

200924004A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安井 弥
平成22年（2010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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安井 弥

平成22年（2010年）年4月

目 次

I. 総括研究報告	
放射線障害に基づく固形がん発生の分子機構の解明とその予防・治療への応用に関する研究 -----	1
安井 弥	
II. 分担研究報告	
1. 遺伝子発現解析による放射線関連固形がんの特異的な遺伝子の同定 -----	13
安井 弥	
2. 放射線障害に基づく乳がん発生の新たな分子機構の解明 -----	19
宮本和明	
3. 原爆被爆者に発生した固形がんの分子腫瘍学的研究 -----	22
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 林 奉権 -----	27
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 楠 洋一郎 -----	33
6. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析 -----	37
小笹晃太郎／西 信雄	
7. 放射線発がんにおけるゲノム修復機構の解析 -----	41
神谷研二	
8. 化学療法感受性を規定する分子機構の解明 -----	47
宮川 清	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	56

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

研究代表者 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、被爆者胃がんでは、miR-21, miR-24, miR-34aを含む32種類のmiRNAが発現亢進していることを見だし、CAST法による遺伝子発現解析では新たに胃がんの特異性の高い6遺伝子を同定した。乳がんにおいて*ASCL1*のDNAメチル化異常を同定し、また、HE2陽性乳がんを高発現するmiR-221, hsa-miR-100など5種類のmiRNAが乳がん患者血液中でも検出できることを示した。成人甲状腺乳頭がんでは*ALK*遺伝子再配列を新たに同定し、被曝線量と相関することを見いだした。分子疫学的研究において、肺がんでは、*EGFR* CA繰り返し多型のShort遺伝子型が高い肺がんリスクを示すこと、Long遺伝子型は被曝放射線量に伴って肺がんリスクが増加することを明らかにした。また、1 Gy 以上の高線量被曝群では*P53BP1*のハプロタイプの違いによって*GPA*突然変異頻度に有意差がみられ、放射線による遺伝子障害感受性の個人差に関わる可能性が示唆された。疫学的解析からは、原爆放射線が長期的に固形がんによる死亡リスクを高めていることが示され、部位による影響の違いも確認された。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、*REV1*は損傷乗り越えDNA合成機能により細胞を死から回避させるが、その代償として突然変異頻度を上昇させ、発がんに関与する可能性が示された。また、がん精巢抗原*SYCP3*が*BRCA2*と結合することによって、*RAD51*のDNA二重鎖切断部位への集積機能を阻害し、相同組換え機能を抑制することから、感受性予測マーカーともなり得ることを見いだした。本成果は、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のみならず、一般集団に発生する固形がんの個別化診断・治療の進展にも貢献するものである。

研究分担者

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

林 奉権

(財)放射線影響研究所・室長

楠 洋一郎

(財)放射線影響研究所・副部長

西 信雄／小笹晃太郎

(財)放射線影響研究所・副部長／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を解明し、それに基づいてリスク評価や診断・治療法の開発を行なうことは、被曝者医療の向上、職業・医療被曝の管理の推進に資するものである。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、それぞれ分子病理学的、分子疫学的、分子生物学的アプローチにより検討し、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、職業被曝や医療被曝等による放射線障害に対す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法・治療法を提示することが可能となる。さらに、ゲノム障害応答・修復機構に関する研究は、放射線治療や抗がん剤感受性診断への応用につなげることでもできる。

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における miRNA の発現解析: ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織と新鮮凍結試料における miRNA 発現の比較は定量的 RT-PCR 法で検討した。被曝者に発生した胃がんの miRNA の発現は、リアルタイム PCR システム) を用い、384 種類のヒト miRNA を網羅的且つ定量的に解析した。対象は、放射線影響研究所の Life Span Study (LSS) 集団に発生した胃がんであり、被曝群

(16-1062mGly) と対照群 (0mGly) の FFPE 切片を使用した。

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: 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。発現の検証は、定量的 RT-PCR, western blot, 免疫染色で行ない、一部については機能解析を行なった。

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

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を対象に、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。

乳がんにおける新規 miRNA 発現異常の探索: miRNA の血液臨床検体での検出を試みた。また、HER2 陽性ホルモン受容体陰性乳がんに着目し、ホルモン受容体陽性乳がんとの間でアレイ解析を行い、HER2 陽乳がんに関連する miRNA 異常の同定を試みた。

乳がんにおける転写因子 OCT4 の発現解析: OCT4 の乳がんにおける発現について蛋白質レベルで検討した。

3. 原爆被曝者に発生した固形がんの分子腫瘍学的解析 (濱谷)

原爆被曝者に発生した成人甲状腺乳頭がん (被曝線量=0 mGy の非被曝者 26 例, 被曝線量>0 mGy の被曝者 79 例) および大腸がん (非被曝者 16 例, 被曝者 35 例) を対象とし、FFPE 組織試料を用いた。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。ALK 遺伝子の再配列はエクソン 20 とパートナー遺伝子の 5' 領域との結合により構成されるので、再配列のスクリーニングはキナーゼ領域 (K 領域) とエクソン 19 と 20 にまたがる領域 (W 領域) をそれぞれ RT-PCR 増幅し、K 領域の PCR 産物と W 領域の PCR 産物と

の比の値が 2.2 以上を示す試料を *ALK* 再配列陽性とした。*MLH1* 蛋白の発現は、免疫染色で検討した。

2) 放射線による固形がんの遺伝的発がん感受性の個体差の解析とリスク評価

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

放影研の成人健康調査 (AHS) コホートに基づき、1982 年以降に肺がん罹患した 124 例を症例群とし、同コホートから 2,160 人のサブコホート群を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 712 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。*EGFR* 遺伝子第一イントロンに存在する CA 繰り返し数多型は、PCR による多型部位を含む DNA 断片の増幅とキャピラリー電気泳動を用いた Genescan 法 (Applied Biosystems) によって検討し、直接 DNA 配列決定法によって CA 繰り返し数を確認した。ケース・コホート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。DNA 修復遺伝子 (*ATM*, *NBS1* ならびに *P53BP1*) の多型は SNP を TaqMan-Allelic Discrimination 法を用いて解析し、ハプロタイプは linkage disequilibrium (LD) coefficients に基づいて推定した。本年度はまず、がんを発生していない 1,300 名について、DNA 修復遺伝子の多型と *GPA* 突然変異頻度との関連を調べた。関連分析には、対数変換した *GPA* 突然変異頻度を、性、年齢、都市、および推定骨髄被ばく線量 (DS02) で補正して用いた。*GPA* 突然変異頻度の SNP およびハプロタイプ間における差異は ANCOVA にて検討した。

3. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析 (西/小笹)

放影研の追跡集団対象者のうち、2002 年線量体系 (DS02) によって個人線量が推定されている 86,611 人について、生死および死因を 1950 年より 2003 年まで追跡した。死因別の死亡リスクは、過剰相対危険度 (excess relative risk; ERR) として算出した。地域、性、出生年 (被曝時年齢)、および観察期間中到達年齢の区別に求められた観察人年およびそこから死因別死亡数のデータから、ポアソン回帰によって各変数のパラメータを求め、ERR の点推定値およびその 95% 信頼区間を計算した。

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)

REV1 の発現を制御するため T-REx™ システム (Invitrogen) を使用した。pcDNA4/TO にヒト *REV1* cDNA を導入し、pcDNA4/TO-REV1 を作成した。pcDNA6/TR 導入ヒト繊維肉腫細胞 HT1080 に上記ベクターを導入した (HT1080-6TR)。同様に REV1 変異体発現ベクター pcDNA4/TO-REV1 (D569A/E570A) と pcDNA4/TO-REV1 (R357S) をヒト繊維肉腫細胞に導入した。これらを用いて、放射線/紫外線の照射または、*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) で処理した後の生存率を Clonogenic 法を用いて測定した。さらに、*HPRT* 遺伝子座における突然変異頻度の測定を行なった。

2. 化学療法感受性を既定する分子機構の解明 (宮川)

相同染色体間の組換えに関与する SYCP3 と DNA 二重鎖切断修復の中心を担う RAD51 の作用機構を解析した。核内におけるフォーカス形成は蛍光免疫法で解析した。Flag タグ SYCP3 を体細胞に発現させ細胞内局在を同定した。RAD51 等の相同組換え関連分子は、各々に対する特異的抗体を用い

て可視化した。SYCP3と共局在する分子については、直接結合する可能性を検討した。BRCA2は全体を11領域に分割し、各々の遺伝子断片をPCRによって単離し、N末端にHAタグを付加して発現ベクターを作成した。これを、FlagタグSYCP3の発現ベクターとともにCOS7細胞に導入し、抗体を用いた共沈実験を行なった。

(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)

新鮮凍結試料とFFPE試料における代表的miRNAの発現では、両者で一致した結果が得られた。被爆者に発生した胃がんのFFPE組織を用いmiRNAの発現解析を行なったところ、多くのmiRNAが被爆群と非被爆群において発現レベルが異なっていた。特に、100mGy以上の高線量被爆群において、miR-21, miR-24, miR-34a, miR-106a, miR-145を含む32種類のmiRNAが2倍以上に発現亢進していた。一方、CAST法による遺伝子発現解析で、胃がんの特異性の高い6遺伝子(PCDHB9, C4orf34, ADAM17, TMEM50B, ENPP4, SLC38A2)を見いだした。さらに、CD151, RFT1, CLDN7, DSC2なども胃がんを高発現していた。DSC2は、CDX2で発現が制御されることを確認した。

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

MS-RDA法により乳がんを高頻度にメチル化異常が認められる遺伝子として*ASCL1*を新規に同定した。そのメチル化異常は細胞株で75%、乳がん症例43%に検出された。miRNA解析では、HE2陽性乳がんを高発現するmiR-221, hsa-miR-100など5種類のmiRNAが乳がん患者血液中でも検出可能であった。また、新たにmiR-31, miR-130a, など8種のmiRNAの過剰発現を見いだした。OCT4の発現解析の結果、OCT4はホルモン受容体陽性乳がんの73%、HE2陽性乳がんの83%、トリプルネガティブ乳がんの全てに発現が認められた。即ち、比較的予後が良好なホルモン受容体陽性乳がんが発現亢進を認めない症例があることが示された。

3. 原爆被爆者に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、昨年度までに未検出の遺伝子変異を有する甲状腺乳頭癌に生じている遺伝子変異も放射線関連甲状腺発がん重要な役割を果たすことが示唆されていた。そこで、*ALK*遺伝子の再配列について解析したところ、非被曝群には全く認められなかったのに対し、被曝群19症例中10例に*ALK*再配列が認められ、被曝線量の増加とともにその相対頻度は有意に増加した。大腸がんに関する検討では、MSI-H (microsatellite instability-high)症例の80%で免疫染色でのMLH1蛋白発現が消失していることが明らかとなった。即ち、MLH1蛋白発現は*MLH1*遺伝子のメチル化状態だけでなくMSIとも密接に関連していた。

2) 放射線による固形がんの遺伝的発がん感受性の個体差の解析とリスク評価

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

肺がんのオッズ比リスクをケース・コホート研究によって、被曝放射線量カテゴリー別、*EGFR* CA繰り返し数多型別、また肺がん組織型別に評価し、コックス回帰モデルにより解析した。非被曝群においては*EGFR* CA繰り返し数多型のShort遺伝子型

と高い肺癌リスクに有意な関連が見いだされた。一方、Long遺伝子型を持つ人は、被曝放射線量に伴って肺癌リスクが増加し、高線量の放射線被曝の場合にはEGFR CA繰り返し数多型による肺癌リスクの違いはみられなくなった。肺癌の組織型別の解析の結果、腺がんでは非被曝群でShort遺伝子型と高いリスクに有意な関連が認められた。

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)

ATM および NBS1 遺伝子におけるSNPについては、GPA突然変異頻度との有意な関連性はなかった。P53BP1 遺伝子座には3箇所のSNP (非翻訳(U1k) SNP (T/G), Asp353Glu (G/C), Lys1136Gln (A/C))があり、LD解析により、ハプロタイプ TCA および GGC を推定した。この P53BP1 ハプロタイプ別に GPA 変異体頻度を解析した。1 Gy 未満の低線量被曝群ではハプロタイプによる GPA 変異体頻度の有意な違いは認められなかったが、1 Gy 以上の高線量被曝群では TCA/TCA ハプロタイプを有する被曝者にGPA 変異体頻度の有意な上昇 ($P = 0.012$) が認められた。原爆被曝者の放射線誘発 GPA 変異体頻度の個人差に P53BP1 遺伝子の多型が関係する可能性を示唆するものである。

3. 放射線被曝による固形がんの疫学的解析 (西/小笹)

対象の86,611人の内、追跡期間中に50,620人 (58%) が死亡し、過剰相対危険度は、総固形がん死亡で0.47/Gy (95%信頼区間: 0.38, 0.56), 食道がん0.46/Gy (同: 0.09, 0.95), 胃がん0.28/Gy (0.14, 0.42), 結腸がん0.54/Gy (0.23, 0.93), 直腸がん0.17/Gy (-0.17, 0.64), 肝がん0.36/Gy (0.18, 0.58) 胆のうがん0.45/Gy (0.10, 0.90), 膵がん0.08/Gy (-0.18, 0.44) であった。固形がん全体に対するリスク修飾効果は被曝時年齢が10歳増加で29%のリスク減少、到達年齢が年齢の-0.86乗であり、これらは有意であった。統計的に有意性を示す最小線量

範囲は0-0.20Gyであり、閾値の点推定値は0.0Gyで95%信頼区間上限は0.15Gyであった。

3) 放射線によるゲノム障害・修復からみた発がん機構の解明と治療感受性

1. 放射線発がんにおけるゲノム修復機構の解析 (神谷)

REV1を過剰発現した細胞株をMNU処理するとHPRT遺伝子座での突然変異頻度は上昇した。また、REV1 (D569A/ E570A)変異体過剰発現株は、その発現誘導によりMNU処理に対する生存率が上昇した。REV1 (R357S)変異体過剰発現株も同様に、テトラサイクリン添加によりMNUに対する生存率の上昇を示した。即ち、MNU処理後の細胞死の抑制には、REV1のポリメラーゼ活性は直接的には関与しなかった。一方、REV1 siRNAの導入によりREV1の発現を抑制した細胞株では、放射線や紫外線の照射により生存率とHPRT遺伝子座の突然変異頻度が有意に低下した。

2. 化学療法感受性を既定する分子機構の解明 (宮川)

SYCP3は核内においてフォーカスを形成しており、放射線照射による変化は明らかではなかった。RAD51及び関連する分子とSYCP3の関係を二重染色によって検討した。SYCP3とRAD51との共局在は観察されなかったが、乳がん抑制蛋白質として知られているBRCA2とSYCP3は核内において共局在することが判明した。次にこの二つの蛋白質が直接結合するかどうかを検討した。BRCA2は3,418アミノ酸から成る巨大な蛋白質であるために、全体を11領域に分割してCOS7細胞において一過性に発現する系を作成し、これらとSYCP3を共発現し、免疫沈降によって直接結合の存在を検討した。その結果、BRCA2のN末端近傍の約200アミノ酸からなる領域のみがSYCP3と直接結合することが明らかとなった。

D. 考察

放射線関連固形がんの特徴的なジェネテ

ニック・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の抽出を行なった。被爆者に発生した胃がんのFFPE組織を用いたmiRNA発現解析により、miR-21, miR-24, miR-34a, miR-145などが高線量被曝群で発現亢進していた。放射線関連胃がんに特徴的なmiRNA signatureである可能性がある。これらについては、強制発現およびノックダウンにより、放射線によるDNA傷害応答および変異頻度について検討し、その普遍性を検証することが重要である。一方、CAST法による発現解析によって、胃がんを高発現する遺伝子としてDSC2を同定した。DSC2は上皮の細胞間接着に重要な役割をもつDesmosomeの構成成分であり、われわれの食道、子宮頸部、肺、膀胱などの扁平上皮がんにおける検討でも高い陽性率が得られている。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解析でも発現亢進を示す遺伝子としても報告されている。CAST法から同定される遺伝子の機能について、モデル系を用いた解析および放射線傷害応答における関与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。

乳がんにおける検討で見いだしたASCL1は、basic helix-loop-helix familyに属する転写因子で増殖抑制的に作用し、主に神経系の分化に関与すると考えられている。ヒストンH3の脱アセチル化とメチル化を介して、WNTシグナル抑制遺伝子DKK1とE-cadherinを抑制することが知られており興味のもたれるところである。また、いくつかのmiRNAが血液などの臨床検体で検出可能であったことから、診断マーカーおよびサブタイプ分類マーカーとして有用である可能性が示唆された。従来の乳がん腫瘍マーカーがすべて陰性の症例においてこれらのmiRNAが検出されており、今後の臨床応用が期待できる。OCT4は幹細胞維持に関与する転写因子であり、本解析では特に悪

性度の高いサブタイプで高頻度発現が認められた。がん幹細胞の概念は、特に治療における薬物療法および放射線治療抵抗性を考える上で重要である。今後はOCT4の発現状態の違いが再発等に影響するか否かについて明らかにする必要がある。

今回の成人甲状腺がんの解析では、未検出の遺伝子変異を持つ(即ち、*RET*, *NTRK1*, *BRAF*および*RAS*遺伝子に変異を持たない)被爆者症例において、甲状腺がんではまだ報告されていない*ALK*遺伝子再配列が検出された。*ALK*再配列は放射線線量と関連することより、放射線関連成人甲状腺乳頭がんでは、*RET/PTC*再配列に加えて*ALK*遺伝子再配列もその発生に関与しているものと考えられる。今後、5'RACE法を用いて*ALK*再配列のDNA断片を単離することが必要である。また、*ALK*遺伝子再配列が*RET*, *NTRK1*, *BRAF*および*RAS*遺伝子の変異と相互排他的かどうかを明らかにすることも今後の課題である。

肺腺がんでは*EGFR*遺伝子の突然変異が多く観察され、*EGFR*シグナル経路がその発生に密接に関与していることが知られている。今回の研究の結果からは、日本人一般集団においても*EGFR*のCA繰り返し数多型が、肺腺がん感受性の一つの指標になり得ることが示唆される。即ち、*Long*遺伝子型を持つ人は、*Short*遺伝子型を持つ人に比べて低い肺腺がんリスクを持つと考えられる。一方、放射線に曝露した場合には*Long*遺伝子型を持つ人の肺腺がんリスクは有意に増加すると考えられることから、放射線被曝に対してより防御の指標となる。CA繰り返し数多型に加えて、*EGFR*遺伝子の突然変異を解析することで、より高精度な肺発がんリスクの評価システムを構築することができる可能性がある。

放射線による体細胞突然変異の個人差の遺伝的背景を模索するために、3種のDNA修復遺伝子の多型と*GPA*突然変異頻度の線量効果との関係を解析したところ、高線量被曝群で*P53BP1*のハプロタイプと有意な関連が認められた。*P53BP1*は、DNA損傷

応答においてP53と結合してDNA修復に関与し、ATM、ATR、BRCA1とも相互作用をすることが知られている。また、DNA 損傷部位に Mre11 および γ H2AXとともに集合体を形成し、修復タンパクの動員に関わる。P53BP1とP53 の結合は、P53が介在する転写の活性化と細胞周期の調節に作用することが示唆されている。したがって、遺伝子多型によってP53BP1のこれらの機能に個人差が生じ、放射線による遺伝子障害の修復に影響を及ぼした可能性が推測される。P53BP1 のSNP がいずれの機能の違いに影響を及ぼすかについては、今後の詳細な構造機能分析によって明らかにされるものである。

原爆被爆者の固形がんに関する疫学的解析からは、過去の研究に引き続いて原爆放射線が長期的に固形がんおよび主要な消化器系がんによる死亡リスクを高めていることが示され、部位による放射線の影響の違いも確認された。放射線被曝による固形がんの発生は、被曝後数十年を経て、対象者の加齢に伴うがん発生率上昇に上乘せされる形で過剰発生として認められる。放射線被曝によりがん抑制遺伝子1コピーの傷害が量反応関係でおこり、時を経てもう片方の1コピーの傷害によってがんを引き起こしていると考えられる。臓器による発がんリスクの違いは、失活するがん抑制遺伝子の放射線感受性と各臓器におけるその遺伝子の重要性とに関連すると思われるが、疫学研究の結果は生物学的知見との整合性のあるものでなければならない。

放射線被曝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、REV1の細胞生物学的な機能解析を行った。REV1を過剰発現した細胞株をMNU処理するとHPRT遺伝子座での突然変異頻度は上昇した。このREV1蛋白の過剰発現による突然変異頻度の上昇は、すでに明らかにしているRev1トランスジェニックマウスでのMNU投与によるT-cell receptorの突然変異頻度の上昇と一致するものである。

したがって、REV1は、損傷DNAを誤りがちなDNA合成により乗り越えてDNA合成を継続することで細胞死を回避するが、その代償として突然変異頻度を上昇させるものと考えられる。一方、siRNAによるREV1発現抑制系において、放射線や紫外線の照射により生存率とHPRT遺伝子座の突然変異頻度が有意に低下したことは、REV1の発現量がDNA損傷に対して損傷乗り越えDNA合成を介して細胞の生存率や突然変異の誘発に関与することを示唆するものである。

がん精巣抗原としても知られるSYCP3が、BRCA2と結合することによって、RAD51のDNA二重鎖切断部位への集積機能を阻害し、相同組換え機能を抑制することが明らかとなった。その結果として、染色体の数的な異常である異数体が増加することで代表されるような染色体不安定性が誘導され、また外的な放射線やDNA架橋剤などのDNA損傷に対する感受性が亢進することになる。これらの表現型は、がんの発生と治療の両方の領域において重要な情報である。既にBRCA2変異乳がんに対するpoly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤の有効性が明らかにされている。したがって、SYCP3はこのような新しい治療の感受性予測マーカーとして今後が期待される。このように、放射線発がんの研究は、分子機構の解析を詳細に行なうことによって、直接放射線に関係しないがんの新しい個別化治療のストラテジーを提唱することにも発展するものである。

E. 結論

本研究は、1) 放射線関連固形がんに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、胃がんおよび乳

がんのmicroRNA発現解析から、放射線被曝と関連して発現が変化するいくつかのmiRNAを同定した。また、成人甲状腺乳頭がんにおける*ALK*再配列を見いだした。分子疫学的には、肺がんの発生リスクに*EGFR*ハプロタイプが影響を及ぼすこと、放射線による遺伝子障害感受性の個人差に*P53BP1*ハプロタイプが関連することを見いだした。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*BRCA2*と共同し治療感受性の予測マーカーとなり得ることを明らかにした。本研究で得られた成果は、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のみならず、一般集団に発生する固形がんの個別化診断・治療の進展にも貢献するものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto H, Yasui W, et al. Wnt5a signaling is involved in aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* (in press)
2. Sakamoto N, Yasui W, et al. Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: *ADAMTS16* is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* (in press)
3. Sentani K, Yasui W, et al. Immunostaining of gastric cancer with neuroendocrine differentiation: Reg IV-positive neuroendocrine cells are associated with gastrin, serotonin, somatostatin and pancreatic polypeptide. *Pathol Int* (in press)
4. Ueda T, Yasui W, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 11:136-146, 2010
5. Seko N, Yasui W, et al. Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer. *Exp Ther Med* 1:73-78, 2010
6. Kuniyasu H, Yasui W, et al. Reg IV enhances peritoneal metastasis of gastric carcinomas. *Cell Proliferation* 42:110-121, 2009
7. Oue N, Yasui W, et al. Characteristic gene expression in stromal cells of gastric cancers among atomic-bomb survivors. *Int J Cancer* 124:1112-1121, 2009
8. 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
9. Noguchi T, Yasui W, et al. h-Prune is an independent prognostic marker for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 16:1390-1396, 2009
10. Yamamoto H, Yasui W, et al. Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion by gastric cancer cells. *Gastroenterol* 137:242-252, 2009
11. Noguchi T, Yasui W, et al. h-Prune is an independent prognostic marker for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 16:1390-1396, 2009
12. Yamamoto H, Yasui W, et al. Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion by gastric cancer cells. *Gastroenterol* 137:242-252, 2009
13. Oue N, Yasui W, et al. Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg IV is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients. *Int J Cancer* 125:2382-2392, 2009
14. Takano A, Yasui W, et al. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 69:6694-6703, 2009
15. Sugiyama H, Nishi N, Yasui W, et al. Incidence and survival of childhood cancer cases diagnosed 1998 and 2000 in Hiroshima city, Japan. *Asian Pac J Cancer Prev* 10:675-680, 2009
16. 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
17. Yasui W, et al. Meeting Report "Recent Progress in Pathogenesis and Management of Colorectal Cancer: The Eighteenth International Symposium of Hiroshima Cancer Seminar, November 2008". Cancer Sci 100:978-985, 2009
 18. Yasui W, et al. Histological and serological tumor markers of gastric cancer. In, Histological and serological tumor markers and their clinical usefulness in cancers, ed. By Dan Hellberg, Nova Science Publishers, New York, pp93-111, 2009
 19. Terada K, Miyamoto K, et al. Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancers. Carcinogenesis 30:466-71, 2009
 20. Iwase H, Miyamoto K, et al. Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. Breast Cancer (in press)
 21. Hamatani K, et al. Improved method for analysis of RNA present in long-term preserved thyroid cancer tissue of atomic-bomb survivors. Thyroid 20:43-49, 2010
 22. Kyoizumi S, Hayashi T, Kusunoki Y, et al. Memory CD4 T-cell subsets discriminated by CD43 expression level in A-bomb survivors. Int J Radiat Biol 86:56-62, 2010
 23. Yoshida K, Kusunoki Y, Hayashi T, et al. Lung cancer susceptibility among atomic-bomb survivors in relation to CA repeat number polymorphism of epidermal growth factor receptor gene and radiation dose. Carcinogenesis 30:2037-2041, 2009
 24. Kawasaki A, Hayashi T, et al. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of parkinson's disease. Neuroscience 160:61-68, 2009
 25. Hattori N, Hayashi T, et al. Changes of ROS during a Two-day Ultra-marathon Race. Int J Sports Med 30:426-429, 2009
 26. Yoshida K, Kusunoki Y, Hayashi T, et al. Caspase-independent cell death without generation of reactive oxygen species in irradiated MOLT-4 human leukemia cells. Clin Immunol 255:61-68, 2009
 27. Hamasaki K, Kusunoki Y, et al. Clonally expanded T lymphocytes from atomic bomb survivors in vitro show no evidence of cytogenetic instability. Radiat Res 172:234-243, 2009
 28. Kusunoki Y, Hayashi T, et al. T-cell immunosenescence and inflammatory response in atomic-bomb survivors. Radiat Res (in press)
 29. Richardson DB, Nishi N, et al. Positive associations between ionizing radiation and lymphoma mortality among men. Am J Epidemiol 169:969-976, 2009
 30. Richardson DB, Nishi N, et al. Ionizing radiation and leukemia mortality among Japanese atomic bomb survivors, 1950-2000. Radiat Res 172:368-382, 2009
 31. Shimizu Y, Nishi N, et al. Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003. BMJ 340, 2010 (doi:10.1136/bmj.b5349)
 32. Fukuda H, Kamiya K, et al. Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) in Vitro: Rev1 inserts dc opposite the lesion and DNA polymerase kappa potentially catalyzes extension reaction from the 3'-dc terminus. J Biol Chem 284:25585-25592, 2009
 33. Huang QM, Kamiya K, et al. Roles of POLD4, smallest subunit of DNA polymerase delta, in nuclear structures and genomic stability of human cells. Biochem Biophys Res Commun 391:542-546, 2010
 34. Piao JL, Kamiya K, et al. Specific amino acid residues are involved in substrate discrimination and template binding of human REV1 protein. Biochem Biophys Res Commun 392:140-144, 2010
 35. Masuda Y, Kamiya K, et al. DNA replication-coupled PCNA mono-ubiquitination and polymerase switching in a human in vitro system. J Mol Biol 396:487-500, 2010
 36. Katsura M, Miyagawa K, et al. The ATR-Chk1 pathway plays a role in the generation of centrosome aberrations induced by Rad51C dysfunction. Nucleic Acids Res 37:3959-3968, 2009

37. Takaku M, Miyagawa K, et al. Recombination activation function of the novel RAD51- and RAD51B-binding protein, human EVL. *J Biol Chem* 284:14326-14336, 2009
38. Sasano N, Miyagawa K, et al. Edaravone, a known free radical scavenger, enhances X-ray-induced apoptosis at low concentrations. *Cancer Lett* (in press)
- 2. 学会発表**
1. Oue N, Yasui W, et al. Olfactomedin 4 in combination with Reg IV have utility in the early detection of gastric cancer. The 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Denver, Colorado (USA), April 18-22, 2009
 2. Sakamoto N, Yasui W, et al. Induction of intestinal phenotype in gastric cancer by EGFR signaling. The 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Denver, Colorado (USA), April 18-22, 2009
 3. Yasui W. Identification of potential therapeutic targets in gastric cancer by basic and translational research – state of art lecture –. 8th International Gastric Cancer Congress, Lecture at Plenary session 1, Krakow (Poland), June 10-13, 2009
 4. Sentani K, Yasui W, et al. Usefulness of Reg IV and claudin-18 immunostaining in the diagnosis of gastrointestinal signet ring cell carcinoma. 8th International Gastric Cancer Congress, Krakow (Poland), June 10-13, 2009
 5. Anami K, Yasui W, et al. Identification of novel genes encoding secretory and transmembrane protein in gastric cancer using CAST method. 8th International Gastric Cancer Congress, Krakow (Poland), June 10-13, 2009
 6. 阿南勝宏, 安井 弥, 他. CAST法を用いた胃癌における分泌・膜蛋白の同定. 第98回日本病理学会総会, 5月1日-3日, 京都, 2009
 7. 大上直秀, 安井 弥, 他. 胃癌における olfactomedin 4の発現と, 血清腫瘍マーカーとしての意義. 第98回日本病理学会総会, 5月1日-3日, 京都, 2009
 8. 林 哲太郎, 安井 弥, 他. 扁平上皮癌の新規診断マーカーDSC 2の膀胱癌における発現と臨床病理学的検討. 第18回日本がん転移学会学術集会・総会, 2009, 7月23-24日, 旭川
 9. 安井 弥. 胃癌の組織像とオーミクス. 第6回日本病理学会カンファレンス「病理組織学の新展開」, レクチャー, 7月31日-8月1日, 筑波, 2009
 10. 阿南勝宏, 安井 弥, 他. CAST法で同定された胃癌における分泌・膜蛋白質の解析. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 11. 林 哲太郎, 安井 弥, 他. 分泌/膜貫通蛋白質のCAST法を用いた解析: CDONは前立腺癌で高発現している膜貫通蛋白である. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 12. 山本利枝, 安井 弥, 他. 原爆被爆者に発生した胃癌におけるTumor-associated macrophageの解析. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 13. 本下潤一, 安井 弥, 他. SAGE法を用いた食道扁平上皮癌における新規マーカーの同定. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 14. 多賀正尊, 安井 弥, 濱谷清裕, 他. 原爆被爆者で発生した非小細胞肺癌におけるがん関連遺伝子のDNAメチル化. 日本放射線影響学会第52回大会, 11月11-13日, 広島, 2009
 15. 阿南勝宏, 安井 弥, 他. 消化器癌の基礎と臨床: 胃癌-2: 胃癌におけるDSC2発現と腸型粘液形質との関連. 第20回日本消化器癌発生学会総会, ワークショップ4, 11月26-27日, 広島, 2009
 16. 伊藤玲子, 濱谷清裕, 安井 弥, 他. 消化器癌の基礎と臨床: 大腸癌-1: 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20回日本消化器癌発生学会総会, ワークショップ2, 11月26-27日, 広島, 2009
 17. 安井 弥. 新しい診断・治療標的の同定へのオーミクス解析によるアプローチ. 第20回日本消化器癌発生学会, 会長講演, 11月26-27日, 広島, 2009
 18. Miyamoto K. MicroRNAs in estrogen receptor-positive and -negative breast cancer cells. The 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research,

- Denver, Colorado (USA), April 18-22, 2009
19. 宮本和明. トリプルネガティブ乳癌におけるmicroRNAの発現異常. 第16回日本乳癌学会学術総会, 7月2-4日, 東京, 2009
 20. Miyamoto K. MicroRNA dysregulation in HER2-positive and -negative breast cancer. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 21. 濱谷清裕, 他. 原爆被爆者に発生した成人甲状腺乳頭がんの分子腫瘍学研究. 第34回ヨーロッパ甲状腺学会年次総会, 9月5-9日, リスボン (ポルトガル), 2009
 22. 濱谷清裕, 他. 原爆被爆者に発生した成人甲状腺乳頭がんの分子腫瘍学的解析. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 23. 高橋恵子, 濱谷清裕, 他. 原爆被爆者甲状腺乳頭がんにおける染色体再配列と *PIK3CA* 遺伝子増幅. 日本放射線影響学会第52回大会, 11月11-13日, 広島, 2009
 24. Hayashi T, Kusunoki Y, et al. IL-18 gene polymorphisms and colorectal cancer risk among atomic bomb survivors. The 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Denver, Colorado (USA), April 18-22, 2009
 25. Kusunoki Y. Immunological alterations in aging A-bomb survivors. Late Health Effects of Ionizing Radiation: Bridging the Experimental and Epidemiologic Divide, Georgetown, Washington DC (USA), May 4-6, 2009
 26. Kusunoki Y, Hayashi T, et al. Increases in the percentages of CD43-low memory and CD25+/CD127- regulatory T cells in the CD4 T-cell populations among A-bomb survivors. The 5th Kyoto T Cell Conference (KTCC) 2009 International Workshop on T Lymphocytes, Kyoto (Japan), June 1-4 June, 2009
 27. Hayashi T, Kusunoki Y, et al. Effects of IL-10 gene polymorphisms and atomic-bomb radiation exposure on risks of stomach and liver cancers. The 55th Annual Meeting of the Radiation Research Society, Georgia (USA), October 3-7, 2009
 28. Yoshida K, Hayashi T, Kusunoki Y, et al. Impact of ATM, ATR, NBS1 genetic polymorphisms on radiation-associated cancer risks in atomic-bomb survivors. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Telomere Biology and DNA Repair, Ashmore (Australia). October 9-10, 2009
 29. 大石和佳, 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. C型肝炎ウイルスのクリアランスと感染持続におけるHLA-DRB1対立遺伝子の影響. 第45回日本肝臓学会総会, 6月4-5日, 神戸, 2009
 30. 楠 洋一郎, 林 奉権, 他. 網状赤血球小核頻度解析による原爆被爆者造血系の放射線誘発遺伝的不安定性の評価. 第19回日本サイトメトリー学会学術集会, 6月20-21日, 松江, 2009
 31. 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. 原爆被爆者集団を対象とした結腸直腸がん感受性の分子疫学研究. がん予防大会2009 愛知, 6月16-17日, 名古屋, 2009
 32. 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. 炎症関連遺伝子多型と原爆放射線被ばくの胃および肝がん発症リスクに及ぼす影響. 第16回日本免疫毒性学会学術大会, 8月27-28日, 旭川, 2009
 33. 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. 炎症関連遺伝子多型および原爆放射線被曝が結腸・直腸がんリスクに及ぼす影響. 第18回日本組織適合性学会, 9月25-27日, 名古屋, 2009
 34. 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. IL-18遺伝子多型と放射線被曝に関連する原爆被爆者の大腸がんリスク. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 35. 濱崎幹也, 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. マウス造血系における炎症とゲノム不安定性. 第52回日本放射線影響学会, 11月11-13日, 広島, 2009
 36. 吉田健吾, 楠 洋一郎, 林 奉権, 他. C型肝炎ウイルス感染におけるNKG2D遺伝子多型の影響. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 12月2-4日, 大阪, 2009
 37. 楠 洋一郎, 林 奉権, 他. ヒト末梢血CD8TおよびNK細胞集団のNKG2D細胞表面発現に関係した遺伝子型. 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 12月2-4日, 大阪, 2009
 38. Grant EJ, 林 奉権, 西 信雄, 他. 健康な原爆被爆者における乳がんの血清リスクマーカーへの放射線の影響. 国際疫学会西太平洋地域学術会議兼第20回

- 日本疫学会学術総会, 1月9-10日, 越谷, 2009
39. 小笹晃太郎, 西 信雄, 他. Overview of mortality in the Life Span Study during 1950-2003. 第52回日本放射線影響学会, 11月11-13日, 広島, 2009
 40. Ozasa K, Shimizu Y, Nishi N, Soda M, Grant EJ, Sakata R, Sugiyama H, Nonaka Y, Kasagi F, Suyama A. Birth cohort effect on cancer mortality in Japan, 1950-2006. The Joint Scientific Meeting of IEA Western Pacific Region and the 20th Japan Epidemiological Association, Koshigaya (Japan), January 9-10, 2010
 41. Masuda Y, Kamiya K, et al. Reconstitution of DNA replication reactions with purified recombinant human proteins in vitro. 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2009), Seoul (Korea), May 17-20, 2009
 42. Toyoshima M, Kamiya K, et al. Function of Rev1 on Carcinogenesis induced by ionizing radiation and chemical agents. 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2009), Seoul (Korea), May 17-20, 2009
 43. 増田雄司, 神谷研二, 他. PCNAのユビキチン化反応の解析. 変異機構研究会・第22回夏の学校, 6月20-21日, 小牧, 2009
 44. 増田雄司, 神谷研二. PCNAのユビキチン化による損傷乗り越えDNA合成反応の制御機構. 第34回中国地区放射線影響研究会, 7月29日, 広島, 2009
 45. 豊島めぐみ, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1過剰発現が化学発がん, 放射線発がんに及ぼす影響. 第34回中国地区放射線影響研究会, 7月29日, 広島, 2009
 46. 増田雄司, 神谷研二. 損傷乗り越えDNA合成におけるポリメラーゼ交換反応の生化学的解析. 日本遺伝学会第81回大会, 9月16-18日, 松本, 2009
 47. 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生化学的解析. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 48. 豊島めぐみ, 神谷研二, 他. Rev1の過剰発現はMNUによる小腸腫瘍誘発を促進する. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 49. 福田博政, 神谷研二, 他. 発がん物質Ph 1 Pに対する細胞応答及同付加体部位での損傷乗り越えDNA修復の解析. 第68回日本癌学会学術総会, 10月1-3日, 横浜, 2009
 50. 増田雄司, 神谷研二, 他. ヒトRAD6-RAD18, MMS2-UBC13, HLTfによるPCNAのポリユビキチン化の分子機構. 第20回DNA複製・組換え・修復ワークショップ, 11月1-3日, 彦根, 2009
 51. 豊島めぐみ, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1過剰発現への寄与. 第20回DNA複製・組換え・修復ワークショップ, 11月1-3日, 彦根, 2009
 52. 増田雄司, 神谷研二. 複製後修復経路におけるDNAポリメラーゼ交換反応の生化学的解析. 第52回日本放射線影響学会, 11月11-13日, 広島, 2009
 53. 豊島めぐみ, 神谷研二, 他. 放射線発がん, 化学発がんにおける損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の役割. 第52回日本放射線影響学会, 11月11-13日, 広島, 2009
 54. 三家本隆宏, 楠 洋一郎, 神谷研二, 他. 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の放射線応答に対する影響. 第52回日本放射線影響学会, 11月11-13日, 広島, 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

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

研究代表者 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し特徴的な異常を見いだすことは、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ものである。本年度はまず、胃がんと非がん部胃粘膜におけるmicroRNA (miRNA)のマイクロアレイ解析において、胃がんで発現が亢進している22個のmiRNA、発現が低下している13個のmiRNAを同定し、さらに、組織型、進行度と相関するmiRNA signatureを見いだした。マイクロアレイと定量的RT-PCRでみたmiRNAの発現はよく相関するが、定量的RT-PCRの方が発現レベルの差がより明瞭に検出できることが分かった。また、新鮮凍結試料とホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 後の試料における代表的miRNAの発現では、両者で一致した結果が得られた。そこで、被爆者に発生した胃がん (被爆群と非被爆群) のFFPE組織を用いmiRNAの発現解析を行なったところ、多くのmiRNAが被爆群と非被爆群において発現レベルが異なっていた。特に、100mGy以上の高線量被曝群において、miR-21, miR-24, miR-34a, miR-106a, miR-145を含む32種類のmiRNAが2倍以上に発現亢進していた。これらは、放射線関連胃がんの特徴的miRNA signatureの可能性があり、症例を追加して検討する必要がある。一方、膜蛋白・分泌蛋白の網羅的遺伝子発現解析として、胃がんのCASTライブラリーの作成、シーケンスと定量的RT-PCRによる検証を行ない、胃がんに特異性の高い6遺伝子 (PCDHB9, C4orf34, ADAM17, TMEM50B, ENPP4, SLC38A2)を見いだした。さらに、CD151, RFT1, CLDN7, DSC2なども胃がんで高発現していた。DSC2は、CDX2で発現が制御され、食道扁平上皮がんの殆どでも陽性を示した。これら遺伝子の機能および放射線傷害との関連を解析することによって、放射線関連固形がんの診断・治療開発につながる。

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。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しており、さらにmicroRNA (miRNA)の遺伝子発現制御における重要性が注目されている。そこで、本研究では、CAST (Escherichia coli ampicillin secretion trap) 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miRNAの発現解

析を行ない、被曝線量を含む臨床・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) 被爆者に発生した胃がんにおけるmiRNAの発現解析

389種類のヒトmiRNAが解析できるマイクロアレイを用いて、182例の胃がんおよび非がん部胃粘膜組織におけるmiRNA発現を網羅的に解析した (Ohio State Univ.のT. Ueda博士との共同研究)。また同様に、組織型および臨床病理学的事項の詳細が判明している胃がんおよび正常胃粘膜組織に

ついて、188種類のヒト miRNA が解析できるマイクロアレイ (Genopal® MICH07 : human microRNA CHIP) を用いて網羅的発現解析を行なった。代表的 miRNA については、胃癌細胞株および胃癌組織凍結試料を用いて、マイクロアレイと定量的 RT-PCR によって、相関性を解析した。さらに、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織と新鮮凍結試料における miRNA 発現の比較は定量的 RT-PCR 法で検討した。

被爆者に発生した胃癌の miRNA の発現解析の対象は、放射線影響研究所の Life Span Study (LSS) 集団に発生した胃癌であり、被爆群 (16-1062mGly) と対照群 (0mGly) の FFPE 切片を使用した。miRNA の発現解析には、TaqMan® Human MicroRNA Array A (Applied Biosystems 社) の定量的 RT-PCR システム (7900HT Fast リアルタイム PCR システム) を用い、384 種類のヒト miRNA を網羅的且つ定量的に解析した。標的遺伝子の解析は、picTar および TargetScan を用いた。

2) 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

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法が開発されている (Cancer Res 65:8209, 2005)。そこで、本法を用いて胃癌細胞株、胃癌組織 (スキルス胃癌)、前立腺がん細胞株および正常胃粘膜組織と前立腺組織について解析した。シグナルシーケンスを欠損させたアンピシリン耐性遺伝子 (β -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。これらが大腸菌に導入して、アンピシリン耐性株を採れば、それは β -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クローン以上を解析し、正常組織との比較から発現異常が認められた遺伝子については、がん組織と種々の正常組織を用いた定量的 RT-PCR, western blot, 免疫染色で発現を検証し、一部については機能解析を行なった。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料を用いた遺伝子解析では、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号:平成16年全部改定)に準じ、広島大学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) 被爆者に発生した胃癌における miRNA の発現解析

被爆者の限定しない通常の胃癌と非がん部胃粘膜における miRNA 発現レベルの比較から、胃癌で発現が亢進している 22 個の miRNA (miR-181d, miR-21, miR-93 など)、発現が低下している 13 個の miRNA (miR-148a, miR-148b, miR-375 など) を同定した。さらに、組織型、進行度と関連する miRNA signature を見だし、let-7g や miR-433 の発現低下および miR-214 の発現亢進は独立した予後因子となることを明らかにした。一方、188 種類の miRNA 発現解析では、miR-143, miR-145 が胃癌で過剰発現しており、miR-148a が発現低下することを確認した。さらに、組織型との関連では、miR-200 ファミリーがび漫型胃癌で発現低下することを見いだした。

miRNA 解析に用いる試料の種類と解析法を検討するために、まず、胃癌細胞株において miR-141, miR-143, miR-145 の発現レベルをマイクロアレイと定量的 RT-PCR で解析したところ、両方法での結果には比較的よい相関を認めた。胃癌および胃粘膜の凍結組織試料における miR-148a 発現の解析では、定量的 RT-PCR の方がその低下がより明瞭に検出された。胃癌細胞株の新鮮凍結試料と FFPE 後の試料における

代表的 miRNA の発現では、両者で一致した結果が得られた。以上より、保存された FFPE 組織を用いても、定量的 RT-PCR であれば、miRNA 発現解析が問題なく行なえることが明らかとなった。

被爆者に発生した胃がんを100mGy以上(102-1062mGly)の高線量被曝群とそれ以下(0-57mGly)の群に分類し、384種類のmiRNAの発現レベルを定量的に解析した。その結果、miR-21, miR-24, miR-34a, miR-106a, miR-145を含む32種類のmiRNAが高線量被曝群で2倍以上に発現亢進していた。これらは、放射線関連胃がんの特徴的miRNA signatureの可能性があり、症例を追加して検討する予定である。また、上記のうち、代表的なmiRNAについては、標的遺伝子を推定し、検証実験および機能解析を開始した。

2) 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

胃がん細胞株2株(MKN-1, MKN-28)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ライブラリーを作成した。このCASTライブラリーのアンピシリン耐性クローンについてコロニーPCRを行ない、インサートが200塩基以上のもの4320コロニーについてシーケンスを行なった。胃がん細胞と胃粘膜の比較から、胃がん細胞株のみで発現している30個の膜蛋白遺伝子を同定した。定量的RT-PCR法での発現検証において、胃がんの特異性の高い6遺伝子(PCDHB9, C4orf34, ADAM17, TMEM50B, ENPP4, SLC38A2)を見いだした。さらに、CD151, RFT1, CLDN7, DSC2なども胃がんを高発現していた。DSC2は、CDX2で発現が制御され、免疫染色では腸型粘液形質を示す28%の胃がんが陽性であった。また、DSC2は食道扁平上皮がんの殆どで陽性を示した。スキルス胃がんを材料にCASTライブラリーを構築し、現在、約1000コロニー

についてシーケンスを行なっている。

D. 考察

miRNAは20-24塩基程度の小さなnon-coding RNAであり、標的遺伝子のmRNAの3'UTRに相補的に結合し標的遺伝子のmRNAを分解あるいは蛋白の翻訳を抑制することにより、発生、増殖、分化、アポトーシスなどの様々な生物現象を担っている。ヒト遺伝子の30%はmiRNAによって調節され、また、ひとつのmiRNAは100以上の標的遺伝子の発現を制御するとされており、エピジェネティクスにおける重要性およびがんの発生・進展における役割が注目されている。本年度の胃がんについての検討では、胃がんの様々な病態に関連したmiRNA signatureが同定された。特に、被爆者に多いとされているび漫型胃がんにおいてmiR-200ファミリーの発現低下が認められたことは興味深い。miR-200はTGF β とともにE-cadherinを抑制的に制御する転写因子ZEB1/ZEB2を標的とすることが知られており、miR-200の発現低下によりTGF β に関連する上皮間葉移行に関わっている可能性が考えられる。

新鮮凍結試料とFFPE後の試料における代表的miRNAの発現解析の検討において両者で一致した結果が得られたことから、本方法によると保存されている被爆者胃がんの病理組織材料についてのmiRNA発現解析が可能であることが明らかとなった。そこで被爆者に発生した胃がんのFFPE組織を用いて解析したところ、miR-21, miR-24, miR-34a, miR-145などが高線量被曝群で発現亢進していた。miR-21の標的として、細胞周期を正に制御するCdc25Aが知られており、miR-21を抑制すると、細胞増殖活性が増加する。miR-34aはp53の標的であり、miR-34を発現させると、アポトーシスが誘導される。また多くの腫瘍においてメチル化により発現が抑制されている。miR-145の標的は、SOX2, OCT4, KLF4であり、発現を抑制する。また、p53がmiR-145を介して、c-Mycの発現を制御している。これらに

については、強制発現およびノックダウンにより、放射線によるDNA傷害応答および変異頻度について検討し、その普遍性を検証する必要がある。

CAST法は、膜蛋白あるいは分泌蛋白を効率良く同定する解析法であり、新しい診断・治療標的の探索に有用である。胃癌細胞株と正常胃粘膜のCAST法を用いた解析とその比較による候補遺伝子のリストアップおよび多数例における定量的RT-PCRによる発現解析によって、胃癌に高発現する遺伝子としてDSC2を同定した。Desmosomeは上皮の細胞間接着に重要であり、DesmocollinとDesmogleinより構成され、その結合は細胞間橋としてとらえられる。DSC2はDesmosomeの存在するすべての上皮で発現しており、Desmosome構成要素のうちDSC2が最も広く発現している。皮膚扁平上皮がんで高発現すると報告されており、われわれの食道、子宮頸部、肺、膀胱などの扁平上皮がんにおける検討でも高い陽性率が得られている。尚、DSC2は、放射線感受性の高い食道がん細胞株のマイクロアレイ解析でも発現亢進を示す遺伝子としても報告されているものである。CAST法から得られる情報を基盤とした探索的研究を継続し、同定される遺伝子については、被爆者に発生した食道がん、胃癌などの固形がんにおける意義を分子病理学的に解析する予定である。さらに、モデル系を用いた機能解析および放射線傷害応答における関与についても検討する。

E. 結論

miRNAの定量的RT-PCRによる解析はFFPE組織についても行なえることが明らかとなり、被爆者に発生した胃癌症例のFFPE組織を用いたmiRNA解析が可能となった。それにより高線量被曝群で発現が亢進する複数のmiRNAを同定し、放射線関連胃癌に特徴的なmiRNA signatureの可能性が考えられた。CAST法を用いた網羅的遺伝子発現解析により、DSC2をはじめとするいくつかの新規がん特異的遺伝子の候補を

同定した。これらの成果は、放射線発がんの分子機構の解明および放射線関連固形がんの診断・治療開発に資するものと見なされる。

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. Wnt5a signaling is involved in aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* (in press)
2. Sakamoto N, Yasui W, et al. Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* (in press)
3. Sentani K, Yasui W, et al. Immunostaining of gastric cancer with neuroendocrine differentiation: Reg IV-positive neuroendocrine cells are associated with gastrin, serotonin, somatostatin and pancreatic polypeptide. *Pathol Int* (in press)
4. Ueda T, Yasui W, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 11:136-146, 2010
5. Seko N, Yasui W, et al. Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer. *Exp Ther Med* 1:73-78, 2010
6. Kuniyasu H, Yasui W, et al. Reg IV enhances peritoneal metastasis of gastric carcinomas. *Cell Proliferation* 42:110-121, 2009
7. Oue N, Yasui W, et al. Characteristic gene expression in stromal cells of gastric cancers among atomic-bomb survivors. *Int J Cancer* 124:1112-1121, 2009

8. 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
 9. Noguchi T, Yasui W, et al. h-Prune is an independent prognostic marker for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 16:1390-1396, 2009
 10. Yamamoto H, Yasui W, et al. Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion by gastric cancer cells. *Gastroenterol* 137:242-252, 2009
 11. Noguchi T, Yasui W, et al. h-Prune is an independent prognostic marker for survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 16:1390-1396, 2009
 12. Yamamoto H, Yasui W, et al. Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion by gastric cancer cells. *Gastroenterol* 137:242-252, 2009
 13. Oue N, Yasui W, et al. Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg IV is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients. *Int J Cancer* 125:2382-2392, 2009
 14. Takano A, Yasui W, et al. Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 69:6694-6703, 2009
 15. Sugiyama H, Yasui W, et al. Incidence and survival of childhood cancer cases diagnosed 1998 and 2000 in Hiroshima city, Japan. *Asian Pac J Cancer Prev* 10:675-680, 2009
 16. 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
 17. Yasui W, et al. Meeting Report "Recent Progress in Pathogenesis and Management of Colorectal Cancer: The Eighteenth International Symposium of Hiroshima Cancer Seminar, November 2008". *Cancer Sci* 100:978-985, 2009
 18. Yasui W, et al. Histological and serological tumor markers of gastric cancer. In, *Histological and serological tumor markers and their clinical usefulness in cancers*, ed. By Dan Hellberg, Nova Science Publishers, New York, pp93-111, 2009
2. 学会発表
1. Oue N, Yasui W, et al. Olfactomedin 4 in combination with Reg IV have utility in the early detection of gastric cancer. The 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Denver, Colorado (USA), April 18-22, 2009
 2. Sakamoto N, Yasui W, et al. Induction of intestinal phenotype in gastric cancer by EGFR signaling. The 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Denver, Colorado (USA), April 18-22, 2009
 3. Yasui W. Identification of potential therapeutic targets in gastric cancer by basic and translational research – state of art lecture –. 8th International Gastric Cancer Congress, Lecture at Plenary session 1, Krakow (Poland), June 10-13, 2009
 4. Sentani K, Yasui W, et al. Usefulness of Reg IV and claudin-18 immunostaining in the diagnosis of gastrointestinal signet ring cell carcinoma. 8th International Gastric Cancer Congress, Krakow (Poland), June 10-13, 2009
 5. Anami K, Yasui W, et al. Identification of novel genes encoding secretory and transmembrane protein in gastric cancer using CAST method. 8th International Gastric Cancer Congress, Krakow (Poland), June 10-13, 2009
 6. 阿南勝宏, 安井 弥, 他. CAST法を用いた胃癌における分泌・膜蛋白の同定. 第