

型とGPA突然変異頻度の関連性を検討した。

## B. 研究方法

GPA突然変異頻度のデータは1988-1996年の約8年間で放影研成人健康調査対象者約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、増殖したTリンパ球を用いて行った。培養Tリンパ球に4GyのX線を照射した後、さらに培養して照射6時間後の $\gamma$ H2AXの発現量をFACSscanで測定した。

網状赤血球小核頻度の測定は、末梢血をマイナス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、CyAnを用いたフローサイトメトリーにて解析した。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。

ATM遺伝子の8箇所のSNPを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に基づいて決定した。

### (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。

## C. 研究結果

試験管内での放射線誘発 $\gamma$ H2AXレベルを指標として、放射線感受性と体細胞突然変異関係を原爆被爆者集団で検討した。GPA突然変異頻度を既に測定している被爆者で、1Gy以上の放射線を被ばくした22名の凍結保存リンパ球からTリンパ球培養を行い、放射線誘発 $\gamma$ H2AXレベルを測定した。図1に、放射線誘発 $\gamma$ H2AXレベルの頻度分布を示すが、 $\gamma$ H2AXレベルが高い、すなわち放射線感受性が高いと考えられるグループと、 $\gamma$ H2AXレベルが低い、すなわち放射線感受性が低いと考えられるグループに二分される傾向が見られた。そこで、この二群間で体細胞突然変異性に違いがあるか検討した

が、 $\gamma$ H2AXレベルが低いグループと高いグループで、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(図2)。

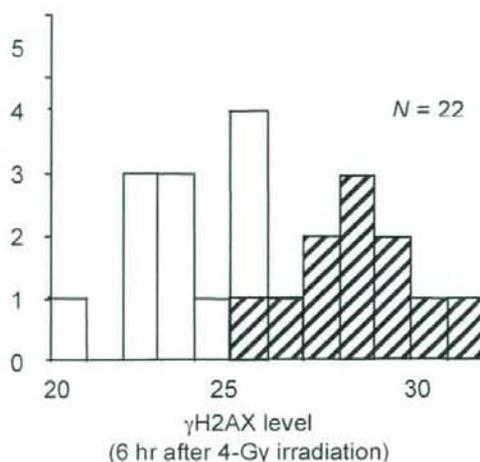


図1. 原爆被爆者(1Gy以上被ばく)の培養Tリンパ球における試験管内放射線誘発 $\gamma$ H2AXレベルの頻度分布

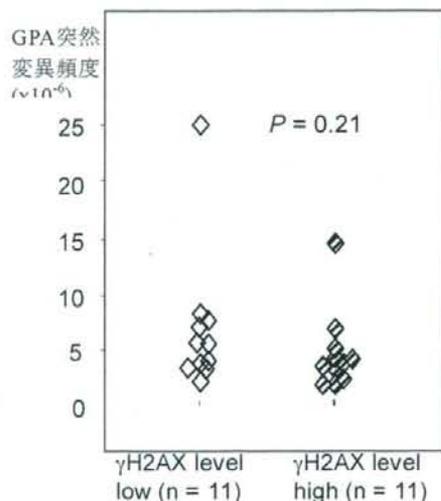


図2. 原爆被爆者(1Gy以上被ばく)の試験管内放射線感受性とGPA突然変異頻度

末梢血網状赤血球小核頻度を指標として、遺伝的不安定性と体細胞突然変異関係を原爆被爆者集団で検討した。図3に1Gy以上の放射線を被ばくした原爆被爆者68名および性、年齢を一致させたコントロール83名について小核頻度の分布を示した。被ばく群と非被ばく群との間に統計学的に有意な差は認められず、原爆被爆者の造血系に

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なかった。また、図4に示すように、1 Gy以上の被ばく群において赤血球GPA突然変異頻度と小核頻度間に有意な相関は認められず、原爆被爆者の被ばく線量に依存した赤血球GPA突然変異頻度の増加に遺伝的不安定性が寄与している証拠はえられなかった。

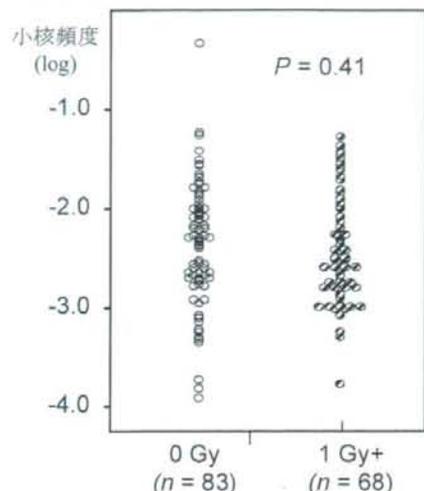


図3. 原爆被爆者の末梢血網状赤血球小核頻度

ATM遺伝子の7箇所のSNPのから構成される2つのハプロタイプについて、GPA突然変異頻度の測定データがある1,825名の被爆者のハプロタイプを決定した。いずれのハプロタイプグループにおいてもGPA突然変異頻度に有意な被曝線量依存性の増加を認められたが、線量効果曲線の勾配に有意な差はみられなかった。

#### D. 考察

原爆被爆者の培養Tリンパ球の試験管内放射線誘導 $\gamma$ H2AXレベルを指標として個人の放射線感受性を評価した。放射線誘導 $\gamma$ 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みられなかった。したがって、放射線による体細胞突然変異の個人差に放射線感受性の個人差が関係する証拠は得られなかった。ただし、被ばく線量や年齢、性差などを補正して解析する必要があると考えられ、さらに対象者を増や

して検討する予定である。

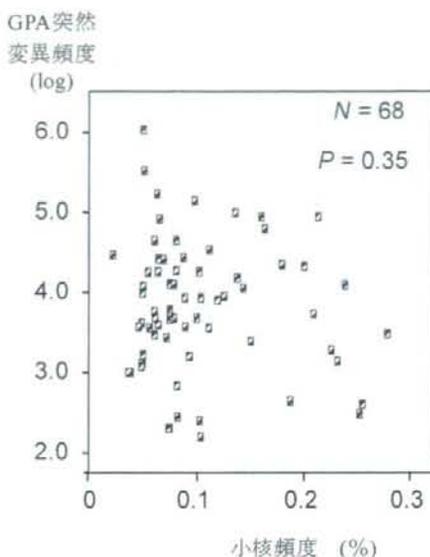


図4. 原爆被爆者（1 Gy以上被ばく）のGPA突然変異頻度と末梢血網状赤血球小核頻度

これまで放射線で誘発される遺伝的不安定性の指標として網状赤血球小核頻度が有用であることを、マウスを用いた実験で明らかにしてきた。原爆被爆者151名について、末梢血網状赤血球小核頻度を測定した結果、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みられなかった。また、赤血球GPA突然変異頻度と網状赤血球小核頻度の間にも有意な相関は認められなかった。ヒトの場合、マウスと比べて個体差が大きいため放射線による影響を十分にみられなかった可能性があるため、今後個体差の背景にある放射線感受性、炎症状態などを考慮に入れた解析を試みる予定である。

放射線による体細胞突然変異の個人差にはDNA修復機能の個人差が関係し、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。今回、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。その結果、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。

## E. 結論

原爆被爆者における赤血球GPA突然変異頻度の個人差に、試験管内放射線感受性、網状赤血球小核頻度、ATM遺伝子多型のいずれにおいても関連性を示唆する証拠は見られず関係は認められなかった。

## 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 – Mutat Res 2008;659(1-2):109-17.

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 2008;76(10):4783-91.

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. Cell Immunol, 2009; in press.

### 2. 学会発表

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 2008, 22-26 April 2008, Otsu

Kusunoki Y. T-cell aging radiation-exposed individuals. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Immunology Board: Immunosenescence Workshop, 18-21 June 2008, San Francisco, California, USA

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, 21-25 September 2008, Boston, Massachusetts, USA

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, 21-25 September 2008, Boston, Massachusetts, USA

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

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 2008/12/01-03 京都

Kusunoki Y, Hamasaki K, Yamaoka M, Kubo Y, Hayashi T, Nakachi K. Development of genetic instability and somatic mutation assays in radiation-exposed individuals. International Symposium on Genotoxicity Assessment, The 37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, 4-6 December 2008, Okinawa

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 2009/02/05-06 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

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 放射線被曝による固形がんの疫学的解析

分担研究者 西 信雄 財団法人放射線影響研究所疫学部

**研究要旨** 放射線影響研究所が長期の追跡調査を行っている寿命調査集団において、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。対象を1958年時点でがんの既往がなく被曝線量(DS02)が推定されている寿命調査集団の105,426人とし、2002年までのがん罹患を把握した。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。なお、第2原発がんは第1原発がん診断後6か月後以降に診断されたものとした。また、がん登録の対象地域を越えて対象者が移動する可能性を考慮して、第1原発がん罹患の計算では年を補正し、第1原発がんの症例については対象地域内のものに限定した。分析の結果、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。今回の分析では第1原発がんに対する治療の影響などが考慮できておらず、今後の課題である。

### A. 研究目的

放射線影響研究所が長期の追跡調査を行っている寿命調査集団では、放射線に関連した統計学的に有意ながん罹患リスクの上昇が、胃がん、結腸がん、肝がん、肺がん、女性乳がんなど多くの部位において認められている (Preston et al., 2007)。これらのがん罹患リスクは、第1原発がんを対象に検討されており、多重がんのリスクについては十分な検討が行われてきていない。

多重がんは、放射線被曝による固形がん発生の分子機構の解明において非常に重要であるが、①第1・第2原発がん共通のリスク要因があるかもしれないこと、②第1原発がんに対する治療により第2原発がんのリスクが上昇する可能性があること、③第1原発がんが発見されたために第2原発がんが偶然に発見される可能性があることなどから、そのリスクの解明には方法論的に特に妥当性の高い研究が必要である。

寿命調査集団は、

- ・約12万人からなる大規模集団であること
- ・全年齢（被曝時）の男女を含むこと
- ・個人ごとに被曝線量が推定されており、低線量域に偏るものの被曝線量幅広い範囲にわたること
- ・精度の高いがん罹患、死亡のデータが得

られていること

・臓器別の被曝線量が推定されていることなどの特徴を有する。近年のがん医療における診断・治療の進歩、被曝者の高齢化、精度の高いがん登録などの条件をもとに、本研究は寿命調査集団において結腸がん罹患後の全固形がん罹患のリスクを検討することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

本研究は寿命調査集団120,321人のうち、  
・1958年までに死亡した、あるいはがんを診断された8,273人  
・追跡不明となった97人  
・DS02により被曝線量が推定されなかった6,525人  
を除く105,426人（80,179人の被曝者と25,247人の入市者）を対象とした。

#### 2. がんの罹患の把握

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、さらに死亡小票の転記書類等により1958年から2002年までについて把握した。固形がんは国際疾病分類腫瘍学第3版 (International Classification of Diseases for Oncology, 3rd revision, ICD-O-3)

の局在コードがC00-C89, 結腸がんは同コードがC18の悪性(性状が3)のものとし, 粘膜がんは除外した。なおDCO(death certificate only)の症例も分析に含めた。

### 3. 第2原発がんの定義

本研究では第2原発がんを以下のように定義した。

- (1) ICD-O-3 の局在コードにおいて, 結腸, 直腸, 結合組織, 皮膚については4桁目の詳細部位, 他の部位については3桁目の部位が異なるもの
- (2) 悪性腫瘍のBergの分類(Berg, 1996)において組織型が異なるとされるもの
- (3) 診断日が第1原発がんの診断後6か月を経過しているもの

なお, 同じ部位で同じ組織型のがんが多発したもの(多発がん)は単一のがんとした。

### 4. 第2原発がんのリスクの推定

第2原発がんのリスクは標準化罹患比(incidence rate ratio: IRR)として, 以下のように求めた。

#### 1) 人年および罹患数の計算

都市(city), 性別(sex), 被爆距離(location), 被爆時年齢(age at exposure), 到達年齢(attained age), 被曝線量(dose), 時期別に層別化したセルにグループ分けした。

#### 2) 第1原発の固形がん罹患率の解析

第1原発固形がんの放射線関連リスクの解析は, 以下のように過剰相対リスク(excess relative risk: ERR) モデルに基づいてポワソン回帰モデルを用いて行った。

$$\text{Rate} = \text{background\_rate} * (1 + \text{ERR})$$

バックグラウンド率(Background rate)と過剰リスク(ERR)項の基本モデリングはPrestonら(2007)が用いたモデルを用いた。バックグラウンドモデルについては, 性別, 到達年齢(lage70), 被爆時年齢(e30)などのパラメトリック関数(男女別)を用いて, 以下のように設定した。

#### Log(Background rate)

$$= \text{City} + \text{sex} + \text{NIC} * \text{city} + \text{sex} * (\text{lage70} + \text{lage70sq} + \text{lage70sp} + \text{e30} + \text{e30sq} + \text{e30sp})$$

ここで

$$\begin{aligned} \text{lage70} &= \log(\text{age}/70) \\ \text{lage70sq} &= (\log(\text{age}/70))^2 \\ \text{lage70sp} &= \log(\text{age}/70) * (\text{age} > 70) \\ \text{e30} &= (\text{agex}-30)/10 \\ \text{e30sq} &= \text{e30}^2 \end{aligned}$$

また, 過剰リスク項に関しては, 以下のように, 線形線量反応に到達年齢による影響修飾を含むモデルとした。

$$\text{ERR} = \text{Dose} * \exp(\text{lage70}) * (1 + \text{sex})$$

#### 3) 第2原発がんの期待罹患数

第1原発の全固形がんの罹患率を第1原発の結腸がん罹患後の人年に乗じて求めた。

#### 4) 第2原発がんのリスク

標準化罹患比(= 観察罹患数 / 期待罹患数)とその95%信頼区間を推定した。

### 5. 移動の調整

がん登録の対象地域は広島県・長崎県であるため, 対象者が県域を越えて移動することを以下のように考慮した。

#### 1) 第1原発がん罹患

放射線影響研究所の成人健康調査(Adult Health Study: AHS)から得られた移動情報をもとに, 本研究の対象者の人年を調整した。第1原発がんの症例は, 診断時住所が広島県・長崎県内の結腸がんとした。

#### 2) 第2原発がん罹患

対象者(第1原発の結腸がん症例)は, 経過観察のため, がん罹患のない対象者より第2原発がんが発見されやすい状況にあると考え, がん登録の対象地域に関する人年の調整を行わなかった。第2原発の固形がんは, 地域を限定せずすべて含めた。

### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

寿命調査集団105,426人について1958年から2002年に把握された第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。このうち、がん登録の対象地域(広島県・長崎県)内の症例は、全固形がんが19,101例(男性8,780例,女性10,321例)で93.5%,結腸がんでは1,535例(男性647例,女性888例)が94.3%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%信頼区間:1.01-1.69),女性が1.19(95%信頼区間:0.94-1.61)であった(第2原発全固形がんの罹患数は男女それぞれ76例と61例)。

第1原発がんが結腸がんの症例について被曝時年齢別に第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(表1)。

表1 被曝時年齢別にみた標準化罹患比(第1原発:結腸がん,第2原発:全固形がん)

年齢(歳)	第2原発がん罹患数	標準化罹患比	(95%信頼区間)
男性			
<10	4	1.16	(0.50-inf)
10-20	30	1.60	(1.07-3.00)
20-30	11	0.90	(0.55-1.83)
30-40	20	1.40	(0.91-2.51)
40+	11	0.96	(0.58-2.20)
傾向性(P値)*		0.29	
女性			
<10	2	1.37	(0.50-inf)
10-20	10	1.35	(0.77-5.00)
20-30	19	1.22	(0.79-2.11)
30-40	17	0.93	(0.63-1.70)
40+	13	1.50	(0.87-4.33)
傾向性(P値)		0.44	

\*ランク検定(Kendall and Stuart)

第1原発がんが結腸がんの症例について第1原発がんの診断時年齢別に第2原発全固形がん罹患の標準化罹患比をみると、若年で診断された症例において比較的高い標準化罹患比がみられたが、統計学的に有意な傾向は認められなかった(表2)。

表2 第1原発がん診断時年齢別にみた標準化罹患比(第1原発:結腸がん,第2原発:全固形がん)

年齢(歳)	第2原発がん罹患数	標準化罹患比	(95%信頼区間)
男性			
<45	2	1.89	(0.50-inf)
45-55	5	1.97	(0.83-inf)
55-65	30	1.88	(1.25-3.33)
65-75	21	0.87	(0.60-1.40)
75+	18	1.10	(0.72-2.00)
傾向性(P値)*		0.13	
女性			
<45	3	5.54	(1.50-inf)
45-55	2	0.71	(0.33-inf)
55-65	14	1.18	(0.74-2.33)
65-75	22	1.30	(0.88-2.21)
75+	20	1.04	(0.71-1.82)
傾向性(P値)		0.23	

\*ランク検定(Kendall and Stuart)

第1原発がんが結腸がんの症例について、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(表3)。

表3 被曝線量別にみた標準化罹患比(第1原発:結腸がん,第2原発:全固形がん)

線量(Gy)	第2原発がん罹患数	標準化罹患比	(95%信頼区間)
男性			
入市者	15	1.42	(0.88-3.75)
<0.005	22	1.11	(0.76-1.83)
0.005-0.1	17	1.21	(0.77-2.43)
0.1-0.5	11	1.29	(0.78-3.67)
0.5+	11	1.55	(0.85-3.67)
傾向性(P値)*		0.43	
女性			
入市者	13	1.19	(0.72-2.60)
<0.005	19	1.22	(0.79-2.38)
0.005-0.1	20	1.41	(0.87-2.86)
0.1-0.5	7	1.03	(0.58-3.50)
0.5+	2	0.52	(0.25-2.00)
傾向性(P値)		0.21	

\*ランク検定(Kendall and Stuart)

#### D. 考察

今回の分析から、第1原発がん診断後6か月未満に診断された第2原発がんを除外しても、結腸がん罹患後の全固形がん罹患のリスクは、少し上昇していることが明らかとなった。ただ、この第2原発がん罹患のリスクは、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。

寿命調査集団を対象に多重がんのリスクを検討した研究として、本研究は方法論的に妥当性の高い研究であると考えられる。原爆被爆者を対象とした多重がんリスクの検討は、中島ら(2008)によって長崎の被爆者を対象に実施されているが、個人ごとに推定された被曝線量ではなく被曝距離を用いていること、標準化罹患比を求めるような統計学的に妥当性の高い方法を用いていないことから、本研究の結果との比較は困難である。

本研究ではDCOの症例を分析に含めたが、その割合は第1原発の結腸がんが6.4%、第2原発の全固形がんが6.6%（第1原発が全固形がんの場合）であった。DCOについては、死亡小票の転記書類から、罹病期間の情報を利用して診断日を逆算で推定しており、遡り調査を実施していないものの、比較的正確に多重がんの判定がなされていると考えられる。

第1原発がん罹患において第2原発がん罹患のリスクが少し上昇していることについて、第1原発がん罹患後の治療が影響しているかどうかは、今回の分析では検討することができなかった。診断・治療の放射線被曝と原爆放射線との関連などについては、今後の課題である。

#### E. 結論

寿命調査集団の105,426人を対象に、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。標準化罹患比でみたところ、第2原発がんのリスクは少し上昇していたものの、被曝線量によって異なるという結果は認められなかった。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の課題である。結腸がんに限らず他の主要な部位についても同様の検

討を行う必要がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nishi N, Sugiyama H, Hsu WL, Soda M, Kasagi F, Mabuchi K, Kodama K. Differences in mortality and incidence for major sites of cancer by education level in a Japanese population. *Ann Epidemiol* 2008; 18: 584-591.

##### 2. 学会発表

1. Nishi N, Li CI, Furukawa K, Sugiyama H, Sakata R, Soda M, Shimizu Y, Kasagi F, Suyama A, Mabuchi K, Davis S, Kopecky K, Kodama K. Risk of second primary cancers among atomic bomb survivors. The 18th World Congress of Epidemiology, Port Alegre, Brazil, Sep 20-24, 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

#### 研究協力者

杉山裕美（放射線影響研究所疫学部）

古川恭治（放射線影響研究所統計部）

## 放射線発がんにおけるゲノム修復機構の解析

分担研究者 神谷 研二（広島大学原爆放射線医科学研究所）  
研究協力者 久保 圭（広島大学原爆放射線医科学研究所）  
豊島 めぐみ（広島大学原爆放射線医科学研究所）  
増田 雄司（広島大学原爆放射線医科学研究所）

**研究要旨** 放射線被ばくが誘発するゲノム損傷の修復機構における損傷乗り越えDNA合成の関与と放射線発がんにおける役割を明らかにするため、損傷乗り越えDNA合成機構の中心的役割を担うREV1の細胞生物学的な機能解析を行った。テトラサイクリンのno/offによりREV1の発現量を制御できる細胞株を樹立した。この細胞を用いて放射線照射やMNUで処理した後の細胞生存率を検討した。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。一方、Rev1を過剰発現させたマウスでは突然変異頻度と発がん率が上昇する。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る。

### A. 研究目的

原爆被爆者のみならず医療の高度化に伴う医療被ばくや、放射線の産業利用や原子力発電に伴う職業被ばくなどで、低線量放射線被ばくによる健康影響の解明は緊急の課題となっている。特に低線量被ばくによる発がん機構の解明とそれに基づく治療法の開発、並びに発がんリスクの解明は、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、放射線が誘発するゲノム障害の修復機構における損傷乗り越え修復の関与を明らかにすると同時に、損傷乗り越え修復機構の中心的役割を担うREV1の放射線発がんにおける役割を明らかにする。この様な研究を推進することで、放射線発がん機構の解明が進み低線量放射線の発がんリスク評価や治療法の開発も可能となる。

### B. 研究方法

#### 1. ベクターの作成

細胞でのREV1の発現を制御するため

T-REX<sup>TM</sup>システム (Invitrogen(株))を使用した。このシステムでは、tetracycline (以下tet)

の培地への添加により目的の遺伝子の発現が誘導できる。このシステムは、tet repressor 遺伝子を組み込んだベクターpcDNA6/TRと tet operator 配列を組み込んだベクターpcDNA4/TOで構成される。ヒトREV1の発現ベクターは、pcDNA4/TOベクターのマルチクローニングサイトにヒトREV1 cDNAを導入し、pcDNA4/TO-REV1ベクターを作成した。

#### 2. トランスフェクションと細胞株の樹立

ヒト繊維肉腫細胞HT1080株にベクターpcDNA6/TRを導入したHT1080-pcDNA6/TR (以下HT1080-6TR)株は、(財)放射線影響研究所の野田朝男先生から分与を受け、以後の実験に使用した。HT1080-6TR株に上記で作成したベクターpcDNA4/TO-REV1をトランスフェクション法により導入した。トランスフェクション効率を高めるため、ベクターpcDNA4/TO-REV1をSca Iで切断し直鎖状にしたものを用いた。導入細胞の選択は、blasticidinとzeocinで行った。導入細胞がコロニーを形成後、クローニングを行い細胞株として樹立した。

### 3. REV1タンパク質の発現量の定量

6cm ディッシュに $2 \times 10^5$ 個の樹立細胞を撒き、24時間後にtet(最終濃度:0.1  $\mu$ g/ml)を加え48時間後にセルスクレーパーで回収した。MULTI-BEADS SHOCHEE (HITACHI)を用いて回収細胞を破碎し、遠心後上清を回収し検体とした。蛋白質の定量は、通常のWestern blotting法でおこなった。1次抗体は、抗REV1ウサギポリクローナル抗体と抗 $\beta$ -actinマウスモノクローナル抗体を使用し、反応時間を1時間とした。ペルオキシダーゼ標識した2次抗体には、抗ウサギIgG抗体と抗マウスIgG抗体を使用し、反応時間は同じく1時間とした。

### 4. 生存曲線の作成

樹立細胞を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。 $1 \times 10^3$ 個の樹立細胞を10cmディッシュに撒き、24時間培養後にtet(0.1  $\mu$ g/ml)を加え、さらに24時間培養した。その後、放射線照射、または各濃度のMNU溶液で処理した。放射線照射では、線源として $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線を用い照射の線量率は0.6843Gy/min、線量は1, 2, 4及び8Gyである。MNU処理の場合は、MNU濃度を3.125, 6.25, 12.5及び25  $\mu$ g/mlとし、1時間処理後に培養液を取り除きPBSで洗浄後に、tetを添加した新しい培養液を入れ約1週間培養した。コロニー形成後に0.06% crystal violet溶液で染色し、コロニー数を数え生存率を求めて生存曲線を作成した。

### 5. 統計処理

増殖曲線、plating efficiency、及びclonogenic法はダネット検定により対照群との有意差を検定した。

#### (倫理面への配慮)

本申請研究には組換えDNA実験が含まれているため、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成十五年法律第九十七号)」に基づき、広島大学組換えDNA実験安全管理規定に従って承認手続きを行い、機関承認実験として承認された。

## C. 研究結果

### 1. ベクターの作成と細胞株の樹立

HT1080-6TR株にT-REx™ Systemを用いて作成したベクターpcDNA4/TO-REV1をト

ランスフェクションしblasticidinとzeocinの選択培地でコロニーが形成されるまで培養した。得られた48個のコロニーをシリンダー法を用いて回収した。回収したコロニーのうち無作為に14個を抽出し、tet存在下と非存在下で培養し、western blotting法によりREV1タンパク質の発現量を測定した。得られた結果から、tet存在下にのみREV1の発現を誘導でき、且つ発現量の異なる以下の2系統の細胞株を樹立した。

- 1) HT1080-pcDNA6/TR-pcDNA4/TO-REV1-C6(以下HT1080-REV1-C6)
- 2) HT1080-pcDNA6/TR-pcDNA4/TO-REV1-C7(以下HT1080-REV1-C7)

### 2. REV1発現細胞の $\gamma$ 線照射とMNU処理による生存率

REV1の発現量がゲノム損傷後の細胞の生存率に及ぼす影響を検討する目的で、 $\gamma$ 線照射とMNU処理後のREV1発現細胞の生存率をclonogenic法を用いて測定した。 $\gamma$ 線照射後の生存率は、tet存在下ではHT1080とHT1080-6TR株は同程度であった。一方、tet添加によりREV1を発現誘導したHT1080-REV1-C6とHT1080-REV1-C7株では、親株のHT1080株より高い生存率を示した。両者の生存率では、HT1080-REV1-C6株の方がHT1080-REV1-C7株よりも高い生存率を示した。HT1080-REV1-C6とHT1080-REV1-C7の高い生存率が、REV1の発現量に起因するのかどうかを調べるため、HT1080-REV1-C6株を用いてtet非存在下での $\gamma$ 線照射後の生存率を求めた。HT1080-REV1-C6株は、tetを添加しないでREV1の発現を誘導しない場合は、親株であるHT1080及びHT1080-6TR株と同程度の生存率を示した。

一方、HT1080-REV1-C6とHT1080-REV1-C7株の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。また、tetを添加しないでREV1の発現を誘導しない場合のHT1080-REV1-C6株は、親株であるHT1080-6TR株と同程度の生存率を示した。

### D. 考察

放射線被ばくによりゲノムは二重鎖切断や酸化的損傷などの様々な損傷を受ける。この中で、酸化的損傷の修復の一部は、損

傷乗り越えDNA合成によって行われると推定されている。一方、高発がん性の色素性乾皮症バリエーション (XPV) の原因遺伝子が「損傷乗り越えDNA合成」(translesion DNA合成)をコードする遺伝子である事が明らかにされ、「損傷乗り越えDNA合成」とがん化との関係が注目されている。本研究は、損傷乗り越えDNA合成機構の中心的役割を担うREV1の放射線発がんにおける役割を解明する一助としてREV1の機能を細胞生物学的解析によって明らかにすることを目的とした。

REV1は、「損傷乗り越えDNA合成」の中心的役割を担い、鋳型G に対しdCMP転移活性を有する。我々は、REV1が脱塩基部位や酸化的損傷である8oxoGに対し効率良くCを挿入することで損傷塩基を乗り越えることを明らかにした。即ち、放射線照射で誘発される脱塩基部位や8oxoGに対しREV1は、損傷塩基を乗り越えDNA合成を継続する可能性がある。実際、REV1をknock outしたDT40細胞では、放射線照射後の細胞の生存率が低下し放射線高感受性になる。このことから、REV1をknock outした細胞では、放射線が誘発するゲノム損傷部位の一部はREV1によるDNA合成が継続されず、その結果、細胞死が増加するものと推定される。今回の実験で、我々は、テトラサイクリン(tet)のno/offによりREV1の発現を制御できる細胞株を樹立した。この細胞を用いて放射線照射やMNUで処理した後の細胞生存率を検討した。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。同一細胞を用いて培地からtetを除去しREV1の発現を抑制した条件で同じ実験を行うと細胞の生存率は、親細胞株と同一レベルまで低下した。このことから、REV1発現の上昇は、放射線が誘発するゲノム損傷による細胞死を抑制し、生存率の上昇を誘導したものと推定される。この結果は、REV1をknock outしたDT40細胞での生存率が低下する現象と表裏の関係であり、REV1が放射線照射で誘発される脱塩基部位や8oxoG等のゲノム損傷を乗り越えるDNA合成に関与している事を示唆している。

一方、REV1は、他のYファイラーポリメラーゼと異なりdCMP転移活性のみを有し、

損傷した鋳型塩基に対してもシトシンのみを挿入するため、鋳型塩基がグアンニン以外の場合は、点突然変異を誘発することになる。我々は、既にRev1を過剰発現した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を明らかにしている。さらに、このRev1トランスジェニックマウスは、放射線照射やMNUやazoxymethane (AOM)の化学発がん剤の投与による発がん感受性が亢進していることも明らかにしている。今回の実験結果と以上の事を総合的に考慮すると、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。しかし、その際に点突然変異を誘発する可能性がある。さらに、この突然変異を起こした細胞の生存率が高くなるため発がん感受性が高くなるのではないかと推定される。実際、MNUで誘発したリンパ腫のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の突然変異頻度を測定したところ、Ikarosでは、その頻度が有意に上昇し、KrasやNotch PESTでは上昇傾向を認めた。この様に、REV1の過剰発現細胞は、突然変異を蓄積することで発がんに促進的に関与するものと推定される。

ところで、REV1をknock outしたDT40細胞では、前述した放射線の他、紫外線、シスプラチン、過酸化水素、さらにはMMS等の広範囲なゲノム損傷因子が誘発する細胞死に対し高感受性になる。これらのゲノム損傷因子が誘発するゲノム障害は、様々なものがあり、個々の障害に対し異なるDNA修復機構や損傷乗り越えDNA合成機構が対応すると考えられる。例えば、Polkは、benzo[a]pyrene-G adductsやthymine glycolを、Polhはthymine-thymine dimerを乗り越えてDNA合成を行うことができる。このような多様なゲノム損傷後のDNA合成にREV1が関与することは、REV1がdCMP転移活性以外の役割で広く損傷乗り越えDNA合成に関与していることを示している。事実、REV1は、thymine-thymine dimerを乗り越えてDNA合成が出来ないにも拘わらず、Polhのthymine-thymine dimerの損傷乗り越えDNA合成にはREV1が不可欠なことは、その事を示唆している。また、Yファイラーポリメラーゼ群は、相互に作用することで、ゲノム損傷の種類によりポリメラーゼdから損

傷乗り越え型のポリメラーゼと入れ替わりDNA合成を継続するポリメラーゼスイッチ機構を構成している可能性が示唆されている。この様にREV1の関与する損傷乗り越えDNA合成機構は、様々なゲノム損傷に対応しゲノムを防護しその恒常性を維持する複雑な生体応答システムの一つであり、その全体像の解明と発がんとの関係は今後に残された大きな課題である。今後、REV1を含め「誤りがちなDNA合成」機構の解明を進め、放射線発がんに於ける役割を明らかにしたい。

## E. 結論

放射線被ばくが誘発するゲノム損傷の修復機構における損傷乗り越えDNA合成の関与と放射線発がんにおける役割を明らかにするため、損傷乗り越えDNA合成機構の中心的役割を担うREV1の細胞生物学的な機能解析を行った。テトラサイクリンのno/offによりREV1の発現量を制御できる細胞株を樹立した。この細胞を用いて放射線照射やMNUで処理した後の細胞生存率を検討した。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。一方、*Rev1*を過剰発現させたマウスでは突然変異頻度と発がん率が上昇する。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る。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Tomida, J., Masuda, Y., Hiroaki, H., Ishikawa, T., Song, I., Tsurimoto, T., Tateishi, S., Shiomi, T., Kamei, Y., Kim, J., Kamiya, K., Vaziri, C., Ohmori, H., Todo, T. DNA damage induced ubiquitylation of RFC2 subunit of RFC complex. *J. Biol. Chem.*, 283(14): 9071-9079, 2008
- 朴金蓮, 増田雄司, 神谷研二. ヒトREV1による損傷乗り越えDNA合成の生化学的解析. *広島医学*, 3; 61(4): 338-339,

2008.

- 顧永清, 増田雄司, 神谷研二. ヒトDNAヘリカーゼPIF1の機能解析. *広島医学*, 3; 61(4): 346-347, 2008.
- Uehara, Y., Ikehata, H., Komura, J., Ito, A., Ogata, M., Itoh, T., Hirayama, R., Furusawa, Y., Ando, K., Panuesku, T., Woloschak, E. C., Komatsu, K., Matsuura, S., Ikura, T., Kamiya, K., and Ono, T. Absence of Ku70 Gene Obliterates X-Ray-Induced lacZ Mutagenesis of Small Deletions in Mouse Tissues. *Radiation Research*, 170(2): 216-223, 2008
- 増田雄司, 神谷研二. 誘発突然変異と損傷乗り越えDNA合成—REV1の構造と生化学的機能—. *生化学*, 9: 80(9): 843-846, 2008
- Gu, Y. Q., Masuda, Y., Kamiya, K., Department of Experimental Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University: Biochemical analysis of human PIF1 helicase and functions of its N-terminal domain. *Nucleic Acids Research*, 36: 6295-6308, 2008
- 豊島めぐみ, 神谷研二, 丹波太貫. S期チェックポイント機構における最近の知見. *放射線生物研究*; 43(3): 223-235, 2008

### 2. 学会発表

- 顧永清, 増田雄司, 神谷研二: Analysis of annealing activity of human PIF1 helicase. 第4回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス, 長崎, 2008.6.7.
- 豊島めぐみ, 習陽, 久保圭, 増田雄司, 本田浩章, 神谷研二: 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, 長崎, 2008.6.8. (抄録, p.41, 2008)
- 朴金蓮, 増田雄司, 神谷研二: REV1のdCMP転移活性の生化学的解析. 第49回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2008.6.8. (抄録, p.41, 2008)
- 顧永清, 増田雄司, 神谷研二: Analysis of annealing activity of human PIF1 helicase. 第49回原子爆弾後障害研究会, 長崎,

2008.6.8. (抄録, p.42, 2008)

5. 増田雄司, 神谷研二: RAD6-RAD18によるPCNAのユビキチン化とポリメラーゼ交換反応の分子機構. 変異機構研究会・第21回夏の学校, 小牧, 2008.6.14-15. (講演要旨集, p.5, 2008)
6. 豊島めぐみ, 習陽, 本田浩章, 柿沼志津子, 島田義也, 増田雄司, 神谷研二: 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の発がんにおける役割. 変異機構研究会・第21回夏の学校, 小牧, 2008.6.14-15. (講演要旨集, p.6, 2008)
7. 増田雄司, 神谷研二: 損傷乗り越えDNA合成を制御するPCNAのモノユビキチン化反応の解析. 第33回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2008.7.30. (プログラム, p.3, 2008)
8. 豊島めぐみ, 習陽, 久保圭, 三家本隆宏, 濱崎幹也, 楠 洋一郎, 本田浩章, 増田雄司, 渡邊敦光, 神谷研二: 放射線がん, 化学発がんにおける損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の寄与. 第33回中国地区放射線影響研究会, 広島, 2008.7.30. (プログラム, p.3, 2008)
9. 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, 名古屋, 2008.9.3-5. (プログラム 予稿集, p.97, 2008)
10. 増田雄司: RAD6-RAD18によるPCNAのユビキチン化のメカニズムとポリメラーゼ交換反応. 国立遺伝学研究所研究集会, 静岡県三島市, 2008.10.6-7. ()
11. 増田雄司, 朴金蓮, 神谷研二: 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, 名古屋, 2007.10.28-30. (抄録集, p.159, 2008)
12. 豊島めぐみ, 本田浩章, 増田雄司, 渡邊敦光, 柿沼志津子, 島田義也, 神谷研二: 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, 名古屋, 2007.10.28-30. (抄録集, p.178, 2008)
13. 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. 日本放射線影響学会第51回大会, 北九州, 2008.11.19-21. (講演要旨集, p.87, 2008)

14. 豊島めぐみ, 習 陽, 本田浩章, 濱崎幹也, 楠 洋一郎, 渡邊敦光, 増田雄司, 神谷研二: 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. 日本放射線影響学会第51回大会, 北九州, 2008.11.19-21. (講演要旨集, p.109, 2008)
15. Toyoshima, M., Xi, Yang., Honda, H., Masuda, Y., Kakinuma, S., Shimada, Y., Kamiya, K.: The Role of Rev1 in Tumorigenesis. International Workshop on Radiation Health Effects Research -47th ISTC Japan Workshop-, 長崎, 2008.12.1-2. (講演要旨集, p.5, 2008)
16. 増田雄司: ヒト複製後修復経路における損傷乗り越えDNA合成反応の生化学的解析. 第3回放射線防護研究センターシンポジウム, 千葉, 2008.12.16-17. (抄録, p.9, 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

## 化学療法感受性を既定する分子機構の解明

分担研究者 宮川 清 東京大学大学院医学系研究科

**研究要旨** 放射線発がんの分子機構を解明するためには、放射線の生体への作用の中でも最も重篤なDNA二重鎖切断に対する修復機構の理解を必要とする。DNA二重鎖切断は放射線のみならず、シスプラチンを代表とするDNA架橋作用を有する抗がん剤でも誘導されるために、これに対する修復機構の解析は、放射線治療と化学療法の両方の感受性を制御する機構の解明へと応用することが期待される。正常組織では生殖細胞のみに発現し、体細胞ではがん細胞においてのみ発現することで定義されるがん精巣抗原の候補であるSYCP3の体細胞における機能を解析した結果、この分子はDNA二重鎖切断に対する修復機能の中でも相同組換え修復を特異的に抑制することによって、染色体不安定性と放射線およびDNA架橋剤に対する感受性を制御することが明らかとなった。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。この遺伝子をヒト正常上皮由来の細胞に導入したところ、染色体の数的異常の増加と、放射線およびシスプラチンに対する感受性の亢進が認められた。このような感受性亢進のパターンは相同組換え修復の機能低下時に観察されることが知られているために、その中心的役割を果たすRad51のDNA損傷部位への集積機能を検討したところ、SYCP3発現細胞ではその頻度が有意に低下していた。これらの結果より、SYCP3は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る可能性が示唆された。

### A. 研究目的

放射線の生体への作用で最も重篤なDNA二重鎖切断は、放射線のみならず多くの抗がん剤でも誘導される。そのために、そのDNA損傷に応答する生体機構を理解することは、放射線治療と化学療法の両方の感受性を制御する機構の解明へと発展することが期待されている。このDNA二重鎖切断は、主として非相同性断端結合と相同組換え修復の2つの経路によって修復される。前者は放射線によるDNA切断を比較的単純な機構によって特異的に修復するのに対して、後者は放射線と抗がん剤の各々によるDNA切断を極めて複雑な機構によって修復する。その中でも、シスプラチンを代表とするDNA架橋剤によるDNA損傷に対しては重要な役割を果たすことが知られている。そのために、本研究は、相同組換え修復を制御する複雑な分子機構を解析することによ

って、放射線治療と化学療法の個別化治療の開発を目指すものである。

既に、相同組換え修復においては、Rad51がDNA二重鎖切断部位に集積して組換えの初期過程を制御し、中心的な役割を果たすことが知られている。この反応においては、BRCA2がRad51と直接結合して、損傷部位への移動を仲介する。また、Rad51と構造的に類似する5つのRad51 paralogも、この初期過程を補助するものと考えられている。これらの分子は正常組織においてはどこにも発現しているために、その機能が正常細胞のDNA修復において重要であることは確立している。それに対して、がん細胞においては、一部のがんにおいてこれらの発現レベルの異常が報告されているにすぎず、がん細胞における相同組換えの実態はまだ不明である点が多い。

相同組換えは、生殖細胞と体細胞では共

通する経路と異なる経路によって制御される。がん研究においては、これまで体細胞における相同組換えの解析が行われてきたが、がん精巣抗原の一部が生殖細胞における相同組換えに関与する分子があることが報告されているために、このような分子のがん細胞における相同組換えに対する影響を検討する必要がある。生殖細胞における組換えの特徴は、父方と母方の染色体同士が次世代の個の多様性を作り出すために互いに組換えをすることである。このような相同染色体が組換えをおこなうためには、本来は位置的には離れているこれらをつなぎとめる構造が必要である。Synaptonemal complexはこの役割を果たす生殖細胞に特異的な構造であり、がん精巣抗原として報告されているSYCP1はこの構造を構成する一つの分子である。そこで、本研究では、同じ構造を形成するSYCP3に着目し、そのがん精巣抗原としての役割を体細胞において解析することによって、その放射線治療と化学療法感受性予測マーカーとしての可能性を検討することを目的とする。このような方法によって、がんの個別化医療に応用できる新しい情報を発見することを目指す。

## B. 研究方法

ヒト正常およびがん由来の細胞株を用いてSYCP3の発現を解析することによって、最初にこの分子が、がん精巣抗原であることの確認を行う。

次に、発現が認められない正常細胞にSYCP3発現ベクターを導入することに、外来性に発現する細胞を作製する。この細胞と非発現細胞を用いて、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する。また、染色体不安定性の解析は、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行う。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する。

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うことによって、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する。Rad51の機能に影響が認められた場合には、相同組換え経路においてその上

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する。

以上の外来性発現の系で、有意な結果が得られた場合には、SYCP3が発現しているがん細胞株においてsiRNAを用いたRNA干渉によるノックダウンの実験を行う。この系において同様にRad51とその周辺の分子の機能を、DNA損傷依存性フォーカス形成によって検討する。

二つの実験系によって、Rad51の機能に影響がみられた場合には、これらの分子の発現量をウェスタン・ブロット法によって解析し、その分子機序を考察する。

### (倫理面への配慮)

既に株化された市販のがん細胞を用いた研究であるために、倫理面での特別な配慮の必要性はない。

## C. 研究結果

ヒト各種がん細胞株では15細胞中7細胞において、コントロールである精巣と比べて低いレベルのSYCP3の発現が認められた。正常乳腺上皮細胞と網膜上皮細胞では発現が認められなかった。そこで、SYCP3発現ベクターを正常網膜上皮細胞に導入し、がん細胞と同じレベルの発現細胞を作製した。

SYCP3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。染色体数については、正常の2つの染色体数以外の数を異数体と定義して、その頻度が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おり、SYCP3の発現によってDNA二重鎖切断と染色体不安定性が誘導されていることが示唆された。

以上の結果より、SYCP3の正常体細胞での異所性発現は、相同組換えに影響を与えることによって染色体不安定性を誘導する可能性が示唆されたために、その発現のRad51のDNA損傷部位への集積機能への影響を解析した。最初に、COS7細胞においてタグ付のSYCP3を一過性に発現することによって放射線照射後のRad51のフォーカス形成を検討したところ、タグに対する抗体で認識されるSYCP3発現細胞ではフォーカス形成が有意に低下していた。次に、正常網膜上皮細胞において安定してSYCP3を発

現する系においても、同様の結果が得られた。これらの実験系において、Rad51の周辺ではたらく分子のフォーカス形成を検討したところ、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。

Rad51とBRCA2は直接結合して複合体を形成するために、SYCP3はこの複合体の機能を特異的に抑制するものと考えられた。そこで、これらの蛋白質の発現量を解析したところ、Rad51の量には変化が観察されなかったのに対して、BRCA2の量の低下が観察された。この低下がどのレベルに由来するものであるのかを解析するために、RNAの量を解析したところ、変化は観察されなかったために、転写以降のレベルでのBRCA2の量の低下がSYCP3によって誘導されるものと考えられた。

これらの結果を確認するために、これらの実験の逆の実験として、SYCP3が発現している肝癌細胞株HepG2において、RNA干渉によりノックダウン細胞を作製した。放射線照射後のRad51のフォーカス形成は、SYCP3の発現を低下させることによって、有意に上昇した。この結果は、SYCP3がRad51の機能を抑制する結果に矛盾しない。

#### D. 考察

本研究により、SYCP3はがん精巣抗原であることが確認され、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。既にがん精巣抗原は40以上同定されているが、その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、初めての例となる。

がん精巣抗原はそれらの遺伝子がX染色体上に存在する場合としない場合で2つに分類される。前者の遺伝子が発現する機構としては、がん細胞における低メチル化の関与がほぼ確立している。すなわち、生殖細胞では低メチル化により発現しているこれらの遺伝子は、体細胞ではメチル化によって発現が抑制されている。ところが、が

ん組織ではメチル化の異常によって低メチル化している部位においては、正常では抑制されていた遺伝子が発現することになる。SYCP3は非X染色体によってコードされるために、以上の発現機構はそのままではまるわけではないが、同じ機序によって発現が誘導される可能性は十分にある。SYCP3の発現により放射線やシスプラチンが効きやすくなるため、もし低メチル化が発現を誘導するのであれば、メチル化阻害剤によりこれらの治療を増感することも可能となるであろう。

BRCA2は遺伝性乳癌や卵巣癌において遺伝子変異により機能低下をきたしていることが知られている。ところが、非遺伝性のがんにおいては、変異は稀であるために、乳癌と卵巣癌に限っても、その異常の頻度は5%以下と低いレベルである。ましてや、がん全体においてはその頻度はかなり低いものと考えられる。ところが、本研究で明らかになったように、遺伝子変異は存在しなくても、他の分子の影響によって発現が低下する例がかなりの頻度で存在することが想定される。このような腫瘍は放射線やシスプラチンに対する感受性が高いために、このような症例に対しては、他の治療よりもこれらの治療の方が有効であることも十分に想定される。

今後の応用研究を考える場合に重要になるのは、いかにSYCP3の発現を抽出組織において正確に評価するかである。本研究では、発現解析においてRT-PCRとウェスタン・ブロット法を用いたが、感度は前者の方が高かった。もしよりよい抗体が存在すれば、蛋白質レベルでの評価法も感度が向上するものと考えられる。このような発現レベル測定と放射線やシスプラチン治療による有効性を正確に検討する応用研究が次の段階で必要とされる。

#### E. 結論

がん精巣抗原の一つとしてSYCP3を同定し、そのがん細胞における発現は、Rad51-BRCA2を標的として相同組換えによる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、染色体不安定性とDNA損傷性のがん治療への感受性が亢進するために、一つの分子の発現が発がんの初期過程と治要の有効性とに寄与している

ことになる。このように、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って、その成果はがんの個別化治療の推進に大きく貢献する可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tomoda Y, Katsura M, Okajima M, Hosoya N, Kohno N and Miyagawa K. Functional evidence for Emel as a marker of cisplatin resistance. *Int J Cancer*, in press.

Hosoya N and Miyagawa K. Clinical importance of DNA repair inhibitors in cancer therapy. *Magazine of European Medical Oncology*, in press.

Sarai N, Kagawa W, Fujikawa N, Saito K, Hikiba J, Tanaka K, Miyagawa K, Kurumizaka H and Yokoyama S. Biochemical analysis of the N-terminal domain of human RAD54B. *2008 36: 5441-5450.*

Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M and Tauchi H. Current topics in DNA double-strand break repair. *J Radiat Res* 2008 49: 93-103.

Enomoto A and Miyagawa K. How to cope with DNA damage induced by ionizing radiation and anti-cancer drugs? *Progress of Theoretical Physics (supple)* 2008 173: 109-123.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yasui W, Sentani K, Sakamoto N, Motoshita J and Oue N	Histological and serological tumor markers of gastric cancer	Dan Hellberg M	Histological and serological tumor markers and their clinical usefulness in cancer: Cancer of the breast, lung, esophagus, stomach, pancreas, liver, colon, rectum, anus, skin, urinary bladder, prostate, ovary, uterus and uterine cervix	Nova Publishers	New York		in press

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasui W, Oue N, Sentani K, Sakamoto N and Motoshita J	Transcriptome dissection of gastric cancer: Identification of novel diagnostic and therapeutic targets from pathology specimens (review article)	Pathol Int	59	121-136	2009
Noguchi T, Oue N, Wada S, Sentani K, Sakamoto N, Kikuchi A and Yasui W	h-Prune is an independent prognostic marker for survival in esophageal squamous cell carcinoma	Ann Surg Oncol	in press		2009 Sep 26; [Epub ahead of print]
Yamamoto H, Kitadai Y, Yamamoto H, Oue N, Ohdan H, Yasui W and Kikuchi A	Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells	Gastroenterol	in press		2009
Oue N, Sentani K, Sakamoto N, Motoshita J, Nishisaka T, Fukuhara T, Matsuura H, Sasaki H, Kanachi K and Yasui W	Characteristic gene expression in stromal cells of gastric cancer among atomic-bomb survivors	Int J Cancer	124	1112-1121	2009

Hayashi T, Matsubara A, Ohara S, Mita K, Hasegawa Y, Usui T, Arihiro K, Norimura S, Sentani K, Oue N and Yasui W	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
Kuniyasu H, Oue N, Sasahira T, Yi L, Moriwaka Y, Shimomoto T, Fujii K, Ohmori H and Yasui W	Reg IV enhances peritoneal metastasis of gastric carcinomas	Cell Proliferat	42	110-121	2009
Kodama M, Kitadai Y, Tanaka M, Kuwai T, Tanaka S, Oue N, Yasui W and Chayama K	Vascular endothelial growth factor C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms	Clin Cancer Res	14	7205-7214	2008
Sentani K, Oue N, Sakamoto N, Arihiro K, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W	Gene expression profiling with microarray and SAGE identifies PLUNC as a marker for hepatoid adenocarcinoma of the stomach	Modern Pathol	21	464-475	2008
Sentani K, Oue N, Sakamoto N, Nishizaka T, Fukuhara T, Arihiro K, Ochiai A and Yasui W	Immunohistochemical staining for Reg IV and claudin-18 is useful in the diagnosis of gastrointestinal signet ring cell carcinoma	Am J Surg Pathol	32	1182-1189	2008
Miyagawa K, Sakakura C, Nakashima S, Yoshikawa T, Fukuda K, Kin S, Nakase Y, Shimomura K, Oue N, Yasui W, Hayashizaki H, Okazaki Y, Yamagishi H, Hagiwara A and Otsuji E	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
Ossandon F, Villarroel C, Aguayo F, Santibanez E, Oue N, Yasui W and Corvalan AH	In silico analysis of gastric carcinoma serial analysis of gene expression libraries reveals different profiles associated with ethnicity	Mol Cancer	7	22	2008 Feb 27
Ohara S, Oue N, Matsubara A, Mita K, Hasegawa Y, Hayashi T, Usui T, Amaty VJ, Takeshima Y, Kuniyasu H and Yasui W	Reg IV is an independent prognostic factor for relapse in patients with clinically localized prostate cancer	Cancer Sci	99	1570-1577	2008

Fujii K, Sasahira T, Moriwaki Y, Oue N, <u>Yasui W</u> and Kuniyasu H	Protection of telomeres 1 protein levels are associated with telomere length in gastric cancer	Int J Mol Med	21	599-604	2008
The Study Group of Millennium Genome Project for Cancer ( <u>Yasui W</u> )	Genetic variation of PSCA gene is associated with a susceptibility to diffuse-type gastric cancer	Nature Genet	40	730-740	2008
Sasahira T, Kirita T, Oue N, Bhawal UK, Tamamoto K, Fujii K, Ohmori H, Luo Y, <u>Yasui W</u> , Bosserhoff A and Kuniyasu H	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
Sentani K, Oue N, Sakamoto N, Fukuhara T, Matsuura H and <u>Yasui W</u>	Positive immunohistochemical staining of gamma-H2AX is associated with tumor progression in gastric cancers from radiation-exposed patients	Oncol Rep	20	1131-1136	2008
Terada K, Okochi-Takada E, Akashi-Tanaka S, <u>Miyamoto K</u> , Taniyama K, Tsuda H, Asada K, Kaminishi M, Ushijima T	Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancers	Carcinogenesis	in press		2009
Kawasaki A, Hayashi T, <u>Nakachi K</u> , Trosko JE, Sugihara K, Kotake Y, Ohta S	Modulation of connexin43 on a rotenone model of Parkinson's disease	Neuroscience	in press		2009
<u>Hamatani K</u> , Eguchi H, Ito R, Mukai M, Takahashi K, Taga M, Imai K, Cologne JB, Soda M, Arihiro K, Fujihara M, Abe K, Hayashi T, Nakashima M, Sekine I, <u>Yasui W</u> , Hayashi Y and <u>Nakachi K</u>	<i>RET/PTC</i> rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose	Cancer Res	68	7176-7182	2008
Yoshida K, Kubo Y, <u>Kusunoki Y</u> , Morishita Y, Nagamura H, Hayashi I, Kyoizumi S, Seyama T, <u>Nakachi K</u> and Hayashi, T	Caspase-independent cell death without generation of reactive oxygen species in irradiated MOLT-4 human leukemia cells	Cellular Immunol	in press		2008 Dec 8. [Epub ahead of print]
Yuasa Y, Nagasaki H, Akiyama Y, Takizawa T, Kojima, K, Kawano T, Sugihara K, Imai K and <u>Nakachi K</u>	DNA methylation status is inversely correlated with green tea intake and physical activity in gastric cancer patients	Int J Cancer	in press		2008 Dec 18. [Epub ahead of print]

<u>Nakachi K</u> , Hayashi T, <u>Hamatani K</u> , Eguchi H and <u>Kusunoki Y</u>	Sixty years of follow-up of Hiroshima and Nagasaki survivors: Current progress in molecular epidemiology studies	Mutat Res	659	109-117	2008
Ohara M, Hayashi T, <u>Kusunoki Y</u> , <u>Nakachi K</u> , Fujiwara T, Komatsuzawa H and Sugai M	Cytotoxic distending toxin induces caspase-dependent and -independent cell death in MOLT-4 cells	Infect Immun	76	4783-4791	2008
Santen RJ, Song RX, Masamura S, Yue W, Fan P, Sogon T, Hayashi S, <u>Nakachi K</u> and 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
Tamakoshi A, <u>Nakachi K</u> , Ito Y, Lin Y, Yagyu K, Kikuchi S, Watanabe Y, Inaba Y and 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]
Sueoka-Aragane N, Imai K, Komiya K, Sato A, Tomimasu R, Hisatomi T, Sakuragi T, Mitsuoka M, Hayashi S, <u>Nakachi K</u> and Sueoka E	Exon 19 of EGFR mutation in relation to the CA-repeat polymorphism in intron 1	Cancer Sci	99	1180-1187	2008
Members of Asia Pacific Cohort Studies Collaboration, <u>Nakachi K</u>	Cigarette smoking, systolic blood pressure, and cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region	Stroke	39	1694-1702	2008
Kanzaki H, Ouchida M, Hanafusa H, Yamamoto H, Suzuki H, Yano M, Aoe M, Imai K, Date H, <u>Nakachi K</u> and 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
Kusunoki Y and <u>Hayashi T</u>	Long-lasting alterations of the immune system by ionizing radiation exposure: Implications for disease development among atomic bomb survivors	Int J Radiat Biol	84	1-14	2008
<u>Nishi N</u> , Sugiyama H, Hsu WL, Soda M, Kasagi F, Mabuchi K and Kodama K	Differences in mortality and incidence for major sites of cancer by education level in a Japanese population	Ann Epidemiol	18	584-591	2008