

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21718

研究課題名（和文）ロングリード配列決定法による放射線被ばく刻印の同定

研究課題名（英文）Identification of genomic radiation signature using long-read sequencing

研究代表者

光武 範吏（MITSUTAKE, Norisato）

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：50404215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ショートリードとロングリードを用いた次世代シーケンシングより、ヒト正常細胞における放射線被ばくによるゲノム変異として、以下の特徴が明らかになった。1) 様々なサイズの欠失が線量依存性に増加した。2) 高線量では、非常に長大な欠失（数十万からメガベース以上）が生じた。3) 欠失の両断端にホモロジー配列がないものが多かった。また、高線量では断端結合部に別の配列を含むものが多かった。4) 一塩基置換も増加したが、線量依存性はなかった。5) 一塩基置換には、酸化損傷を示唆する変異シグネチャーが含まれていた。ただし、放射線被ばくに完全に特異的な変異の同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA配列決定法の技術的な進歩により、DNAの配列変化をゲノムワイドに調べることが可能となってきた。放射線被ばくは、発がんリスクを上昇させることは疫学的に明らかであり、放射線によるゲノム変異がその誘因であると考えられている。本研究において、ヒト正常培養細胞で、放射線によって生じるゲノム変異の特徴の多くが詳細に明らかになった。これらの異常が、発癌の第一歩となる可能性が高い。本研究成果は、放射線による生物学的影響、遺伝子異常、発癌などの他の研究にも活かせる基盤的データとなると思われる。

研究成果の概要（英文）：Two different platforms of next generation sequencing, short- and long-read sequencing, revealed the following characteristics of radiation-induced genomic variants in human normal cells: 1) Deletions of various sizes increased in a dose-dependent manner. 2) At high doses, very long deletions (hundreds of thousands to megabases or more) occurred. 3) Many of the deletions had no homology sequence at break points. Deletions by high doses often contained a distinct sequence at the junction. 4) Single nucleotide substitutions also increased but were not dose dependent. 5) Single nucleotide substitutions contained mutational signatures suggestive of oxidative damage. However, we were unable to identify mutations that were completely specific to radiation exposure.

研究分野：放射線影響学

キーワード：放射線 ゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 放射線被ばくによって癌の発生頻度が増加するのは明らかであるが、被ばく後に発生したあるひとつの癌が放射線で引き起こされたものか、その他の原因で起きたものかを区別する方法はなかった。
- (2) 放射線はクラスター損傷と呼ばれる複雑な異常を DNA に引き起こし、マイクロホモロジーを伴う様々な長さの欠失を生じさせるとされるが、これらを全ゲノムレベルで正確に解析する手法は今までなかった。
- (3) 近年、様々な長さの欠失を含む構造異常を正確に検出できるとされる新規技術ロングリードシーケンシングが開発され、これまでのショートリードによる次世代シーケンシングでは検出できない異常を検出できるようになってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DNA を数百ベースに断片化し、大量にこれら断片をシーケンシングするショートリード次世代シーケンシングに加え、数十キロベースの DNA を直接シーケンシングするロングリード次世代シーケンシングを用い、ヒト正常細胞における放射線被ばくの痕跡、いわゆるゲノム刻印の存在を明らかにすることである。

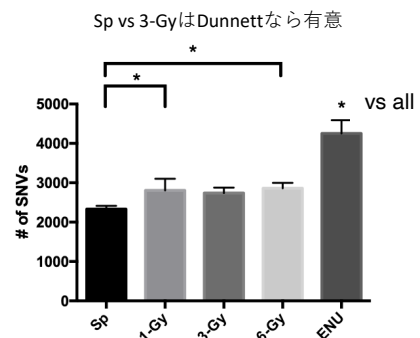
3. 研究の方法

- (1) 正常ヒト線維芽細胞にヒトテロメラーゼ (*hTERT*) 遺伝子を安定導入して不死化させた BJ1-hTERT 細胞を用いた。137Cs- γ 線 (線量率: 1 Gy/min) 0 (コントロール), 1, 3, 6 Gy、もしくは N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) (1 mM で 1 hr 処理) によって突然変異を導入、6-thioguanine (6-TG)存在下で培養し、多数の細胞クローンを樹立した。
- (2) クローンよりゲノム DNA を抽出し、*HPRT* 遺伝子各エクソンの有無を定量 PCR にて解析した。
- (3) ショートリード解析は MGI 社 DNBSEQ-T7、ロングリード解析は Oxford Nanopore Technologies (ONT) 社 PromethION を用いて行った。
- (4) ショートリードに関して、バリエントが正確にコールされていると考えられる領域の single nucleotide variant (SNV)、short insertion/deletion (INDEL)を用い、細胞系譜の作成を行なった。この作成した系譜より、放射線照射とは無関係に培養時に蓄積された非放射線バリエントと、放射線照射後によって入ったバリエントが濃縮されている放射線関連バリエントを抽出した。バリエントの総数は、全クローンの仮想起始細胞からの総計とした。上記の非放射線バリエントと、放射線関連バリエントに対し、COSMIC mutation signature で配布されているソフトウェアを用い、変異シグネチャの解析を行った。大きな欠失については、ショートリードとロングリードの両方のプラットフォームから得られたデータを、コントロール、放射線、ENU 群にユニークなものを抽出し、Integrative Genomic Viewer を用いて目視で検証を行い、正確な欠失のみを抽出した。これら抽出した欠失のブレイクポイント周囲の確認も行なった。これらの結果より、ショートリードのデータよりコールした vcf ファイルのパラメーター上で、正確な欠失と偽陽性を区別するのに有用なものを選び、大きな欠失に関して全クローンに対して総数を計測した。

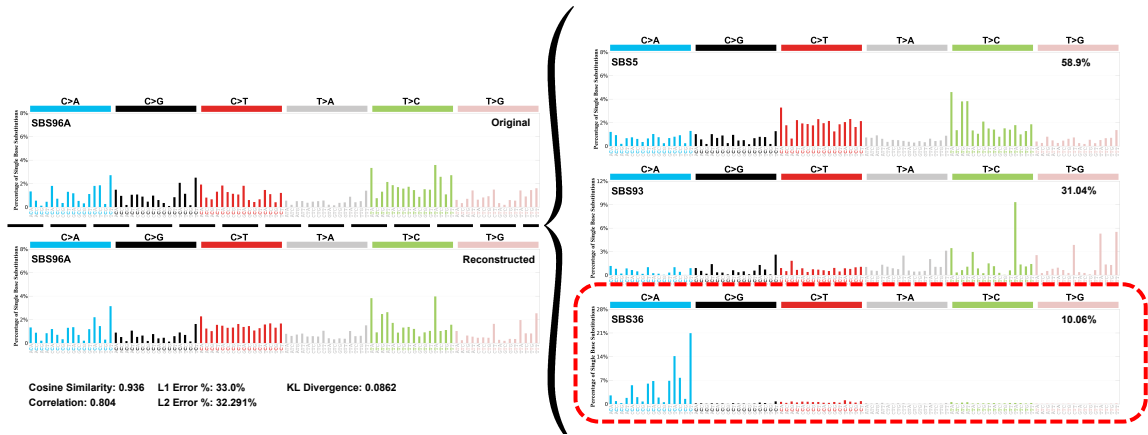
4. 研究成果

- (1) 本研究にて樹立した線量ごとの *HPRT* 変異クローンの数、*HPRT* 遺伝子エクソンの欠失検出結果を下表に示す。被ばく線量依存的に欠失を持つクローンの頻度が増加した。このうち、コントロール、1, 3, 6 Gy からは 5 クローン、ENU から 4 クローン、合計 24 クローンについてショートリードとロングリードによる全ゲノムシーケンシングを施行した。

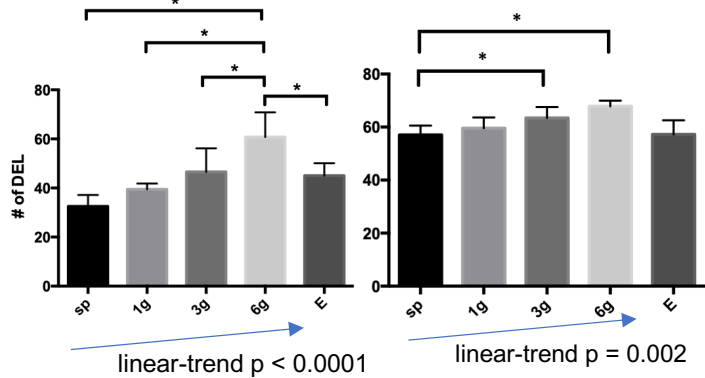
実験群	樹立クローン数	全エクソン欠失	エクソン部分欠失
コントロール	16	0/16 (0%)	0/16 (0%)
γ 線 - 1 Gy	27	0/27 (0%)	1/27 (3.7%)
γ 線 - 3 Gy	27	1/27 (3.7%)	3/27 (11.1%)
γ 線 - 6 Gy	33	10/33 (30.3%)	6/33 (18.2%)
ENU	24	0/24 (0%)	2/24 (8.3%)



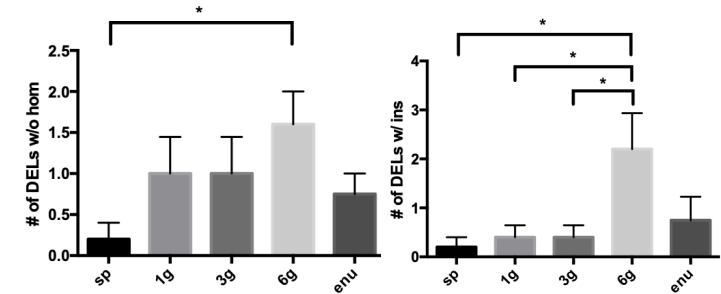
- (2) SNV は、放射線照射によって有意に増加 (約 20%) していた。ただし、線量依存性は見られなかった (右図)。
- (3) SNV のうち、非放射線バリエントと放射線関連バリエントの COSMIC mutation signature 解析、さらに signature decomposition を行ったところ、放射線関連バリエントには、DNA damage due to reactive oxygen species によるものを示唆する signature が含まれていた (下図赤破線)。



(4) Short INDEL は、線量依存性に増加していた。コントロールと比較し、6 Gy では 50%程度の増加が見られた (右、左図)。

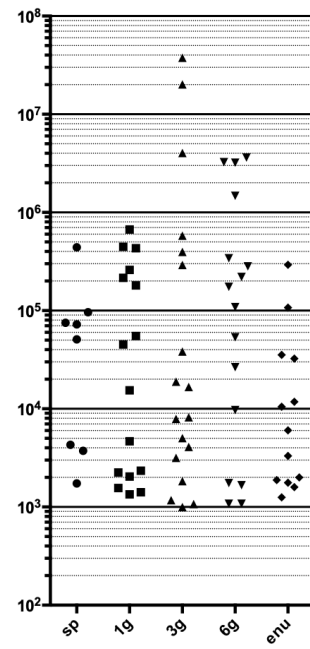


(5) 1,000 bp 超の Large DEL も、線量依存性に増加していた (右、右図)。



(6) 以下は、コントロール、放射線照射、ENU 群にユニークな 1,000 bp 以上の欠失を解析した結果である。放射線被ばくによる欠失では、両ブレイクポイントに 2-3 bp 以上のホモロジー配列を全く持たないものの割合が高かった (右、左図)。また、6 Gy (高線量) のみの結果であるが、ブレイクポイント結合部に、周囲とは無関係な別の配列が挿入されたものが多かった (右、右図)。

(7) 放射線被ばくでのみ、非常に長大な欠失 (数十万~メガベースペア) が生じた (右図)。



(8) *HPRT* 遺伝子変異は、クローニングにおける 6-TG 選択に必須であり、そのことから発癌におけるドライバー変異のような役割であると考え、特に低線量における SNV の比較検討を行った。その結果、それら SNV とコントロールに見られた SNV はその多くが同一のものであり、1 Gy における変異率がコントロールの約 10 倍であったことを考えると、低線量における SNV は、放射線特異的でないことが示唆された。

(9) ヒト正常培養細胞における放射線被ばく時のゲノム変異の様々な特徴が明らかになった。しかし、放射線被ばくに完全に特異的な変異の同定には至らなかった。また癌はそれ自体でゲノム不安定性を示すため、それによるゲノム変異についても理解・比較する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 8件）

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 Kurohama Hirokazu, Matsuda Katsuya, Kishino Mio, Yoshino Miruki, Yamaguchi Yuka, Matsuu-Matsuyama Mutsumi, Kondo Hisayoshi, Mitsutake Norisato, Kinoshita Akira, Yoshiura Ko-ichiro, Nakashima Masahiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Comprehensive analysis for detecting radiation-specific molecules expressed during radiation-induced rat thyroid carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 i78 ~ i87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rraa139	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 Mitsutake Norisato, Saenko Vladimir	4. 巻 62
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of pediatric thyroid carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 i71 ~ i77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rraa096	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 Amrenova Aidana, Suzuki Keiji, Saenko Vladimir, Yamashita Shunichi, Mitsutake Norisato	4. 巻 16
2. 論文標題 Cell competition between anaplastic thyroid cancer and normal thyroid follicular cells exerts reciprocal stress response defining tumor suppressive effects of normal epithelial tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0249059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0249059	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 Rogounovitch Tatiana I., Mankovskaya Svetlana V., Fridman Mikhail V., Leonova Tatiana A., Kondratovitch Victor A., Konoplya Natalya E., Yamashita Shunichi, Mitsutake Norisato, Saenko Vladimir A.	4. 巻 13
2. 論文標題 Major Oncogenic Drivers and Their Clinicopathological Correlations in Sporadic Childhood Papillary Thyroid Carcinoma in Belarus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3374 ~ 3374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13133374	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 Nakao Tomoe, Matsuse Michiko, Saenko Vladimir, Rogounovitch Tatiana, Tanaka Aya, Suzuki Keiji, Higuchi Miyoko, Sasai Hisanori, Sano Tsutomu, Hirokawa Mitsuyoshi, Miyauchi Akira, Kawakami Atsushi, Mitsutake Norisato	4. 巻 95
2. 論文標題 Preoperative detection of the TERT promoter mutations in papillary thyroid carcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Endocrinology	6. 最初と最後の頁 790 ~ 799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen.14567	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zurnadzhy Liudmyla, Bogdanova Tetiana, Rogounovitch Tatiana I., Ito Masahiro, Tronko Mykola, Yamashita Shunichi, Mitsutake Norisato, Chernyshov Serhii, Masiuk Sergii, Saenko Vladimir A.	4. 巻 13
2. 論文標題 The BRAFV600E Mutation Is Not a Risk Factor for More Aggressive Tumor Behavior in Radiogenic and Sporadic Papillary Thyroid Carcinoma at a Young Age	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6038 ~ 6038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13236038	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 Bogdanova TI, Saenko VA, Hashimoto Y, Hirokawa M, Zurnadzhy LY, Hayashi T, Ito M, Iwadata M, Mitsutake N, Rogounovitch TI, Sakamoto A, Naganuma H, Miyauchi A, Tronko MD, Thomas G, Yamashita S, Suzuki S	4. 巻 -
2. 論文標題 Papillary Thyroid Carcinoma in Ukraine After Chernobyl and in Japan After Fukushima: Different Histopathological Scenarios	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thyroid	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) 10.1089/thy.2020.0308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwadate M, Mitsutake N, Matsuse M, Fukushima T, Suzuki S, Matsumoto Y, Ookouchi C, Mizunuma H, Nakamura I, Nakano K, Sakamoto A, Hirokawa M, Ito M, Naganuma H, Hashimoto Y, Shimura H, Yamashita S, Suzuki S	4. 巻 105
2. 論文標題 The Clinicopathological Results of Thyroid Cancer With BRAFV600E Mutation in the Young Population of Fukushima	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e4328-e4336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgaa573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, ..., Tanaka M, Suganami T, Nakada S, Mitsutake N, Hara Y, Kato K, ..., Kaneko H, Matsumoto N, Matsuda F, Matsuo K, Takahashi Y, Mashimo T, Kojima S, Ogi T	4. 巻 6
2. 論文標題 Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd7197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd7197	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 Horiguchi K, Yoshida Y, Iwaku K, Emoto N, Kasahara T, Sato J, Shimura H, Shindo H, Suzuki S, Nagano H, Furuya F, Makita N, Matsumoto F, Manaka K, Mitsutake N, Miyakawa M, Yokoya S, Sugitani I	4. 巻 -
2. 論文標題 Position paper from the Japan Thyroid Association task force on the management of low-risk papillary thyroid microcarcinoma (T1aN0M0) in adults	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	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) 10.1507/endocrj.EJ20-0692	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 Kaminaga K, Hamada R, Usami N, Suzuki K, Yokoya A	4. 巻 194
2. 論文標題 Targeted Nuclear Irradiation with an X-Ray Microbeam Enhances Total JC-1 Fluorescence from Mitochondria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 511-518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RR15110.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 光武 範吏
2. 発表標題 TERTと甲状腺癌の高度悪性化
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光武 範吏、松瀬美智子、岩館 学、サエンコ ウラジミール、鈴木 眞一、山下 俊一
2. 発表標題 小児・若年者甲状腺癌の遺伝子解析
3. 学会等名 第34回日本臨床内科医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松瀬美智子、酒匂あやか、サエンコ ウラジミール、山下俊一、光武範吏
2. 発表標題 TERTの転写制御の違いと甲状腺癌悪性度との関連
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒匂あやか、松瀬美智子、サエンコ ウラジミール、西原永潤、廣川満良、宮内昭、川上純、光武範吏
2. 発表標題 甲状腺乳頭癌におけるTERT mRNAのスプライシングバリエントとTERTプロモーター変異・臨床病理学的指標との関連
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松瀬 美智子, Vladimir Saenko, 中尾 朋恵, 山下 俊一, 光武 範史
2. 発表標題 増悪する甲状腺乳頭癌を予測できる分子マーカー：さらなる高精度化と細胞診への応用
3. 学会等名 第63回 日本甲状腺学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光武 範史
2. 発表標題 遺伝子変異からみた甲状腺がんの診断：穿刺吸引細胞診におけるTERTプロモーター変異の検出
3. 学会等名 第30回 臨床内分泌代謝Update (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 サエンコ ウラジミール, ボグダノワ タチアナ, 橋本 優子, 廣川 満良, リュドミラ ズルナドジ, 林 俊哲, 伊東 正博, 岩館 学, 光武 範史, ログノピッチ タチアナ, 坂本 穆彦, 長沼 廣, 宮内 昭, トロンコ ミコラ, トマス ジュラルディン, 山下 俊一, 鈴木 真一
2. 発表標題 チェルノブイリと福島甲状腺がんにおける様々な病理学的シナリオ
3. 学会等名 第63回 日本放射線影響学会 年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光武 範史, 松瀬 美智子, 岩館 学, 山下 俊一, サエンコ ウラジミール, 鈴木 真一
2. 発表標題 チェルノブイリ原発事故後と福島県における小児・若年者甲状腺癌における遺伝子変異
3. 学会等名 第63回 日本放射線影響学会 年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光武 範吏
2. 発表標題 乳頭癌の遺伝子異常
3. 学会等名 第32回 日本内分泌外科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光武 範吏, 松瀬 美智子, 岩館 学, サエンコ ウラジミール, 鈴木 眞一, 山下 俊一
2. 発表標題 小児・若年者甲状腺がんと成人甲状腺がんの遺伝子変異の相違
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術総会（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
研究分担者	鈴木 啓司 (SUZUKI Keiji) (00196809)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授 (17301)	
研究分担者	荻 朋男 (OGI Tomoo) (80508317)	名古屋大学・環境医学研究所・教授 (13901)	

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
---------	---------