

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12597

研究課題名(和文) 甲状腺初期化細胞を用いた放射線誘発ゲノム融合分子痕跡検出系樹立の試み

研究課題名(英文) Detection of radiation-induced oncogenic fusion in primary thyroid follicular cells

研究代表者

鈴木 啓司 (SUZUKI, Keiji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：00196809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：東日本大震災に伴う東京電力福島第一原子力発電所の事故後の小児甲状腺超音波検査で、極めて高い頻度で甲状腺がんが報告されている。これらの甲状腺がんの放射線起因を判断する一助として、細胞に残る放射線痕跡の同定が極めて重要である。本研究では、甲状腺がんのdriver変異であるキナーゼ遺伝子融合変異が、放射線分子痕跡であるかどうかを検証するための、定量的遺伝子変異検出系の樹立を試みた。その結果、differential RT-PCRの実験条件を決定し、甲状腺乳頭がん細胞株に存在するRET/PTC1を高感度に検出し、本遺伝子変異検出系が、放射線照射による融合型遺伝子変異生成評価に有用である事を示した。

研究成果の概要(英文)：After the Fukushima Daiichi nuclear power plant accident, unexpected numbers of childhood thyroid cancers have been diagnosed during the mass ultrasound thyroid screening. In order to estimate possible association between childhood thyroid cancer and radiation exposure, it is indispensable for identify radiation signatures in those cancers. The aim of this study is to establish an experimental system, by which gene fusions creating oncogenic driver mutations are able to be detected. Considering the kinase fusion mutation is the most prevailing gene fusions in childhood thyroid cancers, differential RT-PCR technique using the primer pairs mapped on 5' region of RET and 3' kinase domain has been applied.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 ゲノム Driver変異 がん 甲状腺

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災に伴う東京電力福島第一原子力発電所の事故を受けて、事故当時18歳以下の子供たちを対象とした甲状腺超音波検査が行われている。先行検査結果としてまとめられた、平成26年12月31日までの検査結果では、極めて高い頻度で甲状腺がんが報告されている。放射線被ばくと小児甲状腺癌との関連は、1986年のチェルノブイリ原子力発電所の事故後の調査委によって明らかにされたが、事故後4~5年経ってから、小児甲状腺癌の診断数の増加が報告されるようになった。また、甲状腺の受けた推定の被ばく線量の分布は、今回の事故による被ばく線量の推定とは異なることから、これらの甲状腺がんは、甲状腺被ばく線量や、事故後の潜伏期間等を考えると、放射線の直接の影響であるとは考えにくい。

しかし、今後も見つかるであろう甲状腺がんでは、被ばくの影響であるかどうかを判断する一助として、がん細胞に残る放射線痕跡が極めて重要になる。とりわけ、放射線エネルギーの吸収によるゲノムの変化は、細胞分裂を経て子孫細胞に伝播され、放射線痕跡として体内に残されている可能性があるため、ゲノムに残された分子痕跡があるのか無いのか、もしあるとすれば、その痕跡にはどのような特徴があるのかを明らかにする必要がある。

最近のシーケンス技術の革新的進歩により、がん細胞で生じているゲノム変異が網羅的に解析できるようになり、点突然変異だけではなく、遺伝子融合型の変異も数多く同定されるようになってきた。例えば、世界的な規模で展開されている、がんゲノムアトラス(TCGA)プロジェクトでは、甲状腺乳頭がんを対象に、がん細胞に起こるDriverゲノム変異を解析し、特に、全年齢の甲状腺がんの特徴的ながんゲノム変異として、変異の15%強を占める遺伝子融合型の変異を同定した。小児の甲状腺癌では、さらに高い頻度で、遺伝子融合型変異の存在が確認されている。遺伝子融合型変異は、2ヶ所以上のDNA二重鎖切断により生成する事、放射線被ばくによるDNA損傷としてDNA二重鎖切断が最も特徴的であることから、これらdriver変異が、放射線起因の甲状腺がんに残る放射線痕跡として重要な分子変化になると考えられた。

しかしながら、チェルノブイリ原発事故後に発症した小児甲状腺がんのゲノム解析から、放射線起因のがんで同定された遺伝子融合型変異は、事故による放射線被ばくとは関連のない散発性(自然発生)の小児甲状腺癌でも高頻度に見いだされ、遺伝子融合型変異の検出率は、放射線起因の小児甲状腺がんと同様で散発性のケースで明らかでないという結論に至った。つまり、遺伝子融合型のDriver変異は、放射線被ばくの分子痕跡ではない可能性が示されたのである。そこで、遺

伝子融合型の変異が、実際に放射線を受けた正常ヒト甲状腺濾胞細胞で、どの程度誘発されるのか、また、放射線照射により誘発された遺伝子融合型変異には、放射線被ばくの痕跡が残されるのかどうか検討する必要があると考えるに至った。

2. 研究の目的

そこで本研究では、正常ヒト甲状腺濾胞細胞において、多様な融合遺伝子型変異を網羅的に検索する融合遺伝子型変異検出系を樹立し、遺伝子融合部位に残る分子痕跡を明らかにする事を目的とした。これまでも、融合遺伝子型変異誘発の検討が行われたことはあるが、甲状腺がん細胞株が用いられたり、SV40ウイルスにより無限増殖化された細胞が用いられたりしており、そもそも、ゲノム安定性の維持に決定的な役割を果たすp53機能が消失した条件下での限定的な検討であった。また、正常ヒト甲状腺組織片をSCIDマウスに移植して照射する実験系が用いられた事もあったが、数十Gyという線量が用いられているなど、いずれも、放射線影響の定量的評価系としては、決定的な欠点を有している。さらに、遺伝子融合部位の塩基配列の報告は、いずれもがん細胞での検討であり、変異が放射線起因であるという証拠は一切存在しない。そこで、本研究が目指す評価系は、従来手法とは一線を画す、いまだかつて誰も試みた事のない革新的な技術を用いた評価系として考えられ、正常ヒト甲状腺細胞において、組織幹細胞様の初期化細胞での、融合遺伝子型変異誘発の線量依存性と分子痕跡を決定できる定量的遺伝子変異検出系の樹立をめざす挑戦的研究の提案である。

3. 研究の方法

(1) Differential RT-PCRの条件決定

小児甲状腺がんで見られるRET融合遺伝子は、他の遺伝子融合型変異と同様に遺伝子融合ジャンクションの位置はゲノム上に限局されており、その多くがエクソン11~イントロン11の間にマップされる。このためまず、RET遺伝子5'上流側の膜貫通ドメイン(エクソン11)あるいは、細胞外ドメイン(エクソン10)に5'プライマーを設定し、一方、キナーゼドメイン(エクソン12)に3'プライマーを設定し、Primer Expressソフトウェアを用いてプライマー配列を設計した。

次に、differential RT-PCRの実験条件を決定するために、RET/PTC1変異を有する甲状腺乳頭がん(TPC-1)から、ISOGEN IIを用いてtotal RNAを抽出し、設計したプライマーによりRT-PCRを実施した。RNAからcDNAへの変換は、High Capacity RNA-to-cDNA kitを用いて行った。次いで、適量の反応液を分取し、SYBR Premix Dimer Eraserキットを用いて、real-time PCRを行った。RT-PCRは、リアルタイムPCR Eco(イルミナ社製)により実施した。PCRの初期条件として、変性お

よび伸長反応の温度をそれぞれ 95 と 72 に固定し、プライマーの Tm 値を考慮しながら、ハイブリダイゼーション温度を検討し、プロトコルを決定した。また、RT-PCR 増幅曲線から Ct 値を算出し、プライマーペアの最適化を行った。

(2) 甲状腺初期化細胞と放射線照射

甲状腺初期化細胞は、低血清混合培養液に、bFGF および数種の低分子阻害剤を添加して培養した。細胞は、分化が誘導されないように低密度で継代培養し、定期的に培地を交換する事によって、対数増殖状態を維持した。甲状腺乳頭がん細胞である TPC-1 は、10%血清を含む DMEM 培地中で培養維持した。混合培養では、TPC-1 と甲状腺初期化細胞を 1:10⁵~1:10⁶ までの比率で混合し、total RNA を抽出した後に、differential RT-PCR を行い、最低検出限界を検討した。

上記検討から確定された混合比をもとに、放射線照射後の細胞培養法を決定し、例えば、1:10⁵ の混合比で RET キナーゼドメインの増幅が確認された場合は、2x10⁶ 個の甲状腺初期化細胞を 0.1 Gy から 10 Gy の線量で照射し、0.5x10⁵ 個の生存細胞を、20~40 枚の 60mm ディッシュに分けて、1 週間程度培養し、その後、各ディッシュから、total RNA を ISOGEN II により抽出し、cDNA 合成反応を経た後に、確立した条件により differential RT-PCR を行い、RET キナーゼドメインに設定したプライマー特異的に RT-PCR 陽性になるディッシュを確定した。

(3) RET 発現陽性標本の融合遺伝子決定

前述の検討で陽性になった RT-PCR 産物を用いて、融合遺伝子の決定を行った。具体的には、3'プライマーとして、既にキナーゼドメインに設定したものを使い、一方、5'プライマーは、遺伝子特異的プライマーを個別に設計した。候補遺伝子としては、CCDC6 (PTC1)以外に、NCOA4 (PTC3)、TRIM24、RFG9、FKBP15、TBLX1XR1 および AKAP13 遺伝子を予定し、Primer Express ソフトウェアを用いてそれぞれの遺伝子に対して複数のエクソン用プライマーを設定した。

適量 (10 ng 程度) の PCR 産物を分取し、SYBR Premix Dimer Eraser キットを用いて、real-time PCR を行った。RT-PCR は、リアルタイム PCR Eco (イルミナ社製) により実施した。PCR の初期条件として、変性および伸長反応の温度をそれぞれ 95 と 72 に固定し、プライマーの Tm 値を考慮しながら、ハイブリダイゼーション温度を検討し、プロトコルの最適化を行った。サイクル数を、最大 35 回程度として増幅曲線の変化を追跡し、融合遺伝子の決定を試みた。

4. 研究成果

(1) Differential RT-PCR の条件決定

甲状腺がんにおける driver 変異として、

点突然変異と融合遺伝子型変異がよく知られているが、とりわけ小児甲状腺がんでは、半数近くのケースが融合遺伝子型変異であり、その多くが RET 遺伝子のキナーゼドメインを 3' 側下流に持つ。もともと RET 遺伝子は、神経細胞増殖因子の受容体をコードする遺伝子であるため、甲状腺濾胞細胞では発現がないか、あるいは発現があってもそのレベルが極めて低い。このため、融合遺伝子が driver 変異となるためには、5' 側上流に融合した遺伝子が恒常的に発現している遺伝子である必要がある。逆に言えば、RET 遺伝子発現の亢進を指標にして、遺伝子融合型 driver 変異を探索する事が可能になる。

これまでに報告がある多くの遺伝子融合と同様に、RET 融合遺伝子も遺伝子融合ジャンクションの位置はゲノム上に限局されており、その多くがエクソン 11~イントロン 11 の間にマップされる。このため、RET 融合遺伝子は、遺伝子 3' 側のキナーゼドメインを必ず含むような遺伝子融合をしている。実際に、小児甲状腺癌では、RET 蛋白質のキナーゼ活性の亢進が見られ、下流の MAP キナーゼ経路が活性化され、細胞増殖を亢進することによって Driver 変異として機能している。

そこで、まず、RET 遺伝子 5' 上流側の膜貫通ドメイン (エクソン 11) あるいは、細胞外ドメイン (エクソン 10) に 5' プライマーを設定し、一方、3' プライマーは、キナーゼドメイン (エクソン 12) に設定して、Primer Express ソフトウェアを用いてプライマー配列を設計した。Differential RT-PCR の実験条件を決定するために、PCR の初期条件として、変性および伸長反応の温度をそれぞれ 95 と 72 に固定し、設計したプライマーの Tm 値を考慮しながら、ハイブリダイゼーション温度を検討し、最適のプロトコルを模索した。また、RT-PCR 増幅曲線から Ct 値を算出し、3' プライマーのサイクル数が少なくとも 25 程度よりも小さく、5' プライマーと 3' プライマーの Ct 値の差が少なくとも 2 以上になるプライマーペアを選択するように試みた。

最適化した条件により、甲状腺乳頭がん細胞株である TPC-1 より得られた RNA から作成した cDNA を用いて検討した。その結果、3' プライマーの Ct 値が 25 程度なのに対し、5' プライマーによる値は 30 を超えることがわかった。TPC-1 は、RET/PTC1 をドライバー変異として有することが既にわかっており、本検出系が十分な検出感度を有していることが示された。

(2) 甲状腺初期化細胞と放射線照射

次に、確立した条件で、線照射した甲状腺初期化細胞において、融合遺伝子型変異の誘導を検出可能であることを確認した。甲状腺初期化細胞 (図 1) は、正常ヒト甲状腺濾胞に由来する濾胞上皮細胞で、低血清混合培養液に、bFGF および数種の低分子阻害剤を添

加して培養することにより、培養可能期間を飛躍的に改善した細胞である。高度な増殖能に加え、遺伝子発現のアレイ解析から、幹細胞に近い性質を有することが判明し、一度甲状腺濾胞細胞に分化した細胞が、上位の細胞に初期化した細胞であると考えている。

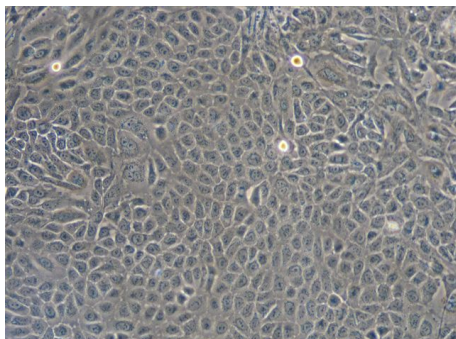


図1 甲状腺濾胞由来初期化細胞

細胞は、分化が誘導されないように低密度で継代培養しながら、定期的に培地を交換する事によって、対数増殖状態を維持した。

まず、TPC-1 と甲状腺初期化細胞を様々な比率で混合して培養し、total RNA を抽出した後に、differential RT-PCR を行い、最低検出限界率を検討した。その結果、3'プライマーを用いた場合に、TPC-1 細胞の混合比依存的に Ct 値が変化する事を確認し、一方で、5'プライマーを用いた同様の検討では、サイクル数に変化はなく、RT-PCR 反応特異性が確認された。

上記検討結果により、1:1000 程度の希釈率までの標本において検出が可能であることが判明したことから、放射線照射後の細胞培養法を決定した。具体的には、 2×10^6 個の甲状腺初期化細胞を 0.1 Gy から 10 Gy の線量で照射し、 0.5×10^5 個の生存細胞を、20~40 枚の 60mm ディッシュに分けて、1 週間程度培養した。その後、各ディッシュから、total RNA を ISOGEN II により抽出し、cDNA 合成反応を経た後に、確立した条件により differential RT-PCR を行い、RET キナーゼドメインに設定したプライマー特異的に RT-PCR 陽性になるディッシュを確定した。

(3) RET 発現陽性標本の融合遺伝子決定

前述の検討で陽性になった RT-PCR 産物を用いて、融合遺伝子の検討を行った。具体的には、3'プライマーとして、既にキナーゼドメインに設定したものを使い、一方、5'プライマーは、遺伝子特異的プライマーを個別に設計した。候補遺伝子としては、*CCDC6* (*PTC1*)、*NCOA4* (*PTC3*)、*TRIM24*、*RFG9*、*FKBP15*、*TBLX1XR1* および *AKAP13* 遺伝子を対象とし、Primer Express ソフトウェアを用いてそれぞれの遺伝子に対して複数のエクソン用プライマーを設定した。

適量 (10 ng 程度) の PCR 産物を分取し、SYBR Premix Dimer Eraser キットを用いて、real-time PCR を行った。RT-PCR は、リアルタイム PCR Eco (イルミナ社製) により実施し、PCR の初期条件として、変性および伸長反応の温度をそれぞれ 95 と 72 に固定し、プライマーの T_m 値を考慮しながら、ハイブリダイゼーション温度を検討し、プロトコルの決定を試みた。サイクル数を、最大 35 回として増幅曲線の変化を追跡し、融合遺伝子の決定を行った。

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)

Iyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko V, Suzuki K, Ashizawa M, Ookouchi C, Suzuki S, Mizunuma H, Fukushima T, Suzuki S, Yamashita S. Identification of Three Novel Fusion Oncogenes, SQSTM1/NTRK3, AFAP1L2/RET, and PPF1BP2/RET, in Thyroid Cancers of Young Patients in Fukushima. *Thyroid*, 27, 811-818, 2017. 査読あり
DOI: 10.1089/thy.2016.0673

Matsuse M, Yabuta T, Saenko V, Hirokawa M, Nishihara E, Suzuki K, Yamashita S, Miyauchi A, Mitsutake N. TERT promoter mutations and Ki-67 labeling index as a prognostic marker of papillary thyroid carcinomas: combination of two independent factors. *Sci Rep.* 7, 41752, 2017. 査読あり
DOI: 10.1038/srep41752.

Yamauchi M, Shibata A, Suzuki K, Suzuki M, Niimi A, Kondo H, Miura M, Hirakawa M, Tsujita K, Yamashita S, Matsuda N. Regulation of pairing between broken DNA-containing chromatin regions by Ku80, DNA-PKcs, ATM, and 53BP1. *Sci Rep.* 7:41812, 2017. 査読あり
DOI: 10.1038/srep41812.

Hendry JH, Niwa O, Barcellos-Hoff MH, Globus RK, Harrison JD, Martin MT, Seed TM, Shay JW, Story MD, Suzuki K, Yamashita S. ICRP Publication 131: Stem cell biology with respect to carcinogenesis aspects of radiological protection. *Ann ICRP.*, 45, 239-252, 2016. 査読あり
DOI: 10.1177/0146645315621849.

[学会発表](計2件)

Suzuki K. Plasticity of thyroid follicular cells and radiation carcinogenesis. *Radiation Protection Week*, Oxford, 2016.

鈴木啓司、小児甲状腺癌の Driver 変移に残る放射線痕跡、日本放射線影響学会第 59 回大会、2016 年

〔図書〕(計 1 件)

Suzuki K. Analyzing ATM Function by Electroporation of Endonucleases and Immunofluorescence Microscopy. *Methods Mol Biol.* 1599, 85-96, 2017.
DOI: 10.1007/978-1-4939-6955-5_7.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 啓司 (SUZUKI, Keiji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授
研究者番号：00196809