

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：17K01939

研究課題名(和文) 子ども期放射線被ばくによる発がんメカニズム～遺伝子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Carcinogenic mechanism of childhood radiation exposure

研究代表者

石川 敦子 (ISHIKAWA, Atsuko)

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(任常)

研究者番号：30443063

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、被ばく時年齢に依存した遺伝子変異パターンの全容と発がんのメカニズムの全体像を明らかにする事を目的として、ヒト急性T細胞性白血病のモデルマウスを用いて、照射時年齢の異なるマウスに発症した胸腺リンパ腫の次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析及びDNAメチル化解析を行った。解析の結果、被ばく時年齢特異的な遺伝子変異、ゲノム・エピゲノム異常を持つ遺伝子を網羅的に同定し、それらが関与する遺伝子ネットワークの候補を同定した。これらの結果は、被ばく時年齢の違いにより関与する発がんメカニズムが異なることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデルマウスを用いた放射線被ばく時年齢に依存した遺伝子変異、ゲノム・エピゲノム異常および発がんメカニズムを明らかにすることで、放射線被ばくによる発がんリスクの評価やリスクの低減法などの提案が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify the overall picture of age-dependent gene mutation patterns and mechanisms of carcinogenesis, we investigated mouse thymic lymphomas, as a model of human acute T-cell leukemia, developed by radiation exposure at different ages. We performed whole-exome sequencing and DNA methylation analysis of the lymphomas. Age at exposure specific gene mutations and epigenetic abnormalities were identified. By integrating the data, we further identified gene networks involved in the lymphomas. Our results suggest that the carcinogenic mechanisms are affected by age at exposure.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線発 発がん 遺伝子変異 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

原爆被爆者や医療被ばくを受けた患者を対象とした疫学調査により、放射線による発がんは被ばく時の年齢の影響を受けることが明らかにされている。とくに小児においては、白血病や甲状腺がんの増加が観察されていることから、こどもは放射線に対する発がん感受性が高いと考えられている。また、近年では、小児へのCTスキャン後に発がんリスクが上昇することも報告されており、小児期被ばくの発がんリスクおよびメカニズムの解明は、放射線防護における喫緊の課題である。

マウス放射線誘発胸腺リンパ腫は、若齢期でリスクの高いヒト急性 T 細胞性白血病のモデルとして古くから研究されている。これまでに異なる週齢で放射線を照射したマウスに誘発された胸腺リンパ腫の解析から、新生児期照射ではがん抑制遺伝子 *Pten* のゲノム異常が、一方、若齢成体期照射では、*Ikaros* のゲノム異常が原因であることを報告している(図1)(Sunaoshi *et al.*, *Mut Res* 2015)。

この結果は、放射線誘発胸腺リンパ腫では、被ばく時年齢に依存して発がんのメカニズムが異なる可能性を示しているが、一部の遺伝子以外のゲノム異常については明らかになっておらず、発がんメカニズムを解析するためにはゲノム網羅的なデータを取得する必要がある。

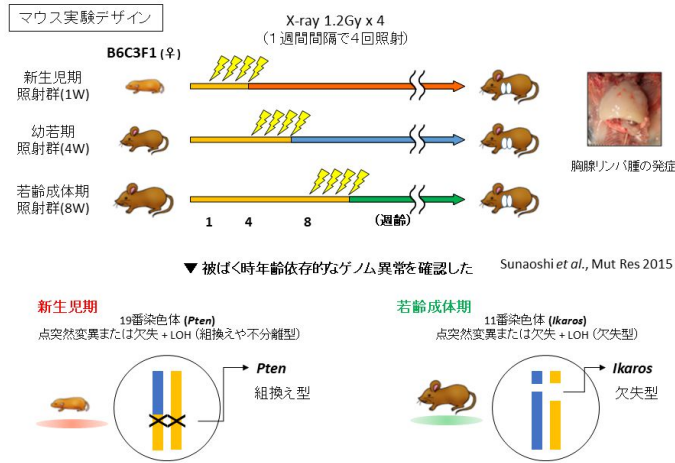


図1. これまでの実験概要と明らかになった *Pten*, *Ikaros* のゲノム異常

2. 研究の目的

本研究は、ヒト急性 T 細胞性白血病のモデルマウスを用いて、照射時年齢の異なるマウスに発症した胸腺リンパ腫の次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析及び DNA メチル化解析を行うことで、被ばく時年齢に依存した遺伝子変異パターンの全容と発がんのメカニズムの全体像を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

放射線照射した時期が異なるマウスから発生した胸腺リンパ腫(新生児期 9 サンプル、幼若期 8 サンプル、若齢成体期 9 サンプル)を材料に、DNA の抽出およびサンプル調整を行い(図2)次世代シーケンサー(NextSeq)による全エクソンおよび DNA メチル化領域のデータを取得した(図2)。

全エクソーム解析では、リファレンスゲノム配列へのマッピング[BWA など]および正常(非照射)とがんの比較によるゲノム変異解析[VarScan2, control-FREEC]を行い、がんが発生したゲノム変異(単塩基変異(SNV)と塩基の挿入または欠損(Indel)、コピー数変異(CNV)の検索、LOHの検出を行った。さらにアノテーション解析により遺伝子機能に影響する変異を同定した。

DNA メチル化解析では、マッピング[Bowtie など]およびメチル化領域検出ソフトウェア[MACS]により、DNA メチル化領域を検出した。(図2)

同定したゲノム・エピゲノム異常および先に取得した遺伝子発現プロファイルデータについて解析を行い、被ばく時年齢が異なる腫瘍に特異的な遺伝子異常を同定した。

さらに DAVID を用いたパスウェイ解析[KEGG]を行い、発がんに関与するメカニズムの推定を行った。

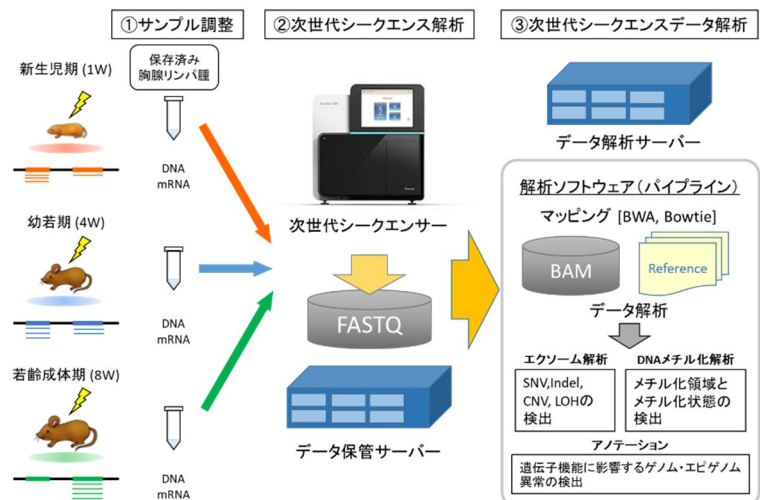


図2. 次世代シーケンズデータ解析の概要

4. 研究成果

(1) エクソームデータを用いたゲノム変異解析

一塩基変異、構造変異（欠失、挿入）解析

ゲノム変異解析では、正常（非照射）との変異頻度の比較解析を行い統計的に有意差のある変異を抽出し、がんのみ発生した遺伝子変異（アミノ酸置換、構造変化が予測される一塩基置換と挿入、欠失）（変異頻度 10%以上）を検出した（図 3）。解析の結果、検出した変異は、一塩基変異(SNV)が最も多く、次に欠失(Deletion)、挿入(Insertion)の順であった（図 4）。また、被ばく時年齢の異なるがんを検出された平均の変異数は、新生児期では 104 個、幼若期では 119 個、若齢成体期では 122 個と被ばく時年齢が高くなるにつれて変異数が多くなったが、3 グループ間における統計的に有意差は見られなかった($p=0.063$)。

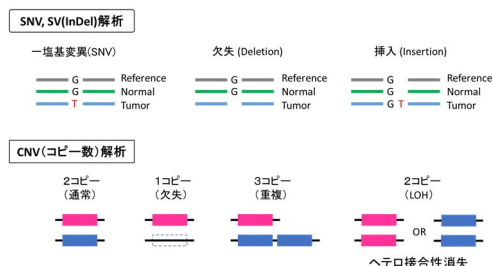


図 3. ゲノム変異解析

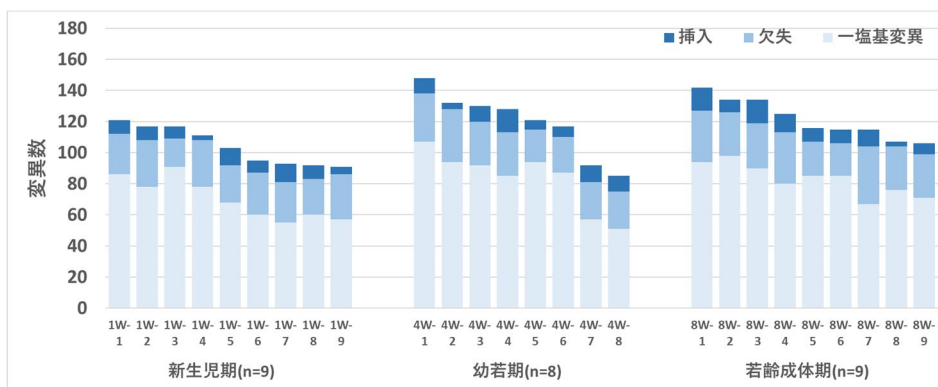


図 4. がんのみ見つかった遺伝子機能に影響のある変異数

コピー数変異解析

コピー数解析では、マッピングデータより算出されたリード数について正常組織との比較解析を行い、がんでのみコピー数変異（欠失、重複、LOH）を示すゲノム領域を同定し、領域内の遺伝子数を染色体別にカウントした。解析の結果、全体では 12 番染色体で欠失領域、15 番染色体で重複領域が多く観察されることが分かった（図 5）。また、LOH を示す 4、12、19 番染色体の一部の領域において、被ばく時年齢による LOH 頻度の違いが観察されることが分かった。

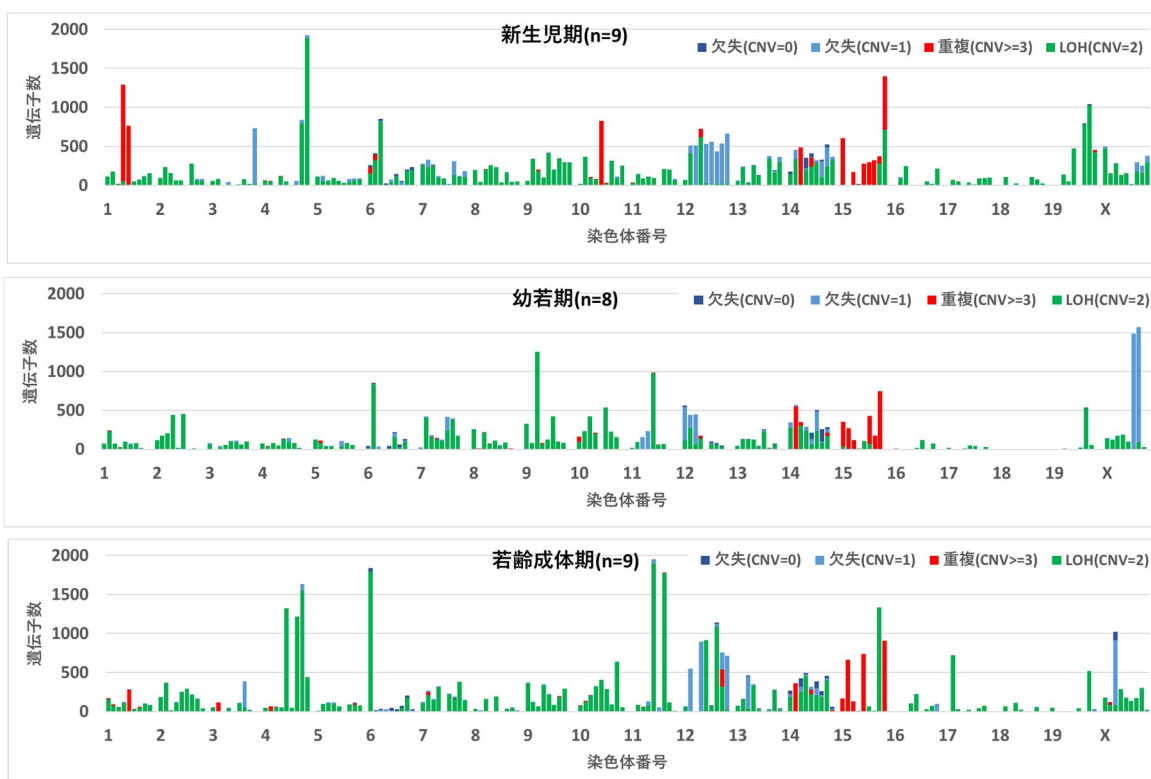


図 5. コピー数変異領域内の遺伝子数

さらに、ゲノム変異とコピー数変異を持つ遺伝子について、被ばく時年齢によって異常の頻度に有意差($p < 0.05$)が認められる遺伝子を抽出した。

(2) DNA メチル化および遺伝子発現データの解析

解析によって得られた DNA メチル化数値データ (88,462 プローブ) を用いて統計解析を行った結果、被ばく時年齢によって DNA メチルレベルに有意差 ($p < 0.05$) のあるプローブは約 3,700 個あることが分かった。各年齢群間について統計解析を行い、被ばく時年齢に特異的なプローブを抽出した結果、新生児期で 56 個、幼若期で 178 個、若齢成体期で 338 個のプローブが抽出され、被ばく時年齢が高くなるとメチル化レベルが変化する領域が増加する傾向が観察された (図 6 : DNA メチル化解析)。

また、先行研究で取得した遺伝子発現プロファイルデータ (38,545 プローブ) についても DNA メチル化解析と同様の解析を行った結果、3 群間で有意差がみられたプローブは約 4,300 個であった。各被ばく時年齢群間での統計解析を行った結果、新生児期で 536 個、幼若期で 44 個、若齢成体期で 93 個のプローブが抽出され、幼若期、若齢成体期と比較して新生児期の被ばくにおいて発現の変動する遺伝子が最も多いことが分かった (図 6 : 遺伝子発現解析)。これらの結果から、DNA メチル化および遺伝子発現において被ばく時年齢との関連性が示唆された。

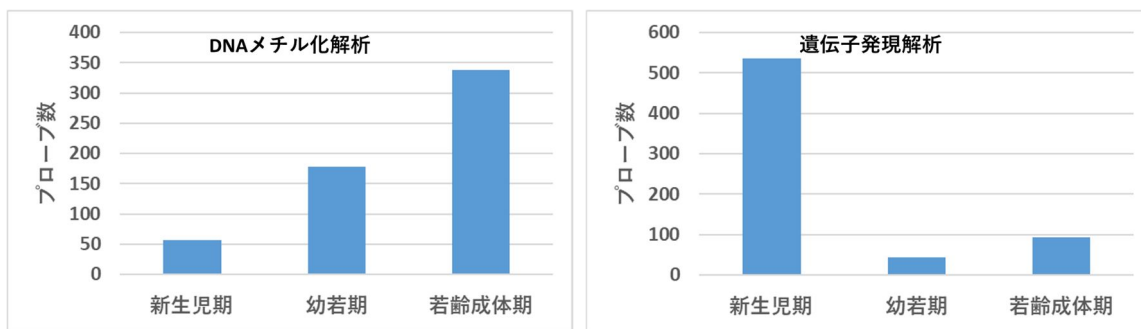


図 6. 被ばく時年齢に特異的なプローブ数

(3) 被ばく時年齢と関連するパスウェイ解析

これまでに行ったゲノム変異解析、DNA メチル化解析および遺伝子発現解析により同定した被ばく時年齢に特異的な異常をもつ遺伝子のデータを用いて、DAVID によるパスウェイ解析 (KEGG) を行い、抽出されたパスウェイ上位 10 種について表 1 に示した。その結果、新生児期では遺伝子の転写に関与するパスウェイやがんにおける代謝や細胞周期、幼若期では、MAPK シグナル伝達や cAMP シグナル伝達など細胞内の情報伝達に関連するパスウェイ、若齢成体期では、甲状腺ホルモンのシグナル伝達や mTOR シグナル伝達など代謝ストレスにより活性化するパスウェイやアポトーシスなどのパスウェイが変化していることが分かった。これらの結果より、被ばく時年齢の違いによって、がんに関連するパスウェイが異なる可能性が示唆された。

| 新生児期 | 幼若期 | 若齢成体期 |
|---|---|---|
| Spliceosome | MAPK signaling pathway | Thyroid hormone signaling pathway |
| Transcriptional misregulation in cancer | cAMP signaling pathway | Colorectal cancer |
| Insulin signaling pathway | Vascular smooth muscle contraction | Aldosterone-regulated sodium reabsorption |
| Proteoglycans in cancer | AMPK signaling pathway | Proximal tubule bicarbonate reclamation |
| Glycerophospholipid metabolism | Neuroactive ligand-receptor interaction | Neurotrophin signaling pathway |
| Choline metabolism in cancer | Ras signaling pathway | Progesterone-mediated oocyte maturation |
| Pertussis | Oxytocin signaling pathway | Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis |
| Staphylococcus aureus infection | Steroid biosynthesis | mTOR signaling pathway |
| Protein export | Aldosterone synthesis and secretion | Apoptosis |
| Cell cycle | Insulin secretion | Pancreatic secretion |

表 1. 被ばく時年齢と関連するパスウェイ

本研究により、被ばく時年齢が異なるマウスに誘発された胸腺リンパ腫において、被ばく時年齢に特異的なゲノム変異や DNA メチル化状態、遺伝子発現が異なる遺伝子が同定された。さらにパスウェイ解析により、これらの遺伝子が関連する複数のパスウェイが見いだされ、被ばく時年齢によって発がんメカニズムが異なる可能性が示唆された。今後、被ばく時年齢の違いによる発がんメカニズムを解明するためには、データのより詳細な解析を行い、遺伝子変異の組み合わせや DNA メチル化状態変化および遺伝子発現変化を考慮した解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 石川敦子、臺野和広、砂押正章、甘崎佳子、今井高志、島田義也、柿沼志津子 |
| 2. 発表標題 放射線被ばくによって誘発されたマウスT細胞リンパ腫の全エクソーム解析 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石川 敦子, 臺野 和広, 砂押 正章, 甘崎 佳子, 今井 高志, 島田 義也, 柿沼 志津子 |
| 2. 発表標題 放射線誘発マウスT細胞リンパ腫の全エクソーム解析 |
| 3. 学会等名 第60回日本放射線影響学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Atsuko Ishikawa, Kazuhiro Daino, Masaaki Sunaoshi, Yoshiko Amasaki, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma |
| 2. 発表標題 Whole-exome analysis of murine T cell lymphomas induced by radiation exposure at different ages |
| 3. 学会等名 the 65th Annual Radiation Research Society Meeting, Radiation Research Society (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 | 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・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・部長 (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 | 今井 高志 (IMAI Takashi) (50183009) | 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・QST病院・室長 (82502) | |
| 連携研究者 | 臺野 和広 (DAINO Kazuhiro) (90543299) | 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) | |
| 連携研究者 | 甘崎 佳子 (AMASAKI Yoshiko) (80435700) | 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・研究員 (82502) | |