

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 財団法人放射線影響研究所疫学部

放射線影響研究所の寿命調査集団において、固形がん罹患に対する放射線の影響を検討した。本集団の105,427人を対象として、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。今後も研究を継続して、若年で被曝した者の放射線リスクを明らかにする必要がある。

A. 研究目的

放射線影響研究所が長期の追跡調査を行っている寿命調査集団は、

- ・約12万人からなる大規模集団であること
 - ・全年齢の男女を含むこと
 - ・個人ごとに被曝線量が推定されており、被曝線量が広い範囲にわたること
 - ・精度の高いがん罹患、死亡のデータが得られていること
 - ・臓器別の被曝線量が推定されていること
- などから、放射線被曝と固形がん罹患の関連を疫学的に明らかにすることが可能である。

本研究は、以前の報告から追跡期間を11年間延長し、固形がん罹患の時間的推移のパターンや出生コホート効果に有用な情報を与える原爆後入市者群を分析に含め、さらに新しい線量体系（DS02）を用いて分析を行った。

B. 研究方法

本研究は寿命調査集団120,321人のうち、

- ・1958年までに死亡した、あるいはがんを診断された8,273人
- ・追跡不明となった96人
- ・DS02により被曝線量が推定されなかった6,525人

を除く105,427人（80,180人の被曝者と

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。

（倫理面への配慮）

寿命調査は放射線影響研究所の人権擁護委員会（倫理審査委員会）で審査を受け実施されている。がんの罹患に関する情報の利用は、広島市地域がん登録事業および広島県腫瘍登録事業、長崎県がん登録事業の各審査委員会に対して資料利用を申請し、承認を得ている。これらの資料について、各登録のデータの管理を委託されている放射線影響研究所疫学部内で個人識別情報（氏名、性別、生年月日、住所）をもとに寿命調査集団と照合した。死亡については、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た。

C. 研究結果

1. 全体の結果

1958年から1998年までに診断された第一原発がんは17,448例であった。主要な部位別の罹患数と、それぞれのDCO(death certificate only)の罹患数・割合を表1に示す。全固形がんではDCO割合(死亡小票ではじめてがんが発見された罹患数の割合で「診断の信頼性」の指標となる)は9.3%で、良好な値を示した。部位別に罹患数をみると、胃がん、肺がん、結腸がんの順に多かった。DCO割合は部位によって異なり、予後が不良な肝がんでは20%を超えていた。

表1 主要部位における罹患数およびDCO数

部位	罹患数	DCO	
		罹患数	%
全固形がん	17,448	1,616	9.3
胃	4,730	461	9.7
肺	1,759	256	14.6
結腸	1,516	79	5.2
肝	1,494	316	21.2
乳房(女性のみ)	1,073	7	0.7

全固形がんを一つのグループとしてみた場合、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%)が原爆放射線被ばくと関連していると推定された。また、0-2 Gyの範囲では線形の線量反応が認められた。さらに、被曝線量が0.15 Gy以下の対象者に解析を限定した場合にも、統計的に有意な線量反応の証拠が認められた。

全固形がんを一つのグループとしてみた場合、および部位別にみた場合も多く部位について過剰リスクは性別・被曝時年

齢・診断時年齢に伴い有意な変動を示した。被曝時年齢が30歳の場合、70歳における固形がん罹患率は、1 Gy当たり男性で約35% (90% 信頼区間 28%; 43%)、女性で約58% (43%; 69%) 増加すると推定された(表2)。全固形がんを一つのグループとしてみた場合、過剰相対リスクは被曝時年齢が10歳増加する毎に約17%減少し(90% 信頼区間 7%; 25%)、また年齢の1.65乗に比例して減少する(90% 信頼区間 2.1; 1.2)と推定された。

2. 結腸がんに関する結果

結腸がんは1,516例で、全体の9%を占めていた。DCO割合は5%、組織診で診断された割合は90%であった。結腸がんにおいても、0-2 Gyの範囲では線形の線量反応が認められた。過剰相対リスクのモデルにより、被曝線量が5mGy以上の者における671例の結腸がんのうち、11.4%が放射線に起因すると推定された(表3)。

過剰相対リスク(30歳で被曝した者の70歳におけるリスク、結腸線量1Gy当たり)は、男が0.73(90% 信頼区間 0.38; 1.17)、女が0.34(90% 信頼区間 0.13; 0.63)でいずれも有意であり、男は女の約2倍であった。男女平均の過剰相対リスクは0.54(90% 信頼区間 0.30; 0.81)であった。

おもに検診で発見された粘膜がんが対象に含まれている可能性があるため、可能な限り進展度の情報を入手し上皮内の症例を除外して分析を行った。その結果、過剰相対リスクは男女平均で0.44(90% 信頼区間 0.21; 0.72)であり、推定値は少し低下したものの有意であった。

表2 全固形がんにおける過剰相対・絶対リスクと被曝時・診断時年齢による変化

モデル	1Gy当たりのリスク*			性別の比 (女/男)	被曝時年齢が 10歳上がる ごとの変化	診断時年齢 での変化 (累乗)
	男	女	男女平均			
過剰相対 リスク	0.35 (0.28, 0.43)†	0.58 (0.43, 0.69)	0.47 (0.40, 0.54)	1.6 (1.31, 2.09)	-17% (-25%, -7%)	-1.65 (-2.1, -1.2)
過剰絶対 リスク	43.2‡ (32.7, 55.1)	59.8 (51.0, 69.1)	51.5 (43.3, 60.2)	1.4 (1.10, 1.79)	-24% (-32%, -16%)	2.38 (1.9, 2.8)

* 30歳で被曝した者の70歳におけるリスク(結腸線量1Gy当たり)

† 90%信頼区間 ‡ 過剰罹患数(10,000人年・Gy当たり)

表3 被曝線量別にみた結腸がん罹患数

被曝線量†	罹患数	推定過剰 罹患数	放射線に 起因する 割合
<0.005	845	0	0.0%
0.005-0.1	367	8	2.0%
0.1-0.2	90	7	7.9%
0.2-0.5	103	16	16.2%
0.5-1	53	18	30.4%
1-2	37	19	47.2%
2+	21	11	64.0%
総数	1,516	78	11.4%‡

† 重み付け結腸線量(Gy)

‡ 被曝線量0.005Gy以上における割合

3. 直腸がんに関する結果

直腸がんは838例で、全体の5%を占めていた。DCO割合は5%、組織診で診断された割合は90%であった。過剰相対リスクのモデルにより、被曝線量が5mGy以上の者における376例の直腸がんのうち、3.7%が放射線に起因すると推定された(表4)。

過剰相対リスク(30歳で被曝した者の70歳におけるリスク、膀胱線量1Gy当たり)は、男女平均で0.19(90%信頼区間 -0.04; 0.47)であり、有意ではなかった。

表4 被曝線量別にみた直腸がん罹患数

被曝線量†	罹患数	推定過剰 罹患数	放射線に 起因する 割合
<0.005	462	0	0.0%
0.005-0.1	230	1	0.6%
0.1-0.2	48	1	2.6%
0.2-0.5	45	3	5.7%
0.5-1	31	3	11.7%
1-2	16	3	20.1%
2+	6	2	31.1%
総数	838	14	3.7%‡

† 重み付け膀胱線量(Gy)

‡ 被曝線量0.005Gy以上における割合

D. 考察

本研究では、以前の報告から追跡期間を11年間延長し、原爆後入市者群を分析に含め、さらに新しい線量体系(DS02)を用いて分析を行ったが、全体としての傾向は以前の報告と同様であった。本報告では、全

体の結果と、部位別の結腸と直腸に着目して分析結果を記述した。

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。しかし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一方、直腸では有意な関係が認められなかった。検診で発見される結腸がんは、便潜血反応陽性者に対する内視鏡検査により発見される腺腫性ポリープ内に認められることが多く、特に中高年の男性に罹患率が高い傾向にある。今回、進展度の情報により上皮内の症例を除外して再分析を行ったが、過剰相対リスクは依然として有意であった。

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癌と浸潤癌の鑑別を行い、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。

E. 結論

寿命調査集団の105,427人を対象として、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ところ、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、0-2Gyの範囲では線形の線量反応が認められた。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。今後も研究を継続して、若年で被曝した者の放射線リスクを明らかにする必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Preston DL, Ron E, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, Soda M, Mabuchi K, Kodama K. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. Radiat Res (in press)

2. 学会発表

1. 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, 2006年5月19日-20日.

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

研究協力者

早田みどり、船本幸代、徳岡昭治、

児玉和紀、（放射線影響研究所）

馬淵清彦、E. Ron（米国国立がん研究所）

D. Preston（ヒロソフト・インターナショナル）

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 (財) 放射線影響研究所 放射線生物学/分子疫学部 江口英孝

研究要旨 広島・長崎に原子爆弾が投下されてから60年以上経過したが、未だ放射線による全固形癌のリスク上昇が認められている。しかし、放射線がどのようなメカニズムで各固形癌の発癌に関わっているか明らかになっていない。その手がかりを得るため、放射線によるリスク上昇が被爆から短期間で認められる甲状腺乳頭癌と、期間がより長い大腸癌を対象として発癌に関与する遺伝子変化と放射線被曝との関連について検討した。甲状腺乳頭癌では*RET/PTC*遺伝子再配列と、昨年度被曝線量と負の相関を見出した*BRAF*遺伝子変異と併せて解析を行った。*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。また、この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、大腸癌では、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。以上より、放射線は発癌過程におけるジェネティック・エピジェネティックな変化と関連し、原爆放射線被曝による発癌誘導メカニズムの多様性が示唆される。

A. 研究目的

原爆被爆者における固形癌の発症リスクおよび発症時期は臓器によって異なることがコーホート研究により明らかになっている。甲状腺癌は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り、被爆者では被曝後約20年で発症のピークを迎える。一方、結腸癌は被曝後30年以上経過してから放射線によるリスクの上昇が認められてくる。これらの固形癌における遺伝子変化を放射線被曝と関連付けて解析し、放射線被曝による発癌メカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。

B. 研究方法

広島・長崎の原爆被爆者（寿命調査集団の対象者）で発生した成人甲状腺乳頭癌71症例（被曝線量=0 mGyの非被爆者21名、被曝線量>0 mGyの被爆者50名）、ならびに（財）日本公衆衛生協会（厚生労働省）委託研究費「原爆症に関する調査研究」班（広島班長：安井弥）により収集された広島の寿命調査集団の対象者で発生した大腸癌51症例（被曝線量=0 mGyの非被爆者 16名、被曝

線量>0 mGyの被爆者35名）を対象とする。甲状腺癌は1956年から1993年まで、大腸癌は1986年から2001年までの症例であり、研究試料は全てホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用いた。病理組織型の分類はWHO分類に従って行った。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い、回収した癌部あるいは非癌部組織からDNA/RNAを抽出した。*RET/PTC*遺伝子再配列は逆転写反応の後、*RET*遺伝子のTKドメインならびに*RET/PTC1-3*についてはRT-PCR法で、コモンタイプ以外の再配列については、5' RACE法を行い、同定した。*BRAF*遺伝子の変異は600番目のコドンを含む領域断片をPCRで増幅した後、RFLPと直接塩基配列を用いて確認した。マイクロサテライト不安定性は6種類のマーカー(*BAT25*, *BAT26*, *NR-21*, *D2S123*, *D5S346*, *D17S250*)を用いて決定した。*MLH1*遺伝子のメチル化は制限酵素 *Mlu*Iを用いたCOBRA法により決定した。また、*MLH1*遺伝子のヘテロ接合性消失(LOH)は、3種類のSTSマーカー(*D3S1561*, *D3S1611*, *D3S1007*)断片長の蛍光シークエンサーによ

る解析および4種類のSNPマーカー(rs4535177, rs1800734, rs9857252, rs9819348)でのRFLPを用いて決定した。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)

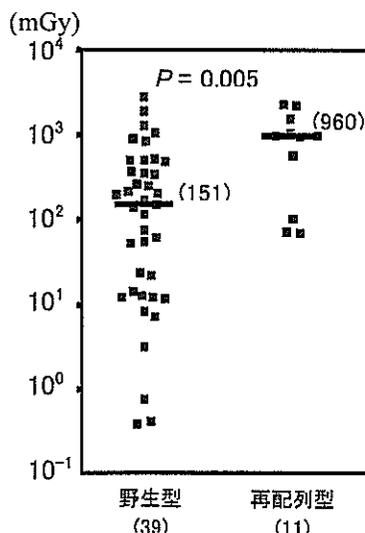
放射線影響研究所の人権擁護委員会ならびに遺伝子研究に関する倫理委員会、さらに大腸癌の解析ではこれらと併せて広島大学医学部倫理委員会の承認を受けて行っている。連結不可能匿名化の後、試料ならびに臨床疫学情報を用いた解析を行っている。

C. 研究結果

1) 甲状腺癌

被爆成人甲状腺乳頭癌症例においてRET/PTC遺伝子再配列を有する症例は再配列を持たない症例に比べ、有意に被曝線量中央値が高かった(図1)。

図1. 被爆甲状腺乳頭癌患者におけるRET/PTC再配列の有無による被曝線量分布



甲状腺乳頭発癌初期における重要なイベントであるMAPキナーゼシグナルの恒常的な活性化には、RET/PTC遺伝子再配列とともにBRAF遺伝子の点突然変異が主たる役割を担っていることが知られている。次に、このRET/PTC遺伝子再配列とBRAF遺伝子の関係について検討した。被爆甲状腺乳頭癌50症例中、RET遺伝子再配列とBRAF遺伝子変異を同時に有する症例は一例もなく、これらが排他的に起こっていることが示唆された

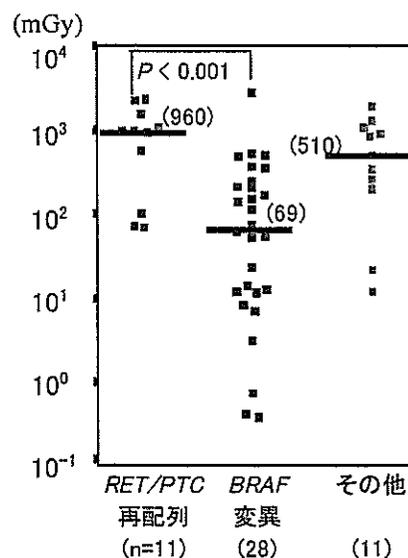
(表1)。

表1 被爆甲状腺乳頭癌患者においてBRAF変異とRET/PTC再配列は排他的である

RET	BRAF		P
	野生型	変異	
野生型	11	28	<0.001
再配列	11	0	

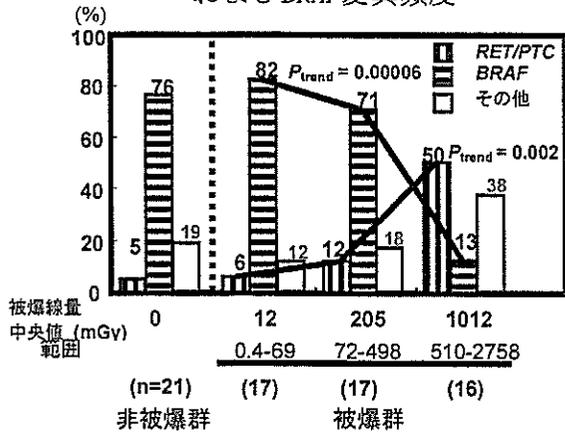
そこで、RET/PTC遺伝子再配列を有する11症例、BRAF遺伝子の点突然変異を有する28症例およびいずれの変異も有さない11症例の3群に分けて、被曝線量との関係について検討した(図2)。RET/PTC遺伝子再配列を有する症例はBRAF遺伝子突然変異症例に比べ、有意に被曝線量中央値が高値を示した。興味深いことに、これらいずれの遺伝子変化も示さない群の被曝線量中央値も510 mGyと高い値を示した。

図2. RET/PTC再配列およびBRAF変異の有無による被曝線量分布の比較



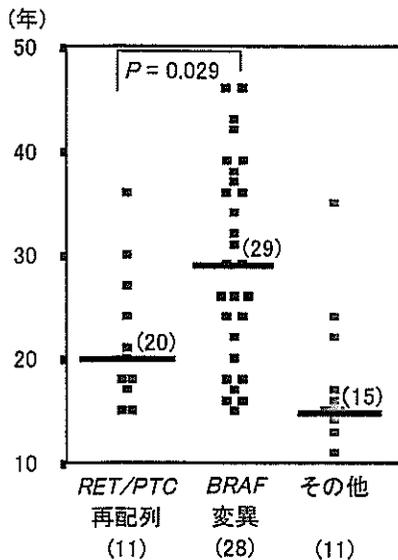
さらに被曝群を被曝線量の3分位で分け3群とし、各群における遺伝子変化の頻度を比較した。RET遺伝子再配列は被曝線量が高くなるにつれ頻度が上がり、一方、BRAF変異頻度は被曝線量が高くなるにつれ、低頻度を示した(図3)。

図3 被曝線量群別でのRET/PTC再配列およびBRAF変異頻度



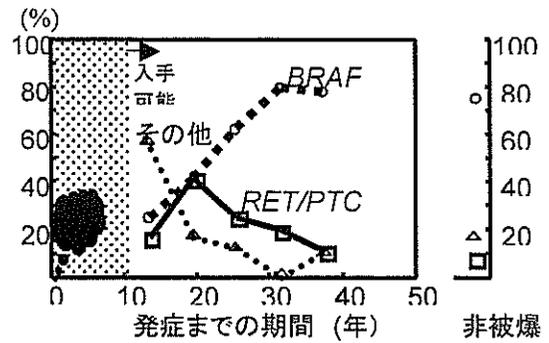
次に被曝から診断までの期間について比較した。RET/PTC再配列を有する症例はBRAF変異症例に比べ、有意に診断までの期間が短かった(図4)。また、これらいずれの遺伝子変化も示さない群の期間も15年と低い値を示した。

図4. RET/PTC再配列およびBRAF変異の有無による被曝から診断までの期間



さらに被曝から診断時までの期間別でのこれらの変異頻度の比較を行った(図5)。BRAF遺伝子変異は被曝後最も短い期間では17%と低頻度であるが、時間が経つにつれ変異頻度は上昇し、30年で非被曝群と同程度の頻度となった。一方、RET/PTC再配列は被曝後20年で変異頻度が42%とピークに達し、その後緩やかに頻度が低下する。さらにこれらいずれの変異も持たない群の頻度が、診断までの期間が最も短いときに頻度が58%を示し、その後期間が長くなるにつれ頻度は減少した。

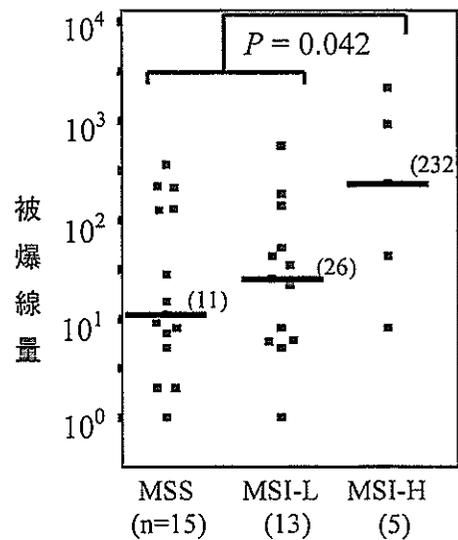
図5. 被曝から診断までの期間と各遺伝子変化頻度との関連



2) 大腸癌

原爆被曝者において結腸癌は放射線による発癌リスクの上昇が確認されているが、直腸では認められていない。散発性の大腸癌ではマイクロサテライト不安定性(MSI)な癌が近位結腸で好発することが報告されていることから、原爆被曝者大腸癌におけるMSIについて検討を行った。高度のMSI(MSI-H)を呈する5症例は全例が近位結腸で発症しており、MSS/MSI-Lに比べ被曝線量中央値が有意に高く(P=0.042)、放射線被曝とMSIとの関連が示唆された。

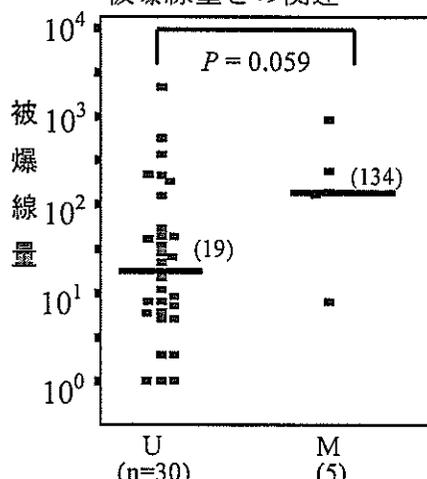
図6. MSIと被曝線量との関連



散発性MSI-H大腸癌では、MLH1遺伝子のメチル化による不活化が、DNA修復酵素欠失において主な要因であることが報告されている。そこでMLH1遺伝子のメチル化と被曝線

量との関係について検討した。MLH1遺伝子のメチル化が起きている症例は非メチル化の症例に比べ被曝線量中央値が高い傾向を示した(図7)。

図7. MLH1遺伝子のメチル化と被曝線量との関連



被曝大腸癌患者においても、このMLH1遺伝子のメチル化とMSI状態との間に有意な相関が認められた(表2)。特に、MSI-H被曝大腸癌5症例のうち3症例でMLH1遺伝子のメチル化が確認された。

表2 被曝大腸癌患者におけるMSIとMLH1遺伝子メチル化との関連

	MLH1		P_{trend}^*	P^{**}
	UM	M		
MSS	14	1	0.017	0.017
MSI-L	12	1		
MSI-H	2	3		

*Cochran-Armitage test

**Fisher's exact test for MSS/MSI-L vs.

次にメチル化以外の遺伝子変化としてMLH1遺伝子のLOHをMSI-Hの5症例について調べたところ、全症例でLOHが確認された(表3)。

表3 MSI-H被曝者大腸癌患者におけるMLH1遺伝子メチル化とLOHの関連

		MLH1 methylation	
		UM	M
MLH1	Retained	0	0
LOH	Loss	2	3

D. 考察

これまで多くの *in vitro*, *in vivo* の実験により、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、さらに、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原爆放射線被曝による成人甲状腺乳頭発癌に強く関与することが示唆された。これまでチェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺癌でRET/PTC遺伝子再配列頻度の上昇が報告されているが、成人発症放射線関連甲状腺癌において初めてその関与を明らかにした。さらに、RET/PTC、BRAFいずれの遺伝子変化も有さない症例の被曝線量中央値が高く、また被曝から診断までの期間が短いことから、まだ未同定の症例の中にRET/PTC遺伝子の再配列以外の放射線被曝によって直接的に誘発される遺伝子変化による発癌経路を経るものの可能性が示唆された。

大腸癌におけるMSI-Hの5症例は全例、近位結腸で発症しており、また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た。MSIの分子機構として、DNA修復酵素遺伝子MLH1のメチル化ならびに欠失(LOH)について解析したところ、MSI-Hの5症例は全例でLOHが認められ、この遺伝子の不活化が被曝者MSI-H大腸癌の主たる要因であることが示唆され、さらにMLH1遺伝子のメチル化と被曝線量との関係が示唆されたことから、ジェネティックな変化だけでなく、エピジェネティックな変化も被曝者大腸癌で重要な役割を担っていることが想起される。これまで、放射線による遺伝子の変化としては直接的な作用によるDNA二重鎖の切断および遺伝子再配列が注目されてきたが、近年、マウスを用いた動物実験において、急性および慢性の放射線被曝により特定の遺伝子のメチル化が誘発されることが示されてきており、放射線による発癌機構におけるエピジェネティックな変化の関与は今後の重要な課題と考えられる。

E. 結論

今回の解析により、甲状腺乳頭癌では遺伝子再配列と、一方大腸癌では遺伝子のメチル化と放射線被曝との関係が示された。すなわち、放射線被曝が発癌過程における遺伝子変化に与える影響が組織によって異なり、また発症時期にも関係することが示唆される。今後さらに症例数を増やすとともに、他の変化についても検討することの重要性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi K, Eguchi H, Arihiro K, Ito R, Koyama K, Soda M, Cologne J, Hayashi Y, Nakata Y, Nakachi K, Hamatani K. The presence of BRAF point mutation in adult papillary thyroid carcinomas from atomic bomb survivors correlates with radiation dose. *Mol Carcinog*. 46(3):242-248. (2007)

Sogon T, Masamura S, Hayashi S-I, Santen RJ, Nakachi K, Eguchi H. 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*. in press

Sueoka N, Sato A, Eguchi H, Komiya K, Sakuragi T, Mitsuoka M, Satoh T, Hayashi S, Nakachi K, Sueoka E. Mutation profile of EGFR gene detected by denaturing high-performance liquid chromatography in Japanese lung cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 133:93-102. (2007)

Ueda H, Ito M, Eguchi H, Tanaka S, Yoshihara M, Haruma K, Hatakeyama M, Chayama K: 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* 73:47-53. (2006)

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*. 54:773-780. (2006)

2. 学会発表

Eguchi H, Hamatani K, Taga M, Ito R, Katayama H, Kodama K, Tahara E, Matsumura S, Yasui W, Nakachi K. Microsatellite instability in colorectal cancers among atomic-bomb survivors. The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar, 2006, 22 October 2006, Hiroshima

Taga M, Eguchi H, Hamatani K, Ito R, Katayama H, Kodama K, Tahara E, Matsumura S, Yasui W, Nakachi K. Mutations of TP53, KRAS, and EGFR genes in lung cancer from atomic bomb survivors. The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar, 2006, 22 October 2006, Hiroshima

Eguchi H, Taga M, Nakachi K, Hamatani K. 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, 6 September 2006-9 September 2006, Kobe.

Hamatani K, Eguchi H, Taga M, Nakachi K. Papillary thyroid carcinogenesis among atomic-bomb survivors. The 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, 2 July 2006-6 July 2006, Prague, Czech

Neriishi K, Nakachi K, Sharp GB, Eguchi H, Grant EJ, Cologne JB, Land CE, Stevens RG, Izumi S. 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, 6 November 2006-9 November 2006, Philadelphia, Pennsylvania, USA

濱谷清裕, 江口英孝, 高橋恵子, 多賀正尊, 伊藤玲子, 今井一枝, 安倍邦子, 有廣光司, 藤原 恵, 中地 敬 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, 2006年9月28日-2006年9月30日, 横浜

江口英孝, 濱谷清裕, 多賀正尊, 伊藤玲子, 今井一枝, 片山博昭, 田原榮一, 和泉志津恵, 松村俊二, 安井 弥, 中地 敬 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, 2006年9月28日-2006年9月30日, 横浜

高橋恵子, 濱谷清裕, 江口英孝, 多賀正尊, 伊藤玲子, 今井一枝, 安倍邦子, 藤原 恵, 有廣光司, 仲田義啓, 中地 敬 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, 2006年9月28日-2006年9月30日, 横浜

多賀正尊, 江口英孝, 濱谷清裕, 伊藤玲子, 今井一枝, 片山博昭, 田原榮一, 和泉志津恵, 松村俊二, 安井 弥, 中地 敬 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, 2006年9月28日-2006年9月30日, 横浜

内藤真理子, 江口英孝, 石田喜子, 西尾和子, 若井建志, 玉腰暁子, 浜島信之 日本多施設共同コーホート研究 (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, 2006年9月28日-2006年9月30日, 横浜

鎌石和男, 中地 敬, Sharp GB, 江口英孝, Grant EJ, Cologne JB, Land CE, Stevens RG, 和泉志津恵 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, 2006年5月19日, 広島

多賀正尊, 江口英孝, 濱谷清裕, 伊藤玲子, 今井一枝, 片山博昭, 児玉和紀, 松村俊二, 安井弥, Harris CC, 中地 敬 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, 2006年5月19日-2006年5月20日, 広島

江口英孝, 濱谷清裕, 多賀正尊, 伊藤玲子, 今井一枝, 片山博昭, 児玉和紀, 松村俊二, 安井弥, 中地 敬 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, 2006年5月19日-2006年5月20日, 広島

濱谷清裕, 江口英孝, 小山和章, 向井真弓, 林雄三, 中地 敬. 改良型 SMART RACE 法のホルマリン固定-パラフィン包埋甲状腺がん組織より抽出した RNA への適用: 被爆者甲状腺がんにおける RET/PTC8 の検出 第47回 原子爆弾後障害研究会, 2006年6月4日, 長崎

濱谷清裕, 江口英孝, 高橋恵子, 多賀正尊, 伊藤玲子, Cologne JB, 早田みどり, 林 徳眞吉, 安倍邦子, Rickinson AB, 有廣光司, 林 雄三, 中地 敬 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, 2006年5月19日-2006年5月20日, 広島

高橋恵子, 濱谷清裕, 江口英孝, 多賀正尊, 伊藤玲子, 今井一枝, Cologne JB, 早田みどり, 林 徳眞吉, 安倍邦子, 藤原 恵, 有廣光司, 林 雄三, 仲田義啓, 中地 敬. 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, 2006年5月19日-2006年5月20日, 広島

鎌石和男, 中地 敬, Sharp GB, 江口英孝, Grant EJ, Cologne JB, Land CE, Stevens RG, 和泉志津恵 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, 2006年6月4日, 長崎

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) 放射線発がん感受性の個体差の生物学的機序を解明するための有効な手段を探る目的で、試験管内放射線感受性および生体内遺伝的不安定性を、それぞれヒトTリンパ球の γ H2AXのレベルおよびマウス網状赤血球小核頻度を指標として検討した。放射線誘発 γ H2AXレベルは同じ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。これらの測定系は原爆被曝者コーホートにおける放射線感受性ならびに遺伝的不安定性の評価に応用可能であることが示唆された。

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曝者の追跡調査から明らかにされている。しかし、放射線発がんに対する感受性の個体差の機序については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同定することは、原爆被曝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）の原爆被曝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個体は放射線発がんのリスクが高いという仮説を検討する。

原爆被曝者のがん発生リスク評価のための生物学的指標として、グリコフォリンA（GPA）遺伝子座の突然変異体頻度が有用であることを示してきた。しかしながら、原爆放射線の物理学的線量推定にはある程度の誤差があり、GPA変異体頻度に見られる個人差には推定線量の誤差も含まれると考えられている。したがって、試験管内の一定の放射線量暴露で生じる遺伝子障害の程度によって個人の放射線感受性を評価し、

GPA変異体頻度が生体内での放射線遺伝子障害の感受性を確かに反映しているか検証する必要がある。また、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、試験管内放射線照射後の遺伝子障害を正確かつ簡便に評価できる測定系を確立する必要がある。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たヒトTリンパ球の γ H2AXレベル測定系を確立し、この測定系が試験管内放射線感受性を評価に有効であるか検討した。

放射線被曝が原因で生体の細胞に遺伝子障害が生じる機構として、放射線による細胞DNAの直接切断の他に、放射線を直接浴びた細胞の子孫細胞や近傍の細胞に遺伝子損傷が生じ易くなるという、遺伝的不安定性の誘導が考えられている。近年、細胞に遺伝的不安定性が誘導されることが、放射線などの環境変異原暴露によって細胞ががん化する重要な過程の一つとみなされるようになった。しかしながら、原爆被曝者コーホートで測定されたGPA変異体頻度に、遺伝的不安定性によって生じた変異体がどの程度含まれるのか不明であり、放射線発

がんのリスクに遺伝的不安定性の誘導が実際に寄与しているか検討不可能であった。

遺伝子切断により生じた小核を有する細胞は細胞分裂が不成功に終わるので、生体内で短寿命である。放射線で直接生じた小核を有する細胞も長く生きられない。したがって、放射線照射後長期間を経て検出される小核は細胞の遺伝的不安定性に起因するものと考えられ、生体細胞の遺伝的不安定性の有効な指標と期待される。今回、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、放射線照射後マウス生体内で長期間継続する可能性のある遺伝的不安定性の評価を試みた。

B. 研究方法

フローサイトメトリーによる γ H2AXの細胞内レベルの測定には、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 γ H2AXの発現量をFACScanで測定した。同じ6名の健康成人について3回の採血を行い、測定の再現性を検討した。また、同一サンプルを用いてフローサイトメトリーで得られるH2AXの細胞内レベルの値と、顕微鏡下で計測される γ H2AXフォーカスの細胞あたりの数を比較した。

網状赤血球MN頻度の測定は、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し、マイナス80度メタノール固定後、CD71-FITC、CD61-PE抗体およびPIで染色して、FACScanを用いて解析した。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。マウスの飼育は、無菌ケージ内で滅菌給水、給餌にて行った。

(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。マウスを用いた実験については、放影研の実験動物管理委員会によって承認されている。

C. 研究結果

Tリンパ球の試験管内放射線誘発 γ H2AX測定の再現性を検討する目的で、同じ6名の健康成人について3回の異なる時点で採血を行い、実験を行った。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($p=0.243$)、個人間に有意な違いを認めた($p=0.007$)。これら個人間で最大1.5倍のレベルの差があった。同様の個人差は、同じ健康成人から適当に選んだ2つのサンプルを可視化したイメージで解析し、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た。したがって、フローサイトメトリーで解析された γ H2AXレベルの差異はDNA損傷の程度の差異とほぼ一致すると思われる。培養Tリンパ球における放射線誘発の γ H2AXレベルの差と、調べたサンプル中のリンパ球サブセットの割合には関係がなかった。今回の結果から、培養Tリンパ球用いる γ H2AXフローサイトメトリーは個人のDNA損傷修復に関係した放射線感受性の評価に有用であることが示唆される。

マウスの末梢血MN頻度の測定については、まず、放射線の急性効果に対する生体内での感受性の評価を試みた。X線全身照射したマウスでは照射後2日目に小核頻度のピークが認められ、その後急速に低下した。照射後2日目の線量効果をC57BL/6およびBALB/cマウスについて調べた結果、いずれの系統でも0.1 Gyという低線量でも有意な放射線の影響が認められ(いずれも $p=0.002$)、小核頻度はそれぞれ0.25%および0.36%であった。この値は、それぞれ非照射マウスに比べ2.3および3.0倍であり、有意な系統差が認められた($p=0.005$)。

小核を有する網状赤血球の生体内寿命は非常に短いので、放射線の遅延効果、すなわち照射後長期間に渡って遺伝的不安定性が生体内で持続するか調べるのが可能である。2.5 Gy全身照射したマウスの照射1年後の小核頻度をC57BL/6およびBALB/cマウスについて調べた結果、それぞれ0.13%および0.19%であった。この値は、0.1 Gyの急性効果よりも低い値であったが、それぞれ同じ年齢の非照射マウスに比べ1.3および1.6倍と有意に高値を示し(それぞれ $p=0.039$, $p=0.035$)、放射線で誘発される遺伝的不安定性が照射1年後においても生体内で検出できることが明らかとなっ

た。また、急性効果と同様に、遺伝的不安定性の程度に有意な系統差が認められた ($p = 0.028$)。

D. 考察

今回検討した測定系を用いることにより、発がん追跡調査が行われている原爆被爆者コーホートで、被爆者個人個人の放射線感受性を急性効果と遅延効果の両側面から評価することが可能であると考えられる。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。

これまで、放射線による遺伝的不安定性は主に試験管内の実験系で検討されており、生体の正常細胞において遺伝的不安定性が放射線照射後長期に認められるかについて十分な証拠は得られていなかった。今回、放射線で誘発される遺伝的不安定性が生体内で長期間持続することが、2.5Gy X線全身照射したマウスの網状赤血球MN頻度を観察することによって明らかにされた。今回の研究結果で示されるように、生体内での放射線誘発遺伝的不安定性の程度は、バックグラウンドの2倍以下と放射線急性効果に比べてはるかに小さく、また、個体差もあると考えられる。このような生体内での放射線遅延効果を検出するには、網状赤血球MN頻度測定系のような高感度な検出法が有効であることが示唆される。

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として、1) 幹細胞のゲノム安定性を制御する遺伝子の変異、2) 造血系細胞のエピジェネティック変化、3) 造血系の加齢促進や炎症反応誘導による酸化ストレスの増加などが考えられる。今後、これらの機構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予定である。また、これら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検討する予定である。

E. 結論

放射線誘発遺伝子障害の感受性指標として、フローサイトメトリーによる培養T細胞 γ H2AXレベルならびに網状赤血球MN頻度解析法を検討した。健康成人6名のT細胞を用いた予備的研究により、試験管内放射線照射後のリン酸化ヒストン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ることが示唆された。網状赤血球MNを指標とする解析法は、異なる系統のマウスにおいて生体内で長期間持続する放射線誘発遺伝的不安定性ならびに放射線感受性の有意な系統差を検出した。また、MN頻度解析法はヒト血液でも解析可能であり、放射線被曝者造血系の遺伝的不安定性の評価に応用可能であ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

Kusunoki Y, Hayashi T and Nakachi K: 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

Kubo Y, Yamaoka M, Kusunoki Y. A preliminary study measuring the number of T-cell receptor-rearrangement excision circles (TREC) in peripheral blood T-cell populations of A-bomb survivors and control populations. *Cytometry Res.*2006; 16(1):33-41.

Hakoda M, Kasagi F, Kusunoki Y, Matsuura S, Hayashi T, Kyoizumi S, Akahoshi M, Suzuki G, Kodama K, Fujiwara S. Levels of Antibodies to Microorganisms Implicated in Atherosclerosis and of C-Reactive Protein among Atomic Bomb Survivors. *Radiat Res.* 2006;166(2):360-6.

Hamasaki K, Imai K, Nakachi K, Takahashi N, Kodama Y, Kusunoki Y. Short-term culture and gammaH2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 2007;48(1):38-47.

2. 学会発表

Hayashi T, Morishita Y, Nagamura H, Imai K, Kusunoki Y, Tahara E, Nakachi K. 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, 23-24 February 2006, Washington DC, USA.

Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y, Tahara E, Nakachi K. Identification of immunologically high-risk individuals of stomach cancer and application to cancer prevention. The 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 1-5 April 2006, Washington DC, USA.

Nakachi K, Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y. Molecular epidemiology on innate-immune defense against cancer. The 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR), 1-5 April 2006, Washington DC, USA.

楠 洋一郎, 山岡美佳, 久保美子, 濱崎幹也, 林 奉権, 京泉誠之, 中地 敬. 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, 2006年6月4日, 長崎.

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学会学術集会, 2006年5月19-20日, 広島.

楠 洋一郎, 久保美子, 山岡美佳, 林 奉権, 今井一枝, 中地 敬. 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, 2006年7月7-8日, 長崎

Hayashi T, Morishita Y, Imai K, Kusunoki Y, Nakachi K. 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, 2-6 July 2006, Prague, Czech.

Morishita Y, Hayashi T, Nagamura H, Maki M, Kubo Y, Kusunoki Y, Nakachi K. Long-term elevation of inflammatory markers among atomic-bomb survivors: Accelerated immunological aging. The 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, 2-6 July 2006, Prague,

Czech.

Nakachi K, Hayashi T, Kusunoki Y, Imai K. Molecular epidemiology on immune defense against cancer. The 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, 2-6 July 2006, Prague, Czech.

中地 敬, 林 奉権, 楠 洋一郎, 今井一枝, 吉田健吾. 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, 2006年9月28-30日, 横浜.

林 奉権, 今井一枝, 楠 洋一郎, 田原榮一, 中地 敬. 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, 2006年9月28-30日, 横浜.

楠 洋一郎, 久保美子, 山岡美佳, 濱崎幹也, 林 奉権, 京泉誠之, 中地 敬. 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, 2006年9月6-8日, 札幌.

濱崎幹也, 児玉喜明, 楠 洋一郎, 高橋規郎, 中村 典, 中地 敬. 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, 2006年9月6-8日, 札幌.

Hayashi T, Morishita Y, Imai K, Nagamura H, Maki M, Yoshida K, Hayashi I, Kusunoki Y, Tahara E, Nakachi K. Effects of inflammation-related gene polymorphism and atomic-bomb radiation exposure on stomach cancer risk. The 16th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar, 2006, 22 October 2006, Hiroshima.

楠 洋一郎, 濱崎幹也, 久保美子, 山岡美佳, 今井一枝, 林 奉権, 中地 敬. 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, 2007年2月16-17日, 福岡.

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

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

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）

研究協力者 増田 雄司（広島大学原爆放射線医科学研究所）

朴 金蓮（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 Pol η 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。我々は、ヒト REV1 が損傷塩基に対して dCMP を取り込むことを明らかにしたが、その詳細な分子機構は不明である。そこでヒト REV1 タンパク質の機能解析を行い dCMP の認識に重要と考えられるアミノ酸残基を同定した。それらのアミノ酸残基が実際に dCMP の認識に機能しているかどうかを実験的に証明するために、それらのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異型 REV1 タンパク質を精製し、その生化学的性質を詳細に解析した。その結果、たった一つのアミノ酸置換によって 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。

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。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」が行われる可能性がある。その結果、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、昨年度に続き「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、変異型のヒト REV1 タンパク質の機能解析を進めた。

B.研究方法

(1) ヒト REV1 タンパク質及び変異蛋白質の精製と機能解析

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、その機能解析を行った。具体的には、1 つのアミノ酸を置換した変異 REV1 蛋白質の各遺伝子を大腸菌で過剰発現させタンパク質を作成した。この蛋白質の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。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) アミノ酸置換した変異型ヒト REV1 の機能解析：

REV1 の N-digit ドメインは、REV1 に特異的な構造のため、REV1 の dCMP 活性に直接的に関係する構造と考えられる。N-digit の N 末端のアミノ酸配列を 9 種の生物で比較したところ、全ての種で保存されている 5 つのアミノ酸を同定した。そこで、ヒト REV1 の詳細な生化学的機能解析を行うために、N-digit ドメインで保存されている 2 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、その機能解析を行った。野生型 REV1 では、template G に対し C を挿入する dCMP 活性が認められる他に、A に対し C を挿入する dCMP 活性が認められた。しかし、T 及び C に C を挿入する活性は非常に弱いものであった。また、U や AP 部位に対し C を挿入する dCMP 活性が確認され REV1 の損傷乗り越え活性を認めた。一方、REV1 のアミノ酸 F348(Phe) を Ala に置換した変異蛋白質での 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、もう一つの変異蛋白である H359(His) を Ala に置換した REV1 変異蛋白質の 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。

D.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。

これまでの解析の結果、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て *hprt* 遺伝子の突然変異生成頻度を測定した結果、これら全ての細胞株は、対照群に比べ有意に高頻度の点突然変異を起こす事を見出した。即ち、これら乳癌細胞株には、点突然変異を起こし易い遺伝的不安定性が誘導されていることを示した。この原因は不明であるが、我々の研究結果も加味して考えると、がんに於ける新しい遺伝的不安定の誘導として注目される。

一方、「損傷乗り越え DNA 合成」における REV1 タンパク質の dCMP 転移活性以外の役割が注目されている。例えば Rev1 は、thymine-thymine dimer を乗り越えて DNA 合成が出来ないが、Pol η の thymine-thymine dimer の損傷乗り越え DNA 合成には Rev1 が必要である。また、DT40 細胞で REV1 を knock out した細胞は、紫外線、放射線、シスプラチン、過酸化水素、さらには MMS 等の広範囲なゲノム障害因子に対し高感受性になる。これらの事は、Rev1 が dCMP 転移活性以外の役割で広く損傷乗り越え DNA 合成に関与していることを示している。さらに、我々が証明した REV1 と REV7 がヘテロダイマーを形成することや Rev1 が Pol κ , Pol η 及び Pol ι と結合することは、REV1 が「損傷乗り越え DNA 合成」で重要な役割を担っていることを示唆している。最近の研究により PCNA が RAD6・RAD18 複合体によりモノユビキチン化されると Yファミリーポリメラーゼに共通に存在するユビキチン結合ドメインにより REV1, Pol κ , Pol η 及び Pol ι は、PCNA に結合することが示された。一方、Pol κ は、benzo[a]pyrene-G adducts や thymine glycol を、Pol η は thymine-thymine dimer を乗り越えて DNA 合成が出来る。これらのことは、fidelity の高いポリメラーゼ δ 等が損傷塩基部位で DNA 合成出来ないとき、ゲノム

損傷の種類により損傷乗り越え型のポリメラーゼと入れ替わり DNA 合成を継続するポリメラーゼスイッチ機構が存在する可能性を示唆している。この様に、損傷乗り越え DNA 合成は、複雑な蛋白質相互作用により高度に制御されており、複製フォークの進行を支えているものと考えられる。REV1 は、これらポリメラーゼ群と競合的に結合することから、損傷乗り越え DNA 合成の中心的役割をなすものと推定され、REV1 の dCMP 転移活性の詳しい生化学的な機能解析が求められている。

そこで本年度は、ヒト REV1 タンパク質の1個のアミノ酸を置換した変異型蛋白質の生化学的性質を詳しく解析した。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。N-digit の N末端のアミノ酸配列を9種の生物で比較したところ、全ての種で保存されている5つのアミノ酸を同定した。そこで、ヒト REV1 の詳細な生化学的機能解析を行うために、N-digit ドメインで保存されている2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機能解析を行った。その結果、REV1 のアミノ酸 F348(Phe)を Ala に置換した変異蛋白質での dCMP 活性や損傷乗り越え活性は、野生型 REV1 に比べ、その活性の特徴に変化はなかった。一方、H359(His)を Ala に置換した REV1 変異蛋白質の損傷乗り越え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、U や AP 部位に対し C を挿入する dCMP 活性は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。このことより、REV1 の dCMP 活性や損傷乗り越え活性は、N-digit ドメインの少数のアミノ酸により規定されていることが明らかとなった。現在、世界的にも損傷乗り越え修復における REV1 の機能と作用機構の解析が行われているが、その全体像は、未だ殆ど解明されていない。今後、REV1 を含め「誤りがちな DNA 合成」機構の解明を進め、放射線発がんに

於ける役割を明らかにしたい。

E. 結論

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。ヒト *REV1* タンパク質の機能解析から、*dCMP* の認識に重要と考えられるアミノ酸残基を同定した。そこで、それらのアミノ酸残基の *dCMP* 活性に於ける役割を解析するため、それらのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異型 *REV1* タンパク質を作成し、その生化学的性質を詳細に解析した。その結果、*N-digit* ドメインのたった一つのアミノ酸置換によって *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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 神谷研二, 増田雄司: 放射線発がんのメカニズム. 広島医学, 59(4), 2006.
2. 朴金蓮, 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* と DNA との相互作用. 広島医学, 59(4), 2006.
3. 明神有紀, 榎本尚樹, 柏原昌次, 神谷研二, 渡辺敦光, 照屋輝一郎, 白畑實隆: 小腸腺窩再生と生存率を用いたマウスにおける発酵乳の放射線防御作用. 広島医学, 59(4), 2006.
4. Masuda, Y., Kamiya, K.: Role of single stranded DNA in targeting *REV1* to primer termini. *J. Biol. Chem.*, 281(34), 2006.
5. 増田雄司, 神谷研二: 損傷乗り越え DNA 合成と発癌. *ゲノム医学*, 7(1), 2007.

2. 学会発表

1. 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, 京都, 2006.5.30-31 (講演要旨集, p.49)
2. 神谷研二, 増田雄司, 梶村順子, 朴金蓮: 次世代の分子バイオドシメトリ一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, 長崎, 2006.6.2 (報告書, p.80-83, 2006.)
3. 朴金蓮, 増田雄司, 神谷研二: 損傷乗り越え DNA 合成に関与するヒト *REV1* の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, 長崎, 2006.6.3 (抄録, p.35, 2006.)
4. 梶村順子, 吉田真衣, 渡辺敦光, 本田浩章, 増田雄司, 川村敏之, 朴金蓮, 楠木洋一郎, 林奉権, 水野久美子, 神谷研二: 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, 長崎, 2006.6.3 (抄録, p.41, 2006.)
5. 神谷研二: 放射線の人体への影響. 広島大学公開講座, 広島, 2006.6.14
6. Gu, Y.Q., Masuda, Y., Kamiya, K.: 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, 京都, 2006.6.18-23
7. 朴金蓮, 増田雄司, 神谷研二: 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, 広島, 2006.7.27

8. 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, 広島, 2006.7.27
9. 増田雄司, 木南凌, 神谷研二: 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, 札幌, 2006.9.6-8 (講演要旨集, p.118, 2006.)
10. 梶村順子, 吉田真衣, 野田朝男, 増田雄司, 楠洋一郎, 浜崎幹也, 林奉権, 神谷研二: 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, 札幌, 2006.9.6-8 (講演要旨集, p.118, 2006)
11. 朴金蓮, 増田雄司, 神谷研二: 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, 札幌, 2006.9.6-8 (講演要旨集, p.120, 2006.)
12. 顧永清, 増田雄司, 神谷研二: 染色体の恒常性維持に必要とされる DNA へリカーゼ PIF1 の機能解析. 日本放射線影響学会第 49 回大会, 札幌, 2006.9.6-8 (講演要旨集, p.119, 2006.)
13. 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, 横浜, 2006.9.28-30 (総会記事, p.177, 2006)
14. 梶村順子, 吉田真衣, 野田朝男, 増田雄司, 楠洋一郎, 浜崎幹也, 林奉権, 神谷研二: 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, 大阪, 2006.11.20-21 (プログラム・要旨集, p77, p115, 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

二重鎖切断修復の分子機構の解明

分担研究者 宮川 清 東京大学大学院医学系研究科

（研究要旨）放射線によるDNA二重鎖切断は数多くあるDNA損傷の中でも最も致命的な損傷である。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。この修復機構の異常はDNA損傷に起因する病態に深く関与するものと考えられるために、未だに機能が不明であるRad51Bのヒト細胞における機能を解析した。そのために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。

A. 研究目的

放射線による致命的なDNA損傷である二重鎖切断は主として非相同性断端結合と相同組換えによって修復される。前者は単純な断端結合であるために、その分子機構も簡単であるのに対して、後者は数多くの分子が関与するきわめて複雑な修復機構である。既に、非相同性断端結合に関わる分子はほぼすべてが同定され、その機能の詳細も明らかにされている。それに対して相同組換えに関わる分子の機能はごく一部のみが知られているにすぎない。

相同組換えで機能が最も詳しく解析されている分子はRad51である。DNAが切断された場合にそれが相同組換えで修復されるためには修復の鋳型となるDNA配列が損傷部位に近接する必要がある。これをペアリングと称するが、これに引き続いて損傷DNAと正常DNAが

交叉する現象がストランド交換と呼ばれている。この一連の現象は相同組換えの前期に相当し、それを制御する中心的分子がRad51である。このRad51に構造的に類似するものとしてRad51パラログと称される分子群が存在する。高等真核生物の体細胞ではRad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3がこれに属する。これらは各々の独自の機能を有していると考えられているが、これまでのところ共通の機能のみが明らかにされている。それらは基本的にRad51と協調した相同組換えの早期に関わる機能である。

放射線発がんの分子機構を考察する上で、放射線によるDNA損傷に対する修復機能を理解することは最も本質的なことである。なぜならば、放射線によってDNA損傷が生成されても、それに対して修復機構が完全に対応すること