

達年齢の区分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。

死因は、総固形がんおよび主要消化器系がんについて、1950年から2003年の死亡を国際疾病分類、第7版から第10版でコーディングされたものを、第9版に従って再分類した。

**(倫理面への配慮)**

本研究は、放射線影響研究所の人権擁護委員会（倫理審査委員会）の審査を経て実施されている。対象者の死亡および死因に関する情報は法務省の認容を得て把握した。

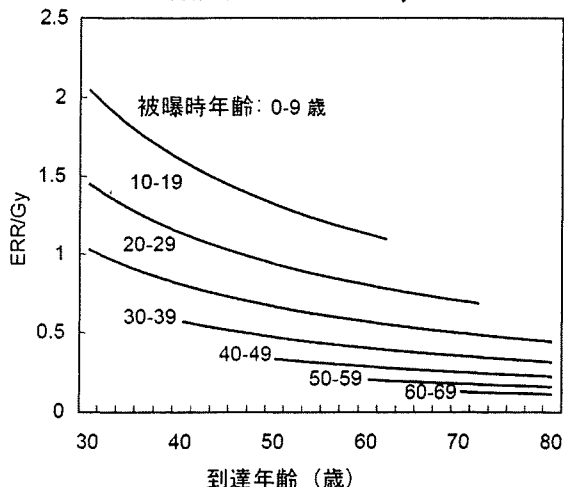
**C. 研究結果**

追跡期間中に50,620人(58%)が死亡した。総固形がんの死者数は10929人、食道がん339人、胃がん3125人、結腸がん621人、直腸がん427人、肝がん1519人、胆のうがん419人、膵がん513人であった。

量反応関係が線形  $[\rho(d)=\beta d]$  であり、リスク修飾作用がない  $[\epsilon(e,s,a)=1]$  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 (-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。

固形がん死亡リスク(ERR/Gy)に対する

図1. 被曝時年齢および到達年齢における性平均の過剰相対リスク (ERR/Gy)

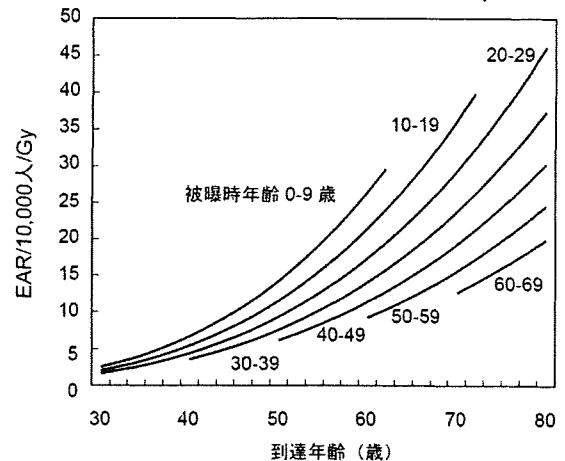


リスク修飾作用を考慮した解析では、性は

男女比が2.1 (女/男、95%信頼区間: 1.4, 3.1) で女性が高く、被曝時年齢の効果は10歳増加につき29%減少 (95%信頼区間: -41%, -17%)、および到達時年齢の効果は(年齢の乗数として-0.86、95%信頼区間-1.60, -0.06) はいずれも有意であった。これを、性で平均した値として、被曝時年齢および到達年齢の1グレイあたりの過剰相対危険リスク (ERR/Gy) に対するグラフとしたものが図1である。

一方、この関係を1グレイの放射線に曝露された1万人あたりの過剰死亡者数として示したものが図2である。すなわち、年齢が高くなるほど過剰死亡者数は多く、被曝時年齢が若いほど、同じ到達年齢での死亡者数は多い。

図2. 被曝時年齢および到達年齢における性平均の過剰死亡者数 (EAR/10,000人/Gy)



固形がん死亡リスクと放射線量との量反応関係は、線型モデルが最も適合した。すなわち、性、被曝時年齢、および観察期間中到達年齢によるリスク修飾作用を考慮したとき  $[\text{ERR}(d,s,e,a)=\rho(d)\epsilon(e,s,a)]$  の線型モデル  $[\rho(d)=\beta d]$  において  $\beta=0.42$ 、線形2次関数複合モデル  $[\rho(d)=\beta d+\gamma d^2]$  において  $\beta=0.36$ 、 $\gamma=0.038$ 、純2次関数モデル  $[\rho(d)=\gamma d^2]$  において  $\gamma=0.22$  であり、これらのdevianceの大きさと有意性から、線型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、閾値は0.0Gyでdevianceが最小となり、95%信頼区間上限は0.15Gyであった。

放射線曝露の総固形がん死亡に対する寄与割合を表1に示す。被曝線量が1Gyのときに、総固形がん死亡のうち約3分の1が当該放射線の影響によると考えることができる。被曝線量1Gyとなる被曝状況は、種々

の遮蔽状況を平均した場合の結腸線量として、広島では爆心地から約1100m、長崎では約1250mの位置に相当すると推定されている。

表1. 放射線曝露の総固形がん死亡に対する寄与割合

被曝線量 (Gy)	死亡数*	寄与割合(%)
<0.005	2/4621	0.0
0.005-	49/3653	1.3
0.1-	46/789	5.8
0.2-	109/870	12.5
0.5-	128/519	24.7
1-	123/353	34.8
2+	70/124	56.5

\* (放射線によると考えられる死亡数) / (観察死亡数全体)

#### D. 考察

本研究では、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た。しかし、部位による放射線の影響の違いも引き続き示され、食道がん、結腸がん、肝がん、胆のうがん、胃がんで有意に死亡リスクを高めていたが、直腸がんおよび膵がんでは有意ではなかった。食道がん、直腸がん、胆のうがん、膵がんでは、死亡者数が300~500人程度と同等であったにもかかわらず、ERRの大きさと有意性が異なり、放射線による影響に違いのあることが示された。

放射線の影響の大きさは、1Gyの被曝あたりの過剰相対リスクで示されている。つまり、例えば胃がんであれば、広島で爆心地から1.1km付近で平均的な遮蔽状況のもとで被曝した人は、被曝していない人よりも胃がんで死亡するリスクが男女平均でおおむね28%高いことを示している。

この相対リスクは、被曝時年齢が若いほど高い(図)。これは、若いほど放射線感受性が高いことを示唆している。一方、到達年齢が高齢になるほど相対リスクは低下してくる。ここで、到達年齢が高齢になるということと、被曝後の経過時間が長くなるということは同義である。したがって、こ

の時間的経過による相対リスクの低下の理由として、ひとつは、加齢に伴って放射線に曝露されていない人でもがん死亡リスクが増加するために放射線の相対的効果が希釈されるということが考えられる。また、被曝後の期間に種々の修復効果などがあり、そのために放射線の効果が弱まることも考えられる。両者の効果を分離することはむずかしい。

一方、被曝後の経過に伴い過剰死亡数自体は増加する(図2)。このことは、放射線によって発がんの初期段階のinitiationを受けていた細胞が被曝していない人よりも多くあり、それらの細胞がその後の生活習慣等によるpromotionを受けて発がんを促進されるという仮説に合致していると考えられる。

放射線被曝による消化器系がんを含む固形がんの発生は、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乗せされる形で過剰発生がみられている。このことが、放射線被曝により腫瘍抑制遺伝子の1コピーの傷害が直線的な量反応関係で増加しており、被曝後期間でのDNA傷害によるもう片方の1コピーの傷害によって、当該遺伝子の両コピーの傷害による遺伝子失活が増加し、さらに、それが被曝後期間におけるpromotionの影響も受けて、がん発生の増加、ひいてはがん死亡の増加を引き起こしていると考えられる。また、臓器・組織によるがん発生リスクの違いは、失活する腫瘍抑制遺伝子の放射線感受性と、それらの遺伝子の各臓器・組織における重要性とに関連すると思われるが、いずれも今後の課題であろう。もとより、放射線による過剰ながん発生のメカニズムが、このような単純なシナリオで説明できるものではないであろうが、疫学研究の結果と生物学的知見との整合性の解釈は必要である。

低線量域での放射線のリスクがどこまで有意であるか、また、放射線によるがんのリスクに閾値効果があるかについて、今回のデータからは、総固形がんに対しては、閾値はみとめられないが、0.2Gyまでのリスク増加は有意でないことも示された。しかし、有意性は症例数に依存するものでもあるので、これらの結果からは、従来からの線形非閾値モデルが最も妥当であろうと考

えられた。

## E. 結論

1950-2003年の間の被爆者追跡調査の結果、総固形がんはじめ主要な消化器系がんの死亡リスクの増加がみとめられた。総固形がんの過剰相対リスクは、被爆時年齢が若いほど高い一方、年齢を経るにつれて低下した。過剰死亡数は、被爆時年齢が若いほど多く、年齢を経るにつれ多くなった。これらの現象を、がん発生の分子生物学的メカニズムに沿って考察を行った。また、低線量域におけるリスクの解析結果から、従来の線形非閾値モデルが最も妥当であると考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Richardson DB, Sugiyama H, Wing S, Sakata R, Grant EJ, Shimizu Y, Nishi N, Geyer S, Soda M, Suyama A, Kasagi F, Kodama K. Positive associations between ionizing radiation and lymphoma mortality among men. *Am J Epidemiol*, 2009;169(8):969-76.

Richardson DB, Sugiyama H, Nishi N, Sakata R, Shimizu Y, Grant EJ, Soda M, Hsu WL, Suyama A, Kodama K, Kasagi F. Ionizing radiation and leukemia mortality among Japanese atomic bomb survivors, 1950-2000. *Radiat Res*, 2009;172(3):368-82.

Sugiyama H, Nishi N, Kuwabara M, Ninomiya M, Arita K, Yasui W, Kasagi F, Kodama K. Incidence and survival of childhood cancer cases diagnosed between 1998 and 2000 in Hiroshima City, Japan. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009;10(4):675-80.

Shimizu Y, Kodama K, Nishi N, Kasagi F, Suyama A, Soda M, Grant E, Sugiyama H, Sakata R, Moriwaki H, Hayashi M, Konda M, Shore R. Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003. *BMJ*, 2010: 340 (doi:10.1136/bmj.b5349)

### 2. 学会発表

Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, Kasagi F, Nishi N, Soda M, Grant EJ, Sakata R,

Sugiyama H, Kodama K. Overview of mortality in the Life Span Study during 1950-2003. The 52nd Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society, Hiroshima 11-13 November 2009 (JRRS, 2010: Suppl p149).

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, 9-10 January 2010 (JE 2010: 20 Suppl; p164).

## 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

特になし

## 放射線発がんにおけるゲノム修復機構の解析

研究分担者 神谷 研二 （広島大学原爆放射線医科学研究所）  
研究協力者 豊島 めぐみ （広島大学原爆放射線医科学研究所）  
三家本 隆宏 （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、REV1の細胞生物学的な機能解析を行った。REV1は、損傷乗り越えDNA合成機構の中心的役割を担う蛋白である。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、ポリメラーゼ活性を変化させた変異REV1蛋白を過剰発現した細胞株の解析から、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い可能性が示唆された。

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する傾向がみられた。以上の結果は、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している事を示唆する。従って、REV1の発現レベルは、放射線発がんの感受性を変化させる可能性があり、今後の検索が必要である。

### 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。このよう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。同様にREV1変異体蛋白質を発現させる目的で、pcDNA4/TOベクターを用いてpcDNA4/TO-REV1 (D569A/ E570A) とpcDNA4/TO-REV1 (R357S) を作成した。

## 2. REV1変異体を過剰発現する細胞株の樹立

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、ベクターをScaI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。REV1蛋白を発現する細胞の樹立では、ベクター導入後にコロニーを形成した細胞のクローニングを行い細胞株として樹立した。

一方、生化学解析からREV1の活性触媒ドメインのアミノ酸を置換したREV1

(D569A/E570A)変異体や基質特異性を決定するドメインのアミノ酸を置換したREV1(R357S)変異体は、その機能を欠損することが明らかにされている。そこで、REV1蛋白発現細胞と同様に、テトラサイクリン遺伝子発現誘導系を用いて、REV1変異体の発現ベクターpcDNA4/TO-REV1

(D569A/E570A)とpcDNA4/TO-REV1

(R357S)をヒト繊維肉腫細胞に導入しクローニングを行った。得られたクローンのうち、テトラサイクリンの添加によりREV1変異体タンパク質の発現を制御することができ、かつ、野生型REV1発現株と同程度のタンパク量を発現誘導することができるクローンをREV1変異体過剰発現株として樹立した。

## 3. siRNAによるREV1発現抑制法

ヒト繊維肉腫細胞株に、REV1に対する化学修飾型siRNA(インビトロジェン社)をリポフェクション法により導入した。蛋白質発現量の測定は、Western法により行った。siRNAを導入した細胞は、その後2日間培養し、生存率の測定、突然変異頻度の測定を行った。

## 4. コロニー形成法による生存率の測定

樹立細胞を放射線、または紫外線で照射するか、*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。3X10<sup>2</sup>-1x10<sup>5</sup>個の樹立細胞を

10cmディッシュに撒き、24時間培養後にtet(0.1μg/ml)を加え、さらに24時間培養した。その後、放射線または紫外線で照射するか、MNU溶液で処理した。放射線照射では、線源として<sup>137</sup>Csγ線を用い照射の線量率は1.03Gy/min、線量は1、2、4、6及び8Gyである。MNU処理の場合は、MNU濃度を4、8、16及び32μg/mlとした。1週間程度培養した後、得られたコロニー数を計測し、未処理培地で形成されたコロニー数と比較し生存率を求めた。コロニーは、0.06% crystal violet溶液で染色し、コロニー数を数えた。

## 5. HPRT遺伝子座における突然変異頻度の測定

HPRT遺伝子が機能している細胞を選択するため、細胞をHAT培地で2日間培養した。その後HAT培地を除き、さらに3日間培養を行った。得られた細胞に、放射線照射(2 Gy)、MNU処理(3 μg/ml)を行った後、5日間培養した。その後、10cmディッシュ1枚あたり、5×10<sup>5</sup>個の細胞を撒き、6-チオグアニン選択培地で培養を行った。1週間培養後、得られたコロニーの数を計測した。Plating efficiencyと、6-チオグアニン耐性変異株の出現頻度から突然変異頻度を求めた。

## 6. 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. REV1変異体を過剰発現した細胞株を用いた損傷感受性試験

REV1変異体過剰発現株を用いて、MNUに対する感受性を調べた。テトラサイクリン非存在下では、REV1(D569A/E570A)変異体、REV1(R357S)変異体過剰発現株は野生型REV1過剰発現株と比較して、同程

度のMNUに対する感受性を示した。次に、テトラサイクリン存在下におけるMNU損傷感受性試験を行い、REV1変異体過剰発現が及ぼす影響を調べた。REV1 (D569A/E570A) 変異体過剰発現株は、テトラサイクリン添加により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。

### 2. REV1過剰発現細胞株を用いた突然変異頻度の測定

REV1過剰発現株を用いて、*HPRT*遺伝子座における突然変異頻度を測定した。テトラサイクリンの存在下、非存在下における自然誘発突然変異頻度は同程度であった。MNU処理は、テトラサイクリン非存在下、存在下ともに突然変異頻度を上昇させたが、後者の方が有意に高い値を示した。

### 3. REV1発現を抑制した細胞株での損傷感受性や突然変異頻度の測定

REV1発現を抑制した細胞株を樹立するために、REV1に対するSiRNAを細胞にリポフェクションし、48時間後にREV1の発現量を測定した。ネガティブコントロールSiRNA処理では、REV1の発現量は変化しなかったが、REV1 SiRNAの導入によりREV1の発現量は抑制された。そこで、このREV1発現が抑制された細胞株を用いて、放射線や紫外線に対する感受性を調べた。REV1の発現抑制は、放射線や紫外線に対する感受性を有意に増加する傾向がみられた。また、培地に1mMのcaffeineの添加は、この傾向を増強した。次に、REV1の発現抑制が突然変異頻度に及ぼす影響を調べた。*HPRT*遺伝子座における突然変異頻度を測定したところ、REV1の発現抑制は、自然誘発突然変異頻度に影響を与えなかった。一方、REV1の発現抑制は、放射線や紫外線の照射より誘発される突然変異頻度を低下させる傾向が見られた。

## 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

乾皮症バリエント (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。

我々は、REV1が鋳型G に対しdCMP転移活性を有し、同時に脱塩基部位や酸化的損傷である8oxoGに対しても効率良くCを挿入することで損傷塩基を乗り越えることを生化学的解析により明らかにしてきた。これらの研究成果を踏まえ、今年度はREV1の変異蛋白を発現する細胞株とREV1の発現を抑制した細胞株を用いてREV1の機能について細胞生物学的解析を行った。

REV1のポリメラーゼ活性を変化させた変異REV1蛋白を発現誘導した細胞株のMNU処理に対する細胞の生存率は上昇した。この結果は、正常のREV1蛋白を発現誘導した細胞株の場合と大きく変わらなかった。このことから、MNU処理によるDNA損傷を乗り越えることで細胞を生存させるREV1の機能には、REV1のポリメラーゼ活性は直接的には関与しない可能性が示唆された。しかし、テトラサイクリン(tet)により正常のREV1蛋白の発現を誘導した細胞株をMNU処理すると*HPRT*遺伝子座における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、我々が明らかにしている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所見と考えられる。以上のことより、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可能性が示唆された。

一方、REV1蛋白の発現をREV1 SiRNAの導入により抑制した細胞株を用いて、放射線や紫外線に対する細胞死の感受性を調べた。その結果、REV1の発現を抑制した細胞では、放射線や紫外線に対する生存率が有意に低下する傾向がみられた。同様な結果

は、*REV1*をknock outしたDT40細胞に於いても認められている。即ち、*REV1*をknock outしたDT40細胞では、放射線や紫外線を照射後の細胞の生存率が著明に低下した。さらに、シスプラチン、過酸化水素、さらにはMMS等のゲノム損傷因子で処理した場合のDT40細胞の生存率も著明に低下した。以上のことから、*REV1*の発現を抑制した細胞では、放射線や紫外線が誘発するゲノム損傷部位の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。

同様に、*REV1*の発現を抑制した細胞を用いて*HPRT*遺伝子座における突然変異頻度を測定した。その結果、放射線や紫外線の照射によって誘発される*HPRT*遺伝子座の突然変異頻度は低下する傾向が観察された。

以上の結果は、前述した*REV1*蛋白の過剰発現細胞と表裏の関係にあり、*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している事を示唆するものと考えられる。従って、放射線照射で誘発される脱塩基部位や8oxoGに対しても*REV1*は、損傷乗り越えDNA合成に関与することで細胞死や突然変異の誘発に関わる可能性がある。我々は、*Rev1*を過剰発現したトランスジェニックマウスでは、放射線照射やMNU投与により胸腺リンパ腫を誘発する発がん感受性が亢進していることを明らかにしている。今回の実験結果からこの現象を解釈すると、*REV1*蛋白の過剰発現が、放射線照射やMNU投与により誘発された損傷DNA部位での損傷乗り越えDNA合成を促進し、細胞死を回避すると共に、突然変異頻度を増加させ、その結果発がん感受性が増加したものと推定される。この様に*Rev1*の発現レベルは、放射線発がんの感受性を変化させる可能性があり、今後の検索が必要である。また、最近の研究により*Rev1*の機能不全は、炎症性サイトカインであるIL-6の過剰発現を誘導し、その結果起きる炎症性hyperplasiaを介して皮膚発がんを促進することがマウスの実験で示された。*Rev1*の機能不全がIL-6の過剰発現を誘導する機序は不明であるが、ゲノム損傷に対する*Rev1*による損傷乗り越えDNA合成機序の不全が発がんの促

進に働くという新たな知見として注目される。

*REV1*が中心的役割をなす損傷乗り越え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る。この様な観点に立てば、この機構の破綻が、放射線発がんを始め一般の癌の発症に深く関与する可能性は十分予想されるところであるが、その全体像は未だ明確ではない。今後の研究が必要である。

## 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、*REV1*の細胞生物学的な機能解析を行った。*REV1*は、損傷乗り越えDNA合成機構の中心的役割を担う蛋白である。*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、ポリメラーゼ活性を変化させた変異*REV1*蛋白を過剰発現した細胞株の解析から、MNU処理による細胞生存率の上昇には、*REV1*のポリメラーゼ活性は直接的には関与しない可能性が示唆された。

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する傾向がみられた。以上の結果は、*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している事を示唆する。従って、*REV1*の発現レベルは、放射線発がんの感受性を変化させる可能性があり、今後の検索が必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fukuda H., Takamura-Enya T., Masuda Y., Nohmi T., Seki C., Kamiya K., Sugimura T., Masutani C., Hanaoka F., Nakagama H. Translesional DNA synthesis through a C8-guanyl adduct of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyr

- idine (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(38): 25585-92, 2009.
2. Huang QM, Akashi T., Masuda Y., Kamiya K., Takahashi T., Suzuki M. Roles of POLD4, smallest subunit of DNA polymerase delta, in nuclear structures and genomic stability of human cells. Biochem Biophys Res Commun., 391(2010): 542-546, 2010.
  3. Piao, J.L., Masuda Y., Kamiya K. Specific amino acid residues are involved in substrate discrimination and template binding of human REV1 protein. Biochem Biophys Res Commun., 392(2010): 140-144, 2010.
  4. Masuda Y., Piao J.L., Kamiya K. DNA Replication-Coupled PCNA Mono-Ubiquitination and Polymerase Switching in a Human In Vitro System. J. Mol. Biol., 396(2010): 487-500, 2010.
- ## 2. 学会発表
1. Masuda Y., Suzuki M., Piao, J.L., Gu Y.Q., Tsurumoto T., Kamiya K.: Reconstitution of DNA replication reactions with purified recombinant human proteins in vitro. 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2009), Seoul, 2009.5.17-20. (Abstract Book, p.116, 2009)
  2. Toyoshima M., Xi Yang., Honda H., Hamasaki K., Kusunoki Y., Watanabe H., Masuda Y., Kamiya, K.: Function of Rev1 on Carcinogenesis induced by ionizing radiation and chemical agents. 2nd Asian Congress of Radiation Research (ACRR 2009), Seoul, 2009.5.17-20. (Abstract Book, p.117, 2009)
  3. 増田雄司, 鈴木美紀, 神谷研二: 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, 小牧, 2009.6.20-21. (講演要旨集, p.14, 2009)
  4. 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, 広島, 2009.7.29. (プログラム, p.3, 2009)
  5. 豊島めぐみ, 習陽, 三家本隆宏, 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, 広島, 2009.7.29. (プログラム, p.3, 2009)
  6. 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, 松本市, 2009.9.16-18. (プログラム 予稿集, p.97, 2009)
  7. 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生化学的解析. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.1-3. (抄録集, p., 2009)
  8. 豊島めぐみ, 本田浩章, 増田雄司, 渡邊敦光, 神谷研二: 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, 横浜, 2009.10.1-3. (抄録集, p., 2009)
  9. 福田博政, 高村岳樹, 増田雄司, 神谷研二, 落合雅子, 中釜 斉: 発がん物質PhIP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, 横浜, 2009.10.1-3. (抄録集, p.96, 2009)
  10. 増田雄司, 鈴木美紀, 神谷研二: 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, 彦根市, 2009.11.1-3. (抄録集, p.22, 2009)
  11. 豊島めぐみ, 習陽, 三家本隆宏, 本田浩章, 渡邊敦光, 増田雄司, 神谷研二: 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, 彦根市, 2009.11.1-3. (抄録集, p.10, 2009)
  12. 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. 日本放射線影響学会第52回大会, 広島, 2009.11.11-13. (講演要旨集, p.99, 2009)
  13. 豊島めぐみ, 習陽, 三家本隆宏, 渡邊敦光, 本田浩章, 濱崎幹也, 楠洋一郎, 増田雄司, 神谷研二: 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. 日本放射線影響学会第52回大会, 広島, 2009.11.11-13. (講演要旨集, p.98, 2009)
  14. 三家本隆宏, 豊島めぐみ, 習陽, 本田浩章, 濱崎幹也, 楠洋一郎, 神谷研二: 損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の放射線応答に対する影響. 日本放射線影響学会第52回大会, 広島, 2009.11.11-13. (講演要旨集, p.116, 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

## 化学療法感受性を既定する分子機構の解明

研究分担者 宮川 清 東京大学大学院医学系研究科

**研究要旨** DNA二重鎖切断は放射線やゲノム障害性抗がん剤によって誘発されるDNA損傷の中でも最も重篤な損傷であり、これらによるがん治療の有効性のみならず副作用の発現をも規定する。したがって、二重鎖切断は正常細胞において残存した場合には発がんなどの疾患の原因となる一方で、がん細胞においてはアポトーシスを誘導することにより治療の最も重要な作用ともなりえる。このように、発がん治療の両方の領域の視点から解析すべき重要な分子群の中に、がんにおいてのみ特異的に発現してDNA修復を制御する分子が存在する。SYCP3は正常細胞においては生殖細胞における減数分裂期においてのみに発現し、体細胞ではがんのみに発現するいわゆるがん精巣抗原である。これまでの解析によって、この分子の体細胞における異所的発現は二重鎖切断に対する相同組換え修復において中心的役割を果たすRAD51の機能を抑制することが判明しているために、その分子機序を検討した。SYCP3の発現細胞における蛍光免疫法によって、その細胞内局在を解析した結果、乳がんの抑制蛋白質で知られるBRCA2と核内において共局在することが判明した。BRCA2はゲノム安定性に役割を果たす数種類の蛋白質と結合するが、RAD51もその一つである。そこで、BRCA2とSYCP3の直接結合を一過性の細胞発現系によって検討したところ、N末端近傍の領域と結合することが明らかとなった。この領域に結合する分子はまだ知られていない。この結果から、SYCP3はBRCA2と結合することによって、RAD51の機能を阻害して相同組換え修復を抑制しているものと考えられた。既にBRCA2変異乳がんに対するPARP阻害剤の有効性が明らかにされていることから、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検討される可能性が示唆された。

### A. 研究目的

正常細胞では生殖細胞においてのみ発現し、体細胞ではがんに特異的に発現する分子は、がん治療のよい標的となり、がん精巣抗原とも呼ばれている。既に50種類以上の分子がこの範疇に分類されることが知られているが、それらの機能については、一部のものが知られているにすぎない。今後、これらを標的とした治療法も開発されていくものと考えられるが、その際にがん細胞における生物学的機能を理解することは、科学的理論に基づく戦略を策定するためにきわめて重要である。

SYCP3は生殖細胞の減数分裂期に特異的に発現する分子であり、相同染色体間に形成されるシナプトネマ複合体を構成することから、相同染色体間の組換えに必要と考えられている。既に複数のグループからこの分子の腫瘍における発現が報告されてお

り、我々も多くの種類で発現していることを確認している。また、正常体細胞において外来性に強制発現した場合には、DNA損傷のマーカーである $\gamma$ H2AXのフォーカスが増加することから、SYCP3は内因性のDNA損傷に対する修復機能を低下させるものと考えられている。さらに外来性にDNA損傷を与えた場合の感受性を検討したところ、放射線とシスプラチンやマイトマイシンCなどのDNA架橋剤に対して有意に感受性が亢進するパターンを示すことより、変異細胞が同じパターンを呈する相同組換え修復を低下するものと考えられた。

相同組換え修復は非相同末端結合とともにDNA二重鎖切断修復の主要な修復経路であり、細胞周期依存性に正確な修復を行うことで知られている。RAD51はその中心的役割を果たす分子であり、DNA二重鎖切断部位に集積することによって、その場所に

において切断されて生成された単鎖DNAと結合し修復を開始する。この特徴を利用してSYCP3発現細胞において放射線照射後のSYCP3の核内におけるフォーカス形成を解析すると、非発現細胞よりも低下していた。この結果は、SYCP3が何らかの機序によってRAD51の機能を抑制することを示唆するものである。

このようなSYCP3の体細胞における相同組換え修復に対する作用が、どのような機序によって発現されるのか知ることは、相同組換え修復の情報に基づく新しいがん治療の開発に重要である。そこで体細胞を用いてSYCP3のRAD51への作用機構を解明することを研究目的とする。

## B. 研究方法

RAD51を筆頭に相同組換え修復の役割を果たす分子は、DNA損傷依存性に核内においてフォーカスを形成する。これは、特異的な抗体を用いて蛍光免疫法を行うことによって可視化することが可能である。そのために、SYCP3についてはFlagタグを融合した遺伝子を体細胞において発現することによって、Flagに対する抗体を用いて細胞内局在を同定する。RAD51を始めとする相同組換えに関与する分子については、各々に対する特異的な抗体を用いて可視化する。抗体作成に使われる動物種を変えることによって、異なる二次抗体を用いて二重染色を行い、共局在する分子を同定する。

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する。その一つの候補であるBRCA2は巨大な蛋白質であり、全体を発現する実験は極めて困難であるために、全体を11領域に分割し、各々の遺伝子断片をPCRによって単離する。そのN末端にHAタグを付加して発現ベクターを作成する。これを、Flagタグを付加したSYCP3の発現ベクターとともにCOS7細胞にリポフェクションによって導入する。両方の抗体によって、一過性の発現が確認できた場合には、片方の抗体によって免疫沈降を行い、もう一方の抗体によってウェスタン・ブロッティングを行うことによって共沈するかどうかを検討する。

### (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

SYCP3を外来性に強制発現した網膜色素上皮細胞において、蛍光免疫法によってこの蛋白質の細胞内局在を検討した。その結果、細胞核内においてははっきりとした形のフォーカスを多数形成していることが判明した。核小体と細胞質へはほとんど局在せず、核質において圧倒的に優位に存在していた。非照射時において既にフォーカスははっきりと観察され、放射線照射による変化は明らかではなかった。

既にSYCP3がRAD51の機能を抑制することが判明しているために、次に、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。まず、RAD51との共局在は観察されなかった。DNA二重鎖切断が生成された場合には、最初にATMと $\gamma$ H2AXがその損傷を感知することによって下流に情報を伝達する。そのために、 $\gamma$ H2AXとの局在を検討したが、共局在は観察されなかった。二重鎖切断に対する修復を開始するにあたっては、上流からの損傷応答情報がRAD51の経路に伝達されなければならないが、その役割を果たす重要な分子が乳がん抑制蛋白質として知られているBRCA1である。このBRCA1との共局在も観察されなかった。BRCA1はPALB2と呼ばれる分子を紹介することによって同じ乳がん抑制蛋白質として知られているBRCA2に情報を伝達する。BRCA2はDNA損傷の情報に応答してRAD51と直接結合する。そこで、BRCA2と二重染色を行ったところ、SYCP3は核内において共局在することが判明した。

このようにSYCP3とBRCA2が複合体を形成することが見出されたために、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た。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判明した。

## D. 考察

本研究によって、がん精巣抗原である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。

まず発がんにおける役割を考察することにする。相同組換え機能が低下すると、DNA二重鎖切断に大きな影響が出ることが知られている。その代表に染色体再構成と染色体異数性があげられる。染色体再構成で最も有名なものは染色体転座であり、古くから白血病やリンパ腫の原因となることが知られている。最近では、これら造血器腫瘍に加えて、肺がんや乳がんなどの固形腫瘍においても予想以上に染色体転座が存在することが報告され、発がんの重要な機序であることが確立している。また、異数体は古くから多くのがんで観察されているが、近年の生物学的な実験により、状況によっては確かに発がんの原因となる場合があることも確認されている。これらの異常はBRCA1やBRCA2の変異がある腫瘍において存在するが、これらの変異が存在しない場合にも同様の異常は頻繁に観察されていた。本研究によって、BRCA1やBRCA2の変異がなくてもSYCP3のようなBRCA2に結合してその機能を抑制する場合が存在すれば、発がんの原因となる染色体不安定性が誘導されることが明らかにされたことは、予想以上に相同組換え修復の低下によって発症するがんが多いことを示唆するものである。

次に、治療の観点から考察してみる。BRCA1やBRCA2の変異を有する乳がんは、内分泌療法や分子標的治療の標的となる分子が発現していないために、サブタイプではtriple-negativeに分類され、治療は抵抗性になることが多い。そのために、2つの治療戦略が国際的に臨床研究で検討されている。一つは、相同組換え修復が低下している場合にはDNA架橋剤に対する感受性が亢進することから、乳がんではあまり使用されて

こなかったシスプラチンやカルボプラチンなどの白金製剤の有効性を検討するものである。もう一つはDNA単鎖切断に対して優位にはたらく酵素であるpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)の阻害剤の有効性の検討である。これは単鎖切断が修復されない場合にはそれが二重鎖切断になり、BRCAが変異をおこしている場合にはその修復ができないために、治療効果が高まることを理論的な根拠としたものである。すでに、海外における臨床試験において良好な有効性が証明され、今後の発展が期待されている薬剤である。本研究は、BRCA2の変異がなくてもSYCP3のようながん精巣抗原が発現しているがんにおいては、このような白金製剤やPARP阻害剤などが有効である可能性を示唆するものである。したがって、これまで治療抵抗性であったがんにおいても、このような新しい治療の適応が拡大できる可能性を示すものである。したがって、今後はこのような治療の感受性予測マーカーとして使用できるかどうかを検討する研究が必要となる。

## E. 結論

がん精巣抗原の一つとして同定されているSYCP3の詳細な分子機能解析を行なった。その結果、乳がんの抑制蛋白質であるBRCA2と複合体を形成することによって、その重要な機能であるRAD51による相同組換え修復を抑制することが明らかとなった。BRCA変異乳がんにおいては、相同組換え修復に異常をきたしていることを利用して新しい治療戦略が検討されているが、本研究の成果は、このような変異がなくても機能的にBRCAが抑制されているがんに対しては同様の治療戦略を策定できる可能性を示唆するものである。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方法を提唱することにも発展するものである。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Katsura M, Tsuruga T, Date O, Yoshihara T, Ishida M, Tomoda Y, Okajima M, Takaku M,

Kurumizaka H, Kinomura A, Mishima HK and Miyagawa K. The ATR-Chk1 pathway plays a role in the generation of centrosome aberrations induced by Rad51C dysfunction. *Nucleic Acids Res* 2009 37: 3959-3968.

Takaku M, Machida S, Hosoya N, Nakayama S, Takizawa Y, Sakane I, Shibata T, Miyagawa K and Kurumizaka H. Recombination activation function of the novel RAD51- and RAD51B-binding protein, human EVL. *J Biol Chem* 2009 284: 14326-14336.

Sasano N, Enomoto A, Hosoi Y, Katsumura Y, Matsumoto Y, Morita A, Shiraishi K, Miyagawa K, Igaki H and Nakagawa K. Edaravone, a known free radical scavenger, enhances X-ray-induced apoptosis at low concentrations. *Cancer Lett*, in press.

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
<u>Yasui W</u> , 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 cancers	Nova Science Publishers	New York	2009	93-111

## 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
Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu C-G, Oue N, <u>Yasui W</u> , Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin G and Carlo CM	Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis	Lancet Oncol	11	136-146	2010
Sakamoto N, Oue N, Noguchi T, Sentani K, Anami K, Sanada Y, Yoshida K and <u>Yasui W</u>	Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is up- regulated in esophageal squamous cell carcinoma	Cancer Sci	in press		2010 2009 Dec 16. [Epub ahead of print]
Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, <u>Yasui W</u> and Kikuchi A	Wnt5a signaling is involved in aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase	Oncogene	in press		2010 2010 Jan 18. [Epub ahead of print]
Sentani K, Oue N, Noguchi T, Sakamoto N, Matsusaki K and <u>Yasui W</u>	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		2010

Seko N, Oue N, Noguchi T, Sentani K, Sakamoto N, Hinoi T, Okajima M and Yasui W	Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer	Exp Ther Med	1	73-78	2010
Oue N, Sentani K, Noguchi T, Ohara S, Sakamoto N, Hayashi T, Anami K, Motoshita J, Ito M, Tanaka S, Yoshida K and Yasui W	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
Sugiyama H, Nishi N, Kuwabara M, Ninomiya M, Arita K, Yasui W, Kasagi F and Kodama K	Incidence and survival of childhood cancer cases diagnosed 1998 and 2000 in Hiroshima city, Japan	Asian Pac J Cancer Prev	10	675-680	2009
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	16	1390-1396	2009
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	137	242-252	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

Iwase H, Kurebayashi J, Tsuda H, Ohta T, Kurosumi M, <u>Miyamoto K</u> , Yamamoto Y and 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			2010 2009 May 23. [Epub ahead of print]
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	30	466-471		2009
<u>Hamatani K</u> , Eguchi H, Mukai M, Koyama K, Taga M, Ito R, Hayashi Y and 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
Yoshida K, Nakachi K, Imai K, Cologne JB, Niwa Y, Kusunoki Y and <u>Hayashi T</u>	Lung cancer susceptibility among atomic bomb survivors in relation to CA repeat number polymorphism of <i>epidermal growth factor receptor</i> gene and radiation dose	Carcinogenesis	30	2037-2041		2009
Hattori N, <u>Hayashi T</u> , Nakachi K, Ichikawa H, Goto C, Tokudome Y, Kuriki K, Hoshino H, Shibata K, Yamada N, Tokudome M, Suzuki S, Nagaya T, Kobayashi M and Tokudome S	Changes of ROS during a Two-day Ultra-marathon Race.	Int J Sports Med	30	426-429		2009
Yoshida K, Kubo Y, <u>Kusunoki Y</u> , Morishita Y, Nagamura H, Hayashi I, Kyoizumi S, Seyama T, Nakachi K and <u>Hayashi T</u>	Caspase-independent cell death without generation of reactive oxygen species in irradiated MOLT-4 human leukemia cells	Cell Immunol	255	61-68		2009
Kawasaki A, <u>Hayashi T</u> , Nakachi K, Trosko JE, Sugihara K, Kotake Y, Ohta S	Modulation of connexin43 in rotenone induced model of Parkinson's disease	Neuroscience	160	61-68		2009
Kyoizumi S, Yamaoka M, Kubo Y, Hamasaki K, Hayashi T, Nakachi K, Kasagi F and <u>Kusunoki Y</u>	Memory CD4 T-cell subsets discriminated by CD43 expression level in A-bomb survivors	Int J Radiat Biol	86	56-62		2010



Hamasaki K, <u>Kusunoki Y</u> , Nakashima E, Takahashi N, Nakachi K, Nakamura N and Kodama Y	Clonally expanded T lymphocytes from atomic bomb survivors in vitro show no evidence of cytogenetic instability	Radiat Res	172	234-243	2009
Richardson D, Sugiyama H, Wing S, Sakata R, Grant EJ, Shimizu Y, <u>Nishi N</u> , Geyer S, Soda M, Suyama A, Kodama K, Kasagi F	Positive association between ionizing radiation and lymphoma mortality among men	Am J Epidemiol	169	969-976	2009
Richardson D, Sugiyama H, <u>Nishi N</u> , Sakata R, Shimizu Y, Grant E, Soda M, Hsu WL, Suyama A, Kodama K and Kasagi F	Ionizing radiation and leukemia mortality among Japanese atomic bomb survivors, 1950-2000	Radiat Res	172	368-382	2009
Shimizu Y, Kodama K, <u>Nishi N</u> , Kasagi F, Suyama A, Soda M, Grant E, Sugiyama H, Sakata R, Moriwaki H, Hayashi M, Konda M and Shore R	Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003	BMJ	340	b4326	2010
Masuda Y, Piao J and <u>Kamiya K</u>	DNA Replication-Coupled PCNA Mono-Ubiquitination and Polymerase Switching in a Human In Vitro System.	J Mol Biol	396	487-500	2010
Piao J, Masuda Y and <u>Kamiya K</u>	Specific amino acid residues are involved in substrate discrimination and template binding of human REV1 protein	Biochem Biophys Res Commun	392	140-144	2010
Huang QM, Akashi T, Masuda Y, <u>Kamiya K</u> , Takahashi T and Suzuki M	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
Fukuda H, Takamura-Enya T, Masuda Y, Nohmi T, Seki C, <u>Kamiya K</u> , Sugimura T, Masutani C, Hanaoka F and Nakagama H	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

Katsura M, Tsuruga T, Date O, Yoshihara T, Ishida M, Tomoda Y, Okajima M, Takaku M, Kurumizaka H, Kinomura A, Mishima HK and Miyagawa K	The ATR-Chk1 pathway plays a role in the generation of centrosome aberrations induced by Rad51C dysfunction	Nucleic Acids Res	37	3959-3968	2009
Takaku M, Machida S, Hosoya N, Nakayama S, Takizawa Y, Sakane I, Shibata T, Miyagawa K and Kurumizaka H	Recombination activation function of the novel RAD51- and RAD51B-binding protein, human EVL	J Biol Chem	284	14326-14336	2009
Sasano N, Enomoto A, Hosoi Y, Katsumura Y, Matsumoto Y, Morita A, Shiraishi K, Miyagawa K, Igaki H and Nakagawa K.	Edaravone, a known free radical scavenger, enhances X-ray-induced apoptosis at low concentrations	Cancer Lett	in press		2010 2010 Jan 19. [Epub ahead of print]

---

## Histological and Serological Tumor Markers of Gastric Cancer

---

*Wataru Yasui<sup>\*</sup>1, Kazuhiro Sentani, Naoya Sakamoto,  
Junichi Motoshita and Naohide Oue*

Department of Molecular Pathology Hiroshima  
University Graduate School of Biomedical Sciences, Japan

### Abstract

Gastric cancer is one of the most common cancers worldwide. The prognosis of early gastric cancer patients is prolonged drastically by recent progress of diagnosis and treatment; however, the prognosis of patients with advanced disease remains poor. Therefore, the most important to conquer gastric cancer is the early detection and the effective treatment for advanced cancer. This chapter reviews classical and possible serological tumor markers and their usefulness in gastric cancer detection and histological tumor markers in relation with patient prognosis. Known tumor markers such as CEA and CA 72-4 are not satisfactory in their sensitivity for early detection although they may have prognostic impact. Several of possible tumor markers such as interleukins, matrix metalloproteinases, cell adhesion molecules, cell cycle regulators and methylated DNA are reported to be useful in clinical or histological diagnosis that must be confirmed by prospective study. Novel tumor markers and possible therapeutic targets such as Reg IV and GW112 identified by our global analysis of gene expression are also described. Further investigations are needed to identify new diagnostic targets, which are directory corrected to molecular target therapy.

**Keywords:** Serological tumor marker – Histological prognostic factor – Gastric cancer – CEA – CA 72-4 – Growth factor – Matrix metalloproteinase – Cell adhesion molecule – DNA methylation – Cell cycle regulator - Serial analysis of gene expression.

---

<sup>\*</sup> Corresponding author: Wataru Yasui; Department of Molecular Pathology Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan; E-mail: [wyasui@hiroshima-u.ac.jp](mailto:wyasui@hiroshima-u.ac.jp)

## Introduction

Gastric cancer is the fourth most common cancer and the second leading cause of cancer death only to lung cancer in the world [1]. Incidence of gastric cancer is declining worldwide, which is mainly due to changes in life style especially eating habits (decreased consumption of high-salt diet and availability of fresh fruit and vegetables throughout the year). Another point for decreasing incidence of gastric cancer is a rate of *Helicobacter pylori* (Hp) infection. It is known that worldwide gastric cancer has geographical variations in incidence, patient's outcome and molecular bases between the West and the East [2, 3]. The prognosis of early gastric cancer is prolonged drastically by recent progress of diagnosis and treatment. However, if patients are diagnosed with gastric cancer as advanced disease, the prognosis is extremely poor with survival rates rarely exceeding 15%. According to the world cancer report by World Health Organization, five-year survival rate of gastric cancer patients of all stages after diagnosis is around 50% in Japan and is 30% or less in other countries [4]. Therefore, the point, which should be conquered in gastric cancer, is the discovery in an early stage and the effective medical treatment for advanced cancer. Integrated research in molecular pathology has uncovered the genetic and epigenetic alterations in the course of development and progression of gastric cancer [5-8]. These include telomerase activation, genetic instability, and abnormalities in oncogenes, tumor suppressor genes, growth factors, matrix degradation enzymes, cell cycle regulators, cell adhesion molecules and DNA repair genes. Most of these can be used as tumor markers of gastric cancer, and if secreted, those serve as serological tumor markers. A better knowledge of the molecular bases of stomach carcinogenesis leads to new paradigms in diagnostics. Novel molecules participating in biological behavior of cancer must be useful targets for cancer therapy. This chapter describes classical, possible and novel tumor markers of gastric cancer and their clinical usefulness in diagnosis using serum samples and histology sections.

## Known Serological Tumor Markers

Serological tumor markers have clinical value in screening high risk group, differentiating between normal and cancer patients, characterizing tumor behavior, and monitoring cancer growth and response to therapy [9]. While most of tumor markers are derived from cancer cells, some are produced by host cells in response to tumor growth and invasion. Known and possible serological tumor markers are listed in table 1.

**Table 1. Serological tumor markers of gastric cancer**

Known markers	Pepsinogen, CEA, CA19-9, CA 72-4
Possible markers	Interleukins
	IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-18, IL-2 receptor
	Growth factor and angiogenic factor
	VEGF-A, VEGF-C, TGF-beta1, HGF
	Matrix metalloproteinase
	MMP-9, MMP-10, MMP-11, TIMP-1