

201313004B

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

放射線障害と宿主要因からみた発がんの分子基盤とその臨床応用に関する研究

平成22年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 安井 弥

平成26年（2014年）年5月

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

放射線障害と宿主要因からみた発がんの分子基盤とその臨床応用に関する研究

平成22年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 安井 弥

平成26年（2014年）年5月

目 次

I. 総合研究報告

放射線障害と宿主要因からみた発がんの分子基盤とその臨床応用に関する研究 - 1
安井 弥

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 33

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 58

放射線障害と宿主要因からみた発がんの分子基盤とその臨床応用 に関する研究

研究代表者 安井 弥 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨 放射線発がんの分子基盤を解明し、その成果をリスク評価や治療開発等の臨床応用に展開することを目的とし、「放射線関連がんにおけるエピジェネティクス」、「放射線障害による発がんモデルにおける検証」、「原発被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん」の観点から研究を行なった。

「放射線関連がんにおけるエピジェネティクス」の解析では、被爆者に発生した胃がんのmiRNAの発現レベルを定量的に解析した結果、miR-143, miR-145が高線量被曝群で2倍以上に発現亢進していた。多変量解析によって、miR-143Highおよび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。被曝線量が100mGy以上の症例ではmiR-24高発現例が有意に多いことが分かった。fukutinの発現では、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。乳がんではメチル化異常が認められる遺伝子NR5A2を同定した。被曝者乳がんが発現が亢進しているmicroRNAとして、miR-137, miR-155, miR-1290, miR-1224-5p等を同定した。乳がんにおけるゲノム網羅的解析を行い、GATA6, NR5A2, GLI3等のメチル化異常を同定した。また、乳がんにおけるlong non-coding RNAのメチル化異常を新たに同定した。放射線二次がん解析のため、がん研究会有明病院におけるデータベースから346症例の重複がんを抽出した。子宮頸がん放射線治療後の大腸がんと一般の大腸がんのパイロット検討から、放射線誘発がん特有のmiRNA発現パターンのあることが示唆された。α粒子を放射する血管造影剤トトロラスト注入者に発生した肝がんにおいて特徴的なmiRNA発現パターンを見いだした。

「放射線障害による発がんモデルにおける検証」においては、Ptc1ヘテロ欠損マウス髄芽腫モデルでは、制御や腫瘍の転移性等と関連する複数のkey遺伝子近傍DNA領域において、放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常を持つ腫瘍は低メチル化状態であることがわかった。ラットの放射線誘発乳がん、自然発症した乳がん検体のメチル化解析の結果、放射線誘発乳がんの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、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。思春期後の放射線曝露により誘発された乳がんでは、Id3遺伝子の高メチル化と発現抑制が特徴的であった。REV1の発がん促進効果は、その直接的なDNA損傷応答反応によるものではないことが示された。複製後修復機構の制御因子であるRAD18の放射線応答への寄与について検討し、RAD18がDNA損傷応答反応およびチェックポイントの活性化に関与することを見いだした。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、細胞死や染色体異常形成に影響を及ぼすことを明らかにした。また、SYCE2の解析から、ATMを入口とするDNA損傷応

答経路が過剰に活性化され染色体不安定性が誘導されるとともに、放射線や化学療法に対する抵抗性がもたらされることが示唆された。DNA修復機能に
関与するSYCP3は、BRCA2の機能抑制、相同組換え修復機能低下をもたらせ、
細胞はPARP阻害剤に対して高感受性を示すことを明らかにした。減数分裂特
異的コヒーシンであるSMC1 β の体細胞における発現は、Rad51を介した相同
組換え修復によるDNA二本鎖切断修復を抑制し、放射線やシスプラチンに対
する細胞の感受性を亢進させることを明らかにした。さらに、放射線による
DNA損傷応答において、MDM2-MDMX複合体の機能を促進しp53を負に制御
する新たな経路が存在し、この経路が活性化された場合には、細胞周期の進
行においてチェックポイントの機能が低下し、ゲノム不安定性が高まること
が観察された。

「原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん」の研究では、肝発がん
において、NKG2Dハプロタイプとともに放射線被曝が関与することが示めさ
れた。CD14のプロモーター領域の遺伝子多型と大腸発がんリスクを解析した
結果、放射線によるリスク増加は結腸がんで有意であり、基準カテゴリー
(CD14-C/Cまたは-C/Aで非被曝)と比べてCD14-A/Aと被曝線量>0.7Gyの組
合わせで結腸発がんリスクが有意に増加することを見いだした。細胞内活性
酸素は主に細胞の活性化状態を反映し、細胞内ROSレベルの個人差にはIL6R
遺伝子多型が関与している可能性が示唆された。IL6R-208A/G遺伝子型は細胞
内ROSレベルの個人差にも関与し、遺伝的要因として原爆被爆者の放射線関
連結腸直腸発がんに関与している可能性が示された。さらに、GPA 突然変異
頻度とcyclin D1の遺伝子型との有意な関連が認められ、P53BP1依存性DNA修
復経路に関わる遺伝子機能の個人差が、放射線誘発遺伝子障害の感受性に影
響を及ぼすことが示唆された。また、ヒト末梢血 CD34 陽性造血幹細胞にお
ける自然発生ならびに放射線誘発 γ H2AX フォーカス頻度測定系を確立した。
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された。原爆被爆
者において、T 細胞免疫老化の特徴であるTREC数の減少とテロメア長短縮は、
肥満指標の増加と逆の関係を示し、2型糖尿病や脂肪肝の罹患と関連していた。

本研究から得られた成果を活用することにより、放射線障害に対する具体
的な評価法や予防策および放射線障害に起因するがんの診断法・治療法を提
示することが可能となる。

研究分担者

石川雄一

(財)がん研究会がん研究所・部長

宮本和明

東広島医療センター・医長

高島貴志 (平成23年3月31日まで)

独立行政法人放射線医学総合研究所・
主任研究員

臺野和広 (平成23年4月1日から)

独立行政法人放射線医学総合研究所・

研究員

神谷研二

広島大学原爆放射線医科学研究所・
所長

宮川 清

東京大学大学院医学系研究科・教授

林 奉権

(財)放射線影響研究所・副部長

楠 洋一郎

(財)放射線影響研究所・部長

A. 研究目的

原子力エネルギーや医療、産業等で放射線利用が激増しており、放射線の健康への影響とその管理が大きな問題となっている。医療における放射線の利用は、CTやMRIなどの疾病の診断とともにがん治療の大きな柱になっている一方で、外的要因として放射線治療後二次がんの発生への影響が懸念されている。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。被爆国として放射線障害に関する研究をリードするわが国には、増加する放射線利用における安全・安心に資する学術情報を世界に発信することが期待されている。本研究は、放射線発がんの分子基盤を解明し、その成果をリスク評価や治療開発等の臨床応用に展開することを目的とし、以下の3つの観点から解析する。

「放射線関連がんにおけるエピジェネティクス」では、microRNAをはじめとする非翻訳RNAおよびCpGメチル化の面から、高線量放射線被ばく発がんである放射線治療後に発生した放射線二次がんとは低線量被ばく影響下の発がんである原爆被爆者に発生したがんを解析し、通常のがんとの違いを遺伝子制御の面から検討する放射線関連固形がんの特徴的異常を同定することにより、それを標的とした診断法・治療法・予防法の開発を目指すものである。

「放射線障害による発がんモデルにおける検証」としては、3つの系を用いる。*Ptch1*^{+/+}マウスに生じた髄芽腫では、放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常を明らかにすることで、放射線による発がん機構の理解と予防法構築に寄与するモデル系を確立する。また、点変異誘発機構の制御を担うREV1やRAD18やDNA損傷応答に関連するRad54Bの遺伝子改変細胞の解析により、放射線被ばくによる点変異誘発機構、ゲノム不安定性および発がん機構の解明を目指す。

さらに、減数分裂特異的遺伝子を取り上げ、そのエピジェネティックな変化とDNA修復機能を解析し、個別化治療に応用することを目的とする。

「原爆被爆者コホートを用いた宿主要因と発がん」の解析の内、炎症・免疫反応の個体差の遺伝的要因を探求する「表現型・遺伝子型ゲノム関連分析」は、本研究独自のアプローチであり、予防研究に有用な「変動する個別のリスクを表す代理指標」の開発が目的である。さらに、ゲノム不安定性、炎症生体指標と遺伝子型ゲノム関連分析により、放射線の影響と遺伝的要因の相互作用に基づく発がんリスクの評価システムの構築を目指す。

これらの研究成果を活用することにより、職業被曝や医療被曝等による放射線障害に対する具体的な予防策および放射線障害に起因するがんの診断法・治療法を提示することが可能となる。

B. 研究方法

1) 放射線関連がんにおけるエピジェネティクス

1. マイクロ RNA からみた放射線関連固形がんの特徴 (安井)

被爆者に発生した胃がんにおけるmiRNAの発現解析：リアルタイムPCRシステムを用い、384種類のヒトmiRNAを網羅的且つ定量的に解析した。対象は、放射線影響研究所のLife Span Study (LSS) 集団に発生した胃がんであり、被爆群と対照群のFFPE切片を使用した。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。代表的miRNAについては、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。また、非翻訳RNAをコードする超保存領域(T-UCR)の発現解析を行なった。

網羅的遺伝子発現解析による新規がん関連遺伝子の同定と機能解析：CAST法を用いて胃がん細胞株、胃がん組織および正常胃粘膜組織について解析し、定量的RT-PCR、

western blot, 免疫染色で発現を検証, 一部については機能解析を行なった。また, 一部の遺伝子・蛋白については, 通常集団に発生した胃がん例と放射線影響研究所のLSS 集団に発生した胃がん例について主に免疫染色で発現解析し, 放射線被曝との関連を検討した。

2. 放射線二次がんの研究 (石川)

放射線治療後に発生したがんとして, がん研病院の院内がん登録データベースを基に, 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。保管されている放射線治療記録 (照射録, 照射野, カルテ記載) をもとに, 放射線が関与している可能性の高い二次がん症例を限定する作業を行った。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。さらに, 子宮がん放射線治療後の大腸がん症例, 一般大腸がん症例, 正常粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から miRNA を抽出し, 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, クラスタ解析を施行した。

また, トロトラスト被注入症例に発生した肝細胞がんのFFPE材料を用いて, 網羅的miRNA解析を行ない, 一般の肝細胞がん (HCV陽性) と比較した。

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

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を対象に, Methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA) 法を行い, 乳がんにおける新規DNAメチル化異常の探索を行なった。また, 乳がんが発現異常を示すmiRNAおよびlong non-coding RNAのメチル化解析を行なった。放射性発がんスクに関連する遺伝性乳がん遺伝子BRCA1およびがん転移関連遺伝子DLX4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を非小細胞肺癌症例において検討した。

被爆者乳がんにおける新規miRNA発現異常の探索: 広島に被爆者に発生した乳がんと非被爆者に発生した乳がんとの間で発現が異なるmicroRNAを網羅的に解析し, 放射線障害に基づく乳腺発がんに関連するmicroRNA異常候補を同定した。

2) 放射線障害による発がんモデルにおける検証

1. 放射線誘発乳腺腫瘍における放射線に特徴的なゲノム変異とメチル化異常 (高島/臺野)

Ptch1 遺伝子ヘテロ欠損マウスに生じた髄芽腫において放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常とDNAメチル化状態の関連について, MeDIP-Chip法でCpGアイランドのメチル化レベルを網羅的に解析した。メチル化レベルに差がみられた領域近傍の遺伝子については, 58の腫瘍を対象にリアルタイムPCR法により発現レベルを比較した。

3 および7週齢のSprague-Dawley雌ラットに, 放射線 (ガンマ線, 2Gy) を全身照射して発症した乳腺腫瘍と, 自然発症した乳腺がんおよび正常乳腺組織より抽出したゲノムDNAからメチル化DNAを濃縮し, ラットカスタムCpGアイランドマイクロアレイ (約8,000遺伝子に対応) にて, ゲノムDNAのメチル化パターンを解析した。さらに, 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。また, 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と正常乳腺組織より抽出したゲノムDNAについて, ラットゲノムCGHアレイ (Agilent社) によりゲノムコピー数の変化を解析した。また, ゲノムDNAのメチル化パターンも解析した。

2. 放射線発がんにおける損傷乗越えDNA合成・複製後修復機構の役割 (神谷)

ヒト繊維肉腫細胞HT1080株にベクターpcDNA6/TR, pcDNA4/TO-REV1を導入し, tetによるREV1の発現誘導あるいはsiRNA

による発現抑制を行なった後、放射線照射および紫外線照射を行った。これらについて、DNA損傷応答、細胞周期、生存率の解析の解析を行なった。

HT1080に、RAD18に対するsiRNAを導入し、生存率、細胞応答、細胞周期の変化について検討した。放射線照射は、線源として¹³⁷Cs γ 線を用い照射の線量率は1.03Gy/min、線量は1, 2, 4, 6及び8Gyとした。放射線照射後の生存率は、コロニー形成法を用いて解析した。細胞応答については、ATM, p53, p21, H2AX, histone H3, 53BP1の発現を検討した。細胞周期の変化は、BD FACS Canto II Flow Cytometerにより解析した。細胞周期の変化は、BD FACS Canto II Flow Cytometerにより解析した。mitotic index (分裂指数)の計測は、放射線照射後に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期の割合として算出した。さらに、放射線照射の後に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。

3. DNA修復遺伝子の発現異常によるがん特性の解析 (宮川)

新たながん精巢抗原であるSYCE2の発現パターンをRT-PCRによって解析した。正常網膜由来上皮細胞由来SYCE2強制発現細胞について、放射線照射とシスプラチン処理後のコロニー形成能を解析し、DNA損傷に対する感受性を評価した。染色体の数的異常はFISHによって解析した。相同組換えについては、放射線照射後の姉妹染色分体交換の頻度を測定した。また、Rad51の核内におけるフォーカス形成、ATMのリン酸化を解析した。

SYCP3の機能解析のために、正常網膜上皮細胞由来SYCP3強制発現細胞とsiRNAノックダウンがん細胞を準備した。PARP阻害剤にはNU1025を用い、最大150 μ Mまでの濃度で培養した後に、生存率をコロニー計数によって算出した。さらに、SYCP3が発現し且つBRCA2変異株であるCapan 1を用いて、同様の検討を行った。また、既存のDNA損傷性抗がん剤との併用の効果をシスプラ

チンを用いて検討した。

SMC1 β の発現および機能解析を行なった。ヒト各種培養細胞株における発現はRT-PCRで検討し、機能解析には、SMC1 β 強制発現系およびsiRNAノックダウン系を用いた。DNA損傷作用への感受性に対するSMC1 β の影響は、放射線照射およびシスプラチン処理後の細胞のコロニー形成能で解析した。また、相同組換え修復機能、細胞周期を解析した。コヒーシオン機能の評価は、姉妹染色分体の形状を観察することで行った。さらに、SMC1 β とSMC3, Rad21との結合、SMC1 α とSMC3, Rad21との結合を免疫沈降で解析した。

Rad54Bのp53に対する調節機構を解析することにより、ATM-p53と拮抗してDNA損傷応答を負に制御する経路を同定した。Rad54BとMDM2あるいはMDMXが結合するかを解析した。Rad54Bのp53への抑制作用について、Rad54Bの発現レベルを低下させた場合のp53タンパク質の安定性をロット法により解析した。MDM2-MDMXのE3ユビキチン・ライゲース活性へのRad54Bの影響を解析した。放射線照射後の細胞周期の分布をRad54Bのレベルの異なる細胞間で比較した。

3) 原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん

1. 放射線関連発がんに関与する遺伝要因の研究 (林)

放射線影響研究所の成人健康調査(AHS)コホートで見出されたHCV持続感染者とHCVクリアランス者によるケース・コントロール研究を行い、肝細胞がんについては同コホートで見出された肝細胞がん115症例および2,107名のサブコホートによるケース・コホート研究を行った。*NKG2D* 遺伝子の転写制御領域を中心にSNPを同定し、複数の*NKG2D* 遺伝子多型部位の中から連鎖不平衡解析により見出されたハプロタイプ(*NKG2D hb1*)を解析に用いた。

AHS コホート内の結腸直腸がん 194 症

例および 2,132 人のサブコホートを選んでケース・コホート研究を行った。免疫関連遺伝子のうち、CD14 の発現量に関連のある CD14 の-911 位の遺伝子多型について結腸直腸発がんリスクとの関係を調べた。被曝線量別では、非被曝、被曝線量の中央値 700 mGy で 2 分割されたグループの計 3 カテゴリーに分けて解析した。

AHSコホート内の血液試料を用いて血漿中ROS、細胞内ROS、血漿中sIL-6R、mIL-6Rを測定した。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。ROS関連遺伝子多型については、639名の健常者の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。さらに、IMGコホートについて、IL6Rの遺伝子型別に結腸直腸がん発生リスクと放射線被曝との関係を調べた。

2. 放射線による遺伝子障害感受性の個体差に基づく発がんメカニズムの研究 (楠)

赤血球GPA (グリコフォリンA) 突然変異頻度のデータは1988-1996年においてAHS対象者について既に測定したものをを用いた。放射線誘発GPA突然変異頻度の個人差とP53BP1遺伝子の多型の関係を支持する結果が得られているため、P53BP1の下流にあるcyclin D1遺伝子を検討した。SNPはTaqMan-Allelic Discrimination法を用いて解析し、がんを発生していない約800名について、遺伝子の多型GPA突然変異頻度との関連を調べた。また、赤芽球バースト形成能 (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。

末梢血よりFicoll法にて単核細胞を分離し、X線照射後あるいは非照射でCD34抗体および細胞系列 (CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56、およびGPA) 抗体にて染色後、細胞内 γ H2AX免疫蛍光染色を行

った。セルソーター (FACS Aria II) にて造血幹細胞分画 (CD34 陽性/細胞系列陰性) およびリンパ球分画に識別し、細胞1個あたりの γ H2AXフォーカス数を比較した。また、AHS対象者より供与された末梢血よりCD4およびCD8T細胞、ナイーブCD4T細胞、メモリーCD4T細胞、CD8T細胞をセルソーターで分取した。TREC数をリアルタイムPCRにて定量し、フローFISH法を用いてテロメア長を測定した。その結果と、BMI、HbA1cレベル、CRPレベル、肥満に關係する疾患、飲酒・喫煙との関連を解析した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮については、ヒト由来試料を用いた遺伝子解析では、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号：平成16年全部改定)に従って行なった。遺伝子組換え生物等使用実験を含む研究は、「遺伝子組換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号)、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律施行規則」(平成15年財務省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第1号)等に基づいて行なった。さらに、各研究機関の倫理委員会の承認の下に実施した。上記に加えて、放射線影響研究所における被曝者に関する研究では、同研究所の「人権擁護委員会」他、当該委員会の承認の下に実施した。

C. 研究結果

1) 放射線関連がんにおけるエピジェネティックス

1. マイクロRNAからみた放射線関連固形がんの特徴 (安井)

被曝者に発生した胃がんでは、miR-143、miR-145を含む32種類のmiRNAが高線量被曝群 (102-1062mGy) で2倍以上に発現亢進していた。胃がんにおけるmiR-143およびmiR-145の発現レベルを高、中、低の3つに

分け、高と中をHigh (H)、低をLow (L)として解析した。miR-143およびmiR-145の発現レベルは、5mGy以上の被曝群で有意にHigh症例が多かった。被曝線量増加に伴い、High症例の割合が有意に増加していた。多変量解析によって、miR-143HighおよびmiR-145Highは被曝関連胃癌の独立したマーカーであることが示された。また、miR-143とmiR-145の発現は、極めて高い相関を示すことを確認した。miR-143およびmiR-145は、がん細胞よりも主として間質細胞で発現していた。LSS症例において、miR-24の発現レベルは、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-24Highが多かった。T-UCRに関しては、胃癌ではUc.416+A, 420+Aの発現が亢進し、Uc.118+A, 158+Aなど多くのT-UCRの発現は低下していた。

一方、CAST法を用いた膜蛋白・分泌蛋白の網羅的遺伝子発現解析から、胃癌に特異性の高い遺伝子としてTSPAN8, TM9SF3, ZDHHC14, FKTNを同定した。TM9SF3と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、TM9SF3陽性例は陰性例に比較して有意に予後不良であった。ZDHHC14は、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。LSS症例86例におけるLSS症例におけるFKTN (fukutin)の発現をみると、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。

2. 放射線二次がんの研究 (石川)

がん研究会有明病院におけるがん登録データベースを基に、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年未満で第二がんが発生している症例を除外して、343例を抽出した。放射線二次がんの可能性が高い20例の性質を調べた。放射線二次がん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、子宮がん放射線治療後の大腸がんを一般大腸がん、正常粘膜と比較した。miRNAの発現量による階層クラスター解析

では、放射線二次がん症例と正常粘膜は、別のクラスターを形成した。また、大腸がん間の検索でも、放射線二次がんは、独立したクラスターを形成した。放射線二次がんの特徴的なmiRNA発現パターンのあることが示唆された。

トロトラスト被注入者に発生した肝がんのmiRNA発現パターンはよく一致していたが、対照例の肝がんとは、そのパターンは大きく異なっていた。非腫瘍部組織においてもトロトラスト症例と対照例でmiRNA発現パターンは大きく異なっていた。階層クラスター解析では、トロトラスト症例からの検体と対照群からの検体は別々にクラスターされた。トロトラスト肝がんと対照例の肝がんとは、279個のmiRNAで発現に有意差が見られた。

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

MS-RDA法によりNR5A2 (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2*), GATA6 (*GATA binding protein 6*), GLI3 (*GLI family zinc finger 3*)を新規に同定した。NR5A2, GATA6, GLI3のメチル化異常は、乳がん細胞株では、それぞれ、50%, 100%, 100%, 乳がん症例は、それぞれ、24%, 100%, 76%に認められた。GATA6のメチル化異常は血液検体でも検出可能であった。miRNAのメチル化については、miR-34cおよびmiR-137のメチル化異常が、検索した乳がん細胞株および乳がん症例4のすべてにおいて認められた。さらに、乳がんにおけるlong non-coding RNAのメチル化異常を高頻度に認めた。

被曝者に発生した乳がんにおいて10倍以上に発現が亢進しているmiRNAとして、miR-150, miR-142-5p, miR-142-3p, miR-146a, miR-223, miR-650, miR-1298, miR-1303の8種類を、5倍以上に発現が亢進しているmiRNAとして、miR-155, miR-1290, miR-1224-5pの3種類を同定した。

BRCA1のエピジェネティックな異常はI期肺がんの約20%に認められ、術後再発と

有意な関連性が認められた。転移関連遺伝子DLX4のメチル化については、I期肺癌症例においてメチル化陽性例が陰性例に比較して有意に予後不良であった。

2) 放射線障害による発がんモデルにおける検証

1. 放射線誘発乳腺腫瘍における放射線に特徴的なゲノム変異とメチル化異常 (高島/臺野)

Ptch1 遺伝子ヘテロ欠損マウスに生じた髄芽腫では、自然発生型のゲノム異常を持つ腫瘍と放射線誘発型のゲノム異常を持つ腫瘍との間に、21か所のCpGメチル化レベルにおいて顕著な差が認められた。低メチル化部位の近傍には複数の遺伝子 (*Pax6*, *Cdkn2a*, *Pdgfra* など) がマップされていた。メチル化レベルと遺伝子発現の関係を検討した結果、*Pax6*, *Pdgfra*, *Otx2* 遺伝子では負の相関、*Cdkn2a* では正の相関が認められた。*Pax6* 遺伝子の発現量は、発症時期が遅く死亡日齢が長くなるほど低く、*Cdkn2a* 遺伝子座にコードされる遺伝子 *p19ARF* および *p16Ink4a* は発症時期が遅くなるほど高かった。

ラット乳がんモデルのメチル化解析において、自然発症した乳がん、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がんの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、96ヶ所、37ヶ所、321ヶ所抽出した。クラスター分類では、自然発症乳がん、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た。思春期後の被ばくにより誘発された乳がんでは、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。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がんの解析では、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。DNAメチル化パターンによるクラスター分類では、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。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等の発生や分化を制御する転写因子であった。

2. 放射線発がんにおける損傷乗越えDNA合成・複製後修復機構の役割 (神谷)

REV1過剰発現系において、対照細胞では、放射線および紫外線照射後ATMのリン酸化、p53のリン酸化、H2AXのリン酸化、p53タンパクの安定化、p21発現レベルの上昇が観察されたが、REV1過剰発現による影響は受けなかった。REV1は、放射線被ばく後の細胞周期チェックポイント、DNA損傷応答に影響を与えなかったが、放射線や紫外線に対する損傷感受性を有意に変化させた。

RAD18発現抑制細胞を用いて細胞生物学的解析を行った結果、RAD18の発現抑制により、放射線に対して高感受性となり、ATM、p53、H2AXなどのリン酸化の誘導が抑制された。さらに、放射線照射によるG2/M期の細胞分画の増加が抑制されていた。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。細胞周期および分裂指数を解析したところ、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が明らかとなった。放射線照射によって誘発される微小核頻度の計測を行ったところ、照射線量依存的に微小核頻度が増加し、各線量における微小核頻度は、RAD18発現抑制細胞の方が、コントロールと比較して有意に高い値を示した。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た。

3. DNA修復遺伝子の発現異常によるがん特性の解析 (宮川)

SYCE2の発現は、各種ヒトがん細胞株の50%に認められた。SYCE2の強制発現により、放射線とシスプラチンに対して約2倍抵抗性となった。さらに、SYCE2の強制発

現により、相同組換え修復の指標である姉妹染色分体交換の頻度が2Gy照射後に増加し、8Gy照射後のRad51の核内フォーカス形成も増加した。染色体の数的異常については、染色体7番、17番ともに増加が認められた。ATMのセリン1981番のリン酸化の8Gy放射線照射による誘導も亢進していた。

がん細胞3種類におけるコロニー形成は、SYCP3ノックダウンにより、いずれも増加した。BRCA2変異株であるCapan1におけるSYCP3のノックダウンの影響を検討したところ、PARP阻害剤への感受性は全く変化せず、SYCP3発現によるPARP阻害剤感受性の変化は、BRCA2を介しているものと見なされた。SYCP3が発現したRPEにおいて観察されていたPARP阻害剤への感受性は、シスプラチンの前処理によって増強した。

SMC1 β の発現は、解析したがん細胞株の半数以上で認められた。SMC1 β の強制発現系およびノックダウン系で機能を解析したところ、SMC1 β は、放射線、シスプラチンに対する感受性、放射線照射後のRad51の核内フォーカス形成、分裂中期における姉妹染色分体の解離に関与することが明らかとなった。また、SMC1 β はSMC3とRad21と結合していることが分かった。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。

Rad54BとMDM2あるいはMDMXの結合を検討した結果、Rad54Bは両方のタンパク質と直接結合することが見いだされた。Rad54BのSNF2ドメインの前半部分のみがMDM2とMDMX両方の結合に必要であることが判明した。Rad54Bのノックダウンでp53の発現は亢進し、それにはRad54BがMDM2とMDMXによるp53のユビキチン化を促進すること関与することが示された。さらに、Rad54Bノックダウン細胞では、放射線照射後のG1期への集積がコントロール細胞と比べてより促進されることが明らかとなった。

3) 原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん

1. 放射線関連発がんに関与する遺伝要因の研究 (林)

*NKG2D*遺伝子型とHCV感染後の経過との関連を調べた結果、*NKG2D*の*HNK1/HNK1*ハプロタイプに比べて、*LNK1*を持つ集団のHCVクリアランス者の割合が低い傾向にあった。肝細胞がんでは、対象者を被曝線量3カテゴリー（非被曝、0.7Gy未満の被曝、0.7Gy以上の被曝）と*NKG2D*ハプロタイプの2カテゴリーとの組み合わせに分けると、参照カテゴリー（*HNK1/HNK1*で非被曝）に比べ、*LNK1*を持つ集団の中で最も高い被曝線量カテゴリー（0.7Gy以上）の組み合わせで肝発がんリスクが最大となった。

*CD14*のプロモーター領域-911位の遺伝子多型（*CD14-C/A*）と大腸発がんおよび放射線被曝の影響について調べた。結腸がんについては、原爆放射線被曝線量1Gy当たりリスクが1.2倍であり、*CD14*遺伝子型では*CD14-A/A*のリスクが*CD14-C/C*あるいは*CD14-C/A*より1.4倍高かった。対象者を被曝線量によって3群に分け、*CD14*遺伝子型別にリスクを算出したところ、基準カテゴリー（*CD14-C/C*または*-C/A*で非被曝）と比べて*CD14-A*アレルのホモ接合体と最も高い被曝線量（>0.7Gy）の組み合わせカテゴリーで結腸発がんリスクが有意に増加していた。

原爆被爆者の約1,500名の血漿中ROSレベルを調べた結果、血漿中ROSレベルは放射線量に伴い増加していた。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、*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かった。健康者を*IL6R*遺伝子型により2群に分けたとき、*IL6R-A/A*に比べて*IL6R-A/G*または*IL6R-G/G*で血漿中sIL-6Rは有意に低値を示す一方、単球、顆粒球、リンパ球、T細胞、CD4+ヘルパーT細胞のmIL-6Rは高値を示した。さししてIMGコホートを*IL6R*の遺伝子型2

群と被曝線量3群 (<0.005Gy“非被曝”, 0.005-0.7Gyと >0.7Gy) の組み合わせに分けると、参照群 (*IL6R-A/A*で非被曝) に比べ、*IL6R-A/G*または*IL6R-G/G*の遺伝子型と最も高い被曝線量群の組み合わせで、結腸直腸がんの相対リスクが最大となった。

2. 放射線による遺伝子障害感受性の個体差に基づく発がんメカニズムの研究 (楠)

*cyclin D1*の870番目の塩基のSNP (rs9344) に *G/G* の遺伝子型を有する対象者と、その他の遺伝子型 (*A/G* or *A/A*) の対象者について、1 Gy未満の低線量被ばく群および1 Gy以上の高線量被ばく群に分けて*GPA* 変異体頻度を比較した。高線量被ばく群では、*cyclin D1*の870番目の塩基に*G/G*を有する被爆者では*A/G*あるいは*A/A*を有する被爆者に比べて*GPA* 変異体頻度は有意に低値であった。原爆被爆者の末梢血造血幹細胞のBFU-Eは、放射線量の増加に伴い低下し、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。*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。

X線照射後の γ H2AX フォーカス頻度は末梢血 CD34 陽性造血幹細胞とリンパ球のいずれにおいても照射線量依存性 (0.1-2.0 Gy) に増加した。放射線誘発 γ H2AX フォーカスのタイムコースを調べたところ、いずれの末梢血においても1.0 Gy X線照射後のフォーカス頻度は造血幹細胞の方がリンパ球に比べ早く低下する傾向が見られた。

BMI と TREC 数に逆の関連性が示唆され、糖尿病や脂肪肝で有意なTREC 数の減少が認められた。CD4 TREC, CD8 TREC では糖尿病と脂肪肝が影響していた。テロメア長はナイーブ CD4 T 細胞, メモリー CD4 T 細胞, および CD8 T 細胞いずれにおいても、年齢, HbA1c レベルと逆の関連性がみられた。さらには糖尿病や脂肪肝で

有意なテロメア長の短縮が認められた。

D. 考察

放射線関連がんにおけるエピジェネティクスに関する研究では、主としてmiRNAなどの非翻訳RNAの発現解析ならびにメチル化異常の解析を行なった。

胃がん組織におけるmiRNAの解析では、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が、標的遺伝子はそれぞれ異なっている。miR-143 / miR-145 clusterには、2カ所にpromoterが存在しており、活性化には共通性と独自性がある。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いるが、miR-143はcollagen type IIIの発現を、miR-145は α -SMAの発現をそれぞれ独自に制御していた。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。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。また、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、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。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。一方、T-UCRに関しては、多くのT-UCRの発現は胃がんで抑制されているが、少ないながらも胃がんで発現亢進を示すT-UCRが存在することが分かった。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、被爆者に多いとされている未分化型胃がんのCAST法による解析から、ZDHHC14, TM9SF3を含むいくつかの膜蛋白・分泌蛋白をコードする遺伝子を同定した。機能解析によって、ZDHHC14は、細胞接着、細胞浸潤、細胞運動を制御すること

が示され、TM9SF3に関しては、浸潤能を制御していることが明らかとなり、発現と患者の予後との間に有意な関連が確認された。放射線発がんとの関連について検討する必要がある。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の原因遺伝子であるが、がんにおける詳細は不明である。本研究では、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。機能解析とともに、なぜ被曝線量の多い胃がんでfukutin陽性例が少ないかを明らかにする必要がある。

放射線二次がんについては、子宮がん放射線治療後の大腸がんに着目して症例を収集したところ、大腸がんの中でも粘液がんの多いことが判明した。また、放射線照射が直接遺伝子に傷をつけて発がんに至るのか、それとも何らかの中間病変が介在して大腸粘膜ががん化するのかについての知見を得るために、放射線治療後によく発生する放射線大腸炎に着目した。統計学的有意差は得られなかったものの、放射線二次がんの特徴である粘液がんでは放射線大腸炎の頻度が高い傾向が示された。また、放射線治療後に発生した重複がんでは、食道がん、胃がんが多くみられた。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十分に考慮する必要がある。明らかな放射線二次がん症例を用いた階層クラスター解析では、放射線二次がんは独立したクラスターを形成し、放射線誘発がんの特徴的なmiRNA発現パターンのあることが示唆された。放射線二次がんを特徴づける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がんの原因を推定できることになり、臨床病理学的意義も大きい。

肝細胞がんについて、放射線誘発と推定されるトロトラスト注入後発症例と肝炎ウイルス抗体陽性例を比較して、放射線誘発signatureとなるmiRNA発現パターンの検出を試みたところ、腫瘍同士の間で有意差のあるmiRNAを検出し、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

た階層クラスターリングでも、トロトラスト例と対照例とに分かれた。このことから、放射線関連肝細胞がんでは、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が考えられた。

乳がんのエピジェネティックな異常として同定したNR5bA2は、核内受容体をコードし幹細胞維持に関与するOCT4の代替機能を有することが知られている。ホルモン受容体陽性のサブタイプでメチル化異常が認められたことから、このサブタイプにおける悪性度の違いに関与する可能性がある。GATA6は内胚葉への分化に関与する転写因子であるが、がん化における役割は未だ不明である。血液検体で検出可能であり、リスク診断あるいは早期発見マーカーとして期待される。GLI3はHedgehogシグナル経路に関与し幹細胞の維持に関連する転写因子であるが、乳がんにおける役割は不明であるあり、今後検討する必要がある。また、乳がんでmiR-34c、miR-137のメチル化異常が高頻度に認められることを示した。miR-34cはp53に関連し増殖抑制作用を有する。

被曝者乳がんで高発現していたmiR-650、miR-1298、miR-1303、miR-155、miR-1290、miR-1224-5pの機能については不明な点が多く、機能解析が必要である。被曝者乳がんでは、サブタイプとしてHER2陽性乳がんの頻度が多い傾向にあり、エピジェネティックな異常は放射線障害に基づくがん発生の重要な分子機構である可能性が高いと考えられる。我々が同定してきたエピジェネティックな異常は、放射線障害発がんメカニズムの一端を明らかにしたものである。

放射線誘発脳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については、自然発生型腫瘍と放射線誘発型腫瘍間でメチル化レベルの異なるCpGアイランドが多数存在し、その近傍に複数の重要な遺伝子がマップされていた。Pax6は、腫瘍の起源である神経顆粒細胞の分化や移動に重要な役割を有し、PdgfraやOtx2は、ヒト髄芽腫でも腫瘍間で異なるレベルで発現している。

放射線誘発型腫瘍は、自然発生型腫瘍より早く発症する傾向があるため、上記モデルの検証を行うことは、放射線誘発型腫瘍の特徴理解や発生メカニズム解明にとって重要である。

放射線誘発ラット乳がんモデルにおいて、自然発症および被曝時年齢の異なる放射線誘発乳がんそれぞれに特徴的なゲノムDNAメチル化異常が存在することが明らかとなった。3週齢の被曝で誘発された乳がんでは、一部のホルモン応答関連遺伝子の高メチル化が確認されたのに対し、7週齢の被曝による乳がんでは、低メチル化が確認された。この結果は、放射線誘発乳がんのゲノムDNAのメチル化は、がんの標的細胞や被曝時の正常乳腺のDNAメチル化パターンの違いを反映し、ホルモン応答関連遺伝子の発現に関与していることを示唆している。思春期後の被ばくにより誘発された乳がんでは、*Id3*遺伝子および*Loxl*遺伝子の高メチル化と発現抑制が特徴的であった。*Id*遺伝子ファミリーは、乳腺の発生に機能することから、思春期後の放射線誘発乳がんには、乳腺の発生異常が関係していると考えられる。CGH解析により、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が、これらは化学発がん感受性に関わる領域とは異なっていた。また、自然発症および放射線で誘発されたラット乳がんにみられる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、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。今後は、原爆被爆者の検体等を用いた研究へと発展させ、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できる可能性がある。

放射線障害による発がんモデルにおける検証のひとつとしてREV1の機能解析を進めた。REV1が中心的役割をなす損傷乗り越えDNA合成機構は、様々なゲノム損傷に対応しゲノムを防護しその恒常性を維持する

複雑な生体応答システムの一つである。Hジョン研究において、REV1の発がん促進効果は、DNA損傷応答反応には直接的には関与せず、細胞死や突然変異頻度に作用することによると示唆される。今後、この機構の解析が進めば、放射線発がんを始め一般のがんが発症する新しいメカニズムの解明が進むことが期待される。

複製後修復も、ゲノム損傷に対応してゲノムを防護する重要な機構であるが、一方で点突然変異誘発にも関与することが知られている。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。放射線照射によりDNAは二重鎖切断や酸化的損傷といったさまざまな損傷を受ける。本研究から、RAD18はG2/M期の細胞において放射線照射後に誘導される細胞応答機構に関与すること、RAD18は放射線照射後のゲノムの安定化に寄与することが明らかとなった。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、損傷修復に寄与し、細胞周期チェックポイントの誘導に関与すると考えられる。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。

SYCE2は減数分裂期のシナプトネマ複合体を構成する分子である。放射線とシスプラチンの感受性への影響については、SYCE2の発現はこれらのDNA損傷に対して細胞に抵抗性を誘導することが明らかとなった。ゲノム損傷応答経路が活性化していることは、放射線治療や化学療法に対する抵抗性が誘導されていることを示唆する。SYCE2の発現と治療抵抗性については、多数の臨床例で検証する必要がある。染色体の数的異常は、がんの進展に寄与することが想定されるが、成因についてはまだ不明

である。

SYCP3は正常では生殖細胞における減数分裂においてのみ発現するが、多種類のがんにおいてメチル化の異常によって発現することが明らかになっている。生殖細胞以外においてSYCP3が発現した場合、DNA二本鎖切断に対する相同組換え修復の機能が低下することによって、ゲノム不安定性が誘導される。その機構としては、SYCP3がこの修復経路において重要な役割を果たすBRCA2に結合して、その機能を阻害することが明らかとなっている。BRCA2の変異は遺伝性乳がん・卵巣がんの原因となるが、その頻度に比べてSYCP3のがんにおける異常発現の頻度が高い。本研究から、BRCA2が変異していない場合にSYCP3が発現すると、PARP阻害剤に対する感受性が亢進することが判明した。DNA修復機能を制御する遺伝子の発現異常の解析により、合成致死の概念を基盤とする治療方法の開発が可能となることが期待される。

減数分裂特異的コヒーシであるSMC1 β に注目して検討し、ヒト各種類のがん細胞株での発現を確認した。また、SMC1 β の発現によるRad51のフォーカス形成の抑制は、相同組換え修復が抑制されたことを意味する。その結果、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。SMC1 β ががん細胞を含む体細胞に発現すると、コヒーシ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、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。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のリクルート状況を解析することが必要である。

Rad54Bがp53のどの機能を制御しているのかを理解することは重要である。本年度の研究成果によって、Rad54BがMDM2-MDMXによる分解経路という負の制御機構に関与することが明らかとなった。DNA損傷応答におけるp53に対する正と負の制御機構の存在が明らかになることによ

り、チェックポイントと細胞死の選択に係る理解が深まっていくと思われる。Rad54B量の低下によりG1期チェックポイントが強化された。放射線照射後のDNA損傷応答機構において、チェックポイントの強さは微妙に制御され、その後の細胞の運命が決まる可能性が示唆された。この考え方は、放射線発がんの機序を明らかにするために重要であると考えられる。

原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がんに関して、NK細胞およびCD8陽性細胞傷害性T細胞の細胞表面のNKG2D蛋白発現量とNKG2D遺伝子型との関連およびNKG2D遺伝子型とHCV感染との関連を明らかにした。NKG2Dは、NK細胞、CD8+細胞傷害性T細胞などに発現する細胞表面レセプターであり、ウイルス感染やがんなどに対する免疫監視の主要な役割を担っている。原爆被爆者コホートでの肝発がんリスクへのNKG2D遺伝子型と原爆放射線被曝の影響を調べた結果では、参照(HNK1/HNK1で非被曝)集団に比べ、最も高い被曝線量のLNK1遺伝子型を持つ集団で肝発がんリスクが最大となった。肝発がんにはNKG2Dハプロタイプのみならず放射線被曝も関与することが示された。

CD14のプロモーター領域の遺伝子多型と大腸発がん、放射線被曝の影響についての研究からは、CD14遺伝子型に関連した免疫炎症応答が結腸がんの発生に関与すること、CD14遺伝子型によって放射線への応答が個人によって異なる可能性が示唆された。リポポリサッカライド(LPS)受容体として作用するCD14蛋白は、大腸菌などの抗原存在下でLPSが結合することにより、TNF- α 、インターフェロン γ などを誘導する。また、腸上皮細胞や活性マクロファージがCD14を産生していることから、CD14が腸管免疫の主要なregulatorである可能性がある。このCD14遺伝子型に関連するCD14の産生蛋白量の個人差が、自然免疫応答の個人差、および炎症誘導の個人差にも関連する可能性が考えられる。

血漿中と細胞内の活性酸素(ROS)レベ

ルに対する放射線被曝の影響ならびにROSレベルに関係する免疫・炎症関連遺伝子多型について検討した。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一方、免疫関連細胞内のROS産生の減少は免疫能を低下させると考えられている。*IL6R*遺伝子型がその蛋白発現に機能的な意味を持ち、放射線関連結腸直腸がんの発生リスクの個人差に関与している可能性が示めされた。ある特定の*IL6R*遺伝子型の集団は、元々は*sIL-6R*レベルが低く、細胞内ROSレベルも低い集団ではあるが、放射線被曝の長期経過後の免疫機能が低下する年代に到達した際に、細胞内ROSレベルの顕著な変化が起こり、がんを発生する放射線関連発がんの遺伝的高危険群となる可能性が考えられる。これらの調査をさらに詳細に進めることにより、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が可能となる。

*P53BP1*の下流に位置し、*P53*依存性の細胞周期調節する *cyclin D1*の遺伝子型と放射線誘発*GPA*突然変異頻度の有意な関連が認められた。*P53BP1*ならびに*cyclin D1*が関与する細胞周期調節機構が放射線による遺伝子障害感受性に関係している可能性が示唆される。放射線誘発*GPA*突然変異頻度との関連が認められた*P53BP1*ならびに*cyclin D1*の遺伝子型の違いが、実際にこれらの遺伝子機能の個人差に繋がっているのか実験的に検討する必要がある。さらに、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、放射線被曝の影響および *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。一方、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リンパ球産生も被曝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検討する必要がある。

TREC 数およびテロメア長の研究では、CD4 TREC および CD8 TREC いずれにおいても放射線被ばくとの関連性は認められなかった。胸腺機能が著しく低下した高齢者において、しかも被ばく後60年以上を経て、放射線の T 細胞産生能に及ぼす影響を明らかにするのは難しいのかもしれない。一方、肥満は炎症を誘発あるいは亢進し、ある種のがんを含む加齢関連疾患のリスクを増加させることが知られている。また、T細胞免疫系の老化は抗腫瘍免疫の減衰と関係すると考えられている。放射線被ばくによる発がんのメカニズムに、肥満とT細胞免疫系の老化が関与する可能性が示唆される。

E. 結論

放射線発がんの分子基盤を解明し、その成果をリスク評価や治療開発等の臨床応用に展開することを目的とし、「放射線関連がんにおけるエピジェネティクス」、「放射線障害による発がんモデルにおける検証」、「原爆被爆者コホートをを用いた宿主要因と発がん」の観点から研究を行なった。

被爆者に発生した胃がんのmiRNAの発現レベルを定量的に解析した結果、miR-143、miR-145が高線量被曝群で2倍以上に発現亢進しており、多変量解析によって、miR-143Highおよび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。被曝線量が100mGy以上の症例ではmiR-24高発現例が有意に多いことが分かった。fukutinの発現では、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。

放射線治療後二次がん解析のための症例の絞り込みを行ない、子宮頸がん放射線治療後の大腸がんと一般の大腸がんの検討から、放射線誘発がん特有のmiRNA発現パターンのあることが示めされた。トロトラスト肝がん症例と肝炎ウイルスによる肝がんにおけるmiRNAの発現パターンを比較し

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。

原爆被爆者乳がんにおいてmiR-650, miR-1298, miR-1303, miR-155, miR-1290, miR-1224-5pが高発現することを見いだした。乳がんにおけるlong non-coding RNAのメチル化異常を新たに同定した。また、乳がんで高頻度にメチル化異常を示す遺伝子として、*GATA6*, *NR5A2*, *GLI3*を同定した。

放射線誘発乳がんラットモデルを用いた検討で、*Ptch1*ヘテロ欠損マウスの髄芽腫モデルでは、放射線誘発腫瘍に特徴的なゲノム異常とDNAメチル化状態の相関性を明らかにした。放射線誘発乳がんラットモデルを用いた検討で、被曝時年齢の異なる乳がんの特徴的なDNAメチル化異常を同定し、放射線誘発乳がんを高頻度に欠失するゲノム領域を見いだした。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が示唆された。

REV1の解析から、その発がん促進効果は細胞死や突然変異頻度に及ぼす影響によると推定されるが、REV1による直接的なDNA損傷応答反応によるものではないことが示された。複製後修復機構と発がんについては、RAD18は、放射線照射後のDNA損傷応答機構、G2/Mチェックポイントの活性化に関与し、細胞死や染色体異常形成に影響を及ぼすことが明らかにされた。

SYCE2の解析から、DNA損傷応答経路が過剰に活性化され染色体不安定性が誘導されるとともに、放射線や化学療法に対する抵抗性がもたらされることが示めされた。また、SYCP3はBRCA2の機能を抑制し、DNA二本鎖切断に対する相同組換え修復機能が低下し、その結果、細胞はPARP阻害剤に対して高感受性を示すことが明らかとなった。減数分裂特異的コヒーシンであるSMC1 β は、Rad51を介した相同組換え修復によるDNA二本鎖切断修復を抑制し、放射線やシスプラチンに対する細胞の感受性を亢進させることが分かった。放射線照射後の細胞のDNA損傷応答機構においては、p53の量を正に制御するATMを介する経路と

ともに、MDM2とMDMXによるp53の分解を促進する経路にDNA修復タンパク質が関与することが明らかとなった。

原爆被爆者コホートを用いた検討では、放射線被曝による肝発がんリスクの増加に個人差があり*NKG2D*遺伝子型が遺伝因子の一つとして関与している可能性が示唆された。大腸発がん*CD14*遺伝子多型の関係から、原爆被爆者の結腸発がんに関連する要因と原爆放射線被曝が影響を及ぼし、持続性炎症がこれらのがんの発生に関与する可能性が示唆された。*IL6R-208A/G*遺伝子型はsIL-6Rの血漿中レベルの個人差に関与する機能性遺伝子多型の可能性が考えられた。また、*IL6R*遺伝子型は細胞内ROSレベルの個人差にも関与し、遺伝的要因として原爆被爆者の放射線関連結腸直腸発がんに関与している可能性が示唆された。

放射線誘発*GPA*突然変異頻度と*cyclin D1*の遺伝子型との有意な関連が認められ、P53BP1およびその下流のDNA修復経路に関わる遺伝子機能の個人差が、放射線誘発遺伝子障害の感受性に影響を及ぼす可能性が示唆された。原爆被爆者の末梢造血幹細胞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された。原爆被爆者において、T細胞免疫老化の特徴であるTREC数の減少とテロメア長短縮は、肥満指標の増加と逆の関係を示し、2型糖尿病や脂肪肝の罹患と関連していた。

本研究から得られた成果を活用することにより、放射線障害に対する具体的な評価法や予防策および放射線障害に起因するがんの診断法・治療法を提示することが可能となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照。

2. 学会発表

<平成22年(2010年)度>

1. Anami K, Yasui W, et al.: Desmocollin 2 (DSC2), identified by CAST method, is associated with intestinal phenotype of gastric cancer. The 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., Maryland (USA), April 17-21, 2010
2. Sakamoto N, Yasui W, et al.: Serial Analysis of gene expression (SAGE) of esophageal squamous cell carcinoma: ADAMTS-16 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma. The 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington D.C., Maryland (USA), April 17-21, 2010
3. Yasui W: Molecular basis of intestinal and gastric phenotypes of gastric cancer. The 17th Seoul International Cancer Symposium “Gastric Cancer Update 2010”, Seoul (Korea), June 1, 2010
4. Sentani K, Yasui W, et al.: Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: claudin-18 is associated with poor prognosis. The 198th Scientific Meeting of the Pathological Society of Great Britain & Ireland, St Andrews (Scotland), UK, June 29-July 1, 2010
5. Yasui W: Novel diagnostic and therapeutic targets of gastrointestinal cancer identified by “Omics” study. The 9th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, Educational Lecture, Gifu (Japan), August 25-27, 2010
6. Yasui W, et al.: Molecular character of gastric and intestinal phenotypes of gastric cancer. The 6th International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis, Lecture: Session 4 “Molecular Marker in GI Cancers”, Houston (USA), January 6-8, 2011
7. 坂本直也, 安井 弥, 他. ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いた胃癌におけるmicroRNA発現解析. 第99回日本病理学会総会, 4月27-29日, 東京, 2010
8. 伊藤玲子, 安井 弥, 他. 原爆被爆者の大腸がんにおけるMSIに関わる遺伝子変化とその免疫組織学的検討. 第99回日本病理学会総会, 4月27-29日, 東京, 2010
9. 大上直秀, 安井 弥, 他. 胃癌における細胞表面蛋白質desmocollin2の解析. 第19回日本がん転移学会学術集会・総会 ミニシンポジウム (2) がん転移診断, 6月16-17日, 金沢, 2010
10. 安井 弥: トランスクリプトーム解析による新規診断標的の同定とがん病理診断への応用. 第69回日本癌学会学術総会, シンポジウム5 「がん病理診断の進歩と今後の展開」, 9月22-24日, 大阪, 2010
11. 上田哲也, 安井 弥, 他. 胃癌の進行と予後に関するmicroRNAの探索. 第69回日本癌学会学術総会, インターナショナルセッション8, 9月22-24日, 大阪, 2010
12. 浦岡直礼, 安井 弥, 他. 原爆被爆者に発生した胃癌におけるmicroRNA発現解析. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
13. 若松雄太, 安井 弥, 他. 胃癌における原発巣とリンパ節転移巣の粘液形質発現の比較. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
14. 坂本直也, 安井 弥, 他. 胃癌におけるmicroRNA発現解析: miR-148aの胃癌組織における発現低下. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
15. 内藤 寛, 安井 弥, 他. 消化管におけるREG4遺伝子のCDX2による誘導. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
16. 安井 弥, 他. 胃癌組織を用いたCAST法による胃癌の新たなバイオマーカー

- の探索. 第69回日本癌学会学術総会, 9月22-24日, 大阪, 2010
17. 阿南勝宏, 安井 弥, 他. CAST法で同定された胃型胃癌関連分子TSPAN8の解析. 第21回日本消化器癌発生学会総会, 11月18-19日, 軽井沢, 2010
 18. Ishikawa Y. New aspects of pathological diagnosis and classification of cancer: focusing on miRNA expression and signaling pathways. Symposium 5 “Advancement of cancer pathology diagnosis and its future development” 2010 Sept 22-24, Osaka.
 19. Miyamoto K. Epigenetic alterations in human breast cancer. Sapporo cancer epigenetics workshop of the A3 foresight program and the first Sapporo international seminar on cancer epigenetics, March 12-13, 2010
 20. Miyamoto K. MicroRNA in triple-negative breast cancer. The 15th Japan – Korea cancer research workshop, December 21-22, 2010
 21. 宮本和明. トリプルネガティブ乳癌におけるmicroRNAの発現異常. 第18回日本乳癌学会学術総会平成22年6月24日-26日, 札幌
 22. 高島貴志, 島田義也, 他. *Ptch1*ヘテロ欠損マウスにおける放射線誘発髄芽腫の特徴, 日本放射線影響学会第53回大会, 京都市, 2010年, 10月
 23. 島田義也, 高島貴志, 他. 放医研における動物実験のアーカイブ化の進展, 同上, 京都市, 2010年, 10月
 24. 甘崎佳子, 高島貴志, 島田義也, 他. X線誘発胸腺リンパ腫の被ばく時年齢依存性の解析(1); *Ikaros*の変異解析, 同上, 京都市, 2010年, 10月
 25. 石田有香, 高島貴志, 島田義也, 他. マウス放射線誘発髄芽腫に認められる被ばく時期依存性と小脳発生段階に伴うLOH様式の違い, 同上, 京都市, 2010年, 10月
 26. 高島貴志, 島田義也, 他. 放射線誘発髄芽腫における遺伝子発現とDNAメチル化パターンの特徴, 発がん病理研究会, 宮城県松島町, 2010年, 8月
 27. 西村まゆみ, 高島貴志, 島田義也, 他. DNA copy number changes in radiation-induced mammary carcinoma of (SD x COP) F1 hybrid rats, ヨーロッパ癌学会, オスロ, 2010年, 6月
 28. 島田義也, 高島貴志, 他. Experimental research on radiation health effects on children, Bond symposium, アメリカ, 2010年, 5月
 29. 神谷研二: 放射線科学の将来展望について/日本放射線影響学会. (独)放医研ダイアログセミナー「放射線科学のこれからを考える」, 千葉市, 4/7/2010
 30. 笹谷めぐみ, 神谷研二, 他. 放射線分割照射によって誘発される胸腺リンパ腫発症メカニズムと損傷乗り越えDNA合成機構異常が及ぼす影響. 第6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, 6/5/2010
 31. 笹谷-豊島めぐみ, 神谷研二, 他. 放射線応答における損傷乗り越えDNA合成の役割. 第51回原子爆弾後障害研究会, 長崎, 6/6/2010
 32. 神谷研二: がん研究入門コース1, 1-1 発がん機構におけるゲノム安定性とDNA修復. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9/24/2010
 33. 笹谷めぐみ, 神谷研二, 他. Rev1の過剰発現は化学物質による発がんを促進する. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9/24/2010
 34. 鈴木 元, 神谷研二, 他. 肺小細胞癌に見られたPOLD4低発現. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9/24/2010
 35. 浅川順一, 神谷研二, 他. DNA2次元電気泳動法を用いた放射線のラット未熟卵母細胞に及ぼす遺伝的影響評価: ヒト女性被曝の動物モデル実験. 日本放射線影響学会第53回大会, 京都市, 10/20/2010