

フェージが増加することは知られているために、早期がんのみを対象に解析すると、間質マクロフェージは被爆群に少ない傾向にあることが明らかとなった。炎症・免疫の中心的役割を担うマクロフェージのサブタイプについての詳細な検討が必要である。昨年度までに、胃がん間質におけるversicanの発現低下が被爆者胃がんの特徴的であることを見いだしている。Versicanは間質細胞によって産生されるコンドロイチン硫酸の一つであり、細胞表面と細胞外基質との結合に重要な役割を果たすことが知られている。今回の解析で、versican陰性例はがん間質のマクロフェージの浸潤が少なく、さらに、この傾向は特に被爆群において顕著であった。このことは、マクロフェージから産生されるTGF-betaなどのサイトカインがversicanの発現を調節している可能性を示すものである。Versican発現低下に加えて間質マクロフェージの減少が放射線関連胃がんの指標となることを示唆している。

被爆者に発生した成人甲状腺乳頭がんではBRAF遺伝子変移とRET/PTC再配列は排他的におきており、RET/PTC再配列は被爆線量が有意に高いことが示されている。また、過去に被爆者非喫煙者に発生した肺がんについてTP53遺伝子の変異スペクトラムが解析されているが、その他の固形がんについての検討は殆どなされていない。そこで、放射線関連胃がんの特徴的遺伝子変異を明らかにするために、代表的胃がん関連遺伝子であるTP53およびCTNNB遺伝子の変異解析を開始した。免疫染色によるスクリーニングでは、p53蛋白の発現は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。しかし、TP53遺伝子、CTNNB遺伝子ともに、SSCPでの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。今後は、症例を増やすとともに、シーケンスにより変異スペクトラムを解析する予定である。

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・治療標的の同定を行なっている。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。ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases)は蛋白分解および細胞接着の機能を有する蛋白群であり、膜結合型のADAMと thrombospondin motifを有し分泌型であるADAMTSの2群に分類される。いくつかのADAMファミリーメンバーでは増殖因子やインテグリンの活性制御を介して細胞増殖や浸潤に関わることが示されている。しかし、ADAMTS16に関しては、発現や機能について殆ど明らかにされていない。今回の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。一方、CAST法で同定したDSC2 (desmocollin 2)は、カドヘリンスーパーファミリーに属し、腸上皮のデスモソームの重要な構成蛋白である。最近、腸特異的転写因子CDX1とCDX2がその発現を制御することが示された。胃がんにおいても高分化腺がんではDSC2陽性が多いことはこれに一致する所見である。また、放射線感受性の高い食道がん細胞株のマイクロアレイによる発現解析の報告では、DSC2が発現亢進を示す遺伝子リストに含まれていた。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。

E. 結論

被爆者に発生した胃癌症例のマクロファージの解析から、間質マクロファージの浸潤低下が特徴的であり、放射線関連発がんに関与する可能性が示唆された。一方、SAGE法およびCAST法を用いた解析により、いくつかの新規マーカー候補遺伝子が同定された。これらの発現を被爆者に発生したがん で解析し、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto H, Yasui W, et al. Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells. *Gastroenterol* 2009 (in press)
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. 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
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
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. 36th 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. 36th 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 18th 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 18th 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

一、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 γ 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, 他. 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

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 国立病院機構呉医療センター・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。本年度は、乳がんのエピジェネティックな異常として以下の点について明らかにした。1) 乳がんにおける新たなエピジェネティックな異常を同定するためゲノム網羅的解析を行い、乳がんを高頻度にメチル化異常が認められる遺伝子*CHRM1*を同定した。2) microRNAはその遺伝情報システムの異常が発がんにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。HER2陽性乳がんに着目し、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、およびHER2陽性乳がんにおいて消失している8種類のmicroRNAを同定した。3) 放射線障害に基づく乳がん発生の分子機構の解明のためには、被爆者に発生した乳がんの解析が重要である。広島市の被爆者に発生した乳がんにおいて、HER2陽性乳がんの頻度が高く、低年齢被曝および低線量被曝に関連している可能性があることが示唆された。

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クローンのシークエンスにより計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microRNAを同定する。

3) 被爆者乳がんの生物学的特徴の解明
被爆者乳がんの臨床病理学的特徴を明らかにし、エピジェネティックな異常に関連する分子生物学的解析を行う。

(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ルにて行う。

C. 研究結果

1. MS-RDA法により*CHRM1*を新規に同定した。*CHRM1*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。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。

2. HE2陽性乳がん細胞で10倍以上に発現が亢進しているmicroRNAとして、hsa-miR-934, hsa-miR-221, hsa-miR-100, hsa-miR-99a, let-7i, let-7gおよびhsa-miR-424の7種類 (7/720, 1%) を同定した。逆にHER2陽性乳がんにおいて発現が消失しているmicroRNAとして、hsa-miR-10a, hsa-miR-200a, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-429, hsa-miR-200b*, hsa-miR-200a*, hsa-miR-769-3p および hsa-miR-489 の8種類 (8/720, 1.1%) を同定した。

3. 被爆者乳がんの臨床病理学および分子生物学的解析を行い、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。被爆者乳がんにはサブタイプとしてHER2陽性乳がんの頻度が高いことが認められた (表1)。

表1 被爆者乳がんのサブタイプ

ホルモンレセプター Subtype	陽性		陰性
	Luminal A & B	HER2	TN
被爆者乳がん n=19	69%	26%	5%
非被爆者乳がん n=11,700	76%	8%	15%

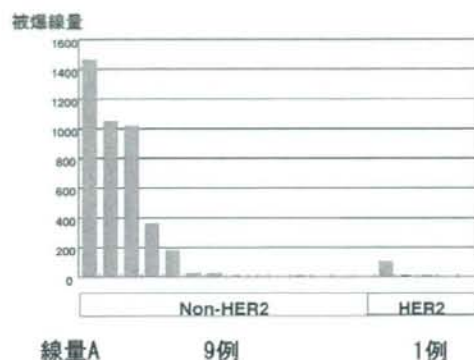
がんの発生には遺伝的要因と環境的要因の両者が関与し、臨床的乳がんの発生には長期にわたる複数の異常の蓄積が必要であると考えられる。本研究では放射線の影響によりHER2陽性乳がんの頻度が上昇している可能性があると考えられたことから、特にHER2陽性のサブタイプに着目し被曝データとの関連性について解析した。

被爆者乳がんにおいてp53, BRCA1およびPTENについて免疫組織学的な解析を行った結果、HER2陽性乳がんではPTENの不活化の頻度が高いことが示された (表2)。

表2 被爆者乳がんの免疫組織学的解析

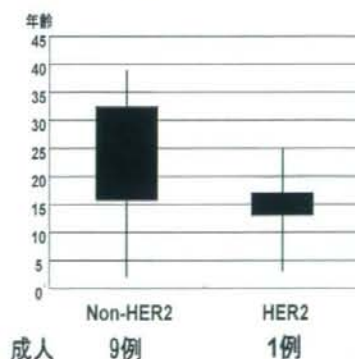
	Non-HER2	HER2	P
PTEN	29%	100%	<0.001
BRCA1	36%	40%	0.864
p53	36%	20%	0.516

図1 被曝線量とHER2サブタイプ



被曝線量とHER2陽性乳がんのサブタイプとの比較では放射線影響研究所のLife Span Study(LSS)A群 (被曝線量4-1466mGy) およびB群 (被曝線量1-3mGy) のうち、被曝線量の多いA群ではHER2サブタイプは10症例中1例と有意に少なく、HER2サブタイプは被曝線量の少ないB群により多く認められた。

図2 被曝時年齢とHER2サブタイプ



被曝時年齢との関係では成人の被曝ではHER2サブタイプが少なくHER2サブタイプは未成年の被曝により多く認められた。

D. 考察

乳がんのエピジェネティックな異常としてCHRM1を新規に同定した。CHRM1はG protein-coupled receptorに属するmuscarinic cholinergic receptorであり乳腺での機能は明らかではない。乳がんの発生や進展における

役割の解明は今後の課題である。しかし、*CHRM1*のメチル化異常が極めて高頻度であることから、*CHRM1*のメチル化異常をエピジェネティックマーカーとしての利用できる可能性があると考えられた。

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、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重要な役割を果たすと考えられている。新たなエピジェネティックな機構として、特にRNAサイレンシングが注目されており、今回はmicroRNAの発現異常に着目した。microRNAは、ゲノム上に少なくとも1,000以上は存在すると考えられ、現時点でも未だ全てが明らかにはされていない。さらに、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。今回、HER2陽性乳がんのmicroRNAの発現異常として15種類を同定した。これらに関与するエピジェネティックな分子機構の解明、特に放射線障害とmicroRNA遺伝情報システム異常の関連についてさらに明らかにすることが今後の課題である。

放射線障害に基づく乳がん発生の分子機構の解明のために被爆者乳がんの解析が重要である。今回は、広島被爆者乳がんでは、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た。我々は別の研究にてエピジェネティックな異常とHER2陽性乳がんの関連性を明らかにしてきており、エピジェネティックな異常が放射線障害に基づく乳がん発生において重要な分子機構であることを支持する所見であると考えられた。今後さらに多数の被爆者乳がんを解析し検証していく予定である。

E. 結論

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のために、エピジェネティックな異常の探索を行い以下の点について明らかにした。1) *CHRM1*の乳がんにおける高頻度のメチル化異常、2) microRNAの発現異常として10倍以上に発現が亢進している7microRNA、発現が消失している8microRNA、合計15種類の発現異常、3) 被爆者乳がんにおけるHER2陽性乳がんの増加、および低年齢被曝と低線量被曝との関連性。

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

が重要であることが示唆された。HER2陽性乳がん発生の分子機構に着目することで、放射線障害に基づく乳がん発生の分子機構の一部を明らかにできる可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Terada K, Okochi-Takada E, Akashi-Tanaka S, Miyamoto K, Taniyama K, Tsuda H, Asada K, Kaminishi M, Ushijima T Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancer s. Carcinogenesis. (in press)

1. 学会発表

1. Miyamoto K, et al. MicroRNAs in human breast cancer cells. American Association for Cancer Research Cancer Epigenetics, Boston, MA April 28-31, 2008
2. Miyamoto K, et al. MicroRNAs and epigenetics in human breast cancer. SABCS, San Antonio TX, December 10-14, 2008
3. 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, April 12-16, 2008
4. 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
5. 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, 2008年9月26-27日, 大阪
6. Miyamoto K, et al. MicroRNAs in human breast cancer cells. 第67回日本癌学会学術総会, 2008年10月28-30日, 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 濱谷清裕（財）放射線影響研究所 放射線生物学/分子疫学部

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がん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がんの発がん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がんと、期間がより長い大腸がんを対象として発がん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71症例の甲状腺乳頭がんの解析より*RET/PTC*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、新たに解析した34症例をあわせた105症例の甲状腺乳頭がんにおける*RET/PTC*及び*NTRK1*再配列並びに*BRAF*突然変異と被曝線量との関連についての解析より、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。一方、大腸がんでは、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。以上より、放射線は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。

A. 研究目的

原爆被曝者における固形がん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ホート研究により明らかになっている。被曝者甲状腺がんは被曝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、結腸がんは被曝後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。これらの固形がんにおける遺伝子変化を放射線被曝との関連より解析し、放射線被曝による発がん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がん105症例（被曝線量=0 mGyの非被曝者26名、被曝線量>0 mGyの被曝者79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がん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。甲状腺がんは1956年から1993年まで、大腸がんは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組織試料を用いた。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、回収したがん部あるいは非がん部組織からDNA/RNAを抽出した。*RET*遺伝子の再配列は逆転写反応後、キナーゼドメインの発現が見られる試料について、*RET/PTC1,3*の発現をRT-PCRにより解析した。他の再配列型は5'RACE法により同定した。*NTRK1*遺伝子の再配列はキナーゼ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*)断片長の蛍光シークエ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Ver1.2.0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、さらに大腸がん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) 成人甲状腺乳頭がん

甲状腺乳頭がんの多くは、初期段階でMAPキナーゼ経路の恒常的活性化が観察され、発がん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がんでは*BRAF*点突然変異が、また小児甲状腺乳頭がんでは放射線被曝歴の有無に関係なく*RET/PTC*再配列が、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、71症例の甲状腺乳頭がんの解析より、*RET/PTC*再配列が被曝線量と関連すること、また、この再配列を持つ症例は被曝から診断までの期間が比較的短いことを明らかにした。

今年度、新たに34症例について*RET/PTC*再配列及び*BRAF*点突然変異の解析を行なうと共に、全症例について*NTRK1*及び*BRAF*再配列を調べた。今回、遺伝子変異を染色体再配列(*RET/PTC*, *NTRK1*と*BRAF*再配列)と点突然変異型(*BRAF*点突然変異)に大別し、被曝線量並びに被曝関連因子との関連を検討した。

図1 被曝者甲状腺乳頭がんにおける遺伝子変異の頻度(被曝線量との関連)

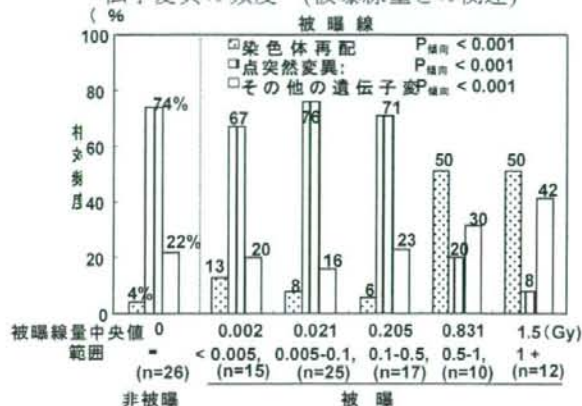


図1に示すように、染色体再配列は被曝線量が高くなると有意に相対頻度が増加し、*BRAF*点突然変異の相対頻度は有意に減少することを見出した。さらに、野生型の*RET*, *NTRK1*及び*BRAF*遺伝子を有する甲状腺乳頭がん即ちその他の遺伝子変異の相対頻度も線量が高くなると有意に増加することが示された。

図2は遺伝子変異の相対頻度と被曝から発症までの期間の関係を示す。点突然変異の相対頻度は被曝からの時間が長くなると共に有意に増加した。一方、染色体再配列の相対頻度は被曝30年ごろまでは大きな変化は見られないが、その後急激に減少するのが観察された。また、その他の遺伝子変異の相対頻度は被曝からの時間が長くなると有意に減少した。

図1と2の結果より、染色体再配列だけでなくその他の遺伝子変異も放射線関連成人甲状腺乳頭発がんにおいて重要な役割を果たすことが示唆された。

我々は被曝時年齢と遺伝子変異との関連についても解析を行なった。図3に示すよう

に、染色体再配列の相対頻度は被曝時年齢が20歳以下では大きな変化は見られないが、被曝時年齢が高くなると有意に減少した。一方、点突然変異は被曝時年齢が高くなるとその相対頻度が有意に増加するのが観察された。しかしながら、その他の遺伝子変異の相対頻度と被曝時年齢の間に有意な関係は見られなかった。

図2. 被曝者甲状腺乳頭がんにおける遺伝子変異の頻度 (被曝からの時間との関連)

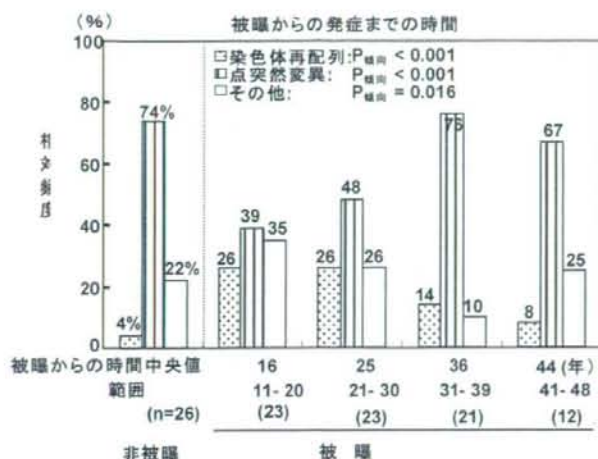
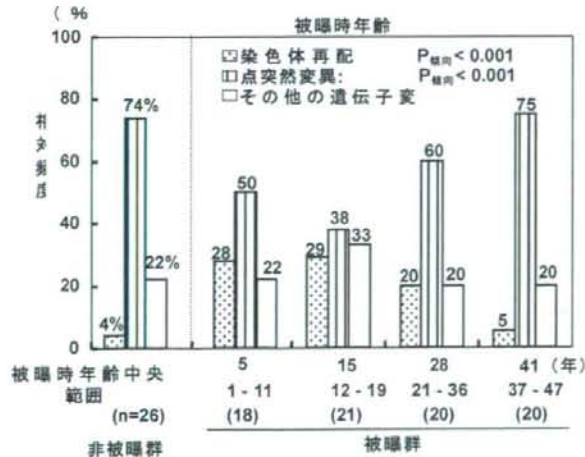


図3. 被曝者甲状腺乳頭がんにおける遺伝子変異の頻度 (被曝時年齢との関連)



2) 大腸がん

原爆被曝者において結腸がんは放射線に

よる発がん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。散発性の大腸がんではマイクロサテライト不安定性 (MSI) を示すがんは近位結腸で好発することが報告されていることから、原爆被曝者大腸がんにおける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なってきた。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被曝大腸がん5症例のうち3症例で*MLH1*遺伝子のメチル化が確認され、被曝大腸がん患者においても、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の大腸がん患者における*MLH1*遺伝子変異と*MSH2*のLOH

<i>MLH1</i>			<i>MSH2</i>
メチル化	LOH*	点突然変異	LOH
-	+	glu→stop at the 588 th a.a. (不完全なタンパク)	-
+	+	未決定	-
+	+	未決定	-
-	+	G → A in intron 11 (スプライシング異常)	-
+	+	未決定	+

*LOH: ヘテロ接合性消

次に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。塩基配列より、1例はスプライシング異常を、他の1例は不完全なタンパクを生成すると予測された。この結果、MSI-Hの5症例は全て*MLH1*遺伝子に2つの変異をもつことが判明した。

次に初期の分子事象であるRasシグナル

に関連した遺伝子変異*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*遺伝子のメチル化状態と放射線量との間に有意な関連のあることを昨年度報告したが、今回これら三種類のRasシグナルに関連した遺伝子変化とMSI及び*MLH1*メチル化状態との関連を検討した。表2に示すように、MSI-Hを呈する全ての症例および*MLH1*遺伝子のメチル化を有する症例は、この三種類の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。一方、MSI-L/MSSでかつ*MLH1*遺伝子が非メチル化の症例では、この三種類の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のは26症例中わずか10例に過ぎなかった。このように、MSIおよび*MLH1*遺伝子のメチル化はこのRasシグナルに関連した遺伝子変化の状態と密接に関連していた(表2)。

表2. Rasシグナル関連遺伝子変化と*MLH1*遺伝子メチル化及びMSI状態との関連

	<i>MLH1</i> メチル化	変異		変異を持つ症 例/	P
		<i>BRAF</i> and/or <i>RASSF2</i>	<i>K-RAS</i>		
MSI-H (n=5)	+(n=3)	3	0	3/3	7/7 (P=0.0046)
	-(n=2)	0	2	2/2	
MSS/ MSI-L (n=28)	+(n=2)	2	0	2/2	
	-	6*	6*	10/26	

*Two cases contain two alterations involving *K-RAS* mutation.

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。今回染色体再配列(*RET/PTC*遺伝子再配列および*NTRK1*遺伝子再配列)の相対頻度が被曝線量の量依存的に上昇し、さらに、染色体再配列を有する症例は被曝から比較的短い期間で発症することより、*RET/PTC*遺伝子あるいは*NTRK1*遺伝子再配列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、野生型*RET*, *NTRK1*及び*BRAF*遺伝子を有する甲状腺乳頭癌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、まだ未同定も遺伝子変異は放射線被曝によって直接的に誘発された遺伝子変異であり、成人発症放射線関連甲状腺乳頭癌の初期事象には*RET/PTC*及び*NTRK1*再配列以外のものがあることが示唆された。

大腸がんにおけるMSI-Hの5症例は全例で、*MLH1*のLOHが認められ、1症例に*MSH2*のLOHも認められた。また、MSI-Hの5症例のうち、*MLH1*が非メチル化の2症例では2例とも点突然変異が観察され、MSI-Hの症例は全て*MLH1*遺伝子に2つの変異をもつことが判明した。また、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。これらのことより、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な変化及びエピジェネティックな変化が被曝者大腸がん重要な役割を担っていることが想起される。

これまで、放射線による遺伝子の変化としては直接的な作用によるDNA二重鎖の切断および遺伝子再配列が注目されてきたが、近年、マウスを用いた動物実験において、急性および慢性の放射線被曝により特定の遺伝子のメチル化が誘発されることが示されてきており、放射線による発がん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、甲状腺乳頭がんでは遺伝子再配列と、一方大腸がんではMSI及びRasシグナルに関連した遺伝子変異と被曝線量との関係並びにMSI及び*MLH1*遺伝子変異とRasシグナルに関連した遺伝子変異との関係が示された。すなわち、放射線被曝が発がん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、他の遺伝子変化についても検討することが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hamatani K, Eguchi H, Ito R, Mukai M, Takahashi K, Taga M, Imai K, Cologne J, Soda M, Arihiro K, Fujihara M, Abe K, Hayashi T, Nakashima M, Sekine I, Yasui W, Hayashi Y, Nakachi K. *RET/PTC* Rearrangements Preferentially Occurred in Papillary Thyroid Cancer among Atomic Bomb Survivors Exposed to High Radiation Doses. *Cancer Res.* 68: 7176-7182. (2008)

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.* 659: 109-117. (2008)

2. 学会発表

伊藤玲子、江口英孝、濱谷清裕、多賀正尊、平野尚子、高橋恵子、大上直秀、田原榮一、安井 弥、中地 敬: 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、2008年5月15日-2008年5月17日、金沢

高橋恵子、多賀正尊、伊藤玲子、今井一枝、中地 敬、濱谷清裕: 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、2008年5月22日-2008年5月23日、福岡

濱谷清裕、江口英孝、Cologne JB、早田みどり、安倍邦子、林 徳真吉、中島正洋、関根一郎、林 雄三、中地 敬: 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、2008年6月8日、長崎

濱谷清裕、高橋恵子、江口英孝、多賀正尊、伊藤玲子、今井一枝、中地 敬: 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、2008年10月28日-2008年10月30日、名古屋

伊藤玲子、江口英孝、濱谷清裕、多賀正尊、平野尚子、高橋恵子、大上直秀、田原榮一、安井 弥、中地 敬: 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、2008年10月28日-2008年10月30日、名古屋

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: 原爆被爆者に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、2008年11月19日-2008年11月21日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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ー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、放射線被曝影響と遺伝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、原爆被爆者を対象とした放射線影響研究所の疫学研究によると、結腸がんのリスクは被爆者で顕著に増加するが、直腸がんは有意なリスク増加を示さないことが報告されている。しかしながら、結腸がんリスクの増加に放射線被曝がどのように関与しているのか、またなぜ直腸がんではリスクの増加が見られないのかは明らかにされていない。一方、放射線影響研究所の免疫学研究によると、原爆被爆者では被曝線量依存的な持続性炎症の亢進が観察されている。そこで、我々は炎症に関連する遺伝子多型に基づき、結腸直腸の発がんリスクに及ぼす個人の遺伝的感受性と放射線被曝の影響を調べた。放射線影響研究所の成人健康調査コーホートに基づき、1982年以降に結腸直腸がん罹患した症例と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。結腸直腸発がんのオッズ比リスクを症例対照研究によって、結腸・直腸別、放射線被曝線量カテゴリー別、*IL-18*ハプロタイプ別に評価した。重回帰モデルにより解析した結果、放射線によるリスクの増加は、結腸がんでは有意であったが、直腸がんでは有意でなかった。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。

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ー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。放射線被曝が持続性炎症を亢進するという免疫学研究の知

見を踏まえて、免疫関連遺伝子の多型に基づく発がんリスクが放射線被曝によってどのように修飾されるか検討する。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、他の放射線への被曝に関連した発がんの予防に重要な知見を与えると期待される。本年度は炎症に関連する遺伝子多型に基

づき、結腸直腸発がんのリスクに及ぼす個人の遺伝的感受性と放射線被曝の影響を調べた。

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基づき、1982年以降に結腸直腸がん罹患した210人を症例群(結腸がん165, 直腸がん45)とし、843人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(SNP)に基づいて連鎖不平衡解析を行った。SNP解析は、TaqMan 5' スクレアーゼ法(PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)及びABI Prism 9700HT sequence detector (PE Applied Biosystems)を用いた。SNPに基づく連鎖不平衡解析は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、遺伝子解析に関する倫理委員会、生物学的試料委員会の承認を受けて行われた。研究に使用するDNAなどの生体試料及び臨床・追跡データはすべて連結可能匿名化され、「ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針」を厳守した。

C. 研究結果

*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*と *IL-18-CG*; *AT*アレルが野生型, *CG*アレルが変異型)を同定した。

重回帰モデルにより、放射線及びハプロタイプの発がんリスクに及ぼす影響をそれぞれ独立に解析し、以下の結果を得た。1) 放射線によるリスクの増加は、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; 2) *IL18-CG*アリルをホモ接合体として持つ人は、*IL18-AT*アリルを持つ人に比べ、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。次に、放射線とハプロタイプの相互作用を考慮して解析を行った。すなわち、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、*IL18-CG*アリ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 (図1)。一方、直腸がんでは被曝線量と*IL-18*ハプロタイプの組み合わせに対して有意なリスクの増加は認められなかった (図2)。

D. 考察

*IL-18*は活性化マクロファージ、腸上皮細胞のIFN γ 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。今後、*IL-18*に連動した他の炎症因子、T細胞免疫、NK細胞活性に関連した遺伝子の多型についても検討する予定である。これにより、放射線関連結腸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。

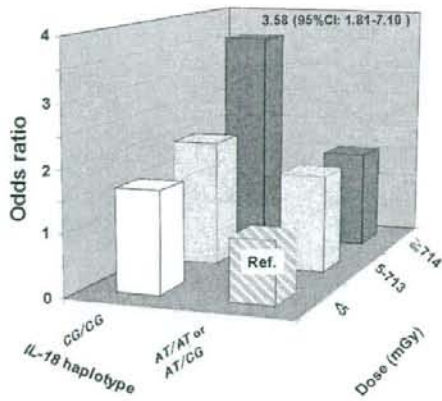


図1. 結腸がんリスクに及ぼすIL-18ハプロタイプと放射線被曝の影響

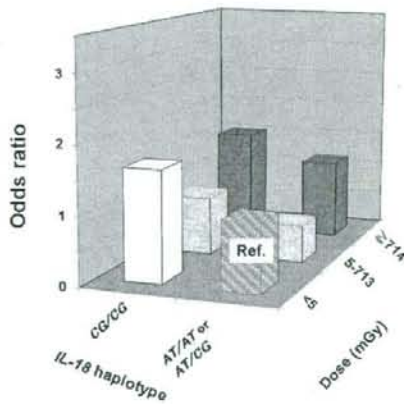


図2. 直腸がんリスクに及ぼすIL-18ハプロタイプと放射線被曝の影響

E. 結論

我々はこれまでに被爆者の胃発がんに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報告した。今回の結腸発がんの研究結果と併せると、1) 原爆被爆者の胃発がんには遺伝的要因が関与する、2) 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。また、直腸発がんにはIL-10、IL-18だけでなく、調べた限りの炎症関連遺伝子多型は関与していなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, Troσκο JE, Sugihara K, Kotake Y, Ohta S. Modulation of Connexin43 on a Rotenone Model of Parkinson's Disease. Neuroscience, 2009; in press.
2. Yuasa, Y, Nagasaki, H, Akiyama, Y, Takizawa, T, Kojima, K, Kawano, T, Sugihara, K, Imai, K, Nakachi, K. DNA methylation status is inversely correlated with green tea intake and physical activity in gastric cancer patients. Int J Cancer, in press.
3. Yoshida, K, Kubo, Y, Kusunoki, Y, Morishita, Y, Nagamura, H, Hayashi, I, Kyoizumi, S, Seyama, T, Nakachi, K, Hayashi, T. Caspase-independent cell death without generation of reactive oxygen species in irradiated MOLT-4 human leukemia cells. Cellular Immunol 255: 61-68, 2009.
4. Oue, N, Sentani, K, Sakamoto, N, Motoshita, N, Nishisaka, T, Fukuhara, T, Matsuura, H, Sasaki, H, Nakachi, K, Yasui, W. Characteristic gene expression in stromal cells of gastric cancers among atomic-bomb survivors. Int J Cancer 124:1112-1121, 2009.

5. Ohara, M, Hayashi, T, Kusunoki, Y, Nakachi, K, Fujiwara, T, Komatsuzawa, H, Sugai, M. Cytotoxic distending toxin induces caspase-dependent and -independent cell death in MOLT-4 cells. *Infect Immun* 76: 4783-4791, 2008.
 6. Santen, RJ, Song, RX, Masamura, S, Yue, W, Fan, P, Sogon, T, Hayashi, S, Nakachi, K, Eguchi, H. 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.
 7. Hamatani, K, Eguchi, H, Mukai, M, Takahashi, K, Ito, R, Taga, M, Imai, K, Cologne, J, Soda, M, Arihiro, K, Fujihara, M, Abe, K, Hayashi, T, Nakashima, M, Sekine, I, Yasui, W, Hayashi, Y, Nakachi, K. RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose. *Cancer Res* 68: 7176-7182, 2008.
 8. Tamakoshi, A, Nakachi, K, Ito, Y, Lin, Y, Yagyu, K, Kikuchi, S, Watanabe, Y, Inaba, Y, Tajima, K. 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.
 9. 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. *Mutat Res* 659: 109-117, 2008.
 10. Sueoka-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* 99: 1180-1187, 2008.
 11. Members of Asia Pacific Cohort Studies Collaboration, Nakachi, K. Cigarette smoking, systolic blood pressure, and cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Stoke* 39:1694-1702, 2008.
 12. 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* 134: 211-217, 2008.
2. 学会発表
1. Hamasaki K, Kodama Y, Kusunoki Y, Nakashima E, Takahashi N, Nakamura N, Nakachi K. 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, 23-24 January 2008, Hiroshima, Japan.

2. 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.
3. Kusunoki Y, Hamasaki K, Imai K, Kubo Y, Hayashi T, Nakachi K. Mouse strain difference in sensitivity to radiation-induced genomic instability persisting in vivo for prolonged periods after irradiation. The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 22-26 April 2008, Otsu, Japan.
4. Hayashi T, Morishita Y, Nagamura H, Maki M, Imai K, Yoshida K, Kusunoki Y, Hayashi I, Tahara E, Nakachi K. Effects of IL-10 and IL-6 gene polymorphisms and atomic-bomb radiation exposure on gastric cancer risk. IARC-EACR-AACR-ECNIS Symposium, 3-5 July 2008, Lyon, France.
5. Hayashi T, Morishita Y, Nagamura H, Maki M, Imai K, Yoshida K, Kusunoki Y, Hayashi I, Tahara E, Nakachi K. 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, 5-8 July 2008, Lyon, France.
6. Hamasaki K, Imai K, Kubo Y, Hayashi T, Nakachi K, Kusunoki Y. 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, 21-24 September 2008, Boston, Massachusetts, USA.
7. Miles EF, Tatsukawa Y, Funamoto S, Kamada N, Nakashima E, Kodama Y, Seed TM, Kusunoki Y, Nakachi K, Fujiwara S, Akahoshi M, Neriishi K. Radiosensitivity of A-bomb survivors pregnant at the time of bombings in Hiroshima and Nagasaki. The 54th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 21-24 September 2008, Boston, Massachusetts, USA.
8. Neriishi K, Blakely EA, Chang P, Nakashima E, Ohishi W, Fujiwara S, Hida A, Akahoshi M, Hayashi T, Ito R, Nakachi K, Minamoto A, Yokoyama T, Toda S, Uematsu M, Tsuiki E, Kiuchi Y, Kitaoka T, Shirai A, Cucinotta FA, Goldstein LE, Chylack LT. Storage of cataract lens tissues in A-bomb survivors. The 54th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 21-24 September 2008, Boston, Massachusetts, USA.
9. Yoshida K, Hayashi T, Imai K, Maki M, Nagamura H, Morishita Y, Kusunoki Y, Nakachi K. 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, 24-28 September 2008, New York, New York, USA.
10. Kusunoki Y, Yamaoka M, Hamasaki K, Imai K, Kubo Y, Hayashi T, Nakachi K. Genetic instability of the hematopoietic system in murine inflammation models. The 10th International Symposium on Dendritic Cells, 1-5 October 2008, Kobe, Japan.
 11. Hayashi T, Kusunoki Y, Morishita Y, Nagamura H, Maki M, Kubo Y, Yamaoka M, Hayashi I, Yoshida K, Nakachi K. 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, 12-16 October 2008, Montreal, Canada.
 12. Kusunoki Y, Hamasaki K, Yamaoka M, Kubo Y, Hayashi T, Nakachi K. 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, 4-6 December 2008, Okinawa, Japan.
 13. 伊藤玲子、江口英孝、濱谷清裕、多賀正尊、平野尚子、高橋恵子、大上直秀、田原榮一、安井 弥、中地 敬。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、2008 年 5 月 15-17 日、金沢。
 14. 高橋恵子、多賀正尊、伊藤玲子、今井一枝、中地 敬、濱谷清裕。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 年 5 月/22-23 日、福岡
 15. 今井一枝、林 奉権、吉田健吾、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（2）。第 15 回 がん予防大会 2008、2008 年 5 月 22-23 日、福岡。
 16. 大石和佳、楠 洋一郎、藤原佐枝子、中島栄二、林 奉権、中地 敬、茶山一彰。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、2008 年 6 月 5-6 日 松山
 17. 濱谷清裕、江口英孝、Cologne JB、早田みどり、安倍邦子、林 徳眞吉、中島正洋、関根一郎、林 雄三、中地 敬。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 2008 年 6 月 8 日、長崎。
 18. 吉田健吾、林 奉権、森下ゆかり、長村浩子、牧 真由美、空 美佐江、今井一枝、楠 洋一郎、中地 敬。放射線被曝と発癌リスクに及ぼす遺伝的要因。第 49 回 原子爆弾後障害研究会、2008 年 6 月 8 日、長崎。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 19 年度喫煙科学研究財団研究発表会 2008 年 7 月 24 日, 東京

19. 吉田健吾、林 奉権、今井一枝、牧真由美、長村浩子、森下ゆかり、楠洋一郎、中地 敬. ゲノム解析に基づく原爆被爆者の発がん感受性の探索 I. 第 33 回 中国地区放射線影響研究会 2008 年 7 月 30 日, 広島.

20. 林 奉権、楠 洋一郎、森下ゆかり、長村浩子、牧 真由美、久保美子、吉田健吾、中地 敬. 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 日本免疫毒性学会学術大会 2008 年 9 月 11-12 日, 東京.

21. 濱谷清裕、高橋恵子、江口英孝、多賀正尊、伊藤玲子、今井一枝、中地敬. 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 2008 年 10 月 28-30 日, 名古屋.

22. 伊藤玲子、江口英孝、濱谷清裕、多賀正尊、平野尚子、高橋恵子、大上直秀、田原榮一、安井 弥、中地 敬. 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, 2008 年 10 月 28-30 日, 名古屋.

23. 林 奉権、今井一枝、楠 洋一郎、田原榮一、中地 敬. 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 2008 年 10 月 28-30 日, 名古屋.

24. 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 51 回 日本放射線影響学会 2008 年 11 月 19-21 日, 北九州.

25. 河崎麻実、林 奉権、中地 敬、太田 茂. パーキンソン病モデルにおけるアストロサイト connexin 43 の変動. 第 7 回 コネキシン研究会, 2008 年 12 月 19-20 日, 京都.

26. 楠 洋一郎、濱崎幹也、今井一枝、林 奉権、中地 敬. 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 2009 年 2 月 5-6 日, 札幌.

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

3. その他

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 原爆被爆者の *GPA* 遺伝子座の突然変異頻度は被ばく線量の増加に伴って上昇するが、その線量効果には大きな個人差があり、がんを発生した被爆者グループの線量効果の勾配はがんを発生しなかったグループに比べて高く、放射線による突然変異誘発の程度と発がんリスクとの関連が示唆されている。個人の放射線誘発遺伝子傷害の感受性が *GPA* 突然変異頻度の線量効果の個人差に反映しているのか検討する目的で、*GPA* 突然変異頻度を既に測定している原爆被爆者 22 名について、培養した T リンパ球を用いた γ H2AX 測定系にて個人の試験管内放射線感受性を評価した。 γ H2AX レベルにより、放射線感受性が高いグループと低いグループにはほぼ二分される傾向が見られたが、両群間で赤血球 *GPA* 突然変異頻度に有意な違いは認められなかった。また、放射線で誘発される遺伝的不安定性が *GPA* 突然変異頻度の線量依存的増加に関係しているか検討するために、*GPA* 突然変異頻度を既に測定している原爆被爆者 151 名について、網状赤血球小核頻度を測定した。その結果、原爆被爆者の造血系において今日まで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* 突然変異頻度と小核頻度の間にも有意な相関は認められなかった。さらに、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* 突然変異頻度の原爆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。

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。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個体差の背景を分子疫学的に検討する。

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の、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、⑥DNA修復遺伝子の多型、および⑦固形癌発生の関係を検討する取り組みが行われている。今年度は、放射線誘発遺伝子傷害の感受性が体細胞突然変異の線量効果の個人差に反映しているのか検討する目的で、 γ H2AX測定系による試験管内放射線感受性と、*GPA*突然変異頻度の関係を調べた。また、遺伝的不安定性の放射線誘発体細胞突然変異への関与を検討するために、網状赤血球小核頻度と被ばく線量ならびに *GPA* 突然変異頻度の関係を調べた。さらに、体細胞突然変異性の個人差の遺伝的背景を探る目的で、*ATM* 遺伝子多