

- 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.
- ## 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. Shiraiishi 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、9月7日、広島、2007
11. 大上直秀, 安井 弥, 他. 転移遺伝子：胃癌においてWnt-5aは β -catenin異常蓄積のない症例で高発現しており予後不良と関連している. 第16回日本がん転移学会総会、ワークショップ1、7月9-10日、富山、2007
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：大腸癌において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、10月2日、東京、2007
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、10月3-5日、横浜、2007
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、10月3-5日、横浜、2007
15. 安井 弥. がんの分子診断学. 日本癌治療学会第13回教育セミナー、10月26日、京都、2007
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、11月8-9日、札幌、2007
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、11月8-9日、札幌、2007
18. 坂本直也, 安井 弥, 他. 大腸癌における血清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、11月8-9日、札幌、

2007

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、1月13-14日、東京、2008
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、2月27-29日、横浜、2008

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

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）

分担研究者 宮本 和明 呉医療センター・中国がんセンター

研究要旨 本研究ではエピジェネティックな機構に着目し、放射線障害に基づく乳がん発生の新たな分子機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、放射線被爆者に発生した乳がんにおいて認められるエピジェネティックな異常を解析し、放射線被爆者乳がんの特徴的なエピジェネティックな異常の有無を明らかにする予定である。今年度は、乳がんにおける新たなエピジェネティックな異常の探索を行うことによりWnt/beta-cateninシグナルに関与する*MDF1*のDNAメチル化異常を同定した。さらに、多くの生命現象に関与し、その遺伝情報システムの異常が発がん重要な役割を果たしていると考えられるmicroRNAについて、乳がんでは10倍以上に発現が亢進している5種類のmicroRNA、および乳がんでは発現が消失している12種類のmicroRNA、合計17種類の発現異常を同定した。

A. 研究目的

エピジェネティックな機構は遺伝子発現制御に関わる後成的修飾であるが、がんによって代表されるような遺伝および環境要因が複雑に関与する疾患の発症機構として、また可塑性の特徴から疾患の予防や治療の標的として重要であると考えられている。本研究では放射線障害に基づく乳がん発生の新たな分子機構としてエピジェネティックな異常に着目し、これまで明らかにされていない放射線被爆者におけるエピジェネティックな異常の特徴について解明する。

B. 研究方法

1) 乳がんにおける新規DNAメチル化異常の探索

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) 法を行う。TesterおよびDriverとして、正常DNAおよびがんDNAを交互に用いることにより、ゲノム網羅的かつ直接的に、乳がんではメチル化されるDNA断片、および脱メチル化されるDNA断片を得ることができる。3種類のメチル化感受性酵素を用いてMS-RDA法を行

い、それぞれで96クローンのシーケンスにより計288個のMS-RDA断片を同定し、これらのゲノムにおける由来を明らかにする。遺伝子の発現調節に重要なプロモーター領域CpG アイランドに由来するものについて乳がん細胞および乳がん症例における異常の有無を明らかにする。

2) 乳がんにおける新規microRNA発現異常の探索

正常乳管上皮細胞と乳がん細胞との間で、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を同定する。後者についてはエピジェネティックなサイレンシングが関与する可能性があることから、DNAメチル基転移酵素阻害剤5-aza-2'-deoxycytidine処理に伴う遺伝子の発現回復の有無について検討する。

（倫理面への配慮）

本研究の実施に際しては厚生労働省、文部科学省、および経済産業省により共同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針」を遵守する。具体的には、呉医療センター・中国がんセンター倫理委員

会により承認を得た研究プロトコールにて行う。

C. 研究結果

1) 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株中8株(100%)に認められた。DNAメチル基転移酵素阻害剤である5-aza-2'-deoxycytidineによりメチル化異常によるサイレンシングが示された。乳がん症例21例中7例(33%)においてもメチル化異常が検出されることを見出した。

2) 乳がん細胞で10倍以上に発現が亢進しているmicroRNAとして、hsa-miR-200a、hsa-miR-429、hsa-miR-652、hsa-miR-594およびhsa-miR-200bの5種類(5/471、1.1%)を同定した。また、乳がん細胞で発現が消失しているmicroRNAとしてhsa-miR-137、hsa-miR-138、hsa-miR-34b、hsa-miR-34c、hsa-miR-374、hsa-miR-376a、hsa-miR-422b、hsa-miR-452、hsa-miR-520e、hsa-miR-455、hsa-miR-554およびhsa-miR-574の12種類(12/471、2.5%)を同定した。発現が亢進しているmicroRNAのターゲット遺伝子には上流のCpG islandに高頻度のメチル化異常を示す例が認められた。また、発現が消失しているmicroRNAのうちDNAメチル基転移酵素阻害剤により発現回復するmicroRNAとしてhsa-miR-137、hsa-miR-374、hsa-miR-554、hsa-miR-554およびhsa-miR-574の5種類を同定した。

D. 考察

*MDFI*は発生および分化に重要な転写因子であり、Wnt/beta-cateninシグナルへの負の制御、およびストレス応答性JNKシグナルへの正の制御が知られている。乳がんにおいて*MDFI*のエピジェネティックなサイレンシングが認められたことから、*MDFI*の異常が乳がんの発生や進展に何らかの役割を果たす可能性あると考えられた。

新たなエピジェネティックな機構として、特にmicroRNAの発現異常に着目した。microRNAは、ゲノム上に少なくとも約1,000は存在すると考えられているが、未だ全てが明らかにはされておらず、各microRNAの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。non-coding RNAの一種である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。多くの生命現象に関与し、細胞の分化や増殖、アポトーシスなどに重要な役割を果たすことから発がんに重要な役割を果たすと考えられている。今回、乳がんのmicroRNAの発現異常として17種類同定したが、これらの異常の一部には、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。

E. 結論

乳がんにおける新たなエピジェネティックな異常の探索を行い、1) Wnt/beta-cateninシグナルに関与する*MDFI*のDNAメチル化異常、および2) microRNAの発現異常として10倍以上に発現が亢進している5microRNA、発現が消失している12microRNA、合計17種類の発現異常を同定した。放射線障害に基づく多数の乳がん症例での解析を予定している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Miyamoto K, et al. *MDFI* (MyoD family inhibitor), which regulates myogenic and Wnt/ β -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, CA April 14-18, 2007
2. Saito A, Miyamoto K, et al. Epigenetic alteration of *SMAD4* in human breast, lung, and ovarian cancers. 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
3. Terada k, Miyamoto K, et al. Association between the CpG island methylator phenotype and clinicopathological findings in human breast cancers. 第66回日本癌学会学術総会, 2007年10月3-5日, 横浜
4. 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

5. 吉田裕, 宮本和明 乳癌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

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

原爆被曝により発生した固形がんの分子腫瘍学的解析

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 濱谷清裕

(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曝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。昨年度甲状腺乳頭癌では*RET/PTC*遺伝子再配列と被曝線量との有意な正の関連を明らかにした。今回、高線量被曝者1症例に*NTRK1*遺伝子の再配列が認められた。また、ま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。一方、大腸癌では、昨年度高度のマイクロサテライト不安定性(MSI)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を明らかにしたが、今回MSI-Hを呈する5症例全てに*MLH1*のヘテロ接合性(LOH)が認められた。また、初期の分子事象であるRasシグナル関連遺伝子の変化を有する大腸癌の被曝線量は、これらの変異を持たない大腸癌に比べ有意に高いことが認められた。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た。

A. 研究目的

原爆被曝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。被曝者甲状腺癌は被曝10年後頃よりリスクの上昇が認められ、被曝後約20 - 25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・長崎の原爆被曝者（寿命調査集団の対象者）に発生した成人甲状腺乳頭癌71症例（被曝線量=0 mGyの非被曝者21名、被曝線量>0 mGyの被曝者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県の寿命調査集団の対象者に発生した大腸癌51

症例（被曝線量=0 mGyの非被曝者 16名、被曝線量>0 mGyの被曝者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*遺伝子の再配列は逆転写反応の後、5'RACE法を行い、同定した。*NTRK1*遺伝子の再配列はカイネズドメインの発現が見られる試料について、報告されている4種類の再配列型についてRT-PCRにより解析した。*KRAS*遺伝子の変異は12/13番目と61番目のコドンを含む領域断片をPCRで増幅した後、直接塩基配列を用いて確認した。*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。*MSH2*遺伝子のLOHは3種類のSTSマーカー(*D2S378*, *D2S391*, *D2S136*)断片長の蛍光シーケンサーによる解析および4種類のSNPマーカー(rs1981928, rs3771274, rs2042649, rs6726691)でのRFLPを用いて決定した。*RASSF2*遺伝子のメチル化は制限酵素 *HpyCH4* IVを用いたCOBRA法により決定した。*BRAF*遺伝子変異はコドン600番目を含む断片をPCRで増幅した後、直接塩基配列を用いて確認した。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。いずれの症例も、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) 成人甲状腺乳頭癌

甲状腺乳頭癌の多くは、初期段階でMAPカインーズ経路の恒常的活性化が観察され、発癌に関与していると考えられている。一般集団の成人甲状腺乳頭癌では*BRAF*点突然変異が、また小児甲状腺乳頭癌では放射線被曝歴の有無に関係なく*RET/PTC*が、この活性化に主要な役割を果たしていることが知られている。

昨年度*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、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曝から診断までの期間が短いことを明らかにした。さらに、*RET/PTC*と*BRAF*点突然変異両方とも持たない症例も被曝線量とともにその頻度が増加する傾向が見られ、また、被曝から診断までの期間も*BRAF*変異を有する症例に比べて有意に短いことを明らかにしてきた。

今年度、高線量被曝者(1.5 Gy)1症例に、まだ報告されていないタイプの*RET/PTC*を単離し、同定した。

図1 高線量被曝者甲状腺乳頭癌における新規*RET/PTCX*

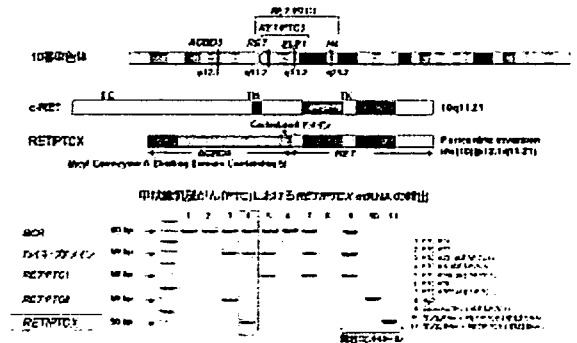


図1に示すようにこの新規 *RET/PTCX* のパートナー遺伝子は10番染色体短腕にある *ACBD5*(Coenzyme A Domain Containing 5)遺伝子で、coiled-coil ドメインを他の *RET/PTC* 同様有しており、二量体を形成することによりリガンドなしに活性化されると考えられる。

全症例について *KRAS* 変異の解析を行なった。また、*RET/PTC* と *BRAF* 点突然変異両方とも持たない甲状腺乳頭癌14症例について *NTRK1* 遺伝子の解析を行なった。*KRAS* 遺伝子変異はいずれの症例にも検出されなかった。一方、*NTRK1* 遺伝子の再配列は高線量被曝者(0.89 Gy)の1症例に検出された。また、この症例の被曝から診断までの期間は15年と短かった。*NTRK1* 遺伝子の再配列と *RET/PTC* 再配列を有する症例を染色体再配列を持つ症例として、被曝線量および被曝から診断までの期間との関連について解析した。その結果を図2と図3に示す。

図2. 被曝線量群別での染色体再配列および点突然変異頻度

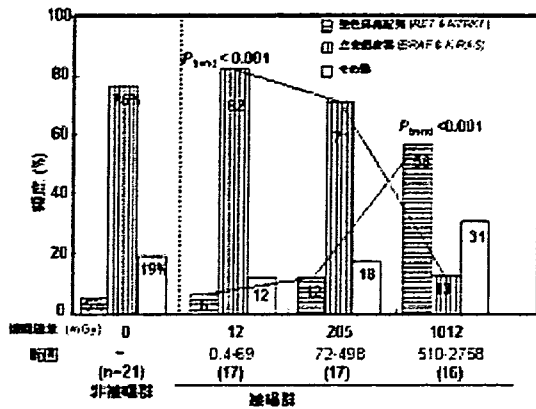


図3. 染色体再配列および点変異の有無による被曝から診断までの期間

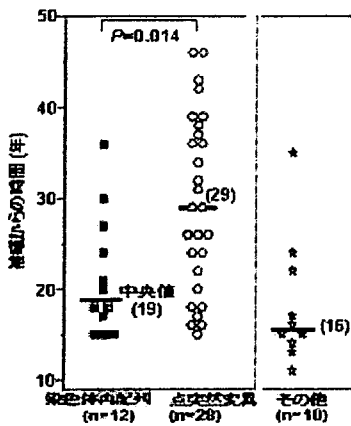


図2および図3より、染色体再配列を有する成人甲状腺乳頭癌は被曝線量と密接な正の関連を示すこと、また原爆被曝から診断までの期間が点変異を持つ甲状腺癌に比べ有意に短いことが示された。

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)を示す癌は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およびその主要な原因の一つである*MLH1*遺伝子のメチル化について検討を行ってきた。その結果、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いこと($P=0.042$)、また、*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すことを明らかにしてきた。さらに、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、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ることも明らかにしてきた。

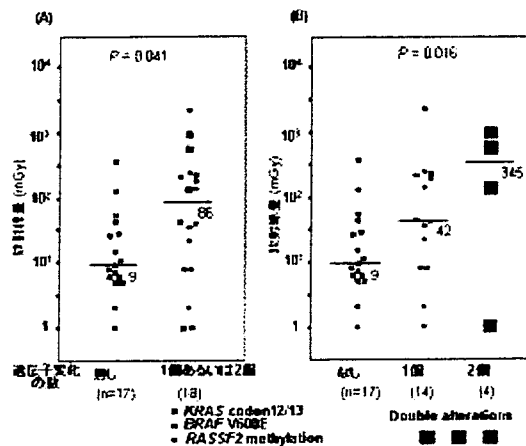
今年度*MLH1*遺伝子のLOHとともにMSH2のLOHを調べたところ、MSI-Hの5症例全てに*MLH1*遺伝子のLOHが確認され、1症例にMSH2のLOHが認められた(表1)。

表 1. MSI-H の大腸癌患者における *MLH1* 遺伝子メチル化と LOH と MSH2 の LOH

症例	メチル化	LOH	
	<i>MLH1</i>	<i>MLH1</i>	MSH2
A	メチル化	+	+
B	メチル化	+	-
C	メチル化	+	-
D	非メチル化	+	-
E	非メチル化	+	-

次に放射線被曝がMSIに関連した初期の分子事象と関連しているかについて明らかにするために*BRAF*遺伝子コドン600および*KRAS*遺伝子コドン12/13の変異、ならびに*RASSF2*遺伝子のメチル化について解析を行なった。これらの遺伝子変化のいずれかを有する大腸癌症例の被曝線量中央値は、いずれの変化も有しない症例に比べ有意に高かった(図4A)。さらに、遺伝子変化の数が増えるにつれて、被曝線量が有意な増加傾向を示した(図4B)。

図4. Rasシグナルに関連した遺伝子変化と放射線量の関連



さらに、このRasシグナルに関連した遺伝子変化の状態はMSIのみならずMLHI遺伝子のメチル化とも密接に関連していた(表2)。実際、全てのMSI-Hを呈する症例およびMLHI遺伝子のメチル化を有する症例は、今回解析を行なった三種類の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。

表2. Rasシグナル関連遺伝子変化とMLHI遺伝子メチル化あるいはMSI状態との関連

		遺伝子変異 n)		P _{trend}	P
		-	+		
MLHI methylation	UM	17	13	0.045	
	M	0	5		
MSI	MSS	9	6	0.044	0.044
	MSI-L	7	6		
	MSI-H	0	5		

Rasシグナル変異はBRAF^{V600E}とKRAS遺伝子(コドン12, 13)変異およびRASSF2遺伝子のメチル化について解析。
*Cochran-Armitage test
**Fisher's exact test for MSS&MSI-L vs. MSI-H

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遺伝子再配列およびNTRK1遺伝子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、さらに、染色体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19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遺伝子あるいはNTRK1遺伝子再配列頻度が原爆放射線被曝による成人甲状腺乳頭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遺伝子あるいはNTRK1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症例は全例で、MLHIのLOHが認められ、1症例にMSH2のLOHも認められた。また、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認められた。さらにRasシグナルに関連した遺伝子変化の状態はMSIのみならずMLHI遺伝子のメチル化とも密接に関連していた。これらのことより、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目目されてきたが、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および点突然変異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

Nakachi K, Hayashi T, Hamatani K, Eguchi H, Kusunoki Y. Hiroshima and Nagasaki 60 Years: Follow-up of Survivors - Current Progress in Molecular Epidemiology Studies -. Mut Res. in press. (2008)

Yano M, Hamatani K, Eguchi H, Hirai Y, MacPhee DG, Sugino K, Dohi K, Itamoto T, Asahara T. Prognosis in patients with hepatocellular carcinoma correlates to mutations

of p53 and/or hMSH2 genes. Eur J Cancer 43: 1092-1100. (2007)

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)

2. 学会発表

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. 20 May - 24 May 2007, Antalya, Turkey

Hamatani K, Eguchi H, Taga M, Takahashi K, Cologne JB, Soda M, Abe K, Hayashi T, Arihiro K, Hayashi Y, Nakachi K. Gene alterations preferentially occurred in adult-onset papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors. 13th International Congress of Radiation Research. 8 July – 12 July 2007, San Francisco, USA

Eguchi H, Hamatani K, Taga M, Ito R, Takahashi K, Imai K, Katayama H, Kodama K, Tahara E, Izumi S, Matsumura S, Oue N, Yasui W, Nakachi K. Microsatellite instability in colorectal cancers among atomic-bomb survivors. 13th International Congress of Radiation Research. 8 July – 12 July 2007, San Francisco, USA

Takahashi K, Eguchi H, Imai K, Hayashi Y, Nakachi K, Hamatani K. Gene alterations preferentially occurred in adult-onset papillary thyroid cancer among atomic-bomb survivors. 8th Korea-Japan Cancer and Aging Symposium. 10 August – 11 August 2007, Gifu, Japan

濱谷清裕、江口英孝、多賀正尊、伊藤玲子、今井一枝、高橋恵子、安倍邦子、藤原 恵、有廣光司、中地 敬: 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日-2007年10月5日、横浜

江口英孝、濱谷清裕、多賀正尊、伊藤玲子、高橋恵子、西 信雄、片山博昭、田原榮一、和泉志津恵、松村俊二、大上直秀、安井 弥、

中地 敬: 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日-2007年10月5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、西 信雄、田原榮一、和泉志津恵、松村俊二、大上直秀、安井 弥、中地 敬: 原爆被爆者で発生した非小細胞肺がんにおける 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日-2007年10月5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

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

分担研究者 中地 敬（財）放射線影響研究所放射線生物学/分子疫学部

研究要旨 発がんは環境と宿主との相互作用の一つの帰結であり、宿主の遺伝的要因は発がん感受性の個体差に重要な役割を果たしている。本研究の目的は、原爆被爆者集団を対象としたコホート研究のゲノム解析により、放射線関連発がんの遺伝的高危険群を同定するとともに、放射線影響と遺伝的要因の相互作用に基づく発がんリスクの評価システムを構築することである。これまでに、原爆放射線被曝によって胃がんリスクが増加することは疫学研究によって報告されており、我々は以前に炎症性サイトカイン*IL-10*遺伝子のハプロタイプが胃がんの遺伝的感受性に関与していることを報告した。一方、Laurénらは、胃がんをその構造と進展様式からintestinal typeとdiffuse typeの2型に分類しているが、これらの胃がん組織型によって放射線被曝の影響が異なるという報告もある。今回、我々は症例をintestinal typeとdiffuse typeに分けて、放射線被曝によるリスクの増加、*IL-10*遺伝子ハプロタイプに基づく遺伝的感受性、遺伝的要因と放射線被曝の相互作用を原爆被爆者コホート内症例対照研究によって検討した。その結果、症例における両typeの割合と被曝線量の関係を見ると、被曝線量が高い群ではdiffuse typeの割合が増加し、intestinal typeが減少していた。さらに、多変量解析により、他の交絡因子を考慮して解析しても、放射線被曝はdiffuse typeの胃がんリスクを有意に増加させるが、intestinal typeのリスクには関連しないことが示唆された。Diffuse typeでは、*IL-10*遺伝子ハプロタイプと放射線被曝との強い相互作用が観察され、特定のハプロタイプと放射線被曝の組み合わせによりdiffuse type胃がんのリスクが顕著に増大した。

A. 研究目的

本研究の目的は、原爆被爆者集団を対象としたコホート研究のゲノム解析により、放射線関連発がんの遺伝的高危険群を同定するとともに、放射線影響と遺伝的要因の相互作用に基づく発がんリスクの評価システムを構築することである。また、放射線被曝が持続性炎症状態を亢進するという従来知見を踏まえて、炎症から発がんに至る作用機序の解析を行う。本研究の成果は、

原爆放射線への被曝のみならず、他の放射線関連発がんの予防に重要な知見を与えることが期待される。

本年度は、intestinal typeとdiffuse typeの胃がん組織型によって、放射線被曝によるリスクの増加、*IL-10*遺伝子ハプロタイプに基づく遺伝的感受性、遺伝的要因と放射線被曝の相互作用を原爆被爆者コホート内症例対照研究によって検討した。

B. 研究方法

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。Intestinal type、diffuse typeの分類は、地域がん登録データに基づいて行った。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解析は、TaqMan 5'ヌクレアーゼ法(PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて行った。遺伝子型の決定にはABI Prism 9700HT sequence detector (PE Applied Biosystems)を用いた。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。

(倫理面への配慮)

本研究は、放射線影響研究所の研究計画書審査委員会、人権擁護委員会、遺伝子に関する倫理委員会、生物学的試料委員会の審査を受け研究計画は了承されており、国の疫学研究のガイドライン、ゲノム・遺伝子研究のガイドラインに従って行われている。研究においては、使用するDNAなどの生体試料および臨床・追跡データはすべて連結可能匿名化されて解析され、「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」を厳守した。

C. 研究結果

症例におけるintestinal typeとdiffuse typeの割合と被曝線量の間を見ると、被曝線量が高い群ではdiffuse typeの割合が増加し、intestinal typeが減少していた(図1)。さらに、多変量解析により、他の交絡因子を考慮し

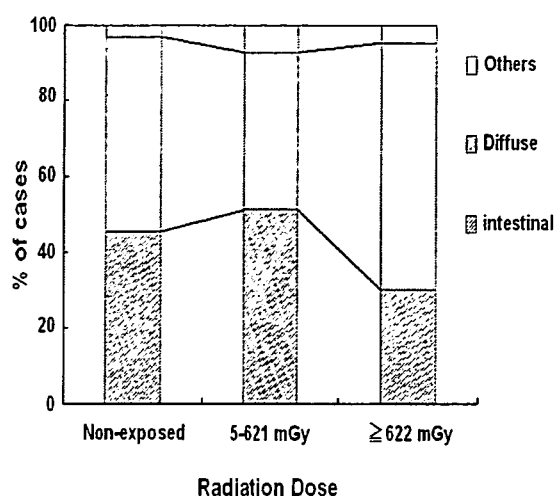


図1 非被曝者と被曝者でのintestinal typeとdiffuse typeの胃がん

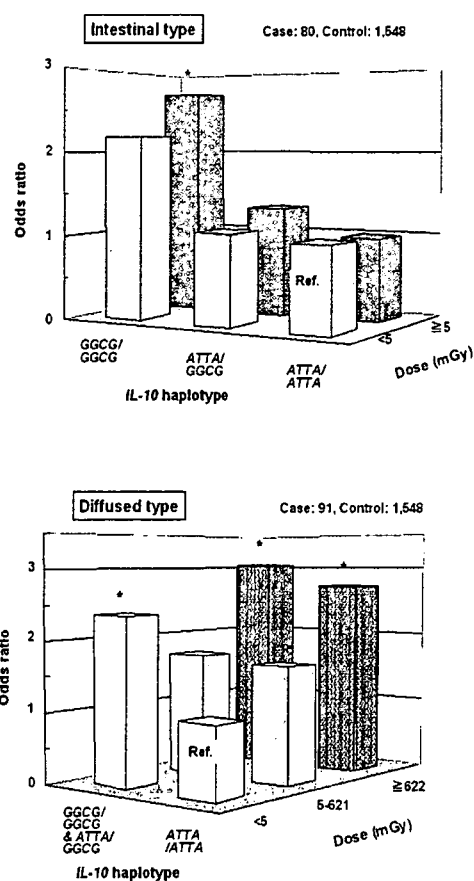


図2 intestinal typeとdiffuse typeの胃がんリスクに及ぼすIL-10ハプロタイプと放射線被曝の影響

て解析しても、放射線被曝はdiffuse typeの胃がんリスクを有意に増加させるが、intestinal typeのリスクには関連しないことが示唆された。

我々は以前、炎症関連サイトカイン*IL-10*遺伝子座に存在する一つのハプロタイプブロックを同定し、二つの主要なハプロタイプアレル*ATTA* (wild)と*GGCG* (variant)を見出した。このハプロタイプブロックは*IL-10*遺伝子の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。この*IL-10*ハプロタイプが、胃発がんの遺伝的要因の一つであることを報告した。

本年度、intestinal typeとdiffuse typeのそれぞれについて、放射線被曝状況と*IL-10*ハプロタイプを組み合わせる胃がんリスクを検討した。その結果、Intestinal type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 (図2上)。しかし、放射線被曝によるそれぞれのハプロタイプのリスクの変動は小さかった。

これに対して、diffuse typeでは、*IL-10*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 (図2下)。その結果、被曝線量が高くかつ変異アレル*GGCG*を持つグループが最も大きい胃がん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。

D. 考察

胃がんは慢性胃炎からゆっくりと時間をかけて萎縮性胃炎、腸上皮化生を経て発生するタイプと萎縮性胃炎を経ずして発生するタイプに大別される。intestinal typeは前者のタイプにほぼ対応し、*H. pylori*の関与が大きいと考えられる。

*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、変異アレル*GGCG*を持つ人の濃度は高い。また、放射線被曝によっても、血中*IL-10*濃度が上昇すること

が対照群で見出されている。すなわち、*IL-10*ハプロタイプは機能的な意味を持って、intestinal typeとdiffuse typeの双方に關与していることになる。このことは、*IL-10*が*H. pylori*に關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關与している可能性がある。なぜintestinal typeよりdiffuse type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關連についても検討する必要があり、今後の研究課題である。

E. 結論

*IL-10*ハプロタイプとintestinal typeとdiffuse typeの胃がんリスクとの關係および放射線被曝の影響を調べた。その結果、放射線被曝はdiffuse typeの胃がんリスクを有意に増加させるが、intestinal typeのリスクへの寄与は少ないことが示唆された。また、diffuse typeでは、*IL-10*遺伝子ハプロタイプと放射線被曝との強い交互作用が觀察され、特に、*ATTA/ATTA*の放射線被曝によるリスクの増大が顕著であった。その結果、被曝線量の高いグループでは*IL-10*ハプロタイプによるリスクの差は減少し、*IL-10*ハプロタイプに依らず高いリスクが觀察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aragane N, Imai K, Komiya K, Sato A, Tomimasu R, Hisatomi T, Sakuragi T, Mitsuoka M, Hayashi S, Nakachi K, Sueoka E. Exon 19 of EGFR mutation in relation to the CA-repeat polymorphism in intron 1. *Cancer Sci* 2008, in press.

2. Nakachi K, Hayashi T, Hamatani K,

- Eguchi H, Kusunoki Y. Sixty Years of Follow-up of Hiroshima and Nagasaki Survivors: Current Progress in Molecular Epidemiology Studies. *Mut Res* 2008, in press.
3. Kanzaki H, Ouchida M, Hanafusa H, Yamamoto H, Suzuki H, Yano M, Aoe M, Imai K, Date H, Nakachi K, Shimizu K. 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.
 4. 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.
 5. 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* 2007 46:242-248.
 6. Kanzaki H, Ouchida M, Hanafusa H, Sakai A, Yamamoto H, Suzuki H, Yano M, Aoe M, Imai K, Date H, Nakachi K, Shimizu K. Single nucleotide polymorphism in the RAD18 gene and risk of colorectal cancer in the Japanese population. *Oncol Rep* 2007 18:1171-1175.
 7. Hayashi I, Morishita Y, Imai K, Nakamura M, Nakachi K, Hayashi T. High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. *Mutat Res* 2007 631: 55-61.
 8. 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* 2007 105: 106-114.
 9. 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* 2007 133: 93-102.
 10. Hamasaki K, Imai K, Nakachi K, Takahashi N, Kodama Y, Kusunoki Y. Short-term culture and γ H2AX flow cytometry determine the difference in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2007 48: 38-47.
 11. Hamasaki K, Imai K, Hayashi T, Nakachi K, Kusunoki Y. 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.
2. 学会発表
 1. Nakachi K, Hayashi T, Hamatani K, Eguchi H, Kusunoki Y. Hiroshima 60 years: Monitoring of survivors--Current progress in molecular epidemiology studies. The 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, 20-24 May 2007, Antalya, Turkey.
 2. Yoshida K, Hayashi T, Morishita Y, Nagamura H, Maki M, Imai K, Kusunoki Y,

- Nakachi K. 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), 20-24 May 2007, Spetses island, Greece.
3. Hamasaki K, Kodama Y, Kusunoki Y, Nakashima E, Takahashi N, Nakamura N, Nakachi K. Cytogenetic instability in peripheral blood T lymphocytes cultured in vitro from A-bomb survivors. The 13th International Congress of Radiation Research, 8-12 July 2007, San Francisco, California, USA.
 4. Hayashi T, Morishita Y, Nagamura H, Maki M, Sora M, Imai K, Yoshida K, Kusunoki Y, Tahara E, Nakachi K. Effects of inflammation-related gene polymorphisms and atomic-bomb radiation exposure on gastric cancer risk. The 13th International Congress of Radiation Research, 8-12 July 2007, San Francisco, California, USA.
 5. Hamatani K, Eguchi H, Taga M, Takahashi K, Cologne JB, Soda M, Abe K, Hayashi T, Arihiro K, Hayashi Y, Nakachi K. Gene alterations preferentially occurred in adult-onset papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors. The 13th International Congress of Radiation Research, 8-12 July 2007, San Francisco, California, USA.
 6. Eguchi H, Hamatani K, Taga M, Katayama H, Kodama K, Tahara E, Izumi S, Matsumura S, Oue N, Yasui W, Nakachi K. Microsatellite instability and related gene alterations in radiation-associated colorectal cancer from atomic-bomb survivors. The 13th International Congress of Radiation Research, 8-12 July 2007, San Francisco, California, USA.
 7. Hayashi T, Nagamura H, Morishita Y, Maki M, Sora M, Imai K, Yoshida K, Kusunoki Y, Nakachi K. Gastric cancer risks among atomic-bomb survivors differ by HLA class I genotype. Joint ESTP/IFSTP Congress of Toxicologic Pathology, 16-19 September 2007, Basel, Switzerland.
 8. Nagamura H, Hayashi T, Morishita Y, Maki M, Imai K, Yoshida K, Kusunoki Y, Nakachi K. Effects of inflammation-related cytokine gene polymorphisms on gastric cancer risk among atomic bomb survivors. Joint ESTP/IFSTP Congress of Toxicologic Pathology, 16-19 September 2007, Basel, Switzerland.
 9. Morishita Y, Hayashi T, Nagamura H, Maki M, Kubo Y, Yoshida K, Kusunoki Y, Nakachi K. Elevated levels of plasma reactive oxygen species and inflammatory markers among atomic-bomb survivors. Joint ESTP/IFSTP Congress of Toxicologic Pathology, 16-19 September 2007, Basel, Switzerland.
 10. Hayashi T, Morishita Y, Nagamura H, Maki M, Sora M, Imai K, Yoshida K, Kusunoki Y, Hayashi I, Tahara E, Nakachi K. 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, 11-13 October 2007, Crete, Greece.
 11. Ohishi W, Kusunoki Y, Fujiwara S, Nakashima E, Hayashi T, Nakachi K.

- Chayama K. 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, 23-26 March 2008, Seoul, South Korea.
12. 濱崎幹也、児玉喜明、楠 洋一郎、中島 栄二、高橋規郎、中村 典、中地 敬. 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
 13. 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
 14. 今井一枝、林 奉権、中地 敬. 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
 15. 今井一枝、林 奉権、中地 敬. 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
 16. 高橋恵子、江口英孝、今井一枝、林 雄三、中地 敬、濱谷清裕. 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
 17. 林 奉権、林 幾江、森下ゆかり、空 美佐江、今井一枝、吉田健吾、中村正和、中地 敬. 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
 18. 吉田健吾、林 奉権、森下ゆかり、久保美子、今井一枝、楠 洋一郎、中地 敬. 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
 19. 濱谷清裕、江口英孝、多賀正尊、伊藤玲子、今井一枝、高橋恵子、安倍邦子、藤原 恵、有廣光司、中地 敬. 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
 20. 多賀正尊、江口英孝、濱谷清裕、伊藤玲子、今井一枝、片山博昭、西 信雄、田原榮一、和泉志津恵、松村俊二、大上直秀、安井 弥、中地 敬. 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
 21. 今井一枝、林 奉権、吉田健吾、楠 洋一郎、中地 敬. 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
 22. 江口英孝、濱谷清裕、多賀正尊、伊藤玲子、高橋恵子、西 信雄、片山博昭、田原榮一、和泉志津恵、松村俊二、大上直秀、安井 弥、中地 敬. 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

23. 濱崎幹也、児玉喜明、楠 洋一郎、中島 栄二、高橋規郎、中村 典、中地 敬. 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
24. 濱崎幹也、今井一枝、大西 寿、林 奉権、中地 敬、楠 洋一郎. 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
25. 楠 洋一郎、大石和佳、林 奉権、中地 敬. 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
26. 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
27. 濱崎幹也、児玉喜明、楠 洋一郎、中島 栄二、高橋規郎、中村 典、中地 敬. 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

3. その他

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

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

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 放射線被ばくが持続性炎症状態を亢進するという知見を基に、炎症から発がんに至る作用機序に迫る目的で、炎症を誘導したマウスの生体内遺伝的不安定性を検討した。炎症モデルとして、親マウスからF1への脾細胞移植によってT細胞依存性の炎症が誘導される移植片対宿主病(GVHD)モデル、ならびに自然免疫が関与するPoly(I:C)誘発急性炎症モデルを用いた。遺伝的不安定性の指標として、放射線による遺伝的不安定性の評価に有用性が認められている網状赤血球小核(MN)頻度を用いた。C57BL/6(B6)から(B6 x DBA2)F1(BDF1)への移植でGVHDを発症したマウスでは、移植後6週目のMN頻度は非移植群およびB6コントロールに比べて、それぞれ1.6倍および1.4倍高値を示した。同様の傾向はB6から(B6 x BALB/c)F1への移植へのGVHDにおいても認められた。ヒトでは、造血細胞移植患者のフォローアップによりGVHDが2次発がんのリスクファクターであることが知られているが、この結果はGVHDによる遺伝的不安定性が2次発がんの要因である可能性を支持する。また、Poly(I:C)400 μ g腹腔投与して自然免疫依存性の炎症を誘導したB6ならびにBALB/cマウスでは、Poly(I:C)投与2日後のMN頻度は、いずれもPBS投与群に比べて有意に1.7倍程度上昇していた。さらに、B6から移植1日前に2.5Gy照射したBDF1マウスへの移植において、移植後15週目に放射線のバイスタンダー効果が確認された。以上の結果は、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を示唆する。さらに、放射線被ばく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。

A. 研究目的

放射線被ばく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爆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。また、一般集団で炎症が固形癌発生のリスクファクターであるという証拠が蓄積されつつあるにもかかわらず、放射線発がんに関与するかが明らかにされていない。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、原爆被爆者医療の向上のみならず、職業被ばくにおける健康管理や医療被ばく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、放射線被ばくによる発がん感受性の遺伝的背景と放射線発がんにおける炎症の関与を検討する。

放射線被ばく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発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。また、遺伝的不安定性は、放射線を直接浴びた細胞が産生する炎症因子によって介在されることが示されている。さらに、原爆被爆者コーホートで測定されたサイトカインなどの免疫指標データから、被爆者では被ばく放射線量に依存した炎症の亢進が持続している可能性がある。これらの点に基づき、放射線による固形癌発生に、炎症によってもたらされる遺伝的不安定性が一部関与しているという仮説を立てた。

この仮説を検討する目的で、原爆被爆者コーホートにおいて、①被ばく線量、②放射線感受性、③遺伝的不安定性、④体細胞突然変異、⑤炎症パラメーター、および⑥固

形癌発生の関係を検討する取り組みが行われている。その一翼として、Tリンパ球の γ H2AXレベルおよび網状赤血球小核 (MN) 頻度がそれぞれ放射線感受性および遺伝的不安定性の指標として有用であることを昨年度報告した。現在、原爆被爆者コーホートにおけるこれらの指標の測定が進行中である。今年度は、炎症から発がんに至る作用機序に迫る目的で、炎症を誘導したマウスの生体内遺伝的不安定性を検討した。

B. 研究方法

昨年度、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、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を示唆する知見を報告した。今回、同様のMN頻度測定系を用いて、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 \rightarrow 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。GVHDモデルでは、①C57BL/6 (B6) \rightarrow (B6 x DBA2) F1 (BDF1)、② B6 \rightarrow (B6 x BALB/c) F1 (BCF1)、あるいは③BALB/c \rightarrow BCF1 の系において親の脾細胞とリンパ節細胞をF1の尾静脈より移入した。なお、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。

網状赤血球 MN 頻度の測定は、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。統計学的解析はノンパラメトリック解析で行った。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

移植後6週目のB6 \rightarrow BDF1群のMN頻度は非移植群および B6コントロールに比べて、それぞれ1.6倍および1.4倍と有意に高値を示した(図1)。同様の傾向はB6 \rightarrow BCF1モデルにおいても認められたが、BALB/c \rightarrow BCF1 の系では非移植群およびBALB/cコントロールのMN頻度と有意な差は見られなかった(図2)。

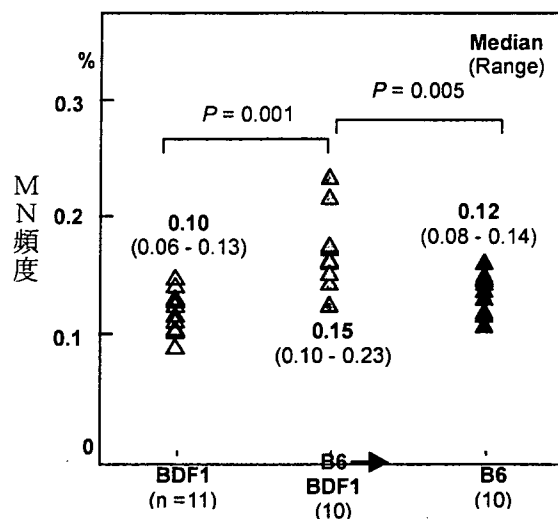


図1. 移植後6週目のB6 \rightarrow BDF1群のMN頻度

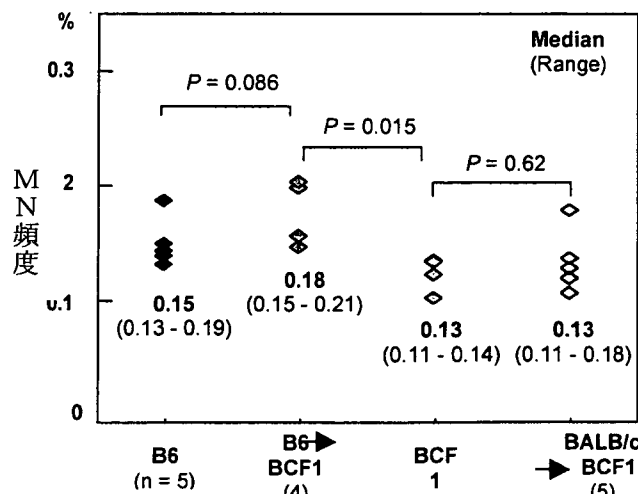


図2. 移植後6週目のB6 \rightarrow BCF1群およびBALB/c \rightarrow BCF1群のMN頻度

次に、レシピエントの放射線被ばくが移植されたドナー造血細胞の遺伝的不安定性にどのように影響するか調べる目的で、B6 \rightarrow BDF1モデルにおいて、移植1日前にレ