

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和2年度～令和4年度実施総括報告書

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
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		

1. 研究の概要

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、被ばくした「集団」の癌発症数の増加は観察可能であっても、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。そこで本研究では、従来のショートリード次世代シーケンシングに加え、構造異常を直接的に検出可能である次世代シーケンシングであるロングリード解析を行い、放射線に特徴的なゲノム変異を明らかにすることを目的とした。また、同様の技術を使って福島小児・若年者甲状腺癌のゲノム解析も行い、放射線に特徴的なゲノム変異が見られないかも検討した。

本研究では、BJ1-hTERT 細胞に様々な線量の ^{137}Cs - γ 線、もしくは N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)処理を行い、6-thioguanine で培養することによって、多数の HPRT 変異クローンを樹立した。これらクローンからゲノム DNA を抽出し、ショートリードとロングリードの両プラットフォームで全ゲノム解析を行った。得られた変異データより、細胞系譜の作成を行い、放射線の影響と考えられる特徴的なゲノム変異を同定した。

福島小児・若年者甲状腺癌においても、発症時期やドライバー変異の違いによって抽出した症例に対して、上記のショートリードとロングリードの両プラットフォームで全ゲノム解析を行い、正常部：腫瘍部のペアで解析を行った。

2. 研究期間内に実施した内容

年目／実施年度	実施した内容
1年目	正常ヒト線維芽細胞にヒトテロメラーゼ (<i>hTERT</i>) 遺伝子を安定導入して不死化させた BJ1-hTERT 細胞に、 ^{137}Cs - 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。コントロール、1、3、6 Gy、ENU それぞれ 16、27、27、33、24 クローンよりゲノム DNA を抽出し、まず HPRT 遺伝子ローカスにおける各エクソン欠失の有無を PCR にて確認した。その結果を元に、全ゲノム解析を行うクローンを、コントロール、1、3、6 Gy より 5 クローン
令和2年度	

	<p>ずつ、ENU より 4 クローン、合計 24 クローンを選択した。令和 2 年度は、それらのうち、コントロール、1、3 Gy のクローン全てと、6 Gy のクローン 1 つについて、ショートリードによる全ゲノムシーケンシング (MGI 社 DNBSEQ-T7) とロングリードによる全ゲノムシーケンシング (Oxford Nanopore Technologies 社の PromethION) を施行した。</p>
2 年目	<p>令和 2 年度に選択した 24 クローンのうち、令和 2 年度において全ゲノムシーケンシングを施行しなかった残りのクローンに対して、令和 2 年度と同じプラットフォームにてショートリード、ロングリードによる全ゲノムシーケンシングを完了させた。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 数等を使ってバリエントを抽出した。</p> <p>福島県立医科大学より提供を受けた小児・若年者甲状腺癌について、正常部・腫瘍部より DNA ならびに RNA の抽出を行い、既知のドライバー遺伝子変異の解析を行った。BRAF 変異に関しては、DNA を用いたサンガーシーケンシングにて解析、RAS 変異は RNA から RT-PCR 後にサンガーシーケンシング、融合遺伝子に関しては、定量 RT-PCR 法にて解析を行った。</p>
令和 3 年度	
3 年目	<p>ショートリードに関して、コールされたバリエントが正確と考えられる領域、さらに性染色体を除いたものを対象とし、細胞系譜の作成を行なった。この作成した系譜より、放射線照射とは無関係に蓄積された非放射線バリエントと、放射線照射後に入ったと考えられるバリエントが濃縮されている放射線関連バリエントを抽出した。バリエントの総数は、想定される起始細胞からの総計とした。上記の非放射線バリエントと、放射線関連バリエントに対し、COSMIC mutation signature decomposition を行い、含まれている変異シグネチャの解析を行った。構造異常に含まれる大きな欠失については、ショートリードとロングリードの両方のプラットフォームから得られたデータを、コントロール、放射線、ENU 群にユニークなものを抽出し、Integrative Genomic Viewer で確認、正確な欠失のみを抽出した。その結果より、Manta vcf ファイルのパラメーター上で、正確な欠失を選択するのに有用なものを選び、大きな欠失に関しても各クローン細胞における総数を計測した。</p> <p>福島県立医科大学より提供を受けた小児・若年者甲状腺癌について、同様にショートリードとロングリードの次世代シーケンシングを行った。正常部・腫瘍部のペアでデータを取得し、ショートリードは strelka と manta、ロングリードは、DeepVariant と sniffles で変異コールを行った。</p>
令和 4 年度	

3. 研究終了時に得られた結果・結論

① 研究結果・結論（総括）・成果など

放射線照射後の *HPRT* 変異クローンの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り、ヒト正常細胞における放射線被ばくによる変異として、以下の特徴が明らかになった。1) 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。

HPRT 遺伝子変異は癌のドライバー変異のような役割であると考え、その解析も行った。低線量で見られた一塩基置換は、非照射クローンのもと同じものがほとんどであった。確率的にこれらの変異も放射線で生じた可能性が高く、低線量における一塩基置換は、放射線に特異的ではないことが示唆された。

チョルノービリ原発事故後に癌症例が増加した事故後4～5年を経過した後の症例も、福島小児・若年者甲状腺癌組織の癌遺伝子プロファイルには変化がないことを確認した。この結果は、これらの癌は放射線誘発ではないことを示唆する。

この中から、事故後早期に発症した症例のうち *BRAF* 変異もつ症例、*RET/PTC* を持つ症例（事故前より発症していたことが推測される）、さらに事故後4～5年経過後に発症した症例のうち *RET/PTC* を持つ症例（チョ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15例を選択し、ゲノム解析を行った。一部の組織に関して、提供された量が少なく、ショートリードのデータ品質が悪いため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。放射線誘発 *HPRT* 変異クローンで最も明らかに増加していた欠失の数を比較したが、有意な差は観察されなかった。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。

本研究で、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、これらの成果を低線量領域に適用できるかは疑問であり、その点に課題が残った。

② 計画・目標通り実施できなかった事項とその理由

放射線照射後の *HPRT* 変異クローンのゲノム解析では、放射線被ばくを受けた細胞に特徴的な変化を捉えることはできたものの、放射線被ばくに完全に特異的な変異とまでは確定できず、さらにそれらもかなりの高線量で見られたものであった。解析を難しいものにした理由としては、ヒト正常細胞でも通常の細胞培養条件（ウシ胎児血清や高濃度酸素存在下）でかなりの変異が入り、使用した細胞がすでになりにヘテロな集団であったことである。細胞系譜を作成することで、培養で入った変異と放射線が入った変異をある程度分けることができたものの、これも完全にはいかなかった。特異的な変異でなければ、低線量被ばくした対象を解析する場合、多数を解析したのちに統計学的な検定を行えば、確率を論じることはできるかもしれないが、それでは被ばく線量と同じことである。しかし、本研究で得られたショートリードとロングリードでの全ゲノムデータは、今後も開発されてくる新しい手法での再解析が可能であり、今後も研究を継続していく。

福島小児・若年者甲状腺癌組織の一部は、腫瘍のサイズが小さく、提供された組織の量が十分でな

かったため、当初既知のドライバー変異を検索するため、RNA と DNA を同時に抽出する手法を用いた。PCR やサンガーシーケンシングでは解析に全く問題はなかったものの、次世代シーケンシングとは相性が悪く、特に PCR 反応時の鋳型乗り換えのような跡が多数見られ、解析に難渋した。そのため、この程度の症例数では各群間における変異の正確な比較が難しかった。また、これら症例の被ばく線量は極めて低く、ポジティブコントロールとしてチオルノービリ原発事故後に発症した小児甲状腺癌のゲノムデータとの比較ができれば良かったが、データにアクセスするための機関承認を達成できなかった。

③ 当初の計画で予定した成果以外（以上）に得られた事項

本研究にて、上記 *HPRT* 変異クローンのゲノム解析において、細胞をクローニングすること、そして次世代シーケンシングのデータ量 (read depth) や判定する変異アレル頻度を考慮することによって、正確な細胞系譜を作成できることが分かった。クローンに共通の変異やユニークな変異によって、系譜のどの段階で入った変異かも特定することができる。これらの知見は、自然に発生する変異と放射線被ばくによる変異を区別する方法や、被ばくした個体の部位別の線量評価などの研究にも活かせる可能性が考えられた。

4. 研究成果の活用方策の提案

本研究をさらに発展させる新たな研究や事業化の提案

次世代シーケンシング、特に次次世代ロングリードシーケンシングはまだ費用が高額であり、本研究でも細胞では各線量あたり5クローンしか解析できていない。しかし今回、両方の解析を行ったことで、ショートリードでも確からしい変異を抽出できる手法が得られた。低線量での研究を進めるには、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。

放射線被ばくの痕跡をヒト癌組織のゲノムで確認しようとする、さらに低線量でも確認できるものとなると、やはり放射線に特異的な変異を同定する必要があるであろう。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。

引用文献

なし