

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430131

研究課題名(和文)放射線甲状腺がんにおけるEML4-ALK融合遺伝子の生物学的役割に関する研究

研究課題名(英文)A study on biological significance of EML4-ALK fusion gene in radiation thyroid cancer

研究代表者

濱谷 清裕 (HAMATANI, Kiyohiro)

公益財団法人放射線影響研究所・分子生物科学部・顧問

研究者番号：80344414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：放射線甲状腺がんにおけるEML4-ALK融合遺伝子の役割を検証するために、不死化ヒト甲状腺上皮細胞の生体外X線照射実験とこの融合遺伝子を持つコンディショナルトランスジェニックマウスを用いた発がん実験を行った。X線照射では、線量に比例してEML4-ALK融合が形成されることより、原爆被爆者甲状腺乳頭がんでのEML4-ALK融合遺伝子は放射線により生じたものと示唆される。

他方、得られたトランスジェニックマウスのEML4-ALK融合遺伝子発現レベルは高くなく、そのようなマウスでは甲状腺がんは形成されなかった。甲状腺がんには、少なくともこの融合遺伝子の高レベル発現が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of EML4-ALK fusion gene in radiation thyroid carcinogenesis, we conducted in vitro X-ray irradiation experiments using immortalized human thyroid epithelial cells and carcinogenesis experiments using conditional transgenic mice with this fusion gene. X-ray irradiation of thyroid cells resulted in increased EML4-ALK fusion events with increased dose, suggesting that EML4-ALK fusion gene found in papillary thyroid cancers among atomic bomb survivors resulted from atomic bomb radiation.

On the other hand, the expression levels of the EML4-ALK fusion gene in the obtained transgenic mouse were not high, and then thyroid cancer was not formed in such transgenic mice. At least, development of thyroid cancers is supposed to require high level expression of this fusion gene.

研究分野：放射線発がん

キーワード：EML4-ALK融合遺伝子 甲状腺乳頭がん コンディショナルトランスジェニックマウス 放射線 組織学的特徴

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人の放射線非被曝成人患者の甲状腺乳頭がんでは MAP キナーゼシグナル経路の活性化を誘起する *BRAF* 突然変異がその多くにみられる。一方、原爆被曝者の甲状腺乳頭がんでは、被曝線量が 500 mGy 以上の症例において、再配列型 *RET* 遺伝子 (主に *RET/PTC1*) を持つ症例の相対頻度が約 50% と高く、一方 *BRAF* 突然変異を持つ症例の相対頻度は 10% 程度まで減少することが見出された (Hamatani K *et al*, *Cancer Res*, 2008)。

(2) 我々はこれまで既知の甲状腺乳頭がん関連遺伝子変異が明らかにされていなかった被曝甲状腺乳頭がん症例において、甲状腺がんでは初めて *EML4-ALK* 融合遺伝子の発現を見出した (Hamatani K *et al*, *Thyroid*, 2012)。一方 *RET*、*BRAF*、*NTRK1* および *RAS* いずれかの遺伝子に変異を持つ症例では、この融合遺伝子の発現が見られないことより、*EML4-ALK* 融合遺伝子は基本的にはこれらの遺伝子変異とは排他的に生じると考えられる。

(3) *EML4-ALK* 融合遺伝子は 5 mGy 以上の原爆放射線被曝甲状腺乳頭がん症例の約 16% に検出されたが、5 mGy 未満の症例ではこれまで見つかっておらず、*EML4-LAK* 融合遺伝子は再配列型 *RET* 遺伝子同様、放射線関連甲状腺乳頭がんの発生に重要な役割を果たすと思われる。

(4) *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性の甲状腺乳頭がんの多くは、悪性度を示す指標である充実/索状構造を部分的に有することが観察された。一方、*ALK* 遺伝子のチロシンキナーゼ領域に点突然変異をもつ甲状腺未分化がんが報告された (Murugan AK *et al*, *Cancer Res*, 2011)。このことは *ALK* 遺伝子活性化が甲状腺がんの増悪に関わる可能性を示唆するが、現在のところその真偽は不明である。

(5) *EML4-ALK* 融合遺伝子が初めて見出された肺がんでも、この融合遺伝子を有する肺がん症例では有さない症例に比べ組織学的特徴が顕著に異なることが示された (Inamura K *et al*, *Modern Pathol*, 2009. Yoshida A *et al*, *Am J Surg Pathol*, 2011)。この肺がんでの知見と *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性の甲状腺乳頭がんの組織学的知見を併せ考えると、*EML4-ALK* 融合遺伝子を有する甲状腺乳頭がんでは充実/索状構造に関連する遺伝子変異あるいは遺伝子発現が起こり易いことが推測される。

(6) チェルノブイリ事故後の小児あるいは青年期の甲状腺がんでは、潜伏期間が短くかつ充実型型の甲状腺乳頭がんは *RET/PTC3* が高頻度で見られるが、チェルノブイリ事故後の甲状腺乳頭がんでは、*EML4-ALK* 融合遺伝子の報告は現在のところ見られない。

2. 研究の目的

我々は、原爆被曝者の甲状腺乳頭がん症例に見出された *EML4-ALK* 融合遺伝子は放射線の

結果であり、甲状腺乳頭がんを引き起こす上で重要な役割を果たすと仮定した。

(1) 仮説の前半部を検証するために、不死化ヒト甲状腺上皮細胞を *in vitro* X 線照射することにより、線量依存的に *EML4-ALK* 融合遺伝子が誘発されるかを明らかにする。

(2) 仮説の後半部を検証するために、*EML4-ALK* 融合遺伝子のコンディショナルトランスジェニックマウスから甲状腺乳頭がんが生成することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* X 線照射実験

不死化ヒト甲状腺細胞 (Nthy-ori 3) を 0、0.1、0.2、1、2 および 5 Gy で *in vitro* X 線単一照射した後、ウェル当たり 1.8×10^4 の細胞密度で 6 ウェルプレートに細胞を分け、8-12 日間培養した。各ウェルから抽出した全 RNA を用いて、遺伝子特異的プライマーで 20 μ l の反応液で cDNA を合成し、50 μ l 反応溶液にて PCR 増幅を行った。

(2) *EML4-ALK* 融合遺伝子のコンディショナルトランスジェニックマウスを用いた発がん実験

EML4-ALK 融合遺伝子のコンストラクトの作製：リバーステトラサイクリンアクティベーターを含むプラスミド DNA の CMV プロモーターをウシサイログロブリンプロモーターに置き換えた。テトラサイクリン応答因子をもつプラスミドに *EML4-ALK* 融合遺伝子の cDNA を挿入した。この 2 種類のプラスミド DNA を結合して、単一のプラスミド DNA (コンストラクト) を作製した。

コンディショナルトランスジェニックマウスの作製：直鎖状の改変プラスミド DNA を C57BL/6 マウスの受精卵にマイクロインジェクションし、これらの受精卵を疑妊娠させたメスマウスの卵管に移植することにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの作製は民間のコーテック社に委託した。

ドキシサイクリン処理による発がん実験：2 mg/ml のドキシサイクリンを含む水溶液を飲み水として一定期間投与した後、甲状腺葉を抽出し甲状腺がんの有無を調べた。

4. 研究成果

(1) *In vitro* X 線照射

EML4-ALK 融合遺伝子の cDNA を挿入した Nthy-ori3 細胞と未処理の Nthy-ori3 細胞を用いて、X 線照射により誘発される *EML4-ALK* 融合を検出するために、特異性と感度の高い RT-PCR 法を確立した。この方法を用いることにより、Nthy-ori3 細胞由来の 10 μ g の RNA に *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性細胞の RNA 10pg を混合した RNA 溶液においても *EML4-ALK* 融合遺伝子の発現を検出することが可能であった。各線量について、 $1 \sim 4 \times 10^6$ 個の照射細胞について解析を行った。 10^6 個の照射細胞当たり誘発される *EML4-ALK* 融合の割合を図

1に示す。X線照射線量の増加に伴い、誘発される *EML4-ALK* 融合が増加するのが観察された。このことより、原爆被爆者甲状腺乳頭がんにおいて発見された *EML4-ALK* 融合遺伝子は原爆放射線により生じたものと示唆される。

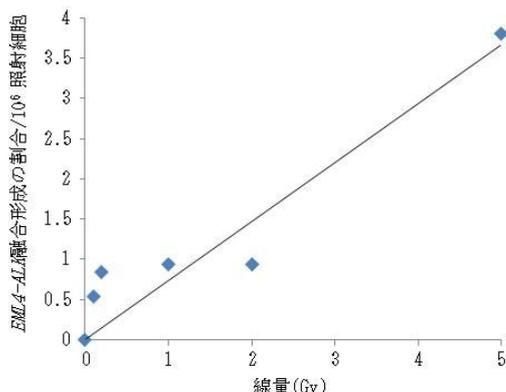


図1. X照射されたNthy-ori3細胞に形成される *EML4-ALK* 融合の割合

(2) トランスジェニックマウスを用いた発がん実験

トランスジェニックマウス作製のためのコンストラクトの組織特異性の検討: コンストラクト DNA をマウス初代培養甲状腺細胞およびマウス線維芽細胞に導入し、これらの細胞にドキシサイクリンを投与した時、*EML4-ALK* 融合遺伝子の発現はマウス甲状腺細胞のみに観察された。このことより、ドキシサイクリン誘導システムが甲状腺細胞特異的に機能することが確認された。

コンディショナルトランスジェニックマウスのドキシサイクリン処理と甲状腺がん形成: *EML4-ALK* 融合遺伝子のトランスジェニックマウスが5系統得られた。それぞれの系統の F1 マウスを用いたドキシサイクリン処理(2週間)により、トランスジェニックマウス5系統中3系統のマウスに *EML4-ALK* 融合遺伝子の発現誘導が甲状腺組織にみられたが、そのレベルは高くなかった。3系統の中で最も発現のレベルが高かった系統の F1 マウスを3か月、4か月、5か月、6か月、7か月、9か月および10か月間、それぞれ3~8匹ずつドキシサイクリン処理を行ったが、いずれのマウスにも甲状腺がんは見られなかった。2 Gy の X 線照射後に4か月および7か月間、ドキシサイクリン処理したマウスにも甲状腺がん形成は見られなかった。これらの結果より、甲状腺発がんには、少なくともかなり高いレベルの *EML4-ALK* 融合遺伝子発現が必要であると考えられる。また、解析した甲状腺組織においては、リバーストランスアクティベーター遺伝子の発現も極めて低かったため、今後リバーストランスアクティベーターを高レベルで発現しているトランスジェニックマウスとの交配を行い、*EML4-ALK* 融合遺伝子を高レベルで発現する

トランスジェニックマウスを作製し、放射線甲状腺発がんにおける *EML4-ALK* 融合遺伝子の役割の解明を目指す。

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)

[学会発表](計 6件)

濱谷清裕、高橋恵子、多賀正尊、楠 洋一郎: In vitro 低線量 X 線照射によるヒト甲状腺細胞における *EML4-ALK* 融合の誘発 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日-10 月 8 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Hamatani K, Koyama K, Yano S, Taga M, Kusunoki Y: In vitro X-ray irradiation induces rearrangements not only of RET, but also of ALK in human thyroid epithelial cells. 15th International Thyroid Congress. 18 October-23 October 2015, Orland, USA

濱谷清裕、高橋恵子、多賀正尊、楠 洋一郎: in vitro X 線照射のヒト甲状腺細胞における *EML4-ALK4* 融合の発生率は線量依存的に増加する 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日-10 月 10 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Hamatani K, Koyama K, Yano S, Taga M, Kusunoki Y: Dose-dependent induction of *EML4-ALK* fusion gene in human thyroid cells irradiated with X-ray in vitro. 15th International Congress of Radiation Research. 25 May-29 May 2015, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

Hamatani K, Koyama K, Yano S, Taga M, Kusunoki Y: In vitro X-ray irradiation induces ALK gene rearrangement in human thyroid epithelial cells. The 84th Annual Meeting of the American Thyroid Association. 29 October-2 November 2014, Coronad, USA

濱谷清裕、多賀正尊、楠 洋一郎: in vitro X 線照射後の不死化ヒト甲状腺上皮細胞における *EML4-ALK* 融合遺伝子誘発 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日-9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱谷 清裕 (HAMATANI, Kiyohiro)
(公財)放射線影響研究所・分子生物科学部・顧問
研究者番号: 80344414

(2) 研究分担者

江口 英孝 (EGUCHI, Hidetaka)
順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00260232

伊藤 玲子 (ITO, Reiko)
(公財)放射線影響研究所・分子生物科学
部・副主任研究員
研究者番号：30283790

(3)連携研究者

本田 浩章 (HONDA, Hiroaki)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：40245064

(4)研究協力者

小山 和章 (KOYAMA, Kazuaki)