

機関番号：17301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790357

研究課題名 (和文)

53BP1 核内フォーカスを指標とした原爆被爆者組織におけるゲノム不安定性の検出

研究課題名 (英文) Detection of genomic instability using a level of 53BP1 nuclear focus in Atomic bomb survivors tissue

研究代表者

三浦 史郎 (MIURA SHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80513316

研究成果の概要 (和文)：

原爆被爆者に発生した癌と原爆放射線被曝との関連を調べている。被爆者の細胞の中に放射線の影響の痕跡 (ゲノム不安定性) が残っており、そのために癌の発生がおこると考え、被爆者乳癌患者の正常皮膚組織におけるゲノム不安定性を調べた。ゲノム不安定性の指標として、53BP1 という DNA 二重鎖切断部位に集簇する蛋白を用いた。近距離被爆者群の正常細胞では、ゲノム不安定性が亢進していることが示唆され、癌化への関与が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

We have examined associations with cancer in atomic bomb (A-bomb) survivor and A-bomb radiation exposure. We have estimated that the signature of radiation effect (genomic instability: GIN) remains in A-bomb survivors' cells and GIN induce carcinogenesis. This study aims to detect the existence of GIN in normal skin tissue in A-bomb survivors. We use a protein of 53BP1 localized at the sites of DNA double strand breaks and forms discrete nuclear foci to detect GIN. The results of this study suggest GIN in normal cells of the proximal group (shorting distance group from the hypocenter) is increasing, and GIN induced radiation is associated with A-bomb survivors' carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：人体病理学、放射線影響科学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：原爆被爆者、ゲノム不安定性、放射線、53BP1、DNA 損傷応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 原爆被爆者の晩発性健康影響の主たるものとして固形がんが知られる。被爆後 60 年以上を経過した現在においてもその罹患率の増加が継続しているが、被爆者固形がん発症メカニズムについては、未だに不明な点

が多い。

(2) 我々は、放射線誘発甲状腺癌に *RET* 遺伝子増幅を見出し、さらに、被爆者には乳癌リスクの上昇に加え、HER-2 と C-MYC がん遺伝子の共増幅率が高頻度であることを報

告している。

(3) がん遺伝子の増幅は固形がん発生における重要な分子異常であり、ゲノム不安定性 (genomic instability: GIN) の結果とみなされている。放射線により発生した DNA 上の損傷修復後の未知の影響が、GIN (易腫瘍発症性) として被爆者の細胞内で存続していることが考えられる。そこで、放射線による DNA 二重鎖切断部位に集積し核内フォーカスを形成する 53BP1 を指標とし、被爆者組織・細胞における GIN の評価を行っている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、「被爆者には原爆放射線被曝により誘導された GIN が長期存続していて、発がん亢進の背景因子となっている」という仮説を検証する。

(2) 原爆後障害として重要な発がんの分子機構の解明につながる易腫瘍発症性のリスク因子としての GIN を正常部組織上で評価することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) HER2、C-MYC 遺伝子増幅または免疫染色で HER2 の過剰発現の判明している原爆被爆者乳癌症例のうち、皮膚の合併切除されている症例を対象とした。

(2) 近距離群 (被爆距離 1.5km 以下)、遠距離群 (被爆距離 2km 以上)、非被爆者群、各々 22、15、17 例において表皮における 53BP1 の核内フォーカスを蛍光免疫染色法により評価し、FISH 解析、免疫染色解析結果と臨床病理学的事項および被爆距離との関連を多変量解析した。

4. 研究成果

(1) 乳癌組織のがん遺伝子過剰発現との関係 (表 1) : 計 54 例中遺伝子増幅または HER2 蛋白の過剰発現陽性症例は 18 例で、近距離群の HER2 遺伝子増幅症例における 53BP1 フォーカス陽性細胞率は平均 9.7%であった。一方、遠距離群、非被爆者群の遺伝子増幅陰性例でのフォーカス陽性細胞率は各々平均 4.68%, 4.70% で、有意に低値であった ($p < 0.05$)。また、HER2 蛋白過剰発現を示す症例においても、近距離群では 9.71%と高率に 53BP1 のフォーカス形成が見られるのに対し、遠距離群、非被爆者群の HER2 蛋白過剰発現陰性例ではそれぞれ 3.57%, 4.50%と有意に低値であった ($p < 0.05$)。また、フォーカス陽性細胞が 10%以上を占める症例はがん遺伝子過剰発現陽性群、陰性群、各々 38.9、13.9%であり、過剰発現陽性群で有意に高値であった ($P < 0.05$)。

表 1: 遺伝子増幅と 53BP1 フォーカス陽性率との関係

Results	Exposure distance		Control (n=17)	p-value*
	≤1.5km (n=22)	>2.0km (n=15)		
FISH				
HER2 amplification				
Negative	8.14%	4.68%	4.70%	0.0234
Positive	9.70%	13.0%	5.18%	
No signal	9.58%	5.22%	5.61%	
C-MYC amplification				
Negative	8.27%	10.3%	5.02%	0.8975
Positive	10.4%	1.96%	6.07%	
No signal	8.42%	5.22%	4.35%	
Immunohistochemistry				
HER2				
-	8.63%	3.57%	4.50%	0.0120
+	9.71%	10.9%	6.12%	

*Jontheere-Terpstra test

(2) 原爆放射線との関係 (表 2) : 近距離群、遠距離群、非被爆者群のフォーカス陽性細胞は各々平均 9.1、6.3、4.9%であり、放射線の影響が少なくなると、有意に減少する傾向を示した ($p < 0.01$)。同様にフォーカス陽性細胞が 10%以上を占める症例は近距離群、遠距離群、非被爆者群で各々 40.9、20.0、5.9%であり有意に減少傾向を示した ($p < 0.05$)。さらに核 1 個当りにフォーカス数 3 個以上を呈する症例は近距離群、遠距離群、非被爆者群で各々 54.5、26.7、5.9%であり有意に減少傾向を示した ($p < 0.05$)。多変量解析 (ステップワイズ法による変数選択: 被爆時年齢、罹患年齢、被爆距離、乳癌異型度、HER2 遺伝子増幅、C-MYC 遺伝子増幅) でも近距離であるほどフォーカスの発現が多く見られ (OR: 8.5, 95%CI: 1.6~67.6)、HER2 遺伝子増幅があるほどフォーカスの発現が多く見られた (OR: 3.6, 95%CI: 1.5~102.8)。

表 2: 被爆距離と 53BP1 フォーカス陽性細胞との関係

	Exposure distance		Control (n=17)	p-value
	≤1.5km (n=22)	>2.0km (n=15)		
Focus positive ratio	9.08%	6.25%	4.89%	0.0011
>10% Focus positive	40.9%	20.0%	5.88%	0.0104
>3 focus positive cells	54.5%	26.7%	5.88%	0.0364

*Jontheere-Terpstra test

(3) 臨床病理学的因子との関係 (表 3) : 腫瘍の大きさ、組織学的異型度、リンパ節転移とフォーカス陽性細胞数には明らかな関連は見出せなかった。

表 3: 臨床病理学的因子と 53BP1 フォーカス陽性率との関係

Pathologic factors	Exposure distance		Control (n=17)	p-value**
	≤1.5km (n=22)	>2.0km (n=15)		
Tumor size				
T1: ≤20mm	8.29%	6.14%	5.32%	0.7203
T2: 20-50mm	9.32%	6.33%	4.84%	
T3: >50mm	8.94%	0.0%	4.01%	
Histological grading*				
Grade 1	9.10%	4.68%	4.40%	0.052
Grade 2	9.65%	5.92%	5.95%	
Grade 3	8.65%	7.18%	4.67%	
Nodal metastasis				
pN0	11.13%	6.94%	5.49%	0.3894
pN1 or N2	8.57%	6.47%	4.66%	
pNX	4.77%	3.88%	4.86%	

* according to modified Bloom-Richardson's system

**Jontheere-Terpstra test

(4) まとめ：正常細胞での自然発症性 DNA 損傷応答の亢進は GIN の存在を示唆している。がん細胞での遺伝子増幅も GIN に起因する現象とされる。被爆者乳癌は原爆放射線の関与が知られる固形がんである。近距離被爆者では放射線被曝により GIN が長期存続し、発がん過程への関与が推察される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Matsuda K, Miura S, Kurashige T, Suzuki K, Kondo H, Ihara M, Nakajima H, Masuzaki H, Nakashima M: Significance of p53-binding protein 1 nuclear foci in uterine cervical lesions: Endogenous DNA double strand breaks and genomic instability during carcinogenesis. *Histopathology* 査読有 in press
- ② Shichijo K, Ihara M, Miura S, Kurashige T, Matsuyama M, Nakashima M, Nakayama T, Sekine I: DNA damage response in aberrant crypt foci of radiation colitis as a anti-cancer barrier in early tumorigenesis. *Gastroenterol* 査読有 138(Suppl.1):S-509, 2010
- ③ 三浦史郎, 中島正洋, 蔵重智美, 塚崎邦弘, 岩永正子, 近藤久義, 横田賢一, 三根真理子, 山下俊一, 関根一郎: 長崎被爆者腫瘍組織バンク構築とその必要性. *広島医学* 査読無 63:275-277, 2010
- ④ 三浦史郎, 蔵重智美, 塚崎邦弘, 近藤久義, 横田賢一, 三根真理子, 宮崎泰司, 関根一郎, 中島正洋: 長崎被爆者腫瘍組織バンク構築に向けた生体試料収集の経過報告. *長崎医学会雑誌* 査読無 85:294-297, 2010
- ⑤ 亀山大介, 陳 俊全, 三嶋亮介, 井上健一郎, 三浦史郎, 牧山和也: 直腸炎型の潰瘍性大腸炎にクラミジア直腸炎を併発した 1 例. *長崎医学会雑誌* 査読無 85:30-36, 2010

[学会発表] (計 8 件)

- ① Matsuyama M, Shichijo K, Kurashige T, Okaichi K, Miura S, Nakashima M: Induction of autophagy in rat thyroid gland after external irradiation. 広島大学原爆放射線医科学研究所第 1 回国際シンポジウム 2011.3.3-4 広島
- ② 松山睦美, 蔵重智美, 七條和子, 岡市協生, 平川 宏, 三浦史郎, 中島正洋: 成熟甲状腺濾胞上皮の放射線誘発細胞死耐性の分子機構. 第 53 回日本甲状腺学会学術集会 2010.11.11-13 長崎

- ③ 松山 睦美, 蔵重 智美, 七條 和子, 岡市協生, 平川 宏, 三浦 史郎, 中島 正洋: 放射線照射ラット甲状腺組織での DNA 損傷応答分子発現解析. 第 53 回日本放射線影響学会 2010.10.20-22 京都
- ④ 三浦史郎, 蔵重智美, 塚崎邦弘, 近藤久義, 横田賢一, 三根真理子, 宮崎泰司, 関根一郎, 中島正洋: 長崎被爆者腫瘍組織バンク構築に向けた生体試料収集の経過報告. 第 51 回長崎原子爆弾後障害研究会 2010.6.6 長崎
- ⑤ 松田勝也, 三浦史郎, 蔵重智美, 鈴木啓司, 近藤久義, 増崎英明, 中島正洋: 子宮頸部腫瘍での 53BP1 と Ki67 蛍光二重免疫染色による DNA 損傷応答異常解析: 高度異形成と上皮内癌の鑑別. 第 6 回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス 2010.6.5 長崎
- ⑥ 三浦史郎, 中島正洋, 蔵重智美, 塚崎邦弘, 山下俊一, 関根一郎: 長崎原爆被爆者腫瘍組織バンクの構築と臨床病理学的解析~第 2 報. 第 99 回日本病理学会総会 2010.4.27-29 東京
- ⑦ 松田勝也, 中島正洋, 三浦史郎, 蔵重智美, 鈴木啓司, 増崎英明, 関根一郎: 子宮頸部腫瘍での 53BP1 と Ki67 蛍光二重免疫染色による DNA 損傷応答異常解析: 高度異形成と上皮内癌の鑑別. 第 99 回日本病理学会総会 2010.4.27-29 東京
- ⑧ ムサジヤノフ ジャンナ, 中島正洋, サイエニコ ウラジミール, 三浦史郎, 関根一郎: 甲状腺微小乳頭癌での 53BP1 発現の意義: BRAF 遺伝子変異とリンパ節転移との関連. 第 99 回日本病理学会総会 2010.4.27-29 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
[http://users.tls-style.jp/nagasaki-u/pa
thology/](http://users.tls-style.jp/nagasaki-u/pa
thology/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 史郎 (MIURA SHIRO)
長崎大学・大学院・医歯薬学総合研究科
研究者番号：80513316

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：