

201118020A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安井 弥
平成24年（2012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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 安井 弥

平成24年（2012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 -----	17
安井 弥	
2. 放射線二次がんの研究 -----	25
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 -----	29
宮本和明	
4. 放射線誘発乳腺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 -	32
臺野和広	
5. 放射線発がんにおける複製後修復機構の解析 -----	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. 放射線関連発がんに関する遺伝要因の研究 -----	44
林 奉権	
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 -----	52
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	58

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て研究を行なった。「放射線関連がんにおけるエピジェネティクス」の解析では、5mGy以上の被曝群の胃がんで有意にmiR-143High症例が多く、被曝線量増加に伴い、miR-143Highの割合が有意に増加した（ $P=0.0359$ ）。多変量解析によって、miR-143Highは被曝関連胃がんの独立したマーカーであることが示された（ $P=0.0405$, 95%CI: 1.076-27.508）。乳がんにおけるゲノム網羅的解析を行い、*GATA6*遺伝子のメチル化異常を同定し、また、高頻度のhsa-miR-137メチル化異常を同定した。被曝者乳がんで発現が亢進しているmicroRNAを新たに3種類同定した。放射線二次がん解析のため、がん研究会有明病院におけるがん登録データベースから候補となる重複がん1,000例を抽出した。「放射線障害による発がんモデルにおける検証」において、ラットの放射線誘発乳がん、自然発症した乳がん検体および正常乳腺組織について、CpGアイランドマイクロアレイによるメチル化解析の結果、がんにおいて高メチル化あるいは低メチル化状態を示す遺伝子領域を複数同定した。複製後修復機構の制御因子であるRAD18の放射線応答への寄与について検討し、RAD18発現抑制細胞では、放射線照射によって細胞死に高感受性を示し、DNA損傷応答反応（ATM, p53, H2AX等のリン酸化の誘導抑制）およびチェックポイントの活性化が抑制されることを見いだした。また、DNA修復機能に関与するSYCP3を発現することによって、BRCA2の機能が抑制され、DNA二本鎖切断に対する相同組換え修復機能が低下し、その結果、細胞はPARP阻害剤に対して高感受性を示すことを明らかにした。「原爆被曝者コホートを用いた宿主要因と発がん」の研究では、*CD14*のプロモーター領域-911位の遺伝子多型と大腸発がんリスクを解析した結果、放射線によるリスク増加は結腸がんで有意であり、基準カテゴリー（*CD14-C/C*または*-C/A*で非被曝）と比べて*CD14-A/A*と被曝線量 $>0.7\text{Gy}$ の組み合わせで結腸発がんリスクが有意に増加する（RR=2.16, 95%CI: 1.25-3.72）ことを見いだした。また、ヒト末梢血 CD34 陽性造血幹細胞における自然発生ならびに放射線誘発 γH2AX フォーカス頻度測定系を確立した。本研究の成果は、放射線障害の具体的な評価法や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

臺野和広

独立行政法人放射線医学総合研究所・
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、産業等において放射線が広く利用されている現在、放射線の健康への影響とその管理は重要な問題である。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、外的要因としての発がんの影響が懸念されている。2011年の東日本大震災に伴う東京電力福島第一原子力発電所の事故においても、放射線の影響は作業員ならびに周辺住民の健康管理上極めて重要な課題である。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。放射線(γ 線)照射により発症するラット放射線誘発乳がんモデルでは、がんでメチル化異常を示す遺伝子領域を同定し、放射線誘

発乳がんの特徴的なDNAメチル化を見いだすことで、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、点変異誘発機構の制御を担うREV1やRAD18の遺伝子改変細胞の解析により、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microRNA発現と機能解析:放射線影響研究所のLife Span Study(LSS)集団に発生した45例のFFPE切片を使用した。miR-143の発現レベルは、定量的RT-PCRによって測定し、被曝線量、被曝時年齢、臨床病理学的事項との相関性を解析した。また、miR-143の発現の局在は、in situ hybridization(ISH)で検討した。さらに、胃がん細胞株および間質線維芽細胞を用い、強制発現系およびノックダウン系と定量的

RT-PCR などにより、機能解析を行なった。

CAST 法による未分化型胃がんにおけるがん関連膜蛋白・分泌蛋白遺伝子の探索：被爆者に頻度の高い未分化型胃がんの細胞株である HSC-44PE（スキルス胃がん細胞株）と 44As3（HSC-44PE 由来高腹膜転移株）を材料に CAST 解析を行ない、抽出された遺伝子については、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。

2. 放射線二次がんの研究（石川）

放射線治療後に発生したがんとして、院内がん登録データベースを基に、「複数のがんがあり、放射線治療後に発生したがん」3,500例を抽出し、症例の重複や照射から二次がんまでの期間の短いものなどを除き約 1,000例に集約した。保管されている放射線治療記録（照射録、照射野、カルテ記載）をもとに、放射線が関与している可能性の高い二次がん症例を限定する作業を行った。miRNAの発現解析は、ホルマリン固定パラフィン包埋材料（FFPE）からmiRNA分画を調整し、miRNAマイクロアレイおよび定量的RT-PCRで解析する予定である。

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）

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）法を行なった。広島被爆者に発生した乳がんと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異常候補の同定を試みた。さらに、乳がんが高頻度に発現が低下するmiR-137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. 放射線誘発乳腺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（臺野）

3 および 7 週齢のSprague-Dawley雌ラットに、放射線（ガンマ線、2Gy）を全身照射して発症した乳腺腫瘍と、自然発症した乳腺がんおよび正常乳腺組織より抽出したゲノムDNAからメチル化DNAを濃縮し、ラットカスタムCpGアイランドマイクロアレイ（約8,000遺伝子に対応）にて、ゲノムDNAのメチル化パターンを解析した。連続したプローブ3つ以上からなるゲノムDNA領域の内、正常乳腺組織に比べてがんにおいて3倍以上メチル化レベルが増加したものを高メチル化領域、2倍以上メチル化レベルが減少したものを低メチル化領域とした。さらに、乳がんにおける遺伝子のメチル化レベルとその発現変動（1.5倍以上）が逆相関する遺伝子群を抽出した。

2. 放射線発がんにおける複製後修復機構の解析（神谷）

ヒト繊維芽肉腫細胞株HT1080に、RAD18に対するsiRNAを導入し、生存率、細胞応答、細胞周期の変化について検討した。放射線照射後の生存率は、コロニー形成法を用いて解析した。放射線照射は、線源として¹³⁷Cs γ線をを用い照射の線量率は1.03Gy/min、線量は1, 2, 4, 6及び8Gyとした。細胞応答については、western blotにてRAD18, phospho-ATM, p53, phospho-p53, p21, phospho H2AX の発現を検討した。細胞周期の変化は、BD FACS Canto II Flow Cytometerにより解析した。

3. DNA修復遺伝子の発現異常によるがん特性の解明（宮川）

正常網膜上皮細胞(RPE)由来SYCP3強制発現細胞とsiRNAノックダウンがん細胞（HepG2, HT1080, MCF7）を用いた。PARP阻害剤にはNU1025を用い、最大150μMまでの濃度で培養した後に、生存率をコロニー計数によって算出した。さらに、SYCP3が発現し且つBRCA2変異株であるCapan 1を用いて、同様の検討を行った。また、既存のDNA損傷性抗がん剤との併用の効果をみるために、RPEにSYCP3を発現した細胞と野生株を用いて、NU1025単独処理の場合と、シスプラチン4μMで1時間処理した後に

NU1025を加えた場合の生存率の差異を解析した。

3) 原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん

1. 放射線関連発がんに関する遺伝要因の研究 (林)

放射線影響研究所の成人健康調査(AHS)コホートで 1982 年以降に結腸直腸がん罹患した 194 人を症例群とし、同コホートから 2,132 人のサブコホート群を選んでケース・コホート研究を行った。免疫関連遺伝子のうち、CD14 の発現量に関連のある CD14 の-911 位の遺伝子多型について結腸直腸発がんリスクとの関係を調べた。SNP解析は、TaqMan 5' ヌクレアーゼ法で行ない、症例対照研究におけるリスク評価は SPSS のロジスティック回帰モデルを用いた。被曝線量別では、非被曝、被曝線量の中央値 700 mGy で 2 分割されたグループの計 3 カテゴリーに分けて解析した。

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)

末梢血より Ficoll 法にて単核細胞を分離し、X 線照射後あるいは非照射で CD34 抗体および細胞系列 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56, およびGPA) 抗体にて染色後、細胞内 γ H2AX 免疫蛍光染色を行った。セルソーター (FACS Aria II) にて造血幹細胞分画 (CD34 陽性/細胞系列陰性) およびリンパ球分画に識別し、それぞれについて、細胞核中の γ H2AX フォーカスを少なくとも100個以上の細胞について計測し、細胞1個あたりの γ H2AX フォーカス数を比較した。

(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ックス

1. マイクロ RNA からみた放射線関連固形がんの特徴 (安井)

胃がんにおけるmiR-143の発現レベルを高、中、低の3つに分け、高と中をmiR-143High (H)、低をmiR-143Low (L)として解析した。miR-143の発現レベルは、5mGy以上の被曝群で有意にmiR-143High症例が多かった (P=0.0163)。被曝線量増加に伴い、miR-143Highの割合が有意に増加していた (P=0.0359)。多変量解析によって、miR-143Highは被曝関連胃がんの独立したマーカーであることが示された (P=0.0405, 95%CI: 1.076-27.508)。細胞株を用いた検討からは、組織サンプルでのmiR-143のレベルは、がん細胞よりも間質細胞での発現を反映している可能性が考えられた。miR-143とmiR-145の発現は、極めて高い相関を示すことを確認した。胃がん細胞株HSC-44PEと44As3についてCAST法により、膜蛋白コード遺伝子では、ITGB6, ZDHHC14, DLG1が高腹膜転移株である44As3において発現が特に亢進しており、分泌蛋白コード遺伝子では、TFPI, MMP10, PRSS1, PRSS2が44As3において発現が低下していた。ZDHHC14の発現は、胃がん組織では種々のレベルで認められた。

2. 放射線二次がんの研究 (石川)

がん研病院のがん登録データベースから

重複がん症例で、かつ、第二がん発生以前に放射線治療の既往を有する症例を全例抽出した。その中で、臨床的に多重がんと推定されるもの、病理学的に転移が否定されたもの、放射線照射が第一がんに対するものがあること、の条件を満たす症例3,500症例を抽出した。次に、第二がん発生までの期間が短いもの（5年未満）、第二がんが白血病である例を除いた1,000例について、第一がんの照射記録が不十分なもの、などを除外して、放射線が関与している可能性の高いがん（放射線二次がん）を抽出中である。miRNA解析では、新鮮凍結材料とFFPEとの比較において、症例によっては、かなりのmiRNAが失われることが判明した。現在、更に条件決めを続けている。

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GATA6 (GATA binding protein 6)を新規に同定した。GATA6のメチル化異常は検討したすべての乳がん細胞株に認められた。乳がん症例でも21症例全例にメチル化異常が検出され、血液検体でも検出可能であることを見いだした。被爆者乳がんにおいて10倍以上に発現亢進を示すmicroRNAとして、miR-650, miR-1298, miR-1303の3種類を同定した。miR-137のDNAのメチル化異常は、検討したすべての乳がん細胞株および症例において認められた。

2) 放射線障害による発がんモデルにおける検証

1. 放射線誘発乳腺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（臺野）

正常乳腺組織に比べ、自然発症および放射線誘発ラット乳がんゲノムDNAのメチル化レベルに異常がみられる遺伝子領域235ヶ所を見出した。クラスター解析の結果、思春期前（3週齢）の放射線被曝により誘発された乳がんは、他の乳がんとは異なるクラスターに分類された。がんにおいてメチル

化異常が検出された遺伝子領域のうち、自然発症した乳がん、3週齢、7週齢の放射線被曝により誘発された乳がんの特徴的な高メチル化領域を、それぞれ19ヶ所、119ヶ所、70ヶ所、低メチル化領域を、それぞれ17ヶ所、3ヶ所、27ヶ所抽出した。さらに、遺伝子発現プロファイル解析データを用い、がんにおけるDNAメチル化異常に伴い、発現が変動していると考えられる23種の標的遺伝子候補を同定した。

2. 放射線発がんにおける複製後修復機構の解析（神谷）

siRNAによるRAD18発現抑制細胞を用いて細胞生物学的解析を行った結果、RAD18発現抑制細胞における8Gy照射後の生存率は0.01%であり、コントロール細胞の1%と比較して、放射線に対してより高感受性を示した。次にこれらの細胞について放射線照射後のDNA損傷応答反応を解析した結果、RAD18発現抑制細胞は、コントロール細胞に比べ、ATM, p53, H2AXなどのリン酸化の誘導が抑制されていた。さらに、RAD18発現抑制細胞では、放射線照射によるG2/M期の細胞分画の増加が抑制されていた。これらの結果から、RAD18は放射線照射後のDNA損傷応答を誘導することにより、G2/Mチェックポイントの活性化に寄与することが示唆された。

3. DNA修復遺伝子の発現異常によるがん特性の解明（宮川）

野生型RPE細胞では、PARP阻害剤NU1025投与によってもコロニー形成能は変化しないのに対して、SYCP3発現RPE細胞では、100 μ Mでは全くコロニーが形成されなかった。がん細胞3種類におけるコロニー形成は、SYCP3ノックダウンにより、いずれも増加した。次に、BRCA2変異株であるCapan1におけるSYCP3のノックダウンの影響を検討したところ、PARP阻害剤への感受性は全く変化せず、SYCP3発現によるPARP阻害剤感受性の変化は、BRCA2を介しているものと見なされた。SYCP3が発現したRPEにおいて観察されていたPARP阻害剤への感受性は、シスプラチンの前処理によって増強し

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. 放射線関連発がんに関する遺伝要因の研究 (林)

*CD14*のプロモーター領域-911位の遺伝子多型 (*CD14-C/A*) と大腸発がんとの関係、およびそれらの関係に対する放射線被曝の影響について調べた。結腸がんについては、性別で男性のリスクが女性より高く、年齢10才当たりリスクが1.3倍、原爆放射線被曝線量1 Gy当たりリスクが1.2倍であり、*CD14*遺伝子型では*CD14-A/A*のリスクが*CD14-C/C*あるいは*CD14-C/A*より1.4倍高かった。一方、直腸がんではこれらは有意のリスク要因ではなかった。対象者を被曝線量によって3群に分け、*CD14*遺伝子型別にリスクを算出したところ、基準カテゴリー (*CD14-C/C*または*-C/A*で非被曝) と比べて*CD14-A*アリルのホモ接合体と最も高い被曝線量 (>0.7Gy) の組み合わせカテゴリーで結腸発がんリスクが有意に増加していた (RR=2.16, 95%CI: 1.25-3.72)。

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)

末梢血 CD34 陽性造血幹細胞における自然発生 γ H2AX フォーカス頻度は、同一人の末梢血リンパ球におけるそれに比べて有意に低かった ($P = 0.037$)。X 線照射1時間後の γ H2AX フォーカス頻度は造血幹細胞とリンパ球のいずれにおいても照射線量依存性 (0.1-2.0 Gy) に増加した。放射線誘発 γ H2AX フォーカスのタイムコースを調べたところ、いずれの末梢血においても1.0 Gy X 線照射後のフォーカス頻度は造血幹細胞の方がリンパ球に比べ早く低下する傾向が見られた。

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、主として原爆被爆者と対照群に発生した胃がん組織を用い、

microRNAの発現解析を行ない、放射線治療後二次がんでは症例抽出作業を行なってきた。本年度の解析により、miR-143が独立した放射線関連胃がんのマーカーであることを明らかにした。miR-143遺伝子の染色体部位は5q32でありmiR-145遺伝子と近接して存在する。細胞株を用いた検討からは、組織サンプルでのmiR-143のレベルは、がん細胞よりも間質細胞での発現を反映している可能性が考えられた。胃がんサンプルにおけるmiR-143とmiR-145の発現解析において両者は極めて高い相関を示したことから、miR-143/miR-145は新たな独立したマーカーとして有用な可能性がある。尚、miR-143の発現と被曝後期間および被曝時年齢との関連については、被曝後20年程度で発生した胃がんサンプルを含めた数症例で検討する必要がある。また、被爆者に頻度の高い未分化型胃がんの細胞株であるHSC-44PEと44As3についてのCAST解析から、ZDHHC14を含むいくつかの膜蛋白・分泌蛋白をコードする遺伝子を同定した。これらについては、被爆者に発生した胃がんでの発現、放射線発がん機構への関与などの解析を進める予定である。

放射線二次がんについては、がん研病院におけるがん登録データベースからの重複がん症例の抽出は、やや遅れながらも進捗している。放射線二次がんと確定した症例については、早めにmiRNA解析へと移行する。今後、抽出された放射線二次がん症例の病理検体を、最新の病理組織学的・分子生物学的手法を用いて検索し、放射線誘発がんにおける細胞の遺伝子制御の面での特徴、放射線二次がんを発生しやすい体質等、病理学的・遺伝子学的な特徴を解明していきたい。

乳がんのエピジェネティックな異常として*GATA6*を新規に同定した。*GATA6*は内胚葉への分化に関与する転写因子であるが、がん化における役割は未だ不明である。*GATA6*のメチル化異常が乳がん細胞および乳がん組織において高頻度に認められ、かつ血液検体で検出可能であったことから、

リスク診断あるいは早期発見マーカーとして利用できる可能性があると考えられた。今回、被爆者乳がんが高発現していたmiR-650, miR-1298, miR-1303については各々の機能が未だほとんど明らかにされておらず、乳がん発生への関与の解明は今後の課題である。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。乳がんにおけるmiR-137のメチル化異常が高頻度に認められたことから、miR-137のメチル化異常は乳腺発がんに関与する可能性が示唆された。

放射線障害による発がんモデルを用いた解析では、まず、放射線誘発ラット乳がんモデルにおいて、自然発症および被曝時年齢の異なる放射線誘発乳がんそれぞれに特徴的なゲノムDNAメチル化異常が存在することが明らかとなった。また、がんにおけるDNAメチル化異常に伴い、発現が変動していると考えられる標的遺伝子候補を23種同定した。3週齢の被曝で誘発された乳がんでは、一部のホルモン応答関連遺伝子の高メチル化が確認されたのに対し、7週齢の被曝による乳がんでは、ホルモン応答関連遺伝子の低メチル化が確認された。この結果は、放射線誘発乳がんのゲノムDNAのメチル化は、がんの標的細胞や被曝時の正常乳腺のDNAメチル化パターンの違いを反映し、ホルモン応答関連遺伝子の発現に関与していることを示唆している。今後、さらに複数の検体を用いた解析によるDNAメチル化異常の検証と、ヒト試料（原爆被爆者の検体等）を用いた研究へと発展させる必要がある。放射線誘発がんの指標を得ることが出来れば、そのリスク推定をより正確なものに出来る可能性がある。

複製後修復機構は、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、RAD6-RAD18複合体が複製後修復機構を制御していると考えられている。本年度の研究において、RAD18の発現抑制は、放射線に高感受性を示すこ

とが明らかとなった。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。RAD18発現抑制細胞では、放射線によるDNA損傷応答反応の抑制が観察されたことから、放射線照射後の損傷応答に、RAD18が寄与していることが示唆された。また、細胞周期解析から、RAD18は放射線照射後のG2/Mチェックポイントの活性化にも関与している知見が得られた。複製後修復機構を制御するRAD18の放射線応答への寄与を解明することにより、複製後修復機構が放射線被ばく後のゲノム修復や突然変異誘発に果たす役割を明らかにすることができる。更なる研究が、放射線発がん機構の新しいメカニズム解明に役立つと期待され、放射線の発がんリスク評価や新たな放射線治療法の開発につながるといえる。

放射線によって活性化される遺伝子の異常、中でも、エピジェネティックな機序により発現異常をきたすDNA修復遺伝子の機能異常ががん特性の原因となるのかを解明することは、新たながんの治療法の開発に大きな影響を与えることが想定されている。SYCP3は正常では生殖細胞における減数分裂においてのみ発現するが、多種類のがんにおいてメチル化の異常によって発現することが既に明らかになっている。このような機序によって生殖細胞以外においてこの分子が発現した場合、DNA二本鎖切断に対する相同組換え修復の機能が低下することによって、ゲノム不安定性が誘導される。その機構としては、SYCP3がこの修復経路において重要な役割を果たすBRCA2に結合して、その機能を阻害することが明らかとなっている。BRCA2の変異は遺伝性乳がん・卵巣がんの原因となるが、その頻度に比べてSYCP3のがんにおける異常発現の頻度が高い。本年度の研究から、BRCA2が変異していない場合にSYCP3が発現すると、PARP阻害剤に対する感受性が亢進することが判明した。この結果は、SYCP3発現による相同組換え修復機能の低下とPARP阻害が、がん細胞特異的に合成致死の表現型をもたらすことを示唆するものである。この

ように、DNA修復機能を制御する遺伝子の発現異常の解析により、合成致死の概念を基盤とする治療方法の開発が可能となることが期待される。

原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がんに関して、本年度は、*CD14*のプロモーター領域の遺伝子多型と大腸発がん、放射線被曝の影響について検討した。今回得られた研究結果から、*CD14*遺伝子型に関連した免疫炎症応答が結腸がんの発生に関与すること、*CD14*遺伝子型によって放射線への応答が個人によって異なる可能性が示唆される。単球・マクロファージ上のリポポリサッカライド (LPS) 受容体として作用するCD14蛋白は、膜型CD14及び可溶性CD14が存在し、大腸菌などの抗原存在下でLPSが結合することにより、CD14に親和性の強いTLR4が活性化されTNF- α 、インターフェロン γ などが誘導される。また、腸上皮細胞や活性マクロファージがCD14を産生していることから、CD14が腸管免疫の主要なregulatorである可能性がある。この*CD14*遺伝子型に関連するCD14の産生蛋白量の個人差が、自然免疫応答の個人差、および炎症誘導の個人差にも関連する可能性が考えられる。今後、さらにCD14に関連する炎症因子、T細胞免疫、NK細胞活性に関連した遺伝子多型についても検討する予定である。これにより、放射線関連大腸がんの高危険群を同定がより進むものと期待される。

さらに、放射線感受性の個体差に関わる生物学的機序を探るための試験管内実験系を開発する目的で、ヒト末梢血中のCD34陽性造血幹細胞における γ H2AX フォーカス測定系を確立した。造血幹細胞における自然発生 γ H2AX フォーカス頻度はリンパ球に比べて有意に低く、X線照射後のフォーカスの頻度も幹細胞においてより低い傾向がみられた。幹細胞は自己再生と分化により長期にわたって子孫細胞を産生し続け

る。造血幹細胞の高いDNA修復能は、生体における造血系腫瘍発生のリスク軽減に働いているのかもしれない。造血幹細胞は骨髄に多く存在し、末梢血中には極めて微量である。今回確立した測定系は、有力な発がんターゲットと考えられる幹細胞の放射線障害感受性を、少量の血液を用いて評価することができることが利点である。また、 γ H2AX フォーカスと他のDNA修復関連タンパクとの共局在を調べることにより、DNA修復の分子機序を調べる実験に応用可能と思われる。さらに、試験管内放射線誘発 γ H2AX フォーカス頻度と発がんリスクの関係を調べることにより、放射線障害に高感受性を有する者は放射線関連がんのリスクがより高くなるという仮説の検証が可能である。

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」の観点から研究を行なった。本年度は、胃がんのmicroRNA解析において、5mGy以上の被曝群で有意にmiR-143High症例が多く、多変量解析によって放射線被曝関連胃がんの独立したマーカーであることが示された。被爆者乳がんにおいてmiR-650, miR-1298, miR-1303が高発現することを見いだした。*GATA6*のメチル化異常は乳がんを高頻度であり、血液検体でも検出が可能であった。また、放射線治療後二次がん解析のための症例の絞り込みを行なった。放射線誘発乳がんラットモデルを用いた検討で、自然発症および被曝時年齢の異なる乳がんそれぞれに特徴的なDNAメチル化異常が存在することが分かった。複製後修復機構の制御因子であるRAD18の放射線応答への寄与に関しては、RAD18は放射線照射後の損傷応答を誘導することにより、G2/Mチ

チェックポイントの活性化に寄与することが示された。また、SYCP3が発現することによって、BRCA2の機能が抑制され、DNA二本鎖切断に対する相同組換え修復機能が低下し、その結果、細胞はPARP阻害剤に対して高感受性を示すことが明らかとなった。原爆被爆者コホートをを用いた研究では、大腸発がんやCD14遺伝子多型の関係およびすでに報告しているIL18遺伝子多型と併せて考え、原爆被爆者の結腸発がんに関する遺伝的要因と原爆放射線被曝が影響を及ぼし、持続性炎症がこれらのがんの発生に関与する可能性が示唆された。さらに、ヒト末梢血CD34陽性造血幹細胞における自然発生ならびに放射線誘発γH2AXフォーカス頻度測定系を確立した。本研究を継続し、得られた成果を活用することにより、放射線障害に対する具体的な評価法や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

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, Matsubara A and Yasui W: Desmocollin 2 is a new immunohistochemical marker indicative of squamous cell carcinoma differentiation in urothelial carcinoma. *Histopathology* 59:710-721, 2011
4. Hayashi T, Oue N, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Sentani K, Ohara S, Teishima J, Matsubara A and Yasui W: Identification of transmembrane protein in prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: Expression of CDON is involved in tumor cell growth and invasion. *Pathobiology* 78:277-284, 2011
5. Yasui W, Sentani K, Sakamoto N, Anami K and Oue N. Molecular pathology of gastric cancer: Research and practice. *Path Res Pract* 207:608-612, 2011
6. Yasui W. Future Perspective of Gastric Cancer Treatment – From Bench to Bedside –. *Pathobiology* 78:293-293, 2011
7. Oue N, Noguchi T, Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka N, Wakamatsu Y, Sasaki H and Yasui W. Serum concentration and expression of Reg IV in patients with esophageal cancer: age-related elevation of serum Reg IV concentration. *Oncol Lett* 2:235-239, 2011
8. Takami H, Sentani K, Matsuda M, Oue N, Sakamoto N and Yasui W: expression profiling in gastric carcinoma: clinicopathologic significance and comparison with tumor-associated molecules. *Pathobiology* 79:154-161, 2012
9. Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N and Yasui W. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in

- primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int* (in press)
10. Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, Yamazaki Y, Watanabe S, Suzuki K, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Rakugi H, Isaka Y and Tsukita S. Deficiency of claudin-18 causes paracellular H⁺ leakage, up-regulation of interleukin-1beta, and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology* 2011 Nov 9. [Epub ahead of print]
 11. Nakayama H, Enzan H and Yasui W. Expression of podoplanin/D2-40 in pericryptal stromal cells in superficial colorectal epithelial neoplasia. *Med Mol Morphol* (in press)
 12. Oue N, Noguchi T, Anami K, Kitano S, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Aoyagi K, Yoshida T, Sasaki H and Yasui W. Cytokeratin 7 is a predictive marker for survival and effect of adjuvant chemotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* (in press)
 13. Yasui W, Oue N and Sentani K. Chapter 33: Molecular diagnostics of esophageal and gastric cancer. In: *Principle of molecular diagnostics and personalized cancer therapy*, ed. By Dongfeng Tan, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. (in press)
 14. Ishikawa N, Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishii A, Goto M, Ishikawa Y, Asaka R, Matsuura M, Hatamochi A, Kuroiwa M, Takubo K. Accelerated in vivo epidermal telomere loss in Werner syndrome. *Aging (Albany NY)*. 2011;3:417-29
 15. Tsuji K, Ishikawa Y, Imamura T. Technique for differentiating alveolar soft part sarcoma from other tumors in paraffin-embedded tissue: comparison of immunohistochemistry for TFE3 and CD147 and of reverse transcription polymerase chain reaction for ASPSCR1-TFE3 fusion transcript. *Hum Pathol*. 2011 Aug 9. [Epub ahead of print]
 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* 2011 Mar; 6(3): 494-9
 17. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK- fusion identification. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 3341-8
 18. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. IASLC/ATS/ERS international multi-disciplinary classification of lung adeno- carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011; 6: 244-85
 19. Kudo K, Ohyanagi F, Horiike A, Miyauchi E, Yanagitani N, Hoshi R, Satoh Y, Motoi N, Hamanaka W, Ishikawa Y, Mun M, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Horai T, Nishio M. Clinicopathological findings of non- small-cell lung cancer with high serum progastrin-releasing peptide concentrations. *Lung Cancer* 74: 401– 4, 2011

20. Numao N, Kawakami S, Sakura M, Yoshida S, Koga F, Saito K, Masuda H, Fujii Y, Yamamoto S, Yonese J, Ishikawa Y, Fukui I, Kihara K. Characteristics and clinical significance of prostate cancers missed by initial transrectal 12-core biopsy. *BJU Int.* 2011 Sep 21. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10427.x. [Epub ahead of print]
21. Urakami S, Yonese J, Yamamoto S, Yuasa T, Kitsukawa S, Numao N, Kubo Y, Ito M, Sukegawa G, Yasuda Y, Ishikawa Y, Fukui I. Outcome of Antegrade Radical Prostatectomy with Intended Wide Resection in Prostate Cancer Patients with a Preoperative Serum PSA Level >100 ng/ml. *Urol Int.* 2011;87(2):175-81. Epub 2011 Aug 18
22. Taniyama K, Morii N, Kuraoka K, Saito A, Nishimura T, Sakane J, Harada M, Tanaka M, Takahashi H, Miyamoto K and Hironori K: Topoisomerase II -alpha index predicts the efficacy of anthracycline-based chemotherapy for breast cancers. *HER2 and Cancer*, 187-200, 2011
23. Takabatake M, Daino K, Imaoka T, Nishimura M, Morioka T, Fukushi M and Shimada Y: Aberrant expression and phosphorylation of 4E-BP1, a main target of mTOR signaling, in rat mammary carcinomas: an association with etiology. *In Vivo*, 25:853-860, 2011
24. Nawata H, Kashino G, Tano K, Daino K, Shimada Y, Kugoh H, Oshimura M and Watanabe M: Dysregulation of gene expression in the artificial human trisomy cells of chromosome 8 associated with transformed cell phenotypes. *PLoS One*, 6:e25319, 2011
25. de Groote FH, Jansen JG, Masuda Y, Shah DM, Kamiya K, de Wind N and Siegal G: The Rev1 translesion synthesis polymerase has multiple distinct DNA binding modes. *DNA Repair* ; 10: 915-925, 2011
26. Toyoshima M, Honda H, Watanabe H, Masuda Y, Kamiya K: Development of a sensitive assay system for tritium risk assessment using Rev1 transgenic mouse. *Fusion Science and Technology* ; 60: 1204-1208, 2011
27. Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, Suzuki F and Kamiya K: Asymmetric nature of two subunits of RAD18, a RING-type ubiquitin ligase E3, in the human RAD6A-RAD18 ternary complex. *Nucleic Acids Research* ; 40(3): 1065-1076, 2012
28. Masuda Y, Kamiya K: Molecular nature of radiation injury and DNA repair disorders associated with radiosensitivity. *Int J Hematol* ; 95(2): 239-245, 2012
29. Hosoya N, Okajima M, Kinomura A, Fujii Y, Hiyama T, Sun J, Tashiro S and Miyagawa K. Synaptonemal complex protein SYCP3 impairs mitotic recombination by interfering with BRCA2. *EMBO Rep* 2012 13: 44-51
30. Enomoto A, Kido N, Ito M, Takamatsu N and Miyagawa K. Serine-Threonine Kinase 38 is regulated by Glycogen Synthase Kinase-3 and modulates oxidative stress-induced cell death. *Free Radical Biol Med* 2012 52: 507-515
31. Grant EJ, Neriishi K, Cologne JB, Eguchi H, Hayashi T, Geyer SM, Izumi S, Nishi N, Land CE, Stevens RG, Sharp GB, Nakachi K. Associations of ionizing radiation and breast cancer-related serum hormone and growth factor levels in cancer-free female a-bomb survivors. *Radiat Res*, 176:678-87, 2011
32. Yoshida K, Ohishi W, Nakashima E, Fujiwara S, Akahoshi M, Kasagi F, Chayama K, Hakoda M, Kyoizumi S, Nakachi K, Hayashi T, Kusunoki Y. Lymphocyte subset characterization associated with persistent hepatitis C virus infection and subsequent progression of liver fibrosis. *Hum Immunol*, 72:821-6,

2011

33. Noda A, Hirai Y, Kodama Y, Kretzschmar WW, Hamasaki K, Kusunoki Y, Mitani H, Cullings HM, Nakamura N. Easy detection of GFP-positive mutants following forward mutations at specific gene locus in cultured human cells. *Mutat Res-Gen tox En*, 2011; 721(1):101-7

学会発表

1. Naito Y, Oue N, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Hayashi T, Uraoka N, Oo HZ, Wakamatsu Y and Yasui W: Transcriptional regulation of REG4, a novel diagnostic marker of gastrointestinal cancer by CDX2. The 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orland, Florida (USA), April 2-6, 2011
2. Shinagawa K, Kitadai Y, Ohnishi M, Ohara E, Tanaka M, Sumida T, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: Blockade of PDFR signaling impairs the tumor promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cell in colon cancer. The 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Orland, Florida (USA), April 2-6, 2011
3. Yasui W, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y and Oue N: Novel diagnostic and therapeutic targets of gastric cancer identified by “Omics” study. 9th International Gastric Cancer Congress, Symposium 7 “Translational research for gastric cancer”, Seoul (Korea), April 20-23, 2011
4. Oo HZ, Uraoka N, Hayashi T, Anami K, Sakamoto N, Sentani K, Oue N and Yasui W: Gene expression profile in scirrhous type gastric cancer by CAST method. 9th International Gastric Cancer Congress, Seoul (Korea), April 20-23, 2011
5. Sakamoto N, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N and Yasui W: microRNA expression profiles in gastric cancer: miR-148a is down-regulated in gastric cancer and involved in gastric cancer invasion by repression of MMP7 expression. 9th International Gastric Cancer Congress, Seoul (Korea), April 20-23, 2011
6. Ueda T, Yasui W, Yoshida K, Sasaki S, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin G, Croce C, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu C and Oue N : Unique microRNA signatures associated with progression and prognosis of gastric cancer . 9th International Gastric Cancer Congress, Seoul (Korea), April 20-23, 2011
7. Gersemann M, Becker S, Liu W, Oue N, Yasui W, Rodgers GP, Wehkamp J and Stange EF: OLFM4 –a bacterial induced epithelial peptide in IBD downstream of Notch. Digestive Disease Week (DDW) 2011, Chicago, Illinois (USA), May 7-10, 2011
8. Parris A, Scobioala-laker N, Reynolds A, Bigwood L, Mitchell EM, Lewis MP, Speakman CT, Wharton R, HERNON J, Sargen K, Kapur S, Oue N, Yasui W and Williams M: Canonical Wnt signals promote intestinal stem cell proliferation in the native human colonic epithelium. Digestive Disease Week (DDW) 2011, Chicago, Illinois (USA), May 7-10, 2011
9. Mitchell EM, Parris A, Bigwood L, Scobioala-laker N, Reynolds A, Lewis MP, Leung W, Belshaw N, Johnson IT, Oue N, Yasui W, Beals I, Jamieson CP, Tremelling M, Tighe R, Prior A and Williams M: Compromised tissue renewal in the ageing human colonic epithelium. Digestive Disease Week (DDW) 2011, Chicago, Illinois (USA), May 7-10, 2011
10. Hayashi T, Ohara S, Shoji K, Teishima J, Anami K, Sakamoto N, Sentani K, Oue N, Yasui W and Matsubara A: Identification

- of transmembrane protein in prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of CDON is involved in tumor cell growth and invasion. The 2011 Annual Meeting of the American Urological Association, Washington D.C. (USA), May 14-19, 2011
11. Yasui W: Identification of novel diagnostic and therapeutic targets of gastric cancer by transcriptome dissection. The Third CREST - SBM International Conference "Mathematical Methods in Cancer Cell Biology", Hiroshima (Japan), June 8-9, 2011
 12. Oue N, Yanagihara K, Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Naito Y and Yasui W: Overexpression of SEC11A is associated with tumor progression through TGF-alpha secretion in gastric cancer. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, Osaka (Japan), September 21-23, 2011
 13. Yasui W: Molecular characteristics of gastric and intestinal phenotypes of gastric cancer. The 21st International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar "Recent Progress in Carcinogenesis, Progression and Management of Upper GI Cancer", Hiroshima (Japan), November 6, 2011
 14. Sentani K, Oue N, Sakamoto N, Naito Y, Anami K, Oo HZ, Uraoka N and Yasui W: Upregulation of HOX10 in intestinal phenotype gastric cancer: Reduction during tumor progression and favorable prognosis. The 21st International Symposium of the Hiroshima Cancer Seminar, Hiroshima (Japan), November 6, 2011
 15. 安井 弥: 胃癌研究のマイルストーン: 胃癌の発生・進展の分子機序のマイルストーン. 第100回日本病理学会総会, シンポジウム1, 4月28-30日, 横浜, 2011
 16. 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. 第100回日本病理学会総会, ワークショップ1, 4月28-30日, 横浜, 2011
 17. 阿南勝宏, 大上直秀, 坂本直也, 林哲太郎, 仙谷和弘, 浦岡直礼, 野口 剛, 安井 弥: CAST法で同定されたTSPAN8の胃型胃癌における発現と機能解析. 第100回日本病理学会総会, 4月28-30日, 横浜, 2011
 18. 浦岡直礼, 坂本直也, 大上直秀, 仙谷和弘, 阿南勝宏, 野口 剛, 真田雄市, 吉田和弘, 安井 弥: SAGE法を用いた食道扁平上皮癌の新規マーカーNRD1の同定. 第100回日本病理学会総会, 4月28-30日, 横浜, 2011
 19. 坂本直也, 浦岡直礼, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: 胃癌の原発巣及びリンパ節転移巣における粘液形質発現, 幹細胞マーカーに関する免疫組織化学的検討. 第100回日本病理学会総会, 4月28-30日, 横浜, 2011
 20. 坂根潤一, 宮本和明, 浦岡直礼, 阿南勝宏, 坂本直也, 仙谷和弘, 倉岡和矢, 大上直秀, 谷山清己, 安井 弥: 子宮頸部病変におけるDNAメチル化異常の検討. 第100回日本病理学会総会, 4月28-30日, 横浜, 2011
 21. 仙谷和弘, 大上直秀, 坂本直也, 阿南勝宏, 安井 弥: 大腸鋸歯状病変におけるolfactomedin4とclaudin-18の発現と臨床病理学的意義. 第100回日本病理学会総会, 4月28-30日, 横浜, 2011
 22. 品川 慶, 北台靖彦, 大原英司, 田中信治, 安井 弥, 茶山一彰: がん転移の病態と治療: 大腸癌増殖・転移促進作用における骨髄由来間葉系幹細胞の重要性和PDGF/レセプター系の関与. 第20回日本がん転移学会学術集会・総会 シンポジウム1, 6月30日-7月1日, 浜松, 2011
 23. 内藤 寛, 坂本直也, 浦岡直礼, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: microRNA-143の胃癌における機能解析と腫瘍マーカーとしての有用性. 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会, 10月2日, 名古屋, 2011
 24. 林哲太郎, 仙谷和弘, 大上直秀, 阿南勝宏, 坂本直也, 浦岡直礼, 内藤 寛, 後

- 藤景介, 亭島 淳, 松原昭郎, 安井 弥 : CAST法を用いた前立腺癌の分泌蛋白の検討 : NBL1の発現は前立腺に特異的である. 第70回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 名古屋, 2011
25. 大上直秀, Aaron J.Schetter, Markus Moehler, 下村 学, 檜井孝夫, 青柳一彦, 佐々木博己, 岡島正純, 大段秀樹, Peter R.Galle, 安井 弥, Curtis C.Harris : miR-21の発現は大腸癌の予後, 薬剤感受性に関与する. 第70回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 名古屋, 2011
26. 内藤 寛, 大上直秀, 仙谷和弘, 坂本直也, 檜井孝夫, 岡島正純, 大段秀樹, 安井 弥 : 新規消化管癌診断マーカーであるRegIVのCDX2による転写制御. 第70回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 名古屋, 2011
27. 森龍太郎, 吉田和弘, 長田真二, 棚橋利行, 八幡和憲, 加藤順子, 津谷康大, 大上直秀, 安井 弥 : 5FUとOxaliplatinの相乗効果におけるFANCIJの役割について. 第70回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 名古屋, 2011
28. 大上直秀, 柳原五吉, 内藤 寛, 阿南勝宏, 坂本直也, 仙谷和弘, 安井 弥 : 消化器癌発生・進展と微小環境 : SEC11Aの胃癌における高発現とTGF- α /EGF分泌促進作用. 第22回日本消化器癌発生学会, ワークショップ1, 11月25-26日, 佐賀, 2011
29. 阿南勝宏, 大上直秀, 坂本直也, 仙谷和弘, 浦岡直礼, 内藤 寛, Htoo Zarni Oo, 野口 剛, 安井 弥 : 癌病理診断・最近の進歩 : CAST法で同定したTSPAN8の胃癌における発現と機能解析. 第22回日本消化器癌発生学会, ワークショップ2, 11月25-26日, 佐賀, 2011
30. 坂本直也, 内藤 寛, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥 : 消化器癌とmiRNA : 胃癌におけるmiR-148aの発現低下とMMP7を介した浸潤への関与. 第22回日本消化器癌発生学会, ワークショップ3, 11月25-26日, 佐賀, 2011
31. 坂根潤一, 宮本和明, 浦岡直礼, 阿南勝宏, 坂本直也, 仙谷和弘, 倉岡和矢, 大上直秀, 谷山清己, 安井 弥 : 子宮頸部病変におけるDNAメチル化異常の検討. 第100回日本病理学会総会, 4月28-30日, 横浜, 2011
32. 原田洋明, 宮本和明, 山下芳典 : p-stage1原発性非小細胞肺癌の完全切除例におけるBRCA1 (Breast Cancer 1) メチル化の臨床的意義. 第111回日本外科学会定期学術総会, 2011年5月26日-28日, 東京
33. 宮本和明, 加藤大典, 吉川幸信, 畑中信良, 砂田祥司, 富永春海, 清水洋祐, 木下尚弘, 遠藤俊治, 西谷暁子, 平岡和也, 伊禮俊充, 高橋裕代, 中島慎介, 朴美和, 谷山清己, 上池 渉 : 乳癌におけるmicroRNAのエピジェネティックな異常. 第19回日本乳癌学会学術総会, 2011年9月2日, 仙台
34. 坂根潤一, 宮本和明, 浦岡直礼, 阿南勝宏, 坂本直也, 仙谷和弘, 倉岡和矢, 大上直秀, 谷山清己, 安井 弥 : 子宮頸部液状細胞診におけるエピジェネティックな異常. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月4日, 名古屋
35. 坂根潤一, 西村俊直, 藤本貴美子, 田中正純, 宇田川学, 辰島純二, 齊藤彰久, 倉岡和矢, 宮本和明, 谷山清己 : 子宮頸部病変進行におけるDNAメチル化異常. 第50回日本臨床細胞学会秋期大会, 2011年10月23日, 東京
36. Masuda Y, Suzuki M, Kamiya K: DNA damage tolerance and molecular mechanism of PCNA ubiquitination. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw, 8/30/2011
37. Sasatani M, Honda H, Hamasaki K, Kusunoki Y, Masuda Y, Kamiya K: The role of Rev1 in radiation and chemical-induced tumor development using Rev1 Tg mice. 14th International Congress of Radiation Research, Warsaw
38. 増田雄司, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 放射

- 線によって誘発されるDNA損傷に対する複製後修復経路の機能解析. 第52回原子爆弾後障害研究会, 広島, 6/5/2011
39. 笹谷めぐみ, 増田雄司, 神谷研二: APCMin/+マウスにおける放射線誘発消化管腫瘍の解析. 第52回原子爆弾後障害研究会, 広島, 6/5/2011
40. 増田雄司, 鈴木美紀, 神谷研二: RAD6-RAD18複合体の構造と機能. 変異機構研究会・第24回夏の学校, 小牧, 7/9/2011
41. 増田雄司, 鈴木美紀, 神谷研二: ヒトPCNAのユビキチン化酵素RAD6-RAD18複合体の解析. 日本遺伝学会第83回大会, 京都, 9/21/2011
42. 神谷研二: 放射線被曝と発がん危険度評価. 第70回日本癌学会学術総会. 特別企画市民公開講座, 名古屋, 10/1/2011
43. 増田雄司, 神谷研二: 損傷DNAの複製とPCNAのポリユビキチン化の分子機構. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10/5/2011
44. 鈴木元, 富田秀太, 有馬千夏, 増田雄司, 神谷研二, 長田啓隆, 谷田部恭, 高橋 隆: 肺癌におけるPOLD4の関与. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10/3/2011
45. 笹谷めぐみ, 本田浩章, 増田雄司, 渡邊敦光, 神谷研二: Rev1の過剰発現が発がんに及ぼす役割. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10/5/2011
46. 神谷研二: 被ばく医療とがん. 第49回日本癌治療学会学術集会, 名古屋, 10/27/2011
47. 河合秀彦, 曹 麗麗, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 増田雄司, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男: γ 線の照射環境下での細胞応答の線量率依存性の解析. 日本放射線影響学会第54回大会, 神戸市, 11/19/2011
48. 笹谷めぐみ, 徐 衍賓, 本田浩章, 濱崎幹也, 楠 洋一郎, 渡邊敦光, 増田雄司, 神谷研二: 放射線発がんとゲノム不安定性. 日本放射線影響学会第54回大会, 神戸市, 11/19/2011
49. 神谷研二: 低線量放射線の人体影響と生体応答. 日本放射線影響学会第54回大会, 神戸市, 11/19/2011
50. 増田雄司, 鈴木美紀, 神谷研二: 放射線によるDNA損傷と複製後修復経路の機能. 日本放射線影響学会第54回大会, 神戸市, 11/17/2011
51. Ohishi W, Yoshida K, Kusunoki Y, Nakashima E, Fujiwara S, Hayashi T, Nakachi K, Chayama K, Immunological features associated with disease progression in persistent hepatitis C virus infection. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases . 4-8 April 2011, San Francisco, California, USA
52. 大石和佳, 吉田健吾, 楠 洋一郎, 中島栄二, 藤原佐枝子, 林 奉権, 中地 敬, 茶山一彰: 慢性C型肝炎ウイルス感染の肝病態進行に関する免疫的特徴の検討. 第15回日本肝臓学会大会, 2011年10月20-23日, 福岡
53. Cologne JB, Langholz BM, 今井一枝, 三角宗近, 吉田健吾, 林 奉権, 中地敬: 放影研の「がん発症と免疫関連遺伝子との関係」研究プロジェクトにおけるケース・コホート・データの多相解析. 2011年度日本計量生物学会年会, 2011年6月2-3日, 大阪
54. 林 奉権, 楠 洋一郎, 中地 敬: 原爆被爆者に見られた免疫遺伝学的発がん感受性への放射線影響. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3-5日, 名古屋
55. 今井一枝, 中地 敬, 林 奉権, 楠 洋一郎: がんリスク関連NKG2DパプロタイプはNKおよびCD8T細胞上のNKG2Dタンパク発現に関係している. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3-5日, 名古屋
56. Ito R, Eguchi H, Hamatani K, Taga M, Oue N, Yasui W, Nakachi K, Kusunoki Y. Genetic and epigenetic alterations in

colorectal cancer among atomic-bomb survivors. The 2nd AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research, 2011/9/14-18, San Francisco, California, USA

57. Duple EB, Fujiwara S, Kusunoki Y, Grant EJ, Kodama Y, Takahashi N, Katayama H, Suyama A, Shore RE. The use of unique archived data and biological samples by the Radiation Effects Research Foundation. 14th International Congress of Radiation Research, 2011/8/28-9/1, Warsaw, Poland
58. 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, 楠 洋一郎: 原爆被爆者の大腸癌における CIMP 解析. 第100回日本病理学会総会, 2011/4/28-30, 横浜
59. 濱谷清裕, 高橋恵子, 伊藤玲子, 多賀正尊, 丹羽保晴, 中地 敬, 楠 洋一郎: 原爆被爆者に発生した再配列 *ALK* 遺伝子を有する成人甲状腺乳頭癌の特徴. 第70回日本癌学会学術総会, 2011/10/3-5, 名古屋
60. 楠 洋一郎: 放射線関連非がん関連疾患に免疫学的変化が関わる可能性. 第54回日本放射線影響学会, 2011/11/17-19, 神戸

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

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の発現・機能解析および被爆者に多いとされている未分化型胃癌についてのCAST法による膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子の発現解析を行なった。放射線影響研究所のLife Span Study (LSS) 集団に発生した45例のFFPE切片を使用したmiRNA発現解析で，miR-143の発現レベルは，年齢，性，進行度，組織型と相関はなかったが，5mGy以上の被曝群で有意にmiR-143High症例が多かった（ $P=0.0163$ ）。また，被曝線量増加に伴い，miR-143Highの割合が有意に増加し，miR-143Lowの割合が低下していた（ $P=0.0359$ ）。さらに，5mGy以上被曝と臨床病理事項との多変量解析によって，miR-143Highは被曝関連胃癌の独立したマーカーであることが示された（ $P=0.0405$ ，95%CI: 1.076-27.508）。細胞株を用いた検討からは，組織サンプルでのmiR-143のレベルは，がん細胞よりも間質細胞での発現を反映している可能性が考えられた。miR-143とmir-145の発現は，極めて高い相関を示すことを確認した。スキルス胃癌細胞株HSC-44PEと44As3についてCAST法により，網羅的に膜蛋白・分泌蛋白をコードする遺伝子の発現解析を行なった。膜蛋白コード遺伝子では，ITGB6，ZDHHC14，DLG1が高腹膜転移株である44As3において発現が特に亢進しており，分泌蛋白コード遺伝子では，TFPI，MMP10，PRSS1，PRSS2が44As3において発現が低下していた。ZDHHC14の発現は，胃癌組織では種々のレベルで認められたが，正常臓器・細胞では末梢血白血球を除いて一般に低いレベルであった。抽出された遺伝子について，被爆者に発生した胃癌での発現，放射線発がん機構への関与などの解析を進める予定である。

A. 研究目的

原子力エネルギーや医療等で放射線が広く利用されており，医療分野では画像診断・がん治療の大きな柱である。また，2011年の東日本大地震に伴う東京電力福島第一原子力発電所の事故においても，疾病の外的要因としての放射線の影響が懸念されており，作業員ならびに周辺住民の健康管理上，重要な問題となっている。本研究全体としては，発がんの分子基盤を放射線障害と宿主要因の面から解析し，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，epigeneticsについては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。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，主に被