

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度～令和5年度実施総括報告書

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
研究期間	令和3年度 ～ 令和5年度（3年間）

	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

1. 研究の概要

小児期の低線量放射線被ばくによる健康影響、とりわけがん発症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、低線量放射線被ばくが健康影響にどの程度寄与しているかを提示することにより、漠然とした健康不安への科学的理解の深化を一層推し進め、あわせて放射線発がんメカニズムの解明に繋げることを本研究課題の目的とした。

環境省『放射線の健康影響に係る研究調査事業』において整備してきた動物実験発がんアーカイブの活用を基盤にして、小児期で放射線（ γ 線、0.1 Gy、1 Gy および 4 Gy：線量率 0.5 Gy/分）を照射した B6C3F1 マウス（雄）を終生飼育し、正常組織および誘発されたがん（B6C3F1 系統では放射線照射後 100～200 日齢で胸腺リンパ腫が、300 日齢以降で肝腫瘍が主に発生するため肝腫瘍を対象とした）の凍結組織標本からゲノム DNA を抽出して、次世代シーケンサーによる全エクソームシーケンスを実施することによりゲノム変異情報を収集した。さらに、変異情報を COSMIC（Catalogue of Somatic Mutations in Cancer）シグネチャーを参照にして変異シグネチャーを同定し、発がん変異における放射線被ばくに起因する変異シグネチャーの寄与割合を、放射線シグネチャー（ID8）、および、老化シグネチャー（SBS1&5 など）に区別して算出した。

がん組織から採取したゲノム DNA を用いた変異シグネチャー解析から寄与割合を算出する際には、がん組織に混在する正常が結果に大きな影響を及ぼすため、標本採取の際には、同時に固定組織標本を調整し、組織薄切切片を作成した後、多重蛍光免疫染色法により、がん細胞とがん関連微小環境を構成するがん細胞以外の細胞を区別して、がん組織におけるがん細胞の**組織占有率**も算出した。

以上の結果から、放射線照射により発症したがんにおける**放射線の寄与割合**を推定し、また同時に、変異シグネチャー解析から、がんの成立に係る病因を特定し、放射線によるがん発症の分子メカニズムを紐解いた。

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	肝腫瘍凍結標本アーカイブから、肝細胞がんを含む組織標本を選び、同一個体の肝臓の別葉で、腫瘍を含まないものを非腫瘍部として用い、それぞれから、
令和3年度	QIAmp Fast DNA Tissue KitによりゲノムDNAを抽出し、Qubitフルオロメーターに

	より濃度を測定した結果、各標本全てにおいて、トータル収量で5μg程度の高分子DNAを採取した。そこで、このうち、200 ng程度を用いて、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kitによりゲノムライブラリーを調製した。その後、Illumina社製NovaSeq 6000により全ゲノムシーケンスを実施した（若手担当部分）。 シーケンス産物をFastQCによりクオリティチェックを行った結果、クオリティスコアは少なくとも35以上であることがわかり、高クオリティである事を確認した。次に、Trimmomaticを用いて、アダプター配列、リード先頭あるいは後尾のクオリティスコアが20未満の塩基等を除去、また、結果としてリードが36bp未満になったリードの除去を行い、その結果、97%以上のマッピング率の高クオリティリードを得た。 トリミング後のシーケンスリードを、BWAを用いてリファレンスゲノムへのマッピングを行った。リファレンスゲノムにはC57BL/6Jのゲノムを基盤としたGRCm38を用いた。マッピング後に、Picardを用いて重複リードの除去を行った。その結果、重複率は、12～16%で、重複リード除去後のシーケンスリード数は、500M～630M readsを確保した。重複リード除去後のbamファイルに対して、samtoolsを用いて、一塩基置換（SNV）および挿入/欠失（INDEL）を抽出した。検出された変異の信頼性について、誤りの確率が1%以上であるものをフィルタリングした結果、700万近くのSNV/INDELを同定し、このうち半数は、遺伝子領域外の変異であった。遺伝子内でもイントロン領域に同定された変異は変異全体の35%程度で、遺伝子領域の上流および下流の遺伝子発現調節領域の変異は全体の数%に認められた。サイレント変異は2万5千個程度、ミスセンス変異は1万5千個程度同定された。遺伝子融合変異も2種検出された。変異の中で最も多かったのがチミンへの変異で、そのうちシトシンからの変異、C>T変異が、全体の65%近くを占めていた（若手担当部分）。
2年目	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、SNVおよびInDelシグネチャーを抽出した。SNV変異の中で最も多かったのがC>T変異で、全体の65%近くを占めており、腫瘍部でも非腫瘍部でも差は認められなかった。腫瘍部での変異シグネチャー解析の結果、老化に関連するSBS5（98%程度）およびSBS1（2%程度）がほぼ100%を占めていた一方、放射線シグネチャーであるID8は全く抽出されなかった（若手担当部分）。これらの結果から、放射線誘発腫瘍であるにもかかわらず、放射線の発がん変異における寄与割合はほぼ0%で、誘発腫瘍は、自然誘発がんの増大による顕在化である可能性が示唆された。
令和4年度	肝腫瘍組織から採取したゲノムDNAにおけるゲノム変異シグネチャー解析から寄与割合を算出する際には、腫瘍組織中の正常細胞の混在比が結果に大きな影響を及ぼす。このため、標本採取の際に同時に作成した固定組織標本から組織薄切切片を作成し、多重蛍光免疫染色法により、がん細胞とがん関連組織微小環境を構成するがん細胞以外の細胞を区別する手法の確立を行った。 具体的には、放射線照射により誘発された肝腫瘍を含む組織標本をホルマリン中で固定した後にパラフィン中に包埋し、薄切標本（厚さ4μm）を作成して解析

	に供した。腫瘍細胞の占有率を算出するための抗体としては、Cytokeratin-18 および、E-cadherin が有効である事がわかったため、画像解析ソフトである Image-J を用いて、DAPI に由来する楕円の青色蛍光シグナルを細胞核と指定し、その数を総細胞数として計測し、抗 E-cadherin 抗体により染色される細胞数を全細胞数で除して占有率を算出した。その結果、4 例とも腫瘍占有率は 95% 程度であることが明らかになり、本研究で抽出した変異シグネチャーは 95% 程度が腫瘍細胞由来のものであると結論できた。
3 年目	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（若手担当部分）。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。 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。
令和 5 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

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。以上の結果から、解析に供した肝腫瘍の発生における放射線の寄与率は 0 % であると結論した。 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。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的影響ではないと分類することが妥当となり、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。

本研究成果はマウスを対象にして得られたものであるが、ヒトとマウスの変異シグネチャーには高い類似性が認められ、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。放射線照射が組織老化を早期化し、その結果、自然発生の肝腫瘍が早期に顕在化した可能性は、本研究（若手担当）で用いたメチル化特異的シーケンス技術を応用する事により、老化クロックであるメチル化クロックの評価が可能になるため、今後、老化クロックを用いて放射線照射個体由来の肝臓組織で老化が早期化している事を証明し、放射線被ばくによる組織老化の早期化が、放射線発がんの本質である事を証明する。

② 計画・目標通り実施できなかった事項とその理由

なし。

③ 当初の計画で予定した成果以外（以上）に得られた事項

変異シグネチャーの解析から、放射線照射個体に認められた肝腫瘍の発生に、放射線が全く寄与していないという新発見があった。本研究計画を立案した当初から、放射線発がんが確率的影響ではない可能性を提唱してきたが、その仮説を証明する具体的な科学的成果として、極めて重要な知見である。組織老化の早期化は、放射線照射による細胞死に起因した現象であるため、いわゆる組織反応が放射線発がんに関与するということができる。この仮説が完全に証明されれば、放射線発がんの線量依存性は、従来の直線的なものではなく、非直線性（しきい値が存在する）の線量依存性になる事になり、現在の放射線防護の概念を根底から覆す極めて重要な発見として、今後、その証明を老化クロックの解析を通じて実施したい。

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

本研究成果を発展させる研究課題として、放射線照射マウスにおける組織老化早期化の検証研究があげられる。具体的には、近年利用されるようになってきた、老化クロックを用いる。ゲノム内の CpG 部位のメチル化は、加齢にともない増加する遺伝子領域と減少する遺伝子領域とがある。そこで、これら領域のメチル化率を複数の遺伝子領域についてモデル化したものが老化クロックである。これまでに、Hovarth クロックに代表されるように、ヒトに適用できる老化クロックはいくつか開発されているが、マウスに応用できる老化クロックはまだまだ乏しい。我々は、本事業で得られたメチル化のデータを駆使して、新たな老化クロックを樹立しているため、同クロックを用いて、放射線照射による老化の早期化を検証する。また、本研究では、肝臓が対象であったが、老化クロックの検証は、肝臓に留まらず、肺、乳腺、甲状腺など、放射線被ばくによるリスクが増加する組織・臓器にも適応可能で、放射線影響の組織依存性のメカニズム解明にも大いに貢献すると期待される。これら解析の

結果をもって、放射線発がんが確率的影響ではないことを証明し、現在の放射線防護体系に一石を投じることが今後の予定である。

引用文献

なし