

男について非飲酒者に対する習慣飲酒者・機会飲酒者・禁酒者の全死因による死亡のハザード比をみると、肝がんで習慣飲酒者・機会飲酒者・禁酒者のハザード比が非飲酒者に比べて有意に低かった（表2）。

表2 がん罹患における非飲酒者に対する習慣飲酒者・機会飲酒者・禁酒者の全死因による死亡のハザード比（男）

部位	習慣飲酒者	機会飲酒者	禁酒者
胃	0.77 (0.57-1.02)	0.81 (0.58-1.12)	0.83 (0.54-1.30)
大腸	1.29 (0.80-2.08)	1.15 (0.62-2.13)	1.26 (0.59-2.67)
肝	0.56 (0.38-0.82)	0.52 (0.34-0.79)	0.44 (0.27-0.71)
肺	0.82 (0.57-1.19)	0.94 (0.61-1.45)	0.76 (0.44-1.31)

診断時の年齢、臨床進行度、診断時期で補正（ ）内は95%信頼区間

女について非飲酒者に対する習慣飲酒者の全死因による死亡のハザード比をみると、胃がんと乳がんでハザード比が有意に低かった（表3）。

表3 がん罹患における非飲酒者に対する習慣飲酒者の全死因による死亡のハザード比（女）

部位	習慣飲酒者
胃	0.74 (0.57-0.95)
大腸	1.06 (0.78-1.44)
肝	1.02 (0.73-1.44)
肺	0.88 (0.57-1.37)
乳房	0.60 (0.38-0.94)

表2と同様

2) 果物の摂取

果物の摂取頻度を性別にみると、男は週1回以下が26%、2-4回が37%、毎日が30%、不明が7%、女は週1回以下が13%、2-4回が27%、毎日が55%、不明が5%であった。

男について果物摂取が週1回以下の者に対する週2-4回および毎日の者の全死因による死亡のハザード比をみると、いずれ

の部位においても週2-4回および毎日の者におけるハザード比は有意な低下を認めなかった（表4）。

表4 がん罹患における果物摂取が週1回以下の者に対する週2-4回および毎日の者の全死因による死亡のハザード比（男）

部位	2-4回/週	毎日
胃	1.28 (0.99-1.67)	1.31 (0.99-1.73)
大腸	0.92 (0.60-1.42)	1.22 (0.79-1.87)
肝	0.96 (0.69-1.34)	0.93 (0.68-1.28)
肺	1.02 (0.75-1.39)	1.06 (0.75-1.50)

診断時の年齢、臨床進行度、診断時期で補正（ ）内は95%信頼区間

女について果物摂取が週1回以下の者に対する週2-4回および毎日の者の全死因による死亡のハザード比をみると、いずれの部位においても週2-4回および毎日の者におけるハザード比は有意な低下を認めなかった（表5）。

表5 がん罹患における果物摂取が週1回以下の者に対する週2-4回および毎日の者の全死因による死亡のハザード比（女）

部位	2-4回/週	毎日
胃	1.10 (0.75-1.60)	1.09 (0.77-1.53)
大腸	1.15 (0.69-1.95)	1.16 (0.74-1.82)
肝	0.90 (0.54-1.51)	0.71 (0.46-1.12)
肺	1.27 (0.73-2.21)	1.35 (0.81-2.27)
乳房	0.99 (0.53-1.85)	0.82 (0.47-1.44)

表4と同様

3) 野菜の摂取

野菜の摂取頻度を性別にみると、男は週1回以下が28%、2-4回が41%、毎日が20%、不明が10%、女は週1回以下が20%、2-4回が44%、毎日が28%、不明が8%であった。

男について野菜摂取が週1回以下の者に対する週2-4回および毎日の者の全死因による死亡のハザード比をみると、いずれの部位においても週2-4回および毎日の者におけるハザード比は有意な低下を認めなかった（表6）。

表6 がん罹患における野菜摂取が週1回以下の者に対する週2-4回および毎日の者の全死因による死亡のハザード比(男)

部位	2-4回/週	毎日
胃	1.08(0.84-1.38)	1.20(0.90-1.59)
大腸	0.85(0.55-1.29)	0.77(0.47-1.26)
肝	1.23(0.91-1.66)	0.86(0.60-1.24)
肺	1.11(0.81-1.54)	0.95(0.66-1.37)

診断時の年齢、臨床進行度、診断時期で補正
()内は95%信頼区間

女について野菜摂取が週1回以下の者に対する週2-4回および毎日の者の全死因による死亡のハザード比をみると、いずれの部位においても週2-4回および毎日の者におけるハザード比は有意な低下を認めなかった(表7)。一方、大腸がんにおいて野菜を毎日摂取する者のハザード比が有意に高い結果が得られた。

表7 がん罹患における野菜摂取が週1回以下の者に対する週2-4回および毎日の者の全死因による死亡のハザード比(女)

部位	2-4回/週	毎日
胃	0.95(0.71-1.28)	0.85(0.61-1.18)
大腸	1.40(0.93-2.10)	1.80(1.20-2.70)
肝	0.78(0.53-1.15)	0.79(0.52-1.20)
肺	0.99(0.65-1.52)	1.55(0.96-2.49)
乳房	1.29(0.74-2.23)	1.07(0.58-1.95)

表6と同様

D. 考察

比例ハザードモデルによる解析の結果、発症前の飲酒習慣と予後に有意な関連を認め、男の肝がん、女の胃がんおよび乳がんでは習慣飲酒者は非飲酒者より予後が良好であった。飲酒はアルコール性肝障害により肝がんの危険因子となることが知られているが、今回の分析では臨床進行度を補正したため、予後を改善する因子として結果が得られた可能性がある。なお肝炎ウイルスの感染については、情報が得られていないため、結果の解釈には慎重である必要がある。また比例ハザードモデルで診断時年齢、

臨床進行度などは補正したが、生活習慣間の交互作用などは考慮していないため、多変量解析により異なる結果が得られる可能性がある。

方法でも述べたように今回はDCOの症例も分析に加えたが、女のDCOの症例はDCOでない症例に比べて、現在喫煙者が多く、教育年数が短い者が多い傾向がみられた。ただこのために臨床進行度が不明の割合が多くなり、得られたハザード比が正しく補正されていない可能性がある。

本研究では飲酒習慣は予後改善因子となりうるということが明らかにされたが、果物・野菜の摂取については男女とも摂取頻度の多い者で予後が良好であるという結果は得られなかった。今後は郵便調査で情報の得られた生活習慣間の交互作用についても分析し、予後を規定する因子を総合的に明らかにする必要がある。

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

E. 結論

放影研の寿命調査集団における1978年郵便調査の回答者について、がんの予後規定因子を検討した。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・野菜の摂取頻度と予後の関連では、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。

今後は生活習慣とがんの生存率との関連

について生活習慣間の交互作用についても分析を行い、がんの罹患から死亡にいたる過程での生活習慣の関連について、包括的に検討を行う必要がある。

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.
3. 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

免疫学的発がん高危険群の同定

分担研究者 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

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、我々は被曝者コー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ー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。

A. 研究目的

本研究は、免疫関連遺伝子多型に基づいて発がん高危険群を同定するとともに、放射線被曝による発がんの危険が高い集団を同定することを目的とする。我々はこれまで放射線被曝の免疫機能に及ぼす影響について研究を行ってきたが、原爆被爆から約 60 年経過した今日においても、被曝者にお

いて免疫機能の低下が観察されている。放射線被曝は宿主の免疫系に大きな影響を与えることから、原爆被曝者を対象とした発がん研究は免疫的発がん感受性と放射線感受性の交点としての意義を持つ。

本研究により、従来の薬物代謝・DNA 修復とは異なる視点から、新規の免疫学的発がん高危険群が見出されると期待される。

また、医療放射線への曝露による発がんの予防に資する知見が得られると期待される。

このような観点から、発がん感受性の個人差を免疫的宿主防御に関与する遺伝子の多型によって明らかにすることが重要であると考へ、免疫関連遺伝子の多型と胃がん発症についての研究を進めている。

本年度は、前年度に引き続き、特に、免疫関連遺伝子のうち、抗炎症・免疫抑制性サイトカインとして重要な役割を担っている*IL-10*遺伝子の多型と胃発がんとの関連を調べるとともに、*IL-10*ハプロタイプの胃がんリスクが放射線被曝によってどのような影響を受けるかを調べ、さらに、この多型の機能的意義を*IL-10*の血中濃度を用いて検討した。

B. 研究方法

成人健康調査コーホート研究で見いだ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*遺伝子の変異アリ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。

（倫理面への配慮）

本研究は、所内の研究計画書審査委員会、人権擁護委員会、遺伝子に関する倫理委員会、生物学的試料委員会の審査を受け研究計画は了承されており、国の疫学研究のガイドライン、ゲノム・遺伝子研究のガイドラインに従って行われている。研究においては、すべての検体は匿名化されて解析され、「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」を厳守した。

C. 研究結果

プロモーター領域を含む多型部位10箇所すべての組み合わせについて連鎖不平衡を調べた結果、*IL-10*遺伝子には4つのhtSNPからなるハプロタイプブロックが存在し、2つの主要なハプロタイプアリル（*IL10-ATTA*、*IL10-GGCG*）が形成されていることを見出した。これらハプロタイプにおける胃がん発症のオッズ比を調べたところ、被曝していない集団において、*IL10-GGCG/IL10-GGCG*のハプロタイプをもつ人は、*IL10-ATTA/IL10-ATTA*の人に比べ胃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さらに胃がんリスクが増加した。

さらに、ハプロタイプブロックのhtSNPがプロモーター領域を含む非翻訳領域に存在することから、対照群についてIL-10遺伝子型とIL-10血中濃度との関係を調べた。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*に比べ各々約1.3倍と1.4倍と有意に高い値を示した。また、*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1.3倍の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。

胃がんリスクに対する影響をIL-10ハプロタイプ、広島・長崎の市間での影響、性差、被曝時年齢、被曝線量の各要因について調べた。IL-10ハプロタイプの影響としては、他の要因を補正した場合、*IL10-ATTA/IL10-ATTA*に対して、*IL10-ATTA/IL10-GGCG* および *IL10-GGCG/IL10-GGCG* はオッズ比がそれぞれ1.53, 1.93と有意に高く、また、とその他の要因を補正した場合、市間での影響は認められないが、性差、年齢、被曝時年齢がそれぞれ胃がんリスクに影響を及ぼしているという結果が得られた。

D. 考察

IL-10は機能的に免疫抑制、IL-6, TNF- α , IL-1 β などの炎症に対する抑制サイトカインとして作用するだけでなく、最近、制御性T細胞を誘導することが報告された。

今回、我々の得た結果から、*IL10-GGCG/IL10-GGCG*を持つ集団は、血中IL-10レベルも他のハプロタイプに比べて高く、胃がん発症リスクも高いことから、胃がん高危険

群であることが示唆された。持続性炎症においては、炎症性サイトカインだけでなくいわゆる抗炎症性サイトカインの血中レベルも増加していることが知られており、今回見出されたIL-10の血中レベルと胃がんリスクの相関は、炎症状態の亢進が胃がん要因の一つであることを示唆している。しかし、炎症状態を的確に評価するためには炎症関連サイトカインおよびC-反応性蛋白(CRP)などの炎症関連指標を総合的に測定する必要があり、今後の研究の課題の一つである。

*IL-10*遺伝子は1番染色体の長腕、1q32上にあり、その周辺にはMAP kinaseに関連した遺伝子とIL19、IL20とってIL-10ファミリーに属する抗炎症性サイトカインをコードする遺伝子が存在する。抗炎症性サイトカインであるIL-10蛋白はT細胞、特にTh0/Th2細胞、CD4+CD25+ regulatory T細胞により産生されるほか、単球、マクロファージ、ケラチノサイト、肥満細胞などによっても産生される。IL-10はTh1からのほとんどのサイトカインの産生およびTh1細胞の増殖を阻害することが知られている。また、実験的にIL-10で処理されたマクロファージはTFN- α に限らず、ほとんどの炎症性サイトカインの産生が抑制されることが報告されている。IL-10の炎症性サイトカイン産生抑制の制御機構はまだ完全に理解はされていないが、炎症とがん発症の関係が最近明らかになってきたことから、今回の結果の*IL-10*遺伝子多型が胃がん発症と関係していること、また、その遺伝子多型がIL-10産生の個人差に関係していることから、IL-10の抗炎症作用が胃がん発症に、炎症という観点から重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

以上の結果から、我々は血中IL-10濃度を例として、リアルタイムでの胃がんリスク

を推定し、胃がん予防のモデルが提案できないだろうかということ考えた。すなわち、ここで示したIL-10の血中レベルは遺伝的要因と、ここでは放射線被ばくを例として、環境要因によって影響を受け、このIL-10血中レベルは胃がんリスクと関連があるという結果を得た。この胃がんリスクとバイオマーカーの関係が今後の研究で、さらにその詳細が明らかになれば、胃がん発症の危険性が推定でき、遺伝要因および環境要因からの予防という、革新的予防法の一助になるのではないかと期待している。

今後、さらに、放射線被曝の胃がん発症リスクに及ぼす影響、胃がん発症前のIL-10蛋白レベル、胃がん組織型、および炎症関連サイトカイン、炎症関連指標を調べる予定である。これらの研究と並行して、これまで長年蓄積してきた、原爆被爆者の免疫データとIL-10を含めたその他の免疫関連遺伝子との関係を調べることにより、発がんにおける炎症・免疫の役割を表現型・遺伝型マーカーの両者に基づき多面的に検討する予定である。

E. 結論

抗炎症性サイトカインIL-10の遺伝子多型について解析した結果、IL-10のプロモーター領域を含む4つの多型部位がハプロブロックを形成し、IL10-ATTA/IL10-ATTAの対象者に比べ、IL10-GGCG/IL10-GGCGの血中IL-10レベルが高い値を示し、胃がん発症リスクが有意に高かったことから、IL10-GGCG/IL10-GGCGは胃がん高危険群である可能性が高いと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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: 9771-8, 2005.
3. Kyoizumi, S., Kusunoki, Y., Hayashi, T. Flow cytometric measurement of mutant T cells with altered expression of TCR: detecting somatic mutations in humans and mice. *Methods Mol Biol* 291: 197-204, 2005.
4. 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: 5462-9, 2005.
5. Hayashi, T., Morishita, Y., Kubo, Y., Kusunoki, Y., Hayashi, I., Kasagi, F., Hakoda, M., Kyoizumi, S., Nakachi, K.: Radiation dose-dependent aging of inflammatory status in association with enhanced humoral immunity in atomic bomb survivors. *Am. J. Med.* 118: 83-86, 2005.
6. Hayashi, T., Morishita, Y., Hayashi, I., Masuda, M., Fujita, K., Kusunoki, Y., Jitsukata, K., Nakachi, K.: Rapid and multi-sample determination of reactive

- oxygen species in human sera. *Jap J Clin Lab Automation*, 30:216-220, 2005.
2. 学会発表
 1. Kusunoki, Y., Kyoizumi, S., Cologne, J.B., Hayashi, T., Hakoda, M., Nakachi, K. Erythrocyte glycoprotein A mutant fraction and cancer risk in atomic bomb survivors. Hiroshima Univ. 21st Century COE Program Symposium, 19 January 2005, Hiroshima.
 2. Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, T. Genome-epidemiological approach to immunological host defense against cancer. Hamamatsu Univ. School of Medicine COE Symposium, "Medical Photonics Symposium", 25 January 2005, Hamamatsu.
 3. Imai, K., Hayashi, T., Nakachi, K. Epidemiological evidence of immunological betterness for prevention of cancer and infectious diseases. The 3rd Takeo Wada Cancer Research Symposium, 24 February 2005-25 February 2005, Khon Kaen, Thailand.
 4. Hayashi, T., Imai, K., Kusunoki, Y., Nakachi, K., Tahara, E. Radiation exposure affects immunogenetic risk of stomach cancer among atomic bomb survivors. The 96th Annual Meeting of American Association for Cancer Research(AACR), 16 April 2005-20 April 2005, Anaheim, California, USA.
 5. Kusunoki, Y., Kyoizumi, S., Hayashi, T., Hakoda, M., Cologne, J.B., Nakachi, K. 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, 3 September 2005-8 September 2005, San Francisco, California, USA.
 6. 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 October 2005-31 October 2005, Seoul, Korea.
 7. Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, T. Immunogenome study on host defense against cancer development: Genetic factors involved in natural cytotoxic activity. The 7th Korea-Japan Cancer and Aging Symposium, 3 November 2005-5 November 2005, Muju, Korea.
 8. Imai, K., Hayashi, T., Nakachi, K. Influence of lifestyle on genetically-restricted immunological defense against cancer. The 7th Korea-Japan Cancer and Aging Symposium, 3 November 2005-5 November 2005, Muju, Korea.
 9. Hayashi, T., Kusunoki, Y., Imai, K., Nakachi, K. Immunological aging is accelerated by radiation exposure. The 7th Korea-Japan Cancer and Aging Symposium, 3 November 2005-5 November 2005, Muju, Korea.
 10. Hayashi, T., Imai, K., Kusunoki, Y., Nakachi, K. Molecular epidemiology on immune defense against cancer. The 36th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, 15 November 2005-17 November 2005, Tokyo.
 11. 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 2005 - 3 December 2005, Melbourne, Australia.

12. 今井一枝, 林 奉権, 中地 敬. NK活性に影響を及ぼす環境及び遺伝的要因とがん予防. 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.
13. 久保美子, 楠 洋一郎, 箱田雅之, 笠置文善, 山岡美佳, 空 美佐江, 井上真弓, 松浦信介, 林 奉権, 京泉誠之, 藤原佐枝子, 赤星正純, 中地 敬. 原爆放射線のヒト免疫応答に及ぼす影響. 第22報: CD4 T細胞サブセットへの放射線影響は長崎原爆被爆者においても明らかである. 第46回 原子爆弾後障害研究会, 2005年6月5日, 広島.
14. 森下ゆかり, 林 奉権, 長村浩子, 久保美子, 笠置文善, 楠 洋一郎, 箱田雅之, 京泉誠之, 藤原佐枝子, 中地 敬. 原爆放射線のヒト免疫応答に及ぼす影響. 第23報: 炎症マーカーの長期的上昇. 第46回 原子爆弾後障害研究会, 2005年6月5日, 広島.
15. 楠 洋一郎, 久保美子, 山岡美佳, 林 奉権, 中地 敬. 爆被爆者末梢血T細胞集団のT-cell receptor-rearrangement excision circle (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日-2005年7月2日, 名古屋.
16. 中地 敬, 今井一枝, 林 奉権, 江口英孝, 和泉志津恵. ヒト集団の長期追跡に基づく喫煙とがん及び心疾患の分子疫学. 平成16年度喫煙科学研究財団研究報告会, 2005年7月21日, 東京.
17. 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日-2005年9月16日, 札幌.

18. 楠 洋一郎, 林 奉権, 中地 敬. 原爆被爆者のT細胞恒常性と炎症反応. 低線量放射線被ばくと生体防御機能に関する国際シンポジウム, 2005年9月28日-2005年9月30日, 青森.
19. 林 奉権, 楠 洋一郎, 箱田雅之, 京泉誠之, 中地 敬. 原爆放射線被曝による免疫機能の減損と炎症マーカーの長期的上昇. 第35回 日本免疫学会総会, 2005年12月13日-2005年12月15日, 横浜.
20. 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・学術集会, 2005年12月13日-2005年12月15日, 横浜.
21. 吾郷里華, 林 奉権, 小川貴彦, 得能正英, Trosko JE, 中地 敬. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤によるギャップ結合細胞間コミュニケーションの亢進. 第4回 コネキシン研究会, 2005年12月16日-2005年12月17日, 京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

5. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yasui W, Oue N, Kitadai Y, Nakayama H.	Part 2: Recent advances in molecular pathobiology of gastric carcinoma.	Kaminishi M, Takubo K, Mafune K.	The Diversity of Gastric Carcinoma: Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy	Springer-Verlag,	Tokyo	2005	pp.51-71
大石和佳, 今村道雄	慢性肝炎治療薬の使い方と選び方	茶山一彰	慢性肝炎治療薬の使い方と選び方	南江堂	東京	2005	pp.1-137

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号:ページ	出版年
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
Tahara E, Jr, Tahara H, Kanno M, Naka K, Takeda Y, Matsuzaki T, Yamazaki R, Ishihara H, Yasui W, Barrett JC, 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 Immunol Immunother.	54: 729-740	2005
Smith M, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM.	Cellular and molecular aspects of gastric cancer.	The World Journal of Gastroenterology		In press
Mitani Y, Oue N, Hamai Y, Aung PP, Matsumura S, Nakayama H, Kamata N, Yasui W.	Histone H3 acetylation is associated with reduced p21 ^{WAF1/CIP1} expression by gastric carcinoma.	J Pathol	205: 65-73	2005
Kondo T, Oue N, Mitani Y, Kuniyasu H, Noguchi T, Kuraoka K, Nakayama H, Yasui W.	Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the <i>PINX1</i> gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma.	Oncogene	24: 157-164	2005
Motoshita J, Oue N, Nakayama H, Kuraoka K, Aung PP, Taniyama K, Matsusaki K and Yasui W.	DNA methylation profile of differentiated-type gastric carcinomas with distinct mucin phenotypes.	Cancer Sci	96(8): 474-479	2005
Oue N, Mitani Y, Aung PP, Sakakura C, Takeshima Y, Kaneko M, Noguchi T, Nakayama H and Yasui W.	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
Mizuiru H, Yoshida K, Toge T, Oue N, Aung PP, Noguchi T and Yasui W.	DNA methylation of genes linked with retinoid signaling in squamous cell carcinoma of the esophagus: DNA methylation of <i>CRBP1</i> and <i>TIG1</i> is associated with tumor stage.	Cancer Sci	96(9): 571-577	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号:ページ	出版年
<u>Yasui W</u> , Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M and Nakayama H.	Molecular-pathological prognostic factor of gastric cancer: a review.	Gastric Cancer	8: 86-94	2005
Hamai Y, Matsumura S, Kuraoka K, Matsusaki K, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, Imai K, Nakachi K, Toge T, <u>Yasui W</u> .	A single nucleotide polymorphism in the 5'untranslated region of <i>EGF</i> gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer.	Pathobiol	72: 133-138	2005
Aung PP, Oue N, Mitani Y, Nakayama H, Yoshida K, Noguchi T, Bosserhoff AK and <u>Yasui W</u> .	Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity (MIA) and matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) are novel prognostic factors in patients with gastric cancer.	Oncogene		In press
Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H and <u>Yasui W</u> .	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
Ron E, Preston DL, Tokuoka S, Funamoto S, <u>Nishi N</u> , Soda M, Mabuchi K, <u>Kodama K</u> .	Solid cancer incidence among atomic bomb survivors: Preliminary data from a second follow-up.	Acta Med Nagasaki	50: 23-25	2005
西 信雄, 児玉和紀.	原爆被爆者における放射線の健康影響.	病理と臨床・別冊	23(7): 757-763	2005
西 信雄, 杉山裕美, 児玉和紀, 小山幸次郎, 桑原正雄, 平松恵一, 有田健一, 碓井静照.	広島市におけるがん登録の精度とがん罹患率.	広島医学	58(2): 93-95	2005
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.	広島市・広島県におけるがん登録の現状と課題.	JACR Monograph No.10	75-78	2005
Yamada M, Wong FL, <u>Fujiwara S</u> , Tatsukawa Y, Suzuki G.	Smoking and alcohol habits as risk factors for benign digestive diseases in a Japanese population: the Radiation Effects Research Foundation Adult Health Study.	Digestion	71: 231-237	2005
Yamaguchi A, Tazuma S, Nishioka T, <u>Ohishi W</u> , Hyogo H, Nomura S, Chayama K.	Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver.	Dig Dis Sci	50(7): 1361-1371	2005
<u>Hayashi T</u> , Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K.	Identification of the <i>NKG2D</i> haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer immunosurveillance.	Cancer Res	66(1): 563-570	2006
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	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号:ページ	出版年
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

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Reprint from

M. Kaminishi, K. Takubo, K. Mafune (Eds.)

The Diversity of Gastric Carcinoma
Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy

© Springer-Verlag Tokyo 2005

Printed in Japan. Not for Sale.

Recent Advances in Molecular Pathobiology of Gastric Carcinoma

WATARU YASUI¹, NAOHIDE OUE¹, YASUHIKO KITADAI², and HIROFUMI NAKAYAMA¹

Introduction

Cancer is a chronic proliferative disease with multiple genetic and epigenetic alterations, namely, disease with altered gene expression. Integrated research in molecular pathology over the past 15 years has uncovered the molecular mechanism of the development and progression of gastric cancer [1–5]. Multiple genetic and epigenetic alterations involve inactivation of tumor suppressor genes, activation of oncogenes, abnormalities of DNA repair genes, cell-cycle regulators, cell adhesion molecules, growth factors/receptors, matrix metalloproteinases, and so on. Gastric carcinoma is histologically classified into two types, well-differentiated and poorly differentiated types, and the former can be further classified into those with gastric and intestinal phenotypes. Some of these alterations occur commonly in both well-differentiated and poorly differentiated types whereas some differ depending on the histological types or mucin phenotypes. Recent advances in genomic science have enabled revealing the molecular mechanism of stomach carcinogenesis more in detail; these include global analysis of gene expression by microarray or other techniques and study of the association of genetic polymorphism with cancer risk. A better knowledge of the molecular bases of gastric cancer may lead to new approaches to diagnosis, treatment, and prevention.

This chapter presents an overview of the classical pathway of molecular stomach carcinogenesis, mechanism of epigenetic alterations, importance of genetic polymorphism, search for novel genes specific in gastric carcinoma through global analysis of gene expression, and the clinical implications.

¹Department of Molecular Pathology, ²Department of Medicine and Molecular Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan
e-mail: wyasui@hiroshima-u.ac.jp

TABLE 1. Footprint of molecular research on gastric cancer

Cancer in general		Gastric carcinoma
1911	Rous sarcoma virus	1983 <i>Helicobacter pylori</i>
1914	Fijinami sarcoma virus	
1953	DNA double helix structure	
1956	Viral transformation	1984 <i>c-myc</i> amplification
1969	Oncogene theory	1985 Establishment of TMK-1
	Normal phenotype by cell fusion	1986 EGF overexpression
1970	Reverse transcriptase	H- <i>ras</i> altered expression
1971	Knudson's two-hit theory	1986 Identification of <i>HST-1</i>
1972	Epidermal growth factor (EGF)	1988 EGF overexpression
	Apoptosis	<i>HER-2/c-erbB2</i> amplification
1973	DNA transfection	1990 <i>K-sam</i> amplification
1975	Southern blot analysis	1991 Loss of E-cadherin
1976	Proto-oncogene <i>c-src</i>	Multiple loss of heterozygosity (LOH)
1979	Transformation by cellular DNA	1992 <i>p53/APC</i> mutations
	<i>c-src</i> encodes tyrosine kinase	<i>c-met</i> amplification
1982	Human H- <i>ras</i> oncogene	Cancer-stromal interaction
1983	Polymerase chain reaction (PCR) method	Genetic changes in intestinal metaplasia
	Platelet-derived growth factor (PDGF) as <i>c-sis</i> , EGFR as <i>v-erbB</i>	1993 Interleukin 1 (IL-1) as an autocrine growth factor
1986	<i>Rb</i> as a tumor suppressor gene	Molecular diagnosis
	Transcription factor Sp1	1994 Microsatellite instability in multiple cancer
1987	Cell adhesion molecule E-cadherin	1995 Increased telomerase activity

1988	Vogelstein's model for colon cancer	
1989	p53 as a tumor suppressor	
1990	Cell-cycle regulator p34 ^{cdc2} Microsatellite assay	
1991	Gene therapy for melanoma APC as a causative gene for familial adenomatous polyposis (FAP)	
1993	Angiogenesis: VEGF hMSH2 as a causative gene for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC)	
1994	p53 as transcription factor for p21	
1995	TRAP assay for telomerase DNA microarray technology Serial analysis of gene expression CpG island methylation of p16	
1996	Laser capture microdissection	
1997	Histone deacetylation	
1999	Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) DNA demethylase	
2001	Chromosome 22 whole genome sequence	Era of Post-Genome and Genomic Medicine
2003	Draft sequence of human genome Complete sequence of human genome	
1996	Cyclin E gene amplification	
1997	Reduced p21 expression	
1998	Microsatellite instability in precancerous lesion	
1998	Reduced p27 expression	
1998	E-cadherin germline mutation	
	hTERT expression	
1999	IL-8 and VEGF expression	
	hMLH1 hypermethylation	
2000	p73 genomic imbalance	
2002	Hypoacetylation of histones	
2002	23040 gene expression profile by microarray	
2004	Serial analysis of gene expression (SAGE) libraries of gastric cancer	

Overview of the Classical Pathway of Molecular Stomach Carcinogenesis

Footprint of Molecular Research on Gastric Carcinoma

We have learned from the footprint of cancer research that the history of cancer research is a repetition of establishment of hypothesis, development of new technologies, and discovery of novel findings (Table 1). For instance, Todaro and Huebner [6] hypothesized the oncogene theory in 1969 and Knudson [7] proposed the two-hit theory in 1971. After several years, methods of DNA transfection, Southern blotting, and polymerase chain reaction (PCR) amplification were developed and enabled them to verify and identify *c-src* as an oncogene and *Rb* as a tumor suppressor gene. Microarray is a powerful technique to reveal gene expression profiles of individual cancers. As of April 2003, the human genome sequence has been completed, and this is now the era of postgenome sequence and genomic medicine.

The history of molecular research on gastric carcinoma began only 20 years ago when *c-myc* amplification was found in primary gastric carcinoma in 1984 [8]. The first oncogene of gastric carcinoma, *HST-1*, was isolated from a primary gastric cancer in 1986 in the National Cancer Center in Tokyo [9]. In the late 1980s and 1990s, extensive analyses of molecular pathogenesis had been performed and the role and significance of novel genes and molecules, identified in other tumors or systems, had been clarified in gastric carcinoma with minimal time lag [4]. Examples include epidermal growth factor (EGF), EGF receptor (EGFR), E-cadherin, *p53*, cyclin E, *p27^{Kip1}*, human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*), and *hMLH1*. The importance of DNA methylation and genetic instability during stomach carcinogenesis was also proved. In 1993, a routine system of molecular diagnosis on pathology specimens was established and this useful information was given to clinics [2,10]. Furthermore, the molecular mechanism of cancer-stromal interaction and genetic changes in intestinal metaplasia was explored, and the HGF/*c-met* system and mutations of *p53* and *APC*, respectively, were found to be involved [4]. Recently, dissection of gene expression profiles has been carried out using microarray or other technology, and vast amounts of information regarding carcinogenesis, biological behavior, and chemosensitivity have been obtained, information that is directly connected with diagnosis and treatment.

Outline of Molecular Stomach Carcinogenesis

A variety of genetic and epigenetic alterations occur during multistep stomach carcinogenesis (Fig. 1) [1–5]; these include activation of oncogenes and growth factors/receptors, inactivation of tumor suppressor genes, DNA repair genes, and cell adhesion molecules, and abnormalities of cell-cycle regulators. Genetic alterations found in gastric carcinoma are gene amplification, point mutation, and loss of heterozygosity, whereas representative epigenetic changes are gene silencing by DNA methylation and overexpression at the transcriptional level [5]. Some alterations are found in both well- and poorly differentiated types, and others are unique depending on the histological type. The former may confer development of cancer whereas the latter may participate in tumor morphogenesis and biological behavior. Genetic

polymorphism predisposes to an endogenous cause and alters cancer susceptibility. Genetic instability, cytosine p guanine (CpG) island methylation, telomerase activation, and *p53* mutation commonly participate in the early steps of stomach carcinogenesis. Amplification and overexpression of the *c-met* and cyclin E genes are frequently associated with the advanced stage. Reduced expression of p27^{Kip1} participates in both development and progression of gastric carcinoma. Overexpression of growth factors/cytokines confers progression through multiple autocrine loops. On the other hand, *K-ras* mutations, *HER-2/c-erbB2* amplification, and *APC* mutation preferentially occur in the well-differentiated type. Precancerous lesions such as intestinal metaplasia and adenoma share alterations similar to those of the well-differentiated carcinomas. Loss of heterozygosity (LOH) of the *p73* gene occurs specifically in well-differentiated gastric carcinomas with foveolar epithelial phenotype. Inactivation of cadherins and catenins and amplification of the *K-sam* and *c-met* are frequently associated with poorly differentiated or scirrhous-type carcinomas.

Telomeric Repeats and Telomerase

The DNA sequence at telomeres consists of tandem repeats of TTAGGG, which protects chromosome ends from recombination and fusion and stabilizes the chromosome structure. Maintenance of the telomere by telomerase activation induces cellular immortalization [11]. Strong telomerase activity associated with hTERT expression is present in a majority of gastric carcinomas regardless of histological type and tumor staging [4]. Some intestinal metaplasia and adenomas express telomerase activity at certain levels. Telomerase activity is found in half of gastric adenomas at a level of activity about 10% of that in gastric carcinomas [12]. Hyperplasia of epithelial “stem cells” expressing hTERT and telomerase activity in precancerous lesion may be triggered by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection.

PINX1, a telomeric-repeat binding factor (TRF)1-binding protein, binds hTERT and inhibits its activity directly [13]. Reduced expression of PINX1 is detected in 70% of gastric carcinomas that show higher telomerase activity [13]. LOH of *PINX1* locus (8p23) is found in 33% of gastric carcinoma and is correlated significantly with reduced PINX1 expression. There are cases with reduced PINX1 expression but without LOH. Treatment with histone deacetylase inhibitor (HDAC) induces PINX1 expression, enhances histone H4 acetylation, and inhibits telomerase activity in gastric carcinoma cell lines. Therefore, reduced expression of PINX1 by LOH of *PINX1* locus and hypoacetylation of histone H4 cause telomerase activation, resulting in cancer development.

POT1, a telomere end-binding protein, is proposed not only to cap telomeres but also to recruit telomerase to the ends of chromosomes [14]. POT1 expression levels are significantly higher in gastric carcinomas of advanced stage, and downregulation is frequently observed in those of early stage [14]. Reduced expression of POT1 is associated with telomere shortening and decreased telomerase activity. Inhibition of *POT1* by antisense oligonucleotides increases telomere shortening, inhibits telomerase activity, and increases anaphase bridging, a sign of telomere dysfunction. Therefore, POT1 may play an important role in regulation of telomere length and that inhibition of POT1 may induce telomere dysfunction. Changes in POT1 expression levels may be associated with development and progression of gastric carcinoma.