

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340035

研究課題名(和文) 肺がんに関係する融合遺伝子の形成に対する放射線影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of radiation effects on the formation of fusion genes involved in lung cancer

研究代表者

多賀 正尊 (TAGA, Masataka)

公益財団法人放射線影響研究所・分子生物科学部・研究員

研究者番号：70359462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：原爆被爆者の放射線関連肺がん発生の分子機序は未だ不明である。近年、未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)融合遺伝子(例、EML4-ALK)が散発性肺腺がんでは報告され、我々は原爆放射線に被曝した甲状腺乳頭がん症例においてALK融合遺伝子を観察している。本研究では、ALK融合遺伝子が放射線被曝によるヒト肺がん発生に関連するか検討した。放射線による肺腺がん発生にALK融合遺伝子が関与する証拠は得られていないが、原爆被爆者保存肺腺がん組織を用いてALK融合遺伝子を解析する一連の方法とヒト肺由来細胞株におけるX線照射後のEML4-ALK誘導を評価する実験系を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms for development of radiation-associated lung cancer among atomic bomb (A-bomb) survivors have thus far remained unclear. Recently, researchers reported anaplastic lymphoma kinase (ALK) fusion genes (e.g. EML4-ALK) in spontaneous lung adenocarcinoma. In addition, we have found ALK fusion genes in papillary thyroid cancer cases exposed to A-bomb radiation. In this study, we examined the possible involvement of ALK fusion genes in the development of human lung adenocarcinoma following radiation exposure. Using archival lung adenocarcinoma tissues from A-bomb survivors, we established a series of analytical methods for ALK fusion genes. An in vitro experimental system was also developed to assess EML4-ALK induction in an X-irradiated human lung cell line. However, no evidence for links between ALK fusion genes and radiation-associated lung adenocarcinoma has been obtained.

研究分野：放射線発がん

キーワード：放射線 肺がん 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

公益財団法人 放射線影響研究所 (以下、放影研) 原爆被爆者コーホートの疫学調査から、被爆者の肺がん相対リスクが被爆後 50 年以上経過しても高値を示すことが報告されてきた。しかし、原爆放射線も含めた放射線関連肺がんの分子腫瘍学的な研究は、国内外ともに多くはなく、放射線被曝が肺がん発生に影響を及ぼす分子機序は未だ不明である。

肺がんは、小細胞肺がんと非小細胞肺がん (主に、扁平上皮がんと腺がん) に大きく分類され、*p53* がん抑制遺伝子の変異や RAS シグナル伝達経路 (RAS/MAPK シグナル伝達経路) のがん遺伝子の変異 (特に腺がんにおいて) を代表とする遺伝的变化と、がん関連遺伝子の DNA メチル化などのエピジェネティックな変化が観察される。我々のこれまでの試行調査では、原爆被爆者肺がん組織において、放射線被曝が、*p53* 変異の頻度やその変異パターン、そして、ゲノム DNA 全体のメチル化などに影響を与えている可能性が示唆された。一方、RAS シグナル伝達経路の遺伝子変異 (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*) と放射線被曝との関連は観察されていない。

こうした中、近年、散発性肺腺がんにおいて RAS シグナル伝達経路を恒常的に活性化する融合タンパク質を産生するようになる未分化リンパ腫キナーゼ (*ALK*) 融合遺伝子 (例、*EML4-ALK*) が報告されてきた。一方、濱谷らは原爆放射線に被曝した甲状腺乳頭がん症例において *ALK* 融合遺伝子を比較的頻繁に観察した (Hamatani K, Thyroid, 2012)。これらのことから、我々は、「放射線被曝が肺がん発生に関係する融合遺伝子の形成を誘導する」という作業仮説をたてた。

2. 研究の目的

上記の作業仮説を検証するために、(1) 原爆被爆者の肺がん組織における *ALK* 融合遺伝子などを解析し、融合遺伝子を持つ肺がんが放射線被曝と有意に関連すること、(2) *in vitro* の実験系を用いて、放射線被曝により肺上皮細胞に融合遺伝子が誘導されることを調べることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

研究対象として、広島の地元病理医ネットワークによって収集された原爆被爆者の手術由来肺腺がん組織 24 症例 (放射線被曝者 12 名および非被曝者 12 名) と扁平上皮がん組織 10 症例 (放射線被曝者 6 名および非被曝者 4 名)、そして、放影研で保存されている原爆被爆者の剖検由来肺腺がん組織 51 症例 (放射線被曝者 43 名および非被曝者 8 名) の使用を計画した。原爆被爆者の被曝線量は「DS02」推定線量を用いた。また、肺がん組織と共に収集された病理・疫学的データ (年齢、性別、病理組織型、分化度、喫煙歴など) も利用した。ホルマリン固定・パラフィン包埋された肺がん組織ブロックから切片を作製し、切り出したがん部から RNA を抽出して解析に用いた。

(2) 融合遺伝子の検出と同定

ALK 融合遺伝子は、濱谷らが確立した方法 (Hamatani K, Thyroid, 2012) を基にして検出した。まず始めに、9 mer のランダムプライマーを用いて、RNA から cDNA を合成した。内在性コントロールとして、*breakpoint cluster region* (BCR) 遺伝子の RT-PCR を

行い、cDNA の状態を確認した。正常型の *ALK* 遺伝子は、通常、肺組織の細胞内で発現しないが、*ALK* 融合遺伝子は、融合したパートナー遺伝子のプロモーターを利用することで発現するようになる。このことを利用して、融合遺伝子になっても保持される *ALK* 遺伝子のキナーゼ領域の RT-PCR により *ALK* 融合遺伝子を持つ症例のスクリーニングを行った。そして、スクリーニング陽性の症例に対して、散発性の肺腺がんにおいて観察頻度が高い *EML4-ALK* バリエーション 1、2、3a/b (以下、バリエーション 1 ~ 3) の RT-PCR を行い、パートナー遺伝子の同定を試みた。増幅した PCR 産物はサンガー法によるシーケンスで確認した。*EML4-ALK* バリエーション 1 ~ 3 以外のパートナー遺伝子については、未知塩基配列を増幅するためのアダプター配列付加による switching mechanism at 5'-end of the RNA transcript rapid amplification of cDNA ends (SMART™ RACE) 法、あるいは、cDNA をライゲーション反応によって環状化させるインバース PCR によって検出を試みた。

(3) 放射線による融合遺伝子の誘導を調べるための培養細胞を用いた実験

ヒト肺腺がん由来 A549 細胞株を使用した。この細胞に 2 Gy の X 線を 1 日 1 回照射し、合計 10 Gy と 20 Gy になるように細胞を継代した。生き残った細胞から RNA を抽出した。そして、*EML4-ALK* バリエーション 1 ~ 3 を検出するための RT-PCR を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってバンドの有無を調べた。さらに、*EML4-ALK* を高感度に検出できるデジタル PCR (QX100 ddPCR, Bio-Rad) によっても、*EML4-ALK* の検出を試みた。このデジタル PCR 装置の利用と技術的な指導に関して、広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学実験部門生命科学機器分析部から多大なご支援を賜

った。

4. 研究成果

(1) 原爆被爆者の肺がん組織における *ALK* 融合遺伝子の解析

原爆被爆者肺がん組織の解析に関しては、手術由来肺腺がん組織 24 症例を用いて、RT-PCR による *ALK* 融合遺伝子のスクリーニングを終え、*EML4-ALK* 融合遺伝子のバリエーション 1 と 2 を各 1 症例ずつ同定した。さらに、これらの *ALK* 融合遺伝子とは異なるパートナー遺伝子を持つ可能性のある症例を数例得たので、SMART™ RACE 法、あるいは、インバース PCR によってパートナー遺伝子の同定を試みた。その結果、パートナー遺伝子の配列を含むと思われる未知の遺伝子配列を一症例で得ることができたが、その配列の長さが不十分なため、データベースの検索によるパートナー遺伝子の同定には至っていない。長期保存組織由来の RNA は断片化が進み、長い cDNA や PCR 増幅産物が得難いことが知られているが、このことによって、未知の遺伝子配列となるパートナー遺伝子領域を増幅することが特に困難となった可能性がある。また、少ない鋳型でも増幅できる高感度な実験系になっているので、わずかに発現した正常型 *ALK* 遺伝子や RNA 抽出の際に除去しきれなかったゲノム DNA 由来の *ALK* 遺伝子 (イントロン配列を含む) が増幅することも、パートナー遺伝子の解析を困難にする原因となった。

原爆被爆者の手術由来肺扁平上皮がん 10 症例についても *EML4-ALK* バリエーション 1 ~ 3 を解析したが、これらの融合遺伝子は検出されなかった。一方、*EML4-ALK* バリエーション 1 ~ 3 のものとは異なるパートナー遺伝子を持つ可能性のある症例が扁平上皮がんでも

見つかった。この症例は、高線量の放射線を被曝した症例だったので、解析を継続している。

原爆被爆者の剖検由来肺腺がん組織における *ALK* 融合遺伝子についても、パートナー遺伝子の同定が困難であることが予想されたので、始めに、*EML4-ALK* バリエーション 1 ~ 3 から解析を進めることにした。その結果、数症例の解析から、*EML4-ALK* バリエーション 2 を持つ症例（約 50 年間保存されていた組織）を同定することができたので、現在も症例数を増やした解析を継続中である。

パートナー遺伝子がまだ同定できていないスクリーニング陽性症例の結果も含めた予備的な解析ではあるが、*ALK* 融合遺伝子と本研究で用いた肺がん組織において過去に解析したレトロトランスポゾン LINE1 のメチル化状態や *p53* がん抑制遺伝子の変異の有無との関連を調べてみたが、有意な関連はなかった。

更に、Sequence Read Archive (SRA) に登録されている肺がん由来細胞株の次世代シーケンスデータを用いて、*ALK* 融合遺伝子と *p53* 変異との関連を調べたが、有意な関連はなかった。一方、この一連の解析の中で、肺腺がん由来の細胞株の一つが、ある *ALK* 融合遺伝子を持つことが示唆された。その融合遺伝子の存在を実験的に証明することができれば、その *ALK* 融合遺伝子の解析をするための貴重な陽性細胞株となり得る。

(2) 放射線による融合遺伝子の誘導を調べるための培養細胞を用いた実験

A549 細胞株に X 線を照射し、*EML4-ALK* バリエーション 1 ~ 3 の発現を通常の RT-PCR によって調べたが、放射線による *EML4-ALK*

の誘導は観察されなかった。更に検出感度を上げるために、計算上、10 の 5 乗から 6 乗個の細胞集団の中で *EML4-ALK* を発現する細胞が一つできれば、その発現を検出し得るデジタル PCR の実験系を確立した。そして、A549 細胞株に X 線を照射し、*EML4-ALK* の発現をこのデジタル PCR によって調べたが、X 線照射による *EML4-ALK* の誘導は観察されなかった。今後は、別の細胞株を使った実験を継続する予定である。

(3) まとめ

本研究を通じて、原爆被爆者保存肺腺がん組織を用いて *ALK* 融合遺伝子を解析する一連の方法とヒト肺由来細胞株における X 線照射後の *EML4-ALK* 誘導を評価する実験系を確立することができた。本研究の作業仮説検証についての最終的な結論を得るために、解析の必要な肺がん症例や細胞株が残っているので解析を継続する。また、肺腺がん由来の細胞株で存在が示唆された *ALK* 融合遺伝子などの本研究から派生した研究課題もあるので、取り組んでいきたい。

< 引用文献 >

Hamatani K, Mukai M, Takahashi K, Hayashi Y, Nakachi K, Kusunoki Y
Rearranged anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in adult-onset papillary thyroid cancer amongst atomic bomb survivors
Thyroid 22(11):1153-9 (2012)

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 2 件)

Hamatani K, Takahashi K, Taga M

Thyroid cancer: Molecular characteristics of radiation-associated papillary thyroid cancer, with a special reference to of atomic radiation exposure
Journal of Thyroid Disorders & Therapy 査読有 4(2):1-7 (2015)
<https://www.omicsgroup.org/journals/thyroid-disorders-therapy.php>

多賀正尊、向井真弓、小山和章、伊藤玲子、三角宗近、中地 敬、楠 洋一郎、安井弥、濱谷清裕
予備的研究：原爆被爆者肺腺がんにおける *ALK* 遺伝子再配列の解析
広島医学 査読有 67(4):361-4 (2014)

[学会発表](計 2 件)

多賀正尊

原爆被爆者の保存肺腺がん標本における *ALK* 融合遺伝子の検出
第 15 回 国際放射線研究会議
2015 年 5 月 25-29 日 国立京都国際会館
(京都府、京都市)

多賀正尊

原爆被爆者肺腺がんにおける *ALK* 融合遺伝子の解析
第 57 回日本放射線影響学会
2014 年 10 月 1-3 日 かがしま県民交流センター (鹿児島県、鹿児島市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

多賀 正尊 (TAGA, Masataka)
公益財団法人放射線影響研究所・分子生物科学部・研究員
研究者番号 : 70359462

(2)研究分担者

濱谷 清裕 (HAMATANI, Kiyohiro)

公益財団法人放射線影響研究所・分子生物科学部・顧問

研究者番号 : 80344414

伊藤 玲子 (ITO, Reiko)

公益財団法人放射線影響研究所・分子生物科学部・副主任研究員

研究者番号 : 30283790