

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17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: 082-261-3131 FAX: 082-263-7279

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 顧問研究員
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
	藤原佐枝子	(財) 放射線影響研究所 臨床研究部長
	大石 和佳	(財) 放射線影響研究所 臨床研究部臨床検査科長
	林 奉権	(財) 放射線影響研究所 放射線生物学/分子疫学部 免疫学研究室長
	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
研究協力者	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

目 次

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 1
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 13
安井 弥
2. 1) 腫瘍抑制因子RUNX3の乳がんにおける不活性化
2) OSNA 法を用いたリンパ節微小がん転移の迅速検出 18
谷山 清己
3. 生活習慣改善支援ツールの開発に関する研究 ―がんリスク評価チャート― 21
笠置 文善
児玉 和紀
4. 保存血清を使った胃がんのコホート内症例・対照研究 25
藤原佐枝子
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
大石 和佳
藤原佐枝子
6. 長期追跡集団におけるがん三次予防に関する疫学研究 35
西 信雄
児玉 和紀
7. 免疫学的発がん高危険群の同定 40
林 奉権

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 47

IV. 研究成果の刊行物・別刷 51

1. 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

主任研究者 田原 榮一（財）放射線影響研究所 顧問研究員

本プロジェクトは三つの大きな柱からなり、本年度の研究成果は以下の如く要約される。

1) 消化管がんの新規がん予防、早期発見システムの開発では、胃がんと主要な正常臓器の SAGE (serial analysis of gene expression) ライブラリーの比較および定量的 RT-PCR 法により、54 個の候補遺伝子から少なくとも 8 種類のがん特異的発現遺伝子を同定した。その内、RegIV および MMP-10 は分泌蛋白をコードしており、免疫染色で 30-40%の胃がんにおいて陽性を示した。さらに、ELISA により胃がん患者および非がん対象者について血清レベルを測定したところ、RegIV は 36%、MMP-10 は 94% において高値を示し、特異性はそれぞれ 99%、85%であった。両者ともにステージ 1 症例においても高い陽性率であり、早期診断の新しい腫瘍マーカーと見なされた。被爆者コホート症例について、経年的に血清レベルを測定したところ、RegIV は予防マーカーとして有用性であることが示された。

染色体の末端のテロメアの短縮や G-tail の短縮によるテロメアの機能障害が、染色体の不安定化を増大させ、がん化のリスクを上げる可能性が指摘されている。そこで今回、我々はこれまでのどの測定法よりも操作が簡単かつ迅速で、がんの早期診断、リスク評価に役立つハイスループットスクリーニングも可能な測定法 G-tail telomere hybridization protection assay (GT-telomere HPA)の開発に成功した。RUNX3 は胃がんのみならず乳がんでも高頻度に不活化されていることを明らかにした。

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では、

(1) 一次予防研究：野菜の日常的摂取や禁煙とがんリスクとの関連の時系列的検討を実施し、長期的持続的な生活習慣の改善ががん抑制要因となっていることを明らかにしてきた。このことは、早期の生活習慣改善への実行ががん一次予防には肝要であることを示唆している。そこで、本年度は、がんリスク評価チャートの作成した。本チャートは、生活習慣と個人のがんリスクとの関連度合を確率表示したものであり、自己のがんリスクが見た目で容易に把握され個々人の生活習慣改善行動への動機付け支援ツールとして有用である。(2) 二次予防研究：胃がん発症における、*H. pylori* 感染、慢性萎縮性胃炎との関係を、放射線影響研究所（放影研）の成人健康調査集団の保存血清を使ったネスティッド症例対照研究（胃がん症例357名、対照者1071名）で検討した。低分化腺がん・印環細胞がん・硬性がん（びまん型）と乳頭腺がん、管状腺がん（腸型）で各リスク要因の関与および寄与度が異なった。腸型では、血清診断の萎縮性胃炎あるいはそのトレンド（診断前平均2.3年と10年前の比較）、*H. pylori* 陽性CagA 低力価はリスク要因であるが、放射線、喫煙とは関係がなかった。びまん型で

は、放射線被曝、喫煙、血清診断の萎縮性胃炎あるいはそのトレンド、*H. pylori* 陽性CagA 低力価は独立したリスク要因であった。次に、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では、成人健康調査集団の中で、保存血清が利用可能な肝細胞がん（肝がん）症例224名と対照者の644名について線維化マーカー（ヒアルロン酸、IV型コラーゲン）、フェリチン、肝炎ウイルスの感染状況の解析を行った結果、放射線を考慮した肝炎ウイルス別の肝がん発症における相対リスク、および線維化マーカー、鉄沈着、血小板数、肥満度、飲酒、喫煙、糖尿病合併などの危険因子における相対リスクが得られた。（3）三次予防研究：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）集団のうち、主たるがん罹患者の生存率に影響する因子について分析した結果、女の胃がん、大腸がん、肝がんにおいて発症後の喫煙習慣が予後と有意に関連していた。

3) 免疫学的発がん高危険群の同定では、本年度*IL-10*遺伝子の多型と胃発がんとの関連を明らかにするために、成人健康調査コホート研究で見出された胃がん症例群238人（放射線非被曝者89人、被曝者149人）と対照群1,757人（非被曝者749人、被曝者1,008人）による症例対照研究を行った。その結果、*IL-10*遺伝子のプロモーターを含む領域に存在する特定のハプロタイプ（*IL10-GGCG, IL10-ATTA*）を有する集団が胃がん発症のオッズ比が統計学的に有意に高く、対照群で血漿中*IL-10*レベルがこのハプロタイプと関連することを見出した。血中*IL-10*濃度は遺伝的影響だけでなく放射線被曝の影響によっても増加し、胃がんリスクと密接に関係していると考えられた。血中*IL-10*濃度は、リアルタイムでの胃がんリスクを表すことから、胃がん予防の代理指標として有望であると考えられた。

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）、藤原佐枝子（放射線影響研究所 臨床研究部長）、大石和佳（放射線影響研究所臨床研究部 臨床検査科長）林 奉権（放射線影響研究所放射線生物学/分子疫学部免疫学研究室長）、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）

研究協力者

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）

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 (安井)

著者らが公表している胃癌 SAGE ライブラリー (GSM8867, GSM8505, GSM7800, GSM9103) と SAGEmap データベース中の 14 の正常臓器 (大脳白質、小脳、視床、脊髄、心臓、肺、胃、大腸、肝臓、腎臓、腹膜、骨格筋、リンパ節、白血球) のライブラリーを比較し、胃がんライブラリーで発現があり正常臓器で全く発現のない遺伝子を抽出した。遺伝子発現の実際の組織における mRNA 発現の確認は、定量的 RT-PCR 法によって行った。用いた試料は、RT-PCR 法では、14 の正常臓器 (大脳、脊髄、心臓、肺、胃、小腸、大腸、肝臓、等) と 44 例の胃がんの腫瘍部と非腫瘍部の新鮮凍結組織である。正常臓器における最高レベル(A)とがんにおけるレベル(B)の比 (B/A) が 10 以上を高特異性とした。また、MMP-10、RegIV 蛋白のがん組織および正常組織における発現 (組織における蛋白の発現は、各特異抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。免疫染色では、消化管粘膜を含む代表的な正常臓器および 151 例の胃がんのホルマリン固定パラフィン切片を用いた) と MMP-10、RegIV 蛋白の血清および腹腔洗浄液における測定 (血清あるいは腹腔内洗浄液における蛋白レベルの測定は、ELISA 法により行った。血清値の測定には、健常者、胃炎患者、胃癌患者から得られた血清を使用した)。

(2) 乳がんにおける RUNX3 の発現 (谷山)

浸潤性乳管がん 168 例を対象として、抗 RUNX3 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的発現解析を行った。エピジェネティックな不活化機構としての RUNX3 の 5' 領域 CpG island のメチル化状態を methylation-specific PCR 法により解析した。

(3) G-tail telomere の新しい測定法の開発 (田原栄俊)

Hybridization protection assay を用いて G-tail telomere HPA を開発した。

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) 一次予防研究—がんリスク評価チャート— (笠置、児玉)

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。この寿命調査対象者の喫煙習慣や食習慣など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。

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、1979年をベースラインとして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。食道がんと胃がん死亡をエンドポイント事象とし、性、年齢、果物や野菜摂取、味覚などの食習慣、喫煙などの要因との関連付けをCox比例ハザードモデルを用いて行った。ベースライン時に個人の持っている生活習慣の状況に応じて、食道がんや胃がんの死亡確率を求めるために、まず生存確率を推定した。Cox比例ハザードモデルの下では、要因 x を持っている人の時間 t における生存確率 $S(t:x)$ は、 $S(t:x) = [S_0(t)]^{\exp(\beta x)}$ で与えられる。ここで、 $S_0(t)$ は、基準ハザードに対応する生存率である。更に、集団での要因の平均 \bar{x} を用いて表せれば、 $S(t:x) = \{[S_0(t)]^{\exp(\beta \bar{x})}\}^{\exp(\beta(x-\bar{x}))}$ となる。右辺の $[S_0(t)]^{\exp(\beta \bar{x})}$ は、対象集団での要因の平均 \bar{x} を持っている人の時間 t における

生存率になっている。従って、要因の平均 \bar{x} の生存確率 $[S_0(t)]^{\exp(\beta \bar{x})}$ を求めれば、それを $\exp(\beta(x-\bar{x}))$ 乗した形で、要因 x に対応した生存確率 $S(t:x)$ が推定されることになる。死亡確率は、従って、 $1-S(t:x)$ である。このようにして、要因 x に対応した死亡確率が推定される。回帰係数 β および基準ハザード $\lambda_0(t)$ に対応する生存率 $S_0(t)$ は、統計ソフトSASを用いて推定した。

(2) 保存血清を使った胃がんのコホート内症例・対象研究 (藤原)

今回の調査対象者は、放影研の成人健康調査集団で1970年から2001年の間に診断された一次胃がんで、かつ1-5年前に血清を有していた症例357例である。胃がんの診断は、広島の腫瘍組織登録および長崎のがん登録の情報を利用した。対照者は、症例1に対し3例を、年齢、性、都市、血清保存状態を一致させ、線量については、カウンターマッチング法で選んだ。対照者は1071名選出された。

胃がん診断前の血清を使って、*H.pylori* IgG, Cag A IgG, ペプシノーゲンI, II (PG I, II) を測定した。*H. pylori* IgG 血清診は、AutoAce *H.pylori*G EIAキット (Azwell Mesco, 大阪)、CagA IgG 血清診断は、CagA IgG EIA WELL (Radim, ローマ、イタリア) を使った。このキットの、CagA 抗原は全配列を含むリコンビナント CagA (欧州株) を用いている。*H.pylori* IgG陽性者をCagA IgG抗体価により3分割 (陰性群、低値群、高値群) して解析した。

慢性萎縮性胃炎の血清診断は、三木の診断基準の萎縮性胃炎(2+)の診断基準 (PG I が50mg/L未満 かつ PG I / PG II 比 3 未満) を使った。

喫煙、飲酒などのライフスタイルに関

する情報は、がん診断前の質問票による情報を使った。解析は、コンディショナル回帰分析を用いた。

(3) 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象研究 (大石、藤原)

成人健康調査集団の中で保存血清が利用可能な肝細胞がん (HCC) 症例224人と、これらの症例と、年齢、性、都市、血清保存時期を一致させ、放射線被曝の有無に基づくコホート内層化抽出法を用いて1症例に対し3人の対照者(664人)を選出し、コホート内症例・対照研究を行う。

HCC診断直前と診断前10年前の保存血清を用いて以下の項目について検討する。

- 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)、HCV感染 (HCVAb, HCV genotype, HCV RNA 定量/定性)

次に、成人健康調査と寿命調査(LSS)データベースから以下の情報を取得する。

- ③ 血小板数、放射線量、飲酒歴、喫煙歴、肥満度 (BMI)、糖尿病合併

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法を開発して測定した。

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ため、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、放射線量および各種リスク要因がHCC発症に及ぼす影響は、過

剩相対リスクモデルを使って解析した。

(4) 三次予防研究 (西、児玉)

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)であった。

がんの罹患は広島市医師会腫瘍統計事業(2005年4月より広島市地域がん登録事業)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月分までを把握した。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、主要な部位として胃、大腸、肝、肺、乳房(女)について、コックスの比例ハザードモデルを用いた解析を行った。統計ソフトはSPSS13.0Jを用いた。

3) 免疫学的発がん高危険群の同定(林)

成人健康調査コホート研究で見出された胃がん症例群238人(放射線非被曝者89人、被曝者149人)と対照群1,757人(非被曝者749人、被曝者1,008人)による症例対照研究を行なった。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*遺伝子の変異アレル頻度が日本人集団で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)を用いて遺伝子型を決定する。このアッセイは検討する多型部位での2つの対立遺伝子の一方に特異的な蛍光プローブを用い、これを切断するTaqDNA polymeraseの5'-3'ヌクレアーゼ活性を利用している。蛍光の検出と遺伝子型の決定はABI Prism 9700HT sequence detector (PE Applied Biosystems)を用いて行った。血中*IL-10*レベルはELISAアッセイキットを用いて測定した。

dbSNPに登録された*IL-10*遺伝子の10個の多型について、450名を対象に多型解析を行い、連鎖不平衡解析を行った。各ブロックにおけるhaplotypeの推定はexpectation-maximizationアルゴリズムによりSNPAlyzeを用いて行い、haplotypeの約90%をカバーし得るSNPをhaplotype tag SNP (htSNP)として選出し、各SNPおよびhaplotype頻度の比較はSPSSを用いて行った。症例と対照者における遺伝子多型の対立遺伝子頻度は、SPSSソフトウェアプログラムを用いて、カイ二乗検定とオッズ比により比較した。ハプロタイプ頻度はがん症例と対照者間で比較し、統計的有意性はSNPAlyzeを用いたpermutation法およびSPSSにより調べた。

C. 研究結果

1) 消化管がんの新規予防、早期発見システムの開発

がんの特異的に発現する新規遺伝子を同定し、新しい診断マーカーとする目的で、我々の胃がん SAGE ライブラリー

(GEO accession no. GSE545)と主要 14 臓器（心臓、肺、肝臓、脳など）のそれとの比較により 54 個の候補遺伝子を抽出した。実際のがん組織および正常臓器を試料とした定量的 RT-PCR 法によって、APIN, TRAG3, CYP2W1, MIA, MMP-10, DKK4, GW112, RegIV, HORMAD1 の 9 遺伝子が胃癌特異的であることを見出した。その内、MMP-10 および RegIV では、免疫染色において発現を検討し、MMP-10 の発現が悪性度と不良な予後と相関することを見出した。RegIV では、胃癌の他に、大腸がん、膵がん、消化管カルチノイドが陽性であった。さらに、MMP-10 と RegIV については ELISA により血清レベルを測定し、胃癌患者中 RegIV では 36%、MMP-10 では 94% が高値を示し sensitivity に優れた診断マーカーとみなされた。経時的に採血された胃癌症例の retrospective な解析では、診断より 3 年前から RegIV の上昇した症例も見出された。一方、SAGE データの比較から新しいがん抑制遺伝子の候補として claudin-18 を同定し、胃癌の 60-70% において発現の低下／消失を確認した。TNM 分類、p53 の発現との相関はなかったが、claudin-18 発現減弱症例は発現保持症例と比較して有意に予後不良であった（安井）。

胃癌の腫瘍抑制遺伝子 RUNX3 の乳癌発がんにおける関与を明らかにするために、乳がんにおける RUNX3 の不活性化の有無およびその機構について解析した。抗 RUNX3 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的発現解析により、乳がん症例 168 例中 RUNX3 の正常な核における染色は、わずか 29 例(17%)のみにしか認められなかった。一方で、RUNX3 の発現消失および細胞質への局在異常は、

各々 63 例(38%)および 76 例 (48%)に認められ、RUNX3 は乳がん極めて高頻度(86%)に不活化されていることを明らかにした。発現消失の原因となる機構として RUNX3 の 5'領域 CpG island のメチル化状態を methylation-specific PCR 法により解析したところ、メチル化異常が存在すること明らかにした。RUNX3 はエピジェネティックな異常によるサイレンシングおよび蛋白質の局在異常により、胃癌だけでなく乳がんでも高頻度に不活化されていることから、乳癌発がんにも関与している可能性が示唆された（谷山）。

G-tail telomere hybridization protection assay は、ヒト G-tail を簡便・高感度・定量的に測定でき、しかも genomic DNA と同様に cell lysates の分析にも使用できる（田原栄俊）。

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：生活習慣改善を通してがんの予防方策を探索するという立場から、野菜の日常的摂取や禁煙とがんリスクとの関連の時系列的検討を実施し、長期的持続的な生活習慣の改善ががん抑制要因となっていることが明らかになった。このことは、生活習慣改善への早期の取り組みががん一次予防には肝要であることを示唆している。そこで、本年度は、早期の生活習慣改善行動を促す動機付け支援ツールとして、がんリスク評価チャートの作成を行った。本チャートは、個人の持つ生活習慣とがんリスクとの関連を確率表示したものであり、がんリスクからみた自己の位置が見た目で容易に把握されるとともに、生活習慣変容によるリスクの変化も読み取りことができる。本チャートは、生活習慣

改善や予防対策を講ずる現場に応用することができ、広く国民の健康増進に役立つものと期待できる（笠置、児玉）。

(2) 胃癌発症における、*H.pylori* 感染およびその他の危険因子と関係を成人健康調査集団の保存血清を使ったコホート内症例対照研究で検討した。対象は、胃癌357例と年齢、性、都市、血清保存状態を一致させ、原爆放射線被ばく線量はカウンターマッチング法で対象者1071例を選んだ。解析は、コンディショナル回帰分析を用いた。*H.pylori* 陽性CagA陰性、*H.pylori* 陽性CagA低抗体価、*H.pylori* 陽性CagA高抗体価、ペプシノーゲンによる血清判定の萎縮性胃炎、喫煙は、独立した有意な胃がんのリスク因子であり、胃被ばく線量は、示唆レベルのリスク要因 ($p=0.057$) であった。全胃がんを非噴門がんに絞ると、*H.pylori* 陽性CagAの相対リスクは少し上がったものの、リスク因子に変わりはなかった。Diffuse type非噴門部がんは、放射線被曝、喫煙、血清診断の萎縮性胃炎、*H.pylori* 陽性CagA（陰性、低力価、高力価）は独立したリスク要因であった。しかし、Intestinal type非噴門部がんでは、血清診断の萎縮性胃炎、*H.pylori* 陽性CagA 低力価はリスク要因であったが、放射線、喫煙とは関係がなかった。結論として、*H.pylori* 陽性CagA陰性、*H.pylori* 陽性CagA低抗体価、*H.pylori* 陽性CagA高抗体価、萎縮性胃炎、喫煙、胃被ばく線量は、独立した胃がんのリスク因子であった。Diffuse type非噴門部がんとIntestinal type非噴門部がんにおける、各リスク要因の関与は異なった（藤原）。

次に肝細胞癌(HCC)への進行促進要因を検証するために、放影研の成人健康調査集団の保存血清を用いて、コホート内

症例・対照研究を行った。HCC症例224例、対照は1症例に対し3人の対照者を選択した。本年度は、昨年度に確立した高感度・ハイレンジな定量系を用いたB型肝炎ウイルス (HBV) およびC型肝炎ウイルス (HCV) の定量とHCV RNA定性、HBVとHCVのgenotypeについて解析を終了し、AHSと寿命調査集団(LSS)データベースからの疫学情報、生活習慣情報の取得を行った。肝炎ウイルス、原爆放射線被曝、肝線維化、肥満度 (BMI) 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多変量解析を行った。HBV単独感染者で30倍(95%CI: 11-77)、HCV単独感染者で67倍(95%CI: 30-152)、HBVとHCVの重複感染者で36倍(95%CI: 5.2-243)、放射線量1Gyでの相対リスクは1.4倍(95%CI:1.0-2.1, $P=0.065$)であり、HBV感染、HCV感染、放射線は、それぞれ独立したHCC発症のリスク要因であった。また、HBVおよびHCV感染の有無にかかわらず、肝線維化、HCC診断10年前の高いBMIはそれぞれHCC発症に寄与するリスク要因であることが明らかになった（大石、藤原）。

(3) 三次予防：放影研が長期の追跡調査を行っている原爆被曝者（寿命調査）集団において、1978年の郵便調査以後に胃がん、大腸がん、肝がん、肺がん、乳がん（女）に罹患した者を対象として研究を実施した。昨年度の研究では予後悪化因子として喫煙習慣について検討し、女の胃がん、大腸がん、（1978年当時の）現在喫煙者は非喫煙者に比べて予後が有意に不良であることを示した。今年度は予後改善因子として飲酒習慣について検討したところ、男の肝がん、女の胃がんおよび乳がん、習慣飲酒者は非飲酒者に比べて全死因でみた予後が有意に

良好であった。また果物および野菜の摂取頻度と予後の関連をみたが、男女のいずれの部位においても果物や野菜を多く摂取していた者ほど予後が良好であるという結果は得られなかった。以上の結果より、がん発症前の生活習慣が予後規定因子となることが示された（西、児玉）。

3) 免疫学的発がん高危険群の同定

がんの発症が宿主免疫系における免疫監視機構によって抑制され得ることを示唆する多くの報告がなされてきた。しかし、ヒト一般集団での発がんにおける免疫的防御の役割やその遺伝的背景については明らかでない。本研究の目的は発がんの免疫防御機構、宿主の免疫機能と持続性炎症の関係、持続的炎症と発がんの関係、免疫学的宿主要因に及ぼす放射線被曝と加齢の影響、放射線発がん感受性の個体差さらにこれらの現象の遺伝的要因を明らかにすることである。今回、我々は被曝者コホート研究で放射線被曝との関連が報告されている胃がんについて、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* 遺伝子多型をマーカーとしてハプロタイプ解析及び血中 *IL-10* レベルとの関連を調べた。被曝者を対象として放影研で行っている成人健康調査コホート研究に基づき、胃がん発症群(238例)と対照群(1,757例)について検討を行った。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 (*IL10-ATTA* および *IL10-GGCG* の2つのアリルが形成される)を見出した。*IL10-GGCG* のアリルのホモ接合であるハプロタイプ *IL10-GGCG/IL10-GGCG* をもつ人は、*IL10-ATTA/IL10-ATTA* の人に比べ胃がん発症のオッズ比が放射線非被曝群で2.46

(95%CI 1.28 - 4.70)と有意に高く、*IL10-GGCG/IL10-GGCG* の放射線被曝群では胃がんリスクはさらに増加した。また、対照群の非被曝者群で *IL10-ATTA/IL10-GGCG*、*IL10-GGCG/IL10-GGCG* の血中 *IL-10* 濃度は *IL10-ATTA/IL10-ATTA* に比べ各々有意に高い値を示した。*IL10-ATTA/IL10-ATTA* の非被曝者と被曝者の血中 *IL-10* 濃度を比べたところ、被曝者は高値を示したことから、血中 *IL-10* 濃度は遺伝的影響だけでなく放射線被曝の影響によっても増加し、胃がんリスクと密接に関係していると考えられた（林）。

D. 考察

1) SAGE法により新規に同定された RegIV と MMP-10 は、胃がんステージIにおいても血清中検出され、その特異性は99%と85%であり、胃がん早期診断の新しい腫瘍マーカーと見なされた。長期追跡集団症例の胃がん発症（診断前）と発症後（診断後）の RegIV 血清値を検討した結果、RegIV は発症予想あるいは予防マーカーとして有用であることが証明された。今後 MMP-10 についても同様な検討を行う予定である。

2) がんの早期診断、リスク評価に役立つハイスループットスクリーニングも可能な GT-telomere HPA 測定法は、簡単かつ迅速でしかも、限られた量の細胞にも適用でき、今後のがん早期発見の発展性に資するところ大である。

3) 本年度、血中 *IL-10* 濃度が胃がんリスクと密接に関係していることを明らかにし、今後胃がん予防の代理指標として有用と考えられる。現在、胃がんの組織型と血中 *IL-10* との関係について検討中である。

4) 本年度作成した早期の生活習慣改善

を促す動機付け支援ツールとなる食道がん・胃がんのがんリスクチャートは、研究成果の国民への還元の一つとして、広く国民の健康増進に役立つものと期待される。

E. 結論

本研究班は三つの柱からなり、1) では、SAGE法により新規に同定されたRegIVとMMP-10は、胃がんステージIにおいても血清中に検出され、その特異性は99%と85%であり、胃がんの早期診断の新しい腫瘍マーカーと見なされた。また、MMP-10は、胃がんの予後マーカーとしても役立つものである。TelomereのG-Tailを簡便・高感度・定量的に測定できるG-tail telomere HPAを開発した。この新しい方法を用いてのG-tail測定は、様々な老化関連疾患のリスク評価に役立ち、特にがんのリスクを早い段階で検出できるものと期待される。2) の放射線影響研究所長期追跡集団における一次がん予防研究から作成した食道がん・胃がんのがんリスクチャートは、早期の生活習慣改善を促す動機付けとなり、今後のがん予防対策を講ずる現場に応用することができる。3) では、*IL-10*遺伝子のハプロタイプの解析から血中*IL-10*レベルは、遺伝的影響のみならず放射線影響によっても増加し、胃がんリスクと密接に関連することを見出した。

以上、これらの研究成果を包括的に組み合わせることによって、胃がん予防のよいモデルが確立されることを提唱したい(図1)。

F. 健康危険情報

H.pylori 感染によって胃がんリスクは2-3倍になる。(「保存血清を使った胃がん

のコホート内症例・対照研究」による)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tahara E, Lotan R. RUNX3 and Retinoic Acid Receptor β DNA Methylation as Novel Targets for Gastric Cancer Therapy. *Current Cancer Therapy Reviews*, 1(2): 139-144, 2005.
2. 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*, 54: 729-740, 2005.
3. Smith M, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *The World Journal of Gastroenterology*, in press.
4. Tahara H, Kusunoki M, Yamanaka Y, Matsumura S, Ide T. G-tail telomere HPA: simple measurement of human single-stranded telomeric overhangs. *Nature Methods*, 2(11): 829-831.
5. Tahara H, Shin-ya K, Seimiya H, Yamada H, Tsuruo T, Ide T. G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene*, in press.

その他、分担研究報告書を参照。

2. 学会発表

1. 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), April 16-20, 2005, Anaheim, California, USA.

2. Tahara E. Comments to Reports for Symposium 2 entitled “Metastasis of Gastroenterological Cancer -Pathology, Molecular Biology, Gene Aberrations and Clinical Application-”. The 16th Annual Meeting of JSGC, October 14, 2005, Kagoshima (Japan).
3. 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, November 29 – December 3, 2005, Melbourne, Australia.
4. 西 信雄, 児玉和紀, 田原榮一. 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, 2005年9月14-16日, 札幌.
5. 鈴木 元, 藤原佐枝子, 児玉和紀, 伊藤玲子, 田原榮一. 放射線発がんにおける胃がん組織型の解析. 第64回日本癌学会総会, 2005年9月14-16日, 札幌.
6. 藤原佐枝子, 大石和佳, 鈴木 元, 田原榮一. コホート内症例対照研究に基づく肝炎ウイルス感染と肝細胞がんリスク. 第64回日本癌学会総会, 2005年9月14-16日, 札幌.
7. 林 奉権, 今井一枝, 楠 洋一郎, 田原榮一, 中地 敬. 免疫学的胃がん高危険群の同定と予防への応用.

第64回 日本癌学会総会, 2005年9月14-16日, 札幌.

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（申請準備中）（大石）

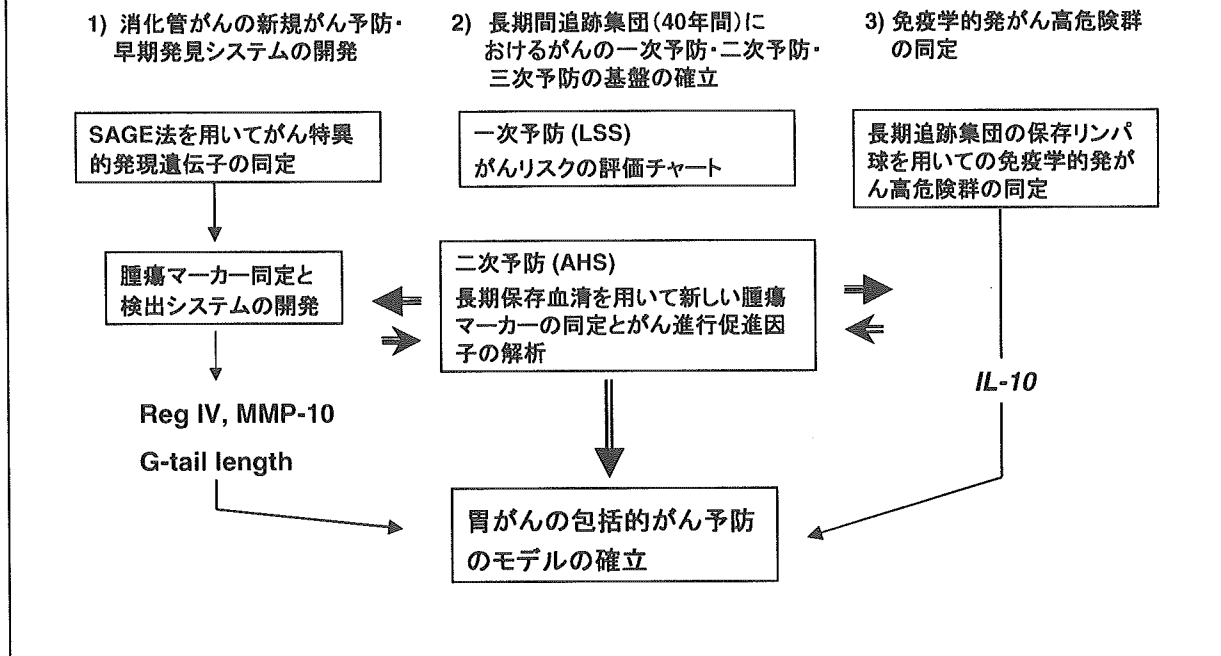
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. 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(田原班)
(H17-3次がん-012)



II. 分担研究報告書

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

がんの特異的に発現する新規遺伝子を同定し、新しい診断マーカーとする目的で、我々の胃がん SAGE ライブラリー (GEO accession no. GSE545) と主要 14 臓器 (心臓、肺、肝臓、脳など) のそれとの比較により 54 個の候補遺伝子を抽出した。実際のがん組織および正常臓器を試料とした定量的 RT-PCR 法によって、APIN, TRAG3, CYP2W1, MIA, MMP-10, DKK4, GW112, REGIV, HORMAD1 の 9 遺伝子が胃がん特異的であることを見出した。その内、MMP-10 および REGIV では、免疫染色において発現を検討し、MMP-10 の発現が悪性度と不良な予後と関連することを見出した。REGIV では、胃がんの他に、大腸がん、膵がん、消化管カルチノイドが陽性であった。さらに、MMP-10 と REGIV については ELISA により血清レベルを測定し、胃がん患者中 REGIV では 36%、MMP-10 では 94% が高値を示し sensitivity に優れた診断マーカーとみなされた。経時的に採血された胃がん症例の retrospective な解析では、診断より 3 年前から REGIV の上昇した症例も見い出された。一方、SAGE データの比較から新しいがん抑制遺伝子の候補として claudin-18 を同定し、胃がんの 60-70% において発現の低下/消失を確認した。TNM 分類、p53 の発現との相関はなかったが、claudin-18 発現減弱症例は発現保持症例と比較して有意に予後不良であった。

A. 研究目的

これまでに、定量性・再現性に優れた網羅的遺伝子発現解析法である Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いて胃がん組織を解析し、世界最大の胃癌 SAGE ライブラリーを完成し (GEO accession no. GSE545: SAGE Hiroshima gastric cancer tissue)、がん化、浸潤、転移に関与する可能性のある多くの遺伝子を報告してきた。がんにもみ発現し、膜蛋白あるいは分泌蛋白をコードする遺伝子は診断の理想的ターゲットであり、さらに、がんの発生や進展に関わる機能を有するものは治療標的にもなり得る。そこで本研究では、胃癌 SAGE ライブラリーと生存に必須の正常臓器のライブラリーを比較して癌特異的発現遺伝子の候補を探索し、定量的 RT-PCR 法、免疫染色、ELISA 法等により、新規の診断・治療

標的の同定を試みた。さらに、がんにおける特異的発現抑制遺伝子についても検討を加えた。

B. 研究方法

1) 新規がん特異的発現遺伝子の同定

著者らが公表している胃癌 SAGE ライブラリー (GSM8867, GSM8505, GSM7800, GSM9103) と SAGEmap データベース中の 14 の正常臓器 (大脳白質、小脳、視床、脊髄、心臓、肺、胃、大腸、肝臓、腎臓、腹膜、骨格筋、リンパ節、白血球) のライブラリーを比較し、胃がんライブラリーで発現があり正常臓器で全く発現のない遺伝子を抽出した。遺伝子発現の実際の組織における mRNA 発現の確認は、定量的 RT-PCR 法によって行った。用いた試料は、RT-PCR 法では、14 の正常臓器 (大脳、脊髄、心臓、

肺、胃、小腸、大腸、肝臓、等) と 44 例の胃がんの腫瘍部と非腫瘍部の新鮮凍結組織である。正常臓器における最高レベル(A)とがんにおけるレベル(B)の比 (B/A) が 10 以上を高特異性とした。

2) MMP-10、REGIV 蛋白のがん組織および正常組織における発現

組織における蛋白の発現は、各特異抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。免疫染色では、消化管粘膜を含む代表的な正常臓器および 151 例の胃がんのホルマリン固定パラフィン切片を用いた。

3) MMP-10、REGIV 蛋白の血清および腹腔洗浄液における測定

血清あるいは腹腔内洗浄液における蛋白レベルの測定は、ELISA法により行った。血清値の測定には、健常者、胃炎患者、胃癌患者から得られた血清を使用した。

4) がん特異的発現抑制遺伝子claudin-18の発現

claudin-18 (CLDN-18)遺伝子は、alternative splicing によって肺特異的 isoform (CLDN-18-V1) と胃特異的 isoform (CLDN-18-V2) が存在するために、それぞれの isoform と特異的に認識する primer を用いて、mRNA 発現を RT-PCR で検討した。組織レベルの発現は、消化管粘膜を含む代表的な正常臓器および胃がん組織のパラフィン切片について抗 claudin-18 抗体を用いた免疫染色で検討した。

(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た。

C. 研究結果

1) 新規がん特異的発現遺伝子の同定

胃がんSAGEライブラリーと正常臓器ライブラリーの比較から、胃がん特異的発現遺伝子の候補として54遺伝子を抽出した。これらの全てにつき、定量的RT-PCR法によって実際の14正常臓器と9例の胃癌組織における発現解析を行ったところ、9遺伝子(APIN, TRAG3, CYP2W1, MIA, MMP-10, DKK4, GW112, REGIV, HORMAD1)が高特異性を示した。胃癌44症例における発現解析では、TRAG3, CYP2W1, MMP-10, GW112, HORMAD1が40%以上で過剰発現し、GW112およびMIAの発現レベルは、T因子、N因子、ステージと有意に相関した。

2) MMP-10、REGIV 蛋白のがん組織および正常組織における発現

MMP-10について、免疫染色で組織における発現を検討したところ、胃癌151例中68例(45%)で陽性であり、非がん部胃粘膜はほぼ陰性であった。MMP-10の発現は、T因子と相関し、58例の進行胃癌症例において、MMP-10の発現と不良な予後との間に有意な相関を認めた。胃がんの悪性度のよい指標になるとみなされる。

REGIVの発現は、胃がん(29%、42/143)、大腸がん(36%、13/36)、膵がん(22%、5/23)、消化管カルチノイド(93%、14/15)に認められたが、肺がん、乳がんには発現は全く認められなかった。胃がんにおけるREGIVの発現は、腸型粘液形質および神経内分泌への分化と有意に相関していた。悪性度との関連では、大腸がんではステージの進行と相関していた。

3) MMP-10、REGIV蛋白の血清および腹腔洗浄液における測定

ELISAによるMMP-10の血清レベルの測

定では、200pg/ml を cutoff とすると、非がん対照者（健常者および胃炎患者）における偽陽性は15% (9/60)、胃がん症例の陽性率は94% (65/69) であり、ステージ2以上では全例陽性であった。腹膜洗浄液では細胞診陽性サンプルのみが高値を示した。極めて感度の高い血清マーカーともなり得ると考えられた。

REGIV 蛋白も ELISA によって血清中で捉えられた。胃がん患者では36% (22/61) に対し、非がん対照者では1% (1/101) のみが陽性であり、ステージ1からも陽性になることから、早期発見の診断マーカーとしては有用とみなされた。経時的に採血された胃がん症例の retrospective な解析では、診断より3年前から REGIV の上昇した症例も見い出された。

4) がん特異的発現抑制遺伝子 claudin-18 の発現

RT-PCRによる mRNA の発現解析において、CLDN-18-V1は肺のみに、CLDN-18-V2は胃および小腸に発現が認められた。正常胃粘膜および担がん患者の非がん部胃粘膜ではすべてにおいて CLDN-18-V2 の発現が認められたが、胃がんでは70%において明らかに発現が低下/消失していた。次に、組織および胃腫瘍における claudin-18 の発現を免疫組織化学的に検討した。正常消化管では、胃のすべての上皮細胞および小腸パネート細胞に発現が認められた。非がん部胃粘膜では一部の腸上皮化生で発現が消失し、胃腺腫の一部においても claudin-18 の発現消失が認められた。胃がんでは、146例中84例 (57.5%) に明らかな発現減弱が認められた。組織型、TNM分類、p53の発現との相関はなかったが、進行がんについてみると、claudin-18発現減弱症例は発現保持症例と比較して有意 ($P=0.0261$) に予後

不良であった。

D. 考察

SAGE法は再現性、定量性に優れた網羅的遺伝子発現解析法である。本研究では、定量的RT-PCRを組み合わせることにより、9個のがんに高特異性を示す遺伝子を同定した。これらは、生存に必須の重要臓器に発現が殆どないことから、診断マーカーとしてのみならず、機能解析をすることによって、副作用の極めて少ない治療標的ともなり得る。MMP-10とREGIVはその可能性が大きいと考えられる。即ち、MMP-10は細胞外基質分解酵素のひとつであり、がんの浸潤に関与することが知られている。REGIVについては、REGIVの胃癌細胞株強制発現系において5-FUによるアポトーシスを抑制し、数種の細胞質内および核内蛋白と相互作用をすること、動物モデル系において腹膜播種を促進することが、我々の機能解析から明らかになっている。

診断マーカーとしての価値に関しては、sensitivityとspecificityが、それぞれMMP-10では94%と85%、REGIVでは36%と91%であった。同一サンプルを用いて測定した既知の腫瘍マーカーのCEAとCA19-9のsensitivityがそれぞれ11%と13%に比較すると極めて高感度である。MMP-10、REGIVどちらにおいても、ステージ1症例も捉えることができた。さらに、重要なことは、胃がん診断以前から経時的に血液サンプルが採取され保存されていた症例の retrospective な解析において、診断より3年前からREGIVの上昇した症例も見い出されたことである。これらのことは、MMP-10とREGIVが胃がんの早期診断の極めて有用な血清診断マーカーであることを示しており、その二次予防に大きく貢献するものと期待される。

E. 結論

SAGE法によって抽出したがん特異的発現遺伝子の内、MMP-10とREGIVは感度の高い血清診断マーカーであり、主要な正常臓器に発現が殆どないことから、その機能を合わせ考えると、格好の治療標的の可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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^{WAF1/CIP1} 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 β , cellular retinol binding protein 1 and tazarotene-induced gene 1 is associated with DNA methylation. *Cancer* 104:1609-1619, 2005
11. Yasui W et al. Molecular-pathological prognostic factor of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 8:86-94, 2005
12. Oue N, Yasui W et al. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer* (in press, 2006)
13. 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)
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* (in press, 2006)
15. Kobayashi T, Yasui W et al. Glycogen synthase kinase-3 and H-prune regulate cell migration by modulating focal