

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度年次報告書（詳細版）

研究課題名	動物実験を用いた慢性的低線量内部被ばくによる突然変異と発がんの非相関性のメカニズム解明 「セシウム137放射線に被ばくした <i>Msh2</i> 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異の解析」
研究期間	令和3年4月1日～令和4年2月28日

	氏名	所属機関・職名
主任研究者	中島 裕夫	大阪大学放射線科学基盤機構・准教授
分担研究者	大野 みずき	九州大学医学研究院基礎放射線医学分野・助教

	氏名	所属機関・職名
研究協力者	續 輝久	九州大学・名誉教授
研究協力者	中島 裕美子	九州大学アイソトープ総合センター・教授
研究参加者	中津 可道	九州大学医学研究院基礎放射線医学分野・准教授

研究要旨	<p>放射線被ばくによる生物影響を考える際には、生体内での様々な反応機構を踏まえ実験的データに基づき科学的に議論する必要がある。特に細胞内で二次的に発生する活性酸素種による酸化損傷の影響を考慮する必要がある。しかし、放射線被ばくと酸化剤の個体レベルでの影響を直接比較した解析例は少ない。そこで今回我々は、^{137}Cs および酸化剤である臭素酸カリウム (KBrO_3) による生体影響を明らかにする目的で、マウスを用いて飲水投与実験を行い、消化管での体細胞変異、発がん、遺伝子発現の解析を行なった。効率的にかつ定量性のあるデータを得るために、本解析では、放射線被ばくや酸化ストレスに感受性の DNA ミスマッチ修復機構を欠損させた <i>Msh2</i> 遺伝子欠損マウスを利用した。KBrO_3 の飲水投与は <i>Msh2</i> 遺伝子欠損マウスの小腸での体細胞突然変異頻度 (MF) と腫瘍の発生頻度を有意に上昇させた。一方、^{137}Cs 投与 (高線量) 群では MF は有意に上昇したにも関わらず腫瘍発生頻度は低かった。小腸の遺伝子発現解析の結果、両実験群間では免疫反応に関する遺伝子群の発現に違いがあることが見出された。また、内部被ばく線量と同程度の線量を同じ期間外部照射した群では MF の上昇は見られなかった。継世代影響の解析では、<i>Msh2</i> 遺伝子欠損マウスのオスと野生型メスとの交配で生まれた仔のゲノム解析の結果、<i>de novo</i> 生殖細胞変異数は KBrO_3 投与オスの仔に比較して ^{137}Cs 投与オスの仔で多い傾向が見られた。</p>
------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	これらの結果より、「放射線被ばくと酸化剤ばく露」「内部被ばくと外部被ばく」「体細胞と生殖細胞」で、それぞれに反応性の違いがあることが明らかとなった。これらの結果はヒトでの内部被ばくの影響を考える上で重要な基礎データとなるため、今後はより詳細な分子メカニズムの解明が必要である。
キーワード	^{137}Cs 内部被ばく、突然変異、 <i>Msh2</i> 遺伝子欠損マウス、発がん、継世代影響

I 研究目的

本研究は ^{137}Cs の経口摂取による内部被ばくの生体影響を効率的に評価することが可能な実験系の検討を行うこと、また化学物質（酸化剤）ばく露と放射線被ばくにより誘発される突然変異や生体反応の違いを明らかにすることを目的としている。

放射線被ばくの生態影響を実験的に評価する際には、放射線の直接影響に加えて、細胞内で二次的に発生する活性酸素種の影響を考える必要がある。これまでに我々は、DNA 修復系関連遺伝子のノックアウトマウスを用いて、様々な環境ストレスによって生じる酸化 DNA 損傷が突然変異を誘発し、がんを引き起こす原因になることを明らかにしてきた¹⁻⁶⁾。一般に「がん」は体細胞に生じた突然変異が原因で細胞増殖の制御機構が破綻し増殖を繰り返す状態であると考えられることから、発がん前の正常組織中の体細胞変異頻度は同組織での将来の発がん頻度の予測因子となり得る。しかし正常組織中の体細胞変異の頻度は非常に低く定量的解析が困難であり、これまでに発がん頻度との関連についての実験的データは十分ではない。

そこで、ごく低頻度の変異を定性的かつ定量性を持って検出するために、本研究課題では高感度に体細胞突然変異を検出することが可能な *rpsL* トランスジェニックマウス (*rpsL*-Tg)^{3,7)} を用いて、 ^{137}Cs の短期内部被ばく後に誘発された突然変異と長期内部被ばく後の発がん頻度の解析を行う。また、低線量・低容量の放射線や化学物質の生態影響を明確に観察する目的で、野生型マウスに加えて DNA ミスマッチ修復機構を欠損したマウスを用いた解析を行う。

DNA ミスマッチ修復に必須の *Msh2*/*MSH2* 遺伝子は、ヒトの遺伝性非ポリポーシス大腸がんの原因遺伝子の一つで、この遺伝子のホモ欠損マウスは DNA ミスマッチ修復機構の不全により 6 ヶ月齢程度で胸腺リンパ腫や消化管がんを自然発症する。*Msh2* 遺伝子欠損マウスに酸化剤である臭素酸カリウム (KBrO_3) の 0.2% 水溶液を 16 週間与えると、小腸に十数個の腫瘍が発生する⁶⁾。一方 4 週間の投与ではまだ腫瘍は形成されていないが、すでに突然変異頻度の上昇が見られた（大野未発表、論文準備中）。これらの結果は酸化ストレスが DNA 損傷を誘発し、体細胞突然変異頻度を上昇させ、結果として発がん頻度の上昇につながることを示唆している。*Msh2* 遺伝子欠損マウスは通常飼育下でも野生型に比較して約 20 倍程度高い自然突然変異頻度を示すことから、野生型マウスでは検出感度以下の低線量・低線量率放射線被ばくによるゲノム変異が定量的に解析できるのではないかと期待された。実際に我々の先行研究の結果では、 ^{137}Cs を 2.5KBq/ml 含む水を自由飲水形式で 4 週間投与（初回投与時のみ 4KBq/g 体重を強制投与）した *Msh2* 遺伝子欠損マウスの小腸の突然変異頻度は非投与マウスに比較して高い傾向が認められた。この時の変異頻度は 0.15% KBrO_3 （顕著に腫瘍が誘発される濃度）投与時とほぼ同程度まで上昇していた。しかし予想に反して、等線量またはそれ以上の線量を外部照射した *Msh2* 遺伝子欠損マウスの小腸では 16 週以降でも腫瘍の発生が全く認められないという結果を得た（放医研 石原による実験より）⁸⁾。放射線被ばくと化学物質（酸化剤）では腫瘍発生に関して異なる経路をたどる可能性が示唆され、さらに詳細に検証する必要があると考えられた。

そこで本研究では、 ^{137}Cs の投与量による消化管の突然変異頻度の変化を検証するために、さらにマウス個体数を増やして突然変異解析実験を行なった。また発がん解析としては、これまでに *Msh2* 遺伝子欠損マウスの放射線による腫瘍形成実験はこれまで比較的高い線量の部分分割照射で行われたので⁸⁾、今回は外部被ばくとして低線量率 γ 線の全身照射、内部被ばくとして ^{137}Cs の長期飲水投与を行った。短期の ^{137}Cs 内部被ばく、 γ 線外部被ばく、酸化ストレスばく露による遺伝子発現変化を観察する目的で、小腸組織用いて RNAseq 解析を行った。

また、内部被ばくの継世代影響を解析する目的で、 ^{137}Cs を投与したオスの *Msh2* 遺伝子欠損マウスを野生型メスと交配し、得られた仔と親のゲノム DNA を用いて *de novo* 生殖細胞変異の検出を試みた。野生型マウスの世代あたりの突然変異率は非常に低いため、十分なデータ量を得るためには莫大な匹数を必要とするが、自然突然変異率が高い *Msh2* 遺伝子欠損マウスでは少ない匹数で ^{137}Cs により誘発された生殖細胞変異が検出できる可能性があり、線量依存的な定量的結果が期待できる。

II 研究方法

^{137}Cs の内部被ばくおよび外部被ばくの生体影響の解析、および酸化剤(臭素酸カリウム, KBrO_3) 投与群との反応性の比較を行うため、野生型マウスと *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて、消化管発がん解析、体細胞突然変異解析、遺伝子発現解析、生殖細胞変異解析を行なった。研究内容の概要、役割分担と実施年度および各解析のワークフローを図 1 に示す。

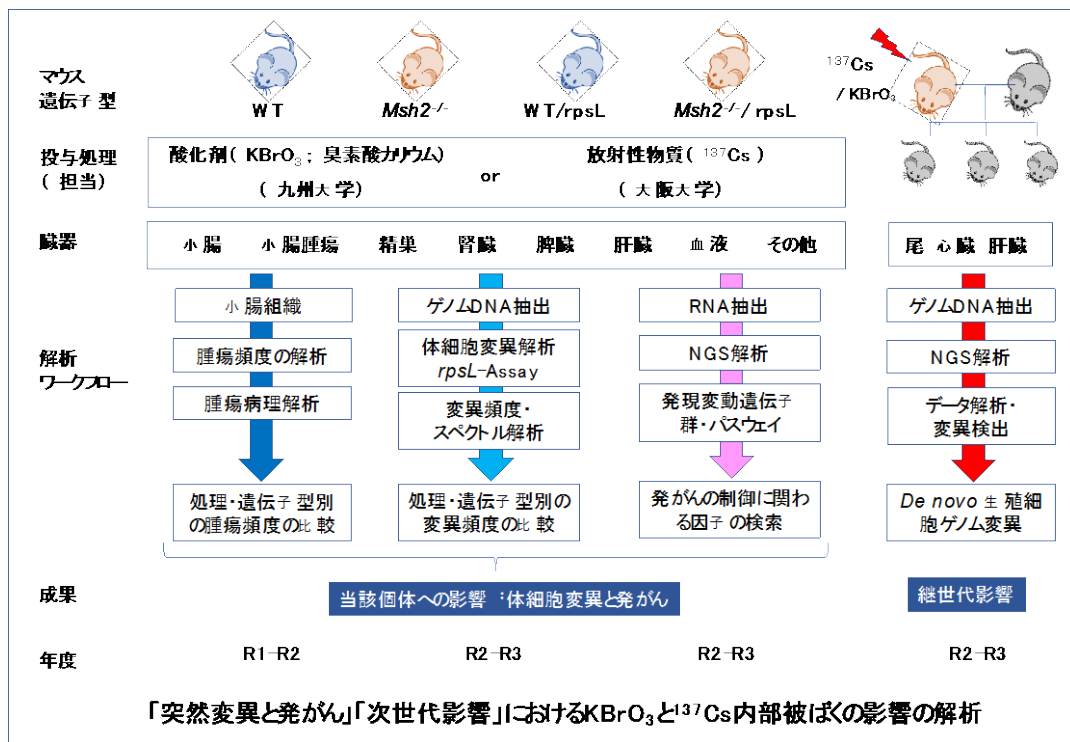


図 1. 研究の役割分担と年度の研究計画概要

発がん実験用および変異検出用マウスの作出：

発がん実験用には *Msh2* 遺伝子ヘテロ欠損マウスの雌雄を交配し *Msh2*^{+/+}, *Msh2*^{-/-} の遺伝子型マウスを作出した。体細胞突然変異解析用には、*rpsL* レポーター遺伝子のトランスジェニックマウス (*rpsL*-Tg) との交配により *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウス (*Msh2*^{-/-}, *rpsL*-Tg)、および、野生型マウス (*Msh2*^{+/+}, *rpsL*-Tg) を作出し実験に用いた。突然変異解析には、各遺伝子型のマウスを 5 群 (表 1 参照) に分け、生後 4 週齢から 4 週間の処置を施し、その後 2 週間は通常の水を与えて飼育した。生後 10 週齢の時点で解剖し、臓器をサンプリングした (図 2)。発がん解析は、 ^{137}Cs および臭素酸カリウムを含む水を生後 4 週齢から 16 週間連続投与し、その後 1~2 週間通常の水に変えて飼育した後に解剖し、小腸を摘出し病理解析に用いた (図 3)。セシウム投与および外部照

射実験は大阪大学の中島が行なった。本実験で行なったマウスの被ばく線量の推定については中島、石原の報告書を参照のこと。

表 1. 実験群と投与方法

実験群	実験群の記号	投与方法、濃度
コントロール群	C	非投与コントロール群（通常飼育）
^{137}Cs 投与群	Cs-1	2.5KBq/ml ^{137}Cs 溶液を自由飲水形式で投与
^{137}Cs 投与群 (高容量)	Cs-2	初日に 4KBq/g 体重を強制飲水、以後 2.5KBq/ml ^{137}Cs を自由飲水形式で投与（推定積算線量は C 群の約 2 倍）
外部被ばく群	IR	γ 線外部照射群（線量率 2.74mGy/日、総線量 76.72mGy, Cs-2 群とほぼ同程度の被ばく線量）
酸化剤投与群	KBr	0.15% 臭素酸カリウム（酸化剤）水溶液を自由飲水形式で投与

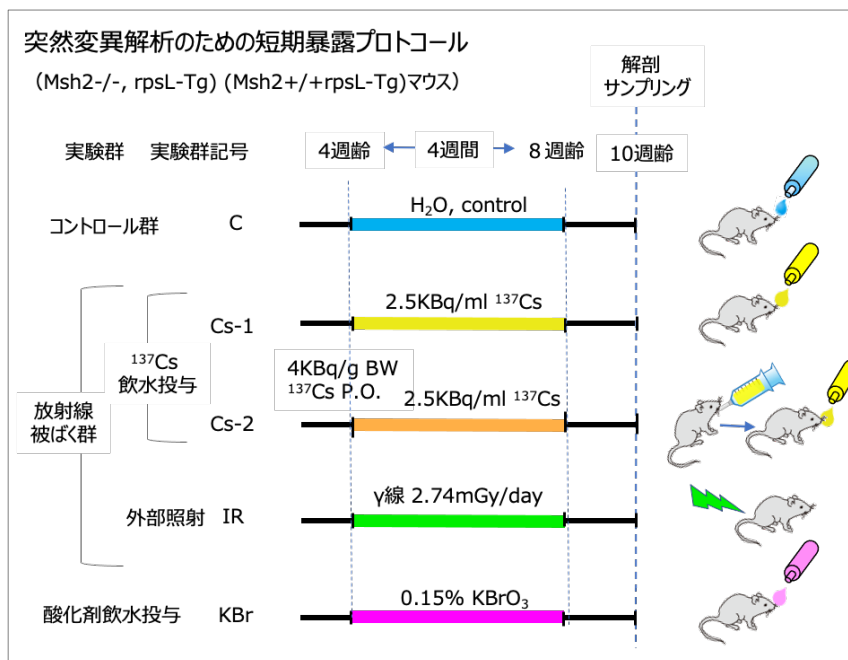


図 2. 突然変異解析：短期ばく露プロトコール

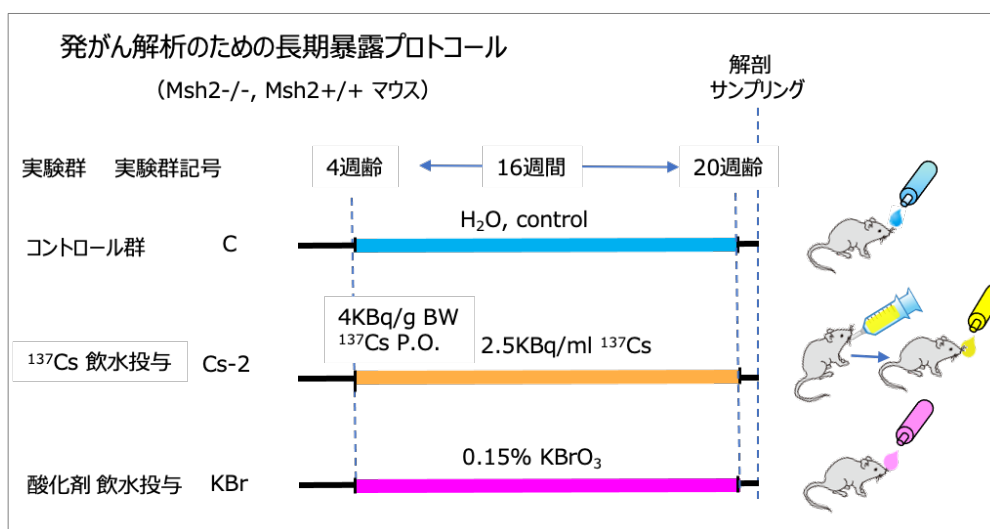


図3. 発がん解析：長期ばく露プロトコール

rpsL トランスジェニックマウスを用いた体細胞突然変異解析

rpsL トランスジェニックマウスは変異検出用シャトルベクター（大腸菌由来 *rpsL* 遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子および *ori* 配列を含む）がゲノム中に組み込まれている。ベクターの単一ユニットは約 3 kb で、これがタンデムに約 100 コピー連結した状態でマウスゲノムの 1 箇所に導入されているため、トランスジェニックマウスの生体内で発生した希な体細胞変異をあらゆる臓器を対象に高効率で検出することができる。本研究では、各実験群のマウスの小腸上部の組織を解析に用いた。凍結保存したサンプルからゲノム DNA を抽出し、制限酵素 Ban II（Takara）で処理しシャトルベクター領域を切り出した後、T4 ライゲース（Takara）を用いてセルフライゲーションを行った。環状化した *rpsL* シャトルベクターを大腸菌（NEB 10-beta Competent E. coli High Efficiency, カナマイシン感受性かつストレプトマイシン耐性の性質を持つ）にエレクトロポレーション法により導入した。抗生物質含有 LB プレートに大腸菌を撒き 28°C で 48 時間培養した。野生型 *rpsL* 遺伝子を含むプラスミドで形質転換された大腸菌はカナマイシン耐性かつストレプトマイシン感受性を示す。一方 *rpsL* 遺伝子の機能欠失型変異を持つプラスミドが導入されるとカナマイシン耐性かつストレプトマイシン耐性を示す。形質転換効率とスクリーニング総数はカナマイシン耐性コロニー数から算出し、カナマイシン耐性かつストレプトマイシン耐性コロニーは突然変異を持つミュータントコロニーである。ミュータントコロニー数（コロニーPCR およびサンガーシーケンスを行い大腸菌中での変異を除いた数）をスクリーニング総数で除した値を変異頻度（MF）とした。全てのカナマイシン/ストレプトマイシン耐性コロニーを新たにプレーティングし、単一コロニーを分離し *rpsL* 遺伝子領域を PCR で増幅しサンガーシーケンスを行い変異箇所を同定した上で、変異のスペクトルの解析、変異頻度の算出を行った。

発がん解析

各実験群のマウスは、図3に示す方法で飲水投与または外部照射を行い、実験終了時点で解剖した。摘出された小腸はホルマリンで固定した後に縦方向に切開し、腫瘍の有無を実体顕微鏡下で解析した。腫瘍が疑われる領域は切り出して、通常の病理標本作成の手順に従ってパラフィンブロック、薄切標本の作成、HE染色を行った。

遺伝子発現解析

各実験群での小腸組織における遺伝子発現変化の解析のために、図 2 に示す突然変異解析用短期ばく露プロトコールで作成・凍結保存されたマウスの小腸サンプルより全 RNA を抽出し、rRNA 枯濁法を用いてライブラリー作成し、ストランド特異的 RNAseq 解析を行った (150bp ペアエンド)。得られたシーケンスデータはマウスのリファレンスゲノム (GRCm39) にマッピングし、遺伝子発現量の解析を行なった。4 つの実験群 [コントロール群、¹³⁷Cs 投与群 (高線量)、外部被ばく群、酸化剤投与群] で野生型マウス、*Msh2* 遺伝子欠損マウスそれぞれ 2 または 3 匹ずつ、および購入した C57BL/6J マウス 2 匹を野生型コントロール群に追加で用いて各群間での比較解析を行なった。実験群間での比較結果より各遺伝子の発現量差の有意差判定には fold change > 1.5 かつ q-value < 0.05 を用いた。

de novo 生殖細胞変異の解析

¹³⁷Cs を 4 週間投与した *Msh2* 遺伝子欠損マウス、または非投与のオスと非投与の野生型メスを交配して得られた仔と親の尾と心臓組織を凍結保存した。それぞれの個体組織からゲノム DNA を抽出し (QIAamp Fast DNA Tissue Kit, Qiagen)、SureSelect Mouse All Exon Kit (Agilent Technologies) を用いて全エクソン領域 49.6Mb をキャプチャーし、ライブラリーを作成し次世代シーケンサー (HiSeq2000, Illumina) にて全エクソーム解析を行った。C57BL/6J マウスリファレンス配列 (mm10) にマッピングし、得られた bam ファイルをその後の変異解析に用いた。*de novo* 生殖細胞変異として両親が持たず仔でのみ検出される変異を検索する目的で、Octopus (v063b)⁹⁾ と GATK (4.1.2.0) HaplotypeCaller を用いて親子トリオデータから *de novo* SNV 候補を抽出し、両方の方法で共通に検出される SNV を同定した。

倫理面への配慮

本研究で行う遺伝子組換え実験 (カルタヘナ法) および動物実験計画に関して所定の審査を受け機関の承認を得ている。九州大学における遺伝子組換え実験については「ゲノム安定性維持に関する分子制御機構の生態における機能解析」(承認番号1-57、有効期限令和6年8月31日まで)、動物実験については「DNA修復機構の破綻による突然変異と発がんの分子遺伝学的研究」(承認番号A20-089、有効期限令和4年3月31日まで) で承認を得ている。研究の遂行にあたっては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」、「動物の愛護および管理に関する法律」などの法令及び関連する学内規則を遵守して行なっている。

III 研究結果

体細胞突然変異解析

R3 年度は主に外部照射群のサンプルおよびその他の実験群の未解析サンプルの解析を行い、R2 年度までに得られた結果に追加した。全ての結果を集計し、実験群ごとに Km 耐性コロニー数から算出した総スクリーニング数、KmSm 耐性 mutant コロニー数 (コロニーPCR およびサンガーシーケンスを行い大腸菌中での変異を除いた数)、変異頻度 (MF) を表 2 に示した。*Msh2* 遺伝子欠損マウスの非投与コントロール群では野生型マウスの約 20 倍高い MF を認めた。まず、それぞれの遺伝子型マウスで ¹³⁷Cs 投与の突然変異頻度に及ぼす効果を検証するために、C 群、Cs-1 群、Cs-2 群の 3 群間での MF の比較を行った。*Msh2* 遺伝子欠損マウスの Cs-2 群の平均 MF は 48.32×10^{-5} で、C 群の 29.25×10^{-5} に対して 1.56 倍と有意に高い値を示したが (Kruskal-Wallis test p=0.0075, Dunn test p=0.0112)、Cs-1 群の値は C 群と有意差がなかった。野生型マウスの Cs-2 群の平均 MF は 4.28×10^{-5} で、C 群の 1.41×10^{-5} に比較して 3.75 倍に上昇していた (Kruskal-Wallis test p=0.0304,

Dunn test $p=0.0422$)、一方 Cs-1 群の値は C 群に比較して 2.56 倍高かったものの有意差ではなかった。次に KBr 群と今回追加解析を行った IR 群を含めた全 5 群で多重検定を行ったところ、*Msh2* 遺伝子欠損マウスでは KBr 群と C 群、KBr 群と IR 群との間でのみ有意差を認めた (Dunn test $p=0.0348, 0.0399$)。総被ばく線量を Cs-2 群と同じ程度に設定し外部照射を行った IR 群では、MF は 29.74×10^{-5} で、C 群と比較してほとんど上昇していなかった。野生型マウスでは C 群と Cs-2 群間でのみ有意差を認めた (Dunn test $p=0.045$)。

表 2. *rpsL* トランスジェニックマウスの小腸を用いた突然変異解析の結果
MF:突然変異頻度、SD : 標準偏差、実験群の記号については表 1 参照

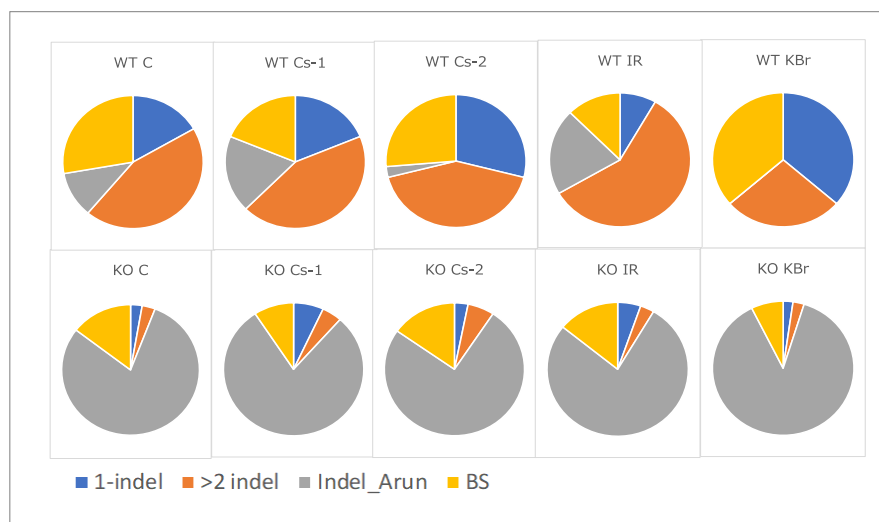
遺伝子型	実験群	サンプル#	総スクリーニング数	KmSm 耐性 コロニー数	MF ($\times 10^{-5}$)	mean MF ($\times 10^{-5}$)	SD ($\times 10^{-5}$)
Msh2 -/-	C	1	299880	66	22.01	29.25	6.53
		2	320000	92	28.75		
		3	144200	46	31.90		
		4	57000	22	38.80		
		5	847000	210	24.79		
	Cs-1	1	54600	18	32.97	32.85	4.43
		2	107000	33	30.81		
		3	65800	23	34.95		
		4	104000	28	26.85		
		5	59500	23	38.66		
	Cs-2	1	345800	152	43.96	48.32	4.69
		2	246400	111	45.05		
		3	171500	92	53.64		
		4	146300	67	45.80		
		5	312200	166	53.17		
	IR	1	253400	58	22.89	29.74	7.10
		2	80150	18	22.46		
		3	99400	30	30.18		
		4	277900	96	34.54		
		5	207200	80	38.61		
KBr	1	36000	32	87.91	58.27	19.39	
	2	95900	51	53.18			
	3	89000	59	66.37			
	4	216300	90	41.61			
	5	187000	79	42.27			
Msh2 +/+	C	1	178500	3	1.68	1.41	0.70
		2	482580	11	2.28		
		3	334880	3	0.90		
		4	128380	1	0.78		
	Cs-1	1	63000	2	3.17	3.61	1.89
		2	63000	2	3.17		
		3	160000	10	6.27		
		4	111000	2	1.81		
	Cs-2	1	107100	4	3.73	4.28	1.65
		2	424900	17	4.00		
		3	291060	8	2.75		
		4	105700	7	6.62		
	IR	1	244300	5	2.05	2.14	1.15
		2	788200	5	0.63		
		3	177100	6	3.39		
		4	362180	9	2.48		
	KBr	1	195720	7	3.58	2.66	0.74
		2	243180	7	2.88		
		3	481880	11	2.28		
		4	426160	8	1.88		

検出された全て (合計 1800 個以上) の KmSm 耐性のミュータントコロニーから PCR で *rpsL* 領域を増幅し、サンガーシーケンスを行い変異のサイトと種類を同定した。それらを集計して、実験群別に変異スペクトルごとの MF 値を算出した結果を表 3 に示す。*Msh2* 遺伝子欠損マウスでは、

検出された変異の大半がアデニン塩基の繰返し配列（A-run 配列）での 1 塩基の挿入または欠失であり（表 3 中の「1-indel_A-run」に対応, 図 4）、これはミスマッチ修復機構欠損の特徴であると考えられた。Cs-2 群、KBr 群での MF の上昇は主にこのタイプの変異の増加に起因し、加えて G:C から A:T への一塩基置換の頻度の上昇も影響していた。KBr 群では野生型マウスでのみ G:C>T:A 変異が上昇していた。野生型マウスでは C 群に比較して Cs-2 群で A:T>G:C、A:T>T:A の頻度の上昇が見られた。また Cs-2 群、IR 群では 2 塩基以上の挿入／欠失（図 4 の「>2 indel」オレンジで示した部分に相当）が全体の変異に占める割合が高くなる傾向を認めた（図 4）。

表 3. *rpsL* 解析結果：スペクトル別変異頻度

MF：突然変異頻度、1_indel：1 塩基挿入／欠失、>2_indel：2 塩基以上の挿入／欠失、A-run：アデニン塩基の連続配列、other：リアレンジメント／複雑な変異、実験群の記号は表 1 参照



MF ($\times 10^{-5}$)	<i>Msh2</i> ^{-/-}					<i>Msh2</i> ^{+/+}					
	C	Cs-1	Cs-2	IR	KBr	C	Cs-1	Cs-2	IR	KBr	
Base Substitution	G:C > A:T	2.10	1.01	4.88	1.67	2.41	0.24	0.23	0.11		0.55
	A:T > G:C	1.30	1.26	1.04	1.77	1.48			0.44	0.09	0.16
	G:C > T:A	0.17	0.25	0.24	0.31	0.19	0.08	0.23	0.11	0.09	0.23
	G:C > C:G	0.11	0.25	0.40	0.10	0.19					
	A:T > T:A	0.23	0.25	0.32			0.08	0.23	0.33		
	A:T > C:G	0.34		0.48	0.31				0.11	0.09	
Frameshift	1_indel	0.79	2.27	1.52	1.57	1.30	0.24	0.68	1.21	0.17	0.94
	1_indel_A-run	23.07	26.03	36.48	22.85	51.22	0.16	0.68		0.43	
	>2_indel	1.13	1.52	2.96	0.94	1.48	0.63	1.58	1.87	1.20	0.70
	other				0.21				0.11	0.09	0.08

図 4. 各変異タイプの相対的割合

1-indel : 1 塩基の挿入/欠失、>2 indel : 2 塩基以上の挿入/欠失、Indel_A-run : アデニン塩基の連続配列での挿入/欠失、BS : 一塩基置換、WT : 野生型マウス、KO : *Msh2* 遺伝子欠損マウス、C、Cs-1、C-2、KBr、IR : 実験群 (表 1 参照)

¹³⁷Cs 長期飲水投与による腫瘍形成への影響の解析

各実験群の処置が終了した時点でマウスから摘出した小腸組織を用いて腫瘍の有無を解析し集計した値を表 4 に示す。いずれの遺伝子型マウスでも今回の解析では自然発がんは検出されなかった (C 群)。*Msh2* 遺伝子欠損マウスの KBr 群では今回解析に用いた 4 匹全てで多数 (平均 13 個) の腫瘍が検出された。Cs-2 群では 10 匹中 4 匹で腫瘍が検出された (33.3%、うち 3 匹は 1 個、1 匹は 2 個の腫瘍)。野生型マウスの KBr 群では 22 匹中 7 匹 (22.7%) で 1 個から 3 個の腫瘍が検出されたが、Cs-2 群では全く検出されなかった。遺伝子型ごとに 3 つの実験群で腫瘍数データを用いた多重検定を行ったところ、*Msh2* 遺伝子欠損マウスの KBr 群と C 群、KBr 群と Cs-2 群間でのみ有意差を認めた (Kruskal-wallis test $p=0.0005$ Dunn test $p=0.0004, 0.0156$)。

表 4. 発がん解析 : 各実験群における解析マウス数と小腸の発がん頻度

	<i>Msh2</i> ^{-/-}			<i>Msh2</i> ^{+/+}		
	C	Cs-2	KBr	C	Cs-2	KBr
number of mice analyzed	9	10	4	7	7	22
total tumor number	0	4	54	0	0	7
mean tumor number	0.0	0.4	13.5	0.0	0.0	0.3
SD	0.0	0.7	1.3	0.0	0.0	0.7
number of mice harbor tumor(s)	0	3	4	0	0	5
tumor prevalence (%)	0.0	33.3	100.0	0.0	0.0	22.7

遺伝子発現解析

各実験群での遺伝子発現パターンを知る目的で、図 2 に示す短期ばく露のプロトコールで得られた小腸サンプルを用いて RNAseq 解析を行なった。表 5 に今回解析に用いたサンプルの情報を示す。

表 5. RNAseq 解析に用いたサンプルの遺伝子型と実験群

mouse ID	sex	Msh2 genotype	Exp.Group	Group Name
WTC-1	F	+/+	C	WT-C
WTC-2	M	+/+	C	WT-C
WTC-3	M	+/+	C	WT-C
WTCB6-1	F	+/+	C	WT-C
WTCB6-2	M	+/+	C	WT-C
WTCs2-1	M	+/+	Cs-2	WT-Cs2
WTCs2-2	M	+/+	Cs-2	WT-Cs2
WTCs2-3	M	+/+	Cs-2	WT-Cs2
WTKBr-1	F	+/+	KBr	WT-KBr
WTKBr-2	M	+/+	KBr	WT-KBr
WTKBr-3	M	+/+	KBr	WT-KBr
WTIR-1	M	+/+	IR	WT-IR
WTIR-2	F	+/+	IR	WT-IR
KOC-1	F	-/-	C	KO-C
KOC-2	M	-/-	C	KO-C
KOC-3	M	-/-	C	KO-C
KOCs2-1	F	-/-	Cs-2	KO-Cs2
KOCs2-2	F	-/-	Cs-2	KO-Cs2
KOCs2-3	M	-/-	Cs-2	KO-Cs2
KOKBr-1	F	-/-	KBr	KO-KBr
KOKBr-2	M	-/-	KBr	KO-KBr
KOKBr-3	M	-/-	KBr	KO-KBr
KOIR-1	M	-/-	IR	KO-IR
KOIR-2	F	-/-	IR	KO-IR
KOIR-3	M	-/-	IR	KO-IR
KOIR-4	M	-/-	IR	KO-IR

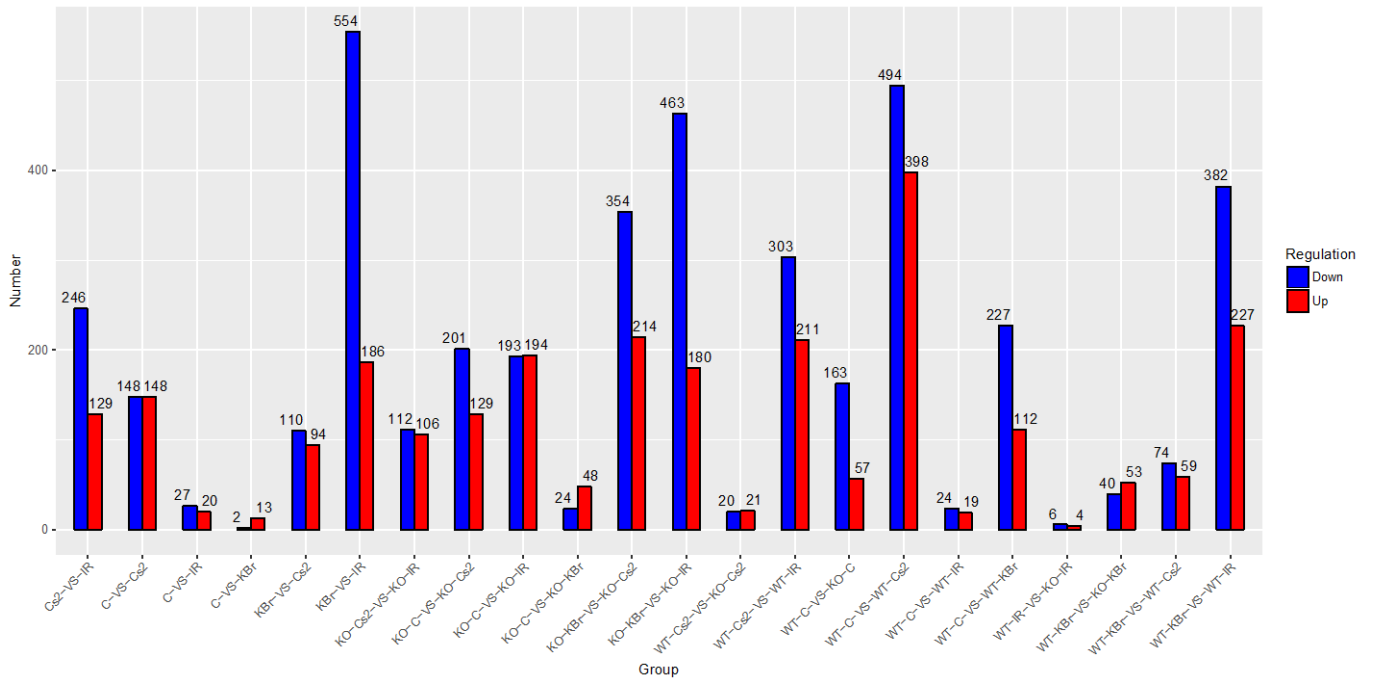


図 5. 各実験群間の比較結果：発現が変化した遺伝子数

WT：野生型、KO：Msh2 遺伝子欠損、C、KBr、Cs2、IR はそれぞれ C 群、KBr 群、Cs-2 群、IR 群（実験群記号の詳細は表 1 参照）、青は発現が低下、赤は発現が上昇した遺伝子、各バー上部の数値は遺伝子数を示す。

各実験群間で遺伝子発現量の違いを比較し、有意に変動した遺伝子の数をプロットした（図 5）。C 群と KBr 群間、C 群と IR 群間では発現が変動した遺伝子は 50 以下であったのに対して、C 群と Cs-2 群間では 296 の遺伝子で有意な変動が見られた。Cs-2 群間と IR 群間ではさらに多くの遺伝子が変動していたことから、総被ばく線量が同程度でも内部被ばくと外部被ばくで小腸において反応性の違いがあること考えられた。KBr 群間と IR 群間では IR 群で発現が低下した遺伝子が顕著に多かった。野生型マウスと Msh2 遺伝子欠損マウスの C 群では 200 以上の遺伝子で発現量に差があったが、IR 群では 10、Cs-2 群では 41、KBr 群では 133 遺伝子のみが変動していた。一方遺伝子型別に見ると、野生型マウスでは C 群と Cs-2 群で 900 近い遺伝子が発現量に差があったのに対して、C 群と IR 群間では 40 程度であり、内部被ばくと外部被ばくの違いが認められた。

本研究課題の前年度までの中島のサイトカインの測定結果で、KBr 群と Cs-2 群での発がん頻度の差に影響する可能性のある因子として、免疫系の反応の違いを見出しており、特に IFN- γ と TNF- α は Cs-2 群で上昇傾向が見られている。そこでまず今回は KBr 群と Cs-2 群での違いに注目した。両群間で発現量に差があった遺伝子について、X 軸を Fold Change、Y 軸に q-value をとってプロットした volcano plot の結果を図 6 に示す。KBr 群に対して Cs-2 群で有意に発現上昇した 94 遺伝子、発現低下した 110 遺伝子がそれぞれ赤と青で示されているが、中でも発現量の差が大きく有意差の p 値が小さい遺伝子群は生物学的意味を持つ可能性がある。これらの遺伝子の機能や特徴を調べるために、遺伝子オントロジー（GO）エンリッチメント解析を行なった。図 7 のヒストグラムはそれぞれの GO term にエンリッチメントした遺伝子の数を横軸に、オントロジーのカテゴリー別 GO term を縦方向に並べたもので、青で示された biological process に注目すると、酸化還元プロセス、ストレス反応、IFN γ や IFN β 応答、MHC 関連などの GO term に属する遺伝

子の発現変動があることがわかる。さらにこれらのデータより、p 値を横軸に GO カテゴリ別に並べてみると (図 8)、GO term 「response to interferon-gamma」に属する遺伝子での差の p 値は非常に小さく ($p=6.09 \times 10^{-8}$)、発現量に有意な差があることがわかった。また他にも免疫系に関する「antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II」、「response to interferon-beta」、「T cell receptor signaling pathway」などの GO term が付されている遺伝子が抽出され、両群に免疫反応性の違いがあることが示唆された。

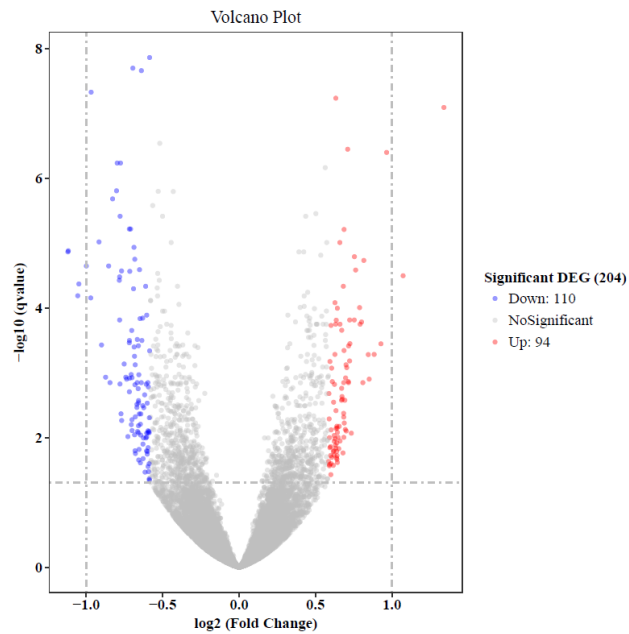


図 6. KBr 群 vs Cs-2 群の Volcano plot

KBr 群に対して Cs-2 群で、有意に発現が低下した遺伝子 (青)、上昇した遺伝子 (赤) を示す。

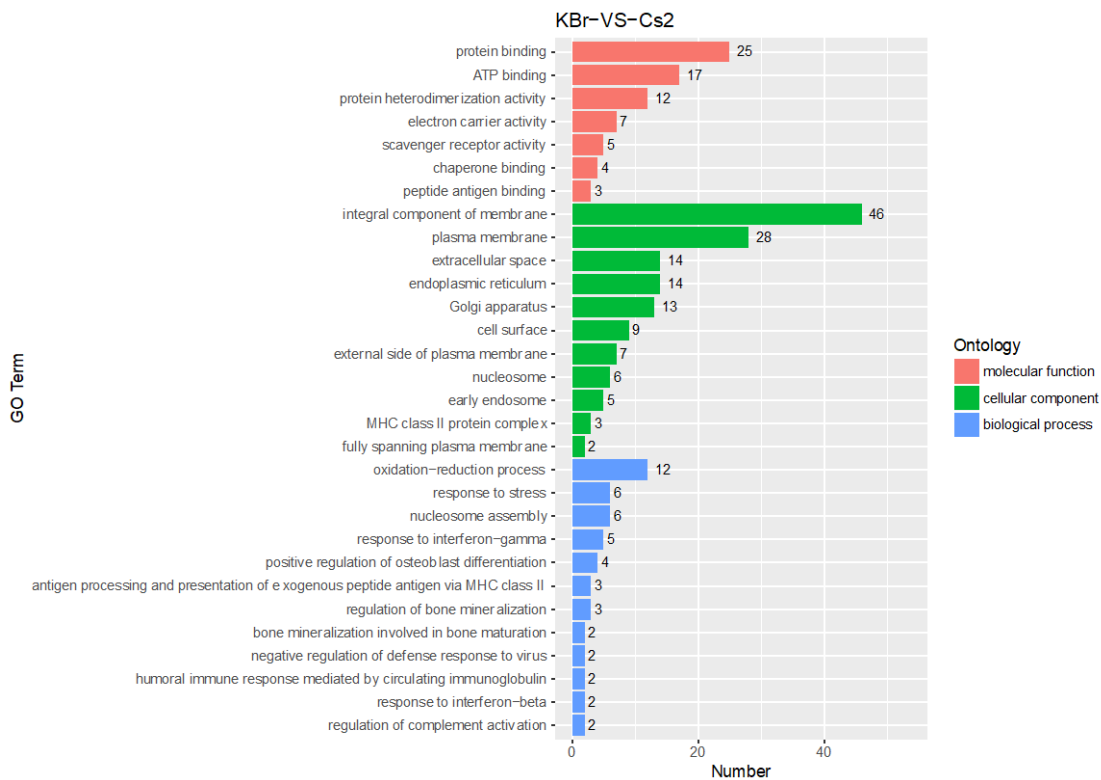


図 7. KBr 群 vs Cs-2 群で有意に発現変動した遺伝子の GO エンリッチメント解析の結果：遺伝子数を横軸にプロット

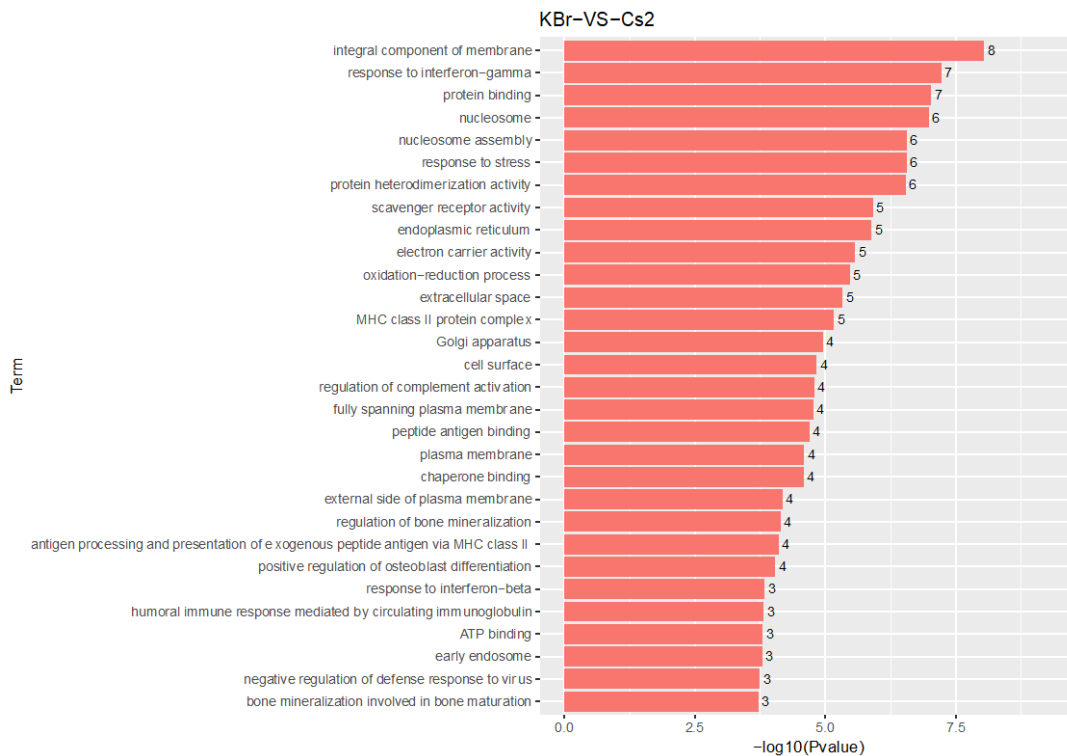


図 8. KBr 群 vs Cs-2 群 GO エンリッチメント解析の結果：p 値を横軸にプロット

次に Cs-2 群と IR 群の比較に注目した。有意な発現変動が見られた合計 375 の遺伝子 (図 9) を解析すると細胞内部の核やオルガネラ関連、および転写関連の GO term に属する遺伝子が多いこと

がわかる (図 10, 11)。それらに含まれる遺伝子には核内で働く転写因子やヒストン関連、オルガネラの構成に関わるものが多く見られた。両群間で細胞内構造や転写の状態が異なる可能性が示唆された。

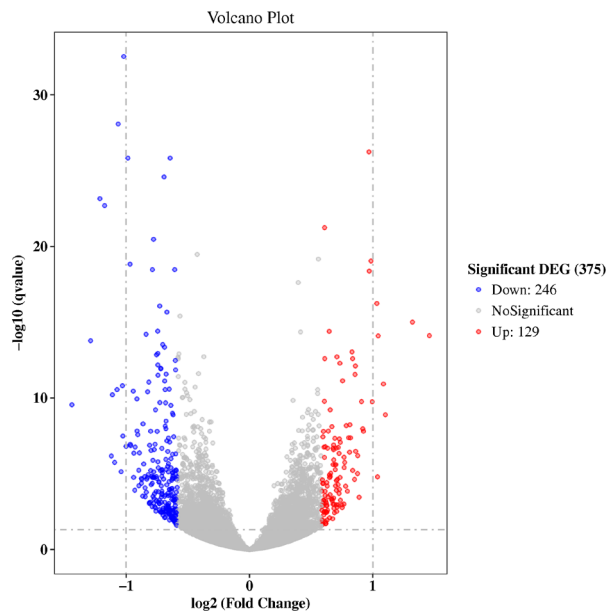


図 9. Cs-2 群と IR 群の Volcano plot

Cs-2 群に対して IR 群で、有意に発現が低下した遺伝子 (青)、上昇した遺伝子 (赤) を示す。

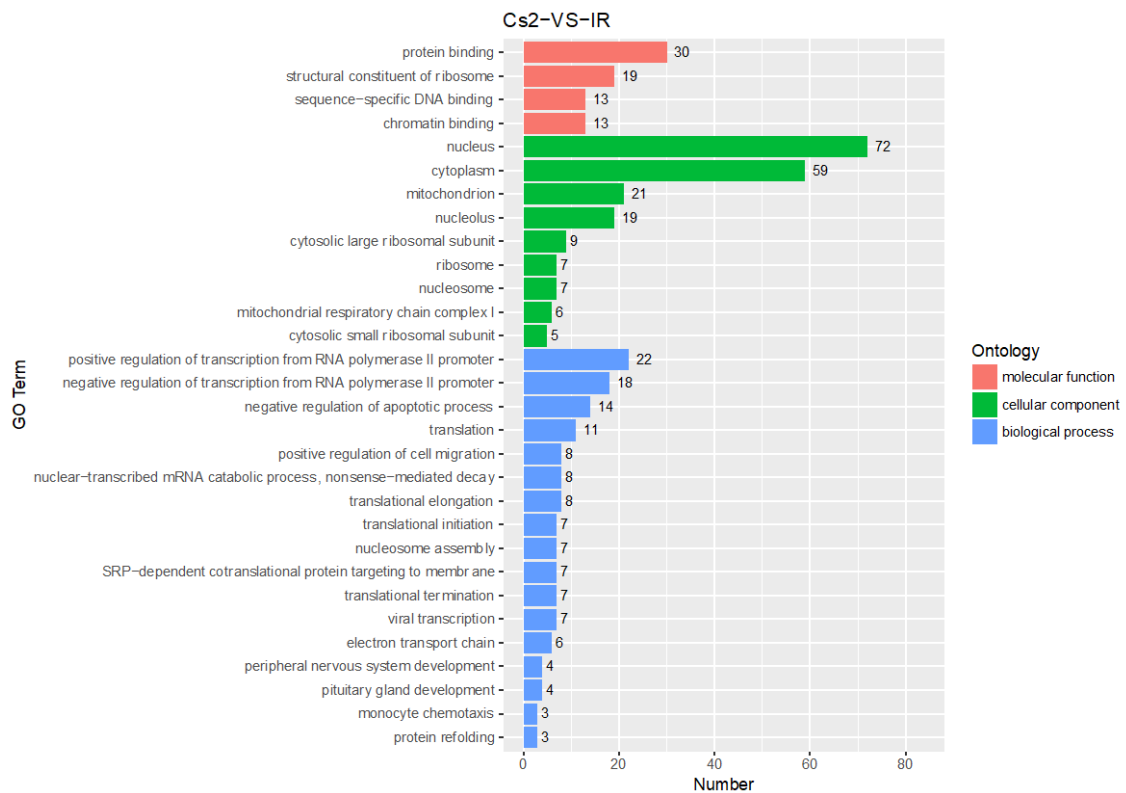


図 10. Cs-2 群 vs IR 群で有意に発現変動した遺伝子の GO エンリッチメント解析の結果：遺伝子数を横軸にプロット

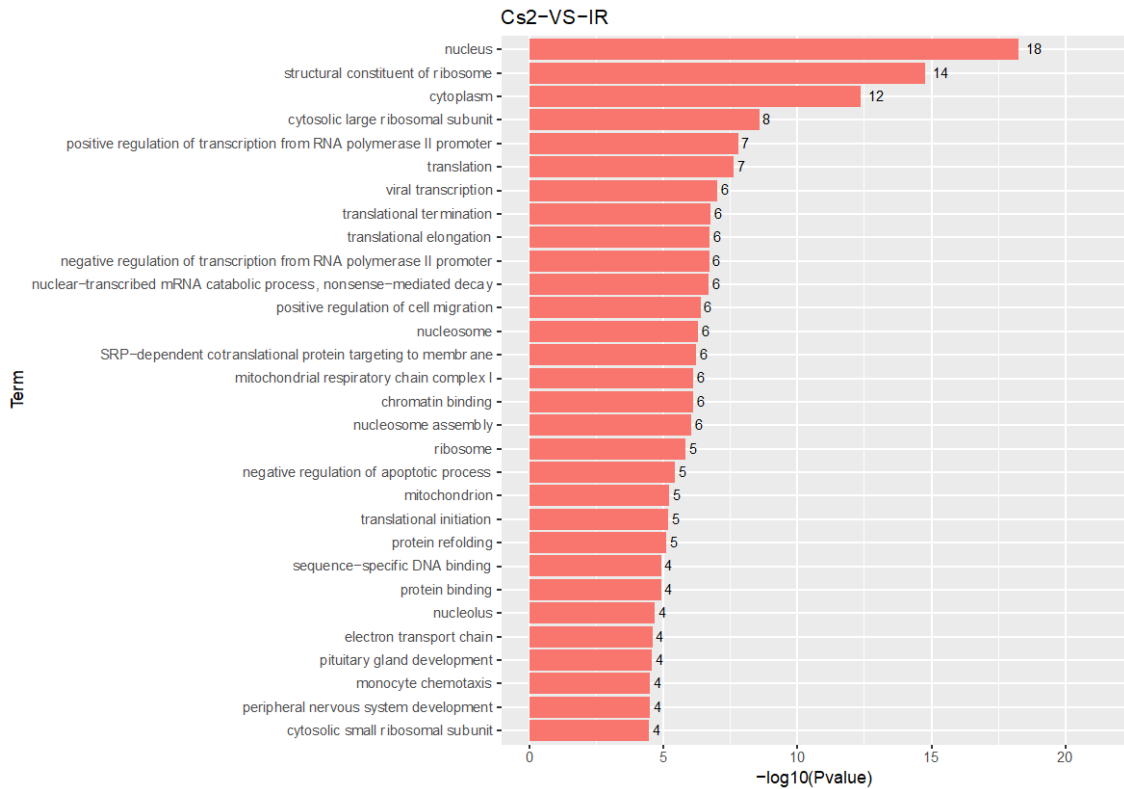


図 11. Cs-2 群 vs IR 群 GO エンリッチメント解析の結果： p 値を横軸にプロット

次世代シーケンスによる *de novo* 生殖細胞変異の解析

Msh2 遺伝子欠損マウスの通常飼育されたオス、 KBrO_3 または ^{137}Cs を 4 週間飲水投与したオスを通常飼育された野生型またはヘテロ接合型のメスと交配し仔を得た。未処理の *Msh2* 遺伝子欠損マウスの若いオスは生殖機能を持ち野生型メスとの交配での産仔数は 6-8 匹で C57BL6/J と変わらなかった。投与群のオスと通常飼育のメスとの交配で生まれた仔は遺伝子型に関係なく出生後も正常に育ち、生殖機能も正常であった。オスマウスへの臭素酸カリウム、 ^{137}Cs の投与は図 2 に示した短期ばく露プロトコールで行い、投与期間終了後直ちに交配に用いた。この方法での投与によりオスの生殖能力が失われることはなく、また産れた仔に外見の形態異常などは見られなかった。

今回解析した 5 家系を図 12 に示す。両親と仔 3 匹の合計 5 匹（1 家系は両親と仔 1 匹の計 3 匹）を用いて次世代シーケンサーによる全エクソン（49.6Mb）解析を行なった。全ての解析サンプルでターゲット領域のカバー率は 98%以上、平均リードデプスは 60 以上であった。既存の 2 種類のアルゴリズム（Octopus と GATK）を用いた親子トリオ解析（親ゲノムで検出されず仔でのみ 50% 前後のアレル頻度で存在する変異の抽出モード）を行い *de novo germline mutation* 候補を抽出し、さらに共通にコールされた SNV を検出した。結果を表 6 に示す。*Msh2* 遺伝子欠損マウスの特徴上、タンデムリピート配列に多くの挿入／欠失型変異の体細胞変異が発生するため、*de novo indel* の検出結果には信頼性の低いサイトが含まれることがあったため、今回は SNV だけに注目した。

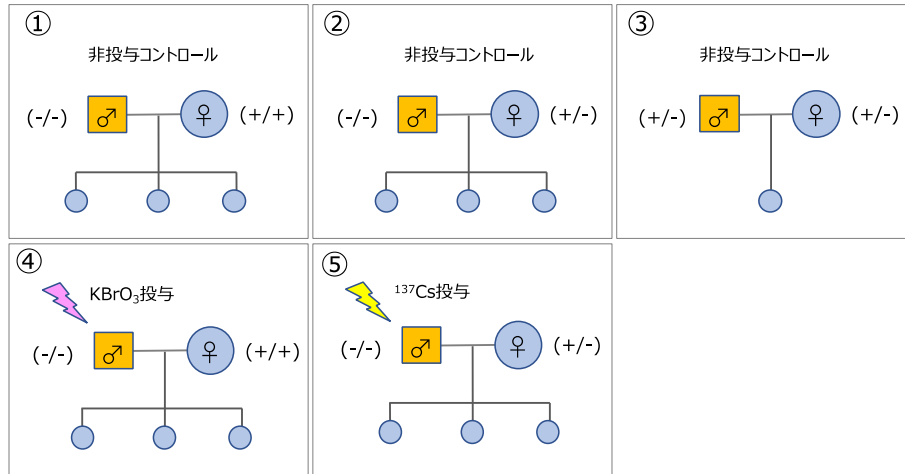


図 12. *de novo* 生殖細胞変異の解析に用いたマウス家系

(-/-) : *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウス、(+/-) : *Msh2* 遺伝子ヘテロ欠損マウス、(+/+) : 野生型マウス

表 6. 親子解析に用いた家系と *de novo* SNVs

family No.	father × mother	offspring #	Octopus	GATK4	overlapped		
			SNVs	SNVs	SNVs	total	mean±SD
①	KO × WT	a	6	6	5	12	4.0±1.7
		b	3	7	2		
		c	5	5	5		
②	KO × He	a	5	7	5	17	5.7±1.2
		b	6	5	5		
		c	7	7	7		
③	He × He	a	0	0	0	0	0
④	KO-KBr × WT	a	7	8	6	17	5.7±0.9
		b	6	6	6		
		c	6	5	5		
⑤	KO-Cs2 × He	a	5	7	4	25	8.3±3.8
		b	10	17	10		
		c	11	13	11		

図2に示す①～⑤の家系でのそれぞれの仔で検出された *de novo* SNV は同腹仔間でも差があった。¹³⁷Cs を投与した *Msh2* 遺伝子欠損マウスから生まれた仔での *de novo* SNV 数は、①②の非投与家系と比較するとやや高い傾向が見られた。一方④の KBrO₃ 投与家系では非投与群と同程度の頻度を示した。③の両親とも *Msh2* 遺伝子ヘテロ欠損で全く変異が検出されなかったことから、この家系のマウスの生殖細胞変異率は野生型マウスに近いが、高くとも野生型マウスの 4 倍以下であると予測された。1 産仔あたりの平均 SNV 数を用いて、各家系での 1 世代あたりの変異率 (/bp/generation) を算出したところ、① 4.08×10^{-8} , ② 5.87×10^{-8} , ③ $< 2.09 \times 10^{-8}$, ④ 5.87×10^{-8} , ⑤ 8.5×10^{-8} であった。検出された SNVs は全ての家系で G:C から A:T への塩基置換が全体の約 80% 前後を占め、ついで A:T から G:C が多く、これは *rpsL* を用いた小腸での体細胞変異のパターンと同様であった。エクソーム解析では対象とするエクソン領域が 49.6Mb であるので 2.09×10^{-8} /

bp/generation 以下の頻度の変異は理論上検出できない。これまでに報告されている野生型マウスの1世代あたりの生殖細胞突然変異率は 0.54×10^{-8} と非常に低い値であり、エクソーム解析では検出感度以下である。野生型マウスを用いる場合や、低い変異頻度を対象にした生殖細胞変異の解析では全ゲノム解析を用いるべきであるが、多くの家系を解析するために膨大なコストがかかるため、*Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いた高感度変異検出系の有効性が示された。

IV 考察

化学物質や放射線による誘発変異は自然突然変異頻度（バックグランド変異頻度）に対する相対比率の変化として考察するので自然突然変異を安定に検出できることが重要である。今回の *rpsL* 解析で得られた野生型マウスのコントロール群の変異頻度 ($1.4 \pm 0.70 \times 10^{-5}$) は、これまで遺伝毒性試験に利用されている種々のトランスジェニックマウスを用いた方法¹⁰⁻¹³⁾での生後約12週齢のC57BL/6マウスの小腸の自然突然変異頻度とほぼ同程度であり、他の変異原誘発変異の解析データとの比較を行う際にも重要な参考値となる。今回の解析では、野生型マウスにおいて線量依存的に突然変異頻度が上昇する傾向が認められたが、自然突然変異頻度が非常に低く、被ばくの影響は変異頻度のわずかな変化としてしか捉えられず、誘発変異の定量的・定性的解析と統計学的検定を行うにはさらに多くのマウス個体が必要であると考えられた。一方で自然突然変異頻度が野生型マウスの約20倍高い*Msh2*遺伝子欠損マウスでは、酸化剤や放射線被ばくによる誘発変異を効率的に検出することが可能であった。特にこのマウスではKBr群、Cs-2群では*rpsL*遺伝子内のA-run配列での変異数の顕著な増加が見られた。ミスマッチ修復を欠損したマウスやヒト細胞では、酸化ヌクレオチドによるrun配列の変異が上昇することが認められていることから^{3, 14)}、¹³⁷Cs内部被ばくによる酸化ストレスに起因したマウスゲノムのマイクロサテライト不安定性を反映している可能性がある。変異原ばく露により生体内では種々のDNA損傷が誘発されるが、それらに起因して発生する突然変異はミスマッチ修復機構が効率的に抑制していること、ミスマッチ修復機構の不全により野生型マウスでは観察できない程度の変異原の影響が可視化されたことを示している。一方でIR群では挿入/欠失変異の頻度の割合が増加傾向を示したものの、C群に比較して顕著なMFの増加は見られず、A-run配列での変異割合の増加もなかった。同程度の総被ばく線量でも内部被ばくと外部被ばくでは小腸組織に対する影響が異なることが考えられた。

*Msh2*遺伝子欠損マウスを用いた外部照射処理では小腸での腫瘍の発生は全く検出されなかったことを以前の我々の研究課題⁸⁾で報告している。今回の解析では、*Msh2*遺伝子欠損マウスでは酸化剤投与により全てのマウスの小腸で顕著な腫瘍形成がみられたが、¹³⁷Csの高線量投与群（Cs-2群）では稀にしか腫瘍の発生が見られなかった。KBr群とCs-2群では同程度の突然変異頻度が検出されたにも関わらず、発がん頻度には大きな差があることを複数のマウスを用いた今回の解析により検証した。野生型マウスでもKBr群では少数ではあるが腫瘍の発生が観察されたが、Cs-2群では全く観察されなかった。このような発がん頻度の違いはばく露後の免疫反応の差に起因する可能性があることがRNAseqによる遺伝子発現解析の結果から推測された。KBr群とCs-2群では、IFN- γ やIFN- β 応答、MHC、T細胞シグナルなど、免疫系に関わる遺伝子の発現に有意な変化が観察された。この結果は、前年度までの本研究課題の一環で中島が行なった血清中のサイトカイン量の分析でCs-2群でもIFN- γ が上昇していた事実とも矛盾せず、両群間で差がある全身性の免疫反応が発がん頻度に影響している可能性が考えられた。またCs-2群とIR群を比較したところ、転写や転写因子、クロマチン構造、細胞内の核やオルガネラに関連する多数の遺伝子の変動

が認められ、内部被ばくと外部被ばくでは、総被ばく線量と被ばく期間が同程度でも、細胞障害性または反応性の違いがあることが示された。しかしこのような遺伝子発現変化が細胞や組織中のどのような状態を意味しているのかを明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

酸化剤または ^{137}Cs 内部被ばくによって遺伝的変異が発生するのかどうかを検証する目的で、*Msh2* 遺伝子欠損の短期ばく露 KBr 群、Cs-2 群のオスと通常飼育されたメスマウス（野生型またはヘテロ）の交配で生まれた仔のゲノムを解析した。KBr 群では小腸での体細胞変異頻度と発がん頻度の顕著な上昇が見られたにも関わらず、仔で新たに発生した *de novo* SNVs の数は非投与オスの仔と等程度であった。一方 Cs-2 群のオスとの交配で生まれた仔での *de novo* SNVs の数は非投与家系と比較して 1.5 倍程度多かった。内部被ばくによってオスマウスの生殖細胞ゲノムに変異が誘発された可能性が示唆された。これらの結果は体細胞と生殖細胞のゲノム維持に対する反応性の違いを表している可能性がある。

V 結論

臭素酸カリウムまたは ^{137}Cs の短期飲水投与は *Msh2* 遺伝子欠損マウスの小腸における体細胞突然変異頻度を有意に上昇させた。一方で長期投与後の *Msh2* 遺伝子欠損マウスでの腫瘍形成頻度には大きな差があり、 ^{137}Cs 投与は臭素酸カリウム投与ほど腫瘍を誘発しなかった。このような反応性の違いは生体レベルでの免疫反応の違いに依る可能性が示唆された。また ^{137}Cs の内部被ばく線量と同程度の線量の外部照射では突然変異頻度の上昇は見られなかったが、両実験群間では転写や核内構造に関わる遺伝子の発現に差が見られ、細胞レベルでの反応性に違いがあることが予測された。またオスの生殖細胞への影響は、*Msh2* 遺伝子欠損マウスで、臭素酸カリウム投与と比較してむしろ ^{137}Cs の短期飲水投与で高くなる結果で、体細胞と生殖細胞におけるゲノム安定性維持機構に相違がある可能性が予測された。野生型マウスでは DNA ミスマッチ修復機構をはじめとする生物学的防御システムの働きにより、 ^{137}Cs の飲水投与による影響としての突然変異と発がんが効果的に抑制されていると考えられた。これらの結果は放射線の生体影響を考える際に重要な情報となるため、今後も継続した基礎研究が重要であると考えられた。

この研究に関する業績

ア) 雑誌

大野みずき, 中津可道, 續輝久. 酸化 DNA 損傷とその修復機構. 公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団/医学書院. 東京. 生体の科学. 2022 ; Vol.73 No.2 : 99-104.

イ) 国際会議、学会発表

- 1) Ohno M, Takano N, Nakajima H, Ishihara H, Nakatsu Y, Tsuzuki T., Analysis of somatic mutations induced by chronic internal exposure to Cs-137 using *rpsL*-transgenic mice, 日本環境変異原ゲノム学会第50回記念大会, 2021年10月, 横須賀
- 2) 大野みずき, 鷹野典子, 日高京子, *de novo* Germline Mutation の頻度とスペクトルに影響する因子. 日本遺伝学会第93回大会ワークショップ招待講演. オンライン開催, 2021年9月

引用文献

- 1) Tsuzuki, T. *et al.* Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11456-11461, doi:10.1073/pnas.191086798 (2001).

- 2) Tsuzuki, T., Egashira, A. & Kura, S. Analysis of MTH1 gene function in mice with targeted mutagenesis. *Mutat Res* **477**, 71-78 (2001).
- 3) Egashira, A. *et al.* Mutational specificity of mice defective in the MTH1 and/or the *MSH2* genes. *DNA Repair (Amst)* **1**, 881-893 (2002).
- 4) Sakamoto, K. *et al.* MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress induced intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* **67**, 6599-6604, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4802 (2007).
- 5) Isoda, T. *et al.* Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice. *Int J Biol Sci* **10**, 940-947, doi:10.7150/ijbs.9241 (2014).
- 6) Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K. & Tsuzuki, T. Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis. *Int J Biol Sci* **10**, 73-79, doi:10.7150/ijbs.5750 (2013).
- 7) Gondo, Y., Shioyama, Y., Nakao, K. & Katsuki, M. A novel positive detection system of in vivo mutations in *rpsL* (*strA*) transgenic mice. *Mutat Res* **360**, 1-14 (1996).
- 8) 環境省 原子力災害影響調査等事業（放射線の健康影響に係る研究調査事業）放射線による健康影響の解明及び放射線以外の要因による健康リスクの低減を含めた総合的な健康リスクに関する研究, 「マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる成体と子孫への影響の定量的実験検証」代表中島裕夫（大阪大学）H30 年度報告書
- 9) Cooke DP, Wedge DC., & Lunter G., A unified haplotype-based method for accurate and comprehensive variant calling. *Nature Biotechnology*, **39**, 885–892. (2021)
- 10) Aoki Y., Matsumoto M., Matsumoto M., Masumura K., Takehiko Nohmi T., Mutant frequency is not increased in mice orally exposed to sodium dichromate. *Food Safety* **7**, 2-10 (2019)
- 11) Dollé ME., Snyder WK., Gossen JA., Lohman PH., and Vijg J., Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *PNAS* **97**, 8403-8408 (2000)
- 12) Arrault X., Michel V., Quillardet P., Hofnung M., Touati E., Comparison of kinetics of induction of DNA adducts and gene mutations by a nitrofurantoin compound, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-b]furan (R7000), in the caecum and small intestine of Big Blue™ mice. *Mutagenesis* **17**, 353–359 (2002)
- 13) Lynch M., Gooderham NJ and Boobis AR., Organ distinctive mutagenicity in Muta™ Mouse after short-term exposure to PhIP. *Mutagenesis* **11**, 505-509 (1996)
- 14) Russo, M. T. *et al.* The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 465–474 (2004)

謝辞

突然変異解析は鷹野典子博士（九州大学）に、消化管腫瘍の病理判定は奈良間功博士に、NGSデータ解析は日高京子博士（北九州市立大学）にご協力いただきました。ここに感謝申し上げます。

Analysis of mutations using *Msh2*-deficient mice internally exposed to Cesium-137 radiation

Mizuki Ohno¹, Yoshimichi Nakatsu¹, Yumiko Nakajima², Teruhisa Tsuzuki³

1 Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Science, Kyushu University

2 Central Institute of Radioisotope Science and Safety Management, Kyushu University

3 Kyushu University

Keywords: cesium-137, internal exposure, mutation, mismatch repair, oxidative stress, genetic effect,

Abstract

It is necessary to consider multi-level biological responses in vivo when estimating the health effects of radiation exposure. In addition to the direct effects of radiation exposure, the indirect effects of reactive oxygen species-mediated oxidative stress should be considered.

In this study, KBrO₃- or cesium-137-containing water was orally administered to the mice and we analyzed the somatic mutations, tumor development, and gene expression profiles in their small intestines. To obtain an effective quantitative data, we used DNA mismatch repair defective *Msh2*-knockout mice, which are sensitive to radiation exposure and oxidative stress. KBrO₃ significantly increased both the somatic mutation frequency (MF) and tumor frequency in the small intestines of these mice, whereas cesium-137 (high dose) treatment only increased the MF. RNAseq analysis revealed differential expression of some genes related to IFN- γ responses, which suggests the differential immune responses between KBrO₃-treated and cesium-137-treated mice. Mice exposed to external irradiation with a dose equivalent to a mouse in the high-dose cesium-137 internal exposure group showed almost an equal MF as the control mice. Furthermore, the offspring derived from the mating of cesium-137 treated *Msh2*-knockout male and untreated female had a tendency more de novo germline mutations than that of offspring from nontreated male. The results indicated a difference in the biological response between “radiation exposure and oxidant exposure,” “internal exposure and external exposure,” and “somatic cells and germ cells.”

Although the results provide important information regarding health effects of internal exposure of cesium-137 in humans, further studies are required to elucidate the underlying molecular mechanisms.