

放射線発がんにおける複製後修復機構の役割

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
広島大学 原爆放射線医科学研究所 飯塚大輔

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は放射線照射後、核内フォーカスを形成し、 γ H2AXや53BP1と共局在した。SiRNA法によるRAD18の発現抑制系を用いて、放射線照射後の細胞応答を解析した結果、RAD18発現抑制細胞では、放射線照射後の53BP1の核内フォーカス数が低下する知見を得た。また、RAD18発現抑制細胞では、放射線照射後のATMのリン酸化や、H2AXのリン酸化といった損傷応答因子の誘導が抑制される傾向がみられた。細胞周期解析や、mitotic index(分裂指数)計測を行った結果、RAD18は放射線照射後のG2期からM期への移行停止に寄与することを明らかにした。これらの結果から、RAD18は、G2期の細胞において、放射線によるDNA損傷部位に集積し、損傷修復に寄与することが示唆される。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点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

現代社会では、医療、産業等での放射線利用が激増し、放射線被ばくによる健康影響問題は人類共通の課題である。さらに福島原発事故では、放射線被ばく、特に低線量、低線量率放射線による健康影響が緊急の課題となっている。発がんリスクの増加は、低線量放射線被ばくによる健康影響の中で重要な課題であり、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評価、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、放射線被ばくによる点突然変異誘発機構に着目し、放射線ゲノム障害における複製後修復機構の役割を明らかにするとともに、複製後修復機構の中で中心的役割を担うRAD18の放射線応答機構への寄与を解明する。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

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、細胞応答解析、細胞周期の測定などを行った。

2. 蛍光免疫染色法

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PFAで固定し、0.5% tritonX処理を行った後、目的のタンパク質に対する特異的抗体、続いて、蛍光標識した2次抗体処理を行った。その後、DAPIを用いて核染色をした後、蛍光顕微鏡下で観察を行った。1次抗体には、抗RAD18抗体、抗phospho H2AX (Ser139) 抗体 (Merck Millipore社)、抗53BP1 (SIGMA社) 抗体を用いた。標識した2次抗体には、Alexa488標識抗ウサギIgG抗体 (Molecular Probe社)、Alexa594標識抗マウスIgG抗体 (Molecular Probe社) を使用した。

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phospho H2AX (Ser139) 抗体 (Merck Millipore社)、抗phospho-HistoneH3 (Ser10) 抗体 (Merck Millipore

社)、抗 β -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。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. mitotic index (分裂指数) の計測

HT1080細胞にsiRNA処理を行い、48時間後、放射線照射を行った。経時的に細胞を回収し、低張処理後、カルノア固定を行った。その後、固定した細胞をスライドガラス上に展開固定し、ヘマトキシリンによる核染色を行い、細胞集団における染色体像を示すM期の割合を計測した。

さらに、照射後経時的に回収した細胞の一部をエタノール固定し、1次抗体に、抗phospho-HistoneH3 (Ser10) 抗体 (Merck Millipore社) を、2次抗体にAlexa488標識-抗ウサギIgG抗体 (Molecular Probe社) を用いてM期の細胞を蛍光標識し、BD FACS Canto II Flow Cytometer (BD) により細胞集団におけるM期の割合を計測した。

6. 統計処理

Mitotic index、核内フォーカス数の解析には、student t-testを用いて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発現抑制系を用いた放射線照射後のDNA損傷応答因子の核内挙動解析

放射線照射後のRAD18の核内挙動を蛍光免疫染色法により解析した。RAD18は、非照射時にはほとんど核内フォーカスを形成しないが、放射線照射により核内フォーカスを形成した。RAD18の核内フォーカスの数は、照射した線量依存的に増加した。また、放射線照射後に形成されるRAD18の核内フォーカスは、 γ H2AXや53BP1と共局在した。次に、siRNA法によるRAD18の発現抑制系を用いて、放射線照射によるDNA損傷応答因子の核内挙動を解析した。その結果、RAD18発現抑制細胞では、ネガティブコントロールsiRNA処理細胞と比較して、放射線照射後の53BP1の核内フォーカス数が低下する傾向を示した。

2. RAD18発現抑制系を用いた放射線による細胞応答解析

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、RAD18siRNA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1、2、4、8Gyの放射線照射を行い、その後、15、30、60、90分後のDNA損傷応答に関与する因子であるATM、H2AXのリン酸化を測定した。ネガティブコ

ントロールsiRNA処理細胞では、放射線照射後、15分後から、ATM、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、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。

3. RAD18の発現を抑制した細胞を用いた放射線照射後の細胞周期解析

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1、2、4、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。

次に、細胞周期のG2期からM期への移行を詳細に解析するため、放射線照射後、30、60、90分におけるmitotic indexを計測した。ネガティブコントロールsiRNA処理細胞では、照射後60分から染色体像を示すM期の割合が低下した。一方、RAD18発現抑制細胞においても、照射によりM期の割合が低下したが、ネガティブコントロールsiRNA処理細胞よりも高い値を示した。

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機構の一つであり、点突然変異誘発に関与することが知られている。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、放射線被ばくにおける点突然変異誘発機構に着目し、放射線ゲノム障害における複製後修復機構の役割を明らかにするために、RAD18発現抑制細胞を用いて、放射線応答におけるRAD18の役割について解析した。蛍光免疫染色法を用いた結果、RAD18は放射線照射後に核内フォーカスを形成し、DNA損傷応答因子である γ H2AXや53BP1と共局在することを明らかにした。さらに、RAD18発現抑制細胞では、ネガティブコントロールsiRNA処理細胞と比較して、放射線照射後の53BP1の核内フォーカス数が低下する結果を得た。これらは、RAD18が放射線照射後の損傷応答に関与することを示唆する結果といえる。次に、western blotting法により放射線照射後の、ATMのリン酸化、H2AXのリン酸化を測定した。その結果、RAD18発現抑制細胞では、放射線によるDNA損傷応答反応の低下が観察された。これらの結果からも、放射線照射後の損傷応答に、RAD18が寄与していると示唆される。また、細胞周期解析、mitotic indexの計測結果から、RAD18は放射線照射後のG2期からM期への移行阻害に関与していることが明らかにされた。

以上の結果から、RAD18は、G2期の細胞において、放射線によるDNA損傷部位に集積し、損傷修復に寄与することが示唆される。

これまでの報告から、RAD18は放射線照射後、G1期では非相同末端結合、S期では、相同組み換えに関与することが報告されているが、G2/Mチェックポイントへの寄与は報告されていない。更なる研究により、放射線照射後の細胞応答におけるRAD18の新規機構の解明が

期待される。

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思う。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。

E. 結論

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機構の一つであり点突然変異誘発に関与することが知られている。我々は、放射線被ばくによる点突然変異誘発に着目し、放射線ゲノム障害における複製後修復機構の役割を明らかにするとともに、複製後修復機構の中で中心的役割を担うRAD18の放射線応答機構への寄与について調べた。

今年度の研究により、RAD18は、G2期の細胞において、放射線によるDNA損傷部位に集積し、損傷修復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の機能解析を進めることで、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が明らかにされ、最終的には放射線発がん機構の解明に役立つと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda Y, Suzuki M, Kawai H, Hishiki A, Hashimoto H, Masutani C, Hishida T,

Suzuki F, Kamiya K., En bloc transfer of polyubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs. *Nucleic Acids Res.* 2012 Nov ;40(20):10394-407.

2. 笹谷めぐみ, 増田雄司, 神谷研二: APC Min/+マウスにおける放射線誘発消化管腫瘍の解析. *広島医学*; 65(4): 316-318, 2012.
3. 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. *広島医学*; 65(4): 292-294, 2012.
4. 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, 笹谷一豊島めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男: 恒常的な放射線照射に対する細胞応答の線量率依存性の解析. *広島医*; 65(4): 302-304, 2012.
5. 徐衍賓, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 増田雄司, 神谷研二: 複製後修復機構が放射線損傷応答におよぼす寄与. *長崎医学雑誌*, in press.

2. 学会発表

1. 飯塚大輔, 笹谷めぐみ, 神谷研二: 放射線発がん分子機構の解明. 第8回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス-放射線災害医療の国際教育研究拠点に向けた機関連携事業-, 長崎, 2012/06/02. (報告書, pp35-37)
2. 河合秀彦, 曹麗麗, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男: 慢性的な放射線照射に対する細胞応答の先端技術を用いた解析. 第8回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス-放射線災害医療の国際教育研究拠点に向けた機関連携事業-, 長崎, 2012/06/02. (報告書, pp31-33)
3. 徐衍賓, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 増田雄司, 神谷研二: 複製後修復機構が放射線損傷応答におよぼす寄与. 第53回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2012/6/3. (講演要旨集, p.20, 2012)
4. 曹麗麗, 河合秀彦, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 笹谷一豊島めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男: 慢性的な γ 線照射に対する細胞応答の先端技術を用いた解析. 第53回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 2012/6/3. (講演要旨集, p. 26, 2012)
5. 増田雄司, 鈴木美紀, 益谷央豪, 神谷研二: ヒトPCNAのユビキチン化酵素RAD6-RAD18複合体の構造と機能. 日本放射線影響学会第55回大会, 仙台, 2012/09/07. (講演要旨集, p.115, 2012)
6. Xu Yanbin, 笹谷めぐみ, 河合秀彦, 増田雄司, 神谷研二: Role of post-replication repair system on radioresponse: 日本放射線影響学会第55回大会, 仙台, 2012/09/06. (講演要旨集, p.139, 2012)
7. 河合秀彦, CaoLili, 飯塚大輔, 松井啓隆, 金井昭教, 稲葉俊哉, 笹谷めぐみ, 神谷研二, 鈴木文男: 異なる線量率の \square 線照射下での細胞応答の多次元解析, 日本放射線影響学会第55回大会, 仙台, 2012/09/06. (講演要旨集, p. 86, 2012)
8. 笹谷めぐみ, 徐衍賓, 本田浩章, 増田雄司, 渡辺敦光, 神谷研二: 白血病モデルマウス (Bcr-Ablトランスジェニックマウス)を用いた放射線誘発胸腺リンパ腫発症機構解明日本放射線影響学会第55回大会, 仙台, 2012/09/07. (講演要旨集, p.157, 2012)
9. Xu Y, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K: Function of RAD18 on radioresponse. The 2nd International Symposium Phenix Leader Education Program (Hiroshima Initiative) for Renaissance for Radiation Disaster. Hiroshima, 2013/2/11. (Abstracts, p.74, 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

DNA修復遺伝子の発現異常によるがん特性の解析

研究分担者 宮川 清 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 DNA二本鎖切断修復の異常は、染色体不安定性の直接的な原因となり、放射線発がんを促進する可能性が想定されている。しかし、その修復遺伝子のゲノム異常の頻度は極めて少ないために、エピジェネティックな機序により、がんに特異的に発現する分子が修復異常の直接的な原因となる可能性を検討した。減数分裂特異的コヒーシオンであるSMC1 β は、正常組織では生殖細胞においてのみ発現しているが、一部のがんにおいてエピジェネティックな機序によって発現していることが明らかとなり、がん精巣抗原であることを確認した。コヒーシオンは相同組換えによるDNA二本鎖切断修復に重要な役割を果たすことが知られているために、がん精巣抗原SMC1 β が、どのように体細胞の染色体安定性の維持に影響を及ぼすのかについて検討した。正常上皮細胞にSMC1 β を発現させた場合には、放射線とシスプラチンに対して細胞の感受性は亢進し、逆に、この分子が発現しているがん細胞においてノックダウンすると、細胞はこれらに抵抗性となった。相同組換えの中心的な分子であるRad51の放射線照射後の核内フォーカス形成は、SMC1 β の発現によって低下した。これらの結果から、この分子は、相同組換え修復によるDNA二本鎖切断修復を抑制することが判明した。次に、コヒーシオンの役割である姉妹染色分体間の結合について、分裂中期の染色体の形態を解析したところ、SMC1 β の発現によって、その結合は解離し、逆に、ノックダウンによって姉妹染色分体解離の頻度は減少した。これらの結果により、がん精巣抗原であるSMC1 β が発現しているがんにおいては、体細胞でのコヒーシオンの機能が抑制されるとともに相同組換えによるDNA二本鎖切断修復機能も抑制され、染色体不安定性が誘導される可能性が示唆された。

A. 研究目的

放射線発がんを理解するためには、放射線によって生成されるDNA損傷に応答する生体の反応経路を解明することが必須である。近年の生命科学の発展によって、このDNA損傷応答経路を構成する分子機構の解明の研究は、めざましい発展を遂げている。その中でも、DNA二本鎖切断に対する修復機構については、酵母の遺伝学を基盤とするアプローチと、染色体不安定性を特徴とする遺伝性疾患の責任分子の同定によって、多くの新しい知見が得られている。

このような分子機能を同定することによって、生命現象における基本原理としてのDNA修復機構については理解が深まっている。その一方で、放射線発がんの理解を深めるためには、これらの異常が個人のレベルでどのような機序によってもたらされるのかについて解明する必要がある。その理

由としては、同じ線量の放射線被ばくによっても、それが発がんに結びつく過程においては、個人差が存在することが想定されるからである。このような放射線発がんにおける個人差の問題はこれまで重視されてこなかったが、低線量放射線被ばくの生体影響が改めて重要視される今日、国際的な研究の動向においては重点的に取り組むべき課題として認識されている。

DNA修復機構の個人差は、放射線発がんの個人差と深く結びつくことが想定されている。そのために、その機構を構成する分子の異常を、個々の疾患で同定することが重要になる。このような視点において最も早期に解明されたのは、遺伝性乳がん・卵巣がん家系の責任遺伝子であるBRCA1とBRCA2がDNA二本鎖切断修復においてRad51の機能に必須であることである。これに関係して、BRCA2はファンconi貧血の責

任遺伝子となることが発見されたことによって、ファンconi貧血分子群のDNA修復における位置づけも明らかとなった。このように、遺伝性乳がん・卵巣がん家系やファンconi貧血においては、遺伝的にDNA修復機能が低下していることによって、DNA損傷に対する感受性が亢進していることが明らかとなっている。そこで問題となるのは、これらの異常は比較的稀にしか見られない事例であるために、他にDNA修復の異常をきたす原因はどの程度存在するのかということである。この問題については、ゲノムレベルでの解析は以前から行われていたが、目立った異常は発見されていない。

分子機構の異常をもたらす原因としては、構成分子のゲノム異常の他に、エピジェネティックな機序も存在する。相同組換え修復においては、その構成分子の遺伝子レベルにおけるメチル化によって、発現レベルが低下することが知られている。さらに、我々は減数分裂特異的遺伝子であるSYCP3が低メチル化によって体細胞において発現する場合には、BRCA2の機能を抑制することによってRad51による相同組換え修復機構を阻害することを明らかにした。この事例は、体細胞におけるDNA修復機構抑制をもたらす新たなエピジェネティックな原因が存在することを示唆するものである。このように、減数分裂特異的分子が体細胞において異所性に発現する場合のDNA修復機構への影響をより深く理解することによって、放射線発がんに寄与する染色体不安定性の新たな機序を同定することを本研究の目的とする。

このような目的を達成するために、相同組換え修復における役割が注目されているコヒーシンの中で、ヒトの減数分裂においてのみ発現することが知られているSMC1 β に着目した。コヒーシンは姉妹染色分体を結合することによって、これら相互による相同組換えを促進するものと考えられている。体細胞においては、SMC1 α が、SMC3、Rad21とリング状の構造を形成することによって、姉妹染色分体が解離することを防いでいるモデルが提唱されている。このSMC1 α は広く種をこえて保存されているが、ヒトにおいては構造的に類似するSMC1 β が存在し、その発現は減数分裂に限定される。そこで、SMC1 β がエピジェネティックな機序によっ

て体細胞において発現する可能性と、その場合のDNA修復機構への影響を検討した。

B. 研究方法

SMC1 β が体細胞で発現することを検討するために、ヒト各種培養細胞株よりRNAを抽出し、この遺伝子に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行う。

SMC1 β の体細胞における生物学的意義を検討するために、この遺伝子が発現していない正常上皮細胞株RPEに、そのcDNAを導入して、発現細胞株を樹立する。また、SMC1 β が発現している細胞株においては、siRNAを用いてこの遺伝子をノックダウンする。

DNA損傷作用への感受性に対するSMC1 β の影響を検討するために、放射線照射およびシスプラチン処理後約1週間後の細胞のコロニー形成能を解析する。

相同組換え修復機能の評価は、放射線照射後のRad51の核内フォーカス形成を免疫染色で可視化することによって行う。また、細胞周期の分布についてもFACSによって解析する。

コヒーシン機能の評価は、細胞をコルヒチンで処理し、細胞分裂中期で細胞周期を停止させ、染色体を展開し、その姉妹染色分体の形状を観察することで行う。

コヒーシン複合体の解析については、SMC1 β とSMC3、Rad21との結合、SMC1 α とSMC3、Rad21との結合について、免疫沈降で行う。また、放射線照射によるSMC1 α とSMC3のリン酸化については、これらのリン酸化p-SMC α (Ser 957)、p-SMC3(Ser 1083)に対する抗体を用いたウェスタン・ブロッティングによって評価する。

(倫理面への配慮)

樹立された細胞株を購入して行う実験であるために、倫理面への配慮は必要としない。

C. 研究結果

SMC1 β の発現は、肺がん細胞株H358、大腸がん細胞株HCT116、肝細胞がん細胞株HepG2、線維肉腫細胞株HT1080など、解析したがん細胞株の半数以上で認められた。正常上皮細胞株RPEでは、発現は認められなかった。

SMC1 β を外来性に導入したRPEにおいては、核内にSMC1 β の集積が確認された。この細胞株は、SMC1 β 非発現RPEと比べて、

放射線、シスプラチンに対する感受性が亢進していた。逆に、HCT116細胞でSMC1 β をノックダウンすると、コントロール細胞と比べて、放射線、シスプラチンに対して抵抗性となった。

放射線照射後のRad51の核内フォーカス形成は、RPEにおいてSMC1 β を発現することによって、低下した。細胞周期の分布は、定常状態でも放射線照射後であっても、SMC1 β 発現の影響は認められなかった。

分裂中期における姉妹染色分体の解離は、RPEにおいてはSMC1 β の発現によって増加した。逆に、HCT116においてはSMC1 β のノックダウンによって低下した。

免疫沈降によって、SMC1 β 発現RPEにおけるコヒーシン複合体形成の状況を解析したところ、SMC1 β はSMC3とRad21と結合していることが認められた。また、SMC1 α とSMC3、Rad21の複合体形成に対してSMC1 β 発現の影響は認められなかった。放射線照射後のSMC1 α とSMC3のリン酸化において、SMC1 β 発現の影響は認められなかった。

D. 考察

SMC1 β がヒト各種類のがん細胞株で発現していたことより、体細胞ではがん細胞に特異的に発現することが示唆された。また、最近の他の報告によってもヒトがんにおいて発現していることが確認されているので、SMC1 β はいわゆるがん精巢抗原であると言える。その発現機序としては、ヒストンの脱メチル化とアセチル化によることが報告されている。

SMC1 β の発現によってRad51のフォーカス形成が抑制されたことは、相同組換え修復が抑制されたことを意味する。その結果として、SMC1 β 発現によって放射線とシスプラチンに対する感受性が亢進したものと考えられる。体細胞においては、相同組換え修復は姉妹染色分体間にておこるために、これらは場所的に近接していることが必要である。そのためには、これらはコヒーシンによって結合していることが重要である。分裂中期においてSMC1 β 発現によって姉妹染色分体が解離する頻度が増加したことは、相同組換え修復にとっては抑制的にはたらくことになる。

以上の結果により、SMC1 β が体細胞において発現した場合には、コヒーシンの機能

が通常のレベルでは維持できずに、姉妹染色分体が解離する傾向が強まり、その結果として姉妹染色分体間における相同組換え修復が抑制されることが示唆された。次の課題としては、減数分裂においてはコヒーシンの役割を担うSMC1 β が、体細胞において発現した場合には、なぜコヒーシンの機能が低下するかである。この課題に取り組むために、最初にSMC1 β が体細胞において形成する複合体を解析した。その結果、SMC1 β はSMC3およびRad21と複合体を形成することが明らかとなり、このパターンは減数分裂と同じであることが確認された。通常、体細胞においては、SMC1 α がSMC3およびRad21と複合体を形成してコヒーシンの役割を担っているために、SMC1 β が発現した場合の、この複合体の構成の変化を検討した。その結果、SMC1 β が発現しても通常の複合体形成には変化が認められなかった。

現時点では、SMC1 β の発現により相同組換え修復に関係するコヒーシン機能が低下することについて、明らかな分子機序を説明することが困難である。可能性として考えられることは、SMC1 β が発現することによって、SMC1 α が形成するコヒーシン複合体のゲノム上における分布が変化することがあげられる。相同組換え修復においては、DNA二本鎖切断の近傍においてコヒーシンによる姉妹染色分体の結合がおこることが重要となる。もしこの近傍にSMC1 α が形成するコヒーシンがリクルートされない場合には、効率的な修復機能が低下することも想定される。このような仮説を検証するためには、ゲノム上の特定の部位にDNA二本鎖切断を導入し、その近傍におけるコヒーシンのリクルート状況を解析する必要がある。

E. 結論

減数分裂特異的なコヒーシンであるSMC1 β は、エピジェネティックな機序によってがん細胞において発現するがん精巢抗原であることが確認された。その体細胞における発現によって、Rad51によって媒介される相同組換え修復によるDNA二本鎖切断修復は抑制され、放射線やシスプラチンに対する細胞の感受性は亢進する。その機序としては、SMC1 α による通常の体細胞のコヒーシ

ン機能が低下することによって、姉妹染色分体間の結合が低下することが想定される。このように、DNA二本鎖切断に対する修復機構は、ゲノム異常のみならず、エピジェネティックな機序によっても制御されていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Genet SC, Fujii Y, Maeda J, Kaneko M, Genet MD, Miyagawa K and Kato TA. Hyperthermia inhibits homologous recombination and sensitizes cells to ionizing radiation in a time- and temperature-dependent manner. J Cell Physiol in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

放射線関連発がんに関与する遺伝要因の研究

研究分担者 林 奉権 （公財）放射線影響研究所 放射線生物学/分子疫学部

研究要旨 活性酸素種（ROS）は、ATP合成等により細胞において常に産生されるが、そのレベルは化学物質、放射線によるラジカル反応や感染/炎症による免疫細胞の活性化によって増加することが報告されている。ROSは免疫にとって重要な役割を果たしている一方、過剰のROSの産生・蓄積は組織およびDNAに損傷を引き起こすと共に、免疫能を低下させ、がん、冠動脈心疾患などの炎症関連疾患のリスクを高める可能性がある。我々は、血漿中の総ROS測定法と血液細胞（単球、顆粒球、リンパ球、および各T細胞サブセット）内で産生されるROS（ H_2O_2 および $O_2^{\cdot-}$ ）の測定法を開発した。本年度は、原爆被爆者の1,520名の血漿中と1,370名の細胞内ROSレベルに対する放射線被曝の影響、さらに、ROSレベルに関係する免疫・炎症関連遺伝子多型について調べた。その結果、血漿中ROSレベルは女性に比べ男性で高く、放射線量に伴い増加していた。また、血漿中ROSレベルは炎症指標であるCRPと正の相関を示した。細胞内 H_2O_2 レベルはリンパ球で男性に比べ女性で高いが、年齢と放射線量による変化は見られなかった。顆粒球では年齢でのみ増加していた。各T細胞サブセットの H_2O_2 レベルは男性に比べ女性で高く、ナイーブCD4 T細胞でのみ年齢に伴い減少していた。すべてのT細胞サブセットで細胞内 H_2O_2 レベルの放射線量に伴う変化は見られなかった。一方、細胞内 $O_2^{\cdot-}$ レベルはリンパ球と顆粒球で女性に比べ男性で高く、年齢と放射線量に伴い増加していた。また、すべてのT細胞サブセットの $O_2^{\cdot-}$ レベルは女性に比べ男性で高く、年齢に伴い増加し、特に、CD3 T細胞でのみ放射線量に伴い増加していた。細胞内ROSレベルと様々な免疫・炎症関連遺伝子多型について調べた結果では、細胞内ROS（ $O_2^{\cdot-}$ ）レベルが*IL6R*遺伝子型によって有意に異なることを見出した。

A. 研究目的

本研究の目的は、原爆被爆者集団を対象としたコホート研究のゲノム解析により、放射線関連発がんの遺伝的高危険群を同定するとともに、放射線影響と遺伝要因の相互作用に基づく発がんリスクの評価システムを構築することである。放射線被曝が持続性炎症を亢進するという免疫学研究の知見を踏まえて、免疫関連遺伝子の多型に基づく発がんリスクが放射線被曝によってどのように修飾されるか検討する。炎症から発がんに至

る作用機序の解析を行う。本研究の成果は、原爆放射線への被曝のみならず、他の放射線への被曝に関連した発がんの予防に重要な知見を与えると期待される。

本年度は原爆被爆者の血漿中と細胞内活性酸素（ROS）レベルに対する放射線被曝の影響、さらに、ROSレベルに関係する免疫・炎症関連遺伝子多型について調べた。

B. 研究方法

放射線影響研究所の成人健康調査対象者から収集した血液試料（血漿と血液細胞）を

用いて血漿中ROSと細胞内ROSを測定した。

1) 血漿中ROS測定: 96ウェルマルチプレートの各ウェルにN,N-diethyl-para-phenylene-diamine溶液と5 μlの検量線作成用の過酸化水素水標準液または血漿を加え、37°C、15秒間隔で経時的に505nmの吸光度を測定した。プレートリーダーでの測定開始から一定時間後までの標準溶液および試料の測定値から傾きを算出する。各濃度の標準溶液の傾きから検量線を作成し、試料の傾きからその過酸化水素水相当値(1 unit = 1.0 mg H₂O₂/l)を求めた。

2) 細胞内ROS測定: 細胞内ROSレベルはフローサイトメーターを用いて測定した。H₂O₂レベルはcarboxy-dichlorodihydro fluorescein diacetate、O₂⁻レベルhydroethidineを用い、特に、CD4、CD8T細胞のnaïve, central memory, effector memoryの細胞内活性酸素はCD3、CD4、CD8、CD45RAおよびCD62Lに対する抗体の組み合わせにより測定した。

3) ROS関連遺伝子多型の探索: 639名の健康者のDNAを用いて44種類の免疫・炎症関連遺伝子のSNPを測定し、血漿中および細胞内ROSレベルとの関連について調べた。SNP解析は、TaqMan 5'ヌクレアーゼ法(PE Applied Bio-systems, Foster City, CA, USA)及びABI Prism 9700HT sequence detector (PE Applied Bio-systems)を用いた。

また、本研究に用いる血液試料は、医学研究およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する同意文書に基づいて収集したものである。また、その使用は放影研の人権擁護委員会および遺伝子研究に関する倫理委員の承認を得ている。

C. 研究結果

1) 血漿中ROS: 原爆被爆者の1,520名の血漿中ROSレベルに対する年齢と放射線被曝の影響を調べた。その結果、血漿中ROSレベルは女性に比べ男性で高く、放射線量に伴い増

加していた(表1)。また、血漿中ROSレベルは炎症指標であるCRPと正の相関を示した(図1)。

表1. 原爆被爆者の血漿中ROSレベル

Variables	Percent increments (95% CI)
Gender (Female>Male)	12.2 (7.6, 16.8)
Age (per 10years)	1.3 (-1.5, 4.1)
Radiation dose (per Gy)	2.2 (0.1, 4.3)

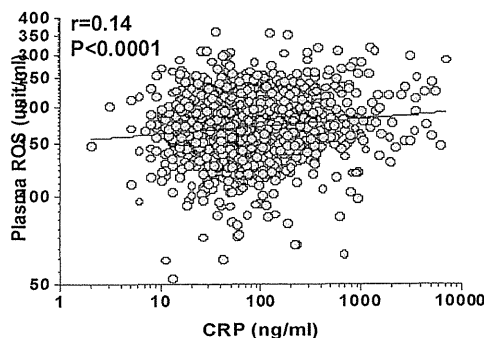


図1. CRPと血漿中ROSレベルの関係

2) 細胞内ROS測定: 原爆被爆者1,370名の細胞内ROS (H₂O₂およびO₂⁻) レベルに対する性差、年齢、放射線被曝の影響について調べた。その結果、細胞内H₂O₂レベルの年齢と放射線量に伴う変化は見られなかったが、細胞内O₂⁻レベルはリンパ球と顆粒球で女性に比べ男性で高く、年齢と放射線量に伴い増加していた。また、すべてのT細胞サブセットのO₂⁻レベルは女性に比べ男性で高く、年齢に伴い増加し、特に、CD3とCD8T細胞で放射線量に伴い増加していた(表2)。また、炎症指標であるCRPと細胞内ROSレベルの相関を調べた結果ではリンパ球と単球中ROSレベルではCRPと負の相関を示した。

3) ROS関連遺伝子多型の探索: 細胞内ROSレベルと様々な免疫・炎症関連遺伝子多型について調べた結果では、細胞内ROS (O₂⁻) レベルがIL6R遺伝子型によって有意に異なっていた。すなわち、IL6R遺伝子の-208番のプロモーター領域にある遺伝子多型で野生型(A/A)に比べ、ヘテロ接合体A/G、変異型ホモ接合体G/Gでは細胞内活性酸素量が有意に低いことを見出した(図2)。

表2. 血液細胞内ROS(O₂⁻)レベル

O ₂ ⁻ (HE)	Percent increment (95% CI)		
	Gender (Female>Male)	Age (10 year)	Radiation (Gy)
Cells			
Lymphocyte	-4.5 (-6.6, -2.4)	2.4 (0.9, 4.0)	1.9 (0.4, 3.3)
Monocyte	2.6 (0.2, 5.2)	2.6 (0.8, 4.4)	NS
Granulocyte	-6.4 (-8.3, -4.5)	4.5 (3.1, 6.0)	1.7 (0.4, 3.0)
CD3 total	-5.3(-7.3, -3.3)	3.5 (2.0, 5.0)	1.8 (0.4, 3.2)
CD4 total	-5.7 (-7.7, -3.6)	3.5 (2.0, 5.1)	NS
naïve	-5.2 (-7.1, -3.2)	1.8 (0.3, 3.3)	NS
memory	-5.5 (-7.6, -3.4)	2.7 (1.1, 4.3)	NS
CD8 total	-3.8 (-5.7, -1.9)	2.5 (1.1, 3.9)	1.3 (0.0, 2.6)
naïve	-4.5 (-6.2, -2.7)	2.8 (1.5, 4.1)	NS
memory	-3.5 (-5.4, -1.6)	2.0 (0.6, 3.5)	NS

The effects of changes in several predictor variables (sex, age, and linear radiation dose) were estimated using a multivariate linear regression model based on the log of the outcome variables. *(% increase), †not significant.

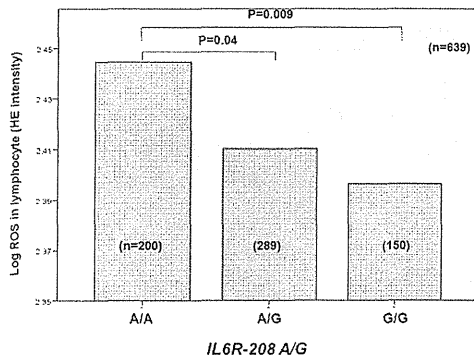


図2. *IL6R*遺伝子型と細胞内ROSレベルとの関係

D. 考察

活性酸素種 (ROS) は、ATP合成等により細胞において常に産生されるが、そのレベルは化学物質、放射線によるラジカル反応や感染/炎症による免疫細胞の活性化によって増加することが報告されている。ROSは免疫にとって重要な役割を果たしている一方、過剰のROSの産生・蓄積は組織およびDNAに損傷を引き起こすと共に、免疫能を低下させ、がん、冠動脈心疾患などの炎症関連疾患のリスクを高める可能性がある。今回の結果から、血漿中ROSレベルが有意ではないが、年齢とともに増加し、また、65年以上前の放射線被曝の線量とともに有意に増加していた。この血漿中ROSがCRPと有意な正の相関を示すことから血漿中ROSが血液中の炎症状態を示す指標として有用であり、原爆被爆者の長期的炎症状態を強く支持する結果であった。一方、細胞内ROSの測定結果において、特にリンパ球と顆粒球の細胞内O₂⁻レベルは年齢および被曝線量に比例して有意に増加するが、血漿中のROSレベルと負の関係を

示したことから、血漿中ROSは体内に蓄積された活性酸素量を表し、炎症との関係がある一方、細胞内活性酸素は細胞の活性化状態を示していると考えられた。この細胞内活性酸素量の個人差にはヒトの免疫において重要な役割を果たす*IL6R*遺伝子型が関与しており、免疫・炎症関連疾患発生と関係する可能性が示唆される。

E. 結論

血漿中ROS、細胞内ROSと炎症指標CRPとの関係から、血漿中ROSは体内に蓄積された活性酸素量を表し、細胞内活性酸素は主に細胞の活性化状態を示していると考えられた。また、細胞内ROSレベルの個人差にはヒトの免疫において重要な役割を果たす*IL6R*遺伝子型が関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. [Hayashi T](#), Ito R, Cologne J, Maki M, Morishita Y, Nagamura H, Sasaki K, Hayashi I, Imai K, Yoshida K, Kajimura J, Kyoizumi S, Kusunoki Y, Ohishi W, Fujiwara S, Akahoshi M, Nakachi K. Effects of *IL10* haplotype and atomic-bomb radiation exposure on gastric cancer risk. *Radiat Res.* in press.
2. [Hayashi T](#), Morishita Y, Khattree R, Misumi M, Sasaki K, Hayashi I, Yoshida K, Kajimura J, Kyoizumi S, Imai K, Kusunoki Y, Nakachi K. Evaluation of systemic markers of inflammation in atomic-bomb survivors with special reference to radiation and age effects, *FASEB J.* 26:4765-73, 2012.
3. Cologne J, Preston DL, Imai K, Misumi M,

Yoshida K, Hayashi T, Nakachi K.
Conventional case-cohort design and analysis
for studies of interaction, *Int J Epidemiol.*
41:1174-86, 2012.

4. Imai K, Hayashi T, Yamaoka M, Kajimura J, Yoshida K, Kusunoki Y, Nakachi K. Effects of NKG2D haplotypes on the cell-surface expression of NKG2D protein on natural killer and CD8 T cells of peripheral blood among atomic-bomb survivors. *Hum Immunol.* 73:686-91, 2012.

学会発表

1. 林 奉権、吉田健吾、大石和佳、京泉誠之、楠 洋一郎、加齢と放射線の影響に特に関連した原爆被爆者の炎症状態の評価、第41回 日本免疫学会総会・学術集会, 12月5-7日, 神戸, 2012
2. 京泉誠之、吉田健吾、林 奉権、van den Brink MRM、Moore MA、楠 洋一郎、ヒト循環造血前駆細胞におけるTおよびNK細胞産生能の評価、第41回 日本免疫学会総会・学術集会, 12月5-7日, 神戸, 2012
3. 大石和佳、Cologne JB、藤原佐枝子、林 奉権、丹羽保晴、植田慶子、柘植雅貴、茶山一彰、炎症性マーカーは肝細胞がんのリスクと関連する：コホート内症例対照研究、第63回 米国肝臓学会議, 11月8-14日, 米国マサチューセッツ州ボストン, 2012
4. 京泉誠之、久保美子、梶村順子、吉田健吾、今井一枝、林 奉権、van den Brink MRM、中地 敬、楠 洋一郎、ヒト血液前駆細胞における年齢にともなうリンパ球分化能のT細胞系からNK細胞系への偏移、第74回 日本血液学会, 10月19-21日, 京都, 2012
5. 林 奉権、今井一枝、京泉誠之、楠 洋一郎、中地 敬、CD14とOIL18遺伝子多形および放射線被曝線量に基づく原爆被爆者の結腸直腸がんリスクの推定、

第71回 日本癌学会学術総会, 9月19-21日, 札幌, 2012

6. 林 奉権、大石和佳、吉田健吾、今井一枝、林 幾江、梶村順子、京泉誠之、楠洋一郎、中地 敬、原爆被爆者コホートでみられた肝炎ウイルス感染と肝細胞発がんの免疫遺伝学的要因、第21回 日本組織適合性学会大会, 9月15-17日, 東京, 2012
7. 林 奉権、伊藤玲子、Cologne JB、林 幾江、今井一枝、吉田健吾、梶村順子、京泉誠之、大石和佳、赤星正純、楠 洋一郎、中地 敬、*IL10*ハプロタイプと原爆放射線被曝が胃癌リスクに及ぼす影響、第55回 日本放射線学会, 9月6-8日, 仙台, 2012
8. 林 奉権、放射線関連がんの分子疫学、第35回 日本がん疫学・分子疫学研究会総会, 7月5-6日, 広島, 2012
9. Cologne JB、三角宗近、今井一枝、Preston DL、吉田健吾、林 奉権、中地 敬、ケース・コホートデザインおよび遺伝子と環境の交互作用とがんとの関係に関する研究、第35回 日本がん疫学・分子疫学研究会総会, 7月5-6日, 広島, 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

研究分担者 楠 洋一郎 （公財）放射線影響研究所 放射線生物学/分子疫学部

研究要旨 ヒト造血系の放射線感受性の指標である赤血球グリコフォリン A (*GPA*) 突然変異頻度と赤血球造血機能との関係を検討する目的で原爆被爆者の末梢血 CD34 陽性造血幹細胞の赤芽球バースト形成能 (BFU-E) の解析を行った。BFU-E は放射線量依存性に低下していた ($P = 0.017$)。また、*GPA* 突然変異頻度と BFU-E には有意な負の関連性が認められた ($P = 0.020$)。これらの結果から、造血幹細胞における放射線誘発突然変異性の上昇は造血機能の低下に関係していることが示唆される。

A. 研究目的

原爆被爆者の赤血球グリコフォリン A (*GPA*) 遺伝子座の突然変異頻度は被ばく線量の増加に伴って上昇するが、その線量効果には大きな個人差がある。本研究では、放射線による遺伝子障害に高い放射線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をより強固なものにするため、*GPA* 突然変異頻度の個体差に関わる生物学的機序の解明を進めている。

原爆被爆者の赤血球に見られる *GPA* 変異は、寿命の長い造血幹細胞の *GPA* 変異に由来すると想定されている。また、放射線による造血幹細胞の遺伝子障害が重度である者ほど、その造血機能に異常が生じる可能性が考えられる。今回、末梢血 CD34 陽性細胞の赤血球造血機能を赤芽球バースト形成能 (BFU-E) にて評価し、放射線被ばくの影響および *GPA* 突然変異頻度との関係を検討した。

B. 研究方法

GPA 突然変異体頻度のデータは 1988-1996年の約8年間で放射線影響研究所(放影研) 成人健康調査対象者約1,902名について測定したものをを用いた。

BFU-E は、末梢血単核細胞を エリスロポイエチン、Kit リガンド、GM-CSF、および Mo 細胞培養上清 (IL-3 などが含まれる) 存在下、メチルセルロース中で14日間培養し、形成された赤芽球コロニー数を計測した。成人健康調査対象者941名について、

BFU-E 測定ならびにフローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞数計測を行い、CD34 陽性細胞100個あたりの BFU-E の割合 (%) を算出した。

統計解析は、SPSS により多重回帰解析にて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、国の疫学研究のガイドライン、ゲノム・遺伝子研究のガイドラインを遵守している。また、本研究に用いる血液試料は、医学研究およびヒトゲノム・遺伝子解析に関する同意文書に基づいて収集したものである。また、その使用は放影研の人権擁護調査委員会および遺伝子研究に関する倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

原爆被爆者の末梢血造血幹細胞の BFU-E は、男性で有意に高く ($P < 0.001$)、年齢で有意に低下していた ($P < 0.001$)。また、図1に示すように放射線量の増加に伴う BFU-E の低下が認められ ($P < 0.017$)、原爆放射線により造血幹細胞の赤血球造血機能が線量依存性に障害されていることが示唆された。

BFU-E 測定を行った941名の被爆者のうち、335名には *GPA* 突然変異解析のデータを得ることができた。図2に示すように、*GPA* 突然変異頻度と末梢血造血幹細胞の BFU-E には有意な負の関連性 ($P = 0.020$) が認められ、造血幹細胞における放射線誘発突然変異性と造血能の関係が示唆された。

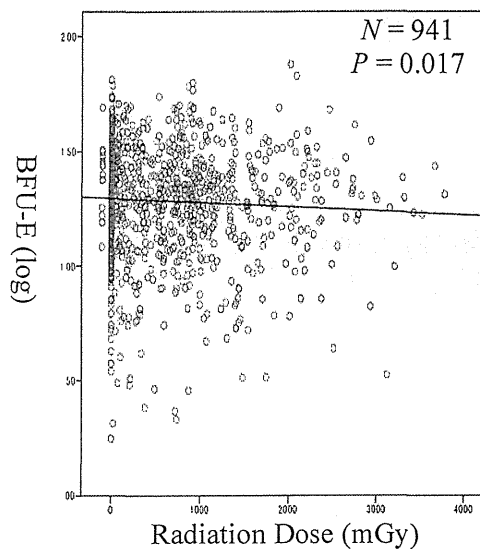


図1. 原爆被爆者の末梢血造血幹細胞 BFU-E の被ばく放射線量依存性の低下

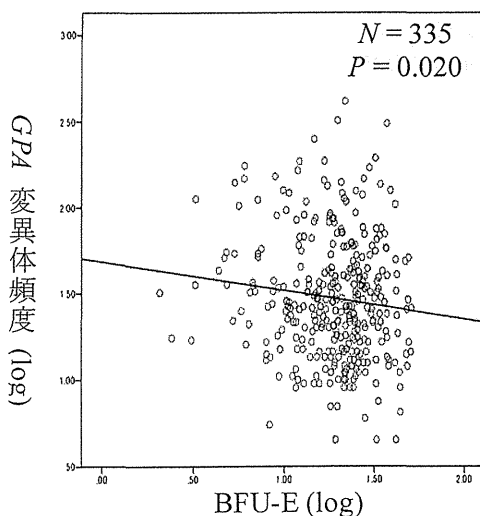


図2. 原爆被爆者における GPA 突然変異頻度と末梢血造血幹細胞 BFU-E の関係

D. 考察

造血幹細胞の遺伝子障害は、造血器腫瘍の発生要因となるばかりか、造血系の細胞老化や機能低下をもたらす機序のひとつと考えられている。他の臓器の放射線発がんにおいても、幹細胞の遺伝子障害と機能不全が関係していると思われる。今回、原爆被爆者の造血幹細胞の機能を末梢血 CD34 陽性細胞の BFU-E にて評価し、放射線被ばくの影響および GPA 突然変異頻度との関係を検討した。その結果、造血幹細胞にお

ける放射線誘発突然変異性の個人差がその機能の個人差に関係している可能性が示唆された。

近年、遺伝子損傷応答に関係する分子が造血幹細胞分化のコントローラーとして作用することが提唱されている。今回の研究結果は、放射線による遺伝子損傷応答の個人差と被ばく後の造血幹細胞分化能の個人差が関係することを示唆しており、この仮説を支持すると思われる。今後、発がんの追跡調査を行い、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を、放射線造血機能障害を含めて検討する。

原爆被爆者では、血液ヘモグロビンや BFU-E など赤血球造血機能のみならず T リンパ球産生も被ばく放射線量に依存した低下が観察されている。したがって、免疫系維持のための造血幹細胞機能も放射線によって障害されている可能性が考えられる。放射線による造血幹細胞の遺伝子障害とリンパ系細胞産生能との関係を調べていく予定である。

E. 結論

原爆被爆者の末梢血造血幹細胞 BFU-E 解析により、放射線被ばくによる線量依存性の造血機能低下が認められた。また、GPA 突然変異頻度と BFU-E に負の関連性が認められ、造血幹細胞の遺伝子損傷と機能低下の関係が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Wang C, Nakamura S, Oshima M, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Kusunoki Y, Kyoizumi S, Imai K, Nakachi K, Iwama A. Compromised hematopoiesis and increased DNA damage following non-lethal ionizing radiation of a human hematopoietic system reconstituted in immunodeficient mice. *Int J Radiat Biol*, 2013; 89(2):132-7.

Taga M, Eguchi H, Shinohara T, Takahashi K, Ito R, Yasui W, Nakachi K, Kusunoki Y, Hamatani K. Improved PCR amplification for molecular analysis using DNA from long-term preserved formalin-fixed, paraffin-embedded

lung cancer tissue specimens. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013; 6(1):76-9.

Hamatani K, Mukai M, Takahashi K, Hayashi Y, Nakachi K, Kusunoki Y. Rearranged anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene in adult-onset papillary thyroid cancer among atomic-bomb survivors. *Thyroid*, 2012; 22(11): 1153-1159.

Hayashi T, Morishita Y, Khattree R, Misumi M, Sasaki K, Hayashi I, Yoshida K, Kajimura J, Kyoizumi S, Imai K, Kusunoki Y, Nakachi K. Evaluation of systemic markers of inflammation in atomic-bomb survivors with special reference to radiation and age effects. *FASEB J*, 2012; 26(11):4765-73.

Imai K, Hayashi T, Yamaoka M, Kajimura J, Yoshida K, Kusunoki Y, Nakachi K. Effects of NKG2D haplotypes on the cell-surface expression of NKG2D protein on natural killer and CD8 T cells of peripheral blood among atomic-bomb survivors. *Hum Immunol*, 2012; 73(6):686-91.

2. 学会発表

Hamatani K, Mukai M, Takahashi K, Hayashi Y, Nakachi K, Kusunoki Y. Characteristics of adult-onset papillary thyroid cancer with rearranged *ALK* gene in atomic bomb survivors. The 36th Annual Meeting of the European Thyroid Association, 8-12 September, Pisa, Italy

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 2012/7/12-13 広島

濱谷清裕、向井真弓、高橋恵子、林 雄三、中地 敬、楠 洋一郎. 原爆被爆者に発生した甲状腺乳頭がんの遺伝子変異の特徴. 第35回 日本がん疫学・分子疫学研究会総会 2012/7/5-6 広島

楠 洋一郎、吉田健吾、久保美子、山岡美佳、梶村順子、林 奉権、中島栄二、大石和佳、藤原佐枝子、箱田雅之、赤星正純. 原爆放射線のヒト免疫応答に及ぼす影響 第26報:末梢血リンパ球における Th1 および Th2 細胞の割合の被ばく線量依存性増加第53回. 原子爆弾後障害研究会 2012/6/3 長崎

濱谷清裕、高橋恵子、中地 敬、楠 洋一郎. 放射線被曝と関連した成人甲状腺乳頭発がんの初期分子事象の特徴. 第71回

日本癌学会学術総会 2012/9/19-21札幌

京泉誠之、久保美子、梶村順子、吉田健吾、今井一枝、林 奉権、van den Brink MRM、中地 敬、楠 洋一郎. ヒト血液前駆細胞における年齢にともなうリンパ球分化能の T 細胞系から NK 細胞系への偏移、第74回 日本血液学会, 10月19-21日, 京都, 2012

鵜飼明子、濱崎幹也、児玉喜明、野田朝男、楠 洋一郎、本間正充. DNA マイクロアレイによるヒト正常細胞での放射線損傷領域のゲノムマッピング. 第41回 日本環境変異原学会 2012/11/29-/30 静岡

京泉誠之、吉田健吾、林 奉権、van den Brink MRM、Moore MA、楠 洋一郎. ヒト循環造血前駆細胞における T および NK 細胞産生能の評価、第41回 日本免疫学会総会・学術集会, 12月5-7日, 神戸, 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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yasui W, Oue N, Sentani K and Tan DF	Molecular diagnostics of esophageal and gastric cancers	Dongfeng Tan, Henry Lynch	Principle of molecular diagnostics and personalized cancer medicine	Lippincott Williams & Wilkins	Philadelp hia	2012	356-367
Ishikawa Y and Matsubara O	Molecular biology and pathology of lung cancer: genotype- morphology correlation	Dongfeng Tan, Henry Lynch	Principle of molecular diagnostics and personalized cancer medicine	Lippincott Williams & Wilkins	Philadelp hia	2012	308-322

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takami H, Sentani K, Matsuda M, Oue N, Sakamoto N and Yasui W	Cytokeratin expression profiling in gastric carcinoma: clinicopathologic significance and comparison with tumor- associated molecules	Pathobiology	79	154-161	2012
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
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	Gastroenterolo gy	142	292-304	2012
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

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
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
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
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
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
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
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
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

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
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		2013
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
Mori R, Yoshida K, Tanahashi T, Yawata K, Kato J, Okumura N, Tsutani Y, Okada M, Oue N and Yasui W	Decreased FANCD1 contributes to the increased sensitivity to oxaliplatin in gastric cancer cells	Gastric Cancer	In press		2013
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
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	82	169-176	2013
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	13	8	2013