

黒濱 大和 論文内容の要旨

主 論 文

Comprehensive analysis for detecting radiation-specific molecules expressed during radiation-induced rat thyroid carcinogenesis

放射線誘発ラット甲状腺がん化過程に発現する放射線特異的分子同定のための網羅的解析

黒濱 大和, 松田 勝也, 木住野 美緒, 吉野 相輝, 山口 裕佳, 松山 睦美,
近藤 久義, 光武 範吏, 木下 晃, 吉浦 孝一郎, 中島 正洋

(J Radiat Res, in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 先進予防医学共同専攻
(主任指導教員：中島 正洋 教授)

緒 言

放射線被曝と甲状腺発がんリスクとの関連は疫学的に明らかであるが、現在まで「真の」放射線誘発甲状腺がんと散発性がんを鑑別できる生物学的指標は知られていない。放射線被曝による個人の甲状腺発がんリスクを評価するためには、放射線誘発甲状腺がん化過程において被曝特異的、時間依存的に変化するバイオマーカーを同定する必要がある。本研究では、ラット放射線誘発甲状腺がん化過程において、前がん段階から変化する特徴的な分子発現を網羅的に解析することを目的とした。

対象と方法

7週齢雄性京都系 Wistar ラット (WKY/Izm) (n=175) の前頸部に X 線 (0, 0.1, 1, 4Gy) を局所照射し, 6, 12, 16 か月後に甲状腺を採取した。組織の半分をホルマリン固定パラフィン包埋切片とし HE 染色での病理学的評価及び免疫組織化学に供した。残りの半分からは total RNA を抽出し, RNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を試行した。放射線被曝後に特異的に変動する遺伝子群からバイオマーカー候補を選択し droplet digital PCR (ddPCR) による定量解析を行った。さらにバイオマーカーとしての有用性を validation set (n=19) において無作為二重盲検的に検証した。

結 果

被曝群での甲状腺発がん率は線量および時間依存的に増加し, 4Gy 被曝 16 か月後で最大 33%であった。4Gy 被曝 16 か月後の甲状腺では, 被曝群において対照群と比較して非腫瘍部甲状腺の Ki-67 labeling index が高い傾向があり, 特になんかの背景濾胞上皮では有意に高値であった [$1.96 \pm 0.80\%$ vs $0.63 \pm 0.49\%$, $p = 0.0233$]。網羅的遺伝子発現解析では, 4Gy 被曝群の非腫瘍部甲状腺において, Ataxia-telangiectasia mutated

(ATM) シグナル伝達系, DNA 損傷修復系, 細胞増殖関連, 細胞接着因子を含む 142 pathway, 3,329 遺伝子が放射線特異的かつ経時的に有意変動しており, このうち 12 遺伝子をバイオマーカー候補として選択し ddPCR で定量解析した. 4Gy 被曝 16 ヶ月後では, *cdkn1a* の発現は対照, 被曝非腫瘍部, 被曝甲状腺がん部の順に段階的に増加し, 一方 *atm*, *53bp1*, *xrcc4*, *ctnnb1* の発現は段階的に減少した. また被曝甲状腺がんでは *cdkn2a* および *cdk1* の発現が有意に上昇し, *cldn4* および *cldn9* の発現は有意に低下した. *cdkn1a* の発現量は 4Gy 被曝 6 ヶ月後, 12 ヶ月後, 16 ヶ月後のすべての時点において被曝群では対照群よりも高値であり, かつ経時的に増加を示した. 4Gy 被曝 16 ヶ月後の甲状腺組織で, *cdkn1a* の転写産物 p21 蛋白の発現を免疫組織化学的に半定量解析すると, スコアに有意差は認められないものの, 被曝群では対照群よりも高い傾向がみられた. validation set による検証実験では, *cdkn1a*/ β -*actin* のカットオフ値 11.69 にて, 陽性適中率 100%, 陰性適中率 69%の精度で被曝群と対照群を鑑別できた.

考 察

放射線被曝甲状腺では前がん状態より 3,000 以上の遺伝子発現が変動していて, 分子病理学的異常が病理組織学的変化に先行することが示された. 中でも ATM 関連 DNA 損傷応答や細胞周期調節系, 細胞接着因子の有意な変化を認め, 非照射群と比較し照射群ではがん, 非がん組織ともに, *atm*, *53bp1*, *xrcc4* 発現は低下, *cdk1*, *cdkn1a*, *cdkn2a* 発現は亢進, *cldn4*, *cldn9*, *ctnnb1* 発現は低下を示すことが判明した. がん化には DNA 損傷応答能の低下によりゲノム不安定性が誘導され, 細胞周期調節の異常, 細胞接着因子の低下が関連することが知られている. これら関連分子の発現量を経時的に解析することで, 被ばく甲状腺組織の分子病理学的マーカーになる可能性がある. 本研究ではラットモデルを用いて放射線誘発甲状腺がん化の初期から *cdkn1a* 発現が段階的に増加することを実証した. ddPCR による *cdkn1a* 定量は発がん期における被曝甲状腺組織を対照から正確に鑑別できるバイオマーカーとなる可能性がある.

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。