

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007～2009

課題番号：19591525

研究課題名（和文） 原爆被爆者に発生した甲状腺がんの分子腫瘍学的研究

研究課題名（英文） Molecular oncological study of thyroid cancer among atomic bomb survivors

研究代表者

濱谷 清裕 (HAMATANI KIYOHRO)

財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・細胞生物学研究室長

研究者番号：80344414

研究成果の概要（和文）：放射線関連成人甲状腺乳頭癌の遺伝子変異に関する特徴を明らかにするため、発癌の初期段階に生じる遺伝子変異に焦点を当て解析を行った。被曝線量の増加に伴い、*RET* 遺伝子の 3' 部位が別の遺伝子の 5' 部位に結合したキメラ遺伝子 (*RET/PTC* 再配列) を持つ症例の頻度が有意に増加し、他方散発性(放射線被曝のない)成人甲状腺乳頭癌で頻繁に検出される *BRAF* 点突然変異を持つ症例は有意に減少することを見出した。

研究成果の概要（英文）：To clarify characteristics of gene alterations in adult-onset radiation-associated papillary thyroid cancer, molecular analyses were conducted focusing on gene alterations occurring at early stage of carcinogenesis. We found that cases having chimera gene (*RET/PTC* rearrangements) formed by fusion of 3' region of *RET* gene to 5' region of other genes significantly increased with increase of exposure dose, while cases with *BRAF* point mutation, which is frequently detected in sporadic (non-exposed) adult-onset papillary thyroid cancer, significantly decreased with exposure dose.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：放射線関連成人甲状腺乳頭癌 染色体再配列 *RET/PTC* 再配列 再配列型 *ALK* 点突然変異 *BRAF* 点突然変異 原爆被爆者

1. 研究開始当初の背景

(1) 甲状腺癌は放射線被曝に強くに関連した癌の一つであり、原爆被爆者でもそのリスクは高いことが見出されている。組

織病理学的にはチェルノブイリ小児甲状腺癌で見られた充実性甲状腺癌はほとんど見られず、日本の一般集団における甲状腺癌同様、多くは乳頭腺癌であ

- た。
- (2) ① 多くの成人甲状腺乳頭癌ではMAPキナーゼシグナル経路の活性化を誘起する *BRAF* 点突然変異あるいは *RET/PTC* 再配列のいずれかが見られる。
- ② *RET* 遺伝子の再配列が *in vitro* および *in vivo* の X 線照射によりヒト正常甲状腺細胞に誘導される。
- ③ チェルノブイリ事故後の小児甲状腺癌では、潜伏期間が短くかつ充実型型の甲状腺乳頭癌に *RET/PTC3* 再配列が高頻度で見出されたが、成人の放射線関連甲状腺癌での *RET/PTC* 再配列の関与は明確でない。
- ④ 放射線被曝歴の有無に関わらず、小児甲状腺癌では *BRAF* 点突然変異はほとんど見られない。
- ⑤ 一般集団の成人甲状腺乳頭癌では、*BRAF* 変異は高頻度に検出されるが、*BRAF* 変異に対する放射線の影響は成人甲状腺乳頭癌では明確でない。
- ⑥ 被曝者を含めた放射線被曝歴のある成人甲状腺乳頭癌における遺伝的不安定性は明確にされていない。
- (3) 我々は保存ホルマリン固定・パラフィン包埋組織より抽出した RNA の効率的な RT-PCR 増幅法を確立した。放射線関連甲状腺乳頭癌の機構をよりよく理解するために、原爆被曝者甲状腺乳頭癌の遺伝子変異を、被曝線量を含む種々の疫学因子との関連について解析しその特徴を明らかにする。

2. 研究の目的

- (1) MAP キナーゼシグナル経路の活性化に関連する *RET/PTC* 再配列、*NTRK1* 再配列、*BRAF* 点突然変異および *RAS* 点突然変異などの解析を行い、放射線量および潜伏期間を含む病理疫学因子との関連を検討することにより、被曝者甲状腺乳頭癌における遺伝子変異の特徴を明らかにする。
- (2) *in vitro* の照射実験系を用いて放射線関連甲状腺乳頭癌における *RET/PTC* 再配列と変異 *BRAF* の生物学的役割の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 保存ホルマリン固定・パラフィン包埋甲状腺乳頭癌の組織切片から癌部と非癌部をレーザーナ・キャプチャー・マイクロディセクションにより切り取った。
- (2) *RET* と *NTRK1* 遺伝子の再配列は遺伝子特異的プライマーを用いた RT-PCR により解析した。
- (3) 3'末端のキナーゼ領域の発現が検出されるが既知の再配列型を示さない癌症

- 例については、改良型の 5' RACE 法を用いてそのパートナー遺伝子を同定した。
- (4) *BRAF* および *RAS* 遺伝子の点突然変異は PCR 産物の直接塩基配列解析によって調べた。
- (5) *RET/PTC1* あるいは変異 *BRAF* を組み込んだ発現ベクターを作製した。種々のリポフェクション試薬を用いて遺伝子導入を行い、導入効率を検討した。*RET/PTC1* 発現ベクターを照射あるいは非照射のマウス甲状腺初代培養細胞にトランスフェクトし、安定なトランスフォーマントを確立後、トランスフォーマントに対する放射線被曝の影響を、造腫瘍能を指標に調べる。

4. 研究成果

- (1) 解析した被曝者成人甲状腺乳頭癌を次の3つのグループに分け、被曝線量との関連を検討した：染色体再配列（主に *RET/PTC* 再配列）を有する甲状腺乳頭癌、点突然変異（主に *BRAF* 点突然変異）を有する癌および遺伝子変異が未同定、即ち *RET*、*NTRK1*、*BRAF* および *RAS* 遺伝子に変異を持たない癌である。染色体再配列のグループの相対頻度は被曝線量の増加に伴い、有意に増加した（コクラン・アミテージの検定、 $P_{傾向} < 0.001$ ）（図1）。他方、点突然変異（主に *BRAF* 点突然変異）のグループの相対頻度は被曝線量とともに有意に減少した（コクラン・アミテージ検定、 $P_{傾向} < 0.001$ ）。興味あることに、遺伝子変異が未同定のグループの相対頻度は被曝線量の増加に伴い、増加する傾向が見られた（コクラン・アミテージ検定、 $P_{傾向} = 0.08$ ）。放射線関連甲状腺癌の解析において、被曝の有無だけでなく、被曝線量と遺伝子変異の頻度との関連を明らかにしたのはこの研究が初めてである。これらの知見より高線量被曝では放射線によって誘発される染色体再配列、特に *RET/PTC* 再配列が成人の甲状腺乳頭癌において重要な役割を果たすと考えられる。

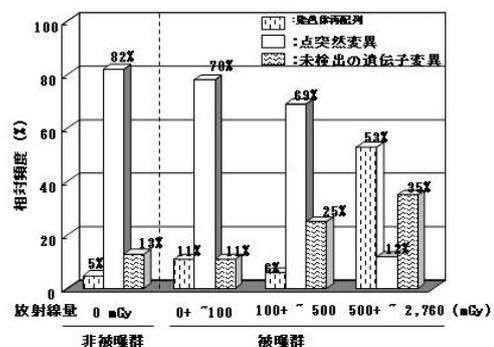


図1 被曝線量別遺伝子変異の頻度

(2) 被曝から発症までの期間の長さに対する反応も、これら3つのグループ間で異なつた。点突然変異を有するグループの相対頻度は被曝から発症までの期間が長くなるとともに有意に増加した(コクラン・アミテージ検定、 $P_{傾向} = 0.004$)(図2)。一方、遺伝子変異が未同定のグループの相対頻度はその期間が長くなるとともに減少する傾向を示した(コクラン・アミテージ検定、 $P_{傾向} = 0.05$)。染色体再配列を持つグループは被曝後20-25年にピークを示めした。被曝から発症までの期間の長さとその遺伝子変異の頻度との関係を明らかにしたのは初めてであり、放射線関連成人甲状腺乳頭癌の機構を理解するのに大いに貢献すると考えられる。

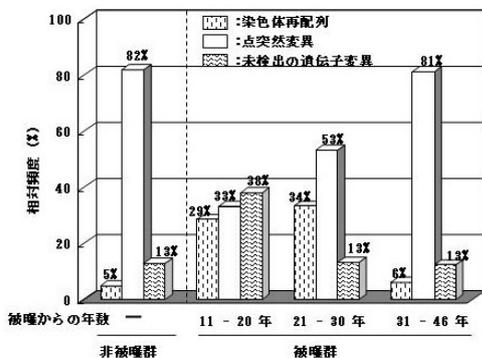


図2 遺伝子変異の型と被曝から発症までの期間の長さとの関係

- (3) 我々は高線量被曝の甲状腺乳頭癌で新規の *RET* 再配列 (*ACBD5-RET* キメラ遺伝子) を発見した。*ACBD5-RET* キメラ遺伝子は他の *RET/PTC* 再配列と同様に、二量体を形成し MAP キナーゼ (ERK1, ERK2) のリン酸化を亢進させること、また造腫瘍能を持つことが判明した。
- (4) 遺伝子変異が未同定の被曝甲状腺乳頭癌症例の一部に、これまで甲状腺癌では報告されていない未分化リンパ腫キナーゼ (*ALK*) 遺伝子の再配列を見出した。非被曝甲状腺乳頭癌症例ではこの変異は検出されなかつた。このことより *ALK* 遺伝子再配列は放射線関連成人甲状腺乳頭癌における新たな重要な遺伝子変異である可能性が示唆された。
- (5) 6種類のリポフェクション試薬について、マウス甲状腺初代培養細胞へのトランスフェクション効率を EGFP 蛍光マーカーを指標に検討した結果、トランスフェクタミン (インビトロジェン) を用いた遺伝子導入が細胞障害も少なく、最もその効率が高かつた。トランスフェクタミ

ンを用いて *RET/PTC1* 発現ベクターをマウス甲状腺初代培養細胞に導入することにより、小さな G418 耐性コロニーを得ることが出来たが、高い増殖能を持つトランスフォーマントを得ることは出来なかつた。今後培養系の改良により安定なトランスフォーマントの確立を目指す。*RET/PTC* 再配列を持つ安定なトランスフォーマントの確立は放射線関連甲状腺乳頭癌の機構解析に大いに寄与すると考える。

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 5件)

- ① Hamatani K, Eguchi H, Mukai M, Koyama K, Taga M, Ito R, Hayashi Y, Nakachi K: Improved method for analysis of RNA present in long-term preserved thyroid cancer tissue of atomic-bomb survivors. *Thyroid* 査読有 20: 43-49, 2010
- ② Hamatani K, Takahashi K, Mukai M: Mechanisms of development of human adult-onset radiation-associated papillary thyroid cancer - Characteristics in early molecular events-. *Radiation Biology research Communications* 査読無 44: 379-395, 2009
- ③ Hamatani K, Eguchi H, Ito R, Mukai M, Takahashi K, Taga M, Imai K, Cologne J, Soda M, Arihiro K, Fujihara M, Abe K, Hayashi T, Nakashima M, Sekine I, Yasui W, Hayashi Y, Nakachi K: *RET/PTC* rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose. *Cancer Res* 査読有 68: 7176-7182, 2008
- ④ Nakachi K, Hayashi T, Hamatani K, Eguchi H, Kusunoki Y: Sixty years of follow-up of Hiroshima and Nagasaki survivors: Current progress in molecular epidemiology studies. *Mut Res* 査読有 659: 109-117, 2008
- ⑤ Takahashi K, Eguchi H, Arihiro K, Ito R, Koyama K, Soda M, Cologne J, Hayashi Y, Nakata Y, Nakachi K, Hamatani K: Comparison of papillary thyroid carcinomas among atomic bomb survivor patients with and without *BRAF* gene mutation. *Mol Carcinogenesis* 査読有 46: 242-248, 2007

[学会発表] (計 10件)

- ① Hamatani K, Takahashi K, Taga M, Ito R, Nakachi K: Molecular oncological analysis of adult-onset papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors. 68th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. 1 October-3 October 2009, Yokohama, Japan
- ② Hamatani K, Takahashi K, Taga M, Ito R, Hayashi Y, Nakachi K: Molecular oncology study on adult-onset papillary thyroid cancer among atomic-bomb survivors. 34th Annual Meeting of the European Thyroid Association. 5 September-9 September 2009, Lisbon, Portugal
- ③ Takahashi K, Taga M, Ito R, Nakachi K, Hamatani K: Chromosomal rearrangements and amplification of *PIK3CA* gene in papillary thyroid cancer among atomic-bomb survivors. 52nd Annual Meeting of Japan Radiation Research Society. 11 November-13 November 2009, Hiroshima, Japan
- ④ Hamatani K, Takahashi K, Eguchi H, Taga M, Ito R, Imai K, Nakachi K: Molecular characteristics in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors. The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 28 October-30 October 2008, Nagoya, Japan
- ⑤ Hamatani K, Eguchi H, Cologne J, Soda M, Abe K, Hayashi T, Nakashima M, Sekine I, Hayashi Y, Nakachi K: Gene alterations preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors. 49th Late A-bomb Effects Research Meeting. 8 June 2008, Nagasaki, Japan
- ⑥ Takahashi K, Taga M, Ito R, Imai K, Nakachi K, Hamatani K: Analysis of RAS point mutations in papillary thyroid cancer among atomic-bomb survivors. 15th The Joint Meeting for Cancer prevention. 22 May-23 May 2008, Fukuoka, Japan
- ⑦ Hamatani K, Eguchi H, Taga M, Nakachi K: Gene Alterations Preferentially Occurred in Papillary Thyroid Cancer among Atomic Bomb Survivors. 13th International Congress of Radiation Research. 8 July-12 July 2007, San Francisco, USA
- ⑧ Hamatani K, Eguchi H, Taga M, Ito R, Imai K, Takahashi K, Abe K, Fujihara M, Arihiro K, Nakachi K: Gene alterations preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic-bomb survivors. The 66th Annual Meeting of the

Japanese Cancer Association. 3 October-5 October 2007, Yokohama, Japan

- ⑨ Nakachi K, Hayashi T, Hamatani K, Eguchi H, Kusunoki Y: HIROSHIMA 60 YEARS: Monitoring of Survivors - Current Progress in Molecular Epidemiology Studies. 5th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations. 20 May-24 May 2007, Antalya, Turkey
- ⑩ Takahashi K, Eguchi H, Imai K, Hayashi Y, Nakachi K, Hamatani K: Gene alterations preferentially occurred in adult-onset papillary thyroid cancer among atomic-bomb survivors. 8th Korea-Japan Cancer and Aging Symposium. 10 August-11 August 2007, Gifu, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱谷 清裕 (HAMATANI KIYOHIRO)
財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・細胞生物学研究室長
研究者番号: 80344414

(2) 研究分担者

伊藤 玲子 (ITO REIKO)
財団法人放射線影響研究所・放射線生物学/分子疫学部・研究員
研究者番号: 30283790

(3) 連携研究者

早田 みどり (SODA MIDORI)
財団法人放射線影響研究所・長崎疫学部・副部長
研究者番号: 00359457
江口 英孝 (EGUCHI HIDETAKA)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00260232