

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

光武 範吏（長崎大学・教授）

研究要旨

正常ヒト線維芽細胞にヒトテロメラーゼ (*hTERT*) 遺伝子を導入して不死化した BJ1-hTERT 細胞において、コントロール（無処理）、 γ 線（1, 3, 6 Gy）あるいは N-ethyl-N-nitrosourea (ENU, 1mM, 1 hr) による処理を行い、6-thioguanine (6-TG, 40 μ M) 培養下でそれぞれ複数の耐性クローンを樹立した。各クローンの *HPRT* 遺伝子における各エクソンの欠失状態を定量 PCR 法にて確認した。高い線量を照射後に得られたクローンほど、欠失の頻度が高かった。各クローンより 5 クローンずつを選択し、そのうち 16 について、ショートリード法、ロングリード法の 2 種類の次世代シーケンシング法にて全ゲノム解析を行い、配列データを得た。

キーワード：放射線、ロングリード次世代シーケンス解析、甲状腺癌

研究協力者

吉浦 孝一郎（長崎大学・教授），三嶋 博之（長崎大学・助教），サエンコ ウラジミール（長崎大学・准教授），鈴木 眞一（福島県立医科大学・教授），岩館 学（福島県立医科大学・講師），山下 俊一（福島県立医科大学・副学長）

I. 研究目的

研究の背景・目的：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、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。福島第一原発事故の後、多くの小児・若年者甲状腺癌が発見された。これらの被ばく線量は極めて低いと思われ、事故により放出された放射性ヨウ素との関連はないと考えられているものの、個々の症例における明確な分子エビデンスはない。そこで本研究の目的は、最新のゲノム解析技術を駆使して、放射線ゲノム刻印の存在を明らかにし、同様の技術を用いて福島県小児・若年者甲状腺癌のゲノム解析を行い、これらの刻印が存在するかを検証すること、さらには本研究の学術成果によって、福島県民の健康管理や不安への対応策の有効性をさらに向上させることである。本年度の目的は、培養細胞系を用い、放射線被ばくによるゲノム変化が確実な細胞クローンを樹立し、ショートリードとロングリード次世代シーケンス解析を実施することである。

II. 研究方法

正常ヒト線維芽細胞にヒトテロメラーゼ (*hTERT*) 遺伝子を安定導入して不死化させた BJ1-hTERT 細胞を用いた。¹³⁷Cs- 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 存在下で培養し、細胞クローンを樹立した。

クローンよりゲノム DNA を抽出し、各エクソンの有無を定量 PCR にて解析した。

全ゲノム解析を行った。使用したのは、ショートリード解析は MGI 社 DNBSEQ-T7 にて、ロングリード解析は Oxford Nanopore Technologies 社の PromethION を用いて行った。

（倫理面への配慮）

本年度の研究内容に関しては、培養細胞を用いた実験のみで、倫理面への配慮は必要なかった。

III. 研究結果

放射線や ENU 処理なしに樹立したクローンをコントロールとし、すべての処理（ γ 線 1, 3, 6 Gy, ENU 1mM）より複数のクローンを樹立することが出来た。それぞれの樹立したクローン数とエクソンの欠失状態を以下に示す。被ばく線量の増加によって、明らかに欠失を持つクローンの割合が増加した。

実験群	樹立クローン数	全エクソン欠失	エクソン部分欠失
コントロール	16	0/16 (0%)	0/16 (0%)
γ 線 - 1 Gy	27	0/27 (0%)	1/27 (3.7%)
γ 線 - 3 Gy	27	1/27 (3.7%)	3/27 (11.1%)
γ 線 - 6 Gy	33	10/33 (30.3%)	6/33 (18.2%)
ENU	24	0/24 (0%)	2/24 (8.3%)

このうち、コントロール、1 Gy、3 Gy、6 Gy から 5 クローンずつ、ENU から 4 クローン、合計 24 クローンを選択し、コントロール、1 Gy、3 Gy のクローン全てと 6 Gy のクローン 1 つ（計 16 クローン）についてショートリードとロングリード法による全ゲノムシーケンスを施行し、配列データを得た。

IV. 考察

BJ1-hTERT 細胞を用いたクローンを樹立できたことで、癌細胞株と比較し、正常に近いゲノムを用いた解析が可能となり、より放射線による変異を正確に検出できるものと考えられる。また、これらのクローンは、放射線照射によってクローン化したことがほぼ確実であり、さらに *HPRT* 遺伝子ローカスを狙って詳細な検討が可能である。さらに、本年度の PCR によるエクソン欠失デ

ータは、次年度の次世代シーケンサーより得られたデータ解析の検証に用いることができる。高線量照射後のクローンにおける欠失数の増加は放射線被ばくによるものと考えられ、実験が適切に行われたことを意味する。

V. 結論

詳細なゲノム解析に供することのできる放射線被ばくによる *HPRT* 変異クローンを樹立が完了し、一部の全ゲノムシーケンシングまで施行した。

VI. 次年度以降の計画

HPRT 変異クローンの全ゲノムシーケンシングを、ショートリード、ロングリード法の両方にて完了させ、放射線特異的なゲノム変異の同定を行う。また、福島県において発見された小児・若年者甲状腺癌症例を、年齢や遺伝子変異別にグループ分けを行い、クローンに用いた同じ手法にて全ゲノム解析を開始する。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 論文・雑誌等

Iwadate M, Mitsutake N, Matsuse M, Fukushima T, Suzuki S, Matsumoto Y, Ookouchi C, Mizunuma H, Nakamura I, Nakano K, Sakamoto A, Hirokawa M, Ito M, Naganuma H, Hashimoto Y, Shimura H, Yamashita S, Suzuki S. The Clinicopathological Results of Thyroid Cancer with BRAFV600E Mutation in the Young Population of Fukushima. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dgaa573.

イ) 学会発表等

なし

ウ) 書籍・総説

なし

エ) 受賞

なし

オ) 特許

なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

なし

VIII. 引用文献

なし

Identification of genomic radiation signatures using long-read sequencing and its application to pediatric thyroid cancers in Fukushima.

Norisato Mitsutake

Professor, Nagasaki University

Key words: radiation, long-read next generation sequencing, thyroid cancers

Abstract

The aim of this study is to identify genomic radiation signatures using latest technologies of genome analysis, to verify the existence of these signatures in childhood and adolescent thyroid cancers found in Fukushima, and to further improve the effectiveness of measures to the health management and anxiety of the people living in Fukushima. The purpose of this academic year's was to establish cell clones that are certain to carry genomic changes induced by ionizing radiation and to perform short-read and long-read next-generation sequencing.

BJ1-hTERT cells, which had been established by introducing the human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene into normal human fibroblasts to immortalize, were treated with three different doses of gamma-rays (1, 3, 6 Gy) or N-ethyl-N-nitrosourea (ENU, 1 mM, 1 hr). Then, the cells were cultured in the presence of 6-thioguanine (6-TG, 40 μ M), and clones were isolated and propagated. Next, a quantitative PCR-based method was developed to confirm the genomic structure of the *HPRT* gene locus, and the status of deletion of each exon was confirmed. Clones established with no treatment and low doses of radiation had almost no exon deletions; however, the number of exon deletions was increased with dose, and many of the clones with 6 Gy were found to lose all exons. We selected 5 clones from each dose and performed Nanopore long-read whole genome sequencing (WGS) and also conventional short-read WGS on 16 of them during this academic year, and their fastq files were successfully obtained, which will be subjected to detailed analysis in the next year.