

## 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	低線量長期被ばくマウスおよび細胞の超高感度変異検出に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析 「ヒト、マウス体細胞における放射線誘発ゲノム変異の大規模検出と解析」
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	権藤 洋一	東海大学医学部分子生命科学領域・客員教授
分担研究者	松本 義久	東京工業大学科学技術創成研究院ゼロカーボンエネルギー研究所・教授

	氏名	所属機関・職名
研究協力者	杉原 崇	公益財団法人環境科学技術研究所・主任研究員
研究参加者	島田 幹男	東京工業大学科学技術創成研究院ゼロカーボンエネルギー研究所・助教
研究参加者	依田 功	東京工業大学科学技術創成研究院ゼロカーボンエネルギー研究所・主任技術専門員
研究参加者	塚田 海馬	東京工業大学・研究員
研究参加者	今村 力也	東京工業大学環境・社会理工学院融合理工学系原子核工学コース・大学院生（博士）
研究参加者	張 博	東京工業大学環境・社会理工学院融合理工学系原子核工学コース・大学院生（博士）

研究要旨	<p>本研究課題は、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解読（WGS）により、低線量・低線量率放射線被ばくのゲノムへの継世代影響を塩基レベルで、高精度かつ高感度で解析することを目的としている。本項目では、ヒト、マウス培養細胞を用いて細胞レベルでの変異解析により、個体と細胞、マウスとヒトの橋渡しを行うことを目的として行った。</p> <p>自然変異、放射線誘発変異に関しては、個体、細胞のいずれにおいても、特定の遺伝子に注目した研究が長らく行われてきた。近年、個体レベルでは、主任研究者・権藤の研究をはじめ、WGS法による研究が出てきている。しかしながら、WGS法を単純に培養細胞系に適用することはできない。私たちは最近、個体世代間の変異検出系の利点を培養細胞で再現するという新規の着想を得て、WGS法を用いた細胞レベルでの変異の大規模検出と解析を試みた。</p>
------	---

	初年度の令和3年度は、ヒト線維芽細胞 NB1RGB を用いて、細胞クローン集団作製の手法、条件の確立を試み、非照射および低線量率連続照射（1, 20 mGy/day）条件下での WGS データを取得した。
キーワード	低線量・低線量率放射線、変異、次世代シーケンサー、全ゲノム解読、体細胞

## I 研究目的

低線量・低線量率放射線の影響として注目されるのは、しきい値を持たない確率的影響に分類される発がんや遺伝性（次世代）影響である。これらはいずれもゲノムに生じた変異が関係すると考えられる。自然変異、放射線誘発変異の定量的研究の歴史は古いが、個体、細胞のいずれにおいても、特定の遺伝子に注目した研究が長らく行われてきた。主任研究者・権藤は、完全遠縁交配法という独自の自然変異蓄積法と次世代シーケンサーを用いたWGS法を組み合わせることで、従来の75万倍の頻度で自然変異を検出する系を確立した。本研究の項目1（主任研究班）では、WGS法を用いて、マウス個体レベルでの次世代影響を解析することが計画されている。しかしながら、個体の場合、各世代の個体のゲノムを回収することが可能である。一方、細胞の場合、分裂すると親細胞は残らないため、WGS法を単純に培養細胞系に適用することはできない。本分担研究者は、個体世代間の変異検出系の利点を培養細胞で再現するという新規の着想を得た。本項目では、この着想に基づき、ヒトおよびマウス培養細胞にWGS法を適用して、細胞レベルでの変異の高感度検出と定量的解析を行う。これにより、個体レベルと細胞レベルでの変異の質的・量的な関係と、ヒト細胞とマウス細胞での変異の質的・量的相違を明らかにすることを目的とする。

本項目は、低線量・低線量率放射線のゲノムへの影響に関して、個体と細胞、マウスとヒトの橋渡しをすることで、福島第一原発事故の影響を受けた地域の住民の不安の解消や軽減につながることを期待される。また、国際放射線防護委員会などによるヒトの遺伝性影響や発がんのリスク推定の高度化に貢献することが期待される。

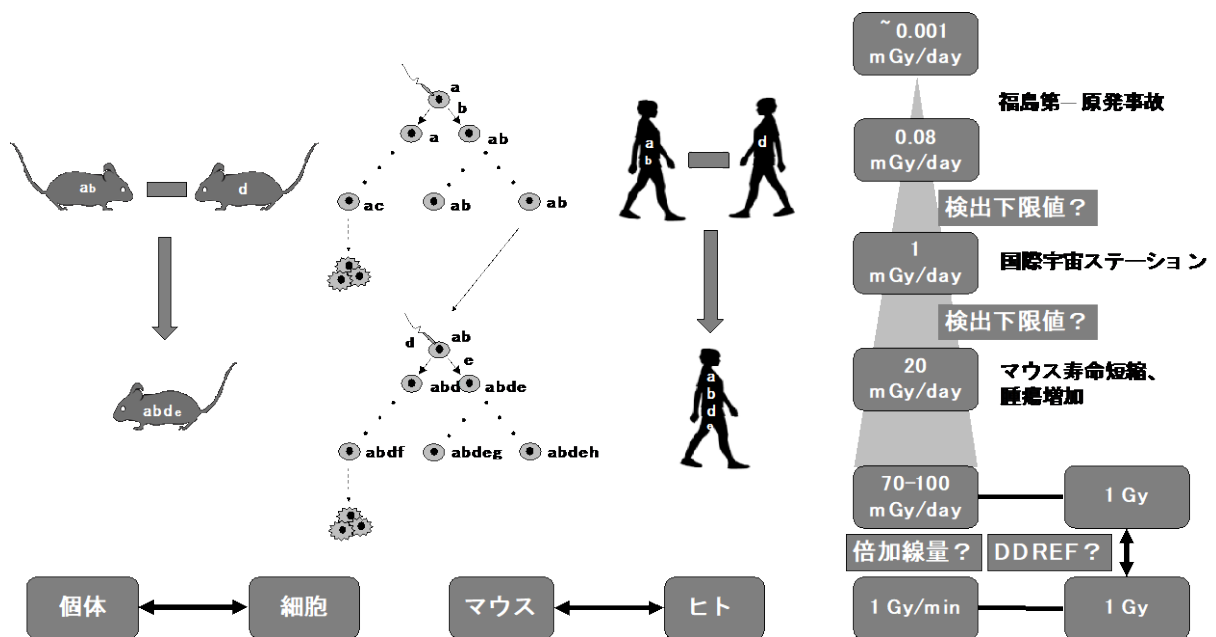


図1 本研究の概要と目的

## II 研究方法

【細胞】本年度は、理研Cell Bankから入手したヒト新生児皮膚線維芽細胞NB1RGBを用いた。使用に際して、PCR法によるマイコプラズマ検査を行い、陰性であることを確認した。培地はDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に10%容の牛胎仔血清、1%容のペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液を添加したものをを用い、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%に設定したインキュベータ中

で培養した。継代は週2回行い、4倍から5倍に希釈した。継代、クローン回収にあたって、細胞をディッシュ、フラスコまたはウェルプレートから剥がす際には、まず、培地を吸引除去し、次に、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline; PBS) で洗浄し、2.5 g/L-トリプシン/1 mmol/L-EDTA溶液をPBSで5倍希釈したもので37°C、5分間処理した。その後、ディッシュまたはウェルプレートから剥がれた細胞を上記培地で回収した。必要に応じて遠心後、適切な濃度に希釈して細胞を播種した。牛胎仔血清はHyclone、DMEMおよびその他の試薬はナカライテスクの製品を用いた。また、ディッシュ、ウェルプレート、ピペットなどはNuncの製品を使用した。細胞の計数は、ディスプレイ細胞係数盤ワケンカウンター (ワケンビーテック) を用いて行った。

【放射線照射】高線量・高線量率照射は、東京工業大学 (以下、東工大) ゼロカーボンエネルギー研究所千代田テクノロコバルト照射施設の  $^{60}\text{Co}$  線源 (2010年2月時点 222TBq) にて行った。線源と細胞との距離を調整し、約 1 Gy/min の線量率を得た。低線量率連続照射は、環境科学技術研究所 (以下、環境研) の  $^{137}\text{Cs}$  線源低線量率細胞照射設備を利用して行った。線量率は、国際宇宙ステーションに近いと考えられる 1 mGy/day、およびマウス低線量率連続照射実験で有意な寿命短縮、腫瘍増加が認められている 20 mGy/day の2条件とした。なお、毎日、22時間照射を行い、2時間は照射を止めた。これは、マウスの照射条件と合わせるためである。環境研での低線量率連続照射に際しては、対数増殖期の細胞をフラスコに入れ、37°Cに維持して東工大から搬送し、37°C、CO<sub>2</sub>濃度 5%に設定したインキュベータ中に一晩静置した。翌日、細胞をフラスコから剥がして回収し、細胞を計数し、適切な濃度に調整した後、96 ウェルプレートの各ウェルに培地 100  $\mu\text{l}$  とともに播種した。今回の実験では照射・培養期間は21日で、途中1回、9日目に培地の交換を行った。照射・培養期間終了後、96 ウェルプレートを 37°Cに維持して環境研から東工大に搬送し、37°C、CO<sub>2</sub>濃度 5%に設定したインキュベータ中に一晩静置した。翌日、ウェルを顕微鏡で観察し、増殖が見られたウェルから細胞を回収し、96 ウェルプレートおよびディッシュに播種し、再び培養した。

【次世代シーケンサーによる全ゲノム解読】細胞からのゲノム DNA 調製は、NucleoSpin Tissue Kit (MACHERY-NAGEL) を用いて当研究室において行った。以降の作業は業者 (株式会社クラボウ) に委託した。ライブラリーは TrueSeq Nano DNA library kit (Illumina) を用いて行い、Illumina platform を用いて、ペアエンド、リード長 151 塩基、平均カバレッジ 32-36 回の解析を行った。UCSC のヒト基準ゲノム配列 hg38 (2,934 Mbp) を参照配列として用いて、塩基配列マッピングを行い、塩基置換、塩基挿入・欠失、大規模挿入・欠失、コピー数増加・減少、転座などを検出した。

(倫理面への配慮)

本分担項目には動物実験、遺伝子組換え実験に該当するものは含まれず、本研究はヒトを対象とする研究には該当しない。また、ヒト培養細胞は理研Cell Bankに寄託され、学術研究における利用については原則として使用制限がないものを用いた。

### III 研究結果

#### 1. 細胞集団クローン作製

当初、1ウェルあたり平均0.1から0.2個の細胞を播種したが、視認できる程度 (数十から数百個) の細胞数まで増殖が見られたウェルがほとんどなかった。コロニー形成実験を行ったところ、コ

ロニー形成効率は15%程度であることが分かった。このことから、実際に播種した細胞の約15%が視認できる程度の細胞数まで増殖すると考えられた。そこで、1ウェルあたり平均2個の細胞を播種すると、2枚の96ウェルプレートでそれぞれ20個、25個のウェルで増殖が認められた。この結果から1ウェルあたりのクローン形成能を有する細胞数（以下、実効播種数）を逆算するとそれぞれ0.23個、0.30個が得られた。播種した細胞数に対する実効播種数の割合（以下、クローン形成効率）はそれぞれ11.5%、15%となった。また、増殖が見られたウェルが2つ以上の細胞に由来する確率はそれぞれにおいて0.11、0.14と見積もられた。そこで、NB1RGB細胞を用いる場合には、1ウェルあたり1～2個の細胞を播種することとした。また、3個のウェルから細胞を回収し、計数した結果、0.9 mlにそれぞれ3個、3個、5個であった。ウェルからの回収容積は100 mlであったことから、これらのウェル中の細胞数はそれぞれ $3.3 \times 10^2$ 、 $3.3 \times 10^2$ 、 $5.5 \times 10^2$ と見積もられた。細胞分裂回数は、それぞれ8.4回、8.4回、9.1回と見積もられた。この実験では、播種してから17日後であったことから、平均分裂（倍加）時間は1.8～2.0日と見積もられた。

環境研での低線量率連続照射実験では、非照射、1 mGy/day、20 mGy/dayのそれぞれについて、1ウェルあたり1個の細胞を播種した96ウェルプレートを2枚、1ウェルあたり2個の細胞を播種したプレートを1枚用いた。表1にクローン形成効率を示す。クローン形成効率は上記の予備的検討の場合とほぼ同じであった。

表1 低線量率照射・培養実験におけるクローン形成効率

	増殖	汚染	実効播種数	クローン 形成効率	平均	標準偏差
非照射						
1 cell-1	11	0	0.122	0.122	0.155	0.078
1 cell-2	9	0	0.098	0.098		
2 cells	37	0	0.487	0.243		
1 mGy/d						
1 cell-1	15	3	0.176	0.176	0.169	0.010
1 cell-2	14	0	0.158	0.158		
2 cells	28	0	0.345	0.172		
20 mGy/d						
1 cell-1	14	0	0.158	0.158	0.129	0.037
1 cell-2	8	0	0.087	0.087		
2 cells	22	7	0.284	0.142		

次に、増殖が見られたウェルについて、目視によって細胞数が多いウェル、中程度のウェル、少ないウェルに分けた。各照射条件において、細胞数が多いウェルと中程度のウェルを選んで、細胞を回収し、細胞を計数した。その結果を表2に示す。各条件において、最も細胞数が多いウェルでは10,000個程度の細胞があった。分裂回数は21日の間に13回程度となり、平均分裂（倍加）時間は約37時間と見積もられた。

表2 低線量率照射・培養実験で得られたクローンの細胞計数結果

ID	細胞数	分裂回数	平均分裂（倍加）時間
非照射			
C1	12750	13.6	37.0
A11	7250	12.8	39.3
H11	500	9.0	56.2
C1	250	8.0	63.3
1 mGy/d			
B5	11750	13.5	37.3
D1	3250	11.7	43.2
G7	3750	11.9	42.5
F12	1500	10.6	47.8
20 mGy/d			
A12	10000	13.3	37.9
D8	9500	13.2	38.1
A2	2556	11.3	44.5
A8	333	8.4	60.1

次に、96ウェルプレートに1ウェルあたり平均1個となるように播種するとともに、残りの細胞をディッシュに播種した。14日後、ディッシュでは播種時に比べて細胞数の増加が見られたが、96ウェルプレートでは増殖が見られたウェルがほとんどなかった。各照射条件4個のディッシュの中からこの時点において細胞数が多いものを2個選択して細胞を回収し、細胞計数、ゲノムDNA調製を行った。その結果を表3に示す。最も速く増殖したと見られるクローンでも分裂回数は14日間に4.4回で平均分裂（倍加）時間は約77時間と見積もられた。上記の1細胞からスタートしてクローンを形成するまでの間の平均分裂（倍加）時間の約2倍であった。最も増殖が遅いクローンではこの期間に2倍の増加に留まっていた。今回用いたNB1RGB細胞は不死化していない正常線維芽細胞であり、有限の分裂寿命を持つため、徐々に分裂能が低下したと考えられる。

表3 ゲノムDNA調製を行ったクローンの細胞計数結果

ID	播種細胞数	細胞数	分裂回数	平均分裂（倍加）時間
0 mGy/d 1 (C1)	11,475	$2.4 \times 10^5$	4.4	76.9
0 mGy/d 2 (A11)	6,525	$1.3 \times 10^4$	1.0	325.9
1 mGy/d 1 (B5)	9,400	$2.0 \times 10^5$	4.4	76.8
1 mGy/d 2 (G7)	3,375	$1.7 \times 10^4$	2.3	145.8
20 mGy/d 1 (A12)	8,000	$4.1 \times 10^4$	2.4	142.3
20 mGy/d 2 (D8)	7,600	$2.1 \times 10^4$	1.5	228.0

## 2. 全ゲノム塩基配列解析（WGS）

WGSは8サンプル実施した。バルクのNB1RGB細胞集団1サンプル、10クローンのプール1サン

プル、および非照射、1 mGy/day、20 mGy/day条件で得られたクローン各2サンプルである。下の表4にWGSで得られたデータの概要を示す。総リード数は6.3億から7億で、1リードあたり151塩基であるため、総リード長は950億塩基から1,060億塩基であった。GC含量は40-42%程度であり、ヒトゲノム解析で得られた結果とほぼ一致していた[1]。参照配列として用いたhg38の総塩基長は29億3400万塩基対であるため、平均リード深度は32.6~35.9となった。総リード数のうち、重複していないリードの割合は82-95%であった。

表4 WGSデータの概要

ID	総リード数	総リード長	GC含量 (%)	平均リード深度	非重複リード数	非重複リード率(%)
Bulk	698,700,714	105,503,807,814	40.42	35.71	575,776,385	82.4
Pool	702,483,940	106,075,074,940	40.92	35.90	642,630,218	91.5
0 mGy/d 1	634,766,594	95,849,755,694	41.33	32.44	591,812,856	93.2
0 mGy/d 2	639,146,466	96,511,116,366	42.03	32.67	567,596,794	88.8
1 mGy/d 1	639,380,922	96,546,519,222	41.29	32.68	600,712,680	94.0
1 mGy/d 2	643,504,286	97,169,147,186	42.16	32.89	551,901,191	85.8
20 mGy/d 1	638,658,828	96,437,483,028	41.43	32.64	605,181,281	94.8
20 mGy/d 2	640,145,272	96,661,936,072	41.56	32.72	598,329,566	93.5

表5に上記で得られた塩基配列のマッピングの結果を示す。非重複リードの中で、マップできたリードは95.8~96.8%で、平均深度は26.9~31.4となった。10回以上解読できた部分が96.9~97.9%、20回以上解読できた部分が80.8~95.4%、30回以上解読できた部分が30.2~58.6%となった。ライブラリーのフラグメントの長さは434~488塩基を中央値として、標準偏差は106~122塩基であった。

表5 WGSデータマッピングの結果

サンプル	マップ可能			カバレッジ			フラグメント長	
	リード数	割合 (%)	平均深度	≥10	≥20	≥30	中央値	標準偏差
Bulk	551,669,421	95.8	27.88	97.5	86.4	36.8	434	106.82
Pool	620,029,359	96.5	31.41	97.9	95.4	58.6	454	109.77
0 mGy/d 1	570,719,400	96.4	28.84	97.5	88.1	42.6	448	111.66
0 mGy/d 2	549,401,127	96.8	27.87	97.1	84.0	35.5	465	117.10
1 mGy/d 1	581,017,595	96.7	29.49	97.5	88.6	45.9	476	118.51
1 mGy/d 2	531,941,085	96.4	26.91	96.9	80.8	30.2	445	111.54
20 mGy/d 1	585,444,982	96.7	29.74	97.6	89.0	47.7	489	122.13
20 mGy/d 2	577,392,480	96.5	29.32	97.5	88.3	44.8	488	122.58

表6、7に各サンプルで検出されたヒト基準ゲノム配列hg38との違いを示す。コピー数変化 (Copy

number variation; CNV) が600~750、構造変化 (Structural variation; SV) が1万前後、塩基置換・欠失・挿入が約460万であった。hg38の総塩基長が29億3400万であることから、約0.16%の違いとなる。コピー数変化の内訳を見ると、増加が減少の2倍程度であった。構造変化では挿入が約30%、欠失が約60%、残りが重複、逆位、転座であった。塩基置換・欠失・挿入では、置換が約80%、挿入、欠失が各10%程度であった。非照射、1 mGy/day、20 mGy/day条件で形成されたクローンの間でこれらの数に関して違いは見られなかった。これらのほとんどはNB1RGBがもともと有していたhg38との違いであり、培養の過程で生じたものはごく一部と考えられる。これらの違いを一つひとつ精査することによって、目的とするこのわずかに生じた新しい変異を今後検出していく。

表6 NB1RGB細胞各サンプルとヒト基準ゲノム配列hg38の相違(1)コピー数変化と構造変化

サンプル	コピー数変化			構造変化					
	計	増加	減少	計	挿入	欠失	重複	逆位	転座
Bulk	705	424	281	9,879	2,816	5,650	431	340	642
Pool	750	457	293	10,666	2,851	6,248	479	354	734
0 mGy/d 1	674	442	232	10,499	3,015	5,910	508	330	736
0 mGy/d 2	663	450	213	10,448	2,885	5,920	499	332	812
1 mGy/d 1	729	466	263	10,610	2,941	6,106	476	349	738
1 mGy/d 2	592	406	186	10,217	2,917	5,794	450	342	714
20 mGy/d 1	737	474	263	10,670	3,015	6,009	490	358	798
20 mGy/d 2	746	468	278	10,480	2,879	6,006	486	339	770

表7 NB1RGB細胞各サンプルとヒト基準ゲノム配列hg38の相違(2)塩基置換・欠失・挿入

サンプル	計	置換	挿入	欠失
Bulk	4,688,578	3,800,318	441,158	447,102
Pool	4,679,555	3,806,877	430,611	442,067
0 mGy/d 1	4,669,120	3,809,043	424,802	435,275
0 mGy/d 2	4,651,585	3,798,607	420,817	432,161
1 mGy/d 1	4,669,842	3,809,751	424,736	435,355
1 mGy/d 2	4,631,583	3,784,930	418,051	428,602
20 mGy/d 1	4,676,887	3,809,417	429,537	437,933
20 mGy/d 2	4,662,143	3,804,176	423,352	434,615

#### IV 考察

本研究では、細胞クローン集団作製によって、WGS法を用いた細胞レベルでの変異の大規模検出と解析を試みた。

細胞クローン集団作製に関しては、クローン形成効率や平均分裂(倍加)時間などを検討した結果、播種数、培養時間などの至適条件を確立することができた。播種数については、少なすぎると十分な数のクローンが得られない可能性があり、一方、多すぎると複数細胞に由来する細胞集団の割合が高くなる可能性がある。96ウェルプレート1枚あたり十数個のクローンが得られ、一



方、複数細胞由来に由来する擬似的クローンの割合を10%程度に抑えることができた。また、培養時間については、クローンによって取得時の細胞数に違いはあるものの1000個あるいはそれ以上の細胞数からなるクローン集団を十分数得ることができた。しかし、そこからさらに培養を続け細胞数増加を試みたものの20倍程度に留まり、PCRによる増幅なしにWGS実施が可能な細胞数には至らなかった。今回用いたNB1RGB細胞は不死化していない正常線維芽細胞であり、有限の分裂寿命を持つため、徐々に分裂能が低下したのではないかと考えられる。なお、今回用いたNB1RGB細胞は理研Cell Bankからの入手時点での分裂世代が17代で、当研究室においておよそ4～5世代経過したところで実験に用いた。一般的な分裂寿命は約50回とされていることを考えると、残り30回程度の分裂能を有していると考えられる。しかしながら、当初のクローンの目標細胞数1,000個に到達するには約10回の分裂が必要で、100万個の細胞の集団にするためにはさらに10回程度の分裂が必要となり、想定される分裂寿命に近くなると考えられる。

WGSに関しては、8サンプルからの解析結果を得た。ヒト基準ゲノム配列hg38を参照配列とした解析の結果、いずれにおいても、600～750個のコピー数変化、約1万の構造変化、約460万の塩基置換・挿入・欠失が見られた。これらのほとんどはNB1RGBがもともと有していたhg38との違いと考えられる。従って、NB1RGBとhg38の間では約0.16%の違いがある結果となり、ヒト個人間のゲノムDNAの相違は約0.1%と考えられていることと概ね一致している。一方、この違いが培養の過程で増殖に伴って生じた変異を埋れさせる要因ともなっている。マウスの世代間の変異は、主任研究者・権藤の研究で1世代あたり約14個と求められている。受精卵から生殖細胞が形成されるまでの細胞分裂回数を正確に見積もることは難しいが、30回程度と考えると、細胞分裂1回あたり新規に生じる変異は0.5個、多く見積もっても1個以下と考えられる。今回の実験の場合、NB1RGB細胞の樹立からの分裂回数は多く見積もっても50回、樹立前の体内での分裂回数を含めても100回以下であると考えられ、クローン間での真の違いは100個程度ではないかと考えられる。塩基置換・挿入・欠失だけでも460万個存在するため、そのうち100個程度となると1万分の1以下である。権藤主任班のマウス実験の場合、参照配列として実験に用いたのと同じC57BL/6J系統の配列を用いることができる。そのため、もともと存在する違いが極めて少ない。実際、NB1RGBの場合1番染色体だけで37万個の塩基置換・挿入・欠失が検出されたが、マウスの場合染色体1本あたり数千個程度と100分の1程度にとどまる。さらに、権藤主任班のマウス実験の場合、近交系を用いるためゲノムは全体的にホモである一方、新たな変異は必ずヘテロとなり、ホモの（既存）変異をフィルタリングで除去することも可能である。一方、NB1RGBはゲノムが全体的にヘテロであり、このフィルタリング手法を利用することができない。このように、WGS解析においても、ヒト細胞を用いた研究特有の課題が明確になった。

## V 結論

本研究課題は、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解読により、低線量・低線量率放射線被ばくのゲノムへの継世代影響を塩基レベルで、高精度かつ高感度で解析することを目的としている。本項目では、ヒト、マウス培養細胞を用いて細胞レベルでの変異解析により、個体と細胞、マウスとヒトの橋渡しを行うことを目的として行った。初年度の令和3年度は、ヒト線維芽細胞NB1RGBを用いて、細胞クローン集団作製の手法、条件の確立を試み、非照射および低線量率連続照射（1,20 mGy/day）条件下で得られたクローンのWGSデータを取得した。3条件で得られたクローンいずれにおいても、ヒト基準ゲノム配列hg38と比較すると、コピー数変化が600～750、

構造変化が約1万、塩基置換・欠失・挿入が約460万検出された。1 mGy/day および 20 mGy/day での低線量率連続照射条件下と非照射条件下で、これらの変異の数の違いは見られなかった。

## VI 次年度以降の計画

本年度はヒト細胞を用いて、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解読による変異解析を行い、1 mGy/day、20 mGy/dayの低線量率照射条件下で培養した場合の変異に関するデータを得た。2年目となる令和4年度は、マウス細胞を用いて、同様の実験を行い、ヒト細胞とマウス細胞での自然および放射線誘発変異の質的・量的相違を明らかにすることを計画している。3年目となる令和5年度は、再びヒト細胞を用いて、異なる線量率（0.08および70-100 mGy/day）での照射・培養実験を行い、この実験系における検出下限値や線量・線量率効果係数（DDREF）を求めることを目指している。

以上の研究を通じて、低線量・低線量率放射線のゲノムへの影響に関して、個体と細胞、マウスとヒトの橋渡しをすることで、福島第一原発事故の影響を受けた地域の住民の不安の解消や軽減や、国際放射線防護委員会などによるヒトの遺伝性影響や発がんのリスク推定の高度化に貢献したいと考えている。また、本研究で得られた成果を一般市民、小中高生に伝えるアウトリーチ活動を積極的に行うことにより、放射線に関する不安の解消や軽減に貢献して行きたいと考えている。

## 謝辞

東京工業大学環境・社会理工学院融合理工学系原子核工学コース博士大学院生の Milai Enkhbaatar 氏には、本研究における細胞培養、DNA 調製など実験全般にわたって支援頂いた。ここに心からの謝意を表す。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

(原著論文等(和文・英文)を学術雑誌等で発表している場合には次の例のように記入すること)

### ア) 雑誌

- 1) Tsuchiya H, Shimada M, Tsukada K, Meng Q, Kobayashi J, Matsumoto Y. The role of DNA double-strand break repair through non-homologous end joining in the dose-rate effect in terms of clonogenic ability, *Radiat Protect Dosim*, in press.

### イ) 学会発表

- 2) Tsuchiya H, Shimada M, Tsukada K, Meng Q, Kobayashi J, Matsumoto Y. The role of DNA double-strand break repair through non-homologous end joining in the dose-rate effect in terms of clonogenic ability, *Institute for Environmental Sciences International Symposium*, 27-29 September 2021, Online, PB-09 (Poster).

## 引用文献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409: 860–921, 2001.

# Genome-wide detection and analysis of radiation-induced mutation in human and mouse somatic cells

Yoshihisa Matsumoto,<sup>1</sup> Mikio Shimada,<sup>1</sup> Takashi Sugihara<sup>2</sup>

*1 Laboratory for Zero-Carbon Energy, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan*

*2 Department of Radiobiology, Institute for Environmental Sciences, Rokkasho-mura, Japan*

*Keywords:* low-dose/low-dose rate radiation, mutation, next generation sequencer, whole genome sequencing, somatic cells.

## **Abstract**

The research project entitled “Analysis of radiation effects and mutagenesis based on high-sensitive detection of mutations in mice and cells exposed to protracted low-dose-rate irradiation” aims to analyze the transgenerational effects of radiation exposure on genome at high resolution and sensitivity by whole genome sequencing using next generation sequencer. This part aimed the analysis of mutation in cultured cells from human (WGS) and murine origin, bridging between individuals (or animals) and cells and that between human and mice.

Natural and radiation-induced mutations at individual (or animal) and cellular levels have been studied mainly focusing on specific gene loci. Now mutation studies employing WGS are emerging, but it has been difficult to apply WGS to mutation studies at cellular level. We recently conceived a novel method to reproduce the relationship between parents and offsprings in individuals or animals in cultured cells and sought to analyze mutations in the genome-wide scale through this method.

In the first fiscal year, FY2021, we aimed to establish the experimental protocols to generate the clonal populations used newborn human derived fibroblast NB1RGB. We also obtained WGS data after culturing NB1RGB for >10 generations under protracted low-dose rate irradiation at 1 mGy/day and 20 mGy/day and without external irradiation as the reference.