

## 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	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
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2年度 ～ 令和4年度（3年間）

	氏名	所属機関・職名
主任研究者	光武 範吏	長崎大学・教授
分担研究者		
若手研究者		

キーワード	放射線、次世代ゲノム解析、ロングリード、変異、欠失、甲状腺癌
-------	--------------------------------

本年度研究成果
<p><b>I 研究背景</b></p> <p>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。放射線による発癌は、放射線によって引き起こされたゲノム DNA 上の変異が主たる原因とされるが、放射線によって生じる変異に関して、どのようなものが放射線に特徴的か、不明な点が多い。</p> <p><b>II 目的</b></p> <p>本研究の目的は、最新のゲノム解析技術を用い、放射線に特徴的な DNA 変異、いわゆる放射線ゲノム刻印の存在を明らかにすることである。また、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も検証する。また本研究の目的には、これらの結果により、福島住民の健康管理の推進に貢献することも含まれる。</p> <p><b>III 研究方法</b></p> <p>BJ1-hTERT 細胞を用い、放射線誘発 <i>HPRT</i> 変異クローンを樹立し、ショートリードとロングリード次世代シーケンシングによって全ゲノム解析を行った。また、福島原発事故後小児・若年者甲状腺癌に関しては、発症時期とドライバー変異の違いによって3グループ（事故後早期・<i>BRAF</i> 変異、事故後早期・<i>RET/PTC</i>、事故後4～5年経過後・<i>RET/PTC</i>）を設定し、同様にショートリードとロングリード次世代シーケンシングによる全ゲノム解析を行った。</p> <p>本研究は、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行われた（長崎大学許可番号 20131010-10）。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ている。</p>

#### IV 研究結果、考察及び今後の研究方針

本年度は、放射線誘発 *HPRT* 変異クローンのショートリードゲノムデータについて、正確にコールできていると考えられる領域のバリエーションを抽出する手法を導入した。BJ1-hTERT 細胞は、通常の培養下においてもかなりの数のバリエーションが生じ、放射線照射時に既にヘテロな集団であり、それぞれの細胞が多く異なるバリエーションを持った状態であることが分かった。そのため、各クローンのバリエーションデータを用い、細胞系譜の作成を行った。細胞系譜によって、バリエーション総数の比較や、完全ではないものの、自然発生と放射線誘発性バリエーションの区別が可能となった。また、ロングリードとショートリードデータの比較検討により、ショートリードでもかなり正確な欠失を選択することができる指標を得た。以上より、放射線被ばくによるゲノム変異として、以下の特徴が明らかになった。

1. 数ベースからキロベース以上まで、様々な長さの欠失が線量依存性に増加した。
2. 被ばくでは、非常に長大な欠失（数十万～メガベース以上）が生じた。
3. 被ばく後の欠失には、両断端にホモロジー配列がないものが多かった。また、高線量では断端結合部に別の配列を含むものが多かった。
4. 被ばくでは一塩基置換も増加したが、線量依存性はなかった。
5. 被ばく後の一塩基置換には、酸化損傷を示唆する変異シグネチャーが含まれていた。

さらに低線量における研究を進めるには、コストはかかるが解析数を増やすことで対応可能となる部分もあり、細胞のクローニングと系譜の作成を十分に考慮された実験系で行うことで、新たな知見が得られる可能性が高いと思われた。

福島小児・若年者甲状腺癌組織から抽出した DNA に対して、同様のショートリード、ロングリードによる次世代シーケンシングを施行した。一部の組織に関して、提供された量が少なく、RNA と DNA を同時に抽出する手法を用いたことが原因と考えられるが、特にショートリードシーケンシングのデータ品質が悪く、サンプル間で変異数の計測などが正確にできないことが予想され、本研究ではロングリードシーケンシングの結果を用い、限定的な解析となった。今回の研究では、事故後早期に発症した症例（事故前より発症していたことが推測される）のうち *BRAF* 変異もつ症例、*RET/PTC* 等の融合遺伝子を持つ症例、さらに事故後 4~5 年経過後に発症した症例のうち *RET/PTC* 等の融合遺伝子を持つ症例（チオルノービリ原発事故後に増加した甲状腺癌のタイプ）の計 3 群にて、放射線誘発 *HPRT* 変異クローンで最も特徴的であった欠失の数を比較したが、有意な差は観察されなかった。しかし、癌はそれ自体がゲノム不安定性を持つため、個々の癌を調べる場合、どうしても放射線被ばくに特異的な変異の同定が必要と感じられた。これは、DNA 配列のみの解析では難しい可能性が高く、次の段階としては、エピゲノム解析を組み合わせる必要が考えられた。

#### V 結論

ショートリードとロングリードによる次世代シーケンシングによって、数 Gy 程度の線量の放射線被ばく後のヒト正常細胞クローンにおける特徴的なゲノム異常を検出することが出来た。しかし、放射線に完全に特異的な変異の同定にまでは至らず、個々の甲状腺癌組織における放射線被ばく痕跡を判断するには、さらなる研究が必要である。また、本研究期間に確立した手法は、今後の放射線影響研究に活かせると考えられた。