

爆者に発生した胃癌についてmiRNA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CAST法による膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子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発現と機能解析

被爆者に発生した胃がんと対照群の胃がんについて、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) を用いた解析から、miR-21, miR-24, miR-34a, miR-106a, miR-143, miR-145 等が高線量被曝群 (100mGy 以上) で高発現することを既に報告している。そこで本年度は、miR-143 の詳細な検討を行った。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。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。

2) 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

CAST (Escherichia coli ampicillin secretion trap) 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る。シグナル配列を欠損させた ampicillin 耐性遺伝子 (beta-lactamase 遺伝子) を組込んだベクター (pCAST vector) を用いた。材料は、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) である。両者の比較および正常組織との比較

から発現の差異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) 倫理面についての配慮

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。

C. 研究結果

1) 被爆者に発生した胃がんにおけるmiRNA発現と機能解析

LSS 症例 45 例の 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、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-143H 症例が多かった ($P=0.0163$)。また、被曝線量増加に伴い、miR-143H の割合が有意に増加し、miR-143L 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-143H 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)。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 40-45 年後に発生した胃がん と 56 年以上経過して発生した胃がん とで、miR-143 の発現に大きな差はみられなかつ

た。miR-143 の発現と被爆時の年齢との間にも明らかな関連はなかった。ISH による局在の検討では、miR-143 の発現は、がん細胞、間質細胞ともに認められた。尚、miR-143 と miR-145 の遺伝子は染色体 5q32 に近接して存在し、同じ転写調節を受けることが知られているが、同一胃癌サンプルにおける 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。

各種胃癌細胞株と間質線維芽細胞（平川弘聖先生、八代正和先生（大阪市立大学）より供与）を用いて、miR-143 の発現を解析した。miR-143 の発現は検討した胃癌細胞株 9 株ではいずれもきわめて低いレベルであり、脱メチル化剤で発現の誘導が認められたことから、メチル化による発現抑制がかかっていることが分かった。一方で間質線維芽細胞では miR-143 の発現は保たれていた。collagen type III の発現は胃癌細胞には殆どなく、間質細胞に発現しており、anti-miR-143 により collagen type III の発現が抑制されることから、間質細胞では、miR-143 は collagen type III を正に制御していることが明らかとなった。同様に、anti-miR-143 により α -SMA の発現も抑制された。一方、Serum free の条件で細胞を培養し、miR-143 の発現を亢進させた結果、胃癌細胞株では TGF- β の産生量が低下した。がん細胞では miR-143 による発現抑制を受けないために TGF- β が高レベルであるものと見なされた。

2) CAST法による未分化型胃癌におけるがん関連膜蛋白・分泌蛋白遺伝子の探索

スキルス胃癌細胞株HSC-44PEと44As3についてそれぞれ1152クローンのシーケンス解析を終了した。HCS-44PEでは、発現レベルの高い順に、MMP10, MMP1, FAM3C, ITGB6, SLC38A2, LAMA3, PRSS1, RFT1, AZGP1, CD63等がリストアップされ、44As3では、発現レベルの高い順に、ITGB6, ZDHHC14, DLG1, FAM3C, MMP1, LAMA3, TFRC, ARSJ, COL17A1, CLDN7等がリスト

アップされた。膜蛋白コード遺伝子では、ITGB6, ZDHHC14, DLG1が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。14種の正常臓器および胃癌組織を用いた定量的RT-PCR解析において発現の検証を行っている。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・細胞では末梢白血球を除いて一般に低いレベルであった。ZDHHC14の44As3における高発現は、蛍光免疫染色で確認された。

D. 考察

これまでのmiRNA発現解析から、miR-24, miR-34a, miR-106a, miR-143, miR-145を含むmiRNA signatureが、放射線関連胃癌の指標となる可能性を指摘している。本年度の解析により、miR-143が独立した放射線関連胃癌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。その標的遺伝子としては、KRAS, ERK5, DNMT3A, SOX2, HOXA9, OCT4, KLF4, MYC, VCANなどが同定されている。例えば、KRASの3'-UTR領域にmiR-143の標的配列が存在して発現を負に制御しており、大腸がん組織ではmiR-143の発現は低下している。血管平滑筋細胞では、TGF- β によってmiR-143/miR-145の発現が誘導される。一方、われわれは、通常の胃癌では、miR-143の発現は非がん部胃粘膜に比較してがん組織では低いレベルであること、スキルス胃癌では非スキルス胃癌に比べて高いレベルであることを見いだしている。さらに、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。被爆者に発生する胃癌は分化型よりも未分化型が多いことが知られている。しかし、今回のLSS45症例の解析では、miR-143のレベルと組織型（スキ

ルス／非スキルス)との関連はなかった。以前, versicanおよびosteonectinの間質における発現低下が放射線関連胃がんのマーカーであることを報告している。そこで, miR-143の発現とversican, osteonectinの発現との関連を検討したが有意な相関は認められなかった。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。

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な方法である。胃がん細胞株および胃がん組織を用いた解析により, これまでにDSC2, TSPAN8, TM9SF3などを同定している。スキルス胃がん細胞株についての解析により, 高腹膜転移株において高発現する遺伝子のひとつとしてZDHHC14 (zinc finger, DHHC-type containing 14)を同定した。

evolutionarily conserved geneであるが詳細は不明である。そのコードする蛋白はERに存在する。DrosophilaではDHHC (Asp-His-His-Cys)モチーフを含むCys-richなドメイン(DHHCドメイン)を持つPalmitoyltransferaseはtumor suppressorのFlatシグナルを制御することが知られている。パルミトイル化は, ミリストイル化, プレニル化とともに脂質修飾のひとつである。パルミトイル化とは, 蛋白質のシステイン残基にチオエステル結合で脂肪酸が付加したものであり, パルミトイル化はシグナル伝達に関わる酵素に特に多く認められる。例えば, Ras, G蛋白質 α サブユニット, SrcファミリーLynなどである。最近, t(6;14)(q25;q32)転座を有する急性白血病でZDHHC14が活性化しており, TPAで誘導される分化を抑制することが明らかにされた。胃がんにおける機能とその機序の解明, 放

射線発がんとの関連については今後の課題である。

E. 結論

胃がんのmiRNA解析において, 5mGy以上の被曝群で有意にmiR-143H症例が多く, 被曝線量増加に伴ってその割合が有意に増加した。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-143H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。胃がん細胞株についてのCAST法を用いた網羅的遺伝子発現解析によってZDHHC14をはじめいくつかの新規発現遺伝子を同定した。抽出された遺伝子について, 被曝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必要がある。これらの研究は, 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である。

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. *Pathobiol* 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* 62:112-119, 2012
 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-1 beta, and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology* 142:292-304, 2012
 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) 2011 Dec 28. [Epub ahead of print]
 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. Ohara E, Kitadai Y, Onoyama M, Ohnishi M, Shinagawa K, Oka S, Yoshida S, Tanaka S, Sakamoto N, Yasui W, Shimamoto F and Chayama K: Regression of rectal MALT lymphoma after antibiotic treatment in a patient negative for Helicobacter pylori. *Clin J Gastroenterol* (in press)
 15. Gersemann M, Becker S, Nuding S, Antoni L, Ott G, Fritz P, Oue N, Yasui W,

Wehkamp J and Stange EF:
Olfactomedin-4 is a glycoprotein secreted into mucus in active IBD (inflammatory bowel diseases). *J Crohns Colitis* (in press) 2011 Nov 15. [Epub ahead of print]

16. Sentani K, Oue N, Naito Y, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Uraoka N, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W: Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with the intestinal mucin phenotype: Reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis* (in press) 2012 Mar 12. [Epub ahead of print]

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 PDGF 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. Ito R, Eguchi H, Hamatani K, Taga M, Oue N, Yasui W, Nakachi K and Kusunoki Y: Epigenetic alterations in colorectal cancer among atomic-bomb survivors. Second AACR International Conference on Frontiers in Basic Cancer Research, San Francisco, California (USA), September 14-18, 2011
 13. 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- α secretion in gastric cancer. 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, Osaka (Japan), September 21-23, 2011
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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
 21. 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
 22. 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, 4月28-30日, 横浜, 2011
 23. 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
24. 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と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
25. 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
26. 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
27. 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
28. 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
29. 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
30. 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
31. 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
32. 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: CAST法を用いた胃癌における新規診断マーカー・治療標的の同定. 第84回日本胃癌学会, 2月8-10日, 大阪, 2012

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

放射線二次癌の研究

研究分担者 石川雄一（公財）がん研究会がん研究所病理部長

研究要旨 放射線治療の結果、発生する癌があり、放射線二次癌と呼ばれる。本研究では、（公財）がん研究会有明病院における癌登録データベースを基に、放射線二次癌を抽出し、その臨床病理学的性質を調査する。これまでに、候補となる重複癌1,000例を抽出した。放射線二次癌の性質を分子生物学的に解析する手段として、miRNAに着目した。新鮮凍結材料のある腫瘍で、パラフィン標本からのRNAと比較したところ、かなり変性のあることが判明した。更に、条件決め実験を継続する。

A. 研究目的

放射線治療はがん治療の重要な柱のひとつである。日本人の高齢化に伴いがん患者は年々増加しており、放射線治療の需要が今後さらに増加すると考えられている。しかし、原爆被爆者の経過などから放射線被ばくによる発がんはよく知られており、放射線治療後に発生する放射線二次癌についても関心が高まっている。欧米では系統的な調査が行われ、放射線のリスク評価について調査がされているが、わが国では症例調査の集積がほとんどであり、系統的な調査は数少ない。

がん研究会有明病院は戦前から多くのがん症例に対し、放射線治療を行ってきており、日本で最も放射線治療の歴史が長く、かつ症例数の多い施設である。本研究では、線量、線質、照射野、二次がん発生までの期間などに関する放射線二次がんのデータベースの構築と、データベースによって抽出された放射線二次がんの病理学的特徴について最新の手法を用いて明らかにすることを目的としている。それにより、放射線治療による害を最小限にするための基礎データを得ることができる。

B. 研究方法

放射線治療後に発生した癌の抽出は、以下のような手順で行っている。当院の癌登録データベースを基に、「複数の癌があり、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癌までの期間の短いものなどを除き約1,000例に集

約した。当院に保管されている放射線治療の記録（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ている。

放射線二次癌と同定された例の腫瘍組織からマイクロRNA（miRNA）を抽出して、一般の癌との比較を行い、放射線二次癌に特徴的なmiRNAプロファイルを抽出する。miRNAの検索にはAgilent社のアレイを用い、数個ないし十数個の遺伝子に絞りこんだ段階で、定量的RT-PCRを施行して確認する。

（倫理面への配慮）

検体は、ICの取られたものを使用し、研究計画ががん研究会のIRBで承認された後に実施した。個人情報漏洩しないよう、実験室では連結可能匿名化を実施した。

C. 研究結果

当院の癌登録データベースから重複癌症例で、かつ、第二癌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、臨床的に多重癌と推定されるもの、病理学的に転移が否定されたもの、放射線照射が第一癌に対するものあること、の条件を満たす症例3,500症例を抽出した。登録項目としては、【基本情報】：患者ID、名前、生年月日、重複番号など、【診断情報】：診断日、治療方針など、【腫瘍情報】：診断名、ステージ、実施検査など、【初回腫瘍情報】：初回治療開始日、治療内容など、【予後情報】：生存最終確認日、死亡日など。【診療

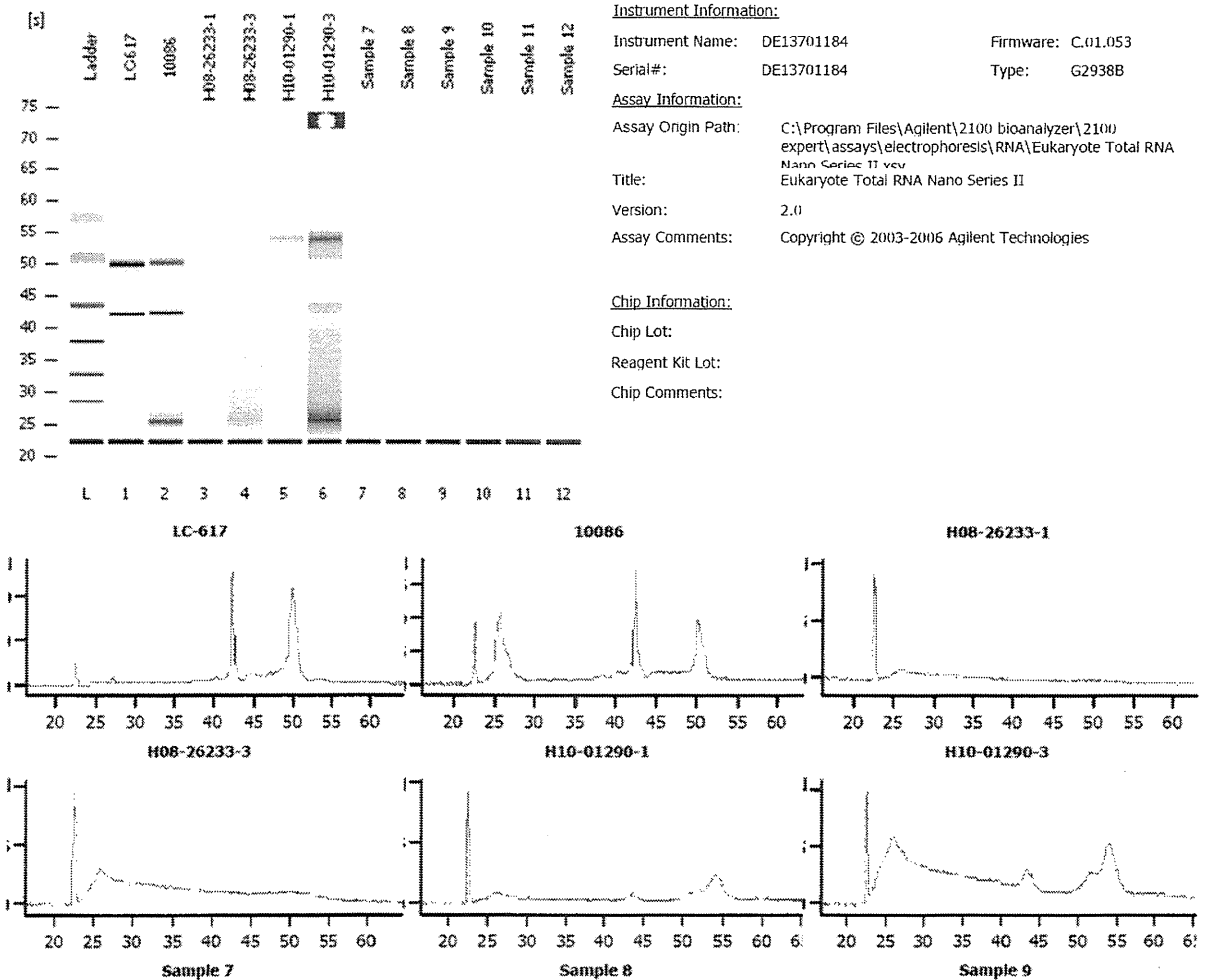
科情報】: 診療科、紹介先など、を登録した。

次に、第二癌発生までの期間が短いもの（5年未満）、第二癌が白血病である例を除いた1,000例について、第一癌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癌（放射線二次癌）を抽出中である。

miRNA解析は、新鮮凍結材料のある症例

について、ホルマリン固定パラフィン包埋材料（FFPE）との比較を行った。その結果、下図に示すように、症例によっては、かなりのmiRNAが失われることが判明した。文献的には、FFPEからでも再現可能なmiRNA解析ができるという報告も多くあり、現在、更に条件決めを続けている。

Electrophoresis File Run Summary



D. 考察

当院における癌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。放射線二次癌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、放射線誘発癌

における細胞の遺伝子制御の面での特徴、放射線二次癌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。

E. 結論

癌登録データベースから、放射線二次癌を含むと推定される1,000症例の重複癌を抽出した。さらに条件を絞って、確実な放

射線二次癌を選択してファイルを完成させる。FFPEを用いたmiRNA解析実験は、新鮮凍結材料との比較では、精度のよい解析には至っていない。更に、条件決め実験を続ける。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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]

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.

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.

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.

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

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]

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.

佐藤征二郎, 石川雄一, 土屋了介. 健康特集「肺癌」. 家族の元気をつくるHealth Salon, 2011年1月号 (No. 255), pp. 5-7

宮内栄作, 工藤慶太, 星利良, 古田則行, 平井康夫, 元井紀子, 石川雄一, 宝来威. 肺野に孤立性陰影を認めた悪性胸膜中皮腫の1例. *日本臨床細胞学会雑誌*, 50(2); 115-9, 2011.

稲村健太郎, 元井紀子, 石川雄一. トランスクリプトームによる病態解析. 第3部 病理組織検体を用いたオーム研究: 疾患関連分子同定への挑戦. *病理と臨床* 29: 臨時増刊号 522-528, 2011

石川雄一. 細気管支肺胞上皮癌とは、どのような癌ですか? 3. 肺癌の病理と分類、弦間昭彦 (編著)、肺癌診療Q & A, pp.24-25,

2011、中外医学社、東京。

石川雄一。ALK融合遺伝子肺癌にはどのような臨床病理学的特徴がありますか？ 3. 肺癌の病理と分類、弦間昭彦（編著）、肺癌診療Q & A, pp.24-25, 2011、中外医学社、東京。

石川雄一、野口雅之。現在の組織分類には、どのような問題点がありますか？ 3. 肺癌の病理と分類、弦間昭彦（編著）、肺癌診療Q & A, pp.24-25, 2011、中外医学社、東京。

小野宏、石川雄一。3. 肺疾患の概要と鑑別診断。小細胞癌。青笹克之、松原修（編）

「癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌」, pp. 140-148, 2011、中山書店、東京

佐藤征二郎、石川雄一。7. 実際の症例。症例2, EGFR変異肺腺癌。青笹克之、松原修（編）「癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌」, pp. 316-320, 2011、中山書店、東京

齋藤雄一、石川雄一。7. 実際の症例。症例4, 肺線維症に伴う肺癌。青笹克之、松原修（編）「癌診療指針のための病理診断プラクティス 肺癌」, pp. 326-331, 2011、中山書店、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

記載可能なものなし。

2. 実用新案登録

記載可能なものなし。

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

放射線障害に基づく乳がん発生の新たな分子機構の解明
（エピジェネティックな機構）

研究分担者 宮本 和明 国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター

研究要旨 本研究ではエピジェネティックな機構に着目し、放射線障害に基づく乳がん発生の新たな分子機構を明らかにする。本年度は、乳がんのエピジェネティックな異常として以下の点について明らかにした。1) 乳がんにおける新たなエピジェネティックな異常を同定するためゲノム網羅的解析を行い、乳がんでメチル化異常が認められる遺伝子*GATA6*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。被爆者乳がんで発現が亢進しているmicroRNAを新たに3種類同定した。3) 乳がんにおける高頻度の*hsa-miR-137*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、乳がんでメチル化されるDNA断片、および脱メチル化されるDNA断片を得ることができる。3種類のメチル化感受性酵素を用いてMS-RDA法を行い、それぞれ96クローンのシークエンスにより計288個のMS-RDA断片を同定し、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

広島に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異常候補を同定する。

3) microRNAのエピジェネティックな制御機構として、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高頻度に発現が低下する*hsa-miR-137*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

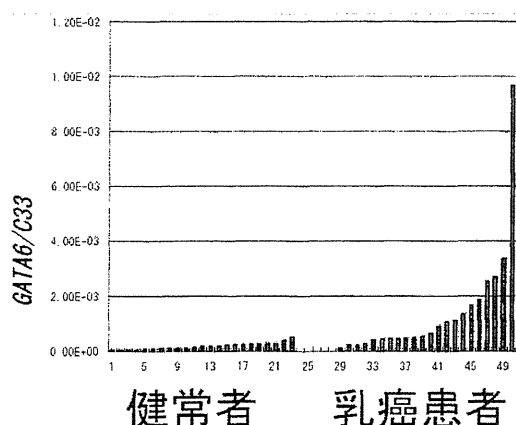
1. MS-RDA法により*GATA6* (GATA binding protein 6)を新規に同定した。*GATA6*のメチル化異常は乳がん細胞株8株中8株(100%)に認められた。さらに、乳がん症例でも21症例中21例(100%)にメチル化異常が検出されることを見出した。さらにこの異常が血液検体で検出可能であることを見出した(図1)。

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-650*、*hsa-miR-1298*、*hsa-miR-1303*の3種類を同定した。

3. 乳がんにおける*hsa-miR-137*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

20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1 *GATA6*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*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。

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hsa-miR-650、hsa-miR-1298、hsa-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。

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-137の発現低下を明らかにしたが、今回、乳がんにおけるhsa-miR-137のメチル化異常が高頻度であることを示した。hsa-miR-137のメチル化異常については、すでに口腔がんなどの扁平上皮がんにおいて報告され、細胞周期関連遺伝子を

制御し腫瘍抑制因子として機能することが明らかになってきている。hsa-miR-137のメチル化異常は乳がんにも重要である可能性が示唆された。

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) *GATA6*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3種類のmicroRNA、3) 乳がんにおける高頻度のhsa-miR-137のメチル化異常。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文著書発表

Topoisomerase II-alpha index predicts the efficacy of anthracycline-based chemotherapy for breast cancers. kiyomi Taniyama, Nao Morii, Kazuya Kuraoka, Akihisa Saito, Toshinao Nishimura, Junichi Sakane, Mieko Harada, Miho Tanaka, Hiroyo Takahashi, Kazuaki Miyamoto, Kato H. *HER2 and Cancer*,187-200, 2011

2. 学会発表

1) トリプルネガティブ乳癌のエピジェネティックな異常

宮本和明, 加藤大典, 吉川幸伸, 畑中信良, 砂田祥司, 富永春海, 清水洋祐, 木下尚弘, 遠藤俊治, 平岡和也, 西谷暁子, 伊禮俊充, 高橋裕代, 中島慎介, 朴美和, 若原誠, 谷山清己, 上池涉 第41回広島乳腺疾患研究会, 2011年4月1日, 広島

2) 子宮頸部病変におけるDNAメチル化異常の検討

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 第100回日本病理学会, 2011年4月28日, 横浜

3) 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

原田洋明, 宮本和明, 山下芳典 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

4) 乳癌におけるmicroRNAのエピジェネティックな異常

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 涉 第19回日本乳癌学会学術総会, 2011年

9月2日, 仙台

5) 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

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 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月4日, 名古屋

6) 子宮頸部病変進行におけるDNAメチル化異常

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 第50回日本臨床細胞学会(秋期大会), 2011年10月23日, 東京

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

研究分担者 臺野 和広 独立行政法人放射線医学総合研究所

研究要旨 原爆被爆者や医療被曝者の疫学調査は、放射線が乳癌のリスクを増加させることを示している。また、被曝時年齢の違いにより乳癌の発症リスクが異なることが報告されている。本研究では、放射線誘発ラット乳腺腫瘍モデルを用いて、自然発症および被曝時年齢の異なる放射線誘発乳癌におけるゲノムDNAのメチル化異常とその特徴を明らかにすることを目的とした。思春期前後に該当する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放射線誘発乳癌、自然発症した乳癌検体および正常乳腺組織よりゲノムDNAを抽出し、CpGアイランドマイクロアレイを用いてメチル化状態の変化を網羅的に解析した。その結果、正常乳腺組織と比較し、癌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。さらには、それぞれの癌に特徴的なDNAメチル化異常を伴う遺伝子領域が存在することが分かった。この結果から、自然発症および被曝時年齢の異なる放射線誘発癌をDNAメチル化状態の変化により識別できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

乳腺は、放射線発がん感受性の高い組織であり、広島・長崎の原爆被爆者の疫学調査等から、放射線被曝により最も発がんリスクの上昇する組織の一つであることが分かっている（*Breast Cancer Res.*, 7:21-32, 2004）。一般的に被曝時の年齢が若いほどリスクも高いが、思春期前の被曝リスクを低いとする報告と、高いとする報告がある（*Cancer* 79:1203-1210, 1997, *Radiat Res.*, 160:707-717, 2003）。近年、種々の癌においてゲノムDNAのメチル化を始めとするエピジェネティックな異常が報告され、発癌と関連すると考えられる複数の標的遺伝子が同定されている。しかしながら、放射線誘発癌におけるゲノムDNAのメチル化異常に関する知見は未だ乏しいといえる。本研究では、放射線誘発ラット乳腺腫瘍モデルを用いて、被曝時年齢の異なる放射線誘発乳癌におけるゲノムDNAのメチル化異常とその特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

思春期前後に該当する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放射線誘発乳腺腫瘍と、自然発症した乳腺腫瘍のうち、腺癌と病理診断された検体および正常乳腺組織（それぞれ3検体）より抽出したゲノムDNAから、メチル化DNA結合ドメイン（MBD）タンパク質を用いてメチル化DNAの濃縮を行った（Invitrogen社、MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit）。濃縮メチル化DNAとインプットDNAを、それぞれ異なる2種類の蛍光色素により標識し、約8,000遺伝子に対応するCpGアイランド領域をカバーしたプローブが搭載されたラットカスタムCpGアイランドマイクロアレイ（Agilent社）に競合ハイブリダイズさせた。蛍光シグナルをマイクロアレイスキャナー（Agilent社）により検出し、専用ソフトウェア（Agilent社、Genomic Workbench）を用いて、ゲノムDNAのメチル化パターンを解析した。正常乳腺組織に比べ、癌において3倍以上メチル化レベルが増加し（ $P < 0.05$ ）、かつ連続したプローブ3つ以上からなるゲノムDNA領域を高メチル化領域とした。一方、正常組織に比べ、癌において2倍以上メチル化レベルが減少し（ $P < 0.05$ ）、かつ連続したプローブ3つ以

上からなるゲノムDNA領域を低メチル化領域とした。これまでの研究により取得した遺伝子発現プロファイル解析データ (*Mol Carcinog.*, 50:539-552, 2011) を基に、乳癌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。

(倫理面への配慮)

本研究には、倫理面に配慮すべき事項は存在しない。動物実験は、放射線医学総合研究所の実験動物取扱安全衛生管理規程を遵守し、動物実験委員会承認のもとに実施した。

C. 研究結果

本研究では、放射線誘発ラット乳腺腫瘍モデルを用いて、放射線誘発乳癌におけるゲノムDNAのメチル化異常とその特徴を明らかにすることを目的とし、放射線 (ガンマ線) 照射により発症したラット放射線誘発乳癌、自然発症した乳癌および正常乳腺組織におけるゲノムDNAのメチル化状態の網羅的解析を行い、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癌でゲノムDNAのメチル化レベルに異常がみられる遺伝子領域を見出した。見出した235ヶ所の遺伝子領域におけるDNAメチル化プ

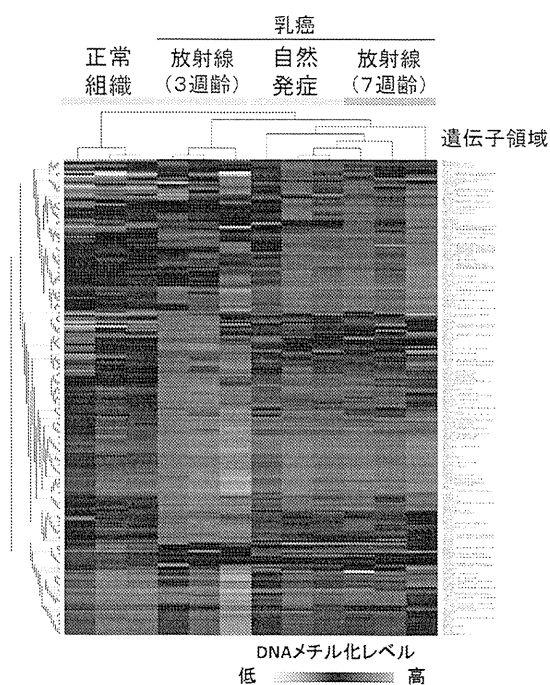
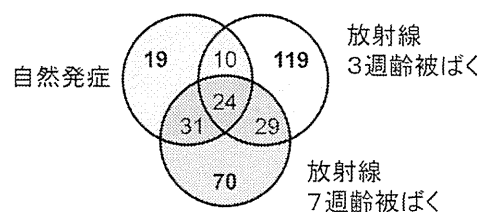


図1 正常乳腺組織、自然発症、放射線誘発乳癌 (各3検体) のDNAメチル化プロファイルのクラスター解析。各行が遺伝子プローブ、列が検体を表す。

ロファイルについてクラスター解析による分類を行った結果、思春期前 (3週齢) の放射線被曝により誘発された乳癌は、自然発症と思春期後 (7週齢) の被曝により誘発された癌と異なるクラスターに分類されることが分かった。(図1)。癌においてメチル化異常が検出された遺伝子領域のうち、自然発症した乳癌、思春期前 (3週齢)、思春期後 (7週齢) の放射線被曝により誘発された乳癌に特徴的に高メチル化を示す遺伝子領域を、それぞれ19ヶ所、119ヶ所、70ヶ所抽出した (図2)。一方、癌において低メチル化を示す遺伝子領域を、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、癌における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。

(A) 高メチル化を示す遺伝子領域の数



(B) 低メチル化を示す遺伝子領域の数

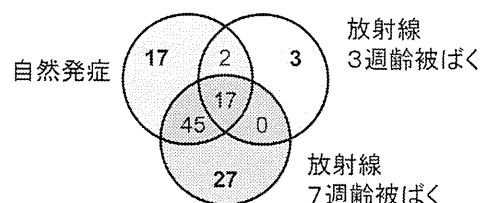


図2 自然発症および放射線誘発乳癌に特徴的なDNAメチル化異常の抽出。乳癌において高メチル化 (A) および低メチル化 (B) を示す遺伝子領域の数をベン図で表す。

D. 考察

本研究により、自然発症および被曝時年齢の異なる放射線誘発乳癌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分かった。DNAメチル化異常が観察された遺伝子領域におけるDNAメチル化プロファイルについてクラスター解析による分類を行った結果、思春期前 (3週齢) の放射線被曝により誘発された乳癌は、自然発症と思春期後 (7週齢) の被曝により誘発され

た癌と異なるクラスターに分類されることが分かった。また、癌における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。思春期前（3週齢）の被曝によって誘発された放射線誘発乳癌では、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一方で、思春期後（7週齢）の被曝によって誘発された乳癌では、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、放射線誘発乳癌のゲノムDNAのメチル化は、癌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。また、本研究において同定した候補遺伝子のなかには、実際ヒトの乳癌検体において発現異常が報告されている癌関連遺伝子が数種含まれていた。

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。放射線誘発癌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。

E. 結論

本研究により、自然発症および被曝時年齢の異なる放射線誘発乳癌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。この結果は、自然発症および放射線誘発癌をDNAメチル化状態の変化により識別できる可能性を示唆している。また、放射線誘発乳癌において、発現異常を伴うメチル化標的遺伝子の候補を見出した。これらの結果は、放射線発がんにおける分子基盤の解明や放射線リスクの機構論的推定に有用な基礎データになると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

2. 学会発表

なし

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複製後修復機構の解析

研究分担者 広島大学 原爆放射線医科学研究所 神谷研二
研究協力者 広島大学 原爆放射線医科学研究所 笹谷めぐみ

研究要旨 放射線発がんにおける複製後修復機構の関与を解析するため、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調べた。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の発現を抑制した細胞は、放射線照射による細胞死に高感受性を示した。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、対照細胞に比べ、ATM、p53、H2AXなどのリン酸化の誘導が抑制されていた。また、RAD18発現抑制細胞では、放射線照射によるチェックポイントの活性化が抑制された。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。

今後、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と考える。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。

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における、低線量放射線被ばくによる健康影響の解明は、国際的にも重要な課題である。さらに、福島原発事故では、低線量放射線被ばくの健康影響が危惧されており、科学的な低線量放射線のリスク解明が緊急の課題となっている。低線量被ばくによる発がん機構の解明とそれに基づくがんリスクの解明、並びに治療法の開発は、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。同時に、放射線発がんリスクの解明は、福島原発事故での住民の放射線防護に重要な情報を提供できる。

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複製後修復機構の関与を明らかにすると同時に、複製後修復機

構の中心的役割を担うRAD18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. SiRNAによるRAD18発現抑制法

ヒト繊維芽肉腫細胞株HT1080に、RAD18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。対照細胞には、ネガティブコントロールsiRNAを導入した。RAD18タンパクの発現は、Western法を用いて測定した。SiRNAを導入した細胞は、その後2日間培養し、生存率の測定、細胞応答解析、細胞周期の測定を行った。

2. コロニー形成法による生存率の測定

HT1080細胞を用いて、放射線照射後の生

存率をコロニー形成法を用いて解析した。1 X 10⁶個のHT1080細胞にsiRNAを行った後、10cmディッシュに撒き、48時間培養した。その後、放射線照射を行った。放射線照射では、線源として¹³⁷Cs γ 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。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の比較により生存率を求めた。コロニーは、0.06% crystal violet溶液で染色し、コロニー数を数えた。

3. Western blotting法を用いた細胞応答解析

HT1080細胞にsiRNA処理を行い、48時間後、放射線照射を行った。その後経時的に細胞を回収し、タンパク抽出を行った。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℃、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 μ 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RAD18抗体、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 α -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

HT1080細胞にsiRNA処理を行い、48時間後、放射線照射を行った。その後、経時的に細胞を回収し、エタノール固定を行っ

た。その後、固定した細胞を用いて、Propidium iodide (PI) 染色を行い、BD FACS Canto II Flow Cytometer (BD)により細胞周期の解析を行った。

5. 統計処理

コロニー形成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. RAD18の発現を抑制した細胞を用いた損傷感受性試験

RAD18タンパクの発現を抑制するために、RAD18に対するsiRNAを細胞にリポフェクションし、48時間後にRAD18のタンパク発現量を測定した。対照細胞にはネガティブコントロールsiRNAを処理した。ネガティブコントロールsiRNA処理後の細胞では、RAD18の発現量に変化はみられなかった。一方、RAD18 siRNA処理後の細胞では、RAD18の発現量が抑制された。

次に、RAD18の発現が抑制された細胞を用いて、放射線に対する損傷感受性試験を行った。ネガティブコントロールsiRNA処理後の細胞では、放射線の線量依存的に生存率が低下し、8Gy照射後の生存率は1%を示した。RAD18発現抑制細胞においても、放射線の線量依存的に生存率の低下が観察されたが、8Gy照射後の生存率は0.01%と、ネガティブコントロールsiRNA処理細胞と比較して、放射線に対してより高感受性を示した。

2. RAD18の発現を抑制した細胞を用いた細胞応答解析

1. と同様の方法により、RAD18の発現を抑制した細胞を用いて、放射線照射後の細胞応答機構を解析した。ネガティブコントロールsiRNA処理細胞、RAD18発現抑制細胞に8Gyの放射線照射を行い、その後、1、2、4、6、12、18、24時間後のDNA損傷応答やチェックポイントに関与する因子であるATM、p53、H2AXのリン酸化、p21のタンパク発現量などを測定した。ネガティブコントロールsiRNA処理細胞では、放射線照射後、1時間後から、ATM、p53、H2AXのリン酸化が誘導された。RAD18発現抑制細胞においても、放射線照射後のATM、p53、H2AXのリン酸化が誘導されたが、ネガティブコントロールsiRNA処理細胞よりも低い値を示した。

また、ネガティブコントロールsiRNA処理細胞では、放射線照射後、4時間後からチェックポイント誘導に関与するp21の発現量の増加が観察され、その増加は、照射後24時間まで継続していた。一方、RAD18発現抑制細胞では、放射線照射後のp21の発現量の増加は観察されたが、ネガティブコントロールsiRNA処理細胞と比較して、p21の発現量の増加は抑制されていた。

3. RAD18の発現を抑制した細胞を用いた細胞周期解析

RAD18の発現を抑制した細胞を用いて、放射線照射後の細胞周期を解析した。コントロールsiRNA処理細胞、RAD18発現抑制細胞に8Gyの放射線照射を行い、その後、6、12、18、24時間後の細胞周期をFlow Cytometerにて測定した。ネガティブコントロールsiRNA処理細胞では、放射線照射後、6時間後からG1/S、G2/M期の細胞分画の増加が観察され始め、その増加は照射後12時間でピークを示し、24時間後には、非照射細胞集団と同様の細胞分布を示した。一方、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た。

D. 考察

RAD18が中心的役割をなす複製後修復機構は、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。複製後修復機構は、損傷を直接修復する機構と異なり、鋳型鎖に損傷が残った状態のまま、複製を継続させるための機構である。複製後修復機構は、損傷乗り越えDNA合成およびテンプレートスイッチ（鋳型鎖乗り越え）の二つの機構から構成される。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。

我々は、放射線応答におけるRAD18の役割を調べるために、RAD18発現抑制細胞を用いて、細胞生物学的な機能解析を試みた。

RAD18の発現を抑制した細胞を用いて、損傷感受性試験を行った結果、RAD18の発現抑制は、放射線に高感受性を示すことを明らかにした。

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、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。すなわち、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。

これまでの報告から、RAD18は放射線照射後、