

- 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. 胃がん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法で同定された胃がんにおける分泌・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, 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, 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
- 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

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）  
分担研究報告書

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)

研究分担者 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。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、乳がんではメチル化異常が認められる遺伝子*ASCL1*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ことから、HER2陽性乳がんに着目し発現が亢進しているmicroRNAを新たに8種類同定した。3) 乳がんにおける転写因子OCT4の蛋白質レベルでの発現解析を行いOCT4の発現亢進が高頻度に認められることを示した。

#### A. 研究目的

エピジェネティックな機構は遺伝子発現制御に関わる後成的修飾であるが、がんにおい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

3) 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

広島市の被爆者に発生した乳がんにおいては、これまでの解析から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ことが示唆された。今回、これまで同定してきたmicroRNA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microRNA異常の同定を試みた。

3) 乳がんにおける転写因子OCT4の発現解析  
OCT4は初期胚の多能性集団の確立と多能性維持に関与する転写因子である。細胞の分化調節に重要な役割を果たしているが癌化との関連は明らかではない。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。

#### (倫理面への配慮)

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

#### C. 研究結果

1. MS-RDA法により*ASCL1*を新規に同定した。

ASCL1のメチル化異常は乳がん細胞株8株中6株(75%)に認められた。さらに、乳がん症例でも21症例中9例(43%)にメチル化異常が検出されることを見出した。

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種類を同定してきたが、今回、これらのうち5種類を乳がん患者血液中で検出した。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microRNAが検出可能であった(図1)。さらに、ホルモン受容体陽性乳がんとHER2陽性乳がん細胞の違いに着目し、HER2陽性乳がんにおいて発現が亢進しているmicroRNAとして、hsa-miR-31、hsa-miR-130a、hsa-miR-29a、hsa-miR-675、hsa-miR-205、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-423-3p、およびhsa-miR-29cの8種類を新たに同定した(図2)。

3. OCT4は初期胚の多能性集団確立と多能性維持に関与する転写因子である。OCT4は細胞の分化調節に重要な役割を果たしているが癌化との関連については明らかではない。OCT4の乳がんにおける発現について検討し、OCT4がホルモン受容体陽性乳がんの73%(28/37)、HE2陽性乳がんの83%(5/6)、トリプルネガティブ乳がんの100%(5/5)に発現が認められた(図3)。比較的予後が良好なホルモン受容体陽性乳がんでは発現亢進を認めない症例があることが示された。

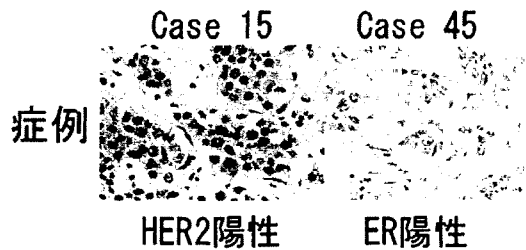
図1 Detection of Cancer with blood miRNAs

miRNAs	Case				Detection rate
	1	2	3	4	
miR-221	+	+	-	-	3/4
miR-100	+	-	-	-	
miR-99a	+	-	-	-	
miR-7i	-	-	+	-	
miR-424	+	-	-	-	

図2 HE2陽性乳がん細胞で発現が亢進

microRNA	発現レベル
hsa-miR-31	>100
hsa-miR-130a	56
hsa-miR-29a	7.9
hsa-miR-675	6.7
hsa-miR-205	5.4
hsa-miR-423-5p	5.4
hsa-miR-423-3p	5.3
hsa-miR-29c	5.1

図3 OCT4の乳がん症例における発現



D. 考察

乳がんのエピジェネティックな異常としてASCL1を新規に同定した。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dickkopf homolog 1 (DKK1)とE-cadherinを抑制することが明らかにされてきている。これまでに乳腺での報告は認められず、乳がんの発生や進展における役割は明らかではない。小細胞がんの特徴を有する乳がんや、先進部など組織の一部分における表現形において役割を果たす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、一種類のmicroRNAが多くの標的遺伝子の発現を制御することが知られている。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がん化

にも重要な役割を果たすと考えられる。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いるが、microRNAについても、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、microRNA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。

OCT4は幹細胞維持に関与する転写因子である。乳がん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。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。

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乳がんの解析が重要である。エピジェネティックな機構に着目し、多数の被爆者乳がんを解析するとともに、細胞および実験モデルで得られた成果と比較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) *ASCL1*の乳がんにおけるメチル化異常、2) microRNAの発現異常として発現が亢進している8種類のmicroRNA、3) 幹細胞維持に関与する転写因子OCT4の乳がんにおける発現。

## 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 cancers. *Carcinogenesis*. 30: 466-71. 2009
2. Iwase H, Kurebayashi J, Tsuda H, Ohta T, Kurosumi M, Miyamoto K, Yamamoto Y, Iwase T. Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. *Breast Cancer*. (in press, published

online: 23 May 2009)

3. PCR/RT-PCR 「アトラス 細胞診と病理診断 医学書籍」 (印刷中)
4. FCM 「アトラス 細胞診と病理診断 医学書籍」 (印刷中)

### 1. 学会発表

1. Miyamoto K MicroRNAs in estrogen receptor-positive and -negative breast cancer cells. The 100th American Association for Cancer Research Annual Meeting, Denver, CO, April 18-22, 2009
2. 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, 平成21年7月2日-4日, 東京
3. Miyamoto K MicroRNA dysregulation in HER2-positive and -negative breast cancer. 第68回日本癌学会学術総会, 平成21年10月1日-3日, 横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
1件予定
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 原爆被爆者に発生した固形がんの分子腫瘍学的解析

研究分担者 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、未だに放射線による特定の固形癌のリスク上昇が認められている。しかし、放射線がどのようなメカニズムで各固形癌の発生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癌と、期間がより長い大腸癌を対象として発癌に関与する遺伝子変化と放射線被曝との関連について検討した。昨年度105症例の甲状腺乳頭癌における*RET*、*NTRK1*及び*BRAF*遺伝子の再配列並びに*BRAF*及び*RAS*遺伝子の点突然変異と被曝線量との関連について解析し、染色体再配列が成人発症放射線関連甲状腺乳頭癌と密接に関連することを明らかにした。同時に、これらのいずれの遺伝子変異も持たない症例は被曝線量と共にその頻度が増加する傾向が見られた。今年度*RET*、*NTRK1*、*BRAF*及び*RAS*遺伝子に変異を持たない被曝甲状腺乳頭癌症例の一部に、これまで甲状腺癌では報告されていなかった*ALK*遺伝子の再配列を見出した。非被曝症例ではこの変異は検出されなかった。このことより、*ALK*再配列は放射線関連甲状腺乳頭癌における新たな重要な遺伝子変異である可能性が示唆された。一方、被曝者大腸癌では、昨年度マイクロサテライト不安定性(MSI)が被曝線量と関連すること、また高度のMSI(MSI-H)を示す5症例について、以下の*MLH1*遺伝子の異常が観察されることを報告した。1) 全症例にLOH、2) 3症例にメチル化、3) 非メチル化の2症例に点突然変異。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。今年度、免疫染色法による*MLH1*蛋白発現の解析より、MSIと*MLH1*メチル化状態は*MLH1*蛋白発現と密接に関連することを見出した。二種類の固形癌の分子解析より、放射線は発癌過程におけるジェネティック・エピジェネティックな変化と関連し、原爆放射線被曝による発癌誘導メカニズムの多様性が示唆された。

### A. 研究目的

原爆被爆者における固形癌の発症リスクおよび発症時期は臓器によって異なることがコホート研究により明らかになっている。被曝者甲状腺癌は被曝10年後頃よりリスクの上昇が認められ、被曝後約20 - 30年で発症のピークを迎える。一方、結腸癌は被曝後30年以上経過してから放射線によるリスクの上昇が認められてくる。これらの固形癌における遺伝子変化を放射線被曝との関連を解析し、放射線被曝による発癌メカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。

### B. 研究方法

広島・長崎の原爆被爆者（寿命調査集団の対象者）に発生した成人甲状腺乳頭癌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「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寿命調査集団の対象者に発生した大腸癌51症例（被曝線量=0 mGyの非被曝者16名、被曝線量>0 mGyの被曝者35名）を対象とする。甲状腺乳頭癌は1956年から1993年まで、大腸癌は1986年から2001年までの症例であり、研究試料は全てホルマリン固定パラフィン包埋組織試料を用いた。病理組織型の

分類はWHO分類に従って行った。レーザーによるマイクロダイセクションあるいはマニュアルでダイセクションを行い、回収した癌部あるいは非癌部組織からDNA/RNAを抽出した。*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蛋白の免疫染色のための抗原賦活化はproteinaseK処理後にクエン酸緩衝液中でマイクロウェーブ処理することにより行った。原爆放射線の被曝線量はDS02システムによって推定された線量を用いた。全ての統計解析はSPSSソフトVer12.0を用いて行った。

### (倫理面への配慮)

放射線影響研究所の人権擁護委員会ならびに遺伝子研究に関する倫理委員会、さらにこれらと併せて広島大学医学部倫理委員会並びに関連病院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て解析を行っている。

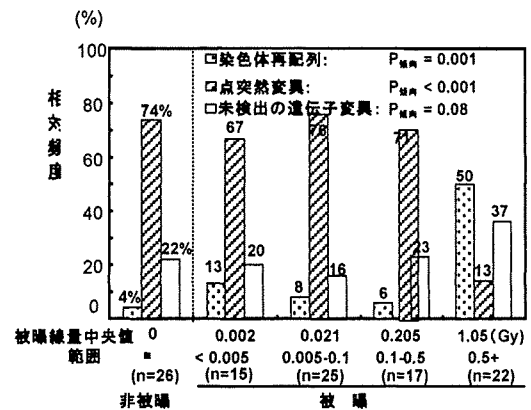
## C. 研究結果

### 1) 成人甲状腺乳頭癌

甲状腺乳頭癌の多くは、初期段階でMAPキナーゼ伝達経路の恒常的活性化が観察され、発癌に関与していると考えられている。一般集団の成人甲状腺乳頭癌では*BRAF*点突然変異が、また小児甲状腺乳頭癌では放射線被曝歴の有無に関係なく*RET/PTC*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。

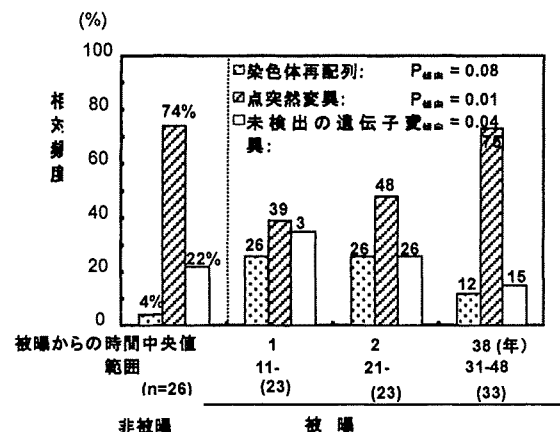
昨年度、105症例の甲状腺乳頭癌の解析より、染色体再配列(主に*RET/PTC*再配列)は被曝線量が高くなると有意にその相対頻度が増加し、*BRAF*点突然変異の相対頻度は有意に減少することを見出した。さらに、*RET*、*NTRK1*、*BRAF*及び*RAS*遺伝子のいずれにも変異を持たない(すなわち未検出の遺伝子変異を有する)甲状腺乳頭癌の相対頻度も線量が高くなると増加する傾向が示された(図1)。

図1 被曝者甲状腺乳頭癌における遺伝子変異の頻度 (被曝線量との関連)



遺伝子変異と被曝から発症までの期間の関係では、点突然変異を持つ甲状腺乳頭癌症例の相対頻度は被曝からの時間が長くなるとともに有意に増加し、染色体再配列を持つ症例の相対頻度は被曝からの時間が長くなると減少する傾向が見られた。一方、未検出の遺伝子変異を有する甲状腺乳頭癌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2)。これらの結果より、染色体再配列(主に*RET/PTC*再配列)だけでなく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(少なくともその一部は)放射線関連成人甲状腺乳頭発癌において重要な役割を果たすことが示唆された。

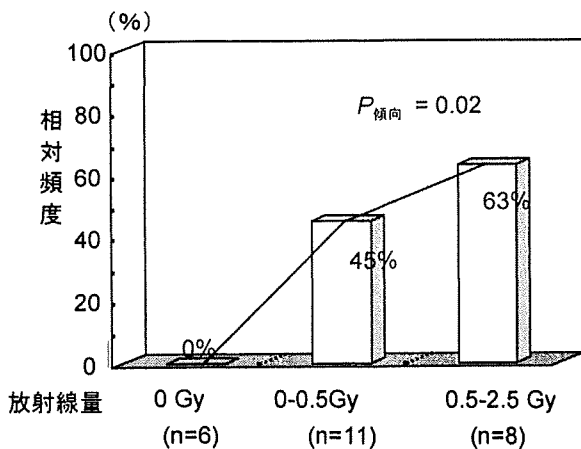
図2. 被曝者甲状腺乳頭癌における遺伝子変異の頻度 (被曝からの時間との関連)



今年度、我々は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、*RET*遺伝子同様にMAPKキナーゼ伝達

経路に関連する遺伝子の染色体再配列であると言う仮説に基づいて、*ALK* 遺伝子の再配列について未検出の遺伝子変異を有する甲状腺乳頭癌 25 症例(被曝線量 = 0 mGy: 6 症例、被曝線量 > 0 mGy: 19 症例)の解析を行ない、成人甲状腺乳頭癌において *ALK* 遺伝子再配列を初めて見出した。すなわち、非被曝群 6 症例には *ALK* 再配列が全く認められなかったが、被曝群 19 症例中 10 例に *ALK* 再配列が認められた。さらに、図 3 に示すように、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。

図3. 未検出の遺伝子変異を持つ甲状腺乳頭癌における*ALK*再配列の相対頻度と被曝線量との関連



## 2) 大腸癌

原爆被曝者において結腸癌は放射線による発癌リスクの上昇が確認されているが、直腸では認められていない。散発性の大腸癌ではマイクロサテライト不安定性(MSI)を示す癌は近位結腸で好発することが報告されていることから、原爆被曝者大腸癌におけるMSIおよびその主要な原因の一つである*MLH1*遺伝子のメチル化について検討を行ってきた。その結果、昨年度までに、高度のMSI (MSI-H)を呈する5症例は全例が近位結腸で発症しており、MSS/MSI-Lに比べ被曝線量中央値が有意に高いこと ( $P=0.042$ )、また、*MLH1*遺伝子のメチル化が起きている症例は非メチル化の症例に比べ被曝線量中央値が高い傾向を示すことを明らかにしてきた。さらに、MSI-H被曝大腸癌5症例のうち3症例で*MLH1*遺伝子のメチル化が確認され、被曝大腸癌患者におい

ても、この*MLH1*遺伝子のメチル化とMSI状態との間に有意な相関が認められることも明らかにしてきた。さらに、MSI-Hで*MLH1*が非メチル化の2症例はともに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。また、MSI-Hの5症例全てに*MLH1*遺伝子のLOHが確認された(表1)。

表 1. MSI-H の大腸癌患者における *MLH1* 遺伝子変異

<i>MLH1</i>		
メチル化	LOH*	点突然変異
-	+	glu→stop at the 588 <sup>th</sup> 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

次に発癌の初期段階での分子事象である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、またこれら三種類のRasシグナル関連遺伝子変化はMSI及び*MLH1*メチル化状態と密接に関連することを見出し報告した(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
	-(n=2)	0	2	
MSS/MSI-L (n=28)	+(n=2)	2	0	2/2
	-	6 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>Two cases contain two alterations involving *K-RAS* mutation.

今年度、MLH1蛋白発現を免疫組織学的方法で解析した。MSI-Hの5症例中4例でMLH1蛋白発現が消失していた。さらに、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(表3)。

表3. 大腸癌におけるMLH1 蛋白発現

		*Strong	Weak or none	P
MSI	MSI-H	1	4	0.004
	MSI-L or MSS	25	3	
Methylation	+	1	4	0.003
	-	27	3	

None, 陽性反応を示す細胞なし; Weak, 陽性反応を示す細胞が40%未満; Strong, 陽性反応を示す細胞が40%以上

#### D. 考察

多くの*in vitro*, *in vivo*の実験より、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などが明らかにされている。これまで、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。今回、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)被曝甲状腺乳頭癌症例において、甲状腺癌ではまだ報告されていない新しいタイプの染色体再配列、*ALK*遺伝子再配列が検出された。一方、非被曝症例にはこの*ALK*再配列は認められなかった。*ALK*再配列は放射線線量と関連することより(図3)、放射線関連成人甲状腺乳頭癌では、*RET/PTC*再配列に加えて*AKL*遺伝子再配列もその発生に関与していることが示唆される。今後、5'RACE法を用いて*ALK*再配列のDNA断片を単離することにより*ALK*再配列の存在を確認する必要がある。さらに、*ALK*遺伝子再配列は*RET*、*NTRK1*、*BRAF*および*RAS*遺伝子の変異と相互排他的であるのかどうかを明らかにすることが必要である。

これまで被曝者大腸癌におけるMSI-Hの5症例は全例で、*MLH1*のLOHが認められ、3症例に*MLH1*のメチル化が認められ、

*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5症例は全て*MLH1*遺伝子に2つの変異をもつことを明らかにしてきた。今回、免疫染色法を用いてMLH1蛋白発現の解析を行い、その蛋白発現もMSI及び*MLH1*のメチル化と密接に関連することが判明した。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と密接に関連することを報告してきた。これらのことから、原爆放射線は大腸癌においてMSIおよびその関連遺伝子のエピジェネティックおよびジェネティックな変異に影響を及ぼすことが示唆された。

#### E. 結論

今回の解析により、放射線関連成人甲状腺乳頭癌では*RET/PTC*再配列に加えて、*ALK*遺伝子再配列もその発生に関与することが示唆された。一方大腸癌ではMSI並びにその関連遺伝子のエピジェネティック及びジェネティック変異と放射線被曝との関連が示唆された。すなわち、発癌への原爆放射線の影響は臓器により異なること、また放射線は発癌経路の変更を引き起こさないが、特定の変異を選択的に誘発することが示唆された。

今後さらに症例数を増やすとともに、他の遺伝子変異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, Mukai M, Koyama K, Taga M, Ito R, Hayashi Y, Nakachi K: Improved method for analysis of RNA present in long-term preserved thyroid cancer tissue of atomic-bomb survivors. *Thyroid* 20: 43-49. (2010)

##### 2. 学会発表

濱谷清裕、高橋恵子、多賀正尊、伊藤玲子、林雄三、中地敬: 原爆被曝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、



2009年9月5日－2009年9月9日、ポルトガル、リスボン

濱谷清裕、高橋恵子、多賀正尊、伊藤玲子、中地 敬：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、2009年10月1日－2009年10月3日、横浜

高橋恵子、多賀正尊、伊藤玲子、中地 敬、濱谷清裕：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 第52回日本放射線影響学会、2009年11月11日－2009年11月13日、広島

多賀正尊、伊藤玲子、三角宗近、中地 敬、安井 弥、濱谷清裕：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 第52回日本放射線影響学会、2009年11月11日－2009年11月13日、広島

伊藤玲子、江口英孝、濱谷清裕、多賀正尊、高橋恵子、大上直秀、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20回日本消化器癌発生学会、2009年11月26日－2009年11月27日、広島

#### 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

研究分担者 林 奉権 （財）放射線影響研究所  
放射線生物学/分子疫学部

発がんは環境と宿主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、肺がんのリスクは被爆者で顕著に増加することが報告されている。しかしながら、肺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は明らかにされていない。一方、肺がんの発生と進行に関与する上皮成長因子受容体 (*EGFR*) 遺伝子は、細胞の放射線感受性を調節することが知られている。そこで、我々は *EGFR* 蛋白質の産生と負に相関する *CA* (シトシン-アデニン) 繰り返し数遺伝子多型に基づき、肺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ホートから、1982年以降に肺がん罹患した症例 (ケース) 群とサブコホート群を選んでゲノム関連解析を行った。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た。コックス回帰モデルにより解析した結果、第一に、非被曝群 (5mGy未滿) では *CA* 繰り返し多型の *Short* 遺伝子型 (各個人の対立遺伝子の *CA* 繰り返し数の合計が37以下) と高い肺がん、特に肺腺がんのリスクに有意な関連が見出された。第二に、放射線被曝は *Long* 遺伝子型 (*CA* 繰り返し数が38以上) の個人の肺がんリスクを放射線量に伴って増加させる一方、*Short* 遺伝子型の個人の肺がんリスクはそのような増加を示さなかった。これらの知見は、放射線被曝関連肺がんに対する発がん感受性の個体差を評価する上で、*EGFR* シグナル経路が重要な役割を果たすことを示唆している。

### A. 研究目的

本研究の目的は、原爆被爆者集団を対象としたコホート研究のゲノム解析により、放射線関連発がんの遺伝的高危険群を同定

するとともに、放射線影響と遺伝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。*EGFR* シグナル経路は複数のがんの発生に関与し、また細胞

の放射線感受性を調節することが知られていることを踏まえ、本研究は、EGFR遺伝子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。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予防に重要な知見を与えることが期待される。

本年度はEGFR遺伝子のCA繰り返し数多型に基づき、肺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ホートに基づき、1982年以降に肺がん罹患した124人を症例(ケース)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。被曝線量別の解析では、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。肺がんの組織型分類としては、腺がん66、扁平上皮がん21、小細胞がん10、大細胞がんを含むその他29であった。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, Foster City, CA, USA) によって調べた。さらに、直接DNA配列決定法 (3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) によってCA繰り返し数を確かめた。ケース・コホート研究におけるリスク評価はSPSS (SPSS, Chicago, IL, USA) のコックス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

EGFRの発現量と負に相関することが知られるEGFR遺伝子第一イントロンに存在するCA繰り返し数多型を同定した結果、各個人の二つの対立遺伝子の繰り返し数の合計は二峰性に分布した(図1)。なお、この同定結果は他の研究グループの報告とよく一致している。本研究では図1の分布に基づき、CA繰り返し数が37以下の場合をShort、38以上の場合をLong遺伝子型と定義した。

コックス回帰モデルにより、放射線被曝及びEGFR CA繰り返し多型の発がんリスクに及ぼす影響を解析し、以下の結果を得た。1) 非被曝群(5mGy未満)かつLong遺伝子型を参照カテゴリーとした解析の結果、非被曝群においてShort遺伝子型と高い肺がんリスクに有意な関連が見出された(相対リスクRR(relative risk) =2.11, 95%CI: 1.09-4.08)。2) EGFR CA繰り返し多型のLong遺伝子型を持つ人は、被曝放射線量に伴って肺がんリスクが増加したが(RR=1.76, 95%CI: 0.88-3.53 for 5-712 mGy and RR=2.60, 95%CI: 1.36-4.96 for  $\geq 712$  mGy)、Short遺伝子型を持つ人ではそのような増加は見られなかった(RR=2.11, 95%CI: 1.09-4.08 for <5 mGy and RR=2.45, 95%CI: 1.22-4.92 for  $\geq 712$  mGy)。その結果、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がんリスクの違いは見られなくなった。これらの結果を図2に示した。

最後に、肺がんの組織型別の解析を行った結果、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見られた

(RR=2.93, 95%CI: 1.11-7.73)。また *Long* 遺伝子型の場合に、被曝放射線量に伴うリスクの増加が見られた (RR=4.37, 95%CI: 1.72-11.1 for  $\geq 712$  mGy)。なお、扁平上皮がんでは、*EGFR* 遺伝子多型と肺がんリスクに関連は見られなかった。

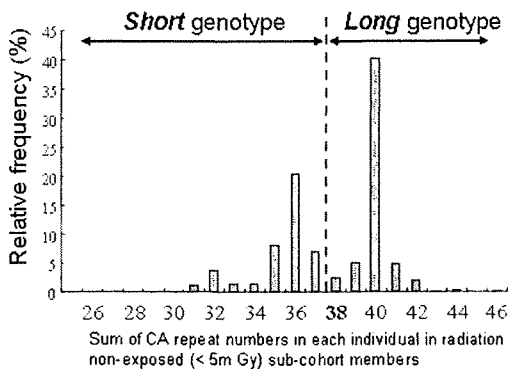


図1. *EGFR* CA繰り返し数多型の分布

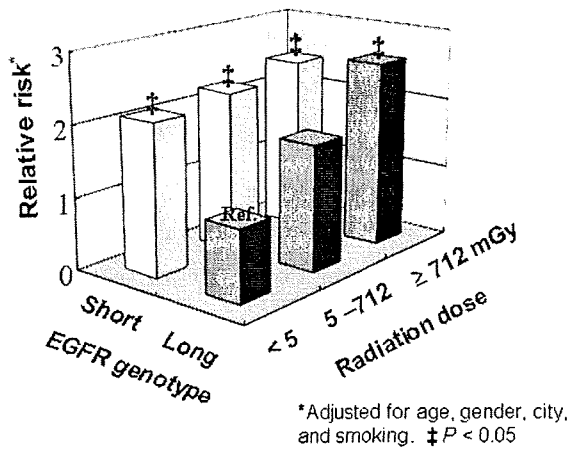


図2. 肺がんリスクに及ぼす *EGFR* CA繰り返し数多型と被曝放射線の影響

#### D. 考察

*EGFR* は上皮系の複数のがんを高発現し、肺腺がん症例で *EGFR* 遺伝子の突然変異が多く観察されることなど、*EGFR* シグナル経路は肺腺がんの発生に密接に関与していることが知られている。これらの臨床知見は、*EGFR* の遺伝子多型と肺腺がんリスクに有意な関連があることを示した本研究結果と整

合的である。本研究の結果から、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、*EGFR* 遺伝子多型という観点からは低い肺腺がんリスクを持つと考えられる。その一方で、放射線を被曝した場合には *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可能性が考えられ、放射線被曝に対してより一層の注意を要するかも知れない。

今後は、CA 繰り返し数多型に加えて、*EGFR* 遺伝子に起こる突然変異を考慮した研究を進めることで、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と期待される。なお、本研究の成果は *Carcinogenesis* 30: 2037-41 (2009) に発表した。

#### E. 結論

本研究は、放射線被曝関連肺腺がんに対する発がん感受性の個体差を評価する上で、*EGFR* シグナル経路が重要な役割を果たすことを示唆している。また、*EGFR* CA 繰り返し数多型は、日本人一般集団においても、肺がん、特に肺腺がん感受性の指標として有用であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kyoizumi S, Yamaoka M, Kubo Y, Hamasaki K, Hayashi T, Nakachi K, Kasagi F, Kusunoki Y. Memory CD4 T-cell subsets discriminated by CD43 expression level in A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol*, 86(1): 56-62, 2010.
2. Yoshida K, Nakachi K, Imai K, Cologne JB, Niwa Y, Kusunoki Y, Hayashi T. 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(12): 2037-41, 2009.
3. Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, Trosko JE, Sugihara K, Kotake Y, Ohta S. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of parkinson's disease. *Neuroscience*. 160(1): 61-8, 2009.
  4. Hattori N, Hayashi T, Nakachi K, Ichikawa H, Goto C, Tokudome Y, Kuriki K, Hoshino H, Shibata K, Yamada N, Tokudome M, Suzuki S, Nagaya T, Kobayashi M, Tokudome S. Changes of ROS during a Two-day Ultra-marathon Race. *Int J Sports Med*. 30(6): 426-9, 2009.
  5. 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, *Clin Immunol*, 255(1-2): 61-8, 2009.
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. Hayashi T, Morishita Y, Nagamura H, Maki M, Kusunoki Y, Yoshida K, Nakachi K. IL-18 gene polymorphisms and colorectal cancer risk among atomic bomb survivors. The 100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR), 18-22 April 2009, Colorado, USA.
  3. Kusunoki Y, Yoshida K, Hayashi T, Nakachi K. 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, 1-4 June 2009, Kyoto, Japan.
  4. Hayashi T, Ohishi W, Morishita Y, Maki M, Sasaki K, Nagamura H, Sora M, Imai K, Yoshida K, Fujiwara S, Kusunoki Y, Nakachi K. 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, 3-7 October 2009, Georgia, USA.
  5. Yoshida K, Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y, Nakachi K. 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, 9-10 October 2009, Ashmore, Australia.

6. 大石和佳、林 奉権、楠 洋一郎、中島栄二、藤原佐枝子、茶山一彰. 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, 2009 年 6 月 4-5 日, 神戸.
7. 楠 洋一郎、久保美子、山岡美佳、濱崎幹也、林 奉権、今井一枝、中地 敬. 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, 2009 年 6 月 20-21 日, 松江.
8. 林 奉権、森下ゆかり、牧 真由美、佐々木圭子、長村浩子、空 美佐江、今井一枝、吉田健吾、楠 洋一郎、中地 敬. 原爆被爆者集団を対象とした結腸直腸発がん感受性の分子疫学研究. がん予防大会 2009 愛知, 2009 年 6 月 16-17 日, 名古屋
9. 今井一枝、林 奉権、中地 敬. 一般住民コ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 20 年度喫煙科学研究財団研究発表会, 2009 年 7 月 16 日, 東京.
10. 林 奉権、大石和佳、今井一枝、吉田健吾、林 幾江、藤原佐枝子、楠 洋一郎、中地 敬. 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, 2009 年 8 月 27-28 日, 旭川.
11. 林 奉権、森下ゆかり、長村浩子、牧 真由美、林 幾江、吉田健吾、楠 洋一郎、中地 敬. 炎症関連遺伝子多型および原爆放射線被曝が結腸・直腸発がんリスクに及ぼす影響. 第 18 回 日本組織適合性学会, 2009 年 9 月 25-27 日, 名古屋.
12. 林 奉権、楠 洋一郎、吉田健吾、今井一枝、中地 敬. 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, 2009 年 10 月 1-3 日, 横浜.
13. 濱崎幹也、今井一枝、小山和章、林 奉権、中地 敬、楠 洋一郎. 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, 2009 年 11 月 11-13 日, 広島.
14. 吉田健吾、大石和佳、茶山一彰、楠 洋一郎、林 奉権. 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, 2009 年 12 月 2-4 日, 大阪.
15. 楠 洋一郎、吉田健吾、大石和佳、林 奉権. 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, 2009 年 12 月 2-4 日, 大阪.
16. Grant EJ、鍊石和男、Cologne JB、江口英孝、林 奉権、Geyer S、和泉志津恵、西 信雄、Land CE、Stevens RG、Sharp GB、中地 敬.

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, 2010年1月9-10日, 越谷.

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

研究分担者 （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** 原爆被爆者の赤血球グリコフォリンA (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る。今回、放射線による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、GPA 突然変異頻度のデータが入手可能な1,900名の被爆者の ATM、NBS1 ならびに P53BP1 遺伝子の多型を解析した。がんの既往のない1,300名のデータを用いた予備的統計解析において、ATM ならびにNBS1 の遺伝子型では GPA 突然変異頻度の原爆放射線量効果関係に違いが見いだされなかったが、P53BP1 の遺伝子型の違いが放射線誘発GPA 突然変異頻度の個人差に関係する可能性が示唆された。すなわち、1 Gy 以上の高線量被ばく群では、P53BP1 の3箇所のSNP を含むハプロタイプブロックにおいて TCA/TCA ハプロタイプを有する被爆者にGPA 変異体頻度の有意な上昇が認められた。今後、P53BP1 の遺伝子型と放射線による固形がん発生リスクの関係を含めた詳細な解析が必要である。

### A. 研究目的

長年に渡る原爆被爆者の追跡調査により、放射線被ばくが固形がん発生リスクのリスクファクターであることが示されている。しかしながら、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。

以前行われた原爆被爆者コホート調査で、赤血球グリコフォリンA (GPA) 遺伝子座の突然変異体頻度が高値を示した被爆者では放射線発がんのリスクが高い可能性が示された。この知見は放射線被ばく後の体細胞遺伝子の変異性には個人差が存在し、より高い変異性を有する者には放射線に関連した固形がんがより高い確率で発生することを示唆すると考えられた。また、この個人差は遺伝的背景の差異と関係していると考えられるので、DNA修復遺伝子の多型性と放射線誘発 GPA 変異体頻度との関連を解析する分子疫学的研究が必要である。本研究では GPA 変異体頻度を測定した被爆者で、

がんを発生していない1,300名について、放射線で生じるDNA double-strand break (DSB) の修復の中心的役割を果たすことが知られている ATM、NBS1、ならびに P53BP1 遺伝子の多型との関連を調べた。

### B. 研究方法

GPA 突然変異体頻度のデータは1988-1996年の約8年間で放射線影響研究所(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。

DNA 修復 遺伝子の多型は 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。今回の解析では、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。

(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、医学研究およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する同意文書に基づいて収集したものである。また、その使用は放影研の人権擁護委員会および遺伝子研究に関する倫理委員の承認を得ている。

### C. 研究結果

ATM および NBS1 遺伝子におけるそれぞれ8箇所および5箇所のSNPについては、GPA 突然変異頻度との有意な関連性はみられなかった（結果は示さない）。

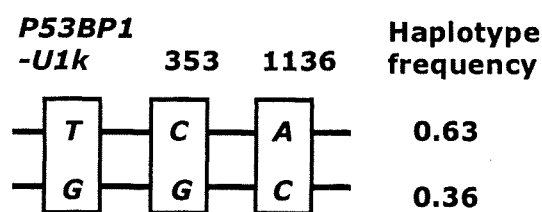


図1. P53BP1 ハプロタイプ

P53BP1 遺伝子座には3箇所の SNP、すなわち、コーディング領域から 1 kb 上流の非翻訳(U1k) SNP (T/G)、353 番目のアミノ酸残基の置換 Asp353 Glu を伴う SNP (G/C)、および1136 番目のアミノ酸残基の置換 Lys1136Gln を伴う SNP (A/C)がある。LD 解析により、これらの SNP から構成されるハプロタイプ TCA および GGC を推定した(図1)。

つぎに、この P53BP1 ハプロタイプ別に GPA 変異体頻度を解析した。その結果、1 Gy 未満の低線量被ばく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(図2)。しかしながら、1 Gy 以上の高線量被ばく群では TCA/TCA ハプロタイプを有する被爆者に GPA 変異体頻度の有意な上昇 ( $P = 0.012$ ) が認められた(図3)。以上の結果は、原爆被爆者の放射線誘発 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。

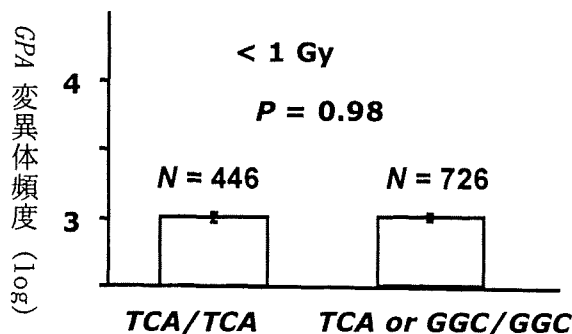


図2. 1 Gy 未満の被爆者における P53BP1 ハプロタイプ別の GPA 変異体頻度

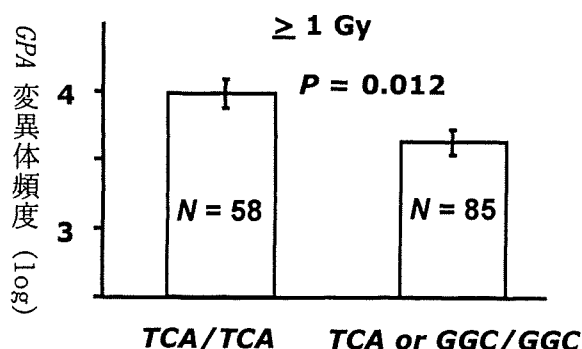


図3. 1 Gy 以上の被爆者における P53BP1 ハプロタイプ別の GPA 変異体頻度

### D. 考察

P53BP1 は DNA 損傷の修復応答において P53 と結合して DNA 修復に関与するのみならず、ATM、ATR、BRCA1 とも相互作用をすることが知られている。また、DNA 損傷が生じた部位に Mre11 および  $\gamma$ H2AX とともに集合体を形成し、修復タンパクの DNA 損傷部位への動員にも関わると考えられている。P53BP1 と P53 の結合は P53 が介在する転写の活性化ならびにそれによる細胞周期の調節に作用することが示唆されている。今回みられた高線量被爆者における GPA 変異体頻度と P53BP1 遺伝子多型の関係から、これらの P53BP1 の機能の個人差が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。しかしながら、P53BP1 の SNP がどのような機能の違いに影響するかは不明であり、今後の詳細な構造機能分析が待たれる。

今回の解析では、1 Gy 未満の低線量被ばく群では P53BP1 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つ

た。また、非被ばく群(5mGy未満)においてもP53BP1ハプロタイプの影響は認められなかった(結果は示さない)。このことから、P53BP1は高線量の放射線でDSBが比較的多く発生した場合に作用し、低線量被ばくで生じる少数のDSBや、酸化的損傷などの放射線以外の遺伝毒性暴露によるDNA損傷の修復にはあまり関与していないことが示唆される。原爆被爆者のGPA変異体頻度には、非被ばく群や低線量被ばく群においても個人差によると考えられる変異体頻度のばらつきが認められる。この個人差の背景にはP53BP1があまり関与していない別の修復機構に関わる遺伝子の多型が関係していると推察される。今後、特に低線量被ばくによる発がんメカニズムを分子疫学的に検討するためには、そのような遺伝子多型についても探索していく必要がある。

これまで、試験管内で放射線照射した細胞の $\gamma$ H2AXフォーカスや小核形成を指標として個人の放射線感受性を評価する試みが行われてきた。また、生体内でのDNA損傷の指標として網状赤血球小核頻度が有用であることが示されている。それらのDNA損傷指標の測定系はGPA変異体検出系に比べて試験管内実験あるいは動物モデルでの評価が容易である。P53BP1遺伝子多型とこれらのDNA損傷指標の関係を試験管内および生体内実験モデルで調べることにより、P53BP1遺伝子多型の遺伝子傷害感受性に及ぼす影響の機序を探ることができるかもしれない。

今回、被ばく線量で対象集団を層別化しANCOVAにて有意なP53BP1ハプロタイプの関係が認められたが、この知見を強めるためには他の統計解析モデルでの検証が必要と思われる。今後、発がんリスクとの関係も含めた詳細な解析を行うことによって、放射線被ばく後の体細胞遺伝子変異性ならびに放射線発がん感受性の遺伝的背景に関する我々の仮説を検討したい。

## E. 結論

がんの既往のない原爆被爆者1,300名の放射線誘発GPA突然変異頻度と遺伝子多型の関係についての予備的統計解析において、P53BP1のハプロタイプが個人の放射線による遺伝子障害感受性に関与する可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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;255:61-8.

Yoshida K, Nakachi K, Imai K, Cologne JB, Niwa Y, Kusunoki Y, Hayashi T. Lung cancer susceptibility among atomic-bomb survivors in relation to CA repeat number polymorphism of epidermal growth factor receptor gene and radiation dose. *Carcinogenesis*, 2009;30:2037-41.

Hamasaki K, Kusunoki Y, Nakashima E, Takahashi N, Nakachi K, Nakamura N, Kodama Y. Clonally expanded T lymphocytes from atomic bomb survivors in vitro show no evidence of cytogenetic instability. *Radiat Res*, 2009;172:234-43.

Kyoizumi S, Yamaoka M, Kubo Y, Hamasaki K, Hayashi T, Nakachi K, Kasagi F, Kusunoki Y. Memory CD4 T-cell subsets discriminated by CD43 expression level in A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol*, 2010; 86:56-62.

Kusunoki Y, Yamaoka M, Kubo Y, Hayashi T, Kasagai F, Douple EB, Nakachi K. T-cell immunosenescence and inflammatory response in atomic-bomb survivors. *Radiat Res*, 2010; In press.

### 2. 学会発表

Kusunoki Y. Immunological alterations in aging A-bomb survivors. Late Health Effects of Ionizing Radiation: Bridging the Experimental and Epidemiologic Divide, 4-6 May 2009, Georgetown University, Washington DC, USA

Kusunoki Y, Yoshida K, Hayashi T, Nakachi K. 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, 1-4 June 2009, Kyoto

Yoshida K, Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y, Nakachi K. 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,

9-14 October 2009, Ashmore, Australia

Hayashi T, Ohishi W, Morishita Y, Maki M, Sasaki K, Nagamura H, Sora M, Imai K, Yoshida K, Fujiwara S, Kusunoki Y, Nakachi K. 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, 3-7 October 2009, Savannah, Georgia, USA

楠 洋一郎、久保美子、山岡美佳、濱崎幹也、林 奉権、今井一枝、中地 敬、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 2009/6/20-21 松江

濱崎幹也、今井一枝、林 奉権、中地 敬、楠 洋一郎、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 2009/01/11-13 広島

楠 洋一郎、吉田 健吾、大石 和佳、林 奉権、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 2009/12/02-04 大阪

吉田 健吾、大石 和佳、茶山 一彰、楠 洋一郎、林 奉権、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 2009/12/02-04 大阪

#### 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

研究分担者 小笹晃太郎 財団法人放射線影響研究所疫学部  
西 信雄 財団法人放射線影響研究所疫学部

研究要旨 放射線影響研究所では長期の追跡調査による放射線後影響の評価を行ってきた。2002年線量体系（DS02）によって個人線量の推定されている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。追跡期間中に50,620人（58%）が死亡し、量反応関係が線形であるとしたときの過剰相対危険度は、総固形がん死亡で0.47/Gy（95%信頼区間: 0.38, 0.56）、食道がんで0.46/Gy（同: 0.09, 0.95）、胃がんで0.28/Gy（0.14, 0.42）、結腸がん0.54/Gy（0.23, 0.93）、直腸がん0.17（-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、および到達年齢が年齢の-0.86乗であり、これらは有意であった。量反応関係は線形モデルが最もよく適合した。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。

### A. 研究目的

放射線影響研究所（放影研）が行ってきた広島および長崎の被曝者の追跡調査により、総固形がんおよび種々の部位のがんにおいて、放射線に関連して統計学的に有意な死亡リスクの増加を示すことが明らかにされてきた。これらは、被曝後長期にわたる影響として観察されている。したがって、観察期間を長くすることによってより確実な結果を得られるとともに、被曝時年齢が若年であった対象者がいわゆるがん年齢に達するとともに、被曝時年齢のがんリスクに対する影響もより明らかにすることができ、また、低線量域における放射線の影響もより明らかにすることができる。

### B. 研究方法

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。すなわち、放射線曝露のなかった場合のバックグラウンド死亡率( $\lambda_0$ )が、地域( $c$ )、性( $s$ )、

出生年( $b$ )、および観察期間中の到達年齢( $a$ )で決定されると考え、それに過剰相対危険度が、放射線曝露量( $d$ )、性( $s$ )、被曝時年齢( $e$ )、および観察期間中の到達年齢( $a$ )で決定されると考えると、観察死亡率( $\lambda$ )は次式で表現される。

$$\lambda = \lambda_0(c, s, a, b) [1 + \text{ERR}(d, s, e, a)]$$

ここで、出生年と被曝時年齢とは、 $e = 1945 - b$ という関係となる。

さらに、ERRが、放射線曝露量と死亡リスクとの直接的な関係 $\rho(d)$  および、放射線と他の因子（被曝時年齢、性、および観察期間中到達年齢）との相互作用  $[\varepsilon(e, s, a)]$  によって構成されると考えると、

$$\text{ERR}(d, s, e, a) = \rho(d)\varepsilon(e, s, a)$$

と表現される。放射線曝露量と死亡リスクとの関係は、線形（1次関数）、2次関数、線形と2次関数の複合モデルなどを想定する。例えば、

$$\rho(d) = \beta d \quad \text{や} \quad \beta d + \gamma d^2$$

である。また、放射線と他の因子との相互作用は経験的に

$$\varepsilon(s, e, a) = \exp(\alpha s + \tau e + \nu \log(a))$$

に従うと考えられている。

これらのモデルに基づいて、地域、性、出生年（被曝時年齢）、および観察期間中到達