

令和元年6月3日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26293142

研究課題名(和文) チェルノブイリ小児甲状腺がんにおけるDNA修復関連遺伝子群の分子遺伝疫学研究

研究課題名(英文) The molecular epidemiological study of DNA repair-related genes in post-Chernobyl radiation-induced thyroid cancers

研究代表者

光武 範史 (MITSUTAKE, Norisato)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授

研究者番号：50404215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：チェルノブイリ原発事故後、放射線被ばく後に発症した小児甲状腺癌症例56例のゲノムDNA、同地域に住み被ばくしたが発症していないコントロール55例のゲノムDNAを用い、次世代シーケンシングにより変異データを取得した。発癌に関連するいくつかの候補遺伝子が見つかったが、さらなる検証が必要である。DNA修復関連遺伝子群には明らかな変異の集積は確認できなかった。非常に貴重な試料の網羅的ゲノム解析データを得ることが出来、今後の継続した研究についての基盤を確立することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺癌は、放射線被ばくによって発症したということが非常に明確な貴重な症例である。この地域では多くの方が被ばくしたが、限られたごく一部の人のみが癌を発症した。この癌発症に関連する遺伝的な背景(個人の体質)を明らかにすることがこの研究の目的であった。明確な原因となる遺伝子を発見することは出来なかったが、これらの非常に貴重なサンプルについて多数の網羅的ゲノムデータを取得することが出来、今後の研究基盤として大いに役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mutation data were obtained by next-generation sequencing using genomic DNA of 56 post-Chernobyl radiation-induced pediatric thyroid cancer cases and 55 controls who were also lived in the same area and exposed but without development of thyroid cancer. Although several candidate genes related to carcinogenesis were found, further research is needed. No obvious accumulation of mutations was identified among DNA repair genes. Through this project, we were able to acquire comprehensive genomic data of the invaluable samples and established the basis of continuous research in future.

研究分野：内分泌腫瘍学

キーワード：甲状腺癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷修復システムに異常を持つ各種遺伝性疾患が存在する。最近まで、これら疾患責任遺伝子の片方だけに変異を持つキャリア（患児の両親など片方のアレルは正常で、もう片方のアレルにしか変異を持たないヘテロ接合体）は、通常は健康で何ら症状を現すことはないと思われていた。ただし極めて限られた遺伝子でのみ、片側アレルの変異で易発がん性となるものが報告されている。乳がん・卵巣がんの頻度が上昇する BRCA1 や BRCA2 の変異、また小児網膜芽細胞腫の Rb 遺伝子等がこれに当たる。

しかしながら、劣性遺伝病の遺伝子に関しても一部の疾患、例えば XP 患者の両親（ヘテロ接合体）が日焼けしやすいといった報告や、大規模な疫学調査によると血管拡張性アタキシア (AT) やナイミーヘン症候群 (NBS) のヘテロ接合体では、特に喫煙者で発がんのリスクが上昇していると報告されている。さらにファンコニー貧血の原因遺伝子 FANCC のヘテロ接合体でも乳がんのリスクが高まることなどが報告されてきている。これら遺伝性疾患の多くは稀であるが、これら疾患の責任変異アレルは一般集団中にも 1/100~1/500 程度の頻度では存在する。

チェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺癌は、交絡因子の影響が少なく放射線誘発癌であることが明確である。この地域では多くの人々が被ばくしたが、ごく限られた一部の人のみが癌を発症している、しかし何がこの違いをもたらすのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、チェルノブイリ原発事故後の放射線誘発小児甲状腺癌患者ゲノムと同地域に住み、同様に被ばくしたと考えられるが癌を発症していない健康人（コントロール）ゲノムを用いて、DNA 修復遺伝子を中心とした大規模なゲノム解析を行い、そのデータを取得すること、そして放射線による発癌に繋がる遺伝的背景を明らかにすることである。

3. 研究の方法

チェルノブイリ周辺地域より収集した上記患者、コントロールの血液より抽出したゲノムを用い、次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析を施行した。得られたデータより変異データベースを構築した。種々の解析手法を用いて、上記放射線誘発甲状腺癌の発症と関連する遺伝子、遺伝子群の同定を試みた。上記手法、もしくは別の研究によって同定された標的に関して、さらに多数の検体を用いた検証実験を行った。

4. 研究成果

全研究期間を通して、Illumina 社プラットフォームを用い、計 56 例の癌患者ゲノム、55 例のコントロールゲノムに対して全エクソン領域、そして 20 例の癌患者ゲノム、10 例のコントロールゲノムに対して全ゲノム領域の次世代シーケンシングを行い、データを得た。基本的には Broad Institute が奨励するパイプラインに従って変異データを得た後に、annovar によるアノテーションを行った。

まず、DNA 修復遺伝子関連を対象とした解析を行ったところ、チェックポイント関連遺伝子群に癌患者で有意な変異の増加を認めたが、意義不明な変異が多数含まれており、さらにはこれらの遺伝子群に対してのみ症例を追加して部分的な変異解析を行ったが、オッズ比は著明に低下し、関連を明らかに出来なかった。

次に、全ゲノムを対象とした解析を common variant、rare variant に分けて行った。まず、12 万の common variant について解析を行ったが、これについては 1000 人ゲノムデータのヨーロッパ人をコントロールとして加えた。ロジスティック回帰解析で、deleterious mutation、p 値が $10E-5$ オーダー（最小 $9.3E-06$ ）の変異を 3 つ同定できた。ただ、12 万の variant とはいえ、genome-wide significance には到達できず、また得られた遺伝子について、機能的にも意味づけは難しそうであった。rare variant については、deleterious mutation について、遺伝子ごとに変異を集積し、遺伝子長などを考慮に入れる解析を行った。p 値が $10E-3$ オーダー以下（最小 $9.1E-04$ ）の遺伝子が 8 個確認され、その中で症例群に多いものが 4 つあった。これは今後の研究課題である。

その他、これまでに甲状腺癌の発症と関連が報告されているいくつかの一塩基多型についても解析を行ったところ、放射線被ばく後、小児期に発症した甲状腺癌では、DIRC3 近傍の rs11693806 については関連が見られず、放射線による発癌メカニズムは発症年齢による違いがあることが示唆された。

以上より、本研究において明確な責任遺伝子群を同定することは出来なかったが、非常に貴重な試料について、ある程度の規模の網羅的ゲノム解析データセットを得ることが出来た。また、大規模シーケンシングデータの解析が可能となり、今後の継続した研究についての基盤

を確立することが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 12 件)

- ① Shimura K, Shibata H, Mizuno Y, Amano N, Hoshino K, Kuroda T, Kameyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Sugino K, Yoshimura Noh J, Hasegawa T, Ishii T: Rapid Growth and Early Metastasis of Papillary Thyroid Carcinoma in an Adolescent Girl with Graves' Disease. *Horm Res Paediatr* 1-6, 2018 査読有 DOI: 10.1159/000491102
- ② Otsubo R, Mussazhanova Z, Akazawa Y, Sato A, Matsuda K, Matsumoto M, Yano H, Matsuse M, Mitsutake N, Ando T, Niino D, Nagayasu T, Nakashima M: Sporadic pediatric papillary thyroid carcinoma harboring the ETV6/NTRK3 fusion oncogene in a 7-year-old Japanese girl: a case report and review of literature. *J Pediatr Endocrinol Metab* 31: 461-467, 2018 査読有 DOI: 10.1515/jpem-2017-0292
- ③ Yabuta T, Matsuse M, Hirokawa M, Yamashita S, Mitsutake N, Miyauchi A: TERT Promoter Mutations Were Not Found in Papillary Thyroid Microcarcinomas That Showed Disease Progression on Active Surveillance. *Thyroid* 27: 1206-1207, 2017 査読有 DOI: 10.1089/thy.2016.0645
- ④ 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 査読有 DOI: 10.1089/thy.2016.0673
- ⑤ 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 査読有 DOI: 10.1038/srep41752
- ⑥ 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* 27(2): 224-235, 2017 査読有 DOI: 10.1089/thy.2015.0541
- ⑦ 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* 157: 2182-2195, 2016 査読有 DOI: 10.1210/en.2015-2066
- ⑧ 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 oncogenic follicular adenoma of the thyroid. *Endocr J* 63: 457-467, 2016 査読有 DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0629
- ⑨ Mitsutake N, Fukushima T, Matsuse M, Rogounovitch T, Saenko V, Uchino S, Ito M, Suzuki K, Suzuki S, Yamashita S: BRAF(V600E) mutation is highly prevalent in thyroid carcinomas in the young population in Fukushima: a different oncogenic profile from Chernobyl. *Sci Rep* 5: 16976, 2015 査読有 DOI: 10.1038/srep16976
- ⑩ Sahasrabudhe R, Estrada A, Lott P, Martin L, Polanco Echeverry G, Velez A, Neta G, Takahashi M, Saenko V, Mitsutake N; JTCMS Consortium, Jaeger E, Duque CS, Rios A, Bohorquez M, Prieto R, Criollo A, Echeverry M, Tomlinson I; CORG1 Consortium; TCUKIN Consortiums, Carmona LG: The 8q24 rs6983267G variant is associated with increased thyroid cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 22: 841-849, 2015 査読有 DOI: 10.1530/ERC-15-0081
- ⑪ Rogounovitch TI, Bychkov A, Takahashi M, Mitsutake N, Nakashima M, Nikitski AV, Hayashi T, Hirokawa M, Ishigaki K, Shigematsu K, Bogdanova T, Matsuse M, Nakahara E, Minami S, Yamanouchi K, Ito M, Kawaguchi T, Kondo H, Takamura N, Ito Y, Miyauchi A, Matsuda F, Yamashita S, Saenko VA: The common genetic variant rs944289 on chromosome 14q13.3 associates with risk of both malignant and benign thyroid tumors in the Japanese population. *Thyroid* 25: 333-340, 2015 査読有 DOI: 10.1089/thy.2014.0431

- ⑫ Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Yamashita S: Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: possible roles of radiation in carcinogenesis. *Cancer Sci* 106: 127-133, 2015 査読有 DOI: 10.1111/cas.12583

〔学会発表〕(計 14 件)

- ① 田中 彩, 松瀬 美智子, サエンコ ウラジミール, 中尾 朋恵, 山之内 孝彰, 崎村 千香, 矢野 洋, 西原 永潤, 廣川 満良, 鈴木 啓司, 宮内 昭, 江口 晋, 永安 武, 山下 俊一, 光武 範吏: 甲状腺乳頭癌における TERT プロモーター変異のアレル頻度・TERT mRNA 発現と予後との関連性について. 第 61 回 日本甲状腺学会学術集会, 2018 年
- ② 光武 範吏, 松瀬 美智子, Vladimir Saenko, 鈴木 眞一, 山下 俊一: 福島で見られる若年者甲状腺癌の分子病態. 第 61 回 日本放射線影響学会(招待講演), 2018 年
- ③ 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 年
- ④ 光武 範吏, 松瀬 美智子, Vladimir Saenko, 鈴木 眞一, 山下 俊一: 小児・若年者甲状腺癌における遺伝子変異: 放射線誘発と散発性の違いについて. 第 52 回 日本小児内分泌学会学術集会(招待講演), 2018 年
- ⑤ 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 眞一, 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 日本内分泌学会学術総会, 2017 年
- ⑥ ログノビッチ タチアナ, サエンコ ウラジミール, Leonava Tatsiana, Drozd Valentina, 高橋 めい子, 川口 喬久, 光武 範吏: Is the common SNP rs966423 at chromosome 2q35 etiology-specific and confers risk for sporadic thyroid cancer only? 第 60 回 日本甲状腺学会学術集会, 2017 年
- ⑦ ニキツキ アリャクサンドル, サエンコ ウラジミール, 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, ルバノビッチ 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. 日本内分泌学会学術総会, 2016 年
- ⑧ 光武 範吏, 松瀬 美智子, 薮田 智範, Saenko Vladimir, 西原 永潤, 廣川 満良, 宮内 昭, 山下 俊一: 甲状腺乳頭癌における遺伝子変異と悪性度・予後との関連. 日本内分泌学会学術総会, 2016 年
- ⑨ 光武 範吏, 松瀬 美智子, 薮田 智範, Vladimir Saenko, 西原 永潤, 廣川 満良, 宮内 昭, 山下 俊一: 甲状腺乳頭癌における悪性度・予後を規定する遺伝子変異. 日本内分泌外科学会総会(招待講演), 2016 年
- ⑩ 光武 範吏, 松瀬 美智子, 薮田 智範, Vladimir Saenko, 西原 永潤, 廣川 満良, 宮内 昭, 山下 俊一: 甲状腺乳頭癌における分子マーカーによるリスク分類. 日本甲状腺外科学会学術集会(招待講演), 2016 年
- ⑪ 松瀬 美智子, 井山慶大, Vladimir Saenko, 光武 範吏, 山下 俊一: 定量 RT-PCR 法を用いた融合遺伝子スクリーニングにより同定した甲状腺癌新規融合遺伝子の機能解析. 日本甲状腺学会学術集会, 2016 年
- ⑫ 光武 範吏: 小児・若年者甲状腺癌に見られる遺伝子変異. 第 27 回 日本内分泌外科学会総会(招待講演), 2015 年
- ⑬ 光武 範吏: 検診で発見された小児・若年者甲状腺癌に見られる遺伝子変異の特徴. 第 58 回 日本甲状腺学会学術集会(招待講演), 2015 年
- ⑭ Norisato Mitsutake: Genetic alterations in thyroid cancer and their clinical implications. 11th Asia and Oceania Thyroid Association Congress(招待講演), 2014 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 萩 朋男

ローマ字氏名: OGI, Tomoo

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 環境医学研究所

職名：教授

研究者番号（8桁）：80508317

(2)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

※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。