

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08379

研究課題名(和文) 長崎原爆被爆者腫瘍バンクと網羅的分子病理学的解析研究

研究課題名(英文) Nagasaki atomic bomb survivors tumor tissue bank and exhaustive analysis of the molecular pathology

研究代表者

三浦 史郎 (MIURA, Shiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・講師

研究者番号：80513316

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)：我々は被爆・病理診断情報とリンクした長崎原爆被爆者の新鮮凍結生体試料の収集を行っている。収集試料のRNAの品質に影響する因子を明らかにするため、抽出前凍結保存期間や抽出核酸量との関係を臓器別に解析したところ、凍結保存期間、核酸抽出量、臓器、腫瘍部または正常部の違いの影響を受けることが示された。さらに、核酸抽出試料を用い、被爆者腫瘍部と周囲の正常部組織DNAを用いたaCGH法による網羅的解析を行い、肺腺癌、扁平上皮癌ともに、被爆距離が2km未満の近距離群の方が、被爆距離2km以上の遠距離群より、腫瘍部では遺伝子増幅と欠失の領域の大きさや頻度が多いことが示された。

研究成果の概要(英文)：We have been conducting a cohort study of tissue bank for cancers which were freshly resected from A-bomb survivors together with information on the A-bombing and medical data. To assess the quality of RNA in this biobank, we investigated the level of RNA degradation and its correlation with frozen tissue storage period/amount of extracted RNA in each organ. The quality of extracted RNA in biobank was significantly influenced by storage period, site of tissue, normal/tumor tissues, and yield of extracted RNA, suggesting a necessity of careful quality control in each site of tissue. Furthermore, using nucleic acid extraction DNA, we conducted the exhaustive analysis of A-bomb survivors' lung cancer by aCGH method. It was shown that short-distance group (<2km from hypocenter) were more size and frequency of the region of gene amplification and the deletion in the tumor region than a long-distance group(2km) in each lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.

研究分野：放射線影響研究学、実験病理学

キーワード：放射線影響研究 放射線発癌 原爆被爆者 腫瘍組織バンク 遺伝子不安定性

1. 研究開始当初の背景

原爆被爆者の晩発性健康影響の主たるものとして固形がんが知られる。その疫学的特徴のひとつは、白血病が被爆後約 10 年で発症のピークに達しその後漸減したのに対し、被爆後 70 年以上を経過した現在においてもその罹患率の増加が継続している点にある。放射線生物学は国内外を問わず *in vitro*, *in vivo* 両方の系で進歩を遂げているが、被爆者固形がん発症メカニズムについては、未だに不明な点が多い。被爆者での発がんリスクの亢進は被爆後数十年が経過した現在においても持続している観点から、放射線の人体への晩発性影響の解明は培養系や動物モデルでは困難である。長期継続した放射線影響があるとすれば、放射線による晩発性のゲノム不安定性(*genomic instability*: GIN)が存在し、放射線誘発癌の背景因子となっていると考えられる。原爆被爆者に発生する放射線関連の明らかな固形がんとして、甲状腺がん、乳がん、肺がん、皮膚がんなどが挙げられるが、我々もこれまでに、1)放射線誘発甲状腺がんでは新規分子異常である RET 遺伝子増幅が存在すること (Hum Pathol 2007)、2)近距離被爆者乳がんではがん遺伝子の増幅が高頻度で、組織学的高悪性度と相関すること (Cancer 2008)、3)近距離被爆者皮膚基底細胞がんの近傍表皮細胞には、自然発症性/内因性の DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) の亢進がみられること (Cancer 2009)、4)近距離被爆者乳がんでは DNA コピー数異常 (copy number aberration: CNA) が大きいこと (Radiat Oncol 2011)などを報告してきた。これらのことより、原爆被爆者において、点突然変異よりも、染色体再配列や遺伝子増幅などの DNA の構造異常が多く見られることが判明してきた。

被爆者生体試料はこれまで病理標本として保存されており、これまでの固形がんの分子異常解析はホルマリン固定パラフィン包埋標本 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE) を用いたものが主体であった。しかし、FFPE からの核酸はホルマリン固定による核酸の断片化の影響が強く、「特定」の標的分子の解析は比較的容易であるが、核酸の網羅的な解析は困難である。そこで、我々は 2008 年 4 月より長崎大学グローバル COE プログラム「放射線健康リスク制御国際戦略拠点」のプロジェクトのひとつとして、「長崎原爆被爆者腫瘍バンク」という新鮮凍結生体試料 (腫瘍部と背景正常組織部を採取) と臨床病理情報を一括した収集体制を立ち上げ、現在も実行している。新鮮凍結試料からの核酸は断片化が少なく、この高分子ゲノムを用いて、これまで不可能であった被爆者発癌の詳細なゲノム解析が可能となる。DNA の網羅的解析により、被爆者腫瘍、及びその背景正常組織のコピー数異常、もしくは大規模欠損などを詳細に解明する

ことにより、放射線被曝の特異的刻印・痕跡 (放射線刻印) の発見につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、収集された凍結試料からの核酸抽出、分注保管を完了させ、「長崎原爆被爆者腫瘍組織バンク」の運用体制を整える。さらに、抽出試料を用い、固形がん発生の背景因子としての GIN を評価する目的で、被爆者腫瘍部と周囲の正常部組織 DNA を用いた *microarray comparative genomic hybridization* (aCGH) 法による網羅的解析を行い、放射線発癌特有の染色体構造変異部を特定する。

3. 研究の方法

「長崎原爆被爆者腫瘍バンク」の対象は、長崎大学病院および日赤長崎原爆病院の外科症例中被爆者手帳集団で、術前に試料提供の書面でのインフォームド・コンセント (informed consent: IC) を全例で得ている。被爆情報、家族歴、治療歴、交絡因子を聴取し腫瘍の病理診断情報とともにデータベース化しており、腫瘍と正常部組織は分取凍結保存されており、凍結保存試料から核酸 (DNA, RNA) を抽出し、分注・保存する。これらの試料を用い aCGH 法でゲノムの網羅的解析を行う。さらに、遠距離被爆者群と比較し、近距離被爆者群のがんに共通した原因遺伝子候補の検索も合わせて行う。

(1) 新鮮凍結試料からの核酸抽出、分注・保存、品質管理

長崎被爆者腫瘍組織バンクで収集された腫瘍部、背景正常部各々の検体から核酸抽出、分注・保存を行う。抽出に関しては、核酸抽出精製装置 QIAcube (QIAGEN) と QIAGEN Allprep DNA/RNA mini kit を用いて、核酸抽出をオートメーション化することで、人為的作業による抽出のぶれを軽減する。総 DNA/RNA 濃度と 260nm/280nm 吸光度比、260nm/230nm 吸光度比は、微量分光光度計 NanoDrop2000 (Thermo 社) で計測する。アガロースゲルを用いた電気泳動像により、DNA の分解程度を評価する。Agilent RNA 6000 Nano Assay プロトコールに従い、Agilent 2100 バイオアナライザーによる RNA Integrity Number (RIN) で RNA の分解を評価する。各検体に濃度とクオリティーチェックデータシートを付加し、DNA は 100 μ l ずつ、RNA は 50 μ l (平均抽出核酸総量 190 μ g: 17 μ g ~ 1103 μ g) ずつ分注し、-80 で冷凍保存する。本バイオバンクは様々な臓器の固形がんとその周囲正常部の核酸と凍結組織を対象としていて、分子異常の網羅的解析に耐えうる高品質の核酸の抽出・保存と品質管理が重要となる。今回、収集試料の RNA の品質を評価し、品質に影響する因子を明らかにすることを目的に、抽出前組織凍結保存期間や

抽出核酸量との関係を臓器別に解析した。収集・保存された新鮮凍結試料を用い、その中から胃がん 44 例、肝がん 111 例、肺がん 164 例(いずれも正常部、腫瘍部を含んだ症例数)の抽出 RNA を対象とし、冷凍保存期間や核酸抽出量との関係をピアソンの相関係数を用いた t 検定により統計的に解析した。

(2) 肺腫瘍の腫瘍部と正常部の aCGH 解析

本研究では、被爆者において放射線との因果関係の明らかな代表的固形がんで、本バンクで収集検体が最も多い肺腫瘍を対象として、aCGH 法による DNA の網羅的解析を行う。腫瘍部と正常部からの DNA を用いて、蛍光標識した DNA を 60k 個のプローブを搭載する高密度 DNA マイクロアレイ SurePrint G3 8x60K (Agilent 社) にハイブリダイズさせ、aCGH 解析する。対象 DNA には製品化されている正常 DNA プール (Promega 社) を使用する。結果の解析は Agilent Genomic Workbench Software (Agilent 社) で行う。被爆距離別に腫瘍部と正常部の増幅および欠失の数と大きさ (CNA) を指標に GIN を評価する。

4. 研究成果

(1) 新鮮凍結試料からの核酸抽出、分注・保存、品質管理

試料収集・核酸抽出状況

2008 年 4 月から 2017 年 12 月末までに 710 症例 (664 名) の被爆者新鮮凍結腫瘍組織を収集した。1 年間に約 50~70 症例が新たに収集・保存されている。2017 年 12 月末までに採取された月別収集検体数の累計 (図 1) と臓器別検体数 (表 1) を示す。随時、核酸抽出中で、現在、核酸を抽出・分注保存済みの主な臓器の症例数 (割合) は、乳腺 134 例 (92.4%)、肺 126 例 (90.0%)、結腸 99 例 (90.8%)、肝臓 72 例 (92.1%)、胃 68 例 (90.7%)、直腸 30 例 (85.7%)、甲状腺 54 例 (93.1%) である。主要な収集臓器のほぼ 8~9 割前後で核酸の抽出は推移し、古い保存検体からの核酸抽出はほぼ完了し、新たな収集検体を抽出するようになってきた。

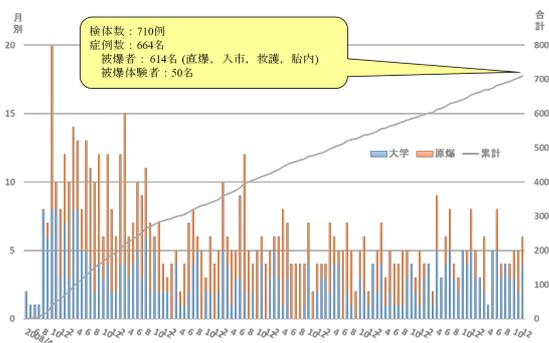


図 1 月別収集検体数の累計 (2008 年 4 月 ~ 2017 年 12 月末まで)

Organ	N	Malignant	Benign	Non-neoplasia
Breast	145	134	3	8
Lung	140	136	1	3
Colon	109	105	2	2
Liver	76	73	0	3
Stomach	75	69	0	6
Thyroid	58	42	9	7
Rectum	35	33	1	1
Gallbladder	26	10	0	16
Pancreas	11	10	0	1
Esophagus	4	4	0	0
Others	31	17	11	3
Total	710	633(89.2%)	27(3.8%)	50(7.0%)

表 1 収集検体の臓器別検数 (n=710) (2008 年 4 月 ~ 2017 年 12 月末まで)

② 核酸抽出の品質管理について

胃、肝臓、肺の各臓器間の抽出 RNA の RIN 値と冷凍保存期間の平均を (表 2) に示す。RIN 値の平均は、胃 (6.4)、肝臓 (7.6)、肺 (6.9) で、肝臓が最も RIN 値が高かった。採取部位 (正常部、腫瘍部) における RIN 値 7 の割合では、胃と肝臓では腫瘍部に比べ、正常部で RIN 値の低下した症例の割合が多かったが、肺では腫瘍部と正常部に大きな違いはなかった (表 3)。

各臓器の冷凍保存期間と RIN 値の相関を (図 2) に示す。肝臓の腫瘍部以外は、全て冷凍保存期間が長くなればなるほど、RIN 値の低下が見られ、胃の正常部でその傾向は顕著であった。核酸抽出量と RIN 値の相関 (図 3) をみると、肝臓と肺では、核酸抽出量が多いほど、RIN 値が高い傾向にあり、肺でその傾向が強くみられた。また、腫瘍部と正常部の相関を見ると、いずれの臓器も腫瘍部と正常部で明らかな相関を認めた。肝臓の腫瘍部以外、すべての検体で冷凍保存期間が長くなるほど RIN 値の低下が見られ、核酸抽出量は肝臓や腫瘍部といった細胞密度の高い組織で多く、RIN 値も高値となる。全臓器ともに、正常部と腫瘍部の RIN が相関していることは (正常がよければ腫瘍もいい)、核酸抽出のテクニックの問題ではなく、採取検体の状態 (阻血時間や自己融解の程度や組織の挫滅の程度など) を RIN 値は反映していると思われる。特に胃の正常部では、核酸抽出量に関わらず、RIN 値の低下が高度で、阻血後の自己融解による影響が考えられ、正常部で顕著にその影響が表れていると推察する。

臓器	RIN 値	核酸抽出までの冷凍保存期間 (月)
胃 (n=44)	6.4 (2.4-8.9)	31.8 (5-70)
肝臓 (n=111)	7.6 (1.0-9.8)	26.9 (0-53)
肺 (n=164)	6.9 (1.1-9.2)	36.0 (0-73)

表 2 各臓器間の RIN 値と冷凍保存期間の平均

採取部位	臓器		
	胃	肝臓	肺
全体	59.1	73.9	54.9
正常部	42.9	66.0	56.2
腫瘍部	87.5	81.0	52.5

表 3 各臓器の採取部位における RIN 値 7 の割合 (%)

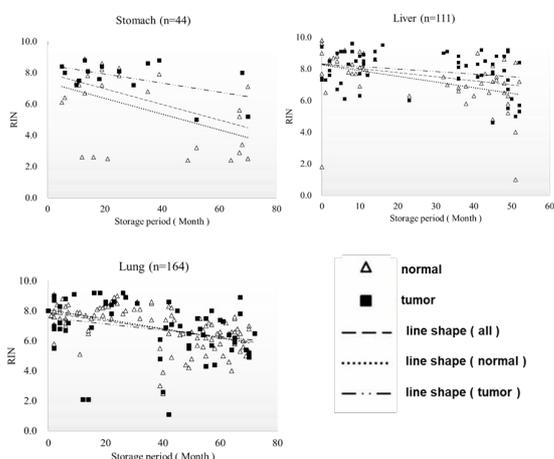


図 2 冷凍保存期間と RIN 値の相関 (散布図)

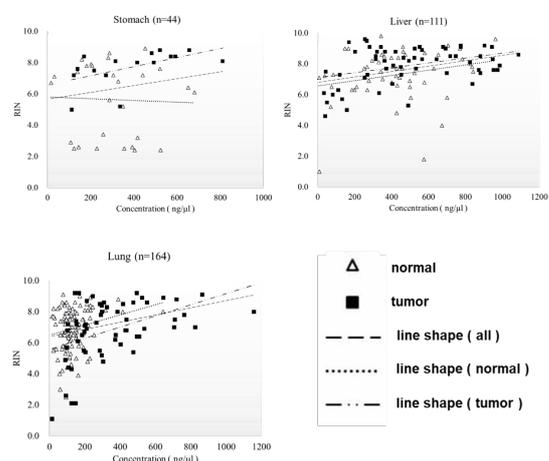


図 3 核酸抽出量と RIN 値の相関 (散布図)

(2) 肺腫瘍の腫瘍部と正常部の aCGH 解析

本バンキングで抽出された肺腺癌症例 8 例 (近距離症例 4 例 : 被爆距離 2km 未満 ; 1.1 ~ 1.6km、遠距離症例 4 例 : 被爆距離 2km 以上 ; 4.0 ~ 8.0km) と肺扁平上皮癌 8 例 (近距離症例 4 例 : 被爆距離 2km 未満 ; 1.2 ~ 1.8km、遠距離症例 4 例 : 被爆距離 2km 以上 ; 4.0 ~ 4.8km) を用いた aCGH 結果を (図 4) に示す。

肺腺癌、扁平上皮癌ともに、被爆距離が 2km 未満の近距離群の方が、被爆距離 2km 以上の遠距離群より、腫瘍部では遺伝子増幅と欠失の領域の大きさや頻度が多いことが示された。遺伝子コピー数異常はゲノム不安定性を示唆する現象である。さらに興味深いことに、我々は肺腺癌において近距離群の周囲正常部の 4 例中 3 例で 7 番染色体の q21.13 領域 (CFAP69 など) のコピー数の増加が共通してみられることを発見した。一見正常に見える組織内にも、高線量を浴びたと思われる近距離群でのみ共通したコピー数異常の存在は、放射線被曝に伴うゲノム痕跡の可能性を想起させる。

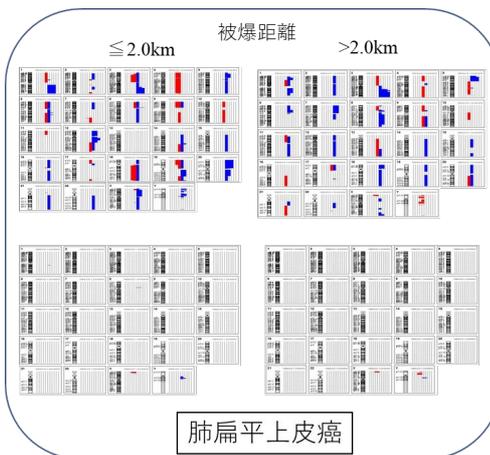
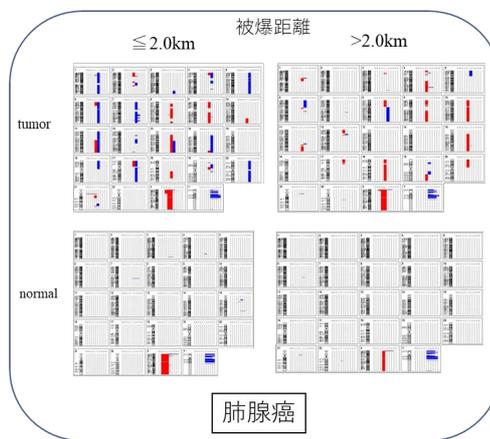


図 4 : 原爆被爆者肺がん (上図 : 腺癌、下図 : 扁平上皮癌) の腫瘍部、周囲正常部の aCGH 解析

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 4 件)

三浦 史郎 , 近藤 久義, 松田 勝也, ムサ ジャノワ ジャンナ, 松山 睦美, 中島 正洋, 長崎原爆被爆者組織バンクの経過報告 (第 4 報): 凍結保存期間と RNA の品質について、広島医学、査読無、2018 (印刷中)

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. Endocrine Pathology, 査読有, 27 巻, 2016, 179-187

DOI: 10.1007/s12022-016-9436-5.

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 oncocytic follicular adenoma of the thyroid. *Endocrine Journal*, 査読有, 63 巻, 2016, 457-467

DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0629. Epub 2016 Mar 1.

Miura S, Akazawa Y, Kurashige T, Tukasaki K, Kondo H, Yokota K, Mine M, Miyazaki Y, Sekine I, Nakashima M. The Nagasaki Atomic Bomb Survivors' Tumor Tissue Bank. The Nagasaki Atomic Bomb Survivors' Tumor Tissue Bank. *Lancet*, 査読有, 386 巻, 2015, 1738

DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00698-4.

[学会発表](計 8 件)

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 年

三浦史郎、近藤久義、松田勝也、ムサジヤノワジャンナ、松山睦美、中島正洋: 長崎原爆者組織バンクの経過報告(第 4 報): 凍結保存期間と RNA の品質について. 第 58 回原子爆弾後障害研究会. 2017 年

近藤久義、早田みどり、横田賢一、三根眞理子、中島正洋、三浦史郎、高村 昇: 長崎市原爆被爆者の同時性重複癌罹患率に対する被爆距離の影響. 第 58 回原子爆弾後障害研究会. 2017 年

三浦史郎、近藤久義、上木 望、ムサジヤノワジャンナ、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 年

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 年

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 年

Nakashima M: Storage of Biosamples from Atomic Bomb Survivors at Nagasaki University. International JSPS-DFG workshop on future joint

studies in the field of radiation research-medical and environmental radiation-. 2016.

Nakashima M, Miura S, Matsuda K, Matsuyama M, Ueki N, Ito M, Yamashita S: "Storage of Biosamples from Atomic Bomb Survivors at Nagasaki University". STAR2015 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 史郎 (MIURA, Shiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・講師
研究者番号: 80513316

(2) 研究分担者

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA, Kouichiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号: 00304931

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