

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月28日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08714

研究課題名(和文)放射線誘発甲状腺発がんリスク亢進の刻印探索

研究課題名(英文)Identification for radiation signature of cancer risk in irradiated thyroid

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、放射線誘発甲状腺発がんラットモデルを用い、正常組織からがん発生までの遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、個別の放射線リスク評価のための腫瘍化特異的バイオマーカーを同定することを目的とした。遺伝子発現はmicroarray解析し、候補遺伝子の発現を定量PCRで確認、さらに盲検的検証実験を行った。結果として、被曝甲状腺では前がん状態から多数の分子の発現異常が観られた。特にCDKN1aは有意な候補分子で、11.7倍以上をcutoff値にすると、感度60%、特異度100%で被曝を適中することが判明した。候補分子の発現動態解析は、放射線影響を示す生物学的根拠となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

被曝者疫学研究では甲状腺がんを始めとする人体における発がん影響が明らかにされていて、福島原発事故後の被曝健康影響の議論がなされてきた。疫学的データでは集団を対象とした被曝影響のリスク比として表現され、個人への放射線影響の評価は曖昧となるため、生物学的エビデンスを基盤とする放射線影響リスク評価の方法論の確立が喫緊の課題となる。本研究では、遺伝子発現の網羅的解析により、被曝甲状腺では前がん状態から分子異常が亢進していて、発がんリスクを反映することを初めて実証した。ラットモデルではCDKN1aが発がんリスク予測のバイオマーカーとして有用で、本法はヒトでのリスク評価への応用に期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to comprehensively examine the expression profile of genes altering in thyroid after irradiation (IR) by rat model and to identify biomarker in irradiated (IR) thyroid to estimate the cancer risk of individuals exposed to IR. Expression profile of mRNA in thyroid after IR were assessed by microarray technique, expression level of candidate for biomarker was quantitatively confirmed by digital PCR, and their usefulness as a biomarker was finally validated by a blinded experiment. In results, it was indicated that expression level of several molecules was abnormally altered in IR thyroid at precancerous stage. In particular, the level of CDKN1a expression was significantly increased in IR thyroid, and adopting 11.7-fold increase as a cutoff value to distinguish IR from non-IR, the sensitivity and specificity values were 60% and 100%, respectively. Thus, analysis for expression of these candidates may provide a biological evidence for IR effect in respective thyroids.

研究分野：実験病理学

キーワード：放射線被ばく 発がん 甲状腺 分子病理学 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

被曝者疫学研究では甲状腺がんを始めとする人体における発がん影響が明らかにされていて、福島原発事故後の被曝健康影響の議論がなされてきた。疫学的データでは集団を対象とした被曝影響のリスク比として表現され、個人への放射線影響の評価は曖昧となるため、生物学的エビデンスを基盤とする放射線影響リスク評価の方法論の確立が喫緊の課題となる。甲状腺がんは原爆放射線被曝の晩発性障害のひとつとして良く知られている。我々はラット放射線誘発甲状腺がんをモデルに分子病理学的解析に取り組んでいて、発がん亢進メカニズムの一端を解明することで、放射線発がんのリスク管理や健康管理に寄与する必要不可欠な情報源を提供する。

2. 研究の目的

本研究では、放射線誘発甲状腺がんラットモデルにより、正常組織からがん発生までの遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、個別の放射線影響リスク評価のための、腫瘍化段階特異的バイオマーカーを同定することを目的とした。ラット放射線誘発甲状腺がんモデルを用いて、発がん前から浸潤がんに至る DNA 異常の蓄積と RNA 発現を網羅的に解析し、発がん亢進の放射線刻印 (radiation signature) を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ラット放射線誘発甲状腺がんモデルの作製: 7週齢若年成熟期ラットの前頸部にX線(対照、0.1、1、4Gy)局所照射後、6、12、16ヶ月に深麻酔下に犠牲死させ、経時的に甲状腺を摘出し、がん部と非がん部より病理組織標本の作製と核酸・蛋白抽出を行う。
- (2) 被曝後甲状腺組織の経時的組織障害の解析
 - 病理組織学的検索
 - 細胞増殖能: Ki-67 陽性細胞数の定量
 - 細胞死: TUNEL 陽性細胞数の定量、Western blot(WB)による関連分子(リン酸化 p53, p21, Puma, cleaved caspase-3)の定量
 - DNA 損傷修復: WB による非同源末端連結(Non-homologous end-joining: NHEJ)に働く Ku70, Ku80 や Artemis, 相同末端連結 (Homologous recombination: HR)に働く RAD51 の定量
- (3) 放射線誘発甲状腺発がんでのオートファジー関連遺伝子発現の Pathway-specific RT-PCR による網羅的解析
- (4) 被曝後甲状腺組織の経時的ゲノム異常の定量
 - DNA 損傷応答分子 p53-binding protein 1(53BP1)蛍光免疫染色核内フォーカス数による内因性 DNA 二重鎖切断の定量
 - Rat Genome CGH マイクロアレイキットを用いた aCGH 法による網羅的 DNA コピー数異常解析
 - 被曝後甲状腺組織の経時的トランスクリプトーム解析: Agilent 社 SurePrint G3 Rat GE マイクロアレイキットを用いて、Agilent GeneSpring プラットホームで解析

4. 研究成果

- (1) 放射線誘発甲状腺発がんオートファジー関連遺伝子: 被曝後 16ヶ月後の発がん率は若齢で 44.4%(対照 0%)、高齢では 14.3%(対照 14.3%)と、若齢被曝で有意に高率であった。甲状腺がん組織でのオートファジー調整因子・構成因子の発現をリアルタイム RT-PCR により解析した。結果として、被曝群では Cxcr4, Cdkn2a, Ctss, Tnf の発現が増加し、若齢被曝群では Tgfb1 の発現増加が見られた。一方、オートファゴソーム形成に必須の構成因子 Atg4b, Atg5 は若齢被曝群で発現低下を認めた。オートファジー誘導は放射線照射後ストレス下での適応反応の可能性があり、加齢によるオートファジー不全が、若齢被曝の発がんリスク亢進因子の候補として示唆された。
- (2) 被曝後甲状腺組織の経時的ゲノム異常として、内因性 DNA 二重鎖切断の指標となる DNA 損傷応答分子 53BP1 蛍光免疫染色核内フォーカス数を定量した。その結果、急性期では線量依存性に 53BP1 核内フォーカス数が増加するが、発がん期における非腫瘍組織に内因性 DNA 二重鎖切断の亢進は確認できなかった。Rat Genome CGH マイクロアレイを用いて aCGH 法による網羅的 DNA コピー数異常を解析したが、発がん期における非腫瘍組織にコピー数異常に変化は認めなかった。
- (3) ラット放射線誘発甲状腺発がんリスク亢進の分子マーカー探索: 7週齢ラットに X線 0.1, 1, 4Gy を前頸部局所照射後 6、12、16ヶ月後に甲状腺を摘出し RNA を抽出、遺伝子発現を網羅的に microarray 解析し、判明した遺伝子変化を定量 RT-PCR で確認した。非照射群では腫瘍発生は認めず、照射群では 16ヶ月後に 0.1, 1, 4Gy 照射で各々 4, 16.6, 33.3%に

発がんを認めた。4Gy 照射 16 ヶ月後の非腫瘍組織では 1486 遺伝子の発現増加と 1843 遺伝子の発現低下があり、DNA 損傷応答、細胞周期調節、細胞接着系の有意な変化を認めた。

- (4) 放射線誘発甲状腺がんリスク亢進の分子マーカーの網羅的探索で明らかになった発現変化を示す放射線刻印候補分子について、droplet digital PCR (ddPCR) で検証を行った。ddPCR での発現量検証の結果、DNA 損傷応答・修復系の ATM、53BP1、XRCC4 は被曝群で経時的に有意に低下を示し、腫瘍化段階特異的バイオマーカーの候補として示唆された。さらに細胞周期調節/細胞接着系の CTNNB1 は有意に低下、細胞周期調節系の CDKN1a は経時的に有意に上昇、細胞接着系の CLDN4 は低下を示し、発がん前段階からの被曝影響に伴う分子病理学的異常として示唆された。本研究により被曝甲状腺では前がん状態から段階的に分子異常が亢進し、発がんに至ることが明らかになった。これらのバイオマーカー候補の発現動態解析は、放射線影響を示す生物学的根拠となる可能性がある。
- (5) 統計学的に放射線刻印分子として有望であると考えられた CDKN1a と XRCC4 について、判定基準値を CDKN1a 11.7、XRCC4 3.7 と設定した。2 分子の放射線被曝指標としての有用性を検証する目的で、4Gy 局所照射後 16 ヶ月後のモデルを対照群とともに作製し、甲状腺抽出全 RNA のランダム化試料による検証実験を行った。2 分子の発現量を ddPCR で 3 回ずつ測定し、その平均値から被曝群と対照群の判別を試みた。その結果、全 19 試料中 CDKN1a 上昇陽性は 6 例で、照合すると 6 例は全て被曝群であり、陽性適中率 100%、陰性的中率 69% で (感度 60%、特異度 100%) 被曝を適中することのできるバイオマーカーとなる可能性がある。一方、XRCC4 低下陽性は 17 例で観られ、指標としては不適であることが判明した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- 1) Otsubo R, Matsuda K, Mussazhanova Z, Sato A, Matsumoto M, Yano H, Oikawa M, Kondo H, Ito M, Miyauchi A, Hirokawa M, Nagayasu T, Nakashima M: A novel diagnostic method for thyroid follicular tumors based on immunofluorescence analysis of p53-binding protein 1 expression: detection of genomic instability. 査読有 Thyroid 2019 Mar 30. doi: 10.1089/thy.2018.0548
- 2) Akazawa Y, Nakashima R, Matsuda K, Okamoto K, Hirano R, Kawasaki H, Miuma S, Miyaaki H, Malhi H, Abiru S, Itoh M, Kondo H, Fukuoka J, Nakao K, Nakashima M: Detection of DNA damage response in nonalcoholic fatty liver disease via p53-binding protein 1 nuclear expression. 査読有 Mod Pathol 2019 Feb 26. doi: 10.1038/s41379-019-0218-8
- 3) Matsuda K, Kawasaki T, Akazawa Y, Hasegawa Y, Kondo H, Suzuki K, Iseki M, Nakashima M: Expression pattern of p53-binding protein 1 as a new molecular indicator of genomic instability in bladder urothelial carcinoma. 査読有 Sci Rep 8(1): 15477, 2018
- 4) Takada N, Mussazhanova Z, Hirokawa M, Nakashima M, Miyauchi A: Immunohistochemical and Molecular Analyses Focusing on Mesenchymal Cells in Papillary Thyroid Carcinoma with Desmoid-Type Fibromatosis. 査読有 Pathobiology 85(5-6):300-303, 2018
- 5) Shimamura M, Shibusawa N, Kurashige T, Mussazhanova Z, Matsuzaki H, Nakashima M, Yamada M, Nagayama Y: Mouse models of sporadic thyroid cancer derived from *BRAFV600E* alone or in combination with PTEN haploinsufficiency under physiologic TSH levels. 査読有 PLoS One 13(8): e020136, 2018
- 6) Otsubo R, Mussazhanova Z, Akazawa Y, Sato A, Matsuda K, Matsumoto M, Yano H, Matsuse M, Mitsutake N, Ando T, Niino D, Nagayasu T, Nakashima M: Sporadic pediatric papillary thyroid carcinoma harboring the *ETV6/NTRK3* fusion oncogene in a 7-year-old Japanese girl: a case report and review of literature. 査読有 J Pediatr Endocrinol Metab 31(4): 461-467, 2018
- 7) Takahara I, Akazawa Y, Tabuchi M, Matsuda K, Miyaaki H, Kido Y, Kanda Y, Taura N, Ohnita K, Takeshima F, Sakai Y, Eguchi S, Nakashima M, Nakao K: Toyocamycin attenuates free fatty acid-induced hepatic steatosis and apoptosis in cultured hepatocytes and ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice. 査読有 PLoS ONE 12(3): e0170591. doi: 10.1371/journal.pone.0170591, 2017
- 8) Kurohama H, Mihara Y, Izumi Y, Kamata M, Nagashima S, Komori A, Matsuoka Y, Ueki N, Nakashima M, Ito M: Protein induced by vitamin K absence or antagonist II (PIVKA-II) producing large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) of lung with multiple liver metastases: a case report. 査読有 Pathol Int 67(2): 105-109 2017
- 9) Hashiguchi K, Ohba K, Nakashima M: Esophageal keratinous inclusion cyst. 査読有 Digest Endosc 29(5): 639-640, 2017
- 10) Otsubo R, Hirakawa H, Oikawa M, Baba M, Inamasu E, Shibata K, Hatachi T, Matsumoto M, Yano H, Abe K, Taniguchi H, Nakashima M, Nagayasu T: Validation of a novel diagnostic kit using the semidry dot-blot method to detect metastatic lymph nodes

in breast cancer: distinguishing macrometastases from nonmacrometastases. 査読有 Clinical Breast Cancer S1526-8209(17)30274-4, 2017

- 11) Wada H, Matsuda K, Akazawa Y, Yamaguchi Y, Miura S, Ueki N, Kinoshita A, Yoshiura K, Kondo H, Ito M, Nagayasu T, Nakashima M: Expression of somatostatin receptor type 2A and PTEN in neuroendocrine neoplasms is associated with tumor grade but not with site of origin. 査読有 Endocr Pathol 27(3): 179-187, 2016
- 12) Mussazhanova Z, Akazawa Y, Matsuda K, Shichijo K, Miura S, Otsubo R, Oikawa M, Yoshiura K, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko V, Kozykenova Z, Zhetpisbaev B, Shabdarbaeva D, Sayakenov N, Amantayev B, Kondo H, Ito M, Nakashima M: Association between p53-binding protein 1 expression and genomic instability in oncocyctic follicular adenoma of the thyroid. 査読有 Endocr J 63(5): 457-467, 2016

[学会発表](計 30 件)

- 1) Sato A, Matsuda K, Otsubo R, Yano H, Hirokawa M, Nakashima M, Nagayasu T: Immunofluorescence analysis for 53BP1 nuclear foci in thyroid cytology: possibility for preoperative diagnosis of follicular tumors. The 64th Annual Congress of International College of Surgeons Japan Section 2018
- 2) 中島正洋: ラット放射線誘発甲状腺発がんの分子病理と濾胞性腫瘍の分子マーカー探索. 第 10 回久留米・佐賀甲状腺研究会 2018
- 3) Mussazhanova Z, Kurohama H, Kurashige T, Ito M, Nagayama Y, Nakashima M: A consistent loss of Meap expression in oncocyctic follicular tumors of the thyroid: associated with epigenetic regulation. 第 22 回日本臨床内分泌病理学会学術総会 2018
- 4) 佐藤綾子、黒濱大和、新藤久和、佐藤伸也、山下弘幸、覚道健一、永安 武、中島正洋: Basedow 病を背景に発生した乳頭癌様の核所見を有する多発結節性病変. 第 6 回日本甲状腺病理学会総会 2018
- 5) 黒濱大和、佐藤綾子、佐藤伸也、山下弘幸、覚道健一、中島正洋: 嚢胞変性の目立つ被包型充実性濾胞上皮性腫瘍の 1 例. 第 6 回日本甲状腺病理学会総会 2018
- 6) 松田勝也、川崎辰彦、赤澤祐子、近藤久義、井関充及、中島正洋: 尿路上皮腫瘍での DNA 損傷応答分子 53BP1 発現プロファイリング: 異型度に関連したゲノム不安定性と DNA 損傷応答. 第 107 回日本病理学会総会 2018
- 7) 藤本成明、松山睦美、中島正洋: 新生仔ラット甲状腺の電離放射線への感受性. 第 59 回原子爆弾後障害研究会 2018
- 8) Mussazhanova Z, Rogounovitch T, Saenko V, Krykpayeva A, Espenbetova M, Matsuda K, Yamashita S, Nakashima M: SNP association with risk for sporadic papillary thyroid carcinoma in Kazakh population: association with clinicopathological pattern and SNP-SNP interactions. 第 3 回放射線災害・医科学研究拠点カンファランス 2018
- 9) 蔵重智美、松山睦美、中島正洋、嶋村美加、永山雄二: マウス甲状腺におけるオートファジーの役割. 第 3 回放射線災害・医科学研究拠点カンファランス 2018
- 10) 黒濱大和、Mussazhanova Z、佐藤伸也、山下弘幸、覚道健一、中島正洋: 高異型度充実性増生を優位成分とする被包型濾胞性腫瘍の 1 例. 第 22 回日本臨床内分泌病理学会学術総会 2018
- 11) 黒濱大和、松田勝也、芦塚賢美、中島正洋: 放射線科医の手指に発症した Bowen 病の 1 例: 放射線関連腫瘍の特徴解析. 第 107 回日本病理学会総会、2018
- 12) 本多 舞、鋤塚さやか、鋤塚 大、松田勝也、中島正洋、宇谷厚志: 限界線治療歴のある被爆者に臀部有棘細胞癌が多発した 1 例. 第 117 回日本皮膚科学会総会 2018
- 13) 中島正洋: Profile of gene expression during radiation-induced thyroid carcinogenesis in rat model. The XIII International scientific-practical conference "ECOLOGICAL RADIATION 2017
- 14) Akazawa Y, Nakashima R, Matsuda K, Nakao K, Nakashima M: Increased 53-binding protein 1 nuclear foci expression in the liver of patients with non- alcoholic fatty liver disease. 29th European Congress of Pathology 2017
- 15) Matsuda K, Kawasaki T, Akazawa Y, Hasegawa Y, Iseki M, Nakashima M: Significance of p53-binding protein 1 nuclear expression in urothelial tumours: Implication of DNA damage response in association with tumour grades. 29th European Congress of Pathology 2017
- 16) Mussazhanova Z, Rogounovitch T, Saenko V, Krykpayeva A, Tuleutayev M, Espenbetova M, Yamashita S, Nakashima M: SNP association with risk for sporadic papillary thyroid carcinoma in Kazakh population. 12th Asia and Oceania Thyroid Association (AOTA) Congress 2017
- 17) Ohnoda T, Matsuda K, Akazawa Y, Ueki N, Yamaguchi Y, Miura S, Kinoshita A, Yoshiura K, Nakashima M: Optimal Conditions of FFPE Samples for Extraction and Molecular Analysis of DNA for Atomic Bomb Survivors. The United States and Canadian Academy of Pathology (USCAP). 106th Annual Meeting 2017

- 18) Miura S, Kondo H, Matsuda K, Matsuyama M, Nakashima M: Evaluation of RNA quality in the Nagasaki Atomic Bomb Survivors' Tumor Tissue Bank. The 1st International symposium of the network-type joint usage/Research center for radiation disaster medical science 2017
- 19) 中島正洋: 放射線と甲状腺がん. 第 67 回知の拠点セミナー 2017
- 20) 中島正洋: ラット放射線誘発甲状腺がんの分子病理と新たな濾胞性腫瘍の鑑別法. 第 11 回神戸甲状腺診断セミナー 2017
- 21) 木住野美緒、松田勝也、木下 晃、光武範吏、吉浦孝一郎、中島正洋: 放射線誘発甲状腺がんラットモデルでの被曝特異的腫瘍化分子指標の探索. 第 21 回日本臨床内分泌病理学会学術総会 2017
- 22) Mussazhanova Z, 上木 望、黒濱大和、松田勝也、三浦史郎、重野里代子、田中藤信、伊東正博、中島正洋: 未分化転化した BRAT と TERT promoter double mutant 甲状腺乳頭癌の 1 例. 第 5 回日本甲状腺病理学会総会 2017
- 23) 三浦史郎、近藤久義、上木 望、ムサジャノワジャンナ、松田勝也、松山睦美、中島正洋: バイオバンクにおける冷凍保存期間と RNA の質: 長崎原爆被爆者組織バンクについて(第 4 報). 第 106 回日本病理学会総会 2017
- 24) 松山睦美、七條和子、近藤久義、土屋 誉、米田純也、松田勝也、三浦史郎、関根一郎、中島正洋: アミノ酸混合物シスチン・テアニンの放射線防護効果: 前投与による生存率と急性小腸障害への影響. 第 60 回日本放射線影響学会 2017
- 25) 七條和子、松山睦美、近藤久義、土屋 誉、米田純也、松田勝也、三浦史郎、関根一郎、中島正洋: アミノ酸混合物シスチン・テアニンの放射線防護効果: 前後投与により生存率と急性大腸障害への影響. 第 60 回日本放射線影響学会 2017
- 26) 松田勝也、佐藤典子、穴見正信、大坪竜太、佐藤綾子、Mussazhanova Z、新野大介、安倍邦子、永安 武、中島正洋: ETV6/NTRK3 遺伝子転座散発性小児甲状腺乳頭癌の 1 例. 第 58 回日本臨床細胞学会総会 2017
- 27) 上木 望、黒濱大和、ムサジャノワジャンナ、松田勝也、三浦史郎、重野里代子、田中藤信、伊東正博、中島正洋: 甲状腺乳頭癌から放射線治療後に未分化転化した一剖検例. 第 106 回日本病理学会総会 2017
- 28) 松山睦美、七條和子、近藤久義、土屋 誉、米田純也、松田勝也、三浦史郎、関根一郎、中島正洋: アミノ酸混合物シスチン・テアニンの放射線防護効果: 急性小腸障害への影響. 第 106 回日本病理学会総会 2017
- 29) 松山睦美、七條和子、松田勝也、三浦史郎、中島正洋: 若齢及び高齢ラット放射線誘発甲状腺がんのオートファジー関連遺伝子の発現解析. 第 59 回日本放射線影響学会 2016
- 30) 松山睦美、七條和子、松田勝也、三浦史郎、中島正洋: 放射線誘発甲状腺がんリスク亢進への年齢影響解析. 第 105 回日本病理学会総会 2016

〔図書〕(計 4 件)

- 1) 中島正洋「甲状腺濾胞がん」: 内分泌腫瘍 甲状腺腫瘍・副腎(癌診療指針のための病理診断プラクティス)長沼 廣, 笹野公伸, 青笹克之編集(中山書店)127-135, 2018
- 2) 中島正洋「放射線被曝と甲状腺癌」: 頭頸部癌学-診断と治療の最新研究動向 日本臨牀 75 巻別冊(日本臨牀社) 615-619, 2017
- 3) 中島正洋「内分泌系」: わかりやすい病理学改訂第 6 版 岩田隆子監修(南江堂)216-235, 2016
- 4) 中島正洋「放射線の消化管への影響」: 新版 放射線医学科-生命と放射線・電磁波・超音波- 大西武雄監修(医療科学社) 61-63, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年:
 国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 <https://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/pathology/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。