

(西暦) 2021 年度 博士前期課程学位論文要旨

学位論文題名 (注: 学位論文題名が英語の場合は和訳をつけること)

RNA シークエンス解析を用いた放射線誘発ラット乳がんにおける融合遺伝子の探索

学位の種類: 修士 (放射線学)

東京都立大学大学院

人間健康科学研究科 博士前期課程 人間健康科学専攻 放射線科学域

学修番号 20897719

氏名: 渡辺 光

(指導教員名: 井上 一雅)

注: 1 ページあたり 1,000 字程度 (英語の場合 300 ワード程度) で、本様式 1~2 ページ (A4 版) 程度とする。

【背景】放射線は DNA を主な標的とし、正常な細胞の遺伝子に損傷を生じさせる。がんは、放射線等により生じた損傷の修復エラーにより変異した遺伝子を持つ細胞が異常に増殖することで発生する。特に重篤な DNA 損傷は DNA 二重鎖切断であり、その修復機構は細胞周期を通じて働く非相同末端結合 non-homologous end joining (NHEJ) 修復機構と、S 期から G<sub>2</sub> 期でのみ働く相同組換え homologous recombination (HR) 修復機構に大別される。NHEJ に関連する修復機構は、DNA の末端を直接繋ぎ合わせる古典的非相同末端結合 classical NHEJ (c-NHEJ) 修復機構と、数塩基から数十塩基程度の短い DNA の相同配列を利用するマイクロホモロジー媒介末端結合 microhomology-mediated end joining (MMEJ) 修復機構等に分類され、放射線被ばくによる DNA 二重鎖切断の再結合の多くは c-NHEJ により修復されることが報告されている。また、乳腺は、放射線による発がん感受性が最も高いことが知られているが、発がんの原因となる遺伝子異常については未だよくわかっていない。本研究で注目した融合遺伝子は、染色体転座や逆位といった染色体再構成によって 2 つの異なる遺伝子から形成されるキメラ遺伝子である。放射線は DNA 二重鎖切断を誘発するため、融合遺伝子は放射線被ばくに関連した発がんメカニズムの 1 種である可能性がある。

【目的】放射線照射群に発症したラット乳がん検体について RNA シークエンス解析等を行い、細胞のがん化に機能すると考えられる融合遺伝子を同定することを目的とした。

【方法】7 週齢時に  $\gamma$  線 4 Gy を照射した Sprague-Dawley 系統の雌ラットに発症した乳がん 6 検体から抽出したトータル RNA を用いて RNA シークエンス解析を行い、取得したデータを用いて融合遺伝子を検出した。続いて、RT-PCR やサンガーシークエンス解析を用いて、乳がんにおける融合遺伝子の発現の確認や DNA 二重鎖切断再結合配列の同定を行った。その後、免疫組織化学染色により融合遺伝子が関係するシグナル伝達経路の変化や融合遺伝子産物の発現を観察した。

【結果】RNA シークエンス解析により取得したデータの中から、ジャンクションリード数やコドンの読み枠等の情報解析により、細胞のがん化に機能すると考えられる融合遺伝子

を絞り込んだ。その結果、3 検体でそれぞれ 1 種類の候補融合遺伝子 Fgfr2-Caprin1、Etv6-Ntrk1、Fgfr2-Pde3b を抽出した。これらの融合遺伝子は、それらが検出された乳がんを発症した同一個体の正常乳腺組織や非照射群の乳がんでは検出されなかった。さらに、 $\gamma$  線照射群に発症した乳がん 3 検体を追加し、合計 9 検体について抽出された融合遺伝子の検出を行ったところ、9 検体中 2 検体において、Fgfr2-Pde3b 融合遺伝子の発現が確認された。融合遺伝子の結合配列の解析から、Fgfr2-Caprin1 融合遺伝子 1 例及び Etv6-Ntrk1 融合遺伝子 1 例、Fgfr2-Pde3b 融合遺伝子 2 例は、2 つの異なる遺伝子のそれぞれのイントロン領域に DNA 二重鎖切断が生じ、それらが誤って再結合された結果、融合遺伝子が生成されていることが予測された。また、Fgfr2 遺伝子が関連する融合遺伝子の結合部位 5 箇所は、MMEJ 修復機構により、Etv6-Ntrk1 融合遺伝子の結合部位 1 箇所は、c-NHEJ 修復機構により再結合修復が行われていることが明らかになった。この結果は、放射線被ばくにより乳腺細胞に生じた融合遺伝子の生成には主に MMEJ による修復機構が用いられることを示唆している。また、リン酸化 Erk1/2 抗体を用いた Fgfr2 融合遺伝子が検出された乳がんにおける免疫組織化学染色では、辺縁部のがん細胞の細胞核や細胞質、細胞膜においてその発現が観察された。

【結論】RNA シークエンス解析により、放射線被ばくによる乳がんの発生に関与すると考えられる 3 種類の融合遺伝子を同定し、その多くが MMEJ により修復されていることが DNA 二重鎖切断再結合配列を同定した結果から明らかになった。