

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：85401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21791238

研究課題名（和文） 原爆被爆者に発生した肺がんの分子腫瘍学的研究

研究課題名（英文） Molecular oncological study on lung cancer among atomic-bomb survivors

研究代表者

多賀 正尊（TAGA MASATAKA）

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・研究員

研究者番号：70359462

研究成果の概要（和文）：原爆投下後 60 年以上が経過しても原爆被爆者における肺がんのリスクはいまだに高い。しかし、放射線被曝が長期間にわたり肺がん発生に影響を及ぼす分子機序は不明である。そこで、肺発がんに関連する分子的变化を解析して、原爆被爆者肺がんの分子腫瘍学的特徴を明らかにすることを本研究の目的とした。これまでの試行調査とあわせ、本研究によって、放射線被曝が、肺がんの特定の遺伝子変異の頻度やその変異パターン、そして DNA メチル化などの分子的变化に影響を与えている可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Risk of lung cancer among atomic-bomb (A-bomb) survivors remains high even now, more than 60 years after the bombings. However, the molecular mechanisms behind how radiation exposure influences the development of lung cancer have long remained unclear. Therefore, this study aimed to investigate the molecular oncological characteristics of lung cancer among A-bomb survivors by analyzing molecular alterations associated with lung carcinogenesis. In combination with our preliminary study, results obtained from this study suggest the possibility that molecular alterations such as frequencies of certain gene mutations and the types and DNA methylation may be associated with radiation exposure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：放射線発がん

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線、肺がん、遺伝子変異、メチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) 原爆投下後 60 年以上が経過しても原

爆被爆者における肺がんの過剰相対リスクは未だに高い。しかし、放射線被曝が長期間

にわたり肺がん発生に影響を及ぼす分子機序は不明である。さらに、原爆被爆者に関する研究を含め、放射線関連肺がん組織試料を用いた研究は、国内・国外ともに少ない。

(2) 原爆被爆者に発生した肺がん症例の標本の多くは長期保存の過程で DNA の断片化が進んでおり、PCR 増幅産物が得られにくい。肺発がんに関連することが知られている遺伝子変異などを解析し、放射線と関連する肺発がんの発生機序を明らかにする手がかりを得るためには、長期保存組織から抽出した DNA の増幅効率を高める必要がある。

(3) これまでの原爆被爆者の肺がん組織試料を用いた試行調査から、放射線被曝が *TP53* 遺伝子変異の頻度やその変異パターンに影響を与えている可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

肺発がんに関連することが知られている分子的变化（遺伝子変異と DNA メチル化の変化）を解析し、被曝線量や喫煙歴を含む病理・疫学因子ならびに肺がんの組織型との関連を検討することによって、原爆被爆者肺がんの分子腫瘍学的特徴を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

研究対象として、広島の地元病理医ネットワークによって収集された原爆被爆者（放射線被曝者 20 人および非被曝者 18 人）の連結不可能匿名化された非小細胞肺がん組織 38 症例を調べた。組織試料と共に収集された患者の病理・疫学的データ（年齢、性別、病理組織型、分化度、喫煙歴など）を用いた。原爆被爆者の被曝線量は、「DS02」推定線量

を用いた。保存ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから組織切片を作り、レーザーマイクロダイセクションによってがん部および非がん部を切り出し、DNA を抽出した。

(2) メチル化の解析

遺伝子特異的なメチル化は、肺がんに関連するがん抑制遺伝子 *p16* と *RASSF1A* を調べた。ゲノム DNA 全体のメチル化は、レトロトランスポゾン LINE1 と Alu について調べた。各遺伝子とレトロトランスポゾンのメチル化レベルは COBRA (combined bisulfite restriction analysis) 法により定量した。電気泳動はポリアクリルアミドゲルあるいは Experion™ 自動電気泳動システム (Bio-Rad 社) を用いた。

(3) タバコ関連 DNA 付加体の定量

OxiSelect™ BPDE DNA Adduct ELISA Kit (Cell Biolabs 社) を用いて、タバコ関連 DNA 付加体の定量を試みた。

(4) 培養細胞への放射線照射によるメチル化の変化の検討

ヒト肺腺がん由来 A549 細胞に 2 Gy の X 線を一日一回照射し、合計 10 Gy と 20 Gy になるように細胞を継代した。生き残った細胞から DNA を抽出し、メチル化の状態を調べた。

4. 研究成果

(1) 肺がん関連遺伝子のメチル化

p16 と *RASSF1A* 遺伝子の DNA メチル化の状態を解析し、放射線被曝との関連を調べた。その解析から、被曝非小細胞肺がん症例の *RASSF1A* 遺伝子の DNA メチル化は非被曝症例よりも低頻度であり (32% (6/19) vs. 56% (10/18))、被曝症例では、扁平上皮がんのメ

メチル化の頻度は腺がんよりも低いという傾向がみられたが、統計学的な有意差はなかった。

(2) ゲノム DNA 全体のメチル化

扁平上皮がんでは、原爆放射線を被曝した患者 (n = 5) の周辺非がん組織の LINE1 メチル化レベルは非被曝者 (n = 5) の非がん組織のものよりも低かった。同じ患者のがん組織では、被曝者と非被曝者との間で、LINE1 メチル化レベルに差はなかった。一方、23 症例の腺がんでは、がん組織・非がん組織ともに、LINE1 メチル化について放射線の影響は観察されなかった。放射線のゲノム DNA 全体への影響をさらに検討するために、上記で解析した部位とは異なる LINE1 CpG 部位のメチル化と、他のレトロトランスポゾン Alu のメチル化の解析を行った。それらの結果をまとめると、扁平上皮がん患者では、がん組織のメチル化レベルは周辺非がん組織のものよりも低かった。一方、腺がんでは、がん組織・非がん組織ともにメチル化レベルに差はなかった。放射線被曝のメチル化への影響に関しては、LINE1 でもその CpG 部位によって、あるいは同じレトロトランスポゾンでも LINE1 と Alu では異なる可能性が示唆された。

(3) タバコ関連 DNA 付加体の定量

メチル化への放射線と喫煙の同時効果についても検討するために、タバコ関連 DNA 付加体を ELISA 法によって定量化する実験系の確立を試みた。本研究期間終了後は、原爆被曝者肺組織での DNA 付加体について調べる予定である。

(4) 培養細胞への放射線照射によるメチル化の変化の検討

培養細胞を用いた基礎実験からも放射線照射によるメチル化への影響を調べた。A549 細胞に対して X 線を照射し、LINE1 と Alu のメチル化を解析したが、メチル化の変化は観察されなかった。

(5) Ras シグナル伝達経路に関連する遺伝子変異の解析

我々のこれまでの原爆被曝者肺がんに関する調査では、Ras シグナル伝達経路の遺伝子変異 (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*) と放射線との関連は観察されていない。近年、肺がん症例を用いた研究から、Ras シグナル伝達経路の活性化に関連する *ALK* 並びに *RET* 融合遺伝子が多数報告され始めている。我々も、現在、原爆被曝者保存肺がん組織の RNA から、これらの融合遺伝子が検出できるかどうかを試みており、本研究期間終了後は、放射線被曝との関連も検討していく予定である。

(6) 長期保存組織から抽出した DNA を用いた分子解析のための PCR 増幅の改良

原爆被曝者に発生した固形がんの分子腫瘍学的研究に有用な研究手法の改良も本研究期間の中で取り組んだ。長期保存組織から抽出した DNA は断片化が進んでおり、PCR 増幅産物が得られにくい。そこで、同組織から抽出した DNA を緩衝液中で熱処理することにより PCR 増幅効率を上げる方法を確立した。また、この方法によって、メチル化レベルは変化しないことも確認した (論文投稿中)。

(7) まとめ

原爆被曝者保存肺がん組織とその周辺部の非がん組織におけるレトロトランスポゾン LINE1 のメチル化の解析から、原爆放射線被曝がゲノム DNA 全体のメチル化に影響を及

ばしている可能性が示唆された。さらに、試行調査の *TP53* 遺伝子変異の結果とあわせて、放射線被曝が、特定の遺伝子変異の頻度やその変異パターン、そして DNA メチル化などの分子的变化に影響を与えていることも示唆された。一方で、これらの観察結果は、限られた研究対象数に基づくものであり、組織試料数を増やした更なる解析を進めるつもりである。

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 2 件)

Taga M, Mechanic LE, Hagiwara N, Vähäkangas KH, Bennett WP, Alavanja MC, Welsh JA, Khan MA, Lee A, Diasio R, Edell E, Bungum A, Jang JS, Yang P, Jen J, Harris CC.

EGFR somatic mutations in lung tumors: Radon exposure and passive-smoking in former- and never-smoking U.S. women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 査読有 印刷中

Hamatani K, Eguchi H, Mukai M, Koyama K, Taga M, Ito R, Hayashi Y, Nakachi K.

Improved method for analysis of RNA present in long-term preserved thyroid cancer tissue of atomic bomb survivors. *Thyroid*. 査読有 20(1):43-9 (2010)

[学会発表] (計 2 件)

多賀正尊、伊藤玲子、丹羽保晴、三角宗近、中地 敬、安井 弥、楠 洋一郎、濱谷清裕
原爆被爆者で発生した非小細胞肺癌における LINE1 の DNA メチル化
日本放射線影響学会第 53 回大会

2010 年 10 月 20-22 日 京都

多賀正尊、伊藤玲子、三角宗近、中地 敬、安井 弥、濱谷清裕

原爆被爆者で発生した非小細胞肺癌におけるがん関連遺伝子の DNA メチル化

日本放射線影響学会第 52 回大会

2009 年 11 月 11-13 日 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多賀 正尊 (TAGA MASATAKA)
財団法人放射線影響研究所・
放射線生物学/分子疫学部・研究員
研究者番号：70359462

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：