

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和5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5年度研究期間	令和5年4月3日～令和6年2月29日
研究期間	令和3年度 ～ 令和5年度（3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（若手担当部分）。シーケンス情報取得の基準として、</p>

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。

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 (^{137}Cs 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 7 症例) 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。対象とした肝腫瘍は肝細胞がんで、腫瘍組織のがん細胞占有率は 95%以上であることを確認した。採取された腫瘍組織よりゲノム DNA を精製し、次世代シーケンサー (NGS) による解析を実施した。その結果、発がん関連遺伝子において、腫瘍組織特異的な単一塩基変異 (SNV) を多数同定したが、これらは、C>T および T>C 変異が変異全体の 60%以上を占める変異シグネチャーであった。次に、ゲノム全体を対象にした変異シグネチャー解析を実施したが、同様に、C>T および T>C 変異が大半を占める変異シグネチャーが抽出され、COSMIC 変異シグネチャーの SigProfiler により、SBS5 や SBS1 などが優先的に抽出された、これらの SBS シグネチャーは、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。さらに、ゲノムの欠失/挿入 (ID) シグネチャーについても抽出を試みたが、放射線誘発 DNA 二重鎖切断に起因する放射線シグネチャーである ID8 は抽出されなかった。メチル化シグネチャー解析でも、メチル化パターンに放射線照射の特徴は認められず (若手担当部分)、放射線により誘発された肝腫瘍において、放射線特異的な変異シグネチャーではなく、老化関連シグネチャーが抽出されたことから、誘発されたがんは、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と考えられ、放射線照射群に発生した腫瘍ではあるが、発がん変異において放射線の寄与率は 0%であると推察した。

本研究で対象にしたのは肝腫瘍であるが、放射線被ばくによりリスクの増加が認められるがんは、全て、加齢により発症頻度が上昇することが明らかである。このため、本研究で得られた結論『放射線が組織老化を早期化する』は、全ての組織に適用できる一般的な知見であると思われ、今後、その検証が必要である。また、老化の早期化は、放射線被ばくによる細胞死、つまり組織反応、に起因する現象であることから、必然的に、放射線発がんは確率の影響ではないと分類することが妥当であり、その線量依存性も、しきい値を有する非直線的なものである可能性が考えられる。

今後の研究計画として、既に獲得が決定した研究所経費により、非照射群の解析例数を増やし、これまでの成果と併せて統計学的議論を経て研究成果を公表する。

V 結論

終生飼育を実施している 4 Gy 照射マウス群において、複数の肝腫瘍の発生を確認し、肝細胞がん

と認めた標本のうち、腫瘍占有率が95%以上であることを確認したケースで、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。また、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、放射線シグネチャーである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、放射線照射個体に発症したがんではあるが、放射線誘発がんではなく、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あると推察した。

引用文献

なし