

## 放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度年次報告書（詳細版）

研究課題名	ゲノム変異シグネチャー解析で紐解く低線量放射線の発がん寄与割合とメカニズム
研究期間	令和3年4月1日～令和4年2月28日

氏名		所属機関・職名
主任研究者	鈴木 啓司	長崎大学原爆後障害医療研究所・准教授
若手研究の活用状況	河村 香寿美	長崎大学原爆後障害医療研究所・特任研究員

氏名		所属機関・職名
研究協力者	Vladimir Saenko	長崎大学原爆後障害医療研究所・准教授

研究要旨	<p>本研究は、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんに係る生物学的研究として、『ゲノム変異シグネチャーにより紐解く放射線の寄与割合』という新たな切り口を確立し、健康影響の理解と放射線発がんメカニズムの解明に繋げることを目的としている。令和3年度には、発がん実験用のマウスの購入および放射線照射を終了し、終生飼育に着手した。また、これまでの環境省『放射線の健康影響に関わる研究調査事業』で得られた動物実験発がんアーカイブから肝腫瘍を選別し、ゲノム DNA の抽出から変異シグネチャー解析までの解析系の樹立を行った。あわせて、肝組織における腫瘍組織の占有率を推定に不可欠な、がん関連微小環境評価のための多重免疫染色法を確立した。加えて、若手研究者を活用した研究の加速化については、動物実験発がんアーカイブから選別した肝腫瘍を共有し、ゲノム DNA の抽出からメチル化シグネチャーの解析までの解析系を確立するための予備実験を実施した。</p>
キーワード	放射線、発がん、ゲノム変異、シグネチャー、メチル化

## I 研究目的

放射線の健康影響は、多様な生活要因の関与を考慮した上で議論する必要がある。このため、従来より、放射線被ばくの『寄与割合』についての議論がなされてきたが、寄与割合の評価は寄与リスクの評価であり、あくまでも、放射線発がんリスクに基づく被ばく者集団疫学における算術上の推定であって、生物学的知見を基盤とする個別の症例における寄与割合の評価ではなかった。このため、とりわけ低線量放射線被ばくによる発がんでは、個々人のレベルで発症したがんの放射線起因性の可能性を払拭する事は不可能であり、被ばくを経験した集団を対象に、『明らかな発がんリスク増加は認められない』、あるいは、『発がんリスク増加の検出は困難』、等の説明をせざるを得なかった。加えて、東京電力福島第一原子力発電所の事故を受けて、低線量・低線量率の放射線を受けた集団に発症したがんは、どんな低線量・低線量率の放射線であっても、それが放射線に起因したがんであると懸念されがちである。しかしながら、低線量であればあるほど、放射線の寄与リスクは低下し、必然的に、自然に起こった散発性がんである可能性がより高くなるはずであるが、これを証明する術を我々は持たない。これらの諸問題を解決するためには、発がんにおける放射線の寄与割合を、生物学的根拠に基づいて記述する事が極めて重要であると確信し、本研究計画を提案した。

本研究の目的は、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんに係る生物学的研究として、『ゲノム変異シグネチャーにより紐解く放射線の寄与割合』という新たな科学的研究手法を新機軸として確立し、若手研究者による、『メチル化シグネチャー解析による放射線の発がん寄与割合評価』の研究と協働する事により、放射線被ばくによる健康影響の理解と、放射線発がんメカニズムの全貌の解明に繋げることある。

これまでにも、放射線被ばくによる発がんリスクを、生活習慣などの他の発がん要因の中で議論するために、例えば運動不足や飲酒、喫煙、あるいは高塩分食品摂取などと比較して議論することがある。しかし、本来必要なのは、がんが、放射線被ばくによらずとも、自然に多段階的なプロセスを経て発症する事を念頭に置くことで、このため、低線量・低線量率放射線被ばくを経験した個人に発症したがんの場合であれば、発がんプロセスに占める放射線の寄与割合を考慮する事が極めて重要である。このため本研究では、ゲノム変異シグネチャーやメチル化シグネチャーに基づいた放射線の発がんプロセスに対する寄与割合の提示を目指し、それをもって、放射線発がんリスクの理解を生物学的基盤に基づいて飛躍的に増進させ、低線量被ばくに対する不安や懸念を低減する新対策に繋がる研究として計画したものである。

本研究の実施により、ゲノム変異シグネチャーやメチル化シグネチャーから放射線発がんへの寄与割合が評価できるようになると期待される。その結果、例えば、これまでの研究により発がんリスクの上昇が認められない0.1 Gy照射群では、発症したがんにおけるシグネチャーは放射線照射とは関係しない事が示され、その結果をもって、発がんへの放射線の寄与割合は0%、即ち全てのがんは自然誘発がんであると推定する技術を提供することができるようになる。さらに、発がんの多段階的プロセスへの放射線の寄与割合という概念が一般化される事により、『放射線被ばく＝がん』という懸念を払拭する事が可能になるだけでなく、放射線以外の発がん要因の寄与割合を低減することがいかに有効かを示し、放射線発がんリスクの低減に繋げる新たな対策の生物学的基盤を提供する事ができると考えている。

## II 研究方法

研究課題の目的を達成するための研究項目として、主任研究者の研究計画としては、次の3項目（1. ゲノム変異シグネチャー解析、2. 組織シグネチャー解析、3. 放射線発がん実験）を設定し、若手を活用した加速化計画（以下若手研究）では、メチル化シグネチャー解析を設定した。研究期間は3年間の予定で、初年度である令和3年度には、これまでの環境省『放射線の健康影響に関わる研究調査事業』で得られた動物実験発がんアーカイブから肝腫瘍を活用してゲノム変異シグネチャーおよびメチル化シグネチャー解析の技術確立を実施した。また、固定組織標本において、がん細胞の占有率とがん関連組織微小環境の解析手法を確立した。これらと同時に、B6C3F1 マウスを用いた放射線発がん実験を開始し、次年度以降の肝腫瘍の解析標本の採取に備えた。各研究項目の詳細な計画・方法は以下のとおりである。

#### 研究項目1：ゲノム変異シグネチャー解析

肝腫瘍凍結標本から採取したゲノム DNA を用いて、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンスを実施し、発がん関連遺伝子に残されたゲノム変異シグネチャーの解析を行う。このため、組織からのゲノム DNA の抽出を、QIAmp Fast DNA Tissue Kit により行い、Qubit フルオロメーターにより濃度を測定してシーケンスに適切なゲノム標本濃度に希釈した。ゲノムライブラリーの調製には、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit を用い、Illumina 社製 NovaSeq 6000 によりシーケンスを実施した。シーケンス情報取得の基準として、平均リード数をサンプルあたり 600M reads、また、平均データ量をサンプルあたり 90 Gb とした。

シーケンスデータは、Trimmomatic (ver 0.38) を用いてトリミングを行い、bwa (ver 0.7.17) によりマッピングを実施、重複リードを除去した後に、Samtools (ver 1.9) により一塩基置換 (SNV) および小規模欠失 (InDel) を検出した。レファレンスゲノムには、GRCm38 を用いた。さらに、大規模なゲノム欠失などのゲノム構造異常 (SV) は、Manta 等の SV caller を用いて解析した。得られた SNV および InDel 情報は、COSMIC が公開している変異シグネチャーデータベースを参照にして解析を行い、シグネチャーのタイプを抽出する。全ゲノムシーケンスは、ターゲットを絞って実施しないが、マウス肝腫瘍で変異頻度が高い p53 等の細胞周期関連遺伝子をはじめ、MAPK 経路関連遺伝子、受容体型チロシンキナーゼ経路関連遺伝子、WNT 経路関連遺伝子、クロマチン修飾因子関連遺伝子、および SWI/SNF 複合体関連遺伝子については重点的に変異解析を進める計画である。

得られた COSMIC ゲノム変異シグネチャーは、各肝腫瘍について個別にカタログ化し、変異が同定された全遺伝子の変異シグネチャー (SBS シグネチャー+ID シグネチャー+CNV シグネチャー) に対し、放射線被ばくに特有のゲノム変異シグネチャー (ID8) が見られる割合を算出し、これを放射線被ばく寄与割合とする。さらに、異なる線量 (0 Gy、0.1 Gy、1 Gy および 4 Gy) を照射した群に発症した肝腫瘍間で比較をおこない、寄与割合の線量依存性や低線量放射線 (0.1 Gy) 照射群での肝腫瘍への放射線被ばく寄与割合を統計学的な有意差と合わせて精査する。

#### 研究項目2：組織シグネチャー解析

腫瘍組織から採取したゲノム DNA を用いたゲノム変異シグネチャー解析から寄与割合を算出する際には、腫瘍組織に混在する正常細胞が結果に大きな影響を及ぼす。このため、標本採取の際に同時に作成した固定組織標本から組織薄切切片を作成し、多重蛍光免疫染色法により、がん細胞とがん関連組織微小環境を構成するがん細胞以外の細胞を区別する手法を確立し、放射線発

がんのがん関連組織微小環境の特徴を抽出すると同時に、腫瘍組織におけるがん細胞の占有率を算出した。

具体的には、採取した肝臓組織をホルマリン中で固定した後、パラフィン中に包埋し、厚さ 4 $\mu$ m の薄切標本を作成して解析に供する。多重免疫染色は既にこれまでの環境省事業で確立した方法を応用したが、がん関連微小環境の解析のために、マウスの肝臓組織を描画できる組織免疫染色用の抗体を選別した。また、肝がん細胞の頻度を算出するために、肝腫瘍に特異的なマーカーを認識する抗体を選別した。さらに、腫瘍組織では炎症性の免疫細胞の浸潤が予想されるため、組織におけるマクロファージ、好中球あるいは樹状細胞の浸潤を、リンパ球系統特異的抗体と共に、これら炎症性細胞に対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法により解析した。組織微小環境は、機能細胞である肝上皮細胞に加え、類洞を構成する類洞内皮細胞、さらに、微小血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞によって構成されている。そこで、これら細胞も、血管内皮細胞あるいはリンパ管内皮細胞に対する特異的抗体を選別して解析した。

一次抗体の可視化には、AlexaFluor によって蛍光標識された特異的二次抗体を用い、Alexa 488、Alexa 555、Alexa 647 および Alexa 800 の 4 蛍光色を同時に検出する多重蛍光免疫染色法を確立して解析を実施した。染色後の標本は、蛍光顕微鏡 (DM6000B、ライカ社) 下で観察し、画像解析システム (FW4000、ライカ社) によりデジタル画像を取得した後に定量的解析を行った。特に、がん細胞の占有率を算出するためには、Image-J を用いた画像解析を実施し、細胞核の数を総細胞数として、肝腫瘍特異的マーカーに染色される細胞数を計測して占有率を算出した。

### 研究項目 3：放射線発がん実験

低線量放射線により誘発された肝腫瘍のゲノム変異シグニチャーを解析するためには、誘発された全ての肝腫瘍の凍結保存標本を整備する必要がある。このため、環境省『放射線の健康影響に関わる研究調査事業』で得られた動物実験発がんアーカイブに収載されている肝腫瘍を活用するが、標本数が限られているため、放射線誘発肝腫瘍および自然発症肝腫瘍を採取するために、B6C3F1 雄マウスを用いた放射線発がん実験を新たに設定した。

実験群は 4 グループを設定し、各群のマウスの設定匹数は、おおよそ半数以下のマウスにおいて肝腫瘍が観察される事を考慮して、30 匹とした。ただし、4 Gy 照射群は、肝腫瘍の発生よりも前に、グループの 20%程度に胸腺リンパ腫の発生が見込まれる事から、使用匹数を 50 匹とした (表 1)。

小児期 (1 週齢) に放射線照射 ( $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  線、0.1 Gy、1 Gy および 4 Gy、線量率は 0.5 Gy/min) を行った。

その後、生涯飼育をおこない、定期的な飼育観察および体重測定を継続している。触診によりがんの発生および病状の悪化が認められるマウスについて解剖し、肝腫瘍が認められた場合には凍結組織標本の作成および保存を行い、一部については固定標本の作成も同時に行い、組織シグニチャー解析に供した。

表 1 照射群の設定とマウスの匹数

実験群	線量 (Gy)	匹数
1	0	30
2	0.1	30
3	1.0	30
4	4.0	50

### 若手研究：メチル化シグネチャーの解析

主任研究者の研究課題と協働して発がん関連遺伝子のメチル化シグネチャー解析を推進するた

めに、研究項目 1 について以下の研究内容を計画している。研究全体は 3 年間の計画で、初年度である令和 3 年度には、これまでの環境省『放射線の健康影響に関わる研究調査事業』で得られた動物実験発がんアーカイブから肝腫瘍を活用して発がん関連遺伝子のメチル化シグネチャーの解析技術の確立に着手する。具体的な計画・方法は以下のとおりである。

肝腫瘍凍結標本から採取したゲノム DNA を用いて、全ゲノムを対象にしたバイサルファイトシーケンスを実施し、発がん関連遺伝子に残されたメチル化シグネチャーの解析を行う。このため、QIAmp Fast DNA Tissue Kit により組織からのゲノム DNA の抽出を行い、抽出した DNA は、Qubit フルオロメーターにより濃度を測定して解析に適切なゲノム標本に希釈した。メチル化の解析は、ゲノム DNA のバイサルファイト化を Zymo Research EZ DNA methylation Gold Kit により行い、Whole genome Bisulfite Sequencing を実施した。ライブラリーの調製は Swift Biosciences Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit により行い、シーケンスは、Illumina 社製の NovaSeq 6000 により行った。シーケンス情報取得の基準は、全ゲノムシーケンスと同様に、平均リード数をサンプルあたり 600 Mb、また、平均データ量をサンプルあたり 90 Gb とした。

同一標本から別に採取した正常肝臓組織も同様に解析を行い、レファレンスゲノムに GRCm38 をおいて放射線照射に関連するメチル化シグネチャーを抽出する。メチル化シグネチャー解析のターゲット遺伝子としては、マウス肝腫瘍に関わる細胞周期関連遺伝子、MAPK 経路関連遺伝子、受容体型チロシンキナーゼ経路関連遺伝子、WNT 経路関連遺伝子、クロマチン修飾因子関連遺伝子、および SWI/SNF 複合体関連遺伝子と、DNMT に関連する Gene body を中心に、全ゲノム領域をカバーして解析を進めた。

得られたメチル化シグネチャーは、各肝腫瘍について個別にカタログ化し、C\*GCC、C\*GGC、C\*ACC、および AC\*AG (\*がメチル化チトシン) の配列を中心にした 7 塩基コアの比較により、シグネチャー分類を行い、放射線被ばくに関連したメチル化シグネチャーの抽出を試みる。その後、放射線被ばくに特有のメチル化シグネチャーが見られる割合を算出して、これを放射線被ばく寄与割合とする。さらに、異なる線量 (0 Gy、0.1 Gy、1 Gy および 4 Gy) を照射した群に発症した肝腫瘍間で比較をおこない、放射線の寄与割合の線量依存性や低線量放射線 (0.1 Gy) 照射群での肝腫瘍への放射線被ばく寄与割合を統計学的な有意差と合わせて精査する。

#### 体制図における研究テーマ間の関係

本研究では、放射線発がん実験により得られた組織標本を用いて、1) 組織シグネチャー解析、2) ゲノム変異シグネチャー解析、および、3) 若手研究加速化計画、を実施した。組織シグネチャー解析では、ゲノム解析に供する組織標本において、がん組織の占有率を算出するための組織染色を実施し、その結果により、ゲノム解析により明らかにされる放射線照射に特有の変異シグネチャーの寄与割合を補正する。ゲノム変異シグネチャー解析および若手研究者が担当するメチル化シグネチャー解析では、組織シグネチャー解析で用いたのと同じ組織標本から採取した DNA を解析し、全ゲノムシーケンス解析からは変異シグネチャーの抽出を、また、全ゲノムバイサルファイトシーケンスからはメチル化部位の抽出を行う。これらシグネチャー解析の結果は、ゲノムブラウザーにより、ゲノム上の同一領域での比較が可能で、ゲノム変異とエピゲノム変異を対応させることにより、放射線に起因するシグネチャーの生物学的意義の理解を加速する計画である。

(倫理面への配慮)

本研究計画では、全ての動物実験は、長崎大学先導生命科学研究支援センター動物実験施設において実施した。このため、動物実験を行うにあたり、長崎大学動物実験委員会等の承認を受けた(承認番号:第 2104221714 号)。また、動物実験を実施するにあたり、動物実験に係る教育訓練を受講する必要があるが、研究代表者は既に受講済みである。動物実験の実施に当たっては、動物愛護法ならびに長崎大学「動物実験規程」を遵守して実験を行った。

### III 研究結果

本研究は全体で3年間の計画であるが、初年度である令和3年度の研究成果の詳細を、以下に研究項目毎にまとめた。

#### 研究項目 1 : ゲノム変異シグネチャー解析

肝腫瘍凍結標本アーカイブから、肝細胞がんを含む組織標本を選び、同一個体の肝臓の別葉で、腫瘍を含まないものを非腫瘍部として用い、それぞれから、QIAmp Fast DNA Tissue Kit によりゲノム DNA を抽出し、Qubit フルオロメーターにより濃度を測定した結果、各標本全てにおいて、トータル収量で 5 µg 程度の高分子 DNA を採取した。そこで、このうち、200 ng 程度を用いて、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit によりゲノムライブラリーを調製した。その後、Illumina 社製 NovaSeq 6000 により全ゲノムシーケンスを実施した。

シーケンス産物を FastQC によりクオリティチェックを行った結果、クオリティスコアは少なくとも 35 以上であることがわかり、高クオリティである事を確認した。次に、Trimmomatic を用いて、アダプター配列、リード先頭あるいは後尾のクオリティスコアが 20 未満の塩基等を除去、また、結果としてリードが 36 bp 未満になったリードの除去を行い、その結果、97 %以上のマッピング率の高クオリティリードを得た。

トリミング後のシーケンスリードを、BWA を用いてリファレンスゲノムへのマッピングを行った。リファレンスゲノムには C57BL/6J のゲノムを基盤とした GRCm38 を用いた。マッピング後に、Picard を用いて重複リードの除去を行った。その結果、重複率は、12~16%で、重複リード除去後のシーケンスリード数は、500 M~630 M reads を確保した。重複リード除去後の bam ファイルに対して、samtools を用いて、一塩基置換 (SNV) および挿入/欠失 (INDEL) を抽出した。検出された変異の信頼性について、誤りの確率が 1 %以上であるものをフィルタリングした結果、700 万近くの SNV/INDEL を同定し、このうち半数は、遺伝子領域外の変異であった。遺伝子内でもイントロン領域に同定された変異は変異全体の 35 %程度で、遺伝子領域の上流および下流の遺伝子発現調節領域の変異は全体の数%に認められた。サイレント変異は 2 万 5 千個程度、ミスセンス変異は 1 万 5 千個程度同定された。遺伝子融合変異も 2 種検出された。変異の中で最も多かったのがチミンへの変異で、そのうちシトシンからの変異、C > T 変異が、全体の 65%近くを占めていた。

ゲノム欠失などのゲノム構造異常 (SV) は、Manta 等の SV caller を用いて解析しているが、すでに数十塩基の欠失で、肝腫瘍に特異的な欠失が認められた。図 1 に具体的な例を示したが、対応する肝臓組織の腫瘍部では、15 塩基の欠失がみとめられた。一方、非腫瘍部では欠失が認められず、当該遺伝子の片アレルに特異的な欠失が生じている事が明らかになった。ASMT 遺伝子は

脳で発現が認められる遺伝子で、肝腫瘍に直接関与している可能性は低いですが、同様の手法を応用する事により、腫瘍部でのゲノム変異シグネチャーを抽出するスキームが樹立され

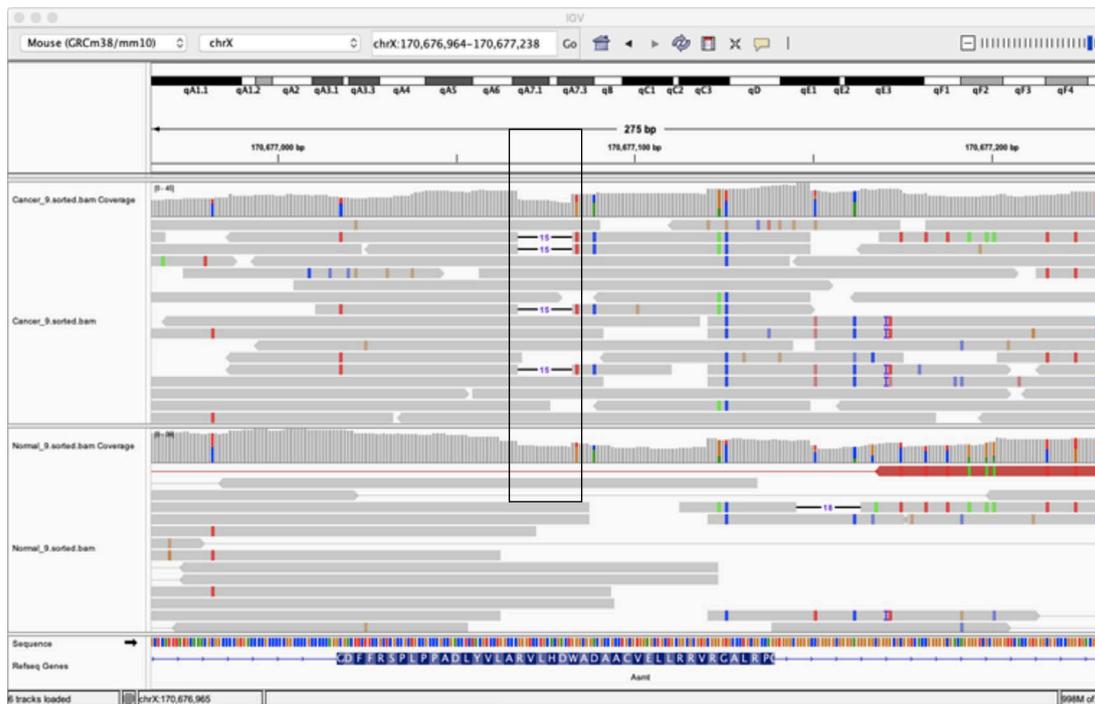


図1 腫瘍部で特異的に検出されたゲノム欠失

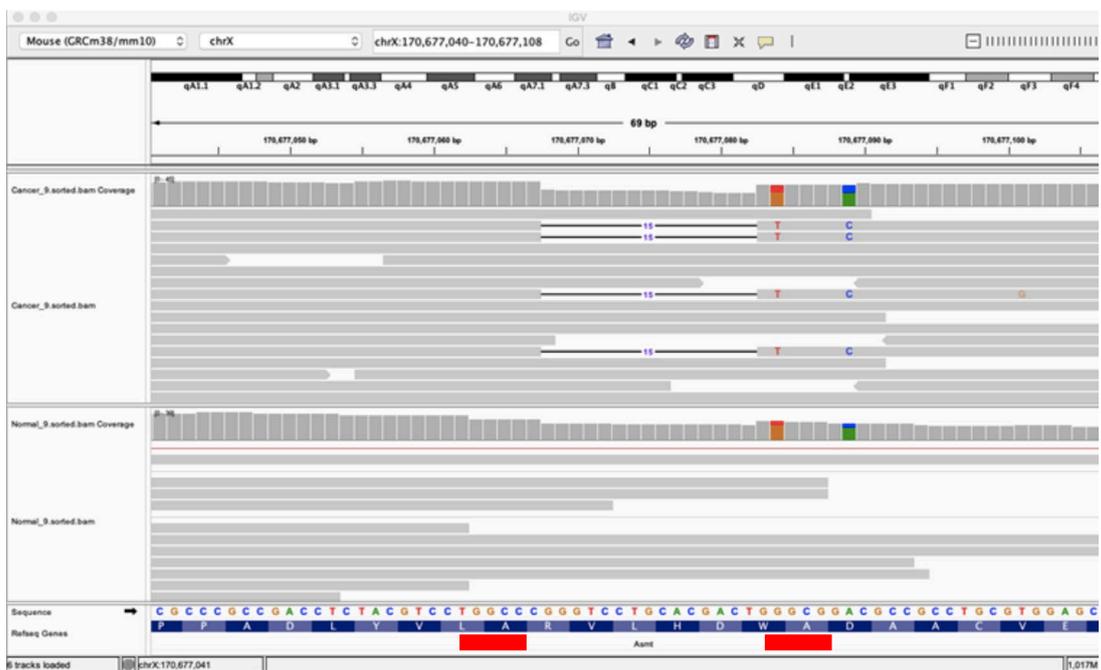


図2 腫瘍部で特異的に検出されたゲノム欠失周辺塩基配列

興味深い事に、欠失領域周辺の塩基配列を読み込むと（図2）、欠失領域上流と下流の近傍に

特異的な反復配列、GGC（赤太線）、が出現している事がわかり、誘発された DNA 二重鎖切断の修復経路との関係が考察できた。

## 研究項目 2：組織シグネチャー解析

肝腫瘍組織から採取したゲノム DNA におけるゲノム変異シグネチャー解析から寄与割合を算出する際には、腫瘍組織中の正常細胞の混在比が結果に大きな影響を及ぼす。このため、標本採取の際に同時に作成した固定組織標本から組織薄切切片を作成し、多重蛍光免疫染色法により、がん細胞とがん関連組織微小環境を構成するがん細胞以外の細胞を区別する手法の確立を行った。

具体的には、放射線照射により誘発された肝腫瘍を含む組織標本をホルマリン中で固定した後にパラフィン中に包埋し、薄切標本（厚さ 4  $\mu\text{m}$ ）を作成して解析に供した。コーティングスライドガラス上に固定した薄切切片は、脱パラフィン処理を施した後に PBS 中に保管し、蛍光免疫染色を実施するまで冷蔵庫中で保存した。標本の抗体染色を行う前に、賦活化溶液中で、95  $^{\circ}\text{C}$  のウォーターバスに 30 分間加熱処理を行い、抗原の賦活化を実施した。冷却後に、5 %skim milk を含む TBS-T（0.5 % Tween-20 を含む TBS 緩衝液）に一次抗体を希釈して、標本切片と共に 37  $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間反応させた。反応終了後、PBS で標本を十分に洗浄した後、TBS-T に希釈した対応する二次抗体を 37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。二次抗体には、AlexaFluor 標識抗体を用いた。二次抗体の反応終了後に、再び PBS を用いて十分に洗浄を行った後に、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の DAPI を含む 10 %グリセリン PBS 溶液中で標本を封入して冷蔵庫中に保存した。

作成した標本は蛍光顕微鏡下で観察して、染色度や抗体の特異性を判定し、抗体の有用性や反応条件の最適化を行った。組織標本染色の結果、肝臓標本中の腫瘍組織において、Cytokeratin-18 および、E-cadherin の特異的な共染色を確認した。これら分子の共染色発現は、複数の肝腫瘍を含む標本で確認され、腫瘍組織における染色の再現性を確認した。その他の一次抗体としては、組織内に浸潤する組織マクロファージを抗 Iba-1 抗体により、好中球を抗 Olfm4 抗体により、また、樹状細胞や T 細胞は抗 CD3 抗体により、B 細胞は抗 CD45R/B220 抗体により検出する事に成功し、炎症性細胞の腫瘍部への浸潤を可視化する事に成功した。しかしながら、これら炎症性細胞を対象にした解析では、腫瘍部への浸潤は顕著ではあるものの、腫瘍部領域のみを特異的に描画するにはやや不向きで、腫瘍細胞の占有率の評価には最適ではないと判断した。

一方、肝臓組織の微小環境は、肝臓の機能細胞である肝上皮細胞に加え、類洞を構成する類洞内皮細胞、さらに、微小血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞によって構成されている。そこで、類洞内皮細胞を抗 VE-cadherin 抗体により、微小血管内皮細胞を抗 CD31 抗体により、また、リンパ管内皮細胞を抗 LYVE-1 抗体により染色する条件を決定した。これらの抗体による組織染色の結果、腫瘍部と非腫瘍部において明確な差はなく、腫瘍部特異的な染色パターンは確認されなかった。

以上の検討から、腫瘍細胞の占有率を算出するための抗体としては、Cytokeratin-18 および、E-cadherin が有効である事がわかったため、画像解析ソフトである Image-J を用いて、DAPI に由来する楕円の青色蛍光シグナルを細胞核と指定し、その数を総細胞数として計測した。一方、肝腫瘍部で特異的な染色が見られた E-Cadherin 陽性細胞を、細胞辺縁の矩形染色パターンにより各々の細胞を認識させ、抗 E-cadherin 抗体により染色される細胞数を全細胞数で除して占有率を算出した。その結果、肝腫瘍組織における腫瘍細胞の占有率には、標本毎のばらつきが存在し、標本毎の占有率の算出が不可欠である事が明らかになった。

### 研究項目 3：放射線発がん実験

低線量放射線により誘発された肝腫瘍のゲノム変異シグニチャーの解析に供するために、放射線誘発肝腫瘍および自然発症肝腫瘍を採取するために、B6C3F1 雄マウスを用いた放射線発がん実験群を設定して、小児期の放射線照射を行うために、1 週齢において放射線照射 ( $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  線由来) を実施した。線量率は、0.1 Gy、1 Gy および 4 Gy で、線量率は 0.5 Gy/min である。照射を終了したマウスを再び飼育施設にもどし、生涯飼育を継続している。毎週の定期的な飼育観察および体重測定を継続している。令和 4 年 4 月 1 日現在、最も飼育日数が進んでいる 4 Gy 照射マウスで 35 週齢に達している。飼育途中の触診によるがんの発生は未だ認められていないが、症状の悪化が認められた 1 例で胸腺リンパ種が、また 2 例で B リンパ腫が認められた。これらのマウスについては、肝臓には異常が認められないため、正常肝組織のコントロールとして組織を凍結保存に供した。

### 若手研究：メチル化シグネチャーの解析

肝腫瘍凍結標本アーカイブから、肝細胞がんを含む組織標本を選び、同一個体の肝臓の別葉で、腫瘍を含まないものを非腫瘍部として用い、それぞれから QIAmp Fast DNA Tissue Kit によりゲノム DNA を抽出し、Qubit フルオロメーターにより濃度を測定した結果、各標本全てにおいて、トータル収量で 5  $\mu\text{g}$  程度の高分子 DNA を採取した。そこで、このうち、200 ng 程度を用いて、Zymo Research EZ DNA Methylation Gold Kit を用いて、バイサルファイト処理を行い、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、Swift Bioscience Accel NGS Methyl-seq DNA Library Kit によりゲノムライブラリーを調製した。ゲノムライブラリーでは、ウラシルはアデニンと塩基対を形成してチミンに変換される事から、バイサルファイト処理により、シトシンからチミンへの変換が観察されなかったシトシンがメチル化シトシンとして特定される。そこで、調整されたライブラリーを Illumina 社製 NovaSeq 6000 によりシーケンスしメチル化部位の同定を行った。

まず、シーケンス産物を FastQC によりクオリティチェックを行った結果、クオリティスコアは少なくとも 35 以上であることがわかった。クオリティスコア 30 が、1,000 回のシーケンスで 1 回のエラーが発生するレベルである事から、行ったシーケンスが高クオリティである事を確認した。次に、Trim galore を用いて、アダプター配列、リード先頭あるいは後尾のクオリティ

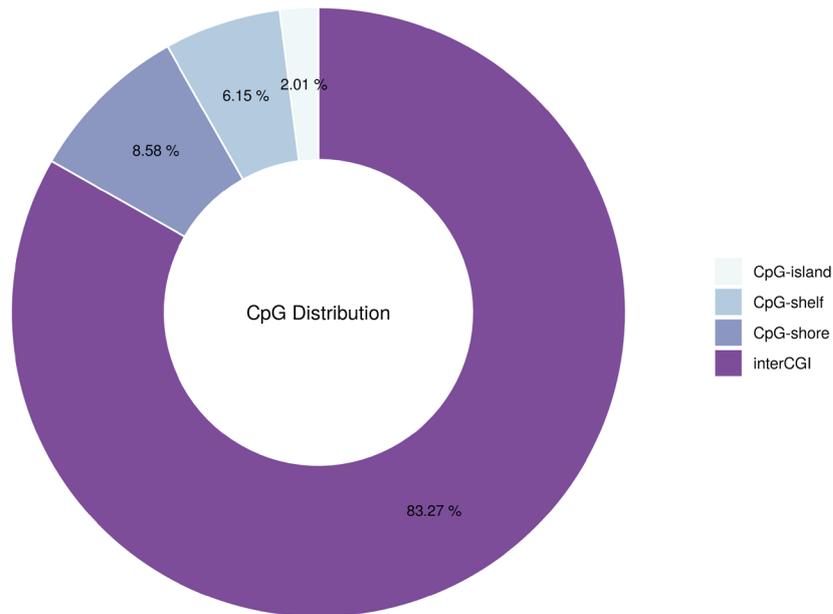


図 3 高メチル化 CpG の分布

コアが 20 未満の塩基等を除去、また、結果としてリードが 36 bp 未満になったリードの除去を行い、その結果、60%程度のマッピング率のリードを得た。トリミング後のシーケンスリードを、methylypy を用いてリファレンスゲノムへのマッピングを行った。リファレンスゲノムには C57BL/6J のゲノムを基盤とした GRCm38 を用いた。その結果、シーケンスリード数として、500 M~630 M reads が確保できた。次に、MethylKit を用いて、メチル化シトシンの抽出および特異的メチル化領域の抽出を行った。その結果、図 3 に示すように、大半のメチル化 CpG は、CpG island (200 塩基以上の領域で G : C 塩基対の含有率が 50 % 以上であるゲノム領域) 間のゲノム領域に存在する事が明らかになった。CpG island 周辺の 2 kb 程度の領域を CpG shore と定義するが、この領域のメチル化の割合が次に高く、CpG shore のさらに 2 kb の周辺領域を CpG shelf と定義するが、この領域の割合がそれに続いていた。最後に、CpG island 自体のメチル化の割合はこの分類の中で最も低かった。

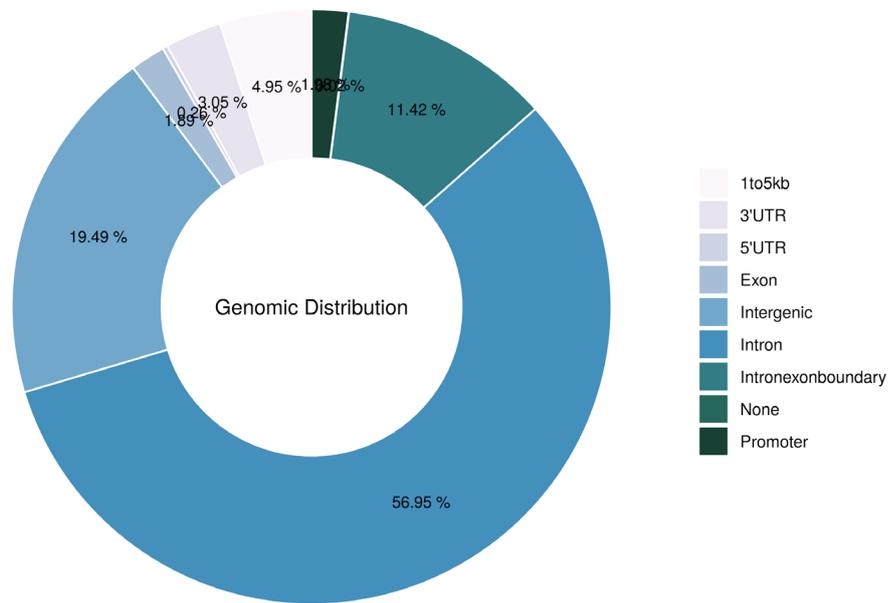


図4 高メチル化 CpG のゲノム内での分布

また、図4に示すように、ゲノム領域別のメチル化率の解析では、遺伝子領域内のイントロンのメチル化率が最も高く、高メチル化領域の半数以上が遺伝子領域内のイントロンに局在していた。次に高メチル化率の高い領域は、遺伝子が散在するゲノム領域内の遺伝子間の領域で、3'非翻訳領域 (UTR)、エクソンが続く。これに対し、5'UTR は高メチル化率が低く、最もメチル化率の低いのがプロモーター領域であることが明らかになった。

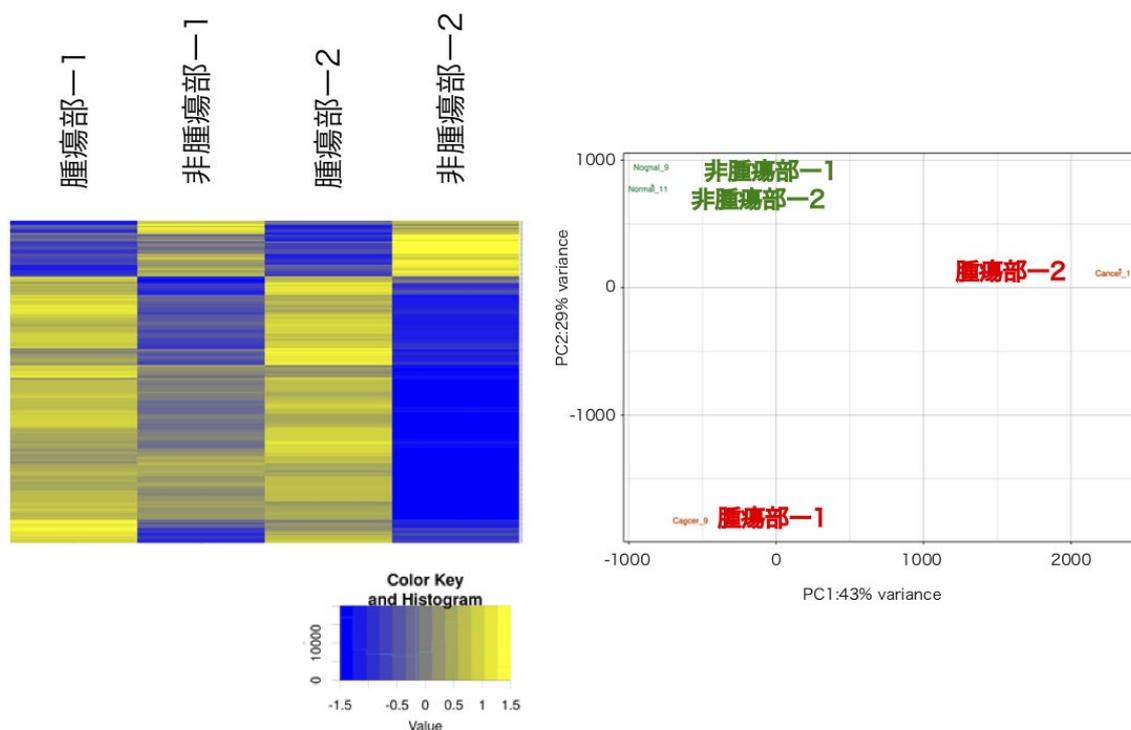


図5 メチル化率のヒートマップ（左）およびメチル化率による標本の主成分分析（右）  
左図では、メチル化率の高い領域を黄色で、低い領域を青で示した。

また、同一標本から採取した腫瘍部と非腫瘍部のメチル化率の比較を領域毎に分けて比較したところ、図5左図のように、腫瘍部と非腫瘍部のメチル化の領域が明確に区別できる事が明らかになった。さらに、メチル化率による主成分分析を実施したところ、非腫瘍部はいずれも近傍にプロットされるのに対し、腫瘍部は、標本毎に、別々の位置にプロットされ、肝腫瘍の多様性が反映される結果となった。

#### IV 考察

##### 研究項目1：ゲノム変異シグネチャー解析

肝腫瘍凍結標本アーカイブから、肝細胞がんを含む組織標本を選び、同一個体の肝臓の別葉で、腫瘍を含まないものを非腫瘍部として用い、それぞれから、ゲノムDNAを抽出し、200ng程度を用いてゲノムライブラリーを調製し、Illumina社製NovaSeq 6000により全ゲノムシーケンスを実施する実験フローを確立した。クオリティチェックにより、シーケンス産物が高クオリティである事を確認し、トリミング後でも97%以上のマッピング率の高クオリティリードが得られる事が確認され、変異シグネチャー解析に十分な品質のシーケンス産物の取得を可能にしたと結論できる。

次に、トリミング後のシーケンスリードを、レファレンスゲノムであるC57BL/6Jのゲノムを基盤としたGRCm38にマッピングした。重複リード除去後のシーケンスリード数は、500M~630M readsで、重複リード除去後のbamファイルに対して、samtoolsを用いて、一塩基置換(SNV)および挿入/欠失(INDEL)を抽出したところ、700万近くのSNV/INDELを同定し、変異シグネチャーに十分な数のSNV/INDELを取得できたと考える事ができる。興味深い事に、このうち半数は、

遺伝子領域外の変異であり、遺伝子内であってもイントロン領域に同定された変異は変異全体の35%程度で、これらの変異を足し合わせると、変異全体の90%以上の変異になる事がわかり、がん関連遺伝子だけでなく、これらのゲノム領域に同定される変異シグネチャーも解析の対象にする事も考える必要があると考えられる。一方、遺伝子コード領域における変異のうち、サイレント変異は2万5千個程度、ミスセンス変異は1万5千個程度同定された。遺伝子融合変異も2種検出され、これら変異遺伝子産物の機能のエンリッチメント解析によるクラスタリングにより、発がん関連遺伝子の変異シグネチャーの同定を可能にした。

これまで解明された変異の中で最も多かったのがチミンへの変異であったが、そのうちシトシンからの変異、C>T変異が、全体の65%近くを占めていた。C>T変異は、シトシンあるいは5-メチルシトシンの自然に起こる脱アミノ化により引き起こされる、自然点突然変異の代表的な変異シグネチャー（SBS1、クロック様シグネチャーと呼ばれる）で、今回の検討でも、腫瘍部でも非腫瘍部でも、共通して高頻度に検出される事がわかっており、これらの変異シグネチャーが発がん関連遺伝子に関わっていた際は、自然発がんと同じプロセスで誘発されたがんであると判断する事ができる。

さらに、ゲノム欠失などのゲノム構造異常（SV）に関しては、腫瘍部で、15塩基の欠失が認められ、非腫瘍部では欠失が認められないことから、がん細胞で当該遺伝子の片アレルに特異的に欠失が生じたことが明らかになった。当該遺伝子であるASMT遺伝子は、脳で発現が認められる遺伝子であることから肝腫瘍に直接関与している可能性は低いですが、同様の手法を応用する事により、腫瘍部でのゲノム変異シグネチャーを抽出するスキームが樹立されたといえる。興味深い事に、欠失領域周辺の塩基配列を読み込むと、欠失領域上流と下流の近傍に特異的な反復配列、GGC、が出現している事がわかり、誘発されたDNA二重鎖切断の修復に、マイクロホモロジーを介したalternative-非相同末端結合修復（a-NHEJ）が関与した可能性が考えられた。この変異シグネチャーは、COSMIC変異シグネチャーのID8に相当し、腫瘍部で放射線照射に関連して誘発された変異シグネチャーである可能性が高い。

以上の研究成果から、本研究項目で今年度設定したマイルストーンは全て達成し、次年度の研究計画に向けた準備が全て整備されたと結論できる。

## 研究項目2：組織シグネチャー解析

肝腫瘍組織から採取したゲノムDNAにおけるゲノム変異シグネチャー解析から寄与割合を算出する際には、腫瘍組織中の正常細胞の混在比が結果に大きな影響を及ぼす。このため、標本採取の際に同時に作成した固定組織標本から組織薄切切片を作成し、多重蛍光免疫染色法により、がん細胞とがん関連組織微小環境を構成するがん細胞以外の細胞を区別する手法の確立を行った。

様々な一次抗体を検討した結果、腫瘍細胞の占有率を算出するための抗体としては、Cytokeratin-18およびE-cadherinが有効である事をつきとめた。そこで、画像解析ソフトであるImage-Jを用いて、DAPIに由来する楕円の青色蛍光シグナルを細胞核と指定し、その数を総細胞数として計測した。一方、肝腫瘍部で特異的な染色が見られたE-Cadherin陽性細胞を、細胞辺縁の矩形染色パターンにより各々の細胞を認識させ、抗E-cadherin抗体により染色される細胞数を全細胞数で除して占有率を算出する評価系を確立した。その結果、肝腫瘍組織における腫瘍細胞の占有率には、標本毎の有意なばらつきが存在するため、標本毎に占有率の評価を行う必要性が明らかになった。

以上の研究成果から、本研究項目で今年度設定したマイルストーンは全て達成した。

### 研究項目 3：放射線発がん実験

低線量放射線により誘発された肝腫瘍のゲノム変異シグネチャーの解析に供するために、放射線誘発肝腫瘍および自然発症肝腫瘍を採取するために、B6C3F1 雄マウスを用いた放射線発がん実験群を設定して、小児期の放射線照射を行うために、1 週齢において放射線照射 ( $^{137}\text{Cs}$  線由来) を実施した。線量率は、0.1 Gy、1 Gy および 4 Gy で、線量率は 0.5 Gy/min である。照射を終了したマウスを再び飼育施設にもどし、生涯飼育を継続している。毎週の定期的な飼育観察および体重測定を継続している。令和 4 年 4 月 1 日現在、最も飼育日数が進んでいる 4 Gy 照射マウスで 35 週齢に達している。飼育途中の触診によるがんの発生は未だ認められていないが、症状の悪化が認められた 1 例で胸腺リンパ種が、また 2 例で B リンパ腫が認められた。これらのマウスについては、肝臓には異常が認められないため、正常肝組織のコントロールとして組織を凍結保存に供し、本研究項目で今年度設定したマイルストーンは全て達成した。

### 若手研究：メチル化シグネチャーの解析

肝腫瘍凍結標本アーカイブから、肝細胞がんを含む組織標本を選び、同一個体の肝臓の別葉で、腫瘍を含まないものを非腫瘍部として用い、それぞれから QIAmp Fast DNA Tissue Kit によりゲノム DNA を抽出し、200 ng 程度を用いて、Zymo Research EZ DNA Methylation Gold Kit を用いて、バイサルファイト処理を行い、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、調製したゲノムライブラリーを Illumina 社製 NovaSeq 6000 によりシーケンスしてメチル化部位の同定を行った。トリミング後のシーケンスリードを、methylpy を用いてリファレンスゲノム (C57BL/6J のゲノムを基盤とした GRCm38) にマッピングした結果、シーケンスリード数として、500M~630M reads が確保でき、今後の解析に十分なシーケンスリードを確保する系が確立できた。

次に、MethylKit を用いて、メチル化シトシンの抽出および特異的メチル化領域の抽出を行った結果、大半のメチル化 CpG は、CpG island 間のゲノム領域に存在する事が明らかになった。また、ゲノム領域別のメチル化率の解析では、遺伝子領域内のイントロンのメチル化率が最も高く、次いで 3' 非翻訳領域 (UTR)、エクソンが続いた。最もメチル化率の低いのがプロモーター領域であった。そこで、同一標本から採取した腫瘍部と非腫瘍部のメチル化率の比較を可能にするため、MethylKit により領域毎に分けてメチル化率の比較したところ、腫瘍部と非腫瘍部を明確に区別して描画する事が可能になった。さらに、メチル化率をもとに主成分分析を実施したところ、非腫瘍部のプロットは、いずれもほぼ同様の位置にプロットされるのに対し、腫瘍部は、標本毎に、別々の位置にプロットされ、肝腫瘍の属性に顕著な違いがあることが判明した。もともとがんは極めて多様性の高い細胞集団で、診断されるまでに多くのクローン進化をする事が最近の研究で明らかにされているが、本研究でもがんの多様性が反映される結果を得る事ができた。

以上の研究成果から、本研究項目で今年度設定したマイルストーンは全て達成し、次年度からのメチル化シグネチャー解析に着手するための予備実験は全て完了した。

## V 結論

令和 3 年度には、発がん実験用のマウスの購入、および放射線照射を終了し、終生飼育を開始した。また、これまでの環境省『放射線の健康影響に関わる研究調査事業』で得られた動物実験発がんアーカイブから肝腫瘍を選別し、ゲノム DNA の抽出から変異シグネチャー解析までの解析系

の樹立に着手した。あわせて、がん細胞の占有率を推定に不可欠な、がん関連微小環境評価のための多重免疫染色法を確立した。若手研究者を活用した研究の加速化については、動物実験発がんアーカイブから選別した肝腫瘍を共有し、ゲノムDNAの抽出からメチル化シグネチャーの解析までの解析系を確立するための予備実験を完了した。

## VI 次年度以降の計画

研究計画は3年間の計画であるが、2年目である令和4年度には、これまでの環境省『放射線の健康影響に関わる研究調査事業』で得られた動物実験発がんアーカイブを活用し、非照射コントロール群並びに放射線（3 Gy）誘発肝腫瘍からゲノムを抽出して、初年度に確立したゲノム変異シグネチャー解析技術によるシグネチャー解析を継続して実施する。また、固定組織標本における、がん細胞の占有率評価も継続すると共に、がん関連組織微小環境の解析手法の樹立を目指す。また、令和4年度後半には、初年度に照射を行った実験群に肝腫瘍の誘発が見込まれるため、誘発された肝腫瘍を採取し、組織標本の作成およびゲノムDNAの調製を順次行い、ゲノム変異シグネチャー解析に供して解析を実施する。また、若手研究者による研究計画では、初年度に予備実験を終了した手法により、肝腫瘍凍結標本から採取したゲノムDNAを用いて、放射線特異的なメチル化シグネチャーの抽出と放射線特異的メチル化シグネチャーによる発がんへの放射線寄与割合の評価に着手する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Kawamura K Suzuki K Mitsutake N. A simple and robust real-time quantitative PCR method for the detection of radiation-induced multiple exon deletions of the human HPRT gene, *radiat Res* 2021; 196: doi: 10.1667/RADE-21-00047.1.

引用文献

なし

# Elucidation of mechanism and contribution of low-dose radiation to carcinogenesis using mutation signature analysis

Keiji Suzuki, Kasumi Kawamura

*Department of Radiation and Life Sciences, Nagasaki University Atomic Bomb Disease Institute*

*Keywords:* low-dose radiation, carcinogenesis, mutation signature, methylation

## **Abstract**

After the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident in 2011, much attention has been paid for the health risks associated with annual low-dose radiation exposure. The Health Management Survey governed by the Fukushima prefecture has already reported that probable radiation dose delivered to children is sufficiently low not to cause any noticeable delayed effects, although there is still anxiety about cancer risk from radiation exposure to low-dose at low-dose rate. Since we have applied the LNT model from the radiation protection point of view, even low-dose at low-dose rate radiation is estimated to have cancer risk. However, considering that cancer development is a multistep process, natural mutation processes should be involved even in radiation-induced cancer. Theoretically, if radiation dose is lower, the contribution of radiation to the mutagenic process of cancer development is lower. If the dose rate is lower, the contribution should be much lower, indicating that the fraction of radiation contribution to mutagenic cancer process must be the one that should take into consideration, but we currently have no way to determine it. Therefore, we proposed the current project to establish the scientific framework to estimate contribution of radiation exposure to individual cancer by using mutation signature analysis.

In order to discriminate contribution of radiation exposure we have applied COSMIC mutational signatures, which classified several mutation signatures by their etiology. For example, the single base signature 1 (SBS1) is a well-known mutation signature caused by spontaneous cytosine deamination. Insertion/deletion (ID) signature is one of the COSMIC signatures, and particularly ID8 is the one associated with DSB repair, so that we have focused on the fraction of ID8 signature among mutations detected in cancer-related genes in radiation-induced mouse liver cancers. The project also plans to examine methylation signature associated with radiation exposure. We currently succeeded in establishing the experimental systems and identified cancer-specific signatures.