

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07617

研究課題名(和文) 各種細胞株の放射線照射による生存率曲線と遺伝子発現量の測定

研究課題名(英文) Measurement of Survival Curves and Gene Expression Levels in Various Cell Lines Following Radiation Exposure

研究代表者

平野 祥之(Hirano, Yoshiyuki)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授

研究者番号：00423129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：HeLa細胞を用いて、ガンマ線照射による遺伝子発現を照射1,5,12時間後の遺伝子発現量をRNA-seqを用いて取得し解析した。その結果同様な変動を示す遺伝子群を12グループに分類し、それぞれの遺伝子の生物学的プロセスを特定した。また、放射線感受性が高い細胞株と放射線抵抗性細胞株を用いて、それぞれガンマ線照射後の遺伝子発現変化について調べ、放射線感受性の違いによる遺伝子発現の変化があるかを調べたが、特徴的な遺伝子発現変動は確認できなかった。しかし抵抗性のある細胞株は、感受性が高い細胞株に比べて全体的に遺伝子発現変動が少ないことが分かった。これらの理由の特定については今後の課題として残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療の分野においても遺伝子の情報を利用する機会が益々増えると考えられる。その際に、様々な細胞株における放射線照射後の遺伝子発現データは、どのように遺伝情報を有効利用するかを決定するための基礎データとして欠かせないと考えられ、本研究ではそのデータの一部を取得できた。また放射線感受性と遺伝子発現情報との関係を明らかにすることができれば、より高精度な放射線治療効果予測や効果的な放射線防護につながると考えられ、本研究ではその関係の特徴を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Using HeLa cells, we measured and analyzed the gene expression levels at 1, 5, and 12 h after gamma radiation exposure using RNA-seq. We classified the genes with similar variations into 12 groups and identified the biological processes of each group. Additionally, we examined gene expression differences after gamma ray exposure in both highly radiosensitive and radioresistant cell lines to investigate the dependence of gene expression differences on radiosensitivity. No characteristic gene expression was observed in the radioresistant cell lines. However, it was found that radioresistant cell lines exhibited fewer changes in gene expression compared to the highly radiosensitive cell lines. Identifying the reasons for these differences remains a future challenge.

研究分野：放射線治療

キーワード：RNA-seq 放射線治療 放射線影響 遺伝子発現 バイオインフォマティクス 生物効果モデル

1. 研究開始当初の背景

放射線治療において、照射線量(物理線量)は厳しく管理されており、その測定手法や測定器の開発は現在も続けられている。しかし腫瘍の局所制御率や正常組織の有害事象の予測には、物理線量に生物学的効果比(Relative Biological Effectiveness : RBE)をかけた生物線量を指標に用いるのが望ましい。これまでのRBEの測定に関する論文を調べた結果、208の細胞照射実験があり、使用された細胞株の上位3つ(35%)はV79, C3H10T1/2, CHOと、これらを形質転換したものであり、いずれもヒト細胞ではない。ヒト細胞は全体の64%であったが、血液・リンパ系、神経系および皮膚が目立ち、放射線治療の適用が多い、乳房や前立腺、肺、頭頸部起源の細胞株は少ない。2019年度6月から一部のがん遺伝子パネル検査が保険適用になり、今後も遺伝子情報を基にした個別化医療が進むことが予想される。放射線照射と遺伝子発現に関する研究はこれまでも存在するが、特定の部位のみの結果や、一部の放射線種あるいはエネルギーによる実験で単発的な研究が多く、系統的なデータを揃えるのは難しい。細胞株については、ベースラインの遺伝子発現データは充実しているが、照射後の遺伝子発現データは少ない。また酸素濃度や線量率、分割照射における遺伝子発現の変化についてはほとんど報告がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト細胞の放射線照射による遺伝子発現の変動についてのデータを取得し、その特徴を抽出することである。特に遺伝子発現の時系列データ、様々な細胞株について、放射線感受性の異なる細胞株の放射線照射後の遺伝子発現情報を取得することである。そしてこれらの特徴を特定し、生物効果モデルに組み込むことである。細胞株種や遺伝子発現データを考慮した生物効果モデルを作成することで、より高精度なRBE予測が可能となり、生物線量を基にした最適な線量分布計算を実現し、放射線治療の質の向上が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では主に3つの実験および解析を行った。文献[1]から得られる細胞株ごとの放射性感受性のデータとCCLEから取得できる細胞株ごとの遺伝子変異の情報をを用いて、遺伝子の変異と放射性感受性の関係を調べた。HeLa細胞を用いて、ガンマ線照射後の遺伝子発現を照射後12時間までの遺伝子発現量をRNA-seqを用いて取得し、解析した。放射性感受性が高いHEC251とIMR32細胞株、放射線抵抗性があるHepG2とKMRC1細胞株を用いて、それぞれガンマ線照射後の遺伝子発現変化について調べ、放射線抵抗性のある細胞株に特徴的な遺伝子発現変化があるかを調べた。なお生存率曲線の測定については、装置の不具合で正確に測定することができなかったため、文献[1]の情報を利用した。

文献[1]からは530種類の細胞株の放射線感受性に関するデータが生存率曲線におけるAUC(area under the curve)として取得できる。AUCの分布はほぼガウス分布だったため平均から1シグマ引いた値より低いAUCをもつ細胞株を放射線感受性が高いとし、また平均から1シグマより大きいAUCをもつ細胞株を放射線抵抗性があるとし、19429の遺伝子において放射線感受性によって、特徴的な変異があるかを調べた。ある遺伝子について、放射性感受性が高い群の細胞株にその遺伝子に変異がある割合と、そうでない群の細胞株に変異がある割合を比較し、有意に差があるか検定した。すべての遺伝子について検定を行ったので、Benjamini-Hochberg法で補正し、FDR<0.05以下の遺伝子を特定した。RNA-seqについては、QIAGENのRNA-seq抽出キットを用いて、サブコンフルエントになった状態でCo-60のガンマ線を2Gy照射し、については、コントロールおよび1時間後、5時間後、12時間後に抽出した。については4種類の細胞株について照射し、5時間後にRNAを抽出した。シーケンスについては、DNB(DNA Nanoball)を、についてはillumina社製のNovaSeqを用いてシーケンスを行った。これらはAzenta社に外注した。解析は主にバイオインフォマティクスで用いられる手法を用いた。については、fastQCでクオリティチェックをしTrimomaticでトリミングをし、HISAT2でマッピングを、featurecountでリードをカウントし、TPMで規格化したのち、変化のあった遺伝子をk-meanクラスタリングで12のクラスターわけ、それぞれのクラスターについてエンリッチメント解析を行った。については、fastqでクオリティチェックおよびトリミングを行い、まず放射線抵抗性の細胞株は、DNA修復に関する遺伝子発現が多いであろうという仮説を立て、2重鎖切断の修復機構である非相同末端結合(NHEJ)と相同組換え修復(HR)に関する遺伝子を洗い出し、これらの遺伝子変化について調べた。またDESeq2で発現変動遺伝子を特定したあとエンリッチメントを行った。最後に放射線感受性が高い細胞株としてHEC251とIMR32を選んだがAUCはそれぞれ1.033、0.634である。一方放射線抵抗性をもつ細胞株HepG2とKMRC1のAUCは5.22と4.43である。AUCの最小値は0.545で最大値は6.21である。

4. 研究成果

の結果については、放射線感受性が高い群については、895の遺伝子が有意に変異を持つことがわかった。多重検定の補正後でも135の遺伝子が残った。一方放射性抵抗性の群については、4つ遺伝子しか見つからず補正後は0となった。つまり放射線感受性が高い細胞株には、特徴的な遺伝子変異があるが、抵抗性のある細胞株については、特徴的な遺伝子変異がないことが示された。また放射線感受性が高い細胞株に見られた特徴的な遺伝子変異およびその組み合わせで、特に割合が高いものとして、ARID1A-DCHS2-2FHX3、DCHS2-SHANK3、DCHS2-KMT2D-LRP1があった。これらの遺伝子に変異を持つ割合は、全細胞株の中で3.4%、3%、3%であり、その中で88.9%、87.5%、87.5%が放射線感受性の高い細胞株であった。よってこれらの遺伝子の変異を調べることで、80%以上の確率で放射線感受性が高いと特定できる。しかしなぜこれらに変異があると感受性が高いのかを特定するのは今後の課題である。また同様な解析を遺伝子パネル検査(NCC Onco panel)で採用されている114の遺伝子についても行った。その結果、ARID1A-PIK3CA-PTENに変異があれば、75%の割合で放射線感受性の高い細胞株だった。現在遺伝子パネル検査は、標準治療が終了あるいは見込み予定の患者および標準治療のない希少がんについて検査が行われているが、これらの遺伝子に変異があれば放射線治療が有効である可能性が高いといえる。

の結果として、まずクラスタリングの結果を図1(a)に示す。コントロールと1時間後の発現量の比にlog2をとったもの、同様に5時間後とコントロール、12時間後とコントロール、5時間後と1時間後、2時間後と1時間後、12時間後と5時間後の発現量の比に用いて12のクラスター(C1-C12)に分けた。図1(b)に各クラスターの遺伝子発現量(TPM)の変動をバイオリンプロットで示す。またそれぞれのクラスターについてBiological process(2018)を用いたエンリッチメント解析を行った。この中でq-value<0.05においてエンリッチメントされたクラスターはC2,C4,C5,C6,C8,C12であり、この中で最もエンリッチメントされた(-log10(q-value)が大きい)結果が得られたのはC4であった。このクラスターの特徴は、発現変動遺伝子は4つのタイムポイントでTPM値が連続的に減少した。例としてC4のエンリッチメント解析の結果を図1(c)に示す。

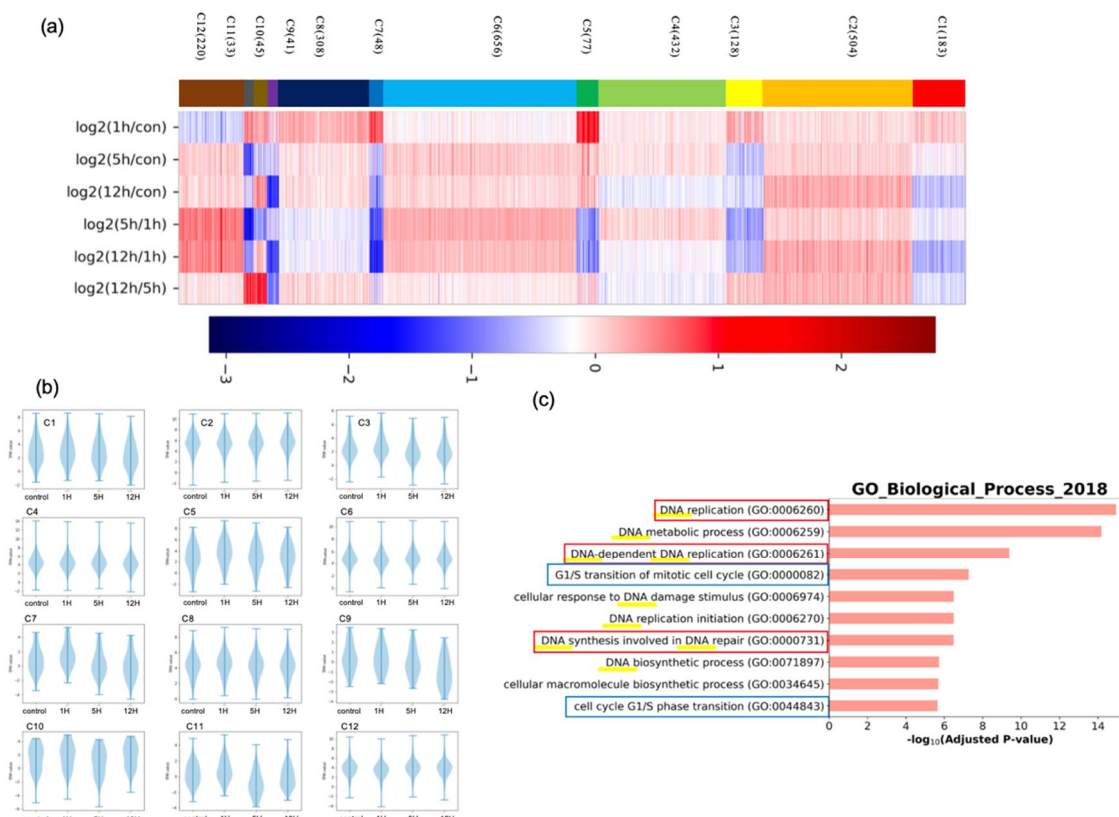


図1 クラスタ解析の結果(a)。C1はクラスター番号のことで括弧の数字はそのクラスターに属する遺伝子数である。(b)は各クラスターの発現量(TPM)の変化 (c)はクラスター4の遺伝子についてのエンリッチメント解析の結果である。

クラスター4(C4)のエンリッチメント解析の結果より、C4はDNAの複製に関する遺伝子であることがわかった。放射線の照射によりDNAの修復等が行われているのではないかと考えられ、その活動はどんどん落ち着いていることが分かる。ストレス応答の解析では、転写レベルでの変化を調べるために、時系列シーケンシング法が多くの研究で用いられている。本研究ではガンマ線照射によるストレス応答過程での遺伝子発現変化は連続的であるため、様々なタイムポイントでの発現量変化を比較することで、ダイナミックな情報を得ることができた。マイクロアレイを

用いた放射線照射後の発現変動のデータはいくつか発表されているが、RNA-seqでタイムポイントが3のデータは本研究だけである。本研究では、各クラスター（経時的発現変動パターン）の生物学的プロセスについて洗い出すことができ、放射線照射によるDNA損傷が起きていることから細胞周期を制御したり、細胞増殖の活性化（増殖死）が生じたりと、様々な遺伝子が発現し、放射線照射によるストレス応答として矛盾がない結果が得られた。今後の課題として、ネットワーク解析やクラスター間でのつながりを明らかにすることで、遺伝子発現の時間発展を明確化することが挙げられる。

の結果として、放射線抵抗性のあるHepG2やKMRC2は、放射線感受性が高いHEC251やKMRC2よりDNA修復が高いという仮説を検証してみたが、図2に示すように2重鎖切断を修復する機構（NHEJやHR）に関わる主な遺伝子について、コントロールと比較したところほとんど変化はないことが分かる。

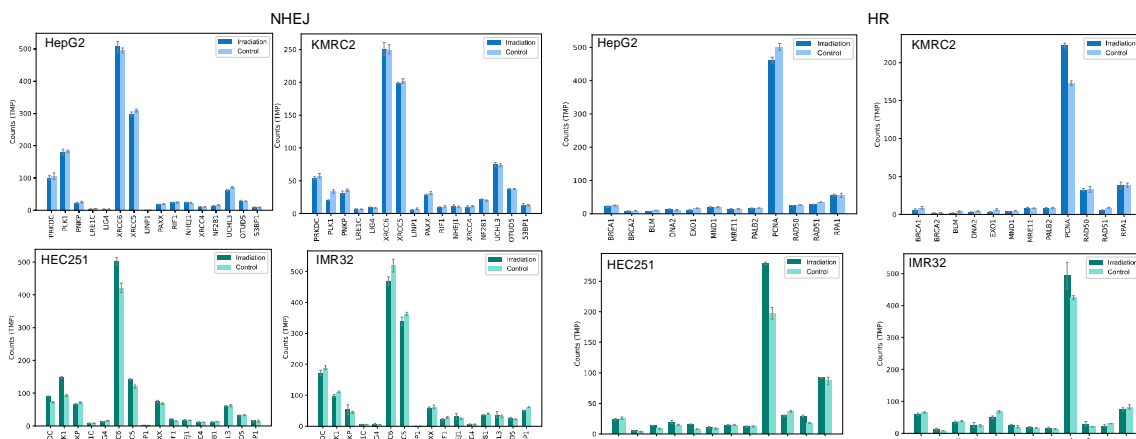


図2 放射線感受性が高い細胞株（HEC251、IMR32）と放射線抵抗性をもつ細胞株（HepG2、KMRC2）におけるDNA修復機構に関わる遺伝子のガンマ線照射前後の発現変動

今回はDNA修復について調べたがチェックポイントに関する遺伝子等も調べる予定である。またDESeq2で変動遺伝子を特定した結果、HepG2、KMRC2、HEC251、IMR32の変動遺伝子数はそれぞれ1594、448、6012、1652あった。しかし増加したものの減少したもののそれぞれエンリッチメント解析を行ったが放射線抵抗性がある細胞株に特徴的なBiological processは見つからなかった。さらに各細胞株のMAプロットを図3に示す。変動遺伝子の変動量(log2 fold change)とその標準偏差は、HepG2、KMRC2、HEC251、IMR32において、 -0.02 ± 0.31 、 -0.02 ± 0.24 、 -0.05 ± 0.46 、 -0.04 ± 0.41 であった。放射線抵抗性がある細胞株の方が、DNA修復等で活発に活動している様子が、遺伝子発現変動として観測されると予想していたが、そうではなく放射線抵抗性がある細胞株の方が全体的に遺伝子の発現変動が小さいことが分かる(図3)。つまり照射前後での遺伝子発現においては、照射による反応は、放射線抵抗性がある細胞株の方が少ないことが示された。

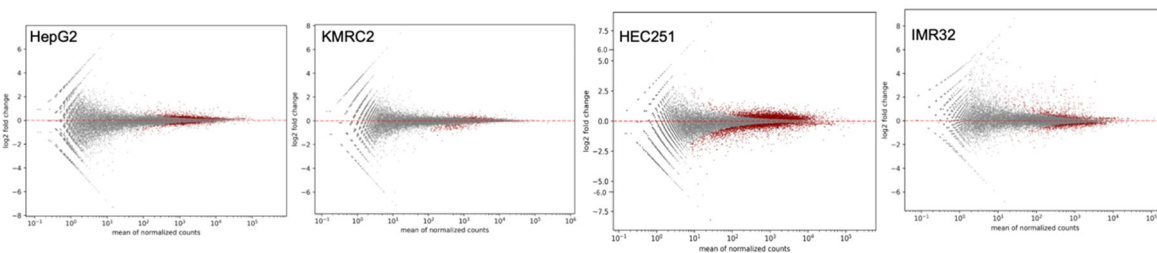


図3 各細胞株のガンマ線照射後、5時間後の遺伝子発現量のMAプロット。比較のため縦軸のスケールを合わせている。

以上により、本研究では放射線感受性と遺伝子情報および照射後の遺伝子発現との関係の一部が明らかとなったが、現象として得られただけで、なぜこのような結果になったかは、今後の課題として残った。残念ながら本研究期間内では、これらの理由を特定することができなかったが、今後の解析により理由を明らかにし、生物効果モデルに組み込むことへの可能性を検討する予定である。また4種類の細胞株しか調べることができなかったため、より多くの細胞株について同様なデータを取得することも重要だと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satsuki MYOGA Yoshiyuki HIRANO
2. 発表標題 Analysis of temporal variations of gene expression after gamma-ray irradiation in HeLa cells by RNA-seq
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seiya KATO Yoshiyuki Hirano
2. 発表標題 Analysis of gene expression changes in human tumor cells after gamma irradiation using RNA-seq
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiyuki Hirano
2. 発表標題 Gene expression analysis of radioresistance in human cell lines
3. 学会等名 第125回日本医学物理学学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshiyuki Hirano
2. 発表標題 Prediction of Radio-Sensitivity from Genetic Variant Data
3. 学会等名 第127回日本医学物理学学会学術大会
4. 発表年 2024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	松井 佑介 (Matsui Yusuke) (90761495)	名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授 (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
---------	---------