

## C. 研究結果

### 1) 被爆者に発生した胃がんにおける miRNA の発現解析

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。これらは、放射線関連胃がんの特徴的miRNA signatureの可能性がある。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。

対照群の胃がんについてのマイクロアレイによる188種類のmiRNA発現解析においてもmiR-143, miR-145が過剰発現していたが、組織型別にみると、分化型よりも被爆者で頻度の高い未分化型で高発現していた。一方、非がん部と比較してがん部で発現が低下するmiRNAとして、miR-148aが同定された。胃がん細胞株を用いたmiR-148aの強制発現系およびノックダウン系において、MTT assayではmiR-148aのレベルの変化は影響を及ぼさなかったが、invasion assayではmiR-148aによって浸潤能が抑制されることが分かった。miR-148aの発現抑制の機序としては、胃がん細胞株におけるbisulfite sequencingならびに脱メチル化剤処理の結果から、DNAメチル化によることが明らかとなった。miR-148aの標的遺伝子予測では、MAPキナーゼ・小分子Gタンパク質系の29遺伝子、プロテアーゼ系の11遺伝子、Wntシグナリング系の6遺伝子、インテグリン/細胞接着系の41遺伝子を含む92遺伝子がリストアップされた。これらについての強制発現系およびノックダウン系での

定量的RT-PCR解析から、MOSPD1, TFRC, DOCK6, ARHGEF12, などが標的遺伝子であることが確認された。MMP7は、定量的RT-PCRとともに蛋白レベルでもmiR-148aの下流標的であることが明らかとなった。

### 2) 網羅的遺伝子発現解析による新規がん関連遺伝子の同定と機能解析

胃がん細胞株3株(MKN-1, MKN-28, HSC-57), スキルス胃がん組織および正常胃粘膜組織から抽出したmRNAを材料にランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、pCAST vectorにライゲーション、その産物をコンピテントセルDH10Bに導入し、CASTライブラリーを作成した。このCASTライブラリーのアンピシリン耐性クローンについてコロニーPCRを行ない、インサートが200塩基以上のもの8000コロニー以上についてシーケンスを行なった。定量的RT-PCRにおいて胃がん細胞/組織に特異性の高い遺伝子についてはさらに解析を進めている。その内、TSPAN8はRT-PCR解析では21%で過剰発現が確認され、免疫染色では39%に発現が認められた。TSPAN8は、MUC5AC陽性の胃型形質を有する胃がんにおいて有意に高頻度に発現していた。TSPAN8-siRNA処理によって、浸潤能、増殖能は有意に抑制された。さらに、TSPAN陽性胃がん症例は陰性例と比較して有意に予後不良であった。TM9SF3は免疫染色の結果、17%に明瞭な陽性像がみとめられた。慢性低分化腺がん症例においては、TM9SF3陽性例が陰性例と比較して有意に予後不良であった。

### 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

一般集団に発生した胃がん原発巣では、CD44は117/191例(61%), CD133は18/192例(9%), ALDH1は114/190例(60%)に陽性であった。CD44およびALDH1は陽性例では50%以上のがん細胞で陽性であったが、CD133は10-14%のがん細胞のみが陽性であり、がん幹細胞に比較的近い細胞群を捉

えているものと考えられた。臨床病理学的事項との関連では、CD44はリンパ節転移、CD133はリンパ節転移と組織型（分化型に多い）、ALDH1は深達度と組織型（分化型に多い）との間に有意な相関が認められた。予後の判明した90例におけるKaplan-Meier解析で、CD44陽性例とCD133陽性例はどちらも陰性例に比較して有意に予後不良であった。110例における胃癌原発巣とリンパ節転移巣でのがん幹細胞マーカー3種の発現に有意な差は認められなかった。組織型別にみると、未分化型ではALDH1の発現が原発巣では27/68例（40%）であったのに対し転移巣では39/54例（72%）であり、有意に高頻度であった（ $P=0.0003$ ）。以上、がん幹細胞マーカーの発現は、胃癌の進展、転移、予後の指標となる可能性が示唆された。

被爆者に発生した胃癌症例74例の原発巣におけるCD44、CD133、ALDH1陽性症例は、それぞれ30例（41%）、1例（1%）、49例（67%）であった。被曝との関係では、CD44陽性がLSSA群で17/39例（43%）、LSSB群で13/34例（38%）、ALDH1陽性が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。

#### D. 考察

miRNAは、様々な標的遺伝子の発現抑制を介して、発生、増殖、分化、アポトーシスなどの多くの生物現象を制御している。胃癌においても数多くのmiRNAの発現異常が認められ、我々のグループも組織型や臨床病理学的事項、予後と相関するmiRNAが存在することを報告している。被爆者に発生した胃癌を100mGy以上の高線量被曝群とそれ以下の群に分類し、miR-143、miR-145を含む32種類のmiRNAが高線量被曝群で2倍以上に発現亢進することを見いだしている。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の誘導を介してversicanの発現が抑制されることが報告された（Wang et al. J Biol Chem. 2010; 285:23241）。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。我々は既に、被爆者胃癌において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（Oen et al. Int J Cancer 2009; 124:1112）。一方、Exosomal miRNAを介したがん-間質相互作用が注目されている。miRNAは、exosomeと呼ばれる小胞を介して細胞外に分泌され、細胞外や体液中で安定して存在している。この分泌型miRNAがあたかもパラクリン増殖因子/サイトカインのように、がん細胞と間質細胞の相互に働き、細胞の増殖・浸潤、間質・血管新生などを制御する可能性が考えられる。確かに、胃癌細胞株でも培養上清中にmiR-143が存在していた。従って、胃癌細胞で過剰発現するmiR-143がこの機構によって間質細胞に作用し、被爆者胃癌ではversicanの発現を抑制しているのかもしれない。現在、胃癌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。

非がん部と比較してがん部で発現が低下するmiR-148aについては、DNAメチル化が発現抑制に関与することを示した。さらに標的遺伝子の同定およびその機能について検討し、いくつかの標的遺伝子を介してがんの浸潤に関わることを見いだした。特に、定量的RT-PCRおよびWestern blotによる検討で、miR-148aを強制発現させるとMMP7がmRNAレベル、タンパク質レベルの両方において発現が低下することが示された。治療への応用の可能性も考えられる。

CAST法は、膜蛋白あるいは分泌蛋白を効率良く同定する解析法であり、新しい診断・治療標的の探索に有用である。胃癌細胞株と正常胃粘膜のCAST法を用いた解析とその比較による候補遺伝子のリストアップおよび多数例における定量的RT-PCRによる発現解析によって、いくつかの胃癌

に高発現する遺伝子を同定している。HCS-57細胞株の解析から抽出したTSPAN8はtetraspanin familyに属する4回膜貫通型蛋白であり、インテグリンと複合体を形成し、細胞の発達、活性化、増殖、運動性を調節する細胞シグナルを仲介する。肝細胞がんで発現と転移との関連が指摘されており、血管新生、浸潤の促進などに関与することが示唆されているが、胃がんについての研究はない。今回の解析では、TSPAN8はMUC5AC陽性の胃型形質を有する胃がん有意に高頻度に発現し、TSPAN8-siRNA処理によって、浸潤能、増殖能は有意に抑制された。TSPAN陽性胃がん症例は有意に予後不良であったことから、胃型形質を有する胃がんの進展・悪性度を制御する遺伝子の可能性がある。一方、2例のスキルス胃がんのどちらにおいても高度に発現する遺伝子としてTM9SF3を抽出した。TM9SF3はpaclitaxel処理した乳がん細胞株のアレイ解析で、発現亢進を示した遺伝子のリストに記載されているものの、がんにおける発現や機能については殆ど知られていない。免疫染色の結果、び慢性低分化腺がん症例においては、TM9SF3陽性例が陰性例と比較して有意に予後不良であった。生物学的意義について解析する必要がある。このような、CAST法から得られる情報を基盤とした探索的研究を継続し、同定される遺伝子については、被爆者に発生した食道がん、胃がんなどの固形がんにおける意義を分子病理学的に解析する予定である。さらに、モデル系を用いた機能解析および放射線傷害応答における関与についても検討する。

ひとつの腫瘍を構成するがん細胞は均一ではなく、一部にがん幹細胞が存在しており、ABCG2、ABCB1トランスポーターを強く発現するために治療の際、抗がん剤抵抗性の原因となっている。すべての腫瘍細胞を死滅させるには、このがん幹細胞を特定して、治療の標的にする必要がある。1997年にAMLのがん幹細胞が同定されて以降、種々の固形がんでもその存在が報告されている。CD133、CD44は全身の様々な正常組

織およびがん組織における幹細胞マーカーとして注目されている。また近年、ALDH1ががん幹細胞マーカーであるという報告がなされている。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よい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。

## E. 結論

miRNAの定量的RT-PCRを用いた解析はFFPE組織についても行なえることから被爆者に発生した固形がんの特徴的なmiRNA発現の同定が期待される。CAST法を用いた網羅的遺伝子発現解析により、TSPAN8やTM9SF3をはじめとするいくつかの新規がん特異的遺伝子の候補を同定した。これらの成果は、放射線発がんの分子機構の解明および放射線関連固形がんの診断・治療開発に資するものと見なされる。がん幹細胞と放射線関連固形がんの関係については今後の課題である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Saeki N, Saito A, Choi IJ, Matsuo K, Ohnami S, Totsuka H, Chiku S, Kuchiba A, Lee YS, Yoon KA, Kook MC, Park SR, Kim YW, Tanaka H, Tajima K, Hirose H, Tanioka F, Matsuno Y, Sugimura H, Kato S, Nakamura T, Nishina T, Yasui W, Aoyagi K, Sasaki H, Yanagihara K, Katai H, Shimoda T, Yoshida T, Nakamura Y,

- Hirohashi S and Sakamoto H: 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, Kitadai Y, Shinagawa K, Tanaka M, Kodama M, Ohnishi M, Ohara E, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: 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, Sentani K, Oue N, Anami K, Sakamoto N, Ohara S, Teishima J, Noguchi T, Nakayama H, Taniyama K, Matsubara A and Yasui W: DSC2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous differentiation in urothelial carcinoma. *Histopathology* (in press)
  4. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu C-G, Oue N, Yasui W, 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
  5. Takakura Y, Hinoi T, Oue N, Sasada T, Kawaguchi Y, Okajima M, Akyol A, Fearon ER, Yasui W and Ohdan H: CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res* 70:6767-6778, 2010
  6. Qui W, Wang X, Leibowitz, Liu H, Barker N, Okada H, Oue N, Yasui W, Clevers H, Schoen RE, Yu J and Zhang L: 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, Oue N, Noguchi T, Sentani K, Anami K, Sanada Y, Yoshida K and Yasui W. 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, Oue N, Noguchi T, Sakamoto N, Sentani K, Hayashi T, Hinoi T, Okajima M, Graff JM and Yasui W: 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, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 127:2323-2333, 2010
  10. Kodama M, Kitadai Y, Sumida T, Ohnishi M, Ohara E, Tanaka M, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: 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, Kitadai Y, Kodama M, Shinagawa K, Sumida T, Tanaka S, Oue N, Yasui W and Chayama K: 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, Kitadai Y, Kodama M, Shinagawa K, Sumida T, Tanaka S, Oue N, Yasui W and Chayama K: 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, Oue N, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W:

Up-regulation of connexin 30 in intestinal phenotype gastric cancer and its reduction during tumor progression. *Pathobiol* 77:241-248, 2010

## 2. 学会発表

1. Anami K, Oue N, Sakamoto N, Hayashi T, Ohara S, Sentani K, Noguchi T and Yasui W: 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, Oue N, Noguchi T, Sentani K, Anami K, Sanada Y, Yoshida K and Yasui W: 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, Matsuda M, Anami K, Sakamoto N, Oue N and Yasui W: 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, Oue N, Sentani K, and Sakamoto N: 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, 内藤 寛, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: 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, 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, 阿南勝宏, 内藤 寛, 坂本直也, 仙谷和弘, 安井 弥: 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, Stefano Volinia, 奥村 浩, Chang-gone Liu, 大上直秀, 安井 弥, 吉田和弘, 佐々木博己, 野村幸世, 瀬戸泰之, 上西紀夫, George A.Calin, Carlo M.Croce: 胃癌の進行と予後に関与する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, 坂本直也, 内藤 寛, 若松雄太, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: 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, 坂本直也, 仙谷和弘, 野口 剛, 大上直秀, 安井 弥: 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, 内藤 寛, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: 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, 大上直秀, 仙谷和弘, 坂本直也, 檜井孝夫, 岡島正純, 安井 弥: 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, 大上直秀, 阿南勝宏, 坂本直也, 林哲太郎, 大原慎也, 仙谷和弘, 浦岡直礼, Htoo Zarni Oo, 野口 剛: 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, 大上直秀, 坂本直也, 林哲太郎, 仙谷和弘, 野口 剛, 安井 弥: 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

#### 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

## 放射線二次がんの研究

研究分担者 石川雄一（公財）がん研究会がん研究所 部長

**研究要旨** 放射線治療の後に発生するがん（放射線二次がん）を調べることは、放射線治療の効果と限界を知る上で重要である。本研究では、がん研病院において観察された放射線二次がんを収集し、その病理組織学的・遺伝子学的性質を解明する。本年度は、子宮がん放射線治療後の大腸がん31例を収集したところ、粘液がんの多いことが判明した。また、通常の大腸がんとマイクロRNAの発現パターンを比較する試みを開始した。

### A. 研究目的

放射線治療が原因で、後年、がんが発生することがあり、放射線二次がんと呼ばれる。本研究では、がん研病院において放射線治療後に発生した悪性腫瘍を収集し、その病理組織学性質を調べ、さらに、通常のがんと遺伝子発現、マイクロRNAの発現のパターンの違いなどを解析するから、放射線二次がんの特徴、放射線発がんのメカニズム、さらには可能なら放射線により発がんしやすい体質を調べ、放射線治療の適応と限界を知ることを目的とする。

### B. 研究方法

複数のがんがひとりの患者の発生するとき多重がん（multiple primary cancer）と呼ばれるが、日本語では更に詳細に区別して、同一臓器の場合は多発がん、異なった臓器の場合は重複がんと呼ぶもある。また、1年以内に複数のがんが発見された場合は同時がん（synchronous cancer）（米国のSEERでは、2ヶ月以内とされている）、それ以上経ってから発見された場合は異時がん

（metachronous cancer）と呼ぶ。本研究では、できるだけこの用語法に従う。

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する。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、二次がんとして推定されるものをピックアップした。例えば、子宮がん放射線治療後であれば、大腸がんや膀胱がんなどが対象となる。背景デ

ータとして、線量、線質、照射野、副作用など、放射線治療の詳細を記録する。

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（すなわち放射線治療歴のないがん）を、得られた二次がんの数に応じて準備した。また、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。

得られた放射線二次がんを病理組織学的に検索して、臨床病理学的事項を、対照群と比較する。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。可能であれば、放射線治療後でもがんを発生しなかった症例とSNPを比較する。

### （倫理面への配慮）

本研究の対象となる症例は大部分が1990年以前に手術されたものであり、検体を遺伝子解析を含む医学的研究に使うことの承諾が得られていない。そこで、そのような症例は、連結可能匿名化して、臨床病理学的・遺伝子発現解析を行う。放射線治療のあとでもがんを生じなかった症例とがんを生じた症例との比較するためのSNP検索は、本人または家族から胚細胞変異の検索を行うことのICを取得できた症例のみを対象とする（H22年度は実施しなかった）。

本報告書に記載する研究は、（公財）がん研究会のIRBで研究計画が承認されたあとに行った。

### C. 研究結果

本年度はこれまで、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。

今回は大腸がんに関する病理組織学的特徴をまとめる。平均年齢は65.4才、性別は全例女性、潜伏期間は17.5年、発生部位は、下行結腸1, S状結腸2, 直腸27 (Rs 1, Ra 6, Rb 20)、肛門管1であった。

組織学的には、超高分化がん3、高/中分化19、低分化0、粘液がん7、扁平上皮がん1、腺腫(径30mm)であった。通常の大腸がんでは、粘液がんは3.5%程度と言われており(佐々木ら 日消外会誌 22:814-, 1989)、6倍程度の高率である。また予後では、全体の5生率は68%であるが、粘液がんは100%であり、予後良好であった。

放射線照射から大腸がん発生に至る missing link を解明する一助として、放射線大腸炎に着目した。すなわち、放射線照射後の大腸炎が大腸がん発生の直接の原因である可能性の検討である。

	muc	other	
rad colitis (+)	6	13	19
rad colitis (-)	1	9	10
	7	22	29

上記のように、放射線大腸炎を伴う症例は粘液がん (muc) では6/7、他の組織亜型 (other) では13/22であり、粘液がんが高い傾向があったが、カイ二乗検定では有意ではなかった ( $p=0.197$ )。

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、通常の癌とマイクロRNA発現パターンを比較することを試みたが、うまくPCRがかからなかった。現在、更に条件を検討中である。

### D. 考察

放射線二次がんは、種々の臓器に生じうる。本年は、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。そのうち、29例については、病理組織学的に詳細に検討した。その結果、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。

がんは遺伝子の疾患であることが判明して以来、様々な研究が行われてきたが、本研究では、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材料でも検索が可能と推定されるmiRNAに注目して、検索したが、これまでのところ、実験はうまくいっていない。更に、条件を変えて研究を進める。

### E. 結論

がん研の腫瘍ファイルから、子宮がん放射線治療後の大腸がん31例を抽出した。病理組織学的には、粘液がんが多く、また放射線照射から発がんまでの中間病変として、放射線大腸炎が介在する可能性が示された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Migita T, Narita T, Asaka R, Miyagi E, Nagano H, Nomura K, Matsuura M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Seimiya H, Ishikawa Y. 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.
2. Hiramatsu M, Ninomiya H, Inamura K, Nomura K, Takeuchi K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Yamori T, Matsuura M, Morikawa T, Ishikawa Y. 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.
3. Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O. Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? Arch Pathol Lab Med. 2010 Jan;134(1): 66-72.
4. 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.
5. Hoshi R, Furuta N, Horai T, Ishikawa Y, Miyata S, Satoh Y. 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
  6. Fujino T, Nomura K, Ishikawa Y, Makino H, Umezawa A, Aburatani H, Nagasaki K, Nakamura T. Function of EWS-POU5F1 in sarcomagenesis and tumor cell maintenance. *Am J Pathol.* 2010 Apr;176(4):1973-82.
  7. Inamura K, Ishikawa Y. Lung cancer progression and metastasis from the prognostic point of view. *Clin Exp Metastasis.* 2010, 27:389-97
  8. Sakao Y, Okumura S, Mun M, Uehara H, Ishikawa Y, Nakagawa K. 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.
  9. Okada A, Shimmyo T, Hashimoto T, Kobayashi Y, Miyagi Y, Ishikawa Y, Nakagawa K, Hayashi J, Tsuchiya E. 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. Epub 2010 Apr 7.
  10. Mochizuki T, Okumura S, Ishii G, Ishikawa Y, Hayashi R, Kawabata K, Yoshida J. Surgical resection for oral tongue cancer pulmonary metastases. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010 Jul;11(1):56-9. Epub 2010 Mar 31.
  11. Yanai H, Nakamura K, Hijioka S, Kamei A, Ikari T, Ishikawa Y, Shinozaki E, Mizunuma N, Hatake K, Miyajima A. 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. Epub 2010 Mar 30.
  12. Ohba T, Motoi N, Kimura Y, Okumura S, Kawabata K, Yoshizawa Y, Inase N, Ishikawa Y. 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.
  13. Dan S, Okamura M, Seki M, Yamazaki K, Sugita H, Okui M, Mukai Y, Nishimura H, Asaka R, Nomura K, Ishikawa Y, Yamori T. Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations. *Cancer Res.* 2010; 70(12): 4982-94. Epub 2010 Jun 8.
  14. Uehara H, Sakao Y, Mun M, Nakagawa K, Nishio M, Ishikawa Y, Okumura S. Prognostic value and significance of subcarinal and superior mediastinal lymph node metastasis in lower lobe tumours. *Eur J Cardiothorac Surg.* 38 (2010) 498-502
  15. Takeuchi S, Takahashi A, Motoi N, Yoshimoto S, Tajima T, Yamakoshi K, Hirao A, Yanagi S, Fukami K, Ishikawa Y, Sone S, Hara E, Ohtani N. 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. Epub 2010 Nov 9.
  16. Sakao Y, Okumura S, Mun M-y, Uehara H, Ishikawa Y, Nakagawa K. 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).
  17. 鈴木奈緒子, 星利良, 佐藤之俊, 古田則行, 宮内栄作, 石川雄一, 平井康夫, 宝来威. ラブドイド細胞が目立った肺大細胞神経内分泌癌の1例. *日本臨床細胞学会雑誌*, 49:15-19, 2010.
  18. 大場岳彦, 石川雄一. 肺神経内分泌腫瘍の分類と組織診断. *病理と臨床*, 28(2): 151-155, 2010.
  19. 二宮浩範, 石川雄一. 微小乳頭状腺癌・腸型腺癌. *病理と臨床*, 28(3): 259-262, 2010.
  20. 荻田 真, 石川雄一. 神経内分泌形態, 第3章肺-腫瘍-, 『病理形態学キーワード』, 臨時増刊号, 病理と臨床 vol. 28, 2010
  21. 石川雄一. ALK肺癌の臨床病理学的特徴 - 形態からわかるその疫学的背景. *呼吸器内科* 18 (4): 362-367, 2010
2. 学会発表
- 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.
- 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】 m i R N A 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

## 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*NR5A2*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重要な役割を果たしていると考えられている。被爆者乳がんでは発現が亢進しているmicroRNAを新たに5種類同定した。3) 乳がんにおける高頻度の*hsa-miR-34c*のメチル化異常を同定した。

### 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関連乳がんにおけるエピジェネティックな異常について解明する。

### B. 研究方法

#### 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クロンのシーケンスにより計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) 被爆者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異常候補を同定する。

3) エピジェネティックな機構として、RNAサイレンシングが注目されているが、microRNA自身の制御についてもメチル化異常などエピジェネティックな機構が重要であると考えられている。これまでに見出した乳がんでは高頻度に発現が低下する*hsa-miR-34c*のDNAのメチル化異常について解析した。

#### (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*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(50%)に認められた。さらに、乳がん症例でも21症例中5例(24%)にメチル化

異常が検出されることを見出した。細胞および症例ともにホルモン受容体陽性がんではメチル化異常が認められた。

2. 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microRNAとして、hsa-miR-150、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-142-3p、hsa-miR-146a、hsa-miR-223の5種類を同定した(表1および図1)。

3. 乳癌におけるhsa-miR-34cのDNAのメチル化異常を乳癌細胞8株および乳がん症例40症例で解析した。すべての細胞および症例においてメチル化異常が認められた(図3)。

表1 被爆者乳がんにおけるmicroRNA発現亢進

miRNAs	Chromosome	CpG island	Predicted Targets
hsa-miR-150	19q13.33	Yes	MYB (209)
hsa-miR-142-5p	17q22	Yes	RPS6KA4 (307)
hsa-miR-142-3p	17q22	Yes	FAM44B (201)
hsa-miR-146a	5q34	No	IRAK1 (393)
hsa-miR-223	Xq12	No	GPM6B (180)

5miRNAs (0.6%)

図2 乳がん組織におけるMIR150の発現

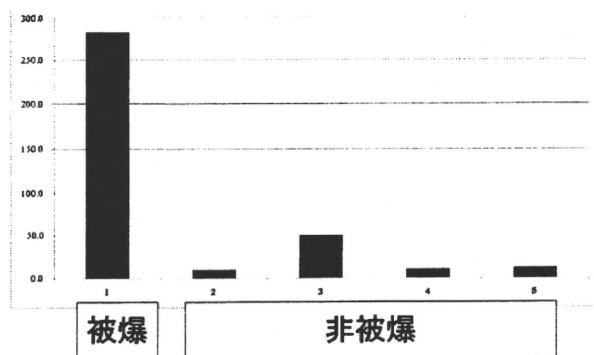
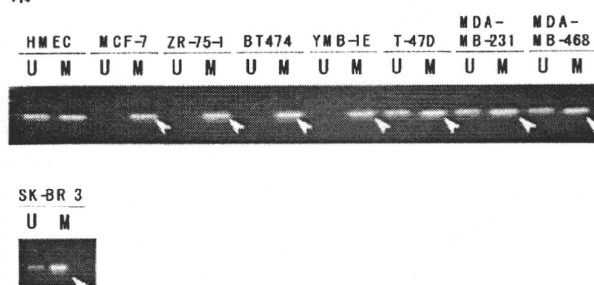


図3 MIR34cの乳がんにおけるメチル化異常



## D. 考察

乳がんのエピジェネティックな異常としてNR5bA2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。

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ている。今回、乳がんを高発現していたhas-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。

エピジェネティックな機構として、RNAサイレンシングが注目されているが、microRNA自身の制御についてもメチル化異常などエピジェネティックな機構が重要であると考えられている。以前の解析において乳がんにおける高頻度のhsa-miR-34cの発現低下について明らかにしたが、今回、hsa-miR-34cのメチル化異常が高頻度に認められることが示した。hsa-miR-34cはp53に関連し増殖抑制作用を有することから、hsa-miR-34cのメチル化異常および発現低下が乳癌発がんに重要である可能性がある。

## 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) NR5A2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5種類のmicroRNA、3) 乳がん

における高頻度のhsa-miR-34c のメチル化異常。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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. 17:118-124, 2010

##### 2. 著書

- 1) PCR/RT-PCR 「アトラス 細胞診と病理診断 医学書籍」 2010
- 2) FCM 「アトラス 細胞診と病理診断 医学書籍」 2010

##### 3. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) MicroRNA in triple-negative breast cancer The 15th Japan – Korea cancer research workshop, December 21-22, 2010

#### 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

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 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

研究分担者 高島貴志 放射線医学総合研究所・主任研究員  
研究協力者 島田義也 放射線医学総合研究所・グループリーダー

研究要旨 *Ptch1*ヘテロ欠損マウスに生じた髄芽腫に関して、放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常（「刻印」と呼ぶ）と、ゲノムDNAメチル化状態に関連があるか調べた。*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、「刻印」を持つ腫瘍は低メチル化状態であること、さらに、メチル化レベルに応じて各遺伝子発現量が変化していることがわかった。放射線誘発腫瘍は自然発症腫瘍に比べて比較的早く発症するが、腫瘍の発症時期と上記メチル化状態にも明瞭な相関が見られたことから、「刻印」と「腫瘍発症時期」と「DNAメチル化状態」の3者に関連があると考えられた。

### A. 研究目的

*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（「刻印」と呼ぶ）を同定している（図1）。この放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常とエピジェネティクスとの関係を明らかにする。これにより、放射線による発がん機構の理解を深め、予防法構築に寄与する。

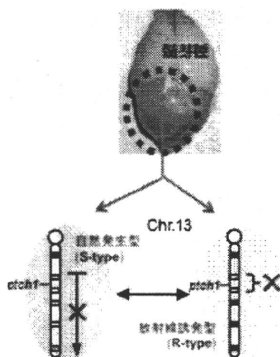


図1. 放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常。*Ptch1*ヘテロ欠損マウスに生じた髄芽腫の解析で、非照射実験群の腫瘍には認められないゲノム異常（右下：正常*Ptch1*の染色体中間部欠失型不活性化）が、低線量照射を含めた7つの照射実験群の腫瘍において線量依存的な頻度上昇を伴って検出された。

### B. 研究方法

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。個々のCpGアイランドのCpG配列におけるシトシンメチル化は、バイサルファイトシークエンス解析により確認した。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。

### （倫理面への配慮）

本研究は遺伝子組換えマウスを用いる実験を含んでおり、動物実験や組換え実験に関する規定に各々適合すると、放射線医学総合研究所の動物実験委員会および遺伝子組換え実験委員会による承認を受け実施した。

### C. 研究結果

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。このうち、R型で高メチル化だったのは

1カ所だけだったのに対し、逆に低メチル化だった箇所が20カ所検出された（表1）。

	染色体番号	近傍の遺伝子等
1) 放射線誘発型でのみ高メチル化	Chr.13	<i>Map3k1</i>
2) 放射線誘発型でのみ低メチル化	Chr.1	<i>Asb18</i>
	Chr.2	<i>Tbr1</i>
	Chr.2	<i>Pax6</i>
	Chr.3	<i>Sox2</i>
	Chr.4	<i>Cdkn2a</i>
	Chr.4	<i>Prdm16</i>
	Chr.5	<i>Pdgfra</i>
	Chr.6	<i>Dls5, Dlx6</i>
	Chr.6	<i>miR-183-96-182 cluster</i>
	Chr.7	<i>Dbx1</i>
	Chr.8	<i>Efnb2</i>
	Chr.8	<i>Irx5</i>
	Chr.11	<i>Hs3st3b1</i>
	Chr.13	<i>Foxj2</i>
	Chr.13	<i>Barx1</i>
	Chr.14	<i>Dupd1</i>
	Chr.14	<i>Otx2, Otx2os1</i>
	Chr.15	<i>Naprt1</i>
	Chr.15	<i>Scrt1</i>
	Chr.16	<i>Gp5</i>

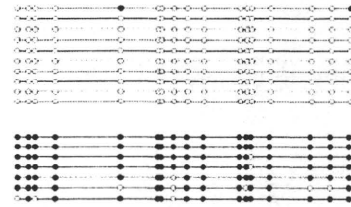
表1 自然発生型腫瘍と放射線誘発型腫瘍間でメチル化レベルの異なるCpGアイランド。

ゲノムデータベース検索の結果これらのCpGアイランド近傍には、髄芽腫の増殖性など、腫瘍細胞の性質に影響しうる複数の遺伝子（*Pax6*, *Cdkn2a*, *Pdgfra*など）がマップされていた。これらのうち、髄芽腫の起源である神経顆粒細胞の分化や移動に重要な*Pax6*と、細胞周期や細胞老化に重要な*Cdkn2a*のCpGアイランドについて、S型とR型の腫瘍を1つずつ代表として選び、CpG配列のシトシン塩基がどの程度メチル化されているか調べた。その結果、MeDIP-Chip法による結果と整合して、S型腫瘍（下段）が高メチル化（黒丸）なのに対し、R型腫瘍（下段）では、多くのCpGのシトシン配列がメチル化されておらず、低メチル化の状態であった（図2）。

CpGアイランドのメチル化レベルは、周辺遺伝子の発現量と密接に関連していることが予想される。MeDIP-Chip法により解析した12腫瘍に関しては、発現アレイ解析を既に行っていたので、メチル化レベルと遺伝子発現量の関係を検討した。その結果、*Pax6*、*Pdgfra*、*Otx2*遺伝子に関しては、負の相関（高メチル化=低発現）が、逆に*Cdkn2a*に関しては正の相関（高メチル化=高発現）が認

められた。

(A) *Pax6*（プロモーター領域）



(B) *Cdkn2a*（第2エクソン領域）

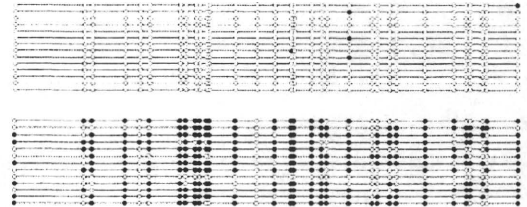


図2 *Pax6*と*Cdkn2a*のCpGアイランドメチル化。白丸は非メチル化、黒丸はメチル化シトシンのCpG配列。上段は、1.5Gy照射後、死亡日齢が87日のマウスのR型腫瘍のパターンで、下段は死亡日齢が173日の非照射マウスのS型腫瘍のパターン。

また、R型腫瘍はS型腫瘍より比較的早く発症する傾向がある。この点に着目し、死亡日齢と*Pax6*と*Cdkn2a*遺伝子発現量の相関を、29個のS型腫瘍と28個のR型腫瘍に関してリアルタイムPCR法で解析した（図3）。その結果、*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の1つである*p19ARF*は、発症時期が遅くなるほど高かった。また、*Cdkn2a*遺伝子座にコードされるもう一つの遺伝子である*p16Ink4a*についても、同様な傾向が認められた。

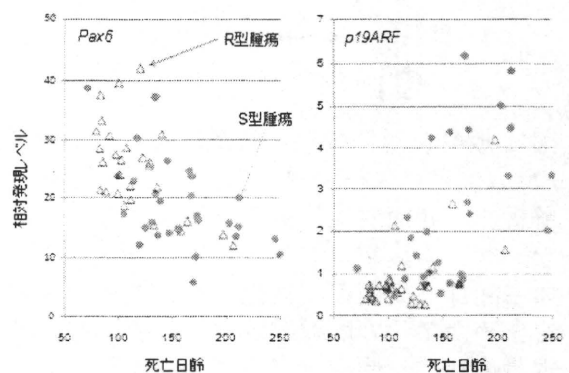


図3 死亡日齢と*Pax6*（左）、*p19ARF*（右）発現量の相関。*p19ARF*は、*Cdkn2a*遺伝子座にコードされる遺伝子の1つである。

#### D. 考察

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。一般に、遺伝子プロモーター領域の高メチル化は遺伝子発現のサイレンシング機能を果たすと考えられている。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。一方、*Cdkn2a*に関してはメチル化領域が第2エクソン領域であり、メチル化と発現量に正の相関が認められた。*Cdkn2a*に関する同様な正の相関は過去にも報告があり、遺伝子の下流域におけるメチル化は発現上昇に貢献していることが示唆されている (Jones P.A. The DNA methylation paradox. Trends Genet. 15, 34-37, 1999)。

*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。また、発生・分化段階でヘッジホッグシグナル伝達系 (*Ptch1*欠損により亢進する経路) で制御されることが知られている遺伝子である。*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おり、*Pdgfra*は転移性の指標となるとも報じられている。*Cdkn2a*は、*p16Ink4a*や*p19ARF*という細胞周期制御に非常に重要な遺伝子をコードしており、高レベルな発現は細胞老化の指標になると考えられている。

これらの重要な遺伝子発現レベルがメチル化と相関していることが今回明らかになった。また、今回のリアルタイムPCRによる57例の腫瘍における発現レベルの違いを併せて考えると、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る。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、現在図4のような2つの作業仮説を立てている。モデル1では、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を仮定している。モデル2では、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を仮定している。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。

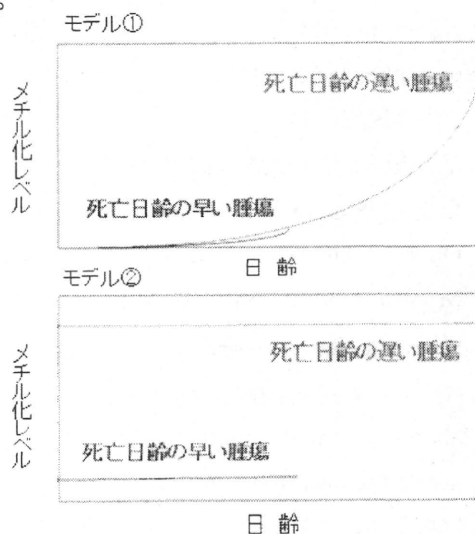


図4 腫瘍の発症日齢の違いによるメチル化レベルの違いが生じるメカニズムを説明する2つの作業仮説

#### E. 結論

*Ptch1*ヘテロ欠損マウスに生じた髄芽腫に関して、放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常と、DNAメチル化状態の相関性を調べた。*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、メチル化レベルに腫瘍間の差が存在し、そのメチル化レベルに呼応して各遺伝子発現量に変化していることがわかった。放射線誘発腫瘍は自然発症腫瘍に比べて概して早く発症するが、腫瘍の発症時期と上記メチル化状態に明瞭な相関が見られたことから、死亡日齢とDNAメチル化状態に関連があると考えられた。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、放射線誘発型腫瘍ではこれらの領域で概して低メチル化状態であると考えられる。この関係は、なぜ放射線誘発型腫瘍は早く発症するのかという命題とも関連している可能性があり、今回明らかになったメチル化レベルの違いが生じるメカニズムを明らかにすることは重要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表



1. Y. Shimada, M. Nishimura, Y. Amasaki, Y. Shang, K. Yamauchi, T. Sawai, S. Hirano, T. Imaoka, Y. Yamada, T. Takabatake, S. Kakinuma. Interaction of low dose radiation and other factors. *Health Physics*, 100, 278-279, 2011.
  2. Y. Ishida, T. Takabatake, S. Kakinuma, K. Doi, K. Yamauchi, M. Kaminishi, S. Kito, Y. Ohta, Y. Amasaki, H. Moritake, T. Kokubo, M. Nishimura, T. Nishikawa, O. Hino, Y. Shimada. Genomic and gene expression signatures of radiation in medulloblastomas after low-dose irradiation in *Ptch1* heterozygous mice. *Carcinogenesis*, 31, 1694-1701, 2010.
  3. D. Iizuka, T. Imaoka, T. Takabatake, M. Nishimura, S. Kakinuma, Y. Nishimura, Y. Shimada. 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.
  4. Y. Yamaguchi, T. Takabatake, S. Kakinuma, Y. Amasaki, M. Nishimura, T. Imaoka, K. Yamauchi, Y. Shang, T. Miyoshi-Imamura, H. Nogawa, Y. Kobayashi, Y. Shimada. Complicated biallelic inactivation of *Pten* in radiation-induced mouse thymic lymphomas. *Mutation Research*, 686, 30-38, 2010.
  5. T. Miyoshi-Imamura, S. Kakinuma, M. Kaminishi, M. Okamoto, T. Takabatake, Y. Nishimura, T. Imaoka, M. Nishimura, K. Murakami-Murofushi, Y. Shimada. Unique characteristics of radiation-induced apoptosis in the postnatally developing small intestine and colon. *Radiation Research*, 173, 310-318, 2010.
2. 学会発表
1. 高島貴志、石田有香、臺野和広、柿沼志津子、小久保年章、甘崎佳子、土居主尚、西村まゆみ、島田義也： *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
  2. 島田義也、柿沼志津子、西村まゆみ、山田裕、今岡達彦、高島貴志、武田志乃、尚奕、甘崎佳子、平野しのぶ、澤井知子、臺野和広、川口勇生、三枝新：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
  3. 甘崎佳子、平野しのぶ、中田章史、高島貴志、山内一己、西村まゆみ、吉田光明、島田義也、柿沼志津子：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
  4. 石田有香、高島貴志、柿沼志津子、鬼頭靖司、太田有紀、小久保年章、西川哲、島田義也：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
  5. 高島貴志、石田有香、臺野和広、柿沼志津子、小久保年章、甘崎佳子、土居主尚、西村まゆみ、島田義也：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
  6. 西村まゆみ、今岡達彦、高島貴志、臺野和広、柿沼志津子、奥谷倫未、高島賢、島田義也：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
  7. 島田義也、西村まゆみ、今岡達彦、柿沼志津子、高島貴志、武田志乃、山田裕、山内正剛、山内一己、尚奕、臺野和広、澤井知子、甘崎佳子、その他、Experimental research on radiation health effects on children、Bond symposium、アメリカ、2010年、5月
- 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。

## 放射線発がんにおける損傷乗り越えDNA合成酵素REV1の役割

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 笹谷 めぐみ （広島大学原爆放射線医科学研究所）  
増田 雄司 （広島大学原爆放射線医科学研究所）

**研究要旨** 放射線被ばくが誘発するゲノム損傷の修復機構における損傷乗り越えDNA合成の関与と放射線発がんにおける役割を明らかにするため、損傷乗り越えDNA合成機構の中心的役割を担うREV1の細胞生物学的な機能解析を行った。REV1過剰発現細胞や発現抑制細胞のDNA損傷応答反応を解析した結果、対照細胞に比べATM、p53、p21、H2AX等の発現や活性化に変化がなかった。REV1の発現量は、放射線被ばく後の細胞周期チェックポイントに影響を与えなかった。また、UV照射で観察される照射後のPCNAのモノユビキチン化は、放射線照射では認められず、また、REV1の発現量による影響を受けなかった。

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。これまでの研究から、REV1の発現量が細胞死や突然変異頻度に作用し、結果として発がん過程に影響を及ぼすことが推定されている。本結果から、この効果は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唆された。更なる解析が、放射線発がんを始め一般の癌が発症する新しいメカニズムの解明につながると期待される。

### A. 研究目的

原爆被爆者のみならず医療の高度化に伴う医療被ばくや、放射線の産業利用や原子力発電に伴う職業被ばくなどで、低線量放射線被ばくによる健康影響の解明は緊急の課題となっている。特に低線量被ばくによる発がん機構の解明とそれに基づく治療法の開発、並びに発がんリスクの解明は、職業被ばくにおける健康管理や医療被ばくでの患者の防護の観点からも極めて重要である。本研究では、放射線が誘発するゲノム障害の修復機構における損傷乗り越え修復の関与を明らかにすると同時に、損傷乗り越え修復機構の中心的役割を担うREV1の放射線発がんにおける役割を明らかにする。この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. REV1過剰発現細胞株

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-pcDNA/6TR-pcDNA4/TO-REV1-C6（以下HT1080-REV1-C6）を用いた。REV1の発現誘導には、tet（最終濃度：0.1 μg/ml）を加え24時間後にDNA損傷応答解析、細胞周期の測定、生存率の測定を行った。

#### 2. siRNAによるREV1発現抑制法

ヒト繊維肉腫細胞株HT1080-REV1-C6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、DNA損傷応答解析、細胞周期の測定、生存率の測定を行った。

#### 3. Western blotting法を用いたDNA損傷応答解析

6cmディッシュに $2 \times 10^5$ 個の樹立細胞

を撒き、24時間後にtet（最終濃度:0.1  $\mu$ g/ml）を加え48時間後、放射線照射および紫外線照射を行った。その後経時的に照射した細胞をセルスクレーパーで回収した。タンパク質抽出液のタンパク質濃度をProtein assay kit（Bio-Rad社）によって測定し、SDSサンプルバッファーを加えて、95°C、10分間の熱処理したものを泳動サンプルとして用いた。10  $\mu$ gの泳動サンプルをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜（BioRad社）に転写した後、目的のタンパク質に対する特異的抗体で処理し、HRP標識した2次抗体で処理した後、ECL反応によりシグナルを検出して解析を行った。1次抗体は、抗REV1抗体（C2）、抗phospho-ATM（Ser1981）抗体（Rockland社）、抗p53抗体（Santa Cruz社）、抗phospho-p53（Ser15）抗体（Cell Signaling社）、抗p21抗体（BD社）、抗phospho H2AX（Ser139）抗体（Millipore社）、抗PCNA抗体（Santa Cruz社）、抗 $\beta$ -actin（SIGMA社）を用いた。標識した2次抗体には、抗ウサギIgG抗体（ZYMED社）、抗マウスIgG抗体（ZYMED社）を使用した。

#### 4. 細胞周期の解析

樹立細胞を放射線、または紫外線で照射した後トリプシン処理によって細胞を回収しエタノールで固定した。その後Propidium iodide（PI）染色し、BD FACS Canto II Flow Cytometer（BD）により細胞周期の解析を行った。

#### 5. 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した後の生存率をコロニー形成法を用いて測定した。3X10<sup>2</sup>-1 X 10<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（0.1  $\mu$ g/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した。放射線照射では、線源として<sup>137</sup>Cs  $\gamma$ 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。放射線または紫外線照射後、培地にCaffeine（1mM）を加え48時間培養した。その後、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。

#### 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過剰発現株を用いたDNA損傷応答解析、細胞周期測定

REV1過剰発現細胞を用いて、放射線および紫外線照射後のDNA損傷応答反応を調べた。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。これらタンパクレベルの挙動は、REV1過剰発現による影響を受けなかった。また、紫外線照射後PCNAがモノユビキチン化されることが報告されているが、REV1過剰発現でも同程度のモノユビキチン化が検出された。

細胞周期解析を行った結果、放射線照射後、6時間後からG1/Sチェックポイント、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。

##### 2. REV1発現を抑制した細胞株でのDNA損傷応答解析、細胞周期測定、損傷感受性試験

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を細胞にリポソーム投与し、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

DNA損傷応答反応を調べたが、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。さらに、1mMのcaffeineの添加は、この感受性を増強した。

#### D. 考察

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。これまでの研究により、REV1の発現量が細胞死や突然変異頻度に作用し、結果として発がん過程へ影響を及ぼすことが推定された。今年度は、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。放射線照射によりDNAは二重鎖切断や酸化的損傷といったさまざまな損傷を受けることが知られている。これら損傷に対して、細胞内ではATMのリン酸化、H2AXのリン酸化、p53のリン酸化とそれに伴うタンパクの安定化、p21の発現量の増加といった損傷応答反応が誘導され、損傷に対する防御機構を立ち上げることが知られている。今回の結果から、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を明らかにした。また、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。

DNA複製装置の構成因子であるPCNAは、そのモノユビキチン化が損傷乗り越えDNA合成機

構を誘導するのに必要であると考えられている。本研究から、紫外線照射ではPCNAのモノユビキチン化が検出されたが、放射線照射においてはPCNAのモノユビキチン化は検出されなかった。これらのPCNAのモノユビキチン化レベルはREV1発現量の影響を受けなかった。このことから、REV1の発現レベルは、PCNAのモノユビキチン化反応を介した損傷乗り越えDNA合成機構の立ち上げには関与しないことを示唆するものである。

また、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、caffeineの添加は、この傾向を増強した。CaffeineはATMおよびATRを抑制することが知られている。今回の結果から、REV1発現抑制細胞では、ATM、ATRシグナル伝達経路を介した別の機構が、REV1発現抑制によって妨げられた損傷防御機構を補っていると示唆される。また、pol $\eta$ 欠損細胞は紫外線に対して感受性を示し、caffeineがこの感受性を増大させることが報告されている。pol $\eta$ はREV1と同様に損傷乗り越えDNA合成機構に関与するポリメラーゼであり、今回の結果と一致するといえる。

本研究結果から、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明らかにした。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癌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。

#### E. 結論

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の発がん促進効果は、REV1が細胞死や突然変異頻度に及ぼす影響によると推定された。今年度の研究により、この効果は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唆された。今後、この機構