

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20454

研究課題名(和文) 中性子線誘発肺癌における融合遺伝子の探索

研究課題名(英文) Searching for fusion genes in neutron irradiation-induced lung cancer.

研究代表者

鈴木 健之 (SUZUKI, Kenshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線影響研究部・研究員

研究者番号：20726442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいくつかの異なる線種を用いた大規模マウス照射実験を行っており、この実験にて得られた肺癌サンプルを多数保管している。本研究ではこのうち自然発生した肺癌ならびに、各種照射群に生じた肺癌の中でも極めて悪性度の高い肺腺癌を選別し、これらのサンプルのRNAシーケンス解析をもって融合遺伝子の探索を行った。解析の結果、照射群の腫瘍に認められる多数の融合遺伝子の候補を検出した。今後は候補の中から、実際ががん化に関わるものを選別し、融合遺伝子が発生しやすいゲノム配列パターンの特徴を明らかにしていく予定である。そして肺癌の増殖に如何に関与しているかなどの機能的特徴を捉える解析を進めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、放射線誘発がんのアーカイブとして整理、保存してきた線量評価が確かかつ発がん要因の明確な動物個体に生じたがんを解析することに特色がある。様々なモデル動物に誘発された腫瘍を体系的に保存したアーカイブは、世界的にも他に類を見ないものであるが、特に中性子線照射実験によって得られたサンプルは、照射由来の施設の希少性からも、国内外を通して非常に貴重なものとなっている。非照射群と中性子線照射群に生じた腫瘍との比較解析により、被ばくに特異的なゲノム異常や発がんメカニズムの存在を探索できるという意味で本研究の持つ学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We have conducted large-scale irradiation experiments on mice using various types of radiation and have stored mouse lung cancer samples obtained from these experiments. In this study, we selected lung adenocarcinomas from unirradiated or irradiated groups and searched for fusion genes by RNA sequence analysis of these samples. As a result of the analysis, we were able to identify a number of candidate fusion genes in lung cancers from irradiated group. In the future, we plan to select from among these candidates those that actually function in oncogenesis and to characterize the genomic sequence patterns that tend to give rise to fusion genes. We are also planning to analyze the functional characteristics of the genes, such as how they are involved in the growth of lung cancer.

研究分野：放射線生物学

キーワード：融合遺伝子 中性子線 肺癌 放射線 マウス

1. 研究開始当初の背景

国際宇宙ステーション (ISS) の運用は 2024 年をもって終了し、次の宇宙開発は月面、そして火星へと、より遠方の領域へと進出して行く。その際に脅威となるのは宇宙放射線の被ばくである。飛行士は様々な線種の放射線の脅威に晒されるが、中でも船壁に粒子線が衝突することによって生じる中性子線は総被曝線量の 30-60% を占めるにも関わらず、現時点で RBE のデータは不足しており、疫学調査も存在しない線種である。中性子線被ばくは、宇宙に関わらず、年々増加傾向にある粒子線治療においても無視出来ない問題である。(図1) 腫瘍形に絞った照射をする特質上、金属物質との衝突の際生じる二次粒子を防ぐことは難しく、患者は少なからずその粒子に被ばくする恐れがある。つまり中性子線の発がんリスク評価は線量評価と並んで重要な課題であり、導かれる成果の社会的な意義は大きい。しかし実際のところ、中性子線誘発がんのリスク評価研究は少なく、まだ分子機構が明らかになっていない部分が多い。放射線は DNA に傷をつけるが、その際に特異的転座が起きることがあり、融合遺伝子を生じさせると考えられている。放射線発がん感受性が高い臓器である肺ですでにいくつかの有名な融合遺伝子が治療方針の判断に用いられていることから融合遺伝子は放射線誘発肺がんにおいて重要な driver 遺伝子となることが推定される。

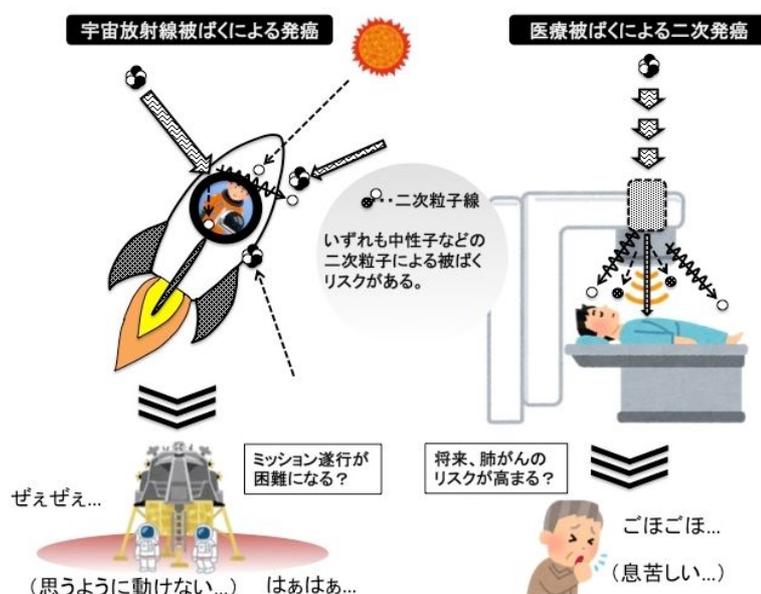


図 1. 宇宙空間や放射線医療における二次粒子線の被ばく

2. 研究の目的

本研究ではマウスを用いた放射線発がん実験で収取した肺がんサンプルを用いて、中性子線の発がんリスクを評価し、さらにそれらのサンプルから融合遺伝子の探索と好発配列パターンの同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では B6C3F1 マウスに自然発生した肺がん、放射線によって生じたと考えられる肺がんについて解析を行った。B6C3F1 は、オスの C57BL/6NCrICrIj マウスとメスの C3H/HeNCrICrIj マウスを交配することによって生成されたマウスである。我々はこれまでに様々な線種を用いて、作出された雌雄マウスに対する大規模な照射実験を行っており、1, 3, 7, 15 週齢での照射で得られたマウス肺がんサンプルを多数保管している。本研究ではまず若齢成体期にあたる 7 週齢照射で得られた肺がんサンプルに注目し、リスク評価と融合遺伝子の検索を行った。方法は以下のとおりである (図 2)。

(1) 放射線誘発肺がんの生物学的効果比 (RBE) の算出

非照射コントロールに加えて、ガンマ線照射 (0.2, 0.5, 1, 2, 4Gy) そして中性子線照射 (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1Gy) を行ったマウスの終生飼育の過程で、瀕死状態または死亡した個体から肺がんを含むほぼ全ての臓器を抽出し、病理組織スライドを作成した。それらはデジタル

データに変換した上で、解剖時のカルテ情報とともにデジタルアーカイブとして保存した。

その後、病理医の助言を得ながら、デジタルデータ化された HE 染色像をもとに、肺がんの病理組織型の診断を行い、腺腫と腺癌の鑑別を行った。そして、COX 比例ハザードリスク解析により、ガンマ線 (137 Cs) および中性子線 (2MeV) の肺がんリスクのハザード比を算出した。

最終的にガンマ線ならびに中性子線の線量毎に得られるハザード比の数値をもとに、ガンマ線、中性子線それぞれの線量反応直線の傾きから生物学的効果比 (RBE) を算出した。

(2) 放射線誘発肺がんにおける融合遺伝子の網羅的探索と好発配列パターンの同定

(1)の結果に基づき、より悪性度の高いと考えられる肺腺癌サンプルを選択する。融合遺伝子の検出を行うためには、サンプルの量と質が重要であるため、解析に用いるサンプル選別の条件として、RNAを回収するに足る、鮮度が保された状態で凍結されたサンプルであること。解析条件に足る充分量の RNA (5 μ g 以上) が回収出来るサンプルであること。正常部分の入り込みが少ない、また壊死病変を含まず、間質の少ないサンプルに限定することにした。

さらに上記の条件をクリアしたサンプルについても癌病巣からの組織としての純度も上げるため、マイクロダイセクション法を用いて正常組織や間質部分を除いた組織からの RNA 抽出とした。

得られた RNA 溶液はエタノール沈殿、精製をし、さらに分解の度合いを見るために電気泳動によるクオリティチェックを行った。純度、濃度、質が確保出来たサンプルについて RNA-seq 解析を行い、アライメントされたペアリードのゲノム上の位置によって融合遺伝子候補を同定する解析ソフト (STAR-Fusion) を用いて融合遺伝子の検出を行った。

～研究の材料と方法～

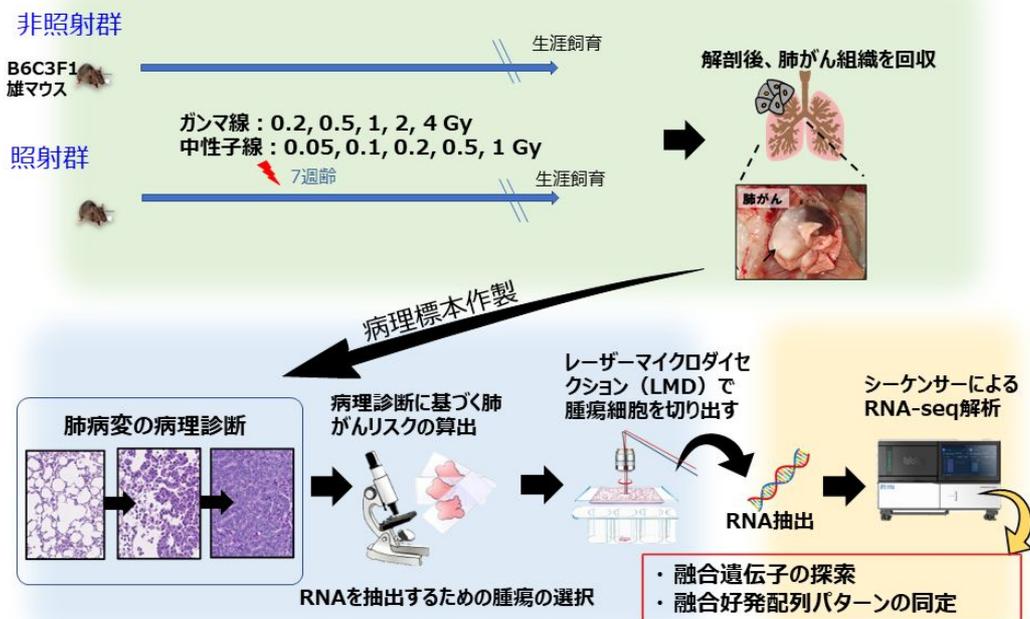


図 2. 研究の材料と方法

(1)放射線誘発肺がんの生物学的効果比の算出

Cox 回帰法により、放射線の種類と線量ごとに肺病変の発生に関するハザード比を算出したところ、中性子線照射雌マウスのガンマ線、中性子線照射雄・雌マウスの肺腺癌について線形線量反応曲線が得られた。サンプル数が少ないため、4 Gy ガンマ線照射のハザード比を除いて近似曲線を得ることができた。実際、4Gy ガンマ線照射の値を除外することにより、線形適合性は改善された (AIC 値) (表 1)。次に、ハザード比のデータを用いて、肺病変の発生に対する相対的生物学的効果 (RBE) 値を算出したところ、中性子 (平均エネルギー 約 2MeV) の影響はガンマ線の約 4-5 倍であることが明らかとなった (表 1)。

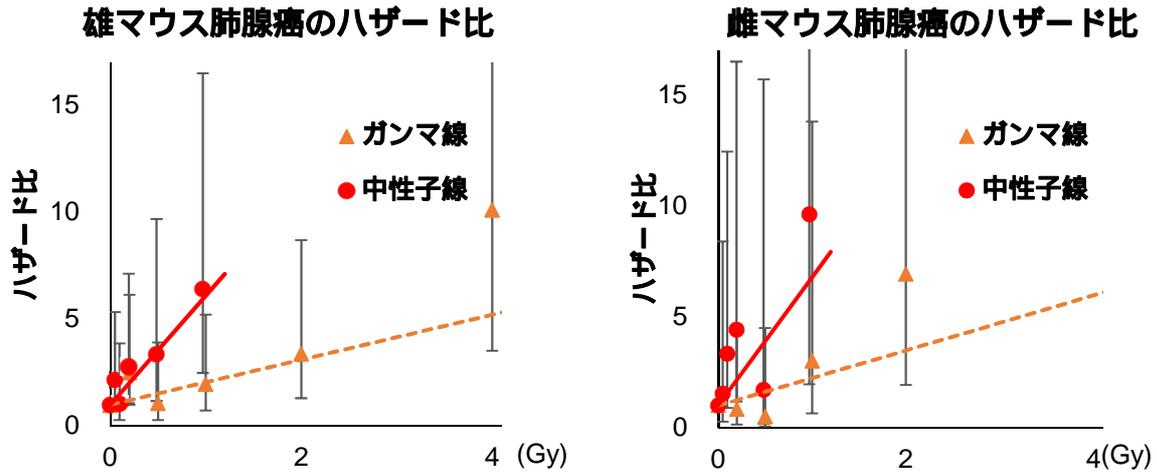


図 3 . ガンマ線ならびに中性子線照射マウスのハザード解析

性別	病変	直線の傾き		RBE (95%CI)	AIC ^a	
		ガンマ線	中性子線		L-model ^b	LQ-model ^c
雄	肺腺癌	1.05	5.1	4.78 (2.02, 11.32)	1112.65	1113.76
雌	肺腺癌	1.24	5.77	4.57 (1.14, 18.28)	611.42	612.91

表 1 . 肺腺癌発生の中性子線 RBE 値

^aAIC ; 値が小さい程、モデルのフィット率が良いことを示す。

^bLinear model ; $1 + D$

^clinear-quadratic model ; $1 + D + D^2$ 、ここで D は線量を示す。

(2)放射線誘発肺がんにおける融合遺伝子の網羅的探索と好発配列パターンの同定

解析においては正常組織の部分ができる限り少なくして、癌病巣の純度を確保するため、マイクロダイセクション法により、簡易染色後の病理スライドから、癌の病巣のみから抽出した RNA を用いた。RNA シーケンス解析の結果、放射線誘発癌にのみ見られる 200 超の融合遺伝子の候補をあげることが出来た。

回収したデータは Junction Read Count (融合ブレイクポイントを定義する RNA-Seq リードの分割数) の値が大きいものから見ていき、今回の検証ではその値が 10 を越える候補 (約 50 個) に絞り込むことにした (表 1)。

#FusionName	JunctionReadCount	SpanningFragCount	SpliceType	LeftGene	LeftBreakpoint	RightGene
Gm13456-- Gm26384	221	0	INCL_NON_REF_SPLICE	Gm13456*ENSMUSG00000082536.1	chr2:40557267:+	Gm26384*ENSMU
Gm19027-- AC124512.1	72	0	INCL_NON_REF_SPLICE	Gm19027*ENSMUSG00000099562.1	chr1:79505832:-	AC124512.1*ENSI
Igkv14-126-- Igj2	60	0	INCL_NON_REF_SPLICE	Igkv14-126*ENSMUSG00000094345.2	chr6:67896639:+	Igj2*ENSMUSG00
8430429K09Rik- -Ndufc2	47	0	INCL_NON_REF_SPLICE	8430429K09Rik*ENSMUSG00000034587.8	chr11:3479665:+	Ndufc2*ENSMUSC
Igkv19-93--Igj2	26	0	INCL_NON_REF_SPLICE	Igkv19-93*ENSMUSG00000098814.2	chr6:68736303:-	Igj2*ENSMUSG00

表 1 . RNA-seq 解析結果の一部 (中性子線照射群における融合遺伝子の候補と Junction Read Count 値)

自然誘発肺がんから検出された融合遺伝子の候補と比較を行い、同じ変異と認められた場合は、放射線によって生じた融合遺伝子の候補からは外した。

Junction Read Count の値が大きいものであっても、融合したそれぞれの遺伝子名がデータベース上で確定していないものについては、候補から外した。

それらのスクリーニングを経て、上がってきた 3 個の候補については精査をし、UCSC Genome Browser 等のゲノム情報サイトに展開されているゲノム配列のデータと照らし合わせ、融合している 2 つの遺伝子が結合部位の読み枠がアミノ酸をコードしているか否かの確認を行った。

結果、ガンマ線照射群に生じた肺がんからは、ヒトの肺がん発生にも寄与する遺伝子 A が含まれる融合遺伝子の候補が見つかった。また、中性子線照射群に生じた肺がんからは、既知のヒト肺がん融合遺伝子にも見られる、遺伝子 B を含む融合遺伝子の候補を上げることが出来た。

それぞれの融合遺伝子の候補は、各線種で生じた肺がんでのみ見つかった変異であり、線質の違いで異なる融合遺伝子が生じる可能性がある。今後は、自然発生、ガンマ線、中性子線群に生じた肺がんそれぞれで上がってきた融合遺伝子の候補を比較しつつ、融合遺伝子が発生しやすいゲノム上の配列パターンを見出していく予定である。

今後の詳細な検討によっては放射線の被ばくリスクを評価するための分子指標の検出につながる可能性がある。続く解析では候補として上がってきた融合遺伝子のリストから、それらの遺伝子の結合配列の特徴を捉えることとする。そして実際に、肺がんの増殖にどのように関与しているか、などの機能的な特徴を捉えるための解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木 健之, 臺野 和広, 甘崎 佳子, 森岡 孝満, 山田 裕, 柿沼 志津子
2. 発表標題 高LET放射線により生じたマウス肺がんのリスクとそのメカニズム
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第35回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenshi Suzuki, Takamitsu Morioka, Kazuhiro Daino, Yutaka Yamada, Tatsuhiko Imaoka, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma,
2. 発表標題 異なるLETの放射線に被ばくしたマウスにおける肺がんのリスクとそのメカニズム : Egfr経路の活性化と核異常の増加
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 健之, 臺野 和広, 甘崎 佳子, 山田 裕, 島田 義也, 柿沼 志津子
2. 発表標題 炭素線誘発マウス肺がんのリスクとそのメカニズム
3. 学会等名 第1回 日本量子医科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki Kenshi, Daino Kazuhiro, Morioka Takamitsu, Kakinuma Shizuko
2. 発表標題 Lung cancer risk in mice after low-dose-rate irradiation
3. 学会等名 第64回日本放射線影響学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenshi Suzuki, Takamitsu Morioka, Kazuhiro Daino, Yutaka Yamada, Tatsuhiko Imaoka, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma,
2. 発表標題 異なるLETの放射線に被ばくしたマウスにおける肺がんのリスクとそのメカニズム：Egfr経路の活性化と核異常の増加
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenshi Suzuki, Shunsuke Yamazaki, Ken-ichi Iwata, Yutaka Yamada, Takamitsu Morioka, Kazuhiro Daino, Yoshiko Amasaki, Mari Ogawa, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma
2. 発表標題 Genomic and histopathological features of lung tumors in mice irradiated with different types of radiation
3. 学会等名 65th RRS annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木 健之	4. 発行年 2019年
2. 出版社 公益社団法人 日本アイソトープ協会	5. 総ページ数 2
3. 書名 Isotope News [No.762] 2019年4月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------