

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

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安井 弥
平成19年（2007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 -----	1
安井 弥	
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 -----	13
安井 弥	
2. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析 -----	19
西 信雄	
3. 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 -----	23
江口英孝	
4. 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 -----	29
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 -----	33
神谷研二	
7. 二重鎖切断修復の分子機構の解明 -----	38
宮川 清	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	42
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	47

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）
総括研究報告書

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 オリゴDNAカスタムアレイを用いた解析から抽出した遺伝子に関する蛋白発現解析において、versicanは放射線影響研究所の寿命調査集団 Life Span Study LSS A群 (>0 dose) の胃がんで有意な発現低下が確認され、pancreatic RNase 1においても発現低下を認めた。GeneChipを用いた遺伝子発現解析により被爆者胃がんに特異的に発現が2倍以上に亢進する遺伝子37個を同定した。また、被爆者胃がんには、リン酸化ヒストンH2AX (γ H2AX)の陽性例、胃型粘液形質を示す例が有意に高頻度であることを見出した。成人甲状腺乳頭がんについてRET/PTC遺伝子再配列とBRAF遺伝子変異の解析を行なったところ、RET/PTC遺伝子再配列は被曝線量との間に有意な正の関連が認められ、再配列を持つ症例はBRAF遺伝子変異を持つ症例より被爆から診断までの期間が短かった。一方、大腸がんでは、高度のマイクロサテライト不安定性およびhMLH1遺伝子のメチル化と被曝線量との関連が認められた。疫学的分析では、固形がん全体では、結腸線量が5mGy以上の調査対象者から発生したがん症例のうち約850例（約11%）が原爆放射線被曝と関連していると推定され、0-2 Gyの範囲では線形の線量反応が認められた。新しい線量体系であるDS02の導入によりリスク推定値は全般的に約10%低下したが、リスクのパターンはこれまでとほぼ同様であった。放射線誘発遺伝子障害の新たな感受性指標として、フローサイトメトリーによる γ H2AXならびに網状赤血球小核解析法を確立した。予備的研究により、試験管内放射線照射後の γ H2AX発現は個人のDNA損傷修復に関係した放射線感受性の評価に有用であり、網状赤血球小核の解析は放射線誘発遺伝的不安定性ならびに放射線感受性の差異を検出可能であることが示された。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のH359(His)をAlaに置換したREV1変異蛋白のdCMP活性に関して、Aに対しCを挿入するdCMP活性は非常に低下し、UやAP部位に対しCを挿入するdCMP活性も殆ど認められなくなり、REV1の損傷乗り越え活性は消失した。DNA二重鎖切断の修復に関与するRad51Bの機能を解析するため、ヒト大腸がん細胞株においてRad51Bを欠失した細胞を作製したところ、放射線やDNA架橋剤に対する感受性の亢進、相同組換えによる姉妹染色分体交換の頻度の低下、Rad51の核内フォーカス形成の低下がみられ、染色体の分配に関わる中心体の数が増加しており、結果として染色体の数的異常である異数体の増加が観察された。

分担研究者

西 信雄

(財)放射線影響研究所・室長

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な遺伝子の同定

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)

昨年度までのオリゴDNAカスタムアレイでの発現解析から抽出した被爆者群の胃がんで発現の異なる10遺伝子について、蛋白レベルでの発現の検証を行なった。さらに、被爆者(放射線影響研究所の寿命調査集団 Life Span Study LSS A群: >0 dose) 胃がんについて54675プローブを搭載するGeneChip (Affymetrix社)を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した(国立がんセンター研究所・佐々木博己先生との共同研究)。上記で抽出した被爆者胃がんで発現が亢進していた遺伝子、DNA損傷応答遺伝子の蛋白レベルでの発現について、LSS A群67例および対照のLSS B群49例に発生した胃がん組織のホルマリン固定パラフィン切片について、特異抗体を用いた酵素抗体法で染色した。

2. 遺伝子変異解析による放射線関連固形がん特異的な遺伝子の同定 (江口)

原爆被爆者に発生した成人甲状腺乳頭がん50症例と対照群21例のパラフィン包埋組織について、*RET/PTC* 遺伝子再配列および*BRAF* 遺伝子変異を解析し、臨床病理学的・疫学的因子との関連について検討した。また、原爆被爆者に発生した大腸がん35例と対照群16例について、遺伝子不安定性は6種類のマイクロサテライトマーカーを用いて検討し、*MLH1* 遺伝子のメチル化およびヘテロ接合性消失(LOH)もあわせて検討した。

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105,427人(80,180人の被爆者と25,247人の入市者)を対象とした。がんの罹患は広島市地域がん登録事業、広島県腫瘍登録事業(組織登録)、長崎県がん登録事業の資料ならびに放射線影響研究所の成人健康調査等により把握した。分析は、ポアソン回帰法を用いて放射線に関連した過剰相対リスクおよび過剰絶対リスクを求め、放射線関連リスクの大きさ、線量反応の形状、性別・被曝時年齢・診断時年齢に伴うリスクの変化、ならびに過剰リスクのレベルおよびパターンにおける部位間の変動を検討した。

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)

フローサイトメトリーを用いたヒトTリンパ球の γ H2AXレベル測定系を確立し、放射線感受性を評価に有効であるか検討した。末梢血単核細胞をPHA存在下、rIL-2含有GIT培養液で約1週間培養したTリンパ球を用いた。種々の線量のX線を照射した後、経時的に γ H2AXの発現量をFACScanで測定した。また、フローサイトメトリーを用いた網状赤血球小核(MN)頻度測定系にて遺伝的不安定

性の評価を試みた。測定は、X線全身照射したC57BL/6およびBALB/c雌マウスの末梢血を採取、CD71-FITC、CD61-PE抗体およびPIで染色しFACSscanにて解析した。MN頻度はCD71陽性、CD61陰性の網状赤血球集団におけるPI陽性細胞の比率にて求めた。

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。REV1のN-digitドメインはREV1のdCMP活性に直接的に関係する構造と考えられる。そこでN-digitのN末端で保存されている5つのアミノ酸の内、二つのアミノ酸F348(Phe)とH359(His)をそれぞれAlaに置換した変異蛋白質の高純度の精製標品を作成した。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. 二重鎖切断修復の分子機構の解明(宮川)

二重鎖切断修復機構の解明のため、まず、大腸がん細胞株HCT116において、Rad51Bをノックアウトした。これらの変異細胞と元の野生株を用いて、DNA損傷に対する感受性、相同組換えの頻度を表す指標、蛍光免疫染色による放射線照射後のRad51の核内フォーカス形成、 γ -tubulin染色による中心体の数と形態、FISHによる染色体の数的異常を解析した。また、異常がみられた表現型に対して、正常cDNAを変異細胞に導入することによって、それが補正されるかどうか確認した。

(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)

被曝者と対照群の胃がんにおける遺伝子発現プロファイルの比較から抽出した10遺伝子については、Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)ではLSS A群において有意な発現低下が確認され、pancreatic RNase A family 1 (RNase 1)においても発現低下を認めた。さらに、GeneChipを用いた遺伝子発現プロファイルの解析により被曝者胃がんの特異的に発現が2倍以上に亢進する遺伝子37個を同定した。これらには、DNAJC12、MED10、TRPS1、SBK1などが含まれており、蛋白レベルでの発現解析を開始した。また、被曝者胃がんには、DNA傷害レスポンスに関連するリン酸化ヒストンH2AX (γ H2AX)の陽性例、胃型粘液形質(特にMUC6)を示す例が有意に高頻度であることを見出した。

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)

成人甲状腺乳頭がんについての*RET/PTC*遺伝子再配列と*BRAF*遺伝子変異の検索の結果、被曝者では両者は排他的に認められ、*RET/PTC*遺伝子再配列は被曝線量との間に有意な正の関連が認められた。再配列を持つ症例は*BRAF*遺伝子変異を持つ症例より被曝から診断までの期間が短く、*RET/PTC*遺伝子再配列と放射線被曝との関係が示唆された。一方、大腸がんでは、高度のマイクロサテライト不安定性(MSI-H)およびその原因となるDNAミスマッチ修復酵素遺伝子*MLH1*のメチル化と被曝線量との関連が認められた。

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)

1958年から1998年までに診断された第一原発がん17,448例に基づいて解析を行った。全固形がん全体では、結腸線量が5mGy以上の調査対象者から発生したがん症例のうち約850例(約11%)が原爆放射線被曝と関連していると推定され、0-2 Gyの範囲では線形の線量反応が認められた。過剰絶対リスクは診断時年齢が高いほど増加したが、過剰相対リスクは診断時年齢が高いほど減少した。新しい線量体系であるDS02の導入によりリスク推定値は全般的に約10%低下したが、リスクのパターンはこれまでとほぼ同様であった。結腸と直腸では、結腸でのみ有意な線量反応関係が認められた。

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)

放射線誘発 γ H2AXレベルについては、同じ6名の健康成人Tリンパ球について3回繰り返し行った実験で、X線4 Gy照射後6時間の γ H2AXレベルに有意な実験間差はなく、個人間に有意な違いを認めた。これら個人間で最大1.5倍のレベルの差があった。同様な個人差は、細胞あたりの γ H2AXフォーカスの数を調べた場合においても観察され、DNA損傷の程度の差異とほぼ一致すると考えられた。また、マウスの小核網状赤血球測定系では、放射線の急性効果は0.1 Gyの低線量でも検出可能であったが、遅延効果は2.5 Gy照射1年後においても有意に検出された。この生体内で長期間持続する放射線誘発遺伝的不安定性の程度に系統差が認められた。

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のN-digitドメインのF348(Phe)をAlaに置換した変異蛋白でのdCMP活性は、野生型REV1に比べtemplate A, T, 及びCでは軽度低下したが、その活性の特徴に変化はなかった。同様に、REV1のUやAP部位に対する損傷乗り越え活性も軽度低下したが、その特徴に変化はなかった。一方、H359(His)をAlaに置換したREV1変異蛋白のdCMP活性は大きく変化した。すなわち、template Gに対しCを挿入するdCMP活性は変化しなかったが、Aに対しCを挿入するdCMP活性は非常に低下した。また、UやAP部位に対しCを挿入するdCMP活性も殆ど認められなくなり、REV1の損傷乗り越え活性は消失した。

2. 二重鎖切断修復の分子機構の解明 (宮川)

相同組換えの前期を制御するRad51Bを4コピー有するヒト大腸がん細胞株においてRad51Bを1コピーずつ欠失した細胞をジーン・ターゲティングにより作製した。その結果、Rad51Bの機能低下細胞では放射線やDNA架橋剤に対する感受性の亢進、相同組換えによる姉妹染色分体交換の頻度の低下、Rad51の核内フォーカス形成の低下が観察され、Rad51Bは確かに相同組換え修復によりDNA二重鎖切断を修復することが確認された。さらに染色体の分配に関わる中心体の数が増加しており、その結果として染色体の数的異常である異数体の増加が観察された。異数体はがんの染色体異常の原因となるために、Rad51Bの一つの機能として中心体の安定化によってがんの発生を抑制している可能性が示唆された。

D. 考察

被曝者に発生した固形がん組織を用いた網羅的遺伝子発現解析から特異的発現態度を示す遺伝子を抽出することで、放射線関連がんの診断標的、治療標的の同定を試みている。昨年度までの胃がんについての検討で抽出した10遺伝子における蛋白レベルの解析で、versicanがその有力な候補である

ことが明らかとなった。さらに、GeneChip解析によって放射線関連がんのマーカー遺伝子の候補が新たに抽出された。これらについても、蛋白レベルでの発現の検証ならびに細胞生物学的・生化学的機能解析が必要である。一方、DNA二重鎖切断部位に集積する γ H2AXの発現が被爆者胃がんにおいて有意に高頻度に認められた。しかし、被爆者群、対照群ともに早期がんでは発現は殆ど認められず、進行がんにおいて被爆者群で発現の亢進が見出された。したがって、放射線被曝に関連したがん化への関与とは言いがたいが、そのマーカーとしての意義はあるものと考えられる。尚、培養Tリンパ球を用いたフローサイトメトリーによる γ H2AXの測定は、放射線量と相関し再現性に優れ、放射線誘発 γ H2AXの個人差を明確に判別できることが確認されており、少なくとも、個人のDNA損傷修復に関与した放射線感受性の評価の指標となる可能性がある。

これまで多くの研究により、放射線照射により誘発される直接的な遺伝子変化としてDNA二重鎖の切断および遺伝子再配列が明らかにされている。今回の成人甲状腺乳頭がんにおける検討で、*RET/PTC*遺伝子再配列の頻度が被曝線量の量依存的に頻度が上昇し、同遺伝子再配列を有する症例の被曝から診断までの期間の中央値20年は被曝者における甲状腺癌発症リスクのピークに近く、この期間での*RET/PTC*遺伝子再配列頻度が42%を示すことから、この遺伝子再配列が放射線被曝による成人の甲状腺乳頭発がんに関与することが示唆された。大腸がんに対する検討では、*MLH1*遺伝子のメチル化、MSI-Hと被曝線量との関連が見られたことから、この発癌経路と放射線被曝との関係が示唆され、遺伝子異常のみならずエピジェネティックな変化も被爆者大腸がんでは重要な役割を担っていることが想起された。

疫学的解析からは、結腸と直腸は連続した臓器であり、組織型の多くを腺癌が占めるという共通点を持つが、放射線の影響は結腸では有意な線量反応関係が見られるの

に対し、直腸では有意な関係が認められなかった。今後、腫瘍登録事業により収集される組織標本をもとに可能な限り上皮内がんと浸潤がんの鑑別を行い、結腸・直腸がんにおける線量反応関係を詳細に解析する必要がある。

放射線誘発遺伝子障害の感受性指標として、 γ H2AX測定系および網状赤血球MN頻度測定系を確立した。急性効果における感受性評価には、 γ H2AX測定系を使用するが、被爆者から得られた凍結保存リンパ球からTリンパ球培養を行い、試験管内放射線感受性の評価を進める予定である。遅延効果における感受性評価には、マウスの測定系と同様な末梢血網状赤血球小核頻度測定系をヒトについても確立し、被爆者の生体内で長期間持続している可能性が考えられる遺伝的不安定性の評価に応用する予定である。生体内造血系細胞での放射線誘発遺伝的不安定性の機序について検討を進め、その背景にある遺伝子の多型と放射線誘発遺伝的不安定性の個体差の関係を調べる必要がある。さらに、この放射線の急性あるいは遅延効果に対する感受性指標が放射線被曝によるがん発生リスク推定に応用可能かどうかの検討は重要な課題である。

「損傷乗り越えDNA合成 (translesion DNA合成)」とがん化との関係は注目される場所である。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ことを目的として行なった本年度の研究において、N-digitドメインの一つのアミノ酸置換をもつ変異型REV1は、REV1の基質特異性と損傷乗り越えDNA合成活性が劇的に変化することが分かった。これは、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ながるものである。

放射線によるDNA二重鎖切断はDNA損傷の中でも最も致命的な損傷であり、この損傷を修復する重要な経路の一つに相同組換え修復が存在する。Rad51B変異細胞で観察されたDNA損傷に対する感受性の亢進、相同組換えの低下、Rad51の核内フォーカス

形成の低下はいずれもRad51Bが相同組換えの前期においてRad51と協調してDNA修復の役割を果たすことを示唆する。これに加えて、中心体の数の増加と異数体の増加が観察された。したがって、Rad51Bは相同組換え修復を制御することによって染色体の数的安定性を保っているものと考えられる。この結果は、放射線に起因するがんの発症の制御に、相同組換え修復の異常と異数体の出現が関与する可能性を示唆するものである。

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。原爆被爆者における解析ならびに実験モデルを用いた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になるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mitani Y, Yasui W, et al. Reg IV is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncogene* 2006 (in press).
2. Matsumura S, Yasui W, et al. DNA demethylation of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) is correlated with gene expression and its possible involvement of lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Cancer* 2007 120:1689-1695
3. Hasegawa Y, Yasui W, et al. DNA methylation of the RIZ1 gene is associated with nuclear accumulation of p53 in prostate cancer. *Cancer Sci* 2007 98:32-36.
4. Yasui W, et al. Systematic collection of tissue specimens and molecular pathological analysis of newly diagnosed solid cancers among atomic bomb survivors. *International Congress Series* 2006 (in press).
5. Yasui W, et al. Molecular pathobiology of gastric cancer. (Review) *Scand J Surg* 2006 95:225-231.
6. Kurayoshi M, Yasui W, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* 2006 66: 10439-10448.
7. Takahashi K, Yasui W, et al. The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 2006 66: 9408-9419.
8. Kose K, Yasui W, et al. Nuclear and mitochondrial DNA microsatellite instability in gastrointestinal stromal tumors. *Pathobiol* 2006 73: 93-97.
9. 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* 2006 56: 200-205.
10. Nakayama H, Yasui W, et al. Lack of pericryptal fibroblastic cells adjacent to intestinal epithelial metaplastic glands. *Histopathol* 2006 48: 610-612.
11. Ishikawa N, Yasui W, et al. Characterization of SEZ6L2 cell-surface protein as a novel prognostic marker for lung cancer. *Cancer Sci* 2006 97: 737-745.
12. 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* 2006 25: 2546-2557.
13. Sanada Y, Yasui W, et al. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol* 2006; 208: 633-642.
 14. Kobayashi T, Yasui W, et al. Glycogen synthase kinase-3 and H-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions. *Mol Cell Biol* 2006 26: 898-911.
 15. Oue N, Yasui W, et al. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer* 2006 106: 1250-1259.
 16. Aung PP, Yasui W, et al. Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. *Virchow Archiv*, 2006 448: 428-434.
 17. Preston DL, Nishi N, et al. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiat Res* 2007 (in press)
 18. Takahashi K, Eguchi H, et al. The presence of BRAF point mutation in adult papillary thyroid carcinomas from atomic bomb survivors correlates with radiation dose. *Mol Carcinog* 2007 46: 242-248.
 19. Sogon T, Eguchi H, et al. Demethylation of promoter C region of estrogen receptor α gene is correlated with its enhanced expression in estrogen-ablation resistant MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007 (in press).
 20. Sueoka N, Eguchi H, et al. Mutation profile of EGFR gene detected by denaturing high-performance liquid chromatography in Japanese lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007 133: 93-102.
 21. Ueda H, Eguchi H, et al. Development of a novel method to detect *Helicobacter pylori* cagA genotype from paraffin-embedded materials: comparison between patients with duodenal ulcer and gastric cancer in young Japanese. *Digestion* 2006 73: 47-53.
 22. 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*. 2006 54: 773-780.
 23. Kusunoki Y, et al. T-cell homeostasis and inflammatory response among A-bomb survivors. In: *Low-Dose Radiation Exposures and BioDefense System*, Ed by Tanaka S, Fujikawa F, Oghiso Y Aomori, The Institute for Environmental Sciences, 2006. pp 13-7
 24. 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* 2006 16: 33-41.
 25. Hakoda M, Kusunoki Y, et al. Levels of Antibodies to Microorganisms Implicated in Atherosclerosis and of C-Reactive Protein among Atomic Bomb Survivors. *Radiat Res* 2006 166: 360-366.
 26. Hamasaki K, Kusunoki Y, et al. Short-term culture and gammaH2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2007 48: 38-47.
 27. Masuda Y and Kamiya K. Role of single stranded DNA in targeting REV1 to primer termini. *J Biol Chem* 2006 281: 24314-24321
 28. Nakai-Murakami C, Miyagawa K, et al. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26: 477-486, 2007

29. Sarai N, Miyagawa K, et al. Stimulation of Dmcl-mediated DNA strand exchange by the human Rad54B protein. *Nucleic Acids Res* 34: 4429-4437, 2006
30. Hosoi Y, Miyagawa K, et al. Suppression of anchorage-independent growth by expression of the ataxia-telangiectasia group D complementing gene, ATDC. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 728-734, 2006
31. Tonotsuka N, Miyagawa K, et al. Heterogeneous expression of DNA-dependent protein kinase in esophageal cancer and normal epithelium. *Int J Mol Med* 18: 441-447, 2006
32. Date O, Miyagawa K, et al. Haploinsufficiency of RAD51B causes centrosome fragmentation and aneuploidy in human cells. *Cancer Res* 66: 6018-6024, 2006
33. Hiyama T, Miyagawa K, et al. Haploinsufficiency of the Mus81-Eme1 endonuclease activates the intra-S-phase and G2/M checkpoints and promotes rereplication in human cells. *Nucleic Acids Res* 34: 880-892, 2006
34. Li Z, Miyagawa K, et al. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 363-368, 2006
- specimens and molecular pathological analysis of newly diagnosed solid cancers among Atomic-bomb survivors. The Second Nagasaki Symposium of International Consortium for Medical Care of Hibakusha and Radiation Life Science. Symposium "Studies on atomic bomb survivors and related issues", Nagasaki (Japan), July 26-27, 2006
3. Yasui W, et al. Systematic search for novel biomarker of gastric cancer through SAGE data analysis. The 4th International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, Symposium C "Gastric Cancer", Honolulu, Hawaii (USA), August 24-26, 2006
4. Oue N, Yasui W, et al. High expression of h-Prune in gastric cancer with gastric phenotype: expression of h-prune is associated with poor survival in gastric cancer. The 11th International Congress of Metastasis Research Society jointed with the 15th Annual Meeting of Japanese Association for Metastasis Research, Tokushima (Japan), September 3-6, 2006
5. Yasui W, et al. Molecular pathogenesis of gastrointestinal neoplasia: Stomach. The XXVI International Congress of the International Academy of Pathology, Symposium SYM48 "Gastrointestinal Pathology: Molecular pathogenesis of gastrointestinal neoplasia", Montréal (Canada), September 16-21, 2006
6. Oue N, Yasui W, et al. RegIV overexpression inhibits apoptosis. The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima (Japan), October 22, 2006
7. Hasegawa Y, Yasui W, et al. DNA methylation of the RIZ1 gene is associated with nuclear accumulation of p53 in prostate cancer. The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima
2. 学会発表
1. Oue N, Yasui W, et al. Expression and localization of Reg IV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: Expression of Reg IV is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation of gastric adenocarcinoma. The 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington, D.C. (USA), April 1-5, 2006
2. Yasui W. Systematic collection of tissue

- (Japan), October 22, 2006
8. Kuniyasu H, Yasui W, et al. Increased peritoneal metastasis of RegIV-transfected MKN28 gastric carcinoma cells. The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima (Japan), October 22, 2006
 9. Kurayoshi M, Yasui W, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima (Japan), October 22, 2006
 10. Hamatani K, Eguchi H, et al. Papillary thyroid carcinogenesis among atomic-bomb survivors. The 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Prague, (Czech), July 2-6, 2006
 11. Eguchi H, et al. Improvement of PCR and RT-PCR amplification for molecular analyses with long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. The 12th International Federation of Placenta Association Meeting, Kobe (Japan), September 6-9, 2006
 12. Eguchi H, et al. Microsatellite instability in colorectal cancers among atomic-bomb survivors. The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima (Japan), October 22, 2006
 13. Taga M, Eguchi H, Yasui W, et al. Mutations of TP53, KRAS, and EGFR genes in lung cancer from atomic bomb survivors. The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima (Japan), October 22, 2006
 14. Neriishi K, Eguchi H, et al. Radiation effects on sex hormones and growth factors in postmenopausal A-bomb survivors: Fundamental analysis in controls of a case control study of breast cancer in atomic bomb survivors. The 53rd Annual Scientific Meeting of the Radiation Research Society, Philadelphia, Pennsylvania (USA), November 6-9, 2006
 15. Hayashi T, Kusunoki Y, et al. Molecular immuno-epidemiology on the health effects of radiation. The Meeting of US-Japan Cooperative Cancer Research Program: Molecular Epidemiological Characteristics of Lung and Colon Cancer Development among Atomic Bomb Survivors, Washington DC (USA), February 23-24, 2006,
 16. Hayashi T, Kusunoki Y, et al. Identification of immunologically high-risk individuals of stomach cancer and application to cancer prevention. The 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington, D.C. (USA), April 1-5, 2006
 17. Nakachi K, Kusunoki Y, et al. Molecular epidemiology on innate-immune defense against cancer. The 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington, D.C. (USA), April 1-5, 2006
 18. Hayashi T, Kusunoki Y, et al. Individuals at high risk of stomach cancer among atomic-bomb survivors identified in RERF immunogenome study The 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Prague, (Czech), July 2-6, 2006
 19. Morishita Y, Kusunoki Y, et al. Long-term elevation of inflammatory markers among atomic-bomb survivors: Accelerated immunological aging. The The 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Prague, (Czech), July 2-6, 2006
 20. Nakachi K, Kusunoki Y, et al. Molecular epidemiology on immune defense against

- cancer. The 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Prague, (Czech), July 2-6, 2006
21. Hayashi T, Kusunoki Y, et al. Effects of inflammation-related gene polymorphism and atomic-bomb radiation exposure on stomach cancer risk The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Cancer Stem Cell", Hiroshima (Japan), October 22, 2006
 22. 安井 弥. 胃癌のトランスクリプトームダイセクション- 探索と展開-. 第17回日本消化器癌発生学会, レクチャー, 9月15日, 名古屋, 2006
 23. 大上直秀, 安井 弥, 他. 胃型胃癌、腸型胃癌: SAGE法で同定した胃癌関連遺伝子と胃型腸型形質との関連. 第17回日本消化器癌発生学会, シンポジウム, 9月15日, 名古屋, 2006
 24. 西 信雄, 杉山裕美, 坂田律、笠置文善, 清水由紀子, 児玉和紀. 寿命調査集団における固形がんの予後規定因子. 第29回日本がん疫学研究会学術総会, 広島, 5月19-20日, 2006
 25. 濱谷清裕, 江口英孝, 他. 原爆被爆者甲状腺がんにおけるRET/PTC再配列(第2報) 第65回 日本癌学会学術総会, 9月28-30日, 横浜, 2006
 26. 江口英孝, 安井 弥, 他. 原爆被爆者で発生した大腸癌におけるマイクロサテライト不安定性 第65回 日本癌学会学術総会, 9月28-30日, 横浜, 2006
 27. 高橋恵子, 江口英孝, 他. 原爆被爆者甲状腺がんにおけるBRAF突然変異(第2報) 第65回 日本癌学会学術総会, 9月28-30日, 横浜, 2006
 28. 多賀正尊, 江口英孝, 安井 弥, 他. 原爆被爆者で発生した肺がんにおけるTP53, KRAS, EGFR遺伝子変異(第1報) 第65回 日本癌学会学術総会, 9月28-30日, 横浜, 2006
 29. 内藤真理子, 江口英孝, 他. 日本多施設共同コホート研究(J-MICC Study)におけるコントロール血液検体 第65回日本癌学会学術総会, 9月28-30日, 横浜, 2006
 30. 鎌石和男, 江口英孝, 他. 閉経後の被爆者における性ホルモンと成長因子に対する放射線影響: 被爆者乳癌症例対照研究の対照における基礎的解析 第29回日本がん疫学研究会, 5月19日, 広島, 2006
 31. 多賀正尊, 江口英孝, 安井 弥, 他. 原爆被爆者で発生した肺癌におけるp53, K-ras, EGFR遺伝子変異 第7回 日本がん分子疫学研究会学術集会, 5月19-20日, 広島, 2006
 32. 江口英孝, 安井 弥, 他. 原爆被爆者で発生した大腸癌におけるマクロサテライト不安定性 第7回 日本がん分子疫学研究会学術集会, 5月19-20日, 広島, 2006
 33. 濱谷清裕, 江口英孝, 他. 原爆被爆者に発生した甲状腺がんにおけるRET/PTC再配列 第7回 日本がん分子疫学研究会学術集会, 5月19-20日, 広島, 2006
 34. 高橋恵子, 江口英孝, 他. 被爆者甲状腺がんにおけるBRAF突然変異(第2報) 第7回 日本がん分子疫学研究会学術集会, 5月19-20日, 広島
 35. 鎌石和男, 江口英孝, 他. 閉経後の被爆者における性ホルモンと成長因子に対する放射線影響: 被爆者乳癌症例対照研究の対照における基礎的解析 第47回原子爆弾後障害研究会, 6月4日, 長崎, 2006
 36. 楠 洋一郎, 他. 原爆放射線のヒト免疫応答に及ぼす影響. 第24報: CD43の発現を指標としたメモリーCD4 T細胞サブセットの測定. 第47回 原子爆弾後障害研究会, 6月4日, 長崎, 2006
 37. 楠 洋一郎. フローサイトメトリーによる生体マーカーの高度分析. 第7回 日本がん分子疫学研究会学術集会, 5月19-20日, 広島, 2006
 38. 楠 洋一郎, 他. 原爆被爆者の末梢血CD4 T細胞集団におけるCD45アイソフォーム発現とCD45遺伝子多型の関連分析.

- 第16回 日本サイトメトリー学会学術集会, 7月7-8日, 長崎, 2006
39. 中地 敬, 楠 洋一郎, 他. 疫学研究におけるバイオマーカーの意義: 変動するがんリスクの評価. 第65回 日本癌学会学術総会, 9月28-30日, 横浜, 2006
40. 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. 炎症関連遺伝子多型と原爆放射線被曝の胃がん発症リスクに及ぼす影響. 第65回 日本癌学会学術総会, 9月28-30日, 横浜, 2006
41. 楠 洋一郎, 他. 原爆被爆者における胸腺機能評価の試み: 胸腺移出後に細胞分裂を行っていないナイーブT細胞の測定. 日本放射線影響学会第49回大会, 9月6-8日, 札幌, 2006
42. 濱崎幹也, 楠 洋一郎, 他. 原爆被爆者末梢血リンパ球における遺伝的不安定性の検討. 日本放射線影響学会第49回大会, 9月6-8日, 札幌, 2006
43. 楠 洋一郎, 他. 網状赤血球小核ならびに末梢Tリンパ球体細胞突然変異を指標とした造血リンパ系の放射線感受性の評価. 第29回日本造血細胞移植学会総会, 2月16-17日, 福岡, 2007
44. 増田雄司, 神谷研二. Role of single stranded DNA in targeting REV1 to primer termini. 第二回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 5月30-31日, 京都, 2006
45. 神谷研二, 他. 次世代の分子バイオドシメトリー法の開発プロジェクト 損傷乗り越え型DNA合成酵素REV1の機能と発がん. 第2回広島大学・長崎大学連携融合事業カンファレンス, 6月2日, 長崎, 2002
46. 朴金蓮, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成に関与するヒトREV1の基質特異性を決定するアミノ酸残基の同定. 第47回原子爆弾後障害研究会, 6月3日, 長崎, 2006
47. 梶村順子, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1による突然変異誘発と発がん感受性について. 第47回原子爆弾後障害研究会, 6月3日, 長崎, 2006
48. Gu YQ, Kamiya K, et al. Cloning and Biochemical Analysis of a Novel Human Helicase-PFH1. 第20回国際生化学・分子生物学会議/ 第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議, 6月18-23日, 京都, 2006
49. 朴金蓮, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成因子REV1の基質特性. 第31回中国地区放射線影響研究会, 7月27日, 広島, 2006
50. 増田雄司, 神谷研二. 損傷乗り越えDNA合成におけるポリメラーゼスイッチ. 第31回中国地区放射線影響研究会, 7月27日, 広島, 2006
51. 増田雄司, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成因子REV1の単鎖DNAを介した損傷部位へのターゲティング機構. 日本放射線影響学会第49回大会, 9月6-8日, 札幌, 2006
52. 梶村順子, 楠洋一郎, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1による突然変異誘発と発がん感受性について. 日本放射線影響学会第49回大会, 9月6-8日, 札幌, 2006
53. 朴金蓮, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成因子REV1のdCMP転移活性と突然変異誘発. 日本放射線影響学会第49回大会, 9月6-8日, 札幌, 2006
54. 顧永清, 神谷研二, 他. 染色体の恒常性維持に必要とされるDNAヘリカーゼPIF1の機能解析. 日本放射線影響学会第49回大会, 9月6-8日, 札幌, 2006
55. 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タンパク質は単鎖DNAを介してプライマー末端にターゲティングされる. 第65回 日本癌学会学術総会, 9月28-30日, 横浜, 2006
56. 梶村順子, 楠洋一郎, 神谷研二, 他. Effect of REV1 on the survival of human cells after various DNA damages. 第35回日本環境変異原学会, 11月20-21日, 大阪, 2006
- 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

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 被爆者に発生した固形がんの新鮮凍結組織およびパラフィン包埋試料を用い、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とともに、放射線関連遺伝子あるいはがん関連遺伝子の変異解析を行なうことにより、それを標的とした診断法・治療法・予防法の開発を目指すものである。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て、被爆者胃がん（放射線影響研究所の寿命調査集団 LSS A群）と対照胃がんの遺伝子発現プロファイルの比較から抽出した10遺伝子について、蛋白レベルでの発現確認を行なった。Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)ではLSS A群において有意な発現低下が確認され、pancreatic RNase A family 1 (RNase 1)においても発現低下を認めた。さらに、GeneChipを用いた遺伝子発現プロファイルの解析により被爆者胃がんの特異的に発現が2倍以上に亢進する遺伝子37個を同定した。これらには、DNAJC12、MED10、TRPS1、SBK1などが含まれており、蛋白レベルでの発現解析を開始した。また、被爆者胃がんには、DNA傷害レスポンスに関連するリン酸化ヒストンH2AX (γ H2AX)の陽性例、胃型粘液形質（特にMUC6）を示す例が有意に高頻度であることを見出した。

A. 研究目的

固形がんの分子発生機構には、様々なジェネティック・エピジェ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の特異的な遺伝子の抽出

これまでに、SAGE (serial analysis of gene expression) 解析で抽出した胃がん特異的発現遺伝子、DNA障害・修復関連遺伝子を含むオリゴDNAカスタムアレイ(三次元アレイ)を用いて、被爆者に発生した胃がんおよび対照胃がんにおける遺伝子発現検索を行ない、そのプロファイルの比較から被爆者群で発現の異なる10遺伝子を同定している。これらについては、蛋白レベルでの

発現の検証を行なった。

本年度は、より多くの遺伝子の発現状況を知るために、54675プローブを搭載するGeneChip (Affymetrix社) を用いて遺伝子発現プロファイルを解析した(国立がんセンター研究所・佐々木博己先生との共同研究)。用いた試料は、被爆者胃がん3例とそれぞれに組織型を合致させた対照群17例である。これらの新鮮凍結試料について、T7-based RNA amplificationを併用し、GeneChipによる遺伝子発現解析を行なった。クラスター解析等により放射線関連がんの特異的な遺伝子群を抽出した。

2) 被爆者胃がんにおける放射線関連遺伝子発現、粘液形質発現の検討

上記で抽出した被爆者胃がんが発現が亢進していた遺伝子、DNA損傷応答遺伝子の蛋白レベルでの発現について、免疫組織化学的に解析した。放射線影響研究所のLife Span Study (LSS) A群67例(年齢49-92才:平均70才、被爆線量4-2601mGy:平均227mGy)および対照のLSS B群49例(年齢49-88才:平均73才、被爆線量0-3mGy:平均0.4mGy)に発生した胃がん組織のホルマリン固定パラフィン切片について、特異抗体を用いた酵素抗体法で染色した。用いた抗体は、抗リン酸化型H2AX(γ H2AX)抗体、抗transketolase抗体、抗NEIL1抗体、抗versican抗体、抗PDGFRB抗体、抗pancreatic RNase A family 1 (RNase 1)抗体、抗osteonectin抗体、抗DNAJC12抗体である。

尚、胃がんは、組織構築による高分化、低分化の分類に加えて、種々の粘液形質発現から胃型と腸型に分類することができる。この分類のためには、胃型のマーカーとして抗MUC5AC抗体、抗MUC6抗体、腸型のマーカーとして抗MUC2抗体、抗CD10抗体を用いた。

(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抽出

三次元カスタムアレイ解析で、LSS A群と対照群で有意に発現レベルの異なる遺伝子は、fluctose-1,6-bisphosphatase 1, TNF receptor superfamily member 14, transketolase, nei endonuclease VIII-like 3 (NEIL 1), chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican), thrombospondin 2, PDGF receptor beta (PDGFRB), RNase A family 1 (pancreatic), ATP-binding cassette sub-family C (CFTR/MRP) member 1, osteonectinの10個であった。

GeneChipを用いた被爆者胃がん3例と対照胃がん17例の遺伝子発現解析では、平均シグナル強度より3倍以上のものが54675プローブ中1162プローブであり、これらによるunsupervised cluster解析では、被爆者群と対照群とを判別はできなかった。シグナルが十分に検出された40347プローブ中、U-testにおいて有意($P < 0.01$)なものは261プローブであり、さらに、被爆者群と対照群とで2倍以上の発現レベルの差のあるものは118プローブであった。supervised cluster解析では、被爆者群と対照群とを判別することができ、さらに放射線関連がんマーカーの候補と考えられる発現亢進を示す37プローブを同定できた。これらには、DNAJC12、MED10、TRPS1、SBK1などが

含まれていた。

2) 被爆者胃がんにおける放射線関連遺伝子発現、粘液形質発現の検討

蛋白レベルでの発現検索の対象とした胃がん症例116例（被爆者LSS A群67例、対照LSS B群49例）では、LSS AにおいてLSS Bと比較して低分化腺癌が多い傾向にあった粘液形質発現による分類では、高分化型ではLSS AとLSS Bにおいて胃型・腸型の頻度に大きな差はなかったが、低分化型では、LSS Aにおいて腸型が有意に少なかった。通常の胃がんは進行とともに腸型が増加することが知られている。そこで、ステージ別にみると、Stage I/IIではLSS AとLSS Bにおける胃型・腸型の頻度に大きな差はなかったものの、Stage III/IVでは、LSS Aにおいて腸型が有意に少なく、胃型が多かった。粘液マーカー別では、Stage III/IVでみると、LSS Aにおいて胃型マーカーであるMUC6陽性が有意に多く、腸型マーカーであるMUC2陽性が有意に少なかった。

H2AXはDNA損傷応答遺伝子のひとつであり、リン酸化型H2AX (γ H2AX)はDNAの二重鎖切断部位に集積するが、様々なヒト腫瘍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ている。 γ H2AXの発現は、LSS Aで30%、LSS Bで13%に認められ、LSS Aで有意に高頻度であった。特に、この傾向はStage III/IVにおいて顕著であった。尚、 γ H2AXの発現は、AFP産生胃がんにおいて高頻度に認められた。

カスタムアレイで抽出した被爆者胃がん と対照胃がん で発現レベルの異なる遺伝子の内、明瞭な染色性が得られたものはversicanとRNase 1であった。Versicanは主に腫瘍の間質細胞に局在していたが、LSS Aでは47%、LSS Bでは64%に陽性であり、ステージ別にみてもLSS Aに陽性症例が有意に少なかった。これは、アレイによる発現

レベルの低下に一致するものと見なされた。また、RNase 1はがん細胞の細胞質に染色されたが、LSS Aにおいて発現が減弱する傾向にあった。

D. 考察

被爆者に発生した固形がん組織を用いた網羅的遺伝子発現解析から特異的発現態度を示す遺伝子を抽出することで、放射線関連がんの診断標的、治療標的の同定を試みている。昨年度のカスタムアレイによる遺伝子発現解析から抽出した被爆者胃がん に特異的な10遺伝子について、蛋白レベルの発現解析を行なった。その内、被爆者胃がん で有意に発現低下が確認されたのはversicanであった。主に間質細胞によって産生されるコンドロイチン硫酸の一つであり、細胞表面と細胞外基質との結合に重要な役割を果たす。がん間質では広く陽性を示し、in vitroでは腫瘍増殖や血管新生を高めることが知られている。肺がん、乳がん、卵巣がんなどで発現が亢進し、再発率やリンパ節転移率が高くなり、予後不良因子との報告がある。多機能性細胞表面分子CD44のリガンドでもある。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。さらに、GeneChip解析によって放射線関連がんのマーカー遺伝子の候補が新たに抽出された。これらについても、蛋白レベルでの発現の検証ならびに細胞生物学的・生化学的機能解析が必要である。

これまでの被爆者胃がんの組織学的解析から、被爆者ではびまん性低分化腺癌が多い傾向が指摘されていた。今回の粘液形質発現の検索によって、被爆者ではMUC6陽性MUC2陰性の胃型がんの多いことが明らかとなった。この結果は、被爆者胃がんの特徴を明らかにしたという意義とともに、胃がんにおいて放射線との関連解析を行な

う際には、粘液形質の特異性を考慮する必要性を示すものである。

DNA二重鎖切断部位に集積する γ H2AXの発現が被爆者胃がんにおいて有意に高頻度に認められた。DNA傷害レスポンス遺伝子は様々なヒト腫瘍の発生早期に関与することが示唆されており、我々の大腸腫瘍の検討でも高度異型腺腫における発現を確認している。しかしながら、胃がんにおける検討では、被爆者群、対照群ともに早期がんでは発現は殆ど認められず、進行がんにおいて被爆者群で発現の亢進が見出された。したがって、放射線被曝に関連したがん化への関与とは言いがたいが、そのマーカーとしての意義はあるものと考えられる。尚、分担研究者の楠は、培養Tリンパ球を用いたフローサイトメトリーによる γ H2AXの測定は、放射線量と相関し再現性に優れ、放射線誘発 γ H2AXの個人差を明確に判別できることを示している。少なくとも、個人のDNA損傷修復に関係した放射線感受性の評価の指標となる可能性がある。

E. 結論

被爆者に発生した胃がんと対照群の新鮮凍結試料についてのGeneChip解析により、新たに被爆者胃がんにおいて有意に発現が亢進している37遺伝子を同定した。放射線関連胃がんのマーカーの候補として注目される。蛋白レベルでの発現の検証を継続するとともに、機能解析を進める予定である。また、免疫組織化学的検討から、MUC6陽性MUC2陰性の胃型がんが多いこと、 γ H2AXの発現亢進、versicanの発現減弱などが被爆者胃がんの特徴であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mitani Y, Yasui W, et al. Reg IV is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncogene* 2006 (in press).
2. Matsumura S, Yasui W, et al. DNA demethylation of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) is correlated with gene expression and its possible involvement of lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Cancer* 2007 120:1689-1695
3. Hasegawa Y, Yasui W, et al. DNA methylation of the RIZ1 gene is associated with nuclear accumulation of p53 in prostate cancer. *Cancer Sci* 2007 98:32-36.
4. Yasui W, et al. Systematic collection of tissue specimens and molecular pathological analysis of newly diagnosed solid cancers among atomic bomb survivors. *International Congress Series* 2006 (in press).
5. Yasui W, et al. Molecular pathobiology of gastric cancer. (Review) *Scand J Surg* 2006 95:225-231.
6. Kurayoshi M, Yasui W, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* 2006 66: 10439-10448.
7. Takahashi K, Yasui W, et al. The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 2006 66: 9408-9419.
8. Kose K, Yasui W, et al. Nuclear and

- mitochondrial DNA microsatellite instability in gastrointestinal stromal tumors. *Pathobiol* 2006 73: 93-97.
9. 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* 2006 56: 200-205.
 10. Nakayama H, Yasui W, et al. Lack of pericryptal fibroblastic cells adjacent to intestinal epithelial metaplastic glands. *Histopathol* 2006 48: 610-612.
 11. Ishikawa N, Yasui W, et al. Characterization of SEZ6L2 cell-surface protein as a novel prognostic marker for lung cancer. *Cancer Sci* 2006 97: 737-745.
 12. 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* 2006 25: 2546-2557.
 13. Sanada Y, Yasui W, et al. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol* 2006: 208: 633-642.
 14. Kobayashi T, Yasui W, et al. Glycogen synthase kinase-3 and H-prune regulate cell migration by modulating focal adhesions. *Mol Cell Biol* 2006 26: 898-911.
 15. Oue N, Yasui W, et al. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer* 2006 106: 1250-1259.
 16. Aung PP, Yasui W, et al. Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. *Virchow Archiv*, 2006 448: 428-434.
2. 学会発表
 1. Oue N, Yasui W, et al. Expression and localization of Reg IV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: Expression of Reg IV is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation of gastric adenocarcinoma. The 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington, D.C., April 1-5, 2006
 2. Yasui W. Systematic collection of tissue specimens and molecular pathological analysis of newly diagnosed solid cancers among Atomic-bomb survivors. The Second Nagasaki Symposium of International Consortium for Medical Care of Hibakusha and Radiation Life Science. Symposium "Studies on atomic bomb survivors and related issues", Nagasaki (Japan), July 26-27, 2006
 3. Yasui W, et al. Systematic search for novel biomarker of gastric cancer through SAGE data analysis. The 4th International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, Symposium C "Gastric Cancer", Honolulu, Hawaii (USA), August 24-26, 2006
 4. Oue N, Yasui W, et al. High expression of h-Prune in gastric cancer with gastric phenotype: expression of h-prune is associated with poor survival in gastric cancer. The 11th International Congress of Metastasis Research Society jointed with the 15th Annual Meeting of Japanese Association for Metastasis Research, Tokushima (Japan), September 3-6, 2006
 5. Yasui W, et al. Molecular pathogenesis of gastrointestinal neoplasia: Stomach. The

XXVI International Congress of the
International Academy of Pathology,
Symposium SYM48 “Gastrointestinal
Pathology: Molecular pathogenesis of
gastrointestinal neoplasia “, Montréal
(Canada), September 16-21, 2006

2006

6. Oue N, Yasui W, et al. RegIV
overexpression inhibits apoptosis. The 16th
International Symposium of the Hiroshima
Cancer Seminar “Cancer Stem Cell“,
Hiroshima (Japan), October 22, 2006
7. Hasegawa Y, Yasui W, et al. DNA
methylation of the RIZ1 gene is associated
with nuclear accumulation of p53 in
prostate cancer. The 16th International
Symposium of the Hiroshima Cancer
Seminar “Cancer Stem Cell“, Hiroshima
(Japan), October 22, 2006
8. Kuniyasu H, Yasui W, et al. Increased
peritoneal metastasis of RegIV-transfected
MKN28 gastric carcinoma cells. The 16th
International Symposium of the Hiroshima
Cancer Seminar “Cancer Stem Cell“,
Hiroshima (Japan), October 22, 2006
9. Kurayoshi M, Yasui W, et al. Expression of
Wnt-5a is correlated with aggressiveness of
gastric cancer by stimulating cell migration
and invasion. The 16th International
Symposium of the Hiroshima Cancer
Seminar “Cancer Stem Cell“, Hiroshima
(Japan), October 22, 2006
10. 安井 弥. 胃癌のトランスクリプトームダ
イセクション- 探索と展開-. 第17回日本
消化器癌発生学会, レクチャー, 9月15日,
名古屋, 2006
11. 大上直秀, 安井 弥, 他. 胃型胃癌、腸型胃
癌: SAGE法で同定した胃癌関連遺伝子と胃
型腸型形質との関連. 第17回日本消化器癌
発生学会, シンポジウム, 9月15日, 名古屋,

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