

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 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
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、発がんにおける放射線の寄与割合を紐解き、放射線による健康影響の理解を促進し、放射線発がんメカニズムを解明するため、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することを本研究課題（若手加速化研究）の目的とした。

主任研究者の研究計画と連携して、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）を照射した後、終生飼育した B6C3F1 マウス（雄）より採取した、正常肝臓組織および誘発された肝腫瘍の凍結組織標本からゲノム DNA を抽出し、肝がん関連遺伝子および DNMT に関連した Gene body を標的にした Whole genome Bisulfite Sequencing による解析を実施し、放射線発がんに関連するメチル化シグネチャーの有無を特定した。その結果から、発がん変異における放射線被ばくに起因するメチル化シグネチャーの寄与割合を算出する事により、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た。

主任研究者の3年間の研究計画計画に合わせて、肝腫瘍凍結標本から採取したゲノム DNA を用いて、放射線特異的なメチル化シグネチャーの抽出と放射線特異的メチル化シグネチャーによる発がんへの放射線寄与割合の評価を実施し、放射線照射個体に発生した肝腫瘍に、放射線特異的シグネチャーが認められないことを明らかにした。これにより、主任研究者が推進する、ゲノム変異シグネチャー解析による放射線の発がん寄与割合の評価研究とは異なる独立した視点で研究を加速した。

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

令和3年度	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 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、Zymo Research EZ DNA Methylation Gold Kit を用いて、バイサルファイト処理を行い、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、Swift Bioscience Accel NGS Methyl-seq DNA Library Kit によりゲノムライブラリーを調製した。ゲノムライブラリーでは、ウラシルはアデニンと塩基対を形成してチミンに変換されることから、バイサルファイト処理により、シトシンからチミンへの変換が観察されなかったシトシンがメチル化シトシンとして特定される。そこで、調整されたライブラリーを Illumina 社製 NovaSeq 6000 によりシーケンスしメチル化部位の同定を行った。 まず、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った。クオリティスコア 30 が、1,000 回のシーケンスで 1 回のエラーが発生するレベルであることから、行ったシーケンスが高クオリティである事を確認した。次に、Trim galore 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、60%程度のマッピング率のリードを得た。トリミング後のシーケンスリードを、methylypy 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。その結果、シーケンスリード数として、500M～630M reads が確保できた。 次に、MethylKit を用いて、メチル化シトシンの抽出および特異的メチル化領域の抽出を行い、その結果、大半のメチル化 CpG は、CpG island (200 塩基以上の領域で G : C 塩基対の含有率が 50%以上であるゲノム領域) 間のゲノム領域に存在する事が明らかになった。また、同一標本から採取した腫瘍部と非腫瘍部のメチル化率の比較を領域毎に分けて比較したところ、腫瘍部と非腫瘍部のメチル化の領域が明確に区別できる事が明らかになった。さらに、メチル化率による主成分分析を実施したところ、非腫瘍部はいずれも近傍にプロットされるのに対し、腫瘍部は、標本毎に、別々の位置にプロットされ、肝腫瘍の多様性が反映される結果となった。
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
令和4年度	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、まず、ゲノム全体でメチル化率の亢進がみられたシトシンは全体の 40%程度、一方、メチル化率の減少がみられたシトシンは全体の 60%程度であることが明らかになった、遺伝子領域としてアノテーションされた情報を、ゲノムブラウザーである Igv により表示させると、アメリカ国立生物工学情報センター (NCBI) にがん関連遺伝子として登録されている遺伝子領域に、がん組織でメチ

	ル化が亢進した領域が一致するものが複数同定された。メチル化の亢進があった領域は、エキソン内、イントロン内、あるいは遺伝子上流領域と多様であり、染色体1番、7番、14番、15番に散在していた。これら遺伝子について、Metascapeによりパスウェイおよびプロセスエンリッチメント解析を実施したところ、姉妹染色体動態や細胞増殖に関連する経路が抽出され、当該領域のメチル化率の亢進が、発がんのプロセスに関わることが示唆された。 次に、メチル化率の亢進があったシトシンを中心に、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、(A/G/T) (A/C/T) (A/G/C) CG (G/T/C) (A/G/T) 配列が高頻度に出現する塩基配列として抽出された。同配列を、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。
3年目	採取した肝腫瘍凍結標本（合計7症例、ただし非照射群に発症した肝腫瘍を含む）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、前年度と同様に、DNMT1 および DNMT3A/B に特徴的なメチル化配列とは相同性を有しないことが明らかになり、放射線照射マウスに発症した肝腫瘍に、放射線照射に関連するメチル化シグネチャーは存在しない事を確認した。以上の結果から、これら肝腫瘍発生への放射線の寄与率は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

本研究の実施により、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を複数同定し、その内、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から、放射線誘発 DNA 二重鎖切断に関連する DNMT1 および DNMT3A/B のメチル化シグネチャーとは全く異なるシグネチャーが抽出されたことから、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と結論した。したがって、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%、つまり、発生した肝腫瘍における放射線の寄与率は 0%であると推察した。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 個体に留まったが、現在までにさらに多くの肝腫瘍が非照射群から採取されており、現在得られている結果をより盤石なものとするために、非照射群の解析数を増やす事が肝要である。

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。放射線照射個体に発症した肝腫瘍における放射線の寄与率は 0%であることから、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と考える事ができる。本研究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、特定遺伝子領域のメチル化率を算出する事が可能で、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

メチル化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事ができる。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、その証明が期待される。

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。その結果をもって、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。

引用文献

なし