

令和元年6月7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：16K09805

研究課題名(和文) Mitochondrial DNA deletions as a bioindicator of radiation exposure in papillary thyroid carcinoma

研究課題名(英文) Mitochondrial DNA deletions as a bioindicator of radiation exposure in papillary thyroid carcinoma

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、放射線被曝の潜在的な分子マーカーとしてミトコンドリアDNA欠失プロファイルを評価することである。初代培養ヒト甲状腺細胞に0.5、1、2、5、10Gyの線を照射し、48時間後にDNAを抽出し、PCRにより増幅したmtDNAを用いてライブラリ調整を行い、NGSによりmtDNAの欠失パターンを解析した。放射線誘発小児PTCでは、散発性小児PTCと比べて大きな欠失の数が多いことを確認した。CYTB、ND6、ND5、ND4、COIII、ATP6及びCOIIのmtDNA遺伝子領域における大きな欠失を有するRNA転写産物が、放射線誘発PTC特異的な分子マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CYTB、ND6、ND5、ND4、COIII、ATP6及びCOのmtDNA遺伝子領域における『大きな欠失(large-scale deletions)』を有するRNA転写産物が、放射線誘発PTC特異的な分子マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of our study is to evaluate the mitochondrial DNA (mtDNA) deletion profile in radiation-induced and sporadic PTCs and in exposed to ionizing radiation (IR) human primary thyrocytes using next-generation sequencing as a potential individual molecular marker of radiation exposure. Using primary cultures of human thyrocytes exposed to IR (from 0.5 to 10 Gy), we found a significant dose-dependent increase of mtDNA deletions, while mtDNA content and common deletion (CD) content did not change. In radiation-induced PTC the number of large-scale deletions is higher than in sporadic. In radiation-induced PTCs deleted mtDNA may persist for a long time after exposure, but only those whose size exceeds 1.9 kb are highly expressed. These findings suggest that RNA transcripts with large deletions involving CYTB, ND6, ND5, ND4, COX3, ATP6 and COX2 mtDNA genes may be a potential marker of radiation etiology of papillary thyroid carcinoma in exposed patients.

研究分野：内分泌学、甲状腺学、分子生物学

キーワード：mtDNA Large-scale deletion RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

チェルノブイリ原発事故の主な健康影響の1つは、放射線に被曝した小児における甲状腺乳頭癌 (PTC) の発症率の増加である。放射線被曝による小児 PTC 発症リスクの上昇は疫学調査から明確であるが、現在までに甲状腺癌発症に関連する癌遺伝子または癌抑制遺伝子のいずれも放射線誘発 PTC 特異的な分子マーカーとはならず、電離放射線による変異シグネチャーについては未だ明らかになっていない。

ミトコンドリア DNA(mtDNA)は細胞一個あたり数千コピー程度存在するため、核 DNA に比べて障害を受けやすく、また修復活性が弱いことから欠失・変異が生じやすいことが知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線被曝の潜在的な分子マーカーとしてミトコンドリア DNA (mtDNA) 欠失プロファイルを評価することである。放射線照射によって誘発された mtDNA 欠失パターンを解析し、サイズ、領域、ブレイクポイント周辺の配列を検討することで放射線誘発特異的な mtDNA 欠失を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 初代培養ヒト甲状腺細胞を用いた解析

3例の初代培養ヒト甲状腺細胞に 0.5、1、2、5、10Gy のγ線を照射し、48 時間後に DNA を抽出した。PCR により増幅した mtDNA を用いてライブラリ調整を行い、NGS により mtDNA の欠失パターンを解析した。

(2) 甲状腺乳頭癌組織検体を用いた解析

放射線誘発小児 PTC4 例、及び散発性小児 PTC4 例の凍結組織より RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。

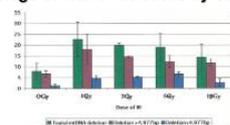
4. 研究成果

(1) 初代培養ヒト甲状腺細胞を用いた解析

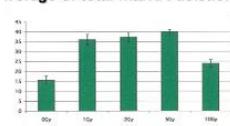
- ・初代培養ヒト甲状腺細胞に γ線を照射し mtDNA の欠失パターンを解析したところ、mtDNA の欠失は線量依存的に増加した (Figure 1)。ただし、10 Gy では逆に減少した。

Figure 1.
Average of mtDNA deletions in "left" part of mtDNA in primary thyrocytes

A. Average of mtDNA deletions by size



B. Average of total mtDNA deletions

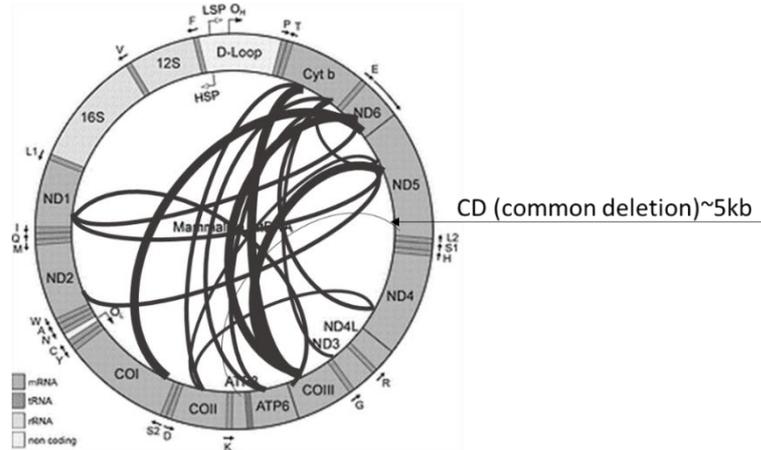


- ・照射後の CytB、ND6、ND5、ND4、COIII、ATP6、ATP8 における欠失は 12sRNA、16sRNA、ND1、ND2 における欠失より有意に多かったが、共通する欠失の "hot spot" は確認されなかった。

(2) 甲状腺乳頭癌組織検体を用いた解析

- ・甲状腺乳頭癌組織検体を用いて、mtDNA 欠失によって生じた融合遺伝子の発現プロファイルを検討した。
- ・放射線誘発小児 PTC では、散発性小児 PTC と比べて『大きな欠失 (large-scale deletions)』の数が多いたことを確認した。
- ・PTC において 400 種類以上の融合遺伝子の発現を確認したが、そのうち高発現するものは 1.9kb 以上の大きな欠失により生じた 20 種類の融合遺伝子であった。
- ・初代培養細胞を用いた検討と同じく、CYTB、ND6、ND5、ND4、COIII、ATP6、COII における欠失が多かったが、各症例に共通する欠失は確認されなかった (Figure 2)。

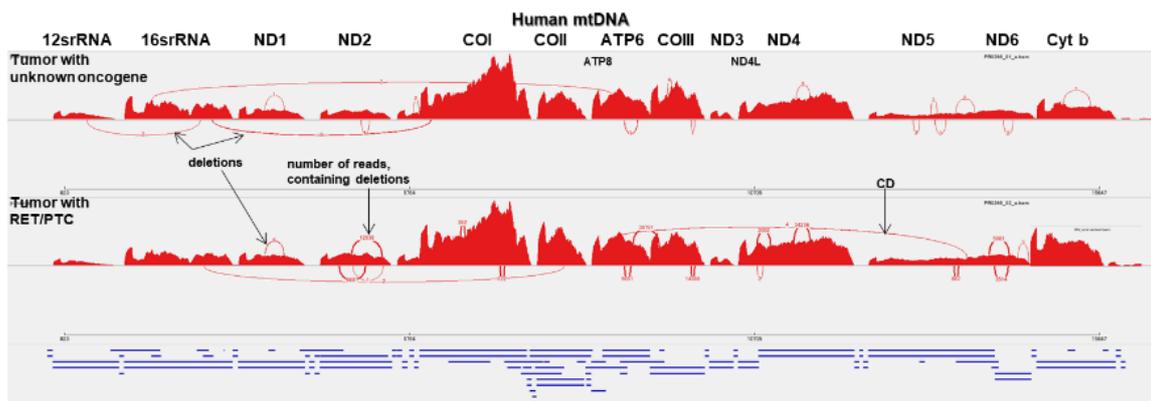
Figure 2.
Human mtDNA (16569bp) with the most frequent types of large-scale deletions in PTC samples



**thickness of lines depends of number of reads and level of expression of deleted mtDNA*
**thickest lines show the most strongly expressed deleted ntDNA*

- ・対応する正常甲状腺部分を用いた検討によると、上述した欠失は認められなかった。
- ・Common deletion により生じる ND5-ATPase8 融合遺伝子の発現は PTC ではほとんど検出されなかった。Common deletion は電離放射線によって誘発されるが、これによって生じる融合遺伝子の発現量は非常に低いため、発癌への寄与はほとんどないものと考えられる。
- ・RET/PTC の再配列を持つ PTC では、mtDNA の含有量及び欠失によって生じた融合遺伝子の発現量が他の癌遺伝子を持つ PTC と比較して高いことを確認した(Figure 3)。

Figure 3.
Expression of wt mtDNA and deleted mtDNA in tumor samples from pediatric PTC patients with different types of “driver” oncogene



以上の結果より、CYTB、ND6、ND5、ND4、COIII、ATP6 及び COII の mtDNA 遺伝子領域における『大きな欠失 (large-scale deletions)』を有する RNA 転写産物が、放射線誘発 PTC 特異的な分子マーカーとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Ohba K, Mitsutake N, Matsuse M, Rogounovitch T, Nishino N, Oki Y, Goto Y, Kakudo K. Encapsulated papillary thyroid tumors with delicate nuclear changes and KRAS mutation as a possible novel subtype of borderline tumor. *J Pathol Transl Med* 2019 Mar; 53(2), 136-141. doi: 10.4132/jptm.2018.12.07. 査読有
2. Suzuki S, Bogdanova TI, Saenko VA, Hashimoto Y, Ito M, Iwadate M, Rogounovitch TI, Tronko MD, Yamashita S. Histopathological analysis of papillary thyroid carcinoma detected during ultrasound screening examinations in Fukushima. *Cancer Sci* 110 (2): 817-827, 2019 Feb doi: 10.1111/cas.13912 査読有
3. Saenko VA, Rogounovitch TI. Genetic polymorphism predisposing to differentiated thyroid cancer: a review of major findings of the Genome-Wide association Study. *Enocrinol Metab (Seoul)* 33 (2): 164-174 2018 Jun doi: 10.3803/EnM.2018.33.2.164. Review. 査読無
4. Bogdanova TI, Saenko VA, Brenner AV, Zurnadzhy LY, Rogounovitch TI, Likhtarov IA, Masiuk SV, Kovgan LM, Shpak VM, Thomas GA, Chanock SJ, Mabuchi K, TronkoMD, Yamashita S. Comparative histopathologic analysis of “radiogenic” and “sporadic” papillary thyroid carcinoma: patients born before and after the Chernobyl accident. *Thyroid* 28 (7): 880-890 2018 Jul doi: 10.1089/thy.2017.0594. 査読有
5. Bogdanova TI, Saenko VA, Hirokawa M, Ito M, Zurnadzhy LY, Hayashi T, Rogounovitch TI, Miyauchi A, Tronko MD, Yamashita S. Comparative histopathological analysis of sporadic pediatric papillary thyroid carcinoma from Japan and Ukraine. *Endocr J*. 2017, 64(10):977-993
6. Rogounovitch Tatiana, Saenko Vladimir Single-nucleotide polymorphisms predisposing to thyroid cancer: major findings of genome-wide association studies. *Thyroid Cancer Explore* 2017, 3(1):25-31 査読無
7. Iyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko VA, Suzuki K, Ashizawa M, Ookouchi C, Suzuki S, Mizunuma H, Fukushima T, Suzuki S, Yamashita S. Identification of three novel fusion oncogenes, SQSTM1/NTRK3, AFAP1L/RET and PPFIBP2/RET in thyroid cancers of young patients from Fukushima. *Thyroid*. 2017 Mar 29, doi: 10.1089/thy.2016.0673. 査読有
8. Nikitski AV, Rogounovitch TI, Bychkov A, Takahashi M, Yoshiura KI, Mitsutake N, Kawaguchi T, Matsuse M, Drozd VM, Demidchik Y, Nishihara E, Hirokawa M, Miyauchi A, Rubanovich AV, Matsuda F, Yamashita S, Saenko VA. Genotype Analyses in the Japanese and Belarusian Populations Reveal Independent Effects of rs965513 and rs1867277 but Do Not Support the Role of FOXE1 Polyalanine Tract Length in Conferring Risk for Papillary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2017 Feb; 27(2):224-235. doi: 10.1089/thy.2015.0541. 査読有
9. Nikitski A, Saenko V, Shimamura M, Nakashima M, Matsuse M, Suzuki K, Rogounovitch T, Bogdanova T, Shibusawa N, Yamada M, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Targeted Foxe1 overexpression in mouse thyroid causes the development of multinodular goiter but does not promote carcinogenesis. *Endocrinology* 2016 May; 157 (5):2182-2195. doi: 10.1210/en.2015-2066. 査読有
10. 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 in thyroid. *Endocr J* 2016 May 31; 63(5):457-467. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0629. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Rogounovitch TI, Saenko VA, Frydman MV, Manskovskaya SV, Yamashita S. Clinicopathological associations of BRAFV600E mutation in papillary thyroid carcinoma diagnosed in young adult patients exposed to Chernobyl radiation at a very young age. 第 91 回日本内分泌学会, 2018
2. Rogounovitch TI, Saenko VA, Leonava TA, Drozd VM, Takahashi M, Kawaguchi T, Mitsutake N, Matsuda F, Yamashita S. The *DIRC3* SNP does not associate with the risk for radiation-related thyroid cancer in children in contrast to other age or exposure-status groups from Belarus. 第 61 回日本放射線影響学会, 2018

3. Vladimir Saenko, Tatiana Rogounovitch, Mikhail Frydman, Svetlana Mankovskaya, Shunichi Yamashita. Comparative analysis of clinical and morphological characteristics according to BRAF mutational status in post-Chernobyl adult PTCs from Belarus. 第 61 回日本放射線影響学会, 2018
4. Tatiana Rogounovitch, Mikhail Frydman, Svetlana Mankovskaya, Shunichi Yamashita, Vladimir Saenko. Clinical and morphological characteristics according to BRAF mutational status in post-Chernobyl young adult PTCs. 第 61 回日本甲状腺学会, 2018
5. Vladimir Saenko, Tatiana Rogounovitch, Alexander Abrosimov, Alexei Sidorin, Pavel Rummyantsev, Shunichi Yamashita. Association of BRAF mutational status with the chance of recurrence of papillary thyroid carcinoma in patients from Russia. 第 61 回日本甲状腺学会, 2018
6. Alexander Abrosimov, Tatiana Rogounovitch, Alexei Sidorin, Pavel Rummyantsev, Pavel Isaev, Kseniya Nizhegorodova, Anna Shinkarkina, Shunichi Yamashita, Vladimir Saenko. Immunohistochemical Analysis of BRAF Mutational Status in the Papillary Thyroid Carcinoma with Special Reference to Recurrent Tumors. The 2nd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science, 2018
7. Mikhail Frydman, Tatiana Rogounovitch, Sviatlana Mankovskaya, Shunichi Yamashita, Vladimir Saenko. Papillary Thyroid Carcinoma Associated with Post-Chernobyl Exposure to Radiation: a Comparative Analysis of Clinical and Morphological Characteristics According to BRAF Mutational Status in Young Adults of Belarus. The 2nd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science, 2018
8. Rogounovitch TI, Saenko VA, Leonava TA, Drozd VM, Demidchik YE, Takahashi M, Kawaguchi T, Mitsutake N, Matsuda F, Yamashita S. Is the common SNP rs966423 at chromosome 2q35 etiology-specific and confers risk for sporadic thyroid cancer only? 第 90 回日本内分泌学会, 2017
9. 井山慶大、光武範吏、松瀬美智子、タチアナ ログノビッチ、ウラジミール サエンコ、鈴木啓司、芦澤舞、大河内千代、鈴木聡、水沼廣、福島俊彦、鈴木真一、山下俊一、福島の小児および思春期の甲状腺乳頭癌における新規融合癌遺伝子の同定, 第 90 回日本内分泌学会, 2017
10. Rogounovitch TI, Saenko VA, Leonava TA, Drozd VM, Takahashi M, Kawaguchi T, Mitsutake N, Matsuda F, Yamashita S. Is the common SNP rs966423 at chromosome 2q35 etiology-specific and confers risk for sporadic thyroid cancer only? 第 60 回日本甲状腺学会, 2017
11. Bogdanova Tetiana, Saenko Vladimir, Hirokawa Mitsuyoshi, Ito Masahiro, Zurnadzhy Liudmyla, Rogounovitch Tatiana, Miyauchi Akira, Tronko Mykola, Yamashita Shunichi. Histopathological features of sporadic papillary thyroid carcinoma in children and adolescents of Japan and Ukraine: a comparative analysis. 第 60 回日本甲状腺学会, 2017
12. ログノビッチ タチアナ, サエンコ ウラジミール, マンコブスカヤ スベトラナ, フリドマン ミハイール, デミドチック ユリ, 山下俊一, Novel RET/PTC rearrangement identified by RNA-NGS in a sporadic pediatric PTC, 第 89 回日本内分泌学会, 2016
13. ニキツキ アレクサンドル, サエンコ ウラジイミール, ログノビッチ タチアナ, ビチコブ アンドレイ, 高橋めい子, 吉浦孝一郎, 光武範吏, 川口喬久, 松瀬美智子, ドロズド ワレンチナ, デミドチック ユリ, 西原永潤, 廣川満良, 宮内昭, ルバのビッチ アレクサンドル, 松田文彦, 山下俊一 Genotype analyses in the Japanese and Belarusian populations reveal independent effects of rs965513 and rs1867277 but do not support the role of *FOXE1* polyalanine tract length in conferring risk for papillary thyroid carcinoma, 第 89 回日本内分泌学会, 2016
14. ムサジャンワ ジャンナ, ログノビッチ タチアナ, サエンコ ウラジミール, Krykpayeva Ainur, Zhumanbayeva Zhanar, Azizov Bayurzhan, Kunslyamova Togzhan, Espenbetova Maira, Tuleutayev Mukhtar, 山下俊一, 中島正, Association of rs965513 with risk for sporadic papillary thyroid carcinoma in Kazakh population, 第 89 回日本内分泌学会, 2016
15. Zhanna Mussazhanova, Yuko Akazawa, Katsuya Matsuda, Kazuko Shichijo, Shiro Miura, Ryota Otsubo, Masahiro Oikawa, Koh-ichiro Yoshiura, Norisato Mitsutake, Tatiana Rogounovitch,

- Vladimir Saenko, Zhanna Kozykenova, Bekbolat Zhetpisbaev, Dariya Shabdarbaeva, Nurlan Sayakenov, Bakanay Amantayev, Hisayoshi Kondo, Masahiro Ito, Masahiro Nakashima. Association between p53-binding protein 1 expression and genomic instability in oncocytic follicular adenoma of the thyroid. 第105回日本病理学会, 2016
16. Mussazhanova Zhanna, Rogounovitch Tatiana, Saenko Vladimir, Krykpayeva Ainur, Tuleutayev Mukhtar, Espenbetova Maira, 山下 俊一, 中島 正洋. Replication study of genetic determinants associating with risk for sporadic papillary thyroid carcinoma in Kazakh population. 第20回日本内分泌病理学会学術総会, 2016
17. タチアナログノビッチ Studies of molecular features of radiation-induced and sporadic papillary thyroid carcinomas. 基礎医学研究助成講演, 第59回日本甲状腺学会学術集会, 2016
18. Zhanna Mussazhanova, Tatiana Rogounovitch, Vladimir Saenko, Ainur Krykpayeva, Bayurzhan Azizov, Mukhtar Tuleutayev, Maira Espenbetova, 山下 俊一, 中島 正洋 SNP association with risk for sporadic papillary thyroid carcinoma in Kazakh population. 第59回日本甲状腺学会学術集会, 2016

〔その他〕

ホームページ等

長崎大学原研医療

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：サエンコ ウラジミール

ローマ字氏名：SAENKO, Vladimir

所属研究機関名：長崎大学

部局名：原爆後障害医療研究所

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30343346

研究分担者氏名：中沢 由華

ローマ字氏名：NAKAZAWA, Yuka

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：環境医学研究所

職名：助教

研究者番号（8桁）：00533902

※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。