

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390190
 研究課題名（和文） 持続性炎症の遺伝的要因の究明とその生活習慣病への関与に関する分子疫学研究
 研究課題名（英文） Molecular epidemiology study on genetic factors of persistent Inflammation and their involvement in lifestyle-associated diseases
 研究代表者
 林 奉権（HAYASHI TOMONORI）
 財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・免疫学研究室長
 研究者番号：70333549

研究成果の概要：原爆被爆者コーホート研究を用いて、持続性炎症とそれに関連する遺伝子の多型との関係を調べ、原爆被爆者のがん発生への遺伝的要因と環境要因の影響について研究を行った結果、胃および肝がんリスクは原爆放射線量に伴い有意に増加するが、それらのリスクは炎症関連遺伝子 *IL-10* の遺伝子型により大きく影響を受けていることを見出した。特に放射線に被曝した時、これらのがんのリスクが高い人々を同定することが可能になると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：生活習慣病、サイトカイン、遺伝子多型、分子疫学、ゲノム、放射線、炎症

1. 研究開始当初の背景

炎症と疾患、特に冠動脈疾患およびがんの発症機構と炎症については多くの研究がこれまでになされてきている。また、炎症の遺伝的要因として炎症関連遺伝子の多型と疾患との関係についての研究も数多く報告されている。しかしながら、ヒト集団を対象としたこれまでの研究は数百名の小規模な集団での断片的調査によるものであった。また、炎症関連遺伝子多型と炎症関連生体指標との関連はほとんど検討されていない。疾患と遺伝子多型の関連性については、世界的にさまざまなコーホート研究が設定され、分子疫学研究が推進ならびに計

画されているが、本研究で用いるコーホート集団は、世界で最も長い追跡期間と綿密な健康調査データを持っている。これまで、放射線影響研究所の原爆被爆者の成人健康調査コーホート研究では、遺伝的背景に考慮しないで、放射線被曝と疾患の関連性を調査してきた。しかし、我々は、ある特定の HLA クラス II 遺伝子ハプロタイプを有する被爆者において、2 型糖尿病の発症リスクが被曝線量に依存して有意に増大することを最近明らかにした。また、多くの炎症関連生体指標が加齢だけでなく被曝線量に伴って増加することから、放射線被曝が加齢による炎症状態の亢進を促進すること、こ

れにより糖尿病、冠動脈疾患、がんなど生活習慣病のリスクが高くなっている可能性を指摘した。これらの知見は、放射線被曝の健康影響が個体の炎症状態およびそれを規定する炎症関連遺伝子の遺伝子型によって修飾される可能性を示唆する。また、本研究は対象者の生活習慣についての情報が利用可能であり、放射線のみならず他のさまざまな環境要因の影響についても解析できる。本研究は、炎症と生活習慣病の分子疫学的研究というだけでなく、原爆被曝者の冠動脈疾患、糖尿病、がんなどの炎症に関連した生活習慣病の高危険群を同定することによって、放射線関連疾患のメカニズム解明にも大きな貢献をすると考えられる。

2. 研究の目的

持続性炎症は冠動脈疾患、糖尿病、がんなどの生活習慣病発生の重要な過程である。炎症状態には複数の遺伝的要因と環境要因が組み合わさって影響を及ぼしていると考えられる。45年以上にわたって2年毎の各種血液検査データを含む健康調査データが蓄積されている原爆被曝者を対象としたコホート研究は、さまざまな疾患発症の追跡調査が行われているだけでなく、多くの炎症関連生体指標を測定してきた。さらに、放射線被曝線量のみならず、喫煙、飲酒など生活習慣病のリスクファクターへの曝露についても記録されている。したがって、炎症関連生体指標と生活習慣病リスクの関係、炎症関連遺伝子の遺伝子型あるいはハプロタイプの生活習慣病発症リスクが、生活習慣の違いや放射線被曝によってどのように修飾されるか調べるのが可能である。本研究は原爆被曝者コホート研究を用いて、持続性炎症とそれに関連する遺伝子の多型との関係を調べ、炎症関連生体指標への遺伝的要因と環境要因の影響を明らかにすることを目的とする。この遺伝的要因が究明できれば、生活習慣病の原因と進展に関する重要な新知見が得られ、炎症関連疾患の予防と診断方法および治療法の開発に大きく貢献することが期待される。炎症関連遺伝子多型に基づき生活習慣病の遺伝的感受性を明らかにするとともに、生活習慣病発症における放射線被曝の影響も検討する。また、研究対象者の疾患発症の追跡調査は将来にわたって継続されるので、炎症関連生体指標ならびに遺伝子多型についてのデータベースを作成し、今後の前向き研究の基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 研究デザイン

これまでの追跡調査により 7,000 名中、冠動脈疾患 1,000 名、糖尿病 1,000 名、がん症例 (全がん) 1,600 名を見出した。これ

ら症例群に対して 2,400 名の対照群を設定してコホート内症例対照研究を行った。

(2) 対象者のデータ収集と遺伝子解析のための DNA サンプルの調製

研究対象者 7,000 名の生活習慣・環境および臨床検査データを収集した。これまでにインフォームドコンセントを得た対象者 7,000 名の内、3,500 名については保存している血球成分からの DNA 抽出を完了しているので、残りの 3,500 名について保存している試料から DNA の抽出を行った。対象者から得られた貴重で有限な DNA 試料を有効に利用するため匿名化し、市販のキットを用いて全ゲノム増幅を行い遺伝子解析に供した。

(3) 炎症性サイトカイン遺伝子の解析多型部位の選定と多型解析

炎症性サイトカイン (*IL-6*, *TNF*, *LTA*, *LTB*, *IFNG*, *IL-10* など) の多型部位をデータベース (NCBI および JSNP) を基に選定した。本研究で多型を解析する候補遺伝子を探索するため、健常者 200 名の DNA パネルを作成し、炎症関連遺伝子をコードする遺伝子領域の多型を TaqMan-Allelic Discrimination 法により同定した。頻度が 10% 以上であり、単一遺伝子領域内の複数の配列多型部位ならびに複数の遺伝子座にまたがる多型の連鎖不平衡を解析し、ハプロタイプを決定した。

(4) 炎症性サイトカイン遺伝子の多型と炎症性サイトカインの血中レベルの関連分析

保存されている血液試料の中で遺伝子多型の解析に基づき、炎症性サイトカインの血漿中レベルを測定し、炎症性サイトカイン遺伝子多型との関連分析を行った。

(5) 炎症関連遺伝子の多型と炎症関連生体指標の血中レベルおよび生活習慣病との関連分析

遺伝子多型・ハプロタイプと各炎症関連生体指標の血中レベルの関連および生活習慣、環境要因、臨床データを総合して、特定の生活習慣病の高発症群を明らかにするとともに、放射線被曝により生活習慣病のリスクが特に高くなる集団を特定した。

4. 研究成果

(1) 炎症性サイトカイン *IL-10* の遺伝子多型と産生レベル、放射線被曝の関連

Interleukin-10 (*IL-10*) は、T 細胞、単球、マクロファージなどの血液細胞から分泌される抗炎症性作用とともに免疫抑制作用を持つサイトカインと考えられている。本研究では原爆被曝者集団を対象に、がん歴のない健常者の末梢血中 *IL-10* レベルを測定し、さらに *IL-10* 遺伝子領域上の 10 個の SNP 部位を解析した。解析した SNP 部位のうち 4 個の SNP は互いに連鎖不平衡を示し、ハプロタイプブロックを形成していることが示唆され

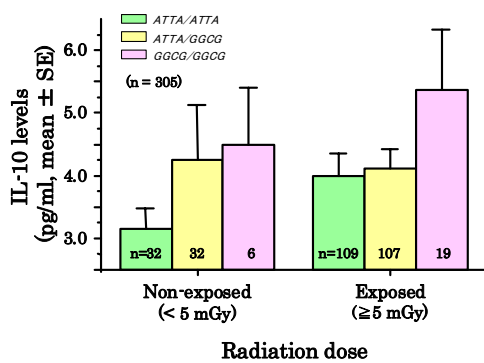


図1 放射線量、*IL-10*ハプロタイプ、産生レベルの関連

たため、この *IL-10* ハプロタイプと *IL-10* 産生レベル、被曝放射線量の関連を検討した。その結果、*IL-10* 産生レベルは *IL-10* 遺伝子型によって有意に異なり、さらに *ATTA* ホモ接合体の遺伝子型の *IL-10* レベルは放射線被曝によって大きく増加することが観察された(図 1)。したがって、炎症性サイトカイン *IL-10* の産生レベルという観点から、*IL-10* の特定の遺伝子型を持つ個人は放射線に対して高感受性である可能性が示唆される。

(2) 胃癌リスクにおける *IL-10* 遺伝子多型と原爆放射線被曝の影響

1982 年以降に診断された胃癌 180 症例(腸型 80 症例、びまん型 91 症例、その他 9 症例)と 1,548 名の対照群をがんに関与していないコーホートメンバーから無作為に選んだ。対象者を *IL10* ハプロタイプ 3 カテゴリー(*IL10-ATTA/ATTA*, *IL10-ATTA/GGCG*, *IL10-GGCG/GGCG*)と被曝線量別 3 カテゴリーによって 9 群に分けたところ、*IL10-ATTA/ATTA* ホモ接合体を持つ非被曝生存者に比べて、最も高い被曝線量群(≥0.622Gy)の *IL10-GGCG/GGCG* ホモ接合体を持つ生存者の胃癌リスク(OR=2.99, 95%CI: 1.32-6.77)が有意に増加していた(図 2)。

胃癌は腸型胃癌とびまん性胃癌によって発がん経路に違いがあると考えられている。そこで、腸型胃癌とびまん性胃癌のそれぞれについて、放射線被曝と *IL-10* ハプロタイプの組み合わせによる胃癌リスクを検討した。症例における両タイプの割合と被曝線量の関係を見ると、被曝線量が高い群ではびまん性胃癌の割合が増加し、腸型胃癌が減少していた。さらに、多変量解析により、他の交絡因子を考慮して解析しても、放射線被曝はびまん性胃癌の胃癌リスク増加に関与するが、腸型胃癌のリスクには有意な関連を示さないことが見出された。さらに、腸型胃癌では、*IL-10* ハプロタイプによって非被曝者の胃癌リスクが大きく異なっていた。しかしそれぞれのハプロタイプのがんリスクに

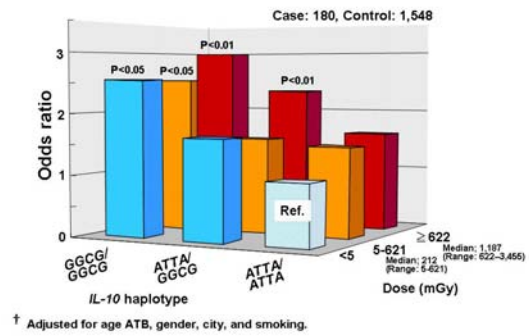


図2 胃癌リスクに対する *IL-10* ハプロタイプと放射線被曝の影響

放射線被曝は大きく影響しないことも示された(図 3 上)。これに対して、びまん性胃癌においては、*IL-10* ハプロタイプによるリスクは大きく異なり、放射線被曝によるリスクの増加は特に *ATTA/ATTA* について著しかった。その結果、高線量の放射線に被曝し変異対立遺伝子 *GGCG* を持つ対象者では胃癌のリスクが最も高かったが、*IL-10* ハプロタイプによるリスクの差異は減少した(図 3 下)。以上の結果から、過去の放射線被曝とびまん性胃癌の胃癌リスクに関連が見られた。一方、腸型胃癌では、有意な関連は見られなかった。また、びまん性胃癌では、*IL-10* のハプロタイプと放射線の強い相互作用が観察された。すなわち、特定のハプロタイプでは放射線被曝によるリスクの増加が

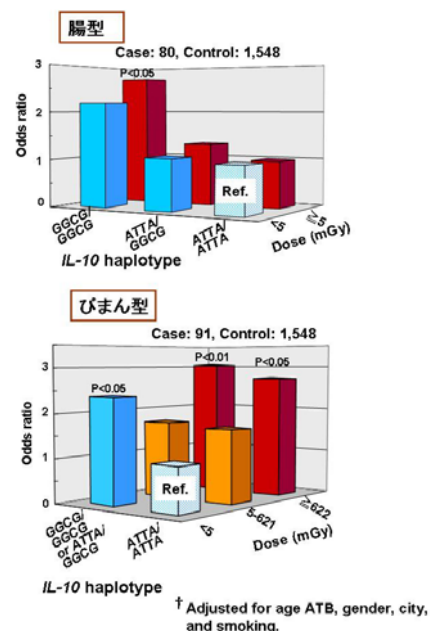


図3 組織型別胃癌リスクに対する *IL-10* ハプロタイプと放射線被曝の影響

顕著であり、放射線関連の胃がん発生に対する遺伝的感受性の高いグループが存在することが示唆された。

(3) 肝がんリスクにおける *IL-10* 遺伝子多型と原爆放射線被曝の影響

1982年以降に診断された肝がん90症例と1604名の対照群をがんに罹っていないコーホートメンバーから無作為に選んだ。対象者を *IL10* ハプロタイプ 2 カテゴリー (*IL10-ATTA/ATTA* vs. *IL10-ATTA/GGCG* or *IL10-GGCG/GGCG*) と被曝線量別 3 カテゴリーによって 6 群に分けたところ、*IL10-ATTA/ATTA* ホモ接合体を持つ非被爆生存者に比べて、最も高い被曝線量群 (≥ 0.575 Gy) の *IL10-GGCG/GGCG* ホモ接合体を持つ生存者の肝がんリスクが有意に増加していた (OR=2.43, 95%CI: 1.13-5.26) (図4)。

我々の結果は炎症に対する個人的感受性要因として機能的 *IL10* ハプロタイプが放射線関連胃がんと肝がんのリスクを変えるかもしれないということを示唆している。我々は本研究で示した発見がこれらのがんのリスクが高い人々を同定することおよび原爆被爆者や職業被爆または放射線治療を経験した他の集団の将来の効果的予防法の確立に貢献すると期待する。

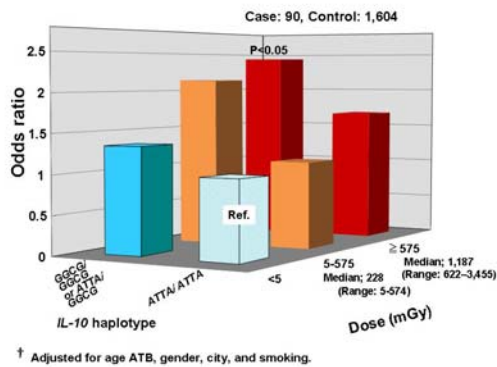


図4 肝がんリスクに対する*IL-10*ハプロタイプと放射線被曝の影響

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14件)

- ① Yoshida K, Kubo Y, Kusunoki Y, Morishita Y, Nagamura H, Hayashi I, Kyoizumi S, Seyama T, Nakachi K, Hayashi T, Caspase-independent cell death without generation of reactive oxygen species in irradiated MOLT-4 human leukemia cells, *Clin Immunol*, 255, 61-8, 2009, 査読有

- ② Sasazuki S, Hayashi T, Nakachi K, Sasaki S, Tsubono Y, Okubo S, Hayashi M, Tsugane S, Protective effect of vitamin C on oxidative stress: a randomized controlled trial. *Int J Vitam Nutr Res*, 78, 121-8, 2008. 査読有
- ③ Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, Matsumoto H, Hayashi T, Ogawa T, Imai K, Kuzuhara T, Nishizono A, Fujiki H. TNF-alpha-inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *Int J Cancer*. 123, 117-22, 2008. 査読有
- ④ Ohara M, Hayashi T, Kusunoki Y, Nakachi K, Fujiwara T, Komatsuzawa H, Sugai M, Cytotoxic distending toxin induces caspase-dependent and -independent cell death in MOLT-4 cells. *Infect Immun*. 76, 4783-91, 2008. 査読有
- ⑤ 放射線被曝と発がんリスクに及ぼす遺伝的要因、吉田健吾、林 奉権、森下ゆかり、長村浩子、牧 真由美、空 美佐江、今井一枝、楠 洋一郎、中地 敬、長崎医学会雑誌、83、254-8、2008、査読無
- ⑥ Nakachi K, Hayashi T, Hamatani K, Eguchi H, Kusunoki Y, Sixty years of follow-up of Hiroshima and Nagasaki survivors: current progress in molecular epidemiology studies. *Mutat Res*, 659, 109-17, 2008. 査読有
- ⑦ Kusunoki Y, Hayashi T, Long-lasting alterations of the immune system by ionizing radiation exposure: Implications for disease development among atomic bomb survivors. *Int J Radiat Biol*, 84, 1-14, 2008. 査読有
- ⑧ Hayashi I, Morishita Y, Imai K, Nakamura M, Nakachi K, Hayashi T, High-throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. *Mutat Res*. 631, 55-61, 2007. 査読有
- ⑨ Hayashi T, Fujiwara S, Kusunoki Y, Nakashima E, Suzuki G, MacPhee DG, Kyoizumi S, Risks of radiation-related diabetes differ among atomic-bomb survivors with different *HLA class II* haplotypes. *Immunobiology of the Human MHC*; pp340-3, 2007. 査読無
- ⑩ 原爆放射線のヒト免疫応答に及ぼす影響(第24報): CD43の発現を指標としたメモリーCD4 T細胞サブセットの測定、楠 洋一郎、山岡美佳、久保美子、濱崎幹也、林 奉権、京泉誠之、中地 敬、長崎医学会雑誌、81、350-3、2006、査読無
- ⑪ 原爆放射線のヒト免疫応答におよぼす影響 第23報: 炎症マーカーの長期的

- 上昇、森下ゆかり、林 奉権、長村浩子、久保美子、笠置文善、楠 洋一郎、箱田雅之、京泉誠之、藤原佐枝子、中地 敬、広島医学、59、413-6 2006、査読無
- ⑫ 原爆放射線のヒト免疫応答におよぼす影響 第22報：CD4 T細胞サブセット比率の被ばく放射線量依存性低下は長崎原爆被爆者においても明らかに認められる、久保美子、楠 洋一郎、箱田雅之、笠置文善、山岡美佳、空 美佐江、井上真弓、松浦信介、林 奉権、京泉誠之、藤原佐枝子、赤星正純、中地 敬、広島医学、59、409-12、2006、査読無
- ⑬ Hakoda M, Kasagi F, Kusunoki Y, Matsuura S, Hayashi T, Kyoizumi S, Akahoshi M, Suzuki G, Kodama K, Fujiwara S, Levels of antibodies to microorganisms implicated in atherosclerosis and of C-reactive protein among atomic bomb survivors. *Radiat Res* 166, 360-6, 2006. 査読有

[学会発表] (計18件)

- ① 林 奉権、原爆被爆における免疫ゲノム解析：*IL-10* ハプロタイプと放射線と腸型とびまん性の胃がんリスク、第38回日本免疫学会総会・学術集会 2008/12/01-03 京都
- ② 林 奉権、胃がんリスクと *IL-10* ハプロタイプとの関連およびそれに対する放射線被曝の影響、第67回日本癌学会学術総会 2008/10/28-30 名古屋
- ③ 林 奉権、腸型胃癌とびまん性胃癌のリスクと *IL-10* ハプロタイプとの関係およびそれに対する放射線被曝の影響、第17回日本組織適合性学会、2008/09/19-21 大阪
- ④ Hayashi T, Aging-associated elevation of inflammatory markers was accelerated among atomic-bomb survivors, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Immunology Board: Immunosenescence Workshop 2008/06/18-21 San Francisco, California, USA
- ⑤ Hayashi T, Effects of *IL-10* and *IL-6* gene polymorphisms and atomic-bomb radiation exposure on gastric cancer risk, IARC-EACR-AACR-ECNIS Symposium 2008/07/03-05 Lyon, France
- ⑥ Hayashi T, Relationship of intestinal- and diffuse-type gastric cancer risks to *IL-10* haplotypes and effects of radiation exposure on the relationship, 20th European Association for Cancer Research 2008/07/05-08, Lyon, France
- ⑦ 林 奉権、炎症関連サイトカイン遺伝子多型と原爆放射線被曝が胃がんリスクに及ぼす影響、第37回日本免疫学会総会・学術集会 2007/11/20-22 東京
- ⑧ Hayashi T, Effects of inflammation-related gene polymorphisms and atomic-bomb radiation exposure on gastric cancer risk, The 12th World Congress on Advances in Oncology and the 10th International Symposium on Molecular Medicine and Cancer Chemoprevention Symposium, 2007/10/11-13 Crete, Greece
- ⑨ Morishita Y, Elevated levels of plasma reactive oxygen species and inflammatory markers among atomic-bomb survivors, Joint ESTP/IFSTP Congress of Toxicologic Pathology 2007, 2007/09/16-19, Basel, Switzerland
- ⑩ Nagamura H, Effects of inflammation-related cytokine gene polymorphisms on gastric cancer risk among atomic bomb survivors, Joint ESTP/IFSTP Congress of Toxicologic Pathology 2007, 2007/09/16-19, Basel, Switzerland
- ⑪ Hayashi T, Gastric cancer risks among atomic-bomb survivors differ by *HLA class I* genotype, Joint ESTP/IFSTP Congress of Toxicologic Pathology 2007, 2007/09/16-19 Basel, Switzerland
- ⑫ 森下ゆかり、*IL-10* 遺伝子多型と原爆放射線被曝の胃がん発症リスクに及ぼす影響、第16回日本組織適合性学会 2007/09/09-11 京都
- ⑬ Hayashi T, Effects of inflammation-related gene polymorphisms and atomic-bomb radiation exposure on gastric cancer risk, 13th International Congress of Radiation Research 2007/07/08-12 San Francisco, California, USA
- ⑭ 林 奉権、炎症関連遺伝子多型と原爆放射線被曝の胃がん発症リスクに及ぼす影響、第16回広島がんセミナー国際シンポジウム 2006/10/22 広島
- ⑮ 林 奉権、炎症関連遺伝子多型と原爆放射線被曝の胃がん発症リスクに及ぼす影響、第65回日本癌学会学術総会 2006/09/28-30 横浜
- ⑯ Hayashi T, Individuals at high risk of stomach cancer among atomic-bomb survivors identified in RERF immunogenome study, 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, 2006/07/02-06, Prague, Czech

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 奉権 (HAYASHI TOMONORI)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/
分子疫学部・免疫学研究室・室長（主任研究
員）

研究者番号：70333549

(2)研究分担者

楠 洋一郎 (KUSUNOKI YOICHIRO)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/
分子疫学部・部長代理

研究者番号：60333548

得能 正英 (TOKUNOU MASAHIDE)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/
分子疫学部・来所研究員

研究者番号：40288824

中地 敬 (NAKACHI KEI)

財団法人放射線影響研究所・プロジェクト代
表研究者

研究者番号：00142117

(3)連携研究者

なし