

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：85401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16574

研究課題名(和文)被爆による造血器腫瘍発症に関与する分子機構の解明と今後への展望

研究課題名(英文)Identifying mechanisms for development of hematological malignancies among A-bomb survivors

研究代表者

吉田 稚明(YOSHIDA, Noriaki)

公益財団法人放射線影響研究所・広島臨床研究部・副主任研究員

研究者番号：20832926

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)：放射線被曝による白血病発症は広く認識されているが、その分子学的な発症機構は十分解明されていない。本研究では、原爆被爆者における白血病発症リスクが最も高かった時期である1980年以前の白血病症例に着目した。そして、1980年以前より保存されている病理標本から抽出したDNA/RNAを用いて、分子病理学的解析方法を確立した。また、更に詳しくそれら白血病症例の特徴をみるために、ハイスループットシーケンスを用いたゲノム解析を実施中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで放射線被曝と白血病発症の関係は主に疫学的研究によって評価されてきた。今回の研究では、放射線被曝の影響が強くみられるサンプルを用いて分子病理学的解析が実施可能であることが明らかとなった。この方法を用いて白血病症例の分子病理学的特徴を詳細に評価することで、放射線被曝によりどのようにして白血病が発症するのかについて解明できる可能性がある。そしてその解明は、今後医療放射線被曝などにおいて白血病予防や早期診断・治療などへの応用につながりうる。

研究成果の概要(英文)：It is widely accepted that radiation can induce leukemia development, but the molecular mechanisms still remain unknown. In the current study, I focused on the leukemia cases that developed before 1980, in which the increased risk of leukemia was identified among A-bomb survivors. I established the methods of pathological and molecular analysis using DNA and RNA extracted from the pathological samples that were stored before 1980. I'm going to investigate the genomic alterations using high throughput sequencing to characterize the leukemia cases.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：白血病 造血器腫瘍 放射線被曝 病理標本 分子病理学

## 1. 研究開始当初の背景

原爆放射線による後影響として最も重大なものの一つが発がんである。中でも被爆者での白血病リスクの増加は広く認識されている。白血病による死亡リスクは被爆後約 2-3 年で現れ、10-15 年でピークに達しその後減少傾向にある。被爆後早期に明らかに増加した悪性疾患は白血病のみであり、このことから白血病は極めて放射線起因性の高い疾患とみなされる。被爆後早期に発症した白血病では、被曝線量に応じて過剰相対リスク (ERR) が上昇することが知られているが、高線量被曝群全員に白血病が発症したわけではない。このことから次の課題として、「放射線によりどのようにして白血病が発症するか？」という問いがあげられる。近年のゲノム異常解析により、数多くの遺伝子変異、融合遺伝子が白血病で同定され、これらゲノム異常が白血病を起こすと考えられている。このことから、放射線リスクが高くみられる時期である被爆後早期に発症した白血病症例が有するゲノム異常は白血病発症に極めて重要であると推測される。

被爆後早期に発症した白血病の中でも、慢性骨髄性白血病 (CML) は特に放射線リスクの高い白血病病型である。現在、CML は *BCR::ABL1* という融合遺伝子の存在により診断される疾患である。被爆後早期の CML 症例ではこの *BCR::ABL1* について評価されていなかった。このため、現在の CML とは異なる疾患単位が、被爆後早期に CML と診断されている可能性がある。被爆後早期における診断確実度についての懸念は、他の血液疾患にも当てはまる。現在、WHO 診断基準などに沿い世界中で造血器腫瘍は診断されているが、多発性骨髄腫 (MM) はその国の経済状況により発生率が異なる疾患と報告されている。これは MM の診断には病理学的解析だけでなく、臨床学的な評価も重要とされているためである。この点からは、被爆後早期に発症した MM 症例の診断確実度が、現在のものと異なっている可能性があるかと推測される。

放射線影響研究所 (放影研) では、現在までに被爆者の血液塗抹標本やホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本などの病理サンプルを 1950 年より保管している。血液塗抹標本や FFPE 標本から DNA/RNA を抽出する方法は確立しているが、古い標本について実施できるかどうかは十分検討されていなかった。放射線影響が強くみられる時期に発症した白血病症例の標本を分子学的に解析することは、その発症機構の解明につながり、それは今後、予防や早期発症予測といった臨床学的に応用可能なものとなりうる。

## 2. 研究の目的

本研究の主目的は、放射線被曝による造血器腫瘍発症機構を分子学的側面から解明することである。そのために今回は、放影研で保管されている FFPE 標本を用いた分子病理学的解析法の確立、診断確実度に基づいた被爆者での MM の放射線リスクの評価、を目的と設定し、主目的を達するための方法や妥当性の検討を実施した。

## 3. 研究の方法

### FFPE 標本を用いた分子病理学解析法の確立

放影研が保有している FFPE サンプルが分子病理学的検討に利用可能かどうかについて検討を実施した。

#### A: 対象

放影研での原爆被爆者のコホート調査である寿命調査集団 (LSS) の中から CML 症例 (International Classification of Disease for Oncology, 1st, 2nd, and 3rd revision, Morphology: ICD-O-1-M or ICD-O-2-M: 9842, 9863, 9893, and ICD-O-3-M: 9863, 9875, 9876, 9946) を同定した。そのうち、1980 年以前に広島放影研で病理解剖された 20 症例の CML 症例のうち、被曝放射線量が 5mGy 未満の 2 例と、被曝放射線量が 5-100mGy の者のうち最も線量の低い 1 例の計 3 例を解析対象とした。希少性のため少数例の解析となった。

#### B: 方法

剖検報告書を用いてこれら 3 症例の血液検査所見を含む臨床学的特徴を用いてまとめた。そして、各症例の肝臓、脾臓、リンパ節の FFPE サンプルを用いて、免疫染色を含む病理学的解析を実施した。そして腫瘍細胞の割合を推定し、各症例内で一番腫瘍細胞が多く含まれる臓器から DNA と RNA を抽出した。*BCR::ABL1* や他の造血器腫瘍で認められ診断学的価値があるゲノム異常について、PCR 法、ドロップレットデジタル PCR 法 (ddPCR 法) を用いて解析を行った。陽性コントロールとして CML 細胞株 (K562) を用いた。

### 診断確実度に基づいた被爆者での MM の放射線リスクの評価

#### A: 対象

LSS のうち、1950-1994 年の間に造血器腫瘍と診断されている症例を同定した。そのうち、MM の可能性がある症例に着目した。

#### B: 方法

上記の MM の可能性がある症例について、臨床情報、病理所見を元に、診断確実度を分類した。そして、放射線リスクについてポワソン回帰を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

##### FFPE 標本を用いた分子病理学解析法の確立

###### 臨床学的特徴：

全例で診断時に末梢血（PB）で白血球数と血小板数の増加がみられ、骨髄芽球も確認されていた。うち2例ではCMLで特徴的な末梢血中の好塩基球の増加も認められていた。1例は軽度の貧血を示した。これらの所見は現在の診断では、CMLを含む骨髄増殖性腫瘍（MPN）とみなされる所見であった。3例とも経口抗がん剤により治療されていたが、腫瘍の増悪がみられ、その後死亡した。剖検時の記録では、3例とも肝脾腫、リンパ節腫大が認められた。2例は骨髄内に腫瘍細胞が認められたが、1例は著明な線維化を示した。

###### 病理学的検討：

HE染色上、腫瘍細胞の存在は評価可能であった。腫瘍細胞を特徴づけるため、幹細胞マーカー（CD34）、骨髄系マーカー（MPO）、B細胞マーカー（CD19）、T細胞マーカー（CD3）を用いて免疫染色を実施した。賦活化をTris-EDTA Buffer（PH9.0）を用いて121°C、15min incubationしたところ、染色はすべて実施できた。2例はMPOと共にCD34が陽性であり、骨髄性白血病と考えられた。残り1例はMPOとCD3が陽性であり、混合型急性白血病（顆粒球/T細胞）と考えられた。

###### 分子学的検討：

採取したRNAからcDNAを作製し、RT-PCRを実施した。GAPDHを内在性コントロールとして評価し、全てのサンプルで増幅可能であることを確認した。BCR::ABL1には様々なvariantsが存在している（Figure 1A）。このうち最も頻度高く認められるp210を評価したところ、1例でp210が認められた。他のサンプルでは見られなかった。より詳細に検討できるddPCR法を用いて、BCR::ABL1の各variantsを評価した。ddPCRでは、標的領域を含む部分をあらかじめPCRで増やした検体を用いることで、異常の有無の評価を行うことができた（感度：0.01%）。1例はe13a2とe14a2双方が発現しており、もう1例はe13a2を発現していることが明らかとなった。BCR::ABL1の他のvariantsであるp190、p230についても評価したが、いずれの症例でもみられなかった。また、診断価値のある遺伝子変異（JAK2 V617F、CSF3R T618I）をddPCR法で評価したが、いずれの症例でもそれら遺伝子変異はみられなかった。

###### まとめ：

今回の試行研究により、1980年以前より保存されているFFPEサンプルを用いて分子病理学解析が実施可能であることが明らかとなった。また、解析した3例のうち2例は現在の診断基準でCMLと診断できた。残り1例ではBCR::ABL1が検出されなかったため、他の造血器腫瘍である可能性が高い（Figure 1B）。ddPCRは網羅的な解析ではないものの、既知の融合遺伝子および遺伝子変異検索を実施することができる。また現在、ターゲットシーケンスによる評価を実施中であり、これにより網羅的な解析が可能かどうか検討する。

##### 診断確実度に基づいた被爆者でのMMの放射線リスクの評価

###### 診断確実度の分類：

臨床情報と病理組織検査の情報をもとに、MMの可能性のある166例について診断確実度に基づき分類した（Figure 2）。そして、このうち本研究の解析対象例122例を同定した（確実例：67例、可能性あり：23例、

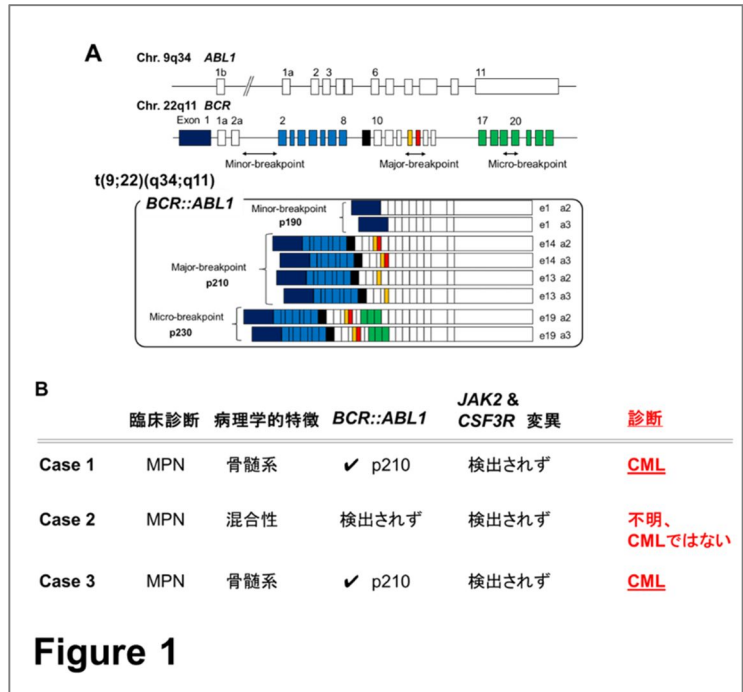


Figure 1

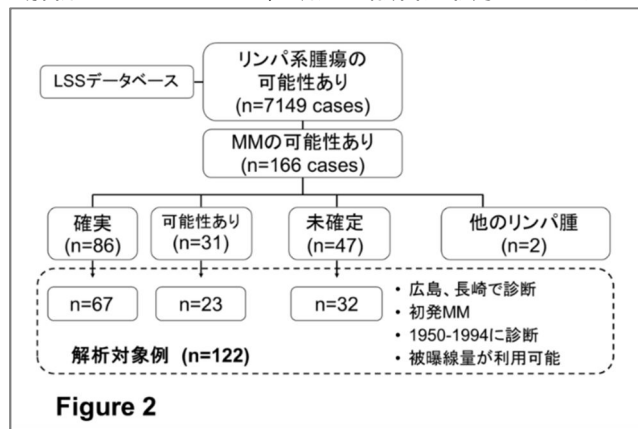
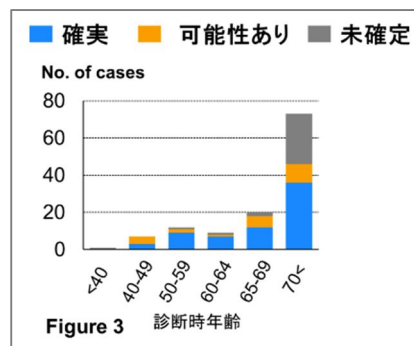


Figure 2

未確定：32例）。未確定の群には、MMの前病変とみなされている、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症（MGUS）が含まれている。

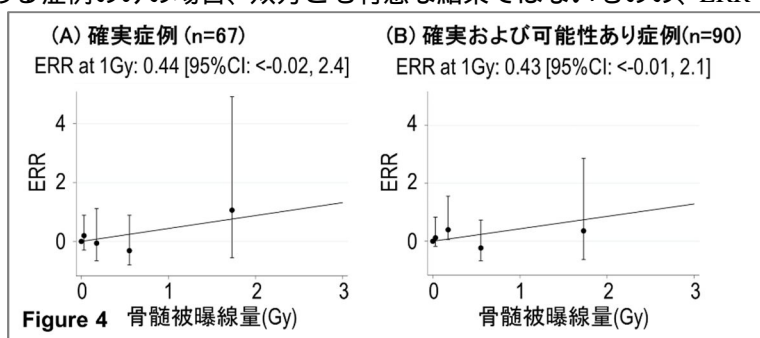
**臨床学的特徴：**

各症例の診断時年齢を評価したところ、多くの症例が70歳台で発症していることが明らかとなった（Figure 3）。この点は、非被爆者でのMM発症年齢と同様である。



**放射線リスク：**

診断確実度に基づいた分類ごとに、放射線被曝による過剰相対リスク（ERR）を評価した（Figure 4）。すると、確実症例のみの場合、確実および可能性ある症例のみの場合、双方とも有意な結果ではないものの、ERRが0.44、0.43を示した。これらは全体のMM症例でのERR - 0.02より高値であった。



**まとめ：**

今回1950-1994年に診断されたMM症例の診断確実度を評価した。一部の症例については、MMと確定できる所見が得られなかった。それらの症例を除くと、ERRが高値となる傾向を認めている。このことは、以前の症例についてはその診断確実度を考慮したうえで、放射線リスクなどの評価をする必要があることを示している。以前の被爆者に関する疫学研究では、若年被爆者において放射線被曝線量に応じたMGUSの発生率の増加が報告されている。本研究の対象期間である1994年においては、若年被爆者の方々が、MMの好発年齢である70歳台に到達していなかった。このためより長期的な評価が必要であることが示された。

**今後の研究：**

本研究により、古い病理組織標本からも分子病理学的解析が可能であることが明らかとなった。被爆後早期の症例の診断についてはその診断確実度を用いる必要性を示唆する結果となった。これらを受けて、後の研究では症例の診断を見直し、原爆放射線被曝の造血器腫瘍発症への影響、またその機構の解明を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujihara Megumu, Sakata Ritsu, Yoshida Noriaki, Ozasa Kotaro, Preston Dale L., Mabuchi Kiyohiko	4. 巻 139
2. 論文標題 Incidence of lymphoid neoplasms among atomic bomb survivors by histological subtype, 1950 to 1994	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 217 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020010475	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 該当する
1. 著者名 Yoshida Noriaki, Fujihara Megumu, Preston Dale L, Ozasa Kotaro, Hida Ayumi, Ohishi Waka, Sakata Ritsu, Mabuchi Kiyohiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Further analysis of incidence of multiple myeloma among atomic bomb survivors, 1950-1994	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	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) 10.1182/bloodadvances.2022009154	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 該当する
1. 著者名 Yoshida Noriaki, Yamada Kyohei, Ohshima Koichi	4. 巻 112
2. 論文標題 Comprehensive genomic analysis identifying heterogeneity in peripheral T cell lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1339 ~ 1347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14849	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 Noriaki Yoshida, Kay Shigemori, Nicholas Donaldson, Christopher Trevisani, Nicolas A Cordero, Kristen E Stevenson, Xia Bu, Fumiko Arakawa, Mai Takeuchi, Koichi Ohshima, Akinori Yoda, Samuel Y Ng, David M Weinstock	4. 巻 135
2. 論文標題 Genomic Landscape of Young ATLL Patients Identifies Frequent Targetable CD28 Fusions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1467-1471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019001815	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Noriaki Yoshida
2. 発表標題 Incidence of hematological malignancies, especially lymphoid neoplasms among A-bomb survivors
3. 学会等名 68th Annual International Meeting of Radiation Research Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田稚明
2. 発表標題 臨床疫学所見に基づく造血器腫瘍ゲノムプロファイルのさらなる検討
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田稚明
2. 発表標題 希少造血器腫瘍でのトランスレーショナルリサーチと、その将来展望
3. 学会等名 放射線影響学会 第63回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------	---------