

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 若手研究項目名：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。しかしながら、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、どんなに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。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。そこで、発がんにおける放射線の寄与割合を、主任研究者が行う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り評価するという独自の切り口を確立した。ゲノム変異シグネチャーでは解析できないエピジェネティックな変異の寄与を評価する手法として、メチル化シグネチャーの解析が必要不可欠と考え、本研究計画を提案した。</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> <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、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</p>

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発がん関連遺伝子の 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 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、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（変動メチル化シトシン）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、メチル化率の変動は、照射群・非照射群ともに、intergenic 領域で最も多く見られ、次いで intron 領域で多く見られる結果となった。遺伝子発現に直接的に関与する exon 領域および promoter 領域は、照射群・非照射群ともにゲノム全体の 5%前後となり、メチル化率の変化の割合は、照射による有意な変化は見られなかった。さらに、promoter・exon・intron 領域における変動メチル化シトシンについて clusterProfiler によってエンリッチメント解析を行ったところ、多様な遺伝子オントロジーが抽出された。加えて、照射群では非照射群よりも非常に多くのメチル化変動シトシンが見られ、放射線によってメチル化および脱メチル化が著しく促進されていることが示唆された。

次に、変動メチル化シトシンを中心に、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、メチル化が亢進された領域において、照射群ではメチル化シトシン周辺の塩基頻度に差は見られなかった。非照射群では、(A/G/C) (A/G/T) (G/A) CG (T/G/A/C) (A/G/C) 配列が高頻度に出現する塩基配列として抽出された。また、メチル化が低下した領域においては、メチル化シトシン周辺の塩基頻度にほとんど差は見られなかった。これらの配列を、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。

以上の結果から、放射線誘発肝腫瘍において、メチル化が亢進しているゲノム領域が複数同定され、いくつかの遺伝子領域は、がん関連遺伝子を含む領域であることが判明した。変動メチル化シトシンのシグネチャー分類は、これらが放射線特異的なメチル化シグネチャーではない可能性を示し、放射線照射によってメチル化変動は促進されるものの、放射線照射の特異的な痕跡はないことから、エピジェネティクス変動への放射線の寄与率は 0%であると推察できた。本研究のマウスは終生飼育であるため、研究期間内で採取された非照射群の標本のうち解析対象は 1 個体に留まった。現在得られている結果をより盤石なものとするためにも、非照射群の解析数をさらに増やす予定である。

V 結論

本研究結果はマウスを対象にして得られたものであるが、ヒトとマウスのメチル化ゲノムには高い類似性が認められることから、本研究で得られた知見はヒトにも適用することが可能である。シグネチャー分類の結果から、放射線誘発 DNA 二重鎖切断の修復に係わるメチル化酵素である DNMT1 や DNMT3 が標的とする優先配列とは異なる配列が同定され、これらは放射線特異的なメチル化シグネ

チャーではない可能性が高く、このため、放射線照射によってメチル化変動は促進されるものの、放射線照射の特異的な痕跡はないことから、放射線照射個体に発症した肝腫瘍におけるエピジェネティクス変動への放射線の寄与率は0%であると推察される。

引用文献