

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00562

研究課題名(和文)放射線誘発乳がんにおける原因遺伝子変異の同定

研究課題名(英文)Identification of driver gene mutations in radiation-induced mammary carcinomas

研究代表者

臺野 和広 (Daino, Kazuhiro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・研究統括(定常)

研究者番号：90543299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、自然発症、ガンマ線、中性子線被ばく群に生じたラット乳癌検体について免疫組織化学染色によるサブタイプの分類と全エクソンシーケンスによる遺伝子変異の網羅的な解析を行った。その結果、被ばくによりホルモン受容体陽性の乳癌が発生しやすくなることが示唆された。また、DNA修復、細胞増殖、転写調節関連遺伝子や、Mapk、Pi3k/Akt、Wntといった重要なシグナル伝達経路に機能する遺伝子に生じた変異が乳がんの原因になっていることが予測された。また、照射群に生じた乳がんの特徴的なゲノム異常として、特定のがん抑制遺伝子を含む領域においてDNAコピー数の減少が観察されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた成果は、放射線被ばくによる発がんリスクを説明する分子メカニズムの解明や予防法の開発に有用である。また、照射群に生じた乳がんの特徴的なゲノム異常は、放射線で誘発されたがんの分子指標として発がんリスクの推定に役立つと考えられるため、今後さらなる解析を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we classified rat mammary carcinomas developed spontaneously or after exposure to neutrons and gamma-rays into luminal and non-luminal subtypes by immunohistochemistry. We then performed whole-exome sequencing to explore gene mutations in the tumors. Radiation-induced development of hormone receptor-positive mammary carcinomas was suggested by the immunohistochemical classification. The whole-exome sequencing identified somatic mutations in genes involved in DNA repair, cell growth, transcriptional regulation, and several signaling pathways, including Mapk, Pi3k/Akt, and Wnt, in the carcinomas. In addition, focal DNA copy number losses in the tumor suppressor genes were frequently observed in the carcinomas developed after radiation exposure.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 ガンマ線 中性子線 乳癌 サブタイプ 遺伝子変異 次世代シーケンス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳腺は、放射線発がん感受性の高い組織であり、広島・長崎の原爆被爆者や医療被曝者の疫学研究から、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。近年では、放射線治療技術の進歩により、粒子線治療や強度変調放射線治療といった治療法が登場し、炭素線や二次的に発生する中性子線といった高エネルギー放射線の被ばくによる二次がんとして、放射線発がん高感受性組織である乳腺の発がんリスク評価が必要となっている。

炭素線や中性子線の影響評価においては、現在、ヒトにおけるリスク推定に利用可能な集団が存在しないため、申請者らは、これまでヒトと病理組織型が類似するラット乳がんモデルを用いて、放射線被ばくによる発がん影響の大規模な動物実験を実施し、炭素線と中性子線被ばくによる発がん作用は、ガンマ線に比べ、それぞれ約3倍と14倍高いことを明らかにしてきた (*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013, 未発表データ)。しかしながら、放射線による発がんリスクの上昇や、線質の違いによる発がんリスクの変化を説明する分子メカニズムについては、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らがこれまでの研究で保存してきたラット乳がん検体(自然発症、ガンマ線、中性子線誘発など)について、免疫組織化学染色によるサブタイプ分類及び、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスによる網羅的な遺伝子変異の解析を行い、自然発症、線質の異なる放射線被ばくによって生じた乳がんの性質や変異遺伝子の種類や変異頻度、変異パターンを比較解析することで、放射線発がんリスクを説明する分子メカニズムの解明と、変異シグネチャーの探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

動物実験

7週齢の Sprague-Dawley 雌ラットに速中性子線(平均エネルギー2.3 MeV) 0.97 Gy または 137Cs 線 4 Gy を全身1回照射した。照射後、一週間に一度触診を行い、乳腺腫瘍の発生週齢を評価した。ラットが瀕死、死亡、あるいは90週齢になった時点で打ち切りとし、100週齢までに解剖によって乳腺腫瘍および正常乳腺組織を採取した。全ての乳腺腫瘍に対してホルマリン固定組織標本を作製し、病理診断を行った。本研究では、腺癌と診断された乳腺腫瘍について解析を行った。全ての動物実験は、量子科学技術研究開発機構、放射線医学総合研究所の動物実験委員会により承認されたのち行った。

免疫組織化学染色法による乳癌のサブタイプ分類

腺癌についてホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を作製し、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR)、HER2、および増殖マーカーKi-67 に対する抗体で免疫組織化学染色を行った(図1)。抗原陽性上皮腫瘍細胞の割合は、Tissue Studio ソフトウェアを用いてROIごとに算出した後、12個のROIの平均値を陽性細胞率とした。ER およびPgRのカットオフ値は乳癌取り扱い規約に則り、1%に設定した。Ki-67については、カットオフを中央値のパーセンテージ(15.9%)に設定した。HER2は、ヒト乳癌と同様の分類法に順次、発現の強さおよび細胞膜の染まり具合を総合して判定した。ルミナル型および非ルミナル型の分類は、ヒト乳癌の標準分類基準に従って定義した。すなわち、ルミナル型はER またはPgRのいずれかが陽性でHER2が陰性の場合と定義し、非ルミナル型はその他の場合と定義した。

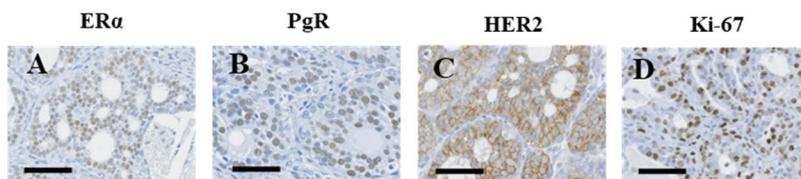


図1. ラット乳癌組織の免疫組織化学染色像

ラット乳癌の組織切片をエストロゲン受容体 α (ER α) (A)、プロゲステロン受容体 (PgR) (B)、ヒト成長因子受容体2 (HER2)

(C)、Ki-67 (D) で染色し、40倍で撮影した代表的な画像を示す。

画像左下のスケールバーは長さ50 μ mを表している。

全エクソンシーケンスによる遺伝子変異の解析

レーザーマイクロディセクションシステムを用いて腫瘍性上皮細胞を収集した後、DNAの抽出を行った。エクソン領域を回収するためのキャプチャープローブの設計は、Refseq 遺伝子として登録されている遺伝子を対象とした。全エクソンシーケンスに使用するDNAは、超音波発生装置 Covaris を用いておよそ150塩基対の長さになるよう断片化した。その後、SeqCap EZ

Library kit (Roche 社) を用いてラットの全エクソン領域を回収し、KAPA Hyperprep kit (Kapa Biosystems 社) によりライブラリ調製を行った。配列情報は、次世代シーケンサーNextSeq システム (Illumina 社) を用いて取得した。

取得した配列の解析には、変異検出に必要なソフトウェアから構成された Reseq パイプライン (Amelieff 社) を用いた。すなわち、FastQC を用いて取得したデータのクオリティを確認した後、ラットの最新の参照ゲノム配列 (Rn6) に対し、取得した配列のマッピングを行った。続いて、VarScan2 ソフトウェアを用いて、乳癌および同一個体の正常乳腺の塩基配列を比較し、体細胞変異を検出した。遺伝子情報などのアノテーションの付与には snpEff、DNA コピー数の解析には Control FREEC を使用した。また、変異シグネチャー解析及び、コサイン類似度の算出には Mutational Patterns を用いた。

統計解析

統計解析は、統計分析ソフトウェア R 及び、EZR を用いて行った。3 群間の比較は、Kruskal-Wallis 検定を用いて行った。2 群間の比較は、Mann-Whitney の U 検定を用いた。また、相関係数の算出には Spearman の順位相関係数を用いた。サブタイプ分類の解析には Fisher の正確検定を用いた。パスウェイ解析には DAVID ソフトウェアを使用し、P 値の算出は Fisher の正確検定により行われた。それぞれ、 $p < 0.05$ の結果について統計的に有意であると判定した。

4. 研究成果

免疫組織化学染色法による乳癌のサブタイプ分類

非照射群、中性子照射群、 γ 線照射群に発生した乳癌検体について、ER、PgR、HER2 及び、Ki-67 に対する免疫組織化学染色を行った。各抗原に対して陽性を示した細胞の割合を調べた結果、どの抗原においても、各群の間に有意な差は見られなかった。次に、乳癌をルミナル型、非ルミナル型の 2 種類のサブタイプに分類したところ、非照射群と比較して、中性子線照射群及び、 γ 線照射群に発生した乳癌ではルミナル型の割合が高くなる傾向が観察された。この結果は、被ばくによりホルモン受容体陽性の乳癌が発生しやすくなることを示唆している。

全エクソンシーケンスによる遺伝子変異の解析

非照射群、中性子照射群、 γ 線照射群に発生した乳癌検体について、全エクソンシーケンス解析を行った。エクソン領域を回収するために用いたプローブによるカバー率は、ラットゲノム参照配列における全エクソン領域の 97.7%であった。

非照射群 10 検体、中性子線照射群 8 検体、 γ 線照射群 10 検体の乳癌及び、それぞれの乳癌が発生した個体の正常乳腺組織 28 検体分の全エクソンシーケンス解析を行った。まず、各乳癌と対応する正常乳腺の塩基配列を比較することで、乳癌に生じた遺伝子変異の検出を試みた。その後、乳癌において検出された挿入・欠失型変異および一塩基置換の総数の比較を行った。その結果、中性子線照射群および γ 線照射群に発生した乳癌では、検体間における変異数にばらつきが見られるものの、遺伝子変異の平均値においては非照射群に発生した乳癌を含めた 3 群の間に有意な差は観察されなかった。次いで、検出された挿入・欠失型変異の長さについて解析した結果、1 塩基の挿入、あるいは欠失が最も多く観察された。また、一塩基置換については、どの群に発生した乳癌においても C:G>T:A 変異が最も多く、その他のパターンの一塩基置換についても 3 群の間での大きな差は見られなかった。また、乳癌における変異の種類について、そのパターンの解析を行った結果、3 群の間で変異パターン (シグネチャー) に大きな違いは観察されないことが分かった。

次に、乳癌において観察された遺伝子変異の中で、アミノ酸の変化を伴い、乳癌における変異アリル頻度が 10%以上ある変異に着目した。このような、がん化に寄与する可能性が高いと考えられる変異の数は、乳癌 1 検体あたり平均して 5 個前後であった。また 3 群の間において、これら遺伝子変異の数に有意な差は見られなかった。

さらに、変異が検出された遺伝子の機能や関連するシグナル伝達経路を調査するために、ウェブツール DAVID を用いてパスウェイ解析を行った。その結果、発がんに関与するシグナル経路に関連する遺伝子が多く含まれていることが分かった。また、中性子線照射群に発生した乳癌において変異していた遺伝子には、DNA 修復経路の一つである相同組み換え修復に関する遺伝子が多く含まれていることが分かった (表 1)。

表1. ラット乳癌において検出された変異遺伝子が関係するシグナル伝達経路

グループ	DAVID ID	シグナル伝達経路	適合した遺伝子数	P値
非照射群	mo05204	化学発がん	3	0.03
中性子線照射群	mo03440	相同組換え	2	0.05
γ 線照射群	mo05222	小細胞肺癌	3	0.02

次に、ヒト癌の遺伝子変異データベース（COSMIC や TSGene）を用いて、ヒトにおいてがん化に寄与することが知られている遺伝子が、ラット乳癌検体において変異している遺伝子に含まれているかについて解析を行い、変異から予測される機能が、細胞のがん化への関与において矛盾していない変異遺伝子について図2にまとめた。その結果、どの群においても、約半数の検体で、細胞のがん化に係りうる遺伝子変異が観察されることが分かった。それら遺伝子は、DNA修復、細胞増殖、転写調節に関連する遺伝子や、Mapk、Pi3k/Akt、Wnt といった重要なシグナル伝達経路に機能する遺伝子であった。さらに、照射群に生じた乳がんでは、特定のがん抑制遺伝子を含む領域において DNA コピー数の減少が観察されることが分かった。

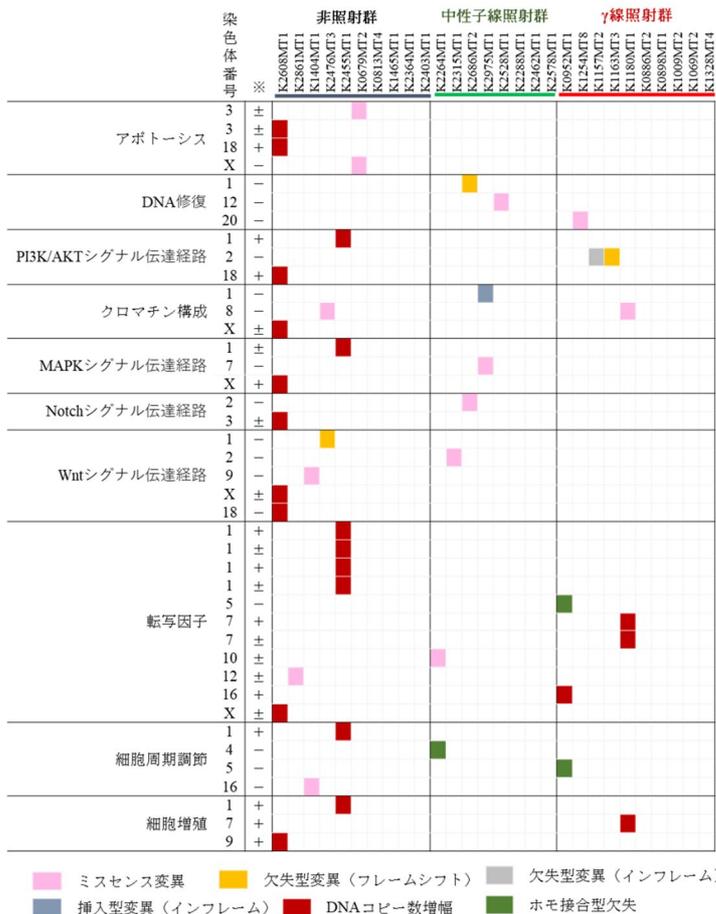


図2. ラット乳癌において検出されたがん化への関連性が予測される遺伝子変異

全エクソームシーケンスで検出されたラット乳癌における遺伝子変異のうち、ヒトでがんの発生に関与することが報告されて遺伝子かつ、遺伝子の機能と獲得した変異ががん化に矛盾しない遺伝子変異を抽出した。※遺伝子の機能ががん化に対し促進的(+)あるいは、抑制的(-)に働くのか、それとも両者(±)の報告があるのかを示している。

本研究により、放射線被ばくによりホルモン受容体陽性の乳癌が発生しやすくなることが示唆された。また、ガンマ線、中性子線被ばく群に生じた乳がんにおいて検出された突然変異の数は、自然発症した乳がんと同程度であり、変異パターンも類似していることが分かった。さらに、DNA修復、細胞増殖、転写調節関連遺伝子や、Mapk、Pi3k/Akt、Wnt といった重要なシグナル伝達経路に機能する遺伝子に生じた変異が乳がんの原因になっていることが予測された。また、照射群に生じた乳がんの特徴的なゲノム異常として、特定のがん抑制遺伝子を含む領域において DNA コピー数の減少が観察されることが分かった。これらの結果は、被ばくにより生じた乳がんに見られる突然変異の全体像は、自然発症した乳がんと類似している一方で、DNA コピー数の減少といった特徴を持っている可能性を示唆している。得られた成果は、放射線発がんリスクを説明する分子メカニズムの解明や予防法の開発に有用である。また、照射群に生じた乳がんの特徴的なゲノム異常は、放射線で誘発されたがんの分子指標として発がんリスクの推定に役立つと考えられるため、今後解析を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森山ひとみ, 臺野和広, 今岡達彦, 高畠賢, 森岡孝満, 石川敦子, 井上一雅, 福土政広, 島田義也, 柿沼志津子
2. 発表標題 放射線誘発ラット乳癌の全エクソーム解析
3. 学会等名 東京大学がんプロフェッショナル養成プラン大学院生研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森山ひとみ, 臺野和広, 今岡達彦, 高畠賢, 森岡孝満, 石川敦子, 井上一雅, 福土政広, 島田義也, 柿沼志津子
2. 発表標題 Subtype classification and whole-exome sequencing of γ -ray- or neutron-induced rat mammary carcinomas
3. 学会等名 第62回日本放射線影響学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山ひとみ, 臺野和広, 今岡達彦, 高畠賢, 森岡孝満, 石川敦子, 西村由希子, 井上一雅, 福土政広, 島田義也, 柿沼志津子
2. 発表標題 中性子線誘発ラット乳がんの病理学のおよび遺伝子変異解析
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Moriyama, Kazuhiro Daino, Tatsuhiko Imaoka, Masaru Takabatake, Takamitsu Morioka, Atsuko Ishikawa, Kazumasa Inoue, Masahiro Fukushi, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma
2. 発表標題 Whole-exome sequencing analysis to identify somatic mutations in radiation-induced rat mammary carcinomas
3. 学会等名 The 16th International Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山ひとみ、臺野和広、今岡達彦、高畠賢、西村由希子、森岡孝満、島田義也、福土政広、柿沼志津子
2. 発表標題 次世代シーケンス解析による放射線誘発ラット乳がんのゲノム変異探索
3. 学会等名 東京大学がんプロフェッショナル養成プラン大学院生研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山ひとみ、臺野和広、今岡達彦、高畠賢、森岡孝満、石川敦子、西村由希子、福土政広、島田義也、柿沼志津子
2. 発表標題 全エクソンシーケンス解析による137Cs 線誘発ラット乳がんのゲノム変異探索
3. 学会等名 若手放射線生物学研究会・日本保健物理学会若手研究会 合同勉強会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山ひとみ、臺野和広、今岡達彦、高畠賢、森岡孝満、石川敦子、福土政広、島田義也、柿沼志津子
2. 発表標題 全エクソーム解析による放射線誘発ラット乳がんのゲノム変異探索
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山ひとみ、臺野和広、今岡達彦、高畠賢、森岡孝満、石川敦子、福土政広、島田義也、柿沼志津子
2. 発表標題 線誘発ラット乳がんにおける全エクソーム解析を用いたゲノム変異探索
3. 学会等名 平成30年度若手放射線生物学研究会専門研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山ひとみ, 臺野和広, 今岡達彦, 西村まゆみ, 西村由希子, 森岡孝満, 井上一雅, 柿沼志津子, 福士政広, 島田義也
2. 発表標題 137Cs 線あるいは2MeV速中性子線の被ばくにより誘発されるラット乳がんの分子生物学的特徴
3. 学会等名 第54回アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森山ひとみ, 臺野和広, 今岡達彦, 高島賢, 西村由希子, 西村まゆみ, 森岡孝満, 井上一雅, 島田義也, 福士政広, 柿沼志津子
2. 発表標題 線または中性子線誘発ラット乳がんにおけるサブタイプ分類とゲノム変異の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1. 第62回日本放射線影響学会大会優秀演題発表賞受賞（発表者：森山ひとみ） 受賞演題：Subtype classification and whole-exome sequencing of γ -ray- or neutron-induced rat mammary carcinomas
2. 第54回アイソトープ・放射線研究発表会若手優秀講演賞受賞（発表者：森山ひとみ） 受賞演題：137Cs 線あるいは2MeV速中性子線の被ばくにより誘発されるラット乳がんの分子生物学的特徴

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	森岡 孝満 (Morioka Takamitsu) (70253961)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・研究統括 (82502)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	石川 敦子 (Ishikawa Atsuko) (30443063)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・主任技術員 (82502)	
連携研究者	今岡 達彦 (Imaoka Tatsuhiko) (40356134)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・チームリーダー (82502)	
連携研究者	柿沼 志津子 (Kakinuma Shizuko) (20392219)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・部長 (82502)	