

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 若手研究項目「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」
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性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<u>証明する術を我々は持たない</u>。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、主任研究者による発がん関連遺伝子におけるゲノム変異シグネチャー解析と協働しながら『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』という切り口を新たに確立し、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（若手加速化研究）の目的である。</p> <p>III 研究方法</p>

本研究で採取された肝腫瘍凍結標本から採取したゲノム DNA を用いて、Whole genome Bisulfite Sequencing (WGBS) を実施し、発がん関連遺伝子および Gene body に残された DNA methyltransferase (DNMT) に関連するメチル化シグネチャーの解析を行った。組織からのゲノム DNA の抽出は、QIAmp Fast DNA Tissue Kit により行い、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、WGBS 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、取得リード数をサンプルあたり 600 M リード、また取得データ数をサンプルあたり 90Gb として実施した。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。

同一標本から別に採取した正常肝臓組織も同様にして解析を行い、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した。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、Gene body を中心に、全ゲノム領域をカバーして解析を進めた。

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、WGBS を実施した後、得られたシーケンス情報を methylkit を用いて解析し、CpG アイランドを対象にして、25%を超えるメチル化率の変動があったシトシンを抽出し、各シトシンに遺伝子領域情報をアノテーションした。

その結果、まず、ゲノム全体でメチル化率の亢進がみられたシトシンは全体の 40%程度、一方、メチル化率の減少がみられたシトシンは全体の 60%程度であることが明らかになった、遺伝子領域としてアノテーションされた情報を、ゲノムブラウザーである Igv により表示させると、アメリカ国立生物学情報センター (NCBI) にがん関連遺伝子として登録されている遺伝子領域に、がん組織でメチル化が亢進した領域が一致するものが複数同定された。メチル化の亢進があった領域は、エキソン内、イントロン内、あるいは遺伝子上流領域と多様であり、染色体 1 番、7 番、14 番、15 番に散在していた。これら遺伝子について、Metascape によりパスウェイおよびプロセスエンリッチメント解析を実施したところ、姉妹染色体動態や細胞増殖に関連する経路が抽出され、当該領域のメチル化率の亢進が、発がんのプロセスに関わることが示唆された。

次に、メチル化率の亢進があったシトシンを中心に、周辺の 7 塩基配列を抽出し、シグネチャー分類を実施した。その結果、(A/G/T) (A/C/T) (A/G/C) CG (G/T/C) (A/G/T) 配列が高頻度に出現する塩基配列として抽出された。同配列を、DNA 損傷修復に関連する DNA メチル化酵素である、DNMT のメチル化シグネチャーと比較すると、いずれも、TCCGTA、T*CGCCA、および TACGGC という、DNMT1 および DNMT3A/B に特徴的なメチル化配列とは特異的な相同性を有しないことが明らかになった。

1 週齢照射実験群は、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ている。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、これら実験群での腫瘍形成が確認され次第、メチル化シグネチャーの解析に供する予定である。

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) において同定された複数の肝腫瘍から採取されたゲノム DNA を、対になる正常組織より採取されたゲノム DNA とともに精製し、次世代シーケンサーによる WGBS 解析を行った結果、複数の発がん関連遺伝子におけるメチル可変同領域の同定に成功した。メチル化シグネチャー解析の結果、放射線特異的シグネチャーは認められず、放射線誘発腫瘍には、放射線照射による痕跡が残されていないことが明らかになった。この結論は、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さらに検証する予定である。