

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-24 (miR-24) およびCAST法で同定したFKTN (fukutin) 遺伝子の発現を解析し，さらに，胃がんにおける非翻訳RNAをコードする超保存領域 (T-UCR) について研究を行なった。放射線影響研究所のLife Span Study (LSS) 集団に発生した56例の胃がん症例では，miR-24の発現レベルは，性，年齢，進行度，組織型と相関はなかったが，被曝線量が100mGy以上の症例では100mGy以下の症例に比較し有意にmiR-24Hが多かった (P=0.0475)。また，通常集団に発生した胃がん36例の内22例 (61%) において，miR-24の発現レベルが非がん部と比較し2倍以上に亢進していた。LSS症例86例におけるfukutinの発現は，高分化腺がんが多く，被曝線量を10mGy，100mGy，500mGyの上下いずれに分けても，被曝線量の高い症例では低い症例に比較して有意にfukutin陽性例が少なかった (P=0.0114, P=0.0160, P=0.030369)。胃がん細胞株を用いたFKTNノックダウンにおいて，細胞増殖が有意に抑制された。28種類のT-UCRの発現解析から，多くのT-UCRが胃がんで抑制されており，特にUc.158+Aでは，胃がん細胞において高メチル化による発現抑制が確認された。一方，Uc.416+A, 420+Aの発現は亢進していた。以上，miR-24とfukutinは，放射線関連がんの新しいマーカーとなることが示された。また，T-UCRの発現と臨床病理学的事項および放射線被曝との比較により，発現プロファイルによる診断への応用の可能性が示唆された。

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となっている。一方，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。本研究全体としては，発がんの分子基盤を放射線障害と宿主要因の面から解析し，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としている。

放射線に関連した固形がんの発がん機構の解明とそれに基づくリスク評価や診断・治療法の開発は，職業・医療被曝の管理，被爆者医療の向上に資するものである。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では，DNAメチル化とともに，microRNA (miRNA)を介した遺伝子・蛋白の発現制御が重要である。本分担研究では，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，CAST (Escherichia coli ampicillin secretion trap) 法などを用いた網羅的遺伝子発現解析を通じて同定されたがん特異的発現遺伝子の放射線関連がんにおける発現検証を行なう。これらにより，放射線関連固形がんの新しい診断法・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，被爆者に発生した胃がんについてmiRNAの発現・機能解析を行ない，さらに，非翻訳RNAをコードする超保存領

域 (Transcribed Ultraconserved Regions: T-UCR) の発現解析を行なった。さらに、CAST法による遺伝子発現解析で同定したFKTN (fukutin)について、被爆者に発生した胃癌における発現を検討した。

B. 研究方法

1) 被爆者に発生した胃癌における miRNA の発現解析

被爆者に発生した胃癌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 等を既に報告している。本年度は、通常集団に発生した胃癌 36 例と放射線影響研究所の Life Span Study (LSS) 集団に発生した胃癌 56 例の FFPE 切片を対象として、上記 4 つの mi-RNA の発現レベルを定量的 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。miR の発現レベルは、そのレベルが中央値より高いものを high (H), 低いものを low (L) としてとして解析した。

2) 胃癌における非翻訳 RNA をコードする超保存領域 (T-UCR) の発現解析

代表的な 28 種類の T-UCR (Uc.1, 73, 118+A, 158+A, 181+A, 184, 234+A, 241+A, 244, 249, 252+A, 261, 282, 291+1, 317, 327, 345, 346, 349, 359, 366, 385, 389, 390, 416+A, 420+A, 427+A, 454+A) について、胃癌細胞株 (MKN-45, MKN-74, HSC-57) と正常胃粘膜組織における発現を定量的 RT-PCR で検討した。さらに胃癌細胞で特徴的に発現が亢進あるいは低下していた T-UCR については、臨床検体約 20 症例について、がん部・非がん部における発現レベルを比較した。さらに、発現低下する T-UCR については、メチル化との関連を検討した。

3) CAST法で同定した分泌蛋白コード遺伝子FKTNの被爆者に発生した胃癌における発現と機能解析

胃癌細胞株 (MKN-1, HSC-57) に対する CAST 法によるがん特異的分泌蛋白コード遺伝子の発現解析から、両細胞株に共通して高発現する遺伝子として、FKTN (fukutin) を同定した。そこで、fukutin の発現を、通常集団に発生した胃癌 695 例と放射線影響研究所の LSS 集団に発生した胃癌 86 例について免疫染色 (一部は定量的 RT-PCR) で検討した。さらに、胃癌細胞株を用いて、FKTN-siRNA ノックダウンの細胞増殖、浸潤に及ぼす影響を検討した。

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癌における miRNA の発現解析

LSS 症例 56 例における miR-21, miR-34a, miR-106a の発現レベルは、性、年齢、進行度、組織型および被曝線量と明らかな相関は認められなかった。miR-24 の発現レベルも、性、年齢、進行度、組織型と相関はなかったが、被曝線量が 100mGy 以上の症例では 100mGy 以下の症例に比較し有意に miR-24H が多かった (P=0.0475)。また、通常集団に発生した胃癌 36 例の内 22 例 (61%) において、miR-24 の発現レベルが非がん部と比較し 2 倍以上に亢進していた。

2) 胃がんにおける非翻訳 RNA をコードする超保存領域 (T-UCR) の発現解析

胃がん細胞株 3 株と正常胃粘膜組織における比較において、胃がん細胞株では Uc.416+A, 420+A の発現が亢進し、118+A, 158+A など多くの T-UCR の発現は低下していた。416+A の発現上昇は、胃がん臨床検体 20 例でも確認された (P=0.0094)。一方、胃がん細胞株を脱メチル化剤 5-Aza-dC で処理したところ、118+A, 158+A, 251, 291+1 の 4 つの領域で、濃度依存性の発現回復を認めた。158+A の上流に CG リッチな領域が認められ、バイサルファイトシーケンスによる詳細なメチル化解析を行った結果、胃がん細胞では高率にメチル化されており、正常胃粘膜組織ではメチル化頻度は低かった。

3) CAST法で同定した分泌蛋白コード遺伝子FKTNの被曝者に発生した胃がんにおける発現と機能解析

FKTN・fukutinの過剰発現は、定量的 RT-PCRでは32% (9/28)、免疫染色では43% (297/695) の胃がんでは認められ、fukutin陽性例は、高分化腺がんに多く、深達度、リンパ節転移と有意な相関が認められた。粘液形質との関連では、CD10陽性例でfukutin陽性例が有意に高頻度であった。さらに胃がん細胞株を用いたFKTNノックダウン系による機能解析において、浸潤能には変化はなかったが、細胞増殖が有意に抑制された。LSS症例86例におけるfukutinの発現は、高分化腺がんに多く、さらに、被曝線量を10mGy, 100mGy, 500mGyの上下いずれに分けても、被曝線量の高い症例では低い症例に比較して有意にfukutin陽性例が少なかった (P=0.0114, P=0.0160, P=0.030369)。

D. 考察

本年度の解析により、miR-24の発現レベルが高被曝群で有意に高いことが明らかとなった。miR-24は、EGFRを脱リン酸化する PTPN9やPTPRF、さらにp27, p16を標的遺

伝子とする。乳がんでは発現が亢進しており、EGFRをリン酸化し細胞増殖能、浸潤能を促進することが知られている。IL-6に誘導されるSTAT3により発現が誘導され、炎症との関わりが想定されている。さらに、筋線維芽細胞においてはTGF- β によりmiR-24の発現が誘導される。昨年度までの検討で、miR-143とmiR-145は、独立した放射線関連胃がんのマーカーであることを見いだしているが、これらも間質線維芽細胞に発現し、TGF- β で発現が制御される。miR-24の放射線発がんにおける役割ならびに炎症との関連は今後の検討課題である。

ヒトゲノムには少なくとも481個の非翻訳RNAをコードするT-UCRが存在し、いくつかのT-UCRはがんとの関連が指摘されているが、その発現の詳細や機能については不明な点が多い。今回の検討で、多くのT-UCRの発現は胃がんで抑制されていることが分かった。さらに、発現が抑制されているUc.158+Aでは、胃がん細胞においてプロモーター領域が高率にメチル化されており、脱メチル化剤処理により発現が回復したことから、一部のT-UCRの発現はメチル化によって制御されていることが明らかとなった。一方で、少ないながらも胃がんで発現亢進を示すT-UCRが存在し、416+Aでは臨床例でも胃がんにおける発現亢進が確認された。これらT-UCRの発現と臨床病理学的事項および放射線被曝との比較により、発現プロファイルによる診断への応用の可能性が示唆される。また、特徴的なT-UCRの同定と機能解析によって、新しい切り口の放射線発がん機構の解明が進むものと期待される。

CAST法で同定したFKTNは、fukutin蛋白をコードしており、福山型先天性筋ジストロフィー (FCMD) の原因遺伝子である。fukutinはシグナルシーケンスを有し、分泌蛋白質であり、細胞ではゴルジに局在する。FCMDでは α -dystroglycanのglycosylationが低下しており、糖鎖修飾にかかわっているものと想定されている。がん細胞においてFKTNをノックダウンすると

細胞増殖能が増加したことからがん抑制機能を持つとする報告があるが、詳細は不明である。今回の検討では、胃がんの30-40%において *fukutin* の過剰発現が認められ、FKTNのノックダウンによって細胞増殖が有意に抑制された。胃がんに関してはがん遺伝子の機能が想定される。詳細な機能解析とともに、なぜ被曝線量の多い胃がんでは *fukutin* 陽性例が少ないかを明らかにする必要がある。

E. 結論

LSS症例に発生した胃がんにおける miR-24の発現解析から、被曝線量が100mGy以上の症例では100mGy以下の症例に比較し有意にmiR-24高発現例が多かった。LSS症例における *fukutin* の発現は、被曝線量を10mGy, 100mGy, 500mGyの上下いずれに分けても、被曝線量の高い症例では低い症例に比較して有意に *fukutin* 陽性例が少なかった。これらは、新しい放射線関連がんのマーカーとなることが期待される。放射線発がん機構における関与は今後の課題である。T-UCRの発現解析と臨床病理学的事項および放射線被曝との比較、さらに機能解析により、T-UCR発現プロファイルによる診断への応用の可能性が示唆された。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. 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

2. 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, 2013
3. 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
4. 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
5. Shinmei S, Sakamoto N, Goto K, Sentani K, Anami K, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A, Oue N, Kitadai Y and Yasui W: MicroRNA-155 is a predictive marker for survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Int J Urol* 20:468-477, 2013
6. Mori R, Yoshida K, Tanahashi T, Yawata K, Kato J, Okumura N, Tsutani Y, Okada M, Oue N and Yasui W: Decreased FANCD1 caused by 5FU contributes to the increased sensitivity to oxaliplatin in gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 16:345-354, 2013
7. 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* 62:1018-1027, 2013

8. Sawada T, Yashiro M, Sentani K, Oue N, Yasui W, Miyazaki K, Kai K, Fujita H, Nakamura K, Maeda K, Kakeji Y, Natsugoe S, Shirabe K, Nomura S, Shimada Y, Tomiya N, Hirakawa K and Maehara Y: New molecular staging with G-factors (VEGF-C and Reg IV) by supplementing TNM classification in colorectal cancers. *Oncol Rep* 30:2609-2616, 2013
9. Taga M, Eguchi H, Shinohara T, Takahashi K, Ito R, Yasui W, Nakachi K, Kusunoki Y and 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* 6:76-79, 2013
10. Onoyama M, Kitadai Y, Tanaka Y, Yuge R, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: Combining molecular targeted drugs to inhibit both cancer cells and activated stromal cells in gastric cancer. *Neoplasia* 15:1391-1399, 2013
11. Reynolds A, Wharton N, Parris A, Mitchell E, Sobolewski A, Bigwood L, El Hadi A, Munsterberg A, Kewis M, Speakman C, Stebbings W, Wharton R, Sargen K, Tighe R, Jamieson C, Hernon J, Kapur S, Oue N, Yasui W and Williams M: Canonical Wnt signals with suppressed TGFbeta/BMP pathways promote renewal of the native human colonic epithelium. *Gut* 63:610-623, 2014
12. Oue N, Anami K, Schetter AJ, Moehler M, Okayama H, Khan MA, Bowman ED, Mueller A, Schad A, Shimomura M, Hinoi T, Aoyagi K, Sasaki H, Okajima M, Ohdan H, Galle PR, Yasui W and Harris CC: High miR-21 expression from FFPE tissues is associated with poor survival and response to adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Int J Cancer* 134:1926-1934, 2014
13. Uraoka N, Oue N, Sakamoto N, Sentani K, Oo HZ, Naito Y, Noguchi T and Yasui W: NRD1, which encodes nardilysin protein, promotes esophageal cancer cell invasion through induction of MMP2 and MMP3 expression. *Cancer Sci* 105:134-140, 2014
14. Sakamoto N, Naito Y, Oue N, Sentani K, Uraoka N, Oo HZ, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W: MiR-148a is down-regulated in gastric cancer, targets MMP7 and indicates tumor invasiveness and poor prognosis. *Cancer Sci* 105:236-243, 2014
15. Naito Y, Sakamoto N, Oue N, Yashiro M, Sentani K, Yanagihara K, Hirakawa K and Yasui W: MicroRNA-143 regulates collagen type III expression in stromal fibroblasts of scirrhous type gastric cancer. *Cancer Sci* 105:228-235, 2014
16. Oo HZ, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oshima T, Yanagihara K, Oue N and Yasui W: Identification of novel transmembrane proteins in scirrhous type gastric cancer by Escherichia coli ampicillin trap (CAST) method: TM9SF3 participates in tumor invasion and serves as a prognostic factor. *Pathobiology* 81:138-148, 2014
17. Shinmei S, Hayashi T, Sakamoto N, Goto K, Sentani K, Matsubara A, Oue N, Kuniyasu H and Yasui W: Identification of PRL1, a novel diagnostic and therapeutic target for castration resistant prostate cancer by the Escherichia Coli ampicillin secretion trap (CAST) method. *Urologic Oncology* (in press)
18. Goto K, Oue N, Hayashi T, Shinmei S, Sakamoto N, Sentani K, Teishima J, Matsubara A and Yasui W: Expression of novel biomarkers identified by Escherichia coli ampicillin secretion trap: Oligophrenin-1 is associated with cell adhesion and migration in prostate cancer. *Pathobiology* (in press)
19. Oo HZ, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Uraoka N, Oshima T, Yanagihara K, Oue N and Yasui W: Overexpression of

ZDHHC14 promotes migration and invasion of scirrhous type gastric cancer. *Oncol Rep* (in press)

20. Oue N, Naito Y, Hayashi T, Takigahira M, Kawano-Nagatsuma A, Sentani K, Sakamoto N, Oo HZ, Uraoka N, Yanagihara K, Ochiai A, Sasaki H and Yasui W: Signal peptidase complex 18, encoded by SEC11A, contributes to progression via TGF- α secretion in gastric cancer. *Oncogene* (in press)

学会発表

1. Naito Y, Sakamoto N, Uraoka N, Sentani K, Oue N, Tashiro M, Hirakawa K and Yasui W: Function of microRNA-143 and its potential of prognostic factor in scirrhous type gastric cancer. The 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., Maryland (USA), April 4-10, 2013
2. Oue N, Hayashi T, Yakigahara M, Nagatsuma A, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Uraoka N, Naito Y, Yanagihara K, Ochiai A, Sasaki H and Yasui W: SEC11A contributes to malignant progression through promotion of EGF and TGF- α secretion. The 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., Maryland (USA), April 4-10, 2013
3. Oo HZ, Sakamoto N, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N, Yanagihara K and Yasui W: ZDHHC14, a potential regulator of peritoneal dissemination of scirrhous type gastric carcinoma, identified by CAST method. The 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., Maryland (USA), April 4-10, 2013
4. Yasui W: Biomarker for gastric cancer. Commemorative Symposium for the 2nd anniversary of SNUCH (Seoul National University Cancer Hospital), **Special Lecture**, Seoul (Korea), April 12-13, 2013
5. Hayashi T, Sentani K, Black PC, Goto K, Shinmei S, Teishima J, Anami K, Yasui W and Matsubara A: TSPAN8 expression in renal cell carcinoma is a poor prognostic factor and a novel therapeutic target. Annual Meeting of the American Urological Association 2013, San Diego, California (USA), May 4-8, 2013
6. Yasui W: HP and carcinogenesis –Pathogenesis and novel diagnostic and therapeutic target. 10th International Gastric Cancer Congress, **Symposium 2** “HP and Carcinogenesis”, Verona (Italy), June 19-22, 2013
7. Sakamoto N, Naito Y, Oue N, Sentani K, Uraoka N, Oo HZ, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H and Yasui W: miR-148a, down-regulated in gastric cancer, targets MMP7 and participates in tumor invasion and poor prognosis. 10th International Gastric Cancer Congress, Verona (Italy), June 19-22, 2013
8. Oshima T, Sakamoto N, Sato T, Cho H, Yukawa N, Yoshikawa T, Rino Y, Kunisaki C, Yasui W, Imada T and Masuda M: Search for biomarkers of stage II/III gastric cancer and development of individualized therapy. 10th International Gastric Cancer Congress, Verona (Italy), June 19-22, 2013
9. Goto K, Hayashi T, Shinmei S, Sakamoto N, Sentani K, Oue N, Teishima J, Matsubara A and Yasui W: Expression analysis of novel biomarkers identified by Escherichia coli ampicillin secretion trap: Oligophrenin-1 is associated with cell adhesion and migration in prostate cancer. The 33rd Congress of the International Society of Urology, Vancouver (Canada), September 8-12, 2013
10. Yasui W, Oue N, Anami K, Oo HZ and Sentani K: Novel biomarkers and therapeutic targets of gastric cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances in Gastric Cancer Research “From

- Basic Science to Therapeutics”. Urayasu, Chiba (Japan), December 16-18, 2013
11. Oo HZ, Sakamoto N, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N, Oshima T, Yanagihara K, Yasui W: ZDHHC14, identified by CAST method, is a putative regulator for peritoneal dissemination of scirrhous-type gastric cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, Urayasu, Chiba (Japan), December 16-18, 2013
 12. Naito Y, Sakamoto N, Uraoka N, Sentani K, Oue N and Yasui W: Role of microRNA-143 and its potential of prognostic factor in scirrhous type gastric cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, Urayasu, Chiba (Japan), December 16-18, 2013
 13. Onoyama M, Kitadai Y, Tanaka Y, Yuge R, Shinagawa K, Tanaka S, Yasui W and Chayama K: Combining molecular target drugs to inhibit cancer-stromal cell interaction in gastric cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, Urayasu, Chiba (Japan), December 16-18, 2013
 14. 多賀正尊, 向井真弓, 小山和章, 伊藤玲子, 三角宗近, 中地 敬, 楠洋一郎, 安井 弥, 濱谷清裕: 予備的研究: 原爆被爆者肺腺がんにおけるALK遺伝子再配列の解析. 第54回原子爆弾後障害研究会, 6月2日, 広島, 2013
 15. 伊藤玲子, 濱谷清裕, 矢野志保, 篠原智子, 高橋恵子, 安井 弥, 中地 敬, 楠洋一郎: 原爆被爆者の大腸がんにおけるマイクロサテライト不安定性とMLH1変化. 第54回原子爆弾後障害研究会, 6月2日, 広島, 2013
 16. 大上直秀, 阿南勝宏, 仙谷和弘, 坂本直也, 浦岡直礼, 安井 弥: CAST法を用いた胃癌細胞表面マーカーの同定: TSPAN8の胃癌における解析. 第102回日本病理学会総会, 6月6-8日, 札幌, 2013
 17. 内藤 寛, 坂本直也, 安野恭平, 浦岡直礼, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: microRNA-143のスキルス胃癌における機能と腫瘍マーカーとしての有用性. 第102回日本病理学会総会, 6月6-8日, 札幌, 2013
 18. 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異変. 第102回日本病理学会総会, 6月6-8日, 札幌, 2013
 19. Oo HZ, 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: Differential gene expression of two scirrhous type gastric cancer cell lines, analyzed by CAST method. 第22回日本がん転移学会学術集会・総会, ワークショップ1, 7月11-12日, 松本, 2013
 20. 安達智洋, 檜井孝夫, 佐々木由布, 新津宏明, 斎藤保文, 三口真司, 下村 学, 大上直秀, 安井 弥, 大段秀樹: 左結腸癌モデル (CPC;Apc) マウスを使用した大腸癌発育浸潤因子の同定と臨床応用に向けて. 第24回日本消化器癌発生学会, ワークショップ2, 9月5-6日, 金沢, 2013
 21. 内藤 寛, 坂本直也, 浦岡直礼, 仙谷和弘, 大上直秀, 八代正和, 平川弘聖, 安井 弥: スキルス胃癌形態形成におけるmiR-143の役割と腫瘍マーカーとしての有用性. 第72回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 横浜, 2013
 22. 安井 弥, 坂本直也, 日比野佑美, Htoo Zarni Oo, 大上直秀: 大腸癌におけるmiR-148aの発現と予後との関連. 第72回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 横浜, 2013
 23. 坂本直也, Htoo Zarni Oo, 仙谷和弘, 大上直秀, 安井 弥: 大腸癌におけるTransmembrane 9 super family member 3 (TM9SF3) の発現とβ-カテニンとの関連. 第72回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 横浜, 2013
 24. 藤國宣明, 山本英喜, 内藤 寛, 坂本直也, 田中友加, 五十嵐友香, 三隅俊博,

- ボウ ダン, 鈴木崇久, 徳本憲昭, 田邊和照, 安井 弥, 大段秀樹: 低酸素が誘導する胃癌細胞浸潤能促進因子CD24の発現はHIF-2aによって制御される. 第72回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 横浜, 2013
25. 品川 慶, 北台靖彦, 田中雄一郎, 弓削亮, 釜山美恵子, 田中信治, 安井 弥, 茶山一彰: 骨髄由来間葉系幹細胞はヒト大腸癌においてメタロチオネインを誘導する. 第72回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 横浜, 2013
26. 岡 清貴, 亭島 淳, 正路晃一, 後藤景介, 永松弘孝, 神明俊輔, 大原慎也, 林哲太郎, 大上直秀, 安井 弥, 松原昭郎: 前立腺癌細胞におけるRegIVの発現は細胞増殖および化学療法耐性を増強する. 第72回日本癌学会学術総会, 10月3-5日, 横浜, 2013
27. 大上直秀, 内藤 寛, 永妻晶子, 仙谷和弘, Oo Htoo Zarni, 浦岡直礼, 柳原五吉, 落合淳志, 佐々木博己, 安井 弥: SPC18は TGF- α の分泌を促進し胃癌の進行に関与する. 第86回日本胃癌学会総会, パネルディスカッション5, 3月20-22日, 横浜, 2014

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・病理部長

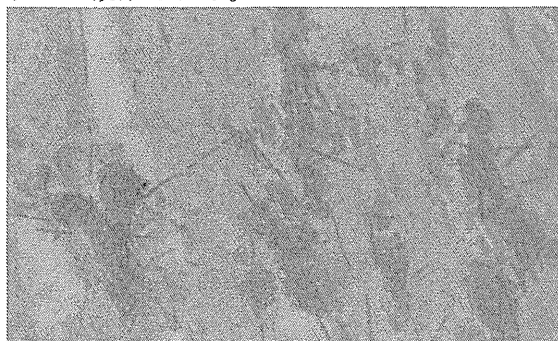
研究要旨 放射線治療が原因で発生する癌があり、放射線二次癌と呼ばれる。本研究では、昨年まで、放射線治療後に発生した癌の登録を行ってきた。本年度は、 α 粒子を放射する血管造影剤トロトラスト注入者に発生した肝癌におけるmiRNA発現パターンを、一般の肝癌と比較した。その結果、トロトラスト肝癌は、一般の肝癌と異なるパターンを示した。しかし、非腫瘍部分同士の比較でも差があり、更なる検討が必要である。

A. 研究目的

本課題では、治療や検査などで放射線被ばくを受け、それが原因と考えられる癌を発症した症例を収集し、放射線によるがんの病理学的・遺伝子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。

本年度は、X線造影剤であるトロトラスト（Thorotrast）注入を受けた人に発生した肝癌においてmiRNA発現を網羅的に解析し、その結果を一般の肝癌と比較した。トロトラストは、二酸化トリウムを25%含む造影剤で、Th-232とその娘核種からの α 放射線により、沈着部位で肝がん、白血病などが発生した。

図1. トロトラスト沈着肝のautoradiography. トロトラスト顆粒から、多数の α 粒子のトラックが観察される。



B. 研究方法

トロトラスト被注入者2例（60才、71才、いずれも男性、肝線量率は各々100および270mGy/年、潜伏期は38、35年）に発生し

表1 検索した症例。トロトラスト例2例、対照例2例。

番号	年齢/性別	組織型	肝線量率 (mGy/y)	潜伏期間 (yr)
T94	60/m	肝細胞癌	100	38
T99	71/m	肝細胞癌	270	35
1300230	72/m	肝細胞癌	0	-
1301270	78/m	肝細胞癌	0	-

た肝がん（肝細胞癌）のホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いて、網羅的miRNA解析を行ない、一般の肝がん（肝細胞癌、HCV陽性）と比較した。マイクロアレイは、Agilent社 SurePrint G3 Human miRNA microarray 8x60K (v19), 1222 miRNA, 146 human viral miRNA (2027 probes) (ID: 46064)を使用した。解析は、GeneSpring v 12.6.1を用いて、階層クラスタ解析などを行った。

（倫理面への配慮）

本研究は遡及的研究であり、患者への害はない。実験的操作に当たっては、連結可能匿名化を行うなど、個人情報厳重に保護している。

C. 研究結果

トロトラスト被注入者に発生した肝癌2例を比較したところ、miRNAの発現パターンは良く一致していた（図2）。

一方、トロトラスト肝癌（T94）と対照例の肝癌（1300230）とは、そのパターンは大きく異なった（図3）。さらに、トロトラス

図2. トロトラスト肝癌2例（縦軸は症例T94、横軸はT99）miRNA発現パターンの比較。

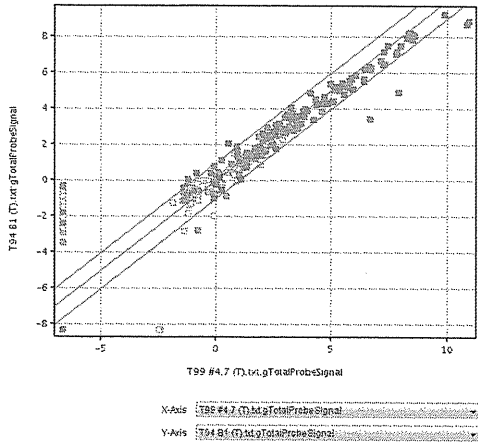


図3. トロトラスト肝癌 (T94) と非トロトラスト対照例 (H1300230) との比較。

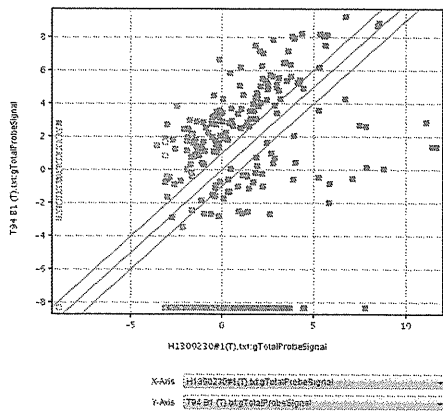
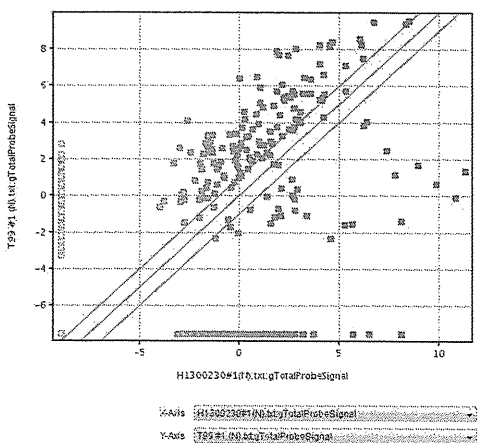
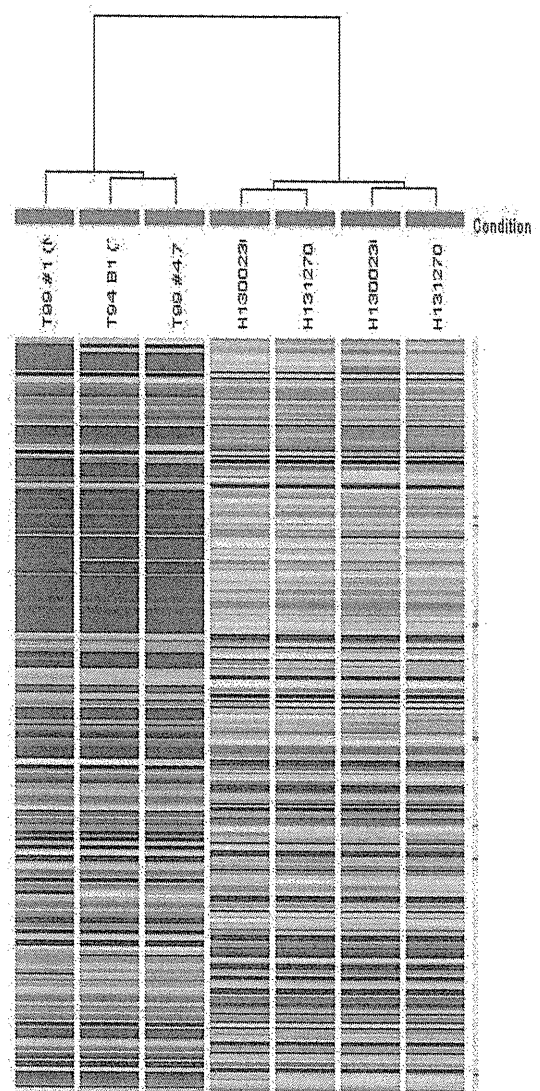


図4. トロトラスト例の正常肝と対照例の正常肝での、miRNA発現比較。



ト症例の正常組織と対照例の正常組織との比較でも、miRNA発現パターンは大きく異なった(図4)。次いで、教師なしの階層クラスタ解析を、トロトラスト肝癌2個、同腫瘍組織1個、および対照例の肝癌2個、正常組織2個の検体を用いて行った。この解析では、独立したトロトラスト肝癌のクラスターは、同定されず、トロトラスト症例からの3個の検体、および対照群からの4個の検体が別々にクラスターされた(図5)。

図5. トロトラスト症例からの3検体、対照症例からの4検体を用いた、教師なしの階層クラスタ解析。腫瘍と非腫瘍とはなく、トロトラスト症例(左3例)と対照例(右4例)とが独立したクラスターを形成した。



トロトラスト肝癌と対照例の肝癌とでは、2027 probesのうち、 $p < 0.05$ で有意差のあるもの258個、 $p < 0.001$ で21個が同定された。

D. 考察

本研究では、肝細胞癌のなかで、放射線誘発と推定されるトロトラスト注入後のものと、肝炎ウイルス抗体陽性患者のものとを比較して、放射線誘発signatureとなるmiRNAの発現パターンを検出しようと試みた。その結果、腫瘍同士の間では有意差のあるmiRNAを検出できたが、非腫瘍部分同士の比較でも、大きな差が見られ、全検体を用いた教師なしの階層クラスタリングでも、腫瘍と非腫瘍ではなく、トロトラスト例と対照例とに分かれた。

このことから、(i) トロトラスト例では、腫瘍でも非腫瘍部分でも、miRNAの発現パターンに対照例と差がある可能性、(ii) トロトラストの検体でmiRNAが変性している可能性、が考えられる。

今回検索した症例は、トロトラスト例は古いものであり、対照例は昨年の症例であって、保存期間の差が原因である可能性もある。また、トロトラスト検体では、RNAの収量が少なく、長鎖RNAがほとんどなかった。miRNA自体は短鎖であるが、RNA全体の品質を示唆している可能性もある。

E. 結論

トロトラスト肝癌症例2例を、肝炎ウイルスによる2例と比較した結果、腫瘍組織のみならず、非腫瘍組織でもmiRNAの発現に差が見られた。さらに、検討が必要である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ono H, Motoi N, Nagano H, Miyauchi E, Ushijima M, Matsuura M, Okumura S, Nishio M, Hirose T, Inase N, Ishikawa Y. Long non-coding RNA HOTAIR is relevant to cellular proliferation, invasiveness and clinical relapse in small cell lung cancer. *Cancer Med*. 2014 Mar 3. doi: 10.1002/cam4.220. [Epub ahead of print]
Hamanaka W, Motoi N, Ishikawa S, Ushijima M, Inamura K, Hatano S, Uehara H,

Okumura S, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, Aburatani H, Matsuura M, Iwasaki A, Ishikawa Y. A subset of small cell lung cancer with low neuroendocrine expression and good prognosis: a comparison study of surgical cases to inoperable cases with biopsy. *Hum Pathol* (in press)

Ueno H, Konishi T, Ishikawa Y, Shimazaki H, Ueno M, Aosasa S, Saiura A, Hase K, Yamamoto J. Histological categorization of fibrotic cancer stroma in the primary tumor is an independent prognostic index in resectable colorectal liver metastasis. *Am J Surg Pathol* (in press)

Kenmotsu H, Niho S, Ito T, Ishikawa Y, Noguchi M, Tada H, Sekine I, Watanabe S-i, Yoshimura M, Yamamoto N, Oshita F, Kubota K, Nagai K. A pilot study of adjuvant chemotherapy with irinotecan and cisplatin for completely resected high-grade pulmonary neuroendocrine carcinoma (large cell neuroendocrine carcinoma and small cell lung cancer). *Lung Cancer* (in press).

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. doi: 10.1016/j.ejrad.2012.05.022

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

Sato T, Kaneda A, Tsuji S, Isagawa T, Yamamoto S, Fujita T, Yamanaka R, Tanaka Y, Nukiwa T, Marquez VE, Ishikawa Y, Ichinose M, Aburatani H. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2013 May 29;3:1911. doi: 10.1038/srep01911.

Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013 Jul 4; 499(7456):97-101. doi: 10.1038/

- nature12347. Epub 2013 Jun 26.
- Ichikawa K, Fujimori T, Moriya T, Ochiai A, Yoshinaga S, Kushima R, Nagahama R, Ohkura Y, Tanaka S, Ajioka Y, Hirata I, Tanaka M, Hoshihara Y, Kinoshita Y, Sasano H, Iwashita A, Tomita S, Hirota S, Yao T, Fujii S, Matsuda T, Ueno H, Ishikawa Y, Takubo K, Fukushima N, Sugai T, Iwafuchi M, Imura J, Manabe T, Fukayama M. Digestive Disease Management in Japan: A Report on The 6th Diagnostic Pathology Summer Fest in 2012. Digestion. 2013 Sep 18;88(3):153-160. doi: 10.1159/000355330 [Epub ahead of print]
- Miyanaga A, Shimizu K, Noro R, Seike M, Kitamura K, Kosaihiara S, Minegishi Y, Shukuya T, Yoshimura A, Kawamoto M, Tsuchiya S, Hagiwara K, Soda M, Takeuchi K, Yamamoto N, Mano H, Ishikawa Y, Gemma A. Activity of EGFR-tyrosine kinase and ALK inhibitors for EML4-ALK-rearranged non-small-cell lung cancer harbored coexisting EGFR mutation. BMC Cancer. 2013 May 29;13:262. doi: 10.1186/1471-2407-13-262.
- Kawano Y, Ohyanagi F, Yanagitani N, Kudo K, Horiike A, Tanimoto A, Nishizawa H, Ichikawa A, Sakatani T, Nakatomi K, Hagiwara S, Ninomiya H, Motoi N, Ishikawa Y, Horai T, Nishio M. Pemetrexed and cisplatin for advanced non-squamous non-small cell lung cancer in Japanese patients: phase II study. Anticancer Res. 2013 Aug;33(8):3327-33.
- Izumiyama-Shimomura N, Nakamura KI, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Hiraishi N, Fujiwara M, Ishikawa Y, Inoshita N, Yonese J, Matsuura M, Poon SS, Arai T, Takubo K. Short telomeres and chromosome instability prior to histologic malignant progression and cytogenetic aneuploidy in papillary urothelial neoplasms. Urol Oncol. 2013 Mar 16. pii: S1078-1439 (13)00002-1. doi: 10.1016/j.urolonc. 2012.12.005. [Epub ahead of print]
- 石川雄一. 肺癌のWHO分類 – その改訂の動き-. 呼吸, 32:109-114, 2013
- 柳谷典子, 工藤慶太, 文 敏景, 星利良, 元井紀子, 石川雄一, 宝来威. 胸腔鏡手術により診断および完全切除しえた肺炎炎症性筋線維芽細胞腫の1例. 日本臨床細胞学会雑誌 2013; 52(2): 164-8.
- 石川雄一. クロム中毒、「産業安全保健ハンドブック」小木和孝 (編)、(公財)労働科学研究所、川崎、2013, pp 896-7.
- 柳谷典子, 大柳文義, 中富克己, 工藤慶太, 堀池篤, 元井紀子, 石川雄一, 宝来威, 西尾誠人. 実地臨床におけるanaplastic lymphoma kinase陽性肺癌に対するクリゾチニブの使用経験. 日本呼吸器学会誌 2013; 2(4): 338-42.
- 元井紀子, 石川雄一. 組織分類に関する最新知見. 「最新肺癌学 –基礎と臨床の最新研究動向- V. 肺癌の病理と病態」、日本臨床 2013; 71: 増刊号6,165-169.
- 石川雄一, 元井紀子, 野口雅之. 新しいIASLC/ATS/ERS腺癌分類について教えてください。「1. 肺癌の分類」、弦間昭彦 (編著)『肺癌診療Q & A 第2版』, pp.2-5, 2013、中外医学社、東京.
- 石川雄一, 元井紀子. 新分類で細気管支肺胞上皮癌および肺炎様の腺癌は、どのように分類されますか? 「1. 肺癌の分類」、弦間昭彦 (編著)『肺癌診療Q & A 第2版』, pp.6-7, 2013、中外医学社、東京.
- 石川雄一, 元井紀子. Driver遺伝子変異を有する腺癌には、どのような臨床病理学的な特徴がありますか? 「1. 肺癌の分類」、弦間昭彦 (編著)『肺癌診療Q & A 第2版』, pp.13-15, 2013、中外医学社、東京.
- 石川雄一, 元井紀子, 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? 「1. 肺癌の分類」、弦間昭彦 (編著)『肺癌診療Q & A 第2版』, pp.39-43, 2013、中外医学社、東京.
- 日向奈恵, 神田浩明, 塩山高広, 鈴木あかね, 武田朴, 石川雄一, 山口俊晴, 加藤洋. DNA ploidy解析にFFTを応用した新しいがん診断法の研究. 生体医工学, 51(2): 103-111, 2013

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

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

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、乳がんではメチル化異常が認められるLong Noncoding RNA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。被爆者乳がんでは発現が亢進しているmicroRNAを新たに3種類同定した。3) 乳がんでは異常が認められる発生関連遺伝子*DLX4*のエピジェネティックな異常が早期肺がん術後の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の分子機構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、乳がんではメチル化されるDNA断片、および脱メチル化されるDNA断片を得ることができる。3種類のメチル化感受性酵素を用いてMS-RDA法を行い、それぞれ96クロンのシークエンスにより計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) 乳がんではエピジェネティックな異常が認められる発生関連遺伝子*DLX4*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癌症例において*DLX4*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）

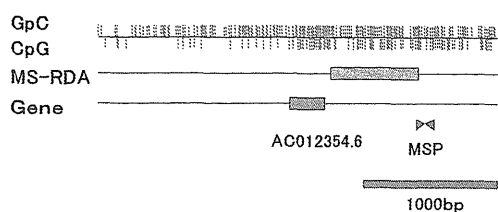
本研究の実施に際しては厚生労働省、文部科学省、および経済産業省により共同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針」を遵守する。具体的には、当該施設の倫理委員会により承認を得た研究プロトコルにて行う。

C. 研究結果

1. MS-RDA法によりnon-coding RNA部位のDNAメチル化異常を新規に同定した。メチル化異常は乳がん細胞株8株中7株（88%）に認められた。さらに、乳がん症例でも42症例中37例（82%）にメチル化異常が検出されることを見出した。

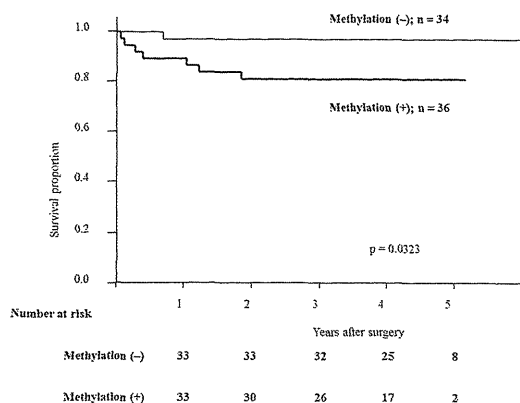
2. 被爆者に発生した乳がんにおいて5倍以上に発現が亢進しているmicroRNAとして、hsa-miR-424、hsa-miR-218、hsa-miR-665の3種類を同定した。

Chr. 2p21



3. *DLX4*のエピジェネティックな異常はI期肺癌70例中36例(51.4%)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 *DLX4*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non-coding RNA部位のDNAメチル化異常を新規に同定した。近傍の遺伝子としてアンチセンス遺伝子の報告があり、周囲の遺伝子の発現調節に関与している可能性がある。メチル化異常は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。一種類のmicroRNAが多くの標的遺伝子の発現を制御し細胞の分化・増殖、アポトーシスなどの生命現象に関与することから、その異常はがん化に極めて重要であると考えられている。今回、乳がんを高発現していたhsa-miR-218は、Wntシグナル活性化を介して乳がん骨転移に関与するという報告がある。一方、hsa-miR-424、hsa-miR-665については乳腺発がんにおける役割は不明であり、いずれのmicroRNAについても放射線障害との関連は今後のあきらかにすべき課題である。

*DLX4*は遺伝性乳がんの原因として知られている*BRCA1*のD発現調節に関与することが報告されている。今回、*DLX4*のメチル化異常が、肺癌病期I期非小細胞の完全切除症例において再発予測因子となりえることを明らかにした。発現調節に関与する*BRCA1*は抗がん剤の感受性および耐性獲得にも関連しており、*DLX4*のメチル化異常が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) 乳がんにおけるnon-coding RNAの新規DNA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) エピジェネティックな診断マーカーとして*DLX4*と肺癌術後予後との関連。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論著発表

1) ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. Okochi-Takada E, Hattori N, Tsukamoto T, Miyamoto K, Ando T, Ito S, Yamamura Y, Wakabayashi M, Nobeyama Y, Ushijima T. *Oncogene*. 2013 May 20

2) *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 Tatsumatsu, Toshiro Sugiyama, Toshikazu Ushijima *Oncogene*. 32: 2140-9, 2013

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

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 乳腺は、放射線発がん感受性の高い組織であり、原爆被爆者や医療被曝者の疫学調査から、放射線被ばく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。発がんは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異や欠失といったゲノムDNAの配列異常や、DNAメチル化に代表されるエピジェネティックな異常の蓄積によって多段階的に進行する。一方、エピジェネティックな発がん機構が、放射線による発がんにどの程度関わっているかについての知見は乏しい。本研究は、ラット乳腺腫瘍モデルを用いて、放射線で誘発された乳がんにおけるDNAメチル化異常を明らかにすることを目的とした。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、 γ 線を照射し誘発させた乳がんよりゲノムDNAを抽出し、CpG islandマイクロアレイを用いてDNAメチル化状態の変化を網羅的に解析した。次に、思春期前後に該当する週齢のSprague-Dawley雌ラットに、 γ 線を照射して誘発した放射線誘発乳がんおよび自然発症した乳がんにおけるゲノムDNAのメチル化状態の変化について網羅的解析を行った。その結果、乳がんにもみられるDNAメチル化異常は、主に発生や分化を調節する遺伝子に起こっていることが分かった。従って、乳がんにもみられるDNAメチル化異常は、発生や分化シグナルの異常を引き起こしていると考えられる。また、放射線誘発乳がんにも特徴的なメチル化異常を伴うがん関連遺伝子候補を複数同定した。この結果は、自然発症および放射線誘発乳がんを、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。

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発がんリスクが高いが、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、種々のがんにおいてゲノム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、発がんに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、放射線誘発乳がんにおけるゲノム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、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がん、被ばく時週齢の異なる放射線誘発乳がんのDNAメチル化異常を解析し、放射線誘発乳がんの特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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（雌）に放射線（ γ 線、4 Gy）を全身照射して誘発させた乳腺腫瘍のうち、腺癌と病理診断された検体（16検体）と正常乳腺組織（4検体）のゲノム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 island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。正常乳腺に比べ、がんにおいて2倍以上メチル化レベルが増加あるいは減少し ($P < 0.05$)、がん16検体中8検体 (50%) 以上の頻度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て抽出した。

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 (γ 線、2 Gy) を全身照射して誘発させた乳腺腫瘍と、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 (各々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のメチル化パターンを同様に解析し、正常乳腺に比べ、がんにおいて2倍以上メチル化レベルが増加あるいは減少し ($P < 0.05$)、各々のがんにおいて7検体中4検体 (57%) 以上の頻度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。思春期前被ばく、思春期後被ばくで誘発された乳がんとは自然発症した乳がん各々において抽出されたメチル化領域のうち、他のがんでは、がん7検体中1検体 (14%) 以下の頻度でしかメチル化の変化がない領域を、各がんに特徴的な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、乳がん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

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を照射して誘発させた乳がん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、放射線誘発乳がんにおいて高メチル化を示す遺伝子領域を109ヶ所、低メチル化を示す領域を135ヶ所見出した (図1A)。また、DNAメチル化パターンによる乳がんのクラスター分類を行ったところ、エストロゲン、プロゲステロン受容体、HER2陽性の乳がん (Luminal Bタイプ) は、DNAメチル化異常の程度が大きく、他のサブタイプのがんと区別されることが分かった (図1AB)。

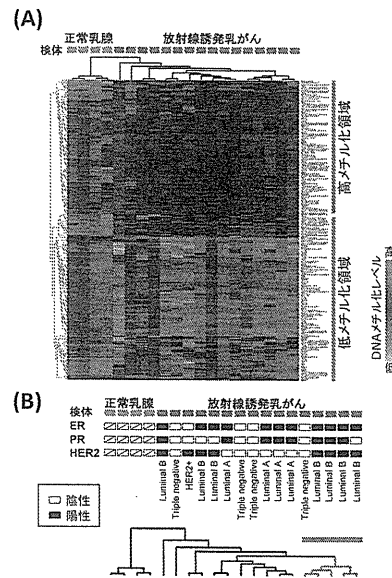


図1 放射線誘発ラット乳がんのDNAメチル化プロファイル (A) DNAメチル化パターンの違いによる乳がんのクラスター分類。(B) クラスターの拡大図と乳がんにおけるホルモン受容体の発現状態。DNAメチル化異常の程度が大きい乳がんからなるクラスターを赤線で示す。

また、正常乳腺組織に比べ、放射線誘発乳がんにおいて高メチル化あるいは低メチル化が見られる領域に存在する遺伝子群を抽出し、Gene Ontology (GO) 解析による遺伝子の機能予測を行った結果、乳がんにおいてDNAメチル化異常を伴う遺伝子の多くは、ホメオボックス遺伝子に代表されるような発生や分化を制御する転写因子であることが分かった (表1)。

表1 DNAメチル化異常を伴う遺伝子群の機能

遺伝子オントロジー	P値
Pattern specification process	4.00E-23
Cell fate commitment	1.07E-18
Regulation of transcription	1.03E-12

次に、思春期前後に該当するSprague-Dawleyラットに放射線を照射して誘発させた乳がん、自然発症した乳がん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、自然発症した乳がん、思春期前、思春期後の放射線被ばくにより誘発された乳がんにおいて特徴的に高メチル化を示す遺伝子領域を、それぞれ146ヶ所、149ヶ所、36ヶ所、低メチル化を示す遺伝子領域を、それぞれ96ヶ所、37ヶ所、321ヶ所抽出した (図2A)。抽出した遺伝子領域のDNAメチル化パターンによる乳がんのクラスター分類を行ったところ、自然発症した乳がん、思春期前、思春期後の放射線被ばくにより誘発された乳がんは、それぞれ別のクラスターに分類されることが分かった (図2B)。

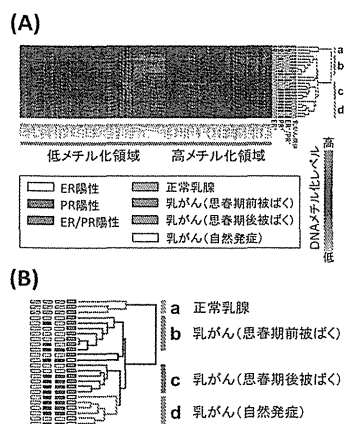


図2 放射線誘発ラット乳がんのDNAメチル化プロファイル (A) DNAメチル化パターンの違いによる乳がんのクラスター分類と乳がんにおけるホルモン受容体の発現状態。(B) クラスターの拡大図。

先と同様に、正常乳腺組織に比べ、乳がんにおいて高メチル化あるいは低メチル化が見られる領域に存在する遺伝子群を抽出し、GO解析による遺伝子の機能予測を行った。その結果、抽出された遺伝子は、自然発症した乳がん、思春期前、思春期後の放射線被ばくにより誘発された乳がん各々に特徴的なDNAメチル化異常を伴う異なる遺伝子であるものの (図2)、共通した機能として、発生や分化を制御する転写因子が多いことが分かった (表2)。一方、興味深いことに、思春期後の放射線被ばくにより誘発された乳がんではDNAメチル化異常を伴う遺伝子のなかには、ホルモン刺激に応答して、発現が変動する遺伝子が含まれていることが分かった (表2、中段)。

表2 DNAメチル化異常を伴う遺伝子群の機能

乳がん	遺伝子オントロジー	P値
放射線誘発乳がん (思春期前被ばく)	Regulation of transcription	1.48E-05
	Cell fate commitment	4.25E-04
	Tube development	3.52E-03
放射線誘発乳がん (思春期後被ばく)	Regulation of transcription from RNA pol II promoter	6.17E-06
	Regulation of system process	1.15E-05
	Cell fate commitment	1.46E-03
	Response to hormone stimulus	4.72E-03
自然発症乳がん	Pattern specification process	3.88E-05
	Cell-cell signaling	1.96E-04
	Regulation of transcription from RNA pol II promoter	6.45E-04

D. 考察

本研究により、自然発症および放射線誘発されたラット乳がんに見られるDNAメチル化異常は、主にホメオボックス遺伝子に代表されるような発生や分化を調節する転写因子に起こっていることが分かった。その結果、これらの乳がんにおいて、発生や分化シグナル経路の異常を引き起こしていると考えられる。ヒト乳がんにおいても同様に、ホメオボックス遺伝子のDNAメチル化による発現抑制が報告されている (*Cancer Res.*, 66:10664-70, 2006)。また、DNAメチル化パターンによる乳がんのクラスター分類を行い、ラット乳がんのサブタイプとの関係を解析したところ、エストロゲン、プロゲステロン受容体、HER2陽性の乳がん (Luminal Bタイプ) は、DNAメチル化異常の程度が大きく、他のサブタイプの乳がんと区別されることが分かった (図1B)。ヒトでも、HER2遺伝子の増幅が見られる乳がんやLuminal Bタイプに分類される乳がんはDNAメチル化異常の頻度が高いことが報告されている (*Carcinogenesis* 30:466-71, 2009, *Breast Cancer Res.*, 12:R36, 2010)。一方、我々のこれまでの研究から、自然発症した乳がんや思春期後の放射線被ばくにより誘発されたラット乳がんでは、エストロゲン、プロゲステロン受容体陽性のサブタイプが多く見られるのに対し、思春期前の放射線被ばくにより誘発された乳がんは、エストロゲン、プロゲステロン受容体陰性のサブタイプが多いという特徴が分かっている (図2, *Mol Carcinog.*, 50:539-552, 2011)。本研究では、自然発症および被ばく時年齢の異なる放射線誘発乳がんそれぞれに、特徴的なゲノムDNAメチル化異常が存在することが分かった (図2)。これらの結果は、自然発症および放射線による乳腺の発がんにおいて、その標的となる細胞の種類や、DNAメチル化異常による発がんメカニズムが異なる可能性を示唆している。特に、思

春期後の被ばくにより誘発されたラット乳がんでは、前年度に報告した*Id3*遺伝子に加え、細胞増殖に関わる*Loxl*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を確認した（未発表データ）。ヒトでは膀胱がんにおいて、*Loxl*遺伝子の高メチル化と発現量の低下が報告されている（*Cancer Res.*, 67:4123-9, 2007）。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。放射線誘発がんの指標を得ることが出来れば、そのリスク推定をより正確なものに出来る可能性がある。

E. 結論

本研究により、放射線で誘発された乳がんにみられるDNAメチル化異常は、主に発生や分化シグナルの異常を引き起こしていると考えられる。さらに、放射線で誘発された乳がんの特徴的なDNAメチル化異常が存在することが分かった。この結果は、放射線で誘発されたがんを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、放射線誘発乳がんにおいて発現異常を伴うDNAメチル化標的遺伝子の候補を見出した。これらの結果は、放射線誘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. Kazuhiro Daino, Tatsuhiko Imaoka, Takamitsu Morioka, Shusuke Tani, Daisuke Iizuka, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada. Loss of the BRCA1-interacting helicase BRIP1 results in abnormal mammary acinar morphogenesis. *PLoS ONE* 8:e74013 (2013).

2. 学会発表

1. 臺野和広、高嶋賢、西村まゆみ、森岡孝満、柿沼志津子、今岡達彦、島田義也：放射線誘発ラット乳がんにおけるエピジェネティック異常、第28回発がん病理研究会、沖縄県南城市
2. ショウラー恵、西村まゆみ、臺野和広、今岡達彦、福土政広、島田義也：

放射線誘発ラット乳がんにおける遺伝子変異の解析、第22回乳がん基礎研究会三重県津市

3. 西村まゆみ、高嶋貴志、今岡達彦、ショウラー恵、臺野和広、高嶋賢、小久保年章、森岡孝満、島田義也：放射線誘発ラット乳がんにおけるヒト乳がんと共通の遺伝子変異の探索、第22回乳がん基礎研究会、三重県津市
4. Masaru Takabatake, Kazuhiro Daino, Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Masahiro Fukushi, Yoshiya Shimada. Global DNA methylation profiling identifies epigenetic differences between spontaneous and radiation-induced mammary carcinomas in rats. 第36回日本分子生物学会年会、神戸市
5. 臺野和広、高嶋賢、西村まゆみ、今岡達彦、島田義也：放射線誘発ラット乳がんにおけるエピジェネティック異常：日本放射線影響学会第56回大会、青森市
6. ショウラー恵、西村まゆみ、臺野和広、今岡達彦、鶴岡千鶴、島田義也：放射線誘発ラット乳がんにおける遺伝子変異の解析、平成25年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、滋賀県大津市
7. 臺野和広、西村まゆみ、今岡達彦、鶴岡千鶴、島田義也：放射線誘発ラット乳がんにおけるDNAメチル化異常、平成25年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、滋賀県大津市

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寄与

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寄与を調べるために、複製後修復機構で中心的役割を担うRAD18の放射線応答への寄与について解析した。昨年度は、RAD18が放射線照射後のG2期からM期の移行に関与することを報告した。また、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。今年度は、さらに詳細な解析を行うために、IN Cell Analyzerを用いて、各細胞周期における53BP1といった放射線損傷応答因子のフォーカス数を定量解析した。その結果、RAD18は、G2/M期特異的に放射線照射後の53BP1といった放射線応答因子のフォーカス形成に関与することが明らかにされた。さらに、RAD18は放射線照射後のゲノムの恒常性の維持に関与することが明らかにされた。

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により、RAD18の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。さらに、RAD18をはじめとした修復機構に関わる遺伝子改変マウスを用いて、低線量率長期被ばくによる発がん研究を行うことにより、福島原発事故によるヒトへの発がんリスク評価の基礎資料となる情報を提供できることが期待できる。

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の解明が緊急の課題となっている。低線量放射線被ばくによる発がんリスクと健康影響の解明を推進する必要がある。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、細胞応答解析、細胞周期の測定などを行った。

2. IN Cell Analyzer を用いた蛍光免疫染色細胞の自動定量解析

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を用いて核染色を行った。1次抗体には、抗RAD18抗体、抗phospho ATM (Ser1981)抗体 (Upstate社)、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。蛍光強度の自動定量にはIN Cell Analyzer (GE Healthcare BioScience)を用いた。DAPI染色により、各細胞の細胞周期を同定した。

3. フローサイトメーターによる γ H2AXの蛍光強度の計測

HT1080細胞にsiRNA処理を行い、48時間後、放射線照射を行った。その後、経時的に細胞を70% EtOHで固定し、0.5% tritonX処理を行った。その後、1次抗体には、抗phospho H2AX (Ser139)抗体 (Merck Millipore社)を、二次抗体には、Alexa488標識抗ウサギIgG抗体 (Molecular Probe社)を用いた。その後、Propidium iodide (BD

Biosciences)を用いて核染色をした後、FACS Canto™ II (BD Biosciences)を用いて、G1, S, G2/M期の各細胞周期における細胞内 γ H2AXの蛍光強度を計測した。

4. 微小核頻度の検出

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MeOHで固定した。その後、Hoechst 33258を用いて核染色、SYTO RNA Select™ Green Fluorescent Cell Stain (Life Technologies Corp.)を用いて細胞質の染色を行った。その後、IN Cell Analyzerを用いて、細胞1個あたりの微小核形成頻度の計測を行った。

6. 統計処理

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 γ H2AX蛍光強度の計測

昨年度の研究から、RAD18発現抑制は、放射線照射後に誘導される細胞応答反応を低下させることを明らかにした。そこで、更なる解析を行うため、フローサイトメーターを用いて、G2/M期の細胞集団における γ H2AXの蛍光強度を測定した。非照射時にお