

41回 日本環境変異原学会
2012/11/29-30 静岡

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保健学研究院 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，原爆被爆者の胃がんにおけるmicroRNAの発現およびCAST法で同定した遺伝子の発現・機能の面から研究を行なった。放射線影響研究所のLife Span Study (LSS) 集団に発生した51例の胃がん症例では、miR-145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-145High症例が多かった (P=0.0150)。被曝線量増加に伴い、miR-145Highの割合が有意に増加した (P=0.0179)。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-145High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=0.0239)。miR-143とmiR-145の発現は高い相関を示すが、それぞれに異なった機能のあることを見いだした。被爆者に多いとされている未分化型胃がん組織および細胞株のCAST法で同定したTM9SF3とZDHHC14の発現・機能解析を行なった。進行期のび慢性低分化腺がんにおいて、TM9SF3陽性例は陰性例に比較して有意に予後不良であり、細胞株において浸潤能を制御することが明らかとなった。ZDHHC14の発現は、ステージの進行および低分化な組織型との相関を示した。細胞株を用いた機能解析では、ZDHHC14が、Integrin $\alpha 5 / \beta 1$ 、MT4-MMP (MMP17) の発現制御を介して、細胞の接着能、浸潤能、運動能を制御することが示された。

A. 研究目的

放射線は、原子力エネルギーや医療の分野で広く利用されており、特に医療分野では画像診断・がん治療の大きな柱である。2011年の東日本大地震・津波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、放射線の影響が懸念されており、作業員ならびに周辺住民の健康管理は、きわめて重要な課題である。本研究は全体として、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、リスク評価や治療開発等の臨床応用に資することを目的するものである。

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貢献するものである。一般にがんの発生・進展には種々のジェネティックおよびエピジェネティックな異常が関与している。エピジェネティクスに

ついては、DNAメチル化による遺伝子発現制御とともに、microRNA (miRNA)を介した制御機構の重要性が近年注目されている。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、昨年度に引き続き、主に被爆者に発生した胃癌についてmiRNAの発現・機能解析行ない、さらに、被爆者に多いとされている未分化型胃がんについてCAST法によるがん特異的膜蛋白・分泌蛋白コード遺伝子の同定と機能解析を行なった。

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の網羅的 miRNA 発現解析から、高線量被曝群 (100mGy 以上) で高発現するものとして、miR-21, miR-24, miR-34a, miR-106a, miR-143, miR-145 等を既に報告している。昨年度は、miR-143 の詳細な検討を行ったが、本年度は、同じ染色体 5q33 に近接して存在する miR-145 について解析し、miR-143 との関連についても検討した。対象症例として、通常集団に発生した胃がん 61 例と放射線影響研究所の Life Span Study (LSS) 集団に発生した 51 例の FFPE 切片を用いた。miR-145 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。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

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 CAST (Escherichia coli ampicillin secretion trap) 法により、未分化型胃がん特異的発現遺伝子の抽出を行なった。材料は、被爆者に頻度の高い未分化型胃がん組織 2 例、未分化型胃がん細胞株である HSC-44PE (スキルス胃がん細胞株) と x (HSC-44PE 由来高腹膜転移株) である。5000 クローン以上を解析し、正常組織との比較および HSC-44PE と 44As3 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た。その過程から、TM9SF3 と ZDHHC14 に注目し、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

通常集団に発生した胃がん組織と非がん部胃粘膜組織における miR-145 の発現レベルに有意な差は認められなかった。一方、胃がん組織における miR-143 と miR-145 の発現レベルには明らかな相関が認められた ($P < 0.0001$, $r = 0.833655$)。LSS 症例 51 例の miR-145 の発現は、そのレベルを高, 中, 低の3つに分け、高と中を miR-145High (H), 低を miR-145Low (L) として解析した。miR-145 の発現レベルは、年齢, 性, 進行度, 組織学的分化度と相関はなかったが、5mGy 以上の被曝群で有意に miR-145H 症例が多かった ($P = 0.0150$)。また、被曝線量増加に伴い、miR-145H の割合が有意に増加し、miR-143L の割合が低下していた ($P = 0.0179$)。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-145H 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 ($P = 0.0239$)。

各種胃がん細胞株と間質線維芽細胞 (Normal fibroblasts: Nf, Cancer-associated fibroblasts: Caf, 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-145 の発現を解析した。miR-145 の発現は検討した胃がん細胞株 9 株ではいずれも

きわめて低いレベルであった。間質線維芽細胞では miR-145 の発現は種々のレベルで認められ、Nf と比較し Caf で高い傾向にあった。collagen type III が間質細胞に発現しており、miR-143 は collagen type III を正に制御していることを既に見いだしている。 α -SMA の発現も Caf 優位に認められるが、miR-143 の影響は受けず、pre-miR-145 処理によって発現が亢進することが分かった。一方、がん細胞においては、pre-miR-143 の処理により、TGF- β の産生量が低下するとともに、浸潤能が抑制された。

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

作成したCASTライブラリーにおいて、正常粘膜では発現がなく、スキルス胃がん組織において最も発現レベルの高かったTM9SF3に注目した。症例200Tでは、768クローン中25クローンを占めて第1位、症例233Tでは864クローン中9クローンを占め第2位であった。免疫染色では、胃がん92例中16例(17%)に発現が認められ、13例(14%)では浸潤先進部に発現していた。患者の予後との関連は、2つの異なったコホートで2つの異なった方法で検討した。広島大学症例の免疫染色での検討では、進行期のび漫浸潤型低分化腺がんにおいて、TM9SF3陽性例は陰性例に比較して有意に予後不良であった(P=0.0115)。横浜市立大学症例(大島 貴先生(横浜市立大学)との共同研究)の定量的RT-PCRでの検討でも、同様の症例でTM9SF3-High症例はLow症例に比較して有意に予後不良であった(P=0.0351)。細胞株を用いた機能解析において、siRNAによるノックダウンは細胞増殖に影響を及ぼさなかったが、細胞の浸潤能が有意に低下した。

次に、胃がん細胞株でCASTライブラリーの比較において、解析した1152クローン中、44As3では19クローン存在したのに対し、HSC44-PEではわずか1クローンであったZDHH14に注目した。定量的RT-PCRでは、

ZDHH14の過剰発現は27%に認められ、ZDHH14の発現は、ステージの進行と有意に相関し(P=0.0078)、低分化な組織型と相関する傾向が認められた(P=0.0705)。細胞株を用いた機能解析では、ZDHH14-siRNAによるノックダウンで、Integrin $\alpha 5 / \beta 1$ の発現が抑制され細胞接着能が減弱すること、MT4-MMP (MMP17) の発現が抑制され細胞浸潤能が低下することを見いだした。さらに、ZDHH14のノックダウンにより、細胞のmigrationが抑制され、F-アクチンでみた細胞骨格の異常も惹起された。

D. 考察

本年度の解析により、miR-143に加えてmiR-145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とmiR-145の遺伝子は染色体5q33に近接して存在する。miR-143の標的遺伝子は、KRAS, ERK5, Elk-1, VCAN, AKT, DNMT3Aなどであり、様々ながんでmiR-143の発現が低下することから、標的遺伝子が過剰発現する。miR-145はSOX2, OCT4, KLF4, KLF5などを標的遺伝子とし、ヒトES細胞内の分化過程で発現が亢進することが知られている。両者には、機能の共通性も存在し、TGF- β との協働やTGF- β による制御、血管平滑筋細胞の分化などがそれである。miR-143/miR-145 clusterには、2カ所にpromoterが存在し、主にTGF- β の下流ではmiR-143/miR-145が同じ転写産物として制御され、p53、Oct4等の下流ではmiR-145のみが単独で制御される。本年度の検討においても、miR-143とmiR-145の発現レベルは強い相関を示し、細胞株の検討においても、miR-143とmiR-145はともに胃がん細胞では殆ど認められず、間質線維芽細胞に発現しており、特にがん間質線維芽細胞Cafにおいて高い傾向にあった。一方、miR-143はcollagen type IIIの発現を、miR-145は α -SMAの発現をそれぞれ制御していた。発現の共通性と機能の独自性を示すものである。我々は、miR-143-High症例が有意に予後不良であることを通常の胃がん集団で確認している。

したがって、miR-143とmiR-145は、独立した放射線関連胃がんのマーカであるのみならず、予後因子として重要である可能性が考えられる。

CAST法で同定したTM9SF3に関しては、パクリタキセル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ひとつとしてリストに記載されているのみであり、がんにおける発現や機能については全く知られていない。今回の細胞株を用いた検討で、TM9SF3が浸潤能を制御していることが明らかとなった。さらに、患者の予後との関連を、2つの異なったコホートで2つの異なった方法で検討し、TM9SF3の発現と患者の予後との間に有意な関連が確認された。一方、ZDHHC14 (zinc finger, DHHC-type containing 14) がコードする蛋白は、脂質修飾のひとつであるパルミトイル化に関与すると考えられている。パルミトイル化は、がんに関連してRAS, LYN, WNT3aなどシグナル伝達に関わる分子に多く認められ、蛋白の安定性、局在、蛋白間相互作用に関与する可能性が示唆されている。胃がん細胞株を用いた機能解析においては、細胞接着、細胞浸潤、細胞運動を制御することが分かった。胃がん、特にび慢性低分化腺がんの治療標的になる可能性がある。放射線発がんとの関連について検討する必要がある。

E. 結論

胃がんのmiRNA解析において、miR-143で認められたのと同様に、5mGy以上の被曝群で有意にmiR-145H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-145Hは被曝関連胃がんの独立したマーカであることが示された。被曝者に頻度の高い未分化型胃がんのCAST法で同定したTM9SF3およびZDHHC14に関して、臨床例における発現解

析および細胞株を用いた機能解析を行なった。どちらの遺伝子もがんの進展に関わることが示され、新しい未分化型胃がんの診断・治療標的として期待される。現在、被曝者に発生した胃がんでの発現を解析中である。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. 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
2. 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
3. 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* 142: 292-304, 2012
4. 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* 19: 1902-1910, 2012

5. Naito Y, Oue N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki H and Yasui W: Reg IV is a direct target of intestinal transcription factor CDX2 in gastric cancer. *PLoS One* 7(11): e47545, 2012
6. Hayashi T, Sentani K, Oue N, Ohara S, Teishima J, Anami K, Sakamoto N, Matsubara A and Yasui W: The search for secreted protein in prostate cancer by the *Escherichia coli* ampicillin secretion trap: Expression of NBL1 is highly restricted in prostate and related in progression. *Pathobiology* 80: 60-69, 2012
7. Sakamoto N, Oue N, Sentani K, Anami K, Uraoka N, Oo HZ, Naito Y, Hinoi T, Ohdan H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W: Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer. *Cancer Sci* 103: 1744-1750, 2012
8. 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* 6: 425-434, 2012
9. 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* 33: 1081-1088, 2012
10. Tamura A, Yamazaki Y, Hayashi D, Suzuki K, Sentani K, Yasui W and Tsukita S: Claudin-based paracellular protein barrier in the stomach. *Ann NY Acad Sci* 1258: 108-114, 2012
11. Kumamoto T, Sentani K, Oka S, Tanaka S and Yasui W: Clinicopathologic features of minute pharyngeal lesions diagnosed by narrow banding imaging endoscopy and biopsy. *World J Gastroenterol* 18: 6468-6474, 2012
12. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Onoyama M, Ohnishi M, Ohara E, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: Stroma-directed imatinib therapy impairs the tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an orthotopic transplantation model of colon cancer. *Int J Cancer* 132: 813-823, 2013
13. Goto K, Oue N, Shinmei S, Sentani K, Sakamoto N, Naito Y, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A and Yasui W: Expression of miR-486 is a potential prognostic factor after nephrectomy in advanced renal cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* 1: 235-240, 2013
14. Nakayama H, Enzan H and Yasui W: Expression of podoplanin/D2-40 in pericryptal stromal cells in superficial colorectal epithelial neoplasia. *Med Mol Morphol* 46: 20-23, 2013
15. Shinmei S, Sakamoto N, Goto K, Sentani K, Anami K, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A, Oue N and Yasui W: MicroRNA-155 is a predictive marker for survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Int J Urol* (in press) 2012 Oct 10. doi: 10.1111/j.1442-2042.2012.03182.x. [Epub ahead of print]
16. Mori R, Yoshida K, Tanahashi T, Yawata K, Kato J, Okumura N, Tsutani Y, Okada M, Oue N and Yasui W: Decreased FANCI caused by 5FU contributes to the increased sensitivity to oxaliplatin in gastric cancer cells. *Gastric Cancer* (in press) 2012 Sep 12. [Epub ahead of print]
17. Sentani K, Sakamoto N, Shimamoto F, Anami K, Oue N and Yasui W: Expression of olfactomedin 4 and claudin-18 in serrated neoplasia of the colorectum: A

characteristic pattern is associated with sessile serrated lesion. *Histopathology* (in press) 2013 Jan 18. doi: 10.1111/his.12099. [Epub ahead of print]

学会発表

1. Uraoka N, Sakamoto N, Oue N, Sentani K, Anami K, Noguchi T, Yoshida K and Yasui W: Transcriptome analysis of esophageal squamous cell carcinoma by SAGE identifies a new biomarker, NRD1. The 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Chicago, Illinois (USA), March 31-April 4, 2012
2. Yasui W: Molecular pathology of gastric cancer – microRNA and novel diagnostic & therapeutic targets. The 96th Annual Meeting of the German Society of Pathology, English Session, Lecture, Berlin (Germany), May 31-June3, 2012
3. Oue N, Sakamoto N, Naito Y, Sentani K, Harris CC and Yasui W: Alteration of microRNA expression in gastrointestinal cancer. The 22nd Hiroshima Cancer Seminar and the 4th Japanese Association for RNA interference Joint International Symposium “MicroRNAs in cancer”, Hiroshima (Japan), August 30, 2012
4. Yasui W: Novel biomarkers of gastric cancer identified by SAGE data analysis. Korea-Japan Cancer Workshop on Gastric Cancer and Liver Cancer, Busan (Korea), November 30, 2012
5. Yasui W: Molecular targets for diagnosis and therapeutics of gastric cancer - Present and future. The 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Busan (Korea), November 30-December 1, 2012
6. 安井 弥, 仙谷和弘, 坂本直也, 大上直秀: 統括病理学の現状と展望: 消化管がんの発生と制御・形態の理解における統括病理学. 第101回日本病理学会総会, シンポジウム3, 4月26-28日, 東京, 2012
7. 坂本直也, 内藤 寛, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: 胃癌におけるDNAメチル化によるmiR-148aの発現低下とMMP7を介した浸潤への関与. 第101回日本病理学会総会, 4月26-28日, 東京, 2012
8. 内藤 寛, 大上直秀, 坂本直也, 浦岡直礼, 仙谷和弘, 安井 弥: スキルス胃癌におけるmicroRNA-143の発現と機能解析. 第101回日本病理学会総会, 4月26-28日, 東京, 2012
9. 後藤景介, 神明俊輔, 坂本直也, 林哲太郎, 亭島 淳, 松原昭郎, 大上直秀, 安井 弥: 進行腎細胞癌におけるmiR-486の発現上昇と予後との相関. 第101回日本病理学会総会, 4月26-28日, 東京, 2012
10. 阿南勝宏, 大上直秀, 坂本直也, 仙谷和弘, 浦岡直礼, Htoo Zarni Oo, 内藤 寛, 野口 剛, 横崎 宏, 安井 弥: エクソソーム構成分子TSPAN8の胃癌における発現と予後との関連および生物学的機能に関する検討. 第101回日本病理学会総会, 4月26-28日, 東京, 2012
11. 大上直秀, 仙谷和弘, 坂本直也, Aaron J. Schetter, 安井 弥, Curtis C. Harris: 大腸癌パラフィン切片を用いたmiR-21の発現解析と薬剤感受性・予後との関連. 第101回日本病理学会総会, 4月26-28日, 東京, 2012
12. 伊藤玲子, 濱谷清裕, 矢野志保, 篠原智子, 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マイクロサテライト不安定性とMLH1蛋白発現の関連. 第101回日本病理学会総会, 4月26-28日, 東京, 2012
13. 坂根潤一, 宮本和明, 谷山清己, 浦岡直礼, 阿南勝宏, 坂本直也, 仙谷和弘, 倉岡和矢, 大上直秀, 安井 弥: 子宮頸部病変におけるDNAメチル化異常の検討 (第2報). 第101回日本病理学会総会, 4月26-28日, 東京, 2012
14. 安井 弥: 消化管がんの新規診断・治療開発に向けた分子病理学的アプローチ. 第21回日本がん転移学会学術集会・総会,

- 会長講演, 7月12-13日, 広島, 2012
15. 北台靖彦, 品川 慶, 斧山美恵子, 大西真由, 田中信治, 安井 弥, 茶山一彰: 転移機構を標的とした治療展開: 腫瘍間質を標的とした治療展開- 消化管がんを中心に. 第21回日本がん転移学会学術集会・総会, シンポジウム2, 7月12-13日, 広島, 2012
 16. 伊藤玲子, 濱谷清裕, 矢野志保, 篠原智子, 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マイクロサテライト不安定性 (MSI) とそれに関わる遺伝子の変異. 第21回日本がん転移学会学術集会・総会, 7月12-13日, 広島, 2012
 17. 安井 弥: 胃癌研究のマイルストーンと今後の展望 Milestone and future of gastric cancer research. 第71回日本癌学会学術総会, モーニングレクチャー, 9月19-21日, 札幌, 2012
 18. 仙谷和弘, 坂本直也, 大上直秀, 嶋本文雄, 安井 弥: 大腸鋸歯状病変における olfactomedin 4 と claudin-18 の発現パターンの検討. 第71回日本癌学会学術総会, 9月19-21日, 札幌, 2012
 19. Htoo Zarni Oo, 坂本直也, 浦岡直礼, 阿南勝宏, 仙谷和弘, 大上直秀, 柳原五吉, 安井 弥: Identification of gene expression profile in scirrhous type gastric cancer cell lines by CAST method. 第71回日本癌学会学術総会, 9月19-21日, 札幌, 2012
 20. 神明俊輔, 坂本直也, 後藤景介, 仙谷和弘, 阿南勝宏, 林哲太郎, 亭島 淳, 松原昭郎, 大上直秀, 安井 弥: microRNA-155 発現の腎細胞癌における予後予測因子としての意義. 第71回日本癌学会学術総会, 9月19-21日, 札幌, 2012
 21. 林哲太郎, 仙谷和弘, 阿南勝宏, 内藤 寛, 神明俊輔, 後藤景介, 坂本直也, 大上直秀, 松原昭郎, 安井 弥: CAST法で同定したTMEM50Bの発現は前立腺癌の進展と相互する. 第71回日本癌学会学術総会, 9月19-21日, 札幌, 2012
 22. 内藤 寛, 坂本直也, 浦岡直礼, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: スキルス胃癌におけるmicroRNA-143の機能の解析. 第35回日本分子生物学会年会, 12月11-14日, 福岡, 2012
 23. 大上直秀, 野口 剛, 仙谷和弘, 阿南勝宏, 坂本直也, 浦岡直礼, 安井 弥: 食道扁平上皮癌におけるサイトケラチン7の免疫染色は術後補助化学療法の効果予測マーカー, 予後予測マーカーとして有用である. 第23回日本消化器癌発生学会, ワークショップ4, 11月15-16日, 徳島, 2012
 24. 浦岡直礼, 坂本直也, 大上直秀, 仙谷和弘, 阿南勝宏, 野口 剛, 吉田和弘, 安井 弥: SAGE法で同定したNRD1の食道扁平上皮癌における発現と機能解析. 第23回日本消化器癌発生学会, ワークショップ4, 11月15-16日, 徳島, 2012
 25. 安井 弥, Htoo Zarni Oo, 坂本直也, 大上直秀: スキルス胃癌の病態と臨床応用- bench to bedside- : スキルス胃癌の分子病理と治療標的. 第85回日本胃癌学会総会, シンポジウム2, 2月27日-3月1日, 大阪, 2013
 26. 大島 貴, 坂本直也, 安井 弥, 吉川貴己, 利野 靖, 國崎主税, 増田宗孝, 今田敏夫: 胃癌診療における新規バイオマーカー: Stage II/III胃癌のbiomarker探索と個別化治療への展開. 第85回日本胃癌学会総会, シンポジウム1, 2月27日-3月1日, 大阪, 2013
 27. 安井 弥: これからの日本の胃癌はどうか: 病理学的見地から. 第85回日本胃癌学会総会, 特別企画, 2月27日-3月1日, 大阪, 2013
 28. 安井 弥: 胃癌の分子・遺伝子を標的とした診断. 第85回日本胃癌学会総会, 教育セミナー, 2月27日-3月1日, 大阪, 2013
 29. Htoo Zarni Oo, 坂本直也, 大上直秀, 柳原五吉, 安井 弥: Analysis of gene expression profile in scirrhous type gastric cancer cell lines by CAST method. 第85回日本胃癌学会総会, International Session,

2月27日-3月1日，大阪，2013

30. 大上直秀，阿南勝宏，仙谷和弘，坂本直也，浦岡直礼，安井 弥：The expression and molecular analysis of TSPAN8, which is one of the components of exosome, in gastric cancer. 第85回日本胃癌学会総会，International Session，2月27日-3月1日，大阪，2013

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副所長

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、照射後に第2癌が発生した343例を抽出し、放射線2次癌の可能性が高い20例の性質を調べた。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発現パターンに着目し、子宮癌放射線治療後の大腸癌を一般大腸癌、正常粘膜と比較したところ、放射線二次癌はひとつのクラスターにまとめられ、特徴的なmiRNA発現パターンのあることが示唆された。

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た。当院の1948年-2011年に当院がん登録データベースに登録された症例で、2つ以上のがんが登録されてい

る3,576例のカルテ調査を実施した。放射線治療後の固形がん発生は照射後5年以降にみられることが多いため、放射線治療後5年以上経過後に重複がんを発症した症例を抽出し、放射線治療との関連性について検討を行った。

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計画である。本年は、子宮癌放射線治療後の大腸癌3例、一般大腸癌5例、正常粘膜3例からmiRNAを抽出して、約1,100プローブを搭載するAgilent社のmiRNAマイクロアレイを使用し、教師なしの階層クラスター解析を施行した。

（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

上述の症例3,576症例から、照射記録がないもの、詳細の不明なもの、照射後5年未満で第2癌が発生している症例を除外して、343例を抽出した。第1がんに対する照射部位は、頭頸部196人、胸部107人、腹部5人、骨盤部33人、四肢2人であった。主なものは、頭頸部では、上咽頭癌10、中咽頭癌28、下咽

頭癌32、喉頭癌55、舌癌40、口腔底癌8、上顎癌5、歯肉癌4、頭頸部リンパ腫3など、胸部では、食道癌33、乳癌68、肺癌6など、骨盤部では子宮頸癌13、前立腺癌11などであった。

発生した第二癌は376個で、主なものの症例数は、中咽頭癌9、下咽頭癌20、喉頭癌11、舌癌12、歯肉癌10、食道癌56、乳癌47、肺癌37、胃癌55、肝細胞癌8、膵癌5、前立腺癌19、大腸癌21、悪性リンパ腫7、肉腫9などである。特徴として、潜伏期間の中央値9.5年、平均11.6年(5.0-48.3年)、第1がんが頭頸部がんである症例が多いこと(196例)、重複がんは食道癌(56例)、胃癌(55例)が多いことが挙げられ、照射野およびその近傍から発生した症例は134例(39%)であった。

これらの中で、第一癌に対する照射領域内から5年以上の潜伏期間の後に発生した、組織型の異なる癌が20例あり、これらは放射線誘発癌である可能性が高いと考えられた。潜伏期間の平均は14.6年(5.3-40.0年)、20例中に肉腫が6例(30%)認められ、第一癌が食道癌で重複がんが肺腺癌である症例が5例あった。

miRNA解析はまず、ホルマリン固定パラフィン包埋材料(FFPE)を用いた検索が信頼できるものであるかどうかの検討を行った。材料に、新鮮凍結組織のあるカルチノイド症例(肺カルチノイド6、消化管カルチノイド2)および正常粘膜8である。その結果、約60%のmiRNAは発現しておらず、発現しているmiRNAは図1に示すように、16症例の

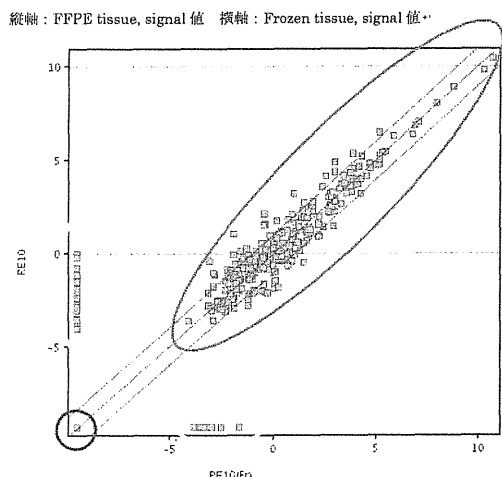


図1. FFPE(縦軸)と新鮮凍結材料(横軸)におけるmiRNAの発現の比較。発現しているmiRNAで、比較的良く一致していた。

うち大半は全体として良く相関しており、FFPE材料でのmiRNA解析が可能と判断した。ただ、腫瘍2例、正常1例では、FFPEで高値(外れ値)となるmiRNAのあることが判明した。今後は、腫瘍の種類毎にこのような外れ値となるmiRNAを見出して、検索の対象から除く必要があるかもしれない。

miRNAの発現量による階層クラスター解析では、放射線二次癌3例と正常粘膜3例は、一つのクラスターを形成した。また、大腸癌のみの検索でも、放射線二次癌は、独立したクラスターを形成した(図2)。

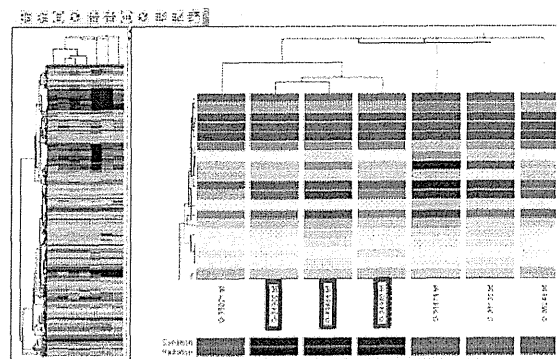


図2. 一般の大腸癌4例に対し、放射線二次癌(赤枠の症例)は、独立したクラスターを形成した。

D. 考察

放射線治療後に発生した重複がんは、食道癌、胃癌が多くみられた。発がん因子として放射線治療以外に喫煙や環境、生活習慣などの因子を考慮する必要があると考えられる。潜伏期間は平均11.6年(放射線誘発がんの可能性が高い症例で平均14.6年)と、過去の報告(菊池ら 平均9.7年、吉沢ら 平均14.3年、三橋ら 平均14.6年)とほぼ一致している。

放射線治療後に発生する白血病は潜伏期間が5年未満でも発生することが知られており、今回みられていないのは潜伏期間を5年以上としたためとも考えられる。

miRNA解析では、基礎実験として実施した、新鮮凍結組織とFFPE組織との比較において、発現しているmiRNAがほぼ相関したことから、FFPE材料を用いても、かなり信頼性の高い結果を得ることができると期待される。明らかな放射線二次癌3例を用いた階層クラスター解析では、放射線二次癌は独立したクラスターを形成し、放射線誘発癌に

特徴的なmiRNA発現パターンのあることが示唆された。また、放射線二次癌を特徴づけるmiRNAが抽出されれば、個々のがんを見た場合でも、そのmiRNA発現を解析することにより癌の原因を推定できることに成り、興味深い結果と言える。

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346症例の重複癌を抽出した。照射後の癌は376個、平均潜伏期間は11.6年であった。そのうち、照射野およびその近傍に発生し、組織型が異なる20症例は、放射線誘発癌の可能性が高いと考えられ、肉腫6例、肺腺癌5例が見られた。平均潜伏期間は14.6年であった。

miRNA発現解析では、FFPE材料でも意味のある解析のことができることが確かめられた。子宮頸癌放射線治療後の大腸癌3例と一般の大腸癌5例を用いた実験では、放射線誘発癌に特有のmiRNA発現パターンのあることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Inamura K, Fujiwara M, Togashi Y, Nomura K, Mukai H, Fujii Y, Yamamoto S, Yonese J, Fukui I, Ishikawa Y. Diverse fusion patterns and heterogeneous clinicopathologic features of renal cell carcinoma with t(6;11) translocation. *Am J Surg Pathol*. 2012, 36(1):35-42.

Fujiwara T, Hiramatsu M, Isagawa T, Ninomiya H, Inamura K, Ishikawa S, Ushijima M, Matsuura M, Jones HM, Shimane M, Nomura H, Ishikawa Y, Aburatani Y. ASCL1-coexpression profiling but not single gene expression profiling defines lung adenocarcinomas of neuroendocrine nature with poor prognosis. *Lung Cancer* 2012, 75(1):119-25.

Kabeya M, Furuta R, Kawabata K, Takahashi S, Ishikawa Y. Prevalence of human papillomavirus in mobile tongue cancer with particular reference to young patients. *Cancer Sci* 2012; 103: 161-168.

Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Hamanaka W, Ninomiya H, Uehara H, Lim Choi Y, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer.

Nat Med. 2012, 18(3):378-81.

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*. 2012, 43(3):356-63

Sugawara E, Togashi Y, Kuroda N, Sakata S, Hatano S, Asaka R, Yuasa T, Yonese J, Kitagawa M, Mano H, Ishikawa Y, Takeuchi K. Identification of anaplastic lymphoma kinase fusions in renal cancer: Large-scale immunohistochemical screening by the intercalated antibody-enhanced polymer method. *Cancer*. 118(18): 4427-36, 2012

Satoh Y, Sugai S, Uehara H, Mun M, Sakao Y, Okumura S, Nakagawa K, Ishikawa Y, Miki Y, Miyata S. Clinical Impact of Intraoperative Detection of Carcinoembryonic Antigen mRNA in Pleural Lavage Specimens from Nonsmall Cell Lung Cancer Patients. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2012 Jan 17. [Epub ahead of print]

Thunnissen E, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Chirieac LR, Dacic S, Flieder D, Gazdar A, Geisinger K, Hasleton P, Ishikawa Y, Kerr KM, Lantejoul S, Matsuno Y, Minami Y, Moreira AL, Motoi N, Nicholson AG, Noguchi M, Nonaka D, Pelosi G, Petersen I, Rehkman N, Roggli V, Travis WD, Tsao MS, Wistuba I, Xu H, Yatabe Y, Zakowski M, Witte B, Kuik DJ. Reproducibility of histopathological subtypes and invasion in pulmonary adenocarcinoma. An international interobserver study. *Mod Pathol*. 2012, 25:1574-83.

Deardorff MA, Bando M, Nakato R, Watrin E, Itoh T, Minamino M, Saitoh K, Komata M, Katou Y, Clark D, Cole KE, De Baere E, Decroos C, Di Donato N, Ernst S, Francey LJ, Gyftodimou Y, Hirashima K, Hullings M, Ishikawa Y, Jaulin C, Kaur M, Kiyono T, Lombardi PM, Magnaghi-Jaulin L, Mortier GR, Nozaki N, Petersen MB, Seimiya H, Siu VM, Suzuki Y, Takagaki K, Wilde JJ, Willems PJ, Prigent C, Gillissen-Kaesbach G, Christianson DW, Kaiser FJ, Jackson LG, Hirota T, Krantz ID, Shirahige K. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature*. 2012, 13; 489(7415): 313-7.

Komai Y, Kawakami S, Numao N, Fujii Y, Saito K, Kubo Y, Koga F, Kumagai J, Yamamoto S, Yonese J, Ishikawa Y, Fukui I, Kihara K. Extended biopsy based criteria incorporating cumulative cancer length for predicting clinically insignificant prostate cancer. *BJU Int*. 2012 Jul 3.

- Nakano K, Takahashi S, Yuasa T, Nishimura N, Mishima Y, Sakajiri S, Yokoyama M, Tsuyama N, Ishikawa Y, Hatake K. Feasibility and efficacy of combined cisplatin and irinotecan chemotherapy for poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Jpn J Clin Oncol*. 2012; 42(8):697-703.
- Yamamoto S, Kawakami S, Yonese J, Fujii Y, Urakami S, Masuda H, Numao N, Ishikawa Y, Kohno A, Fukui I. Long-term oncological outcome and risk stratification in men with high-risk prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Jun;42(6):541-7.
- Zhou H, Tamura T, Kusaka Y, Suganuma N, Subhannachart P, Vijitsanguan C, Noisiri W, Hering KG, Akira M, Itoh H, Arakawa H, Ishikawa Y, Kumagai S, Kurumatani N. Development of a guideline on reading CT images of malignant pleural mesothelioma and selection of the reference CT films. *Eur J Radiol*. 2012 Dec;81(12):4203-10.
- Nagashima T, Sakao Y, Mun M, Ishikawa Y, Nakagawa K, Masuda M, Okumura S. A Clinicopathological Study of Resected Small-Sized Squamous Cell Carcinomas of the Peripheral Lung: Prognostic Significance of Serum Carcinoembryonic Antigen Levels. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2012 Dec 13. [Epub ahead of print]
- 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*. 2012 Mar;109(5):665-71.
- Zhou H, Tamura T, Kusaka Y, Suganuma N, Subhannachart P, Vijitsanguan C, Noisiri W, Hering KG, Akira M, Itoh H, Arakawa H, Ishikawa Y, Kumagai S, Kurumatani N. Evaluation of the efficacy of the guideline on reading CT images of malignant pleural mesothelioma with reference CT films for improving the proficiency of radiologists. *Eur J Radiol*. 2013 Jan;82(1):169-76.
- Ishikawa Y, Matsubara O. Molecular biology and pathology of lung cancer: genotype-morphology correlation. Tan, D. ed. *Principle of molecular diagnosis and personalized cancer therapy*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, 2012.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Nakatani Y, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of Lung Adenocarcinoma in Resected Specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2012 Sep 12. [Epub ahead of print]
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M. Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2012 Sep 12. [Epub ahead of print]
- Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S, Ishikawa Y. Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes. *BMC Cancer*. 2013 Jan 5;13(1):8. doi:10.1186/1471-2407-13-8

2. 学会発表

宮澤一成：放射線治療後に発生した重複がんと放射線治療の影響について、日本放射線腫瘍学会第25回学術大会、2012年

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

本研究関係では、なし。

2. 実用新案登録

本研究関係では、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 国立病院機構東広島医療センター

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を明らかにした。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 *GLI3* 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すと考えられている。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) 遺伝性乳がん遺伝子で放射性発がんリスクに関連すると考えられる *BRCA1* のエピジェネティックな異常が肺がん術後予後診断マーカーとして有用である可能性を示した。

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を明らかにすることを目的とする。

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) 放射性発がんリスクに関連する遺伝性乳がん遺伝子 *BRCA1* のエピジェネティックな異常の術後予後マーカーとしての意義

病期1期で完全切除術された非小細胞肺がん症例において *BRCA1* のエピジェネティックな異常を同定し予後予測因子としての有用性を検討した。

（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ルにて行う。

C. 研究結果

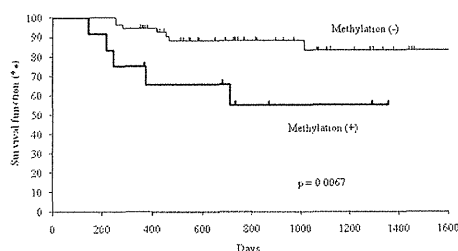
1. MS-RDA法により *GLI3* (*GLI family zinc finger 3*) を新規に同定した。 *GLI3* のメチル化異常は乳がん細胞株8株中8株 (100%) に認められた。さらに、乳がん症例でも21症例中16例 (76%) にメチル化異常が検出されることを見出した。

2. 被爆者に発生した乳がんにおいて5倍以上に発現が亢進しているmicroRNAとして、*hsa-miR-155*、*hsa-miR-1290*、*hsa-miR-1224-5p*

の3種類を同定した。

3. *BRCA1*のエピジェネティックな異常はI期肺癌70例中13例(18.6%)に認められ、術後再発と統計学的に有意な関連性が認められた。

図1 *BRCA1*メチル化異常と再発



D. 考察

乳がんのエピジェネティックな異常として *GLI3* を新規に同定した。 *GLI3* はHedgehogシグナル経路に関与し幹細胞の維持に関連することが報告されている転写因子である。 *GLI3* の乳腺がんにおける役割は未だ不明であるが、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る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 hsa-miR-155、hsa-miR-1290、hsa-miR-1224-5p 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。

BRCA1 はDNAの2本鎖切断の修復に関与し遺伝性乳がんの原因として知られているが、放射性発がんリスクに関連するとも考えられている。今回、*BRCA1* のメチル化異常は、病期1期非小細胞肺癌完全切除症例において再発予測因子となるマーカーであることを明らかにした。*BRCA1* はシスプラチンなどの抗がん剤の感受性および耐性獲得にも関連しており、*BRCA1* のメチル化異常は化学療法

における個別化治療選択に有用である可能性があると考えられた。

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) *GLI3* 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、遺伝性乳がん遺伝子で放射性発がんリスクに関連する *BRCA1* のエピジェネティックな異常が術後予後診断マーカーとして有用である可能性。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文著書発表

- 1) Methylation of breast cancer susceptibility gene 1 (*BRCA1*) predicts recurrence in patients with curatively resected stage I non-small cell lung cancers. Hiroaki Harada, Kazuaki Miyamoto, Yoshinori Yamashita, Kikuo Nakano, Yoshihiro Miyata, Kiyomi Taniyama, Hideki Ohdan, Morihito Okada *Cancer*. 119: 792-8, 2013
- 2) Implication of DNAMethylation Profiling in Oral Epithelium for Lung Cancer Screening. Hiroaki Harada, Kazuaki Miyamoto, Yoshinori Yamashita, Kikuo Nakano, Yoshihiro Miyata, Kiyomi Taniyama, Hideki Ohdan, Morihito Okada *Pulmonology*. 5402/2012/973203, 2012
- 3) *FHL1* on chromosome X is a single-hit gastrointestinal tumor-suppressor gene and contributes to the formation of an epigenetic field defect. Kiyoshi Asada, Takayuki Ando, Toru Niwa, Naoko Watanabe, Takeichi Yoshida, Kazuaki Miyamoto, Shotaro Enomoto, Sohachi Nanjo, Masao Ichinose, Yoshitaka Yamamura, Masae Tatematsu, Toshiro Sugiyama, Toshikazu Ushijima *Oncogene*. 32: 2142-9, 2013

2. 学会発表

- 1) エピジェネティクスに基づく乳癌早期診断マーカーの開発
宮本和明 第20回日本乳癌学会学術総会, 2012年6月30日, 熊本
- 2) Aberrant methylation of CpG islands in human breast cancers
Kazuaki Miyamoto 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月20日, 札幌
- 3) エピジェネティクスに基づく癌診断マーカーの開発

宮本和明 第50回日本癌治療学会学術集会,
2012年10月26日, 横浜

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。しかしながら、放射線で誘発された乳癌に関連するゲノム異常やエピジェネティックな異常に関する知見は未だ乏しい。本研究は、ラット乳腺腫瘍モデルを用いて、被ばく時年齢の異なる放射線誘発乳癌ならびに、乳がん高発系および低発系ラットとの雑種第一代に誘発された乳癌のゲノム変異とメチル化異常を解析し、放射線誘発乳癌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、放射線を全身照射して誘発した放射線誘発乳癌と、自然発症した乳癌よりゲノムDNAを抽出し、CpG islandマイクロアレイを用いてメチル化状態の変化を解析した。また、乳がん高発系Sprague-Dawleyラットおよび低発系Copenhagenラットとの雑種第一代に誘発された乳癌について、メチル化状態とCGH法によるゲノムコピー数の変化を解析した。その結果、放射線誘発乳癌に特徴的なメチル化異常を伴う癌関連遺伝子候補を複数同定した。思春期後の被ばくにより誘発された乳癌では、細胞の分化調節に関わる*Id3*遺伝子の高メチル化と、その発現抑制が特徴的であることが分かった。これらの結果は、自然発症および被ばく時年齢の異なる放射線誘発乳癌を、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、乳がん高発系および低発系ラットとの雑種第一代に誘発された乳癌では、1q52、2q12-15、3q31-36領域と5番染色体全域において高頻度にゲノムの欠失が見られた。これらの領域は、ヒト乳癌において見られるゲノム欠失領域と共通しており、ヒト乳癌のモデルとして有用であると考えられる。

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、被ばく時年齢の異なる放射線誘発乳癌ならびに、乳がん高発系および低発系ラットとの雑種第一代に誘発された乳癌のゲノム変異とメチル化異常を解析し、放射線誘発乳癌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（それぞれ7検体）および正常乳腺組織（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あるいは減少し ($P < 0.05$)、それぞれの癌7検体中5検体以上でメチル化レベルが変化しているゲノムDNA領域を高メチル化および、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が逆相関する遺伝子群を抽出した。

乳がん高発系Sprague-Dawleyおよび低発系Copenhagenラットとの雑種第一代に放射線 (ガンマ線、4Gy) を全身照射して発症した放射線誘発乳腺腫瘍のうち、腺癌と病理診断された検体 (22検体) および正常乳腺組織より抽出したゲノムDNAを、それぞれ異なる2種類の蛍光色素により標識し、ラットゲノムCGH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により検出し、専用ソフトウェア (Agilent社、CGH analytics) を用いて、ゲノムコピー数の変化を解析した。また、腺癌 (16検体) と正常乳腺組織 (4検体) のゲノムDNAのメチル化パターンを、上述の方法により解析した。

(倫理面への配慮)

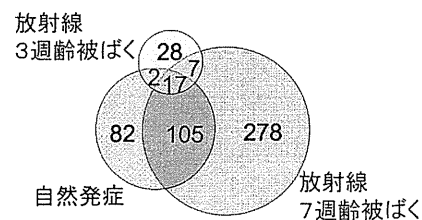
本研究には、倫理面に配慮すべき事項は存在しない。動物実験は、放射線医学総合研究所の実験動物取扱安全衛生管理規程を遵守し、動物実験委員会承認のもとに実施した。

C. 研究結果

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合計531ヶ所見出した。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) の放射線被ばく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82ヶ所、28ヶ所、278ヶ所抽出した (図1)。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131ヶ所、4ヶ所、8ヶ所抽出した。

(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

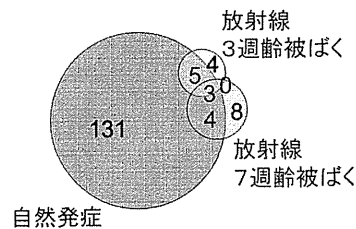


図1 自然発症および放射線誘発乳癌に特徴的なDNAメチル化異常の抽出。乳癌において高メチル化(A)および低メチル化(B)を示す遺伝子領域の数をベン図で表す。

癌のグループ間で1.5倍以上メチル化レベルが異なる遺伝子領域 (34ヶ所) のDNAメチル化パターンについて、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) の放射線被ばくにより誘発された乳癌は、自然発症と思春期後 (7週齢) の被ばく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2)。また、自然発症した乳癌には、思春期後 (7週齢) の被ばくにより誘発された乳癌により近いグループ (右側) とそうでないグループ (左側) が存在することが分かった。

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

D. 考察

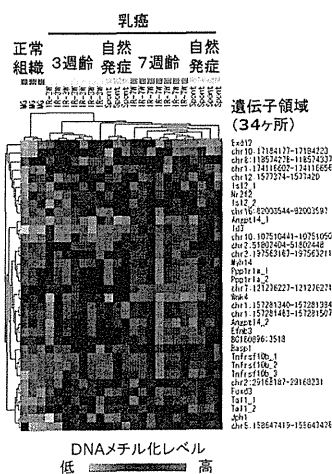


図2 正常乳腺組織(3検体)、自然発症、放射線誘発(各7検体)のDNAメチル化プロファイルのクラスター解析。各行が遺伝子プローブ、列が検体を表す。

現が変動していると考えられる標的遺伝子候補を同定し、特に思春期後の被ばくにより誘発された乳癌では、細胞の分化調節に関わる*Id3* (Inhibitor of DNA binding 3) 遺伝子の高メチル化と、その発現抑制が特徴的であることが分かった (図3)。

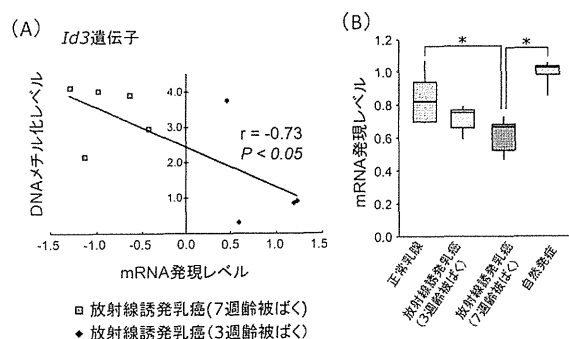


図3 思春期後(7週齢)の被ばくにより誘発された乳癌に特徴的な遺伝子*Id3*。思春期後の被ばくにより誘発された乳癌では、*Id3*遺伝子の高メチル化と、その発現抑制(A)が見られる。(B)定量PCRによる遺伝子発現の検証。

CGH解析により、乳がん高発系および低発系ラットとの雑種第一代に誘発された乳癌では、1q52、2q12-15、3q31-36領域と5番染色体全域において高頻度にゲノムの欠失が見られることが分かった (図4)。これらの領域は、これまでに報告されている化学発癌感受性に関わる領域とは異なっていた。また、正常乳腺組織に比べ、放射線誘発乳癌でゲノムDNAのメチル化レベルに異常がみられる遺伝子領域を合計244ヶ所見出した。

本研究により、自然発症および被ばく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。思春期後の被ばくにより誘発された乳癌では、細胞の分化調節に関わる*Id3*遺伝子の高メチル化と、その発現抑制が特徴的であることが分かった。*Id*遺伝子ファミリーは、乳腺の発生に機能していることが知られていることから (*Adv Cancer Res.*, 92:81-94, 2004)、思春期後の被ばくにより誘発された乳癌には、乳腺の発生異常が関係していると考えられる。また、CGH解析により、乳がん高発系および低発系ラットとの雑種第一代に誘発された乳癌では、1q52、2q12-15、3q31-36領域と5番染色体全域において高頻度にゲノムの欠失が見られた。興味深いことに、欠失の見られた1q52、2q12-15、3q31-36領域は、それぞれヒト染色体の10q23、5q11.2、11p13、15q14-21、2q11-14領域に対応し、乳癌において見られるゲノム欠失領域と共通していることが分かった。これらの領域には、*Pten* (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10) 等の癌抑制遺伝子が多数存在する。さらに、これらの欠失領域は、これまでに報告されている化学発癌感受性に関わる領域 (*Genetics* 149:289-299, 1998) とは異なっていることから、放射線発癌感受性と化学発癌感受性に関わる遺伝子は異なる可能性が示唆された。

今後は、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。放射線誘発乳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、自然発症および被ばく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。乳がん高発系および低発系ラットとの雑種第一代に誘発された乳癌では、1q52、2q12-15、3q31-36領域と5番染色体全域において高頻度にゲノムの欠失が見られた。これらの領域は、ヒト乳癌において見られるゲノム欠失領域と共通しており、ヒト乳癌のモデルとして有用であると考えられる。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

1. Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Toshiaki Kokubo, Kazutaka Doi, Daisuke Iizuka, Yukiko Nishimura, Tomomi Okutani, Masaru Takabatake, Shizuko Kakinuma, Yoshiya Shimada. Influence of age on the relative biological effectiveness of carbon ion radiation for induction of rat mammary carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, (in press).

2. 学会発表

1. 高畠 賢、臺野 和広、今岡 達彦、西村 まゆみ、福士 政広、島田 義也：思春期前後での放射線被ばくにより発症したラット乳がんにおけるゲノムDNAメチル化の網羅的解析、第35回日本分子生物学会年会、福岡市
2. Kazuhiro Daino, Mayumi Nishimura, Tatsuhiko Imaoka, Masaru Takabatake, Takashi Takabatake, Shizuko Kakinuma and Yoshiya Shimada: Genetic and epigenetic alterations in radiation-induced rat mammary carcinomas. Keystone Symposia March 2013 Epigenetic Marks

and Cancer Drugs, New Mexico

3. Masaru Takabatake, Kazuhiro Daino, Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Masahiro Fukushi, Yoshiya Shimada: Global DNA Methylation Profiling of Rat Mammary Carcinomas Induced by Ionizing Irradiation at Pre-or Post-Pubertal Age. Keystone Symposia March 2013 Epigenetic Marks and Cancer Drugs, New Mexico

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