

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固形がん発生の分子機構の解明とその  
予防・治療への応用に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安井 弥

平成20年（2008年）年4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
放射線障害に基づく固形がん発生の分子機構の解明とその予防・治療への応用に関する研究 -----	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 -----	14
安井 弥	
2. 放射線障害に基づく乳がん発生の新たな分子機構の解明（エプジェネティックな機構） -----	22
宮本和明	
3. 原爆被曝により発生した固形がんの分子腫瘍学的研究 -----	25
濱谷清裕	
4. 原爆被曝者集団を対象とした放射線発がん感受性の分子疫学研究と予防への応用 -----	30
中地 敬	
5. 放射線による遺伝子障害感受性の個体差に基づく発がんメカニズムの研究 -----	37
楠 洋一郎	
6. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析 -----	42
西 信雄	
7. 放射線発がんにおけるゲノム修復機構の解析 -----	46
神谷研二	
8. 化学療法感受性を規定する分子機構の解明 -----	50
宮川 清	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	54
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	60

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固形がん発生発の分子機構の解明とその予防・治療への応用に関する研究

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** 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、放射線関連固形がんの特徴的なジェネティック・エピジェネティック異常の同定、放射線による固形がんの遺伝的発がん感受性の個体差の解析とリスク評価、放射線によるゲノム障害・修復からみた発がん機構の解明と治療感受性、に関する研究から多くの成果を得た。*versican*と*osteonectin*のがん間質における発現低下が被爆者群で有意に高頻度であり、がん特異的発現遺伝子*Reg IV*の発現は被爆者群で有意に高頻度であった。放射線関連胃がんのマーカー遺伝子となり得るものと考えられる。乳がんにおいて*MDFI*のDNAメチル化異常を同定した。また、乳がんでは発現が亢進あるいは消失している17種類の*microRNA*を見いだした。成人甲状腺がんおよび大腸がんの検討結果からは、放射線が発がん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がん誘導メカニズムの多様性が示唆された。分子疫学的解析により、放射線被曝は低分化型胃がんリスクを有意に増加させること、*IL-10*遺伝子ハプロタイプと放射線被曝とに強い交互作用が存在し、特に*ATTA/ATTA*の放射線被曝によるリスクの増大が顕著であることを見いだした。T細胞介在性の親→F1マウス移植片対宿主病（GVHD）モデルおよびPoly (I:C)投与モデルにおける網状赤血球MN頻度の解析から、炎症が宿主の造血系に遺伝的不安定性を誘導できることが示唆された。放射線被曝が持続性炎症状態を亢進し、その炎症状態によって遺伝的不安定性がもたらされることが、放射線発がんの機序の一つであると推察される。大腸がんの放射線による過剰相対リスクは全結腸で1Gy当たり0.44と有意に上昇していたが、線量反応、到達年齢影響修飾、男女リスク比のいずれも詳細部位別には有意な差を認めなかった。放射線によるゲノム障害・修復からみた発がん機構に関して、*REV1*の1アミノ酸置換変異蛋白質の機能解析から、生化学的特性を決定している基質特異性と損傷乗り越えDNA合成活性の分子機構の一端が明らかになった。DNA損傷に対する相同組換え修復において中間体の解消を制御する酵素である*Mus81-Eme1*複合体が、シスプラチンを代表とするDNA架橋剤に対して特異的に感受性を変化させることが明らかとなった。放射線に対する損傷応答・修復経路の分子機構の解明が化学療法によるがん治療戦略の基盤となる可能性が示唆された。

分担研究者

宮本和明

呉医療センター・中国がんセンター  
・室長

江口英孝（平成19年9月30日まで）

（財）放射線影響研究所・研究員

濱谷清裕（平成19年10月1日から）

（財）放射線影響研究所・室長

中地 敬

(財)放射線影響研究所・部長

楠 洋一郎

(財)放射線影響研究所・副部長

西 信雄

(財)放射線影響研究所・副部長

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

放射線に関連した固形がんの発がん機構の解明とそれに基づくリスク評価や診断・治療法の開発は、被爆者医療の向上、職業・医療被曝の管理に大きく資するものである。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り、1)放射線関連固形がんの特徴的なジェネティック・エピジェネティック異常、2)放射線による固形がんの遺伝的発がん感受性の個体差の解析とリスク評価、3)放射線によるゲノム障害・修復からみた発がん機構の解明と治療感受性、について検討し、それを予防・治療に応用することを目的とする。本研究から得られた成果を活用することにより、職業被曝等の放射線障害における具体的な予防策および放射線障害に起因するがんの診断・治療への応用方法を提示することが可能となる。

## B. 研究方法

1)放射線関連固形がんの特徴的なジェネティック・エピジェネティック異常の同定

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)

これまでのオリゴ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6遺伝子とSAGE法で抽出したがん特異的に発現する2遺伝子について、蛋白レベルでの発現の検証を行なっ

た。対象症例は、放射線影響研究所のLife Span Study (LSS)の被爆群64例(中央被爆線量51mGy:2-2601mGy)と非被爆群52例(中央被爆線量0mGy:0-4mGy)であり、そのホルマリン固定パラフィン切片を用いた。さらに、カスタムアレイ解析からステージの進行と発現が有意に相関するものとして同定したSEC11A (SPC18)について、mRNA発現解析、強制発現系およびRNA干渉系を用いた機能解析を行なった。

2. 放射線障害に基づく乳がん発生の新たな分子機構の解明 (エピジェネティックな機構) (宮本)

正常乳管上皮細胞と乳がん細胞との間で、Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA)法を行い、乳がんにおける新規DNAメチル化異常の探索を行なった。また、同様の試料について、microRNAアレイ解析を行い、乳がんにおいて発現が異常に亢進する、あるいは発現が消失するmicroRNAの同定を試みた。

3. 原爆被爆により発生した固形がんの分子腫瘍学的解析 (濱谷・江口)

原爆被爆者に発生した成人甲状腺乳頭がんと対照群のパラフィン包埋組織について、RET/PTC遺伝子再配列、NTRK1遺伝子再配列およびBRAFとKRAS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、MLH1遺伝子およびMSH2遺伝子のヘテロ接合性消失(LOH)を検討し、遺伝子不安定性との関連を解析した。さらに、RASSF2遺伝子のメチル化を合わせて検討した。

2)放射線による固形がんの遺伝的発がん感受性の個体差の解析とリスク評価

1. 原爆被爆者集団を対象とした放射線発がん感受性の分子疫学研究と予防への応用 (中地)

放射線影響研究所の成人健康調査コーホートにおいて、1982年以降に罹患した胃がん181症例および同コーホートから選んだ対照群1,548名について解析を行った。胃

がんは組織学的に高分化型 (Intestinal type) と低分化型 (diffuse type) に分類した。症例は非被曝群, および被曝線量の中央値621 mGyにより2分割された被曝群の計3群に分けて解析を行った。免疫関連遺伝子のうち, 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10%を超える多型部位 (SNP)をマーカーとしてハプロタイプ解析を行った。SNPに基づくハプロタイプ解析はSNPAlyzeを用い, 症例対照研究におけるリスク評価はSPSSのロジスティック回帰モデルを用いた。

## 2. 放射線による遺伝子障害感受性の個体差に基づく発がんメカニズムの研究 (楠)

遺伝的不安定性が放射線照射後マウス生体内で長期間継続する可能性が示唆されている。そこで, フローサイトメトリーを用いた網状赤血球MN頻度測定系にて, 炎症を誘導したマウスの遺伝的不安定性を検討した。炎症実験モデルとして, T細胞介在性の親→F1マウス移植片対宿主病 (GVHD) モデル, ならびに自然免疫性介在性のPoly (I:C) 腹腔投与による誘発急性炎症の系を用いた。一部の実験では細胞移入1日前に宿主F1を2.5GyのX線で全身照射した。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。統計学的解析はノンパラメトリック解析で行った。

## 3. 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により2001年まで追跡した。結腸は盲腸・上行結腸, 横行結腸, 下行結腸・S状結腸の3つに区分した。被曝線量は, 重み付け結腸線量を用いた。放射線関連リスクの解析は, 過剰相対リスク

(excess relative risk: ERR) モデルに基づいてポワソン回帰モデルを用いて行った。

## 3) 放射線によるゲノム障害・修復からみた発がん機構の解明と治療感受性

### 1. 放射線発がんにおけるゲノム修復機構の解析 (神谷)

損傷乗り越え修復機構の中心的役割を担うREV1の機能解析を行なうため, S356(Ser), R357(Arg), 及びL358(Leu)をAlaに置換したREV1変異蛋白質を作成した。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, 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。

### 2. 化学療法感受性を既定する分子機構の解明 (宮川)

大腸がん細胞株HCT116を用い, 相同組換え修復の中間段階で生成される組換え中間体を解消するendonucleaseであるMus81-Eme1の遺伝子機能低下細胞を作製した。野生株と変異細胞を用いて各種抗がん剤の感受性試験を行った。HCT116で得られた感受性を規定するマーカーの有用性を検討するために, ヒトの各種がん細胞株を用いて, 対象薬剤の修復に関わる蛋白質の発現レベルをウェスタン・ブロット法により解析するとともに, 対象薬剤に対する感受性を調べて, これらの相関を検討した。

### (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爆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) 放射線関連固形がんの特徴的なジェネティック・エピジェネティック異常の同定

#### 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)

被爆者胃がんと対照胃がんのカスタムアレイ解析から抽出した6遺伝子の蛋白レベルでの発現解析の結果、versicanとosteonectinのがん間質における発現低下が被爆者群で有意に高頻度に見いだされ、同時に非がん部におけるTGF $\beta$ の発現低下が認められた。SAGE解析で同定したがん特異的発現遺伝子の内、GW112の発現と被爆との関連は見いだされなかったが、Reg IVの発現は被爆者群で有意に高頻度であった。一方、signal peptidase complex 18 (SPC18)のmRNA発現はステージの進行と相関し、SPC18の強制発現により、細胞浸潤、SCIDマウスにおける腫瘍増殖が促進された。SPC18導入胃がん細胞の培養上清では有意にTGF $\alpha$ レベルが高く、siRNA処理によりTGF $\alpha$ レベルは減少した。

#### 2. 放射線障害に基づく乳がん発生の新たな分子機構の解明 (エピジェネティックな機構) (宮本)

MS-RDA法によりMDFIを新規に同定した。MDFIのメチル化異常は乳がん細胞株8株すべてに認められ、5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dc)により発現が回復した。乳がん症例でも33%にメチル化異常が見いだされた。また、乳がん細胞で発現亢進するmicroRNAとしてmiR-200a, miR-429等の5種類を、発現消失するmicroRNAとしてmiR-137, miR-138, miR-34b等の12種類を同定した。発現亢進を示すmicroRNAのターゲット遺伝子ではCpG islandに高頻度のメチル化異常を示す例が認められた。発現消失のみら

れたもののうち5-aza-dcで発現回復するmicroRNAとして、miR-137, miR-374等の5種類を同定した。

### 3. 原爆被爆により発生した固形がんの分子腫瘍学的解析 (濱谷・江口)

成人甲状腺乳頭がんについての解析では、高線量被曝者1症例にNTRK1遺伝子の再配列が認められ、未だ報告されていないタイプのRET/PTCを別の高線量被曝者1症例に見出した。さらに、染色体再配列を有する成人甲状腺乳頭がんは被曝線量と密接な正の関連を示すこと、被曝から診断までの期間が点突然変異を持つ甲状腺がんに比べ有意に短いことが示された。大腸がんに関する検討では、MSI-H症例において、MLH1遺伝子に加えてMSH2のLOHも認められた。BRAF遺伝子およびKRAS遺伝子の変異ならびにRASSF2遺伝子のメチル化のいずれかを有する大腸がん症例の被曝線量中央値は有意に高かった。さらに、全てのMSI-Hを呈する症例およびMLH1遺伝子のメチル化を有する症例は、今回解析を行なった3種類のRasシグナルに関連した遺伝子変化を少なくともひとつ有していた。

### 2) 放射線による固形がんの遺伝的発がん感受性の個体差の解析とリスク評価

#### 1. 原爆被爆者集団を対象とした放射線発がん感受性の分子疫学研究と予防への応用 (中地)

組織型別では、多変量解析により他の交絡因子を考慮しても、放射線被曝は低分化型の胃がんリスクを有意に増加させることが示唆された。IL-10遺伝子座に存在する二つの主要なハプロタイプブロック「ATTA (wild)とGGCG (variant)」はプロモーター領域を含み、血漿IL-10レベルと強く関連している。放射線被曝状況とIL-10ハプロタイプを組み合わせて胃がんリスクを検討したところ、分化型では、IL-10ハプロタイプによって非被曝者胃発がんのリスクが大きく異なっていたが、放射線被曝によるリスク変動は小さかった。低分化型では、ハプロタイプによるリスクの違いとともに、特に

ATTA/ATTAの放射線被曝によるリスクの増加が大きかった。その結果、被曝線量が高くかつGGCGアリルを持つグループが最も大きい胃癌リスクを示したものの、IL-10ハプロタイプによるリスクの差は減少した。

## 2. 放射線による遺伝子障害感受性の個体差に基づく発がんメカニズムの研究 (楠)

移植後6週目のB6 → BDF1群のMN頻度はコントロールに比べて、約1.5倍と有意に高値を示した。同様の傾向はB6 → BCF1モデルにおいても認められたが、BALB/c → BCF1の系では認められなかった。次に、B6 → BDF1モデルにおいて、移植1日前にレシピエントを2.5 Gy 全身照射し、移植後のMN頻度を検討したところ、移植後15週目でほぼ完全なドナー由来造血細胞の生着が認められ、照射後移植群のMN頻度は非照射移植群に比べて高値を示した。Poly I:C腹腔投与後のB6ならびにBALB/cマウスのMN頻度は、PBS投与群に比べて有意に上昇していた。

## 3. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析 (西)

結腸がん1,339例(男性566例,女性773例)を把握した。詳細部位別の症例数は、男女とも下行結腸・S状結腸で最も多く、次いで盲腸・上行結腸が多かった。粗罹患率は、盲腸・上行結腸、横行結腸では男女で大きな差を認めなかったが、下行結腸・S状結腸では男性が女性の約1.5倍であった。バックグラウンド率は詳細部位別に有意な差を認めなかったものの、過剰リスクについては線量反応、到達年齢影響修飾、男女リスク比のいずれも詳細部位別に有意な差を認めなかった。放射線による過剰相対リスクは全結腸で1Gy当たり0.44であり、有意に上昇していた。また到達年齢修飾、男女リスク比のいずれも有意であった。

## 3) 放射線によるゲノム障害・修復からみた発がん機構の解明と治療感受性

## 1. 放射線発がんにおけるゲノム修復機構の解析 (神谷)

野生型REVIでは、template Gに対しCを挿入するdCMP活性が認められる他に、弱いながらGを挿入する活性が認められた。また、AP部位や酸化的損傷である8oxoGに対しCを挿入するdCMP活性が確認されREVIの損傷乗り越え活性を認めた。変異蛋白質の内、R357AとL358Aの酵素活性は、kcatとdCTPに対する相対的親和性ともに低下した。また、R357(Arg)をAlaに置換することで、hREVIの基質特異性をdCMPからdGTPに変えた。一方、L358(Leu)をAlaに置換したREVI変異蛋白質では、AP部位や8oxoGに対しCを挿入するREVIの損傷乗り越え活性は消失した。

## 2. 化学療法感受性を既定する分子機構の解明 (宮川)

Mus81のHCT116由来遺伝子改変細胞では、野生株と比べてマイトマイシンCとシスプラチンに対する感受性が亢進していた。Eme1のHCT116由来遺伝子改変細胞では、DNA架橋剤に対する感受性のみが有意に亢進していた。ヒトがん細胞株14種においてMus81, Eme1, ERCC1, Rad51の発現レベルを解析したところ、各種細胞株によってこれらの発現レベルは大きく異なることが判明した。感受性の高い細胞においてはMus81, Eme1, ERCC1の発現が平均以下であるのに対して、Rad51発現は分散していた。感受性の低い細胞においてはMus81, Eme1, Rad51の発現が平均以上であるのに対して、ERCC1の発現は分散していた。さらにMus81とEme1の差異については、わずかではあるがEme1の方が感受性との相関が強かった。

## D. 考察

放射線関連固形がんの特徴的なジェネティック・エピジェネティック異常の同定に関する研究では、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し、放

放射線関連がんの診断標的、治療標的の同定を目指している。これまでのカスタムアレイによる被爆者胃がんの遺伝子発現解析から抽出した6遺伝子について、多数例の被爆者胃がんにおける蛋白発現を免疫染色で解析した結果、versicanとosteonectinが被爆者胃がんのマーカー蛋白になることが示唆された。また、同時に非がん部におけるTGF $\beta$ の発現低下が認められたことから、TGF $\beta$ -versican/osteonectin系を介して、細胞間や細胞外基質との接着や相互作用に異常がおこりがんの発生・進展に関与している可能性が考えられる。Reg IVについては、強制発現細胞やRNA干渉系などを用い、放射線によるDNA傷害レスポンスにおける役割を細胞生物学的に検討する予定である。SPC18は、胃がんの悪性度のよいマーカーであり、新規治療ターゲットになることが示唆されたが、放射線関連発がんに関与するかどうかは今後の課題である。

乳がんにおける検討では、*MDFI*のエピジェネティックサイレンシングを見いだすとともに、microRNAの発現解析を行なった。microRNAは、未だ全てが明らかにはされておらず、標的遺伝子や発現調節機構など解明されるべき点が数多く残されている。microRNAは標的mRNAに結合し、翻訳を制御することによりタンパク質の発現異常をもたらすが、一種類のmicroRNAが多くの標的遺伝子の発現を制御する。今回、乳がんのmicroRNAの発現異常として17種類同定したが、その一部にはエピジェネティックな分子機構が関与している可能性があることが示唆された。今後、放射線障害とmicroRNA遺伝情報システムの異常の関連について明らかにしていく必要がある。

これまで研究から、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。成人甲状腺乳頭がんにおいて*RET/PTC*および*NTRK1*再配列を含む染色体再配列の頻度が被曝線量の量依存的に頻度が上昇しており、これらが原爆放射線被曝による成人の甲状腺発がんに関与する

ことが示唆された。大腸がんでは、MSIに関連した初期の分子事象であるRasシグナルに関連した遺伝子変化と被曝線量との間に有意な相関があり、Ras系の異常はMSIのみならず*MLH1*遺伝子のメチル化とも密接に関連していた。したがって、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る。近年、マウスを用いた動物実験において、放射線によるメチル化の誘発が示されており、放射線による発がん機構におけるエピジェネティックな変化の関与は重要な課題と考えられる。

胃がんは慢性胃炎、萎縮性胃炎、腸上皮化生を経て発生するものと萎縮性胃炎を経ずして発生するものに大別でき、高分化型は前者にほぼ対応し、*H. pylori*の関与が大きい。*IL-10*遺伝子ハプロタイプは血中IL-10濃度と強く関連しており、変異アリル*GGCG*を持つ人の濃度は高く、放射線被曝によって上昇することが見出されている。IL-10が*H. pylori*に関連した炎症の単なるマーカーというだけでなく、局所的な免疫抑制作用を介して胃発がんに関与している可能性がある。なぜ高分化型より低分化型が放射線被曝の影響を強く受けるのかを解明するためには、*H. pylori*感染と放射線被曝、*IL-10*ハプロタイプやそれ以外の遺伝子の多型との関連についても検討することが必要である。

放射線が長期間継続する炎症を誘発する可能性や持続性炎症と発がんリスクの関係が示唆されているが、炎症が生体細胞の遺伝的不安定性に関わるかは明らかにされていない。今回用いた親 $\rightarrow$ F1マウスGVHDモデルは、ドナー由来造血細胞の生着およびGVHDによる全身の炎症を誘導できる。また、本モデルの有利な点は、移植前にレシピエントを照射し、放射線の暴露を直接受けていないドナー由来造血細胞を移植後に解析することで「バイスタンダー効果」を検討できることである。照射後移植群のMN頻度は非照射移植群に比べて高値を示し、「バイスタンダー効果」を生体内で確認す



ることができた。この結果は、炎症が放射線誘発遺伝的不安定性の要因の1つであり、炎症因子が「バイスタンダー効果」を介するという仮説を支持する。今後、この仮説に基づいて、原爆被爆者コーホートにおいて炎症指標と遺伝的不安定性および発がんリスクの関係を検討していきたい。

大腸がんに関する疫学的解析からは、過剰相対リスクは全結腸で1Gy当たり0.44と有意に上昇していたが、放射線被曝の影響（線量反応、到達年齢影響修飾、男女リスク比）が、結腸がんの部位によって異なることを示す証拠は見出せなかった。しかし、部位の分け方によらず、線量反応、到達年齢影響修飾については、有意性が認められた。ただし、バックグラウンド発生率については部位によって異なることが示された。年代による違いなどについて検討しなければならない。さらに、組織標本に基づいて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。

「損傷乗り越えDNA合成（translesion DNA合成）」とがん化との関係が注目されている。「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、REV1のdCMP活性や損傷乗り越え活性は、N-digitドメインのR357(Arg)とL358(Leu)により規定されていることが明らかとなった。この結果は、REV1の結晶構造の解析結果をより詳細に生化学的に証明するものである。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。

Mus81-Eme1複合体はDNA損傷に対する相同組換え修復において中間体の解消を制御する酵素であり、その異常はゲノム不安定性をきたすことから、放射線発がんの機構解明の目的で研究を開始した。ところが、ヒトがん細胞における変異細胞の解析によ

って、これらの発現レベルが、がん細胞におけるシスプラチンの感受性を規定することが明らかとなった。このことから、Mus81-Eme1はDNA架橋を修復する役割を担っていることが確認された。既にERCC1とRad51については肺がんをはじめ各種の腫瘍においてシスプラチン抵抗性の分子マーカーとしての検討が開始されている。Mus81-Eme1についても同様の臨床研究を展開するためにも、次の段階として多数の切除がん組織を使用した研究が必要になる。放射線発がん研究は常にDNA損傷応答が研究の基盤となるために、発がん研究である反面、治療研究ともなりえるのである。したがって、シスプラチン以外の抗がん剤においても同様の研究の重要性が想定される。様々なDNA損傷を引き起こす放射線に対する損傷応答・修復経路の分子機構の解明は、常に放射線と化学療法によるがん治療研究の基盤となる可能性がある。

## E. 結論

本研究の目的は、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である。放射線関連固形がんの特徴的なジェネティック・エピジェネティック異常の同定、放射線による固形がんの遺伝的発がん感受性の個体差の解析とリスク評価、放射線によるゲノム障害・修復からみた発がん機構の解明と治療感受性、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細胞あるいは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. Sentani K, Yasui W, et al. Gene expression profiling with microarray and SAGE identifies PLUNC as a marker for hepatoid adenocarcinoma of the stomach. *Modern Pathol* 2008 (in press).
2. Sentani K, Yasui W, et al. Immunohistochemical staining for Reg IV and claudin-18 is useful in the diagnosis of gastrointestinal signet ring cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2008 (in press)
3. Miyagawa K, Yasui W, et al. Overexpression of RegIV in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastasis. *Anticancer Res* (in press)
4. Ossandon F, Yasui W, et al. In silico analysis of gastric carcinoma serial analysis of gene expression libraries reveals different profiles associated with ethnicity. *Mol Cancer* 2008 (in press).
5. Oue N, Yasui W, et al. Serum concentration of Reg IV in patients with colorectal cancer: Overexpression and high Reg IV serum level is associated with liver metastasis. *Oncology* 2008 72: 371-380.
6. Noguchi T, Yasui W, et al. h-Prune is an independent prognostic marker for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008 (in press)
7. Ishikawa N, Yasui W, et al. Cancer-testis antigen, lymphocyte antigen 6 complex locus K is a serologic biomarker and a therapeutic target for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2007 67: 11601-11611.
8. Suzuki T, Yasui W, et al. Melanoma-associated antigen-A1 expression predicts resistance to docetaxel and paclitaxel in advanced and recurrent gastric cancer. *Oncol Rep* 2007 18: 329-336.
9. Taniwaki M, Yasui W, et al. Activation of KIF4A as a prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007 13: 6624-6631.
10. Mano Y, Yasui W, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner as a novel prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Sci* 2007 98: 1902-1913.
11. Oue N, Yasui W, et al. Increased expression of h-prune is associated with tumor progression and poor survival in gastric cancer. *Cancer Sci* 2007 98: 1198-1205.
12. 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.
13. 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.
14. 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* 2007 26: 4383-4393.
15. Nakachi K, Hamatani K, Eguchi H, Kusunoki Y, et al. Hiroshima and Nagasaki 60 Years: Follow-up of Survivors - Current Progress in Molecular Epidemiology Studies -. *Mut Res*. in press. (2008)
16. Yano M, Hamatani K, et al. Prognosis in patients with hepatocellular carcinoma correlates to mutations of p53 and/or hMSH2 genes. *Eur J Cancer* 43: 1092-1100. (2007)
17. Takahashi K, Eguchi H, Nakachi K, Hamatani K, et al. 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)
18. Aragane N, Nakachi K, et al. Exon 19 of EGFR mutation in relation to the CA-repeat polymorphism in intron 1. *Cancer Sci* 2008, in press.
19. Kanzaki H, Nakachi K, et al. The association between RAD18 Arg302Gln polymorphism and the risk of human non-small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008 134:211-217.
20. Members of the Prospective Studies

- Collaboration, Nakachi K. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55000 vascular deaths. *Lancet* 2007 370:1829-1839.
21. Kanzaki H, Nakachi K., et al. Single nucleotide polymorphism in the RAD18 gene and risk of colorectal cancer in the Japanese population. *Oncol Rep* 2007 18:1171-1175.
  22. Hayashi I, Nakachi K., et al. High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. *Mutat Res* 2007 631: 55-61.
  23. Sogon T, Nakachi K., Eguchi H., et al. Demethylation of promoter C region of estrogen receptor  $\alpha$  gene is correlated with its enhanced expression in estrogen-ablation resistant MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007 105: 106-114.
  24. Sueoka N, Eguchi H., Nakachi K., 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.
  25. Hamasaki K, Nakachi K., Kusunoki Y., et al. Short-term culture and  $\gamma$ H2AX flow cytometry determine the difference in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2007 48: 38-47
  26. Hamasaki K, Nakachi K., Kusunoki Y., et al. Radiation sensitivity and genomic instability in the hematopoietic system: Frequencies of micronucleated reticulocytes in whole-body X-irradiated BALB/c and C57BL/6 mice. *Cancer Sci* 2007 98:1840-1844
  27. Kusunoki Y., Hayashi T. Long-lasting alterations of the immune system by ionizing radiation exposure: Implications for disease development among atomic bomb survivors. *Int J Radiat Biol* 2008;84:1-14.
  28. Preston DL, Nishi N., et al. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiat Res* 2007; 168: 1-64.
  29. Nishi N., et al. Differences in mortality and incidence for major sites of cancer by education level in a Japanese population. *Ann Epidemiol* (in press)
  30. Tomida J, Kamiya K., et al. DNA damage induced ubiquitylation of RFC2 subunit of RFC complex. *J. Biol. Chem.*, 2008, *in press*.
  31. Watanabe H, Kamiya K., et al. Tumor Induction by Monoenergetic Neutrons in B6C3F1 mice. *J. Radiat. Res.* ; 48(3): 205-210, 2007.
  32. Enomoto A, Miyagawa K., et al. Negative regulation of MEKK1/2 signaling by Serine-Threonine Kinase 38 (STK38). *Oncogene* in press.
  33. Miyagawa K. Clinical relevance of the homologous recombination machinery in cancer therapy. *Cancer Sci* 2008 99: 187-194
  34. Shimura T, Miyagawa K., et al. Bloom's syndrome helicase and Mus81 are required to induce transient double-strand DNA breaks in response to DNA replication stress. *J Mol Biol* 2008 375: 1152-1164
  35. Igaki H, Miyagawa K., et al. Pathological changes in the gastrointestinal tract of a heavily radiation-exposed worker at the Tokai-mura criticality accident. *J Radiat Res* 2008 49: 55-62.
  36. Sasano N, Miyagawa K., et al. Free radical scavenger edaravone suppresses X-ray-induced apoptosis through p53 inhibition in MOLT-4 cells. *J Radiat Res* 2007 48: 495-503
  37. Ikura T, Miyagawa K., et al. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol* 2007 27: 7028-7040.
  38. Suzuki T, Miyagawa K., et al. Functional interaction between the transcription factor Kruppel-like factor 5 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in cardiovascular apoptosis. *J Biol Chem* 2007 282: 9895-9901.
- ## 2. 学会発表
1. Kuniyasu H, Yasui W., et al. Increased peritoneal metastasis of reg IV-transfected

- MKN28 gastric carcinoma cells. The 98th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Los Angeles, California (USA), April 14-18, 2007
2. Kodama M, Yasui W, et al. Vascular endothelial growth factor C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms. The 98th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Los Angeles, California (USA), April 14-18, 2007
  3. Yasui W and Oue N. Identification of new serum marker for gastric cancer through SAGE data analysis. The 19th Federation of Asia and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) Conference, Symposium 12 "Gastric Carcinogenesis", Seoul (Korea), May 27-30, 2007
  4. Shiraishi T, Yasui W, et al. The effect of activity outside the field of view in estimation of human neuroreceptor binding with PET. 2007 Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Copenhagen (Denmark), October 10-17, 2007
  5. Oue N, Yasui W, et al. Serum Concentration of Reg IV in patients with colorectal cancers. The 17th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Radiation Therapy of Cancer", Hiroshima (Japan), November 11, 2007
  6. Sentani K, Yasui W, et al. Gene expression profiling with microarray and SAGE identifies PLUNC as a marker for hepatoid adenocarcinoma of the stomach. The 17th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Radiation Therapy of Cancer", Hiroshima (Japan), November 11, 2007
  7. Ohara S, Yasui W, et al. Reg IV is an independent prognostic indicator of relapse of prostate cancer. The 17th International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Radiation Therapy of Cancer", Hiroshima (Japan), November 11, 2007
  8. Yasui W Transcriptome dissection of gastric cancer through serial analysis of gene expression to identify novel diagnostic and therapeutic targets. The 14th Seoul International Cancer Symposium "Gastric carcinogenesis and clinical implication", Seoul (Korea), November 19, 2007
  9. Yasui W, et al. Recent Topics: Molecular Pathobiology of gastric cancer. Japan-Korea Gastrointestinal Pathology Joint Meeting, Short Lecture, The 80th Annual Meeting of the Japanese Gastric Cancer Association, Yokohama (Japan), February 28, 2008
  10. 安井 弥. がん登録資料はどのように活用されるのかー 広島県でがんは増えているのか?ー. 第16回地域がん登録全国協議会総会研究会, 市民公開講座, 2007年9月7日, 広島
  11. 大上直秀, 安井 弥, 他. 転移遺伝子: 胃がんにおいてWnt-5aは $\beta$ -catenin異常蓄積のない症例で高発現しており予後不良と相関している. 第16回日本がん転移学会総会, ワークショップ1, 2007年7月9-10日, 富山
  12. 大上直秀, 安井 弥, 他. 血清腫瘍マーカーとしてのRegIVの有用性: 大腸がんにおいてRegIV高値は肝転移と関連している. 第27回日本分子腫瘍マーカー研究会, ワークショップ1, 2007年10月2日, 東京
  13. 山本英喜, 安井 弥, 他. Cell migration and invasion induced by Wnt-5a in gastric cancer. ワークショップ5, 第66回日本癌学会総会, 2007年10月3-5日, 横浜
  14. 大上直秀, 安井 弥, 他. SAGE-based microarray for gastric cancer identifies SEC11A as a marker for tumor progression. ワークショップ14, 第66回日本癌学会総会, 2007年10月3-5日, 横浜
  15. 安井 弥. がんの分子診断学. 日本がん治療学会第13回教育セミナー, 2007年10月26日, 京都
  16. 仙谷和弘, 安井 弥, 他. 網羅的遺伝子解析法で同定されたPLUNCは胃原発 hepatoid adenocarcinomaの新規マーカーである. 第18回日本消化器癌発生学会, シンポジウム1, 2007年11月8-9日, 札幌
  17. 大上直秀, 安井 弥, 他. SAGE法で同定したRegIV遺伝子の上流/下流の解析と診断への応用. 第18回日本消化器癌

- 発生学会, シンポジウム1, 2007年11月8-9日, 札幌
18. 坂本直也, 安井 弥, 他. 大腸がんにおける血清RegIVの解析: RegIVは肝転移と関連している. 第18回日本消化器癌発生学会, ワークショップ3, 2007年11月8-9日, 札幌
  19. 安井 弥. がんの生物学. 2007年度第1回日本がん治療認定医機構教育セミナー, 2008年1月13-14日, 東京
  20. 大上直秀, 安井 弥. 胃がんの新規血清診断マーカーRegIV. 第80回日本胃癌学会総会, シンポジウム, 2008年2月27-29日, 横浜
  21. Miyamoto K, et al. MDFI (MyoD family inhibitor), which regulates myogenic and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways, is inactivated in human breast cancer by epigenetic gene silencing. The 98th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Los Angeles, California (USA), April 14-18, 2007
  22. Saito A, Miyamoto K, et al. Epigenetic alteration of SMAD4 in human breast, lung, and ovarian cancers. 第66回日本がん学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
  23. Terada k, Miyamoto K, et al. Association between the CpG island methylator phenotype and clinicopathological findings in human breast cancers. 第66回日本がん学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
  24. 川上洋介, 宮本和明, 他. 卵巣がんにおける腫瘍抑制遺伝子RUNX3のエピジェネティックな異常 第45回日本癌治療学会総会, 2007年10月24-26日, 京都
  25. 吉田裕, 宮本和明. 乳がんにおける多剤耐性遺伝子MDR1のエピジェネティックな異常第6回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2008年3月20-21日, 福岡
  26. Nakachi K, Hayashi T, Hamatani K, Eguchi H, Kusunoki Y. HIROSHIMA 60 YEARS: Monitoring of Survivors – Current Progress in Molecular Epidemiology Studies. 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, Antalya (Turkey), May 20-24, 2007
  27. Hamatani K, Nakachi K, et al. Gene alterations preferentially occurred in adult-onset papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors. 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco, California (USA), July 8-12, 2007
  28. Eguchi H, Hamatani K, Yasui W, Nakachi K, et al. Microsatellite instability in colorectal cancers among atomic-bomb survivors. 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco, California (USA), July 8-12, 2007
  29. Takahashi K, Eguchi H, Nakachi K, Hamatani K, et al. Gene alterations preferentially occurred in adult-onset papillary thyroid cancer among atomic-bomb survivors. 8th Korea-Japan Cancer and Aging Symposium, Gifu (Japan), August 10-11, 2007
  30. 濱谷清裕, 江口英孝, 中地 敬, 他. 原爆被爆者に発生した成人甲状腺がんにおいて優先的に選択される遺伝子変異. 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
  31. 江口英孝, 濱谷清裕, 安井 弥, 中地 敬, 他. 原爆被爆者に発生した大腸がんにおけるマイクロサテライト不安定性に関連した遺伝子変異. 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
  32. 多賀正尊, 江口英孝, 濱谷清裕, 安井 弥, 中地 敬, 他. 原爆被爆者で発生した非小細胞肺癌におけるp53遺伝子変異(第2報). 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
  33. Yoshida K, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. A genome approach to inter-individual variations in cancer susceptibility among atomic-bomb survivors. The 12th Congress of the International Association of Biomedical Gerontology (IABG), Spetses island (Greece), May 20-24, 2007
  34. Hamasaki K, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Cytogenetic instability in peripheral blood T lymphocytes cultured in vitro from A-bomb survivors. The 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco, California (USA), July 8-12, 2007
  35. Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Effects of inflammation-related gene polymorphisms and atomic-bomb radiation exposure on gastric cancer risk. The 13th International Congress of Radiation

- Research, San Francisco, California (USA), July 8-12, 2007
36. Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Gastric cancer risks among atomic-bomb survivors differ by HLA class I genotype. Joint ESTP/IFSTP Congress of Toxicologic Pathology, Basel (Switzerland), September 16-19, 2007
  37. Nagamura H, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Effects of inflammation-related cytokine gene polymorphisms on gastric cancer risk among atomic bomb survivors. Joint ESTP/IFSTP Congress of Toxicologic Pathology, Basel (Switzerland), September 16-19, 2007
  38. Morishita Y, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Elevated levels of plasma reactive oxygen species and inflammatory markers among atomic-bomb survivors. Joint ESTP/IFSTP Congress of Toxicologic Pathology, Basel (Switzerland), September 16-19, 2007
  39. Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Effects of inflammation-related gene polymorphisms and atomic-bomb radiation exposure on gastric cancer risk. The 12th World Congress on Advances in Oncology and the 10th International Symposium on Molecular Medicine and Cancer Chemoprevention Symposium, Crete (Greece), October 11-13, 2007
  40. Ohishi W, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Immunological profiles in the persistence and disease progression of hepatitis C virus infection. The 18th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Seoul (Korea), March 23-26, 2008
  41. Hamasaki K, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Chromosome tests in clonally proliferated T lymphocytes in vitro from A-bomb survivors do not suggest presence of genetic instability. 8th International Symposium on Chromosome Aberrations, Awaji (Japan), October 4-6, 2007
  42. 濱崎幹也, 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. 原爆被爆者末梢血リンパ球の in vitro 長期培養クローンにおける染色体不安定性について. 第48回原子爆弾後障害研究会, 2007年6月3日, 広島
  43. 今井一枝, 中地 敬, 他. 発がんリスクを高める喫煙がおよぼす炎症・免疫関連生体指標への影響. がん予防大会 in Tokyo 2007, 2007年7月12-13日, 東京
  44. 今井一枝, 中地 敬, 他. 一般住民コーホートで観察された喫煙の生体影響と生活習慣病の分子疫学研究. 平成18年度喫煙科学研究財団研究発表会, 2007年7月12日, 東京
  45. 高橋恵子, 江口英孝, 中地 敬, 濱谷清裕, 他. 原爆被爆者に発生した成人甲状腺乳頭がんにおいて優先的に起こった遺伝子変異. 第8回日韓がん老化シンポジウム, 2007年8月10-11日, 岐阜
  46. 林 奉権, 中地 敬, 他. 血清・血液細胞における活性酸素種の分光光度法およびフローサイトメトリー法によるハイスループットな測定システム. 第8回日韓がん老化シンポジウム, 2007年8月10-11日, 岐阜
  47. 吉田健吾, 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. 放射線によって誘発される細胞死: ヒト白血球細胞におけるアポトーシスとネクローシス. 第8回日韓がん老化シンポジウム, 2007年8月10-11日, 岐阜
  48. 濱谷清裕, 江口英孝, 中地 敬, 他. 原爆被爆者に発生した成人甲状腺がんにおいて優先的に選択される遺伝子変異. 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
  49. 今井一枝, 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. 炎症およびがん関連免疫におよぼす喫煙の影響. 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
  50. 濱崎幹也, 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. 試験管内でクローン増殖させた原爆被爆者Tリンパ球は染色体調査において遺伝的不安定性を示さない. 第8回国際染色体異常シンポジウム, 2007年10月4-6日, 淡路
  51. 林 奉権, 楠 洋一郎, 中地 敬. 炎症関連サイトカイン遺伝子多型と原爆放射線被曝が胃がんリスクに及ぼす影響. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 2007年11月20-22日, 東京
  52. 濱崎幹也, 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. 試験管内でクローン増殖させた原爆被爆者Tリンパ球における染色体不安定性の研究. 第5回広島大学21世紀COEプログラム国際シンポジウム, 2008年1月

23-24日, 広島

53. 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. 原爆被爆者集団における末梢血ナイーブCD4T細胞比率の加齢あるいは被ばく線量依存性の低下にCD45遺伝子多型との関連性は見られない. 第17回日本サイトメトリー学会, 2007年7月5-6日, 浦安
54. 濱崎幹也, 中地 敬, 楠 洋一郎, 他. X線を全身照射したBALB/cおよびC57BL/6マウスにおける小核網状赤血球のフローサイトメトリーによる解析: 遺伝的不安定性が照射後長期にわたって生体内で持続する証拠. 第50回日本放射線影響学会, 2007年11月14-17日, 千葉
55. 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. 慢性C型肝炎ウイルス感染の肝病態の進行にともなうTh1優位の免疫応答. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 2007年11月20-22日, 東京
56. 西 信雄. Risk of second primary cancers among atomic bomb survivors. 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
57. 西 信雄, 他. 結腸の詳細部位別にみたがん罹患の放射線関連リスク. 第50回日本放射線影響学会, 2007年11月14-17日, 千葉
58. 顧永清, 神谷研二, 他. Characterization of a human DNA helicase, PIF1, which is responsible for chromosomal integrity. 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco, California (USA), July 8-12, 2007
59. 朴金蓮, 神谷研二, 他. Deoxycytidyl transferase activity of human REVI and its substrate specificity. 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco, California (USA), July 8-12, 2007
60. 増田雄司, 神谷研二, 他. Dynamic properties of human replication factors in the elongation of DNA replication. CSHL Meeting-Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, New York (USA), September 5-9, 2007
61. 増田雄司, 神谷研二, 他. ヒトDNA複製装置のダイナミクス. 日本遺伝学会第79回大会, 2007年9月19-21日, 岡山
62. 増田雄司, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成におけるポリメラーゼ交換反応と複製装置のダイナミクス. 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
63. 豊島めぐみ, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の発がんにおける役割. 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
64. 増田雄司, 神谷研二, 他. ヒトDNA複製装置のダイナミクスとポリメラーゼ交換反応. 第50回日本放射線影響学会, 2007年11月14-17日, 千葉
65. 豊島めぐみ, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の発がんにおける役割. 第50回日本放射線影響学会, 2007年11月14-17日, 千葉
66. 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の生化学的機能解析. 第50回日本放射線影響学会, 2007年11月14-17日, 千葉
67. 朴金蓮, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成におけるREVIのdCMP転移活性の生化学的解析. 第50回日本放射線影響学会, 2007年11月14-17日, 千葉
68. 増田雄司, 神谷研二, 他. ヒトDNA複製装置のダイナミクスとPCNAのユビキチン化. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007), 2007年12月11-15日, 横浜

#### 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 原爆被爆者集団は、放射線誘発がんの研究モデルである。被爆者に発生した固形がん試料を用い、遺伝子発現解析から放射線発がんに関連する特異的な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発現解析・変異解析等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。被爆者胃がん（放射線影響研究所の寿命調査集団 LSS A群）と対照胃がんのカスタムアレイ解析から抽出した6遺伝子の蛋白レベルでの発現解析の結果、versicanとosteonectinのがん間質における発現低下が被爆者群で有意に高頻度に見いだされ、同時に非がん部におけるTGF $\beta$ の発現低下が認められた。SAGE解析で同定したがん特異的な発現遺伝子の内、Reg IVの発現は被爆者群で有意に高頻度であった。これらは、放射線関連胃がんのマーカー遺伝子となり得るものと考えられた。一方、SPC18はステージの進行と相関し、TGF $\alpha$ を介して細胞浸潤を促進することから、胃がんの悪性度のよいマーカーであり、新規治療ターゲットになることが示唆された。今後、SPC18の発現を被爆者症例で解析し、放射線関連発がんへの関与を検討する予定である。

### A. 研究目的

放射線に関連した固形がんの発がん機構の解明とそれに基づくリスク評価や診断・治療法の開発は、被爆者医療の向上、職業・医療被曝の管理に大きく資するものである。原爆被爆者集団は、放射線誘発がんの研究モデルと言える。がんの発生・進展には種々のジェネティックおよびエピジェネティックな異常が関与することが知られている。そこで、本研究では、被爆者に発生した固形がん試料を用いて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析と蛋白レベルでの発現の検証を行なう。この結果と被爆線量を含む臨床・疫学的事項との関連を解析し、放射線関連固形がんの特徴的異常を

同定する。これらにより、それを標的とした診断法・治療法・予防法の開発を目指す。

### 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な発現遺伝子、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9遺伝子を同定している。これらの内6遺伝子については、蛋白



レベルでの発現の検証を行なった。蛋白レベルでの発現については、主に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) の被爆群 64 例 (中央被爆線量 51mGy: 2-2601mGy) と非被爆群 52 例 (中央被爆線量 0mGy: 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 transketolase 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 versican 抗体 (生化学工業社)、抗 THBS-2 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 PDGF receptor-beta 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 ribonuclease A 抗体 (abcam 社)、抗 osteonectin 抗体 (Novocastra 社) である。

## 2) SAGE 法で同定したがん特異的遺伝子の被爆者胃がんにおける発現の検討

これまでに、胃がんと正常14臓器におけるSAGEデータの比較および組織試料に対する定量的RT-PCRによって、胃がん特異的発現遺伝子としてAPIN, TRAG3, CYP2W1, MIA, MMP-10, DKK4, GW112, REGIV, HORMAD1の9遺伝子を同定している。この内、REGIVおよびGW112の蛋白レベルの発現について、上記の被爆者集団LSS A群とLSS B群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おいて免疫組織化学的に検討した。用いた抗体は、抗Reg IV ポリクローナル抗体 (R&D社)、抗GW112 モノクローナル抗体 (当研究室で作成) である。

## 3) 網羅的遺伝子発現解析による新規がん関連遺伝子の同定と機能解析

SAGE法で抽出した遺伝子を含む約400プローブを搭載したカスタムアレイを用いて25症例の胃がん組織における遺伝子発現解析を行ない、ステージの進行と発現が有意に相関する3遺伝子を同定した。その内の

SEC11A (SPC18)について、定量的RT-PCRによるmRNA発現解析、強制発現系およびRNA干渉系を用いた機能解析を行なった。

## (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

被爆群と非被爆群とで発現の異なる9遺伝子はSPARC, ABCC1, RNASE1, VCAN, THBS2, PDGFRB, TNFRSF14, TKT, FBP1であった。その内抗体が入手可能であった6遺伝子について、まず、アレイ解析に用いた被爆者群3例および対照群10例の胃がんを用いて免疫染色を行なった。versican と onsteonectin が被爆者群の胃がんにおいて発現が減弱・消失しており、アレイ解析の結果と一致していた。両者ともに、対照群ではがん細胞ではなく間質細胞に発現していた。他の4遺伝子の蛋白発現とアレイにおける発現レベルとに相関はなかった。

Versican は Chondroitin sulfate proteoglycan 2 であり、Stromal cell 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。一方、osteonectin は Secreted protein, acidic, cysteine-rich であり、骨基質の構成成分として知られる糖蛋白質であり、細胞接着や基質のアセンブリーを通して細胞と細胞外基質との相互作用に関与する。がん間質で陽性を示し、in vitro では細胞運動や浸潤を高めることが知られている。肺がんや膵がんなどでは、発現の亢進と浸潤・転移が相関し、予後不良因子との報告がある。

Versican と osteonectin とともに、50%以上の間質細胞に陽性の症例を陽性例と判定した。Versican は47%の胃がん症例で陽性であり、Versican 陽性例は、深達度、リンパ節転移、ステージの進行と有意に相関し、組織型では低分化型に有意に高頻度であった。Versican 陰性例は、非被爆群に比し被爆者群で有意に頻度が高かった (P=0.009)。ステージの進行と発現が相関するために、ステージ別に検討したが、被爆者群での発現低下は有意に認められた。Versican の発現と被爆線量、発症時期、被爆時年齢との間に有意な相関は認められなかった。

Osteonectin は25%の胃がん症例で陽性であり、versican と同様に深達度、リンパ節転移、ステージの進行と有意に相関していた。さらに、osteonectin 陰性例は、非被爆群に比し被爆者群で有意に頻度が高く (P=0.005)、ステージ別にみても同様の結果が得られた。Osteonectin の発現と被爆線量、発症時期、被爆時年齢との間に有意な相関は認められなかった。多変量解析において、versican (P=0.002) と osteonectin (P=0.001) はともに被爆者群の胃がんの独立したマーカーと判明した。TGF-beta は培養線維芽細胞において versican と osteonectin の発現を誘導することが知られている。そこで、TGFB1 の発現を定量的 RT-PCR にて検討したところ、がん組織では被爆者群と非被爆群に差は認められなかったが、被爆者群非がん部組織に

おいて非被爆群のそれと比較して TGFB1 の発現レベルは有意に低かった (P=0.028)。

## 2) SAGE 法で同定したがん特異的遺伝子の被爆者胃がんにおける発現の検討

Reg IVは2001年に炎症性腸疾患にて発現が亢進している遺伝子としてクローニング、また、Differential display法によって、5FU耐性の細胞株で高発現している遺伝子としてもクローニングされている。calcium-dependent lectin superfamilyに属する。われわれのこれまでの検討において、胃がん、大腸がん、膵がん、消化管カルチノイドに発現し、EGFRの活性化、アポトーシスの抑制、播種転移の促進等の機能を持つこと、5-FU耐性や神経内分泌/腸形質分化と関連すること、血清診断マーカーとなることが明らかとなっている。LSS症例についてのReg IVの免疫染色では、32% (25/78) において発現が認められ、被爆者群では45%であったのに対し、非被爆群では17%であり、有意に被爆者群に高頻度であった (P=0.0082)。また、ステージ1に限ってみてもこの有意な相関は認められた。Reg IVの発現と被爆線量、発症時期、被爆時年齢との関連について今後検討する。

GW112は、Olfactomedin 4とも呼ばれ、骨髄芽球からクローニングされた遺伝子であり、510-amino acidsの分泌蛋白をコードする。正常では、骨髄、小腸、大腸、前立腺に発現する。潰瘍性大腸炎、大腸がん、肺がん、乳がんなどにおける発現が確認されている。機能的には、GRIM-19、cadherin、lectinと結合し、アポトーシスや細胞接着を制御することが知られている。免疫染色による胃がんにおける発現は、59% (81/137) に認められ、組織型では分化型に有意に高頻度であり (P=0.0009)、Reg IVの発現とは逆相関が認められた (P=0.0495)。LSS症例

についてのGW112の発現は、被爆者群と非被爆群の間に差は認められず、放射線関連胃癌のマーカーとはなり得ないと判断した。

### 3) 網羅的遺伝子発現解析による新規がん関連遺伝子の同定と機能解析

分泌蛋白は、通常シグナルペプチドを持った形で合成され、膜に局在した後にシグナルペプチダーゼ signal peptidaseによって切断されて分泌される。シグナルペプチダーゼ複合体 signal peptidase complex (SPC) は5つの異なったサブユニットで構成されており、SPC18とSPC21が酵素活性を有するものと考えられている。しかし、その標的蛋白の特異性をはじめ詳細は明らかになっていない。また、がんにおける発現や機能についての報告は全くない。そこで、42症例の胃癌組織と非がん部粘膜組織について定量的RT-PCRにより発現を検討したところ、40%の症例で2倍以上の発現亢進が認められ、リンパ節転移 ( $P=0.0066$ ) およびステージの進行 ( $P=0.0221$ ) と有意に相関していた。SPC18発現ベクターを導入した胃癌細胞株MKN-1では、1%血清存在下でコントロール細胞に比し有意な増殖能の亢進が認められ、浸潤も促進された。さらに、SPC18の強制発現によりSCIDマウスにおける腫瘍増殖が促進された。SPC18導入胃癌細胞とコントロール細胞の培養上清中のTGF $\alpha$ レベルをELISAによって測定したところ、SPC18導入胃癌細胞の培養上清で有意にTGF $\alpha$ レベルが高かった。逆にsiRNA処理によりTGF $\alpha$ レベルは減少した。TGF $\alpha$ はSPC18のシグナルペプチダーゼのひとつの重要な標的と考えられた。以上、SPC18はステージの進行と相関し、TGF $\alpha$ を介して細胞浸潤を促進することから、胃癌の悪性度のよいマーカーであり、新規治療タ

ーゲットになることが示唆された。今後、SPC18の発現を被爆者症例で解析し、放射線関連発がんへの関与を検討する予定である。

### 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、また、新規に同定したがん特異的遺伝子の発現を被爆者がんて解析することによって、放射線関連がんの診断・治療標的の同定を行なっている。これまでのカスタムアレイによる被爆者胃癌の遺伝子発現解析から抽出した6遺伝子について、多数例の被爆者胃癌における蛋白発現を免疫染色で解析した結果、versicanとosteonectinが被爆者胃癌のマーカー蛋白になることが示唆された。即ち、両者ともに、通常の胃癌では間質細胞に発現するが、被爆者胃癌ではその発現が有意に低下していた。その発現減弱の原因として、TGF $\beta$ の発現低下が関わっている可能性が考えられた。Versicanおよびosteonectinの機能解析によって、放射線障害とそれに対する反応とがん化との因果関係を明らかにする必要がある。一般にはDNA傷害が直接的にがん化に関与するが、それに加えて、放射線による微小環境の変化がinitiated cellを臨床がんに導く可能性が指摘されている。TGF $\beta$ は放射線照射を受けた組織において早期から持続して活性化されることが知られている。したがって、TGF $\beta$ -versican/osteonectin系を介して、細胞間や細胞外基質との接着や相互作用に異常がおこりがんの発生・進展に関与しているのかもしれない。

Reg IVは、EGFRの活性化、カスパーズ9を介したアポトーシスの抑制、播種転移の促進等により、がんの発生・進展に関与す

るものと考えている。今回、Reg IVが被爆者胃がんで有意に発現が亢進していたことが分かったが、SAGE解析によって抽出したがん特異的発現遺伝子の中から放射線関連がんのマーカー候補を同定できたはじめての例である。強制発現細胞やRNA干渉系などを用い、放射線によるDNA傷害レスポンスにおけるReg IVの役割を細胞生物学的に検討する予定である。

さらに、新規に同定したがん特異的遺伝子の発現を被爆者胃がんで解析することによって、放射線関連がんの診断・治療標的を同定する戦略にしながらって検討しているのがSPC18である。シグナルペプチダーゼであるがその標的蛋白の特異性をはじめ詳細は明らかではなく、がんにおける発現や機能についての報告は全くない。今回のわれわれの解析で、胃がんのステージの進行とともに発現が亢進し、SPC18の強制発現により、細胞増殖と浸潤、SCIDマウスにおける腫瘍増殖促進が確認された。さらに、シグナルペプチダーゼの標的蛋白のひとつとしてTGF $\alpha$ を同定した。したがって、SPC18は胃がんの悪性度のよいマーカーであり、新規治療ターゲットになることが示唆された。今後、SPC18の発現を被爆者症例で解析し、放射線関連発がんに関与するかどうかを検討する。

## E. 結論

被爆者胃がんのカスタムアレイ解析から抽出した6遺伝子の蛋白レベルでの発現解析の結果、versicanとosteonectinのがん間質における発現低下が被爆者群で有意に高頻度であり、同時に非がん部におけるTGF $\beta$ の発現低下が認められた。SAGE解析で同定したがん特異的発現遺伝子の内、Reg IVの発現は被爆者群で有意に高頻度であった。これらは、放射線関連胃がんのマーカー遺

伝子となり得るものと考えられた。一方、SPC18はステージの進行と相関し、TGF $\alpha$ を介して細胞浸潤を促進することから、胃がんの悪性度マーカー・新規治療標的と考えられる。SPC18の放射線関連発がんとの関連は今後の課題である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sentani K, Yasui W, et al. Gene expression profiling with microarray and SAGE identifies PLUNC as a marker for hepatoid adenocarcinoma of the stomach. Modern Pathol 2008 (in press).
2. Sentani K, Yasui W, et al. Immunohistochemical staining for Reg IV and claudin-18 is useful in the diagnosis of gastrointestinal signet ring cell carcinoma. Am J Surg Pathol 2008 (in press)
3. Miyagawa K, Yasui W, et al. Overexpression of RegIV in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastasis. Anticancer Res (in press)
4. Ossandon F, Yasui W, et al. In silico analysis of gastric carcinoma serial analysis of gene expression libraries reveals different proliferas associated with ethnicity. Mol Cancer 2008 (in press).
5. Oue N, Yasui W, et al. Serum concentration of Reg IV in patients with colorectal cancer: Overexpression and high Reg IV serum level is associated with liver metastasis. Oncology 2008 72: 371-380.
6. Noguchi T, Yasui W, et al. h-Prune is an