

200823018A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安井 弥  
平成21年（2009年）4月

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 安井 弥

平成21年(2009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に特異的な遺伝子の同定	14
安井 弥	
2. 被爆者乳がんの特徴的な DNA メチル化異常の MS-RDA によるゲノム網羅的な解析	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	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	41
西 信雄	
7. 放射線発がんにおけるゲノム修復機構の解析	45
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

## 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

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、などの解析により、放射線障害に基づく発がんの分子機構の解明、その予防・治療への応用を目的として研究を行なった。分子病理学的解析により、がん間質マクロファージの浸潤と放射線被曝との関連が示された。SAGE法およびCAST法によって、がん特異的発現遺伝子としてADAMTS16、DSC2などを同定した。乳がんにおいて*CHRM1*のDNAメチル化異常を同定した。また、被曝者に発生した乳がんではHER2陽性の頻度が高いとともに、それに関連した発現を示す15種類のmicroRNAを同定した。成人甲状腺乳頭がんでは遺伝子再配列、大腸がんではMSIとRas関連遺伝子変異と被曝線量との関係が明らかとなった。分子疫学的研究において、結腸がんでは、高被曝線量群で特定の*IL18*ハプロタイプを持つ人の発がんリスクが大きく増加することを見いだした。*ATM*遺伝子のハプロタイプの違いは*GPA*突然変異頻度の線量効果とは有意な関係を示さず、原爆被曝者の体細胞突然変異の個人差に*ATM*遺伝子の多型が関係する可能性は低いと考えられた。放影研コホート集団において、第1原発がんが結腸がんであった症例では第2原発がんのリスクは上昇していた。放射線によるゲノム障害・修復からみた発がん機構に関する分子生物学的解析により、損傷乗り越え修復機構の中心的役割を担うREVIが放射線や変異原による細胞死を回避し発がんに促進的に働く可能性のあることを明らかにした。また、synaptonemal complexを構成する分子SYCP3ががん精巢抗原であり、放射線治療とシスプラチンによる化学療法の感受性予測マーカーとなり得ることを見いだした。これらの研究成果は、放射線発がん機構の解明、放射線曝露における発がんリスクの評価と予防に貢献するのみならず、広く固形がんの個別化治療の進展にも寄与するものである。

### 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

濱谷清裕

(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

放射線被曝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、被曝者医療の向上、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、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、分子病理学的、分子疫学的、分子生物学のアプローチにより検討し、得られた成果を予防・治療に応用することを目的とする。研究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。さらに、ゲノム障害・修復機構に関する検討は、放射線治療や抗がん剤感受性診断への応用にもつながる。

## 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)

被曝者に発生した胃がんと対照群について、がん間質に浸潤するマクロファージ (CD68 陽性単核細胞) について検討した。対象症例は、放射線影響研究所 (放影研) の Life Span Study (LSS) の被曝群 53 例 (中央被曝線量 51mGy: 2-2601mGy) と非被曝群 40 例に発生した胃がんである。また、同様の症例について、TP53 および CTNNB (beta-catenin) 遺伝子の変異 (PCR-SSCP 法: TP53=exon 5-8, CTNNB=exon 3) および発現 (免疫染色) を検討した。一方、食道扁平上皮がんの SAGE (serial analysis of gene expression) 法による解析を行ない、食道がん特異的な発現遺伝子の候補をリストアップした。その一部について、臨床検体における発現解析 (定量的 RT-PCR 法)、機能

解析を行なった。さらに、細胞表面膜蛋白あるいは分泌蛋白を網羅的に効率良く同定する CAST (Escherichia coli ampicillin secretion trap) 法を用いて、胃がん細胞株、前立腺がん細胞株および正常胃、前立腺組織について解析した。がんと正常粘膜を比較して抽出したがん特異遺伝子の候補については、RT-PCR, western blot および免疫染色により発現および局在を検討した。

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)

正常乳管上皮細胞と乳がん細胞を対象として、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。さらに、被曝者乳がんの臨床病理学および分子生物学の解析を行い、放射線障害に基づく乳がん発生の分子機構の解明を試みた。

3. 原爆被曝により発生した固形がんの分子腫瘍学的解析 (濱谷)

原爆被曝者 (放影研の LSS) に発生した成人甲状腺乳頭がん 79 例と対照群 26 例のパラフィン包埋組織を対象に、RET/PTC 遺伝子再配列、NTRK1 遺伝子再配列および BRAF 遺伝子変異を解析し、臨床病理学的・疫学的因子との関連について検討した。また、原爆被曝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、KRAS 遺伝子の変異、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 (中地)

放影研の成人健康調査 (AHS) コーホー

トに基づき、1982年以降に結腸直腸がん罹患した210例を症例群(結腸がん165例、直腸がん45例)とし、843例の対照群を同コーホートから選んでゲノム関連解析を行った。症例群は非被曝、および被曝線量の中央値714 mGyにより2分割されたグループの計3被曝線量カテゴリーに分けて解析した。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-18* 遺伝子の多型部位 (single nucleotide polymorphism: SNP) に基づいて連鎖不平衡解析を行った。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)

赤血球GPA(グリコフォリンA)突然変異頻度のデータは1988-1996年の放影研AHS対象者約1,900名について測定したものをを用いた。フローサイトメトリーによる $\gamma$ 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1週間培養し、4GyのX線を照射、6時間後の $\gamma$ H2AXの発現量をFACScanで測定した。末梢血中の網状赤血球小核(MN)頻度の測定は、フローサイトメトリーにて解析し、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。*ATM* 遺伝子のSNPはTaqMan-Allelic Discrimination法を用いて決定した。ハプロタイプブロックはlinkage disequilibrium coefficientsに基づき決定した。

## 3. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析(西)

放影研のLSS集団105,426人(80,179人の被曝者と25,247人の入市者)を対象とし、第1原発の結腸がん罹患後の、第2原発全固形がん罹患のリスクを検討した。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2002年まで追跡した。ポワソン回帰モデルにより得られた第1原発がんの罹患リスクをもとに、第1原発の結腸がん罹患者が第2原

発の全固形がん罹患する期待罹患数を求め、観察罹患数との比から標準化罹患比を求めた。

## 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、テトラサイクリン(tet)の培地への添加によりREV1遺伝子の発現が誘導できるシステムを用いた。pcDNA4/TOベクターにヒトREV1 cDNAを導入し、pcDNA4/TO-REV1ベクターを作成した。pcDNA6/TR導入ヒト繊維肉腫細胞HT1080 (HT1080-pcDNA6/TR; 以下HT1080-6TR)に上記ベクターを導入した。これにより樹立した細胞株(HT1080-pcDNA6/TR- pcDNA4/ TO-REV1; 以下HT1080-REV1)を用いて、放射線の照射または、*N*-methyl-*N*-nitrosourea(以下MNU)で処理した後の生存率をClonogenic法を用いて測定した。放射線照射では、線源として<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 線を用い、照射の線量率は0.6843Gy/min、線量は1, 2, 4及び8Gyとした。

### 2. 化学療法感受性を既定する分子機構の解明(宮川)

ヒト正常およびがん由来の細胞株を用いてSYCP3の発現を解析した。SYCP3発現ベクターを導入して強制発現させた細胞を用いて、放射線とシスプラチンの感受性をコロニー形成法によって検討した。また、2つの染色体に特異的なプローブを用いてFISHにより染色体数を定量化することによって染色体不安定性を解析した。DNA二重鎖切断の存在は、この部位に集積する $\gamma$ H2AXの蛍光免疫染色によって評価した。SYCP3の相同組換えへの影響については、放射線照射後にRad51の蛍光免疫染色を行ない、核内においてフォーカスを形成する細胞を定量化することによって検討した。さらに、上流に存在するMRE11と、Rad51の機能を補助するBRCA1とBRCA2の、核内におけるDNA損傷依存性フォーカス形成も検討した。siRNAを用いたRNA干渉によるノックダウンの実験も行なった。



### (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)

間質におけるマクロファージ (CD68陽性単核細胞) の検討の結果、非がん部胃粘膜間質で高線量群にマクロファージは少ないこと、早期がん症例ではがん間質マクロファージが被爆群に少ない傾向にあることが明らかとなった。胃がんにおけるTP53とCTNNB遺伝子のSSCPによる遺伝子変異解析では被爆との間に明らかな相関は認められなかった。食道がんのSAGE解析によって、がん特異的発現遺伝子のひとつとしてADAMTS16を同定した。食道扁平上皮がんの40%に過剰発現しており、食道がん細胞株のADAMTS16-siRNA処理により、増殖および浸潤が有意に抑制された。胃がん細胞株と正常胃粘膜および前立腺がん細胞株と正常前立腺組織からCAST法を用いて網羅的に膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子解析し、いくつかの特異的遺伝子を同定した。その内DSC2は、胃がんでは高分化型に発現しており、扁平上皮がん (食道, 肺, 皮膚, 子宮頸部) では高頻度に陽性であった。

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)

MS-RDA法により乳がんでは高頻度にメチル化異常が認められる遺伝子*CHRMI*を同定した。*CHRMI*のメチル化異常は乳がん細胞

株8株すべてに認められ、乳がん症例でも21症例中21例 (100%) にメチル化異常が検出され、高頻度な異常であることを見出した。被爆者に発生した乳がんでは、HER2陽性の頻度が高く、低年齢被曝および低線量被曝に関連していた。そこでHER2陽性乳がんに着目しmicroRNA発現解析を行なったところ、HER2陽性乳がんにおいて10倍以上に発現が亢進している7種類のmicroRNA (miR-934, miR-221, miR-100, miR-99a, let-7i, let-7g, miR-424), HER2陽性乳がんにおいて消失している8種類のmicroRNA (miR-10a, miR-200a, miR-512-3p, miR-429, miR-200b, miR-200a, miR-769-3p, miR-489) を同定した。

3. 原爆被曝により発生した固形がんの分子腫瘍学的解析 (濱谷)

成人甲状腺乳頭がんにおいて、染色体再配列 (*RET/PTC*, *NTRK1*と*BRAF*再配列) は被曝線量が高くなると有意に相対頻度が増加し、*BRAF*点突然変異の相対頻度は有意に減少することを見出した。また、染色体再配列の相対頻度は被曝30年以降に急激に減少するのが観察され、被曝時年齢が高くなると有意に減少した。すなわち、染色体再配列が成人発症放射線関連甲状腺乳頭がんと密接に関連することが示唆された。大腸がんに関する検討では、高度のMSI (MSI-H) を呈する5症例全てに*MLH1*のヘテロ接合性消失 (LOH) が観察された。また、MSI-Hで*MLH1*が非メチル化の2症例における*MLH1*の点突然変異について調べ、2症例とも点突然変異を持つことを見出した。さらに、MSI-Hを呈する5症例全てに初期の分子事象であるRasシグナル関連遺伝子の変異が認められた。

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)

*IL-18*遺伝子のプロモーター領域に二つのSNPを含むハプロタイプブロックを見出し、二つの主要なアリル (*IL18-AT*野生型と

*IL-18-CG*変異型)を同定した。重回帰モデルにおいて、放射線による発がんリスクの増加は、結腸がんでは有意であったが(OR=1.33/Gy, 95%CI: 1.10-1.60)、直腸がんでは有意でなかった。*IL-18-CG*アレルをホモ接合体として持つ人は、*IL-18-AT*アレルを持つ人に比べ、結腸がんでは有意に高いリスクを示したが(OR=1.71, 95%CI: 1.13-2.59)、直腸がんでは有意でなかった。被曝線量カテゴリーと*IL-18*ハプロタイプの組み合わせに対するオッズ比を算出したところ、最も高い被曝線量カテゴリー(≥0.714 mGy)で、*IL-18-CG*アレルをホモ接合体として持つ人の結腸発がんリスクは大きく増加したが、直腸がんでは有意なリスクの増加は認められなかった。

## 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)

$\gamma$ H2AX測定系による個人の試験管内放射線感受性の評価において、放射線高感受性群と低感受性群間で赤血球*GPA*突然変異頻度に有意な違いは認められなかった。また、MN頻度の測定においても、長期間持続する放射線誘発遺伝的不安定性を示唆する証拠は見られず、赤血球*GPA*突然変異頻度との間にも有意な相関は認められなかった。遺伝子障害感受性の個人差の背景にある遺伝子多型を検討する目的で、1,825名の調査対象者の*ATM*遺伝子多型を解析し、*GPA*突然変異頻度の放射線量効果関係を調べたが、ハプロタイプ間に線量効果の有意差は認められなかった。

## 3. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析(西)

第1原発がんは、全固形がんが20,425例(男性9,507例, 女性10,918例)、結腸がんが1,627例(男性695例, 女性932例)であった。第1原発がんが結腸がんであった症例について第2原発全固形がんの標準化罹患比をみると、男性が1.26(95%CI: 1.01-1.69)、女性が1.19(95%CI: 0.94-1.61)であった。しかし、入市者も含めて被曝線量別に第2

原発全固形がん罹患の標準化罹患比をみると、統計学的に有意な傾向は認められなかった。すなわち、第2原発がんのリスクは少し上昇していたものの、被曝線量が高くなるほどリスクが上昇する傾向は認められなかった。

## 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)

$\gamma$ 線照射後の生存率は、tet存在下ではHT1080とHT1080-6TRは同程度であった。tet添加によりREV1を発現誘導したHT1080-REV1では、親株のHT1080より高い生存率を示し、tetを添加しない場合は、親株であるHT1080およびHT1080-6TR株と同程度の生存率を示した。一方、HT1080-REV1のMNU処理後の生存率は、tet存在下でREV1を発現誘導した場合は、親株であるHT1080-6TR株に比較して高い生存率を示した。tetを添加しない場合のHT1080-REV1は、親株であるHT1080-6TRと同程度の生存率であった。

### 2. 化学療法感受性を既定する分子機構の解明(宮川)

ヒト各種がん細胞株では15細胞中7細胞において、SYCP3の発現低下が認められた。SYCP3強制発現細胞は、非発現と比較して約2倍放射線とシスプラチンに対する感受性が亢進していた。染色体異数体の頻度は発現細胞では有意に上昇していた。また、 $\gamma$ H2AXのフォーカス形成が陽性である細胞も、発現細胞において増加していた。放射線照射後のRad51のフォーカス形成を検討したところ、SYCP3発現細胞ではフォーカス形成が有意に低下していた。さらに、MRE11とBRCA1はSYCP3の発現により影響を受けないが、BRCA2のフォーカス形成は低下することが判明した。逆に、SYCP3ノックダウン細胞では、放射線照射後のRad51のフォーカス形成は有意に上昇した。



#### 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、主に原爆被爆者に発生した固形がん組織を用いた遺伝子・microRNA発現解析から特異的発現態度を示す遺伝子・microRNAを抽出し、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。被爆者に発生する固形がんでは、持続性炎症と免疫環境の異常の関与が示唆されている。本年度の研究で、非がん部胃粘膜間質で高線量群にマクロファージは少ないこと、早期がん症例ではがん間質マクロファージが被爆群に少ない傾向にあることが明らかとなった。マクロファージのサブタイプに関しての詳細な検討が必要である。また、胃がんにおけるTP53とCTNNB遺伝子のSSCPによる遺伝子変異解析では被爆との間に明らかな相関は認められなかった。変異スペクトラムを解析する必要がある。一方、網羅的遺伝子発現解析による検討では、食道がんのSAGE解析によって、がん特異的発現遺伝子のひとつとしてADAMTS16を同定した。siRNAを用いた検討で、食道がん細胞の増殖および浸潤に関わっていることが明らかとなった。CAST法では、腸上皮のデスモソームの重要な構成蛋白であるDSC2を同定した。今後、これらの遺伝子について、被爆者に発生した食道がん、胃がんなどの固形がんについて発現検索を行ない、放射線関連発がんとの関連を解析する予定である。

乳がんにおける検討では、*CHRM1*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、HER2とmicroRNAの発現との関連を解析した。被爆者乳がんでは、サブタイプとしてHER2陽性乳がんの頻度の上昇が認められ、HER2陽性乳がんにおいて10倍以上に発現が亢進している7種類のmicroRNA、HER2陽性乳がんにおいて発現が消失している8種類のmicroRNAを同定した。放射線障害とmicroRNA遺伝情報システム異常の関連についてさらに検討しなければならない。

放射線照射による直接的な遺伝子変化として、DNA二重鎖切断および遺伝子再配列が知られている。成人甲状腺がんの解析において、*RET/PTC*遺伝子あるいは*NTRK1*遺伝子再配列が放射線被曝による発がんに強く関与することが示唆された。大腸がんにおけるMSIおよび*MLH1*遺伝子のメチル化状態は、Rasシグナルに関連した遺伝子変異の状態と密接に関連していた。初期事象と考えられるRasシグナルに関連した遺伝子のジェネティック・エピジェネティックな変化が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。マウスを用いた動物実験モデルにおいて、急性および慢性的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いる。放射線による発がん機構におけるmicroRNAおよびDNAメチル化等のエピジェネティックな変化の関与は重要な研究課題である。

IL-18は活性化マクロファージ、腸上皮細胞のIFN $\gamma$ 産生を強く誘導し、腸管免疫だけでなくNK細胞による免疫的防御にも重要な役割を果たすことが知られている。今回の分子疫学的研究において、結腸がんでは、最も高い被曝線量カテゴリーで、特定の*IL18*ハプロタイプを持つ人の発がんリスクは大きく増加することを見出した。被爆者の胃発がんでは、被曝放射線とともに*IL-10*遺伝子多型が関与することをすでに報告している。IL-10およびIL-18はいずれもT細胞免疫を調節する炎症性サイトカインであり、持続性炎症がこれらのがんの発生に関与することが示唆された。今後の検討により、放射線関連がんの高危険群を同定するだけでなく、発がんにおける炎症の役割と作用機序がより明確になると期待される。

放射線による体細胞突然変異の個人差にはDNA修復機能の個体差が関係し、修復機能の劣る個体は、より高い変異性を有し、放射線に関連したがんの発生するリスクが高い可能性が考えられている。この個人差の遺伝的背景を模索するために、DNA修復過程で中軸的役割を果たす*ATM*遺伝子の多型を調べ、*GPA*突然変異頻度の線量効果と

の関係を解析した。しかしながら、*ATM*遺伝子のハプロタイプの違いは*GPA*突然変異頻度の線量効果とは有意な関係を示さず、原爆被爆者の体細胞突然変異の個人差に*ATM*遺伝子の多型が関係する可能性は低いと考えられた。現在、*NBS1*、*ATR*など*ATM*以外のDNA二重鎖切断修復関連遺伝子の多型との関係について検討を進めている。

放影研LSS集団を対象に、第1原発の結腸がん罹患後の、第2原発全固形がん罹患のリスクを検討したところ、標準化罹患比で見ると第2原発がんのリスクは少し上昇していたものの、被曝線量が高いほど高くなる傾向は認められず、被曝線量との関連はみられなかった。第1原発がん罹患した者に共通する素因があるのかどうか、第1原発がんに対する治療が第2原発がんのリスクを高めたのかどうかについては今後明らかにしなければならない。また、平行して、他の主要な部位に発生したがんについても同様の検討を行う予定である。

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に関しては、損傷乗り越えDNA合成機構の中心的役割を担うREV1の細胞生物学的機能解析を行なった。その結果、REV1過剰発現細胞は、REV1発現ベクターを組み込んでいない親細胞株と比べ放射線照射やMNU処理後の生存率が上昇した。既にREV1トランスジェニックマウスにMNUを投与するとリンパ球のT-cell receptorの突然変異頻度が上昇すること、放射線照射やMNUやazoxymethane (AOM)の化学発がん剤の投与によって発がん感受性が亢進すること、を明らかにしている。従って、REV1の過剰発現細胞は、放射線や変異原によるゲノム損傷を乗り越えDNA合成を継続することで細胞死を回避するが、生存細胞は、突然変異を蓄積する可能性があり、最終的には発がん感受性に促進的に働くものと推定された。

SYCP3は、生殖細胞における減数分裂の遂行に必須である相同染色体間に形成されるsynaptonemal complexを構成する分子である。この発現をがん細胞株で検討した結

果、がんの種類を問わず、約45%の細胞株で発現していることが確認された。その体細胞における発現は、BRCA2の発現レベルを低下させることによってRad51を中心とする相同組換え修復によるDNA二重鎖切断修復を抑制することが明らかとなった。その結果として、発がんの原因となる染色体不安定性が誘導されるとともに、その異常が発がん細胞に存在する場合には、放射線とシスプラチンが効きやすくなる。これまでに多くのがん精巣抗原が同定されているが、発がんへの寄与とがん治療への影響が解明された分子としては、初めての例である。特に重要なことは、SYCP3が放射線治療とシスプラチンによる化学療法の感受性予測マーカーとなり得ることである。放射線発がんの機構を生物学的アプローチすることにより、がんの個別化治療の推進に大きく貢献することができる。

## E. 結論

本研究は、1)放射線関連固形がんにて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、について解析を行ない、放射線障害に基づく発がんの分子機構を解明し、それを予防・治療に応用することを目的としている。本年度は、分子病理学的に、胃がん間質のマクロファージ、乳がんのmicroRNA発現、甲状腺がんおよび大腸癌の遺伝子異常について、放射線被曝と関連する変化を認めた。また、新しいいくつかのがん特異的遺伝子を同定した。分子疫学的には、結腸の発がんリスクに*IL18*ハプロタイプが影響を及ぼすことを見いだした。分子生物学的解析により、REV1が放射線や変異原による細胞死を回避し発がんに促進的に働く可能性のあること、SYCP3が放射線治療とシスプラチンによる化学療法の感受性予測マーカーとなり得ること、を明らかにした。これらのアプローチから得られる成果は、放射線発



がん機構の解明, 放射線曝露における発がんリスクの評価と予防に貢献するのみならず, 広く固形がんの個別化治療の進展にも寄与するものである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yasui W, et al. Transcriptome dissection of gastric cancer: Identification of novel diagnostic and therapeutic targets from pathology specimens (review article). *Pathol Int* 59: 121-136, 2009
2. Noguchi T, Yasui W, et al. h-Prune is an independent prognostic marker for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2009 (in press)
3. Yamamoto H, Yasui W, et al. Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells. *Gastroenterol*, 2009 (in press)
4. Oue N, Yasui W, et al. Characteristic gene expression in stromal cells of gastric cancer among atomic-bomb survivors. *Int J Cancer* 124: 1112-1121, 2009
5. Hayashi T, Yasui W, et al. Immunohistochemical analysis of Reg IV in cancer of the urogenital organs: Frequent expression of Reg IV in prostate cancer and potential utility of serum tumor marker. *Oncol Rep* 21: 95-100, 2009
6. Kuniyasu H, Yasui W, et al. Reg IV enhances peritoneal metastasis of gastric carcinomas. *Cell Proliferat* 42: 110-121, 2009
7. Kodama M, Yasui W, et al. Vascular endothelial growth factor C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms. *Clin Cancer Res* 14: 7205-7214, 2008
8. 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* 21: 464-475, 2008
9. 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 Pathol* 32: 1182-1189, 2008
10. 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* 28: 1169-1179, 2008
11. 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* 7: 22, 2008
12. Ohara S, Yasui W, et al. Reg IV is an independent prognostic factor for relapse in patients with clinically localized prostate cancer. *Cancer Sci* 99: 1570-1577, 2008
13. Fujii K, Yasui W, et al. Protection of telomeres 1 protein levels are associated with telomere length in gastric cancer. *Int J Mol Med* 21: 599-604, 2008
14. The Study Group of Millennium Genome Project for Cancer (Yasui W, et al.) Genetic variation of PSCA gene is associated with a susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nature Genet* 40: 730-740, 2008
15. Sasahira T, Yasui W, et al. High mobility group box-1-inducible melanoma inhibitory activity is associated with nodal metastasis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 99: 1806-1812, 2008
16. Sentani K, Yasui W, et al. Positive immunohistochemical staining of gamma-H2AX is associated with tumor progression in gastric cancers from radiation-exposed patients. *Oncol Rep* 20: 1131-1136, 2008
17. Terada K, Miyamoto K, et al. Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancers. *Carcinogenesis*, 2009 (in press)
18. Kawasaki A, Nakachi K, et al. Modulation of Connexin43 on a Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience*, 2009 (in press)
19. Hamatani K, Yasui W, Nakachi K, et al. *RET/PTC* Rearrangements Preferentially

- Occurred in Papillary Thyroid Cancer among Atomic Bomb Survivors Exposed to High Radiation Doses. *Cancer Res* 68: 7176-7182, 2008
20. Yoshida K, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Caspase-independent cell death without generation of reactive oxygen species in irradiated MOLT-4 human leukemia cells. *Cellular Immunol* 255: 61-68, 2009
  21. Yuasa Y, Nakachi K, et al. DNA methylation status is inversely correlated with green tea intake and physical activity in gastric cancer patients. *Int J Cancer*, 2009 (in press)
  22. Nakachi K, Hamatani K, Kusunoki Y, et al. Sixty years of follow-up of Hiroshima and Nagasaki survivors: Current progress in molecular epidemiology studies. *Mutat Res* 659: 109-117, 2008
  23. Ohara M, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Cytotoxic distending toxin induces caspase-dependent and -independent cell death in MOLT-4 cells. *Infect Immun* 76: 4783-4791, 2008
  24. Santen RJ, Nakachi K, et al. Adaptation to estradiol deprivation causes up-regulation of growth factor pathways and hypersensitivity to estradiol in breast cancer cells. *Adv Exp Med Biol* 630:19-34, 2008
  25. Tamakoshi A, Nakachi K, et al. Soluble Fas (sFas) level and cancer mortality: findings from a nested case-control study within a large-scale prospective study. *Int J Cancer* 123: 1913-1916, 2008
  26. Sueoka-Aragane N, Nakachi K, et al. Exon 19 of EGFR mutation in relation to the CA-repeat polymorphism in intron 1. *Cancer Sci* 99: 1180-1187, 2008
  27. Members of Asia Pacific Cohort Studies Collaboration, Nakachi K. Cigarette smoking, systolic blood pressure, and cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Stroke* 39:1694-1702, 2008
  28. 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* 134: 211-217, 2008
  29. Kusunoki Y and Hayashi T. Long-lasting alterations of the immune system by ionizing radiation exposure: Implications for disease development among atomic bomb survivor. *Int J Radiat Biol* 84: 1-14, 2008
  30. Nishi N, et al. Differences in mortality and incidence for major sites of cancer by education level in a Japanese population. *Ann Epidemiol* 18: 584-591, 2008
  31. Preston DL, Nishi N, et al. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors exposed in utero or as young children. *J Natl Cancer Inst* 100: 428-436, 2008
  32. Ohishi W, Nishi N, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma in a Japanese population: A nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 846-8542, 2008
  33. Richardson D, Nishi N, et al. Positive association between ionizing radiation and lymphoma mortality among men. *Am J Epidemiol*, 2009 (in press)
  34. Gu YQ, Kamiya K, et al. Biochemical analysis of human PIF1 helicase and functions of its N-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 36: 6295-6308, 2008
  35. Uehara Y, Kamiya K, et al. Absence of Ku70 gene obliterates X-Ray-induced lacZ mutagenesis of small deletions in mouse tissues. *Radiat Res* 170: 216-223, 2008
  36. Tomida J, Kamiya K, et al. DNA damage induced ubiquitylation of RFC2 subunit of RFC complex. *J Biol Chem* 283: 9071-9079, 2008
  37. Sarai N, Miyagawa K, et al. Biochemical analysis of the N-terminal domain of human RAD54B. *Nucleic Acids Res* 36: 5441-5450, 2008
  38. Kobayashi J, Miyagawa K, et al. Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res* 49: 93-103, 2008
  39. Enomoto A and Miyagawa K. How to cope with DNA damage induced by ionizing radiation and anti-cancer drugs? *Prog Theor Phys (Suppl)* 173: 109-123, 2008
  40. Tomoda Y, Miyagawa K, et al. Functional evidence for Eme1 as a marker of cisplatin resistance. *Int J Cancer*, 2009 (in press)
  41. Hosoya N and Miyagawa K. Clinical importance of DNA repair inhibitors in



cancer therapy. Magazine of European Medical Oncology, 2009 (in press)

## 2. 学会発表

1. Yasui W, et al. Novel biomarker of gastrointestinal cancers identified by Transcriptome Dissection The 5th International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, Lecture: Session 5 "Methods of prevention", Oxford (UK), August 31-September 2, 2008
2. Sakamoto N, Yasui W, et al. The correlation between LI-cadherin and EGFR in gastric cancer. The 5th International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, Poster session, Oxford (UK), August 31-September 2, 2008
3. Sentani K, Yasui W, et al. Gene expression profiling with microarray and SAGE identifies PLUNC as a marker for gastric hepatoid carcinoma. The 5th International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, Poster session, Oxford (UK), August 31-September 2, 2008
4. Oue N, Yasui W, et al. Olfactomedin 4 and Reg IV: Novel serum biomarkers for gastric cancer patients. 36<sup>th</sup> Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers, Tokyo (Japan), October 5-9, 2008
5. Anami K, Yasui W, et al. Immunohistochemical analysis and serum concentration of Reg IV in patients with esophageal cancer. 36<sup>th</sup> Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers, Tokyo (Japan), October 5-9, 2008
6. Yasui W, et al. Novel biomarkers identified through SAGE data analysis in colorectal cancer. The 18<sup>th</sup> International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Recent Progress in Pathogenesis and Management of Colorectal Cancer", Hiroshima (Japan), November 9, 2008
7. Sentani K, Yasui W, et al. Reg IV and claudin-18 are novel markers in the diagnosis of gastrointestinal signet ring cell carcinoma. The 18<sup>th</sup> International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Recent Progress in Pathogenesis and Management of Colorectal Cancer", Hiroshima (Japan), November 9, 2008
8. 安井 弥. 胃がんのtranscriptome dissection-組織からのシーズの発見とその診断・治療への展開-第97回日本病理学会総会, 宿題報告(平成20年度日本病理学会賞受賞講演), 5月15日, 金沢, 2008
9. 安井 弥. がんの生物学. 2007年度第2回日本がん治療認定医機構教育セミナー, 5月24-25日, 千葉, 2008
10. 仙谷和弘, 安井 弥, 他. 原爆被爆者に発生した胃癌における $\gamma$ H2AXの免疫組織学的検討. 第97回日本病理学会総会, 5月15-17日, 金沢, 2008
11. 本下潤一, 安井 弥, 他. 原爆被爆者に発生した胃癌では, 癌間質に変化がおきている. 第97回日本病理学会総会, 5月15-17日, 金沢, 2008
12. 大上直秀, 安井 弥, 他. SAGE-based microarrayにより同定したSEC11A(SPC18)は胃癌の進行と関連している. 第97回日本病理学会総会, 5月15-17日, 金沢, 2008
13. 大上直秀, 安井 弥, 他. 遺伝子発現プロファイルで同定されたconnexin30は腸型形質を有する胃癌のマーカーである. 第97回日本病理学会総会, 5月15-17日, 金沢, 2008
14. 仙谷和弘, 安井 弥, 他. SAGE法とマイクロアレイの比較で同定されたPLUNCの胃原発肝様腺癌の診断マーカーとしての有用性. 第17回日本がん転移学会, 7月24-25日, 鹿児島, 2008
15. 坂本直也, 安井 弥, 他. 腸型形質を有する胃癌におけるEGFRの発現とEGFによるLi-cadherinの発現誘導. 第17回日本がん転移学会, 7月24-25日, 鹿児島, 2008
16. 阿南勝宏, 安井 弥, 他. 癌の診断と治療:食道扁平上皮癌における血清Reg IVの有用性の検討. 第19回日本消化器癌発生学会, ミニシンポジウム7, 8月28-29日, 別府, 2008
17. 野口 剛, 安井 弥, 他. 遺伝子発現の意義:食道癌におけるサイトケラチン7の発現と予後との関連. 第19回日本消化器癌発生学会, ミニシンポジウム3, 8月28-29日, 別府, 2008

18. 本下潤一, 安井 弥, 他. 原爆被爆者胃癌における網羅的遺伝子発現解析. 第67回日本癌学会学術総会, 10月28-30日, 名古屋, 2008
19. 阿南勝宏, 安井 弥, 他. 胃癌におけるCAST法を用いた分泌/膜貫通蛋白質の網羅的解析. 第67回日本癌学会学術総会, 10月28-30日, 名古屋, 2008
20. 林哲太郎, 安井 弥, 他. 前立腺がんにおいて発現している分泌/膜貫通蛋白質のCAST法を用いた解析. 第67回日本癌学会学術総会, 10月28-30日, 名古屋, 2008
21. 大上直秀, 安井 弥, 他. SAGE-based arrayを用いた胃癌関連遺伝子の探索: SEC11Aは胃癌の進行に関与している. 第67回日本癌学会学術総会, ワークショップ, 10月28-30日, 名古屋, 2008
22. 仙谷和弘, 安井 弥, 他. Reg IVと claudin-18は消化管由来印環細胞癌の新規マーカーである. 第67回日本癌学会学術総会, ワークショップ, 10月28-30日, 名古屋, 2008
23. 大上直秀, 安井 弥. SAGE法で同定した胃癌関連遺伝子と悪性度との関連. 第81回日本胃癌学会総会, シンポジウム, 3月4-6日, 東京, 2009
24. Kawakami Y, Miyamoto K, et al. *RUNX3* is frequently inactivated in human ovarian cancer by protein mislocalization and epigenetic gene silencing The 99th Annual Meeting American Association for Cancer Research, San Diego CA (USA), April 12-16, 2008
25. Miyamoto K, et al. MicroRNAs in human breast cancer cells. American Association for Cancer Research Cancer Epigenetics, Boston MA (USA), April 28-31, 2008
26. Miyamoto K, et al. MicroRNAs and epigenetics in human breast cancer. SABCS, San Antonio TX (USA), December 10-14, 2008
27. Yoshida H, Miyamoto K. Epigenetic alteration of the *MDR1* gene in human breast cancer. The 99th Annual Meeting American Association for Cancer Research, San Diego, CA, April 12-16, 2008
28. 宮本和明, 他. トリプルネガティブ乳癌細胞におけるmicroRNAの発現異常. 第16回日本乳癌学会学術総会, 9月26-27日, 大阪, 2008
29. 宮本和明, 他. MicroRNAs in human breast cancer cells. 第67回日本癌学会学術総会, 10月28-30日, 2008
30. Hamasaki K, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. A study on chromosome instability in clonally expanded T lymphocytes in vitro from A-bomb survivors. The 5th International Symposium of Hiroshima University 21st Century COE Program, Hiroshima (Japan), January 23-24, 2008
31. 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
32. Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Mouse strain difference in sensitivity to radiation-induced genomic instability persisting in vivo for prolonged periods after irradiation. The International Ataxia-Telangiectasia Workshop, Otsu (Japan), April 22-26, 2008
33. Kusunoki Y. T-cell aging radiation-exposed individuals. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Immunology Board: Immunosenescence Workshop, San Francisco CA (USA), June 18-21, 2008
34. Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Effects of IL-10 and IL-6 gene polymorphisms and atomic-bomb radiation exposure on gastric cancer risk. IARC-EACR-AACR-ECNIS Symposium, Lyon (France), July 3-5, 2008
35. Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Relationship of intestinal- and diffuse-type gastric cancer risks to IL-10 haplotypes and effects of radiation exposure on the relationship. The 20th European Association for Cancer Research, Lyon (France), July 5-8, 2008
36. Hamasaki K, Nakachi K, Kusunoki Y, et al. Genomic instability persisting in vivo for prolonged periods after irradiation: Elevated micronucleated reticulocyte frequencies in mice one year after whole-body irradiation. The 54th Annual Meeting of the Radiation Research Society,



- Boston MA (USA), September 21-24, 2008
37. Miles EF, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Radiosensitivity of A-bomb survivors pregnant at the time of bombings in Hiroshima and Nagasaki. The 54th Annual Meeting of the Radiation Research Society, Boston MA (USA), September 21-24, 2008
  38. Neriishi K, Nakachi K, et al. Storage of cataract lens tissues in A-bomb survivors. The 54th Annual Meeting of the Radiation Research Society, Boston MA (USA), September 21-24, 2008
  39. Yoshida K, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Polymorphic NBN and EGFR genes affect cancer development among atomic-bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Molecular Genetics of Aging, New York NY (USA), September 24-28, 2008
  40. Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Genetic instability of the hematopoietic system in murine inflammation models. The 10th International Symposium on Dendritic Cells, Kobe (Japan), October 1-5, 2008
  41. Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Acceleration of aging-associated increase in inflammatory markers and attenuation of the immune system among atomic-bomb survivors. The 7th Joint Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research and the International Cytokine Society, Montreal (Canada), October 12-16, 2008
  42. Kusunoki Y, Nakachi K, et al. Development of genetic instability and somatic mutation assays in radiation-exposed individuals. The International Symposium on Genotoxicity Assessment, 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, Okinawa (Japan), December 4-6, 2008
  43. 伊藤玲子, 濱谷清裕, 安井 弥, 中地 敬, 他. 原爆被爆者の大腸がんにおけるマイクロサテライト不安定性に関わる遺伝子変化. 第97回日本病理学会総会, 5月15-17日, 金沢, 2008
  44. 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. 第15回がん予防大会2008, 5月22日-23日, 福岡, 2008
  45. 高橋恵子, 中地 敬, 濱谷清裕, 他. 原爆被爆者に発生した甲状腺乳頭がんにおけるRAS点突然変異の解析. 第15回がん予防大会2008, 5月22日-23日, 福岡, 2008
  46. 大石和佳, 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. C型肝炎ウイルスのクリアランス, 感染持続, 病態進行に関する免疫学的プロファイル. 第44回日本肝臓学会総会, 6月5-6日, 松山, 2008
  47. 濱谷清裕, 中地 敬, 他. 原爆被爆者の成人甲状腺乳頭がんにおいて特徴的に生じた遺伝子変異. 第49回原子爆弾後障害研究会, 6月8日, 長崎, 2008
  48. 林 奉権, 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. 原爆被爆者における加齢に関連した炎症指標の上昇と放射線被曝の影響. 第15回日本免疫毒学会学術大会, 9月11-12日, 東京, 2008
  49. 林 奉権, 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. 胃がんリスクとIL-10ハプロタイプとの関連およびそれに対する放射線被曝の影響. 第67回日本癌学会学術総会, 10月28-30日, 2008
  50. 濱谷清裕, 中地 敬, 他. 原爆被爆者甲状腺乳頭がんの分子特性. 第67回日本癌学会学術総会, 10月28-30日, 名古屋, 2008
  51. 伊藤玲子, 濱谷清裕, 安井 弥, 中地 敬, 他. 原爆被爆者の大腸がんにおけるマイクロサテライト不安定性に関わる遺伝子変化の解析. 第67回日本癌学会学術総会, 10月28-30日, 名古屋, 2008
  52. 多賀正尊, 濱谷清裕, 西 信雄, 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51回日本放射線影響学会, 11月19-21日, 北九州, 2008
  53. 楠 洋一郎, 林 奉権. マウス移植片対宿主病モデルにみられる造血系の遺伝的不安定性. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 12月1-3日, 京都, 2008
  54. 楠 洋一郎, 中地 敬, 他. マウスGVHDモデルにおける遺伝的不安定性. 第31回日本造血細胞移植学会総会, 2月5-6日, 札幌, 2009
  55. Nishi N, et al. Risk of second primary cancers among atomic bomb survivors. The 18th World Congress of Epidemiology, Port Alegre (Brazil), September 20-24,

2008

56. Toyoshima M, Kamiya K, et al. The Role of Rev1 in Tumorigenesis. International Workshop on Radiation Health Effects Research -47th ISTC Japan Workshop-, December 1-2, Nagasaki (Japan), 2008
57. 豊島めぐみ, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の突然変異誘発への寄与. 第49回原子爆弾後障害研究会, 6月8日, 長崎, 2008
58. 朴金蓮, 神谷研二, 他. REV1の d CMP転移活性の生化学的解析. 第49回原子爆弾後障害研究会, 6月8日, 長崎, 2008
59. 顧永清, 神谷研二, 他. Analysis of annealing activity of human PIF1 helicase. 第49回原子爆弾後障害研究会, 6月8日, 長崎, 2008
60. 増田雄司, 神谷研二. ヒトRAD6-RAD18によるPCNAのモノユビキチン化反応の解析. 日本遺伝学会第80回大会, 9月3-5日, 名古屋, 2008
61. 増田雄司, 神谷研二, 他. ヒトREV1の鋳型への結合と基質の識別に関与するアミノ酸残基の解析. 第67回日本癌学会学術総会, 10月28-30日, 名古屋, 2008
62. 豊島めぐみ, 神谷研二, 他. 発がんにおける損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の役割. 第67回日本癌学会学術総会, 10月28-30日, 名古屋, 2008
63. 増田雄司, 神谷研二. ヒトRAD6-RAD18によるPCNAのユビキチン化反応の分子機構. 第51回日本放射線影響学会, 11月19-21日, 北九州, 2008
64. 豊島めぐみ, 楠 洋一郎, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の放射線応答, 放射線発がんにおける寄与. 第51回日本放射線影響学会, 11月19-21日, 北九州, 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



## 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 原爆被爆者に発生した固形がんを分子病理学的に解析することは、放射線発がんの解明、リスク評価や診断・治療法の開発につながる。被爆者固形がん試料を用い、組織化学的なマクロファージの同定、がん関連遺伝子の発現・変異解析を行なった。さらに、網羅的遺伝子発現解析により新規がん関連遺伝子の同定を試みた。胃がんおよび非がん部胃粘膜の間質におけるマクロファージの浸潤程度をCD68陽性細胞を指標に検討したところ、非がん部胃粘膜間質で高線量群にマクロファージは少ないこと、早期がん症例ではがん間質マクロファージが被爆群に少ない傾向にあることが明らかとなった。胃がんにおけるTP53とCTNNB遺伝子のSSCPによる遺伝子変異解析では被爆との間に明らかな相関は認められなかった。変異スペクトラムを解析する必要がある。食道がんのSAGE解析によって、がん特異的発現遺伝子のひとつとしてADAMTS16を同定した。食道扁平上皮がんの40%に過剰発現しており、食道がん細胞株のADAMTS16-siRNA処理により、増殖および浸潤が有意に抑制された。胃がん細胞株と正常胃粘膜および前立腺がん細胞株と正常前立腺組織からCAST法を用いて網羅的に膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子解析し、いくつかの特異的遺伝子を同定した。そのひとつであるDSC2は、胃がんでは低分化型よりも高分化型に発現しており、諸臓器の扁平上皮がん（食道、肺、皮膚、子宮頸部）では高頻度にDSC2は陽性であった。これらの発現を被爆者に発生したがんて解析し、放射線発がんとの関連を検討することにより、放射線関連固形がんの診断・治療開発につながるものと期待される。

### 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、放射線誘発発がんの研究モデルと言える。一方、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、SAGE (serial analysis of gene expression) 法やマイクロアレイをはじめとする網羅的遺伝子発現解析を用いてがん関連遺伝子を同定し、被爆者

に発生した固形がんにおける遺伝子発現解析と蛋白レベルでの発現の検証を行なう。また、同様の試料を用いて代表的ながん関連遺伝子について遺伝子変異解析を行なう。さらに、組織病理学的解析も行なう。これら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) 放射線関連固形がんの間質マクロフ

## マクロファージの解析

これまでの原爆被爆者に発生した胃がんおよび大腸がんについての分子疫学的解析から、放射線関連発がんにおける炎症および免疫環境の関与が示唆されている。そこで、被爆者に発生した胃がんと対照群について、がん間質に浸潤するマクロファージ (tumor associated macrophage: TAM) について検討した。マクロファージの同定は、間質に存在する CD68 陽性単核細胞とし、代表的組織切片において CD68 陽性細胞の浸潤密度が高い部分について 400 倍 4 視野の陽性細胞数の合計を算出した。解析の対象とした症例は、放射線影響研究所の Life Span Study (LSS) の被爆群 53 例 (中央被爆線量 51mGy: 2-2601mGy) と非被爆群 40 例 (中央被爆線量 0mGy: 0-4mGy) に発生した胃がんであり、そのホルマリン固定パラフィン切片について、抗 CD68 抗体を用いた酵素抗体法で染色した。

## 2) 被爆者胃がんにおけるがん関連遺伝子の変異解析

被爆者に発生した胃がんにおいて、代表的がん関連遺伝子である TP53 および CTNNB (beta-catenin) 遺伝子の発現および変異を解析した。対象は、1) と同様の LSS の被爆群と非被爆群に発生した胃がんである。そのホルマリン固定パラフィン切片から常法に従いゲノム DNA を抽出し、PCR-SSCP法によって TP53 では exon 5-8、CTNNB では exon 3 の変異を検討した。また、免疫染色により p53 および beta-catenin の発現を解析した。TP53 遺伝子には変異があると p53 蛋白が核内に異常蓄積して染色陽性になることが知られており、10% 以上のがん細胞が染色される症例を陽性とした。beta-catenin については、がん細胞の 10% 以上において核内に染色されるものを陽性と

し、細胞膜に局在した染色性は陰性として取り扱った。

## 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

DNA マイクロアレイと並ぶ代表的網羅的遺伝子発現解析法である法は、特に定量性、再現性に秀でたユニークな方法であり、得られたデータと NCBI の SAGEmap に登録・公開されている多くの細胞/組織の SAGE ライブラリーとの直接の比較が可能である。食道扁平上皮がんの手術症例新鮮凍結組織試料より RNA を抽出、10000 個以上の tag のシークエンスを施行し、食道がん SAGE ライブラリーを作成した。次に、これと NCBI の SAGEmap データベース中の主要な種々の正常臓器における SAGE ライブラリーを比較し、食道がん特異的発現遺伝子の候補をリストアップした。これらについて、実際の正常臓器 (心臓、肺、肝臓、脳など 14 臓器) とそれぞれ 10 例の食道がん臨床検体における遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法によって検討し、がん特異的に発現する遺伝子かどうかを検証した。さらに、一部については機能解析を行なった。

一方、細胞表面膜蛋白あるいは分泌蛋白を網羅的に効率良く同定する方法として、CAST (Escherichia coli ampicillin secretion trap) 法が開発されている。そこで、本法を用いて胃がん細胞株、前立腺がん細胞株および正常胃、前立腺組織について解析した。シグナルシークエンスを欠損させたアンピシリン耐性遺伝子 (b-ラクタマーゼ遺伝子) を組込んだベクター (pCAST vector) を準備し、欠損させた部分に解析対象サンプルの cDNA を入れたライブラリーを作成した。これらを大腸菌に導入して、アンピシリン耐性株を採れば、それは b-ラクタマーゼ遺



伝子が分泌あるいは大腸菌の膜上に存在するものであり、pCASTに組込まれた遺伝子配列中に膜貫通ドメインあるいはシグナルシーケンスが存在することが分かる。それぞれ1000クローン程度を解析し、がんと正常粘膜を比較することにより、がんに特異的な遺伝子の候補を同定した。さらに、RT-PCR、western blotおよび免疫染色により発現および局在を検討した。

#### (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) 放射線関連固形がんの間質マクロファージの解析

被爆群の胃がん間質では、CD68陽性細胞と被爆線量に明らかな相関はみとめられなかったが、非がん部胃粘膜の間質CD68陽性細胞数は100mGy以上の症例で有意に低値であった( $P=0.0173$ )。被爆群の胃がん間質CD68陽性細胞は、被爆後47-56年で切除された症例において35-46年で切除された症例と比較し有意に少なかった( $P=0.0140$ )。組織型別の解析では、びまん型低分化腺癌で他の組織型よりもCD68陽性細胞は有意に多かったが( $P=0.0013$ )、被爆群と非被爆群とに差はなかった。胃がんの進展(T grade, N grade, stage)とともにCD68陽性細胞は有意に増加していた( $P<0.02$ )。早期がんに限ると、被爆群で非被爆群に比較し明らかにCD68陽性細胞が少ない傾向が認められた( $P=0.10$ )。

昨年度までのマイクロアレイ/RT-PCR/

免疫染色等の解析から、versicanとosteronectinの胃がん間質における発現低下が、被爆者胃がんの独立した指標となることを明らかにしている。そこで、これらの発現とCD68陽性細胞数との関連を解析した。OsteonectinとCD68陽性細胞には関連は認められなかった。一方、versican陰性例はversican陽性例に比較してがん間質CD68陽性細胞数は有意に少なく( $P=0.0218$ )、このversican陰性例におけるCD68陽性細胞の減少は被爆群において特に顕著であった( $P=0.0030$ )。

#### 2) 被爆者胃がんにおけるがん関連遺伝子の変異解析

免疫染色でみたp53蛋白の発現(異常蓄積)は、被爆群で52%(22/42)、非被爆群で44%(21/48)に認められた。100mGy以上の被爆線量の胃がんでは、それ以下の線量のものに比較してp53陽性例が少ない傾向にあった( $P=0.0929$ )。beta-cateninの核における発現は、被爆群では17%(7/42)、非被爆群では21%(10/48)に認められ、両者に差はなく、被爆線量との関連も認められなかった。

TP53遺伝子のexon 5-8のSSCPにおいて変異バンドが認められた症例は、被爆群で42%(8/19)、非被爆群で26%(6/23)であり、有意な差は認められなかった。同様に、CTNNB遺伝子のexon 3のSSCPにおいて変異バンドが認められた症例は、11%(2/19)、非被爆群では26%(6/23)であり、有意な差は認められなかった。

#### 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

食道扁平上皮がんから常法によりRNAを抽出し、10000個以上のtagをシーケンスした。SAGEmapデータベース中の正常食道

組織のSAGEライブラリーとの比較から、食道がんで発現が亢進している遺伝子として、ADAMTS16, SPARC, KLK10, BLMH, EGRI, NRD1, SUFU, NUTF2, RYBPなどを同定した。定量的RT-PCRによる発現の検証では、ADAMTS16は全身の15の正常臓器や組織には殆ど発現しておらず、食道がんでは40%において過剰発現していた。扁平上皮がんのマーカーとされているSCCA1は、食道がんでは20%のみに過剰発現が認められたのに比べて明らかに高頻度であった。ADAMTS16の機能解析では、食道がん細胞株を用いてADAMTS16-siRNA処理したところ、MTTアッセイでみた増殖能およびinvasionアッセイでみた浸潤能は有意に抑制された。

胃がん細胞株と正常胃粘膜からCAST法を用いて網羅的に膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子を探索した。MKN-1とMKN-28細胞および正常胃粘膜組織から抽出したmRNAを材料にランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、pCAST vectorにライゲーション、その産物をコンピテントセルDH10Bに導入し、CASTライブラリーとした。このCASTライブラリーのアンピシリン含有LB培地陽性コロニーを回収、カナマイシン含有LB培養液培養陽性クローンについてb-ラクタマーゼ遺伝子のプライマーを用いてコロニーPCRを行った。インサートが200塩基以上のものについてシークエンスを行なうこととし、MKN-1では1440クローン、MKN-28では1440クローン、正常胃粘膜では1248クローンを解析した。BLAST (NCBI)との比較で抽出された遺伝子は、それぞれ359, 331, 158であり、正常粘膜で発現している遺伝子を除外し、67遺伝子についてさらに検討を進めた。全身の15種類の正常臓器/組織と胃がんに対して定量的RT-PCR解析を行なったところ、正常組織で発現が

低く胃癌で高い発現レベルを示した遺伝子として、DMKN, PCDHB9, BST2, DSC2などが抽出された。DSC2の免疫染色による発現解析では、胃がんでは低分化型よりも高分化型に発現しており、諸臓器の扁平上皮がん(食道, 肺, 皮膚, 子宮頸部)では高頻度にDSC2は陽性であった。また、同様の検索を前立腺がん細胞株および正常前立腺組織を用いて解析した。LNCapとDU145細胞および正常前立腺組織について、それぞれ1344クローン, 960クローン, 960クローンをシークエンスし、抽出された遺伝子は、それぞれ234, 228, 223であった。その内43遺伝子が定量的RT-PCRで前立腺がん組織に発現していることが確認された。これらの抽出された膜蛋白/分泌蛋白について、被爆者に発生した食道がんおよび前立腺がんにおける発現検索を行なう必要がある。

#### D. 考察

これまでの本研究班における分子疫学的解析から、被爆者に発生する固形がんでは、持続性炎症と免疫環境の異常の関与が示唆されている。例えば、炎症関連サイトカインIL-18は活性化マクロファージで産生されインターフェロン $\gamma$ を誘導するが、結腸がんの発生リスクにおいてIL-18の遺伝子多型と放射線被曝量は有意な相互作用を示す。一方、胃がんの発生リスクについては、IL-10遺伝子のプロモーター領域のハプロタイプにより、高分化型では発がんリスクが異なり、低分化型では特定のハプロタイプで放射線被曝によるリスクの増加が顕著となる。そこで、胃がんおよび非がん部胃粘膜の間質におけるマクロファージの浸潤程度をCD68陽性細胞を指標に検討したところ、非がん部胃粘膜間質で高線量群にマクロファージは少ないことが分かった。さらに、がんの進展とともに間質マクロフ