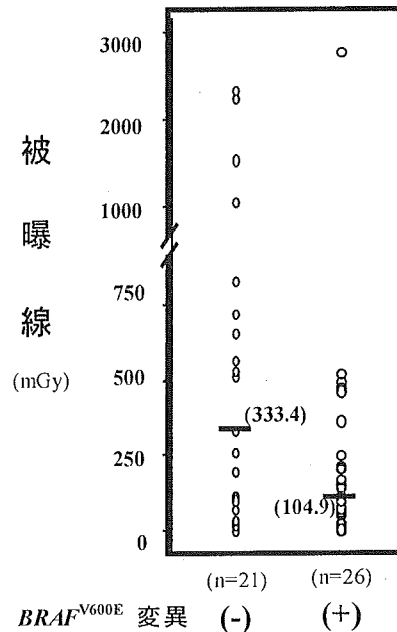


図1 47名の被爆患者における $BRAF^{V600E}$  変異の有無による被曝線量

また、 $BRAF^{V600E}$ 突然変異を有する乳頭癌患者の潜伏期間は変異を有さない患者よりも長い傾向を示した(図2)(Mann-Whitney U-test,  $P=0.014$ )。

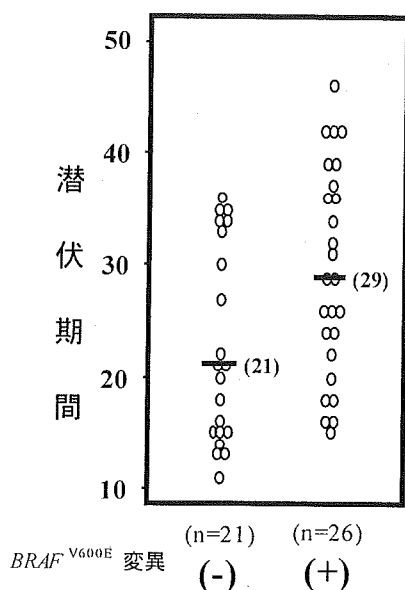


図2. 47名の被爆患者における $BRAF^{V600E}$  変異の有無による潜伏期間

これらの臨床病理学的・疫学的因子が相互に関連している可能性があるため、次に被爆患者47名を対象とし、 $BRAF^{V600E}$ 突然変異の有無を目的変数とするロジスティック回帰分析を行った。対数変換した被曝線量は $BRAF^{V600E}$ 突然変異と有意な逆相関を示し、( $P=0.028$ )、一方潜伏期間は正の相関を示した ( $P=0.010$ )。これにより単変量解析での結果が確認された。

#### D. 考察

以上の結果より、放射線被曝は甲状腺乳頭癌の初期の事象に影響を与えることが示唆された。例えば、MAPキナーゼシグナル系の恒常的な活性化につながる、 $BRAF^{V600E}$ 突然変異以外の他の遺伝的事象、 $RET/PTC$ 遺伝子再配列などが高被曝線量を被曝した原爆被爆者の甲状腺乳頭癌の発生に関与することが考えられる。今後、これらの事象についての検討も併せて行う必要性が強く示唆された。

#### E. 結論

原爆被爆者の甲状腺乳頭癌患者を $BRAF^{V600E}$ 突然変異の有無で比較すると、2つの放射線に関連する因子、すなわち被曝線量および潜伏期間において有意な相関が認められた。高線量を被曝した、あるいは被曝後の潜伏期間が短い原爆被爆者で発生した成人甲状腺乳頭癌では $BRAF^{V600E}$ 突然変異の頻度が低く、これらの患者では、放射線被曝を受けていない成人甲状腺乳頭癌と発がん初期の事象が異なっていることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hamajima N, Mutoh H, Eguchi H, Honda H: Minimal sizes of cases with a susceptible genotype and minimal odds ratios among susceptible individuals in case-control studies. Asian Pac J Cancer Prev. 6 (2): 165-169, 2005.

Kuraoka, K, Matsumura, S, Sanada, Y, Nakachi, K, Imai, K, Eguchi, H, Matsusaki, K, Oue, N, Nakayama, H, Yasui, W: A single nucleotide polymorphism in the extracellular domain of TRAIL receptor DR4 at nucleotide 626 in gastric cancer patients in Japan. Oncol. Rep., 14: 465-470, 2005.

Hamatani K, Eguchi H, Takahashi K, Koyama K, Mukai M, Ito R, Taga M, Yasui W, Nakachi K: Improved RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. J Histochem Cytochem. (2006) in press.

##### 学会発表

Eguchi H, Hamatani K, Taga M, Ito R, Kodama K, Katayama H, Tahara E, Nakachi K, Matsumura S, Yasui W: 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. Feb. 2006, Washington, USA

Hamatani K, Eguchi H, Taga M, Nakachi K: Radiation-associated thyroid carcinogenesis 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, Feb. 2006, Washington, USA

Taga M, Hagiwara N, Mechanic L, Hussain P, Harris CC, Eguchi H, Ito R, Hamatani K, Imai K, Kodama K, Katayama K, Cologne JB, Tahara E, Nakachi K, Yasui W: *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. Feb. 2006, Washington, USA*

高橋恵子, 濱谷清裕, 江口英孝, 多賀正尊, 伊藤玲子, 今井一枝, 早田みどり, 有廣光司, 林 雄三, 仲田義啓, 中地 敬。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, 2005年5月21日, 名古屋

江口英孝, 多賀正尊, 伊藤玲子, 濱谷清裕, 片山博昭, 児玉和紀, 田原榮一, 松村俊二, 安井 弥, 中地 敬。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, 2005年9月14-16日, 札幌

濱谷清裕, 高橋恵子, 江口英孝, 多賀正尊, 伊藤玲子, 今井一枝, 有廣光司, 中地 敬。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第64回日本癌学会総会, 2005年9月14-16日, 札幌

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 （財）放射線影響研究所 放射線生物学/分子疫学部 楠 洋一郎

（研究要旨）放射線誘発遺伝子障害の感受性、発がん関連遺伝子の多型、固形癌発生の関連性を明らかにする目的で、原爆被爆者コーホートにおいて体細胞遺伝子変異頻度、試験管内放射線感受性、およびがん発生を調査している。これまで赤血球グリコフォリン A (GPA) 遺伝子座の突然変異体頻度 (Mf) が高値を示した被爆者では放射線発がんのリスクが高い可能性を示唆する知見を得ている。この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ている ATM 遺伝子の多型について解析し、被爆者の GPAMf との関係性を調べた。ATM 遺伝子のハプロタイプ別に GPAMf の線量効果を解析したが、有意な差は観察されなかった。したがって、原爆被爆者の放射線誘発 GPA 変異体頻度の個人差に ATM 遺伝子の多型が関係する可能性は低いと考えられた。また、培養 T 細胞を用いた試験管内放射線感受性をリン酸化ヒストン 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確立した。研究室コントロールでの予備的検討では、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、放射線感受性の個人差を評価するのに有用であることが示唆された。この測定系を原爆被爆者の血液試料における放射線感受性の評価に応用し、得られたデータと GPAMf、発がん関連遺伝子の多型、固形癌発生の関係を調べる予定である。

### 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。しかし、放射線発がんのリスクが個体の遺伝的背景に影響を受ける可能性があるのか十分に検討されていない。放射線による発がんリスクの高い集団を遺伝子多型により同定することは、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。本研究では、放射線影響研究所（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。

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、どのような遺伝子の多型が放射線誘発遺伝子障害の感受性と関係するかは明らかにされ

ていない。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が、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。今回、GPA を測定した被爆者で遺伝子解析が可能であった 504 名について、放射線で生じる DNA 二重鎖切断の修復に中心的役割を果たすことが知られている ATM 遺伝子の多型と放射線誘発 GPA 変異体頻度との関係を調べた。

原爆被爆者のがん発生リスク評価のための生物学的指標として、GPA Mf の有効性を昨年度報告したが、一般集団で個人の放射線発がんのリスクを推定するためには、試験管内で放射線誘発遺伝子障害の感受性を評価できる測定系を確立する必要がある。試験管内放射線照射後の細胞の染色体異常、DNA 切断、あるいは生存率を測定する従来の方法は熟練と労力を要し、測定値に実験

間差が多いことが指摘されている。今回、高速大量処理が可能で良好な再現性が期待されるフローサイトメトリーを用い、DNA二重鎖切断部位の周辺においてリン酸化されフォーカスを形成するリン酸化ヒストンH2AX ( $\gamma$ H2AX)の細胞内レベルを指標として放射線誘発遺伝子障害の感受性を評価する系を確立した。

## B. 研究方法

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約1,900名について測定したものをを用いた。これらの対象者について、遺伝子解析に関する同意書の取得後、採血した血液試料からのDNA抽出を行った。今回、GPA を測定した被爆者で遺伝子解析が可能であった504名について、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースより検索したATM遺伝子の8箇所のSNPをTaqMan-Allelic Discrimination 法を用いて決定した。ハプロタイプブロックは linkage disequilibrium coefficients に基づいて決定した。

フローサイトメトリーによる $\gamma$ H2AXの細胞内レベルの測定には、研究室所属の健康成人より同意書を得て採取した末梢血単核細胞をPHA 存在下、rIL-2含有GIT培養液で約1週間培養し、増殖したTリンパ球を用いて行った。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FACScanで測定した。 $\gamma$ H2AXの染色はモノクローナル抗H2A.X (S139)抗体ならびにAlexa 488 標識抗マウスIgG1抗体を用いた。また、5 $\mu$ g/ml PIでDNAを染色し、アポトーシス細胞の混入や細胞周期を考慮して解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、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。また、本研究に用いる血液試料は、医学研究に関する同意文書に基づいて収集したもので、その使用は放影研の人権擁護委員会の承認を得ている。遺伝子解析研究については、連結可能匿名化による使用が遺伝子解析倫理審査委員会によって承

認されている。

## C. 研究結果

今回の504名の被爆者におけるATM遺伝子の8箇所のSNP多型解析により、7箇所のSNPのから構成される2つのハプロタイプ、AGCGAAG (ATM-h1) ならびにGATAGGA (ATM-h2) を同定した。ATM-h1およびATM-h2のアリル頻度は、それぞれ0.502および0.455であった。つぎに、ATM-h1/ATM-h1、ATM-h1/ATM-h2、ATM-h2/ATM-h2 のハプロタイプグループ別に、GPAMfの線量効果関係を調べた。その結果、いずれのハプロタイプグループのGPAMfも有意な被曝線量依存性の増加を認めしたが、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。

試験管内でX線照射した健康成人由来培養Tリンパ球の $\gamma$ H2AXの発現量は直線的な線量効果関係を示し、照射後1時間において最大で、その後経時的に減少した。4Gy照射6時間後の $\gamma$ H2AXの発現レベルにおいて、測定した6人の最大と最小の間に、1.5倍程度の差が確認された。またこの線量効果における個人差について同じ6名から培養したTリンパ球を用いて独立に行った2つの実験で良好な再現性 ( $r=0.85$ ) が得られた。この個人差はリンパ球中のCD4およびCD8T細胞の割合の個人差や細胞生存率とは無関係であった。また、 $\gamma$ H2AXのフォーカス形成を蛍光顕微鏡で解析した結果、フローサイトメトリーで検出した放射線誘発 $\gamma$ H2AXレベルの個人差は細胞当たりの $\gamma$ H2AXフォーカス数、すなわちDNA二重鎖切断の数を反映していた。したがって、フローサイトメトリーによる $\gamma$ H2AXレベルの測定は個人の放射線感受性を正確に評価するのに有効な手段であることが示唆された。

## D. 考察

これまでの前向き調査により、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罹患群より有意に大きいことが明らかにされた。こ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がんの発生するリスクが高い可能性を示唆している。今回、この個人差の遺伝的背景を模索するために、一連の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遺伝子の多型を調べ、GPA Mfの線量効果との関係を解析した。その結果、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。

放影研では、約7,000名の成人健康調査対象者から末梢血単核球が分離、凍結保存されている。また、その多くの対象者から遺伝子解析研究ならびに遺伝子型と疾患あるいは生物学的指標との関連を調べる研究についての同意が既に得られている。今回確立された試験管内放射線感受性試験は凍結保存単核球に応用可能であり、同等の線量を受けたと推定される被爆者でGPAMfに高値を示したグループと低値を示したグループとの間で試験管内放射線感受性を比較することが可能である。今後、被爆者の試験管内放射線感受性とGPAMfデータとの関係ならびに修復関連遺伝子の多型との関連を解析することによって、放射線誘発遺伝子傷害の個体差を規定する遺伝子を明らかにし、放射線による発がんリスクの高い集団の同定を試みる方針である。

#### E. 結論

原爆被爆者の放射線誘発GPA変異体頻度の個人差にATM遺伝子の多型が関係する可能性は低いと考えられた。

培養T細胞を用いた試験管内放射線感受性をリン酸化ヒストン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確立した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

Kyoizumi S, Kusunoki Y, Hayashi T, Hakoda M, Cologne JB, Nakachi K. 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.* 2005;65:5462-9.

Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. Identification of the *NKG2D* haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res.* 2006;66: 563-70.

Kubo Y, Yamaoka M, Kusunoki Y. A preliminary study measuring the number of T-cell receptor-rearrangement excision circles (TRECcs) in peripheral blood T-cell populations of A-bomb survivors and control populations. *Cytometry Res*, in press.

##### 2. 学会発表

Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y, Nakachi K, Tahara E: Radiation exposure affects immunogenetical risk of stomach cancer among atomic bomb survivors. The 96th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(AACR), 16 -20 April 2005, Anaheim, California, USA

Hamasaki K, Kusunoki Y, Kodama Y, Takahashi N, Nakachi K: Evaluation of human radiation sensitivity using flow cytometry of phosphorylated histone H2AX in cultured T lymphocytes. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, 3-8 September 2005, San Francisco, California, USA

Kusunoki Y, Kyoizumi S, Hayashi T, Hakoda M, Cologne JB, Nakachi K: Prospective study on the relationship between erythrocyte glycophorin a gene mutations and cancer development among atomic-bomb survivors. The 9th International Conference on Environmental Mutagens, 3-8 September 2005, San Francisco, California, USA

Kusunoki Y, Hayashi T, Nakachi K: T-cell homeostasis and inflammatory response among atomic-bomb survivors. International Symposium on Low-Dose Radiation Exposures and Bio-Defense System, 28-30 September 2005, Aomori



Hayashi T, Morishita Y, Nagamura H, Imai K, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K, Tahara E: 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, 29 November -3 December 2005, Melbourne, Australia

Hayashi T, Morishita Y, Nagamura H, Kubo Y, Kasagi F, Kusunoki Y, Hakoda M, Kyoizumi S, Fujiwara S, Nakachi K: Effects of atomic-bomb radiation on human immunological response: Long-term elevation of inflammatory markers. The International Cytokine Society Conference 2005, 27-31 October 2005, Seoul, Korea

Hamasaki K, Kusunoki Y, Takahashi N, Nakachi K, Kodama Y. 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, 21-22 November 2005, Kyoto

林 奉権, 今井一枝, 楠 洋一郎, 中地 敬. 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, 2005年11月15-17日, 東京

楠 洋一郎, 久保美子, 山岡美佳, 林 奉権, 中地 敬. 原爆被爆者末梢血T細胞集団のT-cell receptor-rearrangement excision circles (TRECs)の測定. 第15回日本サイトメトリー学会学術集会, 2005年7月1-2日, 名古屋

濱崎幹也, 楠 洋一郎, 児玉喜明, 高橋規郎, 中地 敬. 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, 2005年9月19-22日, 倉敷

楠 洋一郎, 林 奉権, 中地 敬. 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, 2005年12月13-15日, 横浜

楠 洋一郎, 林 奉権, 今井一枝, Cologne JB, 箱田雅之, 京泉誠之, 中地 敬. 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,

2006年2月24-25日, 東京

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

## 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

損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ Y ファミリーの一つである XPV の機能不全が色素性乾皮症の原因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。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、REV1 タンパク質は 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。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思われる。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である。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 であることを示唆している。

### 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その解明を行う。本年度は、「translesion DNA 合成」におけるヒト REV1 タンパク質の役割を解明するため、ヒト REV1 タンパク質の新しい機能の解析を進める。

### 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, Pol  $\alpha$ 、Pol  $\beta$ 、及び Pol  $\eta$  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。その為、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。Pol  $\alpha$ 、Pol  $\eta$  の cDNA は名古屋大学の鈴木元先生と大阪大学の花岡文雄先生からそれぞれ供与を受けた。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。

#### (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 の生化学的解析により、REV1 タンパク質が ssDNA に高い親和性をもつことが明らかとなった（図 1 A）。図 1 A は REV1 の ssDNA 結合反応をゲルシフト法により検出した結果を示した。興味深いことに ssDNA との見かけ上の親和性は ssDNA の長さに依存して高くなった（図 1 A）。次に、ssDNA が REV1 の dCMP 転移反応に及ぼす影響を調べるために、ssDNA の存在下での酵素活性を測定した（図 1 B）。その結果、ssDNA はきわめて低い濃度で REV1 の dCMP 転移反応を阻害することが分かった。この阻害は ssDNA の長さに依存して強くなり（図 1 C）、ssDNA との見かけ上の親和性（図 1 A）と相関する結果を得た。この結果は、ssDNA が REV1 に結合することによって dCMP 転移反応を阻害

していることを示唆した。そこで、REV1 の ssDNA 結合領域を同定する目的で、REV1 の欠失変異体を作成し（図 1 D）、ゲルシフト法によりそれら欠失変異体の ssDNA 結合活性を測定した（図 1 E）。その結果、作成した全ての欠失変異体が同等の ssDNA 結合活性をもつことが分かった（図 1 E）。この結果は、REV1 の ssDNA 結合領域は全ての欠失変異体に共通する 341 番目から 829 番目までの領域にあることを示している。この領域は野生型 REV1 と同等の活性をもつ最小 REV1 として同定した領域である。次にこれらの欠失変異体の酵素活性が ssDNA によって阻害されるかについて調べた。すると不思議なことにこれら変異体が同等の ssDNA 結合活性をもつにもかかわらず（図 1 E）、阻害効果には大きな違いが見いだされた（図 1 F）。特に欠失変異体  $\Delta$ #5（図 1 D）はほとんど阻害されないことが明らかとなった（図 1 F）。そこで、REV1 と ssDNA との結合と、REV1 とプライマーテンプレートとの結合を競合させ、見かけ上の結合安定性を測定した。32P で標識した ssDNA と REV1 との結合を解析したゲルシフトにおいて、標識していないプライマーテンプレートを様々な濃度で添加し、その影響を測定した（図 1 G）。その結果、欠失変異体  $\Delta$ #5 は ssDNA との結合が見かけ上不安定であることが分かった（図 1 G、H）。これらの結果から、欠失変異体  $\Delta$ #5 が ssDNA により阻害されない原因が、ssDNA との結合の不安定性にあることが推察された。一方、野生型の REV1 では N-末端と C-末端の領域によって ssDNA との結合が安定化していることが示唆された。

これまでの実験は、REV1 が dCMP を転移するプライマーテンプレートに対してトランスに ssDNA を添加した際の影響を観察したものであったが、次にはプライマーテンプレートが長い ssDNA

領域をもつ場合の影響について観察したいと考えた。そこで、テンプレートの長さの違う2種類のプライマーテンプレートを作成した(図1I)。その一つ(13-mer/30-mer)は通常の酵素反応測定用の基質であり、もう一つはテンプレートの5'末端にTCを31回繰り返す配列を連結させた長いssDNA領域をもつ13-mer/91-merである(図1I)。まず、このプライマーテンプレートに連結したssDNA領域がREV1の反応を阻害するかどうかを、通常の反応条件に13-mer/30-merまたは、13-mer/91-merをトランスに添加して測定した(図1J)。その結果、13-mer/91-merはREV1のdCMP転移反応を阻害することを確認した(図1J)。次に、これらのプライマーを32Pで標識し、そのプライマー末端にdCMPが重合されるかどうかを観察した(図1K)。図1KはdCMP転移反応の経時変化をプロットしたものであるが、どちらのプライマーテンプレートも酵素反応の基質として利用されることが分かった。反応に使用したREV1の量は35 fmolであり、15分間の反応時間に少なくとも5回は酵素がターンオーバーしていることが分かる。さらに、このときのプライマーテンプレートの濃度は図1Jの点線で示した濃度、20 nMであり、この濃度の13-mer/91-merがトランスに存在した場合にはREV1のdCMP転移反応が完全に阻害されることが分かっている(図1J)。これらの結果は鋳型鎖上にシスに存在するssDNAはREV1の酵素活性を阻害しないことを示している。この現象をさらに詳しく調べるために、13-merとは長さや配列の違うプライマーをもつプライマーテンプレート(17-mer/33-mer、図1I)を作成した。これらの三つのプライマーテンプレートそれぞれとREV1を反応させると全て同等にdCMPが重合される(図1La-c)。次に13-mer/30-merと17-mer/33-mer

を1つの試験管内で同時に反応させるとREV1は両方のプライマー末端に同様にdCMPを重合した(図1Ld)。ところが13-mer/91-merと17-mer/33-merを1つの試験管内で同時に反応させた場合には、17-merの末端にはdCMPが全く重合せず、13-merの末端だけに選択的にdCMP転移反応が観察された(図1Le)この実験を欠失型の変異REV1で行ったところ、ssDNAによって阻害されない欠失変異体Δ#5では上記のような選択性が消失することが分かった(図1M)。同様の実験を他のDNAポリメラーゼ、Pol α、Pol β、Pol ηで行ったところ、テンプレートの長さによる選択性は観察されず、上記の特性がREV1特異的であることが判明した。

#### 考察

高発がん性の色素性乾皮症バリエーション(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解明するためヒトREV1蛋白質の生化学的な機能解析を進めている。

昨年度の解析の結果、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。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