

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	ロングリード解析を用いた放射線刻印の同定と福島小児甲状腺癌への応用
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	光武 範吏	長崎大学・教授

氏名		所属機関・職名
研究協力者	吉浦 孝一郎	長崎大学・教授
研究協力者	三嶋 博之	長崎大学・助教
研究協力者	サエンコ ウラジミール	長崎大学・准教授
研究協力者	鈴木 眞一	福島県立医科大学・教授
研究協力者	岩館 学	福島県立医科大学・講師
研究協力者	山下 俊一	福島県立医科大学・副学長

*必要に応じて行を適宜追加。

研究要旨	<p><i>HPRT</i> 変異クローン（無処理、放射線照射、ENU 処理）と無選択クローン、合計 27 クローンに対してショートリードとロングリードの両プラットフォームにて全ゲノムシーケンシングを完了した。リピート領域等を除いた約 50%のヒトゲノム領域について、一塩基置換、短い挿入欠失、長い欠失を中心とした解析を行った。放射線照射クローンに特徴的な変異、特にメガベース以上の長い欠失等を検出している。今後、さらに解析を進め、実際の症例に利用可能な変異の同定を進める。福島県で発見された小児・若年者甲状腺癌に関しては、収集した症例について既知のドライバー変異解析を完了し、全ゲノム解析を行う症例群の設定が完了、一部の症例についてシーケンシングを行った。</p>
キーワード	放射線、ロングリード次世代シーケンス解析、甲状腺癌

I 研究目的

人体への放射線被ばくの晩発影響として最も重要なものは発癌である。しかし、癌は一般集団によく見られる疾患であり、あるひとつの癌が放射線によって引き起こされたものか、その他の原因で起きたものかを区別する方法は今のところない。福島第一原発事故の後、多くの小児・若年者甲状腺癌が発見された。これらの被ばく線量は極めて低いと思われ、事故により放出された放射性ヨウ素との関連はないと考えられているものの、個々の症例における明確な分子エビデンスはない。そこで本研究の目的は、最新のゲノム解析技術を駆使して、放射線ゲノム刻印の存在を明らかにし、同様の技術を用いて福島県小児・若年者甲状腺癌のゲノム解析を行い、これらの刻印が存在するかを検証すること、さらには本研究の学術成果によって、福島県民の健康管理や不安への対応策の有効性をさらに向上させることである。

前年度は、放射線被照射後の細胞クローンの樹立を完了させ、PCRによるエクソン欠失データを確認、全ゲノムシーケンシングを行う24クローンを選び出し、そのうち16クローンに関してショートリードとロングリードによる全ゲノムシーケンシングを完了した。

本年度の目的は、上記細胞クローンのゲノムに対してショートリードとロングリード次世代シーケンシングを完了させ、データ解析によって放射線刻印の同定を行うこと、福島県小児・若年者甲状腺癌の症例に対して既知の遺伝子変異の解析を行い、全ゲノム解析のための群を設定し、実際にシーケンシングを開始することである。

II 研究方法

前年度、正常ヒト線維芽細胞にヒトテロメラーゼ (*hTERT*) 遺伝子を安定導入して不死化させた BJ1-hTERT 細胞を用いた。¹³⁷Cs- γ 線 (線量率: 1 Gy/min) 1, 3, 6 Gy、もしくは N-ethyl-N-nitrosourea (ENU, 1 mM で 1 hr 処理) によって突然変異を導入、6-thioguanine (6-TG) 存在下で培養し、細胞クローンを樹立した。また、コントロールとして、無処理 6-TG 存在下、非存在下 (クローニングのみ) で樹立したクローンも準備した。

本年度に行った全ゲノムシーケンシングは、前年度同様、ショートリード解析は MGI 社 DNBSEQ-T7、ロングリード解析は Oxford Nanopore Technologies (ONT) PromethION を用いて行った。ショートリードの一塩基置換と短い挿入・欠失の解析には、GATK4 の HaplotypeCaller、構造異常解析には、ショートリードは manta、ロングリードは sniffles を使って変異コールを行った。Manta はすべてのサンプルを一度にまとめてコール出来ず、vcf ファイルのマージには SURVIVOR を用いた。得られた vcf ファイルを元に、genotype や variant allele frequency、supported read 数等を使って variant を抽出した。

福島小児・若年者甲状腺癌の既知遺伝子変異は、点突然変異はサンガーシーケンシングで、融合遺伝子は定量 RT-PCR 法にて検出を行った。

(倫理面への配慮)

本研究内容は、福島医大、長崎大学ともにヒトゲノム遺伝子解析研究の倫理審査会で承認を受けた (長崎大学許可番号20131010-6)。患者、もしくは代諾者よりインフォームドコンセントを取得した。

III 研究結果

令和2年度

放射線やENU処理なしに樹立したクローンをコントロールとし、すべての処理（ γ 線 1, 3, 6 Gy, ENU 1mM）より複数のクローンを樹立することが出来た。それぞれの樹立したクローン数とエクソンの欠失状態を以下に示す。被ばく線量の増加によって、明らかに欠失を持つクローンの割合が増加した（表1）。

表1 Established HPRT-mutated clones

実験群	樹立クローン数	全エクソン欠失	エクソン部分欠失
コントロール	16	0/16 (0%)	0/16 (0%)
γ 線 - 1 Gy	27	0/27 (0%)	1/27 (3.7%)
γ 線 - 3 Gy	27	1/27 (3.7%)	3/27 (11.1%)
γ 線 - 6 Gy	33	10/33 (30.3%)	6/33 (18.2%)
ENU	24	0/24 (0%)	2/24 (8.3%)

このうち、コントロール、1 Gy、3 Gy、6 Gy から5クローンずつ、ENU から4クローン、合計24クローンを選択し、コントロール、1 Gy、3 Gy のクローン全てと6 Gy のクローン1つ（計16クローン）についてショートリードとロングリード法による全ゲノムシーケンスを施行し、配列データを得た。

令和3年度

無処理6-TG選択クローン（Sp）5クローン、ENU 6-TG選択クローン（enu）4クローン、1, 3, 6 Gy照射後6-TG選択クローン（1Gy, 3Gy, 6Gy）それぞれ5クローン、無処理クローニングのみ（6-TG不使用）のみ3クローン、合計27クローンについて、150 bp ペアエンドのショートリードシーケンシング（MGIプラットフォーム）、ロングリードシーケンシング（ONTプラットフォーム）を完了した。

1000 Genome Project の成果として、ヒトゲノム上でショートリードによるシーケンシングを比較的正確に行うことができる領域を登録したデータがあり、これにさらに RepeatMasker、WindowMasker によるリピート配列、Segmental duplication のデータを組み合わせ、ショートリードシーケンシングでデータの信頼性が高いと思われる領域（全ゲノムの約50%）を設定した。コールされた変異のうち、領域とオーバーラップがあるもののみを抽出して解析した。

一塩基置換（SNV）と短い挿入・欠失（INDEL）は、さらにカバレッジ20未満のものを取り除いた。3個の無処理クローニングのみクローン間で異なる変異を抽出したところ、約2600個コールされており、単純な細胞培養環境でも多くの変異が入ることが示唆された。無処理クローニングのみクローンに見られた変異は除去し、放射線照射クローンで見られた変異の特徴をSigProfilerMatrixGeneratorで解析した。Spクローンとの比較では、C>A変異、C>G変異、T>C変異の一部でsignatureの違いを示唆するデータを得た（図1矢印）。

構造変異（SV）に関しては、ロングリード解析がより正確にマッピングされ、20 kbp程度までの欠失（DEL）を直接的に観察することができた。本年度は、SVのうちDELについて集中的に解析を行った。放射線照射クローンでは、HPRT遺伝子周囲に線量に従って頻度、大きさともに増加するDELが観察された（図2）。次に、こちらも無処理クローニングのみクローンに見られた変

異は除去し、全 DEL についてその長さをプロットしたところ、放射線照射クローン特異的に 1 Mbp を超える長さの DEL が観察された (図 3、赤丸)。また、これら放射線によると考えられる 1 Mbp を超える DEL の breakpoint の両端には、manta で出力されるホモロジーシーケンスはほとんど観察されなかった。

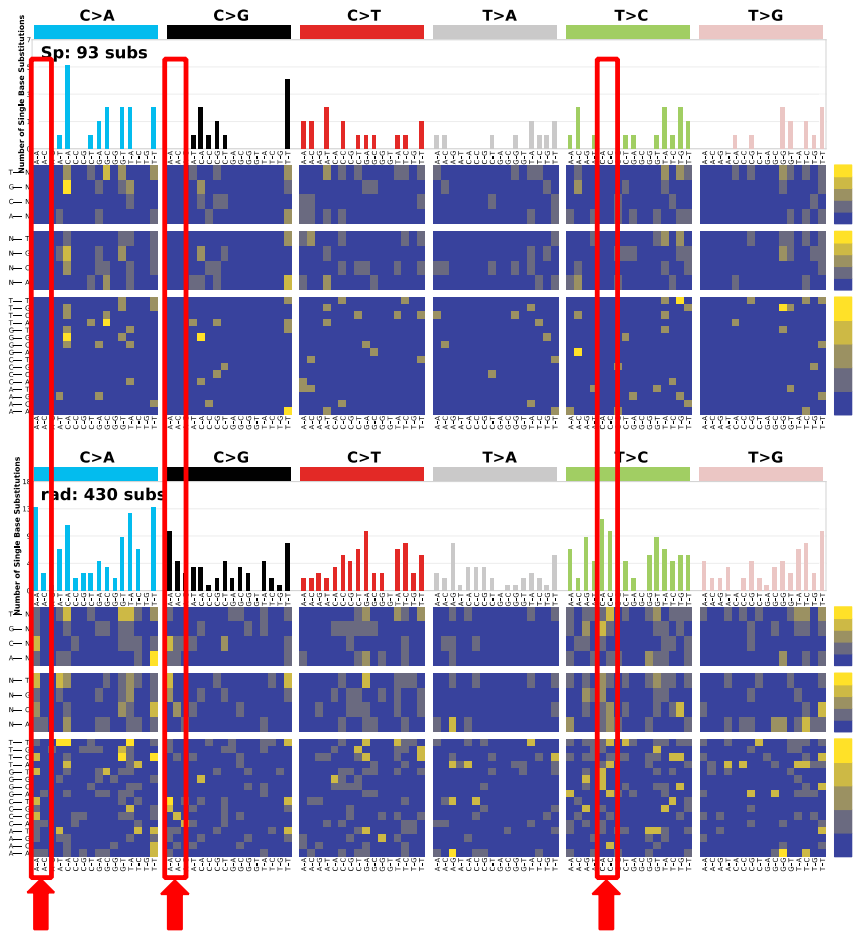


図 1 Mutation signature, SNV

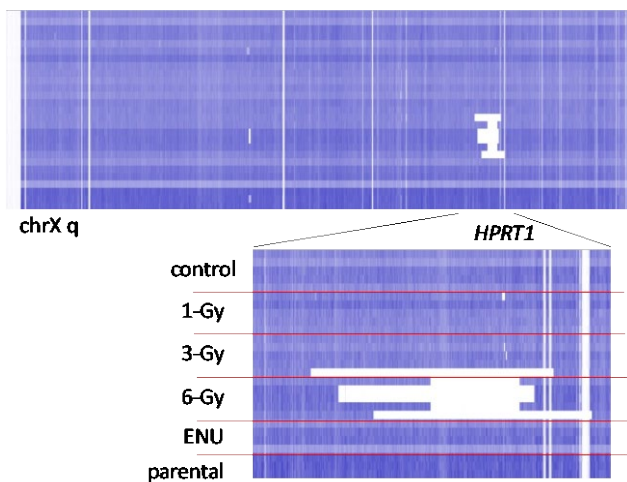


図 2 Read coverage of chrX.q and around the *HPRT1* gene

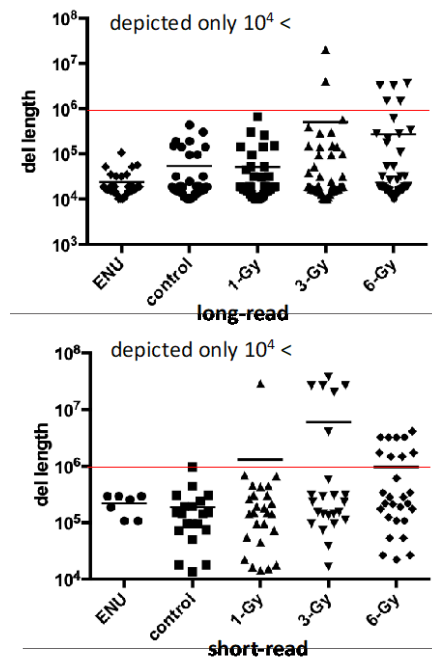


図 3 Deletion length of the clones

複数のクローンで同じ変異が観察され、変異が入りやすいローカスの存在が示唆されたが、今後、詳細な検討が必要である。

福島県立医科大学より提供を受けた小児・若年者甲状腺腫瘍について、既知のドライバー遺伝子変異の解析を行った。176例の乳頭癌(男性70、女性106、年齢の中央値18歳)のうち、*BRAF^{V600E}*変異が114例(64.8%)、*RAS*変異1例(0.6%)、*RET/PTC*17例(9.7%)、*ETV6/NTRK3*7例(4.0%)であった。代表者が2015年に発表した乳頭癌63例の結果との比較、さらには全症例から前述した早期に発見された63例を除く後期に発見された113例の結果との比較において、いずれも遺伝子変異のプロファイルには有意な変化は認められなかった。チェルノブイリ原発事故後に甲状腺癌症例が増加した事故後4~5年を経過した後も、チェルノブイリ放射線誘発癌で高頻度に検出された*RET/PTC*の増加は見られず、*BRAF^{V600E}*変異がドライバー変異の主体であった。このことは、福島県で発見された小児・若年者甲状腺癌の発症機序に変化はなく、事故後4~5年を経過した後も、放射線の影響は見られていないことを示唆する。

次に、本研究で解析する症例を以下の3群に分けて選び出した。

1. 事故後早期に発見され、比較的高齢、*BRAF^{V600E}*変異あり：最も放射線の影響と考えられない群
2. 事故後早期に発見され、比較的若齢、*RET/PTC*をはじめとした融合遺伝子あり：放射線によるものと考えするには潜伏期が短すぎる群、3との比較対象となる
3. 事故4~5年以降に発見され、比較的若齢、*RET/PTC*をはじめとした融合遺伝子あり：潜伏期、遺伝子変異的にはチェルノブイリ放射線誘発癌と最も近い群

それぞれの群で5症例ずつの解析を開始した(表2)。

表2 Candidate Fukushima cases for WGS

onset	age	sex	oncogene
≤ 2014	9	F	RET/PTC1
≤ 2014	21	F	BRAFV600E
≤ 2014	21	F	BRAFV600E
≤ 2014	20	F	BRAFV600E
≤ 2014	18	M	AFAP1L2/RET
≤ 2014	13	F	PPFIBP2/RET
≤ 2014	20	M	BRAFV600E
≤ 2014	20	F	BRAFV600E
≤ 2014	17	F	RET/PTC1
≤ 2014	20	F	RET/PTC1
≤ 2018	18	M	RET/PTC3
≤ 2018	15	F	RET/PTC1
≤ 2020	13	F	RET/PTC1
≤ 2020	19	F	RET/PTC1
≤ 2020	12	F	RET/PTC3

IV 考察

予定通りBJ1-hTERT細胞を用いた*HPRT*変異クローンのシーケンシングは完了し、詳細な解析が進行中である。通常の細胞培養環境でも多くの変異が入ることが示唆され、放射線によって単純に「数」の変化を検出するだけでは、多数の対象を用いた解析が必要、かつ確率を得られるのみとなる可能性が考えられた。SVに対する解析については、ショートリードでも近年のソフトウェアの進歩によりかなりの変異コールが可能であるものの、ロングリードではさらに正確に検出できると考えられた。DELの解析について、Mbp以上のサイズの欠失は放射線照射クローンにしか見られず、放射線特異的であることが示唆された。ただ、それが起きる頻度はそう高くはなく、低線量被ばくの指標とできるかは疑問である。今後は、放射線特異的な追加指標を探索する必要があると考えられた。

福島小児・若年者甲状腺癌に関しては既知のドライバー変異の解析は完了し、解析に供する症例群の設定を行うことができた。予定通りシーケンシングを開始しており、これら貴重な症例の癌ゲノムデータが得られることが期待される。

V 結論

*HPRT*変異クローンの全ゲノムシーケンシングのデータ解析を行い、放射線照射クローンに特異的な変異を検出した。実際のヒト症例へ応用するにはさらなる検討・解析が必要と考えられた。

VI 次年度以降の計画

福島小児・若年者甲状腺癌症例のゲノム解析を完了させる。引き続き、*HPRT*変異クローンのシーケンシングデータの解析を進める。解析する領域は再考する。欠失や逆位の周辺の配列（ホモロジーや欠失）の解析を行うことで、構造異常の原因を推測する。また、アレル頻度によってクローニング中の変異かどうかも判定する。変異のアノテーションを行い、変異の機能的意義も考慮する。

また、研究を加速するための手段として、鈴木啓司班で解析されるマウス放射線誘発腫瘍のゲノムデータ解析によって得られた知見を本研究に活かす。チェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺癌ゲノムデータとの比較を可能とするため、制限データへのアクセス許可取得を目指す。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

Iwadate M, Mitsutake N, Matsuse M, 他 The Clinicopathological Results of Thyroid Cancer with BRAFV600E Mutation in the Young Population of Fukushima. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dga573.

Kawamura K, Suzuki K, Mitsutake N. Technical Report: 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; Online ahead of print.

Mitsutake N, Saenko V. Molecular pathogenesis of pediatric thyroid carcinoma. *J Radiat Res* 2021; 62(Supplement/1): i78-i87.

引用文献

なし

Identification of genomic radiation signatures using long-read sequencing and its application to pediatric thyroid cancers in Fukushima.

Norisato Mitsutake

Professor, Nagasaki University

Key words: radiation, long-read next generation sequencing, thyroid cancer

Abstract

The aim of this study is to identify genomic radiation signatures using latest technologies of genome analysis, to verify the existence of these signatures in childhood and adolescent thyroid cancers found in Fukushima, and to further improve the effectiveness of measures for the health management and to reduce anxiety of the people living in Fukushima.

In this academic year, we completed whole genome sequencing using both short- and long-read sequencing platforms for a total of 24 *HPRT*-mutated clones (untreated, irradiated, and ENU-treated/selected with 6-thioguanine) and three untreated/unselected clones, all of which were established in the previous academic year. We analyzed approximately 50% of regions of the human genome, by excluding repeat sequences and segmental duplications, etc. We then focused on single nucleotide variants, short insertions and deletions, and long deletions. We found mutation signatures and long deletions (> 1 Mb) that were specifically found in the irradiated clones. Further analysis will be conducted to identify variants which can be used in the analysis of human cases.

For childhood and adolescent thyroid cancers discovered in the Fukushima prefecture, we completed the analysis of known driver mutations in all of the collected cases, established the the case groups for whole genome analysis depending on the year of onset and driver mutations, and started sequencing of some of the cases.