

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24406031

研究課題名(和文)チェルノブイリ小児甲状腺癌のパラフィン組織バンク設立と新規癌遺伝子解析

研究課題名(英文) Establishment of Chernobyl paraffin-embedded tissue Bank and discovering of new oncogene

研究代表者

ログノビッチ タチアナ (ROGOUNOVITCH, Tatiana)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：30423643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、チェルノブイリ原発汚染地域であるベラルーシやウクライナの非常に悪性の高い小児甲状腺癌患者(若年齢で被ばくし、1990年から1998年10月の間に手術施行した症例)からパラフィン包埋組織、(入手可能な場合)凍結組織、血液サンプルを収集し、分子疫学研究を展開してきた。RNA-次世代シーケンシング技術を用いて、これらのサンプルにおける遺伝子異常の有無を検索したところ、ベラルーシからの一症例で新しいタイプのRET遺伝子再配列異常(TBL1XR1/RETと命名)を見出した。さらに、我々のヒト培養甲状腺細胞を用いた実験においても、放射線照射によって同じRET遺伝子再配列異常が誘導された。

研究成果の概要(英文)：During this study we collected from affected after Chernobyl fallout territories of Belarus and Ukraine paraffin-embedded tissues, frozen samples (if available) and blood samples from the most aggressive (young age of exposure and short-latent period) pediatric PTCs (operated from 1990 and until October 1998), which are not included in the Chernobyl Tissue Bank and established the Paraffin Tissue Bank. For all collected PTC samples we made data base of patients includes demographic, clinical and morphological information.

Using RNA-NGS technique we discovered a new RET rearrangement (TBL1XR1/RET) in pediatric PTC from Belarus. In vitro irradiation of human thyroid cells was able to induce TBL1XR1/RET rearrangement. The occurrence of TBL1XR1/RET rearrangement in PTC of sporadic and radiation-related etiology suggests that it may likely be induced by different genotoxic insults, one of which could be ionizing radiation.

研究分野：内分泌学, 甲状腺学, 分子生物学

キーワード：小児甲状腺乳頭癌 パラフィン組織バンク 次世代シーケンシング TBL1XR1/RET

1. 研究開始当初の背景

放射線は発癌物質で、DNA と相互作用し種々の遺伝子異常を誘導する。現在の放射線人体影響は大部分が広島・長崎での原爆による全身被爆からのデータに依存しており、これらのデータでは放射線によるがん発生の増加が確認されている。

対照的に、チェルノブイリ原発事故では、数百万人が放射性物質に暴露されたが、甲状腺がんの発生のみの増加が確認されている。

チェルノブイリでの甲状腺がんの増加は、大量の放射性ヨウ素によるもので、最初小児に認められ、被爆時の若年齢と甲状腺乳頭癌発生の危険性の中に強い相関が観察された。甲状腺乳頭癌の垂類型と分子学的特徴は潜伏期により異なり、最も初期に発生した甲状腺乳頭癌（小児例）は、組織型は *solid-type* で *RET/PTC3* 異常遺伝子再配列を有し、遅れて発生した甲状腺乳頭癌（青年期例）は *classical-type* で *RET/PTC1* 異常遺伝子再配列を有し、最近の発生例（成人例）は *classical-type* で *BRAFV600E* 遺伝子異常を有していることが分かっている (*Williams D., Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2008; 22 (6): 1061-1073; Demidchik Y., Arq Bras Endocrinol Metabol 2007; 51(5): 748-762*)。

1998年10月に始まったチェルノブイリ組織バンクプロジェクトは、ロシア（ブリヤンスク、カルーガ、トゥーラ、オーレル）とウクライナ（キエフ、チェルカースィ、チェルニーヒウ、ロブノ、ジトミル、スミ）の放射線汚染地域の19歳以下（1967年4月26日以降誕生）で1998年10月1日以降に手術を受けた症例からの甲状腺がんと甲状腺腫を収集している。ウクライナは設立当初このプロジェクトに参加していたが、現在は参加活動を停止している。

チェルノブイリ組織バンクは、種々の異なる材料（例えば、腫瘍原発巣・転移及び正常組織凍結標本、抽出した核酸、パラフィンブ

ロック、血液サンプル）を症例から収集している。

放射線誘発性と自然発生の甲状腺癌では遺伝子変異はほぼ重複しており、放射線誘発甲状腺がんの特有ながん遺伝子・癌抑制遺伝子の異常は見出されていない。

本研究では、放射線による新規遺伝子異常誘発の存在の可能性を探るため、チェルノブイリ事故後発生した小児甲状腺がん、ベラルーシとウクライナで1998年10月以前に手術をし、最も悪性度が高く潜伏期が短い症例から、パラフィンブロックとリンパ球を収集して（このようなサンプルはチェルノブイリ組織バンクには含まれていない）、バンクを作り、新規遺伝子異常検索研究に供した。

2. 研究の目的

チェルノブイリでの小児甲状腺がんの組織及びデータバンクを作ることを目的とした。ベラルーシ及びウクライナの高悪性度で、短潜伏期、1990-1998年に手術を受け、高い寄与率を有し放射線誘発であることが確実な症例のパラフィン包埋組織、血液サンプル、症例情報を収集した。さらに収集したサンプルで放射線誘発甲状腺がんに関わる新規がん遺伝子同定を次世代シーケンサを用いて形跡した。

3. 研究の方法

- 1) ベラルーシ及びウクライナのチェルノブイリ原発事故後放射線汚染地域に住み、1990-1998年の間に手術を受けた小児甲状腺癌症例を収集した。症例のデータは両国のがん登録システムから入手した。
- 2) パラフィン包埋組織と、可能であれば新鮮凍結組織を収集した。病理診断は、4人の経験を積んだ病理医により確認された。
- 3) 症例は両国の内分泌医による診察を受け、血中遊離T4とTSH濃度を測定された。

4) 血液採集とリンパ球分離は両国の医師によってなされた。

5) なお、全ての情報は、英語とロシア語でアクセス可能である。

日本で施行した研究内容

6) パラフィン包埋組織とリンパ球からゲノム DNA を、凍結組織の正常部分とがん部分から RNA とゲノム DNA を抽出した。

7) 抽出した核酸は、その質によって、HiSeq シークエンサを用いたエクソーム或いは RNA 次世代シークエンサに供された (TAKARA Bio Company)。

8) 発見した新規遺伝子異常は、キャピラリーシークエンサ法により確認された。

9) 新規遺伝子異常の頻度を両国の全ての症例で検討した。

4. 研究成果

1) 3 年間、毎年長崎大学の 2 名の専門家が、ベラルーシとウクライナを訪問し、サンプルの収集に当たった。

2) ウクライナでは、92 サンプルを収集した。病理診断は 2 名のウクライナ病理医、2 名の日本病理医によって確認された。それぞれのパラフィン包埋組織を 5 つに分け、正常部とがん部からゲノム DNA を抽出した。92 例のうち、32 例のみが診察を受け、血液を提供した。32 例中 12 例で血中 TSH が 8~110 mIU/L の範囲で上昇し、甲状腺機能低下を指摘された。適量の甲状腺ホルモン剤投与がなされていないと判断され、適量に調整された。全てのサンプルについて、データベースを作製した。

ベラルーシでは、21 サンプルを収集した。1994/1995/1997 年に手術が施行された症例である。そのうち 14 例から凍結組織を得ることができた。病理診断は 2 名のベラルーシ病理医、2 名の日本病理医によって確認された。ウクライナの場合

と同方法で正常部とがん部からゲノム DNA を抽出した。21 例中 14 例が診察を受け、血液を提供した。全ての症例で血中 TSH は正常範囲であった (すなわち適量の甲状腺ホルモン剤が投与されていた)。全てのサンプルについて、データベースを作製した。

3) 血液とパラフィン包埋組織からゲノム DNA を、凍結組織から DAN と RNA を抽出した。まず、既知の遺伝子異常 (*BRAF*, *H-*, *K-*, *N-RAS*) と異常再配列 (*RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *AKAP9/BRAF* and *ETV6/NTRK3*) について解析して、これらの既知の遺伝子異常のないサンプルを次の実験に用いた。

4) 7 対の正常部とがん部において、HiSeq 次世代シークエンサを用いて、エクソーム解析を行った。2 例で既知の遺伝子異常再配列 (*RET/PTC3* and *RET/PTC1*) が同定されたが、あとの 5 例では、既知の遺伝子異常は見い出されなかった。さらに 4 症例で、RNA を用いて、融合遺伝子同定のため HiSeq 次世代シークエンサを用いて全ゲノムシークエンサを施行した。これらの 4 例は、既知の遺伝子異常を有せず、病理型は同じ病期 (T1N1bM0) の solid, 或いは solid-trabecular、solid-follicular であった。

5) 全てのデータを生物統計学的に解析した。

6) 第 3 染色体 q26.32 と第 10 染色体 q11.21 間での新規染色体転座を同定した。5' 側の遺伝子は *TBL1XR1* 遺伝子の最初の 9 個のエクソンからなり (LisH 領域を含む)、3' 側の遺伝子は *RET* 遺伝子のクロシンキナーゼ領域であった。*RET* 遺伝子上での切断部位は、既知の異常再配列である *RET/PTC1* や *RET/PTC3* と同様にエクソン 12 内であった。

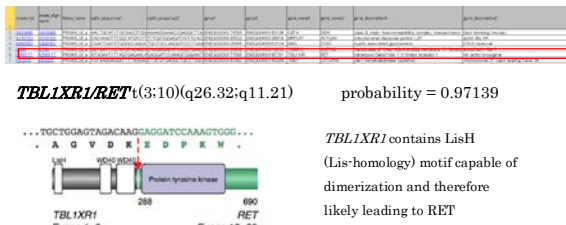


図1. RNA次世代シーケンスの結果

7) この新規遺伝子異常は、キャピラリーシーケンス、RT-PCR、サザンブロットで確認された。

CACTTCTAGCAACTGGTTCCTATGATGGGTTTGCCAGAATATGGACTAAAGATGGTAACCTTGTAGCACCTTAGGCAGCATAAAGGCCCTATATTGCATTAAAATGGAATAAGAAAGGAAATTCATCCTAAGTCTGGAGTAGACAAGGAGGATCCAAAGTGGGAATTCCTCGGAAGAAGCTTGGGA

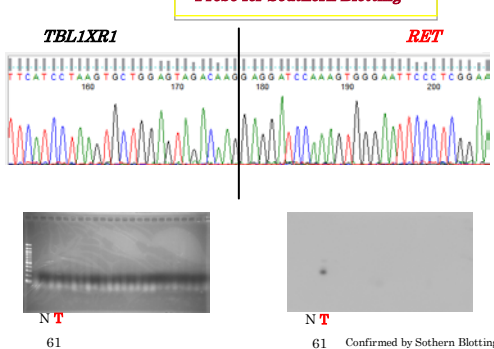


図2. キャピラリーシーケンスとRT-PCR-サザンブロットの結果

8) 同様の遺伝子異常が、34例中1例(2.9%)の散発性小児甲状腺癌でも同定された。

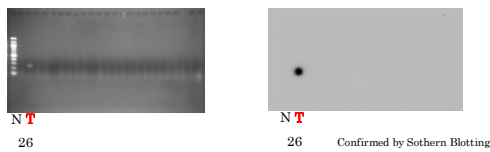


図3. RT-PCR-サザンブロットにより確認された他のPTC症例でのTBL1XR1/RET異常の頻度

9) さらに、in vitroの実験で、ヒト正常甲状腺細胞株であるNthy-ori 3-1細胞への1 Gyの放射線照射により、同じ遺伝子異常が誘導されることも確認した。以上より、この新規遺伝子異常は、放射線を含むゲノム損傷因子原因で誘導されることが示

唆された。

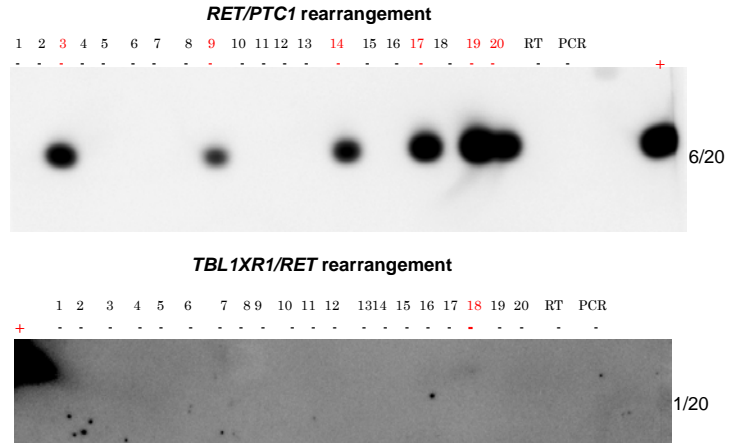


図4. Nthy-Ori-3-1細胞でのγ線照射(1Gy)後に誘導されたRET/PTC1とTBL1XR1/RET再配列

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Rogounovitch TI, Bychkov A, Takahashi M, Mitsutake N, Nakashima M, Nikitski AV, Hayashi T, Hirokawa M, Ishigaki K, Shigematsu K, Bogdanova T, Matusse M, Nakahara E, Minami S, Yamanouchi K, Ito M, Kawaguchi T, Kondo H, Takamura N, Ito Y, Miyauchi A, Matsuda F, Yamashita S, Saenko VA: The common genetic variant rs944289 on chromosome 14q13.3 associates with risk of both malignant and benign thyroid tumors in the Japanese population. *Thyroid* 25(3): 333-340, 2015, 査読有, DOI: 10.1089/thy.2014.0431

② Leonova TA, Drozd VM, Saenko VA, Mine M, Biko J, Rogounovitch TI, Takamura N, Reiners C, Yamashita S. Bone mineral density in treated at a young age for differentiated thyroid cancer after Chernobyl female patients on TSH-suppressive therapy receiving or not Calcium-D3 supplementation. *Endocr J* 62(2): 173-182, 2015, 査読有, DOI: 10.1507/endocr.j.EJ14-0408.

③ Ito M, Bogdanova T, Saenko V, Rogounovitch T, Mitsutake N, Kondo H, Maeda S, Nakashima M, Yamashita S. Morphological difference in adult thyroid papillary carcinoma between Japan and Ukraine. *Endocr J*.61(12): 1221-1228, 2014, 査

読有, DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0239.

④Mussazhanova Z, Miura S, Stanojevic B, Rogounovitch T, Shiraishi T, Kurashige T, Shichijo K, Kaneko K, Takahashi H, Ito M, Nakashima M. Radiation-associated small cell neuroendocrine carcinoma of the thyroid: a case report with molecular analyses. *Thyroid*. 24(3): 593-598,2014, 査読有, DOI: 10.1089/thy.2013.0214.

⑤Mussazhanova Z, Matsuda K, Naruke Y, Mitsutake N, Stanojevic B, Rogounovitch T, Saenko V, Suzuki K, Nishihara E, Hirokawa M, Ito M, Nakashima M. Significance of p53-binding protein 1 (53BP1) expression in thyroid papillary microcarcinoma: association with BRAFV600E mutation status. *Histopathology*. 63(5): 726-34, 2013, 査読有, DOI: 10.1111/his.12233.

⑥Bychkov A, Saenko V, Nakashima M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Nikitski A, Orim F, Yamashita S: Patterns of FOXE1 expression in papillary thyroid carcinoma by immunohistochemistry. *Thyroid* 23(7) 817-828, 2013, 査読有, DOI: 10.1089/thy.2012.0466

[学会発表] (計 19 件)

① T.Rogounovitch, V.Saenko, S.Mankouskaya, M.Fridman, Yu.Demidchik, S.Yamashita: Novel RET/PTC rearrangement identified by RNA-NGS in a sporadic pediatric PTC from Belarus.第 57 回日本甲状腺学会学術総会,2014 年 11 月 14 日,ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター (大阪府・大阪市)

② A. Nikitski, N.Mitsutake, V.Saenko, T.Rogounovitch, S.Yamashita: Effect of target overexpression of Foxe1 in a mouse thyroid. 第 57 回日本甲状腺学会学術総会,2014 年 11 月 14 日,ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター (大阪府・大阪市)

③ V.Saenko, T.Rogounovitch, A.Bychkov, N.Mitsutake, M.Matsuse, E.Nishihara, M.Hirokawa, A.Nikitski, S.Minami, K.Yamanouchi, K.Yoshiura, A.Miyauchi, S.Yamashita : Association of polymorphism in the *FOXE1* gene locus with papillary thyroid carcinoma in Japanese patients. 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 2014 年 4 月 25 日, 福岡国際会議場・福岡サンパレス (福岡県・福岡市)

④ ログノビッチ タチアナ, サエンコ ウラジミール, ピチコブ アンドレイ, ニキツキー アリャクサンドル, 高橋めい子, 中島正

洋, 林徳眞吉, 廣川満良, 宮内昭, 石垣克, 重松和人, 松瀬美智子, 光武範吏, 西原永潤, 南恵樹, 山内孝彰, 伊東正博, 吉浦孝一郎, 松田文彦, 山下俊一 : Rare T allele of rs944289 associates not only with risk of malignant but also of benign thyroid tumors. 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 2014 年 4 月 26 日, 福岡国際会議場・福岡サンパレス (福岡県・福岡市)

⑤ サエンコ ウラジミール, 高橋めい子, ログノビッチ タチアナ, ドロズド ワレンチナ, ピチコブ アンドレイ, 川口喬久, 光武範吏, 廣川満良, 西原永潤, 宮内昭, 吉浦孝一郎, 松田文彦, 山下俊一 : Association of three polymorphisms of the *FOXE1* gene with papillary thyroid carcinoma in Belarussian and Japanese populations. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会, 2013 年 11 月 14-16 日, 和歌山県民文化会館 (和歌山県・和歌山市)

⑥ ログノビッチ タチアナ, サエンコ ウラジミール, ピチコブ アンドレイ, ニキツキー アリャクサンドル, 高橋めい子, 中島正洋, 林徳眞吉, 廣川満良, 宮内昭, 石垣克, 重松和人, 光武範吏, 伊東正博, 松田文彦, 山下俊一 : Genetic polymorphism on chromosome 14q13.3 associates with risk for thyroid follicular adenoma in Japanese patients. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会, 2013 年 11 月 14-16 日, 和歌山県民文化会館 (和歌山県・和歌山市)

⑦ ニキツキー アリャクサンドル, サエンコ ウラジミール, ピチコブ アンドレイ, ログノビッチ タチアナ, 光武範吏, 山下俊一 : Transcriptional activities of *FOXE1* polyalanine tract variants. 第 56 回日本甲状腺学会学術集会, 2013 年 11 月 14-16 日, 和歌山県民文化会館 (和歌山県・和歌山市)

⑧ TI Rogounovitch, VA Saenko, A Bychkov, AV Nikitski, M Takahashi, M Nakashima, T Hayashi, M Hirokawa, A Miyauchi, K Shigematsu, N Mitsutake, F Matsuda, S Yamashita: Rare allele of rs944289 (NKX2-1(TTF1)) associated with increasing risk of both malignant (PTC) and benign (FA) tumors in Japanese population. European Thyroid Association 37th Annual Meeting, 2013 年 9 月 7 日-11 日, Leiden, The Netherlands

⑨ V. Saenko, M.Takahashi, T. Rogounovitch, V.Drozd, Yu.Demidchik, T.Bogdanova, M.Tronko, N.Mitsutake, N.Takamura, F.Matsuda, S.Yamashita: Molecular epidemiology study of Chernobyl thyroid cancer from Belarus and Ukraine. European Thyroid Association 37th Annual Meeting, 2013 年 9 月 7 日-11 日, Leiden, The Netherlands

⑩ V. Drozd, Yu. Demidchik, L. Danilova, A. Kudelsky, I. Branovan, V. Saenko, T. Rogounovitch, S. Yamashita, Jo. Biko, C.

Reiners: May high nitrate levels in drinking water increase the prevalence of radiation-related thyroid cancer in Belarus? 2nd World Congress on Thyroid Cancer, July 10-14, 2013,

Sheraton Centre Toronto, 123 Queen Street, West Toronto, Canada

⑪ TI Rogounovitch, VA Saenko, N

Mitsutake, A Bychkov, Yu Nagayama, S Yamashita: Identification of genes cooperating with mutant BRAF in thyroid carcinogenesis. 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 2013 年 4 月 25 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

⑫ V.Saenko, M.Takahashi, T.Rogounovitch, V.Drozd, Yu.Demidchik, T.Bogdanova, M.Tronko, N.Mitsutake, N.Takamura, F.Matsuda, S.Yamashita

Association of the NRG1 gene with risk for developing thyroid cancer after Chernobyl.

第 86 回日本内分泌学会学術総会, 2013 年 4 月 25 日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

⑬ ログノビッチ タチアナ: Identification of genes cooperating with BRAF in thyroid carcinogenesis. 第 55 回日本甲状腺学会, 2012 年 11 月 29 日~12 月 1 日, アクロス福岡 (福岡県・福岡市)

⑭ サエンコ ウラジミール, 高橋めい子, ログノビッチ タチアナ, ドロズド ワレンティナ, デミチク ユーリ, ボグダノワ タチアナ, トロンコ ミコラ, 光武範吏, 高村 昇, 松田文彦, 山下俊一: Molecular epidemiology study of Chernobyl thyroid cancer in an extended sample set from Belarus and Ukraine. 第 55 回日本甲状腺学会, 2012 年 11 月 29 日~12 月 1 日, アクロス福岡 (福岡県・福岡市)

⑮ ビチコブ アンドレイ, サエンコ ウラジミール, ログノビッチ タチアナ, 光武範吏, 中島正洋, 山下俊一: Relationship of immunohistochemical FOXE1 expression to clinical features and genetics in PTC. 第 55 回日本甲状腺学会, 2012 年 11 月 29 日~12 月 1 日, アクロス福岡 (福岡県・福岡市)

⑯ T. Rogounovitch: Identification of Genes Cooperating with Mutant BRAF in Thyroid Carcinogenesis. 10th Asia and Oceania Thyroid Association Congress, 2012 年 10 月 22 日, Bali (Indonesia)

⑰ A. Bychkov: Clinical and Genetic Correlations of Immunohistochemical Foxe1 Expression in PTC in Japanese Patients. 10th Asia and Oceania Thyroid Association Congress, 2012 年 10 月 22 日, Bali (Indonesia)

⑱ A. Bychkov, V. Saenko, T. Rogounovitch, N. Mitsutake, M. Nakashima, S. Yamashita: Differential expression of FOXE1 at tumor/host interface in papillary thyroid carcinoma. 第 16 回日本内分泌病理

学会学術集会, 2012 年 10 月 11 日-13 日, 東北大学 良陵会館 (宮城県・仙台市)

⑲ A. Bychkov: Patterns of FOXE1 expression in papillary thyroid carcinoma by immunohistochemistry. 第 53 回原子爆弾後障害研究会, 2012 年 6 月 3 日, 長崎原爆資料館 (長崎県・長崎市)

[その他]

ホームページ等

<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/drms/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

ログノビッチ タチアナ

(ROGOUNOVITCH, Tatiana)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号: 30423643

(2)研究分担者

中島 正洋 (NAKASHIMA, Masahiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号: 50284683

サエンコ ウラジミール (SAENKO, Vladimir)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号: 30343346

柴田 義貞 (SHIBATA, Yoshisada)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

客員研究員

研究者番号: 40010954