

201019022 A

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

放射線障害と宿主要因からみた発がんの分子基盤とその臨床応用に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安井 弥  
平成23年（2011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

放射線障害と宿主要因からみた発がんの分子基盤とその臨床応用に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安井 弥

平成23年(2011年)年4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
放射線障害と宿主要因からみた発がんの分子基盤とその臨床応用に関する研究 -	1
安井 弥	
II. 分担研究報告	
1. マイクロ RNA からみた放射線関連固形がんの特徴 -----	16
安井 弥	
2. 放射線二次がんの研究 -----	24
石川雄一	
3. 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 -----	28
宮本和明	
4. 放射線誘発脳腫瘍における放射線に特徴的なゲノム変異とメチル化異常 -	31
高畠貴志	
5. 放射線発がんにおける損傷乗り越えDNA合成酵素REV1の役割 -----	35
神谷研二	
6. DNA修復遺伝子の発現異常によるがん特性の解明 -----	40
宮川 清	
7. 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 -----	44
8. 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 -----	48
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 -----	58

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）

総括研究報告書

## 放射線障害と宿主要因からみた発がんの分子基盤とその臨床応用に関する研究

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 放射線発がんの分子基盤を解明し、その成果をリスク評価や治療開発等の臨床応用に展開することを目的とし、「放射線関連がんにおけるエピジェネティクス」、「放射線障害による発がんモデルにおける検証」、「原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん」の観点から研究を行なった。「放射線関連がんにおけるエピジェネティクス」の解析により、被爆者に発生した胃がんのmiRNAの発現レベルを定量的に解析した結果、miR-143、miR-145が高線量被曝群で2倍以上に発現亢進していた。がん幹細胞マーカーCD44、CD133、ALDH1の被爆者胃がん症例における解析では、被曝との有意な相関は認められなかった。子宮がん放射線治療後の大腸がん31例の解析の結果、粘液がんの多いことが判明し、通常の大腸がんとのmiRNAの発現パターンを比較する試みを開始した。乳がんではメチル化異常が認められる遺伝子*NR5A2*を同定した。被爆者乳がんが発現が亢進しているmiRNAを新たに5種類同定した。「放射線障害による発がんモデルにおける検証」において、*Ptch1*ヘテロ欠損マウス髄芽腫モデルでは、*Cdkn2a*、*Pax6*、*Pdgfra*など細胞周期制御や腫瘍の転移性等と関連する複数のkey遺伝子近傍DNA領域において、放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常を持つ腫瘍は低メチル化状態であることがわかった。REV1の解析から、その発がん促進効果は細胞死や突然変異頻度に及ぼす影響によると推定されるが、REV1による直接的なDNA損傷応答反応によるものではないことが示された。また、SYCE2の解析から、ATMを入口とするDNA損傷応答経路が過剰に活性化され染色体不安定性が誘導されるとともに、放射線や化学療法に対する抵抗性がもたらされることが示唆された。「原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん」の研究では、*NKG2D*ハプロタイプがHCV感染後のHCVクリアランスあるいは持続感染の経路決定に影響すること、また肝発がんには*NKG2D*ハプロタイプのみならず放射線被曝も関与することが示唆された。さらに、*GPA* 突然変異頻度と*cyclin D1*の遺伝子型との有意な関連が認められ、P53BP1依存性DNA修復経路に関わる遺伝子機能の個人差が、放射線誘発遺伝子障害の感受性に影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究の成果は、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・治療法を提示に貢献するものである。

### 研究分担者

石川雄一

(財)がん研究会がん研究所・部長

宮本和明

呉医療センター・中国がんセンター

・室長

高島貴志

独立行政法人放射線医学総合研究所・

主任研究員  
神谷 研二  
広島大学原爆放射線医科学研究所・  
所長  
宮川 清  
東京大学大学院医学系研究科・教授  
林 奉権  
(財)放射線影響研究所・副部長  
楠 洋一郎  
(財)放射線影響研究所・部長

## A. 研究目的

原子力エネルギーや医療、産業等で放射線利用が激増しており、放射線の健康への影響とその管理が大きな問題となっている。医療における放射線の利用は、診断に留まらず、がん治療の大きな柱になっている一方で、発がんの外的要因としての影響が世界的に懸念されている。この度の東北大地震に伴う津波に関連して発生した東京電力福島第一原子力発電所の事故においても、作業員ならびに周辺住民の健康管理上、重要な問題である。被爆国として放射線障害に関する研究をリードするわが国には、増加する放射線利用における安全・安心に資する学術情報を世界に発信することが期待されている。本研究は、放射線発がんの分子基盤を解明し、その成果をリスク評価や治療開発等の臨床応用に展開することを目的とし、以下の3つの観点から解析する。

「放射線関連がんにおけるエピジェネティクス」では、microRNAおよびCpGメチル化の面から、高線量放射線被ばく発がんである放射線治療後に発生した放射線二次がんと低線量被ばく影響下の発がんである原爆被爆者に発生したがんを解析し、通常のがんとの違いを遺伝子制御の面から検討する放射線関連固形がんの特徴的異常を同定することにより、それを標的とした診断法・治療法・予防法の開発を目指すものである。

「放射線障害による発がんモデルにおける検証」としては、3つの系を用いる。*Ptch1*<sup>+/+</sup>マウスに生じた髄芽腫では、放射線

誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常を明らかにすることで、放射線による発がん機構の理解と予防法構築に寄与するモデル系を確立する。また、点変異誘発機構の中心的役割を担うREV1の遺伝子改変細胞/動物をモデルに、放射線被ばくによる点変異誘発機構および発がん機構の解明を目指す。さらに、減数分裂特異的遺伝子を取り上げ、そのエピジェネティックな変化とDNA修復機能を解析し、個別化治療に応用することを目的とする。

「原爆被爆者コホートを用いた宿主要因と発がん」の解析の内、炎症・免疫反応の個体差の遺伝的要因を探索する「表現型・遺伝子型ゲノム関連分析」は、本研究独自のアプローチであり、予防研究に有用な「変動する個別のリスクを表す代理指標」の開発が目的である。さらに、ゲノム不安定性、炎症生体指標と遺伝子型ゲノム関連分析により、放射線の影響と遺伝的要因の相互作用に基づく発がんリスクの評価システムの構築を目指す。

これらの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。

## B. 研究方法

### 1) 放射線関連がんにおけるエピジェネティクス

#### 1. マイクロRNAからみた放射線関連固形がんの特徴 (安井)

被爆者に発生した胃がんにおけるmiRNAの発現解析：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、被爆群と対照群のFFPE切片を使用した。また、miRNAマイクロアレイ (Genopal® MICH07) 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、標的遺伝子の推定ならびに確認を行なった。

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：CAST法を用いて胃がん細胞株、胃がん組織および正常胃粘膜組織について解析し、定量的RT-PCR、western blot、免疫染色で発現を検証、一部については機能解析を行なった。

対照胃がんおよび被爆者胃がんにおけるがん幹細胞の発現解析：一般集団に発生した胃がんおよびLSS集団に発生した胃がんのFFPE切片を使用し、免疫染色によって、がん幹細胞マーカーCD44、CD133、ALDH1の発現を検討した。

## 2. 放射線二次がんの研究（石川）

がん研病院の腫瘍ファイル（1984-2001年の手術症例）を用いて、放射線治療後に発生した悪性腫瘍を収集した。具体的には、多重がん症例のうち、がんの発生以前に放射線治療の履歴を有する症例を抽出した。そのうち、照射野に近いなど、二次がんと推定されるものをピックアップした。比較対照群として、年齢、組織型、発生部位などをマッチさせた一般のがんならびに放射線治療後でも、30年間がんを発生しなかった症例を準備した。さらに、二次がんにおける遺伝子制御パターンを検討するため、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織を用いて、一般のがんとマイクロRNA発現パターンを比較する試みを開始した。

## 3. 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。

被爆者乳がんにおける新規miRNA発現異常の探索：広島県の被爆者に発生した乳がんとは非被爆者に発生した乳がんとの間で発現が異なるmicroRNAを網羅的に解析し、放射線障害に基づく乳腺発がんに関連するmicroRNA異常候補を同定した。

乳がんにおけるエピジェネティックな機

構：乳がんで高頻度に発現が低下するmiR-34cのDNAのメチル化異常について解析した。

## 2) 放射線障害による発がんモデルにおける検証

### 1. 放射線誘発脳腫瘍における放射線に特徴的なゲノム変異とメチル化異常（高島）

*Ptch1*遺伝子ヘテロ欠損マウスに生じた髄芽腫において放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常とDNAメチル化状態の関連を調べるため、自然発生型のゲノム異常を持つ腫瘍（S型腫瘍）6例と放射線誘発型のゲノム異常を持つ腫瘍（R型腫瘍）6例のゲノムDNAについて、抗メチルシトシン抗体とCpGアイランドアレイを用いるMeDIP-Chip法でCpGアイランドのメチル化レベルを網羅的に解析した。CpGアイランドのメチル化レベルに差がみられた領域近傍の遺伝子について、58の腫瘍を対象にリアルタイムPCR法により発現レベルを比較した。

### 2. 放射線発がんにおける損傷乗越えDNA合成酵素REV1の役割（神谷）

ヒト繊維肉腫細胞HT1080株にベクターpcDNA6/TR、pcDNA4/TO-REV1を導入したHT1080-pcDNA6/TR-pcDNA4/TO-REV1-C6(以下HT1080-REV1-C6)を用いた。tetによるREV1の発現誘導あるいはsiRNAによる発現抑制を行なった後、放射線照射および紫外線照射を行った。DNA損傷応答の解析には、抗phospho-ATM (Ser1981)抗体、抗p53抗体、抗phospho-p53 (Ser15)抗体、抗p21抗体、抗phospho H2AX (Ser139)抗体、抗PCNA抗体などを用いた。細胞周期の解析には、BD FACS Canto II Flow Cytometer (BD)を用いた。放射線または紫外線で照射した後の生存率はコロニー形成法を用いて測定した。

### 3. DNA修復遺伝子の発現異常によるがん特性の解明（宮川）

新たながん精巢抗原であるSYCE2の発現パターンをRT-PCRによって解析した。SYCE2が発現していない正常網膜由来上皮

細胞をテロメラーゼ遺伝子の導入によって不死化した細胞に遺伝子導入、放射線照射とシスプラチン処理後のコロニー形成能を解析することによって、これらDNA損傷に対する感受性を評価した。染色体の数的異常はFISHによって解析した。相同組換えの機能を評価するためには、放射線照射後の姉妹染色分体交換の頻度を測定する。また、相同組換えの中心的分子であるRad51の、放射線照射後の核内におけるフォーカス形成を、蛍光免疫染色によって解析する。さらに、DNA損傷応答経路の活性化の状況は、ATMに対する抗体で免疫沈降を行なった後に、ATM1981番セリンのリン酸化抗体を用いたウェスタン・ブロットによって評価した。

### 3) 原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん

#### 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)

放射線影響研究所の成人健康調査(AHS)コホートで見出された HCV 持続感染者群 134 名と HCV クリアランス者群 107 名によるケース・コントロール研究を行い、肝細胞がんについては同コホートで見出された肝細胞がん 115 症例および 2,107 名のサブコホートによるケース・コホート研究を行った。NKG2D 遺伝子多型に関しては、NKG2D 遺伝子の転写制御領域を中心に複数の SNP を TaqMan アッセイによって同定した。同定した複数の NKG2D 遺伝子多型部位の中から連鎖不平衡解析により見出されたハプロタイプ(NKG2D hb1)を解析に用いた。

#### 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1,700名について測定したものをを用いた。放射線誘発GPA突然変異頻度の個人

差とP53BP1遺伝子の多型の関係を支持する結果が得られているため、今年度はP53BP1の下流にあるcyclin D1遺伝子を検討した。SNPはTaqMan-Allelic Discrimination法を用いて解析し、がんを発生していない約800名について、遺伝子の多型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、ANCOVAにて検討した。

#### (倫理面への配慮)

倫理面への配慮については、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)に従って行なった。遺伝子組換え生物等使用実験を含む研究は、「遺伝子組換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号)、「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施行規則」(平成15年財務省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第1号)等に基づいて行なった。さらに、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) 放射線関連がんにおけるエピジェネティクス

##### 1. マイクロ RNA からみた放射線関連固形がんの特徴 (安井)

被爆者に発生した胃がんでは、miR-143、miR-145を含む32種類のmiRNAが高線量被曝群(102-1062mGy)で2倍以上に発現亢進していた。胃がん細胞株では培養上清中にmiR-143が存在していた。一方、非がん部と比較してがん部で発現が低下するmiR-148aはメチル化によって発現が抑制されており、

標的遺伝子MMP7の制御を介してがんの浸潤に関わることが分かった。一方、CAST法を用いた膜蛋白・分泌蛋白の網羅的遺伝子発現解析から、胃がんに特異性の高い遺伝子としてTSPA8およびTM9SF3を同定した。がん幹細胞マーカー3種類の発現解析では、一般集団に発生した胃がん症例において、CD44はリンパ節転移、CD133はリンパ節転移と組織型、ALDH1は深達度と組織型との間に有意な相関を示した。しかし、被爆者に発生した胃がん症例におけるCD44、CD133、ALDH1の発現と被曝との有意な相関は認められなかった。

## 2. 放射線二次がんの研究 (石川)

がん研病院において放射線治療後に発生した悪性腫瘍140個を収集した。その中には、子宮がん放射線治療後の大腸がんは31例あり、膀胱がんは10例あった。大腸がんでは、性別は全例女性、潜伏期間は17.5年、発生部位は直腸が大部分であった。組織学的には、粘液がんが7例と多かったが、予後良好であった。放射線照射から大腸がん発生において放射線大腸炎に着目したところ、放射線大腸炎を伴う症例は粘液がんでは6/7、他の組織型では13/22であり、粘液がんが高い傾向があった。次に、放射線二次がんにおける遺伝子制御パターンを検討するため、大腸がんの何例かのホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて、通常のがんとマイクロRNA発現パターンを比較することを試みた。現在、更に条件を検討中である。

## 3. 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NR5A2 (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2*)を新規に同定した。NR5A2のメチル化異常は乳がん細胞株8株中4株、乳がん症例でも21症例中5例(24%)に検出された。細胞および症例ともにホルモン受容体陽性がんメチル化異常が認められた。被爆者に発生した乳がんにおいて10倍以上に発現が亢進しているmiRNAとして、miR-150、miR-142-5p、miR-142-3p、miR-146a、miR-223の5種類を同定した。乳がんにおける

miR-34cのDNAのメチル化異常を乳がん細胞8株および乳がん症例40症例で解析したところ、細胞株および症例のすべてにおいてメチル化異常が認められた。

## 2) 放射線障害による発がんモデルにおける検証

### 1. 放射線誘発脳腫瘍における放射線に特徴的なゲノム変異とメチル化異常 (高島)

S型とR型腫瘍各6例について、ゲノム網羅的な比較を行った結果、21か所のCpGアイランドにおけるメチル化レベルにおいて、両タイプの腫瘍集団間で顕著な差が認められた。R型では低メチル化箇所が20カ所検出された。この近傍には複数の遺伝子 (*Pax6*, *Cdkn2a*, *Pdgfra*など) がマップされていた。*Pax6*と*Cdkn2a*のCpGアイランドでは、S型腫瘍が高メチル化なのに対し、R型腫瘍では、低メチル化の状態であった。メチル化レベルと遺伝子発現量の関係を検討した結果、*Pax6*, *Pdgfra*, *Otx2*遺伝子では負の相関(高メチル化=低発現)が、逆に*Cdkn2a*では正の相関(高メチル化=高発現)が認められた。死亡日齢と*Pax6*と*Cdkn2a*遺伝子発現量の相関を解析したところ、*Pax6*遺伝子の発現量は、発症時期が遅く死亡日齢が長くなるほど低く、逆に*Cdkn2a*遺伝子座にコードされる遺伝子*p19ARF*およびある*p16Ink4a*は発症時期が遅くなるほど高かった。

### 2. 放射線発がんにおける損傷乗越えDNA合成酵素REV1の役割 (神谷)

REV1過剰発現系において、対照細胞では、放射線および紫外線照射後ATMのリン酸化、p53のリン酸化、H2AXのリン酸化、p53タンパクの安定化、p21発現レベルの上昇が観察されたが、REV1過剰発現による影響は受けなかった。放射線照射後、6時間後からG1/S、G2/Mチェックポイントが立ち上がり、24時間後には非照射と同程度の細胞周期分布を示した。REV1過剰発現は、放射線被ばく後の細胞周期チェックポイントの挙動に影響を与えなかった。DNA損傷応答反応に関しては、REV1の発現抑制による影響はみ



られなかった。また、REV1の発現抑制は放射線被ばく後の細胞周期チェックポイントの挙動に影響を与えなかった。放射線や紫外線に対する損傷感受性を調べた結果、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。

### 3. DNA修復遺伝子の発現異常によるがん特性の解明 (宮川)

SYCE2の発現は、ヒト各種がん細胞株では16細胞中8細胞において認められた。発現のない網膜上皮細胞にSYCE2を強制発現させたところ、核内にびまん性に局在し、放射線とシスプラチンに対して約2倍抵抗性となった。相同組換え修復の指標である姉妹染色分体交換の頻度は、2Gy照射後に発現細胞では増加が認められ、また8Gy照射後のRad51の核内フォーカス形成については、非発現細胞においては平均50%程度の細胞であったものが、発現細胞では60%と増加していた。細胞周期の分布をFACSで解析したが、SYCE2発現の有無で差異は認められなかった。染色体の数的異常については、染色体7番、17番ともに増加が認められた。ATMのセリン1981番のリン酸化の8Gy放射線照射による誘導も亢進していた。SYCE2のメチル化阻害による発現誘導が認められた。

### 3) 原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん

#### 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)

HCVクリアランス者群とHCV持続感染者群について、*NKG2D*遺伝子型とHCV感染後の経過との関連を調べた結果、*NKG2D*の*HNK1/HNK1*ハプロタイプに比べて、*LNK1*を持つ集団 (*LNK1/LNK1*または*LNK1/HNK1*)のHCVクリアランス者の割合が低い傾向が認められた。特に女性において、*LNK1*を持つ集団でHCV持続感染のリスクが有意に増加することが見出された(オッズ比3.7, 95% CI: 1.1-12.5)。肝細胞がんについて行ったケース・コホート解析の結

果、対象者を被曝線量3カテゴリー(非被曝, 0.7Gy未満の被曝, 0.7 Gy以上の被曝)と*NKG2D*ハプロタイプの2カテゴリーとの組み合わせに分けると、参照カテゴリー(*HNK1/HNK1*で非被曝)に比べ、*LNK1*を持つ集団の中で最も高い被曝線量カテゴリー(0.7Gy以上)の組み合わせで肝発がんリスクが最大となった(RR = 4.3, 95% CI: 1.0-18.0)。

#### 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)

*cyclin D1*の870番目の塩基のSNP (rs9344)に*G/G*の遺伝子型を有する対象者と、その他の遺伝子型(*A/G* or *A/A*)の対象者について、1 Gy未満の低線量被ばく群および1 Gy以上の高線量被ばく群に分けて*GPA*変異体頻度を比較した。低線量被ばく群の*GPA*変異体頻度には*cyclin D1*の遺伝子型との有意な関連は認められなかった。一方、高線量被ばく群では、*cyclin D1*の870番目の塩基に*G/G*を有する被爆者では*A/G*あるいは*A/A*を有する被爆者に比べて*GPA*変異体頻度は有意に低値であった( $P=0.013$ )。したがって、*cyclin D1*の870番目の塩基のSNPは、バックグラウンドの*GPA*変異体頻度には関係しないが、高線量放射線被ばくで誘発される*GPA*変異体の頻度に影響を及ぼす可能性が示唆された。

### D. 考察

放射線関連がんにおけるエピジェネティクスに関する研究では、原爆被爆者ならびに対照群に発生した胃がんおよび乳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の抽出を行ない、放射線治療後二次がんについても解析を開始した。胃がん組織の解析で抽出されたmiR-143遺伝子は、染色体に5q32でmiR-145遺伝子の近傍に存在する。最近、平滑筋細胞におけるmyocardinによる分化過程において、miR-143は直接versican遺伝子の3'-UTRに結合し、versicanの発現を抑制することが報告された。我々は既に、

被爆者胃がんにおいてversicanのがん間質における発現が有意に低下していることを報告している。胃がん細胞株でも培養上清中にmiR-143が存在することから、胃がん細胞から分泌されたmiR-143が間質細胞に作用し、被爆者胃がんではversicanの発現を抑制しているのかもしれない。現在、胃がん細胞株とがん組織から単離した線維芽細胞株の共培養系を用いてこの可能性を検証中である。一方、がんの進展・治療抵抗性におけるがん幹細胞の存在が注目されている。今回のがん幹細胞マーカーの解析から、CD44, CD133, ALDH1の中ではCD133が胃がんのがん幹細胞の比較的良好な指標となることが分かった。さらに、がんの進展や予後に関わっていることが示唆された。しかしながら、被爆者に発生した胃がん症例における解析では、被曝とCD44, CD133, ALDH1の発現との間に有意な相関は認められなかった。今後、症例数を増やすとともに、他のがん幹細胞マーカーについても検討する必要がある。

放射線二次がんについては、子宮がん放射線治療後の大腸がんに着目して31例を収集したところ、大腸がんの中でも粘液がんの多いことが判明した。また、放射線照射が直接遺伝子に傷をつけて発がんに至るのか、それとも何らかの中間病変が介在して大腸粘膜ががん化するののかについての知見を得るために、放射線治療後によく発生する放射線大腸炎に着目した。統計学的有意差は得られなかったものの、放射線二次がんの特徴である粘液がんでは放射線大腸炎の頻度が高い傾向が示された。本研究対象の二次がんは材料が古く新鮮凍結材料でしか施行できない方法ではなく、FFPE材料でも解析が可能と推定されるmiRNAに注目して検索をすすめる。

乳がんのエピジェネティックな異常としてNR5A2を新規に同定した。NR5A2は核内受容体であり幹細胞維持に関与する転写因子であるOCT4の代替機能を有することが明らかにされつつある。乳がんでは特にホルモン受容体陽性のサブタイプでメチル化

異常が認められたことから、これらの異常がホルモン受容体陽性のサブタイプにおける悪性度の違いに関与する可能性があると考えられた。乳がんを高発現していたmir-150は血液系の幹細胞を制御するc-Mybおよびアポトーシスに関与するPurinergic P2X<sub>7</sub> Receptorを標的にすることが最近報告された。組織で異常が認められたことから、放射線障害に伴う宿主側の異常、特に組織における免疫系の障害などを反映する可能性があると考えられた。また、miR-34cのメチル化異常が高頻度に認められることを示した。miR-34cはp53に関連し増殖抑制作用を有することから、miR-34cのメチル化異常および発現低下が乳腺発がんに重要である可能性がある。

放射線誘発脳腫瘍における放射線に特徴的なゲノム変異とメチル化異常については、自然発生型腫瘍と放射線誘発型腫瘍間でメチル化レベルの異なるCpGアイランドが多数存在し、その近傍には腫瘍細胞の性質に係わると思われる複数の重要な遺伝子がマップされていた。実際、*Pax6*, *Pdgfra*, *Otx2* 遺伝子に関してはメチル化と遺伝子発現量に負の相関が認められた。*Pax6*は、腫瘍の起源である神経顆粒細胞の分化や移動に重要な役割を有している。*Pdgfra*や*Otx2*は、人の髄芽腫でも腫瘍間で異なるレベルで発現していることが報告されている。また、今回の結果から、死亡日齢の長い腫瘍ではこれら遺伝子近傍でのDNAメチル化が高レベルになっていると予想された。腫瘍の死亡日齢の違いによるメチル化レベルの違いが生じるメカニズムに関して、腫瘍ゲノムDNAでの当該遺伝子メチル化レベルが日齢とともに増加すること、腫瘍化初期段階で既に腫瘍間でのメチル化レベルが大きく異なっていることが考えられる。放射線誘発型腫瘍は、自然発生型腫瘍より早く発症する傾向があるため、上記モデルの検証を行うことは、放射線誘発型腫瘍の特徴理解や発生メカニズム解明にとって重要である。

放射線障害による発がんモデルにおける検証のひとつとしてREVIの機能解析を進

めた。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。REV1の発現量が、直接的にDNA損傷応答反応に作用することで細胞死や突然変異頻度に影響を及ぼすかについて検討したところ、REV1の発現増加および発現抑制は、放射線損傷応答反応に影響を及ぼさないことが明らかとなった。細胞周期解析からも、REV1の発現量は放射線、紫外線によって誘導されるチェックポイント機構に影響しなかった。また、REV1の発現量は直接的には、DNA損傷応答反応に影響を及ぼさないことを見いだした。REV1の発がん促進効果は、DNA損傷応答反応には直接的には関与せず、細胞死や突然変異頻度に作用することによると示唆される。今後、この機構の解析が進めば、放射線発がんを始め一般のがんが発症する新しいメカニズムの解明が進むことが期待される。

がん精巣抗原SYCE2は、SYCE2は減数分裂期のシナプトネマ複合体を構成する分子である。放射線とシスプラチンの感受性への影響については、SYCE2の発現はこれらのDNA損傷に対して細胞に抵抗性を誘導することが明らかとなった。この現象を説明するためには、これらの損傷に対する修復機能の評価が必要であるが、姉妹染色分体交換の頻度とRad51の核内フォーカス形成が、発現細胞で増加していることより、少なくともDNA二重鎖切断修復の中で、相同組換え修復機能はSYCE2の発現によって亢進しているものと考えられる。がんの特性を考える上で、ゲノム損傷応答経路が活性化していることは、放射線治療や化学療法に対する抵抗性が誘導されていることを示唆する。SYCE2が発現しているがんについては、これらの治療に対する抵抗性が生じていることが想定されるために、今後は症例における検討が必要になる。染色体の数的異常は、がんの進展に寄与することが想定される。この成因についてはまだ不明であるが、染色体分配のどの機構に影響を及ぼすのかを今後検討する必要がある。

放射線発がんにおける宿主要因の関与について原爆被爆者コホートをを用いた研究を行なった。NKG2Dは、NK細胞、CD8+細胞傷害性T細胞などに発現する細胞表面レセプターであり、ウイルス感染やがんなどに対する免疫監視の主要な役割を担っている。本研究では、NK細胞およびCD8陽性細胞傷害性T細胞の細胞表面のNKG2D蛋白発現量とNKG2D遺伝子型との関連およびNKG2D遺伝子型とHCV感染との関連を明らかにした。これらの結果は、HCV感染後のNK細胞および細胞傷害性T細胞を介した免疫応答によりHCVのクリアランスあるいは持続感染にNKG2Dの遺伝子型が影響する可能性を示唆している。原爆被爆者コホートでの肝発がんリスクへのNKG2D遺伝子型と原爆放射線被曝の影響を調べた結果では、参照(HNK1/HNK1で非被曝)集団に比べ、最も高い被曝線量のLNK1遺伝子型を持つ集団で肝発がんリスクが最大となった。これらから、NKG2DハプロタイプによるNK活性およびCD8陽性細胞傷害性T細胞機能の差異がHCV感染後のHCVクリアランスあるいは持続感染の経路決定に影響すること、また肝発がんにはNKG2Dハプロタイプのみならず放射線被曝も関与することが示唆された。

P53BP1の下流に位置し、P53依存性の細胞周期調節するcyclin D1の遺伝子型と放射線誘発GPA突然変異頻度の有意な関連が認められた。P53BP1ならびにcyclin D1が関与する細胞周期調節機構が放射線による遺伝子障害感受性に関係している可能性が示唆される。放射線誘発GPA突然変異頻度との関連が認められたP53BP1ならびにcyclin D1の遺伝子型の違いが、実際にこれらの遺伝子機能の個人差に繋がっているのか実験的に検討する必要がある。今後、他の修復遺伝子の多型や網状赤血球小核頻度などの他のゲノム不安定性指標との関係についても検討するとともに、固形がん発生リスクを遺伝子型別に評価する予定である。これらにより、ヒト放射線発がん機構の理解を深めるとともに、遺伝子障害感受性に基

く個人の発がんリスクの評価が可能になると考えられる。

## E. 結論

放射線発がんの分子基盤を解明し、その成果をリスク評価や治療開発等の臨床応用に展開することを目的とし、「放射線関連がんにおけるエピジェネティクス」、「放射線障害による発がんモデルにおける検証」、「原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん」の観点から研究を進めた。本年度は、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、また、放射線治療後二次がんとして子宮がん放射線治療後の大腸がんの解析を開始した。*Ptch1*ヘテロ欠損マウスの髄芽腫モデルでは、放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常とDNAメチル化状態の相関性を明らかにした。また、REV1の解析から、その発がん促進効果は細胞死や突然変異頻度に及ぼす影響によると推定されるが、REV1による直接的なDNA損傷応答反応によるものではないことが示された。SYCE2の解析から、ATMを入口とするDNA損傷応答経路が過剰に活性化され染色体不安定性が誘導されるとともに、放射線や化学療法に対する抵抗性がもたらされることが示唆された。原爆被爆者コホートをを用いた研究では、放射線被曝による肝発がんリスクの増加に個人差があり*NKG2D*遺伝子型が遺伝因子の一つとして関与している可能性が示唆された。また、放射線誘発*GPA*突然変異頻度と*cyclin D1*の遺伝子型との有意な関連が認められ、P53BP1およびその下流のDNA修復経路に関わる遺伝子機能の個人差が、放射線誘発遺伝子障害の感受性に影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究で得られた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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Saeki N, Yasui W, et al.: A functional SNP in MUC1, at chromosome 1q22, determines susceptibility to diffuse-type gastric cancer Short title: MUC1 is a gastric cancer susceptibility gene. *Gastroenterology* 140:892-902, 2011
2. Sumida T, Yasui W, et al.: Anti-stromal therapy with imatinib inhibits growth and metastasis of gastric carcinoma in an orthotopic mouse model. *Int J Cancer* 128:2050-2062, 2011
3. Hayashi T, Yasui W, et al.: DSC2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous differentiation in urothelial carcinoma. *Histopathology* (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. Takakura Y, Yasui W, et al.: CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res* 70:6767-6778, 2010
6. Qui W, Yasui W, et al.: Chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drug eliminates oncogenic intestinal stem cells via SMAC-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:20027-20032, 2010
7. Sakamoto N, et al.: Serial analysis of gene expression of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS16 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 101:1038-1044, 2010
8. Anami K, Yasui W, et al.: Search for transmembrane protein in gastric cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of DSC2 in gastric cancer with intestinal phenotype. *J Pathol* 221:275-284, 2010
9. Shinagawa K, Yasui W, et al.: Mesenchymal stem cells enhance growth

- and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 127:2323-2333, 2010
10. Kodama M, Yasui W, et al.: Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF-receptor  $\beta$  is associated with lymphatic metastasis in human gastric carcinoma. *Cancer Sci* 101:1984-1989, 2010
  11. Tanaka M, Yasui W, et al.: Potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma cells. *Cancer Sci* 101:2121-2127, 2010
  12. Tanaka M, Yasui W, et al.: Potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma cells. *Cancer Sci* 101:2121-2127, 2010
  13. Sentani K, Yasui W, et al.: Up-regulation of connexin 30 in intestinal phenotype gastric cancer and its reduction during tumor progression. *Pathobiol* 77:241-248, 2010
  14. Migita T, Ishikawa Y, et al.: Role of insulin-like growth factor binding proteins 2 in lung cancer: IGF independent anti-apoptotic effect via caspase-3. *Am J Pathol*, 2010, 176: 1756-66.
  15. Hiramatsu M, Ishikawa Y, et al.: Activation status of receptor tyrosine kinase downstream pathways in primary lung adenocarcinoma with reference of KRAS and EGFR mutations. *Lung Cancer* 2010, 70: 94-102.
  16. Inamura K, Ishikawa Y, et al.: Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Jan;134(1): 66-72.
  17. Satoh Y, Ishikawa Y. Primary pulmonary meningioma: Ten-year follow-up findings for a multiple case, implying a benign biological nature. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010 Mar; 139(3): e39-40.
  18. Hoshi R, Ishikawa Y, et al.: Discriminant model for cytologic distinction of large cell neuroendocrine carcinoma from small cell carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol*. 2010 (4); 5: 472-8
  19. Fujino T, Ishikawa Y, et al.: Function of EWS-POU5F1 in sarcomagenesis and tumor cell maintenance. *Am J Pathol*. 2010 Apr;176(4):1973-82.
  20. Inamura K, Ishikawa Y. Lung cancer progression and metastasis from the prognostic point of view. *Clin Exp Metastasis*. 2010, 27:389-97
  21. Sakao Y, Ishikawa Y, et al.: Prognostic heterogeneity in multilevel N2 non-small cell lung cancer patients: importance of lymphadenopathy and occult intrapulmonary metastases. *Ann Thorac Surg*. 2010, 89(4):1060-3.
  22. Okada A, Ishikawa Y, et al.: Predictive advantage of a cell type classification for pulmonary adenocarcinoma coupled with data for p53, K-ras and EGFR alterations. *Cancer Sci*. 2010 Jul;101(7):1745-53.
  23. Mochizuki T, Ishikawa Y, et al.: Surgical resection for oral tongue cancer pulmonary metastases. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2010 Jul;11(1):56-9.
  24. Yanai H, Ishikawa Y, et al.: Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J Biochem*. 2010 Jul;148(1):85-92.
  25. Ohba T, Ishikawa Y, et al.: Cytokeratin expression profiling is useful for distinguishing between primary squamous cell carcinoma of the lung and pulmonary metastases from tongue cancer. *Pathol Int*. 2010, 60(8): 575-80.
  26. Dan S, Ishikawa Y, et al.: Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations. *Cancer Res*. 2010; 70(12): 4982-94.
  27. Uehara H, Ishikawa Y, et al.: Prognostic value and significance of subcarinal and superior mediastinal lymph node metastasis in lower lobe tumours. *Eur J Cardiothorac Surg*. 38 (2010) 498-502
  28. Takeuchi S, Ishikawa Y, et al.: Intrinsic cooperation between p16INK4a and p21 Waf1/Cip1 in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res*. 2010 Nov 15;70(22): 9381-90.
  29. Sakao Y, Ishikawa Y, et al.: The impact of

- superior mediastinal lymph node metastases on prognosis in non-small cell lung cancer located in the right middle lobe. *J Thorac Oncol* (in press).
30. 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* 17:118-124, 2010
  31. Y. Shimada, T. Takabatake, et al.: Interaction of low dose radiation and other factors. *Health Physics*, 100, 278-279, 2011.
  32. Y. Ishida, T. Takabatake, Y. Shimada, et al.: Genomic and gene expression signatures of radiation in medulloblastomas after low-dose irradiation in *Ptch1* heterozygous mice. *Carcinogenesis*, 31, 1694-1701, 2010.
  33. D. Iizuka, T. Takabatake, Y. Shimada, et al.: DNA copy number aberrations and disruption of the p16Ink4a/Rb pathway in radiation-induced and spontaneous rat mammary carcinomas. *Radiation Research*, 174, 206-215, 2010.
  34. Y. Yamaguchi, T. Takabatake, Y. Shimada, et al.: Complicated biallelic inactivation of *Pten* in radiation-induced mouse thymic lymphomas. *Mutation Research*, 686, 30-38, 2010.
  35. T. Miyoshi-Imamura, T. Takabatake, Y. Shimada, et al.: Unique characteristics of radiation-induced apoptosis in the postnatally developing small intestine and colon. *Radiation Research*, 173, 310-318, 2010.
  36. Tachibana N, Kamiya K, et al.: Generation and Evaluation of an Anti-REVI Monoclonal Antibody. *HIJM* ; 59(3): 51-56, 2010.
  37. Huang QM, Kamiya K, et al.: Regulation of DNA Polymerase POLD4 Influences Genomic Instability in Lung Cancer. *Cancer Research* ; 70(21): 8407-8411, 2010.
  38. Watanabe H, Kamiya K, et al.: Paternal monoenergetic neutron exposure results in abnormal sperm, and embryonal lethality and transgenerational tumorigenesis in mouse F1 offspring. *Oncol. Rep.* ; 23(5): 1351-1360, 2010.
  39. Toyoshima M, Kamiya K, et al.: Development of a sensitive assay system for tritium risk assessment using Rev1 transgenic mouse. *Fusion Science and Technology*, 2011, in press
  40. Takaku M, Miyagawa K, et al.: Single-stranded DNA catenation mediated by human EVL and a type I topoisomerase. *Nucleic Acids Res* 2010 38: 7579-7586
  41. Zhan H, Miyagawa K, et al.: Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem* 2010 385: 29662-29670
  42. Suzuki HI, Miyagawa K, et al.: Erdheim-Chester disease: multisystem involvement and management with interferon-alpha. *Leuk Res* 2010 34: e21-24
  43. Hayashi T, Kusunoki Y. Molecular genetics/epidemiology of cancer. *J Public Health Practice*, 74:738-43, 2010
  44. Kusunoki Y, Hayashi T, et al.: Increased DNA damage in hematopoietic cells of mice with graft-versus-host disease. *Mutat Res*, 689:59-64, 2010
  45. Kusunoki Y, Hayashi T, et al.: T-cell immunosenescence and inflammatory response in atomic bomb survivors. *Radiat Res*, 174:870-6, 2010
  46. Kusunoki Y, Hayashi T, et al.: Effects of atomic-bomb radiation on human immune responses. Report 25: A dose-dependent increase in the percentage of regulatory CD4 T cells. *Nagasaki Med J*; 85:282-6, 2010
  47. 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
- ## 2. 学会発表
1. Anami K, Yasui W, et al.: Desmocollin 2 (DSC2), identified by CAST method, is associated with intestinal phenotype of gastric cancer. The 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., Maryland (USA), April 17-21, 2010
  2. Sakamoto N, Yasui W, et al.: Serial

- Analysis of gene expression (SAGE) of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS-16 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma. The 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., Maryland (USA), April 17-21, 2010
3. Yasui W: Molecular basis of intestinal and gastric phenotypes of gastric cancer. The 17<sup>th</sup> Seoul International Cancer Symposium “Gastric Cancer Update 2010”, Seoul (Korea), June 1, 2010
  4. Sentani K, Yasui W, et al.: Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis. The 198th Scientific Meeting of the Pathological Society of Great Britain & Ireland, St Andrews (Scotland), UK, June 29-July 1, 2010
  5. Yasui W: Novel diagnostic and therapeutic targets of gastrointestinal cancer identified by “Omics” study. The 9<sup>th</sup> International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, Educational Lecture, Gifu (Japan), August 25-27, 2010
  6. Yasui W, et al.: Molecular character of gastric and intestinal phenotypes of gastric cancer. The 6th International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, Lecture: Session 4 “Molecular Marker in GI Cancers”, Houston (USA), January 6-8, 2011
  7. 坂本直也, 安井 弥, 他. ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いた胃癌におけるmicroRNA発現解析. 第99回日本病理学会総会, 4月27-29日, 東京, 2010
  8. 伊藤玲子, 安井 弥, 他. 原爆被爆者の大腸がんにおけるMSIに関わる遺伝子変化とその免疫組織学的検討. 第99回日本病理学会総会, 4月27-29日, 東京, 2010
  9. 大上直秀, 安井 弥, 他. 胃癌における細胞表面蛋白質desmocollin2の解析. 第19回日本がん転移学会学術集会・総会 ミニシンポジウム (2) がん転移診断, 6月16-17日, 金沢, 2010
  10. 安井 弥: トランスクリプトーム解析による新規診断標的の同定とがん病理診断への応用. 第69回日本癌学会学術総会, シンポジウム5 「がん病理診断の進歩と今後の展開」, 9月22-24日, 大阪, 2010
  11. 上田哲也, 安井 弥, 他. 胃癌の進行と予後に関するmicroRNAの探索. 第69回日本癌学会学術総会, インターナショナルセッション8, 9月22-24日, 大阪, 2010
  12. 浦岡直礼, 安井 弥, 他. 原爆被爆者に発生した胃癌におけるmicroRNA発現解析. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
  13. 若松雄太, 安井 弥, 他. 胃癌における原発巣とリンパ節転移巣の粘液形質発現の比較. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
  14. 坂本直也, 安井 弥, 他. 胃癌におけるmicroRNA発現解析: miR-148aの胃癌組織における発現低下. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
  15. 内藤 寛, 安井 弥, 他. 消化管におけるREG4遺伝子のCDX2による誘導. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
  16. 安井 弥, 他. 胃癌組織を用いたCAST法による胃癌の新たなバイオマーカーの探索. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
  17. 阿南勝宏, 安井 弥, 他. CAST法で同定された胃型胃癌関連分子TSPAN8の解析. 第21回日本消化器癌発生学会総会, 11月18-19日, 軽井沢, 2010
  18. Ishikawa Y. New aspects of pathological diagnosis and classification of cancer: focusing on miRNA expression and signaling pathways. Symposium 5 “Advancement of cancer pathology diagnosis and its future development” 2010 Sept 22-24, Osaka.
  19. Miyamoto K. Epigenetic alterations in human breast cancer. Sapporo cancer epigenetics workshop of the A3 foresight program and the first Sapporo international seminar on cancer epigenetics, March 12-13, 2010
  20. Miyamoto K. MicroRNA in triple-negative breast cancer. The 15th Japan – Korea cancer research workshop, December 21-22, 2010
  21. 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18回日本乳癌学会学術総会平成22年6月24日-26日, 札幌
22. 高島貴志, 島田義也, 他. *Ptch1*ヘテロ欠損マウスにおける放射線誘発髄芽腫の特徴, 日本放射線影響学会第53回大会, 京都市, 2010年, 10月
  23. 島田義也, 高島貴志, 他. 放医研における動物実験のアーカイブ化の進展, 同上, 京都市, 2010年, 10月
  24. 甘崎佳子, 高島貴志, 島田義也, 他. X線誘発胸腺リンパ腫の被ばく時年齢依存性の解析(1); *Ikaros*の変異解析, 同上, 京都市, 2010年, 10月
  25. 石田有香, 高島貴志, 島田義也, 他. マウス放射線誘発髄芽腫に認められる被ばく時期依存性と小脳発生段階に伴うLOH様式の違い, 同上, 京都市, 2010年, 10月
  26. 高島貴志, 島田義也, 他. 放射線誘発髄芽腫における遺伝子発現とDNAメチル化パターンの特徴, 発がん病理研究会, 宮城県松島町, 2010年, 8月
  27. 西村まゆみ, 高島貴志, 島田義也, 他. DNA copy number changes in radiation-induced mammary carcinoma of (SD x COP) F1 hybrid rats, ヨーロッパ癌学会, オスロ, 2010年, 6月
  28. 島田義也, 高島貴志, 他. Experimental research on radiation health effects on children, Bond symposium, アメリカ, 2010年, 5月
  29. 神谷研二: 放射線科学の将来展望について/日本放射線影響学会, (独)放医研ダイアログセミナー「放射線科学のこれからを考える」, 千葉市, 4/7/2010
  30. 笹谷めぐみ, 神谷研二, 他. 放射線分割照射によって誘発される胸腺リンパ腫発症メカニズムと損傷乗り越えDNA合成機構異常が及ぼす影響. 第6回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス-放射線災害医療の国際教育研究拠点に向けた機関連携事業-, 長崎, 6/5/2010
  31. 笹谷-豊島めぐみ, 神谷研二, 他. 放射線応答における損傷乗り越えDNA合成の役割. 第51回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 6/6/2010
  32. 神谷研二: がん研究入門コース1, 1-1 発がん機構におけるゲノム安定性とDNA修復. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9/24/2010
  33. 笹谷めぐみ, 神谷研二, 他. Rev1の過剰発現は化学物質による発がんを促進する. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9/24/2010
  34. 鈴木 元, 神谷研二, 他. 肺小細胞癌に見られたPOLD4低発現. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9/24/2010
  35. 浅川順一, 神谷研二, 他. DNA2次元電気泳動法を用いた放射線のラット未熟卵母細胞に及ぼす遺伝的影響評価: ヒト女性被曝の動物モデル実験. 日本放射線影響学会第53回大会, 京都市, 10/20/2010
  36. 笹谷めぐみ, 神谷研二, 他. 放射線発がんにおける損傷乗り越えDNA合成酵素Rev1の及ぼす寄与. 日本放射線影響学会第53回大会, 京都市, 10/20/2010
  37. Hayashi T, Kusunoki Y, et al.: Attenuation of the immune system and elevated inflammatory markers caused by aging and atomic bomb radiation exposure. 1st Annual World Congress of Immunodiseases and Therapy, 15-18 May, Beijing, China
  38. Hayashi T, Kusunoki Y, et al.: Genetic susceptibility to radiation-associated colon and rectum cancers among atomic-bomb survivors with special reference to the CD14 gene. 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR). 17-21 April 2010, Washington DC, USA
  39. Hayashi T, Kusunoki Y, et al.: High-throughput flow cytometric assay system of reactive oxygen species in blood cells. 14th International Congress of Immunology. 22-27 August 2010, Kobe, Japan
  40. Geyer SM, Hayashi T, Kusunoki Y, et al.: Methods for development of an immune scoring system. 14th International Congress of Immunology. 22-27 August 2010, Kobe, Japan
  41. Yoshida K, Kusunoki Y, Hayashi T, et al.: Effects of NKG2D and MICA genetic polymorphisms on hepatitis C virus infection. BIT's 1st World Congress of Virus and Infections. 31 July-03 August 2010, Busan, Korea



42. Morishita Y, Kusunoki Y, Hayashi T, et al.: Effects of IL-10 gene polymorphisms on risk of radiation-associated cancers in atomic-bomb survivors. 1st Annual World Congress of Immunodiseases and Therapy. 15-17 May 2010 Beijing, China
43. Hayashi T, Kusunoki Y, et al.: Molecular epidemiology of radiation susceptibility to cancer among atomic-bomb survivors. 56th Annual Meeting of the Radiation Research Society. 25-29 September 2010 Maui, Hawaii, USA
44. Double EB, Kusunoki Y, Hayashi T, et al.: Genetic and molecular research contributions, challenges, and opportunities. 52nd Annual Meeting of the American Society of Therapeutic Radiation Oncologists 31 October-4 November 2010 San Diego, California, USA
45. Hayashi T, Kusunoki Y, et al.: Genetic susceptibility to radiation-associated cancer occurred in atomic-bomb survivors. 10th Korea-Japan Cancer and Aging Symposium 14-15 February 2011 Tokyo
46. Yoshida K, Kusunoki Y, Hayashi T, et al.: Anticipation of natural course of HCV infection in terms of NKG2D and IL28B gene polymorphisms. 10th Korea-Japan Cancer and Aging Symposium. 14-15 February 2011 Tokyo
47. 大石和佳, 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. C型肝炎ウイルス感染における HLA-DRB1 と NKG2D 遺伝子多型の影響. 第46回 日本肝臓学会総会 2010年5月 27-28日 山形
48. 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. 原爆被爆者における放射線被曝と結腸直腸発がん 遺伝的感受性の検討—CD14 遺伝子多型 がん予防学術大会2010札幌 2010年7月 15-16日 札幌
49. 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. 原爆被爆者の結腸直腸がんリスクとCD14 遺伝子多型および放射線被曝量との関連性 第69回 日本癌学会学術総会 2010年9月 22-24日 大阪
50. 森下ゆかり, 林 奉権, 楠 洋一郎, 他. 原爆被爆者における放射線関連胃がん リスクに対するHLA-DRB1 とIL-10 遺伝子多型の複合効果 第19回 日本組織適合性学会大会 2010年9月17-19 東京
51. Kusunoki Y, Hayashi T, et al.: Increased T-cell populations with compromised/senescent phenotype in atomic-bomb survivors. 14th International Congress of Immunology, 22-27 August 2010, Kobe
52. Hamatani K, Hayashi Y, Kusunoki Y, et al.: Rearranged anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene found for the first time in adult-onset papillary thyroid cancer cases among atomic bomb survivors. The 14th International Thyroid Congress, 11-16 September 2010, Paris, France
53. Yoshida K, Hayashi T, Kusunoki Y, et al.: Enhanced T<sub>H</sub>1 immunity in association with persistent infection of hepatitis C virus and progression of liver fibrosis. Keystone symposium "Immunologic memory, persisting microbes and chronic disease", 6-11 February 2011, Banff, Canada
54. 楠 洋一郎, 林 奉権, 他. 原爆放射線のヒト免疫応答に及ぼす影響. 第25報: 制御性CD4T細胞の割合の被ばく線量依存性の増加. 第51回 原子爆弾後障害研究会. 2010/6/06 長崎
55. 楠 洋一郎, 林 奉権, 他. 末梢血CD8T およびNK細胞表面NKG2D発見レベルの個人差と遺伝子型の関係. 第20回 日本サイトメトリー学会学術集会. 2010/6/26-27 東京
56. 楠 洋一郎, 林 奉権, 他. 原爆被爆者末梢血リンパ球におけるT<sub>H</sub>1およびT<sub>H</sub>2細胞の割合の増加. 第53回 日本放射線影響学会 2010/10/20-22 京都
57. 楠 洋一郎, 林 奉権, 他. 放射線で誘発される赤血球グリコフォリンA突然変異体頻度の個人差とDNA修復遺伝子の多型に関する研究. 第33回 日本造血細胞移植学会総会 2011/3/09-10 松山

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

1) 【発明の名称】 miRNAを用いた小細胞肺癌の予後予測方法, 小細胞肺癌治療方法, 小細胞肺癌予後改善方法, 及び小細胞肺癌治療剤のスクリーニング方法

【発明人】 石川雄一, 大場岳彦

【出願人】(財)癌研究会, 中外製薬株式会社

【出願日】2010年4月5日

【出願番号】特願2010-87093

2) 【発明の名称】画像処理装置, 画像処理方法, およびプログラム

【発明人】大橋武史, 石川雄一

【出願人】ソニー株式会社, (財)癌研究会

【出願日】2010年4月5日

【出願番号】特願2010-084755

3) 【発明の名称】Microscope system, specimen observation method, and computer program.

【発明人】Yuichi Ishikawa, Kengo Takeuchi, Tatuki Yamada

【出願人】オリンパス株式会社, (財)癌研究会

【出願日】2010年6月7日

【Docket No.】POLA-10071-US (Cross-reference to related applications. This application is based upon and claims the benefit of priority from Japanese Patent Application No. 2009-145790, filed on Jun. 18, 2009, the entire contents of which are incorporated herein by reference.)

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

## マイクロRNAからみた放射線関連固形がんの特徴

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** 放射線による発がん機構の解明，リスク評価や診断・治療法の開発に向けて，原爆被爆者に発生した固形がんについてmicroRNA解析をはじめとする分子病理学的検討を行なっている。被爆者に発生した胃がんを対象に384種類のmiRNAの発現レベルを定量的に解析した結果，miR-143, miR-145を含む32種類のmiRNAが高線量被曝群（102-1062mGy）で2倍以上に発現亢進していた。miR-143は直接versican遺伝子の3'-UTRに結合し，versicanの発現を抑制する。被爆者ががんにおいてversicanのがん間質における発現が有意に低下しており，一方で確かに，胃がん細胞株でも培養上清中にmiR-143が存在していた。胃がん細胞で過剰発現するmiR-143がexosomal miRNAとしてパラクリン増殖因子／サイトカインのように，間質細胞に作用し，被爆者胃がんではversicanの発現を抑制している可能性が考えられた。一方，非がん部と比較してがん部で発現が低下するmiRNAとしてmiR-148aはメチル化によって発現が抑制されており，標的遺伝子MMP7の制御を介してがんの浸潤に関わることが分かった。一方，CAST法を用いた膜蛋白・分泌蛋白の網羅的遺伝子発現解析から，胃がんの特異性の高い遺伝子としてTSPA8およびTM9SF3を同定した。がん幹細胞マーカー3種類の発現解析では，一般集団に発生した胃がん症例において，CD44はリンパ節転移，CD133はリンパ節転移と組織型，ALDH1は深達度と組織型との間に有意な相関を示した。しかし，被爆者に発生した胃がん症例におけるCD44，CD133，ALDH1陽性症例は，CD44についてはLSSA群で17/39例（43%），LSSB群で13/34例（38%），ALDH1についてはLSSA群で28/39例（71%），LSSB群で21/34例（61%）であり，被曝との有意な相関は認められなかった。今後，他のがん幹細胞マーカーについても検討する必要がある。

### A. 研究目的

原子力エネルギーや医療等で放射線利用が激増しており，医療における放射線の利用は，診断に留まらず，がん治療の大きな柱になっている。一方，発がんの外的要因としての影響が懸念されており，この度の東北大地震に伴う津波に関連して発生した東京電力福島第一原子力発電所の事故においても，作業員ならびに周辺住民の健康管理上，重要な問題である。本研究は，放射線発がんの分子基盤を解明し，その成果をリスク評価や治療開発等の臨床応用に展開することを目的としている。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，職業・医療被曝の管理，被爆者医療の向上に大きく資するものである。

一般にがんの発生・進展には種々のgeneticおよびepigeneticな異常が関与しており，特epigeneticsに関してはmicroRNA (miRNA)を介した遺伝子発現制御の重要性が明らかになっている。さらに，固形がんにおいてもがん幹細胞の存在が確認され，がんの発生・進展・治療抵抗性との関連が注目されており。そこで，本研究では，被爆者に発生した固形がんにおける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。さらに，同様の試料についてCAST（Escherichia coli ampicillin secretion trap）法などを用いた網羅的遺伝子発現解析と蛋白レベルでの発現の検証を行なう。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。本年度は、主に胃がんについて miRNA の発現・機能解析およびがん幹細胞マーカーの発現解析を行なった。

## 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

胃がん 20 例および正常胃粘膜組織 5 例について、188 種類の 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、胃がん細胞株および胃がん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。また、TargetScanHuman (ver5.1) および PicTar (version5.1) を用いて、miRNA の標的遺伝子の推定を行ない、代表的候補遺伝子については、強制発現系およびノックダウン系と定量的 RT-PCR により、標的となるかどうかの確認を行なった。

被爆者に発生した胃がんの miRNA の発現解析の対象は、放射線影響研究所の Life Span Study (LSS) 集団に発生した胃がんであり、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。そこで抽出された被爆者胃がん関連 miRNA については、picTar および TargetScan を用いた標的遺伝子の解析ならびに胃がん細胞株とがん間質線維芽細胞の相互作用について検討した。

### 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

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法を用いて胃がん細胞株、胃がん組織 (スキルス胃

がん) および正常胃粘膜組織について解析した。8000 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。

### 3) 対照胃がんおよび被爆者胃がんにおけるがん幹細胞の発現解析

一般集団に発生し外科的あるいは内視鏡的に切除された 192 例の胃がん組織のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いた。また、110 例については、原発巣とともにリンパ節転移巣についても解析した。被爆者に発生した胃がんについては、放射線影響研究所の Life Span Study (LSS) 集団に発生した被爆群 39 例 (LSSA 群) と対照群 34 例 (LSSB 群) の FFPE 切片を使用した。がん幹細胞マーカーとして、CD44, CD133, ALDH1 (Aldehyde dehydrogenase 1) を検討した。酵素抗体法による免疫染色では、一次抗体として、抗 CD44 抗体 (Novocastra 社), 抗 CD133 抗体 (Miltenyi Biotec 社), 抗 ALDH1 抗体 (BD Biosciences 社) を用い、Dako LSAB Kit (Dako, Carpinteria, CA, USA) にて可視化した。がん細胞の 10% 以上染色されたものを陽性とした。

### (倫理面への配慮)

倫理面への配慮については、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)に従って行なった。遺伝子組換え生物等使用実験を含む研究は、「遺伝子組換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号), 「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施行規則」(平成 15 年財務省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第 1 号) 等に基づいて行なった。