

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12323

研究課題名(和文)放射線誘発がん変異のゲノム・エピゲノムシグニチャーの解明

研究課題名(英文) Genomic and epigenomic analysis of radiation-induced gene fusion

研究代表者

鈴木 啓司 (Suzuki, Keiji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：00196809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：放射線被ばくによる健康影響として発がんがよく知られているが、放射線起因の小児甲状腺がんでは、高頻度に見られるドライバー変異として、RET/PTC等の遺伝子融合型変異が報告されている。しかし、これらの発がん変異が、放射線被ばくにより直接誘起されたものかどうかは実際のところ定かではないため、本研究では、『放射線誘発の発がん変異は被ばく特有のゲノム・エピゲノムシグニチャーを留める』との仮説を証明する研究計画を実施した。その結果、放射線照射した正常ヒト甲状腺濾胞細胞において確認された融合遺伝子に、RET遺伝子およびPTC1/3遺伝子の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線被ばくによる健康影響として発がんがよく知られているが、発がんに関連するドライバー変異は、大半の固形腫瘍では同定されていない。唯一、放射線起因の小児甲状腺がんでは、高頻度に見られるドライバー変異として、RET/PTC等の遺伝子融合型変異が報告されているが、本研究の結果、RET/PTC変異が、高線量の放射線照射では直接生成されることが示唆され、高線量放射線被ばくでは、放射線起因の遺伝子変異が直接関与する可能性が示された。一方、1 Gy以下の低線量放射線では、その可能性は極めて低く、放射線発がんの要因として放射線による変異以外の誘発経路を考える必要が提示された。

研究成果の概要(英文)：Radiation has been known to induce cancer, and it was reported that RET/PTC fusion gene was identified in radiation-related childhood thyroid cancer. However, a question is still remained whether such fusion gene is a direct result of radiation exposure. Therefore, this study aimed at defining a possibility that genome and epigenome signatures transmit radiation memory. Normal human thyroid follicular epithelial cells were used, and exposure of them to gamma-rays resulted in fusion gene transcripts, which could involve the RET gene and the PTC1/3 genes. It was suggested that high dose radiation might be able to induce gene rearrangements.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 発がん 甲状腺 遺伝子変異

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線被ばくが、線量に応じて様々な健康影響を引き起こすことがよく知られているが、発がんは代表的な晩発影響の1つである。国際放射線防護委員会は、放射線防護の観点から、発がんリスクと線量との相互関係に LNT (Linear No-threshold: 直線しきい値なし) モデルを採択しており、放射線生物学の観点でも、放射線により直接生じた DNA 損傷により確率的に起こる遺伝子 (ゲノム) 変異が発がん変異として細胞のがん化に関与する、とのモデルが一般的であるため、放射線発がんは確率的な事象であるとされている。しかしながら、これら全ての基盤となる放射線発がんの分子メカニズムは、実際のところ未だに明らかではない。マウス発がんモデルでは、ドライバー遺伝子変異の分子解析研究が進んでいる胸腺リンパ腫の例があり、放射線誘発に特徴的な *Ikaros* 遺伝子の欠失が同定されているが、固形腫瘍の大半の例では、発がん変異の解析はまだ解明の途上にあるといわざるを得ない。

1986年に起きたチェルノブイリ原子力発電所4号炉での事故では、事故から4~5年経った頃から子供たちに甲状腺がんの増加が報告され始めた。その後、何千例にもおよぶこれら小児甲状腺がんは、大半のケースが放射性ヨウ素の内部被ばくに起因する明らかな放射線誘発がんであるため、放射線発がんに関わるゲノム変異の解析が進められた。その結果、当研究グループの研究成果も含め、RET/PTC 等の遺伝子融合型変異が、ドライバー変異として多くのケースで同定された。当初は、これらの変異は、放射線被ばくによる DSB 生成に起因する発がん変異であると考えられたが、対象地域での散発性の小児甲状腺がんでも同様の頻度で RET/PTC 変異が見られたことから、これらの変異が、放射線被ばくの直接の結果であるかどうか世界的にも疑問視されるようになってきた。小児甲状腺がんのドライバー変異であるこれら遺伝子融合型変異が、放射線によって直接誘発されたゲノム変異かどうかは、放射線発がんの分子メカニズムの解明、ひいては、放射線発がんリスクのモデルの科学的妥当性の議論に大きな影響をおよぼす極めて重要なポイントであり、このような背景から、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

近年、高精度のゲノム変異の網羅的解析技術の進展により、被ばく細胞のゲノムに残る変異シグニチャーの研究が大きく進展しつつある。がん細胞に残る COSMIC 変異シグネチャーはその代表例であるが、変異のパターンから病因を予測できるレベルにまで発展している。研究代表者はこれまで、数 Mb にもおよぶ複雑構造のゲノム欠損や、DSB に起因する特有のエピジェネティック修飾が、DNA 損傷のクロマチンマークとして惹起されることを見いだしてきた。そこで本研究では、これまでの研究成果を更に発展させ、『放射線誘発の発がん変異は被ばく特有のゲノム・エピゲノムシグニチャーを留める』との仮定を、本研究課題の核心をなす学術的「問い」として位置づけ、遺伝子融合型発がん変異においてこれを証明する研究計画を立案した。本研究では、研究代表者が独自に開発した正常ヒト甲状腺濾胞細胞の培養系を用い、放射線照射により誘発される遺伝子融合型変異を同定し、遺伝子融合ジャンクションのゲノムシグニチャーとクロマチン融合領域のエピゲノムシグニチャーを同定し、その結果を、散発性の甲状腺がんの解析結果と比較することにより、放射線痕跡の存在を証明するのが目的である。

3. 研究の方法

正常ヒト甲状腺濾胞細胞 (図1) に、1~10 Gy までの γ 線を照射、 10^3 個の細胞毎にサブグループ化し、GeneRead Pure mRNA kit を用いて mRNA を精製し、cDNA に変換した後に、融合遺伝子の両側に設定したプライマーを用いて、SYBR Premix Ex Taq II による定量的 Real-time PCR (Thermal Cycler Dice real-time system) により融合遺伝子の発現を確認した。対象とする変異は、RET/PTC1、RET/PTC3、TPR-NTRK1、および ETV6-NTRK3 である。

次に、融合遺伝子領域を KOD FX を用いた PCR により増幅し、ExoSAP-IT PCR clean-up reagent により PCR 産物を精製した後に、Big Dye Terminator sequencing kit version 3.1 を用いて、BI3730 automated sequencer により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、既に決定している散発性甲状腺がんの該当する融合遺伝子の塩基配列と比較してゲノムシグニチャーを特定した。

得られた細胞集団は更にサブグループ化し、上述した解析を繰り返し実施することにより、ドライバー変異を有するクローンを特定した。ドライバー変異クローン細胞をホルマリンで固定後に、細胞を粉砕し、ChIP-IT Express Shearing Kits により、クロマチンの断片化をお

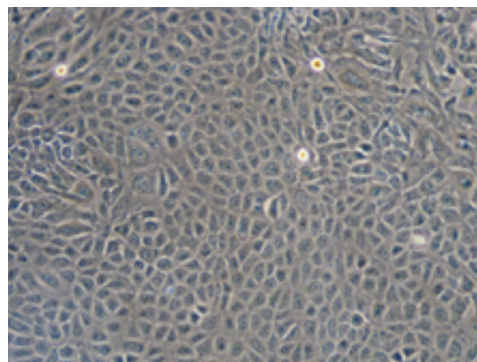


図1 正常ヒト甲状腺濾胞細胞

こなつた。CHIP 解析には、Active Motif 社の CHIP-IT Express kit を用いて、融合遺伝子配列上に設計した多重プライマーを用いた定量的 Real-time PCR により解析を行い、エピゲノムシグニチャーを特定した。エピジェネティックマークとしては、ヒストン H3 のメチル化 (K9, K36)、ヒストン H4 のメチル化 (K20)、およびヒストン H3 のアセチル化 (K27) の解析を計画し、ヒストン H2AX の S139 のリン酸化により DSB 部位の局在性を確認した。これらエピジェネティックマーク解析用の ChIP 抗体は、市販のバリデーションされた抗体リストから入手した。

4. 研究成果

放射線被ばくによる健康影響として発がんがよく知られているが、放射線起因の小児甲状腺がんでは、高頻度に見られるドライバー変異として、RET/PTC 等の遺伝子融合型変異が報告されている。そこで、正常ヒト甲状腺から甲状腺濾胞細胞を樹立し、実験に供する事を目指した。樹立された正常ヒト甲状腺濾胞培養細胞 (NTEC) は、甲状腺濾胞由来の上皮細胞であるため、図 1 に示すような典型的な上皮細胞の形態を示す。また、中間系線維として上皮細胞に広く発現が認められるサイトケラチンを発現しているが、興味深い事に、NTEC では、間葉系細胞の中間系線維であるビメンチンの発現も認められた。通常、組織由来の分化した細胞では、いずれかの中間系線維の発現のみが認められる事が一般的であるが、甲状腺濾胞上皮細胞では、いずれの発現も認められ、この結果は、正常ヒト甲状腺由来の組織切片でも確認された事から、甲状腺濾胞上皮細胞の一般的な特長である事が確認された。個体を構成する細胞の中で、サイトケラチンとビメンチンの両方の発現が認められるのは、胚発生の過程での発生系統の定まっていない段階の細胞だけである事を鑑みると、甲状腺濾胞細胞は、成人であっても、未だに未分化な性質も保持した状態にある事が考えられ、組織再生医療の観点からも注目すべき結果である。

NTEC の生物学的特長を確認するために、甲状腺濾胞上皮細胞に特徴的な蛋白質の発現を検証した。図 2 には、サイログロブリンの発現の有無を検討した結果を示した。サイログロブリンは、甲状腺濾胞細胞で産生され、甲状腺濾胞に蓄積される、甲状腺濾胞に特徴的な蛋白質で、甲状腺ホルモンの前駆物質である。このため、その発現は、採取した甲状腺組織断片 (PT1405 follicle) では共通して認められるが、NTEC (PT0815G-L) では発現は認められなかった。甲状腺研究分野で広く用いられている SV40 により無限増殖化された Nthy ori 細胞や、hTERT 遺伝子の導入により無限増殖化された線維芽細胞 (BJ1-hTERT) でも発現が認められず、組織から採取した培養細胞では、組織内での分化形質が一時的に消失する事が予想された。

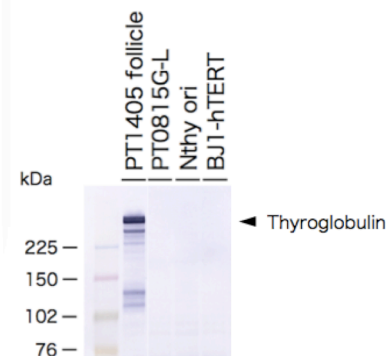


図 2 サイログロブリンの発現

次に、甲状腺上皮細胞としての特長を保持している事を、甲状腺濾胞上皮細胞で甲状腺への分化にかかわる転写因子の発現を確認した (図 3)。サイログロブリンなど、甲状腺で発現する遺伝子の転写制御は、複数の転写調節因子により制御されている事が明らかにされており、そのうち代表的なものが PAX8 と FOXE1 である。そこで、両者の発現を検証したところ、図 3 に示すように、いずれの蛋白質も NTEC 細胞では発現が認められ、体内での甲状腺濾胞上皮細胞としての特長を保持している事が確認された。

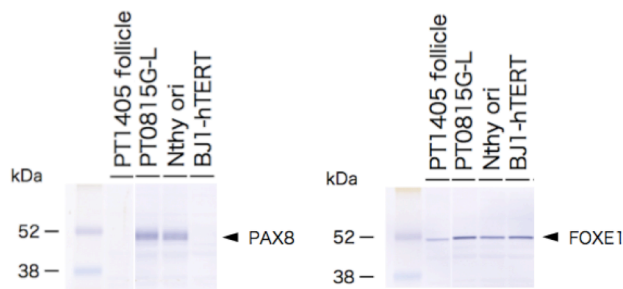


図 3 甲状腺特異的転写因子の発現

チェルノブイリ原発事故後に発症した小児甲状腺がんでは、大半のケースで RET/PTC 等の遺伝子融合型変異が、発がんのドライバー変異として同定された。RET 遺伝子と PTC1/3 遺伝子はもともと第 10 番染色体上に位置し、染色体腕内逆位の発生により、遺伝子融合が生成されている。RET 遺伝子産物である RET 蛋白質は、もともと神経系のグリア細胞で発現している神経系細胞増殖因子受容体で、甲状腺濾胞上皮細胞での発現は存在していない。一方、PTC1 および PTC3 遺伝子産物は、いずれも組織系を問わず恒常的に発現が認められている転写因子で、甲状腺濾胞上皮細胞でも恒常的に発現している。RET/PTC 融合遺伝子の生成の結果、PTC 遺伝子産物の 5' 側と、RET 遺伝子産物の 3' 側の融合が起こり、その結果、融合蛋白質の 5' 側に存在する二量体形成領域によって融合蛋白質が二量体化し、3' 側の RET 由来のキナーゼ領域が活性化して、細胞増殖の主要な制御経路である MAP キナーゼ経路の恒常的

活性化が招来される。このため、甲状腺濾胞上皮細胞の脱分化と共に細胞の無秩序な増殖がもたらされ、これが甲状腺がんの基盤メカニズムになっている。そこで、RET 蛋白質の 3' 領域を特異的に認識できる抗体を用いて、RET/PTC 蛋白質の発現を検証した (図 4)。その結果、すでに、RET/PTC1 の発現が確認されている甲状腺乳頭がん細胞 TPC-1 で、融合蛋白質に該当する分子量を示す蛋白質の発現が確認された。一方、NTEC では、発現は一切認められず、放射線により誘発する RET/PTC 遺伝子融合により発現する融合蛋白質の検出を可能にした。

そこで、培養された NTEC に、¹³⁷Cs 由来の γ 線を 1~10 Gy の線量で照射して、数日の培養期間をおいた後、 10^3 個の細胞毎にサブグループ化を行った。甲状腺濾胞上皮細胞は、放射線照射後にアポトーシスを起こさず、老化様細胞死を誘導する。図 5 には、一例を示したが、10 Gy の放射線照射後、7~10 日経って、細胞老化の代表的な生化学的マーカーである SA- β -gal に対する陽性が認められるようになる。放射線照射により誘導される老化様細胞死は、生理学的な老化とほとんどの性質は共通しているが、唯一、テロメアの短縮はない。そのかわり、細胞内に放射線照射により生じた DNA 二重鎖切断が残存し、恒常的に細胞周期停止シグナルが発出して細胞老化様状態がもたらされる。このため、培養容器中の細胞数に顕著な現象はないが、3 Gy で 10% 程度の、また、6 Gy で 1% 程度の生存率が予想される。

照射後作成したそれぞれのサブグループから、GeneRead Pure mRNA kit を用いて mRNA を精製し、cDNA に変換した後に、融合遺伝子の両側に設定したプライマーを用いて、SYBR Premix Ex Taq II による定量的 Real-time PCR (Illumina Eco-PCR system) により融合遺伝子の発現を検討した。対象とする融合型遺伝子変異としては、RET/PTC1、RET/PTC3、TPR-NTRK1、および ETV6-NTRK3 を検討したが、このうち、RET/PTC1 についてのみ発現が認められた。その発現量は、既に RET-PTC1 融合遺伝子変異が報告されている甲状腺がん細胞株 (TPC-1) と比べるとはるかに低いレベルであった。

次に、融合遺伝子領域を KOD FX を用いた PCR により増幅し、ExoSAP-IT PCR clean-up reagent により PCR 産物を精製した後に、Big Dye Terminator sequencing kit version 3.1 を用いて、BI3730 automated sequencer により塩基配列を決定しようとしたが、予想した長鎖 PCR 産物は得られず、散発性甲状腺がんの該当する融合遺伝子の塩基配列との比較も未達であった。

一方、得られた細胞集団は更にサブグループ化し、上述した解析を繰り返し実施することにより、ドライバー変異を有するクローンを特定したが、ドライバー変異クローン細胞をホルマリンで固定後に、細胞を粉砕し、ChIP-IT Express Shearing Kits により、クロマチンを断片化し、ChIP-IT Express kit を用いた融合遺伝子配列上に設計した多重プライマーを用いた定量的 Real-time PCR による解析は、研究実施期間中では十分には行えなかった。しかしながら、ヒストン H2AX の S139 のリン酸化による DSB 部位の局在性の確認は可能であったため、さらに他のエピジェネティックマーク解析用の ChIP 抗体を入手して検討を重ねる必要がある。

解析の結果、RET 遺伝子と PTC1 あるいは PTC3 遺伝子との融合が示唆され、放射線被ばくに起因する考えられるゲノムシグニチャーが抽出されたが、被ばくに特有のエピゲノムシグニチャーの有無は明確には検出されず、更なる解析が必要である。

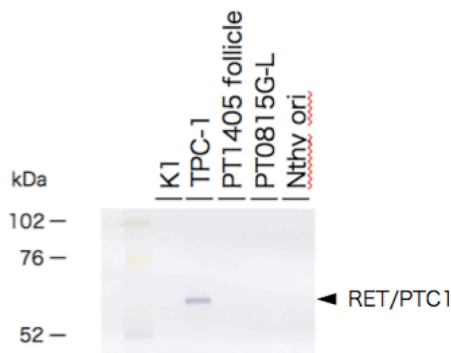


図 4 RET/PTC1 融合蛋白質の発現

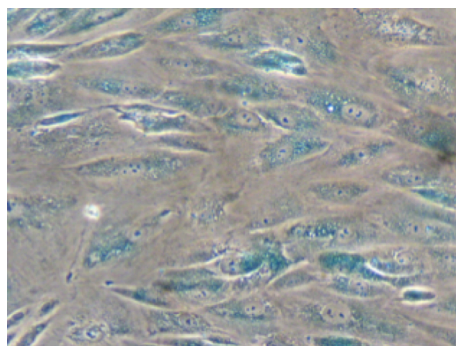


図 5 NTEC における老化の誘導

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawamura K, Suzuki K, Mitsutake N	4. 巻 2021
2. 論文標題 A simple and robust real-time quantitative PCR method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1667/RADE-21-00047.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Keiji, Amrenova Aidana, Mitsutake Norisato	4. 巻 62
2. 論文標題 Recent advances in radiobiology with respect to pleiotropic aspects of tissue reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 i30 ~ i35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rraa086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Eri, Suzuki Keiji, Yokoya Akinari	4. 巻 195
2. 論文標題 Molecular Configuration of Human Genome Neighboring Megabase-Sized Large Deletions Induced by X-Ray Irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 561~567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1667/RR15229.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木啓司
2. 発表標題 核内ゲノム構造と放射線トラック飛跡
3. 学会等名 日本放射線影響学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------