

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和4年度研究報告書

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
令和4年度研究期間	令和4年4月1日～令和5年2月28日
研究期間	令和3年度 ～ 令和5年度（2年目）

	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
分担研究者		
若手研究者	河村 香寿美	長崎大学原爆後障害医療研究所・特任研究員

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
-------	---------------------------

本年度研究成果
<p>I 研究背景</p> <p>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しなければならない。これまでも、放射線被ばくの寄与割合についての議論はあるが、あくまでも、発がんリスクに基づく算術上の議論であって、生物学的知見を根拠にしたものではなかった。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、発症したがんの放射線起因の可能性を払拭する事は不可能であり、『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。さらに、低線量放射線被ばく集団に発症したがんは、どんな低線量放射線であっても、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、本研究計画を提案するに至った。</p> <p>II 目的</p> <p>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、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解明に繋げるのが本研究課題の目的である。</p> <p>III 研究方法</p> <p>研究項目1：本研究で採取された肝腫瘍凍結標本から QIAmp Fast DNA Tissue Kit によりゲノム DNA を抽出し、NEB Next Ultra DNA Library Prep Kit によりゲノムライブラリーを調製した後、Illumina 社製 NovaSeq 6000 によりシーケンスを実施した。メチル化シグネチャー解析では、バイサルファイト</p>

処理後の DNA を用いた。シーケンス情報取得の基準として、平均リード数を 600M reads、平均データ量を 90 Gb とした。レファレンスゲノムに GRCm38 を用い、一塩基置換 (SNV) および挿入/欠失 (InDel) 情報は、発がん関連遺伝子に関連するものを抽出した。また、COSMIC が公開している変異シグネチャーデータベース¹⁾を参照にしてシグネチャータイプを抽出し、各肝腫瘍について個別にカタログ化し、同定された変異シグネチャー (SBS シグネチャー+ID 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) が検出される割合を算出し、これを放射線被ばく寄与割合とした。メチル化シグネチャーでは、Methylkit によりメチル化パターンの抽出を行った。研究項目 2 : 組織シグネチャー解析では、標本採取の際に固定組織標本を同時に作成し、多重蛍光免疫染色法により、がん細胞とそれ以外の細胞とを区別してがん細胞の占有率を算出した。研究項目 3 : 放射線発がん実験では、B6C3F1 雄マウスの小児期 (1 週齢) に放射線照射 (¹³⁷Cs γ 線、0.1 Gy、1 Gy および 4 Gy、線量率は 0.5Gy/min) を行い終生飼育を継続した。確認された肝腫瘍を含む肝臓組織は、凍結標本および固定標本作成に供した (本研究は長崎大学動物実験委員会等の承認を得て実施した)。

IV 研究結果、考察及び今後の研究方針

採取した肝腫瘍凍結標本 (合計 4 ケース) を用いて、腫瘍部位と、同一組織で別葉の非腫瘍部からゲノム DNA を抽出し、SNV および InDel シグネチャーを抽出した。SNV 変異の中で最も多かったのが C>T 変異で、全体の 65% 近くを占めており、腫瘍部でも非腫瘍部でも差は認められなかった。腫瘍部での変異シグネチャー解析の結果、老化に関連する SBS5 (98% 程度) および SBS1 (2% 程度) がほぼ 100% を占めていた一方、放射線シグネチャーである ID8 は全く抽出されなかった。メチル化シグネチャー解析でも、メチル化パターンに放射線照射の特徴は認められず、これらの結果から、放射線誘発腫瘍であるにもかかわらず、放射線の発がん変異における寄与割合はほぼ 0% で、誘発腫瘍は、自然誘発がんの増大による顕在化である可能性が示唆された。今後、自然誘発の肝腫瘍も含め、採取した標本での解析を継続して、放射線誘発腫瘍における放射線の寄与割合の解析を進める。

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ため、肝臓標本中の腫瘍部位を特異的に描画する CK8 抗体を用いて腫瘍占有率を算出したところ、4 例とも腫瘍占有率は 95% 程度であることが明らかになり、本研究で抽出した変異シグネチャーは 95% 程度が腫瘍細胞由来のものであると結論できた。今後、変異シグネチャー解析に供する標本について、腫瘍組織占有率の解析を重点的に実施する。

1 週齢において照射した実験群は、令和 5 年 2 月末現在で照射後 600 日を超え、これまでに、29 例の肝腫瘍 (アデノーマや肝細胞がんなどを含む) サンプルの採取を終えた。いずれも 4 Gy 照射群からの標本であるが、令和 5 年度前半には、低線量照射群および非照射群からの肝腫瘍の誘発が期待される。これら実験群での腫瘍形成が確認され次第、変異および組織シグネチャーの解析に供する。

V 結論

終生飼育を継続している放射線照射マウス群 (4 Gy 照射群) において、複数の肝腫瘍の発生を確認し、腫瘍病理学的解析から肝細胞がんと認めた標本では、腫瘍特異的抗体により、腫瘍占有率が 95% 以上であることを確認した。採取された腫瘍組織および対になる正常組織よりゲノム DNA を精製し、次世代シーケンサーによる解析の結果、発がん関連遺伝子において、腫瘍組織特異的な SNV を多数同定し、C>T および T>C 変異を、変異全体の 60% 以上を占める特徴的な変異シグネチャーとして抽出した。COSMIC 変異シグネチャー解析では、SBS5 が優先的に抽出された一方で、放射線シグネチ

ヤーである ID8 は抽出されなかった。メチル化シグネチャー解析でも、放射線特異的シグネチャーは認められなかった。SBS5 は、クロック様シグネチャーとして知られる老化関連シグネチャーであることから、放射線誘発腫瘍は、放射線照射により肝臓の組織老化が早期化し、自然発症のがんが早期に顕在化した結果ではないかと推察され、この可能性は、令和5年度に発症が期待される非照射マウス群の肝腫瘍の解析を通じて検証する予定である。

引用文献

1. Alexandrov LB, Kim J, Haradhvala NJ, et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*, 2020; 578: 94-101.